

Ulla Jauhiainen

Kaasukromatografisen veren alkoholipitoisuuden määrittämissä menetelmän kehittäminen ja validointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

2.12.2017

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Ulla Jauhiainen Veren alkoholipitoisuuden määrittämenetelmän kehittäminen ja validointi 31 sivua + 5 liitettä 2.12.2017
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat	Oikeuskemisti Kirsi Muuriaisniemi-Skippari Lehtori Mia Ruismäki
<p>Tämä opinnäytetyö tehtiin Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) Oikeustoksikologiayksikön Tilkanmäen toimipisteelle. Tavoitteena oli kehittää veren alkoholipitoisuusmäärittämissä käytettävää HS-GC-FID-menetelmää, validoida uusi laite kehitetylle menetelmälle sekä päivittää etanolistandardien hälytys- ja toimintarajat. Validoitava laite oli PerkinElmer-kaasukromatografi yhdistettynä PerkinElmer-headspace-näytteensyöttäjään.</p> <p>Menetelmää kehitettiin ottamalla sisäisenä standardina käyttöön n-propanoli aiemmin käytetyn tertiäärin butanolin sijaan, koska tertiääristä butanolia esiintyy toisinaan verinäytteissä. Lisäksi määrityksessä käytettävän kaasukromatografian ajo-ohjelma muokattiin n-propanolille paremmin soveltuvaksi. Tämän jälkeen tehtiin laaja validointi, joka kattoi uuden laitteen, sisäisen standardin, ajo-ohjelman, näytematriisit (veri, virtsa, seerumi ja vesi) sekä analyytit: kvantitatiivisesti määritettävät etanolin ja denaturointiaineet (metanoli, asetonin, isopropanolin, tertiäärinen butanoli, metyylietyyliketoni ja 2-butanoli) sekä kolme kvalitatiivisesti määritettävää analyyytiä (n-butanoli, tolueni ja isobutyylimetyyliketoni). Validoinnin yhteydessä tehtiin myös kolonnivertailu, jossa samoja näytteitä määritettiin sekä uudella että kahdella käytössä olevalla laitteella ja tuloksia verrattiin tilastollisesti toisiinsa.</p> <p>Validointi onnistui odotetusti ja täytti menetelmälle asetetut vaatimukset. Kolonnivertailu osoitti, että validoitavan laitteen antamat tulokset vastasivat samoista näytteistä muilla laitteilla määritettyjä tuloksia. Virtsan tulosten hajonta oli muita matriiseja suurempi, mutta odotettavaa ja hyväksyttävällä tasolla. Tulokset todettiin toistettaviksi ja luotettaviksi, ja uutta menetelmää ja laitetta käytetään jatkossa etanolin ja denaturointiaineiden kvantitatiiviseen määrittämiseen verestä, virtsasta ja seerumista.</p>	
Avainsanat	headspace, HS, kaasukromatografia, GC, veren alkoholipitoisuus, etanoli

Author Title	Ulla Jauhiainen The Development and Validation of the HS-GC-FID Method for Alcohol Quantification in Blood
Number of Pages Date	31 pages + 5 appendices 2 December 2017
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Kirsi Muuriaisniemi-Skippari, Forensic Toxicologist Mia Ruismäki, Senior Lecturer
<p>This work was carried out at the National Institute for Health and Welfare in the Tilkanmäki Forensic Toxicology Unit in Helsinki. The objective of the work was to further develop the HS-GC-FID method used for quantification of blood alcohol and to validate the new method for a new PerkinElmer gas chromatograph combined to a PerkinElmer headspace sampler. In addition, the warning and control limits for commercial ethanol standard solutions used for calibration were also revised.</p> <p>The method was developed by replacing tertiary butanol with n-propanol as an internal standard, because small concentrations of tertiary butanol are occasionally discovered in blood samples. The temperature programme of the gas chromatograph was also modified to obtain higher resolution for n-propanol and the analytes.</p> <p>The new method was used for the validation of the new instrument. The validation also covered ethanol and six other quantitative analytes (denaturants methanol, acetone, isopropanol, tertiary butanol, methyl ethyl ketone and 2-butanol) and three qualitative analytes (n-butanol, toluene and isobutyl methyl ketone) as well as blood, urine, serum and water as sample matrices. The performance of the new instrument was evaluated by measuring 30 blood, urine and serum samples using the new instrument as well as two instruments which are currently in use. The data were analysed statistically.</p> <p>The validation was carried out successfully and the requirements were met. Statistical analysis of the performance data confirmed that results obtained by the new instrument are reliable. The variance of ethanol concentration in urine samples was high, yet acceptable. Based on the results, the new instrument was assessed to be accurate and approvable for determining ethanol and denaturant concentrations in blood, urine and serum samples and it will be used for routine analysis.</p>	
Keywords	headspace, HS, gas chromatography, GC, blood alcohol concentration, ethanol

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Veren alkoholipitoisuuden määrittäminen	2
2.1	Tarkkuusalkometri	3
2.2	Verinäyte	4
3	Analyytit	4
4	HS-GC-FID-analyysitekniikka	6
4.1	Kaasukromatografi	6
4.2	FID-detektori	7
4.3	<i>Headspace</i> -näytteensyöttötekniikka	7
4.3.1	Staattinen <i>headspace</i>	8
4.3.2	Matriisiefektin pienentäminen	10
4.3.3	Tasapainotus	12
4.3.4	Injektointitekniikat	12
4.4	Sisäinen standardi	15
5	Laitteet ja reagenssit	16
5.1	Laitteet, reagenssit ja näytematriisit	16
5.2	Liuosten valmistaminen	17
6	Työn toteutus ja tulokset	18
6.1	Menetelmän kehittäminen	18
6.2	Validointi	21
6.2.1	Selektiivisyys	22
6.2.2	Lineaarisuus ja herkkyys	25
6.2.3	Toteamis- ja määritysrajat	25
6.2.4	Oikeellisuus	26
6.2.5	Toistotarkkuus	26
6.2.6	Mittausepävarmuus	27
6.3	Kolonnivertailu	27
6.4	Etanolistandardien hälytys- ja toimintarajat	28
6.5	Johtopäätökset	29

Liitteet

Liite 1. Liuosten valmistaminen

Liite 2. Menetelmän kehittäminen

Liite 3. Validointi

Liite 4. Kolonnivertailu

Liite 5. Hälytys- ja toimintarajat

Lyhenteet

BAC	<i>Blood Alcohol Concentration</i> , veren alkoholipitoisuus. BAC1 ja BAC2 ovat veren alkoholipitoisuuden määrittämistä varten kehitettyjä kolonneja.
EC	<i>Electrochemical</i> , sähkökemiallinen.
FET	<i>Full Evaporation Technique</i> . <i>Headspace</i> -tekniikka, jossa näyte höyrystyy täydellisesti kaasufaasiin.
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> , liekki-ionisaatiodektoni. Ionisoivaan liekkiin perustuva dektoni.
GC	<i>Gas chromatography</i> , kaasukromatografia. Höyrystyvien analyttien kromatografinen erottelutekniikka, joka perustuu kiehumispisteisiin ja tasapainovakioihin stationääri- ja liikkuvan faasin välillä.
HS	<i>Headspace</i> . Kaasukromatografiassa käytettävä näytteensyöttötekniikka.
IBMK	Isobutyylimetyyliketoni, IUPAC-nimi 4-metyyli-2-pentanoni.
INCA	<i>Inside Needle Capillary Adsorption Trap</i> . HS-injektointitekniikka, jossa näyte fokusoidaan adsorboivaan loukkuun ennen injektoriin injektointia.
IR	<i>Infrared Radiation</i> , infrapunasäteily. Elektromagneettisen säteilyn aallonpituusalue 0,700–1000 µm.
ISTD	<i>Internal standard</i> , sisäinen standardi. Analyytin kaltainen yhdiste, joka lisätään näytteisiin luotettavan kvantitoinnin varmistamiseksi.
IUPAC	<i>The International Union of Pure and Applied Chemistry</i> . Kansainvälinen kemian alan järjestö, joka määrittelee standardeja alan käyttöön.
MEK	Metyylietyyliketoni, IUPAC-nimi 2-butanoni.
MHE	<i>Multiple Headspace Extraction</i> . Useaan injektointiin perustuva <i>headspace</i> -tekniikka.

OIML R 126:2012

Kansainvälisen lakisääteisen metrologian järjestön (OIML, *International Organization of Legal Metrology*) suositus tarkkuusalkometrien toiminnasta.

SFS-EN ISO/IEC 17025:2005

Akkreditoitujen testauslaboratorioiden noudattama laatustandardi.

SPME *Solid Phase Micro Extraction*, kiinteäfaasi-mikrouutto.

THL Terveyden ja hyvinvoinnin laitos.

TVT *Total Evaporation Technique*. HS-tekniikka, jossa koko analyttimäärä ja liuotin höyrystyy kaasufaasiin.

1 Johdanto

Tämä opinnäytetyö toteutettiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) Oikeustoksikologiayksikön Tilkanmäen toimipisteelle. Laboratorio muun muassa kehittää päihdetestauksen käytäntöjä ja menetelmiä sekä tuottaa oikeustoksikologiaa ja päihdetestaukseen liittyviä laboratoriotutkimuksia päihde- ja terveydenhuoltosektorille, työterveyshuollolle sekä poliisi- ja oikeusviranomaisille. Yksikössä tehtävät veren alkoholimääritykset liittyvät pääasiassa liikennejuopumusepäilyihin. Määritysten tuloksia voidaankin käsitellä oikeudenkäynneissä, mikä asettaa tarkat vaatimukset analyysin laadunvarmistukselle. Laboratorio on akkreditoitu ja noudattaa laatustandardia SFS-EN ISO/IEC 17025:2005. [1; 2.]

Alkoholien analyysimenetelmä perustuu kaasukromatografiaan, ja sillä voidaan etanolin lisäksi kvantitoida kuusi muuta alkoholia ja ketonia sekä määrittää kvalitatiivisesti kolme yhdistettä. Tapausnäytteiden rinnakkaismääritykset on tähän saakka tehty BAC1-kolonnilla käyttäen sisäisenä standardina n-propanolia sekä BAC2-kolonnilla käyttäen sisäisenä standardina tertiääristä butanolia. Koska tertiääristä butanolia esiintyy toisinaan näytteissä, myös BAC2-kolonnilla haluttiin siirtyä n-propanoliin, mikä vähentää analyysien uusintatarvetta. Työn tavoitteena olikin optimoida määrityksessä käytettävän menetelmän ajo-ohjelma käytettäessä sisäisenä standardina n-propanolia sekä tehdä laaja validointi, joka kattaa uuden laitteen käyttöönoton, sisäisen standardin, ajo-ohjelman sekä määritettävät analyytit ja näytematriisit. Validoinnin yhteydessä uuden laitteen antamia tuloksia arvioitiin tilastollisesti kolonnivertailun avulla ja määrityksissä käytettävien kaupallisten etanolistandardien toiminta- ja hälytysrajat päivitettiin. Validoinnista kirjoitettiin validointiraportti, joka on osana tätä opinnäytetyötä lukuun ottamatta laboratorion omaan käyttöön rajattuja tuloksia.

2 Veren alkoholipitoisuuden määrittäminen

Suomessa veren alkoholipitoisuus voidaan määrittää oikeustoimikelpoisesti joko hengitysilmasta tarkkuusalkometrillä tai kokoverestä HS-GC-FID-tekniikalla. Rikoslaki säätelee liikennejuopumusrajat, ja mittausalueen on katettava pitoisuusalue, jolla veren alkoholipitoisuus voi olla.

Rikoslain (19.8.1889/39) luvussa 23 (30.4.1999/545) säädetään liikennerikoksista ja pykälissä 23:3-9 liikennejuopumuksista. Rattijuopumuksen sekä ilma- ja junaliikennejuopumuksen raja on 0,5 ‰ alkoholia veressä tai 0,22 mg/l alkoholia uloshengitysilmassa. Törkeän rattijuopumuksen raja on 1,2 ‰ alkoholia veressä tai 0,53 mg/l alkoholia uloshengitysilmassa. Vesiliikenteessä juopumusrajat ovat vesiliikenteen ammattilaisille rattijuopumusta vastaavat ja muille 1,0 ‰ veressä tai 0,44 mg/l uloshengitysilmassa. Rattijuopumuksiksi luetaan myös tapaukset, joissa kuljettajan veressä todetaan huumausainetta tai sen aineenvaihduntatuotetta tai kuljettajan kyky tehtävän vaatimiin suorituksiin on huonontunut huumaavan aineen (esimerkiksi lääkeaine) tai huumaavan aineen ja alkoholin vaikutuksesta. [3.]

Veren alkoholipitoisuuden yksikkönä promille voidaan määritellä vastaamaan joko yksikköä g/kg tai g/l, jotka poikkeavat hieman toisistaan veren tiheyden 1,055 g/ml vuoksi [4, s. 355]. Eri valtioilla onkin eri käytäntöjä: Suomessa ja esimerkiksi Ruotsissa, jossa rattijuopumusraja on 0,2 ‰, käytetään yksikköä g/kg. Iso-Britanniassa puolestaan käytetään yksikköä g/l ja rajaksi säädetään 0,8 ‰. [5; 6.]

Suomessa poliisi tarkkailee päihteiden käyttöä tieliikenteessä ja käyttää alkometriä seulontavälineenä. Jos kuljettajaa on syytä epäillä rattijuopumuksesta seulontakokeen perusteella, oikeustoimikelpoinen mittaus tehdään tarkkuusalkometrillä tai tutkittavalta otetaan verinäyte. Verinäyte otetaan esimerkiksi silloin, kun tutkittavaa epäillään huumausaineiden alaisena ajamisesta tai tämä ei kykene puhaltamaan päihtymystilan tai keuhkosairauden vuoksi. [7, s. 25–26; 8, s. 24.]

2.1 Tarkkuusalkometri

Tarkkuusalkometrit toimivat vastaavalla tarkkuudella kuin laboratoriossa käytettävä kaasukromatografinen menetelmä, ja niiden toiminta on määritelty kansainvälisessä suosituksessa OIML R 126:2012. Laitteet huolletaan ja kalibroidaan vuosittain maahantuojalla, minkä jälkeen kolmas osapuoli tarkastaa ne. THL vastaa tarkkuusalkometrien laadunseurannasta. Tarkkuusalkometrejä on käytössä eri puolilla Suomea poliisi- ja rajavartiolaitosilla sekä poliisiautoissa ja -veneissä. Laitteita ei kuitenkaan käytetä seurantatarkoitukseen. [7, s. 25; 8, s. 17–19.]

Dräger-tarkkuusalkometrien toiminta perustuu infrapuna- (IR) ja sähkökemiallisen tekniikan (EC) rinnakkaiskäyttöön, jolloin menetelmä on spesifi etanolille. Infrapunatekniikka mittaa etanolin absorboiman IR-säteilyn määrää aallonpituudella 9,5 μm , jolla hiilen ja hapen välinen sidos (-C-O) absorboi energiaa ja venyy [9]. Sähkökemiallinen menetelmä perustuu etanolin hapettamiseen asetaldehydiksi, jolloin syntyy vapaita elektroneja; mitatun elektronivirran voimakkuus on suoraan verrannollinen etanolin pitoisuuteen. [4, s. 347–348.] Tarkkuusalkometri erottaa etanolin riittävällä tarkkuudella muista samankaltaisista yhdisteistä, kuten asetonista, metanolista ja isopropanolista, ja laitteen toiminta varmistetaan etanolia sisältävällä kaasulla jokaisen mittauksen yhteydessä. [8, s. 18.]

Liikennejuopumusepäilytapauksissa tehdään kaksi erillistä mittausta: Yksittäisessä mittauksessa IR- ja EC-tulosten tulee olla yhteneviä, sillä EC-tekniikka vahvistaa IR-tuloksen. Vastaavasti rinnakkaisissa mittauksissa IR-tulokset eivät saa poiketa liikaa toisistaan. Lopullinen mittaustulos lasketaan IR-tulosten keskiarvona, josta tehdään mittausepävarmuuteen perustuva varmuusvähennys. Vähennys takaa, että tulos on 99,9999 % todennäköisyydellä todellista pitoisuutta pienempi. [8, s. 18–21.]

2.2 Verinäyte

Verinäyte otetaan, jos tutkittava kieltäytyy hengitysilmanäytteen antamisesta, puhalluttaminen ei ole mahdollista tai päihtymyksen syyksi epäillään huumausaineita. Tarvittaessa voidaan ottaa myös useita verinäytteitä useiden tuntien välein, jotta veren alkoholipitoisuudelle voidaan tehdä teoreettinen takaisinlaskenta ajoilanteeseen. Takaisinlaskentaa käytetään, jos ajoajankohdan ja näytteenoton välillä on kulunut aikaa tai tutkittava esittää tai saattaa myöhemmin esittää jälkinauttimisväitteen. [8, s. 25–28.]

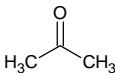

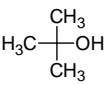
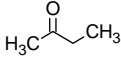
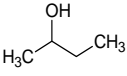
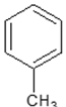
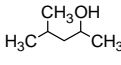
Näytteenotossa on huomioitava, että pistoskohdan ihon puhdistamiseen ei käytetä etanolia [8, s. 27]. Verinäyte kerätään muoviseen 6 ml:n vakuumiputkeen, joka sisältää hyytymisen estämiseksi kaliumoksaattia ($K_2C_2O_4$) sekä säilöntäaineena natriumfluoridia (NaF). Keskusrikospoliisin Rikostekninen laboratorio toimittaa verinäytteet tutkittaviksi THL:n Oikeustoksikologiayksikköön, jossa näytteet kirjataan tietojärjestelmään ja analysoidaan. Tuloksista annetaan analyysivastaus tai lausunto.

3 Analyytit

Kromatografisella alkoholien määritysmenetelmällä voidaan etanolin lisäksi määrittää kvantitatiivisesti myös denaturointiaineet metanoli, aseton, isopropanoli, tertiäärinen butanoli, metyylietyyliketoni (MEK) ja 2-butanoli. Kvalitatiivisesti määritettäviä yhdisteitä ovat näytteissä toisinaan esiintyvät n-butanoli, tolueeni ja isobutyylimetyyliketoni (IBMK). Denaturointiaineita lisätään tekniseen käyttöön tarkoitettuihin alkoholeihin estämään niiden käyttöä päihtymistarkoituksessa, sillä ne tekevät alkoholista epämiellyttävän makuista ja voivat aiheuttaa esimerkiksi limakalvoärsytystä tai oireita ruoansulatuskanavassa. Yhdisteiden kiehumispisteet ovat hyvin lähellä etanolin kiehumispistettä, jolloin niiden erottaminen tislamalla ei ole mahdollista. Nykyään metanolia ei enää käytetä denaturointiaineena sen myrkyllisyyden vuoksi, mutta sitä esiintyy toisinaan verinäytteissä. Isopropanolia ja asetonia voi esiintyä näytteissä hyvin pieninä pitoisuuksina myös luonnollisina metaboliitteina [4, s. 394]. [10, s. 15–16.]

Kaikki tässä työssä määritettävät analyytit ovat yhdisteitä, joita voi esiintyä määritettävissä verinäytteissä ja jotka voidaan tunnistaa käytettävällä kolonnilla. Yhdisteiden merkittävimmät ominaisuudet *headspace*-näytteenyöttötekniikan ja kaasukromatografian kannalta on koottu taulukkoon 1.

Taulukko 1. Analyyttien ja sisäisen standardin (n-propanoli) ominaisuudet [11; 12].

Yhdiste	Metanoli	Etanoli	Asetoni	Isopropanoli
Rakenne	$\text{H}_3\text{C}-\text{OH}$	$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{OH}$		
IUPAC-nimi	metanoli	Etanoli	asetoni	2-propanoli
CAS-numero	67-56-1	64-17-5	67-64-1	67-63-0
Kemiallinen kaava	CH_4O	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$
M (g/mol)	32,042	46,068	58,079	60,095
Tiheys (g/cm ³)	0,7909	0,7893	0,7902	0,7855
Höyrynpaine, 25 °C (kPa)	16,9	7,87	30,8	6,02
Sulamispiste (°C)	-97,5	-114,14	-94,9	-87,91
Kiehumispiste (°C)	64,5	78,24	56,08	82,21
Jakaantumsvakio K		511		286
Yhdiste	Tertiäärinen butanoli	n-propanoli ISTD	Metyylietyyliketoni (MEK)	2-butanoli
Rakenne		$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$		
IUPAC-nimi	2-metyyli-2-propanoli	1-propanoli	2-butanoni	2-butanoli
CAS-numero	75-65-0	71-23-8	78-93-3	78-92-2
Kemiallinen kaava	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$
M (g/mol)	74,121	60,095	72,106	74,121
Tiheys (g/cm ³)	0,7887	0,8048	0,7999	0,8063
Höyrynpaine, 25 °C (kPa)	5,52	2,76	12,6	2,32
Sulamispiste (°C)	25,81	-124,39	-86,67	-88,44
Kiehumispiste (°C)	82,3	97,04	79,6	99,4
Jakaantumsvakio K			68,8	
Yhdiste	n-butanoli	Tolueeni	Isobutyryli- metyyliketoni (IBMK)	
Rakenne	$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$			
IUPAC-nimi	1-butanoli	metyylibentseeni	4-metyyli-2-pentanoni	
CAS-numero	71-36-3	108-88-3	108-10-1	
Kemiallinen kaava	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$	C_7H_8	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}$	
M (g/mol)	74,121	92,139	100,158	
Tiheys (g/cm ³)	0,8148	0,8623	0,7965	
Höyrynpaine, 25 °C (kPa)	0,86	-	-	
Sulamispiste (°C)	-88,6	-95	-85	
Kiehumispiste (°C)	117,6	110,6	115,7	
Jakaantumsvakio K	238	1,77		

4 HS-GC-FID-analyysitekniikka

Tässä luvussa esitellään työssä käytetyn *headspace*-GC-FID-tekniikan toimintaperiaate sekä *headspace*-näytteensyöttötekniikan teoriaa ja soveltamista veren alkoholipitoisuuden määrittämiseen.

4.1 Kaasukromatografi

Kaasukromatografia (GC) on herkkä analyysimenetelmä, jolla määritetään pääasiassa orgaanisia yhdisteitä. Se soveltuu höyrystyville ja termostabiileille yhdisteille, ja tarvittaessa höyrystymistä voidaan parantaa derivatisoimalla analyyttejä [12, s. 145; 13, s. 183]. Liikkuvana faasina toimii inertti kaasu, kuten helium, ja stationäärifaasina yleensä polymeerineste. Analyyttien erottuminen perustuu niiden tasapainoreaktioihin faasien välillä, jolloin stationäärifaasiin herkästi liukenevilla yhdisteillä on pidempi retentioaika (t_r) kuin niillä, joiden tasapaino on enemmän liikkuvan faasin puolella. Koska erottuminen perustuu höyrynpaineeseen, yhdisteet eluoituvat usein kiehumispistejärjestyksessä, mutta esimerkiksi stationäärifaasin poolisuus voi vaikuttaa retentiojärjestykseen. Kaasukromatografiassa tasapainoreaktioiden määrä on tyypillisesti korkea, ja analyysissä voidaan saavuttaa jopa pohjaluku (N) 100 000. Koska erottuminen on tarkkaa ja piikit ovat kapeita, yhdellä näyteajolla voidaan määrittää jopa kymmeniä yhdisteitä. Kaasukromatografiset menetelmät ovatkin tehokkaita yhdisteiden seulontaan, mutta myös tarkkoja kvantitointiin. [13, s. 140–145, 183, 191.]

Kaasukromatografissa käytetään yleensä automaattista näytteensyöttäjää. Sen kaasu-
tiivis ruisku injektoidaan näytteen kuumaan injektoriin, jossa analyytit höyrystyvät kaasufaasiin. Kantajakaasu ohjataan injektorille poikittaissuunnassa, jolloin vain osa kantajakaasusta ja analyyteistä kulkeutuu kolonniin. Kolonni sijaitsee kolonniuunissa, jonka lämpötila voidaan pitää tasaisena (isoterminen ajo) tai muuttaa ajon aikana (lämpötila-gradientit) retentioaikoihin vaikuttamiseksi. Optimaalinen lämpötila riippuu muun muassa stationäärifaasin lämmönkestosta, analyyttien kiehumispisteistä ja kantajakaasun ominaisuuksista. Yleensä optimaalinen lämpötila on hieman analyytin kiehumispistettä alempi [14, s. 63]. Kantajakaasun painetta kolonnissa säädetään stationäärifaasin paineenkeston, käytettävän kaasun ja liikkuvan faasin halutun nopeuden mukaan; jokaisella kaasulla on analyyttien erottumisen kannalta optimaalinen *van Deemterin* yhtälön mukainen virtausnopeutensa. Analyyttien kulkeutuessa kolonnin läpi ne erottuvat omik-

si vyöhykkeikseen, jotka siirtyvät kolonnin jälkeen detektorille. [13, s. 183–191; 15, s. 557.]

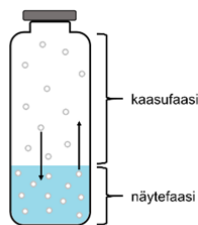
4.2 FID-detektori

FID (*Flame Ionization Detector*) eli liekki-ionisaatiodetektori on kaasukromatografiaa varten kehitetty yleisdetektori, jolla on lineaarinen vaste laajalla pitoisuusalueella. Ennen detektoria analyyttejä kuljettava kantajakaasu sekoittuu vetyyn. Kaasuseos ohjataan happirikkaaseen, yleensä 250 °C:een liekkiin, jossa analyytit palavat tuottaen elektroneja ja ioneja. Ne indusoivat detektorin kahden korkeajännitteisen elektrodin välille sähkövirran, jonka muutos tuottaa millivolteissa (mV) mitattavan vasteen. Tulokset esitetään kromatogrammina, jossa vaste esitetään ajan funktiona piikkeinä. Vaste on suoraan verrannollinen analyytin pitoisuuteen ja hiiliatomien määrään. FID soveltuu hyvin orgaanisille yhdisteille, mutta analyytin happi-, fosfori-, typpi-, rikki- ja halogeeniatomit heikentävät vastetta. Jalokaasuja, hiilidioksidia ja vettä detektori ei havaitse lainkaan. Vesi soveltuukin näyttematriisiksi hyvin, kun lämpötilat ovat riittävän korkeita kondensoitumisen estämiseksi. [13, s. 193; 16, s.115–117.]

4.3 *Headspace*-näytteensyöttötekniikka

Headspace-näytteensyöttötekniikka soveltuu hyvin pienille pitoisuuksille sekä kompleksisille näyttematriiseille, kuten verelle, jonka puhdistaminen muilla menetelmillä olisi aikaa vievää ja heikentäisi saantoa. Koska näytteestä analysoidaan vain haihtunut osa, haihtumattomat aineet eivät häiritse analyysiä tai kerry kaasukromatografian injektoriin ja kolonniin. Näyttematriisiksi soveltuu kiinteä, nestemäinen tai kaasumainen materiaali. *Headspace*-tekniikat voidaan jakaa toimintaperiaatteen mukaan staattisiin ja dynaamisiin. [12, s. xvi, 165–167.]

Staattinen *headspace*-tekniikka perustuu analyyttien jakaantumiseen näyttematriisin ja kaasufaasin välillä kaasutiiviissä näytepullossa (kuva 1). Näyte termostoidaan tunnetaissa lämpötilassa, jolloin saavutetaan analyyteille ominainen pitoisuuksien tasapaino matriisin ja kaasufaasin välillä. Kaasufaasista näyte injektoidaan kromatografille eroteltavaksi. [12, s. 4–5, 53.]



Kuva 1. Tasapainon muodostuminen näytepullossa: analyytit siirtyvät näyte- ja kaasufaasin välillä saavuttaen pitoisuuksien tasapainon [17, s. 3].

Dynaaminen *headspace* on tekniikka, jossa inertti kaasu virtaa joko nestemäisen näytteen lävitse tai nestemäisen tai kiinteän näytteen yllä uuttaen analyytit. Tehokas uutto edellyttää korkeaa kaasun virtausnopeutta, jolloin näyte laimenee huomattavasti. Analyyttien fokuoimiseksi kaasu johdetaan kylmäloukkuun tai adsorboivaa materiaalia sisältävään loukkuun. Loukkua lämmitettäessä analyytit vapautuvat ja kantajakaasu kuljettaa ne kaasukromatografille. Menetelmää kutsutaan *purge and trap* -tekniikaksi (*P&T*). Se on hyvin sensitiivinen ja soveltuu pienille pitoisuuksille, mutta optimoinnissa on kiinnitettävä huomiota useisiin tekijöihin, kuten riittävän pitkään uuttoaikaan, loukun adsorptiokapasiteettiin sekä kaasujen virtausnopeuteen. [12, s. 5–10.]

4.3.1 Staattinen *headspace*

Staattisessa *headspace*-tekniikassa analyyttien jakaantumistasapaino näyte- ja kaasufaasin välillä saadaan aikaan riittävän pitkällä termostoinnilla tunnetussa lämpötilassa. Kun käytetään vakioitua näytematriisia ja -määrää sekä lämpötilaa, faasisuhde β ja analyytin jakaantumismvakio K faasien välillä ovat vakioita. Tasapainotilanteessa analyytin pitoisuus kaasufaasissa on suoraan verrannollinen sen pitoisuuteen näytefaasissa, jolloin kaasufaasista määritetyn analyytin vaste on suoraan verrannollinen sen pitoisuuteen alkuperäisessä näytteessä. Verranto voidaan kirjoittaa muotoon:

$$A \propto c_G = \frac{c_0}{K+\beta} \quad (1)$$

jossa

- A = analyyttipiikin pinta-ala (vaste)
- c_G = analyytin pitoisuus kaasufaasissa
- c_0 = analyytin pitoisuus alkuperäisessä näytteessä
- K = jakaantumismvakio
- β = faasisuhde. [12, s. 19–23; 17, s. 6.]

Faasisuhde kuvaa kaasu- ja näytefaasien tilavuuksien suhdetta:

$$\beta = \frac{V_G}{V_S} \quad (2)$$

jossa β = faasisuhde
 V_G = kaasufaasin tilavuus
 V_S = näytefaasin tilavuus. [12, s. 20.]

Jakaantumisvakio K kuvaa analyytin pitoisuuksien suhdetta faasien välillä. Kun jakaantumisvakio on pieni, analyytin tasapaino on enemmän kaasufaasin puolella:

$$K = \frac{c_S}{c_G} \quad (3)$$

jossa c_S = analyytin pitoisuus näytefaasissa
 c_G = analyytin pitoisuus kaasufaasissa. [12, s. 21.]

Jakaantumisvakio on kullekin analyytille ominainen ja kääntäen verrannollinen analyytin höyrynpaineen ja aktiivisuuskertoimen tuloon:

$$K \propto \frac{1}{p_i^0 \gamma_i} \quad (4)$$

jossa p_i^0 = analyytin höyrynpaine
 γ_i = analyytin aktiivisuuskerroin. [12, s. 25.]

Analyysin herkkyys kasvaa faasisuhteen β sekä jakaantumisvakion K pienentyessä. Vesi-ilmasysteemissä poolisten yhdisteiden, kuten alkoholien, jakaantumisvakio on suuri ja poolittomien, esimerkiksi tolueenin, pieni (taulukko 1). K :n arvoa voidaan pienentää nostamalla tasapainotuslämpötilaa, jolloin höyrynpaine p kasvaa, sekä vaikuttamalla aktiivisuuskertoimeen γ . Aktiivisuuskerroin γ liittyy matriisiefektiin: se kertoo analyyttien ja näytematriisin yhdisteiden välisestä vuorovaikutuksesta, joka vaikuttaa analyytin höyrystymisherkkyyteen. Analyyttien keskinäisillä vuorovaikutuksilla ei juurikaan ole merkitystä analyytin pitoisuuden ollessa alle 0,1 %. Kun näytematriisina on vesi tai vesiseos, analyytin aktiivisuuskerroin riippuu sen poolisuudesta. Poolisten yhdisteiden aktiivisuuskerroin on pieni, ja sitä voidaan kasvattaa lisäämällä näytteeseen epäorgaanista suolaa, jolloin analyytin tasapaino siirtyy enemmän kaasufaasin puolel-

le. Ulossuolaus pienentää myös faasisuhdetta β . Poolittomien analyyttien aktiivisuuskerroin on korkea ja siten jakaantumismvakio pieni, jolloin faasisuhteella β on merkittävä vaikutus analyyttien pitoisuuteen kaasufaasissa sekä analyysin herkkyyteen. Faasisuhdetta voidaan pienentää lisäämällä näytefaasin tilavuutta, jolloin analyytin ainemäärä näytepullossa kasvaa. [12, s. 37–38; 18, s. 9.]

4.3.2 Matriisiefektin pienentäminen

Matriisiefektiiä voidaan heikentää useilla tavoilla. Ulossuolauksella voidaan parantaa etenkin poolisten analyyttien haihtumista, kun näytematriisina on vesi. Kokeellisesti on voitu osoittaa, että näytematriisin komponenttien pitoisuuksien ollessa alle 1 % matriisiefektiiä ei juurikaan esiinny. Nestemäinen näyte voidaankin laimentaa, jos analyyttipitoisuus on riittävän korkea. Laimentaminen soveltuu erityisesti analyyseihin, joissa samoja analyyttejä määritetään eri matriiseista ja matriisien väliset erot halutaan minimoida. [12, s. 188.]

Matriisiefektii voidaan myös eliminoida pienentämällä nestemäisen näytteen määrää niin paljon, että koko analyyttimäärä höyrystyy kaasufaasiin. Tällöin käytetään TVT- ja FET-menetelmiä (*Total Vaporization Technique, Full Evaporation Technique*). Ne soveltuvat erityisesti analyyteille, joiden jakaantumismvakio on suuri, sekä kaasumaisten näytteiden standardien valmistamiseen liuksesta. [12, s. 190–195.]

TVT-menetelmä perustuu koko nestemäisen näytteen höyrystämiseen tasapainotuksen aikana, jolloin näytepullossa on lopulta pelkkä kaasufaasi. Käytettäessä tyypillistä 22,3 ml:n näytepulloa vesipohjaisen näytteen tulee olla tilavuudeltaan 13–15 μ l, jotta kondensoitumista ei tapahdu. Tilavuudessa on huomioitu myös ilman kosteuden vaihtelu ja paineen kasvu tasapainotuksen aikana. Koska jakaantumismvakiota K ja faasisuhdetta β ei huomioida, kaasufaasin analyyttipitoisuus voidaan ilmoittaa seuraavasti:

$$c_G = \frac{W_0}{V_V} \quad (5)$$

jossa c_G = analyytin pitoisuus kaasufaasissa
 W_0 = analyytin massa alkuperäisessä näytteessä
 V_V = näytepullon tilavuus. [12, s.190–191; 18, s. 13–14.]

TVT-menetelmän yhteydessä voidaan hyödyntää MHE-tekniikkaa (*Multiple Headspace Extraction*), jossa näytettä injektoidaan kaasufaasista useita kertoja peräkkäin, ja kaasukromatografilla määritetyt vasteet summataan lopuksi yhteen. Injektointien välillä näyte tasapainotetaan uudelleen. Tekniikka soveltuu esimerkiksi heterogeenisille kiinteille näytteille, joiden koko analyyttimäärä halutaan määrittää. [12, s. 221–223.]

Myös FET-tekniikassa käytetään pientä nestemäisen näytteen tilavuutta, josta osa haihtuu kaasufaasiin. Pieni näytemäärä kasvattaa faasisuhteen β niin korkeaksi, että koko analyyttimäärän voidaan olettaa siirtyvän kaasufaasiin, jolloin jakaantumiskerto K lähenee arvoa 0. Käytännössä menetelmää käytetään kompleksisille näytteille ja pyritään siihen, että analyytin lisäksi liuotin haihtuu kokonaan. Tällöin haihtumaton osa sisältää matriisin kiinteitä aineita, jotka eivät haihdu missään olosuhteissa. Analyytin pitoisuus kaasufaasissa voidaan laskea seuraavasti:

$$c_G = \frac{W_0}{V_V - V_S} \quad (6)$$

jossa c_G = analyytin pitoisuus kaasufaasissa
 W_0 = analyytin massa alkuperäisessä näytteessä
 V_V = näytepullon tilavuus
 V_S = näyteenfaasin tilavuus. [12, s. 191–192; 18, s. 14.]

Alkoholipitoisuusmäärittämissä matriisiefektin pienentämisessä hyödynnetään laimentamista: Käytettävä tekniikka on niin herkkä, että näyte voidaan laimentaa viisinkertaisesti, jolloin eri näytematriisien (veri, virtsa ja seerumi) matriisiefektit heikkenevät, ja tasapaino muodostuu kaikissa näytteissä samalla tavalla. Laimentaminen heikentää myös suolaefektiä, jos alkuperäinen näytemäärä on pieni suhteessa säilöntäainesten ($K_2C_2O_4$, NaF) määrään näyteputkessa. Poolisten alkoholien haihtumista voitaisiin tehostaa ulossuolauksella, mutta veren alkoholimäärittämissä esiintyvien pitoisuuksien kohdalla se ei ole tarpeen.

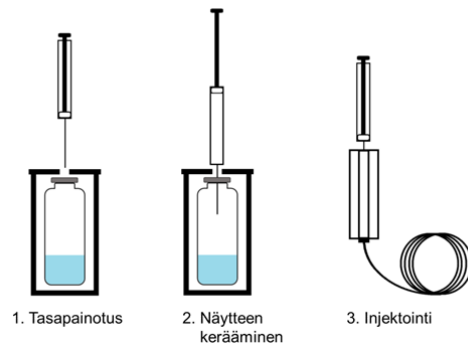
4.3.3 Tasapainotus

Analyytin pitoisuuksien tasapaino faasien välillä saavutetaan optimaalisella tasapainotuksella, johon vaikuttavat muun muassa lämpötila, aika, ravistelu, analyytin poolisuus sekä näytteen tilavuus. Lämpötila valitaan analyytin kiehumispisteen mukaan. Analyytin pitoisuus kaasufaasissa ei kuitenkaan kasva samassa suhteessa lämpötilan noustessa, sillä sen kitkakerroin vaikuttaa haihtumiseen. Kaasufaasiin siirtymistä voidaan edistää ravistelulla, joka parantaa etenkin poolittomien analyyttien haihtumista, kun näytematriisina on vesi. Tasapainon saavuttamisessa aika on kuitenkin merkittävin tekijä, ja näytemäärän kasvaessa tasapainotusaika pitenee. Käytännössä tasapainotusaika tulee testata matriisikohtaisesti eri pitoisuuksilla ja määrittää aika, jonka jälkeen analyytin vaste stabiloituu. [12, s. 165–171; 18, s. 13.]

4.3.4 Injektointitekniikat

Staattisessa *headspace*-tekniikassa voidaan käyttää erilaisia tekniikoita näytteen keräämiseen näytepullosta: ruiskuinjektiota, adsorptioon perustuvia tekniikoita, paineistustekniikkaa tai painesilmukkatekniikkaa. Kun näyte injektoidaan kaasukromatografian injektoriin, käytetään suora- tai jakoinjektioitekniikkaa.

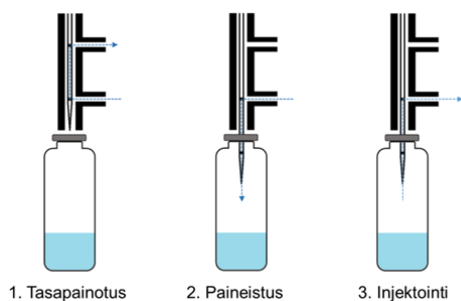
Ruiskuinjektioimenetelmässä (*syringe injection*, kuva 2) käytetään kaasutiivistä ruiskua, joka lävistää tasapainotetun näytepullon septumin keräten tunnetun tilavuuden kaasua. Näyte injektoidaan kaasukromatografian injektoriin, josta se virtaa kolonniin. Näytteenäyttö on alun perin ollut manuaalista, ja edelleenkin manuaalinen injektointi voi soveltua kvalitatiiviseen analytiikkaan. Automatisoitua näytteenäyttäjää käyttämällä menetelmä on kuitenkin tarkempi ja toistettavampi; näytteenäyttäjässä ruiskun lämpötila pysyy tasaisesti suositellussa 90 °C:ssa, termostointiuni tasapainottaa näytteet toistettavasti, ja injektio tilavuus on tarkempi. Näytettä voi kuitenkin haihtua neulasta ruiskun siirtyessä injektorille, joten menetelmä ei ole aivan toistettava. [12, s. 70–72.]



Kuva 2. Ruiskuinjektio: kaasunäyte otetaan näytepullosta ruiskulla ja injektoidaan kaasukromatografian injektoriin [17, s. 6].

Ruiskun sisään voidaan liittää myös kuitu (HS-SPME-menetelmä: *Headspace-Solid Phase Micro Extraction*) tai adsorbenttia (INCA-menetelmä: *Inside Needle Capillary Adsorption Trap*), joka kerää analyytit kaasu- tai nestefaasista. Kuumassa injektorissa analyytit vapautuvat ja kulkeutuvat kantajakaasun mukana kolonniin. Tekniikat mahdollistavat pienten pitoisuuksien konsentroimisen ennen analysointia. Jos näyte kerätään kaasufaasista, menetelmä on monimutkaisempi, sillä näyte- ja kaasufaasin lisäksi kaasufaasin ja kuidun tai adsorbentin välille muodostuu tasapaino, joka vaikuttaa vasteesseen. [12, s. 4–5, 73–74.]

Paineistustekniikkaa (*pressure sampling system*) käytettäessä näytepullo tasapainotetaan ja paineistetaan kantajakaasulla (kuva 3): Termostoinnin jälkeen lämmitetyn ruiskun neulaosa lävistää septumin ja kantajakaasua virtaa neulan kautta pulloon kunnes haluttu paine saavutetaan. Paineistuksen kestäessä noin 1–3 minuuttia kaasufaasi homogenisoituu ja sen lämpötila tasaantuu. Kun kaasunsyöttö suljetaan ja alempi venttiili avataan, kantajakaasun ja näytteen kaasufaasin seosta virtaa kolonniin tai kolonniin johtavaan siirtolinjaan. Koska näytepulloon muodostuvaa painetta ja virtausaikaa voidaan säätää tarkasti, kolonniin virtaava näytetilavuus tunnetaan. Näytepullo paineistetaan joko kolonnin alkuosan painetta vastaavalle tasolle (*balanced pressure sampling*) tai käytetään erillistä kaasulähdettä, jolla paine nostetaan kolonnin painetta korkeammaksi (*increased pressure sampling*). Tekniikan etuja ovat sen yksivaiheisuus ja se, että näyte virtaa suoraan kolonniin laimentumatta tai haihtumatta välillä. Paineistustekniikka voidaan yhdistää aiemmin kuvattuun MHE-tekniikkaan. [12, s. 81–85, 139.]



Kuva 3. Paineistustekniikan periaate: 1. Tasapainotuksen aikana kaasu virtaa neulan lävitse, muttei näytepulloon. 2. Paineistusvaiheessa pulloon johdetaan neulan kautta inerttiä kantajakaasua. 3. Injektointi tapahtuu sulkemalla kaasun tulo ja päästämällä kaasufaasin kaasuvirta neulan kautta siirtolinjaan tai injektoriin. [17, s.7.]

Painesilmukkatekniikkaa (*pressure loop*) käytettäessä näytepullo tasapainotetaan ja paineistetaan ja tunnettu tilavuus kantajakaasun ja näytteen kaasufaasin seosta ohjataan ensin ilmanpaineiseen näytesilmukkaan, josta se johdetaan kantajakaasun avulla kolonniin. Silmukan tilavuus on yleensä 1 ml, ja sen lämpötila on noin 15 °C termos-
tointilämpötilaa korkeampi, jolloin näyte ei pääse kondensoitumaan. [12, s. 83–85.]

Näyte injektoidaan tai se kulkeutuu siirtolinjaa pitkin kaasukromatografian injektoriin, josta se siirtyy kolonniin eroteltavaksi. Injektorin venttiileillä voidaan säädellä kolonniin kulkeutuvaa näytilavuutta: Jakoinjektiossa (*split injection*) vain osa näytteestä päätyy kolonniin, sillä injektoinnin aikana jakoventtiili on auki ja osa näytteestä virtaa kantajakaasun mukana venttiilistä ulos. Jakosuhte on tyypillisesti 1:20–1:100, ja se säädetään kantajakaasun virtausnopeuden avulla. Jakoinjektio soveltuu suurille pitoisuuksille ja kaventaa vastepiikkejä, koska injektorin tyhjentyä nopeasti. Suorainjektiossa (*splitless injection*) venttiilit ovat kiinni ja koko injektoitu näytilavuus siirtyy kolonniin. Tekniikka soveltuu hyvin pienille pitoisuuksille, jolloin koko analyttimäärä vahvistaa vastetta. Suorainjektioita käytetään esimerkiksi SPME-tekniikan kanssa, koska kuidun adsorptiokapasiteetti on rajallinen. [12, s. 90–91; 13, s. 186–188.]

Tässä työssä alkoholimäärityksessä hyödynnettiin paineistustekniikkaa sekä jakoinjektioita. Paineistuksessa näytepullon paine nousee huomattavasti korkeammaksi kuin kantajakaasun paine kolonnissa, jolloin näyte virtaa tehokkaasti haihtumatta ja laimentumatta neulan kautta siirtolinjaan ja edelleen injektoriin. Injektion toistettavuus onkin hyvä, mikä voidaan todeta sisäisen standardin piikkien pinta-alojen pienestä hajonnasta. Jakoinjektio puolestaan mahdollistaa pienen analyttimäärän nopean siirtymiseen

kolonniin, jolloin kromatogrammin piikit pysyvät kapeina. Käytettävä tekniikka soveltuu veren alkoholipitoisuusmäärittäisiin hyvin, sillä pitoisuudet ovat riittävän korkeita.

4.4 Sisäinen standardi

Headspace-menetelmissä analyytin injektoitava ainemäärä riippuu muun muassa injektio-tilavuudesta, lämpötilasta ja kaasun paineesta sekä käytettävän injektointimenetelmän tarkkuudesta. Koska injektointi ei yleensä ole täsmällisen toistettava, käytetään sisäisen standardin (ISTD) menetelmää. Sisäisen standardin tulee olla analyyttien kaltainen yhdiste, joka käyttäytyy näytteenkäsittelyssä ja analyysissä vastaavalla tavalla, mutta jonka retentioaika eroaa analyyttien retentioajoista. Sitä lisätään tunnettu määrä jokaiseen analysoitavaan näytteeseen ja standardiin, jolloin analyyttien pitoisuus voidaan määrittää analyytin ja sisäisen standardin suhteen avulla injektio-tilavuudesta riippumatta. Jos näytettä esikäsitellään, sisäinen standardi lisätään näytteisiin ennen käsittelyä mahdollisen hävikin takia. Näin hävikin suuruutta voidaan myös arvioida. [13, s. 20–22; 15, s.109–110.] Tässä työssä sisäisenä standardina käytettiin n-propanolia, joka lisättiin näytteisiin laimentamalla näytteet sisäisen standardin käyttöliuoksella.

5 Laitteet ja reagenssit

5.1 Laitteet, reagenssit ja näytematriisit

Menetelmän kehittämisessä ja validoinnissa käytettiin seuraavia laitteita:

- Puhdasvesilaite
- Analyysivaaka
- Laimennin
- Vetygeneraattori
- *Headspace*-näytteensyöttäjä, *PerkinElmer Turbomatrix 110*
- Siirtolinja
- GC, *PerkinElmer Clarus 500*
- Kolonni, BAC2
- FID-detektori.
-

Menetelmän kehittämisessä ja validoinnissa käytettiin seuraavia reagensseja:

- Etanoli, Aas-laatu
- Etanolistandardit 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 ja 4 g/l
- n-propanoli, p.a. -laatu
- Metanoli, p.a. -laatu
- Asetoni, p.a. -laatu
- Isopropanoli, p.a. -laatu
- Tertiäärinen butanoli, p.a. -laatu
- Metyylietyyliketoni, p.a. -laatu
- 2-butanoli, p.a. -laatu
- n-butanoli, p.a. -laatu
- Tolueeni, p.a. -laatu
- Isobutyylimetyyliketoni, p.a. -laatu
- Laboratoriovesi
- NaCl, p.a. -laatu
- NaF, p.a. -laatu
- Helium, 99,996 %, (4.6)
- Ilma, generaattori
- Vety, generaattori.

Validoinnissa käytettiin seuraavia näytematriiseja:

- Ihmisen kokoveri
- Ihmisen virtsa
- Hevoson seerumi
- Laboratoriovesi

5.2 Liuosten valmistaminen

Sisäisen standardin eli n-propanolin käyttöliuos valmistettiin pipetoimalla 500 µl n-propanolia 2000 ml:n mittapulloon ja täyttämällä vedellä merkkiin, jolloin lopullinen pitoisuus oli 0,2 g/l.

Menetelmän kehittämistä varten etanolista ja denaturointiaineista (metanoli, asetoni, isopropanoli, tertiäärinen butanoli, MEK ja 2-butanoli) valmistettiin erilliset noin 10 m-% kantaliuokset. Etanolista valmistettiin edelleen pitoisuudeltaan 1,0 g/l liuos ja jokaisesta denaturointiaineesta neljä pitoisuustasoa: 0,1; 0,2; 0,5 ja 1,0 g/l. Lisäksi valmistettiin seosnäyte, joka sisälsi etanolia ja kutakin denaturointiainetta noin 0,3 g/l. Kaikki liuokset valmistettiin laboratorioveteen. Liuosten valmistaminen on esitetty liitteessä 1.

Selektiivisyyden määrittämistä varten n-butanolista, tolueenista ja IBMK:sta valmistettiin yllä kuvatulla tavalla erilliset noin 10 m-% kantaliuokset ja niistä edelleen noin 1 g/l liuokset. Validointia varten jokaisesta näytematriisista (veri, virtsa, seerumi ja vesi) valmistettiin 19 eri pitoisuustasoa välillä 0,01–6,0 g/l liitteen 1 mukaisesti.

6 Työn toteutus ja tulokset

6.1 Menetelmän kehittäminen

Alkoholien määrittämisessä maailmanlaajuisesti käytettävä HS-GC-FID-menetelmä on kehitetty jo 1960-luvulla, jolloin se on ollut ensimmäisiä *headspace*-tekniikkaa hyödyntäviä menetelmiä [12, s. 11]. Alkoholimäärityksille on kehitetty spesifit BAC1- ja BAC2-kolonnit (*Blood Alcohol Concentration*), joilla analyytit voidaan määrittää veri-, virtsa-, seerumi- ja plasmanäytteistä. Kolonnien stationäärifaasien erotteluminaisuudet ovat optimaaliset alkoholeille ja niiden metaboliiteille, ja luotettavat tulokset saavutetaan noin viiden minuutin pituisella ajo-ohjelmalla. Analyyttien retentioajat ja -järjestykset ovat kolonneissa erilaiset, ja analyyttien tunnistamisen varmistamiseksi jokainen määritettävä näyte ajetaan kummallakin kolonnilla. [19.]

Jokainen verinäyte määritetään kahdella eri laitteella, joissa on eri kolonnit, siten, että eri henkilöt analysoivat rinnakkaiset näytteet. Näin inhimillisten virheiden vaikutus tuloksiin minimoidaan. Lopullinen näytteen tulos on kahden analyysin keskiarvo, jolle tehdään varmuusvähennys. Varmuusvähennys on määritetty jokaiselle etanolin pitoisuustasolle tilastollisella *Kernel*-menetelmällä, joka huomioi pitoisuuskohtaisen satunnais- ja systemaattisen virheen, sillä virheen prosentuaalinen suuruus ei ole laajalla pitoisuusalueella vakio. Lisäksi menetelmä takaa, että ilmoitettu tulos ei ylitä todellista pitoisuutta 99,9999 % todennäköisyydellä. [20.]

Etanolin lineaarisuusalue on 0,1–6,0 g/l ja määritettävä pitoisuusalue on 0,1–4 g/l, joka kattaa liikennejuopumuslainsäädännön määrittämät pitoisuudet sekä alueen, jolla veren etanolipitoisuus voi olla. Yli 4 g/l etanolia sisältävät näytteet laimennetaan vedellä puoleen. Denaturointiaineiden määritysalue on 0,1–1,0 g/l, ja tarvittaessa kalibrointisuoraa voidaan jatkaa suuremmille pitoisuuksille. Menetelmä kattaa denaturointiaineet, koska niitä voi esiintyä näytteissä ja ne voidaan helposti erottaa BAC1- ja BAC2-kolonneilla. Alkoholimäärityksissä pääasiallinen näytematriisi on veri, mutta näytteinä voi olla myös virtsaa ja seerumia.

Jokaisessa näyteajossa tehdään kuuden pisteen kalibrointi kaupallisilla vesipohjaisilla etanolistandardeilla sekä määritetään vesipohjaisia nollakontrollinäytteitä sekä etanolia sisältäviä kontrolliseeruminäytteitä. Seosnäytteiden avulla seurataan analyyttien erottumista ja siten kolonnin ja laitteen kuntoa.

Sisäisenä standardina on perinteisesti käytetty n-propanolia BAC1-kolonnilla ja tertiääristä butanolia BAC2-kolonnilla. Tässä työssä menetelmää haluttiin kehittää siirtymällä n-propanoliin myös BAC2-kolonnilla, sillä tertiääristä butanolia esiintyy toisinaan verinäytteissä. n-propanoliin siirtymällä analyysien uusintatarve vähenee. Koska n-propanolin retentioaikaa BAC2-kolonnilla ei tunnettu, menetelmän kehittäminen aloitettiin määrittämällä n-propanolia sisäisenä standardina sisältäviä nollanäytteitä sekä etanolia ja denaturointiaineita sisältäviä seosnäytteitä. Samalla pystyttiin toteamaan, että n-propanoli erottuu omana symmetrisenä piikkinä (liite 2).

Tämän jälkeen menetelmän kehittämisessä keskityttiin ajo-ohjelman lämpötilagradientin, lämpötilan muutosnopeuden sekä kantajakaasun paineen muutosten testaamiseen seosnäytteillä, koska HS-parametrit on jo aiemmin optimoitu. Tuloksissa kiinnitettiin erityisesti huomiota analyyttien tehokkaaseen erottumiseen ja retentioaikojen suhteellisen tasaisiin väleihin, piikkien kapeuteen ja symmetrisyyteen. Ajo-ohjelman lämpötilan täytyi lisäksi ajon lopussa palata alun tasolle, jotta seuraavan näytteen analyysi voisi alkaa mahdollisimman nopeasti. Testiajoilla testattiin muun muassa kolonnin valmistajan suosittelemaa pienille alkoholeille kehitettyä ajo-ohjelmaa, joka ei kuitenkaan soveltunut suuremmille analyyteille, *Van Deemterin* käyrän mukaista heliumin optimaalista virtausnopeutta 40 cm/s [13, s. 185], joka sai analyyttipiikit levenemään, sekä Oikeus-toksikologiayksikössä tehtävän vainajien veren alkoholimäärityksen vastaavaa ajo-ohjelmaa. Paras menetelmä löydettiin kuitenkin muokkaamalla alkuperäistä lämpötila-ohjelmaa parametri kerrallaan.

Uudella ajo-ohjelmalla (taulukko 2) analyytit erottuvat tehokkaammin, ja niiden retentioajat ovat hieman pidemmät. Kantajakaasun paine pidettiin alkuperäisessä arvossa, lämpötilaramppeja on kahden sijaan kolme ja lämpötila nousee korkeammalle nopeammin. Vaikka retentioajat pitenivät hieman, uusi ajo-ohjelma ei ole alkuperäistä pidempi, koska se päättyy heti tertiääriseen butanolin piikin jälkeen. Tertiääristä butanolia esiintyy näytteissä harvoin, ja ohjelman pituus riittää hyvin sen havaitsemiseen. Näin näytteensyöttäjän tasapainotus- ja näytteensyöttösykliä ei ollut tarvetta muuttaa, eikä täyden näyteajon 110 näytteen analyysiaika pidentynyt. Etanolin ja denaturointiaineiden resoluutiot, pohjaluvut ja häntimistekijät molemmilla ajo-ohjelmilla on koottu liitteen 2.

Taulukko 2. Alkuperäinen ja uusi ajo-ohjelma.

[Laboratorion omaan käyttöön]

Alkuperäisellä ja uudella ajo-ohjelmalla ajettujen seosnäytteiden kromatogrammit on esitetty kuvassa 4. Uudella ajo-ohjelmalla asetoni, isopropanoli ja tertiäärinen butanoli erottuvat tehokkaammin kuin alkuperäisellä.

[Laboratorion omaan käyttöön]

Kuva 4. Yllä alkuperäisellä ajo-ohjelmalla ajettu seosnäyte ja alla uudella ajo-ohjelmalla ajettu vastaava.

Ennen validointia uuden ajo-ohjelman toistettavuus varmistettiin ajamalla lyhyiden testiajojen lisäksi pitkä sarja, joka sisälsi etanolin kalibrintisuorat, seosnäytteitä ja pitoisuudeltaan 1,0 g/l etanolinäytteitä. Denaturointiaineiden lineaarisuus vesiliuoksessa määritettiin ajamalla pitoisuuksiltaan 0,1; 0,2; 0,5 ja 1,0 g/l liuoksista rinnakkaiset määritykset. Näin määritettyjen kalibrintisuorien selitysaste R^2 oli kaikilla denaturointiaineilla yli 0,999 (liite 2).

6.2 Validointi

Validointi tehtiin laajana, ja se kattoi uuden laitteen käyttöönoton, n-propanolin sisäisenä standardina, uuden ajo-ohjelman sekä kaikki alkoholien määritysmenetelmällä määritettävät analyytit (etanoli, metanoli, aseton, isopropanoli, tertiäärinen butanoli metyylietyyliketoni (MEK) ja 2-butanoli) sekä näytematriisit. Näytematriiseista veri, virtsa ja seerumi on määritelty menetelmäohjeessa, ja vesi sisällytettiin validointiin siksi, että laaduntarkkailussa käytettävät standardi- ja seosnäytteet ovat vesipohjaisia. Aluksi varmistettiin menetelmän selektiivisyys etanolille ja denaturointiaineille sekä satunnaisesti esiintyville n-butanolille, tolueenille ja isobutyylimetyyliketonille (IBMK) vedessä. Tämän jälkeen määritettiin etanolin ja denaturointiaineiden lineaarisuus sekä etanolin toteamis- ja määritysrajat, oikeellisuus, toistotarkkuus mittauksen sisällä ja mittausten välillä sekä mittausepävarmuus kaikissa näytematriiseissa. Lineaarisuuden, toteamis- ja määritysrajojen ja tarkkuuden yhteydessä kaikille rinnakkaismäärittäyksille laskettiin keskiarvo, keskihajonta (s), suhteellinen keskihajonta (RSD) sekä oikeellisuus tulosten arvioimiseksi. Lisäksi uuden menetelmän luotettavuutta tutkittiin kolonnivertailun avulla.

Validointisuunnitelman pohjana käytettiin THL:n laatimia validointiraporttipohjaa ja validointiohjeita sekä VTT:n julkaisemaa Validoinnin suunnittelun opasta [21]. Tulokset laskettiin näiden ohjeiden mukaan, ja tavoitteena oli saavuttaa vähintään validointi- ja menetelmäohjeiden vaatimuksia vastaavat tulokset. Validoinnista kirjoitettiin raportti, jonka teoriaosuus ja suoritus tuloksia lukuun ottamatta esitellään seuraavissa alaluvuissa.

6.2.1 Selektiivisyys

Menetelmä on selektiivinen, kun se tuottaa vasteen usealle analyytille, ja pystyy erottamaan ne toisistaan useita yhdisteitä sisältävästä seosnäytteestä [22, s. 27]. Kaasukromatografisen menetelmän selektiivisyyttä kuvaavat kullekin analyytille määritettävä retentioaika (t_r), erotustekijä (α) resoluutio (R_s), pohjaluku (N) ja häntimistekijä (T).

Erotustekijä (α)

Erotustekijä on kahden yhdisteen retentioaikojen suhde ja sen tulisi olla riittävästi yli 1,0, jotta yhdisteet erottuvat toisistaan. Erotustekijä lasketaan seuraavasti:

$$\alpha = \frac{t_{r2} - t_M}{t_{r1} - t_M} \quad (7)$$

jossa t_{r2} = jälkimmäisen piikin retentioaika

t_{r1} = ensimmäisen piikin retentioaika

t_M = kuollut aika eli pidättymättömän aineen retentioaika. [13, s. 145.]

Resoluutio (R_s)

Resoluutio kuvaa kahden piikin erottumista toisistaan eli niiden välimatkaa kromatogrammissa: se suhteuttaa piikkien välimatkan niiden kantojen leveyksien keskiarvoon. Menetelmäohjeen mukaan resoluution tulee olla vähintään 1,2, jolloin piikit erottuvat täysin. Resoluutio lasketaan kaavalla:

$$R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{\frac{1}{2}(W_{b1} + W_{b2})} \quad (8)$$

jossa R_s = jälkimmäisen piikin resoluutio

t_{r1} = ensimmäisen piikin retentioaika

t_{r2} = jälkimmäisen piikin retentioaika

W_{b1} = ensimmäisen piikin kannan leveys 10 % korkeudella

W_{b2} = jälkimmäisen piikin kannan leveys 10 % korkeudella. [13, s. 147.]

Pohjaluku (N)

Pohjaluku kuvaa analyytin tasapainoreaktioiden määrää liikkuvan ja stationäärifaasin välillä analyysin aikana. Pohjaluku onkin suoraan verrannollinen kolonnin pituuteen, ja korkea luku viittaa tehokkaaseen erottumiseen. Analyyttipiikille lasketaan tangentiaalinen pohjaluku määrittämällä piikin leveys pohjasta tangenttien avulla:

$$N = 16\left(\frac{t_r}{W_b}\right)^2 \quad (9)$$

jossa t_r = piikin retentioaika

W_b = piikin leveys tangenttien avulla laskettuna. [13, s. 145.]

Häntimistekijä (T)

Häntimistekijä kuvaa analyyttipiikin asymmetrisyyttä ja kertoo kolonnin kunnosta. Piikin ollessa symmetrinen $T = 1,0$. Häntimistekijä lasketaan seuraavasti:

$$T = \frac{W_{0,10}}{2f} \quad (10)$$

jossa $W_{0,10}$ = piikin leveys 10 % korkeudella

f = piikin maksimi- ja alkamiskohdan erotus (aika) 10 % korkeudella.

[23, s. B-23.]

Selektiivisyys määritettiin vesipohjaisista etanolia ja denaturointiaineita sisältävistä seosnäytteistä. Suuret laskettiin *PerkinElmer TotalChromin System Suitability* -ohjelmalla kolmen seosnäytteen keskiarvoina. Tulokset on esitetty taulukossa 3. Suhteelliset retentiotekijät, resoluutiot, pohjaluvut ja häntimistekijät kaikilla yhdisteillä olivat hyväksyttävällä tasolla. 2-butanolin laskennallista pohjalukua (N) pienentää piikin leveys (kuva 4).

Taulukko 3. Etanolin ja denaturointiaineiden selektiivisyys. Yhdisteet ovat retentiojärjestyksessä, jolloin resoluutio ja suhteellinen retentio on määritetty edellisen yhdisteen suhteen.

[Laboratorion omaan käyttöön]

Verinäytteissä voi toisinaan esiintyä myös n-butanolia, tolueenia ja isobutyylimetyyliketonia, joiden retentioajat ovat pidemmät kuin käytettävän ajo-ohjelman pituus. Myös näille yhdisteille määritettiin yllä kuvatut suureet (taulukko 4) 15 minuutin ajo-ohjelmalla. Ajo-ohjelma vastasi taulukossa 2 esitettyä uutta ajo-ohjelmaa, mutta viimeisen lämpötilagradientin pituutta jatkettiin.

Taulukko 4. n-butanolin, tolueenin ja IBMK:n selektiivisyys.

Yhdiste	t_r (min)	α	R_s	N	T
n-butanoli	8,73	2,35	24,5	14667	1,03
Tolueeni	9,39	2,53	27,1	15844	1,03
IBMK	11,6	3,12	29,2	12120	1,02

n-butanoli, tolueeni ja IBMK määritettiin myös käyttöön otettavalla ajo-ohjelmalla, jolloin kunkin yhdisteen piikki siirtyi ajojärjestyksessä seuraavan näytteen kromatogrammiin (liite 3). Kutakin yhdistettä seuraavina näytteinä käytettiin sekä etanoli- että seosliuoksia. Näin määritetyt retentioajat sekä mahdolliset virheelliset tunnistukset on koottu taulukkoon 5. Taulukosta nähdään myös, että seosnäytteen yhdisteet pidentävät IBMK:n retentioaikaa verrattuna pelkkää etanolia sisältävään näytteeseen.

Taulukko 5. n-butanolin, tolueenin ja IBMK:n siirtyminen seuraaviin näytteisiin normaalipituisella ajo-ohjelmalla, kun seuraavina näytteinä on etanoli ja seosnäyte.

Yhdiste	t_r (min) etanoli	Virheellinen tunnistus	t_r (min) seos	Virheellinen tunnistus
n-butanoli		-		isopropanoli
Tolueeni		-		-
IBMK		2-butanoli		-

6.2.2 Lineaarisuus ja herkkyys

Linearisessa menetelmässä analyytin vaste on suoraan verrannollinen sen pitoisuuteen näytteessä, ja menetelmän lineaarinen alue vastaa analyytin pitoisuusaluetta, jolla kalibrintisuora on lineaarinen. Lineaarisen alueen alarajana on määrittäminen [13, s. 13, 18]. Herkkyys kertoo detektorin vasteen muutoksesta, kun analyytin pitoisuus muuttuu yhdellä yksiköllä; lineaarisen menetelmän herkkyys vastaa kalibrintisuoran kulmakerrointa, ja menetelmä ollessa herkkä pieni muutos pitoisuudessa aiheuttaa suuren muutoksen vasteessa [21, s. 21]. Sisäistä standardia käytettäessä herkkyys lasketaan analyytin ja sisäisen standardin vasteiden suhteesta [24, s. 18].

Etanolin lineaarisuus määritettiin kaikille näytematriiseille mittaamalla seitsemän eri etanolipitoisuutta välillä 0,1–6,0 g/l ja nollanäytteet kahdeksana rinnakkaismäärityksenä. Näytteiden valmistus on esitetty liitteessä 1 ja raakadata ja kuvaajat liitteessä 3. Määritetty alue kattoi alkoholien määrittämenetelmän mukaisen määrittäalueen 0,1–4,0 g/l ja lineaarisuuden suuremmilla pitoisuuksilla, joita esiintyy verinäytteissä toisinaan.

6.2.3 Toteamis- ja määrittärajat

Toteamisraja on analyytin alhaisin pitoisuus, jolla se voidaan tunnistaa luotettavasti. Tällöin vasteen signaali-kohinasuhteen (S/N) tulee olla vähintään 3. Määrittäraja on vastaavasti pienin pitoisuus, joka voidaan kvantitoida halutulla toistettavuudella ja oikeellisuudella. Määrittärajapitoisuudella signaali-kohinasuhteen tulee olla vähintään 3 ja tulosten systemaattisen virheen lisäksi alle 20 %. [21, s. 20, 26.]

Rajat määritettiin kaikille näytematriiseille mittaamalla kymmenen pientä pitoisuutta välillä 0,01–1,0 g/l kymmenenä rinnakkaismäärityksenä. Näytteiden valmistus on esitetty liitteessä 1. Signaali-kohinasuhde kullekin näytematriisille ja pitoisuudelle laskettiin *PerkinElmer TotalChrom System Suitability* -ohjelman avulla.

6.2.4 Oikeellisuus

Systemaattinen virhe (harha, bias) kuvaa tulosten oikeellisuutta eli otoksen keskiarvon ja teoreettisen arvon suhdetta. Se ilmoitetaan prosenttilukuna, joka kertoo poikkeaman suuruuden keskiarvosta, ja lasketaan seuraavasti:

$$\text{Systemaattinen virhe} = \frac{c_{\text{mitattu}} - c_{\text{teor}}}{c_{\text{teor}}} \cdot 100 \% \quad (11)$$

jossa c_{mitattu} = mitattu pitoisuus
 c_{teor} = teoreettinen pitoisuus. [21, s. 22–23.]

Oikeellisuus määritettiin kahdeksalla pitoisuustasolla (0,1; 0,15; 0,2; 0,4; 0,5; 1,0; 1,2 ja 2,0 g/l) kymmenenä rinnakkaisena määrittämisnäytteenä. Näytteiden valmistus on esitetty liitteessä 1. Pitoisuudet valittiin siten, että ne kattavat määritys- ja liikennejuopumusrajat (0,1; 0,5; 1,0 ja 1,2 ‰) sekä pitoisuudet 0,2 ja 0,4 ‰ siltä varalta, että liikennejuopumusrajoja päätetään tulevaisuudessa laskea.

6.2.5 Toistotarkkuus

Toistotarkkuus kuvaa satunnaisvirheen suuruutta, kun samasta homogeenisestä näytteestä tehtyjen määrittäysten tuloksia verrataan toisiinsa. Tarkkuus määritetään sekä mittauksen sisällä määrittämällä samaa näytettä useita kertoja että mittausten välillä määrittämällä samaa näytettä useana päivänä. Mittausten välinen toistotarkkuus antaa kuvan laboratorion sisäisestä variaatiosta analyysituloksissa. Toistotarkkuudet ilmoitetaan prosenttilukuna ja lasketaan seuraavasti:

$$RSD = \frac{s}{KA} \cdot 100 \% \quad (12)$$

jossa RSD = suhteellinen keskihajonta eli variaatiokerroin (CV)
 s = keskihajonta
 KA = keskiarvo. [13, s. 32.]

Mittauksen sisäinen toistotarkkuus määritettiin oikeellisuusmittausten yhteydessä. Mittausten välinen toistotarkkuus määritettiin mittaamalla oikeellisuusnäytteitä kymmenenä päivänä yhtenä rinnakkaisena määrittämisnäytteenä.

6.2.6 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus (MEV) antaa kokonaiskuvan analyysin tarkkuudesta ja koostuu mittauksessa esiintyvistä systemaattisesta ja satunnaisesta virheestä. Oikeellisuus kuvaa systemaattista virhettä ja toistotarkkuus satunnaisvirhettä, jotka johtuvat epätarkkuuksista ja virheistä näytteenotossa, näytteen säilytyksessä ja analyysin eri vaiheissa. Laajennettu mittausepävarmuus (2MEV) vastaa 95 % luottamusväliä. Mittausepävarmuus lasketaan seuraavasti:

$$MEV = \sqrt{RSD_{sis}^2 + RSD_{väl}^2 + RSD_{syst}^2} \quad (13)$$

jossa RSD_{sis} = määrittämisen sisäinen toistotarkkuus
 $RSD_{väl}$ = määrittämisten välinen toistotarkkuus
 RSD_{syst} = systemaattinen virhe. [24, s. 54.]

Mittausepävarmuus ja laajennettu mittausepävarmuus kullekin näytematriisille jokaisella pitoisuustasolla on esitetty taulukossa 6. Tulokset ovat hyväksyttäviä, ja menetelmän lopullinen mittausepävarmuus lasketaan BAC1- ja BAC2- kolonnien tulosten keskiarvona.

Taulukko 6. Mittausepävarmuus ja laajennettu mittausepävarmuus kaikille matriiseille jokaisella määritetyllä pitoisuustasolla.

[Laboratorion omaan käyttöön]

6.3 Kolonnivertailu

Kolonnivertailu tehtiin määrittämällä samoja näytteitä validoitavalla laitteella (GC5) sekä kahdella muulla laitteella, joista toisessa oli BAC1-kolonne ja sisäisenä standardina n-propanoli ja toisessa BAC2-kolonne ja sisäisenä standardina tertiäärinen butanoli (GC3). Näytteinä käytettiin veri-, virtsa- ja seeruminäytteitä. Kutakin matriisia kohden määritettiin 30 näytettä, joiden etanolipitoisuus vaihteli välillä 0,1–3,9 g/l.

Uudella laitteella määritettyjä tuloksia verrattiin kahden muun laitteen tuloksiin (liite 4), ja kaikilla matriiseilla tulosten vastaavuus oli hyvä. GC5-laitteella määritettyjä tuloksia verrattiin myös tilastollisesti GC3:n tuloksiin (liite 4). Määrittämisten otosvariansseja

verrattiin kahden otoksen F-testillä sekä otoskeskiarvoja kaksisuuntaisella t-testillä 95 % luottamustasolla. F-testien perusteella veren ja seerumin otosvarianssit eri BAC2-kolonnin laitteilla eivät poikenneet toisistaan, mutta virtsan varianssit poikkesivat tilastollisesti merkitsevästi. t-testien perusteella otoksien keskiarvot eivät poikenneet tilastollisesti merkitsevästi eri BAC2-kolonnien laitteilla.

6.4 Etanolistandardien hälytys- ja toimintarajat

Kaupallisten etanolin standardiliuosten (0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 ja 4,0 g/l) hyväksyttävät pitoisuusrajat päivitettiin laskemalla jokaiselle pitoisuustasolle keskiarvo ja keskihajonta, joista laskettiin uudet hälytys- ($KA \pm 2s$) ja toimintarajat ($KA \pm 3s$). Laskemisessa käytettiin näyteajojen kalibrointisuoria varten tehtyjä standardiliuosten rinnakkaismäärytyksiä noin puolen vuoden ajalta kaikilta alkoholimäärytyksissä käytettäviltä laitteilta. Tulokset jakautuivat tasan kolonnityyppien kesken. Yhteensä näyteajoja oli 150 ja rinnakkaisia tuloksia 297–299 pitoisuustasoa kohden. Tulokset on koottu taulukkoon 7 ja raakadata liitteeseen 5.

Taulukko 7. Standardien uudet ja vanhat hälytys- ($KA \pm 2s$) ja toimintarajat ($KA \pm 3s$).

[Laboratorion omaan käyttöön]

6.5 Johtopäätökset

Menetelmä todettiin kaikille kvantitatiivisesti määritettäville analyytille (etanoli, metanoli, asetoni, isopropanoli, tertiäärinen butanoli, metyylietyyliketoni ja 2-butanoli) selektiiviseksi. Lisäksi pystyttiin toteamaan, etteivät harvemmin esiintyvät n-butanoli, tolueeni ja isobutyylimetyyliketoni (IBMK) häiritse etanolimääritystä. n-butanoli voi kuitenkin antaa virheellisen tunnistuksen isopropanolille ja IBMK 2-butanolille. Jos näitä yhdisteitä tai tunnistamattomia piikkejä havaitaan näytteen kromatogrammissa, kyseinen ja sitä edeltävät näytteet ajetaan uudelleen 15 minuutin ajo-ohjelmalla. Näin sekä yhdisteet että niitä sisältävä näyte voidaan tunnistaa.

Validointi onnistui suunnitellusti, ja tulokset vastasivat menetelmälle asetettuja vaatimuksia. Kolonnivertailussa tulokset olivat yhteneviä joitain poikkeamia lukuun ottamatta, ja virtsan tulosten hajonta oli odotettavaa. Tilastolliset testit osoittivat, etteivät eri laitteilla määritetyt tulokset poikkea toisistaan liikaa.

Standardien hälytys- ja toimintarajat päivitettiin, ja uudet rajat ovat vuonna 2004 määritettyjä vastaavat, mutta hieman matalampia ja tiukemmat etenkin pitoisuudelle 4,0 g/l. Voidaankin todeta, että laitteiden suorituskyky ja tarkkuus ovat säilyneet.

Validoinnin perusteella uuden laitteen ja menetelmän erotuskyky, määrittäminen ja tarkkuus ovat hyväksyttävällä tasolla ja tulokset ovat luotettavia. Menetelmää ja laitetta voidaan käyttää etanolin ja denaturointiaineiden määrittämiseen kvantitatiivisesti verestä, virtsasta ja seerumista. Menetelmä ja laite otetaan käyttöön laboratoriossa.

Lähteet

- 1 Oikeustoksikologia. 21.5.2015. Verkkoaineisto. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. <<https://www.thl.fi/fi/thl/organisaatio/osastot-ja-yksikot/valtion-palvelut/oikeustoksikologia>>. Luettu 9.9.2017.
- 2 THL:n päihdetestauspalvelut. 15.2.2017. Verkkoaineisto. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. <<https://www.thl.fi/fi/web/alkoholi-tupakka-ja-riippuvuudet/paihdehoito/paihdetestaus/thl-n-paihdetestauspalvelut>>. Luettu 9.9.2017.
- 3 Rikoslaki 19.8.1889/39.
- 4 Karch, Steven B. 2007. Drug Abuse Handbook. 2. painos. USA: CRC Press.
- 5 Blood Alcohol Content (BAC) - Drink Driving Limits across Europe. 6.2016. Verkkoaineisto. European Transport Safety Council. <<http://etsc.eu/blood-alcohol-content-bac-drink-driving-limits-across-europe>>. Luettu 26.9.2017.
- 6 The Drink Drive Limit. Verkkoaineisto. The UK government. <<https://www.gov.uk/drink-drive-limit>>. Luettu 27.10.2017.
- 7 Löytty, Marita. 2015. Alkoholirattijuopumus tieliikenteessä. Trafin julkaisuja 1/2015. Helsinki: Liikenteen turvallisuusvirasto.
- 8 Poliisin ohjeita liikennejuopumustapausten selvittämisessä. 2003. Sisäasiainministeriö ja Kansanterveyslaitos. Helsinki.
- 9 Tarkkuusalkometrit: Dräger Alcotest 7110 Evidential. Verkkoaineisto. Dräger. <https://www.draeger.com/fi_fi/Alcohol-And-Drug-Detection/Products/Breath-Alcohol-and-Drug-Testing/Evidential-Alcohol-Measuring-Devices/Alcotest-7110-Evidential>. Luettu 27.10.2017.
- 10 Kiianmaa, Kalervo (toim.) & Ylikarhi, Reino (toim.). 1987. Alkoholi – Vaikutukset elimistöön ja terveyteen. Oy Alko Ab. Valtion painatuskeskus.
- 11 Rumble, John. 2017. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 98. painos. USA: CRC Press.
- 12 Kolb, Bruno & Ettre, Leslie S. 2006. Static Headspace-Gas Chromatography. 2. painos.
- 13 Niiranen, Jukka & Jaarinen, Soili. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. 5. painos. Helsinki: Edita Prima Oy.

- 14 McMaster, Marvin & McMaster Christopher. 1998. GC/MS – A Practical User's Guide. 1. painos. USA: Wiley-VCH.
- 15 Harris, Daniel C. 2010. Quantitative Chemical Analysis. 8. painos. USA: W.H. Freeman & Co Ltd, Basingstoke.
- 16 McNair, Harold M. & Miller, James M. 2009. Basics of Gas Chromatography. 2. painos. USA: John Wiley & Sons.
- 17 A Technical Guide for Static Headspace Analysis Using GC. Verkkoaineisto. Restek. <<http://www.restek.com/pdfs/59895B.pdf>>. Luettu 9.10.2017
- 18 Tipler, Andrew. An Introduction to Headspace Sampling in Gas Chromatography. Verkkoaineisto. PerkinElmer. <https://www.perkinelmer.com/PDFs/downloads/GDE_Intro_to_Headspace.pdf>. Luettu 7.10.2017.
- 19 Rtx®-BAC1 and -BAC2 Columns. Verkkoaineisto. Restek. <<http://m.restek.com/pdfs/121-01-001.pdf>>. Luettu 28.8.2017.
- 20 Moroni, Rossana; Blomstedt, Paul; Reinikainen, Tapani; Sippola, Erkki & Corander, Jukka. 2010. Artikkel. Forensic Science International. Vol. 202, s. 71-74.
- 21 Hägg, Margareta. 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Verkkoaineisto. Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy. <<http://www.vtt.fi/inf/pdf/technology/2016/T276.pdf>>. Luettu 25.8.2017.
- 22 Ehder, Tapio (toim.). 2005. Metrologia – Kemian metrologian opas. Helsinki: MIKES.
- 23 TotalChrom Workstation - User's Guide - Volume II TotalChrom. 2004. PerkinElmer.
- 24 Mäkinen, Irma; Suortti Anna-Mari; Saares, Riitta; Niemi Ritva & Marjanen, Jari J. (toim.). 1996. Ohjeita ympäristönäytteiden kemiallisten analyysimenetelmien validointiin. Suomen ympäristökeskus. Helsinki: Suomen ympäristökeskus