

Heidi Tetri

β -hydroksibutyraatin ja γ -hydroksibutyraatin kvantitatiivinen määrittäminen vainajan verestä ja virtsasta sekä menetelmän validointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Laboratorioanalyttikko (AMK)
Laboratorioalan koulutusohjelma
Opinnäytetyö
28.9.2016

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Heidi Tetri β -hydroksibutyraatin ja γ -hydroksibutyraatin kvantitatiivinen määrittäminen vainajan verestä ja virtsasta sekä menetelmän validointi 54 sivua + 4 liitettä 28.9.2016
Tutkinto	Laboratorioanalytikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Ohjaaja(t)	Oikeuskemisti, FT Ilpo Rasanen Lehtori Mia Ruismäki
<p>Opinnäytetyö tehtiin Terveyden ja hyvinvoinninlaitoksen Oikeustoksikologiayksikön Helsingin Kytösuontien toimipisteen laboratoriossa. Laboratorion toiminta on osana Valtion palveluosastoa, joka esimerkiksi ohjaa ja valvoo kuolemansyyn selvittämistä ja tekee oikeustoksikologisia alkoholi-, huume-, ja lääkeainemäärityksiä oikeuslaitoksen, lainvalvonnan, terveyden- ja päihdehuollon sekä työterveyshuollon tarpeisiin.</p> <p>Oikeuslääketieteellinen ruumiinavaus on tarpeellinen silloin kun oikeuslääketieteellisessä kuolemansyyn selvityksessä kuolemansyytä ei voida ulkoisesti todeta. Äkillisissä ja odottamattomissa kuolemissa on hyvin tärkeää saada tietoa esim. vainajan terveydentilasta, tällöin suoritetaan oikeustoksikologisia laboratoriotutkimuksia pääasiassa vainajien verestä, virtsasta, lasiaisesta, maksasta, mahansisällöstä, lihaksesta, hiuksista tai muista saatavilla olevista näytematriiseista.</p> <p>Tässä työssä näytematriiseina käytettiin post mortem -verta ja -virtsa. Työn tarkoituksena oli määrittää kvantitatiivisesti vainajanäytteistä γ- (GHB) ja β-hydroksibutyraatti (BHB) sekä validoida menetelmä. BHB:ta voidaan pitää hyvänä biomarkerina alkoholiketoasidoosille. BHB:ta analysoidessa voidaan erotella alkoholiketoasidoosi, diabeettinen ketoasidoosi ja hypersmo-laarinen hyperglykeeminen tila toisistaan. GHB on erittäin vaarallinen viihdekäytössä oleva huumausaine, jonka akuutti myrkyllisyys on aiheuttanut useita tahattomia kuolemia. GHB:ta käytetään jonkin verran myös seksuaalirikoksissa huumaavien ominaisuuksien vuoksi. Näytteet analysoitiin kaasukromatografia-massaspektrometrisesti.</p> <p>Työssä validoitavia parametreja oli menetelmän kalibroinnin lineaarisuus ja tarkkuus, kalibroinnin oikeellisuus ja tarkkuus, detektio- ja määritysrajat, toistuvuus, ulkoinen näyttö tulosten oikeellisuudesta, matriisiefektin määrittäminen, mittausepävarmuus ja laajennettu mittausepävarmuus.</p> <p>Menetelmän todettiin olevan riittävän tarkka ja lineaarinen käyttötarkoitukseensa. Detektiorajaksi saatiin γ-hydroksibutyraatille 1 mg/l ja β-hydroksibutyraatille 37 mg/l. Määritysrajaksi GHB:lle verestä ja virtsasta saatiin 3 mg/l ja BHB:lle 50 mg/l. Raportointiraja BHB:lle on 50 mg/l ja GHB:lle elävistä potilaista 10 mg/l ja vainajista 50 mg/l.</p> <p>Menetelmä täyttää vaatimukset ja sitä voidaan käyttää määritettäessä kvantitatiivisesti β- ja γ-hydroksibutyraattia.</p>	
Avainsanat	β -hydroksibutyraatti, γ -hydroksibutyraatti, GC-MS, Validointi

Author(s) Title Number of Pages Date	Heidi Tetri Quantitation of β -hydroxybutyrate and γ -hydroxybutyrate in Post-Mortem Blood and Urine Samples and Validation of the Method 54 pages + 4 appendices 28 September 2016
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructor(s)	Ilpo Rasanen, Forensic Chemist Mia Ruismäki, Senior Lecturer
<p>The thesis work was carried out at National Institute for Health and Welfares Forensic toxicology unit in Helsinki, Kytösuontie agency. The laboratory is part of government services that provides for example guidance and supervision as regards establishing the cause of death. The laboratory also performs forensic post- mortem examinations.</p> <p>Forensic autopsy takes place when the cause of death cannot be determined externally by a medical examiner. When death has occurred suddenly or unexpectedly it is very important to, for example, have information about the state of health of the deceased. In that case, forensic toxicology examination takes place mainly from blood, urine, vitreous humor, content of the stomach, muscle, hair or another obtainable sample matrix of the deceased.</p> <p>In this work, only post- mortem blood and urine were used as a sample matrix. The aim of this thesis was quantitation of β- hydroxybutyrate (BHB) and γ- hydroxybutyrate (GHB) in post- mortem blood and urine and to validation of the method. BHB is potential biomarker for alcoholicketoacidosis. When analyzing BHB you can demerge alcoholicketoacidosis, diabetic ketoacidosis and hypersmolar hyperglycemic state. GHB is very dangerous drug and its acute poisoning has caused several accidental deaths. GHB is sometimes used in sexual assaults for its stunning qualities. Samples were analyzed by using gas chromatography-mass spectrometry.</p> <p>The aim of the validation is to provide reliable results and to point out that the method is applicable for its use. In this work validated parameters were calibration linearity and accuracy, trueness of calibration and accuracy, detection- and concentration limits, repeatability and reproducibility, trueness of quality control samples, matrix effect and standard and expanded uncertainty.</p> <p>The method is found to be precise and linear for its use. Detection limit for GHB is 1 mg/l and BHB 37 mg/l. Concentration limit for GHB blood and urine is 3 mg/l and for BHB blood and urine 50 mg/l. Reportage limit for BHB is 50 mg/l and for GHB for alive is 10 mg/l and deceased 50 mg/l.</p> <p>Method fulfills requirements and can be used for quantitative determination of β- and γ hydrokxybutyrate.</p>	
Keywords	β -hydrokxybutyrate, γ -hydrokxybutyrate, GC-MS, Validation

Kiitossanat

Opinnäytetyö tehtiin Terveyden ja hyvinvoinninlaitoksen Oikeustoksikologian yksikössä Helsingissä Kytösuontien toimipisteessä. Haluan kiittää laboratoriopäällikkö Raimo Ketolaa sekä yksikönpäällikköä Teemu Gunnaria mahdollisuudesta suorittaa opinnäytetyöni Oikeustoksikologian yksikössä. Kiitän myös minua laboratoriossa ohjannutta henkilökuntaa. Erityiskiitokset kuuluvat ohjaajalleni Ilpo Rasaselle hyvästä ohjauksesta ja tuesta opinnäytetyön suorituksen varrella.

24.5.2016 Helsingissä

Heidi Tetri

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Kuolemansyyn selvittäminen Suomessa	2
3	Diabetes	8
4	Ketonit, ketoaineet, ketoosi ja ketoasidoosi	9
4.1	β -hydroksibutyraatti	10
4.2	Alkoholiketoasidoosi (AKA)	11
4.3	Diabeettinen ketoasidoosi (DKA)	11
5	Hypersmolaarinen hyperglykeeminen tila	12
6	γ -hydroksibutyraatti ("Gamma") ja γ -butyrolaktoni ("Lakka")	12
7	Kaasukromatografi-massaspektrometri	14
8	Sisäisen standardin menetelmä	16
9	Validointi	17
10	Validoitavat parametrit	17
10.1	Menetelmän kalibroinnin lineaarisuus ja mittausalue	17
10.2	Kalibroinnin oikeellisuus ja tarkkuus	17
10.3	Detektio- ja määritysrajat	18
10.4	Menetelmän spesifisyys ja selektiivisyys	18
10.5	Toistuvuus (Täsmällisyys)	18
10.5.1	Toistettavuus	19
10.5.2	Uusittavuus	19
10.6	Ulkoinen näyttö tulosten oikeellisuudesta	19
10.7	Matriisiefektin määrittäminen	19
10.8	Mittausepävarmuus ja laajennettu mittausepävarmuus	19
10.9	Valvontakortti (X-kortti) ja sen rajat	20
11	Työssä käytetyt laitteet ja reagenssit	21

11.1	Laitteet	21
11.2	Reagenssit	22
12	Laitteparametrit	23
13	Työn suoritus	23
13.1	Alustava ionien valinta	24
13.2	Retentioajan lukitus	24
13.3	Retentioajan toistettavuus	24
13.4	Uuttomenetelmien vertailu	25
13.5	Näytteiden käsittely	25
13.5.1	Kytösuontien menetelmä	25
13.5.2	Tilkanmäen menetelmä	27
13.6	Varsinaisten ionien valinta	28
13.7	Nollaverien ja -virtsan taustapitoisuuden määrittäminen	28
13.8	Menetelmän kalibroinnin lineaarisuus ja mittausalue	29
13.9	Toistuvuus (Täsmällisyys)	29
13.9.1	Toistettavuus	29
13.9.2	Uusittavuus	29
13.10	Ulkoinen näyttö tulosten oikeellisuudesta	29
13.11	Matriisiefektin määrittäminen	30
14	Tulokset	30
14.1	Retentioajan lukitus	30
14.2	Retentioajan toistettavuus	30
14.3	Uuttomenetelmien vertailu	31
14.4	Nollaverien ja -virtsan taustapitoisuuden määrittäminen	32
14.5	Menetelmän kalibroinnin lineaarisuus ja mittausalue	32
14.6	Detektio- ja määritysrajat	36
14.7	Kalibroinnin oikeellisuus ja tarkkuus	37
14.8	Menetelmän selektiivisyys	39
14.9	Tunnistuksen oikeellisuus	39
14.10	Toistuvuus (Täsmällisyys)	39
14.10.1	Toistettavuus	39
14.10.2	Uusittavuus	41
14.11	Ulkoinen näyttö tulosten oikeellisuudesta	42
14.12	Matriisiefektin määrittäminen	42

14.13 Mittausepävarmuus ja laajennettu mittausepävarmuus	43
15 BHB pitoisuuden korrelaatio PMI:n kanssa	47
16 Johtopäätökset	49
Lähteet	51
Liitteet	
Liite 1. Validointisuunnitelma	
Liite 2. GHB:n ja BHB:n kokonaisonivirtakromatogrammit ja massaspektrit	
Liite 3. Raportti retentioajan lukituksesta	
Liite 4. Determination of β -hydroxybutyrate in Blood and Urine Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry-artikkeli	

Lyhenteet

AKA	<i>Alcoholic Ketoacidosis</i> . Alkoholiketoasidoosi
Asetyyli-CoA	<i>Acetylcoenzyme A</i> . Asetyylikoentsyymia A
Asidoosi	<i>Acidosis</i> . Elimistön nesteiden liiallinen happamuus
BHB	<i>β-hydroxybutyrate</i> . Betahydroksibutyraatti
DKA	<i>Diabetic Ketoacidosis</i> . Diabeettinen ketoasidoosi
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto
GC-MS	<i>Gas Chromatography Mass Spectrometer</i> . Kaasukromatografi- massaspektrometri
GHB	<i>γ-hydroxybutyrate</i> . Gammahydroksibutyraatti
PM-näyte	<i>Post mortem -näyte</i> . ”Kuoleman jälkeinen”-näyte
PMI	<i>Post mortem interval</i> . Aika, joka on kulunut henkilön kuolemasta ruumiin- avaukseen
SIM	<i>Selected ion monitoring</i> . Ionimonitorointitekniikka
TIC	<i>Total ion current-chromatogram</i> . Kokonaisionivirtakromatogrammi
TMS-johdos	<i>Trimethylsilyl -derivate</i> Trimetyylisilyyli –johdos

1 Johdanto

Opinnäytetyö suoritettiin Terveyden ja hyvinvointilaitoksen Oikeustoksikologiayksikössä. Yksikön tarkoituksena on tuottaa oikeustoksikologisia sekä päihdetutinnan piiriin kuuluvia laboratoriotutkimuksia ja asiantuntijalausuntoja sekä arvioida ja kehittää päihdetestauksen käytäntöjä ja menetelmiä. Oikeustoksikologiayksikkö tarjoaa asiantuntijapalveluita sekä koulutustoimintoja päihteisiin ja niiden testauksiin liittyen. Yksikössä tutkitaan myös päihteiden ja uusien muuntohuumeiden käyttöä ja esiintyvyyttä päihdeanalyttisiä menetelmiä hyödyntämällä.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli määrittää kvantitatiivisesti γ -hydroksibutyraatti (GHB) ja β -hydroksibutyraatti (BHB) vainajien verestä sekä virtsasta. γ -hydroksibutyraattia määritetään myös elävistä esimerkiksi seksuaalirikoksissa. BHB on hyvä biomarkkeri alkoholiketoasidoosista (AKA). BHB:lla voidaan indikoida kroonista alkoholismia tai hetkellistä alkoholin kulutusta, ja se voidaan todeta pitkän ajan jälkeen etanolin hajottua kehosta. BHB:lla on myös suuri merkitys diabeettisen ketoasidoosin (DKA) määrittämisessä.

GHB on vahva keskushermoston stimulantti ja se on erittäin vaarallinen viihdekäytössä oleva huumausaine. Sen akuutti myrkyllisyys on aiheuttanut useita tahattomia yliannostuskuolemia. γ -butyrolaktoni (GBL) sen sijaan imeytyy nopeasti ruuansulatuskanavasta, muuttuen entsyymien vaikutuksesta GHB:ksi. GBL on vaikutukseltaan nopeampi kuin GHB ja näin ollen sen väärinkäyttömahdollisuudet ovat suuret.

Menetelmä validoitiin. Validoinnin tarkoituksena oli osoittaa, että menetelmät ovat tarpeeksi herkkiä ja antavat luotettavia tuloksia niin vainajien verestä ja virtsasta BHB:lle sekä vainajien ja elävien potilaiden verestä ja virtsasta GHB:lle.

Teoriaosuudessa on keskitytty kuvailemaan Suomessa suoritettavaa kuolemansyyn selvitystä, diabetesta, ketoasidoosin muodostusta elimistössä sekä validointiin liittyviä parametreja.

2 Kuolemansyyn selvittäminen Suomessa

Kuolemansyyn selvittämistä koskevan lain 7 §:n mukaan poliisi vastaa oikeuslääketieteellisestä kuolemansyyn selvittämisestä:

1. kun kuoleman ei tiedetä johtuneen sairaudesta tai kun vainaja ei ole viimeisen sairautensa aikana ollut lääkärin hoidossa.
2. kun kuoleman on aiheuttanut rikos, tapaturma, itsemurha, myrkytys, ammattitauti tai hoitotoimenpide tai kun on aihetta epäillä kuoleman johtuneen jostakin edellä mainituista syistä; tai
3. kun kuolema on tapahtunut muuten yllättävästi.

Kohtien 1 ja 3 mukaisissa tapauksissa kysymyksessä ovat äkilliset, odottamattomat ja yllättävät luonnolliset kuolemat, ilman että vainaja olisi kuolemaa edeltävänä aikana tai ainakaan kuolemaan johtaneen äkillisen sairauden aikana ollut lääkärin hoidossa. [29, s.84] Luonnollisella kuolemalla tarkoitetaan taudin aiheuttamaa kuolemaa, tällöin kuolintodistukseen merkitään perussyöksi kyseinen tauti. Vaikuttavia tekijöitä voi kuitenkin olla yksi tai useampi muu tauti ja/tai ulkoinen tekijä, kuten vamma, alkoholin nauttiminen yms. [29, s.79]

Kohdan 2 mukaisissa tapauksissa on kyse ei-luonnollisista kuolemista tai sellaisen epäilystä. Myös vammautumisen tai muiden toisen kohdan tapausten pitkään jatkuneet jälkitilat ja kuolema jopa vuosien päästä tapahtuman jälkeen kuuluvat oikeuslääketieteellisten kuolemansyyn selvitysten piiriin. Esimerkiksi todetut tai epäillyt ammattitautikuolemat. [29, s.84]

Erityisolosuhteissa kuten armeijassa, kiinni- tai säilöönötettuna, pidätettynä, vangittuna tahdon vastaisessa hoidossa tai vastaavissa olosuhteissa kuolleiden sekä tuntemattomien vainajien kuolemansyyn selvittäminen vaatii poliisille ilmoittamisen ja oikeuslääketieteellisen kuolemansyyn selvittämisen. Poliisi huolehtii ruumiin kuljettamisen oikeuslääketieteelliseen ruumiinavaukseen. Oikeuslääketieteellisestä kuolemansyyn selvittämisestä aiheutuneista kustannuksista vastaa valtio, ellei toisin ole säädetty tai tuomioistuimien ole määrännyt. [29, s.84]

Poliisin on ilmoitettava syyttäjälle kuolemasta, joka on tapahtunut henkilön ollessa lain määrittämässä, poliisin hallinnoimassa säilytystilassa tai poliisin valvonnassa vapautensa menettäneenä. [21.]

Poliisi voi siis määrätä oikeuslääketieteellisen ruumiinavauksen kuolemansyyn selvittämiseksi, ja sen järjestämisestä vastaa Terveysten ja hyvinvoinninlaitos (THL). Mikäli poliisilla ei ole lainmukaista velvoitetta ryhtyä oikeuslääketieteelliseen kuolemansyyn selvittämiseen, vainajan kuolemansyyn selvitetään lääketieteellisen järjestelmän mukaisesti vainajaa hoitaneen lääkärin tai terveyskeskuksen virkalääkärin toimesta. [21.]

THL ja oikeuslääkärit vastaavat oikeuslääketieteellisestä ruumiinavaustoiminnasta. [21.]

Poliisi kutsuu lääkärin tapahtumapaikalle epäilyissä rikostapauksissa ja joissakin epäselvissä kuolemantapauksissa. Tällöin lääkäri suorittaa poliisin määräyksestä ruumiin oikeuslääketieteellisen ulkotarkastuksen ja tarvittaessa siihen liittyvän tapahtumapaikkatutkimuksen. [29, s.84]

Ulkotarkastus on tärkeä ruumiin tutkimusmenetelmä, tapahtumapaikkatutkimukseen liitettynä se voi antaa mahdollisuuden tehdä havaintoja, jotka usein auttavat ratkaisevasti kuoleman olosuhteiden, kuolemansyyn ja -luokan sekä kuolinajan määrittämiseen. Usein on kuitenkin niin että kuolemansyytä ei pystytä ulkotarkastuksessa toteamaan. [29, s.84-85]

Tapahtumapaikalla lääkäri suorittaa seuraavat tehtävät:

- Toteaa kuoleman, kuolemaa todettaessa tulee ottaa huomioon ensi- ja toissijaiset kuolemanmerkit, jotka antavat viitteitä kuolinajasta, ruumiin kuolemanjälkeisistä asennoista ja joistakin myrkytyksistä. [29, s.85]
- Määrittää kuolinajan, ruumiin lämpötilaan, lautumiin, kuolonkankeuteen, mätänemiseen ja muihin kuolemanjälkeisiin muutoksiin liittyvät havainnot tulee tallentaa tarkasti ja niiden perusteella voidaan tehdä päätelmiä aikavälistä, jolloin henkilö on kuollut. [29, s.85]

- Tekee havainnot kuolemansyyn ja -luokan määrittämiseksi, ulkotarkastuksen yhteydessä vainaja tulee aina riisua ja tutkia kokonaan. Vammojen esiintyessä kehon eri osissa sekä niiden laatu ja laajuus tutkitaan ja tiedot taltioidaan huolellisesti. Havaintojen perusteella voidaan tehdä päätelmiä kuolemansyystä ja kuolintavasta sekä käytetystä voimasta ja laadusta. Vammojen perusteellinen kartoitus on tärkeää, vaikka ulkotarkastuksen jälkeen tehdään oikeuslääketieteellinen ruumiinavaus. Ruumiinavaus suoritetaan yleensä yhden tai useamman vuorokauden kuluttua, jolloin mahdolliset mätänemismuutokset voivat edetä pitkälle esimerkiksi vesiruumiissa ja vammojen arvioiminen voi olla tällöin vaikeaa. [29, s.85]
- Ottaa näytteitä, ulkotarkastuksessa voidaan ottaa rajallinen määrä oikeuskemiallisia näytteitä. Tällöin voidaan ottaa esimerkiksi verinäyte alkoholimääritystä varten. Näytteestä voidaan määrittää myös hääkää, lääkkeitä, huumeita ja muita myrkyllisiä aineita. Etenkin alkoholin määritystä varten verinäyte on otettava mahdollisimman pian kuoleman jälkeen tapauksissa joissa tuloksella voi olla oikeudellista merkitystä kuten mm. liikenneonnettomuuksissa, työtapaturmissa ja henkirikoksissa. Virtsa on varsin hyvin säilyvää ja näyte yleensä otetaan itse ruumiinavauksessa. [29, s.86]
- Varmistaa vainajan henkilöllisyyden ja muodostaa käsityksen kuolemaan liittyvistä olosuhteista. Kuoleman olosuhteiden perusteella ratkaistaan, tehdäänkö kuolemansyyn selvittäminen lääketieteellisen vai oikeuslääketieteellisen järjestelmän mukaisesti. [22.]

Oikeuslääketieteellinen ruumiinavaus on suoritettava, jos kuolemaa ei ole voitu todeta oikeuslääketieteellisen ulkotarkastuksen tehneen lääkärin lausunnon ja muiden tutkinassa ilmenneiden seikkojen perusteella, ennen kuin kuolleen saa haudata tai luovuttaa opetuskäyttöön. Ruumiinavaus on tehtävä mahdollisimman pian kuoleman jälkeen ja henkirikostapauksissa tai sellaista epäiltäessä päivystysluonteisesti. [29, s.86]

Oikeuslääketieteellinen ruumiinavaus tehdään poliisin määräyksestä, ilman omaisten suostumusta. Tällöin määräyksen voi antaa poliisipiirin päällikkö tai poliisipiirin johtosäännössä määrätty muu virkamies, lääninhallitus, keskusrikospoliisi tai tuomioistuin. Määräyksestä ilmenee minkä kuolemansyyn selvittämistä koskevan 7 §:n momentin mukaan poliisi on ryhtynyt tutkintaan ja oikeuslääketieteelliseen kuolemansyyn selvit-

tämiseen. Ruumiinavausmääräyksen mukana avauksen tekeväälle lääkäriille ilmoitetaan myös tarpeelliset tiedot vainajan henkilöllisyydestä, kuolinajasta, kuolinpaikasta jne. Poliisi toimittaa tapauksesta tiedot joista ilmenee tapahtumien yleiskulku, taustatiedot mahdollisista alkoholin ja muiden huumaavien aineiden käytöstä sekä alkoholismista ja narkomaniasta, olennaisista sairauksista ja invalideeteista, käytetyistä lääkkeistä, paikalta mahdollisesti löydetyistä resepteistä jne. [29, s.87]

Suomessa oikeuslääketieteellinen ruumiinavaus tarkoittaa täydellistä ruumiinavausta, jossa kaikki ruumiinontelot avataan ja niiden elimet tutkitaan perusteellisesti. Samoin tutkitaan myös kaikki mahdollisten ulkoisten tekijöiden aiheuttamat elinmuutokset. Oikeuslääketieteelliseen ruumiinavaukseen voi liittyä monenlaisia lisätutkimuksia, kuten näytteiden ottamista, röntgentutkimuksia luun murtumien ja mahdollisten luotien toteamiseksi, tuntemattomien vainajien oikeushammaslääketieteellistä tunnistamista sekä mahdollisten puremajälkien tutkimista jne. [29, s.87]

Tunnistamista varten tärkeää on ottaa DNA-tutkimusta varten verinäytteet ja muut elinäytteet. [29, s.88]

Erikoisemmissa tapauksissa voidaan joutua tekemään neuropatologisia tutkimuksia jolloin aivot ja mahdollisesti selkäydin kiinnitetään kokonaisina formaliiniin ja toimitetaan erikoisasiantuntijalle. [29, s.88]

Histopatologisten näytteiden ottaminen eri elimistä kuten aivot, sydänlihas, keuhkot, maksa ja munuaiset, kuuluvat rutiinitoimenpiteisiin makroskooppisten muutosten selvittämiseksi (vammat, vammanikä, vamman elinaikaisuus, sairausmuutokset jne.) ja tapauksissa joissa kuolinsyy jää epäselväksi ruumiinavauksessa. [29, s.88]

Hukkumiskuolemissa ja vesiruumistapauksissa otetaan myös pii-levämääritykset kudoksenäytteistä kuten aivot, keuhkot, maksa, munuaiset ja tarvittaessa luuydin. [29, s.88]

Biokemiallisiksi näytteiksi otetaan pääsääntöisesti virtsaa, verta ja silmän lasiaisnestettä. [29, s.88]

Oikeuskemiallisiin näytteisiin kuuluu perifeerinen laskimoverinäyte, virtsanäyte, silmän lasiaisnäyte, mahansisältö ja maksanäyte. Näytteistä voidaan todeta mahdolliset alkoholit, lääkeaineet, huumeet ja muut myrkylliset aineet. Alkoholi-, lääkeaine- ja huu-

mausainepitoisuudet tulee aina varmentaa hyväksytyillä kemiallisilla menetelmillä, jotta ne ovat oikeudellisesti päteviä. [29, s.88]

Oikeuskemiallisista näytteistä verinäyte on otettava mahdollisimman pian kuolemasta tapauksissa, joissa vainaja on ollut liikenneonnettomuudessa, työtapaturmassa tai sellaisessa tapahtumassa, joissa verenalkoholipitoisuudella on oikeudellista merkitystä. Viive kuolemasta ruumiinavaukseen on Suomessa useita vuorokausia ja tällöin verenalkoholipitoisuus voi muuttua esim. mikrobitoiminnan vaikutuksesta. Näyte otetaan yleisesti näyteputkeen, johon on lisätty mikrobitoimintaa estävää kemikaalia kuten esim. natriumfluoridia. [29, s.392]

Ruumiinavauksessa oikeuslääkäri ottaa laajat oikeuskemialliset näytteet esim. epäiltäessä myrkytystä. Tutkittavien kudosten valinnassa on vaihtoehtoja ja näiden välisiä pitoisuuksia voidaan vertailla keskenään. Virtsa, joka on keskeisin näyte kliinisessä toksikologiassa, on saatavilla vain noin 75 % tapauksista. Kudosten hajoamisessa syntyviä pienimolekyylisiä yhdisteitä saattaa esiintyä runsaasti. Verisolujen hajoamisen eli hemolyyysin vuoksi vainajista on käytettävä seerumin tai plasman sijaan kokoverta. [29, s.393]

Hyvin tavallista on, että taustatiedoissa mainituista aineista huolimatta oikeuskemiallisissa tutkimuksissa löydökset eivät ole samoja. Tällöin useamman kuin yhden kudoksen tai biologisen nesteen analysointi antaa lisävarmuutta löydöksille. Joskus on mahdollista tehdä päätelmiä myrkytysajankohdasta, myrkytysaikasta ja myrkytyksen äkillisyydestä. [29, s.394]

Elävien henkilöiden oikeustoksikologisia näytteitä ovat veri (plasma, seerumi), virtsa ja mahansisältö. Tarpeen vaatiessa hiusnäytteitä voidaan myös ottaa haluttaessa arvioida huumeiden käytön historiaa kuukausien ajalta. [29, s.394]

Hieman yli puolet oikeuslääketieteellisesti tutkittavista tapauksista kuuluu äkillisten odottamattomien kuolemien ryhmään. Huomattava osa henkilöistä löytyy siis kuolleena ilman silminnäkijöitä tai niitä ei ainakaan ole tiedossa. Ryhmä on erityisen tärkeä siinäkin mielessä, että oikeuslääketieteelliseen ruumiinavaukseen lähetetyistä luonnollisena pidettyjen äkkikuolemien joukosta paljastuu säännöllisesti erityyppisiä väkivaltaisia kuolemia ja jopa henkirikoksia. [29, s.121]

Kuoleman äkillisyys perustuu yleensä taudille ominaiseen kuolinmekanismiin, joka johtaa kuolemaan joko lähes välittömästi tai sekuntien/ minuuttien kuluttua. [29, s.121]

Kuolinmekanismi eroaa kuolemansyystä siten että kuolinmekanismilla tarkoitetaan normaalista poikkeavaa elimistön fysiologisten ja biokemiallisten tapahtumien sarjaa, joka johtaa suoraan kuolemaan tai jonka peruskuolemansyy käynnistää. Kuolemansyylä tarkoitetaan siis puolestaan jotakin vakavaa vammaa, myrkytystä tai sairautta, joka aloittaa elimistössä kuolemaan johtavan tapahtumaketjun. [29, s.93]

Kuolemansyy johtaa siis aina kuolemaa edeltävään agonaaliseen shokkiin, jolloin elimistössä puolustusmekanismit toimivat uupumukseen asti. Äkillinen uhkaava agonaalinen shokki voidaan hoitotoimenpiteillä kumota ja kuolema estää. [29, s.93]

Vuoden 2016 alusta lähtien Suomessa tehdään oikeuslääketieteellisiä ruumiinavauksia viidellä paikkakunnalla; Helsingissä, Turussa, Tampereella, Oulussa ja Kuopiossa. Terveiden ja hyvinvoinnin laitos hyväksyy sairaalan tai muun paikan, jossa ruumiinavaus tehdään.

Kuolemansyyn selvittämisen tavoitteena on:

- vainajan henkilöllisyyden varmentaminen.
- kuoleman olosuhteiden selvittäminen.
- vainajan kuolemansyyn ja kuolemanluokan määrittäminen.
- antaa hautauslupa.
- tehdä ilmoitus kuolemasta rekisteriviranomaiselle.
- antaa kuolintodistus. [22.]

Taulukko 1. Oikeuslääketieteellisten ruumiinavausten määrä vuosina 2008-2015.

	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Kuolemien lkm.	49094	49883	50887	50585	51707	51472	52186	52492
Oikeuslääketieteellisiä avauksia (%)	24,4	24,4	23,2	21,0	19,4	18,5	18,4	?
Oikeuskemiallisia tutkimuksia (%)	13,7	13,8	14,0	13,2	12,6	12,8	12,9	11,8

Oikeuslääketieteellisten ruumiinavausten määrä on sittemmin hieman vähentynyt. [23.]

3 Diabetes

Diabetes on aineenvaihdunnansairaus, joka estää kehoa käyttämästä kunnolla ravinnosta saatua energiaa. Diabetes kehittyy silloin kun haima tuottaa insuliinia hyvin vähän tai vaihtoehtoisesti se ei tuota sitä ollenkaan. Diabetes voi kehittyä myös silloin kun haima tuottaa insuliinia mutta keho ei pysty hyödyntämään sitä kunnolla. [13.] Diabetes on maailman viidenneksi yleisin kuolinsyy. Se luokitellaan kahteen erityyppiseen diabetekseen. [6.]

Tyypin 1 diabetesta sairastaa keskimäärin 10 % kaikista diabetespotilaista. Se on sairaus jossa haiman beeta-solujen tuhoutuminen johtaa absoluuttiseen insuliinin puutokseen. Yleisin tyypin 1 diabeteksen aiheuttaja (n. 95 %) on geneettinen virhe immuunisysteemissä, jota pahentaa ympäristötekijät. Tyypin 1 diabeteksessa insuliinin injektointi päivittäin on tärkeää. [6.]

Tyypin 2 diabetesta, aikuistyyppin diabetesta, ("insuliinista riippumaton diabetes"), sairastaa keskimäärin 90 % kaikista diabeetikoista. Tyypin 2 diabetes kehittyy, kun keho tuottaa puutteellisesti insuliinia tai kun keho ei pysty sitä hyödyntämään kunnolla, tätä kutsutaan insuliiniresistanssiksi. Sitä tavataan yleisesti yli 40-vuotiailla, joiden suku-

taustassa on todettu olevan diabetesta. Ylipaino on vahvasti yhteydessä 2 tyypin diabetekseen. [6.] Etenkin vyötärölihavuus eli rasvakudoksen kertyminen vatsaonteloon ja maksaan johtavat sokeriaineenvaihdunnan häiriöön ja sitä kautta diabetekseen. [34.] Esidiabetes on aikuistyyppin diabeteksen esivaihe, joka vuosien varrella kehittyy varsinaiseksi diabetekseksi. Heikentynyt paastosokeri ja heikentynyt glukoosinsieto ovat sokeriaineenvaihdunnan häiriöitä ja näitä voidaan kutsua esidiabetekseksi. [35.]

4 Ketonit, ketoaineet, ketoosi ja ketoasidoosi

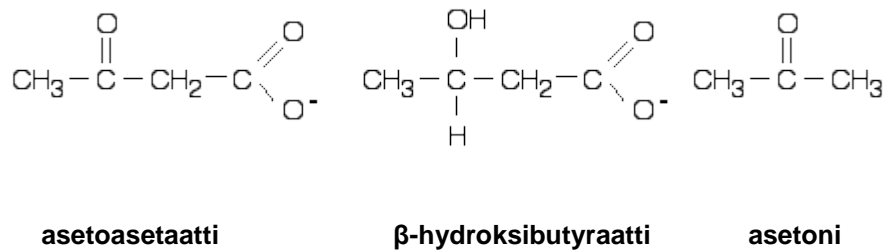
Ketonit ovat orgaanisia yhdisteitä jotka sisältävät funktionaalisena ryhmänä hiiliatomin, joka on sitoutuneena kaksoissidoksella happiatomiin ja kahteen muuhun hiiliatomiin. Asetoni ja asetoasetatti luokitellaan ketoneiksi, mutta β -hydroksibutyraatti ei kemiallisessa mielessä ole ketoni, vaikkakin se luokitellaan kyseiseksi yhdisteeksi esiintyessään tasapainossa asetoasetatin kanssa. [1.]

Ketoaineita muodostuu kehoon maksassa, jossa suurin osa rasvahappo-oksidaation tuotoksesta, asetyyli-CoA:sta hapettuu mitokondriaalisessa sitruunahappokierrossa hiilidioksidiksi ja energiaksi. Osa kuitenkin hajoaa ketogeneesissä eli maksan ja munuaisten soluissa tapahtuvassa prosessissa asetoasetatiksi. [2.]

Asetoasetatti hajoaa entsyymaattisesti β -hydroksibutyraatiksi, tai spontaanisti asetoniksi ja hiilidioksidiksi. Reaktio voi olla myös reversiibeli β -hydroksibutyraatti dehydrogenaasi entsyymin vaikutuksesta. Asetonin merkitys ketoasidoosin muodostumisessa on vähäinen. [1.] Kokonaisketoaineista asetonilla on vain 2 %:n osuus. [6.] Ketoaineista yleisimpiä kehossa on asetoasetatti, β -hydroksibutyraatti ja asetoni. [3.]

Kehon korkeaa ketoainepitoisuutta kutsutaan ketoosiksi. [4.] Ketoosissa asetoasetattia muodostuu kehoon nopeammin kuin sitä pystytään metabolisoimaan. [2.] Näin ollen korkea ketoainepitoisuus aiheuttaa veren pH:n madaltumista (happamoitumista), tätä kutsutaan ketoasidoosiksi. [5.] Ketoasidoosin voi olla tulos monista sairauksista, mutta pääsääntöisesti se johtuu alkoholin väärinkäytöstä ja diabeteksestä. Alkoholismissa, alkoholin (etanoli) suurkulutus johtaa kehon kuivumiseen (kautta oksentelun ja ripuloinnin) ja BHB:n muodostumiseen rasvahapoista. [39.] Aivot pystyvät käyttämään ketoaineita energian lähteenä, silloin kun glukoosia ei ole kehossa tarpeeksi. Asetonin läsnä-

olo ei estä korkeita BHB-pitoisuuksia (>250 mg/l), näin ollen sitä voidaan käyttää indikaattorina patologisesti merkittävässä ketoasidoosissa. [38.]



Kuva 1. Ketoaineiden kemialliset rakennekaavat [2.]

4.1 β -hydroksibutyraatti

BHB:a pidetään hyvin potentiaalisena biomarkkerina alkoholiketoasidoosissa (AKA). BHB:lla on mahdollista indikoida kroonista alkoholismia tai hetkellistä alkoholin kulutusta, ja se voidaan todeta vielä pitkän ajan jälkeen etanolin hajottua kehosta. Sillä on myös suuri merkitys diabeettisen ketoasidoosin (DKA) määrittämisessä. [3.] BHB:n, asetonin ja glukoosin pitoisuuksien määrittäminen on oleellisen tärkeää tunnistettaessa ja eroteltaessa alkoholiketoasidoosi diabeettisesta ketoasidoosista. [37.] Glukoosipitoisuuden määrittäystä ei tosin ole hyvä tehdä vainajan verestä, koska yleensä pitoisuuksien on todettu laskevan lähelle nollaa muutama tunti kuoleman jälkeen. Silmän lasiaisnesteen glukoosipitoisuuksia voidaan pitää luotettavampina AKA:n ja DKA:n erotelussa glukoosipitoisuuksien pysyessä alle 2000 mg/l, huonosti hoidetussa diabeteksessä pitoisuudet voivat kohota yli 2000 mg/l. BHB:a voidaan mitata veren sijasta myös silmän lasiaisnesteestä, niiden pitoisuuksien on todettu korreloivan hyvin keskenään. [38.]

BHB-pitoisuutta alle 50 mg/l voidaan pitää normaalina, 51-249 mg/l pitoisuus ilmaisee kohonneen BHB-pitoisuuden, kun taas yli 250 mg/l BHB pitoisuus on korkea ja patologisesti merkittävä. [39.]

Kokonaisketoainepitoisuus on riippuvainen BHB:n konsentraatiosta. BHB:n osuus kokonaisketoaineista on keskimäärin 78 %. [6.]

4.2 Alkoholiketoasidoosi (AKA)

Matala tai puuttuva etanolipitoisuus veressä, kohonneiden asetonipitoisuuksien kanssa ei vielä itsestään selitä vainajan kuolinsyytä, mutta antaa viitteitä kroonisen alkoholismin taustan omaavien vainajien mahdollisesta ketoasidoosista. Alkoholiketoasidoosi on yhdistettävissä krooniseen alkoholismiin ja vähentyneeseen ravinnon saantiin. Ravinnon vähentymisen johdosta glukoosia on saatavilla vähemmän ja näin ollen maksan glykogeenivarastojen pienentyminen johtaa kasvaneeseen lipolyysiin ja ketogeneesiin. [6.] AKA eroaa diabeettisesta ketoasidoosista siten että BHB/asetoasetaatti-suhde on korkeampi kuin diabeettisessa ketoasidoosissa. [3.]

4.3 Diabeettinen ketoasidoosi (DKA)

DKA yhdistetään tyypin 1 diabetekseen ja se liittyy insuliinin puutokseen ja hyperglykemiaan, korkeaan verensokeriin. Insuliini kontrolloi kehon glukoosia; jos insuliinipitoisuus on alhainen, se aiheuttaa kehoon nestehukkaa ja ylikuormittumista glukoosista. Tällöin kehoon muodostuu ketoasidoosi. [3.]

DKA on hengenvaarallinen tila, joka voi ilmetä insuliinin puuttuessa kokonaan kehosta, kuten tyypin 1 diabeteksessa, tai puutteellisesta insuliinipitoisuudesta stressin tai vakavan sairastumisen yhteydessä, joko tyypin 1 tai 2 diabeteksessa. Arviolta noin kolmasosa kuolemista johtuu diabeettisesta ketoasidoosista, ihmisillä joiden tiedetään sairastavan diabetesta. [1.]

Diabeettinen ketoasidoosi kehittyy varsin lyhyellä aikavälillä, alle 24 h:ssa ja kuolleisuus on tällöin 2-5 %. Diabeettisesta ketoasidoosista johtuva kuolema voidaan osoittaa korkeiden ketoaine- ja glukoosipitoisuuksien aiheuttaman hyperglykemian kehittymisestä ennen kuolemaa. [6.]

AKA:	DKA:
<ul style="list-style-type: none"> • Asidoosi • Ketoosi • Hypoglykemia tai normaali glukoosi - Korkea ketonipitoisuus - Matala/normaali glukoosipitoisuus 	<ul style="list-style-type: none"> • Asidoosi • Ketoosi • Hyperglykemia - Korkea ketonipitoisuus - Korkea glukoosipitoisuus

Kuva 2. Tyypillisiä tunnusmerkkejä/eroja alkoholiketoasidoosista (AKA) ja diabeettisesta ketoasidoosista (DKA) [6.]

5 Hypersmolaarinen hyperglykeeminen tila (HHS)

HHS on yksi vakavista aineenvaihdunnan häiriöistä, jota esiintyy yleensä vanhemmilla tyypin 2 diabeetikoilla, joilla on samanaikaisesti jokin sairaus joka johtaa vähentyneeseen nesteiden saantiin. Kuolleisuus on suurempi verrattuna diabeettiseen ketoasidoosiin, arviolta 10-20%. HHS ei kehitä kehoon merkittävää ketoasidoosia, toisin kuin DKA, syy tähän on tuntematon. [40.] BHB:n analysointi auttaa myös erottamaan DKA:n HHS:sta, asetonin mahdollisesti ollessa negatiivinen veressä joissakin tapauksissa. HHS on selvästi alitunnistettu tila. [37.]

6 γ -hydroksibutyraatti ("Gamma") ja γ -butyrolaktoni ("Lakka")

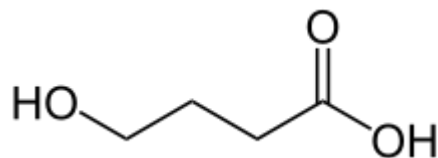
Vuonna 1963 γ -hydroksibutyraattia (GHB) todettiin esiintyvän luonnollisesti ihmisten aivoissa, jossa sen voidaan olettaa toimivan neurotransmitterina eli hermojen välittäjäaineena. [12.] 1960-luvulla sitä kuitenkin syntetisoitiin käytettäväksi nukutusaineena, mutta käyttö lopetettiin pian sen huonon kipua lievittävän vaikutuksen vuoksi. 1970-luvulla GHB:a suositeltiin narkolepsian hoitoon. 80-luvulla sitä käytettiin rasvanpolttajana ja lihasten kasvattajana. 1990 Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto (FDA) julkisti kemikaalin vaaralliseksi. 1999 GHB alkoi saavuttaa suosiota huumausaineena, ja maa-

liskuussa 2000 FDA luokitteli GHB:n virallisesti huumausaineeksi. [8.] Suomessa GHB luokiteltiin huumausaineeksi vuonna 2001. [11.]

GHB on keskushermoston inhibitorisen välittäjäaineen gamma-aminovoihapon (GABA) aineenvaihduntatuote ja esiaste. GHB tunnettiin alun perin unilääkkeenä ja rauhoittavana aineena. Nykyisin sitä käytetään lääkeaineena narkolepsiapotilailla. GHB sitoutuu aivoissa GHB-reseptoreihin, joita esiintyy runsaasti muistia ja tunteita käsittelevässä hippokampuksessa. Lisäksi se sitoutuu GABA_b-reseptoreihin. Vaikutukset näihin reseptoreihin johtavat myös muiden keskushermoston välittäjäainejärjestelmien toiminnan moninaisesti muutoksiin. [27. s, 42.]

γ-hydroksibutyraatti on erittäin vaarallinen viihdekäytössä oleva huumausaine, jonka akuutti myrkyllisyys on aiheuttanut useita tahattomia yliannostuskuolemia. Se on vahva keskushermoston stimulantti ja sen pieni molekyylikoko ja hyvä liukoisuus veteen tekevät siitä nopeasti verenkiertoon imeytyvän. [9.] GHB aiheuttaa käyttäjilleen euforiaa, seksuaalista estottomuutta ja tyyneyttä. GHB annostellaan yleisesti alkoholijuomiin sekoitettuna. Sitä käytetään myös jonkin verran seksuaalirikoksissa, sen tehdessä uhrin toimintakyvyttömäksi vastustamaan seksuaalista hyväksikäyttöä. Se voi aiheuttaa myös muistinmenetyksen. [14.]

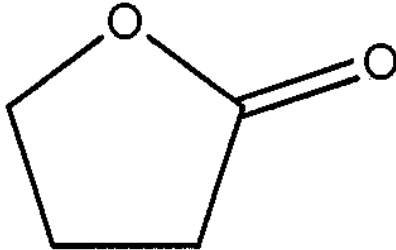
GHB pitoisuus kehossa kuitenkin puolittuu jo alle tunnissa ja n. 5 % suunkautta nautitusta annoksesta erittyy hajoamattomana virtsan mukana. [7.]



Kuva 3. γ-hydroksibutyraatin rakennekaava [10.]

γ-butyrolaktoni (GBL) on hyvin samankaltainen kliinisiltä oireiltaan GHB:n kanssa. GBL imeytyy nopeasti ruuansulatuskanavasta muuttuen GHB:ksi alkoholidehydrogenaasin, aldehydihydrogenaasin ja laktonaasien vaikutuksesta. Se kulkeutuu nopeasti keskushermostoon ja vaikutus alkaa jo n. 15–30 minuutissa. Vaikutuksen kesto on 1-3 tuntia. Saatavilla oleva GBL on nestemäistä ja sitä käytetään yleisesti teollisuudessa esim. liimanpoistoaineena ja maalien ohenteena. [27. s, 42.]

GBL on vaikutukseltaan nopeampi kuin GHB, sen potenssi kuin myös aktiivisuuden kesto ovat pidempiä ja näin ollen sen väärinkäyttö mahdollisuudet ovat suuremmat kuin GHB:lla itsessään. [24.]

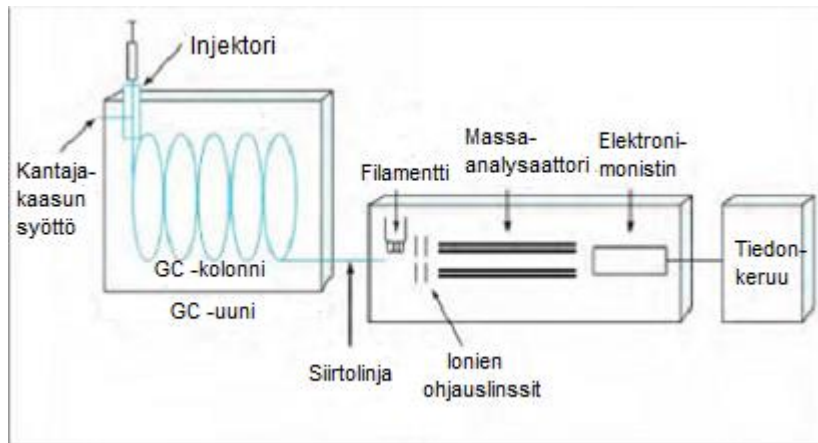


Kuva 4. γ -butyrolaktonin rakennekaava. [25.]

GBL on fyysisiltä ominaisuuksiltaan väritöntä öljymäistä nestettä, joka liukenee hyvin esim. etanoliin, metanoliin, asetoniin eetteriin jne. Liukenemista veteen ei juuri tapahdu. Sillä on myös hyvin ominainen kitkerä maku ja makeahko tuoksu.

7 Kaasukromatografi-massaspektrometri

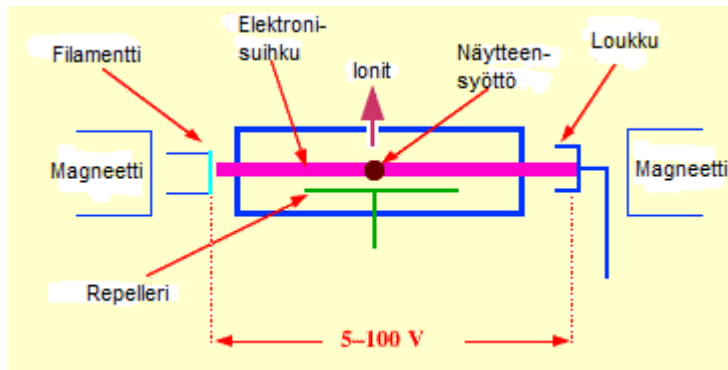
Kaasukromatografia-massaspektrometria (GC-MS) on menetelmä, jossa kaasukromatografi on yhdistettynä massaspektrometriin. Jotta yhdiste voidaan analysoida GC-MS -laitteistolla, tulee sen olla riittävän haihtuva ja termisesti stabiili. Funktionaaliset yhdisteet saattavat vaatia kemiallista muokkausta, kuten derivatisointia, jotta saadaan eliminoitua ei-toivottuja absorptiovaikutuksia mitkä voivat omalta osaltaan vaikuttaa saatavan datan laatuun. [15.] Massaspektrometria ei hyödynnä sähkömagneettisen säteilyn spektriä, vaan siinä on kyse massajakaumasta. Massaspektrometri erottelee massafragmentit toisistaan niiden massa/varaussuhteen (m/z) mukaan. Laite ei siis havaitse neutraaleja molekyylejä tai niiden osia. Massaspekttri kuvaa molekyylin rakennetta ja spektrin pohjalta voidaan yhdisteet tunnistaa. [20, s. 122.]



Kuva 5. GC-MS -laitteiston rakenne. [16.]

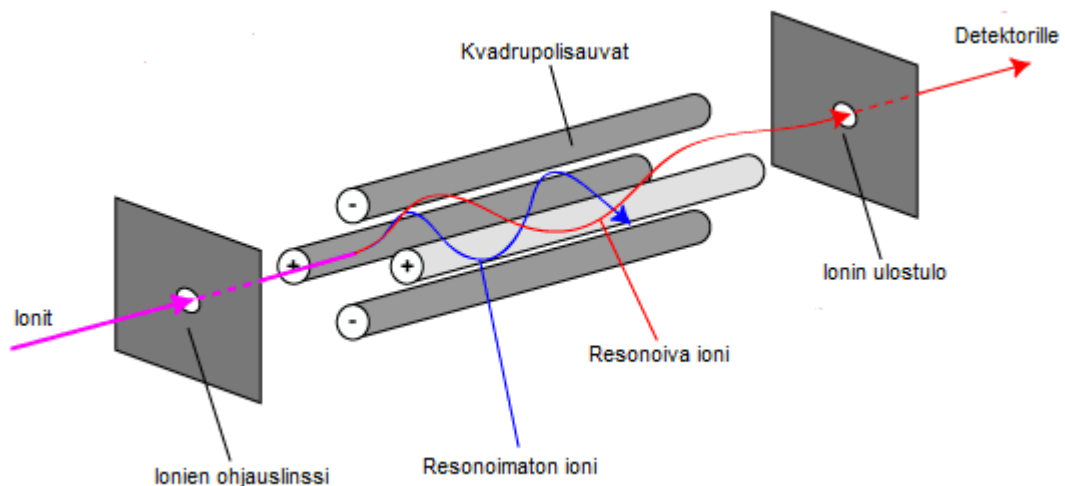
Näyte injektoidaan kaasukromatografian injektoriin, jossa se höyrystetään ja johdetaan kolonniin kantajakaasun mukana. Kolonnissa yhdisteet erottuvat toisistaan stationääri-faasin ja liikkuvan faasin kesken. Kolonnin jälkimmäinen osa läpäisee lämmitetyn siirtolinjan ja päättyy ionilähteen sisääntuloon, missä kolonnissa erottuneet yhdisteet ionisoidaan. [15.]

Ionisointimenetelmiä on kaksi, EI (elektroni-ionisaatio) ja CI (kemiallinen ionisaatio). Näistä yleisin käytössä oleva ionisointimenetelmä on EI. Elektroni-ionisaatiossa elektronisuihku ionisoi näytemolekyylit niin että yksi elektroni irtoaa ja muodostuu positiivisesti varautuneita ioneja/yhdisteitä. Kun kyseinen ioni/yhdiste muodostaa piikin massaspektriin, se antaa tälle yhdisteelle molekyylipainon. Positiivisesti varautuneisiin ioneihin/yhdisteisiin kohdistuu valtavasti energiaa ja ne fragmentoituvat muodostaen vielä pienempiä ioneita, nämä muodostavat ns. sormenjälkiä kyseiselle molekyylirakenteelle. Tätä voidaan hyödyntää yhdisteiden tunnistamisessa sekä havainnollistamisessa tuntemattomien yhdisteiden rakenteita. [15.]



Kuva 6. Kaavakuva elektroni-ionisaatiosta (EI) [17.]

Kvadrupolimassa-analyssaattorissa erotellaan positiivisesti varautuneet ionit. Erotellut ionit kulkeutuvat detektorille joka lähettää kaiken saadun datan tietokoneelle. Ionilähde, massa-analyssaattori ja detektori ovat tyhjiössä, koska varautuneet partikkelit reagoivat herkästi ilman komponenttien kanssa. [15, 16.]



Kuva 7. Kaavakuva kvadrupolimassa-analyssaattorista. [15.]

8 Sisäisen standardin menetelmä

Sisäisen standardin menetelmää käytetään hyvin yleisesti kvantitatiivisissa menetelmissä. Injektioilavuuden vaihtelut eivät tällöin aiheuta virhettä lopputulokseen. Sisäisen standardin on hyvä olla yhdisteen kanssa samankaltainen, koska se käyttäytyy näytteen käsittelyssä ja injektorissa samoin kuin tutkittava yhdiste. Sisäinen standardi valitaan niin, että piikki erottuu muista kromatogrammin piikeistä ja on tällöin helposti integ-

roitavissa. [20, s.198] Tosin massaspektrometriassa mitataan yksittäisiä ioneita ja tällöin sisäisen standardin ei välttämättä tarvitse erottua muista piikeistä.

9 Validointi

Mittausmenetelmän validoinnin tarkoituksena on osoittaa analyysin antamien tulosten luotettavuus ja menetelmän sopivuus käyttötarkoitukseensa. Validoinnissa olennaisinta on arvioida mittausmenetelmän suorituskykyä sekä menetelmän soveltuvuutta haluttuun tarkoitukseen. [18.] Validoitujen analyysimenetelmien käyttö on yksi olennainen keino parantaa tulosten luotettavuutta. Validoinnilla voidaan osoittaa laatua. Validointia tarvitaan myös asiakkaan tarpeiden tyydyttämiseen. Laboratorio on vastuussa tuottamistaan tuloksista.

Validointi koostuu suunnitelmasta, kokeellisista suorituksista, tulosten tilastollisesta arvioinnista ja dokumentoinnista. Mittauksia suoritetaan yleensä pidemmällä aikavälillä, jolloin mahdolliset ympäristönvaikutukset saadaan mukaan tuloksiin. Tutkittavia ominaisuuksia on useita, mutta kaikkia niitä ei aina määritetä. Menetelmän käyttöalueesta ja tutkittavista näytteistä riippuen laboratorio määrittää ominaisuudet, jotka ovat analyysitulosten luotettavuuden kannalta välttämättömiä. [19.]

10 Validoitavat parametrit

10.1 Menetelmän kalibroinnin lineaarisuus ja mittausalue

Lineaarisuudella tarkoitetaan analyttisen menetelmän kykyä antaa tietyllä alueella hyväksyttävä korrelaatio tulosten ja tutkittavan aineen pitoisuuden välillä. Lineaarisuustutkimusten avulla määritetään yleensä myös analyysimenetelmän luotettava mittausalue, jolla saavutetaan hyväksyttävä tarkkuus ja täsmällisyys. [26.]

10.2 Kalibroinnin oikeellisuus ja tarkkuus

Oikeellisuus ilmaistaan yleensä poikkeamana. Oikeellisuus määritetään vertaamalla menetelmällä saatuja mittaustuloksia tiettyihin referenssiarvoihin. Oikeellisuus on

useista mittauksista saatujen tulosten keskiarvon yhtäpitävyys mitattavien suureiden tosiarvon kanssa. [26.]

Tarkkuus on mittaustuloksen ja tosiarvon yhteensopivuus. [26.] Tulosten tarkkuutta arvioidaan systemaattisten- ja satunnaisvirheiden kautta. [32.]

Kalibroinnin tarkkuudella eli paikkansapitävyydellä ja täsmällisyydellä tarkoitetaan mitauslaitteen kykyä antaa tuloksia, joiden keskiarvo on lähellä tosiarvoa, sekä sitä että mittaukset ovat riippumattomia satunnaisista vaihteluista. [28.]

10.3 Detektio- ja määrittämisrajat

Detektio- eli toteamisrajalla tarkoitetaan määritettävän komponentin pienintä pitoisuutta, joka voidaan luotettavasti todeta ja joka eroaa nollanäytteestä merkittävästi. [26.]

Määrittämis- eli kvantitointirajalla tarkoitetaan kvantitatiivisen määrittämisrajituksen pitoisuusalarajaa matriisista mitattuna, jolle voidaan esittää epävarmuusarvio. [26.]

10.4 Menetelmän spesifisyys ja selektiivisyys

Selektiivisyydellä tarkoitetaan menetelmän kykyä määrittää haluttu analyyytti tarkasti ja spesifisesti, kun näytematriisi sisältää muitakin komponentteja määrittämisrajituksen testiolosuhteissa. Menetelmän selektiivisyys tarkoittaa sitä, missä määrin menetelmällä voidaan määrittää tiettyä analysoitavaa ainetta niin että näytematriisin muut komponentit eivät häiritse sitä. Kun menetelmä on täysin selektiivinen analysoitavalle aineelle tai yhdisteille, menetelmää voidaan kutsua spesifiseksi. [26.]

10.5 Toistuvuus (Täsmällisyys)

Toistuvuudella eli täsmällisyydellä tarkoitetaan useiden toistettujen mittausten tulosten suhteellista standardipoikkeamaa; se voidaan jakaa toistettavuuteen ja uusittavuuteen. [31.]

10.5.1 Toistettavuus

Toistettavuudella tarkoitetaan määritettävän suureen peräkkäisistä mittauksista (rinnakkaismääritykset) saatujen tulosten paikkaansapitävyyttä, kun mittaukset on suorittanut sama henkilö, samalla laitteella ja samoissa mittausolosuhteissa. [26.]

10.5.2 Uusittavuus

Uusittavuudella tarkoitetaan samojen mittaussuureiden tulosten yhtäpitävyyttä, kun mittaukset on suorittanut sama henkilö samalla laitteella, samoista näytteistä pitkällä aikavälillä (eri päivinä suoritettut mittaukset). [26.]

10.6 Ulkoinen näyttö tulosten oikeellisuudesta

Varmennettu referenssimateriaali on aine, jonka yhden taikka useamman aineen ominaisarvo on riittävän vakaa ja tunnettu, jotta sitä voidaan käyttää mittauslaitteen mittausten arviointiin. [28.]

10.7 Matriisiefektin määrittäminen

Matriisiefektillä tarkoitetaan sitä näytematriisin vaikutusta, mikä vähentää tai kasvattaa analyysin signaalia. [31.]

Tuloksista laskettiin näytteen ja näytteiden väliset keskiarvot, keskihajonnat ja suhteelliset keskihajonnat. Suhteellisista keskihajonnoista lasketaan keskiarvot, joita verrataan keskenään.

10.8 Mittausepävarmuus ja laajennettu mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus on mittaustuloksiin liittyvä parametri, joka kuvaa mittaussuureen arvojen oletettua vaihtelevuutta. Mittausepävarmuus on siis kvantitatiivinen arvio rajoista, joiden sisäpuolella mittaustuloksen, esim. analyysin pitoisuuden, oletetaan olevan tietyllä todennäköisyydellä. Käytännön mittauksissa tulosten mittausepävarmuuteen

voivat vaikuttaa useat tekijät, kuten näytteenotto, matriisin vaikutus ja sen aiheuttamat häiriöt, vertailuarvot, satunnaiset vaihtelut jne. [26.]

Mittausepävarmuus lasketaan tilastollisia menetelmiä hyödyntäen. Lopullinen mittausepävarmuus ilmaistaan yleensä laajennettuna mittausepävarmuutena, joka saadaan kertomalla yhdistetty mittausepävarmuus peittävyyskertoimella $k=2$. Tämä vastaa likimain 95%:n suuruista luotettavuusväliä, eli ilmoitetun mittausepävarmuusrajan sisällä on n. 95% tuloksista. [26.]

Mittausepävarmuutta laskettaessa käytetään yleensä seuraavaa kaavaa:

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

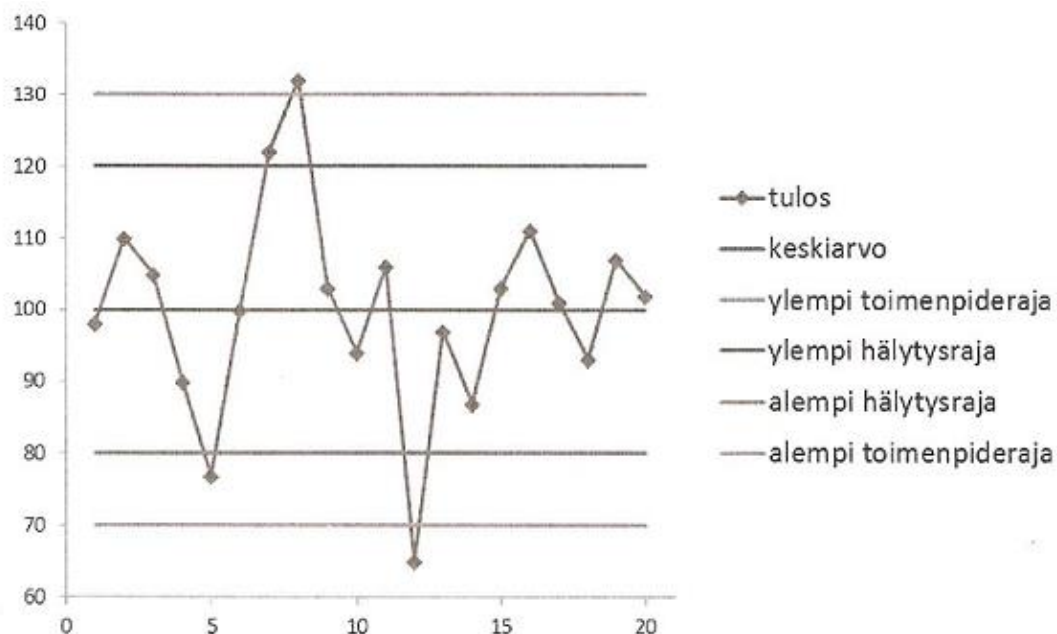
Jossa U_1 on systemaattinen virhe, U_2 on satunnaisvirhe.

Laajennettua kokonaismittausepävarmuutta laskettaessa käytetään seuraavaa kaavaa:

$$U(95\%) = 2 * U \quad (\text{Kaava 3})$$

10.9 Valvontakortti (X-kortti) ja sen rajat

Valvontakortin avulla seurataan systemaattisen- ja satunnaisvirheen summaa verrattuna kontrollinäytteiden tuloksiin. [33.] Valitut rajat x-korttiin ovat yleensä keskiarvo μ , hälytysraja $\mu \pm 2\sigma$ sekä toimenpideraja $\mu \pm 3\sigma$. σ on vähintään 20 mittauksen keskihajonta. Rajojen tulee korreloida menetelmän laajennetun kokonaismittausepävarmuuden kanssa, jolloin toimenpideraja ei saa olla suurempi kuin mittausepävarmuus. [31.]



Kuva 8. Esimerkki X-kortista. [31.]

Valvontakortit otetaan käyttöön samaan aikaan kuin menetelmäkin, joten tässä kohtaa on annettu vain esimerkki tulevasta valvontakortista. Valvontakorteissa käytetään toimenpiderajoina mittausepävarmuutta ja hälytysrajoina 2/3 mittausepävarmuudesta.

11 Työssä käytetyt laitteet ja reagenssit

11.1 Laitteet

- Kaasukromatografi: Agilent 6890 plus GC version A.03.08
- Massaspektrometri: Agilent technologies 5973 Mass selective detector
- Injektori: Agilent technologies 7683 series injector
- Kolonni: DB-1MS (12m x 0,2 μ m x 0,33 μ m), Agilent Technologies
- Haihdutin: Genevac EZ-2plus personal evaporator

- Ravistelijä: Multitube vortexer, Lab-Tek corporation LTD
- Sentrifugi: Megafuge 1.0, Heraeus instruments
- Mäntäpipetit

11.2 Reagenssit

- DL-β-hydroksibutaanihappo, Natrium-suola, Approx 98 %, Sigma-Aldrich
- Ammoniumkloridi, for analysis, Merck
- N,O-bis(trimetyylisilyyli)trifluorasetamidi + 1% trimetyylikloorisilaani, Silyl-991, BSTFA-TMCS (99:1), Macherey-Nagel GmbH & Co.
- Etyyliasetatti, Suprasolv, Merck
- Butyyliasetatti, Chromasolv plus, Sigma-Aldrich
- Natriumkloridi, Emsure, for analysis, Merck
- Natriumdivetyfosfaatti ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), emprove exp., Merck
- Ortofosforihappo 85 %, pro analysis, Merck
- N-Metyyli-N-(trimetyylisilyyli)trifluoroasetamidi, MSTFA, Macherey-Nagel
- 4-hydroksibutaanihappo, Natrium-suola, 98 %, Fluka
- Nollaveri, Naudan veri, Rönkä
- Nollavirtsa, laboratoriohenkilökunnan virtsaa, luovutettu 040316

12 Laiteparametrit

Taulukkoon 2 on kerätty työssä käytetyt laiteparametrit.

Taulukko 2. GC-MS laiteparametrit.

Ajo-ohjelma:	GHB_HJT
Injektori:	250 °C 12,5 psi Splitless
Uuni:	70 °C
Lämpötilaohjelma:	70 °C /(0,5min) ->30 °C/min->140 °C->50 °C/min ->320 °C/(2min)
Detektori:	Ionilähde 300 °C Kvadrupoli 150 °C Siirtolinja 300 °C
Kaasunvirtaus:	1,5 ml/min
Solvent delay:	2,00 min
Ohjelmisto:	MSD Chemstation E.02.00.493

“Solvent delay” eli vapaasti suomennettuna liuottimen viivästyttämisellä vältetään de-tektoimasta liuotin piikkiä, näin menetellessä voidaan pidentää filamentin ikää. Laiteparametreja käytettiin aiemmin GHB:a määrittäessä ja niiden todettiin soveltuvan myös BHB:in määrittämiseen.

13 Työn suoritus

Työ suoritettiin liitteessä 1 olevan validointisuunnitelman mukaisesti. Suunnitelman pohjana on käytetty liitteessä 4 olevaa artikkelia.

13.1 Alustava ionien valinta

Tutkittavista yhdisteistä valmistettiin trimetyylisilylijohdokset (TMS). Ensin suoritettiin trimetyylisilyyli -johdosten scan-ajot, joista nähtiin yhdisteiden massaspektrit (Liite 1 ja 2). Spektreistä valittiin alustavasti seuraavat ionit m/z 117.1, 120.1, 130.1, 133.1, 147.1, 191.1, 204.1, 206.1, 233.1, 234.1, 235.1, 239.1, 240.1, 241.1. SIM-menetelmä luotiin alustavasti valituilla ioneilla.

13.2 Retentioajan lukitus

Tehtiin nollavirtsan scan-ajo, jossa sisäisen standardin lisäys (GHB- d_6 , deuteroitu γ -hydroksibutyyraatti), viidessä eri paineessa (Liite 3). Retentioajan lukituksessa ajetaan näyte viidellä eri paineella (lähtöpaine, +10%, -10%, +20% ja -20% lähtöpaineesta), jotta saadaan paine vs. retentioaikakuvaaja. Kuvaajan avulla voidaan laskea uusi paine, joka tarvitaan, jotta retentioaika palaa alkuperäiseen arvoon, esim. kolonnin lyhennyksen jälkeen tai kolonnin ominaisuuksien muuttuessa esimerkiksi likaantumisen myötä.

Piikkien tunnistus ja menetelmien validointi helpottuvat huomattavasti, kun retentioajoissa ei ole vaihtelua, tällöin on hyvä suorittaa retentioajan lukitus. [36.] Retentioajan lukituksella päästään erinomaiseen pitkän aikavälin kvalitatiiviseen toistettavuuteen ilman retentioindeksien tai muiden mahdollisten korjausstandardien käyttöä. [30.]

13.3 Retentioajan toistettavuus

Retentioajan toistettavuus katsottiin kymmenestä eri näytegrammista ja tuloksia verrattiin kyseisien analyyttien kokonaisionivirtakromatogrammien liitteen 2 retentioaikoihin BHB:n ja GHB:n osalta. GHB- d_6 kokonaisionivirtakromatogrammia ei ole liitetty erikseen työhön.

13.4 Uuttomenetelmien vertailu

Terveyden ja hyvinvoinninlaitoksen Tilkanmäen ja Kytösuontien uuttomenetelmiä verrattiin keskenään uuttamalla yksi kalibrintisarja ja vainajanäytteitä sekä verestä että virtsasta. Molemmissa menetelmissä käytettiin samaa sisäistä standardia, 0,1 mg/ml GHB-d₆ natriumsuolaa vedessä. Molempia uuttomenetelmiä on käytetty aikaisemminkin GHB:n uuttamiseen ja BHB:n samankaltaisen rakenteen vuoksi ne soveltuvat myös BHB:n uuttamiseen biologisista näytteistä.

Vainajanäytteistä valittiin 10 tapaus, joista uutettiin molemmilla menetelmillä veri- sekä virtsanäyte. Testauksien tuloksista valittiin parhaiten, taustaltaan, helppoudeltaan ja määritysrajoiltaan soveltuva menetelmä näytteiden uuttamiseen.

13.5 Näytteiden käsittely

13.5.1 Kytösuontien menetelmä

0,1 mg/ml GHB-d₆ sisäisen standardin liuos valmistettiin siten että γ -hydroksibutyraattia 1 mg/ml sisältävän ampullin koko sisältö (1 ml) pipetoitiin pasteur-pipetillä mahdollisimman tarkasti koeputkeen. Samaiseen koeputkeen pipetoitiin 9 ml laboratoriovettä ja putki suljettiin korkilla.

BHB kalibrintiliuos 1,0 mg/ml valmistettiin siten että 4 ml:n ruskeaan näytepulloon punnittiin 3,28 mg DL- β -hydroksibutaanihapon natriumsuolaa. Punnitustulos jaettiin korjauskertoimella 1,22, jolloin saatiin lisättävän laboratorioveden määrä ml:na.

$$3,28 \div 1,22 = 2,68 \text{ ml} \approx 2,7 \text{ ml}$$

0,1 mg/ml kalibrintiliuos valmistettiin siten että kalibrintiliuosta 1,0 mg/ml pipetoitiin 200 μ l 4 ml ruskeaan näytepulloon sekä 1800 μ l vettä.

Taulukko 3. Kytösuontien menetelmän standardit nollavereen/-virtsaan.

Kalibrointiliuoksen pitoisuus (mg/ml)	Pitoisuus veres- sä/virtsassa (mg/l)	Pipetointilavuus (μ l)
0	0	0
0,1	1	1,0
0,1	3	3,0
0,1	5	5,0
0,1	10	10,0
0,1	30	30,0
0,1	50	50,0
1,0	100	10,0
1,0	200	20,0
1,0	300	30,0
1,0	500	50,0
1,0	1000	100,0
1,0	2000	200,0
1,0	3000	300,0
10,0	5000	50,0
10,0	10000	100,0

10,0 mg/ml β -hydroksibutyaatti kalibrointiliuos valmistettiin siten että 31,77 mg DL- β -hydroksibutaanihapon natriumsuolaa punnittiin 4 ml:n ruskeaan näytepulloon sekä pipetoitiin 2,60 ml laboratoriovettä. Punnitustulos jaettiin korjauskertoimella 1,22.

10 ml kertakäyttöputkiin punnittiin 0,1 g (nolla)verta tai vastaavasti pipetoitiin 0,1 ml (nolla)virtsa. Tässä kohtaa standardinäytteille tehtiin taulukon 3 mukaiset kalibrointiliuosten lisäykset. Putkiin pipetoitiin 20 μ l sisäisen standardin liuosta (0,1 mg/ml GHB- d_6 natriumsuola vedessä), sekä 1 ml kyllästettyä ammoniumkloridiliuosta (pH = 7,4), jotta orgaaniset yhdisteet saadaan liukenemaan paremmin vesifaasista orgaaniseen faasiin (ulosuolaus) ja näin ollen uuttumaan paremmin. Ammoniumkloridiliuos puskuroidi näytteen pH:n arvoon 7,4.

Sekoitettiin vorteksoimalla kevyesti, jotta yhdisteet sekoittuisivat keskenään. Vorteksoinnin jälkeen lisättiin putkiin 2 ml etyyliasettaattia, vorteksoitiin vielä viisi minuuttia ja sentrifugoitiin viisi minuuttia 5000 rpm. Etyyliasettaattifaasi siirrettiin 5 ml:n kertakäyttöputkiin ja haihdutettiin haihduttimessa 30°C:ssa puolen tunnin ajan tai niin kauan, kunnes etyyliasettaatti oli haihtunut kuiviin. Putkiin pipetoitiin 10 µl Silyl-991 derivointireagenssia ja 90 µl butyyliasettaattia. Putket suljettiin korkeilla, vorteksoitiin hetki jonka jälkeen näytteiden annettiin derivatisoitua 30 minuuttia huoneenlämmössä. Sentrifugoitettiin viisi minuuttia. Orgaanista faasia pipetoitiin 50 µl näytteensyöttäjän pulloihin, joihin oli aiemmin laitettu 100 µl kartiopohjainen sisäputki.

13.5.2 Tilkanmäen menetelmä

Ensin valmistettiin 0,3 M natriumdivetyfosfaatti (pH 2,5) reagenssiliuos siten että 20,7 g NaH_2PO_4 :a liuotettiin 500 millilitraan laboratoriovettä. pH säädettiin arvoon 2,5 1:10 laimennetulla orto-fosforihapolla (H_3PO_4).

Kalibrintiliuokset valmistettiin seuraavasti;

GHB 10 mg/ml kalibrintiliuosta varten punnittiin 4-hydroksibutaanihapon natriumsuolaa, 4 ml:n ruskeaan näytepulloon, 29,36 mg ja pipetoitiin 2,410 ml laboratoriovettä.

BHB 10 mg/ml kalibrintiliuosta varten punnittiin DL-β-hydroksibutaanihapon natriumsuolaa, 4 ml:n ruskeaan näytepulloon, 22,51 mg ja pipetoitiin 1,840 ml laboratoriovettä.

Kalibrintiliuoksista valmistettiin laimennos 1,0 mg/ml pipetoimalla 500 µl BHB ja GHB 10 mg/ml kalibrintiliuoksia 4,0 ml:aan nollaverta/-virtsa.

Näytteet käsiteltiin seuraavasti;

Näyteputkiin pipetoitiin 200 µl NaH_2PO_4 liuosta ja 200 µl virtsaa tai vastaavasti punnittiin 0,200 g verta. Kertakäyttöputkiin lusikoitiin n. 50 mg natriumkloridia. Standardinäytteisiin käytettiin taulukon 3 mukaista laimennosta. Vorteksoitiin kevyesti, jotta NaCl liukenisi näytteisiin. Putkiin lisättiin suoraan 50 µl sisäisen standardin liuosta (0,1 mg/ml GHB- d_6 natriumsuola vedessä) ja 500 µl butyyliasettaattia. Sekoitettiin vorteksoimalla ja

sentrifugoitiin viisi minuuttia 5000 rpm. Näytteensyöttäjän pulloihin, joihin laitettiin 100 µl sisäputket, lisättiin 20 µl MSTFA derivointireagenssia ja 50 µl liuotinfasia.

Taulukko 4. THL:n Tilkanmäen menetelmän standardit.

Kalibroitiliuoksen pitoisuus (mg/l)	Pipetointilavuus (µl)	
	Laimennos	Veri/Virtsä
0	-	1000
1	1	999
3	3	997
5	5	995
10	10	990
30	30	970
50	50	950
100	100	900
200	200	800
300	300	700
500	500	500

13.6 Varsinaisten ionien valinta

Molemmilla menetelmillä uutettujen vainajanäytteiden ionikromatogrammeja vertailtiin keskenään, jotta voitiin valita menetelmään alustavista ioneista varsinaiset ionit. Lopullisiksi ioneiksi valikoitui massa-varaussuhteeltaan (m/z) β-hydroksibutyraatille 117,1, 191,1, 233,1, γ-hydroksibutyraatille 204,1, 233,1, 234,1, 235,1 ja GHB-d₆-TMS:lle 206,1, 239,1, 240,1 ja 241,1.

13.7 Nollaverien ja -virtsan β-hydroksibutyraatin taustapitoisuuden määrittäminen

Synteettisen veren puutteellisesta saatavuudesta johtuen selvitettiin kumpaa, lampaan vai naudan verta, voitiin jatkossa käyttää kalibroitua tehdessä nollaverenä.

Lampaan- ja naudanverestä sekä nollavirtsasta määritettiin viidet rinnakkaiset näytteet.

13.8 Menetelmän kalibroinnin lineaarisuus ja mittausalue

Veri- ja virtsanäytteille valmistettiin omat kalibroitinäytteet. Pitoisuustasoiksi valittiin 1 mg/l, 3 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 30 mg/l, 50 mg/l, 100 mg/l, 200 mg/l, 300 mg/l ja 500 mg/l. Myöhemmin valmistettiin vielä BHB:sta standardit 1000, 2000, 3000, 5000 ja 10000 mg/l, koska vainajanäytteitä ajettaessa huomattiin pitoisuuksien olevan hyvinkin korkeita. Standardit valmistettiin sivun 25 ohjeen mukaisesti. Ohjeen kohdassa 2 nollavereen ja -virtsaan pipetoitiin kontrolliliuoksia taulukon 3 mukaisesti. Jokaisesta tasosta määritettiin viisi rinnakkaista. Tuloksista laskettiin keskiarvo, keskihajonta, suhteellinen keskihajonta (RSD- %) sekä analyysimenetelmän tuloksen poikkeama teoreettisesta arvosta eli bias- %. Excel-ohjelmaa käytettiin kaikissa muissa laskuissa paitsi menetelmän poikkeamaa laskettaessa.

13.9 Toistuvuus (Täsmällisyys)

13.9.1 Toistettavuus

Määritettiin analysoimalla eri pitoisuustasoisia, aikaisemmin positiivisiksi todettuja vainajan veri- ja virtsanäytteitä. Jokaisesta pitoisuustasosta määritettiin neljä rinnakkaista. Tuloksista laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta (RSD-%).

13.9.2 Uusittavuus

Määritettiin analysoimalla eri pitoisuustasoisia, aikaisemmin positiivisiksi todettuja vainajan veri- ja virtsanäytteitä neljänä eri päivänä. Tuloksista laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta (RSD-%).

13.10 Ulkoinen näyttö tulosten oikeellisuudesta

GHB laaduntarkkailunäytteestä määritettiin kymmenen rinnakkaismääritystä. Tuloksista laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta (RSD-%). BHB:lle ei ollut laboratorioissa laaduntarkkailunäytettä.

13.11 Matriisiefektin määrittäminen

Matriisiefektiä eli signaalin pienenemistä tai kasvamista tutkittiin kymmenestä negatiiviseksi todetuista post mortem -virtsanäytteistä, joihin tehdään tutkittavan yhdisteen lisäys. Pitoisuustasoiksi valittiin suunnitelmasta poiketen GHB:lle ja BHB:lle 300 ja 500 mg/l, koska näytteet sisälsivät entuudestaan jonkin verran endogeenista BHB:a ja GHB:a. Suunnitelman mukaiset pitoisuudet GHB:lle oli 10 mg/l ja 50 mg/l ja BHB:lle 50 mg/l ja 100 mg/l.

Kymmenestä negatiiviseksi todetuista vainajan virtsanäytteistä määritettiin matriisiefektiä siten että näytteisiin lisättiin eli spikattiin GHB:a ja BHB:a. Viiden eri vainajan näytteisiin pipetoitiin γ -hydroksibutyraatin 0,1 mg/ml standardiliuosta 10 μ l ja β -hydroksibutyraatin 0,1 mg/ml standardiliuosta 50 μ l, jotta näytteissä saavutettiin GHB pitoisuus 10 mg/l ja BHB pitoisuus 50 mg/l. Sekä seuraavien viiden vainajan virtsanäytteisiin pipetoitiin γ -hydroksibutyraatin 0,1 mg/ml standardiliuosta 50 μ l ja β -hydroksibutyraatin 1,0mg/ml standardiliuosta 10 μ l, jotta näytteissä saavutettiin GHB pitoisuus 50 mg/l ja BHB pitoisuus 100 mg/l. Jokaisesta vainajasta määritettiin kolme rinnakkaista. Tuloksista laskettiin näytteen ja näytteiden väliset keskiarvot, keskihajonnat ja suhteelliset keskihajonnat. Suhteellisista keskihajonnoista laskettiin vielä keskiarvot, joita verrattiin keskenään.

14 Tulokset

14.1 Retentioajan lukitus

Retentioaika lukittiin sisäisen standardin mukaan (GHB-d₆-TMS) 2,700 min jolloin paineeksi määräytyi 12.83 psi. Retentioajan lukituksesta on hyötyä esim. kolonnin lyhennettäessä, jolloin ohjelmalla lasketaan uusi paine, jossa retentioaika pysyy kohdillaan. Liite 3.

14.2 Retentioajan toistettavuus

Retentioaikojen voidaan todeta olevan toistettavia ja tavoitearvon $\pm 0,02$ min sisällä β -hydroksibutyraatilla, GHB-d₆:lla ja γ -hydroksibutyraatilla.

Retentioaikojen toistettavuus			
	Retentioaika GHB-d ₆ -TMS (min)	Retentioaika BHB-TMS (min)	Retentioaika GHB-TMS (min)
1	2,697	2,419	2,711
2	2,698	2,420	2,712
3	2,698	2,420	2,713
4	2,698	2,421	2,711
5	2,697	2,418	2,712
6	2,699	2,421	2,711
7	2,698	2,419	2,716
8	2,697	2,421	2,715
9	2,700	2,419	2,717
10	2,703	2,418	2,715
Ka	2,699	2,420	2,713
Sallittu vaihteluväli (min)	2,697-2,703	2,418-2,421	2,711-2,717
RSD- %	0,0682	0,0485	0,0834

14.3 Uttomenetelmien vertailu

Vaikkakin lineaarisuutta kuvaavissa kalibrintokuvaajissa ei ole huomattavia eroja menetelmien välillä niin yksittäisten ionien ionikromatogrammeissa voitiin todeta häiritseviä tekijöitä Tilkanmäen menetelmällä uutetuissa näytteissä. Kytösuontien menetelmä soveltui paremmin käyttötarkoitukseen. Siinä uuttoliuksena käytetty etyyliasetaatti on butyyliasetaatin sijaan parempi liuos uuttamiseen, koska se uuttaa enemmän poolisia

yhdisteitä, kun taas butyyliasetaatti uuttaa näytteistä enemmän rasvaa, jolloin massaspektreissä todettiin enemmän häiriöpiikkejä tutkittavien analyyttien retentioaikojen kohdalla. Tilkanmäen menetelmän voitiin todeta soveltuvan huomattavasti paremmin vainajanäytteiden uuttamiseen näytematriisiin ollessa haasteellisempi esim. mädät näytteet, näytteiden epähomogeenisuus jne.

14.4 Nollaverien ja -virtsan BHB:n taustapitoisuuden määrittäminen

Rinnakkaisten tuloksista voitiin tulkita lampaan veren sisältävän keskimäärin jopa 50 mg/l endogeenista BHB:a, kun taas naudon veri sisälsi endogeenista BHB:a huomattavasti vähemmän. Näin ollen valittiin naudon veri nollavereksi. Synteettistä verta ei ollut työn suorituksen hetkellä saatavilla. Nollavirtsa sisälsi endogeenista BHB:a keskimäärin 8 mg/l. Nollavirtsana käytettiin laboratoriohenkilökunnan luovuttamaa virtsaa.

14.5 Menetelmän kalibroinnin lineaarisuus ja mittausalue

Menetelmän todettiin täyttävän validointisuunnitelmassa asetetut tavoiteparametrit uusittavuuden, toistettavuuden ja tulosten oikeellisuuden osalta tällä osa-alueella. BHB veressä on lineaarinen pitoisuusalueella 30-5000 mg/l. Virtsassa BHB on lineaarinen pitoisuusalueella 50-2000 mg/l (Taulukko 7 ja 8) Yhdisteiden voitiin todeta uuttuvan virtsasta paremmin, jolloin lineaarisuus kärsi detektorin ylikuormituksessa. GHB on lineaarinen veressä sekä virtsassa pitoisuusalueella 3-500 mg/l (Taulukko 5 ja 6). Suunnitelmasta poiketen kalibrointiin valittiin neljä kalibrointipistettä, jotta voidaan luotettavammin määrittää kyseisiä yhdisteitä näytteistä.

Taulukko 5. Lineaarisuus verestä.

Konsentraatio mg/l	3	5	10	30	50	100	200	300	500
Veri	GHB	GHB	GHB	GHB	GHB	GHB	GHB	GHB	GHB
	3,2	5,3	10,0	30,6	50,1	104,3	212,5	309,5	506,7
	3,3	5,4	9,6	29,9	50,8	99,4	201,4	305,3	509,4
	3,0	5,6	10,1	30,5	50,4	102,2	200,9	315,2	509,4
	3,3	4,8	10,3	30,4	49,6	101,2	206,5	300,0	517,8
	3,0	4,6	10,1	30,9	51,5	100,2	209,2	311,1	522,1
Keskiarvo	3,2	5,1	10,0	30,4	50,5	101,5	206,1	308,2	513,1
Keskihajonta	0,1	0,4	0,3	0,4	0,7	1,9	5,0	5,8	6,5
RSD- %	4,3	8,1	2,6	1,2	1,4	1,9	2,4	1,9	1,3
Bias- %	5,0	2,6	0,2	1,5	0,9	1,5	3,0	2,7	2,6

Taulukko 6. Lineaarisuus virtsasta.

Konsentraatio mg/l	3	5	10	30	50	100	200	300	500
Virtsa	GHB	GHB	GHB	GHB	GHB	GHB	GHB	GHB	GHB
	3,1	4,6	11,2	30,8	51,5	99,1	197,4	294,9	506,6
	2,5	4,7	11,3	31,0	50,9	96,5	195,0	294,5	504,5
	2,7	5,1	11,5	31,1	50,9	98,0	194,5	293,2	513,2
	2,8	4,9	11,3	31,1	51,1	98,1	197,1	295,2	498,9
	2,5	5,2	11,3	30,8	53,5	96,4	196,0	299,1	503,1
Keskiarvo	2,7	4,9	11,3	30,9	51,6	97,6	196,0	295,4	505,3
Keskihajonta	0,3	0,2	0,1	0,1	1,1	1,2	1,3	2,2	5,3
RSD- %	10,0	5,1	0,9	0,4	2,2	1,2	0,6	0,8	1,0
Bias- %	-9,4	-2,5	12,9	3,1	3,1	-2,4	-2,0	-1,5	1,1

Taulukko 7. Lineaarisuus verestä.

Konsentraatio mg/l	30	50	100	200	300	500	1000	2000	3000	5000
Veri	BHB	BHB	BHB	BHB	BHB	BHB	BHB	BHB	BHB	BHB
	36,8	59,4	91,1	160,1	269,1	472,7	1031,1	2060,4	3180,1	5230,2
	35,0	57,2	90,0	204,1	285,7	480,4	978,6	2120,2	3125,7	5766,2
	33,7	54,9	89,8	196,5	308,0	469,8	1100,5	2229,8	3356,4	5404,4
	33,6	52,3	89,9	170,1	303,5	500,9	1038,5	2136,0	3021,6	5061,9
	33,7	54,6	97,6	181,2	270,0	492,4	999,8	1990,4	3148,5	5531,0
Keskiarvo	34,5	55,7	91,7	182,4	287,2	483,3	1029,7	2107,4	3166,4	5398,7
Keskihajonta	1,4	2,7	3,4	18,2	18,2	13,2	46,4	89,2	121,7	271,3
RSD- %	4,0	4,9	3,7	10,0	6,3	2,7	4,5	4,2	3,8	5,0
Bias- %	15,1	11,4	-8,3	-8,8	-4,3	-3,3	3,0	5,4	5,5	8,0

Taulukko 8. Lineaarisuus virtsasta.

Konsentraatio mg/l	50	100	200	300	500	1000	2000
Virtsa	BHB	BHB	BHB	BHB	BHB	BHB	BHB
	55,4	106,6	199,4	296,9	502,9	996,0	2166,9
	57,4	98,5	197,4	297,7	507,8	1119,9	2286,0
	60,9	100,9	199,2	288,9	507,7	1042,4	2285,6
	57,4	95,4	200,6	290,5	499,8	1001,3	2381,3
	58,2	99,6	199,1	297,4	504,2	968,4	2191,5
Keskiarvo	57,9	100,2	199,1	294,3	504,5	1025,6	2262,3
Keskihajonta	2,0	4,1	1,2	4,2	3,4	59,0	85,7
RSD- %	3,4	4,1	0,6	1,4	0,7	5,8	3,8
Bias- %	15,7	0,2	-0,4	-1,9	0,9	2,6	13,1

Käytettävät pitoisuudet, suunnitelmasta poiketen, kalibroinnissa oli BHB:lle 50, 100, 300 ja 500 mg/l sekä lineaarisuutta testatessa käytettiin myös kalibroinnissa pitoisuuksia 1000, 2000, 3000 ja 5000 mg/l. GHB kalibroinnissa käytettiin pitoisuuksia 10, 50, 100 ja 300 mg/l. Kuvista 9, 10, 11 ja 12 voidaan nähdä menetelmien kalibroitikuvaajat. R^2 on yli suunnitelman mukaisen tavoitearvon. Suoria ei ole pakotettu kulkemaan nol-lan kautta.

Taulukko 9. Kalibroitikuvaajien kooste.

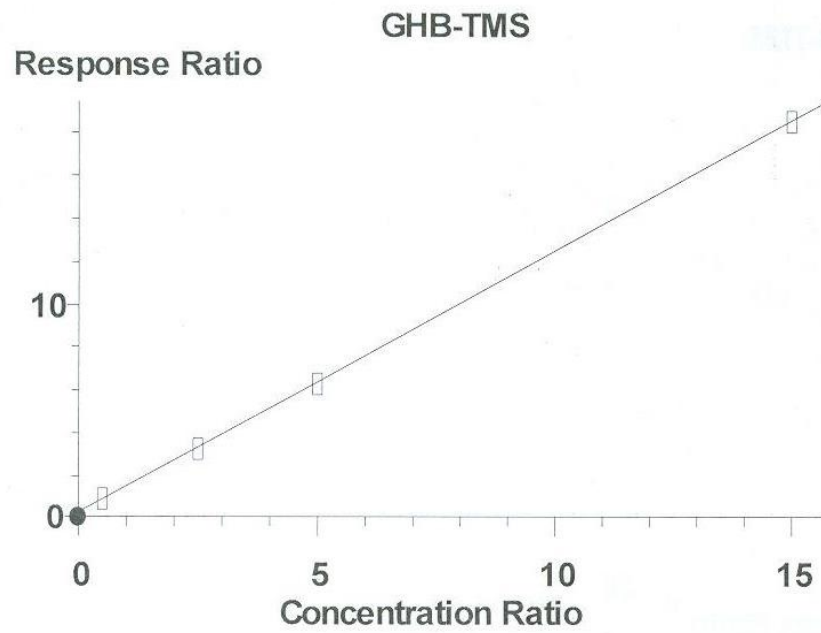
Näytematriisi	Yhdiste	STD lkm.	Leikkauspiste (b)	Kulmakerroin (a)	r^2
Veri	GHB	4	0,231	1,220	0,999994
Virtsa	GHB	4	0,3031	1,161	0,999622
Veri	BHB	4	-0,03888	0,3401	0,999895
Virtsa	BHB	4	0,5758	0,4578	0,998026

Suorien yhtälöt noudattavat seuraavaa kaavaa

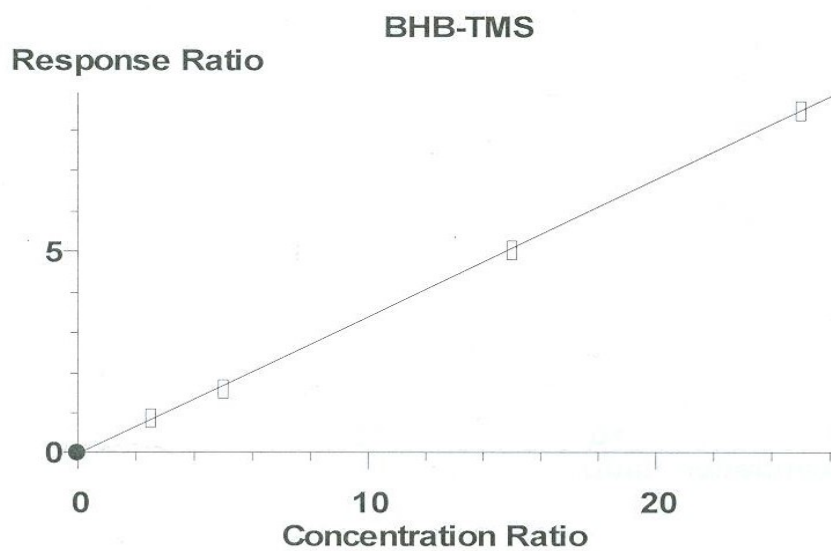
$$Y = ax + b$$

(Kaava 5)

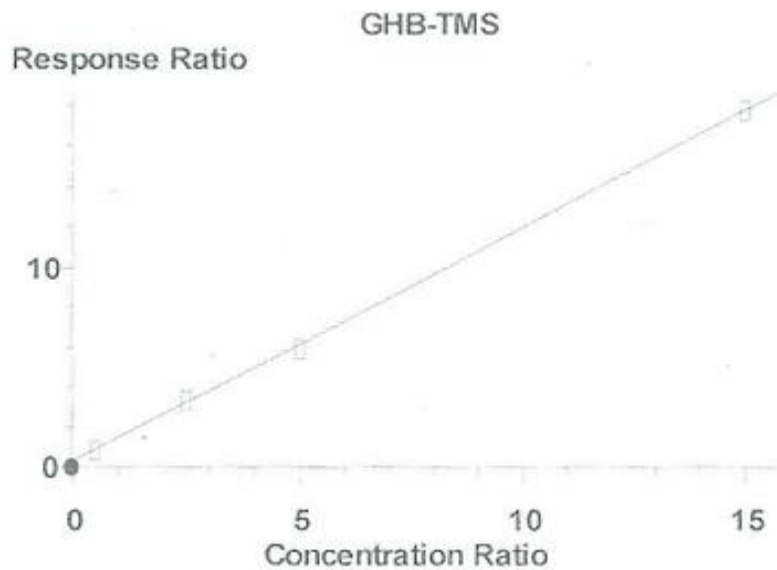
jossa a on suoran kulmakerroin ja b on y-akselin leikkauspiste.



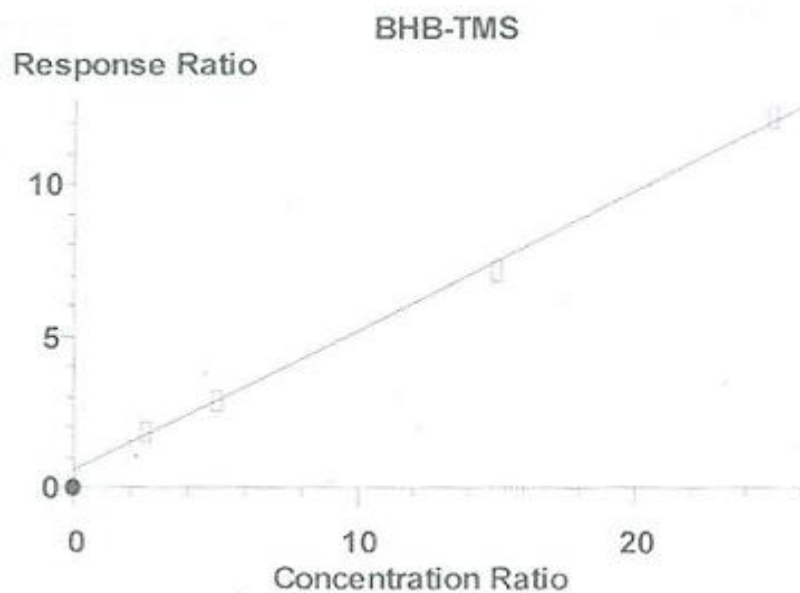
Kuva 9. Veren γ -hydroksibutyraatin kalibrintokuvaaja pitoisuuksille 10, 50, 100 ja 300mg/l.



Kuva 10. Veren β -hydroksibutyraatin kalibrintokuvaaja pitoisuuksille 50, 100, 300 ja 500mg/l.



Kuva 11. Virtsan γ -hydroksibutyraatin kalibroitokuvaaja pitoisuuksille 10, 50, 100 ja 300mg/l.



Kuva 12. Virtsan β -hydroksibutyraatin kalibroitokuvaaja pitoisuuksille 50, 100, 300 ja 500mg/l.

14.6 Detektio- ja määritysrajat

Detektorajaksi eli toteamisrajaksi GHB:lle saatiin 1 mg/l, joka täytti validointisuunnitelmassa asetetut tavoitteet toistettavuuden, uusittavuuden ja tulosten oikeellisuuden osalta. BHB:lle saatiin laskennallisesti detektoraja seuraavalla kaavalla

$$LOD = \bar{x} + 3s \quad (\text{Kaava 4})$$

Naudanveren keskiarvo BHB:lle oli 28,00 mg/l ja keskihajonnaksi saatiin viidelle rinnakkaiselle määrittelykselle 2,99 mg/l.

$$28,00 + (3 * 2,99) = 36,96 \approx 37 \text{ mg/l}$$

Poikkeuksena suunnitelmasta määrittelyrajaksi saatiin BHB verelle ja virtsalle 50 mg/l. GHB:lle määrittelyrajaksi sen sijaan saatiin verestä sekä virtsasta 3 mg/l.

Raportointirajat BHB:lle on 50 mg/l ja GHB:lle elävistä potilaista 10 mg/l ja vainajista 50 mg/l.

14.7 Kalibroinnin oikeellisuus ja tarkkuus

Bias- % laskettiin seuraavalla kaavalla

$$\text{Bias} - \% = (x - \mu) \div \mu * 100\% \quad (\text{Kaava 6})$$

Missä x on mitattu arvo ja μ on odotusarvo.

Alla olevista taulukoista tarkasteltiin kalibrointinäytteiden bias- % ja suhteellisia keskihajontoja.

Taulukko 10. γ -hydroksibutyyraatti kalibrointinäytteiden suhteellinen keskihajonta (RSD- %) ja bias- %.

Standardit							
GHB (mg/l)	Virtsa			10	50	100	300
				11,2	51,5	99,1	294,9
				11,3	50,9	96,5	294,5
				11,5	50,9	98,0	293,2
				11,3	51,1	98,1	295,2
				11,3	53,5	96,4	299,1
			Keskiarvo	11,3	51,6	97,6	295,4
			Keskihajonta	0,1	1,1	1,2	2,2
			RSD- %	0,9	2,2	1,2	0,8
			Bias -%	12,9	3,1	-2,4	-1,5
	Veri			10	50	100	300
				10,0	50,1	104,3	309,5
				9,6	50,8	99,4	305,3
				10,1	50,4	102,2	315,2
				10,3	49,6	101,2	300,0
				10,1	51,5	100,2	311,1
			Keskiarvo	10,0	50,5	101,5	308,2
			Keskihajonta	0,3	0,7	1,9	5,8
			RSD- %	2,6	1,4	1,9	1,9
			Bias -%	0,2	0,9	1,5	2,7

Bias- % ja suhteellisen keskihajonnan (RSD- %) tuli olla alle 15 %, määritysrajalla alle 20 %.

Taulukko 11. β -hydroksibutyyraatti kalibrointinäytteiden suhteellinen keskihajonta (RSD- %) ja bias- %.

Standardit							
BHB (mg/l)	Virtsa			50	100	300	500
				55,4	106,6	296,9	502,9
				57,4	98,5	297,7	507,8
				60,9	100,9	288,9	507,7
				57,4	95,4	290,5	499,8
				58,2	99,6	297,4	504,2
			Keskiarvo	57,9	100,2	294,3	504,5
			Keskihajonta	2,0	4,1	4,2	3,4
			RSD- %	3,4	4,1	1,4	0,7
			Bias -%	15,7	0,2	-1,9	0,9
	Veri			50	100	300	500
				59,4	91,1	269,1	472,7
				57,2	90,0	285,7	480,4
				54,9	89,8	308,0	469,8
				52,3	89,9	303,5	500,9
				54,6	97,6	270,0	492,4
			Keskiarvo	55,7	91,7	287,2	483,3
			Keskihajonta	2,7	3,4	18,2	13,2
			RSD- %	4,9	3,7	6,3	2,7
			Bias -%	11,4	-8,3	-4,3	-3,3

Taulukoista 10 ja 11 voimme todeta menetelmän tulosten oikeellisuuden ja tarkkuuden olevan hyväksyttävissä rajoissa.

14.8 Menetelmän selektiivisyys

Menetelmän voidaan todeta olevan selektiivinen kyseisille analyyteille. Analysoitujen tapauksen kromatogrammeista voitiin todeta, ettei häiritseviä piikkejä esiinny BHB- ja GHB -piikkien kyljessä.

14.9 Tunnistuksen oikeellisuus

Tunnistuksen oikeellisuudessa tarkasteltiin analysoitujen tapauksien kromatogrammeja ja voitiin todeta, että menetelmä täyttää tutkittavien yhdisteiden kohdalla oikeellisuuden kriteerit. Pienemmillä pitoisuuksilla (alle määritysrajan) voi näytematriisi sisältää tunnista häiritseviä tekijöitä mutta ne eivät vaikuta oleellisesti tunnistuksen oikeellisuuteen.

14.10 Toistuvuus

14.10.1 Toistettavuus

Toistettavuutta tutkittiin mittaamalla GHB:n kohdalla viidestä ja BHB:n kohdalla kymmenestä vainajanäytteestä neljä rinnakkaismääritystä verestä sekä virtsasta.

Taulukko 12. Vainajanäytteiden toistettavuus mitattaessa γ -hydroksibutyraattia, pitoisuudet ovat mg/l.

Näyte nro.	Näytematriisi	Rinnakkaiset				Ka	Keskihajonta (mg/l)	RSD- %
		1	2	3	4			
Vainaja 1	Veri	69,0	74,1	64,2	71,2	69,6	4,2	6,0
	Virtsa	222,6	235,3	213,6	231,4	225,7	9,7	4,3
Vainaja 2	Veri	79,6	77,1	84,2	97,3	84,5	9,0	10,6
	Virtsa	559,4	554,0	522,6	551,9	547,0	16,6	3,0
Vainaja 3	Veri	722,6	624,1	640,6	739,2	681,6	57,7	8,5
	Virtsa	2614,7	2722,6	2679,9	2682,8	2675,0	44,7	1,7
Vainaja 4	Veri	2935,6	2770,4	3199,2	2707,3	2903,1	219,6	7,6
	Virtsa	848,9	829,3	802,1	836,5	829,2	19,8	2,4
Vainaja 5	Veri	95,9	93,3	79,0	80,6	87,2	8,7	9,9
	Virtsa	169,9	161,4	169,7	164,2	166,3	4,2	2,5

Taulukko 13. Vainajanäytteiden toistettavuus mitattaessa β -hydroksibutyraattia, pitoisuudet ovat mg/l.

Näyte nro.	Näytematriisi	Rinnakkaiset				Ka	Keskihajonta (mg/l)	RSD- %
		1	2	3	4			
Vainaja 1	Veri	885,3	888,9	928,1	751,1	863,3	77,3	9,0
	Virtsa	601,2	606,5	783,1	768,5	689,8	99,5	14,4
Vainaja 2	Veri	523,5	719,3	689,9	684,9	654,4	88,6	13,5
	Virtsa	458,1	478,7	427,1	424,1	447,0	26,1	5,8
Vainaja 3	Veri	627,2	756,7	576,6	773,5	683,5	96,7	14,2
Vainaja 4	Veri	689,9	574,2	497,0	537,3	574,6	83,1	14,5
	Virtsa	105,8	122,9	125,3	120,7	118,7	8,8	7,4
Vainaja 5	Veri	345,1	353,9	470,6	506,4	419,0	81,7	19,5
	Virtsa	9861,5	9620,9	9650,1	10154,8	9821,8	246,5	2,5
Vainaja 6	Veri	109,6	116,8	106,9	113,4	111,7	4,3	3,9
	Virtsa	2276,3	2263,3	2759,6	2588,1	2471,8	243,6	9,9
Vainaja 7	Veri	275,4	250,2	300,5	284,7	277,7	21,0	7,6
	Virtsa	52,4	52,0	52,3	53,0	52,4	0,5	0,9
Vainaja 8	Veri	135,8	142,8	118,6	140,0	134,3	10,8	8,1
Vainaja 9	Veri	142,1	123,5	155,1	152,4	143,3	14,3	10,0
	Virtsa	1936,3	1692,9	1855,1	1890,5	1843,7	105,9	5,7
Vainaja 10	Veri	95,2	100,7	109,0	91,0	99,0	7,8	7,9

Menetelmän voidaan todeta olevan toistettavuudeltaan hyväksyttävissä raja-arvoissa. Punaisella merkityjä suhteellisia keskihajontoja ei ole käytetty myöhemmässä vaiheessa mittausepävarmuutta laskettaessa, koska näytteiden pitoisuudet ylittivät lineaarisuuden rajan (Taulukot 13 ja 15). Toistettavuudessa RSD- % tulee olla alle 15%, määritysrajalla alle 20%.

14.10.2 Uusittavuus

Uusittavuutta tutkittiin mittaamalla GHB:n kohdalla viidestä ja BHB:n kohdalla kymmenestä vainajanäytteestä rinnakkaismääritykset neljänä eri päivänä verestä sekä virtsasta.

Taulukko 14. Vainajanäytteiden uusittavuus määritettäessä γ -hydroksibutyraattia, pitoisuudet ovat mg/l.

Näyte nro.	Näytematriisi	Näytteenkäsittely päivä				Ka	Keskihajonta (mg/l)	RSD- %
		26.4.2016	27.4.2016	28.4.2016	29.4.2016			
Vainaja 1	Veri	81,6	77,5	87,1	85,0	82,8	4,2	5,1
	Virtsa	199,6	211,3	244,4	233,4	222,1	20,4	9,2
Vainaja 2	Veri	87,5	86,7	97,6	86,1	89,5	5,5	6,1
	Virtsa	515,5	558,5	546,3	528,1	537,1	19,1	3,5
Vainaja 3	Veri	785,0	908,1	691,1	838,2	805,6	91,5	11,4
	Virtsa	2616,3	2729,3	3034,3	2991,4	2842,8	202,4	7,1
Vainaja 4	Veri	3161,3	2952,5	2814,8	3209,1	3034,4	184,0	6,1
	Virtsa	789,0	827,9	813,1	811,2	810,3	16,0	2,0
Vainaja 5	Veri	86,8	96,9	107,5	112,3	100,9	11,4	11,3
	Virtsa	155,2	173,2	170,4	162,4	165,3	8,1	4,9

Taulukko 15. Vainajanäytteiden uusittavuus määritettäessä β -hydroksibutyraattia, pitoisuudet ovat mg/l.

Näyte nro.	Näytematriisi	Näytteenkäsittely päivä					Ka	Keskihajonta (mg/l)	RSD- %
		20.4.2016	21.4.2016	22.4.2016	25.4.2016	26.4.2016			
Vainaja 1	Veri	1973,6	2336,5	2174,6	2131,7		2154,1	149,2	6,9
	Virtsa	3206,3	2013,4	1146,6	1513,3		1969,9	897,6	45,6
Vainaja 2	Veri	1810,9	1602,9	1437,3	1492,3		1585,8	165,1	10,4
	Virtsa	1365,5	1424,6	1472,4	1357,3		1405,0	54,0	3,8
Vainaja 3	Veri	2300,1	2604,3	2351,8	2766,3		2505,6	218,8	8,7
Vainaja 4	Veri	54,4	46,1	45,6	45,0		47,8	4,4	9,3
	Virtsa	30,5	24,3	21,6	26,3		25,7	3,8	14,6
Vainaja 5	Veri		2636,5	2298,2	1888,7	2128,8	2238,0	314,3	14,0
	Virtsa		1596,4	1058,1	1111,9	1196,8	1240,8	243,8	19,7
Vainaja 6	Veri		78,7	91,8	106,2	91,0	91,9	11,3	12,2
	Virtsa		35,8	32,0	38,7	38,7	36,3	3,2	8,7
Vainaja 7	Veri		1875,5	1743,0	1453,7	2010,2	1770,6	237,8	13,4
Vainaja 8	Veri		1825,4	1627,2	1370,9	1547,3	1592,7	188,5	11,8
	Virtsa		6137,6	5726,6	6579,8	7913,4	6589,4	949,0	14,4
Vainaja 9	Veri		30,9	33,7	40,2	41,8	36,7	5,2	14,1
Vainaja 10	Veri		330,8	345,8	420,2	371,4	367,1	39,2	10,7
	Virtsa		202,2	200,8	197,2	200,4	200,2	2,1	1,1

Menetelmän voidaan todeta olevan uusittavuudeltaan hyväksyttävissä rajoissa. RSD-% tulee olla alle 20%.

14.11 Ulkoinen näyttö tulosten oikeellisuudesta

Esimerkkinä alla oleva taulukko GHB varmennetun referenssimateriaalin tuloksista.

Taulukko 16. GHB laaduntarkkailunäytteen tulosten oikeellisuudesta.

Todellinen Pitoisuus (mg/l)		Mitattu pitoisuus (mg/l)
53,0	1	51,8
	2	53,3
	3	51,7
	4	53,4
	5	49,7
	6	56,4
	7	54,9
	8	59,1
	9	56,9
	10	57,3
	Ka	54,5
	Keskihajonta	3,0
	RSD- %	5,4
	Bias-%	2,8

BHB:sta ei ollut saatavilla varmennettua referenssimateriaalia. Jatkossa β -hydroksibutyraatin osalta osallistutaan ulkoisiin vertailumittauksiin, jos niitä on tarjolla.

14.12 Matriisiefektin määrittäminen

Matriisiefektiä ei voitu määrittää post mortem -verinäytteistä, johtuen siitä, että endogeenistä GHB:a ja BHB:a muodostuu vainajaan yhtenä mätänemisen tuotteena. Taulukkoon 17 on kerätty tulokset matriisiefektin määrittämisestä kymmenen vainajan virtsasta.

Taulukko 17. β - ja γ -hydroksibutyraatin matriisiefektin määrittäminen.

Rinnakkaiset BHB 300 mg/l	Vainaja 1	Vainaja 2	Vainaja 3	Vainaja 4	Vainaja 5	Ka	Keskihajonta (mg/l)	RSD- %
1	246,2	308,4	264,4	283,6	256,3	271,8	24,7	9,1
2	259,0	284,1	236,6	273,9	293,8	269,5	22,4	8,3
3	274,7	279,9	262,9	316,0	269,7	280,6	20,7	7,4
								8,3
Ka	260,0	290,8	254,6	291,2	273,2			
keskihajonta	14,3	15,4	15,6	22,1	19,0			
RSD- %	5,5	5,3	6,1	7,6	7,0	6,3		
Rinnakkaiset BHB 500 mg/l	Vainaja 6	Vainaja 7	Vainaja 8	Vainaja 9	Vainaja 10	Ka	Keskihajonta (mg/l)	RSD- %
1	502,9	525,1	501,0	540,6	541,8	522,3	19,7	3,8
2	584,9	501,2	494,7	499,4	514,3	518,9	37,6	7,2
3	589,8	489,1	471,7	483,8	469,4	500,7	50,4	10,1
								7,0
Ka	559,2	505,1	489,1	508,0	508,5			
keskihajonta	48,8	18,3	15,4	29,4	36,5			
RSD- %	8,7	3,6	3,2	5,8	7,2	5,7		
Rinnakkaiset GHB 300 mg/l	Vainaja 1	Vainaja 2	Vainaja 3	Vainaja 4	Vainaja 5	Ka	Keskihajonta (mg/l)	RSD- %
1	301,0	302,9	294,6	301,6	303,4	300,7	3,5	1,2
2	308,7	295,0	296,0	303,0	303,9	301,3	5,7	1,9
3	302,8	295,1	294,3	304,0	305,1	300,3	5,1	1,7
								1,6
Ka	304,2	297,7	295,0	302,9	304,1			
keskihajonta	4,0	4,5	0,9	1,2	0,9			
RSD- %	1,3	1,5	0,3	0,4	0,3	0,8		
Rinnakkaiset GHB 500 mg/l	Vainaja 6	Vainaja 7	Vainaja 8	Vainaja 9	Vainaja 10	Ka	Keskihajonta (mg/l)	RSD- %
1	505,1	510,3	515,3	523,0	515,6	513,9	6,7	1,3
2	506,3	514,3	517,5	520,0	514,7	514,6	5,1	1,0
3	508,4	510,8	517,5	509,0	504,6	510,0	4,7	0,9
								1,1
Ka	506,6	511,8	516,8	517,3	511,6			
keskihajonta	1,7	2,2	1,3	7,4	6,1			
RSD- %	0,3	0,4	0,2	1,4	1,2	0,7		

Taulukosta 17 voimme todeta, että näytteet eivät sisällä matriisiefektiiä, koska suhteelliset keskihajonnat ovat hyvin pieniä. Mikäli matriisiefektiiä olisi suhteelliset keskihajonnat olisivat reilusti yli kymmenen prosenttia.

14.13 Mittausepävarmuus ja laajennettu mittausepävarmuus

Ensin laskettiin taulukoista 10 ja 11 suhteellisten keskihajontojen (RSD- %) keskiarvot. Bias-%:ssa laskettiin ensin - merkkisille tuloksille itseisarvot ja tämän jälkeen keskiarvot.

Tulokseksi GHB virtsalle saatiin taulukosta 10 suhteellisten keskihajontojen keskiarvoksi 1,26 % ja bias-% keskiarvoksi 4,99 %. GHB verelle saatiin sen sijaan RSD- % keskiarvoksi 1,96 % ja bias-% 1,32.

Taulukosta 11 BHB virtsalle saatiin RSD- % keskiarvoksi 2,41 % ja bias-% keskiarvoksi 4,68 %. BHB verelle saatiin RSD- % keskiarvoksi 4,40 % ja bias-% 6,82 %.

Taulukoista 12, 13, 14 ja 15 laskettiin verien ja virtsojen suhteellisten keskihajontojen keskiarvot. Tulokset on kerätty alla oleviin koosteisiin. Tässä kohtaa huomioon ei otettu punaisella merkittyjä arvoja, näytteiden pitoisuuksien ylittäessä lineaarisuuden rajan. Taulukon 12 saatuihin tuloksiin lisättiin vielä laaduntarkkailunäytteestä (taulukko 16) saatu suhteellinen keskihajonta, koska näytematriisi oli verta.

Taulukko 18. Kooste GHB verien ja virtsojen toistettavuusmittauksista saaduista tuloksista, lasketuista RSD- %:sta, sekä niiden keskiarvoista (Taulukko 12).

Vainaja	RSD- % veri		RSD- % virtsa
1	6,0		4,3
2	10,6		3,0
3	8,5		1,7
4	7,6		2,4
5	9,9		2,5
laaduntarkkailunäyte	5,4		
Ka	8,0		2,8

Taulukko 19. Kooste GHB verien ja virtsojen uusittavuusmittauksista saaduista tuloksista, lasketuista RSD- %:sta, sekä niiden keskiarvoista (Taulukko 14).

Vainaja	RSD- % veri		RSD- % virtsa
1	5,1		9,2
2	6,1		3,5
3	11,4		7,1
4	6,1		2,0
5	11,3		4,9
Ka	8,0		5,3

Taulukko 20. Kooste BHB verien ja virtsojen toistettavuusmittauksista saaduista tuloksista, lasketuista RSD- %:sta, sekä niiden keskiarvoista (Taulukko 13).

Vainaja	RSD- % veri	Vainaja	RSD- % virtsa
1	9,0	1	14,4
2	13,5	2	5,9
3	14,2	3	7,4
4	14,5	4	0,9
5	19,5	5	5,7
6	3,9		
7	7,6		
8	8,1		
9	10,0		
10	7,9		
Ka	10,8	Ka	6,9

Taulukko 21. Kooste BHB verien ja virtsojen uusittavuusmittauksista saaduista tuloksista, lasketuista RSD- %:sta, sekä niiden keskiarvoista (Taulukko 15).

Vainaja	RSD- % veri	Vainaja	RSD- % virtsa
1	6,9	1	3,8
2	10,4	2	14,6
3	8,7	3	19,7
4	9,3	4	8,7
5	14,0	5	1,1
6	12,2		
7	13,4		
8	11,8		
9	14,1		
10	10,7		
Ka	11,2	Ka	9,6

Veren GHB-pitoisuuden mittausepävarmuutta laskettaessa käytettiin seuraavia arvoja.

Veren GHB toistettavuuden RSD- % keskiarvon ja veristandardien RSD- % keskiarvon keskiarvoksi saatiin 4,98 %. Uusittavuuden RSD- % keskiarvo oli 7,97%. Laaduntarkkailunäytteen bias-% ja veristandardien bias-% keskiarvoksi saatiin 2,06 %.

Tulokset sijoitetaan mittausepävarmuutta kuvaavaan kaavaan

$$U = \sqrt{4,98^2 + 7,97^2 + 2,06^2} = 9,62 \%$$

Veren GHB-pitoisuuden laajennettu kokonaismittausepävarmuus on

$$U(95\%) = 2 * 9,62 = 19,24 \approx 19 \%$$

Virtsan GHB-pitoisuuden mittausepävarmuutta laskettaessa käytettiin seuraavia arvoja.

Virtsan GHB toistettavuuden RSD- % keskiarvon ja virtsastandardien RSD- % keskiarvon keskiarvoksi saatiin 2,02 %. Uusittavuuden RSD- % keskiarvo oli 5,35 %. Virtsastandardien bias-% keskiarvoksi saatiin 4,99 %.

Tulokset sijoitetaan mittausepävarmuutta kuvaavaan kaavaan

$$U = \sqrt{2,02^2 + 5,35^2 + 4,99^2} = 7,59 \%$$

Virtsan GHB-pitoisuuden laajennettu kokonaismittausepävarmuus on

$$U(95\%) = 2 * 7,59 = 15,18 \approx 15 \%$$

Veren BHB-pitoisuuden mittausepävarmuutta laskettaessa käytettiin seuraavia arvoja.

Veren BHB toistettavuuden RSD- % keskiarvon ja veristandardien RSD- % keskiarvon keskiarvoksi saatiin 7,60 %. Uusittavuuden RSD- % keskiarvo oli 11,17 %. Veristandardien bias-% keskiarvoksi saatiin 6,82 %.

Tulokset sijoitetaan mittausepävarmuutta kuvaavaan kaavaan

$$U = \sqrt{7,60^2 + 11,17^2 + 6,82^2} = 15,14 \%$$

Veren BHB-pitoisuuden laajennettu kokonaismittausepävarmuus on

$$U(95\%) = 2 * 15,14 = 30,28 \approx 30 \%$$

Virtsan BHB-pitoisuuden mittausepävarmuutta laskettaessa käytettiin seuraavia arvoja.

Virtsan BHB toistettavuuden RSD- % keskiarvon ja virtsastandardien RSD- % keskiarvon keskiarvoksi saatiin 4,64 %. Uusittavuuden RSD- % keskiarvo oli 9,58 %. Virtsastandardien bias-% keskiarvoksi saatiin 4,68 %.

Tulokset sijoitetaan mittausepävarmuutta kuvaavaan kaavaan

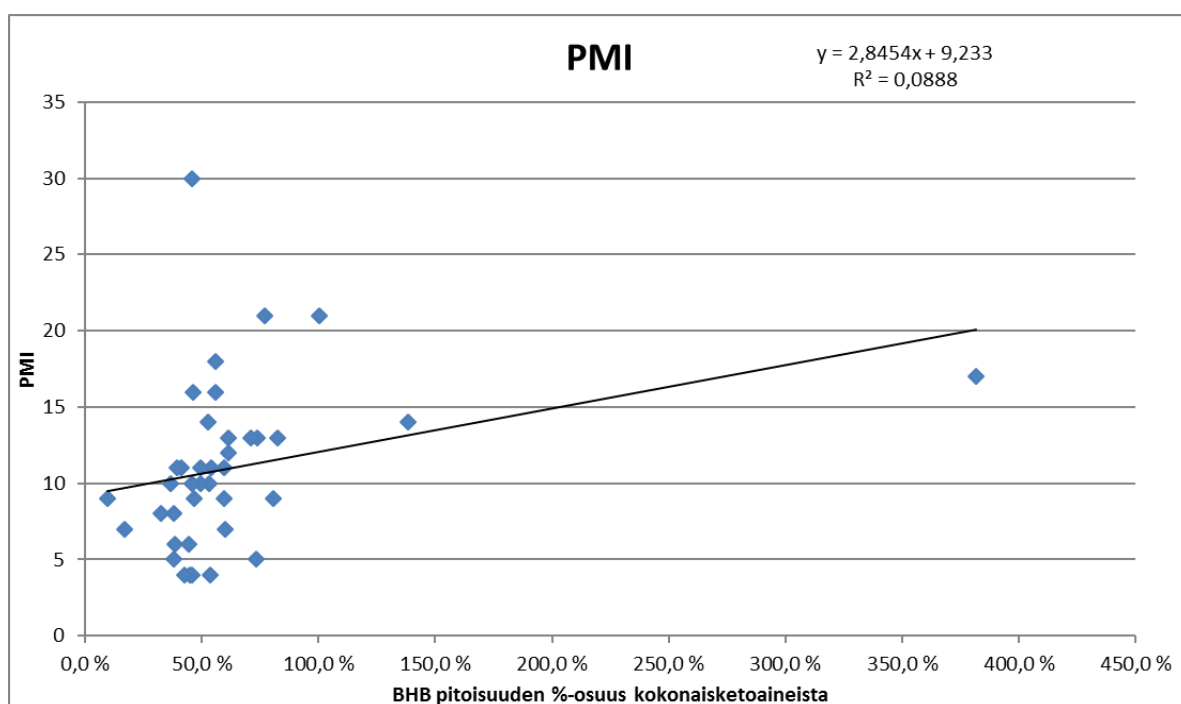
$$U = \sqrt{4,64^2 + 9,58^2 + 4,68^2} = 11,63 \%$$

Virtsan BHB-pitoisuuden laajennettu kokonaismittausepävarmuus on

$$U(95\%) = 2 * 11,63 = 23,25 \approx 23 \%$$

15 BHB pitoisuuden korrelaatio PMI:n kanssa

Näytteistä määritettyjen BHB-pitoisuuksien osuutta koko ketoainepitoisuudesta verrattiin PMI-aikaan eli vainajan kuolinajan ja ruumiinavausajan väliseen aikaeroon. Aikaisemmissa tutkimuksissa on havaittu BHB pitoisuuden pysyvän melko vakaana kuoleman jälkeen, kun taas muiden ketoaineiden pitoisuudet pienenevät hajoamisen takia. Näin ollen voitaisiin olettaa, että mitä pitempi on PMI, sitä suurempi osuus koko ketoainepitoisuudesta koostuu β -hydroksibutyyraatista.



Kuva 13. Näytteiden PMI:n korrelaatio BHB-pitoisuuden prosentiosuuteen kokonaisketoaineista.

Kaaviokuvasta voimme todeta, että BHB:n pitoisuus ei korreloi PMI:n kanssa. Määrittelyksissä veren BHB pitoisuuden osuus kokonaisketoaineista oli 9,6-100,2 % (N = 9, Keskiarvo 66,9 % ja mediaani 73,9 %) lasiaisissa BHB:n osuus oli pienempi 16,8-381,7

% (N = 30, keskiarvo 61,8 % ja mediaani 48,2 %). PMI:n vaihteluväli oli 4-31 päivää (N = 39, keskiarvo 10,9 ja mediaani 10 päivää). Korrelaatiotutkimuksen epävarmuutta lisää myös se, että tutkimuksissa käytettävien PMI-arvoista peräti 32 eli 82 % oli arvioita eli kuolinajasta ei ollut varmaa tietoa. Suhteeseen saattaa vaikuttaa myös se, että BHB-määritykset tehtiin huomattavasti myöhemmin kuin ketoainepitoisuus määritykset, jolloin näytteiden säilytys on voinut vaikuttaa pitoisuuksiin. Jatkossa BHB-määritykset tehdään samaan aikaan kuin ketoainepitoisuudet, eli näytteiden juuri saavuttua laboratorioon.

16 Johtopäätökset

Uuttomenetelmiä vertailtaessa todettiin Kytösuontien menetelmän olevan soveltuvampi käyttötarkoitukseensa, vaikka Tilkanmäen ja Kytösuontien menetelmien lineaarisuuskuvaajissa ei ollut eroja, niin yksittäisistä ionikromatogrammeista häiritseviä tekijöitä löytyi.

Kaiken kaikkiaan menetelmän voidaan todeta antavan luotettavia mittaustuloksia molemmille yhdisteille sekä verestä että virtsasta. Lopullisesti β -hydroksibutyraatin osalta määrittystä suoritetaan verestä, koska virtsa ei välttämättä anna, etenkin jos vainaja on ennen kuolemaa juonut paljon, luotettavaa kuvaa kehon ketoasidoosista kuolinhetkellä. Virtsalle ei myöskään ole viitearvoja kirjallisuudessa. Laboratorion toimesta menetelmää mahdollisesti laajennetaan β -hydroksibutyraatin osalta myös lasiaisiin.

Toteamisrajaksi BHB:lle saatiin laskennalliseksi 37 mg/l. Määrittämissä BHB:lle saatiin verestä (sekä virtsasta) 50 mg/l, koska tätä pienempien pitoisuuksien voidaan todeta olevan normaaleja, tästä syystä validointisuunnitelmaan asetetut tavoitearvot eivät kohdanneet toteamis- ja määrittämissä rajoilla sekä mittausalueella BHB:n kohdalla. GHB:lle toteamisrajaksi saatiin 1 mg/l ja määrittämissä rajoiksi 3 mg/l. Raportointiraja BHB:lle vainajista on 50 mg/l ja GHB:lle vainajista 50 mg/l ja elävistä 10 mg/l.

Kalibrointipisteitä valittiin kolmen sijaan neljä, jotta voidaan luotettavammin tunnistaa yhdisteet. Kalibrointiin käytetään γ -hydroksibutyraatilla pitoisuuksia 10, 50, 100 ja 300 mg/l. β -hydroksibutyraatilla kalibrointiin käytetään pitoisuuksia 50, 100, 300 ja 500 mg/l, vaikkakin menetelmä on lineaarinen alueella 30-5000 mg/l.

Laajennetut kokonaismittausepävarmuudet ovat; GHB verelle 19 % ja virtsalle 15 % sekä BHB verelle 30 % ja virtsalle 23 %.

BHB-pitoisuuksien osuutta koko ketoainepitoisuuksista verrattiin PMI-aikaan ja voitiin todeta, että BHB-pitoisuus ei korreloi PMI:n kanssa. Epävarmuutta korrelaatiotutkimuksiin tuo kuitenkin se, että peräti 82% PMI-arvoista on arvioita eli kuolinaika ei ole täysin varma ja se että BHB-määrittäykset tehtiin myöhemmin kuin ketoainepitoisuus määrittäykset. Jatkossa BHB-määrittäykset suoritetaan näytteiden juuri laboratorioon saavuttua.

Menetelmän voidaan todeta olevan selektiivinen, toistettava ja uusittava, sekä tunnistus on oikeellinen tutkittaville yhdisteille, näin ollen menetelmä voidaan ottaa laboratorioissa rutiinikäyttöön.

Lähteet

- 1 Palmiere Cristian. Postmortem diagnosis of diabetes mellitus and its complications. Forensic science, Croat Med J.2015;56:181-93. Viitattu 22.3.2016
- 2 The University of Liverpool (GB). Rapid analytical techniques for diagnosing and managing diabetes: Theory, Practical 4. Verkkodokumentti. https://www.liverpool.ac.uk/~agmclen/Medpracs/practical_4/theory_4.html. Viitattu 22.3.2016
- 3 Hassan M.A. Huda, Cooper A.A. Gail. Determination of β -Hydroxybutyrate in Blood and Urine Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Journal of Analytical Toxicology, Vol. 33, October 2009. Viitattu 22.3.2016
- 4 Duodecim Terveyskirjasto. Lääketieteen sanasto. Ketoosi. Verkkodokumentti. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=Ilt01564. Viitattu 23.3.2016
- 5 Duodecim Terveyskirjasto. Lääketieteen sanasto. Ketoasidoosi. Verkkodokumentti. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=Ilt01561. Viitattu 23.3.2016
- 6 Hockenhull Joanna, Dhillon Waljit, Andrews Rebecca, Patterson Sue. Investigation of markers to indicate and distinguish death due to Alcoholic Ketoacidosis, Diabetic Ketoacidosis and Hypersmolar Hyperglycemic State using post-mortem samples. Forensic Science International 214 (2012) 142-147. Viitattu 23.3.2016
- 7 Beránková Kateřina, Mutňanská Kateřina, Balíková Marie. Gamma-hydroxybutyric acid stability and formation in blood and urine. Forensic Science International 161 (2008) 158-162. Viitattu 23.3.2016
- 8 University of Maryland. Cesar, Center for Substance Abuse Research. GHB. Verkkodokumentti. <http://www.cesar.umd.edu/cesar/drugs/ghb.asp>. Viitattu 24.3.2015
- 9 Wayne Jones Alan, Holmgren Anita, Kugelberg C. Fredrik. Driving under the influence of gamma-hydroxybutyrate (GHB). Forensic Sci Med Pathol (2008) 4:205-211. Viitattu 24.3.2016

- 10 Wikipedia. Gamma-Hydroxybutyric acid. Verkkodokumentti. Kuva. https://en.wikipedia.org/wiki/Gamma-Hydroxybutyric_acid. Viitattu 25.3.2016
- 11 Wikipedia. Gammahydroksivoihappo. Verkkodokumentti. <https://fi.wikipedia.org/wiki/Gammahydroksivoihappo>. Viitattu 25.3.2016
- 12 Elian A. Albert. A novel method for GHB detection in urine its application in drug-facilitated sexual assaults. *Forensic science international* 109 (2000) 183-187. Viitattu 25.3.2016
- 13 Cleveland clinic. Diabetes basics. Verkkodokumentti. https://my.clevelandclinic.org/health/diseases_conditions/hic_Diabetes_Basics. Viitattu 25.3.2016
- 14 Drugs.com. GHB or Gamma-Hydroxybutyrate. Verkkodokumentti. <http://www.drugs.com/illicit/ghb.html>. Viitattu 29.3.2016
- 15 University of Bristol. Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS). Verkkodokumentti. <http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/gcms.html>. Viitattu 29.3.2016
- 16 FAO Corporate document repository. Analytical techniques. Chromatography. Verkkodokumentti. Kuva. <http://www.fao.org/docrep/009/a0691e/A0691E05.htm>. Viitattu 16.6.2016
- 17 Chromatography online. Gas Chromatography Mass Spectroscopy (GC-MS) Systems > Ion Generation > Electron Impact Ionization > Page 65. Verkkodokumentti. Kuva. http://www.chromatography-online.org/GC-MS/Ion-Generation/Electron-Impact-Ionization/rs_13_65.php. Viitattu 29.3.2016
- 18 Mittatekniikan keskus. Verkkodokumentti. http://www.kalibroitpalvelu.fi/mikes/Oppaat/j6_05_b5_nettiin.pdf. Viitattu 30.3.2016
- 19 Suomen ympäristökeskus. Validointiohjeet. Verkkodokumentti. file:///C:/Users/htax/AppData/Local/Temp/SYKE%20Validointiohjeet%201996.ppd. Viitattu 30.3.2016
- 20 Jaarinen Soili & Niiranen Jukka. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. 5. uudistettu painos. Helsinki: Edita. Viitattu 2.4.2016.
- 21 Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. Oikeuslääketieteellinen kuolemansyyn selvittäminen. Verkkodokumentti. <https://www.thl.fi/fi/palvelut-ja-asiointi/analyysi-ja-tutkimuspalvelut/oikeuslaakinta/kuolemansyyn-selvittamisjarjestelmat/oikeuslaaketieteellinen-kuolemansyyn-selvittaminen>. Viitattu 2.4.2016

- 22 Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. Kuolemansyyn selvittämijärjestelmät. Verkkodokumentti. <https://www.thl.fi/fi/palvelut-ja-asiointi/analyysi-ja-tutkimuspalvelut/oikeuslaakinta/kuolemansyyn-selvittamisjarjestelmat>. Viitattu 2.4.2016
- 23 Valvira, Sosiaali- ja terveystieteiden valvontavirasto. Kuolemansyyn selvittämien. Verkkodokumentti. http://www.valvira.fi/terveydenhuolto/hyva-ammattinharjoittaminen/kuolemansyyn_selvittaminen. Viitattu 2.4.2016
- 24 WHO, World Health Organization. Gamma-Butyrolaktone (GBL). Verkkodokumentti http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/4_3_Review.pdf. Viitattu 19.4.2016.
- 25 Wikipedia. Gamma-Butyrolactone Verkkodokumentti. Kuva. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/13/Synthesis_gamma-Butyrolactone.svg. Viitattu 19.4.2016
- 26 Mittatekniikan keskus. Mikes Metrologia. J6/2005. Verkkodokumentti. http://www.mikes.fi/mikes/Oppaat/j6_05_b5_nettiin.pdf. Viitattu 16.5.2015
- 27 Seppä Kaija, Aalto Mauri, Alho Hannu, Kiiänmaa Kalervo. 2012. Huume- ja lääkeriippuvuudet. 1. painos. Helsinki: Duodecim. Viitattu 26.4.2016
- 28 Mittaustekniikan perusteet. Luento 7. 2007. Verkkodokumentti. http://metrology.tkk.fi/courses/S-108.1010/Luento7_2007.pdf. Viitattu 16.5.2015
- 29 Penttilä Antti, Hirvonen Jorma, Saukko Pekka & Karhunen Pekka J. 2000 Oikeuslääketiede. 1. Painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 18.5.2016
- 30 Suomen Kliinisen Kemian Yhdistyksen jäsenlehti. Kliinisen laboratorioalan julkaisu 4/2003. Verkkodokumentti. http://www.skky.fi/sites/skky.fi/files/media/klab_034_0.pdf. Viitattu 19.5.2016
- 31 Toimintaohje, TO-Validointi, Kvantitoinnin ja validoinnin perusteet, Helsingin yliopisto, Hjelt-instituutti, Oikeuskemian yksikkö, Toksikologian laboratoriot. Viitattu 20.5.2016
- 32 Mittatekniikan keskus. Mikes. Julkaisu J4/2011. Verkkodokumentti. <http://www.vtt.fi/inf/pdf/MIKES/2011-J4.pdf>. Viitattu 25.5.2016
- 33 Päällysaho Tiina. Centria. Analyysimenetelmän kehittämisen toimintamalli. Maaliskuu 2013. Verkkodokumentti. http://ketek.fi/useruploads/files/menetelm%C3%A4t/menetelm%C3%A4nkehitt%C3%A4misen_toimintamalli_k%C3%A4sikirja,_t.p%C3%A4%C3%A4llysaho.pdf. Viitattu 25.5.2016

- 34 Duodecim Terveyskirjasto. Esidiabetes. Verkkodokumentti.
http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk01134. Viitattu 26.5.2016
- 35 Duodecim Terveyskirjasto. Diabetes (Sokeritauti). Verkkodokumentti.
http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00011. Viitattu 26.5.2016
- 36 Agilent Technologies. Retention time locking: Concepts and Applications. Joulukuu 1997. Verkkodokumentti. <http://xoassociates.net/files/5966-2469E.pdf>. Viitattu 1.7.2016
- 37 Tyrkkö Elli, Jönsson Anna, Kronstrand Robert, Abstract, Beta-hydroxybutyrate and the post mortem diagnosis of ketoacidosis, Nordic association of forensic toxicologists (2016). Viitattu 7.7.2016
- 38 Heninger Michael, Postmortem Vitreous Beta-Hydroxybutyrate: Interpretation in a Forensic Settings. J Forensic Sci, September 2012, Vol. 57, No. 5. Viitattu 8.7.2016
- 39 Elliot Simon, Smith Christopher, Cassidy Diane, The post-mortem relationship between beta-hydroxybutyrate (BHB), acetone and ethanol in ketoacidosis. Forensic Science International 198 (2010) 53-57. Viitattu 10.7.2016
- 40 Medscape. Hypersmolar Hyperglycemic state. Verkkodokumentti.
<http://emedicine.medscape.com/article/1914705-overview#a2>. Viitattu 10.7.2016

VALIDOINTISUUNNITELMA

Oikeustoksikologiayksikkö

MENETELMÄN NIMI

PVM

21.3.2016

LAATIJA HJT

HYVÄKSYJÄ IR

VALIDOINTISUUNNITELMA

Menetelmän nimi tai kuvaus

Betahydroksibutyraatin ja gammahydroksibutyraatin kvantitatiivinen määrittäminen vainajan verestä ja virtsasta

Analyysimenetelmän tavoite

Tavoitteena on lisätä gammahydroksibutyraatti menetelmään betahydroksibutyraatti ja validoida molemmat analyytit. Betahydroksibutyraattia pidetään hyvänä biomarkerina alkoholi ketoasidoosissa ja diabeetisessa ketoasidoosissa. Alkoholi ketoasidoosissa BHB/asetoasetatti suhde on korkeampi kuin diabeetisessa ketoasidoosissa 7:1 verrattuna 3:1. Betahydroksibutyraatin osuus kokonaisketoaineista on n. 78 %.

Aikataulu

14.3.- 30.5.2016

Tekijät

Heidi Tarvainen ja Ilpo Rasanen

Laitteet

GC-MS3

Matriisit

Vainajien ja elävien kokoveri ja virtsa

Yhdisteet

Betahydroksibutyraatti (BHB) ja gammahydroksibutyraatti (GHB)

Pitoisuusalueet

10-300mg/l

Lähdeviite

Huda M.A. Hassan, Gail A.A. Cooper. Determination of β -Hydroxybutyrate in Blood and Urine Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Journal of Analytical Toxicology, Vol. 33, October 2009.

Joanna Hockenfull, Waljit Dhillon, Rebecca Andrews, Sue Patterson. Investigation of markers to indicate and distinguish death due to Alcoholic Ketoacidosis, Diabetic Ketoacidosis and Hyperosmolar Hyperglycemic State using post-mortem samples. Forensic Science International 214 (2012) 142-147.



TERVEYDEN JA
HYVINVOINNIN LAITOS

VALIDOINTISUUNNITELMA

Oikeustoksikologiayksikkö

MENETELMÄN NIMI

PVM

21.3.2016

LAATIJA

HJT

Tavoiteparametrit (soveltuvin osin)

Katsotaan ja päätetään yhdessä.

Parametri	Tavoitearvo tai vastaava
Injektion toistettavuus	-
Toistettavuus	RSD <15%, määritysrajalla <20%
Uusittavuus	RSD ≤20%
Tulosten oikeellisuus	BIAS <15%, määritysrajalla <20%
Toteamisraja	1 mg/l
Määritysrajat	10 mg/l
Retentioajan toistettavuus	±0,02 min
Kalibroinnin tarkkuus ja oikeellisuus	BIAS ja RSD < 15%, määritysrajalla < 20%
Menetelmän kalibrintokuvaaja	R ² > 0,99
Mittausalue	määritysraja – 300
Spesifisyys tai selektiivisyys	negatiivisten näytteiden tausta ei aiheuta häiriötä yhdisteiden kohdalla huomioon ottaen endogeeninen pitoisuus
Tunnistuksen oikeellisuus	Qualifier ionien suhteellinen pinta-ala ±20% (suhteellinen) tavoitearvosta
Häiriöalttius	-
Matriisiefekti	ei matriisiefektiä
Mittausepävarmuus	< 30%
Valvontakortti ja sen rajat	15% ja 30%
Ulkoinen näyttö tulosten oikeellisuudesta	osallistutaan jatkossa vertailumittauskierroksille, jos niitä on tarjolla
Raportointiraja	GHB: vainajilla 50 mg/l, elävillä 10 mg/l, BHB 50 mg/l
Yhdisteiden säilyvyys	-

Validointitoimenpiteet**1. Kirjallisuus**

Ensin tutustuttiin kirjallisuuteen ja menetelmäohjeisiin (THL:n Kytösuontien ja Tilkanmäen). Tarkoituksena mieltä kummalla ohjeistuksella lähdetään esikäsittelynäytteitä. Kirjallisuudesta otettiin myös viitteitä BHB:n pitoisuusalueeseen ja tutkittaviin ioneihin.

TERVEYDEN JA
HYVINVOINNIN LAITOSVALIDOINTISUUNNI-
TELMA**Oikeustoksikologiayksikkö**

MENETELMÄN NIMI

PVM

21.3.2016

LAATIJA

HJT

1. Ionien alustava valinta

Tehdään trimetyylisilyyli – johdosten (TMS) scan-ajot joissa nähdään yhdisteiden massaspektrit. Spektristä valitaan ionit jotka ovat mahdollisesti soveltuvia kyesiten analyyttien määrittämiseen. Luodaan SIM-menetelmä alustavasti valituilla ioneilla.

2. Uttomenetelmä

THL:n (Tilkanmäen ja Kytösuontien) uuttomenetelmiä verrataan keskenään uuttamalla yksi kalibroitisarja ja vainajanäytteitä sekä verestä että virtsasta. Testauksien tuloksista valitaan parhaiten taustaltaan, helppoudeltaan ja määrittäysrajoiltaan, soveltuva menetelmä näytteiden uuttamiseen.

3. Ionien varsinainen valinta

Uutetaan valitulla uuttomenetelmällä kymmenen vainajan kokoverinäytettä ja virtsanäytettä (sekä käytetään jo kohdassa 3. ajettujen näytteiden tuloksia). Ajetaan näytteet luodulla SIM-ohjelmalla taustatekijöiden selvittämiseksi ja valitaan ne ionit jotka soveltuvat parhaiten yhdisteille. Valitaan kolme ionia per yhdiste, myös sisäisille standardeille.

4. GC-MS ajo-ohjelma

Jos yhdisteet eroavat toisistaan nykyisellä lineaarisella ohjelmalla, pyritään käyttämään sitä.

5. Menetelmän kalibroinnin tarkkuus, lineaarisuus ja määrittäysrajat

Veri- ja virtsanäytteille valmistetaan omat kalibroitinäytteet. Nollavereen/nollavirtsaan lisätään tutkittavia yhdisteitä siten että saavutetaan seuraavat pitoisuustasot 1mg/l, 3mg/l, 5mg/l, 10mg/l, 30mg/l, 50mg/l, 100mg/l, 200mg/l, 300mg/l ja 500mg/l. Jokaisesta tasosta määritetään viisi rinnakkaista. Lineaarisuutta tutkitaan kalibroitikäyrän kuvasta. Jos kalibroitikuvaaja menee lineaarisesti, valitaan kalibrointiin jatkossa kolme pistettä.

6. Oikeellisuus (Tulosten tarkkuus)

6.1 Toistettavuus



TERVEYDEN JA
HYVINVOINNIN LAITOS

VALIDOINTISUUNNI-
TELMA

Oikeustoksikologiyksikkö

MENETELMÄN NIMI

PVM

21.3.2016

LAATIJA

HJT

Toistettavuus määritetään analysoimalla kymmenen eri pitoisuustasolla, aikaisemmin positiivisiksi todettuja vainajien veri- ja virtsanäytteitä, jokaisesta pitoisuudesta valmistetaan neljä rinnakkaista. Laskuihin voidaan käyttää myös kohdassa 6. ajettuja näytteitä. Tuloksista lasketaan suhteellinen keskihajonta (RSD, %).

1.1 Uusittavuus

Määritetään analysoimalla kymmenen positiivista näytettä verestä ja virtsasta siten, että näytteet analysoidaan eri päivinä. Tuloksista lasketaan suhteellinen keskihajonta (RSD)

2. Matriisiefektin määrittäminen

Signaalien pienenemistä tai kasvamista tutkitaan lisäämällä yhdisteitä kymmenen negatiivisiksi todettuihin vainaja näytteisiin (tai jo aiemmin analysoiduista näytteistä valitaan ne, joissa on mahdollisimman vähän GHB:a ja/tai BHB:a), mukaan pyritään valitsemaan myös mätiä näytteitä. Jokaisesta näytteestä valmistetaan kolme rinnakkaista. Pitoisuustasoiksi valitaan GHB:lle 10mg/l ja 50mg/l ja BHB:lle 50mg/l ja 100mg/l. Tuloksista verrataan rinnakkaisten näytteiden suhteellista keskihajontaa näytteiden välisiin suhteellisiin keskihajontoihin.

3. Mittausepävarmuus ja kokonaismittausepävarmuus

Mittausepävarmuus määritetään käyttäen alla mainittua kaavaa

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

U_1 = Systemaattinen virhe. Laskemisessa käytetään oikeellisuutta eli kalibrointikuvaajan pisteiden (kolmen pisteen kalibrointi) poikkeamaa teoreettisesta arvosta.

U_2 = Satunnaisvirhe. Laskemisessa käytetään todellisten näytteiden ja kalibrointinäytteiden rinnakkaisten hajontaa. Saadaan kohdista 6, 7.1 ja 7.2.

Menetelmien mittausepävarmuus ilmoitetaan laajennettuna mittausepävarmuutena.

Se saadaan kaavasta;

$$U(95\%) = 2 \times U$$



Oikeustoksikologiayksikkö

VALIDOINTISUUNNI-
TELMA

MENETELMÄN NIMI

PVM

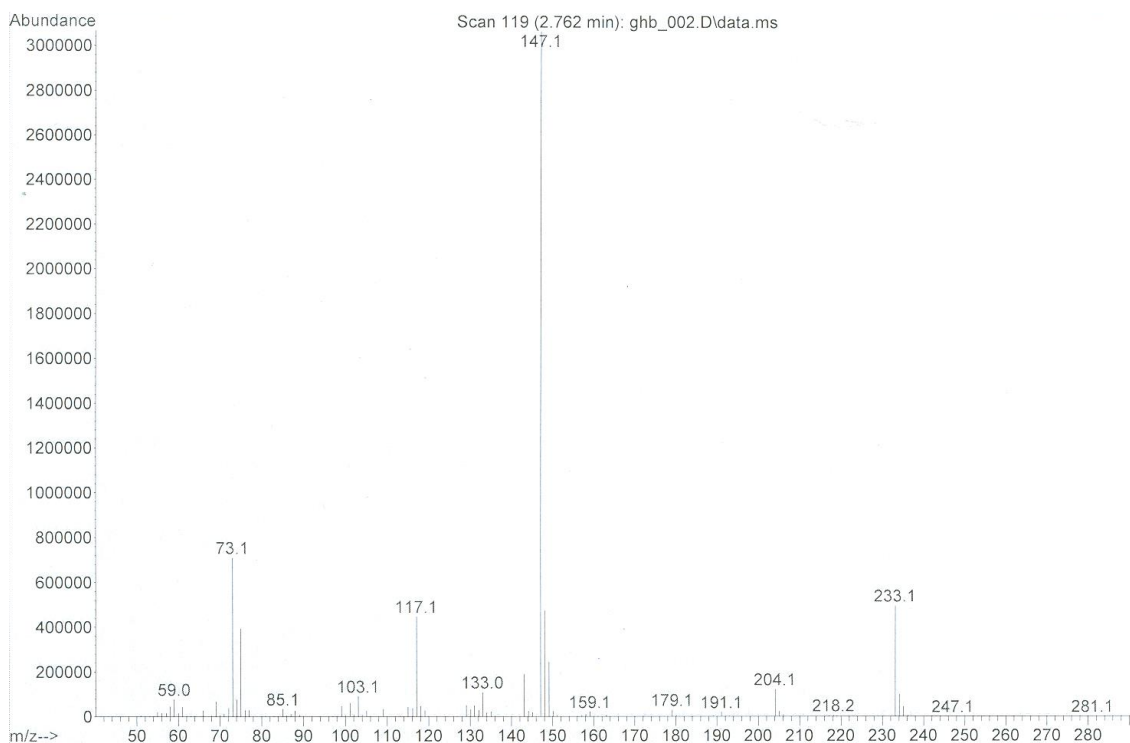
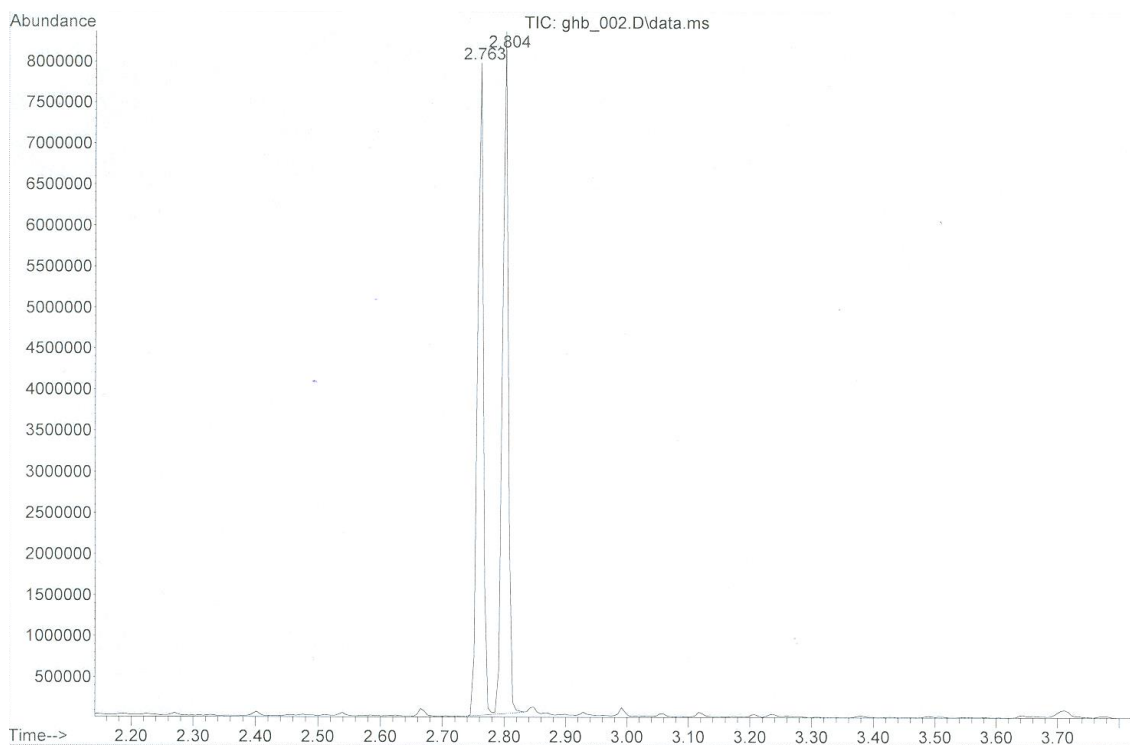
21.3.2016

LAATIJA

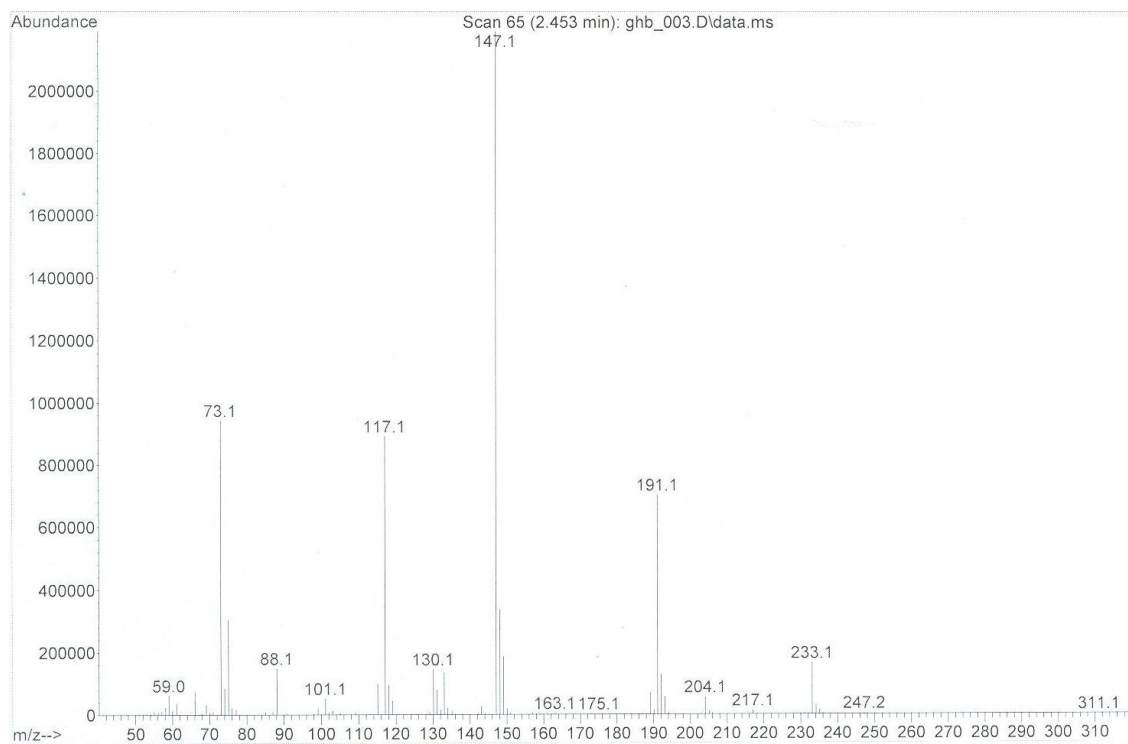
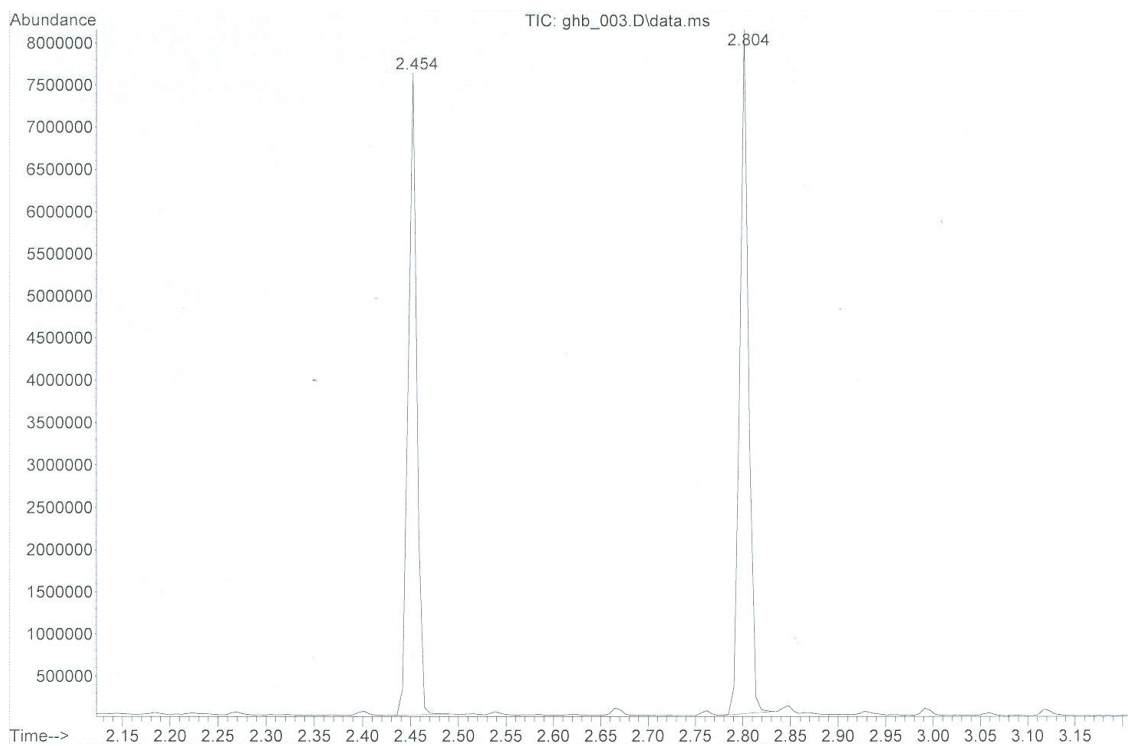
HJT

Tai voidaan käyttää Mukit -ohjelmaa mittausepävarmuuksien laskemisessa.

GHB:n kokonaisionivirtakromatogrammi ja massaspektri



BHB:n kokonaisionivirtakromatogrammi ja massaspektri



Retention Time Locking Data Report

Retention Locked Method: C:\MSDCHEM\1\METHODS\GHB_HJT.M
Retention Locked Cal Date: 19 May 2016 12:20 pm
Instrument: GC-MS3
Operator:

Method Lock is currently On

Compound: GHB-d6

Retention Time Calibration:

File	psi Pressure	Time min.	Spec Xcor	Deviation Seconds
RTLOCK1.D	9.98	2.796	0.99881	5.151
RTLOCK2.D	11.23	2.751	0.99248	2.407
RTLOCK3.D	12.48	2.711	1.00000	0.000
RTLOCK4.D	13.73	2.676	0.99865	-2.064
RTLOCK5.D	14.97	2.642	0.99874	-4.118

Maximum Deviation: 5.151 seconds

RTL Curve: $R = 3.11e+006 A^2 - 1.91e+007 A + 2.99e+007$

Terms of Curve Fit:

Constant = 2.98996e+007

Linear = -1.91361e+007

Quadratic = 3.10755e+006

Coefficient = 0.999888 ** Good Fit **

Locked Retention Time information:

Retention Locked File: C:\MSDCHEM\1\METHODS\GHB_HJT.M\rtlock\rtlock3.d
Acq Date: 19 May 2016 12:20 pm
Instrument: GC-MS3
Operator:

Measured Retention Time: 2.711 Pressure: 12.48 (psi)
Locked Retention Time: 2.700 Pressure: 12.83 (psi)
** Locked RT and Pressure Within Calibrated Limits **

Lock run spectrum XCor: 1.0000

Report created: Thu May 19 12:56:43 2016

Determination of β -Hydroxybutyrate in Blood and Urine Using Gas Chromatography–Mass Spectrometry

Huda M.A. Hassan* and Gail A.A. Cooper

Forensic Medicine and Science, University of Glasgow, Glasgow G12 8QQ, Scotland, United Kingdom

Abstract

β -Hydroxybutyrate (BHB) is considered a potential biomarker for alcoholic ketoacidosis (AKA). A robust and sensitive method was developed and validated for the quantitative determination of BHB in postmortem blood and urine using deuterated γ -hydroxybutyrate as an internal standard. Samples were analyzed by gas chromatography–mass spectrometry following liquid–liquid extraction and silyl derivatization. The limits of detection and lower limits of quantification in blood and urine were 2 and 7 mg/L and 2 and 6 mg/L, respectively. The interday and intraday precision was measured by coefficients of variation for blood and urine and ranged from 1.0 to 12.4% for quality control samples spiked at 50 and 300 mg/L. The linear range of 50–500 mg/L resulted in an average correlation of $R^2 > 0.99$, and the average extraction recoveries in blood and urine were $\geq 82\%$ and $\geq 59\%$, respectively. BHB remains stable in blood spiked at a concentration of 300 mg/L for 15 days when stored within a refrigerator (2–5°C). Postmortem blood and urine samples were analyzed using the validated method for cases where the deceased had a history of chronic alcohol abuse to establish the use of BHB as a potential marker of AKA.

Introduction

Alcohol biomarkers have the potential to be indicators for chronic and acute alcohol consumption and can be detected in the body long after the elimination of ethanol, which decreases rapidly over time (1). β -Hydroxybutyrate (BHB) is one of the ketone bodies and is considered a potential biomarker for alcoholic ketoacidosis (AKA) (2–4).

Ketone bodies are created at moderate levels in human bodies. A high concentration of ketones reduces the pH of the body and causes ketoacidosis. Ketone bodies are formed by the breakdown of fatty acids and deamination of amino acids; the common ketone bodies produced in the body

are acetone, acetoacetate, and BHB as illustrated in Figure 1. Ketoacidosis can occur in starvation, diabetic ketoacidosis (DKA), and AKA.

In many sudden deaths among individuals with a history of alcohol abuse, the cause of death is undetermined following the postmortem examination and associated investigations (e.g., histology, microbiology, and toxicology). Low or absent blood ethanol along with elevated levels of acetone do not in themselves determine the cause of death, but these findings in combination with a history of chronic alcohol abuse suggest AKA (5).

DKA is associated with Type 1 diabetes and is related to insulin deficiency and hyperglycemia. Insulin controls the level of glucose in the body; if it is low, it causes a glucose overload, dehydration, and then acidosis. AKA is associated with chronic ethanol abuse and decreased food intake. AKA can lead to hypoglycemia, and in some cases, hyperglycemia due to glucosuria and low food intake in chronic alcoholics may occur (4). Other factors that differentiate between AKA and DKA are that the BHB/acetoacetate ratio is higher in AKA versus DKA, 7:1 versus 3:1, respectively, and the ratio of lactate/pyruvate is 19:1 versus 11:1 (6).

Analytical methods originally utilized for the analysis of γ -hydroxybutyrate (GHB) (7) and BHB (8) were modified and optimized for the analysis of BHB in postmortem blood and urine. The aims of this study were to develop a sensitive and

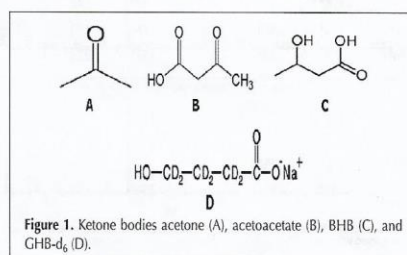


Figure 1. Ketone bodies acetone (A), acetoacetate (B), BHB (C), and GHB-d₆ (D).

* Author to whom correspondence should be addressed.
E-mail: Huda.Hassan@formed.gla.ac.uk.

robust method for determination of BHB in blood and urine, to investigate the potential of BHB as a biomarker for AKA in medicolegal cases, and to investigate the stability of BHB in blood.

Materials and Methods

Materials

The internal standard used was deuterated GHB (GHB-d₆, 1 mg/mL) as illustrated in Figure 1 and was purchased from Cerilliant (Round Rock, TX). BHB and *O*-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) with 1% trimethylchlorosilane (TMCS) were sourced from Sigma Aldrich (Basingstoke, England). Acetonitrile, methanol, and ethyl acetate, all HPLC-grade, and 98% sulfuric acid were all obtained from VWR International (West Chester, PA). Expired packed red blood cell pouches were obtained from the Western Infirmary Blood Bank (Glasgow, Scotland), and urine was obtained from drug-free volunteers.

Preparation of blank blood, working standards, and quality controls

Saline solution was prepared by weighing 9.5 g of sodium chloride into a volumetric flask and dissolving in 1 L of deion-

ized water. The volume of packed red blood cells was measured and diluted 1:1 with saline solution. An intermediate standard was prepared in water at a concentration of 500 mg/L from a stock standard of BHB prepared at a concentration of 2.0 g/L in water. The internal standard solution was prepared at a concentration of 10 mg/L in methanol. Quality control material was prepared by spiking blood and urine at concentrations of 50 and 300 mg/L, respectively.

Specimens

Postmortem blood (*n* = 13) and urine (*n* = 12) were selected from 14 cases where the cause of death was not known and there was a history of alcohol abuse (Table I). Preserved samples were analyzed in preference to unpreserved samples, but these were not available for all cases. The samples collected with preservative (0.2% sodium fluoride) are noted in the table. All unpreserved and preserved samples were stored at 4°C ± 1°C until analysis.

Instrumentation

Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) was utilized using a Thermoquest Trace GC with X-calibur software (Thermo Fisher Scientific, Leicestershire, U.K.). The column used was a DB-5 capillary column (5% phenyl/95% methylsiloxane, 30 m × 0.25-mm i.d., 0.25-mm film thickness) pur-

Table I. BHB Summary of Case Results

Case No.	BHB mg/L			Acetone mg/L			Ethanol mg/dL			History/Cause of Death
	Blood	Urine	VH	Blood	Urine	VH	Blood	Urine	VH	
1	205	> 500		145*	431	152	19*	81	30	Alcoholic/fatty liver, cause of death undetermined
2	343	> 500		35*	452	41	NEG*	NEG	NEG	Fatty liver
3	239	429		694*	780		30*	NEG		Diabetic/possible ketoacidosis or drug/alcohol-related
4		> 500			201	325		12	25	Known alcohol abuser
5	<50	> 500		20*	164		12*	58		Chronic alcohol abuse
6	203	> 500		40*	54		NEG*	NEG		Fatty liver
7	328			387*			NEG*			Diabetic/possible ketoacidosis or drug/alcohol related
8	214*	> 500		19*	89		NEG*	NEG		Alcoholic/fatty liver, cause of death undetermined
9	198*	432		194*	342		12*	NEG		Alcohol abuse
10	138*	323	341	76*	103	71	67*	88	72	Undetermined cause of death, fibrosis
11	233	307		157*	225		340*	538		Liver failure, known alcoholic, smell of alcohol, micronodular cirrhosis, heart disease
12	211			311*			NEG*			Suspected drug-related death/ alcohol abuse but no smell of alcohol
13	246	252		50*	76		297*	347		Found dead in his room
14	267*	> 500		250*	314		NEG*	NEG		Fatty degeneration of the liver, chronic alcohol abuse, fatty liver

* Preserved samples.

chased from Agilent Technologies (Berks, U.K.).

GC-MS conditions

The initial oven temperature was held at 60°C for 2 min, ramped to 180°C at 20°C/min, then ramped to 250°C at 50°C/min, and held for a further 1 min. Total run time was 10.3 min. The source temperature was 200°C; the transfer line temperature was 250°C; the injector base temperature was 250°C using splitless mode, and the carrier gas flow rate was 1.2 mL/min. The mass detector multiplier voltage was 500 V, dwell time was 0.25, and scan range was 40–300.

Data were collected in full scan mode, and the ions monitored were *m/z* 191, and 117 for BHB and *m/z* 240 for the internal standard GHB-d₆. The ions used for quantification were *m/z* 233 for BHB and *m/z* 239 for GHB-d₆.

Experimental

Blood extraction method

One hundred microliters of blood was transferred to a 2-mL snap top polypropylene microcentrifuge tube, and 100 µL of internal standard (10 mg/L) was added to all samples in addition to 500 µL acetonitrile as the extraction solvent. Samples were vortex mixed for 30 s and then centrifuged at 1500 rpm for 15 min. The upper layer was collected, transferred to a clean vial, and evaporated at 45°C ± 1°C to dryness with nitrogen. For the derivatization step, 75 µL of BSFTA + 1% TMCS was added to all samples, mixed, and heated at 90°C for 10 min. Samples were transferred to GC vials and 2 µL injected on column. Figure 2 illustrates a typical chromatogram and spectra for BHB and the internal standard GHB-d₆ extracted from blood.

Urine extraction method

One-hundred microliters of urine was transferred to a 2-mL snap-top polypropylene microcentrifuge tube. One hundred microliters of internal standard (10 mg/L) and 100 µL of 0.025 M sulfuric acid were added to all samples in addition to 1 mL ethyl acetate as the extraction solvent. Samples were vortex mixed for 30 s and then centrifuged at 1500 rpm for 15 min. The upper layer was collected, transferred to a clean vial, and evaporated at room temperature to dryness with nitrogen. For the derivatization step, 75 µL of BSFTA + 1% TMCS and 25 µL of ethyl acetate were added to all samples, mixed, and heated at 70°C for 30 min. Samples were transferred to GC vials and 2 µL injected on column. Figure 3 illustrates a typical chromatogram and

spectra for BHB and the internal standard GHB-d₆ extracted from urine.

Method Validation

Linearity

Calibration standards were prepared by spiking blank blood and urine with BHB at concentrations ranging from 50 to 500 mg/L. The calibration standards were extracted with the post-mortem samples and quality control samples. The peak-area ratio of the BHB to the GHB-d₆ was calculated, and the cali-

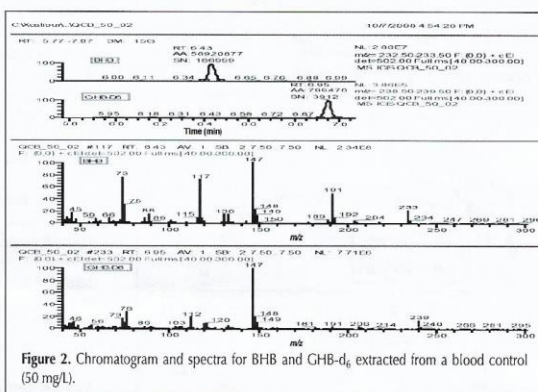


Figure 2. Chromatogram and spectra for BHB and GHB-d₆ extracted from a blood control (50 mg/L).

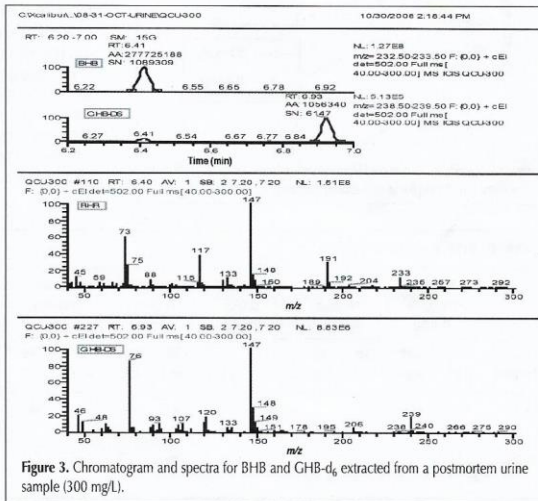


Figure 3. Chromatogram and spectra for BHB and GHB-d₆ extracted from a postmortem urine sample (300 mg/L).

bration curve was generated by plotting the area ratio against the concentration (Figure 4). The correlation of coefficient (R^2) should be greater than 0.99.

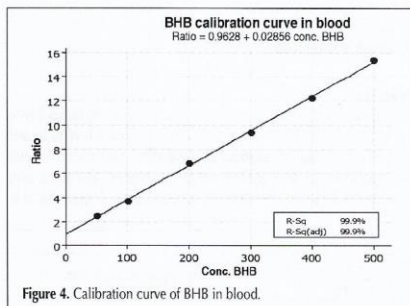


Figure 4. Calibration curve of BHB in blood.

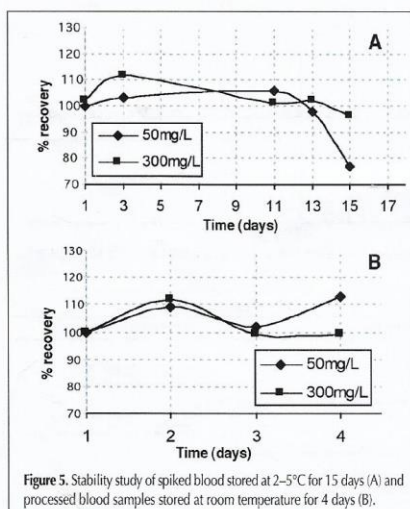


Figure 5. Stability study of spiked blood stored at 2–5°C for 15 days (A) and processed blood samples stored at room temperature for 4 days (B).

Table II. BHB Validation Results

Method	Intraday Precision (CV%)		Interday Precision (CV%)		LOD and LLOQ (mg/L)		Relative Recovery %		Absolute Recovery %	
	50 mg/L	300 mg/L	50 mg/L	300 mg/L	LOD	LLOQ	50 mg/L	300 mg/L	50 mg/L	300 mg/L
Urine	7 (n = 6)	5 (n = 6)	12 (n = 8)	6 (n = 8)	2	6	149	191	73	59
Blood	5 (n = 8)	1 (n = 8)	12 (n = 8)	7 (n = 8)	2	7	98	69	86	82

Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ)

The LOD and lower LOQ (LLOQ) were determined by diluting the spiked samples with decreasing concentrations of BHB within the expected range of the LODs (1.25–25 mg/L). Regression analysis was undertaken, and the LOD and LLOQ were calculated in accordance with Miller and Miller (9).

Case samples that are positive for BHB at concentrations that are above or below the linear range (50–500 mg/L) of this method, which is routinely used in the laboratory, are reported as less than the LOQ (< 50 mg/L) or greater than the highest calibrator (> 500 mg/L).

Recovery and matrix effect

The absolute recovery of BHB from blood and urine was assessed by preparing spiked blood and urine controls at concentrations of 50 and 300 mg/L. The controls were extracted as described previously; however, 100 µL of the internal standard at a concentration of 10 mg/L was added prior to evaporation. The absolute recovery was determined by comparing the extracted BHB/GHB-d₆ ratio to that of the unextracted standards at the same concentration. All analyses were carried out in triplicate and the average calculated.

The relative recovery was obtained by extracting water spiked at concentrations of 50 and 300 mg/L, calculating the BHB/GHB-d₆ ratio and comparing that to the ratio calculated for blood and urine, which is expressed as a percentage. All analyses were carried out in triplicate and the average calculated.

The purpose of assessing the absolute recovery was to check the overall efficiency of the system. The relative recovery was carried out to check the matrix effect (10).

Method precision

Intraday precision (within-day precision). Urine (n = 6) and blood (n = 8) spiked controls were prepared at two different concentrations (50 and 300 mg/L) and were then extracted in a batch with case samples and injected on the same day.

Interday precision (between-day precision). Urine and blood spiked controls were prepared at two different concentrations (50 and 300 mg/L) and were then extracted in batches (n = 8) with case samples on different days. The percentage of the coefficient of variation (CV%) was calculated, and the acceptable CV% was < 20%.

Stability studies

Two small studies were carried out to assess the stability of the derivatized extracts and to assess the stability of BHB in blood. The stability of the derivatized extract was evaluated by repeatedly injecting the same two levels (50 and 300 mg/L) of processed samples for four days following derivatization and storage at room temperature (22°C ± 2°C).

The stability of BHB in blood was assessed by extracting replicate spiked samples (50 and 300 mg/L) from the same quality control lot stored at 2–5°C and analyzed at time intervals of day 1, 3, 11, 13, and 15. The percentage re-

covery was calculated from the mean concentration of QC samples injected in day 3, 11, 13, and 15 and compared as a percentage to day one (normalized as 100%). The 95% confidence interval (CI) from the mean concentration ($n = 6$) for day one was calculated, and stability was assumed when the percentage of the mean of the QC samples was within 80–120% as illustrated in Figure 5 (10).

Results and Discussion

Method validation results

Table II summarizes the validation data for BHB in urine and blood. The LOD and the LLOQ in blood and urine were 2 and 7 mg/L and 2 and 6 mg/L, respectively, for BHB. The interday and intraday precision was measured by CV% for blood and urine and ranged from 1.0 to 12.4% for quality control samples spiked at 50 and 300 mg/L. The linear range of 50–500 mg/L resulted in an average correlation of $R^2 > 0.99$ (Figure 4). The absolute recovery of BHB from blood was $\geq 82\%$, and the relative recoveries were 98% and 69% at concentrations of 50 and 300 mg/L, respectively. The recovery of BHB from blood using the described method is not adversely affected by the matrix.

The absolute recovery of BHB from urine was $\geq 59\%$, and the relative recoveries were 149% and 191% at concentrations of 50 and 300 mg/L, respectively. The recovery of BHB using the described method was significantly lower from water than urine.

The absolute recovery of BHB at the higher concentration of 300 mg/L was lower for both blood and urine raising questions in relation to the efficiency of the method. However, both methods demonstrated excellent linearity over an extended calibration of 50–500 mg/L.

Table III. Stability Data Spiked Blood Stored at 2–5°C for 15 Days

Day	Recovery %	
	50 mg/L	300 mg/L
1	100	100
3	103	117
11	106	105
13	98	106
15	77	100

Table IV. Processed Samples Stored at Room Temperature for 4 Days

Day	Recovery %	
	50 mg/L	300 mg/L
1	100	100
2	109	112
3	102	99
4	113	99

506

Stability of BHB

Table III and IV summarize the stability data for BHB in blood and BHB following derivatization. The initial study to investigate the stability of BHB in blood was conducted over a period of 15 days. Although there was some variation in the measured concentrations, BHB remained stable in blood spiked at a concentration of 300 mg/L for 15 days when stored within a refrigerator (2–5°C) as illustrated in Figure 5A. There was some loss of BHB in the control samples spiked at 50 mg/L on day 15, and a longer stability study is required to investigate this further. BHB remains stable for approximately four days at room temperature after derivatization (Figure 5B).

Case studies

Fourteen cases (Table I) were investigated for BHB with blood ($n = 13$) and urine ($n = 12$) samples predominantly available for analysis, but one vitreous humor sample was also available and analyzed. The cases were selected where levels of acetone were high, and the cause of death was either undetermined or the deceased had a history of chronic alcohol abuse. Two of the 14 cases were known diabetics (Cases 3 and 7), but in all cases, the deceased had a history of alcohol abuse, and postmortem findings included fatty degeneration or fibrosis of the liver.

BHB levels in postmortem blood ≥ 260 mg/L have been associated with fatalities attributed to AKA (4). BHB was elevated within the toxic or fatal ranges in blood for all the cases investigated except one (Case 5) where the BHB level was normal < 50 mg/L. The range of BHB in urine in all 12 cases was between 252 and > 500 mg/L.

Blood acetone levels were elevated in all cases, although in five cases acetone levels were ≤ 50 mg/L. Ethanol levels in all case samples were low or less than the LOD, except for samples from Cases 11 and 13 where the ethanol level for both urine and blood samples was high.

Conclusions

A robust and sensitive method for the analysis of BHB in postmortem blood and urine was validated. The method was utilized to investigate the stability of BHB in blood and the potential of BHB as a biomarker for AKA. BHB was found to be stable in blood for 15 days when stored in the refrigerator, and initial findings support the use of BHB as a biomarker for AKA. The presence of BHB in postmortem blood could provide supporting evidence in deaths associated with chronic alcohol consumption, but further work is required to fully investigate the significance of these findings.

References

1. A. Helander, O. Beck, and A.W. Jones. Laboratory testing for recent alcohol consumption: comparison of ethanol, methanol, and 5-hydroxytryptophol. *Clin. Chem.* 42: 618–624 (1996).
2. S. Felby and E. Nielsen. Determination of ketone-bodies in post-

Journal of Analytical Toxicology, Vol. 33, October 2009

- mortem blood by head-space gas chromatography. *Forensic Sci. Int.* **64**: 83–88 (1994).
3. J.L. Thomsen. Various mechanisms of death and their possible association with alcoholism. *Forensic Sci. Int.* **79**: 199–204 (1996).
 4. P.X. Iten and M. Meier. Beta-hydroxybutyric acid—an indicator for an alcoholic ketoacidosis as cause of death in deceased alcohol abusers. *J. Forensic Sci.* **45**: 624–632 (2000).
 5. F.C. Kugelberg and A.W. Jones. Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: a review of the literature. *Forensic Sci. Int.* **165**: 10–29 (2007).
 6. G.E. Umpierrez, M. DiGirolamo, J.A. Tuvlin, S.D. Isaacs, S.M. Bhoola, and J.P. Kokko. Differences in metabolic and hormonal milieu in diabetic- and alcohol-induced ketoacidosis. *J. Crit. Care* **15**: 52–59 (2000).
 7. S. Elliott, P. Lowe, and A. Symonds. The possible influence of micro-organisms and putrefaction in the production of GHB in post-mortem biological fluid. *Forensic Sci. Int.* **139**: 183–190 (2004).
 8. C. Mathers. St. George's University of London. The development of a method for the detection of β -hydroxybutyrate in postmortem samples, 2007.
 9. J.N. Miller and J.C. Miller. Calibration methods in instrumental analysis: regression and correlation. In *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4th ed. Prentice Hall, New York, NY, 2000, pp 107–150.
 10. F.T. Peters, O.H. Drummer, and F. Musshoff. Validation of new methods. *Forensic Sci. Int.* **165**: 216–224 (2007).