



## **TEKNIikka JA LIIKENNE**

**Laboratorioala**

**Kemiallinen analytiikka**

## **OPINNÄYTETYÖ**

### **USEIDEN ERI LÄÄKEAINEIDEN KVANTITATIIVINEN MÄÄRITTÄMINEN VERESTÄ GC/EI-MS:LLA – MENETELMÄN KEHITTÄMINEN JA VALIDOINTI**

**Työn tekijä: Brita Peltokoski  
Työn ohjaaja: Jukka Toivonen  
Työn ohjaaja: Teemu Gunnar**

**Työ hyväksytty: \_\_. \_\_. 2008**

## ALKULAUSE

Tämä opinnäytetyö tehtiin Kansanterveyslaitoksen Huumetutkimusyksikössä. Haluan kiittää opinnäytetyöni valvojaa yliopettaja Jukka Toivosta ja työpaikan ohjaajaa laboratorionjohtaja Teemu Gunnaria. Lisäksi suuri kiitos työtovereilleni Huumetutkimusyksikössä mukavasta työilmapiiristä sekä opastuksesta jokapäiväisissä työtehtävissä. Erityiskiitos kuuluu perehdyttäjilleni laborantti Riitta Hussolle ja laborantti Pirjo Vuorelle, joiden äidillisellä opastuksella opin rutiinityöskentelyn nopeasti. Kiitos myös apulaistutkija Kari Ariniemelle opastuksesta validointikokeiden suorituksen aikana.

Työskentely Huumetutkimusyksikössä oli kaikin puolin erittäin miellyttävää, mikä osaltaan vaikutti siihen, että myös opinnäytetyön suorittaminen oli mielenkiintoista ja aikataulussa oli helppo pysyä. Sydämelliset kiitokset vielä kaikille, jotka ovat auttaneet tämän opinnäytetyön valmistumisessa.

Helsingissä 21.11.2008

Brita Peltokoski

## OPINNÄYTETYÖN TIIVISTELMÄ

|   |  |
|---|--|
| <b>Työn tekijä:</b> Brita Peltokoski  |  |
| <b>Työn nimi:</b> Useiden eri lääkeaineiden kvantitatiivinen määrittäminen verestä GC/EI-MS:lla – menetelmän kehittäminen ja validointi   |  |
| <b>Päivämäärä:</b> 21.11.2008   | <b>Sivumäärä:</b> 32 s. + 3 liitettä                           |
| <b>Koulutusohjelma:</b><br>Laboratorioala   | <b>Ammatillinen suuntautuminen:</b><br>Kemiallinen analytiikka |
| <b>Työn ohjaaja:</b> Yliopettaja Jukka Toivonen   |  |
| <b>Työn ohjaaja:</b> Laboratorionjohtaja Teemu Gunnar   |  |
| <p>Opinnäytetyö tehtiin Kansanterveyslaitoksen Huumetutkimusyksikössä. Työn tavoitteena oli kehitellä useiden eri lääkeaineiden kvantitatiivista määrittystä varten luotua menetelmää lisäämällä siihen uusia analysoitavia yhdisteitä ja sisäisiä standardeja. Lopuksi menetelmä validoitiin uudelleen.</p> <p>Menetelmän kehittämisvaiheessa päätettiin, mitä yhdisteitä alkuperäisestä menetelmästä poistetaan ja mitä lisätään. Uusien yhdisteiden testiajojen jälkeen yhdisteiden lopulliseksi määräksi muodostui 28 analysoitavaa yhdistettä ja kuusi sisäistä standardia. Validointivaiheessa tutkittiin lineaarisuutta, selektiivisyyttä, toistettavuutta, määrittämissuoraa, derivatisoinnin stabiilisuutta, uutuksen saantoa ja mittausepävarmuutta.</p> <p>Menetelmällä analysoitavat lääkeaineet on jaoteltu kuuteen ryhmään: trisykliset antidepressantit ja muut masennuslääkkeet, selektiiviset serotoniinin takaisinoton estäjät, opioidit, fentiatsiinin johdokset ja muut antipsykootit, lihasrelaksantit sekä unilääkkeet ja hallusino-genit.</p> <p>Näytteiden esikäsittelyssä analysoitavat yhdisteet uutetaan näytematriisista orgaaniseen liuottimeen emäksisissä olosuhteissa. Uuton jälkeen uutoliuotin haihdutetaan, yhdisteet liuotetaan haihdutusjäännöksestä asetonitriliin ja lopuksi derivatisoidaan. Analysointi suoritetaan kaasukromatografi-massaspektrometrillä kohdeioniseurantaa käyttäen.</p> <p>Validointitulosten perusteella menetelmällä voidaan määrittää kvantitatiivisesti 24 eri yhdistettä kuuden sisäisen standardin avulla. Lisäksi menetelmästä löytyy neljä semikvantitatiivista yhdistettä, jotka eivät täyttäneet validoinnissa kaikkia kvantitatiivisen määrittämisen kriteereitä.</p> |  |
| <b>Avainsanat:</b> lääkeainemäärittäminen, GC/EI-MS, validointi, uutto, derivatisointi  |  |

**ABSTRACT**

|  |   |
|--|---|
| <b>Name:</b> Brita Peltokoski  |   |
| <b>Title:</b> Simultaneous Quantification of Several Drugs in Blood with GC/EI-MS – Development and Validation of Method   |   |
| <b>Date:</b> 21 November 2008  | <b>Number of pages:</b> 32 pp + 3 attachments |
| <b>Department:</b><br>Laboratory Sciences  | <b>Study Programme:</b><br>Chemical Analysis  |
| <b>Instructor:</b> Jukka Toivonen, Principal lecturer  |   |
| <b>Supervisor:</b> Teemu Gunnar, Head of laboratory  |   |
| <p>This thesis was performed in the National Public Health Institute's Drug research unit. The main aim was to develop further a method of quantification that has been created for simultaneous analysis of several drugs in blood. Another important objective was to re-validate the method.</p> <p>The first step in developing the method was to decide which compounds were not acceptable in the old validation and which compounds could probably be added to the method. After testing the new drugs, the final number of compounds to be analyzed amounted to 28 with six different internal standards. The validation procedure focused on studying linearity, selectivity, precision, the lowest limit of quantification, stability of derivatization, yield of extraction and uncertainty of measurement.</p> <p>The drugs to be analyzed were categorised into six groups: tricyclic antidepressants and other medicines for depression, selective serotonin reuptake inhibitors, opioids, fentiazin derivatives and other antipsychotics, muscle relaxants and sleep medicines along with hallucinogens.</p> <p>In pre-treatment of the samples the compounds were extracted from blood into an organic solvent in alkaline surroundings. After the extraction the solvent was evaporated and the compounds were dissolved from residue in acetonitrile and finally derivated. The analysis was performed by gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring.</p> <p>The results of this study show that 24 different compounds with six internal standards can be analyzed using this method. In addition it was found that four semiquantitative compounds did not pass all the criteria for quantitative measurements.</p> |   |
| <b>Keywords:</b> quantification of drugs, GC/EI-MS, validation, extraction, derivatization   |   |

# SISÄLLYS

## ALKULAUSE

## TIIVISTELMÄ

## ABSTRACT

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>JOHDANTO</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>TEORIA</b>  | <b>2</b>  |
| 2.1      | <b>Näytteiden esikäsittely</b>                               | <b>2</b>  |
| 2.1.1    | <i>Uutto ja puskurointi</i>                                  | 2         |
| 2.1.2    | <i>Derivatisointi</i>  | 3         |
| 2.1.3    | <i>Sisäisen standardin menetelmä</i>                         | 4         |
| 2.2      | <b>Kaasukromatografia</b>                                    | <b>4</b>  |
| 2.2.1    | <i>Yhdisteiden erottuminen</i>                               | 4         |
| 2.2.2    | <i>Kiinteä faasi ja liikkuva faasi</i>                       | 5         |
| 2.2.3    | <i>Kolonni</i>   | 5         |
| 2.2.4    | <i>Detektori</i>   | 6         |
| 2.3      | <b>Massaspektrometria</b>                                    | <b>6</b>  |
| 2.3.1    | <i>Näytteen saattaminen kaasufaasiin ja ionisointi</i>       | 6         |
| 2.3.2    | <i>Ionien erottelu</i>                                       | 7         |
| 2.3.3    | <i>Detektointi</i>   | 8         |
| 2.3.4    | <i>Tulosten käsittely</i>                                    | 8         |
| 2.4      | <b>Validointi</b>  | <b>8</b>  |
| 2.4.1    | <i>Lineaarisuus</i>  | 9         |
| 2.4.2    | <i>Selektiivisyys</i>  | 10        |
| 2.4.3    | <i>Toistettavuus ja määrittäysraja</i>                       | 10        |
| 2.4.4    | <i>Derivatisoinnin stabiilisuus</i>                          | 11        |
| 2.4.5    | <i>Uuton saanto</i>  | 11        |
| 2.4.6    | <i>Mittausepävarmuus</i>                                     | 11        |
| 2.5      | <b>Yhdisteet</b>   | <b>12</b> |
| 2.5.1    | <i>Trisykliset antidepressantit ja muut masennuslääkkeet</i> | 12        |
| 2.5.2    | <i>SSRI-lääkkeet</i>   | 13        |
| 2.5.3    | <i>Opioidit</i>  | 13        |
| 2.5.4    | <i>Fentiatsiinin johdokset ja muut antipsykootit</i>         | 14        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 2.5.5    | <i>Lihasrelaksantit</i>                | 15        |
| 2.5.6    | <i>Unilääkkeet ja hallusinogeenit</i>  | 15        |
| <b>3</b> | <b>MENETELMÄN KEHITTÄMINEN</b>         | <b>15</b> |
| 3.1      | <b>Yhdisteiden poisto ja lisäys</b>    | <b>16</b> |
| 3.2      | <b>Analyyysilaitte ja reagenssit</b>   | <b>18</b> |
| 3.3      | <b>Menetelmän työvaiheet</b>           | <b>19</b> |
| <b>4</b> | <b>VALIDOINTI</b>                      | <b>21</b> |
| 4.1      | <b>Lineaarisuus</b>                    | <b>22</b> |
| 4.2      | <b>Selektiivisyys</b>                  | <b>23</b> |
| 4.3      | <b>Toistettavuus ja määrittäysraja</b> | <b>23</b> |
| 4.4      | <b>Derivatisoinnin stabiilisuus</b>    | <b>26</b> |
| 4.5      | <b>Uuton saanto</b>                    | <b>27</b> |
| 4.6      | <b>Mittausepävarmuus</b>               | <b>28</b> |
| <b>5</b> | <b>PÄÄTELMÄT</b>                       | <b>30</b> |
|          | <b>VIITELUETTELO</b>                   | <b>32</b> |
|          | <b>LIITTEET</b>                        |           |

Liite 1. Analysoitavat yhdisteet, niiden rakennekaavat ja esimerkit kauppanimistä

Liite 2. Yhdisteiden seurantaionit ja retentioajat

Liite 3. Yhdisteiden validointitulokset kaikilla käytetyillä sisäisillä standardeilla laskettuina

## 1 JOHDANTO

Kansanterveyslaitoksen Huumetutkimusyksikköön saapuville näytteille suoritetaan useimmiten ensin immunologinen ja kaasukromatografi-massaspektrometrinen seulonta. Seulonnan tulosten perusteella näytteistä mahdollisesti löytyvät huumaus- ja lääkeaineet kvantitoidaan erillisillä kvantitointimenetelmillä.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on kehittää useiden eri lääkeaineiden kvantitatiivista määrittystä varten laadittua menetelmää. Menetelmä on jo validoitu ja akkreditoitu, mutta sitä ei ole otettu rutiinikäyttöön. Menetelmään halutaan lisätä uusia analysoitavia yhdisteitä sekä parantaa tulosten laatua useampien sisäisten standardien avulla. Alkuperäisellä menetelmällä voidaan kvantitoida 25 eri lääkeainetta kolmen sisäisen standardin avulla. Kehityksen jälkeen on tarkoitus validoida menetelmä uudelleen ja hakea muutoksille hyväksyntä akkreditointipalvelusta.

Näytteiden esikäsittelyssä näytematriisi puskuroidaan lievästi emäksiseksi, minkä jälkeen lääkeaineet uutetaan orgaaniseen liuottimeen. Osa yhdisteistä derivatisoidaan silyloimalla, jolloin  $\text{NH}_2$ -,  $\text{NH}$ - ja  $\text{OH}$ -ryhmiä sisältävät yhdisteet silyloituvat muodostaen trimetyylisilyyli- (TMS-) johdoksia. Lääkeaineet analysoidaan kaasukromatografi-massaspektrometrillä kohdeioniseurantaa (SIM) käyttäen. Menetelmän ajo-ohjelma on havaittu hyväksi, joten sitä ei ole tarpeellista muuttaa. Näytematriisi voi olla kokoverta, seerumia tai plasmata. Validointikokeissa 0-verenä käytetään lampaanverta. Huumetutkimusyksikössä menetelmällä analysoidaan liikennejuopumus-, sairaala-, työpaikkatestaus-, tutkimus- ja laadunvalvontanäytteitä.

Menetelmällä analysoitavat lääkeaineet vaikuttavat jollain tavalla ihmisen keskushermostoon tai aivotoimintaan. Sopivalla annostuksella lääkkeet aiheuttavat huumaavia vaikutuksia, minkä vuoksi niitä käytetään toisinaan väärin. Liikenteessä lääkeaineiden nauttiminen voi heikentää kuljettajan huomio-, ratkaisu-, koordinaatio- ja toimintakykyä, minkä vuoksi lääkkeiden vaikutuksen alainen kuljettaja saattaa olla vaaraksi myös muille ihmisille. Kvantitoimalla lääkeaineiden määrä ihmisen veressä (tai seerumissa tai plasmassa) voidaan tarvittaessa tehdä päätelmiä lääkeaineiden vaikutuksista ja mahdollisista väärinkäytöistä.

## 2 TEORIA

Seuraavaksi on selostettu opinnäytetyön eri vaiheisiin liittyvää teoriaa alkaen näytteiden esikäsittelystä, päättyen menetelmän validointiin. Lopuksi on kerrottu myös menetelmällä analysoitavista lääkeaineista. Näytteen esikäsittelystä, kaasukromatografi-massaspektrometriasta ja validoinnista kerrottaessa on keskitytty juuri kyseessä olevassa analyysimenetelmässä käytettäviin menetelmiin ja laitteisiin.

### 2.1 Näytteiden esikäsittely

Näytteiden esikäsittely on usein aikaavievin työvaihe kromatografisissa määrityksissä. Tämän menetelmän esikäsittelyvaiheessa analysoitavat yhdisteet on erotettava alkuperäisestä matriisistaan ja muokattava sellaisiksi, että ne voidaan analysoida kaasukromatografi-massaspektrometrillä.

#### 2.1.1 *Uutto ja puskurointi*

Uutto eli ekstraktio on eristysmenetelmä, jossa haluttu yhdiste voidaan erottaa jostain aineesta yhdisteen liukoisuusominaisuuksien perusteella. Uuttaminen tapahtuu kahden toisiinsa liukenemattoman faasin välillä, joko kahden nesteen, nesteen ja kiinteän aineen tai kaasun ja nesteen välillä. Uuttoa käytetään kun halutaan ottaa talteen tiettyjä yhdisteitä alkuperäisestä matriisistaan jatkokäsittelyä varten tai puhdistaa lähtöaine tietyistä yhdisteistä. Jatkuvassa uutossa samalla liuotinmäärällä suoritetaan useita uuttoja jatkuvasti kierrättämällä liuotinta. Aktiivinen uutto puolestaan perustuu uutettavan aineen ja liuottimen väliseen reaktioon. Jotta kaikki halutut yhdisteet saadaan varmasti talteen, on syytä käyttää liuotinta ylimäärin. Käytettävä uuttoliuotin määrää sen mitä yhdisteitä voidaan uuttaa. Kyseessä olevassa menetelmässä käytetään neste-nesteuuttoa siirrettäessä analysoitavat lääkeaineet verestä tolueeniin esikäsittelyn alkuvaiheessa.

Monien kemiallisten systeemien toiminnan kannalta on tärkeää, että pH säilyy vakiona. Tämä taataan käyttämällä puskurointia, joka estää pH-arvon muuttumista merkittävästi, vaikka systeemiin lisättäisiin happoja tai emäksiä. Ihmisen veri sisältää monia heikkoja happoja ja emäksiä, joiden puskurivaikutuksen johdosta sen pH on melko vakio välillä 7,35–7,45. Uuton tehokkuuden ja toistettavuuden takaamiseksi myös kyseisessä menetelmässä

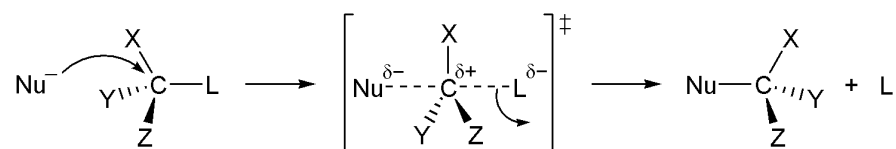


yhdisteiden uuttaminen verestä on suoritettava puskuroiduissa olosuhteissa. [1, s. 48, 54.]

### 2.1.2 Derivatisointi

Derivatisointi eli johdoksenmuodostus on tekniikka, jolla kemiallisesta yhdisteestä tehdään alkuperäisen yhdisteen kaltaisen kemiallisen rakenteen omaava johdos. Yhdisteiden derivatisointiin ennen analyysiä löytyy useita tärkeitä syitä. Ensimmäinen syy on kromatografisen erotuksen parantaminen. Vaikka stationäärifaasi olisi kemiallisesti sidottu ja tehty inertiksi, se saattaa sisältää yhdisteitä, joista löytyy niin sanottuja ”aktiivisia puolia”. Nämä voivat reagoida analyytin kanssa aiheuttaen kromatogrammiikkien häntimistä. Tällaisia yhdisteitä ovat muun muassa sekundääriset amiinit, karboksyylihapot ja jotkut fenyylihydroksiryhmät. Lisäksi derivatisoinnilla voidaan parantaa detektiota ja selektiivisyyttä, sekä yhdisteen lämmönkestävyyttä ja haihtuvuutta. Derivatisointi voidaan suorittaa useilla eri reagensseilla, esimerkiksi diatsometaanilla tai silylointi- tai asylointireagensseilla. [2; 3, s. 313–316.]

Markkinoilta löytyy paljon erilaisia silylointireagensseja, joilla voidaan valmistaa trimetyylisilyylijohdos (TMS). *N*-metyyli-*N*-(trimetyylisilyyli)trifluoroasetamidi, MSTFA, reagoi useiden polaaristen yhdisteiden kanssa syrjäyttäen niistä labiilin vedyn  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ -ryhmällä. Syrjäyttäminen tapahtuu bimolekulaarisen nukleofiilisen substituutioreaktion mukaisesti niin sanottuna  $\text{S}_{\text{N}}2$ -reaktiona kuvassa 1 esitetyn reaktiomekanismin mukaisesti.



Kuva 1.  $\text{S}_{\text{N}}2$ -reaktion reaktiomekanismi

Kaikki silylointireaktiot vaativat toimiakseen mahdollisimman vedettömän ympäristön.

### 2.1.3 Sisäisen standardin menetelmä

Analyysitulosten luotettavuuden parantamiseksi kvantitatiivisissa määrittelyissä käytetään joko ulkoisen tai sisäisen standardin menetelmää. Sisäisen standardin menetelmässä näytteisiin lisätään ennen analyysiä tietty määrä jotakin sopivaa yhdistettä sisäiseksi standardiksi (internal standard, IS). Tuloksia määritettäessä tutkittavan yhdisteen piikin intensiteettiä verrataan sisäisen standardin antamaan intensiteettiin. Tätä suhdetta verrataan sitten standardinäytteiden samalla tavalla laskettuihin tuloksiin lopullisen pitoisuuden selvittämiseksi.

Sisäisen standardin menetelmä poistaa näytteen esikäsittely- ja derivatisointivaiheissa tapahtuvan väistämättömän näytehävikin sekä injektio-tilavuuden mahdollisen muutoksen aiheuttamat mittausepävarmuudet lopputuloksista. Menetelmä huomioi myös sen, että massaspektrometrissa yhdisteiden ionisoinnin tehokkuus ja detektorin vaste voivat vaihdella laitteen kunnosta, lämpötilasta ja paineesta riippuen. Hyvä sisäinen standardi on kemialliselta rakenteeltaan sekä käyttäytymiseltään näytteen esikäsittelyssä ja kromatografisessa erotuksessa mahdollisimman samankaltainen kuin analysoitava yhdiste, erottuen kuitenkin selvästi kromatogrammissa. Paras sisäinen standardi olisi yhdisteen oma deuterioitu muoto. [2, s. 242–243; 4, s. 33–34.]

## 2.2 Kaasukromatografia

Kromatografia on kemiassa ja biokemiassa käytettävä menetelmä, jota käytetään yhdisteiden eristämiseksi, puhdistamiseksi ja määrittämiseksi. Menetelmä perustuu yhdisteiden jakaantumiseen kiinteään ja liikkuvan faasin välillä, mihin vaikuttavat niiden erilaiset fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet. Kaasukromatografiassa liikkuvana faasina on kaasua ja kiinteänä eli stationäärifaasina yleensä viskoosi neste, joka muodostaa erittäin ohuen kerroksen kolonnin sisäpinnalle.

### 2.2.1 Yhdisteiden erottuminen

Yhdisteiden erottuminen toisistaan perustuu kiinteään faasiin liukenemiseen ja höyrypaineeseen vaikuttavaan suhteelliseen haihtuvuuteen. Erottumista voidaan parantaa näitä tekijöitä muuttamalla esimerkiksi lämpötilaohjelman säätämisen tai kolonnin vaihdon avulla. Lämpötilaa nostamalla höyrypaine kasvaa, jolloin yhdiste viihtyy paremmin liikkuvan faasin puolella. Yhdiste voi reagoida liuottimen tai kiinteän faasin sisältämien funktionaalisten ryhmien

kanssa, joten kolonnin valinnassa on syytä kiinnittää huomiota muun muassa stationäärifaasin polaarisuuteen ja materiaaliin. Kolonnin pituus ja halkaisija vaikuttavat stationäärifaasin pinta-alaan; mitä suurempi pinta-ala, sitä enemmän yhdisteillä on tilaa erottua. Myös liikkuvan faasin eli kantokaasun nopeus vaikuttaa erottumiseen. [2, s. 132–133.]

### 2.2.2 *Kiinteä faasi ja liikkuva faasi*

Kiinteän faasin tärkeimmät ominaisuudet ovat stabiilisuus ja haihtumattomuus. Mikäli faasista irtoaa materiaalia, detektori voi kontaminoitua, mikä aiheuttaa kohinaa ja vähentää herkkyyttä. Faasin on oltava myös kemiallisesti inertti, mihin voidaan vaikuttaa muun muassa sitomalla faasi kemiallisesti kolonnin sisäpintaan. Mikäli useammalla yhdisteellä on sama kiehumispiste, niiden erottumista toisistaan voidaan parantaa lisäämällä kiinteään faasiin heikon vetovoiman omaavia funktionaalisia ryhmiä, esimerkiksi dipoli-dipolitai vetysidoksia muodostavia ryhmiä. Nämä auttavat erottumisessa, mutta eivät pidätä yhdisteitä kokonaan. Polysiloksaanit ovat tällä hetkellä käytetyimpiä kiinteän faasin materiaaleja. [2, s. 133–134.]

Liikkuvana faasina voi käyttää esimerkiksi vetyä, typpeä, heliumia, argonia tai ilmaa. Vedyllä on pienin tiheys, minkä vuoksi liuotinmolekyylit diffundoituvat siihen parhaiten ja kulkeutuvat näin ollen nopeimmin ulos kolonnista. Myös virtausnopeuden vaihteluväli on suurin vedyllä. Heliumin käyttöä kantokaasuna suositellaan erityisesti pienillä virtausnopeuksilla, mutta se on käytetyimpiä kantokaasuja myös suurempia virtausnopeuksia käytettäessä. Kantokaasun virtausnopeus vaikuttaa suoraan siihen, kuinka nopeasti yhdisteet saapuvat detektorille. Kaasun virtausnopeus pienenee asetetusta kolonnin koon ja lämpötilan muutoksen vaikutuksista. Keskimääräinen virtausnopeus ja aika, joka kuluu pelkän kaasun virtaukseen kolonnin läpi, voidaan selvittää injektoidulla kolonniin yhdistettä, joka ei tartu stationäärifaasiin lainkaan. Tällainen yhdiste on esimerkiksi metaani. [2, s. 135.]

### 2.2.3 *Kolonne*

Kolonnin pituus, halkaisija sekä filmin (stationäärifaasin) paksuus ja materiaali vaikuttavat yhdisteiden erottumiseen. Mitä pidempi kolonne, sitä enemmän yhdisteillä on tilaa erottua, mutta kromatogrammin piikit saattavat levetä. Kolonnin pituus vaikuttaa myös erotukseen tarvittavaan aikaan. Kolonnin halkaisija vaikuttaa erotustehokkuuteen, näytekapasiteettiin ja kaasu-

virtauksen nopeuteen. Filmin paksuus vaikuttaa yhdisteiden antamien piikkien leveyteen kromatogrammissa. Mitä ohuempi filmi, sitä kapeammat piikit, jolloin kaksi toisiaan lähellä olevaa piikkiä erottuvat paremmin kromatogrammissa. Tällöin kuitenkin näytekapasiteetti pienenee. Filmin materiaali määrää, millaiset yhdisteet siihen voivat kiinnittyä. Kolonni sijaitsee uunissa, jonka lämpötilaa muuttamalla ohjataan yhdisteiden erottumista. Pienikin muutos lämpötilassa vaikuttaa erottumiseen. Kolonnin liitoskohdat injektoriin ja detektoriin pyritään pitämään mahdollisimman lyhyinä ja tiiviinä näytehävien minimoimiseksi. [2, s. 136–138.]

#### 2.2.4 Detektori

Detektori voi olla muun muassa liekki-ionisaatiodetektori (flame ionization detector, FID), typpi-fosforidetektori (nitrogen phosphor detector, NPD), elektronisieppausdetektori (electron capture detector, ECD) tai massaselektiivinen detektori (mass selective detector, MSD). Tässä menetelmässä käytetään massaselektiivistä detektoria, joka on selektiivisyydeltään ja usein myös herkkyydeltään paras detektori kaasukromatografiassa. [2, s. 145.]

### 2.3 Massaspektrometria

Massaspektrometria on menetelmä, jossa tutkittavat molekyylit ionisoidaan ja muodostuneet ionit erotellaan ja detektoidaan niiden massa/varaus-suhteen ( $m/z$ ) mukaisesti. Saadusta massaspektristä nähdään syntyneiden ionien moolimassat, joiden avulla tuntemattomat yhdisteet voidaan tunnistaa. Syntyneiden ionien määrä on suoraan verrannollinen yhdisteen pitoisuuteen näytteessä. Yhdistämällä massaspektrometriin kaasukromatografi saadaan luotettavasti identifioitua tutkittavia yhdisteitä myös monimutkaisista seoksista. Massaspektrometrin toiminta voidaan jakaa neljään osaan: molekyylien saattaminen neste- tai kaasufaasiin ja ionisointi, ionien erottelu  $m/z$ -suhteen perusteella, detektointi ja tulosten käsittely. [4, s. 38.]

#### 2.3.1 Näytteen saattaminen kaasufaasiin ja ionisointi

Kaasukromatografi-massaspektrometriassa näyte on saatettu kaasufaasiin jo kaasukromatografissa. Kromatografisen erotuksen jälkeen näyte ohjataan suoraan massaspektrometriin, jossa se ionisoidaan esimerkiksi elektronionisaatiolla (electron ionization, EI), kemiallisella ionisaatiolla (chemical ionization, CI), tai normaalipaineessa tapahtuvalla ionisaatiolla (atmospheric pressure ionization, API). Kaasukromatografian ja massaspektrometrin

välisissä liitännöissä ei saa olla kylmiä kohtia, sillä ne voivat vähentää herkyyttä tai pahimmassa tapauksessa aiheuttaa näytteen tiivistymistä nesteeksi.

Näytekaasun elektronipommitukseen perustuva elektroni-ionisaatio on toistettava ja tehokas ionisaatiomenetelmä. Elektroneja tuotetaan kuumentamalla elektronisesti hehkulankaa, filamenttia, josta lämmityksen seurauksena emittoituu elektroneja. Syntyneet elektronit ohjataan kapeana suihkuna näytekaasun läpi positiivisesti varautuneelle anodille sähkökentän ja kahden positiivisesti varautuneen ohjausraon avulla. Ohjausrakojen välinen sähkökenttä kiihdyttää elektroneja, jotka törmäävät näytemolekyyleihin aiheuttaen molekyylin virittymistä korkeammalle energiatasolle. Osa virittyneistä molekyyleistä luovuttaa elektroninsa kokonaan pois, jolloin syntyy radikaalikatio-neita eli molekyyli-ioneja ( $M^+$ ). Ionisoitu näyte absorboi yleensä ylimäärin energiaa, mikä aiheuttaa niiden pilkkoutumisen useimmiten positiivisesti varautuneiksi fragmentti-ioneiksi.

Emittoituvien elektronien määrää voidaan säädellä filamentin lämpötilaa muuttamalla ja niiden energiaa elektroneja kiihdyttävän sähkökentän voimakkuuden säätelyllä. Käytetyin elektronien energia on 70 eV. Vakuumissa tapahtuneessa elektronipommituksessa syntyneet positiiviset ionit siirretään massa-analysaattorille positiivisesti varautuneen karkotinlevyn ja negatiivisen varauksen omaavan kiihdytsraon avulla. [2, s. 216–218; 4, s. 39–41.]

### 2.3.2 Ionien erottelu

Ionien erottelu voidaan suorittaa niiden energian, liikemäärän tai nopeuden perusteella. Erottamiseen käytetään sektori-, kvadrupoli-, ioniloukku-, lentoaika- tai Fourier-muunnosmassaspektrometria.

Yleisin analysaattori on kvadrupolilaitteisto, joka koostuu neljästä samansuuntaisesta metallisauvasta. Vastakkaiset sauvat muodostavat kaksi paria, joista toiseen kytketään positiivinen tasavirtajännite ja toiseen negatiivinen jännite. Lisäksi sauvapareihin johdetaan radiotaajuinen vaihtojännite. Ionisoidut näytemolekyylit ohjataan sauvojen väliin, jolloin niiden nopeus sauvojen akselin suunnassa säilyy muuttumattomana. Radiotaajuisen sähkökentän vaikutuksesta ne alkavat kuitenkin värähdellä poikittain ja tarttuvat kvadrupolin sauvoihin. Radiotaajuutta sekä tasa- ja vaihtovirtajännitteiden potentiaaleja muuttamalla saadaan tietyt  $m/z$ -suhteen omaavat molekyylit ulos

analysaattorista halutussa järjestyksessä. Kvadrupolianalysaattorin massa-alue on tyypillisesti 2 - 2000 atomimassayksikköä (amu). Laitteen resoluutioon ja herkkyyteen voidaan vaikuttaa sauvojen pituutta ja halkaisijaa muuttamalla. [2, s. 229–231; 4, s. 49–50.]

### 2.3.3 *Detektointi*

Yksi käytetyimmistä detektoreista on elektronimonistinputki, joka koostuu metallioksidoilla päällystetyistä elektrodeista eli dynodeista. Osuessaan ensimmäiselle dynodille ionisuihku muuttuu elektroneiksi, jotka jatkavat matkaansa seuraavalle dynodille irrottaen siitä lisää elektroneja. Kulkeutessaan seuraavalle dynodille elektronisuihku voimistuu irrottaen matkalla lisää elektroneja, kunnes se saapuu anodille analysoitavaksi. [2, s. 233–234.]

### 2.3.4 *Tulosten käsittely*

Analyysin tuloksena saadaan detektorin mittaamista intensiteeteistä muodostuva massaspektri. Spektrissä kunkin ionin suhteellinen osuus ilmoitetaan  $m/z$ -suhteen funktiona. Useimmiten spektri normitetaan niin, että runsaimmin esiintyvän ionin intensiteetiksi asetetaan 100, ja muiden ionien intensiteetit suhteutetaan tähän. Koska molekyylin fragmentaatio on kullekin yhdisteelle karakterinen, voidaan massaspektriä käyttää yhdisteiden identifiointiin. [2, s. 234–236; 4, s. 56.]

Massaspektrometrilla voidaan määrittää joko näytteen kokonaisionikromatogrammi (total ion chromatogram, TIC) tai ionimonitorikromatogrammi (selected ion monitoring, SIM). Kokonaisionikromatogrammia varten ajetaan scan-ajo, jossa mitataan kaikkia tietyllä massa-alueella esiintyviä ioneja, mutta ionimonitorikromatogrammia varten mitataan vain haluttujen ionien intensiteetit. SIM- menetelmä on hyvä kvantitatiivisissa määrittelyissä, kun tiedetään mitä yhdisteitä näytteestä etsitään. Tällöin on suositeltavaa käyttää kuitenkin vain yli 100  $m/z$ -suhteen omaavia ioneja. SIM-menetelmässä seurattavat ionit syötetään ajo-ohjelmaan tietyillä aikaväleillä rajattuihin ”ikkunoihin”. Laite analysoi kunkin ikkunan kohdalla vain siihen asetetut ionit.

## 2.4 **Validointi**

Kemiallisessa analytiikassa laadunvarmistustoimenpiteiden ensisijainen tarkoitus on taata analyysitulosten oikeellisuus ja todistusvoima. Parhaita tapoja näiden takaamiseksi on validoitujen analyysimenetelmien käyttö.

Validoinnin tavoitteena on varmistaa, että menetelmän antamat tulokset ovat luotettavia, ja niiden mittausepävarmuus tunnetaan. Näin voidaan osoittaa menetelmän soveltuvuus käyttötarkoitukseensa. Hyväksyttävien tulosten raja-arvot laboratorio voi joko päättää itse tai ne voivat olla asiakkaan, esimerkiksi viranomaisen, määrittämiä. [5, s. 1.]

Validointi voidaan suorittaa joko täys-, osittain- tai ristiinvalidointina. Täysvalidointi suoritetaan, mikäli kyseessä on kokonaan uusi menetelmä tai jos vanhaan menetelmään lisätään uusia aineita tai metaboliitteja. Osittainvalidointia käytetään, mikäli aiemmin validoitua menetelmää muokataan (esimerkiksi näytematriisi vaihdetaan tai konsentraatiotasoa muutetaan). Validoinnin laajuus voi vaihdella yhdestä määrittäyksestä melkein täysvalidointiin. Ristiinvalidointi on tarpeellista, jos verrataan vähintään kahta samaa tutkimusta varten kehitettyä menetelmää, esimerkiksi päivitettäessä menetelmää tai siirrettäessä se toiseen laboratorioon. [6, s. 5–6; 7, s. 2–4.]

Analyysimenetelmän validoinnissa tyypillisesti tutkittavia parametrejä ovat spesifisyys ja selektiivisyys, lineaarisuus, mittausalue, toteamis- ja määrittäysraja, poikkeama, saanto, häiriökestävyys, tarkkuus, toistettavuus, uusittavuus, stabiilisuus ja mittausepävarmuus. Useimmiten ei ole tarpeellista tutkia kaikkia edellä mainittuja ominaisuuksia, vaan tutkittavat parametrit valitaan menetelmäkohtaisesti. [8, s. 25–26; 9, s. 2.]

#### 2.4.1 Lineaarisuus

Lineaarisuudella tarkoitetaan analyttisen menetelmän kykyä antaa tietyllä alueella hyväksyttävä lineaarinen korrelaatio tulosten ja näytteistä tutkittavien aineiden pitoisuuksien välillä. Lineaarisuutta määritettäessä on suositeltavaa analysoida rinnakkaismäärittäyksiä (esimerkiksi 6–10 toistoa) vähintään viittä eri konsentraatiotasoa. Tuloksista piirretään suora pienimmän neliösumman menetelmällä vertaamalla vasteen suhdetta määritettyyn pitoisuuteen. Suoran yhtälöstä saadaan korrelaatiokertoimen neliö ( $r^2$ ), joka kuvaa havaintopisteiden välistä riippuvuutta. Laajoja lineaarisuusalueita käytettäessä on hyvä käyttää painotettua kalibrintimallia yhdisteiden eri pitoisuuksista saaduista erilaisista variansseista johtuen (heteroskedastisuus). Painotetussa mallissa painotuskertoimina voidaan käyttää arvoja  $1/a$  tai  $1/a^2$ , joissa  $a$  kuvaa yhdisteen konsentraatiota. Huumetutkimusyksikössä lineaarisuuden raja-arvo on  $r^2 > 0,98$  tai käytettäessä painotettua kalibrintimallia

$r^2 > 0,95$ . Painotuskerrointa käytettäessä nollaa ei saa sisällyttää suoralle. [5, s. 8–9; 8, s. 28–29; 10, s. 9,12.]

#### 2.4.2 Selektiivisyys

Menetelmä on selektiivinen, mikäli se tuottaa samassa määityksessä vasteen usealle yhdisteelle, mutta pystyy erottamaan tutkittavan yhdisteen muista yhdisteistä ilman häiriötä. Selektiivisyyttä voidaan analysoida monella eri tavalla käyttäen esimerkiksi puhtaita näytteitä ja seoksia, joiden antamia vasteita verrataan. Tuloksista voidaan määrittää myös esimerkiksi resoluutio, pohjaluku ja häntimistekijä. [5, s. 1–3; 8, s. 27; 6, s. 6.]

#### 2.4.3 Toistettavuus ja määrittämissuhteet

Toistettavuus kuvaa satunnaistekijöistä johtuvaa tulosten vaihtelua keskiarvon ympärillä. Määrittysten sisäinen toistettavuus kuvaa sellaisten näytteiden tulosten vaihtelua, jotka on määritetty samoissa olosuhteissa samalla mittauuskerralla. Määrittysten välinen toistettavuus sen sijaan kertoo laboratorion sisäisestä vaihtelusta, ja tällöin määrittäykset on voitu suorittaa esimerkiksi eri päivinä, eri laitteella tai eri henkilön toimesta. Uusittavuutta tutkittaessa mitaukset on suoritettu eri laboratoriossa. [6, s. 7–8; 7, s. 5.]

Menetelmän toistettavuus voidaan laskea määrittämällä suhteellinen keskihajonta (relative standard deviation, RSD) eli variaatiokerroin (coefficient of variation, CV) kaavalla 1, jossa  $s$  on rinnakkaisten keskihajonta ja  $\bar{x}$  keskiarvo.

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (1)$$

Toistettavuutta voidaan arvioida myös varianssianalyysillä (analysis of variance, ANOVA).

Oikeellisuus kuvaa analyysimenetelmän tulosten poikkeavuutta teoreettisesta arvosta. Sen laskemisessa voidaan käyttää kaavaa 2.

$$\frac{\text{kaikkien tulosten keskiarvo} - \text{teoreettinen arvo}}{\text{teoreettinen arvo}} \cdot 100\% \quad (2)$$



Määrittäysraja on kvantitatiivisessa määrittäyksessä se pitoisuuden alaraja, jolle voidaan esittää epävarmuusarvio. Standardisuoran pienin arvo täyttää tavallisesti määrittäysrajan ehdot. [8, s. 30.]

#### 2.4.4 Derivatisoinnin stabiilisuus

Derivatisoinnin stabiilisuutta tutkitaan ajamalla sarja täsmälleen samalla tavalla valmistettuja näytteitä tietyn ajanjakson välein. Esimerkiksi ajettaessa kahdeksan näytettä neljän tunnin välein stabiilisuustestin kokonaisajaksi kertyy 28 tuntia. Kontaminaatioiden välttämiseksi ei ole suositeltavaa ruiskuttaa samasta näytepullostasta monta kertaa, minkä vuoksi näytteitä on oltava useampia. On siis syytä valmistaa ensin vain yksi näyte, joka jaetaan useampaan osaan viimeisen esikäsittelyvaiheen jälkeen. Derivatisoinnin stabiilisuutta tutkitaan tarkastelemalla näytteiden antamia vasteita. Yksi hyvä keino datan käsittelyyn on regressioanalyysi. Tällöin stabiilisuuden tilastollisesti merkittävänä raja-arvona voidaan pitää arvoa 0,05. Tätä suuremmat arvot kertovat yhdisteen olevan stabiili tutkitun ajanjakson aikana.

#### 2.4.5 Uuton saanto

Saanto kuvaa analyysimenetelmän tehoa havaita tutkittavan analyytin kokonaismäärä [8, s. 32.]. Uuton saantoa voidaan tutkia valmistamalla sarja saman pitoisuuden omaavia tavallisia standardinäytteitä ja sama määrä vertailunäytteitä, joihin lisätään analyyttien standardia vasta uuttoliuoksen erotuksen jälkeen vastaava määrä kuin tavallisissa näytteissä teoreettisesti pitäisi olla. Tuloksista määritetään uuton saantoprosentti kaavalla 3.

$$\frac{\text{tavallisten näytteiden keskiarvo}}{\text{lisäysnäytteiden keskiarvo}} \cdot 100\% \quad (3)$$

#### 2.4.6 Mittausepävarmuus

Jokainen mittaus sisältää epävarmuuslähteitä, jotka liittyvät muun muassa näytteenottoon, esikäsittelyyn ja itse mittaustapahtumaan. Mittausepävarmuus kertoo kvantitatiivisesti tulosten laadukkuudesta ilmoittaen sen mittausalueen, jonka sisältä oikea arvo tietyllä todennäköisyydellä löytyy. Epävarmuus koostuu systemaattisesta ja satunnaisesta virheestä. Systemaattista virhettä kuvaa menetelmän oikeellisuus ja satunnaista määrittäyksen sisäinen ja määrittäysten välinen toistettavuus. Mittausepävarmuus lasketaan

kaavalla 4, jossa a kuvaa määrittelyn sisäistä toistettavuutta, b määrittelysten välistä toistettavuutta ja c oikeellisuutta.

$$\sqrt{a^2 + b^2 + c^2} \quad (4)$$

Laajennetun mittausepävarmuuden avulla saadaan laskettua rajat, joiden sisällä tulos esiintyy tietyllä todennäköisyydellä. Esimerkiksi kerrotaessa mittausepävarmuus kahdella, tulos esiintyy laskettujen rajojen sisällä 95 %:n todennäköisyydellä. [5, s.16–18.]

## 2.5 Yhdisteet

Kyseessä olevalla menetelmällä on tutkittu 28 eri yhdistettä, joiden rakennekaavat ja esimerkit lääkenimistä on esitetty liitteessä 1. Yhdisteet on jaettu rakenteiden tai käyttötarkoituksen mukaisesti kuuteen ryhmään, jotka esitellään seuraavaksi.

### 2.5.1 Trisykliset antidepressantit ja muut masennuslääkkeet

Trisykliset antidepressantit (tricyclic antidepressants, TCA) ovat vanhimpia käytössä olevia masennuslääkkeitä, joiden käyttö on aloitettu maailmalla jo 1950-luvulla. Lääkkeiden kemiallisissa rakenteissa esiintyy kaksi bentseenirengasta, joiden välissä on yksi seitsenrenas. Tämä saa avaruusrakenteen näyttämään loivan v:n muotoiselta, mitä pidetään erityisen tärkeänä lääkkeen biokemiallisten vaikutusten kannalta. Kaikissa trisyklisissä lääkkeissä on propyyliamiinisivuketju ja keskimäinen seitsenrenas voi sisältää tyyppiä tai happea. Samankaltaisten rakenteiden vuoksi lääkkeet ovat tehokkaita ja sivuvaikutuksiltaan keskenään samankaltaisia. [11; 12, s. 445–450; 13.]

Useimmat tutkijat uskovat trisyklisten masennuslääkkeiden vaikutusmekanismiin perustuvan soluunoton estämiseen, yleensä amiinien, noradrenaliinin tai 5-hydroksitryptamiinin soluunoton estämiseen. Tapahtumaa, joka lopulta saa aikaan antidepressiivisen vaikutuksen, ei kuitenkaan vielä tiedetä. Lääkkeiden vaikutus alkaa yleensä vasta 2–3 viikon kuluttua lääkityksen aloittamisesta, mikä viittaa melko monimutkaiseen reaktiomekanismiin ilmeisesti synapsien läheisyydessä.

TCA-lääkkeiden edut ovat alhainen hinta, luotettava tieto pitkäaikaisvaikutuksista sekä kymmenien vuosien aikana kertynyt tieto farmakokineettisistä

ja -dynaamisista vaikutuksista. Lääkkeiden aiheuttamat sivuvaikutukset, muun muassa keskushermosto- ja sydänvaikutukset (esimerkiksi uneliaisuus ja sydämen lyöntitiheyden muutos), ovat tavallisia, ja yliannostus on hengenvaarallinen. Sivuvaikutuksista huolimatta lääkkeet ovat käyttökelpoisia ja auttavat usein vakavista masennustiloista kärsiviä henkilöitä paremmin kuin uudet masennuslääkkeet. [11; 12, s. 445–450; 13.]

Mirtatsapiini ja mianseriini ovat tetrasyklisiä masennuslääkkeitä. Mianseriinin vaikutus perustuu solureseptoreiden salpaamiseen, mikä johtaa amiinien aineenvaihdunnan muuttumiseen. Mirtatsapiini tehostaa hermopäätteistä erityvän välittäjäaineen vaikutusta. Venlafaksiini on serotoniinin ja noradrenaliinin takaisinoton estäjiin luokiteltu antidepressantti.

### 2.5.2 SSRI-lääkkeet

Selektiiviset serotoniinin takaisinoton estäjät (serotonin selective re-uptake inhibitors, SSRI) ovat 1980-luvun puolivälissä käyttöön otettuja masennuslääkkeitä. Niiden vaikutukset perustuvat serotoniinin takaisinoton estämiseen presynaptisissa hermopäätteissä, mikä aiheuttaa serotoniinin pitoisuuden kasvua soluvälitilassa ja solukalvon reseptoreilla. SSRI-lääkkeiden kemialliset rakenteet eroavat huomattavasti toisistaan, mutta kliinisesti niillä on paljon yhteistä.

Serotoniiniselektiiviset lääkkeet ovat vakavien masennustilojen hoidossa yhtä tehokkaita kuin trisykliset antidepressantit, minkä lisäksi niillä näyttää olevan vaikutusta myös ahdistuneisuushäiriöiden hoidossa. TCA-lääkkeisiin verrattuna SSRI-lääkkeiden sivuvaikutukset ovat huomattavasti vähäisempiä, sillä ne eivät esimerkiksi lihota, väsytä tai tehosta alkoholin vaikutusta, eivätkä ole yhtä toksisia yliannostuksen sattuessa. Kemiallisista rakenteista huolimatta kaikkien SSRI-lääkkeiden sivuvaikutukset (esimerkiksi pahoinvointi ja hikoilu) ovat hyvin samankaltaisia, sillä ne johtuvat serotoniinivaikutuksen lisääntymisestä keskushermostossa. [12, s. 451–452; 13, s. 377–378.]

### 2.5.3 Opioidit

Opioidit eli euforisoivat analgeetit ovat yhdisteitä, jotka kiinnittyvät pääsääntöisesti keskushermostossa tai ruoansulatuskanavassa sijaitseviin opioidireseptoreihin. Ne voidaan karkeasti jakaa neljään eri päätyyppiin: endogeeniset eli kehon synnyttämät, oopiumalkaloidit (peräisin oopiumunikosta,

toiselta nimeltään opiaatit), puolisynteettiset ja synteettiset opioidit. Päätyypit voidaan edelleen jakaa lukuisiin eri ryhmiin niiden erilaisten johdosten ja metaboliittien perusteella.

Opioidien kemialliset rakenteet voivat poiketa toisistaan huomattavasti, ja niillä voi olla erilaisia käyttötarkoituksia. Kaikkia opioideja yhdistää kipua lievittävä vaikutus, minkä vuoksi niitä käytetään muun muassa kipu- ja yskänlääkkeissä. Huumaavan vaikutuksensa vuoksi opioidit ovat tunnetuimpia huumeita maailmalla. Joitain niistä voidaan käyttää myös huumeiden vieroituslääkkeinä. [12, s. 387–402.]

#### 2.5.4 *Fentiatsiinin johdokset ja muut antipsykootit*

Fentiatsiini on eräs neuroleptisiin aineisiin kuuluva perusyhdiste, joka syntetisoitiin ensimmäisen kerran jo 1800-luvulla. Ensimmäinen antipsykoottisesti keskushermostoon vaikuttava fentiatsiinin johdos kehitettiin kuitenkin vasta 1950-luvulla. Fentiatsiinin johdosten molekyylin ydin on kolmirengas, joka muodostuu rikin ja typen yhteensitomista bentseenirenkaista.

Johdokset näyttävät vaikuttavan keskushermostossa useisiin välittäjäainejärjestelmiin, tärkeimpänä ilmeisesti aivojen dopamiiniradastot. Antipsykoottiset lääkeaineet aiheuttavat niin sanotun neuroleptisen oireyhtymän, jolle tyypillisiä piirteitä ovat muun muassa aggressiivisuuden väheneminen ja emotionaalinen välinpitämättömyys. Lääkkeet vähentävät myös vähitellen psykoottisia ja skitsofreenisia oireita, kuten hallusinaatioita ja harhaluuloja. Fentiatsiini johdosten sivuvaikutuksista tärkein on parkinsonismi, johon sisältyy muun muassa vapinaa, syljen valumista ja pakkoliikkeitä. Sivuvaikutuksista huolimatta lääkkeiden akuutti toksisuus on kuitenkin vähäistä. Liitteestä 1 löytyvän taulukon yhdisteistä fentiatsiinin johdoksia ovat klooripromatsiini, promatsiini, levomepromatsiini ja tioridatsiini.

Klooriprotikseeni eroaa klooripromatsiinista ainoastaan siinä, että sen bentsoylirenkaita yhdistävät rikki ja hiiliatomit, eivätkä rikki ja typpiatomit. Sen ominaisuudet vastaavat läheisesti klooripromatsiinia. Klotsapiini on toistaiseksi ainoa niin kutsuttu epätyypillinen antipsykoottinen lääkeaine, joka on tehokkaampi ja haittavaikutuksiltaan siedettävämpi kuin tavalliset antipsykootit. Sen on todettu tehoavan myös sellaisilla henkilöillä, joilla muut hoitokeinot on todettu tehottomiksi. Klotsapiini voi kuitenkin aiheuttaa vakavia verenkuivan häiriöitä, minkä vuoksi sen käyttö on erittäin rajoitettua.

Olantsapiinia käytetään erityisesti skitsofreniapotilaiden psykoosioireiden parantamiseen ja kaksisuuntaisen mielialahäiriön oireiden lievittämiseen. [12, s. 431–436; 13, s. 384–390.]

#### 2.5.5 *Lihasrelaksantit*

Orfenadriini ja titsanidiini ovat niin sanottuja sentraalisia lihasrelaksantteja, jotka vaikuttavat keskushermostoon. Ne halvaannuttavat luurankolihasia estämällä hermo-lihasliitosten toimintaa. Kummankaan aineen tarkkaa vaikutusmekanismia ei tunneta, mutta molempien epäillään vaikuttavan myös selkäydintasolla. Orfenadriini on antihistamiini, jota käytetään esimerkiksi Parkinsonin taudin hoitoon. Titsanidiinia käytetään muun muassa kivulioiden lihaskouristusten ja lihasjäykkyyden hoitoon. [12, s. 352.]

#### 2.5.6 *Unilääkkeet ja hallusinogeenit*

Unilääkkeiden eli hypnoottien tarkoitus on sopivana annoksena edistää luonnollisen unen tuloa tai pidentää sen kestoa. Annoksen suuruutta lisäämällä saadaan aikaiseksi anestesia eli nukutus, ja yliannostuksella voidaan aiheuttaa kooma tai pahimmassa tapauksessa kuolema. Unilääkkeet vaikuttavat laajasti koko elimistössä vaimentaen eri elinten ja etenkin hermoratojen toimintaa. Tsolpideemin vaikutukset välittyvät bentsodiatsepiinireseptori-kompleksin kautta. [12, s. 371.]

PCP:tä eli fensyklidiiniä kehiteltiin suonensisäiseksi nukutus- eli anestesialääkkeeksi, mutta sen käytöstä luovuttiin 1900-luvun puolivälissä voimakkaiden neuroottisten ja hallusinaatioita aiheuttavien sivuvaikutusten vuoksi. Nykyään PCP:tä käytetään päihteenä enkelipölyn tai synteettisen THC:n nimellä.

### 3 MENETELMÄN KEHITTÄMINEN

Menetelmän kehittämisen ensimmäisessä vaiheessa pohdittiin, mitkä yhdisteet alkuperäisestä menetelmästä tulisi poistaa, mitä analyyttejä uuteen menetelmään halutaan lisätä ja millä sisäisillä standardeilla alkuperäisten yhdisteiden validointituloksia voitaisiin mahdollisesti parantaa. Uusia yhdisteitä liittäessä ajettiin testiajoja, joiden perusteella analysoitiin kyseisten yhdisteiden soveltuvuutta menetelmään. Kun yhdisteiden tavoiteltu kokoonpano oli

päätetty, suoritettiin validointikokeet. Vasta validointitulosten perusteella voitiin päättää, mitkä yhdisteet menetelmään varmasti sisällytetään. Ennen menetelmän käyttöönottoa muokattiin tulostenkäsittelypuoli laitteella sellaiseksi, että kukin yhdiste analysoidaan vain parhaaksi katsotun sisäisen standardin avulla.

### 3.1 Yhdisteiden poisto ja lisäys

Alkuperäisen menetelmän validointikokeiden tulosten perusteella todettiin, että yksi yhdiste, fluvoksamiini, ei täytä stabiilisuuden kriteereitä, joten se poistettiin menetelmästä.

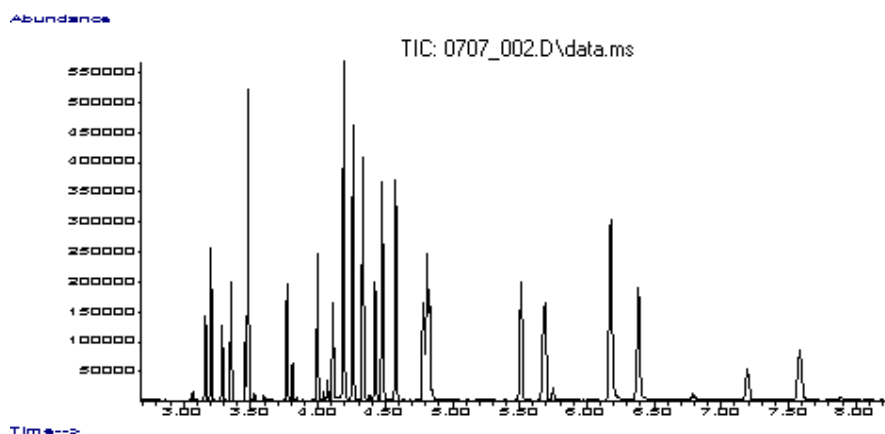
Ensimmäisessä vaiheessa päätettiin lisätä menetelmään analysoitaviksi yhdisteiksi morfiini, kodeiini, 6-asetyylimorfiini, PCP ja olantsapiini, sekä sisäisiksi standardeiksi paroksetiini d6, trimipramiini d3 ja morfiini d6. Jokaista yhdistettä varten valmistettiin oma näytteensä, jossa 1 ml:aan verta pipetoitiin 10 µl (paroksetiini d6, trimipramiini d3 ja morfiini d6) tai 3 µl (morfiini, kodeiini, 6-asetyylimorfiini, PCP ja olantsapiini) kyseisen yhdisteen 1 mg/ml-pitoista metanoliin valmistettua kantaliuosta. Näytteiden esikäsittelyssä yhdisteet uutettiin tolueeniin, liuotin haihdutettiin ja lopuksi yhdisteet liuotettiin asetonitriliin. Näytteet ajettiin alkuperäistä menetelmää vastaavalla ajo-ohjelmalla, mutta scan-ajona.

Tuloksista selvitettiin kunkin yhdisteen retentioaika ja etsittiin suunnilleen kolme tyypillisintä ionia, jotka lisättiin SIM-menetelmän ajo-ohjelmaan seurantaioneiksi. Ajettiin testistandardisuora, joka sisälsi myös kaikki uudet aineet. Tuloksista huomattiin, etteivät morfiini ja morfiini d6 erotu. Todettiin, etteivät kyseiset yhdisteet uutu tolueeniin. Morfiini ja morfiini d6 päätettiin siis jättää pois menetelmästä. Koska kodeiini ja 6-asetyylimorfiini ovat morfiinin kaltaisia yhdisteitä, jotka on hyvä analysoida samalla menetelmällä morfiinin kanssa, myös ne päätettiin jättää pois menetelmästä.

Seuraavaksi haluttiin tarkistaa kaikkien yhdisteiden tarkat retentioajat. Tätä varten valmistettiin näyte, johon pipetoitiin 50 µl standardien kantaliuosta 500 µl:aan verta. Päätettiin lisätä menetelmään vielä buprenorfiini ja norbuprenorfiini sekä niille sisäiseksi standardiksi buprenorfiini d4. Näistä valmistettiin näytteet, jotka sisälsivät 5 µl kantaliuosta (1 mg/ml) 500 µl:ssa verta. Kaikki edellä mainitut näytteet esikäsiteltiin kyseessä olevan menetelmän työohjeen mukaisesti (ks. kuva 4, s. 20), ja ajettiin menetelmää vastaavalla

ajo-ohjelmalla, mutta scan-ajona. Tarkistettiin yhdisteiden retentioajat ja seurantaikkunoiden paikat, sekä lisättiin uusien yhdisteiden seurantaionit menetelmään. Yhdisteiden retentioajat ja seurantaionit löytyvät liitteestä 2.

Lopuksi valmistettiin standardeille uusi kantaliuos, joka sisälsi kaikki tutkittavat yhdisteet. Ajettiin testistandardisuora, ja todettiin menetelmä alustavasti toimivaksi kaikille yhdisteille. Kuvassa 2 on kokonais-ionikromatogrammi, jossa näkyy kaikkien menetelmällä tutkittavien yhdisteiden piikit.



Kuva 2. Yhdisteiden kokonais-ionikromatogrammi

Osa yhdisteistä päätettiin analysoida kolmen, osa kahden ja osa yhden sisäisen standardin avulla, jotta validointitulosten perusteella voidaan valita toimivin. Muokattiin vielä datankäsittelypuoli sellaiseksi, että yhdisteet saadaan analysoitua kaikkia haluttuja sisäisiä standardeja käyttäen. Seuraavaksi aloitettiin menetelmän validointi.

### 3.2 Analyysilaitte ja reagenssit

#### *Analyysilaitte*

Kuvan 3 mukainen GC/El-MS, jossa

- kaasukromatografi: Hewlett Packard HP 6890 Series GC System
- kapillaarikolonne: J&W Scientific DB-35ms
  - pituus 30,0 m
  - sisähalkaisija 320  $\mu\text{m}$
  - filmin paksuus 0,25  $\mu\text{m}$
- automaattinen injektori: Hewlett Packard 7683 Series Injector
- massaspektrometri: Hewlett Packard 5973 Mass Selective Detector



Kuva 3. Hewlett Packard HP 6890

#### *Reagenssit*

- Tolueeni ( $\text{C}_7\text{H}_8$ )
  - analyysilaatu, esim. BDH 10284, AnalaR7
- Metanoli,  $\text{MeOH}$  ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )
  - analyysilaatu, esim. BDH 10158 AnalaR7
- Asetonitriili ( $\text{CH}_3\text{CN}$ )
  - kromatografialaatu, esim. Merck 1.14291 LiChrosolv<sup>®</sup>
- Dinatriumvetyfosfaatti ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
  - analyysilaatu, esim. Merck 1.06580 pro analysi

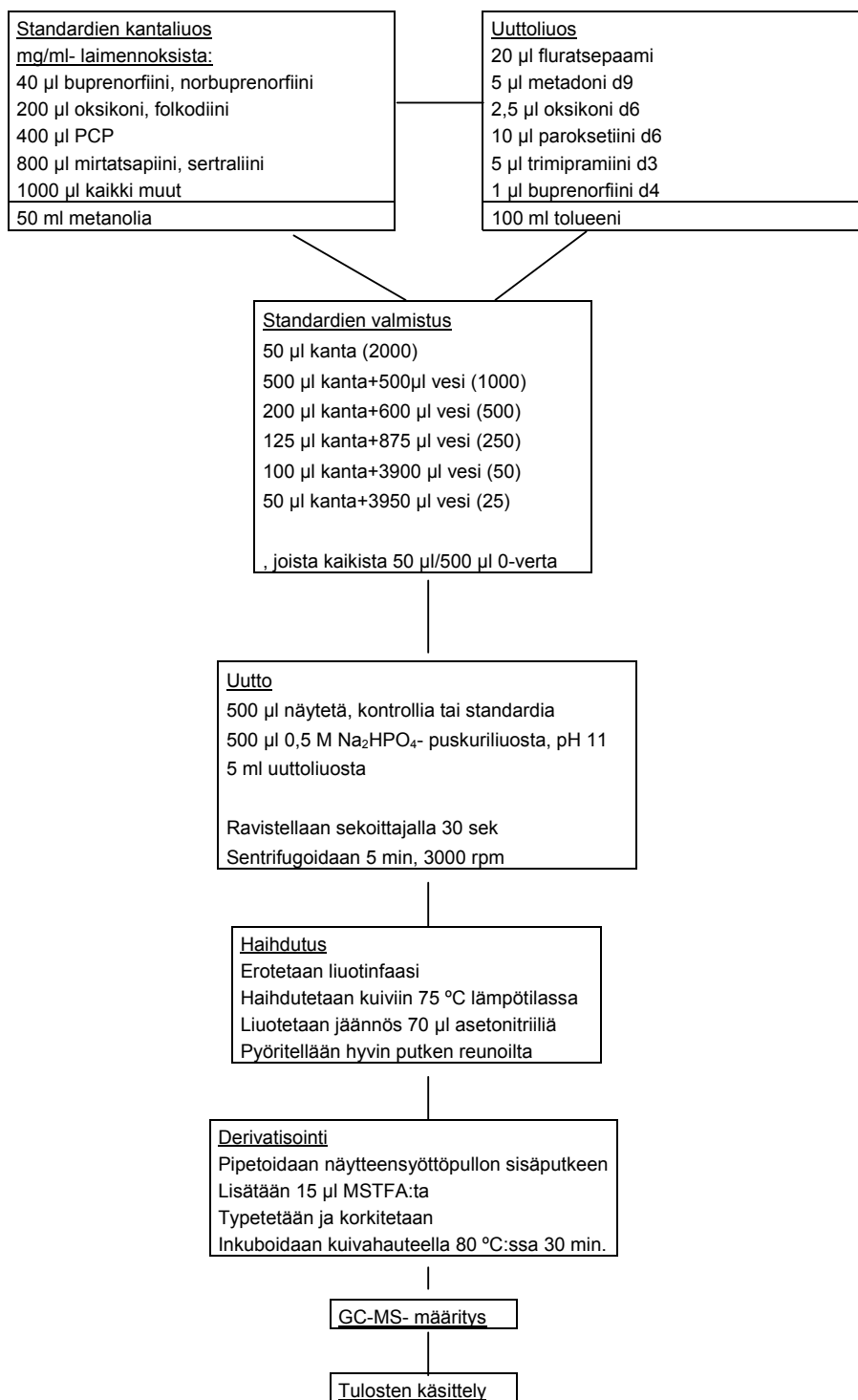


- Natriumhydroksidi (NaOH)
  - analyysilaatu, esim. Merck 6498 pro analysi
- vesi (H<sub>2</sub>O)
  - erityispuhdasta, esimerkiksi ELGASTAT UHQ- laitteesta
- *N*-metyyli-*N*-(trimetyylisilyyli)trifluoroasetamidi, MSTFA (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>F<sub>3</sub>NOSi)
  - Sigma-Aldrich

### 3.3 Menetelmän työvaiheet

Päivittäistä rutiinianalytiikkaa varten valmistetaan kerralla suurempi määrä standardien kantaliuosta, joka jaetaan pienemmiksi eriksi Eppendorf-putkiin ja säilötään pakastimeen (vähintään -15 °C). Kantaliuos valmistetaan pipetoimalla tolueeniin kunkin yhdisteen mg/ml-pitoista metanoliin valmistettua kantaliuosta niin, että standardien kantaliuoksessa yhdisteiden pitoisuudet ovat seuraavat: buprenorfiini ja norbuprenorfiini 800 ng/ml, oksikoni ja folkodiini 4000 ng/ml, PCP 8000 ng/ml, mirtatsapiini ja sertraliini 16000 ng/ml sekä kaikki muut yhdisteet 20000 ng/ml. Analyysiä varten valmistetaan kuusi standardia laimentamalla kantaliuosta veteen niin, että standardien pitoisuudet ovat 80, 40, 20, 10, 2 ja 1 ng/ml (buprenorfiini ja norbuprenorfiini), 400, 200, 100, 50, 10 ja 5 ng/ml (oksikoni ja folkodiini), 800, 400, 200, 100, 20 ja 10 ng/ml (PCP), 1600, 800, 400, 200, 40 ja 20 ng/ml (mirtatsapiini ja sertraliini) tai 2000, 1000, 500, 250, 50 ja 25 ng/ml (kaikki muut yhdisteet).

Näytteen esikäsittelyssä yhdisteet uutetaan 0,5 ml:sta näytettä 5 ml:aan tolueenia emäksiseksi puskuroiduissa olosuhteissa. Sisäiset standardit on lisätty uuttoliuokseen, jolloin niiden lisääminen näytteisiin helpottuu. Varsinainen uutto tapahtuu ravistuksessa, minkä jälkeen näytteet sentrifugoidaan ja yhdisteet sisältävä uuttoliuos erotetaan puhtaisiin koeputkiin. Seuraavaksi uuttoliuos haihdutetaan vesihauteessa ilmapuhalluksen avulla. Koeputkiin jääneestä haihdutusjäännöksestä yhdisteet liuotetaan pieneen määrään asetonitriliä, joka siirretään näytteensyöttöpulloihin. Yhdisteet derivatisoidaan lisäämällä näytteensyöttöpulloihin tarvittava määrä derivatisointiainetta, minkä jälkeen niitä inkuboidaan riittävässä lämpötilassa mahdollisimman täydellisen derivatisointireaktion aikaansaamiseksi. Derivatisoinnin jälkeen näytteet ovat valmiita analysoitaviksi. Kuvassa 4 on esitelty standardien kantaliuoksen valmistus sekä menetelmän työvaiheet.



Kuva 4. Standardien kantaliuoksen valmistus ja menetelmän työvaiheet

Menetelmän lämpötilaohjelmassa uunin lämpötila nostetaan ensin 130 °C:sta 200 °C:seen (70 °C/min), seuraavaksi 330 °C:seen (45 °C/min) ja lopuksi lasketaan takaisin 130 °C:seen. Injektorin lämpötila on 250 °C. Kaasuvirtauksen nopeus kolonnissa on 1,5 ml/min. Yhden näytteen ajoajaksi muodostuu 8,29 minuuttia.

#### 4 VALIDOINTI

Seuraavaksi on esitetty validoinnin suoritus ja tulokset. Jokaisen yhdisteen kohdalla on ilmoitettu tulos, joka on laskettu sille parhaaksi katsotun sisäisen standardin avulla. Kaikki validointitulokset löytyvät liitteestä 3. Yhdisteille valitut sisäiset standardit löytyvät taulukosta 1.

*Taulukko 1. Yhdisteille valitut sisäiset standardit*

|    |                         |    |                      |    |                         |
|----|-------------------------|----|----------------------|----|-------------------------|
|    | <b>TRIMIPRAMIINI d3</b> |    | <b>FLURATSEPAAMI</b> |    | <b>PAROKSETIINI d6</b>  |
| 1  | fluoksetiini            | 5  | venlafaksiini        | 17 | paroksetiini            |
| 2  | tramadoli               | 6  | amitriptyliini       |    |                         |
| 3  | PCP                     | 7  | doksepiini           |    | <b>BUPRENORFIINI d4</b> |
| 4  | orfenadriini            | 13 | sitalopraami         | 25 | buprenorfiini           |
| 8  | nortriptyliini          | 14 | klomipramiini        | 26 | norbuprenorfiini        |
| 9  | mianseriini             | 16 | klooriprotikseeni    |    |                         |
| 10 | titsanidiini            | 18 | klooripromatsiini    |    | <b>METADONI d9</b>      |
| 11 | mirtatsapiini           | 19 | levomepromatsiini    | 27 | metadoni                |
| 12 | promatsiini             | 24 | tioridatsiini        |    |                         |
| 15 | sertraliini             |    |                      |    | <b>OKSIKONI d6</b>      |
| 20 | olantsapiini            |    |                      | 28 | oksikoni                |
| 21 | tsolpideemi             |    |                      |    |                         |
| 22 | klotsapiini             |    |                      |    |                         |
| 23 | folkodiini              |    |                      |    |                         |

## 4.1 Lineaarisuus

Lineaarisuutta tutkittiin kuudella eri pitoisuustasolla analysoimalla kuusi rinnakkaista näytettä jokaisella tasolla. Kalibroitaisuora piirrettiin rinnakkaismääritysten keskiarvoilla käyttäen painotuskertoimena pitoisuuden neliön käänteislukua ( $1/a^2$ ). Tulokset on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. Lineaarisuus

|    | Yhdiste           | Tutkittu alue (ng/ml) | $r^2$  | LOQ (ng/ml) |
|----|-------------------|-----------------------|--------|-------------|
| 1  | fluoksetiini      | 25-2000               | 0,9989 | 25          |
| 2  | tramadoli         | 25-2000               | 0,9979 | 25          |
| 3  | PCP               | 10-800                | 0,9917 | 10          |
| 4  | orfenadriini      | 25-2000               | 0,9986 | 25          |
| 5  | venlafaksiini     | 25-2000               | 0,9968 | 25          |
| 6  | amitriptyliini    | 25-2000               | 0,9954 | 25          |
| 7  | doksepiini        | 25-2000               | 0,9994 | 25          |
| 8  | nortriptyliini    | 25-2000               | 0,9985 | 25          |
| 9  | mianseriini       | 25-2000               | 0,9981 | 25          |
| 10 | titsanidiini      | 25-2000               | 0,9975 | 25          |
| 11 | mirtatsapiini     | 20-1600               | 0,9995 | 20          |
| 12 | promatsiini       | 25-2000               | 0,9949 | 25          |
| 13 | sitalopraami      | 25-2000               | 0,9990 | 25          |
| 14 | klomipramiini     | 25-2000               | 0,9967 | 25          |
| 15 | sertraliini       | 20-1600               | 0,9982 | 20          |
| 16 | klooriprotikseeni | 25-2000               | 0,9997 | 25          |
| 17 | paroksetiini      | 25-2000               | 0,9938 | 25          |
| 18 | klooripromatsiini | 25-2000               | 0,9978 | 25          |
| 19 | levomepromatsiini | 25-2000               | 0,9923 | 25          |
| 20 | olantsapiini      | 25-2000               | 0,9946 | 25          |
| 21 | tsolpideemi       | 25-2000               | 0,9971 | 25          |
| 22 | klotsapiini       | 25-2000               | 0,9988 | 25          |
| 23 | folkodiini        | 5-400                 | 0,9863 | 5           |
| 24 | tioridatsiini     | 25-2000               | 0,9988 | 25          |
| 25 | buprenorfiini     | 1-80                  | 0,9969 | 1           |
| 26 | norbuprenorfiini  | 1-80                  | 0,9742 | 1           |
| 27 | metadoni          | 25-2000               | 0,9895 | 25          |
| 28 | oksikoni          | 5-400                 | 0,9993 | 5           |

Folkodiinilla, norbuprenorfiinilla ja metadonilla korrelaatiokertoimen neliöt ovat pienimmät. Muilla yhdisteillä kertoimet ovat yli 0,99, mikä kertoo suorien olevan erinomaisen lineaarisia. Paras korrelaatiokertoimen neliö löytyy klooriprotikseenilta. Koska kaikki yhdisteet täyttävät lineaarisuusehdon ( $r^2 > 0,95$  painotettua kerrointa käytettäessä) voidaan yksiselitteisesti todeta menetelmän olevan lineaarinen kaikkien yhdisteiden kohdalla tutkitulla pitoisuusalueella.

## 4.2 Selektiivisyys

Selektiivisyyttä tutkittiin analysoimalla 10 autenttista verinäytettä, jotka oli varmistettu negatiivisiksi kyseisten yhdisteiden suhteen GC-MS-veriseulonalla ja immunologisella seulonnalla (VIVA). Lisäksi analysoitiin yksi lampaanverinäyte, johon lisättiin sisäiset standardit. Osa näytteistä sisälsi menetelmän ulkopuolisia huumaus- tai lääkeaineita.

Kromatogrammeista huomattiin, että tutkittujen näytteiden matriisit, muut yhdisteet ja sisäiset standardit eivät aiheuttaneet menetelmässä tutkittavien analyyttien mittausta häiritseviä piikkejä. Menetelmän voidaan siis todeta olevan selektiivinen kyseessä olevien yhdisteiden suhteen.

## 4.3 Toistettavuus ja määrittäysraja

Määrittäksen sisäistä ja määrittästen välistä toistettavuutta sekä tulosten oikeellisuutta tutkittiin analysoimalla kolme rinnakkaista näytettä viidellä eri konsentraatitasolla viitenä eri päivänä. Toistettavuudet on laskettu varianssianalyysillä (ANOVA) ja oikeellisuus kaavalla 2. Tulokset on esitetty taulukossa 3, jossa Oik. tarkoittaa oikeellisuutta, ST määrittäksen sisäistä toistettavuutta ja VT määrittästen välistä toistettavuutta.

Taulukko 3. Oikeellisuus, määrityksen sisäinen ja määritysten välinen toistettavuus

|    | Yhdiste           | Pit. | Oik.  | ST    | VT    | Pit. | Oik.   | ST    | VT    | Pit. | Oik.   | ST    | VT    |
|----|-------------------|------|-------|-------|-------|------|--------|-------|-------|------|--------|-------|-------|
| 1  | fluoksetiini      | 2000 | 9,79  | 7,30  | 8,96  | 1000 | 12,59  | 5,10  | 13,46 | 250  | 8,88   | 7,93  | 9,36  |
| 2  | tramadoli         | 2000 | 5,29  | 7,25  | 11,22 | 1000 | -4,75  | 7,94  | 12,14 | 250  | -0,97  | 6,47  | 8,60  |
| 3  | PCP               | 800  | 10,44 | 30,05 | 29,24 | 400  | -5,06  | 24,95 | 25,09 | 100  | -11,61 | 18,78 | 20,31 |
| 4  | orfenadriini      | 2000 | -2,47 | 5,13  | 7,52  | 1000 | -6,28  | 5,58  | 9,09  | 250  | 3,76   | 4,74  | 6,60  |
| 5  | venlafaksiini     | 2000 | -0,33 | 6,49  | 13,46 | 1000 | -9,30  | 5,67  | 6,43  | 250  | 5,32   | 4,97  | 8,71  |
| 6  | amitriptyliini    | 2000 | -5,08 | 6,37  | 8,49  | 1000 | -10,71 | 5,61  | 7,40  | 250  | 5,47   | 6,41  | 6,08  |
| 7  | doksepiini        | 2000 | -1,79 | 4,16  | 4,29  | 1000 | -7,02  | 4,52  | 6,10  | 250  | 0,70   | 4,54  | 5,29  |
| 8  | nortriptyliini    | 2000 | -1,36 | 17,04 | 18,60 | 1000 | -6,59  | 3,94  | 9,52  | 250  | -5,03  | 7,10  | 10,16 |
| 9  | mianseriini       | 2000 | 2,64  | 3,41  | 5,33  | 1000 | -7,94  | 3,78  | 5,82  | 250  | -3,19  | 5,71  | 6,83  |
| 10 | titsanidiini      | 2000 | 9,52  | 4,47  | 7,99  | 1000 | 1,97   | 3,03  | 8,72  | 250  | 1,03   | 9,34  | 9,45  |
| 11 | mirtatsapiini     | 1600 | -0,74 | 2,84  | 3,59  | 800  | -5,62  | 3,38  | 5,08  | 200  | -1,80  | 9,51  | 9,28  |
| 12 | promatsiini       | 2000 | 6,41  | 7,03  | 8,24  | 1000 | -3,50  | 4,18  | 4,17  | 250  | -9,16  | 10,03 | 10,41 |
| 13 | sitalopraami      | 2000 | -3,61 | 3,62  | 5,01  | 1000 | -8,41  | 2,99  | 6,69  | 250  | 3,16   | 5,89  | 7,37  |
| 14 | klomipramiini     | 2000 | -0,99 | 7,72  | 8,78  | 1000 | -13,16 | 5,92  | 8,28  | 250  | -0,43  | 7,23  | 6,27  |
| 15 | sertraliini       | 1600 | 10,28 | 6,51  | 7,27  | 800  | -2,92  | 5,97  | 7,38  | 200  | -4,65  | 8,21  | 9,38  |
| 16 | klooriprotikseeni | 2000 | -0,61 | 6,52  | 11,49 | 1000 | -4,98  | 6,70  | 12,99 | 250  | -8,13  | 8,54  | 9,46  |
| 17 | paroksetiini      | 2000 | -4,72 | 4,07  | 7,49  | 1000 | -9,37  | 2,15  | 7,22  | 250  | -5,53  | 5,14  | 7,43  |
| 18 | klooripromatsiini | 2000 | -4,14 | 6,94  | 7,18  | 1000 | -9,40  | 4,57  | 8,03  | 250  | 1,05   | 6,77  | 6,01  |
| 19 | levomepromatsiini | 2000 | -7,96 | 7,53  | 8,88  | 1000 | -12,49 | 4,75  | 8,42  | 250  | 5,64   | 6,77  | 6,12  |
| 20 | olantsapiini      | 2000 | 8,68  | 8,99  | 15,14 | 1000 | 12,96  | 7,33  | 15,23 | 250  | 6,52   | 9,03  | 28,53 |
| 21 | tsolpideemi       | 2000 | -1,61 | 5,58  | 6,59  | 1000 | -3,88  | 5,61  | 6,46  | 250  | -5,66  | 6,63  | 13,07 |
| 22 | klotsapiini       | 2000 | 0,65  | 5,87  | 6,78  | 1000 | -2,28  | 5,64  | 6,68  | 250  | -1,15  | 5,59  | 7,67  |
| 23 | folkodiini        | 400  | 19,58 | 5,74  | 12,12 | 200  | 5,97   | 4,62  | 9,38  | 50   | -2,92  | 5,88  | 7,37  |
| 24 | tioridatsiini     | 2000 | -0,43 | 7,48  | 7,88  | 1000 | -1,19  | 4,86  | 10,36 | 250  | -7,73  | 5,95  | 7,67  |
| 25 | buprenorfiini     | 80   | 5,43  | 4,28  | 10,59 | 40   | -0,25  | 3,97  | 5,84  | 10   | -30,71 | 6,48  | 47,63 |
| 26 | norbuprenorfiini  | 80   | -3,61 | 3,53  | 4,23  | 40   | 3,20   | 5,85  | 6,05  | 10   | 9,09   | 7,09  | 7,92  |
| 27 | metadoni          | 2000 | -9,59 | 5,87  | 8,90  | 1000 | -13,69 | 3,40  | 7,48  | 250  | 6,38   | 4,82  | 7,44  |
| 28 | oksikoni          | 400  | -5,73 | 3,38  | 8,25  | 200  | -4,33  | 2,53  | 6,17  | 50   | 4,65   | 6,27  | 7,20  |

|    | Yhdiste           | Pit. | Oik.   | ST    | VT    | Pit. | Oik.  | ST    | VT    |
|----|-------------------|------|--------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| 1  | fluoksetiini      | 50   | 2,06   | 6,98  | 8,31  | 25   | 2,60  | 11,18 | 10,75 |
| 2  | tramadoli         | 50   | 13,26  | 8,63  | 10,60 | 25   | 9,59  | 14,36 | 14,31 |
| 3  | PCP               | 20   | 40,20  | 36,52 | 35,43 | 10   | 42,04 | 49,87 | 53,53 |
| 4  | orfenadriini      | 50   | 12,61  | 7,16  | 8,10  | 25   | 3,28  | 7,23  | 9,87  |
| 5  | venlafaksiini     | 50   | 6,95   | 5,35  | 9,72  | 25   | -6,15 | 5,51  | 10,95 |
| 6  | amitriptyliini    | 50   | 11,16  | 8,47  | 7,41  | 25   | -3,27 | 5,80  | 9,96  |
| 7  | doksepiini        | 50   | 3,12   | 6,04  | 7,38  | 25   | -0,51 | 7,06  | 12,90 |
| 8  | nortriptyliini    | 50   | -2,91  | 4,67  | 8,34  | 25   | -3,91 | 7,32  | 7,24  |
| 9  | mianseriini       | 50   | 5,35   | 4,75  | 6,72  | 25   | 0,72  | 5,24  | 5,56  |
| 10 | titsanidiini      | 50   | 5,14   | 3,98  | 6,58  | 25   | -2,95 | 8,63  | 8,28  |
| 11 | mirtatsapiini     | 40   | 1,40   | 4,19  | 6,33  | 20   | -6,30 | 3,41  | 7,57  |
| 12 | promatsiini       | 50   | -4,12  | 4,00  | 7,23  | 25   | -4,50 | 4,88  | 6,20  |
| 13 | sitalopraami      | 50   | 5,12   | 5,05  | 7,02  | 25   | -5,75 | 4,48  | 6,21  |
| 14 | klomipramiini     | 50   | 13,04  | 9,81  | 10,08 | 25   | -3,52 | 8,57  | 15,39 |
| 15 | sertraliini       | 40   | 3,44   | 5,75  | 10,14 | 20   | 1,05  | 7,52  | 6,29  |
| 16 | klooriprotikseeni | 50   | 7,86   | 10,04 | 13,66 | 25   | 2,24  | 10,11 | 13,38 |
| 17 | paroksetiini      | 50   | -0,79  | 1,95  | 7,60  | 25   | -3,41 | 3,41  | 5,05  |
| 18 | klooripromatsiini | 50   | 12,21  | 10,54 | 10,62 | 25   | -1,73 | 8,86  | 13,22 |
| 19 | levomepromatsiini | 50   | 16,37  | 10,31 | 9,77  | 25   | -2,13 | 9,72  | 15,93 |
| 20 | olantsapiini      | 50   | 8,35   | 4,65  | 24,03 | 25   | 15,52 | 5,53  | 8,63  |
| 21 | tsolpideemi       | 50   | -11,91 | 3,81  | 10,81 | 25   | -4,98 | 3,99  | 10,45 |
| 22 | klotsapiini       | 50   | -1,58  | 4,18  | 6,64  | 25   | 0,67  | 4,41  | 6,85  |
| 23 | folkodiini        | 10   | -10,77 | 3,14  | 3,79  | 5    | 2,04  | 2,02  | 4,84  |
| 24 | tioridatsiini     | 50   | 3,71   | 10,31 | 8,93  | 25   | 5,13  | 6,56  | 9,13  |
| 25 | buprenorfiini     | 2    | -8,63  | 27,93 | 31,03 | 1    | 4,79  | 20,89 | 24,65 |
| 26 | norbuprenorfiini  | 2    | 5,80   | 11,78 | 15,13 | 1    | -3,29 | 24,46 | 37,09 |
| 27 | metadoni          | 50   | 15,29  | 3,95  | 4,82  | 25   | -3,23 | 2,96  | 6,22  |
| 28 | oksikoni*         | 10   | 5,75   | 14,10 | 13,11 | 5    | 0,39  | 27,30 | 24,74 |

\* Oksikonin kvantitatiivinen pitoisuusalue on 10-400 ng/ml

Hyvän tuloksen rajana pidetään tässä menetelmässä oikeellisuuden kohdalla  $< \pm 20 \%$  ja toistettavuuksien kohdalla  $< 20 \%$ .

Tuloksista huomataan, että PCP:llä toistettavuuden raja-arvot ylittyvät melkein kaikilla pitoisuustasoilla ja oikeellisuuskin pienimpien standardien kohdalla. Voidaan siis todeta, ettei menetelmä ole toistettava PCP:n kvantitatiivisessa määrittämisessä. Syynä tähän on todennäköisesti PCP:n erilainen käyttäytyminen näytteen esikäsittelyn, erityisesti haihdutuksen, ja kromatografisen erotuksen aikana verrattuna sisäisen standardin käyttäytymiseen. PCP:n toistettavuutta tällä menetelmällä analysoituna voitaisiin todennäköisesti parantaa käyttämällä sen analysoinnissa omaa deuterioitua muotoa sisäisenä standardina.

Myös buprenorfiinilla toistettavuus ylittyy raja-arvosta kolmen pienimmän standardin kohdalla. Tässä tapauksessa syynä on yksinkertaisesti se, että buprenorfiinin pienet pitoisuudet eivät erotu kunnolla. Tähän vaikuttavat muun muassa laitteessa käytettävän kolonnin pituus, stationäärifaasin materiaali ja menetelmän ajo-ohjelma. Koska norbuprenorfiini on buprenorfiinin aineenvaihduntatuote, se on syytä analysoida samalla menetelmällä buprenorfiinin kanssa. Näin ollen buprenorfiini ja norbuprenorfiini voidaan määrittää kyseisellä menetelmällä PCP:n tavoin ainoastaan semikvantitatiivisena.

Olantsapiini ei läpäise toistettavuutta keskimmäisen ja toiseksi pienimmän standardin kohdalla. Toistettavuusprosenttien ylitys on selitettävissä myöhemmin esitetyn stabiilisuuskokeen perusteella. Koska olantsapiini ei ole stabiili kyseisellä menetelmällä analysoituna, myös sen analysointia pidetään ainoastaan semikvantitatiivisena.

Oksikonilla pienin standardi ylittää toistettavuuksien rajat. Koska pienin standardi on niin kutsuttu cut off-piste, jota alemmat pitoisuudet tulkitaan negatiivisiksi, toistettavuusprosenttien raja-arvon ylitystä ei voida kvantitatiivisessa määrittämisessä hyväksyä. Oksikonin pienimmäksi standardiksi kvantitatiivisissa määrittämisissä valitaan alin piste, joka täyttää toistettavuuden ja oikeellisuuden ehdot; tässä tapauksessa standardi, jonka pitoisuus on 10 ng/ml.

Kaikki muut yhdisteet pysyvät raja-arvojen sisällä niin oikeellisuuden kuin molempien toistettavuuksien suhteen. Parhaat tulokset löytyvät mianseriinin, tisanidiinin, mirtatsapiinin, sitalopraamin, paroksetiinin ja klotsapiinin

kohdalta, sillä näillä yhdisteillä oikeellisuus- ja molemmat toistettavuusprosentit jäävät alle 10 %:iin.

Tässä menetelmässä määritysrajana pidetään sitä standardisuoran alinta pistettä, jolla toistettavuus- ja oikeellisuusprosentit täyttävät toistettavuuden kriteerit. Näin ollen oksikonin määritysraja on 10 ng/ml, ja kaikilla muilla yhdisteillä taulukon 3 mukaiset pienimmät standardit. Vaikka PCP:n, buprenorfiinin ja norbuprenorfiinin taulukon mukaiset pienimmät standardit eivät läpäise toistettavuutta, niitä voidaan kuitenkin pitää määritysrajoina, koska kyseisten yhdisteiden analysointi on ainoastaan semikvantitatiivista.

#### 4.4 Derivatisoinnin stabiilisuus

Derivatisoinnin stabiilisuuden tutkimista varten valmistettiin kahdeksan toiseksi suurimman standardin pitoista standardinäytettä. Näytteet analysoitiin 4 tunnin välein, jolloin stabiilisuuskokeen kokonaisajaksi muodostui noin 28 tuntia. Regressioanalyysillä lasketut tulokset on esitetty taulukossa 4.

*Taulukko 4. Derivatisoinnin stabiilisuus*

|    | Yhdiste           | Pitoisuus (ng/ml) | ka.    | RSD % | Regressioanalyysi (P) |
|----|-------------------|-------------------|--------|-------|-----------------------|
| 1  | fluoksetiini      | 1000              | 46828  | 5,93  | 0,060                 |
| 2  | tramadoli         | 1000              | 90992  | 5,58  | 0,062                 |
| 3  | PCP               | 400               | 57434  | 4,76  | 0,867                 |
| 4  | orfenadriini      | 1000              | 44930  | 4,02  | 0,294                 |
| 5  | venlafaksiini     | 1000              | 78076  | 7,02  | 0,032                 |
| 6  | amitriptyliini    | 1000              | 44608  | 5,04  | 0,227                 |
| 7  | doksepiini        | 1000              | 7520   | 4,89  | 0,248                 |
| 8  | nortriptyliini    | 1000              | 14276  | 3,77  | 0,415                 |
| 9  | mianseriini       | 1000              | 111740 | 3,95  | 0,394                 |
| 10 | titsanidiini      | 1000              | 82311  | 6,57  | 0,647                 |
| 11 | mirtatsapiini     | 800               | 137890 | 5,45  | 0,916                 |
| 12 | promatsiini       | 1000              | 46650  | 4,08  | 0,608                 |
| 13 | sitalopraami      | 1000              | 13205  | 5,11  | 0,503                 |
| 14 | klomipramiini     | 1000              | 40131  | 5,20  | 0,783                 |
| 15 | sertraliini       | 800               | 81574  | 4,56  | 0,531                 |
| 16 | klooriprotikseeni | 1000              | 40866  | 4,84  | 0,449                 |
| 17 | paroksetiini      | 1000              | 32334  | 7,43  | 0,560                 |
| 18 | klooripromatsiini | 1000              | 20908  | 6,32  | 0,915                 |
| 19 | levomepromatsiini | 1000              | 34075  | 4,54  | 0,364                 |
| 20 | olantsapiini      | 1000              | 53926  | 29,23 | 0,00002               |
| 21 | tsolpideemi       | 1000              | 157536 | 8,38  | 0,659                 |
| 22 | klotsapiini       | 1000              | 41996  | 7,32  | 0,853                 |
| 23 | folkodiini        | 1000              | 14549  | 8,63  | 0,226                 |
| 24 | tioridatsiini     | 1000              | 23927  | 8,77  | 0,920                 |
| 25 | buprenorfiini     | 40                | 858    | 8,76  | 0,067                 |
| 26 | norbuprenorfiini  | 40                | 1269   | 8,80  | 0,036                 |
| 27 | metadoni          | 1000              | 72152  | 15,60 | 0,014                 |
| 28 | oksikoni          | 200               | 4431   | 12,16 | 0,023                 |



Regressioanalyysin perusteella norbuprenorfiini, metadoni, oksikoni, venlafaksiini ja varsinkin olantsapiini jäävät alle tilastollisesti merkittävän stabiiliusrajan. Metadonin ja oksikonin vasteiden suureneminen johtuu todennäköisesti siitä, että molemmat yhdisteet jakautuvat useammaksi piikiksi seostuksen aikana derivatisointiaineen vaikutuksesta. Näillä yhdisteillä on kuitenkin sisäisinä standardeina omat deuteroidut muotonsa, joiden vasteet vaihtelevat yhdisteiden kanssa samassa suhteessa. Kyseiset yhdisteet voidaan siis hyväksyä menetelmään regressioanalyysistä huolimatta.

Venlafaksiinin ja norbuprenorfiinin kohdalla regressioanalyysin arvo on niin lähellä raja-arvoa (0,05), että ne voidaan hyväksyä menetelmään, mutta kvantitointi tulisi suorittaa mahdollisimman pian näytteen valmistuksen jälkeen. Tosin aiemmin on jo todettu, että norbuprenorfiinin analysointi suoritetaan vain semikvantitatiivisena.

Regressioanalyysin perusteella olantsapiini ei kyseisellä menetelmällä analysoituna ole kovinkaan stabiili. Syynä tähän on yhdisteen jakautuminen useammaksi piikiksi epätäydellisen derivatisoinnin vaikutuksesta. Tästä syystä menetelmää ei ole suositeltavaa käyttää olantsapiinin kvantitointiin, mutta se voidaan pitää menetelmässä semikvantitatiivista analyysiä varten. Kvantitatiivista määrittystä varten olantsapiini olisi syytä analysoida käyttäen sen omaa deuteroitua muotoa sisäisenä standardina.

#### 4.5 Uuton saanto

Uuton saannon tutkimista varten valmistettiin ensin kuusi toiseksi suurimman standardin pitoista standardinäytettä. Seuraavaksi valmistettiin kuusi näytettä, joihin lisättiin tavallisten standardinäytteiden pitoisuustasoa vastaava määrä standardien kantaliuosta uuttoliuoksen erotuksen jälkeen ennen haihdutusta. Kaavan 3 avulla lasketut tulokset löytyvät taulukosta 5.

Taulukko 5. Uuton saanto

|    | Yhdiste        | Pit. | Uuton saanto (%) |    | Yhdiste           | Pit. | Uuton saanto (%) |
|----|----------------|------|------------------|----|-------------------|------|------------------|
| 1  | fluoksetiini   | 1000 | 73,7             | 15 | sertraliini       | 800  | 64,9             |
| 2  | tramadoli      | 1000 | 64,1             | 16 | klooriprotikseeni | 1000 | 72,3             |
| 3  | PCP            | 400  | 98,1             | 17 | paroksetiini      | 1000 | 90,4             |
| 4  | orfenadiiriini | 1000 | 95,6             | 18 | klooripromatsiini | 1000 | 76,7             |
| 5  | venlafaksiini  | 1000 | 94,0             | 19 | levomepromatsiini | 1000 | 72,1             |
| 6  | amitriptyliini | 1000 | 93,1             | 20 | olantsapiini      | 1000 | 49,6             |
| 7  | doksepiini     | 1000 | 97,4             | 21 | tsolpideemi       | 1000 | 71,6             |
| 8  | nortriptyliini | 1000 | 74,6             | 22 | klotsapiini       | 1000 | 70,3             |
| 9  | mianseriini    | 1000 | 86,4             | 23 | folkodiini        | 200  | 76,0             |
| 10 | titsanidiini   | 1000 | 61,8             | 24 | tioridatsiini     | 1000 | 60,1             |
| 11 | mirtatsapiini  | 800  | 83,3             | 25 | buprenorfiini     | 40   | 78,3             |
| 12 | promatsiini    | 1000 | 73,6             | 26 | norbuprenorfiini  | 40   | 89,9             |
| 13 | sitalopraami   | 1000 | 90,5             | 27 | metadoni          | 1000 | 80,9             |
| 14 | klomipramiini  | 1000 | 72,4             | 28 | oksikoni          | 200  | 88,1             |

Uuton saannolle ei ole määritetty hyväksyttävyyden raja-arvoa. Sisäisen standardin menetelmää käytettäessä uuton saantoprosentin suuruudella ei ole kovin suurta merkitystä. Tämä siitä syystä, että mitattua pitoisuutta verrataan sisäisen standardin pitoisuuteen. Mitä suurempi saantoprosentti on, sitä sopivampia käytettävä uuttoliuotin ja -menetelmä kuitenkin ovat yhdisteen erottamiseen alkuperäisestä matriisistaan.

Tuloksista huomataan, että olantsapiinilla saanto on kaikista huonoin (alle 50 %). Parhaat saantoprosentit ovat PCP:llä, orfenadiiriinilla ja doksepiinilla.

#### 4.6 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuuden ilmoittamiseksi laskettiin laajennettu mittausepävarmuus (LME) toistettavuuskokeiden tuloksista kaavalla 4. Tulokset on ilmoitettu taulukossa 6.

Taulukko 6. Mittausepävarmuus

|    | Yhdiste            | Pit.    | LME    | Pit.    | LME  | Pit.    | LME   | Pit.    | LME   | Pit.    | LME   |
|----|--------------------|---------|--------|---------|------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|
|    |                    | (ng/ml) | (%)    | (ng/ml) | (%)  | (ng/ml) | (%)   | (ng/ml) | (%)   | (ng/ml) | (%)   |
| 1  | fluoksetiini       | 2000    | 30,29  | 1000    | 38,2 | 250     | 30,3  | 50      | 22,1  | 25      | 31,5  |
| 2  | tramadoli          | 2000    | 28,73  | 1000    | 30,5 | 250     | 21,6  | 50      | 38,1  | 25      | 44,8  |
| 3  | PCP *              | 800     | 86,42  | 400     | 71,5 | 100     | 60,0  | 20      | 129,7 | 10      | 168,8 |
| 4  | orfenadiiriini     | 2000    | 18,86  | 1000    | 24,7 | 250     | 17,9  | 50      | 33,2  | 25      | 25,3  |
| 5  | venlafaksiini      | 2000    | 32,57  | 1000    | 25,3 | 250     | 22,7  | 50      | 26,2  | 25      | 35,8  |
| 6  | amitriptyliini     | 2000    | 25,18  | 1000    | 28,3 | 250     | 20,8  | 50      | 31,7  | 25      | 25,4  |
| 7  | doksepiini         | 2000    | 16,37  | 1000    | 20,7 | 250     | 14,0  | 50      | 20,1  | 25      | 30,6  |
| 8  | nortriptyliini     | 2000    | 50,52  | 1000    | 24,5 | 250     | 26,8  | 50      | 20,0  | 25      | 21,1  |
| 9  | mianseriini        | 2000    | 13,70  | 1000    | 21,1 | 250     | 18,9  | 50      | 19,6  | 25      | 16,7  |
| 10 | titsanidiini       | 2000    | 26,42  | 1000    | 18,9 | 250     | 20,2  | 50      | 18,5  | 25      | 24,6  |
| 11 | mirtatsapiini      | 1600    | 9,28   | 800     | 16,6 | 200     | 17,8  | 40      | 15,4  | 20      | 20,8  |
| 12 | promatsiini        | 2000    | 25,17  | 1000    | 13,7 | 250     | 28,3  | 50      | 18,5  | 25      | 18,2  |
| 13 | sitalopraami       | 2000    | 14,86  | 1000    | 22,3 | 250     | 19,9  | 50      | 20,1  | 25      | 19,1  |
| 14 | klomipramiini      | 2000    | 30,14  | 1000    | 33,3 | 250     | 19,1  | 50      | 38,4  | 25      | 35,9  |
| 15 | sertraliini        | 1600    | 28,35  | 800     | 19,9 | 200     | 26,6  | 40      | 24,3  | 20      | 19,7  |
| 16 | klooriprotikseeni  | 2000    | 26,46  | 1000    | 30,9 | 250     | 30,2  | 50      | 37,4  | 25      | 33,8  |
| 17 | paroksetiini       | 2000    | 19,49  | 1000    | 24,1 | 250     | 21,2  | 50      | 15,8  | 25      | 14,0  |
| 18 | klooripromatsiini  | 2000    | 72,80  | 1000    | 26,4 | 250     | 18,2  | 50      | 38,6  | 25      | 32,0  |
| 19 | levomepromatsiini  | 2000    | 28,21  | 1000    | 31,6 | 250     | 21,5  | 50      | 43,4  | 25      | 37,6  |
| 20 | olantsapiini *     | 2000    | 39,26  | 1000    | 42,6 | 250     | 61,2  | 50      | 51,7  | 25      | 37,2  |
| 21 | tsolpideemi        | 2000    | 17,56  | 1000    | 18,8 | 250     | 31,4  | 50      | 33,1  | 25      | 24,5  |
| 22 | klotsapiini        | 2000    | 17,98  | 1000    | 18,1 | 250     | 19,1  | 50      | 16,0  | 25      | 16,4  |
| 23 | folkodiini         | 2000    | 47,47  | 1000    | 24,1 | 250     | 19,7  | 50      | 23,7  | 25      | 11,3  |
| 24 | tioridatsiini      | 2000    | 21,74  | 1000    | 23,0 | 250     | 24,8  | 50      | 28,3  | 25      | 24,7  |
| 25 | buprenorfiini *    | 80      | 279,90 | 40      | 14,1 | 10      | 468,6 | 2       | 85,3  | 1       | 65,3  |
| 26 | norbuprenorfiini * | 80      | 304,45 | 40      | 18,0 | 10      | 404,8 | 2       | 40,1  | 1       | 89,1  |
| 27 | metadoni           | 2000    | 28,67  | 1000    | 31,9 | 250     | 21,8  | 50      | 33,0  | 25      | 15,2  |
| 28 | oksikoni           | 400     | 21,20  | 200     | 15,9 | 50      | 21,2  | 10      | 40,2  | 5       | 73,7  |

\*Semikvantitatiivisia yhdisteitä

Myöskään mittausepävarmuudelle ei ole määritetty hyväksyttävän tuloksen raja-arvoa. Koska tässä tapauksessa mittausepävarmuusprosentti kertoo sen välin, jolla tulos on laskennallisesta arvostaan 95 %:n todennäköisyydellä, voidaan todeta, että mitä pienempi epävarmuusprosentti on, sitä lähempänä saatu tulos on ”oikeaa” tulosta.

Tuloksista huomataan, että matalimmat epävarmuusprosentit löytyvät mianseriinilta, mirtatsapiinilta, sitalopraamilta, paroksetiinilta ja klotsapiinilta, joilla mittausepävarmuusprosentit jäivät alle 25 %:iin kaikilla pitoisuustasoilla. Näistä klotsapiinin tulokset ovat parhaita.

Eniten epävarmuutta löytyy PCP:ltä, buprenorfiinilta ja norbuprenorfiinilta. Nämä yhdisteet on jo kohdassa 4.3 päätetty pitää tässä menetelmässä mukana ainoastaan semikvantitatiivista analysointia varten.

## 5 PÄÄTELMÄT

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehitellä useiden eri lääkeaineiden kvantitatiivista määrittämistä varten Huumetutkimusyksikössä laadittua menetelmää. Kun yhdisteiden tavoiteltu kokoonpano oli saavutettu, menetelmälle suoritettiin validointikokeita.

Menetelmän kehitysvaiheessa alkuperäisestä menetelmästä päätettiin poistaa yksi aine, fluvoksamiini, aikaisempien validointitulosten perusteella. Uusien yhdisteiden testauksen jälkeen menetelmään lisättiin neljä uutta analysoitavaa yhdistettä: PCP, olantsapiini, buprenorfiini ja norbuprenorfiini. Sisäisiksi standardeiksi lisättiin buprenorfiini d4, trimipramiini d3 ja paroksetiini d6. Näin ollen validointikokeissa oli mukana 28 analysoitavaa yhdistettä ja kuusi sisäistä standardia. Validointikokeet päätettiin suorittaa niin, että viiden yhdisteen kohdalla tulokset laskettiin kolmen eri sisäisen standardin avulla, 19 yhdisteen kohdalla kahden ja neljän yhdisteen kohdalla yhden sisäisen standardin avulla. Lopuksi valittiin kullekin yhdisteelle sopivin sisäinen standardi validointikokeiden perusteella.

Validointituloksia tarkasteltaessa 24 jo aiemmin mukana ollutta yhdistettä täyttivät kaikki hyväksyttävien validointitulosten ehdot, mutta neljän uuden yhdisteen (PCP:n, buprenorfiinin, norbuprenorfiinin ja olantsapiinin) todettiin kelpaavan menetelmällä ainoastaan semikvantitatiivisiin määrittäksi. PCP, buprenorfiini ja norbuprenorfiini eivät täytä toistettavuuden ehtoja, ja olantsapiini ei ole riittävän stabiili. PCP:n ja olantsapiinin kvantitointi tällä menetelmällä voisi olla mahdollista, jos menetelmään lisättäisiin sisäisiksi standardeiksi niiden omat deuteroidut muodot. Buprenorfiini ja norbuprenorfiini on syytä analysoida toista kolonnia ja ajo-ohjelmaa käyttäen.

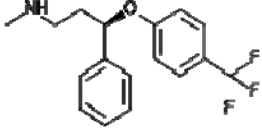
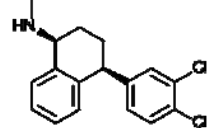
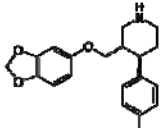
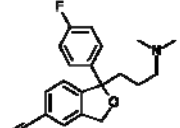
Sisäisiä standardeja verrattaessa huomattiin, että trimipramiini d3 soveltuu aiemmin käytettyä fluratsepaamia paremmin 14 yhdisteelle. Fluratsepaamin avulla analysoitavaksi jäi yhdeksän yhdistettä. Buprenorfiini d4:ä käytetään buprenorfiinin ja norbuprenorfiinin analysoinnissa ja deuteroituja paroksetiinia, metadonia ja oksikonia niiden deuterioimattomien muotojen analysoinnissa.

Vaikka menetelmään ei saatu lisättyä haluttuja yhdisteitä kvantitatiivista määrittystä varten, uudet yhdisteet voidaan analysoida menetelmällä semi-kvantitatiivisesti. Uudet sisäiset standardit toimivat menetelmässä erinomaisesti parantaen joidenkin yhdisteiden tuloksia.

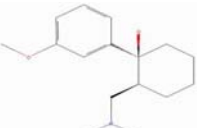
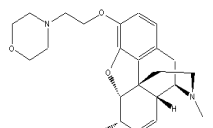
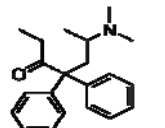
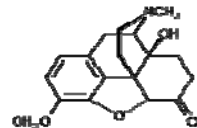
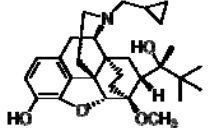
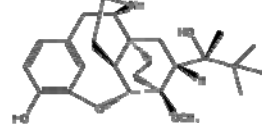
## VIITELUETTELO

- [1] Saarinen, Heikki–Lajunen, Lauri, *Analyttisen kemian perusteet*. Oulu: Oulun yliopistopaino. 2004.
- [2] Venn, Richard F, *Principles and Practise of Bioanalysis*. Lontoo: Taylor and Francis. 2000.
- [3] Barker, James, *Mass Spectrometry*. Toinen painos. Englanti: John Wiley & Sons Ltd. 1999.
- [4] Riekkola, Marja-Liisa–Hyötyläinen, Tuulia, *Kolonnikromatografia ja kapillarielektromigraatiotekniikat, 2. painos*. Helsinki: Yliopistopaino. 2002.
- [5] Teräsahde, Pertti–Manninen, Pentti, *Kemiallisten analyysimenetelmien validointiohje*. Elintarvikeviraston julkaisu. Helsinki: Elintarvikevirasto. 1997.
- [6] *Kaasu- ja nestekromatografisen pitoisuusmäärittelyn validointi (HTY.007) versio 1.1*. Helsinki: Kansanterveyslaitos. 2007.
- [7] *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*. Yhdysvaltojen terveys- ja sosiaalipalvelulaitoksen julkaisu. Yhdysvallat: U.S Department of Health and Human Services. 2001.
- [8] *Kemian metrologian opas*. MIKES Julkaisu J6/2005. Helsinki. 2005.
- [9] Green, Mark, *A Practical Guide to Analytical Method Validation* [verkkodokumentti]. American Chemical Society. 1.5.1996 [viitattu 21.8.2008]. Saatavissa: <http://pubs.acs.org/hotartcl/ac/96/may/may.html>
- [10] *Analyysimenetelmien laadunohjaus (HTY.008) versio 1.3*. Helsinki: Kansanterveyslaitos. 2007.
- [11] Huttunen, Matti, *Lääkkeet mielen hoidossa*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 2006.
- [12] Koulumäki, Markku ym. *Farmakologia ja toksikologia*. Viides painos. Kuopio: Kustannusosakeyhtiö Medicina. 1996.
- [13] Neuvonen, Pertti ym. *Kliininen farmakologia*. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy. 1994.

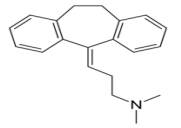
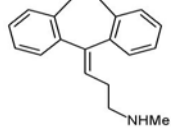
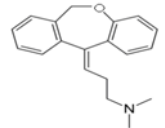
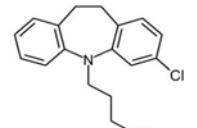
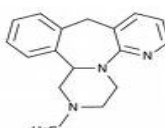
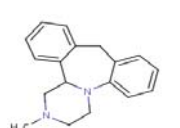
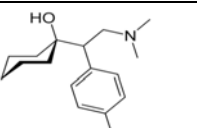
### SSRI- lääkkeet

|                           |   |                            |   |
|---------------------------|---|----------------------------|---|
| Fluoksetiini<br>(Seromex) |  | Sertraliini<br>(Sertralin) |  |
| Paroksetiini<br>(Seroxat) |  | Sitalopraami<br>(Cipramil) |  |

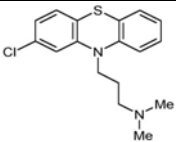
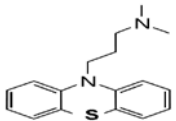
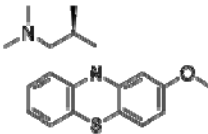
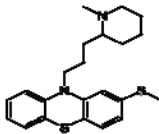
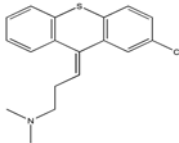
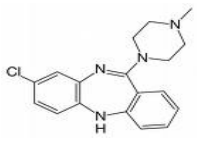
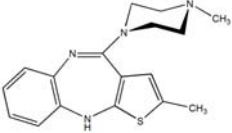
### Opioidit

|                            |  |  |  |
|----------------------------|--|--|--|
| Tramadoli<br>(Tramadin)    |   | Folkodiini<br>(Tuxi)                                 |   |
| Metadoni<br>(Dolmed)       |   | Oksikoni<br>(Oxanest)                                |   |
| Buprenorfiini<br>(Subutex) |  | Norbuprenorfiini<br>(Buprenorfiinin<br>metaboliitti) |  |

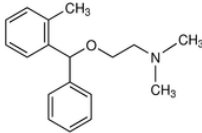
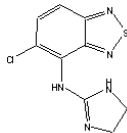
### Trisykliset antidepressantit ja muut masennuslääkkeet

|                             |   |                              |   |
|-----------------------------|---|------------------------------|---|
| Amitriptyliini<br>(Triptyl) |  | Nortriptyliini<br>(Noritren) |  |
| Doksepiini<br>(Doxal)       |  | Klomipramiini<br>(Anafranil) |  |
| Mirtatsapiini<br>(Remeron)  |  | Mianseriini<br>(Miaxan)      |  |
| Venlafaksiini<br>(Efexor)   |  |                              |   |

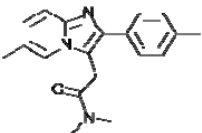
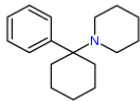
**Fentiatsiinin johdokset ja muut antipsykootit**

|                                   |   |                            |   |
|-----------------------------------|---|----------------------------|---|
| Klooripromatsiini<br>(Klorproman) |  | Promatsiini<br>(Sparine)   |  |
| Levomepromatsiini<br>(Levozin)    |  | Tioridatsiini<br>(Orsanil) |  |
| Klooriprotikseeni<br>(Cloxan)     |  | Klotsapiini<br>(Leponex)   |  |
| Olantsapiini<br>(Zyprexa)         |  |                            |   |

**Lihasselaksantit**

|                           |  |                            |  |
|---------------------------|--|----------------------------|--|
| Orfenadriini<br>(Norflex) |  | Titsanidiini<br>(Sirdalud) |  |
|---------------------------|--|----------------------------|--|

**Unilääkkeet ja hallusinogeenit**

|                         |   |                        |   |
|-------------------------|---|------------------------|---|
| Tsolvideemi<br>(Somnor) |  | Fensyklidiini<br>(PCP) |  |
|-------------------------|---|------------------------|---|



|          | Yhdiste              | Ionit (m/z)     | RT (min) |
|----------|----------------------|-----------------|----------|
| 1        | fluoksetiini-TMS     | 219,262,381     | 3,17     |
| 2        | tramadoli-TMS        | 58,245,335      | 3,21     |
| 3        | PCP                  | 200, 242, 243   | 3,29     |
| 4        | orfenadriini         | 58,165,178      | 3,36     |
| 5        | venlafaksiini-TMS    | 58,134,171      | 3,49     |
| 6        | amitriptyliini       | 58,202,203      | 4,00     |
| 7        | doksepiini           | 58,178,202      | 4,12     |
| 8        | nortriptyliini-TMS   | 202,203,320     | 4,18     |
| 9        | mianseriini          | 193,264,220     | 4,20     |
| 10       | titsanidiini- TMS    | 240,214,362     | 4,26     |
| 11       | mirtatsapiini        | 195,194,208     | 4,34     |
| 12       | promatsiini          | 58,284,238      | 4,43     |
| 13       | sitalopraami         | 324,238,208     | 4,48     |
| 14       | klomipramiini        | 269,268,314     | 4,49     |
| 15       | sertraliini-TMS      | 274,276,348     | 4,58     |
| 16       | klooriprotikseeni    | 221,222,58      | 4,79     |
| 17       | paroksetiini-TMS     | 249,264,401     | 4,80     |
| 18       | klooripromatsiini    | 318,272,320     | 4,81     |
| 19       | levomepromatsiini    | 328,282,228     | 4,82     |
| 20       | olantsapiini         | 301, 314, 285   | 4,83     |
| 21       | tsolpideemi          | 235,236,307     | 6,19     |
| 22       | klotsapiini-TMS      | 243,256,192     | 6,40     |
| 23       | folkodiini-TMS       | 114, 100        | 7,21     |
| 24       | tioridatsiini        | 98,370,185      | 7,60     |
| 25       | buprenorfiini-TMS    | 450,451,482,506 | 7,91     |
| 26       | norbuprenorfiini-TMS | 468, 500, 510   | 6,36     |
| 27       | metadoni-TMS         | 72,296,297      | 3,77     |
| 28       | oksikoni-TMS         | 459,460,444     | 4,43     |
| Sisäiset |                      |                 |          |
| 1        | fluratsepaami        | 86              | 5,52     |
| 2        | trimipramiini d3     | 249             | 4,04     |
| 3        | paroksetiini d6      | 407,207         | 4,76     |
| 4        | buprenorfiini d4     | 454             | 7,9      |
| 5        | metadoni d9          | 78              | 3,76     |
| 6        | oksikoni d6          | 465             | 4,42     |

TMS= yhdiste derivatisoituu MSTFA:lla

YHDISTEIDEN VALIDOINTITULOKSET KAIKILLA KÄYTETYILLÄ  
SISÄISILLÄ STANDARDEILLA LASKETTUNA

LIITE 3 1(1)

Yhdisteiden perässä olevat numerot kertovat, minkä sisäisen standardin avulla arvot on laskettu. Numeroiden selitykset:

- 1= fluratsapaami
- 2= trimipramiini d3
- 3= paroksetiini d6
- 4= buprenorfiini d4
- 5= metadoni d9
- 6= oksikoni d6

Lineaarisuus

|    |                     | Tutkittu alue |                | LOQ     |
|----|---------------------|---------------|----------------|---------|
|    | Yhdiste             | (ng/ml)       | r <sup>2</sup> | (ng/ml) |
| 1  | fluoksetiini 1      | 25-2000       | <b>0,9885</b>  | 25      |
| 2  | tramadoli 1         | 25-2000       | <b>0,9882</b>  | 25      |
| 3  | PCP 1               | 10-800        | <b>0,9808</b>  | 10      |
| 4  | orfenadriini 1      | 25-2000       | <b>0,9781</b>  | 25      |
| 5  | venlafaksiini 1     | 25-2000       | <b>0,9968</b>  | 25      |
| 6  | amitriptyliini 1    | 25-2000       | <b>0,9954</b>  | 25      |
| 7  | doksepiini 1        | 25-2000       | <b>0,9994</b>  | 25      |
| 8  | nortriptyliini 1    | 25-2000       | <b>0,9926</b>  | 25      |
| 9  | mianseriini 1       | 25-2000       | <b>0,9924</b>  | 25      |
| 10 | titsanidiini 1      | 25-2000       | <b>0,9937</b>  | 25      |
| 11 | mirtatsapiini 1     | 20-1600       | <b>0,9908</b>  | 20      |
| 12 | promatsiini 1       | 25-2000       | <b>0,9946</b>  | 25      |
| 13 | sitalopraami 1      | 25-2000       | <b>0,9990</b>  | 25      |
| 14 | klomipramiini 1     | 25-2000       | <b>0,9967</b>  | 25      |
| 15 | sertraliini 1       | 20-1600       | <b>0,9932</b>  | 20      |
| 16 | klooriprotikseeni 1 | 25-2000       | <b>0,9997</b>  | 25      |
| 17 | paroksetiini 1      | 25-2000       | <b>0,9992</b>  | 25      |
| 18 | klooripromatsiini 1 | 25-2000       | <b>0,9978</b>  | 25      |
| 19 | levomepromatsiini 1 | 25-2000       | <b>0,9923</b>  | 25      |
| 20 | olantsapiini 1      | 25-2000       | <b>0,9635</b>  | 25      |
| 21 | tsolpideemi 1       | 25-2000       | <b>0,9919</b>  | 25      |
| 22 | klotsapiini 1       | 25-2000       | <b>0,9909</b>  | 25      |
| 23 | folkodiini 1        | 5-400         | <b>0,9980</b>  | 5       |
| 24 | tioridatsiini 1     | 25-2000       | <b>0,9988</b>  | 25      |
| 1  | fluoksetiini 2      | 25-2000       | <b>0,9989</b>  | 25      |
| 2  | tramadoli 2         | 25-2000       | <b>0,9979</b>  | 25      |
| 3  | PCP 2               | 10-800        | <b>0,9917</b>  | 10      |
| 4  | orfenadriini 2      | 25-2000       | <b>0,9986</b>  | 25      |
| 5  | venlafaksiini 2     | 25-2000       | <b>0,9765</b>  | 25      |

|    |                     | Tutkittu alue |                | LOQ     |
|----|---------------------|---------------|----------------|---------|
|    | Yhdiste             | (ng/ml)       | r <sup>2</sup> | (ng/ml) |
| 6  | amitriptyliini 2    | 25-2000       | <b>0,9970</b>  | 25      |
| 7  | doksepiini 2        | 25-2000       | <b>0,9959</b>  | 25      |
| 8  | nortriptyliini 2    | 25-2000       | <b>0,9985</b>  | 25      |
| 9  | mianseriini 2       | 25-2000       | <b>0,9981</b>  | 25      |
| 10 | titsanidiini 2      | 25-2000       | <b>0,9975</b>  | 25      |
| 11 | mirtatsapiini 2     | 20-1600       | <b>0,9995</b>  | 20      |
| 12 | promatsiini 2       | 25-2000       | <b>0,9949</b>  | 25      |
| 13 | sitalopraami 2      | 25-2000       | <b>0,9978</b>  | 25      |
| 14 | klomipramiini 2     | 25-2000       | <b>0,9905</b>  | 25      |
| 15 | sertraliini 2       | 20-1600       | <b>0,9982</b>  | 20      |
| 16 | klooriprotikseeni 2 | 25-2000       | <b>0,9858</b>  | 25      |
| 17 | paroksetiini 2      | 25-2000       | <b>0,9897</b>  | 25      |
| 18 | klooripromatsiini 2 | 25-2000       | <b>0,9979</b>  | 25      |
| 19 | levomepromatsiini 2 | 25-2000       | <b>0,9979</b>  | 25      |
| 20 | olantsapiini 2      | 25-2000       | <b>0,9946</b>  | 25      |
| 21 | tsolpideemi 2       | 25-2000       | <b>0,9971</b>  | 25      |
| 22 | klotsapiini 2       | 25-2000       | <b>0,9988</b>  | 25      |
| 23 | folkodiini 2        | 5-400         | <b>0,9863</b>  | 5       |
| 24 | tioridatsiini 2     | 25-2000       | <b>0,9828</b>  | 25      |
| 1  | fluoksetiini 3      | 25-2000       | <b>0,9937</b>  | 25      |
| 8  | nortriptyliini 3    | 25-2000       | <b>0,9902</b>  | 25      |
| 17 | paroksetiini 3      | 25-2000       | <b>0,9938</b>  | 25      |
| 21 | tsolpideemi 3       | 25-2000       | <b>0,9961</b>  | 25      |
| 23 | folkodiini 3        | 5-400         | <b>0,9924</b>  | 5       |
| 25 | buprenorfiini 4     | 1-80          | <b>0,9969</b>  | 1       |
| 26 | norbuprenorfiini 4  | 1-80          | <b>0,9742</b>  | 1       |
| 27 | metadoni 5          | 25-2000       | <b>0,9895</b>  | 25      |
| 28 | oksikoni 6          | 5-400         | <b>0,9993</b>  | 5       |

YHDISTEIDEN VALIDOINTITULOKSET KAIKILLA KÄYTETYILLÄ  
SISÄISILLÄ STANDARDEILLA LASKETTUNA

LIITE 3 2(2)

Toistettavuus kolmella suurimmalla pitoisuustasolla

|    | Yhdiste             | Pit. | Oik.   | ST     | VT     | Pit. | Oik.   | ST    | VT    | Pit. | Oik.   | ST     | VT     |
|----|---------------------|------|--------|--------|--------|------|--------|-------|-------|------|--------|--------|--------|
| 1  | fluoksetiini 1      | 2000 | -4,88  | 8,87   | 9,10   | 1000 | 7,37   | 8,55  | 15,12 | 250  | 23,25  | 8,54   | 8,41   |
| 2  | tramadoli 1         | 2000 | -8,90  | 9,54   | 12,01  | 1000 | -9,56  | 10,18 | 13,97 | 250  | 11,54  | 9,59   | 12,18  |
| 3  | PCP 1               | 800  | -5,74  | 32,02  | 30,89  | 400  | -10,96 | 27,47 | 26,11 | 100  | -1,65  | 21,73  | 24,51  |
| 4  | orfenadriini 1      | 2000 | -20,54 | 9,60   | 12,71  | 1000 | -16,42 | 7,92  | 9,82  | 250  | 10,76  | 7,43   | 11,26  |
| 5  | venlafaksiini 1     | 2000 | -0,33  | 8,19   | 14,07  | 1000 | -9,30  | 5,67  | 6,43  | 250  | 5,32   | 4,97   | 8,71   |
| 6  | amitriptyliini 1    | 2000 | -5,08  | 7,26   | 8,95   | 1000 | -10,71 | 5,61  | 7,40  | 250  | 5,47   | 6,41   | 6,08   |
| 7  | doksepiini 1        | 2000 | -1,79  | 5,84   | 5,45   | 1000 | -7,02  | 4,52  | 6,10  | 250  | 0,70   | 4,54   | 5,29   |
| 8  | nortriptyliini 1    | 2000 | -14,13 | 18,97  | 18,92  | 1000 | -10,71 | 4,58  | 11,54 | 250  | 7,34   | 6,97   | 9,43   |
| 9  | mianseriini 1       | 2000 | -11,03 | 6,77   | 6,64   | 1000 | -12,40 | 4,65  | 7,79  | 250  | 9,02   | 4,76   | 4,96   |
| 10 | titsanidiini 1      | 2000 | -4,68  | 10,48  | 10,58  | 1000 | -2,44  | 3,70  | 9,52  | 250  | 14,41  | 5,62   | 5,40   |
| 11 | mirtatsapiini 1     | 1600 | -14,00 | 9,21   | 7,81   | 800  | -10,24 | 3,74  | 6,72  | 200  | 10,62  | 4,01   | 4,81   |
| 12 | promatsiini 1       | 2000 | -11,49 | 5,55   | 7,50   | 1000 | -9,49  | 4,40  | 7,91  | 250  | 3,67   | 5,19   | 7,11   |
| 13 | sitalopraami 1      | 2000 | -3,61  | 3,94   | 5,17   | 1000 | -8,41  | 2,99  | 6,69  | 250  | 3,16   | 5,89   | 7,37   |
| 14 | klomipramiini 1     | 2000 | -0,99  | 10,64  | 10,62  | 1000 | -13,16 | 5,92  | 8,28  | 250  | -0,43  | 7,23   | 6,27   |
| 15 | sertraliini 1       | 1600 | -3,80  | 7,76   | 7,45   | 800  | -6,84  | 6,88  | 9,43  | 200  | 7,99   | 7,01   | 6,82   |
| 16 | klooriprotikseeni 1 | 2000 | -0,61  | 6,52   | 11,49  | 1000 | -4,98  | 6,70  | 12,99 | 250  | -8,13  | 8,54   | 9,46   |
| 17 | paroksetiini 1      | 2000 | 17,76  | 7,58   | 20,70  | 1000 | 31,82  | 4,09  | 34,30 | 250  | 33,07  | 9,38   | 28,31  |
| 18 | klooripromatsiini 1 | 2000 | -10,14 | 25,32  | 24,11  | 1000 | -9,40  | 4,57  | 8,03  | 250  | 1,05   | 6,77   | 6,01   |
| 19 | levomepromatsiini 1 | 2000 | -7,96  | 7,53   | 8,88   | 1000 | -12,49 | 4,75  | 8,42  | 250  | 5,64   | 6,77   | 6,12   |
| 20 | olantsapiini 1      | 2000 | -11,36 | 8,39   | 12,00  | 1000 | 2,85   | 6,66  | 11,13 | 250  | 20,22  | 7,96   | 28,94  |
| 21 | tsolpideemi 1       | 2000 | -14,57 | 4,46   | 6,83   | 1000 | -8,33  | 2,95  | 6,71  | 250  | 6,46   | 5,38   | 10,25  |
| 22 | klotsapiini 1       | 2000 | -12,67 | 4,32   | 6,14   | 1000 | -6,86  | 3,03  | 6,90  | 250  | 11,77  | 3,85   | 5,45   |
| 23 | folkodiini 1        | 400  | 2,24   | 4,68   | 7,85   | 200  | -0,21  | 2,83  | 5,66  | 50   | 8,88   | 4,02   | 4,54   |
| 24 | tioridatsiini 1     | 2000 | -0,43  | 7,48   | 7,88   | 1000 | -1,19  | 4,86  | 10,36 | 250  | -7,73  | 5,95   | 7,67   |
| 1  | fluoksetiini 2      | 2000 | 9,79   | 7,30   | 8,96   | 1000 | 12,59  | 5,10  | 13,46 | 250  | 8,88   | 7,93   | 9,36   |
| 2  | tramadoli 2         | 2000 | 5,29   | 7,25   | 11,22  | 1000 | -4,75  | 7,94  | 12,14 | 250  | -0,97  | 6,47   | 8,60   |
| 3  | PCP 2               | 800  | 10,44  | 30,05  | 29,24  | 400  | -5,06  | 24,95 | 25,09 | 100  | -11,61 | 18,78  | 20,31  |
| 4  | orfenadriini 2      | 2000 | -2,47  | 5,13   | 7,52   | 1000 | -6,28  | 5,58  | 9,09  | 250  | 3,76   | 4,74   | 6,60   |
| 5  | venlafaksiini 2     | 2000 | 20,11  | 4,99   | 17,72  | 1000 | -0,89  | 5,41  | 7,02  | 250  | -3,02  | 4,92   | 11,19  |
| 6  | amitriptyliini 2    | 2000 | 9,24   | 7,00   | 9,43   | 1000 | -6,48  | 4,30  | 5,30  | 250  | -6,58  | 6,73   | 7,56   |
| 7  | doksepiini 2        | 2000 | 8,79   | 4,93   | 7,00   | 1000 | -4,99  | 3,60  | 5,44  | 250  | -6,69  | 6,07   | 7,78   |
| 8  | nortriptyliini 2    | 2000 | -1,36  | 17,04  | 18,60  | 1000 | -6,59  | 3,94  | 9,52  | 250  | -5,03  | 7,10   | 10,16  |
| 9  | mianseriini 2       | 2000 | 2,64   | 3,41   | 5,33   | 1000 | -7,94  | 3,78  | 5,82  | 250  | -3,19  | 5,71   | 6,83   |
| 10 | titsanidiini 2      | 2000 | 9,52   | 4,47   | 7,99   | 1000 | 1,97   | 3,03  | 8,72  | 250  | 1,03   | 6,47   | 7,69   |
| 11 | mirtatsapiini 2     | 1600 | -0,74  | 2,84   | 3,59   | 800  | -5,62  | 3,38  | 5,08  | 200  | -1,80  | 5,51   | 6,78   |
| 12 | promatsiini 2       | 2000 | 6,41   | 7,03   | 8,24   | 1000 | -3,50  | 4,18  | 4,17  | 250  | -9,16  | 6,71   | 8,45   |
| 13 | sitalopraami 2      | 2000 | 0,12   | 3,13   | 5,36   | 1000 | -4,04  | 3,54  | 8,40  | 250  | -5,57  | 6,46   | 10,88  |
| 14 | klomipramiini 2     | 2000 | 19,19  | 9,04   | 13,20  | 1000 | -5,15  | 5,00  | 7,36  | 250  | -8,28  | 8,53   | 8,14   |
| 15 | sertraliini 2       | 1600 | 10,28  | 6,51   | 7,27   | 800  | -2,92  | 5,97  | 7,38  | 200  | -4,65  | 8,21   | 9,38   |
| 16 | klooriprotikseeni 2 | 2000 | 16,30  | 7,91   | 8,93   | 1000 | -0,20  | 5,31  | 7,49  | 250  | -18,93 | 10,17  | 11,38  |
| 17 | paroksetiini 2      | 2000 | 36,97  | 8,03   | 19,83  | 1000 | 38,82  | 5,14  | 32,21 | 250  | 17,90  | 9,66   | 27,05  |
| 18 | klooripromatsiini 2 | 2000 | 5,80   | 8,46   | 9,88   | 1000 | -8,45  | 4,17  | 6,63  | 250  | -6,51  | 8,89   | 7,67   |
| 19 | levomepromatsiini 2 | 2000 | 5,80   | 8,46   | 9,88   | 1000 | -8,45  | 4,17  | 6,63  | 250  | -6,51  | 8,89   | 7,67   |
| 20 | olantsapiini 2      | 2000 | 8,68   | 8,99   | 15,14  | 1000 | 12,96  | 7,33  | 15,23 | 250  | 6,52   | 9,03   | 28,53  |
| 21 | tsolpideemi 2       | 2000 | -1,61  | 5,58   | 6,59   | 1000 | -3,88  | 5,61  | 6,46  | 250  | -5,66  | 6,63   | 13,07  |
| 22 | klotsapiini 2       | 2000 | 0,65   | 5,87   | 6,78   | 1000 | -2,28  | 5,64  | 6,68  | 250  | -1,15  | 5,59   | 7,67   |
| 23 | folkodiini 2        | 400  | 19,58  | 5,74   | 12,12  | 200  | 5,97   | 4,62  | 9,38  | 50   | -2,92  | 5,88   | 7,37   |
| 24 | tioridatsiini 2     | 2000 | 18,02  | 8,52   | 8,94   | 1000 | 6,45   | 6,08  | 10,06 | 250  | -15,99 | 8,20   | 10,40  |
| 1  | fluoksetiini 3      | 2000 | -23,82 | 9,61   | 17,59  | 1000 | -24,58 | 6,34  | 22,17 | 250  | -10,47 | 8,93   | 24,23  |
| 8  | nortriptyliini 3    | 2000 | -26,57 | 23,94  | 29,49  | 1000 | -31,73 | 4,51  | 35,43 | 250  | -18,10 | 10,26  | 30,43  |
| 17 | paroksetiini 3      | 2000 | -4,72  | 4,07   | 7,49   | 1000 | -9,37  | 2,15  | 7,22  | 250  | -5,53  | 5,14   | 7,43   |
| 21 | tsolpideemi 3       | 2000 | -30,83 | 9,20   | 19,90  | 1000 | -33,46 | 4,26  | 30,24 | 250  | -21,20 | 9,93   | 28,38  |
| 23 | folkodiini 3        | 400  | -14,94 | 9,19   | 18,59  | 200  | -24,68 | 3,14  | 32,22 | 50   | -15,48 | 8,61   | 29,35  |
| 25 | buprenorfiini 4     | 80   | 39,89  | 96,05  | 93,65  | 40   | -0,25  | 3,97  | 5,84  | 10   | 18,25  | 159,85 | 170,34 |
| 26 | norbuprenorfiini 4  | 80   | 31,96  | 105,50 | 104,98 | 40   | 3,20   | 5,85  | 6,05  | 10   | 66,89  | 135,21 | 134,92 |
| 27 | metadoni 5          | 2000 | -9,59  | 5,87   | 8,90   | 1000 | -13,69 | 3,40  | 7,48  | 250  | 6,38   | 4,82   | 7,44   |
| 28 | oksikoni 6          | 400  | -5,73  | 3,38   | 8,25   | 200  | -4,33  | 2,53  | 6,17  | 50   | 4,65   | 6,27   | 7,20   |

YHDISTEIDEN VALIDOINTITULOKSET KAIKILLA KÄYTETYILLÄ  
SISÄISILLÄ STANDARDEILLA LASKETTUNA

LIITE 3 3(3)

Toistettavuus kahdella pienimmällä pitoisuustasolla

|    | Yhdiste             | Pit. | Oik.   | ST    | VT    | Pit. | Oik.   | ST    | VT    |
|----|---------------------|------|--------|-------|-------|------|--------|-------|-------|
| 1  | fluoksetiini 1      | 50   | 14,49  | 9,25  | 9,89  | 25   | 1,99   | 13,87 | 17,21 |
| 2  | tramadoli 1         | 50   | 28,95  | 12,50 | 13,62 | 25   | 14,91  | 20,01 | 23,77 |
| 3  | PCP 1               | 20   | 62,59  | 40,96 | 37,59 | 10   | 58,21  | 60,06 | 63,59 |
| 4  | orfenadriini 1      | 50   | 24,58  | 10,24 | 11,83 | 25   | 8,52   | 12,33 | 21,22 |
| 5  | venlafaksiini 1     | 50   | 6,95   | 5,35  | 9,72  | 25   | -6,15  | 10,51 | 13,16 |
| 6  | amitriptyliini 1    | 50   | 11,16  | 8,47  | 7,41  | 25   | -3,27  | 6,66  | 10,31 |
| 7  | doksepiini 1        | 50   | 3,12   | 6,04  | 7,38  | 25   | -0,51  | 7,75  | 13,16 |
| 8  | nortriptyliini 1    | 50   | 7,69   | 6,81  | 9,02  | 25   | -5,00  | 7,80  | 9,12  |
| 9  | mianseriini 1       | 50   | 14,69  | 10,32 | 11,74 | 25   | 1,41   | 6,17  | 11,53 |
| 10 | titsanidiini 1      | 50   | 18,83  | 5,00  | 6,19  | 25   | -3,44  | 9,84  | 10,66 |
| 11 | mirtatsapiini 1     | 40   | 13,56  | 5,23  | 5,36  | 20   | -7,72  | 4,19  | 5,83  |
| 12 | promatsiini 1       | 50   | 7,63   | 6,14  | 8,00  | 25   | -8,50  | 6,60  | 9,88  |
| 13 | sitalopraami 1      | 50   | 5,12   | 5,05  | 7,02  | 25   | -5,75  | 4,48  | 6,21  |
| 14 | klomipramiini 1     | 50   | 13,04  | 9,81  | 10,08 | 25   | -3,52  | 8,57  | 15,39 |
| 15 | sertraliini 1       | 40   | 16,51  | 8,97  | 10,55 | 20   | 0,51   | 6,44  | 9,28  |
| 16 | klooriprotikseeni 1 | 50   | 7,86   | 10,04 | 13,66 | 25   | 2,24   | 10,11 | 13,38 |
| 17 | paroksetiini 1      | 50   | 33,48  | 10,88 | 32,88 | 25   | 23,39  | 19,02 | 34,10 |
| 18 | klooripromatsiini 1 | 50   | 12,21  | 10,54 | 10,62 | 25   | -1,73  | 8,86  | 13,22 |
| 19 | levomepromatsiini 1 | 50   | 16,37  | 10,31 | 9,77  | 25   | -2,13  | 9,72  | 15,93 |
| 20 | olantsapiini 1      | 50   | 23,51  | 7,42  | 28,71 | 25   | 19,50  | 10,56 | 16,00 |
| 21 | tsolpideemi 1       | 50   | -3,93  | 4,78  | 10,01 | 25   | -8,82  | 5,75  | 10,38 |
| 22 | klotsapiini 1       | 50   | 9,93   | 5,22  | 8,36  | 25   | 0,05   | 5,21  | 6,50  |
| 23 | folkodiini 1        | 10   | -2,69  | 4,03  | 4,45  | 5    | -1,21  | 1,93  | 4,94  |
| 24 | tioridatsiini 1     | 50   | 3,71   | 10,31 | 8,93  | 25   | 5,13   | 6,56  | 9,13  |
| 1  | fluoksetiini 2      | 50   | 2,06   | 6,98  | 8,31  | 25   | 2,60   | 11,18 | 10,75 |
| 2  | tramadoli 2         | 50   | 13,26  | 8,63  | 10,60 | 25   | 9,59   | 14,36 | 14,31 |
| 3  | PCP 2               | 20   | 40,20  | 36,52 | 35,43 | 10   | 42,04  | 49,87 | 53,53 |
| 4  | orfenadriini 2      | 50   | 12,61  | 7,16  | 8,10  | 25   | 3,28   | 7,23  | 9,87  |
| 5  | venlafaksiini 2     | 50   | -2,33  | 4,12  | 9,02  | 25   | -6,11  | 3,51  | 5,64  |
| 6  | amitriptyliini 2    | 50   | -0,46  | 5,57  | 7,41  | 25   | -1,86  | 5,92  | 6,12  |
| 7  | doksepiini 2        | 50   | -2,80  | 4,53  | 6,44  | 25   | -1,97  | 4,18  | 6,07  |
| 8  | nortriptyliini 2    | 50   | -2,91  | 4,67  | 8,34  | 25   | -3,91  | 6,88  | 6,95  |
| 9  | mianseriini 2       | 50   | 5,35   | 4,75  | 6,72  | 25   | 0,72   | 5,83  | 5,93  |
| 10 | titsanidiini 2      | 50   | 5,14   | 3,98  | 6,58  | 25   | -2,95  | 8,63  | 8,28  |
| 11 | mirtatsapiini 2     | 40   | 1,40   | 4,19  | 6,33  | 20   | -6,30  | 3,41  | 7,57  |
| 12 | promatsiini 2       | 50   | -4,12  | 4,00  | 7,23  | 25   | -4,50  | 4,88  | 6,20  |
| 13 | sitalopraami 2      | 50   | -10,38 | 3,86  | 10,94 | 25   | -21,97 | 4,76  | 6,93  |
| 14 | klomipramiini 2     | 50   | 2,44   | 6,85  | 8,32  | 25   | -3,08  | 7,65  | 7,15  |
| 15 | sertraliini 2       | 40   | 3,44   | 5,75  | 10,14 | 20   | 1,05   | 7,52  | 6,29  |
| 16 | klooriprotikseeni 2 | 50   | -4,35  | 9,33  | 11,95 | 25   | 0,85   | 7,93  | 8,28  |
| 17 | paroksetiini 2      | 50   | 17,38  | 8,23  | 30,93 | 25   | 19,33  | 15,57 | 28,44 |
| 18 | klooripromatsiini 2 | 50   | 3,40   | 6,88  | 8,20  | 25   | -1,25  | 8,36  | 9,10  |
| 19 | levomepromatsiini 2 | 50   | 3,40   | 6,88  | 8,20  | 25   | -1,25  | 8,36  | 9,10  |
| 20 | olantsapiini 2      | 50   | 8,35   | 4,65  | 24,03 | 25   | 15,52  | 5,53  | 8,63  |
| 21 | tsolpideemi 2       | 50   | -11,91 | 3,81  | 10,81 | 25   | -4,98  | 3,99  | 10,45 |
| 22 | klotsapiini 2       | 50   | -1,58  | 4,18  | 6,64  | 25   | 0,67   | 4,41  | 6,85  |
| 23 | folkodiini 2        | 10   | -10,77 | 3,14  | 3,79  | 5    | 2,04   | 2,02  | 4,84  |
| 24 | tioridatsiini 2     | 50   | -5,34  | 7,93  | 7,84  | 25   | 5,80   | 5,60  | 5,79  |
| 1  | fluoksetiini 3      | 50   | -7,87  | 7,03  | 26,91 | 25   | -11,29 | 9,71  | 16,57 |
| 8  | nortriptyliini 3    | 50   | -13,30 | 10,00 | 35,58 | 25   | -20,54 | 40,53 | 46,81 |
| 17 | paroksetiini 3      | 50   | -0,79  | 1,95  | 7,60  | 25   | -3,41  | 3,41  | 5,05  |
| 21 | tsolpideemi 3       | 50   | -20,69 | 8,43  | 29,06 | 25   | -21,82 | 15,97 | 25,78 |
| 23 | folkodiini 3        | 10   | -15,20 | 3,91  | 21,98 | 5    | -8,51  | 10,83 | 13,03 |
| 25 | buprenorfiini 4     | 2    | -8,63  | 27,93 | 31,03 | 1    | 4,79   | 20,89 | 24,65 |
| 26 | norbuprenorfiini 4  | 2    | 5,80   | 11,78 | 15,13 | 1    | -3,29  | 24,46 | 37,09 |
| 27 | metadoni 5          | 50   | 15,29  | 3,95  | 4,82  | 25   | -3,23  | 2,96  | 6,22  |
| 28 | oksikoni 6          | 10   | 5,75   | 14,10 | 13,11 | 5    | 0,39   | 27,30 | 24,74 |

YHDISTEIDEN VALIDOINTITULOKSET KAIKILLA KÄYTETYILLÄ  
SISÄISILLÄ STANDARDEILLA LASKETTUNA

LIITE 3 4(4)

Derivatisoinnin stabiilisuus

|         |                     | Absoluuttiset vasteet |        |        |        |        |        |        |        |        |          | Regressio-<br>analyysi<br>(P) |         |
|---------|---------------------|-----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|-------------------------------|---------|
| Yhdiste | Pit.<br>(ng/ml)     | 1                     | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | ka.    | RSD<br>% |                               |         |
| 1       | fluoksetiini 1      | 1000                  | 51546  | 46125  | 48633  | 48788  | 46069  | 42395  | 44980  | 46085  | 46828    | 5,93                          | 0,060   |
| 2       | tramadoli 1         | 1000                  | 89488  | 79925  | 91606  | 92364  | 93472  | 89589  | 95281  | 96209  | 90992    | 5,58                          | 0,062   |
| 3       | PCP 1               | 400                   | 59502  | 52087  | 60190  | 59281  | 56438  | 55133  | 58138  | 58703  | 57434    | 4,76                          | 0,867   |
| 4       | orfenadriini 1      | 1000                  | 45646  | 41687  | 45089  | 46019  | 44522  | 43189  | 45780  | 47505  | 44930    | 4,02                          | 0,294   |
| 5       | venlafaksiini 1     | 1000                  | 71997  | 68437  | 79159  | 82007  | 81026  | 77597  | 78963  | 85419  | 78076    | 7,02                          | 0,032   |
| 6       | amitriptyliini 1    | 1000                  | 43498  | 40900  | 44601  | 47659  | 45543  | 42419  | 45463  | 46778  | 44608    | 5,04                          | 0,227   |
| 7       | doksepiini 1        | 1000                  | 7157   | 6979   | 7958   | 7841   | 7431   | 7232   | 7749   | 7812   | 7520     | 4,89                          | 0,248   |
| 8       | nortriptyliini 1    | 1000                  | 14757  | 14189  | 14700  | 14620  | 13979  | 13145  | 14197  | 14621  | 14276    | 3,77                          | 0,415   |
| 9       | mianseriini 1       | 1000                  | 112454 | 110379 | 117349 | 118038 | 109516 | 104916 | 108546 | 112723 | 111740   | 3,95                          | 0,394   |
| 10      | titsanidiini 1      | 1000                  | 76908  | 79155  | 86520  | 89892  | 83968  | 74617  | 80192  | 87233  | 82311    | 6,57                          | 0,647   |
| 11      | mirtatsapiini 1     | 800                   | 139548 | 127248 | 143502 | 148322 | 137627 | 127705 | 135749 | 143420 | 137890   | 5,45                          | 0,916   |
| 12      | promatsiini 1       | 1000                  | 24403  | 23470  | 24973  | 24920  | 24082  | 22187  | 23737  | 24515  | 24036    | 3,80                          | 0,591   |
| 13      | sitalopraami 1      | 1000                  | 12770  | 12494  | 13929  | 13999  | 12797  | 12489  | 13150  | 14014  | 13205    | 5,11                          | 0,503   |
| 14      | klomipramiini 1     | 1000                  | 39767  | 38267  | 40870  | 43615  | 39500  | 37766  | 38672  | 42590  | 40131    | 5,20                          | 0,783   |
| 15      | sertraliini 1       | 800                   | 81726  | 74913  | 83836  | 85624  | 82666  | 77494  | 81173  | 85160  | 81574    | 4,56                          | 0,531   |
| 16      | klooriprotikseeni 1 | 1000                  | 42657  | 40022  | 42661  | 42739  | 38805  | 37761  | 39971  | 42314  | 40866    | 4,84                          | 0,449   |
| 17      | paroksetiini 1      | 1000                  | 31594  | 28793  | 34713  | 34758  | 32682  | 29702  | 31319  | 35109  | 32334    | 7,43                          | 0,560   |
| 18      | klooripromatsiini 1 | 1000                  | 20610  | 19193  | 22273  | 22735  | 21289  | 19410  | 19979  | 21776  | 20908    | 6,32                          | 0,915   |
| 19      | levomepromatsiini 1 | 1000                  | 32009  | 32802  | 35873  | 35579  | 34240  | 32709  | 33529  | 35861  | 34075    | 4,54                          | 0,364   |
| 20      | olantsapiini 1      | 1000                  | 26558  | 34387  | 45458  | 50845  | 52606  | 55279  | 63650  | 69465  | 49781    | 28,55                         | 0,00002 |
| 21      | tsolpideemi 1       | 1000                  | 161434 | 149875 | 164333 | 179298 | 152178 | 143931 | 140566 | 168676 | 157536   | 8,38                          | 0,659   |
| 22      | klotsapiini 1       | 1000                  | 41581  | 39037  | 43772  | 46959  | 41055  | 38321  | 39958  | 45287  | 41996    | 7,32                          | 0,853   |
| 23      | folkodiini 1        | 200                   | 12759  | 13334  | 15749  | 16071  | 14146  | 13781  | 14646  | 15907  | 14549    | 8,63                          | 0,226   |
| 24      | tioridatsiini 1     | 1000                  | 23145  | 22465  | 24543  | 28302  | 22758  | 22642  | 22126  | 25432  | 23927    | 8,77                          | 0,920   |
| 1       | fluoksetiini 2      | 1000                  | 51546  | 46125  | 48633  | 48788  | 46069  | 42395  | 44980  | 46085  | 46828    | 5,93                          | 0,060   |
| 2       | tramadoli 2         | 1000                  | 89488  | 79925  | 91606  | 92364  | 93472  | 89589  | 95281  | 96209  | 90992    | 5,58                          | 0,062   |
| 3       | PCP 2               | 400                   | 59502  | 52087  | 60190  | 59281  | 56438  | 55133  | 58138  | 58703  | 57434    | 4,76                          | 0,867   |
| 4       | orfenadriini 2      | 1000                  | 45646  | 41687  | 45089  | 46019  | 44522  | 43189  | 45780  | 47505  | 44930    | 4,02                          | 0,294   |
| 5       | venlafaksiini 2     | 1000                  | 71997  | 68437  | 79159  | 82007  | 81026  | 77597  | 78963  | 85419  | 78076    | 7,02                          | 0,032   |
| 6       | amitriptyliini 2    | 1000                  | 43498  | 40900  | 44601  | 47659  | 45543  | 42419  | 45463  | 46778  | 44608    | 5,04                          | 0,227   |
| 7       | doksepiini 2        | 1000                  | 37027  | 36016  | 39949  | 40151  | 39147  | 37392  | 40300  | 41310  | 38912    | 4,82                          | 0,072   |
| 8       | nortriptyliini 2    | 1000                  | 14757  | 14189  | 14700  | 14620  | 13979  | 13145  | 14197  | 14621  | 14276    | 3,77                          | 0,415   |
| 9       | mianseriini 2       | 1000                  | 112454 | 110379 | 117349 | 118038 | 109516 | 104916 | 108546 | 112723 | 111740   | 3,95                          | 0,394   |
| 10      | titsanidiini 2      | 1000                  | 76908  | 79155  | 86520  | 89892  | 83968  | 74617  | 80192  | 87233  | 82311    | 6,57                          | 0,647   |
| 11      | mirtatsapiini 2     | 800                   | 139548 | 127248 | 143502 | 148322 | 137627 | 127705 | 135749 | 143420 | 137890   | 5,45                          | 0,916   |
| 12      | promatsiini 2       | 1000                  | 45138  | 45083  | 48366  | 48471  | 47856  | 43489  | 46440  | 48358  | 46650    | 4,08                          | 0,608   |
| 13      | sitalopraami 2      | 1000                  | 32856  | 30842  | 32788  | 31850  | 30086  | 28610  | 29358  | 30902  | 30912    | 4,98                          | 0,069   |
| 14      | klomipramiini 2     | 1000                  | 39767  | 38267  | 40870  | 43615  | 39500  | 37766  | 38672  | 42590  | 41381    | 11,81                         | 0,243   |
| 15      | sertraliini 2       | 800                   | 81726  | 74913  | 83836  | 85624  | 82666  | 77494  | 81173  | 85160  | 81574    | 4,56                          | 0,531   |
| 16      | klooriprotikseeni 2 | 1000                  | 16684  | 16270  | 18830  | 19420  | 17292  | 17816  | 18576  | 19612  | 18063    | 6,90                          | 0,095   |
| 17      | paroksetiini 2      | 1000                  | 31594  | 28793  | 34713  | 34758  | 32682  | 29702  | 31319  | 35109  | 32334    | 7,43                          | 0,560   |
| 18      | klooripromatsiini 2 | 1000                  | 32009  | 32802  | 35873  | 35579  | 34240  | 32709  | 33529  | 35861  | 34075    | 4,54                          | 0,364   |
| 19      | levomepromatsiini 2 | 1000                  | 32009  | 32802  | 35873  | 35579  | 34240  | 32709  | 33529  | 35861  | 34075    | 4,54                          | 0,364   |
| 20      | olantsapiini 2      | 1000                  | 28425  | 36909  | 49119  | 54820  | 56957  | 59724  | 69109  | 76346  | 53926    | 29,23                         | 0,00002 |
| 21      | tsolpideemi 2       | 1000                  | 161434 | 149875 | 164333 | 179298 | 152178 | 143931 | 140566 | 168676 | 157536   | 8,38                          | 0,659   |
| 22      | klotsapiini 2       | 1000                  | 41581  | 39037  | 43772  | 46959  | 41055  | 38321  | 39958  | 45287  | 41996    | 7,32                          | 0,853   |
| 23      | folkodiini 2        | 1000                  | 12759  | 13334  | 15749  | 16071  | 14146  | 13781  | 14646  | 15907  | 14549    | 8,63                          | 0,226   |
| 24      | tioridatsiini 2     | 1000                  | 23145  | 22465  | 24543  | 28302  | 22758  | 22642  | 22126  | 25432  | 23927    | 8,77                          | 0,920   |
| 1       | fluoksetiini 3      | 1000                  | 51546  | 46125  | 48633  | 48788  | 46069  | 42395  | 44980  | 46085  | 46828    | 5,93                          | 0,060   |
| 8       | nortriptyliini 3    | 1000                  | 14757  | 14189  | 14700  | 14620  | 13979  | 13145  | 14197  | 14621  | 14276    | 3,77                          | 0,415   |
| 17      | paroksetiini 3      | 1000                  | 31594  | 28793  | 34713  | 34758  | 32682  | 29702  | 31319  | 35109  | 32334    | 7,43                          | 0,560   |
| 21      | tsolpideemi 3       | 1000                  | 161434 | 149875 | 164333 | 179298 | 152178 | 143931 | 140566 | 168676 | 157536   | 8,38                          | 0,659   |
| 23      | folkodiini 3        | 200                   | 12759  | 13334  | 15749  | 16071  | 14146  | 13781  | 14646  | 15907  | 14549    | 8,63                          | 0,226   |
| 25      | buprenorfiini 4     | 40                    | 764    | 763    | 889    | 940    | 824    | 839    | 878    | 968    | 858      | 8,76                          | 0,067   |
| 26      | norbuprenorfiini 4  | 40                    | 1091   | 1137   | 1310   | 1325   | 1357   | 1225   | 1285   | 1422   | 1269     | 8,80                          | 0,036   |
| 27      | metadoni 5          | 1000                  | 47719  | 64069  | 74328  | 79136  | 76289  | 74285  | 79391  | 82002  | 72152    | 15,60                         | 0,014   |
| 28      | oksikoni 6          | 200                   | 3329   | 4002   | 4638   | 4796   | 4582   | 4353   | 4746   | 5004   | 4431     | 12,16                         | 0,023   |

Uuton saanto

|    | Yhdiste             | Pitoisuus | Uuton saanto (%) |
|----|---------------------|-----------|------------------|
| 1  | fluoksetiini 1      | 1000      | 92,6             |
| 2  | tramadoli 1         | 1000      | 81,3             |
| 3  | PCP 1               | 400       | 124,6            |
| 4  | orfenadriini 1      | 1000      | 120,1            |
| 5  | venlafaksiini 1     | 1000      | 94,0             |
| 6  | amitriptyliini 1    | 1000      | 93,1             |
| 7  | doksepiini 1        | 1000      | 97,4             |
| 8  | nortriptyliini 1    | 1000      | 93,6             |
| 9  | mianseriini 1       | 1000      | 107,6            |
| 10 | titsanidiini 1      | 1000      | 78,2             |
| 11 | mirtatsapiini 1     | 800       | 104,5            |
| 12 | promatsiini 1       | 1000      | 92,0             |
| 13 | sitalopraami 1      | 1000      | 90,5             |
| 14 | klomipramiini 1     | 1000      | 72,4             |
| 15 | sertraliini 1       | 800       | 81,5             |
| 16 | klooriprotikseeni 1 | 1000      | 72,3             |
| 17 | paroksetiini 1      | 1000      | 89,4             |
| 18 | klooripromatsiini 1 | 1000      | 76,7             |
| 19 | levomepromatsiini 1 | 1000      | 72,1             |
| 20 | olantsapiini 1      | 1000      | 63,5             |
| 21 | tsolpideemi 1       | 1000      | 89,9             |
| 22 | klotsapiini 1       | 1000      | 88,6             |
| 23 | folkodiini 1        | 200       | 95,9             |
| 24 | tioridatsiini 1     | 1000      | 60,1             |
| 1  | fluoksetiini 2      | 1000      | 73,7             |
| 2  | tramadoli 2         | 1000      | 64,1             |
| 3  | PCP 2               | 400       | 98,1             |
| 4  | orfenadriini 2      | 1000      | 95,6             |
| 5  | venlafaksiini 2     | 1000      | 74,5             |

|    | Yhdiste             | Pitoisuus | Uuton saanto (%) |
|----|---------------------|-----------|------------------|
| 6  | amitriptyliini 2    | 1000      | 74,6             |
| 7  | doksepiini 2        | 1000      | 75,2             |
| 8  | nortriptyliini 2    | 1000      | 74,6             |
| 9  | mianseriini 2       | 1000      | 86,4             |
| 10 | titsanidiini 2      | 1000      | 61,8             |
| 11 | mirtatsapiini 2     | 800       | 83,3             |
| 12 | promatsiini 2       | 1000      | 73,6             |
| 13 | sitalopraami 2      | 1000      | 72,1             |
| 14 | klomipramiini 2     | 1000      | 57,7             |
| 15 | sertraliini 2       | 800       | 64,9             |
| 16 | klooriprotikseeni 2 | 1000      | 58,8             |
| 17 | paroksetiini 2      | 1000      | 70,8             |
| 18 | klooripromatsiini 2 | 1000      | 57,3             |
| 19 | levomepromatsiini 2 | 1000      | 57,3             |
| 20 | olantsapiini 2      | 1000      | 49,6             |
| 21 | tsolpideemi 2       | 1000      | 71,6             |
| 22 | klotsapiini 2       | 1000      | 70,3             |
| 23 | folkodiini 2        | 200       | 76,0             |
| 24 | tioridatsiini 2     | 1000      | 47,7             |
| 1  | fluoksetiini 3      | 1000      | 93,4             |
| 8  | nortriptyliini 3    | 1000      | 94,5             |
| 17 | paroksetiini 3      | 1000      | 90,4             |
| 21 | tsolpideemi 3       | 1000      | 91,1             |
| 23 | folkodiini 3        | 200       | 97,2             |
| 25 | buprenorfiini 4     | 40        | 78,3             |
| 26 | norbuprenorfiini 4  | 40        | 89,9             |
| 27 | metadoni 5          | 1000      | 80,9             |
| 28 | oksikoni 6          | 200       | 88,1             |

YHDISTEIDEN VALIDOINTITULOKSET KAIKILLA KÄYTETYILLÄ  
SISÄISILLÄ STANDARDEILLA LASKETTUNA

LIITE 3 6(6)

Mittausepävarmuus

|    | Yhdiste             | Pit.<br>(ng/ml) | LME<br>(%) | Pit.<br>(ng/ml) | LME<br>(%) | Pit.<br>(ng/ml) | LME<br>(%) | Pit.<br>(ng/ml) | LME<br>(%) | Pit.<br>(ng/ml) | LME<br>(%) |
|----|---------------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|
| 1  | fluoksetiini 1      | 2000            | 27,22      | 1000            | 37,7       | 250             | 52,3       | 50              | 39,7       | 25              | 44,4       |
| 2  | tramadoli 1         | 2000            | 35,46      | 1000            | 39,5       | 250             | 38,7       | 50              | 68,7       | 25              | 68,9       |
| 3  | PCP 1               | 800             | 89,73      | 400             | 78,9       | 100             | 65,6       | 20              | 167,4      | 10              | 210,1      |
| 4  | orfenadriini 1      | 2000            | 51,98      | 1000            | 41,4       | 250             | 34,5       | 50              | 58,3       | 25              | 52,0       |
| 5  | venlafaksiini 1     | 2000            | 32,57      | 1000            | 25,3       | 250             | 22,7       | 50              | 26,2       | 25              | 35,8       |
| 6  | amitriptyliini 1    | 2000            | 25,18      | 1000            | 28,3       | 250             | 20,8       | 50              | 31,7       | 25              | 25,4       |
| 7  | doksepiini 1        | 2000            | 16,37      | 1000            | 20,7       | 250             | 14,0       | 50              | 20,1       | 25              | 30,6       |
| 8  | nortriptyliini 1    | 2000            | 60,57      | 1000            | 32,8       | 250             | 27,7       | 50              | 27,3       | 25              | 26,0       |
| 9  | mianseriini 1       | 2000            | 29,09      | 1000            | 30,7       | 250             | 22,7       | 50              | 42,9       | 25              | 26,3       |
| 10 | titsanidiini 1      | 2000            | 31,22      | 1000            | 21,0       | 250             | 32,8       | 50              | 40,9       | 25              | 29,8       |
| 11 | mirtatsapiini 1     | 1600            | 36,99      | 800             | 25,6       | 200             | 24,7       | 40              | 31,0       | 20              | 21,1       |
| 12 | promatsiini 1       | 2000            | 29,60      | 1000            | 26,2       | 250             | 19,1       | 50              | 25,3       | 25              | 29,2       |
| 13 | sitalopraami 1      | 2000            | 14,86      | 1000            | 22,3       | 250             | 19,9       | 50              | 20,1       | 25              | 19,1       |
| 14 | klomipramiini 1     | 2000            | 30,14      | 1000            | 33,3       | 250             | 19,1       | 50              | 38,4       | 25              | 35,9       |
| 15 | sertraliini 1       | 1600            | 22,83      | 800             | 27,1       | 200             | 25,3       | 40              | 43,1       | 20              | 22,6       |
| 16 | klooriprotikseeni 1 | 2000            | 26,46      | 1000            | 30,9       | 250             | 30,2       | 50              | 37,4       | 25              | 33,8       |
| 17 | paroksetiini 1      | 2000            | 56,61      | 1000            | 93,9       | 250             | 89,1       | 50              | 96,3       | 25              | 91,0       |
| 18 | klooripromatsiini 1 | 2000            | 21,62      | 1000            | 26,4       | 250             | 18,2       | 50              | 38,6       | 25              | 32,0       |
| 19 | levomepromatsiini 1 | 2000            | 28,21      | 1000            | 31,6       | 250             | 21,5       | 50              | 43,4       | 25              | 37,6       |
| 20 | olantsapiini 1      | 2000            | 37,06      | 1000            | 26,6       | 250             | 72,4       | 50              | 75,7       | 25              | 54,7       |
| 21 | tsolpideemi 1       | 2000            | 33,41      | 1000            | 22,2       | 250             | 26,5       | 50              | 23,5       | 25              | 29,6       |
| 22 | klotsapiini 1       | 2000            | 29,45      | 1000            | 20,4       | 250             | 27,1       | 50              | 28,0       | 25              | 16,7       |
| 23 | folkodiini 1        | 400             | 18,81      | 200             | 12,7       | 50              | 21,5       | 10              | 13,2       | 5               | 10,9       |
| 24 | tioridatsiini 1     | 2000            | 21,74      | 1000            | 23,0       | 250             | 24,8       | 50              | 28,3       | 25              | 24,7       |
| 1  | fluoksetiini 2      | 2000            | 30,29      | 1000            | 38,2       | 250             | 30,3       | 50              | 22,1       | 25              | 31,5       |
| 2  | tramadoli 2         | 2000            | 28,73      | 1000            | 30,5       | 250             | 21,6       | 50              | 38,1       | 25              | 44,8       |
| 3  | PCP 2               | 800             | 86,42      | 400             | 71,5       | 100             | 60,0       | 20              | 129,7      | 10              | 168,8      |
| 4  | orfenadriini 2      | 2000            | 18,86      | 1000            | 24,7       | 250             | 17,9       | 50              | 33,2       | 25              | 25,3       |
| 5  | venlafaksiini 2     | 2000            | 54,54      | 1000            | 17,8       | 250             | 25,2       | 50              | 20,4       | 25              | 18,1       |
| 6  | amitriptyliini 2    | 2000            | 29,89      | 1000            | 18,8       | 250             | 24,1       | 50              | 18,6       | 25              | 17,4       |
| 7  | doksepiini 2        | 2000            | 24,54      | 1000            | 16,4       | 250             | 23,8       | 50              | 16,7       | 25              | 15,2       |
| 8  | nortriptyliini 2    | 2000            | 50,52      | 1000            | 24,5       | 250             | 26,8       | 50              | 20,0       | 25              | 21,1       |
| 9  | mianseriini 2       | 2000            | 13,70      | 1000            | 21,1       | 250             | 18,9       | 50              | 19,6       | 25              | 16,7       |
| 10 | titsanidiini 2      | 2000            | 26,42      | 1000            | 18,9       | 250             | 20,2       | 50              | 18,5       | 25              | 24,6       |
| 11 | mirtatsapiini 2     | 1600            | 9,28       | 800             | 16,6       | 200             | 17,8       | 40              | 15,4       | 20              | 20,8       |
| 12 | promatsiini 2       | 2000            | 25,17      | 1000            | 13,7       | 250             | 28,3       | 50              | 18,5       | 25              | 18,2       |
| 13 | sitalopraami 2      | 2000            | 12,43      | 1000            | 19,9       | 250             | 27,7       | 50              | 31,1       | 25              | 47,0       |
| 14 | klomipramiini 2     | 2000            | 49,96      | 1000            | 20,6       | 250             | 28,8       | 50              | 22,1       | 25              | 21,8       |
| 15 | sertraliini 2       | 1600            | 28,35      | 800             | 19,9       | 200             | 26,6       | 40              | 24,3       | 20              | 19,7       |
| 16 | klooriprotikseeni 2 | 2000            | 40,39      | 1000            | 18,4       | 250             | 48,6       | 50              | 31,5       | 25              | 23,0       |
| 17 | paroksetiini 2      | 2000            | 85,43      | 1000            | 101,4      | 250             | 67,7       | 50              | 72,9       | 25              | 75,5       |
| 18 | klooripromatsiini 2 | 2000            | 28,48      | 1000            | 23,0       | 250             | 26,8       | 50              | 22,5       | 25              | 24,9       |
| 19 | levomepromatsiini 2 | 2000            | 28,48      | 1000            | 23,0       | 250             | 26,8       | 50              | 22,5       | 25              | 24,9       |
| 20 | olantsapiini 2      | 2000            | 39,26      | 1000            | 42,6       | 250             | 61,2       | 50              | 51,7       | 25              | 37,2       |
| 21 | tsolpideemi 2       | 2000            | 17,56      | 1000            | 18,8       | 250             | 31,4       | 50              | 33,1       | 25              | 24,5       |
| 22 | klotsapiini 2       | 2000            | 17,98      | 1000            | 18,1       | 250             | 19,1       | 50              | 16,0       | 25              | 16,4       |
| 23 | folkodiini 2        | 2000            | 47,47      | 1000            | 24,1       | 250             | 19,7       | 50              | 23,7       | 25              | 11,3       |
| 24 | tioridatsiini 2     | 2000            | 43,70      | 1000            | 26,8       | 250             | 41,5       | 50              | 24,7       | 25              | 19,8       |
| 1  | fluoksetiini 3      | 2000            | 62,26      | 1000            | 67,4       | 250             | 55,7       | 50              | 57,8       | 25              | 44,6       |
| 8  | nortriptyliini 3    | 2000            | 92,71      | 1000            | 95,5       | 250             | 73,7       | 50              | 78,5       | 25              | 130,5      |
| 17 | paroksetiini 3      | 2000            | 19,49      | 1000            | 24,1       | 250             | 21,2       | 50              | 15,8       | 25              | 14,0       |
| 21 | tsolpideemi 3       | 2000            | 75,66      | 1000            | 90,6       | 250             | 73,6       | 50              | 73,3       | 25              | 74,7       |
| 23 | folkodiini 3        | 400             | 51,12      | 200             | 81,4       | 50              | 68,6       | 10              | 54,0       | 5               | 37,9       |
| 25 | buprenorfiini 4     | 80              | 279,90     | 40              | 14,1       | 10              | 468,6      | 2               | 85,3       | 1               | 65,3       |
| 26 | norbuprenorfiini 4  | 80              | 304,45     | 40              | 18,0       | 10              | 404,8      | 2               | 40,1       | 1               | 89,1       |
| 27 | metadoni 5          | 2000            | 28,67      | 1000            | 31,9       | 250             | 21,8       | 50              | 33,0       | 25              | 15,2       |
| 28 | oksikoni 6          | 400             | 21,20      | 200             | 15,9       | 50              | 21,2       | 10              | 40,2       | 5               | 73,7       |