

Opinnäytetyö AMK

Bioanalytikkokoulutus

NBIOAS13

2017

Roosa Roininen

S-OHKARBA TUTKIMUKSEN VALIDOINTI HPLC- ANALYSAATTORILLE

Roosa Roininen

S-OHKARBA TUTKIMUKSEN VALIDOINTI HPLC-ANALYSAATTORILLE

Okskarbatsepiini on epilepsiahoitoon käytetty lääkeaine. S-OHKarba tutkimus mittaa okskarbatsepiinin pitoisuutta seerumissa. Tutkimus tehdään HPLC-analysointimenetelmää käyttävällä analysaattorilla.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli validoida S-OHKarba tutkimus Tykslabin osastolla 931 olevalle uudelle käyttöönotettavalle Agilent 1290 Infinity-analysaattorille. Validoinnin avulla varmistetaan uuden analysaattorin sisäinen toistettavuus, sekä uuden ja tällä hetkellä käytössä olevan Agilent 1100 Series-analysaattorin välinen tulosten täsmävyys. Validointi suoritettiin analysoimalla Agilent 1100 Series-analysaattorilla analysoidut näytteet (n=45) uudelleen Agilent 1290 Infinity-analysaattorilla. Näytteet ajettiin useaan kertaan toistettavuuden testaamiseksi ja analysaattoreiden välisiä tuloksia vertailtiin täsmävyiden testaamiseksi.

Tulosten tilastollinen tarkastelu kertoi tulosten olevan yhteneviä ja niiden välillä on voimakas positiivinen korrelaatio. Agilent 1100 Series ja Agilent 1290 Infinity analysaattoreiden väliset tulokset ovat yhteneviä ja Agilent 1290 Infinity-analysaattorin sisäinen toistettavuus on hyvä.

Opinnäytetyön tuloksena voidaan todeta, että Agilent 1290 Infinity-analysaattori antaa luotettavia, sekä toistettavia tuloksia ja sen tulostaso on verrattavissa Agilent 1100 Series-analysaattorin tuloksiin. Näin ollen Agilent 1290 Infinity-analysaattori voidaan ottaa S-OHKarba tutkimuksen analyysikäyttöön Tykslabin osastolla 931.

ASIASANAT:

Validointi, S-OHKarba, HPLC, Korkean erotuskyvyn nestekromatografia

Roosa Roininen

S-OHKARBA ANALYSIS' VALIDATION FOR HPLC ANALYSER

Oxcarbazepine is a drug used to treat epileptic seizures. S-OHKarba analysis measures oxcarbazepine's concentration in serum. The analysis is done with an analyser that uses HPLC analysing method.

The purpose of this thesis is to validate the S-OHKarba analysis for a new analyser called Agilent 1290 Infinity, that is about to be brought to use, in Tykslab's department 931. Validation is used to ensure that the new analyser is internally repeatable and that the results between Agilent 1290 and now in use analyser Agilent 1100 Series are precise. The validation was done by analysing samples (n=45) first with Agilent 1100 Series and then again with Agilent 1290. The samples were analysed several times to test the repeatability and the results between the two analysers were compared to test the precisibility.

The statistical analysis of the results showed that the results are converging and they have a strong positive correlation. The results between Agilent 1100 Series and Agilent 1290 Infinity analysers are precise and the internal repeatability of Agilent 1290 Infinity analyser is good.

As results of this thesis, Agilent 1290 Infinity analyser gives reliable and repeatable results, and the results corresponded with Agilent 1100 Series analyser's results. Therefore Agilent 1290 Infinity analyser can now be taken to use for analysing S-OHKarba analysis in Tykslab's department 931.

KEYWORDS:

Validation, S-OHKarba, HPLC, High performance liquid chromatography

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	6
2 OH-KARBA-TUTKIMUKSEN VALIDOINTI	7
2.1 Okskarbatsepiini	7
2.2 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia	8
2.3 Validointi	9
3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT	11
4 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS	12
4.1 Opinnäytetyön toteutus	12
4.2 Tulosten tilastollinen käsittely	13
4.3 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat	14
4.4 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat	15
5 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU	16
5.1 Tunnusluvut	16
5.2 Korrelaatio	19
5.3 Nollahypoteesi ja merkitsevyystaso	22
5.4 Agilent 1290 Infinity sisäinen toistettavuus	22
5.5 Erotus ja eroprosentti	25
5.6 Tutkimustulosten tarkastelu	27
6 POHDINTA	29
LÄHTEET	32

KAAVAT

Kaava 1. Keskiarvon laskukaava (Heikkilä 2008).	17
Kaava 2. Vaihteluvälin laskukaava (Heikkilä 2008).	17
Kaava 3. Keskihajonnan laskukaava (Excel 2016).	17
Kaava 4. Variaatiokertoimen laskukaava (Heikkilä 2008).	17
Kaava 5. Selitysasteen laskukaava (Heikkilä 2008).	19

KUVAT

Kuva 1. Kromatogrammin periaate (Team-Cag).

9

KUVIOT

Kuvio 1. Agilent 1100 Series vs. Agilent 1290 Infinity analysaattoreiden 1. ajosarjan 1. toistoajo	20
Kuvio 2. Agilent 1100 Series vs. Agilent 1290 Infinity analysaattoreiden 1. ajosarjan 2. toistoajo	20
Kuvio 3. Agilent 1100 Series vs. Agilent 1290 Infinity analysaattoreiden 2. ajosarjan 1. toistoajo	21
Kuvio 4. Agilent 1100 Series vs. Agilent 1290 Infinity analysaattoreiden 2. ajosarjan 2. toistoajo	21
Kuvio 5. Agilent 1290 Infinity 1. ajo vs. Agilent 1290 Infinity 2. ajo, 1. ajosarja	23
Kuvio 6. Agilent 1290 Infinity 1. ajo vs. Agilent 1290 Infinity 2. ajo, 2. ajosarja	24

TAULUKOT

Taulukko 1. Ensimmäisen ajosarjan tunnusluvut	18
Taulukko 2. Toisen ajosarjan tunnusluvut	18
Taulukko 3. Toistettavuuden tunnusluvut	24
Taulukko 4. Ensimmäisen ajosarjan erotukset ja ero prosentit	25
Taulukko 5. Toisen ajosarjan erotukset ja ero prosentit	26

1 JOHDANTO

Noin 1%, eli 56 000 suomalaisista sairastaa epilepsiaa, heistä jatkuvaa epilepsialääkitystä tarvitsee noin 36 000 (Kälviäinen 2016; Kälviäinen ym. 2014 TerveyskirjastoA). Epilepsia on yksi yleisimmistä neurologisista sairauksista, joka voi johtua monesta eri syystä, kuten aivojen kehityshäiriöstä, päävammasta, aivokalvontulehduksesta, perintötekijöistä tai ongelmallisesta synnytyksestä, mutta usein syy jää kuitenkin epäselväksi. (Appleton & Marson 2009; Atula 2015.)

Epilepsia aiheuttaa ohimenevän häiriötilan aivojen sähköisessä toiminnassa, joka tuottaa epileptisen kohtauksen, jossa voi esiintyä esimerkiksi kouristuksia tai tajunnan hämäytymistä. Kohtaukset lähes aina häiritsevät ihmisen tavanomaista toimintakykyä. (Kälviäinen ym. 2016.)

Epilepsiaa sairastavilla on pitkäaikainen alttius saada epileptisiä kohtauksia. Jos epilepsiaan käytettävä lääke ei ole tarpeeksi tehokasta, tai potilas ei halua sitä käyttää, voivat epileptiset kohtaukset lisääntyä ja pitkittyä. Tällainen tilanne voi olla henkeä uhkaava. (Järviseu-Hulkkonen 2016.) Epilepsian hoidon tavoitteena on kohtauksettomuus, jolloin ensisijaisena lääkkeenä säännöllinen ja pitkäaikainen kohtauksia estävä lääke. Lääkkeen valinta on riippuvainen epilepsiatyypistä. Joka vuosi 3000 suomalaiselle määrätään epilepsialääkitys aloitettavaksi. (Kälviäinen ym. 2016.)

Okskarbatsepiini on yksi yleisimmin käytetyistä lääkkeistä epileptisten kohtausten estämiseksi. Sen pitoisuutta seerumissa tulee tietyissä tilanteissa seurata, kuten lääkkeen aloittamisen jälkeen tai raskaana ollessa. (Keränen & Holopainen 2016.)

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on validoida S-OHKarba-tutkimus Tykslabin uudelle käyttöön otettavalle Agilent 1290 Infinity-analysaattorille. Validointi suoritetaan Tykslabissa metabolian laboratoriossa, jossa Agilent 1290 Infinity, sekä tällä hetkellä käytössä oleva, referenssilaitteena toimiva Agilent 1100 Series analysaattorit sijaitsevat. Validointiin käytetään Agilent 1100 Series-analysaattorilla jo analysoituja potilas- ja kontrollinäytteitä. Tämän opinnäytetyön tavoitteena on saada validoitu analysaattori analyysivalmiuteen, jotta se voidaan ottaa analyysikäyttöön Tykslabin metabolian laboratoriossa.

2 OH-KARBA-TUTKIMUKSEN VALIDOINTI

2.1 Okskarbatsepiini

Okskarbatsepiini on yksi tärkeimmistä lääkeaineista, joita käytetään paikallisalkuisten epilepsiakohtausten tai yleistyneiden toonis-kloonisten kohtausten, eli tajuttomuuskouristuskohtausten estämiseksi (Keränen & Holopainen 2016). Okskarbatsepiiniä käytetään yleensä epilepsian hoidossa, pääsääntöisesti estämään epileptisten kohtausten syntyä, mutta se on myös käytössä kaksisuuntaisen mielialahäiriön lääkkeenä. (Lilja ym. 2010; Huttunen 2015). Okskarbatsepiinin vaikutus perustuu natriumkanavien salpaamiseen, jolloin se estää hermosolujen impulssinjohtumisen ja hermovälittäjäaineiden vapautumisen, jotka aiheuttavat epileptisen kohtauksen (Trileptal valmisteyhteenveto 2014; Keränen & Holopainen 2016).

Okskarbatsepiini on myös epilepsian hoitoon käytetyn lääkeaineen karbamatsepiinin inaktiivinen johdos. Okskarbatsepiini on aihiolääke, joten se metaboloituu maksassa aktiiviksi 10-monohydroksikarbatsepiini johdannaiseksi, johon lääkkeen vaikutukset perustuvat. (Lilja ym. 2010; Trileptal valmisteyhteenveto 2014; Keränen & Holopainen 2016.)

Lääkeaineen pitoisuutta seerumissa on tärkeää tutkia, jos kohtaukset jatkuvat lääkityksestä huolimatta, jo hallinnassa ollut epilepsia pahenee, epäillään muiden lääkkeiden yhteisvaikutuksia tai ilmenee uusia neuropsykiatrisia oireita. Pitoisuuksia tarkkaillaan erityisesti lääkkeen aloittamisen jälkeen, lapsilta ja raskaana olevilta. (Lilja ym. 2010; Keränen & Holopainen 2016.)

Okskarbatsepiinin aloittamisen jälkeen esiintyy usein erilaisia haittavaikutuksia, jotka kuitenkin yleensä menevät ajan kanssa ohitse. Haittavaikutuksia voivat olla esimerkiksi väsymys, pahoinvointi, huimaus ja vatsavaivat. Joillain henkilöillä voi lääkkeen aloituksen myötä ilmetä vaurioita maksassa tai luuytimessä, sekä henkilöillä joiden lääkeainemäärä on suuri, ovat iäkkäitä tai heillä on jo todettu munuaisvaurio, voi esiintyä hyponatremiaa, eli alhaisia natrium pitoisuuksia veressä. Okskarbatsepiini kiihdyttää maksan entsyymitoimintaa, joka voi johtaa maksa-arvojen suurenemiseen. Siksi hoidon aikana, erityisesti alussa, seurataan lääkeainemäärän lisäksi perusverenkuva, maksa-arvoja sekä elektrolyyttitasapainoa. (Nurminen 2008; Keränen & Holopainen 2016.)

Okskarbatsepiinin pitoisuutta mitataan veren seerumista. Varsinais-Suomen sairaanhoitopiirissä seerumin okskarbatsepiinin viitearvot ovat 30-120 $\mu\text{mol/l}$. (Tykslab 2015.)

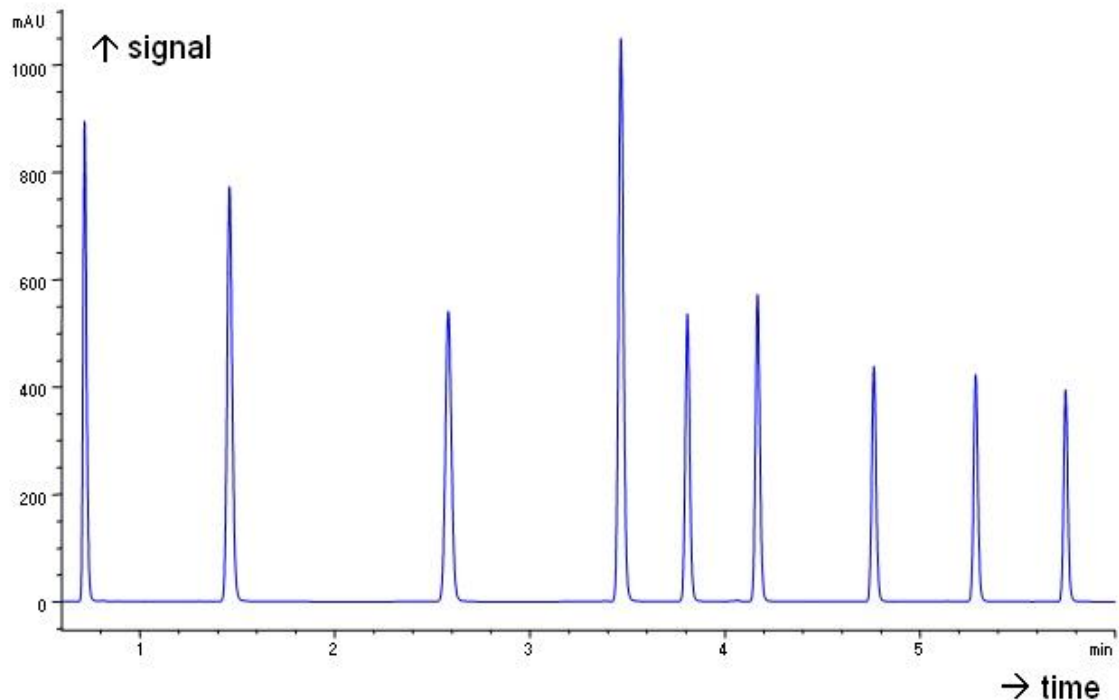
2.2 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia

Korkean erotuskyvyn nestekromatografia on analyysimenetelmä, jota käytetään erottamaan näytteessä olevia yhdisteitä. Se on erinomainen analyysimenetelmä suurien orgaanisten molekyylien, kuten lääkeaineiden analysointiin. Yhdisteet saadaan erotettua niiden fysikaalisten tai kemiallisten erojen perusteella. (Jaarinen & Niiranen 2005; Savolainen & Parviainen 2010.) Tutkittava näyte esikäsitellään ennen analyysiä, jotta määritettävä analyytti saadaan erotettua muusta näytteestä (Lehtonen & Sihvonen 2006). Esikäsitelyn tarkoituksena on poistaa ei-haluttuja yhdisteitä näytteestä, jotta jäljelle jää vain analyysiin haluttavat yhdisteet. Näin näytteestä tulee puhtaampi ja analyysistä selkeämpi. (Suomi 2009.)

Korkean erotuskyvyn nestekromatografian analyysilaitteet koostuvat viidestä pääkomponentista pumpusta, näytteensyöttäjästä, kolonnista, detektorista sekä tietokoneesta. (Haines & Kealey 2002; Savolainen & Parviainen 2010)

Korkean erotuskyvyn nestekromatografiassa analyysi perustuu molekyylien liikkumiseen liikkuvassa faasissa ja stationäärifaasissa. Liikkuva faasi on tässä analyysimenetelmässä nimensä mukaisesti neste, ja stationäärifaasi muodostuu yleensä pienikokoisista silikapartikkeleista. (Lehtonen & Sihvonen 2006.) Analysaattorin näytteensyöttäjä injektioi näytettä, joka siirtyy liikkumaan nestefaasin mukaan. Näyte kulkeutuu kolonniin, jossa analyyttien erottelu tapahtuu ja näyte jakautuu eri komponenteiksi. Jakautuminen perustuu eri yhdisteiden tasapainoihin liikkuvassa faasissa ja stationäärifaasissa. Näytteen sisältämät eri molekyylit etenevät liikkuvan faasin mukana, mutta paikoitellen kiinnittyvät stationäärifaasiin, josta ne taas irtoavat liikkuvan faasin mukaan. Liikkuva faasi ja stationäärifaasi ovat toisiinsa liukenemattomia, mutta vuorovaikutuksessa keskenään. Molekyylit, jotka tarttuvat heikosti stationäärifaasiin etenevät nopeasti ja molekyylit jotka tarttuvat hyvin stationäärifaasiin liikkuvat huomattavasti hitaampaa. Jokainen molekyyli liikkuu omalla nopeudellaan kolonnin läpi, joten sen avulla voidaan erottaa molekyylit toisistaan. (Fifield & Kealey 2000; Haines & Kealey 2002; Jaarinen & Niiranen 2005.) Liikkuva faasi pakotetaan suuren paineen kanssa stationäärifaasilla täytetyn kolonnin läpi. Analysaattorin pumppu

pumppaa näytettä ja liikkuvaa faasia jatkuvasti tasaisesti ja sykkeettömästi eteenpäin painetta vastaan. Kun komponentit ovat kulkeutuneet kolonnin läpi, ne kulkevat detektorin läpi. Detektori on usein UV-detektori, joka tunnistaa partikkeleiden signaalin ja näin ollen pystyy määrittelemään, mikä molekyyli on kyseessä. Jokaisesta detektorin tunnistamasta komponentista piirtyy signaali kromatogrammiin (Kuva 1). (Jaarinen & Niiranen 2005; Lehtonen & Sihvonen 2006.)



Kuva 1. Kromatogrammin periaate (Team-Cag).

2.3 Validointi

Yleinen standardi vaatii, että analyysipalveluita tuottavalla laboratoriolla tulee olla kunnolliset ja asianmukaiset välineet ja laitteistot analyysien tekoon. Laboratorioiden analyysit perustuvat vain validoitujen analyysimenetelmien käyttöön. Analyysimenetelmät ovat usein jo validoitu menetelmää kehittäessä ja analyysilaitetta tehdessä. Analyysimenetelmän validoinnissa käytettäviä osa-alueita ovat spesifisyys, lineaarisuus, tarkkuus, toistettavuus, mitta-alue, määritysalue, stabiilius ja häiriönsietokyky. Laboratorioiden analyysilaitteilla tulee tuottaa tarpeeksi tarkkoja analyysituloksia. Aina ennen laitteiston käyttöönottoa, tulee tarkastaa, että laitteisto

toimii sille tarkoitettuun analyysiin ja laite tulee validoida. (Lehtonen & Sihvonen 2004; Jaarinen & Niiranen 2005; Hiltunen, ym. 2011.)

Validoinnin tarkoituksena on varmistaa, että laitteisto täyttää sille asetetut laatukriteerit, analyysilaitte toimii, se antaa luotettavia tuloksia ja soveltuu sille suunniteltuun käyttötarkoitukseen. Validointiin kuuluu analyysin mittausten teon, tulosten arvioinnin, tulkinnan ja tilastolliset laskut. Lisäksi validoinnista tehdään validointiraportti, johon kirjataan ylös validoinnissa suoritettavat mittaukset ja johtopäätökset. Validoinnissa käytetään vertailumateriaalia kuten käytössä olevaa validoitua laitetta, jonka avulla tutkitaan menetelmän kykyä antaa oikeita tuloksia, lisäksi tutkitaan validoitavan laitteen sisäistä toistettavuutta. (Lehtonen & Sihvonen 2004; Jaarinen & Niiranen 2005; Hiltunen, ym. 2011.)

Täsmävyys ja toistettavuus ovat avainkäsitteitä validoinnissa. Täsmävyydellä tarkoitetaan analyysilaitteen kykyä saada oikea tulos. Vertailukohteena olevan referenssilaitteen oletetaan antavan oikeita tuloksia, joten validoitavan laitteen tulosten oikeellisuutta, eli täsmävyyttä verrataan referenssilaitteen tuloksiin. Kun tulokset ovat yhteneviä, ovat ne täsmäviä. Toistettavuudella tarkoitetaan analyysilaitteen kykyä saada oikea tulos useaan kertaan. Kun sama näyte tutkitaan useaan kertaan, pitäisi tulosten olla kutakuinkin samanlaiset, jolloin ne ovat toistettavia. Tuloksista lasketaan tilastollisia lukuja, kuten keskiarvo ja keskihajonta, jotka kertovat kuinka paljon tulokset eroavat keskenään. Hyvä täsmävyys ei takaa hyvää toistettavuutta, eikä hyvä toistettavuus takaa hyvää täsmävyyttä, vaan molemmat täytyy tutkia ja todeta hyväksi, jotta laitteen validointi on hyväksyttävä. (Harris 1995; Lehtonen & Sihvonen 2004.)

Analyysimenetelmän validoinnin tuloksilla osoitetaan menetelmän toiminta hyväksytyksi sille käytetyissä tehtävissä. Kriteerit validoinnin hyväksymiselle asettaa analyysilaboratorio, viranomainen tai asiakas. (Lehtonen & Sihvonen 2004.)

3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on validoida S-OHKarba-tutkimus Tykslabin kliinisen biokemian metabolian laboratorion uudelle Agilent 1290 Infinity-analysaattorille. Analysaattorin käyttämä tutkimusmenetelmä on jo validoitu laitteen valmistajan, Agilent Technologies:n toimesta. Koska laite otetaan uutena käyttöön metabolian laboratoriossa, tulee sillä analysoitavat tutkimukset validoida, jotta voidaan todentaa tulosten luotettavuus ja täsmällisyys. Opinnäytetyössä tutkitaan antaako uusi Agilent 1290 Infinity-analysaattori yhteneväisiä tuloksia verrattain käytössä olevaan Agilent 1100 Series-analysaattorin tuloksiin. Tarkoituksena on, että käyttöön otettavan analysaattorin tulostasoa on yhteneväinen käytössä olevan analysaattorin tulostason. Tämän opinnäytetyön tavoitteena on saada S-OHKarba-tutkimus validoitua Infinity 1290-analysaattorille, jotta uusi analysaattori saadaan otettua metabolian laboratoriossa analyysikäyttöön.

Opinnäytetyön tutkimusongelmat:

1. Antaako Agilent 1290 Infinity analysaattori sisäisesti toistettavia tuloksia.
2. Ovatko Agilent 1290 Infinity ja Agilent 1100 Series analysaattoreiden tulostasot keskenään yhteneviä.

4 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS

4.1 Opinnäytetyön toteutus

Tässä opinnäytetyössä validoitiin S-OHKarba-tutkimus Tykslabin osastolla 931 metabolian laboratoriossa olevalle Agilent 1290 Infinity-analysaattorille. Validointiin kuuluvat näyteajot suoritettiin alkutalvesta 2016. Opinnäytetyön tilaus tuli keväällä 2016 Tykslabilta, jolloin opinnäytetyön tekijä kävi tutustumassa metabolian laboratorioon sekä siellä tehtävään S-OHKarba-tutkimuksen analysointiin. Validointia varten anottiin tutkimuslupaa TurkuCRC:ltä 3.11.2016 ja tutkimuslupa myönnettiin 8.11.2016. Validointia varten suoritettut käytännön analyysiajot tehtiin useana päivänä kahden viikon aikana marraskuussa ja joulukuussa. Validoinnissa käytetyt näytteet olivat kahden viikon aikana tehdyt näytesarjat, jotka sisälsivät potilasnäytteitä sekä kontrollinäytteitä. Kaikki analyysiajoissa käytetyt näytteet olivat esikäsitelty metabolian laboratoriossa työskentelevän laboratoriohoitajan toimesta.

Validointia varten käytettiin yhteensä 45 seeruminäytettä. Suurin osa näytteistä oli potilasnäytteitä ja loput kontrollinäytteitä. Kaikki näytteet ovat esikäsitelty kiinteäfaasiuutolla. Yhdessä näytesarjassa on useita kontrollinäytteitä ja niitä on sarjan alussa ja lopussa, jolloin pystytään varmistamaan analyysiajon luotettavuutta. Yhtä sarjan alussa olevaa kontrollinäytettä käytetään näytesarjan kalibrointiin. Analyysinäytteistä oli poistettu potilasnäytteiden henkilötiedot, mutta tiedossa oli mitkä näytteistä olivat kontrollinäytteitä ja mitkä potilasnäytteitä. 45 näytteestä tilastollisesti tarkasteltiin vain 41, sillä yhdessä sarjassa on aina yksi näyte, joka toimii kalibraattorina, ja jonka mukaan laite kalibroidaan. Lisäksi molemmissa näytesarjoissa oli yksi näyte, jonka pitoisuus oli niin matala, ettei Agilent 1100 Series-analysaattori pystynyt sitä analysoimaan. Jälkimmäisiä näytteitä ei käytetty täsmäavyyden tutkimisessa, mutta niitä käytettiin Agilent 1290 Infinity-analysaattorin toistettavuuden tutkimisessa. Agilent 1290 Infinity-analysaattori on herkempi matalille pitoisuuksille ja pystyy analysoimaan ne.

Ensimmäisenä analyysipäivänä analysoitiin 20 näytteen sarja. Toisena analyysipäivänä analysoitiin sama 20 näytteen sarja uudelleen. Lisäksi sarjasta valittiin kolme näytettä, joiden tulokset olivat matalia sekä korkeita. Näytteistä ajettiin rinnakkaiset uusinta-ajot viisi kertaa. Kolmantena analysointipäivänä analysoitiin uusi 25 näytteen sarja, joka ajettiin vielä uudelleen neljäntenä analyysipäivänä. Lisäksi sarjasta valittiin neljä

näytettä, joista ajettiin rinnakkaiset uusinta-ajot. Viidentenä analyysipäivänä ajettiin vielä kolme uutta rinnakkaista ajoa samoista neljästä näytteestä, kun edellisenä päivänä. Analyysiajojen välissä esikäsiteltyjä näytteitä säilytettiin jääkaappilämpötilassa.

Esikäsitellyt näytteet ovat pienissä lasipulloissa, joihin on kirjattu järjestysnumero. Potilasnäyte- ja kontrolloastiat numeroidaan, sillä esikäsitelyvaiheessa näytteitä käsitellään eri astioissa, joten numeron avulla pysytään oikeassa järjestyksessä näytteiden kanssa. Tällä tavalla potilasnäytteiden anonymiteetti säilyi koko tutkimuksen ajan. Agilent 1100 Series-analysaattorilla suoritettujen ajojen tulokset saatiin paperikopioina käyttöön.

Jokaisen tutkitun näytteen tulokset tulostuvat paperille, jossa näkyy näytteen kromatogrammi, sekä pitoisuudet numeerisesti. Kaikki tulokset kirjattiin tietokoneelle Excel-taulukkolaskentaohjelmaan ja oikeinkirjoitus tarkastettiin useaan otteeseen virheiden välttämiseksi.

4.2 Tulosten tilastollinen käsittely

Analyysitulosten tilastollinen käsittely suoritettiin Microsoft Excel-taulukkolaskentaohjelman avulla. Analyysitulokset kirjattiin Excel-ohjelmaan analysaattoreiden tulostamien tulosteiden pohjalta. Tilastollinen tarkastelu aloitettiin Agilent 1100 Series ja Agilent 1290 Infinity analysaattoreiden tulosten tunnuslukujen laskennalla. Tunnusluvuiksi laskettiin kaikista ajokerroista keskiarvo, minimi, maksimi, vaihteluväli, keskihajonta sekä variaatiokerroin. Tunnuslukuja tarkastelemalla pystyttiin tekemään päättelyitä analysaattoreiden välisestä täsmävyyydestä sekä Agilent 1290 Infinity-analysaattorin sisäisestä toistettavuudesta. Analysaattoreiden välistä täsmävyyttä tutkittaessa analysaattoreiden tuloksista tehtiin sirontakuviot, joissa Agilent 1100 Series-analysaattorin tulokset kirjattiin x-akselille ja Agilent 1290 Infinity-analysaattorin tulokset y-akselille. Sirontakuvioista pystyy helposti tutkimaan kahden muuttujan välistä riippuvuutta, sekä tulosten yhteyden voimakkuutta, muotoa ja suuntaa (Heikkilä 2008; Holopainen & Pulkkinen 2013). Sirontakuvioihin laskettiin selitysaste, joka kertoo paljonko x-akselin arvot selittävät y-akselin arvoista. Selitysasteen lisäksi sirontakuvioissa näkyvät regressiosuoran yhtälö. Tuloksista laskettiin myös Pearsonin korrelaatiokerroin, joka kertoo kahden muuttujan välisen yhteyden voimakkuudesta.

Korrelaatiokerroin vaihtelee -1:n ja +1:n välillä. Mitä lähempänä luku on +1, sitä suurempi voimakas positiivinen yhteys tuloksilla on. (Heikkilä 2008; Holopainen & Pulkkinen 2013.) Viimeisenä tuloksista tehtiin vielä t-testi, joka antaa tuloksena merkitsevyytason p-arvon. Tällä tarkistetaan tulosten merkittävyys ja mahdollisuus johtua sattumasta. (Heikkilä 2008; Holopainen & Pulkkinen 2013.) Hylkäämisriskin rajana toimi 0,05 eli 5%.

Agilent 1290 Infinity-analysaattorin sisäistä toistettavuutta tutkiessa laskettiin kaikista rinnakkaisajoista tunnusluvut. Tunnuslukuja tarkastelemalla, pystyttiin päättelemään ovatko rinnakkaisajot olleet keskenään yhteneviä. Ajosarjojen välisistä toistoajoista tehtiin sirontakaaviot, joista pystyttiin tarkastelemaan tulosten keskeistä riippuvuutta, yhteyden voimakkuutta, muotoa ja suuntaa. Sirontakuvioihin laskettiin selitysaste, joka kertoo paljonko ensimmäisen ajon tulokset selittävät toisen ajon tuloksista. Sirontakuvioissa on myös nähtävissä regressiosuoran yhtälö. Tuloksista laskettiin korrelaatiokerroin käyttäen Pearsonin korrelaatiokerrointa, sekä lopuksi vielä laskettiin p-arvo kertomaan tulosten tilastollisesta luotettavuudesta.

4.3 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat

Kvantitatiivisessa, eli määrällisessä tai tilastollisessa tutkimusmenetelmässä tutkimuksen tietoa tarkastellaan numeerisesti. (Heikkilä 2008; Vilkkä 2014). Kvantitatiivisessa tutkimuksessa asiat kuvataan numeeristen suureiden avulla ja tulokset pystytään havainnollistamaan taulukoiden ja kuvioiden avulla. Kvantitatiivisten tutkimusten avulla pystytään selvittämään lukumääriin sekä prosenttiosuuksiin liittyviä kysymyksiä ja usein selvitetään eri asioiden välisiä riippuvuuksia tai niiden välisiä muutoksia. (Heikkilä 2008.)

Keskeisiä käsitteitä kvantitatiivisessa tutkimuksessa ovat aiemmat teoriat, käsitteiden määrittely, numeerinen mittaus ja siihen sopiva havaintoaineisto, tilastollisesti käsiteltävä aineisto, tilastollinen analysointi ja päätelmien teko niihin perustuen. (Hirsjärvi ym. 1997).

Tässä opinnäytetyössä käytettiin kvantitatiivista tutkimusmenetelmää, koska opinnäytetyön tutkimuksesta saatu havaintoaineisto ja tulokset olivat numeerisia. Tutkimustulokset saatiin käyttäen tilastollisia tutkimusmenetelmiä ja tulokset esitettiin taulukoin ja kuvioin.

4.4 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat

Kun tutkimus on tehty hyvien tieteellisten käytäntöjen edellyttämällä tavalla, voidaan tutkimusta pitää eettisesti hyväksyttävänä ja luotettavana ja sen tuloksia uskottavina. Hyviin tieteellisiin käytäntöihin kuuluu muun muassa tarvittavien tutkimuslupien hankkiminen, tiedeyhteisön toimintatapojen noudattaminen, kuten rehellisyys ja huolellisuus tutkimustulosten tallentamisessa, esittämisessä sekä arvioinnissa, tutkimus toteutetaan ja raportoidaan tieteelliselle tiedolle asetettujen vaatimusten edellyttämällä tavalla ja tutkimuksessa viitataan muiden tutkijoiden julkaisuihin asianmukaisella tavalla. Hyvien tieteellisten käytäntöjen noudattamisesta vastaa esisijaisesti tutkija itse. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012.)

Tätä opinnäytetyötä tehdessä noudatettiin hyviä tieteellisiä käytäntöjä ja asianmukaiset tutkimusluvut anottiin ennen tutkimusosuuden aloittamista. Tutkimuksessa käytetyt näytteet olivat jo analysoituja ja juoksevilla numerolla korvattuja potilasnäytteitä. Näytteet olivat täysin nimettömiä, eikä niitä voida yhdistää kehenkään potilaaseen, näin ollen potilaiden suostumusta ei tarvittu tutkimuksen suorittamista varten.

5 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

Tässä opinnäytetyössä Agilent 1100 Series-analysaattori toimi referenssilaitteena, johon Agilent 1290 Infinity-analysaattorin tuloksia verrattiin. Agilent 1100 Series-analysaattori on validoitu ja on analyysikäytössä, joten sen tuloksia voidaan pitää oikeina ja luotettavina. Agilent 1290 Infinity-analysaattorin validointia varten analysoitiin yhteensä 45 näytettä, joista tässä opinnäytetyössä tarkasteltiin 43. Täsmävyiden tarkastelussa käytettiin vain 41 näytettä, sillä kahden näytteen analyysitulokset olivat liian matala referenssilaitteen analysoitavaksi. Validoitava laite kuitenkin pystyi analysoimaan matalatkin pitoisuudet, joten kyseessä olevia näytteitä käytettiin Agilent 1290 Infinity-analysaattorin matalien pitoisuuksien toistettavuuden tutkimisessa.

Tuloksia tarkasteltiin Microsoft Excel-tilustarkasteluohjelmaa käyttäen. Täsmävyttä ja toistettavuutta tutkittiin laskemalla tuloksista tunnusluvut, korrelaatiokerroin, t-testi, sirontakuviot ja regressiosuora. Ajosarjojen ja rinnakkaisajojen tuloksista laskettiin erotukset sekä eroprosentit.

5.1 Tunnusluvut

Taulukointi ja graafinen esitys antavat selkeän yhteiskuvan tilastollisten muuttujien jakaumasta. Tulosten johtopäätösten sekä objektiivisen tulkinnan tukena käytetään tunnuslukuja, jotka lasketaan jakaumasta. Tunnuslukuja on monia erilaisia ja jokainen kertoo muuttujan jakaumasta eri tavalla. Tutkimalla tunnuslukujen tuloksia, saadaan jakaumasta tärkeää tietoa. (Holopainen & Pulkkinen 2013.)

Tunnusluvut voidaan erottaa lukujen sijaintia kuvaaviksi tunnusluvuiksi eli sijaintiluvuiksi, sekä lukujen vaihtelua kuvaaviksi tunnusluvuiksi eli hajontaluvuiksi (Heikkilä 2008). Sijaintiluvut voidaan jakaa vielä keskilukuihin ja muihin sijaintilukuihin. Keskiluvut kertovat tulosjakauman keskikohdan. Yleisin käytetty sijaintiasteikon keskiluku on aritmeettinen keskiarvo. (Holopainen & Pulkkinen 2013.) Keskiarvo saadaan laskemalla ensin kaikkien mittaustulosten summa, joka jaetaan kaikkien mittaustulosten määrällä (Kaava 1) (Heikkilä 2008).

$$\text{Keskiarvo} = \frac{\text{Havaintoarvojen summa}}{\text{Havaintojen määrä}}$$

Kaava 1. Keskiarvon laskukaava (Heikkilä 2008).

Hajontaluvut kertovat kuinka hajallaan mittaustulokset ovat keskenään (Kaava 2). Niiden avulla pystytään määrittelemään kuinka paljon tulokset vaihtelevat. Mitä pienempää hajonta on, sitä lähempänä mittaustulokset ovat toisiaan. Vaihteluväli kertoo pienimmän ja suurimman mittaustuloksen välillä olevan arvon. Vaihteluväli saadaan laskettua suurimman ja pienimmän mittaustuloksen erotuksella. (Heikkilä 2008)

$$\text{Vaihteluväli} = \text{max} - \text{min}$$

Kaava 2. Vaihteluvälin laskukaava (Heikkilä 2008).

Yleisin käytetty hajonta luku on keskihajonta. Se kertoo kuinka paljon mittaustulokset ovat hajaantuneet keskiarvon ympärille. Keskiarvosta selvästi poikkeavat arvot nostavat keskihajonnan lukemaa. Keskihajonnan laskuun käytetty kaava on monimutkaisempi kuin monien muiden tunnuslukujen laskukaavat (Kaava 3). Siksi se on kaikista helpointa laskea tietojenkäsittelyohjelman, kuten Microsoft Excelin kanssa. (Mattila 2003; Heikkilä 2008)

$$\text{Keskihajonta} = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

Kaava 3. Keskihajonnan laskukaava (Excel 2016).

Kaavassa 3, x viittaa tulosten keskiarvoon ja n tulosten määrään (Holopainen & Pulkkinen 2013).

Variaatiokerroin kertoo mittaustulosten suhteellisen hajonnan. Variaatiokerroimen avulla voidaan vertailla kahden muuttujan tulosten hajontojen suuruutta. Variaatiokerroin lasketaan keskihajonnan ja keskiarvon osamäärästä (Kaava 4). Koska tulos kerrotaan usein prosentteina, kerrotaan tulos vielä sadalla. (Heikkilä 2008; Holopainen & Pulkkinen 2013.)

$$\text{Variaatiokerroin} = \frac{\text{Keskihajonta}}{\text{Keskiarvo}} * 100$$

Kaava 4. Variaatiokerroimen laskukaava (Heikkilä 2008).

Taulukko 1. Ensimmäisen ajosarjan tunnusluvut

	Agilent 1100 Series	Agilent 1290 Infinity 1. ajo	Agilent 1290 Infinity 2. ajo
Keskiarvo	60,25	59,08	57,94
Minimi	16,45	17,50	14,47
Maksimi	90,64	88,15	87,29
Vaihteluväli	74,19	70,65	72,82
Keskihajonta	16,38	15,74	16,66
Variaatiokerroin	27%	27%	29%

Taulukko 2. Toisen ajosarjan tunnusluvut

	Agilent 1100 Series	Agilent 1290 Infinity 1. ajo	Agilent 1290 Infinity 2. ajo
Keskiarvo	41,89	40,74	40,35
Minimi	1,36	0,45	0,44
Maksimi	89,85	89,87	88,96
Vaihteluväli	88,49	89,42	88,52
Keskihajonta	24,14	24,38	24,23
Variaatiokerroin	58%	60%	60%

Tunnuslukuja tarkasteltaessa (Taulukko 1 ja Taulukko 2) voidaan todeta, että Agilent 1290 Infinity-analysaattorin antamien tulosten keskiarvo on hieman matalampi kuin Agilent 1100 Series-analysaattorin tulosten keskiarvot. Agilent 1290 Infinity-analysaattorilla suoritettujen rinnakkaisajojen välillä on ensimmäisessä ajosarjassa hieman eroavaisuuksia. Tämä on mahdollisesti selitettävissä sillä, että ajokertojen välissä analysaattorin kolonni vaihdettiin. Toisen ajosarjan rinnakkaisajojen välissä ei ole havaittavissa yhtä selkeitä eroavaisuuksia. Analysaattoreiden sekä rinnakkaisajojen tulokset ovat lähellä toisiaan, eikä niiden välillä ole merkittäviä eroavaisuuksia.

5.2 Korrelaatio

Kahden muuttujan välistä riippuvuutta tutkitaan usein sirontakaavion avulla (Heikkilä 2008). Sirontakuviot kertovat tulosten yhteyden voimakkuudesta, muodosta ja suunnasta (Holopainen & Pulkkinen 2013).

Yleisimmin kahden muuttujan välistä yhteyden voimakkuutta tutkitaan Pearsonin korrelaatiokerroimen avulla. Korrelaatiokerroin (r) vaihtelee $-1:n$ ja $+1:n$ välillä. Jos kertoimen arvo on 0, ei muuttujien välillä ole lineaarista riippuvuutta ja kertoimen arvon ollessa lähellä 1 on muuttujien välillä voimakas lineaarinen yhteys. Kertoimen ollessa lähellä arvoa $+1$, on muuttujien välillä voimakas positiivinen korrelaatio, eli ensimmäisen muuttujan kasvaessa toinenkin kasvaa, ja kertoimen ollessa lähellä arvoa -1 , on muuttujien välillä voimakas negatiivinen korrelaatio, eli ensimmäisen muuttujan kasvaessa toinen muuttuja pienenee. (Heikkilä 2008; Holopainen & Pulkkinen 2013.)

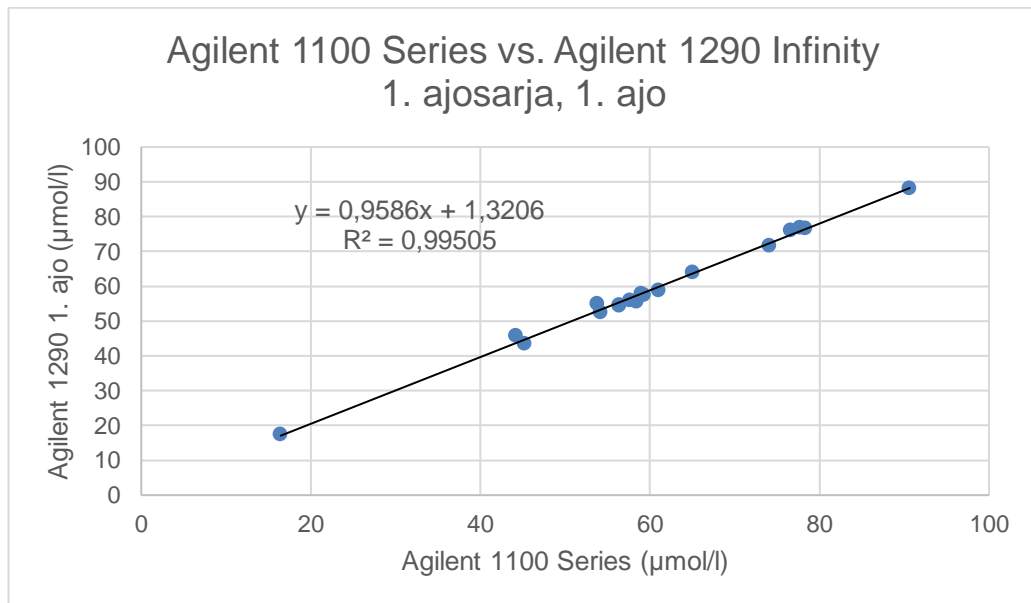
Kun muuttujien välillä todetaan olevan selkeä lineaarinen riippuvuus, tutkitaan muuttujien välistä syy-yhteyttä. Regressiolla tutkitaan muuttujien välistä yhteyttä matemaattisesti, se kertoo, paljonko $y:n$ arvo keskimäärin muuttuu $x:n$ muuttuessa yksikön verran. (Heikkilä 2008; Pulkkinen & Holopainen 2013.) Regressiosuoran yhteydessä sirontakaavioon lasketaan selitysaste, joka kertoo kuinka suuren osan x (selittävä muuttuja) selittää $y:stä$ (selitettävä muuttuja). Selitysasteen ollessa pieni, ei x selitä paljoa $y:n$ vaihtelusta, mutta selitysasteen ollessa suuri, x selittää yksin suurimman osan $y:n$ arvojen vaihtelusta. Selitysaste lasketaan korrelaatiokerroin potenssiin kaksi (Kaava 5). (Heikkilä 2008; Holopainen & Pulkkinen 2013.)

$$\text{Selitysaste} = \text{Korrelaatiokerroin}^2$$

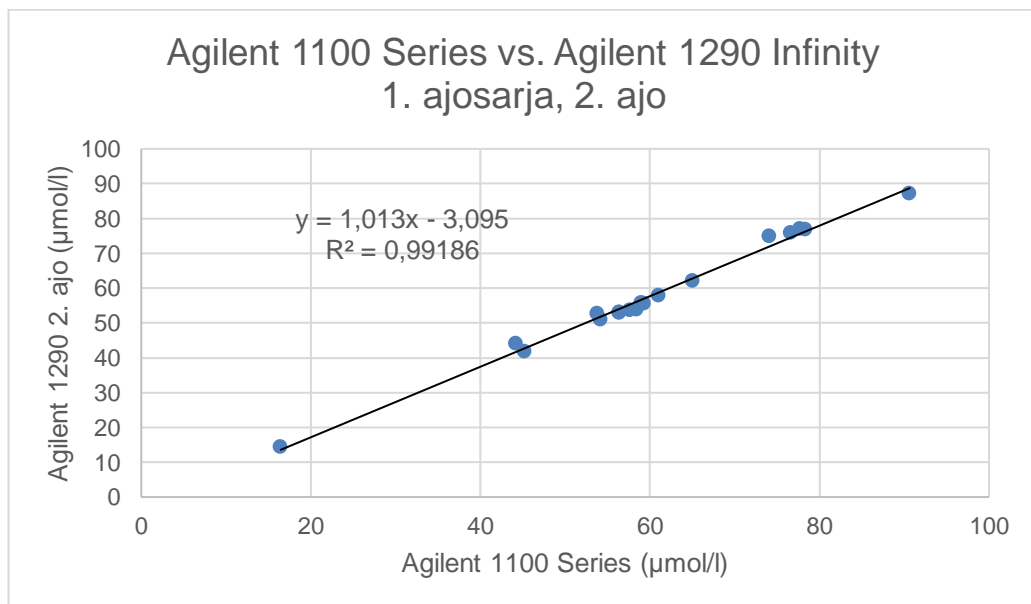
Kaava 5. Selitysasteen laskukaava (Heikkilä 2008).

Ensimmäisestä ajosarjasta suoritettiin kaksi ajoa, ensimmäinen ja toinen. Ajojen sirontakuvioiden selkeästi havaittavissa analysoitavien tulosten välillä olevan selkeä yhteys. Molemmissa ajokerroissa tulokset sijoituivat regressiosuoran välittömään läheisyyteen. Ensimmäisen sirontakuvioiden (Kuvio 1) selitysaste (R^2) on 0,995, eli Agilent 1290 Infinity-analysoitavien tuloksista 99,5% pystytään selittämään Agilent 1100 Series-analysoitavien tuloksilla. Toisen sirontakuvioiden (Kuvio 2) selitysaste (R^2) on 0,992, eli tuloksista on selitettävissä 99,2%. Ensimmäisen ajosarjan ensimmäisen ajon korrelaatioksi saatiin 0,998 ja toisen ajon korrelaatioksi saatiin 0,996. Nämä ovat erittäin

voimakkaita korrelaatioita. Tämän perusteella Agilent 1100 Series-analysaattorin ja Agilent 1290 Infinity-analysaattorin tulokset korreloivat keskenään voimakkaasti.



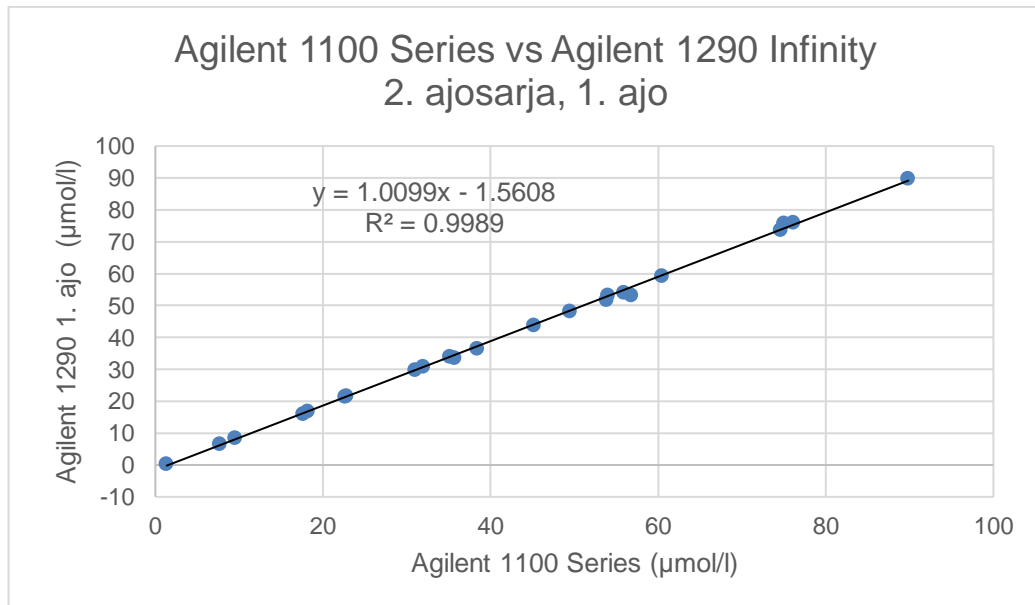
Kuvio 1. Agilent 1100 Series vs. Agilent 1290 Infinity analysaattoreiden 1. ajosarjan 1. toistoajo



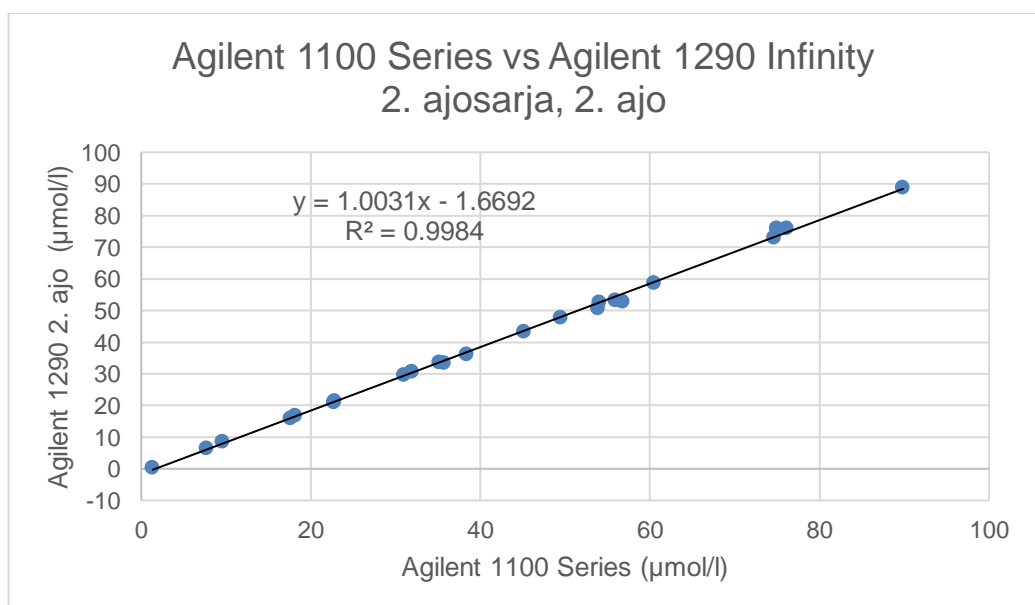
Kuvio 2. Agilent 1100 Series vs. Agilent 1290 Infinity analysaattoreiden 1. ajosarjan 2. toistoajo.

Myös toisesta ajosarjasta suoritettiin kaksi ajoa, ensimmäinen ja toinen. Sirontakuviaita tarkastelemalla, analysaattoreiden välillä on havaittavissa selkeä yhteys. Lähes kaikki

tulokset sijoittuivat regressiosuoralle. Sirontakuviosta (Kuvio 3 ja Kuvio 4) näkee selitysasteiden (R^2) olevan 0,999 ja 0,998, eli Agilent 1290 Infinity-analysaattoriin tuloksista 99,9% ja 99,8% on selitettävissä Agilent 1100 Series-analysaattorin tuloksilla. Toisen ajosarjan ensimmäisen ajon korrelaatiokertoimeksi tuli 0,999 ja toisen ajon korrelaatiokerroin on 0,999. Korrelaatiokertoimet ovat erittäin voimakkaat, joten Agilent 1290 Infinity ja Agilent 1100 Series analysaattoreiden tulokset korreloivat keskenään voimakkaasti.



Kuvio 3. Agilent 1100 Series vs. Agilent 1290 Infinity analysaattoreiden 2. ajosarjan 1. toistoajo.



Kuvio 4. Agilent 1100 Series vs. Agilent 1290 Infinity analysaattoreiden 2. ajosarjan 2. toistoajo.

5.3 Nollahypoteesi ja merkitsevyystaso

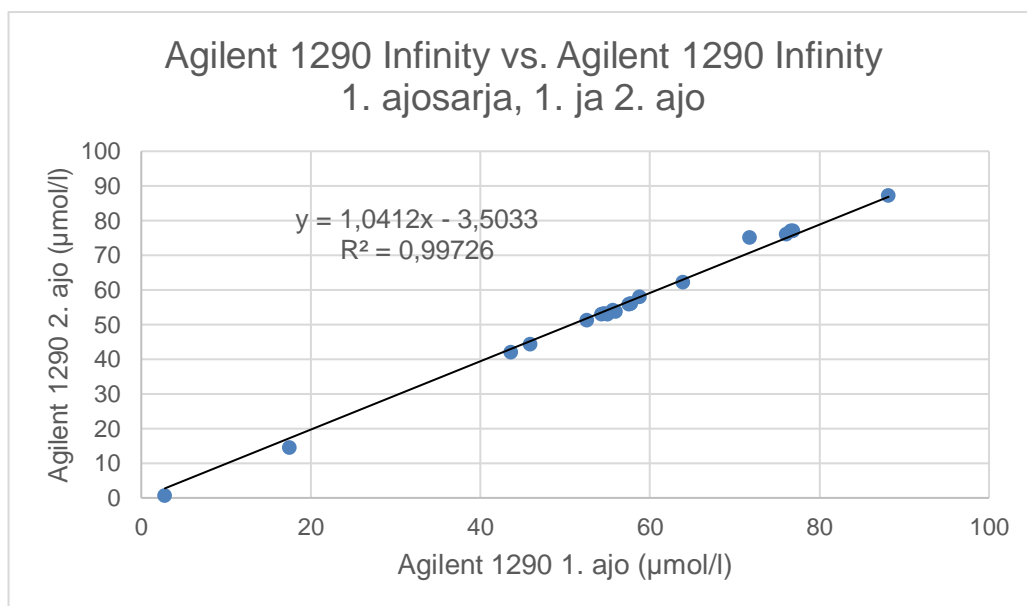
Nollahypoteesi on oletamus, joka asetetaan tutkimukselle. Se on oletamus, jota pidetään tutkimuksen osalta totena. Tutkimuksiin yleisesti kuuluu tiettyjen oletamusten ja väitteiden todenperäisyyden paikkansa pitävyyden testaaminen. (Holopainen & Pulkkinen 2013.) Tämän tutkimuksen nollahypoteesina on, että Agilent 1100 Series-analysaattorin ja Agilent 1290 Infinity-analysaattorin väliset tulokset ovat yhteneviä ja vaihtoehtoinen hypoteesi on, että tulokset eivät ole yhteneviä. Nollahypoteesia testattaessa päätetään, kuinka suuri hylkäämisen riski otetaan. Hylkäämisriski ilmoitetaan merkitsevyystasona, eli p-arvona. Yleisesti käytössä olevat merkitsevyystasot ovat, että tulos on erittäin merkitsevää, jos tulos on $\leq 0,001$ tai tulos ei ole tilastollisesti merkitsevää, jos tulos on $> 0,05$. (Heikkilä & Pulkkinen 2013.) Merkitsevyystaso kertoo jo tehdyn johtopäätöksen tilastollisesta luotettavuudesta, nollahypoteesin hylkäämisvirheen todennäköisyydestä; kuinka suurella todennäköisyydellä vaihtoehtoinen hypoteesi on väärä. (Heikkilä 2008; Holopainen & Pulkkinen 2013.)

Merkitsevyystason p-arvo laskettiin t-testin avulla. T-testi perustuu otoksesta saatuun keskiarvoon (Karjalainen 2010). T-testi suoritettiin analysaattoreiden välillä käyttäen kaksisuuntaista testausta. Ensimmäisessä ajosarjassa Agilent 1100 Series-analysaattorin ja Agilent 1290 Infinity-analysaattorin ensimmäisen ja toisen ajojen välinen p-arvo oli kaikissa vertailuissa $> 0,05$, eli analysaattoreiden tulosten välillä ei ollut merkittävää tilastollista eroa. Myös toisen ajosarjan analysaattoreiden välinen p-arvo oli kaikkien ajokertojen välillä $> 0,05$, eli merkittävää tilastollista eroa ei ollut. Kaikkien p-arvojen ollessa $> 0,05$, ei nollahypoteesia hylätä, vaan todetaan, että Agilent 1100 Series-analysaattorin ja Agilent 1290 Infinity-analysaattorin tulokset ovat yhteneviä.

5.4 Agilent 1290 Infinity sisäinen toistettavuus

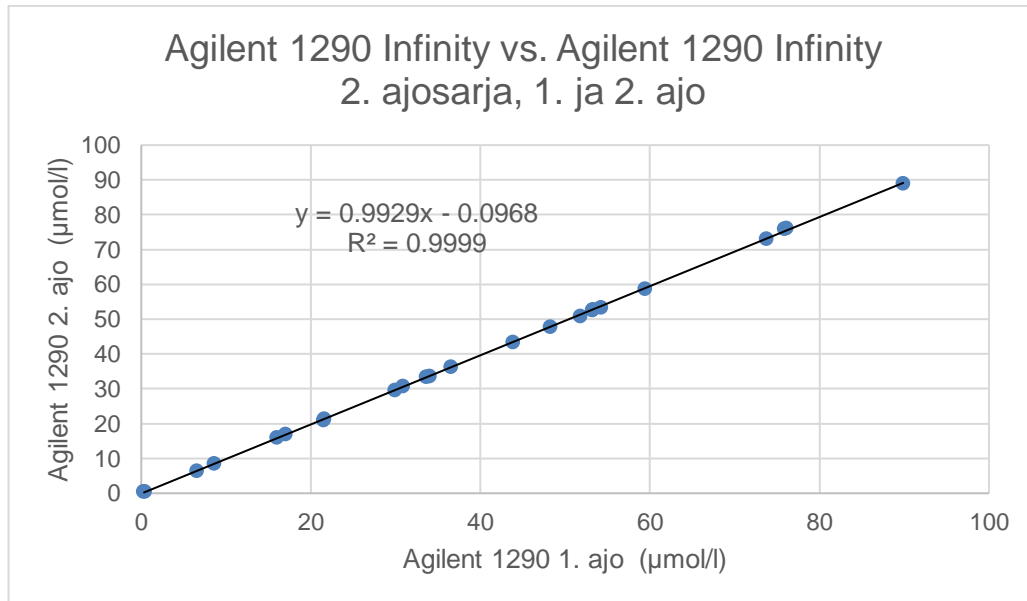
Agilent 1290 Infinity-analysaattorin sisäistä toistettavuutta tutkittiin ajamalla molemmat näytesarjat kahteen kertaan, sekä toisen rinnakkaisajon aikana muutamista näytteistä useampi toisto. Ensimmäisestä ajosarjasta ajettiin kolmesta näytteestä kuusi toistoa ja

toisesta ajosarjasta kolmesta näytteestä kuusi toistoa ja yhdestä näytteestä kolme toistoa. Ajosarjojen välisistä tuloksista tehtiin sirontakaaviot, joihin laskettiin selitysaste, regressio, p-arvo ja tuloksista laskettiin korrelaatio. Tutkimuksen nollahypoteesina on, että Agilent 1290 Infinity analysaattorin sisäinen toistettavuus on hyvä ja vaihtoehtoisena hypoteesina on, että toistettavuus ei ole hyvä. Ensimmäisen ajosarjan rinnakkaisajojen sirontakuviosta (Kuvio 5) on selvästi havaittavissa tulosten yhteneväisyyttä, tulokset ovat yhdensuuntaisia ja lähes kaikki osuvat regressiosuoralle. Tulosten selitysaste (R^2) on 0,997, eli 99,7% tuloksista on selitettävissä. Tulosten korrelaatiokerroin on 0,998, eli tulokset korreloivat keskenään voimakkaasti.



Kuvio 5. Agilent 1290 Infinity 1. ajo vs. Agilent 1290 Infinity 2. ajo, 1. ajosarja.

Toisen ajosarjan rinnakkaisajot asettuivat sirontakuviossa (Kuvio 6) hyvin regressiosuoralle ja tulokset ovat selvästi yhteneviä. Rinnakkaisajojen selitysaste (R^2) on 0,999, täten toisen ajon tuloksista 99,9% on selitettävissä ensimmäisen ajon tuloksilla. Toisen ajosarjan korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,999, joka vastaa erittäin vahvaa positiivista korrelaatiota.



Kuvio 6. Agilent 1290 Infinity 1. ajo vs. Agilent 1290 Infinity 2. ajo, 2. ajosarja.

Molempien ajosarjojen rinnakkaisajoille laskettiin t-testin avulla p-arvo. Molempien rinnakkaisajojen p-arvoksi saatiin yli 0,05, jolloin merkittävää tilastollista eroa ajojen välillä ei ollut, eikä nollahypoteesia näin hylätä.

Yhden näytteen rinnakkaisajojen tuloksista laskettiin tunnusluvut (Taulukko 3). Kirjain näytenumeron perässä kertoo, onko kyseessä ensimmäisen (a) ajosarjan näyte vai toisen (b) ajosarjan näyte. Kaikista muista näytteistä ajettiin 6 toistoa yhdessä ajokerrassa, paitsi näytteestä 4b vain 3 toistoa.

Taulukko 3. Toistettavuuden tunnusluvut

	Näyte 4b	Näyte 5a	Näyte 7a	Näyte 8a	Näyte 12b	Näyte 20b	Näyte 29b
Keskiarvo	89,05	0,45	87,66	14,40	0,26	8,49	0,39
Minimi	88,96	0,39	87,29	14,33	0,23	8,47	0,37
Maksimi	89,10	0,55	88,00	14,47	0,40	8,51	0,44
Vaihteluväli	0,14	0,16	0,71	0,14	0,17	0,04	0,07
Keskihajonta	0,08	0,05	0,34	0,06	0,07	0,01	0,03
Variaatiokerroin	0,08%	11,98%	0,38%	0,39%	27,58%	0,15%	7,27%
n							

Keskihajonta näytteiden välillä on erittäin pientä, joka kertoo näytetulosten olleen erittäin lähellä toisiaan. Variaatiokertoimet ovat pääsääntöisesti pieniä, mutta kun kyseessä on pienet pitoisuudet, näkyvät niiden pienetkin vaihtelut suurina variaatiokertoimessa.

5.5 Erotus ja eroprocentti

Molempien analysaattoreiden tuloksista ja rinnakkaisajojen tuloksista laskettiin erotus ja eroprocentti (Taulukko 4 ja Taulukko 5). Erotus ja eroprocentti laskettiin Agilent 1100 Series-analysaattorin tuloksista ja Agilent 1290 Infinity-analysaattorin tulosten keskiarvosta. Täten nähdään paljonko Agilent 1100 Series-analysaattorin tulokset eroavat Agilent 1290 Infinity-analysaattorin keskimääräisistä tuloksista. Eroprocentti kertoo lasketun erotuksen suhteen referenssilaitteen, Agilent 1100 Series:n tuloksiin.

Taulukko 4. Ensimmäisen ajosarjan erotukset ja eroprocentit.

Agilent 1100 Series ($\mu\text{mol/l}$)	Agilent 1290 Infinity Ajo ($\mu\text{mol/l}$)	Agilent 1290 Infinity Ajo ($\mu\text{mol/l}$)	Agilent 1290 Infinity keskiarvo ($\mu\text{mol/l}$)	Erotus (Agilent 1100 Series – Agilent 1290 ka) ($\mu\text{mol/l}$)	Eroprocentti
74,08	71,80	75,01	73,40	0,67	1%
76,62	76,11	76,03	76,07	0,55	1%
53,77	55,07	52,88	53,97	-0,21	0%
54,20	52,62	51,16	51,89	2,31	4%
90,64	88,15	87,29	87,72	2,91	3%
16,45	17,50	14,47	15,99	0,47	3%
57,66	56,04	53,81	54,92	2,74	5%
65,06	63,95	62,14	63,04	2,02	3%
44,18	45,91	44,22	45,06	-0,89	-2%
61,04	58,81	57,93	58,37	2,67	4%
45,24	43,64	42,00	42,82	2,42	5%
58,47	55,70	54,05	54,88	3,60	6%
56,41	54,38	52,99	53,69	2,72	5%

56,38	54,70	53,14	53,92	2,46	4%
59,01	57,85	55,98	56,92	2,09	4%
59,29	57,58	55,79	56,69	2,61	4%
78,32	76,68	77,00	76,84	1,47	2%
77,75	76,90	77,09	76,99	0,75	1%

Eroprosentteja tutkimalla voi huomata tulosten eroavaisuuksien olevan erittäin pieniä. Mutta esimerkiksi toisen ajosarjan viimeisen näytteen (Taulukko 5) eroprosentti on hyvin korkea (67%). Tämä kuitenkin johtuu siitä, että kyseessä on niin pieni pitoisuus, että pienikin ero, kuten tässä (1 μ mol/l) näkyy ero prosentissa suurena. Ensimmäisessä ajossa suurin pitoisuus ero oli 3,595 μ mol/l eli 6% ja toisessa ajossa suurin pitoisuusero oli 3,739 eli 7%. Tämäkin näyttää sen, että vaikka ero prosenttiosuus joissain näytteissä on suuri, ei näytteiden välinen erotus kuitenkaan ole yhtä iso. Molempien ajokertojen tuloksista on huomattavissa, että Agilent 1100 Series-analysointori antaa pääsääntöisesti suurempia pitoisuuksia kuin Agilent 1290 muutama poikkeus huomioon ottaen.

Taulukko 5. Toisen ajosarjan erotukset ja ero prosentit.

Agilent 1100 Series (μ mol/l)	Agilent 1290 Infinity 1. Ajo (μ mol/l)	Agilent 1290 Infinity 2. Ajo (μ mol/l)	Agilent 1290 Infinity keskiarvo (μ mol/l)	Erotus (Agilent 1100 Series - Agilent 1290 ka) (μ mol/l)	Ero prosentti
75,00	75,92	75,99	75,96	-0,96	-1%
76,13	76,17	76,07	76,12	0,01	0%
89,85	89,87	88,96	89,42	0,43	0%
18,19	17,04	16,93	16,98	1,21	7%
60,46	59,43	58,82	59,12	1,34	2%
54,01	53,26	52,65	52,96	1,05	2%
45,14	43,86	43,44	43,65	1,49	3%
31,96	30,93	30,67	30,80	1,16	4%

49,50	48,31	47,82	48,06	1,43	3%
38,40	36,56	36,27	36,41	1,99	5%
35,16	34,02	33,66	33,84	1,33	4%
31,01	29,95	29,60	29,77	1,24	4%
22,80	21,64	21,42	21,53	1,27	6%
35,69	33,68	33,38	33,53	2,17	6%
17,65	16,07	16,00	16,03	1,62	9%
56,82	53,32	52,84	53,08	3,74	7%
22,70	21,54	21,04	21,29	1,40	6%
9,57	8,64	8,51	8,58	0,99	10%
7,69	6,59	6,47	6,53	1,16	15%
53,88	51,83	50,78	51,30	2,58	5%
55,93	54,25	53,34	53,79	2,14	4%
74,64	73,80	73,02	73,41	1,22	2%
1,36	0,45	0,44	0,44	0,91	67%

5.6 Tutkimustulosten tarkastelu

Agilent 1100 Series ja Agilent 1290 Infinity analysaattoreiden välinen täsmävyys ovat hyviä. Tästä kertoo analysaattoreiden tuloksien hyvä verrattavuus, tulosten vahva positiivinen korrelaatio ja korkea selitysaste. Analyysituloksista lasketut tunnusluvut olivat lähellä toisiaan, eikä suuria eroavaisuuksia analysaattoreiden välillä havaittu.

Agilent 1290 Infinity-analysaattorin sisäinen toistettavuus on hyvä. Tästä kertoo analysaattorilla ajettujen rinnakkaisajojen hyvä verrattavuus, tulosten vahva positiivinen korrelaatio ja korkea selitysaste. Tulokset olivat yhteneviä ja rinnakkaisajojen välinen eroavaisuus oli pientä. Tätä tutkittiin tarkastelemalla tulosten yhtenevyyttä tunnusluvuilla. Tunnusluvuissa ei ollut havaittavissa suuria eroavaisuuksia ja tulokset olivat selkeästi yhteneviä.

Nollahypoteesina oli, että Agilent 1100 Series-analysaattorin ja Agilent 1290-analysaattorin tulokset ovat keskenään täsmäviä ja Agilent 1290-analysaattorin sisäinen toistettavuus on hyvä. Hypoteesi testattiin t-testin kanssa, joka antoi kaikille

testeille tulokseksi >5%, eli tulosten välillä ei ollut merkittävää eroa. Näin ollen nollahypoteesi jää voimaan, sillä nollahypoteesin hylkäämisen riski olisi liian suuri.

6 POHDINTA

Tämän opinnäytetyön tutkimusongelmina oli tutkia Agilent 1290 Infinity-analysointilaitteen sisäistä toistettavuutta sekä Agilent 1290 Infinity-analysointilaitteen ja Agilent 1100 Series-analysointilaitteen välistä täsmävyyttä. Toistettavuudella tarkasteltiin analysointilaitteen tarkkuutta antaa yhteneviä tuloksia useita kertoja peräkkäin ja täsmävyydellä tarkasteltiin analysointilaitteiden välistä tulostason yhtenevyyttä (Harris, 1995). Täsmävyyttä tutkittiin analysoimalla näytesarjat ensin Agilent 1100 Series-analysointilaitteella, joka toimi referenssilaitteena. Tämän jälkeen näytesarjat analysoitiin Agilent 1290 Infinity-analysointilaitteella kahteen kertaan. Näytesarjoja oli yhteensä kaksi. Agilent 1290 Infinity-analysointilaitteen toistettavuutta tutkittiin ajamalla näytesarjat useamman kerran, sekä valitsemalla sarjoista näytteitä, jotka olivat pitoisuuksiltaan matalia, hieman keskitasoa matalampia ja korkeita, ja näitä näytteitä analysoitiin useita kertoja, tutkien onko tulokset joka kerta yhteneviä.

Agilent 1290 Infinity-analysointilaitteella on herkempi analysoimaan pienempiä pitoisuuksia kuin Agilent 1100 Series-analysointilaitteella. Ajosarjoissa oli yhteensä kaksi näytettä joihin Agilent 1100 Series-analysointilaitteella ei ollut laskenut minkäänlaista pitoisuutta. Näitä näytteitä ei käytetty analysointilaitteiden välisessä täsmävyuden tarkastelussa.

Tämän opinnäytetyön tutkimustulosten mukaan Agilent 1100 Series ja Agilent 1290 Infinity-analysointilaitteiden väliset tulokset ovat yhteneviä ja Agilent 1290 Infinity-analysointilaitteen sisäinen toistettavuus on hyvä. Niin analysointilaitteiden kuin rinnakkaisajojen tulokset korreloivat vahvasti keskenään, tulokset selittävät toisiaan lähes 100% ja p-arvot ovat yli 5%, joten merkittävää eroa tulosten välillä ei löydetty.

Agilent 1100 Series ja Agilent 1290 Infinity-analysointilaitteet ovat Agilent Technologies:n valmistamia korkean erotuskyvyn nestekromatografia-analysointilaitteita. Analysointilaitteiden analyysimenetelmä ja toimintatavat ovat samat ja laitteet käyttävät samoja reagenssiliuoksia, täten analysointilaitteiden antamien tulosten vertailu oli helposti tehtävissä.

Ensimmäisen ajosarjan ensimmäisen ja toisen ajon välissä Agilent 1290 Infinity-analysointilaitteen kolonni oli vaihdettu toiseen vastaavaan kolonniin. Kolonnin vaihto saattoi vaikuttaa ajojen rinnakkaisuuteen, mutta tuloksia tarkastellessa ei ollut nähtävissä merkittäviä eroavaisuuksia. Toisen ajosarjan toisen ajon aikana analysointilaitteen käyttämä

puskuriliuos alkoi loppua ja se täytyi vaihtaa uuteen kesken ajon, joka vaikuttaa tulosten retentioaikaan. Ajosarjan kuusi viimeistä näytettä kalibroitiin uudestaan eri ajoliuoksella kuin ajosarjan ensimmäiset näytteet. Tämä ei kuitenkaan vaikuttanut merkittävästi tuloksiin. Viimeisen analyysiajon aikana ajoliuos ehti loppua kokonaan, sillä analysaattorin käyttöohjelmaan ei ollut päivittynyt ajoliuoksen määrä sen vaihdon yhteydessä. Ajoliuoksen loppuminen ehdittiin huomata vasta, kun analysaattori oli analysoinut yhtä näytettä kolmen toiston verran. Näytettä ei ollut enää tarpeeksi jäljellä, jotta olisi voitu suorittaa pilalle menneet ajot uudelleen, siksi analysaattorin toistettavuutta tutkiessa oli yksi näyte, jota ei analysoitu yhtä montaa kertaa kuin muita.

Tämän opinnäytetyön käytännön virhelähteet keskittyvät näytteen käsittelyyn, säilytykseen sekä esikäsittelyyn. Virhelähteitä voi esiintyä jo näytteenotossa, jos näytteenottaja tai asiakas ei kiinnitä huomiota lääkkeen nauttimisaikaan. Näytettä ei tulisi ottaa, jos okskarbatsepiinilääke on otettu aamulla. Analyysivirheitä voi esiintyä virheellisesti säilytetystä näytteestä tai väärin esikäsittelystä näytteestä. Nämä voivat vaikuttaa lääkeainepitoisuuden virheellisen matalaan pitoisuuteen. Tulosten luotettavuutta heikentää esikäsiteltyjen näytteiden säilytys analyysiajojen välissä. Esikäsiteltyjä näytteitä säilytettiin jääkaapissa analyysiajojen välissä, mutta näytteiden säilyvyydestä ei ole tehty tutkimusta. Saman näytesarjan ensimmäisen ja viimeisen ajokerran välissä saattoi olla jopa 7 vuorokautta. Tämän opinnäytetyön tutkimustulosten mukaan voi päätellä, että jääkaappisäilytys ei ollut vaikuttanut näytteiden pitoisuuksiin merkittävästi, mutta tulokset olivat hieman matalampia. Näytetulokset syötettiin tietojenkäsittelyohjelmaan paperitulosteiden pohjalta. Kirjaus tarkistettiin useaan kertaan mahdollisten näppäilyvirheiden poistamiseksi.

Tämä opinnäytetyö on tehty hyviä tieteellisiä käytäntöjä sekä hyviä eettisiä periaatteita noudattaen. Tämän opinnäytetyön tutkimusosuutta varten hankittiin asianmukaiset tutkimusluvut ennen tutkimuksen aloittamista. Tutkimuksessa käytettyjen näytteiden henkilötiedot olivat poistettu ja korvattu juoksevilla numerolla, näin näytteitä pystyivät jäljittämään yhteenkään potilaaseen tutkimusprosessin yhdessäkään vaiheessa. Opinnäytetyö suoritettiin erityistä tarkkuutta, huolellisuutta ja rehellisyyttä noudattaen, varsinkin tulosten käsin kirjaamisessa virheiden välttämiseksi. Opinnäytetyön teoriaosuuden kirjoituksessa käytettiin useita suomenkielisiä sekä englanninkielisiä luotettavia lähteitä. Opinnäytetyöprosessin aikana tuli viivästyksiä tutkimusluvan saamisen kanssa, sekä validoitavan analysaattorin toimivuuden kanssa. Opinnäytetyön

aikana analyysiprosessin eri vaiheiden ymmärtäminen ja hallitseminen vahvistui, sekä ammatillinen osaaminen kehittyi syventyessä opinnäytetyön käsittelemiin aiheisiin.

Tämän opinnäytetyön tuloksena Agilent 1290 Infinity-analysaattori voidaan ottaa S-OHKarba-tutkimuksen analyysikäyttöön Tykslabin osastolla 931.

Jatkotutkimusaiheiksi suositellaan Agilent 1290 Infinity-analysaattorin sisäisen toistettavuuden tutkimista useammalla näytteellä, joiden pitoisuudet ovat matalia, keskitasoisia ja korkeita. Lisäksi myös esikäsiteltyjen näytteiden säilyvyyden tutkimista; kuinka kauan näytteet säilyvät analyysikelpoisina ilman vaikutusta analyysitulokseen.

LÄHTEET

- Appleton, E. & Marson, A. 2009. Epilepsy. 3. painos. New York: Oxford University Press Inc.
- Atula, S. 2015. Epilepsia aikuisella. Lääkärikirja Duodecim. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00121.
- Fifield, F.W. & Kealey, D. 2000. Principles and practice of analytical chemistry. 5. painos. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Haines, P.J. & Kealey, D. 2002. Analytical chemistry. Oxford: BIOAS Scientific Publishers Ltd.
- Harris, D.C. 1995. Quantitative chemical analysis. 4. painos. New York: W.H. Freeman and Company.
- Heikkilä, T. 2008. Tilastollinen tutkimus. 7., uudistettu painos. Helsinki: Edita Prima Oy.
- Hiltunen, E.; Linko, L.; Hemminki, S.; Hägg, M.; Järvenpää, E.; Saarinen, P.; Simonen, S. & Kärhä, P. 2011. Laadukkaan mittaamisen perusteet. Saatavilla: <http://www.mikes.fi/oppaat>.
- Hirsjärvi, S.; Reme, P. & Sajavaara, P. 1997. Tutki ja kirjoita. 13.-14., osin uudistettu painos. Keuruu: Otavan kirjapaino Oy.
- Holopainen, M. & Pulkkinen, P. 2013. Tilastolliset menetelmät. 5.-8. painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy.
- Huttunen, M. 2015. Kaksisuuntaisessa mielialahäiriössä käytettävät lääkkeet. Duodecim – Terveyskirjasto. Viitattu 12.9.2016 http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=lam00049.
- Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. 5. uudistettu painos. Helsinki: Edita Prima Oy.
- Järviseutu-Hulkkonen, M. 2016. Lääkehoito. Lääkehoidon merkitys epilepsian hoidossa. Teoksessa Kälviäinen R., Järviseutu-Hulkkonen, M., Keränen, T. & Rantala, H. (toim.) Epilepsia. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- Karjalainen, L. 2010. Tilastotieteen perusteet. 1. painos. Keuruu: Otavan Kirjapaino Oy.
- Kälviäinen, R. 2016. Epilepsia on muutakin kuin kohtauksia. Teoksessa Kälviäinen R., Järviseutu-Hulkkonen, M., Keränen, T. & Rantala, H. (toim.) Epilepsia. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- Kälviäinen, R.; Tarnanen, K. & Komulainen, J. 2014. Epilepsiat aikuisilla. Käyvän hoidon potilasversiot. Saatavilla: http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=khp00083.
- Lehtonen, P. & Sihvonen, M-L. 2004. Laboratorioalan analyttinen kemia. 1. painos. Edita Prima Oy.
- Lilja J.; Neuvonen P. & Ylitalo P. 2010. Lääkeaineet ja myrkytykset. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) Laboratoriolääketiede – Kliininen kemia ja hematologia. 3. uudistettu painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy ja toimituskunta.
- Mattila, M. 2003a. Hajontaluvut. KvantiMOTV > Hajontaluvut. Viitattu 4.1.2017 <http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/hajontaluvut/hajontaluvut.html>.
- Microsoft Excel 2016. STDEV function.

Nurminen, M-L. 2008. Lääkehoito. 7.-9. painos. WSOY Oppimateriaalit Oy.

Parviainen, M. & Savolainen, K. 2010. Kromatografia. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) Laboratoriolääketiede – Kliininen kemia ja hematologia. 3. uudistettu painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy ja toimituskunta.

Suomi J. 2009. Kemiallisen näytteen esikäsittely. 1. Painos. Keuruu: Otavan kirjapaino Oy.

Team-CAG. Agilent HPLC. The Chromatographic Measurement. Saatavilla: http://www.team-cag.com/support/theory/chroma/hplc_bas_at/list.html

Trileptal valmisteyhteenveto, 2014. Saatavilla: <http://spc.nam.fi/indox/english/html/nam/humspc/5/335695.pdf>.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta. 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa. Saatavilla: http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf.

Tykslab –ohjekirja 2015. S-OHKarba. Viitattu 12.9.2016 <http://webohjekirja.mylabservices.fi/TYKS/index.php?test=3957>.

Vilka, H. 2014. Tutki ja mittaa – määrällisen tutkimuksen perusteet. Helsinki: Tammi. Saatavilla: <http://hanna.vilka.fi/wp-content/uploads/2014/02/Tutki-ja-mittaa.pdf>.