

**Lääkeaineanalytiikan oppimateriaalin  
kehittäminen ammatilliseen laboratorioalan  
koulutukseen**

**Pro gradu -tutkielma**

**Jyväskylän yliopisto**

**Kemian laitos**

**Opettajankoulutus**

**20.2.2015**

**Terhi Eriksson**

## TIIVISTELMÄ

Tässä Pro gradu -tutkielmassa on suunniteltu lääkeaineanalytiikan opetusmateriaalia laboratorioalan ammatillisen koulutuksen valinnaisiin opintoihin. Kirjallisuusosaan on koottu tietoja tulehduskipulääkkeistä, niiden sitoutumisesta plasman proteiineihin sekä lääkeainepitoisuuden analysoinnista ja menetelmän validoinnista. Analysoinnissa on keskitytty erilaisiin plasman proteiinien erotustapoihin ja näytteen derivatisointiin. Analyysilaitteistoina olevista kaasu- ja nestekromatografeista on kirjallisuusosaan kerätty oleelliset tiedot. Menetelmän validointia on käsitelty lähtökohtaisesti biologisten näytteiden kannalta. Kirjallisuusosaan on kerätty tietoja, joita voi käyttää teoriaopetuksen pohjana. Ne myös tukevat tiiviisti kokeellisen osan harjoitustöitä.

Kokeellisessa osassa on kartoitettu kirjallisuudesta löytyviä analyysimenetelmiä tulehduskipulääkkeille. Tutkimukseen on valittu mukaan sekä biologisille plasmanäytteille että apteekin valmisteille soveltuvia analyysimenetelmiä. Tärkeä kriteeri analyysimenetelmiä ja harjoitustöitä valittaessa on ollut, että ne soveltuvat ammatillisen koulutuksen opetuslaboratorioihin.

Tässä tutkimuksessa on kehitetty kolme erilaista harjoitustyötä tulehduskipulääkkeiden pitoisuuksien määrittämisestä. Harjoitustyöt on valittu siten, että ne eroavat toisistaan riittävästi, opettavat lääkeaineanalytiikkaa mahdollisimman laajasti ja soveltuvat ammatillisen koulutuksen laboratorio-opetukseen. Tulehduskipulääkkeiksi on valittu ibuprofeeni, indometasiini ja ketoprofeeni. Tähän tutkimukseen valittujen harjoitustöiden analysointi perustuu kaasu- ja nestekromatografisiin menetelmiin. Detektoreina niissä on käytössä massa-, UV- ja UV-vis –detektorit. Massadetektorilla on käytössä sekä negatiivinen kemiallinen ionisaatio että sähkösumutus.

Tähän tutkimukseen koottu opetusmateriaali monipuolistaa ammatillisen koulutuksen laboranttiopiskelijoiden ammattitaitoa ja -tietoutta. Plasmanäytteiden käsittely sekä kromatografisten tietojen ja taitojen soveltaminen lääkeaineanalytiikkaan vahvistavat opiskelijoiden osaamista laboratoriotyöskentelyssä ja biologisten näytteiden käsittelyssä.

## **ESIPUHE**

Tämä Pro gradu -tutkielma on tehty Jyväskylän yliopiston kemian opettajankoulutuksen opetusohjelmaan syyskuun 2014 ja helmikuun 2015 välisenä aikana. Kiitän suuresti ohjaajaani yliopistonopettaja Jouni Välisaarta työni kärsivällisestä ohjauksesta.

Suuri kiitos miehelleni Tommille tuesta, ymmärryksestä ja kotitöiden hoidosta, jotta sain lopulta tämän tutkielman valmiiksi. Kiitos myös lapsilleni Saaralle, Cecilialle, Sandralle ja Fransille, jotka tsemppasivat kovasti äitiä projektin aikana.

Lempäälässä helmikuussa 2015

Terhi Eriksson

## SISÄLLYSLUETTELO

<b>TIIVISTELMÄ</b> .....	i
<b>ESIPUHE</b> .....	ii
<b>SISÄLLYSLUETTELO</b> .....	iii
<b>LYHENTEET</b> .....	v
<u>KIRJALLISUUSOSA</u>	
<b>1 Johdanto</b> .....	1
<b>2 Tulehduskipulääkkeet</b> .....	2
2.1 Ibuprofeeni .....	3
2.2 Indometasiini .....	3
2.3 Ketoprofeeni .....	3
<b>3 Plasman proteiinit</b> .....	4
3.1 Albumiini .....	4
3.2 $\alpha_1$ - Hapan glykoproteiini .....	4
<b>4 Lääkeaineen sitoutuminen plasman proteiineihin</b> .....	5
4.1 Tulehduskipulääkeaineiden sitoutuminen albumiin <span></span> in .....	6
4.2 Tulehduskipulääkeaineiden sitoutuminen $\alpha_1$ - hapan glykoproteiiniin .....	6
<b>5 Vapaan lääkeaineen analysointi</b> .....	7
5.1 Lääkeaineen erottaminen plasman proteiineista .....	8
5.1.1 Tasapainodialyysi .....	8
5.1.2 Geelisuodatus .....	8
5.1.3 Kiinteäfaasiuutto .....	9
5.1.4 Käänteisfaas <span></span> inestekromatografia .....	10
5.1.5 Ultrasuodatus .....	10
5.2 Näytteen derivatisointi .....	10
5.3 Laitteisto .....	11
5.3.1 Korkean erotus <span></span> kyvyn nestekromatograf <span></span> in rakenneosat ja käyttö .....	12
5.3.1.1 Korkean erotus <span></span> kyvyn nestekromatograf <span></span> in detektoreita .....	13
5.3.2 Kaasukromatograf <span></span> in rakenneosat ja käyttö .....	14
5.3.2.1 Kaasukromatograf <span></span> id <span></span> etektoreita .....	15
<b>6 Menetelmän validointi</b> .....	16
6.1 Selektiivisyys ja spesifisyys .....	16

6.2 Lineaarisuus ja alin määrittäysraja (mittausalue) .....	17
6.3 Toteamis- ja määrittäysraja.....	18
6.4 Saanto.....	19
6.5 Oikeellisuus ja tarkkuus.....	19
6.6 Toistettavuus ja uusittavuus.....	20
6.8 Häiriökestävyys .....	21
6.9 Säilyvyys.....	21
6.10 Virheet .....	21
<b>7 Yhteenveto .....</b>	<b>23</b>

### KOKEELLINEN OSA

<b>8 Tutkimuksen tarkoitus .....</b>	<b>24</b>
<b>9 Tutkimuskysymykset .....</b>	<b>25</b>
<b>10 Tutkimusmenetelmä .....</b>	<b>25</b>
<b>11 Tutkimuksen toteutus .....</b>	<b>27</b>
<b>12 Tutkimustulokset .....</b>	<b>27</b>
12.1 Ibuprofeenin kvantitatiivinen määrittäminen plasmanäytteestä.....	28
12.2 Indometasiinin pitoisuuden määrittäminen plasmanäytteestä.....	29
12.3 Ketoprofeenin pitoisuuden määrittäminen nestekromatografilla .....	31
<b>13 Tutkimuksen tulosten analyysi .....</b>	<b>33</b>
<b>14 Pohdinta .....</b>	<b>34</b>
<b>15 Lähteet.....</b>	<b>38</b>

### **LIITTEET**

**LYHENTEET**

BSTFA	bis-(trimetyylisilyyli)trifluoroasetamidi
EI	electron ionization; elektroni-ionisaatio
ES	electrospray ionization; sähkösumutus-ionisaatio
FID	flame ionization detector; liekki-ionisaatio –detektori
GC	gas chromatography; kaasukromatografi(a)
HPLC	high performance liquid chromatography; suuren erotuskyvyn nestekromatografi(a)
LC	liquid chromatography; nestekromatografi(a)
LLOQ	lower limit of quantification; alin määrittäysraja
MS	mass spectrometry; massaspektrometri(a)
MTBSTFA	<i>N</i> -( <i>t</i> -butyylidimetyylisilyyli)- <i>N</i> -metyyli-trifluoroasetamidi
NCI	negative chemical ionization; negatiivinen kemiallinen ionisaatio
PFBBr	pentafluoropentsyylibromidi
RP-HPLC	reversed-phase high-performance liquid chromatography; käänteisfaasi-suuren erotuskyvyn nestekromatografi(a)
RPLC	reversed-phase liquid chromatography; käänteisfaasi(neste)kromatografia
S/N	signal to noise ratio; signaali/kohina –suhde
SPE	solid phase extraction; kiinteäfaasiuutto
UV	ultraviolet; ultraviolettisäteily
UV-vis	Ultraviolet/visible; ultraviolettisäteily/näkyvä valo

## KIRJALLISUUSOSA

### **1 Johdanto**

Useimpia lääkeaineita kuljettaa veri, tavallisesti veri plasma, jossa osa lääkeaineesta on sitoutuneena sen proteiineihin ja osa on sitoutumattomana.<sup>1</sup> Vapaan eli proteiineihin sitoutumattoman lääkeaineen pitoisuus on tärkeä sekä aineen vaikutusten että kinetiikan kannalta. Lääkeaineanalytiikassa tutkitaan vapaan lääkeaineen pitoisuuksia muun muassa veriplasmasta. Plasman lääkeainepitoisuus on usein ainoa mitattavissa oleva pitoisuus lääkehoidon aikana. Sen perusteella joudutaan päättämään muiden kudosten lääkepitoisuus.

Veri on monimutkainen solujen, valkuaisaineiden ja veden muodostama nestemäinen seos, johon on eri tavoin liuenneena satoja erilaisia aineita.<sup>2</sup> Lääkeaineanalyseissä lääkeainepitoisuuksia tutkitaan usein plasmasta. Se saadaan eristettyä veren puna- ja valkosoluista sekä verihiutaleista sentrifugoimalla. Plasmasta erotetaan proteiinit esimerkiksi saostamalla, jolloin myös niihin sitoutunut lääkeaine erottuu. Tämän jälkeen plasmasta erotetaan jäljelle jäänyt vapaa lääkeaine. Lääkeainepitoisuutta analysoidessa näytteeseen useimmiten kiinnitetään johdos eli derivaatta, jolloin sen analysoiminen onnistuu paremmin. Vapaan lääkeaineen pitoisuudet voivat olla hyvinkin pieniä, joten analysointi tapahtuu usein joko kaasukromatografialla (GC, gas chromatography) tai korkean erotuskyvyn nestekromatografialla (HPLC, high performance liquid chromatography).<sup>3</sup>

Lääkeaineanalyysissä menetelmän validointi on tärkeää, koska halutaan saada luotettavia, toistettavia ja tarkkoja tuloksia.<sup>4</sup> Menetelmän validointia tarvitaan uuden menetelmän kehittämisessä sekä käytössä olevan menetelmän uudistamisessa tai sen käyttötarkoituksen laajentamisessa. Bioanalyttisen menetelmän validointi perustuu menetelmän toistettavuuden, tarkkuuden, selektiivisyyden, herkkyuden, uusittavuuden ja säilymisen tutkimiseen.

Tämä tutkimus on suunniteltu ammatillisen koulutuksen laboratorioalan valinnaisen kurssin oppimateriaaliksi lääkeaineanalytiikasta. Esimerkkeinä käytetään tulehduskipulääkkeitä, erityisesti ibuprofeenia, indometasiinia ja ketoprofeenia. Tutkimukseen on otettu mukaan kolme erilaista harjoitustyötä tulehduskipulääkkeen pitoisuuden määrittämisestä. Harjoitustyöt on valittu siten, että ne opettavat lääkeaineanalytiikkaa mahdollisimman laajasti ja soveltuvat ammatillisen koulutuksen laboratorioon. Ibuprofeenin ja indometasiinin pitoisuudet määritetään plasmanäytteistä. Ketoprofeenin pitoisuus määritetään apteekista saatavasta lääkevalmisteesta.

## 2 Tulehduskipulääkkeet

Tulehduskipulääkkeet eli anti-inflammatoriset analgeetit ovat eniten käytettyjä kipulääkkeitä.<sup>5</sup> Tulehduskipulääkkeitä käytetään kiputiloissa, joihin liittyy tulehdusreaktio (esimerkiksi reumataudeissa). Lisäksi niitä käytetään tuki- ja liikuntaelinsairauksien kiputilojen, päänsäryn, migreenin, kuumeen ja kuukautiskipujen hoitamiseen. Tulehduskipulääkkeitä on saatavilla apteekista sekä itsehoitolääkkeenä ilman reseptiä että lääkärin määräämänä reseptillä.<sup>6</sup> Erilaisia kauppanimiä on kymmeniä.

Eräs vanhimmista tämän ryhmän kipulääkkeistä on salisyalaatti.<sup>5</sup> Sen vaikuttava aine salisiini löydettiin 1800-luvulla, jolloin myös salisyylihappo eristettiin. Tehokkaamman vaikutuksen omaava asetyylisalisyylihappo tuli käyttöön 1900-luvun vaihteessa, ja syrjäytti salisyylihapon lähes kokonaan. Asetyylisalisyylihappo on edelleen yleisesti käytetty kipulääke. Viime vuosina uudemmat teholtaan asetyylisalisyylihapon kanssa samanvertaiset, mutta vähäisemmät sivuvaikutukset omaavat lääkeaineet kuten ibuprofeeni ja ketoprofeeni ovat horjuttaneet sen asemaa kipulääkkeenä.

Tulehduskipulääkkeiden tavallisimmat sivuvaikutukset ovat ruuansulatuskanavan ärsytys, joka ilmenee yleensä närästyksenä, vatsakipuina, pahoinvointina ja oksenteluna.<sup>7</sup> Tulehduskipulääkkeiden haittavaikutuksina ovat myös allergiset reaktiot.



## 2.1 Ibuprofeeni

Propionihappojohdannainen ibuprofeeni on Suomessa käytetyin särkylääke sekä itsehoito- että reseptipuolella.<sup>8</sup> Ibuprofeenimolekyylillä vaikuttaa kohtuullisen poolittomalta, koska sillä on vain yksi karboksyylihapporyhmä (kuva 1). Ibuprofeeni onkin kohtalaisen liukenematon veteen.<sup>9</sup> Se liukenee kuitenkin suurimpaan osaan orgaanisista liuottimista. Ibuprofeenin  $pK_a$ -arvo on 4,9, molekyylipaino 206,28 g/mol ja sulamispiste 75 – 77 °C.<sup>9-10</sup>

Kuva 1. Ibuprofeenin molekyylirakenne.<sup>9</sup>

## 2.2 Indometasiini

Särkyläkkeenä käytetty indometasiini ei ole saavuttanut Suomessa suurta käyttöastetta tulehduskipulääkkeenä.<sup>8</sup> Indometasiinimolekyylissä on yksi tertiäärinen typpi (kuva 2) ja sen  $pK_a$ -arvo on 4,5.<sup>9</sup> Indometasiinin molekyylipaino on 357,79 g/mol ja sillä on kaksi sulamispistettä, 155 °C ja 162 °C. Indometasiinin kaksi sulamispistettä johtuu sen kahdesta eri kidemuodosta. Indometasiini on lähes liukenematon veteen, mutta se liukenee etanoliin, eetteriin ja asetoniin.

Kuva 2. Indometasiinin molekyylirakenne.<sup>9</sup>

## 2.3 Ketoprofeeni

Ketoprofeeni on ibuprofeenin kaltainen propionihappojohdoksiin kuuluva tulehduskipulääke (kuva 3).<sup>5</sup> Ketoprofeeni on heikosti hapan lääkeaine. Sen  $pK_a$ -arvo on 4,6, molekyylipaino 254,3 g/mol ja sulamispiste 94 – 97 °C.<sup>9</sup> Ketoprofeenin liukoisuus veteen on huono, mutta se liukenee hyvin etanoliin, asetoniin tai dikloorimetaaniin.

Kuva 3. Ketoprofeenin molekyylirakenne.<sup>9</sup>

### 3 Plasman proteiinit

Plasman kokonaisproteiinikonsentraatio on noin 7 g / 100 ml.<sup>11</sup> Plasmassa esiintyy kymmeniä eri proteiineja, joilla on runsaasti erilaisia tehtäviä. Tärkeimpiä tehtäviä ovat onkoottisen paineen ja hyytymisjärjestelmän ylläpito sekä erilaisten hormonien, lipidien ja lääkeaineiden kuljetus. Määrällisesti merkittävimpiä proteiineja ovat maksassa syntetisoituvat proteiinit. Näistä merkittävin on albumiini. Lääkeaineiden sitoutumisen kannalta tärkeitä plasmaproteiineja ovat albumiini ja glykoproteiineihin kuuluva hapan  $\alpha_1$ -glykoproteiini eli orosomukoidi.<sup>12</sup>

#### 3.1 Albumiini

Albumiinimolekyylä (kuva 4) koostuu yhdestä noin 580 aminohapon polypeptidiketjusta, jonka molekyylipaino on noin 66,3 kDa.<sup>13</sup> Ketju ei sisällä lainkaan hiilihydraatteja, mutta siinä on yksi vapaa rikkivetyryhmä ja 17 ketjun sisäistä rikkisidosta. Albumiinin osuus plasman proteiinien kokonaismäärästä on noin 60 %.<sup>14</sup> Albumiini syntetisoituu maksassa ja sillä on useita fysiologisia tehtäviä. Albumiini on tärkein tekijä veren osmoottisen paineen säätelyssä, rasvahappojen kuljetuksessa ja bilirubiinin kuljetuksessa.

Kuva 4. Ihmisen albumiinin aminohappojärjestys.<sup>13</sup>

#### 3.2 $\alpha_1$ - Hapan glykoproteiini

$\alpha_1$ - Hapan glykoproteiinin molekyylipaino on 40 kDa ja se koostuu 183 aminohaposta.<sup>15</sup>  $\alpha_1$ - Hapan glykoproteiinilla on kaksi disulfidisidosta ja viisi hiilihydraattiketjua (kuva 5).  $\alpha_1$ - Hapan glykoproteiini eroaa muista plasman proteiineista korkean hiilihydraattipitoisuutensa ja useiden sialyylijäännösten ansiosta.<sup>13</sup>  $\alpha_1$ - Hapan glykoproteiinilla on myös hyvin hapan isoelektrinen piste ja se liukenee hyvin veteen sekä tiettyihin polaarisiin orgaanisiin liuottimiin silloinkin, kun proteiini on denaturoitunut.<sup>15</sup>

Kuva 5.  $\alpha_1$ -Hapan glykoproteiinin rakenne, jossa disulfididisidokset kuvattu mustalla suorakulmiolla ja hiilihydraattiketjut harmaalla ovaalilla.<sup>15</sup>

#### 4 Lääkeaineen sitoutuminen plasman proteiineihin

Lääkeaineen sitoutuminen plasman proteiineihin riippuu proteiinien sitoutumiskohtien lukumäärästä, assosiaatiovakioista, proteiinipitoisuudesta sekä lääkeainepitoisuudesta.<sup>16</sup> Käytännössä lääkeaineen jakautuminen suhteessa vapaa/sitoutunut –lääkeaine on melko vakio kunkin lääkeaineen terapeuttisilla pitoisuuksilla. Sitoutuminen plasman proteiineihin vähentää vapaan eli aktiivisen lääkeaineen määrää (kuva 6). Annostelun alkuvaiheessa tämä hidastaa tarpeellisen vapaan lääkeaineen pitoisuuden saavuttamista kudoksissa ja heikentää näin lääkeaineen tehoa alussa.

Kuva 6. Vain proteiineihin sitoutumaton (vapaa) lääkeaine on diffuusiotasapainossa membraanien ja huokosellisen endoteelin läpi.<sup>16</sup>

Suurin osa lääkeaineista sitoutuu proteiineihin käänteisillä kemiallisilla sidoksilla kuten ioni-, van der Waals- ja vetysidoksilla tai hydrofobisilla hydroksyyli- ja karbonyylisidoksilla tai muilla käänteisillä sidoksilla, joita on tarjolla proteiiniketjun aminohapoissa.<sup>17</sup> Proteiiniin sitoutunut lääkeaine ei pysty läpäisemään fosfolipidikaksoiskalvoa kuten veri-aivoestettä. Proteiinin sitoutumispaikat voivat joissakin tapauksissa kyllästyä lääkeaineella.<sup>1,16</sup> Tällöin käytettäessä samaan aikaan toista lääkeainetta, joka sitoutuu samoihin paikkoihin kuin ensimmäinen lääkeaine, saattaa kilpailun takia sitoutumiskohdissa yllättäen vapautua suurikin määrä lääkeainetta. Tyypillinen esimerkki tällaisesta kilpailutilanteesta on sulfonamidien ja fenyylibutatsonin sitoutuminen samaan kohtaan.<sup>16,18</sup> Myös elimistön omat aineet kuten albumiiniin sitoutuvat rasvahapot ja bilirubiini vaikuttavat lääkeaineiden sitoutumiseen.

#### 4.1 Tulehduskipulääkeaineiden sitoutuminen albumiiniin

Hydrofobiset lääkeaineet sekä useat happoina ionittuvat lääkeaineet (anionit) sitoutuvat albumiiniin.<sup>16</sup> Lisäksi albumiinin hydrofobiset kohdat kuljettavat rasvahappoja, hormoneja ja rasvaliukoisia vitamiineja. Albumiinissa on ainakin kaksi eri lääkeaineita sitovaa kohtaa. Kohdasta I kilpailevat muun muassa albumiiniin hyvin voimakkaasti sitoutuvat varfariini ja fenyylibutatsoni. Diatsepaami ja monet muut lipidiliukoiset aineet sitoutuvat kohtaan kaksi.

Röntgensädediffraktiolla on osoitettu, että albumiinilla on kolme homologista aluetta, joista jokainen koostuu kahdesta alayksiköstä (A ja B).<sup>15</sup> Tutkimukset ovat paljastaneet, että suuri osa korkealla affiniteetillä sitoutuvista lääkeaineista sitoutuu toiseen albumiinin kahdesta sitoutumiskohdista. Tyypillisesti paikkaan I sitoutuvat karboksyylihapot ja/tai isot molekyylin keskeltä negatiivisesti varautuneet heterosykliset molekyylit. Paikka I on tilava ja joustava, ja se sisältää suuren määrän yksittäisiä ligandin sitomiskohtia. Paikka I on myös hyvin mukautuva, minkä ansiosta hyvin erilaiset kemialliset rakenteet omaavat ligandit pystyvät sitoutumaan siihen korkealla affiniteetillä. Paikka I muodostaa taskun IIA alayksikköön ja ottaa mukaansa proteiinin yksinäisen tryptofaanin (Trp214). Taskun sisäpuolelle muodostuu hydrofobinen ketju ja sen ulkopuoli on positiivisesti varautunut.

Paikkaan II sitoutuvat ligandit ovat usein negatiivisesti varautuneita aromaattisia karboksyylihappoja.<sup>15</sup> Sitoutumispaikka II on pienempi kuin paikka I. Tästä syystä suuret molekyylit eivät pysty sitoutumaan siihen. Paikka II ei ole myöskään niin joustava kuin paikka I. Paikka II muodostaa taskun alayksikkö IIIA:sta pääasiassa samalla tavoin kuin paikka I. Alayksikön yksittäisten aminohappopäiden, Arg410 ja Tyr411, oletetaan olevan tärkeitä sitoutumisessa.

#### 4.2 Tulehduskipulääkeaineiden sitoutuminen $\alpha_1$ - hapan glykoproteiiniin

$\alpha_1$ - Hapan glykoproteiinin kolmiulotteinen rakenne on vielä osittain epäselvä, joten lääkeaineiden sitoutumiskohtaa  $\alpha_1$ - hapan glykoproteiiniin ei ole voitu vielä selvittää kokonaan. On kuitenkin pystytty osoittamaan, että emäksinä ionittuvien lääkeaineiden

(kationien) kantajana veressä on etupäässä  $\alpha_1$ - hapan glykoproteiini.<sup>16</sup> Solun sisään päästyään emäksiset lääkeaineet sitoutuvat muun muassa solun RNA:han.

Lääkeaineen sitoutumisesta  $\alpha_1$ - hapan glykoproteiinin on saatu selville myös, että sialyylijäännöksissä olevat oligosakkaridit eivät vaikuta sitoutumiseen.<sup>19</sup> On huomattu, että sialyylihappoihin kiinnittyneet  $\alpha_1$ - hapan glykoproteiinin oligosakkaridit eivät vaikuta sen sitoutumiskapasiteettiin ja rakenteen ominaisuuksiin.  $\alpha_1$ - Hapan glykoproteiinin ilmentymä on todistettu myös hiivassa, *Pichia pastoris*.<sup>20</sup> Hiivan  $\alpha_1$ - hapan glykoproteiinin sitoutumiskapasiteetti on lähes sama kuin ihmisen, vaikka niiden oligosakkaridit eroavat toisistaan. Tämäkin tulos puoltaa voimakkaasti sitä, että lääkeaineen sitoutuminen ei riipu oligosakkaridityypistä eikä niiden läsnäolosta.

## 5 Vapaan lääkeaineen analysointi

Vapaan lääkeaineen analysoinnissa ensin proteiinit eristetään plasmasta. Proteiinien erottaminen plasmasta voi tapahtua esimerkiksi kiinteäfaasiuutolla.<sup>21</sup> Proteiinien erottamisen jälkeen näyte tarvittaessa derivatisoidaan ja lopuksi analysoidaan. Tulehduskipulääkkeet ovat yleensä sitoutuneet voimakkaasti plasman proteiineihin, joten vapaan lääkeaineen pitoisuus on usein melko pieni. Tutkimuksissa on saatu selville tulehduskipulääkkeiden vapaita lääkeainepitoisuuksia plasmassa. Indometasiinin vapaan lääkeaineen osuudeksi plasmassa on mitattu 0,1 % – 0,3 %.<sup>21-22</sup> Ketoprofeenilla vapaan lääkeaineen osuudeksi on saatu 0,7 % ± 0,3 %.<sup>23</sup> Ibuprofeenin vapaan lääkeaineen osuudeksi on mitattu 1 %.<sup>24</sup> Tästä syystä ei ole epätavallista, että vapaan lääkeaineen pitoisuus voi olla vain 1 ng/ml tai pienempikin.<sup>20-21</sup> Pienestä näytepitoisuudesta johtuen vapaan lääkeaineen määrittäminen plasmasta vaatii herkkiä analyysimenetelmiä. Analysointi tapahtuu usein joko kaasukromatografialla (GC) tai korkean erotuskyvyn nestekromatografialla (HPLC).<sup>3</sup>

## 5.1 Lääkeaineen erottaminen plasman proteiineista

Plasmanäytteestä poistetaan proteiinit, jotta saadaan tietää, kuinka paljon annetusta lääkeannoksesta on proteiineihin sitoutumattomana.<sup>17</sup> Vapaan lääkeaineen pitoisuus selvitetään, koska vain vapaa sitoutumaton lääkeaine on farmakologisesti tehokas ja pystyy läpäisemään fosfolipidikaksoiskalvon ja kulkeutumaan edelleen esimerkiksi veri-aivoesteen läpi likvoriin. Lääkeaineen erottamiseen plasmasta on yleisimmin käytetty tasapainodialyysyä, geelisuodatusta, kiinteäfaasiuuttoa, käänteistä nestekromatografiaa tai ultrasuodatusta.

### 5.1.1 Tasapainodialyysi

Tasapainodialyysin avulla pystytään määrittämään proteiinin ja ligandin, tässä tapauksessa lääkeaineen, välisen sitoutumisreaktion tasapainovakio, mikäli proteiinin sitoman ligandin molekyylipaino on pieni.<sup>25</sup> Tasapainodialyysi tehdään yleensä käyttäen erityistä dialyysilaitetta, jossa dialyysikalvo erottaa toisistaan kaksi osastoa. Termостоitua dialyysilaitetta pyöritetään mekaanisesti, jotta tasapaino saavutetaan nopeammin. Lääkeainemolekyylit liikkuvat kalvon läpi, kunnes tasapaino on saavutettu. Tasapainon asetuttua vapaan lääkeaineen pitoisuus kalvon molemmissa osastoissa on sama. Proteiinit eivät läpäise kalvoa vaan pysyvät omassa osastossaan. Tasapainon saavuttaneesta systeemistä otetaan näytteet molemmista osastoista ja analysoidaan niistä lääkeaineen konsentraatio. Proteiinia sisältävän osaston lääkeaineen konsentraatio on sekä vapaan että sidotun lääkeaineen konsentraatioiden summa. Mittaussarjasta saadusta informaatiosta voidaan laskea tasapainovakio, kun proteiinin konsentraatio tunnetaan. Menetelmässä käytetään hyväksi Scatchardin diagrammia. Tasapainodialyysin etuina ovat muun muassa helppokäyttöisyys ja uusittavuus.

### 5.1.2 Geelisuodatus

Geelisuodatus on molekyylin kokoon perustuva erotusmenetelmä.<sup>26</sup> Geelisuodatuksessa pallomaiset geelipartikkelit turvotetaan liuottimessa, jolloin ne päästävät sisäänsä vain partikkeleita, joiden koko on eksluusiorajaa pienempi. Liuoksen virratessa geelisuodatusmateriaalin läpi eksluusiorajaa suuremmat molekyylit kulkevat

geelipartikkeleiden ulkopuolisessa liuostilavuudessa. Eksluusiorajaa pienemmät molekyylit kulkevat osittain myös geelipartikkeleiden sisällä, jolloin niiden eteneminen geelisuodatusmateriaalissa on hitaampaa. Tästä syystä suuret molekyylit eluoituvat pylväästä ensimmäisenä. Tavallisia geelisuodatusmateriaaleja ovat ristisilloittuneet dekstriinit, agarosi, polyakryyliamidi ja polyakryyliamidin ja dekstriinin yhdistelmä. Kullakin geelillä on tyypillinen eksluusioraja sekä fraktiointialue. Fraktiointialueella tarkoitetaan molekyylikokoaluetta, jolla partikkelit voidaan erottaa toisistaan.

### 5.1.3 Kiinteäfaasiuutto

Kiinteäfaasiuutossa käytetään kaupallisesti saatavia pieniä kertakäyttöisiä uuttoputkia.<sup>27</sup> Uuttoputkien täytteenä on vastaavanlaisia materiaaleja kuin nestekromatografiassa (poolinen, pooliton, ionin-b-vaihto). Yhtenä esimerkiksi kiinteäfaasiuutossa on käytössä 18 hiilen käänteisfaasiputkia (RP-18).<sup>28</sup> Kiinteäfaasiuutossa valitaan sopiva liuotin ja täytemateriaali, jotta tutkittava yhdiste saadaan pidättymään kolonniin ja matriisiaineet eluoitumaan sen läpi.<sup>27</sup> Tämän jälkeen vaihdetaan liuotin sellaiseen, että tutkittava aine eluoituu ulos kolonnista. Menetelmän etuna on pieni liuotinkulutus sekä valmiiksi suodatettu näyte, jota ei tarvitse suodattaa enää ennen injektointia.

Käytettäessä kiinteäfaasiuutossa ioninvaihtoon perustuvia uuttoputkia pH vaikuttaa happamien lääkeaineiden erottumiseen.<sup>29</sup> Tulehduskipulääkkeiden  $pK_a$ -alue on noin 4-5, joten ne ovat happamia lääkeaineita. Kuvasta 7 nähdään, että tulehduskipulääkkeiden pidättyminen stationäärifaasissa on hyvä, kun pH pysyy  $pK_a$ -alueen alapuolella. Tällöin lääkeaine on täysin ionittumattomassa muodossa ja tarrautuu paremmin uuttoputken kiinteään faasiin. pH:n noustessa  $pK_a$ -arvon yläpuolelle lääkeaine ionittuu ja eluoituu pois uuttoputkesta. Esimerkiksi indometasiinin karbonyyliryhmä saadaan vapaaseen muotoon lisäämällä plasmanäytteeseen 1,0 ml 0,1 M suolahappoa.<sup>30</sup> Tällöin näytteen pH saadaan välille 4-5. Indometasiini tarrautuu voimakkaasti stationäärifaasiin ja eluoitaessa se saadaan erotettua kolonnista paremmalla saannolla.

Kuva 7. Tulehduskipulääkkeet erottuvat hyvin, kun pH on niiden  $pK_a$ -alueen alapuolella. Kuvassa numero 9 on indometasiini ja numero 12 ketoprofeeni.<sup>29</sup>

#### **5.1.4 Käänteisfaasinestekromatografia**

Käänteisfaasinestekromatografialla (RPLC, reversed-phase liquid chromatography) erottuminen perustuu analyytin hydrofobisuuteen.<sup>31</sup> Siinä näytteen retentio kasvaa, kun eluentin poolisuutta kasvatetaan. Tällöin pooliset yhdisteet eluoituvat ensin. Stationäärifaasina käytetään yleensä silikaan sidottuja hiilivetyketjuja. Eräs yleisimmin käytössä olevista materiaaleista on oktadekyyli-pinnoitettu silika (RP-18, ODS). Käänteisfaasinestekromatografian stationäärifaasit ovat hyvin stabiileja pH-alueella 2 - 8. Liikkuva faasi on poolisempi kuin stationäärifaasi. Liikkuvana faasina käytetään tavallisesti veden ja jonkin vesiliukoisen orgaanisen liuottimen kuten metanolin tai asetonitriilin seosta.

#### **5.1.5 Ultrasuodatus**

Ultrasuodatus on kalvosuodatusmenetelmä, jossa hydrostaattinen paine pakottaa nesteen puoliläpäisevän kalvon läpi.<sup>32</sup> Kalvon huokoskoko valitaan sen mukaan, minkä kokoisia komponentteja sen halutaan päästävän läpi. Ultrasuodatuksella voidaan yleensä erottaa halkaisijaltaan noin 2 - 100 nm suuruisia komponentteja. Paine-ero kalvon ylitse vaihtelee välillä 0,1 – 5,0 bar. Suodatettavaa liuosta kierrätetään lukuisia kertoja membraanin (suodatinkalvon) ylitse, jotta mahdollisimman suuri osa halutusta komponentista saadaan suotautumaan kalvon läpi.

Ultrasuodatuksen etuina muihin proteiinien erotusmenetelmiin voidaan pitää matalaa energian kulutusta, lempeitä prosessiolosuhteita ja usein jatkuvatoimista erotusprosessia.<sup>33</sup> Menetelmä eduksi lasketaan myös se, että se voidaan yhdistää helposti muihin menetelmiin. Ultrasuodatusprosessin mitoitus suureen mittakaavaan onnistuu suhteellisen helposti.

#### **5.2 Näytteen derivatisointi**

Usein plasmasta erotettu vapaa lääkeaine derivatisoidaan eli siihen kiinnitetään johdos, jotta se pystytään analysoimaan riittävän herkällä menetelmällä.<sup>34</sup> Esimerkiksi



tulehduskipulääkkeiden erottaminen kaasukromatografilla voidaan tehdä vasta, kun alkuperäinen yhdiste on derivatisoitu vähemmän polaariseen muotoon. Näiden lääkeaineiden karboksyyli-ryhmä voidaan vaihtaa esimerkiksi metyyliesteriderivaattaan diatsometaaniamia käyttäen. Derivatisoinnissa voidaan käyttää myös muita reagensseja kuten pentafluoropentsyylibromidia (PFBBr), bis-(trimetyylisilyyli)trifluoroasetamidia (BSTFA), pentafluoro-1-propanolia, 1-etyyli-3-*p*-tolyltriatseenia ja *N*-(*t*-butyylidimetyylisilyyli)-*N*-metyyli-trifluoroasetamidia (MTBSTFA).<sup>28,30,34-37</sup>

Tavallisimmin ibuprofeeni, ketoprofeeni ja indometasiini derivatisoidaan PFBBr:lla, jolloin analysoitaessa GC-MS:lla ionisaationa voidaan käyttää negatiivista kemiallista ionisaatiota (NCI, negative chemical ionization).<sup>37-38</sup> Ibuprofeeni ja ketoprofeeni voidaan derivatisoida myös MTBSTFA:lla, jolloin ionisaationa käytetään elektroni-ionisaatiota (EI, electronic ionization).<sup>28</sup> EI soveltuu lisäksi BSTFA:lla derivatisoidun indometasiinin analysointiin.<sup>35</sup> Pentafluoro-1-propanolilla derivatisoidun indometasiinin analysointiin käytetään <sup>63</sup>Ni elektroninsieppausdetektoria.<sup>36</sup> Indometasiinin derivatisointiin voidaan käyttää myös 1-etyyli-3-*p*-tolyltriatseenia, joka on vähemmän myrkyllinen verrattuna esimerkiksi PFPBr:in ja pentafluoro-1-propanoliin.<sup>30</sup> 1-etyyli-3-*p*-tolyltriatseeniolla derivatisoitu indometasiini analysoidaan käyttämällä <sup>63</sup>Ni elektroninsieppausdetektoria.

### 5.3 Laitteisto

Lääkeainekemian analysoinnissa käytetään yleisesti kromatografisia menetelmiä.<sup>3</sup> Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC, high performance liquid chromatography) on laajalti käytetty analyysitekniikka, joka mahdollistaa monen aineen samanaikaisen analysoinnin.<sup>27</sup> HPLC on korvaamaton monien suurikokoisten orgaanisten molekyylien kuten proteiinien, aminohappojen ja lääkeaineiden analysoinnissa. HPLC:n soveltamisen edellytyksenä on, että tutkittava näyte saadaan liukenemaan johonkin liuottimeen. HPLC:ssa erottuminen perustuu yhdisteiden poolisuuksiin. Käytettäessä poolista stationäärifaasia ja poolitonta liuotinta poolittomat yhdisteet eluotuvat ensin. Kasvattaessa eluentin poolisuutta eluotuvien yhdisteidenkin poolisuus kasvaa. HPLC –menetelmässä liikkuvana faasina on neste ja stationäärifaasina kiinteä aine. Analysoitaessa näytettä HPLC:lla, näyte ei muutu, vaan se voidaan ottaa talteen jatkoanalysointia varten.

Kaasukromatografiassa (GC, gas chromatography) liikkuvana faasina on kaasu ja stationäärifaasina on yleensä neste.<sup>27</sup> Kaasukromatografiassa erottuminen perustuu yhdisteiden erilaisiin höyrynpaineisiin ja erilaisiin liukoisuuksiin stationäärifaasissa, jolloin kyseessä on partitiio- eli jakaantumiskromatografia. Yhdisteet eluoituvat usein kiehumispistejärjestyksessä eli helpoimmin höyrystyvät yhdisteet kulkevat nopeimmin kolonnissa. Stationäärifaasin ominaisuudet, esimerkiksi poolisuus, voivat muuttaa eluotumisjärjestystä. Kaasukromatografiset erotukset ovat tehokkaita ja kromatogrammien piikit ovat kapeampia kuin useimmissa muissa kromatografisissa menetelmissä. Tästä johtuen kaasukromatografia soveltuu esimerkiksi seulonta-analyysien tekoon, joissa yhdestä näytteestä voidaan analysoida samalla kertaa kymmeniä eri yhdisteitä.

Kaasukromatografia on herkkä ja nopea analyysimenetelmä, joka soveltuu hyvän erotuskykynsä takia erinomaisesti laajoihin lääkeaineseulontoihin.<sup>39</sup> Kahden rinnakkaisen polaarisuudeltaan erilaisen kolonnin käytön on esitetty lisäävän tuntemattomien yhdisteiden tunnistuksen luotettavuutta. Kaasukromatografiassa yhdisteiden tunnistaminen voi perustua niiden retentioindekseihin, jotka lasketaan käyttäen apuna vertailuaineita eli retentioindeksistandardeja. Hyvän toistettavuuden saavuttamiseksi retentioindeksistandardien tulisi olla kemiallisilta ominaisuuksiltaan tutkittavien yhdisteiden kaltaisia. Lisäksi ne tulisi voida injektoida jokaisen näytteen mukana kaasukromatografiin käyttäen sisäisen standardin menetelmä.

### **5.3.1 Korkean erotuskyvyn nestekromatografian rakenneosat ja käyttö**

HPLC-laitteisto koostuu injektorista, pumpusta, kolonnista, detektorista sekä näitä yhdistävistä kapillaareista ja tulostuslaitteistosta (kuva 8).<sup>27</sup> Nestekromatografi voidaan koota moduuleista, jolloin laitteistoa on helppo muunnella. Vaihtoehtoisesti laitteiston osat voivat olla integroituja, jolloin sen muunneltavuus on pienempi. Injektorin kautta syötetään yleensä muutama kymmenen mikrolitraa näytettä kapeissa kapillaareissa liikkuvaan korkean paineen alaisena olevaan nestefaasiin. Pumpun tulee pumpata eluentia sykkeettömästi korkeata painetta vastaan. HPLC pumpun rakenne voi olla gradienttinen kuten kuvassa 8 tai isokraattinen.<sup>40</sup> Gradienttilaitetta käytettäessä käytetään kahta tai useampaa ajoliuosta, joiden suhde ohjelmoidaan. Isokraattisessa laitteessa

käytetään vain yhtä valmiiksi sekoitettua ajoliuosta. Näyte kulkeutuu eluentin mukana stationäärifaasilla täytetyn kolonnin läpi. Näytteen kulkiessa eluentin mukana kolonnin läpi, se jakautuu komponenteikseen, jotka pidättyvät stationäärifaasiin eripituisiksi ajoiksi. Vuorollaan kukin komponentti päätyy detektoriin tai useampaan detektoriin peräkkäin, jolloin kromatogrammiin muodostuu piikki.<sup>26</sup> Detektoreina käytetään useimmiten UV-vis-, fluoresenssi- tai sähkökemiallista detektoria.<sup>26-27</sup> Nykyisin myös massaspektrometri on usein käytetty detektori nestekromatografiassa.

Kuva 8. HPLC-laitteisto.<sup>41</sup>

### 5.3.1.1 Korkean erotuskyvyn nestekromatografian detektoreita

Detektori mittaa tutkittavan yhdisteen ominaisuutta, joka on verrannollinen yhdisteen konsentraatioon.<sup>40</sup> Detektointi perustuu yhdisteiden spektrometriin, sähkökemiallisiin tai muihin fysikaalisiin ominaisuuksiin. Detektorin tulee olla herkkä kaikille tutkittaville analyyteille. Sen tulee antaa myös mahdollisimman lineaarinen vaste vaaditulla konsentraatioalueella.

UV-detektori on yleisin nestekromatografiassa käytetty detektori.<sup>42</sup> Sen sovellusalue on laaja, koska useat yhdisteet absorboivat UV-valoa. UV-detektori antaa vasteen niille yhdisteille, jotka pystyvät absorboimaan valoa UV-alueella. Usein käytetään myös UV-vis detektoria, jolloin saadaan vaste sellaisillekin yhdisteille, jotka absorboivat näkyvän valon aallonpituuksilla. UV-detektori on suhteellisen herkkä ja sen lineaarinen vastealue on laaja.

Fluoresenssidetektori on absorptiodetektoreja selektiivisempi ja lähes 1000 kertaa herkempi kuin absorbanssi mittaukseen perustuvilla UV-vis –detektoreilla.<sup>40,42</sup> Fluoresenssidetektori antaa vasteen yhdisteille, jotka ovat fluoresoivia tai jotka voidaan derivatisoinnin avulla tehdä fluoresoiviksi.

Sähkökemiallista detektointia käytetään hapettuvien ja pelkistyvien yhdisteiden analysointiin.<sup>27</sup> Sähkökemiallisessa detektoinnissa eluenttiin johdettu jännite aiheuttaa tutkittavassa yhdisteessä sähkökemiallisen muutoksen, mikä havaitaan sähkövirtana. Eluentin tulee siis olla sähköä johtava. Mitä enemmän liuoksessa on hapettuvia tai pelkistyviä yhdisteitä sitä voimakkaampi signaali saadaan aikaan.

Massaspektrometri (MS, mass spectrometer) on hyvä, mutta investointikustannuksiltaan arvokas detektor.<sup>42</sup> Täysin varmaan näytetunnistukseen ei pystytä ilman kromatografiin kytkettyä MS-detektoria. MS-detektorissa jokaisen eluoituvan piikin yhdiste ionisoidaan, kiihdytetään sähkökentässä ja määritetään kyseisen ionin massan suhde sen varaukseen. Ionisointiprosessissa muodostuu yleensä yhdisteen positiivisen ionin lisäksi sarja pilkkoutumistuotteita. Massaspekttristä nähdään pilkkoutumistuoteionien suhteellinen määrä. Massaspektrometri voidaan asettaa detektoimaan tiettyjä valittuja ioneja tai vaihtoehtoisesti kaikkien ionien aiheuttamaa totaalivirtaa detektorilla. Massaspektrometri on erittäin valikoiva detektor ja se soveltuu hyvin pienten ainemäärien pitoisuusmäärittäisiin.

### 5.3.2 Kaasukromatografian rakenneosat ja käyttö

Kaasukromatografi koostuu injektorista, kolonniuunista, kolonnista, detektorista sekä tulostuslaitteistosta (kuva 9).<sup>27, 43</sup> Näyte syötetään kaasutiiviin septumin läpi injektoriin, jossa se höyrystyy ja kulkeutuu kantokaasun kuljettamana kolonnin kautta edelleen detektorille. Kolonni sijaitsee kolonniuunissa, jossa sen lämpötilaa voidaan kontrolloida ajon aikana. Yhdisteiden höyrystymiseen vaikuttaa sekä injektorin että kolonnin lämpötilat. Ne ovat siten erottumisen kannalta keskeisiä parametrejä. Uunin lämpötilaa nostamalla analysoituvien yhdisteiden höyrönpainetta nostetaan, jolloin ne siirtyvät helpommin kantokaasuun ja tulevat nopeammin kolonnista ulos. Detektoreina käytetään muun muassa liekki-ionisaatio- ja elektroninsieppausdetektoria tai massaspektrometria.

Kuva 9. Kaasukromatografilaitteisto.<sup>44</sup>

### 5.3.2.1 Kaasukromatografidetektoreita

Detektori havaitsee kolonnista kantokaasun mukana tulevat yhdisteet ja antaa niille jonkin vasteen.<sup>42</sup> Detektorin antama vaste on verrannollinen aineen konsentraatioon tai massavirtaan. Detektorilta tuleva vaste tallentuu tietokoneen ohjelmistoon ajan funktiona. Kaasukromatografiassa kantokaasuna käytetään heliumia, vetyä tai typpeä. Eri detektorityypit toimivat parhaiten eri kantokaasujen yhteydessä.

Detektoreja on monenlaisia. Yleisimmin käytetty on liekki-ionisaatio –detektori (FID, flame ionization detector), mikä perustuu vety-ilma –liekin sähkönjohtokyvyn muuttumiseen.<sup>43</sup> Orgaaniset yhdisteet hajoavat ja palavat liekissä, jolloin syntyy ionisia palamistuotteita. Ionit ohjataan katodille ja syntynyt sähkövirta mitataan. FID on herkkä lähes kaikille orgaanisille yhdisteille, jotka palavat ja ionisoituvat vety-ilma –liekissä. FID:lle on ominaista hyvin laaja lineaarisuusalue.

Elektronin sieppausdetektori soveltuu yhdisteille, jotka voivat ottaa itselleen ylimääräisen elektronin.<sup>43</sup> Siinä kantajakaasun mukana tulevan elektroneja sieppaava yhdiste reagoi termisten elektronien kanssa, jolloin muodostuu elektroneja hitaammin liikkuvia ioneja. Nämä ionit heikentävät sähkövirtaa suoraan verrannollisesti sieppaavien elektronien määriin sekä affiniteettiarvoihin. Elektronisieppausdetektori on selektiivinen elektronegatiivisille orgaanisille halogeeniyhdisteille.

Myös massaspektrometria käytetään detektorina kaasukromatografiassa. Sen toiminnasta on kerrottu luvussa 5.3.1.1 korkean erotuskyvyn nestekromatografien detektoreita.

## 6 Menetelmän validointi

Menetelmän validointi tarkoittaa menetelmän luotettavuuden varmistusta.<sup>45</sup> Menetelmälle on tärkeää, että se tuottaa tarkkoja, luotettavia ja toistettavia tuloksia. Validoinnissa tutkitaan rinnakkaismittausten avulla selvittää menetelmän toistettavuus sekä vertailumateriaalien avulla menetelmän kykyä antaa oikeita tuloksia.<sup>27</sup> Mitä useampi toisto kussakin vaiheessa tehdään, sitä luotettavampia saadut tulokset ovat.

Kemiallinen mittausmenetelmä tulee validoida, kun on tarpeellista todistaa, että menetelmän parametrit ovat riittäviä tietyn analyttisen ongelman ratkaisemiseen.<sup>46</sup> Tällaisia tapauksia ovat esimerkiksi uuden menetelmän kehittäminen tiettyyn tarkoitukseen, käytössä olevan menetelmän uudistaminen tietyillä parannuksilla tai sen käyttötarkoituksen laajentaminen uusille tutkimusalueille. Menetelmä tulee validoida myös silloin, kun laboratorion laadunvarmistustoimenpiteet osoittavat, että käytössä olevassa menetelmässä on tapahtunut muutoksia.

Menetelmän validointi koostuu sen suunnittelusta, mittausten suorittamisesta, tulosten arvioinnista ja tilastollisista laskuista sekä menetelmäohjeen ja menetelmään liittyvän laadunvalvonnan laatimisesta.<sup>27</sup> Validoinnin laajuus riippuu aina siitä, minkä luonteisia muutoksia mittausmenetelmään tehdään.

Farmaseuttisissa määrityksissä validoinnissa tulee huomioida myös viranomaismääritykset.<sup>46</sup> Bioanalyttisen menetelmän validoinnissa perustana on menetelmän toistettavuuden, tarkkuuden, selektiivisyyden, herkkyuden, uusittavuuden ja säilyvyyden tutkiminen.<sup>4</sup> Tyypillisesti bioanalyttisen menetelmän kehitys sisältää edellä mainittujen lisäksi spiikattujen näytteiden spesifisyyden, saannon, kalibraatio-suoran, häiriökestävyyden ja alimman määritysrajan (LLOQ, lower limit of quantification) määrittämisen. Biologisissa matriisissa jokainen mitattu analytti pitää validoida.

### 6.1 Selektiivisyys ja spesifisyys

Analyysimenetelmä on selektiivinen, kun sen avulla voidaan määrittää yhdiste tarkasti ja spesifisesti muiden näytteen sisältämien yhdisteiden joukosta.<sup>47</sup> Selektiivisyys osoitetaan analysoimalla näytepohjaan lisätyt kalibraationäytteet ja puhtaat kalibraationäytteet

menetelmän määrittämisalueella. Selektiivisyyttä määritettäessä blankkonäytteiden (sisältävät vain näytepohjaa) analyysissä käytettäviä biologisia näytteitä tulee saada vähintään kuudesta testiyksilöstä. Jokainen blankkonäyte tulee testata riippumattomalla tavalla ja selektiivisyys tulee varmistaa alimmalla määrittämisrajalla.<sup>4</sup> Menetelmä on selektiivinen, jos saatujen lineaaristen regressiosuorien yhtälöt ovat samat.<sup>47</sup> Selektiivisyyden puute aiheuttaa tuloksissa systemaattisen virheen.

Menetelmä on spesifinen, jos mitattava signaali on peräisin vain tutkittavasta analyytistä ja sillä pystytään määrittämään analyytti riittävän tarkasti myös silloin, kun kaikki mahdolliset näytteeseen liittyvät komponentit ovat läsnä.<sup>45</sup> Menetelmän spesifisyys osoitetaan analysoimalla yleensä analyytti, näytematriisi ilman analyyttiä, tutkittavan yhdisteen tunnetut lähisukulaiset, lähtöaineet, epäpuhtaudet, hajoamistuotteet ja metaboliitit sekä prosessi- ja reagenssiblankot. Menetelmän selektiivisyys ja spesifisyys ovat tekijöitä, jotka vaikuttavat lähes kaikkiin validoinnin parametreihin.<sup>47</sup>

## 6.2 Lineaarisuus ja alin määrittämisraja

Menetelmän lineaarisuutta kuvataan kalibraatiosuoran avulla.<sup>4</sup> Kalibraatiosuora kuvaa laitteen vasteen ja tietyn analyytin pitoisuuksien välistä suhdetta. Kalibraatiosuoran näytteet tulee olla tehty aina täysin samanlaiseen biologiseen matriisiin kuin tutkittava näyte. Kalibraatiosuoran tulee sisältää blankkonäyte (matriisi ilman sisäistä standardia), nollanäyte (matriisi sisältäen sisäisen standardin) sekä kuudesta kahdeksaan eri pitoisuusalueelta olevaa näytettä sisältäen LLOQ-näytteen. Tulokset arvioidaan yleensä määrittämällä lineaarinen riippuvuussuhde regressiosuoran pienimmän neliösumman menetelmällä (kuva 10). Korrelaatiokerroin ei siis ole lineaarisuuden mitta.<sup>45</sup>

Kuva 10. Regressiosuoran pienimmän neliösumman menetelmällä määritetään lineaarinen riippuvuussuhde.<sup>46</sup>

Analyytin lineaarisuus pitää määrittää koko menetelmän alueella ja mittausalue on riippuvainen menetelmän käyttötarkoituksesta.<sup>48</sup> Mittausalue kuvaa tutkittavan analyytin konsentraatioväliä, jolla analyysimenetelmän on osoitettu olevan toistettava, oikeellinen

ja lineaarinen. Bioanalyttisissä menetelmissä kalibraatiostandardi saa poiketa nimellisestä konsentraatiosta LLOQ-pitoisuudessa 20 % ja muissa pitoisuuksissa 15 %.<sup>4</sup>

LLOQ on määrittäysraja, jolla tarkoitetaan pienintä tutkittavan aineen konsentraatiota, joka voidaan vielä riittävällä oikeellisuudella ja toistettavuudella kvantitoida.<sup>47</sup> LLOQ määräytyy sen suhteellisen hajonnan perusteella, joka ilmoitettavalle tulokselle vielä sallitaan. Kalibraatiokäyrän alhaisin piste nollanäyte pois lukien on yleensä menetelmän LLOQ. Standardisuoran alin pitoisuus hyväksytään raja-arvoksi, jos analyytin vaste LLOQ:ssa on vähintään viisinkertainen blankkonäytteen vasteeseen verrattuna ja jos analyytistä saatava piikki on tunnistettava, irrallinen ja jäljiteltävä 20 % tarkkuudella ja 80 - 120 % oikeellisuudella.<sup>4</sup> Määrittäysrajaa ei tule ekstrapoloida.

### 6.3 Toteamis- ja määrittäysraja

Menetelmää validoitaessa tulee tutkia sen toteamis- ja määrittäysraja. Toteamisraja on tutkittavan aineen pienin konsentraatio, joka voidaan vielä luotettavasti todeta. Toteamisraja voidaan määrittää seuraavilla tavoilla.<sup>49</sup> Aistinvaraisesti toteamisraja havainnollistetaan analysoimalla tunnetun pitoisen näyte ja määritetään siten pienin määrä analyyttiä, mikä voidaan todeta luotettavasti. Signaali/kohina –suhdetta (S/N, signal to noise ratio) voidaan käyttää toteamisrajan määrittämiseen menetelmissä, joissa on pohjaviivan kohinaa. Blankkonäytteeseen verrataan mitattuja signaaleja näytteistä, joissa on tunnettu pieni määrä analyyttiä. Tästä määritetään pienin pitoisuus analyyttille, jolla se voidaan luotettavasti todeta. S/N –suhde on yleensä 2 - 3. Toteamisraja voidaan määrittää myös vasteen keskihajonnan ja kalibraatiosuoran kulmakertoimen avulla. Keskihajonta saadaan, kun riittävä määrä blankkonäytteitä analysoidaan ja niiden pohjan vasteista lasketaan keskihajonta. Kalibraatiosuoran näytteiden pitoisuuksien tulee olla lähellä määrittäysrajaa.

Määrittäysraja on pienin tutkittavan aineen konsentraatio, joka voidaan kvantitoida riittävän oikeellisesti ja toistettavasti.<sup>48</sup> Määrittäysraja tulee varmistaa näytteillä, joissa on määritettävää ainetta määrittäysrajaa vastaava konsentraatio.<sup>49</sup> Määrittäysraja voidaan määrittää aistinvaraisesti analysoimalla tunnetun pitoisen näyte ja määrittämällä siten



pienin määrä analyyttiä, joka voidaan luotettavasti, toistettavasti ja oikeellisesti kvantitoida. S/N –kohinaa voidaan käyttää määritysrajan määrittämiseen menetelmissä, joissa on pohjaviivan kohinaa. S/N –kohinan suhteella määritettäessä verrataan näytteistä, joissa on tunnettu pieni määrä analyyttiä, ja blankkonäytteistä saatuja signaaleja. Tästä määritetään pienin pitoisuus analyyttille, jolla se voidaan luotettavasti kvantitoida. S/N –suhde on yleensä 10. Määritysraja voidaan määrittää myös näytepohjan vasteen keskihajonnan ja kalibraatiosuoran kulmakertoimen avulla. Tällöin blankkonäytteitä täytyy määrittää riittävästi ja kalibraatiosuoran näytteiden pitoisuuksien tulee olla lähellä määritysrajaa.

#### **6.4 Saanto**

Saanto kuvaa koko analyysimenetelmän tehoa havaita tutkittavan analyytin kokonaismäärää.<sup>46</sup> Saanto ilmoitetaan useimmiten prosenttina. Se lasketaan vasteiden suhteista, jotka saadaan verrattaessa näytematriisiin lisätyn tai näytteen käsittelyn jälkeen saadun analyytin vastetta puhtaan ilman näytteenkäsittelyä saadun analyytin vasteeseen. 100 % saannot ovat toivottavia, mutta niinkin alhaiset kuin 50 - 60 % saannot voidaan mukaan hyväksyä bioanalyttisille menetelmille, mikäli saanto on tarkka, oikeellinen ja toistettava.<sup>4</sup> Saanto tulee esittää vertaamalla uutetun näytteen tulosta kolmella konsentraatitasolla (matala, keskitaso ja korkea) ei –uutetun näytteen 100 % saantoon.

#### **6.5 Oikeellisuus ja tarkkuus**

Menetelmän oikeellisuus kuvaa, kuinka lähelle menetelmän todellisia arvoja mittaustulokset saadaan.<sup>43</sup> Oikeellisuus tulee mitata käyttäen vähintään viittä määritystä joka konsentraatiossa ja konsentraatio tulisi mitata vähintään kolmella eri alueella. Menetelmän oikeellisuus saa poiketa pääalueella korkeintaan  $\pm 15\%$  ja LLOQ alueella  $\pm 20\%$  todellisesta arvosta.<sup>4</sup>

Analyysimenetelmän tarkkuutta voidaan arvioida määrittämällä sertifioituja referenssinäytteitä tai vertaamalla omalla menetelmällä saatuja tuloksia toisella tarkasti tunnetulla menetelmällä saatuihin tuloksiin. Menetelmän tarkkuutta voidaan arvioida

myös lisäämällä tunnettu analyyttiä nollamatriisiin ja tarkkailemalla saantoa tai käyttämällä standardilisäysmenetelmää, jolloin ei nollamatriisia tarvita. Tarkkuuden kriteeriksi voidaan asettaa esimerkiksi sallittava erotus oikean ja mittauksessa saadun arvon välillä tai sen suhteellinen osuus prosentteina.<sup>45</sup>

## 6.6 Toistettavuus ja uusittavuus

Toistettavuus kuvaa samoissa mittausolosuhteissa tehtyjen mittausten saman mitattavan suureen peräkkäisten mittaustulosten läheisyyttä (laitteistotarkkuus yhdistettynä näytteenkäsittelyn toistotarkkuuteen).<sup>45</sup> Toistettavuudella voidaan tarkoittaa myös saman näytteen perättäisiä määrittämiä, jolloin puhutaan laitteiston toistotarkkuudesta. Toistettavuudella ilmaistaan tulosten välistä hajontaa ja se kuvaa tuloksen satunnaisvirhettä.<sup>47</sup> Toistettavuus määritetään toistokokeiden avulla pitoisuusmenetelmien ja kvantitatiivisten epäpuhtausmenetelmien validoinnin yhteydessä. Toistettavuus ei anna tietoa tuloksen oikeellisuudesta (kuva 11).

Kuva 11. Samasta näytepitoisuudesta on tehty neljä eri kertaa määrittäminen kymmenellä rinnakkaisnäytteellä. Menetelmän toistettavuus ja tarkkuus eivät kerro menetelmän oikeellisuudesta.<sup>45</sup>

Tulosten toistettavuus ilmaisee, kuinka lähellä toisiaan ovat samoissa olosuhteissa valmistettujen homologisten näytteiden arvot näytesarjojen välillä.<sup>47</sup> Toistettavuus tulee mitata käyttäen vähintään viittä määrittämiä joka konsentraatiossa. Konsentraatioiden tulee olla vähintään kolmella eri pitoisuusalueella. Kvantitatiivinen arvio menetelmän toistettavuudesta saadaan laskemalla toistokokeiden tuloksista suhteellinen keskihajonta. Menetelmän toistettavuuden määrittämisessä sen suhteellisen keskihajonnan ei tule ylittää 15 % millään pitoisuustasolla lukuun ottamatta LLOQ:ta, jolla se ei saa ylittää 20 %:a.<sup>4</sup>

Menetelmän uusittavuus kuvaa eri laboratorioiden välistä toistettavuutta.<sup>46</sup> Uusittavuus kuvaa testitulosten yhtäpitävyyttä silloin, kun mittaukset suoritetaan samalla tai eri menetelmällä, eri mittauslaitteilla, eri laboratorioissa ja eri henkilöiden suorittamana aikavälillä, joka on pitkä verrattuna yksittäisen mittauksen kestoajaksi.

## 6.8 Häiriökestävyys

Häiriökestävyys eli haavoittuvuus kuvaa menetelmän antamien tulosten herkkyyttä pienille muutoksille testausolosuhteissa.<sup>45</sup> Jotta menetelmän haavoittuvuudesta saadaan riittävän hyvä kuva, täytyy tehdä analyysin tuloksiin vaikuttavien eri tekijöiden perusteellinen arviointi ja mittaus. Kriittisiä parametreja haavoittuvuuden kannalta ovat esimerkiksi liuosten säilyvyys, määrityslämpötilat, reagenssierät ja analyysin kulku. Määritettäessä menetelmän haavoittuvuutta hajotetaan analyysin kulku yksittäisin askelin, joille kullekin arvioidaan epävarmuus keskihajontana.

## 6.9 Säilyvyys

Analyytin säilyvyys tietyssä matriisissa ja säilöntäsystemissä on aina tyypillinen vain tietylle matriisille ja säilöntäsystemille, eikä sitä voi soveltaa toisiin matriiseihin ja säilöntäsystemeihin.<sup>4</sup> Analyytin säilyvyys määritetään näytteen keräyksen ja käsittelyn aikana lyhyen (huoneenlämpö) ja pitkän ajan (jääkaappi) säilömisen jälkeen, jäätymsulamiskierron jälkeen sekä prosessin aikana.

Analyytin säilyvyyden lisäksi tulee selvittää menetelmän kannalta kriittisiä kohtia.<sup>45</sup> Yleensä niitä ovat reagenssien, standardien ja liuosten säilyvyys. Näiden säilyvyys selvitetään toistamalla määrittystä yhä uudestaan ja käyttämällä siinä samoja standardi- ja muita liuoksia, kunnes vasteessa havaitaan selvä muutos. Säilyvyyden mittana voidaan pitää aikavaatimusta, minkä ajan sisällä samoja liuoksia voidaan käyttää.

## 6.10 Virheet

Laadunvarmistuksen tärkein tavoite on virheettömyys.<sup>45</sup> Virheellä tarkoitetaan mittausten avulla saadun suureen arvon ja suureen ”oikean” arvon erotusta. Mittauksissa esiintyvät virheet voidaan ryhmitellä karkeisiin, systemaattisiin ja satunnaisiin virheisiin (kuva 12). Virheen suuruus ilmoitetaan absoluuttisena tai suhteellisena virheenä. Mittauksissa ei yleensä synny karkeita virheitä, jos ne tehdään huolellisesti

Kuva 12. Systemaattinen virhe ja satunnaisvirhe.<sup>45</sup>

Systemaattiset virheet ovat yleisempiä ja joskus vaikeastikin havaittavia.<sup>45</sup> Systemaattinen virhe vaikuttaa aina samalla tavalla samoissa olosuhteissa ja se voi myös vaihdella säännönmukaisesti olosuhteiden mukaan. Systemaattisia virheitä ovat muun muassa nollaus- ja skaalausvirheet, olosuhteista ja niiden muutoksista aiheutuvat systemaattiset virheet sekä väärästä mittaustavasta ja näytteenotosta johtuvat systemaattiset virheet. Yleisesti ottaen systemaattinen virhe on pyrittävä löytämään, arvioimaan ja poistamaan. Systemaattisen virheen merkitsevyyttä voidaan arvioida t-testillä (kaava 1).<sup>50</sup> Siinä määritetään kahden tuloksen keskiarvoja ja keskihajontoja keskenään. Vertailun kohteena voi olla esimerkiksi standardiliuos ja siihen tehty näytematriisilisäys. T-testi ilmoittaa virheen ja sen suuruuden, mikäli matriisi aiheuttaa häiriön analyysiin.

$$t = (x - \mu) / (s / \sqrt{n}) \quad (1)$$

$x$  = tulosten keskiarvo

$\mu$  = vertailumateriaalille ilmoitettu pitoisuus

$s$  = tulosten keskihajonta

$n$  = otos

Satunnaisvirhettä voidaan kutsua myös hajontavirheeksi tai tilastolliseksi virheeksi.<sup>45</sup> Ne ovat ennustamattomia ja läsnä kaikissa analyyseissä. Satunnaisvirheen suuruus vaihtelee toistettaessa mittausta samoissa olosuhteissa, eikä se vääristä tulosta mihinkään tiettyyn suuntaan. Satunnaisvirheitä voivat olla esimerkiksi laitteen näytön tai mittauspiirin huojunta sekä näytteistä, näytteenotosta tai olosuhteista johtuvat satunnaisvirheet. Satunnaisvirheet voidaan todeta toistamalla sama mittaus useaan kertaan ja laskemalla tulosten keskihajonta suhteellinen keskihajonta.<sup>27</sup>

## 7 Yhteenveto

Tulehduskipulääkkeet ovat eniten käytettyjä kipulääkkeitä.<sup>5</sup> Ne sitoutuvat voimakkaasti plasman proteiineihin.<sup>21</sup> Analysoitaessa lääkeaineiden pitoisuuksia plasmasta ollaan kiinnostuneita vapaan lääkeaineen pitoisuudesta, koska vain proteiineihin sitoutumaton lääkeaine on farmakologisesti tehokas.<sup>17</sup>

Vapaan lääkeaineen analysoinnissa plasmanäytteestä poistetaan proteiinit ja näyte puhdistetaan.<sup>21</sup> Proteiinien eristämiseen voidaan käyttää esimerkiksi tasapainodialyysyä, geelisuodatusta, kiinteäfaasiuuttoa, käänteisfaasikromatografiaa tai ultrasuodatusta. Proteiinien eristämisen jälkeen vapaaseen lääkeaineeseen voidaan kiinnitetään johdos derivatisoimalla, jolloin näytteen ominaisuuksia saadaan muutettua halutunlaisiksi. Tulehduskipulääkkeet ovat usein sitoutuneet voimakkaasti plasman proteiineihin, joten vapaan lääkeaineen pitoisuudet plasmassa on yleensä hyvin pieniä.<sup>18</sup> Pienestä näytepitoisuudesta johtuen analysointilaitteistona käytetään usein kaasua- ja nestekromatografisia menetelmiä.<sup>3</sup>

Validoinnilla tarkoitetaan menetelmän luotettavuuden varmistusta.<sup>45</sup> Kehitettäessä uutta, ja tarvittaessa muutettaessa vanhaa, menetelmää se tulee validoida.<sup>46</sup> Pienistä lääkeainepitoisuuksista johtuen on tärkeää, että analyyseissä käytettävä menetelmän on selektiivinen, spesifinen ja toistettava analysoitavalla näytteelle.<sup>4</sup> Menetelmän tulee olla myös uusittava ja lineaarinen. On tärkeää, että menetelmä on mahdollisimman häiriökestävä ja siitä saatava saanto riittävän hyvä. Lisäksi näyteliuosten tulee säilyä moitteettomana vaaditun ajan. Mahdollisten systemaattisten ja satunnaisten virheiden havainnointi kuuluu myös menetelmän validointiin.

## KOKEELLINEN OSA

### **8 Tutkimuksen tarkoitus**

Ammatillisen koulutuksen laboratorioalan perustutkinnon kannalta on hyödyllistä, jos opetuksessa on mukana myös lääkeainekemiaa. Tämä tuo monipuolisuutta tutkintoon ja opiskelijoiden osaamiseen. Opiskelijoiden on hyvä ymmärtää lääkkeiden analysoinnin merkitys, ja osata soveltaa perusopinnoissa oppimiaan taitoja lääkeaineanalytiikassa.

Tutkimuksen tavoitteena on ollut koota yhtenäinen opetusmateriaali ammatillisen koulutuksen laboratorioalan opetuskäyttöön. Materiaalissa keskitytään tulehduskipulääkkeiden pitoisuuden määrittämiseen kromatografisilla menetelmillä sekä menetelmien laadun varmistamiseen. Tämän tutkimuksen kirjallisessa osiossa on käsitelty asioita teorian opetukseen. Kokeelliseen osioon on valikoitu työt, jotka tukevat kirjallisen osuuden teoriaa ja selventävät lääkeaineanalytiikkaa. Tutkimukseen on valittu kolme laboratoriossa tehtävää harjoitustyötä, joissa käsitellään lääkeaineiden analysointi kromatografisilla menetelmillä. Töiden valintaan on vaikuttanut opetushallituksen määrittämä laboratorioalan perustutkinnon opetussuunnitelma.<sup>51</sup>

Harjoitustöissä analysoidaan kolmella eri menetelmällä tulehduskipulääkkeiden kvantitatiivinen pitoisuus. Kahdessa työssä lääkeainepitoisuus määritetään plasmasta ja yhdessä apteekin valmisteesta.

Ibuprofeenin kvantitatiivinen pitoisuus plasmasta määritetään UV –detektorilla varustetulla korkean erotuskyvyn kromatografilla (liite 1). Tässä työssä tutustutaan lisäksi proteiinien saostamiseen plasmasta sekä ibuprofeenin erottamiseen käänteisfaasi-nestekromatografisesti.

Indometasiinin määrittämiseen käytetään kaasukromatografiaa, jossa detektorina on massaspektrometri (liite 2). Työssä opitaan proteiinien erottaminen plasmasta kiinteäfaasiutolla sekä näytteen derivatisointi.

Ketoprofeenin määrittäminen eroaa edellä mainituista siten, että siinä määritetään apteekista saatavan valmisteiden pitoisuus. Analysointi tapahtuu massaspektrometrillä varustetulla nestekromatografilla, jossa käytetään lisäksi UV-vis –detektoria (liite 3).

Tavoitteena on oppia tulehduskipulääkkeiden sitoutumisesta plasman proteiineihin sekä niiden analysoinnista ja menetelmän validoinnista. Opetusmateriaali on kehitetty siten, että sen käsittelyn jälkeen opiskelijoilla on tieto ja taito lääkeainenäytteiden käsittelystä sekä analyysien tekemisestä. He osaavat suunnitella työnsä sekä käyttää siinä tarvittavia laitteita ja työvälineitä. Opiskelijat osaavat toimia laatuvaatimusten mukaisesti sekä tarkastella ja dokumentoida työstä saatavia tuloksia. Opetusmateriaalin tavoitteena on oppia tulehduskipulääkkeiden sitoutumisesta plasman proteiineihin sekä niiden analysoinnista ja menetelmän validoinnista.

## 9 Tutkimuskysymykset

Tämä tutkimus pyrkii vastaamaan seuraaviin tutkimuskysymyksiin:

1. Minkälaista lääkeaineanalytiikan opetusta ammattikoulussa tarvitaan?
2. Minkälaisia lääkeaineanalytiikan ja- kemian opetuskokonaisuuksia opiskelijoiden tulisi hallita?
3. Mitä kemian analyysimenetelmiä voidaan oppia lääkeainekemian avulla?

## 10 Tutkimusmenetelmä

Tämä tutkimus on kehittämistutkimus, jonka tavoitteena on ollut uuden opetusmateriaalin kehittäminen ammatillisen koulutuksen laboranttiopintojen vapaasti valittaviin opintoihin. Laboratorioalan perustutkinnon pakollisiin opintoihin ei opetussuunnitelman mukaan sisälly lääkeainekemiaa.<sup>51</sup> Lääkeaineanalytiikka perustuu kuitenkin paljolti

perusopinnoissa opetettavien menetelmien ja laitteistojen hallintaan, joten sen opetus soveltuu hyvin valinnaisiin oppimista syventäviin opintoihin.

Tässä tutkimuksessa on kehitetty ammatillisen oppilaitoksen opettajan käyttöön laboratorioalan opetusmateriaali, jonka avulla opiskelijat voidaan tutustuttaa tulehduskipulääkkeiden lääkeaineanalytiikkaan. Tutkimuksen lähtökohtana on ollut kartoittaa opetusmateriaaliin soveltuvia harjoitustöitä ja valita niistä mukaan sellaiset harjoitustyöt, joiden toteuttaminen onnistuu mahdollisimman monessa opetuslaboratoriossa. Laitteistot harjoitustöihin on pyritty valitsemaan siten, että niitä on käytetty jo perusopinnoissa.<sup>51</sup>

Harjoitustöihin on pyritty löytämään toisistaan eroavia töitä, joiden avulla opitaan erilaisia taitoja. Harjoitustöissä on haluttu tuoda esiin erilaisia prosesseja ja menetelmiä, joiden avulla lääkeaineiden pitoisuus voidaan määrittää. Valinnoissa on pyritty ottamaan huomioon myös ammatillisen koulutuksen laite- ja reagenssiresurssit. Plasman saanti voi olla haastavaa. Tästä syystä tutkimuksessa on koettu tärkeäksi ottaa mukaan myös yksi työ, jossa lääkeainepitoisuus voidaan määrittää apteekin valmisteesta ilman plasmanäytettä.

Tähän tutkimukseen soveltuvien harjoitustöiden työstäminen on alkanut kirjallisuudesta löytyvien laboratoriotöiden kartoituksella. Kirjallisuudessa jo olemassa olevien harjoitustöiden avulla on saatu tutkimuksessa olevat harjoitustyöt muokattua sellaisiksi, että ne soveltuvat ammatilliseen laboratorioalan koulutukseen.

Harjoitustöitä yhdistäväksi tekijäksi on valittu tulehduskipulääkkeet, koska tulehduskipulääke on käsitteenä yleisesti tunnettu. Apteekissa on saatavilla reseptivapaita tulehduskipulääkevalmisteita ja niiden rakenteista, toiminnasta, vaikutuksesta sekä muusta tämän tutkimuksen ulkopuolelle jääneestä teemoista löytyy kirjallisuudesta paljon luotettavaa tietoa.



Tähän tutkimukseen valitut harjoitustyöt on suunniteltu laborantin tutkintoon soveltuviksi. Tutkimuksen harjoitustyöt syventävät opiskelijoiden kemian osaamista. Ne yhdistävät perusopinnoissa eri opintokokonaisuuksissa saatuja kemian taitoja ja opettavat laiteanalytiikkaa sekä näytteen käsittelyä.

## **11 Tutkimuksen toteutus**

Tutkimuksessa on suunniteltu kolme harjoitustyötä, jotka soveltuvat laborantin perustutkintoon johtavaan ammatilliseen koulutukseen. Suunnitteluvaiheessa on perehdytty opetushallituksen opetussuunnitelmaan, jotta on osattu valita harjoitustöihin sellaiset analyysitekniikat ja laitteistot, joiden perusteet opetetaan jo perusopinnoissa.<sup>51</sup> Harjoitustöitä suunniteltaessa on käytetty hyväksi olemassa olevia lääkeaineanalyysiohjeita, joista on koottu ammatilliseen oppilaitokseen soveltuvat työohjeet. Harjoitustöiden valinnassa on lisäksi pyritty huomioimaan se, että niissä käytetään laitteistoja, jotka soveltuvat mahdollisimman monen ammatillista koulutusta antavan laboratorion vaatimuksiin.

## **12 Tutkimustulokset**

Tässä tutkimuksessa on saatu aikaan uutta opetusmateriaalia ammatillisen koulutuksen laboratorialle. Tutkimukseen on valittu kolme laborantin tutkintoon soveltuvaa harjoitustyötä, joiden avulla opiskelija oppii lääkeaineanalytiikan laboratoriotyöskentelyä. Harjoitustöiden lääkeaineiksi on valittu ibuprofeeni, indometasiini ja ketoprofeeni, jotka kaikki kuuluvat tulehduskipulääkkeiden ryhmään.

Nämä harjoitustyöt on valittu tutkimukseen, koska niissä yhdistyy kromatografisen analysointi ja tulehduskipulääkkeiden pitoisuuden määrittäminen. Toisaalta työt eroavat toisistaan joko kromatografisen menetelmän tai siinä käytetyn detektorin osalta, sekä tutkittavan tulehduskipulääkkeen osalta. Lisäksi ibuprofeenin sekä indometasiinin määrittäminen tehdään plasmanäytteistä ja niissä on käytössä sisäisen standardin menetelmä.

Ibuprofeenin ja indometasiinin harjoitustöissä plasman proteiinien erottamiseen on valittu eri menetelmät. Harjoitustyössä, jossa määritetään indometasiinin pitoisuus plasmasta, käytössä on lisäksi näytteen derivatisointi.

### **12.1 Ibuprofeenin kvantitatiivinen määrittäminen plasmanäytteestä**

Ibuprofeenin kvantitatiivisen pitoisuuden analysointi plasmasta tehdään sisäisen standardin menetelmällä (liite 1). Menetelmä sisältää neljä päävaihetta. Ensimmäisessä vaiheessa happamaksi tehtyyn näytteeseen lisätään sisäinen standardi. Toisessa vaiheessa plasmanäytteestä saostetaan proteiinit asetonitriilillä, jonka jälkeen näyte sentrifugoidaan. Kolmannessa vaiheessa proteiinitomasta plasmasta eristetään ibuprofeeni ja sisäiset standardit käänteisfaasi-suuren erotuskyvyn nestekromatografisesti (RP-HPLC). Neljännessä vaiheessa ibuprofeenin ja sisäisten standardien tunnistus ja pitoisuuksien määrittäminen tehdään korkean erotuskyvyn nestekromatografilla, jossa detektorin on UV –detektori (HPLC-UV).

Tässä harjoitustyössä opiskelija oppii plasmanäytteiden käsittelyä ja analysointia. Työssä proteiinit saostetaan ja erotetaan plasmasta. Työssä on käytössä sekä käänteisfaasi- että normaalifaasinestekromatografia. Näissä työvaiheissa opitaan, miten näyteliuoksen polaarisuus vaikuttaa kolonnin valintaan. Lisäksi opitaan tulkitsemaan kromatografisia retentioaikoja sekä UV –spektrejä. Ibuprofeenin sekä sisäisten standardien tunnistus perustuu kromatografisiin retentioaikoihin ja niiden pitoisuudet lasketaan UV –spektrien piikkien vasteiden pinta-alasta.

Ibuprofeenin plasmanäytteen kvantitatiivisen määrittäminen tärkeimmät työvaiheet ja –menetelmät sekä oppimistavoitteet on koottu taulukkoon 1.

Taulukko 1. Ibuprofeenin kvantitatiivinen määrittäminen plasmanäytteestä

Työvaiheet	Työmenetelmät	Oppimistavoitteet
1. Sisäisen standardin lisäys plasmanäytteeseen	1. Pipetoidaan happamaksi tehtyyn plasmanäytteeseen sisäinen standardi	1. Sisäisen standardin käyttö
2. Proteiinien saostus ja erotus	2. Proteiinit saostetaan asetonitriilillä ja erotetaan sentrifugoimalla	2. Proteiinien denaturointi ja sentrifugointi
3. Ibuprofeenin ja sisäisten standardien erotus näytetaustasta	3. Tutkittavat aineet erotetaan RP-HPLC –laitteistolla	3. RP-HPLC –laitteiston käyttö
4. Ibuprofeenin ja sisäisten standardien pitoisuuksien analysointi	4. Näytteiden ja pitoisuudet analysoidaan HPLC-UV:lla	4. HPLC-UV –laitteiston käyttö, tulosten tulkinta sekä näytepitoisuuksien laskeminen niiden avulla

## 12.2 Indometasiinin pitoisuuden määrittäminen plasmanäytteestä

Indometasiinin pitoisuuden määrittäminen plasmasta on monipuolisin tässä tutkimuksessa mukana olevista töistä (liite 2). Siinä ensin kiinteäfaasiuuton (SPE –uuton) avulla erotetaan indometasiini näytematriisista ja tämän jälkeen indometasiiniin kiinnitetään derivatisointireagenssi. Derivatisoinnin jälkeen näyte pystytään analysoimaan massadetektorilla varustetulla kaasukromatografilla. Ionisaationa käytetään negatiivista kemiallista ionisaatiota (NCI). Myös tässä harjoitustyössä pitoisuuden määrittämiseen käytetään sisäisen standardin menetelmää.

Indometasiinin pitoisuuden määrittäminen –harjoitustyö on valittu tähän tutkimukseen ensisijaisesti siinä tehtävän kiinteäfaasiuuton ja derivatisoinnin vuoksi. Kiinteäfaasiuuton avulla indometasiini erotetaan näytematriisista mahdollisimman hyvin ja samalla vähennetään näytteiden epäpuhtauksia. Näytteen derivatisointi tapahtuu tämän jälkeen. Derivatisoinnilla tarkoitetaan derivaatan eli johdoksen kiinnittämistä indometasiiniin. Tässä tutkimuksessa indometasiiniin kiinnitettävä johdos on pentafluorobentsyyli (PFB).

Tämä fluorattu johdos on valittu, koska se mahdollistaa negatiivisen kemiallisen ionisaation käytön.

Tässä työssä opiskelija oppii kiinteäfaasiuuttolaitteiston käytön sekä analysoitavan näytteen erottamisen häiritsevästä näytetaustasta. Opiskelija oppii, kuinka tutkittava näyte saadaan ensin kiinnitettyä uuttoputkiin, kuinka siitä erotetaan epäpuhtauksia ja lopuksi puhdistettu näyte saadaan eluoitua. Derivatisoinnissa opitaan fluoratun johdoksen kiinnittäminen indometasiiniin. Tässä työvaiheessa on tärkeä huomioida ohjeen mukainen vorteksointi eli sekoitus, jotta indometasiini saadaan derivatisoitumaan mahdollisimman täydellisesti.

Indometasiininäyte analysoidaan kaasukromatografi-massaspektrometrilla (GC-MS). Siinä opiskelijan suurin huomio kiinnitetään detektorilta saatavien tulosten tulkitsemiseen. Koska indometasiiniin on liitetty fluorattu johdos, voidaan ionisaationa käyttää negatiivista kemiallista ionisaatiota. Detektorilta tulevista massaspektreistä opitaan etsimään indometasiinin sekä sisäisen standardin aiheuttamat piikit sekä laskemaan niiden vasteiden suhteilla näytepitoisuudet.

Indometasiinin plasmanäytteen pitoisuuden määrittämisen tärkeimmät työvaiheet ja –menetelmät sekä oppimistavoitteet on koottu taulukkoon 2.

Taulukko 2. Indometasiinin pitoisuuden määrittäminen plasmanäytteestä

Työvaiheet	Työmenetelmät	Oppimistavoitteet
1. Sisäisen standardin lisäys plasmanäytteeseen	1. Pipetoidaan sisäistä standardia koeputkeen, haihdutetaan ja lisätään haihdutusjäännökseen plasmanäyte	1. Sisäisen standardin käyttö
2. Proteiinien erotus	2. Esikäsitellään SPE – uuttoputket, lisätään näyte, pestään ja eluoidaan se koeputkeen. Eluoitu näyte haihdutetaan.	2. SPE –uuttolaitteiston käyttö ja toimintaperiaate
3. Derivatisointi	3. Näyte derivatisoidaan PFBBr:lla	3. Derivatisoinnin toimintaperiaate
4. Indometasiinin ja sisäisten standardien pitoisuuksien analysointi	4. Näytteiden pitoisuudet analysoidaan GC-MS – laitteistolla	4. GC-MS –laitteiston käyttö, tulosten tulkinta sekä näytepitoisuuksien laskeminen niiden avulla. NCI -ionisaatiotekniikan vaatimukset ja käyttö.

### 12.3 Ketoprofeenin pitoisuuden määrittäminen nestekromatografilla

Ketoprofeenin pitoisuuden määrittäminen nestekromatografilla (LC) perustuu apteekista saatavaan lääkevalmisteeseen (liite 3). Harjoitustyössä apteekin lääkevalmisteesta otetaan kaksi tablettia, joista toista käytetään standardien valmistukseen ja toista näytteen valmistukseen. Valmistetut näytteet analysoidaan nestekromatografilla, johon on yhdistetty massadetektorit (MS) ja UV-vis –detektorit. Massadetektorissa ionisointitekniikkana käytetään sähkösumutusta (ESI). Näytteenä olevan ketoprofeenin pitoisuus saadaan määritettyä standardisuoralta, mikä piirretään saadun UV-vis –spektrin piikkien pinta-alojen ja niihin käytettyjen jauhattujen tablettien massojen avulla.

Ketoprofeenin määrittäminen on helpoin toteuttaa tämän tutkimuksen harjoitustöistä. Se on ajallisesti nopein, eikä siihen vaadita plasmata. Tässä työssä opitaan standardisuoran tekoa ja kaasukromatografian käyttöä. Lisäksi opitaan massaspektrometrin sähkösumutusionisaation perusteita sekä UV-vis detektorin käyttöä ja tulosten tulkintaa. Opiskelijan kannalta tärkeää on oppia, että käytössä olevasta sähkösumutusionisaatiosta johtuen näytteet tulee saattaa ionimuotoon. Opiskelijan tulee oppia ja ymmärtää, miksi standardisuora ja näyte tehdään eri tableteista.

Ketoprofeenin pitoisuuden määrittämisen tärkeimmät työvaiheet ja –menetelmät sekä oppimistavoitteet on koottu taulukkoon 3.

Taulukko 3. Ketoprofeenin pitoisuuden määrittäminen nestekromatografilla

Työvaiheet	Työmenetelmät	Oppimistavoitteet
1. Standardien valmistus lääketabletista	1. Lääketabletti jauhetaan ja liuotetaan ionimuotoon natriumhydroksidilla. Seos suodatetaan ja siitä valmistetaan standardiliuokset.	1. Standardiliuosten valmistus kaupallisesta lääkeainetabletista
2. Näytteen valmistus lääketabletista	2. Lääketabletti jauhetaan ja liuotetaan ionimuotoon natriumhydroksidilla. Seos suodatetaan ja siitä valmistetaan näyteliuos.	2. Näytteen valmistus kaupallisesta lääkeainetabletista
3. Näytteiden analysointi	3. Näytteiden pitoisuudet analysoidaan LC-MS/UV-vis –laitteistolla	3. LC-MS/UV-vis –laitteiston käyttö, tulosten tulkinta sekä näytepitoisuuksien laskeminen niiden avulla. ESI –ionisaatiotekniikan vaatimukset ja käyttö.

### 13 Tutkimuksen tulosten analyysi

Tähän tutkimukseen valittujen kolmen harjoitustyön avulla opetetaan lääkeaineanalytiikkaa ammatillisen koulutuksen laboratorioalan opiskelijoille. Harjoitustöissä opiskelijat opettelevat tulehduskipulääkkeiden pitoisuuksien määrittystä kaasu- ja nestekromatografisilla menetelmillä. Kromatografien detektoreista opetetaan massa-, UV- ja UV-vis –detektorien käyttöä. Massadetektorien käytössä syvennyttään sähkösumutus- ja negatiiviseen kemialliseen ionisaatiotekniikkaan. Lisäksi plasmanäytteiden pitoisuuksia määritettäessä opetetaan lääkeaineen erottamista plasman proteiineista kiinteäfaasiuutolla ja sentrifugoimalla sekä plasmanäytteen derivatisointi. Tulehduskipulääkkeistä opitaan ibuprofeenin, indometasiinin ja ketoprofeenin pitoisuuksien määrittäminen.

Kromatografian analyttinen opetus kuuluu opetushallituksen opetussuunnitelman mukaan ammatillisen koulutuksen laboratorioalan perustutkintoon kaikille pakollisina opintoina.<sup>51</sup> Tämän tutkimuksen harjoitustyöt on tarkoitettu kyseisen tutkinnon valinnaisiin opintoihin, jolloin tarkoituksena on opettaa ja syventää kromatografian tietoja ja taitoja. Harjoitustöissä kiinnitetään lisäksi huomiota kromatografiselta analyysilaitteistolta saatavien graafisten tulosten tulkintaan ja niiden avulla tulosten laskemiseen.

Tässä tutkimuksessa käytetään kahdessa harjoitustyössä plasmanäytettä. Sekä ibuprofeeni- että indometasiiniharjoitustöissä opetetaan plasman proteiinien erottaminen näytteestä. Ibuprofeenin pitoisuuden määrittämisessä plasman proteiinit ensin denaturoidaan ja sen jälkeen erotetaan plasmanäytteestä sentrifugoimalla. Indometasiinin pitoisuuden määrittämisessä proteiinit erotetaan plasmanäytteestä kiinteäfaasiuutolla. Ammatillisen koulutuksen laboratorio-opinnoissa plasmanäytteiden käyttöä ei opiskella perusopinnoissa. Opetushallituksen opetussuunnitelman mukaan kaikille pakollisiin perusopintoihin kuitenkin kuuluu bioanalytiikkaa, jossa tehdään mikrobiologisia, biokemiallisia tai geenitekniisiä määrittäksiä soluista, solun osista tai solujen muodostamista yhdisteistä.<sup>51</sup> Näin ollen opiskelijoilla on entuudestaan jonkinlainen käsitys bioanalyttisistä näytteistä ja niiden käsittelystä, joita voidaan soveltaa tämän tutkimuksen harjoitustöissä.

Plasmanäytteen derivatisointi on tärkeänä osana opetettaessa indometasiinin pitoisuuden määrittystä plasmanäytteestä. Derivatisoinnissa opetetaan, miten johdos voidaan kiinnittää lääkeaineeseen. Lisäksi indometasiiniharjoitustyössä opetetaan, miten derivaatan eli johdoksen luonne vaikuttaa plasmanäytteen ominaisuuksiin ja edelleen analyysilaitteiston valintaan. Indometasiiniharjoitustyössä näytteeseen derivatisoidaan fluoroyhdiste (PFBB<sub>r</sub>), jolloin näytteen analysointi onnistuu negatiivista kemiallista ionisaatiota käyttäen. Ilman johdoksen lisäystä ei näytteen analysointi valitulla laitteistolla onnistuisi.

Tekemällä tämän tutkimuksen harjoitustöitä opiskelija oppii aiemmin opetetun tiedon soveltamista lääkeaineanalytiikkaan. Opiskelija tutustuu uuden tyyppisiin näytteisiin, plasmanäytteisiin, ja oppii käsittelemään niitä. Harjoitustöissä, joissa analysoidaan plasmanäytteiden pitoisuuksia, on käytössä monipuoliset laitteistot. Näissä töissä opiskelija tutustuu uusiin laitetekniikoihin ja oppii niiden käyttöä. Tässä tutkimuksessa mukana olevat harjoitustyöt monipuolistavat opiskelijan ammatillista taitoa laboratoriotyöskentelyssä ja opettavat opitun tiedon soveltamista lääkeaineanalytiikkaan.

## 14 Pohdinta

Tässä tutkimuksessa on kehitetty uutta opetusmateriaalia ammatillisen oppilaitoksen laboratorioalan koulutukseen. Tutkimuksen kirjallisuusosaan on koottu kirjallisuuslähteistä teoriaopetukseen soveltuvia tietoja tulehduskipulääkkeistä, niiden sitoutumisesta plasman proteiineihin, lääkeaineanalytiikan teoriasta ja menetelmän validoinnista. Kokeelliseen osaan on valittu kolme oppilaslaboratorioon soveltuvaa lääkeaineanalytiikan harjoitustyötä. Tutkimukseen on valittu lääkeaineryhmäksi yleisesti tunnetut ja käytetyt tulehduskipulääkkeet. Tämän tutkimuksen opetusmateriaali antaa opiskelijalle perustietoa tulehduskipulääkkeiden sitoutumisesta plasman proteiineihin, proteiinien erottamisesta plasmasta, näytteiden analysoinnista ja menetelmän validoinnista.

Kirjallisuusosassa käsitellään plasman proteiineja, erityisesti albumiinia ja hapan  $\alpha_1$ -glykoproteiinia, sekä tulehduskipulääkkeiden sitoutumista niihin. Lääkeaineen



analysoinnissa on keskitytty plasman proteiinien erotusmenetelmien, näytteen derivatisoinnin ja analyysilaitteistojen toimintaperiaatteisiin. Kirjallisuusosaan on otettu lisäksi mukaan näytteen validointi. Validointiin liittyen käsitellään mittausmenetelmän laatuvaatimuksia bioanalyttisille näytteille.

Kokeelliseen osaan on valittu kolme harjoitustyötä, jotka soveltuvat ammatillisen koulutuksen laboratorioon oppilastyöksi. Harjoitustöiden suunnitteluun on käytetty hyväksi jo olemassa olevia lääkeaineanalyysiohjeita, joita on muokattu ammatilliseen oppilaitokseen soveltuviksi. Harjoitustöitä suunniteltaessa on pidetty tärkeänä, että työt eroavat toisistaan riittävästi. Harjoitustöihin on valikoitunut kolmen eri tulehduskipulääkkeen pitoisuuden määrittäminen. Kahdessa harjoitustyössä näytteenä on plasmanäyte, yhdessä apteekista saatava valmiste.

Harjoitustöiden valinnassa on onnistuttu löytämään riittävästi toisistaan eroavia analyysimenetelmiä. Plasmanäytteistä määritetään ibuprofeenin ja indometasiinin pitoisuudet. Laitteistoltaan ibuprofeenin pitoisuuden määrittäminen plasmanäytteestä on helpompaa ja nopeampaa toteuttaa kuin indometasiinin määrittäminen plasmanäytteestä. Toisaalta indometasiiniharjoitustyö on monipuolisempi ja sen avulla opitaan enemmän laitetekniikkaa. Ketoprofeenin määrittäminen apteekin valmisteesta on valittu tähän tutkimukseen, koska plasmanäytteiden saanti oppilaslaboratorioon voi olla haastavaa. Tästä syystä on koettu tärkeäksi, että mukana on yksi lääkeaineanalyysimenetelmä, joka voidaan toteuttaa ilman plasmanäytettä.

Tähän tutkimukseen valittujen harjoitustöiden analysointi perustuu kromatografisiin menetelmiin. Harjoitustöihin on otettu mukaan sekä kaasua- että nestekromatografilla tehtäviä määrittämiä. Lisäksi harjoitustöissä detektoreina on käytössä massa-, UV- ja UV-vis –detektorit. Massadetektori on käytössä sekä indometasiinin että ketoprofeenin määrittämisissä, mutta detektorin ionisointitekniikat eroavat toisistaan. Indometasiinin määrittämisessä käytetään negatiivista kemiallista ionisaatiota ja ketoprofeenin määrittämisessä sähkösumutusta. Opetushallituksen opetussuunnitelman mukaan kromatografisen analytiikan opetetaan ammatillisen koulutuksen laboratoriolinjalla jo perusopinnoissa, joten tämän tutkimuksen harjoitustöissä opiskelijat pääsevät soveltamaan kromatografian tietoja ja taitoja lääkeaineanalytiikkaan.<sup>51</sup>

Tässä tutkimuksessa on haluttu saada oppimateriaaliin mukaan myös näytteen derivatisointi. Indometasiinin pitoisuuden määrittäminen plasmanäytteestä on ollut tästä syystä tutkimuksessa vahvasti mukana alusta asti. Näytteen derivatisointi on koettu tärkeänä, koska sen avulla pystytään muuttamaan tutkittavan lääkeaineen ominaisuuksia. Esimerkiksi indometasiinin pitoisuuden määrittämisessä valitsemaan analyysilaitteisto, jolla pienetkin indometasiini pitoisuudet onnistutaan määrittämään tarkasti, luotettavasti ja selektiivisesti.

Tässä tutkimuksessa on toteutettu ammatillisen koulutuksen laboratorioalalle opetuspaketti analyttisen lääkeainekemian perusteista. Lääkeainekemiaa on lähestytty tulehduskipulääkkeiden avulla. Jatkotutkimuskohteita on useita. Esimerkiksi tutkimuksessa kehitetyn opetusmateriaalin käytöstä voi kerätä palautetta opettajilta sekä oppilailta, ja analysoida, miten tässä tutkimuksessa mukana olevat asiat ja harjoitustyöt toimivat opetuskäytössä. Jatkotutkimuksissa lääkeainekemian opetuspakettia ammatilliseen koulutukseen voi myös laajentaa. Mukaan voi ottaa esimerkiksi muiden kuin tulehduskipulääkkeiden pitoisuuksien analysointia, lääkeaineiden syntetisointia ja lääkeaineiden ryhmittelyä niiden ominaisuuksien mukaan.

Koska tämän tutkimuksen oppimateriaali on kohdistettu ammatillisen oppilaitoksen syventäviin opintoihin, oletetaan opiskelijoiden omavan perusopinnoissa opetettavat kromatografisten laitteistojen perustaidot. Lisäksi tässä tutkimuksessa oletetaan, että opettaja tuntee käytettävät analyysilaitteistot ja ymmärtää lääkeainekemian teoriaa.

Ammatillisessa oppilaitoksessa lääkeaineanalytiikkaan tulee tutustua yleisellä tasolla. Lääkeaineanalytiikan opetus tulee perustua perusopinnoissa saatuihin pohjatietoihin, jolloin aiemmin opittuja tietoja opitaan soveltamaan ja niiden käyttöä syventämään. Lääkeaineanalytiikasta tulee oppia erilaisten erotusmenetelmien ja analyysilaitteistojen käyttöä. Menetelmän luotettavuuden tarkkailu standardien avulla ja tulosten tulkinta on oleellinen osa lääkeaineanalytiikan opetusta. Laadukas lääkeaineanalytiikan opetus monipuolistaa opiskelijoiden laboratoriotyöskentelyä ja laajentaa heidän ajattelua kemian sovelluksista.

Opetushallituksen tekemässä opetussuunnitelmassa ammatillisen koulutuksen laboratorioalan tutkintoon ei määritellä tarkasti opetuskokonaisuuksien sisältöjä.<sup>51</sup> Opetuskokonaisuuksiin jätetty liikkumavara antaa opettajalle mahdollisuuden tämän tutkimuksen tapaisen materiaalin käyttöön. Myös koulun laiteresurssit vaikuttavat siihen, miten ja millaiseen opetukseen oppilaitoksessa päädytään. Lääkeainekemian opetuskokonaisuudesta ammatillisen koulutuksen laboranttiopiskelijoiden tulisi hallita lääkeaineanalytiikan perustaidot. Erilaisten kromatografilaitteistojen soveltaminen lääkeaineanalytiikkaan sekä näytteiden käsittely ennen analyysiä. Tulosten tulkinta ja lääkeainepitoisuuksien laskeminen kuuluvat oleellisena osana lääkeaineanalytiikan osaamiseen. Opiskelijoiden tulisi osata arvioida käyttämänsä menetelmän luotettavuus ja sen mahdollisten epäkohtien havaitseminen. Lisäksi opiskelijoiden olisi hyvä ymmärtää lääkeaineiden sitoutumisesta plasman proteiineihin ja vapaan lääkeaineen merkitys elimistössä.

Tässä ammatilliseen koulutukseen kehitetyssä opetusmateriaalissa on mukana kolme eri harjoitustyötä tulehduskipulääkkeiden pitoisuuden määrittämiseen käytettävää menetelmää. Tässä tutkimuksessa olevien lääkeainekemian harjoitustöiden avulla opitaan ja syvennetään tietoa kaasui- ja nestekromatografilaitteistojen käytöstä sekä niiden toimintaperiaatteista ja ominaisuuksista. Harjoitustöissä opitaan näytteen ominaisuuksien muuttaminen derivatisoinnilla sellaiseksi, että sen analysointi valitulla detektorilla on mahdollista. Harjoitustöiden avulla opitaan myös proteiinien erottaminen plasmasta kiinteäfaasiuutolla ja proteiinien denaturointi ja sentrifugointi. Tämän tutkimuksen teoria osassa on lisäksi käyty läpi proteiinien erottaminen plasmasta tasapainodialyysillä, geelisuodatuksella, käänteisfaasinestekromatografilla sekä ultrasuodatuksella. Lääkeainekemian avulla pystytään soveltamaan ja syventämään ammatillisen koulutuksen laboratorioalan perusopinnoissa saatuja tietoja ja taitoja. Lisäksi se tutustuttaa ammatillisen koulutuksen opiskelijat biologisten näytteiden käsittelyyn ja antaa heille entistä laajemman osaamisen kemian alalta.

## 15 Lähteet

1. Farmakologia ja toksikologia, <http://medicina.datamappi.com/fato/04.pdf>, Medicina, (17.9.2014).
2. Veren ainesosat, [http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=snk02011](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk02011), Duodecim terveyskirjasto, (24.11.2014).
3. M. Lehtonen, Analyttinen lääkeainekemia, luentomateriaali 2004, Kuopion yliopisto, farmaseuttisen kemian laitos.
4. Guidance for industry, Bioanalytical method validation, U.S. department of health and human services, Food and drug administration, Center for drug evaluation and research (CDER), Center for veterinary medicine (CVM), 2001.
5. M-L. Nurminen, *Hyvä lääkehoito*, Porvoo, WSOY, 1997, ss. 101-104.
6. Tulehduskipulääkkeet, [http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=khp00036](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=khp00036), Duodecim terveyskirjasto, (24.11.2014).
7. Farmakologia ja toksikologia, <http://medicina.datamappi.com/fato/19.pdf>, Medicina, (17.9.2014).
8. Suomen lääketilasto, [http://www.fimea.fi/download/27596\\_SLT\\_2013\\_net.pdf](http://www.fimea.fi/download/27596_SLT_2013_net.pdf), Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus Fimea ja Kansaneläkelaitos, 2014 Helsinki, sivut 28 ja 233, (4.12.2014).
9. Merck index, *An encyclopedia of chemistry, drugs, and biologicals*, 12. painos, Merck research laboratories, New Jersey, USA, 1996.

10. J. Salonen, L. Laitinen, A. Kaukonen, J. Tuura, M. Björkqvist, T. Heikkilä, K. Vähä-Heikkilä, J. Hirvonen ja V.-P. Lehto, Mesoporous silicon microparticles for oral drug delivery: Loading and release of five model drugs, *J. Control. Release*, **2005**, *108*, 362-374.
11. J. Vilpo, *Laboratoriolääketiede kliininen kemia ja hematologia*, Kandidaattikustannus, Jyväskylä, 1998, ss. 131-133.
12. F. Li, D. Zhou ja X. Guo, Study on the Protein Binding of Ketoprofen Using Capillary Electrophoresis Frontal Analysis Compared with Liquid Chromatography Frontal Analysis, *J. Chromatogr. Science*, **2003**, *41*, 137-141.
13. F.W. Putnam, *The plasma proteins vol. 1*, 2. painos, Academic Press, New York, USA, 1975, ss. 63-70, 143, 194-199.
14. G. Meisenberg ja W.H. Simmons, *Principles of medical biochemistry*, Mosby, Missouri, USA, 1998, ss. 511-515.
15. M. Otagiri, A Molecular Functional Study on the Interactions of Drugs with Plasma Proteins, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **2005**, *20* (5), 309-323.
16. Lääkeaineen sitoutuminen plasman proteiineihin,  
[www.tiedekirjasto.helsinki.fi:70/bitstream/1975/380/1/laakeaineet\\_elaimissa.pdf](http://www.tiedekirjasto.helsinki.fi:70/bitstream/1975/380/1/laakeaineet_elaimissa.pdf), (1.4.2008).
17. S.S. Singh ja J. Mehta, Measurement of drug-protein binding by immobilized human serum albumin-HPLC and comparison with ultrafiltration, *J. Chromatogr. B*, **2006**, *834*, 108-116.
18. O. Pelkonen ja H. Ruskoaho, *Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia*, Duodecim, 1995, ss. 62-63 ja 351.

19. M.L. Friedman, J.R. Wermeling ja H.B. Halsall, The influence of N-acetylneuraminic acid on the properties of human orosomuroid, *J. Biochem.*, **1986**, 236,149-153.
20. K. Nishi, N. Fugunaga, ja M. Otagiri, Construction of expression system for human alpha 1-acid glycoprotein in *Pichia pastoris* and evaluation of its drug-binding properties, *Drug Metab. Dispos.*, **2004**, 32, 1069-1074.
21. A. Mannila, E. Kumpulainen, M. Lehtonen, M. Heikkinen, M. Laisalmi, T. Salo, J. Rautio, J. Savolainen ja H. Kokki, Plasma and cerebrospinal fluid concentrations of indomethacin in children after intravenous administration, *J. Clin. Pharmacol.*, **2007**, 47, 94-100.
22. B. Bannwarth, P. Netter, F. Lopicque, F. Pere, P. Thomas ja A. Gaucher, Plasma and cerebrospinal fluid concentrations of indomethacin in humans: relationship to analgesic activity, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **1990**, 38, 343-346.
23. A. Mannila, H. Kokki, M. Heikkinen, M. Laisalmi, M. Lehtonen, H.L. Louhisto, T. Järvinen ja J. Savolainen, Cerebrospinal fluid distribution of ketoprofen after intravenous administration in young children, *Clin. Pharmacokinet.*, **2006**, 45 (7), 737-743.
24. A.Shah ja D. Jung, Dose-dependent pharmacokinetics of ibuprofen in the rat, *Drug Metab. Dispos.*, **1987**, 15, 151-154.
25. M. Laitinen, M. Vihinen-Ranta, A. Kalela, M. Virtanen ja M. Vuento, Biokemiallisia työmenetelmiä BKE 120, Jyväskylän yliopisto, bio- ja ympäristötieteiden laitos, 1997.
26. R. Boyer, *Biochemistry laboratory: Modern theory and techniques*, 2. painos, Pearson, New Jersey, USA, 2012, ss.132-135 ja 143-146.
27. S. Jaarinen ja J. Niiranen, *Laboratorion analyysitekniikka*, 3. painos, Edita, 2000, ss.31-36, 145-146 ja 159-160.

28. K. Reddersen ja T. Heberer, Multi-compound methods for the detection of pharmaceutical residues in various waters applying solid phase extraction (SPE) and gas chromatography with mass spectrometric (GC-MS) detection, *J. Sep. Sci.*, **2003**, 26, 1443-1450.
29. A. Takeda, H. Tanaka, T. Shinohara ja I. Ohtake, *Systematic analysis of acid, neutral and basic drugs in horse plasma by combination of solid-phase extraction, non-aqueous partitioning and gas chromatography-mass spectrometry*, *J. Chromatogr. B*, **2001**, 758, 235-248.
30. R. Nishioka, T. Harimoto, I. Umeda, S. Yamamoto, ja N. Ō, Improved procedure for determination of indomethacin in plasma by capillary gas chromatography after solid-phase extraction, *J. Chromatogr.*, **1990**, 526, 210-214.
31. Neue UD, *HPLC Columns*, 1. painos, Wiley-VCH, New York 1997, ss. 183-191.
32. S. Hiltunen, *Proteiinien erotus ultrasuodatuksella*, Tekniikan kandidaatintyö, Lappeenrannan teknillinen yliopisto, kemiantekniikan laitos, Lappeenranta, 2007.
33. S. Uotila, *Teurasveren proteiinien hyödyntäminen ultrasuodatuksella ja retentaatin teknologiset ominaisuudet*, Maisterin tutkielma, Helsingin yliopisto, elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos, Helsinki, 2012.
34. I. Rodríguez, J.B. Quintana, J. Carpinteiro, A.M. Carro, R.A. Lorenzo ja R. Cela, Determination of acidic drugs in sewage water by gas chromatography-mass spectrometry as *tert.*-butyldimethylsilyl derivatives, *J. Chromatogr. A*, **2003**, 985, 265-274.
35. A.K. Singh, Y. Jang, U. Mishra ja K. Granley, Simultaneous analysis of flunixin, naproxen, ethacrynic acid, indomethacin, phenylbutazone, mefenamic acid and thiosalicylic acid in plasma and urine by high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr.*, **1991**, 568, 351-361.

36. M.A. Evans, GLC Microdetermination of indomethacin in plasma, *J. Pharmaceutical Sciences*, **1980**, *69*, 219-220.
37. A. Mannila, *Ketoprofeenin kaasukromatografinen määrittäminen likvorista, plasmasta ja plasman ultrasuodoksesta ketoprofeenin PFB-esteri* (SOP PMC-TY-0029, versio 1), Kuopion yliopisto, farmaseuttisen kemian laitos 2004.
38. M. Dawson, M.D. Smith ja C.M. McGee, Gas chromatography/negative ion chemical ionization/tandem mass spectrometric quantification of indomethacin in plasma and synovial fluid, *Biomedical and environmental mass spectrometry*, **1990**, *19*, 453-458.
39. I. Räsänen, *Gas Chromatographic Drug Screening Synthesis and Evaluation of Retention Index Standards*, Cosmoprint, väitöskirja, Helsingin yliopisto, kemian laitos, Helsinki, 1996.
40. S. Mikkola, *Orgaanisen kemian kromatografiset menetelmät 2006*, [users.utu.fi/satkuu/KEMI5147/monistec.pdf](http://users.utu.fi/satkuu/KEMI5147/monistec.pdf), Turun yliopisto, 2006, (24.9.2014).
41. HPLC-laitteisto,  
[http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat\\_2-6\\_nestekromatografia.html](http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_2-6_nestekromatografia.html), Opetushallitus, (18.9.2014).
42. Analyttinen kemia, [https://noppa.aalto.fi/noppa/kurssi/ke-35.1500/materiaali/KE-35\\_1500\\_a-luentokalvot\\_osio\\_4\\_2.pdf](https://noppa.aalto.fi/noppa/kurssi/ke-35.1500/materiaali/KE-35_1500_a-luentokalvot_osio_4_2.pdf), Aalto yliopisto, (18.9.2014).
43. M.L. Riekkola ja T. Hyötyläinen, *Kolonnikromatografia ja kapillaari elektromigraatiotekniikat*, Yliopistopaino, Helsinki, 2000, ss. 69-71 ja 111-115.
44. GC -laitteisto,  
[http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat\\_2-5\\_kaasukromatografia.html](http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_2-5_kaasukromatografia.html), Opetushallitus, (18.9.2014).



45. P.O. Lehtonen ja M.-L. Sihvonen, *Laboratorioalan analyttinen kemia*, 1.-2. painos, Opetushallitus, 2009, ss. 66-69 ja 91-97.
46. T. Ehder (toim.), *Kemian metrologian opas*, MIKES Julkaisu J6/2005 [http://www.mikes.fi/mikes/Oppaat/j6\\_05\\_b5\\_nettiin.pdf](http://www.mikes.fi/mikes/Oppaat/j6_05_b5_nettiin.pdf), (23.10.2014).
47. M. Lehtonen, *Validointi lääkeaineanalytiikassa*, kurssimateriaali 2005, Kuopion yliopisto, farmaseuttisen kemian laitos.
48. T. Partanen, *Analyysimenetelmän validointi*, Pro gradu-tutkielma, Jyväskylän yliopisto, kemian laitos, 1998.
49. The international conference of harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH harmonised tripartite guideline, *Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1)*, 2005.
50. A. Rautava, *Analyysimenetelmän validointi*, Pro gradu -tutkielma, Jyväskylän yliopisto, kemian laitos, 2000.
51. Opetussuunnitelma ammatillinen oppilaitos, [http://www.oph.fi/download/110510\\_Laboratorioalan\\_perustutkinto\\_2009.pdf](http://www.oph.fi/download/110510_Laboratorioalan_perustutkinto_2009.pdf), Opetushallitus, (17.9.2014).

## Ibuprofeenin kvantitatiivinen määrittäminen plasmanäytteestä

### Johdanto

Ibuprofeeni on laajasti käytetty tulehduskipulääke. Yksi tunnetuimmista ibuprofeenin lääkevalmisteista on Burana. Ibuprofeeni on rakenteeltaan propionihappojohdos ja on tunnetusti tehokas akuutin kivun ja kuumeen hoidossa. Ibuprofeenin biologinen hyötyosuus on yli 80 % ja plasman huippupitoisuus saavutetaan tavallisella kalvopäällystetyllä 200 mg:n tabletilla keskimäärin 1,5 tunnin kuluttua lääkkeen otosta. Ibuprofeenin puoliintumisaika plasmassa on 2–3 tuntia. Työssä määritetään ibuprofeenin pitoisuus plasmasta. Määrittäminen tehdään nestekromatografilla (HPLC), jossa detektorina käytetään UV-detektoria. Ibuprofeenin sekä sisäisten standardien tunnistus ja pitoisuuden määrittäminen perustuu kromatografisiin retentioaikoihin ja UV-spektriin ja piikkien vaste määritetään niiden pinta-alasta.

Miksi plasmanäytteeseen lisätään suolahappoa (HCl)?

Mitä RP-HPLC tarkoittaa? Millainen sen stationäärifaasi on?

### Reagenssit

2 M suolahappo

Metanoli

Asetonitriili

Diklofenaakki

Naprokseeni

### Välineistö

Sentrifuugi

RP-HPLC

HPLC-UV

## **Analysointi**

Näytteen otto:

Verinäyte (3,5 ml) otetaan vakuumputkeen. Näytettä sentrifugoidaan välittömästi näytteenoton jälkeen 10 min huoneenlämmössä kierrosnopeudella 3200 rpm, minkä jälkeen plasmaosa otetaan talteen ja jaetaan kahteen Eppendorf-putkeen. Tarvittaessa näytteet pakastetaan  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ :een ja säilytetään pakastettuina analysointiin saakka.

Näytteen analysointi:

Plasmanäytteeseen (200  $\mu\text{l}$ ) lisätään 20  $\mu\text{l}$  2 M suolahappoa (HCl), 50  $\mu\text{l}$  sisäisen standardin käyttöliuosta, joka sisältää diklofenaakkia ja naprokseenia sekä 50  $\mu\text{l}$  metanolia.

Näytteen proteiinit saostetaan lisäämällä 400  $\mu\text{l}$  kylmää asetonitriiliä, jonka jälkeen näytteet sentrifugoidaan.

Proteiinisaostuksen jälkeen plasmasta eristetään ibuprofeeni ja sisäiset standardit näytetaustasta käänteisfaasi-nestekromatografisesti (RP-HPLC).

Ibuprofeenin sekä sisäisten standardien tunnistus ja pitoisuudet määritetään HPLC-UV laitteella (Agilent Technologies 1100 HPLC System) aallonpituudella UV 229 nm. Laitteen analyttisen kolonnin (Zorbax Eclipse XDB-C18) lämpötila on  $50^{\circ}\text{C}$ , injektioilavuus 10  $\mu\text{l}$ , virtausnopeus 1,3 ml/min ja ajoaika 9 minuuttia. Laitteistoa ohjataan ja pitoisuuksien määrittäminen tapahtuu Agilent ChemStation -ohjelmistolla.

## **Pohdinta**

Vastaa työselostuksessa seuraaviin kysymyksiin.

1. Selvitä ja piirrä ibuprofeenin rakenne- ja molekyylikaavat. Merkitse kiraaliakeskus. Kumpi enantiomeereistä on farmakologisesti aktiivinen?
2. Miksi tehdään proteiinisaostus?
3. Mitä RP-HPLC –vaiheessa tapahtuu?
4. Missä työvaiheissa tapahtuu todennäköisimmin näytehävikkiä ja miksi?

## Lähteet

M. Lehtonen, *Ibuprofeenin HPLC määrittäminen plasmanäytteestä*, julkaisematon ohje, Kuopion Yliopisto, FLK/Lääkeaineanalytiikkalaboratorio, (13.9.2007).

H.-M. Lidsle, *Suussa liukenevan ibuprofeenitabletin soveltuvuus leikkauksen jälkeiseen kivunhoitoon*, Pro gradu –tutkielma, Kuopion yliopisto, farmakologian laitos, 2008.

## Indometasiinin pitoisuuden määrittäminen plasmanäytteestä

### Johdanto

Indometasiini (molekyyli massa 357,8 g/mol) on lääkeaine, jolla on kipua lievittävä, tulehdusta rauhoittava ja kuumetta alentava vaikutus. Se sitoutuu voimakkaasti plasman proteiineihin, joten se pystytään määrittämään plasmanäytteistä. Tutkittaessa yhdisteiden pitoisuuksia biologisista näytteistä täytyy näytteet yleensä ensin esikäsitellä, jotta ne pystytään analysoimaan halutulla tavalla. Kiinteäfaasiuuton (SPE-uutto) avulla saadaan erotettua tutkittava yhdiste näytematriisista mahdollisimman hyvin ja vähennettyä näytteiden epäpuhtauksia. Derivatisoinnissa yhdisteeseen liitetään johdos, joka voidaan analysoida GLC-MS -laitteistolla. Tässä työssä indometasiinin analysoinnissa käytetään derivatisointireagenssina pentafluorobentsyylibromidia (PFBBBr). Tällöin indometasiinin liittyy PFB-ryhmä, joka voidaan analysoida elektronegatiivisille ryhmille herkällä negatiivisella kemiallisella ionisaatiolla (NCI). Markkinoilla on myynnissä esimerkiksi Indometin lääkevalmiste, jossa indometasiinipitoisuus on 50 mg.

Mikä indometasiinin funktionaalinen ryhmä korvataan derivatisoinnissa PFB-ryhmällä?

Mitä SPE-uutossa tapahtuu, kun uuttoputkiin lisätään 20 % metanolia (MeOH) ja 100 % etyyliasetaattia?

### Näytteiden valmistus

#### Standardinäytteet

Kantaliuokseen punnitaan tarkasti noin 50 mg indometasiinia ja liuotetaan se 50 ml metanolia, MeOH, (pitoisuus noin 1 mg/ml). Kantaliuoksesta tehdään kaksi välilaimennosta pitoisuuksilla 20 µg/ml ja 1 µg/ml, joista laimennetaan kalibraatiosuoraa varten kuusi eri pitoisuutta välillä 400 ng/ml-20 µg/ml. Menetelmän sisäisenä standardina käytettävän diklofenaakin kantaliuos ja välilaimennokset tehdään kuten indometasiininkin (ks. taulukko 1).

Taulukko 1. Laimennusohjeet indometasiini- ja diklofenaakkiliuoksille

	Laimennos	Pitoisuus (ng/50µl)	Näytepitoisuus (ng/ml)
Kantaliuos (1,0 mg/ml)			
Välilaimennos 1 (20 µg/ml)	0,5 ml kantaliuosta/ 25 ml MeOH		
Välilaimennos 2 (1 µg/ml)	0,5 ml välilaim. 1/ 10 ml MeOH		
Standardi 1 (400 ng/ml)	2,0 ml välilaim. 2/ 5 ml MeOH	20	$\frac{20 \text{ ng}}{2,0 \text{ ml}} = 10 \text{ ng/ml}$
Standardi 2 (1,0 µg/ml)	Välilaimennos 2	50	25
Standardi 3 (2,0 µg/ml)	1,0 ml välilaim. 1/ 10 ml MeOH	100	50
Standardi 4 (6,0 µg/ml)	3,0 ml välilaim. 1/ 10 ml MeOH	300	150
Standardi 5 (12,0 µg/ml)	3,0 ml välilaim. 1/ 5 ml MeOH	600	300
Standardi 6 (20 µg/ml)	Välilaimennos 1	1000	500

Standardinäytteissä koeputkiin (kimax-putkiin) pipetoidaan 50 µl indometasiinin standardinäytettä sekä 100 µl diklofenaakin välilaimennosta 1 µg/ml ja haihdutetaan kuiviin typpivirran avulla (+ 45 °C:ssa).

Haihdutusjäännökseen lisätään 200 µl humaaniplasmaa, vorteksoidaan 10 sekuntia ja tasapainotetaan 10 minuuttia ja suoritetaan SPE-utto.

#### Plasmanäyte

Pipetoidaan 100 µl diklofenaakin 1 µg/ml välilaimennosta koeputkeen (kimax-putkeen) ja haihdutetaan kuiviin typpivirran avulla (+ 45 °C:ssa).

Haihdutusjäännökseen lisätään 200 µl näytettä, vorteksoidaan 10 sekuntia ja annetaan tasapainottua 10 minuuttia ja suoritetaan SPE-utto.

### Nollanäyte

Nollanäytteeseen pipetoidaan 100 µl diklofenaakin välilaimennosta 1 µg/ml ja haihdutetaan kuiviin typpivirran avulla (+ 45 °C:ssa).

Haihdutusjäännökseen lisätään 200 µl humaaniplasmaa, vorteksoidaan 10 sekuntia ja tasapainotetaan 10 minuuttia ja suoritetaan SPE-uutto.

### Blankkonäyte

Blankkonäytteeseen pipetoidaan 200 µl humaaniplasmaa ja suoritetaan SPE-uutto.

### **SPE-uutto**

Esikäsitellään Discovery® DSC-18 (3 ml/500 g) uuttoputket pipetoimalla 3,0 ml 100 % MeOH:a ja tämän jälkeen 3,0 ml 100 % H<sub>2</sub>O. Esikäsitelyn jälkeen lisätään näyte. Uuttoputket eivät saa kuivua tässä välissä.

Näyte pestään 20 % MeOH:lla ja uuttoputkien annetaan kuivua.

Lopuksi näyte eluoidaan uuttoputkesta 100 % etyyliasetaatilla (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>). Virtausnopeus tulee olla koko SPE-uuton ajan pienempi kuin 5 ml minuutissa. Eluoinnista saatu näyte kuivataan typpivirran avulla (45 °C:ssa).

### **Derivatisointi**

Näytteet derivatisoidaan lisäämällä haihdutusjäännökseen 200 µl 3,5 % (v/v) PFBBr:a (asetonitriilissä) ja 50 µl di-isopropylietyyliamiinia. Lisäyksen jälkeen näytettä vorteksoidaan 10 sekuntia ja jätetään reagoimaan suljetussa koeputkessa (kimax-putkessa) huoneenlämpöön kahdeksi tunniksi. Näytettä vorteksoidaan 10 sekuntia 60 minuutin kohdalla.

Reaktioajan loputtua näytteeseen lisätään 1,0 ml 100 % H<sub>2</sub>O ja 1 ml 100 % tolueenia, jonka jälkeen näytettä vorteksoidaan 10 sekuntia ja annetaan tasapainottua 2 minuuttia. Tolueenifaasi kerätään kokonaisuudessaan talteen.

Näytteeseen lisätään uudelleen 1 ml 100 % tolueenia, vorteksoidaan 10 sekuntia ja tasapainotetaan 2 minuuttia. Tolueenifaasi yhdistetään aiemmin talteen otettuun tolueeniin ja siirretään analysointia varten 200 µl vialiin.

## Näytteen analysointi

Näytteet analysoidaan Agilent Technologies GLC-MS laitteistolla. Laitteistoon kuuluvat Agilent Technologies 6890 GLC, Agilent Technologies 5973N MSD ja Agilent Technologies 7683 Autosampler.

### Parametrit:

Kolonni: HP-5MS, 30 m x 0,25 mm i.d. (film 0,25 µm)

Kantokaasu: helium ( 1,0 ml/min)

Injektio: pulssattu splitless

Injektiotilavuus: 1 µl

Injektorin lämpötila: 250 °C

Kolonniuunin lämpötila: 180 °C → 300 °C (20 °C/min)

Derektorin interface lämpötila: 290 °C

Ionisaatiokammion lämpötila: 150 °C

Massaerottimen (kvadrupoli) lämpötila: 150 °C

Ionisaatio: negatiivinen kemiallinen ionisaatio (NCI)

Reagenssikaasu: 40 % metaania

SIM: indometasiinille m/z on 356 (dwell time 25 ms) ja diklofenaakille 294 (dwell time 25 ms).

## Tulokset

Menetelmässä on käytössä sisäinen standardi, jolloin tulokset voidaan laskea piikkien vasteiden suhteilla.

## Pohdinta

Vastaa työselostuksessa seuraaviin kysymyksiin.

1. Mitä eroa on nolla- ja blankkonäytteellä ja miksi molemmat ovat tarpeellisia?
2. Miksi tolueenifaasi kerätään talteen derivatisoinnin lopussa?
3. Miksi näytteen analysointiin käytetään negatiivista kemiallista ionisaatiota?
4. Missä työvaiheissa tapahtuu todennäköisimmin näytehävikkiä ja miksi?



## Lähteet

A. Mannila, E. Kumpulainen, M. Lehtonen, M. Heikkinen, M. Laisalmi, T. Salo, J. Rautio, J. Savolainen ja H. Kokki, Plasma and cerebrospinal fluid concentrations of indomethacin in children after intravenous administration, *J. Clin. Pharmacol.*, **2007**, *47*, 94-100.

T. Salo, *GLC-MS menetelmän kehitys ja sen luotettavuuden arviointi indometasiinin määrittämiseksi plasmasta, ultrasuodatetusta plasmasta ja aivo-selkäydinnesteestä*, Jyväskylän yliopisto, kemian laitos, lääkeainekemian koulutusohjelma, tarkistamaton.

## Ketoprofeenin määrittäminen nestekromatografilla

### Johdanto

Ketoprofeeni,  $C_{16}H_{14}O_3$ , on ibuprofeenin kaltainen tulehduskipulääke, jota käytetään muun muassa lihas- ja nivelkipujen, päänsäryn ja vilustumissairauksiin liittyvien kipujen ja kuumeen hoitoon. Ketoprofeeni on vaikuttavana aineena mm. Ketorin ja Orudis nimisissä lääkevalmisteissa. Ketoprofeenin molekyylimassa on 254,3 g/mol.

Työssä tutkitaan 0,1 M natriumhydroksidiliuokseen liuotetun ketoprofeenitabletin pitoisuus nestekromatografilla (LC-MS). Ionisointitekniikkana on sähkösumutus (ES), joka toimii myös nestekromatografian ja massadetektorin (MS) välisenä liitososana. Analysointi tapahtuu normaali ilmanpaineessa (API). Sähkösumutus soveltuu yhdisteille, jotka ovat liuoksessa ioneina. Yhdiste pyritään saattamaan ionimuotoon säätämällä näyteliuoksen pH:ta. Lisäksi käytössä on UV-vis –detektori, jossa ketoprofeeni analysoidaan aallonpituudella 220 nm.

Miksi yhdiste halutaan saada ionimuotoon?

Missä työvaiheissa tarvitaan erityistä huolellisuutta?

### Näytteen valmistus

Lääkepakkauksesta punnitaan yksi tabletti tarkasti ja jauhetaan huumareessa hienojakoiseksi jauheeksi. Laitetaan jauhe lusikalla 100 ml dekantterilasiin ja liuotetaan pieneen määrään 0,1 M natriumhydroksidiliuosta hyvin sekoittaen. Ketoprofeeni liukenee natriumhydroksidiliuokseen, mutta apuaineet eivät liukene.

Suodatetaan seos suodatinpaperin ja suppilon avulla 100 ml:n mittapulloon. Valmistetaan kalibrintiliuossarja tekemällä perusliuoksesta viisi laimennusta: 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm ja 50 ppm liuokset.

Otetaan toinen tabletti, josta tehdään kalibrintiliuoksen tapaan perusliuos 100 ml:n mittapulloon. Tästä perusliuoksesta tehdään omavalintainen laimennus näytteeksi 100 ml tai 25 ml mittapulloon. Lisäksi tehdään toinen samaa pitoisuutta oleva rinnakkaisnäyte kolmannesta tabletista.

## **Näytteen analysointi**

Kalibrintiliuokset ja näyteliuokset analysoidaan LC-MS -laitteella (Agilent 1100 nestekromatografi). Massaspektrometrin liitännänä on positiivinen normaali-ilmanpaineessa toteutettu ionisaatiosähkösumutus (API-ES). Lisäksi LC-MS:ssä käytetään UV-vis -detektoria. UV-absorbanssitulokset mitataan ketoprofeenille aallonpituudella 220 nm.

Mittausolosuhteet:

Kolonne: Phenomenexin C18 50 mm\*4.6 mm

Injektointitilavuus: 5 µl

Virtausnopeus: 0,150 ml/min

Analysointiaika: 20 minuuttia

Maksimipaine: 400 bar

Lämpötila: 26 °C

Liuotin: 20 mM NH<sub>3</sub> vedessä/metanolia (50%:50%, v/v)

## **Tulosten analysointi**

Piirretään standardisuora, jossa x-akselilla on näytepitoisuus (ppm) ja y-akselilla piikin pinta-alan arvo jaettuna tabletin massalla (%/g) ja luetaan siitä näytteenpitoisuus.

## **Pohdinta**

Vastaa työselostuksessa seuraaviin kysymyksiin.

1. Miksi rinnakkaisnäytteet tehdään eri tableteista?
2. Laske, montako grammaa ketoprofeenia on näytteessä.
3. Miksi saatu ketoprofeenin määrä on pienempi kuin punnittu?
4. Miten virtausnopeuden muutos vaikuttaa analyysiin?

## Lähde

Pulka, Susanna, Kipulääkejäämät vesistö- ja juomavesissä, Lappeenrannan teknillinen yliopisto, soveltavan kemian laboratorio, Kandidaatintyö 2012.