

**HPLC-MS/MS-menetelmän kehittäminen testosteronin ja
kortikosteronin kvantitatiiviseksi määrittämiseksi linnun
veriplasmasta**

Syventävän sivuaineen
tutkielma
Harri Asikainen
Jyväskylän yliopisto
Kemian laitos
9.3.2023

Tiivistelmä

Tämän työn tarkoituksena oli kehittää ja validoida menetelmä Jyväskylän yliopiston Kemian laitoksella jo valmiiksi olevalle HPLC-ESI-QqQ-laitteistolle siten, että menetelmällä saataisiin kvantitatiivisesti määritettyä kortikosteroni- ja testosteronipitoisuudet hyvin vähäisestä määrästä linnun veri-plasmaa ilman näytteiden derivatisointia. Laitteparametrien optimointi suoritettiin kokeilemalla eri parametrien vaikutusta testosteronin ja kortikosteronin erottuvuuteen ja vasteeseen ja valitsemalla parametreista sellaiset, joilla kyseisten yhdisteiden erottuvuus oli selkein ja vaste suurin. Työssä optimoidulla menetelmällä saadaan määritettyä kvantitatiivisesti kortikosteroni ja testosteroni 10 mikrolitrasta linnun veri-plasmaa ilman näytteiden derivatisointia suuruusluokassa ng/ml. Työssä saadut määrittäysrajat (LOQ) olivat kortikosteronille 2,72 ng/ml ja testosteronille 3,17 ng/ml. Saadut määrittäysrajat ovat selvästi liian suuret, sillä jos määrittäysrajoina käytettäisiin pienimmän pitoisuuden standardiliuoksia, niin kortikosteronille määrittäysrajaksi tulisi 1,18 ng/ml (S/N = 12,5) ja testosteronille 0,98 ng/ml (S/N = 39,1). Korkean signaali-kohinasuhteen takia testosteronille saataisiin vielä tätäkin huomattavasti alhaisempi määrittäysraja. Hajonnat kaikissa työssä tehdyissä mittauksissa olivat alle 15 % (CV%) ja QC-näytteiden tarkkuudet testosteronille olivat 94–101 %, mutta kortikosteronille 82–83 %. Kortikosteronin alhaisiin tarkkuuksiin saattoi vaikuttaa käytetty sisäinen standardi (¹³C₃-testosteroni), joka korjasi kortikosteronin kalibroitaisuoran kulmakertoimen liian jyrkäksi. Kalibroitaisuorien selitysasteet olivat kortikosteronille 0,9939 ja testosteronille 0,9954.

Esipuhe

Tämä syventävän sivuaineen tutkielma tehtiin Jyväskylän yliopiston Kemian laitoksella syksyn 2021 ja kevään 2023 välisenä aikana. Tutkielman ohjaajana toimi yliopistonlehtori Elina Kalenius. Tutkielma tehtiin yhteistyössä Jyväskylän yliopiston Bio- ja ympäristötieteiden laitoksen kanssa. Näytteiden käsittely suoritettiin Bio- ja ympäristötieteiden laitoksella ja instrumenttianalytiikka Kemian laitoksella.

Tutkielman aihe rajattiin käsittelemään pelkästään kortikosteronin ja testosteronin analytiikkaa. Tutkielmaan liittyvä lähdeaineisto hankittiin käyttämällä Jyväskylän yliopiston kirjaston kokoelmia, Googlen Scholar -hakupalvelua sekä kustantamoiden, kuten Elsevier ja Springer Science Business Media, omia hakupalveluita. Hakusanoina olivat muun muassa LC-MS/MS, plasma, serum, bird, corticosterone, testosterone ja low volume.

Haluan erityisesti kiittää tutkielmani ohjaajaa Elina Kaleniusta ja Bio- ja ympäristötieteiden laitoksen Suvi Ruuskasta, jotka ottivat minut mukaan tähän mielenkiintoiseen ja erittäin opettavaiseen projektiin. Lisäksi haluan kiittää Hannu Pakkasta hyvistä ajatuksista ja avusta laitekennisten ongelmien kanssa.

Jyväskylässä 1.2.2023

Harri Asikainen

Sisällysluettelo

Tiivistelmä.....	iii
Esipuhe	iv
Sisällysluettelo	v
Käytetyt lyhenteet.....	vi
1 JOHDANTO.....	1
2 TEORIA.....	2
3 TYÖN SUORITUS JA TULOKSET.....	8
3.1 Materiaalit.....	8
3.2 Menetelmät	8
3.3 Näytteen käsittely	9
3.4 Menetelmän optimointi.....	10
3.4.1 Injektiotilavuus.....	11
3.4.2 Injektion kohta, injektion immunopeus ja injektioiden määrä	11
3.4.3 Eluentit	13
3.4.4 Virtausnopeus ja gradienttiohjelma.....	15
3.4.5 Kolonnin lämpötila.....	18
3.4.6 Törmäysenergia.....	18
3.5 Menetelmän validointi.....	20
3.5.1 Selektiivisyys	20
3.5.2 Lineaarisuus, havaitsemisraja ja määritysraja	21
3.5.3 Tarkkuus ja toistettavuus.....	23
3.5.4 Carryover.....	24
4 YHTEENVETO	24
Kirjallisuusluettelo	27
Liitteet	30

Käytetyt lyhenteet

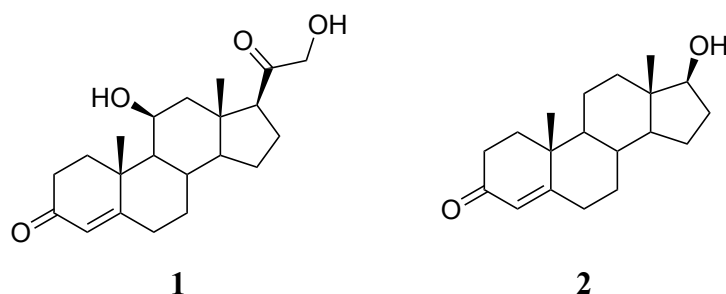
Lyhenne	Merkitys	Suomennos
APCI	atmospheric pressure chemical ionization	kemiallinen ionisaatio normaalissa ilmanpaineessa
APPI	atmospheric pressure photoionization	fotoionisaatio normaalissa ilmanpaineessa
CID	collision-induced dissociation	törmäysaktivointi
CV	coefficient of variation	variaatiokerroin
DAD	diode array detector	diodirividetektori
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys
ESI	electrospray ionization	sähkösumutusionisaatio
FA	formic acid	muurahaishappo
FLD	fluorescence detector	fluoresenssidetektori
GC	gas chromatography	kaasukromatografia
HPLC	high performance liquid chromatography	korkean erotuskyvyn nestekromatografia
ISTD	internal standard	sisäinen standardi
LC	liquid chromatography	nestekromatografia
LLE	liquid-liquid extraction	neeste-nesteutto
LLOQ	lower limit of quantification	alempi määritysraja
LOD	limit of detection	havaitsemisraja
LOQ	limit of quantification	määritysraja
MeOH	methanol	metanoli
MRM	multiple reaction monitoring	useiden reaktioiden seuranta
MS	mass spectrometry, mass spectrometer	massaspektrometria, massaspektrometri
MS/MS, MS ⁿ	tandem mass spectrometry	tandemmassaspektrometria
MTBE	methyl tert-butyl ether	metyyli-tert-butyylieetteri

QC	quality control	laadunvalvonta
QIT	quadrupole ion trap	kvadrupoli-ioniansa
QqQ	triple quadrupole	kolmoiskvadrupoli
RIA	radioimmunoassay	radioimmunomääritys
S/N	signal-to-noise ratio	signaali-kohinasuhde
SPE	solid phase extraction	kiinteäfaasiuutto

1 JOHDANTO

Steroidihormonit käsittävät suuren määrän pieniä, biologisesti aktiivisia molekyyliä, joilla on keskeinen rooli muun muassa eliöiden aineenvaihdunnassa, lisääntymiskäyttäytymisen säätelyssä, verenpaineen säätelyssä, tulehdusreaktioissa ja stressireaktioissa.¹⁻³ Kortikosteroni (Kuva 1) on linnuilla lisämunuaisista erittyvä glukokortikoidi, jolla on keskeinen rooli lintujen stressireaktioissa.^{2,3} Stressireaktiot auttavat lintuja sopeutumaan mahdollisesti haitallisiin ympäristöoloihin.⁴ Tällaisia haitallisia ympäristöoloja ovat esimerkiksi saalistus, ravinnon vähyys tai äärimmäiset sääolosuhteet.² Kortikosteronin positiivisia vaikutuksia lintujen selviytymiseen ovat muun muassa energiavarastojen vapautuminen ja pelontunne, jotka auttavat lintuja poistumaan haitallisista olosuhteista tai välttämään niitä.^{4,5} Kroonisesti koholla olevilla kortikosteronitasoilla on kuitenkin myös negatiivisia vaikutuksia. Sellaisia ovat muun muassa sydänongelmat, haavaumat, vastustuskyvyn aleneminen ja hermovauriot, jotka kaikki huonontavat yksilön selviytymismahdollisuuksia.⁵

Testosteroni (Kuva 1) puolestaan on sukupuolirauhasista erittyvä androgeeninen sukupuolihormoni, jolla on keskeinen rooli lintujen lisääntymiskäyttäytymisessä.⁶ Testosteroni vaikuttaa linnuilla muun muassa hermoston kasvuun ja toimintaan, lihasten ja luiden kehitykseen, vastustuskykyyn, sulkien kasvuun ja koirilla siittiöiden muodostumiseen.⁵ Kortikosteronin tapaan veren korkealla testosteronipitoisuudella on myös haitallisia vaikutuksia. Niitä ovat muun muassa elimistön rasvavarastojen pieneneminen, häiriöt parinmuodostuksessa sekä jälkeläisistä huolehtimisesta ja lisääntyneestä aktiivisuudesta ja aggressiivisuudesta johtuva vammautumisen ja kuoleman riski.⁵



Kuva 1. Kortikosteronin (1) ja testosteronin (2) rakennekaavat.

Perinteisesti steroidihormoneja on määritetty biologisista näytteistä erilaisilla immunomääritysmenetelmillä, kuten radioimmunomäärityksellä (RIA) ja entsyymivälitteisellä immunosor-

benttimäärityksellä (ELISA).^{3,7,8} Ne perustuvat vasta-aineisiin.⁹ Vasta-aineeseen on liitetty jokin määritettävissä oleva molekyyli. Molekyylit voivat olla radioaktiivisia, kuten RIAssa, tai esimerkiksi fluoresoivia. Vasta-aineen sitoutuessa hormoniin, molekyylin vasteen suuruuden perusteella saadaan määritettyä hormonin pitoisuus näytteessä. Nykyisin immunomäärityksiin on saatavissa erilaisia kaupallisia paketteja, jotka tekevät niiden tekemisestä suoraviivaista.⁸

Vaikka immunomääritykset ovat yleisesti käytettyjä, niihin liittyy paljon erilaisia ongelmia. Kukin määritettävä hormoni vaatii oman vasta-aineen ja jos sellaista ei ole saatavilla, niin immunomäärityksiä ei voida käyttää.⁷ Lisäksi ne ovat hitaita, niillä saadaan määritettyä vain yksi hormoni kerrallaan, niiden dynaaminen mittausalue on rajallinen, niissä esiintyy matriisihäiriöitä ja niille ei ole saatavissa sisäisiä standardeja, joilla esimerkiksi matriisihäiriöitä voitaisiin korjata.^{3,7,8,10} Immunomääritysten ehkä merkittävin ongelma on kuitenkin vasta-aineiden ristireaktiivisuus, jossa vasta-aine sitoutuu analyyttiä rakenteeltaan lähellä olevaan molekyyliin, mikä aiheuttaa epätarkkuutta saatuihin tuloksiin.^{1,3,7,10} Steroidihormonit ovat yksi tällainen yhdisteryhmä, jossa ristireaktiivisuutta tapahtuu helposti, sillä steroidit ovat rakenteeltaan hyvin samankaltaisia.^{8,11}

Immunomääritysten huonoista puolista, erityisesti ristireaktiivisuudesta johtuvasta tulosten epävarmuudesta, johtuen hormonianalytiikassa on siirrytty enenevässä määrin käyttämään kromatografiamassaspektrometrisiä menetelmiä, sillä ne ovat tarkkoja, selektiivisiä eri hormoneille, niiden dynaaminen mittausalue on laaja ja lisäksi niillä pystytään määrittämään useamman hormonin pitoisuus samasta näytteestä samalla kertaa.^{5,7,8,10,11} Tämän työn tarkoituksena oli kehittää ja validoida menetelmä Jyväskylän yliopiston Kemian laitoksella jo valmiiksi olevalle HPLC-ESI-QqQ-laitteistolle siten, että menetelmällä saataisiin kvantitatiivisesti määritettyä kortikosteroni- ja testosteronipitoisuudet hyvin vähäisestä määrästä linnun veriplasmaa ilman näytteiden derivatisointia.

2 TEORIA

Biologisissa näytteissä on usein monia steroidihormonien määrittämistä haittaavia yhdisteitä, kuten proteiineja, lipidejä ja suoloja.^{8,10,12} Näytteet voivat myös olla erittäin laimeita tai näytematriisi voi olla kromatografiaan soveltumaton, kuten esimerkiksi seerumi.¹³ Sen takia näytteet usein puhdistetaan, niitä konsentroidaan tarvittaessa ja ne siirretään sopivaan matriisiin ennen

analyysiä.^{9,13} Tavallisia hormoninäytteiden puhdistus- ja konsentrointimenetelmiä ovat kiinteäfaasiutto (SPE)^{12,14} ja neste-nesteutto (LLE),¹⁴ joka tunnetaan myös nimillä liuotinuutto ja osiointi¹⁵.

Kiinteäfaasiuutossa pysyvänä faasina on jokin kiinteä sorbentti, kuten silikapohjainen C18- tai polymeerisorbentti, joka on pakattu ruiskunmuotoiseen kolonniin.⁹ Sorbentit voivat olla hydrofobisia, hydrofiilisiä, ioninvaihtoon perustuvia tai sekamuotoisia.¹⁶ Näyte lisätään kolonniin, jolloin analyytit pidättyvät kiinteään faasiin ja epäpuhtaudet tulevat ulos kolonnin toisesta päästä.¹⁷ Kolonnin huuhdellaan pesuliuksilla ja lopuksi analyytit eluoidaan sopivalla eluentilla irti kiinteästä faasista. Eluointiin voidaan käyttää erivahvuisia eluentejä, jolloin eri analyytit saadaan tarvittaessa eroteltua omiksi jakeikseen.⁹ Kiinteäfaasiuuttoa voidaan käyttää monenlaisille matriiseille. Sillä voidaan erottaa analyytit esimerkiksi virtsa-, veri-, vesi-, maa- tai kudoksetä.¹⁵ Menetelmänä kiinteäfaasiutto on tehokas, sen saanto on hyvä, se voidaan automatisoida ja siinä tarvittavien liuottimien ja sitä kautta myös muodostuvan liuotinjätteen määrä on vähäinen.^{8-10,12} SPE:n huonoina puolina ovat tarvittavan välineistön hinta ja, että perinteisesti suoritettussa kiinteäfaasiuutossa tarvittavan näytteen määrässä puhutaan millilitroista. Nykyään on saatavissa mikro-SPE-pipetinkärkiä, joilla pystytään käsittelemään hyvinkin pieniä näytetilavuuksia. Niidenkin huonona puolena on kuitenkin korkea hinta (noin 2 euroa kappaleelta¹⁸).

Neste-nesteuutossa käytetään yleensä kahta toisiinsa liukenematonta nestettä, joihin yhdisteet jakaantuvat kemiallisten ominaisuuksiensa perusteella.^{9,19} Jos halutaan erottaa jokin tietty yhdiste tai tietyt yhdisteet monimutkaisesta matriisista, puhutaan usein liuotinuutosta.¹⁵ Hormonianalytiikassa pyritään löytämään sellainen uuttoliuotin, että analyytit siirtyvät siihen poispestävien yhdisteiden jäädessä alkuperäiseen matriisiin. Steroidihormonit ovat hydrofobisia yhdisteitä,¹² joten niitä uutettaessa käytetään orgaanisia liuottimia, kuten heksaania,³ tolueenia^{11,20} tai MTBE:tä^{7,20-22}. Ne ovat kaikki vettä kevyempiä,⁹ joten ne jäävät vesifaasin päälle ja ovat siten faasierottelussa helposti pipetoitavissa talteen ilman kontaminaatiota. Suuressa mittakaavassa liuotinuuton huonona puolena on suuri liuottimien ja sitä kautta myös liuotinjätteen määrä. Hyvinä puolina ovat sen helppous, edullinen hinta ja, että uutto voidaan tehdä myös pienestä näytemäärästä.¹⁹ Tämän työn tavoitetta ajatellen, pieni näytemäärä on oleellinen asia, joten näistä kahdesta uuttomenetelmästä liuotinuutto on tässä tapauksessa käyttökelpoisempi myös edullisemman hintansa puolesta.

Kromatografia on tekniikka, jolla erotetaan seoksessa olevat komponentit toisistaan.⁹ Toisin kuin uutossa, kromatografiassa käytetään kahta faasia, joista toinen pysyy paikallaan (pysyvä faasi) ja toinen liikkuu (liikkuva faasi). Faasit valitaan siten, että erotettavat yhdisteet vuorovaikuttavat molempien faasien kanssa. Jos yhdisteet vuorovaikuttavat usein pysyvän faasin kanssa, niiden liike liikkuvan faasin mukana hidastuu. Silloin, kun erotettavat yhdisteet vuorovaikuttavat pysyvän faasin kanssa eri pituisia aikoja, ne liikkuvat liikkuvan faasin mukana eri nopeuksilla ja näin erottuvat toisistaan.

Kaasukromatografialla (GC) erotetaan kaasufaasissa olevia yhdisteitä. Yhdisteet kulkevat kantajakaasun mukana kolonniin, jossa erottuminen tapahtuu. GC:ssä käytettävät kolonnit ovat yleensä useita metrejä pitkiä, todella ohuita putkia. Ne voivat olla joko kapillaarikolonneja tai pakattuja kolonneja. Kapillaarikolonnissa pysyvä faasi on sidottu kolonnin reunoille ja pakattussa kolonnissa pysyvä faasi täyttää koko kolonnin. Pysyvä faasi voi olla joko nestemäinen (partitiokromatografia) tai kiinteä (adsorptiokromatografia). GC-laitteistossa kolonni on sijoitettu kolonniuniin, jolloin sen lämpötila saadaan tarpeeksi korkeaksi ja lämpötilaa voidaan vaihdella, jotta eri analyyteille saadaan sopivat höyrynpaineet ja sitä kautta tehokas ja nopea erottuminen.⁹

Kaasukromatografia on tarkka ja nopea menetelmä steroidihormonien analysoimiseksi.⁷ Steroidihormonit ovat kuitenkin huonosti höyrystyviä ja hajoavat helposti korkeissa lämpötiloissa.¹² Sen takia niitä täytyy derivatisoida kaasukromatografista määrittystä varten. Derivatisoinnissa hormoneihin lisätään funktionaalisia ryhmiä, tai hormonien rakennetta muutetaan siten, että ne höyrystyvät helpommin ja kestävät paremmin korkeita lämpötiloja.¹² Derivatisointi on kuitenkin aikaa vievää ja vaatii monesti useita työvaiheita.^{3,12} Lisäksi määritettävien yhdisteiden massat kasvavat ja siinä saattaa muodostua isomeerejä, jotka voivat haitata varsinaisten yhdisteiden määrittystä.^{11,12,20}

Nestekromatografialla (LC, HPLC) erotetaan liuoksessa olevia yhdisteitä. Nestekromatografiassa yhdisteet kulkevat nestevirran, eluentin, mukana kolonniin, jossa ne erottuvat toisistaan ja tulevat ulos kolonnista, eluotivat, tietyillä retentioajoilla. Nestekromatografiassa käytettävät kolonnit ovat huomattavasti lyhyempiä ja sisähalkaisijaltaan suurempia kuin kaasukromatografiassa käytettävät. Kaasukromatografiasta poiketen, nestekromatografiassa käytetään ainoastaan pakattuja kolonneja, sillä nesteiden diffuusio on 10^4 kertaa hitaampaa kuin kaasujen.⁹ Tällä tavoin liuenneiden analyttimolekyylien ei tarvitse diffundoitua niin kauas kohdatakseen pysyvän faasin ja niiden erottuminen on nopeampaa.

HPLC-laitteisto koostuu tavallisesti automaattisesta näytteensyöttäjästä, pumpusta, kolonniuuni-
nista, kolonnista, detektorista ja tietokoneesta. Automaattinen näytteensyöttäjä injektoidaan näytteen
näytteen syöttöventtiiliin kautta eluentivirran kuljetettavaksi. Useampaa eluentia käytet-
täessä, pumppu sekoittaa ne oikeassa suhteessa ja pitää eluentivirran liikkeessä ohjatulla no-
peudella. Analyttinen kolonni ja siihen liitetty esikolonni ovat sijoitettuina kolonniuuniin. Ko-
lonniuuni pitää kolonnin lämpötilan vakiona. Toisin kuin GC:ssä HPLC:ssä gradientin muutos
tehdään eluenttien suhteita muuttamalla, eikä kolonnin lämpötilaa muuttamalla. Nestekromato-
grafin detektorina voi olla esimerkiksi diodirividetektor (DAD), fluoresenssidetektor (FLD)
tai massaspektrometri (MS). Tietokoneella analysoidaan mittausdata ja ohjataan nykyaikaisia
HPLC-laitteistoja.^{9,12,23}

Hormonianalytiikassa nestekromatografia on pitkälti korvannut kaasukromatografian, koska
nestekromatografialla pystytään analysoimaan huonosti haihtuvia yhdisteitä ilman aikaa vievää
derivatisointia.^{3,12} Steroidihormonien hydrofobisesta luonteesta johtuen niille sopii paremmin
käänteisfaasikromatografia, jossa käytetään poolista liikkuvaa faasia ja vähemmän poolista py-
syvää faasia.¹² Tyypillisesti hormoneille soveltuviin kolonneissa käytetään C8- tai C18-hart-
sia, joka on sidottu piidioksidi- tai polymeeripartikkelien pinnalle. Hyviä liikkuvan faasin liu-
ottimia ovat esimerkiksi vesi ja metanoli. Koska tämän työn tavoitteena oli kehittää menetelmä,
jossa ei tarvittaisi näytteiden derivatisointia, niin HPLC on työn tarkoitukseen paremmin sovel-
tuva yhdisteiden erotusmenetelmä.

Massaspektrometria on tekniikka, jolla voidaan tutkia atomien, molekyylien tai molekyylin
osien molekyyllipainoa.⁹ Massaspektrometriassa kaasufaasissa olevat yhdisteet ionisoidaan ja
niille määritetään massa-varaussuhteet (m/z -arvot). Massa-varaussuhteessa yhdisteen molekyy-
lipaino jaetaan sen varauksella, ja m/z -arvojen perusteella yhdisteet voidaan erottaa toisistaan.

Massaspektrometri koostuu kolmesta pääkomponentista: ionilähteestä, massa-analysaattorista
ja detektorista.⁹ Ionilähteessä tiivistyneessä muodossa olevat yhdisteet ionisoidaan. Massa-ana-
lysaattorissa eri molekyyllipainon omaavat ionit erotetaan toisistaan ja niitä voidaan aktivoida,
jos käytössä on MS/MS-tekniikka. Viimeisessä vaiheessa ionit saapuvat detektorille, jossa ne
havaitaan ja niille saadaan yleisyydet.

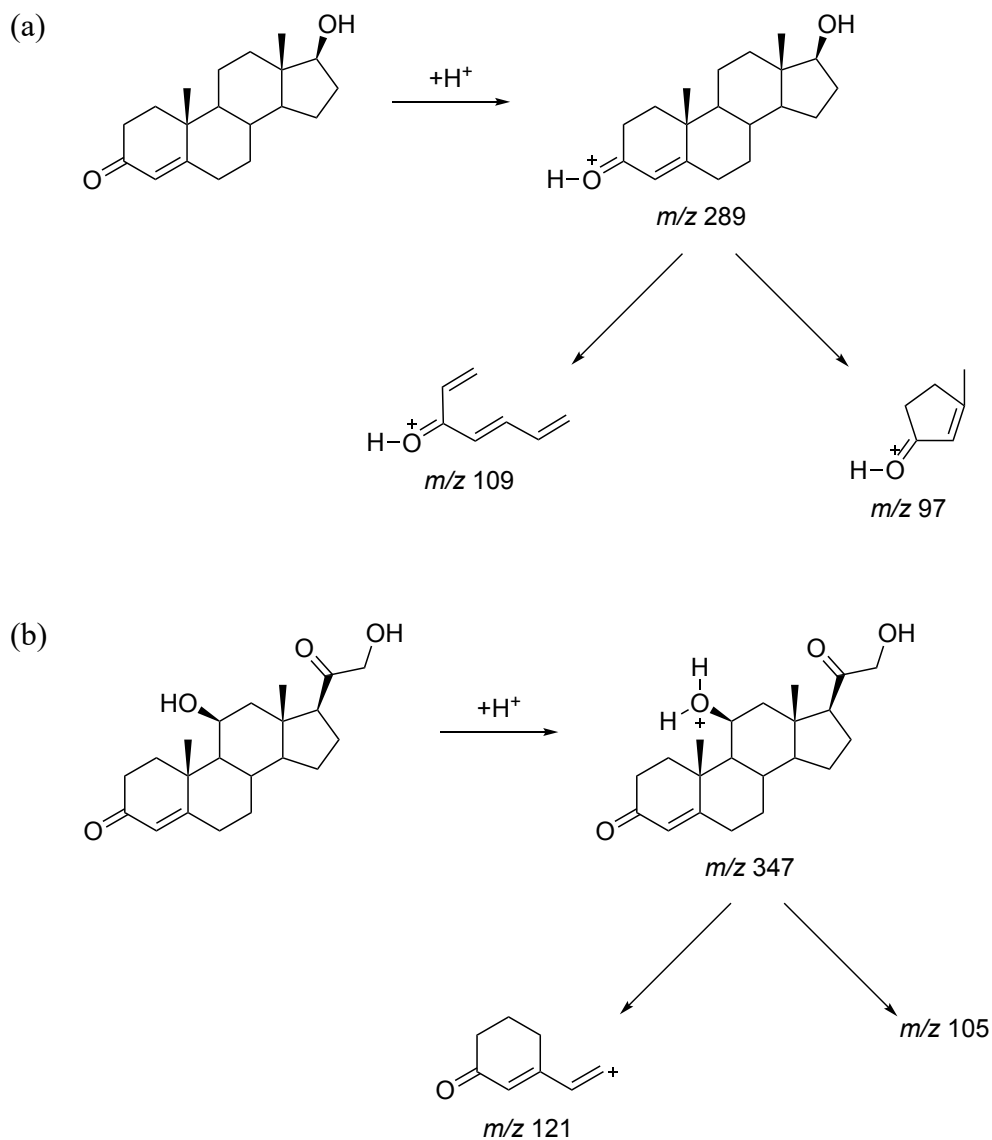
Hormonianalytiikassa kaksi yleisesti käytettyä yhdisteiden ionisaatiomenetelmää ovat kemial-
linen ionisaatio normaalissa ilmanpaineessa (APCI) ja sähkösumutus-ionisaatio (ESI).^{12,14,22}

Myös fotoionisaatiota normaalissa ilmanpaineessa (APPI) on käytetty, mutta se ei ole yhtä käytetty kuin kaksi aikaisemmin mainittua menetelmää.¹⁴ Kemiallisessa ionisaatiossa normaalissa ilmanpaineessa ionisoidaan ensin desolvataatiokaasu, josta varaus siirtyy analyyteille.¹² APCI on niin sanottu pehmeä ionisaatiomenetelmä, eli sitä käytettäessä analyytit eivät pilkkoudu. Tavallisesti APCI:ssä muodostuu yhdesti varattuja ioneja ja näytteet pitää höyrystää, minkä vuoksi se ei sovellu makromolekyyleille kuten proteiineille.⁹ APCI:n merkittävin etu on, että sillä ei esiinny ionisuppressiota, joka heikentää mittauksen herkkyyttä.¹² Ionisuppressiossa analyyttien kanssa samoissa nestepisaroiissa olevat muut yhdisteet tai epäpuhtaudet vievät osan analyyttien ionisaatiopotentiaalista ja näin heikentävät niiden ionisoitumista.¹² Li *et al.*²² olivat saaneet APCI:llä kortikosteronille lähes kolme kertaa suuremman vasteen kuin ESI:llä.

Sähkösumutus-ionisaatio on niin ikään pehmeä ionisaatiomenetelmä. Siinä muodostetaan ensin voimakkaan sähkökentän avulla varauksellisia nestepisaroita, joista haihdutetaan liuotinta lämmitetyn kaasuvirtauksen, yleensä typpi, avulla.^{9,12} Pisarat kutistuvat ja kutistuvat, kunnes jäljelle jää vain ionisoituneet, kaasufaasissa olevat analyytit, jotka ohjataan massa-analysaatorille. Sähkösumutus-ionisaatiossa muodostuu myös useasti varattuja ioneja, joten se soveltuu myös suurille yhdisteille.⁹ Sähkösumutus-ionisaation merkittävin haitta on ionisuppressio.¹² Sitä voidaan kuitenkin korjata sisäisen standardin avulla.¹² Samalla saadaan korjattua näytteen käsittelyssä mahdollisesti tapahtunut analyyttien hävikki. Steroidihormoneille sisäisenä standardina käytetään yleensä isotooppileimattuja (hiili-13 tai deuterium) hormoneja niin, että kolme tai useampi atomi on korvattu isotooppiatomilla. Ihannetapauksessa jokaiselle analyytille on oma sisäinen standardinsa, mutta se ei ole kuitenkaan välttämätöntä.¹²

Vaikka LC-MS on tehokas keino hormonien määrittämiseksi, se kuitenkin kärsii taustakohinasta, alentuneesta herkkyydestä erityisesti biologisten näytteiden kohdalla ja isobaarisesta päällekkäisyydestä, jossa kaksi tai useampi saman m/z -arvon omaavaa yhdistettä eluoituvat päällekkäin.¹² Näitä ongelmia voidaan ehkäistä käyttämällä niin sanottua tandemmassaspektrometriaa (MS/MS, MSⁿ). Tandemmassaspektrometriassa kaksi tai useampi massa-analysaattori on kytketty sarjaan mahdollistaen mielenkiinnon kohteena olevien yhdisteiden tarkemman eristämisen. Yksi yleisimmistä tandemmassaspektrometreista on kolmoiskvadrupoli (QqQ).²⁴ Se koostuu kolmesta sarjassa olevasta kvadrupolista, joista ensimmäisellä ja kolmannella eristetään tietyn m/z -arvon omaavia ioneja. Toisella kvadrupolilla voidaan aktivoita ensimmäisellä kvadrupolilla eristettyjä ioneja. Aktivoinnissa käytetään toisessa kvadrupolissa olevaa törmäyskaasua (N₂, Ar, Xe), johon törmäysenergialla kiihdytetyt ionit törmäävät ja pilkkoutuvat.^{9,24} Muodostuneet pilkeionit määritetään kolmannella kvadrupolilla.

Yksi tandemmassaspektrometrian tyypeistä on useiden reaktioiden seuranta (MRM). Siinä kolmoiskvadrupolilaitteiston ensimmäisellä kvadrupolilla eristetään halutut, alkuperäiset prekursori-ionit. Niitä aktivoidaan (pilkotaan) toisessa kvadrupolissa ja halutut pilkeionit eristetään kolmannella kvadrupolilla. Törmäysaktivoinnissa muodostuu yleensä yhdisteelle karakteristisia pilkeioneja ja niitä mittaamalla yhdiste voidaan tunnistaa ja erottaa muista saman m/z -arvon omaavista yhdisteistä. Yleensä eristettäviksi pilkeioneiksi valitaan alkuperäisestä yhdisteestä yleisimmin muodostuvat pilkeionit.¹² Mikäli yleisiä pilkeioneja on useita, voidaan yhtä niistä käyttää mitattavan yhdisteen kvantitointiin (quantifier) ja toista mitattavan yhdisteen tunnistamisen varmistamiseen (qualifier).¹² Testosteronille tyypillisesti käytetyt pilkeionit ovat m/z 109 ja m/z 97 ja kortikosteronille m/z 121 ja m/z 105 (Kuva 2).^{7,12,14}



Kuva 2. Testosteronin (a)^{25,26} ja kortikosteronin (b)²² yleisimmät pilkeionit törmäysaktivoinnissa (CID).

Tämän työn tavoitetta ajatellen sopiva analyysimenetelmä voisi olla HPLC-ESI-QqQ MRM-menetelmällä yhdistettynä liuotinuuttoon. Vuonna 2020 Nouri *et al.* olivat kehittäneet samantyyllisen menetelmän kalanäynteille.⁷ Sitä käytettiin tämän menetelmän pohjana.

3 TYÖN SUORITUS JA TULOKSET

3.1 Materiaalit

Työssä käytetyt reagenssit, niiden molekyylikaavat, valmistajat ja puhtausasteet on koottu Taulukko 1. Kaikki liuottimet (vesi ja metanoli) olivat puhtaudeltaan HPLC-MS-laatua. Seerumistandardeissa käytetty veriseerumi oli Gibcon valmistamaa, aktiivihiilikäsiteltyä naudan sikiön seerumia (Gibco, Charcoal Stripped Fetal Bovine Serum, Qualified One Shot).

Taulukko 1. Työssä käytetyt reagenssit, niiden molekyylikaavat, valmistajat ja puhtausasteet

Yhdiste	Molekyylikaava	Valmistaja	Puhtausaste
Testosteroni	$C_{19}H_{28}O_2$	Sigma-Aldrich	$\geq 99,0 \%$
Kortikosteroni	$C_{21}H_{30}O_4$	Sigma-Aldrich	$\geq 98,5 \%$
$^{13}C_3$ -testosteroni	$^{13}C_3C_{16}H_{28}O_2$	Sigma-Aldrich	98 %
Ammoniumfluoridi	NH_4F	Sigma-Aldrich	$\geq 99,99 \%$
Muurahaishappo	$HCOOH$	Sigma-Aldrich	$\geq 98 \%$
Metyyli-tert-butyylieetteri	$C_5H_{12}O$	Acros Organics	99,9 %

3.2 Menetelmät

Työssä suoritettu menetelmän kehitys ja optimointi tehtiin laitteistolle, joka koostui 1290 Infinity -sarjan nestekromatografista (1290 Bin Pump, 1290 TCC, 1290 Sampler, Agilent Technologies Inc.) sekä 6460 Triple Quad LC/MS-massaspektrometrasta (Agilent Technologies Inc.). Kolonnina oli Acquity Premier HSS T3, $2,1 \times 50$ mm, $1,8 \mu m$ (Waters Corporation), esikolonnina Acquity Premier HSS T3 VanGuard, $2,1 \times 5$ mm, $1,8 \mu m$ (Waters Corporation) ja ohjelmistoina MassHunter -sarjaan (Agilent Technologies Inc.) kuuluvat ohjelmat Workstation Data Acquisition (versio B.06.00), Qualitative Analysis (versiot B.06.00 ja B.08.00) ja Quantitative Analysis (versio B.06.00). Mittaustapana työssä käytettiin MRM:ää, positiivista polarisaatiota ja käänteisfaasikromatografiaa. MS/MS:ssä yhdisteiden aktivointimenetelmänä oli törmäysaktivointi (CID). Menetelmän sisäisenä standardina oli $^{13}C_3$ -testosteroni. Yhdisteiden seuratt

transitiot olivat: testosteroni m/z 289 \rightarrow 109, kortikosteroni m/z 347 \rightarrow 121 ja $^{13}\text{C}_3$ -testosteroni m/z 292 \rightarrow 112. Näytteen syötössä ei käytetty jäähdystystä. Kalibrointisuorien sovituksessa käytettiin lineaarista sovitusta origo huomioiden ilman painokertoimia. Menetelmän havaitsemisrajat (LOD) laskettiin

$$\text{LOD} = \frac{3s_b}{a} \quad (1)$$

ja määrittämissrajat (LOQ)

$$\text{LOQ} = \frac{10s_b}{a}, \quad (2)$$

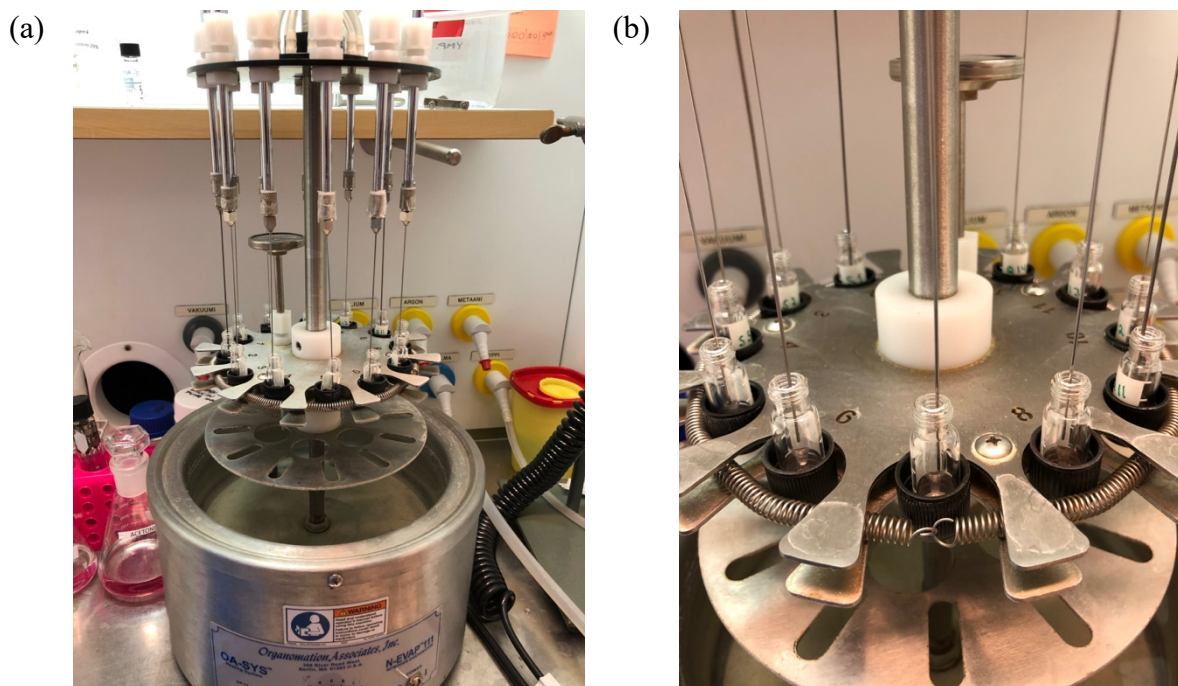
joissa s_b on regressiosuoran y-akselin leikkauspisteen virhe ja a on suoran kulmakerroin. Rinnakkaismäärittämissrajat käytetty variaatiokerroin (CV) puolestaan laskettiin

$$\text{CV} = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \%, \quad (3)$$

joissa s on mittaustulosten keskihajonta ja \bar{x} on mittaustulosten keskiarvo.

3.3 Näytteen käsittely

Näytteitä varten $^{13}\text{C}_3$ -testosteronista (0,1 mg/ml) valmistettiin 100 ng/ml oleva työliuos. 10 μl seeruminäytteeseen lisättiin 2 μl sisäisen standardin työliuosta (näytteen ISTD-pitoisuudeksi tuli 16,67 ng/ml) ja 25 μl MTBE:tä. Näytteitä vortexoitiin 30 sekuntia, sentrifugoitiin 10 minuuttia (1 100 \times g, 4 $^\circ\text{C}$) ja ylempi faasi kerättiin talteen (onnistui parhaiten pitkällä, ohuella pipetinkärjellä). Näytteeseen lisättiin 20 μl MTBE:tä ja vortexointi, sentrifugointi ja faasierottelu toistettiin. Uuton jälkeen kerätyt MTBE-faasit yhdistettiin, haihdutettiin kuiviin huoneenlämmössä, typpivirtauksen alla (Kuva 3) ja niihin lisättiin 12 μl metanolia. Valmiit näytteet säilytettiin jääkaappilämpötilassa (+4 $^\circ\text{C}$).



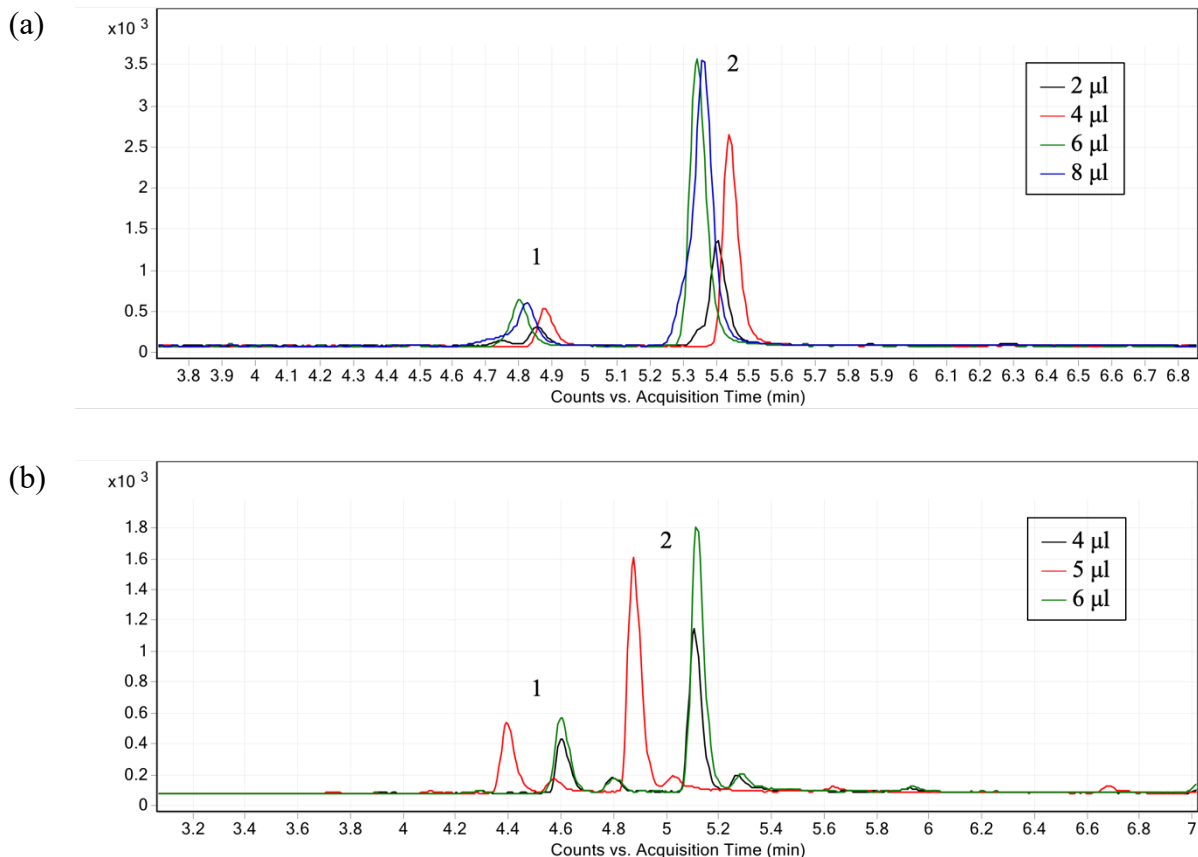
Kuva 3. Näytteiden haihdutuksessa käytetty typpihaihdutin (Organomation Associates Inc. Nitrogen Evaporator N-EVAP 111).

3.4 Menetelmän optimointi

Työ aloitettiin optimoimalla ensin käytetyn mittauslaitteiston parametrit ja gradienttiohjelma ja vasta sen jälkeen optimoitiin näytteen käsittely. Nestekromatografian osalta optimoitaviin asioihin kuuluivat injektio-tilavuus, injektion kohta (draw position), injektion imunopeus (draw speed), eluenttien koostumukset, virtausnopeus, gradienttiohjelma ja kolonnin lämpötila. Massaspektrometrin osalta optimoitiin törmäysenergia (collision energy). Lisäksi selvitettiin, kuinka monta injektiota yhdestä 12 µl:n näytteestä pystyy tekemään. Laitteparametrien optimointi suoritettiin kokeilemalla eri parametrien vaikutusta testosteronin ja kortikosteronin erottuvuuteen ja vasteeseen ja valitsemalla parametreista sellaiset, joilla kyseisten yhdisteiden erottuvuus oli selkein ja vaste suurin. Optimointia varten testosteronista ja kortikosteronista valmistettiin 0,49 ja 0,59 mg/ml olevat kantaliuokset metanoliin ja niistä edelleen 4,9 ja 5,9 ng/ml olevat työliuokset metanoliin.

3.4.1 Injektiotilavuus

Sopivan injektiotilavuuden löytämiseksi kokeiltiin aluksi tilavuuksia 2, 4, 6 ja 8 μl . Niistä parhaaksi osoittautui 6 μl (Kuva 4a). Lisäksi kokeiltiin vielä 5 μl :aa (Kuva 4b), koska alkuperäisenä ajatuksena oli, että 12 μl :n näytteestä saisi mahdollisesti suoritettua kaksi injektiota. Lopulliseen metodiin valittiin injektiotilavuudeksi 5 μl .

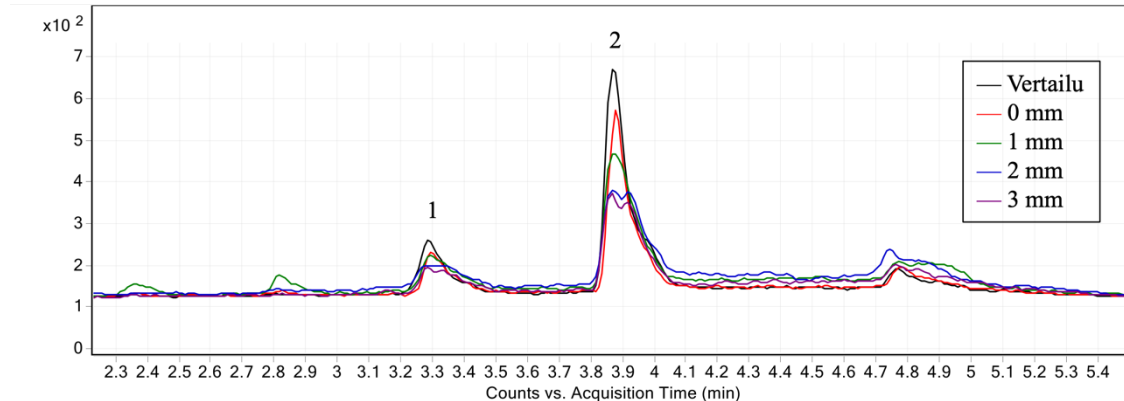


Kuva 4. Injektiotilavuuden vaikutus kortikosteronin (1) ja testosteronin (2) piikkien intensiteetteihin 2, 4, 6 ja 8 μl :n (a) ja 4, 5 ja 6 μl :n (b) injektiotilavuuksilla. Kuvan kohdissa (a) ja (b) on eripituiset gradienttiohjelmat. Piikkien retentioaikojen vaihtelu johtuu laitteessa aluksi olleesta stabiilisuusongelmasta.

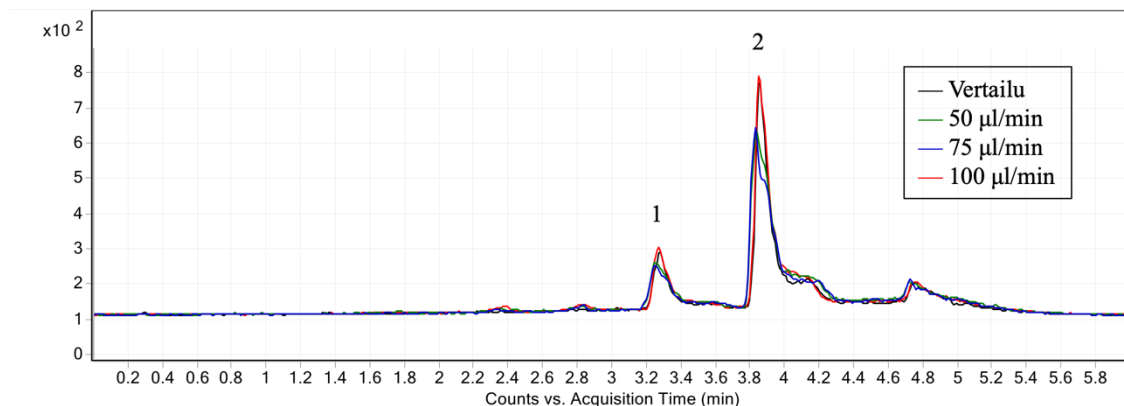
3.4.2 Injektion kohta, injektion imunopeus ja injektioiden määrä

Menetelmän optimointiprosessin aikana havaittu injektion epäonnistuminen jäljitettiin epäso-piviin injektiokohtaan ja injektion imunopeuteen, jolloin laite ei saanut injektioitua näytettä kunnolla 12 μl :n näytteestä, vaan injektioi näytettä vajaan annoksen tai imi kokonaan tyhjää. Injektion kohta määrittää, kuinka syvällä injektioneula käy näytevialissa ja imunopeus, millä

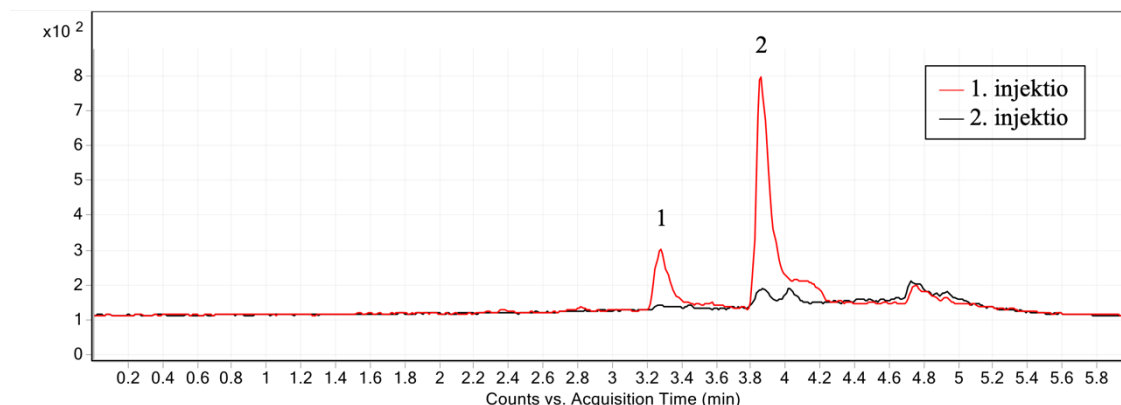
nopeudella injektorin imee näytettä vialista. Ongelma ratkaistiin laskemalla injektion kohta nollaan millimetriin (Kuva 5) ja etsimällä sopiva imunopeus, joka oli 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ (Kuva 6). Onnistuvien injektioiden määräksi 12 μl :n näytteestä varmistui yksi kappale (Kuva 7).



Kuva 5. Injektion imukohdan (draw position) vaikutus näytteen syötön onnistumiseen. 1 = kortikosteroni ja 2 = testosteroni. Vertailuna käytettiin vialia, jossa näytettä oli varmasti riittävästi (100 μl) täyttä injektiota varten. Imunopeutena kaikissa injektioissa oli 200 $\mu\text{l}/\text{min}$.



Kuva 6. Injektion imunopeuden (draw speed) vaikutus näytteen syötön onnistumiseen. 1 = kortikosteroni ja 2 = testosteroni. Vertailuna käytettiin vialia, jossa näytettä oli varmasti riittävästi (100 μl) täyttä injektiota varten. Injektion imukohtana kaikissa injektioissa oli 0 mm.



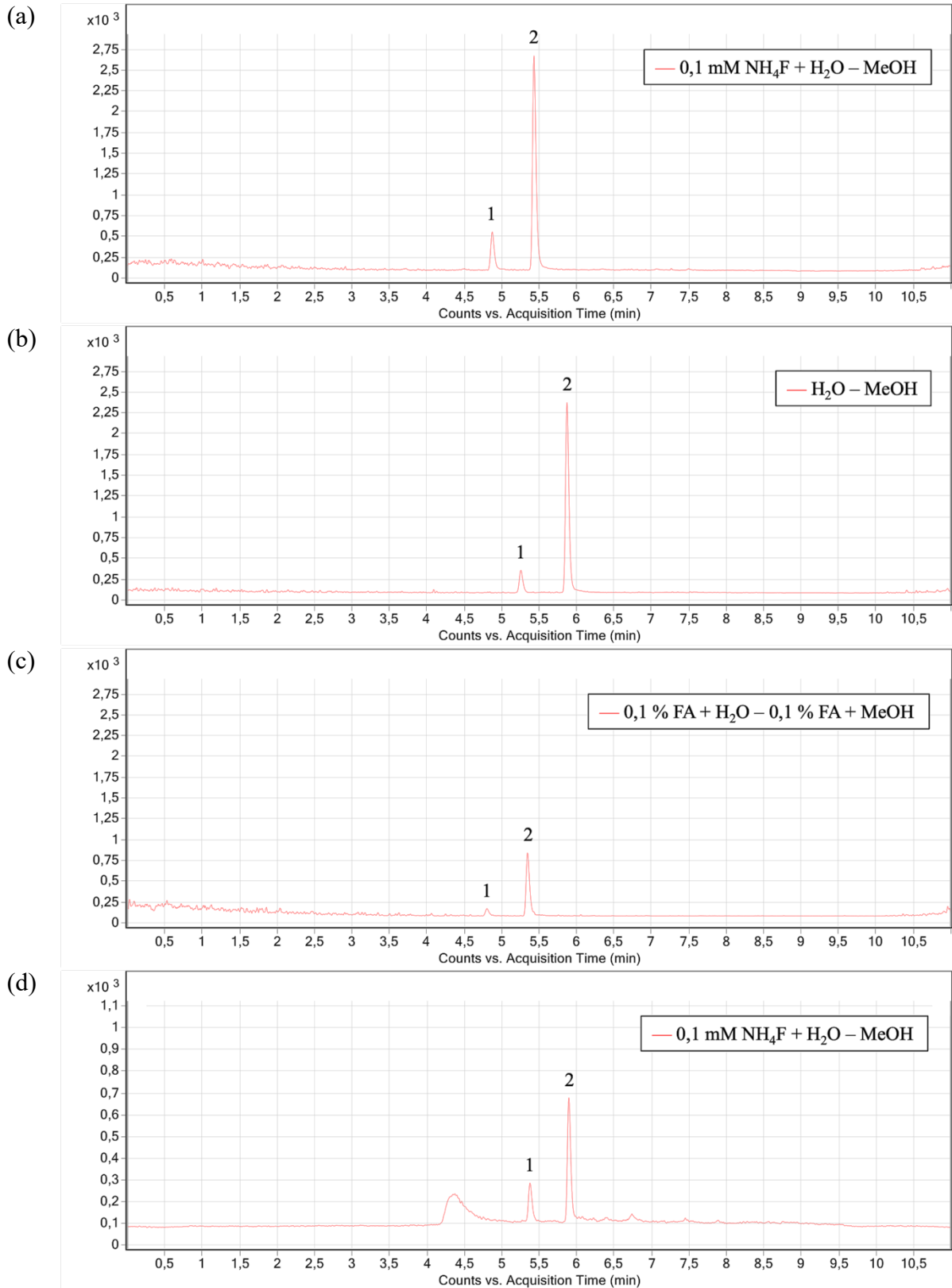
Kuva 7. Onnistuvien injektioiden määrä 12 μ l:n näytteestä. 1 = kortikosteroni ja 2 = testosteroni.

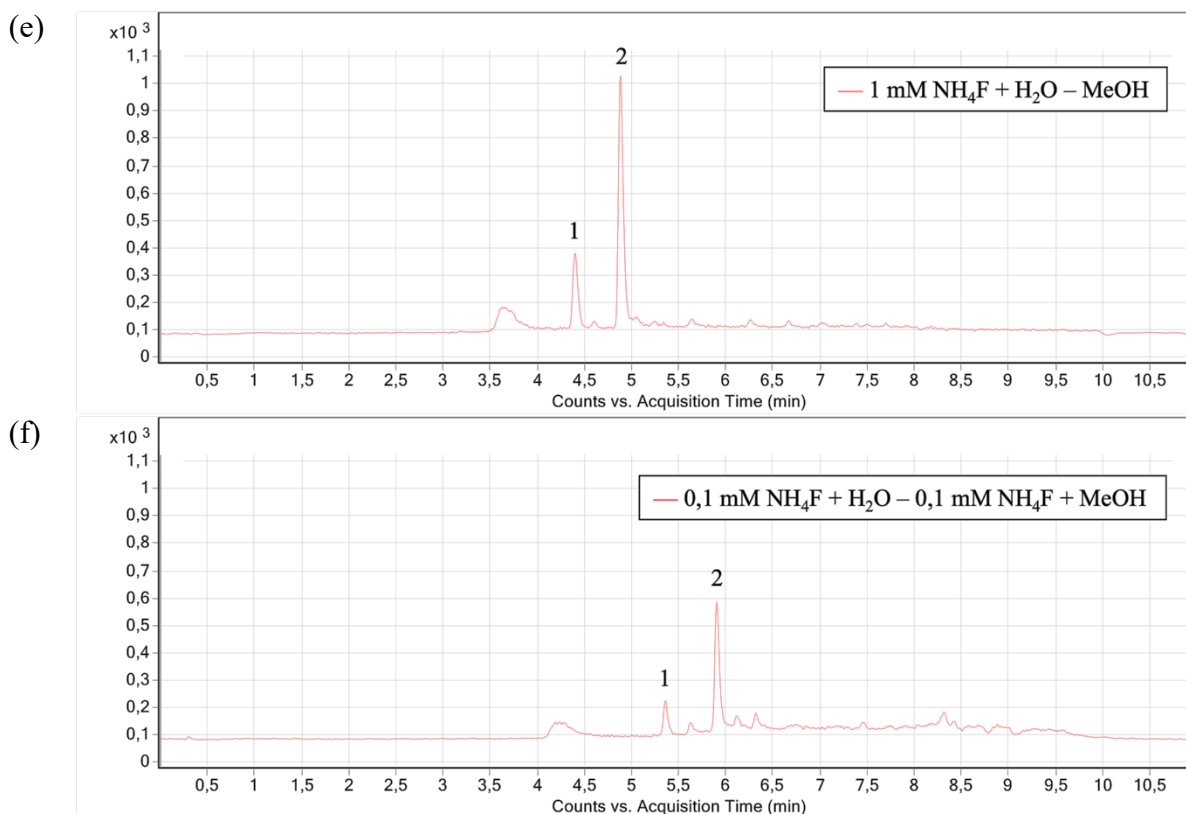
3.4.3 Eluentit

Sopiviksi eluenteiksi kokeiltiin ammoniumfluoridin, veden, metanolin ja muurahaishapon erilaisia yhdistelmiä (Taulukko 2). Ammoniumfluoridia sisältäviä eluenteja varten kiinteästä ammoniumfluoridista valmistettiin 10 ja 100 mM kantaliuokset veteen ja 10 mM kantaliuos metanoliin. Parhaaksi yhdistelmäksi osoittautui pari, jossa toisena eluenttina (A) oli 1 mM NH_4F sekä vesi ja toisena eluenttina (B) metanoli (Kuva 8e). Parhaaksi eluenttipariksi valittiin pari, jolla kortikosteronin ja testosteronin intensiteetit olivat suurimmat. Veteen lisätty NH_4F paransi kortikosteronin ja testosteronin intensiteettejä ja sai ne eluoitumaan aikaisemmin kuin eluenttina A käytetty pelkkä vesi (Kuva 8b). Muurahaishappo (FA) alensi kortikosteronin ja testosteronin intensiteettejä, kuten teki myös metanoliin lisätty NH_4F (Kuva 8c ja Kuva 8f). Lisäksi metanoliin lisätty NH_4F myöhensi molempien mitattavien yhdisteiden eluoitumista (Kuva 8f).

Taulukko 2. Nestekromatografian eluenttien optimoinnissa käytetyt eluenttiparit

Eluentti A	Eluentti B	Lähde
0,1 mM NH_4F + H_2O	MeOH	7
1 mM NH_4F + H_2O	MeOH	–
0,1 mM NH_4F + H_2O	0,1 mM NH_4F + MeOH	11
H_2O	MeOH	8,27
0,1 % FA + H_2O	0,1 % FA + MeOH	21





Kuva 8. Eri eluentiyhdistelmien vaikutus kortikosteronin (1) ja testosteronin (2) piikkien intensiteetteihin. Kuvissa (d)–(f) ennen kortikosteronipiikkejä olevat möykyt johtuivat eluentissa olleesta epäpuhtaudesta. Yhdistelmät testattiin kahtena eri päivänä ((a)–(c) yhtenä ja (d)–(f) toisena). Laitteiston stabiilisuusongelma vaikutti eri päivinä mitattujen yhdistelmien retentioaikoihin ja piikkien intensiteetteihin (vertaa kohtia (a) ja (d)).

3.4.4 Virtausnopeus ja gradienttiohjelma

Sopivaksi virtausnopeudeksi kokeiltiin arvoja 0,3; 0,6 ja 0,9 ml/min. Nopeuksilla 0,3 ja 0,6 ml/min kortikosteronin ja testosteronin erottuvuudet olivat hyvät, mutta nopeudella 0,9 ml/min ne eluoutuivat jo todella lähekkäin, eikä täydellinen erottuminen olisi ollut enää varmaa (Taulukko 3). Nopeudella 0,6 ml/min yhdisteet saatiin eluoitumaan nopeammin kuin nopeudella 0,3 ml/min, joten se valittiin virtausnopeudeksi lopulliseen metodiin.

Taulukko 3. Kortikosteronin ja testosteronin retentioajat eri virtausnopeuksilla

Virtausnopeus (ml/min)	Retentioaika (min)		Piikkien väli (min)
	Kortikosteroni	Testosteroni	
0,3	8,6	9,5	0,9
0,6	4,8	5,3	0,5
0,9	2,7	3,0	0,3

Sopivan gradienttiohjelman löytämiseksi työssä kokeiltiin ohjelmia, joissa eluentin B osuus vaihteli 10 ja 98 prosentin välillä (Taulukko 4–6). Alkuperäiseen⁷ verrattuna ohjelmaa lyhennettiin vaiheittain sekä alku- että loppupäästä siten, että eluentin B muutos pysyi noin 10,5 %/min. Alkuperäisessä ohjelmassa (Taulukko 4) sekä ajon alkuun että loppuun jäi paljon tyhjää yhdisteiden eluoiduttua noin viiden minuutin kohdalla. Ohjelmassa, jossa eluentin B osuus alkoi 40 prosentista (Taulukko 6) kortikosteroni eluoiuui heti ajon alussa (Kuva 9). Parhaaksi eluentin B aloitusosuudeksi todettiin 30 % (Taulukko 5 ja Kuva 9). Siinä yhdisteet eluoiuivat noin kolmen minuutin kohdalla (kortikosteroni 3,2 min ja testosteroni 3,8 min, Kuva 10). Laitteistoon optimoinnin aikana tehty huolto siirsi kortikosteronin ja testosteronin retentioaikoja myöhemmiksi (Kuva 9 ja Kuva 10).

Gradienttiohjelmaa lyhennettiin myös loppupäästä pudottamalla eluentin B lopetusosuus 98 prosentista 75 prosenttiin (Taulukko 7). Näin mittausaika saatiin lyhennettyä 11 minuutista 6 minuuttiin (Taulukko 4 ja Taulukko 7). Lisäksi kolonnin tasapainottumisaikaa (post run) pidennettiin yhdestä minuutista neljään minuuttiin, jotta kolonni varmasti ehti tasapainottua kunnolla ennen seuraavaa ajoa. Työssä parhaaksi todettu gradienttiohjelma kokonaisuudessaan oli siis kuuden minuutin ajon aikana eluentin B osuus kasvoi 30 prosentista 75 prosenttiin virtausnopeuden ollessa 0,6 ml/min ja kolonnin tasapainottumisajan ollessa neljä minuuttia (Taulukko 7). Kokonaisuudessaan yksi ajo kestää 10 minuuttia.

Taulukko 4. Alkuperäinen gradienttiohjelma

Aika (min)	Eluentti B (%)	Virtausnopeus (ml/min)
0	10	0,6
8,5	98	0,6
9	98	0,6
10,5	10	0,6
Run 11 min + post run 1 min = 12 min		

Taulukko 5. Gradienttiohjelma, jossa eluentin B aloitusosuus on nostettu 30 prosenttiin

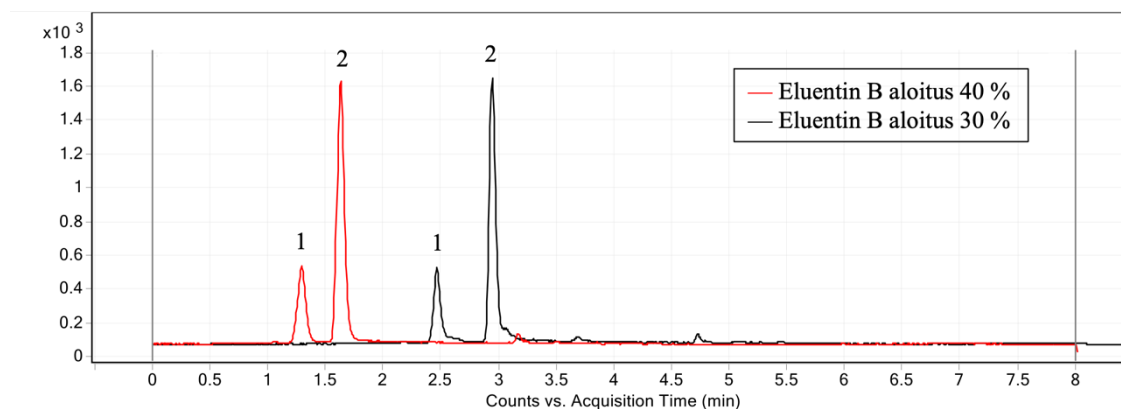
Aika (min)	Eluentti B (%)	Virtausnopeus (ml/min)
0	30	0,6
6,5	98	0,6
7	98	0,6
8,5	30	0,6
Run 9 min + post run 3 min = 12 min		

Taulukko 6. Gradienttiohjelma, jossa eluentin B aloitusosuus on nostettu 40 prosenttiin

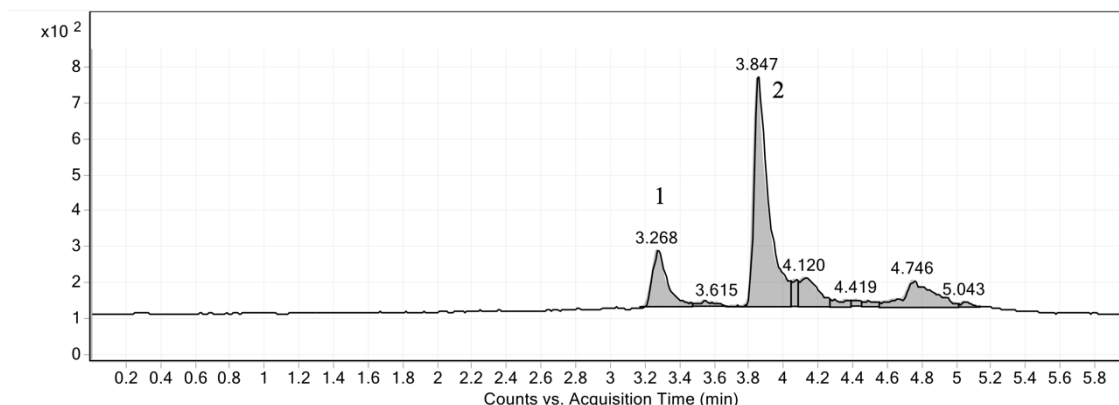
Aika (min)	Eluentti B (%)	Virtausnopeus (ml/min)
0	40	0,6
5,5	98	0,6
6	98	0,6
7,5	40	0,6
Run 8 min + post run 4 min = 12 min		

Taulukko 7. Gradienttiohjelma, jossa eluentin B aloitusosuus on nostettu 30 prosenttiin ja lopetusosuus laskettu 75 prosenttiin

Aika (min)	Eluentti B (%)	Virtausnopeus (ml/min)
0	30	0,6
4	75	0,6
4,5	75	0,6
6	30	0,6
Run 6 min + post run 4 min = 10 min		



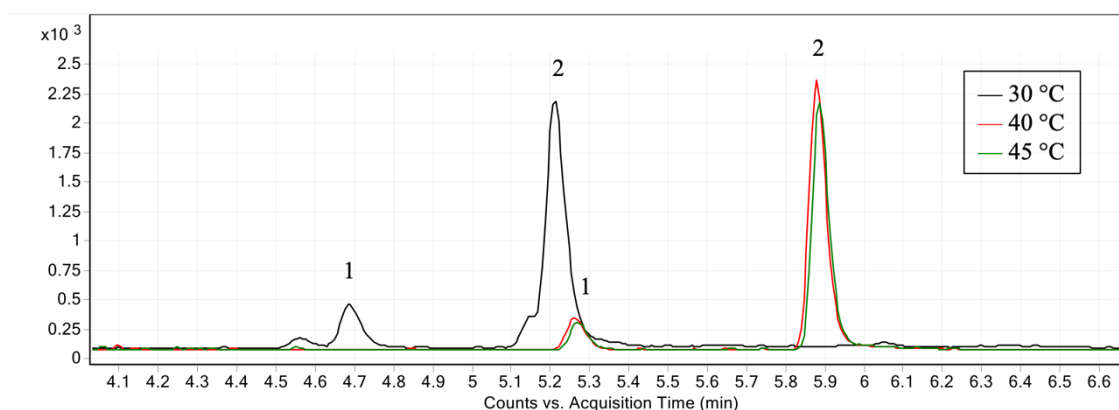
Kuva 9. Kortikosteronin (1) ja testosteronin (2) retentioajat eluentin B osuuden alkaessa 30 ja 40 prosentista.



Kuva 10. Integroitu esimerkkikromatogrammi kortikosteronin (1) ja testosteronin (2) eluutumisesta työssä parhaaksi osoittautuneilla virtausnopeudella ja gradienttiohjelmalla.

3.4.5 Kolonnin lämpötila

Optimaaliseksi kolonnin lämpötilaksi kokeiltiin lämpötiloja 30, 40 ja 45 °C. Lämpötilan ollessa 30 °C yhdisteiden piikit alkoivat hajota (Kuva 11). Koska käytössä olleen kolonnin maksimioperointilämpötila oli 45 °C, ja koska lämpötilalla 40 °C saavutettiin näennäisesti paremmat kortikosteronin ja testosteronin intensiteetit (Kuva 11), niin lämpötila 40 °C katsottiin parhaaksi.

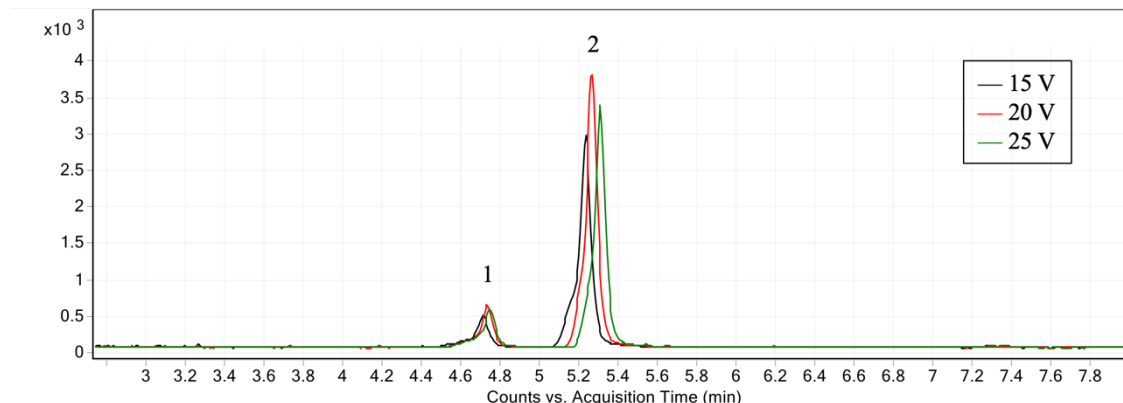


Kuva 11. Kolonnin lämpötilan vaikutus (1) kortikosteroni- ja (2) testosteronipiikkien intensiteetteihin ja muotoihin.

3.4.6 Törmäysenergia

Törmäysenergiaa optimoitaessa parhaaksi jännitteeksi osoittautui 20 V. Muita kokeiltuja arvoja olivat 15 ja 25 V, mutta niillä mitattavien yhdisteiden intensiteetit jäivät 20 voltin vastaavista

(Kuva 12). Koska sekä kortikosteronin että testosteronin intensiteetit näyttivät käyttäytyvän samansuuntaisesti törmäysenergian muuttuessa, niin molemmille yhdisteille päädyttiin käyttämään samaa 20 voltia. Muut massaspektrometrin parametrien arvot on koottu Taulukko 8.



Kuva 12. Törmäysenergian vaikutus kortikosteronin (1) ja testosteronin (2) piikkien intensiteetteihin.

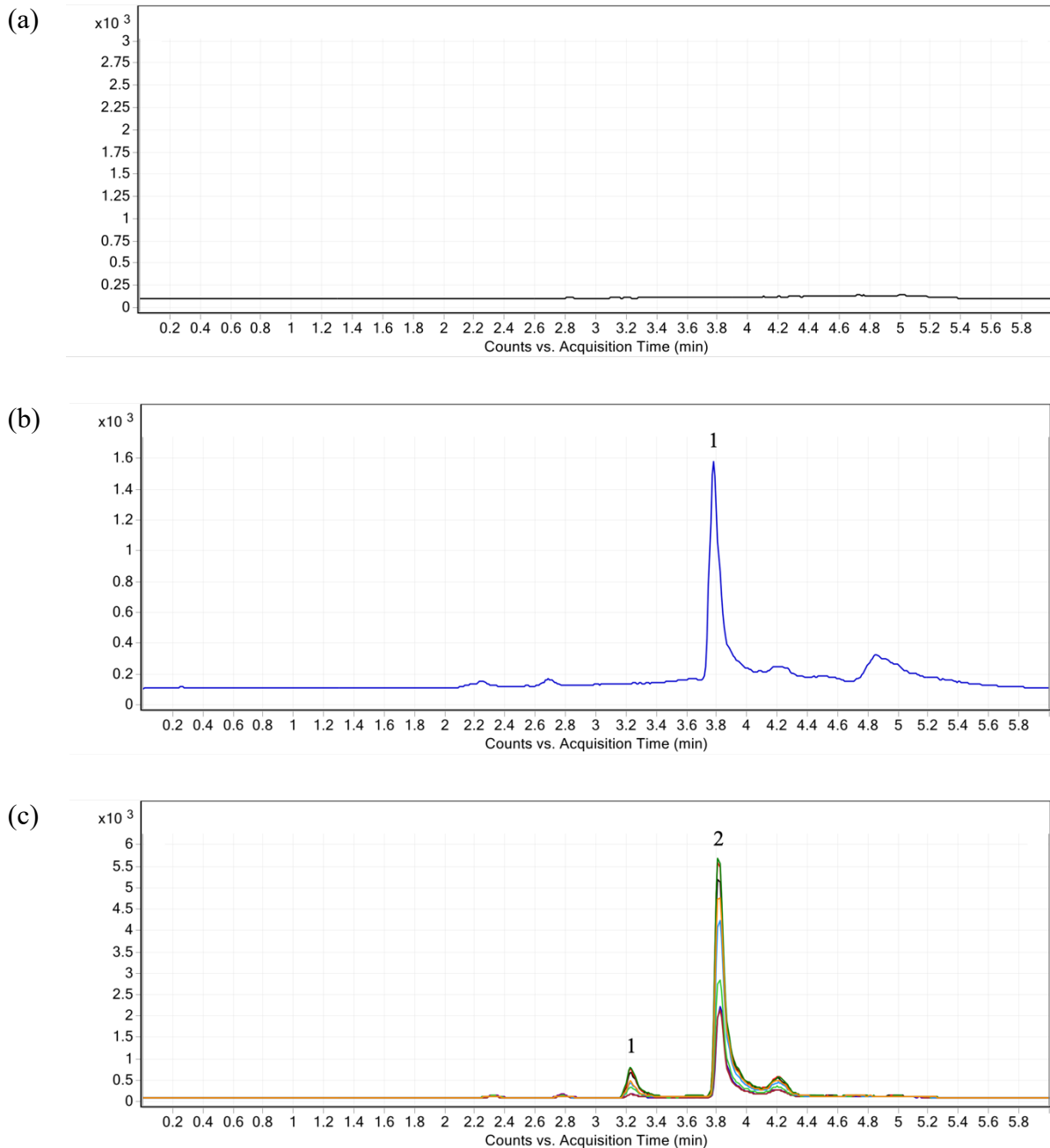
Taulukko 8. Menetelmässä käytetyt massaspektrometrin parametrien arvot

Parametri	Arvo
Fragmentor	135 V
Collision energy	20 V
Cell accelerator voltage	7 V
Polarity	Positive
Gas temperature	325 °C
Gas flow	12 l/min
Nebulizer	40 psi
Sheath gas temperature	325 °C
Sheath gas flow	10 l/min
Capillary	+4500 V / -0 V
Nozzle voltage	+2000 V / -0 V

3.5 Menetelmän validointi

3.5.1 Selektiivisyys

Menetelmän selektiivisyys kortikosteronille ja testosteronille todettiin vertaamalla aktiivihiilikäsiteltyjä seeruminäytteitä, joihin ei ollut lisätty kortikosteronia tai testosteronia aktiivihiilikäsiteltyihin seeruminäytteisiin, joihin niitä oli lisätty (Kuva 13). Menetelmä todettiin selektiiviseksi molemmille mitattaville yhdisteille, sillä seerumista valmistetusta nollanäytteestä molempien analyyttien pitoisuudeksi saatiin 0 ng/ml, ja lisäksi kortikosteroni- ja testosteronipiikit erottuivat toisistaan täysin.

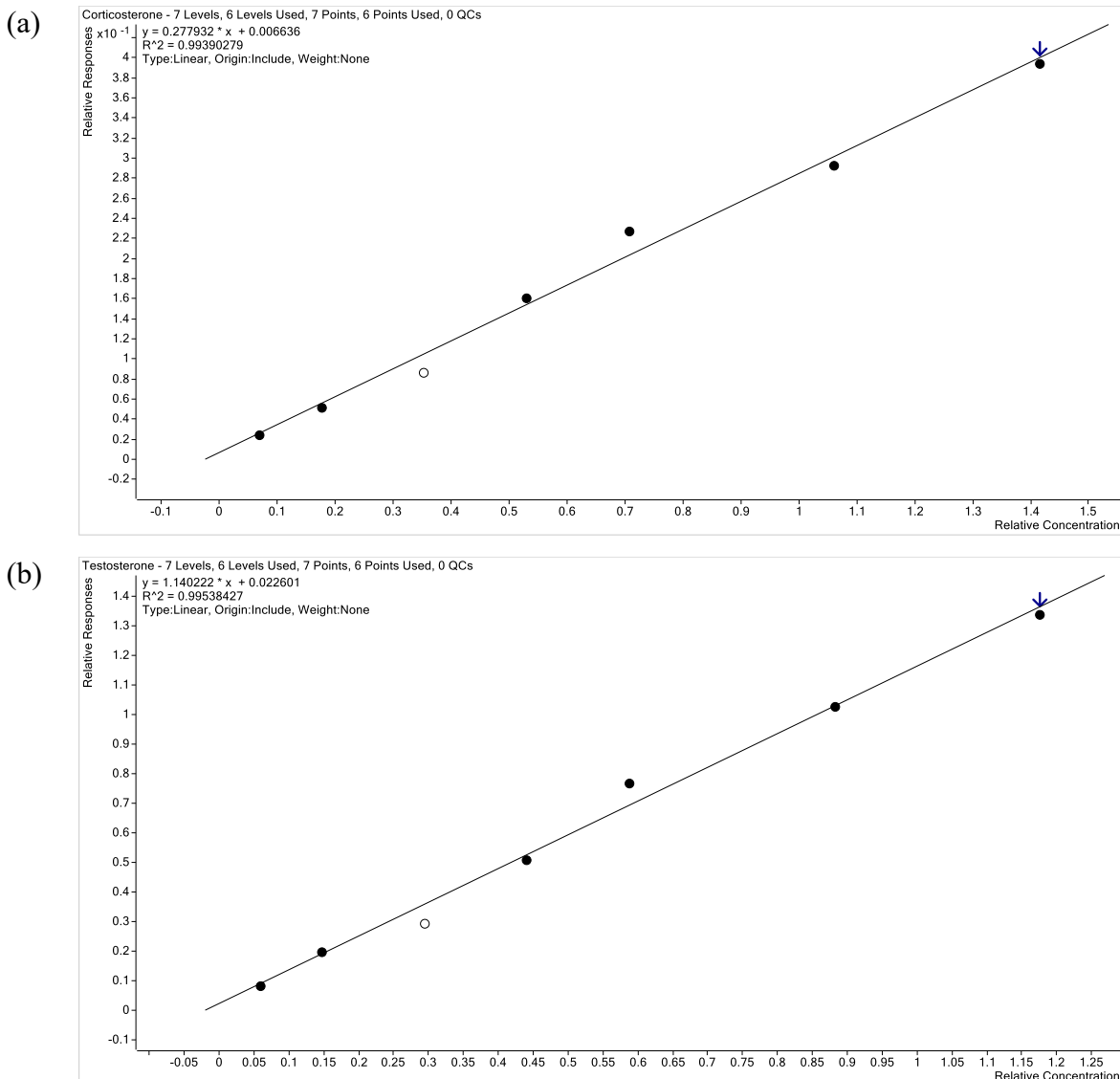


Kuva 13. Menetelmän selektiivisyys todettiin vertaamalla aktiivihiilikäsiteltyjä seeruminäytteitä, joihin (a) ei ollut lisätty kortikosteronia tai testosteronia, (b) lisätty vain sisäistä standardia ($^{13}\text{C}_3$ -testosteroni, 1) ja (c) sekä kortikosteronia (1) että testosteronia (2) sisältäviä QC-näytteitä.

3.5.2 Lineaarisuus, havaitsemisraja ja määrittäysraja

Menetelmän lineaarisuudet todettiin ja havaitsemisrajat sekä määrittäysrajat laskettiin kortikosteronin ja testosteronin kalibrointisuorista (Kuva 14, Kaava 1 ja Kaava 2). Kalibrointisuoria varten aktiivihiilikäsiteltyyn veriseerumiin valmistettiin ensin kantaliuos, jossa kortikosteronin ja testosteronin pitoisuudet olivat 100 ng/ml, ja siitä edelleen seitsemän standardiliuosta, joissa

kortikosteronia oli 1,18; 2,95; 5,90; 8,85; 11,8; 17,7 ja 23,6 ng/ml ja testosteronia 0,98; 2,45; 4,90; 7,35; 9,80; 14,7 ja 19,6 ng/ml. Ajoa varten standardiliuokset käsiteltiin samalla tavalla kuin näytteet (Osio 3.3) ja niiden sisäisen standardin pitoisuudeksi tuli sama 16,67 ng/ml kuin näytteissä. Menetelmä todettiin lineaariseksi sekä kortikosteronille ($R^2 = 0,9939 \geq 0,99^{10}$) että testosteronille ($R^2 = 0,9954 \geq 0,99^{10}$). Kalibroitaisuurien sovituksista poistettiin standardi numero 3, sillä sen määritetyt pitoisuudet poikkesivat odotetuista pitoisuuksista yli 15 %²⁸ sekä kortikosteronille että testosteronille (Liite 1). Havaitsemisrajaksi kortikosteronille saatiin 0,81 ng/ml ja testosteronille 0,95 ng/ml sekä määrittämisrajoiksi 2,72 ja 3,17 ng/ml.

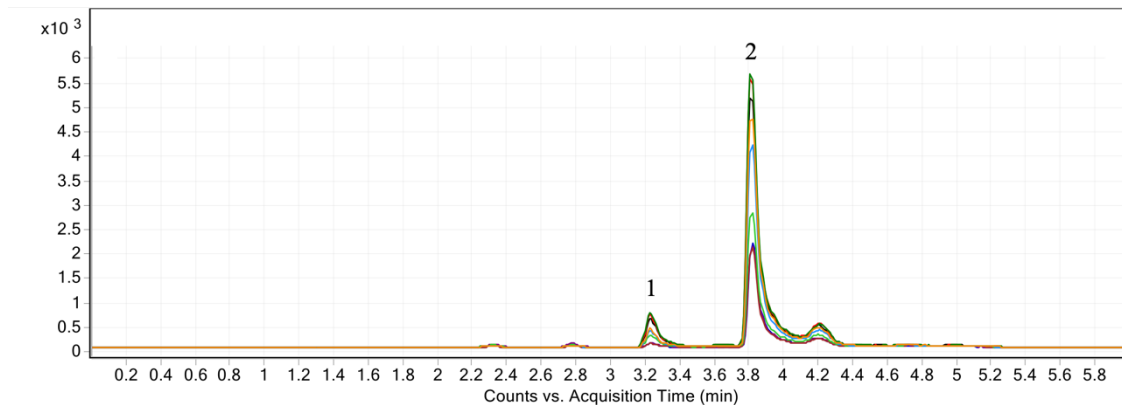


Kuva 14. Kortikosteronin (a) ja testosteronin (b) kalibroitaisuurat. Suorista on poistettu standardi numero kolme, sillä sen määritettyjen pitoisuuksien tarkkuudet erosivat yli 15 % odotetuista.

3.5.3 Tarkkuus ja toistettavuus

Menetelmän tarkkuutta ja toistettavuutta arvioitiin kolmen eri vahvuisen (laimea, keskivanha, vahva) QC-näytteen avulla. Kortikosteronille näytteiden pitoisuudet olivat 2,95; 8,85 sekä 17,7 ng/ml ja testosteronille 2,45; 7,35 sekä 14,7 ng/ml. Kukin näyte mitattiin kolmena rinnakkaisena (Liite 1). Menetelmää pidettiin tarkkana, jos QC-näytetason rinnakkaismääritysten keskiarvon tarkkuus erosi 100 prosentista korkeintaan ± 15 %.²⁸ Testosteronilla QC-näytteiden tarkkuus vaihteli välillä 94–101 % ja kortikosteronilla 82–83 % (Taulukko 9). Menetelmää voidaan pitää tarkkana testosteronille, mutta kortikosteronin osalta tarkkuutta olisi hyvä parantaa.

Menetelmän toistettavuuden arviointiin käytettiin QC-näytteiden retentioaikoja ja rinnakkaismääritysten variaatiokerroimia (Liite 1, Kaava 3). Kortikosteronilla yhden päivän aikana tehtyjen mittausten retentioaika vaihteli välillä 3,2198–3,2300 minuuttia (0,32 %, Kuva 15) ja variaatiokerroin välillä 5,4–13 % (Taulukko 9). Testosteronille vastaavat välit olivat 3,8074–3,8176 minuuttia (0,27 %) ja 4,0–13 %. Menetelmää pidettiin toistettavana, jos rinnakkaismääritysten variaatiokerroin oli korkeintaan 15 prosenttia,²⁸ eivätkä retentioajat eronneet merkittävästi toisistaan (≤ 1 %). Tulosten perusteella menetelmä on toistettava sekä kortikosteronille että testosteronille. Eri päivien välistä toistettavuutta ei tässä työssä tutkittu.



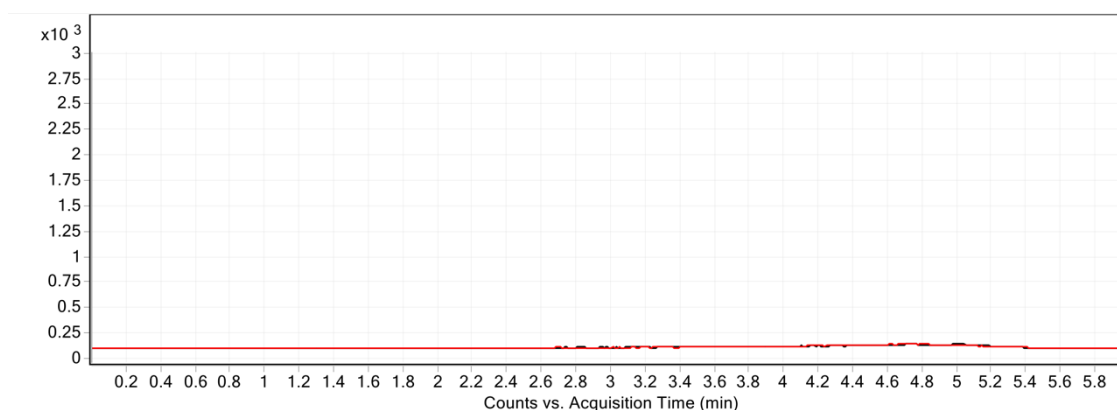
Kuva 15. QC-näytteiden kromatogrammi. 1 = kortikosteroni ja 2 = testosteroni.

Taulukko 9. QC-näytteiden eri tasojen tarkkuudet ja variaatiokerroimet

Yhdiste	Tarkkuus (%)			Variaatiokerroin (%)		
	Laimea	Keskivanha	Vahva	Laimea	Keskivanha	Vahva
Kortikosteroni	83	83	82	5,4	13	12
Testosteroni	101	100	94	4,0	13	11

3.5.4 Carryover

Carryover-vaikutusta tutkittiin mittaamalla nollanäytteitä QC-näytteiden lomassa. Nollanäytteiden tuloksista todettiin, ettei carryover-vaikutusta esiinny, joten siitä ei aiheudu virhettä näytteiden tuloksiin (Kuva 16).



Kuva 16. Nollanäytteiden kromatogrammit carryover-vaikutuksen tutkimiseksi.

4 YHTEENVETO

Tämän työn tarkoituksena oli kehittää ja validoida menetelmä Jyväskylän yliopiston Kemian laitoksella jo valmiiksi olevalle HPLC-ESI-QqQ-laitteistolle siten, että menetelmällä saataisiin määritettyä kortikosteroni ja testosteroni hyvin vähäisestä määrästä linnun veriplasmaa ilman näytteiden derivatisointia. Kehitetty menetelmä pohjasi Nourin *et al.* vuonna 2020 kehittämään samantapaiseen menetelmään kalanäytteille.⁷ Työssä Nourin *et al.* menetelmä optimoitiin ja validoitiin Kemian laitoksen HPLC-ESI-QqQ-laitteistolle.

Menetelmälle tehtiin sekä seerumipohjaisiin että liuotin pohjaisiin standardiliuoksiin perustuva kalibrointi (Osio 3.5.2 ja Liite 2). Liuotin pohjaisessa kalibroinnissa kalibrointisuorien selityksasteet (R^2 -arvot) olivat huomattavasti seerumipohjaisia suoria paremmat ja saadut havaitsemis- ja määrittämissrajat selvästi alhaisemmat (Taulukko 10). Mendes *et al.* eivät havainneet merkittävää eroa liuotin ja seerumipohjaisen kalibroinnin välillä mitattaessa kofeiini- ja teobromiinipitoisuuksia ihmisen veriplasmasta.²⁹ Liuotin pohjaista kalibrointia ei kuitenkaan tämän työn puitteissa testattu seerumipohjaisille QC-näytteille, eli kalibroinnin soveltuvuutta tähän tapaukseen ei tiedetä ja se olisi jatkossa varmasti yksi tutkimisen arvoinen asia.

Menetelmän seerumikalibroinnissa käytetyt standardiliuokset valmistettiin kokonaan pipetoidulla, kun taas liuotin kalibroinnissa käytetyt liuokset valmistettiin mittapulloihin. Tällä saattoi olla vaikutusta seerumikalibroinnin kalibrintisuorien alhaisempiin selityksasteisiin (Taulukko 10). Ilmeisesti seerumikalibroinnin heikommalla kalibrintisuorien sovitukset osaltaan selittävät myös korkeammat LOD ja LOQ-arvot, ja erityisesti sen, miksi kortikosteronin LOD ja LOQ ovat alhaisemmat kuin testosteronilla, vaikka yhdisteiden havaittujen intensiteettien perusteella luulisi olevan toisinpäin. Seerumikalibroinnin kalibrintisuorien selityksasteita voisi yrittää parantaa tekemällä seerumistandardit mittapulloihin.

Taulukko 10. Liuotin ja seerumikalibrointien kalibrintisuorien selityksasteet sekä lasketut havaitsemis- ja määrittämissrajat

Yhdiste	Seerumikalibrointi			Liuotin kalibrointi		
	R^2	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	R^2	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
Testosteroni	0,9954	0,95	3,17	0,9992	0,34	1,13
Kortikosteroni	0,9939	0,81	2,72	0,9992	0,40	1,35

Menetelmän kokonaistarkkuus testosteronille on hyvä (Taulukko 9). QC-näytteiden pitoisuuden kasvaessa testosteronin tarkkuus laskee systemaattisesti, mutta lasku on niin vähäistä, ettei sillä ole merkittävää vaikutusta mittaustuloksiin. Kortikosteronille QC-näytteiden tarkkuudet puolestaan ovat systemaattisesti alle 100 %:n (Taulukko 9), joten mittaustulosten voidaan olettaa olevan noin 15–20 % todellista pienempiä. Tarkkuuksien jääminen systemaattisesti alle 100 prosentin viittaisi siihen, että kortikosteronin kalibrintisuoran kulmakerroin on liian suuri. Tämä selittäisi myös alhaisemmat LOD ja LOQ-arvot suhteessa testosteroniin (Taulukko 10). Työssä käytettiin samaa sisäistä standardia ($^{13}\text{C}_3$ -testosteroni) molemmille yhdisteille. Ottamalla kortikosteronille oman sisäisen standardin, jonka vaste vastaisi paremmin kortikosteronin vastetta, voisi korjata asian. Yksi tällainen yhdiste voisi olla esimerkiksi $^{13}\text{C}_3$ -kortikosteroni.

Kromatografiamassaspektrometrisillä menetelmillä saavutetaan yleisesti LOQ-taso ng/ml, kun taas immunomääritykseen perustuvilla menetelmillä päästään tasoon pg/ml (Taulukko 11). Työssä saadut LOQ-arvot ovat samaa suuruusluokkaa kirjallisuudessa esiintyneiden, vastaaventyypisillä menetelmillä saatujen arvojen kanssa, mutta kuitenkin selvästi suurempia. Tähän voivat olla syynä heikommin onnistunut kalibrointi, LOQ-arvojen erilaiset lasku- tai määrittämissrajat ja käytetyistä laitteistoista johtuvat erot. Työssä mitattujen koenäytteiden perusteella näyt-

tää siltä, että työn menetelmällä päästäisiin laskettuja selvästi alhaisempiin LOQ-tasoihin (Taulukko 12, Liite 1). Koenäytteiden rinnakkaismääritysten alhaiset hajonnat (pienet variaatioker-
toimet) viittaavat vielä hyvään määritettävyyteen.³⁰ Laskettujen LOQ-arvojen sijaan työssä ke-
hitetylle menetelmälle voisi ehkä mieluummin käyttää LLOQ-arvoja. Alempi määritysraja
(LLOQ) on alhaisimman standardiliuoksen pitoisuus, jonka intensiteetti on vähintään viisi ker-
taa nollanäytteen intensiteetti.³¹ Kortikosteronin tapauksessa se olisi 1,18 ng/ml (S/N = 12,5) ja
testosteronille 0,98 ng/ml (S/N = 39,1). Testosteronille päästäisiin vielä huomattavasti alhai-
sempaan LLOQ-arvoon.

Taulukko 11. Kortikosteronille ja testosteronille eri menetelmillä saatuja havaitsemis- ja mää-
ritysrajoja, V = näytetilavuus, Der. = derivatisointi, Läh. = lähde, NA = ei mainittu

Menetelmä	V (μ l)	LOD / LLOD		LOQ / LLOQ		Der.	Läh.
		Kortikos.	Testos.	Kortikos.	Testos.		
LC-ESI- QqQ	10	0,81 ng/ml	0,95 ng/ml	2,72 ng/ml	3,17 ng/ml	Ei	*
LC-ESI- QqQ	100	0,027 ng/ml	0,023 ng/ml	0,08 ng/ml	0,2 ng/ml	Ei	3
LC-ESI- QIT	10	0,5 ng/ml	0,012 ng/ml	0,5 ng/ml	0,012 ng/ml	Ei	7
LC-APCI- QIT	100	NA	NA	0,05 ng/ml	0,1 ng/ml	Ei	8
ELISA	200	NA	NA	7,3–18,1 pg/ml	4,93–9,65 pg/ml	Ei	6

* Tämä työ

Taulukko 12. Koenäytteiden testosteroni- ja kortikosteronipitoisuudet sekä niiden variaatioker-
toimet, n = rinnakkaismääritysten lukumäärä ja ND = ei saatu määritettyä

Näyte	n	Testosteroni		Kortikosteroni	
		Keskiarvo (ng/ml)	CV (%)	Keskiarvo (ng/ml)	CV (%)
Koiras 12	2	0*	–	1,46	4,4
Koiras 49	3	1,03	5,6	4,26	7,2
Naaras 7	3	ND	–	7,74	9,3
Naaras 28	3	ND	–	5,16	12

* Tulos kalibrointialueen ulkopuolella

Menetelmä voitaneen laajentaa myös muiden hormonien määrittämiseen. Gradienttiohjelmaa laventamalla ja ajo aikaa pidentämällä sillä saataneen määritettyä myös muita glukokortikoideja, mineralokortikoideja ja estrogeenejä.⁷ Lisäksi uusille määritettäville yhdisteille vaadittaneen spesifioidut CE-arvot ja saatetaan tarvita polarisaation kääntäminen negatiiviseksi. Erittäin pienissä pitoisuuksissa esiintyvien ja sähkösumutus-ionisaatiolla huonosti ionisoituvien yhdisteiden, kuten esimerkiksi joidenkin estrogeenien, kohdalla saatetaan tarvita derivatisointia.^{7,31}

Työssä optimoidulla menetelmällä saadaan määritettyä kvantitatiivisesti kortikosteroni ja testosteroni 10 mikrolitrasta linnun veriplasmaa ilman näytteiden derivatisointia suuruusluokassa ng/ml. Työn suurin haaste liittyi injektion onnistumiseen näytteen syötössä näytteiden ajotilavuuden ollessa vain 12 µl. Toinen huomionarvoinen asia oli kortikosteronin heikko ionisoituminen sähkösumutus-ionisaatiolla testosteroniin verrattuna, mutta siitä huolimatta sekin saadaan määritettyä suuruusluokassa ng/ml ilman näytteiden derivatisointia. Kehitetty menetelmä on nopea, yksinkertainen ja tehokas. Siinä ei muodostu radioaktiivista jätettä, kuten radioimmunomäärityksessä, ja alhaisen virtausnopeuden ja lyhyen ajoajan takia myös muodostuvan liuotinjätteen määrä on vähäinen. Menetelmällä ei kuitenkaan päästä ihan niin pieniin pitoisuuksiin kuin esimerkiksi ELISAlla (Taulukko 11).

Kirjallisuusluettelo

1. Foley, D. ja Calton, L., Analysis of Corticosteroids and Androgens in Serum for Clinical Research, *Appl. Note Waters Corp. Milford USA*, **2017**, 7.
2. Taborsky, B.; English, S.; Fawcett, T. W.; Kuijper, B.; Leimar, O.; McNamara, J. M.; Ruuskanen, S. ja Sandi, C., Towards an Evolutionary Theory of Stress Responses, *Trends Ecol. Evol.*, **2021**, 36, 39–48.
3. Liu, W.; Yuan, D.; Han, M.; Huang, J. ja Xie, Y., Development and validation of a sensitive LC-MS/MS method for simultaneous quantification of thirteen steroid hormones in human serum and its application to the study of type 2 diabetes mellitus, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2021**, 199, 114059.
4. Cockrem, J. F., Stress, corticosterone responses and avian personalities, *J. Ornithol.*, **2007**, 148, 169–178.
5. Koren, L.; Nakagawa, S.; Burke, T.; Soma, K. K.; Wynne-Edwards, K. E. ja Geffen, E., Non-breeding feather concentrations of testosterone, corticosterone and cortisol are associated with subsequent survival in wild house sparrows, *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, **2012**,

- 279, 1560–1566.
6. Fokidis, H. B.; Orchinik, M. ja Deviche, P., Context-specific territorial behavior in urban birds: No evidence for involvement of testosterone or corticosterone, *Horm. Behav.*, **2011**, *59*, 133–143.
 7. Nouri, M.-Z.; Kroll, K. J.; Webb, M. ja Denslow, N. D., Quantification of steroid hormones in low volume plasma and tissue homogenates of fish using LC-MS/MS, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **2020**, *296*, 113543.
 8. Koren, L.; Ng, E. S. M.; Soma, K. K. ja Wynne-Edwards, K. E., Sample Preparation and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for Multiple Steroids in Mammalian and Avian Circulation, *PLOS ONE*, **2012**, *7*, e32496.
 9. Harris, D. C. ja Lucy, C. A., *Quantitative chemical analysis*, Ninth edition, W. H. Freeman and Company, New York, USA, 2016.
 10. De Baere, S.; Rosendahl Larsen, T.; Devreese, M.; De Backer, P.; De Neve, L.; Fairhurst, G.; Lens, L. ja Croubels, S., Use of LC–MS–MS as an alternative to currently available immunoassay methods to quantitate corticosterone in egg yolk and albumen, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2015**, *407*, 4351–4362.
 11. Häkkinen, M. R.; Murtola, T.; Voutilainen, R.; Poutanen, M.; Linnanen, T.; Koskivuori, J.; Lakka, T.; Jääskeläinen, J. ja Auriola, S., Simultaneous analysis by LC–MS/MS of 22 ketosteroids with hydroxylamine derivatization and underivatized estradiol from human plasma, serum and prostate tissue, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2019**, *164*, 642–652.
 12. McDonald, J. G.; Matthew, S. ja Auchus, R. J., Steroid Profiling by Gas Chromatography–Mass Spectrometry and High Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry for Adrenal Diseases, *Horm. Cancer*, **2011**, *2*, 324–332.
 13. Grobler, P. ja Rsa, S.-A., *Basics of SPE Technology & Mechanisms*, 45.
 14. Kushnir, M. M.; Rockwood, A. L.; Roberts, W. L.; Yue, B.; Bergquist, J. ja Meikle, A. W., Liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of steroids in clinical laboratories, *Clin. Biochem.*, **2011**, *44*, 77–88.
 15. Wesley, S., *Basic Technology and Tools in Chemical Engineering Field*, University Publications, Delhi, India, 2012.
 16. VWR, SPE-opas, https://fi.vwr.com/cms/chromatography_solutions_spe_guide (28.11.2022).
 17. Thermo Fisher, Solid Phase Extraction Guide, <https://www.thermo-fisher.com/uk/en/home/industrial/chromatography/chromatography-sample-preparation/sample-preparation-consumables/solid-phase-extraction-consumables/spe-guide.html> (30.11.2022).
 18. Thermo Fisher, HyperSep™ Tip Microscale SPE Extraction Tips, 1-10µL, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/60109-201> (3.12.2022).

19. Kislik, V. S., *Solvent Extraction: Classical and Novel Approaches*, Elsevier, Oxford, UK, 2011.
20. Häkkinen, M. R.; Heinosalo, T.; Saarinen, N.; Linnanen, T.; Voutilainen, R.; Lakka, T.; Jääskeläinen, J.; Poutanen, M. ja Auriola, S., Analysis by LC–MS/MS of endogenous steroids from human serum, plasma, endometrium and endometriotic tissue, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2018**, *152*, 165–172.
21. Snaterse, G.; van Dessel, L. F.; Taylor, A. E.; Visser, J. A.; Arlt, W.; Lolkema, M. P. ja Hofland, J., Validation of circulating steroid hormone measurements across different matrices by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Steroids*, **2021**, *167*, 108800.
22. Li, H.; Sheng, L.-P.; Wang, B.; Yang, Z.-L. ja Liu, S.-Y., An Optimized Method for Corticosterone Analysis in Mouse Plasma by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Full-Scan High-Resolution Accurate Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. Sci.*, **2015**, *53*, 285–294.
23. Fanali, S.; Haddad, P. R.; Poole, C.; Riekkola, M.-L.; Fanali, S.; Haddad, P. R.; Poole, C. F. ja Riekkola, M.-L., *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*, Second edition, Elsevier, Saint Louis, USA, 2017.
24. de Hoffmann, E., Tandem mass spectrometry: A primer, *J. Mass Spectrom.*, **1996**, *31*, 129–137.
25. French, D., Advances in bioanalytical techniques to measure steroid hormones in serum, *Bioanalysis*, **2016**, *8*, 1203–1219.
26. Nielen, M.; Lasaroms, J. J. P.; Mulder, P. P. J.; Hende; Rhijn ja Groot, M. J., Multi residue screening of intact testosterone esters and boldenone undecylenate in bovine hair using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* *830 2006 1*, **2006**.
27. Kumar, N.; van Dam, A.; Permentier, H.; van Faassen, M.; Kema, I.; Gahr, M. ja Groot-huis, T. G. G., Avian yolk androgens are metabolized rather than taken up by the embryo during the first days of incubation, *J. Exp. Biol.*, **2019**, *222*, jeb193961.
28. European Medicines Agency, Guideline on Bioanalytical Method Validation, Guideline EMEA/CHMP/EWP/192217/2009, 21.7.2011, Committee for Medicinal Products for Human Use, 2011.
29. Mendes, V. M.; Coelho, M.; Tomé, A. R.; Cunha, R. A. ja Manadas, B., Validation of an LC-MS/MS Method for the Quantification of Caffeine and Theobromine Using Non-Matched Matrix Calibration Curve, *Molecules*, **2019**, *24*, 2863.
30. Ruuskanen, S., Suullinen tiedoksiinto, 2022.
31. Adomat, H. H.; Bains, O. S.; Lubieniecka, J. M.; Gleave, M. E.; Guns, E. S.; Grigliatti, T. A.; Reid, R. E. ja Riggs, K. W., Validation of a sequential extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for determination of dihydrotestosterone, androstanediol and androstanediol–glucuronide in prostate tissues, *J. Chromatogr. B*, **2012**,

902, 84–95.

Liitteet

- Liite 1. Työssä optimoidun menetelmän validoinnissa käytetyt mittaustulokset ja niistä lasketut arvot
- Liite 2. Menetelmän liuotin kalibroinnin mittaustulokset, niistä lasketut arvot sekä kalibrointisuorat

Sample			Testosterone Method		Testosterone Results				Corticosterone Method		Corticosterone Results			
Name	Type	Level	Exp. Conc. (ng/ml)	RT (min)	Resp.	Final Conc. (ng/ml)	Accuracy (%)	Exp. Conc. (ng/ml)	RT (min)	Resp.	Final Conc. (ng/ml)	Accuracy (%)		
Liutin-Blank	Blank													
Liutin-Std1	Cal	1	0,98	3,81755	1161,372688	0,999191236	101,9582893		1,18	3,229983333	309,384481	1,160288888	98,32956677	
Liutin-Std2,5	Cal	2	2,45	3,81755	2706,158334	2,390442961	97,56910046		2,95	3,229983333	772,5722039	2,940308937	99,6714894	
Liutin-Std5	Cal	3	4,9	3,81755	5294,265882	4,721322396	96,35351828		5,9	3,229983333	1507,059858	5,762928547	97,67675504	
Liutin-Std7,5	Cal	4	7,35	3,81755	8201,749536	7,339835625	99,86170919		8,85	3,229983333	2263,743786	8,670847943	97,97568298	
Liutin-Std10	Cal	5	9,8	3,81755	11319,49158	10,14770998	103,5480611		11,8	3,229983333	3186,47046	12,21686589	103,5327618	
Liutin-Std15	Cal	6	14,7	3,81755	16583,53072	14,8885642	101,2827496		17,7	3,229983333	4678,020327	17,94885864	101,405981	
Liutin-Std20	Cal	7	19,6	3,81755	21525,86573	19,33968797	98,67187739		23,6	3,229983333	6072,697006	23,30856989	98,76512667	

