

SAIRAALA-APTEEKISSA VALMISTETTUJEN STERIILIEN KIPULÄÄKEVALMISTEIDEN SÄILYVYYS

Paula Filppula
Pro gradu- tutkielma
Proviisorin koulutusohjelma
Itä-Suomen yliopisto, farmasian laitos
Toukokuu 2016

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Terveystieteiden tiedekunta
Farmasian laitos
Proviisorin koulutusohjelma
Farmasian teknologia
FILPPULA PAULA, H.: Sairaala-apteekissa valmistettujen steriilien
kipulääkevalmisteiden säilyvyys
Pro gradu -tutkielma, s.99,1 liite (9 s.)
Opinnäytetutkielman ohjaajat: yliopistonlehtori Tarja Toropainen, yliopistotutkija Miia
Turpeinen, apteekkari Sirpa Ämmälä
Toukokuu 2016

Avainsanat: säilyvyys, kipulääke, steriiliys, sairaala-apteekki, riskienhallinta

Steriilien lääkkeiden valmistaminen on yksi sairaala-apteekin haasteellisimpia tehtäviä. Steriilit kipulääkeseokset valmistetaan aseptisesti sekoittamalla keskenään steriilejä tehdasvalmisteisia kipulääkkeitä, joiden vaikutusmekanismit ovat erilaisia. Tavoitteena on pienentää yksittäisten lääkkeiden määrää ja vähentää sivuvaikutuksia. Sairaala-apteekissa valmistettavat steriilit kipulääkeseokset sisältävät paljon erilaisia riskejä sekä parenteraalisen antotavan että niiden sisältämien lääkeaineiden (opioidit ja puudutteet) vuoksi. Säilyvyystutkimusten tarkoitus on varmistaa, että lääkkeet pysyvät tehokkaina, turvallisina ja laadukkaina koko niille suunnitellun käyttöajan. Valmistettavien lääkevalmisteiden säilyvyyden tutkiminen on tärkeä osa sairaala-apteekin laadunvalvontaa.

Tämän opinnäytetutkielman kirjallisuusosassa käsitellään steriileille kipulääkeseoksille tehtäviä kemiallisia, fysikaalisia ja mikrobiologisia säilyvyystutkimuksia. Säilyvyystutkimuksissa tutkitaan valmisteen vaikuttavan aineen pitoisuutta ja hajoamistuotteita, kriittisten tekijöiden, (kuten lämmön, valon ja kosteuden) vaikutusta valmisteeseen sekä valmisteen steriiliyttä. Sairaala-apteekkien mahdollisuuksia steriilien kipulääkeseosten säilyvyystutkimuksiin tulisi lisätä. Etenkin pitoisuusmittauksiin tarvittavat kalliit ja erityisosaamista vaativat laitteet sekä henkilökuntaresurssit rajoittavat säilyvyystutkimusten määrää.

Kokeellisessa osassa tutkittiin epiduraaliseen kivunlievitykseen käytettävien fentanyyli-levobupivakaiini -ruiskujen kemiallista, fysikaalista ja mikrobiologista säilyvyyttä. Kemiallista säilyvyyttä tutkittiin Oulun kemian laitoksen kehittämällä UPLC-MS -menetelmällä. Fysikaalista säilyvyyttä tutkittiin seuraamalla liuosten pH-arvoja, massan vaihtelua ja ominaisuuksia aistinvaraisesti. Mikrobiologista säilyvyyttä tutkittiin Oulun NordLabin Stert2-steriiliystutkimuksella.

Fentanyyli-levobupivakaiini -kipulääkeseoksen todettiin säilyvän steriilinä 28 vuorokautta huoneenlämpötilassa. UPLC-MS -menetelmän luotettavuus ei kuitenkaan riittänyt kipulääkeseoksen kemiallisen säilyvyyden osoittamiseen. Fysikaalisen säilyvyyden osalta liuosten ulkonäössä ei havaittu muutosta ja ruiskujen massat täyttivät niille asetetut hyväksymiskriteerit. Liuosten pH-arvoja ei saatu mitattua luotettavasti johtuen laboratoriovirheestä tutkimuksen alussa. Tutkimuksesta saatuja tuloksia voidaan pitää suuntaa antavina, mutta tutkimus tulee uusia kipulääkeseoksen säilyvyyden osoittamiseksi. Uusintatutkimusta varten menetelmä tulee validoida ja osoittaa sen kyky erottaa ja määrittää lääkeaineiden lisäksi niiden mahdollisia hajoamistuotteita.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND, Faculty of Health Sciences

School of Pharmacy

Master of Science in Pharmacy program

Pharmaceutical Technology

PAULA FILPPULA, H: Stability of Sterile Analgesic Admixtures Compounded in Hospital Pharmacy

Master's thesis, 99 p, 1 appendices (9 p.)

Supervisors: University Lecturer Tarja Toropainen, Postdoctoral Researcher Miia Turpeinen, Chief pharmacist Sirpa Ämmälä

May 2016

Keywords: stability, analgesics, sterility, hospital pharmacy, risk assessment

Compounding of sterile preparations is one of the most challenging assignments in hospital pharmacy. Sterile analgesic admixtures are prepared under aseptic conditions by compounding commercial analgesic preparations. The aim for compounding analgesics (with different mechanisms of pain relief) is to decrease the dose of single analgesic and minimize the possibility of adverse events. Due to the parenteral route of administration and the potency of analgesics used (local anaesthetics and opioids) there are many risks related to pharmacy-compounded sterile analgesic admixtures. The purpose of stability testing is to provide evidence of quality, safety, and efficacy of admixtures.

In the literary part of this thesis, chemical, physical and microbiological stability studies are discussed. Stability studies include: determining the concentration of analgesics and their degradants, following the impact of critical factors such as temperature, light and humidity on a product and testing of sterility. Requirements of hospital pharmacies for testing sterile analgesic admixtures should increase. The amount of stability studies performed can be limited by factors such as expense, having access to analysis equipment, having enough personnel available, as well as having personnel with the specialized training necessary to operate the analysis equipment.

The experimental part of this thesis deals with the chemical, physical and microbiological stability of epidural analgesic admixtures of levobupivacaine and fentanyl stored in syringes. Chemical stability was analysed by UPLC-MS -method developed by the Department of Chemistry at the University of Oulu. Physical stability was tested by determining pH, mass and organoleptic properties of the admixtures. Microbiological stability was studied using the Stert2-sterility test of NordLab Oulu.

Fentanyl-levobupivacaine admixtures remained sterile at room temperature over 28 days. Chemical stability could not be determined using the UPLC-MS -method due to insufficient validation. There were no changes in physical appearance of the solutions and the mass of syringes were within the acceptable limits. The pH of the solutions was determined not to be reliable due to an error in the laboratory process at the beginning of the study. This stability study should be repeated using a validated method of analysis to investigate stability of the studied solutions. However, the results of this research can still be considered indicative. In a new stability study, the method used should be first validated, and the method should then be able to demonstrate the ability to separate and determine analgesics and their degradants.

ESIPUHE

Tämä opinnäytetyö on tehty Itä-Suomen yliopiston farmasian laitoksella farmasian teknologian oppiaineessa. Pro-gradu -tutkielma suoritettiin yhteistyössä OYS sairaala-apteekin sekä Oulun yliopiston (farmakologian ja toksikologian yksikön ja kemian laitoksen) kanssa. Ohjaajinani toimivat Tarja Toropainen, Miia Turpeinen ja Sirpa Ämmälä, joita haluan kiittää tästä mahdollisuudesta sekä kannustavasta ja asiantuntevasta ohjauksesta. Lisäksi haluan kiittää proviisori Helena Vannista sekä tutkijoita Toni Lassilaa ja Ari Turpeista yhteistyöstä tämän projektin aikana.

Kiitokset myös vanhemmilleni, ystävilleni ja työkavereilleni avusta ja kannustuksesta.

Erityiskiitos kuuluu puolisololleni Mikolle ja tyttärilleni Kiiralle, lidalle ja Siirille tuesta ja kannustuksesta opinnäytetyön aikana.

Oulussa 22.5.2016

Paula Filppula

KÄYTETYT LYHENTEET

APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization, Normaali-ilmanpaine kemiallinen ionisaatio
CEC	Capillary electrochromatography, kapillaarielektrokromatografia
CSPs	Compounded sterile preparations, Steriilit omavalmisteet
DAD	Diode array detector, Diodirividetectori
ESI	Electrospray Ionization, Sähkösumutus-ionisaatio
GMP	Good Manufacturing Practice, Lääkkeiden hyvät tuotantotavat
HPLC	High performance liquid chromatography, Korkean erotuskyvyn nestekromatografia
HPTLC	High performance thin layer chromatography, Korkean suorituskyvyn ohutkerroskromatografia
ICH	The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
MS	Mass spectrometry, Massaspektrometria
NRS	Numerical rating scale, Numeerinen asteikko
NTU	Nephelometric turbidity unit, Nefelometrinen sameusyksikkö
PCA	Patient controlled analgesia, Potilaan ohjaama kivunhallinta
Ph. Eur.	The European Pharmacopoeia, Euroopan farmakopea
PIC/S GPP	The Pharmaceutical Inspection Convention and Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme, Guide to good preparation practices
QbD	Quality by Design, "Laatua suunnittelulla"
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography, Erittäin suuren erotuskyvyn nestekromatografia
USP	United States Pharmacopeia
UV/Vis	Ultraviolet/visible, Ultravioletti/näkyvä valo
VAS	Visual analogue scale, Kipujana
VRS	Verbal rating scale, Sanallinen arvio/asteikko
WHO	World Health Organization

SISÄLTÖ

TIIVISTELMÄ

ESIPUHE

KÄYTETYT LYHENTEET

I KIRJALLINEN OSA

1	JOHDANTO.....	1
2	SAIRAALA-APTEEKISSA VALMISTETTAVAT STERIILIT KIPULÄÄKESEOKSET	3
2.1	Kivun hoidon käytännöt ja suositukset.....	4
2.2	Kipulääkkeiden annostelureiitit.....	5
2.3	Steriileissä kipulääke-seoksissa käytettävät lääkeaineet.....	7
2.4	Steriileihin kipuseoksiin liittyvät riskitekijät.....	9
2.5	Riskienhallinta	12
3	STERIILIIEN KIPUSEOSTEN SÄILYVYYDEN TUTKIMINEN	14
3.1	Säilyvyyteen vaikuttavat tekijät.....	15
3.2	Kelpoisuusajan määrittäminen	17
3.3	Kemiallisen säilyvyyden tutkimusmenetelmät.....	18
3.3.1	Kromatografia ja elektroforeesi	21
3.3.1.1	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia	22
3.3.1.2	Kapillaarielektroforeesi	25
3.3.1.3	Korkean suorituskyvyn ohutkerroskromatografia.....	27
3.3.1.4	Kapillaarielektrokromatografia	28
3.3.2	Spektrometria.....	29
3.3.2.1	Ultravioletti ja näkyvän valon -spektrofotometria	29
3.3.2.2	Massaspektrometria	31
3.4	Fysikaalisen säilyvyyden tutkimusmenetelmät	35
3.4.1	Aistinvarainen tutkimus	35
3.4.2	Nefelometri ja turbidimetri	35
3.4.3	Gravimetria	36
3.4.4	pH-määrittäminen.....	37
3.4.5	Yhteensopimattomuudet valmisteen ja pakkausmateriaalin välillä.....	39
3.5	Mikrobiologisen säilyvyyden tutkimusmenetelmät	40

3.5.1	Steriliytesti	41
3.5.2	Endotoksiinitesti	42
4	YHTEENVETO	43

II KOKEELLINEN OSA

5	JOHDANTO	44
6	TYÖN TARKOITUS	46
7	TEOREETTINEN TAUSTA	47
7.1	Fentanyyli	47
7.2	Levobupivakaiini	48
7.3	Fentanyylin ja levobupivakaiinin säilyvyys	49
8	MENETELMÄN KUVAUS	51
8.1	Materiaalit	51
8.2	Kipulääkeseosten valmistus	52
8.2.1	Ruiskujen määrä ja säilytysolosuhteet	52
8.2.2	Mittausaikapisteet	53
8.2.3	Laatuvaatimukset	54
8.3	Kemiallisen säilyvyyden tutkiminen	55
8.3.1	Menetelmän luotettavuus	55
8.3.2	Näytteiden valmistus	55
8.3.3	Standardien valmistus	56
8.3.4	Mittauslaitteisto	57
8.3.5	Ajo-olosuhteet	58
8.3.6	Tulosten laskeminen	58
8.4	Fysikaalisen säilyvyyden tutkiminen	59
8.4.1	Aistinvarainen tutkimus	59
8.4.2	pH-määritys	59
8.4.3	Gravimetrinen määritys	59
8.5	Mikrobiologisen säilyvyyden tutkiminen	60
9	TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	61
9.1	Menetelmän kehitys	61
9.2	Menetelmän luotettavuuden mittaaminen	64

9.3	Kemiallinen säilyvyys.....	68
9.4	Fysikaalinen säilyvyys	71
9.4.1	Aistinvarainen tutkimus	71
9.4.2	pH-määrittäminen.....	71
9.4.3	Gravimetrinen määrittäminen.....	73
9.4.4	Ruiskujen säilytysolosuhteiden seuranta	73
9.5	Mikrobiologinen säilyvyys	74
10	YHTEENVETO	75
11	POHDINTA.....	77

LÄHTEET

LIITTEET

I KIRJALLINEN OSA

1 JOHDANTO

Sairaala-apteekissa valmistetaan monenlaisia kipulääkeseoksia potilaille, jotka eivät saa apua kaupallisista valmisteista tai tarvitsevat hoitoonsa yksilöllisiä ratkaisuja (Timko 2015). Sairaala-apteekin valmistamilla steriileillä kipuseoksilla hoidetaan vaikeita akuutteja kiputiloja kuten leikkauksen jälkeistä kipua, synnytyskipua, iskeemistä kipua tai traumaa (Salomäki ja Nuutinen 1998, Kokki 2015). Steriilit kipuseokset sisältävät vahvoja opioideja ja pitkäaikaisesti niitä tulisi käyttää vain syöpäkipun ja tiettyjen neuropaattisten kiputilojen hoitoon, sillä näyttö opioidien tehosta on muilta osin epäselvä (Kipu: Käypä hoito -suositus 2015). Steriilien kipulääkeseosten lisäksi sairaala-apteekissa valmistetaan kipupotilaille muun muassa kodeiinifosfaattikapseleita, morfiinoraaliliuoksia ja kapsaisiinivoiteita (Kontra 2005).

Steriilien lääkkeiden valmistaminen on yksi sairaala-apteekin haasteellisimpia tehtäviä (Helin-Tanninen 2005). Steriilit kipulääkeseokset valmistetaan aseptisesti sekoittamalla keskenään steriilejä tehdasvalmisteisia tuotteita (eng. compounded sterile preparations, CSPs) (USP Pharmacists' Pharmacopeia 2nd Ed. <797>). Valmisteen laatu rakennetaan tuotteeseen jo valmistuksen aikana hyviä tuotantotapoja noudattamalla (GMP 2016). Laatu luodaan laadunvarmistuksella, johon kuuluvat muun muassa koulutettu ja osaava henkilökunta, käyttötarkoistukseensa sopivat tilat ja laitteet, dokumentaatio, laatuvaatimukset täyttävät raaka-aineet ja pakkausmateriaalit, valmisteen suunnittelu- ja valmistusprosessi, riskinarvioinnin avulla suoritettavat laadunvalvontatoimenpiteet, validointi ja erän käyttöön vapauttamiseen liittyvät toimenpiteet (Fimean määräys 6/2012, Fimean määräys 6/2011, GMP 2016, PIC/S 2008).

Lääkkeiden säilyvyytutkimusten tarkoitus on varmistaa, että lääkkeet pysyvät tehokkaina, turvallisina ja laadukkaina koko niille suunnitellun käyttöajan (ICH Q1A(R2) 2003). Lääkevalmisteiden säilyvyys koostuu useista toisistaan riippuvaisista osakokonaisuuksista ja sen vuoksi säilyvyytutkimuksissa ei tutkita ainoastaan

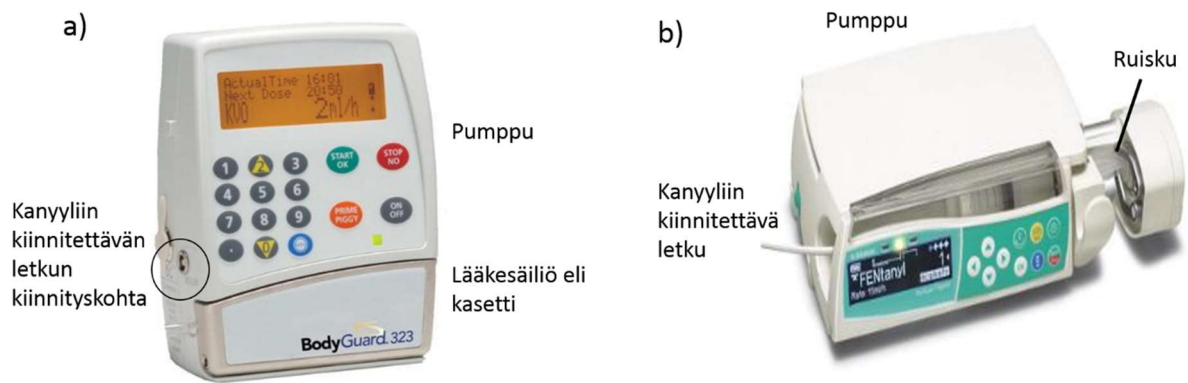
vaikuttavan aineen pitoisuutta vaan kaikkia säilyvyyteen vaikuttavia osatekijöitä (Yoshioka ja Stella 2002). Säilyvyytutkimuksissa huomioidaan kriittisten tekijöiden, kuten lämpötilan, valon ja kosteuden vaikutukset valmisteeseen (ICH Q1A(R2) 2003). Myös valmisteen mikrobiologinen säilyvyys on keskeinen säilyvyyden osa-alue, erityisesti steriiliyttä vaativien valmisteiden kohdalla (GMP 2016).

Tässä kirjallisuuskatsauksessa tarkastelen steriileille kipulääkeseoksille (ex tempore ja omat lääkevalmisteet) tehtäviä kemiallisia, fysikaalisia ja mikrobiologisia säilyvyytutkimuksia. Lisäksi käsittelen steriileihin kipuseoksiin liittyviä riskejä ja säilyvyyteen vaikuttavia tekijöitä.

2 SAIRAALA-APTEEKISSA VALMISTETTAVAT STERIILIT KIPULÄÄKESEOKSET

Vaikean kivun hoidossa riittävä kivunlievitys saavutetaan käyttämällä erilaisten lääkeaineiden yhdistelmää (Kipu: Käypä hoito -suositus 2015). Suurin osa kipupotilaista saa avun käyttämällä yhtä tai useampaa kaupallista tehdasvalmisteista kipulääkettä (Kontra ym. 2005). Joskus kivunhoitoon tarvitaan yksilöllisiä potilaskohtaisia valmisteita, kuten infuusiona tai injektiona annosteltavia steriilejä kipulääkeseoksia, joilla ei ole myyntilupaa Suomessa (Duodecim lääketietokanta 2015, Kontra ym. 2005). Kun tarvittavia valmisteita ei löydy kaupallisesta valikoimasta, sairaala-apteekki täydentää teollista valikoimaa ex tempore- ja omilla lääkevalmisteilla (Timko 2015). Steriilit kipulääkeseokset ovat pääasiassa ex tempore -valmisteita, jotka ovat potilaskohtaisia, tilauksesta valmistettavia, lääkevalmisteita (Fimean määräys 6/2011). Omat lääkevalmisteet valmistetaan apteekin varastoon. Sairaala-apteekissa valmistettavien ex tempore- ja omien lääkevalmisteiden tehtävä on turvata potilaiden lääkitystarpeet sekä vastata hoidossa tarvittaviin potilaskohtaisiin erityistarpeisiin (Committee of Ministers of the Council of Europe 2011).

Steriilien kipuseosten valmistamiseen kuuluu oleellisesti erilaisten infuusiopumppujen täyttö (kuva 1), joiden avulla kipulääkeseokset annostellaan potilaalle (Kontra 2005). Infuusiopumppu voi olla paine-eroon tai painovoimaan perustuva kertakäyttöinen pumppu tai uudelleentäytettävä sähköllä tai paristolla toimiva pumppu. Infuusiopumput täytetään laittamalla lääkeaineseokset pumppuihin soveltuviin ruiskuihin, säiliöihin, infuusioliuospusseihin tai -pulloihin. Infuusiopumpun avulla potilas saa kipulääkeinfuusiota potilaskohtaisesti ohjelmoitujen asetusten mukaisesti (Momeni 2006). Osa infuusiopumpuista sisältää toiminnon, jonka avulla läpilyöntikivusta eli äkillisesti ajoittain pahenevasta kivusta kärsivä potilas voi painaa ylimääräisiä kipulääkeannoksia pumppuun asetetun lukitusajan puitteissa (eng. patient controlled analgesia, PCA).



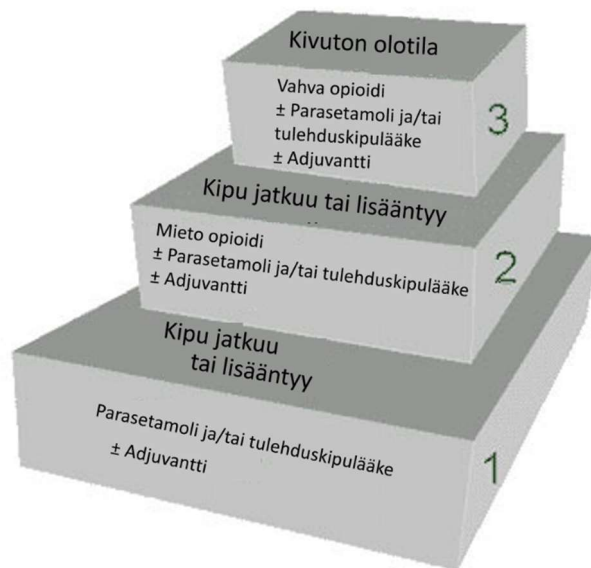
Kuva 1. Erilaisia infuusiopumppuja: a) Mukana (esim. vyötäröllä) kuljetettava PCA infuusiopumppu b) PCA ruiskupumppu (B.Braun 2016)

2.1 Kivun hoidon käytännöt ja suositukset

Kivun hoidossa tavoitteena on hyvä kivunlievitys, potilaan hyvinvoinnin kohentaminen ja sivuvaikutusten minimointi (Kipu: Käypä hoito -suositus 2015). Kivun hoidon edellytyksenä on kivun säännöllinen arviointi, joka perustuu potilaan omaan arvioon kivun voimakkuudesta. Kivun voimakkuus arvioidaan kipujanana (VAS), numeroasteikon 1-10 (NRS), sanallisen asteikon (lievä-kohtalainen-kova-sietämätön kipu) (VRS) tai kasvokuvien avulla. Lisäksi potilas arvioi kivun sijaintia, esiintymisaikaa sekä vaikutusta toimintakykyyn, nukkumiseen ja mielialaan. Kipupotilaan hoidon suunnittelu perustuu kokonaisvaltaiseen arvioon, joka sisältää liikkuvuuden ja toiminallisuuden lisäksi arviot potilaan psyykestä, liikuntakyvystä ja käyttäytymisestä. Potilaille pyritään tarjoamaan monialaista ja moniammatillista hoitoa, johon lääkityksen lisäksi kuuluu psykologisia kivunhallintakeinoja, yleistä elämänhallintaa ja fysioterapiaa.

Lääkkeellinen kivunhoito perustuu Maailman terveysjärjestön WHO:n kivunhoitomalliin (kuva 2), jossa lääke valitaan kivun voimakkuuden mukaisesti (WHO 2015). Kolmiportaisen mallin alimmalla tasolla on lievään kipuun käytettävät tulehduskipulääkkeet (esim. ibuprofeeni, naprokseeni, diklofenaakki tai etorikoksibi) ja adjuvantit (aine, joka vahvistaa toisen aineen vaikutusta, esim. klodiniini tai ketamiini). Kivun lisääntyessä siirrytään hoidossa toiselle tasolle, johon kuuluvat ensimmäisen tason lääkkeiden lisäksi miedot opioidit, kuten kodeiini ja tramadoli. Ylimmän tason

lääkkeillä hoidetaan vaikeaa kipua ja edellä mainittujen lääkkeiden lisäksi käyttöön otetaan myös vahvat opioidit (morfiini, oksikodoni, fentanyyli, hydromorfon ja metadoni). Jos yhdellä lääkkeellä ei saavuteta riittävää kivunlievitystä, hoitoa jatketaan yhdistelemällä kipulääkkeitä, joiden vaikutusmekanismit ja sivuvaikutukset ovat erilaisia (Kipu: Käypä hoito -suositus 2015). Tavoitteena on kunkin lääkkeen sopiva annostus kivunlievityksen lisäämiseksi ilman esiintyviä sivuvaikutuksia.



Kuva 2. WHO:n kolmiaskelmaiset kipuportaavat (Muokattu lähteestä WHO 2015)

2.2 Kipulääkkeiden annostelureitit

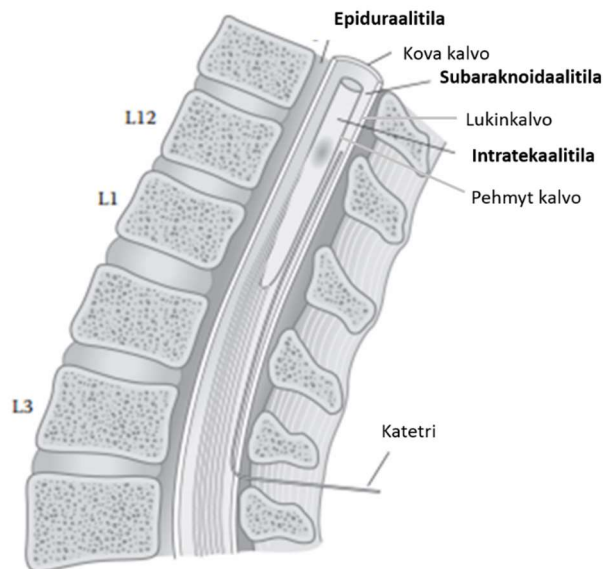
Oraalinen (suun kautta) antotapa on kivunlievityksessä suositeltavin, sillä se on luonnollinen, joustava, turvallinen ja usein taloudellisin (Moscou ja Snipe 2012). Kipua hoidetaan myös transdermaalisesti, intramuskulaarisesti, subkutaanisesti, intravenoosisesti, rektaalisesti ja sublinguaalisesti annosteltavilla kaupallisilla kipulääkkeillä ja oheislääkkeillä. Oheislääkkeellä tarkoitetaan lääkettä, jolla ei sinänsä ole varsinaista kipua poistavaa vaikutusta, mutta edesauttaa kivun lievittymiseen (Keinänen ja Järvimäki 2004). Esimerkiksi loratsepaamia voidaan käyttää levottoman tai ahdistuneen kipupotilaan oheislääkkeenä. Osalla potilaista kipu ei lieydy riittävästi tai potilas saa vaikeita sivuoireita, jolloin kipu hoidetaan sairaala-apteekissa yksilöllisesti valmistetulla kipulääkevalmisteella. Usein sairaala-apteekissa valmistettu

vaikeisiin kiputiloihin tarkoitettu steriili kipulääkeseos annostellaan potilaalle jatkuvana infuusiona infuusiopumpun avulla, joka soveltuu subkutaaniseen, intravenoosiin ja selkäydinalueelle tapahtuvaan annosteluun (Kontra 2005). Pitkäaikaisinfuusion etuja ovat pienempi tarvittava lääkeainemäärä ja tasaiset lääkeainepitoisuudet, lisäannosten antomahdollisuus ja pistokertojen väheneminen (Keinänen ja Järvimäki 2012). Huonoja puolia ovat infuusiopumppujen kallis hinta, mahdollinen potilaan liikkuvuuden rajoittuminen ja ihon ärtyvyys. Lisäksi parenteraalisen lääkkeen annosteluun liittyy suurempi yliherkkyysoireiden riski kuin suun kautta tapahtuvaan annosteluun.

Intravenoosisella antotavalla lääkeaineen vaikutus saavutetaan nopeasti. Sitä käytetään, kun potilaan perifeerinen verenkierto on huono tai hän saa iho-ongelmia subkutaanisen kanyylin kohdalle (Keinänen ja Järvimäki 2012). Infuusiopumpulla laskimoon annosteltavat opioidit ovat yleisemmin käytössä lyhytaikaisessa kivunhoidossa kuten leikkauksen aiheuttamassa kivussa. Kun tarvitaan pidempää kivunhoitoa tai intravenoosinen annostelu ei ole mahdollinen, annostellaan lääkeaineseos subkutaanisesti. Fentanyylilaastari ja läpilyöntikivun hoitoon tarkoitettut fentanyyliä sisältävät valmisteet kuten resoribletti (Abstral[®]) ja bukkaalikalvo (Breakyl[®]) ovat osittain vähentäneet ihonalaisen infuusion käyttöä. Sekä resoribletin että bukkaalikalvon käyttö on rajattu kiputilojen pahenemisen hoitoon syöpäsairauksien yhteydessä (Duodecim lääketietokanta 2016).

Selkäydinalueelle tapahtuvaan annosteluun siirytään, kun systeemisillä antotavoilla ei saavuteta enää riittävää kivunlievitystä, annos kasvaa liian suureksi tai kun suuri annos aiheuttaa vaikeita sivuvaikutuksia (Keinänen ja Järvimäki 2012). Selkäydinalueelle annosteltavalla kipuseoksella saavutetaan tehokas kivuntunnon häviäminen tai heikkeneminen (segmentaalinen analgesia) (Salomäki ja Nuutinen 1998). Annostelu selkäydinalueella voi tapahtua epiduraalitilaan (luukanavan ja kovakalvon väliseen tilaan), intratekaalitilaan (selkäydinkanavaan) tai subaraknoidaalitilaan (lukinkalvonalaan tilaan) (kuva 3). Epiduraalista annostelua suositellaan lyhytaikaiseen (viikkoja) kestävään kivunhoitoon (Heiskanen 2012). Intratekaalinen ja subaraknoidaalinen antotapa soveltuvat paremmin kuukausia tai vuosia kestävään annosteluun, sillä niihin liittyy pitkäaikaisessa käytössä epiduraalista annostelua

vähemmän tekniikasta johtuvia ongelmia, kuten katetrin tukkeutumista (Keinänen ja Järvimäki 2012). Intratekaalisen tai subaraknoidaalisen reitin valintaa puoltaa myös pienempi kipulääkeannos ja infuusiotilavuus epiduraaliseen annosteluun verrattuna, jolloin infuusiopumpun lääkeainesäiliön vaihtoväli on pidempi.



Kuva 3. Selkäydinalueen rakenne (Muokattu lähteestä Jose ym. 2014)

2.3 Steriileissä kipulääkeseoksissa käytettävät lääkkeaineet

Sairaala-apteekissa valmistettavat steriilit kipuseokset ovat vahvoja opioideja sisältäviä valmisteita (Kontra 2005, Salomäki ja Nuutinen 1998, Kokki 2015). Opioidit estävät kivun välittymistä aivoissa ja selkäytimessä (analgeettinen vaikutus) sekä lisäävät hyvänolon tunnetta (euforisoiva vaikutus) (Kalso 2001). Vahvoja opioideja ovat morfiini, oksikodoni, fentanyl, hydromorfoni ja metadoni.

Tehokkain tapa hoitaa äkillistä akuuttia kipua on yhdistää opioidi paikallispuudutteeseen, jolloin molempien lääkeaineiden pitoisuutta voidaan pienentää ja vähentää haittavaikutuksia (Kontra 2005). Puudutteet aiheuttavat kivuttomuuden ja tunnottomuuden salpaamalla hermopäätteiden solukalvojen ionikanavia (Pere 2001). Kipuseoksissa käytettäviä puuduteaineita ovat bupivakaiini, ropivakaiini ja levobupivakaiini.

Tarvittaessa kivun hoitoa tehostetaan lisäämällä opioidin ja puuduteaineen seokseen ns. adjuvantti-lääkeainetta kuten klodiniinia, ketamiinia tai adrenaliinia, jotka vahvistavat opioidin ja puuduteaineen vaikutusta (Salomäki ja Nuutinen 1998, Jäppinen 2005). Klodiniini ja adrenaliini ovat alfa-2-adrenenergisia agonisteja. Klodiniini pidentää opioidin ja puudutteen vaikutusaikaa ja vähentää toleranssin kehittymistä opioideille. Adrenaliini vähentää opioidin ja paikallispuudutteen tarvetta ja lisää niiden voimakkuutta hidastamalla lääkeaineiden absorptiota verenkiertoon. Ketamiini on N-metyyli-D-aspartaatti (NMDA) -reseptorin antagonistti, joka estää sentraalista herkistymistä kivulle. Subkutaanisessa annostelussa voidaan opioidin lisäksi antaa erilaisia oheislääkkeitä kun hoidetaan esimerkiksi syöpäpotilaan pahoinvointia (syklitsiini) tai levottomuutta (loratsepaami). Suomalaisissa sairaalapteekissa valmistettavia steriilejä kipulääkeseoksia ja niillä hoidettavia kiputiloja on koottu taulukkoon 1.

Opioidien vaarallisin sivuvaikutus on hengityslama (Kalso 2001). Hengityslama aiheutuu opioidin kulkeutumisesta aivorungon hengityskeskukseen joko selkäydinnesteen mukana tai imeytyttyään verenkiertoon (Salomäki ja Nuutinen 1998). Epiduraalisesti annosteltavien opioidien haittavaikutuksia ovat myös virtsaretentio ja kutina. Muut opioideille tyypilliset sivuvaikutukset kuten pahoinvointi, uneliaisuus ja suoliston lama tulevat voimakkaammin esiin systeemistä annostelua käytettäessä. Puudutusaineiden sivuvaikutukset johtuvat yleensä turvallisen annostason ylittymisestä (Pere 2001). Sivuvaikutukset vaihtelevat eri puudutteiden välillä, esimerkiksi bupivakaiini on sydäntoksisempi kuin lidokaiini. Puuduteaineiden sivuvaikutuksia ovat keskushermosto-oireet, verenkiertoelimistön toimintahäiriöt ja vakavassa tilanteessa tajuttomuus sekä hengityksen ja verenkierron lama.

Taulukko 1. Steriilejä kipulääkeseoksia ja niiden indikaatioita

Steriili kipulääkeseos	Annostelutapa	Indikaatio	Edut
opioidi + puudute	epiduraalinen	synnytyskipu, leikkauksen jälkeinen kipu, iskeeminen kipu ja trauma	voidaan pienentää yksittäisten lääkeaineiden pitoisuuksia ja vähentää haittavaikutuksia
opioidi + puudute + klodiniini	epiduraalinen, intratekaalinen	leikkauksen jälkeinen kipu, syöpäkipu, neuropaattinen kipu	klodiniini pidentää opioidin ja puudutteen vaikutusaikaa ja vähentävää toleranssin kehittymistä opioideille
opioidi + puudute + ketamiini	subkutaaninen, epiduraalinen, intratekaalinen	syöpäkipu, neuropaattinen kipu	ketamiini estää sentraalista herkistymistä kivulle
opioidi + puudute + adrenaliini	epiduraalinen	leikkauksen jälkeinen kipu	adrenaliini lisää opioidin ja paikallispuudutteen tehoa ja vähentää opioidin tarvetta
opioidi + loratsepaami tai midatsolaami tai levopromatsiini tai syklitsiini tai glykopyrrolaatti	subkutaaninen	syöpäkipu	hoidettaessa levottomuutta, ahdistuneisuutta, masennusta, pahoinvointia, oksentelua, limaneritystä, vatsakoliikkeja tai suolitukosta

Lähde: Kokki 2015, Keinänen ja Järvimäki 2004, Kontra 2005, Salomäki ja Nuutinen 1998

2.4 Steriileihin kipuseoksiin liittyvät riskitekijät

Koska sairaala-apteekissa valmistetuilla kipulääkeseoksilla ei ole myyntilupaa, niiden matka tuotekehittelystä käyttövalmiiksi saatetuksi valmisteeaksi sisältää merkittävän

määrän erilaisia riskitekijöitä. Kriittisiä työvaiheita ja niihin liittyviä riskejä on koottu taulukkoon 2.

Suurin vaaratekijä aseptisesti valmistettaville steriileille tuotteille on niitä valmistava työntekijä (Laakso 2001). Jos työntekijä voitaisiin sulkea pois aseptisestä työstä, kontaminaatoriski pienenesi 90-95 %. Työskentelyssä käytettävät välineet voidaan steriloida ja ilma suodattaa, mutta työntekijää ei voi saada mikrobittomaksi. Työntekijä vaikuttaa valmisteen laatuun myös tietotaidollaan ja toimintatavoillaan. Työntekijän on tunnettava aseptiset työmenetelmät, hallittava ruiskujen ja infuusiopumppujen käyttö sekä toimittava lääkkeiden hyvien tuotantotapojen (GMP) mukaisesti (GMP 2016, Kontra 2005). GMP-ohjeilla tarkoitetaan niitä lääkkeenvalmistuksen ja laadunvarmistuksen järjestelyjä ja menettelytapoja, joilla varmistetaan, että lääkkeiden valmistus täyttää sille asetetut vaatimukset. Kontaminoitunut valmiste tai lääkkeenvalmistuksessa tapahtunut laskuvirhe voivat aiheuttaa potilaalle vakavan haitan, sillä parenteraalisessa annostelussa ohitetaan monia elimistön puolustusmekanismeja ja monien potilaiden vastustuskyky on heikentynyt. Vuonna 2013 tehdyssä raportissa tarkastellaan yhdysvaltalaisissa sairaala-apteeekeissa ja sopimusvalmistusyksiköissä steriilien seosten valmistuksen aikana tapahtuneita vakaviin haittoihin ja kuolemiin johtaneita virheitä (Myers 2013). Vuonna 2012 New Englandilaisessa sopimusvalmistusyksikössä valmistettiin ja vapautettiin myyntiin 3 erää säilöntäaineettomia metyyliiprednisoloni-injektioita, jotka aiheuttivat 750 infektiota ja johtivat 51 ihmisen menehtymiseen maaliskuun loppuun 2013 mennessä. Kontaminoituneet injektiot aiheuttivat aivokalvontulehduksia, aivohalvauksia, selkärangan ympärillä olevia ja periferiaan liittyviä infektiota. Yhdysvaltalaisissa sairaala-apteeekeissa valmistuksen aikana kontaminoituneet silmätipat aiheuttivat 33 sieniperäistä silmäinfektiota vuonna 2012, joista osa johti sokeutumiseen. Vuonna 2011 pakkaamisen aikana kontaminoituneet silmätipat aiheuttivat 16 silmäinfektiota ja samana vuonna 9 potilasta kuoli kontaminoituneen parenteraalisen ravintoliuoksen seurauksena. Sairaala-apteekissa tapahtuneet laskuvirheet muun muassa injektioiden valmistuksessa johtivat 5 ihmisen kuolemaan vuosina 2006–2007. Virheet olivat tapahtuneet liuosten laimennuksissa ja desimaalipilkun käytössä.

Sairaala-apteekissa valmistettavat steriilit kipulääkeseokset kuuluvat korkean riskin valmisteisiin sekä parenteraalisen antotavan että niiden sisältämien lääkeaineiden (opioidien ja puudutteiden) vuoksi (Institute for Safe Medication Practices 2015, Committee of Ministers of the Council of Europe 2011). Korkean riskin lääkeaineet ja -valmisteet ovat lääkkeitä, jotka aiheuttavat merkittävää haittaa käyttäjälleen mikäli niiden käytössä tai valmistuksessa tapahtuu virhe ja laadituista ohjeista poiketaan. Steriilien kipulääkeseosten tuotekehittelystä vastaavalta proviisorilta ja lääkäriltä vaaditaan lääkeaineiden ja pakkausmateriaalien yhteensopimattomuuksien hallitsemista, mutta myös lääkeaineiden kemiallisen, fysikaalisen ja mikrobiologisen säilyvyyden tuntemista.

Steriilin riskilääkkeen valmistaminen, varastointi, merkitseminen, käyttökuntoon saattaminen ja anto potilaalle vaativat poikkeuksellista huolellisuutta (Fimean määräys 6/2011, Institute for Safe Medication Practices 2015). Myös kipulääkeseoksen käytönaikaiset olosuhteet asettavat oman haasteensa, erityisesti silloin kun säilytysaineetonta lääkeaineliuosta annostellaan usean vuorokauden ajan ja lääkeliuos säilytetään kehon lähellä tavallista korkeammassa lämpötilassa (Kontra ym. 2005).

Taulukko 2. Steriileihin kipulääkeseoksiin liittyviä riskitekijöitä eri vaiheissa

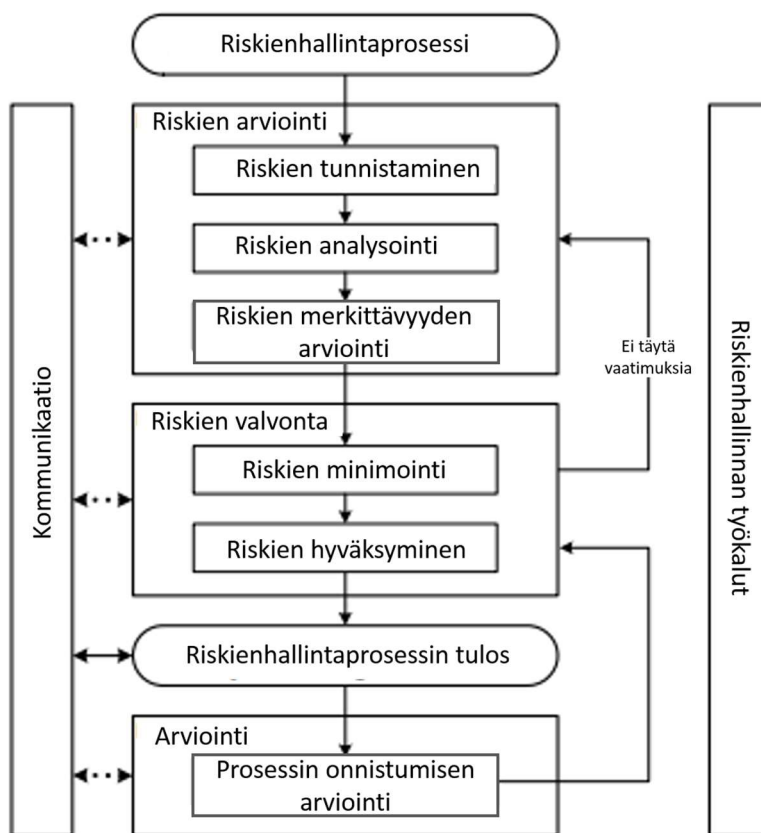
Tuotekehittely	Valmistus	Varastointi ja kuljettaminen osastolle	Käyttö osastolla
Steriilit lähtöaineet	Työntekijän henkilökohtainen hygienia ja terveydentila	Säilytysolosuhteet	Mahdollinen käyttökuntoon saattaminen
Korkean riskitason lääkeaineet (farmakologinen vaikutus ja kapea terapeuttilinen ikkuna)	Pukeutuminen steriiliin puhdistila-asuun ja käsineisiin	Rikkoutuminen	Annostelu potilaalle
Lähtöaineiden ja pakkausmateriaalien yhteensopivuus	Aseptinen työskentely (GMP)	Kestoajat usein lyhyitä	Sairaala potilaat (vastustuskyky heikentynyt)
Säilyvyytustutkimukset	Valmisteen merkitseminen		Infuusiopumpun säilytys potilaan läheisyydessä (lämpötila)
Antoreitin valinta	Inhimilliset virheet (mittaus- ja laskuvirheet)		
	Kontrolloidut aseptiset olosuhteet		

Lähde: Fimean määräys 6/2011, Institute for Safe Medication Practices 2015, Kontra 2005, Laakso 2001

2.5 Riskienhallinta

Lääkevalmisteiden laatu perustuu kattavaan riskienhallintaan, jonka tavoitteena on tunnistaa, arvioida ja hallita ne riskitekijät, jotka vaikuttavat lääkevalmisteen laatuun (kuva 4) (ICH Q9 2005). Riskienhallinta on koko valmisteen elinkaaren mittainen prosessi, joka lähtee liikkeelle ennalta asetetuista tavoitteista ja päämäärästä (eng. Quality by Design, QbD) (ICH Q8(R2) 2009). QbD korostaa farmaseuttisen valmisteen, valmistusprosessin ja prosessikontrollin ymmärrystä tieteeseen ja laaturiskien hallintaan perustuen. Laadukas lopputuote saadaan aikaiseksi suunnittelemalla ennalta lääkkeen farmaseuttinen toteutus ja prosessit niin, että kliinisiin hoitotuloksiin vaikuttavat lääkevalmisteen laatuominaisuudet täyttyvät. Jo harkitessa mahdollista uutta valmistetta, tehdään riskiarvio, jossa arvioidaan kaikkia lopputuotteen laatuun vaikuttavia osatekijöitä kuten raaka-aineita ja pakkausmateriaaleja, valmistusprosessia, laadunvalvontakokeita ja säilyvyyttä. Lisäksi arvioidaan niitä riskitekijöitä, joita valmiste saattaisi aiheuttaa sitä käyttävässä potilasryhmässä. Riskiarviossa lääkevalmiste luokitellaan korkean, kohtalaisen tai matalan riskitason

valmisteeksi (ICH Q9 2005). Riskinarvioinnin pohjalta toteutettaviin laadunvalvontakokeisiin vaikuttavat virheen tapahtumisen todennäköisyys, virheen havaitsemisen todennäköisyys sekä mahdollisen virheen aiheuttamat seuraukset (PIC/S 2008). Lääkkeenvalmistuksen aikaisella laadunvalvontakokeilla mitataan tuotteelle asetettujen vaatimusten täyttymistä. Laadunvalvonnassa käytettävien menetelmien ja valmisteelle asetettujen laatuvaatimusten tulee perustua voimassa olevaan farmakopeaan (Committee of ministers of the Council of Europe 2011). Kun valmiste täyttää sille asetetut vaatimukset, se voidaan hyväksyä käyttöön tai prosessin seuraavaan vaiheeseen (ICH Q9 2005).



Kuva 4. Riskienhallinnan vuokaavio (muokattu lähteestä ICH Q9 2005)

3 STERIILIEN KIPUSEOSTEN SÄILYVYYDEN TUTKIMINEN

Lääkevalmisteiden säilyvyystutkimuksissa täytyy tutkia valmisteiden niitä ominaisuuksia, jotka herkimmin muuttuvat säilytyksen aikana ja todennäköisimmin vaikuttavat valmisteen laatuun, turvallisuuteen ja/tai tehoon (ICH Q1A(R2) 2003). Säilyvyystutkimusten tarkoitus on osoittaa, miten lääkeaineen tai lääkevalmisteen laatu muuttuu ajan kuluessa erilaisten ympäristötekijöiden, kuten lämpötilan, kosteuden ja valon vaikutuksesta. Säilyvyystutkimuksen avulla määritetään valmisteen kesto aika ja suotuisat säilytysolosuhteet. Tutkimuksen tulee kattaa kemiallisen, fysikaalisen sekä mikrobiologisen säilyvyyden määrittäminen. Toistettavien tutkimustulosten saamiseksi säilyvyystutkimuksissa on noudatettava tarkasti säilyvyystutkimusten toteuttamiseen laadittuja ohjeistuksia (Brossard ym. 2013).

Säilyvyystutkimuksissa analysoitavien näytteiden tulee edustaa hyvin tutkittavaa valmistetta (Kontra ym. 2005). Näytteenotossa tapahtuvien tai laitteiston aiheuttamien virhemittausten varalta pitoisuusmittaukset suoritetaan useamman kerran, jolloin poikkeavat tulokset on helpompi havaita. ICH:n ohjeistuksessa uuden lääkeaineen tai valmisteen säilyvyystutkimuksista, ohjeistetaan ottamaan tutkittavasta valmisteesta vähintään 3 rinnakkaista näytettä (ICH Q1A(R2) 2003).

Lääkevalmisteiden säilyvyystutkimuksissa käytettävät analyysimenetelmät on valittava tutkittavan yhdisteen fysikokemiallisten ominaisuuksien mukaan (Brossard ym. 2013). Menetelmien tulee olla validoituja ja säilyvyystutkimuksiin kehitettyjä (eng. stability-indicating) (ICH Q2(R1) 2005, ICH Q1A(R2) 2003). Analyysimenetelmän validoinnilla osoitetaan, että menetelmä sopii käyttötarkoitukseensa (ICH Q2(R1) 2005). Säilyvyystutkimukseen kehitetyllä menetelmällä lääkeaine pystytään erottamaan säilytyksen aikana mahdollisesti muodostuneista hajoamistuotteista (USP Pharmacists' Pharmacopeia 2nd Ed. <1150>). Menetelmä tunnistaa lääkeaineen sekä hajoamistuotteet ja kvantitoi niiden pitoisuudessa tapahtuvia muutoksia ajan funktiona (Brossard ym. 2013). Menetelmän on oltava riittävän herkkä havaitsemaan pienetkin määrät hajoamistuotteita ja erottamaan samankaltaisia rakenteita toisistaan.

3.1 Säilyvyyteen vaikuttavat tekijät

Tietyissä lääkevalmisteissa tapahtuvien muutosten nopeus riippuu olosuhteista, joissa sitä säilytetään (USP Pharmacists' Pharmacopeia 2nd Ed. <1150>). Hajoamisprosessien keskeisinä aiheuttajina ovat lämpötila, valo, suhteellinen kosteus ja happi. Myös hyvin kylmät tai kuivat olosuhteet voivat olla haitallisia (Laakso 2012). ICH:n suositukset säilyvyytutkimuksen aikaisista olosuhteista on koottu taulukkoon 3 (ICH Q1A(R2) 2003).

Taulukko 3. ICH:n suositukset säilyvyytutkimuksen aikaisista olosuhteista

Valmisteelle suunniteltu säilytysmuoto	Tutkimuksen pituus	Valmisteen tutkimuksen aikaiset olosuhteet	Minimi ajanjakso, jolta tutkimusnäyttö vaaditaan
Huonelämpötila	Pitkäkestoinen	25 °C ± 2 °C/60 % RH ± 5 % RH tai 30 °C ± 2 °C/65 % RH ± 5 % RH	12 kuukautta
	Keskimittainen	30 °C ± 2 °C/65 % RH ± 5 % RH	6 kuukautta
	Kiihdytetty	40 °C ± 2 °C/75 % RH ± 5 % RH	6 kuukautta
Jääkaappi	Pitkäkestoinen	5 °C ± 3 °C	12 kuukautta
	Kiihdytetty	25 °C ± 2 °C/60 % RH ± 5 % RH	6 kuukautta
Pakastin	Pitkäkestoinen	-20°C ± 5°C	12 kuukautta

Lähde: ICH Q1A(R2) 2003

Sekä liian korkeat että liian matalat lämpötilat voivat olla haitallisia lääkeaineen säilyvyydelle (Yoshioka ja Stella 2002). Usein lämpötilan nousu kiihdyttää kemiallisia hajoamisreaktioita, mutta myös kylmyys voi aiheuttaa esimerkiksi kiteytymistä ja viskositeetin muutoksia nestemäisissä valmisteissa (Laakso 2012, Yoshioka ja Stella 2002). Lisäksi lääkevalmisteen fysikokemiallinen säilyvyys saattaa olla optimaalinen vain hyvin pienellä lämpötila-alueella, jonka ulkopuolella hajoaminen tapahtuu hyvin nopeasti (Brossard ym. 2013). Jos tutkittavat lääkeaineet eivät hajoa herkästi lämmön vaikutuksesta, säilyvyytutkimukset suoritetaan 25 °C ± 2 °C lämpötilassa (taulukko 3) (ICH Q1A(R2) 2003). Mikäli lääkeaine ei kestä 25 °C lämpötilaa voidaan tutkimus tehdä myös matalissa jääkaappi- tai pakastin lämpötiloissa (5 °C ± 3 °C tai -20 °C ± 5

°C). Lääkeaineiden säilyvyyttä voidaan tutkia myös kiihdytetysti korotetuissa lämpötiloissa ($30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ tai $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$) mikäli lääkeaine kestää korkeita lämpötiloja. Jos tutkimus tehdään ohjeistuksesta poikkeavassa lämpötilassa (esimerkiksi lämpötilassa, jossa valmistetta olisi jatkossa tarkoitus säilyttää) lämpötilaa seurataan säännöllisesti tutkimuksen aikana ja mitattu lämpötila-alue raportoidaan tulosten yhteydessä (Brossard ym. 2013). Lähellä potilaan ihoa säilytettävän valmisteen, kuten esimerkiksi vyötäröllä kuljetettavan infuusiopumpun sisältämän kipulääkeseoksen, säilyvyyttä on tutkittava normaalisäilytysolosuhteiden lisäksi 33 °C :n lämpötilassa.

Hajoaminen valon vaikutuksesta (fotolyysi) on seurausta valon tai säteilyenergian absorboitumisesta lääkevalmisteeseen, jolloin molekyylit virittyvät korkeampaan energiatilaan (Florence ja Attwood 2006). Virittynyt molekyyli voi luovuttaa energiansa säteilynä tai lämpönä, esimerkiksi törmättyään toiseen molekyyliin. Energian vapautuminen voi johtaa hapettumisketjun käynnistymiseen tai muutoin muutoksiin lääkeaineen rakenteessa. Lääke voi hajota myös silloin, kun jokin muu lääkevalmisteen komponentti ottaa vastaan valokvantin, jonka sisältämän energian se pystyy siirtämään lääkeaineelle. Paras tapa suojata lääkevalmiste valon haitallisilta vaikutuksilta on pakata lääkevalmiste valolta suojaavaan pakkaukseen ja säilyttää valmiste pimeässä. Säilyvyystutkimuksissa valonsietoa tutkitaan altistamalla osa tutkittavista näytteistä näkyvää ja UV- valoa tuottavalle keinotekoiselle päivänvalolle ja vertaamalla valmisteessa tapahtuneita fysikokemiallisia muutoksia pimeässä säilytetyissä näytteissä tapahtuneisiin muutoksiin (ICH Q1B 1996).

Myös happi ja ilmankosteus ovat tärkeitä lääkeaineiden ja -valmisteiden säilyvyyteen vaikuttavia tekijöitä (Yoshioka ja Stella 2002). Happi voi johtaa lääkeaineen tai -valmisteen hajoamiseen hapettamalla jotain valmisteen komponenttia. Vesi on usein osatekijänä hapettumiseen johtavissa reaktioissa. Ilmankosteutta mitataan lääkeaineiden ja -valmisteiden säilyvyystutkimuksissa suhteellisena ilmankosteutena, joka ilmaisee paljonko kyseisen ilman kosteus on sen kyllästyskosteudesta. Säilyvyystutkimuksessa lääkeaineiden ja -valmisteiden suhteelliseksi kosteudeksi peruslämpötilassa 25 °C on valittu $60\% \pm 5\%$ (taulukko 3) (ICH Q1A(R2) 2003). Säilyvyystutkimus voidaan tehdä myös tutkimustilan huonekosteudessa, jolloin suhteellista kosteutta seurataan säännöllisesti tutkimuksen aikana (Brossard ym.

2013). Muovi pakkausmateriaalina on puoliläpäisevä ja altistaa pakkauksen sisällön pakkausta ympäröiville olosuhteille (Waterman 2009). Muovin tiheys ja paksuus vaikuttavat hapen ja kosteuden kulkeutumiseen muovin läpi. Kosteuden siirtymiseen vaikuttaa myös ilman suhteellisen kosteuden ero pakkauksen sisä- ja ulkopuolella. Mitä pienempi pakkausta ympäröivän ilman suhteellinen kosteus on verrattuna pakkauksen sisällä olevaan ilmankosteuteen, sitä nopeammin kosteus haihtuu pakkauksen läpi ja sitä nopeammin valmisteen koostumus muuttuu. Esimerkiksi muovisiin pakkausmateriaaleihin pakatut infuusionesteet ovat alttiita hapelle ja ilman kosteudelle. Hapettumista ja haihtumista voidaan pyrkiä estämään pakkaamalla infuusionesteet tiiviiseen sekundaaripakkaukseen esimerkiksi alumiinifolioon ja säilyttämällä asianmukaisissa olosuhteissa.

3.2 Kelpoisuusajan määrittäminen

Myyntiluvallisten lääkevalmisteiden kelpoisuus aika ja säilytysolosuhteet perustuvat hyväksytyihin säilyvyystutkimuksiin (Fimean määräys 3/2013). Fimean lääkevalmistusmääräyksen mukaan myös kaikkiin apteekissa valmistettaviin valmisteisiin tulee olla merkittynä valmisteen viimeinen käyttöpäivämäärä (Fimean määräys 6/2011). Valmistekohtaisilla tutkimuksilla määritetään aika ja olosuhteet, joiden puitteissa lääke on tehokas, turvallinen ja laadultaan moitteeton. Kelpoisuusajojen määrittäminen on tärkeä osa sairaala-apteekkien laadunvarmistusta (Kontra ym. 2005). Omien lääkevalmisteiden ja ex tempore -valmisteiden kelpoisuusajojen määrittäminen poikkeaa toisistaan, sillä ex tempore -valmisteilta ei voida edellyttää yhtä laajoja säilyvyystutkimuksia kuin omilta lääkevalmisteilta (Palmgrén ym. 2012).

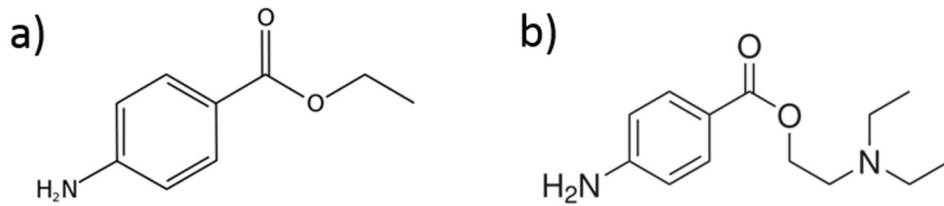
Varastoon valmistettavan oman lääkevalmisteen kelpoisuus aika perustellaan ennakoilmoituksessa, joka toimitetaan Fimealle vähintään kaksi kuukautta ennen valmisteen käyttöön ottamista (Fimean määräys 6/2011). Kelpoisuusajan tulee perustua ensisijaisesti omalle lääkevalmisteelle tehtyihin säilyvyystutkimuksiin. Oman lääkevalmisteen lääke-eräkohtainen laadunvalvonta tehdään valmistuserästä otettavasta näytteestä (Palmgrén ym. 2012). Hyväksytyjen laadunvalvontatulosten varmistumisen jälkeen erä voidaan vapauttaa käyttöön.

Ex tempore -valmisteiden osalta kelpoisuusajan määrittäminen voi olla haastavaa (Palmgrén ym. 2012). Ex tempore -valmistuksessa eräkoot ovat usein pieniä ja lääke annostellaan potilaalle heti valmistamisen jälkeen, joten säilyvyystutkimuksen tulokset eivät ehdi valmistua ajoissa. Kun kelpoisuusajan määrittäminen ei ole mahdollinen säilyvyystutkimuksilla, perustellaan se lääkeaineen säilyvyydestä löytyvien ja yleisten säilyvyyttä koskevien tietojen sekä kirjallisuuden perusteella (Ph. Eur. 8th Ed., USP Pharmacists' Pharmacopeia 2nd Ed. <795>). Perusteluissa tulee huomioida lääkeaineen ominaisuudet, hajoamismekanismit, pakkausmateriaali, suunnitellut säilytysolosuhteet ja arvioitu hoitoaika.

3.3 Kemiallisen säilyvyyden tutkimusmenetelmät

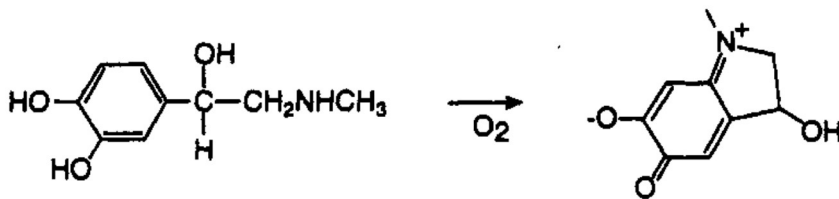
Lääkeaineen kemiallisella säilyvyydellä tarkoitetaan vaikuttavan aineen pitoisuudessa tapahtuvia muutoksia (Yoshioka ja Stella 2002). Kemiallisen hajoamisen seurauksena lääkeaineen rakenne muuttuu, jonka seurauksena valmisteeseen voi muodostua hajoamistuotteita. Sairaala-apteekin omille lääkevalmisteille vaatimuksena on, että vaikuttavan aineen pitoisuuden on pysyttävä 90 – 100 % välillä tavoitearvosta lääkkeen kelpoisuusaikana (USP Pharmacists' Pharmacopeia 2nd Ed. <795>). Säilyvyystutkimuksissa tutkitaan vaikuttavan aineen pitoisuuden lisäksi myös hajoamisen seurauksena mahdollisesti syntyviä hajoamistuotteita säilyvyystutkimukseen kehitetyllä, validoidulla, analyysimenetelmällä (USP Pharmacists' Pharmacopeia 2nd Ed. <1151>).

Lääkeaineen hajoamisreaktio riippuu lääkeaineen kemiallisesta rakenteesta (Yoshioka ja Stella 2002). Tavallisin lääkeaineen hajoamisen reaktiotyyppi on hydrolyysi eli hajoaminen veden vaikutuksesta. Useat lääkeaineet sisältävät hydrolyysille alttiita ester- ja amidisidoksia. Hydrolyysille herkkiä esterisidoksia sisältävät muun muassa puudutusaineet bentsokaiini ja prokaiini (kuva 5). Hydrolyysissa vapautuu happamia ja emäksisiä rakenneosia, jotka voivat olla toksisia tai reaktiivisia aiheuttaen erilaisia jatkoreaktioita (Lapinjoki 2001). Lisäksi ne lähes aina muuttavat valmisteeseen happo-emästasapainoa, mikä voi nopeuttaa lääkeaineen hajoamista.



Kuva 5. Esimerkki esterisidoksen sisältävistä lääkeaineista: a) bentsokaiini ja b) prokaiini

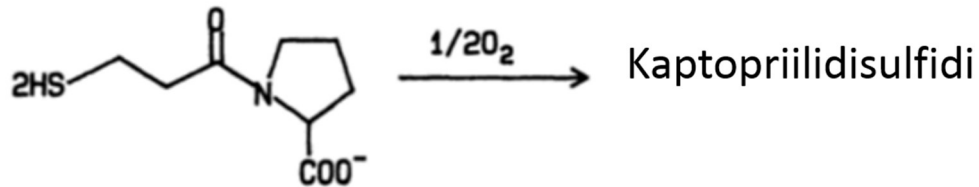
Hapettuminen ilmakehän hapen vaikutuksesta on toinen yleinen lääkeaineiden hajoamista aiheuttava reaktiotyyppi (Yoshioka ja Stella 2002). Helposti hapettuvia lääkeaineita ovat esimerkiksi morfiini ja adrenaliini (kuva 6). Happimolekyylillä on uloimmalla elektronikuorellaan kahden elektronin vajuus, joten se pyrkii pelkistymään kahden arvoiseksi ioniksi. Suurin osa lääkeaineista on pelkistyneessä muodossa, joten ilmassa oleva happi pyrkii hapettamaan niitä itse pelkistyen (Brossard ym. 2013).



Kuva 6. Adrenaliinin hapettuminen (muokattu lähteestä Yoshioka ja Stella 2002)

Myös liuottimena käytetyn veden happipitoisuus on huomioitava, sillä happi liukenee veteen suhteellisen hyvin. Kirjallisuudessa on esimerkki, jossa ampullissa säilytettävä kaptopriililiuos (2 mg / 2 ml) hapettuu nesteeseen liuenneen ja nestepinnan päälle jääneen tyhjän tilan sisältämän hapen vaikutuksesta (Connors ym. 1986). Esimerkissä hapen kokonaismäärä liuoksen päällä olevassa 1 ml:n tilassa on $8,6 \times 10^{-3}$ mmol ja kaptopriililiuoksessa $0,46 \times 10^{-3}$ mmol (hapen liukoisuus veteen 25 °C lämpötilassa on $0,23 \times 10^{-3}$ mmol/ml). Ampullin sisältämä 2 mg kaptopriiliä vastaa $9,2 \times 10^{-3}$ mmol kaptopriiliä. Kun huomioidaan kaptopriilin hapettumisreaktion stoikiometria (kuva 7), voidaan laskea, että ampullin sisältämä happi voisi hapettaa $3,62 \times 10^{-2}$ mmol

kaptopriiliä. Vaikka ampullin sisältämä ilma korvattaisiin inertillä kaasulla, riittäisi veteen liuennut happi silti hapettamaan 20 % ampullin kaptopriilistä.



Kuva 7. Kaptopriilin hajoamisreaktio (Muokattu lähteestä Connors ym. 1986)

Hydrolyysin ja hapettumisen lisäksi lääkeaineiden kemiallisen hajoamisen mekanismeja ovat myös dehydraatio (molekyylistä poistuu vettä), isomeroituminen (isomeeri muuttuu toiseksi isomeerikseen), dekarboksylaatio (lääkeaineesta lohkeaa hiilidioksidi), polymeroituminen (vähintään kaksi identtistä lääkeainemolekyyliä yhdistyy toisiinsa muodostaen suurikokoisen molekyylin) ja lääkeaineiden väliset interaktiot (taulukko 4) (Yoshioka ja Stella 2002).

Taulukko 4. Kemiallisia hajoamisreaktioita ja niille alttiita lääkeaineita

Hajoamisreaktio	Hajoamiselle altis kemiallinen rakenne	Lääkeaine
Hydrolyysi	Esterit	Atropiini, Asetyyლისისyylihappo, Bentsokaiini, Pilocarpiini, Prokaiini, Varfariini
	Amidit	Sulfasetamidi, Indometasiini, β-laktaami penisilliinit (esim. bentsyylipenisilliini, ampisilliini, amoksisilliini, karbenisilliini, metisilliini), β-laktaami kefalosporiinit (esim. kefaleksiimi, kefalotiini, kefadroksiili)
	Schiff emäkset	Bentsodiatsepiinit (esim. diatsepiini, oksatsepaami, nitratsepaami)
Hapettuminen	Katekoliamiinit	Metyylidopa, Adrenaliini
	Tiolit	6-merkaptopuriini, Kaptopriili Morfiini, Hydrokortisoni, Prednisoloni
Dehydraatio	—	Glukoosi, Laktoosi, Prostaglandiinit E1 ja E2, Erytromysiini
Isomeroituminen	Isomeerit	Adrenaliini, Oksatsepaami, Pilocarpiini, Retinoli
Dekarboksylaatio	Karboksyylihapporyhmä	4-aminosalisylihappo, Foskarneetti, Etodolaakki
Polymeroituminen	—	Ampisilliini

Lähde: Yoshioka ja Stella 2002

3.3.1 Kromatografia ja elektroforeesi

Kromatografia on erotusmenetelmä aineiden kvantitatiiviseen ja kvalitatiiviseen määrittämiseen (USP Pharmacists' Pharmacopeia 2nd Ed. <621>). Kromatografiassa tutkittava yhdiste jakautuu kahden eri faasin välille, joista toinen on liikkuva (eluentti) ja toinen pysyy paikallaan (stationäärifaasi). Stationäärifaasi voi olla kiinteä tai kiinteään aineeseen ohueksi kerrokseksi imeytynyt neste tai geeli. Stationäärifaasi voidaan pakata kolonniin tai levittää tasoon. Liikkuva faasi on kaasu tai liuos. Aineet

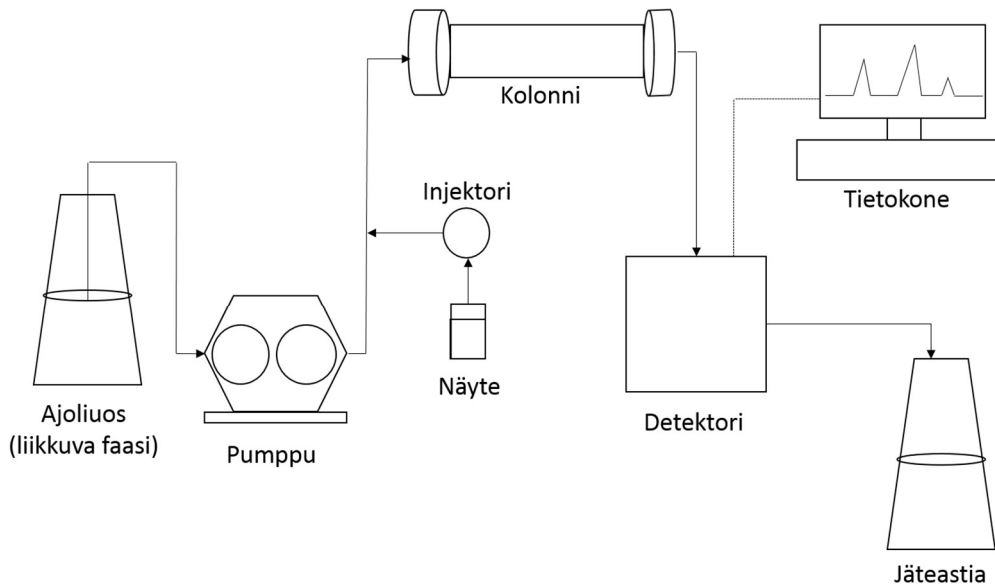
erottuvat toisistaan, kun liikkuvaan faasiin liuotettu yhdiste ajetaan stationäärifaasin läpi. Erottuminen perustuu aineiden adsorptioon, massajakaumaan, ioninvaihtoon tai molekyylien erilaisiin fysikokemiallisiin ominaisuuksiin kuten kokoon, massaan tai määrään.

Lääkeaineiden säilyvyystutkimuksissa korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC) ja kapillaarielektroforeesi (CE) ovat ensisijaisesti suositeltavia menetelmiä, sillä niillä voidaan tutkittavan aineen pitoisuuden lisäksi määrittää kvantitatiivisesti myös mahdollisia hajoamistuotteita (Brossard ym. 2013). CE ei ole varsinaisesti kromatografinen menetelmä, mutta muistuttaa sitä läheisesti. HPLC-laitteet ovat yleisemmin käytössä olevia laitteita kuin CE-laitteet ja säilyvyystutkimuksista valtaosa on tehty HPLC:n avulla (taulukko 5) (Ahuja 2003). HPLC-menetelmistä eniten käytetään käänteisfaasinestekromatografiaa, sillä suurin osa tutkittavista yhdisteistä on hydrofobisia (Bakshi ja Singh 2002). Korkean suorituskyvyn ohutkerroskromatografia (HPTLC) ja kapillaarielektrokromatografia (CEC) voidaan harkita käytettäväksi silloin, kun HPLC ja CE eivät sovellu käyttötarkoitukseen (Brossard ym. 2013).

3.3.1.1 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia

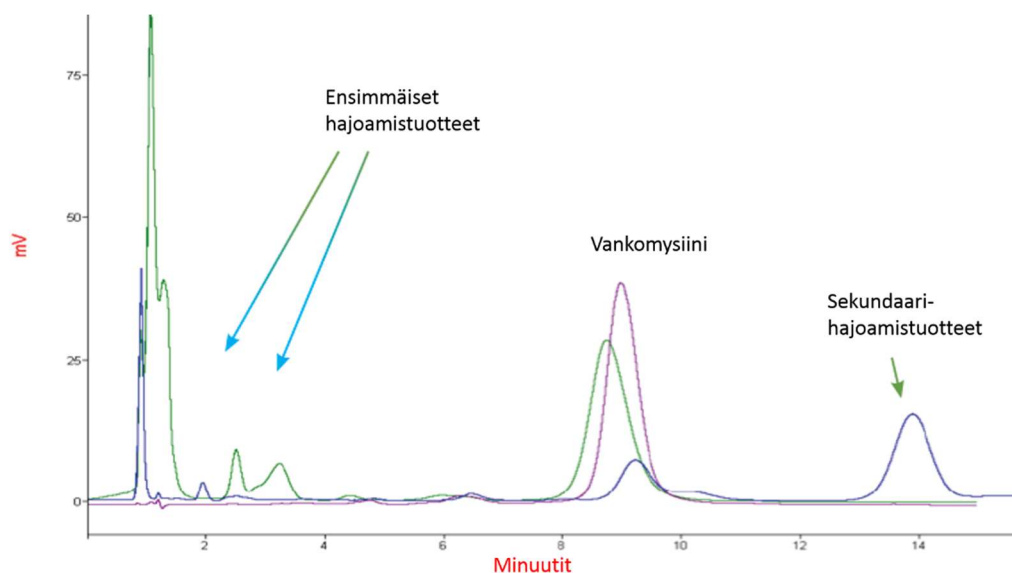
HPLC:a käytetään yhdisteiden erottamiseen, tunnistamiseen ja kvantitatiiviseen analysointiin (USP Pharmacists' Pharmacopeia 2nd Ed. <621>). HPLC on eniten lääkeaineanalytiikassa käytetty menetelmä, jonka eri alalajeja soveltamalla voidaan analysoida suurin osa yhdisteistä (Bakshi ja Singh 2002). HPLC-laitteen etuja ovat korkean erotuskyky, herkkyys ja spesifisyys (Ahuja 2003). Ainoa edellytys laitteen käytölle on, että näyte liukenee johonkin liuottimeen, sillä liukenemattomat hiukkaset voivat tukkia HPLC-laitteiston.

HPLC-laite koostuu pumpusta, injektorista, kolonnista, detektorista ja tiedonkeruuyksiköstä (kuva 8) (Ph. Eur. 8th Ed. 2.2.29.). Injektori injisoi näytteen laitteistoon, jossa näyte on liuenneena ajoliuokseen (eluenttiin). Pumpun aikaansaaman paineen avulla eluenttiin liuennut näyte pakotetaan kulkemaan kolonnin läpi, johon hienojakoinen stationäärifaasi on pakattu. Kolonnissa erottuneet yhdisteet havaitaan detektorilla.



Kuva 8. HPLC-laitteiston kaavakuva

HPLC:ssa käytetyin detektori on ultraviolettisäteily/näkyvän valon (UV/Vis) detektori (taulukko 5) (Brossard ym. 2013). Muita säilyvyystutkimuksiin suositeltuja detektoreja ovat diodirividetektorit, fluoresenssidetektori ja massaspektrometri, sillä niilläkin pystytään määrittämään lääkeaineen pitoisuuden lisäksi myös mahdollisia hajoamistuotteita. Kromatogrammi kuvaa yhdisteiden antaman vasteen ajan funktiona. Kuvassa 9 on esitetty vankomysiiniliuokselle (125 µg/ml) suoritetun hajoamiskokeen kromatogrammit, jossa valmiste altistettiin NaOH-liuoksen aiheuttamalle pH:n muutokselle. Tunnin mittaisen käsittelyn jälkeen vankomysiinistä oli hajonnut noin 20 % (vankomysiinin piikki pienenee) ja kromatogrammissa voidaan havaita vankomysiinin ensimmäiset hajoamistuotteet. 24 tunnin NaOH-käsittely johti vankomysiinin massiiviseen hajoamiseen ja kromatogrammissa havaitaan vankomysiinin ensimmäisten hajoamistuotteiden lisäksi myös vankomysiinin sekundaarihajoamistuotteet. Hajoamiskoe osoittaa sen, että liian voimakkaita tutkimusolosuhteita tulee välttää, sillä vankomysiinin ensimmäiset hajoamistuotteet eivät tule riittävästi esiin liian voimakkaasti aiheutetussa hajoamisessa.



Kuva 9. Käsittlemättömän vankomysiiniliuoksen (125 µg/ml) kromatogrammi (violetti käyrä) sekä liuoksen kromatogrammit tunnin (vihreä käyrä) ja 24 tunnin (sininen käyrä) NaOH-käsittelyn jälkeen (Muokattu lähteestä Brossard ym. 2013)

HPLC:n alalajeja ovat mm. käänteisfaasi-, normaalifaasi, ekskluusio- ioninvaihto- ja kiraalinen kromatografia (Ph. Eur. 8th Ed. 2.2.29.). Tärkein alalajeista on käänteisfaasi HPLC, jonka osuus käytetyistä HPLC-menetelmistä on jopa 90 % (Ahuja 2003). Normaalifaasikromatografiassa stationäärifaasi on polaarisin (tyypillisesti silika), joka käänteisfaasikromatografiassa käännetään poolittomaksi pinnoittamalla silikan pinta hiilivetyketjuilla (yleisimmin oktadekylyketjuilla, C₁₈). Normaalifaasikromatografiassa eluentti on pooliton, mutta käänteisfaasikromatografiassa käytetään polaarisia liuottimia, tavallisesti vesi ja jonkin vähemmän polaarisen orgaanisen liuottimen kuten asetonitriilin tai metanolin seosta. Käänteisfaasikromatografiassa näytteen pidäytyminen perustuu sen hydrofobisuuteen, jolloin ajoliuoksen polarisuuden ja näytteen alifaattisen ketjun pituuden kasvaessa sen retentioaika kasvaa.

Erittäin suuren erotuskyvyn nestekromatografia (UPLC) on suhteellisen uusi nestekromatografinen menetelmä (Reddy ym. 2012). Kirjallisuudessa ei ole kuvattu UPLC:lla tehtyjä säilyvyystutkimuksia. Menetelmää on käytetty lääkeaineiden ja niiden hajoamistuotteiden kvantitatiivisiin määrittäisiin (Kumar ym. 2015, Berg ym. 2013, Vankatao ym. 2012, Liang ym. 2011). UPLC toimii samalla periaatteella kuin HPLC, mutta se on suorituskyvyltään HPLC:a parempi. UPLC – laitteistossa käytetään

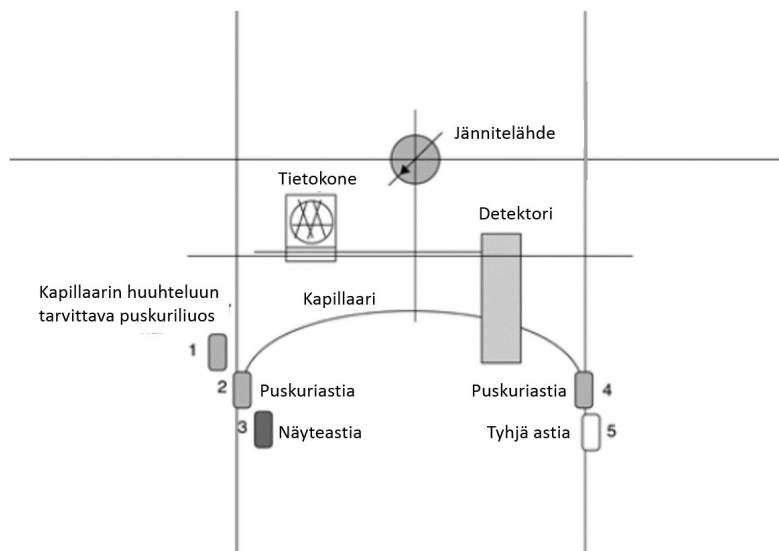
pienemmän partikkelikoon kolonneja, joten faasien välisestä pinta-alasta tulee suurempi (enemmän tasapainoreaktioita faasien välillä) ja erotuksessa päästään HPLC:tä parempaan resoluutioon sekä tehokkuuteen (Nováková ym. 2006). Pienten faasipartikkelien myötä virtausnopeutta voidaan kasvattaa, jolloin analyysiaika lyhenee ja liuottimien kulutus vähenee. Virtausnopeuden kasvattaminen lisää vastapainetta kolonnissa, joten UPLC-laitteet on suunniteltu kestävämmän hyvin suuria paineita. HPLC- ja UPLC-laitteiden huonoja puolia ovat niiden kallis hankinta- ja ylläpito hinta (Ahuja 2003). Myös analyysimenetelmien kehittäminen on vaativaa ja aikaa vievää.

3.3.1.2 Kapillaarielektroforeesi

CE on HPLC:n lisäksi toinen hyvin säilyvyystutkimuksiin sopiva analyysimenetelmä (Brossard ym. 2013). CE:a voidaan käyttää yhdisteiden kvalitatiiviseen tai kvantitatiiviseen määrittämiseen. Yhdisteiden erottuminen sähkökentässä perustuu niiden erilaiseen liikkuvuuteen elektrolyyttiliuoksessa, joka on suoraan riippuvainen yhdisteiden massa/varaus -suhteesta (USP Pharmacists' Pharmacopeia 2nd Ed. <727>). CE:lla voidaan erotella pieniä ja suuria molekyylejä (Perlatti ym. 2013). CE:n etuja HPLC:an verrattuna ovat parempi erotuskyky, lyhempi analyysiaika, vähäisempi näytteen ja liuottimien tarve sekä pienemmät kustannukset.

CE – laitteisto koostuu jännitelähteestä, kahdesta puskuriastiasta, kahden elektrodin yhdistelmästä (katodi ja anodi), kapillaarista, näytteensyöttömenetelmästä, detektorista, termostointisysteemistä, tallentimesta ja tietokoneesta (kuva 10) (Ph. Eur. 8th Ed. 2.2.47.). Näyte syötetään puskuriliuoksella täytettyyn silikakapillaariin, jonka päät on upotettu elektrodien kanssa samoihin puskuriastioihin. Kapillaarin pinnalla olevat silanoliryhmät luovuttavat vetyioneja puskuriliuokseen muuttaen kapillaarin pintavarauksen negatiiviseksi (USP Pharmacists' Pharmacopeia 2nd Ed. <727>). Negatiivisesti varautunut pinta vetää puoleensa kationeja tai liuoksessa olevia positiivisesti varautuneita ioneja, jolloin muodostuu sähköinen kaksoiskerros. Sähköinen kaksoiskerros koostuu kahdesta kationikerroksesta, joista lähempänä kapillaarin pintaa oleva on tiiviisti sitoutunut kerros ja ulompi löyhemmin sitoutunut liikkuva kerros. Kun kapillaarin päiden välille kytketään jännite, ulompi kationikerros alkaa liikkua kohti detektoria kuljettaen mukanaan näytteen sisältämää puskuriliuosta. Syntyy elektro-osmoottinen virtaus (eng. electro-osmotic flow, EOF). Normaalisti näyte

syötetään kapillaarin anodipäästä ja detektori sijaitsee kapillaarin katodipäässä. Kationien liikkeeseen vaikuttaa sekä elektro-osmoottinen virtaus että katodin vetovoima samansuuntaisesti, joten kationit kulkeutuvat ilmaisimelle ensimmäisenä. Virtauksen mukana tulevat neutraalit yhdisteet ja anionit saavuttavat detektorin viimeisenä, koska ne pyrkivät vastavirtaan anodia kohti.



Kuva 10. Kapillaarielektroforeesi-laitteisto (Muokattu lähteestä USP Pharmacists' Pharmacopeia 2nd Ed. <727>)

Näyte injektoidaan kapillaariin joko paineen (hydrodynaaminen injektio) tai jännitteen avulla (elektrokineettinen injektio) (Brossard ym. 2013). Injektioilavuus on 1–10nl. Injektion huonosta toistettavuudesta johtuen kvantitatiivisessa analyysissä sisäisen standardin käyttö on välttämätöntä. Säilyvyystutkimuksiin kehitettävän menetelmän kehityksessä on saavutettava riittävä erotuskyky sisäiselle standardille, tutkittavalle yhdisteelle ja yhdisteen mahdollisille hajoamistuotteille.

Eniten CE:ssa käytetty detektori on UV/VIS-detektori (Perlatti ym. 2013). Pieni näytemäärä ja kapillaarin pienestä sisähalkaisijasta johtuva valotien lyhyys saattavat aiheuttaa ongelmia UV/VIS-detektioinnin herkkyydessä. Ongelma korostuu analysoitaessa laimeita liuoksia. Herkkyyttä on onnistuttu parantamaan valitsemalla erotukseen erikoiskapillaareja, joissa detektointi-ikkuna on tehty leveämmäksi ("bubble" detection cells tai "Z-cells) ja näin valotien pituus ja absorbanssi kasvavat. Herkkyyttä voidaan lisätä myös valitsemalla jokin muu detektori, kuten laserindusoitu

fluoresenssi-detektori (eng. laser-induced fluorescence, LIF), massaspektrometri tai sähkökemiallinen detektori (eng. electrochemical detector, ED) (Perlatti ym. 2013).

Kapillaarielektroforeesin eri tekniikat lisäävät sen käyttömahdollisuuksia analyysimenetelmänä (USP Pharmacists' Pharmacopeia 2nd Ed. <727>). Eniten käytettyjä tekniikoita ovat kapillaarivyöhyke-elektroforeesi (capillary zone electrophoresis, CZE) ja misellaarinen elektrokineettinen kromatografia (micellar electrokinetic capillary chromatography, MEKC) (Perlatti ym. 2013). CZE on menetelmä, jota usein tarkoitetaan kun puhutaan kapillaarielektroforeesista. CZE soveltuu vain varauksellisten yhdisteiden, anionien ja kationien erottamiseen, koska erottuminen perustuu yhdisteiden erilaiseen liikkuvuuteen elektrolyyttiliuoksessa. MEKC:ssa puskuriliuokseen lisätään pinta-aktiivisia aineita yli kriittisen misellikonsentraation, jolloin muodostuu misellejä. Erottuminen perustuu näytekomponenttien jakaantumiseen misellifaasin ja elektrolyyttiliuoksen välillä. MEKC:a voidaan käyttää myös neutraalien yhdisteiden erottamiseen. Kaikkia CE-menetelmiä voidaan muunnella yhdistekohtaisesti elektrolyyttiliuoksen kemiallisten ja fysikaalisten ominaisuuksien avulla tai muuttamalla laiteparametreja. Selektiivisyyteen vaikuttavat muun muassa kapillaarin halkaisija ja pituus, käytettävä jännite, puskurin ionivahvuus, ja pH. Lämpötilan tulee pysyä muuttumattomana, sillä se vaikuttaa puskurin viskositeettiin ja siten myös EOF:seen ja liuoksen liikkuvuuteen.

3.3.1.3 Korkean suorituskyvyn ohutkerroskromatografia

HPTLC on erotusmenetelmä, jossa stationäärifaasina toimii ohut lasi-, muovi- tai metallilevy (USP Pharmacists' Pharmacopeia 2nd Ed. <621>). Levy on päällystetty hienojakoisilla, halkaisijaltaan noin 5 µm:n kokoisilla, hiukkasilla. Näyte aplikoidaan tason alareunan yläpuolelle ja taso asetetaan ajokammioon, jonka pohjalla on ohut kerros eluenttia (Ph. Eur. 8th Ed. 2.2.27.). Eluentti kulkee tasoa ylöspäin kapillaarivoimien ansiosta (Brossard ym. 2013). Tutkittavan näytteen sisältämät aineet kulkevat liuottimen avulla tasoa ylöspäin eri nopeudella, jolloin ne erottuvat toisistaan. Erottuminen perustuu adsorptioon, ionin vaihtoon tai molempien menetelmien kombinaatioon (Ph. Eur. 8th Ed. 2.2.27.).

HPTLC voidaan suorittaa myös käänteisfaasikromatografiana riippuen tutkittavasta näytteestä (Brossard ym. 2013). Käänteisfaasi-HPTLC:n etuna normaali HPTLC:an verrattuna on parempi selektiivisyys. Näytteen kvantitatiivinen määrittäminen tehdään densitometrillä eri aineiden päätepisteistä. Farmaseuttisista määrittämisistä valtaosa on tehty käyttämällä UV-valoa ja mittaamalla heijastuneen ja absorboituneen säteilyn suhdetta (Sherma 2010). Densitogrammi kuvaa aineen antaman vasteen retentiofaktorin (näytteen kulkema matka / liuosrintaman kulkema matka lähtöpisteestä) funktiona. HPTLC:n hyviä puolia ovat helppo toteutettavuus, monikäyttöisyys ja edullisuus. Käyttöä rajoittavat menetelmän alhainen sensitiivisyys ja kvantitatiivinen kapasiteetti (Brossard ym. 2013). Kirjallisuudessa ei ole raportoitu HPTLC:lla tehtyjä säilyvyystutkimuksia.

3.3.1.4 Kapillaarielektrokromatografia

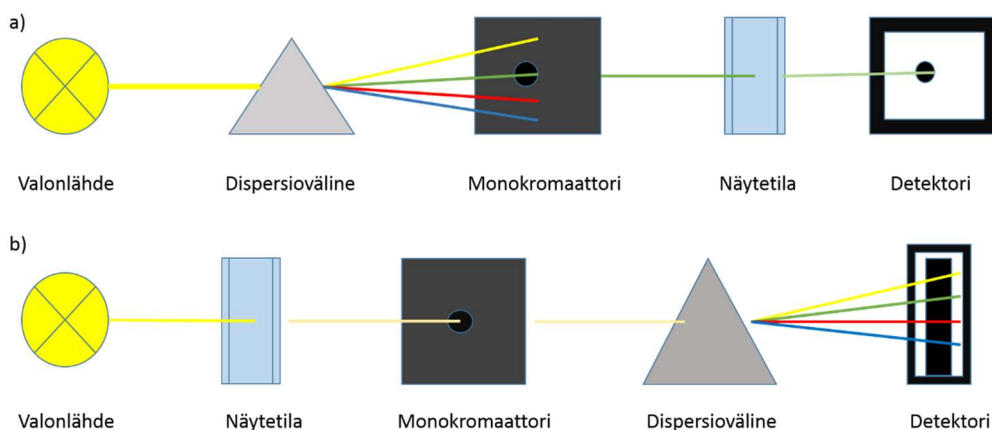
CEC pitää sisällään kaksi eri erotusmenetelmää, kapillaarielektroforeesin ja nestekromatografian (Bartle 2001). CEC:ssa kapillaarin sisäpinta on pinnoitettu kiinteällä stationäärifaasilla ja yhdisteet kulkevat kapillaarin läpi elektro-osmoottisen virran ja sähkökentän vaikutuksesta. Yhdisteiden erottuminen perustuu sekä elektroforeettiin että näytekomponenttien ja stationäärifaasin välisiin vuorovaikutuksiin. Stationäärifaasina voidaan käyttää samoja materiaaleja kuin nestekromatografiassa (esimerkiksi oktadekyyli C-18 partikkeleja) ja eluettina käytetään yleensä orgaanisia liuottimia. CEC:n etuja ovat muun muassa tehokkuus, selektiivisyys ja orgaanisten liuottimien vähäinen käyttö (Brossard ym. 2013). CEC:tä voidaan käyttää myös neutraalien yhdisteiden erotukseen. CEC:n käyttöä vähentää kapillaarien huono saatavuus ja kallis hinta. CEC:n huonoja puolia CE:n verrattuna ovat myös stationäärifaasilla pinnoitetun kapillaarin vahvasta resistanssista johtuvat gradienttiajon ja kapillaarin termostoinnin haastavuus. Lisäksi menetelmän kehitys on vaativaa johtuen useista erotteluun vaikuttavista tekijöistä kuten ionivahvuudesta, jännitteestä sekä ajoliuoksen koostumuksesta. Monimutkaisuudesta johtuen kapillaarielektrokromatografiaa pitäisi harkita säilyvyystutkimusmenetelmänä vain jos nestekromatografiaa tai kapillaarielektroforeesia ei voida käyttää.

3.3.2 Spektrometria

3.3.2.1 Ultravioletti ja näkyvän valon -spektrofotometria

Ultravioletti- ja näkyvän valon -spektrofotometriassa (UV-Vis) mitataan kemiallisiin yhdisteisiin absorboituvan UV- tai Vis-säteilyn määrää spektrofotometrin avulla (USP 29 / NF 24 <851>). Detektori on suhteellisen herkkä ja sopii liuosmuodossa olevien yhdisteiden kvalitatiiviseen ja kvantitatiiviseen määrittämiseen. UV-Vis -detektori on yleisin HPLC:ssä ja CE:ssä käytetty detektori, koska noin 80 % farmaseuttisista aineista sisältää kromoforisen rakenteen, joka absorboi UV-Vis -valoa (Brossard ym. 2013, USP 29 / NF 24 <851>).

Spektrofotometri koostuu valolähteestä, dispersiovälineestä (prisma tai hila), monokromaattorista, näytetilasta, detektorista ja mittauslaitteesta (kuva 11) (USP 29 / NF 24 <851>). Näkyvällä aallonpituudella (380 nm - 780 nm) valonlähteenä on halogeenilamppu ja UV-alueella (380 to 780 nm) käytetään deuterium- tai vetylamppua (Räty ym. 2004). Valonlähteen valo ohjataan peilien avulla prismaan tai hilaan, jossa valo hajoaa eri aallonpituuksiin. Prismän tai hilan asentoa muuttamalla saadaan alkuperäisen valon haluttu aallonpituusalue suunnatuksi monokromaattorin kapeaan rakkoon. Raon lävitse kulkeva valo on monokromaattista eli se sisältää vain yhtä aallonpituutta. Näytetilassa osa näytteeseen kohdistuneesta valosta absorboituu ja osa menee näytteen lävitse. Detektorissa näytteen läpi kulkenut valo muutetaan sähkövirraksi ja ohjataan mittauslaitteelle.



Kuva 11. Yksinkertaistetut kaaviokuvat a) spektrofotometrin ja b) diodirividetektorin rakenteista (Muokattu lähteestä Owen 1996)

Spektrofotometrin toimintaperiaate perustuu Lambertin absorptioyhtälöön (I) ja Lambertin-Beerin lakiin (II), joiden avulla tutkittavan aineen konsentraatio näyteliuoksessa pystytään määrittämään. (Ph. Eur. 8th Ed. 2.2.25.).

$$A = \log_{10} \left(\frac{1}{T} \right) = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) \quad (\text{I})$$

missä

A = absorbanssi

$$T = \frac{I}{I_0}$$

I_0 = alkuperäisen valon intensiteetti

I = näytteen läpi kulkeneen valon intensiteetti

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (\text{II})$$

missä

A = absorbanssi

ε = molaarinen absorptiokerroin

b = nestekerroksen paksuus (cm)

c = tutkittavan liuoksen konsentraatio (mol/l)

Absorbanssi on siis suoraan verrannollinen tutkittavan liuoksen konsentraatioon.

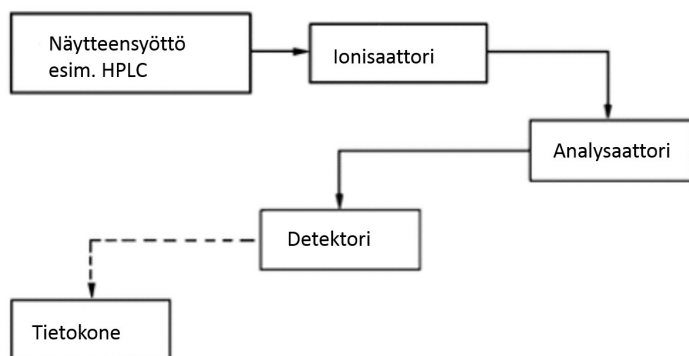
Absorptiospektrofotometria perustuu sähkömagneettisen säteilyn ja kemiallisessa aineessa olevien molekyylien tai atomien välisten vuorovaikutusten mittaamiseen (USP 29 / NF 24 <851>). Säteilyn absorptio perustuu molekyylin eksitaatioon, jossa näytteen atomin elektroni absorboi energiakvantin ja siirtyy korkeammalle energiatasolle (Räty ym. 2004). Näytteen konsentraation on oltava riittävä, sillä hyvin laimeat liuokset eivät anna tarkkaa tulosta. UV-valon aallonpituusalueella absorboivat parhaiten kaikki aromaattiset yhdisteet ja konjugoituneen kaksoissidoksen omaavat yhdisteet. Näkyvän valon aallonpituudella absorboivat värilliset ja värireagensseilla värilliseksi tehdyt yhdisteet.

UV/VIS -spektri kuvaa tutkittavaan aineeseen tulevan ja aineen läpi päästämän säteilyn intensiteettien suhdetta aallonpituuden funktiona (Owen 1996). Detektorista riippuen voidaan absorbanssia mitata joko yhdellä tai useammalla aallonpituudella. Diodirividetektoria (Diode array detector, DAD) suositellaan käytettäväksi pitoisuusmittauksissa, sillä se voidaan ohjelmoida mittaamaan absorbanssia koko

käytettävissä olevalta aallonpituusväliltä (kuva 10). Mittaus perustuu fotodiodiriviin, joista kukin diodi mittaa omaa aallonpituusalueitaan. Diodirividetektorin etuna monokromaattoriin nähden on myös se, että sillä saadaan tietoa yhdisteiden puhtaudesta mittauksen ja taustan välisen absorbanssisuhteen perusteella. Diodirividetektorilla mahdollistaa myös usean näytekomponentin samanaikaisen analysoinnin. Detektorin käyttöä rajoittaa sen kallis hinta.

3.3.2.2 Massaspektrometria

Massaspektrometria (MS) perustuu kaasufaasissa olevien positiivisesti tai negatiivisesti varautuneiden ionien massa-varaussuhteen (m/z) mittaamiseen (Ph. Eur. 8th Ed. 2.2.43.). Massaspektrometri sopii sekä kvalitatiiviseen että kvantitatiiviseen mittaukseen. Laitteisto koostuu ionisaattorista, analysaattorista, detektorista, tietokoneesta ja vakuumpumpusta (kuva 12) (USP Pharmacists' Pharmacopeia 2nd Ed. <736>). Ionisaattorilla näyte ionisoidaan ja siirretään kaasufaasiin. Ionisaattorilta ionit kiihdytetään analysaattorille, jossa ne erotellaan toisistaan massa/varaus -suhteensa (m/z) perusteella vakuumpumpun kehittämässä tyhjiössä (Ph. Eur. 8th Ed. 2.2.43.). Detektori havaitsee ionit ja mittaa tutkittavien ionien suhteellisen runsauden. Tietokone esittää saadut mittaustulokset massaspektrinä, jossa eri ionien suhteellinen runsaus on esitetty niiden massa-varaussuhteen (m/z) funktiona (USP Pharmacists' Pharmacopeia 2nd Ed. <736>, Ph. Eur. 8th Ed. 2.2.43.).



Kuva 12. Massaspektrometrin rakenne (muokattu lähteestä USP Pharmacists' Pharmacopeia 2nd Ed. <736>)

Liuosmuotoisten lääkeaineiden säilyvyytutkimuksissa massaspektrometri on liitetty yleensä HPLC:in, joka erottelee tutkittavat yhdisteet ja näin yhdisteen eri aineet voidaan analysoida massaspektrometrilla (Brossard ym. 2013, Ph. Eur. 8th Ed. 2.2.43.). Massaspektrometri voidaan yhdistää myös kapillaarielektroforeesiin, mutta käyttöä rajoittaa näytteiden pieni määrä ja haihtuvien puskurien käyttö.

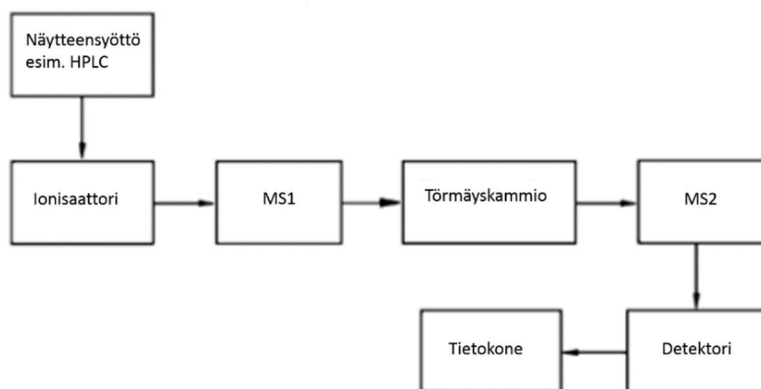
Massaspektrometrian käytön edellytyksenä on, että mitattavat molekyylit ionisoidaan ja muutetaan kaasufaasiin (USP Pharmacists' Pharmacopeia 2nd Ed. <736>). Yleisimmät ionisaatiomenetelmät ovat sähkösumutus-ionisaatio (Electrospray Ionization, ESI) ja normaali-ilmanpaine kemiallinen ionisaatio (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) (Xiaoying ym. 2012). APCI- ja ESI-ionisaatiot tapahtuvat normaali-ilmanpaineessa (Ph. Eur. 8th Ed. 2.2.43.). Niitä kutsutaan pehmeiksi ionisointitekniikoiksi, koska ne aiheuttavat vähemmän fragmentaatiota kuin muut ionisaatiotekniikat (Xiaoying ym. 2012). Vähempi pilkkoutuminen kasvattaa molekyyli-ionien suhteellista lukumäärää ja siten menetelmän herkkyyttä. Molemmilla ionisaatiotekniikoilla voidaan luoda sekä positiivisia että negatiivisia ioneja sen mukaan ovatko molekyylit protonin luovuttajia vai vastaanottajia. APCI sopii erityisen hyvin käytettäväksi HPLC:n kanssa, mutta ESI-ionisaatiota käytetään sekä HPLC:ssa että kapillaarielektroforeesissa (Ph. Eur. 8th Ed. 2.2.43.).

Massa-analysointorin tehtävä on erottaa eri m/z -suhteen omaavat ionit toisistaan tutkittavalla massa-alueella (USP Pharmacists' Pharmacopeia 2nd Ed. <736>). Massaspektrometriassa yleisesti käytössä olevia analysointoreita ovat magneettinen sektorianalysointori, kvadrupolianalysointori, lentoaika-analysointori ja fourier-muunnos -analysointori. Analysointorin valintaan vaikuttavat analyytin koko ja määrä sekä analysointorin kyky erottaa eri painoisia ioneja toisistaan (Ph. Eur. 8th Ed. 2.2.43.). Ionien erottelu tapahtuu sähkö- ja/tai magneettikentässä, josta eri m/z -arvon omaavat ionit erottuvat paikan tai ajan funktiona.

Massa-analysoinnin jälkeen detektorin muuntaa ionien energian sähköiseksi signaaliksi massaspektrin muodostamiseksi (Ph. Eur. 8th Ed. 2.2.43.). Detektorille tulevat ionivirrat ovat niin pieniä, että niitä joudutaan vahvistamaan ennen varsinaista detektointia. Yleisimmin käytetty detektorityyppi varattujen partikkelien havainnoinnissa ovat elektronimonistimet, joissa detektoriin iskeytyviä ioneja

törmäytetään vasteen vahvistamiseksi (Hoffman ja Stroobant 2007). Lopuksi mittaustulokset rekisteröidään tietojenkäsittelylaitteistolla. Massaspekttri kuvaa ionien intensiteetin niiden m/z -suhteen funktiona.

Tandemmassaspektrometriassa (MS/MS) tutkittaville ioneille suoritetaan kaksi tai useampia peräkkäisiä massa-analyysyjä (USP Pharmacists' Pharmacopeia 2nd Ed. <736>). Yksinkertainen menetelmä sisältää kaksi massaspektrometriä (kuva 13), joista ensimmäinen massaspektrometri erottelee valitun molekyyli-ionin, joka fragmentoidaan esimerkiksi törmäyttämällä inerttiin kaasuun. Fragmentoidut tuoteionit johdetaan toiselle massaspektrometrille, jossa ionit analysoidaan. Sekä peräkkäisten massa-analyysien määrää että valittujen ionien määrää voidaan lisätä, jolloin ensimmäisellä massaspektrometrilla valittujen ja tuotettujen fragmentti-ionien joukosta valitaan ionit toiselle massaspektrometrille, jotka edelleen siirretään seuraavalle massaspektrometrille kunnes viimeinen massaspektrometri analysoi valikoidut tuoteionit (Hoffman ja Stroobant 2007). MS/MS lisää menetelmän selektiivisyyttä ja herkkyyttä ja sopii erityisesti suurten molekyylien ja erilaisten seosten tutkimiseen (USP Pharmacists' Pharmacopeia 2nd Ed. <736>). Laite kykenee mittaamaan samanaikaisesti tarkat massat sekä molekyyli-ionille että MS/MS:n fragmentoimille tuoteioneille. Ionien erottelun lisäksi MS/MS:lla voidaan tuottaa tietoa tutkittavien aineiden rakenteesta.



Kuva 13. Tandemmassaspektrometrin rakenne (muokattu lähteestä USP Pharmacists' Pharmacopeia 2nd Ed. <736>)

Massaspektrometri sopii hyvin lääkeaineiden ja -valmisteiden säilyvyystutkimuksiin, koska sillä saadaan tietoa tutkittavan yhdisteen lisäksi mahdollisista hajoamistuotteista

(Brossard ym. 2013). Myös massaspektrometrin herkkyys, tehokkuus ja nopeus puoltavat sen käyttöä säilyvyystutkimuksissa. Massaspektrometrin käyttöä rajoittaa se, että tutkittavan yhdisteen on oltava kaasufaasissa. Lisäksi näytteiden käsittely voi olla työlästä, sillä näytteiden oltava puhtaita, jotta ne eivät aiheuta häiriötä yhdisteen massaspektriin.

Taulukko 5. Yhteenveto kipulääkeseosten kemiallisen säilyvyyden tutkimuksista vuosilta 2005–2015

Lääkeaineseos	Tutkimusmenetelmä	Detektori	Lähde
Butorfanoli + tropisetroni	HPLC	DAD	Chen ym. 2015
Butorfanoli + tramadoli, butorfanoli + fentanyl	HPLC	DAD	Chen ym. 2014
Metoklopramidi + difenhydramiini + Deksametasoni	LC	MS/MS	Kintzel ym. 2014
Fentanyl + bupivakaiini + adrenaliini	HPLC	DAD	Brustugun 2013
Morfiini + naloksoni	HPLC	UV	Kistner ym. 2013
Fentanyl + levobupivakaiini + epinefriini	HPLC	fluoresenssi + DAD	Helin-Tanninen ym. 2013
Tramadoli + haloperidoli + hyoskiinibutyylibromidi	HPLC	UV	Negro ym. 2010
Hydromorfonit + ketamiini	HPLC	UV	Ensom ym. 2009
Morfiini + bupivakaiini + klonidiini, hydromorfonit + bupivakaiini + klonidiini	HPLC	DAD	Bianchi ym. 2008
Tsikonotidi + klonidiini, tsikonotidi + klonidiini + morfiini	HPLC	UV	Shields ja Montenegro 2007
Deksametasoni + ketamiini	HPLC	UV (DAD)	Watson ym. 2005

3.4 Fysikaalisen säilyvyyden tutkimusmenetelmät

Fysikaalinen säilyvyys on luonteeltaan spesifistä lääkemuoto- ja valmistekohtaista (Yoshioka ja Stella 2002). Fysikaalinen vanheneminen havaitaan valmisteen farmaseuttis-teknisten ominaisuuksien muuttumisena (Lapinjoki 2001) Fysikaaliset muutokset valmisteen ulkonäössä ja tasa-aineisuudessa vaikuttavat usein merkittävästi valmisteen liukenemisominaisuuksiin, lääkkeen siedettävyyteen ja käyttökelpoisuuteen (Yoshioka ja Stella 2002).

3.4.1 Aistinvarainen tutkimus

Aistinvaraisessa tutkimuksessa valmisteen ominaisuuksia arvioidaan yhden tai useamman aistin avulla (The Pharmaceutical Codex 1994). Lääkevalmisteista voidaan tutkia muun muassa värin, hajun ja koostumuksen muutoksia. Kirkkaissa liuksissa aistinvaraiset muutokset näkyvät sameutena, saostumina tai kaasun muodostuksena. Liuksissa tapahtuvat ulkoiset muutokset voivat olla merkki liuksen mikrobiologisesta kontaminoitumisesta. Kaikkia aistein havaittavia ominaisuuksia ja muutoksia tulee tarkkailla koko säilyvyydetutkimuksen ajan (Brossard ym. 2013).

Euroopan farmakopeasta löytyy monografia näkyvän hiukkaskontaminaation analysoimiseen parenteraalisista liuksista (Ph. Eur. 8th Ed. 2.9.20.). Monografiassa on ohjeistus yksinkertaisen tutkimuslaitteiston rakentamiseen, jossa valmistetta tutkitaan määrättyssä valossa mustaa ja valkoista taustaa vasten. Analyysin tarkoitus on varmistaa, että nesteen komponentit ovat kokonaan liuenneessa muodossa eikä ala hitaasti saostua valmistuksen jälkeen. Aistinvarainen tutkimus ei yksin riitä määrittämään valmisteissa tapahtuvaa hajoamista, vaan muutosten tutkimiseen vaaditaan tarkempia analyysimenetelmiä.

3.4.2 Nefelometri ja turbidimetri

Nefelometria ja turbidimetria käytetään liuosten sameuden mittaamiseen (Ph. Eur. 8th Ed. 2.2.1.). Sameus aiheutuu liuksessa muodostuneista hiukkasista, jotka heikentävät liuksen valonläpäisevyyttä. Liuksessa olevien hiukkasten määrä

voidaan mitata liuoksen optisten ominaisuuksien avulla. Sameuden mittauksessa yksisuuntainen valo ohjataan näytteeseen, jolloin osa liuoksen hiukkasiin törmänneestä valosta absorboituu, osa heijastuu ja siroaa ja loppuosa läpäisee liuoksen. Nefelometria perustuu hiukkasista sironneen säteilyn ja turbidimetria liuoksen läpäisseen säteilyn mittaamiseen. Molemmissa menetelmissä mitattavan säteilyn määrä riippuu hiukkasten koosta ja määrästä. Nefelometriassa saadaan luotettavemmat mittaustulokset matalilla sameusasteilla, missä sameusyksiköiden (eng. nephelometric turbidity unit, NTU) ja detektorin antaman vasteen välille saadaan lineaarinen riippuvuus. Turbidimetrinen menetelmä sopii ainoastaan hyvin laimeille ja pieniä hiukkasia sisältäville liuksille, sillä sameuden ja konsentraation välillä on lineaarinen suhde ainoastaan silloin, kun hiukkasten koko on yhdenmukainen ja ne ovat jakautuneet liuokseen tasaisesti. Sameus määritetään vertaamalla näytteen ja standardin aiheuttaman vasteen voimakkuutta. Sameutta vastaava hiukkaspitoisuus saadaan vertaamalla tuloksia tunnettujen näyteliuosta vastaavien liuosten sameuteen kalibrointisuoran avulla.

3.4.3 Gravimetria

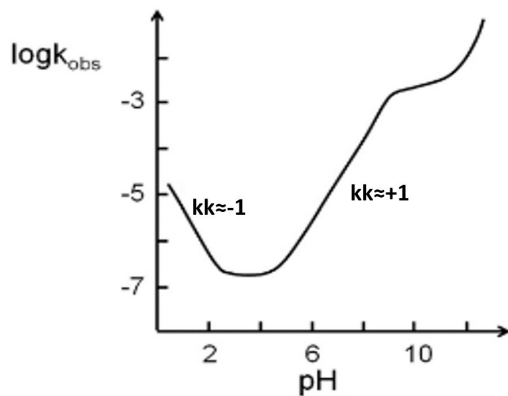
Gravimetrinen analyysi perustuu tutkittavan valmisteeseen punnitsemiseen. Puoliläpäisevässä pakkauksessa (esim. ruiskut, kipukasetit, infuusiopussit ja -pullot) lääkevalmisteet altistuvat lääkepakkausta ympäröiville olosuhteille, mikä aiheuttaa veden haihtumisen (Lapinjoki 2001). Veden haihtumista steriileistä kipuseoksista seurataan säilyvyystutkimuksen aikana, mikäli tutkittava valmiste on pakattu puoliläpäiseviin pakkauksiin (ICH Q1A(R2) 2003). Muutos on merkittävä, kun se on yli 5 % alkuperäisestä arvosta. Ilman lämpötila ja kosteus vaikuttavat veden haihtumisnopeuteen. Veden haihtuessa lääkelius konsentroituu. Jos lääkepakkauksen pinta-ala on suuri suhteessa valmisteeseen määrään, rajoittaa myös tämä usein valmisteeseen käyttöikä. Pakkausmateriaaleista ainoastaan lasiampullit ovat niin tiiviitä, ettei vesi pääse haihtumaan niiden läpi.

3.4.4 pH-määrittely

pH on vesiliuokselle ominainen arvo, joka kuvaa liuoksen happamuutta (Kaur 2010). Happamuuteen vaikuttaa liuoksessa olevien vetyionien aktiivisuus. Teoreettisen määritelmän mukaan pH on vetyionien aktiivisuuden negatiivinen logaritmi (III) (USP Pharmacists' Pharmacopeia 2nd Ed. <791>).

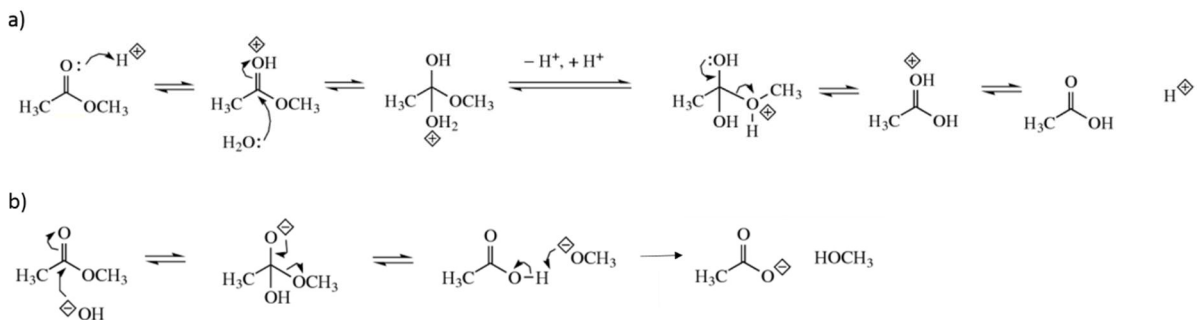
$$\text{pH} = -\log a_{\text{H}^+} \quad (\text{III})$$

pH:lla on tärkeä merkitys ionisoituvan lääkeaineen liukoisuuteen ja siten myös stabiiliuteen (Brossard ym. 2013). Liian korkeat ja matalat pH-arvot johtavat lääkeaineen hajoamiseen. Lääkeaineen säilyvyyden kannalta optimaalinen pH on usein sama kuin se pH, jossa lääkeaine liukenee kaikkein parhaiten. Yleensä pH:n vaikutus lääkeaineen hajoamiseen esitetään kuvaajan avulla, jossa lääkeaineen hajoamisreaktion reaktionopeusvakioiden logaritmi kuvataan pH:n funktiona (kuva 14). Protonit- ja hydroksidi-ionit katalysoivat hajoamisreaktioita (Yoshioka ja Stella 2002). Koska eri pH-alueilla on eri konsentraatio protoneita ja hydroksidi-ioneja, tapahtuu hajoaminen eri pH-alueilla eri nopeudella. Lisäksi lääkeaineen ionisoituneen ja ionisoitumattoman muodon välillä saattaa olla eroja niiden hajoamisnopeudessa. Kuvassa 14 on kuvattu pH:n vaikutus prokaiinin hajoamiseen (Loftsson 2014). Prokaiini hajoaa happokatalysoidulla hydrolyysillä pH-alueella 1–3 ja emäskatalysoidulla hydrolyysillä pH-alueella 5–11. Hap- ja emäskatalysoidun osan välillä (pH 3–5) protonien ja hydroksidi-ionien konsentraatiot ovat pieniä, jolloin prokaiinin ei-spesifinen reaktio liuotinmolekyylien kanssa vaikuttaa merkittävimmin sen hajoamisnopeuteen.



Kuva 14. Prokaiinin hydrolyysinopeus pH-arvon funktiona 37 °C lämmössä (nopeusvakiot yksikössä min^{-1} , kk = kulmakerroin) (Loftsson 2014)

Jos lääkeaineella ei ole happo/emäs -luonnetta, vesiliukoisuus ei ole riippuvainen pH-arvosta, mutta pH vaikuttaa silti merkittävästi lääkeaineen säilyvyyteen. Tämä nähdään esimerkiksi esterin hydrolyysistä (kuva 15), sillä protoni- ja hydroksyyli-ionit katalysoivat reaktiota riippumatta siitä onko molekyyli ionisoituneessa vai neutraalissa muodossa.



Kuva 15. Esterisidoksen a) happokatalysoitu hydrolyysi ja b) emäskatalysoitu hydrolyysi (Muokattu lähteestä Dewick 2006)

Potentiometrisessä pH:n määrittämisessä pH mitataan vesiliuoksen vetyioni konsentraation avulla (IV) (Ph. Eur. 8th Ed. 2.2.3.). Siinä tutkittavan liuoksen pH on riippuvainen standardiliuoksena käytettävän liuoksen pH:sta. Kun standardiliuos on

riittävän samanlainen tutkittavan liuoksen kanssa, teoreettinen pH on hyvin lähellä potentiometrisesti määritettyä pH:ta.

$$pH = pH_s - \frac{E - E_s}{k} \quad (IV)$$

missä

E = tutkittavan liuoksen potentiaali voltteina

E_s = vertailuliuoksen potentiaali voltteina

pH_s = vertailuliuoksen pH

k = Nernstin kaavasta laskettu potentiaalın muutos voltteina kun pH muuttuu yhdellä yksiköllä (Ph. Eur. 8th Ed. 2.2.3.).

Potentiometrinen pH:n määrittäminen perustuu kahden tutkimusliuokseen upotetun elektrodin potentiaalieron mittaamiseen (Ph. Eur. 8th Ed. 2.2.3.). Toinen elektrodeista on herkkä vetyioneille (yleensä lasielektrodi) ja toinen toimii vertailuelektrodina (esimerkiksi saturoitu kalomelielektrodi), jonka potentiaali on vakio. Elektrodien välinen potentiaaliero mitataan jännitemittarilla. Eniten käytetään yhdistelmäelektrodia, jossa lasielektrodi ja vertailuelektrodi on sisällytetty samaan elektrodirunkoon. Koska pH-arvo on riippuvainen lämpötilasta, mittaus suoritetaan aina 20 – 25 °C:n lämpötilassa.

3.4.5 Yhteensopimattomuudet valmisteen ja pakkausmateriaalin välillä

Lääkeaineet ja apuaineet voivat reagoida pakkausmateriaalien kanssa (Loyd ja Howard 2014). Lääkepakkauksen materiaalien ja lääkeaineiden yhteensopivuus tulee aina selvittää, sillä tarkoitukseensa sopimaton pakkaus voi aiheuttaa lääkevalmisteen pilaantumisen (Yoshioka ja Stella 2002). Lääkepakkauksissa yleisimmin käytettäviä materiaaleja ovat lasi, polyvinyylidikloridi (PVC), polypropeeni (PP), polyeteeni (PE), etyyliivinyyliasetaatti (EVA), elastomeeri ja polysiloksaani (Kontra ym. 2005).

Adsorptio on prosessi, jossa lääkeaine tarttuu pakkauksen pintaan (Kontra ym. 2005). Adsorptiota voi tapahtua kaikilla pinnoilla mukaan lukien lasi, muovi ja kumi (Yoshioka ja Stella 2002). Adsorptiota seuraa usein absorptio, jossa lääkeaine imeytyy pakkausmateriaaliin. Erityisesti PVC-muovin on osoitettu reagoivan useiden

lääkeaineiden kanssa. Lääkeaine voi imeytyä myös pakkausmateriaalin läpi, jolloin kyseessä on permeaatio. Myös lääke voi uuttua pakkausmateriaalista erilaisia aineita, esimerkiksi muovista polymeerin lisäaineita kuten stabilisaattoreita, pehmittimiä tai hapettumisen estoaineita (Loyd ja Howard 2014). Lääkeaineen ja pakkausmateriaalin välisillä reaktioilla voi olla merkittävä vaikutus kun lääkettä säilytetään pienissä annosyksiköissä tai lääkeseoksen konsentraatio on alhainen (Mehta 1993). Muita reaktioiden laajuuteen vaikuttavia tekijöitä ovat muun muassa lääkkeen ja pakkausmateriaalin välinen pinta-ala suhteessa lääkemäärään, säilytysaika sekä lääkeaineen lämpötila ja ionisoitumisaste (Loyd ja Howard 2014, Yoshioka ja Stella 2002). Ionisoitumaton lääke sitoutuu muoviin herkemmin kuin ionisoitunut.

3.5 Mikrobiologisen säilyvyyden tutkimusmenetelmät

Mikrobiologinen säilyvyys tarkoittaa valmisteen kykyä vastustaa mikrobien kasvua valmisteelle asetettujen vaatimusten mukaisesti (Kiviranta 2001). Mikrobiologista säilyvyyttä pyritään usein parantamaan antimikrobisilla apuaineilla (säilytysaineilla). Lääkevalmisteissa säilytysaineita käytetään riittävän tehokas, mutta mahdollisimman vähäinen määrä, sillä ne aiheuttavat apuaineista yleisimmin haittavaikutuksia (Makkonen 2012). Säilytysaineiden mikrobeja tuhoava vaikutus perustuu reaktiivisiin kemiallisiin ryhmiin, joista myös haittavaikutukset saattavat johtua. Säilytysainetta voidaan käyttää valmisteissa, joissa säilytysaineen pitoisuus pysyy riittävän alhaisena aiheuttamatta toksisia vaikutuksia. Injektioissa ja infuusioissa säilytysaineita ei juurikaan käytetä, sillä tarvittavan säilytysaineen määrä on usein riittävän suuri aiheuttamaan haitallisia vaikutuksia. Euroopan Farmakopean mukaan kaikkien tilavuudeltaan yli 15 ml olevien infuusioiden ja injektoiden tulisi olla säilöntäaineettomia, ellei niiden käytölle ole erityisiä perusteluita (Ph. Eur. 8th Ed. 0520).

Tauteja aiheuttavia mikrobeja sanotaan patogeenisiksi mikrobeiksi (Hodges 2011). Opportunistit mikrobit ovat patogeneja, joiden taudinaiheuttamiskyky normaalioloissa on heikko, mutta yksilön vastustuskyvyn heiketessä pystyvät aiheuttamaan infektion. Kuumetta aiheuttavat pyrogeenit ovat mikrobien aineenvaihduntatuotteita. Pyrogeeneja saattaa esiintyä lääkevalmisteissa vaikka eläviä mikrobeja ei

havaittaisikaan. Valmistamisen ja käyttökuntoon saattamisen yhteydessä valmiste voi kontaminoitua myös bakteereilla, homeilla, sienillä ja hiivoilla.

Nestemäiset vettä sisältävät valmisteet ovat helpoimmin kontaminoituvia ja otollisia mikrobien kasvualustoja. Myös liuksissa käytettävät lääkkeet ja fysiologinen natriumkloridiliuos voivat toimia mikrobien kasvualustana (Ford ja Jones 2011). Mikrobit tarvitsevat lisääntyäkseen suotuisat kasvuolosuhteet; sopivan pH:n, lämpötilan ja ravinteita kuten vettä, hiiltä, typpeä, fosforia, kalsiumia, kaliumia, natriumia, magnesiumia, rautaa, rikkiä ja hivenaineita. Mikrobien kasvu parenteraalisissa liuksissa voidaan havaita liuksen haalistumisena, sameutumisenä, kaasun muodostumisena tai saostumina. Kontaminoituneen valmisteen aiheuttamat komplikaatiot ovat harvinaisia, mutta vakavia (Myers 2013). Infektio selkäydinalueella voi olla hengenvaarallinen.

3.5.1 Steriiliystesti

Steriili lääkevalmiste tarkoittaa elävistä organismeista vapaata valmistetta (Fimean määräys 6/2011). Steriilit lääkevalmisteet joko valmistetaan aseptisesti tai steriloidaan lopullisessa pakkauksessa valmistuksen jälkeen (Ph. Eur. 8th Ed. 2.6.1., PIC/S 2008). Ex tempore -valmisteet valmistetaan aseptista valmistusmenetelmää käyttämällä, sillä seoksiin käytettävät raaka-aineet, pakkausmateriaalit ja määrät eivät useinkaan sovellu loppusterilointiin (Palmgrén ym. 2012). Aseptisen valmistuksen tarkoituksena on mahdollisimman tehokkaasti estää lääkevalmisteen kontaminoituminen kaikkien valmistusvaiheiden aikana (Fimean määräys 6/2011). Aseptinen valmistus tapahtuu A-luokan laminaarivirtaustilassa GMP – ohjeita noudattaen (GMP 2016).

Euroopan Farmakopeassa on kuvattu steriiliyden tutkimiseen tarkoitettu kalvosuodatusmenetelmä (Ph. Eur. 8th Ed. 2.6.1.). Kalvosuodatusmenetelmässä tutkittava näyte suodatetaan membraanin läpi, jonka huokoskoko on korkeintaan 0,45µm. Mikrobit eivät läpäise membraania vaan jäävät membraaniin, joka siirretään elatusaineeseen. Koska tutkittavassa näytteessä mahdollisesti olevan mikrobin alkuperää ei tiedetä, tulee steriiliydestissä käytettävien elatusaineiden olla Euroopan Farmakopean mukaisia, ravintorikkaita liuksia, jotta mahdollisimman monet mikrobit

saadaan kasvamaan niissä. Sairaala-apteekissa tehtävissä steriiliystutkimuksissa käytetään tioglykolaatti- ja soijapapu-kaseiini-elatusaineita (Ph. Eur. 8th Ed. 2.6.1., PIC/S 2008). Anaerobisten mikrobien kasvua tutkitaan yhdellä membraanilla tioglykolaattielatusaineessa ja lientä inkuboidaan 30–35 °C:ssa. Aerobisten mikrobien kasvua tutkitaan kahdella membraanilla soijapapu-kaseiini-elatusaineessa ja lientä inkuboidaan 20–25 °C:ssa. Anaerobi- ja aerobielatusaineita inkuboidaan 14 vuorokauden ajan. Hiivoja, homeita ja sieniä tutkitaan yhdellä membraanilla soijapapu-kaseiini-elatusaineessa ja elatusainetta inkuboidaan 30–35 °C:ssa korkeintaan viisi vuorokautta.

3.5.2 Endotoksiinitesti

Suurin osa endotoksiineista on gram-negatiivisten bakteerien ulkoseinän sisältämiä pyrogeeneja, jotka ovat kemialliselta rakenteeltaan lipopolysakkarideja (Baird 2011). Kun bakteerisolu kuolee, membraani rikkoutuu ja endotoksiinit vapautuvat. Verenkiertoon joutuessaan endotoksiinit aiheuttavat kuumereaktion, joka heikkokuntoiselle voi olla vakavaa.

Endotoksiinit tutkitaan yleisimmin Euroopan Farmakopean mukaisella gel-clot -menetelmällä (Ph. Eur. 8th Ed. 2.6.14.). Menetelmä perustuu *Limulus polyphemus* -ravusta (hevosenkenkäravusta) eristetyn amebosyyttilysaatin ja endotoksiinien väliseen reaktioon, jonka seurauksena syntyy hyytymä tai samentuma. Näyte pipetoidaan pieneen koeputkeen, lisätään lysaatti ja säädetään pH tarvittaessa välille 6 – 8. Näytettä inkuboidaan 60 minuuttia 37 °C:ssa. Jos koeputkeen muodostuu hyytymä, joka pysyy koeputken pohjalla kun koeputki käännetään ylösalaisin 180°, tulos on positiivinen. Jos hyytymää ei muodostu, tulos on negatiivinen.

4 YHTEENVETO

Steriilien kipulääkeseosten tuotekehittelyyn, valmistamiseen, varastointiin, käyttöön saattamiseen ja käytönaikaisiin olosuhteisiin liittyy runsaasti erilaisia säilyvyyteen liittyviä riskitekijöitä. Säilyvyytutkimuksissa pitäisi tutkia valmisteen niitä ominaisuuksia, jotka herkimmin muuttuvat säilytyksen ja käytön aikana ja jotka todennäköisimmin vaikuttavat valmisteen laatuun, tehoon ja turvallisuuteen (ICH Q1A(R2) 2003). Sairaala-apteekissa valmistettavien lääkevalmisteiden säilyvyyden tutkiminen on tärkeä osa sairaala-apteekin laadunvalvontaa (Kontra 2005).

Korkean erotuskyvyn nestekromatografia ja elektroforeesi sopivat steriilien lääkeaineseosten säilyvyytutkimuksiin, koska niillä voidaan vaikuttavan aineen pitoisuuden lisäksi määrittää kvantitatiivisesti mahdolliset hajoamistuotteet (Brossard ym. 2013). Valtaosa raportoiduista säilyvyytutkimuksista on toteutettu HPLC-UV -menetelmällä. Steriileissä lääkevalmisteissa käytettävien lääkeaineiden ja pakkausmateriaalien yhteensopivuus on aina varmistettava, sillä lääkevalmisteiden eri komponentit voivat reagoida eri pakkausmateriaalien kanssa ja johtaa lääkevalmisteen pilaantumisen (Yoshioka ja Stella 2002). Veden haihtumista steriileistä lääkeaineseoksista tutkitaan, kun ne on pakattu muovisiin pakkausmateriaaleihin ICH Q1A(R2) 2003. Lääkevalmiste altistuu pakkausta ympäröiville olosuhteille ja olosuhteet vaikuttavat veden haihtumisnopeuteen valmisteesta. Tämä on huomioitava erityisesti silloin kun infuusiopumppua säilytetään potilaan kehon läheisyydessä normaalia korkeammassa lämpötilassa (Kontra 2005).

Sairaala-apteekkien mahdollisuuksia steriilien kipulääkeseosten säilyvyytutkimuksiin tulisi lisätä (Jäppinen 2006). HPLC-laitteiston kalleuden ja sen vaatiman menetelmäkehityksen osaamisen vuoksi pitoisuusmittaukset joudutaan ulkoistamaan apteekkien sopimuslaboratorioille. Myös henkilökuntaresurssit rajoittavat laajempien säilyvyytutkimusten määrää. Steriilien kipuseosten valmistaminen sairaaloiden osastoilla on valmisteille merkittävä kontaminaatoriski, sillä osastoilta puuttuvat steriilien kipuseosten valmistamiseen vaadittavat puhdistilat. Valmisteiden laadunvarmistuksen ja potilasturvallisuuden kannalta kipulääkeseokset tulisi valmistaa sairaala-apteekeissa, joissa on tarvittavat tilat ja välineet steriilien kipuseosten valmistamiseen.

II KOKEELLINEN OSA

5 JOHDANTO

OYS sairaala-apteekissa valmistettiin vuoden 2014 aikana yhteensä 2630 fentanylilevobupivakaiini -epiduraaliruiskua (EPI-ruiskut). EPI-ruiskuja valmistettiin myös sairaalan osastoilla. Sairaala-apteekin tekemän kyselyn mukaan osastoilla valmistettiin marraskuun 2014 aikana yhteensä 493 EPI-ruiskua. Kesäkuussa 2015 sairaala-apteekki lisäsi EPI-ruiskujen valmistusta ja tarkoitus oli valmistaa EPI-ruiskut keskitetysti koko sairaalan tarpeisiin. Kesäkuusta lähtien sairaala-apteekki on pääsääntöisesti toimittanut EPI-ruiskut osastoille ja valmistus osastoilla on huomattavasti vähentynyt. Muutoksella haluttiin lisätä potilasturvallisuutta, vastata paremmin Fimean asettamiin määräyksiin ja helpottaa osastofarmaseutin työtä. Valmisteen laadunvarmistuksen kannalta on tärkeää, että kipulääkeseokset valmistetaan sairaala-apteekissa, jossa on edellytykset valmistaa steriili lopputuote.

EPI-ruiskujen varastoon valmistuksesta on tehty omien valmisteiden ennakoilmoitus Fimea:an kesäkuussa 2013. EPI-ruiskut on valmistettu lisäämällä fentanylinjektionestettä (Fentanyl B.Braun 50 µg/ml) levobupivakaiini- infuusionestepussiin (Chirocaine 1,25 mg/ml; 200 ml) ja jakamalla kipulääkeseos 50 ml:n ruiskuihin. Eräkkö on ollut suurimmillaan 10 infuusiopussia, joista on jaettu enimmillään 50 ruiskua.

Sairaala-apteekissa valmistettavien epiduraaliruiskujen valmistusmäärän lisääntyessä on mietitty, voisiko valmistusmenetelmää muuttaa tehokkaammaksi, ergonomisemmaksi ja enemmän tarkoitukseensa sopivaksi. Valmiin lääkeaineseoksen jakaminen ruiskuihin tapahtuu koneellisesti pumpun (Baxa Repeater) tai käsin lääkkeenottokanyylin (Mini-Spike®) avulla. Nykyisellä valmistusohjeella lääkeaineseoksen jakelu ruiskuihin keskeytyy jatkuvasti, sillä yhdestä infuusiopussista voidaan jakaa vain viisi ruiskua. Koneellisesti tapahtuvassa ruiskujen täyttämässä keskeytysten riskinä on, että jakeluletkuun pääsee ilmaa,

jonka seurauksena jakelupumpun kalibrointi kärsii. Käsin, lihasvoimalla täyttäminen, puolestaan kuormittaa käsiä ja hartioita.

Valmistusohjetta on suunniteltu muutettavaksi niin, että fentanyyli-levobupivakaiini -kipuseoksen valmistus tapahtuisi lisäämällä fentanyyli ja levobupivakaiini tilavuudeltaan suurempaan natriumkloridiliuos (0,9 %) pulloon (1000 ml). Infuusionestepulloon valmistetusta liuoksesta olisi mahdollista jakaa 25 ruiskua koneellisesti ilman keskeytystä, joten kipuseoksen ruiskuihin jakelu nopeutuisi ja erien valmistaminen helpottuisi. Ruiskuihin jakelun helpottuessa, jakelun voisivat tehdä myös lääketyöntekijät, jolloin farmaseuttien työpanos voitaisiin suunnata enemmän farmaseuttista osaamista vaativiin tehtäviin.

6 TYÖN TARKOITUS

Tässä erikoistyössä oli tarkoitus selvittää uudella valmistusmenetelmällä valmistetun fentanyyli-levobupivakaiini -seoksen säilyvyys 50ml:n ruiskussa. Tutkimuksen oli tarkoitus olla osa Fimealle tehtävää ennakoilmoitusta omasta lääkevalmisteesta (Fimea 6/2011). Ennakoilmoituksen tulee sisältää tiedot oman valmisteen laatuvaatimuksista ja laadunvarmistamiseksi tehdyistä tutkimuksista. Fentanyyli-levobupivakaiini -ruiskujen laatuvaatimukseksi asetettiin kemiallinen, fysikaalinen ja mikrobiologinen säilyvyys 28 vuorokautta huoneenlämpötilassa. Liuoksen kemiallista säilyvyyttä tutkittiin Oulun yliopiston kemian laitoksen kehittämällä korkean erotuskyvyn nestekromatografi-massaspektrometri (UPLC-MS) menetelmällä. Fysikaalista säilyvyyttä tutkittiin seuraamalla liuoksen pH:ta, massan vaihtelua ja ominaisuuksia aistinvaraisesti (Ph. Eur. 8th Ed. 2.9.20 ja 2.2.3, ICH Q1A (R2) 2003 ja USP Pharmacists' Pharmacopeia 2nd Ed. <791>). Mikrobiologista säilyvyyttä tutkittiin Euroopan farmakopean steriiliystestiä vastaavalla menetelmällä (Ph.Eur. 8th Ed. 2.6.1). Valmisteesta ei tutkittu paljain silmin näkymättömiä partikkeleita eikä endotoksiineja ja pyrogeenejä, sillä valmisteeseen käytetään ainoastaan kaupallisia, parenteraalisia lääkevalmisteita ja valmistus tapahtuu kontrolloiduissa olosuhteissa sairaala-apteekin puhdastilassa.

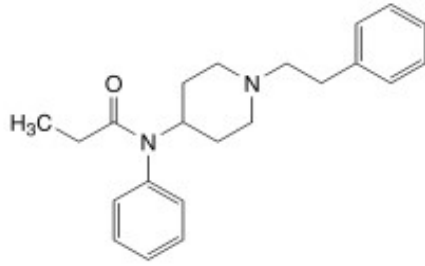
7 TEOREETTINEN TAUSTA

7.1 Fentanyyli

Fentanyyli (1-fenetyyli-4-N-propionyylianilinopiperidiini) on anestesiassa ja voimakkaan kivun lievityksessä käytettävä synteettinen opioididiagonisti (kuva 15) (Anuradha ym. 2010). Fentanyyli on rasvaliukoinen ja 50–100 kertaa voimakkaampaa kuin morfiini (Mather 1983). Se syntetisoitiin vuonna 1960.

Suuren ensikierron metabolian vuoksi fentanyyliä ei voi käyttää suun kautta. Annostelu tapahtuu transdermaalisesti, transmukosaalisesti, intranasaalisesti, subkutaanisesti, intravenoosisesti tai epiduraalisesti (Aaltonen 2015, Kokki 2015, Keinänen ja Järvimäki 2012, Heiskanen 2010, Sarvela ja Nuutila 2009, Kalso 1999). Fentanyyliä käytetään muun muassa syöpäkivun, synnytyskivun ja leikkausten jälkeisen kivun hoidossa. Kipu lievittyy kun fentanyyli kiinnittyy keskushermostossa sijaitseviin μ - opioidireseptoreihin. Vaikutus on nopea, mutta suhteellisen lyhyt verrattuna esimerkiksi vesiliukoiseen morfiiniin, jonka vaikutus kehittyy hitaasti, mutta kestää pidempään (Salomäki ja Nuutinen 1998). Fentanyylin vaarallisin sivuvaikutus on hengityslama.

Fentanyyliä saa kaupallisesti parenteraaliseen, bukkaliseen, sublinguaaliseen ja nasaaliseen käyttöön sitraattimuodossa ja transdermaaliseen käyttöön sekä emäs- että kloridimuodossa (Duodecim lääketietokanta 2016, McEvoy 2015). Fentanyylisitraatti injektiot ovat herkkiä valolle ja ne tulee säilyttää valolta suojassa, huonelämpötilassa 15–30 °C. Hetkellinen altistuminen korkeintaan 40 asteen lämpötilalle ei vaikuta injektioihin haitallisesti. Kaupallisten fentanyyli-injektoiden pH on 4,0–7,5. Mikäli fentanyyli-injektioneste sekoitetaan NaCl- tai glukoosi-infuusionesteisiin on liuos käytettävä välittömästi.

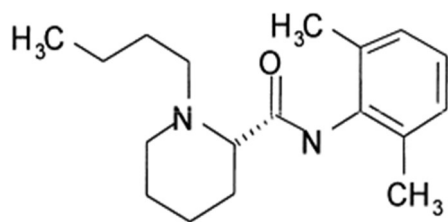


Kuva 15. Fentanyylin rakenne (Ph. Eur. 8th Ed. 1103)

7.2 Levobupivakaiini

Levobupivakaiini on tehokas ja pitkävaikutteinen paikallispuudute (McClellan ja Spencer 1998). Kemialliselta rakenteeltaan se on raseemisen bupivakaiinin S-enantiomeeri. Levobupivakaiini koostuu aromaattisesta tertiaarisesta aminoryhmästä (vesiliukoinen osa), substituoidusta aromaattisesta renkaasta (rasvaliukoinen osa) ja niitä yhdistävästä karboksyyliamidista (kuva 16). Kaupallisten levobupivakaiiniliuosten pH on 4,0–6,5 (Duodecim lääketietokanta 2016).

Levobupivakaiinia käytetään kirurgisessa anestesiassa ja kivunhoidossa, kuten leikkauksen jälkeisessä kivussa ja synnytyskivussa (Foster ja Markham 2000). Levobupivakaiini voidaan annostella selkäydintilaan tai sillä voidaan puuduttaa tietty ihoalue ennen kirurgista toimenpidettä. Lisäksi levobupivakaiini voidaan injektoida hermoja ympäröivään kudokseen perifeeristen hermojen puudutuksissa. Puudutteen vaikutus perustuu jännitteen säätelien Na^+ -kanavien toiminnan estämiseen (McEvoy 2015, Pere 2001). Puudutteet sitoutuvat ionikanavan solunsisäiseen päähän ja estävät ionikanavien toimintaa hermoissa. Hermojen lisäksi ne vaikuttavat myös muihin elimiin, joissa on hermojen tapaan toimivia solukalvoja. Puudutteen haittavaikutukset ilmenevät niiden farmakologisina vaikutuksina muissa kuin tarkoitetuissa kohde-elimissä. Liian suuret puudutepitoisuudet tai -määrät voivat johtaa keskushermoston ja sydämen myrkytystilaan. Eläinkokeiden ja vapaaehtoisilla tehtyjen kokeiden mukaan levobupivakaiini on vähemmän sydän- ja keskushermostotoksinen kuin D- ja S-enantiomeerejä sisältävä bupivakaiini (Kostamoinen 2001). Pienempi sydäntoksisuus johtuu siitä, että S-enantiomeerit eivät sitoudu yhtä tiukasti sydämen Na^+ -kanaviin kuin D-enantiomeerit.



Kuva 16. Levobupivakaiinin rakenne (McLeod ja Burke 2001)

7.3 Fentanyylin ja levobupivakaiinin säilyvyys

UPLC sopii hyvin lääkeaineiden pitoisuusmittauksiin ja hajoamistuotteiden määrittämiseen (Kumar ym. 2015, Berg ym. 2013, Vankatao ym. 2012, Liang ym. 2011), mutta kirjallisuudessa ei ole kuvattu UPLC-menetelmällä tehtyjä säilyvyystutkimuksia. Kirjallisuudesta löytyy fentanyyli-levobupivakaiini -seokselle tehty säilyvyystutkimus, jossa lääkeaineiden kemiallisen säilyvyyden määrittämisessä on käytetty käänteisfaasi HPLC:a ja fluoresenssi- ja diodirividetektoria (Helin-Tanninen ym. 2013). Fentanyyliä ja bupivakaiinia sisältävistä kipulääkeseoksista löytyy useampia säilyvyystutkimuksia (Priston ym. 2004, Kjonniksen ym. 2000, Sattler ym. 1998, Dawson ym. 1992). Myös fentanyyli-midatsolaami -seoksen säilyvyyttä on tutkittu (Wilson ym. 1998). Lisäksi on raportoitu tutkimuksia levobupivakaiinin ja sufentaniiliseoksen säilyvyydestä. (Boitquin ym. 2004, Jäppinen ym. 2003). Näissäkin tutkimuksissa lääkeaineiden määrittämisessä on käytetty HPLC:a ja detektoreina UV-, diodi- ja fluoresenssidetektoreita.

Ennen erikoistyöni aloittamista fentanyylin ja levobupivakaiinin hajoamistuotteita oli etsitty kirjallisuudesta. Fentanyylille löydettiin kaksi raportoitua hajoamiskoetta (Qi ym. 2011, Garg ym. 2010). Garg:n työryhmän tutkimuksessa tarkasteltiin fentanyylin hajoamista valon, hapon, emäksen, lämmön ja hapetusreaktion vaikutuksesta. Yhteensä seitsemän hajoamistuotetta raportoitiin happo-, lämpö- ja hapetuskäsittelyiden seurauksena. Valoaltistus ja emäskäsittely eivät vaikuttaneet fentanyylin säilyvyyteen. Qi ym. tutkivat fentanyylin hapettumista peroksidi- ja hypokloriittivesiliuoksissa sekä hapettumisen seurauksena syntyneitä hajoamistuotteita. Yhteensä 17 eri hapetusolosuhteissa muodostunutta hajoamistuotetta oli kuvattu. Tutkimuksen mukaan fentanyylin rakenteessa hapettumiselle alttiita rakenteita ovat erityisesti piperidiini-rengas ja amidisidos. Levobupivakaiinin tai bupivakaiinin hajoamistuotteista ei löydetty tutkimustietoa.

Kirjallisuudesta löytämässäni bupivakaiinille kehitetyssä ja validoidussa HPLC–menetelmässä fosforihaposta, asetonitrilistä ja Milli Q -vedestä 5:40:650 (v/v/v) muodostettu ajoliuos puskuroitiin (pH 6,5) bupivakaiinin kemiallisessa rakenteessa olevien ionisoituvien ryhmien vuoksi (Prathyusha ym. 2012). Kolonnina toimi Peerless HT C18 (1,8 µm; 50 × 4,6 mm) lämpötilan ollessa 45 °C ja virtausnopeuden ollessa 1,0 ml/min. Myös Helin-Tannisen työryhmän (2013) fentanyyli-levobupivakaiini - lääkeaineseoksen säilyvyystutkimuksessa käytettiin puskuroitua (pH 7) fosforihappo-asetonitrili 1:1 (v/v) -ajoliuosta. Kromatografisessa erotuksessa käytettiin pKb-100 (5 µm; 50 × 4 mm) -kolonnia lämpötilan ollessa 40 °C ja virtausnopeuden ollessa 2,0 ml/min. Molempien tutkimusten määrittäykset tehtiin isokraattisissa olosuhteissa.

8 MENETELMÄN KUVAUS

8.1 Materiaalit

Tutkittavien kipulääkeaineseosten komponentteina käytettiin fentanyylisitraattia (Fentanyl Hameln 50 µl/ml – inj.neste 10 ml, eränro: 403054, Hameln Pharmaceuticals GMPH, Hameln, Saksa), levobupivakaiinia (Chirocaine 7,5 mg/ml inj.neste 10 ml, eränro: 1036535/282698, AbbVie Ltd, Maidehead, UK) ja natriumkloridia (Natriumklorid 9mg/ml 1000ml, eränro: 140958151, B.Braun Ecoflac, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Saksa). Fentanyylin ja levobupivakaiinin injektionesteitä käytettiin myös standardiliuosten valmistamiseen. Sisäisenä standardina käytettiin lidokaiinia (Xylocain 10mg/ml inj.neste 10ml säilöntäaineeton, erä: DACG, AstraZeneca, North Ryde, Australia). Ajoliuoksen komponentteina käytetyt asetonitrili ja muurahaishappo olivat Fisher Scientific Companyn Optima™ LC/MS -laatua. Näytteiden, standardien ja ajoliuosten valmistukseen tarvittava vesi oli ultrapuhdasta (Milli-Q). ESI-ionisaatiossa sumutuskaasuna käytettiin typpi (N₂) -kaasua Peak Scientificiltä. Lukkomassana käytettiin Watersin leusiinienkefaliiniä.

Säilytysastiana toimineet 50 ml:n polypropeeni ruiskut (Original Perfusor®+ Multi-Ad Luer Lock Syringe Cap, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Saksa) täytettiin Baxa-pumpulla (Baxa Repeater Pump™, Baxter International Inc, Deerfield, Illinois, USA). Sekundaaripakkauksina valolta suojatuille ruiskuille toimivat Soluvit-suojapussit (Fresenius Kabi, Helsinki, Suomi) ja valolle altistetuille ruiskuille Freegrip-pussit (avattavat ja suljettavat pussit pakastukseen ja säilytykseen 2l, Suomen Kerta Oy, Imatra, Suomi). Ruiskujen valoaltistus toteutettiin keinotekoisella päivänvalolla (Osram Biolux® L18W/965, Osram GmbH, Munich, Saksa). Punnitukset tehtiin analyysivaa'alla (Sartorius Laboratory Balance, Model BP 310S, max 310g, Item Number: 427287, Sartorius, Göttingen, Saksa) ja pH mitattiin kalibroidulla pH-mittarilla (Mettler Toledo Seven Easy, Mettler-Toledo, LLC, Columbus, Ohio, USA + Mettler-Toledo InLab® Expert pH elektrodi, NTC 30 kOhm, pH 0-14, 100 °C). Lämpötilaa ja suhteellista ilmastokosteutta seurattiin olosuhdemittarilla (Digitaalinen kosteus/lämpö, SLM (L2) 3060 mittari, Suomen lämpömittari OY, Helsinki Suomi) ja lämpötilaa lisäksi lämpötilaloggerilla (HOBO Temperature Data Logger, U10-001, Onset Computer Corporation, Bourne, Massachusetts, USA). Veden suodatuksessa käytettiin Milli-Q -

laitteistoa, jossa suodatuskalvona oli Millipore 0,45 µm Millipak® Express 20 membraani.

8.2 Kipulääkeseosten valmistus

Tutkimusruiskut valmisti lääkevalmistukseen perehtynyt farmaseutti OYS sairaala-apteekissa A-luokan puhtaustilassa proviisorin hyväksymien valmistusohjeiden mukaisesti. Lääkeaineseokset valmistettiin lisäämällä fentanylia ja levobupivakaiini natriumkloridiliuoksen infuusiopulloihin (taulukko 6). Sekoittamisen jälkeen liuokset jaettiin ruiskuihin Baxa-pumpun avulla. Ennen lääkeaineiden lisäystä natriumkloridin infuusiopulloista poistettiin valmisteyhteenvedossa mainittu laskennallinen ylitäyttö ja lisättävien lääkeaineliuosten tilavuus. Molempien ruiskukoostumusten valmistuserä oli 25 ruiskua. EPI5-ruiskujen täyttötilavuus oli 45 ml ja EPI7-ruiskujen täyttötilavuus 47 ml.

Taulukko 6. Tutkittujen lääkeaineseosten koostumus

	EPI5-ruiskut		EPI7-ruiskut	
	Määrä	Pitoisuus	Määrä	Pitoisuus
Fentanyylisitraatti	5,0 ml	5,6 µg/ml	7,0 ml	7,4 µl/ml
Levobupivakaiini	6,6 ml	1,1 mg/ml	6,64 ml	1,1 mg/ml
Natriumkloridi (0,9 %)	33,4 ml	6,7 mg/ml	33,36 ml	6,4 mg/ml

8.2.1 Ruiskujen määrä ja säilytysolosuhteet

Ruiskuja (EPI5 ja EPI7) valmistettiin yhteensä 50 kappaletta, joista 42 ruiskua otettiin tutkimusta varten, molempia ruiskukoostumuksia 21 kappaletta. 8 ylimääräistä ruiskua pidettiin vararuiskuina ja säilytettiin tutkimusruiskujen kanssa samoissa olosuhteissa (molempia ruiskukoostumuksia 2 kappaletta valossa ja 2 kappaletta pimeässä). Molemmista ruiskukoostumuksista otettiin 6 ruiskua, joista 3 rinnakkaista ruiskua säilytettiin valolta suojattuna valonsuojapussissa ja 3 rinnakkaista freegrip – pussiin pakattua näytettä valolle altistettuna (taulukko 7). Lisäksi molemmista koostumuksista otettiin 12 ruiskua kontrolliruiskuiksi, jotka säilytettiin eri mittausaikapisteissä

analysoitavien ruiskujen kanssa samoissa olosuhteissa, 6 rinnakkaista ruiskua valolta suojattuna ja 6 rinnakkaista ruiskua valolle altistettuna. Valosuojapussissa säilytetyt kontrolliruiskut siirrettiin valoon 28. tutkimuspäivän kohdalla 24 tunnin ajaksi jäljitellen ruiskujen säilytysolosuhteita sairaalassa. Vielä 3 rinnakkaista ruiskua molemmista koostumuksista otettiin mikrobiologisia tutkimuksia (kappale 8.5) varten. Mikrobiologisen säilyvyyden tutkimiseen valmistetut ruiskut säilytettiin valolta suojassa.

Valolle altistetut ruiskut säilytettiin läpinäkyvässä muovilaatikossa ja valolta suojatut ruiskut läpinäkymättömässä muovilaatikossa. Tutkimusruiskujen säilytysolosuhteita seurattiin tutkimuksen aikana. Ruiskut säilytettiin huonelämpötilassa ja lämpötilaa seurattiin lämpötilamittarilla ja olosuhdemittarilla. Suhteellista kosteutta mitattiin olosuhdemittarilla.

Taulukko 7. Näytteenottoajankohdat ja ruiskujen säilytysolosuhteet

Aika	EPI5 Valosuojattu 3 ruiskua (1 näyte/ruisku)	EPI7 Valosuojattu 3 ruiskua (1 näyte/ruisku)	EPI5 Valolle altistus 3 ruiskua (1 näyte/ruisku)	EPI7 Valolle altistus 3 ruiskua (1 näyte/ruisku)
0 piste	1–4 ml	1–4 ml	1–4 ml	1–4 ml
4 h	1–4 ml	1–4 ml	1–4 ml	1–4 ml
24 h	1–4 ml	1–4 ml	1–4 ml	1–4 ml
3 vrk	1–4 ml	1–4 ml	1–4 ml	1–4 ml
7 vrk	1–4 ml	1–4 ml	1–4 ml	1–4 ml
14 vrk	1–4 ml	1–4 ml	1–4 ml	1–4 ml
21 vrk	1–4 ml	1–4 ml	1–4 ml	1–4 ml
28 vrk	1–4 ml	1–4 ml	1–4 ml	1–4 ml
42 vrk	1–4 ml	1–4 ml	1–4 ml	1–4 ml
Kontrollit:	6 ruiskua	6 ruiskua	6 ruiskua	6 ruiskua
28 vrk	1–4 ml	1–4 ml	1–4 ml	1–4 ml
29 vrk	1–4 ml	1–4 ml	–	–

8.2.2 Mittausaikapistees

Näytteet otettiin taulukon 7 mukaisesti. Ensimmäiset näytteet otettiin heti ruiskujen valmistamisen jälkeen. Muut näytteenotto ajankohdat olivat 4h, 24h, 3vrk, 7vrk, 14vrk, 21vrk ja 28vrk ruiskujen valmistumisesta. Näytteet tutkittiin aistinvaraisesti, määritettiin pH ja vaikuttavien aineiden pitoisuus. Mikrobiologiset näytteet otettiin

tutkimuksen alussa ja päivänä 28. Tutkimuksen alussa molempien pitoisuuksien 3 rinnakkaista näytettä otettiin suoraan lääkeaineseoksen kantaliuoksesta vastaten EPI-ruiskujen steriilistystä varten tehtävää näytteenottoa sairaala-apteekissa. Kontrolliruiskujen massa määritettiin gravimetrisesti ilman sekundaaripakkausta jokaisessa mittausaikapisteessä. Kontrolliruiskuista otetut näytteet analysoitiin aistinvaraisesti sekä määritettiin pH ja vaikuttavien aineiden pitoisuus. Valonsuojapussissa säilytetyt kontrolliruiskut pakattiin freegrip-pusseihin ja altistettiin valolle 24h:n ajan jäljitellen ruiskujen käyttöolosuhteita sairaalassa. Vuorokauden mittaisen valoaltistuksen jälkeen otettaville näytteille tehtiin aistinvarainen tutkimus sekä määritettiin pH ja lääkeaineiden pitoisuus (tutkimuspäivä 29). Vielä tutkimuspäivänä 42 oli tarkoitus analysoida lääkeaineiden pitoisuus eri näytteenottopisteissä (4h, 24h, 3vrk, 7vrk, 14vrk, 21vrk ja 28vrk) analysoiduista ruiskuista, jotta olisi saatu tarkempi kuva lääkeaineiden hajoamisreaktion etenemisestä.

8.2.3 Laatuvaatimukset

EPI-ruiskujen säilyvyystutkimukset perustuivat fentanyyli-levobupivakaiini -seoksille laadittuun spesifikaatioon (taulukko 8).

Taulukko 8. Fentanyyli-levobupivakaiini -seosten laatuvaatimukset

Määritettävä ominaisuus tai komponentti	Menetelmä	Hyväksymiskriteerit
Liuoksen ulkonäkö	Aistinvaraisesti	Kirkas, väritön neste, ei saostumia eikä kaasun muodostumista
Liuoksen pH	pH – mittari	Alkuperäinen pH \pm 0,5
Vaikuttavien aineiden pitoisuus	UPLC-MS (Ultra Performance Liquid Chromatography- Mass spectrometry)	Lääkeaineen pitoisuutta verrataan lähtöpitoisuuteen (t=0)
- Levobupivakaiini		
EPI 5		90 – 110% (1,1 mg/ml)*
EPI 7		90 – 110% (1,1 mg/ml)*
- Fentanyylisitraatti		
EPI 5		90 – 110% (5,6 μ g/ml)*
EPI 7		90 – 110% (7,4 μ g/ml)*
Ruiskujen massa	gravimetrisesti (punnitus)	Alkuperäinen massa +/- 5 %
Mikrobiologinen puhtaus	Nordlabin Stert2-steriilistutkimus	Steriili

*suluissa esitetty teoreettinen lähtöpitoisuus

8.3 Kemiallisen säilyvyyden tutkiminen

8.3.1 Menetelmän luotettavuus

Lääkeaineseosten kemiallista säilyvyyttä tutkittiin Oulun yliopiston kemian laitoksen kehittämällä ulkoisen standardin menetelmällä. Ennen erikoistyöni alkamista ulkoisen standardin menetelmän luotettavuutta oli tutkittu valmistamalla tutkittavia lääkeaineseoksia vastaavat mallinäytteet ja vertaamalla näytteistä mitattua pitoisuutta vastaaviin teoreettisiin pitoisuuksiin. Fentanyylin laimennoskerroin oli 100 ja levobupivakaiinin 50000. Lisäksi menetelmän lineaarisuutta oli tarkasteltu ajamalla kolme rinnakkaista mittausta viidellä eri pitoisuudella. Näytteinä toimivat fentanyylin ja levobupivakaiinin standardit (taulukot 9 ja 10), joiden mittaustuloksista sovitettiin kalibrointisuorat pienimmän neliöjäännössumman lineaarisen regression avulla.

8.3.2 Näytteiden valmistus

Molemmista fentanyyli-levobupivakaiini -kipulääkeseoksista valmistettiin erilliset näytteet sekä fentanyylin että levobupivakaiinin UPLC-MS pitoisuusmittauksia varten. Näytteiden valmistus tehtiin laimentamalla kipulääkeseoksia ultrapuhtaalla vedellä.

Ulkoisen standardin menetelmässä näytteet fentanyylin pitoisuusmittauksiin tehtiin laimentamalla kipulääkeseosta 1:100 (v/v). Fentanyylinäytteestä valmistettiin levobupivakaiininäytteet laimentamalla kahden välilaimennoksen kautta lopulliseen laimennussuhteeseen 1:50000 (v/v). Laimennettujen fentanyylinäytteiden teoreettiseksi fentanyylipitoisuudeksi tuli 56 ng/ml (EPI5) ja 74 ng/ml (EPI7). Molempien kipulääkeseosten laimennettujen levobupivakaiininäytteiden teoreettiseksi levobupivakaiinipitoisuudeksi tuli 22 ng/ml.

Sisäisen standardin menetelmässä fentanyylinäytteitä laimennettiin kymmenen kertaa enemmän kuin ulkoisen standardin menetelmässä ja kaikkiin näytteisiin lisättiin sisäisenä standardina käytetty lidokaiini. Laimennettujen fentanyylinäytteiden teoreettiseksi fentanyylipitoisuudeksi tuli 5,6 ng/ml (EPI5) ja 7,4 ng/ml (EPI7). Molempien kipulääkeseosten laimennettujen levobupivakaiininäytteiden teoreettiseksi

levobupivakaiinipitoisuudeksi tuli 22 ng/ml. Sisäisen standardin teoreettinen pitoisuus näytteissä oli 10 ng/ml.

8.3.3 Standardien valmistus

Ulkoisen standardin menetelmässä fentanyyliin ja levobupivakaiinin injektioestesteistä valmistettiin kantaliuokset laimentamalla ultrapuhtaalla vedellä. Fentanyyliä laimennettiin 1:500 (v/v), jolloin kantaliuoksen teoreettinen fentanyylipitoisuus oli 100 ng/ml. Levobupivakaiinin kantaliuos laimennettiin välilaimennoksen kautta siten, että kantaliuoksen teoreettiseksi levobupivakaiinipitoisuudeksi saatiin 1 µg/ml.

Standardien käyttöliuokset valmistettiin pieniin koeputkiin viiteen eri pitoisuustasoon (taulukot 9–11). Fentanyylisandardien koeputkiin lisättiin fentanyyliin lisäksi levobupivakaiinin kantaliuosta (110 µg/ml) niin, että käyttöliuosten levobupivakaiinipitoisuudeksi saatiin sama pitoisuus kuin tutkittavissa näytteissä (1,1 µl/ml). Sisäisen standardin menetelmässä fentanyyliä laimennettiin kymmenen kertaa enemmän ja kaikkiin koeputkiin lisättiin laimennettu lidokaiini, jonka pitoisuus oli 1 µl/ml. Kahtena ensimmäisenä analyysipäivänä käytettiin samoja standardien kantaliuoksia, mutta muina analyysipäivinä valmistettiin uudet kantaliuokset.

Taulukko 9. Fentanyyliin kalibroitistandardit ulkoisen standardin menetelmässä

Standardit	Fentanyyliin pitoisuus (ng/ml)	Levobupivakaiinin pitoisuus (µl/ml)
1	10	1,1
2	25	1,1
3	50	1,1
4	75	1,1
5	100	1,1

Taulukko 10. Fentanyylin kalibrointistandardit sisäisen standardin menetelmässä

Standardit	Fentanyylin pitoisuus (ng/ml)	Levobupivakaiinin pitoisuus (µl/ml)	Sisäisen standardin pitoisuus (pl/ml)
1	2	1,1	100
2	4	1,1	100
3	7	1,1	100
4	10	1,1	100
5	15	1,1	100

Taulukko 11. Levobupivakaiinin kalibrointistandardit sisäisen ja ulkoisen standardin menetelmässä

Standardit	Levobupivakaiinin pitoisuus (ng/ml)	Sisäisen standardin pitoisuus (pl/ml) sisäisen standardin menetelmässä
1	5	100
2	10	100
3	20	100
4	35	100
5	50	100

8.3.4 Mittauslaitteisto

Näytteiden kromatografinen erottaminen tapahtui erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografilla (Acquity UPLC, Waters, Milford, MA, USA) ja pitoisuuden määrittäminen kvadrupoli-lentoaika-massaspektrometrilla (Synapt G1 QTOF, UAA088-21674451, Waters, Millford, MA, USA). UPLC-MS-laitteistoon kuuluivat binääripumppu (Acquity B11UPB640A-22775334 Binary Solvent Manager), näytteensyöttöyksikkö (Acquity A11UPA525M-22775335 Autosampler) ja kolonniuuni (Acquity K10UPH349G-22775336 column compartment). Massaspektrometria ohjattiin MassLynx 4.1 -ohjelmalla, jonka aliohjelmalla QuanLynxiä käytettiin pitoisuuksien laskemiseen ja kolonnina Water BEH C18 (1,7 µm, 2,1mm x 50mm).

8.3.5 Ajo-olosuhteet

Ajoliuoksena käytettiin muurahaishapon vesiliuoksen (0,1 %) ja asetonitriilin seosta. Sekä ulkoisen että sisäisen standardin menetelmissä käytettiin gradienttiajtoa virtausnopeudella 0,4 ml/min kolonnin lämpötilan ollessa 30 °C. Ulkoisen standardin menetelmässä asetonitriilin osuus nostettiin 16 prosentista 34 prosenttiin, pidettiin 34 prosentissa 0,5 minuuttia ja laskettiin takaisin alkupitoisuuteen 1 minuutissa. Sisäisen standardin menetelmä ajettiin samalla tavalla kuin ulkoisen standardin menetelmä, mutta asetonitriilin osuus nostettiin 10 prosentista ja 35 prosenttiin. Ajoaika oli 4,5 minuuttia. Injektioilavuus oli 2 µl ja jokaisesta näytteestä otettiin kaksi injektiota.

Ionisaatiomenetelmänä käytettiin sähkösumutusionisaatiota (ESI). Kaikki ionit mitattiin positiivisessa ionimuodossa. Lukkomassana toimi 2 ng/ml leusiinienkefaliiniliuos (asetonitriili/vesi 1:1, 0,1 muurahaishappo), jonka tarkka m/z-arvo on 556,2771. Sumutuskaasuna käytettiin typpeä virtausnopeudella 400 l/h ja sumutuskaasun lämpötila oli 400 °C. Sumutuskapillaarin jännite oli 3 kV, kartiojännite 30 V ja ionilähteen lämpötila 150 °C

8.3.6 Tulosten laskeminen

Sairaala-apteekin omien lääkevalmisteiden laatuvaatimuksena on, että vaikuttavan aineen pitoisuuden on pysyttävä 90 – 100 % välillä tavoitearvosta lääkkeen kelpoisuusaikana (USP Pharmacists' Pharmacopeia 2nd Ed. <795>). Tässä säilyvyystutkimuksessa tavoitearvona pidettiin lääkeaineiden lähtöpitoisuuksia (taulukko 8). Tulokset laskettiin automatisoidulla QuanLynx-ohjelmalla. Tutkittavat komponentit tunnistettiin tarkan massan avulla käyttämällä lukkomassakorjausta. Tulosten laskemisen mahdollistamiseksi ohjelmaan syötettiin lääkeaineiden tarkat massat ja retentioajat (fentanyyli: 337,228 (m/z), 2,77 min; levobupivakaiini 289,228 (m/z), 2,41 min; lidokaiini 235,181 (m/z), 1,38 min; massaikkuna 0,1 Da). Ohjelman sisältämä Apex Track -algoritmi integroi kromatogrammien piikkien pinta-alat, jotka määräytyivät tarkasteltavan ionien määrästä eri aikapisteissä. Quan Lynx laski näytteiden sisältämien lääkeaineiden määrän piikkien pinta-aloista määritetyn vasteen ja standardeista muodostamansa kalibraatiosuoran avulla. Tutkimuspäivinä 0–3 kalibrointi tehtiin ulkoisen standardin menetelmällä ja tutkimuspäivästä 7 lähtien

kalibroinnissa käytettiin sisäisen standardin menetelmää. Näytteiden laimennokset otettiin huomioon tuloksia laskettaessa. Kemiallisen säilyvyyden tulokset laskettiin GraphPad Prism5 -ohjelmalla (versio 6,07) lineaarisen regression avulla.

8.4 Fysikaalisen säilyvyyden tutkiminen

8.4.1 Aistinvarainen tutkimus

Molempien kipulääkeseosten ulkonäön muutoksia seurattiin aistinvaraisesti kaikissa mittausaikapisteissä. Spesifikaation mukaan kipuseokset ovat kirkkaita ja värittömiä liuoksia, joissa ei esiinny saostumia eikä kaasun muodostumista (taulukko 8).

8.4.2 pH-määrittäminen

Lääkeaineseosten pH mitattiin jokaisessa näytteenottoajankohdassa ja hyväksymisrajana oli korkeintaan 0,5 pH-yksikön muutos alkuperäiseen arvoon verrattuna (taulukko 8). pH-mittari kalibroidiin standardiliuoksilla pH 4,0; 7,0 ja 10,0 ennen jokaista mittausaikapistettä ja kalibrointi tarkistettiin mittaamalla puskuriliuos pH 4,00 tai pH 7,00. Kalibroinnin ja standardiliuosmääritysten hyväksymisrajana pidettiin $\pm 0,04$ yksikön vaihtelua standardin sertifioidusta arvosta ja mittaukset täyttivät vaatimuksen. Ensimmäisissä mittausaikapisteissä pH:n määrittämiseen käytetty näytemäärä oli 1,0 millilitraa, mutta näytetilavuutta lisättiin tutkimuksen aikana tulosten luotettavuuden parantamiseksi. Viimeisissä mittausaikapisteissä pH:n määrittämiseen käytetty näytetilavuus oli 3,0–3,5 millilitraa.

8.4.3 Gravimetrinen määrittäminen

Veden haihtumista ruiskuista seurattiin punnitsemalla kontrolliruiskut näytteenottopisteissä 4h, 24h, 3vrk, 7vrk, 14vrk, 21vrk ja 28vrk. Ruiskut poistettiin sekundaaripakkauksistaan punnitsemisen ajaksi. Gravimetrinen määrittäminen hyväksymisrajana oli korkeintaan 5 prosentin muutos alkuperäiseen painoon verrattuna (taulukko 8).

8.5 Mikrobiologisen säilyvyyden tutkiminen

Euroopan farmakopean mukaan parenteraalisten lääkevalmisteiden ja infuusionesteiden tulee täyttää hiukkaskontaminaatio-, steriiliys- ja bakteerindotoksiini/pyrogeeni -testien vaatimukset (Ph. Eur. 8th Ed. 2.9.19., 2.6.1., 2.6.14.). Valmisteiden on oltava kirkkaita ja partikkelittomia liuoksia, joissa ei esiinny mikrobikasvua. Mikrobiologisten tutkimusnäytteiden steriiliystutkimukset tehtiin 28 vuorokautta kestävän rikastusviljelyn avulla Oulun NordLabin laboratoriossa (NordILab Oulu 2016). Molemmista lääkeaineseoksista otettiin kolme rinnakkaista näytettä heti tutkimusruiskujen valmistuttua (t=0) ja viimeisenä tutkimuspäivänä (t=28). Näytteiden steriiliydestä saatiin alustava vastaus kahden vuorokauden kasvatuksen jälkeen ja lopullinen vastaus 28 vuorokauden jälkeen viljelyn päätyttyä. Kipulääkeseoksista ei tutkittu paljain silmin näkymättömiä partikkeleita eikä endotoksiineja/pyrogeenejä, sillä valmisteeseen käytettiin ainoastaan kaupallisia, parenteraalisia, lääkevalmisteita ja valmistus tapahtui kontrolloiduissa olosuhteissa sairaala-apteekin A-luokan puhdastilassa.

9 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

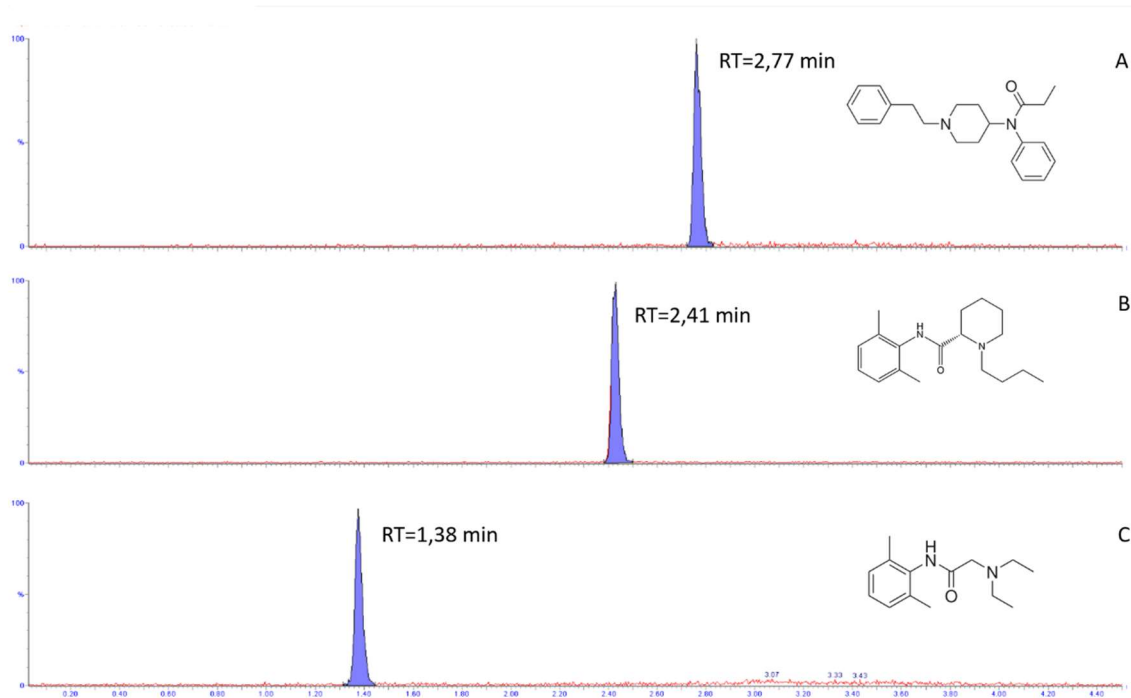
9.1 Menetelmän kehitys

Tutkimusnäytteille pyrittiin valitsemaan laimennossuhde, joka mahdollistaisi molempien lääkeaineiden määrittämisen samasta näytteestä. Lääkeaineiden suuri pitoisuusero aiheutti sen, ettei analyyteille löydetty yhtä molemmille sopivaa laimennospitoisuutta vaan ne tuli määrittää molemmat omista näytteistään. Fentanyylinäytteiden laimennossuhteeksi valittiin 1:100 (56 ng/ml EPI5 ja 74 ng/ml EPI7) ja levobupivakaiininäytteiden laimennossuhteeksi 1:50000 (22 ng/ml EPI5 ja 22 ng/ml EPI7).

Ajoliuokseksi oli valittu muurahaishapon vesiliuoksen (0,1 %) ja asetonitriilin seos. Menetelmässä käytettiin gradienttiajoa, koska isokraattisella ajolla levobupivakaiini oli saatu retentoitumaan vain pienellä orgaanisen liuottimen pitoisuudella, mistä johtuen fentanyylin retentioaika oli kasvanut liian suureksi. Gradienttiajo päädyttiin toteuttamaan nostamalla asetonitriilin osuus 16 prosentista 34 prosenttiin 3 minuutissa, pitämään 34 % prosentissa 0,5 minuuttia ja laskemaan alkupitoisuuteen 1 minuutissa. Virtausnopeudeksi valittiin 0,4 ml/min ja kolonnin lämpötilaksi 30 °C.

Ionisaatiomenetelmänä käytettiin sähkösumutus-ionisaatiota (ESI). Kaikki ionit mitattiin positiivisessa ionimuodossa. Lukkomassana toimi 2 ng/ml leusiinienkefaliiniliuos (asetonitriili/vesi 1:1, 0,1 muurahaishappo), jonka tarkka m/z-arvo on 556,2771. Sumutuskaasuna käytettiin typpeä virtausnopeudella 400 l/h ja sumutuskaasun lämpötila oli 400 °C. Sumutuskapillaarin jännite oli 3 kV, kartiojännite 30 V ja ionilähteen lämpötila 150 °C.

Menetelmän kehitysvaiheessa levobupivakaiinin oli havaittu vaikuttavan fentanyylin antaman vasteen intensiteettiin, vaikka lääkeaineiden piikit erottuivat kromatogrammissa selvästi (levobupivakaiinin retentioaika 2,41 min ja fentanyylin 2,77 min) (kuva 17). Levobupivakaiinia sisältävät keinotekoiset näytteet antoivat fentanyylille suuremman vasteen kuin fentanyylin puhdasaine ilman levobupivakaiinia. Levobupivakaiinin suuresta pitoisuudesta johtuen, levobupivakaiini piikin epäiltiin häntävän niin pitkälle, että se häiritsi fentanyylin määrittystä. Lääkeaineiden erottumista yritettiin parantaa gradienttiajoa muuttamalla, mutta siinä ei onnistuttu.



Kuva 17. Fentanyylin (7,4 ng/ml) (A), Levobupivakaiinin (22 ng/ml) (B) ja Lidokaiinin (10ng/ml) (C) kromatogrammit ja rakennekaavat. Ulkoisen ja sisäisen standardin menetelmässä käytettiin gradienttiajoa virtausnopeudella 0,4 ml/min kolonnin lämpötilan ollessa 30 °C.

Erikoistyon puolivälissä menetelmän luotettavuutta pyrittiin lisäämään ottamalla mukaan sisäinen standardi (taulukko 12). Sisäiseksi standardiksi valittiin lidokaiini, joka sisältää samankaltaisia kemiallisia rakenteita kuin fentanyyli ja levobupivakaiini. Kaikkien lääkeaineiden rakenteessa on aromaattinen rengas, aminoryhmä ja niitä yhdistävä amidiketju. Lisäksi lidokaiinin retentioaika on riittävän erilainen verrattuna fentanyylin ja levobupivakaiinin retentioaikoihin, joten sen piikki on selkeästi erotettavissa kromatogrammissa (kuva 17).

Taulukko 12. Analyysimenetelmän olosuhteet, laimennokset ja standardit tutkimuksen alussa ja lopussa

Menetelmä	Gradienttiajon olosuhteet	Näyte	Näytteiden laimennokset (v/v)	Näytteiden pitoisuus (ng/ml)
Ulkoisen standardi	Asetonitriili	Fentanyyli (EPI5)	1:100	56
	16 % → 34 % (3 min)	Fentanyyli (EPI7)	1:100	74
	34 % (0,5 min)	Levobupivakaiini	1:50000	22
Sisäinen standardi	34 % → 16 % (1 min)	Fentanyyli (EPI5)	1:1000	5,6
	Asetonitriili	Lidokaiini	1: 100000	10
	10 % → 35 % (3 min)	Fentanyyli (EPI7)	1:1000	7,4
	35 % (0,5 min)	Lidokaiini	1:100000	10
	35 % → 10 % (1 min)	Levobupivakaiini	1:50000	22
	Lidokaiini	1:1000000	10	

Taulukossa 13 on fentanyylin ja levobupivakaiinin kromatogrammeista käsin laskettuja kromatografisia tekijöitä. Erottumistehokkuutta kuvaavasta resoluutio-arvosta (R_S) nähdään, että fentanyylin ja levobupivakaiinin piikit erottuivat toisistaan vain osittain, jonka vuoksi levobupivakaiinin piikki häiritsevi fentanyylin kvantitointia (taulukko 13). Kun resoluutio on $\geq 1,5$, piikit erottuvat toisistaan pohjaviivan asti ja analyytit erottuvat riittävästi toisistaan (Ornaf ja Dong 2005). Sisäisen standardin menetelmässä fentanyylinäytteitä päätettiin laimentaa vielä 10 kertaa lisää, jotta levobupivakaiinin häiritsevä vaikutus olisi hävinnyt. Näytteet tutkittiin ajallisesti samanlaisella gradienttiajolla kuin ulkoisen standardin menetelmässä, mutta asetoniitriilin osuus nostettiin 10 prosentista ja 35 prosenttiin.

Taulukko 13. Fentanyylin, levobupivakaiinin ja lidokaiinin kromatografiset tekijät sisäisen standardin menetelmässä

Kromatografinen tekijä	Fentanyyli	Levobupivakaiini
Retentioaika (min)	2,77	2,41
Symmetrisyystekijä (A_S)	1,13	1,20
Resoluutio (R_S)	1,06	1,06

9.2 Menetelmän luotettavuuden mittaaminen

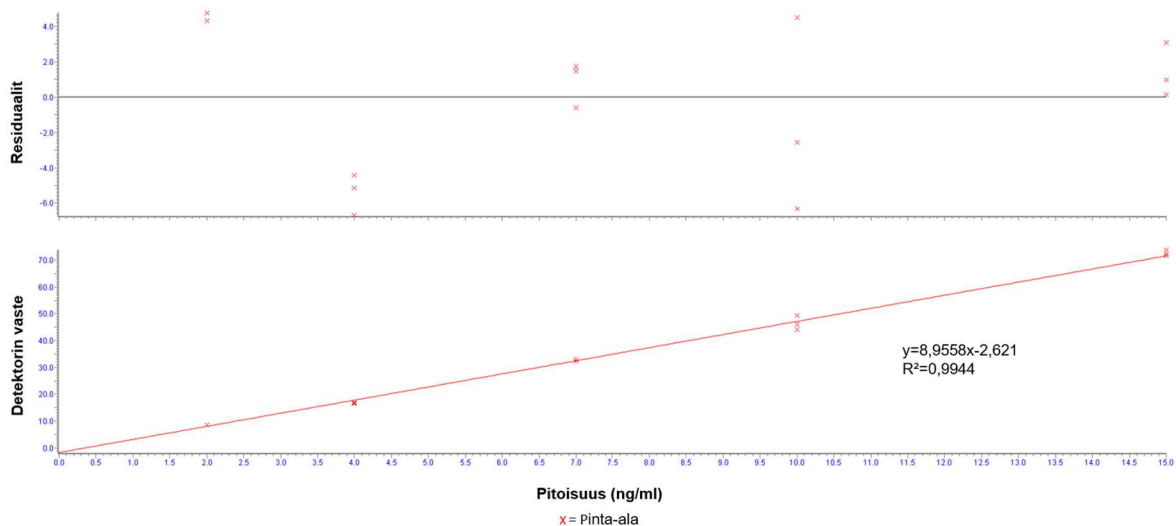
Lääkeaineiden ja -valmisteiden säilyvyytutkimuksiin käytettyjen menetelmien tulisi olla validoituja ja säilyvyytutkimuksiin kehitettyjä (ICH Q2(R1) 2005, ICH Q1A(R2) 2003). Menetelmän validoinnilla osoitetaan, että menetelmä soveltuu käyttötarkoitukseensa. ICH:n ohjeistuksissa menetelmän luotettavuuden tutkimisessa käytettäviä parametreja ovat toistettavuus, laboratorion sisäinen toistettavuus, laboratorion sisäinen uusittavuus, spesifisyys, toteamisraja, määritysraja, lineaarisuus, haavoittuvuus ja alue. Jokaiselle tutkittavalle parametrille asetetaan hyväksymiskriteerit, jotka menetelmän tulee täyttää. Onnistuneen validoinnin kannalta olennaista on tuntea validointiparametrien sisältö sekä tunnistaa ja tutkia ne parametrit, jotka ovat merkityksellisiä menetelmän toimivuudelle. Kirjallisuudesta löytyvät fentanyylille ja levobupivakaiinille/bupivakaiinille tehdyt säilyvyytutkimukset on validoitu ICH-ohjeistuksien mukaisesti. (Helin-Tanninen ym. 2013, Piekarski ym. 2012, Priston ym. 2004, Boitquin ym. 2004, Jäppinen ym. 2003).

Tässä erikoistyössä ensimmäisistä mittausaikapisteistä ($t=0-3$ vrk) saadut tulokset osoittivat, ettei käytetyllä ulkoisen standardin menetelmällä saada riittävän luotettavia tuloksia. Neljännen mittausaikapisteen jälkeen ($t=7$ vrk) menetelmää kehitettiin edelleen ja pyrittiin saamaan viimeisistä mittausaikapisteistä oikeelliset tulokset ilman odottamatonta hajontaa. Menetelmän luotettavuutta pyrittiin parantamaan ottamalla mukaan sisäinen standardi, valmistamalla mallinäytteet ja tutkimalla menetelmän toimivuutta mallinäytteiden avulla. Molempien lääkeaineiden mallinäytteet valmistettiin kolmella eri pitoisuusalueella. Mitattavat pitoisuudet olivat EPI5-koostumuksen tavoitepitoisuudet sekä lääkeaineiden pitoisuudet menetelmän ylä- ja alarajalla. Menetelmän ylä- ja alarajat olivat samat kuin kalibrintisuorien ylimmät ja alimmat pisteet. Mallinäytteet käsiteltiin samalla tavalla kuin varsinaiset näytteet. Saatiin fentanyylinäytteet pitoisuuksilla 2,8 ng/ml, 5,6 ng/ml ja 15 ng/ml ja levobupivakaiininäytteet pitoisuuksilla 11ng/ml, 22 ng/ml ja 50 ng/ml. Näytteitä valmistettiin kolme rinnakkaista kustakin pitoisuudesta.

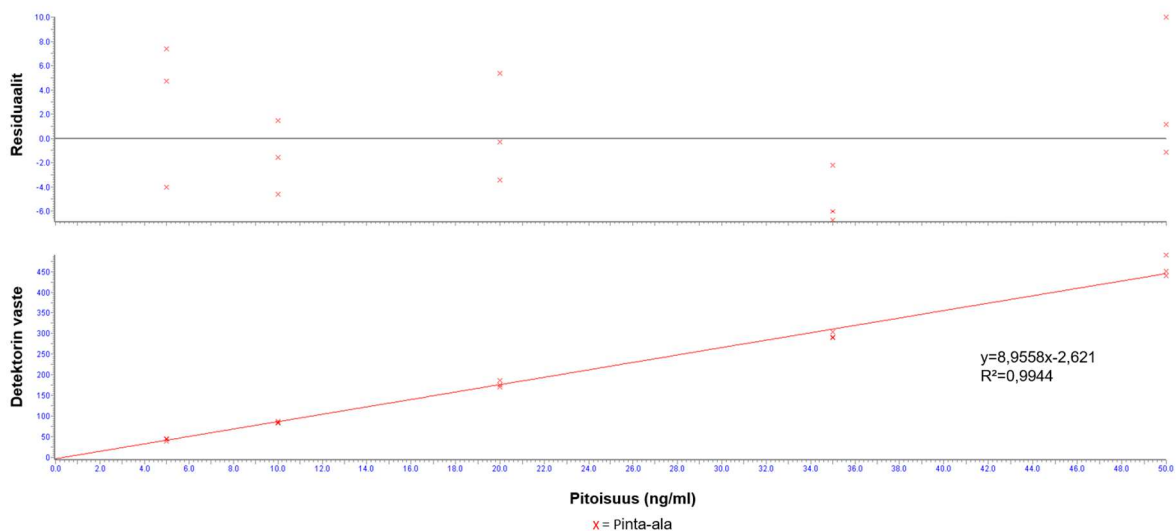
Menetelmän spesifisyyden avulla arvioidaan menetelmän kykyä mitata tutkittavaa yhdistettä, kun näytteen muut komponentit ovat mukana mittauksessa. Spesifisyyttä voidaan mitata vertaamalla tutkittavaa yhdistettä sisältävien keinotekoisien näytteiden tuloksia sellaisiin näytteisiin, joissa tutkittava yhdiste ei ole läsnä.

Säilyvyystutkimuksissa tulee olla mukana myös osoitus tutkittavan yhdisteen erottumisesta mahdollisista hajoamistuotteista. Hajoamiskokeissa yhdiste altistetaan erilaisille hajoamista aiheuttaville tekijöille kuten hapolle, emäkselle, lämmölle ja hapettimelle ja tutkitaan, että yhdisteen mahdolliset hajoamistuotteet eivät muodosta lääkeaineiden määritystä häiritseviä piikkejä. Tässä erikoistyössä käytetyn menetelmän spesifisyys ei ollut vaaditulla tasolla, sillä fentanyyli ja levobupivakaiini eivät erottuneet toisistaan riittävästi ja levobupivakaiini vaikutti fentanyyliinkin intensiteettiin. Toisaalta menetelmä ei kyennyt mittaamaan fentanyyliä oikeellisesti ilman levobupivakaiinin läsnäoloa vaan fentanyylin puhtasaineen antama vaste jäi liian pieneksi. Kirjallisuudesta löydettyjä fentanyylin hajoamistuotteita tai muitakaan ylimääräisiä piikkejä ei havaittu kromatogrammeissa tutkimuksen aikana.

Menetelmän lineaarisuudella tarkoitetaan menetelmän kykyä antaa tuloksia, jotka ovat suoraan verrannollisia tutkittavan aineen konsentraatioon (ICH Q2(R1) 2005). Lineaarisuuskokeiden avulla määritetään menetelmän käyttöalue, jolla riittävä tarkkuus ja oikeellisuus voidaan saavuttaa. Kuvissa 18 ja 19 ovat fentanyylin ja levobupivakaiinin kalibrintisuorat, jotka muodostettiin ajamalla kolme rinnakkaista määritystä viidellä eri pitoisuusalueella. Tuloksista laskettiin lineaarinen regressiosuora pienimmän neliöjäännössumman menetelmällä, jolloin kalibrintinäytteiden konsentraation ja mittauslaitteen antaman vasteen välille saatiin ensimmäisen asteen yhtälö.



Kuva 18. Lineaarisuus: Fentanyylin kalibrintisuora ja residuaalien kuvaaja viidellä eri pitoisuustasolla (2–15 ng/ml, n=3) sisäisen standardin menetelmässä.



Kuva 19. Lineaarisuus: Levobupivakaiinin kalibrintisuora ja residuaalien kuvaaja viidellä eri pitoisuustasolla (5–50 ng/ml, n=3) sisäisen standardin menetelmässä.

Kalibrintisuoran yhteydessä ilmoitetaan suoran korrelaatiokerroin (R^2), y-akselin leikkauspiste, regressiosuoran kulmakerroin ja neliöjäännössumma. Korrelaatiokerrointa pidetään yleisesti parhaana lineaarisuuden mittarina (Jimidar ym. 2007). Jimidar ym. suosittavat korrelaatiokertoimen hyväksymiskriteeriksi $\geq 0,999$ menetelmän alueella 80–120 % ja koko menetelmän alueella (yläraja 120 %) $\geq 0,99$. Lineaarisuutta voidaan tutkia myös vastetekijän ja y-residuaalien avulla sekä tarkastelemalla detektorin antamaa vastetta visuaalisesti analyysin pitoisuuden funktiona. Vastetekijä kuvaa detektorin antaman vasteen ja konsentraation suhdetta. Vastetekijän suhteellisen keskihajonnan hyväksymiskriteeriksi on esitetty ≈ 3 % menetelmän alueella 80–120 % ja $\approx 10,0$ % koko menetelmän alueella (yläraja 120 %). Y-residuaalit (mitattujen ja kalibraatiosuoralta laskettujen y-arvojen erotus) kuvataan x-akselin funktiona (kuvat 18 ja 19). Jos kalibrintisuora on lineaarinen, eri pitoisuustason residuaalit jakautuvat tasaisesti nollatason molemmin puolin. Kalibraatiosuoran visuaalisen arvioinnin hyväksymiskriteerinä voidaan pitää sitä, että lineaarinen riippuvuus on selkeästi havaittavissa. Fentanyylin kalibrintisuoran korrelaatiokerroin oli 0,9969 ja levobupivakaiinin 0,9944 menetelmän alueella 50–150 %. Y-residuaalikuvaajista nähdään, että rinnakkaiset residuaalit poikkesivat toisistaan ja saattoivat asettua jopa molemmin puolin nollatasoa. Osa residuaaleista jäi kaus nollatasosta. Myös fentanyylin ja levobupivakaiinin kalibrintisuorista nähdään, että eri

pitoisuustasolla määritettyjen rinnakkaisten mittausten välillä oli hajontaa ja osa tuloksista poikkeaa suoralta.

Toistettavuus ilmaisee peräkkäisten mittaustulosten läheisyyttä (ICH Q2(R1) 2005), Jimidar ym. 2007). Laboratorion sisäinen toistettavuus kuvaa toistettavuutta lyhyellä aika välillä samoissa mittausolosuhteissa ja laboratorion sisäinen uusittavuus tarkoittaa toistettavuutta laboratorion sisällä eri päivinä. Jimidar ym. mukaan laboratorion sisäisen toistettavuuden suhteellinen keskihajonta (RSD) pitäisi olla $\leq 2,0$ %, kun määritetään lääkevalmisteessa olevan lääkeaineen pitoisuutta. Kirjallisuudessa kuvatussa fentanyylille ja levo/bupivakaiinille tehdyissä säilyvyystutkimuksissa fentanyylin päivän sisäinen ja päivien välinen toistettavuus on ollut alle 2 % ja levo/bupivakaiinin välillä 0,6 %–2,72 % ja 0,8 %–1,36 % (Helin-Tanninen ym. 2013, Piekarski ym. 2012, Boitquin ym. 2004, Jäppinen ym. 2003) Tässä erikoistyössä menetelmän toistettavuutta tutkittiin sisäisen standardin käyttöön oton yhteydessä rinnakkaisten keinotekoisien mallinäytteiden avulla. Vaikka tavoitteessa ei pysytty (RSD 3 %–13 %), sisäinen standardi lisäsi menetelmän toistettavuutta, sillä viimeisissä mittausaikapisteissä rinnakkaiset määritykset olivat lähempänä toisiaan kuin ulkoisen standardin menetelmällä mitattaessa.

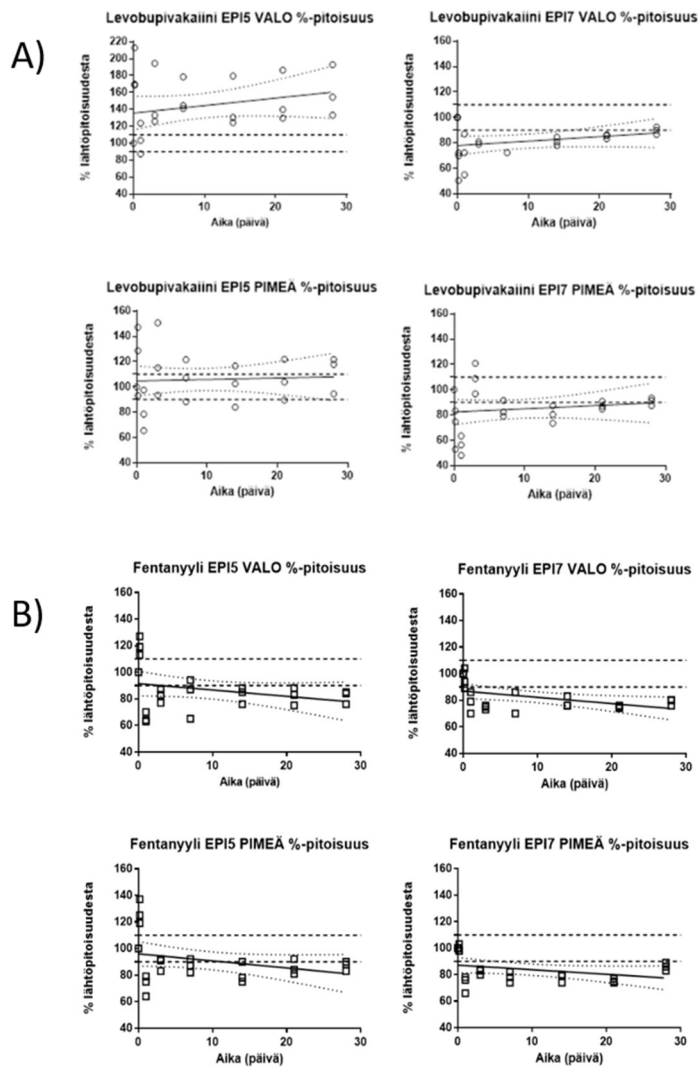
Oikeellisuus ilmoittaa mitatun arvon poikkeaman tunnetusta todellisesta arvosta (ICH Q2(R1) 2005). Lääkevalmistetta tutkittaessa menetelmän oikeellisuus tulee osoittaa kolmella rinnakkaisella määrittelyllä kolmella eri pitoisuustasolla. Oikeellisuutta arvioidaan oikeellisuusprosentin avulla, joka saadaan jakamalla määritetty pitoisuus teoreettisella pitoisuudella ja muuttamalla saatu arvo prosenteiksi. Oikeellisuusprosenttien keskiarvon tulee olla 98–102 % ja RSD:n ≤ 2 % (Jimidar ym. 2007). Tässä erikoistyössä oikeellisuuskäytteinä toimivat seitsemäntenä tutkimuspäivänä valmistetut keinotekoiset näytteet. Näytteiden pitoisuudet olivat 91–108 % välillä lukuun ottamatta määrittelyä levobupivakaiinin alarajalla, jossa fentanyylin pitoisuus jäi vieläkin pienemmäksi. Kun levobupivakaiinia oli huomattavasti vähemmän kuin näytteissä yleensä, fentanyylin pitoisuuteen aiheutui systemaattinen virhe siten, että fentanyyliä oli vain 83 % teoreettisesta pitoisuudesta. Vaikka oikeellisuus ei ollut riittävällä tasolla, todettiin sen parantuneen sisäisen standardin avulla, sillä määrittelyt olivat lähempänä todellista arvoa kuin ulkoisen standardin menetelmässä.

Käytetyn menetelmän luotettavuuden mittaamisesta saadut tulokset osoittivat, ettei menetelmää voida pitää riittävän luotettavana säilyvyystutkimukseen. Menetelmän spesifisyys, tarkkuus ja toistettavuus eivät ole riittävällä tasolla osoittamaan fentanyyliin ja levobupivakaiinin säilyvyyttä.

9.3 Kemiallinen säilyvyys

Kemiallisen säilyvyyden hyväksymiskriteerinä oli, että fentanyyliin ja levobupivakaiinin pitoisuus ei saa muuttua enempää kuin 10 % alkuperäiseen arvoon verrattuna (taulukko 8). Koska säilyvyystutkimuksissa kaikkien seuraavien mittausaikapisteiden tuloksia verrataan alkuperäiseen pitoisuuteen, on lähtöpitoisuuden oikeellisuus olennaisen tärkeää (ICH Q1A(R2) 2003). Jos lähtöpisteessä ($t=0$) rinnakkaisten mittausten välillä on suurta hajontaa ja tulos ei ole oikeellinen, vaikuttaa se virheellisesti myös kaikkien muiden mittausaikapisteiden tuloksiin.

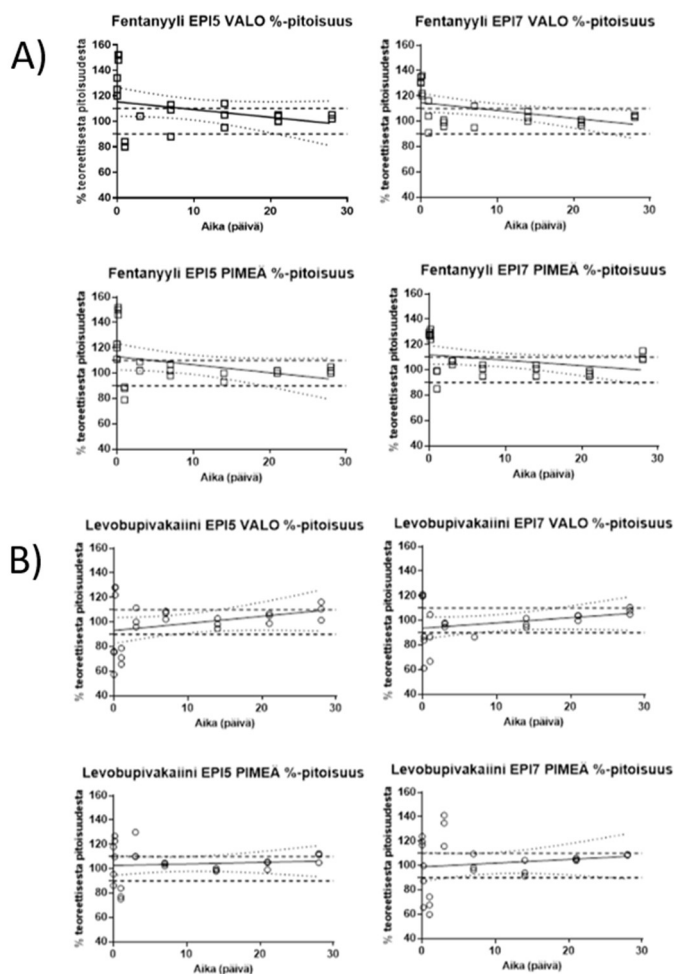
Kuvassa 20 on esitetty fentanyyliin ja levobupivakaiinin pitoisuusmittausten tulokset lähtöpitoisuuteen (100 %) verrattuna regressioanalyysin avulla (GraphPad Prism5, versio 6,07). EPI5-lääkeaineseoksen rinnakkaisten fentanyyliinäytteiden määritetty lähtöpitoisuus oli 111–134 % ja EPI7:ssa 127–135 % teoreettisesta pitoisuudesta. EPI5-lääkeaineseoksen rinnakkaisten levobupivakaiininäytteiden lähtöpitoisuus oli 56–118 % ja EPI7:ssa 117–124 % teoreettisesta pitoisuudesta. Todennäköisesti suuri hajonta ja pitoisuuksien vaihtelu johtuivat analyysimenetelmän epäluotettavuudesta. Tästä johtuen säilyvyystutkimuksesta saatuja tuloksia ei voitu hyödyntää sellaisenaan, vaan tutkimus päätettiin uusien luotettavien tulosten saamiseksi. Tutkimussuunnitelmasta jouduttiin poikkeamaan, jotta erikoistyöselostuksen kirjoittaminen olisi mahdollista. Tässä erikoistyöselostuksessa tulokset analysoitiin vertaamalla eri mittausaikapisteissä saatuja tuloksia niiden teoreettiseen pitoisuuteen (ei lähtöpitoisuuteen). Teoreettiseen pitoisuuteen vertaamalla voitiin pohtia myös menetelmän kehityksen vaikutusta viimeisten mittausaikapisteiden tuloksiin.



Kuva 20. EPI5- ja EPI7-lääkeaineseosten kemiallinen säilyvyys huoneenlämmössä valossa ja pimeässä. A on fentanyylin pitoisuudet ja B on levobupivakaiinin pitoisuudet alkuperäiseen pitoisuuteen verrattuna 28 vuorokauden aikana. Kuvassa katkoviivat ovat 90 % ja 110 % säilyvyyden hyväksymisrajat ja 95 % luottamuväli.

Kuvassa 21 on esitetty fentanyylin ja levobupivakaiinin pitoisuusmittausten tulokset teoreettiseen lähtöpitoisuuteen verrattuna. Säilyvyyden osoittamiseksi kunkin mittausaikapisteen määritysten ja luottamusvälin pitäisi olla hyväksymisrajojen (vaakasuorat katkoviivat) sisäpuolella. Kuvasta nähdään, että lähes kaikki ensimmäisenä tutkimuspäivänä (t=0 ja t=4h) määritetyt fentanyylin ja levobupivakaiinin pitoisuudet ovat 90 % ja 110 % säilyvyyden hyväksymisrajojen ulkopuolella. Lisäksi kaikissa ulkoista standardia käytetyissä mittausaikapisteissä (t=0–3 vrk) rinnakkaisten

määrittysten ja mittauspäivien välisten määrittysten välillä oli suurta vaihtelua. Sisäisen standardin käyttöönnoton myötä rinnakkaisten määrittysten pitoisuudet lähenivät toisiaan ja myös mittausaikapisteiden välinen hajonta väheni. Lisäksi pitoisuudet pysyivät muutamaa mittausta lukuunottamatta 90 % ja 110 % säilyvyyden hyväksymisrajojen sisäpuolella. Tämän perusteella voidaan arvioida, että lääkeainepitoisuuksissa havaittu vaihtelu oli todennäköisesti peräisin analyysimenetelmän epäluotettavuudesta eikä itse valmisteesta tapahtuneista pitoisuusmuutoksista.



Kuva 21. EPI5- ja EPI7-lääkeaineseosten kemiallinen säilyvyys huoneenlämmössä valossa ja pimeässä. A on fentanyylin pitoisuudet ja B on levobupivakaiinin pitoisuudet teoreettiseen pitoisuuteen verrattuna 28 vuorokauden aikana. Kuvassa katkoviivat ovat 90 % ja 110 % säilyvyyden hyväksymisrajat ja 95 % luottamuväli.

Pitoisuusmittauksista saadut tulokset eivät täyttäneet lähtöpitoisuuksiin verrattavaa $\pm 10\%$ spesifikaatorajaa (taulukko 8). Viimeisten mittausaikapisteiden tuloksia voidaan pitää lähinnä suuntaa antavina, mutta oikeellisen ja luotettavan lähtöarvon puuttuessa tutkimuksella ei voitu osoittaa EPI5- ja EPI7-lääkeaineseosten kemiallista säilyvyyttä. Koska hetkellä $t=0$ määritetyt lähtöpitoisuudet eivät olleet luotettavia, myöskään myöhempiä mittausaikapisteitä itsenäisinä mittaustuloksina ei voida pitää perusteluna tuotteen säilyvyydelle. Säilyvyyden osoittamiseksi valmisteen on säilyttävä muuttumattomana hetkestä $t=0$ hetkeen $t=28\text{vrk}$.

9.4 Fysikaalinen säilyvyys

9.4.1 Aistinvarainen tutkimus

Jokaisessa mittausaikapisteessä tutkimusliuokset olivat kirkkaita ja värittömiä eikä niissä havaittu saostumia tai kaasun muodostumista. Valmisteissa ei tapahtunut aistinvaraisesti havaittavia muutoksia.

9.4.2 pH-määrittäminen

Tutkimusnäytteiden pH (taulukko 14) ei täyttänyt spesifikaation (taulukko 8) mukaisia rajoja johtuen laboratoriovirheestä. Vaikka ennen erikoistyön aloittamista mittaamenetelmän (pH-laitteen, mittausastian, näytemäärän) toimivuus oli osoitettu mittaamalla vettä ja standardiliuosta (pH 7), ensimmäisessä mittausaikapisteessä määritetyt EPI5- näytteiden pH-arvot poikkesivat toisistaan merkittävästi (pH 5,7–7,2) (taulukko 12). pH-määrittämisessä ilmennyt ongelmaa ei saatu ratkaistua toiseen mittausaikapisteeseen ($t=4\text{h}$) mennessä. Rinnakkaiset EPI5- ja EPI7-näytteet yhdistettiin suuremman näytetilavuuden saamiseksi. Yhdistetyille näytteille mitattiin pH-arvot väliltä 5,7–6,9. pH:n määrittämisessä ilmenneen ongelman jäljittämisen ja tutkimusruiskujen säilytyspaikan muuttamisen seurauksena EPI7-ruiskujen alkuperäiset pH-arvot ($t=0$) ja kaikkien ruiskujen toisen mittausaikapisteen ($t=4\text{h}$) arvot jäivät mittaamatta pH-mittarilla. Lopulta yhdistettyjen rinnakkaisnäytteiden pH mitattiin kahdella eri asteikon omaavalla indikaattoripaperilla (pH 0–14 ja 0–6) kahdessa

ensimmäisessä mittausaikapisteessä (t=0 ja t=4h). Indikaattorien väriasteikkoihin vertaamalla näytteen pH:n todettiin olevan välillä 4,5–5.

pH-määrittystä hankaloitti se, ettei pH-mittarin lukema useinkaan pysähtynyt ja mitattu pH-arvo oli hankalasti tulkittavissa. pH-mittaria testatessa standardiliuoksen todellinen pH oli tiedossa, mikä helpotti tuloksen tulkintaa. Lisäksi mittari tasaantui paremmin standardiliuosta mitattaessa. Neljännessä mittausaikapisteessä (t=3vrk) otettiin käyttöön mittarin toiminto, joka automaattisesti lukitsi mitatun arvon näytölle, kun mittaus oli valmis. Automaattilukituksen käyttöönottamisen ja näytemäärän lisäämisen avulla mitattujen pH-arvojen hajonta väheni, mutta kolmessa eri mittausaikapisteessä (3vrk, 7 vrk ja 14vrk) yksi näytteistä antoi poikkeavan tuloksen. Poikkeava arvo saatiin jokaisella kerralla eri ruiskusta otetusta näytteestä. Poikkeaman syyksi epäiltiin koeputkien kontaminaatiota, joten viimeisiä tutkimuspäiviä varten koeputket pestiin niiden puhtauden varmistamiseksi. Tutkimuspäivästä 14 lähtien mitatut pH-arvot olivat linjassa keskenään ja niitä voidaan pitää oikeellisina. Myös kontrolliruiskuista otettujen näytteen pH:t vastasivat tutkimuspäivinä 14, 21 ja 28 mitattuja pH-arvoja. Luotettavien alkuarvojen puuttuessa ei tuloksia voida verrata pH:lle määritetyn spesifikaation mukaisesti. Jos indikaattoripaperilla määritettyjen alkuarvojen oletettaisiin olevan lähempänä arvoa 5, mittausaikapisteissä 14vrk–29vrk määritetyt pH-arvot täyttäisivät spesifikaation.

Taulukko 14. pH-mittarilla määritetyt pH-arvot

	Keskiarvo ± keskihajonta			
	EPI5 valo	EPI5 pimeä	EPI7 valo	EPI7 pimeä
0h	6,4 ± 0,7	5,8 ± 0,1	-	-
4h	-	-	-	-
24h	5,2 ± 0,1	5,7 ± 0,7	5,3 ± 0	5,3 ± 0
3vrk	5,9 ± 0,6	5,4 ± 0,1	5,3 ± 0,2	5,4 ± 0,2
7vrk	5,7 ± 0,4	5,3 ± 0,1	5,5 ± 0,06	5,4 ± 1,09
14vrk	5,3 ± 0,1	5,3 ± 0,1	5,3 ± 0,06	5,4 ± 0,2
21vrk	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1	5,3 ± 0,06	5,2 ± 0,06
28vrk	5,1 ± 0,1	5,1 ± 0	5,2 ± 0,06	5,2 ± 0,06
Kontrollit:				
28vrk	5,1 ± 0,02	5,1 ± 0,01	5,2 ± 0,04	5,2 ± 0,01
29vrk	-	5,2 ± 0,04	-	5,2 ± 0,02

9.4.3 Gravimetrinen määrittäminen

Kontrolliruiskujen massat pysyivät niille asetetuissa hyväksymisrakoissa (taulukko 15). Vain pientä massojen alenemaa 0,02–0,09 % havaittiin. Vähäiseen massan muutokseen saattoi vaikuttaa se, että sekundaaripakkaamisen lisäksi ruiskut säilytettiin suurissa kannellisissa muovilaatikoissa. Myös potilaskäyttöön myöhemmin valmistettavat ruiskut tulee säilyttää ja kuljettaa vastaavanlaisissa laatikoissa.

Pakkaamisella on tärkeä merkitys lääkeaineiden ja -valmisteiden säilyvyydelle (Loyd ja Howard 2014, Yoshioka ja Stella 2002). Veden haihtumisen kannalta sekundaaripakkaus suojaa valmistetta sitä ympäröiviltä kosteuseroilta. Helin-Tannisen (2013) työryhmän tekemässä säilyvyystutkimuksessa verrattiin sekundaaripusseihin pakatuista ja ilman sekundaaripakkausta säilytettävistä infuusiopusseista haihtuvan veden määrää 22 °C lämpötilassa. Ilman sekundaaripakkausta säilytettyjen infuusiopussien massa laski 5 % (t=15vrk) ja lähes 20 % tutkimuksen loppuun mennessä (t=60vrk). Sekundaaripakkauksissa säilytettyjen infuusiopussien massa laski 60 vuorokauden aikana vain 0,3–2,4 %.

Taulukko 15. EPI5- ja EPI7-ruiskuissa tapahtunut massan muutos

Lääkeaineseos	Ruiskujen alkumassojen keskiarvo ± muutos lähtöarvosta (%)	Menetetty massa (%)	
		Valoaltistus	Valosuojattu
EPI5	83,5± 0,1	0,09 %	0,07 %
EPI7	85,7± 0,2	0,08 %	0,09 %

9.4.4 Ruiskujen säilytysolosuhteiden seuranta

Tutkimusruiskujen säilytysolosuhteita seurattiin tutkimuksen aikana (taulukko 16). Suhteellinen ilman kosteus oli koko tutkimuksen ajan 20 %. Lämpötilaa mitattiin lämpötilaloggerilla ja olosuhdemittarilla. Lämpötilaloggerilla mitattiin koko tutkimuksen ajan korkeammat lämpötilat kuin olosuhdemittarilla. Olosuhdemittarin lämpötila pysyi alle 25 °C-asteen koko tutkimuksen ajan, mutta lämpötilaloggerilla mitattiin 2 kertaa hetkellisesti korkeampi lämpötila kuin 25 °C. Tutkimuksen alussa lämpötila kohosi yllättäen, kun ruiskut laitettiin säilytysolosuhteisiinsa, jonka seurauksena ruiskujen säilytyspaikkaa jouduttiin muuttamaan. Lisäksi tutkimuksen loppupuolella (t=28vrk)

lämpötilaloggerin mittaama lämpötila kävi hetkellisesti yli 25 °C. Hetkellisellä lämpötilan ylityksellä ei arvioitu olevan vaikutusta tutkimusnäytteiden lämpötilaan.

Taulukko 16. Olosuhdeseurannan tulokset

Aika	Lämpötilaloggerilla mitattu lämpötila (°C)	Olosuhdemittarin mittaama lämpötila (°C)	Suhteellinen kosteus (%)
0 h	22,7	22,4	20
2 h	27,7	23,8	20
4 h	23,7	21,9	20
1 vrk	24,0	21,9	20
2 vrk	24,7	21,8	20
3 vrk	24,6	21,9	20
4 vrk	24,9	22,1	20
7 vrk	24,0	21,6	20
9 vrk	24,4	20,9	20
11 vrk	24,3	20,9	20
14 vrk	24,0	21,8	20
17 vrk	24,9	22,6	20
21 vrk	24,0	21,9	20
24 vrk	24,9	22,1	20
28 vrk	24,3	21,4	20
29 vrk	24,4	21,9	20

9.5 Mikrobiologinen säilyvyys

Steriiliystutkimusten alustavat ja lopulliset tulokset olivat negatiivisia eli 28 vuorokauden aikana kasvatusastioissa ei havaittu mikrobiologista kasvua. Tulokset osoittivat, että EPI5- ja EPI7-liuokset säilyvät steriileinä 28 vuorokautta huoneenlämmössä valolta suojattuna.

Levobupivakaiinin ja muiden paikallispuudutteiden antibakteerista tehoa on tutkittu useissa eri tutkimuksissa (Johnson ym. 2008, Eldor 2003, Pere ym. 1999, Zaidi and Healy 1997). EPI 5- ja EPI7-tutkimuseoksia vastaavalla levobupivakaiinipitoisuudella (1 mg/ml) ei todettu olevan antibakteerista aktiivisuutta sufentaniili-levobupivakaiini-lääkeaineseoksessa (Jäppinen ym. 2003). Raseemisella bupivakaiinilla on osoitettu olevan parempi antibakteerinen teho kuin levobupivakaiini-isomeerilla (Hodson ym. 1999). Bupivakaiinin pienin antibakteerinen konsentraatio oli 2,5 mg/ml ja levobupivakaiinilla 5 mg/ml.

10 YHTEENVETO

Uudella valmistusmenetelmällä valmistetut fentanyyli-NaCl-levobupivakaiini-liuokset täyttivät mikrobiologisen säilyvyyden vaatimukset ja säilyivät steriileinä 28 vuorokautta valolta suojattuna huoneenlämpötilassa. Mikrobiologisen säilyvyyden lisäksi, steriiliys osoittaa EPI-ruiskujen uuden valmistusmenetelmän aseptiikan olevan kunnossa, eikä menetelmän muuttamiseen ole tarvetta ennen suunniteltua uusintatutkimusta.

Kemiallisen säilyvyyden tutkimista varten kehitetyllä UPLC-MS -menetelmällä ei voida riittävän luotettavasti osoittaa liuosten säilyvyyttä ruiskuissa. Liian vähäinen validointi johti siihen, ettei menetelmän epäluotettavuutta havaittu ajoissa, jonka vuoksi menetelmällä ei saatu hyväksymiskriteerit täyttäviä tuloksia. Sisäisen standardin käyttöön otolla pystyttiin vähentämään erityisesti näytteenkäsittelyssä mahdollisesti tapahtuvaa virhettä, mutta myös muita menetelmän satunnaisia ja systemaattisia virheitä. Sisäinen standardi pienensi rinnakkaisten määritysten keskihajontaa ja tulokset olivat lähempänä teoreettista lähtöpitoisuutta kuin ulkoisen standardin menetelmässä. Kuitenkin luotettavien lähtöpitoisuuksien puuttuessa myöskään myöhempiä, näennäisesti lähellä teoreettista pitoisuutta olevia mittaustuloksia, ei voida pitää perusteluna tuotteen säilyvyydelle. Tuloksia ei myöskään voida pitää luotettavina, sillä käytetty menetelmä ei ollut validoitu, joka olisi osoittanut menetelmän antavan oikeellisia ja toistettavia tuloksia.

Fysikaalisen säilyvyyden osalta liuosten ulkonäkö pysyi muuttumattomana. Tutkimusruiskujen massa laski vain hieman 29 tutkimusvuorokauden aikana, joten käytettyjen sekundaaripakkausten todettiin olevan sopivia estämään veden haihtuminen ruiskuista säilytyksen aikana. Liuosten pH-arvot eivät pysyneet niille asetetuissa rajoissa. Ilmeisimmin liian pieni näytemäärä johti siihen, että liuoksille ei saatu määritettyä oikeellisia pH-arvoja tutkimuksen ensimmäisissä mittausaikapisteissä. Hyväksymisraja perustui lähtöarvoon vertaamiseen, mistä johtuen myöskään myöhempien mittapisteiden arvot eivät täyttäneet pH:lle asetettuja hyväksymikriteerejä.

Tutkimuksesta saatuja tuloksia voidaan pitää suuntaa antavina, mutta säilyvyyden osoittamiseen ne eivät riitä. Menetelmän kehityksen seurauksena saatujen tulosten perusteella uusintatutkimuksessa tulisi käyttää sisäisen standardin menetelmää.

Uusintatutkimusta suunniteltaessa on huomioitava, että lääkeaineen lähtöarvon tulee perustua luotettavaan mittaukseen tutkimusnäytteestä (ei teoreettiseen pitoisuuteen), johon myöhemmissä mittausaikapisteissä saatuja tuloksia verrataan. Käytettävän menetelmän on oltava validoitu sekä kyettävä erottamaan ja määrittämään lääkeaineiden lisäksi myös niiden mahdollisia hajoamistuotteita. Menetelmän alueen määrittämiseen käytetään rinnakkaisia validointinäytteitä sopivin pitoisuusvälein. Luotettavan menetelmän alueella detektorin antaman vasteen ja näytteiden pitoisuuden välillä on hyväksyttävä lineaarinen korrelaatio, jolla riittävä tarkkuus ja toistettavuus voidaan saavuttaa.

11 POHDINTA

Vaikka ensimmäisten mittausaikapisteiden perusteella todettiin, ettei käytetyllä menetelmällä pystytä osoittamaan lääkevalmisteiden säilyvyyttä, päätettiin tutkimusta jatkaa erikoistyöselostuksen kirjoittamisen mahdollistamiseksi. Samalla mietittiin kirjoittamisprosessin kannalta sopivaa tutkimuksen lopettamisajankohtaa. Tutkimuspäivälle 29 suunnitellut pitoisuusmittaukset vuorokaudeksi valoon siirretyistä kontrolliruiskuista päätettiin tehdä, jotta saatiin useampi aikapiste ilman näytepitoisuuksien odottamatonta hajontaa. Useampien mittausaikapisteiden avulla pystyttiin pohtimaan menetelmän kehitystä tutkimuksen edetessä ja sen vaikutusta saatuihin tutkimustuloksiin. Lisäksi pystyttiin vertaamaan tutkimuspäivinä 28 ja 29 mitattuja pitoisuuksia, mikä antoi alustavaa viitettä siitä, että 28 vuorokautta pimeässä säilytetyt tutkimusruiskut säilyvät vielä vuorokauden valossa, vastaten ruiskujen olosuhteita sairaalassa. Tulos tulee kuitenkin osoittaa oikeaksi luotettavalla menetelmällä uusintatutkimuksessa. Vielä tutkimuspäivänä 42 oli tarkoitus analysoida lääkeaineiden pitoisuus eri näytteenottopisteissä (4h, 24h, 3vrk, 7vrk, 14vrk, 21vrk ja 28vrk) analysoiduista ruiskuista, jotta olisi saatu tarkempi kuva lääkeaineiden hajoamisreaktion etenemisestä. Tämä kuitenkin päätettiin jättää tekemättä ja keskittyä säilyvyystutkimuksen onnistumisen ja menetelmän luotettavuuden parantamisen kannalta tärkeimpiin asioihin.

Pitoisuusmittausten kannalta suurimmaksi ongelmaksi muodostui menetelmän heikko spesifisyys. Tutkittavat lääkeaineet eivät erottuneet toisistaan riittävästi, vaan levobupivakaiini ja fentanyyli vapautuivat kolonnista osittain samanaikaisesti. Kromatogrammissa fentanyylipeikki muodostui levobupivakiinin häntivän osan päälle. Jotta lääkeaineen pitoisuus voidaan määrittää luotettavasti, on detektorin vasteen tultava ainoastaan kyseisellä hetkellä määritettävästä lääkeaineesta. Uusintatutkimusta varten spesifisyys on osoitettava vertaamalla fentanyyliä sisältävien keinokekoisten näytteiden tuloksia sellaisiin näytteisiin, joissa fentanyyliä ei ole läsnä. Sama on tehtävä myös levobupivakiinin kohdalla. Spesifisyyden tutkimisnäytteinä voisi toimia UPLC-ajoliuos, NaCl-infusioliuos, Fentanyyli-NaCl-liuos, Levobupivakaiini-NaCl-liuos, fentanyyliä ja levobupivakaiinia sisältävät keinokekoiset näytteet sekä tutkimusnäytteiden pitoisuuksia vastaavat standardit. Myös lääkeaineiden erottuminen niiden mahdollisista hajoamistuotteista on osoitettava.

Tämä voitaisiin osoittaa altistamalla tutkimusnäytteiden pitoisuuksia vastaavat standardit stressiolosuhteille (valo, lämpö, kosteus, happo, emäs, vesi ja hapetin) ja vertaamalla tuloksia ilman altistusta mitattujen näytteiden tuloksiin. Lisäksi spesifisyyttä voidaan arvioida laitteiston antamalla raportilla kromatografisista tekijöistä ja piikin puhtaudesta.

Menetelmän validointi on välttämätöntä lääkeaineiden ja -valmisteiden säilyvyystutkimuksen onnistumisen kannalta. Validoinnilla osoitetaan, että menetelmä sopii käyttötarkoitukseensa ja määrittää analyytit riittävän tarkasti ja toistettavasti. Vaikka validoimattomalla menetelmällä pitoisuudet saataisiin mitattua näennäisesti oikein, tulokset eivät kelpaa osoitukseksi lääkeaineen tai -valmisteen säilyvyydestä. Vain validointitutkimusten avulla voidaan varmistua siitä, että menetelmällä saadut tulokset ovat oikeita tai totta.

Säilyvyystutkimuksen toteuttaminen vaatii sairaala-apteekilta paljon resursseja. Tutkimuksen huolellinen suunnittelu ja toteutus sitovat työntekijöitä ja vaativat aikaa. Erityisesti kalliita laitteita ja erityisosaamista vaativat pitoisuusmittaukset joudutaan usein ulkoistamaan, mikä edellyttää yhteistyötä sopimuslaboratorioiden kanssa. Pitoisuusmittausten ulkoistamisen lisäksi raaka-aineet, laitteiden ylläpito ja tutkimuksen muut kustannukset vaativat sairaala-apteekilta myös taloudellisia resursseja.

LÄHTEET

Ahuja S: Thin-layer chromatography: Chromatography and Separation Science, Separation Science and Technology 4: 153–208. Taylor&Francis, Philadelphia 2003

Anuradha G, Dennis W, Lori H ym.: Forced degradation of fentanyl: Identification and analysis of impurities and degradants. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 53(3): 325–334, 2010

Baird R: Mikrobial spoilage, infection risk and contamination control. Kirjassa: Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology. 8. painos, s. 273–292. Toim. Denyer S, Hodges N, Gorman S, Gilmore B, Wile-Blackwell, Chichester 2011

Bakshi M, Singh S: Development of Validated Stability-indicating Assay Methods–Critical Review. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis: 28: 1011–1040, 2002

Bartle K, Cikalo M, Robson M: An Introduction to Capillary Electrochromatography. Kirjassa: Capillary Electrochromatography. 1. painos, s. 1-22. Toim. Smith R, The Royal Society of Chemistry, Cambridge 2001

Berg T, Jørgenrud B, Strand D: Determination of buprenorphine, fentanyl and LSD in whole blood by UPLC-MS-MS. Journal of Analytical Toxicology 37(3):159–165, 2013

Bianchi F, Ginggen A, Tardy Y: Stability and compatibility of drug mixtures in an implantable infusion system. Anaesthesia 63(9): 972–978, 2008

B.Braun Medical Inc. Products. Perfusor® Space Infusion Pump System. Haettu internetistä 15.2.2016. <http://www.bbraunusa.com/products.html>

Boiquin L, Hecq JD, Evrard JM, Vanbeckbergen D, Jamart J, Galanti L: Long-Term Stability of Sufentanil Citrate with Levobupivacaine Hydrochloride in 0,9 % Sodium

Chloride Infusion PVC Bags at 4 °C. *Journal of Pain and Symptom Management* 28(1): 4–6, 2004

Brossard D, Chedru-Legros V, Crauste-Manciet S ym.: Methodological guidelines for stability studies of hospital pharmaceutical preparations. 1. painos, s. 35 - 39. Société Française de Pharmacie Clinique, Groupe d'Evaluation et de Recherche sur la Protection en Atmosphère Contrôlée, 2013

Brustugun J, Troland S, Breivik H: The stability of a sulphite-free epidural analgesic solution containing fentanyl, bupivacaine, and adrenaline. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 57(10): 1321–1327, 2013

Chen FC, Shi XY, Li P, Yang JG, Zhou BH: Stability of Butorphanol–Tropisetron Mixtures in 0,9 % Sodium Chloride Injection for Patient-Controlled Analgesia Use. *Medicine (Baltimore)* 94(6): 1–5, 2015

Chen F, Fang B, Li P, Zhu X, Zhou B: Physico-chemical stability of butorphanol-tramadol and butorphanol-fentanyl patient-controlled analgesia infusion solutions over 168 hours. *Pharmazie* 69: 585–588, 2014

Committee of Ministers of the Council of Europe: Resolution CM/ResAP(2011)1 on Quality and Safety Assurance Requirements for Medicinal Products Prepared in Pharmacies for the Special Needs of Patients. The 1103rd meeting of the Ministers' Deputies, 2011

Connors K, Amidon G, Stella V: *Chemical Stability of Pharmaceuticals, A Handbook for Pharmacists*. 2. painos. A Wiley-Inter Science Publication John Wiley and Sons, New York 1986

Dawson PJ, Bjorksten AR, Duncan IP, Barnes RK, Beemer GH: Stability of Fentanyl, Bupivacaine, and Adrenaline Solutions for Extradural Infusion. *British Journal of Anaesthesia* 68: 414–417, 1992

Dewick P: Essentials of Organic Chemistry: For Students of Pharmacy, Medicinal Chemistry and Biological Chemistry, s.221–282. John Wiley and Sons Ltd, Chichester 2006

Duodecim lääketietokanta. Haettu internetistä 16.11.2015. www.terveysportti.fi

Eldor J: Local anaesthetic antibacterial activity. *Anaesthesia* 58(9): 926–928, 2003

Ensom M, Decarie D, Leung K, Montgomery C: Stability of Hydromorphone–Ketamine Solutions in Glass Bottles, Plastic Syringes, and IV Bags for Pediatric Use. *The Canadian Journal of Hospital Pharmacy* 62(2): 112–118, 2009

European Pharmacopoeia, 8th Edition (Ph. Eur. 8th Ed.). Council of Europe, Strasbourg, France 2010

Fimea, Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus: Apteekkien lääkevalmistus. Määräys 6/2011

Fimea, Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus: Lääkevalmisteen myyntipäällysmarkinnat ja pakkausseloste. Määräys 3/2013

Fimea, Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus: Sairaala-apteekin ja lääkekeskuksen toiminta. Määräys 6/2012

Florence A ja Attwood D: *Physicochemical Principles of Pharmacy*. 4. painos, s. 93 – 137. Pharmaceutical Press, London and Chicago, 2006

Ford J ja Jones R: *Sterile Pharmaceutical Products*. Kirjassa: Hugo and Russell's *Pharmaceutical Microbiology*. 8. painos, s. 381–401. Toim. Denyer S, Hodges N, Gorman S, Gilmore B, Wiley-Blackwell, Chichester 2011

Foster RH, Markham A: Levobupivacaine, A Review of its Pharmacology and Use as a Local Anaesthetic. *Drugs* 59(3): 551–579, 2000

Garg A, Solas DW, Takanashi LH, Cassella JV: Forced Degradation of Fentanyl: Identification and Analysis of Impurities and Degradants. *Journal Of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 53: 325–334, 2010

GMP- Guides to Good Manufacturing Practice, Medicinal Products for Human and Veterinary Use, EudraLex, European commission, Brussels. Haettu Internetistä 11.2.2016. http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index_en.htm

Hamunen K, Kontinen V: Mitä uutta kivun hoidossa? *Sic!* 4, 2015

Heiskanen T: Kivun hoito erikoistekniikoin. *Finnanest* 45(5): 166 – 169, 2012

Helin-Tanninen M, Lehtonen M, Naaranlahti T ym.: Stability of an epidural admixture of levobupivacaine, fentanyl and epinephrine. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 38: 104–108, 2013

Hodges N: Fundamental features of microbiology. Kirjassa: Hugo and Russell's *Pharmaceutical Microbiology*. 8. painos, s. 9–21. Toim. Denyer S, Hodges N, Gorman S, Gilmore B, Wiley-Blackwell, Chichester 2011

Hodson M, Gajraj R, Scott NB: A comparison of the antibacterial activity of levobupivacaine vs. bupivacaine: an in vitro study with bacteria implicated in epidural infection. *Anaesthesia* 54(7): 699–702, 1999

Hoffmann E, Stroobant V: *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 3. painos, s. 175 – 211. John Wiley & Sons Ltd, England, 2007

Institute for Safe Medication Practices (ISMP): ISMP's List of High-Alert Medications, 2015. Haettu Internetistä 16.11.2015.
<http://www.ismp.org/tools/highalertmedications.pdf>

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH): Quality Risk Management, Q9. Step 4, 2005

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH): Pharmaceutical Development, Q8(R2). Step 4, 2009

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH): Photostability Testing of New Drug Substances and Products, Q1B. Step 4, 1996

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH): Stability Testing of New Drug Substances and Products, Q1A(R2). Step 4, February 2003

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1). Step 5, November 2005

Jimidar M, Heylen P, Sm M: Method validation. Kirjassa: HPLC Method Development for Pharmaceuticals. 8. painos, 1–513. Toim. Ahuja S and Rasmussen H, Academic Press, San Diego 2007

Johnson SM, Saint John BE, Dine AP: Local anesthetics as antimicrobial agents: a review. *Surgical Infections* 9(2): 205–213, 2008

Jäppinen A: Stability of Hospital Pharmacy-prepared Analgesic Mixtures Administered by a Continuous Infusion. Publications of the University of Eastern Finland. Dissertations in Health Sciences 91, Itä-Suomen yliopisto, Kuopio 2006

Jäppinen A, Turpeinen M, Kokki H ym.: Stability of sufentanil and levobupivacaine solutions and a mixture in a 0,9 % sodium chloride infusion stored in polypropylene syringes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 19(1): 31–36, 2003

Kalso E: Keskushermostoon vaikuttavat lääkeaineet. Euforisoivat analgeetit. Kirjassa: Farmakologia ja toksikologia. 6. painos, 329 – 358. Toim. Koulu M, Tuomisto J, Kustannusosakeyhtiö Medicina, Kuopio 2001

Kalso E: Uudet opioidivalmisteet kivun hoidossa. Duodecim 115(20): 2211–2214, 1999

Kaur H: Instrumental Methods of Chemical Analysis. s. 942–960, Pragati Prakashan, Meerut 2010

Keinänen N ja Järvimäki V: Syöpäkivun erikoishoidot. Finnanest 37(4): 330–335, 2004

Kintzel PE, Zhao T, Wen B, Sun D: Stability of i.v. admixture containing metoclopramide, diphenhydramine hydrochloride, and dexamethasone sodium phosphate in 0,9 % sodium chloride injection. American Journal of Health-System Pharmacy 71: 2061–2065, 2014

Kipu: Käypä hoito -suositus. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin, Suomen Anestesiologiyhdistyksen ja Suomen Yleislääketieteen yhdistyksen asettama työryhmä, Suomalainen Lääkäriseura Duodecim 4.12.2015, www.kaypahoito.fi

Kistner C, Ensom M, Decarie D, Lauder G, Carr R: Compatibility and Stability of Morphine Sulphate and Naloxone Hydrochloride in 0,9 % Sodium Chloride for Injection. The Canadian Journal of Hospital Pharmacy 66(3): 163–170, 2013

Kiviranta J: Lääkevalmisteiden mikrobiologinen säilyvyys ja säilytysaineet. Kirjassa: Farmaseuttinen mikrobiologia. 2.painos, s. 217–228. Toim. Vuorela P, Suomen Farmaseuttinen Yhdistys ry, Helsinki 2001

Kjonniksen I, Brustugun J, Niemi G, Breivik H, Anderssen E, Klem W: Stability of an epidural analgesic solution containing epinephrine, bupivacaine and fentanyl. Acta Anaesthesiologica Scandinavica 44: 864–867, 2000

Kokki M: Synnytyskivun uudet lääkehoidot. SIC! 4: 20 – 21, 2015

Kontra K, Helin-Tanninen M, Jäppinen A ym.: Lääkkeenvalmistus sairaala-apteekissa. Kirjassa: Sairaala-farmasia. 1.painos, s. 220–363. Toim. Saano S, Naaranlahti T, Helin-Tanninen M, Järviluoma E, Fortis, Kuopio 2005

Kostamoinen L: Ropivakaiini versus levobupivakaiini. Finnanest 34 (1): 35–42, 2001

Kumar V, Rao V, Kumat A, Subbaiah V: A Novel, Rapid, and Validated Stability-Indicating UPLC Method for the Estimation of Drotaverine Hydrochloride and Ibuprofen Impurities in Oral Solid Dosage Form. Scientia Pharmaceutica 83(4): 567–581, 2015

Laakso T: Hyvät tuotantotavat apteekin aseptisessä valmistuksessa. Kirjassa: Farmaseuttinen mikrobiologia. 2.painos, s. 266–276. Toim. Vuorela P, Suomen Farmaseuttinen Yhdistys ry, Helsinki 2001

Laakso T: Lääkkeiden säilyvyys ja säilytysohjeet. SIC! 2/2012
http://sic.fimea.fi/2_2012/laakkeiden_sailyvyys_ja_sailytysohjeet

Laitinen J, Pakanen V: Syöpäkivun hoito. Kustannus Oy Duodecim, 109(10):905,1993
Lloyd A, Howard A: Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. 10 painos, s. 76–100. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2014

Liang L, Wan S, Xiao J, Zhang J, Gu M: Rapid UPLC-MS/MS method for the determination of sufentanil in human plasma and its application in target-controlled infusion system. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 54(4): 838–844, 2011

Loftsson T: Drug Stability for Pharmaceutical Scientists. 1.painos, s. 63–102. Elsevier, Kidlington 2014

Makkonen N: Muista myös apuaineiden aiheuttamat haitat! SIC! 3/2012

Mather LE: Clinical pharmacokinetics of fentanyl and its newer derivatives. *Clinical Pharmacokinetics* 8(5): 422–446, 1983

McClellan K, Spencer C: Levobupivacaine. *Drugs* 56(3): 355-62, 1998

McEvoy G K: AHFS Drug Information. American Society of Health System Pharmacists, Bethesda, 2015

McLeod GA, Burke D: Levobupivacaine. *Anaesthesia* 56(4): 331–341, 2001

Mehta KC: Practice research: Strategies for stability studies on hospital pharmaceutical preparations. *International Journal of Pharmacy Practice* 2: 49–52, 1993

Moscou K, Snipe K: *Pharmacology for Pharmacy Technicians*. 2. painos, s. 2–54. Elsevier Health Sciences, Missouri 2012

Momeni M, Crucitti M, Kock MD: Patient-Controlled Analgesia in the Management of Postoperative Pain. *Drugs* 66(18): 2321–2337, 2006

Myers C: History of sterile compounding in U.S. hospitals: Learning from the tragic lessons of the past. *American Journal of Health-System Pharmacy* 70: 1414–1427, 2013

Negro S, Martín A, Azuara L, Sánchez Y, Barcia E: Compatibility and Stability of Ternary Admixtures of Tramadol, Haloperidol, and Hyoscine N-Butyl Bromide: Retrospective Clinical Evaluation. *Journal of Palliative Medicine* 13(3): 273–277, 2010

NordLab Oulu: Steriiliystutkimus 2, rikastusviljelyn avulla. Haettu internetistä 11.5.2016. http://oyslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=8176&terms=stert

Nováková L, Matysová L, Solich P: Advantages of Application of UPLC in Pharmaceutical Analysis. *Talanta* 68: 908–918, 2006

Ornaf RM, Dong MW: Key Concepts of HPLC in Pharmaceutical Analysis. Kirjassa: Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC. 6 painos, s.19–44. Toim. Ahuja S, Dong MW, Elsevier Academic Press, London 2005

Owen T: Fundamentals of Modern UV-visible spectroscopy. 1. painos, s. 38–61
Hewlett-Packard Company, Germany 1996

Palmgrén J, Manninen R, Putkuri N, Väänänen R, Lohikoski J: Mikrobiologinen menetelmä sairaala-apteekin ex tempore -lääkevalmisteiden säilyvyyden määrittämiseen. Dosis 28(4): 282–293, 2012

Pere P, Lindgren L, Vaara M: Poor antibacterial effect of ropivacaine: comparison with bupivacaine. Anesthesiology 91(3): 884–886, 1999

Pere P: Perifeeriseen hermostoon vaikuttavat lääkeaineet, autakoidit, anti-inflammatoriset analgeetit. Puudutteet. Kirjassa: Farmakologia ja toksikologia. 6. painos, 257–264. Toim. Koulu M, Tuomisto J, Kustannusosakeyhtiö Medicina, Kuopio 2001

Perlatti B, Carrilho E, Aguiar F: Sample Stacking: A Versatile Approach for Analyte Enrichment in CE and Microchip-CE. Kirjassa: Capillary Electrophoresis and Microchip Capillary Electrophoresis: Principles, Applications, and Limitations. 1. painos, s. 20–40. Toim. Carcía C, Cumbimuni-Torres K, Carrilho E, John Wiley & Sons, New Jersey 2013

The Pharmaceutical Codex: Principles and Practice of Pharmaceutics, 311–321, 12th Edition. The Pharmaceutical Press, Lontoo 1994

Piekarski M, Jelin'ska A, Szymczak K: Development and validation of an HPLC method to determine the stability of fentanyl citrate and bupivacaine hydrochloride mixtures in infusion solutions. European Journal of Hospital Pharmacy 19(5): 447–451, 2012

Prathyusha P, Shanmugasundaram P, Naidu PY, Singamsetty S: Development and validation of stability indicating UPLC assay method for bupivacaine in pharmaceutical formulation. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 4(11):4702–4709, 2012

Priston MJ, Hughes JM, Santillo M, Christie IW: Stability of an epidural analgesic admixture containing epinephrine, fentanyl and bupivacaine. *Anaesthesia* 59(10): 979–983, 2004

Qi L, Cheng Z, Zuo G, Li S, Fan Q: Oxidative Degradation of Fentanyl in Aqueous Solutions of Peroxides and Hypochlorites. *Defence Science Journal* 61(1): 30–35, 2011

Reddy T, Balammad G, Kummar A: Ultra Performance Liquid Chromatography: An introduction and review. *International Journal of Pharmaceutical Research & Analysis* 2 (1): 24–31, 2012

Räty J, Peiponen K, Asakura T: UV-Visible Reflection Spectroscopy of Liquids. 1.painos, 99 - 144. Springer, Berlin 2004

Sainio E: Mikrobien määrittäminen lääkeaineista ja valmisteista. Kirjassa: Farmaseuttinen mikrobiologia. 2.painos, s. 200 - 207. Toim. Vuorela P, Suomen Farmaseuttinen Yhdistys ry, Helsinki 2001

Salomäki T, Nuutinen L: Leikkauksen jälkeisen kivun hoito. *Duodecim*, 144(16):1639, 1998

Sarvela J, Nuutila M: Synnytyskipu. *Duodecim*, 125(17): 1881 – 1888, 2009

Sattler A, Jage J, Krämer I: Physico-chemical stability of infusion solutions for epidural administration containing fentanyl and bupivacaine or lidocaine. *Pharmazie* 53(6): 386–391, 1998

Sherma J. Review of HPLC in drug analysis: 1996–2009. *Journal of AOAC international*, 93(3): 754–764, 2010

Shields D, Montenegro R: Chemical Stability of Ziconotide-Clonidine Hydrochloride Admixtures With and Without Morphine Sulfate During Simulated Intrathecal Administration. *Neuromodulation: Technology at the Neural Interface* 10: 6–11, 2007

Timko R: Applying Quality by Design Concepts to Pharmacy Compounding. *International Journal of Pharmaceutical Compounding* 19(6): 453–463, 2015

USP Pharmacists' Pharmacopeia, 2nd edition. The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, USA, 2012

The United States Pharmacopeia 29 / National Formulary 24 (USP 29 / NF 24). United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, USA 2006

Vega J, Ochoa B, Holder P: Introduction to Parenteral Preparations. Kirjassa: *Concepts in Sterile Preparations and Aseptic Techniques*. s. 1 – 15. Ochoa B, Vega J, Jones & Bartlett Publishers, Burlington 2014

Venkatarao P, Kumar N, Kumar R: Novel Validated Stability-Indicating UPLC Method for the Estimation of Naproxen and its Impurities in Bulk Drugs and Pharmaceutical Dosage Form. *Scientia Pharmaceutica* 80(4): 965–976, 2012

Waterman K: Understanding and Predicting Pharmaceutical Product Self-Life. Kirjassa: *Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development (Regulations, Methodologies and Best Practices)*, 1. painos, s. 115 – 138. Toim. Kim Huynh-Ba, Springer Science+Business Media, New York, 2009

Watson DG, Lin M, Morton A, Cable CG, McArthur DA: Compatibility and Stability of Dexamethasone Sodium Phosphate and Ketamine Hydrochloride Subcutaneous Infusions in Polypropylene Syringes. *Journal of Pain and Symptom Management* 30(1): 80–86, 2005

Wilson K, Schneider J, Ravenscroft P: Stability of Midazolam and Fentanyl in Infusion Solutions. *Journal of Pain and Symptom Management* 16(1): 52–58, 1998

World Health Organization (WHO): The International Pharmacopoeia, 5th Edition (Ph. Int. 5th Ed.), 2015. Haettu Internetistä 1.1.2016. <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>

World Health Organization (WHO): WHO's pain ladders for adults.
<http://www.who.int/cancer/palliative/painladder/en/> Luettu 29.10.2015

Xiaoying X, Wenkui L, Francis T: Quantitative Mass Spectrometry in Support of Pharmaceutical Studies. Kirjassa: *Mass Spectrometry Handbook*, 1. painos, s. 171 – 190. Toim. Lee M, John Wiley & Sons, New Jersey, 2012

Yoshioka S, Stella VJ: *Stability of Drugs and Dosage Forms*. Kluwer Academic Publishers, Hingham, MA, USA 2002

Zaidi S, Healy TE: A comparison of the antibacterial properties of six local analgesic agents. *Anaesthesia* 32(1): 69–70, 1977