

Kimmo Sipilä

Desoksipipradrolin ja mefedronin kvantitatiivisen menetelmän kehitys ja validointi HPLC-UV-MS-tekniikalla.

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

28.11.2012

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Kimmo Sipilä Desoksiipradrolin ja mefedronin kvantitatiivisen menetelmän kehitys ja validointi HPLC-UV-MS-tekniikalla 31 sivua + 1 liite 28.11.2012
Tutkinto	Laboratorioanalytikko
Suuntautumisvaihtoehto	Kemiallinen analytiikka
Ohjaajat	Rikoskemisti Ulla-Maija Laakkonen Tekninen tutkija Liisa Vahter Lehtori Mia Ruismäki
<p>Tämä opinnäytetyö tehtiin Keskusrikospoliisin (KRP) Rikosteknisen laboratorion (RTL) huumausainelaboratoriossa Vantaalla. Laboratorio on osa RTL:n tutkimuslinjaa ja kuuluu kemian ryhmään.</p> <p>Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää rutiinikäyttöön soveltuva kahden muuntohuumeen mefedronin ja desoksiipradrolin (Daisy) kvantitatiivinen analyysimenetelmä käyttäen HPLC-UV-MS tekniikkaa. Työssä käytettiin näytteiden kvantitoimiseen diodirividetektoria, piikkien puhtautta tutkittiin ioniloukku-massaspektrometrilla.</p> <p>Menetelmän kehitys käsitti näytteenkäsittelytekniikan sekä nestekromatografian ajo-olosuhteiden optimointia. Työssä validoitiin kaksi eri huumausainetta ja testattuja parametrejä olivat lineaarisuus ja mittausalue, toteamis- ja määrittäysraja, tarkkuus, uusittavuus, mittausepävarmuus, ristikontaminaatio, kalibrointiliuosten säilyvyys sekä spesifisyys ja selektiivisyys.</p> <p>Menetelmän näytteen esikäsittelystä tehtiin yksinkertainen ja helppokäyttöinen, joten se soveltuu nyt paremmin rutiinikäyttöön. Menetelmä toimii ja se täytti sille asetetut vaatimukset. Siihen voidaan jatkossa lisätä uusia muuntohuumeita.</p> <p>Menetelmällä on laaja lineaarinen alue. Mittausalueet ovat mefedronilla 0,01 - 1,0 mg/ml ja desoksiipradrolilla 0,02 - 1,0 mg/ml. Tulokset ovat hyvin toistettavia, saman päivän aikana ja eri päivinä tehtyjen mittausten tuloksissa ei havaittu merkittävää eroa. Tulosten tarkkuus on käyttötarkoitukseen riittävä. Mittausepävarmuudeksi laskettiin mefedronilla 11 % ja desoksiipradrolilla 15 %.</p> <p>Tällä hetkellä menetelmä on käytössä, ja sillä voidaan kvantitoida kolmea eri muuntohuumetta, MDPV:tä, mefedronia ja desoksiipradrolina.</p>	
Avainsanat	muuntohuumeet, desoksiipradroli, Daisy, mefedroni, HPLC-UV-MS, menetelmän kehitys, sähkösumutus-ionisaatio

Author Title Number of Pages Date	Kimmo Sipilä Quantitative Method Development and Validation for Desoxypipradrol and Mephedrone using HPLC-UV-MS- technique 31 pages + 1 appendice 28 November 2012
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructor(s)	Ulla-Maija Laakkonen Criminal Chemist Liisa Vahter Technical Researcher Mia Ruismäki Lecturer
<p>This thesis was carried out at The National Bureau of Investigation (NBI), Forensic Laboratory, drug laboratory in Vantaa, Finland. The laboratory is part of the group of Forensic Analyses function and Chemistry group.</p> <p>The purpose of this study was to develop an appropriate routine use method for quantitative analysis of mephedrone and desoxypipradrol (Daisy) using HPLC-UV-MS-technique. A Diode-array detector was used for quantitation and the peak purity was studied using an ion trap mass spectrometer.</p> <p>The method development consisted of optimization of sample preparation and liquid chromatography acquisition parameters. Two different designer drugs were validated in this thesis and the validation parameters were linearity and range, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ), accuracy, reproducibility, measurement uncertainty, carry over, calibration solution stability as well as specificity and selectivity.</p> <p>The method sample preparation was designed to be simple and easy to use, making it suitable for routine use. The method worked as expected and filled all the criteria. The method can be further used as a template to which you can add new designer drugs.</p> <p>This method has a wide linear range. The measuring range is 0,01 - 1,0 mg/ml for mephedrone and 0,2 - 1,0 mg/ml for desoxypipradrol. The results are very reproducible and no difference was detected in between measurements done during the same day or the next day. Accuracy of the results is sufficient for the intended use of the method. The measurement uncertainty was 11 % for mephedrone and 15 % for desoxypipradrol.</p> <p>This method is currently in use in the Forensic Laboratory. At the moment three designer drugs can be quantitated using this method, MDPV, desoxypipradrol and mephedrone.</p>	
Keywords	designer drugs, desoxypipradrol, Daisy, mephedrone, HPLC-UV-MS, method development, electrospray ionization

Sisällys

Lyhenteitä ja käsitteitä

1	Johdanto	1
2	Muuntohuumeet	2
2.1	Lainsäädäntö	2
2.2	Tutkitut huumausaineet	2
2.2.1	Mefedroni	2
2.2.2	Desoksipipradroli	4
2.3	Huumausaineiden rakenne	4
3	Analyysitekniikat	5
3.1	Massaspektrometria	6
3.2	API-ESI	6
3.3	Ionisoitumiseen vaikuttavat tekijät	7
3.4	Ioniloukku	9
4	Materiaalit ja laitteistot	10
4.1	Laitteet	10
4.2	Reagenssit	11
5	Menetelmän kehitys	12
5.1	Mefedronin tunnistaminen FTIR-spektroskopiolla	12
5.2	Näytteen esikäsittelyn optimointi	13
5.3	Testatut parametrit	14
5.3.1	Lineaarisuus ja mittausalue	14
5.3.2	Toteamis- ja määritysraja	16
5.3.3	Tarkkuus	18
5.3.4	Uusittavuus	21
5.3.5	Mittausepävarmuus	22
5.3.6	Ristikontaminaatio	23
5.3.7	Kalibrointiliuosten säilyvyys	23
5.3.8	Spesifisyys ja selektiivisyys	25
6	Loppupäätelmät	28
	Lähteet	30

Liitteet

Liite 1. Mittausepävarmuuden arviointi

Lyhenteitä ja käsitteitä

2-DPMP	<i>Desoxy pipradrol</i> . Desoksipipradroli. "Daisy".
4-MMC	<i>4-methylmethcathinone</i> . Mefedroni.
API-ESI	<i>Atmospheric Pressure Interface - Electrospray Ionization</i> . Ilmanpaineessa toimiva ionilähde - Sähkösumutus-ionisaatio.
DAD	<i>Diode Array Detector</i> . Diodirividetektor.
DWG	The Drugs Working Group. Eurooppalainen huumausainetyöryhmä.
EDNS	<i>The European information system and database on new drugs</i> .
EMCDDA	<i>European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction</i> .
ENFSI	European Network of Forensic Science Institutes. Kansainvälinen rikosteknisen tutkimuksen ryhmittymä.
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> . Fourier-muunnosinfrapunaspektroskopia.
GC	<i>Gas Chromatography</i> . Kaasukromatografia.
HILIC	<i>Hydrophilic interaction chromatography</i> . Hydrofiilinen vuorovaikutus kromatografia.
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> . Korkean erotuskyvyn nestekromatografia.
IR	<i>Infrared Spectroscopy</i> . Infrapunaspektroskopia.
KRP	Keskusrikospoliisi.
LOD	<i>Limit of Detection</i> . Toteamisraja.

LOQ	<i>Limit of Quantitation.</i> Määrittäysraja.
LSD	<i>Lysergic acid diethylamide.</i> Lysergihapon dietyyliamidi.
MeOH	<i>Methanol.</i> Metanoli.
MDPV	<i>3,4-Methylenedioxypropylone.</i> Metyleenidioksypropylone.
MS	<i>Mass Spectrometry.</i> Massaspektrometria.
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry.</i> Tandemmassaspektrometria.
m/z	<i>Mass to Charge Ratio.</i> Massa-varaussuhde.
NBI	<i>The National Bureau of Investigation.</i> Keskusrikospoliisi.
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry.</i> Ydinmagneettinen resonanssispektrometria.
PT	<i>Proficiency test.</i> Pätevyyskoe.
RSD	<i>Relative Standard Deviation.</i> Suhteellinen keskihajonta.
RTL	Rikostekninen laboratorio.
S/N	<i>Signal to Noise Ratio.</i> Signaali-kohinasuhde.
TLC	<i>Thin Layer Chromatography.</i> Ohutkerroskromatografia.
UV/VIS	<i>Ultraviolet/Visible light.</i> Ultraviolettivalo/näkyvä valo.

1 Johdanto

Tämä opinnäytetyö toteutettiin Keskusrikospoliisin (KRP) Rikosteknisen laboratorion (RTL) Kemian linjan huumausainelaboratoriossa Vantaalla keväällä 2012. Rikostekninen laboratorio tuottaa asiantuntijapalveluita ja vastaa rikospaikoilta taltioitun näytemateriaalin tutkimisesta Suomessa. RTL:ssa on yli 20 tutkimusalaa, joista tämä opinnäytetyö kohdistui huumaus- ja lääkeaineanalytiikkaan.

Uusia muuntohuumeita ilmestyy markkinoille koko ajan kasvavaan tahtiin. Uusi huumausainelaki astui voimaan 1.6.2011, ja sen ansiosta voidaan uudet aineet luokitella entistä nopeammin laittomiksi huumausaineiksi [1]. Muuntohuumeiden kasvava käyttö ja määrä synnyttivät tarpeen kehittää kvantitatiivista analyysimenetelmää muuntohuumeiden pitoisuuksien selvittämiseksi. Tavoitteena oli luoda jo aiemmin validoidun muuntohuumeen MDPV:n (metyleenidioksiropyrovaleroni) menetelmän pohjalta HPLC-UV-MS-menetelmä, jota voidaan käyttää yleismenetelmänä uusien muuntohuumeiden kvantitoinnissa.

Laittomien huumausaineiden valmistaminen, salakuljetus ja käyttö ovat maailmanlaajuinen ongelma. Huumeiden käyttö yleistyi erityisesti 1960-luvulla, jolloin yleisimpiä huumausaineita olivat kannabis, heroini, kokaiini, LSD ja amfetamiini. 70- ja 80-lukujen taitteessa laittomissa laboratorioissa uusien *designer*-huumeiden syntetisointi yleistyi, sillä esimerkiksi heroiinin valmistaminen oli kallista ja saanto oli huonoa. Muuntohuumeista pyrittiin kehittämään helposti valmistettavia ja halvempia. Niiden tarkoituksena on tuottaa ilman sivuvaikutuksia fysiologisesti samankaltainen vaikutus kuin huumeilla joita ne jäljittelevät. Näin ei kuitenkaan käytännössä ole. Monet muuntohuumeet ovat monin verroin vahvempia ja aiheuttavat enemmän sivuvaikutuksia kuin niiden jäljittelemä aine. Muuntohuumeiden vaarallisuudesta kertoo myös se, että aine-erien pitoisuuksissa voi olla merkittäviä eroja, eikä välttämättä myyjällä eikä käyttäjällä ole tietoa aineen koostumuksesta. [2; 3, s. 5]

Merkittävänä erona laittomiin huumausaineisiin, muuntohuumeet ovat molekyyliarakenteeltaan hieman erilaisia, jolloin niitä ei ole vielä luokiteltu huumausaineiksi ja näin ollen voidaan kiertää kansainvälisiä ja kansallisia oikeussäännöksiä. [2.] Tästä syntyy myös nimitys ”Legal High”, joka viittaa siihen, että

kyseinen huume on ”laillinen”, kunnes se luokitellaan huumeeksi. Internetin käytön myötä muuntohuumeiden myynnistä ja välittämisestä on tullut helpompaa. Yhteistyöllä kansainvälisten tahojen kuten EMCDDA:n (*European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*), EDND-tietokannan (*European information system and database on new drugs*) ja tullin kanssa voidaan jakaa tutkimustuloksia ja seurata trendejä, kuinka paljon kyseisiä muuntohuumeita on liikkeellä ja missä niitä liikkuu. Parhaassa tapauksessa voidaan jopa päästä niiden alkulähteeseen kiinni.

2 Muuntohuumeet

2.1 Lainsäädäntö

Suomen huumausainelakiin (30.5.2008/373) tehtiin 8.4.2011 muutoksia, joiden mukaan yhdisteet voidaan luokitella huumausaineiksi kansallisesti entistä nopeammin. Muutokset astuivat voimaan 1.6.2011. Huumausainelaisissa sanotaan aiheesta seuraavasti:

3 a § (8.4.2011/322)

Huumausaineiden ominaisuuksien arviointi

Edellä 3 §:n 1 momentin 5 kohdan e alakohdassa tarkoitetun aineen huumaavat ominaisuudet ja vaarallisuuden arvioi Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus yhteistyössä Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen sekä poliisin ja tullin kanssa. Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus toimittaa arvion sosiaali- ja terveysministeriölle ja liittää siihen toimenpide-ehdotuksensa, joka perustuu siihen, esiintyykö ainetta Suomessa tai voiko sitä todennäköisesti esiintyä Suomessa ennen kuin aineen valvontaan ottamisesta voidaan päättää 3 §:n 1 momentin 5 kohdan c alakohdassa tarkoitetun neuvoston päätöksen mukaisesti. [1.]

Uusien aineiden maahantuontia ja myyntiä on voitu rajoittaa 1.6.2011 asti vain lääkelain nojalla. Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus Fimea on luokitellut päihdyttäviä terveydelle vaarallisia aineita niiden vaikutusten ja suuren väärinkäyttöriskin vuoksi lääkkeeksi, vaikkei aineella ole lääkkeellistä käyttöä. Lääkkeeksi luokiteltujen aineiden käyttö ei ole rangaistavaa, ja maahantuontia tutkitaan joko lääkerikoksena tai salakuljetuksena. Näiden rikosten rangaistukset ovat maltillisia huumausainerikoksiin verrattuna. [3.]

2.2 Tutkitut huumausaineet

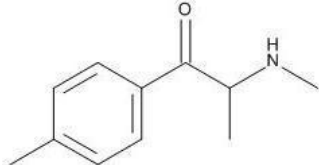
2.2.1 Mefedroni

Mefedronia (4-metyylimetkatinoni, 4-MMC) on tutkittu laajamittaisemmin Strathclyden yliopistossa Glasgowssa, Englannissa 2011. Tutkimuksissa käytettiin muun muassa seuraavia menetelmiä IR (infrapunaspektroskopia), NMR (ydinmagneettinen

resonanssispektrometria) sekä kahta kvantitatiivista menetelmää GC-MS (kaasukromatografi - massaspektrometri) ja HPLC-UV-tekniikoilla (korkean erotuskyvyn nestekromatografia - ultraviolettivo). Englannissa mefedronin määrittämiseen käytetty HPLC-menetelmä on laitteistoltaan melko samankaltainen kuin opinnäytetyössä kehitetty menetelmä. Heidän käyttämänsä HPLC-laitteisto on samaa Agilentin 1100-sarjaa, mutta UV-detektorina oli yksisädespektrofotometri. Lisäksi heidän käyttämänsä kolonni oli hieman erilainen C₁₈-kolonni. Itse menetelmä poikkeaa enemmän, sillä heillä oli käytössä sisäinen standardi, sekä näytematriisina he käyttivät kalibroitiliuoksissa seosta, jossa oli yleisimpiä jatkeaineita sekä muita huumausaineita, kuten parasetamolia, kofeiinia, metylonia ja ketamiinia. [4.]

Mefedronilla on paikkaisomeriaa, jossa aromaattiseen renkaaseen kiinnittynyt metyyli-ryhmä vaihtaa paikkaansa. Näitä isomeerejä kutsutaan nimillä 2-MMC ja 3-MMC. Isomeerien erotuksesta ja tunnistamisesta on hyviä tutkimustuloksia Unkarista. Unkarin rikostekninen instituutti on tutkinut mefedronin paikkaisomeerejä muun muassa GC-MS-, HPLC-, FTIR- (Fourier-muunnosinfrapunaspektroskopia) ja TLC-tekniikoilla (ohutkerroskromatografia). Heidän käyttämänsä C₁₈-kolonni, eluointiliuokset sekä ajoparametrit eroavat opinnäytetyössä käytetyistä. Heidän tutkimuksissaan havaittiin, että mefedronin paikkaisomeereillä retentioajat sekä absorptiomaksimit poikkeavat hieman toisistaan. Parhaiten isomeerit erottaa toisistaan FTIR-tekniikalla. Isomeerien vaikutuksista ei ole vielä paljoa tutkimustuloksia, mutta niillä on havaittu olevan samankaltaisia vaikutuksia kuin 4-MMC:llä. Kyseisiä isomeerejä saattaa esiintyä pieninä määrinä mefedronin joukossa epäpuhtautena, riippuen synteesiprosessista ja lähtöaineista. [5; 6.] (Taulukko 1.)

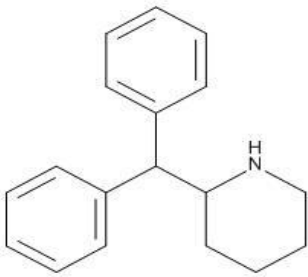
Taulukko 1. Mefedronin tiedot [7].

Nimet	Mefedroni, 4-MMC, 4-metyylimetkatinoni, Subcoca, SC, Meow, M-Cat ym.
Rakenne	
Moolimassa	Emäs: 177,24 g/mol HCl suolana: 213,71 g/mol
Vaikutus	Piriste vaikutuksiltaan amfetamiinin kaltainen
Käyttöannos	Suun kautta: 75 - 100 mg, vahva annos 150 - 200 mg Nenän kautta: 40 - 80 mg, vahva annos 80 - 150 mg
Olomuoto	Kapseleina tai jauheena
Päihdekäyttö	Suun kautta, nuuskaamalla tai suonensisäisesti
Lääkekäyttö	Ei lääkekäyttöä
Lainsäädäntö	Suomessa luokiteltu huumausaineeksi 23.2.2011

2.2.2 Desoksipipradroli

Desoksipipradrolin, joka tunnetaan myös nimillä ”Daisy” ja 2-DPMP, keksi lääkeyhtiö Ciba-Geigy, nykyisin Novartis, vuonna 1953. Silloin sitä käytettiin nukutuspotilaiden herättämiseen. Desoksipipradrolia muistuttavaa pipradrolia on käytetty myös ADHD:n, liikalihavuuden sekä narkolepsian hoitoon. 50-luvulla desoksipipradrolin vaarallisuutta tutkittiin myös eläinkokeilla, ja niiden mukaan monissa tapauksista desoksipipradroli oli myrkyllisempää kuin amfetamiini ja metamfetamiini. Kuolettava annos LD50:tä vaihtelee välillä 6 - 80 mg/kg koe-eläimestä ja antotavasta riippuen. Samaisissa tutkimuksissa arvioitiin eläinkokeiden perusteella ihmiselle sopivaa käyttöannosta, sen mukaan suositeltava käyttöannos ihmiselle olisi alle 1 mg. Yli 10 mg:n kerta annosten arvioitiin olevan ihmiselle huomattavan haitallisia. [8.] (Taulukko 2.)

Taulukko 2. Desoksipipradrolin tiedot [9].

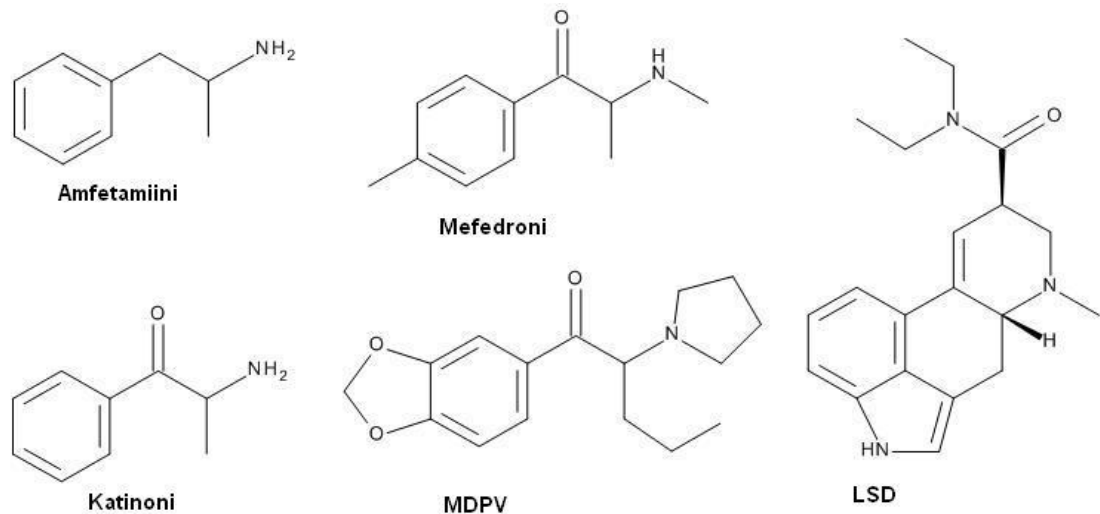
Nimet	Desoksipipradroli, Daisy, 2-difenyylimetyylijpiperidiini, 2-DPMP, Ivory Wave, Deso
Rakenne	
Moolimassa	251,366 g/mol
Vaikutus	Pitkävaikutteinen piriste
Käyttöannos	5 - 20 mg, pienen käyttöannoksen vuoksi suuri yliannostusvaara
Olomuoto	Jauheena tai nesteenä
Päihdekäyttö	Suun kautta, nuuskaamalla tai suonensisäisesti
Lääkekäyttö	Ei lääkekäyttöä nykyään
Lainsäädäntö	Suomessa luokiteltu huumausaineeksi 12.3.2012

2.3 Huumausaineiden rakenne

Uusia huumausaineita ei aivan tuon tuosta vain keksitä ja tuoda markkinoille. Usein taustalla on tarkkaa ja pitkälle harkittua systemaattista ”tuotekehittelyä”. 60- ja 70-luvuilla yhdysvaltalainen kemisti ja farmakologi Alexander Shulgin kehitti ja syntetisoi yli 230 erilaista psykoaktiivista yhdistettä sekä testasi eläimillä niiden vaikutuksia. Tutkiessaan β -fenyylietyyliamiinin johdannaisia Shulgin käytti lähtöaineenaan myrkkykaktuksesta saatavaa meskaliinia. Hän muokkasi systemaattisesti meskaliinin

metoksi-substituenttiryhmiä määrää ja sijaintia, lisäksi hän lisäsi eri substituentteja ja muokkasi etyleeniketjua saadakseen lisää erilaisia analogeja. [2.]

Kuvassa 1 nähdään rinnakkain joukko huumausaineita, jotka muistuttavat rakenteeltaan amfetamiinia. Tästä voidaan havaita, että pienetkin muutokset molekyylin rakenteessa vaikuttavat. Vertaillen amfetamiinia LSD:hen, voidaan todeta, että molekyylit voivat vielä kasvaa entisestään ja erilaisia analogeja, joilla on huumaavia vaikutuksia, löydetään varmasti lisää tulevaisuudessa. Aina osa niistä päätyy Suomen markkinoille asti. [2; 5.]



Kuva 1. Amfetamiini ja sen analogeja.

3 Analyysitekniikat

Työssä käytettiin yhdisteiden erottamiseen korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa (HPLC), johon on liitetty diodirividetktori (DAD) yhdisteiden kvantitoimiseen. Lisäksi yhdisteet ionisoitiin ilmanpaineessa toimivalla ionilähteellä, sähkösumutus-ionisaatiota käyttäen (API-ESI), ja piikkien puhtauden selvittämiseen käytettiin ioniloukkutekniikalla toimivaa massaspektrometria. Tutkimuksissa käytettiin myös paikallisomeerien määrittämiseksi Fourier-muunnosinfrapunaspektrometria (FTIR). Seuraavissa kappaleissa esitellään kyseisten analyysimenetelmien teoriaa.

3.1 Massaspektrometria

Massaspektrometria on analyttinen mittaustekniikka, jossa yhdisteet aluksi ionisoidaan, jolloin ionisoituneiden molekyylien sidokset katkeavat ja ne pilkkoutuvat pienemmiksi kappaleiksi, jotka erotellaan toisistaan niiden massan ja varauksen suhteen (*mass-to-charge ratio*, m/z) perusteella ja lopuksi mitataan m/z -arvojen intensiteetti. Massaspektri kuvaa molekyylin rakennetta, jonka pohjalta voidaan tunnistaa yhdiste. Tyypillisesti massaspektrometri on yhdistetty kromatografiin, jolloin yhdisteet voidaan analysoida puhtaina, näin molemmat tekniikat tukevat toisiaan ja saadaan tutkittavista yhdisteistä enemmän tietoa. Massaspektrometrilla voidaan havaita ainoastaan varauksellisia ioneja. Signaalin suuruus vastaa kyseisen ionien määrää ja on näin verrannollinen alkuperäisen näytemolekyylin määrään. [10, s. 122 - 123; 11, s. 15.]

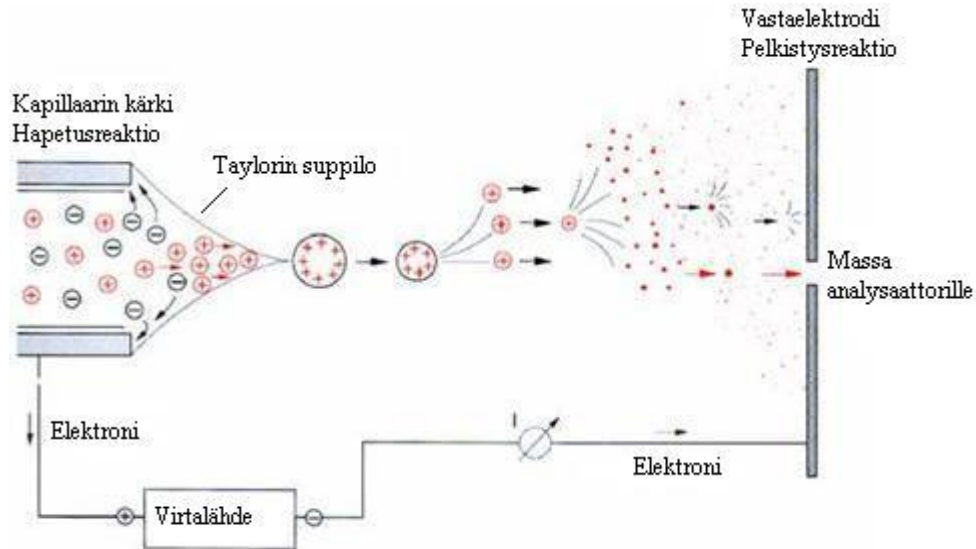
Korkean erotuskyvyn massaspektrometrit mittaavat massat niin tarkasti, että ionien m/z -arvojen perusteella voidaan määrittää yhdisteen alkuainekoostumus. Tiettyjen alkuaineiden isotooppisuhteita voidaan käyttää myös yhdisteiden tunnistamisen apuna. [10, s. 122.]

3.2 API-ESI

Ilmanpaineessa toimivan ionilähteen (API) tarkoituksena on poistaa näytteestä ilman sisältämät molekyylit ja liuotinmolekyylit sekä siirtää muodostuneet ionit ilmanpaineesta vakuumiin ja massa-analyysiin. [11, s. 69.]

Sähkösumutusionisaatio (ESI) on ilmanpaineessa tapahtuva pehmeä ionisointitekniikka, jossa neste sumutetaan pieniksi pisaroiksi korkean jännitteen avulla. Sumuttimessa ja kuivauksessa käytetään apuna typpikaasua. Varautuneen pisaran pinnalta haihtuu liuotinta, jonka seurauksena varaustiheys kasvaa pisaran pinnalla. Kun sähköinen poistovoima voittaa pintajännityksen saavutetaan Rayleighin raja-arvo, jolloin pisarat hajoavat pienemmiksi pisaroiksi. Pisarat voivat hajota pienemmiksi niin monta kertaa, kunnes liuotin on täysin haihtunut ja jäljelle jää yksittäisiä kaasufaasissa olevia ioneja, jotka sitten kerätään massaspektrometriin. Muodostuneet ionit ovat samassa muodossa, kuin ne ovat olleet eluointiliuoksessa. Positiivisia ioneja tutkittaessa kapillaarin jännite (2 - 5 kV) on positiivinen. Tällöin negatiiviset ionit hakeutuvat kapillaarin seinämille ja positiiviset ionit pyrkivät eluentin pinnalle. Tämän seurauksena eluentin pinnan virtausnopeus on suurempi kuin eluentin sisäosien.

Virtausnopeuksien erosta johtuen eluenttivyöhyke kapenee suppilomaisesti muodostaen Taylorin suppilon, joka antaa nesteelle suuremman liike-energian, jolloin muodostuu pienempiä pisaroita, joiden halkaisija on noin 1 μm . (Kuva 2.) [11, s. 71 – 73.]



Kuva 2. ESI-ionisaatio ja Taylorin suppilo [mukailtu lähteestä 12].

Sähkösumutusionisaatiossa syntyy tavallisesti yhdesti varautuneita ioneja, joista emäksiset molekyylit tuottavat protonoituneita ($[M+H]^+$) molekyylejä sekä happamat yhdisteet tuottavat deprotonoituneita ($[M-H]^-$) molekyylejä. Massaspektreissä voi myös esiintyä addukti-ioneja kuten esimerkiksi emäksillä $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$ ja $[M+K]^+$ tai vastaavasti happamilla yhdisteillä, $[M-HCOO]^-$, $[M-CH_3COO]^-$ ja $[M-Cl]^-$. Suuret molekyylit saattavat tuottaa myös monivarauksellisia ioneja, näitä voidaan hyödyntää esimerkiksi proteiinianalytiikassa. [11, s. 74 – 75.]

3.3 Ionisoitumiseen vaikuttavat tekijät

Ionisoitumistehokkuuteen vaikuttavat monet fysikaaliset ja kemialliset tekijät. Tärkeimmät kemialliset tekijät liittyvät käytettävän eluutin ja tutkittavien yhdisteiden ominaisuuksiin. Fysikaalisista ominaisuuksista keskeisimpiä vaikuttajia ovat kapillaarin jännite ja ulkohalkaisija, lämpötila ja virtausnopeus. [11, s. 75.]

Liuotin

Jotta kapillaarin kärjessä voisi muodostua varautuneita aerosoleja, tulee käytettävän liuottimen sähköjohtokyvyn olla riittävän suuri. Parhaiten soveltuvia liuottimia ESI:lle ovat pooliset liuottimet, kuten metanoli, asetonitrili ja vesi, tai keskipooliset liuottimet

kuten dikloorimetaani tai isopropanoli. Liuottimilla on erilaiset pintajännitykset: mitä suurempi pintajännitys on, sitä suurempia pisaroita ESI tuottaa. Isot pisarat hajoavat hitaammin pieniksi pisaroiksi ja siten kaasufaasiin siirtyvien pisaroiden määrä vähenee, samalla myös liuottimen haihtuminen hidastuu. Tästä syystä ESI:n herkkyys on parempi metanolia tai asetonitriliä kuin vettä käytettäessä. [11, s. 75.]

Puskuri

ESI:ssä tulee käyttää ainoastaan haihtuvia puskureita, jottei ionilähde likaannu. Tavallisimpia puskureita ovat ammoniumformaatti tai ammoniumasettaatti, joiden konsentraatio on alhainen (1 - 20 mM). Paras herkkyys saavutetaan, kun tutkittava yhdiste ionisoituu jo nestefaasissa. Tähän vaikuttavat yhdisteen pK_a -arvo ja liuoksen pH. Emäksiset yhdisteet analysoidaan positiivisina ioneina ja käytetään hapanta tai neutraalia eluenttia, jonka pH on säädetty tavallisesti etikkahapolla tai muurahaishapolla. Happamat yhdisteet analysoidaan negatiivisina ioneina, käyttäen emäksistä tai neutraalia eluenttia. ESI:ssä hapettumis- ja pelkistysreaktiot sekä liuottimen haihtuminen muuttavat pisaroiden pH:ta ja ionisoitumistehokkuus kärsii. [11, s. 75 – 76.]

Konsentraatio

Ionisaatiotehokkuuteen vaikuttaa keskeisesti myös tutkittavan yhdisteen konsentraatio. Liian korkeilla pitoisuuksilla pisarat kyllästyvät tutkittavan yhdisteen ioneista, eikä niitä saada enää tehokkaasti kaasufaasiin. Tästä syystä tulee selvittää menetelmän lineaarinen alue. [11, s. 76.]

Tutkittava yhdiste

Yhdisteen pK_a -arvon ja eluentin pH:n välillä on merkittävä vaikutus ionisaatioon. Mikäli yhdisteen pK_a -arvo ja eluentin pH ovat samat, niin tutkittavaa yhdistettä on noin 50 % ionisoituneessa muodossa ja 50 % neutraalissa muodossa. Poolittomat yhdisteet ovat hydrofobisia, nämä yhdisteet siirtyvät kaasufaasiin nopeammin kuin hydrofiiliset pooliset yhdisteet. [11, s. 76 – 77.]

Fysikaaliset tekijät

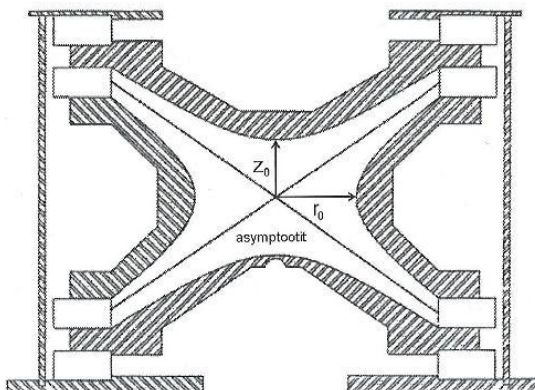
ESI-kapillaarin kärjessä tulee olla riittävän suuri elektrostaattinen kenttä, jotta se aiheuttaisi riittävän tehokkaan ionisoitumisen. Kentän voimakkuus riippuu jännitteestä, kapillaarin ulkohalkaisijasta sekä kapillaarin kärjen etäisyydestä API-lähteeseen. Liian lähelle API-lähdettä ei kärkeä kannata viedä, sillä se saattaa aiheuttaa

varauksenpurkauksen, joka voi vaurioittaa laitteistoa. Liian nopea virtausnopeus voi aiheuttaa sen, että muodostuu liian suuria pisaroita, jotka eivät ehdi jakautumaan riittävän pieniksi pisaroiksi. Tyypillisesti virtausnopeus ESI:ssä vaihtelee välillä 5 - 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. [11, s. 77.]

3.4 Ioniloukku

Menetelmän massadetektorina käytettiin Agilentin valmistamaa LC/MSD Trap SL laitetta, jonka detektorin on valmistanut Bruker. Ioniloukun etuja ovat sen edullisuus, hyvä herkkyys, sekä mahdollisuus moniulotteiseen massaspektrometriaan (MS^n). Ioniloukun heikkouksia ovat pienten massojen diskriminointi sekä sen heikko kvantitatiivisuus. Tämä johtuu siitä, että ioniloukussa on hyvin rajallinen tila ioneille ja jos niitä on liikaa, ne alkavat vuorovaikuttamaan toisiinsa. Tästä syystä menetelmän kvantitointisuus tehtiin diodirividetektorilla massaspektrometrin sijaan. [11, s. 38.]

Ioniloukku rakentuu kolmesta metallielektrodista, mikä poikkileikkaukseltaan muistuttaa renkaaksi kierrettyä lineaarista kvadrupolia. Kytettäessä jännitteet elektrodeihin sähkökenttä on kohtisuorassa loukun asymptootteja vastaan ja kasvaa reunoja kohti. Loukun keskelle muodostuu sopivilla jännitteillä potentiaalikuoppa, johon ionit pyrkivät. Ioniloukun toiminta perustuu siihen, että ionit, joilla on eri massa-varaussuhteet, poistetaan ioniloukusta detektorille järjestyksessä, yleensä pienimmästä suurimpaan. Koska ioniloukku on sylinterisymmetrinen, siinä syntyvä sähkökenttä on sylinterisymmetrinen. Tällöin ionien liikettä voidaan kuvata sylinterikoordinaateilla r (säteittäinen etäisyys keskipisteestä kehäelektrodin suuntaan) ja z (etäisyys keskipisteestä päätyelektrodien suuntaan) (kuva 3). Ionit pysyvät stabiileina, kun niiden liikeradat eivät saavuta elektrodeja ja ne ovat samanaikaisesti stabiileja r - ja z -suunnissa. [11, s. 34 – 37.]



Kuva 3. Ioniloukun poikkileikkaus [11].

Jännitettä kasvattaessa ioneista tulee epästabiileja z-suunnassa ja ne poistuvat ioniloukusta z-akselin suuntaisesti. Jännitteellä on kuitenkin yläraja, jolloin myöskään tietyn m/z-arvon ioneja ei voida loukusta poistaa. Massa-alueita on pystytty suurentamaan kahdella eri tekniikalla. Näistä ensimmäinen on resonanssiviritys, jossa loukun päätyelektrodeihin tuodaan muutaman voltin vaihtojännite samalla taajuudella kuin loukussa resonoiva ioni. Tämä kasvattaa ionin liikerataa z-akselin suuntaan. Näin ioneista saadaan epästabiileja pienemmällä jännitteellä. Massa-alueita on pystytty kasvattamaan myös lisäämällä loukkuun heliumia. Törmäillessään heliumatomien kanssa ionit luovuttavat kineettistä energiaa. Näin niiden liikeradat keskittyvät pienemmälle alueelle ja varastointikapasiteetti on suurempi. Heliumin käytössä on myös toinen massa-resoluutiota parantava tekijä. Tiiviisti loukussa olevat ionit voidaan poistaa loukusta nopeammin ja tehokkaammin. [11, s. 37 – 38.]

Ioniloukku on vertaansa vailla tandem-massaspektrometriassa (MS-MS ja MSⁿ), sillä siihen riittää yksi laite. Äiti-ioniksi voidaan valita ioni, jolle annetaan lisää kineettistä energiaa resonanssivirityksellä, ja ionit törmäytetään heliumkaasuun. Ionit hajoavat törmäyksestä ja niiden tuotteita voidaan tutkia. Koska ioniloukussa voidaan varastoida ioneita ja poistaa ei-haluttuja, tuoteioneita voidaan törmäyttää uudelleen. Prosessia voidaan ioniloukulla jatkaa niin monta kertaa kuin signaalin intensiteetti sen sallii. Tämä parantaa selektiivisyyttä ja antaa tutkittavista yhdisteistä enemmän tietoa. Tällä tavoin voidaan tunnistaa joitakin vaikeasti erotettavia yhdisteitä, joilla on samantyyppiset massaspektrit ja retentioaika. [10, s. 213 - 214; 11, s. 37 – 38; 13, s. 92.]

4 Materiaalit ja laitteistot

4.1 Laitteet

Työssä käytettiin Watersin valmistamaa XSELECT CSH C18-käänteisfaasikolonnia, sillä se soveltuu poolisten yhdisteiden erottamiseen paremmin kuin tavalliset C18 kolonnit. Työssä tutkitut yhdisteet ovat emäksisiä ja käytetty ajoliuos on heikosti hapan, tästä johtuen piikit ovat voimakkaasti epäsymmetrisiä. Käytetyllä kolonnilla on pidempi retentio ja se korjaa happamuudesta johtuvaa häntimistä, jolloin piikkien muoto on parempi kuin tavallisilla C18-kolonneilla. Työssä käytetyt laitteet ja ohjelmistot on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Työssä käytetyt laitteet ja ohjelmistot.

Laitteet	Malli
LC-MS -laite	Agilent 1100 Series LC/MSD Trap SL (Ioniloukku Brukerin valmistama)
Diodirividetektori	Agilent 1100 Diode Array Detector
Nestekromatografiakolonne	Waters XSELECT CSH C18 3,5 µm, 3,0 x 150 mm
Typpigeneraattori	Whatman Model 75-72
FTIR	Perkin-Elmer Spectrum One -yksisädelaitte
Ultraäänihaude	Ultrasonic Cleaner Branson 200
Vaaka	Mettler AE 200
Sentrifuugi	Eppendorf Centrifuge 5810
Ohjelmistot	Chemstation for LC 3D, LCMSD Trap Software 5.3

4.2 Reagenssit

Mefedronistandardiliuosten valmistamiseen käytettiin takavarikoitua näytettä, jonka oletettiin olevan puhdasta lähes 100-%:sta mefedronia. Kyseisen näytteen pitoisuus varmennettiin puhtasaineella. Vertailumateriaalina käytettiin ENFSI:n (European Network of Forensic Science Institutes) DWG:n (Drugs Working Group) pätevyyskokeissa käytettyä PT-näytettä (*Proficiency Test Sample*), jonka tunnettu pitoisuus oli 26,7 p-%. Työssä käytetyt reagenssit on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4. Työssä käytetyt reagenssit.

Kemikaali	Puhtaus	Toimittaja tai valmistaja
Mefedroni 02355	100 %	Toronto Research Chemicals Inc.
Desoksipipradroli 02673	98,4 %	LGC
Metanoli	HPLC-laatu	J.T.Baker
Ammoniumasettaatti	98 % Analytical Reagent	Riedel-de Haën
Asetonitriili	Ultra gradient HPLC-laatu	J.T.Baker
D(+) Glukoosi vedetön	99,5 %	Merck
Muurahaishappo	98 - 100 %	Riedel-de Haën
Ionivaihdettu vesi Milli-Q	100 %	Millipore Milli-Q Plus -laite

Desoksipipradrolin standardiliuosten valmistamiseen käytettiin Hjelt-instituutilta saatua näytettä, joka oli heidän mukaansa 100 %:sta. Pitoisuus varmistettiin puhtasaineella.

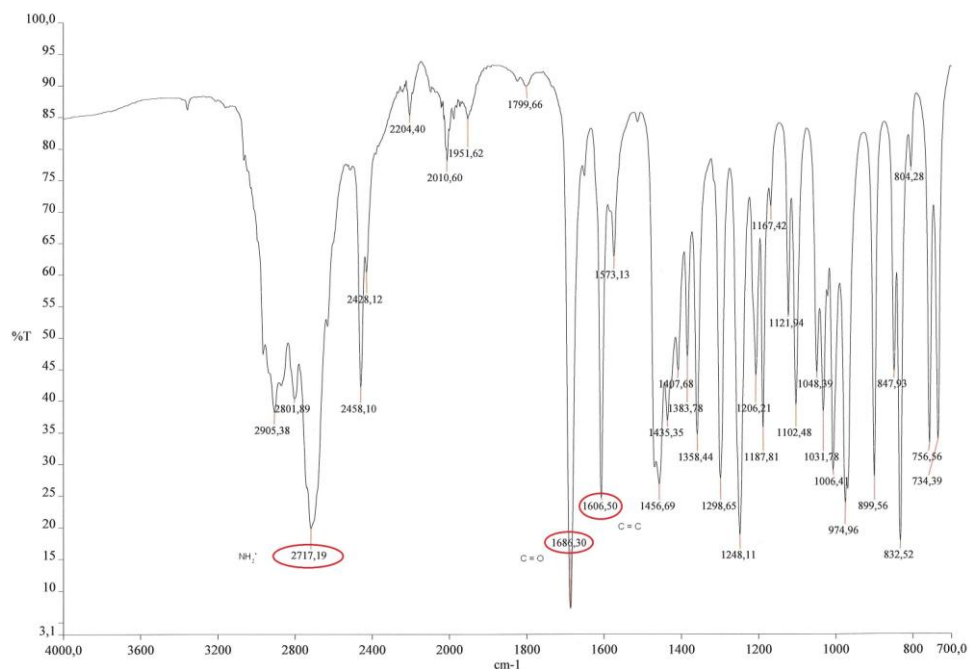
5 Menetelmän kehitys

Seuraavissa kappaleissa käsitellään menetelmän kehityksen vaatimuksia, vaiheita ja testattujen parametrien tuloksia.

Opinnäytetyössä pyrittiin kehittämään kvantitatiivinen HPLC-UV-MS-menetelmä, jolla tutkittavat analyytit voidaan määrittää riittävän luotettavasti ja toistettavasti. Menetelmän käytön ja näytteiden käsittelyn kannalta pyrittiin yksinkertaisuuteen, jotta menetelmää voitaisiin käyttää päivittäisessä rutiinistyössä. Menetelmän kehitys sisälsi näytteiden esikäsittelyn optimointia ja nestekromatografian ajoparametrien optimointia.

5.1 Mefedronin tunnistaminen FTIR-spektroskopiolla

Työssä oli tärkeää tietää, missä olomuodossa mefedroni on tutkittavissa näytteissä. Mefedroni voi esiintyä joko emäksenä tai se voi muodostaa suolan vetykloridin tai vetybromidin kanssa. Lähdetietojen perusteella [4 ja 6] tiedettiin, mistä erottaa kunkin muodon. Kuvassa 4 on ympyröity merkittävät spektrin piikit, joiden perusteella päädyttiin tulokseen, että näyte esiintyy HCl-suolana.



Kuva 4. Takavarikoidun mefedroninäytteen IR-spektri.

5.2 Näytteen esikäsittelyn optimointi

MDPV:n validointiraportin [14] pohjalta oli valmis näytteiden esikäsittelymenetelmä, mutta se oli todettu epäkäytännölliseksi ja sitä tulisi yksinkertaistaa. Merkittäviä muutoksia esikäsittelyyn ei kuitenkaan haluttu. Käsittelyn merkittävin vaihe on uuttoprosessi, joten siihen liittyviä parametreja testattiin. Uuttotehokkuutta testattiin eri metanolikonsentraatioilla sekä pidentämällä uuttoaikaa ultraäänihauteessa.

Mefedroni

Uuttoliuoksen MeOH-pitoisuutta muuttamalla testattiin, liukeneeko mefedroni paremmin metanoliin kuin veteen. Uuttoliuoksen metanolikonsentraatiolla ei ole merkittävää vaikutusta mefedronin liukenemiseen (taulukko 5). Edellytys esikäsittelylle oli se, että tutkittavissa näytteissä tuli olla metanolia samassa suhteessa kuin ajoliuoksessa. Koska metanolipitoisuudella ei ole merkittävää vaikutusta, menetelmässä käytetyksi metanolipitoisuudeksi valittiin 20-%:nen metanoli-vesi-liuos. Lisäksi näytteen käsittelyssä tarvitaan yksi laimennos vähemmän, ja näin on myös yksi virhelähde vähemmän. Suuremmalla metanolikonsentraatiolla metanolin haihtuminen on myös todennäköisempää.

Taulukko 5. Metanolipitoisuuden vaikutus mefedronin uuttumiseen.

Metanolin osuus	0 % metanolia	40 % metanolia	80 % metanolia	100 % metanolia
Pitoisuus (p-%)	110,7	110,4	114,91	116,9
Muutos veteen uutettuun (%)	0	-0,3	3,6	5,3

Uuttoajan vaikutusta mefedronin uuttotehokkuuteen testattiin (ks. taulukko 6). Näytteitä pidettiin ultraäänihauteessa 5 ja 10 minuuttia. Uuttoajan pidentäminen yli 5 minuuttiin ei lisää uuttotehokkuutta merkittävästi.

Taulukko 6. Uuttoajan vaikutus mefedronin uuttumiseen.

Uuttoaika	5 min uutto	10 min uutto
Pitoisuus (mg/ml)	0,3497	0,3490

Desoksipipradroli

Uuttoliuoksen MeOH-pitoisuutta muuttamalla testattiin, uuttuuko desoksipipradroli paremmin metanoliin kuin veteen. Uuttoliuoksen metanolikonsentraatiolla ei ole merkittävää vaikutusta desoksipipradrolin liukenemiseen, korkeammassa metanolipitoisuudessa desoksipipradroli uuttuu heikommin kuin 20-%:sessa metanoli-vesiliuoksessa (taulukko 7). Edellytys esikäsittelylle oli se, että tutkittavissa näytteissä tuli olla metanolia samassa suhteessa kuin ajoliuoksessa. Jotta esikäsittely olisi

mahdollisimman yksinkertainen, uuttoliuoksen konsentraatioksi valittiin 20-%:nen metanoli-vesi-liuos. Tällöin näytteitä laimentaessa samalla liuksella metanolipitoisuus pysyy vakiona, eikä tarvitse erikseen laimentaa useammalla liuksella.

Taulukko 7. Desoksipipradrolin uutuminen eri metanolipitoisuuksissa.

Metanolin osuus	20 % metanolia	100 % metanolia
Pitoisuus (p-%)	34,2	27,6

Uuttoajan vaikutusta desoksipipradrolin uutotehokkuuteen testattiin. Näytteitä pidettiin ultraäänihauteessa 5, 10 ja 15 minuuttia. (Taulukko 8).

Taulukko 8. Uuttoajan vaikutus desoksipipradrolin pitoisuuteen.

Uuttoaika	5 min uutto	10 min uutto	15 min uutto
Pitoisuus (p-%)	34,2	35,1	35,4

Uuttoajan pidentäminen yli viiteen minuuttiin ei lisää uutotehokkuutta merkittävästi, joten uuttoajaksi valittiin 5 minuuttia.

5.3 Testatut parametrit

Menetelmän toimivuus mefedronilla ja desoksipipradrolilla arvioitiin opinnäytetyössä. Tutkittavat asiat olivat lineaarisuus ja mittausalue, toteamisraja ja määrittäysraja, tarkkuus, toistettavuus, ristikontaminaatio, mittausepävarmuus, kalibrointiliuosten säilyvyys sekä spesifisyys ja selektiivisyys. Seuraavissa kappaleissa on esitetty testatut parametrit ja niistä saadut tulokset.

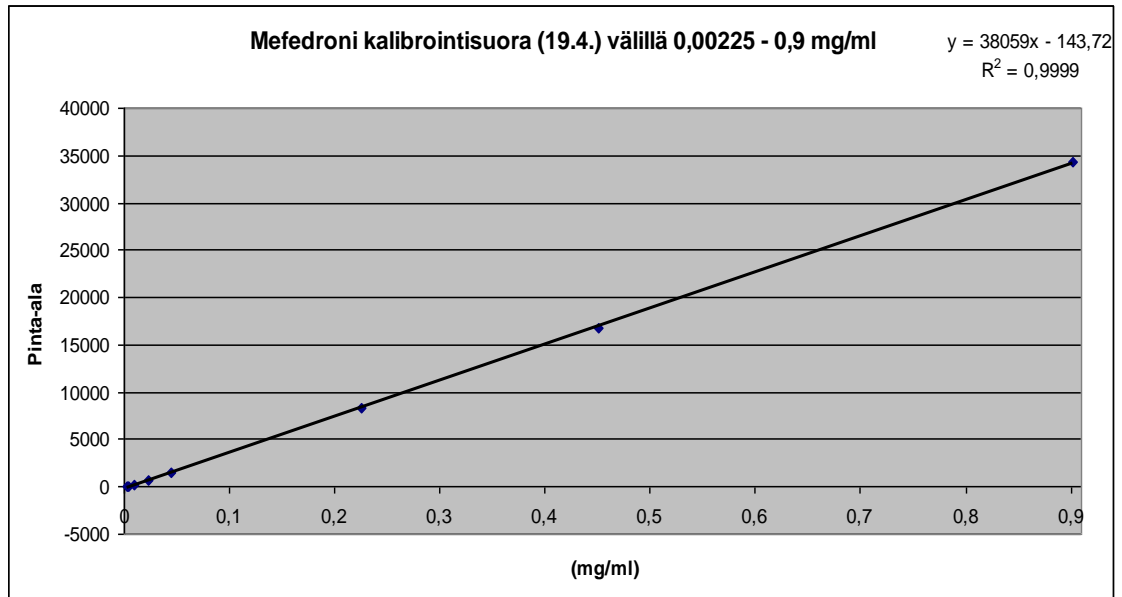
5.3.1 Lineaarisuus ja mittausalue

Menetelmän mittausalueella tarkoitetaan yleensä lineaarista mittausaluetta, laimennusrajaa tai analyttistä toiminta-aluetta. Lineaarisuudella tarkoitetaan menetelmän kykyä antaa tietyllä alueella lineaarinen korrelaatio tulosten ja näytteestä tutkittavien aineiden pitoisuuksien välillä. Käytettävällä mittausalueella virhe on tunnetuissa, määritellyissä rajoissa. [15.]

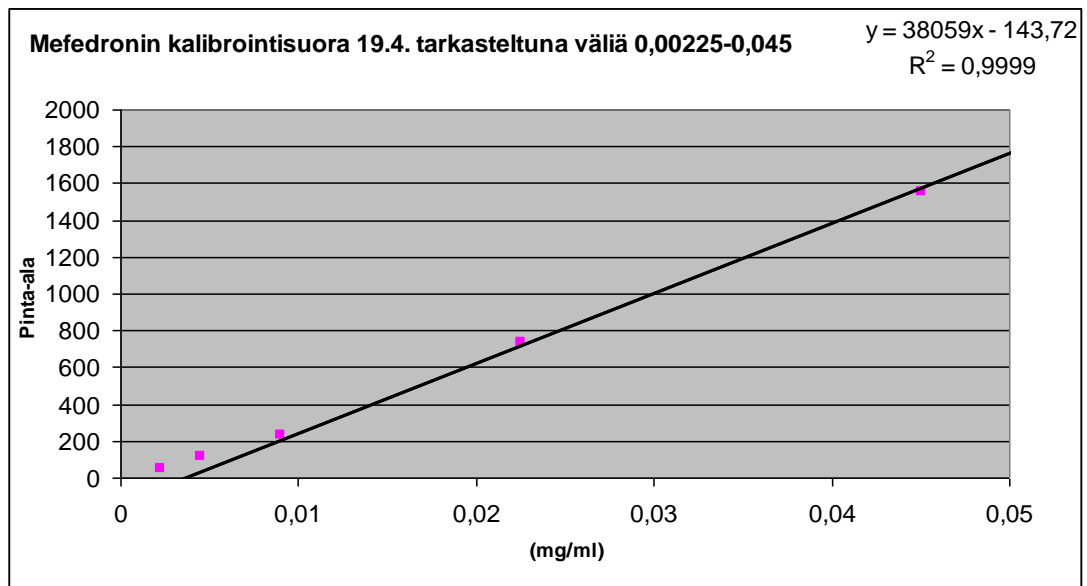
Mefedroni

Lineaarisuutta tutkittaessa mefedroni mitattiin yhdeksällä eri pitoisuudella välillä 0,00225 - 0,900 mg/ml (kuva 5). Mittaustuloksista havaittiin, että menetelmällä mefedroni on lineaarinen välillä 0,00900 - 0,900 mg/ml. Lähemmin tarkasteltuna alle

0,00900 mg/ml pitoisuuden mittauspisteet eivät silmämääräisesti sovi lineaarisen suoran sovitukseseen, lisäksi takaisin laskettuna mittauspisteen 0,00450 mg/ml pitoisuus on 50 % suurempi kuin todellisuudessa sekä pisteessä 0,00225 mg/ml pitoisuus on lähes kolminkertainen. (Kuva 6.)



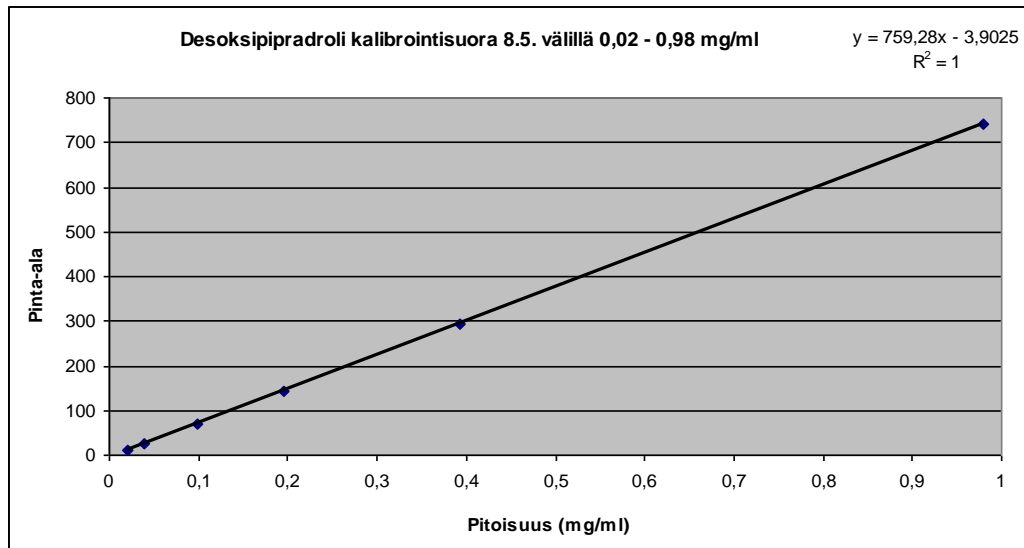
Kuva 5. Mefedronin kalibrointisuora koko alueelta.



Kuva 6. Mefedronin kalibrointisuora välillä 0,00225 - 0,045 mg/ml.

Desoksipipradroli

Lineaarisuutta tutkittaessa desoksipipradroliä mitattiin seitsemällä eri pitoisuudella välillä 0,01 - 0,98 mg/ml (kuva 7).



Kuva 7. Desoksipipradroli kalibrointisuora välillä 0,02 - 0,98 mg/ml.

Mittaustuloksista havaittiin, että menetelmällä desoksipipradroli on lineaarinen välillä 0,02 - 0,98 mg/ml. Tätä pienemmillä pitoisuuksilla laitteen antama signaali on liian pieni, pitoisuudella 0,01 mg/ml kromatogrammin piikin pinta-ala oli 1, jota ei voida pitää tarpeeksi luotettavana. Pitoisuudella 0,02 mg/ml vastaava pinta-ala oli 7,5.

5.3.2 Toteamis- ja määrittysraja

Toteamisraja

Toteamisraja LOD (*Limit of Detection*) tarkoittaa alinta analyytin pitoisuutta, joka voidaan todeta riittävällä varmuudella [16]. Kromatografisissa menetelmissä LOD:n määrittämiseen käytetään tavallisesti signaali-kohinasuhdetta $S/N \geq 3$ (*Signal to Noise ratio*).

Mefedroni

Opinnäytetyössä toteamisraja määritettiin tekemällä kalibrointisuoran pienimmästä pitoisuudesta vielä 1:10 laimennos, jolloin kyseinen analyytin määrä on 0,001 mg/ml. Kyseisellä pitoisuudella signaali-kohinasuhde on 70. Tämä LOD on kyseiselle menetelmälle riittävä, sillä vastaavilla pitoisuuksilla huumausaineen käyttöannos olisi niin suuri, että ainetta voidaan sanoa lähes käyttökelvottomaksi.

Desoksipipradroli

Opinnäytetyössä toteamisraja määritettiin tutkimalla kalibrintisuoran kahta pienintä piikkiä ja niiden signaali-kohinasuhteita. Pitoisuudella 0,01 mg/ml signaali-kohinasuhde on 8, mutta signaali on erittäin pieni. Tämä LOD on kyseiselle menetelmälle riittävä, sillä vastaavilla pitoisuuksilla huumausaineen käyttöannos olisi niin suuri, että ainetta voidaan sanoa lähes käyttökelvottomaksi.

Määritysraja

Määritysraja LOQ (= *Limit of Quantitation*) tarkoittaa alinta analyytin pitoisuutta, joka voidaan määrittää riittävän tarkasti ja toistettavasti [16]. Määritysrajaa käytetään tavallisesti kalibrintisuoran pienimpänä pitoisuutena. LOQ:n määrittämiseen käytetään tavallisesti signaali-kohinasuhdetta $S/N \geq 10$. Kun analyytin pitoisuus on toteamis- ja määritysrajan välillä, voidaan analyyttiä todeta olevan näytteessä, mutta sen pitoisuuden olevan alle määritysrajan. [10, s. 13.]

Mefedroni

LOQ määritettiin tutkimalla menetelmän lineaarisuutta sekä tutkimalla kalibrintisuorien keskihajontaa tietyssä pisteessä (taulukko 9). Määritysrajaksi valittiin 0,01 mg/ml, sillä siihen päättyy kalibrintisuoran lineaarinen alue, eikä sitä pienempiä pitoisuuksia ole tarpeen määrittää.

Taulukko 9. Mefedronin kalibrintisuorien takaisinlaskettu saanto pisteessä 0,01 mg/ml.

Kalibrintisuoran piste 0,01 mg/ml	Takaisinlaskettu saanto (%)
16.5. mitattu	96,49
30.5. mitattu	101,57
6.7. mitattu	104,69
Keskiarvo	100,92
Keskihajonta	4,14

Kalibrintiliuosten takaisinlaskennan perusteella, kyseisellä pitoisuudella suhteellinen keskihajonta on alle 5 %, joten kyseinen pitoisuus sopii hyvin määritysrajaksi.

Desoksipipradroli

LOQ määritettiin tutkimalla menetelmän lineaarisuutta sekä tutkimalla kalibrintisuorien keskihajontaa tietyssä pisteessä (taulukko 10). Määritysrajaksi valittiin 0,02 mg/ml, sillä se on kalibrintisuoran lineaarisella alueella.

Taulukko 10. Desoksipipradroli kalibrintisuorien takaisinlaskettu saanto pisteessä 0,02 mg/ml.

Kalibrintisuoran piste 0,02 mg/ml	Takaisinlaskettu saanto (%)
8.5. mitattu	104,84
11.5. mitattu	114,92
6.7. mitattu	115,70
Keskiarvo	111,82
Keskihajonta	6,06

Kalibrintiliuosten takaisinlaskennan perusteella, kyseisellä pitoisuudella suhteellinen keskihajonta on 6 %, jota voidaan pitää tarpeeksi luotettavana.

5.3.3 Tarkkuus

Menetelmän tarkkuutta arvioidaan systemaattisen ja satunnaisen virheen perusteella. Mittausten oikeellisuutta eli systemaattista virhettä voidaan tutkia vertaamalla tulosten keskiarvoa tunnettuun arvoon. Toistotarkkuutta eli satunnaista virhettä voidaan tutkia vertailemalla mittaustulosten keskinäistä paikkansapitävyyttä. [15.] Koska on mahdollista tehdä vain äärellinen määrä mittauksia, pystytään määrittämään ainoastaan satunnaisen virheen keskiarvo seuraavan kaavan perusteella:

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

missä

s = keskihajonta

\bar{x} = keskiarvo

Systemaattinen virhe (*bias*) lasketaan seuraavan kaavan perusteella:

$$bias(\%) = \frac{(x - \mu)}{\mu} \cdot 100\% \quad (2)$$

missä

μ = tunnettu arvo

x = tulosten keskiarvo

Systemaattista virhettä voidaan myös arvioida saantokokeella standardin lisäyksen avulla seuraavan kaavan perusteella:

$$Saanto(\%) = \frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \cdot 100\% \quad (3)$$

missä

C_1 = lisäyksen sisältävän näytteen pitoisuus (mitattu)

C_2 = näytteen alkuperäinen pitoisuus (mitattu)

C_3 = lisätyn standardiliuoksen pitoisuus (tunnettu)

Mefedroni

Satunnais- ja systemaattinen virhe laskettiin yhdeksästä rinnakkaisesta PT-näytteestä (*Proficiency test*), jotka on mitattu lyhyellä aikavälillä samoissa olosuhteissa (taulukko 11).

Taulukko 11. Mefedronin satunnais- ja systemaattinen virhe PT-näytteestä.

Näyte	Pitoisuus (p-%)
02629-1	27,94
02629-2	26,91
02629-3	28,09
02629-4	28,21
02629-5	27,34
02629-6	28,48
02629-7	27,36
02629-8	26,51
02629-9	27,59
Keskiarvo	27,60
Keskihajonta	0,64
Satunnaisvirhe RSD(%)	2,32
Systemaattinen virhe <i>bias</i> (%)	3,38

Koska saadut pitoisuudet ovat kaikki suurempia kuin tunnettu pitoisuus 26,7 p-%. Voidaan olettaa, että mittauksissa tapahtuu systemaattista virhettä, jonka seurauksena tulokset ovat hieman suurempia kuin todellisuudessa.

Saantokokeita tehtiin kuusi kappaletta lisäämällä näytteeseen standardiliuosta siten, että näytteen pitoisuus kasvaa 0,1 mg/ml (taulukko 12).

Taulukko 12. Mefedronin saantokoetulokset.

Näyte	Saanto (%)
Saanto 1	105,46
Saanto 2	100,33
Saanto 3	112,73
Saanto 4	95,33
Saanto 5	104,47
Saanto 6	108,87
Keskiarvo	104,53
Keskihajonta	6,15
Satunnaisvirhe RSD(%)	5,89
Systemaattinen virhe <i>bias</i> (%)	4,53

Saantokokeiden keskihajonta on suurempi kuin PT-näytteitä tutkimalla. Tästä syystä saantokokeiden satunnaisvirhe kasvaa. Suurempi keskihajonta saattaa johtua näytteen epähomogeenisuudesta. Koska saantoprosentti on yli 100 % viittaa tämä siihen, että tuloksissa on systemaattista virhettä.

Desoksipipradroli

Satunnais- ja systemaattinen virhe laskettiin kolmesta rinnakkaisesta kontrollinäytteestä, joiden tunnettu pitoisuus on 100 p-%. Mittaukset suoritettiin lyhyellä aikavälillä samoissa olosuhteissa (taulukko 13).

Taulukko 13. Desoksipipradroli satunnais- ja systemaattinen virhe kontrollinäytteestä.

Näyte	Pitoisuus (p-%)
02238-1	106,29
02238-2	104,84
02238-3	105,99
Keskiarvo	105,71
Keskihajonta	0,77
Satunnaisvirhe RSD(%)	0,73
Systemaattinen virhe bias(%)	5,71

Koska saadut pitoisuudet ovat yli 100 p-%, tämä viittaa systemaattiseen virheeseen, jossa mitattu pitoisuus on hieman suurempi kuin todellinen pitoisuus. Keskihajonta on pientä, joten kontrollinäyte on homogeeninen.

Saantokokeita tehtiin viisi kappaletta lisäämällä näytteeseen standardiliuosta siten, että näytteen pitoisuus kasvaa 0,1 mg/ml (taulukko 14).

Taulukko 14. Desoksipipradrolin saantokoetulokset.

Näyte	Saanto (%)
Saanto 1	94,43
Saanto 2	106,02
Saanto 3	101,55
Saanto 4	105,46
Saanto 5	107,31
Keskiarvo	102,95
Keskihajonta	5,22
Satunnaisvirhe RSD(%)	5,08
Systemaattinen virhe bias(%)	2,95

Saantokokeiden keskihajonta sekä satunnaisvirhe ovat suurempia kuin kontrollinäytteissä. Tämä saattaa johtua näytteen epähomogeenisuudesta.

5.3.4 Uusittavuus

Uusittavuudella tarkoitetaan tulosten yhtäpitävyyttä, joka saavutetaan kun mittaukset tehdään muuttuneissa olosuhteissa. Uusittavuutta tutkittiin vertailemalla eri päivinä valmistettuja näytteitä yhdensuuntaisella varianssianalyysillä ANOVA-tilukkoa apuna käyttäen (tilukko 15) [17].

Tilukko 15. ANOVA-tilukko.

Hajonnan lähde	Neliösumma (SS)	Vapausasteet (df)	Keskineliö (MS)	F
Ryhmiin välinen	$S_b = S_1 - S_3$	p-1	$M_b = S_b / (p-1)$	M_b / M_w
Ryhmiin sisäinen	$S_w = S_2 - S_1$	n-p	$M_w = S_w / (n-p)$	
Kokonais	$S_{tot} = S_b + S_w$	n-1		

missä

S_1 = kunkin päivän tuloksiin summan neliö / mittauksiin lukumäärä per päivä

S_2 = tuloksiin neliöiden summa

S_3 = tuloksiin summan neliö / mittauksiin lukumäärä

Mefedroni

Vertailtiin keskenään neljänä eri päivänä valmistettuja näytteitä, joissa jokaisessa kolme rinnakkaisnäytettä (tilukot 16).

Tilukko 16. Mefedroninäytteen 02575 pitoisuudet eri päivinä.

Rinnakkaiset lajit	27.4.	3.5.	16.5.	6.7..
1	100,77	99,03	93,55	91,78
2	96,30	88,50	93,21	92,69
3	96,79	96,66	93,05	94,41
$S_1 =$	107729,12			
$S_2 =$	107805,87			
$S_3 =$	107682,15			

Varianssianalyysi laskettiin ANOVA-tilukon mukaisesti mefedroninäyttestä (tilukko 17).

Tilukko 17. Mefedronin laskettu F-arvo ANOVA-tilukon avulla.

Hajonnan lähde	Neliösumma (SS)	Vapausasteet (df)	Keskineliö (MS)	F
Ryhmiin välinen	46,97	3	15,66	1,63
Ryhmiin sisäinen	76,75	8	9,59	
Kokonais	123,72	11		

Taulukkoarvo $F_{3,11}$ 95 %:n merkitsevyystasolla on $3,59 > 1,63$, joten päivien välillä ei ole merkittävää eroa ja menetelmä on toistettava.

Desoksipiradrolin

Vertailtiin keskenään kolmena eri päivänä valmistettuja näytteitä, joissa jokaisessa oli kolme rinnakkaisnäytettä (taulukko 18).

Taulukko 18. Desoksipiradrolinäytteen 02659 pitoisuudet eri päivinä.

Rinnakkaiset\ajot	11.5.	30.5.	6.7.
1	34,26	36,54	34,05
2	36,20	35,70	36,31
3	32,28	35,41	35,46
$S_1 =$	11114,19		
$S_2 =$	11125,15		
$S_3 =$	11110,11		

Varianssianalyysi laskettiin ANOVA-taulukon mukaisesti (taulukko 19).

Taulukko 19. Desoksipiradrolin laskettu F-arvo ANOVA-taulukon avulla.

Hajonnan lähde	Neliösumma (SS)	Vapausasteet (df)	Keskineliö (MS)	F
Ryhmien välinen	4,09	2	2,04	1,12
Ryhmien sisäinen	10,96	6	1,83	
Kokonais	15,04	8		

Taulukkoarvo $F_{2,8}$ 95 %:n merkitsevyystasolla on $4,46 > 1,12$, joten päivien välillä ei ole merkittävää eroa ja menetelmä on toistettava.

5.3.5 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuudella arvioidaan vaihteluväliä, jolla mittaustulosten oletetaan olevan tietyllä todennäköisyydellä [15, s. 19]. Liitteessä 1 on esitetty mittausepävarmuuden laskemiseen vaadittavat kaavat sekä laskettu mefedronin ja desoksipiradrolin mittausepävarmuudet 95 %:n luottamusvälillä. Mefedronin laajennettu mittausepävarmuus on 9 % sekä desoksipiradrolin 15 %. Mittausepävarmuudet ovat varsin hyvät ja täyttävät menetelmälle asetetut vaatimukset. Suurin mittausepävarmuustekijä on näytteiden epähomogeenisuus. Koska mefedronin mittausepävarmuutta arvioitiin PT-näytteellä, joka on homogeeninen näyte (pieni keskihajonta), voidaan olettaa mefedronin mittausepävarmuuden olevan hieman

suurempi. Epähomogeenisuus huomioon ottaen mefedronin mittausepävarmuudeksi arvioitiin 11 %.

5.3.6 Ristikontaminaatio

Ristikontaminaatiota voi ilmentyä käytettäessä väkeviä liuoksia, sillä jotkin yhdisteet saattavat adsorboitua työvälineisiin tai laitteistoon. Adsorboitunut analyytti voi ilmentyä seuraavissa injektioissa signaalina. Ongelmia tämä aiheuttaa erityisesti tutkittaessa hyvin pieniä pitoisuuksia. Kontaminaatoriskiä voidaan ehkäistä huolellisella työskentelyllä, sekä mittaamalla näytteiden joukossa riittävästi liuotin- tai blank-näytteitä. [11, s. 190.] Työssä ristikontaminaatiota tutkittiin mittaamalla liuotinnäyte jokaisen kalibrintiliuoksen jälkeen sekä jokaisen kolmen rinnakkaisnäytteen jälkeen. Liuotinnäytteiden puhtaus varmistettiin vielä massaspektristä.

Mefedroni

Mefedronilla havaittiin hyvin pientä ristikontaminaatiota väkevien näytteiden jälkeen. Kontaminaation suuruus jää reilusti alle toteamisrajan. Toteamisrajan pitoisuudella piikin pinta-ala on noin 20, kun taas kontaminaatiopiikin pinta-ala on alle 2. Tämä voidaan huomioida menetelmässä, etteivät alle 10 pinta-alan piikit integroidu. Kontaminaation suuruus ei ole merkittävä eikä menetelmän käyttötarkoitus edellytä vastaavaa tarkkuutta.

Desoksipipradroli

Huolellisen työskentelyn ansiosta mittauksissa ei havaittu tapahtuvan ristikontaminaatiota.

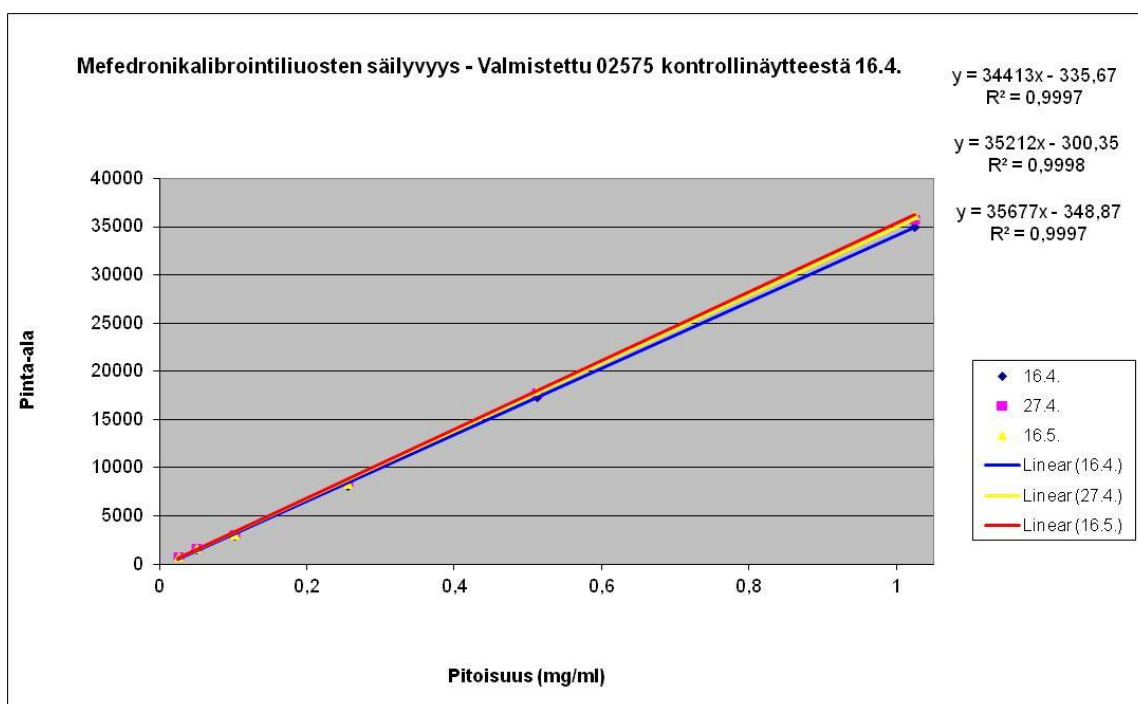
5.3.7 Kalibrintiliuosten säilyvyys

Analyytin säilymistä voidaan tutkia vertaamalla tuoreiden ja vanhojen kalibrintiliuosten kulmakertoimia, mittauspisteiden eroa kuvaajan avulla tai vertaamalla vanhoja kalibrintiliuoksia tuoreisiin.

Mefedroni

Kalibrintiliuosten säilyvyyttä tutkittiin mefedronin osalta siten, että 16.4. valmistettua kalibrintisarjaa säilytettiin mittapulloissa jääkaapissa. Kalibrintiliuokset mitattiin uudelleen 27.4. ja 16.5., eli 11 päivän ja 1 kuukauden kuluttua liuosten

valmistamisesta. Uudelleen mitatut kalibrintiliuokset mitattiin aina myös tuoreiden kalibrintiliuosten kanssa. Kuvasta 8 nähdään, että kalibrintiliuosten kulmakerroin kasvaa hitaasti ajan myötä. Näin ollen myös pitoisuus kalibrintiliuksissa kasvaa, tämä viittaa siihen, että analyytti itsessään ei hajoa tai häviä, vaan mittapullossa säilytetty liuotin haihtuu. Pitoisuuden muutos ei vielä ole merkittävä, mutta tiiviimmässä astiassa säilöttynä sekä valolta suojattuna analyytin säilyvyyttä voitaisiin edelleen parantaa. Tästä syystä voidaan myös olettaa, ettei pitkien ajosarjojen aikana analyytti hajoa, eikä liuotin haihdu tiiviissä näyteastiassa liikaa ja näin anna liian suurta tai pientä mittaustulosta.



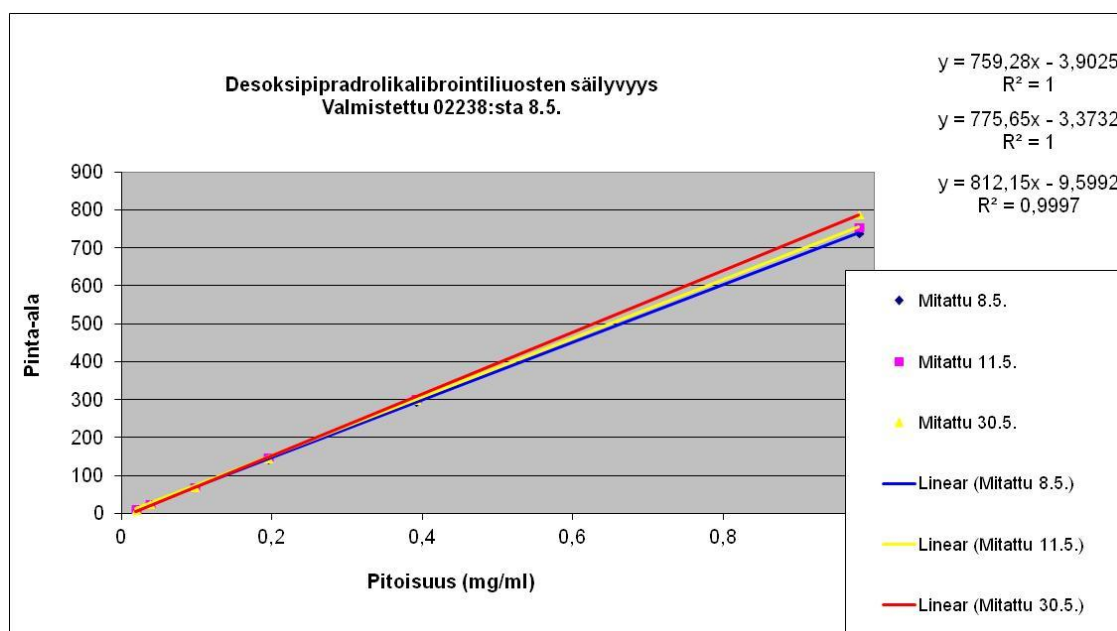
Kuva 8. Mefedronikalibrintiliuosten säilyvyys. Kalibrintisuorat on esitetty päällekkäin eri päivinä mitatuista kalibrintiliuksista.

Kalibrintisuorat menevät lähes päällekkäin, kulmakertoimen muutos 30 päivän aikana on vain 3,7 %, joten kalibrintiliuosten säilyvyys on varsin hyvä.

Desoksipipradroli

Desoksipipradrolin kalibrintiliuosten säilyvyyttä tutkittiin siten, että 8.5. valmistettua kalibrintisarjaa säilytettiin mittapulloissa jääkaapissa. Kalibrintiliuokset mitattiin uudelleen 11.5. ja 30.5., eli 3 päivän ja 22 päivän kuluttua liuosten valmistamisesta. Uudelleenmitatut kalibrintiliuokset mitattiin aina myös tuoreiden kalibrintiliuosten kanssa.

Kuvasta 9 nähdään, että kalibrointiliuosten kulmakerroin kasvaa hitaasti. Näin ollen myös pitoisuus kalibrointiliuoksissa kasvaa. Tämä viittaa siihen, että analyytti itsessään ei hajoa tai häviä, vaan mittapullossa säilytetty liuotin haihtuu. Pitoisuuden muutos ei vielä ole merkittävä, mutta tiiviimmässä astiassa säilöttynä sekä valolta suojattuna analyytin säilyvyyttä voitaisiin edelleen parantaa. Tästä syystä voidaan myös olettaa, ettei pitkien ajosarjojen aikana analyytti hajoa, eikä liuotin haihtu tiiviissä näyteastiassa liikaa mittausten aikana ja näin anna liian suurta tai pientä tulosta.



Kuva 9. Desoksipipradrolikalibrointiliuosten säilyvyys. Kalibrointisuorat on esitetty päällekkäin eri päivinä mitatuista kalibrointiliuoksista.

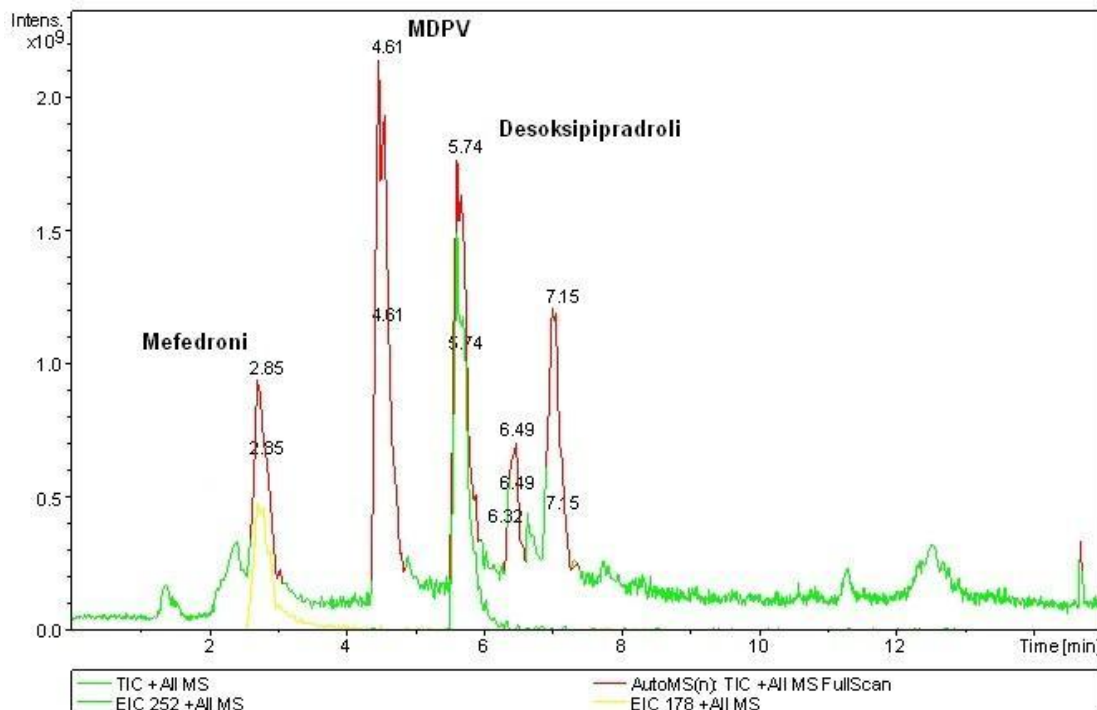
Kalibrointisuorat menevät lähes päällekkäin, kulmakertoimen muutos 22 päivän aikana on 7 %, joten kalibrointiliuosten säilyvyys on melko hyvä.

5.3.8 Spesifisyys ja selektiivisyys

Spesifisyys- ja selektiivisyyskokeilla pyritään varmistumaan siitä, että menetelmällä mitataan todellakin sitä, mitä on tarkoitus mitata. Mitattava signaali saa olla peräisin vain tutkittavasta yhdisteestä. [15.]

Menetelmän spesifisyyttä ja selektiivisyyttä tutkittiin tekemällä näytteseos, jossa tutkittavina aineina oli mefedronia, desoksipipradrolia, MDPV:tä, amfetamiinia, metamfetamiinia, kofeiinia sekä muita tuntemattomia jatkeaineita, joita on takavarikkonäytteissä. Näytteistä pyrittiin selvittämään mefedronin ja desoksipipradrolin

pitoisuudet mittaamalla näytteet desoksipipradrolille ja mefedronille tyypillisillä aallonpituuksilla sekä tutkimalla, erottuvatko yhdisteet toisistaan. Piikkien puhtaus varmistettiin massadetektorilla tutkimalla kummankin yhdisteen varautuneita ($[M+H]^+$) ioneja (extracted ion chromatogram, EIC). (Kuva 10.)



Kuva 10. Kromatogrammi näytteestä, jossa useita eri huumausaineita.

Kuvassa 10 nähdään työssä tutkitut huumausaineet mefedroni ja desoksipipradroli sekä MDPV, jonka pohjalta menetelmää lähdettiin kehittämään. Nämä kolme erottuvat hyvin toisistaan eivätkä muut yhdisteet häiritse niiden signaalia. Amfetamiini ja metamfetamiini eivät erotu toisistaan, ja ne eluoituvat ennen mefedronia retentioajalla 2,19 - 2,38 min. Lopussa olevat piikit ovat kofeiinia ja muita tuntemattomia jatkeaineita, joita käytetyissä näytteissä oli ylimääräisenä mukana.

Mefedroni

Mefedronin pitoisuus laskettiin seoksesta ja näytteen pitoisuutta verrattiin aikaisemmin mitattuihin tuloksiin (taulukko 20).

Taulukko 20. Mefedronin pitoisuus huumausaineseoksessa.

Näyte	Pitoisuus (p-%)
02575 huumausaine seoksessa	92,96
02575 aikaisemmin mitattu	95,61

Tulosten välillä ei ole merkittävää eroa, joten voidaan olettaa, etteivät muut yhdisteet seoksessa ole vaikuttaneet mefedronin signaaliin. Menetelmä on siis spesifinen hankalassa matriisissa.

Jauhemaisia huumeita jatketaan usein erilaisilla sokereilla, joten sokerin vaikutusta menetelmään testattiin valmistamalla mefedronin kontrollinäyte glukoosiin. Ajosarjoissa mitattiin kaksi samasta näytteestä valmistettua mefedronikontrollinäytettä. Matalaa kontrollia on jatkettu 1:5 glukoosilla. Kontrollien pitoisuuksia vertailtiin keskenään siten että matalan kontrollin pitoisuus kerrottiin viidellä (taulukko 21).

Taulukko 21. Matalan ja korkean kontrollin vertailu.

Näyte	Matala kontrolli (p-%)	Korkea kontrolli (p-%)
3.5.	93,04	91,20
7.5.	94,15	93,00
16.5.	90,93	88,87
30.5.	88,08	86,94
Keskiarvo	91,55	89,95
Keskihajonta	2,67	2,68

Tuloksista havaitaan, että molemmilla kontrolleilla keskihajonta on lähes yhtä suuri, mutta matalan kontrollin pitoisuus on hieman suurempi. Ero tuloksissa voi selittyä matalaa kontrollia valmistaessa vaa'an mittausepävarmuudella.

Desoksipipradroli

Desoksipipradrolin pitoisuus laskettiin seoksesta ja verrattiin näytteen pitoisuutta aikaisemmin mitattuihin tuloksiin (ks. taulukko 22).

Taulukko 22. Desoksipipradrolin pitoisuus huumausaineseoksessa.

Näyte	Pitoisuus (p-%)
02659 huumausaineseoksessa	35,27
02659 aikaisemmin mitattu	34,27

Tulosten välillä ei ole merkittävää eroa, joten voidaan olettaa, etteivät muut yhdisteet seoksessa ole vaikuttaneet desoksipipradrolin signaaliin. Menetelmä on siis spesifinen hankalassa matriisissa.

6 Loppupäätelmät

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää kvantitatiivinen HPLC-UV-MS-menetelmä kahdelle muuntohuumeelle, mefedronille ja desoksipipradrolille sekä testata kehitetyn menetelmän toimivuutta.

Testatut parametrit olivat lineaarisuus ja mittausalue, toteamis- ja määritysraja, tarkkuus, toistettavuus, mittausepävarmuus, ristikontaminaatio, uusittavuus sekä spesifisyys ja selektiivisyys. Keskeinen osa menetelmän kehitystä oli näytteen esikäsittelyn optimointi, ja jotta menetelmää voitaisiin käyttää rutiinikäytössä, tuli näytteenkäsittelyn olla mahdollisimman yksinkertainen ja helppo toteuttaa.

Näytteenesikäsittelyssä käytetään jatkossa yhtä uuttoliuosta näytteiden ja kalibrintiliuosten valmistukseen sekä laimentamiseen. Uuttoliuoksessa on metanolikonsentraatio vakio, joten näytteisiin ei tarvitse erikseen lisätä metanolia. Näin ollen esikäsittely on käyttötarkoituksen mukaisesti hyvin yksinkertainen ja helppokäyttöinen.

Menetelmällä on laaja lineaarinen alue ja tulosten toistettavuus on hyvä koko mittausalueella. Määritysrajoiksi valittiin mefedronille 0,01 mg/ml ja desoksipipradrolille 0,02 mg/ml, sillä kyseiset pitoisuudet voitiin määrittää riittävän tarkasti ja luotettavasti. Ristikontaminaatio on erittäin pieni eikä vaikuta tuloksiin merkittävästi. Menetelmässä havaittiin pientä systemaattista virhettä, jonka epäillään aiheutuvan suurelta osin pienen näytemäärän aiheuttamasta suuresta punnitusvirheestä.

Kehitetty menetelmä oli selektiivinen ja spesifinen tutkituissa matriiseissa, eikä työssä havaittu analyysiä häiritseviä yhdisteitä. Menetelmän tarkkuutta voidaan pitää käyttötarkoitukseen riittävänä, ja mittausepävarmuus on hyväksyttävissä rajoissa.

Kalibrintiliuksilla on hyvä säilyvyys, tiiviissä astiassa valolta suojattuna niitä voidaan säilöä useita kuukausia. Tästä voidaan päätellä, että näytteet säilyvät hyvin liuoksessa, joten pitkät ajosarjat eivät aiheuta ongelmia.

Menetelmää voidaan vielä kehittää, sillä kromatogrammin piikit häntivät voimakkaasti. Häntiminen johtuu pääosin siitä, että kyseessä on käänteisfaasikromatografia ja tutkittavat yhdisteet ovat emäksisiä ja käytetty eluentti on heikosti hapan. Piikkien

epäsymmetrisyysongelmaa voidaan lähteä ratkaisemaan esimerkiksi HILIC-kromatografialla. Työssä oli tarkoitus tutkia, kuinka menetelmä toimisi HILIC-kromatografialla, mutta aikasyistä tähän ei ryhdytty. Menetelmästä saataisiin entistä luotettavampi, mikäli siinä käytettäisiin sisäistä standardia. Sisäisen standardin tulisi olla tutkittavien yhdisteiden kaltainen eikä se saa häiritä tutkittavia yhdisteitä.

Menetelmä on tällä hetkellä käytössä RTL:n huumausainelaboratoriossa. Menetelmään lisätään tulevaisuudessa muita muuntohuumeita, sitä mukaa kuin tarvetta on kvantitoida uusia muuntohuumeita.

Lähteet

- [1] FINLEX® - Valtion säädöstietopankki. Huumausainelaki 2008/373 [verkkodokumentti, viitattu 23.5.2012]. Saatavissa: <http://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2008/20080373>.
- [2] Carroll F.I., ym. 2011. Designer drugs: a medicinal chemistry perspective. Annals of the New York Academy of Sciences. North Carolina USA: Center for Organic and Medicinal Chemistry.
- [3] Kohtamäki, E., 2011. Muuntohuumeet - haaste lainsäätäjälle. Evidenssi. KRP:n rikosteknisen laboratorion asiakaslehti 4/2011. Vantaa: KRP, RTL.
- [4] Santali, E.Y., ym., 2011. Synthesis, full chemical characterisation and development of validated methods for the quantification of (±)-4'-methylmethcathione (mephedrone): A new "legal high". Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.
- [5] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. 2012. Mephedrone EDND. EU: EMCDDA. [verkkodokumentti, viitattu 16.5.2012]. Saatavissa: <http://www.emcdda.europa.eu/>
- [6] Institute for Forensic Sciences. 2011. Separation and identification of methyl-methcathionines. Budapest, Hungary: Institute for Forensic Sciences.
- [7]* Keskusrikospoliisi, Rikostekninen laboratorio. 2012. Mefedroni (4-MMC) infosivu 5.4.2012. Vantaa: RTL.
- [8] Advisory Council on the Misuse of Drugs. 2011. Consideration of Desoxypipradrol (2-DPMP) and related pipradrol compounds. ACMD.
- [9]* Keskusrikospoliisi, Rikostekninen laboratorio. 2012. Desoksipipradroli, Daisy infosivu 5.4.2012. Vantaa: RTL.
- [10] Jaarinen, S. & Niiranen, J., 2008. Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki: Edita.
- [11] Ketola, R. ym. 2010. Massaspektrometrian perusteet. Suomen Massaspektrometrian seura ry. Helsinki: Hakapaino.
- [12] The Maiman Institute for Proteome Research at Tel-Aviv University, QSTAR-QqTOF Tandem Hybrid System [verkkodokumentti, viitattu 17.10.2012]. Saatavissa: <http://www.tau.ac.il/lifesci/units/proteomics/qstar.html>

- [13] Snyder, L.R. ym., 1997. Practical HPLC Method Development. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- [14]* Partanen, H. 2011. MDPV:n pitoisuusmääritys. Validointiraportti. Vantaa: RTL.
- [15] Ehder, T. 2005. Kemian metrologian opas. Mittatekniikan keskus, Mikes. Helsinki: Metrologian neuvottelukunta.
- [16] Eurachem Working Group. 1998. The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Teddington, UK: EURACHEM Working Group.
- [17] Näykki, T. 2012. Luento 2, Tilastolliset testit osa2 ja ANOVA-luentomateriaali. Metropolia Ammattikorkeakoulu. Helsinki.

* Ei saatavilla. Luottamuksellista tai vaatii käyttöoikeudet.

Mittausepävarmuuden arviointi

Mefedronin mittausepävarmuus			
Näyte	Pitoisuus (m-%)	bias %	bias % ^2
02629-1	27,94	-4,63	21,42
02629-2	26,91	-0,79	0,63
02629-3	28,09	-5,19	26,96
02629-4	28,21	-5,65	31,96
02629-5	27,34	-2,41	5,78
02629-6	28,48	-6,67	44,52
02629-7	27,36	-2,49	6,20
02629-8	26,51	0,72	0,51
02629-9	27,59	-3,32	11,00
Keskiarvo	27,60		
Keskihajonta	0,64		
RSD %	2,32		
u(R _w)	1,28		
u(RMS _{bias})	4,07		
u(Cref)	0,77		
u(bias)	4,14		
u _c	4,34	%	
U	8,67	%	Laajennettu mittausepävarmuus

$$bias (\%) = \frac{(x_{ref} - x_i)}{x_{ref}} \cdot 100 \quad (4)$$

$$RSD \% = \frac{s}{x} \cdot 100 \quad (5)$$

$$u(R_w) = s^2 \quad (6)$$

$$u(RMS_{bias}) = \sqrt{\frac{\sum bias_i^2}{n}} \quad (7)$$

$$u(Cref) = \frac{s_R}{\sqrt{n}} \quad (8)$$

$$u(bias) = \sqrt{RMS_{bias}^2 + u(Cref)^2} \quad (9)$$

$$u_c = \sqrt{u(R_w)^2 + (u(bias))^2} \quad (10)$$

$$U = 2 \cdot u_c \quad (11)$$

Daisyn mittausepävarmuus			
Näyte	Pitoisuus (m-%)	bias %	bias % ^2
02659-1	32,15	5,31	28,18
02659-2	31,34	7,68	59,04
02659-3	31,72	6,58	43,23
02659-4	34,25	-0,87	0,77
02659-5	36,14	-6,44	41,42
02659-6	32,22	5,10	26,03
02659-7	36,54	-7,62	58,10
02659-8	35,83	-5,54	30,71
02659-9	35,35	-4,12	17,01
Keskiarvo	33,95		
Keskihajonta	2,09		
RSD %	6,17		
u(R _w)	4,19		
u(RMS _{bias})	5,82		
u(Cref)	2,06		
u(bias)	6,17		
u _c	7,46	%	
U	14,91	%	Laajennettu mittausepävarmuus