

Anssi Lemmetti

Olantsapiinin kvantitatiivinen määrittäminen seerumista LC-MS/MS-tekniikalla – menetelmän kehitys ja validointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

2.5.2018

<p>Tekijä Otsikko</p> <p>Sivumäärä Aika</p>	<p>Anssi Lemmetti Olantsapiinin kvantitatiivinen määrittely seerumista LC-MS/MS-tekniikalla – Menetelmän kehitys ja validointi</p> <p>34 sivua + 11 liitettä 15.5.2018</p>
<p>Tutkinto</p>	<p>Laboratorioanalytiikka (AMK)</p>
<p>Tutkinto-ohjelma</p>	<p>Laboratorioanalytiikka</p>
<p>Ohjaajat</p>	<p>FT, asiantuntija Terhi Launiainen Yliopettaja Jukka Niiranen</p>
<p>Opinnäytetyö suoritettiin Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy:n (YML) huume-, lääkeaine- ja dopinganalytiikan osastolla.</p> <p>Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää ja validoida antipsykoottiselle lääkeaineelle, olantsapiinille, uusi ja nopea proteiinisaostukseen ja nestekromatografia-massaspektrometria-tekniikkaan perustuva kvantitointimenetelmä seerumista vanhan neste-nesteuuttoon ja nestekromatografiaan perustuvan menetelmän tilalle. Kehitysvaiheessa optimoitiin näytteen esikäsittelyssä käytettävät reagenssit ja näyte-liuotin-suhde, sekä kromatografian parametrit. Lisäksi analyysin kalibrointi- ja kontrollialuetta laajennettiin. Menetelmän kehityksessä pyrittiin myös ottamaan huomioon samalla laitteistolla suoritettavat analyysit, jotta rutiinianalytiikka olisi mahdollisimman sujuvaa.</p> <p>Validointi suoritettiin YML:n oman validointiohjeen, sekä European Medicines Agency (EMA) ohjeen ”Guideline on bioanalytical method validation, 2012” perusteella. Kyseinen EMA:n dokumentti määrittelee biologisia matriiseja käyttävien kvantitatiivisten menetelmien validoinnin pääkohdat ja antaa suosituksia validoitavien ominaisuuksien määrittämiseksi.</p> <p>Projektissa validoitavat parametrit täyttivät hyväksyttävät kriteerit, ja menetelmä otettiin käyttöön rutiinianalytiikkaan välittömästi validoinnin valmistumisen jälkeen.</p>	
<p>Avainsanat</p>	<p>Olantsapiini, validointi, LC-MS/MS</p>

Author Title	Anssi Lemmetti Quantitative determination of olanzapine from serum using the LC-MS/MS-technique – Method development and validation
Number of Pages Date	34 pages + 11 appendices 21 August 2017
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	FT, expert, Terhi Launiainen Principal Lecturer, Jukka Niiranen
<p>This study was performed at the narcotic-, doping analytics, and therapeutic drug monitoring section of the United Medix Laboratories Ltd.</p> <p>The aim of the study was to develop and validate a new, fast quantitation method from serum based on protein precipitation and liquid chromatography-mass spectrometry for the antipsychotic drug olanzapine. The method is to replace the old method based on liquid-liquid extraction and liquid chromatography. In the development phase the reagents used in the sample preparation and sample-solvent ratio was optimized along with the chromatography parameters. The calibration-, and control ranges were also extended. Other analyses performed on the same apparatus were considered in the development to ensure fluid routine analytics.</p> <p>The validation was carried out according to an internal validation directive along with the directive "Guideline on bioanalytical method validation, 2012" by the European Medicines Agency (EMA). The directive specifies the main points, and gives recommendations on determining the validation parameters for methods using biological matrices.</p> <p>The parameters determined in the validation fulfilled the required criteria, and the method was applied into routine analytics immediately after the validation was finished.</p>	
Keywords	Olanzapine, validation, LC-MS/MS

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Terapeuttisten lääkeaineiden seuranta	1
3	Olantsapiini	3
4	Teoria	5
4.1	Nestekromatografia	6
4.2	Massaspektrometria	7
5	Menetelmän kehitys	9
5.1	LC-MS/MS-analyysin parametrien kehitys ja optimointi	9
5.2	Kalibrointisuoran ja kontrollialueen laajennus	11
5.3	Näytteen esikäsittelymenetelmän kehitys	11
6	Validointi	12
7	Reagenssit ja laitteet	18
7.1	Reagenssit	18
7.2	Laitteet, välineet ja ohjelmistot	19
8	Työn toteutus	19
8.1	Näytteiden esikäsittely	19
8.2	Sisäinen standardi	20
8.3	Kalibrointiliuokset	20
8.4	Laatukontrollit	21
8.5	LC-MS/MS-menetelmän kuvaus	22
8.6	Validointisarjat	22
9	Tulokset	23
9.1	Selektiivisyys	23
9.2	Kvantitointiraja	23
9.3	Kalibrointisuora	24
9.4	Satunnaisvirhe	25
9.5	Systemaattinen virhe ja vertailumittaukset	28

9.6	Analyttinen säilyvyys	30
9.7	Ionisupressio	30
9.8	Matriisivaikutus	31
9.9	Siirtymävirhe	32
9.10	Mittausepävarmuus	32
9.11	Spesifisyys	33
10	Yhteenveto ja johtopäätökset	34

Lähteet

Liitteet

Liite 1. Validointisarjat

Liite 2. Analyttisen säilyvyyskokeen tulokset

Liite 3. Mittausepävarmuuden laskeminen

Liite 4. Matriisivaikutuskokeen tulokset

Liite 5. Sarjojen sisäisen satunnaisvirheen laskemiseen käytetyt tulokset

Liite 6. Selektiivisyyden määrittämiseen käytetyt tulokset

Liite 7. Olantsapiinin tunnistamiseen käytettävien ionifragmenttien vasteiden CV%:n, sekä ionisuhteiden CV%:n laskemiseen käytetyt tulokset

Liite 8. Sarjojen sisäinen toistettavuus ja oikeellisuus sisäisen standardin osalta. Retentionajan toistettavuus ja ionifragmenttien vasteiden CV%, sekä ionisuhteiden CV%

Liite 9. Sarjojen välisen toistettavuuden määrittämiseen käytetyt tulokset

Liite 10. Vertailumittausten tulokset ja niistä lasketut prosentuaaliset erot

Liite 11. Esimerkki tulosraportista (Cal 1)

Lyhenteet

CV	Coefficient of variation, variaatiokerroin
ISTD	Internal standard, sisäinen standardi
LC	Liquid chromatography, nestekromatografia
LLOQ	Lower limit of quantification, alempi määrittäysraja
MS	Mass spectrometer, massaspektrometri
m/z	Mass to charge ratio, massa-varaussuhde
PBL	Plasma blank, plasmanolla
QC-L	Quality control – low, laatukontrolli - matala
QC-M	Quality control – medium, laatukontrolli - keskikorkea
QC-H	Quality control – high, laatukontrolli – korkea
RBL	Reagent blank, reagenssinolla
TDM	Therapeutic drug monitoring, terapeuttisten lääkeaineiden seuranta
UHPLC	Ultra-High Performance Liquid Chromatography, erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia

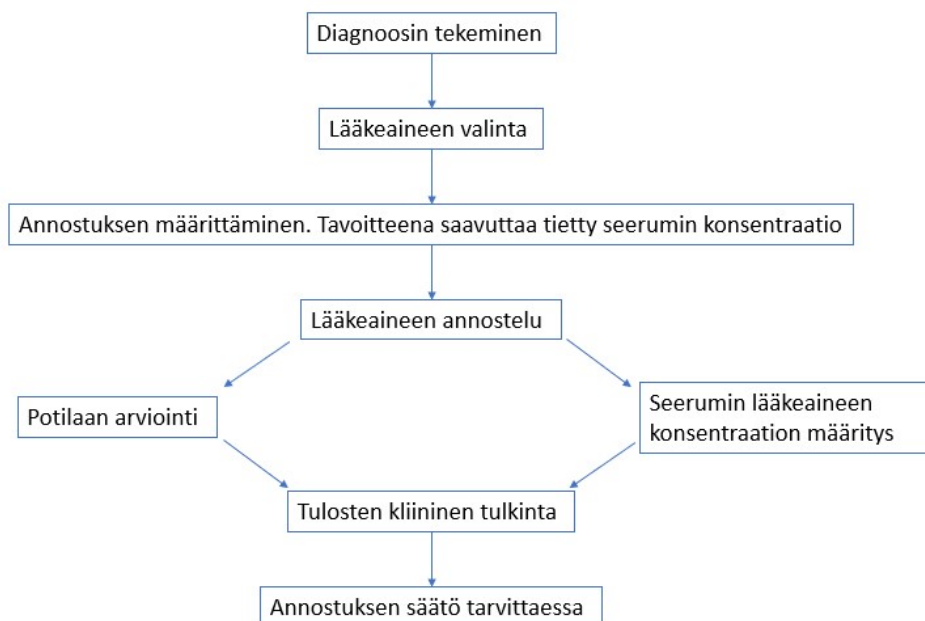
1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy:n (YML) Huume-, lääkeaine- ja dopinganalytiikan osastolla Kivihaan toimipisteessä. YML tarjoaa kattavasti laboratoriopalveluita kliinisen kemian, patologian, mikrobiologian ja genetiikan aloille sekä lääkeaine-, huume ja dopinganalytiikkaan. YML:n laboratoriot ovat FINAS-akkreditointipalvelun (Finnish Accreditation Service) hyväksymiä (akkreditointipäätös T070 (EN ISO/IEC 17025)).

Työn tavoite oli kehittää ja validoida antipsykootti olantsapiinille uusi menetelmä, joka perustuu proteiinisaostukseen ja nopeaan nestekromatografia-massaspektrometria-analyysiin (LC-MS/MS, liquid chromatography-mass-spectrometry). Olantsapiinin määritys suoritettiin aikaisemmin nestekromatografisesti (LC, liquid chromatography). Uuden LC-MS/MS-tekniikkaan perustuvan menetelmän odotetaan olevan vanhaa menetelmää nopeampi ja tarkempi. Opinnäytetyön ohjaajina toimivat YML:n asiantuntija Terhi Launiainen sekä Metropolia Ammattikorkeakoulun yliopettaja Jukka Niiranen.

2 Terapeuttisten lääkeaineiden seuranta

Terapeuttinen lääkeaineiden seuranta (TDM, therapeutic drug monitoring), eli lääkeaineiden konsentraation määrittäminen veren seerumista tai plasmasta, on tärkeä väline potilaiden lääkeannostusten optimoinnissa. Kun lääkeaineen kemialliset parametrit, kuten sen farmakokineettiset ominaisuudet tai vuorovaikutukset muiden lääkeaineiden kanssa, sekä potilaan henkilökohtainen affiniteetti lääkeainetta kohtaan ovat epäselviä, on sen konsentraation kvantitointi seerumista hyödyllistä. [1.] Kuvassa 1 on selitettyä terapeuttisten lääkeaineiden annostuksen optimointiprosessiä käyttäen TDM:ää.



Kuva 1. Annostuksen optimointiprosessi käyttäen terapeuttisten lääkeaineiden seuranta.

TDM:ää alettiin harjoittaa 1960-luvun lopulla, kun aikaiset farmakokineettiset tutkimukset todistivat, että matemaattista teoriaa lääkeaineiden annostuksesta voidaan liittää potilaiden lääkityksen tehokkuuteen. Seurannassa keskityttiin aluksi lääkeaineiden haitallisten vaikutusten tunnistamiseen ja siten lääkeaineiden terapeuttisten konsentraatioalueiden määrittämiseen, jotta lääkeannostusten toksisuustapaukset olisivat helpommin vältettävissä. Lääkeaineen terapeuttisella alueella tarkoitetaan pienimmän ja suurimman konsentraatiotason väliä, jolloin saavutetaan hoitovaikutus ilman vakavia haittavaikutuksia. Myöhemmin TDM:n päämäärät ovat laajentuneet sisältämään lääkityksen tehokkuuden optimoinnin, lääkeaineiden välisen vuorovaikutuksen, potilaan hoitomyöntyvyyden ja lääkityksen lopettamisen tarkkailun. Seerumin lääkeainekonsentraation ja lääkeaineen annostelun suhteen tarkkailu on hyödyllistä lääkeaineesta riippumatta, mutta kuitenkin ensisijaisen tärkeää lääkeaineilla, joiden terapeuttinen alue on hyvin kapea. [2.]

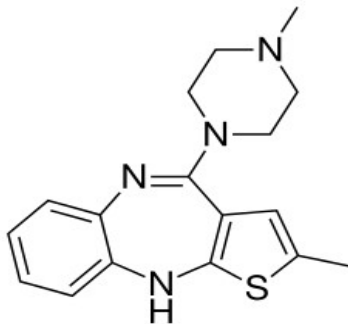
Suurimmalla osalla psykoterapeuttisista lääkeaineista on hyvin samankaltaisia farmakokineettisiä ominaisuuksia, mikä helpottaa niiden keskinäisten interaktioiden kartoittamista ja ymmärtämistä. Näitä yleisiä ominaisuuksia ovat muun muassa tehokas imeytyminen ruoansulatuskanavan kautta, vaihteleva ensikierron metabolia, nopea jakaantuminen veren plasmasta keskushermostoon, hidas eliminaation puoliintumisaika, kohtalaisen lineaarinen suhde annostuksen ja plasman konsentraation välillä, sekä yhteiset

metaboliareitit. Poikkeuksia kuitenkin on runsaasti, minkä vuoksi jatkuva tutkimus lääkeaineiden interaktioista on ensisijaisen tärkeää. [1.]

3 Olantsapiini

Olantsapiini on antipsykoottinen lääkeaine, jota käytetään skitsofrenian hoidossa, maanisten jaksojen lieventämisessä ja kaksisuuntaisen mielialahäiriön maanisten jaksojen toistumisen estossa. Olantsapiinin kauppanimiä ovat mm. Zyprexa, Zalasta ja Zypadhera. Olantsapiini annostellaan päivittäisessä hoidossa oraalisesti, mutta sitä voidaan myös antaa lihaksensisäisesti injektoimalla akuuttien psykoosien, skitsofrenia-kohtausten tai maanisten kohtausten hoitamiseksi. Olantsapiinilla on terapeuttisia etuja moniin muihin antipsykootteihin nähden, kuten pienempi riski aiheuttaa hermostoperäisiä liike-ongelmia, eli ekstrapyramidaalioireita. Negatiivisia sivuoireita ovat muun muassa painon nousu, uneliaisuus, kolesteroli- ja verensokeriarvojen nousu, ruokahalun voimistuminen, huimaus, ihottuma, voimattomuus, väsymys, nivelkipu ja turvotus.

Kuvassa 2 on esitettyä olantsapiinin kemiallinen rakennekaava sekä kemiallisia parametreja.



Olantsapiini, (2-metyyli-4-(1-metyyli-1-piperatsiinyli)-10H-thieno[2,3-b][1,5] bentsodiatsepiini
 $C_{17}H_{20}N_4S$
 CAS: 132539-06-01
 MW: 312,141 g/mol
 V_d : 10-20L/kg
 $t_{1/2}$: 30-60 h
 pK_a : 5,0 (emäs) ja 7,4 (emäs)
 $LogD$: pH 5,5: -0,02 ja pH 7,4: 1,90

[3,4]

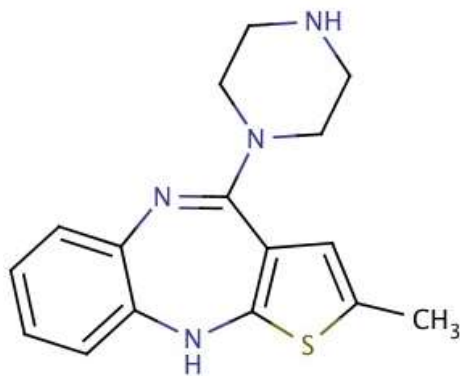
Kuva 2. Olantsapiinin rakennekaava.

Oraalisesti annosteltuna olantsapiini imeytyy noin 85-prosenttisesti, ja sen biologinen hyötösuus on 60 %. Plasman huippupitoisuus saavutetaan 5-8 tuntia oraalisen annostelun jälkeen, tai 15-45 minuuttia lihaksensisäisen injektion jälkeen. Oraalisesti annostellun olantsapiinin eliminaation puoliintumisaika, eli aika jossa sen farmakologinen ja fysiologinen aktiivisuus puolittuu, on 30-60 tuntia. Eliminaation puoliintumisaika vaihtelee

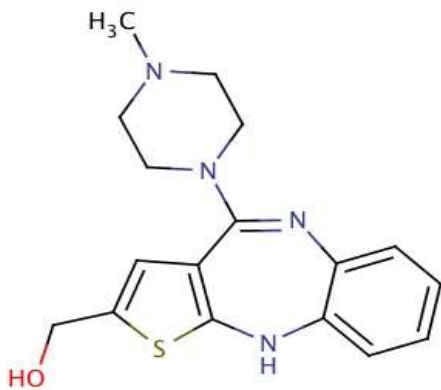
suuresti riippuen potilaan iästä ja sukupuolesta [5]. Myös tupakointi lyhentää tutkitusti olantsapiinin eliminaation puoliintumisaikaa [6].

Olantsapiini metaboloituminen tapahtuu maksassa ja sen pääasiallinen metaboliitti on olantsapiinin 10-N-glukuronidi, jonka osuus olantsapiinin plasmatasoista on noin 44 %. Olantsapiinin 10-N-glukuronidi ei kuitenkaan läpäise veri-aivoestettä, eli se ei siirry verenkierrosta keskushermostoon, eikä sillä ole farmakologista vaikutusta. Muita metaboliitteja ovat N-desmetyyliolantsapiini ja 2-hydroksimetyyliolantsapiini, mutta kummallakaan metaboliitilla ei ole suurta farmakologista vaikutusta. Metaboliittien kvantitointi potilaiden veren plasmasta ei ole tarpeellista terapeuttien lääkeaineiden seurannan kannalta. [5; 6.]

Alla olevissa kuvissa (3 ja 4) on esitetty olantsapiinin metaboliittien rakennekaavat.



Kuva 3. N-desmetyyliolantsapiinin rakennekaava.



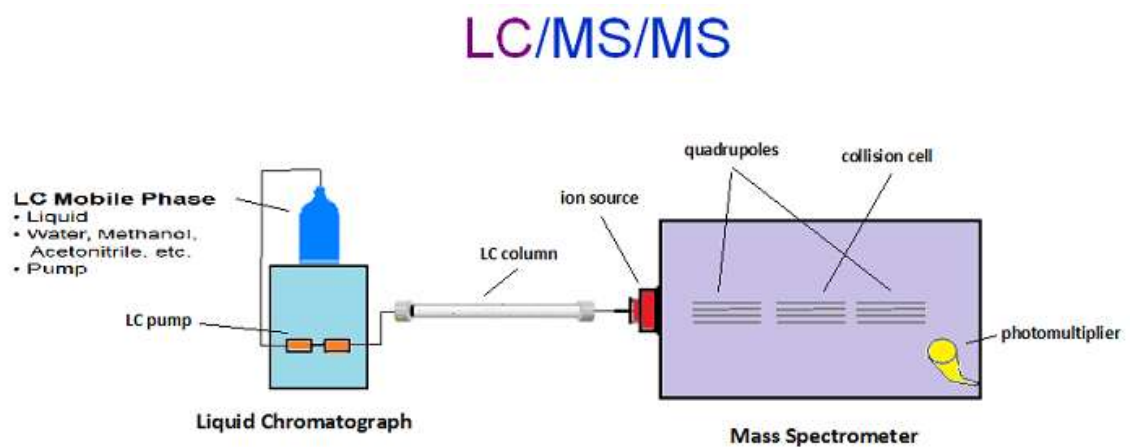
Kuva 4. 2-hydroksimetyyliolantsapiinin rakennekaava.

Olantsapiini sitoutuu plasman proteiineihin noin 93-prosenttisesti vakiintuneilla pitoisuustasoilla. Olantsapiini sitoutuu pääasiassa plasman albumiiniin ja α_1 -glykoproteiiniin. Terapeuttisen lääkeaineen seurannan kannalta voimakas proteiinisitoutuminen korostaa näytteen esikäsittelyssä suoritettavan erottelun tärkeyttä.

Olantsapiinilla on useita tunnettuja yhteisvaikutuksia muiden lääkeaineiden kanssa. Karbamatsepiinilääkitys sekä tupakointi voivat kiihdyttää olantsapiinin metaboloitumista, joka aiheuttaa plasman olantsapiinipitoisuuden laskua. Tämän lisäksi olantsapiinin metaboloitumisesta vastaavia entsyymejä CYP1A2 ja CYP2D6 inhiboivat tai indusoivat lääkeaineet vaikuttavat olantsapiinin farmakokinetiikkaan. Myrkytysten ensihoitoon tarkoitettu lääkehiili vähentää oralisesti annostellun olantsapiinin biologista hyötyosuutta 50-60%, jonka vuoksi sen samanaikaista käyttöä tulee välttää. [1;6.]

4 Teoria

Nestekromatografia-tandemmassaspektrometria-tekniikassa (LC-MS/MS) analyttien erottelu näytematriisista suoritetaan erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografian avulla, jonka jälkeen syntyneet näytevyöhykkeet siirtyvät HPLC-detektorin sijasta nestekromatografiin liitetyn kolmoiskvadrupoli-massaspektrometrialaitteiston ionisaattoriin, ja sitä kautta massa-analysaattoriin. Massaspektrometrin liittäminen kromatografialaitteistoon tuo suurta etua tavanomaisiin kromatografiassa käytettyihin detektoreihin nähden herkän ja spesifisen luonteensa vuoksi. Kuvassa 5 on esitettyä LC-MS/MS-laitteisto.

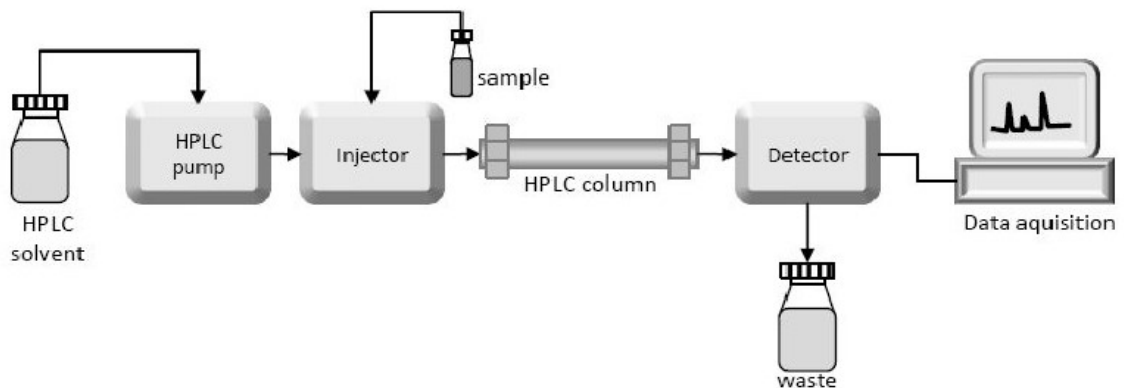


Kuva 5. Nestekromatografi-kolmoiskvadrupoli-massaspektrometri-laitteiston kokoonpano [7].

4.1 Nestekromatografia

Erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa (UHPLC, Ultra-high Performance Liquid Chromatography) käytetään analyttien erotteluun erilaisista näytematriiseista. Kuvassa 6 on esitettyä nestekromatografialaitteiston eri osat. Nestekromatografian erotte- lukyky perustuu yhdisteiden liukoisuuseroihin liikkuvan faasin, eli ajoliuoksen (engl. sol- vent), ja kolonnin stationäärifaasin välillä. Ajoliuos pumpataan tasaisella virtauksella kro- matografialaitteistoon. Useissa kokoonpanoissa ajoliuoksen orgaanisen liuottimen suh- detta voidaan muunnella kesken ajon pumpaamalla sen vesipohjainen ja liuotinpohjai- nen komponentti eri säiliöistä. Ajoliuos kulkeutuu laitteiston näytteensyöttäjään (engl. sampler), jossa näyte injesoidaan sen mukaan. Ajoliuos, eli kromatografian liikkuva faasi, kantaa näytteen kolonniin (engl. column), jossa analyttien erottelu tapahtuu. Erot- telun tehokkuuteen vaikuttavia parametreja ovat ajoliuoksen virtausnopeus, kolonniuu- nin lämpötila ja ajoliuoksen orgaanisen liuottimen pitoisuus. Näytematriisin eri kom- ponentit tulevat ulos laitteistosta eri aikaan joko detektorille (engl. detector) tai vaihtoeh- toisesti jatkoanalyysiin massa-analyysaattoriin. [8.]

Kuvassa 6 on esitettyä HPLC-laitteiston kokoonpano.



Kuva 6. HPLC-laitteiston kokoonpano [9].

Kuvassa 7 on esitettyä bifenyylisolonnin kemiallinen rakenne.

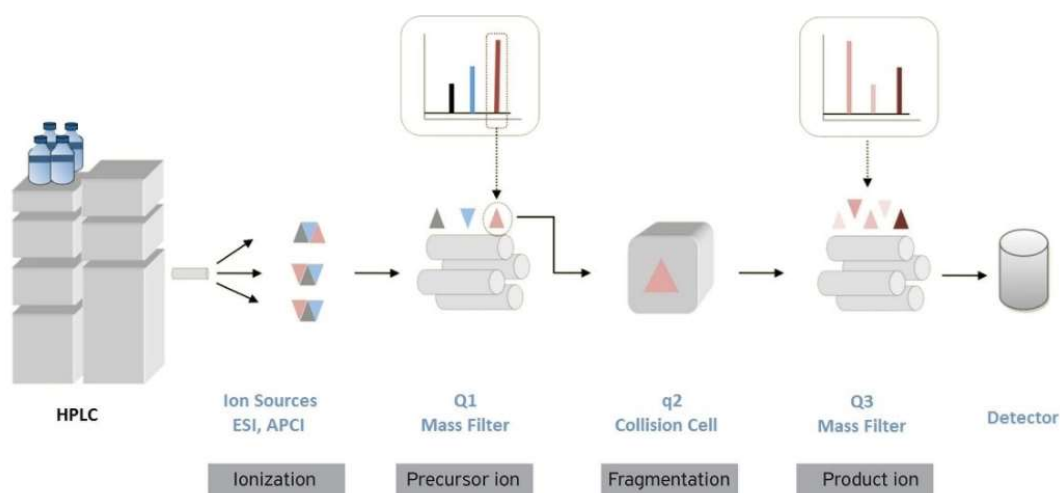


Kuva 7. Bifenyylisolonnin kemiallinen rakenne [10].

Suuri osa lääkeaineista ja niiden metaboliiteista ovat aromaattisia yhdisteitä, jonka vuoksi bifenyyliligandeja sisältävän kolonnin käyttö on usein hyödyllistä bioanalyttisissä nestekromatografiasovelluksissa. Bifenyylisolonnin avulla aromaattisille yhdisteille saadaan tehokas retentio myös yksinkertaisen metanolipohjaisen liikkuvan faasin kanssa, mikä on eduksi etenkin massaspektrometrin detektiota käytettäessä. Bifenyylisolonnilla voidaan parantaa menetelmän selektiivisyyttä aromaattisia yhdisteitä analysoitaessa, mikä on ensisijaisen tärkeää kliinisessä lääkeaineanalytiikassa, jossa näytematriisi sisältää usein toisiaan läheisesti muistuttavia yhdisteitä. [10.]

4.2 Massaspektrometria

UHPLC-laitteistosta saapuvat analyytit ionisoidaan ionilähdekammiossa menetelmään sopivalla tekniikalla, mistä syntyneet ionit siirretään vakuumin avulla massa-analysaattoriin. Massa-analysaattori erottelee ja analysoi ionisaatiossa syntyneet ionit, ja niiden fragmentit massa-varaussuhteiden perusteella. Tandemmassaspektrometritekniikassa kvadrupoli-massa-analysaattoreita on kytketty peräkkäin, jolloin analyytteja voidaan fragmentoida pidemmälle, minkä ansiosta voidaan saavuttaa korkeampi selektiivisyys ja herkkyys. Kuvassa 8 on kuvattuna kolmoiskvadrupoli-massaspektrometrin eri komponentit. [11.] Kuvassa 8 on esitettyä Kolmoiskvadrupoli-massaspektrometrin eri komponentit.

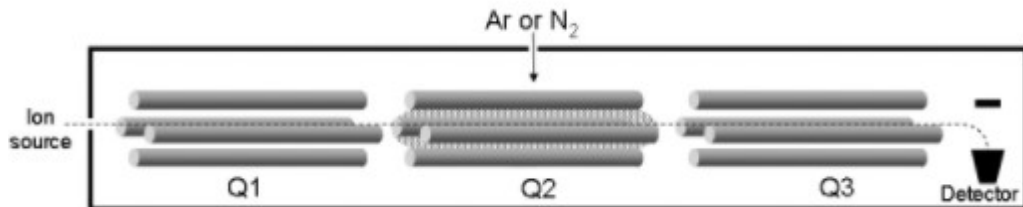


Kuva 8. Kolmoiskvadrupoli-massaspektrometrin eri komponentit [12].

Sähkösumutusionisaatio (ESI, Electrospray ionization) on yleisin nestekromatografian yhteydessä käytettävä ionisaatiomenetelmä. Nestemäiset näytteet pumpataan noin 3-5 kV:n jännitteisen kapillaarin läpi ionisaatiokammioon, jossa ne nebulisoituvat, eli muodostavat hyvin hienon suihkun varautuneita pisaroita. Pisarat haihdutetaan typpikaasuvirtauksen ja korkean lämpötilan avulla, jolloin niiden varaus siirtyy haluttuihin analyytteihin. Analyytit voidaan varata tarpeen mukaan negatiivisesti tai positiivisesti. Analyytit kuljetetaan vakuumin avulla ionisaatiokammioista massa-analyysaattoriin. ESI:tä voidaan pitää niin sanottuna pehmeänä ionisaatiotekniikkana, jolla tarkoitetaan sitä, ettei se aiheuta analyyttien laajaa fragmentoitumista jo ionisaatiovaiheessa. [13.]

Kvadrupolimassa-analyysaattori koostuu neljästä yhdensuuntaisesta sähköisesti varustusta sauvasta, joiden sähkökentän vaikutuksesta ionisoidut analyytit ohjautuvat tasaisesti analyysaattorin lävitse. Muuntelemalla sauvojen varauksia, voidaan määrittää, minkä m/z -suhdeluvun omaavat molekyylit kulkeutuvat sauvaston lävitse detektorille asti. Ionisoiduista molekyyleista valikoidaan ensimmäisen kvadrupolin avulla niin sanottu äiti-ioni. Äiti-ioni törmäytetään toisessa kvadrupolissa inerttiin kaasuun (Ar -, tai N_2 -kaasu), jolloin se fragmentoituu pidemmällä niin sanotuiksi tytärioneiksi. Toista kvadrupolia kutsutaan usein törmäyskammioksi. Toisessa kvadrupolissa tapahtuneen fragmentoitumisen jälkeen halutut ionifragmentit ohjataan kolmanteen kvadrupoliin, jossa ne taas erotellaan haluttujen m/z -suhdelukujen mukaisesti. Ensimmäinen ja kolmas kvadrupoli

voidaan asettaa useaa eri m/z -suhdelukua varten samanaikaisesti, jolloin voidaan havaita suurempi määrä kohde-analyytteja. Tätä menetelmää kutsutaan MRM-menetelmäksi (engl. Multiple reaction monitoring). MRM tuottaa hyvin spesifisen ja herkän analyysin, jonka vuoksi se on ideaalinen vaihtoehto kliiniseen lääkeaineanalytiikkaan, jossa näytematriisi voi sisältää kemiallisesti hyvin samankaltaisia analyytteja. [8;13.] Kuvassa 9 on esitetty kolmoiskvadrupoli-massa-analysaattori.



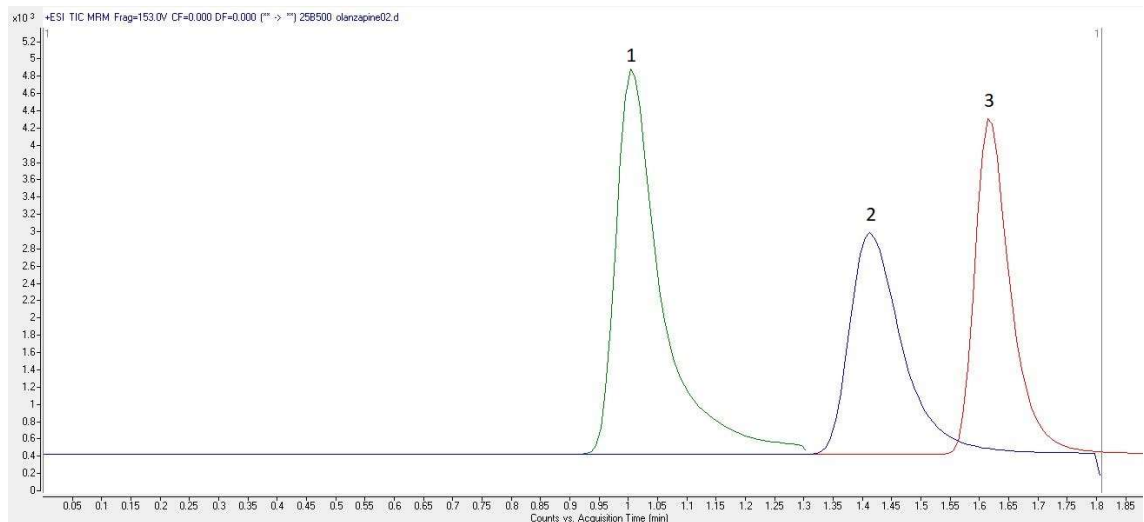
Kuva 9. Kolmoiskvadrupoli-massa-analysaattori [13].

5 Menetelmän kehitys

5.1 LC-MS/MS-analyysin parametrien kehitys ja optimointi

Menetelmän kehityksessä lähdettiin liikkeelle samankaltaisen analyytin, klotsapiinin, analysoinnissa käytettävistä parametreista. Tavoitteena oli käyttää ajossa samoja ajoliuksia sekä kolonnia kuin klotsapiinin analyysimenetelmässä, jotta rutiinianalyysien suorittaminen samalla laitteistolla olisi mahdollisimman sujuvaa.

Nestekromatografian parametrien optimointi tehtiin muuttamalla ajo-ohjelman virtausnopeutta, orgaanisen liuottimen osuutta eluentissa, näytteen injektioilavuutta sekä kokeilemalla erilaisia gradienttiohjelmia, kunnes saavutettiin tehokas retentio ja sopiva retentioaika. Näytteinä testiajoissa käytettiin puhtasaineista metanoliin valmistettuja näytteitä. Kuvassa 10 esitetään eri parametriyhdistelmien tuottamia kromatogrammeja. Optimoinnissa päädyttiin kuvassa 10 esitetyn kromatogrammi 3:n tuottamiin parametreihin.



Kuva 10. Menetelmän kehitysvaiheessa eri eluutio-virtausnopeusyhdistelmien tuottamia kromatogrammeja. Kuvan kromatogrammi 1 saatiin 25 %:lla orgaanisen liuottimen osuudella eluentissa ja 500 ml/min virtausnopeudella, kromatogrammi 2 50 %:lla orgaanisen liuottimen osuudella eluentissa ja 300 ml/min virtausnopeudella, ja kromatogrammi 3 20 % → 30 % gradientteluutiolla ja 500 ml/min virtausnopeudella.

Massa-analysaattorin osalta valittiin viisi ionifragmenttia, jotka ovat spesifisiä olantsapiinille (Kuva 11), sekä viisi fragmenttia, jotka ovat spesifisiä käytettävälle sisäiselle standardille, olantsapiini-d8:lle (Kuva 12), joiden perusteella yhdisteet tunnistetaan.

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
Olanzapine	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ S	312.14	2
Method Name			
D:\MassHunter\Methods\Menetelmänkehitys\Optimointi_POS.m			
Polarity	Positive	Ion Source	AJS ESI
Precursor Ion		Fragmentor	
313.15		153	
Product Ion	Collision Energy	Abundance	
256	20	1385658	
84.1	24	425370	
197.9	44	247669	
213	32	190344	
169	48	113863	

Kuva 11. Olantsapiinin tunnistamiseen valitut ionifragmentit.

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
Olanzapine-d8	C ₁₇ H ₁₂ D ₈ N ₄ S	320.19	3
Method Name			
D:\MassHunter\Methods\Menetelmänkehitys\Optimointi_POS.m			
Polarity	Positive	Ion Source	AJS ESI
Precursor Ion		Fragmentor	
321.2		153	
Product Ion	Collision Energy	Abundance	
261	24	660779	
198	48	188830	
90.1	24	216754	
213	32	124141	
169	48	82394	

Kuva 12. Olantsapiini-d8:n tunnistamiseen valitut ionifragmentit.

5.2 Kalibroitaisuoran ja kontrollialueen laajennus

Menetelmän kalibraatioaluetta päätettiin laajentaa vanhaan menetelmään nähden, jotta näytteet joiden pitoisuus ylittää kalibraatioalueen, ja täten vaativat uusinta-analyysin laimennettuna, vähenisivät. Uuden kalibraatiopisteen pitoisuus (640 nmol/l) todettiin sopivaksi vanhojen analyysitulosten perusteella. Uusi kalibraatiopiste lisättiin vanhan, korvattavan menetelmän kalibraatioalueen perään.

Kalibraatioalueen laajentamisen vuoksi päätettiin lisätä myös korkeamman pitoisuuden laatukontrollinäyte (QC-H) kontrolloimaan entistä korkeampia pitoisuuksia.

Menetelmään harkittiin myös ulkoisten laatukontrollien hyödyntämistä, mutta sopivaa kaupallista kontrollia ei löydy tutkittavalle analyylille.

5.3 Näytteen esikäsittelymenetelmän kehitys

Näytteiden esikäsittely suoritettiin saostamalla seeruminäytteestä proteiinit orgaanisella liuottimella. Kehitysvaiheessa testattiin eri liuottimia, erilaisia näyte-liuotin suhteita, sekä kahta eri nollamatriisia validointinäytteiden valmistukseen.

Päädyttiin käyttämään liuottimena asetoniiriä (ACN) ja nollamatriisina kaupallista nollaplasmaa, sillä ne tuottivat spektrissä pienimmän taustahäiriön tutkittavan analyysin re-tentioajan kohdalla. Näyte-liuotin-suhteeksi valittiin 1:5, koska tutkittava pitoisuusalue on niin matala, että suuremmat laimennokset aiheuttavat vasteen liiallista pienenemistä jolloin analyysin tarkkuus kärsii.

6 Validointi

Validointi perustui sekä YML:n omaan validointiohjeeseen että European Medicines Agency (EMA) ohjeeseen "Guideline on bioanalytical method validation, 2012". EMA:n ohje määrittelee biologisia matriiseja käyttävien kvantitatiivisten menetelmien validoinnin pääkohdat ja antaa suosituksia validoitavien ominaisuuksien määrittämiseksi.

Validoitavan menetelmän kohdalla määritettiin menetelmän spesifisyys, selektiivisyys, kvantitointiraja, satunnaisvirhe (sarjojen sisäinen ja sarjojen välinen), systemaattinen virhe, mittausepävarmuus, analyttinen säilyvyys, sekä menetelmän mahdollinen ionisuppressio, matriisivaikutus ja siirtymävirhe.

Selektiivisyys

Menetelmän selektiivisyydellä (engl. selectivity) tarkoitetaan sen kykyä tunnistaa ja kvantitoida vain haluttu analyytti matriisin endogeenisten, eli sisäisten komponenttien, sekä näytteen muiden mahdollisten yhdisteiden seasta [14].

Selektiivisyyttä tutkittiin analysoimalla olantsapiinin osalta lääkeainevapaita seeruminäytteitä ilman sisäistä standardia. Lisäksi analysoitiin RBL ja PBL-näytteet ilman sisäistä standardia ja sen kanssa. Tarkoituksena oli todistaa, ettei nollanäytteiden ionikromatogrammeissa ilmene olantsapiinille tai sisäisenä standardina käytettävälle olantsapiini-d8:lle ominaisia fragmentteja ja ettei sisäinen standardi aiheuta taustaa olantsapiinille. Tämän lisäksi analysoitiin näyte suurimman kalibrointipisteen pitoisuudella ilman sisäistä standardia, jotta voitiin varmistaa, ettei olantsapiini aiheuta taustaa sisäisen standardin kohdalle.

Mahdollinen nollanäytteissä esiintyvä vaste tulee olla < 20 % LLOQ-tason vasteesta ja < 5 % sisäisen standardin vasteesta.

Spesifisyys

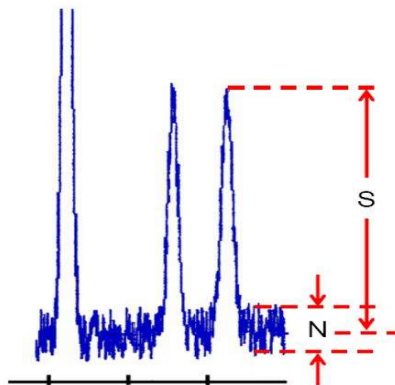
Menetelmän spesifisyydellä (engl. specificity) tarkoitetaan sen kykyä mitata vain haluttua analyyttiä [15].

Spesifisyys määritettiin mittaamalla potilasnäytteitä, joissa on suurella todennäköisyydellä myös muita lääkkeitä, ja tarkkailemalla tuloksia ja ionisuhteita mahdollisten häiriöiden varalta.

Kvantitointiraja

Kvantitointirajalla (engl. Lower limit of quantification, LLOQ) tarkoitetaan pienintä analyysin pitoisuutta, jolla saavutetaan hyväksyttävä toistettavuus ja oikeellisuus. Kvantitointiraja määritettiin analysoimalla kuusi rinnakkaista pienimmän kalibraatiopisteen näytettä ja laskemalla niiden prosentuaalinen variaatiokerroin CV% ja prosentuaalinen poikkeama bias% todellisista arvoista. [14.]

Signaali-kohina-suhte voidaan määrittää silmämääräisesti LLOQ-tason näytteen kromatogrammista. Kuvassa 13 on esitettyä signaali-kohina-suhteen määrittäminen kromatogrammista.



Kuva 13. Signaali-kohina-suhteen määrittäminen kromatogrammista.

Hyväksymiskriteereinä olivat $CV\% < 20\%$, $-20\% < bias < 20\%$ ja $signaali/kohina > 5$.

Kalibrointisuora

Menetelmästä tulee määrittää sen lineaarisuus (engl. linearity) ja kalibraatiosuoran oikeellisuus (engl. accuracy) ja toistettavuus (engl. precision). Tämä määritetään laske-
malla jokaisen validointisarjan kalibraatiosuoran pisteistä CV% ja bias%. [14.]

Hyväksyttävät kriteerit ovat $CV% < 15\%$, $-15\% < bias < 15\%$, paitsi LLOQ-tasolla $CV% < 20\%$, $-15\% < bias < 20\%$. Vähintään 75 % pisteistä tulee olla hyväksyttäviä. Suo-
rista raportoidaan determinaatiokerroin, kulmakerroin, leikkauspiste ja sovitus.

Satunnaisvirhe

Menetelmän satunnaisvirhettä tutkimiseksi määritettiin validointisarjojen välinen ja niiden
sisäinen oikeellisuus sekä toistettavuus.

Oikeellisuudella tarkoitetaan menetelmällä saatujen tulosten suhdetta nimellisiin arvoi-
hin. Sitä tutkittiin analysoimalla näytteitä, joiden pitoisuus on tunnettu, esimerkiksi laatu-
kontrolleja tai kalibrointinäytteitä, ja laskemalla niiden pitoisuudet erillisen kalibrointisuoa-
ran avulla. Saatuja pitoisuuksia verrataan nimellisiin arvoihin, ja lasketaan bias%. [14.]

Menetelmän toistettavuus tarkoittaa sillä tehtyjen rinnakkaismääritysten tulosten variaa-
tiota. Toistettavuus tulee määrittää laajalla pitoisuusskaalalla. Tuloksista lasketaan
CV%. [14.]

Sarjojen sisäinen oikeellisuus ja toistettavuus määritettiin valmistamalla kuusi rinnak-
kaisnäytettä viidellä eri pitoisuustasolla (CAL1, QC-L, QC-M, QC-H ja CAL6) ja laske-
malla niistä CV% ja bias%.

Sarjojen välinen oikeellisuus ja toistettavuus määritettiin laskemalla jokaisen validointi-
sarjan CAL1, QC-L, QC-M, QC-H ja CAL6 näytteiden välinen CV% ja bias%.

Hyväksyttävät poikkeamat tutkittaville pitoisuustasoille ovat $CV\% \leq 15$ ja $-15\% < bias < 20\%$ tavoitepitoisuudesta paitsi LLOQ-rajalla $CV\% \leq 20\%$ ja $-15\% < bias < 20\%$. Sallittavat vaihteluvälit ionisuhteille on esitetty taulukossa 1, ne pe-
rustuvat WADA:n tekniseen dokumenttiin TD2015IDCR [1]. Retentioajan sallittu vaihtelu
on $\pm 2\%$.

Taulukko 1. Ionisuhteiden vaihtelun kriteerit [1].

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

Lisäksi määritettiin menetelmän retentioajan toistettavuus, sekä tutkittavien ionifragmenttien suhteiden vaihtelu.

Systemaattinen virhe

Systemaattisella virheellä (engl. bias) tarkoitetaan mitattavan suureen oletetun mittaus-tuloksen ja tosiarvon tai sovitun arvon välistä eroa. Sen määrittämiseksi on tehtävä vertailumittauksia, joissa saatuja tuloksia verrataan toisella menetelmällä saatuihin, tai toisen laboratorion saamiin tuloksiin samoista näytteistä. [14.]

Systemaattista virhettä tutkittiin analysoimalla vanhoja potilasnäytteitä ja vertaamalla niitä vanhalla, korvattavalla menetelmällä saatuihin tuloksiin. Samalla tarkkailtiin, ettei todennäköisesti muitakin lääkkeitä sisältävistä potilasnäytteistä tule analyysia häiritsevää taustaa, joka voi ilmetä esimerkiksi piikin muodon muutoksena tai ionisuhteiden häiriönä. Analysoitiin myös LGC:n ulkoisia laaduntarkkailunäytteitä ja verrattiin tuloksia muiden laboratorioden niistä määrittämiin tuloksiin. Ulkoisia laaduntarkkailunäytteitä oli rajallisesti saatavilla, sillä vain joka kolmas laaduntarkkailukierros sisältää olantsapiini-näytteitä.

Analyyttinen säilyvyys

Tutkitaan kuinka kauan näytteitä voi säilyttää tietyissä olosuhteissa ilman, että ne alkavat hajoamaan eivätkä enää ole analyysikelpoisia. [14.]

Näytteet analysoitiin niiden valmistuspäivänä, kaksi päivää valmistuksesta ja viisi päivää valmistuksesta. Jokaisessa analyysissa kvantitointi tehtiin tuoreita kalibraattoreita vastaan. Uusinta-analyyseista laskettiin muutos- % alkuperäiseen tulokseen nähden.

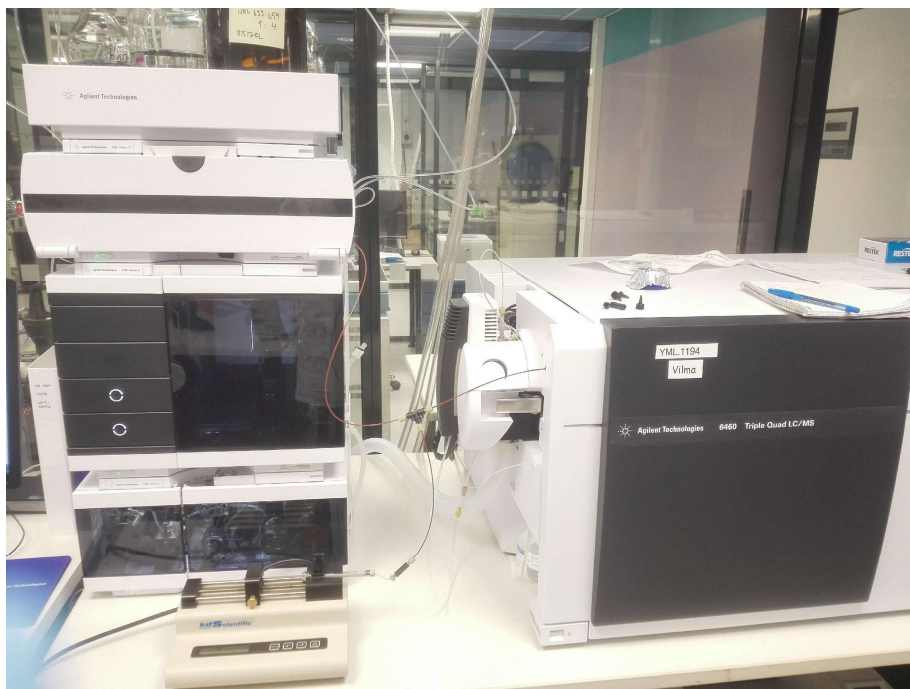
Analyttisen säilyvyyden hyväksymiskriteerinä on $\leq \pm 15\%$:n muutos eri mittauskertojen lasketussa tuloksessa.

Näytteitä säilytettiin analyysien välissä $4\text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa, sillä analyysissa käytettävän laitteiston näytteensyöttäjä on asetettu tähän lämpötilaan.

Ionisupressio ja matriisivaikutus

Massaspektrometriaan perustuvissa menetelmissä tulee määrittää näytematriisin aiheuttama mahdollinen ionisupressio, jotta voidaan varmistaa, ettei se tapahdu tutkittavan analyytin retentioajalla.

Ionisupressio määritettiin suorasyöttämällä analyyttiä korkealla pitoisuudella massaspektrometriin, jotta saadaan tasainen, jatkuva signaali. Nestekromatografian näytteesyöttäjän (engl. sampler) kautta injektointiin PBL (plasma blank) näyte, jolloin nähtiin sen aiheuttaman supression ajankohta signaalissa. Kuvassa 14 on ionisuppression määrittämiseen käytetty järjestely.



Kuva 14. Ionisuppression määrittämiseen käytetty järjestely.

Mahdollinen matriisivaikutus tulee myös tutkia. Tämä tehtiin valmistamalla saman pitoisuuden näytteitä eri henkilöiden luovuttamiin nollamatriiseihin. Näytteiden tuloksista laskettiin CV%. Tämän lisäksi matriisin aiheuttamaa vaikutusta signaalissa tutkittiin valmistamalla nollamatriisinäytteiden lisäksi samojen pitoisuuksien näytteet suoraan saostusreagenssiin, ja laskettiin niiden tuottaman vasteen, ja lasketun pitoisuuden prosentuaalinen ero suhteessa nollamatriisinäytteisiin.

Siirtymävirhe

Validoinnin yhteydessä tulee varmistaa ja minimoida menetelmässä tapahtuva siirtymävirhe (engl. carry-over), eli aikaisemmasta näytteestä seuraavaan siirtyvä vaste.

Siirtymävirhe määritettiin injektoimalla kolme PBL-näytettä kuuden rinnakkaisen CAL6-konsentraation näytteen jälkeen. PBL-näytteissä esiintyvistä analyytin ja sisäisen standardin vasteista laskettiin niiden prosentuaalinen osuus LLOQ:n ja ISTD:n vasteista.

Hyväksymiskriteereinä nollanäytteistä mitatun vasteen tulee olla <20 % LLOQ:n vasteesta, sekä <5 % ISTD:n vasteesta.














Mittausepävarmuus

Menetelmän mittausepävarmuus ja laajennettu mittausepävarmuus määritettiin validoinnin yhteydessä saatujen tulosten satunnaisvirheestä ja systemaattisesta virheestä. Mittausepävarmuutta verrattiin korvattavan menetelmän mittausepävarmuuteen.

7 Reagenssit ja laitteet

7.1 Reagenssit

Menetelmän validoinnissa käytettiin seuraavia reagensseja:

- Olantsapiini, valmistaja: European Pharmacopeia 
 Tuotekoodi: Y0001370
 Batch: 1,0
 CAS: 132539-06-1
- Olantsapiini-d8, valmistaja: Cerilliant  
 Tuotenumero: O-035
 LOT: FN11061401
- K-3 EDTA plasma, single donor, valmistaja: BBI Solutions
 Tuotekoodi: S112-1
- Asetonitrili, HPLC Grade, valmistaja: J.T. Baker  
 CAS: 75-05-8
- Etanoli, Etax AaS, valmistaja: Altia Oyj  
- Metanoli, valmistaja: VWR   
 CAS: 67-56-1
- Muurahaishappo ULC/MS Optigrade®, valmistaja: LGC Standards  
- Ammoniumformiaatti, valmistaja: Honeywell 
- Ionivaihdettu vesi, Millipore

7.2 Laitteet, välineet ja ohjelmistot

Menetelmän validoinnissa käytettiin seuraavia laitteita, välineitä ja ohjelmistoja:

- Ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografi, 1290 Infinity II, Agilent Technologies
 - Kolonni: Restek Raptor™ Biphenyl 3,0 x 50 mm (2,7 µm) (tuotenumero 9309A5E)
 - Tulosuodatin: Restek Raptor™ Biphenyl EXP Guard Column Cartridge 5 x 3,0 mm (2,7 µm) (tuotenumero 9304A0253)
- Kolmoiskvadrupoli massaspektrometri, 6460 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies
 - Agilent Jet Stream sähkösumutusionisaattori
- Agilent MassHunter Software
- 1,5 ml näytepullot
 - 400 µl lasiset sisäputket, valmistaja: Agilent
 - Silikoniseptat, valmistaja: Agilent Technologies
- 1,5 ml eppendorf-putket, valmistaja: Sarstedt AG & Co

8 Työn toteutus

8.1 Näytteiden esikäsittely

Näytteiden esikäsittely tehtiin proteiinisaostuksella käyttäen orgaanisena liuottimena asetonitriilia.

40 µl näyteseerumia/kalibraattoria/kontrollia pipetoitiin 1,5 ml eppendorfputkeen. Lisättiin 160 µl sisäistä standardia sisältävää saostusreagenssia (50 ng/ml olantsapiini-d8 asetonitriilissä) ja vorteksoitiin heti lisäyksen jälkeen. Näytettä seisotettiin vähintään 10 min ja vorteksoitiin uudelleen. Saostunut näyte sentrifugoitiin 5 min 16 000 rcf. 150 µl supernatantia pipetoitiin sisäputkelliseen näytepulloon.

8.2 Sisäinen standardi

Sisäisenä standardina käytettiin deuteroitua olantsapiinia (olantsapiini-d8). 50 ng/ml liuos valmistettiin 100 µg/ml kantaliuksesta suoraan proteiinisäostusreagenssiin, asetonitriliin. Sisäisen standardin pitoisuus valittiin niin, että se osuu keskelle menetelmässä käytettävää kalibrointisuoraa. Liuos säilytettiin 4 °C:ssa jääkaapissa.

8.3 Kalibrointiliuokset

Menetelmän kalibrointiin käytettiin kuutta konsentraatitasa. Kalibraatioliuokset valmistetaan 1 mg/ml olantsapiini-kantaliuksesta, josta tehtiin ensiksi 0,1 mg/l käyttöliuos. Tämän jälkeen kalibrointiliuokset valmistetaan lisäämällä käyttöliuosta taulukon 2 mukaisesti 10 ml mittapulloon, jonka jälkeen mittapullo täytetään merkkiin AaS laatusella etanolilla. Kalibrointiliuoksia säilytetään -18 °C:ssa, ja ne säilyvät 6 kk.

Taulukko 2. Kalibrointiliuosten valmistukseen käytettävät käyttöliuostilavuudet

Kalibrointiliuos	Käyttöliuosta (µl)
1	24
2	80
3	160
4	250
5	600
6	800

Analyysia varten 25 µl kalibrointiliuosta lisättiin 975 µl:aan kaupallista nollamatriisia jolloin saadaan kalibrointinäytteet taulukon 3 mukaisilla pitoisuuksilla. Kalibrointinäytteet säilytetään 4 °C:ssa, ja ne säilyvät 2 viikkoa.

Taulukko 3. Kalibrointiäytteiden pitoisuudet

Kalibrointiäytteiden pitoisuus	Pitoisuus (nmol/l)
1	19
2	64
3	128
4	200
5	480
6	640

8.4 Laatu- ja kalibrointiäytteiden valmistus

Analyysien välistä vaihtelua ja oikeellisuutta varten valmistettiin kolme laatu- ja kalibrointiäytettä, QC:ta (Quality Control), kolmelle eri pitoisuustasolle. QC-L- ja QC-M (Quality Control-Low ja Quality Control-Medium) -tasolla käytettiin jo vanhassa olantsapiinin analyysimenetelmässä käytettyjä laatu- ja kalibrointiäytteitä. Niiden lisäksi valmistettiin QC-H (Quality Control-High) -näyte kontrolloimaan korkeampia pitoisuustasoja.

1 mg/ml olantsapiini-kantaliuoksesta laimennettiin käyttöliuos pipetoimalla 50 µl 10 ml:n mittapulloon, joka täytetään merkkiin vedellä. Laatu- ja kalibrointiäytteet valmistetaan taulukon 4 mukaisesti 50 ml:aan lääkeaineetonta seerumia, jolloin saadaan taulukon 4 mukaiset pitoisuudet. Laatu- ja kalibrointiäytteet jaetaan 2,2 ml käyttöeriin 5 ml muovisiin koeputkiin. Laatu- ja kalibrointiäytteet säilytetään -18 °C:ssa, ja ne säilyvät 12 kk.

Taulukko 4. Kalibrointiäytteiden valmistukseen käytettävät käyttöliuostilavuudet, sekä lopulliset pitoisuudet.

Kalibrointiäytteen nimi	Käyttöliuosta (µl)	Pitoisuus (nmol/l)
QC-L	150	48
QC-M	600	192
QC-H	1050	336

8.5 LC-MS/MS-menetelmän kuvaus

LC-MS/MS-menetelmän parametrit:

Eluentti: A: 2,5 mM ammoniumformiaatti 0,1 % HCOOH vedessä
 B: 2,5 mM ammoniumformiaatti 0,1 % HCOOH metanoli:
 ACN seoksessa (4:1)

Ajoparametrit: Virtaus: 500 µl/min
 Injektiotilavuus: 1 µl
 Uuni: 40 °C
 Eluutio:

Taulukko 5. Gradientteluution ohjelma

T (min)	A %	B %
0	80	20
0,5	80	20
1	70	30
2	80	20

MS: DynamicMRM
 Gas temp: 300 °C
 Gas flow: 5 l/min
 Nebulizer: 45 psi
 Sheath gas temp: 250 °C
 Sheath gas flow: 11 l/min
 Capillary: 3500 V
 Nozzle voltage: 500 V

8.6 Validointisarjat

Validoinnin aikana ajetut näytesarjat on kuvattu liitteessä 1.

9 Tulokset

Tuloksissa esitetyt CV%:t ovat laskettu kaavan 1 mukaisesti ja esitetyt bias%t ovat laskettu kaavan 2 mukaisesti.

Kaava 1:

$$\text{Prosentuaalinen korrelaatiokerroin, CV\%} = \frac{\text{keskihajonta}}{\text{keskiarvo}} * 100$$

Kaava 2:

$$\text{Prosentuaalinen bias, bias\%} = \frac{(\text{tulos} - \text{tavoitetulos})}{\text{tavoitetulos}} * 100$$

9.1 Selektiivisyys

Analysoiduissa näytteissä ei ilmennyt kaupallisesta nollamatriisista, seerumeista tai menetelmässä käytettävistä reagensseista aiheutuvaa häiritsevää taustaa olantsapiinille (>20 % LLOQ-tason vasteesta tai >5 % ISTD:n vasteesta).

Ilman sisäistä standardia ajatussa CAL6-pitoisuustason näytteessä ei ilmennyt häiritsevää taustaa olantsapiini-d8:lle.

Selektiivisyyden määrittämiseen käytetyt tulokset ovat esitettynä liitteessä 6.

9.2 Kvantitointiraja

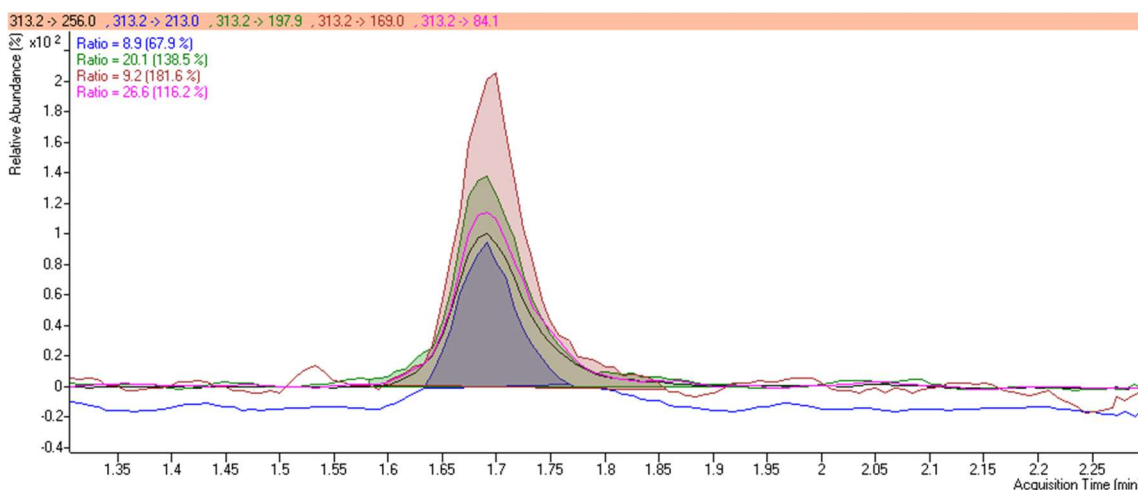
Näytteet täyttivät hyväksyttävät kriteerit (<15 % CV%, -15%<bias<15%, S/N > 5). LLOQ-tason näytteen S/N voitiin määrittää silmämääräisesti olevan suurempi kuin 5 (Kuva 15).

Kvantitointirajan määrittämisessä käytetyt tulokset ovat esitettynä taulukossa 6.

Taulukko 6. Kvantitointirajan määrittämiskokeen tulokset ja niiden pohjalta lasketut prosentuaaliset variaatiokertoimet sekä bias%.

Näyte	Tavoitepitoisuus (nmol/l)	Laskettu pitoisuus (nmol/l)	Vaste (pinta-ala)	bias%
CAL1	19,00	21,30	86,63	12 %
CAL1	19,00	20,13	79,21	6 %
CAL1	19,00	21,46	88,07	13 %
CAL1	19,00	21,60	88,73	14 %
CAL1	19,00	19,24	77,52	1 %
CAL1	19,00	18,27	72,12	-4 %
	Keskiarvo	20,33	82,05	7 %
	Keskihajonta	1,25	6,18	
	CV %	6,13 %	7,53 %	

Alla olevassa kuvassa on esitettyä esimerkkitromatogrammi CAL-1 näytteestä.



Kuva 15. Esimerkki CAL1-näytteen kromatogrammista.

9.3 Kalibrintisuora

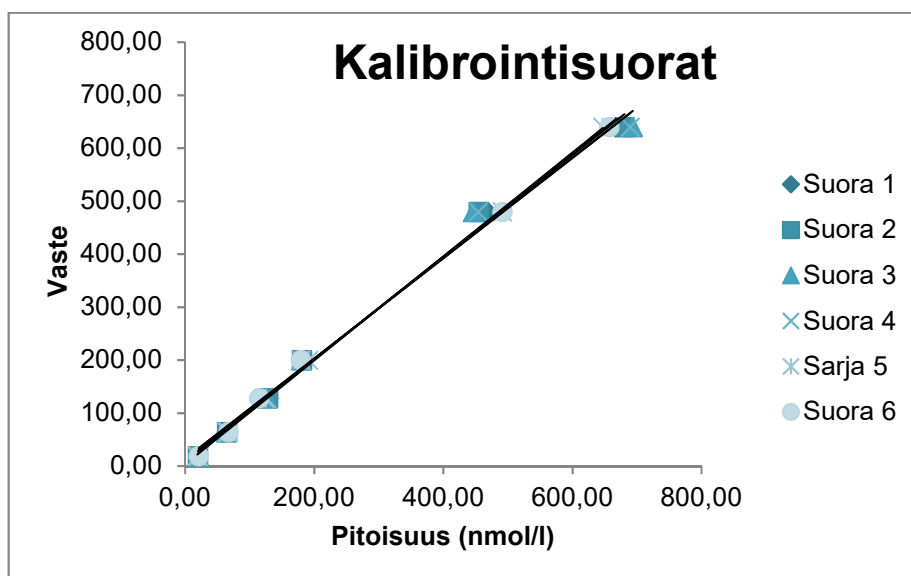
Kaikki validoinnin aikana käytetyt kalibraatiopisteet täyttivät hyväksyttävät kriteerit (CV% < 15%, -15%<bias<15%, paitsi LLOQ-tasolla CV% < 20%, -20%<bias<20%).

Taulukossa 7 on esitettyä validointisarjojen kalibrintisuorien parametrit.

Taulukko 7. Kalibrintisuorien determinaatiokertoimet, kulmakertoimet, sovitukset ja leikkauspisteet. Suoran sovituksella tarkoitetaan kalibrointipisteiden painotusta.

	R ²	Kulmakerroin	Sovitus	Leikkauspiste
Sarjan 1 suora	0,99708	0,00326	1/x	-0,00954
Sarjan 2 suora	0,99490	0,00268	1/x	-0,00805
Sarjan 3 suora	0,99185	0,00266	1/x	-0,01263
Sarjan 4 suora	0,99295	0,00279	1/x	-0,01391
Sarjan 5 suora	0,99926	0,00325	1/x	-0,01468
Sarjan 6 suora	0,99578	0,00283	1/x	-0,01683

Kuvassa 16 on esitettyä validointisarjojen kalibraatiosuorat kuvaajana.



Kuva 16. Validointisarjojen kalibrintisuorat tavoitepitoisuuksia vastaan.

9.4 Satunnaisvirhe

Sarjojen sisäinen toistettavuus ja oikeellisuus

Sarjojen sisäisen satunnaisvirheen laskemiseen käytetyt tulokset on esitetty kokonaisuudessaan liitteessä 5. Jokaisen määritetyn pitoisuustason tuloksien keskiarvot ja niistä lasketut CV%:t on esitetty taulukossa 8.

Näytteet täyttivät hyväksyttävät kriteerit toistettavuuden (CV% < 15%) ja oikeellisuuden (-15%<bias<15%), sekä retentioajan toistettavuuden (vaihtelu < 2 %) osalta.

Taulukko 8. Sarjojen sisäisen satunnaisvirheen laskemiseen käytettyjen rinnakkaisnäytteiden laskettujen pitoisuuksien, sekä vasteen keskiarvot ja prosentuaalinen variaatiokerroin CV%.

Olantsapiini						
Näyte	Keskiarvo (nmol/l)	Keskihajonta (nmol/l)	CV%	Keskiarvo (Vaste)	Keskihajonta (Vaste)	Vaste CV%
CAL1	20,3	1,3	6,1 %	82,1	6,2	7,5 %
QC-L	47,0	2,6	5,5 %	205,4	9,9	4,8 %
QC-M	188,1	5,1	2,7 %	849,7	17,8	2,1 %
QC-H	343,2	16,0	4,7 %	1592,6	67,0	4,2 %
CAL6	675,0	17,3	2,6 %	3088,8	66,2	2,1 %

Määritettiin myös olantsapiinin tunnistamiseen käytettävien ionifragmenttien vasteiden CV%, sekä ionisuhteiden CV%. Tulokset ovat esitettynä liitteessä 7.

Määritettiin myös sisäisen standardin retentioajan toistettavuus, vasteen prosentuaalinen variaatiokerroin CV%, sen tunnistamiseen käytettävien ionifragmenttien vasteiden CV%, sekä ionisuhteiden vaihtelu.

Sisäisen standardin retentioaika oli stabiili ja täytti validoinnin kriteerit (vaihtelu < 2 %). ISTD:n tunnistamiseen käytettävien ionifragmenttien vasteiden CV%:t, sekä ionisuhteiden vaihtelu, olivat myös hyväksyttävät. Tulokset sisäisen standardin vasteen osalta ovat esitettynä taulukossa 9, ja ionifragmenttien CV%:ien ja ionisuhteiden osalta kokonaisuudessaan liitteessä 8.

Taulukko 9. Olantsapiini-d8:n kohdalla tapahtuvan satunnaisvirheen määrittämiseen käytettyjen tuloksien keskiarvo ja niiden laskettu prosentuaalinen variaatiokerroin CV%.

Olantsapiini-d8	
Keskiarvo (Vaste)	1735,9
Keskihajonta (Vaste)	28,9
CV%	1,7

Sarjojen välinen toistettavuus ja oikeellisuus

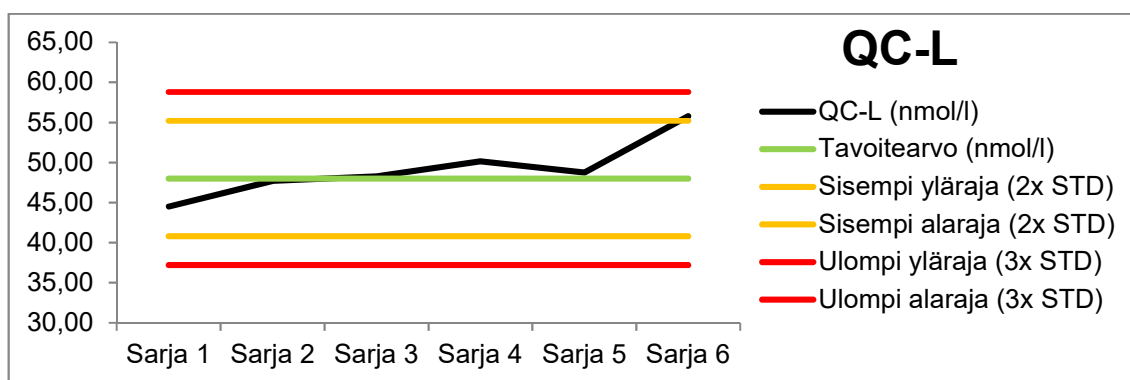
Tulosten CV%:t ovat esitettynä taulukossa 10. Tulokset ja niistä lasketut bias%:t ovat esitettynä kokonaisuudessaan liitteessä 9.

Näytteet täyttivät hyväksyttävät kriteerit toistettavuuden ($CV\% < 15\%$) ja oikeellisuuden ($-15\% < bias < 15\%$), sekä retentioajan toistettavuuden (vaihtelu $< 2\%$) osalta.

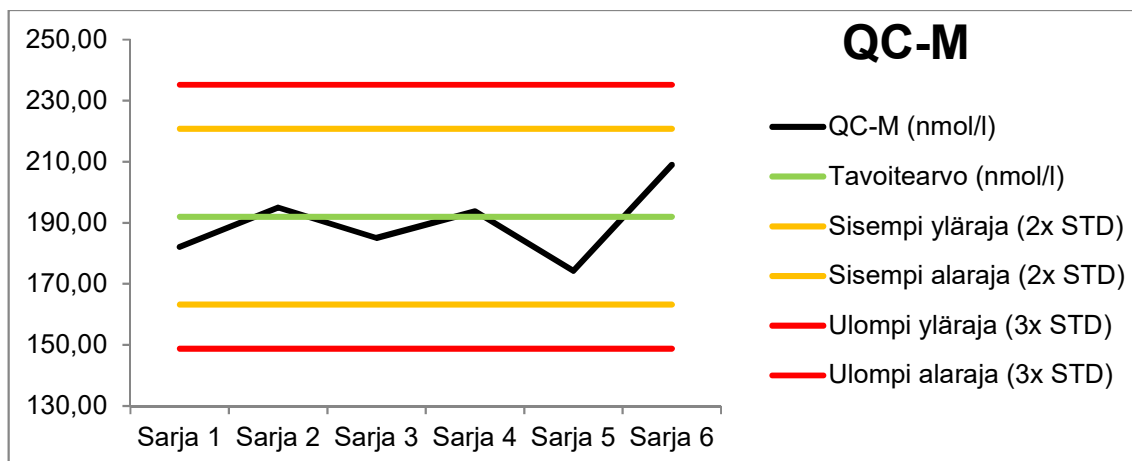
Taulukko 10. Sarjojen välisen satunnaisvirheen määrittämiseen käytettyjen näytteiden laskettujen pitoisuuksien keskiarvot ja niistä lasketut prosentuaaliset variaatiokertoimet CV%.

Näyte	Keskiarvo (nmol/l)	Keskihajonta (nmol/l)	CV%
CAL1	20,1	0,8	4,0 %
CAL6	669,8	20,1	3,0 %
QC-L	49,2	3,4	6,9 %
QC-M	186,1	11,1	5,9 %
QC-H	364,0	17,6	4,8 %

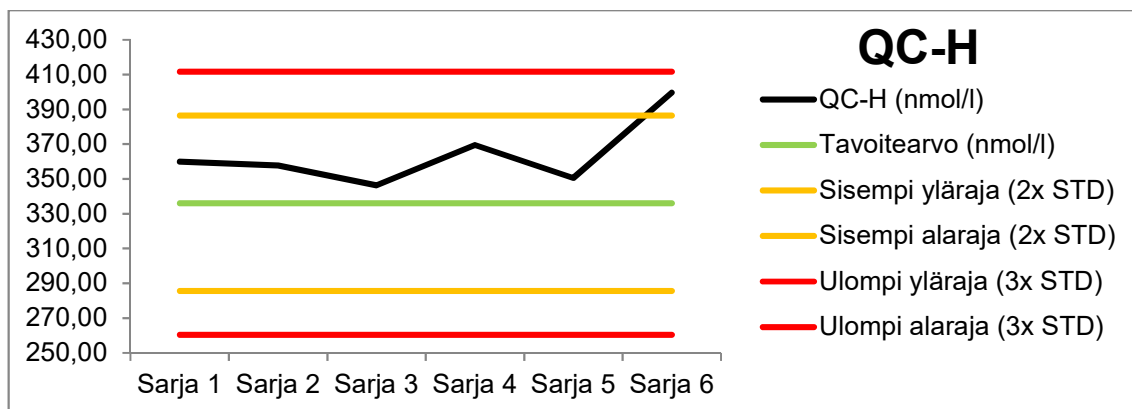
Validoinnin aikana laatukontrollinäytteiden oikeellisuutta tarkkailtiin, ja niistä koottiin kontrollikortit. Korteissa sisemmät hälytysrajat ovat 2 x kontrollin keskihajonta ja ulommat 3 x kontrollin keskihajonta. Korteihin lisättiin myös kahden rutiinisarjojen uusintoja varten tehtyjen sarjojen kontrollit. Kontrollikortit ovat esitettynä kuvissa 17, 18 ja 19.



Kuva 17. QC-L kontrollikortti validoinnin ajalta.



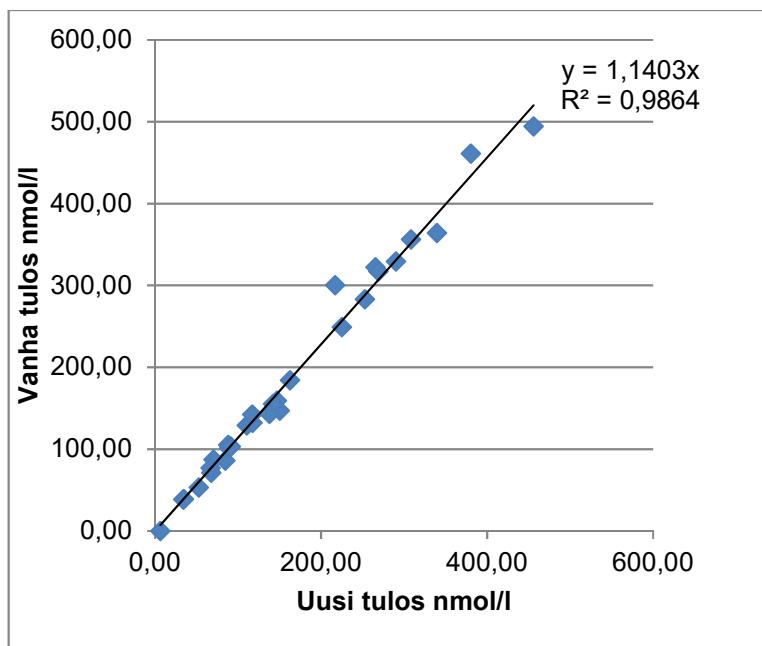
Kuva 18. QC-M kontrollikortti validoinnin ajalta.



Kuva 19. QC-H kontrollikortti validoinnin ajalta.

9.5 Systemaattinen virhe ja vertailumittaukset

Tuloksen ero korvattavaan menetelmään nähden oli keskimäärin -11,11 %. Yli ± 15 % poikkeamia oli 7. Vertailumittausten tulokset ovat esitettynä graafisesti kuvassa 20, ja kokonaisuudessaan liitteessä 10.



Kuva 20. Vertailukokeen tuloksien poikkeamat kuvaajana.

Analysoitiin vanhoja LGC:n ulkoisia laaduntarkkailunäytteitä. Tuloksista laskettiin bias% ja niitä verrattiin ilmoitettuun pitoisuustasoon (spike value), muiden laaduntarkkailukierrokselle osallistuneiden laboratorioiden saamiin tuloksiin, sekä vanhalla olantsapiinin analyysimenetelmällä saatuihin tuloksiin. LGC:n laaduntarkkailukierrosten tulosten, ja saadun tuloksen perusteella laskettiin standardiarvo (z-score, kaava 3). LGC-näytteet analysoitiin kahdesti. Näytteitä oli saatavilla harmillisesti vain kolmelta kierrokselta. Tämä johtuu siitä että LGC:n ohjeistuksen mukaan kiinteä näyte liuotetaan 5 ml:aan liuotinta, ja korvattava menetelmä käytti 2 ml näytettä, jolloin näyte kului lähes kokonaan jos näyte on haluttu uusia.

Kaava 3:

$$z = \frac{\text{oma tulos} - \text{kaikkien osallistuneiden laboratorioiden tulosten keskiarvo}}{\text{kaikkien tulosten keskihajonta}}$$

Taulukko 11. LGC:n ulkoisten laaduntarkkailunäytteiden tulokset uudella menetelmällä verrattuna vanhalla menetelmällä saatuihin ja niistä lasketut bias%:t.

Näyte	Uusi (LC-MS/MS)	Uusi (LC-MS/MS)	Vanha (HPLC)	Todellinen arvo	Bias%		
	Tulos 1 (nmol/l)	Tulos 2 (nmol/l)	Tulos (nmol/l)	(nmol/l)	tulos 1	tulos 2	vanha
LGC Round 140	27,8	25,6	<20	23,9	17 %	7 %	ei tulosta
LGC Round 146	51,6	49,2	31	53,6	-4 %	-8 %	-42 %
LGC Round 161	321,3	310,9	209	325,3	-1 %	-4 %	-36 %

Taulukko 12. Ulkoisten laaduntarkkailunäytteiden tulokset verrattuna tarkkailukierrokseen osallistuneiden laboratorioiden tuloksiin, sekä korvattavaan menetelmään nähden.

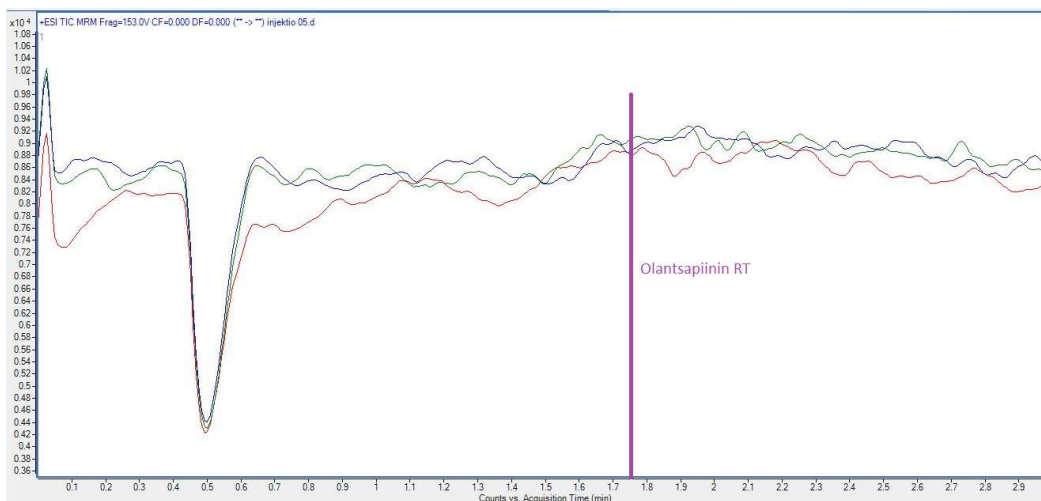
Näyte	Kaikki osallistuneet laboratoriot		Uusi (LC-MS/MS)		Uusi (LC-MS/MS)		Vanha (HPLC)	
	keskiarvo (nmol/l)	Tulosten keskihajonta (nmol/l)	Tulos 1 (nmol/l)	Z-score	Tulos 2 (nmol/l)	Z-score	Tulos (nmol/l)	Z-score
LGC Round 140 (n=43)	22,3	4,2	27,8	1,32	25,6	0,80	<20	-
LGC Round 146 (n=51)	49,9	8,7	51,6	0,20	49,2	-0,07	31	-1,77
LGC Round 161 (n=61)	320,9	73,2	321,3	0,01	310,9	-0,14	209	-1,74

9.6 Analyttinen säilyvyys

Kaikki analyysitulokset pysyivät kriteerien sisällä, eli tuloksen lasketun pitoisuuden muutos eri analyysikerroilla oli < 15 %. Tulokset on esitetty liitteessä 2.

9.7 Ionisupressio

Menetelmässä ei tapahdu ionisupressiota olantsapiinin retentioajan kohdalla. Kuvasta 21 nähdään että ionisupressiota ilmenee ennen ensimmäistä minuuttia, jonka jälkeen signaali on stabiili. Tämä tapahtuu riittävän kaukana olantsapiinin ja olantsapiini-d8:n retentioajasta, joten se ei aiheuta häiriötä.



Kuva 21. Kolmen rinnakkaisen PBL-näytteen kromatogrammit päällekkäin.

9.8 Matriisivaikutus

Kuuden eri luovuttajan nollaseeruminäytteisiin tehtyjen lisäysten laskettujen pitoisuuksien vaihtelu on pientä ($CV\% < 2,6\%$). Taulukossa 12 on esitettyä matriisivaikutuskokeen tulokset.

Taulukko 13. Eri nollaseerumeihin valmistettujen näytteiden laskettujen pitoisuuksien keskiarvot ja prosentuaaliset variaatiokertoimet.

MQC-L		MQC-H	
Keskiarvo (nmol/l)	47,5	Keskiarvo (nmol/l)	250,8
Keskihajonta (nmol/l)	1,2	Keskihajonta (nmol/l)	5,1
CV%	2,5	CV%	2,0

Lisäksi suoraan asetonitriliin tehtiin QC-L ja QC-H pitoisuuksia vastaavat lisäykset (ACN-QC) ja niiden tuottamaa vastetta verrattiin poolattuihin nollaseerumeihin valmistettujen vastaavien pitoisuuksien näytteiden (MQC) tuottamaan vasteeseen ja laskettuun pitoisuuteen.

MQC -näytteiden vasteet olivat +54 % QC-L – tasolla ja +14 % QC-H – tasolla suuremmat kuin ACN-QC – näytteiden, eli matriisivaikutus on positiivinen. Sisäinen standardi kuitenkin kompensoi eroa, ja laskettujen pitoisuuksien ero oli vain +9,5 % QC-L – tasolla ja +5,3 % QC-H – tasolla.

Matriisivaikutuskokeen tulokset on esitetty liitteessä 4.

9.9 Siirtymävirhe

Menetelmässä tapahtuva siirtymävirhe on hieman yli hyväksyttävän kriteerin (22,6 % > 20 %). Tämä huomioidaan lisäämällä blank-näytteitä korkean pitoisuuden kalibraatio- ja kontrollinäytteiden näytteiden jälkeen, sekä uusimalla näytteet odottamattomien suurten pitoisuuden näytteiden jälkeen. Kriteerien ylitys ei ollut suuri yllätys, sillä CAL6 näytteen pitoisuus on yli 30 kertainen LLOQ-pitoisuuteen nähden. Siirtymävirheen määrittämiseen käytetyt tulokset ovat esitettynä taulukossa 14.

Taulukko 14. CAL6 näytteen jälkeinen siirtymä PBL näytteisiin ja sen prosentuaalinen osuus ISTD:n vasteesta sekä LLOQ:n vasteesta.

Näyte	Vaste, olantsapiini	Siirtymä %, olantsapiini	Vaste, ISTD	Siirtymä %, ISTD	Siirtymä % suhteessa LLOQ, olantsapiini
CAL1	86,6		1765,3		
CAL6	2971,8		1737,8		
PBL	19,6	0,66 %	9,9	0,57 %	22,60 %
PBL	8,7	0,29 %	4,4	0,25 %	10,08 %
PBL	0,8	0,03 %	3,7	0,21 %	0,97 %

9.10 Mittausepävarmuus

Menetelmän mittausepävarmuus (u) ja laajennettu mittausepävarmuus (2*u) laskettiin LGC:n ulkoisten laaduntarkkailunäytteiden, ja jokaisen validointisarjan sisäisten laatu-kontrollien tuloksista. Taulukossa 15 on esitettynä menetelmän laskettu mittausepävarmuus sekä laajennettu mittausepävarmuus. Mittausepävarmuuden laskemiseen käytetyt arvot ja laskut ovat esitetty liitteessä 3.

Taulukko 15. Menetelmän mittausepävarmuus ja laajennettu mittausepävarmuus.

	u (%)	2*u (%)	u (%) korvattava menetelmä
QC-L	10,2	20,4	17
QC-M	8,3	16,6	
QC-H	10,9	21,8	
Keskiarvo		19,6	

	u (%)	2*u (%)	u (%) korvattava menetelmä
LGC-tulos 1	16,7	33,4	17
LGC-tulos 2	12,0	24,0	
Keskiarvo		28,7	

9.11 Spesifisyys

Vertailukokeen yhteydessä analysoitujen potilasnäytteiden tuloksissa tai ionisuhteissa ei havaittu häiriöitä. Näytteiden tulokset ovat esitettynä liitteessä 10.

10 Yhteenveto ja johtopäätökset

Menetelmän validointi onnistui hyvin. Validoitavat parametrit täyttivät hyväksyttävät kriteerit. Tulosten pohjalta voidaan sanoa, että menetelmä oli spesifinen ja selektiivinen olantsapiinille. Menetelmän tarkkuus ja oikeellisuus olivat erinomaisia. Vertailukokeissa analysoitujen potilasnäytteiden tuloksissa oli havaittavissa negatiivinen trendi vanhan menetelmän tuloksiin nähden, mutta niistä ei ollut tarvetta huolestua, sillä ulkoisten laaduntarkkailunäytteiden tulokset osoittivat uuden menetelmän olevan vanhaa tarkempi. Mittausalue oli lineaarinen. Mittausepävarmuus oli vähintään samaa tasoa kuin korvattavalla menetelmällä. Korvattavan menetelmän laskettuun mittausepävarmuuteen tuli kuitenkin suhtautua varauksella, sillä se oli laskettu vain kahden rinnakkaisen laaduntarkkailunäytteen pohjalta. Validoitu menetelmä soveltuu erinomaisesti olantsapiinin määrittämiseen seerumista.

Mahdollisia riskejä aiheuttaa pienen seerumivolyymien pipetointi tarkasti ja toistettavasti. Pipetin kärki tulee huuhdella näytteellä ennen sen annostelua adsorption estämiseksi. Validoinnissa määritetty toistettavuus ja oikeellisuus osoittivat, että menetelmän sisäinen hajonta on pientä. Validoinnin yhteydessä havaittiin myös pientä siirtymävirhettä erittäin suurten pitoisuuksien jälkeen. Tämän estämiseksi injektorissa käytetään neulanpesuohjelmaa, sekä sekvenssiin lisätään nollanäyteinjektio aina suurimman pitoisuuden kalibrointinäytteen jälkeen. Potilasnäytteet uusitaan, mikäli epäillään siirtymää edellisestä näytteestä.

Menetelmä otettiin käyttöön välittömästi validointiprojektin valmistuttua. Uusi LC-MS/MS-tekniikkaan perustuva menetelmä osoittautui odotusten ja tavoitteiden mukaisesti nopeammaksi ja tarkemmaksi kuin vanha LC-tekniikkaan perustuva menetelmä.

Lähteet

- 1 AGNP Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry: Update
- 2 Ju-Seop, Kang & Min-Ho, Lee. 2009. Overview of Therapeutic Drug Monitoring. Hanyang University College of Medicine, Seoul, Korea.
- 3 Baselt C Randall, Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man, 10th ed., Biomedical Publication, Seal Beach, CA, USA
- 4 ChemSpider, Olanzapine. <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10442212.html>>. Verkkodokumentti. Luettu 20.4.2018.
- 5 Patteet, Lisbeth ym. 2012 Therapeutic Drug Monitoring of Common Antipsychotics, 639-640
- 6 OLANZAPIN ORION tabletti 2,5 mg, 5 mg 7,5 mg, 10 mg, 15 mg Pharmaca Fennica-seloste. Verkkodokumentti. <<https://pharmacafenica.fi/spc/4008673>>. Luettu 16.4.2018.
- 7 2011WADA Technical Document – TD2015IDCR. Verkkodokumentti. <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2015idcr_-_eng.pdf>. Luettu 16.4.2018.
- 8 Harris, Daniel. Quantitative Chemical Analysis 8th edition. W. H. Freeman Co Ltd. 2010.
- 9 High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principle, Types, Instrumentation and Applications. 2015. Verkkodokumentti. <<https://laboratoryinfo.com/hplc/>>. Luettu 27.4.2018.
- 10 Restek Raptor Biphenyl LC Columns -seloste. <<http://www.restek.com/pdfs/GNBR1891B-UNV.pdf>>. Verkkodokumentti. Luettu 24.4.2018.
- 11 Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS). Verkkodokumentti. <https://www.labce.com/spg1069800_liquid_chromatography_with_tandem_mass_spectrometr.aspx>. Luettu 27.4.2018.
- 12 Triple Quadrupole Mass Spectrometry. Verkkodokumentti. <<https://www.creative-proteomics.com/technology/triple-quadrupole-mass-spectrometry.htm>>. Luettu 27.4.2018.
- 13 Pitt, James. 2009. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. VCGS Pathology, Murdoch Children's Research Institute, Royal Children's Hospital, Melbourne.
- 14 Guideline on biomedical method validation. European Medicines Agency, EMA. 2011.
- 15 Kemia metrologian opas. 2005. Mittatekniikan keskus, MIKES.

Liite 1: Validointisarjat

Validointisarja 1: Selektiivisyys

- Näytteet:
 - Reagenssiblank (RBL), ilman ISTD:ta ja sen kanssa
 - Seerumiblank (SBL), ilman ISTD:ta ja sen kanssa
 - Tutkittavan analyysin kohdalta negatiivisia seeruminäytteitä (n=10)
 - CAL6 pitoisuuden näyte ilman ISTD:ta

Validointisarja 2: Sarjan sisäinen satunaisvirhe ja siirtymävirhe

- Näytteet:
 - Kuusi rinnakkaisnäytettä viidellä eri pitoisuustasolla (CAL1, QC-L, QC-M, QC-H, CAL6)
 - Kolme SBL näytettä CAL6 rinnakkaisnäytteiden jälkeen

Validointisarja 3: Matriisivaikutus, analyttinen säilyvyys

- Näytteet:
 - Sarjan 2 CAL1 pitoisuuden rinnakkaisnäytteet
 - Negatiivisiin seeruminäytteisiin lisätyt QC-L ja QC-H pitoisuustasojen näytteet (n=12)

Validointisarja 4: Matriisivaikutus, analyttinen säilyvyys

- Näytteet:
 - Sarjan 2 CAL1 pitoisuuden rinnakkaisnäytteet
 - Asetonitriliin lisätyt QC-L ja QC-H pitoisuustasojen näytteet
 - Sarjan 3 negatiivisiin seeruminäytteisiin lisätyt QC-L ja QC-H pitoisuustasojen näytteet (n=12)
- Huomioita:

- Matriisivaikutuskoe päätettiin uusia myöhemmissä sarjoissa näytteiden valmistusvirheeseen viittaavan tuloksen vuoksi

Validointisarja 5: Systemaattinen virhe

- Näytteet:
 - Vanhoja, korvattavalla menetelmällä aikaisemmin analysoituja potilasnäytteitä (n=19)
 - LGC:n ulkoisia laaduntarkkailunäytteitä (n=3)
- Huomioita:
 - Matriisivaikutuskoe päätettiin uusia kokonaan kuudennessa sarjassa

Validointisarja 6: Matriisivaikutus ja systemaattinen virhe

- Näytteet:
 - Vanhoja, korvattavalla menetelmällä aikaisemmin analysoituja potilasnäytteitä (n=10) varmistukseksi sarjan 5. vertailunäytteiden trendistä.
 - Sarjassa 3 käytetyistä nollaseeruminäytteistä poolattuun matriisiin valmistettuja QC-L ja QC-H pitoisuustasojen näytteitä (n=3 ja 3)
 - Suoraan asetoniitriliin valmistettuja QC-L ja QC-H pitoisuustasojen näytteitä (n=3 ja 3)

Liite 2: Analyttisen säilyvyyskokeen tulokset:

Näyte	1d		2d		5d	
	Tulos 0d (nmol/l)	Tulos (nmol/l)	Muutos%	Tulos 5d (nmol/l)	Muutos%	
CAL1STa	21,30	22,53	5,77	21,45	0,68	
CAL1STb	20,13	22,33	10,93	22,03	9,40	
CAL1STc	21,46	21,97	2,39	23,82	11,02	
CAL1STd	21,60	22,85	5,77			
CAL1STe	19,24	21,65	12,54	21,34	10,92	
CAL1STf	18,27	20,87	14,25	19,52	6,86	

Liite 3: Mittausepävarmuuden laskeminen

= saatavilla oleva tulos



= laskettu väli tulos



= lopullinen tulos ja sen laskentaan käytetyt tulokset

EQAS

= kierroksen päivämäärä

n (lab)

= kierrokselle osallistuneiden labrojen lkm

RSD (lab)

= kierrokselle osallistuneiden labrojen tulosten kesk.hajonta

Ref x (lab)

= kierrokselle osallistuneiden labrojen tulosten keskiarvo (referenssiarvo)

Oma

= oma saatu tulos

bias

= oma tuloksen ero referenssiarvosta

u (ref)

= referenssin epävarmuus

$$u_{\text{ref}} = \sqrt{SD_{\text{lab}}^2 / n_{\text{lab}}}$$

u (bias)

= biasin epävarmuus

$$u_{\text{bias}} = \sqrt{\text{bias}^2 + u_{\text{ref}}^2}$$

RMS u (bias)

= eri bias-tulosten yhdistäminen

$$u_{\text{bias(RMS)}} = \sqrt{(\text{bias}_1^2 + \text{bias}_2^2 + \dots + \text{bias}_n^2) / n}$$

QC u (prec)

= QC-näytteen sarjojen välinen toistettavuus (%)

u (c)

= yhdistetty mittausepävarmuus (%)

$$u_c = \sqrt{u_{\text{prec}}^2 + u_{\text{bias}}^2}$$

2 (4)

LGC sarja
5

EQAS	n (lab)	Ref		
		SD (lab)	x (lab)	Oma
140	43	4,206	22,28	27,8
146	51	8,726	49,85	51,6
161	61	73,218	320,93	321,3

bias	u (ref)	u (bias)	r ²	SUM r ²	n	RMS	QC-M	u (c)
						u (bias)	u (prec)	
25,0	0,6	25,0	624,1	726,2	3	15,6	5,94	16,65
3,6	1,2	3,8	14,2					
0,1	9,4	9,4	87,9					

QC-L

Ref	Oma
48,00	44,50
48,00	47,71
48,00	48,28
48,00	50,14
48,00	48,76
48,00	55,78

bias	u (ref)	u (bias)	r ²	SUM r ²	n	RMS	QC-L	u (c)
						u (bias)	u (prec)	
-7,3	0,0	7,3	53,1	339,1	6	7,5	6,91	10,2
-0,6	0,0	0,6	0,4					
0,6	0,0	0,6	0,3					
4,5	0,0	4,5	19,8					
1,6	0,0	1,6	2,5					
16,2	0,0	16,2	262,9					

3 (4)

QC-M

Ref	Oma
192,00	182,14
192,00	195,05
192,00	185,05
192,00	193,75
192,00	174,27
192,00	208,97

bias	u (ref)	u (bias)	r ²	SUM r ²	n	RMS u (bias)	QC-M u (prec)	u (c)
-5,1	0,0	5,1	26,4	206,3	6	5,9	5,94	8,3
1,6	0,0	1,6	2,5					
-3,6	0,0	3,6	13,1					
0,9	0,0	0,9	0,8					
-9,2	0,0	9,2	85,3					
8,8	0,0	8,8	78,1					

QC-H

Ref	Oma
336,00	359,97
336,00	357,70
336,00	346,30
336,00	369,58
336,00	350,51
336,00	399,62

bias	u (ref)	u (bias)	r ²	SUM r ²	n	RMS u (bias)	QC-H u (prec)	u (c)
7,1	0,0	7,1	50,9	579,1	6	9,8	4,83	10,9
6,5	0,0	6,5	41,7					
3,1	0,0	3,1	9,4					
10,0	0,0	10,0	99,9					
4,3	0,0	4,3	18,6					
18,9	0,0	18,9	358,5					

4 (4)

LGC erä
246

EQAS	n (lab)	Ref		
		SD (lab)	x (lab)	Oma
140	43	4,206	22,28	25,63
146	51	8,726	49,85	49,20
161	61	73,218	320,93	310,85

bias	u (ref)	u (bias)	r ²	SUM r ²	n	RMS	QC-M	u (c)
						u (bias)	u (prec)	
15,0	0,6	15,0	225,8	326,8	3	10,4	5,94	12,01
-1,3	1,2	1,8	3,2					
-3,1	9,4	9,9	97,7					

Liite 4: Matriisivaikutuskokeen tulokset

Näyte	Vaste (OLA)	Laskettu pitoisuus (nmol/l)	Vaste (ISTD)
M1QC-L	187,33	48,27	1618,84
M2QC-L	176,20	46,45	1589,18
M3QC-L	174,76	46,29	1582,19
M4QC-L	180,26	47,46	1587,43
M5QC-L	175,96	47,00	1566,39
M6QC-L	186,04	49,80	1552,95
M1QC-H	1021,91	249,28	1571,68
M2QC-H	996,44	243,91	1566,94
M3QC-H	1012,64	245,73	1580,42
M4QC-H	1045,53	258,80	1547,80
M5QC-H	1014,25	252,82	1537,67
M6QC-H	1046,37	254,34	1576,71

Näyte	Vaste (OLA)	Laskettu pitoisuus (nmol/l)
MQC-La	1069,48	63,62971076
MQC-Lb	1052,53	64,91943307
MQC-Lc	1071,93	64,81094232
Keskiarvo	1064,65	64,45

Näyte	Vaste (OLA)	Laskettu pitoisuus (nmol/l)
ACN-QC-La	810,30	57,26992618
ACN-QC-Lb	488,20	61,37184572
ACN-QC-Lc	780,93	57,8943667
Keskiarvo	693,15	58,85

Näyte	Vaste (OLA)	Laskettu pitoisuus (nmol/l)
MQC-Ha	7673,81	423,5350393
MQC-Hb	7828,97	458,4494232
MQC-Hc	7716,35	462,2871397
Keskiarvo	7739,71	448,09

Näyte	Vaste (OLA)	Laskettu pitoisuus (nmol/l)
ACN-QC-Ha	6740,61	426,3888151
ACN-QC-Hb	6913,21	434,3646559

ACN-QC-Hc	6795,89	425,442532
Keskiarvo	6816,57	428,73

Liite 5: Sarjojen sisäisen satunnaisvirheen laskemiseen käytetyt tulokset

Olantsapiini					
Näyte	RT	Vaste	Laskettu pitoisuus (nmol/l)	Tavoitepitoisuus (nmol/l)	bias%
CAL1	1,69	86,63	21,30	19,00	12,13 %
CAL1	1,69	79,21	20,13	19,00	5,96 %
CAL1	1,70	88,07	21,46	19,00	12,95 %
CAL1	1,69	88,73	21,60	19,00	13,71 %
CAL1	1,69	77,52	19,24	19,00	1,26 %
CAL1	1,70	72,12	18,27	19,00	-3,86 %
QC-L	1,70	206,60	47,71	48,00	-0,61 %
QC-L	1,69	216,00	50,34	48,00	4,88 %
QC-L	1,70	190,23	43,03	48,00	-10,36 %
QC-L	1,70	212,24	48,37	48,00	0,76 %
QC-L	1,70	213,58	48,51	48,00	1,05 %
QC-L	1,70	193,77	44,16	48,00	-8,01 %
QC-M	1,70	872,02	195,05	192,00	1,59 %
QC-M	1,70	848,19	187,94	192,00	-2,12 %
QC-M	1,69	855,29	188,06	192,00	-2,05 %
QC-M	1,70	835,14	188,01	192,00	-2,08 %
QC-M	1,70	866,98	191,14	192,00	-0,45 %
QC-M	1,69	820,44	178,33	192,00	-7,12 %
QC-H	1,69	1658,27	357,70	336,00	6,46 %
QC-H	1,69	1542,04	326,11	336,00	-2,94 %
QC-H	1,69	1517,40	327,27	336,00	-2,60 %
QC-H	1,69	1526,98	334,38	336,00	-0,48 %
QC-H	1,69	1622,29	343,86	336,00	2,34 %
QC-H	1,70	1688,42	369,83	336,00	10,07 %
CAL6	1,69	3140,71	678,51	640,00	6,02 %
CAL6	1,69	3033,12	667,76	640,00	4,34 %
CAL6	1,69	3163,50	692,59	640,00	8,22 %
CAL6	1,69	3120,59	689,27	640,00	7,70 %
CAL6	1,69	3102,97	681,09	640,00	6,42 %
CAL6	1,69	2971,75	640,72	640,00	0,11 %

Liite 6: Selektiivisyyden määrittämiseen käytetyt tulokset

Näyte	Olantsapiini		Olantsapiini-d8	
	Vaste	% CAL-1 vasteesta	Vaste	% istd vasteesta
RBL (-ISTD)	0,65	0,66	0,00	0,00
SBL (-ISTD)	0,36	0,36	0,06	0,00
RBL	0,61	0,61		
SBL	0,30	0,30		
F1	7,74	7,81	74,36	4,24
F2	2,66	2,69	11,74	0,67
F3	0,97	0,98	5,78	0,33
F4	0,69	0,70	0,17	0,01
F5	0,81	0,81	2,25	0,13
M1	0,21	0,21	0,15	0,01
M2	1,42	1,44	1,20	0,07
M3	0,30	0,30	1,86	0,11
M4	1,02	1,03	0,77	0,04
M5	1,09	1,10	1,19	0,07
CAL6 ei istd	3776,03		72,73	4,15

Liite 7: Olantsapiinin tunnistamiseen käytettävien ionifragmenttien vasteiden CV%:n, sekä ionisuhteiden CV%:n laskemiseen käytetyt tulokset

Taulukko 11: Olantsapiinin tunnistamiseen käytettävien ionifragmenttien vasteiden keskiarvot, sekä niiden ionisuhteiden keskiarvot, ja niistä lasketut CV%:t.

213.0 Fragmentti						
Näyte	Keskiarvo (Vaste)	Keskihajonta (Vaste)	Vaste CV%	Keskiarvo (ionisuhde)	Keskihajonta (ionisuhde)	Ionisuhteen CV%
CAL1	10,04	1,40	13,92	12,28	1,82	14,8
QC-L	27,00	2,20	8,15	13,17	1,29	9,8
QC-M	114,01	5,42	4,75	13,41	0,46	3,4
QC-H	216,42	7,73	3,57	13,59	0,19	1,4
CAL6	413,57	6,79	1,64	13,39	0,17	1,3
197.9 Fragmentti						
Näyte	Keskiarvo (Vaste)	Keskihajonta (Vaste)	Vaste CV%	Keskiarvo (ionisuhde)	Keskihajonta (ionisuhde)	Ionisuhteen CV%
CAL1	15,26	1,40	9,18	18,62	1,31	7,0
QC-L	36,92	3,27	8,86	17,97	1,36	7,6
QC-M	158,34	5,36	3,39	18,63	0,46	2,5
QC-H	294,58	12,62	4,28	18,50	0,25	1,3
CAL6	567,89	23,80	4,19	18,38	0,51	2,8
169.0 Fragmentti						
Näyte	Keskiarvo (Vaste)	Keskihajonta (Vaste)	Vaste CV%	Keskiarvo (ionisuhde)	Keskihajonta (ionisuhde)	Ionisuhteen CV%
CAL1	6,66	0,72	10,78	8,14	0,92	11,3
QC-L	16,32	1,41	8,65	7,94	0,56	7,1
QC-M	68,16	2,50	3,66	8,03	0,38	4,8
QC-H	130,70	5,71	4,37	8,21	0,14	1,7

CAL6	248,82	4,34	1,74	8,06	0,13	1,6
84.1 Fragmentti						
Näyte	Keskiarvo (Vaste)	Keskihajonta (Vaste)	Vaste CV%	Keskiarvo (ionisuhde)	Keskihajonta (ionisuhde)	Ionisuhteen CV%
CAL1	21,23	1,33	6,25	25,93	1,32	5,1
QC-L	55,44	3,43	6,19	26,99	0,96	3,5
QC-M	230,06	5,37	2,33	27,08	0,23	0,8
QC-H	428,56	20,62	4,81	26,90	0,26	1,0
CAL6	830,99	15,08	1,81	26,91	0,23	0,8

Liite 8: Sarjojen sisäinen toistettavuus ja oikeellisuus sisäisen standardin osalta. Retentioajan toistettavuus ja ionifragmenttien vasteiden CV%, sekä ionisuhteiden CV%

Olantsapiini-d8	
Näyte	RT
CAL1	1,66
CAL1	1,66
CAL1	1,66
CAL1	1,66
CAL1	1,66
CAL1	1,67
QC-L	1,66
QC-L	1,66
QC-L	1,66
QC-L	1,66
QC-L	1,67
QC-L	1,67
QC-M	1,66
QC-M	1,66
QC-M	1,66
QC-M	1,66
QC-M	1,66
QC-M	1,66
QC-H	1,66
QC-H	1,66
QC-H	1,66
QC-H	1,66

213.0 Fragmentti						
Näyte	Keskiarvo (Vaste)	Keskihajonta (Vaste)	Vaste CV%	Keskiarvo (ionisuhde)	Keskihajonta (ionisuhde)	Ionisuhteen CV%
CAL1	323,45	4,41	1,36	18,33	0,25	1,3
QC-L	320,26	3,26	1,02	18,39	0,24	1,3
QC-M	312,85	5,58	1,78	18,27	0,17	0,9
QC-H	321,59	4,57	1,42	18,42	0,28	1,5
CAL6	308,67	5,49	1,78	18,00	0,24	1,3
197.9 Fragmentti						
Näyte	Keskiarvo (Vaste)	Keskihajonta (Vaste)	Vaste CV%	Keskiarvo (ionisuhde)	Keskihajonta (ionisuhde)	Ionisuhde CV%
CAL1	465,45	4,89	1,05	26,37	0,20	0,8
QC-L	456,96	7,48	1,64	26,24	0,58	2,2
QC-M	453,19	7,71	1,70	26,47	0,42	1,6
QC-H	463,43	7,56	1,63	26,54	0,43	1,6
CAL6	454,12	6,23	1,37	26,49	0,40	1,5
169.0 Fragmentti						
Näyte	Keskiarvo (Vaste)	Keskihajonta (Vaste)	Vaste CV%	Keskiarvo (ionisuhde)	Keskihajonta (ionisuhde)	Ionisuhde CV%
CAL1	206,43	1,77	0,86	11,70	0,17	1,4
QC-L	205,52	5,35	2,61	11,80	0,24	2,0
QC-M	200,55	2,38	1,19	11,71	0,21	1,8
QC-H	207,04	7,09	3,42	11,86	0,40	3,4
CAL6	197,31	2,54	1,29	11,51	0,18	1,6
90.1 Fragmentti						
Näyte	Keskiarvo (Vaste)	Keskihajonta (Vaste)	Vaste CV%	Keskiarvo (ionisuhde)	Keskihajonta (ionisuhde)	Ionisuhde CV%
CAL1	494,06	5,85	1,18	27,99	0,15	0,5
QC-L	490,78	8,42	1,72	28,18	0,37	1,3
QC-M	483,99	6,43	1,33	28,26	0,26	0,9
QC-H	495,60	7,39	1,49	28,38	0,40	1,4

Liite 8

4 (4)

CAL6	482,83	9,66	2,00	28,16	0,36	1,3
------	--------	------	------	-------	------	-----

Liite 9: Sarjojen välisen toistettavuuden määrittämiseen käytetyt tulokset.

	Näyte	Tavoitepitoisuus (nmol/l)	Laskettu pitoisuus (nmol/l)	bias%
Sarja 1	CAL1	19,00	20,13	5,93 %
	CAL6	640,00	667,30	4,27 %
	QC-L	48,00	44,50	-7,29 %
	QC-M	192,00	182,14	-5,13 %
	QC-H	336,00	359,97	7,13 %
Sarja 2	CAL1	19,00	20,11	5,82 %
	CAL6	640,00	680,53	6,33 %
	QC-L	48,00	47,71	-0,61 %
	QC-M	192,00	195,05	1,59 %
	QC-H	336,00	357,70	6,46 %
Sarja 3	CAL1	19,00	20,88	9,88 %
	CAL6	640,00	693,36	8,34 %
	QC-L	48,00	48,28	0,59 %
	QC-M	192,00	185,05	-3,62 %
	QC-H	336,00	346,30	3,07 %
Sarja 4	CAL1	19,00	21,27	11,96 %
	CAL6	640,00	689,57	7,75 %
	QC-L	48,00	50,14	4,45 %
	QC-M	192,00	193,75	0,91 %
	QC-H	336,00	369,58	9,99 %
Sarja 5	CAL1	19,00	18,93	-0,39 %
	CAL6	640,00	646,96	1,09 %
	QC-L	48,00	48,76	1,59 %
	QC-M	192,00	174,27	-9,24 %
	QC-H	336,00	350,51	4,32 %
Sarja 6	CAL1	19,00	19,05	0,27 %
	CAL6	640,00	640,98	0,15 %
	QC-L	48,00	55,78	16,22 %
	QC-M	192,00	208,97	8,84 %
	QC-H	336,00	399,62	18,93 %

Liite 10: Vertailumittausten tulokset ja niistä lasketut prosentuaaliset erot

Näyte	Uusi (LC-MS/MS)	Vanha (HPLC)	Ero%
	Pitoisuus (nmol/l)	Pitoisuus (nmol/l)	
L17010276	84,55	86,00	-1,68 %
L17010159	67,49	71,00	-4,94 %
L17010158	110,48	129,00	-14,36 %
L17010142	150,21	147,00	2,18 %
L17010140	339,48	364,00	-6,74 %
L17010137	6,35	0,00	
L17010369	290,32	329,00	-11,76 %
L17010317	34,47	39,00	-11,62 %
L17010279	52,45	53,00	-1,05 %
L17009982	89,44	101,00	-11,44 %
L17010027	146,52	159,00	-7,85 %
L17010036	87,95	105,00	-16,24 %
L17010110	142,09	155,00	-8,33 %
L17009090	216,80	300,00	-27,73 %
L17009165	117,37	132,00	-11,08 %
L17009328	265,33	322,00	-17,60 %
L17009608	70,33	87,00	-19,16 %
L17009295	116,91	142,00	-17,67 %
L17009605	34,19	38,00	-10,03 %
L17010988	66,88	77,00	-13,14 %
L17010567	162,47	184,00	-11,70 %
L17010838	456,03	494,00	-7,69 %
L17010676	380,47	461,00	-17,47 %
L17010623	252,64	283,00	-10,73 %
L17010450	268,96	317,00	-15,15 %
L17010404	225,07	249,00	-9,61 %
L17010462	308,21	356,00	-13,42 %
L17010504	91,05	103,00	-11,60 %
L17010447	137,99	143,00	-3,50 %
		Keskiarvo	-11,11 %

Liite 11. Esimerkki tulosraportista (Cal 1 näyte)

Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy

Analysis Info

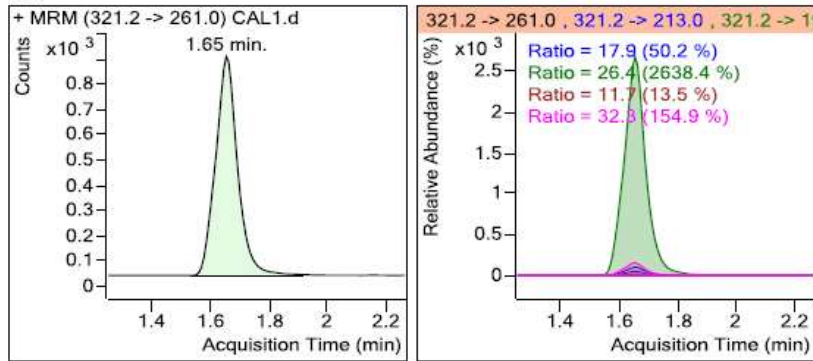
DataPathName D:\MassHunter\Data\OLA\ola_247u
 DataFileName CAL1.d
 AcqOperator AL
 Acq Time 2017-06-14 14:11
 InstrumentName Instrument 1
 Acq Method Finalolanzapine.m
 Sample Name CAL1
 Comment
 Position P1-A3

Name	Transition	RT	Response	Conc	Q1	Q1-RT	Q1-Area	Q1-RR
Olanzapine-d8	321.2 -> 261.0	1,654	4547		321.2 -> 213.0	1,654	812	17,9

Name	Transition	RT	Response	Conc	Q1	Q1-RT	Q1-Area	Q1-RR
Olanzapine	313.2 -> 256.0	1,683	256	18,37 nmol/l	313.2 -> 213.0	1,683	35	13,8

Olanzapine-d8

ISTD



Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy

