



Jasmina Mäntynen

Statiinien kvantitatiivisen analyysimenetelmän validointi verinäytteille LC-MS/MS-analyysitekniikalla

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

4.8.2022

Tiivistelmä

Tekijä:	Jasmina Mäntynen
Otsikko:	Statiinien kvantitatiivisen analyysimenetelmän validointi verinäytteille LC-MS/MS-analyysitekniikalla
Sivumäärä:	42 sivua + 7 liitettä
Aika:	4.8.2022
Tutkinto:	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat:	Oikeuskemisti Antti Jylhä Lehtori Mia Ruismäki

Opinnäytetyö tehtiin Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen oikeuskemian yksikössä Helsingin toimipisteellä. Opinnäytetyön tavoitteena oli validoida kvantitatiivinen määritysmenetelmä statiineille veri- ja seeruminäytteistä käyttämällä LC-MS/MS-analyysitekniikkaa. Validoinnin avulla selvitettiin menetelmän toimivuus.

Statiinit ovat kohonneen kolesterolin hoidossa käytettäviä lääkkeitä. Statiinit estävät solujen kolesterolisynteesiä. Suomessa on markkinoilla kuusi eri statiinia: atorvastatiini, rosuvastatiini, simvastatiini, lovastatiini, fluvastatiini ja pravastatiini. Tässä opinnäytetyössä validoitiin kaikkien muiden statiinien, paitsi pravastatiinin analyysimenetelmä.

Validoinnissa tutkittiin seuraavia validointiparametreja: selektiivisyys, toteamisraja, alempi määrittämiss raja, saanto, oikeellisuus, toistettavuus, prosessoitujen näytteiden säilyvyys, uusittavuus, mittausepävarmuus, matriisivaikutus ja laimennettujen näytteiden poikkeavuus. Lisäksi atorvastatiinin ja rosuvastatiinin kohdalla uuden määritysmenetelmän tuloksia verrattiin vanhalla määritysmenetelmällä saatuihin tuloksiin. Simvastatiinin, lovastatiinin ja fluvastatiinin kohdalla vertailua ei voitu tehdä, sillä niitä ei ole aikaisemmin analysoitu.

Validoinnin perusteella määritysmenetelmä sopii hyvin atorvastatiinin ja rosuvastatiinin määritykseen. Fluvastatiinin, lovastatiinin ja simvastatiinin osalta validointi hylättiin. Niille tilattiin uudet deuteroidut sisäiset standardit menetelmän luotettavuuden ja toistettavuuden parantamiseksi. Lisäksi ennen menetelmän käyttöönottoa uuttoa muokataan, jotta näytteistä saadaan puhtaampia. Näiden muutosten jälkeen menetelmä validoidaan käyttöön.

Avainsanat: LC-MS/MS, massaspektrometria, statiinit, lääkkeitä sisältävä verinäyte.

Abstract

Author: Jasmina Mäntynen
Title: Validation of the Quantitative analysis method of Statins using the LC-MS/MS-analysis technique
Number of Pages: 42 pages + 7 appendices
Date: 15 July 2022

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

The study was carried out for the National Institute for Health and welfare in Helsinki. The aim of the thesis was to validate the method of quantitative determination of statins in blood and serum samples by LC-MS / MS analysis technique. The functionality of the method was determined by validation.

Statins are drugs used to treat high cholesterol. Statins inhibit cellular cholesterol synthesis, i.e., inhibit cells from making cholesterol. There are six different statins on the market in Finland: atorvastatin, rosuvastatin, simvastatin, lovastatin, fluvastatin and pravastatin. In this study, the assay methods for five statins (atorvastatin, rosuvastatin, simvastatin, lovastatin, and fluvastatin) were validated.

The following validation parameters were considered for validation: selectivity, limit of detection, lower limit of determination, yield, accuracy, reproducibility, stability of processed samples, reproducibility, measurement uncertainty, matrix effect and deviation of diluted samples. In addition, for atorvastatin and rosuvastatin, the results of the new assay were compared with those of the old assay. For simvastatin, lovastatin and fluvastatin, a comparison could not be made as these had not been previously studied in the National Institute for Health and welfare.

Based on the validation, the assay method is well suited for the assay of atorvastatin and rosuvastatin. For fluvastatin, lovastatin and simvastatin, validation was rejected. New deuterated internal standards were ordered for fluvastatin, lovastatin, and simvastatin to improve method reliability and reproducibility. In addition, before introducing the method, the extraction is modified to make the samples cleaner. The method is then verified for use.

Keywords: LC-MS/MS, mass spectrometry, statins, drug concentration in blood.

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Statiinit kolesterolilääkkeenä	2
2.1	Kolesteroli	2
2.2	Korkean kolesterolin lääkehoito	2
2.3	Haitta- ja yhteisvaikutukset	4
3	LC-ESI-MS/MS-analyysitekniikka	5
3.1	Nestekromatografia	5
3.2	Massaspektrometria	6
3.3	Kolmoiskvadrupoli	8
3.4	Vaihtoehtoisia analyysimenetelmiä	11
4	Post mortem -analytiikan haasteet	12
4.1	Verinäytteet	12
4.2	Kuoleman jälkeiset muutokset verinäytteissä	13
4.3	Vaihtoehtoisia uuttomenetelmiä	14
5	Työn toteutus	16
5.1	Laitteet ja reagenssit	16
5.2	Näytteiden esikäsittely	17
5.3	Menetelmän kehitys	17
5.4	Validointi	21
6	Tulokset	22
6.1	Selektiivisyys	22
6.2	Matriisiefekti	23
6.3	Alempi määritysraja	23
6.4	Toteamisraja	24
6.5	Tarkkuus	25
6.5.1	Oikeellisuus	25
6.5.2	Toistettavuus	26
6.5.3	Uusittavuus	28

6.6	Prosessoitujen näytteiden säilyvyys	28
6.7	Saantoprosentti	30
6.8	Pienemmän näytemäärän verifiointi	31
6.9	Mittausepävarmuus	32
6.10	Menetelmän toimivuus vanhoilla positiivisilla näytteillä	34
6.11	Kontaminaatiotestaus	36
6.12	Valvontakortit	37
7	Johtopäätökset	38
	Lähteet	42

Liitteet

Liite 1: Nestekromatografian ajo-olosuhteet

Liite 2: Matriisiefektin mittaus- ja laskutulokset

Liite 3: Tarkkuusnäytteiden mittaustulokset

Liite 4: Laitteen toistettavuuskokeiden mittaustulokset

Liite 5: Uusittavuuskokeiden mittaustulokset

Liite 6: MuKit-raportit

Liite 7: Valvontakortit

Lyhenteet

- APCI: *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*. Kemiallinen ilmanpaineionisaatio.
- API: *Atmospheric Pressure Ionization*. Ilmanpaineionisaatio.
- ESI: *Electron spray ionisation*. Sähkösumutusionisaatio.
- LC: *Liquid Chromatography*. nestekromatografi. Molekyylien erotteluun käytetty tekniikka.
- MS/MS: *Tandem mass spectrometry*. Tandem-massaspektrometri. Kolmesta kvadrupolista koostuva massa-spektrometrinen analyysilaitteisto.
- PM: *Post mortem*. Kuoleman jälkeen.
- PMR: *Post mortem Redistribution*. Kuoleman jälkeinen lääkeaineiden uudelleen jakautuminen elimistössä.
- QC-näyte: *Quality control sample*. Laadunvarmistusnäyte.
- S/N: *Signal to noise*. Signaali-kohinasuhde. Hyötysignaalin voimakkuuden suhde kohinan voimakkuuteen.
- TCA: *Trichloroacetic acid*. Trikloorietikkahappo.
- THL: Terveyden ja hyvinvoinnin laitos.

1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) oikeuskemian yksikössä oikeustoksikologian osastolla. Oikeustoksikologian osasto tekee oikeustoksikologisia ja päihdetestauksen piiriin kuuluvia laboratoriotutkimuksia, laatii asiantuntialausuntoja, arvioi ja kehittää päihdetestauksen käytäntöjä ja menetelmiä, tutkii päihteiden ja uusien muuntohuumeiden käyttöä sekä esiintyvyyttä moderneja päihdeanalyttisiä menetelmiä hyödyntäen. Oikeustoksikologian osasto toimii myös referenssilaboratoriona ja välittää huumausaineiden käyttöä koskevaa tietoa kansallisesti ja kansainvälisesti sekä toimii kansallisena asiantuntijana oikeustoksikologiaan liittyvissä kysymyksissä. Oikeustoksikologian laboratorio on akkreditoitu ja noudattaa SFS-EN ISO/IEC 17025:2017 -laatustandardia. [1.]

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli validoida kvantitatiivinen määritysmenetelmä statiineille veri- ja seeruminäytteistä LC-MS/MS-analyysitekniikalla. Suomessa markkinoille on hyväksytty kuusi statiinia, joista aikaisemmin THL:llä on analysoitu vain kahta: rosuvastatiinia ja atorvastatiinia. Uusi statiinien määritysmenetelmä sisältää viisi statiinia: atorvastatiini, rosuvastatiini, simvastatiini, lovastatiini ja fluvastatiini. Statiineja käytetään korkean kolesterolin hoidossa. Statiinit estävät kolesterolisynteesiä soluissa ja näin ollen alentavat kolesterolin määrää.

Opinnäytetyön tavoitteena oli validoida kyseinen uusi määritysmenetelmä ja tarkastella sen toimivuutta. Ennen validointia tehtiin validointisuunnitelma ja validointitulosten perusteella laadittiin validointiraportti, jotka ovat myös osana tätä opinnäytetyötä.

2 Statiinit kolesterolilääkkeenä

2.1 Kolesterol

Kolesterol on rasvan kaltainen aine, joka liikkuu verenkierrossa. Elimistö pystyy valmistamaan kolesterolia itse ja lisäksi sitä saadaan ravinnosta. Kolesterolia tarvitaan esimerkiksi D-vitamiinin, sappihappojen ja hormonien tuotantoon, ja siksi kolesterol on elimistölle välttämätön aine. [2.]

Kolesterol liikkuu verenkierrossa kuljetusproteiinien sisällä, mitä kutsutaan lipoproteiineiksi. Lipoproteiineja on kahdenlaisia: LDL- ja HDL-lipoproteiinit. LDL-lipoproteiinit kuljettavat kolesterolia verestä kudoksiin, ja siksi sitä kutsutaankin puhekielessä ”huonoksi kolesteroliksi”. HDL-lipoproteiinit kuljettavat kolesterolia kudoksista pois ja valtimoiden seinämistä takaisin verenkiertoon ja maksaan. HDL-kolesterol on puhekielessä tunnettu ”hyvänä kolesterolina”. [2.]

Liiallinen LDL-kolesterolin määrä elimistön verenkierrossa on haitallista. Kolesterol kertyy valtimoiden seinämiin ja aiheuttaa niiden ahtautumista. Ahtautuneet verisuonet lisäävät riskiä sairastua sepelvaltimotautiin ja aivoverenkierron häiriöihin. Kolesteroliarvon säännöllisellä mittauksella voidaan arvioida verisuonten ahtautumisen vaaraa. Kolesterol voidaan pyrkiä alentamaan esimerkiksi ravitsemuksen ja elämäntapamuutosten avulla. Suuren verisuonten ahtautumisen riskin tapauksissa myös lääkehoito on tarpeen. [2.]

2.2 Korkean kolesterolin lääkehoito

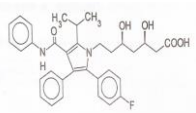
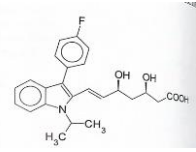
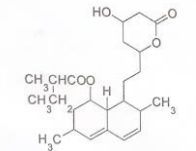
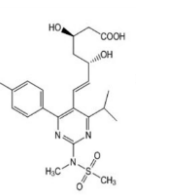
Statiinit ovat tärkein kolesterolilääkkeiden ryhmä. Statiinit estävät kolesterolisynteesiä, eli soluja valmistamasta kolesterolia. [3.]

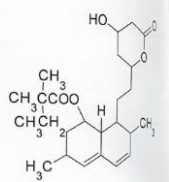
Kolesterolisynteesin alkuvaiheessa maksassa 3-hydroksi-3-metyyliglutaryyli-koentsyymi A:sta (HMG-CoA) muodostuu mevalonaattia HMG-CoA-reduktaasin katalysoimana. Statiinit vaikuttavat estämällä HMG-CoA-reduktaasin toimintaa. Kolesterolin määrän väheneminen maksassa aiheuttaa maksasolujen LDL-re-

septorien määrän kasvun. LDL-reseptorien määrän kasvu pyrkii kompensoimaan maksan pienentyntä sterolipitoisuutta, ja reseptorien määrän kasvun vuoksi maksa ottaa verenkierrosta enemmän LDL-kolesterolia, jolloin LDL-kolesterolin määrä veressä vähenee. Kolesterolisynthesin eston vuoksi kokonais- ja LDL-kolesterolipitoisuudet veressä pienentyvät. [4, s. 733.]

Suomessa käyttöön on rekisteröity kuusi statiinia: atorvastatiini, fluvastatiini, lovastatiini, pravastatiini, rosuvastatiini ja simvastatiini. Tässä opinnäytetyössä valittiin määritysmenetelmä atorvastatiinille, fluvastatiinille, lovastatiinille, rosuvastatiinille ja simvastatiinille. Statiinit ovat keskenään hyvin samankaltaisia yhdisteitä. Niiden suurimmat erot ovat niiden farmakologisissa ominaisuuksissa. Taulukossa 1 on esitetty opinnäytetyössä käytettävien statiinien farmakokineettisiä ominaisuuksia. [4, s. 734.]

Taulukko 1. Statiinien farmakokineettisiä ja kemiallisia ominaisuuksia. [4, s. 734; 5; 6; 7; 8; 9; 10].

Statiini	Kemiallinen kaava	Moolimassa (g/mol)	T _{1/2} (h)	Metaboloiva entsyymi
Atorvastatiini		558,6	14	CYP3A4
Fluvastatiini		411,5	0,5–1	CYP2C9
Lovastatiini		404,5	2	CYP3A4
Rosuvastatiini		481,5	19	CYP2C9

Simvastatiini		418,6	2	CYP3A4
---------------	---	-------	---	--------

Statiinit vähentävät tehokkaasti LDL-kolesterolin määrää, mutta statiineilla ei ole kovin suurta HDL-kolesterolin määrää lisäävää vaikutusta. Monissa tutkimuksissa on osoitettu, että statiinit vähentävät sepelvaltimotautiin liittyvää sairastuvaisuutta ja kuolleisuutta. Niillä on myös kasvava merkitys sepelvaltimotaudin sekundaari- ja primaaripreventiossa. Statiineja voidaan yhdistää myös muihin lipidilääkkeisiin, kuten esimerkiksi resiineihin ja etsetimibiin. [4.] Taulukossa 2 on esitetty statiinien hoitoalueet pitoisuuksina veressä.

Taulukko 2. Statiinien hoitoalueet veressä. [11; 12; 13; 14; 15].

Statiini	Hoitoalue veressä
Atorvastatiini	0,003–0,01 mg/l
Fluvastatiini	0,01–0,5 mg/l
Lovastatiini	0,05–10 µg/l
Rosuvastatiini	0,005–0,05 mg/l
Simvastatiini	0,5–10 µg/l

2.3 Haitta- ja yhteisvaikutukset

Usein statiinit ovat hyvin siedettyjä lääkkeitä. Statiineja käytettäessä haittavaikutuksia voivat olla esimerkiksi seerumin transaminaasiaktiivuuksien nousu, jota esiintyy noin 0,5–2 %:lla käyttäjistä. Statiinien käyttäjillä tavataan

myös oireetonta kreatiinifosfokinaasiarvon nousua. Myopatiaa, johon liittyy voimakas kreatiinikinaasiin nousu, esiintyy noin 0,2 %:lla käyttäjistä. Rabdomyolyyisin aiheuttama munuaisvaurio on mahdollinen, mutta erittäin harvinainen komplikaatio. Markkinoilta poistuneen serivastatiinin käyttöön liittyi vakavia kuolemaan johtaneita lihaskudoksen äkillisiä vaurioita. Yleisin haittavaikutus on lihaskipu tai -heikkous, jota esiintyy 5 % käyttäjistä ja on tavallisin syy lääkityksen lopettamiseen. Muutokset ovat kuitenkin palautuvia ja korjaantuvat lääkityksen lopettamisen jälkeen. [16, s. 467.]

Statiinien kinetiikkaan vaikuttavat monet mikrosomaalista lääkemetabolialla estävät lääkeaineet. CYP3A4-estäjät hidastavat tämän isoentyymien kautta metaboloituvien statiinien (simvastatiini, atorvastatiini, lovastatiini) metabolialla ja saattavat lisätä niiden hyötysuhdetta ja nostaa niiden pitoisuutta plasmassa. Tämän takia statiinien annosta tulisi pienentää tai niiden käyttö lopettaa kokonaan kyseisten lääkeaineiden käytön yhteydessä. [16, s. 467.]

3 LC-ESI-MS/MS-analyysitekniikka

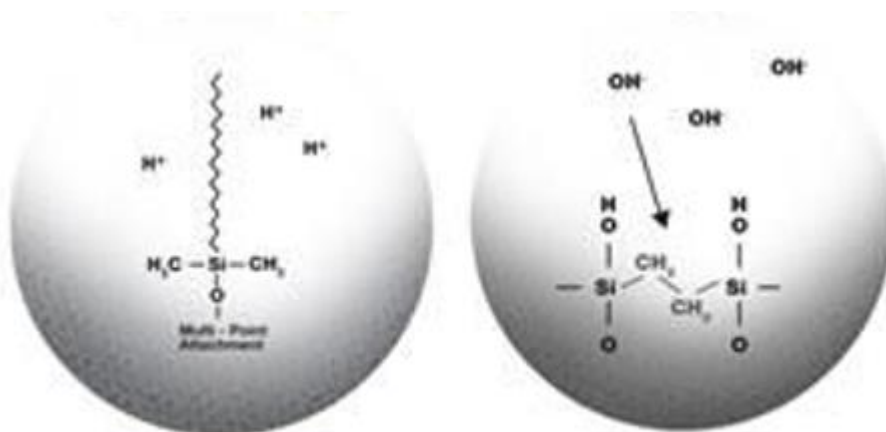
3.1 Nestekromatografia

Nestekromatografia (liquid chromatography, LC) on erotusmenetelmä, jossa yhdisteiden erottuminen perustuu niiden erilaisiin vuorovaikutuksiin liikkuvan nestefaasin ja stationaarifaasin välillä. LC:llä voidaan analysoida yhdisteitä, jotka liukenevat johonkin liuottimeen. Tämän vuoksi nestekromatografia on yleinen analyysitekniikka lääkeaineita analysoitaessa. [17, s. 71.]

Liikkuvaa faasia eli eluenttia pumpataan halutulla virtausnopeudella kolonnin läpi, joka on vuorattu stationaarifaasilla. Eluentin koostumusta voidaan muuttaa ajon aikana, jolloin on kyseessä gradientt ajo, tai eluentin koostumus voi pysyä samana koko ajon ajan, jolloin on kyseessä isokraattinen ajo. Näyte injektoidaan eluenttiin injektorin avulla ja yhdisteet erottuvat kolonnissa. Kolonnissa

erottuneet yhdisteet havaitaan detektorilla. Nestekromatografiassa massaspektrometri on yleisin käytetty detektori biologisten näytteen analysoinnissa sen erinomaisen spesifisyyden ja herkkyuden vuoksi. [17, s. 71.]

Opinnäytetyössä käytettiin Gemini-NX C18 -kolonna, joka on käänteisfaasikolonna. Käänteisfaasikromatografiassa erottuminen tapahtuu molekyylien poolisuuden perusteella. Kolonna koostuu C18-silikageelista, joka sisältää alkyyliryhmiä. Näin ollen poolittomat molekyylit pidäytyvät kolonnissa poolisia molekyylejä pidempään ja ne havaitaan myöhemmin detektorilla. Työssä käytetty Gemini-NX C18 -kolonna soveltuu hyvin korkean sekä matalan pH:n menetelmiin. Kuvassa 1 on esitetty kolonnin rakenne. [18; 19.]



Kuva 1. Gemini-NX C18 -kolonnin rakenne.

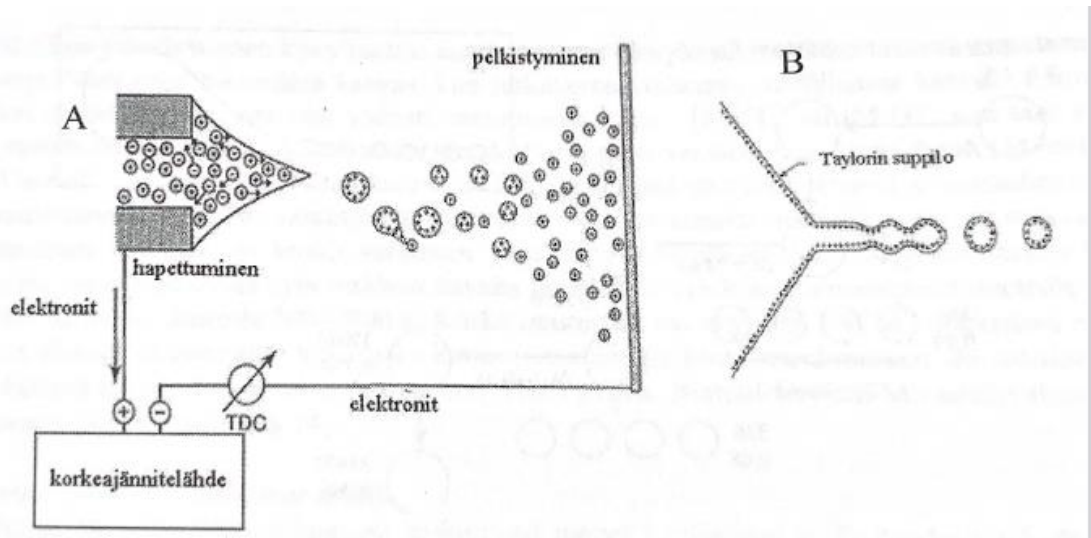
3.2 Massaspektrometria

Opinnäytetyössä käytetyssä massaspektrometrissa ionisaatiomenetelmänä toimi sähkösumutus-ionisaatio (ESI). Sähkösumutus-ionisaatiossa neste sumutetaan pieniksi pisaroiksi korkean jännitteen avulla. Menetelmässä pisaroiden muodostumista tehostetaan kaasulla, joka on inerti. Inerti kaasu virtaa ionisuihkun suuntaisesti, ja sen seurauksena ionisointi on stabiilimpaa kuin puhtaassa sähkösumutuksessa. ESI-ionilähde sisältää sisähalkaisijaltaan tyypilli-

sesti noin 0,1–0,2 mm:n levyisen teräskapillaarin ja ilmanpaine ionisaatiolähteen (API), jonka avulla ionit kerätään massaspektrometristä analyysia varten. [17, s. 71–72.]

Kaasuvirtaus aiheuttaa kapillaarin päässä turbulenssin, joka edesauttaa pisaroiden muodostumista. Ionisaatiomekanismi sopii sekä positiivisille, että negatiivisille ioneille. Opinnäytetyössä käytettiin positiivista ionisaatiota, jossa kapillaarin kärkeen muodostuu korkea elektrostaattinen kenttä, jonka vuoksi negatiiviset ionit kulkeutuvat kapillaarin seinille ja kapillaarista ulos tulevat positiivisesti varautuneet ionit kulkeutuvat eluentin pinnalle. Varautuneen eluentin pinnan virtausnopeus tulee suuremmaksi kuin eluentin sisäosassa, minkä seurauksena eluenttivyöhyke kapenee ja muodostuu Taylorin kartio. [17, s. 72.]

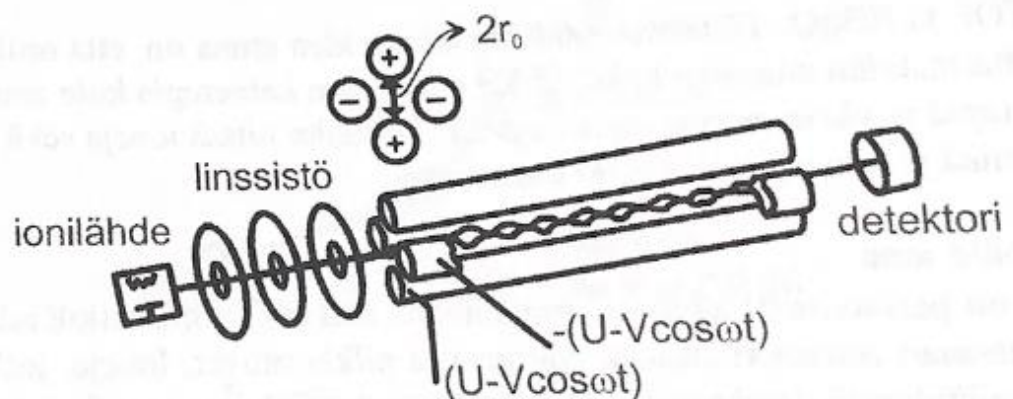
ESI-ionisaatiosta on tehty monia tutkimuksia, mutta sen todellinen mekanismi on vielä osittain tuntematon. Tämänhetkisen tiedon mukaan kapenemisen takia eluentista muodostuu varautunut pisara. Kun varautunut pisara on muodostunut, siitä haihtuu liuotinta ja pisaran pinnan varaustiheys kasvaa. Varaustiheyden kasvaessa myös repulsio eli poistovoima kasvaa. Kun varaustiheys saavuttaa tietyn arvon (Rayleighin raja-arvo 4,27) ja repulsio tulee suuremmaksi kuin pisaran pintajännitys, pisara hajoaa pieniksi aerosoleiksi. Tämä tapahtumasarja toistuu, kunnes kaikki liuotin on haihtunut ja jäljellä on vain kaasufaasissa olevat ionit. Kuvassa 2 on esitetty varautuneen aerosolin muodostuminen ESI:ssä sekä Taylorin kartion ja alkupisaran muodostuminen. [17, s. 72–73.]



Kuva 2. A) Varautuneen aerosolin muodostuminen ESI:ssä. B) Taylorin kartio ja alkupisaran muodostuminen [17, s. 73].

3.3 Kolmoiskvadrupoli

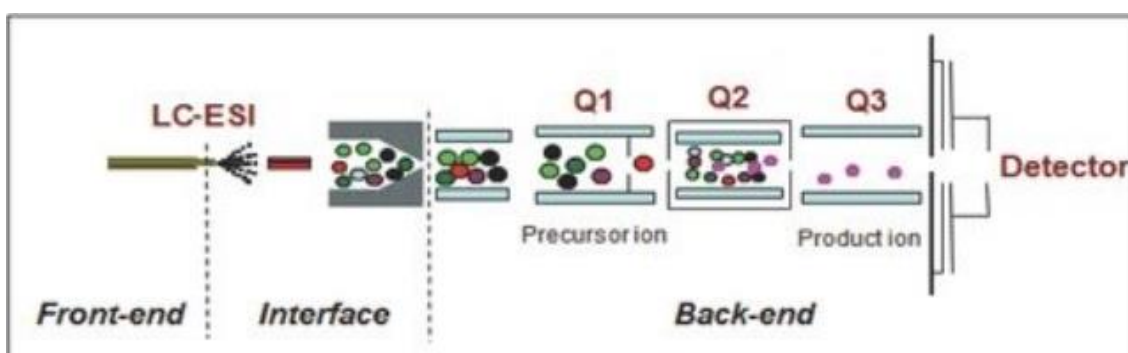
LC-MS-laitteissa massaspektrometrinä on yleisimmin kvadrupolilaitte. Kvadrupolit ovat suodattimia, jotka päästävät ioneita lävitseen niiden m/z -suhteen perusteella. Kvadrupoli koostuu neljästä elektrodista, joiden väliin johdetuilla jännitteillä muodostetaan sähkökenttä. Kuvassa 3 on esitetty kvadrupolianaalysaattorin periaate. [17 s. 27–28.]



Kuva 3. Kvadrupolianaalysaattori [17, s. 28].

Kun ionit saapuvat elektrodien väliin, ne joutuvat sähkökentän vaikutuksesta niiden kulkusuunnalle kohtisuoraan värähdysliikkeeseen. Elektrodeihin asetettu tietty jännite päästää vain tietyn m/z -suhteen omaavat ionit kvadrupolin läpi detektorille. Jos ionien värähtely on liian laajaa, ne tarttuvat kiinni elektrodeihin eivätkä pääse kvadrupolin läpi detektorille. Jännitettä muuttamalla voidaan muuttaa kvadrupolin läpäisevien ionien m/z -suhdetta ja näin voidaan pyyhkäistä läpi tietty m/z -alue ja mitata massaspektri. [17, s. 28.]

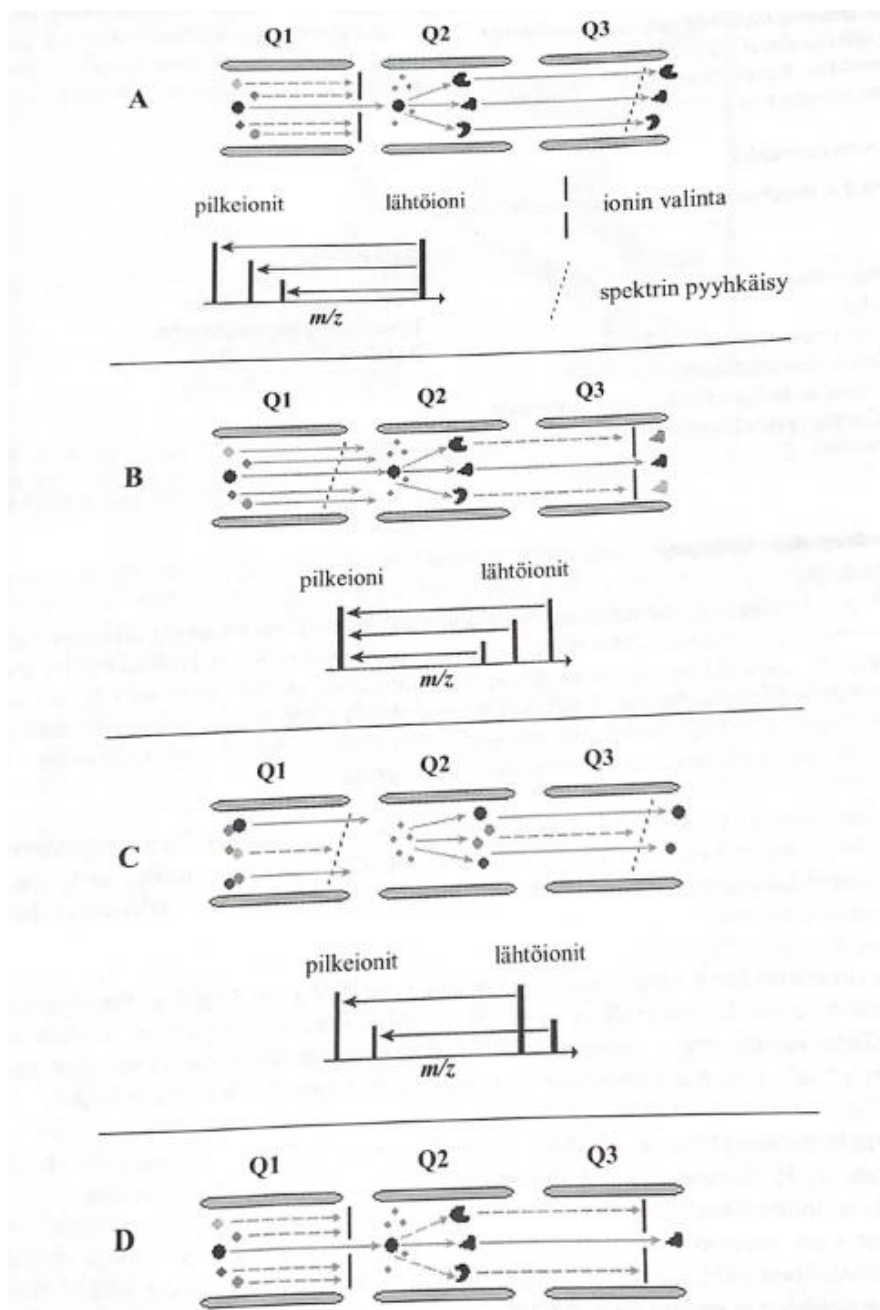
Monipuolisempien toimintojen saavuttamiseksi useampia kvadrupoleja voidaan kytkeä peräkkäin. Kolmoiskvadrupoli, joka koostuu kolmesta kvadrupolista, on yleisin LC-MS-analyysitekniikassa käytetty yhdistelmä. Kolmoiskvadrupolissa ensimmäinen (Q1) ja kolmas (Q3) kvadrupoli ovat tavallisia kvadrupoleja toimintaperiaatteeltaan. Toinen kvadrupoli (Q2) on törmäyskammio, johon johdetaan törmäyskaasua. Yleisimpiä käytettyjä törmäyskaasuja ovat esimerkiksi typpi tai argon. Q2:n läpi kulkiessa ionit törmäävät yhden tai useamman kerran neutraalien kaasumolekyylien kanssa ja hajoavat. Massaspektrometrissä olevien elektrodien avulla voidaan säätää Q2:een tulevien ionien kineettistä energiaa. Ionien kineettistä energiaa muuttamalla törmäysenergia muuttuu. Q2 ei suodata ioneja, koska sitä käytetään ilman tasajännitettä. Näin ollen kaikki törmäyksissä syntyneet ionit voidaan analysoida Q3:lla. [17, s. 32.] Kuvassa 4 on esitetty kolmoiskvadrupolin rakenne.



Kuva 4. Kolminkertaisen kvadrupolin massaspektrometrin kaavio [20].

Kolmoiskvadrupolissa voidaan käyttää useita eri pyyhkäisytekniikoita. Tuoteioni-pyyhkäisyssä (product ion scan) ensimmäisessä kvadrupolissa valitaan ioni,

joka törmää tai reagoi törmäyskammiossa, ja syntyneiden tuoteionien massaspektri mitataan kolmannessa kvadrupolissa. Lähtöionipyyhkäisyssä ne ionit, jotka tuottavat hajoamisessa tai reaktiossa tietyn tuoteionit, tulevat havaituksi, koska lähtöionipyyhkäisyssä kolmas kvadrupoli päästää läpi vain tietyn kokoisia tuoteioneja, samalla kuin ensimmäisellä kvadrupolilla pyyhkäistään läpi massa-alueita. Neutraalinpalan lohkeamispyyhkäisyssä tulevat havaituksi kaikki ionit, jotka tuottavat ionin, jonka massa on $m-a$, eli ionit, joista irtoaa neutraalipala, jonka massa on a . Tämä johtuu siitä, että neutraalinpalan lohkeamispyyhkäisyssä Q1:llä ja Q3:lla pyyhkäistään massa-alueita samanaikaisesti, mutta pyyhkäistävien massojen välillä on vakiona pidettävä massaero a . Valittujen reaktioiden seurannassa havaitaan vain tietyn ionin spesifinen hajoamisreaktio, joita voi olla useampi ja jolloin kutakin mitataan vuorotellen lyhyt aika kerrallaan. Tässä pyyhkäisytekniikassa Q1 ja Q3 on lukittu tietyn massaisiin lähtö- ja tuoteioneihin. Kuvassa 5 on esitetty pyyhkäisytekniikoiden periaatteet. [17, s. 32–34.]



Kuva 5. Kolmoiskvadrupolin pyyhkäisyteknikat. A) tuoteionipyyhkäisy, B) lähtöionipyyhkäisy, C) neutraalipalan lohkeamispyyhkäisy ja D) valittujen reaktioiden seuranta. [17, s. 33.]

3.4 Vaihtoehtoisia analyysimenetelmiä

LC-MS/MS-analyysitekniikka on noussut suosioon lääkeaineiden kvantitatiiviseen määrittämiseen verinäytteistä, mutta sen selektiivisyys on osoittanut haas-

teita. Lääkeaineet analysoidaan yleensä biologisesta matriisista, kuten esimerkiksi veri-, seerumi- tai virtsanäytteistä. Biologisen matriisin korkeat proteiini- ja rasvapitoisuudet heikentävät laitteen suorituskykyä ja kontaminoivat helposti laitteen. [21, s. 235.]

Vuonna 2003 Murphyn tekemässä tutkimuksessa vertailtiin matriisinvaikutusta sähkösumutus-ionisaatio (ESI) -tekniikalla ja kemiallinen ionisaatio ilmakehän paineessa (APCI) -tekniikalla. Tutkimus osoittaa, että matriisivaikutus on riippuvainen ionisaatiotyypistä, sekä näytteen esikäsittelystä. Matriisivaikutus johti vakavaan ionisuppressioon, joka vaihtoehtoisesti joko kasvatti tai madalsi analyytin pinta-alaa. Matriisin vaikutusta havaittiin kummallakin ionisaatiotekniikalla, mutta vähemmän APCI:lla. ESI-tekniikan todettiin olevan herkempi matriisivaikutukselle. Myös näytteen esikäsittelyllä oli vaikutusta tuloksiin ja APCI sallii yksinkertaisemman näytteenkäsittelyn, mikä myös mahdollistaa kustannustehokkaan työskentelyn. LC-ESI-MS/MS:ää parempi analyysitekniikka lääkkeitä biologisesta matriisista analysoidessa oli LC-APCI-MS/MS-analyysitekniikka. [22.]

4 Post mortem -analytiikan haasteet

Kuoleman syyn selvittämisen lain 7§:n mukaan oikeuslääketieteelliseen kuolemansyynselvittämiseen kuuluu aina poliisitutkinta. Poliisi suorittaa tutkimuksen kuolemansyyn selvittämiseksi, jos kuoleman on aiheuttanut esimerkiksi tapaturma, rikos, itsemurha, myrkytys, tai kuolema on tapahtunut äkillisesti yllättäen. Suomessa oikeuslääketieteellisen ruumiinavauksen järjestämisestä ja kuolemansyyn selvittämisen laboratoriotutkimuksista vastaa Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitos. [23; 24, s. 54.]

4.1 Verinäytteet

Veri on suosituin matriisi lääkeaineiden ja lääkeaineenvaihduntatuotteiden analysoinnissa biologisesta matriisista. Eri lääkeaineilla on taipumus jakaantua ta-

saaisesti plasman ja verisolujen välille, kun taas toiset lääkeaineet sitoutuvat selektiivisesti plasman proteiineihin. Lääkeaineita analysoitaessa on tärkeä selvittää, miten analyytit jakautuvat verinäytteeseen, sillä se vaikuttaa menetelmän kehitykseen ja näytteenkäsittelytekniikan valintaan. [21, s. 228–229.]

Post mortem (PM) eli kuoleman jälkeen otetuissa verinäytteissä on havaittu tutkimusten perusteella lääkeaineiden uudelleenjakautumista. Lääkeaineiden uudelleenjakautumisen vuoksi lääkeainepitoisuudet PM-veressä eivät ole samat analyysihetkellä ja kuolemanhetkellä. Tätä ilmiötä kutsutaan PMR-toiminnoksi, ja sen taustalla on esimerkiksi lääkeaineiden vapautumista lääkevarastoista heti kuoleman jälkeen ja mätänemismuutosten edetessä. Tutkimuksissa on havaittu, että usein sydäimestä peräisin oleva veri ja valtimoiden veri ovat alttiimpia PMR:lle kuin ääreisveri. Tämän takia vainajatutkimuksissa käytetään reisiluun laskimon verta, jotta analysoitu lääkeainepitoisuus olisi lähellä kuolemanhetken pitoisuutta. [25.]

4.2 Kuoleman jälkeiset muutokset verinäytteissä

Vainajan hajoaminen ja mätäneminen on monimutkainen ilmiö, joka johtuu pääsääntöisesti bakteerien aiheuttamasta mätänemisestä, entsyymien aiheuttamasta autolyysistä eli kudosten hajoamisesta, sekä eliöiden, yleensä hyönteisten aiheuttamasta tuhosta. Autolyysi tapahtuu ensimmäisenä. Autolyysissä esimerkiksi solukalvot ja suonten seinämät käyvät läpäisevimmiksi ja tapahtuu diffuusiota eli aineiden pitoisuuserojen tasaantumista. Esimerkiksi kun veren nesteosaa tasaantuu ympäristöönsä, veri käy paksummaksi ja punasolujen suhteellinen määrä veressä nousee ja samalla tapahtuu muutoksia veren entsyymipitoisuuksissa. [24, s. 73–74.]

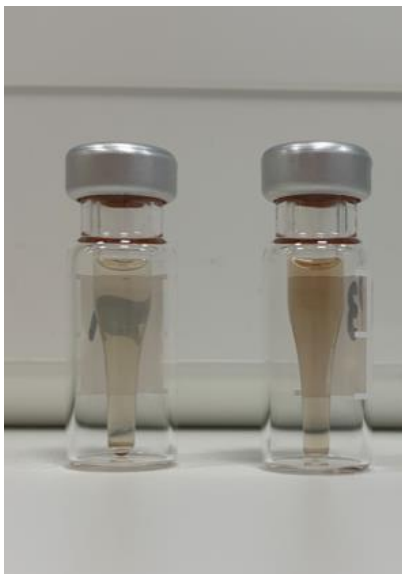
Mätäneminen on pääasiassa bakteerien aiheuttama ilmiö autolyysiin sekoittuneena. Suolistoa pidetään suurimpana yksittäisenä bakteerien lähteenä. Kirjallisuudessa mätänemisen aiheuttajiksi on listattu suuri määrä bakteerilajeja, mutta mukana on myös mikro-organismeja, kuten sieninä ja hiivoja. Mätänemisen seu-

rauksena syntyy yksinkertaisia yhdisteitä, kuten hiilivetyä, rikkivetyä ja ammoniakkia. Hiilihydraattien hajoamisen seurauksena syntyy maitohappoa, mutta myös propanolia, butanolia, isoamyylialkoholia, ja pieniä määriä metanolia ja etanolia. [24, s. 74.]

Näistä syistä elävän ihmisen diagnostiikassa monia hyödyllisiä laboratoriotutkimuksia ei voida suorittaa vainajille tai ne vaativat paremman ja työläämmän näytteenkäsittelyn, jotta matriisi ei vaikuttaisi laboratoriotulosten oikeellisuuteen.

4.3 Vaihtoehtoisia uuttomenetelmiä

Opinnäytetyössä statiinien eristämiseen verinäytteistä käytettiin metanolisaostusta, joka on yksi proteiinisaostuksen menetelmistä. Proteiinisaostuksen tarkoituksena on erottaa proteiini liuksesta joko häiriöiden poistamiseksi. Saostusmenetelmän tehokkuus vaihtelee proteiinin liukoisuudesta ja molekyyliirakenteesta riippuen. Metanolisaostuksessa alkoholin lisääminen liukseen vähentää proteiinin hydratoitumista poistamalla proteiinia ympäröivän vesikilven, jolloin proteiinin väliset vetysidokset katkeavat ja proteiini saostuu. [26.] Opinnäytetyön aikana huomattiin, että käytössä oleva metanolisaostus ei puhdistanut näytettä tarpeeksi, sillä analyysilaitteet likaantui helposti näytesarjoja ajettaessa. Kuvassa 6 on esitetty tyypillinen näyte uuttoprosessin jälkeen. Kuvasta voidaan huomata, että näytteet ovat hyvin sakeita.



Kuva 6. Tyypillinen näyte uuttoprosessin jälkeen.

Alkoholisaostuksessa voitaisiin kokeilla käyttää jotain muuta orgaanista liuotinta, kuten esimerkiksi etanolia tai asetonia näytteiden puhtauden parantamiseen. Opinnäytetyön aikana kokeiltiin myös pidentää metanolin saostusaikaa yön yli. Saostusajan pidentäminen aiheutti vähemmän likaantumista laitteella suuren ajosarjan jälkeen.

Vaihtoehtoisia proteiinisaostustekniikoita voisi olla esimerkiksi happosaostus tai suolasaostus. Happosaostus perustuu liuoksen pH:n muutokseen. Proteiineilla on yksilöllinen isoelektrinen piste, ja jo pienet muutokset väliaineen pH:ssa vaikuttavat proteiinin rakenteeseen. Happojen lisääminen liuokseen alentaa sen pH:ta ja johtaa proteiinin positiiviseen varautumiseen aminohapporyhmien protonien sieppaamisen vuoksi. Vesiliuoksessa proteiinia ympäröivä hydraatiopallo hajoaa ja rakenteen epätasapainotila johtaa saostumiseen. Yleisin happosaostuksessa käytetty happo on trikloorietikkahappo (TCA), koska se on erittäin reaktiivinen ja sitä voidaan käyttää pieniä määriä. [26.]

Suolasaostuksessa suolaionien lisääminen liuokseen aiheuttaa proteiinien käytävissä olevien vesimolekyylien syrjäytymisen, mikä johtaa vetysidosten tuhoutumiseen. Vuorovaikutus proteiinien välillä on voimakkaampaa kuin proteiini-

nin ja vesimolekyylien välillä, mikä aiheuttaa proteiinien aggregoitumista ja saostumista. Esimerkkejä suolasaostuksesta on sinkkisulfaatti- ja ammoniumsulfaattisaostus. [26.]

Yllä mainittuja saostustekniikoita voitaisiin kokeilla uuttomenetelmiksi statiinien uuttamiseen verinäytteistä, jotta saataisiin näytteistä puhtaampia sekä laite pysymään puhtaampana ja estämään laitetta kontaminoitumasta erittäin likaisista näytteistä.

5 Työn toteutus

Tässä luvussa on esitetty opinnäytetyössä käytettävät laitteet ja reagenssit, näytteiden esikäsittely, menetelmän kehitys ja validoinnissa tutkittavat parametrit.

5.1 Laitteet ja reagenssit

Opinnäytetyössä käytettiin seuraavia laitteita ja analysointiohjelmia:

- nestekromatografi: Agilent Tehcnology 1200 1312A
- näytteensyöttäjä: Agilent 120 1367B
- kolonni: Gemini-NX, C18, 100 mm x 2,0 mm ID, 3 µm, Phenomenex.
- esikolonni: Security Guard Gartridges, C18, 4,0 mm L x 2,0 mm ID, 3 µm, Phenomenex
- massaspektrometri: 4000 QTrap Sciex, Turbo Ions Spray
- analysointiohjelmat: Analyst Software ja Multiquant 3.0.3.

Opinnäytetyössä käytettiin seuraavia reagensseja:

- metanoli, LC-MS-laatu, Fluka LC-MS Chromasolv
- etikkahappo, EMSURE®, ≥ 99,8 %
- muurahaishappo, Honeywell Research Chemicals, 97,5 %
- ammoniumasetaatti, Merck, ≥ 98 %

- atorvastatiini kalsiumsuola, Pfizer
- rosuvastatiini kalsiumsuola, AstraZeneca
- simvastatiini, LGC, DR Ehrenstorfer
- lovastatiini, LGC, DR Ehrenstorfer
- fluvastatiini natriumsuola, LGC, DR Ehrenstorfer
- rosuvastatiini-d3 natriumsuola, Trc Canada
- atorvastatiini-d5 natriumsuola Trc Canada
- dibentsepiini, Trc Canada, 100 %.

5.2 Näytteiden esikäsittely

Statiinien uuttamiseen verinäytteestä käytettiin metanolisaostusta, jossa 2,7 ml 0,1 %:sta etikkahappoa metanolissa lisättiin 0,3 g:aan verinäytettä. Näytteitä vorteksoitiin 1 minuutin ajan ja sentrifugoitiin 10 minuutin ajan (5000 rpm), jonka jälkeen supernatantti siirrettiin puhtaaseen putkeen ja haihdutettiin kuiviin 40 °C:n vesihauteessa. Haihdutuksen jälkeen näytteisiin lisättiin 20 µl metanolia ja 280 µl ammoniumasetaattipuskuria, jonka pitoisuus oli 10 mmol/l, pH 3,2 ja johon oli lisätty 0,1 % muurahaishappoa. Näytteitä vorteksoitiin 5 minuutin ajan ja sentrifugoitiin mikrosentrifugilla Eppendorf-putkissa 3 minuuttia (12000 rpm). Kaikki näytteet uutettiin samalla tavalla.

5.3 Menetelmän kehitys

Menetelmän kehitystä varten tehtiin testiajo, jonka tuloksista valittiin kullekin analyytille kaksi parhaita ionia. Tarkoituksena oli löytää optimaaliset parametrit kullekin yhdisteelle, joilla saadaan mahdollisimman suuri vaste kullekin tutkittavalle analyytille toteutettua. Menetelmän kehitys suoritettiin Agilent Technologies -nestekromatografilla ja 4000QTrap-laitteella. Valittujen ionien massat ja parametrit on esitetty taulukossa 3 ja nestekromatografian ajo-olosuhteet on esitetty liitteessä 1.

Taulukko 3. Analyyttien valittujen ionien massat ja parametrit.

Ioni	Q1 massa (Da)	Q3 massa (Da)	Viipymäaika (ms)	Törmäysenergia (V)
Atorvastatiini 1	559,300	440,300	20,0	20,0
Atorvastatiini 2	559,300	466,200	20,0	30,0
Fluvastatiini 1	412,400	266,300	40,0	20,0
Fluvastatiini 2	412,400	290,000	40,0	20,0
Lovastatiini 1	405,400	285,300	40,0	20,0
Lovastatiini 2	405,400	303,300	40,0	20,0
Rosuvastatiini 1	482,500	300,000	50,0	35,0
Rosuvastatiini 2	482,500	258,000	50,0	35,0
Simvastatiini 1	436,200	285,200	40,0	20,0
Simvastatiini 2	436,200	199,400	40,0	20,0
Atorvastatiini-d5	564,100	445,300	20,0	20,0
Rosuvastatiini-d6	488,500	306,00	40,0	35,0
Dibentsepiini	296,200	251,200	10,0	15,0

Valitut ionit antoivat parhaimmat intensiteetit ja visuaalisesti arvoituna parhaimman näköiset ja selkeimmät piikit yhdisteille. Muut ylimääräiset ionit poistettiin menetelmästä menetelmän parantamiseksi.

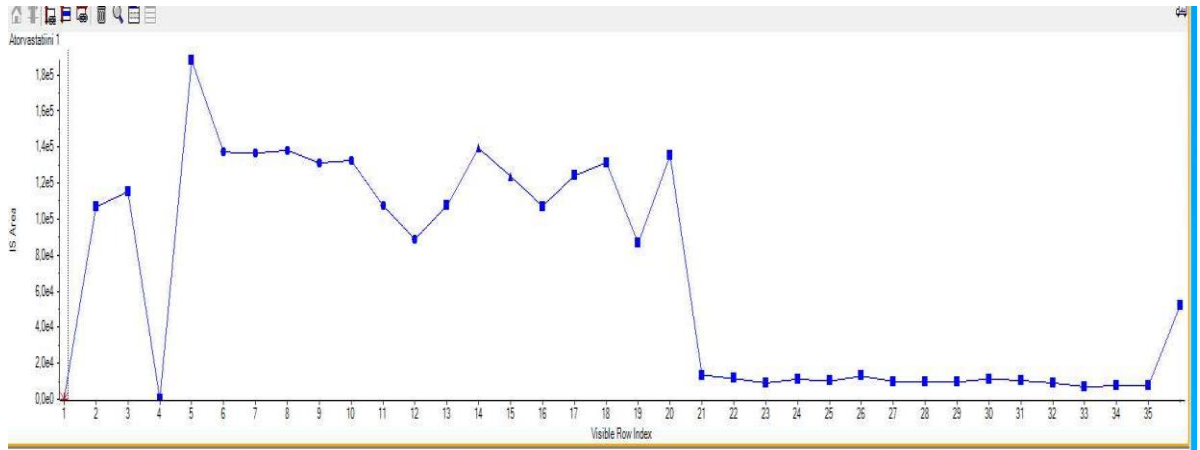
Määritysmenetelmässä on mukana kolme eri sisäistä standardia: dibensepiini, atorvastatiini-d5 ja rosuvastatiini-d3. Testiuuton perusteella valittiin kullekin yhdisteelle sopivin sisäinen standardi, jolla suorasta tulee mahdollisimman hyvä ja jolla suoran selitysaste on mahdollisimman lähellä lukua 1. Taulukossa 4 on esitetty yhdisteille valitut sisäiset standardit.

Taulukko 4. Yhdisteille valitut sisäiset standardit.

Yhdiste	Sisäinen standardi
Atorvastatiini	Atorvastatiini-d5
Fluvastatiini	Rosuvastatiini-d6
Lovastatiini	Atorvastatiini-d5
Rosuvastatiini	Rosuvastatiini-d6
Simvastatiini	Atorvastatiini-d5

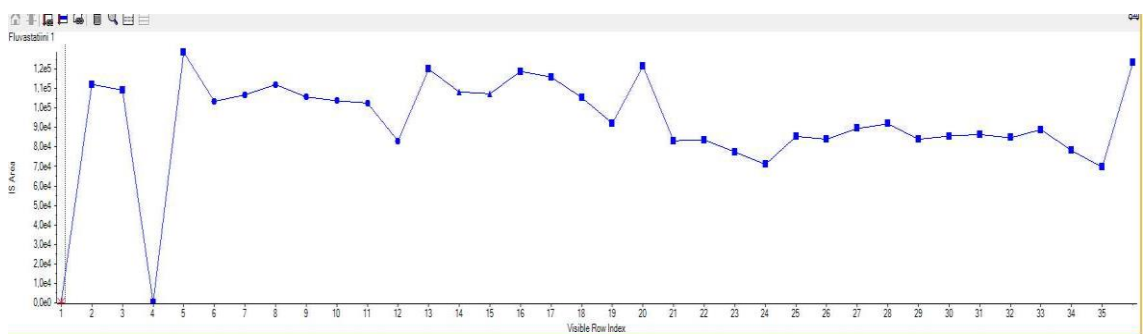
Dibentsepiiniä ei valittu millekään yhdisteelle sisäiseksi standardiksi, mutta se pidettiin määritysmenetelmässä mukana, sillä sitä on käytetty aikaisemmassa määritysmenetelmässä sisäisenä standardina atorvastatiinille ja rosuvastatiinille.

Myöhemmin tuloksia tulkittaessa huomattiin, että atorvastatiini-d5 käyttäytyy nollamatriisissa eri lailla kuin todellisessa näytematriisissa, vainajaveressä. Kuvassa 7 on esitetty atorvastatiini-d5:n pinta-alojen välinen ero nollamatriisissa eli ihmisveressä ja todellisessa näytematriisissa eli vainajaveressä.



Kuva 7. Atorvastatiini-d5:n pinta-alojen vaihtelu nollamatriisissa eli ihmisveressä x-akselilla kohdissa 1–20 ja todellisessa matriisissa eli vainajaveressä x-akselilla kohdasta 21 alkaen.

Kuvassa X-akselilla kohdissa 1–20 matriisina on nollaveri ja atorvastatiini-d5:n pinta-alat pysyvät suurina eri näytteiden välillä. Kuvassa X-akselilla kohdasta 21 alkaen matriisina on vainajaveret, joissa atorvastatiini-d5:n piikin pinta-ala pienenee huomattavasti. Verrattiin atorvastatiini-d5:n ja rosuvastatiini-d6:n pinta-alojen vaihtelua keskenään. Kuvassa 8 on esitetty rosuvastatiini-d6:n pinta-alojen vaihtelu.



Kuva 8. Rosuvastatiini-d6:n pinta-alojen vaihtelu nollamatriisissa eli ihmisveressä ja todellisessa matriisissa eli vainajaveressä.

Rosuvastatiini-d6:n pinta-alat pysyvät tasaisina sekä nollamatriisissa että todellisessa matriisissa eli vainajaveressä. Suurta heittelyä ei ole havaittavissa. Tämän huomion jälkeen kokeiltiin vaihtaa lovastatiinin ja simvastatiinin sisäiset

standardit atorvastatiini-d5:sta rosuvastatiini-d6:ksi. Kuitenkin huomattiin, että menetelmän toistettavuus huononi lovastatiinilla ja simvastatiinilla, kun sisäinen standardi vaihdettiin rosuvastatiini-d6:ksi. Lovastatiinin ja simvastatiinin sisäiseksi standardeiksi jätettiin alkuperäinen atorvastatiini-d5 ja todettiin samalla sen toimivan sisäisenä standardina oikein halutulla tavalla pinta-alojen muuttumisista huolimatta.

Pinta-alojen muuttuminen ei voi johtua pipetointivirheestä uuton aikana tai sisäisen standardin liuosta tehtäessä, koska kaikki kolme sisäistä standardia ovat samassa liuoksessa ja muiden sisäisten standardien pinta-alat pysyvät tasaisina ja suurina, ja pinta-alat heittelevät ainoastaan vainajaverinäytteissä. Kyseessä on vainajien veressä tapahtuvista muutoksista, jotka vaikuttavat yhdisteiden ionisoitumiseen ja sitä kautta yhdisteen vasteisiin analyysissä. Tämän vuoksi jokaiselle statiinille tarvitaan oma deuteroitu sisäinen standardi, jolla varmistetaan, ettei matriisiefektistä aiheudu ongelmaa näytteiden tuloksia analysoidessa.

5.4 Validointi

Validointi suoritettiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen oikeuskemian yksikön laboratoriossa. Validointi suoritettiin Agilent Technologies -nestekromatografilla ja 4000QTrap-laitteella. Validointi tehtiin oikeuskemian yksikön sisäisen validointiohjeen mukaan. Näytteet esikäsiteltiin metanolisakkauksella, joka on esitetty kohdassa 4.2.

Validoinnissa määritetyt validointiparametrit olivat seuraavat: selektiivisyys, oikeellisuus, toistettavuus, uusittavuus, toteamisraja, alempi määritysraja, saantoprosentti, prosessoitujen näytteiden säilyvyys, matriisin vaikutus ja mittausepävarmuus ala-, ja ylärajalle, sekä laajennettu mittausepävarmuus. Lisäksi tutkittiin myös laimennettujen näytteiden oikeellisuutta vertaamalla laimennettujen näytteiden pitoisuuksia laimentamattomien näytteiden pitoisuuksiin.

Atorvastatiinin ja rosuvastatiinin osalta verrattiin myös uuden määrittämen tuloksia vanhan määrittämen antamiin tuloksiin. Lovastatiinia, simvastatiinia ja fluvastatiinia ei ole aikaisemmin määritetty oikeuskemian yksikössä, joten niiden kohdalla vertailua ei voitu suorittaa.

6 Tulokset

6.1 Selektiivisyys

Määrittämen selektiivisyyttä tutkittiin todellisilla vainajanäytteillä, jotka olivat tutkittavia yhdisteitä kohtaan negatiivisia. Negatiiviseksi tiedettyjä vainajanäytteitä tehtiin 10 rinnakkaista, joista tarkoituksena oli tarkastella matriisin aiheuttamia mahdollisia häiriösignaaleja yhdisteiden kromatogrammeissa. Määrittämen on selektiivinen, jos häiritsevien signaalien pitoisuus on korkeintaan 10 % alemman määrittämen pitoisuudesta. Taulukossa 5 on esitetty häiritsevien signaalien pitoisuudet alemman määrittämen pitoisuuksista.

Taulukko 5. Häiritsevän signaalien pitoisuus alemman määrittämen pitoisuudesta prosentteina.

Yhdiste	Häiritsevän signaalien pitoisuus alemman määrittämen pitoisuudesta (%).
Atorvastatiini	0
Fluvastatiini	7
Lovastatiini	0
Rosuvastatiini	0
Simvastatiini	0

Kaikilla yhdisteillä häiritsevien signaalien pitoisuudet jäivät alimman määrittämen pitoisuuksista alle 10 %:n, joten tulokset ovat hyväksyttäviä ja menetelmä on riittävän selektiivinen.

6.2 Matriisiefekti

Matriisiefektiä tarkasteltiin negatiiviseksi tiedetyillä vainajanäytteillä, joihin tehtiin standardilisäys pitoisuuksilla atorvastatiini 0,0125 mg/l, rosuvastatiini 0,0125 mg/l, simvastatiini 0,0021 mg/l, lovastatiini 0,0021 mg/l ja fluvastatiini 0,2083 mg/l. Negatiivisia vainajanäytteitä otettiin määrittämiseen mukaan 10 kappaletta, joista jokaisesta tehtiin 4 rinnakkaismäärittystä. Jokaiselle näytteelle laskettiin rinnakkaisten hajonta, eri näytteestä saatujen tulosten välinen hajonta, sekä poikkeama teoreettisista pitoisuuksista. Matriisiefektiä on, jos hajonta näytteiden välillä on yli kolme kertaa suurempi kuin näytteiden sisällä ja kun samanaikaisesti tulokset eroavat teoreettisesta pitoisuudesta ≥ 20 %.

Mittaustulokset, niistä lasketut hajonnat ja poikkeamat teoreettisista arvoista on esitetty liitteessä 2. Kaikilla yhdisteillä näytteiden välinen hajonta jäi alle kolme kertaa pienemmäksi kuin hajonta näytteiden välillä, joten matriisilla ei ole suurta vaikutusta analyysitulokseen.

6.3 Alempi määrittäysraja

Alempi määrittäysraja on pienin pitoisuus, jolla rinnakkaismäärittysten keskiarvo poikkeaa teoreettisesta arvosta (Bias-%) ≤ 20 % ja jolla eri näytteistä saatujen tulosten välinen hajonta on (RSD-%) ≤ 20 % ja piikit ovat visuaalisesti arvoituna hyväksyttäviä. Alemman määrittäysrajan määrittämistä varten tehtiin kolme mittausta viidessä eri ajosarjassa, joten rinnakkaismittauksia koko validoinnin aikana tehtiin yhteensä 15 kappaletta. Näytteet tehtiin nollamatriisin pitoisuuksilla atorvastatiini 0,004 mg/l, rosuvastatiini 0,005 mg/l, simvastatiini 0,0005 mg/l, lovastatiini 0,0005 mg/l ja fluvastatiini 0,034 mg/l. Taulukossa 6 on yhdisteiden konsentraatioiden avulla lasketut alimman määrittäysrajan RSD-% ja Bias-%.

Taulukko 6. Alemman määrittämissrajan konsentraatioiden avulla lasketut RSD-% ja Bias-%.

Yhdiste	RSD-%	Bias-%
Atorvastatiini	11	25
Fluvastatiini	20	27
Lovastatiini	44	3
Rosuvastatiini	11	19
Simvastatiini	46	8

RSD-%:n osalta atorvastatiini, fluvastatiini ja rosuvastatiini täyttävät tavoitteen. Lovastatiinin ja simvastatiinin RSD-% on reilusti yli tavoitteen. Bias-%:n osalta rosuvastatiini, lovastatiini ja simvastatiini täyttävät tavoitteen. Atorvastatiinin, ja fluvastatiinin Bias-% on hieman korkeita, mutta silti hyväksyttäviä, koska pitoisuudet ovat pieniä, minkä takia heittoa syntyy helposti.

6.4 Toteamisraja

Toteamisrajalla määritetään, sisältääkö kyseinen näyte tutkittavaa yhdistettä vai ei. Toteamisraja määritettiin ajamalla 5 kpl näytteitä kolmessa eri ajosarjassa eli rinnakkaismäärittämissä tuli yhteensä 15 kpl koko validoinnin aikana. Tehtiin alimasta kalibrointipisteestä kolme eri laimennosta: 1:10, 1:5 ja 1:2. Tulokset ovat hyväksyttäviä, kun signaali-kohinasuhde (S/N) määritetyssä pitoisuustasossa kaikilla rinnakkaismäärittämissä ≥ 3 , ja piikkien muoto on arvioitu hyväksyttäväksi. Yhdisteiden toteamisajat on esitetty taulukossa 7.

Taulukko 7. Yhdisteiden toteamisrajojen pitoisuudet.

Yhdiste	Toimintaraja (mg/l)
Atorvastatiini	0,004
Fluvastatiini	0,034

Lovastatiini	0,001
Rosuvastatiini	0,0005
Simvastatiini	0,00005

S/N-arvot olivat suurimmassakin laimennoksessa hyvin korkeat, välillä 142–255, joten fluvastatiinin toteamisraja voisi olla 10 kertaa vieläkin pienempi, eli 0,0034 mg/l. Muiden tuoteionien piikit olivat vaihtelevia, ja osa vaikeasti määritettävissä, mikä näkyy niiden S/N-arvojen suurena vaihteluna. Osa S/N-arvoista toisten tuoteionien kohdalla eivät täytyneet.

6.5 Tarkkuus

Menetelmän tarkkuutta tarkasteltiin oikeellisuuden, toistettavuuden ja uusittavuuden avulla.

6.5.1 Oikeellisuus

Oikeellisuuskokeita varten valmistettiin laaduntarkkailunäyte (QC-näyte) kahdella eri pitoisuustasolla. Pitoisuustasot on esitetty taulukossa 8.

Taulukko 8. QC-näytteiden pitoisuudet.

Yhdiste	Pitoisuustaso 1. (mg/l)	Pitoisuustaso 2. (mg/l)
Atorvastatiini	0,0038	0,1061
Rosuvastatiini	0,0038	0,1061
Simvastatiini	0,0006	0,0177
Lovastatiini	0,0006	0,0177
Fluvastatiini	0,0631	1,7677

Näytteitä ajettiin 6 kappaletta molemmista pitoisuustasoista kahtena eri ajokertana. Näytteiden pitoisuuksista laskettiin näytteiden poikkeavuus teoreettisesta

arvosta. Tulos on hyväksyttävä, kun Bias-% on ± 20 %. Liitteessä 3. on esitetty oikeellisuusnäytteiden mittaustulokset ja taulukossa 9 on esitetty näytteiden konsentraatioiden avulla laskettu Bias-%.

Taulukko 9. Oikeellisuuskokeiden Bias-%.

Yhdiste	Bias-%, 1. Pitoisuustaso	Bias-%, 2. pitoisuustaso
Atorvastatiini	18	1
Fluvastatiini	55	33
Lovastatiini	4	22
Rosuvastatiini	6	4
Simvastatiini	21	25

Atorvastatiinin ja rosuvastatiinin osalta tavoite täyttyy molemmilla pitoisuustasoilla. Lovastatiinilla 1. pitoisuustason Bias-% on tavoitteen rajoissa, mutta 2. pitoisuustason Bias-% on hieman tavoitteen yli. Fluvastatiinilla ja simvastatiinilla Bias-% menee yli tavoitteen.

6.5.2 Toistettavuus

Toistettavuus lasketaan oikeellisuusnäytteiden rinnakkaismääritysten avulla. Toistettavuudella tarkastellaan näytteiden välistä toistettavuutta samassa ajosarjassa sekä näytteiden välistä toistettavuutta eri ajosarjojen välissä kahdella eri pitoisuustasolla. Tulokset ovat hyväksyttäviä, kun RSD-% on ± 20 %. Pitoisuudet esitettiin taulukossa 8. ja mittaustulokset liitteessä 3. Näytteiden konsentraatioiden avulla lasketut RSD-%:t on esitetty taulukossa 10.

Taulukko 10. Toistettavuuskokeiden RSD-%.

Yhdiste	RSD-%, 1. Pitoisuustaso	RSD-%, 2. pitoisuustaso
---------	-------------------------	-------------------------

Arovastatiini	7	12
Fluvastatiini	7	7
Lovastatiini	21	24
Rosuvastatiini	13	15
Simvastatiini	23	15

Tavoitteet täyttyivät atrovastatiinilla, fluvastatiinilla ja rosuvastatiinilla. Simvastatiinilla alemman pitoisuustason (1) RSD-% on hieman yli tavoitteen, mutta RSD-% paranee korkeammilla pitoisuustasoilla (2). Lovastatiinilla kummankin pitoisuustason RSD-% on hieman yli tavoitteen.

Tutkittiin myös laitteen toistettavuutta injektoimalla yhtä alemman pitoisuustason näytteestä kuusi kertaa ja tuloksista laskettiin RSD-%. Laitteen toistettavuuden mittaustulokset on esitetty liitteessä 4. Laitteen toistettavuuden RSD-%:t kullekin yhdisteelle on esitetty taulukossa 11.

Taulukko 11. Laitteen toistettavuuskokeen RSD-%.

Yhdiste	RSD-%
Atorvastatiini	6
Fluvastatiini	3
Lovastatiini	14
Rosuvastatiini	5
Simvastatiini	10

Lovastatiinilla ja simvastatiinilla laitteen toistettavuus on ≥ 10 %, mutta niillä on myös pienimmät pitoisuudet, mikä lisää suhteellista hajontaa.

6.5.3 Uusittavuus

Määritysmenetelmän uusittavuutta tutkittiin vertailemalla QC-näytteen tuloksia kahden eri henkilön saamien tulosten välillä eri analyysilaitteistolla. Henkilöt tekivät samoista näytteistä kuusi rinnakkaismäärittystä kahdella eri pitoisuustasolla. Pitoisuustasot yhdisteille on esitetty taulukossa 8. (luvussa 6.5.1.) Tuloksista laskettiin näytteistä saatujen tulosten välinen hajonta. Tulos on hyväksyttävä, kun RSD-% on ≤ 30 %. Uusittavuuskokeiden mittaustulokset on esitetty liitteessä 5. Taulukossa 12 on esitetty kahden eri henkilön saamien tulosten välinen RSD-%.

Taulukko 12. Uusittavuuskokeiden RSD-%.

Yhdiste	RSD-%, 1. Pitoisuustaso	RSD-%, 2. Pitoisuustaso
Atorvastatiini	8	7
Fluvastatiini	18	5
Lovastatiini	13	25
Rosuvastatiini	14	7
Simvastatiini	24	16

Kaikilla tutkittavilla yhdisteillä eri henkilöiden saamien tulosten välinen hajonta jää alle 30 %:n, eli menetelmän uusittavuus on hyvä.

6.6 Prosessoitujen näytteiden säilyvyys

Tarkoituksena oli tutkia näytteiden säilyvyyttä tilanteissa, joissa ilmenee tarve uudelleenajoon, esimerkiksi, jos ajo on jostain syystä pysähtynyt yön tai viikonlopun aikana. Säilyvyyden tutkimisessa käytettiin aiemmin analysoituja näytteitä ja kalibrointinäytteitä. Uudelleenanalysointi tehtiin 4, 6 ja 8 päivän kuluttua alkuperäisestä analyysipäivästä.

Tutkittiin analyyttien ja sisäisen standardin pinta-alojen, sekä lasketun pitoisuuden mahdollisia muutoksia esikäsitellyissä näytteissä. Kun lasketun pitoisuuden muutos alkuperäisestä pitoisuudesta on $\leq 20\%$ ja piikkien pinta-alat pysyvät hyväksyttävän kokoisina ja muotoisina näytteiden stabiilisuus tutkitulla aikavälillä on hyväksyttävä. Taulukossa 13 on esitetty eri päivien mittaustuloksien pitoisuuden muutokset alkuperäisestä pitoisuudesta pitoisuustasolla 1.

Taulukko 13. Eri päivien mittaustuloksien pitoisuuden muutokset alkuperäisestä pitoisuudesta pitoisuustasolla 1.

Yhdiste	4. päivän muutos (%)	6. päivän muutos (%)	8. päivän muutos (%)
Atorvastatiini	10	21	24
Fluvastatiini	8	4	11
Lovastatiini	41	54	46
Rosuvastatiini	1	2	4
Simvastatiini	29	40	37

Tulos on hyväksyttävä, jos muutos alkuperäisestä pitoisuudesta on alle 20 %. Samat näytteet voidaan ajaa seuraavassa ajosarjassa atorvastatiinilla enintään 4 päivän kuluttua, fluvastatiinilla ja rosuvastatiinilla enintään 8 päivän kuluttua. Lovastatiinilla ja simvastatiinilla näytteiden pitoisuudet poikkesivat jo neljäntenä päivänä yli 20 % alkuperäisestä pitoisuudesta, joten prosessoituja näytteitä ei voida säilyttää uusinta-ajoa varten. Näytteet tulee prosessoida uudelleen, mikäli on tarvetta uudelleen ajolle. Taulukossa 14 on esitetty eri päivien mittaustulosten poikkeavuus alkuperäisestä pitoisuudesta pitoisuustasolla 2.

Taulukko 14. Eri päivien mittaustuloksien pitoisuuden muutokset alkuperäisestä pitoisuudesta pitoisuustasolla 2.

Yhdiste	6. päivän muutos (%)	8. päivän muutos (%)
Atorvastatiini	8	2
Fluvastatiini	5	4
Lovastatiini	38	16
Rosuvastatiini	6	4
Simvastatiini	6	55

Myös pitoisuustasolla 2 tulos on hyväksyttävä, jos muutos alkuperäisestä pitoisuudesta on alle 20 %. Pitoisuustasolla 2 näytteet säilyivät paremmin, koska pitoisuudet olivat suurempia. Samat näytteet voidaan ajaa seuraavassa ajosarjassa atorvastatiinilla, fluvastatiinilla ja rosuvastatiinilla enintään 8 päivän kuluessa ja simvastatiinilla enintään 6 päivän kuluessa. Lovastatiininäytteiden pitoisuudet poikkesivat jo kuudentena päivänä yli 20 % alkuperäisestä pitoisuudesta, joten prosessoituja lovastatiininäytteitä ei voida säilyttää uusinta-ajoa varten. Näytteet tulee käsitellä uudelleen, mikäli on tarvetta uudelleen ajolle.

6.7 Saantoprosentti

Valmistettiin QC-näyte pitoisuustasolla atorvastatiini 0,0038 mg/l, fluvastatiini 0,0625 mg/l, simvastatiini 0,0006 mg/l, rosuvastatiini 0,0038 mg/l ja lovastatiini 0,0006 mg/l, joka uutettiin normaaliin tapaan. Tämän lisäksi uutettiin nollamatriisia, joka sisältää vain sisäistä standardia. Nollamatriiseihin lisättiin samat pitoisuudet statiineja uutun jälkeen loppuliukseen. Tuloksen avulla laskettiin saantoprosentti ja tarkasteltiin yhdisteen pinta-alan ja sisäisen standardin pinta-alan suhdetta. Saannolla varmistettiin sisäisen standardin korjaus uuttohävikin korjauksessa. Saantoprosentti laskettiin kaavalla 1.

$$\%R = \frac{C1*100\%}{C2} \quad (1)$$

jossa C1 on näytteiden pitoisuus (lisäys ennen uuttoa) ja C2 on näytteiden pitoisuus (lisäys uuton jälkeen). Yhdisteiden saantoprosentit on esitetty taulukossa 15.

Taulukko 15. Yhdisteiden saantoprosenttien keskiarvo rinnakkaismäärityksille.

Yhdiste	Saantoprosentti (%)
Atorvastatiini	80
Fluvastatiini	130
Lovastatiini	97
Rosuvastatiini	101
Simvastatiini	102

Atorvastatiinin, rosuvastatiinin, simvastatiinin ja lovastatiinin saantoprosentit ovat hyvät ja niiden perusteella voidaan todeta, että sisäisten standardien lisäys korjaa hyvin uutossa hävinneen yhdisteen. Fluvastatiinilla saanto on liian korkea, mikä voi kertoa sisäisen standardin toimimattomuudesta fluvastatiinin kanssa.

6.8 Pienemmän näytemäärän verifiointi

Oikeellisuuskokeita varten valmistettuja näytteitä pitoisuuksilla atorvastatiini 0,3181 mg/l, rosuvastatiini 0,3182 mg/l, simvastatiini 0,0530 mg/l, lovastatiini 0,0530 mg/l ja fluvastatiini 5,3030 mg/l laimennettiin 1:10. Laimennoksia tehtiin 6 rinnakkaisnäytettä. Tarkoituksena oli varmistaa, että saadaan sama pitoisuus sekä laimentamattomista että laimennetuista näytteissä. Tulos saa poiketa 30 % normaalin näytemäärän tuloksesta. Rinnakkaismääritysten tulosten keskiarvopoikkeamat normaalin näytemäärän tuloksista on esitetty taulukossa 16.

Taulukko 16. Laimennettujen näytteiden pitoisuuden poikkeavuus laimentamattomien näytteiden pitoisuudesta.

Yhdiste	Poikkeama (%)
Atorvastatiini	0,5
Rosuvastatiini	62
Simvastatiini	22
Lovastatiini	6
Fluvastatiini	53

Atorvastatiinin, lovastatiinin ja rosuvastatiinin laimennettujen näytteiden tulos poikkeaa alle 30 % laimentamattomien näytteiden tuloksista. Fluvastatiinin ja simvastatiinin laimennettujen näytteiden tulokset poikkeavat yli 30 % laimentamattomien näytteiden tuloksista, joten fluvastatiini ja simvastatiini näytteitä ei voida laimentaa.

6.9 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuutta tutkittiin ala-, ylärajalla ja laajennettuna mittausepävarmuutena. Mittausepävarmuus laskettiin Mukit-laskentaohjelman avulla, joka perustuu Nordtest TR 537 -oppaaseen, sekä THL:n validointiohjeen mukaan. Mittausepävarmuuden laskuissa käytettiin luottamustasoa 95 % ja tulosten laskennassa käytettiin kahden eri pitoisuustason QC-näytteiden rinnakkaismääritysten tuloksia. Pitoisuudet kullekin yhdisteelle on esitetty taulukossa 8. (Luvussa 6.5.1.)

THL:n validointiohjeen mukaan mittausepävarmuus laskettiin käyttäen kaavaa 2 [27].

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

jossa $U1$ on systemaattinen virhe ja $U2$ on satunnaisvirhe

Systemaattinen virhe laskettiin kaavalla 3 [27].

$$U1 = (|U1_a| + |U1_b|)/2 \quad (3)$$

jossa a on oikeellisuus bias-% teoreettisesta arvosta validointikuvaajan pisteissä, b on standardilisäysten bias-% todellisista näytteistä (matriisiefektin määrittämisen yhteydessä). Jos poikkeamat ovat sekä negatiivisia että positiivisia, systemaattista virhettä ei ole.

Satunnaisvirhe lasketaan kaavalla 4 [27].

$$U2 = (|U2_a| + |U2_b| + |U2_c|)/3 \quad (4)$$

jossa a on toistotarkkuus, näytteen sisäinen hajonta (toistettavuusnäytteet), b on hajonta todellisissa tapauksissa (toistettavuus ja uusittavuusnäytteet), c on standardilisäysten RSD todellisista näytteistä (matriisiefektin määrittämisen yhteydessä).

Menetelmän mittausepävarmuutena ilmoitetaan laajennettu mittausepävarmuus: $U(95\%) = 2 \times U$. Mittausepävarmuus laskettiin erikseen ala- ja ylärajalle, sekä yhdistettynä laajennettuna mittausepävarmuutena. Mittausepävarmuuden tavoite on $n. \leq 30\%$. Taulukossa 17 on esitetty yhdisteille lasketut mittausepävarmuudet THL:n validointiohjeen mukaan, sekä Mukit-laskentaohjelman avulla lasketut mittausepävarmuudet, mikä perustuu Nordtest TR 537 -oppaaseen.

Taulukko 17. Mittausepävarmuudet alarajalle, ylärajalle, ja laajennettu mittausepävarmuus Mukit- laskentaohjelmalla ja THL:n validointioppaan mukaan.

Yhdiste	Alarajan laajennettu mittausepävarmuus (%)	Ylärajan laajennettu mittausepävarmuus (%)	Yhdistetty mittausepävarmuus (%)	Mukit- laskentaohjelmalla laskettu laajennettu mittausepävarmuus (%)

				nettu mittausepävarmuus (%)
Atorvastatiini	39	27	33	34
Fluvastatiini	77	60	69	116
Lovastatiini	32	50	41	53
Rosuvastatiini	29	27	28	39
Simvastatiini	28	35	32	71

THL:n validointioppaan mukaan laskettu fluvastatiinin mittausepävarmuus on hyvin korkea, eikä siksi hyväksyttävä. Myös lovastatiinilla mittausepävarmuus on yli rajan. Atorvastatiinilla, rosuvastatiinilla ja simvastatiinilla mittausepävarmuudet ovat hyväksyttävällä tasolla. Mukit-laskentaohjelmalla saadut mittausepävarmuudet eroavat suuresti THL:n validointioppaan mukaan lasketuista mittausepävarmuuksista fluvastatiinin, lovastatiinin, rosuvastatiinin ja simvastatiinin kohdalla ja ovat liian korkeita. Atorvastatiinille saatiin Mukit-laskentaohjelmalla laskettua lähes sama mittausepävarmuus kuin THL:n validointioppaan mukaan. Atorvastatiinin mittausepävarmuus oli hyväksyttävä. Mukit-laskentaohjelma ja THL:n validointiopas käyttävät eri tapaa laskea mittausepävarmuus, mikä voi aiheuttaa eroja tuloksissa. Tarkemmat Mukit-raportit ovat esitetty liitteessä 6.

6.10 Menetelmän toimivuus vanhoilla positiivisilla näytteillä

Atorvastatiinia ja rosuvastatiinia on aikaisemmin analysoitu oikeuskemian yksikössä eri määrittämenetelmällä. Valittiin yhteensä 15 positiivista rosuvastatiini tai atorvastatiini näytettä, jotka analysointiin uudella määrittämenetelmällä. Uu-

den määrittymenetelmän tuloksia verrattiin vanhalla määrittymenetelmällä saattuihin tuloksiin. Tavoitteena oli, että tulosten välinen poikkeavuus on alle 30 %. Taulukossa 18 on esitetty uuden ja vanhan määrittymenetelmän antamat tulokset atorvastatiinille ja rosuvastatiinille, sekä niiden poikkeama toisistaan.

Taulukko 18. Uuden ja vanhan määrittymenetelmän tulosten poikkeavuus.

Näyte	Atorvastatiini (mg/l)	Rosuvastatiini (mg/l)	Vanhalla määrittymenetelmällä saatu pitoisuus (mg/l)	Poikkeama (%)
1	0,14	-	0,08	70
2	0,04	-	0,01	250
3	0,58	-	0,16	261
4	0,04	-	0,04	8
5	0,02	-	0,01	126
6	0,04	-	0,02	111
7	0,02	-	0,01	66
8	0,27	-	0,06	345
9	0,04	-	0,02	111
Keskiarvo				150
10	-	0,13	0,09	40
11	-	0,01	0,01	11
12	-	0,17	0,19	11
13	-	0,07	0,05	45
14	-	0,27	0,14	94
15	-	0,05	0,04	18
Keskiarvo				29

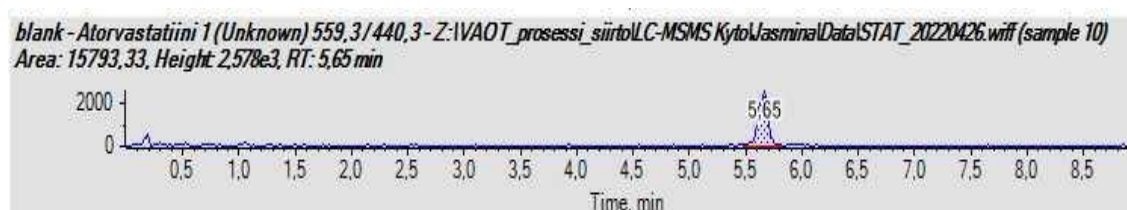
Uudella määritysmenetelmällä saadut atorvastatiini tulokset eroavat reilusti vanhan määritysmenetelmän tuloksista. Rosuvastatiini tulokset eroavat juuri alle 30 % vanhan määritysmenetelmän tuloksista.

Vanhassa määritysmenetelmässä sisäisenä standardina on käytetty dibenstsepiiniä ja uudessa määritysmenetelmässä atorvastatiinilla ja rosuvastatiinilla on omat deuteroidut sisäiset standardit atorvastatiini-d5 ja rosuvastatiini-d6. Rosuvastatiinin tulokset poikkeavat vanhan määritysmenetelmän tuloksista vähemmän siksi, koska rosuvastatiini ja dibenstepiinin ei reagoi vainajaveren matriisiin samalla tavalla kuin atorvastatiini.

Deuteroitua sisäistä standardia pidetään tarkempana, koska se on hyvin samankaltainen kuin itse tutkittava yhdiste. Tämän takia uuden määritysmenetelmän tuloksia pidetään oikeina ja vanhan määritysmenetelmän tuloksia virheellisinä.

6.11 Kontaminaatiotestaus

Kontaminaatioita testattiin injektoimalla kahta suurinta kalibrointipitoisuutta kuusi kertaa peräkkäin, joiden kummankin jälkeen injektoitiin nollanäyte neljä kertaa peräkkäin. Katsottiin, näkyykö nollanäytteessä tutkittavia yhdisteitä, kun sitä ennen on ajettu näyte, jonka pitoisuus on suuri. Suurien kalibrointipitoisuuksien jälkeen ajetuissa nollanäytteissä havaittiin kontaminaatiota. Kuvassa 9 on esitetty tyypillinen kontaminaatiopiikki



Kuva 9. Kontaminaatiopiikki kromatogrammissa.

Laitteen injektioneulan pesuohjelmaa muutettiin vähentämään neulasta tulevaa kontaminaatiota näytteisiin ja kontaminaatiotestaus tehdään uudelleen ennen määritysmenetelmän käyttöönottoa.

6.12 Valvontakortit

Valvontakorttien hälytysrajoiksi päätettiin asettaa $\pm 20\%$ kontrollinäytteen tiedetystä pitoisuudesta. Valvontakorttien toimintarajoiksi kullekin yhdisteelle päätettiin ottaa laskettu laajennettu mittausepävarmuus. Valvontakortit tehtiin molemmille kontrollipitoisuuksille. THL:n ohjeistuksen mukaan kontrollinäytteen pitoisuuden ylittäessä hälytysrajan tai lähestyy sitä viidessä mittauskerrassa peräkkäin, on syytä ruveta toimenpiteisiin, kuten esimerkiksi tarkistamalla kontrolliliuoksen säilyvyys ja tekemällä uusi kontrolliliuos seuraavaan ajokertaan. Kontrollinäytteen pitoisuuden mentäessä toimintarajalle tai sen yli ajosarja tulee hylätä. Liitteessä 7 on esitetty yhdisteiden valvontakortit.

Atorvastatiinin kummankin pitoisuustason kontrollinäytteet asettuvat toimintarajojen sisäpuolelle. Alemmalla pitoisuustasolla ajokertojen 1, 5 ja 7 kontrollinäytteen pitoisuudet osuvat tai ovat hieman yli ylemmän hälytysrajan, mutta eivät peräkkäisillä ajokerroilla.

Fluvastatiinin kontrollinäytteen pitoisuudet menevät alemmassa pitoisuustasossa ajokerroilla 4 ja 5 yli ylemmän hälytysrajan. Ylemmällä pitoisuustasolla fluvastatiinin kontrollinäytteen pitoisuudet ovat ylemmällä hälytysrajalla ajokertoina 5 ja 8. Koska fluvastatiinin mittausepävarmuus oli hyvin suuri, toimintarajoja ei voida pitää oikeellisena. Alemman pitoisuustason ajokertojen 4 ja 5 kontrollinäytteiden pitoisuudet olisivat ylittäneet toimintaraja, jos toimintarajat olisi laskettu mittausepävarmuudella noin $\pm 30\%$, mikä oli tavoite.

Lovastatiinin kummankin pitoisuustason kontrollinäytteet asettuvat toimintarajojen sisäpuolelle eivätkä ole viidessä peräkkäisessä ajossa yli hälytysrajojen. Alemmalla pitoisuustasolla toisen ajokerran kontrollinäytteen pitoisuus on ollut

hieman yli alemman hälytysrajan. Ylemmällä pitoisuustasolla ajokerran 6 kontrollinäytteen pitoisuus osuu ylemmälle hälytysrajalle.

Rosuvastatiinin alemman pitoisuustason kontrollinäytteen pitoisuudet ajokertoina 1 ja 3 ovat hieman korkeat, mutta toimintarajan sisäpuolella. Ylemmällä pitoisuustasolla rosuvastatiinin kontrollinäytteiden pitoisuudet asettuvat tasaisesti tiedetyn pitoisuuden ympärille. Rosuvastatiinin kummankin pitoisuustason kontrollinäytteet asettuvat toimintarajojen sisäpuolelle eivätkä ole viidessä peräkkäisessä ajossa yli hälytysrajojen.

Simvastatiinin alemman pitoisuustason kontrollinäytteiden pitoisuudet olivat neljässä ensimmäisessä ajokerrassa lähellä tai hieman yli alemman hälytysrajan. Viidennellä mittauskerralla pitoisuus oli kuitenkin hieman yli tiedetyn pitoisuuden, joten toimenpiteisiin ei ryhdytty. Myös 9 ajokerran kontrollinäytteen pitoisuus ylitti hieman ylemmän toimintarajan. Ylemmässä pitoisuustasossa kontrollinäytteen pitoisuudet asettuivat tasaisesti hälytysrajojen sisäpuolelle.

7 Johtopäätökset

Validointi päätettiin hyväksyä atorvastatiinin ja rosuvastatiinin osalta ja määrittämenetelmä sopii hyvin atorvastatiinin ja rosuvastatiinin määrittämiseen verinäytteistä. Fluvastatiinin, simvastatiinin ja lovastatiinin osalta validointi hylättiin. Validoinnin tulokset on koottu taulukkoon 19. Taulukossa virheällä värillä merkityt tulokset ovat hyväksyttäviä, oranssilla värillä merkityt tulokset ovat tavoitearvojen rajamailla ja punaisella merkityt tulokset hylättyjä.

Taulukko 19. Yhteenveto validoinnin tuloksista.

Validointiparametri	Tavoite	Atorvastatiini	Fluvastatiini	Simvastatiini	Rosuvastatiini	Simvastatiini
Selektiivisyys	≤ 10 %	0	7	0	0	0

Matrii-siefekti	Näytteiden välinen hajonta yli kolme kertaa suurempi kuin näytteiden sisäinen ja Bias-% ≤ 20 %	Hajonta 0,94 Bias-% 20	Hajonta 0,59 Bias-% 14	Hajonta 0,27 Bias-% 11	Hajonta 0,96 Bias-% 4	Hajonta 0,46 Bias-% 2
Alempi määrittämiss raja (RSD-%)	≤ 20 %	11	20	44	11	46
Alempi määrittämiss raja (Bias-%)	≤ 20 %	25	25	3	19	8
To-teamis-raja	S/N ≥ 3	0,004 mg/l	0,034 mg/l	0,00005 mg/l	0,0005 mg/l	0,001 mg/l
Oikeellisuus 1. pitoisuustaso	Bias-% ± 20	18	55	4	6	21
Oikeellisuus 2. pitoisuustaso	Bias-% ± 20	1	33	22	4	25
Toistettavuus 1. pitoisuustaso	RSD-% ± 20	7	7	21	13	23
Toistettavuus 2. pitoisuustaso	RSD-% ± 20	12	7	24	15	15
Uusittavuus 1.	RSD-% ≤ 30	8	18	13	14	24

pitoisuus- taso						
Uusittavuus 2. pitoisuustaso	RSD-% ≤ 30	7	6	25	7	16
Saanto	~ 100 %	80	130	97	101	102
Säilyvyys 1. pitoisuustaso	≤ 20 % alkuperäisestä pitoisuudesta	4. pv	8. pv	< 4. pv	8. pv	< 4. pv
Säilyvyys 2. pitoisuustaso	≤ 20 % alkuperäisestä pitoisuudesta	8. pv	8.pv	< 6. pv	8.pv	6. pv
Pieneimmän näytteen verifiointi	≤ 30 %	0,5	62	22	6	53
Mittausepävarmuus	≤ 30 %	33	69	41	28	32
Mukit mittausepävarmuus	≤ 30 %	34	116	53	39	71
Menetelmän toistettavuus vanhoilla positiivisilla näytteillä	≤ 30 %	150	-	-	29	-

Ennen menetelmän käyttöönottoa lovastatiinille, simvastatiinille ja fluvastatiinille tilataan omat deuteroidut sisäiset standardit menetelmän tulosten luotettavuutta ja toistettavuutta parantamaan. Uudet deuteroidut sisäiset standardit lisätään menetelmään ja validointia jatketaan fluvastatiinin, lovastatiinin ja simvastatiinin osalta uusien sisäisten standardien kanssa. Tässä opinnäytetyössä havaittua

suurta matriisiefektieroa vainajien ja elävien verinäytteiden välillä ei ole havaittu aiemmin.

Lisäksi vielä ennen määritysmenetelmän käyttöönottoa tehdään uuttoprosessiin muutoksia, jotta näytteitä saataisiin puhtaimmiksi. Validoinnin aikana laite liikaantui useaan kertaan ja se jouduttiin puhdistamaan. Opinnäytetyön suorittamisen aikana kokeiltiin, auttaako metanolisakkauksen ajan pidentäminen puhdistamaan näytteitä. Metanolisaostus tehtiin yön yli ja tulokseksi saatiin, että laite oli puhtaampi yön yli sakattujen näytteiden jälkeen. Myös muita mahdollisia uuttoja ja näytteiden puhdistusmenetelmiä testataan mahdollisesti ennen määritysmenetelmän käyttöönottoa.

Lähteet

- 1 Oikeuskemia. Verkkoaineisto. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. <<https://thl.fi/fi/thl/organisaatio/osastot-ja-yksikot/valtion-palvelut/oikeuskemia>>. Luettu 20.4.2022.
- 2 Kolesteroli paljastaa verisuonten terveydentilan. Verkkoaineisto. Terveystalo. <<https://www.terveystalo.com/fi/tietopakettit/kolesteroli/#Mit%c3%a4%20kolesteroli%20on?>> Luettu 23.4.2022.
- 3 Hekkala, Anna-Mari. 2019. Kolesterolilääkkeet. Verkkoaineisto. Sydänliitto. <<https://sydan.fi/fakta/kolesterolilaakkeet/>>. 1.8.2019. Luettu 23.4.2022.
- 4 Koulu, Markku (toim.) & Tuomisto Jouko (toim.). 2007. Farmakologia ja toksikologia. Kuopio: Medicina.
- 5 Shas, Yasar; Iqbal, Zafar; Ahmad, Lateef; Nazir, Shabnam; Waston, David G; Khuba, Fazil; Khan, Abbas & Nasir, Fazil. 2015. Determination of Rosuvastatin and its Metabolite N-Desmethyl Rosuvastatin in Human Plasma by Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry: Method Development, Validation, and Application to Pharmacokinetic Study. Verkkoaineisto. <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10826076.2014.982866>>. Luettu 23.4.2022.
- 6 Atorvastatin. PubChem. Verkkoaineisto. National Center for Biotechnology Information. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/60823>>. Luettu 5.5.2022.
- 7 Fluvastatin. PubChem. Verkkoaineisto. National Center for Biotechnology Information. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/446155>>. Luettu 5.5.2022.
- 8 Lovastatin. PubChem. Verkkoaineisto. National Center for Biotechnology Information. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/53232>>. Luettu 5.5.2022.
- 9 Rosuvastatin. PubChem. Verkkoaineisto. National Center for Biotechnology Information. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/446157>>. Luettu 5.5.2022.
- 10 Simvastatin. PubChem. Verkkoaineisto. National Center for Biotechnology Information. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54454>>. Luettu 5.5.2022.

- 11 Chou, Y.-C.; Wang, Y.-K.; Charng, M.-J. & Ueng, Y.-F. 2013. Determination of serum atorvastatin concentrations in lipid-controlling patients with and without myalgia syndrome. Verkkoaineisto. <<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.05.003>>. Luettu 10.3.2022.
- 12 Siekmeier, R.; Lattke, P.; Mix, C.; Park, J.-W. & Jaross, W. 2001. Dose Dependency of Fluvastatin Pharmacokinetics in Serum Determined by Reversed Phase HPLC. Verkkoaineisto. <Doi:10.1177/107424840100600205>. Luettu 10.3.2022.
- 13 Lovastatin. Verkkoaineisto. Drugbank Online. <<https://go.drugbank.com/drugs/DB00227>>. Luettu 10.3.2022.
- 14 DeGorter, M.K.; Tirona, R.G.; Schwarz, U.I.; Choi, y.-H.; Dresser, G.K.; Suskin, N.; Myers, K.; Zou, G.; Iwucukwu, O.; Wei, W.-Q.; Wilke, R.A.; Hegele, R.A. & Kim, R.B. 2013. Clinical and Pharmacogenetic Predictors of Circulating Atorvastatin and Rosuvastatin Concentrations in Routine Clinical Care. Verkkoaineisto. <Doi: 10.1161/CIRCGENETICS.113.000099>. Luettu 10.3.2022.
- 15 Backman, J. 2000. Plasma concentrations of active simvastatin acid are increased by gemfibrozil. Verkkoaineisto. <Doi: 10.1067/mcp.2000.108507>. Luettu 10.3.2022.
- 16 Neuvonen, Pertti J. (toim.); Backman, Janne T. (toim.); Himberg, Jakko-Juhani (toim.); Huupponen, Risto (toim.); Keränen, Tapani (toim.) & Kivistö, Kari T. (toim.) 2011. Kliininen farmakologia ja lääkehoito. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy.
- 17 Ketola, Raimo (toim.); Kostianen, Risto (toim.); Kotiaho, Tapio (toim.) & Vainiotalo, Pirjo (toim.). 2012. Massaspektrometrian perusteet. Helsinki: Hakapaino.
- 18 Gemini-NX C18. Verkkoaineisto. Hplc-Mart. <<http://hplcmart.com/hplc/viewproduct/id:12473/gemini-nx-c18/phenomenex/reversed-phase#undefined>>. Luettu 1.5.2022.
- 19 Korkean suorituskyvyn nestekromatografia-massaspektrometria. Verkkoaineisto. Measurlabs. <<https://measurlabs.com/fi/menetelmat/nestekromatografia-massaspektrometria-hplc-ms/>>. Luettu 1.5.2022.
- 20 Tujin, Shi; Dian, Su; Tao, Liu; Keqi, Tang; David, G. Camp II, Wei-Jun, Qian & Richard, D. Smith. 2012. Advancing the sensitivity of selected reaction monitoring-based targeted quantitative proteomics. Verkkoaineisto. <Doi:10.1002/pmic.201100436>. Luettu 1.5.2022.

- 21 Sample Preparation fundamentals for chromatography. Verkkoaineisto. Agilent Technologies. <https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5991-3326EN_SPHB.pdf>. Luettu 5.5.2022.
- 22 Dams, Riet; Huestis, Marilyn A.; Lambert, Willy E. & Murphy, Constance M. 2003. Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: Influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. Verkkoaineisto. <[https://link.springer.com/article/10.1016/S1044-0305\(03\)00574-9](https://link.springer.com/article/10.1016/S1044-0305(03)00574-9)>. Luettu 8.5.2022.
- 23 Kuolemansyyn selvittäminen. Verkkoaineisto. Valvira. <https://www.valvira.fi/terveydenhuolto/hyva-ammatinharjoittaminen/kuolemansyyn_selvittaminen>. Luettu 8.5.2022.
- 24 Penttilä, Antti (toim.); Hirvonen, Jorma (toim.); Saukko, Pekka (toim.) & Karhunen, Pekka J. (toim.). 2000. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- 25 A Better Understanding of the Interpretation of Postmortem Blood Drug Concentrations. 2011. Verkkoaineisto. Journal of Analytical Toxicology. <<https://academic.oup.com/jat/article-pdf/35/6/381/2312261/35-6-381.pdf>>. Luettu 8.5.2022.
- 26 Principals of various protein precipitation methods. Verkkoaineisto. BOC Redox Technologies. <<https://bioquochem.com/principals-of-various-protein-precipitation-methods/#>>. Luettu 8.5.2022.
- 27 Validointiohje TO-008. Yrityksen sisäinen dokumentti. Terveysten ja hyvinvoinnin laitos.

Nestekromatografिन ajo-olosuhteet

Nestekromatografिन ajo-olosuhteet:

Taulukko 1. Nestekromatografिन ajo-olosuhteet.

Injektioilavuus	20 µl
Draw speed	200 µl/min
Eject speed	200 µl/min
Washtime	1 sec
Total time	9 min

Taulukko 2. Nestekromatografिन gradientiajo.

	Totaltime (min)	Flow rate (µl/min)	B (%)	A (%)
0	0,00	350	60,0	40,0
1	3,00	350	5,0	95,0
2	6,00	350	5,0	95,0
3	6,50	350	60,0	40,0
4	9,00	350	60,0	40,0

Matriisiefektin mittaus- ja laskutulokset

Atorvastatiinin matriisiefektin mittaustulokset, niistä lasketut hajonnat näytteiden sisällä ja välillä, sekä poikkeama teoreettisesta arvosta on esitetty kuvassa 1.

M 1	0,0226	Atorvastatiini	Näytteiden sisällä			
M 1.2	0,025118		s	ka	RSD-%	Bias-%
M 1.3	0,027035	M1	0,001910956	0,02516675	7,59318	
M 1.4	0,025961	M2	0,001379039	0,0123745	11,1442	
M 2	0,011155	M3	0,001281473	0,01403275	9,13202	
M 2.2	0,014246	M4	0,001803694	0,0139485	12,9311	
M 2.3	0,01255	M5	0,000644545	0,014183	4,54449	
M 2.4	0,011547	M6	0,00019418	0,013712	1,41613	
M 3	0,01374	M7	0,000832865	0,01364825	6,10236	
M 3.2	0,013846	M8	0,000956849	0,0138365	6,9154	
M 3.3	0,015804	M9	0,001178067	0,01468225	8,02375	
M 3.4	0,012741	M10	0,001843329	0,014095	13,0779	
M4	0,016411	yht.	0,000561447	1,50E-02	3,75	19,7436
M 4.2	0,014174					
M 4.3	0,012477	Atorvastatiini	Näytteiden välillä			
M 4.4	0,012732		s	ka	RSD-%	
M 5	0,014554	1. Rinnakkaine	0,003048854	1,50E-02	2,03E+01	
M 5.2	0,01438	2. Rinnakkaine	0,003783171	1,46E-02	2,59E+01	
M 5.3	0,014573	3. Rinnakkaine	0,004236191	1,53E-02	2,77E+01	
M 5.4	0,013225	4. Rinnakkaine	0,004088507	1,49E-02	2,74E+01	
M 6	0,013442	yht.	0,000528373	1,50E-02	3,53E+00	
M 6.2	0,013699					
M 6.3	0,013852	Erostus näytteiden välillä/näytteiden sisällä			0,94	
M 6.4	0,013855					
M 7	0,012746					
M 7.2	0,013228					
M 7.3	0,013981					
M 7.4	0,014638					
M 8	0,015183					
M 8.2	0,012928					
M 8.3	0,013696					
M 8.4	0,013539					
M 9	0,014683					
M 9.2	0,013308					
M 9.3	0,014553					
M 9.4	0,016185					
M 10	0,01564					
M 10.2	0,01142					
M 10.3	0,014581					
M 10.4	0,014739					

Kuva 1. Atorvastatiinin matriisiefektin tulokset.

Fluvastatiinin matriisiefektin mittaustulokset, niistä lasketut hajonnat näytteiden sisällä ja välillä, sekä poikkeama teoreettisesta arvosta on esitetty kuvassa 2.

M 1	0,100185	Fluvastatiini 1	Näytteiden sisällä			
M 1.2	0,11383		s	ka	RSD-%	Bias-%
M 1.3	0,102363	M1	0,00733055	0,10545933	6,95107	
M 1.4	0,117986	M2	0,012483143	0,12354375	10,1042	
M 2	0,138311	M3	0,196483307	0,3962675	49,5835	
M 2.2	0,128323	M4	0,088893302	0,189945	46,7995	
M 2.3	0,109555	M5	0,206913063	0,238539	86,7418	
M 2.4	0,140897	M6	0,02068254	0,10359825	19,9642	
M 3	0,58551	M7	0,02173109	0,0778115	27,9279	
M 3.2	0,349947	M8	0,027805463	0,11614175	23,941	
M 3.3	0,508716	M9	0,026298192	0,1429465	18,3972	
M 3.4	0,313468	M10	0,110017907	0,32014225	34,3653	
M4	0,192986	yht.	0,0762706	1,81E-01	42,04	-13,533
M 4.2	0,112006					
M 4.3	0,14132	Fluvastatiini 1	Näytteiden välillä			
M 4.4	0,110772		s	ka	RSD-%	
M 5	0,477019	1. Rinnakkaine	0,18420462	2,29E-01	8,06E+01	
M 5.2	0,10671	2. Rinnakkaine	0,103641905	1,66E-01	6,24E+01	
M 5.3	0,131888	3. Rinnakkaine	0,14312057	1,83E-01	7,82E+01	
M 5.4	0,087816	4. Rinnakkaine	0,082155951	1,54E-01	5,33E+01	
M 6	0,096946	yht.	0,045026915	1,83E-01	24,61	
M 6.2	0,134029					
M 6.3	0,095602	Erustus näytteiden välillä/näytteiden sisällä			0,59	
M 6.4	0,109279					
M 7	0,060088					
M 7.2	0,073935					
M 7.3	0,067944					
M 7.4	0,077982					
M 8	0,143732					
M 8.2	0,116621					
M 8.3	0,126232					
M 8.4	0,134919					
M 9	0,109762					
M 9.2	0,158079					
M 9.3	0,169026					
M 9.4	0,155375					
M 10	0,38131					
M 10.2	0,366667					
M 10.3	0,377217					
M 10.4	0,293479					

Kuva 2. Fluvastatiinin matriisiefektin tulokset.

Lovastatiinin matriisiefektin mittaustulokset, niistä lasketut hajonnat näytteiden sisällä ja välillä, sekä poikkeama teoreettisesta arvosta on esitetty kuvassa 3.

M 1	0,002038	Lovastatiini 1	Näytteiden sisällä			
M 1.2	0,002769		s	ka	RSD-%	Bias-%
M 1.3	0,003393	M1	0,000569228	0,00279925	20,335	
M 1.4	0,002997	M2	0,000451897	0,00276675	16,3331	
M 2	0,002958	M3	0,000629814	0,00249275	25,2658	
M 2.2	0,003285	M4	8,22734E-05	0,00242075	3,39868	
M 2.3	0,002579	M5	0,000251952	0,001822	13,8283	
M 2.4	0,002245	M6	0,000412967	0,002389	17,2862	
M 3	0,002914	M7	9,182E-05	0,00132875	6,91026	
M 3.2	0,002059	M8	0,000629154	0,00294975	21,3291	
M 3.3	0,003141	M9	0,000231472	0,002169	10,6718	
M 3.4	0,001857	M10	0,000414502	0,00221675	18,6987	
M4	0,002517	yht.	0,000204874	0,002335	8,77	11,2131
M 4.2	0,002402					
M 4.3	0,002444	Lovastatiini 1	Näytteiden välillä			
M 4.4	0,00232		s	ka	RSD-%	
M 5	0,002178	1. Rinnakkainen	0,000536075	2,47E-03	2,17E+01	
M 5.2	0,001756	2. Rinnakkainen	0,000609908	2,26E-03	2,70E+01	
M 5.3	0,001584	3. Rinnakkainen	0,000654199	2,29E-03	2,86E+01	
M 5.4	0,00177	4. Rinnakkainen	0,000655422	2,33E-03	2,82E+01	
M 6	0,002988	yht.	5,60381E-05	2,34E-03	2,40	
M 6.2	0,002109					
M 6.3	0,002121	Erustus näytteiden välillä/näytteiden sisällä			0,27	
M 6.4	0,002338					
M 7	0,001463					
M 7.2	0,001299					
M 7.3	0,001255					
M 7.4	0,001298					
M 8	0,003162					
M 8.2	0,002854					
M 8.3	0,002141					
M 8.4	0,003642					
M 9	0,002177					
M 9.2	0,002426					
M 9.3	0,001864					
M 9.4	0,002209					
M 10	0,002297					
M 10.2	0,00163					
M 10.3	0,002335					
M 10.4	0,002605					

Kuva 3. Lovastatiinin matriisiefektin tulokset.

Rosuvastatiinin matriisiefektin mittaustulokset, niistä lasketut hajonnat näytteiden sisällä ja välillä, sekä poikkeama teoreettisesta arvosta on esitetty kuvassa 4.

M 1	0,012139	Rosuvastatiini	Näytteiden sisällä			
M 1.2	0,012993		s	ka	RSD-%	Bias-%
M 1.3	0,014454	M1	0,001590186	0,01383075	11,4975	
M 1.4	0,015737	M2	0,001976973	0,01380825	14,3173	
M 2	0,015252	M3	0,002675103	0,0131675	20,316	
M 2.2	0,015007	M4	0,00168468	0,014729	11,4378	
M 2.3	0,014022	M5	0,001381105	0,01261325	10,9496	
M 2.4	0,010952	M6	0,001599806	0,01246125	12,8382	
M 3	0,016909	M7	0,001307262	0,011812	11,0672	
M 3.2	0,011062	M8	0,001136364	0,01273075	8,92614	
M 3.3	0,013271	M9	0,001501388	0,012043	12,4669	
M 3.4	0,011428	M10	0,001916087	0,01248475	15,3474	
M4	0,013672	yht.	0,000435162	1,30E-02	3,36E+00	3,7444
M 4.2	0,014542					
M 4.3	0,017166	Rosuvastatiini	Näytteiden välillä			
M 4.4	0,013536		s	ka	RSD-%	
M 5	0,014538	1. Rinnakkainen	0,002361099	1,32E-02	1,79E+01	
M 5.2	0,011539	2. Rinnakkainen	0,001470608	1,27E-02	1,16E+01	
M 5.3	0,012689	3. Rinnakkainen	0,001774881	1,32E-02	1,35E+01	
M 5.4	0,011687	4. Rinnakkainen	0,001470085	1,28E-02	1,15E+01	
M 6	0,014049	yht.	0,000419922	1,30E-02	3,24E+00	
M 6.2	0,010728					
M 6.3	0,011499	Erustus näytteiden välillä/näytteiden sisällä			0,96	
M 6.4	0,013569					
M 7	0,010442					
M 7.2	0,011942					
M 7.3	0,011322					
M 7.4	0,013542					
M 8	0,014399					
M 8.2	0,012292					
M 8.3	0,011849					
M 8.4	0,012383					
M 9	0,010546					
M 9.2	0,014114					
M 9.3	0,011194					
M 9.4	0,011572					
M 10	0,009697					
M 10.2	0,012755					
M 10.3	0,013725					
M 10.4	0,013762					

Kuva 4. Rosuvastatiinin matriisiefektin tulokset.

Simvastatiinin matriisiefektin mittaustulokset, niistä lasketut hajonnat näytteiden sisällä ja välillä, sekä poikkeama teoreettisesta arvosta on esitetty kuvassa 5.

M 1	0,002022	Simvastatiini 1	Näytteiden sisällä			
M 1.2	0,002075		s	ka	RSD-%	Bias-%
M 1.3	0,002858	M1	0,000506492	0,0024845	20,3861	
M 1.4	0,002983	M2	0,000580207	0,0025825	22,4669	
M 2	0,002574	M3	0,000343981	0,002594	13,2606	
M 2.2	0,003345	M4	0,000288323	0,002116	13,6258	
M 2.3	0,002474	M5	0,00038456	0,0014925	25,7662	
M 2.4	0,001937	M6	0,00010916	0,002121	5,14665	
M 3	0,002766	M7	0,000215782	0,0011955	18,0495	
M 3.2	0,002444	M8	0,000630394	0,0028795	21,8925	
M 3.3	0,002972	M9	0,000378862	0,0018515	20,4624	
M 3.4	0,002194	M10	0,000390606	0,00207325	18,8403	
M4	0,002485	yht.	0,000159464	2,14E-03	7,45E+00	1,85833
M 4.2	0,002188					
M 4.3	0,001969	Simvastatiini 1	Näytteiden välillä			
M 4.4	0,001822		s	ka	RSD-%	
M 5	0,001243	1. Rinnakkainen	0,000589963	2,22E-03	2,65E+01	
M 5.2	0,001483	2. Rinnakkainen	0,000612413	2,10E-03	2,92E+01	
M 5.3	0,002039	3. Rinnakkainen	0,000605707	2,14E-03	2,83E+01	
M 5.4	0,001205	4. Rinnakkainen	0,000747578	2,09E-03	3,57E+01	
M 6	0,002158	yht.	7,30501E-05	2,14E-03	3,42E+00	
M 6.2	0,00199					
M 6.3	0,002248	Erostus näytteiden välillä/näytteiden sisällä			0,46	
M 6.4	0,002088					
M 7	0,001477					
M 7.2	0,001251					
M 7.3	0,001044					
M 7.4	0,00101					
M 8	0,003255					
M 8.2	0,002592					
M 8.3	0,002141					
M 8.4	0,00353					
M 9	0,002167					
M 9.2	0,002067					
M 9.3	0,001318					
M 9.4	0,001854					
M 10	0,002096					
M 10.2	0,001515					
M 10.3	0,002374					
M 10.4	0,002308					

Kuva 5. Simvastatiinin matriisiefektin tulokset.

Tarkkuusnäytteiden mittaustulokset

Punaisella merkityt tulokset ovat jätetty pois laskuista niiden suuren poikkeavuuden vuoksi. Taulukossa 1. on esitetty atorvastatiinin oikeellisuusnäytteiden mittaustulokset.

Taulukko 1. Atorvastatiinin oikeellisuusnäytteiden mittaustulokset.

Näyte	1.pitoisuus-taso (mg/l)	Näyte	2.pitoisuus-taso (mg/l)
QC1-1	0,0044	QC2-1	0,1150
QC1-2	0,0042	QC2-2	0,1115
QC1-3	0,0047	QC2-3	0,1032
QC1-4	0,0046	QC2-4	0,1046
QC1-5	0,0046	QC2-5	0,1070
QC1-6	0,0041	QC2-6	0,1046
QC1-7	0,0049	QC2-7	0,0933
QC1-8	0,0049	QC2-8	0,0932
QC1-9	0,0048	QC2-9	0,0949
QC1-10	0,0041	QC2-10	0,0792
QC1-11	0,0047	QC2-11	0,0909
QC1-12	0,0047	QC2-12	0,0915
QC1-13	0,0045	QC2-13	0,1108
QC1-14	0,0047	QC2-14	0,1306
QC1-15	0,0046	QC2-15	0,1250
QC1-16	0,0039	QC2-16	0,1080
QC1-17	0,0051	QC2-17	0,1162
QC1-18	0,0040	QC2-18	0,1139
Bias-%	18	Bias-%	1
RSD-%	7	RSD-%	12

Taulukossa 2. on esitetty fluvastatiinin oikeellisuusnäytteiden mittaustulokset.

Taulukko 2. Fluvastatiinin oikeellisuusnäytteiden mittaustulokset.

Näyte	1.pitoisuus- taso (mg/l)	Näyte	2.pitoisuus- taso (mg/l)
QC1-1	0,1010	QC2-1	2,5482
QC1-2	0,0999	QC2-2	2,5594
QC1-3	0,0984	QC2-3	2,3552
QC1-4	0,1096	QC2-4	2,6473
QC1-5	0,1137	QC2-5	2,6294
QC1-6	0,1150	QC2-6	2,5198
QC1-7	0,0961	QC2-7	2,1752
QC1-8	0,0969	QC2-8	2,1060
QC1-9	0,0985	QC2-9	2,8327
QC1-10	0,0970	QC2-10	2,0682
QC1-11	0,0975	QC2-11	2,4888
QC1-12	0,1062	QC2-12	2,2449
QC1-13	0,1439	QC2-13	2,3320
QC1-14	0,1459	QC2-14	2,6175
QC1-15	0,1091	QC2-15	2,6563
QC1-16	0,0847	QC2-16	2,3304
QC1-17	0,0934	QC2-17	2,2913
QC1-18	0,0884	QC2-18	2,4858
Bias-%	55	Bias-%	33
RSD-%	7	RSD-%	7

Taulukossa 3. on esitetty lovastatiinin oikeellisuusnäytteiden mittaustulokset.

Taulukko 3. Lovastatiinin oikeellisuusnäytteiden tulokset.

Näyte	1.pitoisuus- taso (mg/l)	Näyte	2.pitoisuus- taso (mg/l)
QC1-1	0,0006	QC2-1	0,0182
QC1-2	0,0005	QC2-2	0,0195
QC1-3	0,0004	QC2-3	0,0185
QC1-4	0,0005	QC2-4	0,0182
QC1-5	0,0006	QC2-5	0,0179
QC1-6	0,0005	QC2-6	0,0164
QC1-7	0,0006	QC2-7	0,0138
QC1-8	0,0007	QC2-8	0,0113
QC1-9	0,0008	QC2-9	0,0120
QC1-10	0,0006	QC2-10	0,0102
QC1-11	0,0007	QC2-11	0,0119
QC1-12	0,0005	QC2-12	0,0125
QC1-13	0,0015	QC2-13	0,0096
QC1-14	0,0005	QC2-14	0,0115
QC1-15	0,0008	QC2-15	0,0109
QC1-16	0,0004	QC2-16	0,0096
QC1-17	0,0008	QC2-17	0,0091
QC1-18	0,0004	QC2-18	0,0103
Bias-%	4	Bias-%	22
RSD-%	21	RSD-%	24

Taulukossa 4. on esitetty rosuvastatiinin oikeellisuusnäytteiden tulokset.

Taulukko 4. Rosuvastatiinin oikeellisuusnäytteiden mittaustulokset.

Näyte	1.pitoisuus- taso (mg/l)	Näyte	2.pitoisuus- taso (mg/l)
QC1-1	0,0033	QC2-1	0,1028
QC1-2	0,0037	QC2-2	0,1081
QC1-3	0,0031	QC2-3	0,0933
QC1-4	0,0040	QC2-4	0,1001
QC1-5	0,0041	QC2-5	0,1078
QC1-6	0,0033	QC2-6	0,1008
QC1-7	0,0051	QC2-7	0,0832
QC1-8	0,0036	QC2-8	0,0816
QC1-9	0,0049	QC2-9	0,0922
QC1-10	0,0050	QC2-10	0,0779
QC1-11	0,0044	QC2-11	0,0852
QC1-12	0,0063	QC2-12	0,0868
QC1-13	0,0043	QC2-13	0,1132
QC1-14	0,0045	QC2-14	0,1227
QC1-15	0,0041	QC2-15	0,1223
QC1-16	0,0060	QC2-16	0,1190
QC1-17	0,0047	QC2-17	0,1105
QC1-18	0,0042	QC2-18	0,1204
Bias-%	6	Bias-%	4
RSD-%	13	RSD-%	15

Taulukossa 5. on esitetty simvastatiinin oikeellisuusnäytteiden tulokset.

Taulukko 5. Simvastatiinin oikeellisuusnäytteiden tulokset.

Näyte	1.pitoisuus- taso (mg/l)	Näyte	2.pitoisuus- taso (mg/l)
QC1-1	0,0005	QC2-1	0,0145
QC1-2	0,0005	QC2-2	0,0154
QC1-3	0,0005	QC2-3	0,0148
QC1-4	0,0006	QC2-4	0,0150
QC1-5	0,0005	QC2-5	0,0143
QC1-6	0,0005	QC2-6	0,0128
QC1-7	0,0004	QC2-7	0,0127
QC1-8	0,0005	QC2-8	0,0113
QC1-9	0,0004	QC2-9	0,0122
QC1-10	0,0004	QC2-10	0,0098
QC1-11	0,0004	QC2-11	0,0111
QC1-12	0,0004	QC2-12	0,0108
QC1-13	0,0021	QC2-13	0,0104
QC1-14	0,0003	QC2-14	0,0089
QC1-15	0,0005	QC2-15	0,0103
QC1-16	0,0007	QC2-16	0,0109
QC1-17	0,0004	QC2-17	0,0112
QC1-18	0,0001	QC2-18	0,0107
Bias-%	21	Bias-%	25
RSD-%	23	RSD-%	15

Laitteen toistettavuuskokeiden mittaustulokset

Taulukossa 1. on esitetty laitteen toistettavuuskokeiden injektioiden mittaustulokset kullekin yhdisteelle.

Taulukko 1. Laitteen toistettavuuskokeiden mittaustulokset.

Yhdiste	Injektio	Pitoisuus (mg/ml)
Atorvastatiini	1	0,0041
	2	0,0045
	3	0,0040
	4	0,0045
	5	0,0045
	6	0,0052
	RSD-%	
Fluvastatiini	1	0,1150
	2	0,1151
	3	0,1161
	4	0,1169
	5	0,1251
	6	0,1212
	RSD-%	
Lovastatiini	1	0,0050
	2	0,0008
	3	0,0006
	4	0,0007
	5	0,0005
	6	0,0005
	RSD-%	
Rosuvastatiini	1	0,0059

	2	0,0053
	3	0,0052
	4	0,0051
	5	0,0055
	6	0,0053
RSD-%		5
Simvastatiini	1	0,0005
	2	0,0006
	3	0,0005
	4	0,0006
	5	0,0004
	6	0,0005
RSD-%		10

Uusittavuuskokeiden mittaustulokset

Atorvastatiinin uusittavuuskokeiden kahden henkilön väliset tulokset ja niistä laskettu RSD-% on esitetty kuvassa 1.

Laitteen injektioneulan pesuohjelmaa muutettiin vähentämään neulasta tulevaa kontaminaatiota näytteisiin ja kontaminaatiotestaus tehdään uudelleen ennen määritysmenetelmän käyttöönottoa.

Kuva 1. Atorvastatiinin uusittavuuskokeiden tulokset.

Fluvastatiinin uusittavuuskokeiden kahden henkilön väliset tulokset ja niistä laskettu RSD-% on esitetty kuvassa 2.

ALEMPI PITOISUUSTASO					
Henkilö 1			Henkilö 2		
		C			C
QC1-1	Fluvastatiini 1	0,10099	QC1-1	Fluvastatiini 1	0,1439
QC1-2	Fluvastatiini 1	0,09992	QC1-2	Fluvastatiini 1	0,1459
QC1-3	Fluvastatiini 1	0,09838	QC1-3	Fluvastatiini 1	0,1091
QC1-4	Fluvastatiini 1	0,10964	QC1-4	Fluvastatiini 1	0,0847
QC1-5	Fluvastatiini 1	0,11368	QC1-5	Fluvastatiini 1	0,0934
QC1-6	Fluvastatiini 1	0,11504	QC1-6	Fluvastatiini 1	0,0884
	s	0,01943283			
	ka	0,1085875			
	RSD-%	17,8960078			
YLEMPI PITOISUUSTASO					
Henkilö 1			Henkilö 2		
		C			C
QC2-1	Fluvastatiini 1	2,54817	QC2-1	Fluvastatiini 1	2,332
QC2-2	Fluvastatiini 1	2,5594	QC2-2	Fluvastatiini 1	2,6175
QC2-3	Fluvastatiini 1	2,35515	QC2-3	Fluvastatiini 1	2,6563
QC2-4	Fluvastatiini 1	2,64728	QC2-4	Fluvastatiini 1	2,3304
QC2-5	Fluvastatiini 1	2,62943	QC2-5	Fluvastatiini 1	2,2913
QC2-6	Fluvastatiini 1	2,51978	QC2-6	Fluvastatiini 1	2,4858
	s	0,1363763			
	ka	2,49770917			
	RSD-%	5,46005538			

Kuva 2. Fluvastatiinin uusittavuuskokeiden tulokset.

Lovastatiinin uusittavuuskokeiden kahden henkilön väliset tulokset ja niistä laskettu RSD-% on esitetty kuvassa 3.

ALEMPI PITOISUUSTASO						
Henkilö 1		C		Henkilö 2	C	
QC1-1	Lovastatiini 1	0,00056		QC1-1	Lovastatiini 1	0,0015
QC1-2	Lovastatiini 1	0,00051		QC1-2	Lovastatiini 1	0,0005
QC1-3	Lovastatiini 1	0,00043		QC1-3	Lovastatiini 1	0,0008
QC1-4	Lovastatiini 1	0,00051		QC1-4	Lovastatiini 1	0,0004
QC1-5	Lovastatiini 1	0,00056		QC1-5	Lovastatiini 1	0,0008
QC1-6	Lovastatiini 1	0,00051		QC1-6	Lovastatiini 1	0,0004
	s	6,2321E-05				
	ka	4,94E-04				
	RSD-%	12,62				
YLEMPI PITOISUUSTASO						
Henkilö 1		C		Henkilö 2	C	
QC2-1	Lovastatiini 1	0,01817		QC2-1	Lovastatiini 1	0,0096
QC2-2	Lovastatiini 1	0,01946		QC2-2	Lovastatiini 1	0,0115
QC2-3	Lovastatiini 1	0,01848		QC2-3	Lovastatiini 1	0,0109
QC2-4	Lovastatiini 1	0,01822		QC2-4	Lovastatiini 1	0,0096
QC2-5	Lovastatiini 1	0,01793		QC2-5	Lovastatiini 1	0,0091
QC2-6	Lovastatiini 1	0,01643		QC2-6	Lovastatiini 1	0,0103
	s	0,00369355				
	ka	0,01477857				
	RSD-%	24,9926076				

Kuva 3. Lovastatiinin uusittavuuskokeiden tulokset.

Rosuvastatiinin uusittavuuskokeiden kahden henkilön väliset tulokset ja niistä laskettu RSD-% on esitetty kuvassa 4.

ALEMPI PITOISUUSTASO						
Henkilö 1		C		Henkilö 2	C	
QC1-1	Rosuvastatiini 1	0,00334		QC1-1	Rosuvastatiini 1	0,004313
QC1-2	Rosuvastatiini 1	0,00366		QC1-2	Rosuvastatiini 1	0,004492
QC1-3	Rosuvastatiini 1	0,00314		QC1-3	Rosuvastatiini 1	0,004109
QC1-4	Rosuvastatiini 1	0,00404		QC1-4	Rosuvastatiini 1	0,006012
QC1-5	Rosuvastatiini 1	0,00414		QC1-5	Rosuvastatiini 1	0,004684
QC1-6	Rosuvastatiini 1	0,00329		QC1-6	Rosuvastatiini 1	0,004153
	s	0,00053531				
	ka	0,0039221				
	RSD-%	13,6485126				
YLEMPI PITOISUUSTASO						
Henkilö 1		C		Henkilö 2	C	
QC2-1	Rosuvastatiini 1	0,10283		QC2-1	Rosuvastatiini 1	0,113198
QC2-2	Rosuvastatiini 1	0,10812		QC2-2	Rosuvastatiini 1	0,122673
QC2-3	Rosuvastatiini 1	0,09334		QC2-3	Rosuvastatiini 1	0,122334
QC2-4	Rosuvastatiini 1	0,10005		QC2-4	Rosuvastatiini 1	0,119013
QC2-5	Rosuvastatiini 1	0,10784		QC2-5	Rosuvastatiini 1	0,11054
QC2-6	Rosuvastatiini 1	0,10076		QC2-6	Rosuvastatiini 1	0,1204
	s	0,00739986				
	ka	0,10919456				
	RSD-%	6,77676553				

Kuva 4. Rosuvastatiinin uusittavuuskokeiden tulokset.

Simvastatiinin uusittavuuskokeiden kahden henkilön väliset tulokset ja niistä laskettu RSD-% on esitetty kuvassa 5.

ALEMPI PITOISUUSTASO						
Henkilö 1			C	Henkilö 2		
QC1-1	Simvastatiini 1	0,00052		QC1-1	Simvastatiini 1	0,002063
QC1-2	Simvastatiini 1	0,0005		QC1-2	Simvastatiini 1	0,000252
QC1-3	Simvastatiini 1	0,00053		QC1-3	Simvastatiini 1	0,000526
QC1-4	Simvastatiini 1	0,00055		QC1-4	Simvastatiini 1	0,00073
QC1-5	Simvastatiini 1	0,0005		QC1-5	Simvastatiini 1	0,000389
QC1-6	Simvastatiini 1	0,00052		QC1-6	Simvastatiini 1	0,000121
	s	0,00012091				
	ka	0,0005017				
	RSD-%	24,0999725				
YLEMPI PITOISUUSTASO						
Henkilö 1			C	Henkilö 2		
QC2-1	Simvastatiini 1	0,01449		QC2-1	Simvastatiini 1	0,01044
QC2-2	Simvastatiini 1	0,0154		QC2-2	Simvastatiini 1	0,008857
QC2-3	Simvastatiini 1	0,01478		QC2-3	Simvastatiini 1	0,010293
QC2-4	Simvastatiini 1	0,01495		QC2-4	Simvastatiini 1	0,010928
QC-2-5	Simvastatiini 1	0,0143		QC-2-5	Simvastatiini 1	0,011209
QC-2-6	Simvastatiini 1	0,01278		QC-2-6	Simvastatiini 1	0,010653
	s	0,00212725				
	ka	0,01301667				
	RSD-%	16,342472				

Kuva 5. Simvastatiinin uusittavuuskokeiden tulokset.

MuKit-raportit

MEASUREMENT UNCERTAINTY ESTIMATION

Step	Action	Statiinit	9.5.2022																														
1	Specify Measurand	Measurand: Atorvastatiini Concentration range: 0,004-4 mg/l Sample Type (Matrix): Veri Analysis Principle (Analyzer etc.): LC-ESI-MS/MS Sample preparation: Metanolisakkaus																															
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: 9 Average concentration: 0,34832 mg/l Standard deviation, s_{Rw} : 5,76 % B: Routine replicate samples Matrisiefektin näytteet Number of routine replicate series: 10 Number of parallell measurements: 4 Concentration range: 0,01237-0,02518 mg/l Pooled standard deviation, s_r : 8,80 % $u(R_w) = \sqrt{s_{Rw}^2 + s_r^2}$: 10,52 %																															
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" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>i</th> <th>1</th> <th>2</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Certified concentration, $c_{ref\ i}$</td> <td>0,0038 mg/l</td> <td>0,1061 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>0,00451 mg/l</td> <td>0,10518 mg/l</td> </tr> <tr> <td>Standard deviation of measured concentration, s_{bias}</td> <td>7,25 %</td> <td>12,37 %</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>18,68 %</td> <td>-0,87 %</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> $u(c_{ref}) = \frac{\sum_{i=1}^N u(c_{ref\ i})}{N} : 0,50 \%$ $RMS_{bias} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N bias_i^2}{N}} : 13,23 \%$		i	1	2	Certified concentration, $c_{ref\ i}$	0,0038 mg/l	0,1061 mg/l	Standard uncertainty of certified concentration, $u(c_{ref\ i})$	0,50 %	0,50 %	Measured concentration, c_i	0,00451 mg/l	0,10518 mg/l	Standard deviation of measured concentration, s_{bias}	7,25 %	12,37 %	Number of Measurements, n_i	18	18	$bias_i = \frac{c_i - c_{ref\ i}}{c_{ref\ i}} \cdot 100\%$	18,68 %	-0,87 %	Period of measurements			Sample Type (Matrix)			Additional information		
i	1	2																															
Certified concentration, $c_{ref\ i}$	0,0038 mg/l	0,1061 mg/l																															
Standard uncertainty of certified concentration, $u(c_{ref\ i})$	0,50 %	0,50 %																															
Measured concentration, c_i	0,00451 mg/l	0,10518 mg/l																															
Standard deviation of measured concentration, s_{bias}	7,25 %	12,37 %																															
Number of Measurements, n_i	18	18																															
$bias_i = \frac{c_i - c_{ref\ i}}{c_{ref\ i}} \cdot 100\%$	18,68 %	-0,87 %																															
Period of measurements																																	
Sample Type (Matrix)																																	
Additional information																																	

about:blank9.5.2022

MEASUREMENT UNCERTAINTY ESTIMATION

		$u(bias) = \sqrt{RMS_{bias}^2 + u(c_{ref})^2} : 13,24 \%$
4	Convert components to standard uncertainty	$u(R_w) = 10,52 \%$ $u(bias) = 13,24 \%$
5	Calculate combined standard uncertainty, u_c	$u_c = \sqrt{u(R_w)^2 + u(bias)^2} = 16,90 \%$
6	Calculate expanded uncertainty, U	$U = 2 \cdot u_c = 34 \%$

Nordtest ReportPage 2 of 2

Kuva 1. Atorvastatiinin MuKit-raportti.

MEASUREMENT UNCERTAINTY ESTIMATION

Step	Action	Statiinit	9.5.2022																														
1	Specify Measurand	Measurand: Fluvastatiini Concentration range: 0,34-34 mg/l Sample Type (Matrix): Veri Analysis Principle (Analyzer etc.): LC-ESI-MS/MS Sample preparation: Metanolisakkaus																															
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: 9 Average concentration: 6,17193 mg/l Standard deviation, S_{Rw} : 11,43 % B: Routine replicate samples Matriisiefektin näytteet Number of routine replicate series: 10 Number of parallel measurements: 4 Concentration range: 0,06999-0,43941 mg/l Pooled standard deviation, S_r : 33,49 % $u(R_w) = \sqrt{S_{Rw}^2 + S_r^2}$: 35,38 %																															
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" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>i</th> <th>1</th> <th>2</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Certified concentration, $c_{ref\ i}$</td> <td>0,0631 mg/l</td> <td>1,7677 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>0,09774 mg/l</td> <td>2,35635 mg/l</td> </tr> <tr> <td>Standard deviation of measured concentration, S_{bias}</td> <td>7,03 %</td> <td>7,68 %</td> </tr> <tr> <td>Number of Measurements, n_i</td> <td>13</td> <td>13</td> </tr> <tr> <td>$bias_i = \frac{c_i - c_{ref\ i}}{c_{ref\ i}} \cdot 100\%$</td> <td>54,90 %</td> <td>33,30 %</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> $u(c_{ref}) = \frac{\sum_{i=1}^N u(c_{ref\ i})}{N} : 0,50 \%$ $RMS_{bias} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N bias_i^2}{N}} : 45,40 \%$		i	1	2	Certified concentration, $c_{ref\ i}$	0,0631 mg/l	1,7677 mg/l	Standard uncertainty of certified concentration, $u(c_{ref\ i})$	0,50 %	0,50 %	Measured concentration, c_i	0,09774 mg/l	2,35635 mg/l	Standard deviation of measured concentration, S_{bias}	7,03 %	7,68 %	Number of Measurements, n_i	13	13	$bias_i = \frac{c_i - c_{ref\ i}}{c_{ref\ i}} \cdot 100\%$	54,90 %	33,30 %	Period of measurements			Sample Type (Matrix)			Additional information		
i	1	2																															
Certified concentration, $c_{ref\ i}$	0,0631 mg/l	1,7677 mg/l																															
Standard uncertainty of certified concentration, $u(c_{ref\ i})$	0,50 %	0,50 %																															
Measured concentration, c_i	0,09774 mg/l	2,35635 mg/l																															
Standard deviation of measured concentration, S_{bias}	7,03 %	7,68 %																															
Number of Measurements, n_i	13	13																															
$bias_i = \frac{c_i - c_{ref\ i}}{c_{ref\ i}} \cdot 100\%$	54,90 %	33,30 %																															
Period of measurements																																	
Sample Type (Matrix)																																	
Additional information																																	

about:blank9.5.2022

MEASUREMENT UNCERTAINTY ESTIMATION

Step	Action	Statiinit	9.5.2022
4	Convert components to standard uncertainty	$u(bias) = \sqrt{RMS_{bias}^2 + u(c_{ref})^2}$: 45,40 % $u(R_w) = 35,38 \%$ $u(bias) = 45,40 \%$	
5	Calculate combined standard uncertainty, u_c	$u_c = \sqrt{u(R_w)^2 + u(bias)^2} = 57,56 \%$	
6	Calculate expanded uncertainty, U	$U = 2 \cdot u_c = 116 \%$	

Kuva 2. Fluvastatiinin MuKit-raportti.

MEASUREMENT UNCERTAINTY ESTIMATION

Step	Action	Statiinit	9.5.2022																														
1	Specify Measurand	Measurand: Lovastatiini Concentration range: 0,0005-0,5 mg/l Sample Type (Matrix): Veri Analysis Principle (Analyzer etc.): LC-ESI-MS/MS Sample preparation: Metanolisakkaus																															
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: 9 Average concentration: 0,0572 mg/l Standard deviation, S_{Rw} : 10,72 % B: Routine replicate samples Number of routine replicate series: 10 Number of parallel measurements: 4 Concentration range: 0,00133-0,00295 mg/l Pooled standard deviation, S_r : 16,69 % $u(R_w) = \sqrt{S_{Rw}^2 + S_r^2}$: 19,84 %																															
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>0,0006 mg/l</td> <td>0,0177 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>0,00057 mg/l</td> <td>0,01356 mg/l</td> </tr> <tr> <td>Standard deviation of measured concentration, S_{bias}</td> <td>21,11 %</td> <td>25,91 %</td> </tr> <tr> <td>Number of Measurements, n_i</td> <td>15</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>$bias_i = \frac{c_i - c_{ref i}}{c_{ref i}} \cdot 100\%$</td> <td>-5,00 %</td> <td>-23,39 %</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 % $RMS_{bias} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N bias_i^2}{N}}$: 16,91 %	i	1	2	Certified concentration, $c_{ref i}$	0,0006 mg/l	0,0177 mg/l	Standard uncertainty of certified concentration, $u(c_{ref i})$	0,50 %	0,50 %	Measured concentration, c_i	0,00057 mg/l	0,01356 mg/l	Standard deviation of measured concentration, S_{bias}	21,11 %	25,91 %	Number of Measurements, n_i	15	12	$bias_i = \frac{c_i - c_{ref i}}{c_{ref i}} \cdot 100\%$	-5,00 %	-23,39 %	Period of measurements			Sample Type (Matrix)			Additional information			
i	1	2																															
Certified concentration, $c_{ref i}$	0,0006 mg/l	0,0177 mg/l																															
Standard uncertainty of certified concentration, $u(c_{ref i})$	0,50 %	0,50 %																															
Measured concentration, c_i	0,00057 mg/l	0,01356 mg/l																															
Standard deviation of measured concentration, S_{bias}	21,11 %	25,91 %																															
Number of Measurements, n_i	15	12																															
$bias_i = \frac{c_i - c_{ref i}}{c_{ref i}} \cdot 100\%$	-5,00 %	-23,39 %																															
Period of measurements																																	
Sample Type (Matrix)																																	
Additional information																																	

		$u(bias) = \sqrt{RMS_{bias}^2 + u(c_{ref})^2}$: 16,92 %
4	Convert components to standard uncertainty	$u(R_w) = 19,84$ % $u(bias) = 16,92$ %
5	Calculate combined standard uncertainty, u_c	$u_c = \sqrt{u(R_w)^2 + u(bias)^2} = 26,07$ %
6	Calculate expanded uncertainty, U	$U = 2 \cdot u_c = 53$ %

Kuva 3. Lovastatiinin MuKit-raportti.

MEASUREMENT UNCERTAINTY ESTIMATION

Step	Action	Statiinit	13.6.2022																														
1	Specify Measurand	Concentration range: 0,005-5 mg/l Sample Type (Matrix): Veri Analysis Principle (Analyzer etc.): Rosuvastatiini																															
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: 9 Average concentration: 0,0135 mg/l Standard deviation, S_{Rw} : 9,24 % B: Routine replicate samples Number of routine replicate series: 10 Number of parallel measurements: 4 Concentration range: 0,01299-0,0162 mg/l Pooled standard deviation, S_r : 15,86 % $u(R_w) = \sqrt{S_{Rw}^2 + S_r^2}$: 18,35 %																															
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>0,0125 mg/l</td> <td>0,35 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>0,0135 mg/l</td> <td>0,35372 mg/l</td> </tr> <tr> <td>Standard deviation of measured concentration, S_{bias}</td> <td>9,24 %</td> <td>9,08 %</td> </tr> <tr> <td>Number of Measurements, n_i</td> <td>9</td> <td>9</td> </tr> <tr> <td>$bias_i = \frac{c_i - c_{ref\ i}}{c_{ref\ i}} \cdot 100\%$</td> <td>8,00 %</td> <td>1,06 %</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> $u(c_{ref}) = \frac{\sum_{i=1}^N u(c_{ref\ i})}{N} : 0,50 \%$ $RMS_{bias} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N bias_i^2}{N}} : 5,71 \%$ $u(bias) = \sqrt{RMS_{bias}^2 + u(c_{ref})^2} : 5,73 \%$	i	1	2	Certified concentration, $c_{ref\ i}$	0,0125 mg/l	0,35 mg/l	Standard uncertainty of certified concentration, $u(c_{ref\ i})$	0,50 %	0,50 %	Measured concentration, c_i	0,0135 mg/l	0,35372 mg/l	Standard deviation of measured concentration, S_{bias}	9,24 %	9,08 %	Number of Measurements, n_i	9	9	$bias_i = \frac{c_i - c_{ref\ i}}{c_{ref\ i}} \cdot 100\%$	8,00 %	1,06 %	Period of measurements			Sample Type (Matrix)			Additional information			
i	1	2																															
Certified concentration, $c_{ref\ i}$	0,0125 mg/l	0,35 mg/l																															
Standard uncertainty of certified concentration, $u(c_{ref\ i})$	0,50 %	0,50 %																															
Measured concentration, c_i	0,0135 mg/l	0,35372 mg/l																															
Standard deviation of measured concentration, S_{bias}	9,24 %	9,08 %																															
Number of Measurements, n_i	9	9																															
$bias_i = \frac{c_i - c_{ref\ i}}{c_{ref\ i}} \cdot 100\%$	8,00 %	1,06 %																															
Period of measurements																																	
Sample Type (Matrix)																																	
Additional information																																	
	Convert components to	$u(R_w) = 18,35 \%$																															

4	standard uncertainty	$u(bias) = 5,73 \%$
5	Calculate combined standard uncertainty, u_c	$u_c = \sqrt{u(Rw)^2 + u(bias)^2} = 19,23 \%$
6	Calculate expanded uncertainty, U	$U = 2 \cdot u_c = 39 \%$

Kuva 4. Rosuvastatiinin MuKit-raportti.

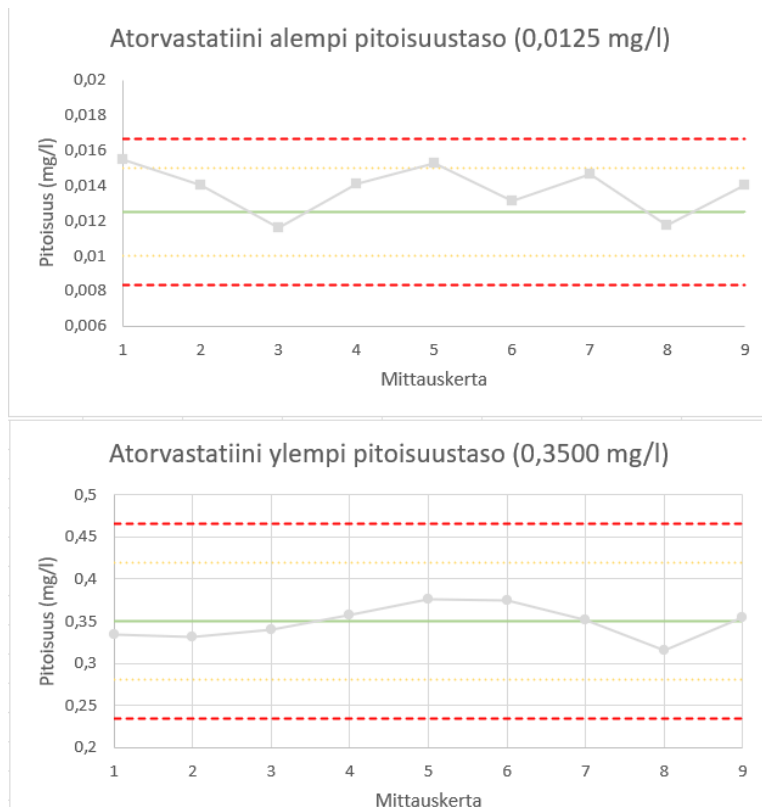
Nordtest Report		Page 1 of 2																															
MEASUREMENT UNCERTAINTY ESTIMATION																																	
Step	Action	Statinit	9.5.2022																														
1	Specify Measurand	Measurand: Simvastatiini Concentration range: 0,0005-0,5 mg/l Sample Type (Matrix): Veri Analysis Principle (Analyzer etc.): LC-ESI-MS/MS Sample preparation: Metanolisakkaus																															
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: 9 Average concentration: 0,00195 mg/l Standard deviation, S_{Rw} : 15,35 % B: Routine replicate samples Number of routine replicate series: 10 Number of parallel measurements: 4 Concentration range: 0,0012-0,00288 mg/l Pooled standard deviation, S_r : 18,84 % $u(R_w) = \sqrt{S_{Rw}^2 + S_r^2}$: 24,30 %																															
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>0,0004 mg/l</td> <td>0,0177 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>0,00048 mg/l</td> <td>0,01237 mg/l</td> </tr> <tr> <td>Standard deviation of measured concentration, S_{bias}</td> <td>23,40 %</td> <td>15,21 %</td> </tr> <tr> <td>Number of Measurements, n_i</td> <td>14</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>$\frac{bias_i - c_i - c_{ref\ i}}{c_{ref\ i}} \cdot 100\%$</td> <td>20,00 %</td> <td>-30,11 %</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 % $RMS_{bias} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N bias_i^2}{N}}$: 25,56 %		i	1	2	Certified concentration, $c_{ref\ i}$	0,0004 mg/l	0,0177 mg/l	Standard uncertainty of certified concentration, $u(c_{ref\ i})$	0,50 %	0,50 %	Measured concentration, c_i	0,00048 mg/l	0,01237 mg/l	Standard deviation of measured concentration, S_{bias}	23,40 %	15,21 %	Number of Measurements, n_i	14	15	$\frac{bias_i - c_i - c_{ref\ i}}{c_{ref\ i}} \cdot 100\%$	20,00 %	-30,11 %	Period of measurements			Sample Type (Matrix)			Additional information		
i	1	2																															
Certified concentration, $c_{ref\ i}$	0,0004 mg/l	0,0177 mg/l																															
Standard uncertainty of certified concentration, $u(c_{ref\ i})$	0,50 %	0,50 %																															
Measured concentration, c_i	0,00048 mg/l	0,01237 mg/l																															
Standard deviation of measured concentration, S_{bias}	23,40 %	15,21 %																															
Number of Measurements, n_i	14	15																															
$\frac{bias_i - c_i - c_{ref\ i}}{c_{ref\ i}} \cdot 100\%$	20,00 %	-30,11 %																															
Period of measurements																																	
Sample Type (Matrix)																																	
Additional information																																	
about:blank		9.5.2022																															

		$u(bias) = \sqrt{RMS_{bias}^2 + u(c_{ref})^2}$: 25,57 %
4	Convert components to standard uncertainty	$u(R_w) = 24,30 \%$ $u(bias) = 25,57 \%$
5	Calculate combined standard uncertainty, u_c	$u_c = \sqrt{u(R_w)^2 + u(bias)^2} = 35,27 \%$
6	Calculate expanded uncertainty, U	$U = 2 \cdot u_c = 71 \%$

Kuva 5. Simvastatiinin MuKit-raportti.

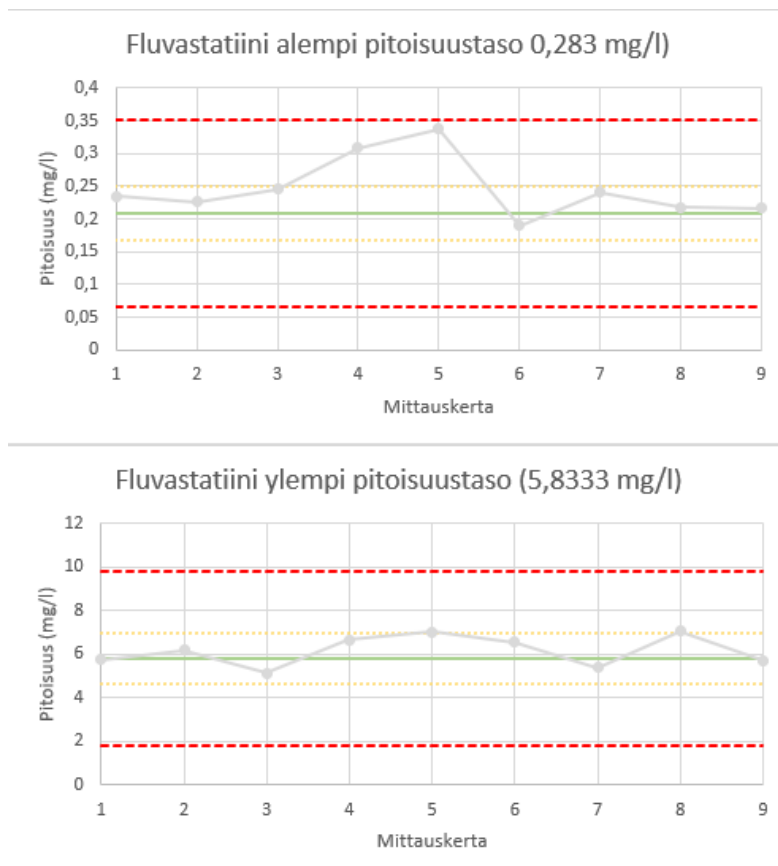
Valvontakortit

Kuvassa 1. on esitetty atorvastatiinin valvontakortit.



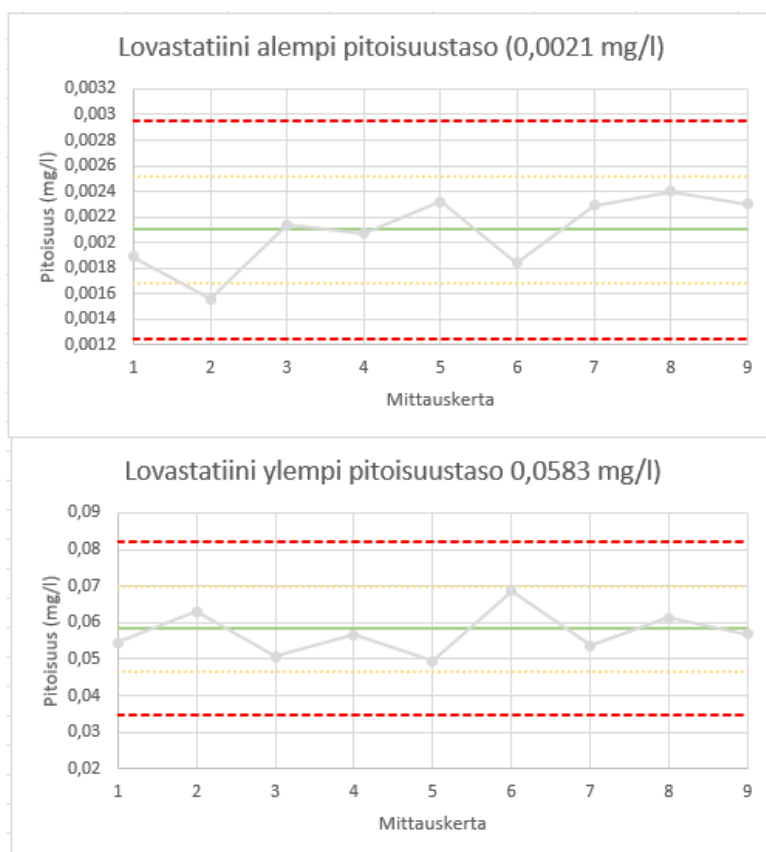
Kuva 1. Atorvastatiinin valvontakortit.

Kuvassa 2. on esitetty fluvastatiinin valvontakortit.



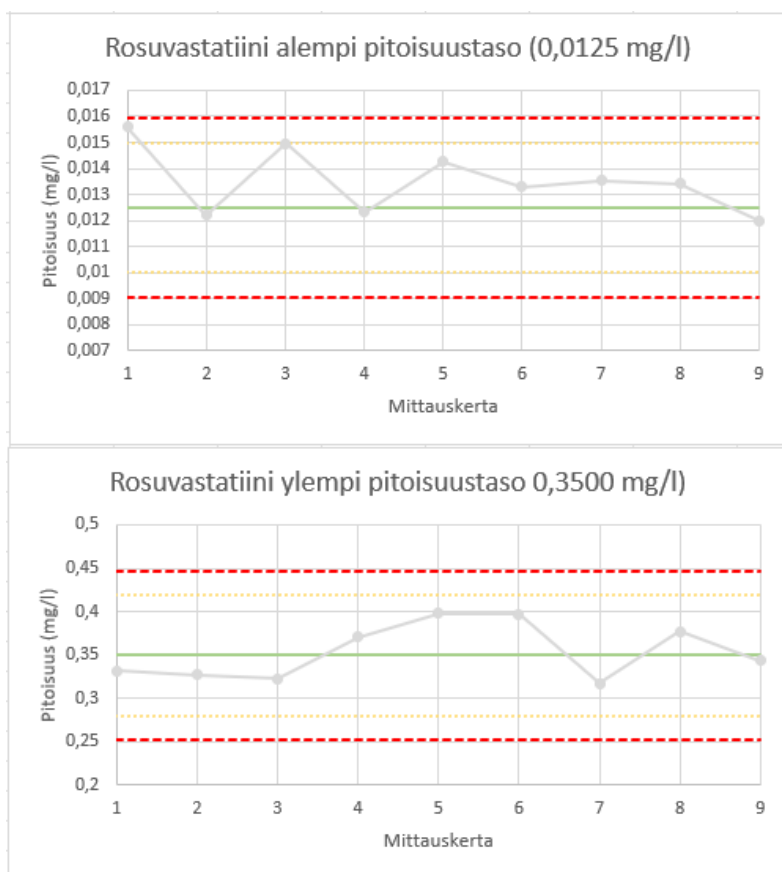
Kuva 2. Fluvastatiinin valvontakoritit.

Kuvassa 3. on esitetty lovastatiinin valvontakoritit.



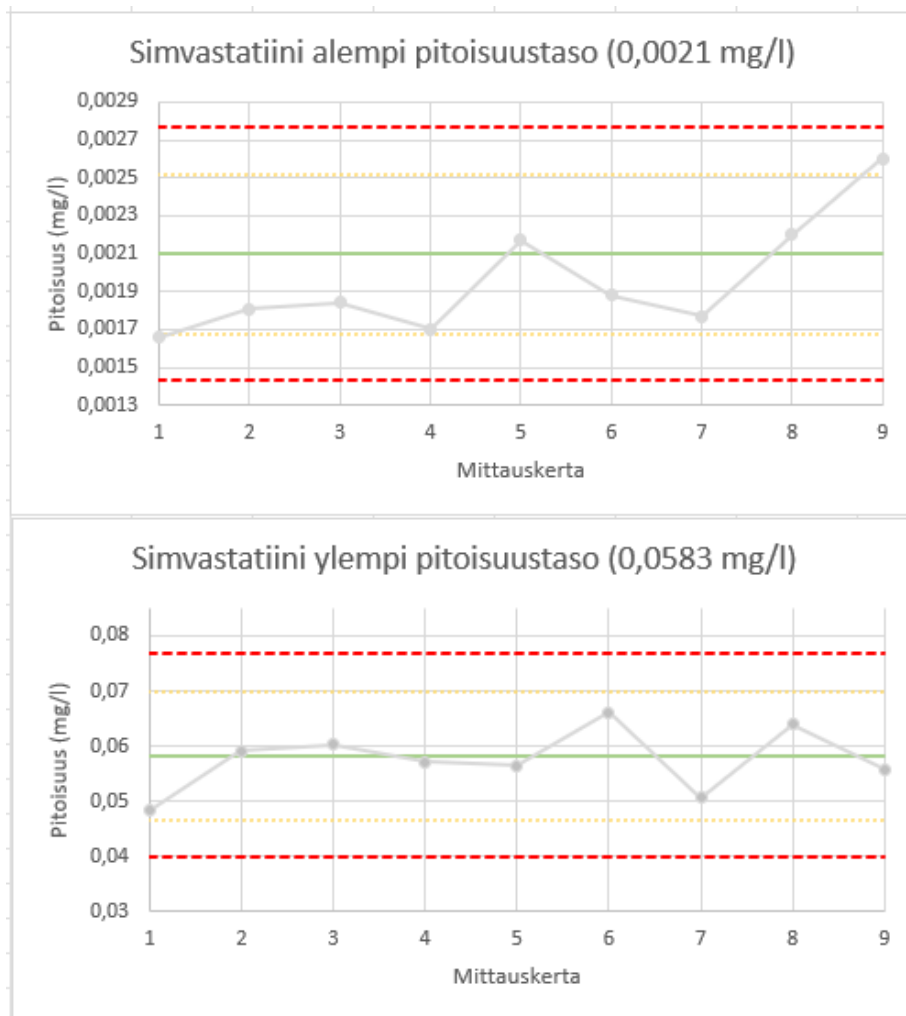
Kuva 3. Fluvastatiinin valvontakorit.

Kuvassa 4. on esitetty rosuvastatiinin valvontakorit.



Kuva 4. Rosuvastatiinin valvontakortit.

Kuvassa 5. on esitetty simvastatiinin valvontakoritit.



Kuva 5. Simvastatiinin valvontakortit.