



Jasmin Holappa

Furosemidin validointi happamien ja neutraalien lääkeaineiden analyysimenetelmään

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

5.5.2022

Tiivistelmä

Tekijä:	Jasmin Holappa
Otsikko:	Furosemidin validointi happamien ja neutraalien lääkeaineiden analyysimenetelmään
Sivumäärä:	43 sivua + 7 liitettä
Aika:	5.5.2022
Tutkinto:	Laboratorioanalyttikko(AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat:	Oikeuskemisti Antti Jylhä Lehtori Mia Ruismäki

Opinnäytetyö tehtiin Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen Helsingin toimipisteen oikeuskemian osastolle. Tavoitteena opinnäytetyössä oli validoida furosemidi happamien ja neutraalien lääkeaineiden kvantitatiiviseen seulontamenetelmään (NEUT-SEUL) post mortem -verinäytteille. Seulontamenetelmän analyysilaitteistona toimii UPLC-PDA-CAD. Furosemidia on aikaisemmin tutkittu kvantitatiivisesti Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksella LC-MS/MS-analyysimenetelmällä.

Furosemidi on loop-diureetiksi määritelty lääkeaine, jota käytetään esimerkiksi turvotusten ja resistentin hypertension eli vaikean verenpainetaudin hoitoon. Furosemidi-analyysille tehtiin esivalidointi ja validointi, jotta kyseisen analyysimenetelmän toimivuus analyytin kvantitoimiseen varmistui. Furosemidille on aikaisemmin tehty kvalitatiivinen analyysi samalla analyysimenetelmällä. Validoinnissa analysoitiin vanhoja positiivisia furosemidinäytteitä vainajista. Vanhojen näytteiden tarkastelulla saatiin samoja tuloksia kuin aikaisemmallaakin analyysimenetelmällä.

Alemmaksi määrittämisrajaksi saatiin validointitulosten perusteella 0,1 mg/l PDA-detektorille ja 0,3 mg/l CAD-detektorille. Toteamisrajaksi määritettiin pitoisuustaso 0,05 mg/l ja laajennetuksi mittausepävarmuudeksi saatiin 33 %:a luottamustasolla 95 %. Näytteiden matriisiefekti ei vaikuttanut furosemidin kvantitoimiseen. Toistettavuusnäytteiden suhteellinen keskihajonta jäi alle 20 %:n.

Validointitulokset täyttivät validointisuunnitelmassa asetetut vaatimukset. Furosemidi ei aiheuttanut määrittämismenetelmässä olevien muiden analyyttien kromatogrammeihin häiriösignaaleja, ja menetelmä todettiin sopivaksi furosemidin kvantitatiiviseen analysoimiseen. Menetelmässä olevat muut analyytit eivät myöskään häirinneet itse furosemidin kvantitoimista.

Avainsanat: UPLC-PDA-CAD, furosemidi, lääkeaineet, validointi, tuettu nesteutto, lääkeainepitoisuus verinäytteissä

Abstract

Author: Jasmin Holappa
Title: Furosemide Validation for Acidic and Neutral Drugs Analysis Method
Number of Pages: 43 pages + 7 appendices
Date: 5 May 2022

Degree: Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme: Laboratory Sciences
Professional Major:
Supervisors: Antti Jylhä, Forensic Chemist
Mia Ruismäki, Senior Lecturer

The thesis work was carried out for the National Institute for Health and Welfare in Helsinki. Main purpose was to validate furosemide for the quantitative analysis method of acidic and neutral drugs from postmortem blood samples by an UPLC-PDA-CAD-analyzer. Furosemide has previously been analyzed quantitatively by LC-MS/MS-analytical method at the National Institute for Health and Welfare.

Furosemide is a loop-diuretic, which is used to treat for example edema and resistant hypertension. Furosemide was pre-validated and validated to see if the analysis method is suitable for furosemide quantification. Furosemide has previously been analyzed qualitatively by the same analysis method. Old furosemide positive postmortem blood samples were analyzed. Examination of the old samples gave same results as the previous method that had been used to detect furosemide.

Based on the validation results, the lower limit of furosemide quantification is 0.1 mg/l for the PDA-detector and 0.3 mg/l for the CAD-detector. The limit of detection was defined to the concentration level of 0.05 mg/l and expanded measurement uncertainty of 33 %. The matrix effect of postmortem samples did not affect the quantification of furosemide. The relative standard deviation of the repeatability samples was less than 20 %.

The validation result corresponds to the requirements set out in the validation plan. Furosemide did not cause interfering signals in the chromatograms of the method's other analytes, and this analysis method was found suitable for furosemide quantification. Other analytes of the method did not cause any problems in furosemides quantification.

Keywords: HPLC-PDA-CAD, furosemide, drugs, validation, supported liquid extraction, drug concentration of blood sample

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Terveyden ja hyvinvoinnin laitos	2
3	Happamat ja neutraalit lääkeaineet	4
4	Furosemidin toimintamekanismi	5
5	Tuettu nesteuutto	7
6	UPLC-PDA-CAD-analyysitekniikka	8
6.1	Erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia	9
6.2	Diodirividetektori	11
6.3	Varautuneen aerosolin detektor	12
7	Furosemidin analysoiminen eri menetelmillä	14
8	Työn toteutus	15
8.1	Validointi	15
8.2	Laitteet ja reagenssit	16
8.3	Liuosten valmistus	17
8.4	Näytteen käsittely	18
9	Tulokset	18
9.1	Esivalidointi	19
9.2	Selektiivisyys ja spesifisyys	20
9.3	Määritys- ja toteamisraja	22
9.4	Tarkkuus	23
9.5	Laimennetun näytemäärän verifiointi	26
9.6	Näytteiden säilyvyys	27
9.7	Uuttomenetelmän saantoprosentti	28
9.8	Laajennettu mittausepävarmuus	29
9.9	Valvontakortit	31
9.10	Menetelmän toimivuuden testaus	33
9.11	Matriisivaikutus	33

10	Yhteenveto	34
	Lähteet	35
	Liitteet	
	Liite 1: Nestekromatografian ajo-olosuhteet	
	Liite 2: Liuosten valmistus	
	Liite 3: Tarkkuustulokset	
	Liite 4: Mittausepävarmuustulokset yrityksen ohjeen mukaan	
	Liite 5: Mukit-raportti	
	Liite 6: Furosemidiposiitivisten näytteiden tulokset	
	Liite 7: Matriisivaikutuksen tulokset	

Lyhenteet

CAD:	Charged Aerosol Detector, varautunut aerosolidetektor.
MS/MS:	Tandem mass spectrometry, tandem-massaspektrometri.
PDA-detektori:	Photodiode-array Detector tai Diode-array Detector, diodirividetektor.
PM:	Post mortem, kuoleman jälkeinen.
SLE:	Supported liquid extraction, tuettu nesteutto.
THL:	Terveyden ja hyvinvoinnin laitos.
UPLC:	Ultra Performance Liquid Chromatography, erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia.

1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) oikeuskemian toksikologian yksikössä. Oikeuskemian laboratorio on akkreditoitu ja noudattaa testauslaboratorioiden SFS-EN ISO/IEC 17025:2005 -laatustandardia. Opinnäytetyön tarkoituksena oli lisätä happamien ja neutraalien lääkeaineiden seulontamenetelmään (NEUT-SEUL) uusi analyytti, furosemidi. Analyyttia on aikaisemmin määritetty samassa menetelmässä kvalitatiivisella analyysillä. Positiivisesta havainnosta näyte menee kvantitatiiviseen analysointiin LC-MS/MS-analyysilaitteelle. Furosemidin lisääminen kvantitatiiviseksi NEUT-SEUL-menetelmään vähentää työmäärää ja helpottaa kuolinsyiden määrittämistä.

Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen oikeuskemian toksikologian yksikössä suoritetaan oikeuslääketieteellisen kuolemansyyn selvittämisen lisätutkimukset. THL:n toimintaan kuuluu päihdetestauksen sekä oikeustoksikologian laboratoriotutkimukset. Oikeustoksikologisiin laboratoriotutkimuksiin kuuluu huume-, alkoholi- ja lääkeainemääritykset, kudospäytteen histologiset värjäykset ja käsitellyt sekä lakisäätteiset oikeusgeneettiset isyystutkimukset. [1.]

Vuonna 2018 huumausaineisiin kuoli 261 henkilöä ja kyseiset kuolemat painotettiin nuorempiin ikäryhmiin. Huolestuttavaa oli, että joka kuudes 15–19-vuotiaana menehtynyt kuoli tapaturmaiseen myrkytykseen vuosina 2016–2020. Huumeriippuvuudesta aiheutuvia kuolemia oli 49 ja huumeilla tehtyjä itsemurhia 35 kappaletta vuonna 2018. Huumausainekuolemista suurin osa oli moniainemyrkytyksiä, ja kuolemat ovat olleet tapaturmia. [2; 3.] Oikeustoksikologisten tutkimusten teko on hyvin tärkeää, jotta pystytään seuraamaan kansan kuolinsyitä ja tekemään tilastoja, joilla voidaan mahdollisesti vaikuttaa kansan terveyteen ja hyvinvointiin.

Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää furosemidille optimoidut nestekromatografiset olosuhteet sekä validoinnin tekeminen NEUT-SEUL-menetelmän toimi-

vuuden tarkastelua varten. Terveiden ja hyvinvoinnin laitokselle laadittiin validointiraportti validoinnista saatujen tuloksien perusteella. Validointiraportin tekeminen oli osa tätä opinnäytetyötä.

Furosemidi on loop-diureetti, jota käytetään erilaisten sydän- ja verisuonitautien hoitoon. Furosemidin kliinistä toksikologiaa on tutkittu muun muassa sairaalassa olevilla potilailla. Yhdessä tutkimuksessa 2 367 sairaalahoidossa olevan potilaan sairauksia hoidettiin furosemidilla. Yksi kolmasosa näistä henkilöistä oli yli 69-vuotiaita. Näistä 239 potilaalla todettiin furosemidin aiheuttamia haittavaikutuksia, joista vain 14:ää tapaus pidettiin henkeä uhkaavana. 14 tapauksesta kahdeksan potilasta kuoli, joista kahden kuolemaan katsottiin furosemidilla olleen vaikutusta. Molemmilla kuolemantapauksilla oli vakava tai terminaalinen eli kuolemaan johtava sairaus. Heille annettiin myös muita lääkkeitä, jotka vaikuttivat nesteen ja elektrolyyttien tasapainoon. Tutkimuksessa todettiin furosemidin olevan suhteellisen turvallinen diureetti ja sen aiheuttaman vakavan myrkytystilan olevan epätavallista. [4.] Kuitenkin furosemidi voi olla yhtenä vaikuttavana tekijänä ihmisen menehtymiseen. Furosemidin tutkimisella vainajanäytteistä saadaan laajempi kokonaiskuva siitä, mikä on mahdollisesti aiheuttanut vainajan kuoleman.

2 Terveiden ja hyvinvoinnin laitos

Terveiden ja hyvinvoinnin laitos huolehtii väestön hyvinvoinnin ja terveyden seuraamisesta. THL kehittää, kerää ja tuottaa tutkimukseen ja tietoaisteistoihin liittyviä tietoja. Tärkeänä osana on myös asiantuntemuksen ja ratkaisujen tarjoaminen. THL tarjoaa monipuolista osaamistaan eri tahoille, joita on muun muassa valtio, sosiaali- ja terveysalan toimijat, kansalaiset, tutkimusmaailma sekä erilaiset järjestöt. [5.]

Painopisteet THL:n toiminnassa ovat terveysuhkiin varautumisessa, hyvinvointiyhteiskunnan kestävyudessa, eriarvoisuuden ja syrjäytymisen vähentämisessä, muuttuvien sairauksien kirjossa sekä palvelujärjestelmien muutossa.

Myös sosiaali- ja terveydenhuollon erityispalveluiden järjestäminen ja ohjaaminen kuuluvat THL:n työnkeskiöön. [5.]

Terveyden ja hyvinvoinnin laitokseen kuuluu useita eri yksiköitä, kuten esimerkiksi oikeuskemian yksikkö, joka sisältää oikeustoksikologian ja oikeusgenetiikan. Kyseinen yksikkö toimii kansallisena asiantuntijakeskuksena. Oikeustoksikologian yksikkö tekee laboratoriotutkimuksia, jotka liittyvät oikeustoksikologiaan ja päihdetestaukseen. Yksikkö laatii myös asiantuntijalausuntoja. [6.]

Oikeustoksikologian toimintaan kuuluu päihteiden ja uusien muuntohuumeiden käytön tutkiminen ja menetelmien sekä käytäntöjen kehittäminen päihdetestauksessa. Yksikkö osallistuu myös kansainvälisen ja kansallisen tiedon välittämiseen huumausaineiden käyttöön liittyvissä asioissa. [6.]

Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksessa tehtävän oikeuslääketieteellisen kuolemansyyn selvittämisen lisätutkimukset tehdään oikeuskemian toksikologian yksikössä. Vainajan kuolinsyy selvitetään tilanteissa, joissa vainaja ei ole ollut viimeisen sairautensa aikana lääkärin hoidossa tai kuoleman ei tiedetä aiheuttaneen sairaudesta. Myös silloin kun kuoleman on aiheuttanut rikos, myrkytys, tapaturma, itsemurha, hoitotoimenpide, ammattitauti tai epäillään jotain näistä syistä, on kuolemansyyn selvittäminen tarpeellista. Jos kuolema on tapahtunut yllättävästi, tutkitaan, mikä on mahdollisesti ollut syynä tähän. [7.]

Oikeuslääketieteellisen kuolemansyyn selvittämiseen kuuluu poliisin suorittama tutkinta, ruumiin ulkotarkastus lääkärin suorittamana ja tarvittaessa oikeuslääketieteellinen ruumiinavaus ja siihen liittyvät lisätutkimukset. Ennen oikeuslääketieteellisen ruumiinavausmääräyksen antamista tehdään tarkka tapauskohtainen harkinta. Epäselvissä tilanteissa poliisi konsultoi oikeuslääkärinä, jotta selviää, onko tarpeellista suorittaa ruumiinavaus. [7.]

3 Happamat ja neutraalit lääkeaineet

Opinnäytetyön NEUT-SEUL-menetelmä analysoi happamia ja neutraaleja lääkeaineita. Menetelmällä tutkitaan jopa 64 erilaista lääkeainetta verinäytteistä. Lääkeaineet luokitellaan usein heikoiksi hapoiksi, emäksiksi tai neutraaleiksi. Lipofiilisuus, vetysidokset, molekyylipaino, protonin luovuttajat ja vastaanottajat (pKa-arvo), polaarinen pinta-ala ja aromaattisuus ovat tärkeimpiä ominaisuuksia, joita tutkitaan, kun määritellään, mihin ryhmään lääkeaine kuuluu. [8.]

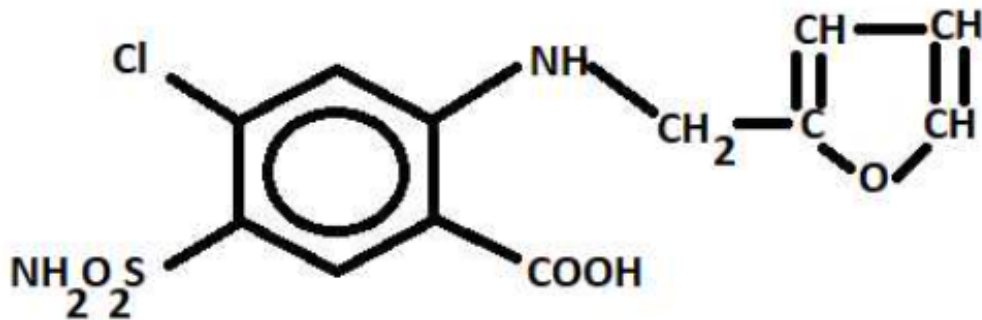
Lääkeaineiden jakaminen luokkiin erilaisin perustein on historian edetessä muokkaantunut. 1800-luvun alussa ja puolivälissä saksalainen kemisti Justus von Liebig yhdisti happamien lääkeaineiden määrittämisen lääkeaineessa olevan vedyn läsnäoloon. Fyysikko Svante Arrhenius syvensi von Liebigin lääkeainemäärittäystä, johon Thomas Martin Lowry ja Johannes Nicolaus Brønsted lisäsivät, että happamaksi luokiteltaisiin aine, joka määritellään protonin luovuttajaksi, ja emäkseksi luokiteltaisiin vastaavasti protonin vastaanottaja. [9.]

1900-luvun alussa amerikkalainen fysikaalinen kemisti Gilbert N. Lewis laajensi määritelmää entisestään. Lewis lisäsi happojen ja emästen määritelmään lääkeaineiden liukenemistavan vedettömissä liuottimissa, joissa ei ole mukana vapaita protoneja. Kuitenkin Brønstedin ja Lowryn tekemä määritelmä on yleisimmin käytetty kuvaamaan happamuutta ja emäksisyyttä lääkeaineiden ominaisuuksissa. [9.]

Emäksisiin lääkeaineisiin verrattuna happamien lääkeaineiden suuri ionisaatioaste fysiologisessa pH:ssa tekee niistä enemmän vesiliukoisemman [9]. Neutraalit lääkeaineet ovat ionisoimattomia, mikä tekee niistä vähemmän liukenevia [8]. Happamat ja neutraalit lääkeaineet voivat sietää suurempaa lipofiilisyyttä eli rasvaliukoisuutta. Happamien lääkeaineiden on huomattu myös sitoutuvat hyvin plasman proteiineihin. [9.]

4 Furosemidin toimintamekanismi

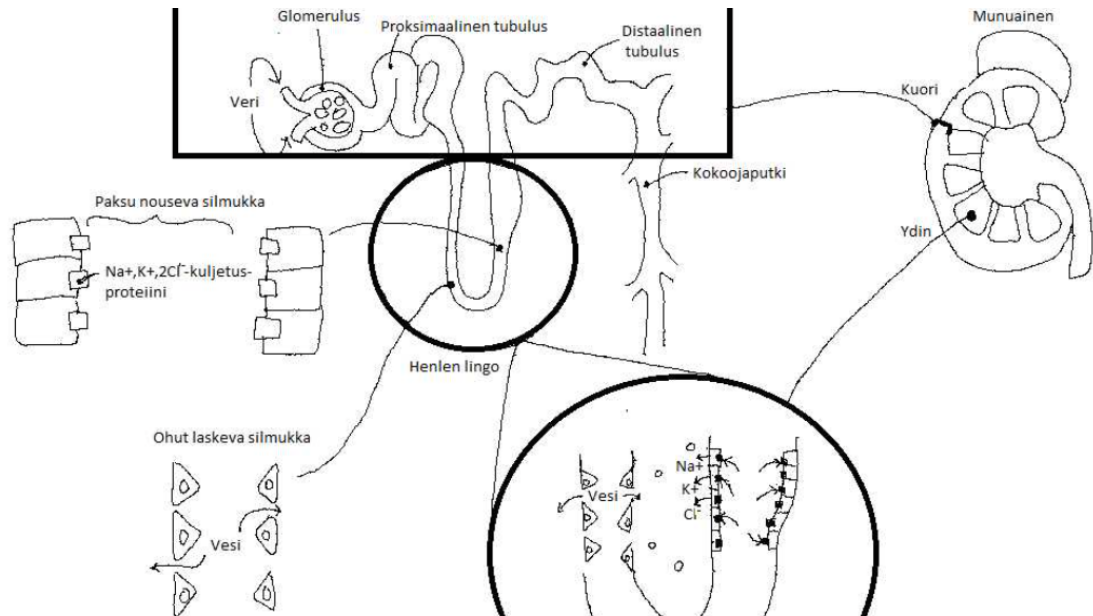
Furosemidi on loop-diureetiksi määritelty lääkeaine, jota käytetään esimerkiksi turvotuksen ja resistentin hypertension eli vaikean verenpainetaudin hoitoon. Diureettien toiminta perustuu veden ja natriumin poistamiseen. [10, s.579] Loop-diureetit vaikuttavat munuaisten nefronien osan toiminnan muuttamiseen. [11.] Furosemidin molekyyli rakenne on esitetty kuvassa 1.



Kuva 1 Furosemidin molekyyli rakenne [10].

Munuaiset koostuvat miljoonista pienistä putkista, joita kutsutaan nefroneiksi. Nefronit vastaavat elektrolyyttien ja nesteen tasapainottamisesta sekä suodattamisesta veren ja virtsan välillä. Nefronit koostuvat viidestä osasta: glomeruluksesta, proksimaalisesta tubuluksesta, henlen lingosta, distaalisesta kiertyneestä tubuluksesta ja kokoojaputkesta. [11.] Henlen lingo on osa, johon loop-diureetit vaikuttavat, ja se sijaitsee alhaalla munuaisen ytimessä [9, s. 584]. Vesi ja pienet molekyylit suodattuvat verestä glomeruluksessa, minkä jälkeen vaihteleva määrä molekyylejä imeytyy uudelleen vereen, kun se kulkee munuaisen viiden

eri osan läpi. Glomeruluksessa suodatettua ainesta kutsutaan glomerulusuodokseksi. Se mitä ei imeydy uudelleen takaisin vereen, muodostuu virtsaksi. [11.] Nefronin rakenne ja toiminta on esitetty kuvassa 2.



Kuva 2 Nefronin rakenne ja toiminta [11; 9, s. 581].

Henlen lingossa poistetaan natrium-, kalium- ja kloridi-ionit virtsasta ja ne absorboidaan uudelleen vereen. Henlen lingon kaksi tärkeintä osaa ovat ohut laskeva silmukka, jossa glomerulussuodos kulkee alaspäin, ja paksu nouseva silmukka, jossa suodos kulkee ylöspäin. [11.]

Paksu nouseva silmukka sisältää pylväsmäisiä epiteelisoluja, jotka ovat tiiviisti toisissaan kiinni. Tämä estää veden pääsemisen ulos. Paksun nousevan silmukan epiteelisolut sisältävät Na⁺, K⁺, 2Cl⁻-kuljetusproteiinin, joka siirtää kloridi-, natrium- ja kaliumionit epiteelisolujen läpi munuaistiehyeen tilaan, jonne syntyy korkean konsentraation alue. Korkean konsentraation alue syntyy, kun sinne tulva neste sisältää paljon näitä kolmea ionia. [11.]

Ohuen laskevan silmukan epiteelisolut läpäisevät hyvin vettä, joten vesi virtaa osmoosin vaikutuksesta alhaisen konsentraation alueelta korkean konsentraation alueelle. Alue on sama, jossa nousevasta silmukasta siirretyt ionit ovat.

Ohuessa laskevassa silmukassa suodoksesta liukenee vettä pois, ja nousevassa paksussa silmukassa suodoksesta liukenee ioneja pois.

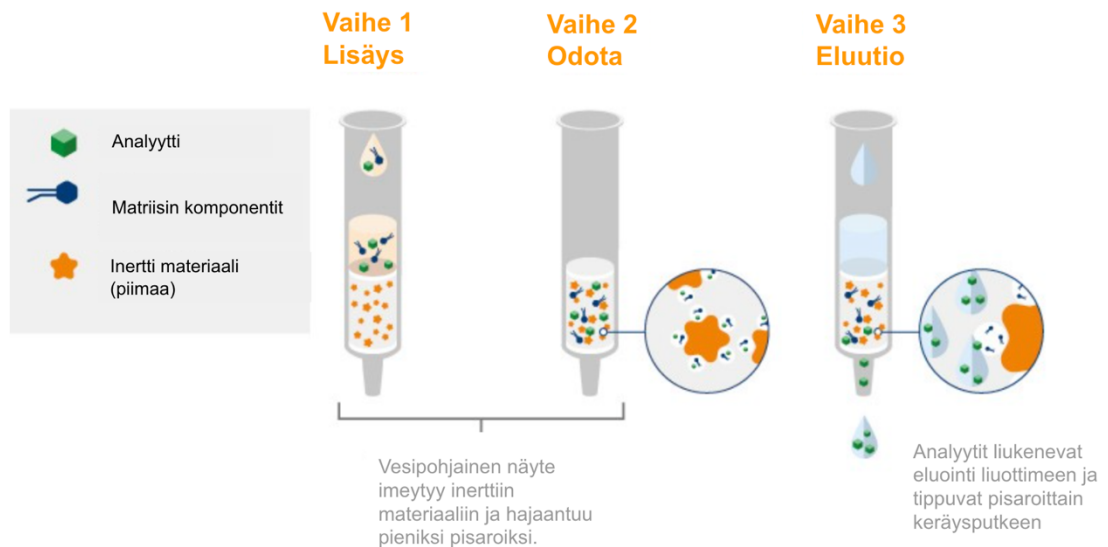
Loop-diureetit toimivat siten, että ne estävät Na^+ , K^+ , 2Cl^- -kuljetusproteiinin toiminnan paksussa nousevassa silmukassa. Tällöin natrium-, kalium- ja kloridi-ioneja ei pääse epiteelisolujen kautta imeytymään korkean konsentraation alueeseen, jolloin alueen nesteen konsentraatio pysyy alhaisena. Koska kyseinen konsentraatio ei nouse, vettä ei myöskään poistu laskevasta silmukasta. Tällöin suodokseen jää enemmän vettä sekä natrium-, kalium- ja kloridi-ioneja, jotka vapautetaan virtsan kautta pois. Tätä järjestelmää, jossa eritetään liuenneita aineita paksusta nousevasta silmukasta veden vetämiseksi ulos ohuesta laskeutuvasta silmukasta, kutsutaan vastavirtakertoimeksi. Diureetit ovat hyvin tehokkaita nesteen poistajia, koska ne estävät 20 % suodatetun natriumin ja 15 % suodatetun veden uudelleen absorboitumisen, mikä ilmenee veden määrästä virtsassa. [11.]

Furosemidi on veteen liukenematon lääkeaine eli pooliton yhdiste [12]. Furosemidin käytöllä on muutamia eri haittavaikutuksia. Todettuja haittavaikutuksia on muun muassa potilaan kuivuminen, verenkiertokollapsi, hypokalemia, neste- ja elektrolyyttitasapainon häiriöt ja ototoxiset haittavaikutukset. Furosemidi lisää myös kefalosporiinien ja aminoglykosidien munuaistoksisuutta. [10.]

5 Tuettu nesteutto

Opinnäytetyössä käytettiin näytteenvalmistuksessa tuettua nesteuttoa (SLE, supported liquid extraction). SLE-menetelmässä käytetään inerttiä materiaalia, joka on pakattu esimerkiksi patruunaan. Inertti materiaali imee itseensä siihen laitetun vesipohjaisen näytteen, esimerkiksi veren, ja pidättää sen sisältämät analyytit [13]. Inertti materiaali koostuu piimaasta, jossa piimaahiukkaset imevät

veden hiukkasten pintaan [14]. Kuvassa 3 on esitetty SLE-uuttomenetelmän vaiheet.



Kuva 3 SLE-uuttomenetelmän vaiheet [14].

Uutossa analysoitava näyte, esimerkiksi veri, lisätään kuivaan patruunaan ja annetaan imeytyä. Imeytymiseen menee yleensä 5–10 minuuttia. Imeytymisen jälkeen, näytteessä olevat analyytit eluoidaan selektiivisesti pois materiaalista lisäämällä veteen sekoittumatonta orgaanista liuotinta patruunaan. Liuottimen annetaan imeytyä käyttämällä joko painovoimaa tai kevyttä painetta apuna. Orgaaninen liuotin kulkee sorbentin läpi ja on samalla siellä olevan näytteen kanssa läheisesti kosketuksissa. Matriisin komponentit jäävät patruunan inerttiin matriisiin. Näytteen analyytit liukenevat käytettäviin liuottimiin ja kulkeutuvat niiden mukana pois patruunasta näytteenkeräysputkeen. [13; 14.]

6 UPLC-PDA-CAD-analyysitekniikka

Validoinnissa furosemidin analysoimiseen käytettiin UPLC-PDA-CAD-analyysitekniikkaa. Erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia (UPLC) on sopiva lääkeainetutkimuksiin, koska se pystyy analysoimaan termisesti epästabiileja,

huonosti haihtuvia ja korkean molekyyllipainon omaavia lääkeaineita. Markkinoilla käytetään analyysitekniikasta kahta lyhennettä UHPLC ja UPLC. Nämä ovat samanlaisia analyysilaitteistoja, mutta UPLC on Watersin oma tavaramerkki. Diodirividetektori (Photodiode-array Detector, PDA-detektori) avulla saadaan analysoitua lääkeaineet, joilla on rakenteessaan kromoforeja. Kaikki lääkeaineet eivät kuitenkaan sisällä kromoforeja, jolloin varautuneen aerosolidetektorin (Charged Aerosol Detector, CAD) käyttäminen PDA-detektorin lisäksi mahdollistaa myös sellaisten lääkeaineiden tutkimisen, joilla ei ole kromoforeja. Kahden eri detektorin käyttö analyysimenetelmässä mahdollistaa kattavan lääkeainetutkimuksen tekemisen. [15.] Tässä luvussa käsitellään syvemmin UPLC-PDA-CAD-analyysitekniikan osat ja niiden toimintaperiaatteet.

6.1 Erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia

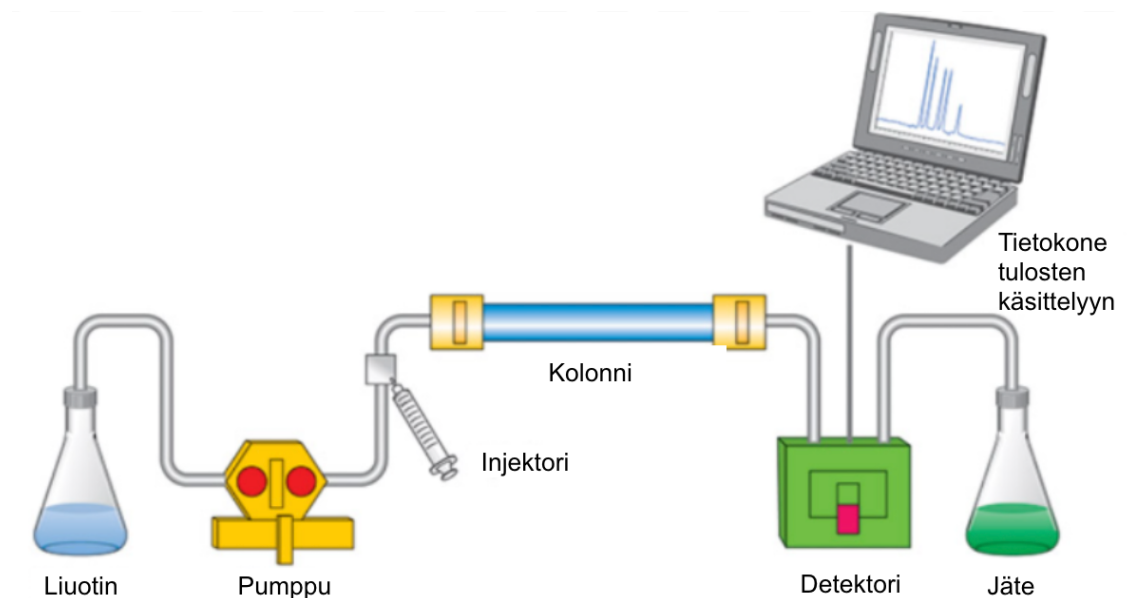
Epäorgaanisten ja orgaanisten yhdisteiden analysoimiseen soveltuu erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia menetelmä (ultra performance liquid chromatography, UPLC). Menetelmä mahdollistaa usean analyytin samanaikaisen tutkimisen. Tutkittavina analyytteina voivat olla esimerkiksi suuret biologiset molekyylit ja lääkeaineet, proteiinit sekä lipidit. [16, s.153]

Kromatografiamenetelmissä lääkeaineiden erottuminen perustuu tasapainoihin ja jakaantumiseen kromatografiakolonnissa. Näyte jaetaan komponenteiksi analyysin aikana, jotta ne voidaan tunnistaa detektorilla ja määrittellä niiden pitoisuudet. Liikkuva faasi ja stationäärifaasi ovat kromatografiakolonnissa kaksi toisiinsa liukenematonta faasia. Näiden faasien välillä näytemolekyylit tasapainottelevat tarttuen toistuvasti stationäärifaasiin ja irtoavat siitä liikkuvaan faasiin, joka kuljettaa niitä eteenpäin. [16, s.140]

Lääkeaineet, jotka sitoutuvat voimakkaasti stationäärifaasiin, kulkevat hitaasti liikkuvan faasin mukana. Heikosti stationäärifaasiin sitoutuvat lääkeaineet liikkuvat nopeasti liikkuvan faasin mukana, koska ne eivät vietä paljon aikaa kiinni stationäärifaasissa. Tämä yhdisteiden erilainen tasapainottelu faasien välillä ja

kulkeutumisnopeus kolonnissa mahdollistaa monien lääkeaineiden samanaikaisen tutkimisen ja erottelun toisistaan. [16, s.140]

UPLC-laitteisto vaatii toimiakseen tutkittavan analyysin nestemäisessä muodossa. Tutkittavan näytteen tulee siis liueta johonkin liuottimeen, jotta se pystytään analysoimaan UPLC-laitteella. Laitteisto koostuu pääosin pumpuista, injektorista, kolonnista ja detektorista tai detektoreista (kuva 4). [16, s.153]



Kuva 4 UPLC-laitteiston osat [17].

Näyte syötetään UPLC-laitteistoon injektorin kautta liikkuvaan nestefaasiin, yleensä injektoitava näytetilavuus on 5–10 µl. Liikkuva nestefaasi on korkean paineen alaisena ja kulkee kapeissa kapillaareissa. Eluentti kuljettaa näytteen mukanaan kolonniin, joka koostuu stationäärifaasista eli pienikokoisista partikkeleista. Partikkelien koko vaikuttaa näytteessä olevien yhdisteiden erottumiseen. Mitä pienempiä stationäärifaasin partikkelit ovat, sitä tehokkaampaa yhdisteiden erottuminen on, koska aktiivinen pinta-ala on suurempi. [16, s.154]

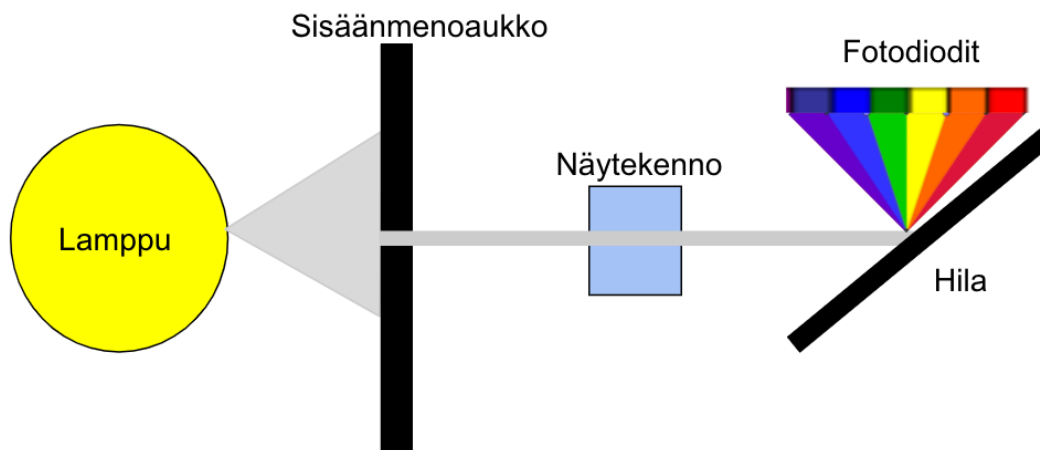
Detektori ilmoittaa yhdisteen signaalin ajan funktiona eli kromatogrammina. Tasapainoon faasin välillä vaikuttaa yhdisteiden poolisuus ja kolonnin materiaali [16, s.154–156]. Opinnäytetyössä käytettiin C18-käänteisfaasikolonnin. Käänteisfaasinimitys tulee siitä, että stationäärifaasi on pooliton ja eluentti poolinen,

normaalifaasikromatografiassa nämä poolisuudet ovat toisinpäin. Kolonnin materiaali C18 on erittäin pooliton, jolloin poolittomat yhdisteet tarttuvat siihen voimakkaasti ja pooliset yhdisteet heikommin. C18-nimitys tulee siitä, että kolonnissa on 18 hiiltä sitoutuneena piidioksidiin. Kolonni sopii hyvin lääkeaineiden analysoimiseen. [16, s.156.] Opinnäytetyössä tutkittava furosemiidi on pooliton lääkeaine, jolloin se tarttuu C18-kolonneihin hyvin [11]. Etuna käänteiskromatografiassa ovat stabiilimmat olosuhteet verrattuna normaalifaasikromatografiaan [16, s.156].

Opinnäytetyössä käytettiin gradienttiajoa. Gradienttiajossa eluentin koostumusta muutetaan portaittain ajon aikana tai jatkuvasti. Eluutiovoimakkuuden kasvattamisella pystytään lyhentämään yhdisteiden retentioaikaa ja gradienttiajoa käyttämällä pystytään analysoimaan monikomponenttisiä näyteseoksia. [18, s. 143.] Heikosti pidätyvät yhdisteet pystytään gradienttiajolla erottamaan selkeästi. Gradienttiajossa voimakkaasti pidätyvien yhdisteiden pohjaluku kasvaa, jolloin kromatogrammille tulevan piikin resoluutio eli kyky erottua kasvaa. [19, s.120]

6.2 Diodirividetektor

Kun tutkittavat yhdisteet absorboivat UV-säteilyn tai näkyvän valon alueilla, parhain detektor niiden analysoimiseen on UV/Vis-detektor. Kyseisen detektorinoudattaa Lambert-Beerin lakia signaalin, piikin korkeuden ja pinta-alan muodostamisessa. UV/Vis-detektoreita on kolmenlaisia: monokromaattori, suodatin tai diodirivi. Diodirivillä varustettu detektor mahdollistaa UV/Vis-spektrin mittaamisen millä tahansa retentioajalla. Opinnäytetyössä käytetty diodirividetektor eli PDA-detektor (Photodiode-array Detector) sisältää deuteriumlampun, joka emittoi valoa 190–600 nanometriä. [16.] Detektor tunnetaan myös nimellä DAD (Diode-Array Detector). Detektorin pääosia ovat lamppu, sisäänmenoaukko, näytekenno, hila ja diodirivi (kuva 5).



Kuva 5 PDA-detektorin pääosat.

Kuvassa 5 säteilylähteestä tuleva valo kulkeutuu sisäänmenoaukon kautta näytekennon läpi hilalle. Hila hajottaa säteilyn eri aallonpituuksiksi, jotka kulkeutuvat hilalta diodeille. Jokainen diodi mittaa yhtä aallonpituutta. [20.]

Ultraviolettisäteilyn ja näkyvän valon spektrialue on aallonpituudeltaan noin 190–1 000 nanometriä. Orgaaniset yhdisteet ovat usein värittömiä, minkä takia ne eivät absorboi näkyvää valoa. Niillä voi olla kuitenkin UV-alueella absorptiota. Yhdisteen kromoforeilla on suuri vaikutus siihen, kykeneekö se absorboimaan UV- ja näkyvän valon säteilyä. Kromoforit ovat molekyylissä olevia rakenneosia esimerkiksi aromaattisia renkaita ja karbonyyliryhmiä. [16, s.54.]

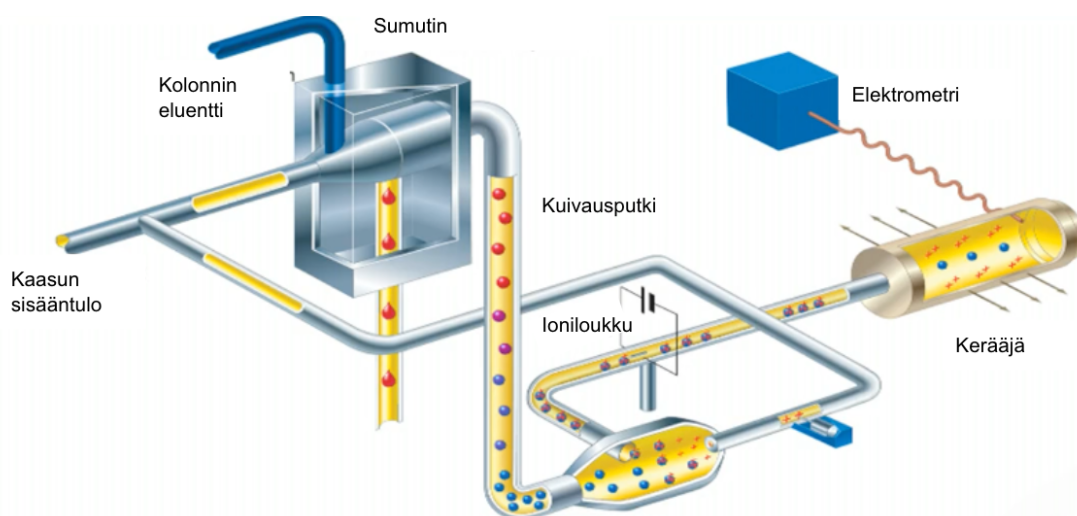
PDA-detektori kykenee mittaamaan useita aallonpituuksia samaan aikaan, mikä on sen yksi eduista. Detektori mittaa sekunnin välien spektrejä samalla, kun UPLC:lla tapahtuu erottumista. Komponentit tunnistetaan näytteestä puhtasaiheen retentioajan perusteella, joten jos retentioajassa on pieni poikkeama, yhdisteiden tunnistaminen voi hankaloitua. Tällaisissa tilanteissa voidaan käyttää apuna komponenttien tunnistamista spektrin vertailulla. [20.]

6.3 Varautuneen aerosolin detektori

Varautuneen aerosolin detektoria (Charged Aerosol Detector, CAD) käytetään tutkittaessa esimerkiksi lääkkeitä, polymeereja ja biomolekyylejä. Detektori

kykenee tunnistamaan haihtumattomia sekä semi-haihtumattomia yhdisteitä. Detektori on sopiva esimerkiksi yhdisteille, jotka eivät sisällä kromoforeja ja joita ei pystytä analysoimaan UV-detektoreilla. CAD-detektoria voidaan käyttää myös yhdessä PDA-detektorin kanssa. Yhteiskäyttö mahdollistaa hyvän analyyttien detektoinnin. [21; 22.] Opinnäytetyössä käytettiin Corona CAD -detektoria.

CAD-detektorissa eluentivirtaus kulkee sumuttimeen, joka muodostaa liuoksesta hienoja pisaroita käyttäen typpikaasua apuna. Pisaroista haihdutetaan liuotin kuivausputkessa, jotta saadaan tuotettua kuivia partikkeleita. Toinen typpi-kaasuvirtaus kulkee korkeajännitteisen koronaneulan ohi, jolloin muodostuu positiivisia typpi-ioneja. Kuivatut partikkelit eli analyyttihiukkaset törmäytetään vastakkaisen ionivirtauksen kanssa reaktiokammiossa, ja törmäys aiheuttaa partikkeleiden aktivoitumisen, koska positiivinen varaus siirtyy analyytteihin. Aktivoitumisen voima riippuu partikkelin koosta. Mitä suurempi partikkeli on kyseessä, sitä voimakkaamman varauksen se saa törmäyksestä. [21.] Kuvassa 6 on esitetty CAD-detektorin pääosat.



Kuva 6 CAD-detektorin pääosat [22].

Ioniloukulla poistetaan ylimääräiset typpi-ionit, jotka eivät reagoineet analyyttipartikkelien kanssa. Varautuneet analyyttipartikkelit kulkeutuvat läpi suodattimesta, joka johtaa sähköä ja mittaa herkällä elektrometrillä partikkelien varauk-

sen. Elektrometri tuottaa signaalin, joka on verrannollinen analyytin pisaran koon ja massaan. Mitä suurempi partikkeli on, sitä suurempi varaus sillä on.

[21.]

7 Furosemidin analysoiminen eri menetelmillä

Opinnäytetyössä on käytetty SLE-uuttomenetelmää lääkeaineiden eristämiseen verinäytteestä. Lääkkeiden eristämiseen on kuitenkin muitakin uuttomenetelmävaihtoehtoja. Tyypillisiä veressä olevien lääkeaineiden eristysmenetelmiä ovat hemolyysi, neste-nesteuutto (liquid-liquid extraction, LLE), kalvosuodatus, anti-koagulaatio, kiinteäfaasiuutto (solid phase extraction, SPE) ja proteiinisaostus [23 s.229]. Furosemidin analysoimiseen verestä on etenkin käytetty SPE- ja LLE-uuttomenetelmiä [24; 25]. SPE- ja LLE-uuttomenetelmillä on saatu tutkimusten mukaan hyviä saantoprosenttituloksia. Nämä kaksi lääkkeiden eristysmenetelmää ovat tarvittaessa hyviä vaihtoehtoja SLE-uuttomenetelmän tilalle.

Analyysilaitteistona furosemidin tutkimisessa on käytetty UV/Vis-spektrofotometriä, kaasu-, ohutkerros- ja nestekromatografia [26]. Kaasukromatografiin sekä nestekromatografiin on usein yhdistetty massaspektrometri [27; 28]. Lääkeaineiden tutkimiseen käytetään usein massaspektrometrisia analyysimetojia. Kuitenkin laajassa kvantitatiivisessa lääkeseulonnassa massaspektrometrinen menetelmä on työläs kalibroinnin ylläpitämisen takia. Korkean erotuskyvyn nestekromatografilla ja kahdella peräkkäisellä detektorilla on todettu olevan korkea suorituskyky samanaikaiseen monikomponenttianalyysiin. Opinnäytetyössä käytettävän menetelmän kalibrointi pysyy vakaana yhden kuukauden ajan, jolloin uuden kalibroinnin tekeminen vaaditaan vain kerran kuukaudessa. Nämä ovat syitä, miksi UPLC-PDA-CAD-analyysitekniikka on hyvä happamien ja neutraalien lääkeaineiden seulontamenetelmänä. [29.] UPLC-analyysimenetelmä on kuitenkin hyvin herkkä, jolloin myös lääkeaineissa olevat epäpuhtaudet tulevat esiin, etenkin mädäntyneissä vainajanäytteissä. Epäpuhtaudet näkyvät kromatogrammissa häiritsevinä signaaleina. Menetelmä tunnistaa myös yhdisteitä, jotka eivät erotu retentioaikojen perusteella ja ilmenevät siten häiritsevinä signaaleina. Lääkeaineille, joille UPLC-PDA-CAD-analyysitekniikka ei ole sopiva,

on kehitetty omat analyysitekniikat Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksella. Näitä lääkkeitä on muun muassa statiinit eli kolesterolilääkkeet.

8 Työn toteutus

Tässä luvussa käydään läpi validoinnin suoritus ja siinä käytetyt laitteet, reagenssit, liuokset ja näytteenkäsittely. Työhön valitut vainajanäytteet valittiin sen mukaan, sisältävätkö ne furosemidia vai ei. Validoinnissa tutkittiin furosemidipitoisuuksia sekä -negatiivisia näytteitä, jotta tietyt validointiparametrit oli mahdollista analysoida. Nollamatriisina käytettiin lampaanverta. Osa validointiparametrien näytteistä tehtiin nollamatriisiin.

8.1 Validointi

Validoinnissa lisättiin NEUT-SEUL-menetelmään furosemidi. Furosemidista on aikaisemmin tehty kyseisellä analyysimenetelmällä kvalitatiivinen analyysi. Opinnäytetyön tarkoituksena oli lisätä furosemidi kvantitatiiviseksi, jotta voidaan suoraan määrittää analyysin pitoisuus verinäytteessä ilman lisätutkimuksia. Validointi suoritettiin käyttäen nestekromatografia ja PDA- ja CAD-detektoreita. Validointi tehtiin oikeuskemian yksikön sisäisen validointiohjeen mukaan [30]. Ennen varsinaisen validoinnin aloittamista suoritettiin esivalidointi, jossa selvitettiin furosemidin kalibrointipiste ja lineaarisuusalue. Sekä esivalidoinnissa että varsinaisessa validoinnissa käytettiin samaa uuttomenetelmää (SLE).

Esivalidoinnissa lineaarisuusalueeksi määritettiin 0,1–20,0 mg/l, jonka mukaan validointiin valittiin kuusi mittauspistettä. Validoitavassa menetelmässä käytetään yhden pisteen kalibrointia, johon valittiin arvoksi 10 mg/l. Lisäksi validoinnissa tarkasteltiin kuinka paljon tulokset eroavat, kun käytetään yhden pisteen kalibrointia tai kuuden pisteen kalibrointia.

Validointiparametrit, joita validoinnissa määritettiin:

- saanto

- toteamisraja
- selektiivisyys
- alempi määritysraja
- laimennetun näyttemäärän verifiointi
- toistettavuus
- oikeellisuus
- näytteiden säilyvyys
- uusittavuus
- suhteellinen matriisiefekti
- laajennettu mittausepävarmuus.

Ylempää määritysrajaa ei erikseen määritetty, koska se on menetelmässä kalibrointisuoran piste (10 mg/l) kymmenkertaisena [30]. Tämä varmistettiin laimennetun näytteen verifiointissa. Näytteet laimennetaan, jos ne ylittävät kalibrointisuoran. Suurin menetelmässä tutkittava 1/10 laimennetun furosemidinäytteen lääkeainepitoisuus voi olla 10 mg/l, jonka todellinen lääkeainepitoisuus on silloin 100 mg/l. Validoinnissa tarkasteltiin vanhojen vainajanäytteiden tuloksia. Näytteiksi valittiin sellaisia, joilla on saatu aikaisemmin positiivinen furosemidituloks. Näytteiden tutkimisella saatiin selville menetelmän toimivuus sekä todellisten positiivisten vainajanäytteiden sijoittuminen kalibrointisuoralle.

Vainajanäytteiden ongelmana on näytteiden rajallinen saatavuus. Tämän vuoksi validoinnissa tarkasteltiin myös, miten laimennettujen näytteiden tulokset eroavat laimentamattomien näytteiden tuloksista. Näin pystyttiin varmistamaan, että oikeellinen tulos saavutetaan silloinkin, kun näytettä on saatavilla vähäinen määrä.

8.2 Laitteet ja reagenssit

Opinnäytetyössä käytettiin taulukon 1 mukaisia datan käsittelyohjelmia ja laitteistoa. Nestekromatografialaitteen ajo-olosuhteet on esitetty liitteessä 1.

Taulukko 1 Opinnäytetyössä käytetyt laitteistot ja datankäsittelyohjelmat.

Laitteisto ja datankäsittelyohjelmat	Valmistaja
XcelVap haihdutin tyypipuhalluksella	Horizon Technology
Acquity UPLC (sisältää automaattisen näytteen­syöttäjän, kolonniuunin, nelikanavaisen pumpun ja PDA-detektorin)	Waters
Corona CAD Ultra detektori	ESA Inc.
Esikolonne: VanGuard Acquity UPLC HSS C18 1.8 µm 2.1 x 150 mm	Waters
Kolonne: Acquity UPLC HSS C18 1.8 µm 2.1 x 150 mm	Waters
Uuttokammio Biotage Pressure+ 48	Biotage
Empower 3/ohjelmisto	Waters

Validoinnissa käytettiin seuraavia reagensseja:

- metanoli, LCMS-laatu, Fluka
- ammoniumkloridi, Merck
- etyyliasetaatti $\geq 99,5$ %, VWR chemicals
- trifluoretikkahappo (TFA), 1 ml:n ampulleissa, Fluka
- 5-metyyli-5-fenyylihydantoiini, sisäinen standardi, Sigma Aldrich
- Furosemidi, + 98,7 %, Dr. Ehrenstorfer.

8.3 Liuosten valmistus

Validoinnissa tehdyt kantaliuokset valmistettiin metanoliin ja ne säilytettiin jääkaapissa. Puhtaasta furosemidista valmistettiin liuokset pitoisuusvälillä 0,001–1 mg/l. A-ajoliuksena käytettiin 0,1-prosenttista trifluoretikkahappoa vedessä ja B-ajoliuksena 100-prosenttista LC-MS-metanolia.

Lampaanveri ja todelliset vainajanäytteet toimivat validoinnissa näytematriiseina. Näytematriiseihin oli lisätty 1 % natriumfluoridia säilöntäaineeksi. Liuoksien valmistamisen tarkemmat tiedot on esitetty liitteessä 2.

8.4 Näytteen käsittely

Näytettä sekä nollamatriisina käytettyä lampaanverta punnittiin koeputkeen 0,500 g ± 0,025 g. Koeputkiin lisättiin 25 µl sisäisen standardin käyttöliuosta ja 500 µl kylläistä ammoniumkloridia. Sen jälkeen putkien sisältö sekoitettiin käytämällä vortex-sekoittajaa minuutin ajan.

Vortex-sekoittajan jälkeen näytteet siirrettiin SLE-putkiin, jotka oli kiinnitetty uutokammioon, joka on varustettu vakuumpumpulla. SLE-putkien alle sijoitettiin kartiopohjaiset keräyskoeputket. Näyte absorboitiin matriisiin vakuumin avulla 5–10 sekunnin ajan ja annettiin imeytyä viisi minuuttia.

SLE-putkien uutossa käytettiin ensimmäisenä uuttoluottimena etyyliasettaattia (1,5 ml) ja toisena uuttoluottimena yksiprosenttista trifluorietikkahappoa (1,5 ml). Liuottimien välissä oli viiden minuutin odotusaika, jotta lisätty liuos kulki SLE-putken läpi kartiopohjaiseen keräyskoeputkeen. Lopussa käytettiin vielä pientä vakuumia 10 sekunnin ajan, jotta saatiin viimeisetkin pisarat koeputkiin. Tämän jälkeen uuttoluotin haihdutettiin typpipuhalluksella XcelVap-haihdutuslaitteessa. Haihdutus kesti noin 20 minuuttia.

Haihdutuksen jälkeen koeputkiin lisättiin 100 µl loppuliuosta (40 % metanoli). Lisäyksen jälkeen koeputkia sekoitettiin vortex-sekoittajalla viiden minuutin ajan ja sitten sentrifugoitiin viisi minuuttia 4000 rpm:ssä (4330 g). Sentrifugin jälkeen näyteputkista pipetoitiin neste 2 ml:n näytteensyöttäjäpulloon, jossa oli 250 µl:n sisäputki.

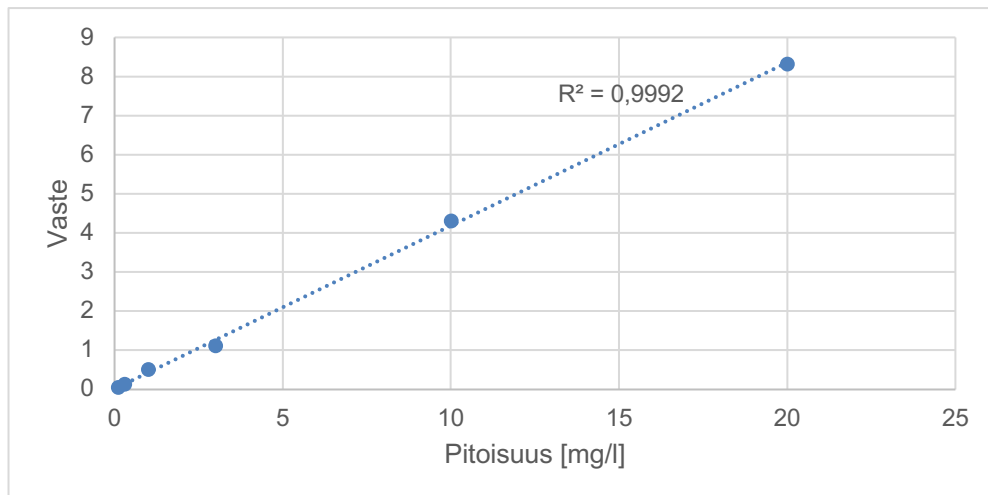
9 Tulokset

Tässä luvussa käsitellään esivalidoinnissa ja validoinnissa saadut tulokset.

9.1 Esivalidointi

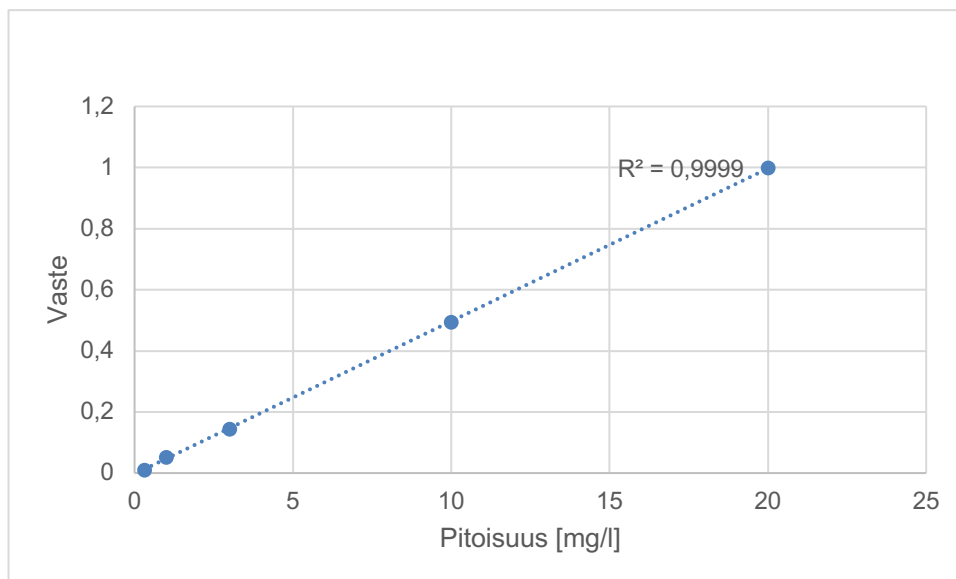
Lineaarisuusaluetta tarkasteltiin 7 pitoisuustasolla, jotka sijoittuvat välille 0,1–50 mg/l. Viimeisinä kalibroitipisteinä olivat pitoisuudet 30 mg/l ja 50 mg/l, jotka menivät laitekapasiteetin yli, joten päädyttiin ottamaan näiden tilalle pitoisuus 20 mg/l. Nollanäytteen avulla pystyttiin varmistamaan, ettei analyysissä ole kontaminaatioita.

Esivalidoinnissa saatujen tuloksia käyttämällä tehtiin lineaarisen mallin kalibroitikuvaaja. Kuvassa 7 on esitetty kuuden pisteen kuvaaja PDA-detektorin puolelta (0,1; 0,3; 1; 3; 10; 20 mg/l). Kalibroitikuvaajan selitysasteen (R^2) tulee olla suurempi tai yhtä suuri kuin 0,995.



Kuva 7 PDA-detektorin 6 pisteen kalibroitikuvaaja.

PDA-puolen (kuva 7) kalibroitikuvaajan selitysasteen arvo osuu halutulle alueelle. CAD-detektori ei ylety pitoisuuksiin 0,1 mg/l, joten usean pisteen kalibroitikuvaaja pystyttiin aloittamaan 0,3 mg/l pitoisuudesta (kuva 8)



Kuva 8 CAD-detektorin 5 pisteen kalibrointisuora.

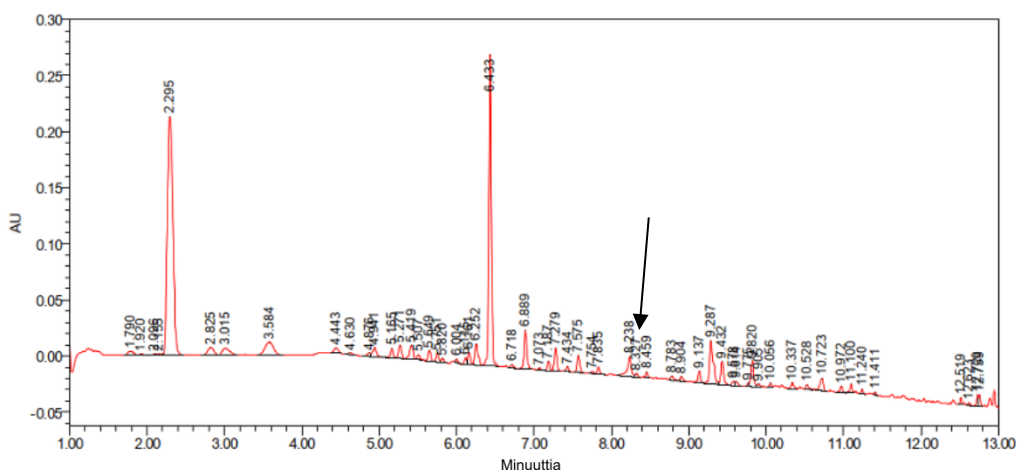
Jokaisesta kalibrointikuvaajasta näkyy, että kalibrointiin käytetyt pitoisuudet osuvat hyvin lineaariselle suoralle. Menetelmässä käytetään yhden pisteen kalibrointikuvaajaa, jonka pisteeksi määritettiin 10 mg/l. Yhden pisteen kalibrointikuvaajalla laskettiin validoinnin tulokset. Toteamisrajan pitoisuudeksi arvioitiin 0,05 mg/l ja alemmaksi määritysrajaksi PDA-detektorille 0,1 mg/l ja CAD-detektorille 0,3 mg/l.

9.2 Selektiivisyys ja spesifisyys

Spesifisyyttä ei määritelty opinnäytetyössä erikseen, koska käytettiin hyvin selektiivistä HPLC-PDA-CAD-tekniikkaa. Selektiivisydessä tarkasteltiin negatiiviksi todettuja vainajanäytteitä ja analyytin kohdalla esiintyviä taustoja. Rinnakkaismäärityksiä tehtiin 10 kappaletta erilaisilla vainajaverinäytteillä, jolloin erilaisten näytematriisien välillä olevat mahdolliset häiriöpiikit saatiin tietoon.

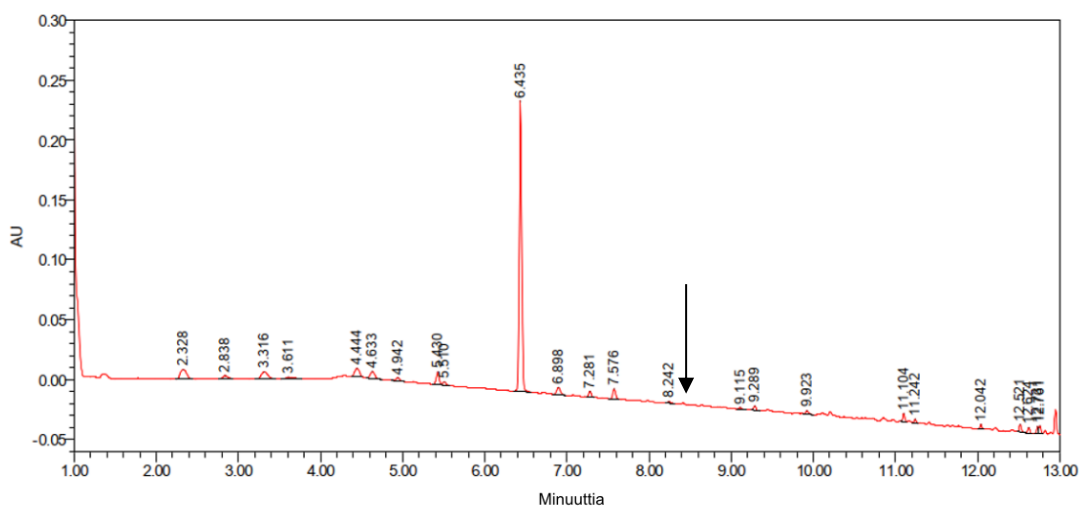
Häiritseviä signaaleja ei pääsääntöisesti esiintynyt. Analyysilaitte teki 4 negatiiviseen vainajanäytteeseen furosemiditunnistuksen. Tunnistukset olivat kuitenkin retentioajoiltaan väärä. Myös PDA- ja CAD-detektoreilta saatujen tuloksien väli-

set suuret erot viittaavat siihen, että tunnistetut piikit ovat epäpuhtauksista johtuvia. Epäpuhtaudet voivat johtua mädäntymisprosessista, jonka näytematriisi on käynyt. Mädäntymisprosessi esiintyy kromatogrammeissa useina pieninä taustapiikkeinä. Kuvan 10 PDA-detektorin kromatogrammissa on esitetty, millaisena mädäntynyt vainajanäyte näkyy analyyseissa. Kuvassa oleva nuoli osoittaa kohdan, jossa furosemidin piikki normaalisti olisi. Furosemidin retentioaika on 8,414 min.



Kuva 9 Mädäntyneen vainajanäytteen PDA-detektorin kromatogrammi.

Normaalissa vainajanäytteessä taustaa esiintyy paljon vähemmän, esimerkkinä tähän on furosemidinegatiivinen näyte PDA-detektorilta (kuva 11). Nuoli osoittaa kohdan, jossa furosemidin piikki olisi.



Kuva 10 Normaalin vainajanäytteen PDA-detektorin kromatogrammi.

Tuloksien pitoisuuksien vastaavuuksia vertaamalla, retentioaikojen tarkistamisella sekä kromatogrammin piikkien puhtausanalyysillä voidaan määrittää, ovatko tunnistetut piikit oikeita tunnistuksia. Menetelmä todettiin riittävän selektiiviseksi erottamaan furosemidi taustasignaaleista.

9.3 Määritys- ja toteamisraja

Määritysrajanäytteet valmistettiin nollamatriisiin pitoisuustasoilla 0,1 mg/l (PDA) ja 0,3 mg/l (CAD). Molemmista pitoisuustasoista tehtiin kolme rinnakkaismäärittystä viitenä päivänä. Koko validoinnin aikana tehtiin yhteensä 15 määrittystä kummallakin pitoisuustasolla. Määritysrajan rinnakkaismääritysten keskiarvo saa poiketa validointisuunnitelman mukaan todellisesta arvosta enintään 20 % (Bias-%) ja rinnakkaismääritysten RDS-% tulee olla ≤ 20 %.

Määritysrajan PDA-detektorin pitoisuusarvoilla laskettujen 0,1 mg/l:n näytteiden RDS-arvoksi saatiin 9,6 %. Pitoisuustason 0,1 mg/l tulokset laskettiin vain PDA-

detektorin tuloksilla, koska CAD-detektori ei kykene tunnistamaan niin pientä pitoisuutta. CAD- ja PDA-detektorien konsentraatioiden keskiarvoilla laskettu 0,3 mg/l:n näytteiden RDS-tulokseksi saatiin 11,8 %, joten molemmat määritysajat pysyvät toivotulla alueella. Poikkeama todellisesta arvosta (bias) laskettiin pitoisuustuloksia käyttämällä. Tulokseksi saatiin 0,1 mg/l pitoisuustasolla 12 % ja 0,3 mg/l pitoisuustasolla 18 %. Tulokset pysyvät tavoitelluissa arvoissa.

Toteamisrajaksi valittiin pienin mahdollinen furosemidipitoisuus, jonka detektorit pystyvät määrittämään vainajanäytteestä. Yhdisteen piikin S/N-arvon tuli olla suurempi tai yhtä suuri kuin kolme. Rinnakkaismääryksiä tehtiin 5 kappaletta yhden ajosarjan aikana, mikä erosi validointisuunnitelmassa olevasta määrästä (3 kappaletta/ajosarja). Yhteensä koko validoinnin aikana toteamisrajanäytteitä analysoitiin 15 kappaletta. Näytteet valmistettiin nollamatriisiin pitoisuustasolla 0,05 mg/l.

Analyysilaitteiston S/N-laskentaohjelma ei ole toiminnassa. Tämän takia toteamisrajan tuloksien S/N-arvojen laskeminen suoritettiin silmämääräisesti arvioimalla kromatogrammeista laskemiseen tarvittavat arvot. S/N-arvoiksi saatiin 1–2. Tulokset jäävät alle 3, johon voi vaikuttaa tuloksien laskemiseen käytetty silmämääräinen arviointi.

9.4 Tarkkuus

Menetelmän tarkkuuden määrittelemiseen kuuluu menetelmän oikeellisuus ja täsmällisyys eli toistettavuus ja uusittavuus. Tarkkuus kuvaa oikean arvon ja analyysituloksen läheisyyttä. Kun suhteellinen poikkeama ja suhteellinen keskihajonta ovat ≤ 20 %, analyysimenetelmä voidaan todeta riittävän tarkaksi. Tarkkuuden analysoimiseen käytettiin nollamatriisiin (lampaanveri) tehtyjä vertailunäytteitä kahdella eri pitoisuustasolla 0,8 mg/l ja 12 mg/l. Molemmille pitoisuustasoille tehtiin yhteensä 6 rinnakkaismäärytystä kolmena päivänä. Koko validoinnin aikana tehtiin yhteensä 18 määrytystä kummallakin pitoisuustasolla.

Poikkeama teoreettisesta pitoisuudesta eli suhteellisen poikkeaman avulla laskettiin oikeellisuus (kaava 1)

$$Bias - \% = \frac{x - T}{T} \cdot 100\% \quad (1)$$

x on mitattujen arvojen keskiarvo

T on teoreettinen arvo.

Suhteellinen poikkeama pitoisuustasolla 0,8 mg/l oli 4,6 % ja 4,5 % pitoisuustasolla 12 mg/l. Suhteellinen poikkeama jäi molemmilla pitoisuuksilla alle 20 %. Tarkkuusosion oikeellisuusnäytteet täyttivät tavoitteen.

Toistettavuus laskettiin suhteellisen keskihajonnan avulla (kaava 2):

$$RSD - \% = \frac{s}{x} \cdot 100 \% \quad (2)$$

s on keskihajonta

x on mitattujen arvojen keskiarvo.

Toistettavuuden suhteellinen keskihajonta pitoisuustasolla 0,8 mg/l oli 6,7 % ja 5,9 % pitoisuustasolla 12 mg/l. Suhteellinen keskihajonta jäi molemmilla pitoisuuksilla alle tavoitellun maksimiprosenttiarvon 20 %. Samalla kaavalla 2 laskettiin myös laitteen toistettavuus.

Laitteen toistettavuus suoritettiin injektoimalla yksi näyte neljä kertaa saman ajon aikana. Laitteen toistettavuus mitattiin kahdessa eri ajosarjassa. Tuloksiksi tuli ensimmäisessä toistettavuustestissä 6,5 % ja toisessa toistettavuustestissä 1,3 %. Tulokset täyttivät tavoitteen.

Toistettavuutta tutkittiin myös aikaisemmin esikäsiteltyjen näytteiden kohdalla. Näytteille laskettiin tulokset vanhalla ja uudella 6 pisteen kalibrintisuoralla sekä vanhalla ja uudella yhden pisteen kalibrintisuoralla. Näitä tuloksia vertailtiin keskenään. Tulokset on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2 Toistettavuustulokset eri kalibrintisuorilla.

Näyte [mg/l]	Vanha 6 pisteen kalibrintisuora (RDS-%)	Uusi 6 pisteen kalibrintisuora (RDS-%)	Vanha 1 pisteen kalibrintisuora (RDS-%)	Uusi 1 pisteen kalibrintisuora (RDS-%)
0,8	9,3	9,2	9,5	9,2
12	6,9	3,4	6,8	3,6

Suhteellinen keskihajonta pysyy 6 pisteen kalibrintisuorilla pienissä pitoisuuksissa samana; suuremmissa pitoisuuksissa on hieman enemmän eroa. Sama näkyy yhden pisteen kalibrintisuorissa. Yleensä suhteellinen keskihajonta pienenee, kun pitoisuus kasvaa. Huomattavaa tuloksissa on se, että suhteellisen keskihajonnan arvot ovat samanlaisia kummallakin suoralla, joten yhden pisteen kalibrintisuora voidaan todeta yhtä toimivaksi kuin useamman pisteen kalibrintisuora.

Menetelmän uusittavuus suoritettiin vertailemalla kahden eri ihmisen saamia tuloksia samasta näytteestä, jonka pitoisuudet tunnetaan. Uusittavuus toteutettiin käyttämällä pitoisuustasoja 0,8 mg/l ja 12 mg/l. Molemmista pitoisuustasoista tehtiin kuusi rinnakkaismäärittystä kolmena päivänä. Koko validoinnin aikana tehtiin yhteensä 18 määrittystä kummallakin pitoisuustasolla.

F-testillä vertaillaan kahden eri otoksen keskihajontoja tai variansseja. T-testillä tutkitaan opinnäytetyössä kahden riippumattoman otoksen keskiarvojen tuloksien yhtäläisyyttä. F- ja T-testin tuloksien laskemiseen käytettiin kahden laboriokerran tuloksia, joissa analyysin tekijä vaihtui. Tuloksista tehdyn F-testin perusteella p-arvoksi saatiin 0,3 pitoisuustasolla 0,8 mg/l ja 0,5 pitoisuustasolla

12 mg/l, luottamustasolla 0,05. Varianssit eivät poikkea tilastollisesti merkitsevästi toisistaan F-testin perusteella. F-testi tehtiin, jotta tiedettiin, mitä t-testiä käytetään. Uusittavuuksien tuloksia tarkasteltiin kahden otoksen t-testillä, jossa varianssit oletettiin yhtä suuriksi. T-testin tuloksien hypoteesit olivat seuraavat:

- P-arvo > luottamustaso (0,05), eli tulokset eivät poikkea tilastollisesti merkitsevästi.
- P-arvo < luottamustaso (0,05), eli ainakin yksi tulos poikkeaa muista tilastollisesti merkitsevästi.

P-arvoksi saatiin 0,0000025 pitoisuustasolla 0,8 mg/l ja 0,009 pitoisuustasolla 12 mg/l, joten tulosten keskiarvot poikkeavat tilastollisesti merkitsevästi luottamustasolla 0,05. Tuloksien RDS-prosentti jää kuitenkin laajennetun mittausepävarmuuden alapuolelle (33 %), jolloin uusittavuuden tulokset ovat hyväksyttäviä. Taulukossa 3 on esitetty uusittavuuden tulokset.

Taulukko 3. Uusittavuustulokset.

Näyte	Keskiarvo [mg/l]		RSD-%
	Henkilö 1 + Henkilö 2	Keskihajonta [mg/l] Henkilö 1 + Henkilö 2	
QC1	0,76	0,08	11
QC2	12,5	0,8	6,4

RSD-prosentti pysyi pienempänä kuin laajennetun mittausepävarmuuden arvo (33 %). Voidaan todeta, että menetelmä on toistettava, vaikka analyysin suorittava henkilö ja uutossa käytettävät välineet vaihtuisivat. Tuloksien laskemiseen käytettiin kaikkien kolmen laboratoriokertojen tuloksia. Tarkemmat tulokset tarkkuudesta on esitetty liitteessä 3.

9.5 Laimennetun näytemäärän verifiointi

Pienimmän näytemäärän verifiointilla varmistetaan laimennettujen näytteiden oikeellisuus. Pitoisuustasosta 12 mg/l valmistettiin 1/10-laimennos ja tehtiin yhteensä 6 rinnakkaismäärittystä. Näytteiden tuloksia verrattiin aikaisemman

ajosarjan oikeellisuusnäytteiden tuloksiin. Tavoitteena oli, että tulokset saavat poiketa toisistaan ± 30 %. Taulukossa 6 on esitetty saadut tulokset, jossa laimennetuissa rinnakkaismäärittelyissä on otettu huomioon laimennuskerroin (10).

Taulukko 4 Pienimmän näytemäärän verifiointitulokset

Näyte	Pitoisuus laimennetusta näytteestä [mg/l]	Laimentamaton pitoisuus [mg/l]	Poikkeama (%)
1	11,6	11,8	1,69
2	11,5	11,9	3,49
3	13,5	12,1	10,6
4	13,7	12,2	10,9
5	13,3	13,1	1,34
6	12,3	12,5	2,39
Poikkeamien keskiarvo [%]	3,09		

Kokonaisuudessaan laimennettujen näytteiden poikkeama toisistaan oli 3 %, joten kriteerit täyttyivät.

9.6 Näytteiden säilyvyys

Tarkoituksena oli analysoida näytteiden säilyvyyttä. Säilyvyyden tarkastelu on tärkeää, jos tulee tilanne, jossa näytteiden analysoiminen laitteilla keskeytyy tai muun asian vuoksi näytteet joudutaan analysoimaan uudelleen. Säilyvyyden tarkastelu toteutettiin käyttämällä näytteitä kahdella eri pitoisuustasolla (0,8 mg/l ja 12 mg/l), joista tehtiin kolme rinnakkaismäärittelyä. Myös kalibrointinäytteet pitoisuustasoilla 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 20 mg/l analysoitiin. Näytteet ajettiin uudelleen 1, 5 ja 8 päivän kuluttua alkuperäisestä analyysistä, jotta vaikutukset näytteiden säilyvyyteen pystyttiin analysoimaan.

Näytteiden säilyvyydessä tutkittiin analyytin ja sisäisen standardin pinta-alojen sekä lasketun pitoisuuden mahdollisia muutoksia esikäsitellyissä näytteissä. Tavoitteena oli, että pitoisuuden muutos alkuperäisestä on $\leq 20\%$ ja piikkien pinta-alat tulisi pysyä hyväksyttävän muotoisina ja kokoisina, jotta näytteen stabiilius tutkitulla aikavälillä olisi riittävä. Taulukossa 4 esitellään lasketut näytteiden säilyvyytulokset.

Taulukko 5. Näytteiden säilyvyyskokeen muutosprosenttitulokset päiväkohtaisesti.

Päivä	Pitoisuustaso 0,8 mg/l	Pitoisuustaso 12 mg/l
5. päivän muutos-%	5,3	3,8
8. päivän muutos-%	14	10

Päivän 5 ja 8 kohdalla päästiin molemmissa pitoisuustasoissa tavoitteisiin. Pitoisuudet kasvoivat ajan funktiona. Prosessoitujen näytteiden säilyvyyden tuloksista voidaan päätellä, että näytteet voidaan uudelleen analysoida kahdeksan vuorokauden jälkeen ilman, että näytteen pitoisuus muuttuisi radikaalisti.

9.7 Uttomenetelmän saantoprosentti

Saantoa varten valmistettiin nollamatriisista kuusi kappaletta näytteitä, joihin lisättiin ennen uuttoja furosemidia pitoisuustasolla 3 mg/l. Nollamatriisista tehtiin myös kuusi kappaletta näytteitä, joihin lisättiin uuton jälkeen sama pitoisuus furosemidia (3 mg/l). Furosemidi lisättiin uuton jälkeen spiikattaviin saantonäytteisiin käyttämällä loppuliuosta, johon oli lisätty furosemidia pitoisuustasolla 3 mg/l. Normaalisti näytteisiin lisätään loppuliuosta, joka on 40 prosenttista metanolia.

PDA- ja CAD-detektorien tuloksien keskiarvojen avulla laskettiin saantoprosentti ja tuloksista tarkasteltiin myös furosemidin pinta-alan ja sisäisen standardin pinta-alan suhteita. Saantoprosentin laskemiseen käytettiin kaavaa 3:

$$\%R = \frac{C_1}{C_2} \cdot 100 \% \quad (3)$$

C_1 on furosemidi konsentraatio, kun lisäys on tehty ennen uuttoa.

C_2 on furosemidi konsentraatio, kun lisäys on tehty uuton jälkeen.

Saantoprosenteiksi tuli PDA-detektorilla 32 % ja CAD-detektorilla 29 %. Saantoprosentiksi tavoitellaan 100 %:a. Jos saantoprosentiksi saa sata prosenttia, se tarkoittaa sitä, että teoreettinen arvo sekä todellinen arvo täsmäävät. Todellinen arvo on kuitenkin usein pienempi kuin teoreettinen, jolloin saantoprosentti jää alle sadan prosentin. Syy tälle on esimerkiksi näyttemäärän menettäminen uuton aikana. [30.]

Jos saantoprosentin haluaisi lähemmäksi sataa, uutomenetelmänä voisi kokeilla esimerkiksi kiinteäfaasiuuttoa tai neste-nesteuuttoa [24;25;31]. Toisen uutomenetelmän avulla voisi saada vähennettyä uuttamisen aikana menetettyä näyttemäärää. Myös saantonäytteen tekeminen eri tavalla voisi vaikuttaa tulokseen. Furosemidi lisäyksen voisi tehdä esimerkiksi pipetoimalla suoraan furosemidia näytepulloon, jossa on jo valmiina loppuliuos. Koska standardit uutetaan samoin kuin tutkittavat näytteet, menetelmällä saatuja pitoisuuksia ei tarvitse korjata saantoprosentilla.

9.8 Laajennettu mittausepävarmuus

Mittausepävarmuuden arvioinnilla nähdään menetelmällä saatujen tuloksien vaihteluväli. Mittausepävarmuus arvioitiin Nordtest TR 537 -oppaan mukaan, käyttäen Mukit-laskentaohjelmaa. Vertailumateriaalina käytettiin tuloksien laskemiseen kahta pitoisuustasoa 0,8 mg/l ja 12 mg/l, joiden epävarmuudeksi arvioitiin 0,5 %. Laskemiseen käytettiin myös rutiininäytteiden rinnakkaismäärittäviä pitoisuustasolla 1 mg/l. Tulokset on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 6 Mukit-raportin tuloksia.

Konsentraatio alue [mg/l]	u (Bias)	u (R _w)	Yhdistetty stan- dardiepävarmuus	Laajennettu mit- tausepävarmuus (95 % luottamustaso)
0,8–12	4,57 %	9,81 %	10,82 %	21,7 %

Taulukon 5 tuloksien laajennettu mittausepävarmuus jää alle ≤ 30 prosenttia. Mukit-laskentaohjelman mukaan laajennettu mittausepävarmuus tulos on hyvä ja täyttää validointisuunnitelmassa määritetyt tavoitteet. Mukit-laskentaohjelma käyttää yhdistetyn standardiepävarmuuden laskemiseen laboratorion sisäistä uusittavuutta (R_w) ja suhteellista poikkeamaa (bias).

Mittausepävarmuus määritettiin myös THL:n validointiohjeen mukaan systemaattisen virheen ja satunnaisvirheen avulla. Systemaattinen virhe arvioitiin kaavalla 4.

$$U1 = \frac{|U1^a| + |U1^b|}{2} \quad (4)$$

$U1^a$ on oikeellisuusnäytteen bias-%.

$U1^b$ on standardilisäysnäytteiden eli matriisiefektin bias-%.

Satunnaisvirhe määritettiin kaavalla 5.

$$U2 = \frac{|U2^a| + |U2^b| + |U2^c|}{3} \quad (5)$$

$U2^a$ on toistettavuusnäytteiden sisäinen hajonta eli RSD-%.

$U2^b$ on uusittavuus- ja toistettavuusnäytteiden RSD-%.

$U2^c$ on standardilisäysnäytteiden RSD-%.

Satunnaisvirheen ja systemaattisen virheen kaavoilla lasketuista tuloksista saatiin selvitettyä mittausepävarmuus U kaavalla 6.

$$U = \sqrt{U1^2 + U2^2} \quad (6)$$

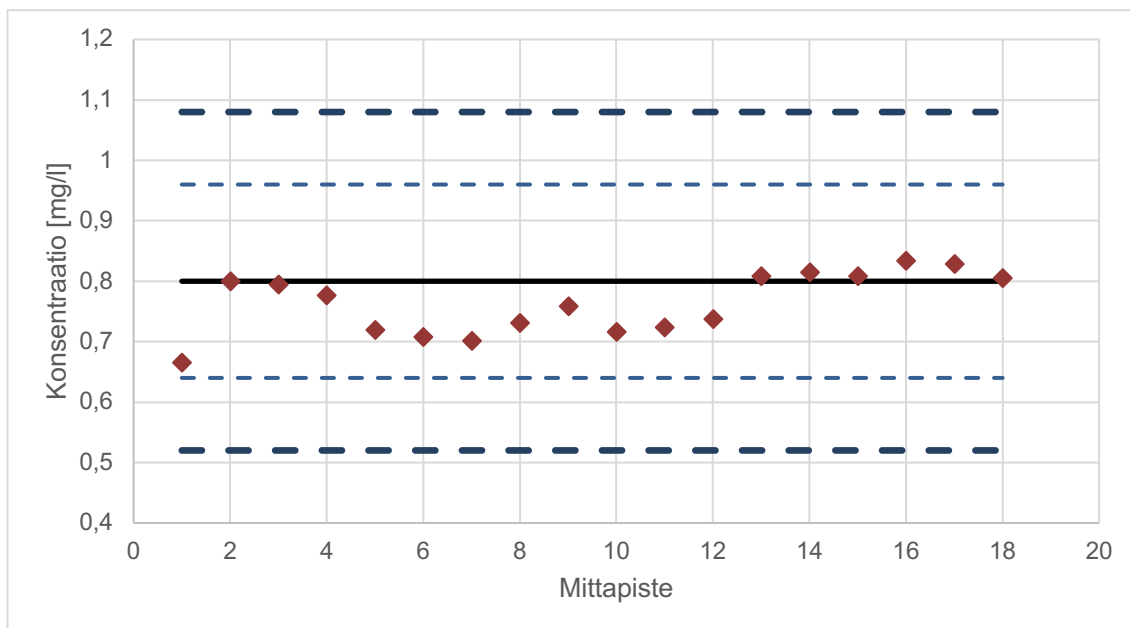
$U1$ on systemaattinen virhe.

$U2$ on satunnaisvirhe.

Mittausepävarmuudeksi saatiin 16 % molemmilla pitoisuustasoilla, joten laajennettu mittausepävarmuus on 33 %. Laajennetun mittausepävarmuustuloksen tulisi olla ≤ 30 %. Kuitenkin analyysimenetelmässä olevilla muilla yhdisteillä on osalla mittausepävarmuudeksi määritetty 35 %, joten tulos on hyväksyttävissä. Validointiohjeen laskentakaavassa käytetään matriisiefektin bias-prosentti arvoa, joka oli suhteellisen korkea. Tämä voi olla syynä laajennetun mittausepävarmuuden korkeaan prosenttiarvoon. Tarkemmat validointiohjeella ja Mukit-laskentaohjelmalla lasketut tulokset on esitetty liitteissä 4 ja 5.

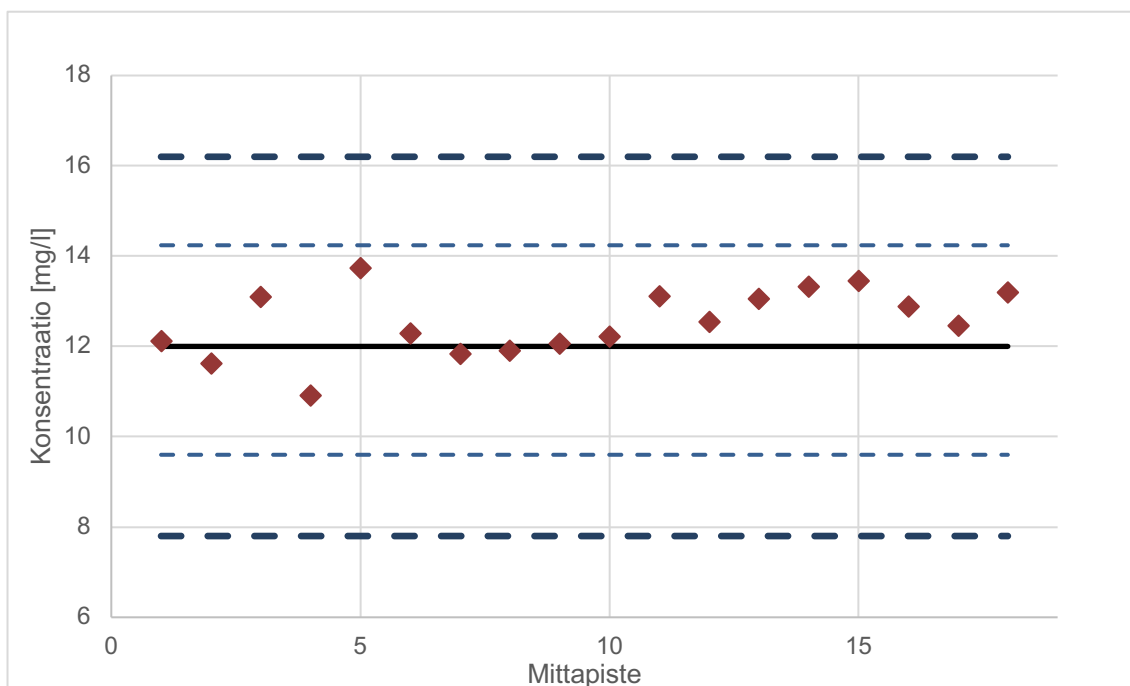
9.9 Valvontakortit

Valvontakortteja käytetään apuvälineinä tilastollisessa laadunvalvonnassa. Valvontakortteihin on määritetty laajennetun mittausepävarmuuden avulla hälytysraja (20 %) ja toimintaraja (35 %). Valvontakortit tehtiin pitoisuuksille 0,8 mg/l ja 12 mg/l. Kuvassa 12 on esitetty kontrollinäytteiden asettuminen valvontakortille pitoisuustasolla 0,8 mg/l.



Kuva 11 Kontrollinäytteiden (0,8 mg/l) asettuminen valvontakorttiin

Alemman kontrollinäytteen pitoisuudet asettuvat valvontakortin keskiviivan molemmille puolille. Kuvassa 13 on esitetty kontrollinäytteiden asettuminen valvontakortille pitoisuustasolla 12 mg/l.



Kuva 12 Kontrollinäytteiden (12 mg/l) asettuminen valvontakorttiin

Suuremman kontrollinäytteen pitoisuudet asettuvat hyvin hälytysrajojen sisäpuolelle.

9.10 Menetelmän toimivuuden testaus

Furosemidiposiitivisia vainajanäytteitä käyttämällä määritettiin menetelmän toimivuus. Määritykseen valittiin 20 aiemmin positiiviseksi todettua vainajanäytettä. Menetelmän toimivuuden testaamisessa määritettiin myös todellisten näytteiden asettuminen yhden pisteen kalibrointisuoralle.

Jokainen positiivisen näytteen tulos osui kalibrointisuoralle hyvin. Jos vainajanäyte ylittää kalibrointisuoran, näyte laimennetaan ja analysoidaan uudelleen, jotta saadaan määriteltyä todellinen pitoisuus. Menetelmä sopii furosemidin analysoimiseen, koska aikaisemmin todettujen pitoisuuksien ja uudella menetelmällä saatujen pitoisuuksien poikkeavuus toisistaan on 6 %. Tarkemmat furosemidiposiitivisten näytteiden tulokset on esitetty liitteessä 6.

9.11 Matriisivaikutus

Suhteellisen matriisiefektin määrittämisellä nähdään, onko näytemateriaalilla vaikutusta tuloksiin. Määritykseen valittiin 10 negatiivista vainajanäytettä, joihin tehtiin standardilisäys furosemidia pitoisuustasolla 1 mg/l. Jokaisesta tehtiin lisäksi 4 rinnakkaista eli yhteensä näytteitä tuli 40 kappaletta. Jokaiselle näytteelle laskettiin rinnakkaisten hajonta (RSD), eri näytteistä saatujen tulosten välinen hajonta (RSD) sekä poikkeama teoreettisesta pitoisuudesta eli bias-%.

THL:n validointisuunnitelman mukaan, jos näytteiden välinen hajonta on yli kolme kertaa suurempi kuin näytteiden sisäinen hajonta ja samanaikaisesti bias-% on teoreettisesta pitoisuudesta ≥ 20 %, voidaan todeta, että matriisiefektiä on. Ulkoisen ja sisäisen hajonnan välinen ero viittaa, kuinka paljon näytematriisi lisää tulokseen epävarmuutta.

Näytteen sisäiseksi hajonnaksi saatiin 3 % ja näytteiden väliseksi 2 %. Näytteiden välinen hajonta pysyy alle kolmen. Bias-%:ksi saatiin 27 %, joka ylittää tavoitellun 20 %. Kuitenkin koska näytteiden välinen hajonta pysyi ≤ 3 , voidaan todeta, ettei matriisiefektiä ole. Tarkemmat tulokset on esitetty liitteessä 7.

10 Yhteenveto

Neutraalien ja happamien lääkeaineiden seulontamenetelmän todettiin soveltuvan furosemidin kvantitatiiviseen analysoimiseen. Furosemidi ei aiheuttanut muiden analyyttien kromatogrammeissa häiriöpiikkejä, eivätkä muut analyytit häirinneet furosemidin määrittämistä. HPLC-PDA-CAD-analyytilaitteisto sopi hyvin furosemidin analysoimiselle. Jos olisi tarve, toisella uuttomenetelmällä, esimerkiksi kiinteäfaasi- tai neste-nesteuutolla, voitaisiin mahdollisesti saada parempi saantoprosentti.

Laajennettu mittausepävarmuus ylitti tavoitellun 30 %:n arvon; kuitenkin osalla seulontamenetelmän muilla analyyteillä mittausepävarmuudeksi on arvioitu 35 %, joten tulos oli hyväksyttävissä. Analyysimenetelmän tarkkuuteen liittyvät tulokset pysyivät tavoitelluissa arvoissa, ja matriisiefektin ei todettu vaikuttavan furosemidin kvantitoimiseen.

Kokonaisuudessa tulokset vastasivat validointisuunnitelmassa asetettuja vaatimuksia ja validointi onnistui hyvin. Seulontamenetelmällä pystytään määrittämään furosemidin pitoisuus PM-verinäytteissä ja yhden pisteen kalibrointisuoraan määritetty pitoisuustaso 10 mg/l kattoi todellisten vainajanäytteiden pitoisuudet hyvin.

Lähteet

- 1 Oikeuslääketieteelliset laboratoriotutkimukset. Verkkoaineisto. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. <<https://thl.fi/fi/palvelut-ja-asiointi/valtion-sosiaali-ja-terveydenhuollon-erityispalvelut/oikeuslaakinta/kuolemansyyn-selvittaminen/oikeuslaaketieteellinen-kuolemansyyn-selvittaminen/oikeuslaaketieteelliset-laboratoriotutkimukset>>. Luettu 14.4.2022.
- 2 Lasten kuolleisuus jatkaa alenemistaan, mutta nuorten kuolleisuudessa on huolestuttavia piirteitä. Verkkoaineisto. Tieto & trendit. <<https://www.stat.fi/tietotrendit/artikkelit/2022/lasten-kuolleisuus-jatkaa-alenemistaan-mutta-nuorten-kuolleisuudessa-on-huolestuttavia-piirteita/>>. Luettu 15.4.2021.
- 3 Huumeisiin ja alkoholiin kuolleita aiempaa enemmän. Verkkoaineisto. Tilastokeskus. <https://www.stat.fi/til/ksyyt/2018/ksyyt_2018_2019-12-16_tie_001_fi.html>. Luettu 15.4.2022.
- 4 Clinical toxicity of furosemide in hospitalized patients: A report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program. Verkkoaineisto. ScienceDirect. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0002870377803372>>. Luettu 19.4.2022
- 5 Mikä on THL? Verkkoaineisto. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. <<https://thl.fi/fi/thl/mika-on-thl>>. Luettu 15.4.2022.
- 6 Oikeuskemia. Verkkoaineisto. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. <<https://thl.fi/fi/thl/organisaatio/osastot-ja-yksikot/valtion-palvelut/oikeuskemia>>. Luettu 15.4.2022.
- 7 Oikeuslääketieteellinen kuolemansyyn selvittäminen. Verkkoaineisto. Terveyden ja hyvinvoinninlaitos. <<https://thl.fi/fi/palvelut-ja-asiointi/valtion-sosiaali-ja-terveydenhuollon-erityispalvelut/oikeuslaakinta/kuolemansyyn-selvittaminen/oikeuslaaketieteellinen-kuolemansyyn-selvittaminen>>. Luettu 15.4.2022
- 8 D. Leeson, Paul; A. St-Gallay, Stephen & C. Wenlock, Mark. 2011. Impact of ion class and time on oral drug molecular properties. Verkkoaineisto. <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2011/MD/C0MD00157K>>. Luettu 15.4.2022.
- 9 S. Charifson, Paul & Walters, W. Patrick. 2014. Acidic and Basic Drugs in Medicinal Chemistry: A Perspective. Verkkoaineisto. <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm501000a#>>. Luettu 14.5.2022

- 10 Koulou, Markku & Tuomisto, Jukka. 2007. Farmakologia ja Toksikologia. 7., uudistettu painos. Jyväskylä. Medicina.
- 11 Watchman, Tom. 2019. How Does Furosemide Work? Understanding Loop Diuretics. Verkkoaineisto. Zerofinals. <<https://zerofinals.com/video/>>. Luettu 15.4.2022.
- 12 Sigma ProductInformation, Furosemide. Verkkoaineisto. Sigma. <<https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/426/819/f4381pis.pdf>>. Luettu 19.4.2022.
- 13 Rury, Maura. 2020. SLE, SPE and LLE- How are Those Different? Verkkoaineisto. Biotage. <<https://sampleprep.biotage.com/expandyourhorizon/sle-spe-and-lle-how-are-those-different>>. Luettu 17.4.2022
- 14 Majors, Ronald E. 2012. Supported Liquid Extraction: The BestKept Secret in Sample Preparation. Verkkoaineisto. LCGC Solutins for separation scientists. <<https://www.chromatographyonline.com/view/efficient-hplc-method-development-and-personal-reflections-0>>. Luettu 5.4.2022
- 15 Rees, Victoria. 2020. How is liquid chromatography used in the pharmaceutical industry?.Verkkoaineisto. European pharmaceutical review. <<https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/116263/how-is-liquid-chromatography-used-in-the-pharmaceutical-industry/>>. Luettu 20.4.2022.
- 16 Niiranen, Jukka & Jaarinen, Soili. 2005. Laboratorion analyysitekniikka.5–6. painos. Helsinki: Edita Prima Oy.
- 17 Aryal, Sagar. 2022. HPLC- Definition, Princible, Parts, Types, Uses. Verkkoaineisto. Microbe Notes. <<https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>>. Luettu 5.4.2022
- 18 Reikkola, Marja-Liisa & Hyötyläinen, Tuulia. 2002. Kolonnikromatografia ja kapillaarielektromigraatiotekniikat. 2., painos. Helsinki, Yliopistopaino.
- 19 Danilo Corradini; Corradini, Danilo; Goddard IWilliam A. & Phillips, Terry M. 2010. Handbook of HPLC. E-kirja. Hoboken CRC Press.
- 20 Princible and Feature of Various Detection Methods. Verkkoaineisto. Hitachi High-Tech CLOBAL. <<https://www.hitachi-hightech.com/global/products/science/tech/ana/lc/basic/course7.html>>. Luettu 14.4.2022.
- 21 Harris Daniel C. 2016. Quantitative Chemical Analysis. 9th Ed. New York: W.H. Freeman and Company.

- 22 Corona Veo Charged Aerosol Detector. Verkkoaineisto. LabTube. <<https://www.labtube.tv/video/MTAyMTUx>>. Luettu 17.4.2022.
- 23 Sample Preparation fundamentals for chromatography. Verkkoaineisto. Agilent. <https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5991-3326EN_SPHB.pdf>. Luettu 19.4.2022.
- 24 Solid phase extraction of furosemide from plasma and urine and subsequent analysis by high-performance liquid chromatography. Verkkoaineisto. ScienceDirect. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378434700825724>>. Luettu 19.4.2022.
- 25 M, Walshe; MT, Kelly & MR, Smyth. 1995. Comparison of two extraction methods for determination of propranolol and furosemide in human plasma by mixed-mode chromatography. Verkkoaineisto. Europe PMC. <<https://europepmc.org/article/MED/8729647>>. Luettu 19.4.2022.
- 26 Nagori, B.P & Solanki, Renu. 2010. RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Furosemide and Amiloride in Tablet Formulation. Verkkoaineisto. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3003178/#CIT3>>. Luettu 19.4.2022.
- 27 Ptacek, P; Vyhnaek, O; Breuel, H. P & Macek, J. 1996. Determination of furosemide in plasma and urine by gas chromatography/mass spectrometry. Verkkoaineisto. National Library of Medicine. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8901149/>>. Luettu 19.4.2022.
- 28 Abdel-Hamid, M.E. 2000. High-performance liquid chromatography-mass spectrometric analysis of furosemide in plasma and its use in pharmacokinetic studies. Verkkoaineisto. National Library of Medicine. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11204745/>>. Luettu 19.4.2022.
- 29 Ojanperä, Ilkka & Viinamäki, Jenni. 2014. Comprehensive non-MS drug screening by UPLC-PDA-CAD with durable quantitative calibration. Verkkoaineisto. ResearchGate. <https://www.researchgate.net/publication/263508524_O31_Comprehensive_non-MS_drug_screening_by_UPLC-PDA-CAD_with_durable_quantitative_calibration>. Luettu 19.4.2022.
- 30 Validointiohje TO-008. Yrityksen sisäinen dokumentti. Terveystieteiden tutkimuskeskus ja hyvinvoinnin laitos.
- 31 Helmenstine, Anne Marie. 2019. Percent Yield Definition and formula. Verkkoaineisto. ThoughtCo. <<https://www.thoughtco.com/definition-of-percent-yield-605899>>. Luettu 16.4.2022.

Nestekromatografian ajo-olosuhteet ja gradientti

Taulukko 1 Analyysimenetelmän ajo-olosuhteet

Ajoaika	20 min
Ajoliuos A	0,1 % trifluorietikkahappo vedessä
Ajoliuos B	LC-MS-metanoli
Huuhteluliuos	10 % metanoli vedessä
Injektio-tilavuus	5 µl
Virtausnopeus	0,4 ml/min
Kolonnin lämpötila	60 °C
CAD (haihdutus lämpötila)	29 °C
CAD (kaasun paine)	35,0 ± 0,5 psi
CAD (kaasun paine)	210–400 nm (kvantitointi & kromatogrammi 230 nm)

Taulukko 2 Analyysimenetelmässä käytetty gradientti

Aika (min)	% A	% B	Virtausnopeus (ml/min)
0–3	90	10	0,4
3–13	90	10	0,4
13–13,5	5	95	0,4
13,5–14	5	95	0,4
14,5–20	1	99	0,4

Liuosten valmistus

Uuttoliuotin: 1000 ml:n mittapulloon lisätään 10 x 1 ml:n TFA-ampulleja ja täytetään etyyliasetaatilla merkkiin.

10 % metanoli: mitataan säilytyspulloon mittalasilla 100 ml metanolia ja 900 ml laboratoriovettä.

Furosemidikantaliuos 1 mg/ml: punnitaan 1,0 mg furosemidia. Pipetoidaan sama määrä metanolia (ml).

Tarkkuustulokset

Taulukko 1 Oikeellisuusnäytteiden tulokset ja bias %

Näyte	Pitoisuustaso 0,8 [mg/l]	Näyte	Pitoisuustaso 12 [mg/l]
QC1.1	0,67	QC2.1	12,1
QC1.2	0,80	QC2.2	11,6
QC1.3	0,79	QC2.3	13,1
QC1.4	0,78	QC2.4	10,9
QC1.5	0,72	QC2.5	13,7
QC1.6	0,71	QC2.6	12,3
QC1.7	0,70	QC2.7	11,8
QC1.8	0,73	QC2.8	11,9
QC1.9	0,76	QC2.9	12,1
QC1.10	0,72	QC2.10	12,2
QC1.11	0,72	QC2.11	13,1
QC1.12	0,74	QC2.12	12,5
QC1.13	0,81	QC2.13	13,0
QC1.14	0,82	QC2.14	13,3
QC1.15	0,81	QC2.15	13,4
QC1.16	0,83	QC2.16	12,9
QC1.17	0,83	QC2.17	12,4
QC1.18	0,81	QC2.18	13,2
Bias %	4,60	Bias %	4,50

Taulukko 2 Toistettavuusanalyysin tulokset pitoisuustasolla 0,8 mg/l.

Näyte	Pitoisuustaso 0,8 [mg/l]
Ajosarja 1	
1	0,67

2	0,80
3	0,79
4	0,78
5	0,72
6	0,71
Ajosarja 2	
1	0,70
2	0,73
3	0,76
4	0,72
5	0,72
6	0,74
Ajosarja 3	
1	0,81
2	0,82
3	0,81
4	0,83
5	0,83
6	0,81
RDS-%	6,70

Taulukko 3 Toistettavuusnäytteiden tulokset pitoisuustasolla 12 mg/l.

Näyte	Pitoisuustaso 12 [mg/l]
Ajosarja 1	
1	12,1
2	11,6
3	13,1
4	10,9
5	13,7

6	12,3
Ajosarja 2	
1	11,8
2	11,9
3	12,1
4	12,2
5	13,1
6	12,5
Ajosarja 3	
1	13,0
2	13,3
3	13,4
4	12,9
5	12,4
6	13,2
RDS-%	5,90

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances		
Pitoisuustaso 12 mg/l		
	<i>Henkilö 1</i>	<i>Henkilö 2</i>
Mean	12,274	13,056
Variance	0,2291248	0,1277002
Observations	6	6
Pooled Variance	0,1784125	
Hypothesized Mean D	0	
df	10	
t Stat	-3,206673487	
P(T<=t) one-tail	0,004692422	
t Critical one-tail	1,812461123	
P(T<=t) two-tail	0,009384845	
t Critical two-tail	2,228138852	

Kuva 1 T-testi pitoisuustasolle 12 mg/l

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances		
Pitoisuustaso 0,8 mg/l		
	<i>Henkilö 1</i>	<i>Henkilö 2</i>
Mean	0,728416667	0,817
Variance	0,000373442	0,0001442
Observations	6	6
Pooled Variance	0,000258821	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	10	
t Stat	-9,537027397	
P(T<=t) one-tail	1,22512E-06	
t Critical one-tail	1,812461123	
P(T<=t) two-tail	2,45024E-06	
t Critical two-tail	2,228138852	

Kuva 13 T-testi pitoisuustasolle 0,8 mg/l

Mittausepävarmuustulokset yrityksen ohjeen mukaan

Taulukko 1 Pitoisuustason 12 mg/l, lähtöarvot mittausepävarmuuden laskentaan.

Suure	Lähtöarvot
Standardilisäys bias-%	26,5
Oikeellisuus bias-%	4,60
Toistettavuus ja uusittavuus RSD-%	5,90
Toistettavuus RSD-%	5,90
Matriisiefektin RSD-%	3,10

Taulukko 2 Mittausepävarmuustulokset pitoisuustasolle 12 mg/l.

Suure	Tulos
Systemaattinen virhe (U1)	15,6
Satunnaisvirhe (U2)	4,90
Mittausepävarmuus (U)	16,3
Laajennettu mittausepävarmuus (2*U)	33,0

Taulukko 3 Pitoisuustason 0,8 mg/l, lähtöarvot mittausepävarmuuden laskentaan.

Suure	Lähtöarvot
Standardilisäys bias-%	26,5
Oikeellisuus bias-%	4,50
Toistettavuus ja uusittavuus RSD-%	6,70

Toistettavuus RSD-%	6,70
Matriisiefektin RSD-%	3,10

Taulukko 4 Mittausepävarmuustulokset pitoisuustasolle 0,8 mg/l.

Suure	Tulos
Systemaattinen virhe (U1)	15,5
Satunnaisvirhe (U2)	5,50
Mittausepävarmuus (U)	16,4
Laajennettu mittausepävarmuus (2*U)	33,0

Mukit-raportti

MEASUREMENT UNCERTAINTY ESTIMATION

Step	Action	Furosemidin kvantitatiivinen määrittäminen verestä	4/19/2022																														
1	Specify Measurand	Measurand: Furosemidin konsentraatio Concentration range: 0.5 - 12 mg/l Sample Type (Matrix): Post mortem-veri Analysis Principle (Analyzer etc.): HPLC-PDA-CAD Sample preparation: SLE																															
2	Quantify within-laboratory reproducibility, $u(R_w)$ A: Control sample B: Possible steps not covered by control sample	A: Control samples: Number of control samples: 18 Average concentration: 0.76322 mg/l Standard deviation, s_{RW} : 6.67 % B: Routine replicate samples : Number of routine replicate series: 40 Number of parallel measurements: 2 Concentration range: 0.578 - 0.949 mg/l Pooled standard deviation, s_r : 7.19 % $u(R_w) = \sqrt{s_{RW}^2 + s_r^2} = 9.81 \%$																															
3	Quantify method and laboratory bias, $u(bias)$	Method and laboratory bias from certified reference material: Different certified reference materials count, N : 2 <table border="1"> <thead> <tr> <th>i</th> <th>1</th> <th>2</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Certified concentration, $c_{ref i}$</td> <td>0.8 mg/l</td> <td>12 mg/l</td> </tr> <tr> <td>Standard uncertainty of certified concentration, $u(c_{ref i})$</td> <td>0.50 %</td> <td>0.50 %</td> </tr> <tr> <td>Measured concentration, c_i</td> <td>0.76322 mg/l</td> <td>12.53944 mg/l</td> </tr> <tr> <td>Standard deviation of measured concentration, s_{bias}</td> <td>6.67 %</td> <td>5.90 %</td> </tr> <tr> <td>Number of Measurements, n_i</td> <td>18</td> <td>18</td> </tr> <tr> <td>$bias_i = \frac{c_i - c_{ref i}}{c_{ref i}} \cdot 100\%$</td> <td>-4.60 %</td> <td>4.50 %</td> </tr> <tr> <td>Period of measurements</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sample Type (Matrix)</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Additional information</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> $u(c_{ref}) = \frac{\sum_{i=1}^N u(c_{ref i})}{N} = 0.50 \%$ $RMS_{bias} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N bias_i^2}{N}} = 4.55 \%$ $u(bias) = \sqrt{RMS_{bias}^2 + u(c_{ref})^2} = 4.57 \%$	i	1	2	Certified concentration, $c_{ref i}$	0.8 mg/l	12 mg/l	Standard uncertainty of certified concentration, $u(c_{ref i})$	0.50 %	0.50 %	Measured concentration, c_i	0.76322 mg/l	12.53944 mg/l	Standard deviation of measured concentration, s_{bias}	6.67 %	5.90 %	Number of Measurements, n_i	18	18	$bias_i = \frac{c_i - c_{ref i}}{c_{ref i}} \cdot 100\%$	-4.60 %	4.50 %	Period of measurements	-	-	Sample Type (Matrix)			Additional information			
i	1	2																															
Certified concentration, $c_{ref i}$	0.8 mg/l	12 mg/l																															
Standard uncertainty of certified concentration, $u(c_{ref i})$	0.50 %	0.50 %																															
Measured concentration, c_i	0.76322 mg/l	12.53944 mg/l																															
Standard deviation of measured concentration, s_{bias}	6.67 %	5.90 %																															
Number of Measurements, n_i	18	18																															
$bias_i = \frac{c_i - c_{ref i}}{c_{ref i}} \cdot 100\%$	-4.60 %	4.50 %																															
Period of measurements	-	-																															
Sample Type (Matrix)																																	
Additional information																																	

about:blank

19.4.2022

Nordtest Report

Page 2 of 2

4	Convert components to standard uncertainty	$u(R_w) = 9.81 \%$ $u(bias) = 4.57 \%$
5	Calculate combined standard uncertainty, u_c	$u_c = \sqrt{u(R_w)^2 + u(bias)^2} = 10.82 \%$
6	Calculate expanded uncertainty, U	$U = 2 \cdot u_c = 21.7 \%$

Kuva 14 Mukit-raportti

Furosemidiposiitivisten näytteiden tulokset

Taulukko 1 Furosemidiposiitivisten näytteiden tulokset

Näyte	Keskiarvo pitoisuudesta [mg/l]	Aiemmin todettu [mg/l]
Pos1	2,9	2,7
Pos2	1,1	1,1
Pos3	0,1	<1
Pos4	2,3	1,6
Pos5	1,2	1,2
Pos6	2,8	1,8
Pos7	0,4	0,98
Pos8	1,1	1
Pos9	3,1	2,3
Pos10	1,4	1,2
Pos11	1,3	1,2
Pos12	5,8	4,7
Pos13	3,1	3,9
Pos14	3,5	3
Pos15	6,9	9,1
Pos16	2,1	2,1
Pos17	1,3	1,9
Pos18	2,4	2,4
Pos19	3,6	2,6
Pos20	4,9	5

Matriisivaikutuksen tulokset

Taulukko 1 Matriisivaikutuksen tulokset

Näyte	Pitoisuus [mg/l]
M1.1	0,66
M1.2	0,68
M1.3	0,58
M1.4	0,64
M2.1	0,71
M2.2	0,69
M2.3	0,71
M2.4	0,72
M3.1	0,69
M3.2	0,68
M3.3	0,67
M3.4	0,70
M4.1	0,74
M4.2	0,73
M4.3	0,71
M4.4	0,68
M5.1	0,59
M5.2	0,59
M5.3	0,60
M5.4	0,63
M6.1	0,79
M6.2	0,78
M6.3	0,88
M6.4	0,82
M7.1	0,76
M7.2	0,76
M7.3	0,69
M7.4	0,74
M8.1	0,77
M8.2	0,78
M8.3	0,77
M8.4	0,81
M9.1	0,82
M9.2	0,77
M9.3	0,90

M9.4	0,70
M10.1	0,86
M10.2	0,95
M10.3	0,82
M10.4	0,84
Näytteen sisäinen RSD-%	3,1
Näytteiden välinen RSD-%	2,1
Näytteen sisäinen Bias-%	-26,5