



**TURUN  
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen  
tiedekunta

# Artemisiinin kvantitatiivinen LC-MS/MS-analytiikka

Siiri Suuronen

Kemia, luonnonyhdistekemian tutkimusryhmä

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

19.4.2024

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

**Pääaine:** Kemia

**Tekijä:** Siiri Suuronen

**Otsikko:** Artemisiinin kvantitatiivinen LC-MS/MS analytiikka

**Ohjaaja:** Juha-Pekka Salminen

**Sivumäärä:** 26 sivua

**Päivämäärä:** 19.4.2024

---

Artemisiini on kesämarunasta (*Artemisia annua*) alun perin eristetty seskviterpeenilaktoni. Erityisen kemiallisen rakenteensa vuoksi artemisiini on merkittävä ja tehokas lääkeaine malarian hoidossa. Sen lisäksi, että artemisiinilla on antimalaarinen vaikutus, on sillä havaittu olevan potentiaalia virus- ja syöpälääkkeenä. Artemisiinin pitoisuus kasvilla voi olla usein alhainen ja vaihteleva. Näiden syiden vuoksi on tärkeä pystyä määrittämään, missä marunalajissa tai kasvinosissa artemisiinipitoisuus on korkeimmillaan, jotta artemisiinia voitaisiin hyödyntää tehokkaasti.

Kasveissa esiintyvän alhaisen artemisiinipitoisuuden vuoksi näytteiden esikäsittely- ja analyysivaiheet pitää suunnitella huolellisesti. Esikäsittelyvaiheet pitävät usein sisällään uuton ja uutteen puhdistamisen, joiden avulla voidaan erottaa ja puhdistaa artemisiini muista komponenteista. Analyysivaiheessa artemisiinille suosittu menetelmäkokonaisuus on ollut nestekromatografia (LC) yhdistettynä tandemmassaspektrometriaan (MS/MS). LC-menetelmistä erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia (UHPLC) on osoittautunut varteenotettavaksi vaihtoehdoksi perinteisimmille menetelmille. Massaspektrometriassa kolmoiskvadrupolimassaspektrometria (QqQ-MS) ja usean reaktion seuraaminen (Multiple Reaction Monitoring, MRM) on mahdollistanut artemisiinin selektiivisen kvantitoinnin.

Luotettavan kvantitatiivisen tuloksen saamiseksi käytetään isotooppileimattua sisäistä standardia (IS) ja sen avulla muodostettua kalibraatiokäyrää. IS:n avulla voidaan korjata näytteenvalmistuksessa mahdollisesti syntyneet häviöt, ja kalibraatiokäyrältä voidaan määrittää artemisiinin pitoisuus, joka on suoraan verrannollinen artemisiinin ja IS:n vasteiden suhteeseen.

---

**Avainsanat:** artemisiini, kromatografia, luonnonyhdisteet, massaspektrometria, näytteen esikäsittely

# Sisällysluettelo

<b>1</b>	<b>Johdanto</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Artemisiini</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Menetelmien validointi ja sisäinen standardi</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>Erilaiset uuttomenetelmät</b>	<b>5</b>
4.1	Artemisiinin uuttaminen kasvista perinteisellä tavalla	5
4.2	SFE ja MAE – potentiaaliset uuttomenetelmät artemisiinille	5
<b>5</b>	<b>Näytteen puhdistus</b>	<b>7</b>
5.1	Neste-nesteuutto (LLE)	7
5.2	Kiinteäfaasiuutto (SPE)	8
5.3	MIPit sorbenteina SPE:ssä	10
5.4	MEPS – Pienennetty versio perinteisestä kiinteäfaasiuutosta	12
<b>6</b>	<b>Analysointi LC-MS/MS:llä</b>	<b>13</b>
6.1	UHPLC – artemisiinin erottaminen nestekromatografisesti	13
6.2	QqQ-MS – artemisiinin analysointi massaspektrometrisesti	16
6.3	Artemisiinin kvantitointi	19
<b>7</b>	<b>Johtopäätökset</b>	<b>21</b>
	<b>Lähteet</b>	<b>23</b>

## LYHENTEET

ESI	sähkösumutus-ionisaatio (engl. electrospray ionization)
IS	sisäinen standardi (engl. internal standard)
LC-MS/MS	nestekromatografia tandem massaspektrometria (engl. liquid chromatography tandem mass spectrometry)
LLE	neste-nesteuutto (engl. liquid-liquid extraction)
LOD	toteamisraja (engl. limit of detection)
LOQ	määrittämisraja (engl. limit of quantification)
MAE	mikroaaltoavusteinen uutto (engl. microwave-assisted extraction)
MEPS	mikrouutto pakatulla sorbentilla (engl. microextraction by packed sorbent)
MIP	molekyylimuottipolymeerit (engl. molecular imprinted polymers)
MRM	usean reaktion seuraaminen (engl. multiple reaction monitoring)
QqQ-MS	kolmoiskvadrupolimassaspektrometria (engl. triple quadrupole mass spectrometry)
RSD	suhteellinen keskihajonta (engl. relative standard deviation)
SFE	ylikriittinen uutto (engl. supercritical fluid extraction)
SPE	kiinteäfaasiuutto (engl. solid-phase extraction)
SRM	valitun reaktion seuraaminen (engl. selected reaction monitoring)
UHPLC	erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia (engl. ultrahigh performance liquid chromatography)

## 1 Johdanto

Artemisiini on malarian hoitoon käytettävä lääkeaine, joka on alun perin eristetty kesämarunasta (*Artemisia annua*). Sen pitoisuuden on osoitettu olevan melko alhainen ja vaihteleva *Artemisia* -lajeissa (Dahnum et al., 2012; Numonov et al., 2019). Kemiallisesti artemisiini on seskviterpeenilaktoni, joka on terpenoideihin kuuluva erikoistunut (sekundääri) metaboliitti (Chang, 2016). Kolmen isopreeniyksikön lisäksi artemisiinin rakenteessa on laktoni- ja trioksaanirengas. Trioksaanirenkaassa sijaitsee peroksidisilta, joka on vastuussa molekyylin antimalaarisesta vaikutuksesta (de Vries & Dien, 1996).

Alhaisen artemisiinipitoisuuden takia näytteen esikäsittelyvaiheiden suorittaminen ja huolellinen suunnittelu on kannattavaa. Näytteen esikäsittelyvaiheet pitävät sisällään uuton sekä näytteen puhdistuksen, joiden tarkoituksena on erottaa artemisiini muista näytteessä olevista komponenteista (Babacan et al., 2022; Liu et al., 2011). Etenkin näytteen puhdistus on kannattavaa tehdä, kun kohdeyhdisteen pitoisuus on alhainen tutkittavassa näytteessä (Camel, 2003).

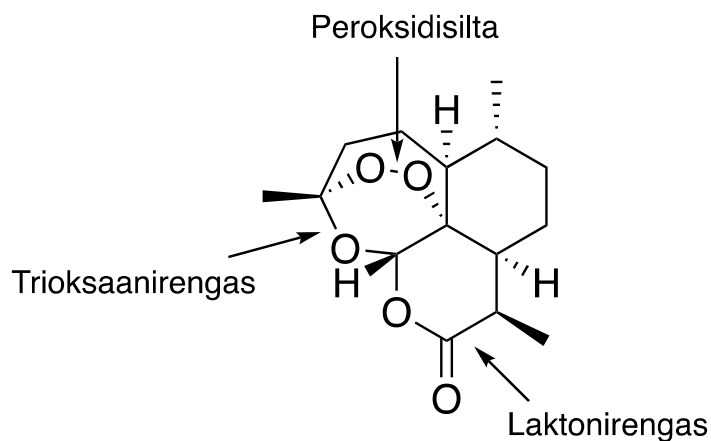
Artemisiini voidaan analysoida kvantitatiivisesti käyttämällä nestekromatografia-tandemmassaspektrometriaa (engl. liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, LC-MS/MS). Artemisiinin erottaminen nestekromatografisesti tapahtuu pääasiassa käänteisfaasikromatografialla käyttäen kolonnimateriaalina C18 (Jessing et al., 2011; Protti et al., 2019; Singh et al., 2021). HPLC eli korkean erotuskyvyn nestekromatografia (engl. high performance liquid chromatography) on perinteinen menetelmä artemisiinin erottamiseen muista näytteessä olevista komponenteista (Li et al., 2008). UHPLC eli erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia (engl. ultrahigh performance liquid chromatography) on kuitenkin noussut varteenotettavaksi vaihtoehdoksi artemisiinin analysoimiseen nopeutensa ja tehokkuutensa takia (Li et al., 2008; Swetha Sri et al., 2020). Massaspektrometria käytetään usein detektorina artemisiinin kvantitoinnissa, sillä se mahdollistaa yhdisteen analysoinnin monimutkaisista matriiseista (Jessing et al., 2011). Usean reaktion seuraaminen (engl. multiple reaction monitoring, MRM) kolmoiskvadrupolia käyttäen on puolestaan mahdollistanut artemisiinin kvantitoinnin eri *Artemisia* -lajeista (Singh et al., 2021). Menetelmä perustuu tiettyjen prekursori/tuoteioni -parien analysointiin. Lopullisen artemisiinipitoisuuden määrittämiseen käytetään sisäistä standardia (engl. internal standard, IS) ja sen avulla muodostettua kalibraatiokäyrää (Pitt, 2009).

Tutkielman tarkoituksena on käsitellä artemisiinia sisältävän näytteen esikäsittelyvaiheita, analysointia ja pitoisuuden määrittämistä LC-MS/MS:llä. Eri vaiheiden tehokkuutta ja luotettavuutta on arvioitu validoinnissa käytettävien parametrien ja sisäisen standardin avulla. Artemisiinin alhaisen ja vaihtelevan pitoisuuden takia on toivottavaa, että esikäsittely- ja analyysivaiheet ovat tehokkaita, toistettavia ja antavat luotettavia tuloksia. Vaihtelevan pitoisuuden takia on tärkeä myös pyrkiä

määrittämään, missä marunalajeissa ja kasvin osissa artemisiinipitoisuus on korkein, jotta yhdistettä voidaan käyttää tehokkaasti lääkeaineena malarian ja muiden tautien hoidossa.

## 2 Artemisiini

Artemisiini on seskviterpeenilaktoni, joka on terpenoideihin kuuluva sekundäärimetaboliitti (Christen & Veuthey, 2001). Sekundäärimetaboliitit, toiselta nimeltään erikoistuneet metaboliitit, ovat kasvien tuottamia yhdisteitä, joiden tehtävä on edistää esimerkiksi kasvin selviytymismahdollisuuksia. Terpenoidit rakentuvat terpeenien tapaan isopreeniyksiköistä, jotka muodostuvat viiden hiiliatomin ketjusta. Näiden lisäksi terpenoideissa esiintyy muita funktionaalisia ryhmiä, jotka voivat sisältää esimerkiksi happea. Artemisiini rakentuu kolmesta isopreeniyksiköstä ja happea sisältävästä laktonirenkaasta (Chang, 2016). Lisäksi rakenteessa on trioksaanirengas, jossa on molekyylin aktiivinen osa eli peroksidisilta (kuva 1) (de Vries & Dien, 1996). Artemisiinin molekyylikaava on  $C_{15}H_{22}O_5$  ja tätä vastaava molekyylipaino on 282 Da.



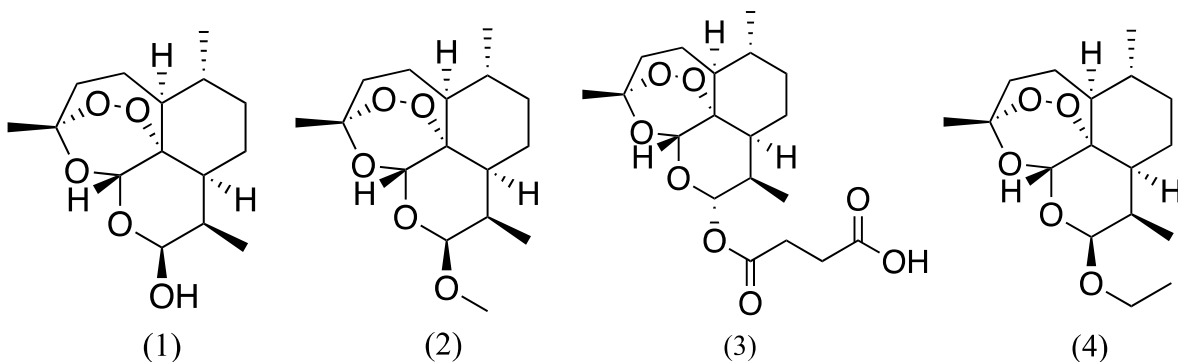
**Kuva 1.** Artemisiinin rakennekaava.

Artemisiini on alun perin löydetty kesämarunasta (*Artemisia annua*), jossa se esiintyy pääasiassa kasvin maanpäällisissä osissa. Kasvi kuuluu asterikasvien (Asteraceae) heimoon ja se on lähtöisin Aasiasta, jossa sillä on pitkä käyttöhistoria kiinalaisessa lääketieteessä (Christen & Veuthey, 2001). *Artemisia annua*ssa artemisiinipitoisuuden on havaittu olevan 0,01–1,4 % kuivien lehtien painosta (Dahnum et al., 2012). Muissa *Artemisia* -lajeissa artemisiinipitoisuus on ollut 0,0005–1,38 % (Numonov et al., 2019).

Erityisen kemiallisen rakenteensa takia artemisiini on merkittävä ja tehokas lääkeaine malarian hoidossa (Dahnum et al., 2012). Malaria on kuolemia aiheuttava loistauti, jonka aiheuttaa Plasmodium-sukuun kuuluva yksisolainen alkueläinparasiitti, joka leviää hyttysen kautta (Chang, 2016). Artemisiinin on havaittu olevan tehokas Plasmodium falciparum ja P. vivax kantoja vastaan (Christen & Veuthey, 2001). Tämän lisäksi artemisiinilla on havaittu olevan potentiaalia muidenkin tautien hoidossa (Protti et al., 2019).

Malarian torjumisessa on ollut haasteita, koska käytettyjä malarialääkkeitä kohtaan on syntynyt resistenssejä loiskantoja. Esimerkiksi kiniiniä käytettiin 1920-luvulle ja sen johdannaista klorokiinia 1960-luvulle asti tehokkaina malarialäkkeinä, kunnes niitä vastaan alkoi ilmestyä resistenttejä kantoja (Chang, 2016). Kliinisissä tutkimuksissa havaittiin kuitenkin *Artemisia annua* uutteen alentavan malariapotilaiden oireita tehokkaammin sekä loisten määrää veressä kuin klorokiini. *Artemisia annua* uutteen teho perustui sen aktiivisena komponenttina toimivaan artemisiiniin (Tu, 2011).

Artemisiinin antimalaarinen vaikutus perustuu sen rakenteessa olevaan peroksidiryhmään, jonka takia se on haluttu säilyttää myös artemisiinin johdannaisten rakenteessa (Chang, 2016). Nämä johdannaiset ovat dihydroartemisiini, artemeetteri, artesunaatti ja arteetteri (kuva 2) (de Vries & Dien, 1996). Artemisiinin huono vesiliukoisuus ja lyhyt eliminaation puoliintumisaika ovat syitä, jotka ovat johtaneet artemisiinin johdannaisten tutkimiseen ja käyttämiseen malarian hoidossa (de Vries & Dien, 1996). Artemisiinin johdannaisten lisäksi malarianhoidossa on käytetty artemisiiniyhdistelmähoitoa (engl. artemisinin-combination therapy, ACT), jossa yhdistetään malarialääkkeitä, joilla on lyhyt ja pitkä puoliintumisaika (Chang, 2016).



**Kuva 2.** Artemisiinin johdannaisten rakennekaavat (1) dihydroartemisiini, (2) artemeetteri, (3) artesunaatti ja (4) arteetteri.

### 3 Menetelmien validointi ja sisäinen standardi

Yhdisteiden pitoisuuden määrittäminen perustuu kvantitatiiviseen analytiikkaan. Artemisiinin tapauksessa pitoisuuden määrittäminen antaa tärkeää tietoa, esimerkiksi siitä, missä kasvin osissa, kasvupaikassa ja *Artemisia* -lajeissa artemisiinipitoisuus on korkein (Qiu et al., 2018; Singh et al., 2021; Wang et al., 2011). Nämä tiedot edistävät artemisiinin tehokasta käyttämistä lääkeaineena.

Jotta voidaan varmistua siitä, että artemisiinipitoisuuden määrittämiseen käytettävät analyysilaitteet antavat luotettavia tuloksia, tulee analyysimenetelmän antaa kvantitatiivinen tulos hyväksytyllä epävarmuustasolla. Mittaustuloksien epävarmuutta ja menetelmien luotettavuutta voidaan arvioida validoinnin avulla. Monivaiheisille prosesseille voidaan suorittaa myös

modulaarista validointia, joka mahdollistaa analyysiprosessin eri vaiheiden erillisen validoinnin ja varmistaa koko analyysiprosessin olevan luotettava (Taverniers et al., 2004).

Validoinnissa tutkittavia mittausten menetelmän suorituskykyä ilmaisevia parametrejä on useita (Taverniers et al., 2004). Lineaarisuus, tarkkuus, toistettavuus, saanto, toteamis- ja määrittämissrajat ovat parametrejä, jotka otetaan usein huomioon artemisiinille käytettävien menetelmien validoinnissa (Protti et al., 2019; Singh et al., 2021; Xing et al., 2006). Saanto viittaa siihen, kuinka hyvin analyysimenetelmä havaitsee tutkittavan kohdeyhdisteen kokonaismäärän näytteestä (Ehder, 2005). Toistettavuus kuvaa sitä, kuinka lähellä yksittäiset mittaukset ovat toisiaan ja sitä voidaan kuvata RSD-arvolla (engl. relative standard deviation) (Ehder, 2005; Taverniers et al., 2004). Tarkkuus kertoo, kuinka lähellä mitatut arvot ovat todellisia arvoja. Lineaarisuus kuvaa analyysimenetelmän kykyä antaa tuloksia, jotka ovat suhteessa kohdeyhdisteen pitoisuuteen. Toteamisraja, eli LOD (engl. limit of detection), on kohdeyhdisteen pienin pitoisuus, joka voidaan havaita luotettavasti. Määrittämissraja, eli LOQ (engl. limit of quantification), on kohdeyhdisteen pienin pitoisuus, joka voidaan mitata luotettavasti (Ehder, 2005). Nämä parametrit on otettu huomioon myös tässä tutkielmassa artemisiinin kvantitatiivisen tuloksen saamiseksi.

Tulosten luotettavuus voidaan varmistaa käyttämällä sisäistä standardia (engl. internal standard, IS). IS on yhdiste, jota lisätään näytteisiin tietty määrä ja se voi olla mukana analyysiin kaikissa vaiheissa, näytteenvalmistuksesta itse analyysiin (Wieling, 2002). Artemisiinillä IS on ollut mukana näytteenvalmistuksesta lopulliseen analyysiin asti sekä joissakin tilanteissa se on lisätty juuri ennen analyysia (Jessing et al., 2011; Protti et al., 2019). Sen lisäksi, että IS auttaa parantamaan tulosten luotettavuutta, sillä voidaan korjata näytteenvalmistusprosesseissa syntyneet kohdeyhdisteen häviöt. Tämä on mahdollista, sillä kohdeyhdisteen ja IS:n välinen suhde pysyy aina samana (Pitt, 2009). Jotta voidaan kompensoida kohdeyhdisteen häviöitä, tulee IS:n olla mahdollisimman samankaltainen kuin kohdeyhdiste, mutta erota kemiallisesti merkityksettömillä muutoksilla. Näin voidaan varmistaa, että IS ja kohdeyhdiste käyttäytyvät samankaltaisesti näytteenvalmistuksessa ja analyysissä (Wieling, 2002). IS:n käyttäminen helpottaa validointiprosessia ja mahdollistaa tarkan kvantitatiivisen analyysin.

Ideaalinen IS on stabiili isotooppisesti leimattu yhdiste, joka eroaa kohdeyhdisteestä vähintään kolmen massayksikön verran (Wieling, 2002; Zhou et al., 2017). Atomit korvataan vakailta isotoopeilla, kuten  $^2\text{H}$  (D),  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  tai  $^{17}\text{O}/^{18}\text{O}$ , jolloin yhdiste eroaa kohdeyhdisteestä isotooppikoostumukseltaan (Zhou et al., 2017). Esimerkiksi artemisiinille on käytetty artemisiini-D3 vetyisotooppia, jonka molekyylipaino on 285,35 Da (Protti et al., 2019). Koska stabiileja isotooppeja ei ole aina kuitenkaan saatavilla, käytetään IS:nä myös rakenteellisia analogeja, eli yhdisteitä, joilla on samanlainen rakenne, mutta pieni ero funktionaalisissa ryhmissä (Wieling, 2002). Artemisiinille on käytetty usein sen johdannaisia (kuva 2) IS:nä (Jessing et al., 2011; Li et al., 2008).

## 4 Erilaiset uuttomenetelmät

Artemisiinin uuttaminen kasvista on ensimmäinen merkittävä vaihe näytteenkäsittelyprosessia. Uutto on erotusmenetelmä, jolla voidaan erottaa haluttu yhdiste näytteestä, kuten kasvimateriaalista, liukoisuusominaisuuksien perusteella. Kasvissa olevan alhaisen artemisiinipitoisuuden takia on tärkeä suorittaa tehokas uuttovaihe, koska sillä voidaan lisätä sekä artemisiinin saantoa että puhtautta (Babacan et al., 2022).

### 4.1 Artemisiinin uuttaminen kasvista perinteisellä tavalla

Artemisiinille käytettävät uuttoliottimet ovat usein hiilivetytypohjaisia johtuen artemisiinin heikosta vesiliukoisuudesta. Yleisin käytetty uuttoliuotin artemisiinille on *n*-heksaani, mutta esimerkiksi petrolieetteriä, etanolia ja tolueenia on myös käytetty (Nahar et al., 2020). Artemisiinin liukoisuutta on vertailtu laajemmin erilaisiin uuttoliuottimiin, joiden erot perustuvat polaarisuuteen. Babacan et al. (2022) osoittivat artemisiinin liukoisuuden olevan lähes sama etanoliin, dikloorimetaniin, *n*-propanoliin, 2-propanoliin, asetonitriiliin, *n*-heksaaniin ja sykloheksaaniin. Artemisiinin liukoisuus veteen oli kuitenkin heikko johtuen veden polaarisuudesta. Artemisiini liukenee paremmin liuottimiin, jotka ovat vähemmän polaarisia tai polaarittomia, kuten *n*-heksaani. Näiden artemisiinille usein käytettyjen uuttoliuottimien huono puoli on kuitenkin se, että ne eivät ole ympäristöystävällisiä ja niillä on alhainen selektiivisyys (Babacan et al., 2022).

Perinteinen tapa erottaa artemisiini *Artemisia annuasta* on liuottaa tai sekoittaa kasvimateriaalia uuttoliuottimessa (Nahar et al., 2020). Tarkemmin sanottuna menetelmä, jota kasville käytetään artemisiinin erottamiseksi on kiinteä-nesteuutto (engl. solid-liquid extraction), josta yksi esimerkki on Soxhlet-uutto (Christen & Veuthey, 2001). Alhaisen artemisiinipitoisuuden vuoksi uuttosaannon lisäämiseksi on käytetty kohonnutta lämpötilaa ja refluksointia 10–48 tunnin ajan (Nahar et al., 2020). Yksi ongelma artemisiinin perinteisessä uuttamisessa *Artemisia annuasta* on kuitenkin pitkät uuttamisajat (Christen & Veuthey, 2001; Nahar et al., 2020). Tehokkaamman uuttamisen ja vähemmän myrkyllisten liuottimien käyttämiseksi artemisiinille on kehitetty käyttökelpoisempia ja ympäristöystävällisempiä uuttomenetelmiä, joita käydään läpi seuraavassa luvussa.

### 4.2 SFE ja MAE – potentiaaliset uuttomenetelmät artemisiinille

Uuttotekniikat, jotka käyttävät vähemmän orgaanisia liuottimia, ovat nousseet perinteisten menetelmien rinnalle hyvien uuttosaantojen ja nopeampien uuttoaikojen takia (Christen & Veuthey, 2001). Ylikriittinen uutto (engl. supercritical fluid extraction, SFE) on yksi esimerkki tällaisesta uuttomenetelmästä artemisiinille (Kohler et al., 1997a, 1997b; Rodrigues et al., 2019). Menetelmä perustuu siihen, että liuottimen painetta ja lämpötilaa säädetään niin, että ne ylittävät kriittisen

paineen ja lämpötilan eli kriittisen pisteen. Fluidi kulkee näytematriisin läpi liuottaen uutettavan materiaalin, jonka jälkeen fluidi laajenee ja saadaan liuotinvapaa uute (Rodrigues et al., 2019). Artemisiinille ylikriittisenä fluidina on käytetty pääasiassa hiilidioksidia (CO<sub>2</sub>), jonka etuna on myrkyttömyys, saatavuus, alhaiset kustannukset ja säädettävät liuotinominaisuudet (Ciftci et al., 2018; Kohler et al., 1997b). Lisäksi hiilidioksidilla on kohtalainen kriittinen lämpötila (31,1 °C) ja paine (7,4 MPa) (Ciftci et al., 2018). SFE:llä voidaan tehostaa artemisiinin saantoa *Artemisia annuasta* muuttamalla painetta, lämpötilaa ja apuliuottimien määrää (Rodrigues et al., 2019). Apuliuottimia, kuten metanolia ja etanolia, voidaan lisätä pieniä määriä varsinaiseen liuottimeen tarkoituksena lisätä huonosti liukenevan yhdisteen liukoisuutta (Nahar et al., 2020).

Mikroaaltoavusteinen uutto (engl. microwave-assisted extraction, MAE) on uuttomenetelmä, jota on myös käytetty artemisiinin uuttamiseen *Artemisia annuasta*. Menetelmässä yhdistyy perinteinen liuotinuutto ja mikroaallot (Hao et al., 2002). Mikroaaltoavusteisen uutun yksi tunnusomainen piirre on sen lyhyt uuttoaika, joka johtuu siitä, että liuottimen kiehumispiste saavutetaan nopeasti. Tehokas lämmitys ja täten nopea kiehumispisteen saavuttaminen johtuvat siitä, että mikroaaltosäteily kohdistuu suoraan näytteeseen. Toistettavuus ja homogeenisyys lisääntyvät myös tehokkaan lämmityksen seurauksena. Menetelmän selektiivisyyttä voidaan parantaa käytettävällä liuottimella. Artemisiinin kohdalla on havaittu, että *n*-heksaani uuttaa kyseistä yhdistettä selektiivisemmin kuin etanoli ja tolueenia (Christen & Veuthey, 2001).

Hao et al. (2002) vertailivat artemisiinin uuttamista *Artemisia annuasta* perinteisellä Soxhlet-uutolla, SC-CO<sub>2</sub>:lla ja MAE:lla. Tulokset osoittavat, että nopein ja tehokkain uuttomenetelmä *Artemisia annuan* uuttamiseen on MAE, jolla artemisiinin saanto oli 92,1 % 12 minuutissa. Soxhlet-uutolla saanto oli 75,2 % 12 tunnissa, kun taas 6 tunnissa saanto oli 60,4 %. SC-CO<sub>2</sub>:lla saatiin heikoin saanto, joka oli 30,8 % 2,5 tunnissa ja 33,2 % kahdessa tunnissa (Hao et al., 2002).

Kun SFE- ja kiinteä-nesteuutto-menetelmän toistettavuutta on vertailtu artemisiinin uuttamiseksi, on SFE:llä saatu RSD-arvo 7,1 %, kun taas kiinteä-nesteuutolla 7,5 %. SFE:ssä liuottimena käytiin ylikriittistä CO<sub>2</sub>:sta ja 3 % metanolia, ja kiinteä-nesteuutossa tolueenia. Pienemmän RSD-arvon lisäksi SFE:n on havaittu uuttavan artemisiinia selektiivisemmin ja estävän paremmin artemisiinin hajoamisen riskin kuin perinteinen kiinteä-nesteuutto (Kohler et al., 1997a).

Kun SFE:ssä on käytetty ylikriittistä CO<sub>2</sub>:sta ja apuliuottimena 3 % etanolia, on artemisiinin saannoksi saatu kolmessa eri erässä 0,88, 0,99 ja 1,49 %. Kun taas kiinteä-nesteuutolla vastaavat arvot ovat 0,82, 0,92 ja 1,14 % (Kohler et al., 1997b). Tässä tapauksessa saanto on laskettu jakamalla artemisiinin saanto koko raaka-aineen määrällä (Hao et al., 2002). Kun vertaillaan menetelmien toistettavuutta, havaitaan kiinteä-nesteuutolla olevan hieman pienemmät RSD-arvot jokaisessa erässä kuin SFE:llä (Kohler et al., 1997b).

Esitettyjen tuloksien perusteella voidaan päätellä, että MAE vaikuttaa nopeimmalta ja tehokkaimmalta uuttomenetelmältä artemisiinin uuttamiseen *Artemisia annuasta*. Perinteisen Soxhlet-uuton ongelmana on pitkät uuttoajat ja hiilivetyliuottimien suuri kulutus. Menetelmän etuna on kuitenkin hyvät uuttoaannot sekä edullisuus. SFE on potentiaalinen vaihtoehto artemisiinin uuttamiseen, mutta sillä ei saavuteta yhtä hyviä saantoja kuin MAE:lla. SFE uuttoaika on kuitenkin lyhyempi kuin Soxhlet-uutossa ja se käyttää vain vähäisiä määriä apuliottimia menetelmän tehostamiseen.

## 5 Näytteen puhdistus

Kasvilääkevalmisteiden, kuten artemisiinin, näytteenvalmistuksessa seuraava vaihe uuttoa jälkeen on näytteen puhdistus, jolla voidaan erottaa näytteessä olevat epäpuhtaudet kohdeyhdisteestä (Liu et al., 2011). Näytteen puhdistusta ja esikonsentroitua vaaditaan usein tilanteissa, joissa kohdeyhdisteen pitoisuus on alhainen tutkittavassa näytteessä, kuten artemisiinin tapauksessa (Camel, 2003). Lisäksi *Artemisia annua* -kasvia uuttaessa useat kemialliset yhdisteet uuttuvat samanaikaisesti artemisiinin kanssa. Näillä kemiallisilla yhdisteillä tarkoitetaan usein klorofylliä, eterisiä öljyjä ja vahoja, jotka ovat uutteissa olevia epäpuhtauksia. Näistä epäpuhtauksista klorofylliä esiintyy suurimpia määriä uutteissa, koska se liukenee hyvin käytettyihin uuttoliuottimiin (Babacan et al., 2022).

Näytteenpuhdistamisella voidaan vähentää matriisivaikutusta, joka on häiritsevä tekijä kvantitatiivisissa LC-MS-analyysissä johtuen negatiivisesta vaikutuksesta menetelmän herkkyyteen, toistettavuuteen sekä tarkkuuteen (Zhou et al., 2017). Matriisivaikutuksessa on kyse siitä, että analysoitavassa näytteessä on muita komponentteja, jotka eluoituvat kohdeyhdisteen kanssa samanaikaisesti, ja näin häiritsevät kohdeyhdisteen havaitsemista (Dams et al., 2003). Tämä voi johtaa ionisuppressioon monimutkaisissa matriiseissa, mikä on yleinen ongelma sähkösumutus-ionisaatio-massaspektrometriassa (Moein et al., 2015). Puhdistamalla näytettä voidaan kuitenkin erottaa näytteestä kohdeyhdisteen kanssa samanaikaisesti eluoituvat yhdisteet ja näin helpottaa kohdeyhdisteen havaitsemista (Zhou et al., 2017).

### 5.1 Neste-nesteuutto (LLE)

Neste-nesteuutto eli LLE (engl. liquid-liquid extraction) on näytteen esikäsittelymenetelmä, jossa on kaksi toisiinsa sekoittumatonta nestefaasia, joiden välille näytteessä olevat yhdisteet jakautuvat. Menetelmä perustuu näytteessä olevien yhdisteiden liukoisuus- ja polaarisuuseroihin kahden nestefaasin välillä (Camel, 2003). Tutkittavaa näytettä käsitellään peräkkäisillä tilavuuksilla valittua liuotinta tai liuottimia, joiden polariteetti kasvaa vaiheittain. Tämän seurauksena kohdeyhdiste saadaan eri uutefraktioon kuin muut komponentit (Filippou et al., 2017). Esimerkiksi Dahnum et al. (2012) käyttivät heksaania, etyyliasettaattia ja metanolia artemisiinin erottamiseen *Artemisia*

*annuasta*. Heksaani muodostaa ei-polaarisen fraktion, etyyliasettaatti puolipolaarisen ja metanoli polaarisen. Uuttotesteissä havaittiin, että artemisiinia esiintyy pääasiassa ei-polaarisissa heksaanuutteissa, kun taas polaarisisa uutteissa sitä ei juurikaan havaittu (Dahnum et al., 2012).

Celeghini et al. (2006) puhdistivat artemisiinia *Artemisia annuasta* LLE-menetelmällä käyttäen 10 %:sta lyijyasetaattia. Kolmessa eri konsentraatiossa saadut RSD-arvot olivat 3,98 % (600 µg/ml), 2,35 % (1000 µg/ml) ja 5,89 % (1400 µg/ml) (Celeghini et al., 2006). Tulokset viittaavat siihen, että konsentraation ollessa 1000 µg/ml saavutetaan pienin RSD-arvo.

Artemisiinin puhdistamista ihmisen seerumista on tutkittu myös käyttämällä liuottimena *n*-heksaania. Artemisiinin saannoksi saatiin 94,2 % ja lisäksi menetelmä mahdollisti artemisiinin herkän ja selektiivisen määrityksen seerumista (Amponsaa-Karikari et al., 2006). Puolestaan, kun artemisiinia on erotettu tuoreverestä käyttämällä heksaania liuottimena, saatiin keskiarvoksi saannosta 81,6 % ja RSD:stä 10,3 % (Mount et al., 1995). Saadut tulokset viittaavat siihen, että käyttämällä heksaania liuottimena saadaan hyviä saantoja artemisiinille, koska se liukenee hyvin polaarittomiin hiilivetyperustaisiin liuottimiin. Toisaalta lyijyasetaatilla saavutetaan pienempi RSD-arvo, joka on suotavaa menetelmän toistettavuuden kannalta.

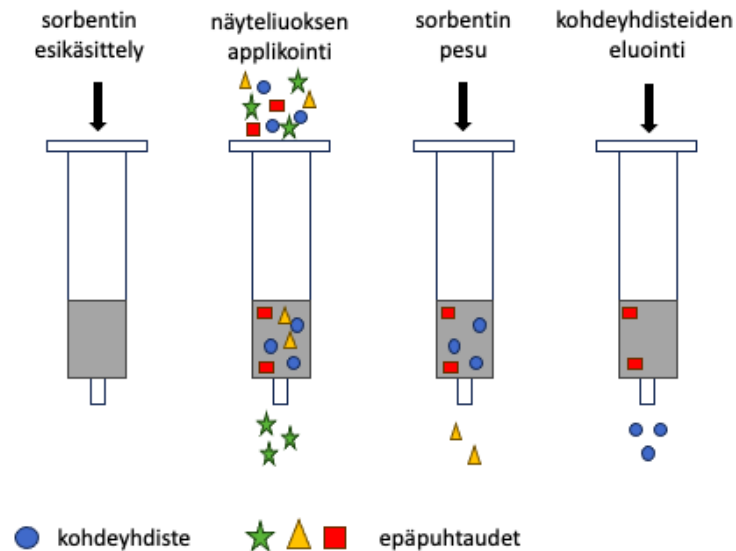
Vaikka neste-nesteuutto soveltuu hyvin epäpuhtauksien poistoon artemisiinista, käytetään siinä suuria määriä orgaanisia liuottimia (Liu et al., 2011). Menetelmässä on myös mahdollisuus näytteen kontaminaatioon sekä kohdeyhdisteen häviämiseen, jonka takia se voi vaikeuttaa artemisiinin tarkkaa analysointia ja heikentää menetelmän kvantitatiivisuutta (Filippou et al., 2017).

## 5.2 Kiinteäfaasiuutto (SPE)

Kiinteäfaasiuutto eli SPE (engl. solid-phase extraction) on yleinen ja tehokas esikäsitelymenetelmä näytteen valmisteluun ja esikonsentroidiin. Menetelmä perustuu kohdeyhdisteen siirtymiseen nestefaasista kiinteäfaasin aktiivisiin kohtiin (Bilici, 2020). Nestefaasi eli näytematriisi, sisältää kohdeyhdisteen toimien liikkuvana faasina, ja kiinteäfaasi eli sorbentti sitoutuu kohdeyhdisteeseen toimien stationäärifaasina (Camel, 2003). Sitoutuminen perustuu siihen, että kohdeyhdisteellä on korkeampi affiniteetti sorbenttia kohtaan kuin muilla näytteessä olevilla yhdisteillä. Menetelmällä voidaan poistaa suuri osa näytematriisia, minkä seurauksena analyysin suorittaminen helpottuu (Badawy et al., 2022).

SPE-menetelmä suoritetaan kuvassa 3 esitetyllä tavalla. Ensimmäisessä vaiheessa sorbentti aktivoidaan ja tasapainotetaan sopivilla liuottimilla (Camel, 2003). Artemisiinin tapauksessa aktivoinnissa voidaan käyttää esimerkiksi metanolia ja tasapainotuksessa vettä (Jessing et al., 2011). Seuraavassa vaiheessa näyte ladataan patruunaan sopivalla virtausnopeudella. Kolmas vaihe on pesu, jonka tarkoituksena on huuhdella latausvaiheessa sorbenttimateriaaliin tarttumatta jääneet epäpuhtaudet. Viimeisessä vaiheessa kohdeyhdisteet eluoidaan patruunasta sopivalla liuottimella.

Eluutiassa käytettävällä liuottimella tulisi olla vahvempi affiniteetti kohdeyhdisteeseen, jotta sen vuorovaikutus katkeaa sorbentin kanssa (Camel, 2003). Artemisiinin kohdalla eluenttina on käytetty esimerkiksi asetonitriiliä (Jessing et al., 2011). Kohdeyhdisteen kvantitatiiviseen saantoon voidaan myös vaikuttaa säätämällä eluenttien tilavuutta niin, että vältetään näytteen laimentumista (Camel, 2003).



**Kuva 3.** Kiinteäfaasiuuton (SPE) vaiheet. Mukailtu lähteestä (Camel, 2003).

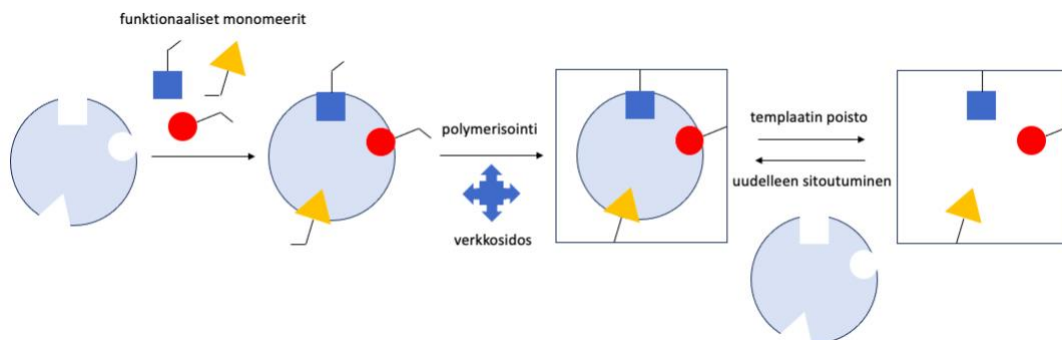
Sorbenttimateriaalilla voidaan vaikuttaa kohdeyhdisteen pysyvyyteen patruunassa. Jessing et al. (2011) ovat testanneet artemisiinin pysyvyyttä neljällä Oasis-patruunalla, jotka sisältävät eri sorbenttimateriaalia. Testatut patruunat olivat WCX, MAX, WAX ja MCX, joista parhaimmaksi osoittautui MCX. Samassa tutkimuksessa artemisiinin pysyvyyttä näytteen applikointivaiheessa tehostettiin kokeilemalla seitsemää eri etanolipitoisuutta, 96, 80, 60, 40, 20, 10 ja 5 vol %. Testi osoitti, että pienempi etanolipitoisuus lisäsi artemisiinin pidättymistä. Lisäksi menetelmässä optimoitiin käytettävä eluentti artemisiinin vapauttamiseksi. Havaittiin, että etanolilla saavutettiin 85 %:n, etyyliasetaatilla 8 %:n ja asetonitriilillä 93 %:n saanto. Artemisiinin lopulliseksi saannoksi saatiin kyseisellä SPE-menetelmällä 94 % (Jessing et al., 2011).

Piiksididi ja Florisil ( $\text{MgO}_3\text{Si}$ , magnesiumsilikaatti) ovat sorbentteja, joita on kokeiltu artemisiinin puhdistamiseen *Artemisia annuasta*. Samassa tutkimuksessa verrattiin aiemmin mainittua LLE-menetelmää 10 % lyijyasetaatilla artemisiinin puhdistamiseksi *Artemisia annuasta*. Piiksididin kohdalla havaittiin, että artemisiinia ei saatu erotettua klorofyllistä tehokkaasti pienillä liuotinmäärillä, jonka takia menetelmää pidettiin epäkäytännöllisenä. Puolestaan Florisilin kohdalla saadut puhdistustulokset olivat lupaavia ja sillä pystyttiin puhdistamaan artemisiinia tehokkaammin kuin piiksididilla. Kolmessa eri konsentraatiossa saadut RSD-arvot Florisililla olivat 1,21 % (600  $\mu\text{g/ml}$ ), 1,68 % (1000  $\mu\text{g/ml}$ ) ja 1,57 % (1400  $\mu\text{g/ml}$ ), joten tuloksista nähdään, että menetelmän toistettavuus on parempi SPE:llä kuin LLE:llä (Celeghini et al., 2006).

SPE:llä on useita etuja, kuten laaja valikoima erilaisia sorbentteja, vähäinen orgaanisten liuottimien käyttö, helppokäyttöisyys ja nopeus (Camel, 2003). Menetelmän selektiivisyyttä ja spesifisyyttä artemisiinia kohtaan voidaan lisätä uudella sorbenttimateriaaleilla (Augusto et al., 2013). Lisäksi SPE:ssä tarvittavat suuret näytemäärät, jotka ovat ongelma biologisten näytteiden kuten kasvien kohdalla, voidaan korjata mikrouuttotekniikoilla (Filippou et al., 2017). Tulevissa luvuissa tarkastellaan kahta SPE:hen perustuvaa menetelmää, joissa toisessa artemisiinia sisältävän näytteen puhdistamiseen käytetään selektiivistä sorbenttia ja toisessa näytteen puhdistus voidaan suorittaa pienellä näytemäärällä.

### 5.3 MIPit sorbenteina SPE:ssä

SPE:ssä voidaan käyttää erilaisia sorbentteja, mutta niiden valinnassa tulee kuitenkin ottaa huomioon mahdolliset epäspesifiset vuorovaikutukset. Ei ole toivottavaa, että sorbentti sitoo useampia eri yhdisteitä ja siten heikentää menetelmän selektiivisyyttä sekä tarkkuutta kohdeyhdistettä kohtaan. Molekyylimuottipolymeerit eli MIPit (engl. molecular imprinted polymers) ovat uusia selektiivisiä sorbentteja SPE:ssä (Bilici, 2020). Ne ovat stabiileja ja kestävät orgaanisia liuottimia, kuumentamista, vahvoja emäksiä sekä happoja (Zwir-Ferenc & Biziuk, 2006). MIPien valmistus on esitetty kuvassa 4. Ensin valmistetaan esipolymerointikompleksi sekoittamalla funktionaalinen monomeeri ja templaattimolekyyliliuottimessa, jonka jälkeen suoritetaan polymerisaatio verkkosidoksen (engl. cross-linker) läsnä ollessa. Saatu polymeeri jauhetaan ja seulotaan, jonka jälkeen templaattimolekyylit poistetaan. Templaatin poiston myötä polymeerirakenteeseen jää kuopat, jotka ovat rakenteeltaan ja kooltaan samanlaiset kuin poistettu templaatti. Ontelot pystyvät sitomaan kohdeyhdisteen (templaatin) selektiivisesti monimutkaisesta seoksesta vetysidoksin, ionisin sekä hydrofobisin vuorovaikutuksin (Zwir-Ferenc & Biziuk, 2006). MIPien selektiivisyyttä ja adsorptiokapasiteettia templaattimolekyyliliuottimien kohtaan vertaillaan usein NIPien (engl. non-imprinted polymers) avulla, jotka on valmistettu ilman templaatin läsnäoloa (Bilici, 2020).

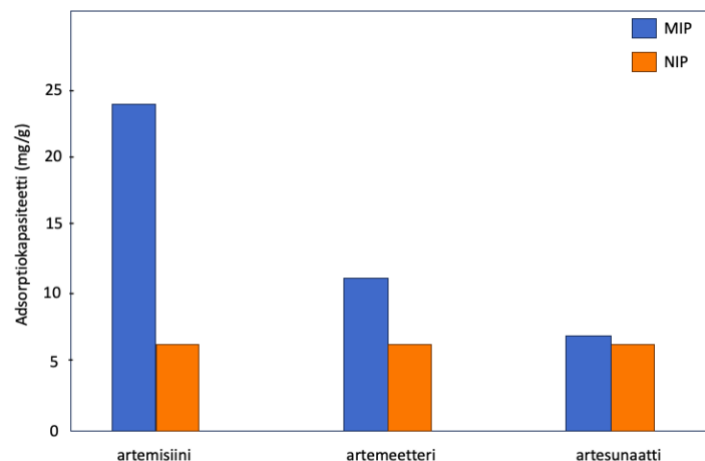


**Kuva 4.** Molekyylimuottipolymeerin (MIP) valmistus. Mukailtu lähteestä (Badawy et al., 2022).

MIPejä on käytetty SPE:ssä artemisiinin erottamiseen virtsanäytteistä. Artemisiinille suunnitellun MIPin valmistuksessa käytettiin metakryylihappoa funktionaalisenä monomeerinä, etyleeniglykolidimetakrylaattia (EGDMA) verkkosidoksena ja atsobisisobutyronitriiliä (AIBN) initiaattorina, joka auttaa käynnistämään polymerisaation. Liuottimena esipolymerointikompleksin muodostamisessa käytettiin asetonitriiliä. Menetelmä osoittautui tehokkaaksi ja toistettavaksi artemisiinille, sillä saannot kolmella eri pitoisuudella olivat >95,6 % ja RSD-arvot <4,18 %. Artemisiinin saantoon voitiin vaikuttaa sorbenttin määrällä sekä lataus-, pesu- ja eluointiliuottimen tyypillä. Polaarilla eluentilla saatiin rikottua artemisiinin ja polymeeriverkoston väliset vetysidokset ja lisättyä artemisiinin saantoa (Bilici, 2020).

Xie et al. (2013) ovat puolestaan käyttäneet MIPejä artemisiinin erottamiseen *Artemisia annuasta* käyttämällä funktionaalisenä monomeerinä styreeniä. Artemisiinin saannot olivat >80,0 % ja RSD-arvot <4,15 % kolmella eri pitoisuudella, kun sorbenttina oli MIP. Puolestaan, kun sorbenttina käytettiin NIPEjä saannot olivat >13,1 % ja RSD-arvot <15,9 % (Xie et al., 2013). Tulosten perusteella voidaan todeta, että MIPit sitovat NIPEjä selektiivisemmin artemisiinia johtuen MIPeissä olevista spesifistä sitoutumiskohdista artemisiinille.

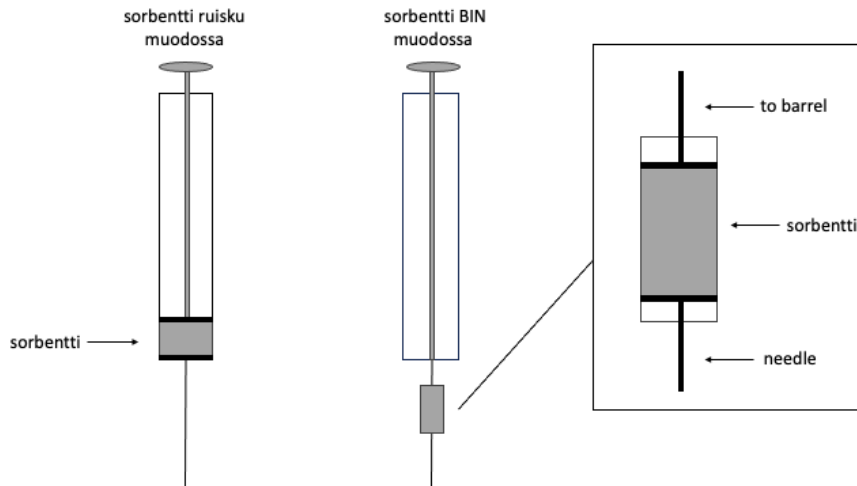
MIPin selektiivisyyttä artemisiinia kohtaan on tutkittu artemisiinin johdannaisilla arteemetterillä ja artesunaatilla (kuva 2), ja verrattu sitä NIPiin. Kuvasta 5 nähdään, että MIPin adsorptiokapasiteetti on suurempi artemisiinia kohtaan kuin arteemetteriä ja artesunaattia, kun taas NIPin adsorptiokapasiteetti on sama kaikkiin tutkittaviin molekyyliin (Bilici, 2020). Tämä osoittaa sen, että MIP sitoo huomattavasti selektiivisemmin artemisiinia kuin NIP, joka ei sisällä templaattia vastaavia onteloita.



**Kuva 5.** MIPin ja NIPin adsorptiokapasiteetti artemisiinia, arteemetteriä ja artesunaattia kohtaan. Mukailtu lähteestä (Bilici, 2020).

#### 5.4 MEPS – Pienennetty versio perinteisestä kiinteäfaasiuutosta

Mikrouutto pakatulla sorbentilla, eli MEPS (engl. microextraction by packed sorbent), on näytteen esikäsittelymenetelmä, jota vartenotettava vaihtoehtona perinteisimmille menetelmille (Moein et al., 2015). Se voi esiintyä kahdessa eri muodossa, joissa toisessa sorbentti on pakattu ruiskuun ja toisessa BINiin (barrel insert and needle) (Kuva 6) (Filippou et al., 2017). BINin etuna on se, että sitä voidaan käyttää useita kertoja verrattuna perinteisessä SPE:ssä käytettävään patruunaan (Protti et al., 2019).



**Kuva 6.** MEPS sorbentti ruisku ja BIN muodossa. Mukailtu lähteestä (Filippou et al., 2017).

MEPS on pienennetty versio perinteisestä SPE-menetelmästä. Vaikka MEPS erottaa ja puhdistaa näytteen komponentteja SPE:en tavoin, on menetelmässä jotain eroavaisuuksia (Moein et al., 2015). Yksi ero on se, että MEPS menetelmässä liuoksen virtaus on kaksisuuntainen. Tämä mahdollistaa jokaisen vaiheen toistamisen, jonka seurauksena näytteen ja sorbentin vuorovaikutus lisääntyy ja menetelmän tehokkuus paranee (Filippou et al., 2017). Lisäksi MEPS käyttää perinteistä SPE:tä verrattuna huomattavasti vähemmän sorbenttia. MEPS:issä tarvittava sorbentti määrä on välillä 1–4 mg, kun taas SPE:ssä tarvittava sorbentti määrä välillä 30–1000 mg. MEPS käyttää myös pienempiä määriä näytettä ja liuottimia kuin SPE (Protti et al., 2019).

Protti et al. (2019) ovat käyttäneet MEPS-menetelmää artemisiinin puhdistamiseen *Artemisia annuasta*. Menetelmä optimoitiin artemisiinille sorbenttimateriaalin, liuottimien sekä ruiskun täyttämisen ja tyhjentämisen määrien ja nopeuksien mukaan. Neljästä käytetystä sorbentista, C2, C8, C18 ja M1, havaittiin, että riittävä uuttoaanto ja toivotut tulokset puhdistuksen kannalta saavutettiin C8-sorbentilla. Täyttämällä ja tyhjentämällä ruisku näyteliuoksella kymmenen kertaa nopeudella 2  $\mu\text{l/s}$  saavutettiin artemisiinin riittävä absorptio sorbenttiin. Näyteliuos sisälsi uutetta, ultrapuhdasta vettä ja sisäisen standardin (artemisiini-D3). Sorbentti pestiin 100  $\mu\text{l}$ :lla ultrapuhdasta vettä ja 100  $\mu\text{l}$ :lla vesi/metanoli 95:5 seosta nopeudella 10  $\mu\text{l/s}$ . Artemisiinin eluutio maksimointiin täyttämällä ja tyhjentämällä ruisku viisi kertaa 100  $\mu\text{l}$  metanolia nopeudella 2  $\mu\text{l/s}$ . Artemisiinin saannoksi saatiin

yli 85 % ja suhteelliset saannot olivat välillä 88–93 %. Menetelmän toistettavuudesta kertoo RSD-arvo, joka oli alle 3,5 % (Protti et al., 2019).

## 6 Analysointi LC-MS/MS:llä

Suosittu tapa artemisiinin kvantitatiivisen analyysiin suorittamiseen on käyttää nestekromatografiaa yhdistettynä tandemmassaspektrometriaan (engl. liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) (Dogan et al., 2022; Jessing et al., 2011; Protti et al., 2019; Singh et al., 2021). Artemisiinin kvantitoinnissa detektorina käytetään usein massaspektrometriä, koska se mahdollistaa yhdisteiden analysoinnin ja kvantitoinnin UV-detektoria paremmin monimutkaisista matriiseista (Jessing et al., 2011). Artemisiinilta puuttuu fluoresoiva sekä UV-valoa absorboiva kromofori (de Vries & Dien, 1996), jonka takia UV-detektori ei sovellu riittävän hyvin artemisiinin kvantitointiin. Massaspektrometri on detektorina herkempi sekä selektiivisempi, koska se mahdollistaa pienien pitoisuuksien havaitsemisen monimutkaisista näytteistä. Kokonaisuudessaan nestekromatografia ja massaspektrometria muodostavat toimivan kokonaisuuden, jolla voidaan parantaa menetelmän suorituskykyä (Jessing et al., 2011).

### 6.1 UHPLC – artemisiinin erottaminen nestekromatografisesti

Nestekromatografia (engl. liquid chromatography, LC) perustuu yhdisteiden erottamiseen liikkuvan faasin ja stationaarifaasin avulla ennen niiden detektointia massaspektrometrialla. Liikkuvan faasin tehtävänä on kuljettaa näytteestä erottuneet yhdisteet kolonnin läpi massaspektrometrissä olevalle ionisaatiolähteelle (Parasuraman et al., 2014). LC voidaan jakaa normaali- ja käänteisfaasikromatografiaan käytetyn kolonnimateriaalin polaarisuuden perusteella. Artemisiinin analysoinnissa suositaan käänteisfaasikromatografiaa, jossa liikkuva faasi on poolisempi kuin stationaarifaasi (Parasuraman et al., 2014). Tällöin pooliset yhdisteet eluoituvat ensin ja vähiten pooliset viimeisenä (Pitt, 2009). Käänteisfaasikromatografiassa käytettävä stationaarifaasin kolonnimateriaali on artemisiinilla usein C<sub>18</sub>, koska sillä on havaittu olevan parempi suorituskyky kuin esimerkiksi C<sub>8</sub>-kolonnimateriaalilla (Jessing et al., 2011; Li et al., 2008; Protti et al., 2019; Singh et al., 2021).

LC:ssä käytetty eluutio voi olla isokraattinen eluutio tai gradientteluutio riippuen liikkuvan faasin koostumuksesta (Zhou et al., 2017). Kun eluentin koostumusta muutetaan ajonaikana, on kyseessä gradientteluutio. Puolestaan, kun eluentin koostumus pidetään samana analyysin ajan, puhutaan isokraattisesta eluutiosta. Artemisiinin tapauksessa on käytetty sekä gradientteluutiota että isokraattista eluutiota (Ciftci et al., 2018; Ruan et al., 2019).

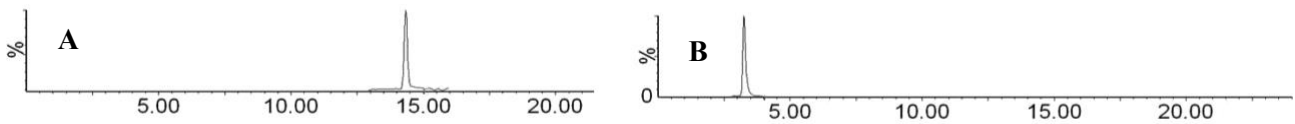
Yhdisteiden erottumiseen nestekromatografiassa voidaan vaikuttaa liikkuvan faasin koostumuksella. Protti et al. (2019) vertailivat haihtuvia happamia liuottimia eri pitoisuuksina ja

orgaanisia modifiointiaineita *Artemisia annua* näytteiden gradienttieluutioon. Paras kompromissi retentioaikojen ja piikin muodon välillä artemisiinille ja IS:lle (artemisiini-D3) saavutettiin asetonitriilin ja veden gradienttieluutiolla virtausnopeudella 0,2 ml/min. Paras ionisointikyky sekä suurimman piikin pinta-ala saavutettiin 0,25 % muurahaishapolla (Protti et al., 2019). Singh et al. (2021) tutkivat artemisiinin erottumista erilaisista *Artemisia* -näytteistä gradienttieluutiolla vertaillen erilaisia liikkuvan faasin koostumuksia. Paras erottuminen saavutettiin 0,1 % (v/v) muurahaishapon vesiliuoksella (A) ja asetonitriilillä (B) virtausnopeudella 0,4 ml/min (Singh et al., 2021). Liikkuvan faasin koostumuksia on optimoitu myös artemisiinin isokraattisessa eluutiossa virtausnopeuden ollessa 0,2 ml/min. Paras erottelutehokkuus saavutettiin 0,1 % muurahaishapon vesiliuoksella (A) ja asetonitriilillä (B) (A:B=40:60, v/v), kun vertailussa oli viisi erilaista liikkuvaa faasia. 0,1 % muurahaishapon lisääminen liikkuvaan faasiin sai aikaan korkean signaalivasteen ja terävät piikit, mikä johti menetelmän herkkyyden lisääntymiseen (Ruan et al., 2019).

Artemisiinin analysointiin käytetään usein korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa (engl. high-performance liquid chromatography, HPLC), mutta vaikka menetelmä on spesifinen, on sen yhtenä ongelmana liian pitkät analyysiajat (Li et al., 2008). UHPLC, eli erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia (engl. ultrahigh-performance liquid chromatography), josta käytetään myös nimeä UPLC (Watersin rekisteröity tavaramerkki), on vaihtoehtoinen nestekromatografiamenetelmä, joka käyttää pienempää partikkelikokoa, vähemmän aikaa ja korkeampia paineita analyysin suorittamiseen kuin HPLC (Swetha Sri et al., 2020).

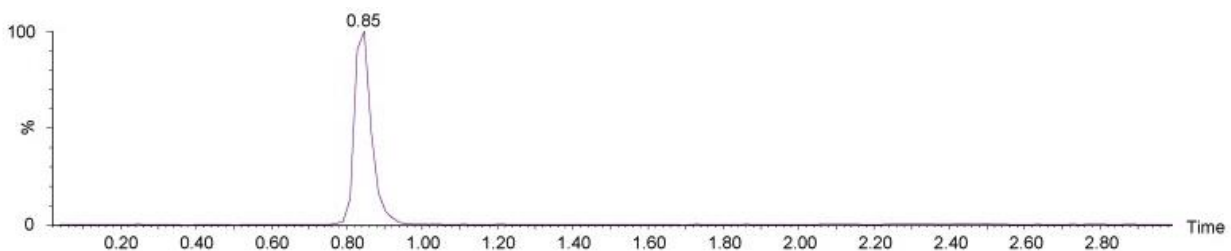
UHPLC-menetelmä eroaa perinteisestä HPLC-menetelmästä nimenomaan kolonnin partikkelikoon perusteella. UHPLC käyttää alle 2  $\mu\text{m}$ :n partikkelikokoa kolonnimateriaalina, kun taas HPLC:n partikkelikoot ovat 3–5  $\mu\text{m}$ . On havaittu, että kolonnin partikkelikoon pienetessä erottelun tehokkuus, nopeus ja erottelukyky kasvavat. Partikkelikoon lisäksi erottelun tehokkuuteen ja nopeuteen vaikuttavat kolonnimateriaali, kolonnin mitat ja virtausnopeus. Lyhyemmät kolonnit johtavat nopeampaan analyysiin ja pienemmät virtausnopeudet tehokkuuden sekä herkkyyden kasvamiseen (Pitt, 2009; Swetha Sri et al., 2020).

Jessing et al. (2011) tutkivat artemisiinin erottamista *Artemisia annua* näytteistä 30 minuutin kokonaisajoajalla kahdella erilaisella kolonnilla. Artemisiinin retentioajaksi saatiin 14,37 minuuttia gradienttieluutiolla (kuva 7A). Virtausnopeus oli 0,25 ml/min ja käytetyn kolonnin (Luna phenyl-hexyl) mitat 150 mm  $\times$  4,6 mm ja partikkelikoko 5  $\mu\text{m}$ . Kun artemisiinin erottamiseen käytettiin samassa tutkimuksessa isokraattista eluutiota virtausnopeudella 0,1 ml/min ja kolonnia (Kinetix C<sub>18</sub> Ultrahigh-performance), jonka mitat olivat 150 mm  $\times$  2,1 mm ja partikkelikoko 2,6  $\mu\text{m}$ , saatiin artemisiinin retentioajaksi 3,23 minuuttia (kuva 7B) (Jessing et al., 2011).

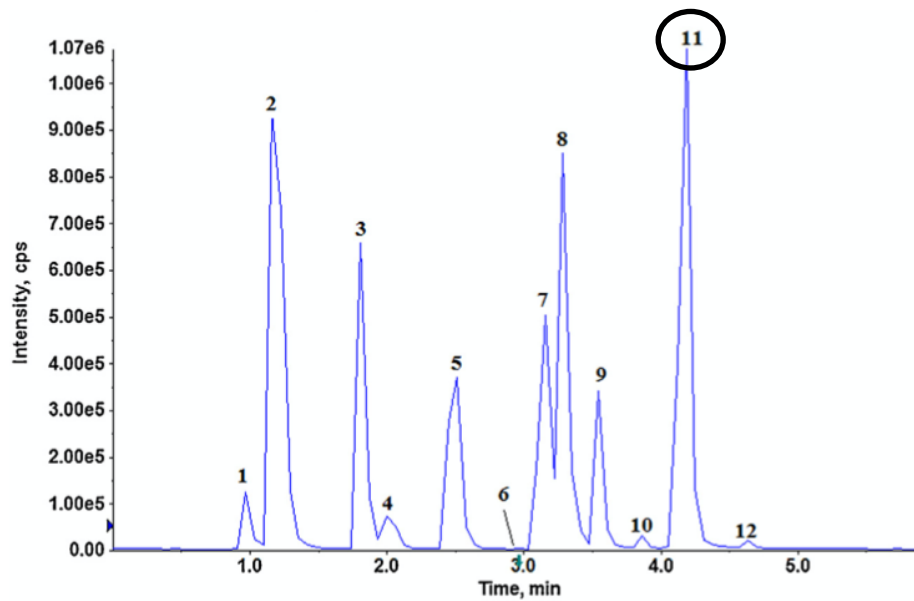


**Kuva 7.** Artemisiin LC-kromatogrammi kahdella eri kolonnilla. Artemisiinin retentioaika 14,37 minuuttia gradienttieluutiolla, virtausnopeudella 0,25 ml/min ja kolonnilla, jonka mitat 150 mm × 4,6 mm, 5 µm partikkelikoko (A). Artemisiinin retentioaika 3,23 minuuttia isokraattisella eluutiolla, virtausnopeudella 0,1 ml/min ja kolonnilla, jonka mitat 150 mm x 2,1 mm, 2,6 µm partikkelikoko (B). Kuva lainattu American Chemical Society luvalla: “Reprinted with permission from Jessing, K. K., Juhler, R. K., & Strobel, B. W. (2011). Monitoring of artemisinin, dihydroartemisinin, and artemether in environmental matrices using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11735–11743. <https://doi.org/10.1021/jf2027632>. Copyright 2024 American Chemical Society.”

Li et al. (2008) käyttivät artemisiinin erottamiseen rotan seerumista UPLC-laitteistoa, jossa virtausnopeus on ollut 0,3 ml/min ja käytetyn kolonnin (Waters Acquity UPLC™ BETH C<sub>18</sub>) mitat 50 mm × 2,1 mm ja partikkelikoko 1,7 µm. Artemisiinin retentioajaksi saatiin 0,85 minuuttia, kun käytössä oli isokraattinen eluutio ja kokonaisajoaika oli 3 minuuttia (kuva 8) (Li et al., 2008). Singh et al. (2021) ovat puolestaan tutkineet artemisiinin erottamista eri *Artemisia* -lajeista UPLC-laitteistolla, jossa virtausnopeus on ollut 0,4 ml/min ja käytetyn kolonnin (Acquity BEH™ C<sub>18</sub>) mitat ovat 50 mm × 2,1 mm ja partikkelikoko 1,7 µm. Tutkimuksessa käytettiin gradienttieluutiota ja kokonaisajoaika oli 6 minuuttia, jolloin artemisiinin retentioajaksi saatiin 4,18 minuuttia (kuva 9 numero 11) Singh et al. (2021).



**Kuva 8.** Artemisiin UPLC-kromatogrammi. Artemisiinin retentioajaksi on saatu 0,85 minuuttia isokraattisessa eluutiossa virtausnopeudella 0,3 min/ml. Käytössä olleen kolonnin mitat ovat 50 mm × 2,1 mm ja partikkelikoko 1,7 µm. Kuvattu lainattu Elsevierin luvalla: “Reprinted from Li, L., Pabbisetty, D., Carvalho, P., Avery, M. A., Williamson, J. S., & Avery, B. A. (2008). Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the determination of Artemisinin in rat serum and its application in pharmacokinetics. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 867(1), 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.01.057>, Copyright 2024, with permission from Elsevier (license number 5735941319651).”



**Kuva 9.** Artemisiinin (numero 11) UPLC-kromatogrammi. Artemisiinin retentioajaksi on saatu 4,18 minuuttia gradientteluutiiossa eluutiiossa virtausnopeudella 0,4 min/ml. Käytössä olleen kolonnin mitat ovat 50 mm × 2,1 mm ja partikkelikoko 1,7 μm. Kuvattu lainattu Elsevierin luvalla: “Reprinted from Singh, P., Bajpai, V., Khandelwal, N., Varshney, S., Gaikwad, A. N., Srivastava, M., Singh, B., & Kumar, B. (2021). Determination of bioactive compounds of *Artemisia* Spp. plant extracts by LC–MS/MS technique and their *in-vitro* anti-adipogenic activity screening. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 193, 113707. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113707>, Copyright 2024, with permission from Elsevier (license number 5758130359965).”

Pienemmän partikkelikoon seurauksena menetelmän herkkyys paranee. Herkkyyden parantuminen johtuu UHPLC:n tuottamista terävemmistä piikeistä ja paremmasta erotuskyvystä (Ruan et al., 2019). Kun artemisiini on erottu rotan seerumista UPLC-menetelmällä, on saatu alle kahden sekunnin kromatografisia piikkejä kolmen minuutin ajoajalla, mitkä viittaavat menetelmän hyvään kromatografiseen herkkyyteen sekä tehokkuuteen (Li et al., 2008). Mikäli nestekromatografian selektiivisyyttä ja herkkyyttä halutaan parantaa entisestään, voidaan laitteisto liittää tandem-kvadrupoli-massaspektrometriin (Li et al., 2008).

## 6.2 QqQ-MS – artemisiinin analysointi massaspektrometrisesti

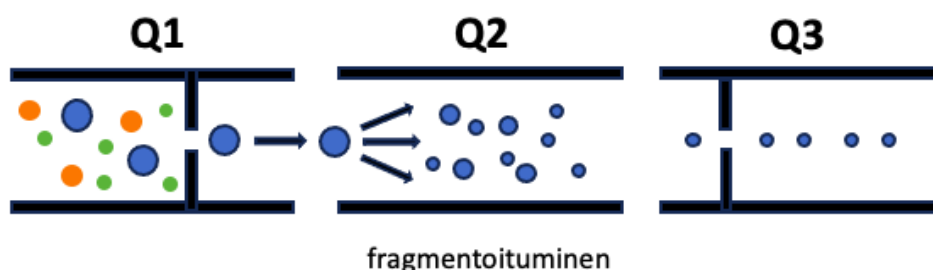
Massaspektrometri on usein käytetty detektori artemisiinin kvantitointiin. Sen toiminta perustuu siihen, että molekyylit ionisoidaan ja saadut ionit analysoidaan niiden massa-varaus-suhteen ( $m/z$ -suhde) perusteella (Pitt, 2009). Artemisiinin ionisoitiin käytetään usein sähkösumutusionisaatiota (engl. electrospray ionization, ESI). ESI tuottaa neutraaleista molekyyleistä varautuneita ioneita, jotka sitten siirtyvät massa-analysointilaitteelle analysoitavaksi. Se on pehmeä ionisaatiolähde, joka käyttää melko vähän energiaa, jonka seurauksena molekyylin fragmentoituminen on vähäistä. Kyseinen ionilähde toimii hyvin osittain polaaristen molekyyliden, kuten artemisiinin, kanssa ja sitä voidaan käyttää sekä positiivisten ja negatiivisten ionien tuottamiseen (Pitt, 2009). Artemisiinille on

käytetty pääasiassa positiivista ionisaatiota (Dogan et al., 2022; Jessing et al., 2011; Li et al., 2008; Protti et al., 2019), jolloin molekyyliin lisätään protoni ja ioni esitetään muodossa  $[M+H]^+$ .

Massa-analysaattorille saapuneet ionit erotellaan niiden  $m/z$  -suhteen mukaan, jonka jälkeen ne päätyvät detektorille havaittavaksi. Detektorilla ionit muodostavat sähköisiä signaaleja, joista saadaan massaspektri (Parasuraman et al., 2014). Yleisin käytetty massa-analysaattori on kvadrupolianalysaattori. Se koostuu neljästä samansuuntaisesta metallisauvasta, jonka läpi varautuneet ionit kulkeutuvat  $m/z$ -suhteen perusteella. Kvadrupolianalysaattorissa käytettävät vakiojännite ja muuttuva radiotaajuinen jännite muodostavat sähkökentän, jonka vaikutuksesta vain tietyt  $m/z$ -arvon omaavat ionit pääsevät sauvojen läpi detektorille. Massaspektri saadaan aikaan muuttamalla jännitteitä systemaattisesti ajan myötä, jonka seurauksena on mahdollista skannata eri  $m/z$ -arvojen aluetta (Pitt, 2009).

Kun menetelmässä suoritetaan vähintään kaksi massa-analyysiä, on kyseessä tandemmassaspektrometria, joka on huomattavasti spesifisempi kuin yksivaiheinen massa-analyysi (Pitt, 2009). Kolmoiskvadrupoli-massaspektrometriaa (QqQ-MS) käytetään usein artemisiinin analysoinnissa ja se on esimerkki tandemmassaspektrometristä (Li et al., 2008; Protti et al., 2019; Wang et al., 2011; Xing et al., 2006). Kolmoiskvadrupolissa on kolme kvadrupolia peräkkäin, jotka ovat Q1, Q2 ja Q3. Näistä Q1 ja Q3 ovat kvadrupolimassa-analysaattoreja, joiden välissä on Q2, joka toimii matalapaineista inerttiä kaasua sisältävä törmäyskammiona. Kolmannen kvadrupolin jälkeen ionit siirtyvät detektorille (Pitt, 2009).

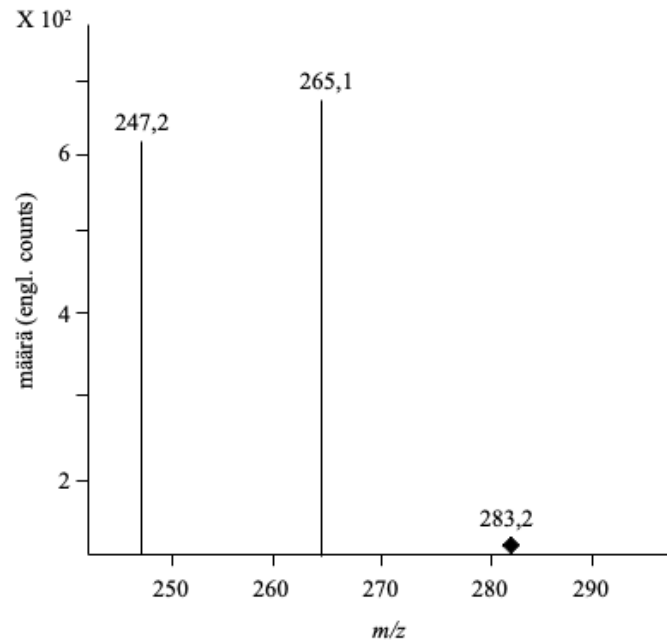
Valitun reaktion seuraaminen (engl. selected reaction monitoring, SRM) ja usean reaktion seuraaminen (engl. multiple reaction monitoring, MRM) ovat massaspektrometrisiä tekniikoita, joiden avulla voidaan spesifisesti havaita kohdeyhdiste. SRM-tilassa analysoidaan yhtä prekursori/tuoteioni-paria, eli Q1 päästä läpi vain valitun prekursori-ionin ja Q3 päästä läpi vain tietyn prekursori-ionista fragmentoituneen tuoteionin (kuva 10). MRM-tilassa puolestaan analysoidaan tiettyjä prekursori/tuoteioni-pareja, eli voidaan analysoida useampia prekursori-ionista muodostuneita tuoteioneja. Tämä mahdollistaa tarkan ja herkän analyysin halutulle yhdisteelle näytteestä (Li et al., 2008; Pitt, 2009; Wang et al., 2011).



**Kuva 10.** SRM-menetelmän toimintaperiaate.



tunnistamiseen ja  $m/z$  209,2 yhdisteen kvantitointiin. Wang et al. (2011) ovat käyttäneet hyödyksi artemisiinin kvalitatiivisen tuloksen saamiseksi  $m/z$  265,1  $[M-H_2O]^+$  ja 247,2  $[M-2 H_2O]^+$  -fragmentti-ionien runsaussuhdetta. Kvantitatiivisen tuloksen saamiseksi käytettiin näytteessä runsaammin esiintyvää tuoteionia  $m/z$  265,1, joka voidaan havaita kuvan 12 artemisiinin massaspektristä.

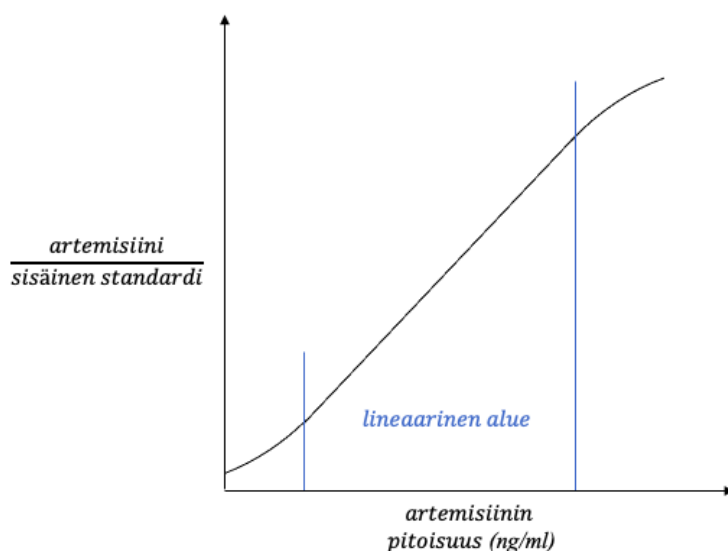


**Kuva 12.** Artemisiinin massaspektri. Mukailtu lähteestä (Wang et al., 2011).

Käytetyllä törmäysenergialla on vaikutus QqQ-MS:n havaitsemisherkkyyteen, koska sillä on vaikutus prekursori-ionin fragmentoitumiseen (Li et al., 2008; Wang et al., 2011). Törmäysenergian suuruus tulee valita niin, että saavutetaan tuoteionien suurin esiintyvyys (Wang et al., 2011). Artemisiinille on käytetty törmäysenergioita 11, 22 ja 14 eV QqQ-MS:llä (Li et al., 2008; Qiu et al., 2018; Singh et al., 2021).

### 6.3 Artemisiinin kvantitointi

Kvantitatiivisten tulosten saamiseksi on helpointa käyttää sisäistä standardia, joista vakaat isotoopit ovat paras vaihtoehto. Vaikka ne ovat kohdeyhdisteen kanssa lähes identtiset kemiallisilta ominaisuuksiltaan, on ne kuitenkin helppo erottaa toisistaan MS-menetelmässä. Tarkkojen tuloksien saavuttamiseksi IS tarvitsee kalibrointikäyrän. Kalibrointikäyrä muodostetaan artemisiinin ja IS:n vasteen suhteen artemisiinin pitoisuuden funktiona (kuva 13) (Pitt, 2009). Artemisiinin ja IS:n välinen suhde on suoraan verrannollinen artemisiinin pitoisuuteen tutkittavassa näytteessä lineaarisella alueella.



**Kuva 13.** Kalibrointikäyrä artemisiinin pitoisuuden määrittämiseen. Y-akselilla on esitetty artemisiinin ja IS:n piikkien pinta-alojen suhde ja X-akselilla on artemisiinin pitoisuus. Kalibrointi käyrä on lineaarinen kuvassa esitetyllä sinisellä välillä.

Li et al. (2008) muodostivat kalibrointikäyrän artemisiinin määrittämisestä rotan seerumista artemisiinin ja IS:n (arteetteri) piikkien pinta-alojen suhteiden sekä artemisiinin teoreettisen pitoisuuden avulla. UPLC-MS/MS-menetelmällä saatu kalibrointikäyrä oli lineaarinen alueella 4–10 000 ng/ml ja menetelmän LOQ oli artemisiinille 4 ng/ml. Saatu korrelaatiokerroin oli 0,9981, joka viittaa hyvään korrelaatiokertoimeen (Li et al., 2008). Yleisesti artemisiinin LC-MS/MS-analyysimenetelmillä on saavutettu hyviä korrelaatiokertoimia ( $r$ ), jotka ovat  $r > 0,9986$  (Dogan et al., 2022; Protti et al., 2019; Qiu et al., 2018; Singh et al., 2021; Wang et al., 2011).

Singh et al. (2021) määrittivät artemisiinipitoisuuden 10:stä eri *Artemisia* -lajista UPLC-ESI-QqQ<sub>LIT</sub>-MS/MS-menetelmällä, missä Q<sub>LIT</sub> on lineaarinen kvadrupoli-ioniloukku. Artemisiinin kalibrointikäyrä tehtiin pitoisuusalueella 10–2000 ng/ml käyttäen kuutta kalibrointistandardiliuosta ja se osoitti lineaarisen suhteen piikin pinta-alan ja pitoisuuden välillä 50–1500 ng/ml. Suurin artemisiinipitoisuus määritettiin *Artemisia absinthiumissa*, jossa pitoisuus oli 2,32 mg/g. Toiseksi suurin pitoisuus, 2,18 mg/g, määritettiin *Artemisia vulgariksesta*. Alhaisin artemisiinipitoisuus, joka pystyttiin määrittämään, oli 0,78 mg/g *Artemisia annuassa*. Osassa *Artemisia* -lajeista artemisiinipitoisuus oli liian alhainen havaittavaksi, koska se oli alle LOD-arvon, joka on 6,55 ng/ml. Puolestaan menetelmän LOQ-arvoksi mitattiin 19,86 ng/ml (Singh et al., 2021).

Qiu et al. (2018) tutkivat artemisiinipitoisuutta 18:ssa *Artemisia annua* näytteessä LC-MS/MS:llä (HPLC), jossa lineaarisuus alue on 5,00–5000 ng/ml, LOD 1,50 ng/ml ja LOQ 5,00 ng/ml artemisiinille. Suurin artemisiinipitoisuus määritettiin näytteestä 1, jossa pitoisuus oli  $22,1 \pm 0,415$  ng/g. Tuloksista ilmenee, että artemisiinipitoisuus lehti- ja varsinäytteissä (näytteet 1–13) on huomattavasti korkeampi kuin juurinäytteissä (14–18). Näytteissä 1–13 artemisiinin pitoisuus on

välillä 13,1–22,1 ng/g, kun taas näytteissä 14–18 artemisiinin pitoisuus on 0,122–0,020 ng/g. Tuloksista voidaan päätellä, että *Artemisia annua* varsi- ja lehtiosat ovat parempia osia lääkkeiden valmistukseen kuin kasvin juuriosat (Qiu et al., 2018).

Protti et al. (2019) määrittivät artemisiinin pitoisuuden neljästi *Artemisia annua* uutteesta (A–D) LC-MS/MS:llä ja vertailivat niiden sytotoksista potentiaalia HL60-leukemiasoluihin. Seitsemässä eri konsentraatiossa olevat artemisiinin standardiliuokset sisälsivät IS:ää (artemisiini-D3) vakio- ja vertailupitoisuuden. Analysoinnin jälkeen saatiin artemisiinin ja IS:n piikkien pinta-alojen suhteet, jotka asetettiin vastaaviin pitoisuuksiin (ng/ml). Pienimmän neliösumman menetelmällä muodostettiin lopulta kalibrointikäyrä, joka oli lineaarinen artemisiinille välillä 5 ng/ml–1 µg/ml. Menetelmän LOQ oli 5 ng/ml ja LOD 1,5 ng/ml. Suurin artemisiinin pitoisuus oli uutteessa B, joka oli  $109,40 \pm 2,63$  µg/ml. Uute C:n artemisiinipitoisuus oli  $94,79 \pm 2,14$  µg/ml, uute A:n  $21,40 \pm 1,52$  µg/ml ja uute D:n  $5,90 \pm 0,84$  µg/ml. Tulokset osoittivat, että artemisiinipitoisuuden määrä vaikutti HL60-solujen kasvuun. Mitä suurempi artemisiinipitoisuus uutteessa oli, sitä tehokkaammin se esti näiden solujen kasvua (Protti et al., 2019).

Artemisiinin määrittämiseen *Artemisia annua*sta on myös käytetty herkkää, nopeaa ja selektiivistä RRLC-QQQ-menetelmää (engl. rapid resolution, RR), jossa käytettävä kolonnin partikkelikoko 1,8 µm. Menetelmä viittaa siis aiemman esitettyyn UHPLC-menetelmään. Kalibrointikäyrä tehtiin lineaarisen regression avulla, jossa artemisiinin piikkien pinta-ala piirrettiin suhteessa viiden eri kalibrointistandardien pitoisuuksiin. Kalibrointikäyrä antaa lineaarisen vasteen artemisiinille välillä 10–400 ng/ml. LOD arvo artemisiinin määrittämiseksi on 0,20 ng/ml ja LOQ 0,75 ng/ml. Menetelmällä mitattiin kolme *Artemisia annua* -näytettä, jotka oli kerätty Kiinan eri maakunnista. Yunnanin maakunnasta kerätyssä kasvissa oli suurin artemisiinipitoisuus  $8,83 \pm 0,21$  mg/g. Toiseksi suurin pitoisuus havaittiin Sichuanin maakunnasta kerätystä kasvista  $7,95 \pm 0,18$  mg/g, kun taas Shandongin maakunnassa kerätyssä kasvissa artemisiinipitoisuus oli huomattavasti pienempi  $3,37 \pm 0,14$  mg/g (Wang et al., 2011).

## 7 Johtopäätökset

Artemisiinin erottaminen nestekromatografisesti ja analysointi massaspektrometrisesti ovat mahdollistaneet luotettavan ja tehokkaan tavan artemisiinin selektiiviseen kvantitointiin. Kasveissa esiintyvän alhaisen artemisiinipitoisuuden vuoksi näytteen esikäsittelyvaiheet ennen varsinaista analyysia pitää kuitenkin suunnitella huolellisesti.

MAE- ja SFE-uuttomenetelmät ovat osoittautuneet varteenotettaviksi vaihtoehtoiksi perinteiselle Soxhlet-uutolle nopeutensa, tehokkuutensa ja vähemmän liuottimen kulutuksen takia. MAE:lla saadut tulokset ovat osoittaneet sen olevan nopeampi ja tehokkaampi uuttomenetelmä artemisiinille kuin perinteinen Soxhlet-uutto. Artemisiinin puhdistaminen LLE:llä käyttäen

liuottimena heksaania on osoittanut hyviä saantoja artemisiinille, mutta orgaanisten liuottimien suuri kulutus on osoittautunut yhdeksi LLE:n ongelmaksi. SPE:ssä orgaanisen liuottimen kulutus on vähäisempää ja lisäksi menetelmässä on mahdollista käyttää erilaisia sorbentteja, jotka voivat sitoa artemisiinia selektiivisemmin ja spesifisemmin. MIPien käyttö sorbentteina on lisännyt menetelmän selektiivisyyttä artemisiinia kohtaan johtuen MIPeissä olevista spesifisistä sitoutumiskohdista. Puolestaan MEPS-menetelmän avulla on pystytty puhdistamaan pienempiä näytemääriä ja lisäämään artemisiinin ja sorbentin välistä vuorovaikutusta kaksisuuntaisella liuosvirtauksella.

Artemisiinin erottaminen UHPLC:llä on osoittanut varteenotettavaksi menetelmäksi perinteiselle HPLC:lle nopeutensa, herkkyytensä ja tehokkuutensa ansiosta. Muun muassa pienemmän kolonnin partikkelikoon seurauksena ajoaika on huomattavasti lyhyempi UHPLC:ssä. Menetelmällä on saatu artemisiinille terävämpiä piikkejä, mikä parantaa puolestaan menetelmän herkkyttä. Artemisiinin detektoinnissa ja analysoinnissa massaspektrometri on UV-detektoria herkempi ja selektiivisempi. Se mahdollistaa yhdisteiden havaitsemisen pieninä pitoisuuksina monimutkaisista näytteistä. Artemisiinin ionisointiin käytetään pääasiassa ESI:ä positiivisella ionisaatiolla ja analysointiin QqQ-MS:ää. SRM- ja MRM-menetelmien käyttö on mahdollistanut artemisiinin luotettavan kvantitoinnin, ja useampia tuoteioneja käyttämällä artemisiini on voitu tunnistaa ja kvantitoida entistä tarkemmin. MRM-kromatogrammista voidaan määrittää artemisiin ja IS:n tuottamien piikkien pinta-alojen välinen suhde, ja tätä tietoa hyödyntämällä määrittää artemisiinipitoisuus tutkittavassa näytteessä. Artemisiinin pitoisuuden määrittämiseen käytetään IS:n lisäksi sen avulla muodostettavaa kalibrointikäyrää. IS:n avulla pystytään saamaan luotettavampia kvantitatiivisia tuloksia korjaamalla näytteenvalmistuksessa syntyneet mahdolliset häviöt.

Artemisiinipitoisuuden määrittäminen kasvista on antanut tärkeää tietoa siitä, missä kasvin osissa, kasvupaikoissa ja *Artemisia* -lajeissa pitoisuus on korkein. Hyödyntämällä näitä tietoja pystytään artemisiinia käyttämään entistä tehokkaammin lääkeaineena malarian ja muiden tautien hoidossa.

## Lähteet

- Amponsaa-Karikari, A., Kishikawa, N., Ohba, Y., Nakashima, K., & Kuroda, N. (2006). Determination of artemisinin in human serum by high-performance liquid chromatography with on-line UV irradiation and peroxyoxalate chemiluminescence detection. *Biomedical Chromatography*, *20*(11), 1157–1162. <https://doi.org/10.1002/bmc>
- Augusto, F., Hantao, L. W., Mogollón, N. G. S., & Braga, S. C. G. N. (2013). New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *43*, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.08.012>
- Babacan, Ü., Cengiz, M. F., Bouali, M., Tongur, T., Mutlu, S. S., & Gülmez, E. (2022). Determination, solvent extraction, and purification of artemisinin from *Artemisia annua* L. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, *28*, 100363. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2021.100363>
- Badawy, M. E. I., El-Nouby, M. A. M., Kimani, P. K., Lim, L. W., & Rabea, E. I. (2022). A review of the modern principles and applications of solid-phase extraction techniques in chromatographic analysis. *Analytical Sciences*, *38*(12), 1457–1487. <https://doi.org/10.1007/s44211-022-00190-8>
- Bilici, M. (2020). Synthesis of a Novel Molecularly Imprinted Polymer for the Sensitive and Selective Determination of Artemisinin in Urine Samples Based on Solid-Phase Extraction (SPE) and Determination with High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Analytical Letters*, *54*(7), 1145–1161. <https://doi.org/10.1080/00032719.2020.1795187>
- Camel, V. (2003). Solid phase extraction of trace elements. *Spectrochimica Acta Part B*, *58*(7), 1177–1233. [https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(03\)00072-7](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(03)00072-7)
- Celeghini, R. M. S., Silva, A. P., Sousa, I. M. O., & Foglio, M. A. (2006). Evaluation of *Artemisia annua* L. clean-up methods for artemisinin quantification by HPLC. *Rev Bras Pl Med*, *8*, 119–122.
- Chang, Z. (2016). The discovery of Qinghaosu (artemisinin) as an effective anti-malaria drug: A unique China story. *Science China Life Sciences*, *59*(1), 81–88. <https://doi.org/10.1007/s11427-015-4988-z>
- Christen, P., & Veuthey, J.-L. (2001). New trends in extraction, identification and quantification of artemisinin and its derivatives. *Current Medicinal Chemistry*, *8*(15), 1827–1839. <https://doi.org/10.2174/0929867013371563>
- Ciftci, O. N., Cahyadi, J., Guigard, S. E., & Saldaña, M. D. A. (2018). Optimization of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L. with supercritical carbon dioxide + ethanol using response surface methodology. *Electrophoresis*, *39*(15), 1926–1933. <https://doi.org/10.1002/elps.201800084>
- Dahnum, D., Abimanyu, H., & Senjaya, A. (2012). Isolation of artemisinin as antimalarial drugs from *Artemisia annua* L. cultivated in Indonesia. *International Journal of Basic & Applied Sciences*, *12*(4), 90–95.
- Dams, R., Huestis, M. A., Lambert, W. E., & Murphy, C. M. (2003). Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: Influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *14*(11), 1290–1294. [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(03\)00574-9](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(03)00574-9)

- de Vries, P. J., & Dien, T. K. (1996). Clinical pharmacology and therapeutic potential of artemisinin and its derivatives in the treatment of malaria. *Drugs*, 52(6), 818–836. <https://doi.org/10.2165/00003495-199652060-00004>
- Dogan, K., Erol, E., Didem Orhan, M., Degirmenci, Z., Kan, T., Gungor, A., Yasa, B., Avsar, T., Cetin, Y., Durdagi, S., & Guzel, M. (2022). Instant determination of the artemisinin from various *Artemisia annua* L. extracts by LC-ESI-MS/MS and their *in-silico* modelling and *in vitro* antiviral activity studies against SARS-CoV-2. *Phytochemical Analysis*, 33(2), 303–319. <https://doi.org/10.1002/pca.3088>
- Ehder, T. (2005). 4.3 Validoinnissa tutkittavat mittausmenetelmän suorituskykyä ilmaisevat parametrit. In *Kemian metrologian opas* (Vol. 6, pp. 28–37). Centre of Metrology and Accreditation (MIKES).
- Filippou, O., Bitas, D., & Samanidou, V. (2017). Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1043, 44–62. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.08.040>
- Hao, J. Y., Han, W., Huang, S. D., Xue, B. Y., & Deng, X. (2002). Microwave-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L. *Separation and Purification Technology*, 28(3), 191–196. [https://doi.org/10.1016/S1383-5866\(02\)00043-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5866(02)00043-6)
- Jessing, K. K., Juhler, R. K., & Strobel, B. W. (2011). Monitoring of artemisinin, dihydroartemisinin, and artemether in environmental matrices using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11735–11743. <https://doi.org/10.1021/jf2027632>
- Kohler, M., Haerdi, W., Christen, P., & Veuthey, J.-L. (1997a). Extraction of artemisinin and artemisinic acid from *Artemisia annua* L. using supercritical carbon dioxide. *Journal of Chromatography A*, 785(1–2), 353–360.
- Kohler, M., Haerdi, W., Christen, P., & Veuthey, J.-L. (1997b). Supercritical fluid extraction and chromatography of artemisinin and artemisinic acid. An improved method for the analysis of *Artemisia annua* samples. *Phytochemical Analysis*, 8(5), 223–227. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(199709/10\)8:5<223::AID-PCA370>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(199709/10)8:5<223::AID-PCA370>3.0.CO;2-A)
- Li, L., Pabbisetty, D., Carvalho, P., Avery, M. A., Williamson, J. S., & Avery, B. A. (2008). Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the determination of Artemisinin in rat serum and its application in pharmacokinetics. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 867(1), 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.01.057>
- Liu, N. Q., Schuehly, W., von Freyhold, M., & Van der Kooy, F. (2011). A novel purification method of artemisinin from *Artemisia annua*. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 1084–1088. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.03.023>
- Moein, M. M., Abdel-Rehim, A., & Abdel-Rehim, M. (2015). Microextraction by packed sorbent (MEPS). *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 67, 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.12.003>

- Mount, D. L., Todd, G. D., & Navaratnam, V. (1995). Packed-column supercritical fluid chromatography of artemisinin (qinghaosu) with electron-capture detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 666(1), 183–187.
- Nahar, L., Guo, M., & Sarker, S. D. (2020). A review on the latest advances in extraction and analysis of artemisinin. *Phytochemical Analysis*, 31(1), 5–14. <https://doi.org/10.1002/pca.2873>
- Numonov, S., Sharopov, F., Salimov, A., Sukhrobov, P., Atolikshoeva, S., Safarzoda, R., Habasi, M., & Aisa, H. A. (2019). Assessment of artemisinin contents in selected *Artemisia* species from Tajikistan (Central Asia). *Medicines*, 6(1), 23. <https://doi.org/10.3390/medicines6010023>
- Parasuraman, S., Anish, R., Balamurugan, S., Muralidharan, S., Kumar, K. J., & Vijayan, V. (2014). An overview of liquid chromatography-mass spectroscopy instrumentation. *Pharmaceutical Methods*, 5(2), 47–55.
- Pitt, J. J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*, 30(1), 19–34.
- Protti, M., Mandrioli, R., Mandrone, M., Cappadone, C., Farruggia, G., Chiocchio, I., Malucelli, E., Isani, G., Poli, F., & Mercolini, L. (2019). Analysis of *Artemisia annua* extracts and related products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled to sample treatment miniaturisation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 174, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.05.044>
- Qiu, F., Wu, S., Lu, X., Zhang, C., Li, J., Gong, M., & Wang, M. (2018). Quality evaluation of the artemisinin-producing plant *Artemisia annua* L. based on simultaneous quantification of artemisinin and six synergistic components and hierarchical cluster analysis. *Industrial Crops and Products*, 118, 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.043>
- Rodrigues, M. F. F., Sousa, I. M. O., Vardanega, R., Nogueira, G. C., Meireles, M. A. A., Foglio, M. A., & Marchese, J. A. (2019). Techno-economic evaluation of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L. using supercritical carbon dioxide. *Industrial Crops and Products*, 132, 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.049>
- Ruan, J., Liu, Z., Qiu, F., Shi, H., & Wang, M. (2019). Simultaneous quantification of five sesquiterpene components after ultrasound extraction in *Artemisia annua* L. by an accurate and rapid UPLC–PDA assay. *Molecules*, 24(8), 1530. <https://doi.org/10.3390/molecules24081530>
- Singh, P., Bajpai, V., Khandelwal, N., Varshney, S., Gaikwad, A. N., Srivastava, M., Singh, B., & Kumar, B. (2021). Determination of bioactive compounds of *Artemisia* Spp. plant extracts by LC–MS/MS technique and their *in-vitro* anti-adipogenic activity screening. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 193, 113707. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113707>
- Swetha Sri, R., Bhavya Sri, K., & Mounika, C. (2020). A review on comparative study of HPLC and UPLC. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 13(3), 1570–1574. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2020.00284.X>

- Taverniers, I., De Loose, M., & Van Bockstaele, E. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 23(8), 535–552. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.04.001>
- Tu, Y. (2011). The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nature Medicine*, 17(10), 1217–1220. <https://doi.org/10.1038/nm.2471>
- Wang, X., Zhao, X.-E., Yang, B., Dong, H., Liu, D., & Huang, L. (2011). A combination of ultrasonic-assisted extraction with RRLC-QQQ method for the determination of artemisinin in the Chinese herb *Artemisia annua* L. *Phytochemical Analysis*, 22(3), 280–284. <https://doi.org/10.1002/pca.1277>
- Wieling, J. (2002). LC-MS-MS experiences with internal standards. *Chromatographia*, 55, 107–113.
- Xie, J., Cai, C., Yang, H., & Chen, X. (2013). Synthesis and Application of Molecularly Imprinted Polymer on Selective Solid-Phase Extraction for the Determination of Artemisinin in *Artemisia Annua* L. *Analytical Letters*, 46(1), 107–119.
- Xing, J., Yan, H., Zhang, S., Ren, G., & Gao, Y. (2006). A high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of artemisinin in rat plasma. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(9), 1463–1468. <https://doi.org/10.1002/rcm.2467>
- Zhou, W., Yang, S., & Wang, P. G. (2017). Matrix effects and application of matrix effect factor. *Bioanalysis*, 9(23), 1839–1844. <https://doi.org/10.4155/bio-2017-0214>
- Zwir-Ferenc, A., & Biziuk, M. (2006). Solid phase extraction technique - Trends, opportunities and applications. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(5), 677–690.