



Ida Sallinen

Klotsapiinin analyysimenetelmän menetelmänkehitys, optimointi, siirto ja verifiointi toiselle LC-MS-laitteelle

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

14.5.2025

Tiivistelmä

Tekijä:	Ida Sallinen
Otsikko:	Klotsapiinin analyysimenetelmän menetelmänkehitys, optimointi, siirto ja verifiointi toiselle LC-MS-laitteelle
Sivumäärä:	29 sivua + 7 liitettä
Aika:	14.5.2025
Tutkinto:	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat:	Lehtori Kari Raatikainen Kemisti Päivi Pöhö

Opinnäytetyö tehtiin SYNLAB Suomi Oy:n keskuslaboratoriossa, huumaus- ja lääkeainelaboratoriossa talven 2024–2025 aikana.

Klotsapiini on toisen polven psykoosilääke, jota käytetään psyykkisten sairauksien, kuten skitsofrenian hoidossa. Klotsapiinilla on suhteellisen kapea terapeuttilinen alue ja vakavia haittavaikutuksia, minkä takia sitä käytäviltä henkilöiltä otetaan säännöllisiä laboratoriokokeita. Klotsapiinin vakavin sivuoire on agranulosytoosi, joka altistaa vaikeille infektioille.

Työn tavoitteena oli siirtää ja verifioida klotsapiinin analyysimenetelmä toisen laitevalmistajan laitteelle ja tarkistaa, että verifioitavan laitteen tarkkuus, toistettavuus ja oikeellisuus ovat samalla tasolla käytössä olevan laitteen kanssa. Samalla menetelmää kehitettiin. Analysoinnissa käytetään ESI-LC-MS/MS- ja dynamic MRM -tekniikkaa.

Verifiointi onnistui hyvin, ja verifioitavan laitteen todettiin soveltuvan klotsapiinin määrittämiseen. Kaikki asetetut laatutavoitteet saavutettiin, ja tulokset olivat yhtenäiset laitteiden välillä. Verifioitu laite otettiin käyttöön heti verifiointin valmistumisen jälkeen.

Avainsanat: klotsapiini, LC-ESI-MS/MS, optimointi, verifiointi, menetelmänkehitys

Tämän opinnäytetyön alkuperä on tarkastettu Turnitin Originality Check -ohjelmalla.

Abstract

Author: Ida Sallinen
Title: Method Development, Optimization, Transfer and Verification of Clozapine Analysis Methods to Another LC-MS Instrument
Number of Pages: 28 pages + 7 appendices
Date: 14 May 2025

Degree: Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme: Laboratory Sciences
Supervisors: Kari Raatikainen, Senior Lecturer
Päivi Pöhö, Chemist

This bachelor's thesis study was performed in the central laboratory of SYNLAB Suomi Oy, in the department of narcotics and drug analysis during the winter of 2024-2025.

Clozapine is a second-generation antipsychotic medication used in the treatment of psychiatric disorders, primarily in the treatment of schizophrenia. Due its relatively narrow therapeutic range and the risk of serious side effects, patients using clozapine require regular laboratory monitoring. The most serious side effect of clozapine is agranulocytosis, which increases susceptibility to severe infections.

The aim of this work was to transfer and verify the clozapine analysis method on a LC-MS/MS from a different manufacturer and to ensure whether the new instrument met the required standards for accuracy, repeatability and correctness to the existing instrument. The method was developed during the process. The analysis uses ESI-LC-MS/MS and dynamic MRM techniques.

The verification was successfully completed, and the device was proven suitable for analysis of clozapine. All criteria for quality were met and results between devices were consistent. Following the verification, the new device was taken into routine use.

Keywords: clozapine, LC-ESI-MS/MS, optimization, verification, method development

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Terapeuttisten lääkeaineiden seuranta	2
3	Klotsapiini	3
4	Teoria	5
4.1	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia	5
4.2	Massaspektrometria	6
4.3	Menetelmän kehitys	7
5	Verifiointi	7
6	Laitteet ja reagenssit	10
7	Menetelmän optimointi	12
7.1	MRM-siirtymien optimointi	12
7.2	MS-parametrit	12
7.3	Gradienttimuutos	13
8	Työn suoritus	13
9	Tulokset	14
9.1	Menetelmänvertailu	14
9.2	Satunnaisvirhe	16
9.3	Systemaattinen virhe	17
9.4	Mittausepävarmuuden arviointi	19
9.5	Siirtymävirhe	20
9.6	Spesifisyys	21
9.7	Matriisiefekti	22
9.8	Määritysraja	24
9.9	Lineaarisuus ja mittausalue	26

10	Yhteenveto	28
	Lähteet	29

Liite 1: Analyysimenetelmä (salainen)

Liite 2: Työn suoritus (salainen)

Liite 3: Verifiointisarjat

Liite 4: Käytössä olevan ja verifioitavan menetelmän menetelmänvertailun tulokset

Liite 5: Retentioajat

Liite 6: Piikin pinta-alojen ja ionisuhteiden CV%

Liite 7: Mittausepävarmuuden laskeminen

Lyhenteet

AGNP:	<i>Arbeitsgemeneinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie.</i> Saksankielinen Neuropsykofarmakologian työryhmä
CAL:	<i>Calibration Sample.</i> Kalibrointinäyte
ESI:	<i>Electrospray Ionization.</i> Sähkösumutusionisaatio
FINAS:	<i>Finnish Accreditation Services.</i> Suomen kansallinen akkreditointielin
ISTD:	<i>Internal standard.</i> Sisäinen standardi
LC-MS/MS:	<i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry.</i> Nestekromatografi-tandemmassaspektrometri
LGC:	<i>LGC Standard.</i> Ulkoisia laaduntarkkailunäytteitä tarjoava toimija
MRM:	<i>Multiple Reaction Monitoring.</i> Analyysimenetelmä, jolla mitataan tyhdisteen tiettyjä ionisiirtymiä.
m/z:	<i>Mass to Charge Ratio.</i> Massa-varaussuhde
QC:	<i>Quality Control.</i> Laatukontrolli
Q1:	<i>Quadrupole 1: Ensimmäinen kvadrupoli</i>
Q2:	<i>Quadrupole 2: Toinen kvadrupoli eli törmäyskammio</i>
Q3:	<i>Quadrupole 3: Kolmas kvadrupoli</i>
TIC:	<i>Total Ion Chromatogram.</i> Kokonaisionikromatogrammi

TQ: *Triple quadrupole.* Kolmoiskvadrupoli.

1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin SYNLAB Suomi Oy:n keskuslaboratoriossa, huumaus- ja lääkeaineanalytiikan osastolla 2024–2025 vuodenvaihteessa. SYNLAB Suomi tuottaa laboratorio- ja kuvantamispalveluita julkisille ja yksityisille toimijoille, vakuutusyhtiöille, sairauskassoille sekä yksityisasiakkaille. Laboratorio on FINAS-akkreditoima testauslaboratorio T070, joka noudattaa standardin SFS-EN ISO 15189 vaatimuksia. SYNLAB Suomi on osa SYNLAB Groupia, joka on Euroopan johtava lääketieteellisen diagnostiikan tuottaja. SYNLABilla on toimintaa yli neljässäkympyessä maassa ja noin 20 000 työntekijää. Tavoitteena on tarjota laadukkaita ja tehokkaita terveyden seurannan ja sairauksien ennaltaehkäisyn palveluita. [1.]

Työn tavoitteena oli siirtää ja verifioida klotsapiinin analyysimenetelmä toiselle laitteelle, jotta saatiin vapautettua laiteaikaa käytössä olevalta laitteelta. Käytössä olevalla laitteella laiteaikaa oli liian vähän, joten oli tarpeellista siirtää osa menetelmistä toisaalle, jotta resurssien käyttö pystyttiin optimoimaan. Analyysimenetelmän siirron yhteydessä tehtiin menetelmänkehitys ja optimoitiin metodin ajoparametrit analyysin laadunparantamiseksi. Optimointi oli myös tarpeen, sillä menetelmä siirrettiin toisen laitevalmistajan laitteelle.

Menetelmän verifiointilla on tarkoitus varmistaa, että jo aikaisemmin validoitua menetelmää pystytään käyttämään haluttuun käyttötarkoitukseen. Tavoitteena on, että verifioitavan laitteiston tarkkuus, toistettavuus ja oikeellisuus ovat samalla tasolla kuin käytössä olevalla laitteistolla.

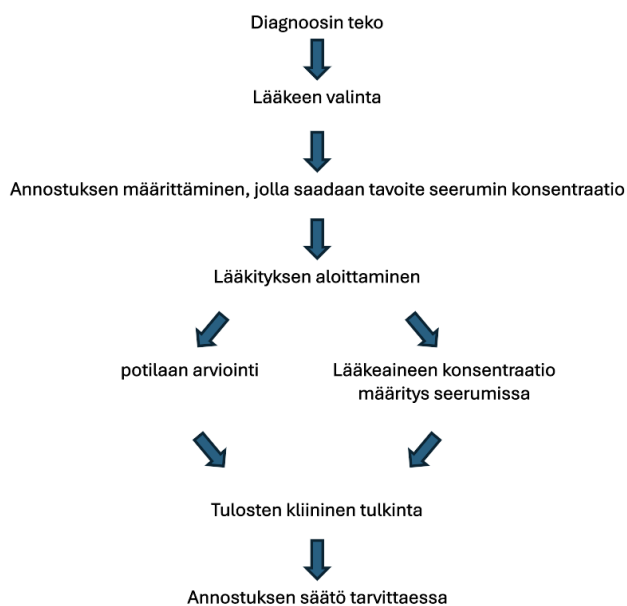
Klotsapiinin analyysimenetelmän tavoite on seurata potilaiden seerumin lääkeainepitoisuutta ja optimoida heidän lääkehoitoansa. Näytteiden esikäsittely on proteiinisaostus asetonitriilillä, joka sisältää sisäisen standardin. Analysoinnissa käytetään ESI-LC-MS/MS- ja dynamic MRM -tekniikkaa. Yhdisteet identifioidaan ja kvantitoidaan spesifisten MRM-siirtymien avulla, ionisuhteisiin ja retentioaikaan perustuen.

Tiedonhaussa on käytetty tekoälyä apuna.

2 Terapeuttisten lääkeaineiden seuranta

Terapeuttinen lääkeaineiden seuranta (TDM, therapeutic drug monitoring) eli lääkeaineiden pitoisuuden määrittäminen veren seerumista tai plasmasta on tärkeä työkalu potilaan lääkeannostuksen optimoinnissa. Terapeuttisia lääkkeitä ovat sairauden hoitoon käytettävät lääkkeet, kuten esim. kipulääkkeet, antibiootit ja psyykelääkkeet. Lääkepitoisuuksien mittaamisesta ja seuraamisesta on hyötyä, kun potilaan hoitoon sitoutuminen, lääkeaineen farmakokineettiset ominaisuudet tai vaikutus muiden lääkeaineiden kanssa on epäselvää. [2.]

Kuvassa 1 on esitetty lääkeannostuksen optimointiprosessi terapeuttista lääkeaineiden seurantaa käyttäen.



Kuva 1 Lääkeannostuksen optimointi käyttäen TDM:ää [3].

TDM perustuu 1960-luvulla julkaistuihin farmakokineettisiin tutkimuksiin, joiden perusteella todettiin, että matemaattista teoriaa lääkeaineiden annostuksesta voidaan liittää potilaiden lääkityksen tehokkuuteen. Alussa seurattiin lääkeaineiden haittavaikutuksia, joiden avulla saatiin määritettyä terapeuttiset alueet eri

lääkeaineille. Tämän johdosta lääkeannostusten toksisuustapaukset ovat helpommin vältettävissä [3]. Lääkeaineen terapeuttisella alueella tarkoitetaan pienimmän ja suurimman konsentraation väliä, jolla saavutetaan hoitovaikutus ilman vakavia haittavaikutuksia. Nykyään TDM:ää käytetään lääkityksen tehokkuuden optimointiin, eri lääkeaineiden vuorovaikutuksen tutkimiseen ja lääkityksen lopettamisen tarkkailuun. [2.]

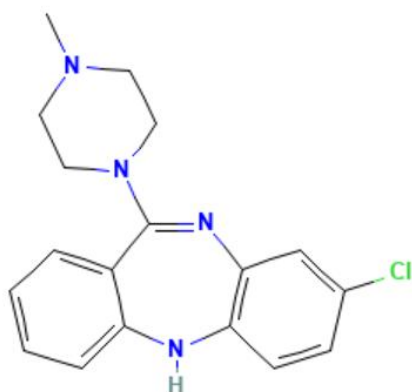
Varsinkin lääkeaineita, joiden terapeuttinen alue on hyvin kapea, on tärkeä seurata seerumin lääkeainepitoisuuden ja lääkeaineen annostelun suhteen.

AGNP:n ”Therapeutic Drug Monitoring” -työryhmän ylläpitämässä listauksessa on yli sata neuropsykoottista lääkeainetta, jotka on jaettu neljään kategoriaan sen perusteella, kuinka vahvasti seurantaa suositellaan. [2.]

3 Klotsapiini

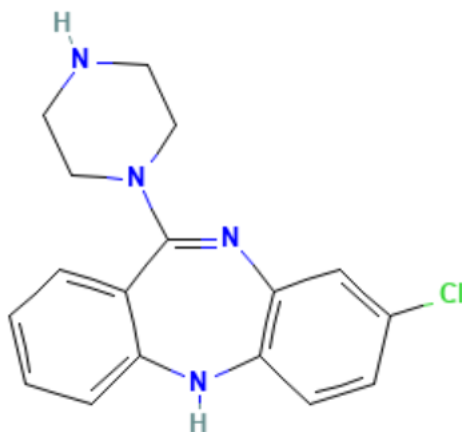
Klotsapiini on toisen polven psykoosilääke, jota käytetään psyykkisten sairauksien, kuten skitsofrenian, hoidossa. Se salpaa perinteisiä psykoosilääkkeitä selvästi heikommin aivojen dopamiinin D2-reseptoreita ja voimakkaammin serotoniinin 5-TH-2-reseptoreita. Klotsapiinin kauppanimiä ovat mm. Leponex, Clozapin ja Fazaclo. [4.]

Klotsapiini on trisyklinen bentsodiatsepiini, joka koostuu kahdesta bentseenirenkaasta sekä diatsepiinirenkaasta, joka sisältää typpiatomin [5]. Klotsapiinin rakennekaava on esitetty kuvassa 2.



Kuva 2 Klotsapiinin rakennekaava [5].

Klotsapiini metaboloituu täydellisesti, ja sen metaboliiteista desmetyyliklotsapiini on biologisesti aktiivinen. Sen vaikutukset ovat heikompia kuin klotsapiinilla ja kestävät lyhyemmän ajan. Desmetyyliklotsapiinin pitoisuus seerumissa on 0,3–1,2-kertainen klotsapiiniin verrattuna. Metaboliittien eliminaatio on kaksivaiheinen, puoliintumisaika keskimäärin 9,5 ja 38 tuntia. [6.] Kuvassa 3 on desmetyyliklotsapiinin rakennekaava.



Kuva 3. Desmetyyliklotsapiinin rakennekaava [7.]

Oraalisesti annosteltuna klotsapiini imeytyy hyvin. Klotsapiinilla on kohtalainen alkureitin metabolia, jonka hyötösuus on 55 ± 12 % [6.]. Alkureitin metabolia

tarkoittaa lääkeaineen imeytymisvaiheen aikana, mm. maksassa tapahtuvaa metaboliaa ennen lääkeaineen pääsyä systeemiseen verenkiertoon [8]. Klotsapiinin terapeuttinen alue on 1,1–1,8 $\mu\text{mol/l}$ ja mahdollisesti toksinen alue yli 3,0 $\mu\text{mol/l}$ [6.]

Klotsapiini on todettu monelle skitsofreniapotilaalle selvästi tehokkaimmaksi lääkkeeksi. Sillä on kuitenkin hankalia haittavaikutuksia, joiden vuoksi klotsapiinia käytetään vain henkilöiden hoidossa, jotka eivät ole saaneet muista psykoosilääkkeistä riittävästi apua.

Klotsapiinia käyttäviltä henkilöiltä otetaan säännöllisiä laboratoriotarkastuksia sen käyttöön liittyvän agranulosytoosin eli veressä kiertävien liuskamaisten valkosolujen puutostila takia. Agranulosytoosi altistaa vaikeille infektioille. Klotsapiinin muita sivuoireita ovat mm. väsymys, ummetus, painon nousu ja diabeteksen suurentunut riski. [4.]

4 Teoria

4.1 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia

Korkean erotuskyvyn nestekromatografia on analyysitekniikka, jolla voidaan analysoida sekä epäorgaanisia että orgaanisia yhdisteitä. Nestekromatografialla pystytään analysoimaan monia orgaanisia molekyylejä, kuten proteiineja, aminohappoja ja lääkeaineita. Edellytyksenä on, että näyte saadaan liukenemaan johonkin liuottimeen. [9, s.144–145].

Nestekromatografiassa näyte erotetaan komponenteiksi analyysin aikana tunnistamista varten. Erotus tapahtuu kolonnissa, jossa stationääri- ja liikkuva faasi ovat vuorovaikutuksessa toistensa kanssa. Näytemolekyylit tarttuvat stationääri-faasiin toistuvasti ja irtoavat siitä liikkuvaan faasiin. Näin ne ovat dynaamisessa tasapainotilassa faasien välillä. Tasapainoon vaikuttaa erotettavien yhdisteiden poolisuus, kemialliset ominaisuudet, stationäärifaasin materiaali sekä käytetty eluentti. [9, s.131–132]. Kolonnissa näyteliuoksen sisältämät yhdisteet

kulkeutuvat eri aikaan detektorille, joka pystyy havaitsemaan kolonnista ulos tulevat yhdisteet. Detektori mittaa niiden lähettämää signaalia ajan funktiona, josta tietokoneen laiteohjelmisto piirtää kromatogrammin. [9, s.153–154].

Eluentti koostuu tyypillisesti vähintään kahdesta komponentista. Yleensä käänteisfaasikromatografiassa eluenttina toimii jonkin orgaanisen liuottimen ja veden seos. Niiden välistä suhdetta muuttamalla luodaan analysointiolosuhteet, joilla näytteen yhdisteet saadaan erotettua toisistaan. [9, s.151].

Opinnäytetyössä verifioitu nestekromatografinen laitteisto on erittäin korkea erotuskyvyn nestekromatografi (UHPLC), joka on paljon käytetty analyysilaitteisto huume- ja lääkeaineanalyysissä. UHPLC ei erotusmekanismiltaan tai erotuksen optimoinnin olosuhteilta eroa HPLC:stä. Erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografi on kuitenkin herkempi ja sillä saavutetaan parempi resoluutio, koska sillä pystyy käyttämään pienemmän partikkelikoon kolonneja. Lisäksi vertailussa on päästy lyhyempään ajoaikaan sekä matalampiin LOD-arvoihin. [10.]

4.2 Massaspektrometria

Massaspektrometria on analyttinen mittaustekniikka, jossa tutkittavat näyttemolekyylit ionisoidaan ja ionit erotellaan massa-varaussuhteen (m/z) perusteella. Tämän jälkeen mitataan kvantitatiivisesti tai kvalitatiivisesti eri $m-z$ -arvojen intensiteetti. [11, s.15].

Molekyylit voidaan ionisoida useilla tavoilla. Tässä työssä käytettiin sähkösumutusionisaatiota (ESI). ESI on pehmeä ionisointitekniikka, jossa ionien sisäinen energia ei kasva, joten pilkkoutumista ei juurikaan tapahdu. Ionisoinnin jälkeen ionit ohjataan ensimmäiselle kvadrupolille. Kvadrupoli koostuu neljästä yhdensuuntaisesta sauvasta, joiden välillä on sähkökenttä. Ionit tulevat kvadrupolisauvojen väliin niiden suuntaisesti ja kulkevat kvadrupolin läpi detektorille. Kun sauvoihin on asetettu tietty jännite vain tietyn m/z -suhteen omaavat ionit pääsevät kvadrupolin läpi. [11, s.27–28]

Kolmoiskvadrupolimassaspektrometreissä on kolme kvadrupolia peräkkäin, joista ensimmäinen (Q1) ja kolmas kvadrupoli (Q3) ovat tavallisia kvadrupoleja ja toinen kvadrupoli (Q2) toimii törmäyskammiona. Törmäyskammioon johdetaan törmäyskaasua, kuten typpeä tai argonia, joiden neutraalien kaasumolekyylien kanssa ionit törmäilevät ja hajoavat. Hajonneet ionit viedään eteenpäin kolmannelle kvadrupolille. MRM-mittaustekniikassa Q1:llä valitaan prekursori-ioni, joka törmää tai reagoi törmäyskammiossa- Tämän jälkeen Q3:lla mitataan valittujen tuoteionien antama signaali. [11, s.31]

4.3 Menetelmän kehitys

Menetelmän kehitys on tärkeä osa analyyttisessä kemiassa, jossa nestekromatografia ja massaspektrometria yhdistetään yhdisteiden havaitsemiseksi, herkkyiden ja spesifisyyden parantamiseksi. Järjestelmällisen optimoinnin ja laatu-standardien noudattamisen ansioista LC-MS-menetelmät edistävät merkittävästi tutkimuksen, lääkkeiden ja ympäristötieteen kehitystä.

LC-MS-menetelmän kehitys koostuu kromatografisten olosuhteiden ja massaspektrometrin asetusten valinnasta, minkä jälkeen menetelmä verifioidaan tai validoidaan riippuen muutosten suuruudesta. Kromatografisten olosuhteiden optimoinnissa valitaan sopiva kolonni, joka vaikuttaa suuresti erotuksen tehokkuuteen ja erottelukykyyneen. Lisäksi liikkuvan faasin pH:n ja ionivahvuuden sekä gradienttitekniikan valinta ja optimointi on oleellista. Massaspektrometriassa valitaan toimiva ionisointitekniikka ja optimoidaan massaspektrometrin parametrit. Onnistunut menetelmänkehitys parantaa analyysin herkkyyttä, nopeutta ja kustannustehokkuutta. [12.]

5 Verifiointi

Menetelmän validointi on olennainen osa analyyttistä kemiaa. Sillä varmistetaan laboratoriomittausten olevan luotettavia ja käyttötarkoitukseen sopivat. Ympäri maailmaa tehdään miljoonia laboratoriotestejä päivittäin eri aloilla, kuten

terveydenhuollossa, elintarviketurvallisuudessa ja rikostutkinnoissa, joten virheellisillä tuloksilla voi olla vakavia seurauksia. Laboratorioiden ja niiden henkilöstön vastuulla on tuottaa tarkkoja ja todennettavissa olevia mittaustuloksia. [13.]

Verifiointi on suppeampi kuin validointi. Verifiointi suoritetaan, kun aiemmin validoituun ja käytössä olevaan menetelmään tehdään muutoksia esim. laitteissa, analyysimenetelmässä tai näytteen esikäsittelyssä. Tässä työssä analyysimenetelmä siirrettiin toiselle laitteelle. Lisäksi kehitettiin analyysimenetelmää, mutta ei tehty niin suuria muutoksia, että validointi olisi ollut tarpeellinen. [14.]

Tavoitteena oli tarkistaa, että verifioitavan laitteiston tarkkuus, toistettavuus ja oikeellisuus ovat samalla tasolla kuin käytössä olevalla laitteistolla. Verifioitavan menetelmän kohdalla määritettiin satunnaisvirhe, systemaattinen virhe, spesifisyys sekä menetelmän mahdollinen matriisivaikutus ja siirtymävirhe.

Satunnaisvirhe

Satunnaisvirhettä esiintyy aina kemiallisissa analyyseissä. Menetelmän satunnaisvirhettä arvioidaan toistettavuuden ja uusittavuuden tasolla.

Systemaattinen virhe

Systemaattinen virhe (eng. bias) on mittausvirheen osa, joka pysyy mittauksessa vakiona tai vaihtelee ennustettavasti. Sen määrittämiseksi tehtiin vertailumittauksia käyttäen LGC:n ulkoisia laaduntarkkailunäytteitä ja verrattiin tuloksia muiden laboratorioiden saamiin tuloksiin.

Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus koostuu mittauksessa esiintyvistä systemaattisesta ja satunnaisesta virheestä. Se kuvaa mittaustulosten vaihtelua ja se määritellään virherajojen avulla. Mittausepävarmuuden avulla voidaan arvioida mittaustuloksen

tarkkuuden riittävyttä esim. päätöksenteon kannalta sekä vertailla eri laboratorioiden tuloksia keskenään.

Siirtymävirhe

Siirtymävirhe (eng. carry-over) tarkoittaa menetelmässä aikaisemmasta näytteestä seuraavaan siirtyvää vastetta.

Spesifisyys

Menetelmä on spesifinen, kun se tuottaa vasteen ainoastaan tutkittavalle yhdisteelle tai analyyttille.

Matriisiefekti

Matriisiefektillä tarkoitetaan näytteen muiden komponenttien kuin analyytin yhteisvaikutusta mitattavan suureen arvoon [15]. Näytematriisi voi sisältää aineita, jotka häiritsevät analyysiä vahvistamalla tai heikentämällä analyytin signaalia.

Toteamisraja/määritysraja

Toteamisraja (LOD, limit of detection) on pienin pitoisuus tutkittavaa yhdistettä, joka voidaan todeta luotettavasti. Kvantitatiivisessa kemiassa sen määrittäminen perustuu hajonnan tutkimiseen analysoimalla nolla- tai pienen pitoisuuden analyyttejä sisältäviä näytteitä toistuvasti. Myös signaali-kohina-suhteen avulla voidaan määrittää toteamisraja.

Tässä työssä ei kuitenkaan määritetty toteamisrajaa, koska siihen ei tehty muutoksia. Työssä tarkistettiin alempi määritysraja, joka on alhaisin pitoisuus, joka pystytään kvantitatiivisesti määrittämään menetelmällä, halutulla toistettavuudella ja tarkkuudella. Tämä on usein sama kuin pienin pitoisuus kalibrointisuoralla.

Lineaarisuus

Lineaarinen alue kuvaa mittausaluetta, jossa analysoitavan yhdisteen vaste käyttäytyy lineaarisesti konsentraatioon nähden. Alkupäässä rajoittavana tekijänä on toteamisraja ja loppupäässä mittalaitteen kyky havainnoida analyytin pitoisuuden muutoksia. Lineaarisuutta arvioidaan usein regressiokertoimella, joka kuvaa suoran sovituksen hyvyttä. Se ei ole kuitenkaan riittävä todentamaan lineaarisuutta. Kun kalibrintisuora on lineaarinen, sen residuaalit jakautuvat satunnaisesti nollatason molemmille puolille. [14.]

6 Laitteet ja reagenssit

Opinnäytetyössä käytettiin seuraavia listattuja laitteita, reagensseja ja mittavälineitä. Listaukseen ei ole sisällytetty laboratorion liuosyksikön käyttämiä laitteita ja reagensseja.

Taulukossa 1 esitetään verifiointissa käytettyjen vertailuaineiden eränumerot, valmistajat ja viimeinen käyttöpäivä.

Taulukko 1. Puhdasaineiden tiedot.

Puhdasaine	Eränumero	Valmistaja	EXP.
clozapine	FN07272120	Supelco	31.8.2026
desmethylclozapine	FN08102002	Supelco	31.12.2026
clozapine-d4	FN06112159	Supelco	30.9.2026
desmethylclozapine-d8	FN08252214	Supelco	30.11.2026

Työssä verifiointiin rinnakkaislaitteen "ALLI" suorituskyky verrattuna käytössä olevaan laitteistoon "SUBU".

Verifioitava laite on nestekromatografi / Kolmoiskvadrupolimassaspektrometri LC-MS/MS-laitteisto "ALLI" YMS.291, joka koostui Shimadzu Nexera X2 UHPLC:stä ja Sciex Citrine QTRAP 6500+ MS/MS:stä.

Käytössä oleva laite on 1290 Infinity II LC-MS/MS, Agilent Technologies, "SUBU" YML.1424, jossa on 6475 LC/TQ-kolmoiskvardupoli massaspektometri.

Datan käsittelyyn ja optimointiin käytetyt ohjelmistot:

- Sciex OX
- Analyst MD
- Agilent MassHunter
- Validation Manager

Työssä käytetyt kalibrointi- ja kontrolliliuosten kantaliuosten eränumerot, valmistajat ja viimeinen käyttöpäivä ovat taulukossa 2.

Taulukko 2 Kalibrointi- ja kontrollinäytteiden tiedot.

Liuos	Erä	LOT.	EXP.	Valmistaja
CAL 1	-	041224	040625	Liuosyksikkö
CAL 2	-	041224	040625	Liuosyksikkö
CAL 3	-	041224	040625	Liuosyksikkö
CAL 4	-	041224	040625	Liuosyksikkö
CAL 5	-	041224	040625	Liuosyksikkö
CAL 6	-	041224	040625	Liuosyksikkö
QC-L	-	-	-	Kaupallinen kontrolli
QC-M	-	-	-	Kaupallinen kontrolli
QC-H	-	270924	270925	Liuosyksikkö
Nollaseerumi	041224	N9103B	041224	Scantibodies Laboratory Inc
Sisäinen standardi	-	301024	300425	Liuosyksikkö

Lisäksi työssä käytettiin liitteissä 1 ja 2 mainittuja reagensseja ja ajoliuoksia.

7 Menetelmän optimointi

7.1 MRM-siirtymien optimointi

Verifioitava laite on eri valmistajan kuin käytössä oleva laite, joten menetelmää ei voitu siirtää suoraan laitteelle. Käytössä oleva laite on kolmoiskvadrupoli LC-MS/MS-laitteisto, Agilent 1290 II LC ja 6475 Triple Quad MS "SUBU", ja verifioitava laite on kolmoiskvadrupoli LC-MS/MS-laitteisto, Shimadzu CL IVD UHPLC ja Sciex Citrine QTRAP IVD MS/MS "ALLI".

Työ aloitettiin prekursori-ionin ja tuoteionien määrittämisellä sekä MS-parametrien optimoinnilla. Tätä varten valmistettiin puhtasaineista kantaliuokset klotsapiinille, desmetyyliklotsapiinille, klotsapiini-d4:lle (ISTD) ja desmetyyliklotsapiini-d8:lle (ISTD). Kantaliuokset valmistettiin metanoliin, ja niiden pitoisuudet olivat 0,3 µg/ml. Näitä liuoksia suorasytettiin massaan, jolloin nähtiin prekursori-ionin arvo. Tämän jälkeen laitteen compound optimization –toiminnolla laite teki raportit yhdisteen kymmenestä suurimman intensiteetin ionifragmentista eli tuoteioneista.

Jokaiselle analyyttille valittiin kolme suurimman intensiteetin antanutta siirtymää, jotka lisättiin menetelmään. Siirtymille optimointiin törmäysenergia (CE), deklusterin potentiaali (DP) ja törmäyskammion ulostulojännite (CXP), ja ne löytyvät liitteestä 1.

7.2 MS-parametrit

Metodille piti optimoida seuraavat MS-parametrit:

- DP, declustering potential
- EP, entrance potential
- CUR, curtain gas
- CAD, collision gas
- TEM, temperature

- GS1, Ion source gas 1
- GS2, Ion source gas 2.

Laitteen FIA compound optimization -toiminnolla laite testasi eri määritettyjä arvoja parametreille. Tulosten peruustella se loi valmiin metodin, johon se valitsi parhaat parametrit intensiteetin mukaan. Tulokset kuitenkin käytiin myös manuaalisesti läpi, ja lopullisen analyysimetodin parametrit löytyvät liitteestä 1.

7.3 Gradienttimuutos

Käytössä olevassa metodissa oli isokraattinen eluutio, Tämä toimi myös verifioitavalla laitteella. Menetelmä haluttiin kuitenkin muuttaa gradienttiauoksi, joka puhdistaa kolonnia jo ajon aikana eikä ole niin herkkä ajoliuosten muutoksille. Käytetyt ajoliuokset ovat listattuna liitteessä 1.

Ensimmäisenä testattiin gradienttia, joka nousi hitaasti ja lineaarisesti. Kun piikien eluoitumiskohta saatiin määritettyä, gradienttia pystyttiin muokkaamaan. Lopulliseen gradienttiin päädyttiin, koska ajoaika saatiin pidettyä samana kuin käytössä olleessa ajometodissa sekä klotsapiinin ja desmetyyliklotsapiinin piikit erottuivat toisistaan riittävästi.

8 Työn suoritus

Näytteiden esikäsittely, kalibrointi- ja kontrollinäytteet ja sisäinen standardi on kuvattu liitteessä 2.

Ajettuja verifiointisarjoja oli neljä ja ne ovat kuvattuna liitteessä 3.

9 Tulokset

Tuloksissa esitetyt laskut ovat laskettu seuraavien kaavojen mukaan.

$$\text{Suhteellinen varianssikerroin, CV\%} = \frac{\text{keskihajonta}}{\text{keskiarvo}} \cdot 100 \quad (1)$$

$$\text{Systemaattinen virhe, bias - \%} = \frac{(\text{tulos} - \text{tavoitetulos})}{\text{tavoitetulos}} \cdot 100 \quad (2)$$

$$z - \text{core} = \frac{\text{tulos} - \text{tavoite}}{\text{keskijahonta}} \quad (3)$$

$$\text{Tarkkuus - \%} = \left(\frac{\text{tulos}}{\text{tavoite}} \right) \cdot 100\% \quad (4)$$

$$\text{Ero - \%} = 100\% - \left(\frac{\text{tavoite}}{\text{tulos}} \right) \cdot 100\% \quad (5)$$

$$\text{Keskihajonta, SD} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2} \quad (6)$$

n on havaintojen määrä

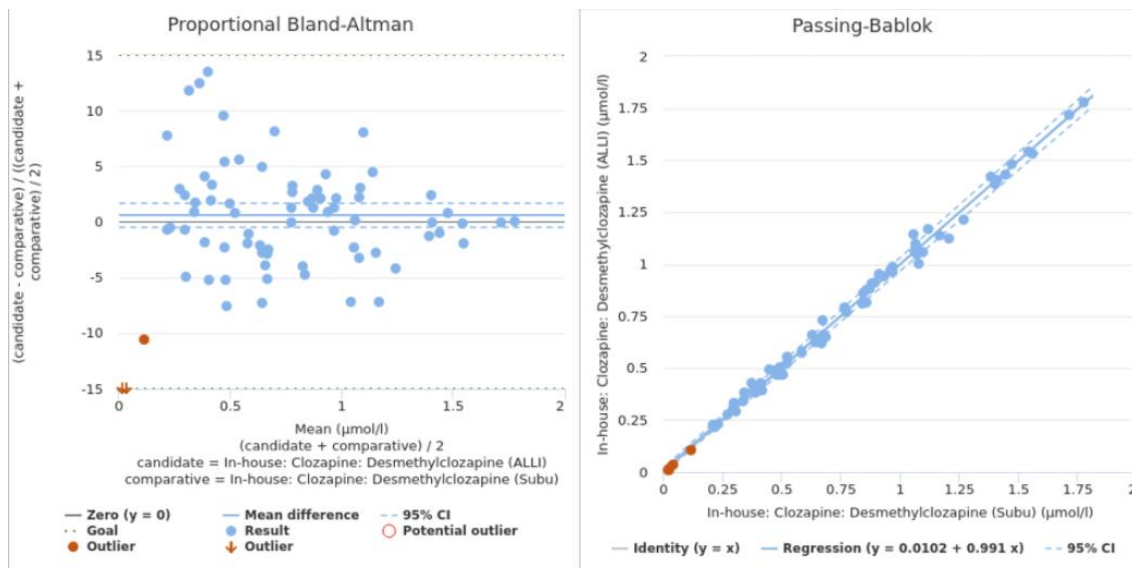
x_i on yksittäinen havainto

\bar{x} on otoksen keskiarvo

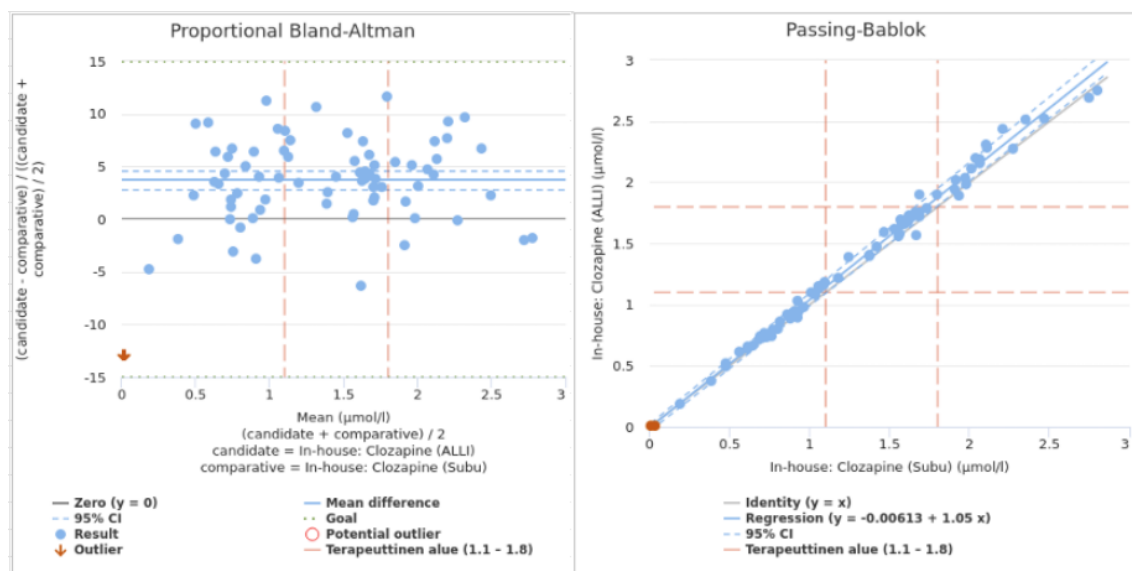
9.1 Menetelmänvertailu

Rinnakkaislaiteverifiointissa ajettiin 77 potilasnäytettä. Tavoite käytössä olevan laitteen ja verifioitavan laitteen pitoisuuserolle oli $\pm 15\%$. Liitteestä 4 löytyy Validation Manager -ohjelmistosta saatu tulosraportti. Klotsapiinin ja desmetyyliklotsapiinin rinnakkaisvertailutulokset täyttivät asetetun tavoitteen, pois lukien alle määrittärajän olleita tuloksia.

Kuvassa 4 nähdään kaksi eri kuvaaja potilasnäytteiden tuloksista desmetyyli-
liklotsapiinille. Kun sininen keskiarvoviiva Bland-Altman -kuvaajassa on lähellä
nollaa y-akselilla, voidaan päätellä, että systemaattista virhettä ei ole.



Kuva 4 Menetelmänvertailu Validation Manager -raportti, desmetyyli-
liklotsapiini.



Kuva 5 Menetelmänvertailu Validation Manager -raportti,klotsapiini.

Kuvasta 5 huomataan, että klotsapiinin osalla verifioitava laite on antanut suu-
rempaa tulosta suuremmalle osalle näytteitä, kuin käytössä oleva laite. Tulokset

kuitenkin ovat jakautuneet molemmille x-akselin puolille ja kaikki arvot ovat rajoissa. Systemaattinen virhe lasketaan luvussa 9.3.

9.2 Satunnaisvirhe

Sarjojen sisäinen toistettavuus arvioitiin injektoimalla kuusi kertaa CAL-1 tasoa. Klotsapiinin sarjan sisäiseksi toistettavuudeksi saatiin 2,47 % ja desmetyyliklotsapiinin 3,08 %.

Sarjojen välinen toistettavuus arvioitiin injektoimalla CAL-1 tasoa kuusi kertaa neljässä eri sarjassa. Klotsapiinilla sarjojen väliseksi toistettavuudeksi saatiin 5,17 % ja desmetyyliklotsapiinille 9,85 %.

Kuvassa 6 on Validation Manager –ohjelmistosta saatu raportti satunnaisvirheelle. Within-Run tarkoittaa sarjojen sisäistä toistettavuutta ja Between-Day sarjojen välistä toistettavuutta. Within-Lab kuvaa kokonaisvariaatiota eli laboratorion sisäistä uusittavuutta.

Analyte	Unit	Sample	Mean	N / Outliers	Within-Run		Between-Day		Within-Lab	
					SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
In-house: Clozapine: Desmethylclozapine	ng/ml	CAL 1	0.115	24	0.00354	3.08%	0.0113	9.85%	0.0118 (0.00691 – 0.0381)	10.3%
					(0.00195 – 0.00369)	(2.36% – 4.45%)	(0.00636 – 0.0436)	(5.54% – 38%)	(6.03% – 33.2%)	
			Goals		15%		15%		15%	
In-house: Clozapine:	ng/ml	CAL 1	0.104	24	0.00255	2.47 %	0.00536	5.17%	0.00594	5.73%
					(0.00195 – 0.00369)	(1.89% – 3.56%)	(0.00299 – 0.0217)	(2.89% – 20.9%)	(0.00359 – 0.0165)	(3.46% – 15.9%)
			Goals		15%		15%		15%	

Kuva 6 Validation Manager toistettavuus (ANOVA) -yhteenvedoraportti

Yhdistettynä kokonaisvariaatioksi saatiin klotsapiinille 5,73 % ja desmetyyliklotsapiinille 10,3 %.

Kaikki näytteet täyttivät hyväksyttävät kriteerit, jotka pitoisuuksille olivat $CV\% \leq 15\%$, paitsi LOQ rajalla $\leq 20\%$. Myös retentioajan sallittu vaihtelu $\pm 0,1$ min toteutui. Nämä tulokset on kuvattu tarkemmin liitteessä 5.

Klotsapiinin ja desmetyyliklotsapiinin tunnistamiseen käytettävien ionifragmenttien pinta-alan ja ionisuhteiden CV% ovat esitetty liitteessä 6. Ioniosuhteiden osalta seurattiin WADAn (world Anti-Doping Agency) raportointikriteereitä taulukon 3 mukaisesti.

Taulukko 3 Wadan dokumentti TD20151DCR [16.]

Ionisuhde	Vaihteluväli
> 50 %	± 10 % (absoluuttinen)
25 % - 50 %	± 20 % (suhteellinen)
1 % - 25 %	± 5 % (absoluuttinen)

9.3 Systemaattinen virhe

Systemaattista virhettä arvioitiin ulkoisten laaduntarkkailunäytteiden avulla. Kriteerit ulkoisten laaduntarkkailunäytteiden hyväksynnälle oli $-2 \leq z\text{-score} \leq 2$ ja $-15 \% \leq \text{bias} \leq 15 \%$. Verifiointisarjoissa analysoitiin yhdeksän laaduntarkkailunäytettä, jotka kaikki paitsi LGC 254 -näyte täyttivät molempien analyyttien kohdalla asetetut tavoitteet. Taulukoissa 4 ja 5 on esitetty verifioitavan laitteen ja käytössä olevan laitteella saadut tulokset. Molemmille analyyteille on omat taulukot. Ulkoisten laaduntarkkailunäytteiden tulokset on ilmoitettu valmistajan käyttämässä yksikössä nmol/l.

Taulukko 4 Klotsapiini, ulkoisten laaduntarkkailunäytteiden tulokset

Klotsapiini (ALLI)				
	mitattu pitoisuus (nmol/l)	Todellinen pitoisuus nmol/l	Bias % (± 15 %)	z-score (± 2)
LGC 250	1953	1731,95	12,8	1,74
LGC 251	340	336,6	1,0	0,06
LGC 252	6109	6438,2	-5,1	-0,54
LGC 244	1320	1192	10,7	1,35
LGC 245	731	667,08	9,6	0,95
LGC 246	3475	3073,61	13,1	1,76
LGC 241	2949	3008,57	-2,0	-0,20
LGC 242	1700	1494,86	13,7	1,35
LGC 254	4910	4130,97	18,9	1,84
Klotsapiini (SUBU)				
LGC 250	1878	1731,95	8,4	1,15
LGC 251	346	336,6	2,8	0,18
LGC 252	6008	6438,2	-6,7	-0,70
LGC 244	1303	1192	9,3	1,17
LGC 245	714	667,08	7,0	0,69
LGC 246	3272,9	3073,61	6,5	0,87
LGC 241	3039	3008,57	1,0	0,10
LGC 242	1651	1494,86	10,4	1,03
LGC 254	4868	4130,97	17,8	1,74

Taulukosta 4 huomataan, että näytteen LGC 254 bias-% ja z-score on yli asetettun tavoitteen, mutta rinnakkaiset tulokset eivät poikkea toisistaan laitteiden välillä.

Taulukko 5 Desmetyyliklotsapiini, Ulkoisten laaduntarkkailunäytteiden tulokset

Desmetyyliklotsapiini (ALLI)				
	mitattu pitoisuus (nmol/l)	Todellinen pitoisuus nmol/l	Bias % (±15 %)	z-score (±2)
LGC 250	1881	1709,21	10,1	1,15
LGC 251	326	319,69	2,0	0,10
LGC 252	6017	6940,53	-13,3	-1,11
LGC 244	2500	2459,72	1,6	0,19
LGC 245	580	581,84	-0,3	-0,02
LGC 246	4125	3781,97	9,1	0,97
LGC 241	3417	3961	-13,7	-1,09
LGC 242	1565	1520,14	3,0	0,23
LGC 254	5770	5703,32	1,2	0,11
Desmetyyliklotsapiini (SUBU)				
LGC 250	1813,2	1709,21	6,1	0,70
LGC 251	313	319,69	-2,1	-0,11
LGC 252	6199	6940,53	-10,7	-0,89
LGC 244	2455	2459,72	-0,2	-0,02
LGC 245	602	581,84	3,5	0,27
LGC 246	4043	3781,97	6,9	0,74
LGC 241	3527	3961	-11,0	-0,87
LGC 242	1496	1520,14	-1,6	-0,12
LGC 254	6116	5703,32	7,2	0,66

9.4 Mittausepävarmuuden arviointi

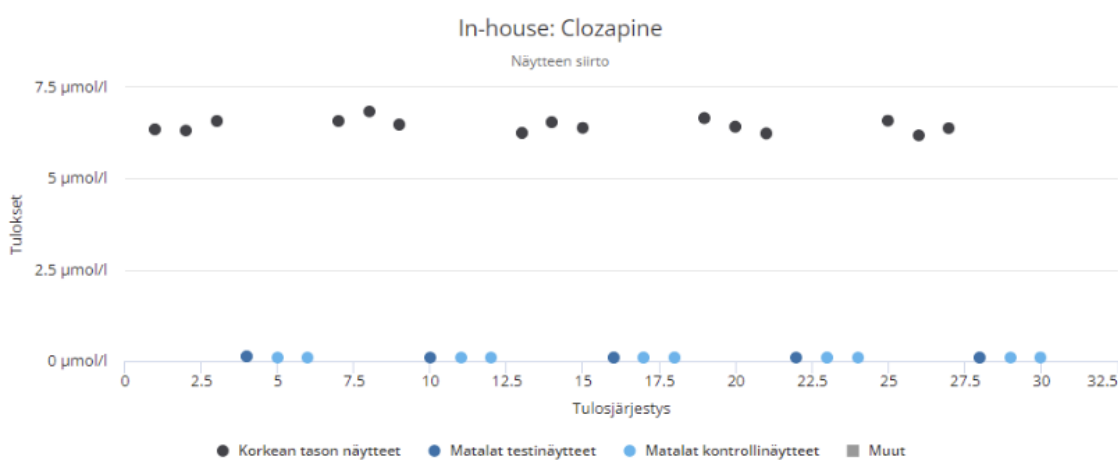
Menetelmän mittausepävarmuus (u) ja laajennettu mittausepävarmuus (2*u) laskettiin LGC:n ulkoisten laaduntarkkailunäytteiden sekä sisäisten laatukontrollien tuloksista. Laskut löytyvät liitteestä 7.

Klotsapiinille saatiin mittausepävarmuudeksi 12,4 % ja laajennetuksi mittausepävarmuudeksi 25,8 %. Desmetyyliklotsapiinilla mittausepävarmuus oli 12,8 % ja laajennettu mittausepävarmuus 25,7 %.

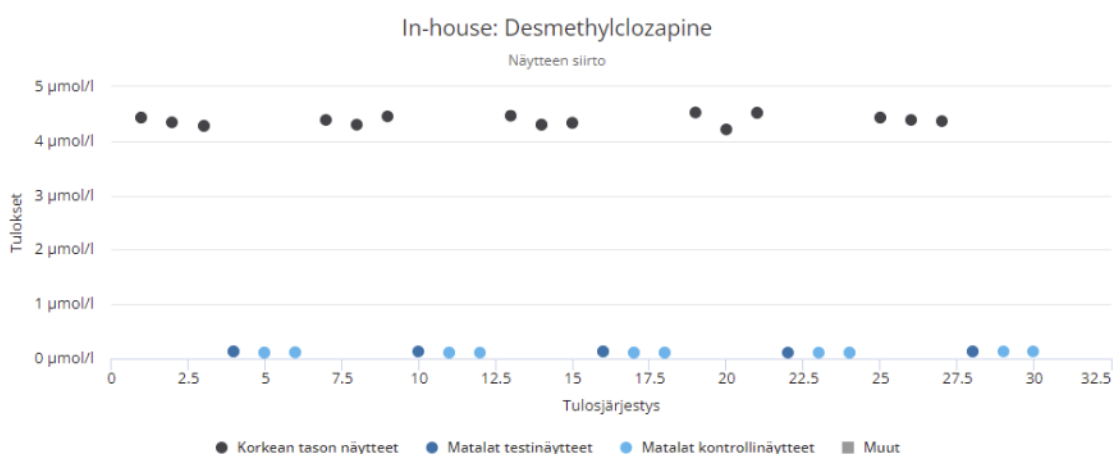
9.5 Siirtymävirhe

Siirtymävirhe määritettiin injektoimalla CAL 6-tasoa kolme kertaa peräkkäin ja sen jälkeen kolme kertaa CAL 1-tasoa. Tämä toistettiin viisi kertaa. Sallittu siirtymävirhe saa olla $\leq 20\%$ CAL 1-tason vasteesta.

Klotsapiinin siirtymävirheeksi määritettiin 0,104 % ja desmetyyliklotsapiinin 0,213 % Validation Managerilla. Kuvissa 7 ja 8 näkyvät ohjelmasta saadut kuvaajat.



Kuva 7. Klotsapiinin siirtymävirhe.



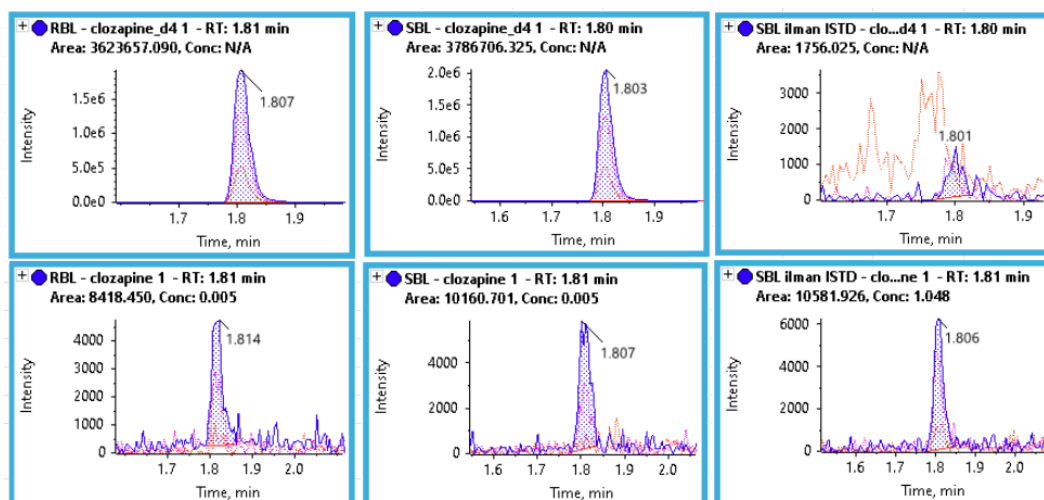
Kuva 8. Desmetyyliklotsapiinin siirtymävirhe.

Ohjelma vertaa Matalien testinäytteiden ja matalien kontrollinäytteiden tuloksia ja vertaa eroavatko ne toisistaan. Jos näytteiden välillä olisi suuri ero tarkoittaisi se, että menetelmässä olisi siirtymävirhettä.

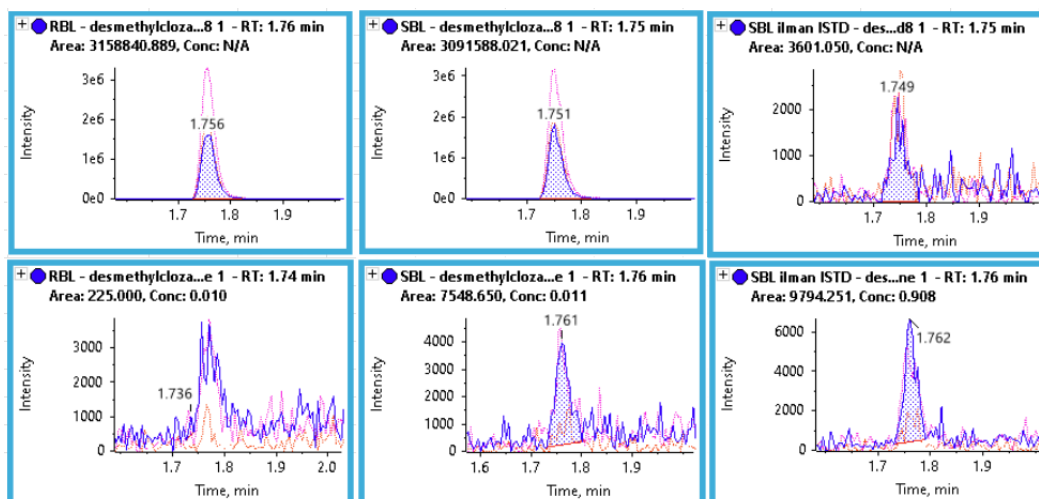
9.6 Spesifisyys

Spesifisyys arvioitiin analysoimalla SBL-näyte ilman sisäistä standardia, SBL-näyte sisäisen standardin kanssa sekä RBL-näyte, joka sisältää ISTD:n. SBL eli seeruminollanäyte sisältää nollaseerumia ja RBL eli reagenssinollanäyte sisältää vettä.

Tutkituissa näytteissä havaittiin signaalia tutkittavan yhdisteen kohdalla, mutta sen intensiteetti ei ole yli 20 % CAL-1:n piikin intensiteetistä. Klotsapiinin kohdalla piikin intensiteetti on 0,72 % CAL-1:n piikin pinta-alasta ja desmetyyliklotsapiinillä 1,64 %. Piikit eivät siis häiritse analyysiä.



Kuva 9. Klotsapiinin spesifisyys.



Kuva 10. Desmetyylklotsapiinin spesifisyys.

Kuvissa 9 ja 10 näkyvät tutkittujen näytteiden kromatogrammit. Näytteet ovat vasemmalta oikealle järjestyksessä: RBL, SBL ja SBL ilman ISTD. Alarivillä on analyttin kromatogrammit ja ylärivillä sisäisen standardin.

9.7 Matriisiefekti

Matriisiefektiä tutkittiin tekemällä kalibrintisuora veteen ja verrattiin sen tuloksia seerumista valmistettuun suoraan vertaamalla piikkien pinta-aloja. Lisäksi määritettiin veteen tehdyn kalibrintisuoran tarkkuus-%. Taulukossa 6 on klotsapiinin tulokset ja taulukossa 7 desmetyylklotsapiinin tulokset.

Taulukko 6. Klotsapiinin matriisiefektin tulokset.

Klotsapiini						
	Tavoite- pitoisuus umol/l	Mitattu pitoisuus umol/l (veteen tehty suora)	Tarkkuus- %	A(seeru- missa)	A(vedessä)	Pinta- alojen ero-%
CAL 1	0,12	0,104	86,67	2356755	1901214	80,7
CAL 2	0,37	0,39	105,41	7929225	6314308	79,6
CAL 3	1,22	1,353	110,90	26110712	24411744	93,5
CAL 4	2,45	2,434	99,35	44754534	40587456	90,7
CAL 5	4,9	4,806	98,08	84303614	80337094	95,3
CAL 6	6,62	6,594	99,61	127845067	106305926	83,2
Korrelaatiokerroin		0,9984				
y-akselin leikkauspiste		0,05566				

Taulukko 7. Desmetyyliklotsapiinin matriisiefektin tulokset.

Desmetyyliklotsapiini						
	Tavoitepi- toisuus umol/l	Laskettu pitoi- suus umol/l (veteen tehty suora)	Tarkkuus- %	A(seeru- missa)	A(vedessä)	Pinta- alojen ero-%
CAL 1	0,13	0,13	100,00	956120	760759	79,6
CAL 2	0,4	0,387	96,75	3545353	3220224	90,8
CAL 3	0,8	0,845	105,63	7830164	7489408	95,6
CAL 4	1,6	1,543	96,44	13302546	13567287	102,0
CAL 5	3,2	3,243	101,34	24637176	27116776	110,1
CAL 6	4,32	4,302	99,58	34342728	34216171	99,6
Korrelaatiokerroin		0,9992				
y-akselin leikkauspiste		-0,13385				

Piikkien pinta-alaa vertaamalla huomataan piikkien koon välillä ero, joka kertoo matriisiefektistä. Tarkkuus-%:sta voi kuitenkin päätellä, että matriisiefekti ei ole liian suuri sekä ISTD korjaa tulosta, koska tulokset ovat lähellä 100 %:a.

Suoran korrelaatiokerroin oli 0,9984, ja kaikki pisteet osuivat hyvin suoralle. Myös desmetyyliklotsapiinin suora täytti vaaditut kriteerit, jotka ovat $r^2 < 0,990$ ja takaisin laskettujen pitoisuuksien poikkeama alle 20 % eli tarkkuus-% on 80-120 %.

9.8 Määrittäysraja

Määrittäysraja varmistettiin injektoimalla kuusi kertaa CAL 1 -pitoisuutta sekä lisäksi puolet CAL 1 tason pitoisuudella. Tavoitteena oli toistettavuuden kriteerien täyttäminen; Bias-% ± 20 % LOQ-tasolla ja signaali-kohina-suhde ≥ 6 .

Taulukoissa 8–11 näkyvät tulokset molemmille tasoille.

Taulukko 8. Klotsapiini määrittäysraja CAL 1-tasolla.

Klotsapiini					
Näyte	Tavoitepitoisuus umol/l	Laskettu pitoisuus umol/l	Tarkkuus-%	Bias-%	Signaali/kohina-suhde
CAL1_1	0,12	0,103	85,8	-14,17	3248,4
CAL1_2	0,12	0,103	85,8	-14,17	2823,7
CAL1_3	0,12	0,101	84,2	-15,83	3044,4
CAL1_4	0,12	0,098	81,7	-18,33	2865,7
CAL1_5	0,12	0,103	85,8	-14,17	2720,8
CAL1_6	0,12	0,105	87,5	-12,50	2547,6
Keskiarvo		0,1022			
Keskihajonta		0,0024			
RSD-%		2,3505			

Taulukko 9. Klotsapiinin määrittäysraja 0,5 CAL 1-tasolla.

Klotsapiini					
Näyte	Tavoitepitoisuus umol/l	Laskettu pitoisuus umol/l	Tarkkuus-%	Bias-%	Signaali/kohina-suhde
0,5 x CAL1_1	0,06	0,062	103,3	3,33	1535
0,5 x CAL1_2	0,06	0,066	110,0	10,00	1704,3
0,5 x CAL1_3	0,06	0,065	108,3	8,33	1574,9
0,5 x CAL1_4	0,06	0,064	106,7	6,67	1699
0,5 x CAL1_5	0,06	0,065	108,3	8,33	1680,6
0,5 x CAL1_6	0,06	0,062	103,3	3,33	1598,4
Keskiarvo		0,0640			
Keskihajonta		0,0017			
RSD-%		2,6146			

Taulukko 10. Desmetyyliklotsapiinin määrittäysraja CAL 1 -tasolla.

Desmetyyliklotsapiini					
Näyte	Tavoitepitoisuus umol/l	Laskettu pitoisuus umol/l	Tarkkuus-%	Bias-%	Signaali/kohina-suhde
CAL1_1	0,13	0,116	89,2	-10,77	1487,4
CAL1_2	0,13	0,124	95,4	-4,62	1462,6
CAL1_3	0,13	0,117	90,0	-10,00	1155,1
CAL1_4	0,13	0,119	91,5	-8,46	1253,2
CAL1_5	0,13	0,123	94,6	-5,38	1412,1
CAL1_6	0,13	0,125	96,2	-3,85	1843,8
Keskiarvo		0,1207			
Keskihajonta		0,0038			
RSD-%		3,1738			

Taulukko 11. Desmetyyliklotsapiinin määrittäminen 0,5 CAL 1-tasolla.

Desmetyyliklotsapiini					
Näyte	Tavoitepitoisuus umol/l	Laskettu pitoisuus umol/l	Tarkkuus-%	Bias-%	Signaali/kohina-suhde
0,5 x CAL1_1	0,065	0,064	98,5	-1,54	642,3
0,5 x CAL1_2	0,065	0,064	98,5	-1,54	686,1
0,5 x CAL1_3	0,065	0,061	93,8	-6,15	555,2
0,5 x CAL1_4	0,065	0,061	93,8	-6,15	603
0,5 x CAL1_5	0,065	0,065	100,0	0,00	587,7
0,5 x CAL1_6	0,065	0,062	95,4	-4,62	724,3
Keskiarvo		0,0628			
Keskihajonta		0,0017			
RSD-%		2,7412			

Menetelmän kvantitointirajat 0,12 $\mu\text{mol/l}$ (klotsapiini) ja 0,13 $\mu\text{mol/l}$ (desmetyyliklotsapiini) saavutettiin hyvin verifioitavalla menetelmällä. Klotsapiinille bias-% oli -18,33... -12,5 ja tarkkuus-% 81,7–87,5. Desmetyyliklotsapiinille bias-% -10,77... -3,85 ja tarkkuus-% 89,2–96,2.

9.9 Lineaarisuus ja mittausalue

Menetelmässä on käytössä kuuden pisteen kalibrintisuora, jonka sovitus on lineaarinen ja painotus $1/x$. Mittausalueen lineaarisuutta arvioitiin kolmen sarjan kalibrintisuorien avulla. Tavoitteena oli korrelaatiokerroin vähintään 0,990, y-akselin leikkauspiste $-0,5$ – $0,5$ ja takaisin laskettujen pitoisuuksien poikkeama alle 20 % eli tarkkuus-% välillä 80-120 %. LOQ-tasolla ja 15 % muilla. Taulukossa 12 on esitetty klotsapiinin kalibrointisuorien tulokset ja taulukossa 13 desmetyyliklotsapiinin.

Taulukko 12. Klotsapiinin lineaarisuuden laskemiseen käytetyt tulokset.

Klotsapiini							
		Sarja 1		Sarja 2		Sarja 3	
	Tavoitepitoisuus umol/l	Laskettu pitoisuus umol/l	Tarkkuus-%	Laskettu pitoisuus umol/l	Tarkkuus-%	Laskettu pitoisuus umol/l	Tarkkuus-%
CAL 1	0,12	0,099	82,50	0,107	89,17	0,099	82,50
CAL 2	0,37	0,413	111,62	0,403	108,92	0,397	107,30
CAL 3	1,22	1,294	106,07	1,297	106,31	1,331	109,10
CAL 4	2,45	2,489	101,59	2,321	94,73	2,512	102,53
CAL 5	4,9	4,916	100,33	4,928	100,57	5,052	103,10
CAL 6	6,62	6,47	97,73	6,623	100,05	6,288	94,98
Korrelaatiokerroin		0,9986		0,9987		0,9970	
y-akselin leikkauspiste		0,15875		-0,0268		0,08433	

Taulukko 13. Desmetyylıklotsapiinin lineaarisuuden laskemiseen käytetyt tulokset.

Desmetyylıklotsapiini							
		Sarja 1		Sarja 2		Sarja 3	
	Tavoitepitoisuus nmol/l	Laskettu pitoisuus umol/l	Tarkkuus-%	Laskettu pitoisuus umol/l	Tarkkuus-%	Laskettu pitoisuus umol/l	Tarkkuus-%
CAL 1	0,13	0,114	87,69	0,112	86,15	0,119	91,54
CAL 2	0,4	0,439	109,75	0,420	105,00	0,421	105,25
CAL 3	0,8	0,822	102,75	0,866	108,25	0,839	104,88
CAL 4	1,6	1,624	101,50	1,669	104,31	1,604	100,25
CAL 5	3,2	3,215	100,47	3,110	97,19	3,159	98,72
CAL 6	4,32	4,236	98,06	4,273	98,91	4,308	99,72
Korrelaatiokerroin		0,9989		0,9990		0,9994	
y-akselin leikkauspiste		-0,011		-0,02959		-0,10176	

Jokaisen verifiointisarjan kalibrointisuorat täyttivät asetetut tavoitteet.

10 Yhteenveto

Verifioitava laite soveltuu klotsapiinin ja sen metaboliitin desmetyyliklotsapiinin määritykseen. Verifioinnissa asetetut laatutavoitteet saavutettiin ja tulosten todettiin olevan käytössä olevan laitteen kanssa yhtenevät.

Menetelmän siirrolla toiselle laitteelle saatiin vapautettua laiteaikaa, mikä oli yksi työn tavoitteista. Analyysissä käytettävä kolonni ja eluentit ovat jo käytössä muilla menetelmillä verifioidulla laitteella, joten se ei myöskään aiheuta lisätyötä laboratorion päivittäisessä toiminnassa.

Menetelmän kehityksen yhteydessä vaihdettiin isokraattinen ajo gradienttiajoon, sillä se puhdistaa paremmin kolonnia jo ajon aikana ja pidentää kolonnin ikää. Muutos pystyttiin tekemään, sillä gradienttiajolla saatiin erotettua klotsapiini ja desmetyyliklotsapiini sekä pysymään vanhassa ajoajassa.

Verifioinnista tehtiin erikseen laboratorion sisäinen verifiointiraportti, joka hyväksyttiin. Menetelmä otettiin käyttöön laboratoriossa heti, kun raportti oli hyväksytty ja työohje päivitetty.

Lähteet

- 1 SYNLAB Suomi. Verkkoaineisto <<https://synlab.fi/yritys/>>. Luettu 30.1.2025
- 2 AGNP Consensus Guidelines for Therapeutic Drugs Monitoring in Psychiatry: Update 2011. Verkkoaineisto <<https://agnp.de/wp-content/uploads/2015/02/hiemke-2011-consensus-guideline-tdm-in-psychiatry-update.pdf>>. Luettu 30.1.2025
- 3 Ju-Seop Kang, Min-Ho Lee. 2009. Overview of Therapeutic Drug Monitoring <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2687654/#F1>> Luettu 30.1.2025
- 4 Psykoosien hoidossa käytettävät lääkkeet. 2023. Verkkoaineisto <<https://www.terveyskirjasto.fi/dlk01338>>. Luettu 3.2.2025
- 5 PubChem Clozapine. Verkkoaineisto <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135398737>>. Luettu 13.2.2025
- 6 SYNLAB Suomi, Tuotekuvaus Klotsapiini. <https://www.yml.fi/tuotekuvaus_show.php?tuotenro=226> Luettu 16.2.2025
- 7 PubChem Desmethylclozapine. Verkkoaineisto <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135409468#section=2D-Structure>>. Luettu 13.2.2025
- 8 Lääkeaineiden ongelmalliset yhteisvaikutukset. Verkkoaineisto <<https://www.duodecimlehti.fi/duo80236>>. Luettu 13.2.2025
- 9 Jaarinen Soili, Niiranen Jukka. Laboratorion analyysitekniikka. 1995.
- 10 Cielecka-Piontek Judyta, Zalewski Premyslaw, Jelinska Anna, Garbacki Piotr. UPHLC: The Greening Face of Liquid Chromatography. 2013. <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3825615/>>. Luettu 24.1.2025
- 11 Suomen Massaspektrometrian Seura ry. Massaspektrometrian perusteet. 2010.
- 12 LCMS-menetelmän kehittäminen – EUROLAB. Verkkoaineisto <<https://www.eurolab.tr/fi/detail/food-healthcare/lcms-method-development>>. Luettu 24.1.2025
- 13 A laboratory Guide to Method Validation by Eurachem. Second Edition 2014.
- 14 VTT. Hägg Margareta. Validoinnin suunnitelun opas. 2016
- 15 Finntesting Laatusanasto. <<https://kemianseurat.fi/finntesting/laatusanasto/>>. Luettu 26.1.2025

- 16 WADA Technical Document. <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2015idcr_-_eng.pdf>. Luettu 13.1.2025

Liite 3. Verifiointisarjat

Sarja 1.

Menetelmävertailu, satunnaisvirhe, systemaattinen virhe

- RBL
- SBL
- CAL 1, 6 rinnakkaista injektiota
- CAL 1-6
- RBL
- SBL
- QC-L
- QC-M
- QC-H
- EQA 1
- EQA 2
- EQA 3
- 25 potilasnäytettä
- RBL
- SBL
- QC-L
- QC-M
- QC-H

Sarja 2.

Menetelmävertailu, satunnaisvirhe, siirtymävirhe, spesifisyys, määritysraja, systemaattinen virhe

- RBL
- SBL
- (SBL ilman ISTD)

- ½ MRPL (0,5 x CAL 1 pitoisuus), 6 rinnakkaista injektiota
- CAL 1, 6 rinnakkaista injektiota
- CAL 6, 6 rinnakkaista injektiota
- SBL
- CAL 1-6
- RBL
- SBL
- QC-L
- QC-M
- QC-H
- EQA 1
- EQA 2
- EQA 3
- 13 potilasnäytettä
- RBL
- SBL
- QC-L
- QC-M
- QC-H

Sarja 3.

Menetelmävertailu, satunnaisvirhe, systemaattinen virhe

- RBL
- SBL
- CAL 1, 6 rinnakkaista injektiota
- CAL 1-6
- RBL
- SBL
- QC-L
- QC-M
- QC-H
- EQA 1

- EQA 2
- EQA 3
- 18 potilasnäytettä
- RBL
- SBL
- QC-L
- QC-M
- QC-H

Sarja 4.

Menetelmävertailu, satunnaisvirhe, systemaattinen virhe

- RBL
- SBL
- CAL 1, 6 rinnakkaista injeksiota
- CAL 1-6
- RBL
- SBL
- QC-L
- QC-M
- QC-H
- EQA 1
- EQA 2
- EQA 3
- 21 potilasnäytettä
- RBL
- SBL
- QC-L
- QC-M
- QC

Liite 4. Käytössä olevan ja verifioitavan menetelmän menetelmänvertailun tulokset

Candidate method	Comparative method	Unit	Matrix	N	Range	Slope	Intercept	r	r ²	Difference	Bias	Goal	Conclusion
In-house: Clozapine: Desmethylclozapine	In-house: Clozapine: Desmethylclozapine	umol/ml	Serum	72	0.0126 –1.78	0.991	0.0102	0.997	0.994	0.642 % (-0.413% – 1.73%)	3.98% -- 0.281%	15 %	Passed
In-house: Clozapine	In-house: Clozapine	umol/ml	Serum	73	0.0130 –2.80	1.05	-0.00613	0.996	0.991	3.77% (2.88% – 4.66%)	1.40% – 4.35%	15 %	Passed

Liite 5. Retentioajat

Klotsapiini		Klotsapiini-d4		Desmetyyliklotsapiini		Desmetyyliklotsapiini-d8	
Näyte	RT	Näyte	RT	Näyte	RT	Näyte	RT
CAL 1	1,82	CAL 1	1,81	CAL 1	1,77	CAL 1	1,76
CAL 1	1,80	CAL 1	1,80	CAL 1	1,76	CAL 1	1,75
CAL 1	1,81	CAL 1	1,80	CAL 1	1,76	CAL 1	1,75
CAL 1	1,81	CAL 1	1,81	CAL 1	1,77	CAL 1	1,76
QC-L	1,81	QC-L	1,81	QC-L	1,77	QC-L	1,76
QC-L	1,81	QC-L	1,81	QC-L	1,77	QC-L	1,75
QC-L	1,81	QC-L	1,80	QC-L	1,76	QC-L	1,75
QC-L	1,82	QC-L	1,81	QC-L	1,77	QC-L	1,76
QC-M	1,81	QC-M	1,81	QC-M	1,77	QC-M	1,75
QC-M	1,81	QC-M	1,81	QC-M	1,77	QC-M	1,76
QC-M	1,81	QC-M	1,80	QC-M	1,76	QC-M	1,75
QC-M	1,82	QC-M	1,81	QC-M	1,77	QC-M	1,76
QC-H	1,81	QC-H	1,81	QC-H	1,77	QC-H	1,76
QC-H	1,81	QC-H	1,81	QC-H	1,77	QC-H	1,75
QC-H	1,81	QC-H	1,80	QC-H	1,76	QC-H	1,75
QC-H	1,81	QC-H	1,80	QC-H	1,76	QC-H	1,75
CAL 6	1,81	CAL 6	1,81	CAL 6	1,77	CAL 6	1,75
CAL 6	1,81	CAL 6	1,80	CAL 6	1,76	CAL 6	1,75
CAL 6	1,81	CAL 6	1,80	CAL 6	1,76	CAL 6	1,75
CAL 6	1,82	CAL 6	1,81	CAL 6	1,77	CAL 6	1,76

Liite. 6 Piikin pinta-alojen ja ionisuhteiden CV%

Taulukko 1. Klotsapiinin fragmenttien ionisuhteet.

clozapine 1 (tgt)						
Näyte	Keskiarvo (area)	Keskihajonta (area)	Area CV%	Keskiarvo (ion ratio %)	Keskihajonta (ion ratio %)	Ion Ratio CV%
CAL 1	1829011	466681	25,52	58,62	1,28	2,18
CAL 2	6611914	920560	13,92	58,21	0,82	1,41
CAL 3	21504993	3226361	15,00	58,88	0,43	0,72
CAL 4	38464884	4447422	11,56	59,97	1,18	1,97
CAL 5	74393669	6814625	9,16	60,12	0,84	1,39
CAL 6	102169178	17197563	16,83	58,68	2,03	3,46
QC-L	3470662	547187	15,77	58,78	1,42	2,41
QC-M	35087162	4120056	11,74	59,44	1,01	1,70
QC-H	78515106	14531586	18,51	61,25	0,44	0,72
clozapine 2						
Näyte	Keskiarvo (area)	Keskihajonta (area)	Area CV%	Keskiarvo (ion ratio %)	Keskihajonta (ion ratio %)	Ion Ratio CV%
CAL 1	1062717	259699	24,44	58,62	1,28	2,18
CAL 2	3845190	502372	13,06	58,21	0,82	1,41
CAL 3	12672254	2001139	15,79	58,88	0,43	0,72
CAL 4	23047545	2469854	10,72	59,97	1,18	1,97
CAL 5	44724687	4110308	9,19	60,12	0,84	1,39
CAL 6	59878021	9525459	15,91	58,68	2,03	3,46
QC-L	2039278	319911	15,69	58,78	1,42	2,41
QC-M	20881572	2775165	13,29	59,44	1,01	1,70
QC-H	48002821	8995479	18,74	61,12	0,31	0,51
clozapine 3						
Näyte	Keskiarvo (area)	Keskihajonta (area)	Area CV%	Keskiarvo (ion ratio %)	Keskihajonta (ion ratio %)	Ion Ratio CV%
CAL 1	195605	49247	25,18	10,79	0,37	3,40
CAL 2	713459	99479	13,94	10,81	0,21	1,91
CAL 3	2343926	340973	14,55	10,91	0,09	0,81
CAL 4	4303416	484575	11,26	11,20	0,27	2,38
CAL 5	8684751	849044	9,78	11,67	0,12	1,04
CAL 6	11796706	1989150	16,86	11,55	0,25	2,20
QC-L	376752	56222	14,92	10,87	0,17	1,58
QC-M	3928098	562953	14,33	11,18	0,34	3,06
QC-H	9166046	1657971	18,09	11,68	0,18	1,57

Taulukko 2. Klotsapiini-d4 fragmenttien ionisuhteet.

clozapine_d4 1						
Näyte	Keskiarvo (area)	Keskihajonta (area)	Area CV%	Keskiarvo (ion ratio %)	Keskihajonta (ion ratio %)	Ion Ratio CV%
CAL 1	2947161	766571	26,01	67,19	1,27	1,89
CAL 2	2861190	464616	16,24	65,77	1,88	2,86
CAL 3	2821543	444608	15,76	66,96	0,79	1,18
CAL 4	2816123	484237	17,20	66,03	2,04	3,08
CAL 5	2740905	481312	17,56	67,33	1,53	2,27
CAL 6	2685025	468342	17,44	66,66	1,22	1,83
QC-L	2732280	453298	16,59	66,29	1,27	1,91
QC-M	2632633	354573	13,47	66,30	1,56	2,35
QC-H	2522341	411094	16,30	67,68	1,28	1,89
clozapine_d4 2						
Näyte	Keskiarvo (area)	Keskihajonta (area)	Area CV%	Keskiarvo (ion ratio %)	Keskihajonta (ion ratio %)	Ion Ratio CV%
CAL 1	1985990	507704	25,56	67,19	1,27	1,89
CAL 2	1880801	302230	16,07	65,77	1,88	2,86
CAL 3	1887916	284785	15,08	66,96	0,79	1,18
CAL 4	1854296	275813	14,87	66,03	2,04	3,08
CAL 5	1843701	313716	17,02	67,33	1,53	2,27
CAL 6	1791065	325040	18,15	66,66	1,22	1,83
QC-L	1812375	312251	17,23	66,29	1,27	1,91
QC-M	1741477	191406	10,99	66,30	1,56	2,35
QC-H	1703662	246541	14,47	67,68	1,28	1,89
clozapine_d4 3						
Näyte	Keskiarvo (area)	Keskihajonta (area)	Area CV%	Keskiarvo (ion ratio %)	Keskihajonta (ion ratio %)	Ion Ratio CV%
CAL 1	747233	184921	24,75	25,42	0,72	2,82
CAL 2	715381	123792	17,30	24,99	0,99	3,97
CAL 3	742043	115801	15,61	26,30	0,49	1,87
CAL 4	770732	112387	14,58	27,45	0,86	3,12
CAL 5	831881	130750	15,72	30,42	0,61	2,01
CAL 6	883348	142466	16,13	32,96	0,95	2,87
QC-L	701338	126745	18,07	25,63	0,69	2,70
QC-M	729942	95460	13,08	27,74	0,28	1,00
QC-H	786539	122953	15,63	31,21	0,53	1,69

Taulukko 3. Desmetyyliklotsapiinin fragmenttien ionisuhteet.

desmethylclozapine 1 (tgt)						
Näyte	Keskiarvo (area)	Keskihajonta (area)	Area CV%	Keskiarvo (ion ratio %)	Keskihajonta (ion ratio %)	Ion Ratio CV%
CAL 1	723216	201921	27,92	95,08	4,50	4,74
CAL 2	2970056	391518	13,18	94,66	1,49	1,58
CAL 3	6096327	1177292	19,31	94,64	3,25	3,44
CAL 4	10760164	1716813	15,96	95,67	2,14	2,24
CAL 5	20242784	2953449	14,59	95,79	2,56	2,67
CAL 6	27396088	4681190	17,09	94,46	1,48	1,56
QC-L	1480826	274894	18,56	96,48	3,31	3,43
QC-M	8993414	1277854	14,21	94,54	2,02	2,14
QC-H	23639990	4652761	19,68	94,91	2,11	2,22
desmethylclozapine 2						
Näyte	Keskiarvo (area)	Keskihajonta (area)	Area CV%	Keskiarvo (ion ratio %)	Keskihajonta (ion ratio %)	Ion Ratio CV%
CAL 1	685384	196791	28,71	95,08	4,50	4,74
CAL 2	2808664	340384	12,12	94,66	1,49	1,58
CAL 3	5785778	1248128	21,57	94,64	3,25	3,44
CAL 4	10269296	1403689	13,67	95,67	2,14	2,24
CAL 5	19392308	2867662	14,79	95,79	2,56	2,67
CAL 6	25828383	3976060	15,39	94,46	1,48	1,56
QC-L	1428327	269688	18,88	96,48	3,31	3,43
QC-M	8490329	1101669	12,98	94,54	2,02	2,14
QC-H	22368613	3865479	17,28	94,91	2,11	2,22
desmethylclozapine 3						
Näyte	Keskiarvo (area)	Keskihajonta (area)	Area CV%	Keskiarvo (ion ratio %)	Keskihajonta (ion ratio %)	Ion Ratio CV%
CAL 1	202610	52882	26,10	28,23	0,78	2,76
CAL 2	821461	115926	14,11	27,64	0,28	1,03
CAL 3	1688032	356304	21,11	27,63	0,68	2,46
CAL 4	3042395	457835	15,05	28,30	0,52	1,84
CAL 5	5683889	782685	13,77	28,10	0,62	2,20
CAL 6	7754752	1273263	16,42	28,33	0,28	1,00
QC-L	416403	80083	19,23	28,11	0,82	2,93
QC-M	2520430	325277	12,91	28,06	0,52	1,86
QC-H	6700697	1199517	17,90	28,41	0,88	3,09

Taulukko 4. Desmetyyliklotsapiini-d8 fragmenttien ionisuhteet.

desmethyclozapine_d8 1						
Näyte	Keskiarvo (area)	Keskihajonta (area)	Area CV%	Keskiarvo (ion ratio %)	Keskihajonta (ion ratio %)	Ion Ratio CV%
	2514356	825984	32,85	188,37	3,72	1,97
	2403074	452219	18,82	186,77	6,12	3,27
	2356600	411351	17,46	184,21	4,90	2,66
	2251492	436329	19,38	184,32	6,13	3,33
	2222335	434308	19,54	184,57	3,12	1,69
	2115020	457021	21,61	184,73	7,15	3,87
	2272066	489330	21,54	186,01	6,16	3,31
	2511659	1018608	40,56	187,69	4,08	2,17
	1906841	299802	15,72	185,03	3,14	1,70
desmethyclozapine_d8 2						
Näyte	Keskiarvo (area)	Keskihajonta (area)	Area CV%	Keskiarvo (ion ratio %)	Keskihajonta (ion ratio %)	Ion Ratio CV%
CAL 1	4755419	1486853	31,27	188,37	3,72	1,97
CAL 2	4469109	687085	15,37	186,77	6,12	3,27
CAL 3	4345365	807895	18,59	184,21	4,90	2,66
CAL 4	4149223	810078	19,52	184,32	6,13	3,33
CAL 5	4092737	731102	17,86	184,57	3,12	1,69
CAL 6	3893461	767632	19,72	184,73	7,15	3,87
QC-L	4208959	780328	18,54	186,01	6,16	3,31
QC-M	3928184	439096	11,18	184,71	5,04	2,73
QC-H	3534528	617526	17,47	185,03	3,14	1,70
desmethyclozapine_d8 3						
Näyte	Keskiarvo (area)	Keskihajonta (area)	Area CV%	Keskiarvo (ion ratio %)	Keskihajonta (ion ratio %)	Ion Ratio CV%
CAL 1	2998504	919321	30,66	120,18	2,71	2,25
CAL 2	2917366	459964	15,77	121,86	3,58	2,94
CAL 3	2773171	518296	18,69	117,55	3,24	2,76
CAL 4	2692562	550592	20,45	119,43	1,37	1,15
CAL 5	2597359	477231	18,37	117,04	1,95	1,67
CAL 6	2504528	507328	20,26	118,65	1,76	1,49
QC-L	2710316	517167	19,08	119,70	4,82	4,03
QC-M	2488397	338214	13,59	116,75	2,27	1,95
QC-H	2285628	409031	17,90	119,60	2,30	1,92

Liite 7. Mittausepävarmuuden laskeminen

Menetelmä:		S-Klotsa													
Laitte:		LC-MS/MS													
Kokonaisepävarmuus u (c) on arvioitu WADAn teknisen dokumentin "DECISION LIMITS FOR THE CONFIRMATORY QUANTIFICATION OF THRESHOLD SUBSTANCES" ehdottamalla tavalla.															
bias eri EQAS-kierroksilta, toistettavuus (u prec) sisäisestä laadun varmistuksesta															
EQAS	n (lab)	RDS			Ref		RMS					QC	u (c) %		
		SDPA	(lab)%	x (lab)	Oma	bias	u (ref)	u (bias)	r^2	SUM r^2	n	u (bias)		u (prec)	
LGC 250	89	126,87	7,325	1731,95	1953	12,8	0,8	12,8	163,5	1125,8	9	11,2	5,3	12,4	
LGC 251	84	52,93	15,72	336,6	340	1,0	1,7	2,0	4,0						
LGC 252	84	610,85	9,488	6438,2	6109	-5,1	1,0	5,2	27,2						
LGC 244	86	94,48	7,926	1192	1320	10,7	0,9	10,8	116,0						
LGC 245	87	67,56	10,13	667,08	731	9,6	1,1	9,6	93,0						
LGC 246	82	227,96	7,417	3073,61	3475	13,1	0,8	13,1	171,2						
LGC 241	92	296,15	9,844	3008,57	2949	-2,0	1,0	2,2	5,0						
LGC 242	88	151,75	10,15	1494,86	1700	13,7	1,1	13,8	189,5						
LGC 254	81	328,36	7,949	4130,97	4910	18,9	0,9	18,9	356,4						
- Bias LGC-kierrokselta:															
- Toistettavuus (QC-L, -M, -H) u(prec) sisäisestä laadunvarmistuksesta 16.12.2022 -29.6.2023 N=60															
= saatavilla oleva tulos															
= laskettu väli tulos															
= lopullinen tulos ja sen laskentaan käytetyt tulokset															
verifointisarjojen:		N=7													
QC-L	u (prec)	5,2	EQAS	= kierroksen päivämäärä											
QC-M	u (prec)	5,3	n (lab)	= kierrokselle osallistuneiden labrojen lkm											
QC-H	u (prec)	3,8	RSD (lab) %	= kierrokselle osallistuneiden labrojen tulosten suhteellinen kesk. hajonta											
			Ref x (lab)	= kierrokselle osallistuneiden labrojen tulosten keskiarvo (referenssiarvo)											
			Oma	= oma saatu tulos											
			bias	= oma tuloksen ero referenssiarvosta											
			u (ref)	= referenssin epävarmuus $U_{ref} = \sqrt{(SD_{lab}^2/n_{lab})}$											
			u (bias)	= biaksen epävarmuus $U_{bias} = \sqrt{(bias^2 + u_{ref}^2)}$											
			RMS u (bias)	= eri bias-tulosten yhdistäminen $U_{bias(RMS)} = \sqrt{(bias^2 + bias^2 + \dots + bias^2)/n}$											
			QC u (prec)	= QC-näytteen sarjojen välinen toistettavuus (%)											
			u (c)	= yhdistetty mittausepävarmuus (%)											
Klotsapiini															
Kokonaismittausepävarmuus u(c):															
$u(c) = \sqrt{(U_{prec}^2 + U_{bias(RMS)}^2)} = 12,4 \%$															
Laajennettu epävarmuus U (k=2) = 2u= 24,75 %															

Menetelmä:		S-Norklotsa													
Laitte:		LC-MS/MS													
Kokonaisepävarmuus u (c) on arvioitu WADAn teknisen dokumentin "DECISION LIMITS FOR THE CONFIRMATORY QUANTIFICATION OF THRESHOLD SUBSTANCES" ehdottamalla tavalla.															
bias eri EQAS-kierroksilta, toistettavuus (u prec) sisäisestä laadun varmistuksesta															
EQAS	n (lab)	Ref			RMS					QC	u (c) %				
		SDPA	RSD (lab) %	x (lab)	Oma	bias	u (ref)	u (bias)	r^2	SUM r^2		n	u (bias)	u (prec)	
LGC 250	75	149,1	8,7	1709,21	1881	10,1	1,0	10,1	102,0	584,1	9	8,1	10,0	12,8	
LGC 251	72	60,5	18,9	319,69	326	2,0	2,2	3,0	8,9						
LGC 252	74	834,4	12,0	6940,53	6017	-13,3	1,4	13,4	179,0					tähän oikee arvo	
LGC 244	73	213,2	8,7	2459,72	2500	1,6	1,0	1,9	3,7						
LGC 245	75	74,22	12,8	581,84	580	-0,3	1,5	1,5	2,3						
LGC 246	72	354,07	9,4	3781,97	4125	9,1	1,1	9,1	83,5						
LGC 241	78	501,19	12,7	3961	3417	-13,7	1,4	13,8	190,7						
LGC 242	73	197,3	13,0	1520,14	1565	3,0	1,5	3,3	11,0						
LGC 254	72	622,1	10,9	5703,32	5770	1,2	1,3	1,7	3,0						

- Bias LGC-kierrokselta:					
- Toistettavuus (QC-L, -M, -H) u(prec) sisäisestä laadunvarmistuksesta 16.12.2022 - 29.6.2023 N=60					
					= saatavilla oleva tulos
					= laskettu väli tulos
					= lopullinen tulos ja sen laskentaan käytetyt tulokset
verifointisarjojen:	N=7		EQAS		= kierroksen päivämäärä
QC-L	u (prec)	4,3	n (lab)		= kierrokselle osallistuneiden labrojen lkm
QC-M	u (prec)	7,1	RSD (lab)		= kierrokselle osallistuneiden labrojen tulosten kesk. hajonta
QC-H	u (prec)	10	Ref x (lab)		= kierrokselle osallistuneiden labrojen tulosten keskiarvo (referenssiarvo)
			Oma		= oma saatu tulos
			bias		= oma tuloksen ero referenssiarvosta
			u (ref)		= referenssin epävarmuus $u_{ref} = \sqrt{SD_{lab}^2/n_{lab}}$
			u (bias)		= biasin epävarmuus $u_{bias} = \sqrt{bias^2 + u_{ref}^2}$
			RMS u (bias)		= eri bias-tulosten yhdistäminen $u_{bias(RMS)} = \sqrt{bias^2 + bias_2^2 + \dots + bias_n^2} / n$
			QC u (prec)		= QC-näytteen sarjojen välinen toistettavuus (%)
			u (c)		= yhdistetty mittausepävarmuus (%)
Norklotsapiini					
		Kokonaismittausepävarmuus u(c):			
		$u(c) = \sqrt{u_{prec}^2 + u_{bias(RMS)}^2} =$		12,8	%
Laajennettu epävarmuus U (k=2) = 2u=				25,68261	%