

Auri Lomperi

Muuntohuumeiden pitoisuusmääritykset neste- kromatografilla ja typpispesifisellä kemilumi- nesenssidetektorilla

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri

Kemiantekniikka

Insinööryö

20.05.2014

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Auri Lomperi Muuntohuumeiden pitoisuusmääritykset nestekromatografilla ja tyypispesifisellä kemiluminesenssidetektroilla 26 sivua + 6 liitettä 20.05.2014
Tutkinto	Insinööri
Koulutusohjelma	Kemiantekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Prosessitekniikka
Ohjaajat	Oikeuskemisti, FT Ilpo Rasanen Yliopettaja, FT Pekka Lehtonen
<p>Tämän insinööryön tarkoituksena oli määrittää muuntohuumeiden pitoisuuksia takavarikonäytteistä käyttäen tyypispesifistä kemiluminesenssidetektoria (LC-CLND-menetelmä). Työn kokeellinen osuus suoritettiin Helsingin yliopiston Hjelt-instituutin oikeuslääketieteen osaston toksikologian laboratoriossa.</p> <p>Nestekromatografi, johon on liitetty tyypispesifinen kemiluminesenssidetektori (LC-CLND), mahdollistaa muuntohuumeiden kvantitatiivisen määrittämisen. Tällöin voidaan käyttää sekundaaristandardina esimerkiksi kofeiinia. Menetelmän soveltuvuutta takavarikonäytteiden tutkimuksiin on tutkittu vähän.</p> <p>Muuntohuumeilla eli design-huumeilla tarkoitetaan huumeita, joiden kemiallista koostumusta on muokattu. Muuntohuumeilla pyritään saamaan alkuperäisen huumeen kaltaiset vaikutukset. Niiden analysointi perinteisiä menetelmiä käyttäen on osoittautunut vaikeaksi referenssistandardien rajallisen saatavuuden takia.</p> <p>Takavarikonäytteet saatiin Tullilaboratoriosta ja Keskusrikospoliisin rikosteknisestä laboratoriosta. Näytteistä valmistettiin metanoliin liuokset, joista valmistettiin rinnakkaislaimenokset.</p> <p>Työssä määritettiin LC-CLND-menetelmän lineaarisuus, detektoriraja (LOD) ja kvantitointiraja (LOQ), toistettavuus, mittausepävarmuus sekä tarkasteltiin menetelmän ekvimolaarisuutta.</p> <p>Kofeiini on edullinen, helposti saatavilla oleva tyyppiä sisältävä aine. Työssä saatujen tulosten perusteella kofeiini soveltuu hyvin tyyppiä sisältäväksi standardiaineeksi huumeiden pitoisuusmäärityksiin.</p>	
Avainsanat	muuntohuumeet, nestekromatografi, LC-CLND

Author Title	Auri Lomperi The determination of the concentration of designer drugs using a Nitrogen Specific Liquid Chromatograph with Chemiluminescence Detector
Number of Pages Date	26 pages + 6 appendices 20 May 2014
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Chemical Engineering
Specialisation option	Process Engineering
Instructor(s)	PhD, Ilpo Rasanen PhD, Pekka Lehtonen
<p>The goal of this Bachelor's thesis was to determine the concentrations of confiscated designer drugs using LC-CLND method. The experimental part of this Bachelor's thesis was performed in Helsinki University's Hjelt Institute's Department of Forensic Medicine at the Laboratory of Toxicology.</p> <p>The Nitrogen Specified Chemiluminescence Detector which is connected to the liquid chromatograph (LC-CLND) allows the quantitative determination of designer drugs. At that point it is possible to use for instance caffeine as a secondary standard. The suitability of this method for confiscated designer drugs has been researched very little.</p> <p>Designer drugs stand for drugs whose chemical structure has been changed. The intention of using designer drugs is to have a similar effect to the original drug. The analysis of designer drugs using original methods has turned out to be difficult because of the limited availability of reference standards.</p> <p>The confiscated drugs were received from the Finnish Customs Laboratory and National Bureau of Investigation Laboratory. Methanol solutions were made out of each drug and parallel dilutions were prepared out of these.</p> <p>In this Bachelor's thesis the linearity, limit of detection, limit of quantification, accuracy of repetition, ambivalence of determination and the equimolarity of this method were researched.</p> <p>Caffeine is an easily available, inexpensive nitrogen containing substance. According to the results that were received during the research, it was found that caffeine suits well as a standard substance to the determination of the concentration of drugs.</p>	
Keywords	designer drugs, liquid chromatograph, LC-CLND

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Teoreettinen osa	2
2.1	Tutkimuksen tarkoitus	2
2.2	Validointi	2
2.3	Muuntohuumeet	3
2.4	Nestekromatografia	7
2.5	Nestekromatografi (LC)	7
2.5.1	Laitteisto	8
2.5.2	Detektio- eli toteamisraja	9
2.5.3	Kvantitointi- eli määritysraja	10
2.5.4	Toistettavuus	11
2.5.5	Kolonni ja kolonniuuni	11
2.5.6	CLND	11
3	Kokeellinen osa	13
3.1	Takavarikkonäytteet ja standardit	13
3.2	Menetelmän testaus	14
3.2.1	Lineaarisuus ja mittausalue	14
3.2.2	Toistettavuus	19
3.2.3	Ekvimolaarisuus	20
3.2.4	Mittausepävarmuus	21
4	Tulosten tarkastelu	24
5	Johtopäätökset	26
	Lähteet	27
	Liitteet	
	Liite 1. MDPV	
	Liite 2. Amfetamiini	
	Liite 3. Kokaiini	
	Liite 4. MDMA	
	Liite 5. Metyloni	
	Liite 6. Mefedroni	

Käytetyt lyhenteet ja käsitteet

2-DPMP	desoksi pipradroli, "Daisy"
4-MEC	4-metyyli-N-etyylikatinoni
analyytti	tutkittava aine
average	keskiarvo
bias-%	systemaattinen virhe, poikkeama
CLND	typpispesifinen kemiluminesenssidetektorin (Chemiluminescent Nitrogen Detection)
CV %	variaatiokerroin
detektoriraja	toteamisraja
FA	muurahaishappo (formic acid)
KRP	Keskusrikospoliisi
kvantitointiraja	määrittäysraja
lineaarinen alue	tuloksen oikeellisuus < ~10 % (kofeiinistandardit)
LOD	detektoriraja (Limit of Detection)
LOQ	kvantitointiraja (Limit of Quantification)
matriisi	näytetausta
MDMA	3,4-metyleenidioksimetamfetamiini
MDPV	metyleenidioksi pyrovaleroni
MeOH	metanoli
NO	typpimonoksidi
NO ₂	typpidioksidi
O ₂	happi
O ₃	otsoni
referenssimenetelmä	jonkin kansainvälisen organisaation hyväksymä testimenetelmä
retentioaika	aika, joka kuluu mittauksen aloituksesta siihen kun yhdiste päätyy detektorille
sekvenssi	sarja, jono, jakso
standard deviation (stdev)	keskihajonta
tarkkuus	ekvimolaarisuus (yhdistekohtainen)

1 Johdanto

Tämän insinööriyön tarkoituksena oli määrittää pitoisuuksia erilaisille muuntohuume-näytteille käyttäen LC-CLND-analyysimenetelmää. Työn kokeellinen osuus suoritettiin Helsingin yliopiston Hjelt-instituutin oikeuslääketieteen osaston toksikologian laboratoriossa.

LC-CLND-menetelmän soveltuvuutta muuntohuumeiden analytiikkaan on tutkittu hyvin vähän. Menetelmässä muuntohuumeiden sekundaaristandardiksi soveltuu mikä tahansa tyyppiä sisältävä aine. Kofeiini valittiin sekundaaristandardiksi, koska se on helposti saatavilla ja edullinen.

Työssä tutkittiin muuntohuumeiden pitoisuusmäärittämiä takavarikonäytteistä käyttäen kofeiinia sekundaaristandardina. Työssä määritettiin menetelmän toteamis- ja määrittämisrajat (detektio- ja kvantitointirajat), lineaarinen alue ja toistettavuus sekä arvioitiin tutkittavien yhdisteiden mittausepävarmuutta. Yhdisteillä, joille on saatavilla kaupallinen referenssistandardi, verrattiin kvantitatiivisia tuloksia käyttäen sekä kofeiinia että kaupallista referenssistandardia.

Tullilaboratorio ja Keskusrikospoliisin rikostekninen laboratorio lähettivät oikeuslääketieteen osastolle takavarikoituja huumeita analysoitaviksi LC-CLND-menetelmällä. Suurin osa oikeuslääketieteen osastolle toimitetuista huumeista oli MDPV-huumeita eli metyleenidioksimetamfetamiinia (yhteensä 11 näytettä). Toiseksi eniten oli mefedronia (4-MMC, yhdeksän näytettä). Menetelmällä analysoitiin myös MDMA-huumeita (metyleenidioksimetamfetamiini), metylonia (bk-MDMA), amfetamiinia sekä kokaiinia. Menetelmällä analysoitiin myös yksi 4-MEC- (4-metyyli-N-etyylikatinoni) ja yksi 3-FMA-näyte (3-fluorometamfetamiini).

Lämpimät kiitokset Ilpo Rasaselle ja Pekka Lehtoselle työni ohjaamisesta. Suuret kiitokset myös muille työssä auttaneille.

2 Teoreettinen osa

2.1 Tutkimuksen tarkoitus

Referenssistandardien rajallinen saatavuus hankaloittaa muuntohuumeiden eli designhuumeiden analyysijä perinteisiä analyysitekniikoita käytettäessä. Erityisesti yhdisteiden kvantitatiivinen määrittäminen on ollut lähes mahdotonta. Nestekromatografi, johon on liitetty tyypispesifinen kemiluminesenssitetektori (LC-CLND) mahdollistaa yhdisteiden kvantitatiivisen määrittämisen käyttäen yhtä sekundaaristandardia, esimerkiksi kofeiinia. Menetelmä perustuu detektorin ekvimolaariseen vasteeseen tyyppelle. Riittää, kun tiedetään tutkittavien yhdisteiden suhteellinen tyypipitoisuus. Menetelmä soveltuu takavarikkonäytteiden analyysiin on tutkittu hyvin vähän.

Tässä insinööriyössä määritettiin takavarikkohuumeiden pitoisuuksia. Työssä haluttiin selvittää, soveltuuko LC-CLND muuntohuumeiden pitoisuusmäärittämiin takavarikkonäytteistä. Menetelmässä muuntohuumeiden sekundaaristandardiksi soveltuu mikä tahansa tyyppiä sisältävä aine, sillä suurin osa huumeista sisältää myös tyyppiä. Kofeiini valittiin sekundaaristandardiksi, koska se on helposti saatavilla ja edullista.

Tässä insinööriyössä määritettiin LC-CLND-menetelmän detektio- (toteamisraja, LOD) ja kvantitointirajat (määrittämisraja, LOQ), lineaarinen alue (tuloksen oikeellisuus < ~10 % (kofeiinistandardit)) ja toistettavuus sekä arvioitiin mitattavien yhdisteiden mittausepävarmuutta. Yhdisteillä, joille on saatavilla kaupallinen referenssistandardi, verrattiin kvantitatiivisia tuloksia käyttäen sekä kofeiinia että kaupallista vertailustandardia.

2.2 Validointi

Validoinnilla tarkoitetaan menettelyä, jonka avulla osoitetaan analyysimenetelmän soveltuvuus aiottuun käyttötarkoitukseen. Validoinnin tuloksena syntyvä tieto ja mahdollisesti jo olemassa oleva muu tieto sekä tausta-aineisto kerätään yhteen ja niiden perusteella todetaan menetelmän luotettavuus [1, s. 11.]

Kun näytteiden analysoinnissa käytetään referenssimenetelmiä, eli jonkin kansainvälisen organisaation hyväksymiä testimenetelmiä, validoinnin tavoitteena on osoittaa, että

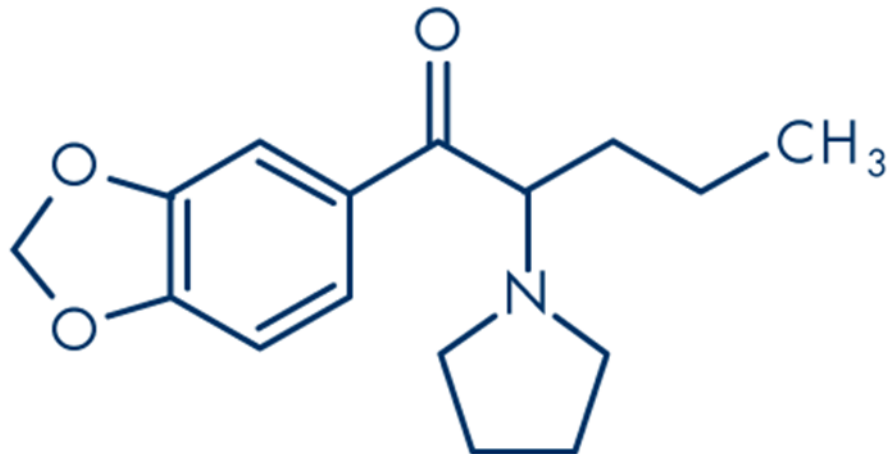
menetelmän luotettavuuskriteerit täyttyvät laboratoriossa, jossa menetelmää käytetään [1, s.11].

Selektiivisyys kertoo, kuinka hyvin analyytit (tutkittavat aineet) voidaan erottaa näytetaustasta ja kuinka niiden pitoisuudet voidaan määrittää, kun näytetaustassa esiintyy useampia komponentteja. Täten analyysimenetelmä on täysin selektiivinen, jos sen avulla analyytti (tutkittava aine) pystytään tunnistamaan muiden komponenttien joukosta [1, s. 11.]

2.3 Muuntohuumeet

Muuntohuumeeksi eli design-huumeeksi sanotaan ainetta, joka vaikuttaa huumausaineen tavoin, mutta jota ei ole luokiteltu huumausainelaisissa huumausaineeksi. Usein kyseessä on huumausainejohdannainen, jossa huumausainemolekyylin kemiallista rakennetta on muutettu. [2]

Suomessa MDPV (Kuvio 1) luokiteltiin huumausaineeksi 28.06.2010. Tämä oli ensimmäinen kerta, kun jokin muuntohuume luokiteltiin huumausaineeksi kansallisella tasolla. Samalla aloitettiin uuden huumausainelain valmistelu, jotta myös jatkossa uusien aineiden kansallinen luokittelu olisi helpompaa. [3]



Kuvio 1. MDPV:n rakennekaava. [4]

Vuonna 2010 Tullilaboratoriossa tutkittiin rikosepäilyihin liittyviä näytteitä 4 912 kappaletta. Edellisvuodesta näytemäärä kasvoi 13 %. Eniten lisääntyivät designhuumeet, joiden prosentuaalinen määrä vuoteen 2009 verrattuna kasvoi 19 %. Vuonna 2010 Tullilaboratorioon toimitetuista näytteistä noin 60 % oli postilähetyksistä, noin 20 % tullitarkastuksista ja noin 20 % kotietsinnöistä peräisin. Osuudet ovat pysyneet lähes samoina jo usean vuoden ajan. [3]

Muuntohuumeiden ja huumaaviin tarkoituksiin käytettävien rohdosten Internettilaaminen on edelleen lisääntynyt vuodesta 2009. Vuonna 2010 Tullilaboratoriossa todettiin kyseessä olevia aineita 459 näytteestä kun vuonna 2009 vastaavia aineita todettiin 296 näytteestä (2008: 144 näytettä). Kaiken kaikkiaan vuonna 2010 tutkimuksissa todettiin 52 erilaista huumaaviin tarkoituksiin käytettävää ainetta ja 13 erilaista rohdosta. [3]

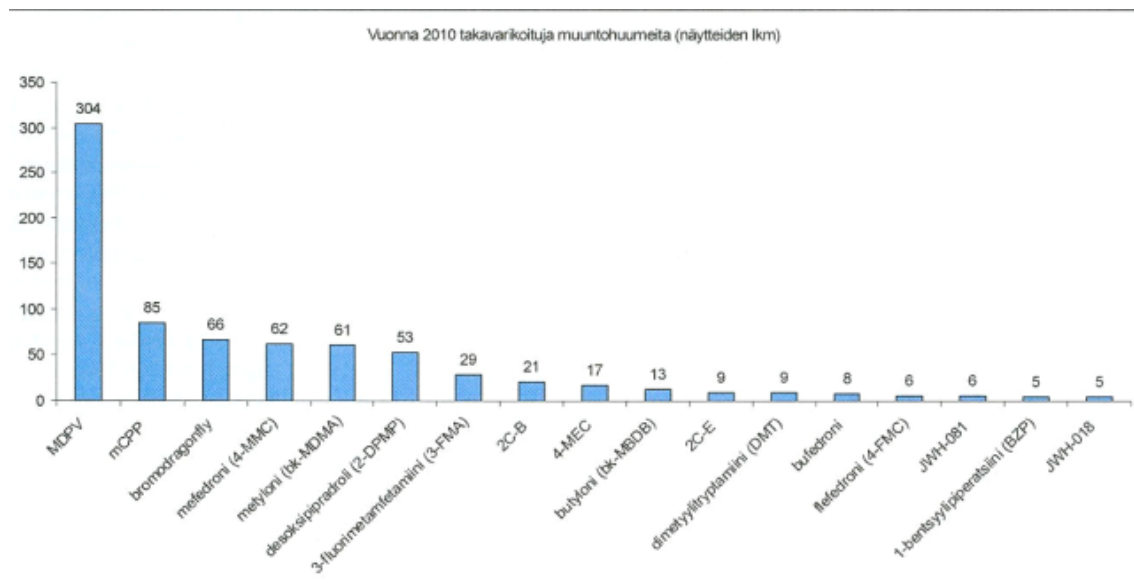
Internetin kautta tilattavat määrät ovat jatkuvasti kasvaneet myös kilomääräisesti tarkasteltuna. Vuonna 2010 Tullilaboratorion tilastojen mukaan suosituimpia muuntohuumeita olivat muun muassa mefedroni, bufedroni, metyloni, 4-MEC, 2-DPMP (desoksi-pipradroli, ”Daisy”) sekä erilaiset synteettiset kannabinoidijauheet, joiden osuus oli kilomääräisesti noin 97 % kaikista muuntohuumeista. [3]

Taulukko 1. Vuosien 2011 ja 2012 takavarikoidut huumaus- ja dopingaineet. [5]

Muut takavarikoidut huumaus- ja dopingaineet				2011	2012
Amfetamiini ja metamfetamiini				99 kg	139 kg
MDPV				2,4 kg	5,1 kg
Ekstaasi				17 800 kpl	23 623 kpl
LSD				1 260 kpl	1 102 kpl
Bromo dragonfly				1 100 kpl	2 653 kpl
Lakka ja gamma				932,5 l	229 l
Heroini				1 kg	0,7 kg
Kokaiini				3,5 kg	25,7 kg
Subutex				31 700 kpl	48 700 kpl
Kat				5 800 kg	1 920 kg
Muut huumelääkevalmisteet				243 000 kpl	76 700 kpl
Dopingaineet				123 000 kpl	135 300 kpl
Lähde: Keskusrikospoliisi					

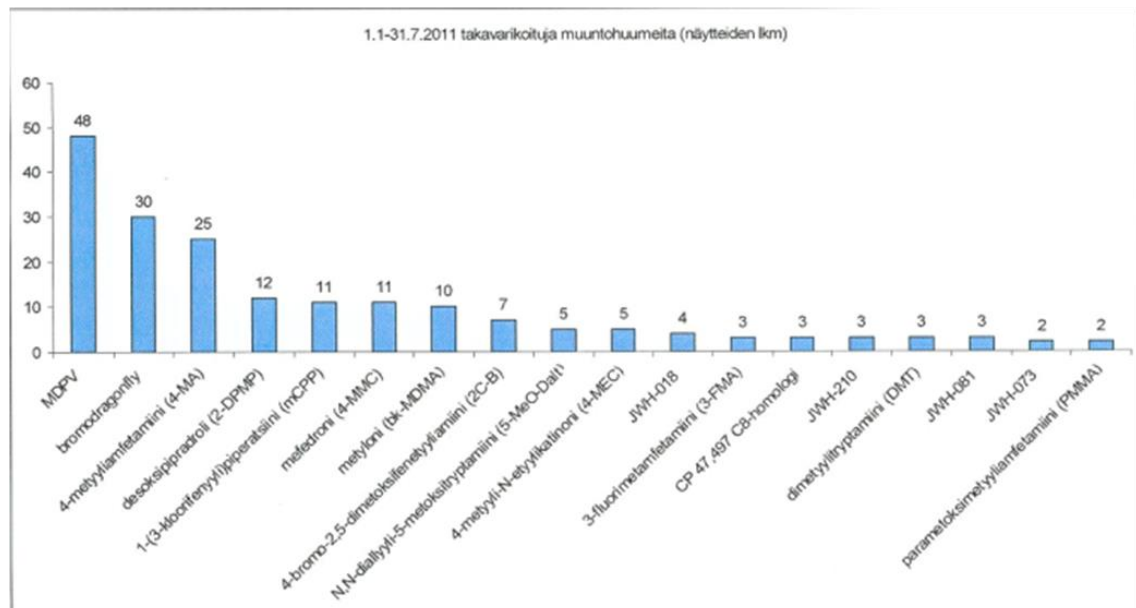
Taulukossa 1 on esitetty vuosien 2011 ja 2012 Keskusrikospoliisin (KRP:n) takavarikoimat huumaus- ja dopingaineet. Suurimmalta osin takavarikoitujen aineiden määrät lisääntyivät vuonna 2012 ja vain muutaman aineen kohdalla määrät vähenivät.

Tullilaboratorion mukaan vuonna 2012 tunnistettiin 98 erilaista muuntohuumetta, joista 38 oli sellaisia, joita ei ole aikaisemmin Suomessa tavattu. Vuonna 2011 Tullilaboratorio tunnisti 85 erilaista muuntohuumetta. Näistä 43:a ei ollut tavattu Suomessa aikaisemmin. [5]



Kuvio 2. Suomessa esiintyneitä yleisimpiä muuntohuumeita vuonna 2010 Keskusrikospoliisin rikosteknisessä laboratoriossa. [6]

Kuviossa 2 on esitetty vuoden 2010 takavarikoitujen muuntohuumeiden lukumäärä Keskusrikospoliisin rikosteknisessä laboratoriossa. MDPV:tä esiintyi selvästi muita takavarikonäytteitä enemmän. Samana vuonna takavarikoituista huumausaineista amfetamiinia esiintyi 2 235 näytteessä, kokaiinia 139 näytteessä ja MDMA:ta 130 näytteessä. [6]



Kuvio 3. Suomessa esiintyneitä yleisimpiä muuntohuumeita takavarikoituna 01.01.-31.07.2011 välisenä aikana. [6]

Kuviossa 3 on esitetty vuoden 2011 alusta saman vuoden heinäkuun loppuun mennessä Keskusrikospoliisin rikostekniseen laboratorioon saapuneet takavarikkonäytteet. [6]

Taulukko 2. Keskusrikospoliisin tilasto takavarikoituista huumausaineista vuosina 2000-2009. [7]

Takavarikoidut huumausaineet 2000-2009

Vuosi	Kiloa						Kpl		
	Hasis	Marihuana	Amfetamiinit	Kokaiini	Heroiini	Kat	Subutex	Ekstaasi	LSD
2000	196,5	13,8	78,3	38,6	6,0	348,4	12 951	87 393	2 355
2001	566,6	13,7	149,7	7,3	7,9	624,1	38 200	82 900	49
2002	482,0	32,0	129,0	0,4	3,0	1 039,0	18 700	45 100	4 680
2003	423,1	45,3	114,6	1,1	1,6	1 879,4	37 284	35 216	1 460
2004	467,4	25,8	108,6	1,1	0,2	2 117,9	32 970	23 243	196
2005	430,6	43,4	116,6	1,2	52,4	2 561,5	24 478	52 210	451
2006	282,7	32,9	129,0	6,5	0,2	3 283,1	22 979	39 185	171
2007	360,0	36,0	152,0	4,0	0,4	3 300,0	20 600	83 000	2 138
2008	47,0 *	56,0	147,0	3,0	0,2	2 250,0	12 000	34 000	3 082
2009	440,0	100,0	115,0	2,8	2,0	3 300,0	17 000	15 100	620

*) Takavarikoidun hasiksen määrän romahtaminen vuonna 2008 johtuu poliisin tutkintatöiden vaiheistuksesta.

Lähde: Keskusrikospoliisi

Taulukossa 2 on esitetty Keskusrikospoliisin laboratoriosta lähetetyt huumausaineet kilogrammoina (hasis, marihuana, amfetamiinit, kokaiini, heroiini ja kat) sekä kappaleina (Subutex, ekstaasi ja LSD) vuosina 2000-2009. [7]

2.4 Nestekromatografia

Kromatografia on kemiallinen erotusmenetelmä, joka perustuu tutkittavan seoksen komponenttien erilaiseen jakautumiseen kahden eri faasin kesken [8, s. 128].

Kromatografiassa yhdisteiden erottuminen perustuu aina tasapainoihin. Jakautuminen tapahtuu kromatografikolonnissa tai -levyllä, jossa kaksi toisiinsa liukenematonta faasia, stationäärifaasi ja liikkuva faasi, ovat vuorovaikutuksessa toistensa kanssa. Stationäärifaasina toimii eluenttiin liukenematon kiinteä aine tai neste. Liikkuva faasi on neste tai kaasu, joka kulkee stationäärifaasin läpi. Tutkittavan seoksen täytyy liueta eluenttiin [1, s. 140; 8, s. 128.]

Liikkuva faasi on joko neste tai kaasu ja stationäärifaasi on neste tai kiinteä aine. Stationäärifaasin ei tulisi kulkeutua liikkuvan faasin mukana [1, s. 141.]

Nestekromatografiassa lämpötilalla ei ole tasapainoon suurta merkitystä. Nestekromatografiassa tasapainoon vaikuttaa lähinnä erotettavien yhdisteiden poolisuus. Kun stationäärifaasi on poolinen, pooliset yhdisteet tarttuvat siihen voimakkaasti ja poolittomat heikosti poolitonta liuotinta eli eluenttia käytettäessä. Näin ollen pooliset yhdisteet liukenevat paremmin pooliseen liikkuvaan faasiin. Nestekromatografiassa tasapainoon vaikutetaan muuttamalla eluentin poolisuutta [1, s. 142.]

2.5 Nestekromatografi (LC)

Nestekromatografialaitteisto koostuu eluenttisäiliöstä, pumpusta, injektorista, kolonnista ja detektoreista sekä tiedonkeruu- ja tulostusyksiköstä. Näyte syötetään injektoriin, jonka jälkeen se kulkeutuu kolonniin. Näytemäärä on tavallisesti muutamia kymmeniä mikrolitroja, ja se syötetään laitteistoon, jonka sisällä virtaa liikkuva faasi. Näyte virtaa liikkuvan faasin mukana kolonniin, jossa yhdisteiden varsinainen erottuminen tapahtuu. Näytteen eri yhdisteet voidaan erottaa sen mukaan, millä tavoin ne ovat vuorovaikutuksessa stationäärifaasin ja eluentin kanssa. Näyte jakaantuu komponenteikseen, kun se

kulkee kolonnin läpi eluentin mukana. Kolonnissa erottuneet yhdisteet tunnistetaan detektorilla [1, s. 153-154.]

2.5.1 Laitteisto

Työssä käytettiin nestekromatografia, johon on liitetty typpispesifinen kemiluminesenssidetektor (LC-CLND). LC-CLND on hyvä detektor kvantitatiiviselle analyysille, sillä se perustuu ekvimolaariseen vasteeseen typpelle [9]. LC-CLND-menetelmässä nestekromatografian Agilent 1100 (Kuviot 4 ja 5) injektioilavuus oli 10 μl ja virtaus 0,250 ml/min. Yhden rinnakkaislaimennoksen analysointi-aika oli 19 minuuttia. Jokainen yhdiste ja eluentti reagoivat hapen kanssa 1050 °C:ssa (Kuvio 5). Kuviossa 4 oikealla keskellä on nestetarjotin, johon laimennokset asetettiin. Vasemmalla näkyvissä pulloissa on ajoliuokset metanoli ja muurahaishappo (FA).



Kuvio 4. Agilent 1100-nestekromatografi.

Kolonnin lämpötila pysyi koko ajan vakiona 40 °C:ssa. Kolonnin maksimipaineeksi asetettiin manuaalisesti 400 bar ja minimipaineeksi 40 bar. Laitteessa virtaavat kaasut olivat argon (Ar), helium (He) ja happi (O₂). Nestekromatografi sisälsi näytetarjottimen, kalvopumpun, kolonniuunin, kaasun poistajan ja diodirividetektorin (Agilent 1260 Infini-

ty). Laitteesta poistuneet nesteet kerättiin erillisiin pulloihin ja tyhjennettiin niiden täyttyessä. Kuviossa 5 ylhäällä sijaitsee uuni ja alhaalta säädeltiin kaasujen virtauksia.



Kuvio 5. Uunin lämpötila pysyi vakiona 1050 °C:ssa.

2.5.2 Detektio- eli toteamisraja

Toteamisraja on analyytin pitoisuus, jonka antama mittalaitteen signaalin taso voidaan todeta luotettavasti (95 %:n todennäköisyydellä) ja joka eroaa nollanäytteen arvosta merkitsevästi ollen esimerkiksi kolme kertaa nollanäytteen keskihajonnan (s) suuruinen eli

toteamisraja = nollanäytteen keskiarvo $\pm 3 \cdot s$. [1, s. 13; 10, s. 29]

Toteamisrajalla analyytillä määritetyn pitoisuuden tulee olla niin suuri, että sitä ei enää voida tulkita johtuvan taustan satunnaisvaihtelusta. Analysoitavan aineen detektio- eli

toteamisrajan määrittäminen perustuu taustan hajonnan tutkimiseen analysoimalla nollanäytteitä toistuvasti [10, s. 29-30.]

Mittalaitteen toteamisraja voidaan määrittää tekemällä rinnakkaismittaukset samasta yhtä suuriin osiin jaetusta näytteestä, jonka pitoisuus on toteamisrajan tuntumassa [1, s. 13]. Työssä detektio- ja kvantitointirajat määritettiin kofeiinilla. Kvantitointirajan kriteerinä on ± 10 % oikeellisuus tuloksessa sekä ± 10 % hajonta rinnakkaismäärittämisissä.

Muuntohuumeiden pitoisuusmäärittämisissä detektio- ja kvantitointirajoilla ei ole suurta merkitystä, sillä riittävän herkkyyden saavuttamiseksi tutkittavasta näytteestä voidaan valmistaa väkevämpi liuos ja analysoida se uudelleen.

2.5.3 Kvantitointi- eli määrittämisraja

Kvantitointi- eli määrittämisraja on näytetaustaa vastaan mitatun analyysin pienen pitoisuustaso, jolle kvantitatiivisia mittauksien voidaan suorittaa tietyllä luotettavuustasolla. Määrittämisraja lasketaan nollanäytteen hajonnan, s, avulla. Esimerkiksi

määrittämisraja = nollanäytteen keskiarvo $\pm 10 \cdot s$. [1, s. 13]

Kun analyysin pitoisuus on toteamis- ja määrittämisrajan välillä, voidaan analyysiä todeta olevan näytteessä, mutta sen pitoisuuden olevan ”alle määrittämisrajan” [1, s. 13].

Määrittämisraja tulee todeta käyttäen sopivaa mittanormaalia tai varmennettua vertailumateriaalia [10, s. 30].

Tässä työssä detektio- ja kvantitointirajat määritettiin toteamalla kuvaajien piikkien olevan niin suuret, että niitä ei voida sekoittaa taustakohinaan. Tarkat rajat voidaan määrittää yllä esitetyillä kaavoilla tai esimerkiksi valmistamalla ja ajamalla eri pieneneviä pitoisuuksia (5 rinnakkaista). Tällöin kvantitointirajana käytetään pienintä pitoisuutta, jossa tulosten suhteellinen hajonta (CV %) on alle 10 % ja tulos poikkeaa teoreettisesta arvosta alle 10 %.

LC-CLND-menetelmän tarkat detektio- ja kvantitointirajat on määritetty vasta myöhemmin (Rasanen et al.). [12]

2.5.4 Toistettavuus

Menetelmään liittyvä hajonta eli toistettavuus saadaan laskettua, kun toistomittaukset tehdään lyhyellä aikavälillä ja sama mittaaja tekee ne samasta näytemateriaalista samalla laitteella [1, s. 34]. Toistettavuuden kuuluisi olla < 3 %.

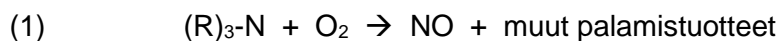
2.5.5 Kolonni ja kolonniuuni

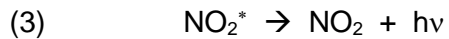
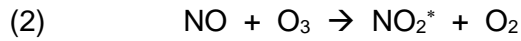
Kolonnilta on analyysissä erityinen tehtävä, sillä se erottaa jo pienet määrät analyyttiä paljon suuremmasta määrästä näytematriisia (näytetausta). Tavallisesti kolonni on teräsputki, joka on 3 - 30 cm pitkä ja on 2 - 8 mm halkaisijaltaan. Usein kolonnissa käytetään esikolonnia, joka on ennen kolonnia, ja joka on helposti puhdistettavissa ja vaihdettavissa. Esikolonni on pakattu samanlaisella tai samankaltaisella materiaalilla kuin kolonni. Esikolonni poistaa näytteestä kiinteät partikkelit, jotka saattavat häiritä analyysiä. Täten myös varsinaisen kolonnin suorituskyky paranee ja käyttöikä pitenee [1, s. 154.]

2.5.6 CLND

LC-CLND on nestekromatografi, johon on liitetty typpispesifinen kemiluminesenssidektektori. Kemiluminesenssi on kemiallista valon emissiota eli säteilyä, joka tapahtuu kemiallisen reaktion yhteydessä. Kemiluminesenssi perustuu typpimonoksidin (NO) ja otsonin (O₃) väliseen reaktioon. [11]

Typhen määritys kemiluminesenssimenetelmään perustuvassa detektorissa perustuu siihen, että aluksi kaikki typpeä sisältävät yhdisteet (reaktio 1) palavat hyvin korkeassa lämpötilassa (noin 1000 °C) happylimäärän kanssa. Palamistuotteina syntyy typpimonoksidia (NO), vettä, hiilidioksidia ja muita palamistuotteita tai oksideja. Palamistuotteena ei kuitenkaan muodostu typpidioksidia (NO₂), koska typpidioksidin tiedetään hajoavan täysin yli 600 °C:sen lämpötilassa. Palamisprosessissa syntynyt typpimonoksidi (NO) reagoi nyt otsonin kanssa (reaktio 2) ja tässä reaktiossa syntyy virittyneessä tilassa olevaa typpidioksidia (NO₂^{*}) ja happea (O₂).





Virittyneessä tilassa olevan typpidioksidin viritystila purkautuu (reaktio 3) ja syntyvä kemiluminesenssisäteily on verrannollinen typpimonoksidin (NO) määrään.

Jotta typen määrä voidaan kvantitatiivisesti määrittää, reaktiosekvenssin pitää täyttää tietyt vaatimukset. Reaktion (reaktio 1), joka konvertoi typpeä sisältäviä analyyttejä typpimonoksidiksi, täytyy olla kvantitatiivinen.

LC-CLND-menetelmän käyttöön liittyy kuitenkin joitain rajoituksia. Esimerkiksi kaikki synteettiset kannabinoidit eivät sisällä lainkaan typpeä. CLND-analysimenetelmä on muuttuva analyyteille, joilla on vierekkäiset typpiatomit. [12] Osa huumeista on synteettisiä ja vaikeasti nesteeseen liukenevia. Näiden analysointi saattaa olla haastavaa ja lisäksi ne voivat tukkia nestekromatografian kolonnin.

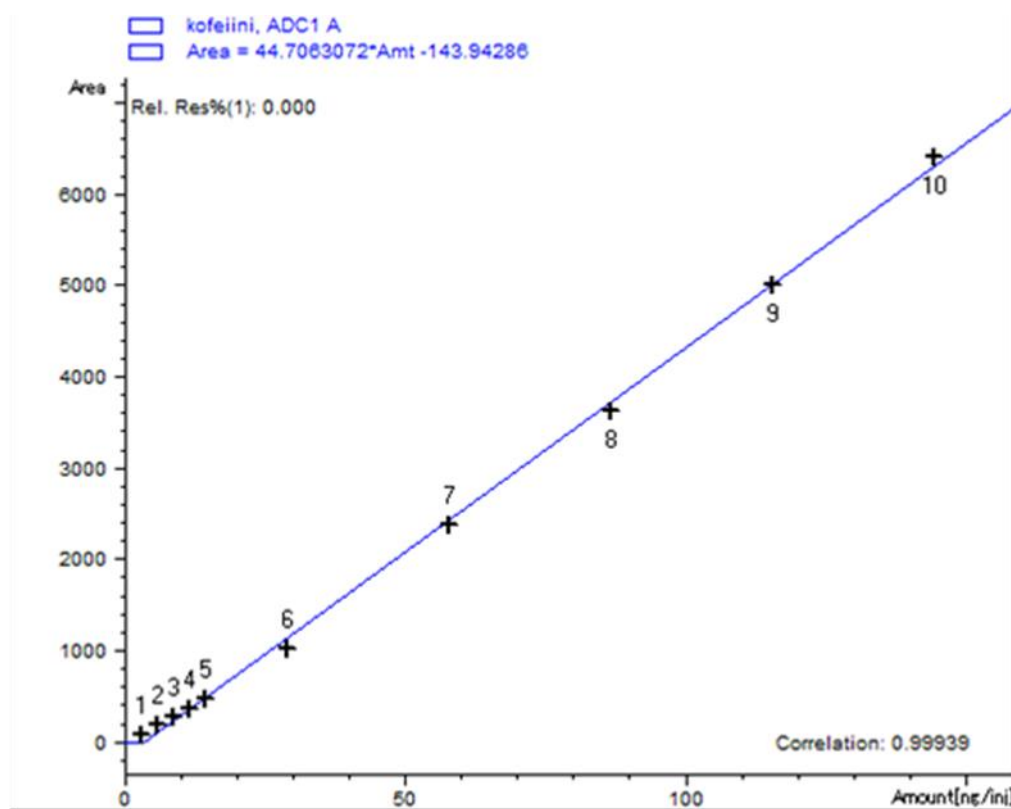
3 Kokeellinen osa

Kokeellisessa osassa määritettiin menetelmän lineaarisuus, detektio- ja kvantitointirajat, toistettavuus, ekvimolaarisuus sekä mittausepävarmuus.

3.1 Takavarikkonäytteet ja standardit

Tullilaboratoriosta ja KRP:n laboratoriosta lähetetyt takavarikkonäytteet olivat kaikki valkoista jauhetta. Näytteistä valmistettiin metanoliin (MeOH) liuokset, joiden pitoisuus oli

1 mg/ml. Jokaisesta liuksesta tehtiin rinnakkaislaimennokset analyysiä varten.



Kuvio 6. Kofeiinin standardisuora.

Tutkittavista huumeista ja muuntohuumeista valmistettiin standardinäytteet, jotka saatiin kaupallisesti saatavista standardiaineista. Standardit valmistettiin amfetamiinista, MDMA:sta, MDPV:stä, metylonista, mefedronista ja kokaiinista. Standardien todelliset pitoisuudet laskettiin ja niitä verrattiin mitattuihin arvoihin. Standardinäytteet valmistettiin standardiliuoksesta ja eluentista. Kuviossa 6 on esitetty kofeiinin standardisuora.

Mittaustuloksista laskettiin variaatiokerroin (CV %). Standardinäytteistä laskettiin myös ero odotusarvoon (bias-%).

3.2 Menetelmän testaus

Testattavia suureita olivat lineaarisuus, detektio- ja kvantitointirajat, toistettavuus, ekvimolaarisuus ja mittausepävarmuus.

3.2.1 Lineaarisuus ja mittausalue

Lineaarilla mittausalueella mittalaitteen herkkyys on vakio eli tulosten ja näytteestä tutkittavien aineiden pitoisuuksien välillä on lineaarinen korrelaatio. Menetelmän validoinnin yhteydessä määritettiin kvantitatiiviseen analyysiin soveltuva pitoisuusalue. Lineaarilla mittausalueella mittaussignaalin taso ja analyytin pitoisuus ovat suoraan verrannollisia toisiinsa. Tällöin kalibrointikäyrä on suora [1, s. 18.]

Lineaarisen mittausalueen kriteereinä ovat: toistettavuus CV % < 10 % ja tarkkuus bias-% < 10 %. Suurimmalla osalla näytteistä CV % oli hyvä ja pysyi alle 5 %:n, jopa alle 1 %:in. Joidenkin näytteiden kohdalla CV % nousi 8 %:iin.

Taulukko 3. Menetelmän lineaarisuuden tutkiminen erikseen valmistetuilla kofeiinistandardeilla. Tulokset analysoitiin kofeiinisuoralla (MUUNTOH4).

Todellinen pitoisuus kofeiini (mg/ml)	Mitatut arvot ng/injektio N	Teoreettiset arvot ng/injektio N	Ero odotusarvosta (bias %)
0,00025	3,14	0,72	335,46
0,0005	3,6	1,44	150,13
0,001	4,58	2,89	58,46
0,002	6,84	5,77	18,54
0,003	8,62	8,66	-0,49
0,004	11,01	11,54	-4,56
0,005	13,11	14,43	-9,18
0,01	25,82	28,85	-10,49
0,02	54,16	57,7	-6,14
0,03	84,77	86,55	-2,05
0,04	114,13	115,4	-1,10
0,05	148,42	144,25	2,89

Taulukosta 3 huomaa, että standardien pienillä pitoisuuksilla bias-% oli suuri. Taulukossa 4 on esitetty eri aineiden mitatut pitoisuudet käyttäen kofeiinin standardisuoraa (MUUNTOH4). Mittaukset tehtiin, koska haluttiin tutkia, kuinka hyvin eri aineet soveltuvat kofeiinisuoralla mitattaviksi.

Taulukossa 4 on analysoitu eri aineiden standardisuorien soveltuvuutta mitattavaksi kofeiinin standardisuoralla. Taulukon mukaan kaikkien aineiden kohdalla pienillä pitoisuuksilla (0,01 - 0,03 mg/ml) mitatut bias-%-arvot olivat yli sallitun rajan. Mefedronilla luotettava bias-%-arvo oli arvosta 13 ng/inj. lähtien, metylonilla 11 ng/inj., MDPV:llä 19 ng/inj., amfetamiinilla 20 ng/inj., kokaiinilla 22 ng/inj. ja MDMA:lla 12 ng/inj. lähtien.

Taulukko 4. Eri aineiden standardit on analysoitu kymmenen pisteen kofeiinisuuralla (MUUNTOH4). Pitoisuudet ovat kaikilla aineilla samat.

MEFEDRONI				METYLONI			
pitoisuus (mg/ml)	saatu tulos (ng/inj)	teor. tulos (ng/inj)	Bias %		saatu tulos (ng/inj)	teor. tulos (ng/inj)	Bias %
0,01	8,075	6,55	23,288		7,243	5,75	25,969
0,02	13,039	13,1	-0,464		11,242	11,5	-2,246
0,03	19,127	19,65	-2,664		15,392	17,24	-10,721
0,04	24,802	26,2	-5,337		19,640	22,99	-14,572
0,05	30,539	32,75	-6,753		24,253	28,74	-15,614
0,06	36,672	39,3	-6,688		29,120	34,49	-15,570
0,07	41,997	45,85	-8,404		33,690	40,23	-16,257
0,08	47,802	52,4	-8,774		38,024	45,98	-17,303
0,09	54,477	58,95	-7,587		43,251	51,73	-16,391
0,1	60,357	65,5	-7,852		48,849	57,48	-15,016
MDPV				AMFETAMIINI			
pitoisuus (mg/ml)	saatu tulos (ng/inj)	teor. tulos (ng/inj)	Bias %		saatu tulos (ng/inj)	teor. tulos (ng/inj)	Bias %
0,01	6,738	4,49	50,072		12,188	10,36	17,642
0,02	11,005	8,98	22,549		21,214	20,72	2,386
0,03	15,053	13,48	11,667		30,970	31,08	-0,352
0,04	19,280	17,97	7,292		40,627	41,44	-1,963
0,05	23,957	22,46	6,666		51,293	51,8	-0,978
0,06	28,249	26,95	4,821		61,768	62,16	-0,631
0,07	32,879	31,44	4,576		73,698	72,52	1,625
0,08	37,845	35,94	5,299		83,229	82,88	0,421
0,09	42,793	40,43	5,844		95,503	93,24	2,427
0,1	47,623	44,92	6,018		107,184	103,6	3,459
KOKAIINI				MDMA			
pitoisuus (mg/ml)	saatu tulos (ng/inj)	teor. tulos (ng/inj)	Bias %		saatu tulos (ng/inj)	teor. tulos (ng/inj)	Bias %
0,01	6,784	4,12	64,652		8,161	6,10	33,789
0,02	10,420	8,24	26,461		12,819	12,19	5,156
0,03	14,133	12,37	14,254		17,703	18,29	-3,210
0,04	18,389	16,49	11,515		22,666	24,39	-7,070
0,05	22,762	20,61	10,443		28,079	30,48	-7,878
0,06	26,675	24,73	7,867		33,707	36,58	-7,855
0,07	30,548	28,85	5,885		39,261	42,68	-8,011
0,08	35,223	32,98	6,800		44,644	48,77	-8,460
0,09	39,166	37,10	5,568		50,601	54,87	-7,781
0,1	44,255	41,22	7,362		56,463	60,96	-7,376

Taulukko 5. Esimerkki näyteseurannasta.

ajo KRP XXX	kofeiini (ng/inj)		amfetamiini (ng/inj)		
	290911	A	B	A	B
		14,95	26,66	15,06	26,52
		14,5	27,16	14,62	27,01
		14,66	27,46	14,78	27,3
		14,87	27,37	14,98	27,22
		15,01	27,44	15,12	27,29
average		14,8	27,22	14,91	27,07
stdev		0,21	0,33	0,21	0,33
CV %		1,43	1,23	1,39	1,21

Taulukossa 5 on esitetty esimerkki menetelmän näyteseurannasta ja toistettavuudesta. Toistettavuuden testaus on esitetty laajemmin taulukossa 7. Taulukossa 5 on esitetty erään amfetamiininäytteen nestekromatografista saadut tulokset. Yhtä laimennosta on injektoitu viisi kertaa, ja niiden keskiarvon (average) perusteella voitiin laskea pitoisuuksien keskihajonta (standard deviation, stdev) ja variaatiokerroin (CV %). Tämän mittauksen perusteella menetelmän toistettavuus on hyvä, sillä keskihajonta ja variaatiokerroin ovat pieniä ja molempien standardisuurien keskiarvot lähellä toisiaan. Taulukossa 6 on esitetty taulukossa 5 mitatun amfetamiininäytteen todellisen puhtauden mittaaminen.

Taulukon 5 arvot ovat taulukossa 6 sarakkeessa CLND N/inj.

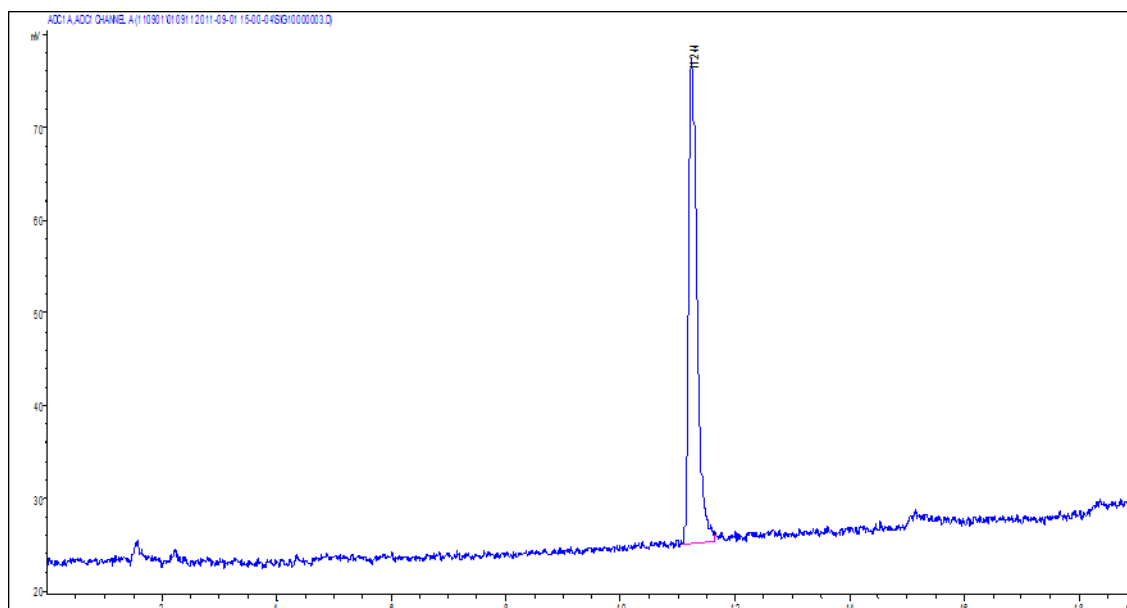
Taulukko 6. Esimerkki erään amfetamiininäytteen puhtauden laskemisesta.

Luna PFP		lineaarinen gradientti						
10 µl injektio 0,05 mg/ml liuosta → 500 ng/injektio kanta-ainetta								
Yhdiste	Näytetro KRP XXX	Bruttokaava	Mp	N	%N	Kanta-ainetta ng/inj.	CLND N/inj.	Kanta-aineen puhtaus %
Amfetamiini		$C_9H_{13}N$	135.2	14.01	10.36	500	14,91	28,789
Amfetamiini H_2SO_4		$(C_9H_{13}N)_2 H_2SO_4$	368.5	28.01	7.6	500	14,91	39,233
Amfetamiini (kof.)		$C_9H_{13}N$	135.2	14.01	10.36	500	14,8	28,571
Amfetamiini H_2SO_4 (kof.)		$(C_9H_{13}N)_2 H_2SO_4$	368.5	28.01	7.6	500	14,8	38,937

10 µl injektio 0,1 mg/ml liuosta → 1000 ng/injektio kanta-ainetta								
Yhdiste	Näytetro KRP XXX	Bruttokaava	Mp	N	%N	Kanta-ainetta ng/inj.	CLND N/inj.	Kanta-aineen puhtaus %
Amfetamiini		$C_9H_{13}N$	135.2	14.01	10.36	1000	27,07	26,129
Amfetamiini H_2SO_4		$(C_9H_{13}N)_2 H_2SO_4$	368.5	28.01	7.6	1000	27,07	35,608
Amfetamiini (kof.)		$C_9H_{13}N$	135.2	14.01	10.36	1000	27,22	26,271
Amfetamiini H_2SO_4 (kof.)		$(C_9H_{13}N)_2 H_2SO_4$	368.5	28.01	7.6	1000	27,22	35,802

Taulukossa 6 on esitetty näytteen pitoisuuden laskeminen. Aluksi tarkistettiin molekyylimassat (Mp) ja typen (N) osuudet yhdisteessä. [13] Tämän jälkeen laskettiin typen prosentuaalinen osuus yhdisteessä (%N). CLND-lukema vastaa rinnakkaislaimennosten tulosten perusteella laskettuja keskiarvoja sekä kofeiini- että amfetamiinistandardisuorien perusteella. Kanta-aineen puhtaus laskettiin CLND-lukeman, kanta-aineen määrän sekä typen prosentuaalisen osuuden perusteella. Taulukossa 6 sekä ylemmän (A-näyte) että alemman (B-näyte) taulukon tulosten (kanta-aineen puhtaus) pitäisi vastata toisiaan. B-laimennoksen CLND-tuloksen kuuluisi olla kaksinkertainen A-laimennoksen tulokseen verrattuna. C-laimennoksia valmistettiin yhteensä kolmesta eri näytteestä. C-laimennokset valmistettiin vain sellaisista liuoksista, joista saatiin A- ja B-laimennoksista pienet tulokset. Näytteet olivat MDPV:tä (2 kappaletta) ja kokaiinia (1). C-laimennosten CLND-tuloksien kuuluisi olla kaksinkertaiset B-laimennosten tuloksiin verrattuna. Kaikkien C-laimennoksien tulokset vastasivat A- ja B-laimennosten perusteella laskettuja kanta-aineen puhtauksia. Amfetamiini- ja kofeiinisuurien tulokset vastasivat toisiaan hyvin. Kanta-aineen puhtaus-%-sarakeessa on laskettu huumeen pitoisuus.

Liitteissä 1-6 on esitetty satunnaisesti valittujen näytteiden tulokset, joiden pitoisuudet on laskettu samalla tavalla kuin taulukossa 5 on esitetty.



Kuvio 7. Esimerkki MDPV-standardinäytteen (13,48 ng/injektio) piikistä.

Kuviossa 7 on esitetty erään MDPV-standardin piikki. Detektorajan (toteamisraja, LOD) määrittämisessä oli signaali–kohina-suhde $s/n > 3$, eli piikin tulee olla ainakin kolme kertaa kohinaa suurempi. [14] Detektoraja testattiin toteamalla näytteiden kuvaajista, että laite tunnistaa testattavan aineen ja muodostaa kuvaajaan piikin, jonka ei voida katsoa kuuluvan laitteen normaaliin taustakohinaan.

Kvantitointirajan (määrittämisraja, LOQ) määrittämisessä oli signaali–kohina-suhde $s/n > 10$, eli piikin tulee olla ainakin kymmenen kertaa suurempi. Myös kvantitointiraja testattiin toteamalla näytteen kuvaajan piikin olevan niin suuri, ettei sitä voida sekoittaa taustakohinaan.

3.2.2 Toistettavuus

Menetelmään liittyvä hajonta eli toistettavuus saadaan laskettua vastaavista lausekkeista, kun toistomittaukset tehdään lyhyellä aikavälillä ja sama mittaja tekee ne samasta näytemateriaalista samalla laitteella [1, s. 34].

Taulukossa 7 on esitetty menetelmän toistettavuuden määrittäminen. Toistettavuuden määrittämisessä otettiin yhden takavarikoidun MDPV-näytteen yksi A- ja yksi B-rinnakkaislaimennos ja injektioitiin kumpaakin laimennosta 10 kertaa. Tämän jälkeen

tulosten keskiarvo ja keskihajonta sekä CV % laskettiin. Mittaukset analysoitiin sekä kofeiinin että MDPV:n standardisuorilla. CV % -osuudet olivat erittäin hyviä molemmilla suorilla mitattuina.

Taulukko 7. Menetelmän toistettavuuden mittaaminen käyttäen yhtä takavarikonäytettä.

Tulli XXXX mittaus	kofeiini (ng/inj)		MDPV (ng/inj)	
	A	B	A	B
1	8,23	13,91	5,9	11,5
2	8,22	14,18	5,91	11,48
3	8,3	13,89	6,06	11,49
4	8,13	13,85	5,83	11,39
5	8,31	13,81	6,03	11,4
6	8,43	13,97	6,07	11,48
7	8,29	14,08	5,93	11,68
8	8,29	13,92	6,05	11,46
9	8,24	13,97	5,98	11,57
10	8,35	13,87	6,07	11,44
average	8,28	13,95	5,98	11,49
stdev	0,08	0,11	0,09	0,08
CV %	0,97	0,81	1,43	0,73

Menetelmän tarkkuutta voitiin arvioida valmistamalla rinnakkaislaimennoksia, joilla on tunnettu pitoisuus ja laskemalla niiden pitoisuudet käyttäen kofeiinia sekundaaristandardina. Niiden yhdisteiden tarkkuutta, joille on saatavilla referenssistandardi, arvioitiin myös käyttämällä referenssistandardista valmistettua kalibrointisuoraa ja vertaamalla tulosta kofeiinisuuron antamiin tuloksiin.

3.2.3 Ekvimolaarisuus

Ekvimolaarisuus tarkoittaa sitä, että kahdella aineella on sama konsentraatio. Kun aineet ovat keskenään ekvimolaarisia, niiden konsentraatiot ovat samat ja aineet ovat täten keskenään vertailukelpoisia.

Ekvimolaarisuus ei päde, mikäli molekyylissä on vierekkäisiä typpi-atomeja. Typpi-atomien välissä pitää olla hiiliatomi, jotta tulokset olisivat mahdollisimman luotettavia. Tulos on ekvimolaarinen, kun saatu tulos on $\pm 10\%$ standardista.

Taulukossa 8 on esitetty MDPV-standardinäytteen ekvimolaarisuuden määrittäminen sekä kofeiini- että MDPV-standardisuorilla. Pienimmillä pitoisuuksilla ekvimolaarisuuden pro-

sentuaalinen arvo oli suurempi, kun taas MDPV:n määrästä 0,04 mg/ml ylöspäin ekvimolaarisuus täyttää asetetun vaatimuksen ($\pm 10\%$ teoreettisesta arvosta).

Taulukko 8. Ekvimolaarisuuden määrittäminen. Suluissa käytetyn analyysimenetelmän nimi.

Pitoisuus	MDPV-standardi (MUUNTOH4)	MDPV-standardi (MDPV)	
MDPV Hcl mg/ml	Mitattu tulos ng/inj.	Teoreettinen tulos ng/inj.	Ekvimolaarisuus %
0,01	6,7	4,5	148,89
0,02	11	9	122,22
0,03	15,1	13,5	111,85
0,04	19,3	18	107,22
0,05	24	22,5	106,67
0,06	28,2	27	104,44
0,07	32,9	31,4	104,78
0,08	37,8	35,9	105,29
0,09	42,8	40,4	105,94
0,1	47,6	44,9	106,01

3.2.4 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus on kvantitatiivinen arvio niistä rajoista, joiden sisäpuolella mittaus-tuloksen oletetaan olevan tietyllä todennäköisyydellä. Mittausepävarmuus lasketaan tilastollisia menetelmiä käyttäen. Mittausepävarmuustietoja tarvitaan, kun halutaan arvioida mittaus-tuloksen riittävää tarkkuutta. Näiden tietojen avulla voidaan arvioida tarkkuutta esimerkiksi tietyn päätöksenteon kannalta [10, s. 19.]

Mittaamiseen ja analysointiin liittyy aina epätarkkuutta. Mikäli käytetään epätarkkoja mittausvälineitä, epätarkkuus on suurempi, kun käytettäessä tarkkoja mittausvälineitä [15, s. 113.]

Mittausepävarmuuteen liittyy monta eri tekijää. Näytteenotto, näytteen valmistus, mit-tauslaitteiden kalibrointi, analyysi virhelähteistä, tulosten muokkaus, tulosten raportointi ja tulosten tulkinta ovat mahdollisia epävarmuuslähteitä [10, s. 21.] Lisäksi pipetoitaes-sa rinnakkaislaimennoksia virhe saattaa johtua esimerkiksi pipetistä tai pipetoijasta. Vaikka nestekromatografi injektioi aina yhtä näytettä 10 μ l, virheen syntyminen on mah-dollista. Analyysivaiheessa integrointi voi aiheuttaa pienen virheen, jonka seurauksena mittaus-tuloksessa on virhe.

Taulukko 9. Eri standardiaineiden Bias-%:in määrittäminen käyttämällä sertifioidusta referenssistandardista ja kofeiinista valmistettuja standardiliuoksia. Suluissa on ilmoitettu analyysimenetelmän nimi ja standardien pitoisuus on ng/injektio.

pitoisuus (mg/ml)	AMFETAMIINI (AMPHETAMINE)	AMFETAMIINI (MUUNTOH4)	Bias %	KOKAIINI (COCAINE)	KOKAIINI (MUUNTOH4)	Bias %
0,01	12,35	12,19	-1,353387	4,73	6,78	43,48064
0,02	21,19	21,21	0,103008	8,34	10,42	24,90348
0,03	30,74	30,97	0,735649	12,03	14,13	17,45150
0,04	40,2	40,63	1,065722	16,26	18,39	13,07009
0,05	50,64	51,29	1,287089	20,61	22,76	10,44113
0,06	60,9	61,77	1,430584	24,5	26,68	8,87977
0,07	72,58	73,7	1,544632	28,35	30,55	7,75638
0,08	81,91	83,23	1,612373	33	35,22	6,74944
0,09	93,92	95,5	1,679768	36,91	39,17	6,09714
0,1	105,36	107,18	1,729634	41,97	44,25	5,43539

pitoisuus (mg/ml)	MDPV (MDPV)	MDPV (MUUNTOH4)	Bias %	MDMA (MDMA)	MDMA (MUUNTOH4)	Bias %
0,01	5,01	6,74	34,46709	7,17	8,16	13,77374
0,02	9,25	11	19,02160	12,49	12,82	2,65558
0,03	13,57	15,05	10,89912	18,01	17,7	-1,72185
0,04	17,5	19,28	10,15822	23,73	22,67	-4,48662
0,05	21,98	23,96	8,99601	29,81	28,08	-5,80319
0,06	26,73	28,25	5,66607	36,19	33,71	-6,85371
0,07	31	32,88	6,07444	42,59	39,26	-7,82549
0,08	35,77	37,84	5,80413	48,38	44,64	-7,72049
0,09	40,7	42,79	5,13893	55,09	50,6	-8,14817
0,1	45,55	47,62	4,55842	61,99	56,46	-8,91363

Standardien mittausepävarmuudet olivat pieniä, eikä suuria poikkeamia ole (Taulukko 9). Kokonaisuudessaan menetelmän mittausepävarmuus on pieni, sillä CV %:ien keskiarvo (satunnaisvirhe) on hyvä. Vaikka standardien suhteet kofeiinistandardeihin saattavat hieman poiketa, menetelmä on silti osoittautunut luotettavaksi ja menetelmällä voidaan määrittää luotettavasti muuntohuumeiden pitoisuuksia.

Systemaattinen virhe U_1 laskettiin jokaiselle yhdisteelle erikseen. Systemaattinen virhe perustuu ekvimolaarisuuteen, joka mitattiin kofeiinistandardisuoralla. Yhdistekohtaiset systemaattiset virheet on esitetty taulukossa 10.

Satunnaisvirheeksi saatiin $U_2 = 1,79 \%$, mikä on kaikkien takavarikkonäytteiden CV %:ien keskiarvo.

Yhdistekohtaiset mittausepävarmuudet voidaan laskea kaavalla:

$$U = \sqrt{U_1^2 + U_2^2} \text{ , jossa}$$

U = mittausepävarmuus

U₁ = systemaattinen virhe

U₂ = satunnaisvirhe eli kaikkien rinnakkaislaimennosten CV %-ien keskiarvo (sisältäen kaikki mittaukset)

Taulukko 10. Yhdistekohtainen mittausepävarmuus.

Yhdiste	Systemaattinen virhe (U1)	Satunnaisvirhe (U2)	Mittausepävarmuus (U)
MDPV	11,04	1,79	11,18
MDMA	-3,5	1,79	3,93
Mefedroni	-11,03	1,79	11,17
Metyloni	-5,12	1,79	5,42
Amfetamiini	0,99	1,79	2,05
Kokaiini	14,42	1,79	14,53

4 Tulosten tarkastelu

LC-CLND-mittausmenetelmän mukaan lasketut eri huumeiden puhtaudet on esitetty liitteissä 1-6. Puhtauden laskeminen mitattujen tulosten perusteella on luotettava.

Menetelmän lineaarisuutta varten valmistettiin erikseen omat kofeiinistandardit. Menetelmän lineaarisuus pätee alueella 2,89 - 144,25 ng/inj., sillä pienemmillä pitoisuuksilla bias-%-arvo (poikkeama) oli niin suuri, ettei tuloksia voida välttämättä pitää täysin luotettavina. Alueella 2,89 - 144,25 ng/inj. bias-%-arvot olivat hyviä, ja näin ollen menetelmän lineaarisuutta voidaan pitää luotettavana.

Menetelmän toistettavuuden testauksen tulokset on esitetty taulukossa 7. Taulukossa 4 erään amfetamiininäytteen tulosten perusteella laskettu CV % on erittäin pieni. CV % - arvolle on asetettu rajaksi 10 % eroavaisuus, mutta mitatun näytteen CV % on alle kaksi. Taulukossa 6 testatun MDPV-näytteen CV % on myös alle kaksi. Näin ollen menetelmän toistettavuus on erittäin hyvä.

Taulukossa 4 on esitetty eri aineiden standardisuorien soveltuvuutta mitattavaksi kofeiinin standardisuoralla. Bias-%-arvot ovat luotettavia alueella 0,03 - 0,07 mg/ml lähtien riippuen aineesta. Kokaiinin standardien määrittämiseen kofeiinisuora soveltui noin puolestavälisestä mittausasteikosta lähtien, mikä aiheuttaa mittaukseen epävarmuutta. Muiden aineiden kohdalla pienimpiä pitoisuuksia lukuunottamatta bias-%-arvot pysyivät hyvin rajojen sisällä.

Detektio- ja kvantitointirajat määritettiin toteamalla kuvaajien piikin olevan tarpeeksi suuri, että sitä ei voida sekoittaa laitteen normaaliin taustakohinaan. Molemmat rajat toteutuivat hyvin.

Taulukossa 8 mitattu ekvimolaarisuus pätee hyvin määritettyjen rajojen puitteissa pitoisuudesta 0,04 mg/ml vahvempaan. Alhaisempien arvojen (0,01 - 0,03 mg/ml) suuret erot ekvimolaarisuudessa olivat korkeimmillaan noin puolitoistakertaiset teoreettisiin arvoihin verrattuna. Kuitenkin suuremmilla pitoisuuksilla ekvimolaarisuuden tulokset ovat hyvin tasaisia, ja näin ollen sitä voidaan pitää luotettavana.

Mittausepävarmuus laskettiin kuudelle mitattavalle yhdisteelle erikseen, ja tulokset vaihtelivat 2,05 % - 14,53 % välillä, mitkä ovat hyviä tuloksia. Mittausepävarmuuden

ollessa hyvä myös mittausmenetelmän voidaan uskoa olevan hyvin luotettava. Eri standardisuurien mittausepävarmuus on esitetty Taulukossa 9. Tulosten perusteella sekä amfetamiini- että MDMA-standardisuurilla oli hyvät bias-%-arvot suhteessa kofeiinin standardisuoraan. Molempien aineiden kohdalla bias-%-arvo oli pienimmällä pitoisuuden arvolla (0,01 mg/ml) suurempi kuin suuremmilla mitatuilla arvoilla. Kokaiini- ja MDPV-standardisuurilla pitoisuuden arvoilla 0,01-0,03 mg/ml bias-%-arvo olivat selvästi sallitun rajan yläpuolella. Yleisesti kaikilla standardisuurilla oli erittäin hyvät bias-%-arvot, ja täten standardisuurien mittausepävarmuutta voidaan pitää luotettavana.

Taulukossa 10 esitetyt yhdistekohtaiset mittausepävarmuudet ovat hyvät. Ainoastaan kokaiinin mittausepävarmuus oli hieman suurempi kuin muiden yhdisteiden. Tämän perusteella menetelmää voi hyvin käyttää jatkossakin.

5 Johtopäätökset

Tässä insinööriyössä tutkittiin, voidaanko LC-CLND-menetelmää käyttää muuntohuumeiden pitoisuusmäärityksissä. LC-CLND-menetelmässä kofeiinin käyttäminen muuntohuumeiden pitoisuuden määrittämisessä on yksinkertainen ja hyvin soveltuva, mikäli vain muuntohuumeeseen sisältämä tyypimäärä tiedetään.

Kofeiini on edullinen, hyvin saatavilla oleva standardiaine, jota voidaan käyttää muuntohuumeiden määrityksiin LC-CLND-menetelmässä. On todennäköistä, että uusia muuntohuumeita valmistetaan. Olisi kallista ja aikaa vievää, jos jokaisesta uudesta muuntohuumeesta valmistettaisiin omat standardit. Jotta muuntohuumeita voitaisiin helposti tutkia, on valittava sekundäristandardiksi aine, joka on helposti saatavilla ja edullinen ja joka sisältää tyyppeä (esimerkiksi kofeiini).

LC-CLND-menetelmä soveltuu hyvin muuntohuumeiden ja muiden huumeiden pitoisuusmäärityksiin, sillä analysoitavien aineiden standardisuorat tämän tutkimuksen perusteella pääasiassa vastasivat kofeiinisuoraa. Muiden huumeiden standardisuorat vastasivat kofeiinisuoraa myös hyvin, ja näin ollen kofeiinia pystyy jatkossa käyttämään huumeiden pitoisuuksien tutkimiseen. Uusien huumeiden standardien rajallinen saatavuus vaikeuttaa analyysien tekemistä, mutta kofeiinin avulla analyysien tekeminen on mahdollista.

Lähteet

- 1 Jaarinen, Soili; Niiranen, Jukka. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. 5.-6. painos. Helsinki: Edita Prima Oy.
- 2 Tulli. Verkkodokumentti.
<http://www.tulli.fi/fi/tiedotteet/lehdistotiedotteet/201025777/tiedote_20100527/index.html?bc=3035> Luettu 12.10.2011
- 3 Kyber, Marianne: Tullirikostutkimukset Tullilaboratoriossa vuonna 2010. Artikkel. Tullin laboratorio
- 4 European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. Verkkodokumentti.
<<http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/synthetic-cathinones>> Luettu 11.11.2013
- 5 Talvio, Anna-Mari. Yle Uutiset. Verkkodokumentti. 29.05.2013. Näin Suomessa on takavarikoitu huumausaineita viime vuosina.
<http://yle.fi/uutiset/nain_suomessa_on_takavarikoitu_huumausaineita_viime_vuosina/6662988> Luettu 04.11.2013
- 6 Keskusrikospoliisi, Rikostekninen laboratorio: Infosivu 8.8.2011. Keskusrikospoliisi
- 7 Terveystieteiden tutkimuskeskus. 2010. Päihdetilastollinen vuosikirja 2010. Alkoholit ja huumeet. Helsinki: Yliopistopaino.
- 8 Toivonen, J.; Yliruokanen, I. 2006. Analyttisen kemian harjoitustyöt. Kvantitatiivinen analyysi. 12. korjattu painos. Valopaino Oy. Helsinki: Otatieto.
- 9 Laks, Suvi; Pelander, Anna; Vuori, Erkki; Ali-Tolppa, Elisa; Sippola, Erkki; Ojanperä, Ilkka. 2004. Analysis of Street Drugs in Seized Material without Primary Reference Standards. Department of Forensic Medicine, University of Helsinki, Helsinki, Finland and Crime Laboratory, National Bureau of Investigation, Vantaa, Finland. Artikkel. Analytical Chemistry, Vol. 76(24); 7375-9.
- 10 Ehder, Tapio (toim.). 2005. Mikes Metrologia. Kemian metrologian opas. Metrologian neuvottelukunta. Kemian ja mikrobiologian jaosto. Kemian työryhmä. Helsinki.
- 11 Brannegan, D.; Ashraf-Khorassani, M.; Taylor, L. T. 2001. High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Chemiluminescence Nitrogen Detection for the Study of Ethoxyquin Antioxidant and Related Organic Bases. Department of Chemistry, Virginia Tech, Blacksburg, VA 24061-0212. Artikkel. Journal of Chromatographic Science, Vol 39(6); 217-21.
- 12 Rasanen, Ilpo; Kyber, Marianne; Szilvay, Ilmari; Rintatalo, Janne; Ojanperä, Ilkka. 2014. Straightforward single-calibrant quantification of seized designer drugs by liquid chromatography-chemiluminescence nitrogen detection. Artikkel. Forensic Science International 237; 119-125.

- 13 Moffat, Anthony C; Osselton, M David; Widdop, Brian (toim.). 2004. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceutical, bodyfluids and postmortem material. Volume 1 & 2. Pharmaceutical Press. UK/USA.
- 14 Peters, Frank T.; Drummer, Olaf H.; Musshoff, Frank. 2007. Validation of new methods. Forensic Science International. Artikkele. Forensic Science International 165; 216-224. ScienceDirect. Elsevier.
- 15 Lehtonen, Pekka O. 2000. Kemian laskut laboratoriossa. Hakapaino Oy. 1. painos. Helsinki: Opetushallitus.

MDPV

Erään MDPV-näytteen tuloksen puhtauslaskelma.

Luna PFP		lineaarinen gradientti							
10 µl injektio 0,05 mg/ml liuosta → 500 ng/injektio kanta-ainetta									
Yhdiste	Näytenro	Bruttokaava	Mp	N	%N	Kanta-ainetta		Kanta-aineer	
	TULLI 1					ng/inj.	CLND N/inj.	puhtaus %	
MDPV		C ₁₆ H ₂₁ NO ₃	275,3468	14,0067	5,0869304	500	20,665	81,248	
MDPV HCl		C ₁₆ H ₂₁ NO ₃ HCl	311,8077	14,0067	4,4920956	500	20,665	92,006	
MDPV (kof.)		C ₁₆ H ₂₁ NO ₃	275,3468	14,0067	5,0869304	500	22,949	90,227	
MDPV Hcl (kof.)		C ₁₆ H ₂₁ NO ₃ HCl	311,8077	14,0067	4,4920956	500	22,949	102,174	
10 µl injektio 0,1 mg/ml liuosta → 1000 ng/injektio kanta-ainetta									
Yhdiste	Näytenro	Bruttokaava	Mp	N	%N	Kanta-ainetta		Kanta-aineer	
	TULLI 1					ng/inj.	CLND N/inj.	puhtaus %	
MDPV		C ₁₆ H ₂₁ NO ₃	275,3468	14,0067	5,0869304	1000	43,735	85,975	
MDPV HCl		C ₁₆ H ₂₁ NO ₃ HCl	311,8077	14,0067	4,4920956	1000	43,735	97,360	
MDPV (kof.)		C ₁₆ H ₂₁ NO ₃	275,3468	14,0067	5,0869304	1000	46,761	91,924	
MDPV Hcl (kof.)		C ₁₆ H ₂₁ NO ₃ HCl	311,8077	14,0067	4,4920956	1000	46,761	104,096	

Amfetamiini

Erään amfetamiininäytteen tuloksen puhtauslaskelma.

Luna PFP		lineaarinen gradientti						
10 µl injektio 0,05 mg/ml liuosta → 500 ng/injektio kanta-ainetta								
						Kanta-ainetta		Kanta-aineen
Yhdiste	Näytetro	Bruttokaava	Mp	N	%N	ng/inj.	CLND N/inj.	puhtaus %
	KRP 1							
Amfetamiini		C ₉ H ₁₃ N	135,2	14,0067	10,35998521	500	14,912484	28,789
Amfetamiini H ₂ SO ₄		(C ₉ H ₁₃ N) ₂ H ₂ SO ₄	368,5	28,0134	7,602008141	500	14,912484	39,233
Amfetamiini (kof.)		C ₉ H ₁₃ N	135,2	14,0067	10,35998521	500	14,799976	28,571
Amfetamiini H ₂ SO ₄ (kof.)		(C ₉ H ₁₃ N) ₂ H ₂ SO ₄	368,5	28,0134	7,602008141	500	14,799976	38,937
10 µl injektio 0,1 mg/ml liuosta → 1000 ng/injektio kanta-ainetta								
						Kanta-ainetta		Kanta-aineen
Yhdiste	Näytetro	Bruttokaava	Mp	N	%N	ng/inj.	CLND N/inj.	puhtaus %
	KRP 1							
Amfetamiini		C ₉ H ₁₃ N	135,2	14,0067	10,35998521	1000	27,069394	26,129
Amfetamiini H ₂ SO ₄		(C ₉ H ₁₃ N) ₂ H ₂ SO ₄	368,5	28,0134	7,602008141	1000	27,069394	35,608
Amfetamiini (kof.)		C ₉ H ₁₃ N	135,2	14,0067	10,35998521	1000	27,216948	26,271
Amfetamiini H ₂ SO ₄ (kof.)		(C ₉ H ₁₃ N) ₂ H ₂ SO ₄	368,5	28,0134	7,602008141	1000	27,216948	35,802

Kokaiini

Erään kokaiininäytteen tuloksen puhtauslaskelma.

Luna PFP		lineaarinen gradientti						
10 µl injektio 0,05 mg/ml liuosta → 500 ng/injektio kanta-ainetta								
Yhdiste	Näytenro	Bruttokaava	Mp	N	%N	Kanta-ainetta ng/inj.	Kanta-aineer CLND N/inj.	puhtaus %
TULLI 2								
Kokaiini		C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	303,4	14,0067	4,6165788	500	17,380	75,295
Kokaiini Hcl		C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	339,8	14,0067	4,1220424	500	17,380	84,329
Kokaiini (kof.)		C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	303,4	14,0067	4,6165788	500	19,513	84,533
Kokaiini Hcl (kof.)		C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	339,8	14,0067	4,1220424	500	19,513	94,675
10 µl injektio 0,1 mg/ml liuosta → 1000 ng/injektio kanta-ainetta								
Yhdiste	Näytenro	Bruttokaava	Mp	N	%N	Kanta-ainetta ng/inj.	Kanta-aineer CLND N/inj.	puhtaus %
TULLI 2								
Kokaiini		C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	303,4	14,0067	4,6165788	1000	37,106	80,375
Kokaiini Hcl		C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	339,8	14,0067	4,1220424	1000	37,106	90,018
Kokaiini (kof.)		C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	303,4	14,0067	4,6165788	1000	39,358	85,253
Kokaiini Hcl (kof.)		C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	339,8	14,0067	4,1220424	1000	39,358	95,481

MDMA

Erään MDMA-näytteen tuloksen puhtauslaskelma.

Luna PFP		lineaarinen gradientti							
10 µl injektio 0,05 mg/ml liuosta → 500 ng/injektio kanta-ainetta									
Yhdiste	Näytenro	Bruttokaava	Mp	N	%N	Kanta-ainetta		Kanta-aineer	
						ng/inj.	CLND	N/inj.	puhtaus %
	TULLI 3								
MDMA		C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	193,2	14,0067	7,2498447	500	29,701346		81,937
MDMA Hcl		C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	229,75	14,0067	6,0964962	500	29,701346		97,437
MDMA (kof.)		C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	193,2	14,0067	7,2498447	500	28,024416		77,310
MDMA Hcl (kof.)		C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	229,75	14,0067	6,0964962	500	28,024416		91,936
10 µl injektio 0,1 mg/ml liuosta → 1000 ng/injektio kanta-ainetta									
Yhdiste	Näytenro	Bruttokaava	Mp	N	%N	Kanta-ainetta		Kanta-aineer	
						ng/inj.	CLND	N/inj.	puhtaus %
	TULLI 3								
MDMA		C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	193,2	14,0067	7,2498447	1000	60,129344		82,939
MDMA Hcl		C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	229,75	14,0067	6,0964962	1000	60,129344		98,629
MDMA (kof.)		C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	193,2	14,0067	7,2498447	1000	54,926508		75,762
MDMA Hcl (kof.)		C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	229,75	14,0067	6,0964962	1000	54,926508		90,095

Metyloni

Erään metyloninäytteen tuloksen puhtauslaskelma.

Luna PFP		lineaarinen gradientti						
10 µl injektio 0,05 mg/ml liuosta → 500 ng/injektio kanta-ainetta								
Yhdiste	Näytenro	Bruttokaava	Mp	N	%N	Kanta-ainetta ng/inj.	Kanta-aineer CLND N/inj.	puhtaus %
	TULLI 4							
metyloni		C ₁₁ H ₁₃ NO ₃	207,2286	14,0067	6,7590574	500	31,896	94,380
metyloni HCl		C ₁₁ H ₁₃ NO ₃	243,6895	14,0067	5,7477651	500	32,896	114,466
metyloni (kof.)		C ₁₁ H ₁₃ NO ₃	207,2286	14,0067	6,7590574	500	27,297	80,771
metyloni Hcl (kof.)		C ₁₁ H ₁₃ NO ₃	243,6895	14,0067	5,7477651	500	27,297	94,982
10 µl injektio 0,1 mg/ml liuosta → 1000 ng/injektio kanta-ainetta								
Yhdiste	Näytenro	Bruttokaava	Mp	N	%N	ng/inj.	Kanta-aineer CLND N/inj.	puhtaus %
	TULLI 4							
metyloni		C ₁₁ H ₁₃ NO ₃	207,2286	14,0067	6,7590574	1000	64,011	94,704
metyloni HCl		C ₁₁ H ₁₃ NO ₃	243,6895	14,0067	5,7477651	1000	64,011	111,367
metyloni (kof.)		C ₁₁ H ₁₃ NO ₃	207,2286	14,0067	6,7590574	1000	52,989	78,397
metyloni Hcl (kof.)		C ₁₁ H ₁₃ NO ₃	243,6895	14,0067	5,7477651	1000	52,989	92,191

Mefedroni

Erään mefedroninäytteen tuloksen puhtauslaskelma.

Luna PFP		lineaarinen gradientti						
10 µl injektio 0,05 mg/ml liuosta → 500 ng/injektio kanta-ainetta								
						Kanta-ainetta		Kanta-aineen
Yhdiste	Näyttenro	Bruttokaava	Mp	N	%N	ng/inj.	CLND N/inj.	puhtaus %
	KRP 2							
mefedroni		C ₁₁ H ₁₅ NO	177,2456	14,0067	7,902424658	500	27,722	70,161
mefedroni HCl		C ₁₁ H ₁₅ NO HCl	213,7065	14,0067	6,554175938	500	27,722	84,593
mefedroni (kof.)		C ₁₁ H ₁₅ NO	177,2456	14,0067	7,902424658	500	22,802	57,709
mefedroni HCl (kof.)		C ₁₁ H ₁₅ NO HCl	213,7065	14,0067	6,554175938	500	22,802	69,580
10 µl injektio 0,1 mg/ml liuosta → 1000 ng/injektio kanta-ainetta								
						Kanta-ainetta		Kanta-aineen
Yhdiste	Näyttenro	Bruttokaava	Mp	N	%N	ng/inj.	CLND N/inj.	puhtaus %
	KRP 2							
mefedroni		C ₁₁ H ₁₅ NO	177,2456	14,0067	7,902424658	1000	66,407	84,034
mefedroni HCl		C ₁₁ H ₁₅ NO HCl	213,7065	14,0067	6,554175938	1000	66,407	101,321
mefedroni (kof.)		C ₁₁ H ₁₅ NO	177,2456	14,0067	7,902424658	1000	52,957	67,013
mefedroni HCl (kof.)		C ₁₁ H ₁₅ NO HCl	213,7065	14,0067	6,554175938	1000	52,957	80,799