



Ida Tarkiainen

Kannabinoidien määrittäminen verinäytteenästä GC-MS-laitteella

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

24.1.2024

Tiivistelmä

Tekijä: Ida Tarkiainen
Otsikko: Kannabinoidien määrittäminen verinäytteestä GC-MS-laitteella
Sivumäärä: 35 sivua + 2 liitettä
Aika: 24.1.2024

Tutkinto: Laboratorioanalytiikka (AMK)
Tutkinto-ohjelma: Laboratorioanalytiikka
Ammatillinen pääaine: -
Ohjaajat: Oikeuskemisti Anssi Kivinen
Lehtori Miika Kuivikko

Tämä opinnäytetyö tehtiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen Oikeuskemian yksikössä, ja sen tarkoituksena oli kehittää ja validoida uusi menetelmä kannabinoidien määrittämiseen verinäytteistä GC-MS-laitteella. Kehitetyn menetelmän on tarkoitus korvata tällä hetkellä käytössä oleva kannabinoidien varmistusmenetelmä.

Kannabinoidit ovat kannabiskasvien vaikuttavia aineita, ja ne luokitellaan Suomessa huumausaineiksi. Kaiken kaikkiaan kannabinoideja on yli sata, joista työssä määritetyt olivat kannabidioli, tetrahydrokannabinoli, kannabinoli, 11-hydroksi-delta9-tetrahydrokannabinoli sekä 11-nor-delta9-THC-karboksyylilappo.

Menetelmän kehitys aloitettiin testaamalla uuttoa eri uuttoliuoksilla. Testattiin myös uuttoliuotintilavuuden vaikutusta sekä eri derivatisointireagensseja. Lopullisessa menetelmässä uuttoa tehdään neste-nesteuutona ja uuttoliuoksena toimii 5:1-heksaanietyyliasettaattiliuos, jota lisätään 1,5 ml. Valmiin uuttomenetelmän soveltuvuus varmistettiin validoinnilla.

Validoinnissa tutkittiin selektiivisyys, lineaarisuus, tarkkuus (oikeellisuus, toistettavuus ja uusittavuus), toteamisraja, alempi määrittämiss raja, ylempi määrittämiss raja, saanto, prosessoitujen näytteiden stabiilisuus, suhteellinen matriisivaikutus, pienempi näytemäärä ja laajennettu mittausepävarmuus. THC:n, 11-OH-THC:n ja THC-COOH:n kohdalla verrattiin uudella ja vanhalla menetelmällä saatuja tuloksia.

Validoinnin perusteella menetelmä sopii kannabinoidien määrittämiseen erityisesti elävien henkilöiden näytteille, mutta vaatii jatkotestejä ennen kuin se voidaan ottaa käyttöön osana kuolinsyyselvityksiä.

Avainsanat: kannabinoidit, kaasukromatografia-massaspektrometria, neste-nesteuutto, validointi

Abstract

Author: Ida Tarkiainen
Title: Determination of Cannabinoids from Blood Samples with GC-MS
Number of Pages: 35 pages + 2 appendices
Date: 24 January 2024

Degree: Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme: Laboratory Sciences
Professional Major: -
Supervisors: Anssi Kivinen, Forensic Chemist
Miika Kuivikko, Senior Lecturer

This thesis work was carried out at the National Institute for Health and Welfare in Helsinki and its main purpose was to develop and validate an assay for determining cannabinoids from postmortem blood samples with GC-MS. This new assay is to replace the existing screening assay for cannabinoid detection.

Cannabinoids are the active compounds of cannabis, and they are considered illegal substances in Finland. There are over 100 different cannabinoids in total, and the ones screened in this assay are cannabidiol, tetrahydrocannabinol, cannabinol, 11-hydroxy-delta9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol.

Assay development began by testing different extraction solvents. Different quantities of extraction solvents were also tested along with different derivatization reagents. The assay was tested with postmortem samples before validation. Finalized assay uses 1.5 ml of 5:1 hexane ethyl acetate solution. Suitability of the assay was determined by validation.

The following parameters were investigated: selectivity, linearity, accuracy, limit of detection, lower and upper limits of determination, recovery, stability of processed samples, relative matrix effect, deviation of diluted samples and measurement uncertainty. In addition, results for THC, 11-OH-THC and THCCOOH with both old and new assays were compared.

Based on the validation, this method is suitable for determining cannabinoids from blood samples. However, further testing is required before this assay can be used on postmortem samples.

Keywords: cannabinoids, gas chromatography-mass spectrometry, liquid-liquid extraction, validation

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Kannabinoidit	2
3	Kannabiksen käyttö Suomessa	5
3.1	Lääkekannabis	6
3.2	Huumetestaus	6
4	Analyysitekniikat	7
4.1	Näytteen esikäsittely	7
4.1.1	Entsymaattinen hydrolyysi	7
4.1.2	Neste-nesteuutto	8
4.1.3	Derivatisointi	9
4.2	Kaasukromatografia-massaspektrometria	10
5	Laitteet ja reagenssit	12
5.1	Laitteet	12
5.2	Reagenssit	12
6	Menetelmän kehitys	13
6.1	Alustava uuttomenetelmä	13
6.2	Uuttoliuossuhteiden testaaminen	14
6.3	Uuttoliuotinmäärän testaaminen	15
6.4	Kahden derivatisointireagenssin käyttö	15
6.5	Testaaminen vainajanäytteillä	15
6.6	Validointi	16
7	Menetelmän kehityksen tulokset	16
7.1	Uuttoliuossuhteiden testaaminen	16
7.2	Uuttoliuosmäärän testaaminen	18
7.3	Testaaminen vainajanäytteillä	19
7.4	Lopullinen menetelmä	20
8	Validoinnin tulokset	21
8.1	Selektiivisyys ja spesifisyys	21

8.2	Lineaarisuus, mittausalue ja kalibrointimalli	21
8.3	Määrittämis- ja toteamisraja	22
8.4	Tarkkuus	23
8.5	Stabiilius	24
8.6	Saanto	25
8.7	Suhteellinen matriisiefekti	26
8.8	Menetelmien vertailu	27
8.9	Pienemmän määrän verifiointi	28
8.10	Carry over-testi	29
8.11	Laajennettu mittausepävarmuus	30
9	Yhteenveto	31
	Lähteet	33

Liitteet

Liite 1: Stabiilisuuskokeiden tulokset

Liite 2: Suhteellisen matriisiefektin tulokset

Lyhenteet

- 11-OH-THC: *11-hydroxy-delta9-tetrahydrocannabinol*. 11-hydroksi-delta9-tetrahydrokannabinoli. THC:n metaboliitti.
- CBD: *Cannabidiol*. Kannabidioli.
- CBN: *Cannabinol*. Kannabinoli.
- EI: *Electron ionization*. Elektroni-ionisaatio.
- GC: *Gas Chromatograph*. Kaasukromatografi.
- GC-MS: *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*. Kaasukromatografi-massaspektrometri.
- MSTBFA: *N-tert-butyltrimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide*. Silylointireagenssi.
- MSTFA: *N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide*. Silylointireagenssi.
- PMR: *Postmortem redistribution*. Lääkeaineiden kuoleman jälkeinen uudelleen jakaantuminen.
- RRT: *Relative Retention Time*. Suhteellinen retentioaika.
- RSD: *Relative Standard Deviation*. Suhteellinen keskihajonta.
- SIM: *Selected ion monitoring*. Valittujen massafragmenttien seuranta.
- THC: *delta-9-tetrahydrocannabinol*. Tetrahydrokannabinoli. Kannabiksen tärkein päihdyttävä aine.
- THC-COOH: *11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol*. 11-nor-delta9-THC-karboxyylihapo.

1 Johdanto

Kannabis on tällä hetkellä maailman käytetyin ja kasvatetuin huume, jonka käyttäjiä arvellaan olevan maailmanlaajuisesti jopa n. 150 miljoonaa. Tämä on noin 12 kertaa enemmän kuin esimerkiksi opioidien käyttäjiä. [1.] Se lukeutuu käytetyimpiin huumeisiin myös Suomessa. Kannabisvalmisteiden käytön määrä on noussut erityisesti Pohjois-Amerikassa, Euroopassa ja Australiassa. Kannabiksen käyttö linkittyy erityisesti nuorisokulttuuriin, ja se aloitetaankin yhä nuorempana. [1.]

Myös alkoholin ja kannabiksen yhteiskäyttö on lisääntynyt. Alkoholi lisää tetrahydrokannabinolin (THC) määrää veressä, mikä tekee päihtymistilasta voimakkaamman. Tämä puolestaan lisää riskiä mm. humalassa autoiluun ja itsensä vahingoittamiseen. Vaikka kannabismyrkytykseen kuoleminen onkin hyvin epätodennäköistä, sen käyttö voi myötävaikuttaa kuolemaan. [2; 3.] Tämän vuoksi onkin tärkeää, että kannabinoideja voidaan seuloa mm. veri- ja virtsanäytteistä.

Tämä opinnäytetyö tehtiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen Oikeuskemian yksikölle, joka on FINAS:n akkreditoima laboratorio ja noudattaa SFS-EN ISO/IEC 17025:2005 -laatustandardia. Työn tarkoituksena oli kehittää ja validoida menetelmä kannabinoidien määrittämiseen verinäytteistä. Ensisijaisesti menetelmän on tarkoitus tulla osaksi oikeustoksikologisia kuolinsyyselvityksiä, mutta sillä voitaisiin myös tarvittaessa tehdä varmistusanalyyskejä elävien analytiikan puolella.

Menetelmän on tarkoitus korvata aikaisempi, huomattavasti työläämpi kaksivaiheinen kiinteäfaasiuuttoon perustuva uuttomenetelmä ja lisätä uuttokapasiteettiä. Vanhassa menetelmässä seulottavia yhdisteitä ovat tetrahydrokannabinoli, 11-hydroksi-delta9-tetrahydrokannabinoli (11-OH-THC) ja 11-nor-delta9-THC-

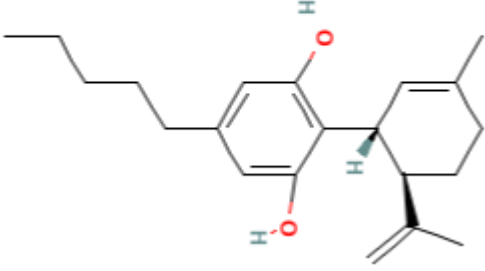
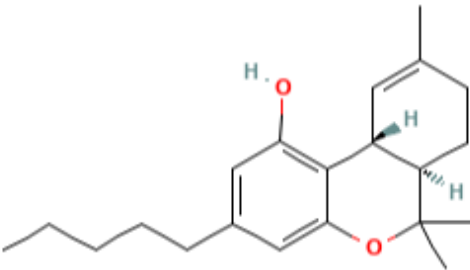
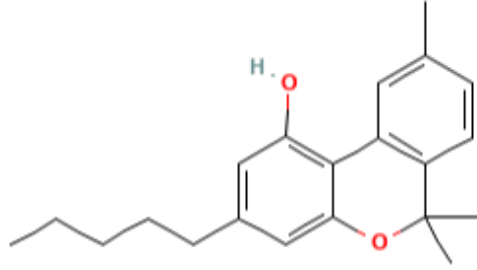
karboksyylihapo (THC-COOH). Näiden kolmen lisäksi uudessa menetelmässä on tarkoitus määrittää myös kannabidiolia (CBD) ja kannabinolia (CBN).

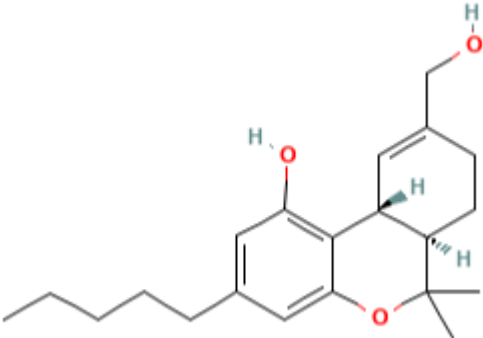
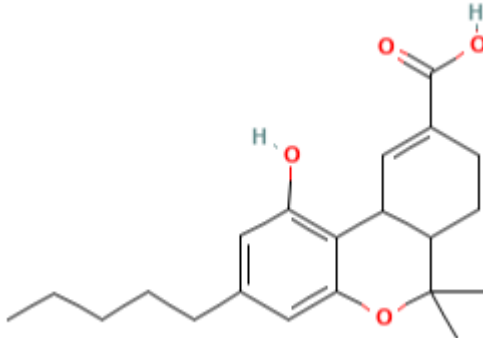
2 Kannabinoidit

Kannabiksella viitataan erilaisiin hamppukasveista saataviin valmisteisiin, joita käytetään päihtymistarkoituksessa. Näitä on esim. marihuana (kuivatut kukinnot) ja hasis eli kasvin kuivattu pihka tai pihkapuriste. Kannabinoidit puolestaan ovat kannabiksen päihdyttäviä aineita. Niistä keskeisin ja psykoaktiivisin on tetrahydrokannabinoli eli THC, joka aiheuttaa kannabiksen käyttöön liittyvän päihtymistilan. [2.] On myös olemassa ihmisen tekemiä eli synteettisiä kannabinoideja, mutta niitä ei käsitellä tässä työssä.

Kannabinoideja on kaiken kaikkiaan yli 100, mutta tämän opinnäytetyön kannalta tärkeimmät kannabinoidit ovat yllä mainittu THC, kannabidioli, kannabinoli, 11-hydroksitetrahydrokannabinoli (11-OH-THC) ja 11-nor-delta9-THC-karboksyylihapo (THC-COOH). Näistä sekä kannabidioli että THC ovat kannabiskasveista löytyviä yhdisteitä ja kannabinoli, 11-OH-THC ja THC-COOH puolestaan THC:n metaboliitteja. Kannabinolia voi muodostua THC:stä kannabiskasvin vanhetessa tai hapettumisen seurauksena kehossa [4]. Metabolian ensimmäisessä vaiheessa THC:hen lisätään -OH-ryhmä ja siitä tulee 11-OH-THC, joka hapettuu ja muodostaa THC-COOH:ta. Lopuksi THC-COOH:sta muodostuu vielä glukuronidijohdannainen, joka erittyy virtsan mukana pois kehosta. Näitä glukuronidijohdannaisia muodostuu myös THC:stä ja 11-OH-THC:stä. Metabolaatio tapahtuu maksassa sytokromientsyymien vaikutuksesta. [5; 6.] Työssä tutkitut kannabinoidit on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Työssä määritettyjen kannabinoidien kemialliset molekyyli- ja rakennekaavat.

Yhdiste	Kaava	Rakenne
Kannabidioli (CBD)	$C_{21}H_{30}O_2$	
Delta-9-tetrahydrokannabinoli (THC)	$C_{21}H_{30}O_2$	
Kannabinoli (CBN)	$C_{21}H_{26}O_2$	

<p>11-hydroksi- delta⁹-tet- rahydrokanna- binoli (11-OH-THC)</p>	<p>C₂₁H₃₀O₃</p>	
<p>11-nor-delta⁹- THC-kar- boksyylihappo (THC-COOH)</p>	<p>C₂₁H₂₈O₄</p>	

Kannabinoidien vaikutukset perustuvat niiden kykyyn sitoutua endokannabinoidijärjestelmän kannabinoidireseptoreihin CB₁ ja CB₂. Endokannabinoidit ovat kehon muodostamia kannabinoideja, joiden raaka-aineena käytetään arakidoni-happoa. Kannabinoidireseptoreita löytyy ympäri kehoa, mm. immuunipuolustuksen soluista (CB₂) ja keskushermostosta (CB₁). Kannabinoidien aiheuttamat oireet riippuvat siitä, mihin reseptoriin ne sitoutuvat sekä käytetystä määrästä. [7.] Yleisiä vaikutuksia on mm. rentoutuminen, tarkkaavaisuuden aleneminen sekä ahdistuneisuus. Samanaikainen alkoholin käyttö kaksinkertaistaa THC:n määrän veressä ja lisää näin oireita. [3.] Oireet riippuvat hieman THC:n ja CBD:n suhteesta kasvissa sekä siitä, onko kyse kroonisesta käytöstä. Kannabiksen pitkäaikainen käyttö lisää skitsofreniariskiä ja voi lisätä iskeemisten sydänoireiden riskiä. [8.]

Kannabinoidien vaikutusnopeus ja määrä veressä riippuvat käytetystä aineesta ja käyttötavasta. Polttamalla vaikutukset alkavat nopeiten, jo muutamissa

minuuteissa, kun taas kannabistuotteiden syömisessä vaikutukset alkavat hitaammin, mikä voi lisätä aineen käytettävää määrää. [9.]

THC on hyvin lipofiilinen, ja sitä voi varastoitua kehon rasvakudokseen, josta sitä voi vapautua pieniä määriä parin viikon ajan käytön jälkeen. Tämä kuitenkin vaatii suuria säännöllisiä käyttömääriä, eikä vapautuvilla määrillä ole käytännön merkitystä. [2; 10.]

3 Kannabiksen käyttö Suomessa

Kannabis on tällä hetkellä Suomen käytetyin huume, jota kokeilleiden määrä on viisinkertaistunut vuosina 1992–2022. 19–65-vuotiaista jopa 29 % on kokeillut kannabista, ja sen suurin käyttäjäryhmä on 25–34-vuotiaat. [11.] Tämän lisäksi se on alle 20-vuotiaiden keskuudessa yleisin ongelmapäihde, jonka vuoksi on hakeuduttu hoitoon [2].

Kannabisvalmisteet ovat Suomen lainsäädännön mukaan huumausaineita, ja niiden osto, kasvattaminen ja käyttö on kiellettyä. Kannabisvalmisteiden laillistamisesta keskustellaan mediassa tasaisin väliajoin, mutta se ei ole johtanut toimiin. Kannabiksen laillistamiseksi on tehty kansalaisaloitteita, mutta edellinen eduskuntaan edennyt hylättiin [12].

Asenteet laillistamista kohtaan ovat kuitenkin muuttuneet avoimemmiksi, ja yli puolet suomalaisista ei rankaisisi kannabiksen käytöstä. Tämän lisäksi neljä viidestä on sitä mieltä, että lääkekannabista tulisi saada laillisesti lääkekäyttöön. [11.]

Kannabista voidaan käyttää polttamalla, tai sitä voidaan sekoittaa ruokaan. Suomessa yleisin käyttötapa on polttaminen. [2; 13.]

3.1 Lääkekannabis

Kannabisvalmisteita voi käyttää myös lääkinnällisiin tarkoituksiin, mutta tällöin vaaditaan erikoislupa ja lääkäriltä saatu resepti. Suomessa lääkekannabista myönnetään vain MS-tautiin (multippeliskleroosi) liittyvään lihasjäykkyyteen, jos muista hoidoista ei ole ollut apua. Maailmalla sitä voidaan myöntää myös syöpäkipuihin, silmänpaineen laskuun, pahoinvointiin jos muut lääkkeet ei auta sekä AIDS-potilaan anoreksiaan. Lääkekannabis on aina hoitoketjun viimeinen lääke, jos muuten ei saada vaivaan apua. [14, s. 236–239.]

Valmisteita on lukuisia erilaisia sumutteista kapseleihin, ja yleensä ne sisältävät vaihtelevina pitoisuuksina sekä THC:tä että CBD:tä, mutta valmiste voi myös sisältää näistä vain toista. Lääkekannabiksella on samat haittavaikutukset kuin huumausaineellakin, ja varsinkin sen pitkäaikainen käyttö vaikuttaa ajokykyyn. [15.]

3.2 Huumetestaus

Suomessa huumetestejä tehdään valvonnallisista ja sairaanhoidollisista syistä. Valvonnallisia syitä on mm. vankien, työnhakijoiden ja oppilaiden huumetestaus. Sairaanhoidollisia syitä puolestaan ovat oikeuslääkinnälliset syyt (kuolemansyyn selvittäminen), ongelmakäyttäjien hoidon seuranta sekä klinisiin tutkimuksiin liittyvät testit. Myös rattijuopumistapauksien selvittämiseen voi kuulua huumetesti. [14, s. 54–55.] Testaus on yleensä kaksivaiheinen, ensin tehdään laaja huumeseulonta, ja sen perusteella vielä mahdolliset jatkovarmistukset positiivisille aineille. Ensivaiheentestinä voidaan myös tehdä huumepikatesti virtsasta tai syljestä. [14; 16.]

Kannabinoideja voidaan tutkia verestä, virtsasta ja hiuksista. THC:tä voidaan havaita vielä 5 tuntia käytön jälkeen otetusta verinäytteestä, mutta sen aineenvaihduntatuotetta THC-C:tä puolestaan huomattavasti pidempään, jopa useita vuorokausia käytön jälkeen. [17.] Virtsasta THC:tä pystytään havaitsemaan kauemmin, 5–14 tuntia käytön jälkeen, riippuen siitä, miten säännöllistä käyttö

on ollut. Suurkäyttäjillä THC:tä voidaan havaita virtsasta jopa 30 vuorokautta lopettamisen jälkeen. [14, s. 57; 17.]

4 Analyysitekniikat

4.1 Näytteen esikäsittely

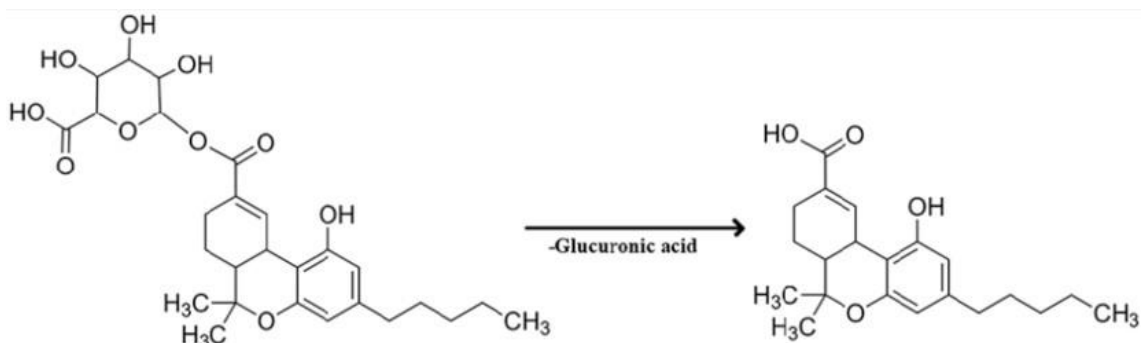
Tutkittavana näytteenä on vainajasta tai elävästä henkilöstä pulloon tai putkeen otettu kokoveri. Varsinkin vainajilla veren koostumus saattaa vaihdella voimakkaasti sen mukaan, miten kauan kuolemasta on ja mistä näyte on otettu. Näytteenotto paikalla on merkitystä, sillä kuoleman jälkeen otetuissa verinäytteissä on todettu lääkeaineiden uudelleen jakautumista (PMR, postmortem redistribution). Ilmiössä verta siirtyy läheiseen elimeen ja lääkeaineiden pitoisuudet muuttuvat sen seurauksena. Sydäimestä peräisin oleva veri on altista uudelleen jakautumiselle, ja kuoleman jälkeisissä tutkimuksissa suositaankin ääreisverta esim. reisiluun laskimosta. [18.]

Kuoleman jälkeen veri käy paksummaksi ja sen entsyymipitoisuuksissa tapahtuu muutoksia. Mätänemisen lopputuloksena syntyy mm. ammoniakkia ja rikkivetyä. Hiilihydraattien hajoamisessa esiintyy maitohappoa ja propanolia, ja myös etanolia saattaa esiintyä, minkä seurauksena veren alkoholipitoisuus saattaa olla virheellinen. Näiden biologisten muutosten takia elävän henkilön analytiikkaan sopivat tutkimukset eivät välttämättä sovi kuolinsyyselvityksiin. [19, s.73–75.]

4.1.1 Entsyymaattinen hydrolyysi

Entsyymaattinen hydrolyysi on prosessi, jossa hydrolaasientsyymi hajottaa esim. proteiinin reaktiotuotteiksi vesimolekyylin avulla. THC:n metaboliatuotteina syntyy vesiliukoisia glukuronidijohdannaisia (THC-glukuronidi, 11-OH-THC-glukuronidi ja THC-COOH-glukuronidi). Näistä THC ja 11-OH-THC muodostavat glukuronidihappomolekyylin kanssa eetterisidoksen, THC-COOH puolestaan muodostaa esterisidoksen. Tämän esterisidoksen hajottamiseen sopii sekä

emäshydrolyysi että entsyymattinen hydrolyysi, mutta eetterisidoksen hajottamiseen sopii näistä ainoastaan entsyymattinen hydrolyysi. [20; 21.] Hydrolyysi lisää uutosta saatavaa konsentraatiota. Kuvassa 1 on esitetty THC-COOH-glukuronidin hajoaminen THC-COOH:ksi hydrolyysissä.



Kuva 1. THC-COOH-glukuronidin hajoaminen hydrolyysissä [23].

β -glukuronidaasi on yleisesti hydrolyysissä käytettävä entsyymi, jota voidaan käyttää sekä virtsa, että verimatriiseissa. Entsyymiä saadaan eri lähteistä, ja kaikilla on optimaaliset käyttöolosuhteet, jotka voivat erota toisistaan. Sitä saadaan mm. *Escherichia colista* ja *Helix Pomatiasta*. Tässä työssä käytetty entsyymi oli *Patella vulgatasta*. [21; 22.]

4.1.2 Neste-nesteutto

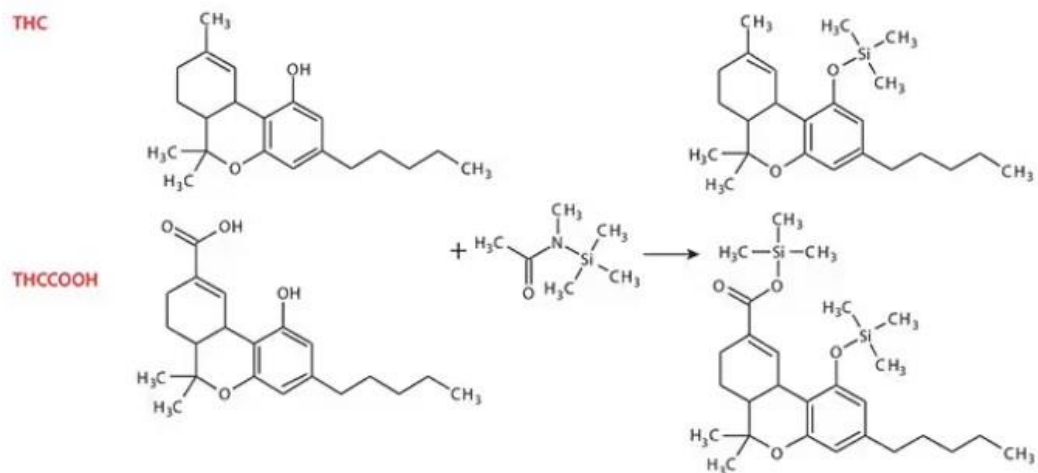
Neste-nesteutto eli liuotinuutto on erotusmenetelmä, jossa käytetään kahta toisiinsa liukenematonta nestettä erottamaan haluttuja yhdisteitä. Tyypillisesti käytetään vesifaasia ja orgaanista liuotinta. [24.]

Uuttoliuotin valitaan sen mukaan, mitä aineita halutaan erottaa, ja pääperiaatteena on, että poolinen liukenee pooliseen ja pooliton poolittomaan nesteeseen. Nestekerrokset täytyy saada sekoittumaan kunnolla esim. ravistelijalla, jolloin haluttu aine siirtyy liuottimeen. Painavampi eli tiheämpi faasi jää astian pohjalle, ja tätä tietoa voidaan hyödyksi oikeaa faasia talteen otettaessa. Apuna voidaan

käyttää erotussuppilaa tai haluttu faasi voidaan siirtää puhtaaseen astiaan pipetin avulla. Sekoitus ja erottelu saatetaan joutua toistamaan. [24.]

4.1.3 Derivatisointi

Yhdisteen täytyy olla haihtuva, jotta se voidaan analysoida kaasukromatografilla. Jos aine ei ole luontaisesti haihtuva, siitä voidaan tehdä haihtuva derivatisoinnilla, eli alkuperäisestä aineesta tehdään johdannainen. Tämä johdannainen on stabiilimpi, haihtuvampi ja poolittomampi kuin alkuperäinen. Derivatisointimenetelmiä ovat alkylointi ja silylointi. Näistä silylointi soveltuu alkoholeille, amiineille, karboksyylihapoille sekä tiroleille. Reaktiossa näiden yhdisteiden aktiivinen vety korvautuu silyyliryhmällä. [25.] Tämä tekee johdannaisesta haihtuvamman, sillä se ei muodosta enää yhtä paljon vetysidoksia. [25, s. 90; 26 s. 38–39.] THC:n ja THC-COOH:n silylointireaktioita on havainnollistettu kuvassa 2.

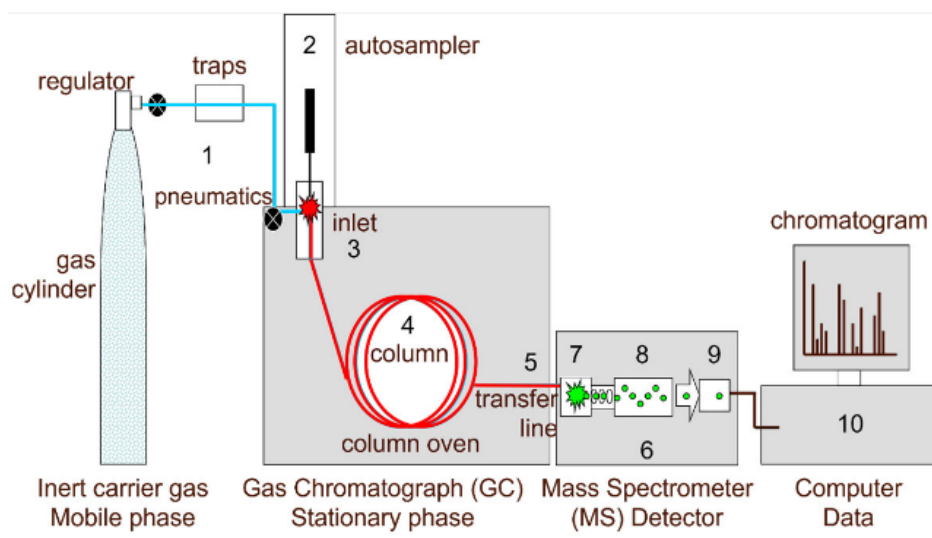


Kuva 2. THC:n ja THC-COOH:n reaktiot MSTFA:n kanssa. Vasemmalla puolella on yhdisteiden rakennekaavat perusmuodossa, oikealla silyloidut muodot. [27.]

4.2 Kaasukromatografia-massaspektrometria

Kaasukromatografia-massaspektrometria on yhdistelmätekniikka, jossa näytteet erotellaan ensin kaasukromatografilla ja sen jälkeen tunnistetaan massaspektrometrillä. Vaatimuksena on, että yhdiste soveltuu kaasukromatografille analysointiin eli kestää korkeita lämpötiloja ja höyrystyy. [28, s.207.]

Kaasukromatografia (gas chromatography, GC) on analyysimenetelmä, jossa liikkuvana faasina on inerttikaasu (esim. vety tai helium) ja stationäärifaasina yleensä viskoottinen neste. Se soveltuu haihtuvien yhdisteiden erottamiseen ja tunnistamiseen. Aineen tulee olla haihtuva, eikä se saa hajota alle 400 °C:n lämpötilassa. [29.] Kuvassa 3 kaasukromatografi-massaspektrometri.



Kuva 3. GC-MS-laitteisto. Siihen kuuluu kantokaasusäiliöt, näytteensyöttök-sikkö, kaasukromatografi, massaspektrometri ja tulostenkäsittelyohjelmisto. [30.]

Nestemäisessä muodossa oleva näyte syötetään injektorille, jossa se höyrystyy ja siirtyy kolonniin. Näytteensyöttötekniikoita on mm. kolonniin injektio, suorainjektio ja jakoinjektio. Tässä työssä käytettiin suorainjektiota, mikä sopii pienille ainemäärille. [28, s.186–187.] Injektorin lämpötila tulee valita tarkkaan, jotta näyte höyrystyy riittävästi, mutta yhdisteet eivät hajoaisi.

Kolonniuunin tehtävä on pitää kolonni tietyssä lämpötilassa analyysin aikana. Uunin lämpötila voi olla vakio (isoterminen), tai sitä voidaan muuttaa erillisen lämpötilaohjelman mukaan (gradientti). Lämpötilaa muuttamalla voidaan vaikuttaa retentioaikoihin, esim. lämpötilaa nostamalla voidaan lyhentää analyysiaikaa. Jokaisen ajon loppuksi kolonni puhdistetaan kuumentamalla uuni lähelle kolonnin maksimilämpötilaa. [28, s. 190.]

Kolonnina käytetään yleensä silikakapillaareja, joissa stationäärifaasi on ohuena kerroksena kapillaariputken sisäpinnalla. Kolonnin sisähalkaisija on 0,2–0,7 mm ja pituudeltaan se on 5–100 m. GC-MS:llä tyypillisin kolonnin pituus on 20–30 m. Voidaan käyttää myös esikolonnia, mikä pidentää analyysikolonnin käyttöikää. Mitä helpommin yhdiste höyrystyy, sitä nopeammin se kulkee kolonnin läpi. Yleensä yhdisteet eluoituvat höyrystymispisteen mukaisessa järjestyksessä, mutta mm. kolonnin poolisuus saattaa vaikuttaa järjestykseen. Kolonnin pituutta ja sisähalkaisijaa sekä stationäärifaasia muuttamalla voidaan vaikuttaa analyysiaikaan ja resoluutioon. [28, 183–191.]

Kolonnista yhdistemolekyylit siirtyvät massaspektrometriin. Massaspektrometria on analyttinen mittaustekniikka, joka perustuu ionisoitujen molekyylien havaitsemiseen ja erottamiseen toisistaan niiden massan ja varauksen suhteen (m/z , mass-to-charge). Molekyylit ionisoidaan esim. ioniplasmalla tai pommittamalla niitä elektroneilla, ja muodostuneet ionit voivat olla varaukseltaan joko positiivisia tai negatiivisia. [31, s.15.] Tässä työssä oli käytössä elektroni-ionisaatio (EI), joka on laajasti käytössä oleva ionisaatiomenetelmä.

Elektroni-ionisaatio tapahtuu ionilähteessä vakuuolosuhteissa, ja näytteen täytyy olla kaasufaasissa ennen ionisaatiota. Ionilähde koostuu ionisaatiokammioista, repelleristä, filamentista ja kerääjästä. Kaasumaisia analyttimolekyylejä pommitetaan korkeaenergisillä elektroneilla, jolloin molekyyleistä irtoaa elektroni ja muodostuu molekyyli-ioni M^+ , joka hajoaa neutraaliksi ja positiiviseksi fragmentiksi. Repelleri työntää positiivisia ioneita kohti massa-analysaattoria. [28, s. 124; 31, s. 54–55.]

SIM-menetelmä

SIM-menetelmässä (Selected-ion monitoring) seurataan yhtä tai useampaa tunnettua massafragmenttia analyysin aikana ja sitä käytetään yhdisteiden kvantitatiiviseen analytiikkaan. Massafragmenttien valinnalla saavutetaan suurempi herkkyys siihen verrattuna, että seurattaisiin kaikkia syntyneitä ioneita (total ion chromatogram). Tämä mahdollistaa tutkittaville yhdisteille alemmat toteamisarajat. [28, s. 207–209.]

5 Laitteet ja reagenssit

5.1 Laitteet

Näytteiden esikäsittelyssä ja analysoinnissa käytettiin erilaisia laboratoriolaitteita ja GC-MS-laitteistoa (laitteen tarkemmat tiedot alla). Menetelmäkehitykseen ja validointiin käytettiin seuraavia laitteita:

- GC-MS-laitteisto GCMS-01: Agilent Technologies 6890N
- massaspektrometri: Agilent Technologies 5975
- ravistelija: Glas-Col Multi-Pulse Vortexer tai VWR Digital Vortex Mixer
- sentrifuugi: Eppendorf Centrifuge 5810
- haihdutin ja lämpöhaude: Techne Dri-Block DB-100/3
- MassHunter Quantitative Analysis MS, v.10.2. ohjelmisto.

5.2 Reagenssit

Näytteiden esikäsittelyyn sisältyi entsymaattinen hydrolyysi, neste-nesteuutto sekä derivatisointi, ja näiden tekemiseen käytettiin erilaisia reagensseja ja liuoksia. Menetelmän kehityksen ja validoinnin aikana käytettiin seuraavia reagensseja:

- β -glukuronidaasientsyymi, Type L-II from limpets (Patella vulgata), Sigma G8132-250KU

- asetonitrili, Honeywell, Rien-de-Haal
- metanoli, Honeywell, Rien-de-Haal
- heksaani, Supelco
- etyyliasetaatti, VWR Chemicals
- N-metyyli-N-(trimetyylisilyyli)trifluoroasetamidi, MSTFA
- N-metyyli-N-(tert-butyylidimetyylisilyyli)trifluoroasetamidi, MTBSTFA.

Näiden lisäksi kalibrointi- ja kontrolliliuosten sekä sisäisen standardin tekemiseen on käytetty metanolikantaliuoksia. Uttoliuottimena käytettiin heksaanietyyliasetaattiliuosta, johon lisättiin sisäisen standardin käyttöläimennosta 25 µl per näyte. Näytteisiin lisättiin myös kaliumdivetyfosfaattipuskuria (pH 4).

6 Menetelmän kehitys

Menetelmän kehityksessä testattiin uuttoliuottimien suhteita, uuttoliuottimen määrää sekä kahden derivointireagenssin samanaikaista käyttöä (MSTFA + MTBSTFA). Ennen työn aloitusta kullekin aineelle oli katsottu valmiiksi sopivia tunnistusioneita, alustava uuttomenetelmä sekä tehty ajometodi, joten näiden tekeminen ei kuulunut opinnäytetyön menetelmän kehitykseen, eikä niihin tehtyjä muutoksia käsitellä tässä työssä.

6.1 Alustava uuttomenetelmä

Menetelmän kehitysvaiheessa noudatettiin kirjallisuuden perusteella koottua alustavaa uuttomenetelmää. Näytettä tai nollamatriisia (naudanveri) punnittiin 1,0 g 10 ml:n koeputkeen. Kalibrointi- ja kontrollinäytteisiin lisättiin 200 µl näytepuskuria (kaliumdivetyfosfaattipuskuri, pH 4). Tämän jälkeen kaikkiin näytteisiin lisättiin 25 µl sisäisen standardin käyttöliuosta, 1 ml näytepuskuria ja 3 ml uuttoliuotinta. Näytteitä sekoitettiin tasoravistelijassa tai yksitellen vorteksoimalla 45 sekunnin ajan, ja sentrifugoitiin 5 minuuttia (3500 rpm).

Sentrifugoinnin jälkeen orgaaninen faasi eroteltiin uuteen putkeen ja se haihdutettiin kuiviin 60 °C:ssa lämpöhauteessa typpihaihdutuksella.

Haihdutusjäännökseen lisättiin 50 µl asetonitriiliä, joka pyöriteltiin koeputkessa. Asetonitriili siirrettiin sisäputkelliseen näytepulloon. Tämän jälkeen lisättiin 15 µl MSTFA:ta. Näytteitä derivatisoitiin 80 °C:ssa lämpöhauteella 30 minuuttia. Tämän jälkeen näytteet analysoitiin.

Ennen neste-nesteuuttoa oikeille verinäytteille tehtiin entsymaattinen hydrolyysi, jossa kaliumdivetyfosfaattipurkuriin (pH 4) liuotettua β-glukuronidaasientsyymiä lisättiin näytteeseen 200 µl. Tämän jälkeen näyteputket korkitettiin, sekoitettiin ja jätettiin lämpöhauteeseen 37 °C:seen yön yli tai vähintään kahdeksi tunniksi. Menetelmäkehityksen aikana sisäisen standardin käyttöliuos lisättiin koeputkiin erikseen, mutta validoinnissa se sekoitettiin uuttoluottimeen.

Jokaiselle tutkittavalle yhdisteelle oli oma deuteroitu sisäinen standardi. Yhdisteet, sisäiset standardit ja niiden retentioajat on koottu taulukkoon 2.

Taulukko 2. Tutkittavat yhdisteet, niiden sisäiset standardit ja retentioajat (min) validoinnin aikana.

Aine	Retentioaika	Sisäinen standardi	Retentioaika
CBD	6,874	CBD-D3	6,865
THC	7,435	THC-D3	7,423
CBN	7,787	CBN-D3	7,775
11-OH-THC	8,430	11-OH-THC-D3	8,421
THC-COOH	8,962	THC-COOH-D3	8,953

6.2 Uuttoliuosuhteiden testaaminen

Uuttoliuottimena käytettiin heksaanin ja etyyliasetaatin seosta, ja näiden liuosten suhteista testattiin 95:5, 9:1, 5:1 ja 3:1 -liuokset. Jokaisella suhteella

testattiin standardit pitoisuudella 1 µg/l ja 50 µg/l ja näistä tehtiin kolme rinnakkaista, poikkeuksena suhde 5:1 jolla tehtiin vain kaksi rinnakkaista määrittystä.

6.3 Uttoliuotinmäärän testaaminen

Uttoliuossuhteiden testaamisen jälkeen testattiin uttoliuoksen määrää käyttäen valittua suhdetta 5:1 heksaanietyyliasetatiliuosta. Testattavat liuotinmäärät olivat 2 ml, 3 ml ja 4 ml. Kaikkia tilavuuksia testattiin standardeilla 1 µg/l, 25 µg/l sekä 100 µg/l. Kaikista tehtiin kolme rinnakkaista määrittystä.

6.4 Kahden derivatisointireagenssin käyttö

Testattiin myös toisen derivatisointireagenssin käyttöä. Tällöin uutto tehtiin normaalisti aina asetonitriiliin lisäykseen asti, mutta näytteensyöttäjän pulloihin lisättiin ensin 15 µl MTBSTFA:ta. Sen jälkeen korkitettut näytepulot laitettiin lämpöhauteeseen 80 °C:seen 30 minuutiksi. Tämän jälkeen korkit avattiin, lisättiin 15 µl MSTFA:ta, korkitettiin uudelleen ja sekoitettiin pikaisesti.

Testiä varten tehtiin myös näyte, joka sisälsi vain standardiliuosta sekä näyte, joka sisälsi vain sisäistä standardia. Näissä sisäputkelliseen näytepulloon pipetoitiin 25 µl sisäisen standardin liuosta sekä 100 µl kontrolliliuosta, ja haihdutettiin kuiviin näytepullossa. Tämän jälkeen tehtiin MTBSTFA:n lisäys, derivatisointi lämpöhauteessa ja MSTFA:n lisäys. Nämä näytteet ajettiin käyttäen SCAN-menetelmää, ja tuloksista etsittiin uusia johdannaisia. Niitä ei kuitenkaan löytynyt, joten muita tällä menetelmällä uutettuja näytteitä ei analysoitu, ja toinen derivatisointiaine hylättiin.

6.5 Testaaminen vainajanäytteillä

Kun menetelmä todettiin toimivaksi nollaverellä, siirryttiin testaamaan oikeita vainajanäytteitä. Vainajaveri voi olla koostumukseltaan juoksevaa tai täysin hyytynyttä, riippuen siitä miten pitkä aika kuolemasta ja näyteenotosta on, sekä näyteen säilytyksestä ja ottopaikasta (hyytymä, sydänveri, alaraaja). Näytteellä

voi olla vaikutusta uuttoon. Uuttotekniikkana neste-nesteeutto ei ole yhtä puhdistava kuin kiinteäfaasiuutto, joten näytteisiin mahdollisesti jäävät epäpuhtaudet saattavat hankaloittaa tunnistusta [32].

6.6 Validointi

Kun analyysimenetelmä oli saatu hiottua riittävän tehokkaaksi, tehtiin menetelmälle validointi. Validointi on suoritettu Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen sisäisen validointiohjeen mukaisesti. Validoinnissa mitattiin selektiivisyys, spesifisyys, lineaarisuus, määrittämis- ja toteamisraja, tarkkuus (oikeellisuus, toistettavuus), näytteiden säilyvyys, saanto, suhteellinen matriisivaikutus, carry over -efekti (kontaminaatio), laajennettu mittauserävarmuus sekä verifioitiin pienempi näytemäärä. Näiden lisäksi THC:n, 11-OH-THC:n ja THC-COOH:n osalta verrattiin tuloksia vanhalla menetelmällä saatuihin tuloksiin.

Varsinaista esivalidointia ei tehty tämän työn yhteydessä, sillä näille yhdisteille on yritetty jo aiemmin kehittää uutta menetelmää, ja lineaarinen alue on tutkittu aikaisempien testien yhteydessä.

7 Menetelmän kehityksen tulokset

7.1 Uuttoliuossuhteiden testaaminen

Testattiin uuttoliuoksia heksaanin ja etyyliasetaatin suhteilla 3:1, 5:1, 9:1 ja 95:5. Näistä saadut tulokset kerättiin taulukkoon 3.

Taulukko 3. Näytteinä standardit pitoisuuksissa 1 µg/l ja 50 µg/l, liuossuhteilla 3:1, 5:1, 9:1 ja 95:5. Jokaiselle aineelle on laskettu pitoisuuksien keskiarvo molemmissa pitoisuustasoilla.

Näyte	CBD	THC	CBN	11-OH-THC	THC-COOH
STD1, 3:1	1,2	0,61	1,2	1,1	1,08
STD50, 3:1	48	54	51	49	46
STD1, 5:1	0,98	0,96	0,83	0,96	0,91
STD50, 5:1	42	40	35	44	43
STD1, 9:1	1,3	3,2	1,4	1,2	1,4
STD50, 9:1	45	56	52	51	46
STD1, 95:5	1,8	1,7	2,6	1,4	3,1
STD50, 95:5	43	52	49	50	42

Tuloksissa ei juurikaan ole eroja isommalla pitoisuustasolla, mutta alemmalla tasolla erot ovat merkittäviä. Yksittäisinä tuloksina yhdisteiden ja uuttoliuottimien välillä on toki eroa, mutta kaikilla uuttoliuottimilla suhteellinen keskihajonta pysyy alle 10 %:n pitoisuudella 50 µg/l. Pitoisuudella 1 µg/l ainoastaan uuttoliuoksella 5:1 rinnakkaisten määritysten keskihajonta pysyy alle 10 %:n, muilla suhteilla 20–40 %.

CBD:llä, THC:llä ja CBN:llä pitoisuus nousee heksaanin määrän kasvaessa. Tämä johtuu siitä, että kannabidioli, kannabinoli ja THC ovat rasvaliukoisia aineita, ja liukenevat paremmin poolittomaan heksaaniin. 11-OH-THC:ssä ja THC-COOH:ssa taas on enemmän poolisia happo- ja hydroksyyliiryhmiä, joten ne liukenevat paremmin etyyliasettaattiin.

Etenkin pienillä pitoisuuksilla nähdään, että mitä enemmän heksaania, sitä enemmän arvo poikkeaa teoreettisesta. Varsinkin suhteilla 9:1 ja 95:5 arvot ylittävät teoreettisen pitoisuuden, joten mukaan on uuttunut myös muita yhdisteitä siinä määrin, että ne vaikuttavat pitoisuuteen.

Tulosten perusteella päädyttiin uuttoliuokseen, jossa on heksaania ja etyyliasettaattia suhteessa 5:1, sillä se toimii parhaiten pienillä pitoisuuksilla.

7.2 Uuttoliuosmäärän testaaminen

Testattiin 5:1 heksaanietyyliasetatiliuosta tilavuuksilla 2 ml, 3 ml ja 4 ml. Testeistä saadut tulokset koottiin taulukkoon 4. Rinnakkaisista määrytyksistä on laskettu keskiarvot. Huomioitavaa on myös se, että kannabidiolin ja kannabinolin pitoisuusalue 0,5–50 µg/l, muilla aineilla 1–100 µg/l.

Taulukko 4. Eri liuostilavuuksilla tehtyjen testien tulokset. Testattiin tilavuuksia 2 ml, 3 ml ja 4 ml kolmella eri pitoisuustasolla. Tulokset ovat kolmen rinnakkaismäärytyksen pyöristetyt keskiarvot (µg/l)

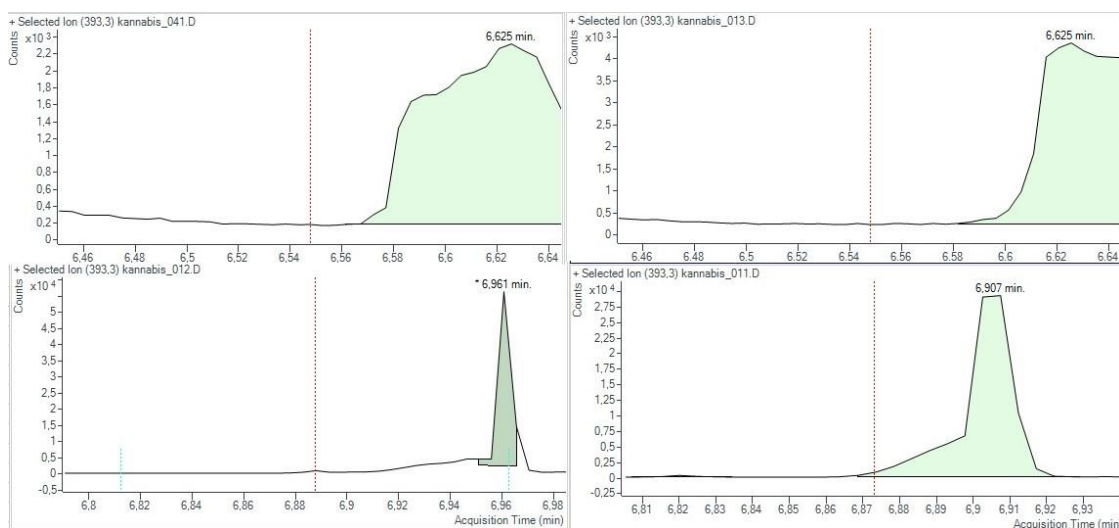
Näyte	CBD	THC	CBN	11-OH-THC	THC-COOH
STD100, 4 ml	47	96	46	94	93
STD25, 4 ml	12	26	14	26	25
STD1, 4 ml	0,32	0,74	0,29	0,51	0,69
STD100, 3 ml	55	103	50	101	97
STD25, 3 ml	12	26	12	26	25
STD1, 3 ml	0,32	0,83	0,28	0,52	0,71
STD100, 2 ml	51	96	49	97	98
STD25, 2 ml	13	26	13	26	25
STD1, 2 ml	0,32	0,86	0,29	0,52	0,71

Muilla tilavuuksilla ei huomattu suuria muutoksia 3 ml:aan verrattuna, joten pidädyttiin alkuperäisestä liuotintilavuudessa. Päätöstä tehdessä on otettu huomioon myös itse uuton suoritus, sillä faasien erottelu tehdään kertakäyttöisillä pasteur-pipeteillä, mitä vähäinen liuotinmäärä vaikeuttaa. Liian suuri liuotinmäärä puolestaan vaikeuttaisi ravistelua.

7.3 Testaaminen vainajanäytteillä

Oikeilla näytteillä tehdyissä testeissä nähtiin, että erityisesti sisäisen standardin retentioaika siirtyi näytteiden välillä paljon. Näytteissä näkyi myös isoja likapiikkejä, jotka koeluoituivat samaan aikaan analyytin ja/tai sisäisen standardin piikin kanssa. Rinnakkaismäärityksissä samalla näytteellä saattoi olla selkeä sisäisen piikki yhdessä määrityksessä ja suuri likapiikki seuraavassa.

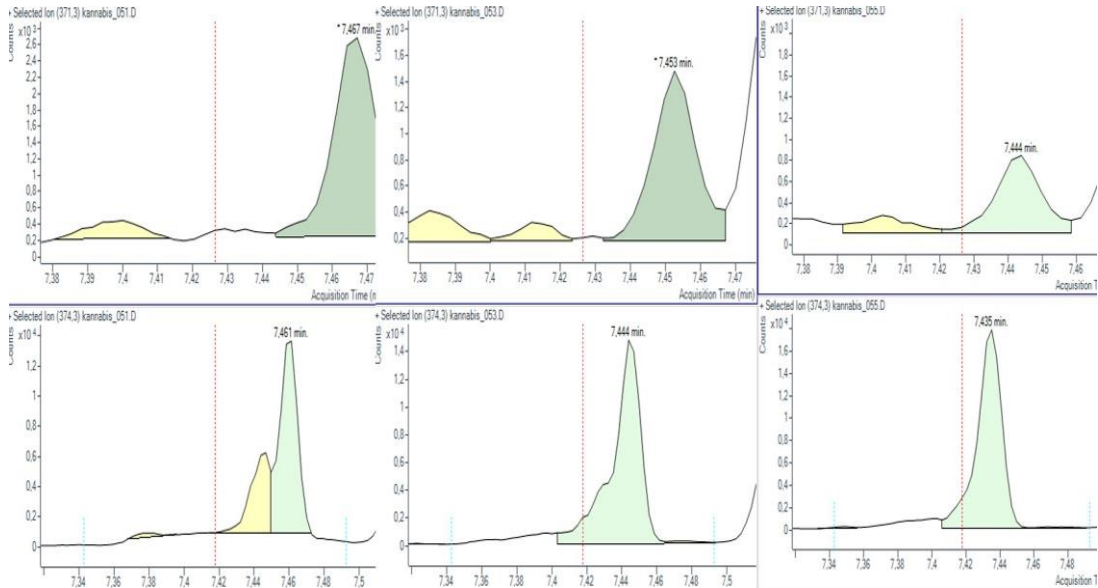
Testien jälkeen kokeiltiin uuttoa pienemällä näyte- ja liuosmäärällä, toiveena saada likapiikkejä pienennettyä. Tämän lisäksi laitteen analyysimenetelmää muutettiin. Näillä saatiin pienennettyä likapiikkejä ja hillittyä retentioaikojen siirtymistä niin, että tulokset pysyivät tasalaatuisina ja toistettavina. Lisäksi jokaisen näytteen jälkeen ajettiin pesuliuos (asetonitriili), jolla pyrittiin estämään kontaminaatiota. Kuvassa 4 on kannabidiolin sisäisen standardin piikki saman näytteen rinnakkaismäärityksissä.



Kuva 4. Kaksi ylintä ja alavasemmalla oleva piikki ovat kannabidiolin sisäisen standardin piikkejä saman näytteen rinnakkaismäärityksissä. Alaoikealla on saman näytteen sisäisen standardin piikki uuttoon ja analyysimenetelmään tehtyjen muutosten jälkeen.

Mädillä näytteillä nähtiin retentioaikojen siirtymistä vielä näiden toimien jälkeen. Asia saatiin ratkaistua näytteen laimentamisella. Kuvassa 5 nähdään, miten

laimentaminen vaikuttaa retentioajan siirtymiseen mädällä näytteellä. Huomataan, että mitä laimeampi näyte, sitä lähemmäksi oikeaa retentioaikaa piikki siirtyy.



Kuva 5. Ylärivillä näkyy analyytin piikki ja alarivillä sisäisen standardin piikki. Vasemmalla puolella on laimentamaton näyte, keskellä 1:2-laimennos ja oikealla 1:5-laimennos.

7.4 Lopullinen menetelmä

Lopullinen menetelmä noudattaa luvussa 6.1 mainittua alustavaa uuttomenetelmää. Näytettä tai nollamatriisia punnitaan 0,5 g alkuperäisen 1,0 g:n sijaan, ja kaikkia liuoksia lisätään puolet alkuperäisen ohjeen määristä:

- 100 µl β -glukuronidaasientsyymiä tutkittaviin näytteisiin
- 100 µl näytekuskuria standardeihin ja kontrollinäytteisiin
- 500 µl näytekuskuria kaikkiin näytteisiin
- 1,5 ml uuttoliuosta (sisäistä standardia lisätään edelleen samassa suhteessa).

Haihdutuksen jälkeen lisätään edelleen 50 µl asetonitriiliä ja 15 µl MSTFA-silylointireagenssia.

8 Validoinnin tulokset

8.1 Selektiivisyys ja spesifisyys

Spesifisyyden määrittämistä ei tehty validoinnissa erikseen, mutta analyysissä käytetään hyvin selektiivistä GC-MS-tekniikkaa, jossa aineiden tunnistuskriteereinä on kaksi diagnostista tunnistusionia sekä suhteellinen retentioaika (RRT).

Selektiivisyys määritettiin analysoimalla 15 negatiiviseksi tiedettyä vainajanäytettä, ja tarkasteltiin analyyttien kohdalla esiintyviä taustoja. Häiritsevien signaalien korkeus (tai sen perusteella laskettu pitoisuus) sai olla korkeintaan 10 % alemman määritysrajan korkeudesta.

Tämä vaatimus täyttyi kaikkien muiden yhdisteiden kohdalla, paitsi THC-COOH:n, jolla esiintyi välillä hieman tätä isompaa häiritsevää signaalia. Tämän seurauksena THC-COOH:n alemmaa määritysrajaa tullaan nostamaan.

8.2 Lineaarisuus, mittausalue ja kalibrointimalli

Lineaarinen alue tutkittiin 6 pitoisuudella 1,0–100 µg/l (1, 5, 10, 25, 50 ja 100 µg/l), ja jokaisesta pitoisuudesta tehtiin viisi määritystä. Näistä laskettiin kullekin pitoisuudelle keskiarvot, joiden avulla piirrettiin kalibrointikuvaaja, ja laskettiin korrelaatiokerroin R^2 . Tavoitteena kaikille aineille kalibrointikuvaaja selitekertoimella $R^2 > 0,99$ ja kaikille mittausalueen pisteille bias-% ≤ 20 sekä rsd% ≤ 20 .

Kaikkien aineiden osalta vaatimukset täyttyivät: mittauspisteiden bias oli ≤ 20 % ja rsd ≤ 20 %. Kaikille aineille saatiin lineaarinen kalibrointikuvaaja painotuksella $1/x^2$ selitekertoimella $R^2 > 0,99$.

8.3 Määritys- ja toteamisraja

Määritysrajanäytteet valmistettiin nollamatriisiin eli naudanvereen. Niitä tehtiin pitoisuustasoilla 1 µg/l, 50 µg/l ja 150 µg/l. Kaikista pitoisuustasoista tehtiin kolme rinnakkaista viitenä päivänä eli yhteensä 15 näytettä.

Määritysrajoiksi valitaan pitoisuudet, joissa rinnakkaismääritysten keskiarvon poikkeama todellisesta pitoisuudesta on $\leq 20\%$, rinnakkaismääritysten RSD on $\leq 20\%$ ja piikit ovat visuaalisesti arvioituna hyväksyttäviä.

Taulukkoon 5 on koottu määritysrajoihin liittyvät tulokset. Tulokset täyttivät asetetut vaatimukset.

Taulukko 5. Määritysrajojen tulokset tasoilla 1 µg/l, 50 µg/l ja 150 µg/l. Taulukossa on myös selitekertoimet.

Yhdiste	1 µg/l		50 µg/l		150 µg/l		
	%RSD	BIAS-%	%RSD	BIAS-%	%RSD	BIAS-%	R ²
CBD	8,5	-4,7	11	8,1	10	-1,2	0,9995
THC	5,4	-4,4	13	3,8	9,1	-2,4	0,9992
CBN	10	-3,3	14	9,6	13	-0,40	0,9992
11-OH-THC	11	-8,4	7,9	3,9	8,7	-3,3	0,9979
THC-COOH	20	-2,3	9,4	4,2	7,2	-4,7	0,9979

Toteamisraja on pienin pitoisuus, jossa signaali-kohinasuhde $S/N \geq 3$. Rajaksi valittiin pitoisuus 0,1 µg/l. Siitä tehtiin kolme rinnakkaista 3 päivänä, eli yhteensä 9 näytettä koko validoinnin aikana. Toteamisrajaa ei onnistuttu määrittämään validoinnin aikana. Pitoisuudella 0,1 µg/l kaikilla yhdisteillä näkyi pieni piikki, mutta ohjelmisto ei kyennyt laskemaan sille pitoisuutta. Tällä pitoisuustasolla signaali-kohinasuhde oli CBD:llä 9, THC:llä < 1 , CBN:llä 4, 11-OH-THC:llä 3 ja THC-COOH:lla 3. Kyseessä kaikkien mittausten keskiarvo.

8.4 Tarkkuus

Tarkkuudessa määritettiin oikeellisuus, toistettavuus ja uusittavuus. Oikeellisuutta varten valmistettiin QC-näytteet kahdella pitoisuustasolla (5 µg/l ja 50 µg/l). Molemmilla pitoisuustasoilla tehtiin kuusi rinnakkaismäärittystä kolmena päivänä, eli yhteensä 18 mittauksia, ja niille laskettiin poikkeama teoreettisesta pitoisuudesta (bias-%). Tavoitteena bias ≤ 20 %. Bias-% on laskettu kaavalla 1.

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

x on 6 rinnakkaisen mittauksen keskiarvo

T on teoreettinen arvo.

Toistettavuudella tarkoitetaan näytteiden välistä toistettavuutta sarjan sisällä. Se määritetään oikeellisuusnäytteiden rinnakkaismäärittysten avulla ja ilmoitetaan analyytille suhteellisena keskihajontana RSD, jonka tavoitteena on RSD ≤ 20 %. Oikeellisuuden ja toistettavuuden tulokset on koottu taulukkoon 6.

Taulukko 6. Oikeellisuus- ja toistettavuuskokeiden tulokset pitoisuustasoilla 5 µg/l ja 50 µg/l.

Aine	5 µg/l		50 µg/l	
	RSD%	BIAS-%	RSD%	BIAS-%
CBD	4,2	1,5	4,6	-14
THC	4,1	-1,6	5,1	-16
CBN	6,5	-5,8	6,7	-19
11-OH-THC	5,2	-6,0	3,7	-16

THC-COOH	11	7,5	7,0	-4,6
----------	----	-----	-----	------

Sekä oikeellisuuden että toistettavuuden kohdalla asetetut tavoitteet täyttyivät.

Uusittavuus määritetään oikeellisuustestien avulla. Kaksi henkilöä analysoi eri päivinä samat näytteet kahdella eri pitoisuusalueella, ja näille lasketaan suhteellinen keskihajonta, jonka tavoitteena on olla $\leq 30\%$. Uusittavuuden tulokset koottu taulukkoon 7.

Taulukko 7. Uusittavuustestien tulokset.

Aine	5 µg/l	50 µg/l
CBD	13	3,3
THC	9,2	16
CBN	21	7,7
11-OH-THC	18	6,8
THC-COOH	20	13

Tavoitteeksi asetettu suhteellinen keskihajonta $\leq 30\%$ täyttyi kaikilla yhdisteillä.

8.5 Stabiilius

Stabiilius mitattiin analysoimalla näytteitä vuorokauden ajan 4, 8, 12, 16, 20 ja 24 tunnin välein. Analyysia varten valmistettiin kuusi kalibrointisuoraa. Stabiilius on riittävää, kun lasketun pitoisuuden muutos alkuperäisestä on 20 % ja piikkien korkeus pysyy hyväksyttävän kokoisena ja muotoisena. Taulukossa 8 ilmoitettu stabiilisuustestien tulokset kaikilla kalibrointisuoran pisteillä. Tulokset on ilmoitettu tunteina, ja tarkemmat tulokset pitoisuusineen on esitetty liitteessä 1.

Taulukko 8. Stabiilisuustestien tulokset. Ylärivillä kalibrintisuoran pisteet (µg/l). Tulokset on ilmoitettu tunteina.

Aine	100	50	25	10	5	1
CBD	alle 4	yli 21	yli 21	yli 21	yli 21	yli 21
THC	yli 21	alle 16	yli 21	yli 21	yli 21	yli 21
CBN	alle 12	yli 21	yli 21	yli 21	yli 21	alle 12
11-OH-THC	yli 21	yli 21	yli 21	yli 21	yli 21	alle 12
THC-COOH	yli 21	yli 21	yli 21	yli 21	yli 21	alle 12

Mittauksissa ensimmäinen suora oli pitoisuudeltaan muita suurempi, mikä vaikutti tuloksiin. Epävirallisissa testeissä on todettu kaikkien yhdisteiden säilyvän kaikilla kalibrintisuoran pitoisuuksilla yli vuorokauden.

8.6 Saanto

Valmistettiin kuusi kappaleita näytteitä nollamatriisiin. Näytteisiin tehtiin standardin lisäys pitoisuudella 5 µg/l ennen uuttoa. Tehtiin myös kuusi näytettä, joissa standardin lisäys tehtiin suoraan sisäputkeen ja työ aloitettiin haihdutuksella. Saantokokeilla varmistetaan sisäisen standardin toimivuus uuttohävikin korjauksessa. Saantokokeiden tulokset on koottu taulukkoon 9.

Saantoprosentti laskettiin kaavalla 2

$$\%R = \frac{C1 * 100 \%}{C2} \quad (2)$$

C1 on näytteiden pitoisuus (standardinlisäys ennen uuttoa)

C2 näytteiden pitoisuus (standardinlisäys uuton jälkeen).

Taulukko 9. Yhdisteiden saantoprosentit.

Yhdiste	Saantoprosentti (%)
CBD	98
THC	82
CBN	84
11-OH-THC	94
THC-COOH	109

Saantoprosentin osalta tulokset olivat hyväksyttävät.

8.7 Suhteellinen matriisiefekti

Määrittämiseen valittiin 10 oikeaa vainajanäytettä, joihin tehtiin standardinlisäys pitoisuustasolla 5 µg/l. Jokaisesta näytteestä tehtiin kuusi rinnakkaista määrittäystä, eli yhteensä näytteitä oli 60. Jokaiselle näytteelle laskettiin rinnakkaisten määritysten hajonta, näytteiden välinen hajonta sekä poikkeama teoreettisesta pitoisuudesta. Jos näytteiden välinen keskihajonta on $\leq 20\%$, matriisiefektin vaikutuksia ei eritellä.

Matriisiefektiä on, jos näytteiden välinen keskihajonta on yli kolme kertaa suurempi kuin näytteiden sisäinen keskihajonta, ja samaan aikaan näytteen bias-% on $\geq 20\%$. Testien perusteella lasketut tulokset on koottu taulukkoon 10. Tarkemmat tulokset on koottu liitteeseen 2.

Taulukko 10. Matriisiefektin tulokset.

Aine	Näytteen sisällä		Näytteiden välinen
	RSD%	BIAS-%	RSD%
CBD	1,8	-8,2	2,5
THC	2,6	-5,2	2,6
CBN	2,9	-8,7	2,4
11-OH-THC	1,7	-4,7	1,5
THC-COOH	2,9	4,2	3,2

Yhdelläkään yhdisteellä näytteiden välinen keskihajonta ei ole yli kolme kertaa sisäistä keskihajontaa suurempi, joten matriisiefekti ei ole merkitsevää, vaikka näytematriisilla on selkeästi hieman vaikutusta tuloksiin (liite 2). Näytteiden välinen suhteellinen keskihajonta on alle 20 %, joten menetelmä täyttää vaatimukset.

8.8 Menetelmien vertailu

Valittiin 10 oikeaa näytettä, joissa oli todettu tutkittavia aineita. Näytteet analysoitiin vanhalla ja uudella menetelmällä, ja tuloksia verrattiin toisiinsa. Tulosten suhteellinen keskihajonta sai olla ± 30 %. Kannabinolia ja kannabidiolia ei ole ennen kvantitoitu rutiininomaisesti Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitoksella, joten niiden osalta ei voitu tehdä vertailua. THC:n, 11-OH-THC:n ja THC-COOH:n osalta tulokset on koottu taulukkoon 11.

Taulukko 11. Vanhan ja uuden menetelmän vertailun tulokset THC:lle, 11-OH-THC:lle ja THC-COOH:lle.

Näyte	THC			11-OH-THC			THC-COOH		
	Uusi (µg/l)	Vanha (µg/l)	Ero (%)	Uusi	Vanha	Ero (%)	Uusi	Vanha	Ero (%)
1	2,5	4,4	43	5,6	7,1	21	48	74	36
2	2,6	4,4	40	13	22	41	255	383	33
3	3,5	5,4	35	9,2	18	50	174	282	38
4	28	28	0,61	3,8	11	65	43	95	55
5	1,5	2,8	47	2,5	7,7	67	43	76	44
6	4,4	5,9	25	2,6	23	89	9,6	13	28
7	2,2	3,5	38	2,4	6,0	60	8,6	14	39
8	1,5	2,9	50	1,8	6,5	72	11	20	47
9	0,50	1,7	71	1,2	11	89	17	48	64
10	1,8	3,0	41	0,97	3,9	75	7,1	10	31

Asetetut vaatimukset eivät täytyneet menetelmien vertailun osalta. Vain pari yksittäistä tulosta täytti vaatimukset, mutta yksikään näyte ei. Hyväksyttävissä rajoissa olevat tulokset on väritetty vihreiksi. Tämä tarkoittaa, että menetelmää ei voi ottaa käyttöön tällaisena, vaan täytyy selvittää, mistä poikkeavuudet johtuvat, ja saada ne korjattua.

8.9 Pienemmän määrän verifiointi

Analysoitiin kolme vanhaa vainajanäytettä, joista tehtiin laimennokset 1:1, 1:2 ja 1:5 (täydennettiin laboratoriovedellä painoon 0,5 g). Tulokset saavat poiketa toisistaan $\pm 30\%$, ja jos ne poikkeavat suuresti, näyte analysoidaan uudestaan vanhalla menetelmällä. Taulukkoon 12 on koottu testeistä saadut tulokset. Laimennosten tulokset on ilmoitettu laimentamalla saadun tuloksen poikkeamana alkuperäisestä (%).

Taulukko 12. Kolme vainajanäytettä analysoitiin laimennoksilla 1:1, 1:2 ja 1:5. Alkuperäinen tulos on jokaisella aineella sarakkeen 1:1 alla, 1:2 ja 1:5 tulokset on ilmoitettu tuloksen prosenttiosuutena alkuperäisestä.

Näyte	THC			11-OH-THC			THC-COOH		
	1:1 (µg/l)	1:2 (%)	1:5 (%)	1:1	1:2 (%)	1:5 (%)	1:1	1:2 (%)	1:5 (%)
1	9,1	25	40	0,35	34	100	28	8,2	21
2	4,5	14	16	9,6	9,1	13	200	-1,0	4,5
3	1,7	-36	37	1,6	20	56	19	5,8	15

1:2-laimennoksella tulokset poikkeavat pääsääntöisesti alle 30 %, 1:5-laimennoksella poikkeama on isompaa. Laimentamattoman näytteen pitoisuudella on vaikutusta laimentamalla saadun tuloksen oikeellisuuteen. Pienillä pitoisuuksilla saannot heittivät yli sallitun 30 %, mutta se oli odotettavissa, eikä aiheuta toimenpiteitä. Isoilla pitoisuuksilla laimennos toimii hyvin, ja sitä voidaan käyttää myös yli kalibrointisuoran menevien pitoisuuksien tarkempaan määrittämiseen.

8.10 Carry over-testi

Carry over -testillä selvitetään, tapahtuuko isojen pitoisuuksien jälkeen kontaminaatiota. Tehtiin kuusi peräkkäistä injektiota suurimmasta pitoisuudesta 100 µg/l, ja lopuksi analysoitiin nollanäyte häiritsevien piikkien varalta. Häiritsevien piikkien korkeus tai sitä vastaava pitoisuus saa olla korkeintaan 10 % kyseisen analyysin alimmasta määrittämisrajasta.

Kaikkien aineiden alin määrittämisraja validoinnissa on 1 µg/l, joten häiritsevien piikkien pitoisuus saa olla korkeintaan 0,1 µg/l. Tämä täyttyi kaikilla muilla tutkituilla yhdisteillä paitsi THC-COOH:lla, jolla häiritsevien piikkien pitoisuus/korkeus oli 0,28 µg/l.

8.11 Laajennettu mittausepävarmuus

Jokaiseen mittaukseen sisältyy epävarmuutta. Mittausepävarmuutta arvioimalla nähdään menetelmällä saatujen tulosten vaihteluväli. Tavoitteena on, että mittausepävarmuus on ≤ 30 luottamustasolla 95 %.

Laajennettu mittausepävarmuus laskettiin Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen sisäisen validointiohjeen mukaisesti jokaiselle aineelle kaikilla pitoisuustasoilla, mukaan lukien QC-tasot (5 µg/l ja 50 µg/l).

Mittausepävarmuus laskettiin kaavalla 3

$$U = \sqrt{U1^2 + U2^2} \quad (3)$$

U1 on systemaattinen virhe

U2 on satunnaisvirhe.

Mittausepävarmuuden määrittämiseen tarvitaan systemaattinen virhe ja satunnaisvirhe. Systemaattinen virhe U1 laskettiin kaavalla 4

$$U1 = \frac{(|U1a| + |U1b|)}{2} \quad (4)$$

a on oikeellisuus: (bias-% teoreettisesta arvosta)

b on standardilisäysten bias-% todellisista näytteistä (matriisiefektin yhteydessä).

Satunnaisvirhe U2 laskettiin kaavalla 5

$$U2 = \frac{(|U2a| + |U2b| + |U2c|)}{3} \quad (5)$$

a on toistotarkkuus validointikuvaajan pisteissä

b hajonta todellisissa tapauksissa (toistettavuus ja uusittavuus)

c on standardinlisäysten RSD todellisista näytteistä.

Menetelmän mittausepävarmuus ilmoitetaan laajennettuna mittausepävarmuutena $U (95 \%) = 2 \times U$. Taulukossa 13 laajennettu mittausepävarmuus pitoisuuksilla 5 µg/l (QC1) ja 50 µg/l (QC2).

Taulukko 13. Laajennettu mittausepävarmuus QC-tasoilla 5 µg/l ja 50 µg/l.

Aine	QC1	QC2
CBD	14	21
THC	13	27
CBN	25	30
11-OH-THC	20	22
THC-COOH	26	15

Kaikilla yhdisteillä laajennettu mittausepävarmuus täytti asetetut vaatimukset.

9 Yhteenveto

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää ja validoida käyttöön uusi menetelmä kannabinoidien määrittämiseen verinäytteistä. Työhön kuului uutteen optimointi ja menetelmän validointi. Työn tuloksena kehitettiin menetelmä kannabinoidien määrittämiseen verinäytteestä, jossa erotusmenetelmänä on neste-nesteuutto ja analyysi tapahtuu GC-MS-laitteistolla. Uuttoliuokseksi valittiin heksaanietyyliasetatiliuos (5:1) ja uuttoliuotintilavuudeksi alun perin 3 ml. Uuttoliuottimen ja muiden uuttoon käytettävien liuosten määrä puolitettiin ennen validointia. Myös näytteen määrä puolitettiin.

Validointi oli pääosin onnistunut, ja lähes kaikki vaatimukset täyttyivät. To-teamisraja jäi määrittämättä, ja sille lasketaan teoreettinen arvo. Tulosten perusteella myös THC-COOH:n alemmaa määrittämissä tuloksilla todennäköisesti

nostamaan. Ainoa validoinnin osa, joka ei täyttänyt vaatimuksia, oli menetelmävertailu käytössä olevan menetelmän kanssa.

Menetelmää ei ole vielä otettu käyttöön, ja se vaatisi, että menetelmien vertailuissa saadut tulokset poikkeavat $\leq 30\%$, mikä ei tällä hetkellä täyty. Tämä voi osaksi johtua siitä, että yhdisteet hajoavat herkästi ja testejä on tehty hyvin vanhoilla näytteillä. Toinen vaikuttava tekijä voisi olla näytteen ja uuttoluokset sekoitus, joka testeissä tehtiin vorteksoimalla näytteet yksitellen. Sekoitusaika 30–45 sekuntia varsin lyhyt vainajanäytteille, joten pidemmästä ravistelusta voisi olla hyötyä. Menetelmää on testattu myös laatunäytteillä, joilla sekoitus toimi riittävän hyvin, eli tällaisenaan menetelmä toimisi hyvin elävien analytiikassa. Käyttöönoton jälkeen menetelmään voisi jatkossa lisätä myös muita kannabinoideja. Uuttoprosessia voisi myös helpottaa käyttämällä näytteiden sekoitukseen tasoravistelijaa vorteksin sijaan.

Lähteet

- 1 Alcohol, drugs and addictive behaviours. Cannabis. World Health Organization. 2023. Verkkoaineisto. <<https://www.who.int/teams/mental-health-and-substance-use/alcohol-drugs-and-addictive-behaviours/drugs-psychoactive/cannabis>>. Luettu 20.10.2023.
- 2 Kannabis. Nuortenlinkki. A-klinikkasäätiö. Verkkoaineisto. <<https://nuortenlinkki.fi/tietopiste/pikatieto/kannabis/>>. Luettu 11.10.2023.
- 3 Kannabiksen ja alkoholin yhteiskäyttö. Nuortenlinkki. A-klinikkasäätiö. Verkkoaineisto. <<https://nuortenlinkki.fi/tietopiste/tietoartikkelit/huumeet-ja-laakkeet/kannabiksen-ja-alkoholin-yhteiskaytto/>>. Luettu 19.8.2023.
- 4 Cannabinol 101: The science of cannabitol. Inmed Pharmaceuticals. Verkkoaineisto. <<https://www.inmedpharma.com/media-news/cannabinol-101-the-science-of-cannabinol-cbn/>>. Luettu 18.8.2023.
- 5 Marijuana. Labce. Verkkoaineisto. <https://www.labce.com/spg1094110_marijuana.aspx>. Luettu 18.9.2023.
- 6 Metabolism. Cannify. Verkkoaineisto. <<https://www.cannify.us/education/cannabis-and-the-body/cannabinoid-clinical-pharmacology>>. Luettu 17.9.2023.
- 7 Savolainen, Markku. 2004. Endokannabinoidit – monivaikutteinen välittäjäjärjestelmä mielihyvän ja syömiskäyttäytymisen säätelyssä. <<https://www.duodecimlehti.fi/duo94345>>. Luettu 17.8.2023.
- 8 Kannabiksen aiheuttamat terveyshaitat. Käypä hoito -suositus. Duodecim. Verkkoaineisto. <<https://www.kaypahoito.fi/nix01881>>. Luettu 17.8.2023.
- 9 What are marijuana's effects? National Institute on Drug Abuse. 2020. Verkkoaineisto. <<https://nida.nih.gov/publications/research-reports/marijuana/what-are-marijuana-effects>>. Luettu 18.8.2023.
- 10 Cannabis Drug Profile. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. Verkkoaineisto. <https://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/cannabis_en>. Luettu 18.9.2023.
- 11 Terveyden ja hyvinvoinninlaitos. Suomalaisten huumeiden käyttö ja huumeasenteet 2022. Raportti. <<https://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/146435/Suomalaisten%20huumeiden%20käyttö%20ja%20huumeasenteet%202022.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Luettu 17.8.2023

- 12 Kannabiksen käytön rangaistavuuden poistaminen. Eduskunta. Verkkoaineisto. <https://www.eduskunta.fi/FI/naineduskuntatoimii/kirjasto/aineistot/kotimainen_oikeus/LATI/Sivut/kannabiksen-kayton-rangaistavuuden-poistaminen.aspx>. Luettu 18.10.2023.
- 13 Hakkarainen, Pekka & Karjalainen, Karoliina (2017). ”Pilvee, pilvee. Kannabiksen käyttötavat, käyttäjät ja poliittiset mielipiteet”. Yhteiskuntapolitiikka, vol 82:1.
- 14 Seppä, Kaija; Aalto, Mauri; Alho, Hannu & Kiiänmaa, Kalervo (toim.) Huume- ja lääkeriippuvuudet. 2012. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- 15 Häkkinen, Margareeta. Kannabiksen terveysvaikutukset ja kannabisriippuvuus. 2023. Duodecim. Verkkoaineisto. <<https://www.terveyskirjasto.fi/dlk01324>>. Luettu 18.8.2023.
- 16 Huumeongelmat. Käypä hoito -suositus. 2022. Verkkoaineisto. <<https://www.kaypahoito.fi/hoi50041>>. Luettu 19.8.2023.
- 17 Käypä hoito. Huumetestien aikarajoja. 2018. Verkkoaineisto. <<https://www.kaypahoito.fi/nix00462>>. Luettu 17.8.2023.
- 18 Postmortem redistribution of drugs: a literature review. 2023. <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12024-023-00709-z>>. Luettu 12.10.2023.
- 19 Penttilä, Antti (toim.); Hirvonen, Jorma (toim.) & Saukko, Pekka (toim.). Oikeuslääketieteen perusteet. 1993. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- 20 Gustafson, Richard; Moolchan, Eric; Barnes, Allan; Levine, Barry & Huestis, Marilyn. Validated method for the simultaneous determination of delta9-tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC and 11-nor-9-carboxy-THC in human plasma using solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry with positive chemical ionization. 2003. Journal of Chromatography.
- 21 Focus on enzymatic hydrolysis. Silab. Verkkoaineisto. <<https://www.silab.fr/en/inspirations/18/focus-on-enzymatic-hydrolysis>>. Luettu 20.9.2023.
- 22 B-glucuronidase. Sigma Aldrich. Verkkoaineisto. <<https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/144/331/g8420dat.pdf>>. Luettu 18.8.2023.

- 23 Kul, Aykut & Sagiril, Olcay. Determination of Enzymatic Hydrolysis Efficiency in Detection of Cannabis Use by UPLC-MS/MS. *Journal of analytical Toxicology*. 2021.
- 24 Erotusmenetelmät. Opetushallitus. Verkkoaineisto. <http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_2-1_yleista_erotusmenetelmista.html>. Luettu 16.8.2023.
- 25 Orata, Francis. InTech-Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis. Verkkoaineisto. <https://cdn.intechopen.com/pdfs/32817/InTech-Derivatization_reactions_and_reagents_for_gas_chromatography_analysis.pdf>. Luettu 16.8.2023.
- 26 McMaster, Marvin & McMaster, Christopher. *GC/MS: A Practical User's Guide*. 1998. Yhdysvallat: Wiley-VCH.
- 27 Stenerson, Katherine. Analysis of Tetrahydrocannabinol (THC), and Carboxytetrahydrocannabinol (THCC) in Surface Waters by SPME and GC-MS. *Reporter Volume* 34.1.
- 28 Jaarinen, Soili & Niiranen, Jukka. 2005. *Laboratorion analyysiteknikka*. Helsinki: Edita.
- 29 Kaasukromatografia. Analyysimenetelmät. Opetushallitus. Verkkoaineisto. <http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_2-5_kaasukromatografia.html>. Luettu 16.8.2023.
- 30 Turner, Diane. GC-MS Principle, Instrument and Analyses and GC-MS/MS. *Technology Network*. 2022. Verkkoaineisto. <<https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/gc-ms-principle-instrument-and-analyses-and-gc-msms-362513>>. Luettu 19.11.2023.
- 31 Ketola, Raimo; Kostianen, Risto; Kotiaho, Tapio & Vainiotalo, Pirjo (toim.). 2010. *Massaspektrometrian perusteet*. Helsinki: Hakapaino.
- 32 Danaceau, Jonatha; Haynes, Kim & Chambers, Erin. A Comprehensive Comparison of Solid Phase Extraction (SPE) vs. Solid Liquid Extraction (SLE) vs. Liquid Liquid Extraction (LLE) Sample Prep Techniques in Bioanalysis and Forensic Toxicology Analyses. *Waters Corporation*. 2017. Verkkoaineisto. <<https://www.waters.com/nextgen/th/en/library/application-notes/2017/solid-phase-extraction-vs-solid-liquid-extraction-vs-liquid-liquid-extraction.html>>. Luettu 12.12.2023.

Stabiilisuuskokeiden tulokset

Stabiilisuuskokeiden laskut ja tulokset kaikille tutkituille yhdisteille on kuvassa 1. Arvot ovat prosenttiosuus ensimmäisenä analysoidusta suorasta. Vaaleanpunaisella värjätyt alittavat vaatimukset.

cbd						
Muutos	100	50	25	10	5	1
1	77.19437	93.67563	101.75645	98.1173	88.6846	100.6424
2	70.46633	103.5143	103.37059	92.07481	91.33293	86.85135
3	73.64182	103.5143	90.518051	100.62895	88.39881	84.20155
4	76.11641	86.14406	92.907694	93.440649	84.73688	81.24059
5	65.55268	98.79035	98.397642	80.492159	70.98274	82.90675

thc						
Muutos	100	50	25	10	5	1
1	88.99867	82.43607	102.82856	111.24854	91.07182	87.50994
2	89.69662	86.75989	99.332637	111.29863	98.88123	87.58943
3	91.59394	70.52713	99.631564	106.18447	101.798	87.00318
4	95.46413	78.64828	92.127848	99.280294	95.2772	83.7341
5	80.73099	92.56352	102.68753	93.598859	84.59295	83.36645

cbn						
Muutos	100	50	25	10	5	1
1	87.82913	88.11536	100.16414	101.87746	97.69092	90.30993
2	75.86781	97.37483	97.659915	98.508516	100.9303	71.38093
3	77.5181	82.1303	96.927969	93.965535	110.0908	70.28246
4	80.99404	89.8948	88.076508	91.595284	104.8078	82.17929
5	72.88006	94.21786	96.012366	80.160234	86.62294	68.98784

11-oh-thc						
Muutos	100	50	25	10	5	1
1	105.3503	93.8333	96.29599	88.872234	81.26345	80.99633
2	93.49585	103.7705	97.92072	99.809998	89.86224	41.96686
3	93.01883	91.08163	89.64927	93.946335	87.84337	52.22785
4	96.53769	88.48611	93.886585	96.476524	99.83245	51.44388
5	95.37006	102.322	98.473804	82.939959	82.13429	56.84231

thcc						
Muutos	100	50	25	10	5	1
1	106.2665	95.89287	88.336821	95.364001	93.76143	87.45513
2	94.98233	104.1709	93.276533	92.019102	88.84292	72.83606
3	99.33331	94.01348	84.448979	93.244402	89.81582	72.75628
4	99.94529	96.71856	85.831973	90.538574	95.10644	88.96091
5	97.06272	94.4985	87.899848	93.114793	92.85922	71.08097

Kuva 1 Stabiilisuuskokeiden tulokset.

Suhteellisen matriisiefektin tulokset

Kannabidiolin ja tetrahydrokannabinolin mittaustulokset, hajonta näytteen sisällä ja näytteiden välillä sekä poikkeama teoreettisesta arvosta on esitetty kuvassa 1.

1.

CBD					THC				
näyte	s	ka	rsd	bias%	näyte	s	ka	rsd	bias%
1.	0,325742964	4,638833333	7,022088114		1.	0,319400911	4,98122	6,41211	
2.	0,40898398	4,7575	8,596615452		2.	0,376281259	5,13422	7,32889	
3.	0,240173177	4,67365	5,138878117		3.	0,288091241	5,10675	5,64138	
4.	0,212866603	4,696433333	4,532516228		4.	0,31495174	5,06387	6,21959	
5.	0,24545159	4,68465	5,239486193		5.	0,113202185	5,02077	2,25468	
6.	0,352083308	4,8343	7,283025636		6.	0,345683211	4,01953	8,60008	
7.	0,419524795	4,239316667	9,896047595		7.	0,589824838	4,20225	14,0359	
8.	0,276788892	4,11575	6,725114316		8.	0,238095321	4,12802	5,76779	
9.	0,414960006	4,532333333	9,155549153		9.	0,211316426	4,5148	4,68053	
10.	0,223802133	4,702466667	4,759249745		10.	0,313566654	5,20873	6,02002	
yht.	0,082863786	4,587523333	1,806285869	-8,24953	yht.	0,123918124	4,73802	2,6154	-5,2397

Näytteiden vä	rinnakkainen	s	ka	rsd%	Näytteiden vä	rinnakkainen	s	ka	rsd%
1.		0,520307378	4,60659	11,2948	1.		0,76854	4,70396	16,3381
2.		0,370916185	4,54199	8,16638	2.		0,41024	4,57298	8,97089
3.		0,165578059	4,47636	3,69894	3.		0,52893	4,72196	11,2015
4.		0,373486238	4,61751	8,08848	4.		0,46614	4,84623	9,61859
5.		0,399854532	4,66376	8,57365	5.		0,59167	4,82579	12,2606
6.		0,368768087	4,61893	7,98384	6.		0,52696	4,75717	11,0771
yht.		0,114203602	4,587523333	2,48944	yht.		0,12412	4,73802	2,61964

Kuva 1 Kannabidiolin ja tetrahydrokannabinolin matriisiefektin tulokset.

Kannabinolin, 11-OH-THC:n ja THC-COOH:n mittaustulokset, hajonta näytteen sisällä ja näytteiden välillä sekä poikkeama teoreettisesta arvosta on esitetty kuvassa 2.

cbn					11-oh-thc					thcc				
näyte	s	ka	rsd	bias%	näyte	s	ka	rsd	bias%	näyte	s	ka	rsd	bias%
1.	0,36531	4,67043	7,82166		1.	0,15215	4,50645	3,37638		1.	0,29456	4,64478	6,34175	
2.	0,20568	4,59995	4,4713		2.	0,30745	4,5702	6,72731		2.	0,41951	4,82832	8,68853	
3.	0,12762	4,77123	2,67486		3.	0,20537	4,70452	4,36542		3.	0,66692	5,77528	11,5478	
4.	0,09519	4,76892	1,99599		4.	0,23119	4,60435	5,02114		4.	0,15062	4,36113	3,45376	
5.	0,2665	4,43847	6,00423		5.	0,15198	4,51858	3,36334		5.	0,33239	4,7828	6,9496	
6.	0,26297	4,21655	6,2366		6.	0,38769	5,25143	7,3826		6.	0,58209	8,0328	7,24636	
7.	0,54662	4,33723	12,6029		7.	0,2441	4,84957	5,03351		7.	0,34706	4,15673	8,3493	
8.	0,13469	4,34465	3,10017		8.	0,28684	4,86232	5,89916		8.	0,40241	5,69247	7,06925	
9.	0,31932	4,78035	6,67988		9.	0,34796	4,84093	7,18782		9.	0,24216	4,76297	5,08421	
10.	0,2517	4,75852	5,28956		10.	0,30221	4,96313	6,08902		10.	0,35639	5,08727	7,00553	
yht.	0,1334	4,56863	2,91989	-8,6274	yht.	0,07897	4,76715	1,65665	-4,65703	yht.	0,15204	5,21246	2,91684	4,2491

Näytteiden vä	rinnakkais	s	ka	rsd%	Näytteiden vä	rinnakkais	s	ka	rsd%	Näytteiden vä	rinnakkais	s	ka	rsd%
1.		0,48707	4,5595	10,6825	1.		0,29721	4,78642	6,20949	1.		1,27737	5,14995	24,8036
2.		0,34959	4,4799	7,80343	2.		0,32868	4,70581	6,9846	2.		1,36109	5,26566	25,8484
3.		0,22999	4,55128	5,05331	3.		0,28032	4,73233	5,92349	3.		0,98496	5,09722	19,3234
4.		0,25461	4,7363	5,37568	4.		0,48221	4,87514	9,8913	4.		0,9848	5,34088	18,4389
5.		0,40209	4,61507	8,7126	5.		0,32354	4,70289	6,87953	5.		1,10347	5,16752	21,3539
6.		0,20895	4,46973	4,67485	6.		0,32185	4,8003	6,70484	6.		1,30541	5,2535	24,8483
yht.		0,10974	4,56863	2,40196	yht.		0,07258	4,76715	1,52252	yht.		0,16694	5,21246	3,20272

Kuva 2. Kannabinolin, 11-OH-THC:n ja THC-COOH:n matriisiefektin tulokset.