

Metabolomiikka massaspektrometrialla

Pro gradu -tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Kemian laitos

21.3.2018

Sara Vähätalo

Tiivistelmä

Tässä Pro gradu -tutkielmassa käsitellään erilaisten organismien aineenvaihdunnan eli metabolian tutkimusta keskittyen erityisesti nisäkkäille tyypilliseen soluhengitykseen ja haaraketjuisten aminohappojen aineenvaihduntaan. Haaraketjuisilla aminohapoilla on mekanismiltaan vielä tuntematon yhteys lihaskasvuun ja rasvahappojen lisääntyneeseen aineenvaihduntaan. Kirjallisessa osassa tarkastellaan ravinnon makroravintoaineiden ja soluhengityksen yhteyttä, haaraketjuisten aminohappojen vaikutusta fyysiseen harjoitteluun, rasvahappoaineenvaihduntaan ja aineenvaihduntareitteihin Kainulainen *et. al* esittämän mallin mukaisesti. Tätä ehdotettua rasvahappojen hapettumisen ja haaraketjuisten aminohappojen katabolian välistä yhteyttä on tarkoitus tutkia rotista, joilla on säädelty ruokavalio, mutta tutkimusta tullaan tekemään myös ihmissoluista. Aineenvaihduntareittien tutkimus tehdään nestekromatografia-massaspektrometria-menetelmällä (LC-MS), jonka kehittämistä varten tutkielman kokeellisessa osassa tehtiin kiinnostuksen kohteina olevien yhdisteiden ominaisuuksia kartoittavia massaspektrometrisia mittauksia. Kirjallisessa osuudessa perehdytään nestekromatografia- ja kaasukromatografia-massaspektrometria-menetelmien ominaisuuksiin ja kehitykseen nimenomaan metabolomiikan näkökulmasta, mihin kuuluu näytteen esikäsittely, laitteiston ominaisuuksien säätäminen huippuunsa, käytettyjen liuottimien optimointi, niiden sopivien suhteiden löytäminen ja tulosten vertailu. Nestekromatografiasta, kaasukromatografiasta ja massaspektrometriasta esitetään teoreettiset perusteet ja vertaillaan niiden etuja metaboliittianalyysissä.

Pro gradu -tutkielman kokeellinen osuus jakautui lopulta kahteen osaan: metaboliittianalyysiä varten tehtävään massaspektrometriseen kartoitukseen ja kukurbit[n]uriilien ($n = 6, 7, 8$) (CB[n]) ja (2,3-diatsabisyklo[2.2.2]okt-2-en-1-yyli)metyyliamiini-vieras molekyylin vuorovaikutuksen massaspektrometriseen tutkimukseen. Metaboliittien massaspektrometrisissa kokeissa havaittiin odotetusti negatiivisen polarisaation spektreissä selkeästi tunnistettavat piikit ja voimakkaammat intensiteetit lähes kaikille tutkittaville yhdisteille verrattuna positiivisen polarisaation spektreihin. Suurin osa tutkimukseen kuuluvista metaboliiteista oli poolisia ja sisälsivät karboksyylihapporyhmän. Ainoastaan oksaloetikkahappoa ei onnistuttu analysoimaan massaspektrometrisesti. Kaikista muista metaboliiteista eristettiin $[M-H]^-$ -ioni, jolle tehtiin törmäysaktivointikokeet. Törmäysaktivointikokeiden perusteella LC-MS-analyysiin saadaan lisää luotettavuutta ja niistä saatavan informaation pohjalta isobaariset yhdisteet pystytään erottamaan.

Kukurbituriilien massaspektrometrisissa analyyseissä tarkkailtiin vapaan atsoalkaanivieraan hajoamista ja verrattiin sitä CB[n]:n ja atsoalkaanin komplekseissa tapahtuvaan hajoamiseen. Analysointi tehtiin happamissa olosuhteissa. Analyyseissä havaittiin atsoalkaanin pilkkoutuvan eri tavoin isäntämolekyyliin sitoutuneena verrattuna vapaan atsoalkaanimolekyylin pilkkoutumiseen. Monimuotoisimmat vuorovaikutukset ja pilkkoutumiset havaittiin CB[7]:n ja atsoalkaanin kompleksien pilkkoutumisessa. CB[6] on onkaloltaan liian pieni sitomaan atsoalkaania sisäänsä ja CB[8]:n onkalo on niin suuri, että vieraana oleva atsoalkaani irtoaa siitä helpommin kuin CB[7]:n onkalosta, joten pilkkoutumista havaitaan vähemmän, kuin CB[7]:n ja atsoalkaanin komplekseissa.

Esipuhe

Erikoistyö tehtiin Jyväskylän yliopiston kemian laitoksella yhteistyössä liikuntabiologian laitoksen Heikki Kainulaisen tutkimusryhmän kanssa 02-10/2017. Kainulaisen ryhmän akatemiaprojektin tarkoituksena on tutkia haaraketjuisten aminohappojen vaikutusta rasvahappojen hapettumiseen ja terveyteen. Kirjallista osaa varten tietoa etsittiin Kainulaisen ryhmän tutkimukseen liittyvien artikkeleiden pohjalta, analytiikan perusteoksista ja Google Scholarilla. Näiden biologisten reaktioiden tutkimista varten kehitetään kvantitatiivista nestekromatografia-massaspektrometrin menetelmää, jolla voitaisiin tehokkaasti mitata kudoksen-, solu- ja seeruminäytteiden metaboliittien pitoisuuksia. Ajanpuutteen ja laiteteknisten ongelmien takia, menetelmän kehitystä ei tämän erikoistyön puitteissa saatu valmiiksi ja lopullista nestekromatografia-massaspektrometria-menetelmän kehitystä jatkettiin erikoistyön päätyttyä. Menetelmän kehityksen sijaan erikoistyöhön yhdistettiin kukurbit[n]juriilien (n = 6, 7, 8) massaspektrometrin tutkimusta atsoalkanivieraan kanssa.

Kiitän Pro gradu –tutkielmani ohjaajaa Elina Kaleniusta ja liikuntabiologian laitoksen Heikki Kainulaista, jotka ottivat minut tähän kiinnostavaan projektiin mukaan. Kiitän myös kaikkia orgaanisen kemian siivessä työskenteleviä opiskelijoita ja henkilökuntaa niin käytännön avusta kuin kannustavista sanoista – käytännön avusta erityisesti Johanna Lindiä, jonka kanssa erikoistyössä käytetty massaspektrometri avattiin useaan kertaan. Kiitän läheisiäni - isää, äitiä ja poikaystävää - sekä samaan aikaan omia Pro gradu -tutkielmiaan kirjoittavia opiskelijoita, joiden kanssa sain jakaa ajatuksiani, iloita edistyksistäni ja uusista mielenkiintoisista löydöksistäni.

TIIVISTELMÄ	I
ESIPUHE	III
LYHENTEET	VI
KIRJALLINEN OSA	1
1 JOHDANTO	1
2 METABOLIITIT	3
2.1. Proteiinien, hiilihydraattien ja rasvojen aineenvaihdunta	4
2.2. Haaraketjuisten aminohappojen merkitys rasvahappojen aineenvaihdunnassa	8
3 METABOLIITTIANALYYSI BIOLOGISESTA NÄYTTEESTÄ	13
3.1. Metabolomiikan tarjoama informaatio	13
3.2. Koejärjestely ja biologisen näytteen esikäsittely	16
3.3. Ravitsemusmetabolomiikka	20
4 MASSASPEKTROMETRIA	21
4.1. Ionilähteet	24
4.1.1. Sähkösumutus-ionisaatio	25
4.1.2. Elektroni-ionisaatio	27
4.1.3. Kemiallinen ionisaatio ja normaalissa ilmanpaineessa tapahtuva kemiallinen ionisaatio	29
4.1.4. Muut ionisointimenetelmät metabolomiikassa	30
4.2. Massa-analysaattorit	31
4.3. Tandem-massaspektrometria	34
4.4. Massaspektrometrian edut metabolomiikassa	35
5 NESTEKROMATOGRAFIA-MASSASPEKTROMETRIA METABOLOMIIKASSA	36
5.1. Nestekromatografian perusteet	36
5.1.1. Kolonnit ja erottumistehokkuus	38
5.2. Nestekromatografia-massaspektrometria-menetelmän kehittäminen metabolomiikkaa varten	41
5.3. Nestekromatografia-massaspektrometria-laitteiston kalibrointi kvantitatiivisessa analyysissä	45
5.4. Nestekromatografia-massaspektrometria-menetelmän datan käsittely	47
5.5. Nestekromatografia-massaspektrometria-menetelmän tulosten arviointi	50
6 KAASUKROMATOGRAFIA-MASSASPEKTROMETRIA METABOLOMIIKASSA	53
6.1. Kaasukromatografia-massaspektrometria-menetelmä metabolomiikassa	55

7	YHTEENVETO	59
KOKEELLINEN OSA		61
8	JOHDANTO	61
9	HAARAKETJUISTEN AMINOHAPPOJEN KATABOLIAAN LIITTYVIEN METABOLIITTIE MASSASPEKTROMETRINEN ANALYYSI	62
9.1.	Massaspektrometrinen analyysi tavoite	62
9.2.	Näytteiden valmistus ja mittaukset	62
9.3.	Metaboliittien massaspektrometrinen analyysi positiivisella polarisaatiolla	66
9.4.	Metaboliittien massaspektrometrinen analyysi negatiivisella polarisaatiolla	74
9.5.	ESI-MS-analyysien vertailu	87
9.5.1.	Isobaaristen metaboliittien erottaminen	88
9.6.	Nestekromatografia-massaspektrometriamenetelmän kehitys	89
10	KUKURBIT[N]URIILIE (N = 6, 7, 8) KATALYSOIMA ATSOALKAANIN PILKKOUTUMINEN JA KOMPLEKSINMUODOSTUS	89
10.1.	Työn tavoite	89
10.2.	Näytteiden valmistus ja mittausparametrit	90
10.3.	Mittaukset ja tulokset	92
10.3.1.	Vapaan atsoalkaanin massaspektrometrinen analyysi	92
10.3.2.	CB[n] + DBOA -kompleksien analyysit	94
10.4.	Yhteenveto	104
11	KIRJALLISUUSLUETTELO	106

Lyhenteet

Ac-CoA	asetyyli-koentsyymi-A
APCI	atmospheric pressure chemical ionization, ilmanpaineessa tapahtuva kemiallinen ionisaatio
APPI	atmospheric pressure photoionization, ilmanpaineessa tapahtuva fotoionisaatio
ATP	adenosiinitrifosfaatti
BCAA	branched-chain amino acids, haaraketjuiset aminohapot
BCAT _m	BCAA-transferaasientsyymi
BCKD	BCAA- α -ketohappodehydrogenaasi
CB[n]	kukurbit[n]uriili
CE	collision energy, törmäysenergia
CI	chemical ionization, kemiallinen ionisaation
CID	collision induced dissociation, törmäysaktivointi
DBOA	(2, 3-Diatsabisyklo[2.2.2]okt-2-en-1-yyli)metyyliamiini
DESI	desorption electrospray ionization, desorptio sähkösumutus-ionisaatio
ECD	electron capture detection, elektroninsieppausdetektori
EI	elektroni-ionisaatio
ESI	electrospray ionization, sähkösumutus-ionisaatio
FD	field desorption, kenttädesorptio
FI	field ionization, kenttäionisaatio
FID	flame ionization detector, liekki-ionisaatiotektori
FTICR	Fourier-transformation ion cyclotron resonance, Fourier-muunnos-ionisyklotroniresonanssi
GC	gas chromatography, kaasukromatografi
HCR	high-capacity runner, korkea juoksuikyky
HILIC	hydrophilic interaction chromatography, hydrofiilistä vuorovaikutusta hyödyntävä kromatografia
HPLC	high-performance liquid chromatography, korkean suorituskyvyn nestekromatografia
IM-MS	ion-mobility mass spectrometry, ioniliikkuvuus-massaspektrometria
LC	liquid chromatography, nestekromatografia
LCR	low-capacity runner, matala juoksuikyky
LIT	linear ion trap, lineaarinen ioniloukku
LOD	lowest limit of detection, toteamisraja
LOQ	lowest limit of quantitation, määritysraja

<i>m/z</i>	massa/varaus
MALDI	matrix assisted laser desorption, matriisiavusteinen laser desorption ionisaatio
MRM	multiple reaction monitoring, useiden reaktioiden seuranta
mRNA	messenger ribonucleic acid, lähettiribonukleiinihappo
MS	massaspektrometri(a)
MS/MS	tandem-massaspektrometria
MSTFA	metyylisilyylitrifluoroasetamidi
MSTBSTFA	metyyli- <i>tert</i> -butyylisilyylitrifluoroasetamidi
mTOR	mammalian target of rapamycin
MW	molecular weight, molekyylipaino
NIMS	nanostructure initiator mass spectrometry
NMR	nuclear magnetic resonance spectroscopy, ydinmagneettinen resonanssispektroskopia
NPLC	normal phase liquid chromatography, normaalifaasinestekromatografia
PCA	principal component analysis, pääkomponenttianalyysi
PEPCK-C	fosfoenolipyruvaattikarboksikinaasientsyymi
PFPP	pentafluorifenyylikolonne
PLS	partial least squares, osittaiset pienimmät neliöt
PLSR	partial least squares regression, osittaisten pienimpien neliöiden regressio
QIT	quadrupole ion trap, kvadrupoli-ioniloukku
QQQ/QqQ	kolmoiskvadrupoli
RNA	ribonukleiinihappo
RPLC	reversed-phase liquid chromatography käänteisfaasinestekromatografia
RSD	relative standard deviation, suhteellinen keskihajonta
Suc-CoA	sukkinyylikoentsyymi-A
SIM	single ion monitoring, yhden ionin tarkkailu
SRM	selected reaction monitoring, valitun reaktion tarkkailu
TBA	tributyyliamiini
TCD	thermal conductivity detector, lämmönjohtodetektori
TOF	time-of-flight mass analyzer, lentoaikamassa-analysaattori
UPLC	ultra-high-performance liquid chromatography, ultrakorkean suorituskyvyn nestekromatografi
β -NAD ⁺	nikotiiniamidiadeniinidikleotidi
β -NADH	pelkistynyt nikotiiniamidiadeniinidikleotidi

KIRJALLINEN OSA

1 Johdanto

”Terveellistä lihavuutta ei ole olemassakaan, ylipaino vaikuttaa aina heikentävästi terveyteen”, uutisoi Helsingin sanomat (19.5.2017, lähteenään tutkimus Isosta-Britanniasta ja Suomessa tehdyt kaksosseurantatutkimukset). Lihavuus ja sen aiheuttamat sairaudet ja siitä edelleen aiheutuvat kustannukset ovat tunnetusti varakkaiden länsimaiden vitsaus. Vaikka otsikoissa ja sosiaalisessa mediassa hehkutetaan kehopositiivisuutta ja kerrotaan terveestä lihavuudesta, tulee ylipainon myötä aina jossakin vaiheessa ongelmia terveyden kanssa. Lihavuuden metabolisesti terve vaihe ei ole kestävä tila, mutta lihavuus itsessään ei tarkoita yksilön olevan sairas.¹

Mutta mitä on metabolinen terveys? Miksi fyysisesti hoikemmat yksilöt ovat terveempiä ja pystyvät fyysisesti vaativampiin suorituksiin? On jo pitkään tiedetty elintapojen ja varsinkin ruokavalion vaikuttavan terveyteen. Vaikka soluissamme tapahtuvat aineenvaihduntareaktiot on tunnettu kauan, ei vieläkään ole varmuutta siitä, mitkä tekijät vaikuttavat energia-aineenvaihduntaan ja kehon rasvakudoksen määrään, tai miten tietynlaisen ruokavalion noudattaminen vaikuttaa fyysiseen suoritukseen ja lihaskasvuun. Näiden mekanismien säätely on vielä osittain pimennossa.²

Sairauden, ruokavalion tai lääkityksen aiheuttamia muutoksia aineenvaihdunnassa voidaan seurata ja ymmärtää metabolian tutkimuksella eli metabolomiikalla. Metabolomiikassa hyödynnetään aineenvaihduntamekanismien tuntemusta ja kvantitatiivisia mittauksia, jotka antavat tietoa biologisen näytteen metaboliittipitoisuuksista. Pitoisuuksia selvittämällä ja varsinkin niiden muutoksia tarkkailemalla voidaan ymmärtää solun tasapainotilojen säätelyä ja eri tekijöiden vaikutusta säätelymekanismeihin.³

Metaboliittien erottaminen ja pitoisuuksien määrittäminen on usein vertailevaa tutkimusta eli pääasiallisena tarkoituksena on havainnoida tapahtuvia muutoksia. Toisaalta, myös absoluuttisten pitoisuuksien mittaaminen eli kvantitatiivinen metabolomiikka on yhä suositumpaa vaikkakin haastavampaa.⁴ Metabolomiikkaa tehdään rajoittaen tutkimus esimerkiksi johonkin solun tehtäväkokonaisuuteen tai veren seerumiin, mutta saatavat tulokset ja päätelmät voidaan yleistää koskemaan kudosta tai koko yksilön metabolista terveyttä.³ Tässä tutkielmassa keskitytään erityisesti nisäkkäiden metabolomiikkaan ja niiden perusaineenvaihduntaa koskeviin tutkimuksiin. Perusaineenvaihdunnan tutkimus, joka kattaa

primääristen metaboliittien kierron, antaa tietoa esimerkiksi energiankulutuksen säätelystä ja yksittäisten metaboliittien vaikutuksista toteutuviin mekanismeihin.⁵

Metaboliittien kvantitatiivinen kemiallinen analyysi on haastavaa tutkittavien näytteiden sisältämien, kemiallisesti monimuotoisen yhdisteiden joukon takia. Analyyttien suuret eroavaisuudet, esimerkiksi koon ja poolisuuden suhteen, vaativat paljon sekä niitä havaitsevilta että niitä erottelevilta laitteilta.⁶ Metabolomiikan tutkimus jaetaan kohdentamattomaan ja kohdennettuun metabolomiikkaan, joista kohdennetussa pyritään tavallisesti todentamaan jokin hypoteesi, tarkkailemalla valitun metaboliittijoukon metaboliittien pitoisuuksien muutoksia. Kohdentamattomaa metabolomiikkaa on esimerkiksi metabolisten sormenjälkien vertailu, missä vertaillaan ärsyksen tai muutoksen aiheuttamia eroja, tarkkailemalla suurien linjojen muutoksia yksittäisten molekyylien konsentraatiomuutosten sijaan.⁷ Koska tasapainotilassa olevan kohteen tutkiminen on haastavaa, tehdään metabolomiikan tutkimusta usein häiritsemällä tätä tavanomaista tilaa jotenkin ja tarkkailemalla tapahtuvia muutoksia.⁵

Tyypillisimmät metaboliittien analysointimenetelmät ovat kaasukromatografia-massaspektrometria (GC-MS), nestekromatografia-massaspektrometria (LC-MS) ja ydinmagneettinen resonanssispektroskopia (NMR). Massaspektrometriaa (MS) hyödynnetään metabolomiikassa sen ylivoimaisen herkkyyden ja tarkkuuden ansiosta. Koska saatava informaatio on ilman erottelevaa tekniikkaa hyvin monimutkaisessa muodossa, yhdistetään massaspektrometri usein johonkin kromatografiseen laitteistoon. Kromatografisten menetelmien ansiosta metaboliitit saadaan myös kvantitoitua. Näiden kahden menetelmän yhdistäminen tuo varmuutta yhdisteiden tunnistamiseen, kun yksittäisten yhdisteiden tunnistuskriteereinä ovat sekä kromatografilla saadut retentioajat että massaspektrometrilla havaitut m/z -arvot.^{6,7}

Metabolomiikan tutkimus vaatii laitteistolta paljon, mutta myös näytteen käsittelyllä on suuri merkitys onnistuneessa analyysissä, jotta tulokset vastaavat mahdollisimman tarkasti säädettyjä olosuhteita. Näytteen eristäminen ja sen metabolian pysäyttäminen on tehtävä tehokkaasti ja nämä aineenvaihdunnan pysäyttäneet olosuhteet on ylläpidettävä kaikessa näytteen säilytyksessä.⁴ Näytteen käsittelyn kaikesta tarkkuudesta huolimatta, biologisen näytteen metaboliittipitoisuudet muuttuvat prosessoinnissa metaboliittipitoisuuksien mittakaavassa jopa merkittävästi. Tämä on varmasti metabolomiikassa osa-alue, jota on vielä kehitettävä totuudenmukaisten tulosten saamiseksi.

2 Metaboliitit

Metaboliitit ovat aineenvaihdunnan reaktioihin osallistuvia pieniä, alle 1 kDa kokoisia, molekyyliä. Ne ovat osa jonkin tehtäväkokonaisuuden suorittamista, niitä tarvitaan solun tavallisimpiin toimintoihin ja kasvuun. Käytännössä metaboliittien määrät kertovat ylempien säätelymekanismien, eli geenien ja lopulta proteomin toiminnasta, mikä näkyy yksilön fenotyypinä. Metaboliitteihin kuuluu aminohappoja, lipidejä, orgaanisia happoja, nukleotideja ja monia muita pienikokoisia molekyyliä, joilla on keskenään hyvinkin erilaiset kemialliset ja fysikaaliset ominaisuudet. Erilaisten ominaisuuksien lisäksi, metaboliittien keskinäiset konsentraatiot vaihtelevat vain joistakin pikomooleista satoihin millimooleihin,⁸ mikä tekee niiden analyttisestä tutkimuksesta haastavaa.⁷

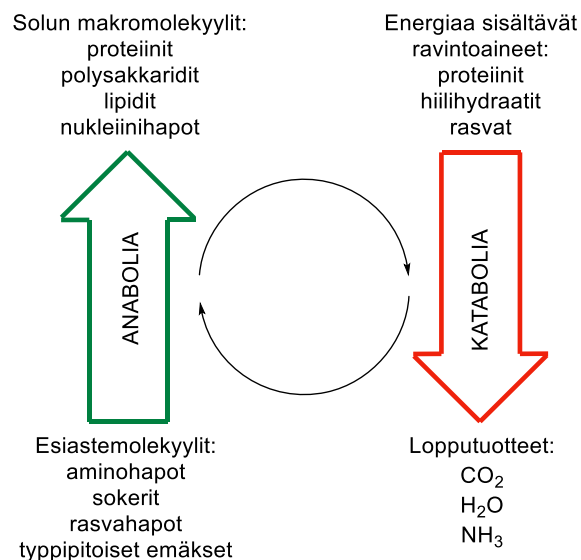
Genomiikan ja proteomiikan tuntemus on vielä toistaiseksi ottanut etenemisessä paljon suurempia harppauksia metabolomiikkaan verrattuna. Genomiikassa tarkastellaan yksilön kaikkia genejä eli selvitetään genomien sisältöä, kun proteomiikassa tarkastellaan mRNA:n kautta kääntymisen tuloksena saatua proteiinien joukkoa eli proteomia. Koska metabolomiikka kertoo fenotyypistä ja siihen vaikuttavista ulkoisista tekijöistä, saadaan metabolomiikalla tietoa esimerkiksi sairauksista ja geenitekijöistä.^{9,7} Metaboliittipitoisuuksia selvittämällä ja vertailemalla voidaan tutkia esimerkiksi makroravintoaineiden vaikutusta lihaskasvuun eli metabolomiikassa nähdään syy-seuraus-suhteiden toteutumista käytännössä, aineenvaihduntareittien yhdisteitä kvantitoimalla ja muutoksia havainnoimalla.⁷ Toisaalta metabolomiikka myös täydentää proteomiikan ja genomiikan avulla saatua informaatiota.¹⁰

Metabolomiikalla saadaan tietoa elimistössä, kudoksissa tai solussa tapahtuvista muutoksista: Mitä solussa kulutetaan, tuotetaan ja millaisella nopeudella eli miten solun toimintojen säätely toimii. Tutkimuksessa on usein kyse metaboliittien virtauksesta eli fluksomiikasta. Fluksomiikan tutkimuksen motiivina voi olla lääkkeen vaikutuksen kartoittaminen, sairauden etenemisen tutkimus tai lihavuuden ja haaraketjuisten aminohappojen yhteyden ymmärtäminen. Toisin kuin genomiikan ja proteomiikan tutkimuksessa, metabolomiikassa saadaan informaatiota todella tapahtuvista aineenvaihdunnan reaktioista, eli havaitaan kuinka geenit ilmenevät. Geenien tai proteiinien ilmeneminen ei vielä tarkoita aineenvaihduntatuotteiden ilmenemistä. Metabolomiikan avulla saatua tietoa voidaan käyttää esimerkiksi solulinjojen metaboliatuotteiden saannon optimointiin, sen avulla voidaan löytää biologisia merkkiaineita sairauksien tunnistamiseen tai selvittää fyysisen aktiivisuuden yhteyttä aineenvaihdunnan reaktioihin.¹¹ Toisaalta tutkimalla veren seerumia tai virtsaa, saadaan myös informaatiota

homeostasiasta, eritettävistä yhdisteistä tai imeytymisongelmista.⁵ Kvantitatiivisella metabolomiikalla on sovelluksia bioteknologian, personoidun lääketieteen, lääkekehityksen, ravitsemuksen, toksikologian ja genomiikan parissa. Metabolomiikasta on siis hyötyä hyvin monella alalla, eikä kaikkia potentiaalisia käyttökohteita ole vielä löydetty.¹² Tässä luvussa käsitellään eukaryootteja ja nisäkkäitä koskevaa aineenvaihduntaa ja metabolomiikan avulla saatavaa informaatiota. Luvussa 3 käsitellään kattavammin näytteenkäsittelyä ja käytännössä tapahtuvaa prosessia.

2.1. Proteiinien, hiilihydraattien ja rasvojen aineenvaihdunta

Karkea esitys aineenvaihdunnan periaatteesta on esitetty kuvassa 1: aineiden vaihtuminen jakautuu katabolisiin eli hajottaviin reaktioihin ja anabolisiin eli rakentaviin mekanismeihin. Kataboliset reaktiot vapauttavat ravinnosta saatavaa energiaa ja anaboliset reaktiot käyttävät sitä. Metabolia ja elimistö eivät kuitenkaan todellisuudessa toimi aivan näin yksinkertaisesti. Energiaa valjastetaan eri käyttötarkoituksiin, sen muoto muuttuu, sitä varastoidaan ja vapautetaan erilaisiin toimintoihin.^{13b}

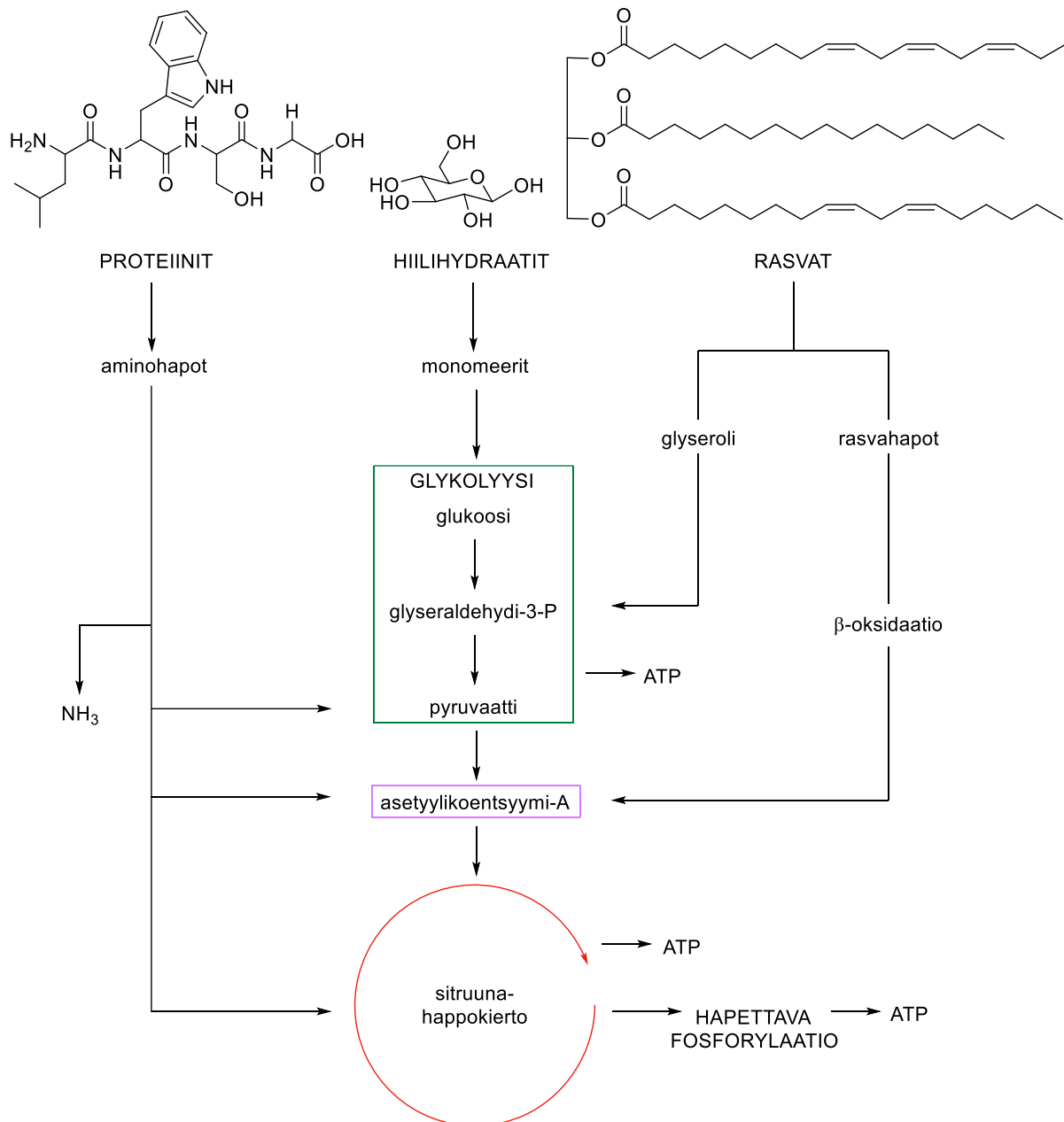


Kuva 1. Elimistön energia-aineenvaihdunnan peruseriaate. Ravintoaineiden energia vapautetaan kataboliassa, jolloin lopputuotteina saadaan matalan energian yhdisteitä eli hiilidioksidia, vettä ja ammoniakkaa. Pilkkomalla makroravintoaineet pienemmiksi yksiköiksi, voidaan niitä käyttää myös biosynteesissä eli anabolissa, missä taas kulutetaan kataboliassa varastoitua energiaa.^{13b}

Kuten kaikkia elimistön toimintoja, myös kataboliaa ja anaboliala säädelään, sillä ei ole energiatehokasta esimerkiksi hajottaa lipidejä rasvahapoiksi ja samanaikaisesti rakentaa samoja

lipidejä uudelleen. Välittömin säätelyyn vaikuttava tekijä on lähtöaineiden eli tässä tapauksessa entsyymien substraattipitoisuuksien määrät. Säätelyyn vaikuttavat myös reaktioiden tapahtuminen solun eri osissa ja osittain eri entsyymien katalysoimina: yhden entsyymin inhiboituminen voi aiheuttaa toisten entsyymien katalysoimien reaktioiden tapahtumisen toisaalla.^{13b}

Eukaryoottisoluissa vapautetaan siis energiaa erilaisiin toimintoihin, joihin kuuluvat esimerkiksi fyysinen rasitus, mutta myös anaboliset reaktiot. Energian vapauttamisessa syntyy matalan energian lopputuotteina hiilidioksidia, vettä ja ammoniakkaa. Katabolian ja anabolian periaatteiden kannalta pystytään tarkastelemaan erikseen kaikkien makroravintoaineiden käsittelyä, mutta lopulta myös niiden käsittely liittyy toisiinsa, mikä nähdään soluhengityksen vaiheista (kuva 2). Hiilihydraattien aineenvaihdunnassa pilkotaan ensin hiilihydraatit monomeereiksi, muokataan glykolyysissä pyruvaatiksi, josta hiilihydraatit tulevat joko suoraan käyttöön energiaksi sitruunahappokierron ja hapettavan fosforylaation kautta tai sitten ne varastoidaan glukoneogeesissä. Myös proteiineista ja rasvoista pystytään vapauttamaan energiaa, mutta varsinkin proteiinien käyttötarkoitukset ovat ensisijaisesti anabolisten tuotteiden valmistamisessa.¹⁴



Kuva 2. Proteiinien, hiilihydraattien ja rasvojen käsittely tapahtuu soluhengityksen vaiheissa. Energian vapauttaminen ja ravintoaineiden muokkaaminen alkaa makroravintoaineiden pilkkomisella, minkä jälkeen niitä tai niiden osia voidaan edelleen käsitellä soluhengityksessä. Kaikista makroravintoaineista on mahdollista varastoida energiaa ATP:n muodossa, mutta soluhengityksessä muodostuvia tuotteita ja välituotteita voidaan käyttää myös muiden tärkeiden molekyylien rakentamiseen.¹⁴

Ravintoaineita käytetään joko sellaisenaan tai muokattuina kehon erilaisten rakenteiden, kuten kudosten ja elinten, ja niiden solujen rakennusaineina. Elimistö pystyy mukautumaan muuttuviin olosuhteisiin esimerkiksi hyödyntämällä energiantuotossa proteiineja, jos

ensisijaista energianlähdettä eli hiilihydraatteja ei ole saatavilla riittävästi. Solun makromolekyylejä valmistetaan energeettisesti edullisimmista ja sopivimmista lähteistä, mutta niiden puuttuessa lähtöaineina käytetään sitä mitä on saatavilla. Esimerkiksi välttämättömiä aminohappoja ja hivenaineita elimistö ei kuitenkaan osaa valmistaa. α -linoleenihapossa on kaksoissidos kohdassa, jonka luomiseen ihmiselimistössä ei ole sopivia entsyymejä, joten sitä on saatava ravinnosta.^{13a} Evolutiivisten syiden takia liika energia, tulipa se mistä makroravintoaineista tahansa, varastoidaan rasvana. Toisaalta mitään ei valmisteta turhaan ja entsyymaattisesti säädellyt aineenvaihduntareitit estyvät eli inhiboituvat, kun lopputuotetta on tilanteeseen nähden riittävästi.¹⁴

Aerobisissa olosuhteissa olevat eukaryoottisolut vapauttavat energiaa keskenään samalla tavalla soluhengityksen kautta: Nopein energianlähde on glukoosi $C_6H_{12}O_6$, joka pilkotaan ensin kahdeksi pyruvaattimolekyyliksi glykolyysissä. Seuraavaksi vapautuu hiilidioksidia ja jäljelle jäänyt asetyyli liittyy koentsyymi-A:han, jonka mukana energian vapauttaminen jatkuu sitruunahappokierrossa ja hapettavassa fosforylaatioissa. Tämän ketjun välivaiheissa ja varsinkin lopun fosforylaatioissa energiaa pakataan adenosiniitri-fosfaatti-molekyyleihin (ATP), joiden kautta sitä saadaan käyttöön fyysisessä rasituksessa ja anabolisissa eli rakentavissa reaktioissa.¹⁴

Vaikka glukoosi ja hiilihydraatit ovat nopein energianlähde, on niitä enemmän energiaa kuitenkin ravinnon rasvoissa. Tämän takia keho myös varastoi ylimääräisen energian rasvoina, jolloin energia on pakattuna tiiviisti. Hiilihydraatit ja proteiinit sisältävät noin 4 kcal/g energiaa, kun rasvoissa on keskimäärin 9 kcal/g energiaa.¹⁵ Kehon rasvojen vähentäminen laihdutuksessa vaatii siis myös paljon työtä, jotta niiden sisältämä energia saadaan käyttöön soluhengityksessä. Pilkkoutuminen alkaa rasvojen hajottamisesta glyseroliksi ja rasvahapoiksi, joista glyseroli päättyy soluhengitykseen jo glykolyysissä. Rasvahapot vaativat kahden hiilen pätkiksi tehtävän β -oksidation, ennen koentsyymi-A:han ja sitruunahappokiertoon liittymistä.¹⁴

Myös proteiinit päättyvät, aminohapoiksi pilkkomisen ja deaminaation jälkeen, soluhengityksen eri vaiheisiin riippuen aminohappojen rakenteista. Proteiinien aminohappoja ei ole tarkoitettu pääasialliseksi energianlähteeksi, mutta niitä voidaan muokata ja siirtää eteenpäin soluhengityksessä ja niistäkin voidaan saada energiaa. Aminohappojen muokkaus soluhengityksessä voi alkaa jo glykolyysissä, koentsyymi-A:han liittämässä tai vasta sitruunahappokierrossa.¹⁴

2.2. Haaraketjuisten aminohappojen merkitys rasvahappojen aineenvaihdunnassa

Energiansaannin ja kehonkoostumuksen, eli lihasmassan ja rasvan suhteen, yhteys on ollut tiedossa jo pitkään: Ylipainoa keräävä yksilö, joko saa ravinnosta liikaa energiaa tai ei pysty hyödyntämään sitä, jolloin ylimääräinen energia varastoituu vartaloon rasvakudoksena. Laihdutus on nimenomaan rasvakudosta polttavaa, kun ruokavalion makroravintoaineiden ja haaraketjuisten aminohappojen saanti on kohdallaan. Haaraketjuiset aminohapot (branched-chain amino acids, BCAA) ovat L-leusiini, L-isoleusiini ja L-valiini, joita saadaan ravinnon maitotuotteista, lihasta, kalasta, kananmunista, palkokasveista, pähkinöistä ja täysjyväviljatuotteista eli proteiinirikkaista lähteistä.² Donato *et. al* tekemässä kuuden viikon rottakokeessa ylimääräistä L-leusiinia ja lisäproteiinia saaneet rotat menettivät laihtuessaan enemmän rasvakudosta kuin vertailuryhmän rotat, jotka saivat tavanomaista ruokaseosta. Pelkän L-leusiinin lisääntynyt saanti ei kuitenkaan riitä lihasmassan säilyttämiseksi tai kasvattamiseksi vaan myös lisäproteiinia tarvitaan.¹⁶

Vaikka tulokset L-leusiinin saannin ja lihasmassan kasvattamisen tai säilyttämisen yhteydestä ovat joidenkin tutkimusten perusteella ristiriitaisia, on BCAA:lla, ja näistä varsinkin L-leusiinilla yhteys lihasanaboliaan. BCAA:in kuuluvat L-leusiinin lisäksi L-isoleusiini ja L-valiini. L-leusiini stimuloi lihasanaboliaa aktivoimalla mTOR-signaalointireittiä (mammalian target of rapamycin), joka aloittaa viesti-ribonukleiinihapon:n (messenger-RNA, mRNA) kääntämisen ja proteiinisynteesin. Erilaisilla ruokavalioidella, joissa pelkän L-leusiinin tai kaikkien BCAA:n määrää lisättiin merkittävästi, havaittiin kymmenien prosenttien suuruinen muutos lihaksen proteiinisynteesissä ja myös proteiinien hajotus lihaksessa väheni. Kun ruokavalioon lisätty proteiini ei sisältänyt BCAA:ta, ei proteiinisynteesissä havaittu muutoksia. Suurin osa tutkimuksesta koskee lyhytkestoisia kokeita, mutta myös pidempiä, viikkoja kestäviä, kokeita on tehty.^{17,18}

BCAA:t ja erityisesti L-leusiini säätelevät lihaskudoksessa tapahtuvan proteiinisynteesin aloitusta, joten näiden avulla lihastasapaino laihdutuksessa säilyy ja paino tippuu nimenomaan rasvakudoksen energiaa vapauttamalla. BCAA:n saannin ja rasvahappojen aineenvaihdunnan yhteys nähdään veren seerumista, sillä toisin kuin muut aminohapot, BCAA:ta ei oteta käyttöön ja hajoteta maksassa vaan ne jäävät vereen ja kulkeutuvat lihaksiin. Ylipainoisilla yksilöillä, joilla on lisääntynyt rasvakudoksen määrä, on suurempi veren BCAA-pitoisuus kuin keskiverroilla yksilöillä, mikä kertoo, ettei BCAA-kataboliaa tapahdu lihas- tai rasvakudoksessa yhtä tehokkaasti.¹⁹ Kaksoskokeilla on havaittu lisääntyneen BCAA-katabolian olevan yhteydessä rasvakudoksesta vapautettavaan energiaan ja hoikkuuteen, mikä nähdään paitsi

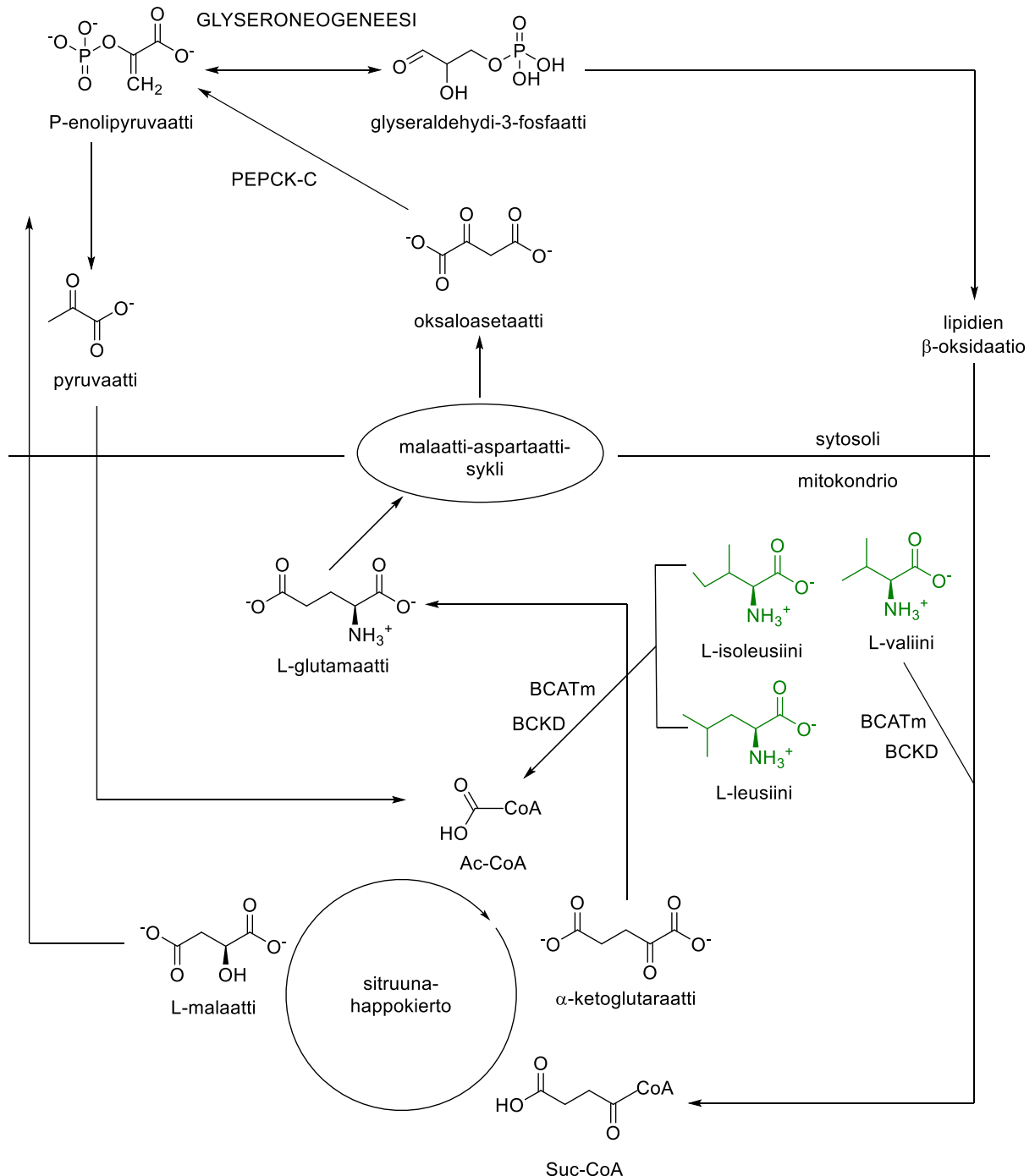
matalampana seerumin BCAA-pitoisuutena, myös kohonneena triglyseridisynteesinä. Jotta lihas pystyy käyttämään rasvahappoja energianlähteenä, on ne ensin muokattava takaisin triglyserideiksi. Tässä kaksostutkimuksessa tutkittavat eivät noudattaneet erityistä ruokavaliota, mutta heidän välillään oli suuri ero vapaa-ajan liikunnassa.²⁰

Vaikka L-leusiini on proteiinisynteesin aloittajana tärkeässä asemassa, on huomattu, että L-isoleusiini- ja L-valiininvarannot ehtyvät, ellei kaikkia kolmea BCAA:a saada tasapainoisesti. Tietenkin myös muita aminohappoja on oltava riittävästi saatavilla, jotta proteiinisynteesissä voidaan tosiaan muodostaa uusia proteiineja, jotka koostuvat muistakin aminohapoista kuin leusiinista. BCAA:n yhteys lisääntyneeseen proteiinisynteesiin ja rasvahappojen hapettumiseen on kuitenkin mekanismeiltaan vielä epäselvä. On havaittu, ettei L-leusiini yksin lisää anaboliaa vaan proteiineista erityisesti myös L-isoleusiinia ja L-valiinia tarvitaan tehokkaaseen lihasanaboliaan.²¹

BCAA:t eivät ole kuitenkaan terveyden automaattisesti palauttava ihmeaine, sillä niillä on myös yhteys insuliiniresistenssiin. Tätäkään mekanismia ei tunneta tarkkaan, mutta lopulta BCAA:t joko saavat insuliinin erityksen laskemaan proteiinisynteesiä aktivoivan mTOR-signalloinnin välityksellä tai sitten rasvojen muuttuessa ensisijaiseksi energianlähteeksi hiilihydraattien sijaan, vereen jää paljon glukoosia.²²

Kainulainen, Hulmi ja Kujala ehdottavat kuvan 3 mukaista aineenvaihduntareittiä, yksilöille, joilla on hyvä aerobinen kapasiteetti. Kuvasta nähdään BCAA-aineenvaihdunnan yhteys rasvahappojen lisääntyneeseen hapettumiseen, sitruunahappokiertoon ja glyseroneogeneesiin eli rasvojen uudelleenmuodostukseen. BCAA:t yhdistettynä fyysiseen aktiivisuuteen ja/tai energialtaan rajoitettuun ruokavalioon voivat olla tämän aineenvaihduntareitin kautta avuksi lihavuuden ja sitä seuraavien metabolisten sairauksien hillinnässä. Kuvassa haaraketjuiset aminohapot eli L-leusiini, L-isoleusiini ja L-valiini ensin deaminoidaan ja dekarboksyloidaan, minkä jälkeen ne liitetään koentsyymien avulla sitruunahappokiertoon asetyyli- ja sukkinyylikoentsyymi-A:na (Ac-CoA, Suc-CoA). Termodynamiikan mukaan sitruunahappokierrosta on poistettava jotakin, kun siihen tuodaan ulkopuolelta uusia metaboliitteja lisää: kvantitatiivisissa kokeissa on havaittu α -ketoglutaraaatin pitoisuuden laskevan ja muiden metaboliittien, erityisesti malaatin, pitoisuuden nousevan ruokavaliion BCAA-määrän noustessa. α -ketoglutaraaatti muutetaan Kainulaisen ryhmän hypoteesin perusteella L-glutamaatiksi ja kuljetetaan malaatti-aspartaatti-kierrossa sytosoliin oksaloasetaatiksi, mikä johtaa lopulta lipidien synteesiin, niiden β -oksidointiin ja liittämiseen

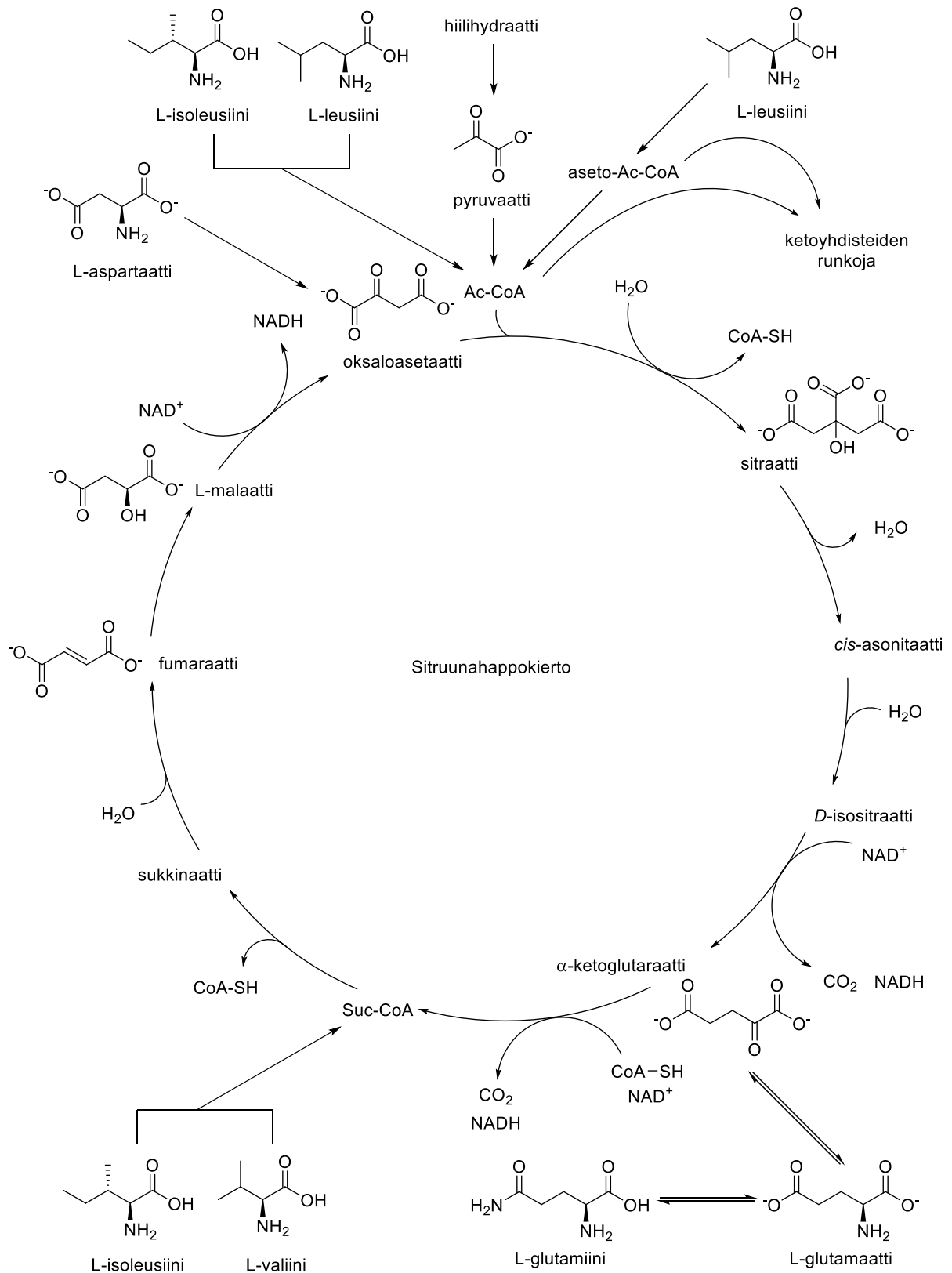
taas sitruunahappokiertoon energianlähteeksi. Näiden pitoisuuksia muutoksien seuraaminen voi olla avainasemassa BCAA:n ja lisääntyneen rasvahappoaineenvaihdunnan yhteyden ymmärtämisessä, mutta jo pelkästään veren seerumin BCAA-pitoisuuksien seuraaminen kertoo metabolisesta terveydentilasta.²



Kuva 3. BCAA:n ja rasvahappoaineenvaihdunnan yhteys sitruunahappokierron ja glyseroneogeneesin välityksellä. Osa väli- ja sivutuotteista on jätetty selkeyden vuoksi pois. Glyseroneogeneesiin päätyvän reitin voidaan ajatella alkavan BCAA:sta (vihreällä).²

BCAA:n hajotusta energian vapauttamiseksi tapahtuu erityisesti fyysisen harjoittelun aikana. BCAA-katabolian deaminaation aloittavaa mitokondriaalista BCAA-transferaasientsyymiä (BCATm-entsyymi) inhiboimalla on havaittu, ettei ilman ravinnon BCAA:ta pystytä harjoittelemaan. BCAA:sta tuotetaan Ac-CoA:ta ja Suc-CoA:ta sitruunahappokiertoon, mutta myös lipideistä saadaan Suc-CoA:ta. Kehon rasvahapot saadaan sitruunahappokierron käyttöön lipideiksi, glyseroneogeneesin avulla. Kainulainen *et. al* ovat esittäneet, että lihas saa aerobisessa liikunnassa triglyseridejä käyttöönsä eniten nimenomaan glyseroneogeneesin avulla. Glyseroneogeneesi alkaa fosfoenolipyruvaatin valmistamisesta pyruvaatista, laktaatista tai joistakin aminohapoista, tässä hypoteesissa oksaloasetaatista, ja sitä säädelään fosfoenolipyruvaattikarboksikinaasientsyymillä (PEPCK-C-entsyymi). PEPCK-C säätelee tiedetysti rasvakudoksen metaboliaa ja sillä on yhteys rasva-aineenvaihdunnan sairauksiin, mutta sillä voi olla vaikutusta myös lihaksen rasvojen aineenvaihduntaan. Paaston tai rajoitetun energian ruokavaliassa rasvakudoksen vapaita rasvahappoja uudelleenesteröidään triglyserideiksi glyseroneogeneesissä, mikä vaatii glyseroli-3-fosfaatin syntetisointia PEPCK-C-entsyymien avulla.²³ Yhteys kehon rasvojen käytöllä energianlähteenä ja BCAA:n käytöllä näkyy PEPCK-C-entsyymien kohonneena pitoisuutena. Suuri PEPCK-C:n pitoisuus lihaksessa kertoo lisääntyneestä rasvojen hapettumisesta, mikä on nähty hyvänä aerobisena kapasiteettina ja maksimihapenottokykynä, hoikkuutena, aktiivisuutena, pitempänä elinikänä ja alhaisena viskeraalisena, eli sisäelimiä ympäröivänä rasvana.^{2,24}

Kuvassa 4 on esitetty sitruunahappokierto, jossa nähdään erikoistyössä käsiteltyjen metaboliittien rakenteet. BCAA:t voivat siis liittyä sitruunahappokiertoon liittymällä Ac-CoA:han kierron alussa, missä pyruvaattikin liittyy kiertoon, tai Suc-CoA:han kierron puolivälissä. Kuten Kainulainen *et. al* ovat huomanneet, malaatin pitoisuus runsaassa BCAA:n saannissa ja fyysisessä rasituksessa nousee, kun siitä muodostuvaa oksaloasetattia poistetaan kierrosta. Koska Suc-CoA-pitoisuus nousee L-isooleusiinin ja varsinkin L-valiinin nostaessa sen konsentraatiota, laskee sitä edeltävän α -ketoglutaraatin pitoisuus, kun sitä muutetaan enemmän L-glutamaatiksi. Lisääntyneessä BCAA:n kataboliassa eli fyysisessä rasituksessa, malaatti-aspartaattiketju saa uuden merkityksen, kun L-glutamaatti reagoi oksaloasetatin kanssa muodostaen ensin L-aspartaattia. L-aspartaatti reagoi sytosolisen α -ketoglutaraatin kanssa ja muodostaa sytosolista oksaloasetattia ja edelleen lopulta lipidejä. α -ketoglutaraattia tarvitaan siis toisaalla kuin sitruunahappokierrossa.²



Kuva 4. Sitruunahappokierto ja kaikki erikoistyöhön liittyvät metaboliitit.¹³

Ruokavalion BCAA:t ja rasvat lisäävät energian vapauttamista kehon rasvakudoksesta, missä joko lisätään lipidien glyseroneogeneesiä energiaa kuluttavasti tai inhiboidaan hiilihydraattien

käyttöä energianlähteenä. Metaboliseen terveyteen ja hyvään aerobiseen kapasiteettiin pystytään tällä hetkellä yhdistämään ja käyttämään indikaattoreina veren seerumin matalaa BCAA-pitoisuutta, lihasten noussutta rasvan määrää, pientä viskeraalisen rasvan määrää ja korkeaa PEPCK-C-entsyymien pitoisuutta. BCAA:n runsas saanti on siis yhteydessä hyvään kehonkoostumuksen, fyysiseen suorituskykyyn, lihaksen ominaisuuksiin, glukoosin imeytymiseen ja rasvahappojen aineenvaihduntaan, mutta näiden välinen mekanistiikka on vielä selvittämättä.²

3 Metaboliittianalyysi biologisesta näytteestä

Metabolomiikka on metaboliittien tunnistamista ja kvantitointia. Tutkimus on joko kohdentamatonta suurien linjojen ja niin kutsuttujen sormenjälkien vertailua tai kohdennettua tutkimusta, jossa keskitytään esimerkiksi tiettyyn samankaltaisten metaboliittien kokonaisuuteen tai tiettyä tehtäväkokonaisuutta toimittaviin metaboliitteihin.³ Kvantitoitavat metaboliitit voivat olla solun sisäisiä tai jonkin elimistön nesteen kuten seerumin tai urean sisältämiä molekyylejä.²⁵ Tutkimuksen kohteena ovat usein primäärisiksi metaboliiteiksi kutsutut kasvuun, kehitykseen ja lisääntymiseen liittyvät metaboliitit, tai sekundääriset metaboliitit, jotka osallistuvat muihin kuin suoraan elämää ylläpitäviin reaktioihin, kuten puolustusjärjestelmän ylläpitoon.⁶ Metabolomiikan tutkimus voidaan siis jakaa lukemattomiin osa-alueisiin ja tutkimuksen alkuvaiheessa tärkeää onkin tehdä jonkinlainen raja. NykYTEKNIKALLA tutkitaan tarpeen mukaan jopa satoja metaboliitteja yhdellä analyysillä.¹⁰

3.1. Metabolomiikan tarjoama informaatio

Metaboliittien analyysiä voidaan pitää genomiikkaan ja proteomiikkaan verrattuna puolueettomampana metodina. Geenisekvensien analysoiminen ei kerro koko totuutta geenien toiminnasta tai aktiivisuudesta, mutta metaboliitit sen sijaan ilmentävät solun säätelyprosesseja, mikä nähdään metaboliatuotteina eli metaboliitteina.²⁶ Muutokset metaboliittipitoisuuksissa ovat äärimmäinen vaste ärsytykseen.

Metabolomiikan voi jakaa kohdentamattomaan ja kohdennettuun tutkimukseen, joista kohdentamattomassa metabolomiikassa analysoidaan kaikki havaittavat metaboliitit, kun kohdennetussa analysoitavien yhdisteiden joukko on rajattu.²⁷ Kohdennetussa metabolomiikassa rajattu metaboliittien joukko on usein esimerkiksi tiettyyn aineenvaihduntareittiin liittyvät tai hypoteettisesti liittyvät metaboliitit. Tarkoituksena voi olla osoittaa yhden ravinnon hivenaineen puutoksen ja sairauden yhteys, proteiinin saannin ja

lihaskasvun yhteys tai etsiä syöpää osoittavia biologisia tunnusmerkkejä.^{2,5,7} Kohdentamattomassa metabolomiikassa, jota kutsutaan myös metaboliittien profiloinniksi,²⁶ tietämystä aineenvaihduntareiteistä tarvitaan vähemmän sillä tarkoituksena on vertailla saadun informaation tunnuspiirteitä näytteiden välillä ja mahdollisesti jopa löytää uusia metaboliareittejä tai yhdistää aineenvaihduntareittejä toisiinsa.²⁸ Kohdentamattoman metabolomiikan avulla voidaan esimerkiksi tunnistaa biologisia merkkiaineita, joista yksittäisten, mutta yleensä useamman poikkeava näkyminen profiilissa, kertoo sairaudesta. Merkkiaineita etsitään vertailemalla terveen ja sairaan yksilön metaboliittiprofiileja. Toisaalta merkkiaine voi löytyä myös kohdennetun metabolomiikan tekniikoilla.⁷ Kohdentamattomassa metabolomiikassa tutkimuksen kannalta ei ole olennaista tietää yksittäisten metaboliittien ominaisuuksia, mutta kohdennetussa tutkimuksessa siitä on paljon hyötyä analyysimenetelmän optimoinnin kannalta.²⁸

Koska metaboliittien pitoisuudet voivat olla hyvin alhaisia ja lisäksi näytemäärät pieniä, vaatii metabolomiikka analyttiseltä menetelmältä hyvää herkkyyttä, erotuskykyä ja toistettavuutta. Vaikka useita laitteita voidaan harkita metabolomiikan tutkimukseen, tällä hetkellä käyttökelpoisimmat tekniikat ovat NMR-spektroskopia ja massaspektrometria, jotka yhdistetään usein kromatografiseen laitteistoon. Kohdennetussa metabolomiikassa hypoteesit ja kysymyksenasettelu vaativat metaboliittien kvantitoimista ja kohdentamaton metabolomiikka tuottaa laajemman katsauksen metaboliittiprofiilista. Silti molemmissa tapauksissa käytetään samoja analyttisiä työkaluja.²⁹

Ennen kiinnostavien metaboliittien tutkimusta metaboliitit on paikannettava, jos niiden sijainti ja jakautuminen yksilössä ei ole tiedossa. Kuvantamistekniikoilla voidaan paikantaa kiinnostuksen kohteena olevia metaboliitteja esimerkiksi aivoista. Kuvantamista tehdään NMR-spektroskopisesti ja massaspektrometrisesti käyttäen tekniikoita, jotka saavat näytteen analyytit ionisoitumaan suoraan näytteen pinnalta. NMR-tekniikoita herkempiä ovat käytössä olevat massaspektrometrit, joissa voi olla ionilähteenä esimerkiksi matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatiolähde (matrix assisted laser desorption ionization, MALDI) tai nanopartikkeleilla ionisoiva massaspektrometri (NIMS, nanostructure-initiator mass spectrometry). Kuvantamisessa poikkileikatusta näytteestä analysoidaan jokainen piste, ja jokaiselle pisteelle saadaan massaspekttri. Spektreistä voidaan etsiä tietyn metaboliitin signaalia ja havaittujen runsauksien perusteella luodaan pitoisuuksien eroista kertova kuva. Kuvantamista voidaan hyödyntää kohdentamattoman metabolomiikan tutkimuksessa jos käytössä on myös esimerkiksi histologista informaatiota tai muuta taustatietoa.

Kohdentamattomassa kuvantamisessa voidaan löytää tutkitulta erilaiselta alueelta esimerkiksi biologisia merkkiaineita. Saadun kuvan perusteella näytteenotto voidaan rajata tietylle alueelle, kudoksen- tai solutyypin.^{10,29}

Kuvantamisen jälkeen voidaan siis jatkaa kohdentamattoman metabolomiikan tekniikoilla, jotka antavat lisätietoa metaboliitin runsauden syistä. Tutkimuksissa voi paljastua esimerkiksi muita metaboliitteja, joiden runsaus liittyy kuvantamisessa seuratun metaboliitin pitoisuuteen. Lisätietoja monimutkaisemmista aineenvaihduntareiteistä ja metaboliittien kulkeutumisesta saadaan fluksomiikalla (flux, virtaus). Fluksomiikka kertoo dynamisemmin aineenvaihdunnasta eli esimerkiksi ravinnon koostumuksen vaikutuksesta fysiologisiin prosesseihin molekyylitasolla.³⁰ Virtauksiin keskittyvää metabolomiikkaa voidaan tehdä esimerkiksi antamalla kasvatetuille soluille niiden entsyymeihin vaikuttava substraattipulssi. Substraattipulssin aiheuttamat pitoisuusmuutokset kvantitoidaan ja niille lasketaan reaktionopeudet eli tarkkaillaan substraatin kulutusta ja sen aiheuttamaa muiden metaboliittien tuottoa eli reaktiokinetiikkaa. Koska yksittäisiä metaboliitteja syntyy useiden reaktioreittien tuotteina ja metaboliitit päätyvät myös lähtöaineina eri aineenvaihduntareitteihin, on reaktionopeuksien laskeminen tietylle yksittäiselle reitille haastavaa. Kokeilla, joissa organismin tai solun käytettävissä olevia metaboliitteja rajoitetaan, saadaan tietoa myös solun toimintaa inhiboivista tai rajoittavista aineista. Esimerkiksi R. Takors *et. al* tutkimuksessa tarkkailtiin *E. coli* -bakteerin metaboliassa tapahtuvia muutoksia ensin rajoittamalla bakteerin glukoosin saantia ja sitten antamalla sille glukoosipulssi. Toinen koe tehtiin ensin rajoittamalla glyserolin saantia ja sitten antamalla glyserolipulssi. Kokeissa huomattiin kirjallisuuden perusteoksista löytyvää tietoa tukevia konsentraation muutoksia, mutta myös vielä tuntemattomia ilmiöitä.³¹

Metaboliittien kokonaisuus esimerkiksi ihmiskehossa, sen soluissa, nesteissä ja kudoksissa, on hyvin laaja. Metaboliitit ovat kemiallisilta ominaisuuksiltaan hyvin erilaisia, eikä tällä hetkellä uskota löytyvän yhtä menetelmää, jolla pystyttäisiin tekemään kokonaisvaltainen metaboliittinen analyysi biologisesta näytteestä. Kokonaisvaltainen analyysi ei todennäköisesti tuota aineenvaihdunnasta järkevästi tulkittavaa informaatiota, eikä näin palvele mitään tarkoitusta tai pysty vastaamaan hypoteesin kysymyksiin. Useita tekniikoita yhdistelemällä saadaan kuitenkin täydennettyä vajavaista informaatiota.³

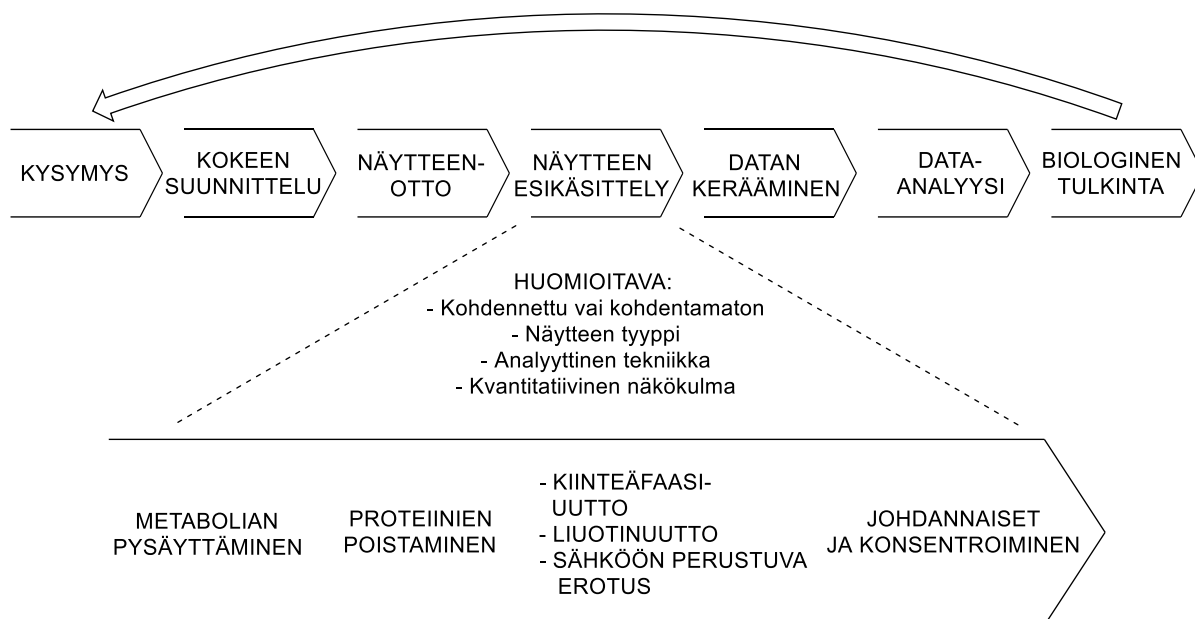
Metaboliittianalyysi valitaan siis tutkimusmenetelmäksi, kun halutaan tietoa aineenvaihduntareittien säätelystä, lääkkeiden vaikutuksista, mutta toisaalta myös

geenitekijöiden vaikutuksesta fenotyyppiin. Metabolomiikan tarjoama informaatio on kohdennetun metabolomiikan tapauksessa kvantitoivaa ja laboratorioden välillä helpommin vertailtavaa, mutta tavallisemmin informaatiota saadaan kontrollinäytteen ja ärsykkeen tai muun altistuksen saaneen näytteen välisistä muutoksista, sillä tavanomaisessa tilassa olevasta näytteestä ei sellaisenaan saada kiinnostavaa tietoa. Vaste voi syntyä ympäristötekijöiden vaikutuksesta, mutaatioista, huumeista tai lääkeaineista, myrkyistä, ravinnosta, syövästä, diabeteksestä, muusta sairaudesta, vanhenemisesta tai kasvusta. Signaalien muutoksia vertailemalla ja kvantitoimalla metaboliittien pitoisuuksia ymmärretään sairauksien syntyä ja solujen reaktioiden säätelymekanismeja, mutta mahdollisia sovelluskohteita on varmasti vielä selvittämättä.³

Kysymyksenasettelu ja valittu analysointitekniikka vaikuttavat ennen analysointia tapahtuvaan näytteenkäsittelyyn. Käytetty tekniikka ja informaation muoto ja määrä taas vaikuttavat informaation käsittelyssä käytettyihin laskennallisiin tekniikoihin. Kun informaatio on helpommin tulkittavassa muodossa, palataan biologisten kysymysten ääreen ja mahdollisesti palataan vielä muokkaamaan tutkimussuunnitelmaa ja koko tutkimusta.^{3,10}

3.2. Koejärjestely ja biologisen näytteen esikäsittely

Riippumatta metaboliittianalyysin tavoitteesta ja käytettävästä analyysimenetelmästä, näytteenkäsittely on otettava huomioon jokaisessa analyysiin johtavassa vaiheessa, analyysitekniikka ja tutkimuksen tarkoitus huomioiden. Yksikään analyysiin liittyvä vaihe ei ole yhdentekevä ja näytteenkäsittely onkin työnkulussa eniten virhettä tuottava vaihe.²⁸ Metaboliittien pitoisuuksissa tapahtuu muutoksia niin elävässä organismissa kuin myös eristetyssä näytteessä, joten todellisuutta vastaavien tulosten saamiseksi olosuhteet on säädettävä ja mahdollisuuksien mukaan pidettävä huipussaan koko työnkulun ajan. Tämä tarkoittaa tarkkaa tutkimusasetelman noudattamista ennen näytteenottoa, näytteenoton optimointia lämpötilan, pH:n ja nopeuden suhteen ja näiden olosuhteiden mahdollisimman hyvää ylläpitoa kaiken näytteenkäsittelyn ja mielellään myös analyysin ajan.^{7,32} Kuvassa 5 on esitetty metaboliittianalyysin vaiheet kysymyksenasettelusta näytteenkäsittelyyn, analyysiin ja informaation käsittelyyn. Oikeiden kysymysten asettamisen ja analyysistrategian jälkeen, tärkein vaihe on näytteenkäsittely ja sen kaikki vaiheet. Näytteen esikäsittelyyn kuuluu aineenvaihduksen pysäyttämisen jälkeen makromolekyylien poistaminen, erilaisia uuttoja tai muuten metaboliitteja edelleen erottelevia tekniikoita ja useissa tapauksissa johdannaisten valmistamista ja näytteen väkevöimistä eli konsentroimista.²⁸



Kuva 5. Metaboliittianalyysin työnkulun periaate.²⁸

Aineenvaihdunnan tutkimusta voidaan tehdä ihmisistä, jyrksijöistä ja muista nisäkkäistä, bakteereista ja kasveista – organismeista, joilla on aineenvaihduntaa. Näytteenkäsittely poikkeaa eri tapauksien välillä suuresti ja esimerkiksi kasvukunnan lajeissa on paljon eri solutyyppisiä, joiden hajottaminen analyysiä varten on haastavaa.²⁸ Tässä tutkielmassa keskitytään nisäkkäiden metabolomiikkaan, sen tarjoamaan informaatioon ja ongelmakohtiin. Tutkimusasetelmasta riippuen, aineenvaihdunnan tutkimusta tehdään usein jyrksijöillä, jolloin tulokset voidaan yleistää lajirajojen yli ja koskemaan myös ihmisiä. Esimerkiksi Donato *et. al*¹⁶ tutkimuksessa, koe-eläimet jaettiin kahteen ryhmään, joilla oli erilainen ruokavalio L-leusiinin suhteen ja tarkoituksena oli tutkia ruokavalion vaikutusta kehonkoostumukseen. Kivelä *et. al*³³ tutkimuksessa taas vertailtiin tutkimusta varten jalostettujen korkean juoksuvoimien (HCR, high capacity runners) ja matalan juoksuvoimien (LCR, low capacity runners) rottia ja näiden eroja metabolisen terveyden suhteen. Metabolomiikka on siis yleensä vertailevaa tutkimusta, jossa koe-eläimet tai henkilöt saavat esimerkiksi erilaista ruokaa tai ovat joko terveitä tai sairaita. Koejärjestelyä on helpompaa säätää valvotuissa olosuhteissa koe-eläimillä, kuin valita vastaaviin kokeisiin ihmisiä. Toisaalta ihmisistä otetuilla näytteillä ja koehenkilöitä käyttämällä saadaan toisenlaisiin tapauksiin sopivaa informaatiota, jos tutkitaan esimerkiksi ihmisen iän tai jonkin lääkkeen vaikutusta aineenvaihdunnassa. Toisaalta juuri esimerkiksi ikä tai sukupuoli saattaa tuoda ei-toivotun muuttujan tutkimukseen, mikä vaikeuttaa päätelmien tekemistä.⁷ Vaihtoehtona solujen erottelemiselle on solulinjan kasvattaminen.¹⁰

Metaboliittien analyysiä voi tehdä monenlaisista näytteistä. Nisäkkäiden tapauksessa tavallisimpia ovat veri-, seerumi-, plasma-, urea- tai erilaiset solunäytteet, joiden näytteenkäsittely ja niihin liittyvät hypoteesit poikkeavat toisistaan. Kaikessa näytteenotossa kriittisintä on metabolian pikainen pysäyttäminen, mikä tehdään usein nestemäisellä tyypellä, suoloja sisältävällä -40 (-50) °C metanoliliuoksella tai happokäsittelyllä. Menetelmien tehosta on eriäviä mielipiteitä, mutta aineenvaihdunta on pysäytettävä alle sekunnissa.³⁴ Käsittely pysäyttää mahdollisen entsyymitoiminnan ja sen tarkoituksena on pitää metaboliittien konsentraatiot juuri sellaisina kuin ne näytteenottohetkellä ovat, sillä metaboliitit alkavat nopeasti muuttua pysyvämmiksi matalan energian metaboliiteiksi, mikä vääristää tuloksia. Näytteenoton ja aineenvaihdunnan pysäyttämisen jälkeen näytettä saatetaan säilyttää ennen muuta käsittelyä. Myös tässä vaiheessa tulee olla yhdenmukainen ja säilyttää näytteitä keskenään samanlaisissa olosuhteissa, jotta tulokset ovat vertailukelpoisia. Ihanteellista olisi myös tehdä analyysi mahdollisimman pian ja yhtä pitkän ajan jälkeen näytteenotosta ja metabolian pysäyttämisestä.⁷

Ihmisen terveydentilan tutkimusta tehdään monissa tapauksissa verestä. Verinäyte annetaan usein paastoamisen jälkeen, jotta ruokavalion ja verensokerin määrän vaikutusta voidaan vähentää tutkimuksissa. Näytteenoton jälkeen veri alkaa hyytyä ja tähän kuluva aika vaikuttaa metaboliittiprofiiliin. Hyytymisen nopeuteen ja lämpötilaan vaikuttamalla tulokset muuttuvat, mikä on huomioitava tulosten tarkastelussa. Veri kerätään näyteputkiin, joista voi irrota yhdisteitä verinäytteeseen, mikä jälleen hankaloittaa metaboliittipitoisuuksien määrittystä ja metaboliittien havaitsemista. Veren plasman tutkimuksessa pitäisi huomioida siihen lisättävän hyytymisenestoaineen vaikutus, ja kuten muidenkin näytteiden tapauksissa, myös säilytysolosuhteet ja -aika. Verinäytteen tapauksessa jäädytys tehdään jopa -80 °C-asteeseen, jolloin aineenvaihdunta pysähtyy ja tasapainotilat jäävät ennalleen. Tutkimuksissa on onneksi huomattu, ettei jäädyttämisellä ja uudelleen sulattamisella ole suurta vaikutusta metaboliittipitoisuuksiin. Muutoksia kuitenkin tapahtuu, jolloin luotettavuus heikkenee eli jäädytyksen toistaminen kannattaa pitää minimissä.³⁰

Näytteenoton jälkeen, käsittely aloitetaan analyysiä häiritsevien tausta-aineiden erottamisella, mikä tehdään sekä kohdentamattoman että kohdennetun metabolomiikan tapauksissa. Samassa vaiheessa tehdään myös näytteen mahdollinen väkeväminen jos tutkittavien metaboliittien pitoisuudet ovat hyvin alhaisia. Metabolomiikassa häiritsevinä tausta-aineina pidetään lähinnä suoloja, proteiineja ja peptidejä. Tässä vaiheessa voidaan eristää myös tutkimuksen kannalta epäolennaiset metaboliittien luokat. Näytteenkäsittely kohdentamattomassa ja kohdennetussa

metabolomiikassa on tavoitteiltaan melko erilaista, vaikka molemmissa vaaditaan omanlaista tarkkuutta: Kohdentamattomassa metabolomiikassa näytteenkäsittelyä tehdään mahdollisimman vähän, jotta analysoitavaa materiaalia on mahdollisimman paljon ja ominaisuuksiltaan erilaisia metaboliitteja kattavasti. Samalla pyritään tekemään käsittely helposti toistettavalla tavalla.²⁷ Kohdennettua metaboliittianalyysiä varten tehdään enemmän näytteenkäsittelyn optimointia, koska analyysin kohteena on rajattu metaboliittien joukko, joilla on tietyt ominaisuudet. Myös käytettävä analyysitekniikka asettaa näytteenkäsittelylle vaatimuksia, sillä kaikki tekniikat eivät havaitse analyyttejä yhtä herkästi.²⁸

Näytteenkäsittelyn etenemiseen vaikuttaa tietenkin itse biologinen näyte. Tavoitekonsentraatioiden määrittämistä varten täytyy huomioida näytteen määrä, jonka on oltava riittävän suuri, kun pyritään havaitsemaan tai kvantitoimaan hyvin pieniä konsentraatioita, jotka voivat olla pikomoolien luokkaa. Plasman lipidien määrittämiseen riittää 10-30 µl näytettä, mutta sen D-vitamiiniaineenvaihduntaan liittyvien metaboliittien pitoisuuksia varten plasmaa tarvitaan jopa 250 µl.²⁷ Vaikka ensimmäisenä on aina tarkoitus eristää näytteestä proteiinit, tehdään se eri tavalla kun kyseessä on urea- tai solunäyte, sillä niiden proteiinikoostumukset ovat erilaiset. Solunäytteissä on ureaan verrattuna paljon enemmän proteiineja, jotka on eristettävä ja pestävä huolellisesti pois. Urea vaatii vähemmän käsittelyä. Lisäksi kudoksenäyte vaatii ennen metaboliittien eristämistä homogenisointia eli käytännössä esimerkiksi jäädyneen lihaskudoksen hienontamista morttelilla. Tavallisin proteiinien eristämistekniikka on joka tapauksessa niiden saostaminen johonkin orgaaniseen liuottimeen, joista metanoli, etanoli tai näiden seos auttaa säilyttämään metaboliitit kattavasti, vaikka asetonitriili ja asetoni saostavatkin proteiinit tehokkaammin. Saostuneet proteiinit poistetaan sentrifugoimalla tai käyttämällä membraanisuodatinta.^{27,28}

Proteiinien saostamisen jälkeen näytteenkäsittely muuttuu spesifimmäksi, sillä seuraavat näytteenkäsittelyn vaiheet rajaavat metaboliittien joukkoa pienemmäksi. Tavallisimmat erotusmenetelmät ovat kiinteäfaasiuutto, nestefaasiuutto ja sähköä hyödyntävät erotustekniikat. Nestefaasi- tai neste-neste-uutossa metaboliitit uutetaan 4 °C orgaaniseen ja vesifaasiin, joista yhdisteet analysoidaan erikseen.³⁴ Tässä pääasiallisesti lipidit uutetaan orgaaniseen faasiin, joka voi olla dikloorimetaania, metyyli-*tert*-butyylietteriä tai kloroformia. Lipidit ja muut metaboliitit päädytään siis tavallisesti erottamaan esikäsittelymenetelmien hyödyntämien poolisuuserojen takia ja metabolomiikassa on oma alalajinsa lipidien tutkimukselle eli lipidomiikalle. Kohdentamattomassa metabolomiikassa tämän erotuksen jälkeen voidaan jo valmistaa mahdolliset johdannaiset ja tehdä näytteen konsentroiminen nestettä haihduttamalla,

näyte uudelleen liuottamalla ja siirtyä analysoimaan näytettä.³⁴ Kohdennetussa metabolomiikassa yksi erotusvaihe ei riitä, sillä vesifaasiin jää jonkin verran orgaaniseen faasiin liukoisia yhdisteitä. Siksi neste-nesteuuttoja tehdään useammalla kuin yhdellä orgaanisella liuottimella, jotta erilaiset orgaaniset yhdisteet saadaan puhdistettua vesifaasista pois. Uuton yhteydessä näyte sentrifugoidaan, jotta faasit saadaan erilleen.^{27,28}

Kiinteäfaasiuutossa hyödynnetään imukykyisiä yhdisteitä, joiden avulla saavutetaan selektiivisempi erotus kuin neste-nesteuutossa, joten tämä erotusmenetelmä sopii paremmin kohdennetun metabolomiikan näytteiden käsittelyyn. Imukykyiset sorbentit ovat tuttuja LC-kolonnien materiaaleista: ne voivat olla käänteisfaasimateriaaleja ja sisältää fenyylejä, ionivaihtomateriaaleja, joilla on aminoryhmiä tai jopa HILIC-materiaaleja. Neste-nestefaasiuuton automointi on toistaiseksi hankalaa, mutta kiinteäfaasiuutossa automointia on käytössä paljon enemmän, joten näytteiden epästabiilien yhdisteiden ja prosessin nopeuttamisen kannalta neste-nestefaasiuuton käyttöä pyritään minimoimaan. Erottamisen arviointia tehdään proteiinien erotustehokkuuden, erotettujen metaboliittien kattavuuden ja erotuksen tarkkuuden perusteella.²⁸

Vaikka metaboliittianalysissä on useita vaiheita ennen biologisen informaation tulkitsemista, vaikuttaa näytteenkäsittely tuloksiin eniten. Tärkeintä kaikessa näytteenkäsittelyssä on yhdenmukaisuus, tasalaatuisuus ja nopeus. Kohdennetussa metabolomiikassa käsittelyn optimointi on tärkeämpää etenkin jos tutkittavien metaboliittien pitoisuudet ovat hyvin alhaisia. Kohdentamattomassa metabolomiikassa korostuvat nopeus ja tehokkuus.

3.3. Ravitsemusmetabolomiikka

Ravitsemusmetabolomiikka tuo tukevaa informaatiota esimerkiksi ruokavalion vaikutuksista metaboliseen terveyteen. Viime vuosien muotidieetit alkavat usein yksilön hyvän subjektiivisen kokemuksen perusteella saada kannattajia, vaikka tieteellinen näyttö on hyvin vajavaista. Todellisia eroja aineenvaihdunnassa kartoitetaan mittaamalla ja vertailemalla faktoja, kuten terveyden indikaattorina tunnettua verenpainetta, kehonpainoa tai yksityiskohtaisemmin yksittäisiä metaboliitteja.³⁰

Ravitsemuksellisesti on kiinnostavaa tutkia muun muassa elintärkeiksi tai välttämättömiksi kutsuttujen ravintoaineiden saannin vaikutuksia. Metabolomiikka osoittaa, miksi nämä ravintoaineet todella ovat välttämättömiä eli mihin aineenvaihduntareaktioihin ne osallistuvat tai mitä reittejä ne rajoittavat. Haastavaa ravitsemuksellisesta metaboliittitutkimuksesta tekee ravintoaineiden vaikuttaminen ja pilkkoutuminen useassa kohteessa ja erilaisilla

mekanismeilla, mikä on tavallista metaboliittien kulkeutumisessa. Niiden tutkimus ei onnistu farmakologisia menetelmiä muistuttavilla tekniikoilla, joissa ajatellaan yhdisteen päätyvän johonkin kohteeseen ja vuorovaikuttavan vain siellä, muuttuen yhdeksi lopputuotteeksi. Yksittäisillä ravintoaineilla ei ole myöskään lääkeaineille tyypillisiä voimakkaita ja nopeita vaikutuksia, sillä ravintoaineen puute havaitaan ehkä vasta kuukausien kuluttua. Keho on monimutkainen kokonaisuus ja metabolia koostuu lukuisista pienemmistä toistensa kanssa vuorovaikuttavista kokonaisuuksista. Hetkellinen vitamiinin puutos ei nosta kuolleisuuden todennäköisyyttä ja keho osaa myös reagoida ravitsemuksen muutoksiin.³⁰

Toisaalta metabolomiikka voisi tarjota myös selkeämpää ravintoaineiden vaikutusten karakterisointia, varsinkin jos tarjolla on kattavasti metaboliitteja mittaava menetelmä, josta käy ilmi millä kaikilla tavoilla ja reiteillä ravintoaine vaikuttaa. Ravitsemuksen metaboliittien tutkimus on siis tavallisesti joko puutostilan tai lisäravintoaineiden saannin vaikutusten kartoittamista. Myös samankaltaisten ruokien kuten kokojyvävehnäjäuhon ja käsitellympien valkoisten vehnäjäuhon käytön vaikutusta yksilössä voidaan tarkkailla. Metaboliittipitoisuuksiin ja suhteisiin voidaan mahdollisesti liittää ikään, sukupuoleen tai fysiologiseen tilaan liittyviä tekijöitä, jotka voitaisiin analyysissä tunnistaa ja siten arvioida muita ravitsemukselliseen tilaan liittyviä vaikutuksia paremmin.³⁰

Ravitsemuksen vaikutusten tutkiminen ei ole yksinkertaista. Esimerkiksi jauhojen vaihtamisen vaikutusten analysoimisesta tekee vaikeaa muu ruokavalio, jonka muutoksia kokeen aikana tietenkin pyritään minimoimaan. Metaboliaan voi vaikuttaa päivän aikana moni muukin tekijä kuin pelkkä ruokavalio. Lopulta eristettyyn näytteeseen ja sen metaboliittipitoisuuksiin vaikuttavat vielä näytteen käsittelyn vaiheet ja lopulta myös laitteisto ja senhetkiset mittaolosuhteet. Raan informaation saaminen metaboliittimittauksesta vaatii siis ravitsemusmetabolomiikassakin monen tekijän huomioon ottamista. Saatavalla pitoisuustietoudella voidaan ymmärtää miksi tiettyjä metaboliitteja on kehossa juuri olemassa oleva määrä. Se kertoo paitsi metaboliittien tarpeesta eri puolella kehoa, myös kehon nesteiden kuten veren, seerumin ja urean vuorovaikutuksesta elimien kanssa eli avartaa tietämystä ihmiskehosta kokonaisuutena.³⁰

4 Massaspektrometria

Kattavan metaboliittianalyysin toteuttaminen tarjolla olevilla analyttisillä menetelmillä on haastavaa, mutta massaspektrometria on noussut siinä käytetyimmäksi työkaluksi.⁷

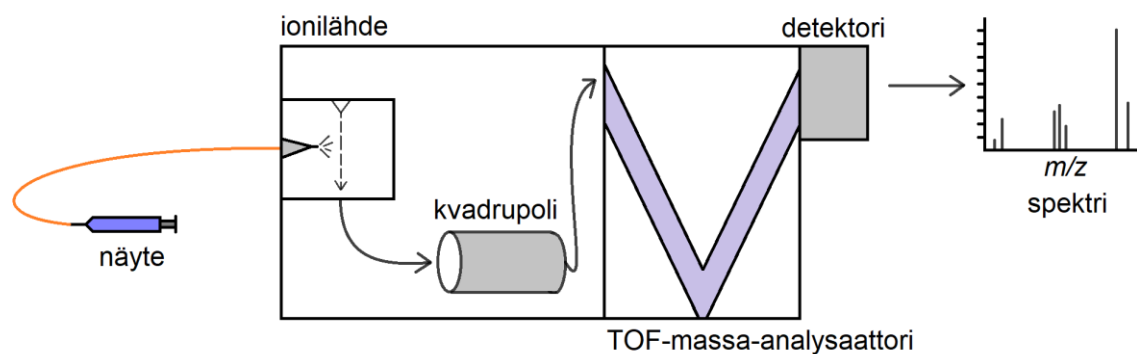
Massaspektrometrian herkkyys ja nopeus tekevät siitä ylivoimaisen tutkimusmenetelmän metabolomiikassa, minkä lisäksi sitä on jo pitkään hyödynnetty esimerkiksi biokemiassa ja lääketieteessä.^{39a,40a} Massaspektrometriaa käytetään sekä kohdentetussa että kohdentamattomassa metabolomiikassa: kohdentamattomassa metabolomiikassa ei ole välttämättä edes tarkoituksena tunnistaa näytteen metaboliitteja eli tutkimus nojaa vahvasti näytteiden välisten erojen tunnistamiseen myös massaspektrometriseen informaation lukemisessa. Kohdentetussa metabolomiikassa massaspektrometrinen informaatiota tutkitaan tarkemmin, yksittäisiä signaaleja etsien.⁷

Massaspektrometria on pääasiassa yhdisteiden kvalitatiiviseen analyysiin eli tunnistamiseen tarkoitettu menetelmä, mutta sitä voidaan hyödyntää myös kvantitatiivisissa analyysissä. Massaspektrometrin toiminta perustuu atomin tai yhdisteen ionisoimiseen ja sen jälkeiseen erotteluun massa/varaussuhteen (m/z) perusteella. Analyytti voidaan ionisoida termisesti, sähkökenttiä hyödyntämällä tai siirtämällä näytteeseen energiaa elektronien, ionien tai fotonien muodossa. Ionisoitunut analyytti voi olla tämän jälkeen yksittäinen ionisoitunut atomi, molekyyli, kompleksi, klusteri tai analyytin pilkkoutumistuote. Tunnistaminen tapahtuu vertaamalla tuloksena saadun spektrin piikkien m/z -arvoja laskettuihin teoreettisiin arvoihin tai vertailemalla spektriä valmiiseen spektrikirjastoon. Varmuutta tunnistamiseen saadaan tarkkailemalla molekyyli-ionista tai muusta kokonaisesta varatusta molekyylistä muodostuvia pilkeioneita ja isotooppipatteria. Muodostuvat ionit ja pilkeioneiden runsaus riippuvat käytetystä ionisointimenetelmästä. Spektrin piikkien intensiteetit kertovat muodostuneiden ionien runsaudesta, mutta ne eivät korreloi suoraan pitoisuuksiin, sillä ionisoitumistehokkuus on kullekin analyyttille tyypillinen ominaisuus.^{33,36a}

Massaspektrometriaa hyödynnetään metabolomiikassa yhdisteiden tunnistamisessa nimenomaan sen ylivoimaisen herkkyyden, tarkkuuden ja resoluution takia. Koska metaboliiteilla voi olla sama nominaalinen massa ja myös niiden rakenteet voivat olla lähes identtiset, vaaditaan niitä tunnistavalta menetelmältä paljon. Hyvin samanpainoisten metaboliittien tunnistaminen varmistetaan pilkeioneita tarkkailemalla, mutta viimeistään tapauksissa, joissa pilkkoutumistuotteiden tarkkailukaan ei auta erottamaan analyyttejä toisistaan, on massaspektrometriin yhdistettävä jokin kromatografinen menetelmä.²⁷

Kuvassa 6 on esitetty kaaviokuva massaspektrometristä, jossa on kytketty sarjaan kaksi massa-analysaattoria, mikä mahdollistaa tandem-massaspektrometriset eli MS/MS-kokeet. Eri ionisointitekniikat tuottavat hieman erilaisen tuloksen, mikä näkyy massaspektrissä ionien

suhteellisissa runsauksissa, mutta myös muodostuneiden ionien m/z -arvoissa. Ionisoinnin jälkeen yksittäiset ionit kulkevat massa-analysaattorille, jolla ne erottuvat massa/varaussuhteensa perusteella. Lopulta erotellut ionit päätyvät detektorille, jolta signaalit saadaan graafisesti näkyviin tietokoneella.^{35a,37}



Kuva 6. MS-laitteisto, jossa kaksi massa-analysaattoria.

Vaikka massaspektrometria onkin kvalitatiivinen menetelmä, jolla yhdisteiden rakenteita voidaan selvittää, analyysiä helpottaa ja nopeuttaa näytemolekyylien ominaisuuksien tunteminen entuudestaan. Useimmiten MS:lla analysoidaan yhden tai muutaman yhdisteen seosta, joiden molekyylipainojen perusteella valitaan analyysissä käytettävä massa-alue. Tulosten varmistamiseksi massa-alueen on ulotuttava myös tarpeeksi matalille m/z -arvoille, jotta kaikki mahdolliset pilkeionit ja useasti varatut ionit voidaan havaita. Mitä useammin ioni on varattu, sitä alemmalla m/z -arvolla se havaitaan.^{35a}

Jos havaitun ionin molekyylikaavalle on useita vaihtoehtoja, tehdään kokeelliselle m/z -arvolle massatarkkuuden vertailu teoriassa mahdollisten ionien m/z -arvojen kanssa. Teoreettisia ja kokeellisia arvoja vertailemalla ionin alkuainekoostumus voidaan varmistaa. Massatarkkuudet lasketaan monoisotooppisia massoja käyttäen. Tapauksissa, joissa näytteen analyyttien teoreettiset m/z -arvot ovat hyvin lähellä toisiaan, on tärkeää suorittaa mittausta edeltävä kalibrointi mahdollisimman hyvin.^{35a,36b}

Massaspektrometrian etuja ovat menetelmän nopeus ja hyvin pieni analyytin kulutus. Ionisointimenetelmästä riippuen analyysiä voi hidastaa useiden parametrien säätäminen tutkittavalle analyytille sopivaksi, laitteiston kalibrointi ja analyytin ominaisuuksien selvittäminen näytteen tekemistä varten.^{35a} Koska yhdisteiden tunnistaminen perustuu massa/varaussuhteeseen, on analyytillä oltava ionilähteen jälkeen varaus. Jos analyytti ei ionisoidu, ei sitä myöskään voi massaspektrometrisesti tunnistaa. Hyvät ennakkotiedot

helpottavat massaspektrometrin analyysin tekoa ja niiden avulla analyysistä saadaan varmasti talteen kaikki informaatiota esimerkiksi riittävän laajalta massa-alueelta. Lopulta analyysin pitäisi vielä olla analyysiä varten riittävän stabiili.³⁷

Massaspektrometreja voidaan vertailla herkkyuden, tarkkuuden, transmission ja erotustehokkuuden eli resoluution perusteella. Herkkyydellä tarkoitetaan kykyä havaita pieniä analyyttipitoisuuksia – ominaisuus, joka on massaspektrometreilla ylivoimainen muihin analyyttisiin tekniikoihin verrattuna. Massaspektrometrien massa-analysointilaitteiden herkkyyksissä on eroja, mutta herkkyys ei ole ainoa tekijä, joka vaikuttaa analysointilaitteen ja koko massaspektrometrin valintaan. Massaspektrometrin tarkkuus tarkoittaa kykyä havaita analysointilaitteelle saapuvia ioneita hyvällä massatarkkuudella eli lähellä teoreettisia m/z -arvoja. Erotustehokkuus puolestaan kertoo massaspektrometrin kyvystä erottaa ionit toisistaan. Huono erotustehokkuus voi siis vääristää tuloksia, vaikka tarkkuus olisikin hyvä. Erillisiä lähekkäin olevia piikkejä ei havaita, jos massaspektrometri ei pysty erottamaan niitä toisistaan. Toisaalta usein erotustehokkuuden parantuessa herkkyys laskee. Transmissio taas kertoo detektorille päätyvien ionien määrästä eli toisaalta massaspektrometrin osiin hukkuvien analyysi-ionien määrästä.^{35b,36b}

Massaspektrometri yhdistetään usein kaasu- tai nestekromatografiin jos näyte sisältää useita erilaisia yhdisteitä, jotka havaitessa tuottavat vaikeaselkoisen spektrin. Itseasiassa suorasyöttömenetelmien käyttö metabolomiikassa on yhdistelmätekniikoiden käyttöä harvinaisempaa, mutta silläkin saadaan näytteistä informaatiota – tosin suppeammassa muodossa kuin yhdistelmätekniikoilla.³⁸ Erotusmenetelmän avulla massaspektrometrille saadaan tunnistettavaksi kerrallaan vain yhdenlaisia analyytteja, joille saadaan omat massaspektrit. Erottelevan menetelmän yhdistämisessä on otettava huomioon erityisesti ionilähteen ja kromatografisen laitteiston yhteensopivuus. Kromatografisia menetelmiä voi myös sellaisenaan käyttää yhdisteiden tunnistamiseen, mutta massaspektrometrin yhdistäminen kromatografiaan tuo tunnistamiseen huomattavasti lisää varmuutta.^{36j}

4.1. Ionilähteet

Ionilähteen tehtävä on tuottaa neutraaleista analyyteistä varattuja ioneita, jotka kulkeutuvat analysoitaviksi massa-analysointilaitteille. Ionisointitekniikoita vertaillaan tyypillisesti niiden kovuuden perusteella. Kovuudella tai pehmeydellä viitataan ionisointitekniikan käyttämään energiaan, mikä vaikuttaa analyysin pilkkoutumiseen. Pilkkoutuminen on joissakin tapauksissa arvokasta tietoa, muttei aina tarjoa toivottua informaatiota jos tarkoituksena on nimenomaan

määrittää yhdisteen tarkka massa varmuudeksi analyytin tunnistamiseen.^{36a} Ionilähteiden luokittelua tehdään myös sen perusteella, missä olomuodossa näytteen on oltava ennen ionisoimista. Elektroni-ionisaatio (EI), kemiallinen ionisaatio (CI), kenttäionisaatio (FI) ja kenttädesorptio (FD) ionisoivat yhdisteitä kaasufaasissa. Normaalissa ilmanpaineessa toimivia ionilähteitä taas ovat elektronisumutus-ionisaatio (ESI) ja normaalissa ilmanpaineessa tapahtuva kemiallinen ionisaatio (atmospheric chemical ionization, APCI). Myös kiinteistä näytteistä voidaan ionisoida analyyttejä esimerkiksi matriisiavusteisella laser-desorptiolla (matrix-assisted laser desorption, MALDI). Kaasufaasissa toimivat ionilähteet toimivat vakuuissa, kun muut ionilähteet eivät sitä vaadi. Ionilähteen jälkeen muut massaspektrometrin osat toimivat vakuuissa.^{35a,36i}

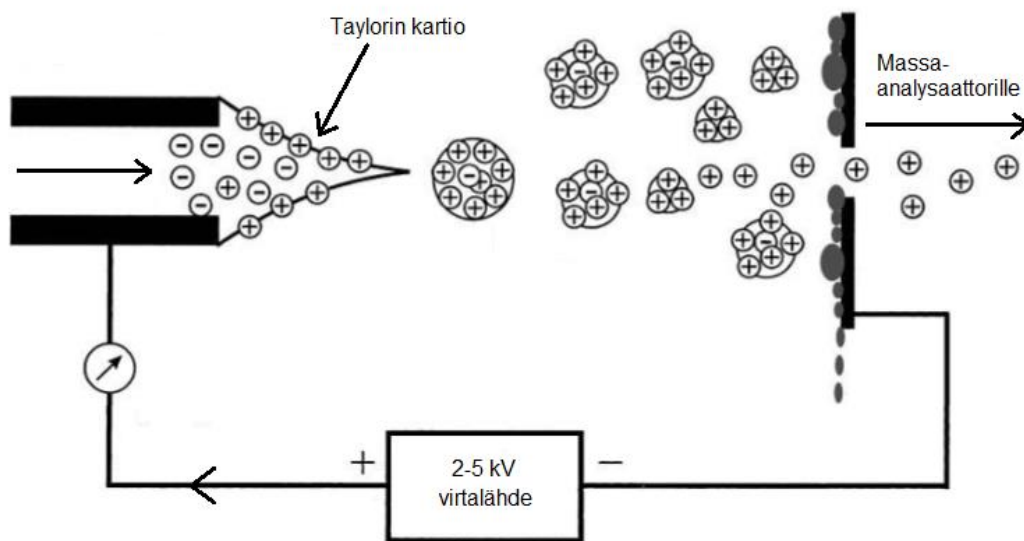
Ionilähteen valinta tehdään näytteen analyyttien ominaisuuksien ja halutun informaation perusteella. Kovat ja pehmeät ionisointitekniikat voivat täydentää toisiaan esimerkiksi jos analyytti pilkkoutuu hyvin herkästi, voidaan se analysoida vielä pehmeämmällä ionisointimenetelmällä. Pelkän molekyyli-ionin tai protonoituneen ionin eli kokonaisen analyytti-ionin m/z -arvon perusteella ei välttämättä voi todentaa esimerkiksi oikean synteesituotteen olemassaoloa, mutta oikeat pilkeionit voivat varmistaa kyseessä olevan oikea isomeeri.^{35a}

Riippumatta käytetystä ionilähteestä, näytteen analyyttien on oltava massa-analysaattorille tullessa kaasufaasissa ja kerran tai useammin varattuina. Ionilähteen valintaan vaikuttavat halutun informaation lisäksi myös näytteen ominaisuudet eli näytteen olomuoto, poolisuus ja sen sisältämien komponenttien määrä, mikä voi tarkoittaa kromatografian tarvetta. Kromatografisista yhdistelmämenetelmistä yleisimmin käytetään GC-MS- ja LC-MS-menetelmiä. Näyte saapuu siis ionilähteelle GC:n tapauksessa kaasumaisena ja LC:ltä nestemäisenä, mikä on otettava huomioon ionilähteen valinnassa: GC:kan kanssa yhdistetään CI- tai EI-ionilähde ja LC:n kanssa ESI, APCI tai APPI riippuen analyyttien poolisuudesta.^{36i,j}

4.1.1. Sähkösumutus-ionisaatio

Sähkösumutus-ionisaatio (electrospray ionization, ESI) on yleisesti käytetty pehmeä ionisointimenetelmä, joka voidaan yhdistää esimerkiksi LC-laitteistoon, koska se toimii normaalissa ilmanpaineessa ja koska ESI ja LC soveltuvat samantyyppisten analyyttien tutkimukseen. ESI:llä analyyttimolekyylit ionisoituvat noin 2-5 kV jännitteen avulla suoraan liuoksesta. Hyvin laimeaa, 1-100 μM näyteliuosta,^{36f} suihkutetaan kapillaarista heikolla virtauksella ja nebulisaatiokaasun avulla kohti vastinelektrodia, jolta ionit jatkavat kulkuaan

massa-analysointilaitteelle. Ionilähteen sisäisen voimakkaan sähkökentän ansiosta näytesumusta muodostuu kapillaarin päähän Taylorin kartio, jolta analyytit irtoavat ensin liuosnauhana ja lopulta muodostuu sumu yksittäisistä varatuista ioneista. Varatuista pisaroista liuotin haihdutetaan lämmön ja kaasun avulla ja jäljelle jäävät analyytti-ionit. Mikäli näyteliuoksen olosuhteet ovat varauksen muodostumiselle oikeanlaiset eli esimerkiksi analyytin emäksinen ryhmä saa näyteliuoksen vedeltä protonin. Kuvassa 7 on esitetty ESI-lähteen toimintaperiaate.^{35a,36f,39}



Kuva 7. ESI:llä muodostuva Taylorin kartio ja siitä irtoavat varatut pisarat ja lopulta yksittäiset analyytti-ionit.⁴⁰

Yksi ESI:n eduista on useasti varattujen ionien havaitseminen massaspektrissä. Suuretkin molekyylit voidaan havaita niiden saadessa useamman varauksen, minkä seurauksena havaittava m/z -arvo pienenee. Happo- tai emäryhmän sisältävät analyytit ionisoituvat ESI:ltä tavallisesti protonoituneina tai deprotonoituneina, mutta muuten pooliset yhdisteet muodostavat tavallisesti voimakkaammin addukteja tavallisimpien kationien ja anionien kanssa jo näyteliuoksessa. ESI on herkkä ionisointimenetelmä ja sopii monenlaisten yhdisteiden MS-analyysiin. Esimerkiksi suurikokoisia proteiineja voidaan analysoida ESI:ä hyödyntäen, mutta toisaalta se sopii myös pienikokoisten poolisten molekyylien analysoimiseen. ESI:llä onnistuvat sekä positiivisen että negatiivisen polarisaation mittaukset. Taulukossa 1 on esitetty ESI:llä mahdollisesti muodostuvat ionit, joiden tyyppi riippuu analyytin ominaisuuksista ja liuotINVALINNASTA. Näytteen valmistamisessa on hyvä huomioida käytetty liuotin, sillä liuotin pitää haihduttaa ionilähteellä. Heikosti haihtuva tai paljon suoloja sisältävä liuotin vaikuttaa haihtumiseen sitä heikentävästi. Käytettävien puskureiden tulisi olla mielellään helposti

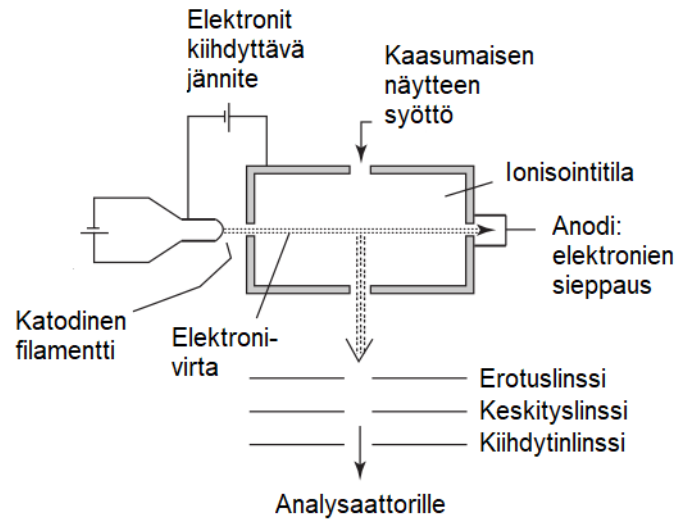
haihtuvia. Koska ESI:llä tapahtuu melko vähän pilkeioneiden muodostumista, valitaan siihen yhdistettäväksi massa-analysaattoriksi usein tandemmassaspektrometriaan kykenevä analysaattori. ESI voidaan yhdistää mihin tahansa massa-analysaattoriin, kunhan välissä on pumppusysteemi, jolla luodaan ionilähteen jälkeen massa-analysaattorin vaatima vakuumi.^{35a,36f,g,h,40}

Taulukko 1. ESI:llä muodostuvat ionit. Tässä on käytetty esimerkkinä alkalimetallista Na⁺:ia, mutta myös muut alkalimetallit voivat näkyä ESI-MS-spektrissä. Na⁺ tai K⁺ -ionit ovat tavallisimmat alkalimetallit, jotka havaitaan positiivisella polarisaatiolla ja anionina A havaitaan usein Cl⁻.^{36h}

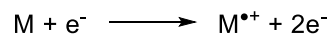
Analyytti	Tyyppi	Positiiviset ionit	Negatiiviset ionit
pooliton	protoni, kationi tai anioni	[M+H] ⁺ [M+Na] ⁺	[M-H] ⁻ [M+A] ⁻
kohtalaisen poolinen tai hyvin poolinen	protoni tai alkalimetalli, protonin tai muun osan vaihto, klusterit, adduktit	[M+H] ⁺ [M+Na] ⁺ [M-H _n +Na _{n+1}] ⁺ [2M+H] ⁺ [2M+Na] ⁺ [M+liuotin+H] ⁺ , [M+liuotin+Na] ⁺	[M-H] ⁻ [M+A] ⁻ [M-H _n +Na _{n-1}] ⁻ [2M-H] ⁻ [M+liuotin-H] ⁻
ioninen	ionit ja ionien yhdistelmät	kationi ⁺ [kationi _n +anioni _{n-1}] ⁺	anioni ⁻ [anioni _n +kationi _{n-1}] ⁻

4.1.2. Elektroni-ionisaatio

Elektroni-ionisaatiossa (EI) kaasumaiset molekyylit saavat varauksen elektronivirrasta, kuten kuvasta 8 nähdään. Näyte saapuu ionilähteelle kaasumaisena, mikä vaatii joko näytteensyötössä kaasumaiseksi muodostavaa injektoria tai yhdistämistä kaasukromatografiin. EI:n sisällä, vakuuissa, tuotetaan elektroneja filamentin avulla. Kaasumaiset analyytit kiihdytetään syntyvän elektronivirran läpi. Noin joka sadas analyytti saa elektronien vuorovaikutuksessa varauksen (kaavio 1), ja nämä varautuneet molekyyli-ionit M⁺ ja ioniset pilkkoutumistuotteet erotellaan ja kiihdytetään kohti massa-analysaattoria. EI:tä pidetään herkkänä ionistointitekniikkana.^{36d}



Kuva 8. EI:n rakenne.^{35a}



Kaavio 1. Elektroni-ionisaatiossa tapahtuva pääasiallinen reaktio.^{41c}

EI:n injektorin on siirrettävä näyte normaalista ilmanpaineesta vakuumiin ja saatava näyte kaasumaiseksi kiinteästä tai nestemäisestä näytteestä. Standardiolosuhteissa käytetään 150 – 250 °C:n lämpötilaa, mutta myös korkeampien lämpötilojen käyttö on mahdollista. EI voidaan yhdistää myös nestekromatografiin jos analyytit sopivat vain EI:llä analysoitaviksi ja analyysistä saadaan tarvittavaa tietoa.^{36d}

EI:llä ionisoitavien näytteiden täytyy olla termisesti stabiileja. EI:tä käytetään alle 1000 u kokoisten analyyttien ionisoimiseen. Analyytit eivät saa olla hyvin poolisia eli esimerkiksi sokereiden tai peptidien ionisoiminen ei onnistu EI:llä ellei niistä tehdä poolittomampia johdannaisia. EI ei aseta seuraavaksi laitteistossa tulevan massa-analysaattorin valinnalle rajoituksia.^{36d}

EI luokitellaan kovaksi ionisaatiomenetelmäksi, sillä elektroneilla on paljon energiaa, mikä aiheuttaa molekyyli-ioneiden muodostumisen lisäksi runsaasti pilkeioneita. Elektronipommituksessa käytettävää energiaa voidaan säädellä, jolloin voidaan huomata eroja pilkkoutumisessa ja saada esiin enemmän pilkeioneita. Laskemalla elektronipommitukseen käytettävää energiaa ei kuitenkaan pystytä nostamaan molekyyli-ionin absoluuttista

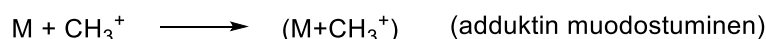
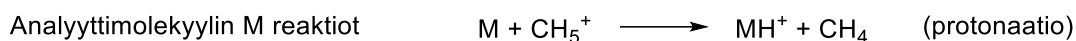
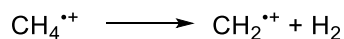
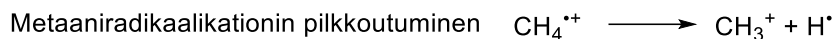
intensiteettiä. Joskus molekyyli-iona ei havaita ollenkaan vaan päätelmät on tehtävä pelkkien pilkeioneiden perusteella, eli EI ei sovi kaikenlaisten yhdisteiden analysointiin. Elektronivirta aikaansaa tyypillisesti positiivisesti varattuja radikaalikationeita ja negatiivisesti varattujen ioneiden muodostuminen on huomattavasti tehottomampaa. EI:llä tehdään siis positiivisen polarisaation mittauksia.^{35a}

4.1.3. Kemiallinen ionisaatio ja normaalissa ilmanpaineessa tapahtuva

kemiallinen ionisaatio

Kemiallisessa ionisaatiossa (chemical ionization, CI) on usein käytännössä käytössä lähes sama laitteisto kuin EI-lähteessä, sillä niiden toimintaan vaadittava laitteisto poikkeaa vain CI:n vaatimalla kaasun sisäänviennillä ja tiivydellä. CI asettaa näytteelle samat vaatimukset kuin EI, mutta tuottaa erilaista, täydentävää informaatiota ja siksi MS-analyysit suoritetaan tällä laitteistolla usein kummallakin ionisaatiotekniikalla tarpeen vaatiessa. Myös CI voidaan yhdistää GC:n kanssa.^{35a}

Toisin kuin EI:ssa, CI:ssa voi tapahtua monenlaisia reaktioita, joiden tuotteena syntyy esimerkiksi protonoituneita ioneja. Ionisointi tapahtuu pienessä kammiossa, jossa on korkea paine. Kammiossa olevat ionit reagoivat reagenssikaasumolekyylien kanssa, jotka reagoivat edelleen analyyttimolekyylien kanssa (kaavio 2). Tavallisesti reagenssikaasuna käytetystä metaanista muodostuu radikaalikationi, josta tuotetaan sekundäärisiä reagenssi-ioneita ja nämä ionit reagoivat analyytti-ionien M kanssa. Tavallisimmat reaktiot ovat protoninsiirto, varauksensiirto, anionin irtoaminen ja adduktin muodostuminen eli sekä positiivisesti että negatiivisesti varattuja ioneita pystytään tuottamaan. CI-MS-spektrissä nähdään tavallisesti runsaampana kokonaiset molekyyli-ionit ja hieman pilkkoutumista, mutta tähän voidaan vaikuttaa reagenssikaasulla: Protoninsiirtoa käytettäessä analyyttimolekyyli saa reagenttikaasulta protonin jos sen protoniaffiniteetti on suurempi kuin reagenssikaasun. Affiniteettieron ollessa suuri, pilkkoutumista nähdään spektrissä enemmän.^{35a}



Kaavio 2. Kemiallisessa ionisaatiossa reaktiot tapahtuvat reagenssikaasun välityksellä. Tässä esimerkkinä metaanin avulla tapahtuvat reaktiot. Varauksensiirtoa tapahtuu esimerkiksi käyttämällä jalokaasuja, typpeä tai hiilimonoksidia.^{35a}

Normaalissa ilmanpaineessa tapahtuva kemiallinen ionisaatio (atmospheric chemical ionization, APCI) on metabolomiikassa huomattavasti suositumpi ionisointimenetelmä CI:hin verrattuna. Se sopii pienikokoisten analyttien ionisoimiseen ja yhdistetään tavallisesti LC:n kanssa, sillä näyte saapuu APCI-lähteelle nestemäisenä.^{3,42} APCI:ssa tapahtuvat ionisointireaktiot ovat samanlaisia CI-lähteellä tapahtuvien reaktioiden kanssa, mutta havaittavat ionit ovat pääasiassa kokonaisia ja vain kerran varattuja. Ioneille on tapahtunut protonaatio, deprotonaatio tai jokin adduktin muodostuminen. Saatu informaatio on siis helppolukuista. Näytteen saapuessa APCI-lähteelle siitä muodostuu sumua, josta liuotin haihdutetaan kuumentamalla. Ionilähteen neulan kärjen koronalla muodostuu reaktiivisia molekyylejä kaasuna käytetystä ilmasta. Ilman ionit reagoivat analyytti-ionien kanssa samaan tapaan kuin CI:llä. Muodostuvat ionit riippuvat valitusta polariteetista eli APCI:llä voi muodostua joko positiivisesti tai negatiivisesti varattuja ioneja.^{35a,43}

4.1.4. Muut ionisointimenetelmät metabolomiikassa

ESI, EI ja joissain tapauksissa APCI ovat tyypillisimmät metabolomiikassa käytetyt ionilähteet, joiden lisäksi kuvantamisessa käytetään pääasiassa MALDI:a ja desorptio sähkösumutus-ionisaatiota (desorption electrospray ionization, DESI).^{3,43} Laserdesorptiomenetelmiin (LD) kuuluvaa MALDI:a käytetään metabolomiikan tapauksessa sen monipuolisuuden ja hyvän saatavuuden takia. MALDI:ssa näyte liuotetaan ennen ionisointia näytematriisiin, ja näyteliuos haihdutetaan, jotta analyysiä varten saadaan kiinteä

näyte. Näytteen analyytit on nyt ympäröity matriisiin pienillä orgaanisilla yhdisteillä, jotka absorvoivat voimakkaasti laserin aallonpituutta. Ionisoinnissa näytteen pinta altistetaan voimakkaille laserpulsseille. Matriisimolekyylit virittyvät, sublimoituvat ja näytteen analyytit ssiirtyvät kaasufaasiin energian siirtyessä matriisimolekyyleiltä. Ionisoitumismekanismia ei vielä tarkkaan tunneta. MALDI on hyvin herkkä menetelmä ja se sopii hyvin suurten biologisten molekyylien ja polymeerien ionisointiin. Koska MALDI ei tuota pilkeioneita, voi sitä käyttää suuren massa-alueen ansiosta myös useita analyyttejä sisältävien seosten tutkimuksessa. Informaatiota saadaan myös usein varatuista ioneista ja analyysit voidaan tehdä sekä positiivisella että negatiivisella polarisaatiolla.^{35a}

4.2. Massa-analysaattorit

Kun näytteen analyytit on ionisoitu ja ne ovat kaasumaisessa muodossa, erilaiset ionit erotellaan toisistaan massa-varaussuhteensa perusteella massa-analysaattorilla. Analysaattoreiden erotuskyky voi perustua kineettiseen energiaan, momenttiin, ionien nopeuteen tai lentorataan mutta hyvin usein erottelu tapahtuu resonanssitaajuuden perusteella. Analysaattoreita voidaan vertailla pulssituksen tyyppin, käytetyn energian määrän ja ionisäteen tai ioniloukun käytön perusteella. Kuten ionilähteiden tapauksessa, ei myöskään massa-analysaattoreissa ole yhtä universaalia kaikenlaisille yhdisteille sopivaa analysaattoria vaan valinta tehdään käyttötarkoituksen mukaan tapauskohtaisesti.^{35b}

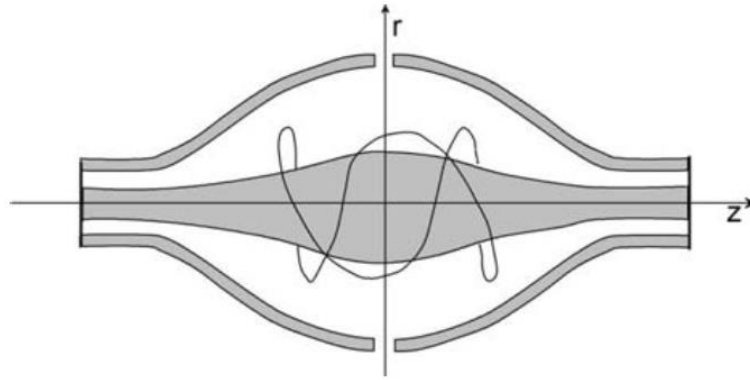
Metabolomiikassa yleisesti käytettyjä massa-analysaattoreita ovat (kolmois)kvadrupolimassa-analysaattori^{29,44}, orbitrap^{6,45}, lentoaikamassa-analysaattorit (time-of-flight, TOF) tai esimerkiksi kvadrupolin ja TOF:n tai kvadrupolin ja orbitrapin yhdistelmät.⁶ Massa-analysaattoreita vertaillaan tyypillisesti massa-alueen, resoluution, massatarkkuuden, ioneiden erottelun tyyppin ja tandem-massaspektrometrian ominaisuuksien perusteella. Massaspektrometrin tehokkuudesta kertovat tehtäväsykli, transmissio ja detektorin tehokkuus.^{35a}

Tehtäväsykliksi kutsutaan aikaa, jona tietyt m/z -arvon ionit tuotetaan ja tehokkaasti analysoidaan. Se ilmaistaan joko suhteena tai prosenttina ja kertoo havaittavien ionien osuuden ionilähteeltä kiihdytettävistä ioneista. Tehtäväsykli kertoo toisaalta enemmän myös koko massaspektrometrin kuin pelkästä massa-analysaattorista. Toisaalta tehtäväsykli on myös mittaukselle ja sille säädetyille parametreille ominainen, ja nämä ominaisuudet liittyvät massa-analysaattoriin. Massatarkkuus taas kertoo teoreettisen ja mitatun m/z -arvon erotuksesta, eli m/z -arvojen totuudenmukaisuudesta, ja on yhteydessä massaspektrometrin resoluutioon: Hyvä

resoluutio tarkoittaa usein myös hyvää massatarkkuutta ja mitä suurempi resoluutio on, sitä lähemmäs tarkkaa massaa päästään. Ilman tarkkaa massaa ei voida määrittää yhdisteen alkuainekoostumusta. Toisaalta resoluutio tarkoittaa myös erotustehokkuutta eli massaspektrometrin kykyä erottaa hyvin samanpainoiset yhdisteet toisistaan.^{35b}

Kvadrupolimassa-analyssaattorit koostuvat tangoista, joissa kulkee oskilloiva sähkökenttä. Kentän pulssi erottelee ionit m/z -arvojen ja sitä myötä niiden erilaisten lentoratojen perusteella. Kvadrupoleja käytetään metabolomiikassa usein kolmoiskvadrupoleina.^{27,46} Kytkemällä kolme kvadrupolia sarjaan kolmoiskvadrupoliksi (QqQ), voidaan tehdä tandem-massaspektrometrisia eli MS/MS-kokeita. Tällöin ensimmäisessä kvadrupolissa eristetään kiinnostava ioni, toisessa sille tehdään törmäysaktivointi matalalla energialla ja kolmannessa massa-analyysi. Ionin eristäminen tehdään ensimmäisen kvadrupolin sähkökenttää säätämällä, jolloin muut kuin kiinnostuksen kohteena olevat ionit eivät pääse ensimmäisestä kvadrupolista läpi. Kolmoiskvadrupolien etuna on laitteiston kompakti koko ja herkkyys, mutta menetelmän kehitystä haittaa työläys: jokaiselle analyyttille on etsittävä ja ohjelmitava pilkeionit, mikä rajoittaa analysoitavien metaboliittien määrää. Toisin kuin muut tässä käsitellyt massa-analyssaattorit, kvadrupolit analysoivat ioneita jatkuvasti, kun muut analyssaattorit erottelevat ionit pulsseina.^{6,35b}

Orbitrap, FTICR ja TOF ovat korkean resoluution massa-analyssaattoreita, joten niitä voidaan käyttää tunnistamaan yhdisteitä, joilla on lähes identtiset massat.⁶ Orbitrap on ioniloukkutyypinen massa-analyssaattori, ja myös sen toiminta perustuu oskilloivaan sähkökenttään. Ioniloukuissa kiinnostavien ionien erottaminen perustuu loukusta vapauttamiseen, mutta orbitrapin tapauksessa m/z -arvot saadaan ionien taajuuksista.⁴⁷ Orbitrapin rakenne muistuttaa kehrää, joka rakentuu kahdesta sisäkkäisestä elektrodista ja eri painoiset ionit erottuvat sisempää kehrää oskilloimalla (kuva 9). Ionien liike Orbitrapissa saadaan aikaan pienellä kehräelektrodilla tasavirralla. Ionien saama taajuus tuottaa virran, joka voidaan mitata ja muuntaa spektriiksi Fourier-muunnoksella.^{35c}



Kuva 9. Orbitrap-analysaattorin rakenne muistuttaa kehrää.^{35c}

Myös FTICR:ää (Fourier-transformation ion cyclotron resonance, Fourier-muunnosionisyklotroniresonanssi) käytetään metabolomiikassa sen korkean suorituskyvyn ja resoluution takia. FTICR pystyy siis erottamaan yhdestä näytteestä yhdellä analyysillä hyvin suuren määrän ioneita.³ FTICR:n erotuskyky on erityisen hyvä alhaisilla m/z -arvoilla.^{35c} FTICR:ssä hyödynnetään staattista magneettikenttää, jonka avulla ionit saavat niiden massoille tyypilliset lentoradat. Ionit jäävät loukkuun lentoradoilleen ja käyttämällä taajuuden kanssa resonoivaa sähköistä radiotaajuutta, ioneille tyypilliset taajuudet voidaan havaita. Massaspektri saadaan tekemällä Fourier-muunnos saaduille taajuuksille.⁴⁸

TOF:n lentoputki voi sisältää reflektorin, tehden analysaattorista pienikokoisemman ja samalla parantaen resoluutiota. Resoluutiota voidaan parantaa myös lentoputkea pidentämällä tai kiihdytinjännitettä laskemalla. TOF:ssa kaikki ionit saavat kiihdytysalueella saman verran liike-energiaa, minkä jälkeen ne erottuvat m/z -arvonsa perusteella lentoputkessa. Lentoputkessa ei ole kenttää, joka vaikuttaisi ioneihin. Koska TOF erottelee ionit pulsseissa, on ionilähteen toimittava pulssimaisesti tai sen jälkeen on oltava pulssitukseen kykenevä laitteisto. Ortogonaalinen kiihdytin (orthogonal acceleration) koostuu kahdesta alueesta, joista ensimmäisen jännitettä säädetään. Kun jännite ensimmäisellä alueella on päällä, liikkuvat siellä olevat ionit jälkimmäiselle alueelle, jolla kiihdytys kohti TOF:ia tapahtuu. TOF voidaan siis yhdistää minkä tahansa ionilähteen kanssa. TOF:n etuja ovat sen käytännössä rajaton massa-alue, yksinkertainen rakenne, nopeus yhdistettynä laajan massa-alueen analysointiin, hyvä transmissio ja herkkyys sekä parhailta laitteilla kyky tarkan massan analysointiin ja MS/MS-kokeisiin.^{35c,36c}

4.3. Tandem-massaspektrometria

Koska pehmeät ionisaatiotekniikat eivät tarjoa informaatiota analyytin rakenteesta, voidaan rakennetutkimusta tehdä tandem-massaspektrometrian avulla. MS/MS-kokeissa analyysi tehdään siis vähintään kaksivaiheisesti. MS/MS-laitteita on kahdenlaisia analysaattorin tai analysaattoreiden tyypistä riippuen: MS/MS-analyysi voidaan tehdä tilassa tai ajassa. MS/MS tilassa tarkoittaa kiinnostavan ionin valintaa sille eristykseen tarkoitettulla massaspektrometrin alueella, jolta sen analysointia jatketaan seuraavalla massa-analysaattorilla. Tilassa tehtäviä MS/MS-analyysyjä ovat TOF/TOF, QqTOF ja metabolomiikassa käytetyin QqQ. Ajassa tehtävät MS/MS-analyysit tehdään yhdessä massa-analysaattorissa vaiheittain. Näitä massa-analysaattoreita ovat kvadrupoli-ioniloukku (quadrupole ion trap, QIT), lineaarinen ioniloukku (linear ion trap, LIT) ja FTICR. Kiinnostavan ionin valinta, aktivointi ja analyysi tehdään siis samassa analysaattorissa.^{36e}

Suurin osa MS/MS-kokeista hyödyntää törmäysaktivointia (collision-induced dissociation, CID). CID:n avulla kiinnostava ioni eristetään ja tutkitaan siitä muodostuvia pilkeioneita. Pilkkoutumisreaktio saadaan aikaan törmäyskammiossa törmäyskaasulla, joka on tavallisesti helium, typpi tai argon. QqQ:n tapauksessa toinen kvadrupoli on laitteiston törmäyskammio. QqQ:lla voidaan tehdä kolmenlaisia MS/MS-analyysyjä: tutkia eristetyn ionin CID:ssä muodostuvia pilkeioneita, tutkia mistä ionista tietyn m/z -arvon ionit ovat peräisin tai tutkia mistä ioneista tapahtuu tietyn neutraalin irtoaminen, jolloin massa-alue rajataan kiinnostuksen mukaiseksi. Ionisaatiomenetelmästä riippuen, eristettävä ioni on tavallisesti molekyyli-ioni, (de)protonoitunut molekyyli tai jokin addukti. Selektiivisen reaktio seurannan (selected reaction monitoring, SRM, toisaalta multiple reaction monitoring, MRM) tapauksessa ensimmäinen ja kolmas kvadrupoli säädetään etsimään vain tiettyä ionia ja pilkeionia.⁴⁹ Vain oikean pilkeionin tuottavat ionit analysoidaan. SRM:n avulla QqQ:n herkkyyttä voidaan nostaa.^{35e,36e}

TOF:ia voidaan hyödyntää kytkemällä kaksi TOF-analysaattoria TOF/TOF-laitteistoksi, jossa on ensin lyhyempi lentoputki, minkä jälkeen tulee ajastettu ioninvalitsin, törmäyskammio, eristettyjen ionien kiihdytysalue ja toinen lentoputki reaktiossa syntyneiden ionien analysointiin.^{36e} Hyvin suosittu yhdistelmä on kvadrupolin ja TOF:n yhdistelmä QqTOF, jossa kolmas kvadrupoli on korvattu TOF:lla, jolla massa-analyysi tapahtuu. QqTOF:lla hyödynnetään TOF:n hyvää erotuskykyä ja massatarkkuutta, mutta samalla kvadrupoleilla voidaan säätää tarkasteltavien ionien massa-alue eli päästää läpi vain kiinnostavat ionit.^{35d}

4.4. Massaspektrometrian edut metabolomiikassa

Massaspektrometria on yleisesti käytetty analyttinen menetelmä ja massaspektrometreja löytyy useista laboratorioista.⁵⁰ Laitteistot ovat siis helposti saatavilla ja niitä on myös totuttu käyttämään hyvin monenlaisissa tutkimuksissa. Massaspektrometria on NMR-spektroskopian ohella eniten käytetty kvalitatiivinen analyysimenetelmä metabolomiikassa. MS-laitteistolla pystytään havaitsemaan jopa pikomoolien suuruisia pitoisuuksia, joihin metabolomiikan tapauksessa on päästävää. Massaspektrometrian etuna on myös pilkkoutumisesta aiheutuvan rakenteellisen informaation saaminen.^{35h}

Massaspektrometriaa voidaan hyödyntää metaboliittianalyyysissä itsenäisenä tekniikkana, jolloin näyte analysoidaan ilman erillistä näytteen komponenttien erottelua. Saatavassa spektrissä on silloin kaikista näytteen yhdisteistä peräisin olevat signaalit, mikä tekee spektrin tulkitsemisesta työlästä. Siksi massaspektrometri yhdistetäänkin usein kromatografiseen menetelmään, jolloin saavutetaan ylivoimainen herkkyys, kattavuus ja suoritusteho muihin menetelmiin verrattuna.⁵¹

Massaspektrometriset menetelmät yleistyivät hyvän herkkyyden, suorituskyvyn, havaittavan tarkan massan sekä pilkkoutumiskuvioiden ja niiden avulla luotavien spektrikirjastojen ansiosta. NMR-spektrometriset tekniikat ovat selkeästi epäherkempiä, eikä niillä kyetä analysoimaan yhtä suurta määrää metaboliitteja kuin massaspektrometrian keinoin.³⁰ Massaspektrometrisessä metaboliittianalyyysissäkin on kehitettävää: massaspektrometrinen sormenjälkialueen analyysi eli uusien metaboliittien kartoittaminen on standardoimattomien metodien puuttuessa hankalaa. Menetelmien standardoimista edesauttaisi MS-pohjaisten metaboliittikirjastojen kehittäminen ja luokitteluaineenvaihduntakokonaisuuksien mukaan sisältäen esimerkiksi ruoka-aineen, sen lisäaineet ja kehossa muodostuvat metaboliitit. Myös tunnistamista tekeviä ohjelmistoja sekä rakennetta ja kemiallista koostumusta ennustavia ohjelmistoja tulisi kehittää enemmän ja pidemmälle. Vastaavaa luokittelua voitaisiin hyödyntää myös muussa metabolomiikan tutkimuksessa. Tämä työ on jo hyvällä mallilla ja esimerkiksi metabolomiikkaan keskittyvä lehti *Metabolomics* edesauttaa metabolomiikan tuntemuksen kehittymistä. Metabolomiikan kehitys vaatii sen tutkijoilta yhteistyötä, jossa yhdistetään hyväksi todetut välineet, tieto ja tulokset.³⁰

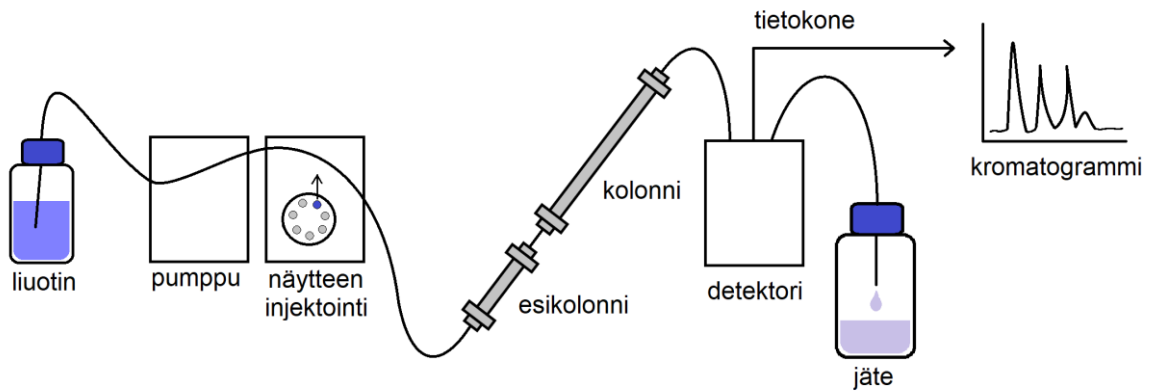
5 Nestekromatografia-massaspektrometria metabolomiikassa

Kromatografiaa käytetään analyttisiin prosesseihin, joissa tarkoituksena on erotella ja tunnistaa seoksen sisältämät analyytit. Kromatografian avulla voidaan myös vain erotella näytteseoksen komponentteja jatkotoimenpiteitä varten. Kromatografian tulokset saadaan kromatogrammina, joka on detektorin vaste eluotumisajan funktiona. Kromatogrammissa nähdään kolonnissa erottuneet yhdisteet ja niiden poistuessa kolonnista tehdään havainnointi usein UV-detektorilla, infrapuna-älydyntävällä spektrometrillä^{52a} mutta hyvin usein myös massaspektrometrillä.^{53a} Kromatografisiin tunnistusmenetelmiin verrattuna massaspektrometria on nopea analyysimenetelmä.^{35g}

Pelkän kromatografian keinoin yhdisteet voidaan tunnistaa retentioaikojen, eluotumisjärjestyksen ja kromatogrammin piikin suhteellisen pinta-alan perusteella, jos yhdisteiden havainnointi tehdään jotenkin muuten kuin massaspektrometrisesti. Retentioaika kertoo kuinka nopeasti yhdiste kulkee kromatografian kolonnin läpi.⁵⁴ Metabolomiikan tapauksessa tarvitaan havainnointimenetelmä, jolla pienten pitoisuuksien havaitseminen, luotettava tunnistaminen ja kvantitointi ovat mahdollisia – tarvitaan siis NMR-spektrometri tai mieluummin matalampia pitoisuuksia havaitseva massaspektrometri. Kromatografiaa ja massaspektrometriaa yhdistelemällä saadaan metabolomiikkaan käyttökelpoisin työkalu, jolla monimutkainen seos pystytään analysoimaan kvalitatiivisesti ja kvantitatiivisesti.^{35f}

5.1. Nestekromatografian perusteet

Nestekromatografi (liquid chromatography, LC) ja varsinkin korkean suorituskyvyn nestekromatografi (high-performance liquid chromatography, HPLC) sopivat monimutkaisten seosten erotteluun ja niiden komponenttien tunnistamiseen. Kromatografian erottuminen perustuu analyttien erilaisiin vuorovaikutuksiin kahden eri faasin välillä. kuvassa 10 on esitetty nestekromatografian pääkomponentit: Laitteistossa ensimmäisenä on erotukseen valittu liikkuva faasi eli liuotin, joita voi myös olla laitteistoon kytkettyinä kaksi tai useampi, riippuen käytettävästä menetelmästä. Liuotin kulkee koko laitteiston läpi ja ennen kolonneja liuottimeen injektoidaan näyteliuosta muutamasta mikrolitrasta satoihin mikrolitroihiin.^{53c} Joissakin erotusmenetelmissä myös näytteen liuottamiseen käytetyllä liuottimella on merkitystä, jolloin näytteen liukenemisen lisäksi on huomioitava käytetyn liikkuvan faasin ja näyteliuoksen yhteensopivuus.^{53a,54}



Kuva 10. Kaaviokuva nestekromatografian osista ja toiminnasta.

HPLC-laatuisten liuotinten virtaus laitteiston läpi luodaan tehokkaan pumppusysteemin avulla. Koska kolonnien kehityksen myötä tarvitaan yhä korkeampia paineita, vaaditaan pumpulta tehokkuutta tämän luomiseksi. Kun HPLC-laitteistolla paine kasvaa enintään 400 bariin voidaan ultrakorkean suorituskyvyn nestekromatografilla (ultra-high-performance liquid chromatography, UPLC tai UHPLC) nousta jopa 1300 barin paineeseen.^{53a} Pumpun yhteydessä tapahtuu myös liuotimen degassointi eli kaasujen poisto ja mahdollinen liuotinsuhteiden muuttaminen. Analyysin alkaessa, liuotinvirtaan syötetään näytettä injektorilla ja näyterintama kulkeutuu virtauksessa kohti kolonnia, missä erottuminen tapahtuu. Ennen varsinaista analyysiä erotteluvaa kolonnia on usein esikolonne, jonka tarkoitus on estää epäpuhtauksien pääsy kolonniin. Erottuessaan ja päästessään kolonnin läpi, näytteen yhdisteet havaitaan detektorilla. LC:llä ei ole standardoitua detektoria vaan vaihtoehtoja on useita. Havaitseminen voidaan tehdä esimerkiksi UV-valoon perustuen, mutta detektorin valinta kannattaa tehdä näytteen komponenttien ominaisuuksien mukaan. Hyvin tavallista on myös yhdistää LC massaspektrometriin rinnakkain toisen detektorin kanssa. Lopullinen informaatio saadaan näkyviin tietokoneella kromatogrammina. Kromatogrammi kertoo yhdisteiden retentiosta kolonnissa ja havaittavien piikkien pinta-alojen tai korkeuksien avulla saadaan kvantitatiivista tietoa. Retentioaikojen ja detektorin informaation perusteella yhdisteet voidaan tunnistaa. Riippuen näytteen ominaisuuksista, käytetyistä liuottimista, kolonnin sisältämästä stationäärifaasista ja sen pituudesta, yksi analyysi voi kestää joistakin minuuteista useisiin kymmeneen minuutteihin ja lisäksi laitteisto on pestävä käyttöä ennen ja sen jälkeen huolellisesti.^{53a, c,54}

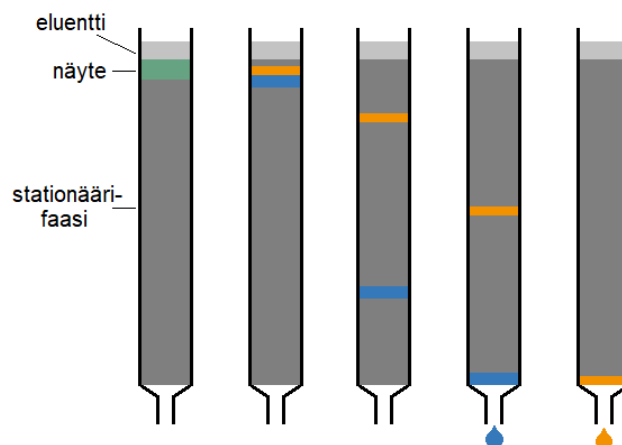
Kromatografiassa tasapainotellaan hyvän erottumisen eli resoluution ja järkevän retentioajan kanssa. Erottumiseen vaikutetaan kolonnin valinnalla, liuotimen ja liuottimeen lisättävien

aineiden avulla. Hyvin samankokoiset ja kemiallisesti samankaltaiset yhdisteet on saatava liikkuvassa faasissa erilleen, mutta myös ominaisuuksiltaan ja kooltaan hyvin erilaiset yhdisteet pitää saada käytännöllisen retentioajan puitteissa detektorille saakka. Näytteen analyyttien kulkeutumiseen voidaan vaikuttaa myös muuttamalla käytettävien liuottimien suhteita analyysin aikana eli valitsemalla isokraattisen eluoinnin sijaan gradientteluutio.^{8,55}

Isokraattisessa eluutiolla pidetään liuottimien A ja B suhteet samoina koko analyysin ajan. Eluentina A merkitään analyysin kannalta heikkoa liuotinta, joka käänteisfaasitekniikassa on vesi ja normaalifaasitekniikassa orgaaninen liuotin.^{53c} Jos isokraattisella eluutiolla ei saavuteta riittävää resoluutiota, eli yhdisteet eivät erotu kolonnissa tai osa yhdisteistä eluoituu hyvin aikaisin toisten eluoutuessa hyvin pitkällä retentioajoilla, kokeillaan gradientteluutiota. Gradientteluutiolla A- ja B-eluenttien suhteita muutetaan analyysin aikana. Esimerkiksi käänteisfaasitekniikalla on pystytty osoittamaan, että yhdisteiden retentio vaihtelee eksponentiaalisesti muuttamalla orgaanisen liuottimen pitoisuutta.⁵⁴

5.1.1. Kolonnit ja erottumistehokkuus

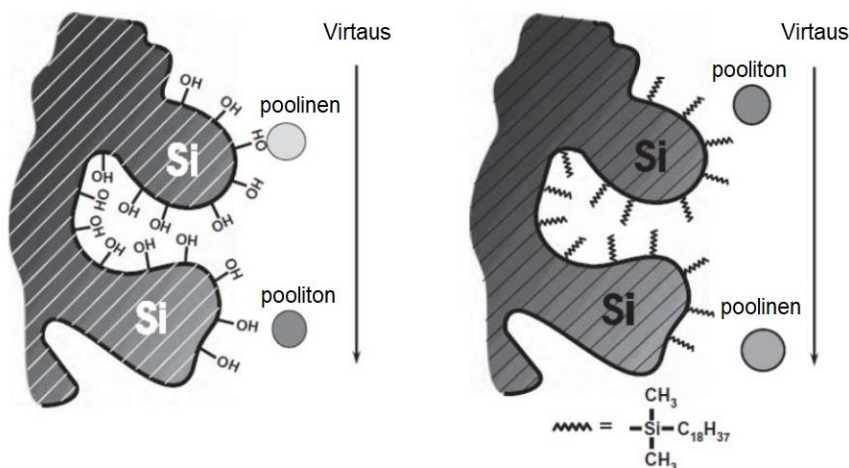
Kolonne on kromatografian perusta eli hyvin tärkeässä osassa erottumisen onnistumisessa. Kolonnin sisältämä stationäärifaasi ja käytetty liikkuva faasi vuorovaikuttavat näytteen sisältämien analyyttien kanssa, ja tämän perusteella analyytit kulkevat kolonnin läpi eri nopeuksilla, kunnes ne saapuvat rintamina detektorille (kuva 11). Kolonnin valinta riippuu näytteen erilaisten yhdisteiden määrästä ja niiden ominaisuuksista eli näytteen yhdisteiden ominaisuuksien tuntemus helpottaa huomattavasti kolonnin valintaa. LC-kolonnin ominaisuuksia ovat sen pituus, halkaisija, partikkelikoko ja tärkeimpänä sen sisältämä kiinteä faasi eli stationäärifaasi, jonka mukaan kolonne myös nimetään.^{53a}



Kuva 11. Kahden yhdisteen kromatografinen erottuminen kolonnissa.⁵²

Kromatogrammin piikkien terävyyteen eli resoluutioon ja erottumistehokkuuteen vaikuttavat monet tekijät. Laskennallisia periaatteita ja yhtälöitä hyödynnetään myös kaasukromatografisten kolonnien vertailussa, joskin yhtälöissä on eroavaisuuksia. Itseasiassa yhtälöt on kehitetty kaasukromatografien kolonneille ja LC-kolonnien yhtälöt ovat laajennoksia näistä. Kolonneja voidaan vertailla keskenään ns. levynumeron N ("plate number") perusteella, joka kuvaa kolonnin sisään mahtuvien analyyttien ja stationäärifaasin välisten tasapainotilojen määrää. Mitä enemmän mahdollisia tasapainotiloja on, sitä tehokkaammin kolonni pystyy yhdisteitä erottelemaan eli sitä parempi resoluutio saavutetaan. Kaasukromatografiassa levynumero esitetään retentioajan ja piikin leveyden perusteella, mutta nestekromatografiassa levynumero yhdistetään resoluutioon, retentiokertoimeen ja erottumistekijään. Käytännössä levynumeroa, ja samalla resoluutiota, voidaan kasvattaa tiettyyn pisteeseen asti kolonnin pituutta kasvattamalla.^{41b,56}

LC-tekniikan nimeäminen tehdään kolonnin stationäärifaasin, liikkuvan faasin sekä analyytin ja kolonnin välisten vuorovaikutusten tyyppien perusteella. Perinteisimmät käytettävät kolonnit ovat normaali- ja käänteisfaasikolonnit, jotka on esitetty kuvassa 12. Normaalifaasikolonnin (Normal Phase Liquid Chromatography, NPLC) pintamateriaalina on usein poolinen silika, ja erottuminen perustuu poolisiin vuorovaikutuksiin. Liikkuvana faasina käytetään veden ja orgaanisen liuottimen, kuten metanolin, seosta ja ensimmäisenä eluoituvat poolittomat yhdisteet, jotka sitoutuvat stationäärifaasiin heikoimmin. Käänteisfaasikolonnin (Reversed Phase Liquid Chromatography, RPLC) stationäärifaasi on silikaa, johon on sidottu tavallisesti C18-hiilivetyketjuja, ja eluenttina käytetään vettä, jossa on muutamista prosenteista kymmeneen prosentteihin jotakin orgaanista liuotinta kuten asetonitriiliä, metanolia tai isopropanolia. Käänteisfaasikolonnista eluoituvat ensimmäisenä pooliset analyytit ja erottuminen perustuu dispersiovoimiin. Käänteisfaasikolonnin hyvän erotuskyvyn ansiosta se sopii hyvin monenlaisten analyyttien erottamiseen.⁵⁴



Kuva 12. Vasemmalla NPLC-kolonne, jossa poolittomat yhdisteet eluoituvat poolisia yhdisteitä nopeammin. Oikealla RPLC-kolonne, jossa eluoituminen tapahtuu päinvastaisessa järjestyksessä. Silikaan on sidottu tässä C18-ketjuja.⁵⁷

Metabolomiikassa käytetään usein käänteisfaasitekniikkaa, hydrofiilistä vuorovaikutusta hyödyntävää kolonnia (HILIC) tai pentafluorifenyylipropyylikolonnia (PFPP).¹⁰ HILIC:llä saadaan erottumaan yhdisteet, joita ei RPLC:llä saada erilleen edes ioniparinmuodostajan avulla. HILIC:n stationäärifaasiksi on useita vaihtoehtoja, jotka muistuttavat hieman RPLC-kolonnin stationäärifaaseja. Silikaan sidotun hiiliketjun pituus vaihtelee ja sen päässä voi olla esimerkiksi syano-, amino-, amidi- tai dioliryhmä, mutta toisaalta stationäärifaasi voi olla myös puhdasta silikaa. Käytetty eluentti sisältää vähintään 70 % asetonitriiliä ja 2,5-30 % vettä, jossa vesi tarvitaan luomaan vesikerros kolonnin pintaan. Koska HILIC-kolonneja on hyvin monenlaisia, ei tälle menetelmälle ole olemassa yhtä selkeää erottumista perustelevaa esitystä. Analyyttien erottumiseen vaikuttavat vuorovaikutus niin stationäärifaasin materiaalin kuin sen pinnalla olevan vesifaasin kanssa.^{53b}

Koska metabolomiikassa käsitellään hyvin poolisia tai melko poolisia yhdisteitä, ei normaalifaasikolonneja juuri käytetä. RPLC-tekniikan erotuskykyä puolestaan voidaan parantaa lisäämällä eluenteihin puskureita tai esimerkiksi ioniparin muodostavaa reagenssia. Ioniparitekniikkaa käyttivät Takors *et. al*⁵⁵ tutkimuksessaan, jossa oli tarkoitus kvantitoida tyypillisenä esimerkkitapauksena käytetyn *E. coli* -bakteerin hiilen keskeiseen aineenvaihduntaan liittyviä metaboliitteja. Ioniparin muodostavaksi reagenssiksi valittiin tributyylimiamiini (TBA), joka voimistaa negatiivisella polarisaatiolla havaittavien ionien signaaleja ja parantaa resoluutiota, hidastaen analyyttien eluoitumista. Ioniparin muodostuminen edistää näitä ilmiöitä, sillä sen muodostuminen on voimakkaampaa kuin

muiden adduktien, jolloin ESI:ssä muodostuva $[M-H]^-$ -ioni havaitaan intensiivisempänä. Resoluutio paranee, koska muodostuvat ioniparit ovat analyyttejä suurikokoisempia. TBA:n käytön haittapuolena on, että sitä jää kolonniin vaikeasti poistettavaksi kontaminaatioksi.⁵⁸

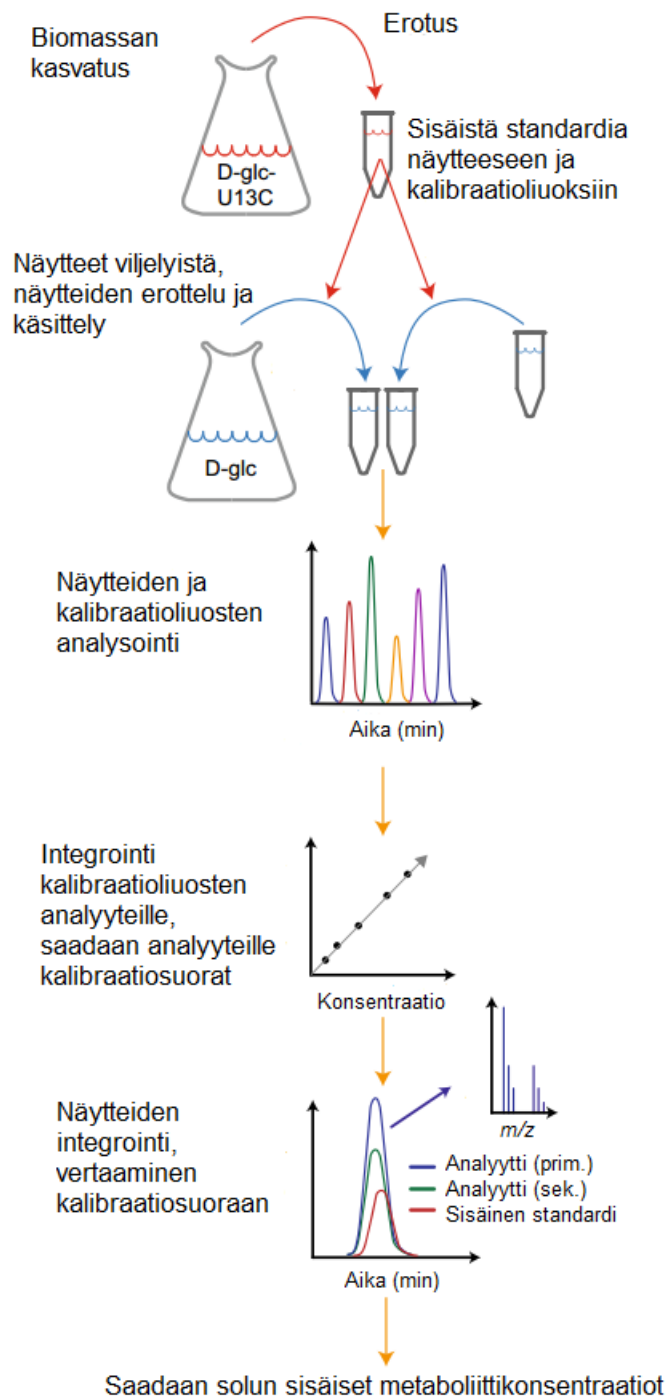
Rabinowitz *et. al.*⁴ päätyivät tutkimuksessaan kehittämään menetelmän, jossa tunnistettiin yhteensä noin 140 metaboliittia, kahdella eri polarisaatiolla ja näin ollen kahdella eri kolonnilla. Ryhmä päätyi kolonnien vertailussa valitsemaan positiivisen polarisaation mittauksiin aminopropylikolonnin, joka hyödyntää hydrofiilistä vuorovaikutusta. Negatiivisen polarisaation mittauksiin valittiin useiden kokeilujen jälkeen käänteisfaasikolonne, käyttäen liikkuvassa faasissa ioniparin muodostavana reagenssina TBA:ta. Menetelmä on kattava, mutta vaatii myös pitkän, yhteensä 90 minuutin mittausajan. Toisaalta on mahdollista kytkeä kolonnit myös rinnakkain ja hyödyntää laitteiston mahdollistamaa automatiikkaa, kuten Sabatine *et. al.*⁵⁹ tekivät: He käyttivät kolmea erilaista kolonnia, joissa kaikissa käytettiin eluenttina asetonitriilin ja veden seosta ja jokaiseen lisättiin pH-arvoon vaikuttavia lisäaineita. Mittausajat jokaiselle kolonnille olivat vain joitakin minuutteja ja plasmanäytteestä saatiin analysoitua 173 metaboliittia.

5.2. Nestekromatografia-massaspektrometria-menetelmän kehittämisen metabolomiikkaa varten

Menetelmän kehittäminen voidaan aloittaa kartoittamalla kvantitoitavien yhdisteiden ominaisuuksia ja LC-MS:n tapauksessa tekemällä niille massaspektrometriset mittaukset, joista nähdään mitkä m/z -arvot ovat intensiivisimmät ja näin ollen käyttökelpoisimmat yhdisteiden tunnistamiseen. Tunnistamisen varmistamiseksi yhdisteille valitaan myös niille tyypilliset pilkeionien piikit, joita käytetään LC-MS-menetelmän aikana tunnistamisessa. Pilkeionien piikeistä tarkkaillaan myös niiden keskinäistä suhdetta, eikä ainoastaan m/z -arvoja, mikä tuo jälleen lisävarmuutta tunnistamiseen. Pilkeioneiden perusteella voidaan erottaa yhdisteet, joilla on sama nominaalinen massa tai jopa sama monoisotooppinen massa, mutta eri rakenteet. Tällaisten yhdisteiden erottamisessa LC:n kromatografiset ominaisuudet on viritettävä huippuunsa, jotta massaspektrometrille saadaan puhtaat yhdisteet yksi kerrallaan tunnistettaviksi. Toki myös LC:llä saatu retentioaika lisää varmuutta tunnistamiseen.⁵¹

Kuvassa 13 on esitetty LC-MS-menetelmälle tyypillinen työnkulku, joka alkaa kiinnostavan näytteen kuten virtsan⁴⁶ tai solujen erotuksella, mahdollisesti solujen viljelyllä, jatkuu näytteenkäsittelyllä, laitteiston kalibroinnilla, näytteen analyysillä ja tulosten arvioinnilla. Näytteenkäsittelyä käsiteltiin tämän tutkielman luvussa 3.2. Työnkulussa nähdään

ensimmäisenä analyysivaiheena kokonaisionikromatogrammi, joka antaa analyysille suuntaa kertomalla mittaukseen tarvittavasta ajasta. Kvantitatiivista menetelmää varten tarvitaan kalibraatio-suora, joka saadaan kalibraatioliuoksilla. Kvantitatiiviset tulokset saadaan vertaamalla näytteestä saatavaa signaalia tähän kalibraatio-suoraan. LC-MS-menetelmän kehityksessä ja tulosten arvioinnissa pohditaan jokaista kuvassa esitettyä vaihetta. Kaikissa siirtymisvaiheissa ja analyysin aikana on huolehdittava metaboliittien, kalibraatioliuosten ja standardien säilyvyydestä ja pidettävä olosuhteet näytettä stabiloivina. Kiinnostavien metaboliittien ominaisuuksien selvittäminen etukäteen on ensiarvoisen tärkeää laadukkaiden ja totuudenmukaisten mittaustulosten saavuttamiseksi. Metaboliittien ominaisuudet vaikuttavat valittavaan eristämistekniikkaan, kalibraatioliuoksiin ja standardeihin, LC-laitteiston kolonniin, eluenteihin ja massaspektrien ja kromatogrammien tulkintaan. Kohdentamattoman metabolomiikan tekeminen ilman kattavia esitietoja on siis huomattavasti haastavampaa, koska näytteessä voi tapahtua konsentraatiomuutoksia missä tahansa vaiheessa, kun sen ominaisuuksia ei tunneta. Haastetta ja lisää työvaiheita tuo tietenkin jo tuntemattomien analyyttien tunnistaminen kromatogrammista ja massaspektristä.^{7,8}



Kuva 13. Työnkulku solulinjan viljelystä näytteiden LC-MS-mittauksiin.⁸

LC-MS-menetelmä on olemassa olevista kvantitatiivisista menetelmistä ylivoimaisesti kattavin ja tehokkain metaboliittien pitoisuuksien määrittämiseen. LC-MS-metodilla pystytään kuitenkin määrittämään suurin mahdollinen joukko metaboliitteja yhdellä analyysillä. LC-MS erottelee näytteen metaboliitit kolonnissa, tunnistaa ne retentioajan lisäksi massaspektrometrisesti ja laskee pitoisuudet kromatogrammin piikkien pinta-aloista. Ennen

biologisen näytteen analysointia, näyte on käsiteltävä ja puhdistettava analyysin tarkoitukselle ja laitteistolle sopivalla tavalla, laitteisto on kalibroitava ja tätä ennen on valittava sopivat kalibrantit ja standardiliuokset. Menetelmän kehitykseen vaikuttavat menetelmällä haettava kattavuus eli onko tarkoituksena tehdä kohdennettua vai kohdentamatonta metaoblomiikkaa, mikä vaikuttaa massaspektrometrilta toivottuihin ominaisuuksiin kuten resoluutioon ja MRM-ominaisuuksiin, mutta myös LC-laitteen kolonnin valintaan. Ideaalitalanne ei kuitenkaan välttämättä ole laitteistojen hintavuuden takia saavutettavissa vaan olemassa olevia laitteistoja voidaan myös muokata rajallisesti metaboliittianalyysiin sopiviksi esimerkiksi hankkimalla sopiva kolonni ja optimoimalla kromatografian erotuskyky.⁶

Kun menetelmää kehitetään suurelle määrälle analysoitavia yhdisteitä, on haastavaa pystyä huomioimaan kaikkien analyyttien erilaiset ominaisuudet ja vaatimukset. Esimerkiksi pysyvyys kaasua- ja nestefaasissa saattaa aiheuttaa ongelmia eli pelkkä varovaisuus ja huolellisuus esikäsitelyvaiheessa ei riitä, jos analyytit hajoavat mittauksessa. Toinen tyyppinen olosuhteissa huomioon otettava ominaisuus on pH. Liuoksen pH:lla on vaikutusta käytettyyn kolonniin, mutta pH:lla on merkitystä myös tutkittavien komponenttien erottumiseen ja stabiilisuuteen. Esimerkiksi olosuhteiden muutoksille herkkä β -NADH vaatii pH:n säädön 8:aan. Happamissa olosuhteissa se alkaa hapettua β -NAD⁺:ksi, jonka analyysijä varten pH kannatta säätää noin 6:een. Kummatkin nukleotidit alkavat kuitenkin hajota vesiliuoksissa jo päivissä, joten niiden säilyttämistä vedettömissä olosuhteissa voi harkita. Analyysin kannalta on yksinkertaisempaa määrittää nämä yhdisteet erillisillä analyyseillä, joissa pH säädetään joko emäksiseksi tai happamaksi. Jotkin metaboliiteista vaativat siis joko happamat tai emäksiset olosuhteet pysyäksään stabiileina, mutta neutraalit olosuhteet ovat monille metaboliiteille sopivimmat. Metabolomiikassa onkin ongelmallista pyrkiä määrittämään joukko hyvin erilaisia yhdisteitä, eikä yhtä tähän luotettavasti pystyvää menetelmää välttämättä pystytä luomaan. Yhdisteet alkavat stabiilisuusalueensa ulkopuolella hajota toisiksi, matalamman energina metaboliiteiksi, mikä vääristää tuloksia.³²

LC-MS-menetelmän suurin rajoitus on ollut semi-kvantitatiivisuus eli kvantitatiivisuuden jääminen suhteelliseksi, vertailevaksi analytiikaksi. LC-MS-tekniikkaa on vasta viime vuosina pystytty kehittämään absoluuttiseksi kvantitatiiviseksi tekniikaksi.²⁵ Kromatogrammin piikkien pinta-alat ja siten näytteestä mitatut pitoisuudet eivät ole skaalautuneet lineaarisesti, vaikka pitoisuuksien pitäisi kalibroinnin perusteella asettua kalibroitisuoralle. Konsentraatioiden huonoon skaalautumiseen vaikuttavat paitsi itse metaboliittien pitoisuudet myös kolonnin tyyppi ja sen kyky kestää erisuuruisia pitoisuuksia eli kuormitusta. Lisäksi tarkkuuteen

vaikuttavat näytteen ominaisuudet eli sen sisältämät metaboliitit ja niiden väliset vuorovaikutukset, jotka vaikuttavat eri metaboliittien ionisoituvuuskykyyn ja liukoisuuteen sekä retentioaikojen vaihteluun. Näytteen ja laitteiston ominaisuudet näkyvät mittauksissa siten, että saman yhdisteen piikki kromatogrammissa ei näykään aina samalla retentioajalla tai yhdestä metaboliitista havaitaan kaksi piikkiä yhden sijaan. Retentioajat voivat ailahtella, kun monta näytettä mitataan peräjälkeen. Toisaalta mittaolosuhteiden tulisi olla mahdollisimman samanlaiset, jotta analyysien vertailu on luotettavaa. Hyvin peräkkäisten analyysien tekemisen vaarana on systemaattisen virheen syntyminen.⁶⁰ Monimutkaisia seoksia analysoidessa ei pystytä aina ennustamaan tuloksia ja niiden laatua, ja siksi menetelmää kehitetään useiden tulosten laatua arvioivien kriteerien perusteella.

Haasteet lineaarisuuden, näytteen analyyttien keskinäisen vuorovaikutuksen ja retentioaikojen kanssa ovat yhä olemassa, mutta kehitystä tapahtuu jatkuvasti. Esimerkiksi Takorsin ryhmä⁵⁵ on saavuttanut lineaarisuuden suhteen hyviä tuloksia kuten myös McCloskeyn ryhmä⁸, jonka tutkimukset ovat hyvin tuoreita. Absoluuttinen kvantitointi eli paras mahdollinen herkkyys ja pitoisuuksien lineaarisuus eivät ole välttämättömiä, jos menetelmän kehitys tähtää vain vertailevaan analytiikkaan, mutta tällöinkin mittauksen on oltava luotettavasti toistettavissa, jotta vertailu on mahdollista.

5.3. Nestekromatografia-massaspektrometria-laitteiston kalibrointi kvantitatiivisessa analyysissä

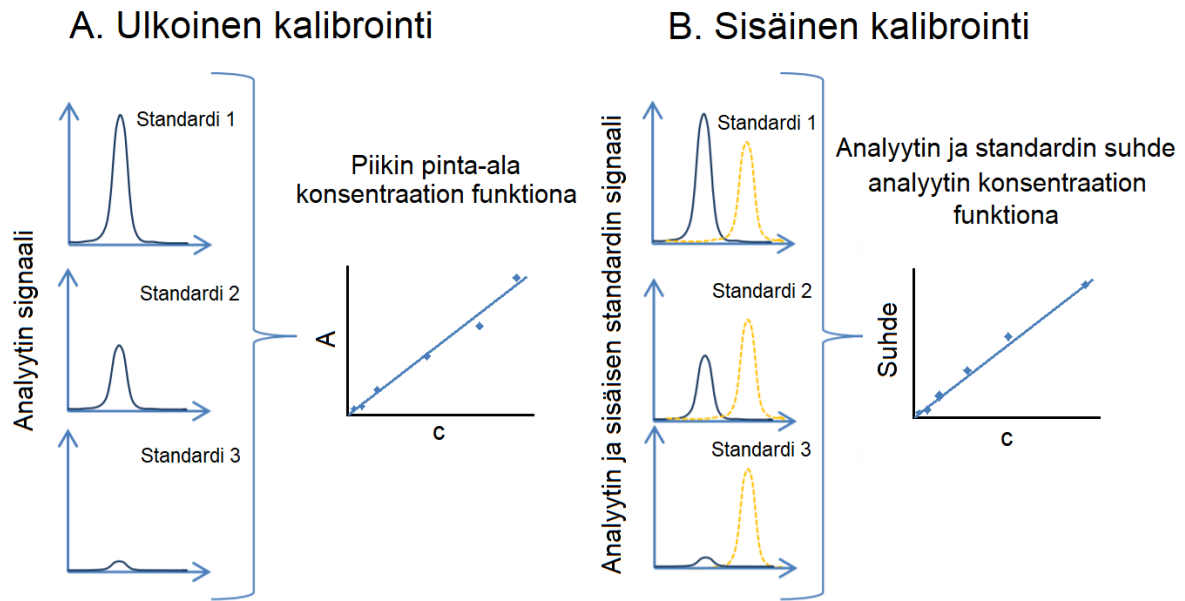
Näytteen metaboliittien tuottamat kromatogrammin piikit ja niiden pinta-alat eivät ole suoraan verrannollisia pitoisuuksiin ja siksi tarvitaan kalibrointia, jolla pitoisuudet saadaan skaalattua oikeiksi. Saataviin signaaleihin vaikuttaa metaboliittien hyvin erilainen ionisaatiotehokkuus eli tietty määrä ioneita voi vastata mitä tahansa konsentraatiota mikromooleista millimooleihin.⁶ Kalibrointia varten valitaan sopivat standardit, kalibrointitekniikka ja pohditaan jälkepäin tehtävää datan käsittelyä. Lisäksi on mietittävä standardin säilytystä ja esikäsittelyä esimerkiksi standardin ollessa yhdiste, joka hajoaa lämmön tai valon vaikutuksesta, isomerisoituu tai rasemoituu, hydrolysoituu tai hapettuu.⁴² Työnkulussa (kuva 13) kalibrointi tehdään ennen näytteen analyysia.

Metabolomiikan kvantitatiivinen tutkimus vaatii hyvää tarkkuutta, joka saavutetaan isotooppileimattulla standardimenetelmällä. Tässä tunnettu pitoisuus leimattua metaboliittistandardia injektoidaan näytteeseen erotusvaiheessa (kuva 13). Leimattu yhdiste on leimaa lukuunottamatta samanlainen kuin jokin näytteen analyytti. Koska leimattu yhdiste

käyttäytyy näytteenkäsittelyssä ja LC-MS-erotuksessa samoin kuin analyytti, mutta se voidaan erottaa massaspektrometrisesti, on se ideaali sisäinen standardi. Valitettavasti isotooppileimattuja standardeja ei ole saatavilla läheskään kaikille metaboliiteille, mikä rajoittaa isotooppileimamenetelmän käyttöä.²⁷ Tutkittavan ja erotellun analyytin konsentraatio saadaan kaavasta (1), missä c on konsentraatio ja A on integroinnista saatu pinta-ala.⁴⁹

$$c(\text{analyytti}) = \frac{c(\text{std}) \cdot A(\text{analyytti})}{A(\text{std})} \quad (1)$$

Isotooppilaimennoksen lisäksi kalibrointi voidaan tehdä hyödyntämällä kalibroitisuoria. Näitä tekniikoita ei pidetä yhtä tarkkoina kuin isotooppilaimennosta.²⁷ Kuvassa 14 on esitetty kaksi kromatografiassa yleisesti käytettyä kalibroitimenetelmää: ulkoinen ja sisäinen kalibrointi. Ulkoisen kalibroinnin menetelmässä kalibraatiostandardille suoritetaan omat erilliset mittauksensa muutamassa erilaisessa konsentraatiossa. Mittausten perusteella tehdään kalibraatiosuora, johon analysoitavan näytteen piikkien pinta-aloja verrataan. Sekä ulkoisen että sisäisen kalibroinnin menetelmässä käytetään tutkittavien analyyttien kanssa samankaltaista kalibraatiostandardiyhdistettä, jonka kemialliset ominaisuudet tunnetaan. Standardi on jokin yleisesti hyväksytty ja käytössä oleva vertailuyhdiste. Toisin kuin ulkoisessa kalibroinnissa, sisäisessä kalibroinnissa lisätään vielä toista standardia vakiokonsentraatiossa suoraan näytteeseen, kalibroitiliuokseen ja mittausten välissä käytettäviin pesuliuoksiin. Kalibrointi perustuu siis kahden standardin pinta-alojen suhteeseen ja on näin ulkoista kalibraatiota luotettavampi vaihtoehto, sillä esimerkiksi näytteen injektoinnin muutokset eivät vaikuta tuloksiin. Vertailu tapahtuu aina standardin vakiokonsentraatioon perustuvan suhdeluvun pohjalta. Metaboliittien kvantitatiivisen määrittämisen kannalta pyritään parhaaseen mahdolliseen tarkkuuteen ja myös hyvin alhaisten pitoisuuksien täsmälliseen määrittämiseen, koska joidenkin metaboliittien konsentraatiot ovat hyvin alhaisia. Vaikka metaboliittipitoisuudet ovat häviävän pieniä, niiden konsentraatioiden muutokset ovat solutasolla usein hyvin merkittäviä ja paras mahdollinen kalibraatio on siis välttämätöntä. LC-MS-menetelmässä käytetään siis sisäistä kalibrointia, kun se on mahdollista.^{61,62}



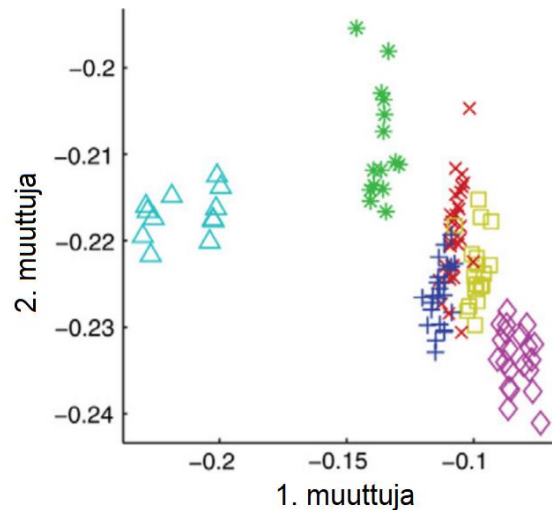
Kuva 14. A. Ulkoisessa kalibroinnissa tehdään kalibraatio-suora pitoisuuksiltaan erilaisista kalibraatiostandardeista (sininen viiva). Mitattavan analyytin konsentraatioita verrataan tähän suoraan. B. Sisäisen kalibroinnin tapauksessa hyödynnetään kalibraatiostandardin (sininen viiva) lisäksi sisäistä standardia, jonka konsentraatio pidetään vakiona (keltainen katkoviiva). Tekniikka on ulkoista kalibraatiota luotettavampi vakiona pidettävän sisäisen standardin ansiosta, jolloin mittausten toistettavuus on varmempaa, sillä pienetkin muutokset konsentraatioissa otetaan huomioon käyttämällä vertailukonsentraationa kalibrantin ja standardin suhdetta.⁶¹

5.4. Nestekromatografia-massaspektrometria-menetelmän datan käsittely

Nestekromatografiassa pitoisuuksien määrittäykset perustuvat kromatogrammin erottuneiden piikkien pinta-alojen tai korkeuksien määrittämiseen ja standardeihin vertaamiseen. Yksinkertaisissa tutkimuksissa piikkien integrointi voidaan tehdä jopa käsin jokaisen analyysin jälkeen, mutta analysoitavan seoksen sisältäessä jopa satoja yhdistettä, käytetään semi-automaattista integrointia, joka hyödyntää esimerkiksi Gaussin käyrää pinta-alan laskemiseen. Kohdentamattomassa analyysissä, jokaiselle signaalille luodaan oma ionikromatogramminsa, eli dataa kerätään näytteestä valtavasti. Datan keräämisen jälkeen saatua kvalitatiivista informaatiota verrataan tietokantoihin. Laitteistosta ja sen käyttämästä ohjelmistosta riippuen, piikkien integroinnissa käytettävät funktiot ja säädöt voivat vaihdella hieman ja tuottaa toisistaan poikkeavia tuloksia.⁴⁵

Metaboliittien analyysi tuottaa menetelmästä riippumatta informaatiota, jonka taustalla on paljon muuttujia (variables), minkä takia on luonnollista käyttää informaation jäsentelyyn ja

tulkittamiseen multivariaattianalyysiä eli monimuuttuja-analyysiä. Näillä tilastollisilla menetelmillä pystytään käsittelemään suurta informaatiomäärää, huomioimalla useita muuttujia samanaikaisesti. Ennen kokonaisvaltaisempaa ja kattavaa data-analyysiä, dataa kannatta seuloa sen verran, että huomataan ovatko tulokset lainkaan odotetunlaisia. Tämän voi tehdä esimerkiksi laskemalla suhteellista keskihajontaa. Datan käsittely aloitetaan raakadatan muokkaamisella, mihin kuuluu kohinan vähentäminen, piikkien kohdentaminen, kromatogrammin piikkien integrointi ja datan normalisointi. Normalisointi voidaan tehdä esimerkiksi analyyttien mediaanikonsentraatioon vertaamalla, mutta standardiaineiden ollessa käytössä, konsentraatiot saadaan vertaamalla näytteiden signaaleja standardien signaaleihin.⁶³ LC-MS-menetelmän tapauksessa analyyttien retentioajat kustakin analyysistä yhdistetään tämän jälkeen niihin kuuluvaan MS-dataan eli m/z -arvoihin. Tilastollisessa analyysissä tarkastellaan siis kromatografian ja massaspektrometrin havaitsemismenetelmän tapauksissa kaksiulotteista informaatiota eli retentioaikoja ja m/z -arvoja. Analyysissä havaituille piikeille (rt. vs. m/z) annetaan referenssinumero. Piikit yhdistetään omassa taulukossaan, niin että saman rt. vs m/z -arvon saaneet piikit ovat samalle riville kohdistettuina. Taulukossa on myös piikkien normalisoidut intensiteetit, joiden perusteella voidaan tehdä esimerkiksi pääkomponenttianalyysi (principal components analysis, PCA). Multivariaattianalyysiin kuuluvan bilineaarisen PCA:n avulla voidaan erottaa metaboliitit, jotka ovat vastuussa esimerkiksi lääkeainetta saaneiden ja kontrolliryhmän välillä havaituista muutoksista, sillä niiden lisääntyvä pitoisuus havaitaan taulukosta, jonka PCA:ta suorittava ohjelmisto käy läpi. Käytännössä PCA:ssa luodaan kuvaaja, jossa data nähdään ryhmiteltynä x- ja y-akselin suhteen (kuva 15). Ryhmittely syntyy koejärjestelyn eri ryhmien ominaisuuksien perusteella, jotka tulevat toiselle akselille, kun toiselle tulee esimerkiksi jonkin metaboliitin pitoisuus, jonka muutos on herättänyt huomiota. Lääkeaineen vaikutukseen liittyvät metaboliitit voidaan näin osoittaa suuresta metaboliittien joukosta, mutta tilastollisen analyysin luotettavuuden edellytyksenä on myös luotettavasti toistetut analyysit. Vastaavaa ryhmittelyä voidaan tehdä näytteiden eli esimerkiksi potilaista otettujen näytteiden välillä tai jonkin muun muuttujan kuin m/z -arvon suhteen.^{63,64}



Kuva 15. Ryhmiteltyä, pisteytettyä informaatiota kahden muuttujan suhteen.⁶³

PCA:ta tehokkaampana menetelmänä pidetään osittaisten pienimpien neliöiden (partial least squares, PLS) käyttämistä. PLS:ää voidaan käyttää, kun tutkitaan selkeästi jonkin aiheuttamaa vastetta tai pitoisuuksia verrataan johonkin tunnettuun ominaisuuteen tai ominaisuuksiin. Se siis mallintaa suoraan metaboliitin ja ominaisuuden yhteyden. Osittaisten pienimpien neliöiden regressioanalyysillä (PLSR) maksimoidaan selittävien muuttujien ja vasteen tai ominaisuuden kovarianssi, eli lopulta voidaan ennustaa suoraa vuorovaikutusta havaittujen metaboliittien ja ominaisuuden välillä. Data-analyysiä voidaan tehdä siis ryhmittelevän tyylin lisäksi myös etsimällä jatkuvia vasteita eli regressiota. Jatkuva vaste syntyy esimerkiksi insuliinin pitoisuuden kasvaessa veressä. Kummassakin tapauksessa informaation perusteella pystytään kuitenkin luomaan malleja ja ennustuksia. Vaikeasti analysoitavan insuliinin tapauksessa, sen konsentraatiomuutoksiin liitettyjen metaboliittien kautta tehty regressioanalyysi voi ennustaa insuliinin pitoisuuden.⁶³

Tilastolliseen analyysiin valittava menetelmä riippuu paljon analyyttisten tulosten laadusta eli analyysin onnistumisesta ja toistettavuudesta, mutta toisaalta myös analyysin tyypistä. Pelkän massaspektrometrin informaation käsittely on yhdistelmätekniikoiden tuottamaan informaatioon verrattuna huomattavasti yksinkertaisempaa. Lisäksi datan analysointi on erilaista kohdennetun ja kohdentamattoman metabolomiikan tapauksissa. Kohdennetussa metabolomiikassa käytetään esimerkiksi MRM-tekniikkaa, jolloin informaatio on vielä massaspektrometrin profiilispektriäkin yksinkertaisemmassa muodossa, mikä helpottaa datan käsittelyä.²⁷ MRM:ää hyödyntävässä kohdennetussa metabolomiikassa on siis ennen analyysijä luotava lista etsittävästä metaboliiteista, niiden m/z -arvoista ja oletusikkuna

retentioajoista. Tämän tekniikan hyödyntämisessä on vaarana, että päällekkäisistä piikeistä heikompi jää data-analyysissä huomaamatta.⁶⁵

Datan käsittelyssä hyödynnetään laskennallisia ohjelmia, joita tarjoavat analyttisten laitteistojen myyjät, muut itsenäiset ohjelmistokehittäjät ja lisäksi tarjolla on kaikille avoimia ohjelmistoja. Ohjelmistot voivat esimerkiksi etsiä biologisia merkkiaineita informaatiosta multivariaattianalyysillä, joita on PCA:n ja PLS:n lisäksi tarjolla useita erilaisia. Ohjelmistot hyödyntävät yhdisteiden tunnistamisessa usein pisteytys-järjestelmää, jonka perusteella datasta löytyvät yhdisteet pyritään saada vastaamaan tietokannan yhdisteitä. Näiden ohjelmistojen tuloksilla ja niiden toimintatavoilla on kuitenkin eroavaisuuksia eli niistä kaikki eivät esimerkiksi tunnista samoja tai yhtä monta merkkiainetta näytteestä.²⁷ Haastetta kaikkeen tilastolliseen datan käsittelyyn tuovat nämä hieman puolueelliset datan käsittelymenetelmät, sopivan menetelmän valitseminen, kromatografisten menetelmien kanssa havaittavat piikkien siirtymiset ja järjestyksen muuttuminen ja pyrkimys etsiä vain yksi signaali yhtä metaboliittia kohti.⁶⁵

5.5. Nestekromatografia-massaspektrometria-menetelmän tulosten arviointi

Menetelmän kehittämiseen kuuluu tulosten arvioiminen, mikä tehdään vertailemalla saatujen kromatogrammien ja spektrien ominaisuuksia vanhempiin tuloksiin, mutta myös tekemällä sisäistä vertailua tehtyjen analyysien välillä. Vertailun kohteena on laadun lisäksi kattavuus, eli tarkastellaan kuinka suurelle ja heterogeeniselle yhdistevalikoimalle menetelmä sopii. Kvantitatiivisten menetelmien arvioinnissa on tyypillistä vertailla alhaisinta havaitsemispitoisuutta eli etsiä toteamisraja (lowest limit of detection, LOD). LOD:iin vaikuttaa pH, käytetyt eluentit ja niiden suhteet, kolonnin ominaisuudet ja käytössä olevat tekniikat. Kromatografiassa olennaista on myös analyttien erottuminen pohjaviivasta, mikä kertoo menetelmän herkkyydestä. Korkeaan, paljon kohinaa sisältävään pohjaviivaan voi jäädä piiloon pienen pitoisuuden yhdisteitä tai isobaarisia signaaleja, jolloin niitä ei voi detektoida.⁸

Herkkyyttä ja havaitsemisrajoja verrataan usein edeltäviin tutkimuksiin, mutta myös menetelmän kehittämisen sisäinen vertailu on tärkeää luotettavien tulosten saamiseksi. Tätä varten mittauksia toistetaan samoilla asetuksilla ja vertaillaan mahdollisia muutoksia, jotka ovat kromatografiassa tyypillisesti retentioaikojen ja kromatogrammin piikkien pinta-alojen muutoksia. Yksittäisten analyttien retentioaikojen tulisi pysyä samoina, mutta myös yhdisteiden keskinäisen eluutiojärjestyksen pitäisi säilyä ja kromatogrammissa olevat piikit pitäisi selkeästi pystyä erottamaan toisistaan. Piikeistä myös nähdään jos yhdisteen eluutio on

ollut epätarkkaa, jolloin piikissä nähdään häntä, mikä tekee sen pinta-alan ja pitoisuuden määrittämisestä hankalaa.⁸

Mittaustuloksissa tulee siis olla mahdollisimman vähän hajontaa, jotta menetelmää voidaan pitää täsmällisenä ja luotettavasti toistettavana. Toisaalta myös uusittavuutta tarkkaillaan muuttamalla mittaukseen vaikuttavia tekijöitä kuten mittauksen suorittajaa, laboratoriota tai muuttamalla muita mittausolosuhteita.⁶¹ Koska olosuhteet voivat erota esimerkiksi laitteiston ominaisuuksien, kalibraation, ilman kosteuden tai lämpötilan takia, kannattaa vertailtavat mittaukset tehdä peräjälkeen. Kun uusi analyysi suoritetaan pian edellisen mittauksen jälkeen, on tarkkailtava ns. carryover-vaikutusta eli edeltävästä mittauksesta jääneitä kontaminaation vaikutuksia - muistijälkeä. Vaikka useiden mittausten suorittaminen lyhyellä aikavälillä olosuhteiden muuttumattomuuden takia olisi suotavaa, on muistijäljen vaikutus minimoitava riittävällä laitteiston huuhtelemisella.⁸

Analyysin täsmällisyyttä arvioidaan siis hajonnan perusteella. Menetelmän virheettömyyttä puolestaan on tulosten paikkansapitävyys eli kuinka totuudenmukaisia kvantitatiiviset tulokset ovat. Metabolomiikassa todelliseen kvantitatiiviseen tulokseen vaikuttaa jo näytteen käsittelyssä hyvin moni vaihe, joissa analyyttien konsentraatiot muuttuvat. Laitteiston ja menetelmän täsmällisyys voidaan kuitenkin virittää huippuunsa vertailemalla tuloksia standardeihin, joiden alkuperä ei vaikuta mittaustuloksiin.⁶¹

Kvantitatiivisissa tekniikoissa on tärkeää arvioida tulosten lineaarisuutta. LC-MS-menetelmää varten valmistetaan standardit, joiden avulla tehdään laitteistokohtainen kalibrointisuora. Näytteen kromatogrammin piikkien pinta-aloja verrataan kalibrointisuoraan, minkä avulla saadaan selville kunkin analyytin todellinen pitoisuus. Sopivan lineaarisen välin päättäminen riippuu tutkittavista näytteistä: Metaboliittien tutkimuksen tapauksessa lineaarisuuden noudattaminen hyvin alhaisilla pitoisuuksilla on olennaista, joten kalibrointi tulee tehdä matalille konsentraatioille tarkasti. Tällöin kalibrointisuoralle tulee vähemmän pisteitä korkeille pitoisuuksille.⁸

Sekä McCloskey että Takors *et. al* tarkkailivat lineaarisuuden toteutumista numeerisesti vertailemalla korrelaatiokertoimia eli pitoisuuden vaikutusta kromatogrammin pinta-alaan. Korrelaation tulee olla mahdollisimman lähellä arvoa 1 ja Takorsin ryhmän tutkimuksissa se oli vähintään 0,9982 kun McCloskeyllä alin korrelaatio oli 0,991. Kumpikin ryhmä tarkkaili myös LOD-, LOQ- (lowest limit of quantitation, määrittäysraja) ja variaatiokerrointa eli kunkin analyytin retentioajoissa tapahtuvia prosentuaalisia muutoksia mittausten välillä. McCloskeyn

ryhmä oli kiinnostunut myös ylimmästä kvantitoidusta pitoisuudesta, joka tosin ei metabolomiikassa ole tärkeässä roolissa. Takorsin tutkimuksessa LOD vaihteli 1,17 nM 364,25 nM:iin ja LOQ 4,18 nM:sta 1,26 µM:iin. McCloskey *et. al* pääsivät LOQ:ssa alimmillaan $8,0 \cdot 10^{-6}$ µM:iin ja korkeimmillaan he kvantitoivat 2 µM-pitoisuuksia. LOD-lukuja ei heidän tutkimuksessaan tarkkailtu. Takorsin ryhmällä korrelaatiokerroin eli toistettavuus oli korkeimmillaan 5,65 % NADH:lle. Korrelaatiokerroin kertoo kokeen uudelleen toistettavuudesta kokonaisuudessaan huomioiden laitteiston, mittajaan ja näytteen ominaisuudet. Takorsin tuloksissa suhteelliset keskihajonnat (relative standard deviation, RSD) olivat 100 nM ja 500 nM + 5µM standardeille 9 % ja 4 % eli korkeampien pitoisuuksien kvantitointi on matalia luotettavampaa. McCloskey *et. al* saavuttivat *E. coli* -bakteerin metaboliittien analyysissä korkeimmillaan 35,9 % ja matalimmillaan 1,4 % suhteellisen keskihajonnan eli heillä hajontaa oli paljon enemmän. He eivät myöskään saaneet tutkimuksessaan kvantitoitua kaikkia kohdemetaboliitteja toisin kuin Takorsin ryhmä. Toisaalta Takorsin ryhmä tutki paljon rajatumpaa metaboliittien kokonaisuutta – vain 29 metaboliittia. Heidän saamistaan kromatogrammeista myös nähdään, että menetelmällä voisi kvantitoida suuremman määrän analyyttejä yhdellä ajolla, joka on kuitenkin jopa 90 minuuttia pitkä. Kromatogrammin piikkien välillä on huomattavasti väljyyttä. McCloskeyn kehittämässä metodissa mittausaika oli vain 33 minuuttia ja alle 30 % RSD:llä kvantitoitiin 77 metaboliittia eli yli kaksi kertaa enemmän kuin Takorsin tutkimuksessa. Käytetyt laitteistot olivat hyvin samanlaiset: HPLC yhdistettynä massaspektrometriin, jonka massa-analysointina oli QTRAP, joka yhdistää kolmoiskvadrupolin ja lineaarisen ioniloukun (LIT). Tutkimusten tavoitteet kuitenkin poikkesivat toisistaan metaboliittien määrän ja tavoitepitoisuuksien suuruusluokan suhteen.^{8,55}

Metaboliitteja kvantitoivien menetelmien vertailua ei voi aina tehdä suoraviivaisesti, sillä käytetyissä laitteistoissa, näytteenkäsittelyssä, olosuhteissa ja tavoitteissa on eroja. Takorsin ja McCloskeyn ryhmien tapauksissa nämä kaikki analyysieihin vaikuttavat tekijät olivat kuitenkin hyvin samanlaisia, vaikka loppupäätelmissä on eroavaisuuksia. Merkittävimmät erot olivat käytetyissä orgaanisissa eluenteissa ja päätelmissä pH:sta, joilla voi olla tekemistä toistensa kanssa. Kummankin ryhmän tulokset ovat olosuhteita säätämällä saadut parhaat mahdolliset tulokset, mutta McCloskeyn ryhmä oli keskittynyt hyvin alhaisiin pitoisuuksiin, mikä näkyy esimerkiksi kehoissa RSD-arvoissa. Korkeammassa pitoisuuksissa tehdyt Takorsin ryhmän tulokset saivat matalammat eli RSD-arvot.^{8,55}

Kaksi tekniikkaa yhdistävissä metodeissa, kuten juuri LC-MS-menetelmän tapauksessa, on arvioitava ja testattava kummankin tekniikan luotettavuutta ja suorituskykyä. Esimerkiksi McCloskey *et. al*⁸ vaihtelivat testeissään hieman eluenttien suhteita, kolonnin pituutta ja LC-laitteiston letkujen pituutta. Testien tuloksena ei havaittu muutoksia retentioaikojen suhteessa ja suurin RSD jäi 15,8 %:iin. Koska laitteistoon tai menetelmään tehdyt pienet muutokset muuttivat kaikkia retentioaikoja yhtäläisesti, menetelmä ja laitteisto läpäisivät testin ja LC-laitteistoon voitiin luottaa.

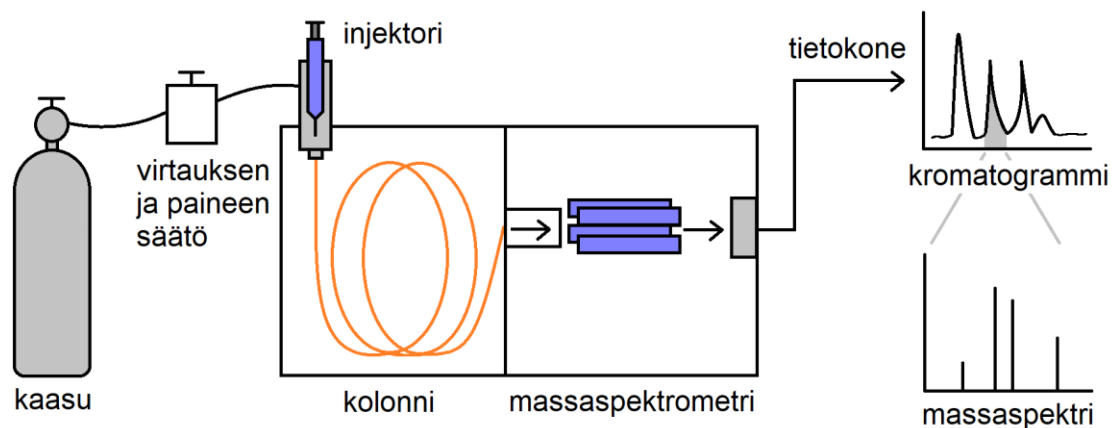
LC yhdistetään metabolomiikan tutkimuksessa massaspektrometriin juuri yhdisteiden tunnistamisen luotettavuuden lisäämisen takia, mutta myös itse MS-laitteiston luotettavuutta arvioidaan. Yhdisteiden tunnistamisen luotettavuutta lisää massaspektrometrin SRM/MRM-ominaisuus, jonka avulla voidaan seurata yhdisteiden pilkkoutumista. Analyytin alkaessa pilkkoutua massaspektrometrilla, saadaan edelleen lisää luotettavuutta seuraamalla pilkkoutumistuotteiden signaalien intensiteettejä. Vaikka kvantitointi perustuukin runsaimpaan piikkiin, tulee luotettavuus runsaimman piikin ja pilkkoutumispiikkien suhteista, joiden avulla varmistetaan oikean yhdisteen tunnistaminen. Juuri tämän takia kolmoiskvadrupolia suositaan massa-analysaattorin osana. Yhdisteen massaspektrin pilkeioneiden suhteiden pitäisi pysyä samana, vaikka pitoisuudessa tapahtuisikin muutoksia. Massa-analysaattoreiden havaitsemisrajoissa on tässä suhteessa eroja, mutta esimerkiksi juuri sekä Takorsin että McCloskeyn käyttämä hybridimassa-analysaattori pystyy hyvin tarkkaan ja luotettavaan määrittelykseen.⁸

6 Kaasukromatografia-massaspektrometria metabolomiikassa

Kromatografisista menetelmistä kaasukromatografia (GC) on vähintään yhtä yleisesti käytetty menetelmä kuin nestekromatografia, mm. laitteiston yksinkertaisuuden ja käyttäjävälisyyden vuoksi. Kaasukromatografia sopii parhaiten hydrofiilisten, pienten mutta alle 1000 u painoisten haihtuvien orgaanisten yhdisteiden ja niistä valmistettujen johdannaisten erottamiseen. Kun nestekromatografiassa liikkuvana faasina on nestemäinen eluentti tai eluenttien seos, kaasukromatografiassa erottuminen tapahtuu kantajakaasun virratessa kolonnissa. Erottumisen perusteena ovat analyyttien suhteelliset höyrynpaineet ja vuorovaikutus kolonnin stationäärifaasin kanssa.^{41a}

Kuvassa 16 on esitetty GC-MS-laitteiston tärkeimmät osat, joista detektoreita voi olla useita rinnakkain ja yksi vaihtoehto yhdisteiden havaitsemiseksi ja tunnistamiseksi on

massaspektrometrinen määrittäminen. GC:ssä käytetään inerttiä helium-, vety- tai typpikaasua kromatografian liikkuvana faasina eli kantajakaasuna. Ensimmäinen erottumiseen vaikuttava tekijä on kantajakaasun virtauksen nopeus, jota säädellään ennen kaasun pääsemistä injektoriin. Joitakin mikrolitroja näytettä injektoidaan kaasuvirtaukseen lämpösäädellyssä säiliössä, jotta näyte sekoittuu kaasumaisena kantajakaasuun. Tämä tarkoittaa, että injektointilämpötilan on oltava kaikkien näytteen analyyttien kiehumispisteitä korkeampi. Injektointiportin lämpötilan muutos nähdään kromatogrammissa yhdisteiden retentioaikojen ja piikkien muotojen muutoksena. Liian matalissa lämpötiloissa kaikki analyytit eivät höyrysty ja liian korkeissa lämpötiloissa yhdisteet alkavat hajota tai uudelleenjärjestäytyä.^{41a,b}



Kuva 16. Kaaviokuva GC-MS-laitteistosta.

Kaasukromatografiseen erottumiseen vaikutetaan siis kaasun virtausnopeudella, lämpötilasäätelyllä ja kolonnin valinnalla. GC-kolonnit ovat tavallisesti joitakin kymmeniä metrejä, mutta joissain tapauksissa jopa satoja metrejä pitkiä. Kolonnin stationäärifaasina on joko nestettä tai kiinteää materiaalia, joista nestefaasin sisältävät kolonnit ovat merkittävästi suosituimpia. Kolonnit voidaan jakaa myös stationäärifaasin pakkaustyyppin mukaan, joista avoimet kapillaarikolonnit ovat pakattuja kolonneja suosituimpia.^{41a} Päälystetyissä avoimissa kolonneissa käytetään silikaa (SiO_2) ja kolonnin ulos jäävä pinta on polyimidipolymeeriä, joka tekee silikasta stabiilia. Kolonnin stationäärifaasi voi olla joko pooliton tai poolinen.⁶⁶

Kolonnissa tapahtuvaa erottumista voidaan ajatella hetkellisten tasapainotilojen kautta, joissa analyytit imeytyvät stationäärifaasiin tai vuorovaikuttavat sen pinnalla. Analyytin kykyä vuorovaikuttaa kolonnin stationäärifaasin kanssa kuvataan jakautumisvakiona (partition/distribution constant), joka muistuttaa tasapainovakiota. Jakautumisvakio kuvaa stationäärifaasissa olevan analyytin pitoisuuden ja liikkuvassa faasissa olevan analyytin

pitoisuuden suhdetta ja sen arvo on lämpötilariippuvainen. Tämän takia lämpötilasäätelyllä voidaan vaikuttaa analyyttien retentioaikoihin.^{41a} Esimerkiksi juuri jakautumisvakiota voidaan hyödyntää kromatogrammin eri ominaisuuksien numeeristen arvojen laskemisessa. Näitä arvoja ovat levynumero, resoluutio, retentiotilavuus ja erottumistekijä. Tuntemalla tätä teoriataustaa kolonneja pystytään kehittämään ja tuloksia vertailemaan tehokkaasti.⁶⁶

Kolonne on GC-laitteistossa kolonniuunin sisässä. Uunilla säädellään lämpötilaa alle sadasta °C-asteesta 360 °C:een. Kun nestekromatografiassa analyysi voi olla isokraattinen tai gradienttianalyysi, joissa liuotinsuhteet pysyvät samoina tai muuttuvat analyysin aikana, kaasukromatografisessa analyysissä säädetään lämpötilaa. Isotermisessä analyysissä kolonnin lämpötila pidetään samana ja ohjelmoidussa analyysissä lämpötilaa nostetaan lineaarisesti, jolloin kaikki näytteen analyytit varmasti ovat kolonnissa kaasumaisina ja pääsevät etenemään detektorille saakka. Lopulta myös kolonnin jälkeen tulevan detektorin lämpötila on oltava riittävän korkea estämään analyyttien tiivistymisen sille.^{41b} Samoin kuin nestekromatografian tapauksessa, erottuneet analyytit havaitaan esimerkiksi massaspektrometrillä ja informaatio saadaan kromatogrammin muodossa. Kromatogrammista voidaan lukea analyyteille retentioajat, ja pinta-aloista voidaan johtaa analyyttien pitoisuudet näyteessä. Näytteen analyytit tunnistetaan tavallisesti spektrikirjaston informaatioon tehtävällä vertailulla, jossa huomioidaan retentioaika ja detektorin saamat arvot, jotka massaspektrometrin tapauksessa ovat m/z -arvoja. Analyyttien tunnistaminen voidaan tehdä myös manuaalisesti tarkastelemalla spektrissä havaittavia ioneja. Muita havaitsemismenetelmiä ovat liekki-ionisaatiodektori (flame ionization detector, FID), lämmönjohtodektori (thermal conductivity detector, TCD) ja elektroninkaappausdetektori (electron-capture detector, ECD).⁶⁶

6.1. Kaasukromatografia-massaspektrometria-menetelmä metabolomiikassa

GC asettaa näytteelle enemmän vaatimuksia kuin LC ja sitä käytetään usein metabolomiikassa tapauksissa, joissa LC ei pysty erottelemaan kaikkia metaboliitteja. Vaikka injektointikammion ja kolonnin uunin lämpötilaa pystytään säätämään, on laitteistolla rajansa, eikä heikosti haihtuvia yhdisteitä pystytä erottelemaan. Näytteen analyyttien pitää siis olla kolonnissa kaasumaisina ja myös kestettävä korkeaa lämpötilaa hajoamatta kokonaan. Näytettä voidaan esikäsitellä ja valmistaa analyyteistä johdannaisia mutta se vie aikaa ja tekee tulosten tulkittamisesta työläämpää. Lisäksi näytteenkäsittely on yksinkertaisempaa jos näyte saadaan ennen analyysiä liukenemaan GC-laitteistolle sopivaan alhaisissa lämpötiloissa haihtuvaan nesteeseen, sillä tavalliset injektorit sopivat nestemäisille näytteille.⁶⁶

GC-MS-menetelmä sopii heikosti poolisten yhdisteiden tai sellaisiksi johdannaisiksi valmistettujen yhdisteiden analytiikkaan. GC:llä saadaan erottumaan öljyt, esterit, alkyylisilylijohdannaiset (usein trimetyyli- tai *tert*-butyylidimetyylisilyylit), hiilivedyt ja hajuaaineet. Esimerkiksi oksaloetikkahappo on kaasufaasissa hyvin epästabiili, pieni kahden arvoinen karboksyylihappo, jonka kvantitointi voisi onnistua silyloituna paremmin. GC on rajoittunut myös yhdisteiden koon suhteen ja viimeistään yli 1000 u yhdisteet eivät enää ole erotettavissa, sillä niiden haihtuvuus on heikompaa. Toisaalta LC-MS-laitteiston erotuskyky ei välttämättä riitä juuri pienikokoisimpien yhdisteiden erottamiseen, jolloin GC-MS on hyvä täydentävä menetelmä.⁶⁷

Kaasukromatografisella erotuksella on myös etunsa. GC-analyysi on nopea: se kestää parhaimmillaan vain minuutteja. Nopeuden lisäksi saavutetaan hyvä resoluutio eli yhdisteet ehtivät lyhyiden analyysienkin tapauksessa erottua toisistaan. Analyysiin vaaditaan vain mikrolitroja näytettä ja herkkyydessä päästään jopa ppb-pitoisuuksiin. Kvantitatiivinen analyysi on tarkka ja luotettava, mikä nähdään alle 5 % RSD-arvoina.^{41a}

Koska pelkällä kaasukromatografilla ei pystytä tunnistamaan analyyttejä luotettavasti pelkän retentioajan perusteella, yhdistetään GC usein massaspektrometriin. Massaspektrisen informaation ansiosta analyytit pystytään tunnistamaan myös MS-kirjaston avulla. Tietokone vertaa saatu massaspekttriä kirjaston spektreihin. Koska jokaisen piikin vertaaminen on hidasta, voidaan massaspekttrillä tarkkailla vain kiinnostavina pidettyjä ioneita (selected ion monitoring, SIM), mikä vaikuttaa myös massaspektrometrin asetuksiin. SIM:n avulla päästään alempiin herkkyyksiin, kun kaikkia detektorille saapuvia ioneita ei tarvitse analysoida. GC:n kanssa voi käyttää myös MS/MS-ominaisuuksia jos se on massa-analysointin puitteissa mahdollista. GC yhdistetään perinteisesti EI-lähteen kanssa, jossa ionisaatio tapahtuu kaasumaisille analyyteille. Koska EI tuottaa runsaasti pilkeioneita, on spektrikirjastoon tehtävä vertailu tärkeässä osassa yhdisteiden oletettujen yhdisteiden tunnistamista. EI-spektrit ovat luotettavasti toistettavia kaikilla EI-lähteillä, joten kirjastoon tehtävä vertailu on luotettavaa. Myös CI-lähdettä käytetään, mutta merkittävästi vähemmän. Massa-analysointina GC:n tapauksessa käytetään usein kvadrupolia, ioniloukkaa tai TOF-massa-analysointia. TOF on hyvä valinta tapauksissa, joissa piikkien leveydet ovat alle sekunnin.^{41c}

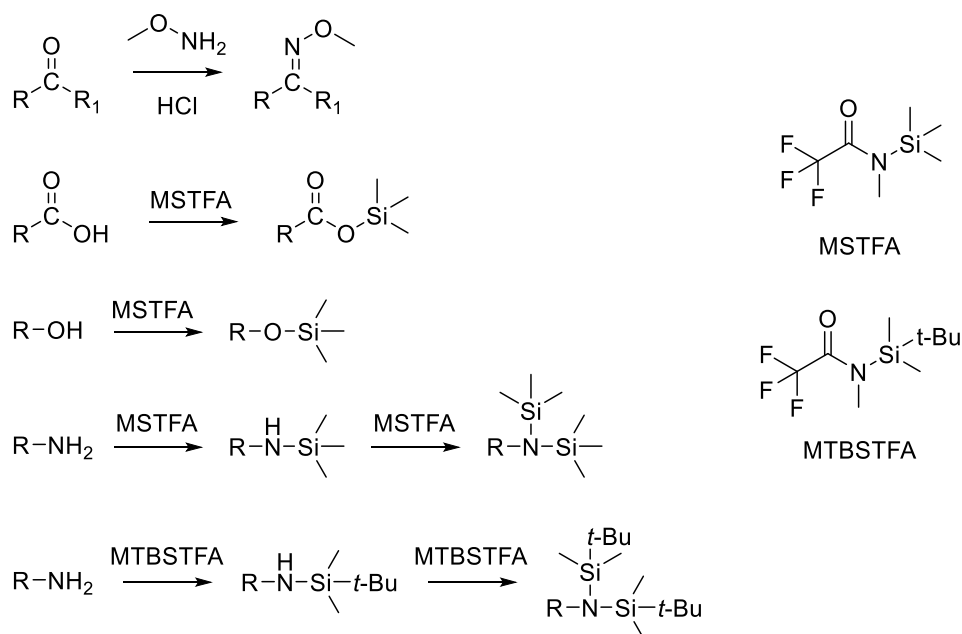
GC:n ja massaspektrometrin yhdistämisessä on otettava huomioon myös kaasuvirtaus. Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, ettei GC-MS-laitteistossa voi käyttää pakattuja kolonneja, joissa kaasuvirtaus on kapillaarikolonneja suurempi, sillä ionilähde ei kestä sitä. Toisaalta

kapillaarikolonneilla on myös huomattavasti parempi erotuskyky kuin pakatuilla kolonneilla ja se valitaan myös tämän takia GC-MS-analyysiin. GC:n ja MS:n yhdistäminen voidaan tehdä T-kappaleella, jonka sisällä luodaan kapillaarin ympärille ionilähteen tarvitsema vakuumi. Toinen vaihtoehto on suora kytkentä, jossa kaikki GC:ltä tulevat analyytit päätyvät varmasti massaspektrometrille.^{35f}

GC-MS on ollut, ja on yhä, suosituin analyytin menetelmä metaboliittien analyysissä. GC:llä analysoitavat metaboliitit voivat olla esimerkiksi orgaanisia happoja, sokereita tai rasvahappoja. Myös joidenkin aminohappojen analysointi onnistuu, mutta niistä ja monista muista yhdisteistä on valmistettava johdannaisia niiden haihtuvuuden parantamiseksi.³ Tämä takia LC-MS-tekniikka kasvattaa kuitenkin suosiotaan jatkuvasti, sillä sen avulla pystytään analysoimaan ominaisuuksiltaan keskenään erilaisempia analyyttejä ilman johdannaisten valmistamista.⁴⁹ Kuten LC-MS-analyysissä, ei GC-analyysissäkään ei tarvita suuria määriä näytettä, sillä menetelmän herkkyys on niin hyvä, GC-analyysi erottelee näytteen analyytit tehokkaammin kuin LC. GC-MS:n käyttämälle EI:lle on laajat spektrikirjastot ja GC-MS:lle on kehitetty standardoituja menetelmiä, laitteiston hinta on kohtuullisen alhainen, eikä sen käyttäminen ole haastavaa. Metabolomiikan tapauksessa menetelmän kehittäminen ei kuitenkaan ole täysin suoraviivaista, metaboliittien monimutkaisen joukon ja niiden vaihtelevien ominaisuuksien takia.¹²

GC:n erotuskyky on itseasiassa LC:n erotuskykyä parempi, mutta sen näytteelle asettamat vaatimukset tekevät siitä metabolomiikan tutkimuksessa rajoittuneen menetelmän. Metaboliitit eivät pääsääntöisesti ole helposti haihtuvia tai stabiileja korkeissa lämpötiloissa, joten niistä ja myös käytössä olevista standardiyhdisteistä joudutaan poikkeuksetta valmistamaan johdannaisia. Valmiit johdannaiset eivät saa tukkia tai muuten vahingoittaa laitteiston osia. Valitettavasti johdannaisten valmistaminen aiheuttaa aina jonkin verran vääristymiä saatavaan informaatioon ja vääristymä on jokaiselle metaboliitille tyypillinen, mikä tekee jälkeenpäin tehtävästä virheiden korjaamisesta työlästä ja haastavaa. Vääristymiä tulee jo johdannaisten valmistamisessa, sillä epästabiileimmat metaboliitit alkavat pian lämpimissä olosuhteissa muuttua matalamman energian yhdisteiksi. Johdannaisten valmistaminen siis vaikuttaa kaikkiin näytteen metaboliitteihin jonkin verran, mutta eri tavoin. Johdannaisten valmistamista lukuunottamatta työnkulku on hyvin samanlainen kuin LC-MS-menetelmän kehityksessä ja analyysissä (kuva 13).¹²

GC-MS-metabolomiikassa silyloivat ja/tai metoksoivat johdannaisreaktiot ovat tavallisimpia. Toisin kuin LC-MS:lle valmistetut näytteet, GC-MS-laitteistolle valmistettavat näytteet kuivataan vakuumissa ennen johdannaisten valmistamista, sillä vesi estää suojausreaktion tapahtumista. Metoksojohdannaista valmistetaan ketoryhmän sisältävistä yhdisteistä, minkä jälkeen tehdään silyloiti OH-, -COOH- ja NH₂-ryhmille. Kaaviossa 3 on esitetty joitakin tyypillisiä vaihtoehtoja valmistaa johdannaista. Aminoryhmän silyloittuminen on näistä kolmesta hitainta ja sen kumpikin protoni pitää saada korvattua silyyliryhmällä. Koska metaboliittien konsentraatioissa tapahtuu helposti muutoksia, pitäisi johdannaisten valmistaminen tehdä nopeasti. Liian lyhyillä reaktioajoilla johdannaisten muodostuminen jää kuitenkin kesken, ja näyte sisältää joistakin metaboliiteista vain osittain reagoineita molekyyliä. Reaktion keskeneräisyys näkyy yksittäisen yhdisteen kromatogrammissa useampana piikkinä. Pienempi, osittain reagoinut johdannainen retentoituu ensin ja suurempi myöhemmin. Jos reaktio ei ole loppunut ja analyysi suoritetaan uudelleen, havaitaan piikkien suhteiden muuttuvan. Koska johdannaisten valmistus, joillekin yhdisteryhmille kestää jopa vuorokauden, mutta useille yhdisteille riittää muutama tunti, on usein kannattavampaa pyrkiä tekemään korjauksia jälkeinpäin kuin odottaa reaktion loppumista. Toisaalta silloin syntyy todennäköisemmin epävarmuutta metabolisesti tärkeiden yhdisteiden kvantitointiin. Tällaisia, hitaasti reagoivia yhdisteitä ovat esimerkiksi aminohapot.¹²



Kaavio 3. Tavallisimpien johdannaisten valmistus. Tässä metyyliisilyylitrifluoriasetamidi (MSTFA) ja metyyli-*tert*-butyyliisilyylitrifluoriasetamidi (MTBSTFA).¹²

GC-MS-menetelmää arvioidaan hyvin samanlaisilla kriteereillä kuin LC-MS-menetelmää eli tarkkaillaan lineaarisuutta, massaspektrin pilkeioneiden piikkien suhteita, kromatogrammin yhdisteiden retentioaikojen ailahtelevuutta, mahdollisia muistijälkiä, LOQ- ja LOD-arvoja, keskihajontaa ja menetelmän kattavuutta.⁶⁸ Kvantitatiivisten tulosten lineaarisuuden toteutumista tarkkaillaan kromatogrammin piikkien pinta-alan muutoksena konsentraation suhteen. Sekä kokonaispinta-alan että massaspektriin perustuvan merkkiipiikin (piikki, jonka avulla kvantitointi tehdään) pinta-alan muutosten on oltava lineaarisia. Lineaarisuuden toteutumista testataan standardeilla ja muuttamalla injektointitulavuutta (eng. split ratio), jotta lineaarisuutta noudatetaan kummankin pinta-alan laskemisessa. Tarvittaessa eri metaboliitteja varten voidaan suorittaa useampi analyysi eri injektointitulavuuksilla, parhaiden mahdollisten tulosten saavuttamiseksi varsinkin jos alimmat havaitut pitoisuudet ovat hyvin matalia.¹²

7 Yhteenveto

Aineenvaihdunnan peruseräiteisiin kuuluu ravinnon muuttaminen aineenvaihduntatuotteiksi hajottavissa eli katabolisissa reaktioissa. Anaboliset reaktiot puolestaan hyödyntävät katabolisten reaktioiden välituotteita ja muokkaavat niistä elimistön tarvitsemia makromolekyylejä. Eukaryoottisoluisissa anabolioa ja katabolioa tapahtuu soluhengityksen vaiheissa. Soluhengitykseen kuuluvassa sitruunahappokierrossa on useita vaiheita, joista aminohappojen ja rasvahappojen aineenvaihdunnan säätelyn mekanismeja ei vielä täysin tunneta. Mekanismin tuntemus voisi hyödyttää diabetekseen ja lihavuuteen liittyvää tutkimusta. Tietoa BCAA-aineenvaihdunnan mekanismeista, lääkkeiden vaikutuksesta, sairauksien etenemisestä, geenien ilmenemisestä, ruokavalion tai toksisten aineiden vaikutuksesta aineenvaihduntaan saadaan metabolomiikan avulla.

Metabolomiikan tutkimusta tehdään kohdentamattomasti tai kohdennetusti, mutta kummassakin tapauksessa käytetään samoja analyttisiä työkaluja, joita ovat NMR-spektroskopia, massaspektrometria ja kromatografisista menetelmistä yleisimmin neste- ja kaasukromatografia. Tavallisinta metabolomiikan tutkimuksessa on yhdistää monimutkaisen näytteen analyytit erotteleva kromatografinen menetelmä ja spektroskopisista laitteistoista massaspektrometri hybridilaitteistoksi, jolloin analyytit pystytään sekä kvantitoimaan että tunnistamaan luotettavasti. Massaspektrometri valitaan hybridimenetelmiin NMR-spektrometrin sijaan sen paremman herkkyyden ja tarkkuuden takia. Metaboliittianalyysin tekeminen on käytettävästä tekniikasta riippumatta haastavaa aina näytteenotosta ja käsittelystä analyysin suorittamiseen ja data-analyysiin saakka. Metaboliittipitoisuudet näytteen sisällä

vaihtelevat paljon, metaboliittien kemialliset ominaisuudet voivat olla hyvin lähellä tai hyvin kaukana toisistaan, niiden pysyvyyksissä ja pH-vaatimuksissa on eroja, eikä saatavilla ole kvantitatiivisiin analyyseihin sopivia standardeja.

GC-MS oli pitkään yleisimmin käytetty analyyttinen menetelmä metabolomiikan tutkimuksessa: se on nopea, erottelee näytteen analyytit hyvällä resoluutiolla, saatavilla on kattava spektrikirjasto ja laitteistoja löytyy useista laboratorioista. LC-MS-menetelmä on noussut kuitenkin GC-MS-menetelmän rinnalle, sillä se ei vaadi johdannaisten valmistamista ja sillä saadaan eroteltua yhdisteitä joiden analyysiin kaasukromatografi ei pysty. Tällaisia yhdisteitä ovat hyvin pooliset yhdisteet, joita metaboliiteista löytyy paljon. Toisaalta kaasukromatografi on käyttökelpoinen laite hyvin pienten ja poolittomien analyyttien, kuten lipidien, erotteluun.

Metabolomiikan tutkimus on verrattain tuoretta ja se on kehittynyt erityisesti viimeisen 20 vuoden aikana. Kehitystä pyritään koordinoimaan jatkuvasti, mutta hyvin erilaisten tutkimustavoitteiden, laitteistojen ja menetelmien kehittäjien takia täysin standardoituja menetelmiä ei ole olemassa. Rajatuille tavoitteille kuten juuri BCAA-katabolian ja rasvahappoaineenvaihdunnan metaboliittien tutkimukselle voitaisiin kuitenkin kehittää toistettavissa olevia menetelmiä. Ihmiskehon aineenvaihdunnan tutkimusta laadukkaasti analysoivalle menetelmälle on varmasti kysyntää, ja tulevaisuudessa metabolomiikan avulla voitaisiin tehdä entistä tarkempaa seurantaa koskien varsinkin terveydentilan muutoksia.

KOKEELLINEN OSA

8 Johdanto

Erikoistyön tarkoituksena oli kehittää kvantitatiivinen menetelmä Heikki Kainulaisen ryhmän kudos-, solu- ja seeruminäytteiden metaboliittipitoisuuksien analysoimiseksi. Ryhmän tutkimuksessa selvitetään haaraketjuisten aminohappojen katabolian ja rasvahappopaineenvaihdunnan yhteyttä. Tavoitteena oli kehittää menetelmästä absoluuttisen kvantitatiivinen, mutta sen käyttötarkoitus tulisi kuitenkin olemaan ensisijaisesti metaboliittipitoisuuksien vertailu, eikä välttämättä jokaisen metaboliitin tarkka kvantitatiivinen määritys. Valmiin menetelmän piti olla suhteellisen nopea, suoritettavissa löytyvillä laitteilla ja työvaiheiltaan kohtuullinen. Menetelmän kehittäminen LC-MS-laitteistolle aloitettiin analyttien ominaisuuksien massaspektrometrisellä kartoittamisella ja tutustumalla kirjallisuuteen. LC-MS QQQ -laite ei kuitenkaan alustavien MS-mittausten jälkeen ollut käytettävissä ja tämän jälkeen siinä ilmeni laitevika, jonka korjauksessa kului useita viikkoja aikaa. Massaspektrometriset mittaukset ehdittiin tehdä tämän projektin puitteissa puolelle projektin kannalta kiinnostavista metaboliiteista. Viivästyksen takia Pro gradun -tutkielman kokeelliseen osaan liitettiin projektityö, jossa tutkittiin kukurbit[n]uriileja massaspektrometrisesti.

Kukurbit[n]uriilit (CB[n]) koostuvat metyleenisilloilla toisiinsa liittyneistä glykouriiliyksiköistä, jotka muodostavat sylinterimäisen, hyvin stabiilin rakenteen. Kukurbit[n]uriilien onkalo on hydrofobinen ja ne pystyvät sitomaan onkalon kokoon sopivia molekyylejä sisälleen. Edellisten atsoalkaaneilla ja vastaavilla CB[n]-molekyyleillä tehtyjen kokeiden perusteella⁶⁹ tutkittiin CB[n]-isäntämolekyylien kompleksinmuodostusta ja niiden pilkkoutumista katalysoivia vaikutuksia (2, 3-diatsabisyklo[2.2.2]okta-2-en-1-yyli)metyyliamiinin eli DBOA-vieras molekyylin kanssa. DBOA on bisyklinen atsoalkaani, joka sisältää metyyliaminoryhmän. DBOA voi protonoitua aminoryhmästään ja sen sitoutuessa CB[n]-molekyyliin havaitaan kahdesti varattuja komplekseja, joissa toinen varattu protoni tai kationi vuorovaikuttaa CB[n]:n karbonyylikehän ja DBOA:n atsoryhmän kanssa. Tämän huomattiin vaikuttavan DBOA:n pilkkoutumiseen CB[7]:ään sitoutuneena.

Koska CB[n]-molekyylien onkalot ovat erikokoiset, ovat myös niiden kompleksinmuodostusominaisuudet erilaiset. Vuorovaikutuksen syntyessä, vieras molekyyli vuorovaikuttaa parhaassa tapauksessa kummankin CB[n]-molekyylin karbonyylikehän

glykouriilihappien kanssa. Sitoutuminen voi tapahtua myös pelkästään sylinterirakenteen ulkokehälle *ekso*-asemaan. CB[n]-molekyylien katalyyttisiä ominaisuuksia ei havaita, jos vierasmolekyyli ei sovi onkaloon. CB[n]-molekyylien tutkimuksesta tekee haastavaa niiden huono liukeneminen yleisesti käytettyihin liuottimiin, sillä CB[n]:n onkalo on hyvin hydrofobinen.

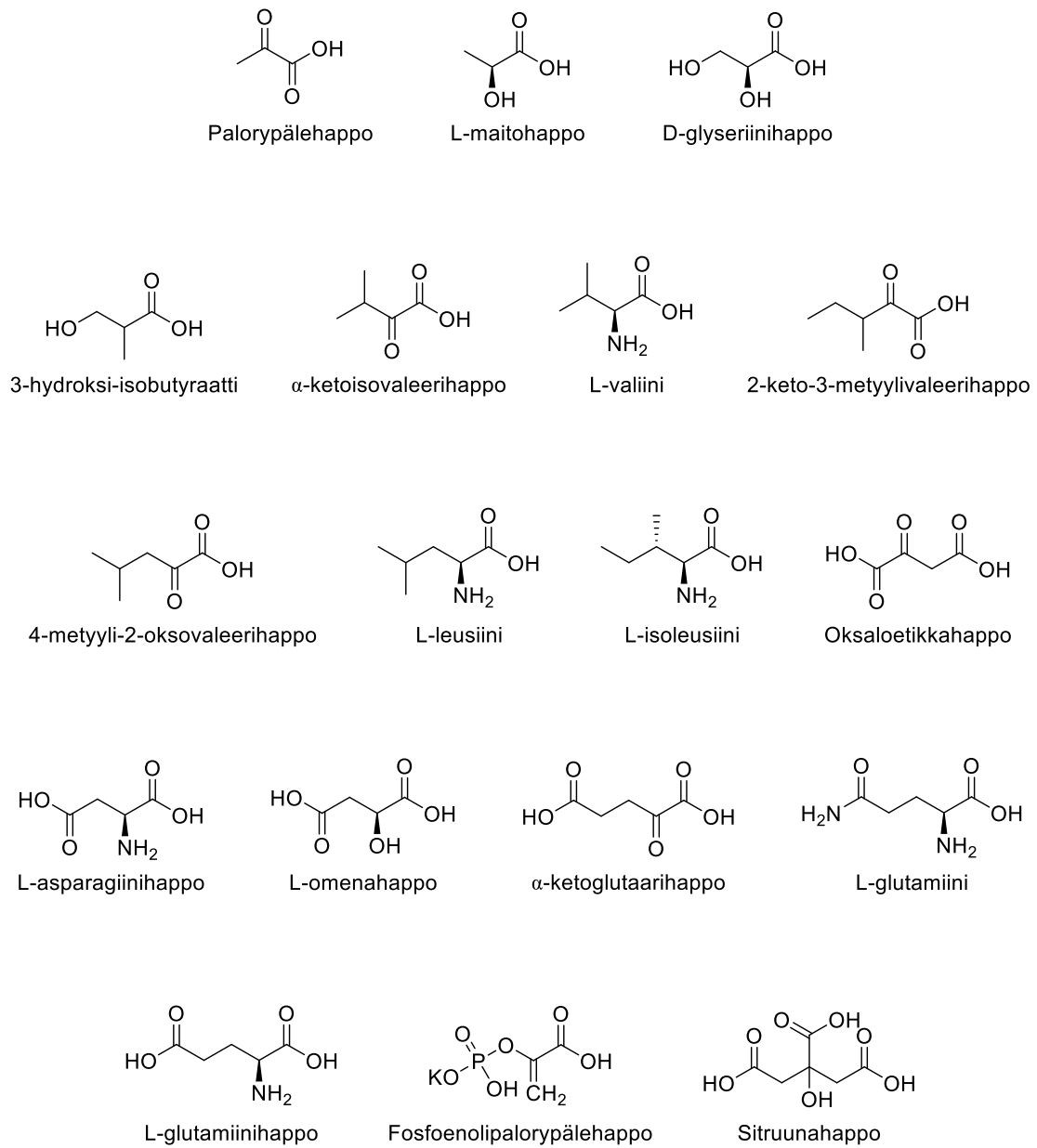
9 Haaraketjuisten aminohappojen kataboliaan liittyvien metaboliittien massaspektrometrinen analyysi

9.1. Massaspektrometrinen analyysin tavoite

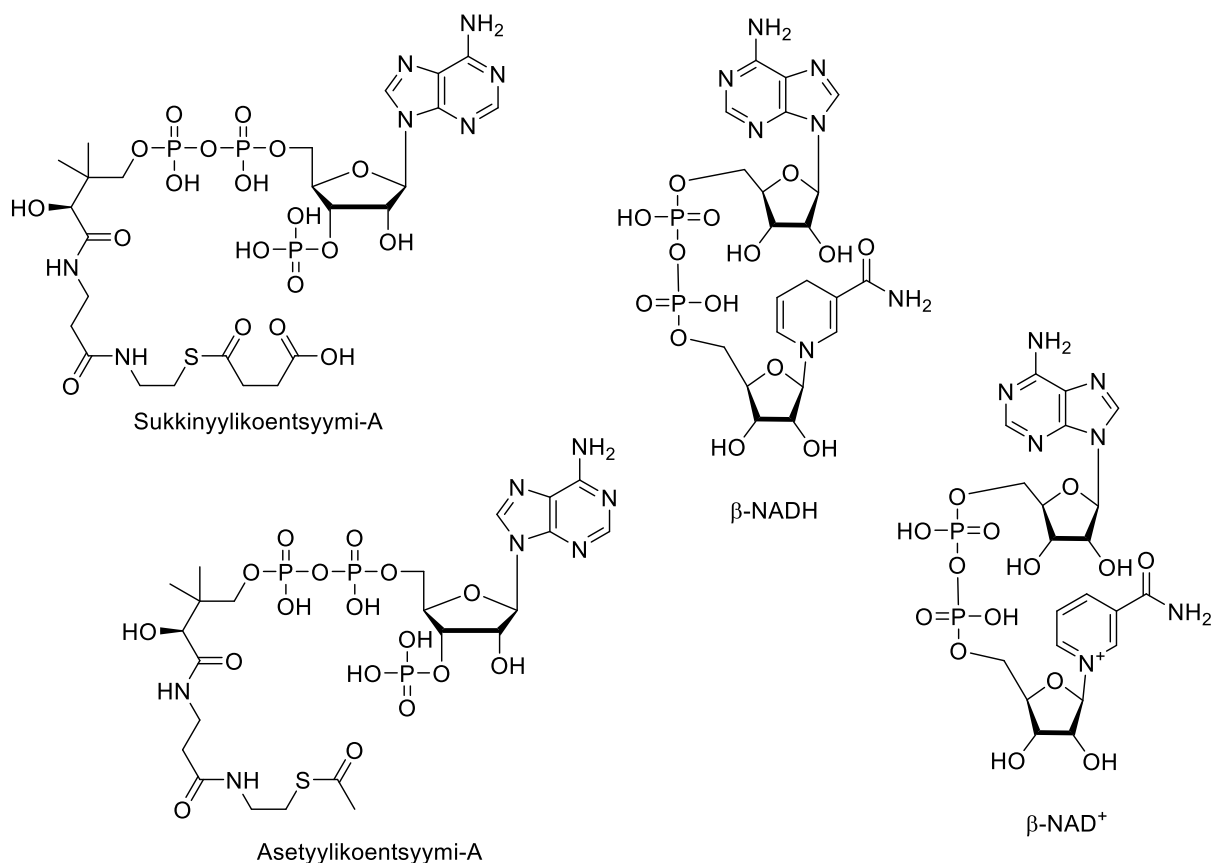
Tavoitteena on tehdä massaspektrometrinen analyysi lihaskasvuun ja solun energiantuottoon liittyville metaboliiteille. Näitä metaboliitteja ovat haaraketjuiset aminohapot (BCAA), niiden aineenvaihduntaan liittyvät metaboliitit, sitruunahappokierrossa esiintyvät metaboliitit, glykolyysi- ja glyserolisynteessin metaboliitit ja lisäksi D-glyseriinihappo. Kaikki analysoitavat metaboliitit sisältävät yhden tai useamman karboksyylihapporyhmän. Massaspektrometrisissa analyyseissä pyritään eristämään positiivisella polarisaatiolla $[M+H]^+$ -ioni ja negatiivisella polarisaatiolla $[M-H]^-$ -ioni kustakin metaboliitista. Ioneille tehtävillä törmäysaktivointikokeilla pyritään saamaan kvalitatiivista analyysiä tukevaa informaatiota. Törmäysaktivoinnilla selvitetään esimerkiksi isobaaristen L-leusiinin ja L-isoleusiinin pilkkoutumisen eroja, sillä niitä ei voi erottaa pelkkien ESI-MS-spektrien perusteella. Massaspektrometrisissa analyyseissa säädettyjä parametreja, sekä kokemusta yhdisteiden pysyvyydestä neste- ja kaasufaasissa voidaan hyödyntää LC-MS-analyysejä suunniteltaessa.

9.2. Näytteiden valmistus ja mittaukset

Puhtaista metaboliiteista (kuvat 17 ja 18) valmistettiin kantaliuokset veteen (1 mM, 1 ml) joitakin poikkeuksia lukuunottamatta. Näyteliuoksista tehtiin 20 μ M (20 μ l metaboliitin kantaliuos, 980 μ l MeOH). Mittauksia ennen tehtiin ulkoinen kalibrointi käyttäen Agilentin ESI-tuning –sekoitusta (1:5 ESI Tuning:MeOH). Mittaukset suoritettiin AB Sciex QSTAR Elite ESI-Q-TOF-massaspektrometrillä ja liuottimina käytettiin Sigma Aldrichin HPLC-laatuisia liuottimia. Kuivaus- ja törmäyskaasuina käytettiin typpeä, massaspektrometrinen datan analysointiin käytettiin Analyst® QS 2.0 -ohjelmistoa ja spektrikuvien käsittelyyn CoreIDRAW X4-ohjelmaa.



Kuva 17. BCAA-aineenvaihduntaan liittyviä metaboliitteja molekyylipainon mukaisessa järjestyksessä, neutraaleissa muodoissaan.



Kuva 18. BCAA-aineenvaihduntaan liittyviä nukleotideja.

Joidenkin metaboliittien pysyvyyden parantamiseksi jouduttiin säätämään pH:ta. Kirjallisuuden perusteella fosfoenolipalorypalehappo on vesiliuoksessa epästabiili ja alkaa hydrolysoitua. Siksi sen kantaliuoksen pH säädettiin noin 10:een käyttämällä ammoniumasetaatti-puskuria, kuten Kawamura *et. al* patentissa.⁷⁰ Puskurin pitoisuus näyteliuoksessa oli 0,01 mol/l. Asetyylikoentsyymi-A:n kantaliuos tehtiin Sigma-Aldrichin ohjeiden mukaisesti happamaksi käyttämällä etikkahappoa. Myös sivuketjultaan hieman pitemmän sukkinyylikoentsyymi-A:n kantaliuoksen pH säädettiin 3:een. Asetyylikoentsyymi-A:ta oli käytössä vain 1 mg, joten kantaliuos tehtiin suoraan valmistajalta tulleeseen astiaan. Sukkinyylikoentsyymi-A:n ilmoitettu puhtaus oli mitatuista metaboliiteista huonoin – vain 93 % - sisältäen yhdisteeseen sitoutuneen natriumin ja veden.

β-NADH:n kantaliuos valmistettiin Sigma-Aldrichin ohjeistuksen mukaan emäksiseen ammoniumasetaattipuskuriin (0,01 mol/l, pH 10). β-NADH alkaa hajota happamissa olosuhteissa ja myös valon vaikutuksesta, joten sen kantaliuos valmistettiin ruskeaan lasiputkeen. Valolle herkän β-NAD⁺:n kantaliuos valmistettiin etikkahapolla happamaksi tehtyyn veteen (pH 4), ruskeaan lasiputkeen.

ESI-MS-spektrien analyyseissä parametrit säädettiin niin että protonoitunut tai deprotonoitunut ioni ja mahdolliset muut adduktit näkyivät mahdollisimman hyvin eli pilkeionien runsaus pyrittiin pitämään alhaisena. ESI-MS-analyyseissä dataa kerättiin 5 minuuttia. CID-kokeissa käytettiin pääsääntöisesti näitä samoja parametreja, jotta kunkin metaboliitin positiivisen polarisaation $[M+H]^+$ ja negatiivisen polarisaation $[M-H]^-$ -ioni saatiin erottumaan runsaana. Onnistuneen eristyksen jälkeen törmäysenergiaa (collision energy, CE) kasvatettiin, jolloin havaittiin eristetystä ionista muodostuvia pilkeioneita. Törmäysenergiaa nostettiin ja analyysejä tehtiin niin kauan kunnes eristetyn ionin piikkiä ei enää näkynyt. CID-kokeissa analyyysi-aika oli 1 minuutti, jokaiselle törmäysaktivoinnille. Törmäysaktivoitinkokeissa havaitut pilkkoutumistuotteet todennettiin laskemalla massatarkkuudet havaituille ioneille. ESI-MS-analyysejä tehtiin käytännössä kartoittamaan CID-kokeisiin sopivia parametreja. LC-MS-menetelmää varten CID-kokeista saatiin tarvittavaa informaatiota pilkkoutumisesta. ESI-MS-analyyseissä ja CID-kokeissa käytetyt laitteiston parametrit on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. Laitteiston parametrit

Parametri	Arvo (pos)	Arvo (neg)
GS1	10-20 psi	10-20 psi
CUR	15-20 psi	15-20 psi
IS	5000-5500 ^a V	-4500 V
DP	25-90 V	-75-(-20) V
FP	250 V	-350-(-150) V
DP2	5 V	-45-(-10) V
IRD	6 ms	6 ms
IRW	5 ms	5 ms
Flow rate	5 μ l/min	5 μ l/min
Mass range (profile)	m/z 40/50-500 ^b , 80-1000 ^c	m/z 40-500 ^b , 80-1000 ^c
Mass range (CID)	m/z 40/50-500 ^b , 80-1000 ^c	m/z 40-500 ^b , 80-1000 ^c
Q1 Transmission window (profile)	m/z 40 50 % m/z 90 50 %	m/z 40 50 % ^b m/z 90 50 % ^b
Q2 Transmission window (CID)	m/z 30 50 % ^b m/z 80 50 % ^b	m/z 30 50 % ^b m/z 80 50 % ^b
CAD (CID)	5 psi	5 psi
IE1	2 V	-2,5 V
RO2	12,5 V	-7,5 V
GR	10 V	-10,5 V
TFO	12,5 V	-11,5 V
TST	0,100 V	0 V
CEM	2150-2250 V	2150-2200 V
Time bins to sum	20	20

a: Kaikille muille metaboliiteille, 4100 V 4-metyyli-2-oksovaleerihapolle

b: Pienille metaboliiteille

c: Suurille metaboliiteille eli β -NAD⁺:lle, β -NADH:lle, Ac-CoA:lle ja Suc-CoA:lle.

Q1 ja Q2 NAD⁺:lle m/z 100-800, m/z 80 50 %, m/z 170 50 %.

Q1 ja Q2 NADH:lle m/z 80-800, m/z 60 50 %, m/z 140 50 %.

Q1 ja Q2 As-koA:lle ja S-koA:lle m/z 100-1000, m/z 80 50 %, m/z 190 50 %.

9.3. Metaboliittien massaspektrometriset analyysit positiivisella polarisaatiolla

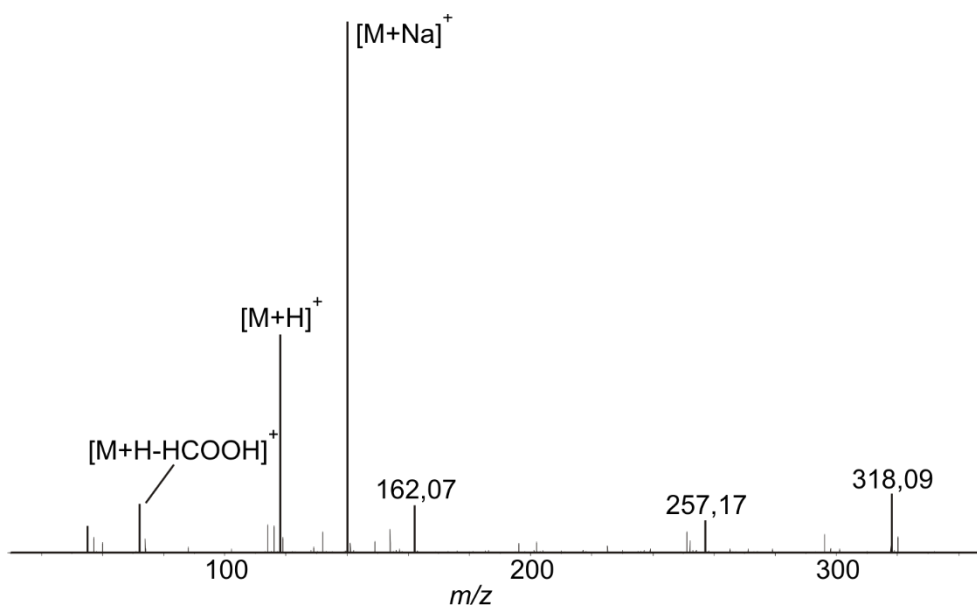
Positiivisen polarisaation ESI-MS-analyysit onnistuivat pääsääntöisesti negatiivisen polarisaation mittauksia huonommin: Vain kymmenestä metaboliitista onnistuttiin eristämään $[M+H]^+$ -ioni, kun kaiken kaikkiaan tarkoituksena oli analysoida 22 metaboliittia. Metaboliitit, joille positiivisen polarisaation mittaukset onnistuivat, olivat BCAA:t, L-asparagiinihappo, L-maitohappo, L-glutamiinihappo, L-glutamiini, β -NADH ja β -NAD⁺. Nämä kaikki L-maitohappoa ja 4-metyyli-2-oksovaleerihappoa lukuun ottamatta tuottivat myös $[M+Na]^+$ -ionin. Lisäksi L-omenahapolle, sitruunahapolle ja α -ketoglutaarihapolle havaittiin pelkkä $[M+Na]^+$ -ioni, jonka CID-kokeesta ei saa lisäinformaatiota molekyylin pilkkoutumisesta. Koska lähes kaikki mitattavat metaboliitit olivat karboksyylihappoja, ei protonoitumista siksi havaittu. Metaboliitit, joiden protonoitumista ei havaittu, olivat joko hyvin pienikokoisia aminohappoja tai nukleotideihin kuuluvat koentsyymi-A:t. Jos mittauksessa ei saatu eristettyä $[M+H]^+$ -ionia, ei sille myöskään tehty CID-kokeita.

CID-kokeissa eristetyt ionit ja CID-kokeiden perusteella havaitut runsaimmat pilkeionit on esitetty taulukossa 3. Esitettyihin spektreihin on merkitty ionit, joiden koostumus on päätelty tarkkailemalla massatarkkuuksia. Merkitty pilkeioni on siis pienimmän teoreettisen ja kokeellisen m/z -arvon erotuksen antanut molekyylin koostumus. Huonoimmat massatarkkuudet ovat epästabiilille oksaloetikkahapon $[M+H]^+$ -ionille (35 mDa) ja 4-metyyli-2-oksovaleerihapon $[M+H]^+$ -ionille (68 mDa). Paras tarkkuus oli β -NADH:n $[M+H]^+$ -ionille (-0,05 mDa). Positiivisen polarisaation analyyseissä yllettiin siis joissakin tapauksissa absoluuttisen tarkkaan massa.

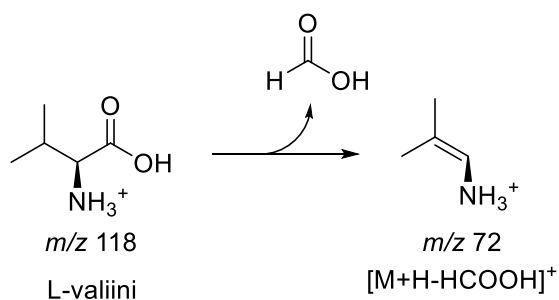
Taulukko 3. CID-kokeiden perusteella havaitut pilkeionit ja massatarkkuuksien arviointi positiivisella polarisaatiolla

Metaboliitti	Ioni		Tarkkuus		Pilkeioni	Molekyyli- kaava	Tarkkuus <i>m/z</i> exp <i>m/z</i> teor (mDa)
	<i>m/z</i> teor	<i>m/z</i> exp	(mDa)	(mDa)			
Palorypälehappo		89,02332					
L-maitohappo	[M+H] ⁺	91,03897	91,0528	-13,83			
3-hydroksi-isopalorypälehappo		105,0546					
D-glyseriinihappo	[M+H] ⁺	107,0339					
α-ketoisovaleeriinihappo		117,0546					
L-valiini	[M+H] ⁺	118,0863	118,095	-8,34	[M+H-HCOOH] ⁺	C ₄ H ₁₀ N ⁺	72,0843 72,0808 -3,52
2-keto-3-metyylivaleeriinihappo		131,0703					
4-metyyli-2-oksovaleeriinihappo	[M+H] ⁺	131,0703	131,002	68,47			
L-leusiini	[M+H] ⁺	132,1019	132,105	-3,39	[M+H-HCOOH] ⁺	C ₃ H ₁₂ N ⁺	86,0904 86,0964 6,03
L-isoleusiini	[M+H] ⁺	132,1019	132,105	-3,39	[M+H-HCOOH] ⁺	C ₃ H ₁₂ N ⁺	86,0904 86,0964 6,03
Oksaloetikkahappo	[M+H] ⁺	133,0132	132,978	35,25			
L-asparagiinihappo	[M+H] ⁺	134,0448	134,046	-1,12	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₄ H ₆ NO ₃ ⁺	116,029 116,0342 5,02
L-omenahappo		135,0288					
α-ketoglutaraarihappo		147,0288					
L-glutamiini	[M+H] ⁺	147,0764	147,062	14,82	[M+H-NH ₃] ⁺	C ₃ H ₈ NO ₃ ⁺	130,05 130,0499 0,27
L-glutamiinihappo	[M+H] ⁺	148,0604	148,049	11,53	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₃ H ₈ NO ₃ ⁺	130,05 130,0499 0,27
Fosfoenolipalorypälehappo	[M+H] ⁺	168,9897					
Sitruunahappo		193,0343					
β-NAD ⁺		663,1086					
β-NADH	[M+H] ⁺	666,1321	666,132	-0,05			
Asetyyli-CoA		810,1331					
Sukkinyyli-CoA		868,1385					

Metaboliiteista pienikokoisimmat ja suurikokoisimmat tuottivat heikoimmat tulokset positiivisen polarisaation analyyseissä. Pienin positiivisella polarisaatiolla havaittu metaboliitti oli L-maitohapon $[M+H]^+$ -ioni, mutta siitä ei saatu CID-kokeissa lisää informaatiota. Kokojärjestyksessä seuraavaksi havaitun L-valiinin ESI-MS-spektrissä havaittiin paljon epäpuhtauksista aiheutuvia piikkejä (kuva 19). CID-kokeissa havaittiin karboksyylihaporyhmän pilkkoutuminen $[M+H-HCOOH]^+$ (kaavio 4).



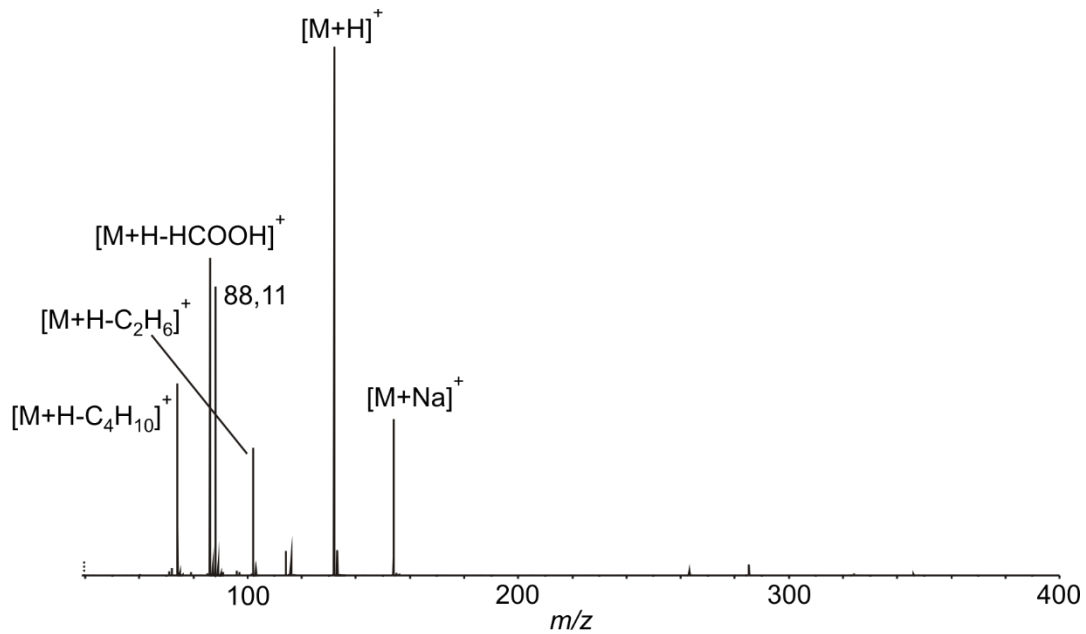
Kuva 19. L-valiinin positiivisen polarisaation ESI-MS-spektri. Heikon intensiteetin takia havaittiin myös piikkejä epäpuhtauksista.



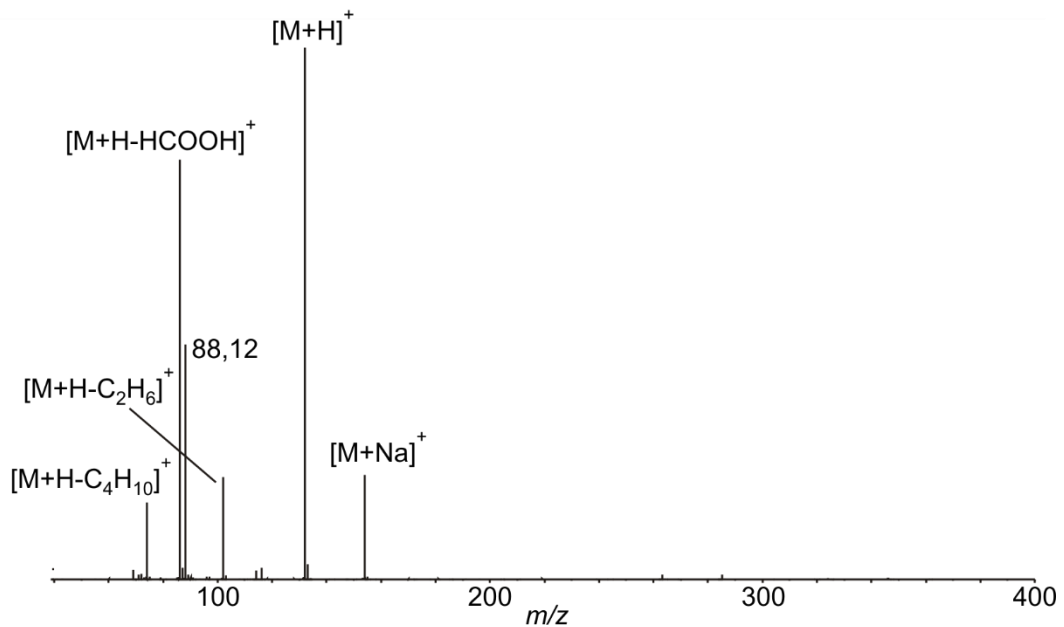
Kaavio 4. L-valiinista irtosi CID-kokeen perusteella muurahaishappo.

Myös 4-metyyli-2-oksovaleriinihapolle havaittiin $[M+H]^+$ -ioni, jonka eristäminen ei kuitenkaan onnistunut. BCAA:sta L-leusiini ja L-isolesiini ovat isobaarisia eli niiden massa on sama, mutta niillä on erilainen rakenne. Kuvien 20 ja 21 L-leusiinin ja L-isolesiinin ESI-MS-spektrit olivat intensiteettieroja lukuun ottamatta samanlaiset: Kumpikin tuotti $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+H-HCOOH]^+$ ja $[M+H-C_2H_6]^+$ -ionit. Lisäksi havaittiin C_4H_{10} -pilkkeen irtoaminen eli jäljelle jäi

vain aminohapon runko. Puhtaiden aineiden liuksista analysoidut L-leusiini ja L-isoleusiini tuottivat lähes samanlaiset ESI-MS-spektrit positiivisella polarisaatiolla, eikä niitä tämän perusteella voitu erottaa toisistaan.



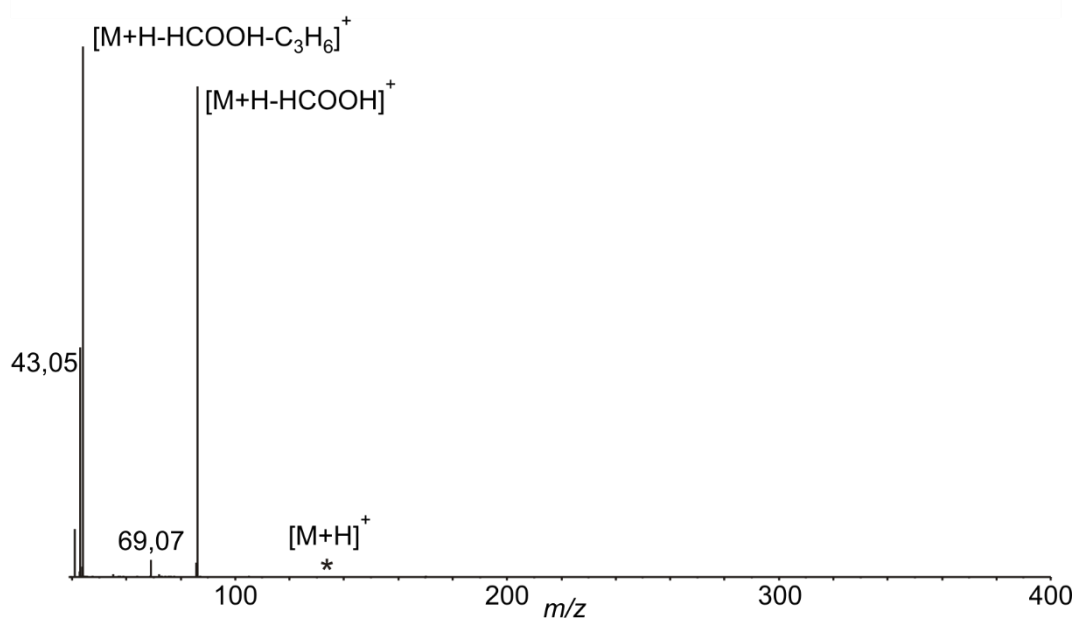
Kuva 20. L-leusiinin ESI-MS-spektri positiivisella polarisaatiolla.



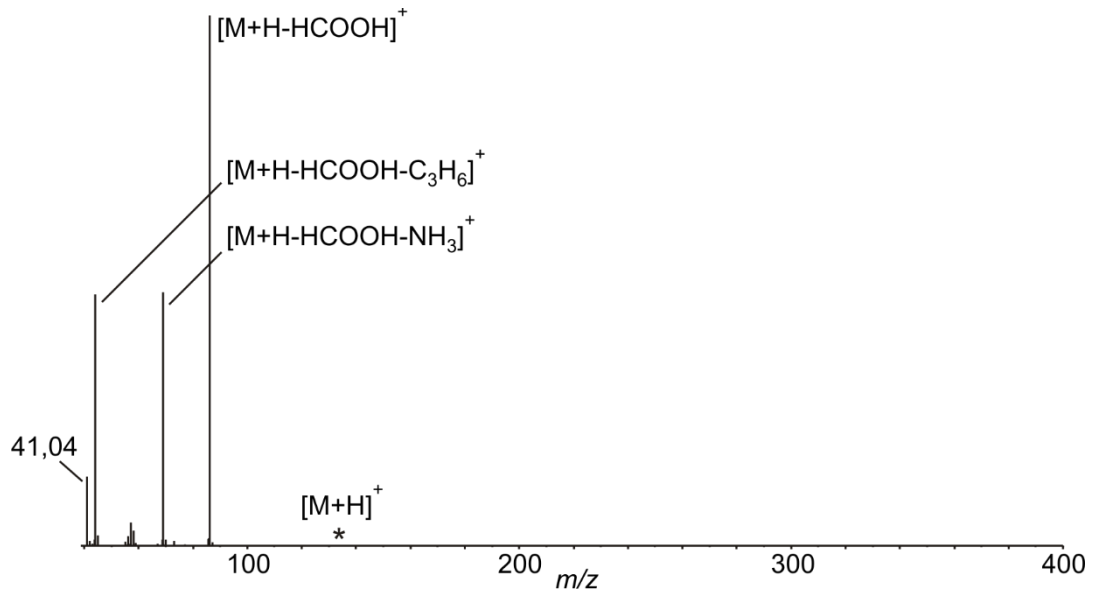
Kuva 21. L-isoleusiinin ESI-MS-spektri positiivisella polarisaatiolla.

Isobaaristen L-leusiinin ja L-isoleusiinin CID-kokeet törmäysenergialla 25 V on esitetty kuvissa 22 ja 23. Sekä profiilispektrien mittaukset että CID-mittaukset tehtiin kummallekin aminohapolle samoilla parametreilla, jotta spektrit olisivat vertailukelpoisia. Kummankin aminohapon hajoamistuotteena havaittiin HCOOH-molekyylin irtoaminen m/z -arvolla 86,

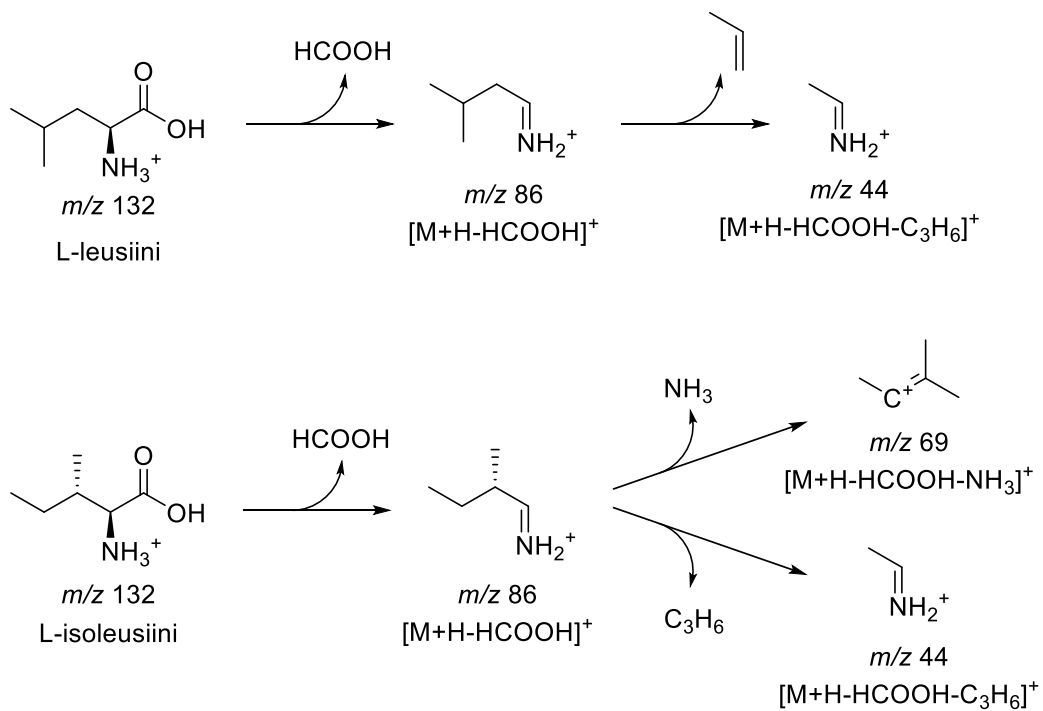
kuten jo ESI-MS-spektreistä huomattiin. Selkeät erot pilkkoutumisessa havaittiin kuitenkin m/z -arvoilla 69 ja 44, joista kumpaakaan ei havaittu ESI-MS-analyyseissä. L-leusiinin pilkkoutumistuotteena ei muodostu juuri lainkaan pilkeionia m/z 69 ja L-isolesiini tuottaa kumpaakin ionia lähes yhtä runsaasti. Tämän perusteella L-leusiini ja L-isolesiini voitiin siis erottaa massaspektrometrisesti CID-mittausten avulla. L-leusiinin ja L-isolesiinin pilkkoutumisreitit on esitetty kaaviossa 5. CID-mittausten intensiteetit olivat valitettavasti huonot, mutta riittivät erotukseen.



Kuva 22. L-leusiinin positiivisen polarisaation CID-mittaus CE-arvolla 25 V.



Kuva 23. L-isolesiinin positiivisen polarisaation CID-mittaus CE-arvolla 25 V.

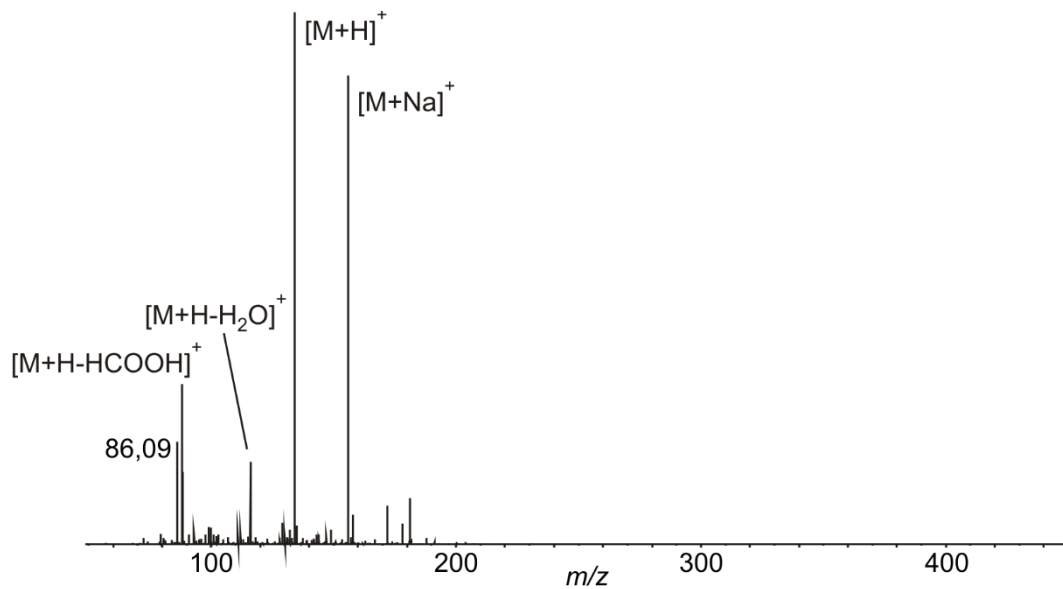


Kaavio 5. L-lesiinin ja L-isolesiinin pilkkoutuminen.

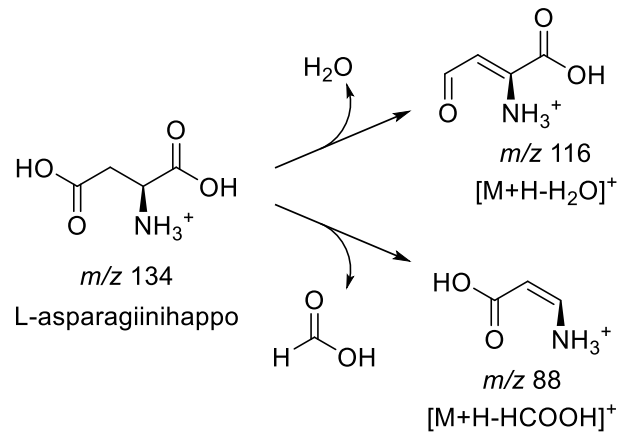
Oksaloetikkahappo oli kaikista valituista metaboliiteista ainoa, jolle ei saatu mitattua kummallakaan polarisaatiolla massaspektriä. Kuten kuvasta 17 nähdään, oksaloetikkahappo on pieni dihapo, jossa on vielä karboksyylihapporyhmien lisäksi yksi ketoryhmä. Todennäköisesti se on kaasufaasissa niin epästabiili, ettei sitä siksi pystytty havaitsemaan.

Kromatografinen erottaminen saattaisi silti olla mahdollista, vaikkei massaspektrometrinen tunnistaminen onnistunut. Kirjallisuuden perusteellakaan ei ollut yllättävää ettei oksaloetikkahapon massaspektrometrinen analyysi onnistunut.⁷¹ Jos oksaloetikkahappo kuitenkin haluttaisiin saada lopulliseen LC-MS-menetelmään mukaan, niin että sen tunnistaminen ja kvantitointi olisivat luotettavia, pitäisi siitä tehdä stabiilimpi johdannainen. Valitettavasti tämä tarkoittaisi todennäköisesti myös johdannaisten tekemistä muista metaboliiteista.

L-asparagiinihappo tuotti sekä protonoituneen ionin että Na-adduktiin. Protonoituminen onnistui, koska L-asparagiinihapon rakenteessa on typpi, joka pystyy vastaanottamaan protonin vapaalla elektroniparillaan. L-asparagiinihapon ESI-MS-spektri on esitetty kuvassa 24 ja CID-kokeiden avulla päätelty pilkkoutumisreitit kaaviossa 6.

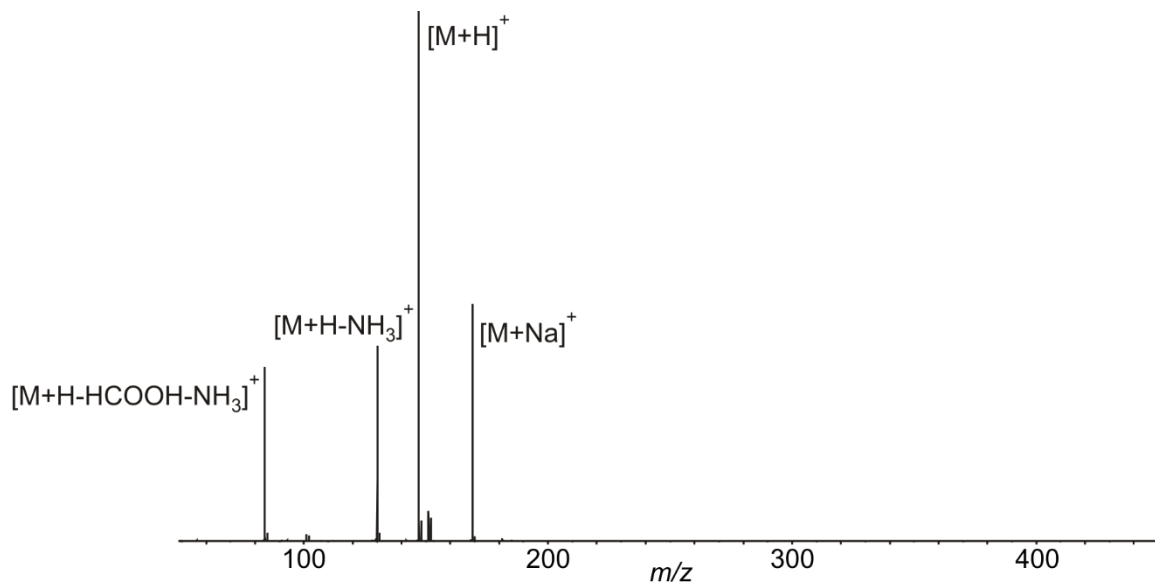


Kuva 24. L-asparagiinihapon ESI-MS-spektri positiivisella polarisaatiolla.

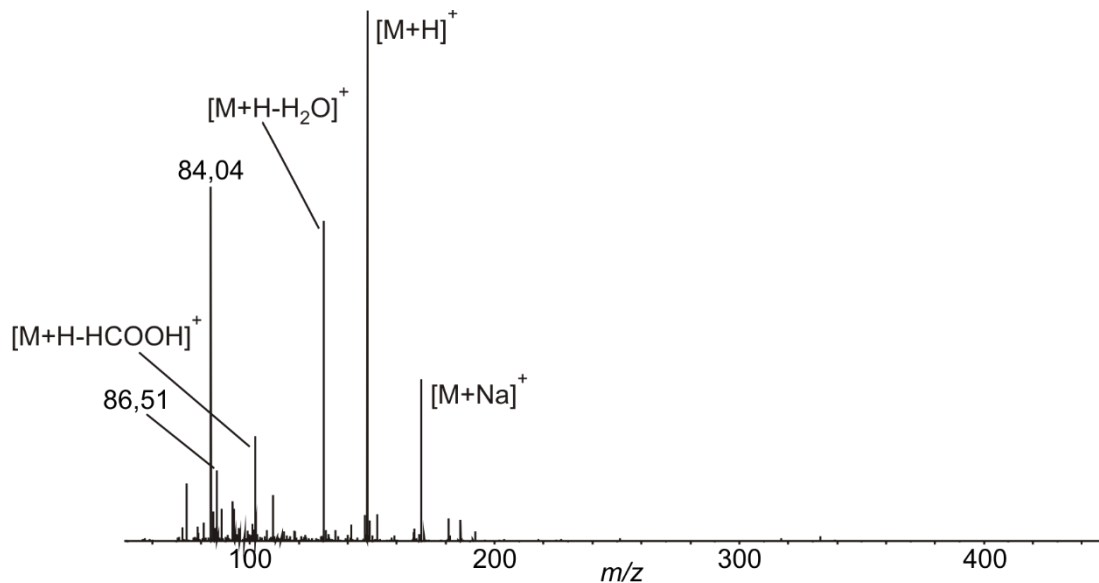


Kaavio 6. L-asparagiinihaposta lohkesi muurahaishappo tai vesi.

L-omenahappo, eli malaatin neutraali muoto, ja α -ketoglutaraanihappo tuottivat vain $[M+Na]^+$ -ionit, eikä niille tehty törmäysaktivointia. L-glutamiinihapolla ja L-glutamiinilla oli lähes sama molekyyllipaino. Rakenne erosi L-glutamiinin aminoryhmän ollessa L-glutamiinihapossa OH-ryhmä. Kummatkin tuottivat positiivisella polarisaatiolla piikit $[M+H]^+$ ja $[M+Na]^+$, jotka olivat L-glutamiinille m/z 147 ja m/z 169 ja L-glutamiinihapolle m/z 148 ja m/z 170. Kumpikin tuotti pilkkoutuessaan saman rungon m/z -arvolla 130. Positiivisella polarisaatiolla nähtiin (kuvat 25 ja 26) paljon mitatulle metaboliitille kuulumattomia piikkejä, ja metaboliiteista peräisin olevien tunnistettujen ionien runsaus oli alhainen.



Kuva 25. L-glutamiinin ESI-MS-spektri positiivisella polarisaatiolla.



Kuva 26. L-glutamiinihapon ESI-MS-spektri positiivisella polarisaatiolla mitattuna.

Sitruunahapolle pystyttiin eristämään $[M+Na]^+$ -ioni, muttei protonoitunutta ionia. Nukleotideista ainoastaan β -NADH:lle saatiin näkymään $[M+H]^+$ -ioni, mutta ionin eristäminen ei onnistunut. Pienikokoisten metaboliittien vähäistä protonoitumista selittävät niiden keto- ja karboksyylihapporyhmät yhdistettynä lyhyeen hiiliketjuun. Nukleotidien tapauksessa protonoituneita ioneita ei havaittu, koska nukleotidit eivät saa positiivista kokonaisvarausta niiden happoryhmien luovuttaessa protonin.

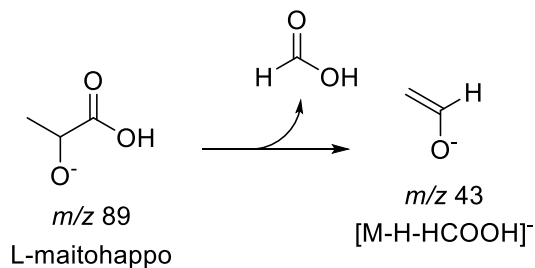
9.4. Metaboliittien massaspektrometriset analyysit negatiivisella polarisaatiolla

Negatiivisen polarisaation massaspektrometriset analyysit ja $[M-H]^-$ -ionin eristäminen onnistui kaikille metaboliiteille oksaloetikkahappoa lukuun ottamatta. CID-kokeissa eristetyt ionit ja niissä havaitut runsaimmat pilkeionit massatarkkuuksineen on esitetty taulukossa 4. Massatarkkuuksissa oli paljon vaihtelua, mikä selittyy osittain välissä tehdyillä kalibroinneilla. Deprotonoitujen ionien eristyksessä massatarkkuus vaihteli suurusluokassa 1 mDa:sta 34 mDa:han. Pilkeioneiden massatarkkuuksien arvot vaihtelivat saman verran L-valiinin poikkeuksellisen huonoa massatarkkuutta (120 mDa) lukuunottamatta. Pilkeionin tunnistaminen oli hyvin epävarmaa ja ionien runsaus massaspektrissä alhainen.

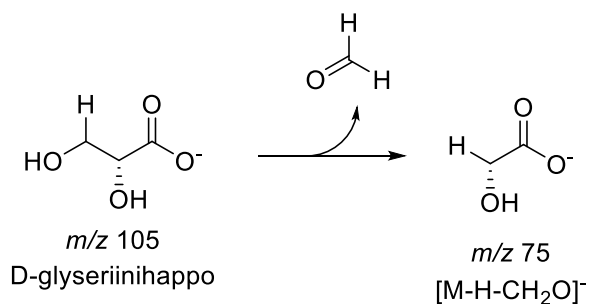
Taulukko 4. Negatiivisen polarisaation CID-kokeissa eristetyt ionit ja runsaimmat pilkeionit.

Metaboliitti	Tarkkuus				Tarkkuus				
	Ioni	m/z teor	m/z exp	(mDa)	Pilkeioni	Molekyylikaava	m/z teor	m/z exp	(mDa)
Palorypälehappo	[M-H] ⁻	87,00877	87,0162	-7,43	[M-H-CO ₂] ⁻	C ₂ H ₃ O ⁻	43,0189	43,0121	6,84
L-maitohappo	[M-H] ⁻	89,02442	89,0198	4,62	[M-H-HCOOH] ⁻	C ₂ H ₃ O ⁻	43,0189	43,0121	6,84
3-hydroksi-isopalorypälehappo	[M-H] ⁻	103,0401	103,0311	8,97	[M-H-CH ₂ O] ⁻	C ₃ H ₅ O ₂ ⁻	73,0295	73,03	-0,5
D-glyseriinihappo	[M-H] ⁻	105,0193	105,0131	6,23	[M-H-CH ₂ O] ⁻	C ₂ H ₃ O ₃ ⁻	75,0088	74,9945	14,31
α-ketoisovaleeriinihappo	[M-H] ⁻	115,0401	115,0459	-5,83	[M-H-CO ₂] ⁻	C ₄ H ₇ O ⁻	71,0502	71,0409	9,34
L-valiini	[M-H] ⁻	116,0717	116,074	-2,3	[M-H-CH ₄] ⁻	C ₄ H ₆ NO ₂ ⁻	100,0404	99,92	120,4
2-keto-3-metyylivaleeriinihappo	[M-H] ⁻	129,0557	129,051	4,72	[M-H-CO ₂] ⁻	C ₅ H ₉ O ⁻	85,0659	85,0701	-4,21
4-metyyli-2-oksovaleeriinihappo	[M-H] ⁻	129,0557	129,0654	-9,68	[M-H-CO ₂] ⁻	C ₅ H ₉ O ⁻	85,0659	85,0816	-15,71
L-leusiini	[M-H] ⁻	130,0874	130,0961	-8,75	[M-H-HCOOH] ⁻	C ₅ H ₁₀ N ⁻	84,0819	84,091	-9,13
L-isoleusiini	[M-H] ⁻	130,0874	130,0961	-8,75	[M-H-HCOOH-H ₂] ⁻	C ₅ H ₈ N ⁻	82,0662	82,0754	-9,18
Oksaloetikkahappo		130,9986							
L-asparagiinihappo	[M-H] ⁻	132,0302	132,0281	2,13	[M-H-CO ₂] ⁻	C ₃ H ₆ NO ₂ ⁻	88,0404	88,0206	19,8
L-omenahappo	[M-H] ⁻	133,0143	133,0226	-8,35	[M-H-H ₂ O] ⁻	C ₄ H ₃ O ₄ ⁻	115,0037	115,018	-13,92
α-ketoglutaraanihappo	[M-H] ⁻	145,0143	144,9933	20,95	[M-H-CO ₂] ⁻	C ₄ H ₅ O ₃ ⁻	101,0244	101,023	1,22
L-glutamiini	[M-H] ⁻	145,0619	145,064	-2,13	[M-H-NH ₃] ⁻	C ₅ H ₆ NO ₃ ⁻	128,0353	128,044	-8,28
L-glutamiinihappo	[M-H] ⁻	146,0459	146,0445	1,38	[M-H-H ₂ O] ⁻	C ₅ H ₆ NO ₃ ⁻	128,0353	128,044	-8,28
Fosfoenolipalorypälehappo	[M-H] ⁻	166,9751	166,9709	4,2	[M-]	PO ₃ ⁻	78,9591	78,9518	7,25
Sitruunahappo	[M-H] ⁻	191,0197	191,0161	3,63	[M-H-2H ₂ O-CO ₂] ⁻	C ₅ H ₃ O ₃ ⁻	111,0088	111,004	4,77
β-NAD ⁺	[M-2H] ⁻	662,1019	662,1274	-25,55	[M-2H-C ₆ H ₇ N ₂ O] ⁻	C ₁₅ H ₂₀ N ₅ O ₁₃ P ₂ ⁻	540,0538	540,087	-33,47
β-NADH	[M-H] ⁻	664,1175	664,1256	-8,1	[M-H-C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₅] ⁻	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₉ P ₂ ⁻	408,0116	408,006	5,67
Asetyyli-CoA	[M-H] ⁻	808,1185	808,1523	-33,8	[M-H-C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P] ⁻	C ₁₃ H ₂₃ N ₂ O ₁₀ P ₂ S ⁻	461,0554	461,071	-15,59
Sukkinyyli-CoA	[M-H] ⁻	866,124	866,1214	2,58	[M-H-C ₁₅ H ₂₆ N ₂ O ₉ PS] ⁻	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₁₀ P ₂ ⁻	426,0221	426,025	-2,96

Palorypälehapolle ja L-maitohapolle havaittiin karboksyylihapporyhmän lohkeaminen varattuna ionina m/z 43. Runsain pilkeioni palorypälehapolle oli kuitenkin $[M-H-CO_2]^-$ ja L-maitohapolle $[M-H-HCOOH]^-$ (kaavio 7). 3-hydroksi-isopalorypälehapon ja D-glyseriinihapon $[M-H]^-$ -ionin törmäysaktivoinnissa havaittiin formaldehydin irtoaminen $[M-H-CH_2O]^-$ (kaavio 8).

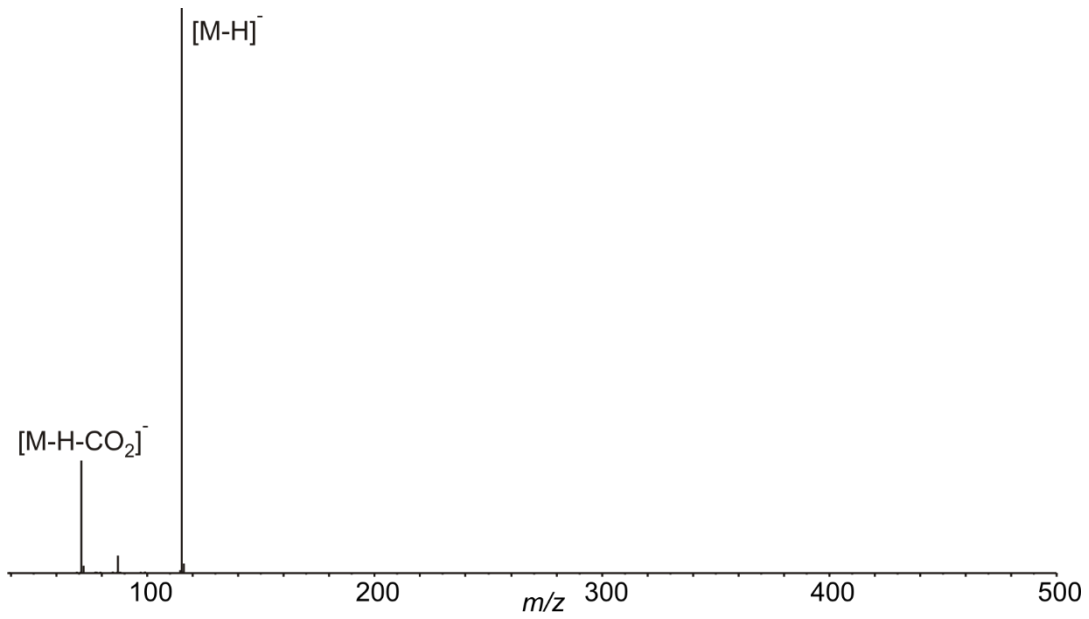


Kaavio 7. L-maitohaposta lohkesi muurahaishappo.

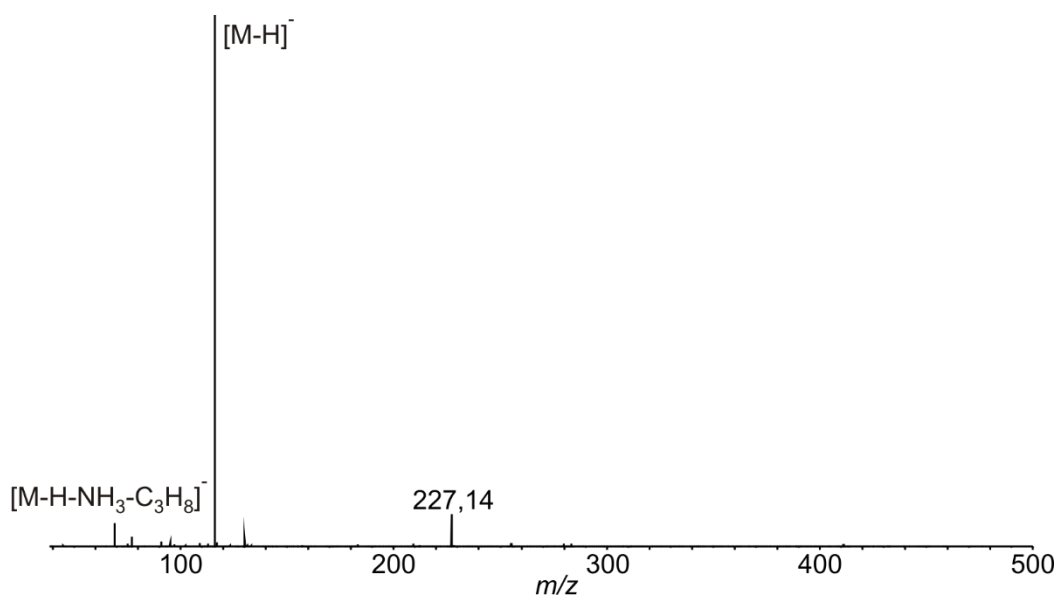
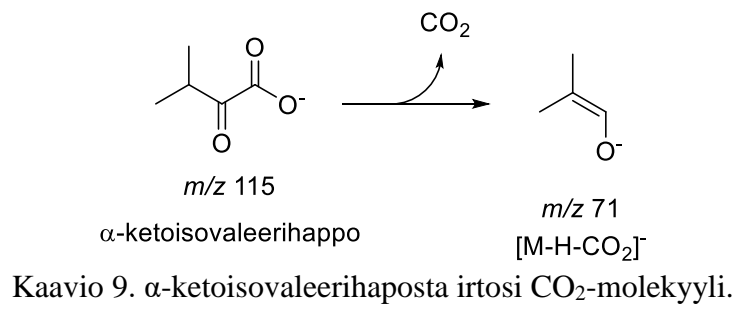


Kaavio 8. D-glyseriinihaposta lohkesi formaldehydi.

α -ketoisovaleerihapon CID-kokeessa havaittiin CO_2 -molekyylin irtoaminen (kuva 27, kaavio 9). L-valiinin ESI-MS-spektrissä nähtiin runsaasti epäpuhtautta m/z 227 ja mahdollista pilkkoutumistuotetta $[M-NH_3-C_3H_8]^-$ (kuva 28). L-valiinin CID-kokeen pilkeionien runsaus jäi hyvin alhaiseksi, mikä selittää myös huonoa pilkeionin massatarkkuutta. 2-keto-3-metyylivaleerihappo ja 4-metyyli-2-oksovaleerihappo tuottivat pilkkoutuessaan $[M-H-CO_2]^-$ -ionit. Esimerkkinä CO_2 -molekyylin irtoamisesta on esitetty α -ketoisovaleerihapon pilkkoutuminen kaaviossa 9.

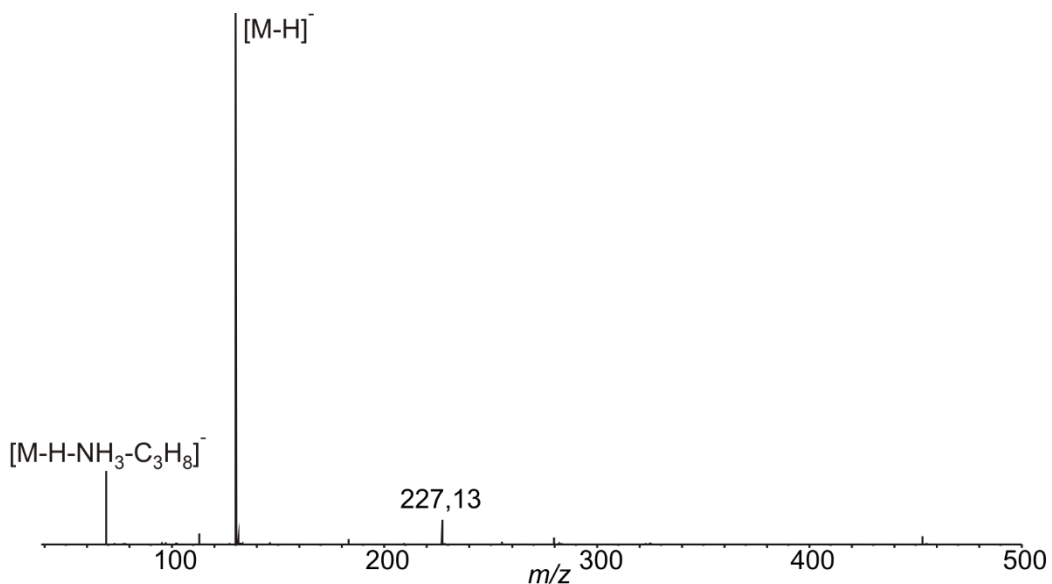


Kuva 27. α -ketoisovaleerihapon negatiivisen polarisaation CID-mittaus CE-arvolla 20 V.

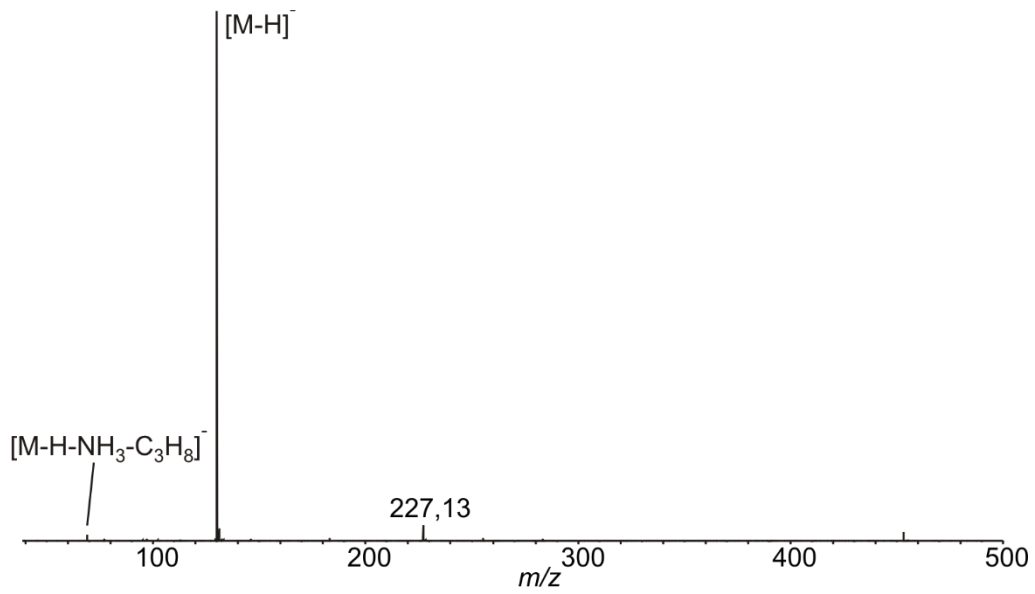


Kuva 28. L-valiinin ESI-MS-spektri negatiivisella polarisaatiolla.

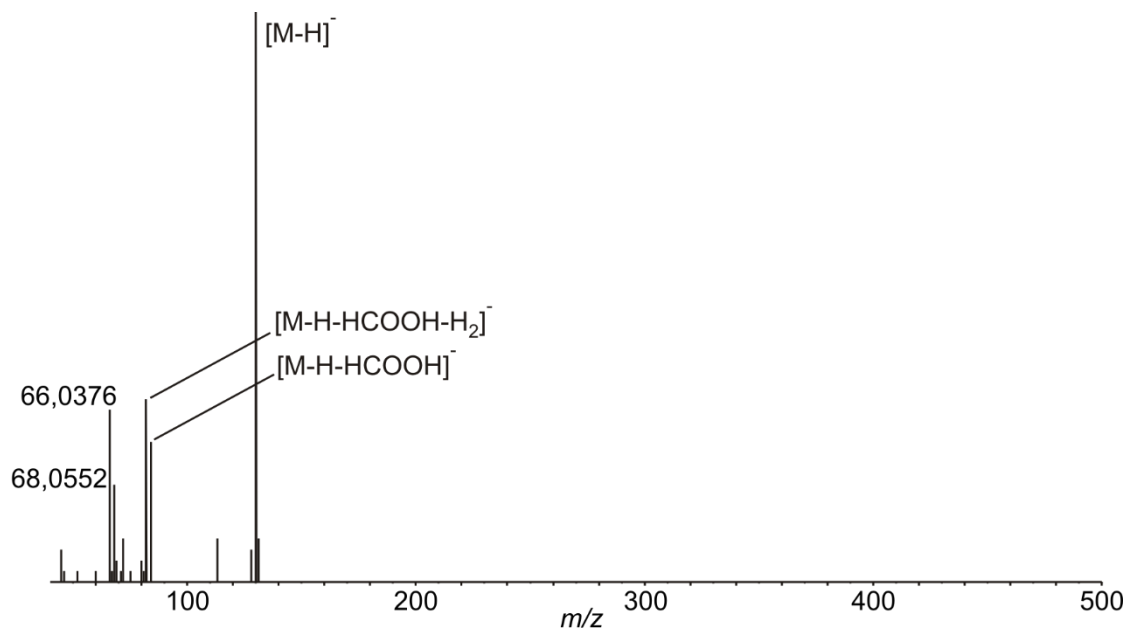
Kaikilla kolmella haaraketjuisella aminohapolla havaittiin ESI-MS-spektreissä $[M-H]^-$ -ionista aiheutuva peruspiikki ja joitakin pilkeioneita. Kuvan 29 L-leusiinin profiilispektrin m/z -arvolla 69 $[M-H-NH_3-C_3H_8]^-$ ollut piikki oli L-isolesiinin (kuva 30) vastaavaa runsaampi. Myös L-valiinilla (kuva 28) havaittiin samasta ionista aiheutuva piikki, mikä viittasi hajoamistuotteen olevan peräisin aminohapporungosta. CID-kokeissa m/z 69 havaittiin heikosti ainoastaan L-valiinille, eikä se siis ollut pääasiallinen pilkeioni. L-leusiinin ja L-isolesiinin eroja vertailtiin m/z 84 ja m/z 82 piikkien eli $[M-H-HCOOH]^-$ ja $[M-H-HCOOH-H_2]^-$ ionien runsauden suhteen. L-isolesiini tuotti spektrin sisällä suhteessa runsaammin ionia m/z -arvolla 82 kun L-leusiinin CID-mittauksissa myös m/z 84 piikki havaittiin selkeästi. L-leusiinin ja L-isolesiinin CID-kokeet on esitetty kuvissa 31 ja 32 ja niiden pilkkoutumisreitit kaaviossa 10. Spektreissä näkyvä piikki m/z 227 oli peräisin Eppendorf-putkesta liuenneista epäpuhtauksista.



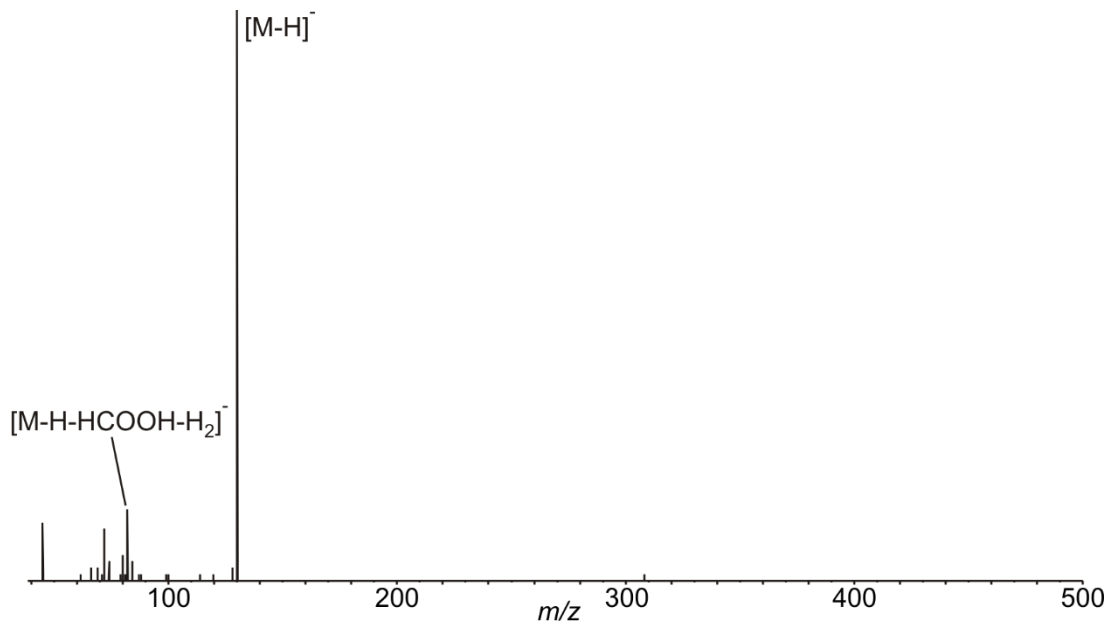
Kuva 29. L-leusiinin ESI-MS-spektri negatiivisella polarisaatiolla.



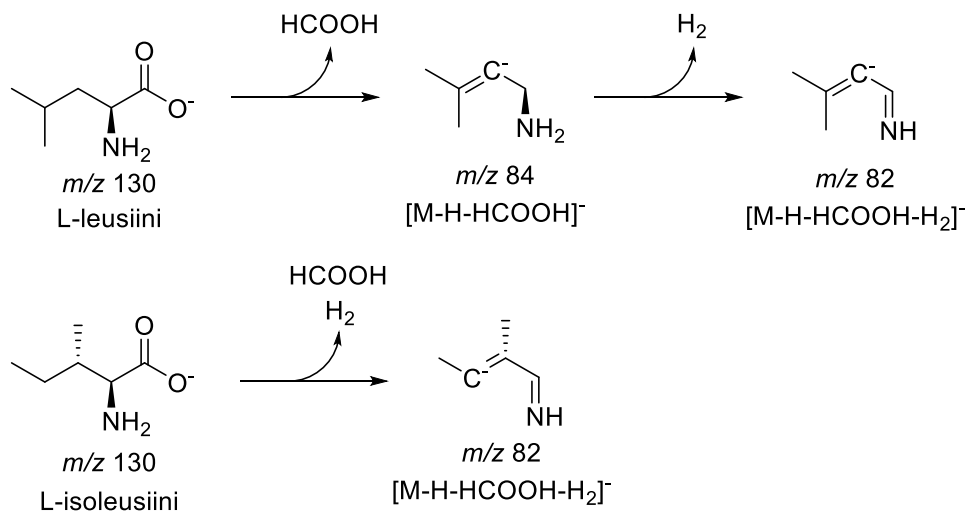
Kuva 30. L-isoleusiinin ESI-MS-spektri negatiivisella polarisaatiolla mitattuna.



Kuva 31. L-leusiinin CID-spektri CE-arvolla 32 V.



Kuva 32. L-isoleusiinin CID-spektri CE-arvolla 32 V.

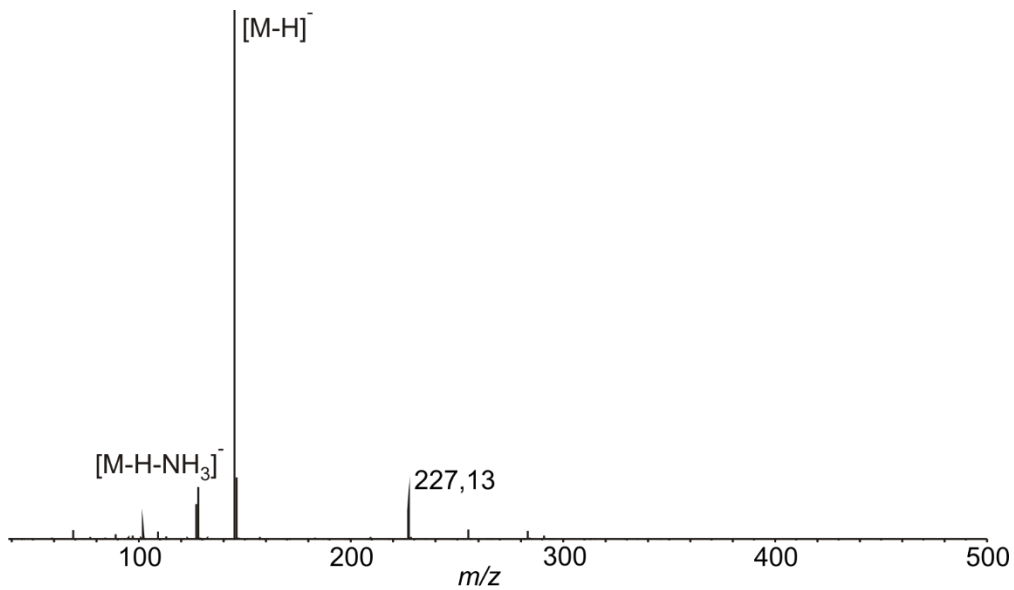


Kaavio 10. L-leusiinin ja L-isoleusiinin pilkkoutuminen negatiivisella polarisaatiolla.

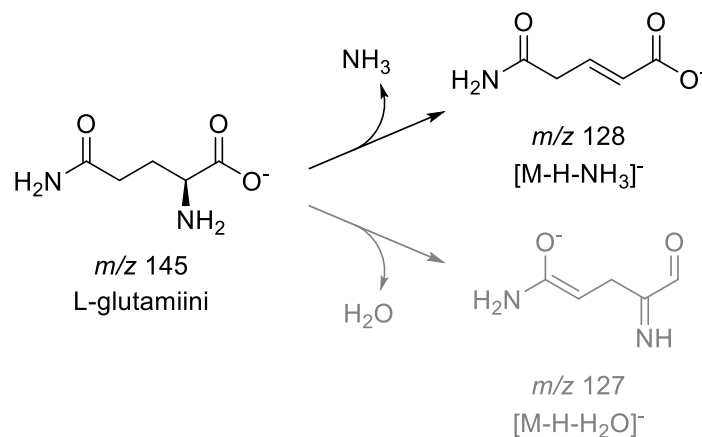
L-asparagiinihapon m/z -arvolla 88 ja α -ketoglutaarihapon m/z -arvolla 101 havaittiin CO_2 -molekyylin irtoaminen. L-asparagiinihapon pilkkoutuminen karboksyylihapporyhmän ja α -hiilen välillä havaittiin myös positiivisella polarisaatiolla $[M+H]^+$ -ionin eristyksessä. Positiivisella polarisaatiolla α -ketoglutaarihapolle havaittiin vain $[M+\text{Na}]^+$ -ioni.

L-glutamiini, joka on isobaarinen α -ketoglutaarihapon kanssa, tuotti CID-kokeessa kolme pilkeionia m/z -arvoilla 128, 127 ja 109. Nämä isobaariset yhdisteet pystyttiin siis selkeästi

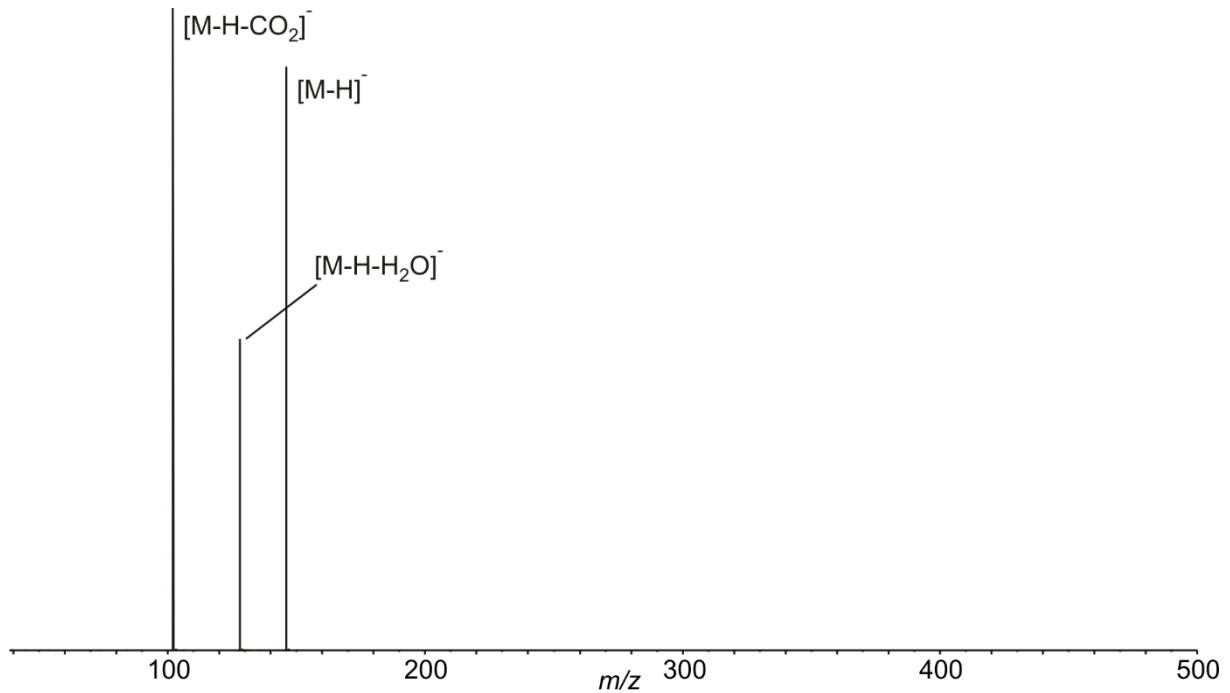
erottamaan erilaisten pilkeioneiden perusteella. L-glutamiini tuotti jo ESI-MS-analyyseissä runsaimpana $[M-H-NH_3]^-$ -ionin m/z -arvolla 128. L-glutamiinihappo tuotti $[M-H-H_2O]^-$ -ionin samalla m/z -arvolla. L-glutamiinihapon negatiivisen polarisaation ESI-MS-spektriä verratessa vastaavaan positiivisen polarisaation spektriin, nähtiin kuinka paljon selkeämmin L-glutamiinihapolle ominaiset pilkeionit erottuvat negatiivisen polarisaation analyysissä. L-glutamiinin ja L-glutamiinihapon ESI-MS-spektrit negatiivisella polarisaatiolla on esitetty kuvissa 33 ja 34. Niiden pilkkoutumiset on esitetty kaavioissa 11 ja 12. ESI-MS-analyyseissä havaitut pilkeionit nähtiin myös CID-kokeissa.



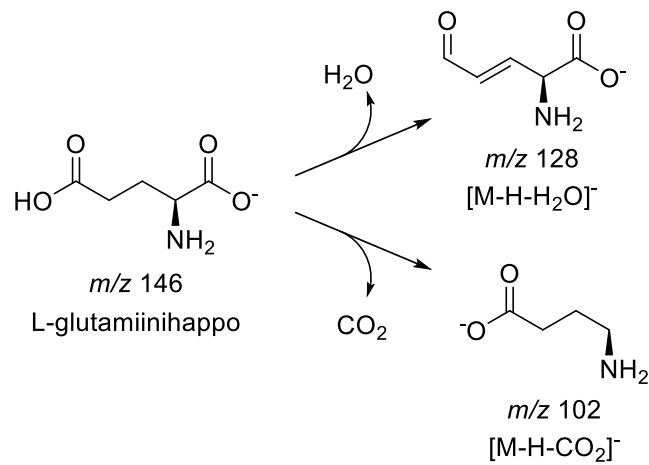
Kuva 33. L-glutamiinin ESI-MS-spektri negatiivisella polarisaatiolla.



Kaavio 11. L-glutamiinin pääasiallinen pilkkoutuminen tapahtuu aminoryhmästä.

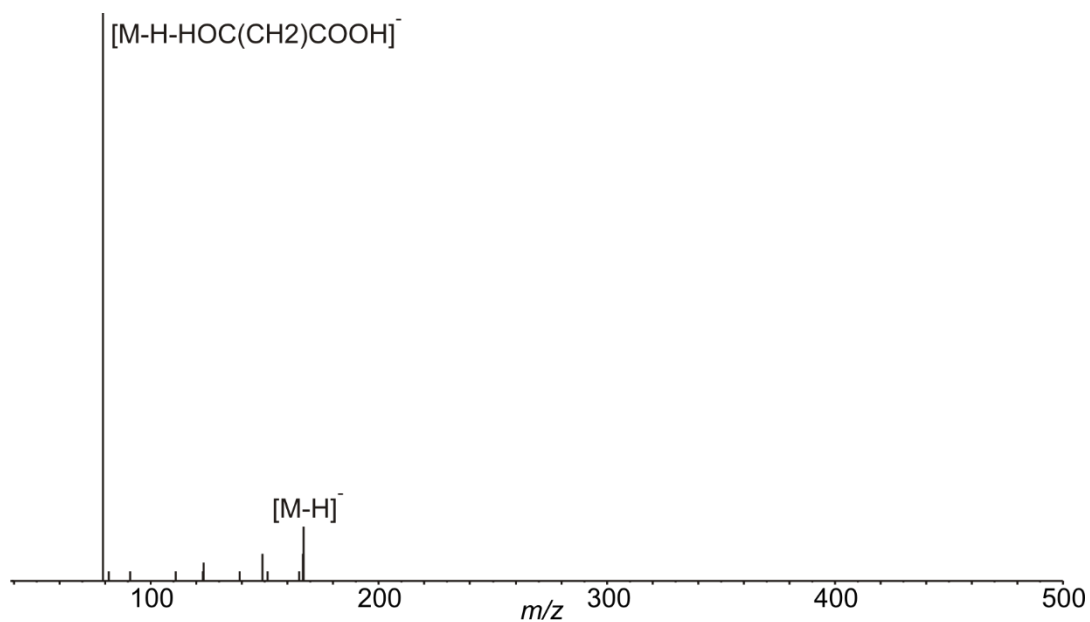


Kuva 34. L-glutamiinihapon negatiivisen polarisaation CID-koe CE-arvolla 15 V.

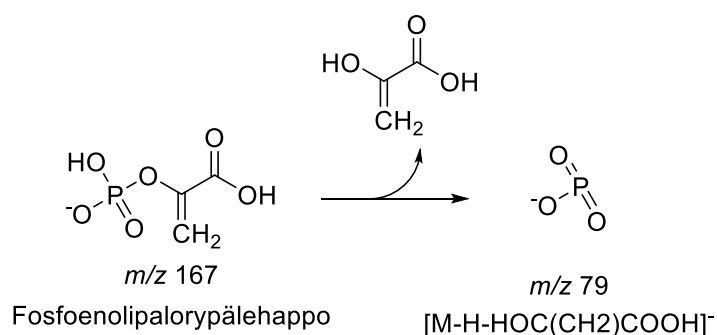


Kaavio 12. L-glutamiinihapon spektrissä havaitaan selkeästi veden ja hiilidioksidin lohkeaminen.

L-omenahapon negatiivisen polarisaation mittauksessa havaittiin [M-H]⁻ -ioni, jonka CID-kokeissa nähtiin veden lohkeaminen *m/z* 115. Fosfoenolipalorypalehapon pilkkoutumisessa havaittiin fosfaattiosan ioni eli enolipalorypalehapon lohkeaminen *m/z*-arvolla 79 (kuva 35, kaavio 13). Vaikka fosfoenolipalorypalehapon kantaliuos valmistettiin yhdistettä stabiloivasti, oli negatiivisen polarisaation ionien intensiteetti hyvin heikko. Intensiteettiä yritettiin parantaa lisäämällä käytettyä puskuria myös näyteliuokseen ja kaksinkertaistamalla fosfoenolipalorypalehapon konsentraatio 40 μM:iin, mutta intensiteetti nousi vain hieman.

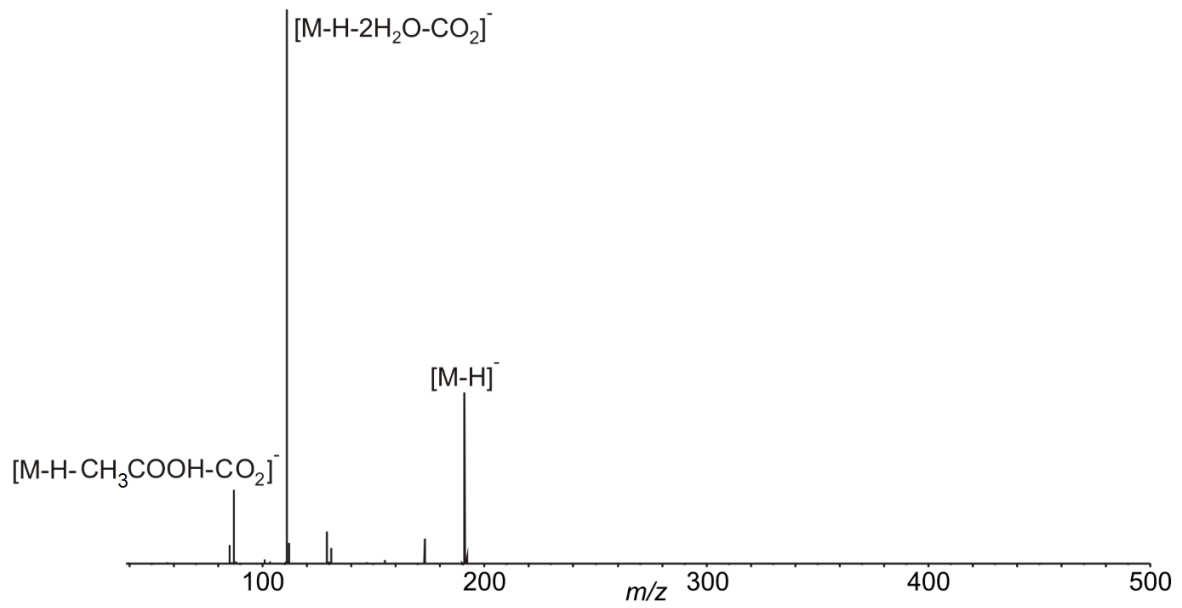


Kuva 35. Fosfoenolipalorypähapon CID-spektri CE-arvolla 15 V.

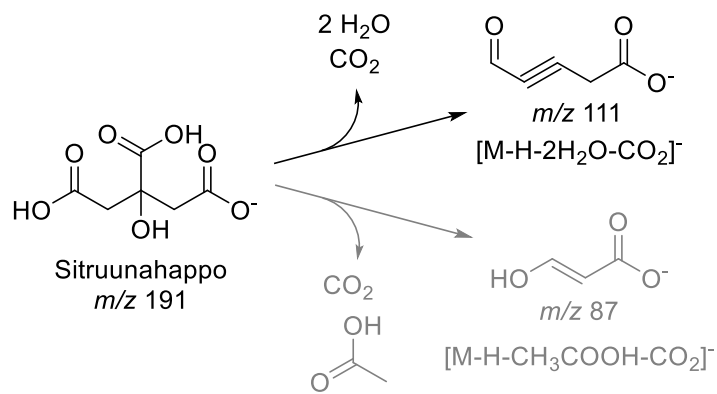


Kaavio 13. Fosfoenolipalorypähapon hajoaminen.

Sitruunahappo on trikarboksyylihapo, jolle kuitenkin pystyttiin tunnistamaan negatiivisella polarisaatiolla [M-H]⁻ -ioni. Sen törmäysaktivoinnissa havaittiin trihapon hajoaminen eli vesimolekyylien ja hiilidioksidin lohkeamiset *m/z*-arvolla 111 ja hiilidioksidin ja etikkahapon lohkeaminen *m/z*-arvolla 87. CID-spektrissä havaittiin samat pilkeionit kuin ESI-MS-spektrissä. Sitruunahapon CID-spektri CE-arvolla 15 V on esitetty kuvassa 36 ja siinä havaittu pilkkoutuminen kaaviossa 14.

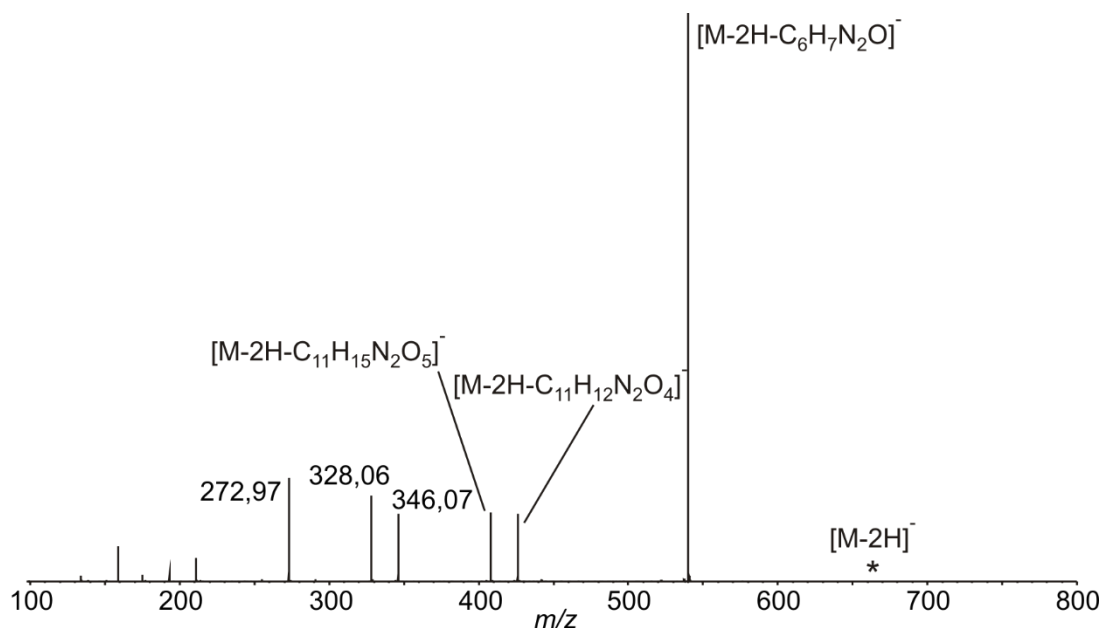


Kuva 36. Sitruunahapon CID-spektri CE-arvolla 15 V.



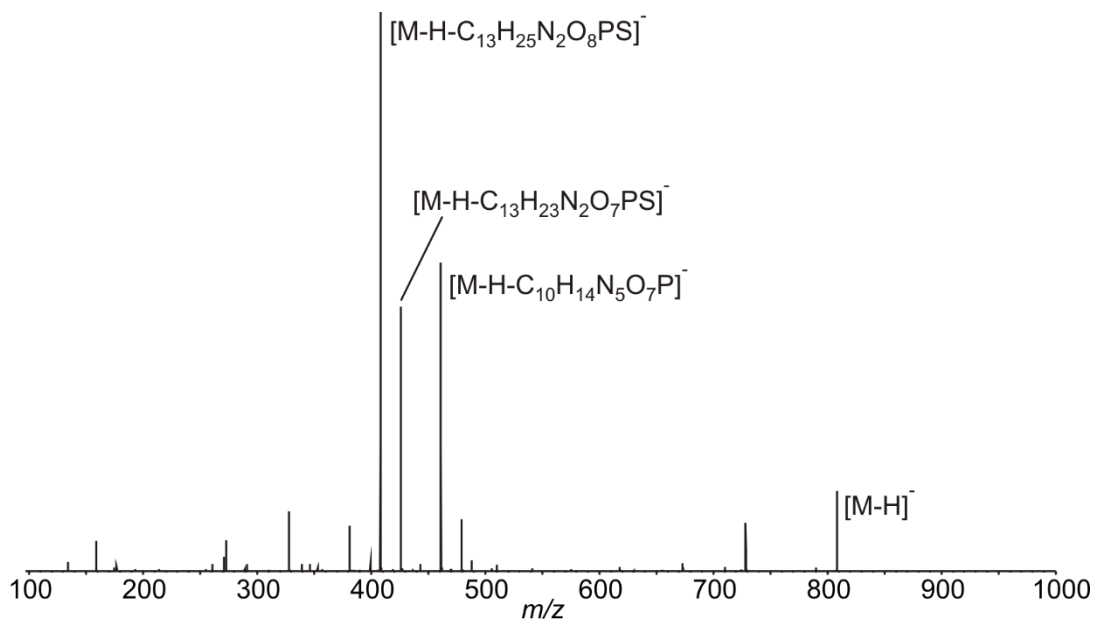
Kaavio 14. Sitruunahapon kaksi pilkkoutumisreittiä.

β -NAD⁺:sta havaittiin [M-2H]⁻ -ioni, jonka pilkkoutumista tutkittiin CID-kokeissa. β -NAD⁺:n ja β -NADH:n rakenteissa on sama runko kuin koentsyymeillä joten [M-H]⁻ ja [M-2H]⁻ -ionien CID-kokeissa havaittiin samoja pilkeioneita m/z -arvoilla 408 ja 426. Myös pelkästään β -NAD⁺:lle ja β -NADH:lle tyypillisiä pilkkeitä havaittiin. Kuvasta 37 nähdään β -NAD⁺:n CID-kokeen spektri. Eristetty [M-2H]⁻ -ioni alkoi hajota jo matalalla jännitteellä kuvan [M-2H-C₆H₇N₂O]⁻ -ioniksi ja kun jännitettä nostettiin, havaittiin myös ionit [M-2H-C₁₁H₁₅N₂O₅]⁻ ja [M-2H-C₁₁H₁₂N₂O₄]⁻, joiden m/z -arvot olivat 426 ja 408.

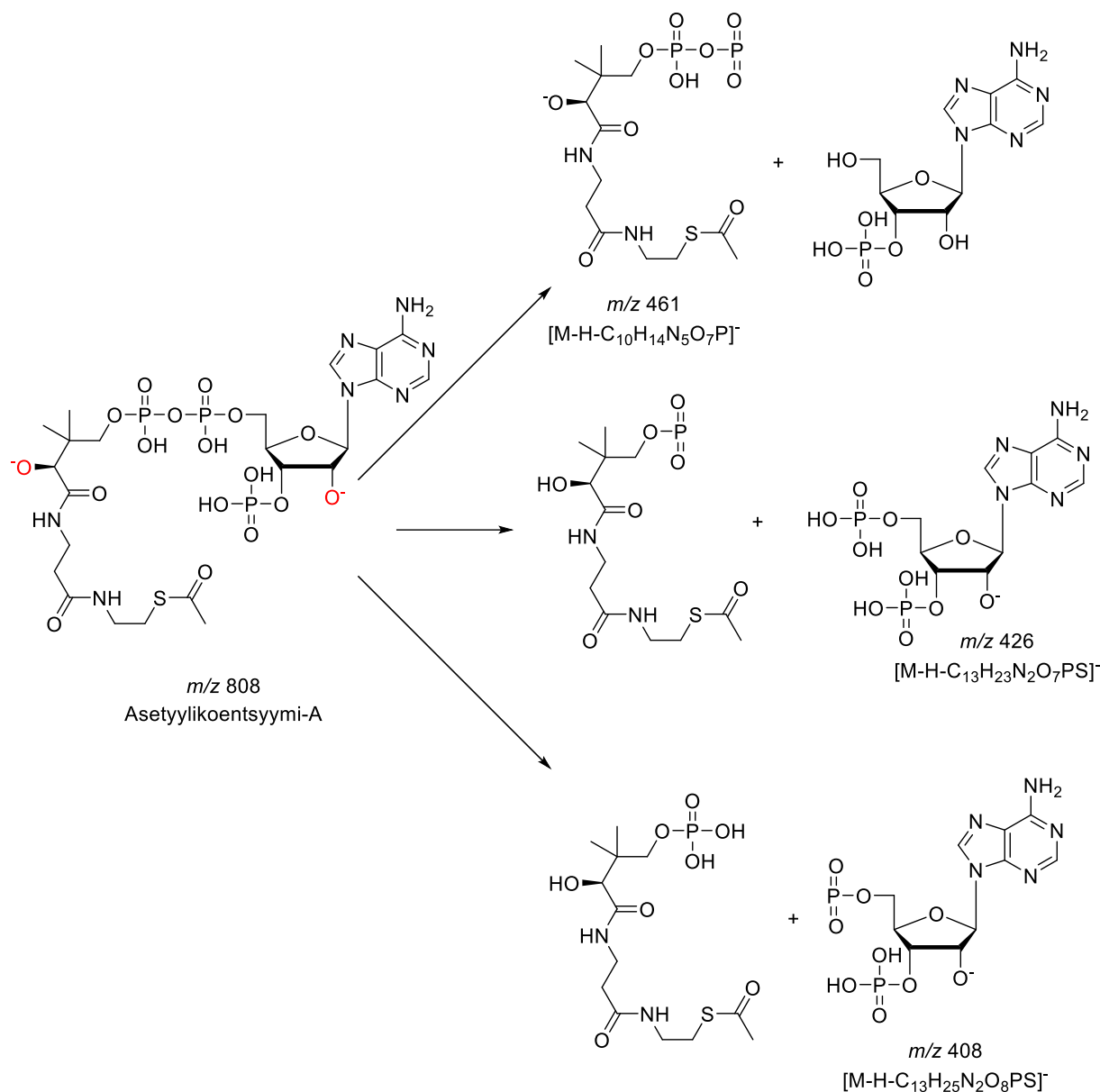


Kuva 37. β -NAD⁺:n negatiivisella polarisaatiolla tehty CID-koe CE-arvolla 35 V.

Sekä Ac-CoA että Suc-CoA tuottivat negatiivisella polarisaatiolla $[M-H]^-$ -ionit. Koska koentsyymit poikkesivat vain sivuketjunsä perusteella toisistaan, havaittiin CID-kokeissa samat ionit, jotka aiheutuivat saman rungon pilkkoutumisesta. Kumpikin tuotti ionit m/z 426 ja 408 ja sivuketjut havaittiin Ac-CoA:n m/z -arvolla 461 ja pitempi Suc-CoA m/z -arvolla 519. Koentsyymit voitiin kuitenkin erottaa toisistaan selkeästi poikkeavien $[M-H]^-$ -ionien signaalien perusteella. Kuvassa 38 on esitetty Ac-CoA:n CID-analyysin spektri, joka oli hyvin samanlainen Suc-CoA:n vastaavan spektrin kanssa. Ac-CoA:n kolme piikkiä tuottavat pilkkoutumiset on esitetty kaaviossa 15.



Kuva 38. Asetyylikoentsyymi-A:n CID CE-arvolla 45 V negatiivisella polarisaatiolla.



Kaavio 15. Asetyylikoentsyymi-A:n kolme erilaista pilkkoutumista.

9.5. ESI-MS-analyysien vertailu

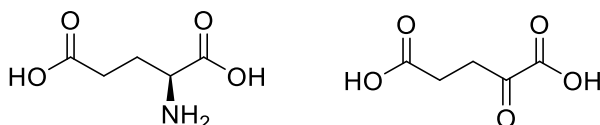
Analysoidut metaboliitit olivat molekyylipainoiltaan pääasiassa pieniä, poolisia molekyyliä ja niissä kaikissa oli karbonyylihiili tai usein karboksyylihapporyhmä ja monissa metaboliiteissa myös aminoryhmä. Useat pienikokoiset metaboliitit sisälsivät saman rungon jonkin toisen metaboliitin kanssa, jolloin niiden pilkkoutumiskuviot muistuttivat toisiaan. Jos $[M+H]^+$ -ioni saatiin eristettyä, positiivisella polarisaatiolla havaittiin pilkeioneita $[M-H-HCOOH]^+$, $[M-H-H_2O]^+$ ja $[M-H-NH_3]^+$. Negatiivisella polarisaatiolla yleisimmät pilkeionit $[M-H]^-$ -ionien CID-kokeissa olivat $[M-H-CO_2]^-$, $[M-H-HCOOH]^-$ ja $[M-H-H_2O]^-$. Myös toisiaan muistuttavilla isokokoisemmilla metaboliiteilla huomattiin yhteneviä pilkkoutumiskuvioita negatiivisella polarisaatiolla: Ac-CoA, Suc-CoA, β -NAD⁺ ja β -NADH sisälsivät kaikki saman perusrungon, josta aiheutui samoja pilkeioneita, jotka tosin näkyivät vasta CID-kokeissa. ESI-MS-

analyyseissä ei välttämättä havaittua samoja pilkkeitä tai ei ainakaan yhtä runsaina ja selkeinä kuin CID-mittauksissa.

Negatiivisen polarisaation MS-analyysit saatiin suoritettua kaikille valituille metaboliiteille oksaloasetaattia lukuun ottamatta. Näistä onnistuneista mittauksista jokaisesta voitiin eristää $[M-H]^-$ -ioni, ja niille tehtiin CID-kokeet. Positiivisen polarisaation mittauksista onnistui odotetusti vain puolet, joten LC-MS-menetelmän kehittämisen kannalta päätettiin keskittyä onnistuneempiin negatiivisen polarisaation mittauksiin. Positiivisen polarisaation mittauksissa $[M+H]^+$ -ioni saatiin eristettyä haaraketjuisille aminohapoille, L-asparagiinihapolle, L-maitohapolle, L-glutamiinihapolle, L-glutamiinille, 4-metyyli-2-oksovaleerihapolle ja β -NADH:lle. Näillä kaikille havaittiin myös Na-addukti $[M+Na]^+$ β -NADH:ta ja 4-metyyli-2-oksovaleerihappoa lukuun ottamatta. Positiivisen polarisaation spektreistä nähtiin myös niiden huono intensiteetti: Tunnistettujen ionien lisäksi nähtiin myös paljon muita ioneita, jotka olivat peräisin edellisistä mittauksista tai näyteliuosten teossa käytetyistä Eppendorf-putkista.

9.5.1. Isobaaristen metaboliittien erottaminen

Metaboliiteista α -ketoglutaarihapon ja L-glutamiinihapon m/z -arvot olivat lähes samat: α -ketoglutaarihapon $[M-H]^-$ -ionin m/z -arvo on 144,99 ja L-glutamiinihapon m/z -arvo 145,06. Niiden erot huomattiin jo ESI-MS-spektrejä tulkitessa, sillä hajoamistuotteet olivat aivan erilaiset. Sama nähtiin myös CID-kokeissa. Pilkkoutumistuotteita tarkkailemalla ja teoreettisiin massoihin vertailemalla, α -ketoglutaarihappo ja L-glutamiinihappo voidaan todennäköisesti erottaa myös biologisen näytteen massaspektristä, sillä niiden rakenteet ovat riittävän erilaiset kuten kuvasta 39 nähdään.



Kuva 39. L-glutamiinihappo ja α -ketoglutaarihappo.

Positiivisen polarisaation mittaukset eivät tuottaneet yhtä selkeitä tuloksia kuin negatiivinen polarisaatio: α -ketoglutaarihappo ei protonoitunut lainkaan, mutta muodosti kuitenkin Na-adduktiin. L-glutamiinihappo protonoitui, muodosti Na-adduktiin ja myös joitakin hajoamistuotteita havaittiin. Helpompaa näiden vertailu oli kuitenkin negatiivisen polarisaation spektreistä, jolloin kummallekin metaboliitille havaittiin sekä kokonaisista molekyyleistä aiheutuva ioni että pilkeioneita.

Hankalimmat isobaariset molekyylit olivat L-leusiini ja L-isoleusiini, joiden ainoa ero oli hiilivetyketjun haaroittumisessa. Niiden pilkkoutumisessa havaittiin samat pilkeionit, mutta intensiteetit pilkkeille olivat hieman erilaiset kummallakin polarisaatiolla. Myös Chenin ryhmän positiivisen polarisaation mittauksista L-leusiinille ja L-isoleusiinille huomattiin pilkeioneiden runsauksien erot.⁷² Jos L-leusiini ja L-isoleusiini saadaan nestekromatografisesti erotettua, voidaan ne melko luotettavasti myös tunnistaa.

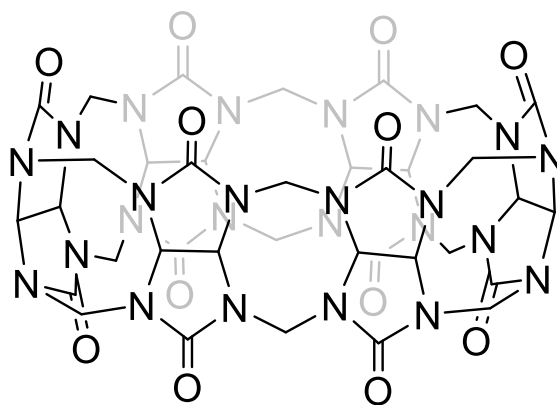
9.6. Nestekromatografia-massaspektrometriamenetelmän kehitys

Edellä käsiteltyjä metaboliittien MS-analyysistä hyödyntäen, LC-MS-menetelmän kehitystä tullaan jatkamaan Agilentin LC-MS QQQ -laitteistolla. Analyysien perusteella menetelmää aiotaan kehittää lähtökohtaisesti vain negatiivista polarisaatiota hyödyntäväksi. Positiivisen polarisaation mukaan ottaminen ei näiden metaboliittien tapauksessa tuota lisäinformaatiota, ja se pidentäisi analyysiaikaa. Koska tämän tutkielman kokeellisessa osassa on käsitelty vain noin puolet tutkimuksen kannalta kiinnostavista metaboliiteista, pitää toisen polarisaation mukaan ottaminen pitää vielä vaihtoehtona. Nyt menetelmän kehittäminen tullaan aloittamaan käyttämällä 150 mm pitkää käänteisfaasikolonnia, jolloin voidaan hyödyntää esimerkiksi jo esiteltyä ioniparitekniikkaa. Vaihtoehtoisesti menetelmän kehitys voidaan aloittaa myös LC-MS-laitteistolle, jonka massa-analysaattorina on ioniliikkuvuusmassaspektrometri (IM-MS, ion-mobility mass spectrometry).

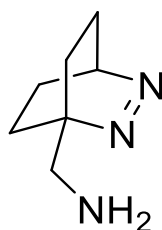
10 Kukurbit[n]uriilien (n = 6, 7, 8) katalysoima atsoalkaanin pilkkoutuminen ja kompleksinmuodostus

10.1. Työn tavoite

Tarkoituksena oli tutkia (2,3-diatsabisyklo[2.2.2]okt-2-en-1-yyli)metyyliamiini-vierasemolekyylin (DBOA) pilkkoutumista kaasufaasissa massaspektrometrin menetelmin. Pilkkoutumista tutkittiin vapaasta DBOA:sta ja CB[n]-isäntään sitoutuneesta DBOA:sta sekä kerran että kahdesti varatuista ioneista. Päämääränä oli selvittää CB[n]-molekyylin kompleksinmuodostuskykyä DBOA:n kanssa ja tarkkailla vapaan ja isäntämolekyyliin sitoutuneen DBOA:n pilkkoutumisen eroja. CB[6]:n rakenne on esitetty kuvassa 40 ja DBOA:n kuvassa 41.



Kuva 40. Kukurbit[6]uriilin rakenne.



Kuva 41. (2, 3-Diatsabisyklo[2.2.2]okt-2-en-1-yyli)metyyliamiinin (DBOA) rakenne.

10.2. Näytteiden valmistus ja mittausparametrit

Kukurbit[n]uriilit liukenevat yleisesti käytetyistä liuottimista ainoastaan veteen ja ovat siihenkin niukkaliukoisia. Paras liukoisuus esimerkiksi CB[6]:lle saavutettiin 30 % HCl:lla tai 60 % muurahaishapolla.⁷³ Liukoisuuserot perustuvat symmetriaan.⁷⁴ Lisäämällä vesiliuokseen happoa, nämä molekyylit saadaan liukenemaan.⁷⁵ Vahvat ja väkevät happoliuokset kuluttavat massaspektrometria, joten näytteiden valmistamisessa käytettiin lopulta korkeintaan 10 % etikkahappoa. Etikkahappo on muurahaishappoa paljon miedompi happo, joten CB[6] ja CB[8] liuokset valmistettiin kylläisiksi ja niiden konsentraatio jäi noin 10 μM :iin. CB[7] liukenee parillisista CB[6]:ta ja CB[8]:aa paremmin ja sen kantaliuos tehtiin 1 mM:ksi veteen. DBOA:n 1 mM kantaliuos valmistettiin veteen. DBOA:n ESI-MS-mittaukset ja CID-kokeet tehtiin 20 μM vesiliuoksesta, jossa oli 10 % etikkahappoa. CID-kokeissa eristettiin CB[n]:n ja DBOA:n komplekseista protonoitunut, kahdesti protonoitunut sekä natriumin ja protonin sisältävät kompleksit. Kompleksien ja DBOA:n näyteliuokset valmistettiin CB[7]:n tapauksessa 1:10 ja CB[6]:n ja CB[8]:n tapauksissa jopa 1:50. Näyteliuoksissa käytettiin pääsääntöisesti 10 % etikkahappoa. CB[6]:n ja DBOA:n kompleksien analyysissä näyteliuoksessa oli 2 % etikkahappoa. Näytteiden valmistamisessa käytettiin HPLC-puhtaita

liuottimia, mittaukset tehtiin AB Sciex QSTAR Elite ESI-Q-TOF-massaspektrometrillä, laitteisto kalibroitiin Agilentin ESI-tuning mixillä ja mittaukset tehtiin positiivisella polarisaatiolla. Kuivaus- ja törmäyskaasuna käytettiin typpeä. Massaspektrometrin käsittelyssä ja datan analysoimisessa käytettiin Analyst® QS 2.0 -ohjelmistoa ja spektrikuvien käsittelyyn CoreIDRAW X4-ohjelmaa. DBOA:n ja CB[n]:n ja DBOA:n kompleksien analyseissä käytetyt parametrit on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5. Massaspektrometrin parametrit

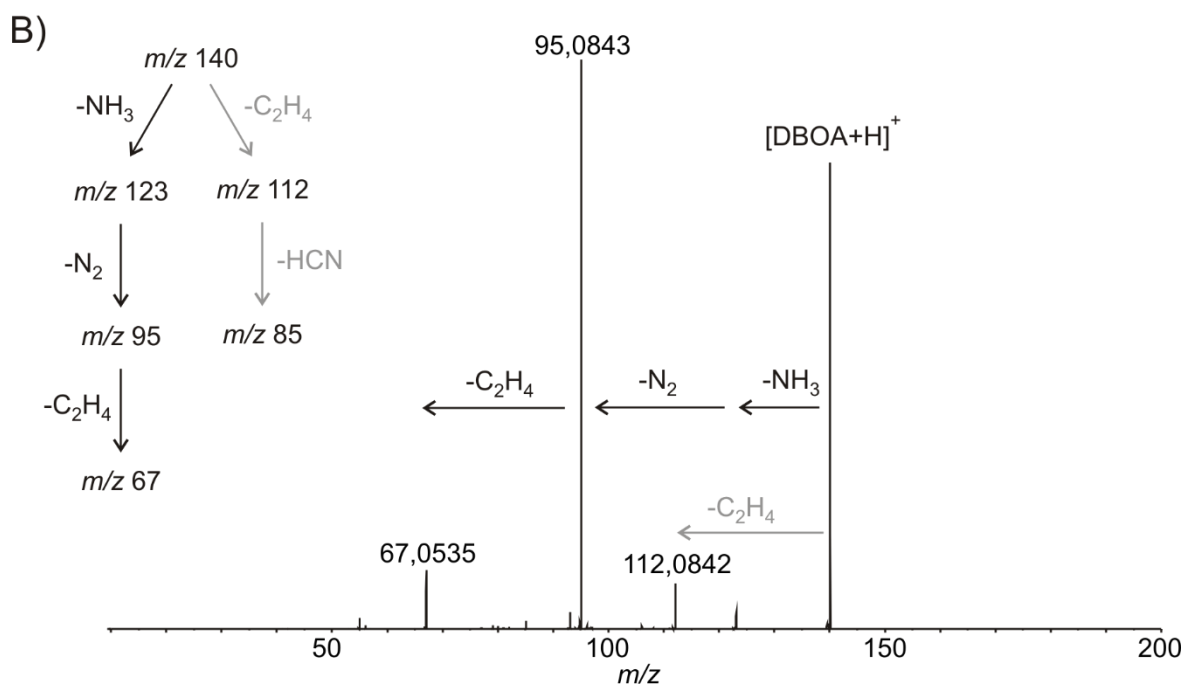
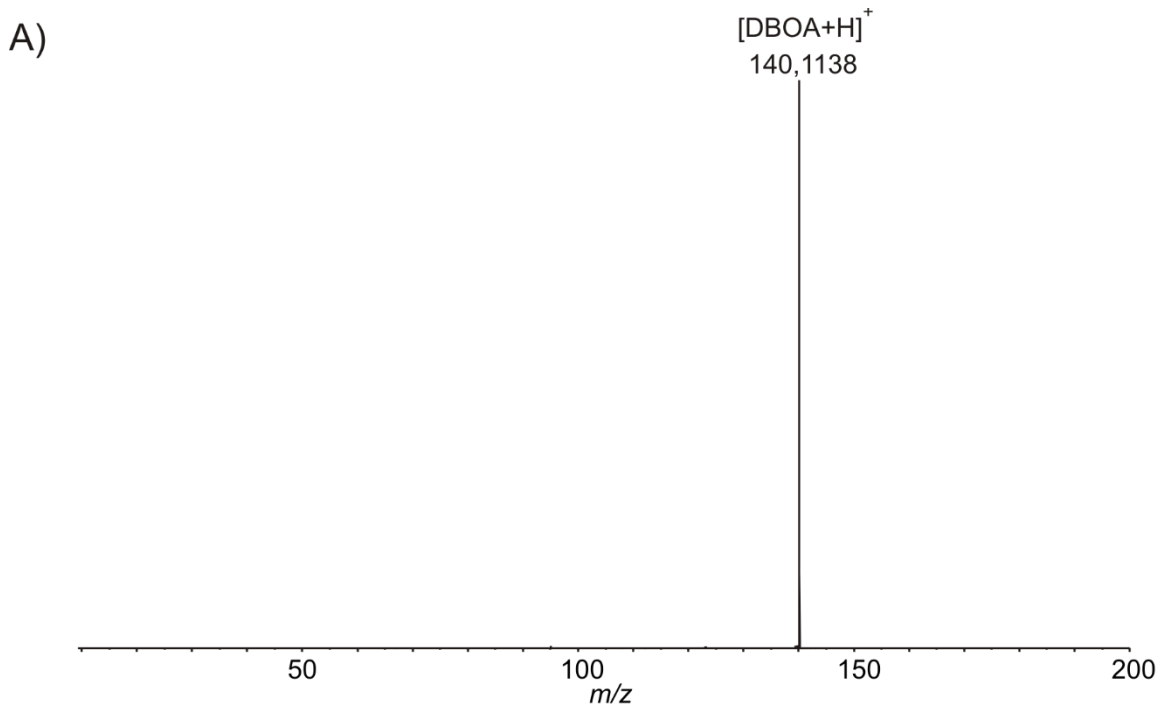
Parametri	Arvo (DBOA)	Arvo (CB[n] + DBOA)
GS1	35 psi	35-40 psi
CUR	20 l/min	20-30 l/min
IS	5500 V	4800-5500 V
Accumulation time	1 s	1-2 s
DP	25 V	225-300 V
FP	200 V	200-400 V
DP2	10 V	10-20 V
IRD	6 ms	6 ms
IRW	5 ms	5 ms
Flow rate	5 µl/min	5-7 µl/min
Mass range (profile)	10-200 <i>m/z</i>	CB7: <i>m/z</i> 100-1500 CB6: <i>m/z</i> 40-1500 CB8: <i>m/z</i> 200-2000
Mass range (CID)	10-200 <i>m/z</i>	CB7: <i>m/z</i> 40-1500 CB6: <i>m/z</i> 40-1500 CB8: <i>m/z</i> 100-2000
Q1 Transmission window (profile)	<i>m/z</i> 20 33 % <i>m/z</i> 110 33 % <i>m/z</i> 140 34 %	CB7: <i>m/z</i> 1300 100 %; 650 100 % CB6: <i>m/z</i> 1200 100 %; 550 100 % CB8: <i>m/z</i> 750 100 %
Q1 Transmission window (CID)	<i>m/z</i> 20 50 % <i>m/z</i> 110 50 %	CB7: <i>m/z</i> 100 50 %, <i>m/z</i> 1000 50 %; <i>m/z</i> 80 50 %, <i>m/z</i> 210 50 % CB6: <i>m/z</i> 30 33 %, <i>m/z</i> 600 67 %; <i>m/z</i> 30 50 %, <i>m/z</i> 1100 50 % CB8: <i>m/z</i> 80 50 %, 230 50 %
IE1	2 V	2 V
RO2	12,5 V	12,5 V
GR	10 V	10 V
TFO	12,5 V	12,5 V
TST	0,1 V	0,1 V
CEM	2250-2300 V	2250-2300 V
Time bins to sum	20	20

10.3. Mittaukset ja tulokset

Massaspektrometriset kokeet suoritettiin analysoimalla DBOA- ja CB[n]-molekyylejä vapaina ja sen jälkeen isännän ja vieraan seoksina. ESI-MS-spektreistä etsittiin sekä kerran että kahdesti varattuja ioneja, joista eristettiin CID-kokeisiin protonoituneet kompleksit tai natriumin ja protonin sisältävät kompleksit. CID-kokeissa tarkasteltiin kompleksissa hajoavan DBOA:n m/z -arvoja vertailemalla piikkien arvoja teoreettisiin m/z -arvoihin ja neutraalien pilkkeiden arvoihin. CID-kokeiden tulokset ja massatarkkuuksien vertailut koottiin taulukoihin, joihin on laskettu erotukset eristetystä ionista ja pilkeionista tai kahdesta toisiaan seuranneesta pilkeionista. Ionien massatarkkuuksien, muodostuneiden pilkkeiden molekyylipainojen ja spektrien ionien intensiteettejä hyödyntäen pääteltiin, mikä molekyyli DBOA:sta kussakin tapauksessa irtosi. CID-kokeista tehdyissä taulukoissa lihavoituna on merkitty eristetty ioni ja mustalla fontilla ionit, joiden massatarkkuus on harmaalla merkittyjä ioneita parempi.

10.3.1. Vapaan atsoalkaanin massaspektrometrinen analyysi

DBOA:n CID-kokeessa eristettiin $[DBOA+H]^+$ -ioni, jonka pilkeioneiden ja pilkkeiden massatarkkuuksista (taulukko 6) pääteltiin pilkkoutumisreitit. Kuvassa 42 on esitetty $[DBOA+H]^+$ -ionin eristys, CID-spektri ja kaksi pilkkoutumisreittiä, joista tummennettu reitti on piikkien intensiteettien perusteella pääreitti. N_2 :n ja C_2H_4 :n monoisotooppiset massat eroavat vain 0,025 Da, joten kalibrointi CID-mittauksia varten tehtiin huolella, mutta lopulliset päätelmät tehtiin pilkkeiden molekyylipainojen perusteella.



Kuva 42. A) [DBOA+H]⁺-ionin eristys CE-arvolla 10 V. B) [DBOA+H]⁺-ionin CID-spektri CE-arvolla 20 V. Eristys ja CID-kokeet tehtiin 20 μM DBOA 10 % etikkahapon vesiliuoksessa. Harmaalla merkitty hajoaminen on sekundäärinen pilkkoutuminen.

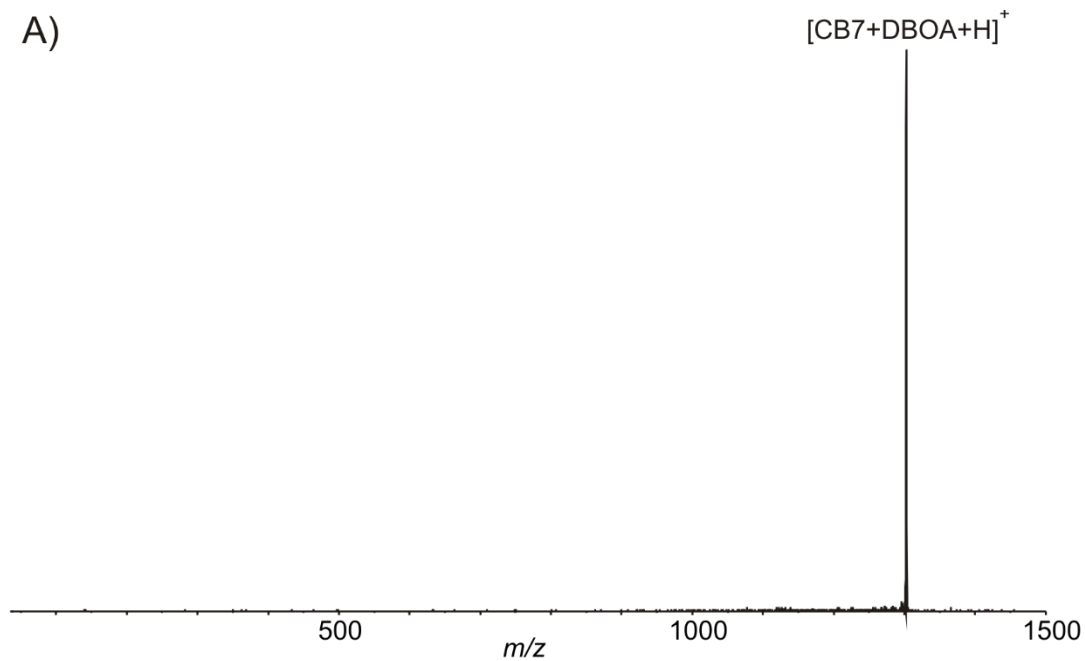
Taulukko 6. [DBOA+H]⁺-ionin CID-kokeissa havaitut *m/z*-arvot ja niiden vertailu teoreettisiin arvoihin (MW = molecular weight, molekyylipaino)

CE (V)	Ioni	<i>m/z</i> (teor)	<i>m/z</i> (exp)	$\Delta m/z$	MW pilke (teor)	MW pilke (exp)	teor- exp
20	[DBOA+H] ⁺	140,1182	140,1138	0,004			
20	[DBOA+H-NH ₃] ⁺	123,0916	123,088	0,004	17,027	17,026	0,001
20	[DBOA+H-N ₂] ⁺	112,1121	112,0868	0,025	28,006	28,027	-0,021
20	[DBOA+H-C ₂ H ₄] ⁺	112,0869	112,0868	0,000	28,031	28,027	0,004
20	[DBOA+H-NH ₃ -N ₂] ⁺	95,0855	95,0845	0,001	17,027	17,002	0,024
20	[DBOA+H-NH ₃ -C ₂ H ₃] ⁺	95,0604	95,0845	-0,024	17,027	17,002	0,024
20	[DBOA+H-N ₂ -HCN] ⁺	85,1012	85,0755	0,026	27,011	27,011	0,000
20	[DBOA+H-C ₂ H ₄ -HCN] ⁺	85,0760	85,0755	0,001	27,011	27,011	0,000
20	[DBOA+H-NH ₃ -N ₂ -C ₂ H ₄] ⁺	67,0542	67,0547	0,000	28,031	28,030	0,001
20	[DBOA+H-NH ₃ -C ₂ H ₄ -C ₂ H ₄] ⁺	67,0291	67,0547	-0,026	28,031	28,030	0,001

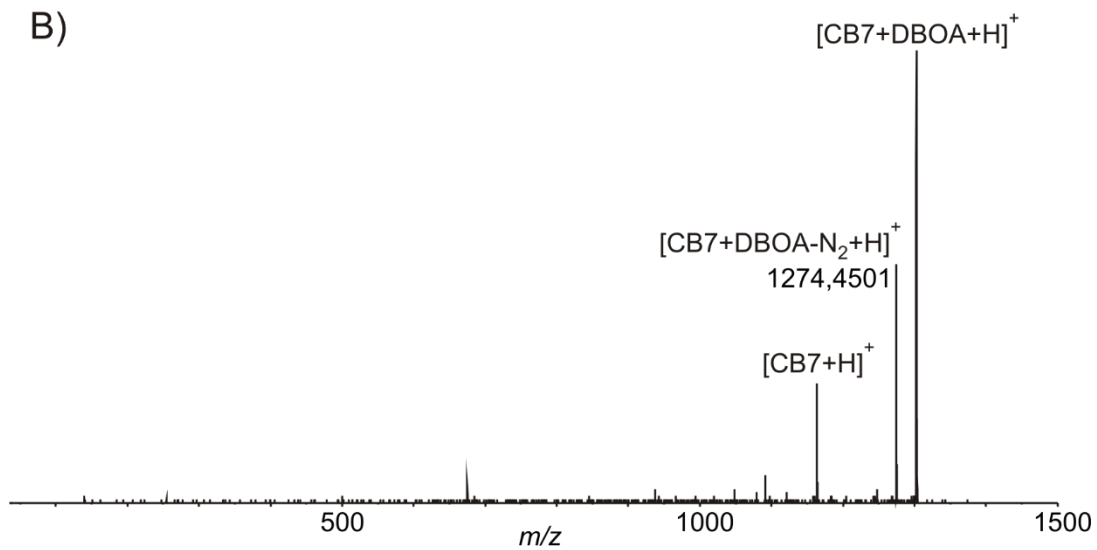
10.3.2. CB[n] + DBOA -kompleksien analyysit

CB[7]:stä ja DBOA:sta valmistettiin 1:10 näyteliuos 10 % etikkahappoon, jossa CB[7]:n konsentraatio oli 10 µM. CID-kokeissa eristettiin [CB7+DBOA+H]⁺, [CB7+DBOA+2H]²⁺ ja [CB7+DBOA+Na+H]²⁺-ionit. Kuvan 43 spektreissä nähdään [CB7+DBOA+H]⁺-ionin eristys sekä kompleksin pilkkoutuminen ja hajoaminen. DBOA:sta irtosi kerran varatussa kompleksissa N₂-molekyyli, minkä jälkeen DBOA:n loppuosa ei enää pysynyt isäntään sitoutuneena. Kompleksi hajosi, mikä nähtiin [CB7+H]⁺-ionin intensiteetin nousuna. Spektreihin merkityt pilkeionit on päätelty taulukon 7 arvojen perusteella.

A)



B)

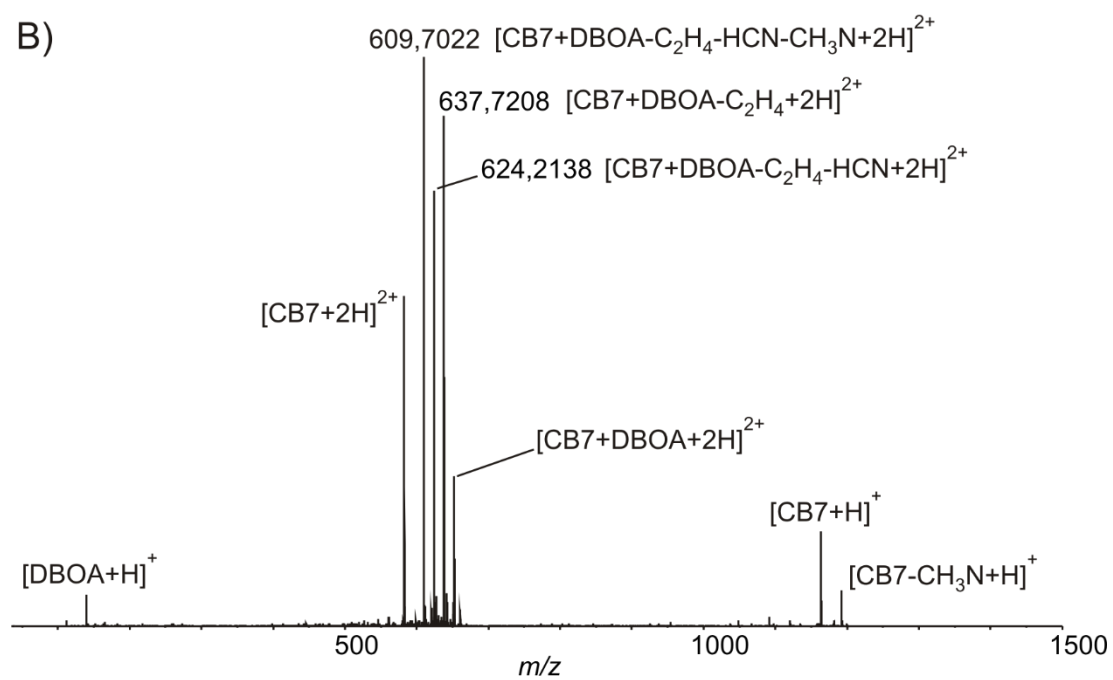
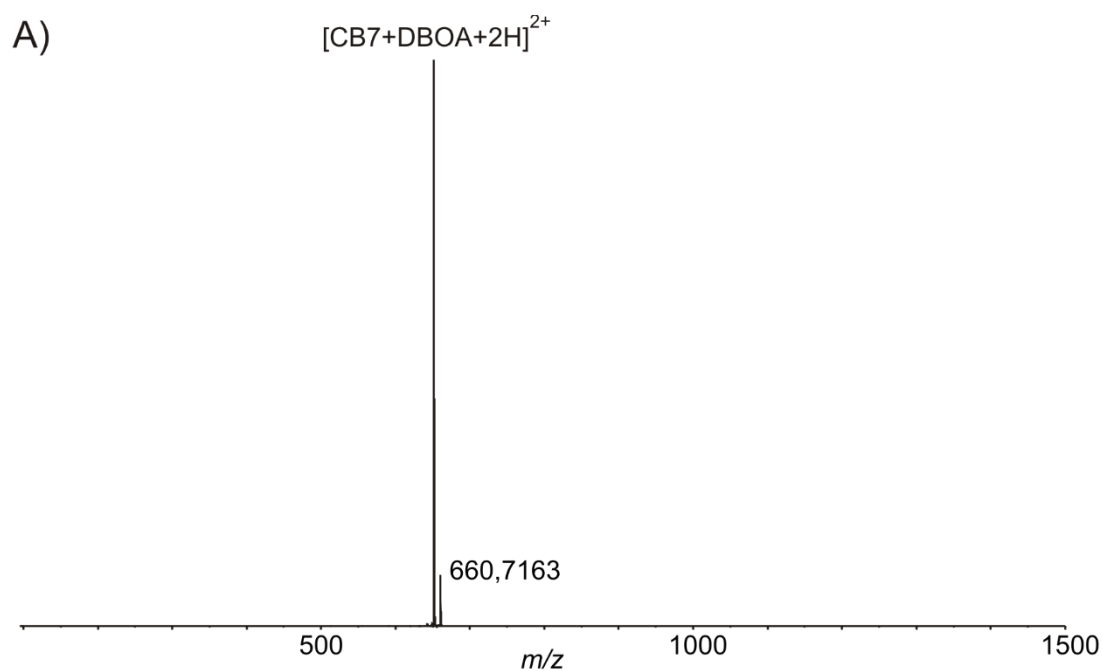


Kuva 43. A) $[\text{CB7+DBOA+H}]^+$ -ionin eristys CE-arvolla 30 V. B) $[\text{CB7+DBOA+H}]^+$ -ionin CID-spektri CE-arvolla 75 V.

Taulukko 7. [CB7+DBOA+H]⁺-ionin CID-kokeissa havaitut ionit, niiden m/z-arvot ja vertailu teoreettisiin arvoihin

CE (V)	Ioni	m/z (teor)	m/z (exp)	Δ m/z	MW pilke (teor)	MW pilke (exp)	teor- exp
30	[CB7+DBOA+H] ⁺	1302,4618	1302,4579	0,004			
60	[CB7+H+DBOA-N ₂] ⁺	1274,4556	1274,4516	0,004	28,006	28,006	0,000
60	[CB7+H+DBOA-C ₂ H ₄] ⁺	1274,4305	1274,4516	-0,021	28,031	28,006	0,025
60	[CB7+H] ⁺	1163,4037	1163,3702	0,034			

Kahdesti varatun [CB7+DBOA+2H]²⁺-ionin eristäminen ei onnistunut täysin vaan eristyksessä nähtiin myös [CB7+DBOA+H₂O+2H]²⁺-ioni m/z-arvolla 660. [CB7+DBOA+2H]²⁺-ionin CID-spektrissä CE-arvolla 40 V DBOA:sta nähtiin irtoavan etyleenipilke m/z-arvolla 637 eli havaittiin [CB7+DBOA-C₂H₄+2H]²⁺-ioni, kun kerran varatusta [CB7+DBOA+H]⁺-ionista havaittiin CID-kokeissa [CB7+DBOA-N₂+H]⁺-ioni. Kahdesti varatun kompleksin analyysistä huomattiin siis DBOA:n pilkkoutuvan eri tavalla kuin vapaan DBOA:n analyysissä tai kerran varatun kompleksin hajoamisessa. Kahdesti protonoituneella CB[7]:n kompleksilla oli vapaan DBOA:n pilkkoutumisen pääreittiin verrattuna sekundääristä hajoamisreittiä katalysoiva vaikutus. Etyleenin irtoamisen jälkeen havaittiin myös joitakin muita pilkkoutumistuotteita, mutta lopulta kompleksi hajosi ja havaittiin kerran varatut [DBOA+H]⁺ ja [CB7+H]⁺-ionit. [CB7+DBOA+2H]²⁺-ionin eristysspektri ja CID-spektri on esitetty kuvassa 44 ja spektreistä saadut m/z-arvot ja niiden massatarkkuuksien vertailu on tehty taulukossa 8.

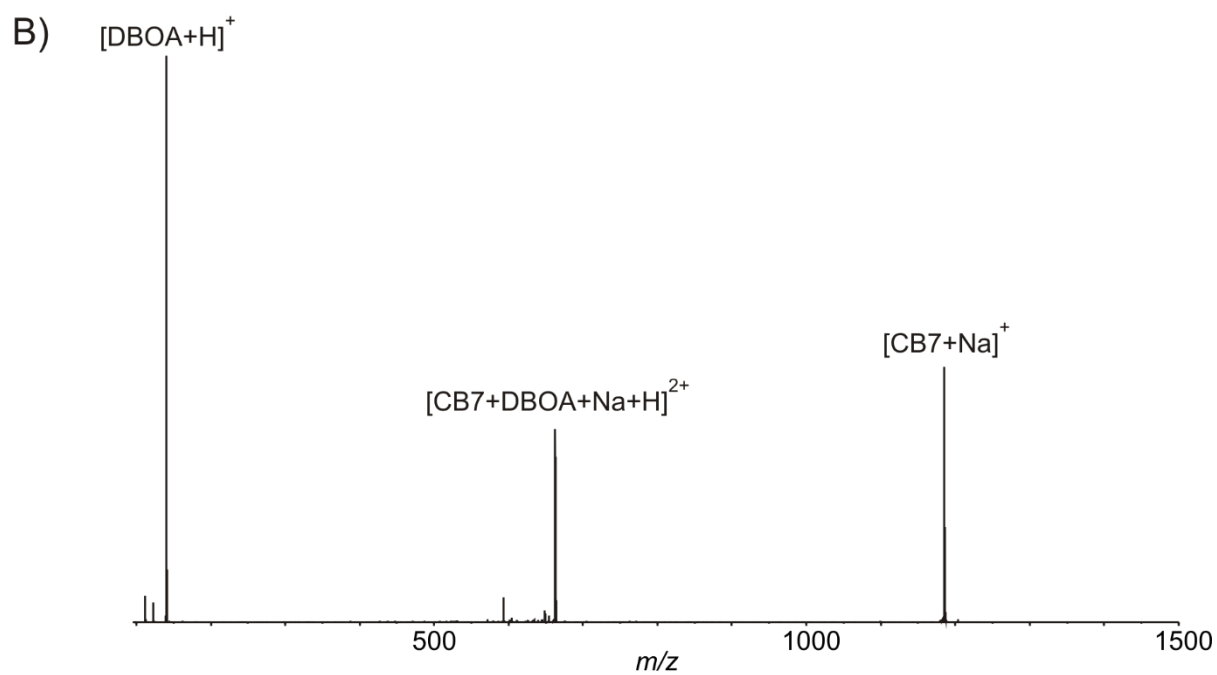
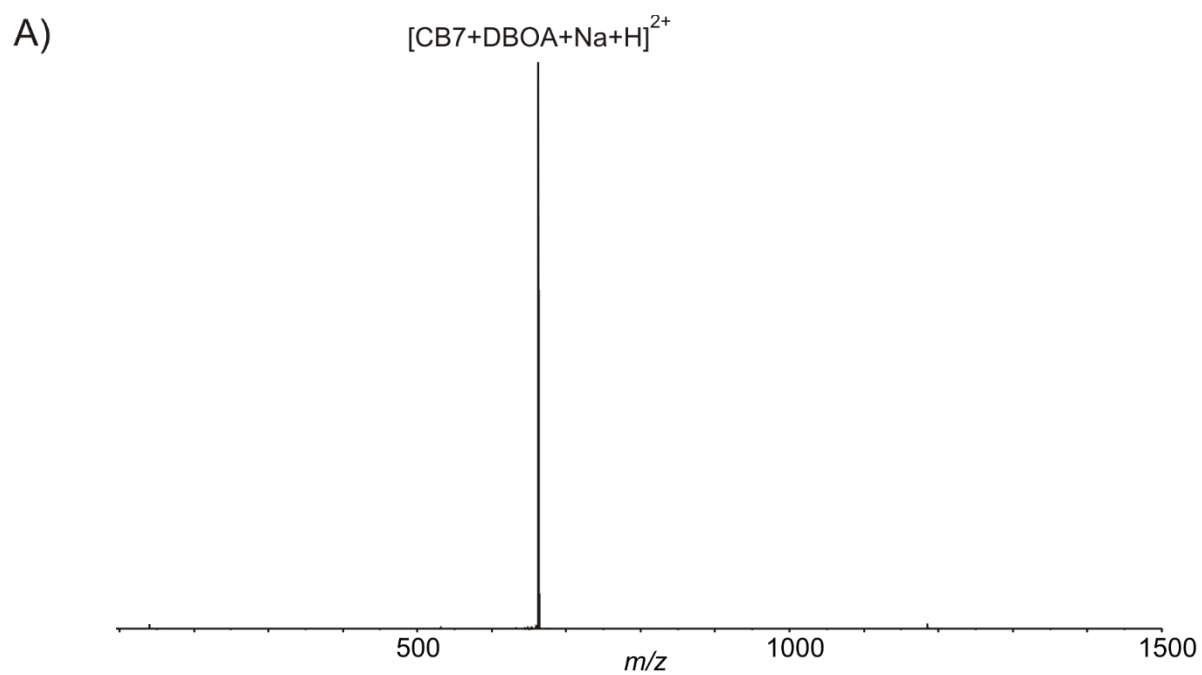


Kuva 44. A) $[\text{CB7+DBOA+2H}]^{2+}$ -ionin CID-koe CE-arvolla 5 V. B) $[\text{CB7+DBOA+2H}]^{2+}$ -ionin CID-koe CE-arvolla 40 V.

Taulukko 8. [CB7+DBOA+2H]²⁺-ionin CID-kokeissa havaitut ionit

CE (V)	Ioni	<i>m/z</i> (teor)	<i>m/z</i> (exp)	$\Delta m/z$	MW pilke (teor)	MW pilke (exp)	teor- exp
5	[CB7+DBOA+2H] ²⁺	651,7345	651,7395	-0,005			
40	[CB7+DBOA-N ₂ +2H] ²⁺	637,7314	637,7208	0,011	28,006	28,037	-0,031
40	[CB7+DBOA-C ₂ H ₄ +2H] ²⁺	637,7189	637,7208	-0,002	28,031	28,037	-0,006
40	[CB7+DBOA-N ₂ -HCN+2H] ²⁺	624,2260	624,2138	0,012	27,011	27,014	-0,003
40	[CB7+DBOA-C ₂ H ₄ -HCN+2H] ²⁺	624,2134	624,2138	0,000	27,011	27,014	-0,003
40	[CB7+DBOA-C ₂ H ₄ N-HCN- CH ₃ N+2H] ²⁺	609,7001	609,7022	-0,002	29,027	29,023	0,003
40	[CB7+2H] ²⁺	582,1790	582,1754	0,004			
40	[CB7+H] ⁺	1163,4037	1163,3553	0,048			
50	[DBOA+H] ⁺	140,1182	140,1216	-0,003			
50	[DBOA+H-NH ₃] ⁺	123,0917	123,0902	0,001	17,027	17,031	-0,005
50	[DBOA+H-N ₂] ⁺	112,1121	112,0912	0,021	28,006	28,030	-0,024
50	[DBOA+H-C ₂ H ₄] ⁺	112,0869	112,0912	-0,004	28,031	28,030	0,001

[CB7+DBOA+Na+H]²⁺-ionin hajoaminen näkyi CID-spektreissä selkeästi. DBOA:n pilkeionit havaittiin hyvin matalilla intensiteeteillä eli käytännössä kompleksi hajoaa, eikä DBOA:n pilkkoutumista kompleksissa tapahdu. Hajoamisessa Na⁺-ioni jäi CB[7]:lle ja protoni DBOA:lle. [CB7+DBOA+Na+H]²⁺-ionin eristys ja CID-spektri CE-arvolla 40 V on esitetty kuvassa 45. Havaittujen ionien massatarkkuuksien vertailu on tehty taulukossa 9.

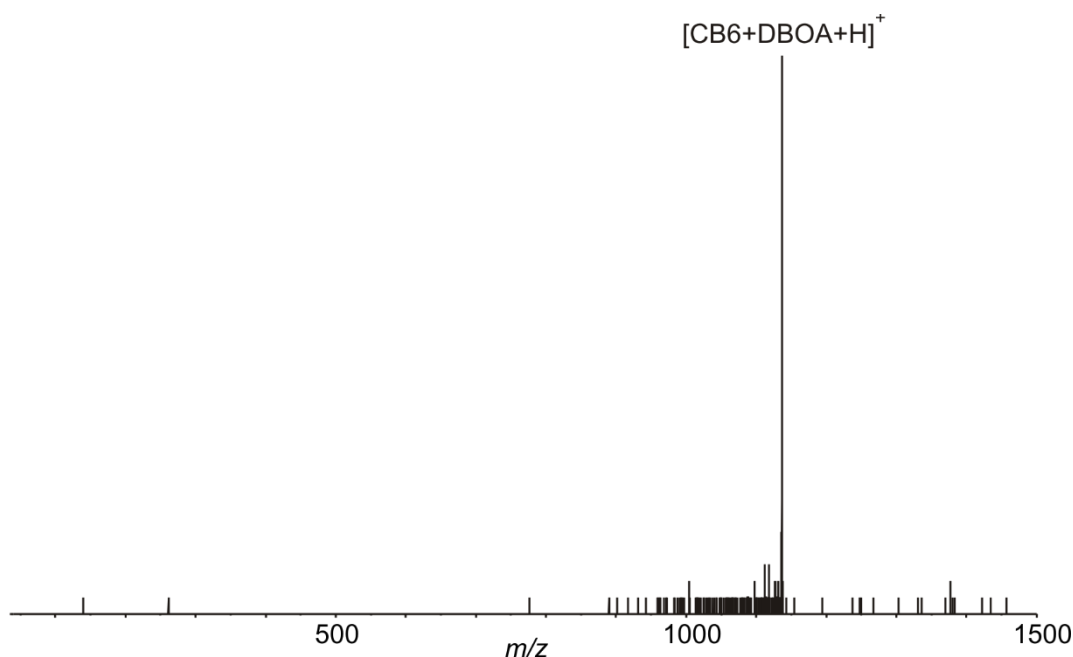


Kuva 45. A) $[CB7+DBOA+Na+H]^{2+}$ -ionin eristys CE-arvolla 25 V.
 B) $[CB7+DBOA+Na+H]^{2+}$ -ionin CID-spektri CE-arvolla 40 V.

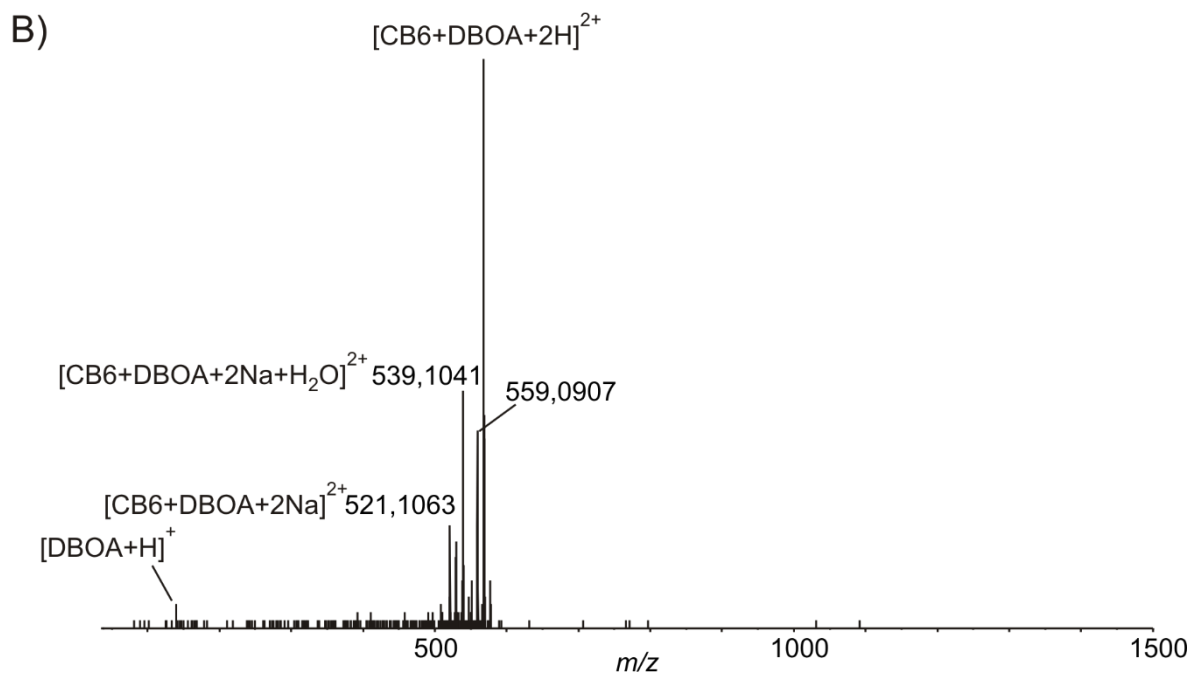
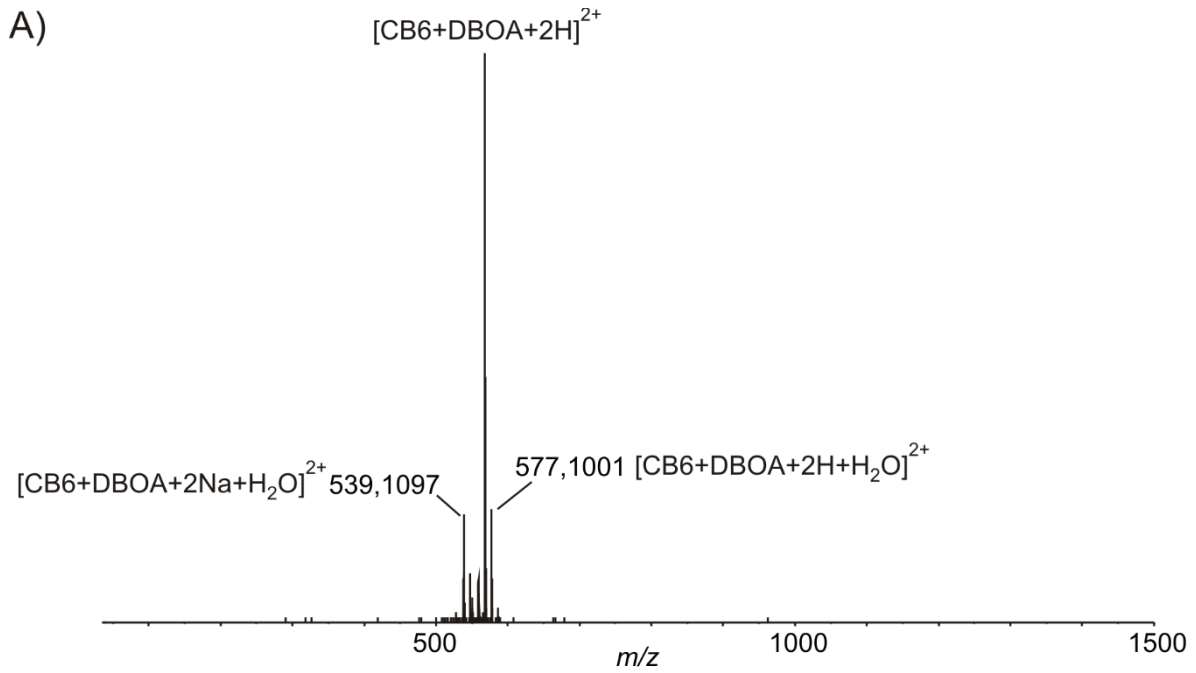
Taulukko 9. [CB7+DBOA+Na+H]²⁺-ionin CID-kokeissa havaitut ionit

CE (V)	Ioni	<i>m/z</i> (teor)	<i>m/z</i> (exp)	$\Delta m/z$
15	[CB7+DBOA+Na+H] ²⁺	662,7255	662,7407	-0,015
40	[CB7+Na] ⁺	1185,3328	1185,3289	0,004
40	[CB7+Na+H] ²⁺	593,1700	593,1811	-0,011
40	[DBOA+H] ⁺	140,1182	140,1238	-0,006

CB[6] + DBOA –liuoksen ESI-MS-spektreissä näkyi paljon muita CB[6]:n addukteja veden, etikkahapon, natriumin ja kaliumin kanssa. Kerran protonoitunut [CB6+DBOA+H]⁺-ioni saatiin eristettyä, mutta DBOA:n pilkkoutumista isäntämolekyyliin sitoutuneena ei havaittu CID-kokeissa varmasti ja se vaatisi lisätutkimusta. [CB6+DBOA+H]⁺-ionin eristys on esitetty kuvassa 46. Intensiteetti sekä ionin eristämässä että siitä tehdyissä CID-kokeissa oli hyvin matala. [CB6+DBOA+2H]²⁺-ionin eristyksessä nähtiin myös ionit [CB6+DBOA+2H+H₂O]²⁺ ja [CB6+2Na+2H₂O]²⁺ *m/z*-arvoilla 577 ja 539 eli osa CID-kokeissa havaituista pilkeioneista *m/z*-arvoilla 559, 551, 530 ja 521, oli peräisin näistä ioneista (kuva 47, taulukko 10). Kahdesti varatussa protonoituneessa kompleksissa ei havaittu DBOA-vieraan pilkkoutumista eli törmäysenergiaa kasvattamalla kompleksi hajosi.



Kuva 46. [CB6+DBOA+H]⁺-ionin eristys CE-arvolla 20 V. 1:10 2 % etikkahapon vesiliuoksessa.

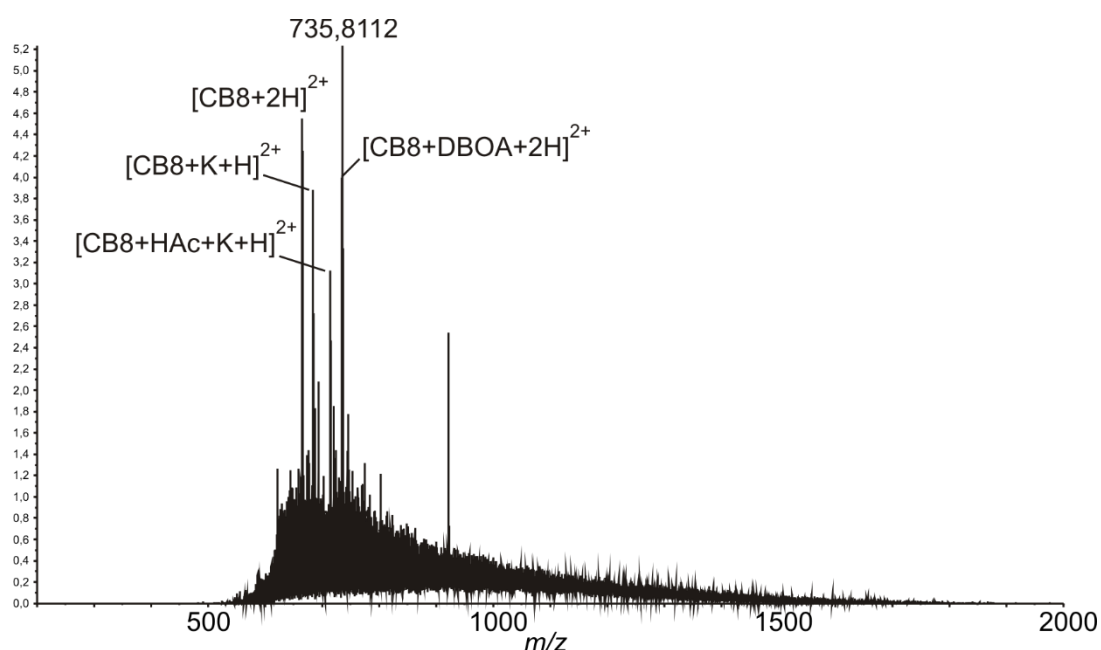


Kuva 47. A) [CB6+DBOA+2H]²⁺-ionin CID-spektri CE-arvolla 5 V. B) [CB6+DBOA+2H]²⁺-ionin CID-spektri CE-arvolla 40 V. CB6:DBOA suhde CID-kokeissa oli 1:50 2 % etikkahapon vesiliuoksessa.

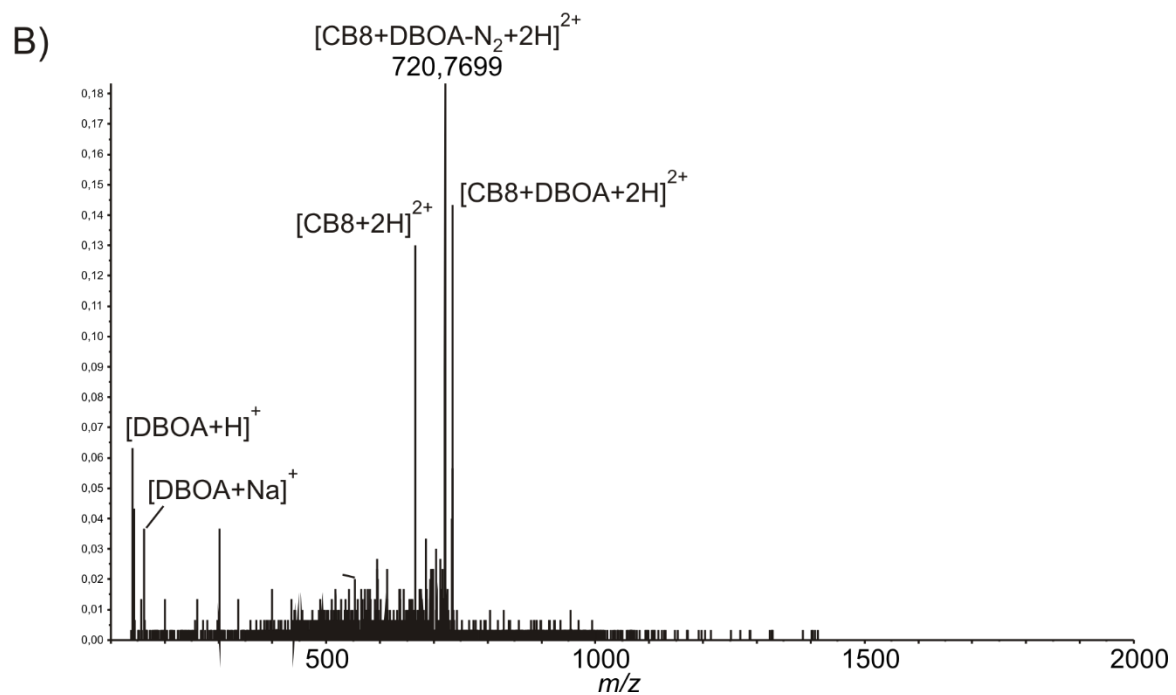
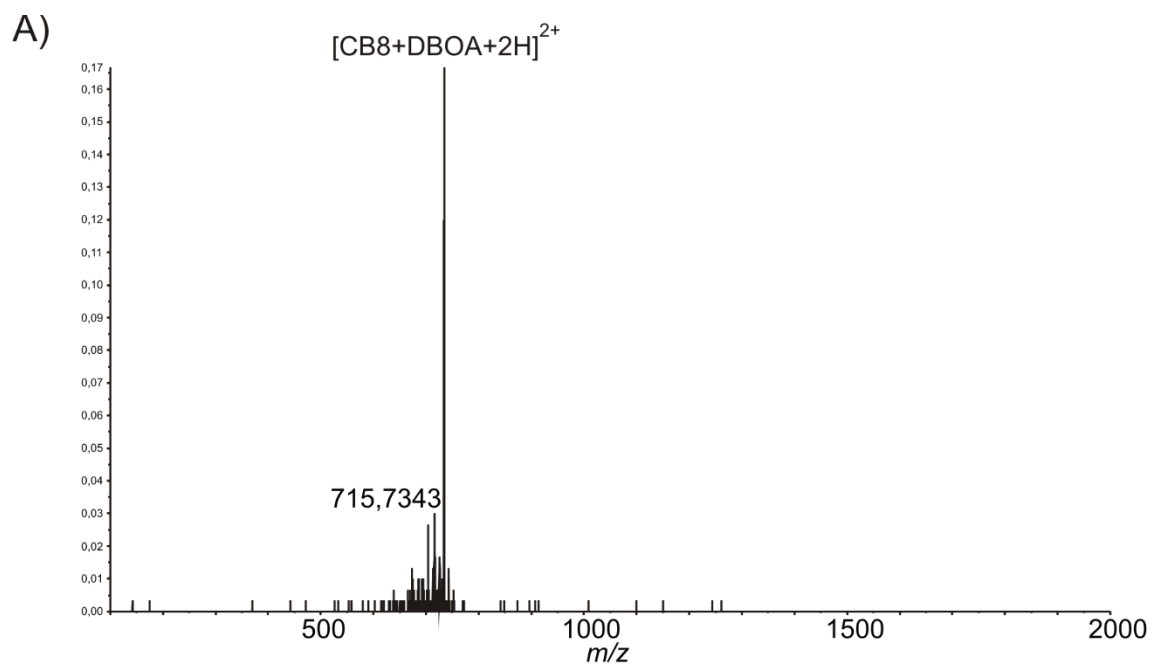
Taulukko 10. [CB6+DBOA+2H]²⁺-ionin CID-kokeissa havaitut ionit

CE (V)	Ioni	<i>m/z</i> (teor)	<i>m/z</i> (exp)	Δ <i>m/z</i>
20	[CB6+DBOA+2H] ²⁺	568,7100	568,0863	0,624
55	[DBOA+H] ⁺	140,1182	140,1092	0,009

Myös CB[8] sitoi huonosti DBOA-vieras­molekyyliä. CB[8] liukenee tutkituista kukurbit[n]uriileista huonoimmin veteen, joten siitä 10 % etikkahappoon 1:20 DBOA:n kanssa valmistettu näyte sentrifugoitiin ennen analyysiä. CB[8]:sta valmistettu kantaliuos tehtiin kylläiseksi ja sen konsentraation arvioitiin olevan 10 µM. Kuvasta 48 nähdään, että mittausten intensiteetti oli huono, mutta eristys kahdesti varatulle protonoidulle kompleksille saatiin tehtyä. CID-kokeiden (kuva 49) ja taulukossa 11 kirjattujen massatarkkuuksien perusteella DBOA:sta irtosi N₂-pilke, mikä näkyi *m/z*-arvolla 720. Kompleksin hajoamisessa havaittiin [DBOA+H]⁺ ja [CB8+2H]²⁺-ionit. Kerran varattuja ioneita ei pystytty eristämään lainkaan.



Kuva 48. CB8+DBOA:n liuksesta mitattu ESI-MS-spektri.



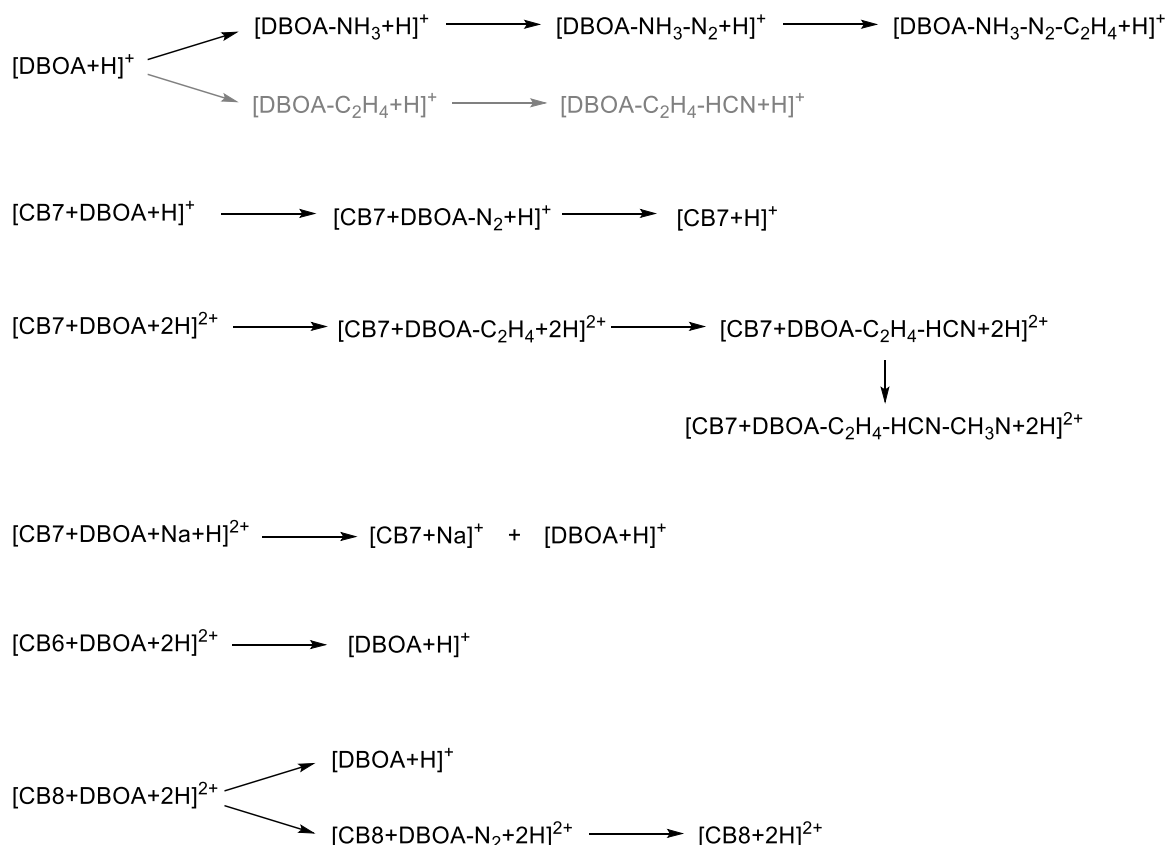
Kuva 49. A) $[CB8+DBOA+H]^{2+}$ -ionin eristys CE-arvolla 6 V. B) $[CB8+DBOA+2H]^{2+}$ -ionin CID CE-arvolla 40 V.

Taulukko 11. [CB8+DBOA+2H]²⁺-ionin CID-kokeissa havaitut ionit ja massatarkkuuksien vertailu

CE (V)	Ioni	<i>m/z</i> (teor)	<i>m/z</i> (exp)	$\Delta m/z$	MW pilke (teor)	MW pilke (exp)	teor- exp
6	[CB8+DBOA+2H] ²⁺	734,7591	734,7768	-0,0177			
40	[CB8+DBOA-N ₂ +2H] ²⁺	720,7560	720,7699	-0,0139	28,006	28,014	0,008
40	[CB8+DBOA-C ₂ H ₄ +2H] ²⁺	720,7434	720,7699	-0,0265	28,031	28,014	0,018
40	[CB8+2H] ²⁺	665,2036	665,2306	-0,0270			
40	[DBOA+H] ⁺	140,1182	140,1234	-0,0052			

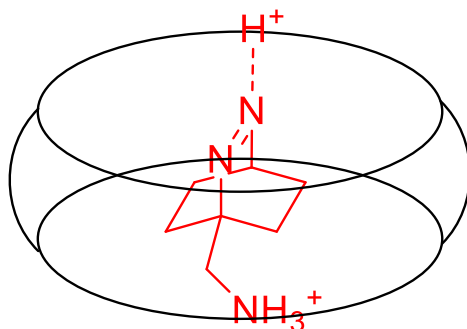
10.4. Yhteenveto

CB[7]:n ja CB[8]:n havaittiin katalysoivan DBOA:n pilkkoutumista. Pelkän DBOA:n mittauksissa pääasiallinen pilkkoutuminen kaasufaasissa alkoi aminoryhmän irtoamisella, mutta näin ei tapahtunut muodostuneissa komplekseissa. Pilkkoutuminen komplekseihin sitoutuneena alkoi N₂- tai C₂H₄-molekyylin irtoamisella, koska DBOA:n aminoryhmään keskittynyt positiivinen varaus piti sen kiinnittyneenä CB[n]-molekyylin karbonyyliryhmiin. CB[n] + DBOA –kompleksien havaitut pilkkoutumiset on esitetty kaaviossa 16.



Kaavio 16. Koonti kaikista eristetyistä ioneista saaduista pilkkoutumistuotteista.

[CB7+DBOA+H]⁺-ionin pilkkoutumisessa havaittiin N₂-molekyylin irtoaminen, minkä jälkeen kompleksi hajosi. [CB7+DBOA+2H]²⁺-ionista irtosi ensin C₂H₄-molekyylit ja edelleen HCN ja CH₃N-molekyylit. [CB7+DBOA+Na+H]²⁺-ionin CID-kokeissa havaittiin vain kompleksin hajoaminen, missä suurikokoisempi Na⁺-ioni jäi CB[7]:lle. Tutkituista kukurbit[n]uriileista niukkaliukoisin CB[8] muodosti DBOA:n kanssa kahdesti varatun protonoituneen kompleksin [CB8+DBOA+2H]²⁺, jonka CID-kokeissa havaittiin N₂-molekyylin irtoaminen. Kahdesti protonoituneet [CB7+DBOA+2H]²⁺ ja [CB8+DBOA+2H]²⁺-ionit tuottivat erilaiset pilkkoutumiskuviot keskenään ja verrattuna pelkän DBOA:n pilkkoutumiseen. CB[7]:n ja DBOA:n tapauksessa muodostui kahdesti varattu protonoitu kompleksi, jossa CB[7]:n kummassakin karbonyyliportaalissa oli protoni eli DBOA oli ikään kuin ankkuroituna paikalleen kuten kuvasta 50 nähdään. DBOA:n vuorovaikutus CB[7]:n ja CB[8]:n kanssa oli erilainen CB[n]:n onkaloiden erilaisen koon takia.⁷⁶ CB[6] vuorovaikutti DBOA:n kanssa vain heikosti, sillä sen ulkokehän halkaisija on DBOA:n kokoon nähden hyvin kapea eikä DBOA mahtunut CB[6]:n onkaloon. Mielenkiintoisimmat ja varauksesta riippuen monimuotoisimmat pilkkoutumiset havaittiin CB[7]:n ja DBOA:n välillä.



Kuva 50. Kaaviokuva kahdesti protonoituneesta DBOA:n ja CB[n]:n kompleksista.

CB[n]:n tutkimusta voidaan jatkaa käyttämällä IM-MS:ää. Lisätietoa vierasmolekyylin asemasta CB[n] nähden yritetään saada myös röntgenkristallografisin menetelmin kasvattamalla kiteitä CB[n] ja DBOA:n happamassa vesiliuoksessa. [CB6+DBOA+H]⁺-ionin CID-kokeet voitaisiin toistaa pitemmillä mittausajoilla luotettavampien tulosten saavuttamiseksi.

11 Kirjallisuusuusluettelo

1. Bogl, L. H.; Kaye, S. M.; Rämö, J. T.; Kangas, A. J.; Soininen, P.; Hakkarainen, A.; Lundbom, J.; Lundbom, N.; Ortega-Alonso, A.; Rissanen, A.; Ala-Korpela, M.; Kaprio, J. ja Pietiläinen, K. H., Abdominal obesity and circulating metabolites: A twin study approach, *Metabolism.*, **2016**, *65*, 111–121.
2. Kainulainen, H.; Hulmi, J. J. ja Kujala, U. M., Potential Role of Branched-Chain Amino Acid Catabolism in Regulating Fat Oxidation, *Exerc. Sport Sci. Rev.*, **2013**, *41*, 194–200.
3. Zhang, A.; Sun, H.; Wang, P.; Han, Y.; Wang, X.; Tabet, J. C.; Parker, C. E.; Rusyn, I.; Zeisel, S.; Borchers, C. H.; Want, E. J.; Xia, J.; Knox, C.; Dong, E.; Huang, P.; Hollander, Z.; Pedersen, T. L.; Smith, S. R.; Bamforth, F.; Greiner, R.; McManus, B.; Newman, J. W.; Goodfriend, T.; Wishart, D. S.; Beecher, C. ja Chinnaiyan, A. M., Modern analytical techniques in metabolomics analysis, *Analyst*, **2012**, *137*, 293–300.
4. Lu, W.; Bennett, B. D. ja Rabinowitz, J. D., Analytical strategies for LC–MS-based targeted metabolomics, *J. Chromatogr. B*, **2008**, *871*, 236–242.
5. Emwas, A.-H.; Luchinat, C.; Turano, P.; Tenori, L.; Roy, R.; Salek, R. M.; Ryan, D.; Merzaban, J. S.; Kaddurah-Daouk, R.; Zeri, A. C.; Nagana Gowda, G. A.; Raftery, D.; Wang, Y.; Brennan, L. ja Wishart, D. S., Standardizing the experimental conditions for using urine in NMR-based metabolomic studies with a particular focus on diagnostic studies: a review, *Metabolomics*, **2015**, *11*, 872–894.
6. Lu, W.; Su, X.; Klein, M. S.; Lewis, I. A.; Fiehn, O. ja Rabinowitz, J. D., Metabolite Measurement: Pitfalls to Avoid and Practices to Follow, *Annu. Rev. Biochem.*, **2017**, *86*, 277–304.
7. Dettmer, K.; Aronov, P. A. ja Hammock, B. D., Mass spectrometry-based metabolomics., *Mass Spectrom. Rev.*, **2007**, *26*, 51–78.
8. McCloskey, D.; Gangoiti, J. A.; Palsson, B. O. ja Feist, A. M., A pH and solvent optimized reverse-phase ion-pairing-LC–MS/MS method that leverages multiple scan-types for targeted absolute quantification of intracellular metabolites, *Metabolomics*, **2015**, *11*, 1338–1350.
9. Anderson, J. D.; Johansson, H. J.; Graham, C. S.; Vesterlund, M.; Pham, M. T.; Bramlett, C. S.; Montgomery, E. N.; Mellema, M. S.; Bardini, R. L.; Contreras, Z.; Hoon, M.; Bauer, G.; Fink, K. D.; Fury, B.; Hendrix, K. J.; Chedin, F.; EL-Andaloussi, S.; Hwang, B.; Mulligan, M. S.; Lehtiö, J. ja Nolte, J. A., Comprehensive Proteomic Analysis of Mesenchymal Stem Cell Exosomes Reveals Modulation of Angiogenesis via Nuclear Factor-KappaB Signaling, *Stem Cells*, **2016**, *34*, 601–613.
10. Nakanishi, T.; Hishiki, T.; Morikawa, T.; Kajimura, M. ja Suematsu, M., 2. Primary Metabolites LC/MS/MS Method Package, *Shimadzu Rev.*
11. Buchholz, A.; Hurlbaas, J.; Wandrey, C. ja Takors, R., Metabolomics: quantification of intracellular metabolite dynamics, *Biomol. Eng.*, **2002**, *19*, 5–15.
12. Kanani, H.; Chrysanthopoulos, P. K. ja Klapa, M. I., Standardizing GC–MS

- metabolomics, *J. Chromatogr. B*, **2008**, 871, 191–201.
13. Nelson, D. L. ja Cox, M. M., *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, 5th edition., 2008.
 14. Reece; Urry; Cain; Wasserman; Minorsky ja Jackson, *Campbell Biology*, Pearson, 9th edition., 2011. ss. 209-227.
 15. Ravintotekijät - Fineli, <https://fineli.fi/fineli/fi/ravintotekijat/2331>, (3.10.2017).
 16. Donato, J.; Pedrosa, R. G.; Cruzat, V. F.; Pires, I. S. de O. ja Tirapegui, J., Effects of leucine supplementation on the body composition and protein status of rats submitted to food restriction, *Nutrition*, **2006**, 22, 520–527.
 17. Balage, M. ja Dardevet, D., Long-term effects of leucine supplementation on body composition, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **2010**, 13, 265–270.
 18. Kimball, S. R. ja Jefferson, L. S., Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis., *J. Nutr.*, **2006**, 136, 227S–31S.
 19. Pietiläinen, K. H.; Naukkarinen, J.; Rissanen, A.; Saharinen, J.; Ellonen, P.; Keränen, H.; Suomalainen, A.; Götz, A.; Suortti, T.; Yki-Järvinen, H.; Orešič, M.; Kaprio, J. ja Peltonen, L., Global Transcript Profiles of Fat in Monozygotic Twins Discordant for BMI: Pathways behind Acquired Obesity, *PLoS Med.*, **2008**, 5, 472–483.
 20. Leskinen, T.; Rinnankoski-Tuikka, R.; Rintala, M.; Seppä Nen-Laakso, T.; Pöllänen, E.; Alen, M.; Sipilä, S.; Kaprio, J.; Kovanen, V.; Rahkila, P.; Orešič, M.; Kainulainen, H. ja Kujala, U. M., Differences in Muscle and Adipose Tissue Gene Expression and Cardio-Metabolic Risk Factors in the Members of Physical Activity Discordant Twin Pairs, *PLoS One*, **2010**, 5, 1-9.
 21. Leenders, M.; Verdijk, L. B.; Van Der Hoeven, L.; Kranenburg, J. Van; Hartgens, F.; Wodzig, W. K. W. H.; Saris, W. H. M. ja Van Loon, L. J. C., Prolonged Leucine Supplementation Does Not Augment Muscle Mass or Affect Glycemic Control in Elderly Type 2 Diabetic Men 1–3, *J. Nutr.*, **2011**, 141, 1070–1076.
 22. Kimball, S. R. ja Jefferson, L. S., Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis., *J. Nutr.*, **2006**, 136, 227–231.
 23. Cadoudal, T.; Leroyer, S.; Reis, A. F.; Tordjman, J.; Durant, S.; Fouque, F.; Collinet, M.; Quette, J.; Chauvet, G.; Beale, E.; Velho, G.; Antoine, B.; Benelli, C. ja Forest, C., Proposed involvement of adipocyte glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase in the metabolic syndrome, *Biochimie*, **2004**, 87, 27–32.
 24. Novak, C. M.; Escande, C.; Gerber, S. M.; Chini, E. N.; Zhang, M.; Britton, S. L.; Koch, L. G. ja Levine, J. A., Endurance Capacity, Not Body Size, Determines Physical Activity Levels: Role of Skeletal Muscle PEPCK, *PLoS One*, **2009**, 4, 1-7.
 25. Dias, D. A.; Koal, T. ja Anthony Dias, D., Progress in metabolomics standardisation and its significance in future clinical laboratory medicine, *J. Int. Fed. Clin. Chem. Lab.*

- Med.*, **2016**, *27*, 331–343.
26. Naz, S.; Vallejo, M.; García, A. ja Barbas, C., Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics, *J. Chromatogr. A*, **2014**, *1353*, 99–105.
 27. Cajka, T. ja Fiehn, O., Toward Merging Untargeted and Targeted Methods in Mass Spectrometry-Based Metabolomics and Lipidomics, *Anal. Chem.*, **2015**, *88*, 524–545.
 28. Raterink, R.-J.; Lindenburg, P. W.; Vreeken, R. J.; Ramautar, R. ja Hankemeier, T., Recent developments in sample-pretreatment techniques for mass spectrometry-based metabolomics, *Trends Anal. Chem.*, **2014**, *61*, 157–167.
 29. Patti, G. J.; Yanes, O. ja Siuzdak, G., Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2012**, *13*, 263–269.
 30. Scalbert, A.; Brennan, L.; Fiehn, O.; Hankemeier, T.; Kristal, B. S.; van Ommen, B.; Pujos-Guillot, E.; Verheij, E.; Wishart, D. ja Wopereis, S., Mass-spectrometry-based metabolomics: limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research, *Metabolomics*, **2009**, *5*, 435–458.
 31. Buchholz, A.; Hurlebaus, J.; Wandrey, C. ja Takors, R., Metabolomics: quantification of intracellular metabolite dynamics, *Biomol. Eng.*, **2002**, *19*, 5–15.
 32. Siegel, D.; Permentier, H.; Reijngoud, D.-J. ja Bischoff, R., Chemical and technical challenges in the analysis of central carbon metabolites by liquid-chromatography mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, **2014**, *966*, 21–33.
 33. Kivelä, R.; Silvennoinen, M.; Lehti, M.; Rinnankoski-Tuikka, R.; Purhonen, T.; Ketola, T.; Pullinen, K.; Vuento, M.; Mutanen, N.; Sartor, M. A.; Reunanen, H.; Koch, L. G.; Britton, S. L. ja Kainulainen, H., Gene expression centroids that link with low intrinsic aerobic exercise capacity and complex disease risk, *Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **2010**, *24*, 4565–4574.
 34. Beltran, A.; Samino, S. ja Yanes, O., *Mass Spectrometry in Metabolomics, Methods and Protocols*, 2014.
 35. de Hoffmann, E. ja Stroobant, V., *Mass Spectrometry Principles and Applications*, Wiley, 3rd edition., 2007. a) ss.1-80 b) 85-100 c) 122-141 d) 169 e) 189-199 f) 217-221 g) 347 h) 387.
 36. Gross, J. H., *Mass Spectrometry : a Textbook*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004. a) ss. 1-14 b) 96-98 c) 121-124 d) 223-245 e) 415-445 f) 561-580 g) 578-580 h) 601-603 i) 621-622 j) 652-668.
 37. Ho, C.; Lam, C.; Chan, M.; Cheung, R.; Law, L.; Lit, L.; Ng, K.; Suen, M. ja Tai, H., Electrospray ionisation mass spectrometry: Principles and clinical applications, *Clin. Biochem. Rev.*, **2003**, *24*, 3–12.
 38. Lin, L.; Yu, Q.; Yan, X.; Hang, W.; Zheng, J.; Xing, J. ja Huang, B., Direct infusion mass spectrometry or liquid chromatography mass spectrometry for human metabolomics? A serum metabolomic study of kidney cancer, *Analyst*, **2010**, *135*, 2970.

39. Gupta, P. K.; Brown, J.; Biju, P. G.; Thaden, J.; Deutz, N. E.; Kumar, S.; Hauer-Jensen, M. ja Hendrickson, H. P., Development of high-throughput HILIC-MS/MS methodology for plasma citrulline determination in multiple species, *Anal. Methods*, **2011**, *3*, 1759.
40. Cech, N. B. ja Enke, C. G., Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals, *Mass Spectrom. Rev.*, **2001**, *20*, 362–387.
41. McNair, H. M. ja Miller, J. M., *Basic gas chromatography*, John Wiley & Sons, 2009. a) ss. 1-12 b) 24-36 c) 156-169.
42. Wolff, C.; Mussell, C.; Neville, D.; Lord, G.; Saeed, M.; Lad, R.; Godfrey, R.; Hird, S. ja Barwick, V., *Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements RSC Analytical Methods Committee*, 1st edition., 2013.
43. Dunn, W. B.; Erban, A.; Weber, R. J. M.; Creek, D. J.; Brown, M.; Breitling, R.; Hankemeier, T.; Royston, G.; Neumann, S.; Kopka, J.; Viant, M. R.; Dunn, W. B.; Brown, Á. M.; Erban, A.; Kopka, Á. J.; Weber, R. J. M.; Viant, Á. M. R.; Creek, D. J.; Breitling, R.; Hankemeier, T. ja Goodacre, R., Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics, *Metabolomics*, **2013**, *9*, 44–66.
44. Bajad, S. U.; Lu, W.; Kimball, E. H.; Yuan, J.; Peterson, C. ja Rabinowitz, J. D., Separation and quantitation of water soluble cellular metabolites by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **2006**, *1125*, 76–88.
45. Lu, W.; Clasquin, M. F.; Melamud, E.; Amador-Noguez, D.; Caudy, A. A. ja Rabinowitz, J. D., Metabolomic Analysis via Reversed-Phase Ion-Pairing Liquid Chromatography Coupled to a Stand Alone Orbitrap Mass Spectrometer, *Anal. Chem.*, **2010**, *82*, 3212–3221.
46. Boizard, F.; Brunchault, V.; Moulos, P.; Breuil, B.; Klein, J.; Lounis, N.; Caubet, C.; Tellier, S.; Bascands, J.-L.; Decramer, S.; Schanstra, J. P. ja Buffin-Meyer, B., A capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry pipeline for long term comparable assessment of the urinary metabolome, *Sci. Rep.*, **2016**, *6*, 34453.
47. Hu, Q.; Noll, R. J.; Li, H.; Makarov, A.; Hardman, M. ja Graham Cooks, R., The Orbitrap: a new mass spectrometer, *J. Mass Spectrom.*, **2005**, *40*, 430–443.
48. Marshall, A. G.; Hendrickson, C. L. ja Jackson, G. S., Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer, *Mass Spectrom. Rev.*, **1998**, *17*, 1–35.
49. Pitt, J. J., Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry., *Clin. Biochem. Rev.*, **2009**, *30*, 19–34.
50. Urban, P. L., Quantitative mass spectrometry: an overview, *Philosophical Trans. R. Soc. a Math. Phys. Eng. Sci.*, **2016**, *374*, 1–4.
51. Cao, M.; Fraser, K.; Huege, J.; Featonby, T.; Rasmussen, S. ja Jones, C., Predicting retention time in hydrophilic interaction liquid chromatography mass spectrometry and its use for peak annotation in metabolomics., *Metabolomics*, **2015**, *11*, 696–706.

52. Harris, C. D., *Quantitative Chemical Analysis*, W. H. Freeman and Company, 7th edition., 2007. a) ss. 506-511 b) 541.
53. Fanali, S.; Haddad, P.; Poole, C.; Lloyd, D. ja Schoenmakers, P., *Liquid Chromatography Fundamentals and instrumentation*, Elsevier Science, 2013. a) ss. 6-48 b) 105-115 c) 286-296.
54. Ramos, F., *Liquid chromatography : principles, technology and applications*, Nova Science Publishers, Inc, 2013. ss. 2-24.
55. Luo, B.; Groenke, K.; Takors, R.; Wandrey, C. ja Oldiges, M., Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **2007**, *1147*, 153–164.
56. Deemter, J. J.; Zuiderweg, F. J. ja Klinkenberg, A., Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography, *Chem. Eng. Sci.*, **1956**, *5*, 271–289.
57. Dong, M. W., *Modern HPLC for practicing scientists*, Wiley-Interscience, 2006.
58. Buescher, J. M.; Moco, S.; Sauer, U. ja Zamboni, N., Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Fast and Robust Quantification of Anionic and Aromatic Metabolites, *Anal. Chem.*, **2010**, *82*, 4403–4412.
59. Sabatine, M. S.; Liu, E.; Morrow, D. A.; Heller, E.; McCarroll, R.; Wiegand, R.; Berriz, G. F.; Roth, F. P. ja Gerszten, R. E., Metabolomic Identification of Novel Biomarkers of Myocardial Ischemia, *Circulation*, **2005**, *112*, 3868–3875.
60. Jankevics, A.; Merlo, M. E.; de Vries, M.; Vonk, R. J.; Takano, E. ja Breitling, R., Separating the wheat from the chaff: a prioritisation pipeline for the analysis of metabolomics datasets, *Metabolomics*, **2012**, *8*, 29–36.
61. Villanueva, J.; Carrascal, M. ja Abian, J., Isotope dilution mass spectrometry for absolute quantification in proteomics: Concepts and strategies, *J. Proteomics*, **2014**, *96*, 184–199.
62. Técnica, N.; Cruz De Oliveira, E.; Muller, E. I.; Abad, F.; Dallarosa, J.; Adriano, C.; Cruz, S.; Frederico, A. ja Ritter, A., INTERNAL STANDARD VERSUS EXTERNAL STANDARD CALIBRATION: AN UNCERTAINTY CASE STUDY OF A LIQUID CHROMATOGRAPHY ANALYSIS, *Quim. Nov.*, **2010**, *33*, 984–987.
63. Liland, K. H., Multivariate methods in metabolomics – from pre-processing to dimension reduction and statistical analysis, *TrAC Trends Anal. Chem.*, **2011**, *30*, 827–841.
64. Plumb, R. S.; Stumpf, C. L.; Granger, J. H.; Castro-Perez, J.; Haselden, J. N. ja Dear, G. J., Use of liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and multivariate statistical analysis shows promise for the detection of drug metabolites in biological fluids, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2003**, *17*, 2632–2638.

65. Koek, M. M.; Renger, J. H.; Van Der Greef, J.; Tas, A. C. ja Hankemeier, T., Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives, *Metabolomics*, **2011**, *7*, 307–328.
66. Karasek, F. W. ja Clement, R. E., *Basic gas chromatography-mass spectrometry : principles and techniques*, Elsevier, 3rd edition., 2003. ss. 5-18.
67. Halket, J. M.; Waterman, D.; Przyborowska, A. M.; Patel, R. K. P.; Fraser, P. D. ja Bramley, P. M., Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS, *J. Exp. Bot.*, **2005**, *56*, 219–243.
68. Warth, B.; Parich, A.; Bueschl, C.; Schoefbeck, D.; Neumann, N. K. N.; Kluger, B.; Schuster, K.; Krska, R.; Adam, G.; Lemmens, M. ja Schuhmacher, R., GC–MS based targeted metabolic profiling identifies changes in the wheat metabolome following deoxynivalenol treatment, *Metabolomics*, **2015**, *11*, 722–738.
69. Lee, T.-C.; Kalenius, E.; Lazar, A. I.; Assaf, K. I.; Kuhnert, N.; Grün, C. H.; Jänis, J.; Scherman, O. A. ja Nau, W. M., Chemistry inside molecular containers in the gas phase, *Nat. Chem.*, **2013**, *5*, 376–382.
70. Kawamura, H., Ohtsu, N. ja Utiumi, S., Container for stabilized aqueous phosphoenolpyruvic acid, *US Pat.*, 4,889,943, 1989.
71. Kamenický, M., University of South Bohemia in České Budejovice.
72. Liu, G.; Chen, J.; Che, P. ja Ma, Y., Separation and Quantitation of Short-Chain Coenzyme A's in Biological Samples by Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.*, **2003**, *75*, 78-82.
73. Jansen, K.; Buschmann, H.-J.; Wego, A.; Döpp, D.; Mayer, C.; Drexler, H.-J.; Holdt, H.-J. ja Schollmeyer, E., Cucurbit[5]uril, Decamethylcucurbit[5]uril and Cucurbit[6]uril. Synthesis, Solubility and Amine Complex Formation, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **2001**, *39*, 357–363.
74. Malaspina, T.; Fileti, E. ja Chaban, V. V., Peculiar Aqueous Solubility Trend in Cucurbiturils Unraveled by Atomistic Simulations, *J. Phys. Chem. B*, **2016**, *120*, 7511–7516.
75. Barrow, S. J.; Kasera, S.; Rowland, M. J.; del Barrio, J. ja Scherman, O. A., Cucurbituril-Based Molecular Recognition, *Chem. Rev.*, **2015**, *115*, 12320–12406.
76. Mock, W. L. ja Shih, N. Y., Structure and selectivity in host-guest complexes of cucurbituril, *J. Org. Chem.*, **1986**, *51*, 4440–4446.