

Soili Nikonen

D₃-vitamiinin määrittäminen maidosta LC-MS/MS-menetelmällä: menetelmän käyttöönotto ja validointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

4.12.2013

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Soili Nikonen D ₃ -vitamiinin määrittäminen maidosta LC-MS/MS- menetelmällä: menetelmän käyttöönotto ja validointi 25 sivua + 2 liitettä 4.12.2013
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioala
Ohjaajat	Tutkija Mervi Rokka Laboratorioinsinööri Miika Kuivikko
<p>Opinnäytetyö tehtiin Elintarviketurvallisuusviraston (Evira) Kemian ja toksikologian tutkimusyksikössä, jonka laboratorio on FINAS-akkreditoitu standardin SFS-EN ISO/IEC 17025:2005 mukaan.</p> <p>Opinnäytetyössä oli tavoitteena saada uusi menetelmä D₃-vitamiinin määrittämiseen maidosta. Ennen kuin määritysmenetelmä voidaan hyväksyä käyttöön, on varmistettava sen toimivuus ja validoitava menetelmä.</p> <p>Suomessa D-vitamiinia lisätään maitotaloustuotteisiin, koska vitamiinin saanti auringonvalon vaikutuksesta on vähäistä. Maitotaloustuotteisiin lisätään vitamiini D₃-muodossa, joka on peräisin eläinkunnasta. Tämän takia määritysmenetelmä tarvitaan nimenomaan D₃-muodon analysointiin.</p> <p>Aikaisempi määritysmenetelmä D₃-vitamiinin määrittämiseen on LC-UV-tekniikka, jossa on aikaa vievä näytteen esikäsittely. Kirjallisuudesta löytyi menetelmä, joka perustuu LC-MS/MS-tekniikkaan ja jossa näytteen esikäsittely on yksinkertaisempi.</p> <p>Ennen menetelmän validointia sen toimivuus varmistettiin vertaamalla sitä jo monta vuotta käytössä olleeseen akkreditoituun menetelmään. Tämän jälkeen menetelmälle tehtiin validointi, jossa määritettiin matriisin vaikutus analyttiin, selektiivisyys, spesifisyys, lineaarisuus, toistettavuus, uusittavuus, toteamis- ja määrittämiss raja sekä menetelmän saanto. Saaduista tuloksista arvioitiin menetelmän laajennettu mittausepävarmuus.</p> <p>Lisäksi tehtiin vielä pieni säilyvyyskoe, jossa todettiin, että derivoitu näyte säilyy huoneenlämmössä vähintään yhdeksän vuorokautta. Tämä helpottaa käytännön työskentelyä, kun näytteitä voidaan tehdä useampana päivänä peräkkäin ja analysoida useampi näyte yhtä aikaa.</p> <p>Opinnäytetyön lopputuloksena saatiin uusi validoitu menetelmä D₃-vitamiinin määrittämiseen maidosta. Menetelmä tullaan ottamaan käyttöön Evirassa.</p>	
Avainsanat	D ₃ -vitamiini, maito, LC-MS/MS, validointi

Author(s) Title Number of Pages Date	Soili Nikonen Determination of Vitamin D ₃ in Milk: Test and Validation of LC-MS/MS Method 25 pages + 2 appendices 4 December 2013
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Specialisation option	Chemical Analytics
Instructor(s)	Mervi Rokka, Researcher Miika Kuivikko, Laboratory engineer
<p>The thesis was conducted at Finnish Food Safety Authority (Evira) at the laboratory of Chemistry and Toxicology Unit. The laboratory is an accredited according to SFS-EN ISO/IEC 17025:2005.</p> <p>The purpose of this thesis was to test a new method for analyzing vitamin D₃ in milk. Before the method can be accepted into the routine analysis, the capability of the method is confirmed. In addition, the method has to be validated.</p> <p>Sunlight exposure is by far the most important source of vitamin D. As the sunlight is limited during winter time in Finland, vitamin D is added to dairy products. The form of vitamin D in dairy products is animal origin of vitamin D₃. For that reason, in this thesis focused on vitamin D₃.</p> <p>At the moment, the method used in routine analysis for vitamin D₃ is based on the LC-UV technique, where the sample preparation is time-consuming. In the literature was found an LC-MS/MS method with simpler sample preparation.</p> <p>The capability of the LC-MS/MS method was tested by comparing it with the accredited LC-UV method used in the laboratory. After that, the LC-MS/MS method was validated including the determination of matrix effect, selectivity, linearity, specificity, repeatability, reproducibility, the limit of detection, the limit of quantification and recovery. The uncertainty of measurement was evaluated with the results of the validation.</p> <p>In addition, the stability of the derived sample was tested. The derived sample was stable for at least nine days in room temperature. Due to this stability, the samples can be stored and many sequences can be analyzed at the same LC-MS/MS run.</p> <p>In conclusion, a new LC-MS/MS method was validated for the determination of vitamin D₃ in milk. The method will be used in routine analysis in near future.</p>	
Keywords	vitamin D ₃ , milk, LC-MS/MS, validation

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	D-vitamiini	2
3	Työssä käytetyt analyysitekniikat	3
3.1	Näytteen esikäsittely	3
3.1.1	Proteiinien saostus	3
3.1.2	Sisäinen standardi	3
3.1.3	Neste-nesteuutto	4
3.1.4	Johdoksen tekeminen	4
3.2	Nestekromatografia	5
3.3	Massaspektrometria	5
3.4	Massaspektrometrin kalibrointi ja viritys	8
4	Analysimenetelmä	9
4.1	Työssä käytettiin seuraavia laitteistoja:	9
4.2	Reagenssit	9
4.2.1	D ₃ -vitamiini	9
4.2.2	Deuteroitu D ₃ -vitamiini	10
4.2.3	Muut reagenssit	10
4.2.4	UPLC-ajoliuokset	10
4.3	Muita tarvikkeita	11
4.4	Näytteen esikäsittely	11
4.5	UPLC- ja MS-menetelmä	12
5	Validoinnin suureet	13
5.1	Matriisin vaikutus, selektiivisyys ja spesifisyys	13
5.2	Lineaarisuus	14
5.3	Toteamisraja ja määrittämissuureet	14
5.4	Saantokoe	14
5.5	Toistettavuus ja uusittavuus	14
5.6	Mittausepävarmuus	15

6	Työn suorittaminen ja tulokset	15
6.1	Menetelmän toimivuuden testaus	15
6.2	Matriisin vaikutus, selektiivisyys ja spesifisyys	16
6.3	Lineaarisuus	17
6.4	Toteamisraja ja määrittäysraja	18
6.5	Saantokoe	19
6.6	Toistettavuus ja uusittavuus	19
6.7	Mittausepävarmuus	21
6.8	Säilyvyys	21
7	Yhteenveto	22
	Lähteet	24

Liitteet

Liite 1. Kromatogrammi MS/MS-laitteelta

Liite 2. Tulostusparortti Mukit-mittausepävarmuusohjelmasta

Lyhenteet

API	<i>Atmospheric Pressure Ion source.</i> Ilmanpaineionilähde.
ESI	<i>Electrospray Ionization.</i> Sähkösumutus-ionisaatio.
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography.</i> Korkean erotuskyvyn nestekromatografia.
LC	<i>Liquid Chromatography.</i> Nestekromatografia.
LC-MS	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry.</i> Nestekromatografia-massaspektrometria.
MS	<i>Mass Spectrometry.</i> Massaspektrometria.
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry.</i> Tandemmassaspektrometria.
PTAD	<i>4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione.</i> 4-fenyyli-1,2,4-triazoliini-3,5-dioni.
SPE	<i>Solid Phase Extraction.</i> Kiinteäfaasiuutto.
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography.</i> Korkean erotuskyvyn nestekromatografiatekniikka.
UV	<i>Ultraviolet.</i> Ultraviolettivalo.

1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin Elintarviketurvallisuusvirastossa (Evira) Kemian ja toksikologian tutkimusyksikössä (KETO). Laboratorio on akkreditoitu laboratorio, jossa tutkitaan lannoite-, multa-, komposti-, rehu- ja viljanäytteitä sekä eläinperäisiä näytteitä, samoin kuin eläimistä saatavia elintarvikkeita ja elintarvikkeiden raaka-aineita. Näytteistä tehdään muun muassa peruskoostumus- ja vierasaineanalytiikkaa sekä analysoidaan elintarvikkeiden valmistuksessa syntyviä yhdisteitä. Akkreditointi on ollut vuodesta 1994 ja laboratorion akkreditointitunnus on T014.

Evirassa tehdään D-vitamiinimääryksiä maidosta ja maitovalmisteista sekä rehusta. Nyt käytössä oleva menetelmä on nestekromatografinen (LC) menetelmä, jossa detektorina on ultraviolettidetektor (UV). Menetelmässä on monimutkainen näytteen esikäsittely, joka sisältää kylmäkuivauksen, saippuoinnin, neste-nesteuton (Extrelut-pylväällä), kiinteäfaasipuhdistuksen (SPE), fraktioinnin LC:llä sekä näytteen konsentrointia useissa eri vaiheissa ennen kvantitatiivista analysointia. Näytteen analysointiin kuluu 4–5 päivää.

Tässä opinnäytetyössä oli tarkoitus käyttöönottaa ja validoida uusi menetelmä D₃-vitamiinin määrittämiseksi maidosta. Kirjallisuudesta löytyi menetelmä, joka voitiin ottaa käyttöön laboratoriossa lähes sellaisenaan [1, s. 1434–1435]. Valittu menetelmä on nestekromatografia-massaspektrometrinen tekniikka (LC-MS). Näytteen esikäsittely sisältää neste-nesteuton ja johdoksen valmistamiseen. Menetelmässä näytteen esikäsittely kestää noin kaksi tuntia ja LC-MS/MS-ajo muutaman minuutin. MS-menetelmän toimivuutta arvioitiin vertaamalla sitä käytössä olevaan UV-menetelmään. Työn ohjaajana toimi tutkija Mervi Rokka Evirasta.

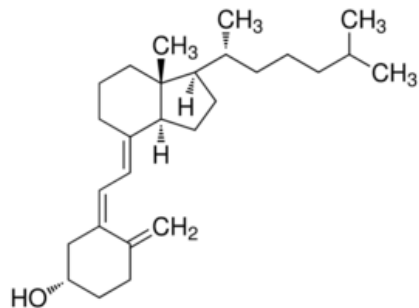
Menetelmän validoinnissa varmistetaan, että menetelmällä saadut tulokset ovat luotettavia ja että tulosten epävarmuus tunnetaan. Validointiparametrejä olivat selektiivisyys, spesifisyys, lineaarisuus, toteamisraja, määritysraja sekä toistettavuus ja uusittavuus. Saaduista tuloksista arvioitiin myös menetelmän mittausepävarmuus.

Esikäsitellylle näytteelle tehtiin säilyvyyskoe. Kokeen tarkoituksena oli selvittää, kuinka kauan esikäsiteltyjä näytteitä voidaan säilyttää huoneenlämmössä ennen LC-MS/MS-ajoa.

2 D-vitamiini

D-vitamiini on rasvaliukoinen vitamiini, jonka saanti on ihmiselle tärkeää. D-vitamiinia tarvitaan kalsium- ja fosforiaineenvaihdunnassa sekä luun ja hampaiden muodostumisessa. D-vitamiinin puute voi aiheuttaa lapsille riisitautia ja aikuisille luiden pehmenemistä. D-vitamiinin pääasiallinen lähde on auringonvalo ja sen UVB-säteily, jonka vaikutuksesta iholla käynnistyy D_3 -vitamiinin tuotanto. Lisäksi D-vitamiinia saadaan ruuasta. Talvisessa pohjoisen auringossa ei ole riittävästi UVB-säteilyä vitamiinin tuotantoa varten, joten D-vitamiinin saanti jää talvella vähäiseksi. Tästä johtuen Suomessa ja Pohjoismaissa on annettu saantisuosituksia. Suomessa saantisuositus D-vitamiinille vaihtelee $7,5 \mu\text{g}/\text{vrk}$ – $20 \mu\text{g}/\text{vrk}$, riippuen iästä ja sukupuolesta. [2.]

D-vitamiinia lisätään elintarvikkeisiin, kuten esimerkiksi maitoon, piimään ja rasvoihin. Maitotuotteisiin vitamiini lisätään yleensä D_3 -muodossa (kolekalsiferoli), joka on D-vitamiinin eläinperäinen muoto. Joihinkin elintarvikkeisiin D-vitamiini lisätään D_2 -muodossa (ergokalsiferoli) kuten esimerkiksi kauramaitoon. D_2 -vitamiini on D-vitamiinin kasvipерäinen muoto. [3.] Kuvassa 1 on esitetty D_3 -vitamiinin rakennekaava. Tässä työssä analysoitiin D_3 -vitamiinia maitonäytteistä.



Kuva 1. D_3 -vitamiinin rakennekaava [4].

3 Työssä käytetyt analyysitekniikat

3.1 Näytteen esikäsittely

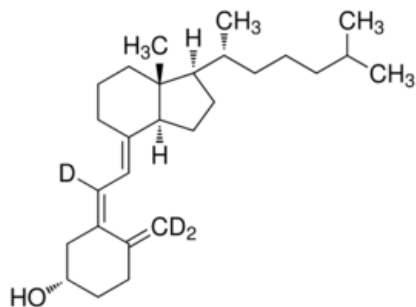
3.1.1 Proteiinien saostus

Maidossa olevat proteiinit ovat häiritseviä monessa analyysissä, joten ne pitää poistaa. Proteiinien poistoon voidaan käyttää saostusmenetelmää. Tässä menetelmässä saostaminen tehtiin metanolilla. Saostamisen jälkeen proteiinisakka sentrifugoitiin putken pohjalle.

3.1.2 Sisäinen standardi

Sisäisen standardin menetelmää voidaan käyttää, kun esimerkiksi analyysiin liittyy monivaiheinen esikäsittelymenetelmä. Sisäinen standardi lisätään näytteeseen heti esikäsittelyn aluksi, ja sen tulee olla tutkittavan yhdisteen kaltainen yhdiste sekä käyttäytyä esikäsittelyssä tutkittavan yhdisteen kanssa samalla tavalla. Jos tutkittavaa yhdistettä häviää esikäsittelyn aikana, niin suhteessa saman verran häviää myös sisäistä standardia. Näin näytteen esikäsittelyssä syntynyt hävikki tulee huomioiduksi sisäisen standardin avulla. Käytettäessä sisäisen standardin menetelmää myös standardeihin lisätään suhteessa sama määrä sisäistä standardia kuin näytteisiin.

Artikkelissa käytettiin sisäisenä standardina 26,26,26,27,27,27-d₆ D₃-vitamiinia [1 s. 1434]. Tässä menetelmässä sisäisenä standardina käytettiin 6,19,19-d₃-vitamiinia, joka oli aikaisemmin hankittu laboratorioon. Sisäisen standardin rakennekaava on esitetty kuvassa 2.



Kuva 2. 6,19,19-d₃-vitamiinin rakennekaava [5].

3.1.3 Neste-nesteuutto

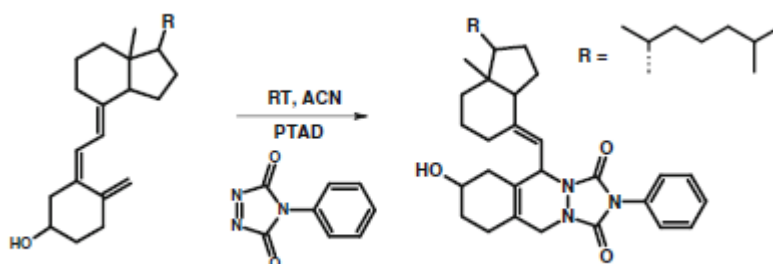
Neste-nesteuutossa kaksi toisiinsa liukenematonta nestettä joutuvat kosketuksiin toistensa kanssa. Uuttoa voidaan tehdä esimerkiksi erotussuppilossa ravistelemalla tai koeputkessa sekoittamalla. Uutossa tutkittavat analyytit siirtyvät nesteestä toiseen. Uuttoon vaikuttavat näytteen sekä uuttoliuosten poolisuudet ja pH. Neste-nesteuuton selektiivisyyttä voidaan lisätä vaihtamalla liuotinta tai muuttamalla olosuhteita, esimerkiksi pH:ta. [6 s. 46–47; 55.]

Käytetyssä menetelmässä näytteen esikäsittelyssä käytettiin liuotin-liuotinuuttoa. Näytteeseen lisättiin sisäinen standardi, minkä jälkeen näyte liuotettiin metanoliin. Metanolista D-vitamiini uutettiin iso-oktaaniin, josta D-vitamiini uutettiin edelleen asetonitriiliin.

3.1.4 Johdoksen tekeminen

Tutkittavasta analyytistä voidaan tehdä johdos eli derivaatta. Siinä analyyttiin liitetään jokin funktionaalinen ryhmä, fragmentti tai kokonainen molekyyli. Reaktio tulee olla nopea, spesifinen ja kvantitatiivinen. Derivoinnilla voidaan lisätä menetelmän spesifisyyttä sekä saada tutkittavasta analyytistä pysyvämpi yhdiste. [6, s. 143–144.]

Käytetyssä menetelmässä reaktio oli niin sanottu Diels-Alder-additioreaktio, jossa D₃-vitamiiniin liitetään derivoinnissa käytetty reagenssi 4-fenyyl-1,2,4-triaatsolin-3,5-dioli (PTAD). Reaktio tapahtuu huoneenlämmössä. Reaktioyhtälö on esitetty kuvassa 3, jossa vasemmalla on D₃-vitamiini ja oikealla derivoitu yhdiste. Derivointi parantaa D-vitamiinin ionisaatiotehokkuutta ja lisää herkkyttä ilman näytteen konsentroitua. Lisäksi esikäsittelyn näytteen säilyvyys paranee. Näytteet säilyivät jopa viikon huoneenlämmössä. [1, s. 1434.]

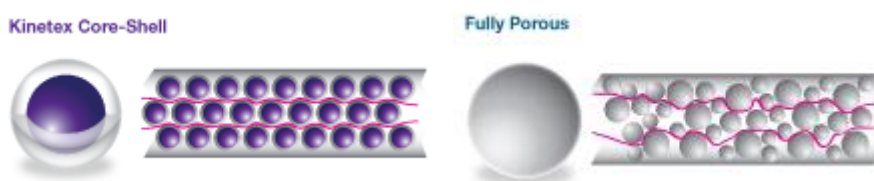


Kuva 3. Diels-Alder-additioreaktio D₃-vitamiinille [1, s. 1434].

3.2 Nestekromatografia

Näytteen syöttöön ja näytteen kromatografiseen erottamiseen käytettiin erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografialaitteistoa (UHPLC), joka on suorituskyvyltään parempi kuin korkean erotuskyvyn nestekromatografialaitteisto (HPLC). UHPLC-laitteisto kestää korkeaa painetta, jopa 15 000 psi, minkä seurauksena siinä voidaan käyttää kooltaan pienempiä kolonneja suurillakin virtauksilla. Kolonnien partikkelikoko vaihtelee 1,7–2,6 μm välillä. UHPLC:tä käytettäessä analyysiaika lyhenee sekä herkkyys ja erotuskyky paranevat.

Työssä käytettiin phenomenex® Kinetex™ -kolonnia. Tämä kolonni on uudenlainen kolonni huokoisiin kolonnimateriaaleihin nähden. Kolonnissa olevissa partikkeleissa on uudenlainen kiinteä ydin, jolloin erotuskyky kasvaa ja suorituskyky paranee. Kolonni oli C18, jonka mitat olivat: partikkelikoko 2,6 μm , pituus 75 mm ja halkaisija 3,00 mm. Kuvassa 4 on esitetty kiinteäytiminen kolonni vasemmalla ja huokoinen kolonni oikealla.

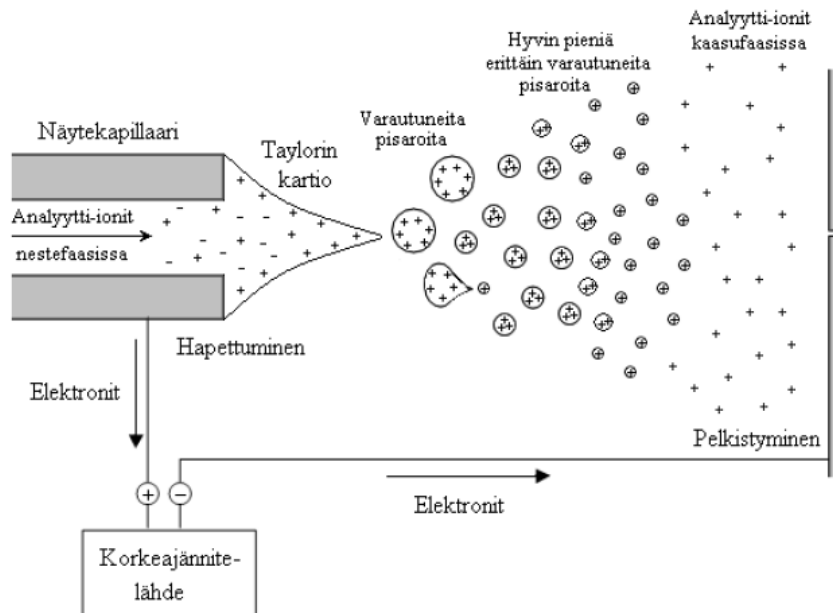


Kuva 4. Rakennekuva kiinteäytimisestä kolonnista ja huokoisesta kolonnista [7].

3.3 Massaspektrometria

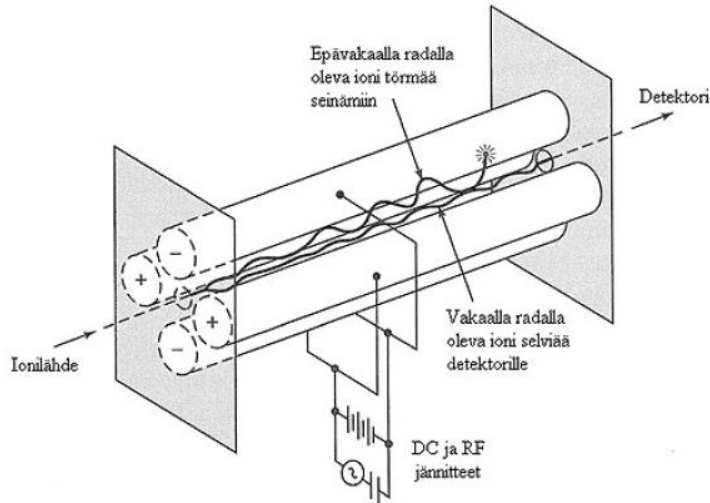
Massaspektrometria perustuu yhdisteen massa/varaussuhteeseen, jonka perusteella orgaaniset tai epäorgaaniset molekyylit erotetaan. Massaspektrometriassa näytemolekyylit on saatava ionisoitumaan. Kun massaspektrometri on liitetty nestekromatografialaitteeseen, näytteen saaminen ionisoituun muotoon on haasteellisempaa kuin kaasukromatografiassa [8, s. 519]. Näytteen saamiseksi ionimuotoon on olemassa useita eri tekniikoita. Tässä työssä käytettiin ionisaatiotekniikkana sähkösumutus-ionisaatiota (ESI, *elektrospray ionisation*), joka tapahtuu ilmanpaineessa (API, *atmospheric pressure ionisation*). Ionisaatiossa näytteestä tehdään varautunut aerosoli sumutuskaasun, joka yleensä on typpi, ja korkeajännitteen avulla. [9, s. 69.]

Kuvassa 5 on esitetty ionisaation tapahtuminen ESI:ssä. Kolonnista ohjataan haluttu fraktio näytekapillaariin. Ionisaatiossa syntyy kaasufaasissa olevia analyytti-ioneja, jotka ohjataan ensimmäiselle kvadrupolisauvastolle (Q1).



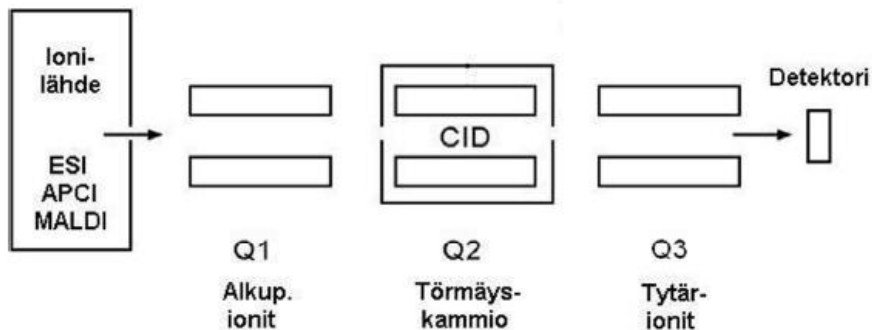
Kuva 5. Varautuneen aerosolin muodostuminen sähkösumutusionisaatiossa [10, s. 7].

Kuvassa 6 on esitetty kvadrupolisauvasto, joka koostuu neljästä samansuuntaisesta sauvasta. Kaksi sauvaa on negatiivisesti varautuneita ja kaksi positiivisesti varautuneita. Kvadrupolisauvastossa epävakaa radalla olevat ionit törmäävät seinämiin eivätkä päädy detektorille tai MS/MS-laitteessa seuraavalle kvadrupolille. Vakaaalla radalla oleva ioni pääsee detektorille. Kvadrupolisauvasto on tyhjiössä eli vakuumissa, jotta syntyneet ionit pääsevät kulkemaan laitteen läpi törmäämättä muihin ioneihin tai laitteiston seinämiin. [9, s. 92.]



Kuva 6. Kaavakuva kvadrupolisauvastosta [10, s. 12].

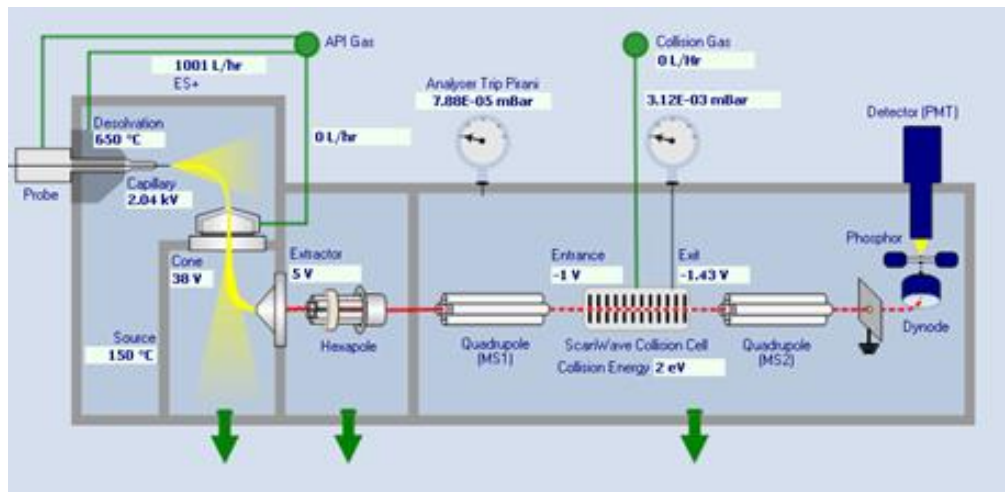
Sähkösumutusionisaatio on yksi tavallisimmin käytössä oleva erittäin pehmeä ionisaatiotekniikka, jossa ionien sisäinen energia ei kasva eikä pilkkoutumista juurikaan tapahdu. Ionien pilkkoutumista voidaan kuitenkin lisätä käyttämällä tandemmassaspektrometriä (MS/MS), jossa on kolme kvadrupolia peräkkäin. Kuvassa 7 on esitetty kaavakuva kyseisestä analysaattorista. Ensimmäinen kvadrupoli (Q1) erottelee valitun molekyyli-ionin, joka jatkaa törmäyskammioon (Q2). Törmäyskammioon johdetaan kaasua, jolloin ionit törmäävät kaasuun ja fragmentoituvat. Käytetty kaasu on yleensä argon. Fragmentoidut tuoteionit johdetaan kolmannelle kvadrupolille (Q3), joka analysoi tuoteionit. Tästä eteenpäin tietyn massa/varaussuhteen omaavat ionit johdetaan detektorille. [9, s. 73 ja 11, s. 214.]



Kuva 7. Kaavakuva kolmoiskvadrupoli-MS/MS-analysaattorista [10, s. 20].

MS/MS-menetelmän kvantitointissa seurataan kahta tuoteionia. Toista tuoteionia käytetään kvantitointiin ja toinen tuoteioni on varmistusioni. Sisäisestä standardista seurataan vain yhtä tuoteionia.

Työssä käytettiin Xevo™ TQ MS -laitteistoa, jossa sumutuskammion ionisuihkun muoto vähentää ionisoitumisvaiheeseen liittyviä häiriöitä, mikä erottaa sen muiden valmistajien massa-analysaattoreista. Xevo™ -laitteessa on Watersin patentoima Z-spray™, joka ei puhalla ionivirtausta suoraan kartiolle, vaan suurin osa liuottimesta ja eitoivoituista molekyyleistä haihtuu ionisaatiokammioon. Sähkökentän avulla johdetaan halutut molekyylit kartiolle ja siitä edelleen kvadrupolille. Kuvassa 8 on laitteen kaavakuva, jossa vasemmalla on esitetty Z-spray™. Kuva on otettu MassLynz-ohjelmistosta.



Kuva 8. Waters Xevo™ TQ MS -laitteiston toimintakaavio.

Kuvassa 8 näkyy menetelmässä käytetyn sähkösumutusionisaation lämpötila- ja jänniteasetukset sekä massa-analysaattorin paine- ja jänniteasetukset.

3.4 Massaspektrometrin kalibrointi ja viritys

Massaspektrometrillä mitattaessa on laite ensin kalibroitava ja sen jälkeen viritettävä kullekin analyylille sopivaksi. Kalibrointi tehdään laitteelle huollon yhteydessä tai tarvittaessa, kun laitetta puhdistetaan perusteellisemmin. Kalibroinnissa varmistetaan laitteen toimivuus. Viritys tehdään jokaiselle tutkittavalle yhdisteelle erikseen. Virityksessä optimoidaan olosuhteet tutkittavalle yhdisteelle sen saamiseksi ionimuotoon. Viritettä-

viä parametreja ovat kapillaarijännitteen sekä sisäänmenokartion (cone) että törmäyskammion (collision cell) jännitteiden suuruus, kaasujen virtaukset ja sekä sumutus-kammion että ionilähteen (source) lämpötilat.

Xevo™ -laitteessa viritys voidaan tehdä automaattisesti (*IntelliStart*), jolloin laite virittää itsensä käytetyn menetelmän ajo-olosuhteissa käyttäen ajoliuoksia ja standardia näytteenä. Tässä virityksessä laite kalibroi massa-analysaattorin sekä optimoi MS/MS-menetelmän parametrit.

4 Analyysimenetelmä

4.1 Työssä käytettiin seuraavia laitteistoja:

- UHPLC, Watersin UPLC® -laitteisto
- massaspektrometri, Watersin Xevo™ TQ MS
- spektrofotometri, Shimadzu UV-2401 PC
- sentrifuugi, Heraeus Labofuge 400R.

4.2 Reagenssit

4.2.1 D₃-vitamiini

Kolekalsiferoli eli D₃-vitamiini C₂₇H₄₄O M = 384,64 g/mol Sigma-Aldrich CAS 67-97-0. D₃-standardista tehtiin kantaliuos 10 µg/ml etanoliin, jonka tarkka pitoisuus määritettiin UV-spektrofotometrisesti aallonpituudessa 265 nm etanolia vastaan. Pitoisuus voidaan laskea Lamber-Beerin lauseesta.

$$A = \epsilon \times c \times l \rightarrow c = A / (\epsilon \times l)$$

A = absorbanssi, ϵ = ekstintiokerroin, c = pitoisuus, l = valotien pituus. Ekstintiokerroin D_3 -vitamiinille on 473 etanolissa 20 °C:ssa 1 cm valotiessä aallonpituudessa 265 nm [4].

Kantaliuoksesta laimennettiin käyttöliuos 0,2 µg/ml asetonitrilissä.

4.2.2 Deuteroitu D_3 -vitamiini

1 mg/ml deuteroitu D_3 -vitamiini (6,19,19-d3), $C_{27}D_3H_{41}O$ $M = 387,66$ g/mol Sigma-Aldrich. Kantaliuos 20 µg/ml etanolissa ja käyttöliuos 0,4 µg/ml etanolissa.

4.2.3 Muut reagenssit

Lisäksi työssä käytettiin seuraavia liuottimia ja reagensseja.

- etanoli, ETAX 96,1 til-% Altia Oyj UN1170
- asetoni, $(CH_3)CO$, $M = 58,08$ g/mol J.T. Baker CAS 67-64-1 UN 1090
- metanoli, CH_3OH , $M = 32,04$ g/mol J.T. Baker CAS 67-56-1 UN 1230
- iso-oktaani, $(CH_3)_3CCH_2CH(CH_3)_2$, $M = 114,23$ g/mol J.T. Baker CAS 540-84-1 UN 1262
- asetonitrili, CH_3CN , $M = 41,04$ g/mol J.T. Baker 75-05-8 UN 1648
- PTAD, 4-fenyyl-1,2,4-triatsoliini-3,5-dion; $C_8H_5N_3O_2$ $M = 175,14$ g/mol Sigma-Aldrich CAS 4233-33-4
- ammoniumformiaatti, HCO_2NH_4 $M = 63,06$ g/mol CAS 540-69-2.

4.2.4 UPLC-ajoliuokset

Menetelmässä käytettiin ajoliuoksina linjassa A 0,2 massa % ammoniumformiaatti vedessä ja linjassa B 100 % metanoli.

4.3 Muita tarvikkeita

Lisäksi työssä tarvittiin 50 ml ja 10 ml kierrekorkillisia lasiputkia, pulloannostelijoita, sekoittaja, pasteur-pipettejä, automaattipipettejä, ajopulloja ja 0,25 µm näytesyodattimia.

4.4 Näytteen esikäsittely

Maitonäytettä pipetoitiin 4 ml ja punnittiin 50 ml:n kierrekorkillisiin lasiputkiin, joihin lisättiin 250 µl deutoitua D₃-vitamiinia sisäiseksi standardiksi. Putkiin lisättiin 25 ml metanolia, 10 ml iso-oktaania ja 5 ml vettä. Metanoli ja oktaani lisättiin pulloannostelijalla. Putket suljettiin, sekoitettiin hyvin ja sentrifugoitiin 5 min 2000 x g. Ylintä kerrosta siirrettiin 5 ml 10 ml:n sentrifugiputkiin ja lisättiin 100 µl derivointireagenssia (PTAD-reagenssia). Näyte sekoitettiin välittömästi. 10 min:n seisotuksen jälkeen lisättiin 1 ml asetonitriliä, sekoitettiin ja sentrifugoitiin pikaisesti 2000 x g, jotta saatiin kerrokset erottumaan. Lopuksi alimmaista kerrosta suodatettiin ajopulloihin. [1, s. 1453.]

Referenssimaitojauhe esikäsiteltiin muuten samalla tavalla kuin maito, mutta alussa jauhetta punnittiin 0,4 g ja lisättiin 3,6 ml vettä, sekoitettiin ja annettiin seistä 10 min.

Standardisuora pipetoitiin taulukon 1 mukaan ja suodatettiin ajopulloihin.

Taulukko 1. Standardien laimennos.

Standardin pitoisuus (ng/ml)	0,4 µg/ml (6,19,19)-D ₃ standardin määrä (µl)	0,2 µg/ml D ₃ -standardin määrä (µl)	Asetonitriliin määrä (ml)
5	250	50	1,7
10	250	100	1,65
25	250	250	1,5
40	250	400	1,35
50	250	500	1,25

4.5 UPLC- ja MS-menetelmä

UPLC-ajossa virtausnopeus oli 0,6 ml/min ja käytössä oli gradienttiohjelma, joka on esitetty taulukossa 2. Kokonaisajoaika oli 6 min. Näytteen injektioilavuus oli 10 µl ja kolonniuunin lämpötila oli 40 °C.

Taulukko 2. Gradienttiohjelma.

Aika (min)	Virtaus (ml)	Ajoliuos A (%)	Ajoliuos B (%)
0	0,6	25	75
4	0,6	0	100
4,2	0,6	25	75

Massa-analysaattorin asetukset on esitetty taulukossa 3. Sähkösumutusionisaatiossa käytettiin ionisaation positiivista sovellutusta (ES+).

Taulukko 3. Massa-analysaattorin asetukset.

Ionilähde (ES+)	Asetus
Kapillaarijännite (kV)	2,00
Extractor* (V)	3,00
Ionilähteen lämpötila (°C)	150
Desolvaatio lämpötila (°C)	650
Desolvaatiokaasun virtaus (l/h)	1000
Törmäyskaasun virtaus (ml/h)	0,15

* Laitevalmistajan käyttämä termi.

MS/MS-menetelmässä seurattiin kolmea tuoteionia, jotka on esitetty taulukossa 4. Taulukossa on myös esitetty jännitteet, jotka tarvitaan tuoteionien pilkkoutumiseen. Tulokset kerättiin 3–4,2 minuuttien välistä ja muu ajo johdettiin viemäriin. Näin voidaan estää, että massa-analysaattori ei likaannu niin helposti. Liitteessä 1 on esimerkki MS/MS-ajosta.

Taulukko 4. MS/MS-menetelmän menetelmäparametrit.

Yhdiste	Molekyyli- ioni/tuoteioni (m/z)	Sisäänmenokartion jännitteen suuruus (V)	Törmäyskammion jännitteen suuruus (V)
Derivoitu D ₃ -vitamiini	560.10 > 161.00	34	38
Derivoitu D ₃ -vitamiini	560.10 > 298.10	34	20
Derivoitu sisäinen standardi	563.20 > 301.10	33	33

5 Validoinnin suureet

Määritelmä: Kemiallisen mittausmenetelmän validointi on menettely, jolla osoitetaan analyttisen menetelmän sopivuus aiottuun käyttötarkoitukseen [12, s. 26].

5.1 Matriisin vaikutus, selektiivisyys ja spesifisyys

MS-tekniikassa matriisi saattaa vaikuttaa tutkittavaan yhdisteeseen joko intensiteettiä lisäävästi tai vähentävästi. Siksi on tärkeää tutkia matriisin vaikutus. Selektiivisyys osoittaa menetelmän kykyä mitata tarkasti ja spesifisesti haluttu analyytti, kun näytematriisissa esiintyy muitakin komponentteja käytössä olevissa testiolosuhteissa. Selektiivisyyttä ja matriisin vaikutusta voidaan arvioida esimerkiksi vertaamalla standardisuorien kulmakertoimia, kun suorat on tehty liuotinsuorana ja matriisisuorana. Saatujen suorien kulmakertoimia verrataan t-testillä.

Spesifisyys kuvaa menetelmän kykyä mitata vain haluttua analyyttiä. Sitä voidaan arvioida mittaamalla nollamatriisia. Näistä mittauksista voidaan arvioida häiritsevät tekijät, joita voivat olla esimerkiksi tutkittavan yhdisteen kanssa samankaltaiset yhdisteet, hajoamistuotteet ja epäpuhtaudet. MS-tekniikka on suhteellisen spesifinen tekniikka, koska kalibrointi ja kvantitointi perustuvat kullekin yhdisteelle ominaiseen ionisoitumiseen. Spesifisyys lisääntyy, kun laitteena on käytössä MS/MS-laite.

5.2 Lineaarisuus

Menetelmän lineaarisuutta tutkitaan tekemällä standardisuora suuremmalle pitoisuusalueelle, kuin mitä pitoisuusaluetta menetelmässä käytetään. Saadun standardisuoran kulmakerrointa verrataan pienemmällä pitoisuusalueella olevan suoran kulmakertoimeen sekä katsotaan, että standardipisteiden residuaalit ovat $\pm 10\%$ ja vaihtelevat nol-lan arvon molemmin puolin. Tällöin voidaan sanoa, että menetelmä on lineaarinen tutki-tulla välillä.

5.3 Toteamisraja ja määrittäysraja

Toteamisraja on pienin mahdollinen pitoisuus, joka voidaan luotettavasti todeta kysei-sellä menetelmällä. Toteamisrajan määrittäys perustuu taustan hajonnan tutkimiseen. Toteamisraja laskemiseen käytetään usein kaavaa tausta plus kolme kertaa taustan hajonta.

Määrittäysraja on pienin mahdollinen pitoisuus, joka voidaan luotettavasti määrittää ky-seisellä menetelmällä. Sen laskemiseen käytetään kaavaa tausta plus kuusi tai kym-menen kertaa taustan hajonta.

5.4 Saantokoe

Saantokoe osoittaa menetelmän tehon havaita tutkittava yhdiste. Saantokoe voidaan määrittää nollanäytteestä, johon on lisätty tunnettu määrä tutkittavaan yhdistettä. Jos nollanäytettä ei ole saatavilla, voidaan saantokoe tehdä reagenssinollaan. Saantopro-sentin tulisi olla välillä 85–115 [9, s. 191]. Jos saantoprosentti poikkeaa merkittävästi edellä mainitusta, voidaan tämä ottaa huomioon tuloksia laskettaessa.

5.5 Toistettavuus ja uusittavuus

Menetelmän toistettavuus kuvaa mitattavan suureen paikkansapitävyyttä toistettavien mittaustulosten välillä. Toistettavuutta arvioidaan näytteistä, jotka on määritetty samalla menetelmällä, saman tekijän toimesta, samassa laboratoriossa yhden päivän aikana. Näytteinä toistokokeessa käytetään vertailumateriaalia, sisäistä valvontanäytettä tai

väkevöityä nollamatriisia. Tuloksista lasketaan keskimääräinen pitoisuus, hajonta ja variaatiokerroin.

Uusittavuus kertoo tulosten välisestä yhtäpitävyydestä. Määritykset tehdään samalla menetelmällä vaihtelevissa olosuhteissa vaihtaen esimerkiksi analyysin tekijää tai mittalaitetta tai tehden määritykset eri päivinä. Kun uusittavuutta tutkitaan laboratorion sisäisesti, voidaan puhua sisäisestä uusittavuudesta. Uusittavuutta voidaan arvioida referenssinäytteellä, joka määritetään useammassa eri laboratoriossa samalla menetelmällä. Kaikista määrittämissä, jokaisesta pitoisuustasosta lasketaan keskimääräinen pitoisuus, hajonta ja variaatiokerroin.

5.6 Mittausepävarmuus

Analyysimenetelmällä ei koskaan saada tulokseksi yhtä oikeaa lukua. Saadulla tuloksella on aina jokin vaihteluväli, minkä sisällä tulos on. Tätä vaihteluväliä kutsutaan mittausepävarmuudeksi. Mittausepävarmuus kuvaa koko menetelmän epävarmuutta, aina ensimmäisestä pipetoinnista tai punnituksesta viimeiseen mittaustulokseen asti. Analyysitulosta ei koskaan saisi ilmoittaa ilman mittausepävarmuutta.

6 Työn suorittaminen ja tulokset

6.1 Menetelmän toimivuuden testaus

Ennen validointia LC-MS/MS-menetelmän toimivuutta arvioitiin menetelmävertailulla laboratoriossa käytössä olevaan UV-menetelmään. Koska käytettävissä ei ollut referenssimateriaalia maidolle, niin tämä oli ainoa tapa, jolla toimivuutta voitiin arvioida.

Menetelmävertailua varten kaupasta ostettiin kaksi maitoa. Niiden ilmoitetut D₃-vitamiini pitoisuudet olivat 1,0 µg/100 g (kevytmaito, rasvaa 1,5 %) ja 2,0 µg/100 g (rasvatonmaito). Näistä maidoista analysoitiin molemmilla menetelmillä kuusi rinnakkaista määrittystä. Saaduille tuloksille tehtiin tilastollinen vertailu. Menetelmävertailussa käytettiin rasvatonta ja kevytmaitoa, joten voitiin myös nähdä, onko rasvapitoisuudella vaikutusta näytteen esikäsittelyyn MS-menetelmässä.

Taulukossa 5 on esitetty menetelmävertailun tulokset. Menetelmiä verrattiin t-testillä, joka osoitti, että menetelmillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa 95 %:n luottamustasolla.

Taulukko 5. Menetelmävertailussa saadut tulokset rasvattomalle maidolle ja kevytmaidolle.

	Rasvatonmaito UV-menetelmä	Rasvatonmaito MS-menetelmä	Kevytmaito UV-menetelmä	Kevytmaito MS-menetelmä
Keskiarvo µg/100 g	2,43	2,41	0,85	0,87
Hajonta µg/100 g	0,0012	0,0014	0,0014	0,0008

Menetelmän toimivuutta testattiin vielä maitojauheella. Maitojauhe ei ollut menetelmän validoinnissa mukana, mutta sillä haluttiin saada lisävarmuutta menetelmän toimivuudesta, koska maitoa ei ole saatavana referenssimateriaalina. Referenssimaitojauheen, FAPAS T2169, ilmoitettu D₃-pitoisuus oli 9,46 µg/100 g ± 1,47 µg/100 g. Maitojauhetta analysoitiin kahtena eri päivänä kuusi rinnakkaista kumpanakin päivänä. Määrityksen keskiarvo oli 8,82 µg/100 g ja keskihajonta oli 0,72 µg/100 g. Saatu tulos on ilmoitetun pitoisuuden rajoissa.

6.2 Matriisin vaikutus, selektiivisyys ja spesifisyys

Matriisin vaikutusta tutkittiin tekemällä standardisuora pitoisuusalueella 0–50 ng/ml nollamaitoon sekä liuotinsuora. Liuotinsuora ja matriisisuora tehtiin kolmena rinnakkais- toistona kahtena eri päivänä. Saatujen suorien kulmakertoimille (taulukko 6) tehtiin t-testi, joka osoitti, että matriisilla ei ole tilastollisesti merkitsevää vaikutusta analytyttiin, joten menetelmässä voidaan käyttää liuotinsuoraa.

Taulukko 6. Liuotinsuorien ja matriisisuorien kulmakertoimet.

Analyysipäivä	Liuotinsuoran kulmakerroin	Matriisisuoran kulmakerroin
10.1.2013	0,145246	0,152881
10.1.2013	0,155207	0,156165
10.1.2013	0,153644	0,155942
15.1.2013	0,130758	0,143503
15.1.2013	0,145158	0,147635
15.1.2013	0,144445	0,153681

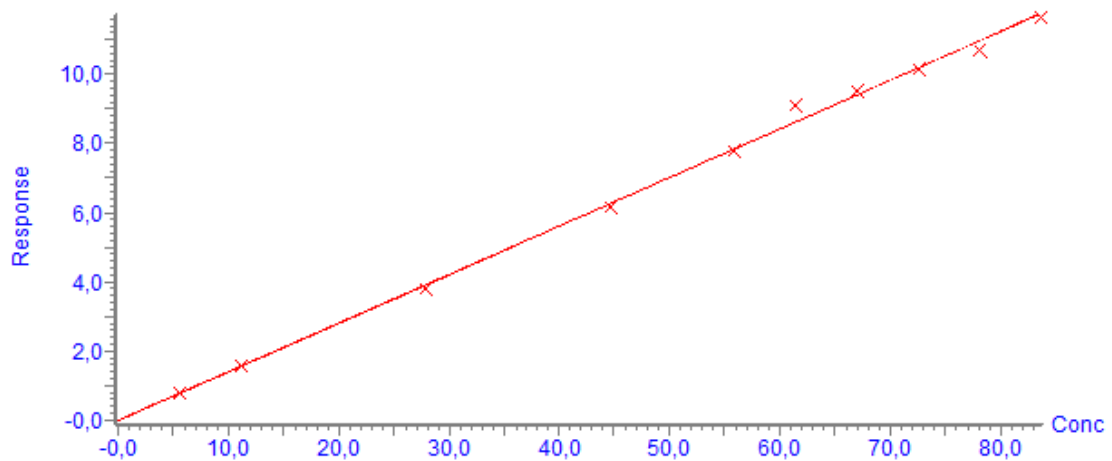
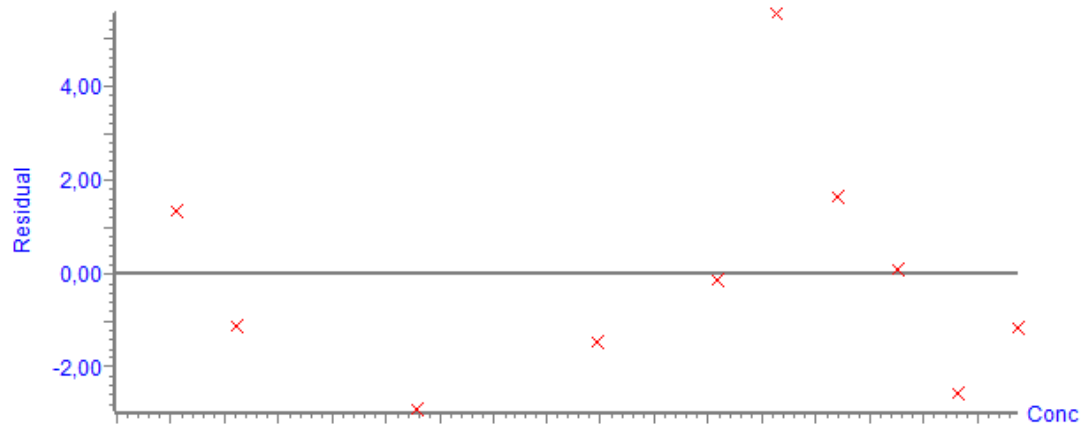
Selektiivisyyttä arvioitiin samoista tuloksista. Koska matriisilla ei ole vaikutusta analyysiin, menetelmä on selektiivinen D₃-vitamiinille.

Spesifisyyttä ei erikseen tutkittu, koska MS-menetelmän voidaan todeta olevan spesifinen tekniikka. Myös näytteen esikäsittelyssä käytetty derivointi lisää menetelmän spesifisyyttä.

6.3 Lineaarisuus

Lineaarisuuden arviointia varten tehtiin liuotinsuora, jossa standardien pitoisuudet vaihtelivat välillä 5–83 ng/ml. Standardisuora on esitetty kuvassa 9. Suoran kulmakerroin on 0,140668 ja selitysaste R^2 on 0,999105. Työssä käytettiin pienempää standardisuoraa, jossa pitoisuudet vaihtelivat 5–60 ng/ml välillä, näiden suorien kulmakertoimet vaihtelivat välillä 0,121–0,159 ja selitysasteet olivat välillä 0,998748–0,999981. Kuvassa 9 nähdään suoran residuaalit ja voidaan niiden todeta olevan välillä -3–6 %, joten menetelmä on lineaarinen pitoisuusalueella 5–83 ng/ml.

Compound name: D-vitamiini
 Correlation coefficient: $r = 0.999552$, $r^2 = 0.999105$
 Calibration curve: $0.140668 * x + -0.00585978$
 Response type: Internal Std (Ref 2), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



Kuva 9. Standardisuora pitoisuusalueella 5–83 ng/ml sekä standardisuoran residuaalit yllinä kuvassa.

6.4 Toteamisraja ja määrittäysraja

Toteamis- ja määrittäysrajan laskemista varten analysoitiin rasvatonta luomumaitoa, jossa ei ole lisättyä D₃-vitamiinia. Rasvattomasta luomumaidosta löytyi kuitenkin pieniä pitoisuuksia luontaista D₃-vitamiinia, koska LC-MS-menetelmällä on suuri herkkyys.

Nollamaitoa analysoitiin neljänä eri päivänä. Kaikista tuloksista laskettiin keskiarvo ja keskihajonta. Keskiarvo oli 0,017 µg/100 g ja keskihajonta 0,006 µg/100 g. Saaduista

tuloksista laskettiin toteamisraja kaavalla: keskiarvo + 3 x keskihajonta. Laskennalliseksi toteamisrajaksi saatiin 0,035 µg/100 g. Samoista tuloksista laskettiin määritysraja kaavalla: keskiarvo + 10 x keskihajonta. Laskennalliseksi määritysrajaksi saatiin 0,077 µg/100 g.

Validoinnissa ei testattu toteamis- ja määritysrajaa näytteillä, koska työssä analysoitujen maitojen D₃-vitamiinipitoisuudet ovat suurempia kuin laskennalliset toteamis- ja määritysrajat.

6.5 Saantokoe

Saantomäärityksinä tehtiin standardin lisäykset rasvattomaan nollamaitoon. Lisäysoikeiksi valittiin pieni, keskisuuri ja suuri pitoisuus, jotka vastaavat maitoon lisättyjä pitoisuuksia. Lisäysoikeudet olivat 0,28 µg/100 g, 1,39 µg/100 g ja 2,23 µg/100 g. Määritykset tehtiin kuutena rinnakkaisena määrityksenä. Taulukossa 7 on esitetty keskiarvot näistä määrityksistä.

Taulukko 7. Saantokokeiden tulokset.

Analyysipäivä	Lisäys (µg/100 g)	Saanto (%)
11.2.2013	0,28	110
12.2.2013	0,28	112
11.2.2013	1,39	109
12.2.2013	1,39	112
11.2.2013	2,23	107
12.2.2013	2,23	113

Kaikkien saantomääritysten keskiarvo oli 110 %. Tuloksista voidaan todeta, että lisäysoikeus ei vaikuttanut tuloksiin.

6.6 Toistettavuus ja uusittavuus

Menetelmän toistettavuuden ja uusittavuuden arvioimista varten tehtiin kuusi rinnakkaista määritystä kahdella eri pitoisuustasolla neljänä eri päivänä. Ilmoitetut pitoisuustasot olivat 1 µg/100 g (kevytmaito, rasvaa 1,5 %) ja 2 µg/100 g (rasvaton plusmaito). Saaduista tuloksista laskettiin toistettavuus ja uusittavuus.

Taulukossa 8 on esitetty saadut toistettavuustulokset kevytmaidolle. Tulosten variaatiokerroin (CV-%) vaihtelee välillä 2,5–7,0 %.

Taulukko 8. Kevytmaidolle saadut toistettavuustulokset.

Analyysipäivä	4.2.2013	6.3.2013	15.3.2013	25.3.2013
Tulos µg/100 g	0,861	0,986	0,838	0,862
Tulos µg/100 g	0,822	0,952	0,786	0,844
Tulos µg/100 g	0,875	0,983	0,828	0,904
Tulos µg/100 g	0,858	1,012	0,830	0,884
Tulos µg/100 g	0,895	1,015	0,818	1,022
Tulos µg/100 g	0,883	1,015	0,830	0,925
Keskiarvo µg/100 g	0,866	0,994	0,822	0,907
Keskihajonta µg/100 g	0,026	0,025	0,019	0,064
CV-%	3,0	2,5	2,3	7,0

Samalla tavalla tehtiin määrykset plusmaidolle, jonka ilmoitettu D₃-vitamiinipitoisuus oli 2,0 µg/100 g. Taulukossa 9 on esitetty plusmaidon toistettavuustulokset.

Taulukko 9. Plusmaidolle saadut toistettavuustulokset.

Analyysipäivä	4.2.2013	6.3.2013	15.3.2013	25.3.2013
Tulos µg/100 g	2,393	2,743	2,322	2,267
Tulos µg/100 g	2,303	2,710	2,214	2,342
Tulos µg/100 g	2,265	2,725	2,310	2,209
Tulos µg/100 g	2,376	2,892	2,242	2,344
Tulos µg/100 g	2,292	2,776	2,244	2,379
Tulos µg/100 g	2,402	2,843	2,264	2,221
Keskiarvo µg/100 g	2,338	2,782	2,266	2,294
Keskihajonta µg/100 g	0,056	0,073	0,047	0,069
CV-%	2,4	2,6	2,1	3,0

Plusmaidolle saatujen tulosten variaatiokerroin vaihtelee välillä 2,1–3,0 %.

Edellä mainituista tuloksista laskettiin menetelmän uusittavuus (taulukko 10). Koska määrykset on tehty samassa laboratoriossa, voidaan puhua laboratorion uusittavuudesta.

Taulukko 10. Uusittavuustulokset kevytmaidolle ja plusmaidolle.

	Kevytmaito	Plusmaito
Keskiarvo µg/100 g	0,897	2,420
Keskihajonta µg/100 g	0,074	0,223
CV-%	8,2	9,2

6.7 Mittausepävarmuus

Menetelmän mittausepävarmuus arvioitiin rutiininäytteiden rinnakkaistuloksista, kontrollinäytteestä, joka oli maitojauhe (sisäinen uusittavuus), ja saantokokeiden avulla (menetelmän harha). Menetelmän mittausepävarmuutta arvioitiin Mukit-ohjelman avulla, joka perustuu Nordtest TR 537-raporttiin (*Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories*) ja standardiohjeeseen ISO 11352 (*Water quality -- Estimation of measurement uncertainty based on validation and quality control data*) [13]. Menetelmälle saatu laajennettu mittausepävarmuus oli 16 %. (Liite 2.)

6.8 Säilyvyys

Esikäsitellyn näytteen säilyvyyttä testattiin säilyttämällä näytesarjaa huoneenlämmössä 9 vrk. Näytesarja sisälsi standardit pitoisuusalueella 5–55 ng/ml sekä kuusi rinnakkaismääritystä plusmaidolle. Saatuja tuloksia, jotka on esitetty taulukossa 11, verrattiin toisiinsa t-testillä. Testi osoitti, että tilastollisesti merkitsevää eroa 95 %:n luottamustasolla ei ollut.

Taulukko 11. Säilyvyyskokeen tulokset.

	Säilytys 0 vrk	Säilytys 9 vrk
Pitoisuus µg/100 g	2,743	2,816
Pitoisuus µg/100 g	2,710	2,745
Pitoisuus µg/100 g	2,725	2,683
Pitoisuus µg/100 g	2,892	2,553
Pitoisuus µg/100 g	2,776	2,692
Pitoisuus µg/100 g	2,843	2,814
Keskiarvo µg/100 g	2,782	2,717
Keskihajonta µg/100 g	0,005	0,010

7 Yhteenveto

Työn tavoitteena oli käyttöönottaa uusi nopeampi menetelmä D₃-vitamiinin määrittämiselle maidosta. Käyttöönotto onnistui hyvin ja alkuperäistä artikkelissa olevaa menetelmää jouduttiin muokkaamaan vain vähän. Artikkelista poiketen sisäisenä standardina käytettiin D₃-vitamiinia, jossa kolme vetyä oli deuteroitu. Sisäisen standardin määrää standardeihin ja näytteisiin lisättiin, jotta saatiin suurempi vaste sisäiselle standardille. Validoitussa LC-MS/MS-menetelmässä on liuottimien määrä huomattavasti pienempi kuin käytössä olevassa UV-menetelmässä.

Maidolle ei ole referenssinäytettä, joten menetelmän toimivuutta arvioitiin referenssimaitojauheella. Näin saatiin varmuutta menetelmän toimivuudesta.

Laskennallinen määrittämiss raja menetelmälle on 0,077 µg/100 g ja laskennallinen toteamisraja on 0,035 µg/100 g. Kun menetelmä otetaan käyttöön Evirassa, tulee määrittämissrajaa vielä testata saantonäytteillä. Lisäystasyksiksi valitaan laskennallinen määrittämissraja eli 0,077 µg/100 g sekä toiseksi lisäystasyksiksi puolet määrittämissrajasta eli 0,0385 µg/100 g. Näin voidaan vielä saada varmuutta määrittämissrajasta. Menetelmän takaisin-saanto oli 110 %.

Menetelmän laajennettu mittausepävarmuus on 16 %. Mittausepävarmuutta on syytä arvioida uudelleen, kun menetelmä on ollut jonkin aikaa rutiinikäytössä sekä useampi

laborantti on tehnyt määryksiä tällä menetelmällä. Validoinnin määrykset on tehnyt yksi henkilö.

Evirassa tehdään D₃-vitamiini määryksiä muistakin maitotuotteista kuten esimerkiksi piimästä. Jos tällä menetelmällä halutaan analysoida muita elintarvikkeita, tulee validointi tehdä kullekin matriisille erikseen. Menetelmän toimivuutta on tarkoitus testata vielä rehunäytteillekin.

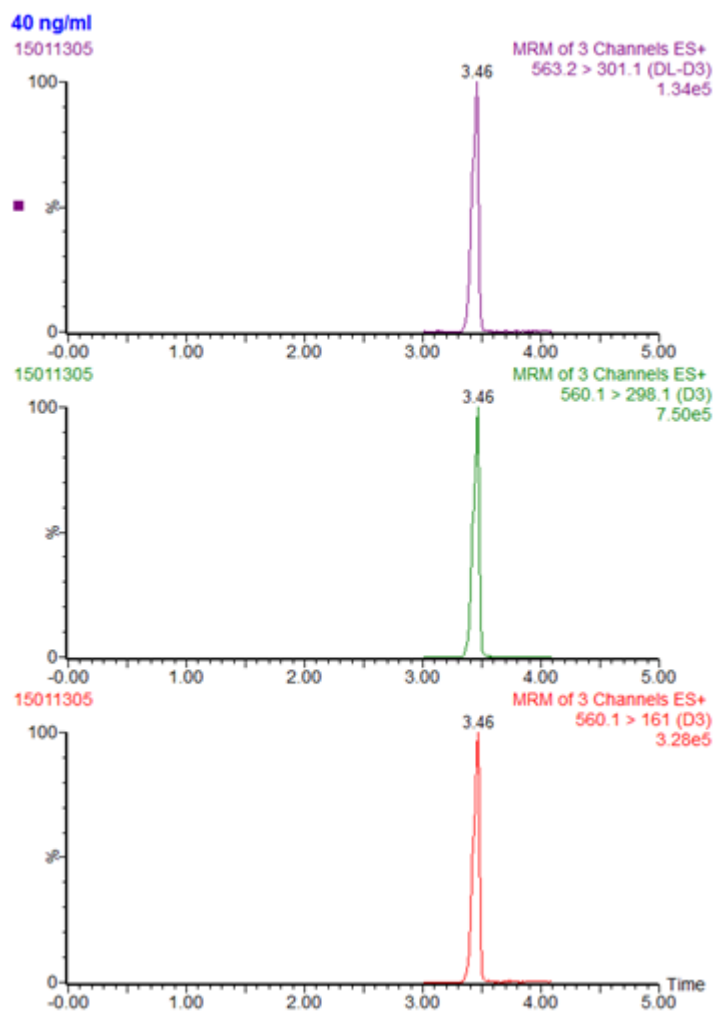
Lähteet

- 1 Abernethy, Grant A. 2012. A rapid analytical method for cholecalciferol (vitamin D₃) in fortified infant formula, milk and milk powder using Diels-Alder derivatisation and liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Vol. 403, s. 1433–1440.
- 2 Terveysten ja hyvinvoinnin laitos. Fineli. 2011. Verkkodokumentti. <www.fineli.fi/component.php?compid=2271&lang=fi>. Päivitetty 5.12.2011. Luettu 10.11.2013.
- 3 Lönnfors, Sanna. IBD-opas Ravitseemus. 2013. Verkkodokumentti. <http://www.crohnjacolitis.fi/cms/fileadmin/pdf/suomi_IBD_2_2013.pdf>. Päivitetty 15.1.2013. Luettu 20.11.2013.
- 4 Sigma-Aldrich. 1996. Verkkodokumentti. <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/c9756pis.pdf>. Luettu 20.11.2013.
- 5 Sigma-Aldrich. 2013. Verkkodokumentti. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?interface=All&term=Vitamin+D3%286%2C19%2C19-d3%29+solution&lang=fi®ion=FI&focus=product&N=0+220003048+219853114+219853286&mode=match%20partialmax>. Luettu 20.11.2013.
- 6 Suomi, Johanna. 2009. Kemiällisen näytteen esikäsittely. Keuruu. Otavan Kirjapaino Oy.
- 7 Phenomenex. 2013. Verkkodokumentti. <<http://www.phenomenex.com/Kinetex/CoreShellTechnology>>. Luettu 20.11.2013.
- 8 Harris, Daniel C. 2010. *Quantitative Chemical Analysis*. 8th ed. W.H. Freeman & Co Ltd. Basingstoke, United Kingdom.
- 9 Ketola, Raimo, ym (toim.). 2010. *Massaspektrometrian perusteet*. Helsinki. Hakapaino.
- 10 Laine, Aleks. 2009. *Polaaristen yhdisteiden analytiikkaan soveltuvat nestekromatografia-massaspektrometria-menetelmät*. Pro gradu -tutkielma. Jyväskylän yliopisto.
- 11 Jaarinen, Soili & Niiranen, Jukka. 2008. *Laboratorion analyysitekniikka*. Helsinki. Edita.

- 12 Ehder, Tapio (toim.). 2005. Kemian metrologian opas. Helsinki. Mittatekniikan keskus.
- 13 Suomen ympäristökeskus. 2013. Verkkodokumentti. < http://www.syke.fi/fi-FI/Palvelut/Kalibrointipalvelut_ja_sopimuslaboratorio/MUkit_mittausepavarmuuso_hjelma>. Päivitetty 8.10.2013. Luettu 20.11.2013

Kromatogrammi MS/MS-laitteelta

Esimerkkistandardin pitoisuus 40 ng/ml. Kuvasta nähdään tuoteionit, jotka erottuvat toisistaan erilaisella massa/varaussuhteella, vaikka retentioaika on sama kaikille.



Tulostusparotti Mokit-mittausepävarmuusohjelmasta

MITTAUSEPÄVARMUUDEN ARVIOINTI

As- kel	Toiminta	D-vitamiinin määrittäminen maidosta LC-MS menetelmällä	22.11.2013																					
1	Määritetään mit- tasuure	Mitattu analyytti: D-vitamiini Pitoisuusalue: 0.5 - 10 µg/100 g Matriisi: Maito																						
2	Määritetään labo- ratorion sisäinen uusittavuus, $u(R_w)$ A: Kontrollinäyte B: Huomioidaan myös ne ana- lyysivaiheet jotka eivät vaikuta kontrollinäytteen tulokseen	A: Kontrollinäytteet: Kontrollinäytteiden lukumäärä: 6 Pitoisuuden keskiarvo: 9.2865 µg/100 g Keskihajonta, s_{Rw} : 5.14 % B: Rinnakkaismittaukset: Rutiinireplikaattinäytteiden lukumäärä: 27 Rinnakkaismääritysten lukumäärä: 2 Pitoisuusalue: 0.812284 - 2.809893 µg/100g Keskihajonnan arvio vaihteluväleistä, s_r : 2.54 % $u(R_w) = \sqrt{s_{Rw}^2 + s_r^2} = 5.74 \%$																						
3	Määritetään me- netelmän ja labo- ratorion harha, $u(bias)$	Menetelmän ja laboratorion harha saantokokeista: Standardiliuoksen pitoisuuden standardiepä- varmuus, $u(conc)$: 2.00 % Standardiliuoksen tilavuuden standardiepä- varmuus, $u(vol)$: 2.00 % Saantokokeiden lukumäärä, N : 6	<table border="1"> <thead> <tr> <th>i</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Lisätyn ana- lyytin saan- to, $Recovery_i$</td> <td>100. 60 %</td> <td>102. 80 %</td> <td>105. 00 %</td> <td>103. 00 %</td> <td>106. 00 %</td> <td>104. 00 %</td> </tr> <tr> <td>Pitoisuusar- vio</td> <td>1,39 µg/1 00 g</td> <td>1,39 µg/1 00 g</td> <td>0,56 µg/1 00 g</td> <td>1,40 µg/1 00 g</td> <td>0,56 µg/1 00 g</td> <td>1,40 µg/1 00 g</td> </tr> </tbody> </table>	i	1	2	3	4	5	6	Lisätyn ana- lyytin saan- to, $Recovery_i$	100. 60 %	102. 80 %	105. 00 %	103. 00 %	106. 00 %	104. 00 %	Pitoisuusar- vio	1,39 µg/1 00 g	1,39 µg/1 00 g	0,56 µg/1 00 g	1,40 µg/1 00 g	0,56 µg/1 00 g	1,40 µg/1 00 g
i	1	2	3	4	5	6																		
Lisätyn ana- lyytin saan- to, $Recovery_i$	100. 60 %	102. 80 %	105. 00 %	103. 00 %	106. 00 %	104. 00 %																		
Pitoisuusar- vio	1,39 µg/1 00 g	1,39 µg/1 00 g	0,56 µg/1 00 g	1,40 µg/1 00 g	0,56 µg/1 00 g	1,40 µg/1 00 g																		

		<table border="1"> <tbody> <tr> <td>Standardiliuoslisäys</td> <td>0,05 577 µg</td> <td>0,05 577 µg</td> <td>0,02 245 µg</td> <td>0,05 6125 µg</td> <td>0,02 245 µg</td> <td>0,05 6125 µg</td> </tr> <tr> <td>Päivämäärä</td> <td>4.2. 201 3</td> <td>4.2. 201 3</td> <td>1.3. 201 3</td> <td>1.3. 2013</td> <td>1.3. 201 3</td> <td>1.3. 2013</td> </tr> </tbody> </table>	Standardiliuoslisäys	0,05 577 µg	0,05 577 µg	0,02 245 µg	0,05 6125 µg	0,02 245 µg	0,05 6125 µg	Päivämäärä	4.2. 201 3	4.2. 201 3	1.3. 201 3	1.3. 2013	1.3. 201 3	1.3. 2013
Standardiliuoslisäys	0,05 577 µg	0,05 577 µg	0,02 245 µg	0,05 6125 µg	0,02 245 µg	0,05 6125 µg										
Päivämäärä	4.2. 201 3	4.2. 201 3	1.3. 201 3	1.3. 2013	1.3. 201 3	1.3. 2013										
		$u(c_{r_{recovery}}) = \sqrt{u(conc)^2 + u(vol)^2} = 2.83 \%$ $RMS_{bias} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (100\% - Recovery_i)^2}{N}} = 3.96 \%$ $u(bias) = \sqrt{RMS_{bias}^2 + u(c_{r_{recovery}})^2} = 4.87 \%$														
4	Muutetaan komponentit standardiepävarmuuksiksi	$u(R_w) = 5.74 \%$ $u(bias) = 4.87 \%$														
5	Lasketaan yhdistetty standardiepävarmuus, u_c	$u_c = \sqrt{u(R_w)^2 + u(bias)^2} = 7.53 \%$														
6	Lasketaan laajennettu epävarmuus, U	$U = 2 \cdot u_c = 16 \%$ <p>Mittausepävarmuutta on syytä arvioida uudelleen, kun menetelmä on ollut rutiinikäytössä sekä kun useampi laborantti on tehnyt analyyseja. Validoinnin on suorittanut yksi henkilö.</p>														