



Henna-Riikka Manninen

# Menetelmän kehitys ja validointi lääkeaineen määrittämiseen biologi- sista matriisista

Metropolia Ammattikorkeakoulu  
Laboratorioanalytiikka (AMK)  
Laboratorioanalytiikka koulutusohjelma  
Opinnäytetyö  
4.1.2022

## Tiivistelmä

Tekijä:	Henna-Riikka Manninen
Otsikko:	Menetelmän kehitys ja validointi lääkeaineen määrittämiseen biologisesta matriisista
Sivumäärä:	46 sivua + 9 liitettä
Aika:	4.1.2022
Tutkinto:	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Laboratorioanalytiikka
Ammatillinen pääaine:	
Ohjaajat:	Oikeuskemisti Antti Jylhä Lehtori Mia Ruismäki

---

Opinnäytetyö tehtiin Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen oikeuskemian osastolle Helsingin toimipisteeseen. Työn tavoitteena oli kehittää kvantitatiivinen määritysmenetelmä enalapriilaatin pitoisuuksien määrittämiseen post mortem -verinäytteistä hyödyntämällä LC-MS/MS-massatekniikkaa. Opinnäytetyössä määritettiin lääkeaineelle optimaaliset massaspektrometriset olosuhteet, ja validoinnin perusteella selvitettiin menetelmän toimivuus.

Enalapriilaatti on aihiolääkkeenä annettavan enalapriilin aktiivinen lääkeaine, joka metaboloituu imeytymisen jälkeen maksassa entsyymaattisesti. Menetelmän kehityksessä enalapriilaatille selvitettiin parametrit, joilla on mahdollista tuottaa korkein intensiteetti tutkittavalle lääkeaineelle. Samalla tarkasteltiin analyysin fragmentoitumista massa-analyysaattorilla positiivisella ionisaatiolla. Menetelmän kehityksen jälkeen suoritettiin esivalidointi ja validointi menetelmän toimivuuden tarkasteluun. Validoinnin yhteydessä tarkasteltiin myös vanhoja vainajanäytteitä, joilla on saavutettu positiivinen tulos enalapriililla. Tulosten perusteella saatiin tietoa enalapriilaatin oikeista pitoisuuksista PM-verinäytteissä.

Validointitulosten perusteella toteamisrajan pitoisuudeksi saatiin 0,0002 mg/l ja määrittäysrajan pitoisuudeksi 0,0005 mg/l. Suhteellinen poikkeama molemmilla pitoisuustasoilla jäi alle 6 %, ja toistettavuusnäytteiden suhteellinen keskihajonta jäi alle 20 %:iin. Näytteiden matriisivaikutus on suhteellisen suuri, mutta se ei vaikuta analyysitulokseen merkittävästi, koska suhteellinen poikkeama odotusarvosta jää alle 10 %:n. Laajennetuksi mittausepävarmuudeksi saatiin 21 %.

Validointitulokset vastasivat odotuksia ja täyttivät validointisuunnitelmassa asetetut vaatimukset. Todelliset vainajanäytteet asettuivat hyvin kalibrointisuoralle, ja menetelmä toimii hyvin enalapriilaatin määrittämiseen. Enalapriilaatti pidättyy C-18-kolonissa epätasaisesti, mikä näkyy piikin epäsymmetrisyytenä. Siitä huolimatta analyysituloksen toistettavuus säilyy. Enalapriilaatti ei aiheuta häiriösignaaleja muihin määrittäysmenetelmän analyysien kromatogrammeihin, eivätkä muut analyysit häiritse enalapriilaatin määrittämistä merkittävästi.

Avainsanat: LC-MS/MS, lääkeaineet, massaspektrometria, verinäytteen lääkeainepitoisuus, enalapriilaatti

## Abstract

Author: Henna-Riikka Manninen  
Title: Development and Validation of a Method for Determining a Drug from a Biological Matrix  
Number of Pages: 46 pages + 9 appendices  
Date: 4 January 2022

Degree: Bachelor of Laboratory Services  
Degree Programme: Laboratory Sciences  
Professional Major:  
Supervisors: Antti Jylhä, Forensic Chemist  
Mia Ruismäki, Senior Lecturer

---

The work was commissioned by the National Institute for Health and welfare in Helsinki. The aim of the work was to develop a suitable assay method for the determination of enalaprilat in postmortem blood samples by an LC-MS/MS mass analyzer. In the work, the optimized mass spectrometric conditions for the drug were determined and based on the validation, the functionality of the method was determined.

Enalaprilat is the active drug of the prodrug enalapril, which is enzymatically metabolized in the liver after absorption. In the development of the method for Enalaprilat, the parameters that can produce the highest intensity of the drug of interest were elucidated. At the same time, the fragmentation of the analyte with positive ionization was examined by a mass analyzer. Following the development of the method, prevalidation and validation were performed to review the functionality. In addition, with validation old postmortem blood samples with a positive result with Enalapril were also examined. Based on the result of the blood samples, information was obtained on the correct concentrations of enalaprilat in real postmortem samples.

Based on the validation results, the limit of detection was 0.0002 mg/l and the limit of quantification was 0.0005 mg/l. The relative deviation at both concentration levels was less than 6 %, and the relative standard deviation of the repeatability samples was less than 20 %. The expanded measurement uncertainty was 21 %. The matrix effect of the samples is relatively high, but it does not significantly affect the analytical result, as the relative deviation from the expected value is less than 10 %.

The validation results correspond to the expectations and requirements of the validation plan. Actual postmortem samples settled well on the calibration line and the method is suitable for the determination of enalaprilat. Enalaprilat is unevenly retained on the C-18 column, which is reflected in the asymmetry of the peak. Nevertheless, the reproducibility of the analytical result remains. Enalaprilat does not interfere with the chromatograms of other analytes in the analytical method and other analytes do not significantly interfere with the determination of enalaprilat.

Keywords: LC-MS/MS, drugs, mass spectrometry, drug concentration of blood sample, enalaprilat

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Enalapriilaatin ominaisuudet	2
3	LC-ESI-MS/MS-analyysitekniikka	4
3.1	Aineiden erottuminen nestekromatografiassa	4
3.2	Sähkösumutusionisaatio	7
3.3	Kolmoiskvadrupoli	8
4	Post mortem -toksikologia	10
4.1	Bioanalyysit	10
4.2	Lääkeaineiden eristäminen	12
4.3	Matriisivaikutus	14
4.4	Matriisivaikutuksen vähentäminen näytteenkäsittelyllä	15
4.5	Myrkytyspitoisuuden rajallinen tulkinta	18
5	Työn toteutus	19
5.1	Laitteet ja reagenssit	19
5.2	Liuokset	20
5.3	Menetelmän kehitys	21
5.4	Validointi	25
5.5	Näytteiden esikäsittely	26
6	Tulokset	26
6.1	Esivalidointi	26
6.2	Selektiivisyys	29
6.3	Toteamis- ja määritysraja	30
6.4	Tarkkuus	32
6.5	Pienemmän näytemäärän verifiointi	33
6.6	Uuttoprosessin saanto	34
6.7	Mittausepävarmuuden arviointi Nordtest TR 537 -oppaan mukaan	35
6.8	Prosesoitujen näytteiden säilyvyys	36
6.9	Tilastollinen merkitsevyys eri analyysilaitteella	37

6.10 Matriisivaikutus	38
6.11 Menetelmän toimivuuden testaus todellisilla vainajanäytteillä	38
6.12 Kontaminaatio	39
6.13 Valvontakortit	40
7 Yhteenveto	42
Lähteet	43
Liitteet	
Liite 1: Määrittämenetelmän analyytit	
Liite 2: Nestekromatografian ajo-olosuhteet	
Liite 3: Liuokset	
Liite 4: Massa-analysaattorin olosuhteet	
Liite 5: Tarkkuusnäytteiden tulokset	
Liite 6: Saantoprosentit	
Liite 7: Mukit-raportti	
Liite 8: Mittausepävarmuustulokset yrityksen ohjeen mukaan	
Liite 9: Matriisivaikutuksen varianssianalyysi	

## Lyhenteet

- ACE: Angiotensiinikonvertaasientsyymi. Elimistön entsyymi, joka syntetisoi plasman angiotensiini I:n muuntumista angiotensiini II:ksi.
- APCI: *Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*, ilmanpaineinen kemiallinen ionisaatio.
- CE: *Collision Energy*, törmäysenergia. Energia, jolla massaspektrometriin tuleva ioni hajotetaan fragmenteiksi.
- ESI: *Electron spray ionisation*, sähkösumutus-ionisaatio. Elektrostaattiseen sähkökenttään perustuva molekyylien ionisaatiotekniikka.
- FTI: *Fatal toxicity index*. Indeks, joka ottaa huomioon kuolemaan johtaneen myrkytyksen esiintyvyyden suhteessa lääkeaineen kulutukseen.
- HPLC: *High Pressure Liquid Chromatography*, korkean erotuskyvyn nestekromatografia. Molekyylien erotteluun käytetty tekniikka, joka perustuu molekyylien tasapainoihin stationäärifaasin ja liikkuvan faasin välillä.
- MRM: *Multiple Reaction Monitoring*. Tandem-massaspektrometriassa käytetty pyyhkäisytekniikka, jossa analysoidaan tiettyjä valittuja molekyyli-ioni ja kaksi tai useampi fragmentti.
- MS/MS: *Tandem mass spectrometry*, tandem-massaspektrometri. Massaspektrometrinen analyysilaitteisto, joka koostuu kolmesta kvadrupolista.
- PM: *Post mortem*, kuoleman jälkeinen.

PMR: *Post Mortem Redistribution*, kuoleman jälkeinen uudelleenjakautuminen. Lääkeaineiden jakautuminen elimistössä lääkeainevarastosta kuten maksasta.

SFS-EN ISO/IEC 17025:2005:

Testauslaboratorioiden noudattama laatustandardi.

SPE: *Solid Phase Extraction*, kiinteäfaasiuutto. Näytteenkäsittelytekniikka lääkeaineiden eristämiseen näytematriisista.

SRM: *Selected Reaction Monitoring*. Tandem-massaspektrometriassa käytetty pyyhkäisytekniikka, jolla valitaan äiti-ioni ja yksi tytärioni.

THL: Terveystieteiden tutkimuskeskus ja hyvinvoinnin laitos.

# 1 Johdanto

Opinnäytetyö toteutettiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) oikeuskeemian toksikologian osastolla. Laboratoriossa kehitetään uusia käytäntöjä ja menetelmiä päihdetestauksiin ja niiden perusteella laaditaan asiantuntijalausuntoja sekä tehdään uusia laboratoriotutkimuksia. Oikeustoksikologian osasto välittää tietoa huumausaineiden käytöstä kansainvälisesti ja kansallisesti. [1.] Laboratorio on akkreditoitu ja noudattaa SFS-EN ISO/IEC 17025:2005 -laatustandardia.

Suomessa kaikki oikeuslääketieteelliset kuolemansyyn selvitykset suorittaa oikeuslääkäri viidellä eri paikkakunnalla. Oikeuslääketieteellinen kuolemansyynselvitys tehdään, jos lain (1.6.1973/459) määräämät edellytykset täyttyvät. Määräyksen antaa joko poliisi, asianomainen syyttäviviranomainen, tuomioistuin tai Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. [2.] Vuosina 2016–2018 tehdyn tutkimuksen mukaan Suomessa tapahtui yhteensä 2400 itsemurhaa, josta noin 20 %:lla henkilöistä itsemurhan tekotapana oli myrkytys. Yleisimmät lääkeaineet itsemurhatapauksissa olivat ketiapiini, tramadoli ja tsopikloni, mutta myös muita lääkeainekuolemia on havaittu. [3.]

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli parantaa sydän- ja verisuonilääkkeiden määrittämenetelmää oikeuslääketieteellisessä kuolemansyyn selvityksessä. Määrittämenetelmällä määritetään tällä hetkellä yhteensä 38 eri sydän- ja verisuonilääkettä, ja mihin on tarkoitus lisätä yhden aihiolääkkeen aktiivinen lääkeaine, jota kutsutaan enalapriilaatiksi. Enalapriilaatin lisääminen auttaa myrkytyskuolemien tunnistamisessa, sillä aihiolääke (enalapriili) pilkkoutuu entsyymaattisesti enalapriilaatiksi elimistössä, joten noin 4 tunnin kuluttua enalapriilia ei voida havaita suurina pitoisuuksina [4].

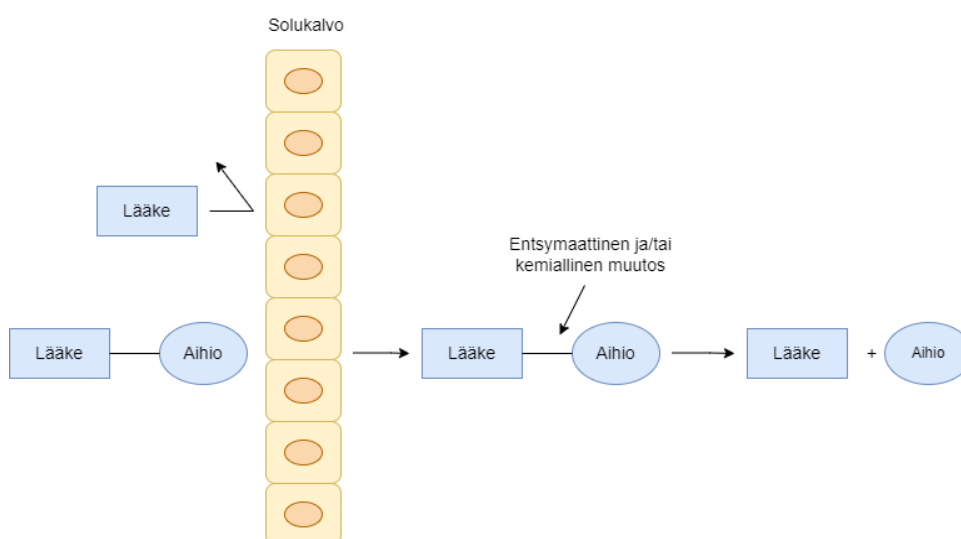
Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää enalapriilaatille optimoidut massaspektrometriset olosuhteet sekä tehdä validointi kyseisen menetelmän toimivuuden tarkastelua varten. Validointitulosten perusteella laadittiin validointiraportti, joka on myös osana tätä opinnäytetyötä.



## 2 Enalapriilaatin ominaisuudet

Enalapriilaattia käytetään hypertension eli kohonneen valtimoverenpaineen hoidossa ja se luokitellaan angiotensiinikonvertaasientsyymiä (ACE) inhiboiviin lääkaineisiin [5, s. 543]. Enalapriilaatin läsnäolo estää ACE:n toiminnan elimistössä, mikä syntetisoi plasman angiotensiini I:n muuntumista angiotensiini II:ksi. Angiotensiini II vaikuttaa lisämunuaisen kuorikerroksesta erittyvän aldosteronituotantoon positiivisesti, jolloin elimistön natriumin takaisinimeytyminen munuaisissa muuttuu, mikä vaikuttaa veren suola- ja vesipitoisuuteen supistaen verisuonia. [6, s. 200–201.] ACE:n toiminnan estyminen johtaa tämän tapahtumasarjan katkeamiseen, jolloin verisuonien supistuminen estyy ja verenpaine ei nouse.

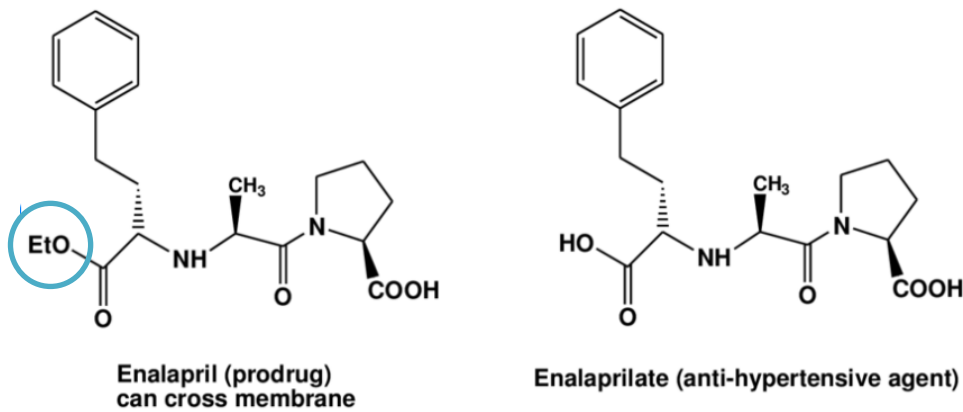
Enalapriilaatti annostellaan oraalisesti aihiolääkkeenä (enalapriili), jossa lääkeainemolekyylit yhdistetään aihio-osaan kovalenttisella sidoksella, kuten esterisidoksella. Aihiolääkkeen tarkoituksena on parantaa aktiivisen lääkeaineen imeytymistä ruuansulatuskanavasta lisäämällä sen rasvaliukoisuutta, sillä isot lääkeainemolekyylit kulkeutuvat ruuansulatuskanavan solukalvon läpi passiivisella diffuusiolla. Kuvassa 1 on esitetty aihiolääkkeen toimintaperiaate ruuansulatuskanavassa yksinkertaisesti. [7.]



Kuva 1 . Aihiolääketeknologian toimintaperiaate ruuansulatuskanavassa [7].

Elimistöön päässeet aihiolääkkeet pilkkotaan joko entsyymaattisesti tai kemiallisesti, jolloin lääkeainemolekyyli aktivoituu. Lääkeaineen aktivoituminen voi tapahtua muun muassa suolen luumenissa, suolen seinämässä, maksassa tai kohdekudoksessa. [7.]

Enalapriili kulkeutuu maksaan, jossa se pilkkotaan karboksyyliesteri-entsyymien vaikutuksesta, minkä jälkeen aktiivinen enalapriilaatti kulkeutuu kohdesoluun. [7.] Kuvassa 2 esitettyjen molekyyli- rakenteiden perusteella voidaan todeta, että enalapriilaatin karboksyyliosaa- n on yhdistetty etanoliryhmä aihio- osana. Muodostuneen esterin rasvaliukoisuus on korkeampi kuin happaman enalapriilaatin.



Kuva 2. Enalapriilaatin ja enalapriilin molekyyli- rakenteet [8].

MacFadyen-tutkimuksessa on osoitettu, että enalapriili pilkkoutuu maksassa nopeasti imeytymisen jälkeen, minkä seurauksena sitä ei voida havaita suurina pitoisuuksina noin 4 tunnin kulutta nauttimisen jälkeen. Enalapriilin biotransformaation jälkeen enalapriilaatin huippukonsentraatio saavutettiin noin 3–4 tunnin kuluttua. [4.] Enalapriilin nopean biotransformaation vuoksi sen mahdollinen osuus myrkytystapauksissa on voinut jäädä huomaamatta.

### 3 LC-ESI-MS/MS-analyysitekniikka

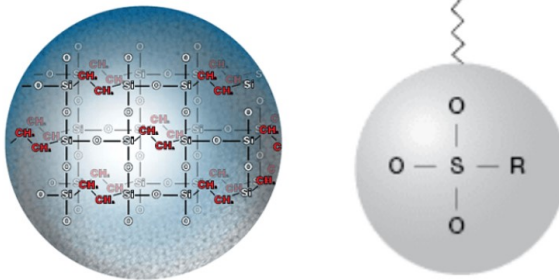
Tässä luvussa käsitellään opinnäytetyössä käytetyn LC-ESI-MS/MS-tekniikan toimintaperiaatetta.

#### 3.1 Aineiden erottuminen nestekromatografiassa

Korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa (HPLC) käytetään laajalti lääkeaineiden erotteluun eri biologisista matriiseista ennen massa-analyysiaattoria. Nestekromatografiassa lääkeaineiden erottuminen perustuu aineen dynaamiseen tasapainoon, minkä periaatteena stationäärifaasiin herkästi pidätyvät analyytit kulkeutuvat kolonnin ohi pidemmän aikaa. Liikkuva faasi on yleensä orgaanisen liuottimen ja puskuriliuoksen seos, jonka mukana analyytit kulkevat niiden tasapainon ollessa liikkuvan faasin puolella. Kiinteä faasi on puolestaan yleensä kiinteää hienojakoista ainetta, jonka koostumuksen mukaisesti analyytit pidätyvät kiinteässä aineessa. [9, s. 140, 153.]

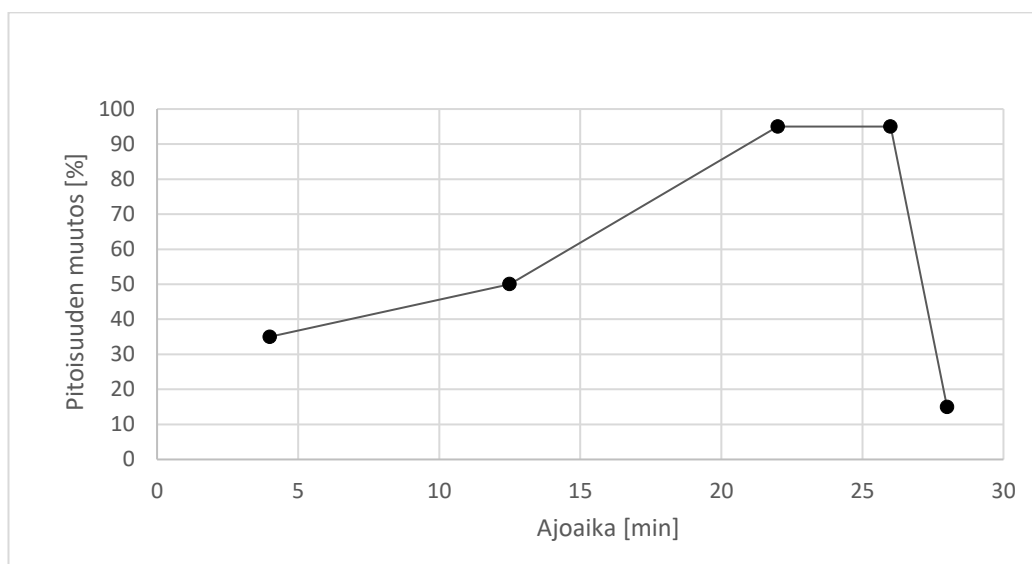
Käänteisfaasikromatografia on yleisesti käytetty erotustapa, missä erottuminen tapahtuu molekyylin poolisuuden perusteella. Poolittomat molekyylit pidätyvät kiinteässä faasissa pidempään ja liikkuvat siten myöhemmin detektoriin. Työssä käytettiin Gemini NX-C18 -käänteisfaasikolonnia, joka soveltuu hyvin sekä korkean että matalan pH:n menetelmiin. Silika on tehty stabiiliksi etaanisilloilla, jotka on liitetty yhden happiatomin tilalle. Kolonnissa 18 hiilen yhdiste on kiinnitetty silikan OH-ryhmään. [10.] Kuvassa 3 on esitetty kolonnin tarkempi rakenne.

Gemini NX-C18  
TWIN-NX Technology



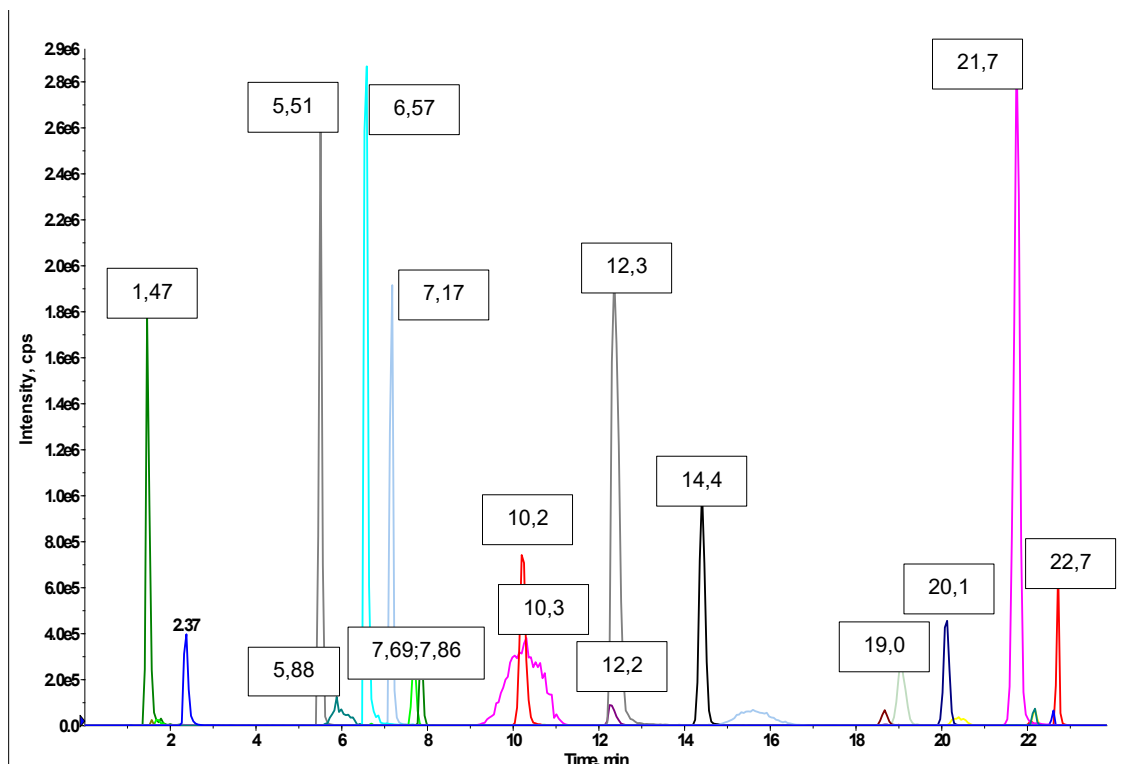
Kuva 3. Opinnäytetyössä käytetty kolonni. Vasemmalla kuvattu silikarakenne tarkemmin ja oikealla kolonnin silikaan kiinnitetty 18 hiilen sivuketju. [10.]

Usean analyytin erottaminen voi olla haastavaa, jos määrittäminen sisältää analyyttejä, joilla on erilaiset poolisuusindeksit. Tällöin suositetaan gradienttiajoa, jossa liikkuvan faasin polaarisuus muuttuu ajan aikana. Gradienttiajolla heikosti pidättäytyvät yhdisteet pystytään erottamaan selkeästi ja voimakkaasti pidättäytyvien pohjaluku pienenee, jolloin resoluutio kasvaa. [11, s.120.] Kuvassa 4 on esitetty työssä käytetty gradienttiajon kuvaaja, jossa orgaanisen liuottimen pitoisuus kasvaa ajan aikana.



Kuva 4. Opinnäytetyössä hyödynnetty gradienttiajo.

Opinnäytetyössä hyödynnettiin gradienttiajtoa, koska määrittämenetelmän analyteillä on laaja polaarisuusalue. Yleisesti lipofiilisyttä mitataan logP-arvolla, joka kuvaa neutraalin molekyylin jakautumiskertoimen logaritmia kahden sekoittumattoman aineen, kuten oktanolin ja veden, välillä. Lääkeaineanalytiikassa logP-arvo ei kuitenkaan aina selitä täysin lääkeaineiden lipofiilisyttä, minkä vuoksi hyödynnetään logD-arvoa, joka huomioi sekä ionisoimattoman että ionisoituneen muodon jakautumista kahden faasin välillä. Suurin osa lääkeaineista sisältää ionisoituvia ryhmiä, minkä vuoksi gradienttiajtoa suunniteltaessa on hyödyllisempää käyttää logD-arvoa. [12.] Kuvassa 5 on esitetty sydän- ja verisuonilääkkeille tyypillinen kromatogrammi gradienttiajtoa hyödyntäen.



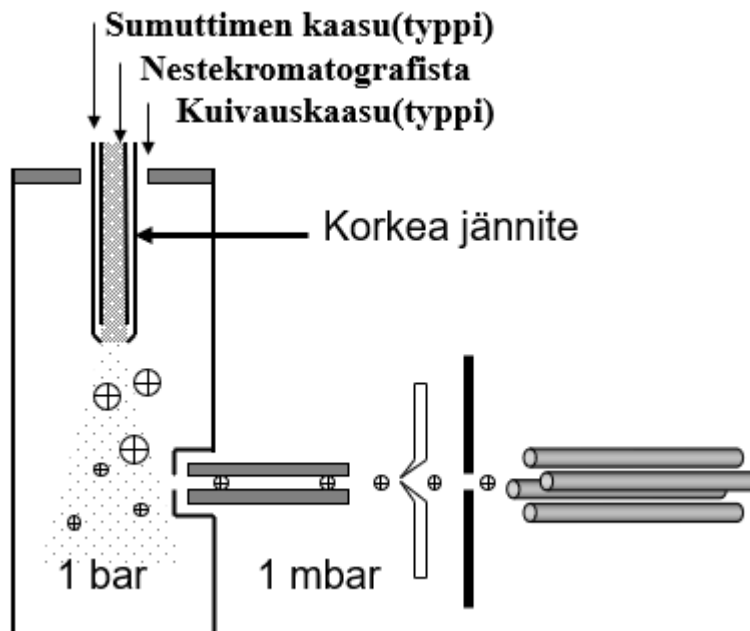
Kuva 5. Sydän- ja verisuonilääkkeiden LC-MS/MS-tekniikan kromatogrammi gradienttiajtoa hyödyntäen käänteisfaasikolonilla.

Kuvan 5 avulla voidaan havainnollistaa logD-arvon eroa logP-arvoon gradienttiajajan aikana. Piikki retentioajan 1,47 min kohdalla vastaa atenolia ja kohdalla 2,37 min vastaa amiloridia. Liitteen 1 analyyttien perusteella amiloridin logP-arvo on -0,3 ja atenololin 0,16, minkä perusteella analyyttien pitäisi tulla C-18-

kolonnin läpi toisinpäin. Kuitenkin atenololin logD-arvo fysiologisessa pH:ssa on -1,82 ja amiloridin -0,89 [12; 13], joten logD-arvo selittää paremmin aineiden kulkeutumisen kolonnin läpi.

### 3.2 Sähkösumutusionisaatio

Sähkösumutusionisaatiossa (ESI) eluentti kulkee ohuita kapillaareja pitkin, joihin on johdettu korkeajännite ja sumutinkaasua. Korkeajännite aiheuttaa elektrostaattisen kentän, jonka vaikutuksesta liuottimesta poistuu elektroneja kapillaariputkien seinämiin. [9, s. 211; 14, s. 72.] Liuotin kulkeutuu kammioon, missä se haihtuu mikrometrin kokoisista sähköisesti varautuneista pisaroista tiivistäen sähkövarausta. Varauksen kasvaessa sähköinen poistovoima poistaa pintajännityksen, jolloin pisarat hajoavat pieniksi aerosoleiksi. [9, s. 212.] Positiivisessa ionisaatiossa syntyy muun muassa protonoituneita molekyyliä ( $[M+H]^+$ ), mutta myös niin sanottuja addukti-ioneja, kuten  $[M+Na]^+$ -ioni. Sähköisesti varautuneet hiukkaset kulkevat paine-eron ansiosta ionisaatiokammion massa-analysaattoriin, ja neutraalit molekyylit poistetaan poistoputken kautta. [14, s.69, 74.] Kuvassa 6 on esitetty sähkösumutusionisaation toimintaperiaate.



Kuva 6. Ionisoitumisen toimintaperiaate sähkösumutusionisaatiossa [15, s.44].

ESI luokitellaan ilmanpaineessa tapahtuvaan ionisaatiotekniikkaan, joka soveltuu sekä pienten että suurten poolisten molekyylien ionisointiin, mutta neutraaleille ja poolittomille yhdisteille ionisointi ei ole yhtä tehokas. ESI soveltuu positiivisille ja negatiiviselle ionisaatiolle, mutta se asettaa vaatimuksia liuottimelle ja tutkittaville analyyteille. [14, s. 68–75.]

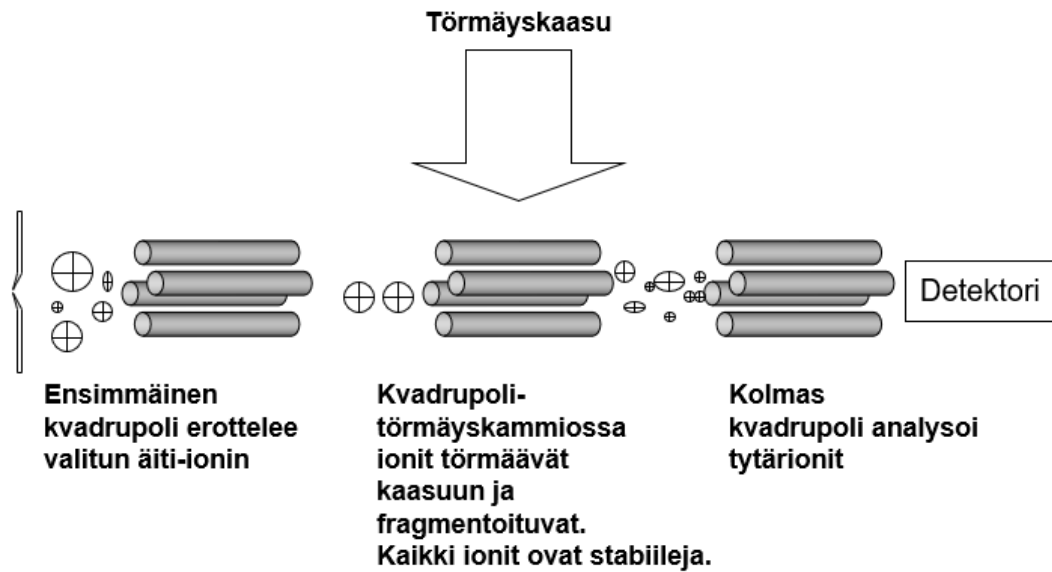
Liuottimen sähkönjohtokyvyn tulee olla tarpeeksi suuri, jotta elektrostaattinen kenttä pystyy siirtämään negatiiviset tai positiiviset varaukset liuottimesta kapillaariputkissa. Puskurin komponenttien tulee olla haihtuvia, jotta ionilähde ei likaannu ja aiheuta häiritseviä taustasignaaleja. Yleisesti käytetään noin 1–10 mM:sta ammoniumformaattia tai -asetaattia puskuriliuoksena, ja positiivisen ionisaation varmistamiseksi puskurin pH on hyvä säätää happamaksi joko etikka- tai muurahaishapolla. [14, s. 75–76.]

### 3.3 Kolmoiskvadrupoli

Kvadrupoli on neljän yhdensuuntaisen elektrodin komponentti, jonka väliin muodostetaan sähkökenttä jännitteen avulla. Tutkittavat varautuneet ionit tulevat sauvojen väliin ja kulkevat niiden ohi detektorille. Elektrodien välissä oleva sähkökenttä aiheuttaa ioneihin värähtelyä kulkusuuntaan nähden kohtisuorassa, mikä saa ionit pyörimään kvadrupolin sisällä. Jos värähtely ei ole analyytille optimaalinen, ionit törmäävät elektrodeihin. Värähtelyn optimoinnilla voidaan valita juuri tietyt  $m/z$ -arvon omaavat molekyylit, joita halutaan tarkastella. [14, s. 27–28.]

Kolmoiskvadrupoli koostuu kolmesta kvadrupolista, joista ensimmäinen (Q1) ja kolmas (Q3) yksikkö ovat tavallisia neljän elektrodin komponentteja [14, s.32]. Q1-komponentissa valitaan äiti-ioni, joka on yleensä  $[M+H]^+$ -ionin suuruisen ESI-teknikassa positiivisella ionisaatiolla [9, s.213]. Äiti-ioni kulkee törmäyskammioon (Q2), jonka periaatteena on hajottaa valittu ioni pienemmiksi fragmenteiksi törmäyskaasun ja jännitteen avulla. Törmäyskaasu on inerttiä kaasua, joka on usein typpi- tai argonkaasua. Koska törmäyskammiossa käytetään tasavirtaa, ei tässä kvadrupolissa suodateta molekyylejä. [14, s.32.] Muodostuneet

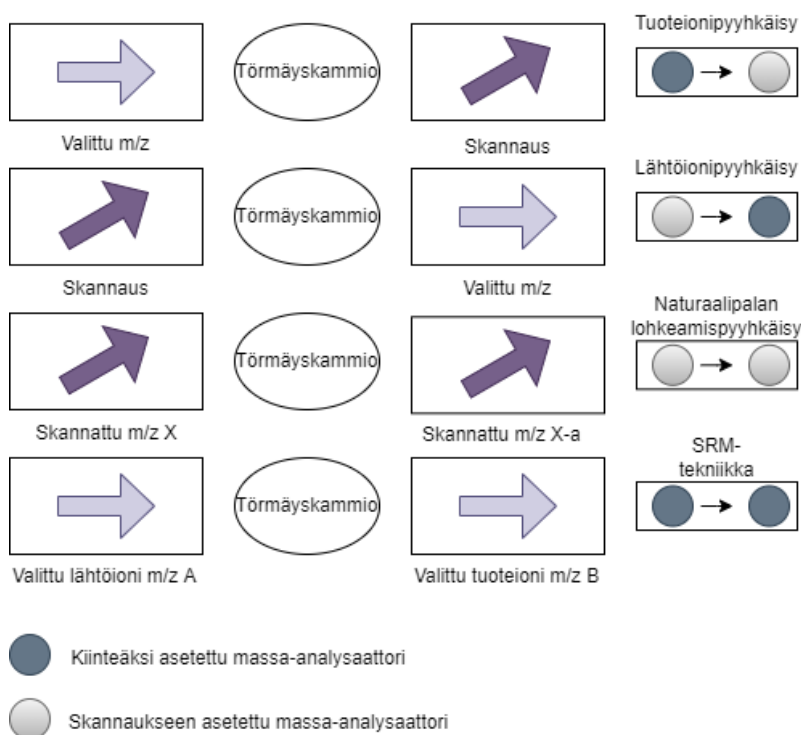
fragmentit kulkevat Q3-komponenttiin, jossa niistä voidaan valita tarkasteltavat fragmentit. [9, s.214]. Kuvassa 7 on esitetty kolmoiskvadrupolin prosessikaavio.



Kuva 7. Tandem-massaspektrometrian prosessikaavio [15, s.52].

Kolmoiskvadrupolissa voidaan hyödyntää useita pyyhkäisytekniikoita riippuen, mihin tarkoitukseen analysointia halutaan käyttää. Näitä tekniikoita ovat muun muassa tuoteionipyyhkäisy-, lähtöionipyyhkäisy-, neutraalipalan lohkeamispyyhkäisy- ja SRM-tekniikka (Selected Reaction Monitoring). Kuvassa 8 on havainnollistettu pyyhkäisytekniikoiden hyödyntämistä kolmoiskvadrupolissa. [14, s. 32–34.]





Kuva 8. Pyyhkäisytekniikat, joita on mahdollista hyödyntää kolmoiskvadrupolilla [16, s. 9].

Näiden lisäksi on myös MRM-tekniikka (multiple reaction monitoring), joka toimii samaan tapaan kuin SMR-tekniikka, mutta Q3-komponenttiin siirtyy yhden spesifisen fragmentin sijasta useampi. Tässä opinnäytetyössä hyödynnettiin sekä tuoteionipyyhkäisyä että MRM-tekniikkaa.

## 4 Post mortem -toksikologia

Tässä luvussa käsitellään post mortem (PM) -analytiikkaa ja sen tuomia haasteita lääkeaineiden määrittämiseen sekä myrkytyspitoisuuksien rajallista tulkittaa myrkytyspäilyssä.

### 4.1 Bioanalyysit

Bioanalyysiksi kutsutaan analyyskejä, joissa lääkkeitä, lääkeainemetaboliitteja ja biomarkkereita määritetään biologisesta matriisista, kuten verestä, plasmasta

ja virtsasta. Näytteenkäsittelyssä biologisesta matriisista halutaan eristää selektiivisesti monimutkaisen rakenteen omaavia molekyylejä, jotka sisältävät lukuisia eri komponentteja, kuten emäksiä ja happoja. [17, s. 227].

Verimatriisi on yksi yleisimmistä biologisista matriiseista lääkeaineiden ja niiden metaboliittien määrittämiseen. Lääkeaineiden eristämiseen voidaan käyttää joko kokoveri- tai plasmanäytettä, riippuen lääkeaineiden jakautumisesta näytteessä. Jotkin lääkeaineet jakautuvat verinäytteeseen tasaisesti verisolujen ja plasman välille, kun taas osa sitoutuu selektiivisesti plasmaproteiineihin. [17, s. 228.] Menetelmän kehityksessä on tärkeä selvittää, miten analyytit jakautuvat verinäytteessä ennen matriisin ja näytteenkäsittelytekniikan valintaa.

Kokoverianalyyseissä perinteisiä eristysmenetelmiä ovat neste-nesteuutto, proteiinisaostus, kiinteäfaasiuutto (SPE), dialyysi, hemolyysi, kalvosuodatus sekä antikoagulaatio. Monissa näytteenkäsittelytekniikoissa vaaditaan suuri määrä näytettä, ja monivaiheisessa käsittelyssä voi tapahtua merkittäviä häviöitä analyytin suhteen, mikä vääristää analyysitulosta. [17, s. 229.] Analyytin häviötä voidaan korjata sisäisen standardin avulla, jos analyysitekniikka on monivaiheinen ja häviö oletetaan merkittävän suureksi.

Useiden lääkeaineiden samanaikainen uuttaminen yhdestä näytematriisista on haasteellista, koska kaikki analyytit eivät käyttäydy samalla tavalla valitussa näytteenkäsittelyprosessissa. Siksi joudutaan määrittämään samasta näytematriisista eri analyyttejä eri menetelmillä, mikä toisaalta vaatii enemmän näytettä, aikaa ja välineitä.

PM-verinäytteet eroavat tavallisesta kokoverinäytteestä niiden vaihtelevan koostumuksen vuoksi, mikä aiheutuu kuoleman ja näytteenoton välisen ajan vaihtelusta sekä PM-muutoksista. PM-muutoksia ovat muun muassa solujen sedimentaatio, hyytymien muodostuminen, kontaminaatio kudostenesteissä, mädäntyminen ja mikrobien hajoaminen sekä joissain tapauksissa vainajan kuivuminen tai vainajan laimentuminen riippuen kuolintavasta. [18, s.39–40; 38.]

Myös vainajan yksilölliset tekijät, kuten verenohennuslääkkeet ja hyytymistekijät, vaikuttavat PM-verien erilaisuuteen [19].

Vaikka normaaleissa verianalyyseissä on mahdollista hyödyntää sekä kokoverta että veriplasmaa lääkeaineen määrittämiseen, PM-verissä käytetään aina reisilaskimosta kerättyä kokoverta. PM-verissä plasman erottaminen verisolusta on lähes mahdotonta punasolujen hemolyysin vuoksi, ja Suomessa PM-väli eli kuoleman ja ruumiinavauksen välinen aika on keskimäärin suhteellisen pitkä, jolloin seerumin tai plasman erottaminen kokoverestä on lähes mahdotonta. [19.]

PM-muutosten ja kuolintavan vuoksi verta ei välttämättä ole saatavilla, jolloin hyödynnetään vaihtoehtoisia matriisia, kuten lihasta tai maksaa. [20.] Suurien elinten hyödyntäminen näytematriisina on huomattu aiheuttavan vaihtelua lääkeainepitoisuuksiin, mikä pitää huomioida analyysitulosten tarkastelussa [18, s. 40]. Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen näkemyksen mukaan lihaksen lääkeainepitoisuus vastaa parhaiten veren lääkeainepitoisuutta, minkä vuoksi sitä suositetaan vaihtoehtoisena matriisina, kun verta ei ole saatavilla [19; 21]. Menetelmän kehitysvaiheessa olisi hyvä tarkastella myös analyytin käyttäytymistä vaihtoehtoisissa matriisissa.

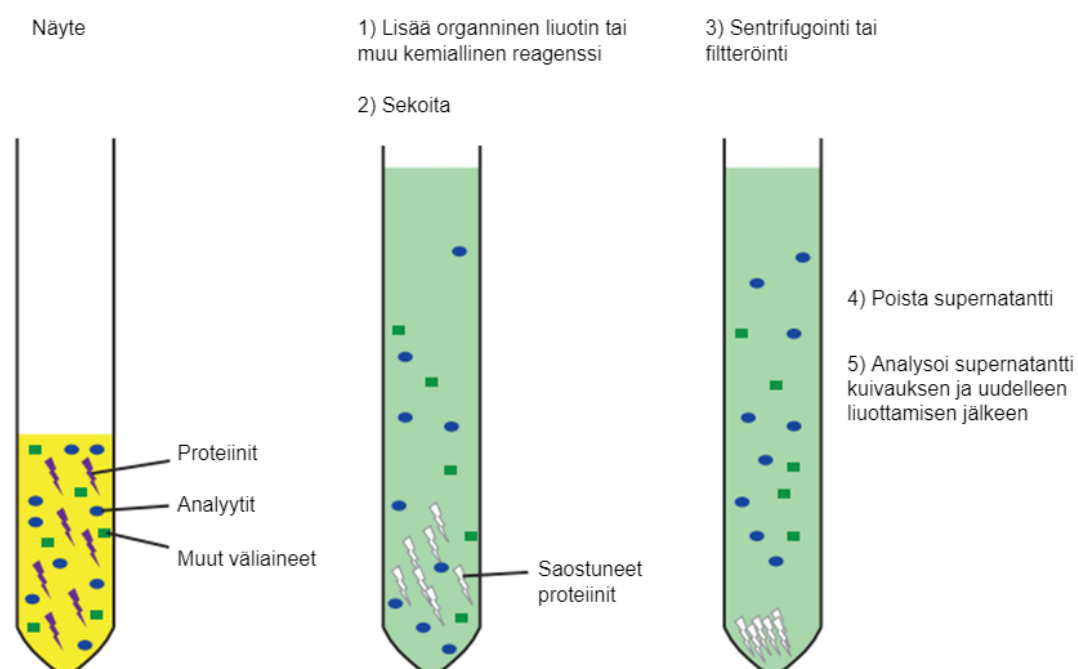
## 4.2 Lääkeaineiden eristäminen

Lääkeaineiden määrittämiseen käytetään nykyisin lisääntyvästi LC-MS/MS-analyysitekniikkaa laitteen herkkyyden vuoksi, mutta biologisia matriiseja ei voi suoraan analysoida tällä analyysitekniikalla.

Korkea proteiini- ja rasvapitoisuus näytematriisissa vaikuttaa heikentävästi kolonnin suorituskykyyn ja ionilähteen kontaminaatioon, minkä vuoksi niiden poistaminen näytematriisista on ehdottoman tärkeää [17, s. 235]. Kolonnin suorituskyvyn heikentyminen näkyy yleensä piikkien päällekkäisyytenä eri analyyttien välillä. Likaantuessa kolonnin pohjaluku laskee, mikä vaikuttaa resoluution ja sitä kautta analyyttien erottumiseen. [9, s. 155.]

Proteiinisaostus on yksinkertainen ei-selektiivinen näytteenkäsittelymenetelmä, jossa tarkoituksena on saada erotettua haitalliset proteiinit ja vapauttaa lääkeaine valittuun liukeseen esimerkiksi orgaaniseen liuottimeen [17, s. 236]. Saostus voidaan tehdä orgaanisen liuottimen lisäksi myös suolalla tai hapoilla riippuen, mitä näytteestä halutaan määrittää. Proteiinien aggregaatio suolan tai orgaanisen liuottimen vaikutuksesta perustuu proteiinien vesikuoren häviämiseen, jolloin vesimolekyylien ja proteiinin väliset vetysidokset katkeavat. [22.] Kuvasta 9 huomataan, että lääkeaine vapautuu supernatanttiin ja proteiinit saostuvat putken pohjalle.

### Proteiinisaostus



Kuva 9. Proteiinisaostustekniikan yksinkertainen toimintaperiaate [17, s. 236].

Verinäytteiden lääkeainepitoisuudet ovat usein hyvin pieniä, joten näytteen laimentuminen vaikeuttaa analyttien havaitsemista massa-analysointilla. Orgaaniset liuottimet on helppo haihduttaa, jolloin lääkeainejäännös voidaan liuot-

taa pienempään tilavuuteen. Lääkeaineiden konsentraatiot kasvavat, jolloin niiden määrittäminen on helpompaa. Tätä käytäntöä hyödynnetään monissa päihdeanalyysissä.

### 4.3 Matriisivaikutus

LC-MS/MS-tekniikka on osoitettu tehokkaaksi lääkeaineiden kvantitatiiviseen määrittämiseen verinäytteistä, mutta selektiivisyys on tuonut haasteita voimakkaan ionisuppression vuoksi. Ionisuppression vaikutus analyysitulokseen voi olla joko negatiivinen tai positiivinen, jolloin matriisikomponentit muuttavat analyysin pinta-alaa pienentämällä tai kasvattamalla sitä. [23.] Merkitsevä matriisivaikutus voi kasvattaa analyysituloksen systemaattista virhettä, jolloin analyysituloksien pitoisuudet ovat toistuvasti joko liian suuria tai pieniä oletettuun arvoon verrattuna [24, s. 8].

Matriisivaikutuksen lähteenä on sekä endogeeniset että eksogeeniset aineet. Endogeenisiä aineita ovat muun muassa suolat, lipidit, aminohapot ja hiilihydraatit. Eksogeenisiä aineita ovat erilaiset puskurisuolat, muovimateriaalit ja muut samantapaiset aineet. [25.] Tämän lisäksi on todettu, että ionisaatiotyypillä, näytteenkäsittelyllä sekä näytteellä on eroa matriisivaikutuksen suhteen. [26.]

Murphy'n vuoden 2003 tutkimuksen mukaan matriisivaikutus on todettu olevan yleisempää sähkösumutus-ionisaatiossa kuin ilmanpaineisessa kemiallisessa ionisaatiossa (APCI). Tyypillisesti matriisivaikutusta oli enemmän laajan polariiteettialueen omaavilla komponenteilla ESI-tekniikassa ja hydrofobisten molekyylien, kuten fosfolipidien, todettiin myös vaikuttavan merkittävästi tässä ionisaatiotekniikassa. [26.]

Lääkeaineiden eristämiseen usein hyödynnetään proteiinisaostusta sen epäspesifisyyden vuoksi, mutta matriisivaikutuksen on todettu olevan merkittävän suuri tällä näytteenkäsittelytekniikalla LC-ESI-MS/MS-analyysitekniikassa [26]. Tämä voi johtua proteiinisaostuksen kyvyttömyydestä poistaa fosfolipidejä näytematriisista, jolloin ionisuppression vaikutus kasvaa [27].

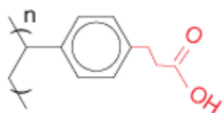
#### 4.4 Matriisivaikutuksen vähentäminen näytteenkäsittelyllä

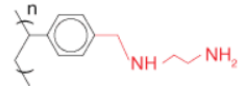
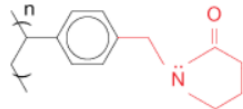
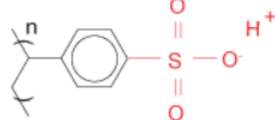
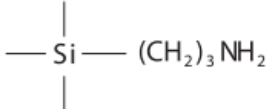
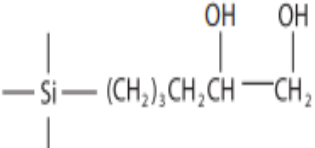
Nykyisessä määritysmenetelmässä hyödynnetään proteiinisaostusmenetelmää, jossa käytetään metanolia saostavana kemikaalina. Kohdassa 4.3 on osoitettu, että proteiinisaostusmenetelmällä on suuri matriisivaikutus ESI-tekniikassa aiheuttaen ionisuppressiota, mikä voi vaikuttaa menetelmän herkkyyteen. Kohdassa 4.2 todettiin, että näytteiden epäpuhtaudet kuluttavat kolonnia, minkä vuoksi resoluutio heikkenee. Määritysmenetelmään olisi hyvä löytää parempi näytteenkäsittely, jolla voidaan saada puhtaampia näytteitä ja joka mahdollistaisi paremman herkkyyden analyyttien havaitsemiseen.

Nykyisessä määritysmenetelmässä on useita sydän- ja verisuonilääkkeitä (liite 1), jotka käyttäytyvät sekä fysikaalisesti että kemiallisesti eri tavalla. Analyteissä on emäksisiä, neutraaleja ja happamia molekyylejä, joten yhden selektiivisen ionivaihtotekniikan hyödyntäminen näytteenkäsittelyssä ei ole mahdollista. Tämän lisäksi niillä on myös laaja logP-alue, joten poolittoman tai poolisen SPE-tekniikan hyödyntäminen on haastavaa.

Molekyylit voidaan jakaa eri fragmentteihin niiden kemiallisten ja fysikaalisten ominaisuuksien suhteen. Lääkeaineet jaettiin happoihin, emäksiin ja neutraaleihin niiden pKa-arvon perusteella, jolloin kolmen erityyppisen ionivaihtosovelluksen hyödyntäminen on mahdollista. Tämän lisäksi tarkasteltiin näytteenkäsittelysovelluksia hydrofobisten ja lipofiilisten lääkeaineiden eristämiseen. Taulukossa 1 on esitetty eri valmistajien sovelluksia, jotka soveltuvat eri analyttien eristämiseen.

Taulukko 1. Analyttien luokittelu eri ominaisuuksien suhteen ja niihin sopivat näytteenkäsittelytekniikat [28; 29].

Tuote	Soveltuvuus	Tekniikka	Sopimattomat analyytit	Funktionaalisuus
Strata-X-CW, Phenomenex	Emäksiset yhdisteet (pKa > 8)	Kationivaihto	Liitteen 1 analyytit 1–23 sekä 38 ja 39.	

Strata-X-AW, phenomenex	Happamat yhdisteet (pKa < 5)	Anioni-vaihto	Liitteen 1 näytteet 24–39	
Stara-X, Phenomenex	Lipofiiliset (logP > 0)	Käänteis-faasi	Liitteen 1 analyytit 3, 4 ja 28	
Stara-XC, Phenomenex	Heikosti emäksiset (pKa ~ 0)	Kationi-vaihto	Liitteen 1 analyytit 19–36	
Discovery ion DSC-NH2, Supelco	Happamat yhdisteet (pKa < 7,8)	Anioni-vaihto	Liitteen 1 analyytit 1–23	
Discovery ion DSC-WXC, Supelco	Emäksiset yhdisteet (pKa > 6,8)	Kationi-vaihto	Liitteen 1 analyytit 21–37	-
Discovery Normal-Phase, DSC-Diol Supelco	Polaariset molekyylit	Normaali-faasi	Liitteen 1 analyytit 3,4 ja 28	

Selektiivisen näytteenkäsittelyn hyödyntäminen sydän- ja verisuonilääkkeiden määrittämiseen vaatii enemmän aikaa, koska analyytit tulee määrittää erikseen. Tämä vaatii enemmän näytettä, joten näiden tekniikoiden hyödyntäminen ei välttämättä ole tehokkain tapa. Lääkkeiden jatkuvan kehityksen vuoksi myös uusien analyyttien lisääminen selektiiviseen menetelmään on haastavampaa, joten ei-selektiivinen näytteenkäsittelymenetelmä voi olla soveltuvampi, kun halutaan lisätä uusia lääkkeitä samaan menetelmään.

Ei-selektiivisen proteiinisäostuksen rinnalla fosfolipidien poisto voi olla tehokkaampi tapa saada aikaan puhtaampia näytteitä, mikä soveltuu kaikkien ana-

lyyttien määrittämiseen samanaikaisesti ja mahdollistaa uusien analyyttien lisäämisen helposti. Taulukossa 2 on esitetty muutama kaupallinen sovellus fosfolipidien poistoon.

Taulukko 2. Fosfolipidien poistoon soveltuvat kaupalliset tuotteet ja valmistajat [27; 29; 30].

Kaupallinen sovellus	Valmistaja/jälleenmyyjä
Phree™-kuoppalevy	Phenomenex
Ostro-kuoppalevy	Waters Corporation
HybridSPE®-kuoppalevy	Merck Life Science Oy

Kuoppalevy- ja SPE-sovellukset eivät suoraan ole soveltuvia vainajaverien analysointiin, koska näytteet eivät ole pipetoitavia. Osa näytteistä sisältää hyytymiä ja verisuonen palasia, tai ovat muuten kiinteitä, minkä vuoksi vainajaveret punnitaan yksitellen. Kiinteät näytematriisit tarvitsevat lisäkäsittelyn, jotta näytteet saadaan homogeeniseen muotoon. Näytteiden homogenisointiin löytyy myös useita kaupallisia sovelluksia, ja osa niistä on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Verinäytteiden homogenisointiin sopivat laitteet [31].

Laite	Kapasiteetti (näytettä)	Valmistaja ja jälleenmyyjä
Minilys®, personal homogeniser	3	Bertin, VWR
Precellys® 24 homogeniser	24	Bertin, VWR
Bead Mill MAX homogeniser	24	VWR
Fastprep-24 5G™ homogeniser	24	MP Biomedicals, VWR

Kaikki homogenisointilaitteet ovat suljettuja, joten tartuntavaaraiset näytteet eivät pääse kontaminoimaan muita näytteitä homogenisoinnin aikana. Kertakäyttöisten näyteastioiden käyttäminen on välttämätöntä, mikä ei välttämättä ole



kustannustehokasta. Yhdessä näytteenkäsittelysarjassa on yleensä yli 40 näyttä samaan aikaan, joten ylimääräinen homogenisointi voi viedä enemmän aikaa nykyiseen määrittämenetelmään verrattuna, mutta kokonaisaika analysoinnista tulosten vastaamiseen voi pienentyä, kun yön yli saostus poistuu kokonaan.

#### 4.5 Myrkytyspitoisuuden rajallinen tulkinta

Post mortem -toksikologian tarkoituksena on auttaa kuolemansyyn selvityksessä tai saada lisätieto kuoleman lähitapahtumista. PM-toksikologian rajallisessa tulkinnassa hyödynnetään plasman terapeuttisia lääkeainepitoisuuksia, koska halutaan kattaa sekä hoidollinen että toksinen alue. Myrkytystapauksissa on aiemmin arvioitu pelkästään lääkkeiden normaalia ja terapeuttista plasmapiitoisuutta, koska oletettiin lääkeaineiden pitoisuuksien olevan samat myös kuolemahetkellä. Nykyisin kuitenkin tiedetään, että normaalit PM-lääkepitoisuudet eivät vastaa täysin terapeuttista plasmapiitoisuutta. [18, s.38–40; 32.]

Ojanpään vuoden 2013 tutkimuksen perusteella on löydetty yhteys PM-lääkkeiden uudelleen jakautumiseen, minkä vuoksi vainajaverien lääkeainepitoisuudet eivät ole samat kuolemahetkellä. Tätä toimintoa kutsutaan PMR-toiminnoksi (Post Mortem Redistribution). PMR-toiminnon taustalla on muun muassa lääkeaineen passiivinen vapautuminen lääkevarastosta, kuten ruuansulatuskanavasta ja maksasta, ja heti kuoleman jälkeen sekä myöhemmin tapahtuvasta solujen autolyysistä että mädäntymisprosessista. Toiminnon vuoksi näytteenotto paikalla ja -ajalla on suuri merkitys vainajan lääkeaineiden pitoisuuksiin. [8.] Koska mätänemismuutokset lähtevät liikkeelle ruuansulatuskanavasta, sydämen ja isojen valtimoiden verien PMR-toiminto on suhteellisen suuri. Sen vuoksi PM-toksikologiassa hyödynnetään aina reisiluun laskimoverta, jossa PMR-toiminnon on havaittu olevan pienempi. [19; 32.]

Vanhoiden myrkytyskuolemien hyödyntäminen myrkytystapauksien tulkinnassa on hyödyllistä, mutta tutkimusdatasta tulee selvittää mahdolliset virhelähteet.

Uusien lääkeaineiden myrkytyspitoisuuksista ei ole tietoa, jolloin myrkytyspitoisuudet uuden lääkkeen kohdalla joissain tapauksissa ei vastaa oikeita myrkytyskuolemia. Myös uusien myrkytystapauksien tulkinnassa hyödynnetään FTI-toksisuusindeksiä (Fatal Toxicity Index), joka ottaa huomioon kuolemaan johtaneen myrkytyksen esiintyvyyden suhteessa lääkeaineen kulutukseen. [33; 19.]

Uusien tutkimusten avulla myrkytyspäilyjen rajallisessa tulkinnassa on kehitytty ja sen avulla opittu hyödyntämään muun muassa kliinistä farmakologiaa, vainajan ikää, kuolemahetken olosuhteita, mahdollisia ensiaputoimia kuten elvytys, ruumiin säilytysolosuhteita sekä analysoitavan näytteen näytteenottomenetelmää, kun epäillä kuoleman johtuneen myrkytyksestä. Nykyään tiedetään myös tarkemmin lääkeaineiden häviämisestä ja muodostumisesta kuoleman jälkeen, joten niiden mahdolliset vaikutukset on hyvä huomioida myrkytystapauksissa. [18, s. 40.] Myrkytystapauksien rajallista tulkintaa hyödynnetään uusien määrittämenetelmien kehittämisessä, minkä vuoksi niiden tunteminen on tärkeää.

## 5 Työn toteutus

### 5.1 Laitteet ja reagenssit

Menetelmän kehityksessä sekä validoinnissa käytettiin taulukon 4 mukaisia laitteita ja datan käsittelyohjelmia. Nestekromatografian ajo-olosuhteet on esitetty liitteessä 2.

Taulukko 4. Menetelmän kehityksessä ja validoinnissa käytetyt laitteet ja datankäsittelyohjelmat.

Laitteisto ja datankäsittelyohjelmat	Valmistaja
Agilent Technology 1200 1312 A (näytteenotto: Agilent 1200 1357B)	Agilent technology
Kolonni: Gemini-NX, C <sub>18</sub> , 100mm * 2,0 mm ID, 3 µm	Phenomenex

4000 QTrap, Turbo Ion Spray	Sciex
Esikolonne: Security Guard Gartridges C <sub>18</sub> , 4,0 mm L * 2,0 mm ID, 3 µm	Phenomenex
3000 QTrap, Turbo Ion Spray	Sciex
Shimadzu Prominence LC-20AD (näytteen­syöttäjä: SIL-20AHT)	Shimadzu
Analyst Software	Sciex
Multiquant 3.0.3	Sciex
XcelVap evaporation	Horizon Technology

Työssä käytettiin seuraavia reagensseja:

- metanoli, VWR, p.a. -laatu
- ammoniumasetaatti, ≥ 98 %, Merck
- enalapriilaatti-D5 dihydrate, Toronto Research Chemicals Ins
- enalaprilat dihydrate, European Pharmacopeia reference standard
- typpikaasu 5.6
- muurahaishappo, 98–100 %, Merck.

## 5.2 Liuokset

Kaikki kantaliuokset valmistettiin 100-prosenttiseen metanoliin ja ne säilytettiin pakastimessa koko validoinnin ajan. Menetelmän kehitystä ja validointia varten puhtaasta enalapriilaatista valmistettiin liuokset, joiden pitoisuudet ovat välillä 0,1–1000 mg/l. Ajoliuoksina käytettiin ammoniumasetaattipuskuria (0,01 mol/l) ja puhdasta metanolia. Molempiin ajoliuoksiin oli lisätty 0,1 %:n verran muurahaishappoa.

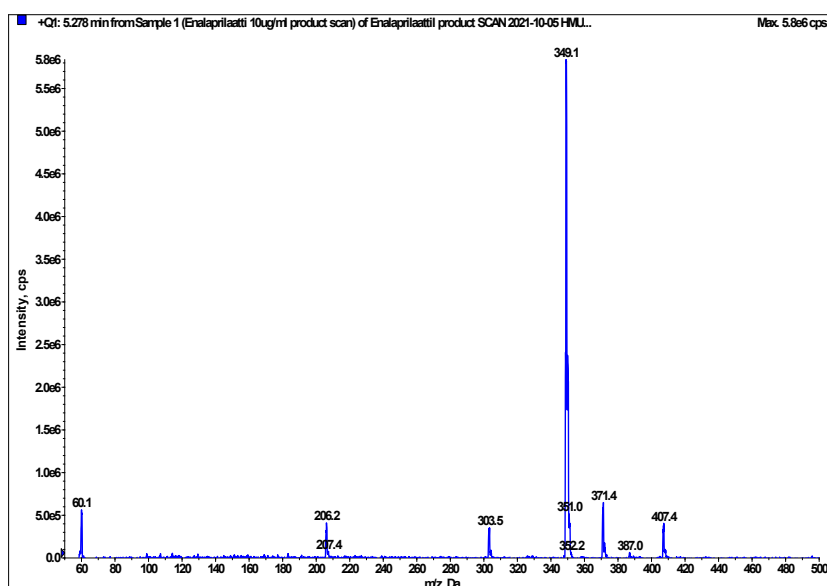
Näytematriiseina käytettiin sekä sairaalasta saatua ihmisen verta että todellisia vainajanäytteitä, joihin oli lisätty 1 %:n verran natriumfluoridia. Tarkemmat tiedot työssä käytetyistä liuoksista on esitetty liitteessä 3.

### 5.3 Menetelmän kehitys

Menetelmän kehitys aloitettiin massa-analysaattorin optimoinnilla, minkä tarkoituksena oli löytää optimaaliset parametrit, jolla saadaan tuotettua mahdollisimman suuri vaste tutkittavalle analytille. Menetelmän kehitys suoritettiin 3000QTrap-massaspektrometrilla sekä Shimazun nestekromatografilla.

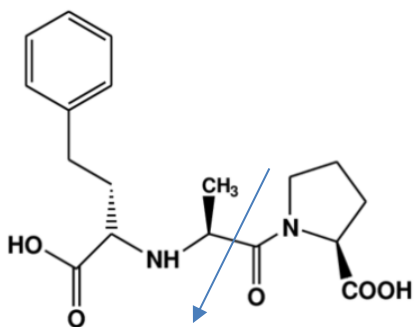
Parametrien optimointi aloitettiin selvittämällä enalapriilaatin fragmentoitumisionit precursor ion scan -analyysillä, jossa käytettiin puhdasta enalapriilaattia (10 mg/l). Törmäysenergian jännitettä muuttamalla enalapriilaatti hajotettiin pienemmiksi osiksi äiti-ionin ja varmistusionien valitsemista varten. Enalapriilaatti ionisoitiin positiivisella ionisaatiolla, koska ajoliuosten pH oli saatettu alas muurahaishapolla.

Äiti-ioni näkyi selkeästi massaspektrissä (kuva 10) m/z-arvolla 349,1 Da, mikä vastaa  $[M+H]^+$ -ionia. Korkean äiti-ionia vastaavan piikin vasemmalla puolella on kaksi mahdollista varmistusionia eli tytäri-ioneita. Massa-varaussuhteeltaan äiti-ionia suuremmat piikit vastaavat addukti-ioneita. 407 Da:n suuruinen piikki on enalapriilaatin ( $M=348$  g/mol) ja asetaatti-ionin ( $M=59$  g/mol) addukti-ioni eli  $[M+CH_3COO]^+$ -ioni.



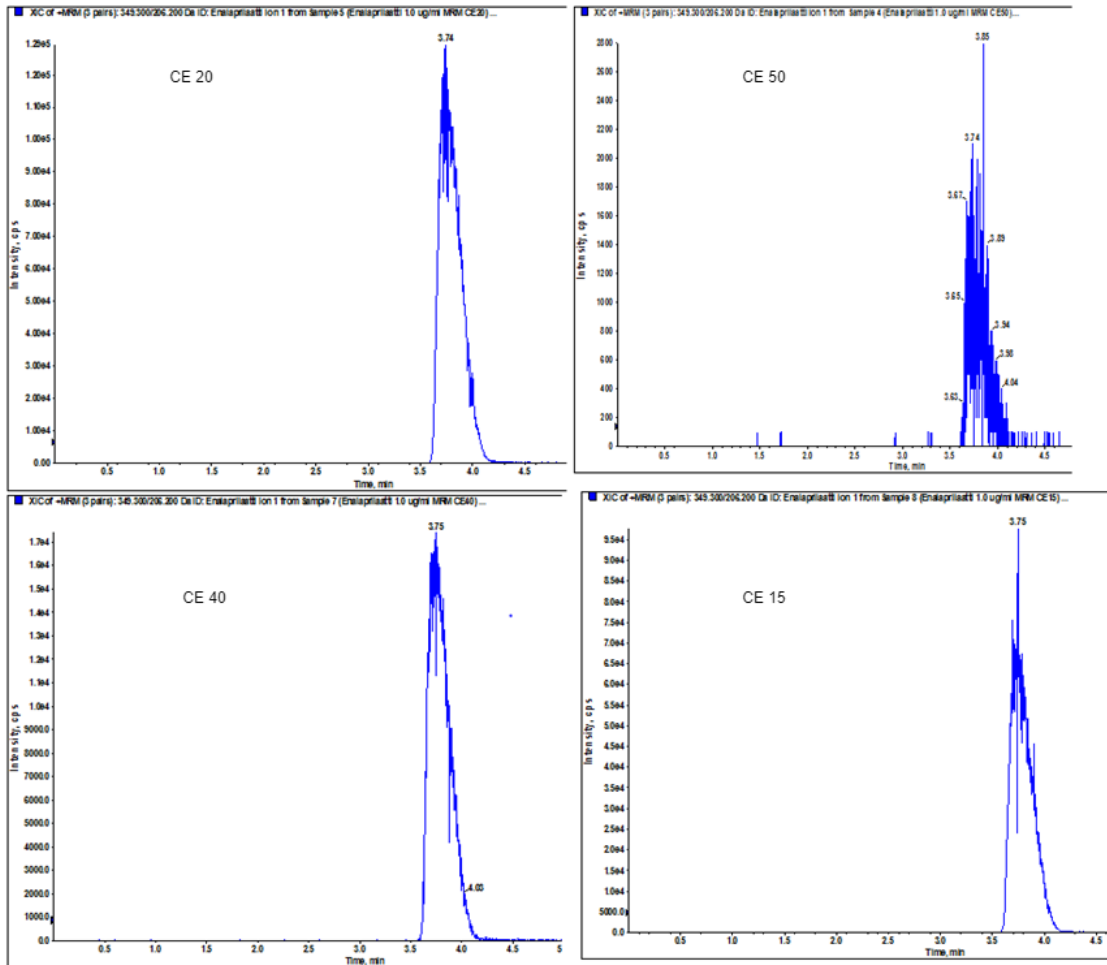
Kuva 10. Enalapriilaatin hajoaminen törmäysenergian (25 kV) avulla.

Haluttiin selvittää, miten molekyyli käyttäytyy suuremmalla törmäysenergialla asettamalla törmäysenergia arvoon 50 kV. Uusia fragmentteja ei syntynyt liisäyksestä huolimatta, joten tytärionipareiksi valittiin  $m/z$  206,2 Da ja  $m/z$  303,1 Da. Massavaraussuhteiden perusteella voidaan todeta, että molekyylistä irtoaa karboksyyliiryhmää vastaava osa ( $M=45$  g/mol), jolloin fragmentti vastaa  $m/z$  303,1 Da:n suuruista massaa. Toinen fragmentti katkeaa amidisidoksen jälkeen kuvan 11 osoitetulla tavalla.



Kuva 11. Enalapriilaatin fragmentoitumiskohta, josta oikeanpuoleinen fragmentti näkyy massaspektrissä  $m/z$  206,2 Da:n kohdalla.

Äiti- ja tytärionien valinnan jälkeen optimoitiin analyytista riippuvat parametrit massa-analysointorilla MRM-pyyhkäisytekniikalla. Parametrien optimointi tehtiin analysoimalla enalapriilaattiliuosta (1 mg/l) muuttamalla manuaalisesti tarkasteltavaa parametria. Tämän tarkoituksen oli tuottaa enalapriilaatille suurin intensiteetti molemmille fragmenteille. Kuvassa 12 on havainnollistettu intensiteetin muutos törmäysenergian (CE) suhteen ensimmäisellä tytärionilla.



Kuva 12. Intensiteetin muuttuminen törmäysenergian suhteen.

Korkein intensiteetti saavutettiin, kun törmäysenergia asetettiin arvoon 20 kV molemmilla ioneilla. Kaikki muut parametrit optimoitiin samaan tapaan, ja arvot on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5. Optimoidut massa-analysaattorin parametrit 3000QTrap-LC-MS/MS-analysaattorille.

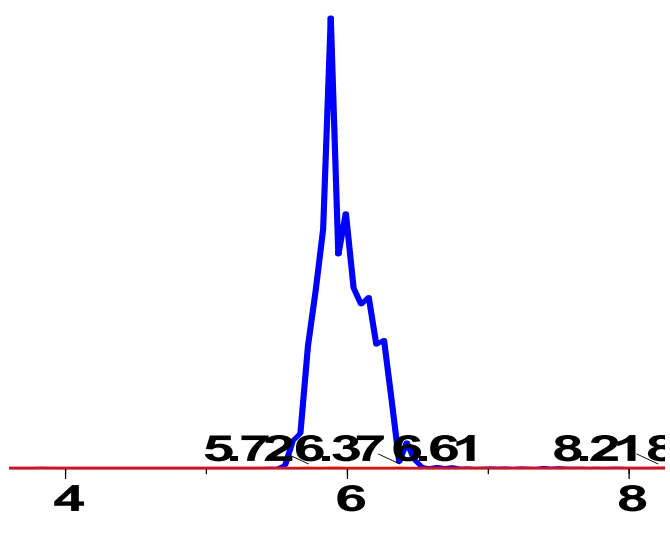
Optimoidut parametrit	Valitut asetukset [kV]
Entrance Potential	10
Decluster Potential	35
Collision Energy	20

Cell Exit Potential	2
---------------------	---

Validointi suoritettiin eri massaspektrometrilla, joten optimoidut parametrit ekstrapoloitiin kyseisen laitteen spekseihin (liite 4).

Menetelmän kehityksessä varmistettiin myös enalapriilaatin aiheuttamat häiriösignaalit muiden määrittämissä menetelmän analyttien kohdalla. Häiritseviä signaaleja ei havaittu muiden analyttien kromatogrammeissa.

Enalapriilaatin molekyyli-rakenteesta voidaan todeta, että se sisältää vähän poolittomia osia, minkä perusteella se pidättyy käänteisfaasikolonnissa epätasaisesti. Tämä voidaan huomata enalapriilaatin kromatogrammista epäsyyntienä. Kuvassa 13 on havainnollistettu enalapriilaatin kromatogrammi Analyst Software -datankäsittelyohjelmalla.



Kuva 13. Enalapriilaatin kromatogrammi.

Epäsyyntisyys johtuu yleensä liian väkevästä näyteliuoksesta, näytteelle sopimattomasta stationäärifaasista tai epähomogeenisestä faasista [9, s.147].

Tässä tapauksessa kyseessä on luultavasti kolonnin sopimattomuus. Kuitenkin

nykyisillä datan käsittelyohjelmilla pystytään korjaamaan häntimistä tasoitustyökälulla.

#### 5.4 Validointi

Validointi tehtiin oikeuskemiayksikön sisäisen toimintaohjeen mukaan, joka jaettiin esivalidointiin ja varsinaiseen validointiin [34]. Validointi suoritettiin 4000QTrap-laitteella ja Agilentin nestekromatografialla. Sekä esivalidoinnissa että validoinnissa käytettiin lääkeaineiden eristämiseen olemassa olevaa proteiinisaostusmenetelmää, joka on esitetty kohdassa 5.5.

Ennen varsinaista validointia suoritettiin esivalidointi, jossa selvitettiin enalapriilaatin lineaarisuusalue ja kalibrointimalli. Näiden avulla määritetään sisäinen toistotarkkuus sekä kalibrointisuoran painottuneisuus. Farmakokineettisten tutkimusten mukaan enalapriilaatin hoidollisesta maksimiarvosta on saatu vaihtelevia tuloksia, mutta tutkimusten perusteella korkein pitoisuus ulottui arvoon 0,1 mg/l. Viimeinen kalibrointipiste tulee olla suuruusluokaltaan 10 kertaa suurempi kuin hoidollinen maksimiarvo, jotta kalibrointisuora kattaa myrkytyspitoisuudet. Tämän perusteella viimeinen kalibrointipiste tulee olla vähintään 1 mg/l. [35; 36.]

Validoinnissa määritettiin seuraavat validointiparametrit: selektiivisyys, saanto, toteamisraja, alempi määrittäysraja, oikeellisuus, toistettavuus, ajettujen näytteiden säilyvyys, uusittavuus, laajennettu mittausepävarmuus sekä matriisivaikutus. Ylempää määrittäysrajaa ei määritetty, koska näytteet laimennetaan aina, kun ne ylittävät kalibrointisuoran.

Näiden lisäksi tarkasteltiin laimennettujen näytteiden poikkeavuutta laimentamattomiin näytteisiin verrattuna, jotta oikeellinen tulos saavutetaan myös, kun näytettä ei ole riittävästi saatavilla. Validointiin lisättiin myös vanhoja vainajänäytteitä, joilla on saatu positiivinen tulos enalapriililla. Tämän avulla tarkasteltiin menetelmän toimivuutta sekä todellisten näytteiden sijoittumista kalibrointisuoralle.



## 5.5 Näytteiden esikäsittely

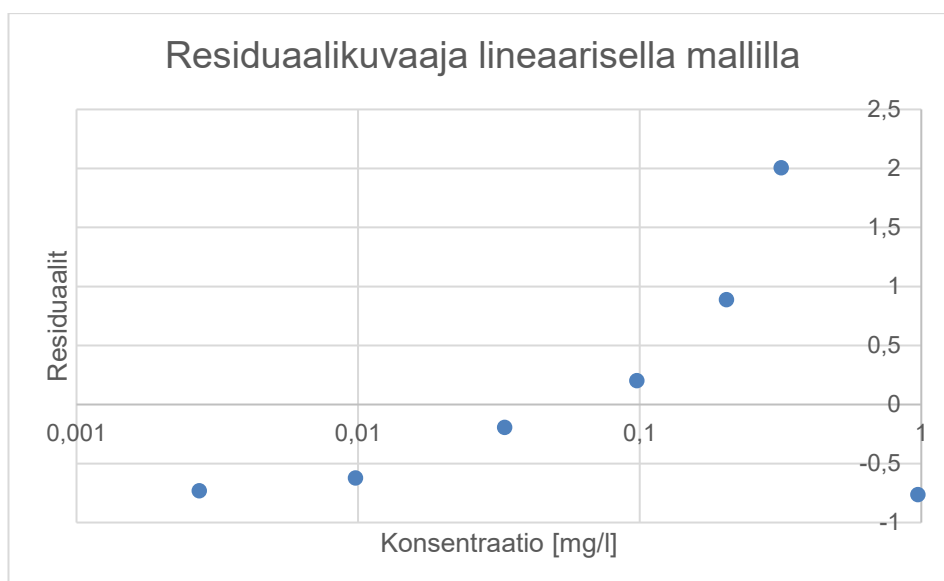
Kaikki näytteet esikäsiteltiin samalla tavalla. Lääkeaineiden uuttamiseen käytettiin proteiinisaostusmenetelmää, jossa metanolia lisättiin 2 ml 1 g verinäytteeseen. Näytteet sentrifugoitiin -10 °C:ssa 20 minuutin ajan, ja saostumisen annettiin tapahtua yön yli. Metanolifaasista siirrettiin haihdutusputkiin 1 ml näytettä, joka haihdutettiin 40 °C:n vesihauteessa vetykaasun avulla. Näytejäämä liuotettiin 300 µl:aan loppuliuotinta. Näytteet sekoitettiin ja sentrifugoitiin 3000 RPM:n pyörimisnopeudella 3 minuutin ajan ennen injektiopulloihin siirtoa.

## 6 Tulokset

### 6.1 Esivalidointi

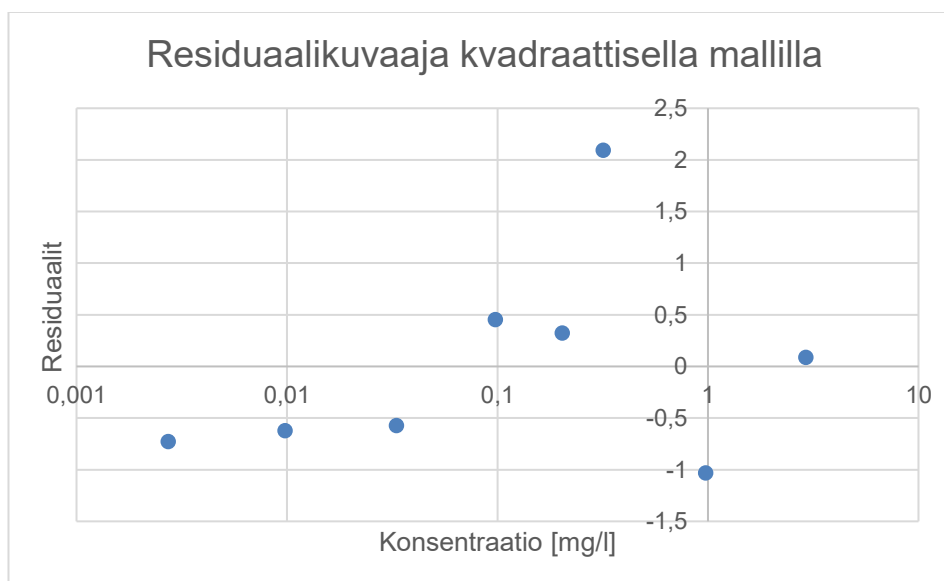
Lineaarisuusaluetta tarkasteltiin 8:lla eri pitoisuustasolla välillä 0,003–3 mg/l. Nollanäytteen avulla varmistettiin analyysin mahdolliset kontaminaatiot.

Kalibrointisuoran toimivuutta tarkasteltiin residuaaleilla sekä regressioanalyysin avulla. Residuaalikuvaajassa käytettiin konsentraatioiden logaritmisia arvoja, jotta residuaalit saadaan selkeämmin näkyviin. Lineaarisen mallin residuaalikuvaaja on esitetty kuvassa 14.



Kuva 14. Lineaarisen mallin residuaalit.

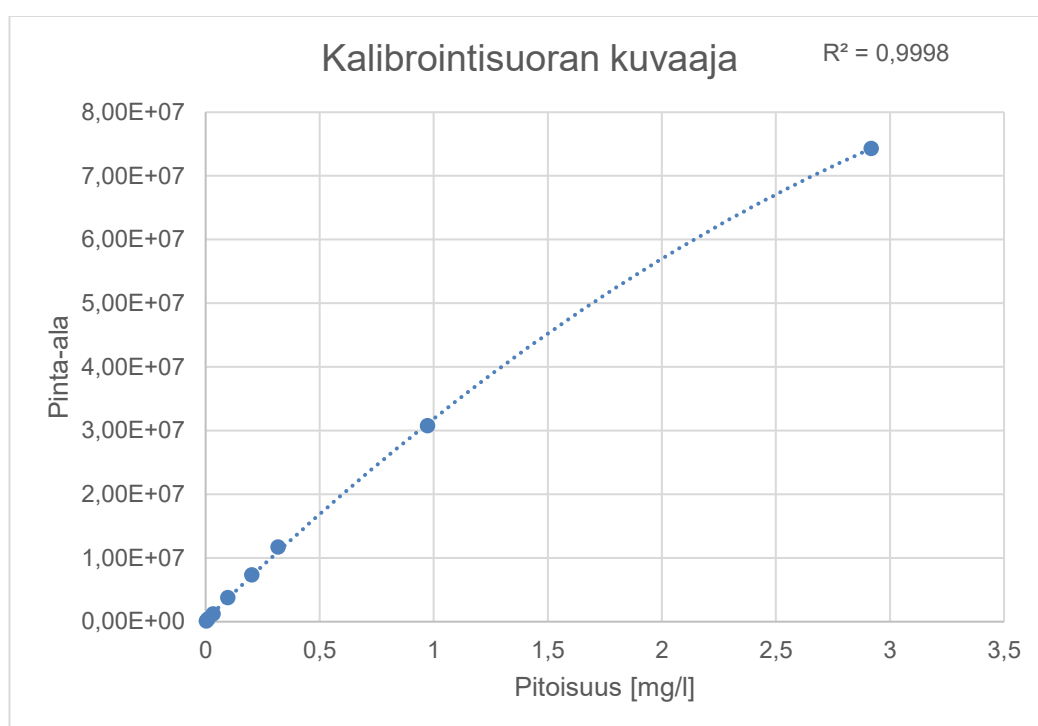
Lineaarisen mallin residuaalikuvaajasta huomataan, että residuaalit eivät asetu satunnaisesti nollan molemmille puolille vaan muodostavat selkeän käyrän. Tämä voidaan korjata joko pienentämällä mittausaluetta tai käyttämällä kvadraattisen yhtälön sovitusta [37, s 17]. Mittausaluetta ei voi pienentää, koska halutaan ylettää myrkytyspitoisuuksiin, joten päädyttiin kvadraattisen yhtälön sovitukseen. Kvadraattisen mallin residuaalikuvaaja on esitetty kuvassa 15.



Kuva 15. Kvadraattisen mallin residuaalit.

Kuvasta 15 huomataan, että kvadraattisella mallilla residuaalit asettuvat satunnaisesti nollan molemmille puolille, joten malli sopii hyvin enalapriilaatin määrittämiseen.

Regressioanalyysin perusteella molemmat regressiomallit ovat merkitsevästi parempia kuin malli, jossa vastemuuttuja on vakio. Molemmissa malleissa p-arvot eroavat tilastollisesti merkitsevästi nolasta. Kalibroitikuvaajan ja selityksasteen perusteella kvadraattinen malli on kuitenkin parempi enalapriilaatin määrittämiseen. Kalibroitikuvaaja on esitetty kuvassa 16.



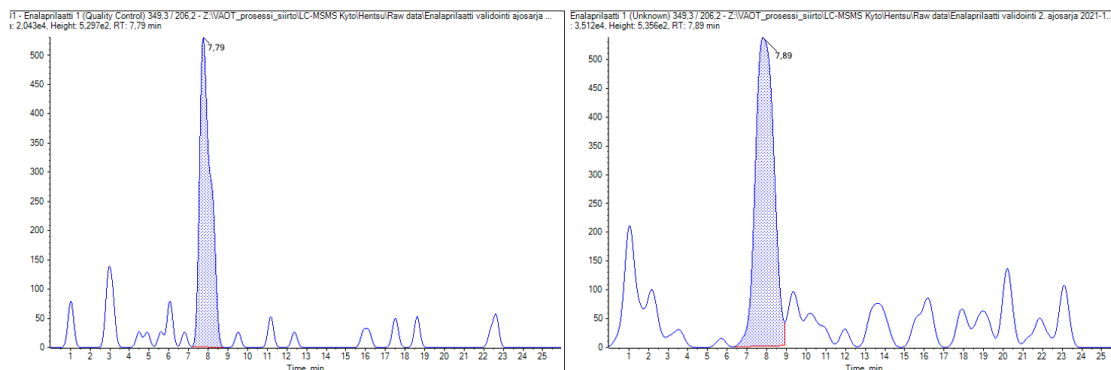
Kuva 16. Kalibroitikuvaaja kvadraattisella mallilla.

Tämän esivalidoinnin perusteella valittiin 7 kalibroitisuoran pistettä väliltä 0,001–3,0 mg/l varsinaiseen validointiin. Toteamisrajan pitoisuudeksi valittiin 0,0002 mg/l ja määrittärajaksi 0,0005 mg/l, koska haluttiin yletää mahdollisimman pieniin pitoisuuksiin.

## 6.2 Selektiivisyys

Selektiivisyyden testaus tehtiin todellisilla vainajanäytteillä, jotka eivät sisältäneet enalapriilaa. Rinnakkaismääryksiä tehtiin yhteensä 10 kpl erilaisilla veinäytteillä, jotta saadaan tietoa mahdollisista häiriöpiikeistä erilaisten näytematriisien välillä. Menetelmä todetaan riittävän selektiiviseksi, jos häiritsevien signaalien pinta-alat ovat alle 10 määritysrajan pitoisuudesta.

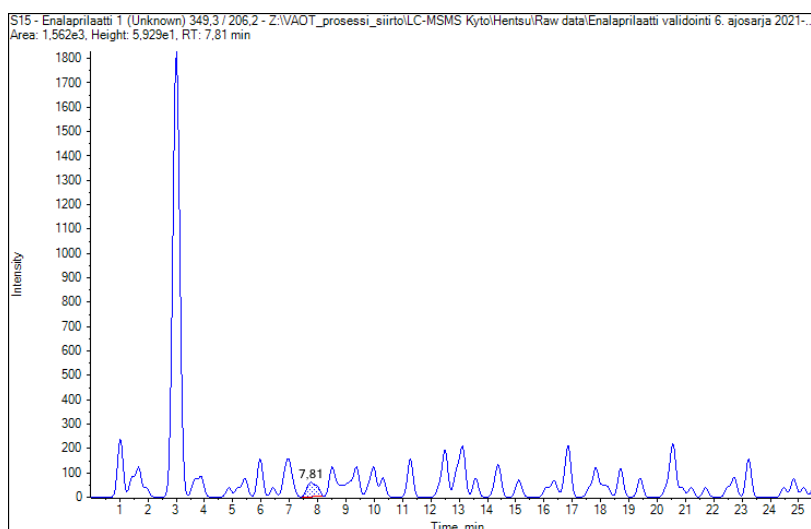
Ensimmäisten ajosarjojen aikana huomattiin, että selektiivisyysnäytteissä näkyi analyytin kohdalla huomattavan korkea piikki, joka ulottui lähes toteamisrajan pitoisuuksiin. Kuvassa 17 on esitetty selektiivisyysnäytteen sekä toteamisrajan kromatogrammit.



Kuva 17. Selektiivisyysnäytteen kromatogrammi vasemmalla puolella ja toteamisrajan oikealla.

Molempien näytteiden piikit ovat yhtä korkeat ja laitteen antamat pitoisuudet molemmille mittauksille olivat noin 0,00030 mg/l. Laitteella ajatussa blank-näytteessä ei näkynyt piikkiä, joten kontaminaation oletettiin tulevan uuttoprosessin aikana.

Näytteenkäsittelyssä käytetyt laitteistot puhdistettiin, ja selektiivisyysnäytteet ajettiin uudelleen. Seuraavien näytteiden kromatogrammeissa ei esiintynyt piikkejä enalapriilatin retentioajan kohdalla, joten kontaminaatio oli luultavasti ollut pipeteissä. Kuvassa 18 on esitetty uuden selektiivisyysnäytteen kromatogrammi.



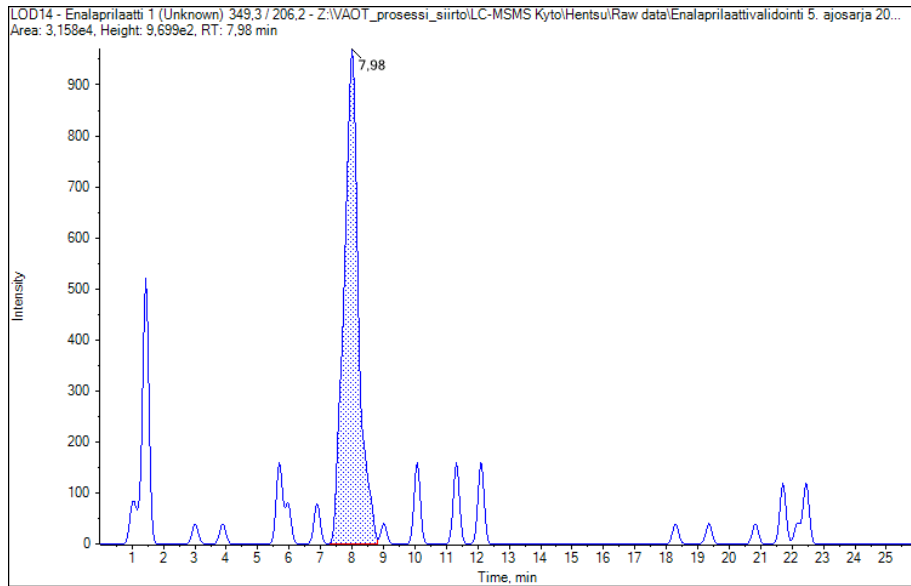
Kuva 18. Puhdas selektiivisyysnäyte, jossa enalapriilaatin kohdalla ei havaita piikkiä.

Selektiivisyysnäytteen pinta-ala on määrittämissuhteesta 4,0 %, joten määrittämissuhteeseen on riittävän selektiivinen analyysi suhteeseen.

### 6.3 Toteamis- ja määrittämissuhteet

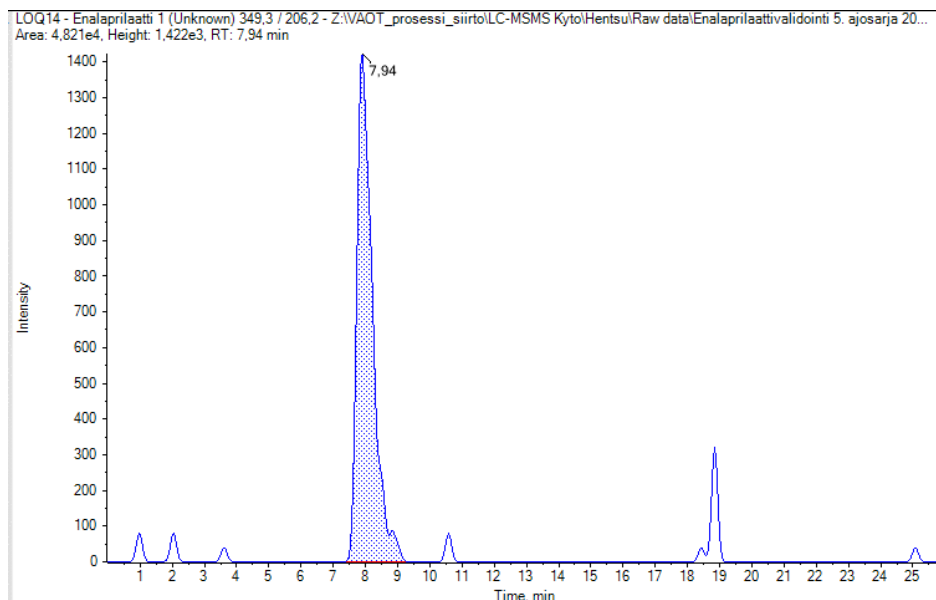
Toteamisrajan avulla voidaan määrittää, onko näytteessä analyysiä vai ei. Alempi määrittämissuhteet on se pitoisuus, jolla analyysi voidaan määrittää hyväksyttävällä täsmällisyydellä ja tarkkuudella. [37, s. 23–24.] Toteamisraja on riittävä, kun signaalikohinasuhde (S/N) on suurempi tai yhtä suuri kuin 3. Validointisuunnitelman mukaan määrittämissuhteiden rinnakkaismäärittämissuhteiden keskiarvo saa poiketa todellisesta arvosta enintään 20 %. Näytteet valmistettiin nollamatriisiin pitoisuustasolla 0,0002 mg/l (toteamisraja) ja 0,0005 mg/l (määrittämissuhteet). Molemmilla pitoisuustasolla tehtiin 12 todellista rinnakkaismäärittämissuhteetä.

Toteamisrajan rinnakkaismäärittämissuhteiden signaalikohinasuhteiksi saatiin tuloksia välillä 13–40. Kuvassa 19 on esitetty toimintarajan arviointiin käytetty tyypillinen kromatogrammi.



Kuva 19. Toteamisrajan arviointiin käytetty kromatogrammi pitoisuustasolla 0,0002 mg/l.

Tulosten perusteella enalapriilaatti on mahdollista tunnistaa pitoisuustasolla 0,0002 mg/l. Määritysrajan rinnakkaismäärityksistä laskettiin suhteellinen keskihajonta ja suhteellinen poikkeama (bias-%). Kuvassa 20 on esitetty määritysrajan arviointiin käytetty tyypillinen kromatogrammi pitoisuustasolla 0,0005 mg/l.



Kuva 20. Kromatogrammi pitoisuustasolla 0,0005 mg/l.

Konsentraatioiden avulla laskettu RSD-% oli 18 %, joka asettuu validointisuunnitelman kriteereihin. Bias-%:n arvoksi saatiin 58 %, joka on reilusti yli oletetun arvon. Kalibrointisuora ei kuitenkaan yletä määrittysrajaan asti, minkä vuoksi pitoisuudet ovat korkeampia oletettuun arvoon verrattuna. Tulosten perusteella 0,0005 mg/l on kuitenkin riittävä pitoisuus määrittämään enalapriilaatti hyväksyttävällä täsmällisyydellä ja tarkkuudella.

#### 6.4 Tarkkuus

Menetelmän tarkkuus käsittää menetelmän oikeellisuuden sekä täsmällisyyden (toistettavuus ja uusittavuus), mikä kuvaa analyysituloksen ja tuntemattoman oikean arvon läheisyyttä. [38, s. 3.] Analyysimenetelmä on riittävällä tarkkuudella, kun suhteellinen poikkeama sekä suhteellinen keskihajonta ovat maksimissaan 20 %. Tarkkuuden arviointiin käytettiin tunnettua vertailunäytettä, josta nollamatrisiin valmistettiin näytteitä kahdella eri pitoisuustasolla (0,0020 mg/l ja 0,020 mg/l). Molemmilla pitoisuustasolla tehtiin yhteensä 6 rinnakkaismäärittystä.

Oikeellisuus arvioitiin suhteellisen poikkeaman avulla (kaava 1):

$$Bias - \% = \frac{(x-\mu)}{\mu} * 100 \% \quad (1)$$

$x$  on mitattujen arvojen keskiarvo

$\mu$  on todellinen oletettu arvo. [37, s.43.]

Molemmilla pitoisuutasoilla päästiin hyvin tavoitteeseen. Suhteellinen poikkeama pitoisuustasolla 0,002 mg/l oli 1,5 % ja -5,9 % pitoisuustasolla 0,2 mg/l.

Toistettavuus arvioitiin suhteellisen keskihajonnan avulla (kaava 2):

$$\%RSD = \frac{s}{x} * 100\% \quad (2)$$

$s$  on keskihajonta

$x$  on tulosten keskiarvo. [37, s. 26.]

Molemmilla pitoisuustasoilla suhteellinen keskihajonta jäi alle 20 %:n. Suhteellinen keskihajonta oli 11 % pitoisuustasolla 0,2 mg/l ja 17 % pitoisuustasolla 0,002 mg/l. Pienemmän pitoisuuden RSD-arvo oli suhteellisen korkea, mutta tulokset ovat kuitenkin tavoitteiden rajoissa.

Uusittavuus arvioitiin kahden henkilön välisillä tuloksilla, joissa päivä ja mahdolliset välineet vaihtelevat. F-testin perusteella luottamustasolla 0,05 p-arvoksi saatiin 0,85 pitoisuustasolla 0,002 mg/l ja 0,60 pitoisuustasolla 0,2 mg/l. F-testin perusteella varianssit eivät poikkea tilastollisesti merkitsevästi toisistaan, joten uusittavuutta tarkasteltiin kahden otoksen t-testillä olettaen varianssit yhtä suuriksi. T-testin tuloksia arvioitiin seuraavasti:

- p-arvo > luottamustaso (0,05), niin tulokset eivät poikkea tilastollisesti merkitsevästi
- p-arvo < luottamustaso (0,05), niin ainakin yksi tulos poikkea muista tilastollisesti merkitsevästi.

Pitoisuustasolla 0,002 mg/l p-arvoksi saatiin 0,069, joten tulosten keskiarvot eivät poikkea tilastollisesti merkitsevästi. Korkeamman pitoisuustason (0,2 mg/l) p-arvoksi saatiin 0,023, joten tulosten keskiarvot poikkeavat tilastollisesti merkitsevästi. Kuitenkin kaikkien tulosten suhteellinen poikkeama jää alle laajennetun mittausepävarmuuden (21 %), jolloin tulokset ovat uusittavuuden suhteen hyväksyttäviä. Tarkemmat tarkkuuteen liittyvät tulokset on esitetty liitteessä 5.

## 6.5 Pienemmän näytemäärän verifiointi

Pienemmän näytemäärän verifiointin tarkoituksena on selvittää laimennettujen näytteiden oikeellisuus. Samasta oikeellisuusnäytteestä valmistettiin 6 rinnakkaismäärittystä 1/10-laimennoksella pitoisuustasolla 0,2 mg/l. Tavoitteena on, että laimennettujen näytteiden pitoisuudet poikkeavat laimentamattomasta näytteestä enintään  $\pm 30$  %. Taulukossa 6 on esitetty rinnakkaismäärittysten tulokset ja niiden keskiarvot sekä laimentamattomalla että laimennetulla näytteellä.



Taulukko 6. Pienemmän näytemäärän verifiointi.

Rinnakkaismääritykset	Konsentraatio laimennettu [mg/l]	Konsentraatio laimentamaton [mg/l]
1	0,205	0,218
2	0,173	0,202
3	0,215	0,216
4	0,203	0,214
5	0,201	0,222
6	0,239	0,217
Keskiarvo	0,205	0,215
Laimennetun näytteen poikkeama laimentamattomasta näytteestä (%)	4 %	

Taulukon 6 mukaan laimennettujen näytteiden keskiarvo poikkeaa laimentamattomien näytteiden keskiarvosta 4 %, joten pienempi näytemäärä soveltuu hyvin enalapriilaatin määrittämiseen. Laimennettujen näytteiden pitoisuus on lähes poikkeuksetta pienempi kuin alkuperäinen tulos. Tämä johtuu todennäköisesti matriisiefektin muutoksesta laimentumisessa.

## 6.6 Uuttoprosessin saanto

Uuttoprosessin saantoa tarkasteltiin analyytin ja sisäisen standardin pinta-alojen suhteella, jonka avulla arvioitiin analyytin häviön korjaus sisäisen standardin avulla. Tarkastelua varten valmistettiin näytteet, jossa loppuliukseen lisättiin sama pitoisuus kuin uuttoprosessin näytteissä. Saantoprosentti laskettiin kaavalla 3:

$$\%R = \frac{C1 * 100\%}{C2} \quad (3)$$

C1 on näytteiden pinta-alojen suhde (lisäys ennen uuttoa)

C2 on näytteiden pinta-alojen suhde (lisäys uuton jälkeen).

Saantoprosenttien keskiarvo rinnakkaismäärityksille oli 108 %, mikä on varsin hyvä tulos. Voidaan todeta, että sisäisen standardin lisäys korjaa hyvin uutto-prosessissa hävinneen analyytin. Kaikille saantokokeille lasketut tulokset on esitetty liitteessä 6.

### 6.7 Mittausepävarmuuden arviointi Nordtest TR 537 -oppaan mukaan

Laajennettu mittausepävarmuus arvioitiin Mukit-laskentaohjelman avulla luottamustasolla 95 %. Tulosten laskentaan käytettiin varmennettua vertailumateriaalia (0,002 mg/l ja 0,2 mg/l) ja rutiininäytteiden rinnakkaismäärityksiä (0,1 mg/l). Varmennetun vertailumateriaalin epävarmuudeksi arvioitiin 0,5 %. Tulokset on esitetty taulukossa 7.

Taulukko 7. Laajennettu mittausepävarmuus.

Konsent-raatio alue (mg/l)	u (R <sub>w</sub> )	u (bias)	Yhdistetty standardiepävarmuus	Laajennettu mittausepävarmuus
0,001–1,0	12,32 %	4,30 %	13,05 %	27 %

Yhdistetty standardiepävarmuus arvioitiin laboratorion sisäisen uusittavuuden (R<sub>w</sub>) ja suhteellisen poikkeaman (bias) avulla. Mukit-raportti on esitetty liitteessä 7. Laajennettu mittausepävarmuus on suhteellisen korkea, mikä voi johtua laajasta mittausalueesta. Rutiininäytteitä tehtiin vain yhdellä pitoisuustasolle, joten mittausalueen jakaminen kahteen osaan ei ollut mahdollista.

THL:n validointiohjeen [34] mukaan mittausepävarmuus määritettiin systemaattisen virheen ja satunnaisvirheen avulla kaavalla 4.

$$U = \sqrt{U_1^2 + U_2^2} \quad (4)$$

U<sub>1</sub> on systemaattinen virhe

U<sub>2</sub> on satunnaisvirhe

Systemaattinen virheen arviointiin kaavalla 5.

$$U1 = \frac{|U1_a| + |U1_b|}{2} \quad (5)$$

$U1_a$  on oikeellisuusnäytteiden bias-%

$U1_b$  on standardilisäysnäytteiden (matriisivaikutus) bias-%.

Satunnaisvirhe arvioitiin kaavalla 6.

$$U2 = \frac{|U2_a| + |U2_b| + |U2_c|}{3} \quad (6)$$

$U2_a$  on toistettavuusnäytteiden sisäinen hajonta (RSD-%)

$U2_b$  on uusittavuus- ja toistettavuusnäytteiden RSD-%

$U2_c$  on standardilisäysnäytteiden RSD-%.

Tulosten avulla mittausepävarmuudeksi saatiin 10,2 %, joten laajennettu mittausepävarmuus (2U) oli 21 %. Tarkemmat tulokset on esitetty liitteessä 8.

## 6.8 Prosessoitujen näytteiden säilyvyys

Tarkoituksena oli tarkastella näytteiden säilyvyyttä tilanteessa, jossa ajot keskeytyvät viikonlopun aikana tai muun asian vuoksi näytteet joudutaan ajamaan laitteistolla uudestaan. Säilyvyyden tarkasteluun käytettiin QC-näytteitä kahdella eri pitoisuustasolla kolmen rinnakkaismäärittysten keskiarvolla. Samat näytteet analysoitiin 3., 7., ja 16. päivän jälkeen ensimmäisestä analysoinnista. Tulokset laskettiin muutosprosentteina:

$$\text{Muutos} - \% = \frac{x}{x(1.\text{päivä})} * 100\% \quad (7)$$

$x$  on tarkastelupäivän rinnakkaisten mittaustulosten keskiarvo

$x(1.\text{päivä})$  on 1. päivän rinnakkaisten mittaustulosten keskiarvo.

Laskennalliset arvot on esitetty taulukossa 8 muutosprosenttien avulla.

Taulukko 8. Muutosprosentti päivien välillä ensimmäiseen ajoon verrattuna.

	Pitoisuustaso 0,002 mg/l	Pitoisuustaso 0,2 mg/l
3. päivän muutos-%	93	95
7. päivän muutos-%	120	86
16. päivän muutos- %	106	76

Päivien 3 ja 7 tulokset eivät poikkea 1. päivän analyysituloksesta yli 20 %, joten samat näytteet voidaan ajaa seuraavassa ajosarjassa. Päivän 16 kohdalla pitoisuustasolla 0,2 mg/l tulos poikkeaa enemmän kuin 20 %, joten tulos ei välttämättä ole luotettava enää kyseisen päivän kohdalla. Tulosten perusteella voidaan todeta, että näytteitä voidaan analysoida uudelleen samasta näytepullosta 7 vuorokauden jälkeen valmistamisesta.

## 6.9 Tilastollinen merkitsevyys eri analyysilaitteella

Tarkasteltiin kuuden rinnakkaismäärityksen avulla kahden eri LC-MS/MS-laitteiston tulosten poikkeavuutta parittaisen kahden otoksen t-testin avulla. Haluttiin selvittää, onko laitteistolla eroja luottamustasolla 95 %. Alkuperäiset data-analyysillä saadut tulokset on esitetty kuvassa 21.

Parittainen kahden otoksen t-testi keskiarvoille		
	<i>Calculated Concentration</i>	<i>Calculated Concentration</i>
Keskiarvo	0,00205	0,00197
Varianssi	7,37367E-08	6,003E-08
Havainnot	6	6
Pearsonin korrelaatio	0,440	
Arvioitu keskiarvojen ero	0	
va	5	
t Tunnusluvut	0,77	
P(T<=t) yksisuuntainen	0,24	
t-kriittinen yksisuuntainen	2,02	
P(T<=t) kaksisuuntainen	0,47	
t-kriittinen kaksisuuntainen	2,57	

Kuva 21. Kahden eri laitteen tarkastelu parittaisella kahden otoksen t-testillä.

Tuloksen perusteella p-arvo on suurempi kuin luottamustaso, joten laitteiden välinen ero ei ole tilastollisesti merkitsevä.

## 6.10 Matriisivaikutus

Matriisivaikutusta varten valittiin 10 vainajanäytettä, jotka eivät sisällä enalapriilaattia. Näytteisiin lisättiin enalapriilaattia 0,1 mg/l, ja jokaisesta näytteestä tehtiin 4 rinnakkaismäärittystä. Matriisivaikutus arvioimiseen käytettiin ANOVA Single Factory -data-analyysiä. Alkuperäiset analyysitulokset ovat esitetty liitteessä 9. Tulokset arvioidaan seuraavasti:

- f-arvo on yhtä suuri tai pienempi kuin F (kriittinen), kun matriisi ei vääristä tuloksia
- f-arvo on suurempi kuin F (kriittinen), kun matriisi vaikuttaa tuloksiin.

F-arvo on suurempi kuin f(kriittinen), joten vähintään yhden näytematriisin tulos poikkeaa muista. Näytematriisilla on vaikutusta analyysin pitoisuuteen tilastollisesti merkitsevästi. Luokkien välinen p-arvo on yli 3 kertaa suurempi, joten matriisivaikutus on tilastollisesti merkitsevä. Kuitenkin bias-% on alle 10 %, joka on alle laajennetun mittausepävarmuuden. Tulokset voidaan tämän perusteella hyväksyä.

## 6.11 Menetelmän toimivuuden testaus todellisilla vainajanäytteillä

Validoinnissa tarkasteltiin aiempia todellisia enalapriilipositiivisia näytteitä. Valittiin 10 aiemmin todettua positiivista näytettä, minkä avulla arvioidaan menetelmän toimivuus, ja enalapriilaatin PM-pitoisuuksien sijoittuminen kalibrointisuoralle. Tulokset on esitetty taulukossa 9.

Taulukko 9. Näytteiden enalapriili- ja enalapriilaattitulokset.

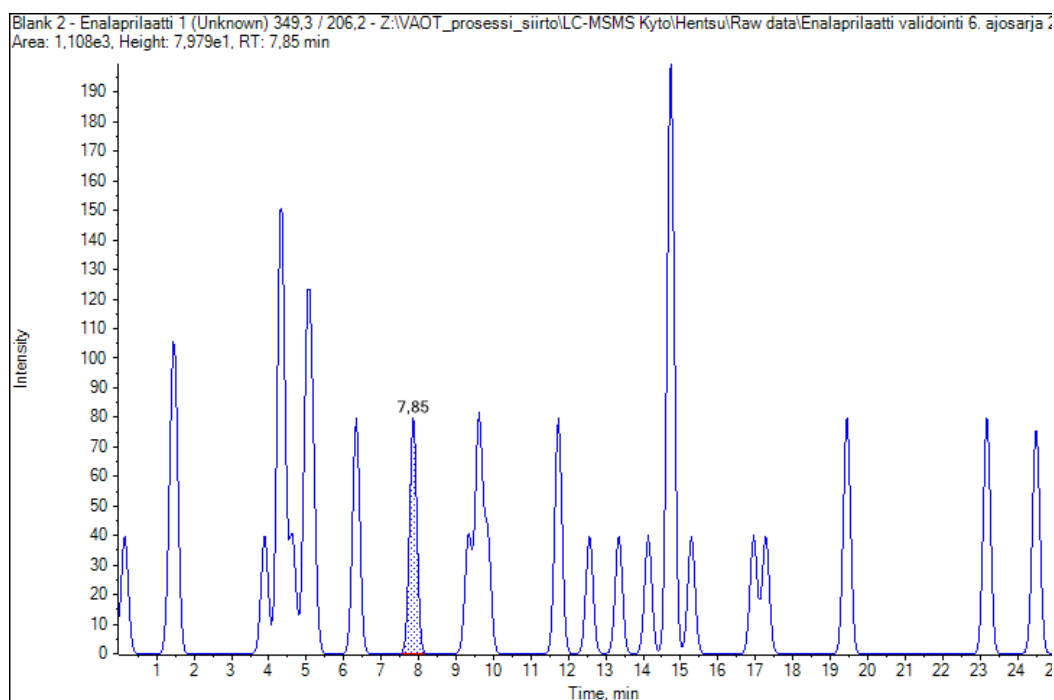
Näyte	Enalapriili [mg/l]	Enalapriilaatin pitoisuus tytärionilla 206,2 Da [mg/l]	Enalapriilaatin pitoisuus tytärionilla 303,1 Da [mg/l]

N1	0,0014	0,052	0,052
N2	0,0084	0,23	0,21
N3	0,070	3,1	2,6
N4	0,020	0,044	0,040
N5	0,030	0,030	0,030
N6	0,030	0,42	0,39
N7	0,020	0,13	0,13
N8	0,020	0,20	0,20
N9	0,0	0,0	0,0
N10	0,040	0,50	0,48

Suurin osa näytteistä osui hyvin kalibrointisuoralle, joten kalibrointisuora kattaa todelliset PM-pitoisuudet. Kaikki kalibroinnista yli menevät näytteet laimennetaan, jotta todellinen määrä saadaan laskettua. Näyte N9 oli negatiivinen sekä enalapriilin että enalapriilaatin puolesta, koska näytenumero oli katsottu väärin. Voidaan todeta, että menetelmä toimii hyvin enalapriilaatin määrittämiseen PM-veristä. Huomioitavaa on, että enalapriilaatin pitoisuus oli usein yli 10 kertaa suurempi kuin enalapriilin pitoisuus samassa vainajanäytteessä. Joissain tapauksissa päästiin jopa 50 kertaa suurempiin pitoisuuksiin.

## 6.12 Kontaminaatio

Kontaminaatiotestaus suoritettiin injektoimalla 6 rinnakkaismääritystä kalibrointisuoran pitoisuustasoista 0,3 mg/l ja 1,0 mg/l. Kuuden rinnakkaisinjektointin jälkeen ajettiin kaksi blank-liuosta, jotta nähdään laitteella tapahtuva kontaminaatio korkeissa pitoisuuksissa. Kuvassa 22 on esitetty puhtaan blank-liuoksen kromatogrammi rinnakkaisinjektointien jälkeen.

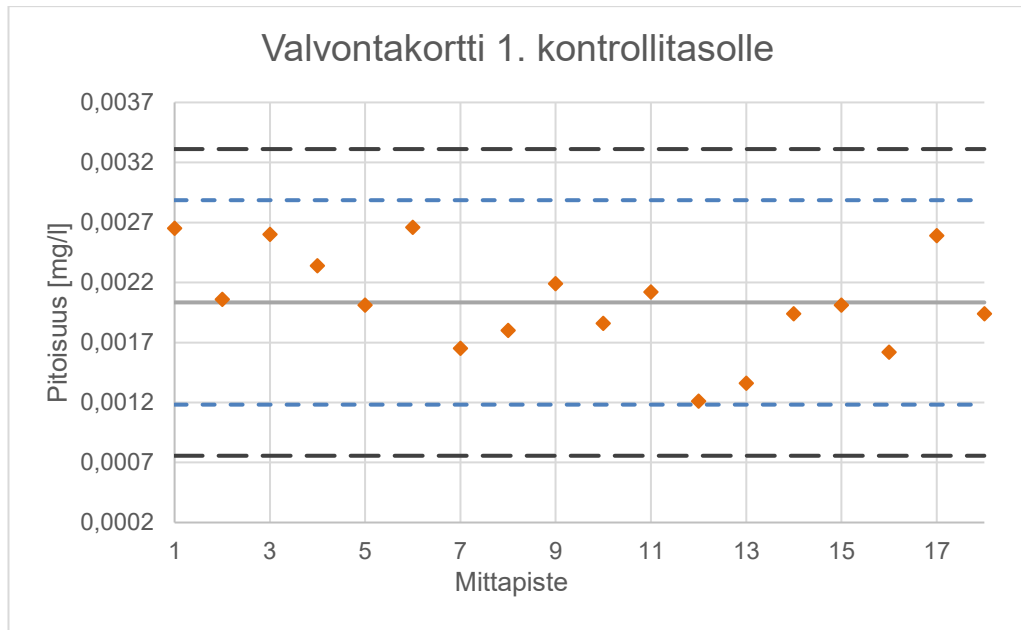


Kuva 22. Blank-näytteen kromatogrammi rinnakkaisinjektioiden jälkeen.

Voidaan todeta, että huomattavaa kontaminaatiota ei synny korkeampien pitoisuuksien jälkeen seuraavan näytteen injektioinnissa.

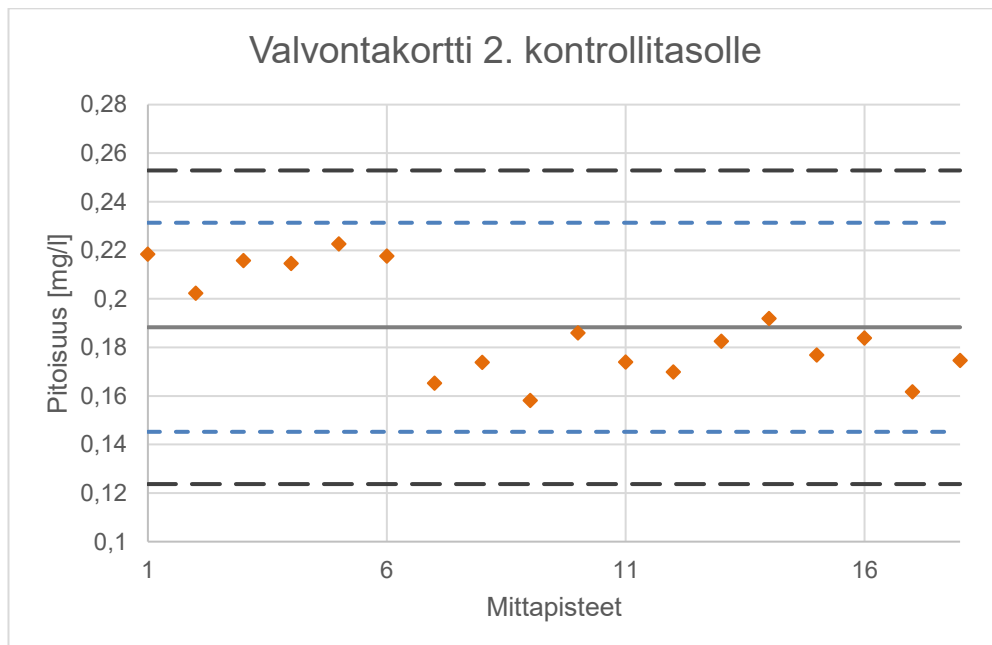
### 6.13 Valvontakortit

Valvontakortit laadittiin kontrolliliuosten pitoisuustasoille 0,002 mg/l ja 0,2 mg/l. Kuvassa 22 on esitetty kontrollinäytteiden (0,002 mg/l) asettuminen valvontakortille.



Kuva 23. Valvontakortti pitoisuustasolle 0,002 mg/l.

Pienemmän pitoisuuden kontrollinäytteet asettuvat hyvin hälytysrajojen sisälle lukuun ottamatta mittapistettä 12, joka osuu hälytysrajaan. Kuvassa 24 on esitetty kontrollinäytteiden (0,2 mg/l) asettuminen valvontakortille.



Kuva 24. Valvontakortti pitoisuustasolle 0,2 mg/l.



Suuremman pitoisuuden kontrollinäytteet asettuvat hyvin hälytysrajojen sisäpuolelle.

## 7 Yhteenveto

Menetelmän todettiin soveltuvan hyvin enalapriilaatin kvantitatiiviseen määrittämiseen. Pystyttiin toteamaan, että muut analyytit eivät häiritse enalapriilaatin määrittämistä eikä enalapriilaatti aiheuta häiriöpiikkejä muiden analyyttien kromatogrammeihin. Enalapriilaatti pidättäytyy nykyisessä kolonnissa epätasaisesti, joten sen määrittämiseen voisi soveltua paremmin poolisesti modifioitu kolonni kuten Luna Omega Polar C18, Kinetex Polar C18, Synergi Polar tai Synergi Fusion-PR [27].

Matriisivaikutus oli suhteellisen suuri, mikä voi johtua nykyisen uutomenetelmän kyvyttömyydestä poistaa fosfolipidejä, jolloin näytteet jäävät suhteellisen likaiseksi. Näytteenkäsittelytekniikkaan olisi hyvä lisätä fosfolipidien poisto, jolloin on mahdollista pienentää ionisuppression vaikutusta ESI-analyysitekniikalla.

Validointi onnistui suunnitellusti, ja tulokset vastasivat validointisuunnitelmassa asetettuja vaatimuksia. Menetelmällä pystytään hyvin määrittämään enalapriilaatin pitoisuus PM-verissä, ja todelliset pitoisuudet asettuivat hyvin kalibrointisuoralle.

## Lähteet

- 1 Oikeuskemia. Verkkoaineisto. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. <<https://thl.fi/fi/thl/organisaatio/osastot-ja-yksikot/valtion-palvelut/oikeuskemia>>. Luettu 4.9.2021.
- 2 Oikeuslääketieteellinen ruumiinavaus. Verkkoaineisto. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. <<https://thl.fi/fi/palvelut-ja-asiointi/valtion-sosiaali-ja-terveydenhuollon-erityispalvelut/oikeuslaakinta/kuolemansyyn-selvittaminen/oikeuslaaketieteellinen-kuolemansyyn-selvittaminen/oikeuslaaketieteellinen-ruumiinavaus>>. Luettu 5.9.2021.
- 3 Grainger, Marjut; Eklin, Aki; Kauppila, Riitta; Partonen, Timo; Suvisaari, Jaana & Virtanen, Antti. 2020. Itsemurhakuolemat Suomessa 2016–2018. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. < [https://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/139029/RAP2020\\_3\\_Itsemurhakuolemat%20Suomessa%202016-2018\\_sa\\_.pdf](https://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/139029/RAP2020_3_Itsemurhakuolemat%20Suomessa%202016-2018_sa_.pdf) >. Luettu 5.9.2021.
- 4 Elliot, Henry L., MacFadyen, Robert J. & Meredith, Peter A., 2012. Enalapril Clinical Pharmacokinetics and Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships. Verkkoaineisto. Springer Link. < <https://link.springer.com/article/10.2165%2F00003088-199325040-00003>>. Luettu 8.10.2021.
- 5 Koulu; Markku (toim.) & Toimisto; Jouko (toim.). 2007. Farmakologia ja toksikologia. 7., uudistettu painos. Jyväskylä: Guimmerus Kirjapaino Oy.
- 6 Bjålie Jan G.; Haug, Egil; Sand, Olav; Sjaastad Oystein V. & Toverud, Kari C., 2015. Ihmisen fysiologia ja anatomia. 8.–12. painos. Helsinki: Sanoma Pro.
- 7 Malmioja Kalle; Peura, Lauri & Rautio, Jarkko. 2011 Aihiolääketeknologia lääkekehityksessä. Verkkoaineisto. Aikakausikirja Duodecim. < <https://www.duodecimlehti.fi/duo99343>>. Luettu 5.9.2021.
- 8 Karaman, Rafik. 2014. Prodrugs design based on inter- and intramolecular processes. Verkkoaineisto. Research Gate. <DOI:10.13140/2.1.2853.9208>. Luettu 3.9.2021.
- 9 Niiranen, Jukka & Jaarinen, Soili. 2005. Laboratorion analyysitekniikka.5–6. painos. Helsinki: Edita Prima Oy
- 10 Gemini HPLC Information. Verkkoaineisto. Phenomenex. < <https://www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/Gemini/NX-C18>>. Luettu 1.12 2021.
- 11 Danilo Corradini; Corradini, Danilo; Goddard IWilliam A. & Phillips, Terry M. 2010. Handbook of HPLC. E-kirja. Hoboken CRC Press.

- 12 Alvarsson, Jonathan; Arvidsson, Staffan; Berg, Arvid; Lampa, Samuel; Lappins, Maris; Schaal, Wesley & Spjutha, Ola. 2018. A confidence predictor for logD using conformal regression and a support-vector machine. Verkkoaineisto. <DOI:10.1186/s13321-018-0271-1>. Luettu 15.12.2021.
- 13 Albóniga, Oihane Elena; Alonso, María Luz; Alonso Rosa María; Encarnación Blanco, María; González, Oskar & Uribe, Beatriz. 2019. Analysis of the Heterogeneous Distribution of Amiloride and Propranolol in Dried Blood Spot by UHPLC-FLD and MALDI-IMS. Verkkoaineisto. <DOI:10.3390/molecules24234320>. Luettu 15.12.2021.
- 14 Ketola, Raimo (toim.); Kostianen, Risto (toim.); Kotiaho, Tapio (toim.) & Vainiotalo, Pirjo (toim.). 2012. Massaspektrometrian perusteet. Helsinki: Hakapaino
- 15 Niiranen, Jukka. 2021. Yhdistelmätekniikat ja menetelmänkehitys 1. luentomoniste. Metropolia Ammattikorkeakoulu.
- 16 Parsain, Jeevan K., 2012. Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles. E-kirja. IntechOpen.
- 17 Sample Preparation fundamentals for chromatography. Verkkoaineisto. Agilent. <[https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5991-3326EN\\_SPHB.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5991-3326EN_SPHB.pdf)>. Luettu 1.10.2021.
- 18 Baselt, Randall. 2020. Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 12th ed. California: Biomedical Publication.
- 19 Kriikku, Pirkko. 2021. Oikeuskemisti, Terveysten ja hyvinvoinnin laitos, Helsinki. Keskustelu 16.12.2021.
- 20 Linnet, Kristian; Lund-Hansen, Stine; Klose-Nielsen, Marie-Kristine & Schou-Rasmussen, Brian. 2021. Simple implementation of muscle tissue into routine workflow of blood analysis in forensic cases – A validated method for quantification of 29 drugs in postmortem blood and muscle samples by UHPLC–MS/MS. Verkkoaineisto. Journal of Forensic Science International. Vol. 325. <<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110901>>. Luettu 11.9.2021.
- 21 Ketola, Raimo & Kriikku, Pirkko. 2019. Drug concentrations in post-mortem specimens. Verkkoaineisto. <<https://doi.org/10.1002/dta.2662>>. Luettu 16.12.2021.
- 22 Principals of various protein precipitation methods. Verkkoaineisto. Bioquochem Redox Technologies. <<https://bioquochem.com/principals-of-various-protein-precipitation-methods/>>. Luettu 11.9.2021.
- 23 Chavez-Eng, C.M; Constanzer, M.L & Matuzewski, B.K. 2003. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. Verkkoaineisto. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12964746/>>. Luettu 10.10.2021.

- 24 Ruismäki, Mia. 2021. Analyysilaadun varmistus ja laitteiden ylläpito. Mitäusepävarmuuden arviointi Nordtestin oppaan mukaisesti -luentomoniste. Metropolia Ammattikorkeakoulu.
- 25 Boyd-Barr, Dana; Chen, Xianyu; Cohen, Jordan R.; D'Souza, Priya; Hunter, Ronald E. Jr.; Kartavenka, Kostya; Marder, Elizabeth M.; Panuwet, Parinya; Radford, Samantha & Rayan; Barry. 2016. Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring. Verkkoaineisto. <doi: 10.1080/10408347.2014.980775>. Luettu 1.11.2021.
- 26 Dams, Riet; Morphy, Constance; Huestis, Marilyn & Lambert Willy. 2003. Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. Verkkoaineisto. <DOI: 10.1016/S1044-0305(03)00574-9>. Luettu 1.11.2021.
- 27 Karhu, Matti, 2021. Senior Technical Consult, Phenomenex. Turku. Sähköposti 29.11.2021.
- 28 Strata-X Polymeric SPE Information. Verkkoaineisto. Phenomenex. <<https://www.phenomenex.com/Products/SPDetail/Strata-X>>. Luettu 3.12.2021.
- 29 Solid Phase Extraction Products. Verkkoaineisto. Sigma Aldrich. <<https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/glglob/documents/284/485/solid-phase-extraction-products-brochure-br3075en-mk.pdf>>. Luettu 3.12.2021.
- 30 Ostro Protein Precipitation & Phospholipid Removal Plate. Verkkoaineisto. Waters. <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/186005518-ostro-protein-precipitation--phospholipid-removal-plate-25-mg-1-.html>>. Luettu 3.12.2021.
- 31 Järveläinen, Mika. 2021. Laitteasantuntija, VWR International Oy. Helsinki. Sähköposti 10.12.2021.
- 32 Ketola, Raimo & Ojanpää, Ilkka. 2019. Summary statistics for drug concentrations in post-mortem femoral blood representing all causes of death. Verkkoaineisto. Wiley Analytical Science Journal. <<https://doi.org/10.1002/dta.2655>>. Luettu 22.9.2021.
- 33 Kriikku, Pirkko; Ojanperä, Olli & Vuori, Erkki. 2016. Fatal toxicity index of medicinal drugs based on a comprehensive toxicology database. Verkkoaineisto. International Journal of Legal Medicine. <DOI:10.1007/s00414-016-1358-8>. Luettu 24.9.2021.
- 34 Validointiohje TO-008. Yrityksen sisäinen dokumentti. Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitos.
- 35 Adel, Ayman; Alam, Mahmood; Admour, Isra; Astigarraga, Rafael; De Nucci, Gilberto; Dham, Ruwayda; Dhum, Qumaruzaman; Idkaibek, Nasir

- &Najib, Najj. 2003. Bioequivalence Evaluation of Two Brands of Enalapril 20 mg Tablets (Narapril and Renitec) in Healthy Human Volunteers. Verkkoaineisto. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14520685/>>. Luettu 20.9.2021.
- 36 Al-Nasan, A; Arafat, T; Awad, R, Azzam, R, Hamad, M; Jehanli, A & Matalka, K. 2005. Pharmacokinetics and pharmacodynamics profiles of enalapril maleate in healthy volunteers following determination of enalapril and enalaprilat by two specific enzyme immunoassays. Verkkoaineisto. < DOI: 10.1111/j.1365-2710.2005.00646.x>. Luettu 5.10.2021.
- 37 Ruismäki, Mia. 2021. Analyysilaadun varmistus ja laitteiden ylläpito. Analyysimenetelmän validointi -luentomoniste. Metropolia Ammattikorkeakoulu.
- 38 Kemiällisen analyysimenetelmän validointiohje. 1997. Helsinki: Elintarvikevirasto.
- 39 PubChem. Verkkoaineisto. National Library of Medicine. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Luettu 16.12.2021.
- 40 Chemical Book. Verkkoaineisto. <[https://www.chemical-book.com/ProductIndex\\_EN.aspx](https://www.chemical-book.com/ProductIndex_EN.aspx)>. Luettu 16.12.2021.
- 41 Charde, S; Japal, A; Kumar, A; Malik, R & Pandey, M. 2013. Verkkoaineisto. Determination of pK(a) of felodipine using UV-Visible spectroscopy. <DOI:10.1016/j.saa.2013.07.001>. Luettu 16.12.2021.

## Määrittymenetelmän analyytit

Taulukko 1. Määrittymenetelmän analyytit [39; 40; 41].

nro	Analyytti	pKa1	pKa2	logP
1	Olmesartaani	0,91	4,96	0,73
2	EXP-3174	1		3,92
3	Dabigatraani	1,82	3,18	-2,4
4	Enalapriilaatti	2,3	3,13	-0,74
5	Kandesartaani	2,45	6,7	6,1
6	Isradipiini	2,56		4,28
7	Nisoldipiini	2,67		3,26
8	Kinapriili	2,8		0,86
9	Enalapriili	3	5,4	0,007
10	Eprosartaani	3,11	3,76	3,9
11	Perindropiili	3,15		2,6
12	Kaptopriili	3,7	9,8	0,34
13	Ramipriili	3,74	5,15	2,9
14	Furosemidi	3,8	7,5	2,03
15	Telmisartaani	3,86		7,7
16	Nifedipiini	3,9		2,2
17	Irbesartaani	4,08	4,29	4,5
18	Valsartaani	4,73		5,8
19	Flodipiini	5,07		3,86
20	Losartaani	5,5		1,2
21	Pratsosiini	6,54		1,3
22	Amiodaroni	6,56		7,2
23	Moksonidiini	7,11		0,9

24	Klonidiini	8,05		1,59
25	Nebivololi	8,13		4,04
26	Kinidiini	8,56		3,44
27	Trikloorimetiartsidi	8,6		0,62
28	Amiloridi	8,7		-0,3
29	Indapamidi	8,8		2,2
30	Propafenoni	8,91		3,2
31	Labetaloli	9,3		3,09
32	Amlodipiini	9,4		3
33	Esmololi	9,5		1,7
34	Atenololi	9,6		0,16
35	Lerkadipiini	9,63		6,4
36	Dabigartaanieteksi- laatti	9,88		3,9
37	Nilvadipiini	12		2,97
38	Spironolaktoni	neutr.		2,78
39	Eplerenoni	neutr.		1,3

## Nestekromatografian ajo-olosuhteet

Nestekromatografian ajo-olosuhteet:

Taulukko 1. Tasapainotusajon olosuhteet.

Minimum pressure	0 psi
Maximum pressure	3800 psi
Compressibility	50
Dead volume	40
Stroke volume	-1
Maximum pressureramp	100 psi/sec
Maksimum flow ramp	290 ml/min <sup>2</sup>
Time	7 min

Taulukko 2. Ajo-olosuhteet.

Injection volume	20 µl
Draw speed	200 µl/min
Eject speed	200 µl/min
Washtime	30 sec
Total time	28 min

Taulukko 3. Gradienttija.

	Tota ltime (min)	Flow rate (µl/min)	B (%)	A (%)
2	4	300	35	65
3	12,5	300	50	50
4	22	300	95	5
5	26	300	95	5
6	28	300	15	85



## **Liuokset**

Ammoniumasetaattipuskuri: 3850 mg ammoniumasetaattia 5000 ml mittapulloon ja 5 ml muurahaishappoa. Täytetään ultrapuhtaalla vedellä merkkiin asti.

Metanoliajoliuos: 5 ml muurahaishappoa 5000 ml mittapulloon. Täytetään metanolilla merkkiin asti.

Enalapriilaatti kantaliuos 1000 mg/l: 0,5–1,0 mg enalapriilaattia. Pipetoidaan sama määrä metanolia (ml).

Ammoniumasetaattipuskuri+ 7 % MeOH: 70 ml ammoniumasetaattipuskuria + 5 ml metanoli

## Massa-analysaattorin olosuhteet

Massa-analysaattorin olosuhteet:

Taulukko 1. Sciex 4000Qtrap massa-analysaattorin olosuhteet.

<b>Optimoidut parametrit</b>	<b>Valitut asetukset</b>
Entrance Potential	10
Decluster Potential	90
Collision Energy	30
Cell Exit Potential	15

## Tarkkuusnäytteiden tulokset

Taulukko 1. Oikeellisuusnäytteiden tulokset ja poikkeama odotetusta arvosta.

Näyte	1.pitoisuustaso [mg/l]	Näyte	2. pitoisuustaso [mg/l]
QC1-1	0,00265	QC2-1	0,21839
QC1-2	0,00206	QC2-2	0,20231
QC1-3	0,0026	QC2-3	0,21574
QC1-4	0,00234	QC2-4	0,21455
QC1-5	0,00201	QC2-5	0,22261
QC1-6	0,00266	QC2-6	0,21759
QC1-7	0,00165	QC2-7	0,16522
QC1-8	0,0018	QC2-8	0,17375
QC1-9	0,00219	QC2-9	0,15815
QC1-10	0,00186	QC2-10	0,18594
QC1-11	0,00212	QC2-11	0,1739
QC1-12	0,00121	QC2-12	0,16984
QC1-13	0,00136	QC2-13	0,18246
QC1-14	0,00194	QC2-14	0,19187
QC1-15	0,00201	QC2-15	0,17687
QC1-16	0,00162	QC2-16	0,18384
QC1-17	0,00259	QC2-17	0,16167
QC1-18	0,00194	QC2-18	0,17465
Bias %	1,7	Bias-%	5,9

Taulukko 2. Toistettavuusnäytteiden rinnakkaismääritykset ja laskennallinen RSD-%.

Ajosarjan rinnakkaismääritykset	1. pitoisuustaso [mg/l]
---------------------------------	-------------------------

1	0,00265
2	0,00206
3	0,00260
4	0,00234
5	0,00201
6	0,00266
RSD-%	12,43409
Ajosarjan rinnakkaismääritykset	1. pitoisuustaso [mg/l]
7	0,00165
8	0,00180
9	0,00219
10	0,00186
11	0,00212
12	0,00121
RSD-%	19,64300
Ajosarjan rinnakkaismääritykset	1. pitoisuustaso [mg/l]
13	0,00136
13	0,00194
13	0,00201
13	0,00162
13	0,00259
13	0,00194
RSD-%	21,72365
Ajosarjan rinnakkaismääritykset	2. pitoisuustaso [mg/l]
QC2-1	0,218
QC2-2	0,202
QC2-3	0,216
QC2-4	0,215

QC2-5	0,223
QC2-6	0,218
RSD%	3,204
Ajosarjan rinnakkaismääritykset	2. pitoisuustaso [mg/l]
QC2-7	0,165
QC2-8	0,174
QC2-9	0,158
QC2-10	0,186
QC2-11	0,174
QC2-12	0,170
RSD%	5,475
Ajosarjan rinnakkaismääritykset	2. pitoisuustaso [mg/l]
QC2-13	0,182
QC2-14	0,192
QC2-15	0,177
QC2-16	0,184
QC2-17	0,162
QC2-18	0,175
RSD-%	5,731

Kahden otoksen t-testi olettaen varianssit yhtäsuuriksi Pitoisuustasolla 0,002 mg/l		
	<i>Henkilö 1</i>	<i>Henkilö 2</i>
Keskiarvo	0,002386667	0,00205
Varianssi	8,80667E-08	7,4E-08
Havainnot	6	6
Yhdistetty varianssi	8,09017E-08	
Arvioitu keskiarvojen ero	0	
va	10	
t Tunnusluvut	2,039983713	
P(T<=t) yksisuuntainen	0,034324612	
t-kriittinen yksisuuntainen	1,812461123	
P(T<=t) kaksisuuntainen	0,068649224	
t-kriittinen kaksisuuntainen	2,228138852	
Kahden otoksen t-testi olettaen varianssit yhtäsuuriksi Pitoisuustasolla 0,2 mg/l		
	<i>Henkilö 1</i>	<i>Henkilö 2</i>
Keskiarvo	0,215198333	0,20289
Varianssi	4,75325E-05	7,8E-05
Havainnot	6	6
Yhdistetty varianssi	6,2963E-05	
Arvioitu keskiarvojen ero	0	
va	10	
t Tunnusluvut	2,687779789	
P(T<=t) yksisuuntainen	0,011393188	
t-kriittinen yksisuuntainen	1,812461123	
P(T<=t) kaksisuuntainen	0,022786377	
t-kriittinen kaksisuuntainen	2,228138852	

Kuva 1. Uusittavuusnäytteiden t-testit.

## Saantoprosentit

Taulukko 1. Enalapriilaatin pitoisuus ennen uuttoa ja uuton jälkeen.

Ennen uuttoa	Pitoisuus [mg/l]	Area ratio	Uuton jälkeen	Pitoisuus [mg/l]	Area ratio
QC2-1	0,22	3,61	R1	0,18	3,34
QC2-2	0,20	3,35	R2	0,17	3,32
QC2-3	0,22	3,57	R3	0,18	3,60
QC2-7	0,17	3,37	R7	0,16	3,00
QC2-8	0,17	3,54	R8	0,16	2,90
QC2-9	0,16	3,23	R9	0,18	2,91
QC2-13	0,18	3,65	R10	0,17	3,17
QC2-14	0,19	3,84	R11	0,18	3,42
QC2-15	0,18	3,54	R12	0,18	3,48

Taulukko 2. Saantoprosentit rinnakkaismäärityksellä.

Recovery-%	Recovery % (Area ratio)
120,7	108,3
115,9	101,1
123,3	99,2
101,0	112,2
106,9	122,1
89,5	111,2
110,0	115,3
106,8	112,2

96,7	101,7
Ka	106,9
Ka (Area ratio)	107,6



## Mukit-raportti

## MEASUREMENT UNCERTAINTY ESTIMATION

Step	Action	Enalapriilaatin kvantitatiivinen määrittäminen verinäytteestä	12/12/2021																														
1	Specify Measurand	Measurand: Enalapriilaatin konsentraatio Concentration range: 0.001-1 mg/l Sample Type (Matrix): Post mortem -veri Analysis Principle (Analyzer etc.): LC-MS/MS Sample preparation: Proteiinisaostus																															
2	Quantify within-laboratory reproducibility, $u(R_w)$ A: Control sample B: Possible steps not covered by control sample	<b>A: Control samples</b> Number of control samples: 18 Average concentration: 0.1883 mg/l Standard deviation, $s_{Rw}$ : 11.43 %  <b>B: Routine replicate samples</b> Number of routine replicate series: 10 Number of parallel measurements: 4 Concentration range: 0.07984-0.09968 mg/l  Pooled standard deviation, $s_r$ : 4.59 %  $u(R_w) = \sqrt{s_{Rw}^2 + s_r^2}$ : 12.32 %																															
3	Quantify method and laboratory bias, $u(bias)$	<b>Method and laboratory bias from certified reference material</b> Different certified reference materials count, $N$ : 2 <table border="1"> <thead> <tr> <th>i</th> <th>1</th> <th>2</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Certified concentration, <math>c_{ref i}</math></td> <td>0.2 mg/l</td> <td>0.002 mg/l</td> </tr> <tr> <td>Standard uncertainty of certified concentration, <math>u(c_{ref i})</math></td> <td>0.50 %</td> <td>0.50 %</td> </tr> <tr> <td>Measured concentration, <math>c_i</math></td> <td>0.1883 mg/l</td> <td>0.00203 mg/l</td> </tr> <tr> <td>Standard deviation of measured concentration, <math>s_{bias}</math></td> <td>11.43 %</td> <td>20.94 %</td> </tr> <tr> <td>Number of Measurements, <math>n_i</math></td> <td>18</td> <td>18</td> </tr> <tr> <td><math>bias_i = \frac{c_i - c_{ref i}}{c_{ref i}} \cdot 100\%</math></td> <td>-5.85 %</td> <td>1.50 %</td> </tr> <tr> <td>Period of measurements</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Sample Type (Matrix)</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Additional information</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> $u(c_{ref}) = \frac{\sum_{i=1}^N u(c_{ref i})}{N}$ : 0.50 % $RMS_{bias} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N bias_i^2}{N}}$ : 4.27 % $u(bias) = \sqrt{RMS_{bias}^2 + u(c_{ref})^2}$ : 4.30 %	i	1	2	Certified concentration, $c_{ref i}$	0.2 mg/l	0.002 mg/l	Standard uncertainty of certified concentration, $u(c_{ref i})$	0.50 %	0.50 %	Measured concentration, $c_i$	0.1883 mg/l	0.00203 mg/l	Standard deviation of measured concentration, $s_{bias}$	11.43 %	20.94 %	Number of Measurements, $n_i$	18	18	$bias_i = \frac{c_i - c_{ref i}}{c_{ref i}} \cdot 100\%$	-5.85 %	1.50 %	Period of measurements			Sample Type (Matrix)			Additional information			
i	1	2																															
Certified concentration, $c_{ref i}$	0.2 mg/l	0.002 mg/l																															
Standard uncertainty of certified concentration, $u(c_{ref i})$	0.50 %	0.50 %																															
Measured concentration, $c_i$	0.1883 mg/l	0.00203 mg/l																															
Standard deviation of measured concentration, $s_{bias}$	11.43 %	20.94 %																															
Number of Measurements, $n_i$	18	18																															
$bias_i = \frac{c_i - c_{ref i}}{c_{ref i}} \cdot 100\%$	-5.85 %	1.50 %																															
Period of measurements																																	
Sample Type (Matrix)																																	
Additional information																																	
4	Convert components to standard uncertainty	$u(R_w) = 12.32$ % $u(bias) = 4.30$ %																															
5	Calculate combined standard uncertainty, $u_c$	$u_c = \sqrt{u(R_w)^2 + u(bias)^2} = 13.05$ %																															
6	Calculate expanded uncertainty, $U$	$U = 2 \cdot u_c = 27$ %																															

Kuva 1. Mittausepävarmuuden arviointi mukit-ohjelmalla.

12/12/2021

**Summary of the method's measurement uncertainties****Method information**

Method name	Enalapriilaatin kvantitatiivinen määrittäminen verinäytteestä
Measurand	Enalapriilaatin konsentraatio
Sample Type (Matrix)	Post mortem -veri
Analysis Principle (Analyzer etc.)	LC-MS/MS
Sample preparation	Proteiinisaostus

**Calculated Uncertainties at Different Measurand Levels**

Concentration range (mg/l)	Within-lab Reproducibility Data	u (Rw)	Bias Data	u (bias)	Combined standard uncertainty	Expanded uncertainty
0.001-1	Control sample and routine sample replicates	12.32 %	Certified reference material / Control Sample	4.30 %	13.05 %	27 %

Kuva 2. Laajennettu mittausepävarmuus.

## Mittausepävarmuustulokset yrityksen ohjeen mukaan

Taulukko 1. Lähtöarvot mittausepävarmuuden laskentaan.

	Lähtöarvot
Oikeellisuus bias-%	5,9
Standardilisäys bias-%	7,2
Toistettavuus RSD-%	11,43
toistettavuus ja uusittavuus RSD-%	10,44
Matriisiefektin RSD-%	1,52

Taulukko 2. Mittausepävarmuus lähtöarvojen perusteella.

Suure	Tulos
Systemaattinen virhe (U1)	6,5
Satunnaisvirhe (U2)	7,8
Mittausepävarmuus (U)	10,2
Laajennettu mittausepävarmuus (2*U)	20

## Matriisivaikutuksen varianssianalyysi

Anova: yksisuuntainen						
YHTEENVETO						
<i>Ryhmät</i>	<i>Lukumäärä</i>	<i>Summa</i>	<i>Keskiarvo</i>	<i>Varianssi</i>		
N1	4	0,38164	0,09541	5,06E-05		
N2	4	0,37581	0,093953	1,34E-05		
N3	4	0,38724	0,09681	1,98E-05		
N4	4	0,3987	0,099675	2,99E-06		
N5	4	0,39101	0,097753	1,14E-05		
N6	4	0,31935	0,079838	8,5E-06		
N7	4	0,38696	0,09674	2,3E-05		
N8	4	0,39243	0,098108	2,19E-05		
N9	4	0,34948	0,08737	1,32E-05		
N10	4	0,32842	0,082105	1,75E-05		
ANOVA						
<i>Vaihtelun lähde</i>	<i>NS</i>	<i>va</i>	<i>KN</i>	<i>F</i>	<i>P-arvo</i>	<i>F-kriittinen</i>
Luokkien välissä	0,00180638	9	0,000201	11,01119	2,4E-07	2,210696983
Ryhmissä	0,000546832	30	1,82E-05			
<b>Yhteensä</b>	<b>0,002353212</b>	<b>39</b>				
Ryhmissä/Luokkien välissä=	3,30					

Kuva 1. Matriisivaikutuksen rinnakkaismääritysten avulla laadittu varianssianalyysi.