



**TEKNIikka JA LIIKENNE**

**Laboratorioala**

**OPINNÄYTETYÖ**

**HUUMAUS- JA LÄÄKEAINEIDEN KVANTITATIIVINEN MÄÄRITTÄMINEN  
VERITÄPLÄNÄYTTEISTÄ – MENETELMÄN KEHITTÄMINEN JA VALIDOINTI**

**Työn tekijä: Hannu Uusivirta  
Työn ohjaajat: Mia Ruismäki  
Kaarina Langel**

**Työ hyväksytty: \_\_\_\_ . \_\_\_\_ . 2010**

**Mia Ruismäki  
lehtori**



## **ALKULAUSE**

Tämä opinnäytetyö tehtiin Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen Päihdeanalytiikan yksikössä.

Haluan kiittää opinnäytetyöni ohjaajia lehtori Mia Ruismäkeä ja tutkija Kaarina Langelia. Suuri kiitos laboratoriotyöskentelyn opastuksesta laboratorioanalytikko Outi Saimaselle. Haluan kiittää kaikkia muitakin työtovereita Päihdeanalytiikan yksikössä mukavasta työilmapiiristä ja opastuksesta jokapäiväisissä laboratoriotöhtävissä. Kiitos myös apulaistutkija Kari Ariniemelle avustuksesta menetelmän kehittämisessä. Kiitokset kaikille muillekin, jotka ovat auttaneet ja tukeneet opinnäytetyön teossa.

Helsingissä 3.6.2010

Hannu Uusivirta

## TIIVISTELMÄ

<b>Työn tekijä:</b> Hannu Uusivirta	
<b>Työn nimi:</b> Huumaus- ja lääkeaineiden kvantitatiivinen määrittäminen veritäplänäytteistä – menetelmän kehittäminen ja validointi	
<b>Päivämäärä:</b> 3.6.2010	<b>Sivumäärä:</b> 42 s.
<b>Koulutusohjelma:</b> Laboratorioala	<b>Suuntautumisvaihtoehto:</b>
<b>Työn ohjaajat:</b> Lehtori Mia Ruismäki Tutkija Kaarina Langel	
<p>Opinnäytetyö tehtiin Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen Päihdeanalytiikan yksikössä. Työn tavoitteena oli kehittää uusi menetelmä huumaus- ja lääkeaineiden kvantitatiivista määrittystä varten veritäplänäytteistä. Kehitetylle menetelmälle suoritettiin täysvalidointi.</p> <p>Menetelmän kehittelyn alkuvaiheessa analysoitavia yhdisteitä oli kahdeksan. Kehittämisen tärkeimpiä kokeiluja olivat eri uuttoliuottimet, puskuriliuokset ja liuottimet, joihin haihdutusjäännös liuotettiin. Kun menetelmä oli saatu toimivaksi, lisättiin 17 yhdistettä, minkä jälkeen analysoitavien yhdisteiden määräksi tuli 25. Sisäisiä standardeja oli 16. Validointivaiheessa tutkittiin lineaarisuutta, määritysrajaa, toistettavuutta, uuton saantoa, derivatisoinnin stabiilisuutta ja mittausepävarmuutta.</p> <p>Menetelmällä analysoitavat yhdisteet jakautuivat kahteen pääryhmään: lääkeaineisiin sekä huumausaineisiin ja muutama niistä tehtiin lääkejohdannaisiin. Lääkeaineisiin kuului 10 bentsodiatsepiinia ja kaksi niiden kaltaista lääkeainetta. Huumausaineisiin kuuluivat amfetamiini ja sen johdannaiset, THC ja sen aineenvaihduntatuote THC-COOH, opioidit ja kokaiini.</p> <p>Näytteiden esikäsittelyssä pilkokuista veritäplistä analysoitavat yhdisteet uutettiin butyyliasetaatilla emäksisissä olosuhteissa. Uuton jälkeen uuttoliuotin jaettiin kahteen osaan. Eroteltu liuotin haihdutettiin ja haihdutusjäännös liuotettiin butyyliasetaatilla ja asetoniin seokseen. Lopuksi suoritettiin derivatisointi MSTFA:lla tai MTBSTFA:lla. Näytteiden analysointi suoritettiin kaasukromatografi-massaspektrometrillä SIM-menetelmää käyttäen.</p> <p>THC-COOH, tramadoli ja tsolpideemi voidaan analysoida vain semikvantitatiivisesti, koska ne eivät täyttäneet kaikkia kvantitatiivisen määrittämisen kriteerejä. MDEA:n kohdalla eivät täyttyneet edes semikvantitatiiviset raja-arvot. Validointitulosten perusteella kaikki loput tutkittavat yhdisteet voidaan analysoida kvantitatiivisesti 16 sisäisen standardin avulla.</p>	
<b>Avainsanat:</b> huumaus- ja lääkeainemääritys, GC/EI-MS, GC/NICI-MS, validointi, derivatisointi, veritäplänäyte	

**ABSTRACT**

**Name:** Hannu Uusivirta

**Title:** Simultaneous Quantification of Drugs and Medicines in Blood Spots-  
Development and Validation of Method

**Date:** 3 June 2010

**Number of pages:** 42

**Department:**

**Study Programme:**

Laboratory Sciences

**Instructor:** Mia Ruismäki, Senior Lecturer

**Supervisor:** Kaarina Langel, Researcher

This study was performed in the Alcohol and Drug Analytics Unit of National Institute for Health and Welfare. The main aim of the study was simultaneous quantification of several drugs and medicines in blood spot samples. Another important aim was to validate the method.

In the beginning of developing the new method there were eight compounds to be analyzed. The most important experiments in the development were different extract solvents, buffer solutions and concentrate solvents. 25 compounds with 16 different internal standards were analyzed applying the functional method. In the validation phase, the linearity, limit of quantification, yield of extraction, stability of derivatization and uncertainty of measurement were determined.

The compounds to be analyzed were categorized into two main groups which are drugs and medicines. Ten benzodiazepines with two similar medicines belong to medicines while amphetamine with its derivatives, THC with its metabolite THC-COOH, opioids and cocaine belong to drugs.

In sample preparation, cut blood spots were extracted to butyl acetate in alkaline circumstances. After the extraction the solvent was split in two parts. Then solvent was evaporated and the compounds were dissolved from residue in a mixture of butyl acetate and acetonitrile. Finally the compounds were derivatized with MSTFA or MTBSTFA. The analysis was performed by using gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring.

It turned out that the analysis of THC-COOH, tramadol and zolpidem provided only semi-quantitative data as they did not pass all criteria for quantitative measurements. As for MDEA, it did not pass the criteria of semiquantitative measurements. The results of validation show that rest of compounds can be analyzed quantitatively with 16 internal standards.

**Keywords:** quantification of drugs and medicines, GC/EI-MS, GC/NICI-MS, validation, derivatization, blood spot sample

# SISÄLLYS

## ALKULAUSE

## TIIVISTELMÄ

## ABSTRACT

<b>1</b>	<b>JOHDANTO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>TEORIA</b>	<b>1</b>
<b>2.1</b>	<b>Veritäplä-menetelmä</b>	<b>2</b>
<b>2.2</b>	<b>Näytteiden esikäsittely</b>	<b>3</b>
2.2.1	<i>Uutto ja puskurointi</i>	3
2.2.2	<i>Derivatisointi</i>	4
2.2.3	<i>Sisäinen standardi</i>	5
<b>2.3</b>	<b>Kaasukromatografia</b>	<b>5</b>
2.3.1	<i>Liikkuva- ja stationäärifaasi</i>	6
2.3.2	<i>Injektiotekniikat</i>	6
2.3.3	<i>Kolonne</i>	7
2.3.4	<i>Detektorit</i>	8
<b>2.4</b>	<b>Massaspektrometria</b>	<b>8</b>
2.4.1	<i>Elektronipommitusionisaatio</i>	9
2.4.2	<i>Kemiallinen ionisaatio</i>	10
<b>2.5</b>	<b>Yhdisteet</b>	<b>11</b>
2.5.1	<i>Amfetamiini ja sen johdokset</i>	11
2.5.2	<i>Kannabis</i>	12
2.5.3	<i>Opioidit</i>	12
2.5.4	<i>Kokaiini</i>	13
2.5.5	<i>Bentsodiatsepiinit</i>	13
<b>2.6</b>	<b>Validointi</b>	<b>14</b>
2.6.1	<i>Lineaarisuus ja mittausalue</i>	14
2.6.2	<i>Tarkkuus</i>	15
2.6.3	<i>Toteamis- ja määritysraja</i>	16
2.6.4	<i>Saanto</i>	16
2.6.5	<i>Stabiilisuus</i>	17
2.6.6	<i>Mittausepävarmuus</i>	17
<b>3</b>	<b>MENETELMÄN KEHITTÄMINEN</b>	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Näytteiden esikäsittely</b>	<b>19</b>
<b>3.2</b>	<b>Esikäsittelyn optimointi</b>	<b>21</b>
<b>3.3</b>	<b>Analyysilaitteet ja reagenssit</b>	<b>24</b>
<b>3.4</b>	<b>Menetelmän työvaiheet</b>	<b>25</b>

<b>4</b>	<b>VALIDOINTITULOKSET</b>	<b>28</b>
4.1	Lineaarisuus	29
4.2	Tarkkuus	32
4.3	Määrittäysraja	35
4.4	Saantokokeet	36
4.5	Stabiilisuus	37
4.6	Mittausepävarmuus	39
<b>5</b>	<b>YHTEENVETO</b>	<b>40</b>
	<b>VIITELUETTELO</b>	<b>42</b>

## 1 JOHDANTO

Opinnäytetyö on tehty Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) Päihdeanalytiikan yksikössä. THL on sosiaali- ja terveysministeriön hallinnonalalla toimiva tutkimus- ja kehittämislaitos. Sen tehtävänä on väestön hyvinvoinnin ja terveyden edistäminen, sairauksien ja sosiaalisten ongelmien ehkäiseminen sekä sosiaali- ja terveystalouden kehittäminen.

Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen Päihdeanalytiikan yksikkö on osallisena Euroopan unionin rahoittamassa DRUID-projektissa (*Driving under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines*). Seitsemästä työpaketista koostuvassa projektissa pyritään vertaamaan eri näytematriiseista (kokoveri, plasma ja sylki) saatuja tuloksia toisiinsa ja tekemään päätelmiä huumausaineiden ja liikenteelle haitallisiksi luokiteltujen lääkeaineiden esiintyvyydestä tieliikenteessä ja onnettomuusuhreissa, psykoaktiivisten aineiden aiheuttamista onnettomuusriskeistä, lääkeaineiden vaikutuksista terveisiin henkilöihin ja potilaisiin sekä huumausaineiden vaikutuksista ajokykyyn.

Tämän opinnäytetyön aiheena oli yksi osio edellä mainitussa projektissa. Työn tarkoituksena oli kehittää uusi menetelmä, jossa tutkittavilta henkilöiltä oli otettu kapillaarisesti verinäyte sormenpäältä. Verinäyte imeytettiin suodatinpaperille ja annettiin kuivua. THL:lla on analysoitava verinäytteitä varten, mutta kuivunutta veritäplää näytematriisina ei ole tutkittu aiemmin THL:lla, joten menetelmää lähdettiin kehittämään aiheesta kirjoitettujen julkaisujen avulla. Uudelle kehitellylle menetelmälle suoritettiin täysvalidointi THL:n validointiohjeiden mukaan.

## 2 TEORIA

Seuraavissa osioissa käydään läpi työn eri vaiheisiin liittyvää teoriaa. Aluksi on kerrottu veritäplä-menetelmän taustaa, jonka jälkeen on selostettu teoriaa näytteen esikäsittelystä menetelmän validointiin. Lopuksi on käsitelty vielä menetelmällä analysoitavia yhdisteitä.

## 2.1 Veritäplä-menetelmä

Veritäplä- eli *blood spot* -analyyseistä on kuvauksia jo vuodelta 1913, jolloin menetelmää käytettiin veren glukoosipitoisuuden arviointiin. Ensimmäinen huomattava käyttö menetelmällä on 1960-luvun alkupuolelta, jolloin tohtori Robert Guthrie kehitti analyysin, jolla tunnistettiin fenyyliketonuriaa, joka on kehitysvammaisuutta aiheuttava perinnöllinen sairaus. Guthrien menetelmä kerätä veri suodatinpaperille johti perinnöllisten aineenvaihduntasairauksien seulomiseen vastasyntyneillä lapsilla. Guthrien mukaan nimettyä suodatinpaperia on käytetty veren keräämiseen 1960-luvun alusta lähtien ja käytetään vielä tänä päivänäkin. Nykyään veren keräämisestä suodatinpaperille on tullut merkittävä työtapu seuloa yksilöitä kliinisiä kokeiluita varten ja suorittaa epidemiologisia tutkimuksia. [1.]

Huumaus- ja lääkeainemäärityksiä varten on kehitelty menetelmiä, joissa tutkitaan kuivia verinäytteitä. Artikkelissa [2.], jossa Alfasil ja Anderson ovat tutkineet veritäplänäytteiden stabiilisuutta säilytyksessä, kokeillaan eri uuttoluottimia ja säilytyslämpötiloja. Siinä sormenpäästä tai kantapäädästä otetaan kapillaarilla verinäyte ja laitetaan suodatinpaperille. Veritäplän annetaan kuivua paperille tasaisissa olosuhteissa (esim. yön yli huoneenlämmössä). Veritäplä irrotetaan suodatinpaperista leikkaamalla saksilla tai lyömällä pyöreällä muotilla irti. Tutkimuksessa uuttoa kokeillaan kolmella eri liuottimella (metanoli, etyyliasetaatti ja asetonitrili) ja fosfaattipuskuriliuoksella (pH 6). Tutkimuksessa todetaan, että puskuriliuoksen käyttö antaa parhaan saannon, joten sitä käytetään testauksissa. Menetelmässä kuivattu veritäplä liuotetaan fosfaattipuskuriin. Aineiden uuttaminen suodatinpaperista suoritetaan ultraäänihauteessa (1 h), minkä jälkeen suodatinpaperi poistetaan ja uute sentrifugoidaan. Tämän jälkeen suoritetaan kiinteäfaasiuutto, jossa kiinteäfaasi ensin kunnostetaan, minkä jälkeen lisätään näyteliuos. Sitten faasi huuhdellaan ja siihen kiinni jääneet analyytit eluoidaan. Lopuksi liuotin haihdutetaan ja haihdutusjäännös liuotetaan nestekromatografian liikkuvana faasina käytettävään liuottimeen. Analysointi suoritetaan nestekromatografi-tandemmassaspektrometri -laitteistolla. [2.]

Toisessa artikkelissa [3.] Schutz ym. ovat seuloneet huumausaineita pienistä verinäytteistä ja veritahroista. Verinäytteet voidaan raapia irti kiinteästä materiaalista tai uuttaa paperista tai tekstiilistä. Menetelmässä näytteen joukkoon lisätään metanolia ja Tris-puskuria. Tämän jälkeen suoritetaan kiin-



teäfaasiuutto, jossa ensin faasi kunnostetaan ja sitten lisätään näyte. Tämän jälkeen faasi huuhdellaan ja analyytit eluoidaan liuottimeen. Lopuksi suoritetaan derivatisointi ja näytteiden ajo kaasukromatografi-massaspektrometrilla. [3.]

## 2.2 Näytteiden esikäsittely

Toimivan kromatografisen menetelmän perustana on toistettava ja kaikille tutkittaville yhdisteille sopiva esikäsittely. Näytteiden esikäsittely on usein eniten aikaa vievä työvaihe kromatografisissa menetelmissä. Esikäsittelyvaiheessa analysoitavat yhdisteet erotetaan alkuperäisestä matriisista ja muokataan sellaisiksi, että ne voidaan analysoida kaasukromatografi-massaspektrometrillä. Tässä menetelmässä näytematriisi on imeytetty suodatinpaperiin. Analysoitavat yhdisteet tulee saada irti sekä suodatinpaperista että alkuperäisestä näytematriisista eli verestä. Seuraavaksi käydään läpi tarkemmin uuttoa, puskurointia, yhdisteiden derivatisointia sekä sisäisen standardin käyttämistä kemiallisissa analyyseissä.

### 2.2.1 Uutto ja puskurointi

Uuttaminen eli ekstraktio on kemiallinen eristysmenetelmä, jolla haluttu aine voidaan erottaa liuoksesta aineen liukoisuusominaisuuksien perusteella. Uuttaminen tapahtuu kahden toisiinsa liukenemattoman faasin välillä, jotka voivat olla kaksi eri nestettä, neste ja kiinteä aine tai kaasu ja neste. Uuttamista käytetään, kun halutaan siirtää ja ottaa talteen haluttuja yhdisteitä alkuperäisestä matriisista. Uuttamista käytetään myös lähtöaineen puhdistamiseen tietyistä yhdisteistä.

Neste-nesteuutto on eniten käytetty esikäsittelymenetelmä huumaus- ja lääkeaineanalyyseissä. Toisena faasina on yleensä vesi ja toisena jokin orgaaninen liuotin. Neste-nesteuuttoa suoritettaessa on tärkeää huomioida uuttolosuhteet. Säättämällä pH sopivaksi saadaan optimoitua uutonsaanto sekä voidaan välttää uuton yhteydessä ilmeneviä ongelmia, kuten emulsion muodostuminen, saostuminen ja haitalliset sivureaktiot. Uuttoliuotinta valittaessa on otettava huomioon sen poolisuus, selektiivisyys ja kapasiteetti.

Toinen käytetty uuttotapa on kiinteäfaasiuutto. Se on nopea, yksinkertainen ja toteutettavissa pienessäkin mittakaavassa. Kiinteäfaasiuutossa periaatteena on sitoa tutkittavat yhdisteet näyteliuoksesta kiinteään faasiin, josta ne

irrotetaan sopivalla liuottimella. Kiinteäfaasiuutto on nelivaiheinen. Ensimmäisessä vaiheessa kiinteäfaasi kunnostetaan sopivalla liuottimella näytedyhdisteiden pidättävyyden parantamiseksi ja epäpuhtauksien poistamiseksi. Seuraavaksi uuttolonniin laitetaan näyte, jolloin yhdisteet pidättäytyvät kiintoaineeseen. Faasi huuhdellaan heikolla liuottimella ei-toivotun näydetäustan poistamiseksi. Lopuksi tutkittavat yhdisteet eluoidaan kiinteästä faasista pieneen määrään liuotinta.

Monien kemiallisten systeemien toiminnan kannalta on tärkeää, että pH säilyy vakiona. Tähän päästään käyttämällä analyysissä puskuriliuosta, joka estää merkittävän pH-arvon muutoksen, vaikka systeemiin lisättäisiin happoja tai emäksiä. Ihmisen veren sisältämien monien heikkojen happojen ja emäksien puskurivaikutuksen johdosta veren pH on normaalisti välillä 7,35 - 7,45. Kehitellyssä menetelmässä käytetyn puskuriliuoksen pH on 10, jolloin uuttolosuhteet saadaan emäksisen puolelle. [4, s. 48.]

### 2.2.2 Derivatisointi

Derivatisointi eli johdoksenmuodostus on tekniikka, jolla yhdistettä muokataan kemiallisesti, jolloin saadaan alkuperäisen yhdisteen kaltaisen kemiallisen rakenteen omaava johdos. Tekniikan avulla saadaan aikaan termisesti pysyvämpiä yhdisteitä sekä voidaan parantaa kromatografisia ominaisuuksia, kuten haihtuvuutta, jolloin lähekkäin eluoituvien yhdisteiden erottuminen paranee. Derivatisoinnin avulla pystytään myös parantamaan analyysin herkkyyttä, spesifisyyttä ja määrityksen tarkkuutta. Onnistuneessa derivatisointireaktiossa kaikki merkitykselliset funktionaaliset ryhmät saadaan derivatisoitumaan mahdollisimman täydellisesti. Derivatisointi voidaan suorittaa esimerkiksi silyloimalla, alkyloimalla tai asyloimalla. Silyloinnissa aktiivinen vety korvataan polaarista ryhmästä, joka voi olla -OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>, =NH tai -SH. [5, s. 544 - 545.]

Kehitellyssä menetelmässä kaikkien tutkittavien yhdisteiden derivatisointi suoritettiin silyloimalla. Silylointireagensilla voidaan valmistaa esimerkiksi trimetyylisilyyli tai tert-butyylidimetyyli johdoksia. Tällöin reagenssiaineena voi olla N-metyyli-N-(trimetyylisilyyli)trifluoroasetamidia (MSTFA), joka reagoi useiden polaaristen yhdisteiden kanssa syrjäyttäen niistä vedyn Si(CH<sub>3</sub>)-ryhmällä. Toisena derivatisointireagenssiaineena käytettiin N-metyyli-N-(tert-butyylidimetyylisilyyli)trifluoroasetamidia (MTBSTFA). Bentsodiatsepiinien derivatisointi suoritettiin MTBSTFA:lla ja muiden yhdisteiden MSTFA:lla. Jot-

ta silylointireaktio onnistuu, se vaatii toimiakseen täysin vedettömän ympäristön.

### 2.2.3 Sisäinen standardi

Kemiallisissa analyyseissä tulosten luotettavuuden parantamiseksi kvantitatiivisissa määrityksissä käytetään usein sisäisen standardin menetelmää. Sitä standardia käytetään yleensä silloin, kun näytteen saattaminen analysoitavaan muotoon vaatii monivaiheista esikäsittelyä. Menetelmässä standardeihin ja tutkittaviin näytteisiin lisätään esikäsittelyn alussa tietty määrä sopivaa yhdistettä sisäiseksi standardiksi (*internal standard*, IS). Jos tutkittavia yhdisteitä on paljon, on suositeltavaa käyttää useita eri sisäisiä standardeja.

Sisäisenä standardina käytetään yleensä tutkittavan yhdisteen deuterioitua muotoa, koska sillä on samanlaiset ominaisuudet kuin tutkittavalla yhdisteellä. Näin ollen se reagoi samalla tavalla esikäsittelyn työvaiheissa kuin tutkittava yhdiste. Hyvä IS eluoituu lähellä tutkittavaa yhdistettä ja erottuu kromatografisesti tutkittavasta yhdisteestä. Sisäisen standardin käyttö korjaa näytteen esikäsittelyssä ja injektoinnissa esiintyvät vaihtelut sekä laitteen toiminnan pienet muutokset mittauskertojen välillä. IS:n piikin korkeuden tulisi olla lähellä standardiliuosten keskipitoisuutta vastaavaa piikin korkeutta.

Kalibroinnissa määritetään tutkittavien yhdisteiden ja sisäisten standardien signaalien arvot eri pitoisuustasoilla. Näistä tuloksista lasketaan tutkittavan yhdisteen piikin intensiteetin ja sisäisen standardin piikin intensiteetin suhde. Kalibrointisuora esitetään edellä laskettu suhde yhdisteen pitoisuuden funktiona. Tältä suoralta voidaan laskea näytteen pitoisuus, kun tiedetään näytteen sisältämän yhdisteen piikin ja sisäisen standardin piikin suhde. [6, s. 21 - 22; 7, s. 34.]

## 2.3 Kaasukromatografia

Kaasukromatografia on orgaanisen analytiikan perustekniikka, jolla voidaan analysoida haihtuvia yhdisteitä kvalitatiivisesti sekä kvantitatiivisesti. Kaasukromatografiassa erottuminen perustuu yhdisteiden erilaisiin höyrynpaineisiin ja liukoisuuksiin stationäärifaasiin. Lämpötilaa ajon aikana muuttamalla voidaan vaikuttaa yhdisteiden höyrystymiseen, joka vaikuttaa yhdisteiden erottumiseen ja ajo-ohjelman pituuteen. Kaasukromatografiassa liikkuvan faasin muuttaminen ei merkittävästi vaikuta erottumiseen, kuten nestekro-

matografiassa. Tästä johtuen erottumisen parantamiseksi käytetään erityyppisiä kolonneja. Kromatografialaitteiston pääkomponentit ovat injektor, kolonni, uuni ja detektori.

### 2.3.1 *Liikkuva- ja stationäärifaasi*

Kaasukromatografiassa liikkuvaa faasia kutsutaan kantajakaasuksi, joka usein on helium, typpi, vety, argon tai ilma. Helium on yleisimmin käytetty kantajakaasu, koska se on yhteensopiva monien detektorien kanssa. Vedylä on näistä kaasuista parhaat kromatografiset ominaisuudet ja sillä saadaan aikaan nopein erottuminen. Vedyn käytön haittapuolina ovat sen reaktioherkkyys sekä se, että se saattaa aiheuttaa ongelmia laitteessa, jossa detektorina on massaspektrometri. Käytettävien kaasujen on oltava inerttejä näytteen ja stationäärifaasin suhteen. Kantajakaasu kuljettaa injektorissa höyrystyneen näytteen kolonniin. Hyvän erottumisen kannalta jokaisella kantajakaasulla käytetään sen omaa optimaalista lineaarista virtausnopeutta. [7, s. 73 - 75.]

Kaasukromatografiassa stationäärifaasina on yleensä neste, mahdollisesti myös kiinteä aine, joka on inertti ja kestää hajoamatta ja höyrystymättä korkeita lämpötiloja. Faasiaineena käytettävää ainetta ei saa siirtyä kantajakaasun mukaan, koska tällöin detektori voi kontaminoitua, mikä voi aiheuttaa taustakohinan lisääntymistä tai heikentää laitteen herkkyyttä. Analyysissä käytettävän stationäärifaasin ominaisuuksien tulisi olla samankaltaiset kuin tutkittavien yhdisteiden. Käytetyimpiä nestemäisiä stationäärifaasimateriaaleja ovat polysiloksaanit, joihin on usein sidottu jokin orgaaninen ryhmä, jolloin stationäärifaaseille saadaan erilaisia ominaisuuksia erilaisia käyttötarkoituksia varten. Neste on sidottu kemiallisesti ohueen kapillaarikolonniin. [7, s. 77.]

### 2.3.2 *Injektiotekniikat*

Yleisimmät injektointitekniikat kaasukromatografiassa ovat jakoinjektio (*split injection*), suorainjektio (*splitless injection*) ja kolonniin injektio (*on-column injection*). Muita injektointitekniikoita ovat kylmäinjektio, headspace-tekniikka, pyrolyysi-injektio ja kiinteäfaasimikrouuttotekniikka. Yleisimpien injektiotekniikoiden ero on, että jakoinjektiossa vain pieni osa näytemäärästä menee kolonniin kantajakaasun mukana. Suora- ja kolonniin injektiossa lähes koko näytemäärä menee kolonniin, joten nämä injektiotavat sopivat hyvin määri-

tettäessä pieniä pitoisuuksia. Suoraan kolonniin injektiota käytetään usein silloin, kun vaarana on näytteen hajoaminen injektorissa termisesti tai näyte höyrystyy liuotinta helpommin. [6, s. 186.]

Jakoinjektotekniikassa injektorin lämpötilan on oltava niin korkea, että kaikki näytekomponentit höyrystyvät nopeasti kaasufaasiin. Injektoinnin aikana jakoventtiili on auki, jolloin vain osa höyrystyneestä näytteestä kulkeutuu kantajakaasun mukana kolonniin. Kolonniin menevän kaasun ja jakoventtiilin kautta kulkevan kaasun suhdetta kutsutaan split-suhteeksi, joka on yleensä 1:20 - 1:100. Tämän tekniikan etuina ovat sen yksinkertaisuus, kapeat näytevöhykkeet sekä se, että se säästää kolonnia, koska suurin osa näytemäärästä poistuu jakoventtiilin kautta. Tekniikan haittapuolia ovat pienten pitoisuuksien hankala analysointi sekä väärän split-suhteen aiheuttamat virheet kvantitatiivissa analyyseissä. [7, s. 93 - 96.]

Suorainjektotekniikassa näyte injektoidaan kuumaan injektoriin, jotta kaikki näytekomponentit höyrystyisivät kaasufaasiin. Jakoventtiili pidetään suljettuna injektioinnin ajan ja avataan vasta, kun injektointi on lopetettu. Tänä aikana lähes koko näytemäärä menee kolonniin, jonka alkulämpötila on säädetty 20 - 30 °C näytteen liuottimen kiehumispisteen alapuolelle. Näin ollen näytehöyry tiivistyy ohueksi nestekerrokseksi kolonnin alkuosan sisäpintaan ja samaan aikaan kantajakaasu kuljettaa liuotinmolekyylejä mukanaan, jolloin näyte kuivuu ja konsentroituu. Tämä aikaansaa terävät piikit kromatogrammissa. Liuottimen haihduttua näyte muodostaa kapean vyöhykkeen, liuotinefektin, joka saadaan liikkeelle avaamalla jakoventtiili ja nostamalla uunin lämpötilaa. Tämä injektotekniikka on melko luotettava sekä kvalitatiivisessa että kvantitatiivisessa työskentelyssä. [7, s. 96 - 97.]

Kolonniin injektiossa näyte injektoidaan kokonaisuudessaan kolonniin, jossa liuotinefektin kaventaa näytevöhykettä kuten suorainjektiossa. Tekniikkaa käytetään analysoitaessa lämpöä huonosti kestäviä yhdisteitä. Tekniikan huonona puolena on, että se likaa ja kuluttaa kolonnia enemmän kuin muut tekniikat. [7, s.100 - 101.]

### 2.3.3 Kolonni

Kaasukromatografiassa käytetyimpiä ovat silikakapillaarikolonnit, jotka ovat pituudeltaan viidestä sataan metriä pitkiä ja sisähalkaisijaltaan 0,1 mm:stä 0,6 mm:iin. Erottumiseen vaikuttavat kolonnin pituus, sisähalkaisija, sta-

tionäärifaasin paksuus ja materiaali. Erotuskykyä voidaan parantaa pidentämällä kolonnin, pienentämällä kolonnin sisähalkaisijaa tai ohentamalla stationäärifaasin paksuutta. Samalla kun erotuskyky paranee, niin ajoaika pidentyy, joten analyseissä pyritään kompromissiin, jolloin erotuskyky on tarpeeksi hyvä ja ajoaika siedettävän pitkä. Kolonneja on erilaisia eri käyttötarkoituksiin. Tämän takia kolonnin sisähalkaisija, pituus, stationäärifaasin paksuus ja kemiallinen koostumus valitaan erikseen kuhunkin käyttötarkoitukseen. [7, s. 85.]

#### 2.3.4 Detektori

Detektori on kolonnin jälkeinen laite, joka havaitsee yhdisteet ja antaa tietokoneelle signaalin, joka on verrannollinen yhdisteen määrään. Kaasukromatografiassa on käytössä herkkiä yleisdetektoreja sekä tietyille yhdisteille tai yhdisteryhmille selektiivisiä detektoreja. Käytössä olevana detektorina voi olla muun muassa liekki-ionisaatiotektori (FID), elektronisieppausdetektori (ECD), typpi-fosforidetektori (NPD), lämmönjohtokykydetektori (TCD) tai massaselektiivinen detektori (MSD). FID on herkkä ja laajalla alueella lineaarinen. Se havaitsee kaikki yhdisteet, jotka muodostavat sähköisesti varattuja hiukkasia palaessaan happirikkaassa vetyliekissä. MSD on selektiivisyydeltään ja usein herkkyydeltään paras detektorivalinta kaasukromatografiassa. [6, s. 193 - 195.]

### 2.4 Massaspektrometria

Massaspektrometria on menetelmä, jossa tutkittavan näytteen molekyylit ionisoidaan. Muodostuneet ionit erotellaan niiden massa/varaus-suhteen ( $m/z$ ) perusteella, minkä jälkeen detektori havaitsee ne ja piirtää kromatogrammin. Yleensä syntyneillä ioneilla on yhden arvoinen positiivinen varaus, jolloin erottelu tapahtuu ionin massan perusteella. Massaspektrometrin signaali on verrannollinen ionisoituneiden ionien määrään, joka on verrannollinen yhdisteen pitoisuuteen näytteessä. Yhdistämällä massaspektrometri kaasukromatografiin, saadaan näyte kaasufaasiin sekä seoksista tutkittavat yhdisteet eroteltua ennen massaspektrometria. [7, s. 38; 8, s. 1 - 2.]

Massaspektrometrilla voidaan määrittää tutkittavalle näytteelle kokonaisioni-kromatogrammi (*total ion chromatogram, TIC*) tai ajaa näyte SIM-menetelmällä (*selected ion monitoring*), jossa seurataan massasignaalia vain muutamalla massaluvulla. Tunnettujen yhdisteiden kvantitatiivisessa analy-

tiikassa käytetään pääsääntöisesti SIM-menetelmää. Menetelmässä seurattavat ionit valitaan niin, että ne ovat tyypillisiä tutkittaville yhdisteille, eikä lähellä eluoituvilla yhdisteillä olisi samoja tutkittavia ioneja. Jos analyysissä on paljon tutkittavia yhdisteitä ja käytetään SIM-menetelmää, ajo-ohjelma jaetaan ikkunoihin, joissa mitataan ikkunan sisällä eluoituvien yhdisteiden ioneja. SIM-menetelmällä saavutetaan hyvä herkkyys ja selektiivisyys, koska massadetektori seuraa analyysin aikana vain pientä valittua ryhmää ioneja. [6, s. 207 - 209.]

#### 2.4.1 Elektronipommitusionisaatio

Kaasukromatografista tuleva kaasufaasissa oleva näyte ohjataan ionisaattorille, jossa näyte ionisoidaan esimerkiksi elektronipommitusionisaatiolla (EI), kemiallisella ionisaatiolla (CI) tai normaalissa ilmanpaineessa tapahtuvalla kemiallisella ionisaatiolla (APCI).

EI-ionisaatio perustuu näytekäasun elektronipommitukseen. Menetelmän periaate on, että hehkutetulta filamentilta termisesti irtoavat elektronit kiihdytetään sähkökentän avulla ja ohjataan kapeana suihkuna näytekäasun läpi anodille sähkökentän ja kahden positiivisesti varatun ohjausraon avulla. Elektronit saavat kiihdytyksestä kineettistä energiaa, jonka ne luovuttavat törmäyksissä näyteaineen molekyyleille, jolloin vain osa niistä virittyy ja tapahtuu elektronisiirtymä korkeampaan energiatilaan. Osa virittyneistä molekyyleistä luovuttaa elektronin, jolloin niistä muodostuu radikaalioneja, molekyyli-ioneja  $M^+$ . Molekyyli myös usein pilkkoutuu, jolloin massaspektrissä havaitaan molekyyli-ionin lisäksi yhdisteelle ominaisia fragmentti-ioneja. Syntyneet ionit kerätään näytealueelta kiihdyttämällä ne optisten linssien avulla massa-analysaattoriin. EI-ionisaatiossa suurin osa syntyvistä ioneista on positiivisesti varautuneita.

EI-ionisaatiossa ionisaatiokammio pidetään vakuuissa, jotta lentävät ionit eivät törmää laitteen sisällä oleviin kaasumolekyyleihin, ja voidaan poistaa epäpuhtauksia laitteistosta. EI-ionisaatio on voimakas ionien tuottamistapa, joten se johtaa helposti molekyyli-ionin täydelliseen hajoamiseen. Näin tapahtuu, koska yleensä elektronien energiana käytetään 70 eV, joka on reilusti isompi kuin heikoimpien sidosten katkeamiseen vaadittava energia. EI-ionisaation etuina ovat menetelmän toistettavuus, hyvä ionisaatiotehokkuus ja ionien voimakas pilkkoutuminen. Suurin osa saatavilla olevista spektrikirjastoista perustuu EI-ionisaatioon. [7, s. 40 - 41; 8, s. 19 - 26.]

### 2.4.2 Kemiallinen ionisaatio

EI-ionisaatiota vähäenergisempi kemiallinen ionisaatio perustuu reagenssi-kaasun käyttöön molekyylien ionisoinnissa. Ionisaation voimakkuutta voidaan säädellä muuttamalla reagenssikaasua, joka on tyypillisesti metaani, isobutaani tai ammoniakki. Metaanikaasu tuottaa voimakkaasti reagoivia ja pilkkovia reagenssi-ioneja, kun taas isobutaani tuottaa huomattavasti hellävaraisemmin reagoivia ioneja.

Kemiallisessa ionisaatiossa reagenssikaasu ohjataan ionisaatiokammioon, jossa se yleensä ionisoidaan elektronipommituksen avulla. Tässä muodostuvat primääriset reagenssikaasuionit reagoivat edelleen muiden reagenssi-kaasun molekyylien kanssa, jolloin muodostuu stabiili reagenssi-ioniplasma. Tämä plasma ionisoi näytemolekyylit kemiallisten reaktioiden kautta. Kemiallisessa ionisaatiossa syntyy sekä negatiivisesti että positiivisesti varautuneita ioneja. Tämän takia kemiallinen ionisaatio jakautuu positiiviseen (PCI) ja negatiiviseen kemialliseen ionisaatioon (NCI). PCI:ssa mitataan vain positiivisesti varautuneita ioneja ja NCI:ssa negatiivisesti varautuneita ioneja.

Positiivisessa kemiallisessa ionisaatiossa tapahtuva prosessi on kaksivaiheinen. Ensin EI-ionisaatiolla muodostetaan reagenssi-ioneja tai protonoituja reagenssi-ioneja, jotka tämän jälkeen reagoivat näytemolekyylien kanssa. Yleisimpiä näistä reaktiosta ovat protonin siirto, hydridin abstraktio ja varauksen siirto. Protoninsiirtoreaktio tapahtuu silloin, kun näytemolekyylin protoniaffiniteetti on suurempi kuin reagenssikaasun. Hydridin abstraktio on yleistä, kun reagenssikaasuna käytetään metaania tai isobutaania. Varauksenvaihto tapahtuu yleensä, kun käytetään sellaista reagenssikaasua, joka ei reagoi kemiallisesti näytemolekyylien kanssa.

Negatiivisessa kemiallisessa ionisaatiossa reagenssikaasun protoniaffiniteetin täytyy olla suurempi kuin näyteionien. NCI:ssa reagenssikaasun tehtävän on toimia puskurikaasuna, johon törmätessä elektronipommituksen elektronien energia pienenee. Tästä syntyy hitaita ja alhaisen energian omaavia termisiä elektroneja. NCI:ssa analyyttimolekyylille voi tapahtua seuraavallaisia reaktioita: elektronisieppaus, dissosiatiivinen elektronisieppaus, protonin siirto tai ioniparinmuodostus.



Kemiallisen ionisaation etuna on molekyyli-ionin vähäinen fragmentoituminen, koska ionisaatio on vähäenergisempi. Näin ollen yhdisteen molekyyli-massan määrittäminen helpottuu. [7, s. 41 - 43; 8, s. 27 - 36.]

## 2.5 Yhdisteet

Huumausaineiden käyttö liikenteessä on lisääntynyt voimakkaasti vuosien 1990 ja 1999 välillä. Vuonna 1990 15 prosentilta tieliikenteessä testatulta moottoriajoneuvon kuljettajalta todettiin huumeita. Vuonna 1999 huumeita todettiin 55 prosentilla testatuista. Yleisimmin löydettiin amfetamiinia ja kannabista. Huumausaineita kokeillaan selvästi enemmän ikäryhmässä 15 - 25-vuotiaat kuin 26 - 35-vuotiaat. Lääkkeiden käyttäjät jakautuvat tasaisemmin sukupuolten ja kaikkien ikäryhmien kesken. Työssä kehitetyllä menetelmällä oli tarkoitus tutkia veritäplänäytteistä 25 eri yhdistettä, joista 10 kuului bentsodiatsepiineihin ja kaksi bentsodiatsepiinien kaltaista unilääkettä, tsolpideemi ja tsopikloni. Muita tutkittavia yhdisteitä olivat amfetamiini ja sen johdannaiset, kannabis (THC) ja sen aineenvaihduntatuote THC-COOH, opioidit ja kokaiini. [9; 10, s. 55.]

### 2.5.1 Amfetamiini ja sen johdokset

Amfetamiinit ovat kemiallisia fenyylityyliamiinijohdoksia, jotka ovat synteettisiä valmisteita. Amfetamiinin kemiallinen rakenne on perustana muille amfetamiinijohdannaisille. Työssä tutkittavat synteettiset johdokset ovat metamfetamiini, ekstaasi eli MDMA (3,4-metyleenidioksimetamfetamiini), ekstaasin aineenvaihduntatuote MDA (3,4-metyleenidioksiamfetamiini) ja MDEA (3,4-metyleenidioksietyyliamfetamiini). Amfetamiineja käytetään suun kautta, nuuskaamalla ja suonensisäisesti. Amfetamiini ja sen johdokset ovat voimakkaita keskushermostoa stimuloivia aineita. Niiden päihdyttävä vaikutus johtuu dopamiinin ja noradrenaliinin vapautumisesta. Muotihuumeet tuottavat käyttäjälleen vahvan euforian tunteen ja halun sosiaaliseen kanssakäymiseen, joten ne ovat suosittuja juhlimishuumeita. Toleranssi eli sietokyky aineen vaikutuksille kasvaa nopeasti suonensisäisessä käytössä. Suomessa myytävässä amfetamiinissa epäpuhtauksia painosta on yleensä noin 70 - 90 %. Suomessa noin 70 - 80 % suonensisäisiä huumeita käyttävistä on myös käyttänyt tai käyttää amfetamiinia suonensisäisesti. Suomessa amfetamiinia käytetään suhteellisesti enemmän kuin muissa Euroopan maissa. Ekstaasi on Euroopassa toiseksi suosituin huume kannabiksen jälkeen 15 - 25-vuotiaiden keskuudessa. [11, s. 31 - 44.]

### 2.5.2 *Kannabis*

Kannabistuotteita ovat hasis, hasisöljy ja marihuana. Niitä saadaan *Cannabis sativa* -nimisen hamppukasvin eri osista. Hamppukasvien eri lajikkeet voidaan luokitella joko päihdeettömäksi kuituhampuksi tai päihdyttäviä aineita sisältäväksi päihdehampuksi. Päihdehamppu sisältää huumaavia alkaloideja eli kannabinoideja yli 60, joista tärkein painomäärältään ja psykoaktiivisilta ominaisuuksilta on THC eli delta-9-tetrahydrokannabinoli. Kannabinoidit ovat rasvaliukoisia, joten ne imeytyvät nopeasti keuhkoista keuhkoverenkiertoon ja sieltä keskushermostoon. Kannabinoidit varastoituvat rasvakudokseen, josta ne vapautuvat hyvin hitaasti, joten pitkäaikaisen käytön lopettamisen jälkeen huumeeseula voi olla kannabispositiivinen jopa yli kuukauden. THC:n metaboloivat sytokromi P-450 entsyymit psykoaktiiviseksi 11-hydroksi- $\Delta$ -9-tetrahydrokannabinoliksi (OH-THC) ja siitä eteenpäin tehottomaksi 11-nor-9-karboksi- $\Delta$ 9-tetrahydrokannabinoliksi (THC-COOH). Käytön välittömiä vaikutuksia ovat puheliaisuus, iloisuus, estojen katoaminen, voimakas näläntunne sekä ajantajun heikkeneminen. Fyysisiä vaikutuksia ovat pulssin kiihtyminen, silmien verestäminen sekä silmien, suun ja nielun kuivuminen. Cannabis on yleisimmin käytetty huumausaine, jota miltei jokainen suomalainen huumeita käyttänyt on vähintäänkin kokeillut. Euroopan huumausaineiden ja niiden väärinkäytön seurantakeskuksen raportin (2000) mukaan arviolta 5 - 10 % Suomen väestöstä on joskus käyttänyt kannabista. Kannabiksen käyttäjä on useimmiten 15 - 24-vuotias. [11, s. 7 - 15.]

### 2.5.3 *Opioidit*

Opioidit jaetaan luonnon- ja synteettisiin opioideihin. Oopiumiunikosta saatavia oopiumialkaloideja ja niiden puolisynteettisiä johdannaisia kutsutaan opiaateiksi. Luonnon opiaatteja ovat morfiini, kodeiini ja heroini, joiden raaka-aineena on unikon siemenkodista saatava raakaoopiumi. Tästä valmistetaan uuttamalla morfiinia ja kodeiinia ja edelleen kemiallisesti heroinia. Synteettisiä opioideja ovat esimerkiksi metadoni, tramadoli ja petidiini. Opioidit ovat euforisoivia yhdisteitä, jotka kiinnittyvät pääsääntöisesti keskushermostossa tai ruuansulatuskanavassa sijaitseviin opioidireseptoreihin. Ne voidaan jakaa neljään pääryhmään, jotka ovat endogeeniset eli kehon synnyttämät, puolisynteettiset ja synteettiset opioidit sekä oopiumalkaloidit, jotka saadaan uni-koista. Opioideja käytetään huumausaineiden lisäksi yleisesti kipu- ja yskänlääkkeissä kipua lievittävän vaikutuksen takia. Suomessa suurin osa opiaatteja käyttävistä on 20 - 35-vuotiaita miespuolisia (noin 66 %) sekäkäyttäjiä.

Buprenorfiinia sisältävän Subutexin ongelmakäyttö on kasvanut valtavasti 90-luvun lopulla. [11, s. 61 - 69.]

#### 2.5.4 *Kokaiini*

Kokaiini on kokapensaan lehdestä uutettu kideaine alkaloidi. Kokaiinia eli kokaiinihydrokloridia valmistetaan uuttamalla kuivista kokapensaan lehdistä kemiallisen prosessin avulla tahnaa, joka jalostetaan valkoiseksi jauheeksi. Kokaiinihydrokloridi on vesiliukoinen aine, jonka vaikutus perustuu hermostossa dopamiinin, noradrenaliinin ja serotoniinin takaisinoton estoon. Kokaiinia käytetään pureskelemalla kokapensaan lehtiä, nuuskaamalla tai ottamalla suonensisäisesti kokaiinihydrokloridia, joka on valkoista jauhetta sekä polttaen crackia tai koka-basea. Crack on kokaiiniemäs, jota saadaan sekoittamalla kokaiinia, ammoniakkia ja vettä. Koka-base on epäpuhdasta kokatahnaa. Kokaiini metaboloituu nopeasti suureksi määräksi metaboliitteja. Kokaiinia käyttäviä on Suomessa suhteellisen vähän, joten myös kokaiinin aiheuttamat kuolemantapaukset ovat harvinaisia. Vähäistä käyttöä selittävät kokaiinin hankala saatavuus ja kallis hinta. Vertailun vuoksi Yhdysvalloissa vain kannabis on kokaiinia käytetympi laiton päihde. [11, s. 51 - 55.]

#### 2.5.5 *Bentsodiatsepiinit*

Bentsodiatsepiinit ovat bentseenirenkaan sisältäviä kemiallisia yhdisteitä, jotka on tarkoitettu lääkinnällisiin tarkoituksiin. Työssä tutkitaan seuraavia bentsodiatsepiineja: diatsepaami, nordiatsepaami, midatsolaami, fenatsepaami, oksatsepaami, nitratsepaami, tematsepaami, loratsepaami, klonatsepaami ja alpratsolaami. Edellä mainittujen yhdisteiden lisäksi tutkitaan kahta bentsodiatsepiinien kaltaista uunilääkettä, jotka ovat tsolpideemi ja tsopikloni. Bentsodiatsepiineihin ja niiden johdannaisiin kuuluvien lääkkeiden vaikutus kohdistuu pääasiassa keskushermoston GABA-reseptoreihin. Bentsodiatsepiineilla voidaan hoitaa univaikeuksia tai depressioita, ja niitä käytetään rauhoittavina ja lihasten rentouttajina. Niillä voidaan myös lieventää mielen-terveysongelmia. Säännöllinen käyttö aiheuttaa riippuvuutta ja toleranssin kasvua, jolloin lääkinnällinen teho heikkenee. Bentsodiatsepiinit vahvistavat alkoholin ja muiden huumaavien aineiden päihdyttävää vaikutusta. Suomessa oletetaan olevan jopa 20 000 lääkkeiden säännöllistä väärinkäyttäjää. Bentsodiatsepiinit ovat eniten väärinkäytetty lääkeaineryhmä Suomessa. [11, s. 79 - 86.]

## 2.6 Validointi

Kemiallisen mittausmenetelmän validointi on tärkeä laadunvarmistustoimenpide kemiallisen analyysin antamien tulosten oikeellisuuden kannalta. Validoitujen menetelmien käyttö on edellytys toimivalle laatujärjestelmälle. Validointi suoritetaan, jotta varmistetaan menetelmän antamien tulosten luotettavuus ja mittausepävarmuuden tunteminen. Näin saadaan varmistettua, että menetelmä soveltuu käyttötarkoitukseensa. Validointi tulee suorittaa, kun otetaan käyttöön uusi menetelmä tai käytössä olevaa menetelmää muokataan tai siihen lisätään uusia tutkittavia yhdisteitä tai halutaan vertailla samaa tutkimusta varten olevia menetelmiä. Näissä tapauksissa voidaan käyttää joko täys-, osittain- tai ristiinvalidointia.

Menetelmän validoinnissa tyypillisesti tutkittavia parametrejä ovat spesifisyys, selektiivisyys, lineaarisuus, tarkkuus, mittausalue, toteamis- ja määrittäysraja, saanto, stabiilisuus, häiriöalttius ja mittausepävarmuus. Useimmiten validointia suoritettaessa ei ole tarpeen tutkia kaikkia edellä mainittuja ominaisuuksia, vaan validointiin valitaan menetelmäkohtaisesti tutkittavat ominaisuudet. Tässä työssä menetelmän validointi suoritettiin THL:n Päihdeanalytiikan yksikön oman Kaasu- ja nestekromatografisen pitoisuusmäärittäksen validointi – ohjeen mukaisesti. [12; 13, s. 1.]

### 2.6.1 Lineaarisuus ja mittausalue

Lineaarisuudella tarkoitetaan analyttisen menetelmän kykyä antaa tietyllä alueella hyväksyttävä lineaarinen korrelaatio laitteen antaman vasteen ja tutkittavan aineen pitoisuuden välillä. Lineaarisuuden arvioinnin tavoitteena on selvittää mittausalueen pitoisuusalue, jossa kalibrointisuora täyttää lineaarisuuden ehdot. Lineaarisuutta määritettäessä on suositeltavaa analysoida 5-10 rinnakkaismäärittystä vähintään viidellä eri pitoisuustasolla. Saatujen tulosten pohjalta piirretään suora pienimmän neliösumman menetelmällä, jossa mitattu vaste esitetään pitoisuuden funktiona. Lasketun suoran yhtälöstä saadaan korrelaatiokerroimen neliö ( $r^2$ , selitekerroin), joka kuvaa suoran ”hyvyyttä” ja havaintopisteiden välistä riippuvuutta. Laajoja kalibrointialueita käytettäessä on hyvä käyttää painotettua kalibrointimallia, kuten 1/konsentraatio tai 1/konsentraation neliö – painotusta. Lineaarisuusmäärittäksessä suoran selitekerroimen tulee olla vähintään 0,98 tai painotettua kalibrointimallia käytettäessä vähintään 0,95. [12; 14, s. 28 - 29.]

Mittausalue on pitoisuusalue, jolla menetelmää voidaan käyttää hyväksyttävällä toistettavuudella ja painottuneisuudella. Alueen alkupäässä rajoittavana tekijänä on menetelmän määrittäjäraja ja loppupäässä laitteen detektioominaisuudet eli laitteen kyky havainnoida analyysin pitoisuuden muutoksia.

### 2.6.2 Tarkkuus

Menetelmän tarkkuuteen vaikuttaa systemaattinen virhe ja satunnainen virhe. Määrityksen sisäisellä toistettavuudella mitataan satunnaistekijöistä johtuvaa tulosten vaihtelua rinnakkaistulosten keskiarvon ympärillä. Sillä ilmoitetaan tulosten lähekkäisyyttä, kun rinnakkaisnäytteet on analysoitu samasta poolista, samoissa olosuhteissa ja samana päivänä. Määritysten välinen toistotarkkuus kertoo laboratorion sisäisestä vaihtelusta. Tällöin määritykset on voitu suorittaa eri päivinä, eri laitteella tai eri henkilön toimesta. Toistettavuus lasketaan määrittämällä suhteellinen keskihajonta (RSD) kaavalla 1.

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (1)$$

missä  $s$  on rinnakkaisten keskihajonta ja  $\bar{x}$  keskiarvo.

Toistettavuus voidaan myös laskea varianssianalyysillä (*analysis of variance*, ANOVA).

Painottuneisuudella kuvataan systemaattisen virheen aiheuttamaa rinnakkaistulosten keskiarvon poikkeamista sovitusta todellisesta näytteen pitoisuudesta. Se voidaan ilmoittaa prosentuaalisena poikkeamana referenssituloksesta. Painottuneisuus lasketaan samana päivänä ajettujen rinnakkaisajojen tuloksista. Oikeellisuus tarkoittaa muuten samaa asiaa kuin painottuneisuus, paitsi siinä tulokset lasketaan eri päivinä ajetuista rinnakkaisajoista. Molemmat lasketaan kaavalla 2.

$$\text{Painottuneisuus} = \frac{\text{rinnakkaisten keskiarvo} - \text{tosiarvo}}{\text{tosiarvo}} \cdot 100\% \quad (2)$$

Tosiarvona suositellaan olevan referenssimateriaali tai verrataan saatua tulosta referenssilaboratoriossa saatuun tulokseen. Mikäli ei ole mahdollista käyttää edellä mainittuja tapoja, voidaan tulosten oikeellisuuden todistamiseen käyttää interkalibrointituloksia, vertailututkimuksia kahden muun laboratorion kanssa, vertailututkimuksia muilla menetelmillä tai verrata saatua pi-

toisuutta laskettuun, joka tässä työssä on standardin pitoisuus. [12; 14, s. 35 - 37.]

### 2.6.3 Toteamis- ja määrittysraja

Toteamisrajana (*limit of detection*, LOD) on pienin määritetty pitoisuus, josta voidaan päätellä sisältääkö tutkittava näyte määritettävää yhdistettä kohtuullisella tilastollisella varmuudella vai ei. Pitoisuuden pitää myös erota nolosta merkittävästi. Kromatografiassa voidaan toteamisraja laskea signaali/kohina-suhteen perusteella, missä  $S/N > 3$ .

Määrittysraja (*limit of quantification*, LOQ) on tutkittavan aineen alhaisin pitoisuus, joka voidaan mitata hyväksyttävällä toistettavuudella ja oikeellisuudella. THL:en Päihdeanalytiikan yksikön Validointiohjeen mukaan alempi määrittysraja (LLOQ) on arvo, joka poikkeaa todellisesta arvosta enintään 20 % ja suhteellinen keskihajonta (RSD %) saa olla enintään 20 %. Alemman määrittysrajan signaali/kohinasuhteen tulee olla vähintään 10. Määrittysrajana on yleensä kalibrintisuoran pienin pitoisuus. Ylempi määrittysraja (ULOQ) puolestaan on korkein analysoitavan yhdisteen pitoisuus, joka voidaan määrittää hyväksyttävällä toistettavuudella ja oikeellisuudella. Tämä on usein sama kuin korkein pitoisuus kalibrintisuoralla. [12.]

### 2.6.4 Saanto

Saanto on analyysimenetelmän kyky havaita tutkittavan yhdisteen kokonaismäärä. Saantoa voidaan tutkia valmistamalla sarja keskipitoisuustason standardinäytteitä ja sama määrä nollanäytteitä. Molemmille sarjoille suoritetaan normaalisti näytteen esikäsittely eli ne uutetaan, sentrifugoidaan ja erotellaan liuotin. Tämän jälkeen nollanäytteisiin lisätään tutkittavia yhdisteitä sisältävää kantaliuosta sellainen määrä, että se vastaisi teoreettista maksimikonsentraatiota normaalissa standardinäytteessä uuton jälkeen. Uuton saanto saadaan laskettua vertaamalla kalibrintisuoran avulla laskettujen standardisarjan ja nollanäytesarjan, joihin suoritettu standardiaineiden lisäys, pitoisuuksien suhdetta. Saanto ilmoitetaan yleensä prosenttiosuutena tunnetun standardiliuoksen laskennallisesta arvosta. Jos menetelmä on tarkka, suhteellinen saanto lähestyy 100 %. Tuloksista määritetään saantoprosentti kaavalla 3.

$$\%R = \frac{C}{S} \cdot 100\% \quad (3)$$

missä C on standardinäytteen laskettu pitoisuus

S on lisäyksen sisältävän nollanäytteen laskettu pitoisuus

[12; 14, s. 32 - 33.]

### 2.6.5 Stabiilisuus

Stabiilisuusosassa tutkitaan prosessoitujen näytteiden stabiilisuutta. Tällä tarkoitetaan tutkittavien yhdisteiden hajoamista näytteensyöttökierroilla. Tätä varten ajetaan saman pitoisuuden omaavia näytteitä tietyin aikavälein. Ajetaan kahdeksan näytettä neljän tunnin välein, jolloin kokonaisajaksi saadaan 28 tuntia. Näin saadaan selville, tapahtuuko näytteissä tuloksiin vaikuttavia muutoksia. Tuloksissa tutkitaan näytteiden antamien vasteiden muutoksia. Regressioanalyysi on yksi keino, jolla voidaan käsitellä dataa. Tällöin stabiilisuuden rajana voidaan pitää arvoa  $p > 0,05$ , jolloin tuloksissa ei tilastollisesti merkittävää muutosta. Tätä arvoa suuremmat tulokset kertovat yhdisteen olevan stabiili tutkitun ajan aikana. [12.]

### 2.6.6 Mittausepävarmuus

Jokainen laboratoriossa tehtävä analyysi sisältää epävarmuuslähteitä, jotka liittyvät näytteenottoon, esikäsittelyyn ja mittaukseen laitteella. Mittausepävarmuus on kvantitatiivinen arvio niistä rajoista, joiden sisäpuolella mittaus tuloksen oletetaan olevan tietyllä todennäköisyydellä. Se koostuu systemaattisesta ja satunnaisesta virheestä. Analyysin systemaattista virhettä kuvaa menetelmän oikeellisuus ja satunnaista määrittelyn sisäinen ja määrittysten välinen toistettavuus. Mittausepävarmuus lasketaan kaavalla 4, jossa epävarmuustekijöiden neliöt summataan ja tästä otetaan neliöjuuri.

$$\text{Mittausepävarmuus} = \sqrt{a^2 + b^2 + c^2} \quad (4)$$

Mittausepävarmuutta ilmoitettaessa käytetään usein laajennettua mittausepävarmuutta, jolloin saadaan laskettua rajat, joiden sisällä tulos esiintyy tietyllä todennäköisyydellä. Jos mittausepävarmuus kerrotaan kahdella, niin tulos on laskettujen rajojen sisällä 95 %:n todennäköisyydellä. [12.]

### 3 MENETELMÄN KEHITTÄMINEN

THL:en Päihdeanalytiikan yksikössä ei ole käytössä vastaavanlaista analyysimenetelmää, joten aluksi käytiin läpi muutamia aiheeseen liittyviä artikkeleita. Artikkeleissa käytettyjä menetelmiä kokeiltiin soveltuvin osin, kuten jätettiin työvaiheista pois kiinteäfaasiuutto ja muutettiin uutto-olosuhteita. Aluksi analysoitaviksi yhdisteiksi valittiin amfetamiini, MDMA, THC, kodeiini, morfiini, kokaiini, diatsepaami ja alpratsolaami. Ensin valmistettiin kantaliuos edellä mainituista yhdisteistä, joiden pitoisuudet on esitetty taulukossa 1. Kantaliuosta pipetoitiin 50 µl koeputkeen, jossa se haihdutettiin kuiviin tyypivirrassa. Haihdutusjäännöksen päälle pipetoitiin 40 µl asetonitriliä, joka pipetoitiin näytevialiin yhdessä derivointiaineena käytetyn MSTFA:n kanssa. Näyte ajettiin kaasukromatografi-massaspektrometrilla käyttäen scan-ajoa. Ajotulosten ja aikaisempien menetelmien pohjalta kromatogrammista haettiin tutkittavien yhdisteiden paikat retentioaikojen perusteella. Tutkittavan yhdisteen piikistä haettiin tyypillisimmät ionit, jotka lisättiin SIM-menetelmän ajo-ohjelmaan seurantaioneiksi. Retentioaikojen perusteella jaettiin ajoaika ikkunoihin, joissa massadetektorilla mitataan vain tietyt yhdisteille ominaisia ioneja.

*Taulukko 1. Kantaliuoksen pitoisuudet*

Yhdiste	Pitoisuus (ng/ml)
amfetamiini	40 000
MDMA	40 000
THC	2 000
kodeiini	20 000
morfiini	20 000
kokaiini	20 000
diatsepaami	100 000
alpratsolaami	10 000

Menetelmän kehittämissä vaiheissa keskityttiin näytteen esikäsittelyyn. Siinä kokeiltiin eri uuttoliuottimia, puskuriliuoksia, ultraäänihauteen käyttöä, täplän kostuttamista ja liuottimia, joihin haihdutusjäännös liuotettiin. Seuraavaksi käydään läpi esikäsittelyvaiheen kokeiluja. Tarkemmin esitellään joka kokeilukerran parhaiten toiminut menetelmä. Muut kokeilut mainitaan vain lyhyesti. Aluksi kaikki kokeilut suoritettiin veritäplistä, jotka oli valmistettu pipetomalla 50 µl kantaliuosta ja 950 µl lampaanverta. Tätä laimennosta pipetoitiin 100 µl suodatinpaperille.



### 3.1 Näytteiden esikäsittely

Ensimmäisessä onnistuneessa kokeilussa kuivattu veritäplä uutettiin 1 ml:lla metanolia (MeOH). Uuttaminen suoritettiin sekä seisotuksessa pöydällä 15 minuuttia että 5 minuutin ajan ultraäänihauteessa. Tämän jälkeen liuotin erotettiin ja haihdutettiin vesihauteessa kuiviin typpivirrassa. Seuraavaksi derivatisointia varten haihdutusjäännös liuotettiin 40 µl 1:1 BuAC:ACN-liuokseen, joka pipetoitiin näytteensyöttöpulloon, johon oli pipetoitu 10 µl MSTFA:a. Pullot laitettiin 80 °C:lle lämpöhauteelle 30 minuutiksi. Taulukossa 2 on esitetty tulokset, kun uutto suoritettiin metanolilla seisotuksessa ja ultraäänihauteessa. Muut kokeilut olivat asetonitriliin (ACN), butyyliasetaatin (BuAC) sekä BuAC:n ja fosfaattipuskuriliuoksen (pH 6) käyttö uuttoliuottimena. Muuten työvaiheet olivat samat kuin edellä. Kokeiluissa otettiin myös ennen haihduttamista 40 µl liuotinta näytteensyöttöpulloon, jossa oli MSTFA:a. Näillä muilla kokeiluilla kaikille yhdisteille ei saatu vastetta tai vasteet olivat huomattavasti huonompia kuin käytettäessä uuttoliuottimena MeOH:a.

Taulukko 2. Metanoliuutolla saadut vasteet

Yhdiste	Vaste (seisotus)	Vaste (UA-haute)
amfetamiini	0	160 000
MDMA	8 000	16 000
THC	600	1 000
kodeiini	30 000	60 000
morfiini	8 000	16 500
kokaiini	84 000	210 000
diatsepaami	250 000	500 000
alpratsolaami	7 500	12 000

Seuraavaksi kokeiltiin uuttamisen tehostamista kostuttamalla veritäplä MeOH:lla ennen uuttamista. Muuten työvaiheina olivat uuttaminen 3 ml:aan BuAC:a ja 1 ml fosfaattipuskuriliuosta (pH 10,5) ravisteltiin koeputkiravistajalla 45 sekuntia. Sitten näyte sentrifugoitiin ja yhdisteet sisältävä uuttoliuos erotettiin ja haihdutettiin vesihauteessa kuiviin. Derivatisointi suoritettiin samalla tavalla kuin ensimmäisissä kokeiluissa. Muita kokeiluja olivat boraatti (pH 10) ja fosfaattipuskurin (pH 6) käyttö, ravistelun korvaaminen ultraäänihauteella, MeOH:n käyttö uuttoliuoksena ja derivatisoinnissa käytetyn BuAC:ACN-liuoksen korvaaminen ACN:llä. Muilla kokeiluilla saadut vasteet vaihtelivat suuresti toisiinsa verrattuna. ACN:n käyttö derivatisoinnissa antoi kauttaaltaan huonompia tuloksia kuin BuAC:ACN-liuoksen käyttö (taulukko 3). Ultraäänihaudetta käytettäessä parempia vasteita saatiin, kun sekä liuo-

tin että puskuri lisättiin ennen hauteen käyttöä, verrattuna siihen että vain puskuri lisättiin ennen.

*Taulukko 3. Derivointiliuottimen vaikutus vasteisiin*

Yhdiste	Vaste (BuAC:ACN)	Vaste (ACN)
amfetamiini	42 000	0
MDMA	580 000	140 000
THC	0	0
kodeiini	84 000	60 000
morfiini	22 000	12 000
kokaiini	300 000	160 000
diatsepaami	420 000	250 000
alpratsolaami	23 000	13 000

Kokeiluja jatkettiin kostuttamalla veritäplä MeOH:lla ja silppuamalla se pasteur-pipettiin. Uutettiin noin kymmenen kertaa 500 µl BuAC:a, otettiin 40 µl vialiin ja derivatisoitiin MSTFA:lla. Loppuun uuttoluokseen lisättiin 100 µl boraattipuskuria, vorteksoitiin 30 s, sentrifugoitiin ja eroteltiin liuotin, jota otettiin 40 µl vialiin ja derivatisoitiin MSTFA:lla. Loppu liuotin haihdutettiin ja derivoitiin ACN:llä ja MSTFA:lla. Suoritettiin toinen testi samalla tavalla kuin edellinen, mutta lopussa haihdutuksen jälkeen derivoitiin BuAC:ACN-liuoksella ja MSTFA:lla. Näiden kokeiluista saatujen tulosten perusteella paras tapa oli suorittaa kaikki työvaiheet ja derivatisoida BuAC:ACN-liuoksella.

Amfetamiinipiikin paikan vaihtelua kromatogrammeissa tutkittiin ajamalla amfetamiinikantaliuoksesta valmistettua standardia. Näiden testien perusteella amfetamiinipiikki tuli aikaisemmin, jos derivatisointi tehtiin ACN:ssä ja myöhemmin, jos käytettiin BuAC:ACN-liuosta.

Amfetamiinipiikin paikan varmistamisen myötä testattiin uudelleen jo kokeiluja esikäsittelymenetelmiä. Testauksessa veritäplä kostutettiin MeOH:lla, uutettiin 1 ml BuAC:a ja 500 µl boraattipuskuria (pH 10). Ravisteltiin nopein sykäyksin 45 sekunnin ajan koeputkiravistelijalla. Tämän jälkeen näyte sentrifugoitiin ja eroteltiin liuotin, joka haihdutettiin kuiviin. Seuraavaksi derivatisointia varten haihdutusjäännös liuotettiin 40 µl 1:1 BuAC:ACN-liuokseen, joka pipetoitiin MSTFA:n kanssa näytteensyöttöpulloon. Muut kokeilut olivat fosfaattipuskureilla (pH 6 sekä 10,5), nopean ravistelun sijaan 5 minuutin rauhallinen sekoitus sekä puolitetut liuotin- ja puskurimäärät. Kaikki kokeilut antoivat jo vasteen kaikille yhdisteille. Boraattipuskurin käyttö antoi parempia tuloksia kuin fosfaattipuskurit. Tulosten perusteella paras esikäsittelymenetelmä olisi kostutus MeOH:lla, uutto 1 ml BuAC:a ja 500 µl boraattipuskuria

(pH 10), nopea ravistelu, sentrifugointi, liuottimen erottelu, haihdutus, derivatisointi MSTFA:lla BuAC:ACN-liuoksessa ja inkubointi lämpöhauteella 30 minuuttia 80 °C:ssa. Taulukossa 4 on esitetty yhdisteiden antamat vasteet, jotka saatiin käyttämällä edellä olevaa esikäsitelyä.

*Taulukko 4. Parhaan esikäsitelymenetelmän antamat vasteet*

Yhdiste	Vaste
amfetamiini	210 000
MDMA	700 000
THC	2 100
kodeiini	70 000
morfiini	13 000
kokaiini	240 000
diatsepaami	560 000
alpratsolaami	18 000

### 3.2 Esikäsitelyyn optimointi

Menetelmästä oli saatu sen verran toimiva, että seuraavaksi lähdettiin kokeilemaan kolmella pitoisuustasolla. Ensimmäinen standardi valmistettiin pipetoimalla 50 µl kantaliuosta ja 950 µl lampaanverta. Toinen standardi valmistettiin tekemällä 10-kertainen laimennos ensimmäisestä standardista. Kolmas standardi valmistettiin tekemällä 10-kertainen laimennos toisesta standardista. Työvaiheet olivat samat, jotka oli todettu parhaimmiksi edellisen osion lopussa. Kaikille kolmelle standardille tehtiin kolme rinnakkaista ajoa, joiden keskiarvovasteet on esitetty taulukossa 5. Viidelle yhdisteelle, jotka antoivat vasteen kaikilla pitoisuustasoilla, piirrettiin kolmeen pisteen suora. Kaikkien suorien selitekerroimet olivat vähintään 0,99.

*Taulukko 5. Standardisarjan keskiarvovasteet*

Yhdiste	Pit.	Std I ka vaste	Pit.	Std II ka vaste	Pit.	Std III ka vaste
amfetamiini	2000	196 667	200	14 333	20	1 833
MDMA	2000	600 000	200	46 333	20	4 667
THC	100	1 300	10	0	1	0
kodeiini	1000	61 333	100	5 333	10	767
morfiini	1000	9 167	100	1 033	10	0
kokaiini	1000	256 667	100	20 667	10	2 300
diatsepaami	5000	416 667	500	30 000	50	3 000
alpratsolaami	500	16 667	50	1 333	5	0

Samanlainen kolmen standardin sarja tehtiin muuten samoilla työvaiheilla, paitsi jätettiin pois MeOH:lla kostutus. Standardeille ei tehty rinnakkaisia. Tu-

loksiksi saadut vasteet olivat muuten samansuuruisia kuin edellä paitsi, että kostutuksen pois jättämisellä saatiin myös morfiinille vaste.

Seuraavaksi valmistettiin kahdeksalle tutkittavalle yhdisteelle kuudella pitoisuustasolla (taulukko 9) kaksi sarjaa, joista toisessa veritäplää ei kostutettu ja toisessa kostutettiin. Molemmista sarjoista tehtiin kaksi rinnakkaista ajoa. Kostutetussa sarjassa liuotin lisättiin ennen puskuriliuosta ja kostuttamattomassa päinvastaisessa järjestyksessä. Aiempiin tuloksiin verrattuna puskuriliuoksen laittaminen ennen liuotinta antoi paremmat tulokset, joten tästä eteenpäin testauksissa puskuriliuos laitettiin ennen liuotinta. Molemmissa sarjoissa edelleen ongelmana oli THC:n, morfiinin ja alpratsolaamin piikin puuttuminen pienimmissä standardeissa. Kostuttamattomissa standardeissa edellä mainitut yhdisteet näkyivät paremmin.

Menetelmä oli sen verran toimiva, että testattiin sen eri osa-alueiden pieniä muuttumisia isoimmalla ja pienimmällä pitoisuustasolla. Testauksen kohteena olivat kostuttaminen, liuotimen määrä (1 ja 2 ml) ja ultraäänihauteen käyttö. Ultraäänihauteen käyttö ei parantanut tuloksia, joten siitä luovuttiin. Liuotimen määrällä ei ollut suurta merkitystä tuloksille. Kostuttamattomissa täplissä THC ja morfiini antoivat parempia vasteita väkevimmässä standardissa kuin kostutetuissa. Ongelmana oli edelleen THC:n ja alpratsolaamin puuttuminen pienimmässä standardissa.

Samoja yhdisteitä tutkittaessa syljestä Päihdeanalytiikan yksikössä käytettiin Statsure SalivaSampler™-syljenkeräyslaitetta, jossa ollutta puskuriliuosta (taulukko 6) kokeiltiin laittaa pilkotun veritäplän sekaan 500 µl yhdessä 500 µl boraattipuskuria ja 2 ml BuAC:a kanssa. Kokeiltiin myös kostutusta edellä mainitulla puskurilla. Statsure-puskurin käyttö ei parantanut tuloksia, joten sen käytöstä luovuttiin. Tehtiin myös kaksi sarjaa, joista toisessa MeOH-kostutus ja toisessa ei kostutusta. Loput työvaiheet olivat samat kuin aiemmin oli parhaiksi koettu. Taas THC:n ja morfiinin vasteet olivat parempia kostuttamattomilla kuin kostutetuilla. Muiden vasteet olivat molemmilla tavoilla hyviä.

Taulukko 6. *Statsure SalivaSampler<sup>TM</sup>*-sylkikeräimen puskuriliuoksen koostumus

Ainesosa	Pitoisuus
natriumkloridi	6,79 g/l
natriumfosfaatti	1,77 g/l
kaliumpfosfaatti	0,43 g/l
EGTA	0,90 g/l
EDTA	3,72 g/l
natriumatsidi	2,0 g/l
IGPAL (pesuaine)	1 ml/l
Triton x-100 (polyetyyliglykoli)	1 ml/l
gentamysiinisulfaatti	0,3 g/l

Tämän jälkeen testattiin edelleen kostutetuilla sekä kostuttamattomilla täplillä, jotka uutettiin 1 ml boraattipuskuria ja 2 ml BuAC:a. Sentrifugoinnin jälkeen liuotin jaettiin kahteen koeputkeen. Haihdutuksen jälkeen toinen derivatisoitiin MSTFA:lla BuAC:ACN-liuoksessa ja toinen MTBSTFA:lla BuAC:ACN-liuoksessa. MTBSTFA:lla derivatisoidut standardit ajettiin toisella laitteella. Sillä saatiin omat tulokset diatsepaamille ja alpratsolaamille, jotka olivat varsinkin alpratsolaamin osalta paljon parempia kuin aikaisemmin. Saatujen tulosten perusteella luovuttiin MeOH:lla kostuttamisesta.

Menetelmällä saatiin jo lähes kaikille tutkittaville yhdisteille vasteet, myös pienimille standardeille, joten testattiin vielä puskuriliuoksen, liuottimen ja BuAC:ACN-liuoksen eri määriä sekä eripituisia ravisteluaikoja. Puskuriliuoksen määrä vaihteli välillä 500 - 800 µl, BuAC:n määrä 1,5 ml:sta 3 ml:aan ja BuAC:ACN-liuoksen määrä oli välillä 30 - 40 µl. Ravistelun pituus vaihteli 30 sekunnista minuuttiin. Kaikki testit antoivat ihan hyviä tuloksia, mutta kokaiinin, kodeiinin, THC:n ja alpratsolaamin näkyminen pienimmässä standardissa oli vaihtelevaa. Alpratsolaamin kohdalla ongelma poistui, kun testinäytteitä ajettiin toisella laitteella. Parhaat tulokset saavutettiin, kun silputtu täplä uutettiin 500 µl boraattipuskuria ja 2 ml BuAC:a, sekoitettiin nopein syklein 45 sekuntia koeputkiravistelijassa, sentrifugoitiin, liuotin eroteltiin kahteen osaan, haihdutettiin ja derivatisoitiin 30 µl 1:1 BuAC:ACN-liuoksella ja MSTFA:lla tai MTBSTFA:lla.

Tämän jälkeen tutkittavien aineiden listaa laajennettiin 17 aineella, jotka olivat metamfetamiini, MDA, MDEA, tramadoli, metadoni, THC-COOH, tsolpideemi, buprenorfiini, nordiatsepaami, midatsolaami, fenatsepaami, oksatsepaami, nitratsepaami, tematsepaami, loratsepaami, klonatsepaami ja tsopikloni. Kaikista tutkittavista aineista tehtiin 1 mg/ml liuokset, joista tehtiin standardien kantaliuos. 1 mg/ml liuoksia varten aineet liuotettiin asetonitrii-

liin, paitsi amfetamiini, metamfetamiini, MDA, MDEA, kodeiini, morfiini ja tsolpideemi liuotettiin metanoliin. 1 mg/ml liuoksia pipetoitiin 50 µl koeputkiin, haihdutettiin ja derivatisoitiin 40 µl 1:1 BuAC:ACN-liuoksella ja MSTFA:lla tai MTBSTFA:lla. Näytteet ajettiin scan-ajona, jolloin saatiin selville kaikkien yhdisteiden retentioajat ja ionit, joita käytetään SIM-metelmässä. Lopuksi tehtiin sisäisen standardin liuos, joka sisälsi 16 aineen deuteroidut muodot. Taulukossa 7 on esitetty, minkä sisäisen avulla tutkittava yhdiste on tutkittu. Uusilla standardiliuoksilla ajettiin testistandardisuora ja, koska tulokset olivat hyviä, voitiin aloittaa menetelmän validointi.

*Taulukko 7. Yhdisteille valitut sisäiset standardit*

<b>Sisäinen standardi</b>	<b>Tutkittavat yhdisteet</b>
amfetamiini d11	amfetamiini
metamfetamiini d14	metamfetamiini
MDMA d5	MDA, MDMA, MDEA
metadoni d9	tramadoli, metadoni
kokaiini d3	kokaiini
THC d3	THC, THC-COOH
kodeiini d6	kodeiini, tsolpideemi
morfiini d6	morfiini
buprenorfiini d4	buprenorfiini
diatsepaami d4	diatsepaami
nordiatsepaami d5	metamfetamiini
midatsolaami d4	midatsolaami
klonatsepaami d4	nitratsepaami, klonatsepaami
tematsepaami d5	tematsepaami
oksatsepaami d5	oksatsepaami, fenatsepaami, loratsepaami
alpratsolaami d5	tsipokloni, alpratsolaami

### 3.3 Analyysilaitteet ja reagenssit

#### *Analyysilaitteet*

Analyysit suoritettiin kahdella eri laitteella, joista toisessa oli elektronipommitus-ionisaatio ja toisessa kemiallinen ionisaatio.

#### GC/EI-MS

Agilent Technologies 7890A Network GC System, 5975C inert Mass Selective Detector

- J &W Scientific 122-5512 (UI) DB-5MS (UI) kapillaarikoloni, jonka pituus on 15,0 m, sisähalkaisija 250 µm ja filmin paksuus 0,25 µm

## GC/NCI-MS

Agilent Technologies 6890N Network GC System, jossa 5975 inert Mass Selective Detector

- J&W Scientific 123-5731 DB-5HT –kapillaarikolonne, jonka pituus on 30,0 m, sisähalkaisija 320 µm ja filmin paksuus 0,10 µm

*Reagenssit*

- n-Butyyliasetaatti (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>), pro analysi, Merck

- Asetonitrili (CH<sub>3</sub>OH), 1.14291 LiChrosolv, Merck

- Natriumboraatti (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> \* 10H<sub>2</sub>O), pro analysi, Merck

- Vesi (H<sub>2</sub>O), erityispuhdasta, ELGASTAT UHQ- laite

- N-metyyli-N-(trimetyylisilyyli)trifluoroasetamidi, MSTFA (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>F<sub>3</sub>NOSi),

## Sigma-Aldrich

- N-metyyli-N-(tert-butyylidimetyylisilyyli)trifluoroasetamidi,

MTBSTFA (C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>NOSi), Sigma-Aldrich

**3.4 Menetelmän työvaiheet**

Päivittäin suoritettavia analyyseja varten valmistettiin kerralla suurempi määrä standardien kantaliuosta, joka jaettiin pienemmiksi eriksi Eppendorf-putkiin, joita säilytettiin pakastimessa. Kantaliuos valmistettiin pipetoimalla taulukossa 8 esiintyvät määrät 1 mg/ml liuosta kyseisiä yhdisteitä 10 ml mittapulloon ja täyttämällä se merkkiin asetonitrilillä. Veritäpliä varten valmistettiin kuusi eri pitoisuustason standardia (taulukko 9) lampaanvereen. Standardeja pipetoitiin 100 µl suodatinpaperipaloille (Whatman 210\*297 mm suodatinpaperiarkki) ja annettiin kuivua huoneenlämmössä yön yli.

Taulukko 8. Standardiaineiden kantaliuoksen laimennostaulukko

Standardiaine	Pitoisuus (ng/ml)	Laimennoskerroin	Pipetoidaan 1 mg/ml liuosta (µl)
MDMA	20 000	50	200
amfetamiini	20 000	50	200
THC*	1000	50	200
kodeiini	10 000	100	100
morfiini	10 000	100	100
kokaiini	10 000	100	100
diatsepaami	50 000	20	500
alpratsolaami	5000	200	50
metadoni	10 000	100	100
metamfetamiini	20 000	50	200
MDA	20 000	50	200
MDEA	20 000	50	200
THC-COOH**	5000	20	500
oksatsepaami	50 000	20	500
klonatsepaami	5000	200	50
nordiatsepaami	20 000	50	200
loratsepaami	5000	200	50
tsolpideemi	20 000	50	200
tsopikloni	10 000	100	100
tematsepaami	50 000	20	500
midatsolaami	10 000	100	100
fenatsepaami	20 000	50	200
nitratsepaami	10 000	100	100
buprenorfiini**	1000	10	100
tramadoli	50 000	20	500

\*THC valmistettiin tekemällä 1 mg/ml liuoksesta välilaimennos, jonka pitoisuus oli 50 000 ng/ml. Valmistettiin pipetoimalla 50 µl 1 mg/ml liuosta ja 950 µl asetonitriiliä (laimennoskerroin: 20)

\*\* pipetoitavan liuoksen pitoisuus 0,1 mg/ml



Taulukko 9. Standardien pitoisuudet (ng/ml)

Standardiaine	Std I	Std II	Std III	Std IV	Std V	Std VI
MDMA	2000	1000	500	200	100	20
amfetamiini	2000	1000	500	200	100	20
THC	100	50	25	10	5	1
kodeiini	1000	500	250	100	50	10
morfiini	1000	500	250	100	50	10
kokaiini	1000	500	250	100	50	10
diatsepaami	5000	2500	1250	500	250	50
alpratsolaami	500	250	125	50	25	5
metadoni	1000	500	250	100	50	10
metamfetamiini	2000	1000	500	200	100	20
MDA	2000	1000	500	200	100	20
MDEA	2000	1000	500	200	100	20
THC-COOH	500	250	125	50	25	5
oksatsepaami	5000	2500	1250	500	250	50
klonatsepaami	500	250	125	50	25	5
nordiatsepaami	2000	1000	500	200	100	20
loratsepaami	500	250	125	50	25	5
tsolpideemi	2000	1000	500	200	100	20
tsopikloni	1000	500	250	100	50	10
tematsepaami	5000	2500	1250	500	250	50
midatsolaami	1000	500	250	100	50	10
fenatsepaami	2000	1000	500	200	100	20
nitratsepaami	1000	500	250	100	50	10
buprenorfiini	100	50	25	10	5	1
tramadoli	5000	2500	1250	500	250	50

Kuivatut veritäplät leikattiin kuuteen osaan koeputkeen. Ensin lisättiin 0,5 ml boraattipuskuriliuosta (pH 10) ja kostutettiin kaikki veritäplän osat pyörittelemällä ja naputtelemalla koeputkea. Lisättiin 2 ml butyyliasetaattia, johon oli lisätty sisäiset standardit, uuttoliukseksi. Varsinainen uuttaminen tapahtui ravistelussa koeputkiravistelijalla 45 sekunnin ajan. Tämän jälkeen näytteet sentrifugoitiin (Eppendorf Centrifuge 5810) ja analysoitavat yhdisteet sisältävä uuttoliuos jaettiin kahteen puhtaaseen koeputkeen, minkä jälkeen uuttoliuos haihdutettiin 75 °C:ssa vesihauteessa (Zymark TurboVap LV Evaporator) typpivirrassa. Koeputkien pohjalle jääneestä haihdutusjäännöksestä yhdisteet liuotettiin butyyliasetaatin ja asetonitriilin seokseen. Derivatisointi suoritettiin lisäämällä koeputkesta liuos näytteensyöttöpulloihin, joihin oli laitettu MTBSTFA:ta bentsodiatsepiineja ja MSTFA:ta muita huumausaineita varten. Näytteensyöttöpullot laitettiin lämpöhauteelle ja niitä inkuboitiin 80 °C:n lämpötilassa 30 minuutin ajan hyvän derivatisointireaktion aikaansaamiseksi. Tämän jälkeen näytteet olivat valmiita analysointia varten. Näytteet analysoitiin kahdella eri GC-MS-laitteella. Laitteet erosivat käytettävän kolonin ja massadetektorin ionisointitavan osalta. Bentsopuolen aineet ajettiin

laitteella, jossa NCI-ionisaatio, jotta päästäisiin pienempiin pitoisuuksiin käyttäessä derivatisointireagenssina MTBSTFA:ta.

Huumausaineryhmän aineet analysoitiin laitteella, jossa oli EI-ionisaatio. Tämän laitteen lämpötilaohjelmassa uunin lämpötila oli aluksi 120 °C:ta, jonka jälkeen lämpötilaa nostettiin 30 °C/minuutti 213 °C:een, sitten 40 °C/minuutti 240 °C:een, sitten 30 °C/minuutti 289 °C:een ja lopuksi 50 °C/minuutti 330 °C:een, jossa pidettiin 3 minuuttia. Näin ollen ajo-ohjelman pituudeksi tuli 9,73 minuuttia. Injektorin lämpötilana oli 280 °C:ta. Kantokaasuna käytettiin heliumia.

Lääkeaineita analysoitiin laitteella, jossa oli NCI-ionisaatio. Ionisaatiossa reagenssikaasuna käytettiin metaania. Lämpötilaohjelmassa uunin lämpötila oli aluksi 160 °C:ssa 0,7 minuuttia, jonka jälkeen lämpötilaa nostettiin 50 °C/minuutti 330 °C:een, jossa pidettiin 0,4 minuuttia. Tällä lämpötilaohjelmalla yhden ajon ajoajaksi tuli 4,5 minuuttia. Injektorin lämpötilana oli 300 °C:ta. Kantokaasuna käytettiin vetyä.

#### 4 VALIDOINTITULOKSET

Menetelmällä tutkittavia aineita analysoitiin kahdella eri laitteella. Toisella laitteella (GC/NCI-MS) analysoitiin bentsodiatsepiineihin kuuluvia lääkkeitä (bentsot), joita olivat diatsepaami, nordiatsepaami, midatsolaami, fenatsepaami, oksatsepaami, nitratsepaami, tematsepaami, loratsepaami, klonatsepaami, alpratsolaami ja tsopikloni, joka on bentsodiatsepiinien kaltainen unilääke. Toisella laitteella (GC/EI-MS) analysoitiin huumausaineet ja muutama niistä tehty lääkeainejohdannainen (huumausaineet), joita olivat amfetamiini, metamfetamiini, MDA, MDMA, MDEA, tramadoli, metadoni, kokaiini, THC, THC-COOH, kodeiini, morfiini, buprenorfiini ja tsolpideemi, joka on bentsodiatsepiinien kaltainen unilääke.

Seuraavaksi käsitellään validoinnin suorittamista ja siitä saatuja tuloksia. Validointimittaukset suoritettiin kuutena eri päivänä. Ensimmäisenä päivänä ajettiin lineaarisuutta varten kuudella pitoisuustasolla kuusi rinnakkaista toistoa. Tämän jälkeisinä viitenä päivänä ajettiin neljällä tai viidellä pitoisuustasolla kolme rinnakkaista ajoa toistettavuutta varten. Ajettiin myös yhdet ajot keskipitoisuustasolla sekä saantokoetta että stabiilisuusmittausta varten. Kaikkia validointimittauksia varten valmistetut standardit tehtiin laimentamal-

la kantaliuosta vereen ja pipetoimalla laimennosta suodatinpaperiin, jonka annettiin kuivua yön yli. Mittauksissa käytettävät pitoisuustasot väkevimmistä laimeimpaan on numeroitu yhdestä kuuteen (I - VI).

#### 4.1 Lineaarisuus

Lineaarisuuden määrittämistä varten tehtiin kuusi rinnakkaista standardisuoraa kuudella eri pitoisuustasolla. Kalibrointisuora piirrettiin rinnakkaismääritysten keskiarvoilla käyttäen painotuskertoimena pitoisuuden neliön käänteislukua ( $1/a^2$ ). Jokaiselle kuudelle standardisuoralle laskettiin yhdistetyn kalibrointisuoran avulla takaisin pitoisuudet, joiden perusteella laskettiin yhdisteille eri pitoisuustasoilla suhteelliset keskihajonnat (RSD, %) ja painottuneisuudet, jotka kertovat kuinka paljon laskettu arvo eroaa todellisesta arvosta. Kvantitatiivisessa määityksessä RSD saa olla korkeintaan 20 % ja painottuneisuus saa erota tosiarvosta korkeintaan 20 %. Seulontanalyysissä vastaavat raja-arvot ovat 25 %. Taulukossa 10 on esitetty kaikille tutkittaville yhdisteille suhteelliset keskihajonnat ja painottuneisuudet kaikilla kuudella pitoisuustasolla.

Taulukko 10. Lineaarisuusmittauksista saadut suhteelliset keskihajonnat (RSD, %) ja painottuneisuudet (Pain, %)

Yhdiste	Pit. (ng/ml)	RSD (%)	Pain. (%)	Pit. (ng/ml)	RSD (%)	Pain. (%)	Pit. (ng/ml)	RSD (%)	Pain. (%)
amfetamiini	2000	2,9	5,3	1000	3,2	4,0	500	1,1	-3,7
metamfetamiini	2000	2,6	6,4	1000	2,2	4,2	500	3,0	-5,2
MDA	2000	4,9	6,5	1000	9,7	6,3	500	8,2	-3,2
MDMA	2000	8,8	7,5	1000	9,1	4,3	500	4,3	-3,4
MDEA	2000	13,1	6,5	1000	13,0	6,1	500	14,4	-3,3
tramadoli	5000	18,1	17,7	2500	12,8	7,8	1250	12,7	-5,2
metadoni	1000	6,0	7,2	500	5,0	2,4	250	6,1	-2,5
THC	100	3,2	3,7	50	4,2	-0,1	25	3,9	-4,1
THC-COOH	500	8,2	10,2	250	13,5	9,2	125	19,1	3,8
kodeiini	1000	4,7	4,0	500	3,3	4,8	250	5,1	-4,2
kokaiini	1000	9,6	3,5	500	8,4	2,0	250	14,0	-4,5
tsolpideemi	2000	10,5	22,4	1000	13,8	7,9	500	20,2	-4,9
morfiini	1000	6,5	10,6	500	6,7	2,9	250	4,9	-5,7
buprenorfiini	100	4,8	-4,9	50	9,3	0,8	25	5,3	4,8
diatsepaami	5000	2,3	-15,0	2500	2,8	-3,3	1250	3,0	5,1
nordiatsepaami	2000	2,5	-7,4	1000	5,0	-4,5	500	3,9	3,6
midatsolaami	1000	2,2	3,9	500	4,1	0,0	250	1,6	-0,5
nitratsepaami	1000	2,9	17,1	500	4,5	12,0	250	4,9	-2,3
klonatsepaami	500	3,3	3,7	250	2,8	2,8	125	2,8	-1,7
tematsepaami	5000	11,0	-7,2	2500	5,8	0,4	1250	1,5	3,7
oksatsepaami	5000	3,6	-44,4	2500	1,8	-25,3	1250	2,3	-3,1

fenatsepaami	<b>2000</b>	5,0	63,3	<b>1000</b>	4,3	23,2	<b>500</b>	3,4	1,1
loratsepaami	<b>500</b>	4,7	52,4	<b>250</b>	3,9	21,1	<b>125</b>	3,7	1,2
tsopikloni	<b>1000</b>	11,3	18,0	<b>500</b>	13,5	2,1	<b>250</b>	10,1	-5,3
alpratsolaami	<b>500</b>	3,0	5,8	<b>250</b>	3,5	0,1	<b>125</b>	3,1	-0,5

Yhdiste	Pit. (ng/ ml)	RSD (%)	Pain. (%)	Pit. (ng/ ml)	RSD (%)	Pain. (%)	Pit. (ng/ ml)	RSD (%)	Pain. (%)
amfetamiini	<b>200</b>	3,6	-1,1	<b>100</b>	2,2	-5,8	<b>20</b>	2,3	1,4
metamfetamiini	<b>200</b>	2,8	-2,0	<b>100</b>	3,0	-4,5	<b>20</b>	4,1	1,5
MDA	<b>200</b>	16,0	-8,2	<b>100</b>	6,5	-5,9	<b>20</b>	6,4	1,8
MDMA	<b>200</b>	8,2	-2,5	<b>100</b>	4,7	-8,3	<b>20</b>	4,3	2,1
MDEA	<b>200</b>	17,5	0,6	<b>100</b>	15,4	-5,3	<b>20</b>	11,9	2,8
tramadoli	<b>500</b>	15,1	-4,5	<b>250</b>	15,9	-6,8	<b>50</b>	12,0	4,5
metadoni	<b>100</b>	6,8	-0,7	<b>50</b>	6,1	-3,8	<b>10</b>	5,9	1,9
THC	<b>10</b>	7,6	-0,8	<b>5</b>	11,1	-2,0	<b>1</b>		
THC-COOH	<b>50</b>	11,1	-7,9	<b>25</b>	14,0	-5,3	<b>5</b>	12,7	4,6
kodeiini	<b>100</b>	5,4	0,2	<b>50</b>	2,7	-4,4	<b>10</b>	1,7	1,0
kokaiini	<b>100</b>	8,8	3,2	<b>50</b>	9,0	0,5	<b>10</b>		
tsolpideemi	<b>200</b>	9,5	-8,6	<b>100</b>	8,4	-16,1	<b>20</b>	6,2	4,5
morfiini	<b>100</b>	6,6	-2,2	<b>50</b>	2,5	-6,8	<b>10</b>	7,0	2,3
buprenorfiini	<b>10</b>	12,1	3,8	<b>5</b>	12,9	-1,2	<b>1</b>		
diatsepaami	<b>500</b>	4,3	9,0	<b>250</b>	4,7	6,4	<b>50</b>	1,2	-2,5
nordiatsepaami	<b>200</b>	3,1	6,1	<b>100</b>	3,8	3,6	<b>20</b>	3,4	-1,1
midatsolaami	<b>100</b>	1,7	-0,2	<b>50</b>	1,9	-3,6	<b>10</b>	4,0	1,1
nitratsepaami	<b>100</b>	4,0	-13,0	<b>50</b>	5,0	-18,2	<b>10</b>	4,7	5,4
klonatsepaami	<b>50</b>	2,3	-2,9	<b>25</b>	4,2	-2,3	<b>5</b>	4,2	14,1
tematsepaami	<b>500</b>	3,8	8,6	<b>250</b>	8,2	6,0	<b>50</b>	13,1	4,7
oksatsepaami	<b>500</b>	1,1	15,8	<b>250</b>	4,7	17,0	<b>50</b>	3,9	-4,4
fenatsepaami	<b>200</b>	4,8	-12,1	<b>100</b>	5,4	-16,0	<b>20</b>	4,5	3,8
loratsepaami	<b>50</b>	4,0	-10,9	<b>25</b>	2,8	-14,9	<b>5</b>	3,5	3,5
tsopikloni	<b>100</b>	10,2	-5,7	<b>50</b>	10,7	-9,0	<b>10</b>	10,5	4,1
alpratsolaami	<b>50</b>	2,5	-2,0	<b>25</b>	4,5	-3,9	<b>5</b>	3,4	1,1

Eräillä huumausaineryhmän yhdisteiden standardisuorien eri pitoisuustasoilla keskihajonnoissa ja painottuneisuuksissa on huomattaviakin eroja. Näihin eroavaisuuksiin vaikuttaa ainakin se, että muutamien yhdisteiden yksittäiset takaisin lasketut pitoisuudet eroavat muista rinnakkaisista tuloksista. MDEA:n ensimmäisen suoran kaikkien pitoisuustasojen takaisin lasketut pitoisuudet ovat pienempiä kuin muiden suorien, joten tämä vaikuttaa laskettuun keskihajontaan ja painottuneisuuteen heikentäen näiden tuloksia.

Lähes kaikilla huumausaineryhmän yhdisteillä painottuneisuus on negatiivinen kolmannella, neljännellä ja viidennellä pitoisuustasolla. Positiivisena painottuneisuus on ensimmäisellä, toisella ja kuudennella pitoisuustasolla. Tsolpideemilla painottuneisuus on ensimmäisellä ja kolmannella pitoisuustasolla yli kvantitatiivisen määrittelyn raja-arvon ja muilla tasoilla raja-arvojen sisäpuolella. Tsolpideemin painottuneisuudet pysyvät kuitenkin seulonta-

analyyseissä käytettävien raja-arvojen sisäpuolella. Kaikilla muilla yhdisteillä painottuneisuus on kaikilla pitoisuustasoilla raja-arvojen sisäpuolella.

Bentsodiatsepiinien painottuneisuuksissa raja-arvo ylittyy oksatsepaamilla, fenatsepaamilla ja loratsepaamilla ensimmäisellä ja toisella pitoisuustasolla. Oksatsepaamilla, fenatsepaamilla ja loratsepaamilla lineaarinen määrittelyalue ulottuu vain kolmanteen pitoisuustasoon, joten raja-arvojen ylityksiä ei tarvitse huomioida. Kaikilla muilla pitoisuustasoilla ja yhdisteillä painottuneisuus pysyy raja-arvojen sisällä, vaikka arvot vaihtelevat pitoisuustasoittain.

Taulukossa 11 on esitetty lineaarisuusmittausten perusteella saatuja tuloksia. Taulukossa  $r^2$  tarkoittaa standardisuoran selitekerrointa, joka kuvaa suoran "hyvyyttä" ja havaintopisteiden välistä riippuvuutta. Taulukossa LOQ tarkoittaa alemmaa määrittelyrajaa ja ULOQ ylempää määrittelyrajaa.

Taulukko 11. Lineaariset mittausalueet

Yhdiste	Tutkittu alue (ng/ml)	$r^2$	LOQ (ng/ml)	ULOQ (ng/ml)
amfetamiini	20 - 2000	0,9978	20	2000
metamfetamiini	20 - 2000	0,9974	20	2000
MDA	20 - 2000	0,9958	20	2000
MDMA	20 - 2000	0,9963	20	2000
MDEA	20 - 2000	0,9967	20	2000
tramadoli	50 - 5000	0,9899	50	5000
metadoni	10 - 1000	0,9982	10	1000
THC	1 - 100	0,9987	5	100
THC-COOH	5 - 500	0,9939	5	500
kodeiini	10 - 1000	0,9982	10	1000
kokaiini	10 - 1000	0,9913	50	1000
tsolpideemi	20 - 2000	0,9785	20	2000
morfiini	10 - 1000	0,9946	10	1000
buprenorfiini	1 - 100	0,9983	5	100
diatsepaami	50 - 5000	0,9908	50	2500
nordiatsepaami	20 - 2000	0,9967	20	2000
midatsolaami	10 - 1000	0,9993	10	1000
nitratsepaami	10 - 1000	0,9775	10	1000
klonatsepaami	5 - 500	0,9991	5	500
tematsepaami	50 - 5000	0,9948	50	5000
oksatsepaami	50 - 5000	0,9640	50	1250
fenatsepaami	20 - 2000	0,9715	20	500
loratsepaami	5-500	0,9760	5	500
tsopikloni	10-1000	0,9887	10	1000

alpratsolaami	5-500	0,9987	5	500
---------------	-------	--------	---	-----

Kokaiinia, THC:tä ja buprenorfiinia lukuun ottamatta huumausaineryhmässä olevien yhdisteiden lineaarinen määritysalue on pienimmältä suurimmalle pitoisuustasolle, koska laskettujen tulosten keskihajonnat ja painottuneisuudet ovat sallittujen rajojen sisäpuolella. Kolmen edellä mainitun yhdisteen lineaarinen määritysalue on toiseksi pienimmältä pitoisuustasolta suurimmalle. Kokaiinin kohdalla pienimmällä pitoisuustasolla kromatogrammissa kokaiinipiikkiä häiritsee likapiikki, jonka takia pienintä pitoisuustasoa ei pystytä määrittämään. THC:n ja buprenorfiinin osalta pienimmän pitoisuustason piikit eivät ole käyttökelpoisia, koska niiden paikka integroitaessa vaihtelee ja piikit ovat pieniä ja muodoltaan huonoja.

Bentsodiatsepiineista lineaarinen mittausalue ei ulotu pienimmästä suurimpaan pitoisuustasoon diatsepaamilla, oksatsepaamilla, fenatsepaamilla ja loratsepaamilla. Diatsepaamin kohdalla lineaarisuusmittauksista saadut tulokset eivät ylittäneet asetettuja raja-arvoja, mutta piirretystä kalibrintisuorasta näkyy selvästi, että suora kaartuu suurilla pitoisuuksilla. Tämän takia diatsepaamin mittausalue loppuu toiseksi suurimpaan pitoisuustasoon. Kolmen muun yhdisteen osalta suurilla pitoisuuksilla painottuneisuusarvot ovat huomattavasti raja-arvoa suuremmat. Näillä yhdisteillä lineaarinen mittausalue loppuu kolmanneksi suurimpaan pitoisuustasoon kvantitatiivisessa analyysissä. Kaikkien aineiden osalta lineaarinen mittausalue alkaa pienimmästä pitoisuustasosta.

Kaikkien yhdisteiden kohdalla standardisuoran selitekerroin on parempi kuin 0,95 määritettävällä alueella, kun käytetään painotettua kalibrintimallia.

## 4.2 Tarkkuus

Määrityksen sisäinen toistotarkkuus (RSD) laskettiin lineaarisuusmääritystä varten tehdyistä rinnakkaisista standardisuorista, joille laskettiin pitoisuudet takaisin yhdistetyn kalibrintisuoran avulla. Huumausaineryhmän määritysten välinen toistotarkkuus (RSD) sekä tulosten oikeellisuus tutkittiin analysoimalla neljällä eri pitoisuustasolla (I, III, V ja VI) ja bentsodiatsepiinien osalta viidellä eri pitoisuustasolla (I, II, III, V, VI) kolme rinnakkaista näytettä viitenä päivänä. Jokaisena päivänä ajettujen standardien avulla saatiin kalibrintisuora, jonka avulla rinnakkaisnäytteiden pitoisuudet voitiin laskea.

Kaikkien päivien lasketuista pitoisuuksista laskettiin suhteelliset keskihajonnat ja oikeellisuudet.

Toistotarkkuudet ilmoitetaan ainoastaan mittausalueen pienimmällä, suurimmalla ja keskipitoisuustasolla. Mittauksia suoritettiin kuitenkin useammalla pitoisuustasolla, koska menetelmä oli uusi ja standardien pitoisuudet olivat vastaavia kuin muissa projektin menetelmissä. Kvantitatiivisessa määrittämisessä määrittämissä suhteellinen keskihajonta (RSD) saa olla korkeintaan 20 % ja oikeellisuuden poikkeamat saavat olla korkeintaan 20 % todellisesta arvosta. Muilla standardisuoran pisteillä RSD ja oikeellisuuden poikkeamat saavat olla korkeintaan 15 %. Seulonta-analyyseissä vastaavat raja-arvot ovat 30 % ja 25 %. Tulokset on esitetty taulukossa 12, jossa ST tarkoittaa määrittämissä sisäistä toistettavuutta, VT määrittämissä välistä toistettavuutta ja Oik. oikeellisuutta.

Taulukko 12. Määrittämissä sisäinen (ST, %) ja määrittämissä välinen toistettavuus (VT, %) ja oikeellisuus (Oik, %)

Yhdiste	Pit. (ng/ml)	ST (%)	VT (%)	Oik. (%)	Pit. (ng/ml)	ST (%)	VT (%)	Oik. (%)	Pit. (ng/ml)	ST (%)	VT (%)	Oik. (%)
amfetamiini	2000	2,9	4,5	2,6	500	1,1	2,9	-1,5	20	2,3	4,4	-0,4
metamfetamiini	2000	2,6	5,3	5,0	500	3,0	2,2	-2,2	20	4,1	5,2	3,0
MDA	2000	4,9	9,7	5,7	500	8,2	7,7	1,3	20	6,4	11,5	2,0
MDMA	2000	8,8	4,7	6,4	500	4,3	3,6	-2,9	20	4,3	5,4	4,0
MDEA	2000	13,1	14,8	43,7	500	14,4	15,7	34,3	20	11,9	13,1	26,1
tramadoli	5000	18,1	7,7	25,5	1250	12,7	8,4	8,3	50	12,0	8,5	14,6
metadoni	1000	6,0	6,1	6,6	250	6,1	7,2	5,8	10	5,9	7,6	8,0
THC	100	3,2	5,5	-1,9	25	3,9	5,1	4,4	5	11,1	6,6	-0,4
THC-COOH	500	8,2	11,0	7,0	125	19,1	4,8	-3,6	5	12,7	21,1	10,0
kodeiini	1000	4,7	6,9	2,5	250	5,1	3,9	-3,0	10	1,7	9,8	-4,1
kokaiini	1000	14,0	5,5	9,7	250	9,4	7,6	1,5	50	5,0	5,1	5,9
tsolpideemi	2000	10,5	8,2	23,0	500	20,2	8,3	-4,1	20	6,2	17,0	4,8
morfiini	1000	6,5	7,3	-4,1	250	4,9	4,8	-3,6	10	7,0	9,9	-2,1
buprenorfiini	100	4,8	9,1	-5,7	25	5,3	6,6	0,7	5	12,9	10,2	3,8
diatsepaami	2500	2,8	3,8	-2,0	1250	3,0	3,8	6,0	50	1,2	5,3	-1,1
nordiatsepaami	2000	2,5	4,1	-4,8	500	3,9	4,6	5,6	20	3,4	4,2	0,9
midatsolaami	1000	2,2	4,9	0,6	250	1,6	4,4	1,4	10	4,0	3,1	2,6
nitratsepaami	1000	2,9	7,0	11,6	250	4,9	6,1	0,6	10	4,7	8,0	2,2
klonatsepaami	500	3,3	4,0	3,1	125	2,8	3,9	2,7	5	4,2	4,9	0,0
tematsepaami	5000	11,0	12,7	-10,7	1250	1,5	3,2	3,9	50	13,1	11,0	-4,8
oksatsepaami	1250	2,3	3,1	-2,6	250	4,7	4,5	16,9	50	3,9	4,1	-6,0
fenatsepaami	500	3,4	7,3	10,6	100	5,4	5,1	-10,3	20	4,5	5,9	10,3

loratsepaami	<b>125</b>	3,7	5,9	6,3	<b>25</b>	2,8	4,9	-12,3	<b>5</b>	3,5	8,7	4,1
tsopikloni	<b>1000</b>	11,3	9,0	18,8	<b>250</b>	10,1	8,4	-0,1	<b>10</b>	10,5	11,8	-13,8
alpratsolaami	<b>500</b>	3,0	3,7	1,9	<b>125</b>	3,1	3,7	0,9	<b>5</b>	3,4	5,0	0,3

Huumausaineryhmällä määrityksen sisäisissä toistotarkkuuksissa tramadolien ensimmäisellä, tsolpideemin keski- ja THC-COOH:n keskipitoisuustasolla raja-arvo ylittyy. Kaikkien muiden yhdisteiden kaikilla pitoisuustasoilla sisäisen toistotarkkuuden tulokset pysyvät raja-arvojen sisällä.

Bentsodiatsepiineilla määrityksen sisäinen toistotarkkuus on läpi mittausalueen hyvä. Tematsepaamilla ja tsopiklonilla pitoisuustasojen keskihajonnat ovat kymmenen prosentin tuntumassa. Muiden yhdisteiden kaikilla pitoisuustasoilla keskihajonnat ovat pääsääntöisesti alle viiden prosentin muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta.

Huumausaineryhmällä määritysten välisessä toistotarkkuudessa raja-arvot ylittivät juuri ja juuri MDEA:lla keskipitoisuustasolla ja THC-COOH:lla pienimmällä pitoisuustasolla. Muiden yhdisteiden ja pitoisuustasojen osalta pysytään raja-arvojen määräämällä välillä.

Bentsodiatsepiinien määritysten välisessä toistotarkkuudessa kaikkien yhdisteiden osalta tulokset jäivät kaikilla pitoisuustasoilla alle raja-arvojen. Kaikilla pitoisuustasoilla suhteelliset keskihajonnat ovat noin 10 % tuntumassa tai sen alle.

Huumausaineryhmän yhdisteiden oikeellisuuksissa MDEA:lla raja-arvo ylittyy kaikilla kolmella pitoisuustasolla. Tramadolilla ja tsolpideemilla raja-arvo ylittyy ensimmäisellä pitoisuustasolla.

Bentsodiatsepiinien oikeellisuuksissa raja-arvo ylittyy ensimmäisellä pitoisuustasolla diatsepaamilla, oksatsepaamilla, fenatsepaamilla, loratsepaamilla ja tsopiklonilla. Tsopiklonia lukuun ottamatta nämä ylitykset eivät vaikuta tuloksiin, koska pitoisuustaso ei kuulu näillä yhdisteillä lineaariseen mittausalueeseen. Tsopikloninkaan osalta ei tarvitse luopua kvantitatiivisesta määrittämisestä, koska kaikissa muissa mittauksissa pysytään raja-arvojen sisällä. Muiden yhdisteiden osalta pysytään raja-arvojen sisäpuolella.



### 4.3 Määrittäysraja

Määrittäysrajoja ei tutkittu erillisillä mittauksilla, vaan alemmaksi määrittäysrajaksi tuli sama kuin pienimmän käytössä olleen standardin pitoisuus, paitsi kokaiinilla, THC:lla ja buprenorfiinilla toiseksi pienimmän pitoisuustaso. Rajan hyväksymiskriteerinä oli enintään 20 % poikkeama todellisesta arvosta ja suhteellinen keskihajonta sai olla korkeintaan 20 %. Sitä kuinka alhaalla alempi määrittäys- ja toteamisraja ovat, ei tutkittu, koska menetelmässä pienimpien standardien pitoisuudet määrittäytyivät diatsepaamia ja alpratsolaamia lukuun ottamatta suoraan Druid-projektin pitoisuustaulukon mukaan. Cut-off-pitoisuus on huumausainemäärittäyksissä käytettävä määrittäysraja, jota suuremmat pitoisuudet ovat positiivisia. Cut-off-pitoisuus on yleensä sama kuin pienimmän käytössä olevan standardin pitoisuus. Määrittäysrajalla S/N-suhde pitää olla vähintään 10, joka ylittyy kaikkien yhdisteiden osalta (taulukko 13).

Taulukko 13. Tutkittavien yhdisteiden S/N-suhteet

Yhdiste	S/N-suhde	Yhdiste	S/N-suhde
amfetamiini	39	diatsepaami	364
metamfetamiini	24	nordiatsepaami	487
MDA	55	midatsolaami	45
MDMA	60	nitratsepaami	62
MDEA	120	klonatsepaami	30
tramadoli	79	tematsepaami	698
metadoni	15	oksatsepaami	588
THC	35	fenatsepaami	105
THC-COOH	13	loratsepaami	179
kodeiini	26	tsopikloni	52
kokaiini	105	alpratsolaami	37
tsolpideemi	124		
morfiini	22		
buprenorfiini	11		

Ylemmän määrittäysrajan hyväksymiskriteerinä oli enintään 15 % poikkeama todellisesta arvosta ja suhteellinen keskihajonta sai olla korkeintaan 15 %. Kaikille huumausainepuolen yhdisteille ylemmäksi määrittäysrajaksi tuli sama kuin suurimman käytössä olleen standardin pitoisuus. MDEA:n ja tsolpideemin kohdalla 15 % raja-arvo ylittyy, joten kyseisiä yhdisteitä voidaan analysoida ensimmäiselle pitoisuustasolle seulonta-analyysissä, joissa toistettavuuden ja oikeellisuuden raja-arvot ovat suuremmat.

Bentsodiatsepiineista oksatsepaamille, fenatsepaamille ja loratsepaamille ylempi määräysrajaksi saatiin kolmas pitoisuustaso, koska oikeellisuus erosi liikaa ensimmäisellä ja toisella pitoisuustasolla. Muiden bentsodiatsepiinien osalta ylempi määräysraja oli ensimmäinen pitoisuustaso, koska se voitiin määrittää hyväksyttävällä toistettavuudella ja oikeellisuudella.

#### 4.4 Saantokokeet

Saantokokeita varten valmistettiin kuusi kolmannen pitoisuustason standardia ja kuusi nollanäytettä. Nollanäytteisiin lisättiin kolmatta pitoisuustasoa vastaava määrä standardien kantaliuosta uuttoliuokseen ennen haihdutusta.

Saantokokeista saadut tulokset (taulukko 14) osoittavat, että saannot ovat hyvällä tasolla muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta. Hyvät saannot kertovat, että analysoitavat yhdisteet saadaan uutettua hyvin sekä suodatinpaperista että verestä, joten käytettävä uuttomenetelmä ja -liuotin ovat sopivia. Myöskään ei tapahdu suurta näytehävikkiä menetelmän esikäsitteilyvaiheissa. Uuton saannolla ei ole yksiselitteistä raja-arvoa. Kun käytetään sisäisen standardin menetelmää, ei uuton saantoprosentin suuruudella ole kovin suurta merkitystä.

Taulukko 14. Uuton saanto-% ja lasketut keskiarvot standardi- ja lisäysnäytteen pitoisuuksille

Yhdiste	Pit. (ng/ml)	ka pit. std III (ng/ml)	RSD (%)	ka pit. lisäys (ng/ml)	RSD (%)	Uuton saanto-%
amfetamiini	500	482	2,0	541	3,3	89,2
metamfetamiini	500	497	2,4	569	1,6	87,3
MDA	500	566	3,8	574	5,2	98,6
MDMA	500	491	2,8	541	1,5	90,9
MDEA	500	660	3,3	739	5,9	89,3
tramadoli	1250	1586	5,1	2034	2,9	78,0
metadoni	250	251	3,3	320	2,8	78,5
THC	25	25	5,6	61	4,3	41,2
THC-COOH	125	120	6,6	372	8,6	32,2
kodeiini	250	237	4,8	267	2,9	88,8
kokaiini	250	247	8,7	297	5,7	83,2
tsolpideemi	500	453	4,0	530	3,2	85,6
morfiini	250	224	5,0	447	4,3	50,1
buprenorfiini	25	24	4,6	48	4,3	49,8
diatsepaami	1250	1243	1,9	1307	2,8	95,1
nordiatsepaami	500	489	2,8	506	2,0	96,6

midatsolaami	250	228	2,3	248	4,3	92,0
nitratsepaami	250	225	5,4	256	4,7	88,2
klonatsepaami	125	118	2,2	128	1,6	92,3
tematsepaami	1250	1328	6,1	1378	2,6	96,4
oksatsepaami	1250	1090	4,2	1156	3,7	94,3
fenatsepaami	500	448	9,2	513	3,3	87,4
loratsepaami	125	113	5,9	120	5,1	94,4
tsopikloni	250	260	9,1	328	4,5	79,3
alpratsolaami	125	119	3,3	124	2,4	96,1

Saannot eivät saisi vaihdella suuresti näytteestä toiseen, joten suhteellisen keskihajonnan tulisi olla alle 15 prosenttia. Tämän rajan alle päästään kaikkien yhdisteiden osalta. Huumausaineryhmän yhdisteillä keskihajonnat jäävät alle kymmenen prosentin. Bentsodiatsepiinien osalta tulokset ovat hieman tätäkin parempia, koska keskihajonnat jäävät alle viiden prosentin.

Huumausaineryhmän yhdisteillä tuloksista huomataan, että uuton saantoprosentit ovat noin 80-100 prosentin luokkaa lukuun ottamatta THC:ta, THC-COOH:a, morfiinia ja buprenorfiinia, joiden saantoprosentit ovat 30-50 prosentin välillä.

Bentsodiatsepiinien osalta saantoprosentit ovat kauttaaltaan hieman parempia kuin huumausaineryhmän yhdisteillä. Tsopiklonia, jonka saantoprosentti on noin 80, lukuun ottamatta kaikkien muiden bentsodiatsepiinien saantoprosentit ovat noin 90–100 välillä. Näiden tulosten perusteella kaikille tutkitaville aineille uutosta saatavat saannot ovat erittäin hyvällä tasolla.

#### 4.5 Stabiilisuus

Prosessoitujen näytteiden stabiilisuutta eli analysoitavien yhdisteiden hajoamista näytteensyöttökiekolla tutkittiin ajamalla samaan aikaan valmistettuja näytteitä neljän tunnin välein 28 tunnin ajan. Saadun datan perusteella saadaan selville tapahtuuko vasteissa muutosta, pienenemistä tai suurenemistä, kun näytteensyöttöpullo on pidemmän aikaa näytteensyöttökiekolla. Mahdollisten vasteiden muuttuminen seisotuksessa antaa tiedon siitä, tarvitseeko valmistaa uudet näytteet vai voidaanko näytteet ajaa uudelleen valmistusta seuraavana päivänä, mikäli ajossa on tapahtunut jokin ongelma.

Saatujen vasteiden perusteella ei voi suoraan sanoa onko muutos merkitsevä, vaan tuloksille suoritetaan regressioanalyysi, jolloin stabiilisuuden rajana voidaan pitää todennäköisyyttä  $p < 0,05$ . Silmämääräisesti huumausaineista

vain metadonilla vasteet laskevat. THC:lla, THC-COOH:lla ja tsolpideemilla vasteet pysyvät muuttumattomina ja muiden vasteilla on havaittavissa nousevaa trendiä. Samaan aikaan edellä mainittujen yhdisteiden sisäisten standardien vasteet käyttäytyvät samalla tavalla. Vasteille suoritetuissa regressioanalyysissä useiden yhdisteiden osalta jäädään vaadittavan todennäköisyysrajan alle (taulukko 15), joten tämän perusteella näitä yhdisteitä ei voisi analysoida uudelleen enää myöhemmin. Kun regressioanalyysi tehdään pitoisuuksille, tulokset paranevat, koska pitoisuuksia laskettaessa on otettu myös huomioon sisäinen standardi, jonka vaste useilla yhdisteillä muuttuu samalla lailla kuin itse tutkittavilla yhdisteillä. Tramadolien kohdalla pitoisuuksista tehty regressioanalyysi antaa huomattavasti raja-arvoa pienemmän tuloksen, koska metadoni d9, jota vasten tramadolien pitoisuus lasketaan, käyttäytyy ajan kuluessa eri tavalla kuin tramadoli.

Taulukko 15. Derivatisoinnin stabiilisuus

Yhdiste	Pit. (ng/ml)	vaste (RSD, %)	Regressioanalyysi (P)	ka pit.	Pit. (RSD, %)	Regressioanalyysi (P)
amfetamiini	500	20,0	0,077	479	4,0	0,040
metamfetamiini	500	16,4	0,102	482	3,5	0,281
MDA	500	18,0	0,062	512	5,9	0,206
MDMA	500	17,3	0,074	493	3,7	0,097
MDEA	500	13,7	0,039	813	6,2	0,932
tramadoli	1250	11,3	0,106	8705	74,5	0,0001
metadoni	250	71,0	0,0003	317	7,5	0,002
THC	25	20,8	0,301	24	6,1	0,572
THC-COOH	125	9,2	0,336	146	20,4	0,455
kodeiini	250	16,1	0,061	244	2,2	0,641
kokaiini	250	6,4	0,004	243	6,0	0,337
tsolpideemi	500	9,2	0,353	449	18,0	0,262
morfiini	250	19,9	0,086	250	6,6	0,848
buprenorfiini	25	12,1	0,495	25	9,2	0,734
diatsepaami	1250	6,6	0,103	1320	2,8	0,275
nordiatsepaami	500	8,2	0,089	523	2,3	0,888
midatsolaami	250	27,4	0,003	249	2,5	0,476
nitratsepaami	250	17,8	0,009	250	6,6	0,065
klonatsepaami	125	21,3	0,0002	121	2,6	0,393
tematsepaami	1250	29,2	0,023	1251	6,0	0,596
oksatsepaami	1250	3,0	0,018	1159	3,5	0,029
fenatsepaami	500	9,0	0,009	461	8,3	0,001
loratsepaami	125	8,9	0,016	116	8,1	0,002
tsopikloni	250	22,9	0,002	272	11,6	0,032

alpratsolaami	125	31,4	0,0002	123	2,4	0,840
---------------	-----	------	--------	-----	-----	-------

Mittauksesta saatujen tulosten perusteella bentsodiatsepiinien osalta vasteet laskevat kaikilla muilla yhdisteillä paitsi tematsepaamilla, jolla vasteet nousevat ajan kuluessa. Tutkittavia yhdisteitä vastaavien sisäisten standardien vasteet muuttuvat samalla tavalla. Regressioanalyysillä vasteista saatujen tulosten perusteella vain diatsepaamin ja nordiatsepaamin arvot ovat suuremmat kuin 0,05. Muiden yhdisteiden osalta jäädään selvästi raja-arvon alle. Kun lasketaan kalibrintisuoran avulla pitoisuudet stabiilisuusmittauksen tuloksille, niin ne osoittavat, että lasketuissa pitoisuuksissa ei ole suuria eroja. Laskettujen pitoisuuksien keskihajonnat ovat tsopiklonia lukuun ottamatta alle kymmenen prosenttia. Kaikilla muilla yhdisteillä paitsi tsopiklonilla viimeisen mittauksen pitoisuus eroaa ensimmäisen mittauksen pitoisuudesta alle 20 prosenttia.

#### 4.6 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuudet lasketaan vain pienimmälle, keskimmaiselle ja suurimmalle pitoisuustasolle. Mittausepävarmuudet ilmoitetaan laajennettuina epävarmuuksina (LME). Mittausepävarmuudelle ei ole määritetty hyväksyttävän tuloksen raja-arvoa, vaan yhdistetty mittausepävarmuusprosentti kertoo sen välin, jolla tulos on laskennallisesta arvostaan 95 %:n todennäköisyydellä.

Joidenkin yhdisteiden laajennetuksi mittausepävarmuudeksi saatiin hyvinkin suuria arvoja (taulukko 16), mikä selittyy osin sillä, että toistokokeiden tuloksissa oli heittoa, jonka takia määrittämisen sisäisen ja määrittämisen välisten toistotarkkuuksien tulokset olivat joko yli tai lähellä sallittavuusrajaa. Huumausainepuolen yhdisteillä keskitason mittausepävarmuus on pääsääntöisesti pienempi kuin pienimmällä ja suurimmalla pitoisuustasolla. Epävarmuudet vaihtelevat 7 ja 95 % välillä. Bentsojen osalta epävarmuudet ovat suurimpia suurimmalla pitoisuustasolla, mihin osalla yhdisteistä vaikuttaa se, että kalibrintisuorat alkavat kaartua suurilla pitoisuuksilla. Pienimmällä ja keskipitoisuustasolla epävarmuudet vaihtelevat 9 ja 47 % välillä.

Taulukko 16. Mittausepävarmuus

Yhdiste	Pit. (ng/ml)	LME (%)	Pit. (ng/ml)	LME (%)	Pit. (ng/ml)	LME (%)
amfetamiini	2000	12,3	500	7,0	20	10,1
metamfetamiini	2000	15,9	500	9,1	20	25,2
MDA	2000	23,8	500	22,2	20	26,5
MDMA	2000	24,7	500	12,4	20	15,0
MDEA	2000	95,4	500	77,2	20	63,8
tramadoli	5000	64,1	1250	30,7	50	41,9
metadoni	1000	20,8	250	24,0	10	26,2
THC	100	12,2	25	18,1	5	22,7
THC-COOH	500	33,0	125	48,0	5	66,3
kodeiini	1000	18,4	250	17,1	10	22,1
kokaiini	1000	35,8	250	24,4	50	18,5
tsolpideemi	2000	52,3	500	45,8	20	40,3
morfiini	1000	20,1	250	17,0	10	23,3
buprenorfiini	100	27,3	25	18,7	5	27,5
diatsepaami	2500	10,3	1250	15,5	50	11,1
nordiatsepaami	2000	13,5	500	16,4	20	10,9
midatsolaami	1000	10,9	250	9,8	10	11,4
nitratsepaami	1000	27,6	250	15,6	10	19,0
klonatsepaami	500	12,1	125	11,0	5	12,8
tematsepaami	5000	39,9	1250	10,5	50	35,5
oksatsepaami	1250	9,3	250	36,2	50	16,5
fenatsepaami	500	26,7	100	25,5	20	25,5
loratsepaami	125	18,8	25	27,1	5	20,4
tsopikloni	1000	47,4	250	26,3	10	42,0
alpratsolaami	500	10,2	125	9,8	5	12,1

## 5 YHTEENVETO

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää kokonaan uusi menetelmä, jolla analysoidaan kuivatuiista veritäplänäytteistä huumaus- ja lääkeaineita. Menetelmän kehittelyn alussa tutkittavia yhdisteitä olivat ne olennaiset yhdisteet, jotka menetelmällä tulisi pystyä analysoimaan. Kun menetelmä oli saatu toimivaksi, lisättiin tutkittavien yhdisteiden määrää. Menetelmän kehittämisessä onnistuttiin, minkä jälkeen menetelmälle suoritettiin validointikokeita, jotta pystyttiin varmistamaan menetelmän toimivuus ja luotettavuus.

Validointitulosten perusteella huumausaineryhmästä MDEA:ta, tramadolia, THC-COOH:ta ja tsolpideemia ei voida analysoida kvantitatiivisesti. Tramadoli, THC-COOH ja tsolpideemi voidaan analysoida semikvantitatiivisesti.

MDEA:n osalta validointitulokset olivat sen verran huonot, että sitä ei voida analysoida edes semikvantitatiivisesti. Muut yhdisteet voidaan määrittää kvantitatiivisesti. MDEA:lla varsinkin oikeellisuus on kautta pitoisuustasojen yli sekä kvantitatiivisen analyysin että semikvantitatiivisen raja-arvon. Myös toistettavuustuloksissa kvantitatiivisen analyysin raja-arvo ylitetään tai ollaan sen tuntumassa. Edellä mainituista yhdisteistä MDEA:n, tramadolin ja tsolpideemin keskihajontaa ja oikeellisuutta voitaisiin parantaa käyttämällä jokaisen yhdisteen omaa deuterioitua muotoa sisäisenä standardina. Huumausainepuolen yhdisteillä tulosten keskihajonnat ja oikeellisuudet ovat pääosin pienempiä määrittämisen sisäisissä tuloksissa kuin määrittämisen välisissä. Muutaman aineen osalta ei päästy niin pieniin pitoisuuksiin kuin olisi toivottu, mutta muilta osin aineiden validointitulokset ovat hyväksyttäviä. Huumausainepuolen joukosta alemmaa määritysrajaa jouduttiin nostamaan pienimmästä pitoisuustasosta toiseksi pienimmälle THC:lla, kokaiinilla ja buprenorfiinilla.

Bentsodiatsepiinien kohdalla oksatse-, loratse- ja fenatsepaamin osalta ylempää määritysrajaa jouduttiin laskemaan kolmannelle pitoisuustasolle, koska standardisuora lähti kaartumaan suoran yläpäässä. Kaikki bentsodiatsepiinit voidaan määrittää kvantitatiivisesti niille määritetyllä pitoisuusalueella. Bentsodiatsepiinien joukosta nitratse-, oksatse-, fenatse- ja loratsepaamin osalta lasketut pitoisuudet eroavat selvästi kaikissa mittauksissa toisistaan neljännellä ja viidennellä pitoisuustasolla. Keskihajonnat ovat samalla tasolla muiden aineiden kanssa. Tälle eroavaisuudelle ei löytynyt mitään loogista selitystä. Bentsojen osalta yhdisteiden tulosten keskihajonnat ja oikeellisuudet ovat hyvin lähekkäin toisiaan määrittämisen sisäisissä ja määrittämisen välisissä tuloksissa.

Saantokokeesta saadut tulokset ovat muutamaa yhdistettä lukuun ottamatta hyvällä tasolla eli saantoprosentit ovat 75 - 100 % välillä. Tämän perusteella uuttoliuos, -olosuhteet ja -tapa sopivat hyvin suurimman osan tutkittavien yhdisteiden uuttamiseen kuivatusta veritäplästä sekä verestä. Saantokokeiden tulokset ovat menetelmässä vain suuntaa antavia, koska käytetään sisäisen standardin menetelmää ja positiivisen tuloksen rajana on pienimmän pitoisuustason eli cut-off -arvon ylitys.

## VIITELUETTELO

- [1] Skopp, G. *Blood Spot Analysis*. Institute of Legal Medicine and Traffic Medicine
- [2] Alfazil, Abdulkareem A. - Anderson, Robert A. *Stability of Benzodiazepines and Cocaine in Blood Spots Stored on Filter Paper*. Journal of Analytical Toxicology. Vol. 32. September 2008.
- [3] Schutz, Harald ym. *Simultaneous screening and detection of drugs in small blood samples and bloodstains*. Forensic Science International 126. 2002.
- [4] Saarinen, Heikki - Lajunen, Lauri. *Analyttisen kemian perusteet*. Oulu: Oulun yliopistopaino. 2004.
- [5] Willard, Hobart H. ym. *Instrumental Methods of Analysis*. Seitsemäs painos. Yhdysvallat: Wadworth, Inc. 1988.
- [6] Jaarinen, Soili - Niiranen, Jukka. *Laboratorion analyysitekniikka*. Viides painos. Helsinki: Edita Prima Oy. 2005.
- [7] Riekkola, Marja-Liisa - Hyötyläinen, Tuulia. *Kolonnikromatografia ja kapillarielektromigraatiotekniikat*. 2. painos. Helsinki: Yliopistopaino. 2002.
- [8] Barker, James. *Mass Spectrometry*. Toinen painos. Englanti: John Wiley & Sons Ltd. 1999.
- [9] Seppälä, Timo. *Huumeet liikenteessä* [verkkodokumentti]. Päihdelinkki. 15.6.2009 [viitattu 29.4.2010]. Saatavissa: <http://www.paihdelinkki.fi/tietoiskut/153-huumeet-liikenteessa>,
- [10] Irti huumeista ry ym. *Suomi ja huumeet*. 3. painos. Kirjapaino West Point Oy. 2001.
- [11] Dahl, Päivi - Hirschhovits, Tanja. *Tästä on kyse - tietoa päihhteistä*. Neljäs painos. Helsinki. Hakapaino Oy. 2002.
- [12] Kaasu- ja nestekromatografisen pitoisuusmäärityksen validointi (HTY.007) versio 1.2. Helsinki: Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2009.
- [13] Teräsahde, Pertti - Manninen, Pentti. *Kemiallisten analyysimenetelmien validointiohje*. Elintarvikeviraston julkaisu. Helsinki: Elintarvikevirasto. 1997.
- [14] *Kemian metrologian opas*. MIKES Julkaisu J6/2005. Helsinki. 2005.