



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

Sydänglykosidien MS/MS-fragmentaatio ja sen hyödyntäminen niiden analytiikassa

Eetu Hokkanen

Luonnonyhdisteiden kemia

Kemian laitos

Turun yliopisto

Laajuus: 6 op

2.6. 2025

Turku

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä

LuK-tutkielma

Pääaine: Kemia

Tekijä: Eetu Hokkanen

Otsikko: Sydämglykosidien MS/MS-fragmentaatio ja sen hyödyntäminen niiden analytiikassa

Ohjaajat: Maarit Karonen ja Juha-Pekka Salminen

Sivumäärä: 16 sivua

Päivämäärä: Kesäkuu 2025

Sydämglykosidit ovat tiettyjen kasvien ja eläinten tuottamia erikoistuneita metaboliitteja, joilla eliöt puolustautuvat niitä syöjiltä kasvin- tai lihansyöjiltä. Sydämglykosideja on tiettävästi käytetty erilaisiin lääkinnällisiin tarkoituksiin jo yli 2000 vuotta, mutta William Witheringin (1741–1791) tutkimusten myötä vakiintui sydämglykosidien käyttö sydämen vajaatoiminnan hoidossa

Lääkkeinä digoksiini ja digitoksiini ovat käytetyimpiä sydämglykosideja. Näiden käyttöä on kuitenkin alettu vähentämään 1990-luvulta lähtien johtuen sydämglykosidien kapeista terapeuttisista ikkunoista. Viime aikoina sydämglykosideilla on havaittu myös antineoplastisia vaikutuksia, jotka riippuvat käytetystä sydämglykosidista.

Sydämglykosidit rakentuvat steroidiosasta, steroidiosaan kiinnittyneestä laktoniosasta C17-hiilessä, sekä sokeriosasta, joka on kiinnittyneenä glykosididisidoksella C3-hiileen. Korkean tai erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografian (HPLC ja UHPLC) käyttö sähkösumutus-ionisaation (ESI) ja tandemmassaspektrometrian (MS/MS) kanssa on muodostunut yleiseksi menetelmäksi sydämglykosidien erotteluun ja analysointiin

Sydämglykosidien fragmentaatiokaaviot ovat varsin monimutkaisia. Mikäli sydämglykosidilla on useita sokeriyksiköitä, voivat sokeriosat pilkkoutua joko yksitellen tai useamman sokeriyksikön mittaisissa osissa. Steroidirungon hydroksyyliiryhmät voivat myös pilkkoutua yksitellen tai useampi kerrallaan ja ne havaitaan H₂O-molekyylin lohkeamisina. Lisäksi laktonisubstituenttien pilkkoutuminen riippuu laktonisubstituentista. Esimerkiksi 2-furanoni voi pilkkoutua, mutta vain osittain, kun taas 2-pyrone puolestaan voi pilkkoutua osittain tai kokonaan.

Sydämglykosidien kvalitatiiviseen määrittäminen MS/MS:llä käytetään olemassa olevaa kirjallisuutta apuna sekä spektrikirjastoja. Ongelmaksi sydämglykosidien spektrien tulkitsemisessä on tietyillä yhdisteillä tietokantojen puutteellisuus. Eräs keino edesauttaa sydämglykosidien MS/MS-spektrien määrittämistä on hyödyntää kilpailevaa fragmentaatiomallinnusta (CFM) normaalin analyysin tukena.

Avainsanat: erikoistuneet metaboliitit, nestekromatografia, sydämglykosidi, tandemmassaspektrometria

Sisällysluettelo

Lyhenteet.....	4
1. Johdanto.....	5
2. Sydänglykosidien rakenne.....	6
3. Massaspektrometria.....	7
3.1 Näytteensyöttö.....	9
3.2 Ionisaatiomenetelmät.....	10
3.3 Massa-analysaattorit.....	10
4. MS/MS-fragmentaatio.....	12
5. Datan hyödyntäminen.....	17
6. Yhteenveto ja johtopäätökset.....	18
Viitteet.....	19

Lyhenteet

CFM	Kilpaileva fragmentaatiomallinnus (engl. Competitive fragmentation modeling)
Da	Molekyyli massa (g/mol) (engl. Dalton)
EI	Elektroni-ionisaatio (engl. Electron ionisation)
ESI	Sähkösumutus-ionisaatio (engl. Electrospray ionisation)
FAB	Nopeilla atomeilla pommitus (engl. Fast atom bombardment)
HPLC	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia
MALDI	Matriisiavusteinen laserdesorptio-ionisaatio (engl. Matrix-assisted laser desorption ionisation)
MS/MS	Tandemmassaspektrometria
m/z	Massavaraussuhde
Q	Kvadrupoli (engl. Quadrupole)
TOF	Lentoaika (engl. Time of flight)
UHPLC	Erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia

1. Johdanto

Sydänglykosidit ovat tiettyjen kasvien ja eläimien valmistamia erikoistuneita metaboliitteja, joiden tarkoituksena on suojella eliötä niitä syövilta kasvis- tai lihansyöjiltä. Joitakin tunnetuimpia sydänglykosideja ja sydänglykosidijohdannaisia ovat digoksiini, digitoksiini, ouabaiini, oleandriini, calotropiini, thevetiini, convallatoksiini, bufaliini, marinobufageniini ja telocinobufageniini (Kumavath et al. 2021). Sydänglykosideja sisältäviä kasvirohdoksia on tiedettävästi käytetty erilaisten vaivojen hoitoon yli 2000 vuoden ajan. Vasta William Withering (1741–1799) havaitsi kliinisten tutkimusten jälkeen sydänglykosidien vaikutuksen erityisesti sydämen toimintaan, johon nykyaikainen käyttö myös perustuu (Grovesa ja Bissetb 1991). Sydänglykosidien vaikutusmekanismia saatiin tarkennettua vasta 1950-luvulla, kun Schatzmann kollegoineen havaitsivat näiden yhdisteiden inhiboivan vaikutuksen sydämen Na^+/K^+ -pumppujen toimintaan (Prassas ja Diamandis 2008). Tämä häirintä johtaa Ca^{2+} -ionien kertymiseen solukalvon sisällä, mikä taas puolestaan vahventaa sydänlihaksen supistusvoimaa samalla harventaen sydämen lyöntitiheyttä (Kumavath et al., 2021).

Yleisimmäksi sydänglykosideiksi sydämen vajaatoiminnan hoidossa ovat muodostuneet digoksiini, jota saadaan eristettyä *Digitalis lanata*-kasvilajista, ja digitoksiini, jota saadaan eristettyä *Digitalis purpurea*-kasvilajista (Whayne, 2018). Näiden sydänglykosidien käyttö perustuu niiden vaikuttavuuden etuihin. Digoksiinin lääkevaikutus alkaa nopeammin ja se viipyy kehossa vähemmän aikaa. Toisaalta digitoksiini pilkkoutuu maksassa, jolloin mahdollinen munuaisten vajaatoiminta ei vaikuta aineen poistumiseen elimistöstä (Whayne, 2018; Dashti et al., 2023).

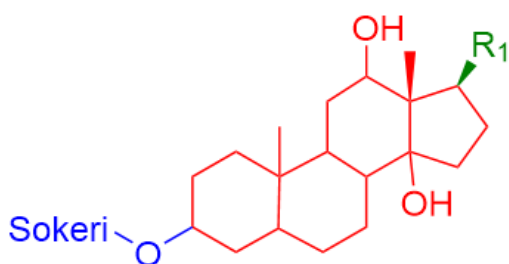
Digoksiinin käyttöä sydänlääkkeenä on vähennetty 1990-luvulta lähtien (Ren et al., 2024). Käytön vähentämisen taustalla ovat myrkytystilat, jotka voivat syntyä joko akuutisti tai pitkäaikaiskäytön seurauksena. Sydänglykosidien aiheuttama myrkytystila ilmenee muun muassa anoreksiana, pahoinvointisuutena, oksenteluna, neurologisina oireina sekä kuolettavina rytmihäiriöinä (Ren et al., 2024). Eräs seikka, joka tekee digoksiinin ja muidenkin sydänglykosidien käytöstä hankalaa, on niiden kapea terapeutinen ikkuna (Ziff ja Kotecha 2016).

Nimestään huolimatta sydäglykosideilla on myös havaittu olevan antineoplastisia (syövän kasvua heikentäviä) vaikutuksia (Kumavath et al., 2021). Nämä vaikutukset ja se, mihin vaikutukset kohdentuvat riippuvat sydänglykosidien koostumuksista. Esimerkiksi bufaliinin on havaittu vaikuttavan sytotoksisesti keuhkosityöpäsoluihin, kun taas ouabiinin on havaittu vaikuttavan sytotoksisesti rinta- ja eturauhassyöpäsoluihin. Sydänglykosidien antineoplastinen vaikutusmekanismi on monimutkainen (Kumavath et al., 2021). Jo vuosikymmenten ajan hyväksi

havaittu menetelmä suurikokoisten molekyylien, mukaan lukien sydänglykosidien analysointiin on tandemmassaspektrometrian eli MS/MS:n hyödyntäminen. Tässä tutkielmassa käsitellään pintapuolisesti, mitä MS/MS on ja millä eri laitteilla MS/MS:ään perustuvaa tutkimusta voidaan tehdä. Tutkielmassa käsitellään myös mitä sydänglykosidien massaspektreistä voidaan havaita, sekä miten näitä spektrejä voidaan hyödyntää sydänglykosidien analytiikassa. Tässä tutkielmassa keskitytään digoksiinin, digoksiinin, adynerigeniinin, oleandrigeniinin bufaliinin ja bufotaliinin pilkkoutumisiin MS/MS:ssä. On hyvä huomata, että sydänglykosideista on rajallisesti tietoa niiden pilkkoutumisreiteistä. Muiden sydänglykosidien tutkiminen voisikin olla potentiaalisesti tärkeä tutkimuskohde. Lisäksi tässä tutkielmassa käsitellään muita mahdollisia menetelmiä sydänglykosidien rakenteen määrittämiseen, jotka eivät perustu suoraan mittauksiin.

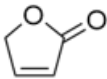
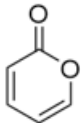
2. Sydänglykosidien rakenne

Sydänglykosidit rakentuvat steroidiosasta, siihen kiinnittyneestä tyydyttymättömästä laktonirenkaasta steroidirungon C17-asemassa sekä sokeriosasta (Botelho, Pierezan, Soto-Blanco, ja Melo, 2019). Erot sydänglykosidien rakenteissa perustuvat laktonirenkaiden ja sokeriosien eroavaisuuksiin. Sydänglykosidit voidaan jakaa kardenoliineihin ja bufadionilideihin niiden laktoniosien rakenteiden perusteella. Tyypillisimmät sokeriosat sydänglykosideilla ovat puolestaan glukoosi, galaktoosi, mannoosi, ramnoosi ja digitaloosi (Botelho et al., 2019). Sydänglykosidien yleinen rakenne on esitetty kuvassa 1 ja mahdolliset laktonisubstituentit on esitetty taulukossa 1.



Kuva 1. Luonnossa esiintyvien sydänglykosidien yleinen rakenne. Sydänglykosidit muodostuvat steroidikeskuksesta (punainen), sokeriosasta (sininen) sekä C17-hiilessä olevassa laktonisubstituenttiosasta (vihreä).

Taulukko 1. Sydänglykosidien steroidirungon C17-hiilen mahdolliset laktonisubstituentit. Kardenoliineissa substituenttina on 2-furanoni, bufadionilideissa substituenttiosana on 2-pyroni

Yhdiste	R ₁
2-furanoni	
2-pyroni	

Sydänglykosidien rakenne vaikuttaa yhdisteiden aktiivisuuteen sydänlihaksessa. Sydänglykosidien sokeriosa vaikuttaa yhdisteen voimakkuuteen, kun taas laktoniosa vaikuttaa yhdisteen kohdentumiseen sydänlihaksessa (Kumavath et al., 2021).

3. Massaspektrometria

Massaspektrometria on analyysitekniikka, jonka avulla voidaan tutkia yhdisteen rakennetta. Massaspektrometria on tekniikkana ollut tunnettu jo 1900-luvun alusta lähtien alkaen J.J Thompsonin tutkimuksista, joiden myötä löydettiin elektroni ja sen massavaraussuhde (de Hoffmann ja Stroobant 2007). Muita merkittäviä urauurtavia tutkijoita olivat muun muassa E. Goldstein, joka havaitsi anodisäteitä kaasufaasissa ja W. Wien, joka tutki anodisäteitä ja havaitsi näiden olevan positiivisesti varautuneita (de Hoffmann ja Stroobant 2007).

Massaspektrometria pysyi pääosin fysiikan ja fysikaalisen kemian tutkimusalueina aina 1960-luvulle, jonka aikana tekniikat ja menetelmät edistyivät huomattavasti (Greaves ja Roboz 2013). 1960-luvulla kaasukromatografian kaupallistuminen laajensi massaspektrometrian käyttöaluetta, koska tämä mahdollisti monimutkaisten yhdisteseoksien analysoinnin. Kaasukromatografian käyttö kuitenkin tuotti hankaluuksia polaaristen yhdisteiden analysoinnissa, mikä johtui kaasukromatografien taipumuksesta hajottaa polaarisia yhdisteitä, kun niitä haihdutettiin kaasufaasiin. Tämä hankaloitti bioaktiivisten yhdisteiden analysointia, koska suurin osa bioaktiivisista yhdisteistä on polaarisia. Lisäksi elektroni-ionisaation (EI) käyttö ionisaattorina toi omat haasteensa bioaktiivisten yhdisteiden analysointiin, koska EI:llä on taipumuksena pilkkoa

(fragmentoida) yhdisteet jo ionisaatiovaiheessa, mikä hankaloittaa yhdisteiden analysointia ja prekursori-ionin molekyyllipainon määrittystä.

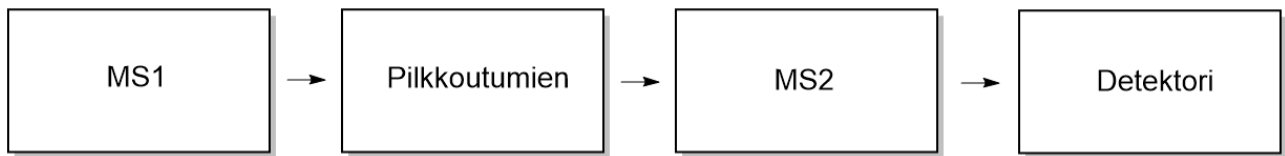
Bioaktiivisten yhdisteiden analysoinnin parantamiseksi kehitettiin 1970-luvun loppupuolella nopeilla atomeilla pommitukseen (FAB) perustuva ionisaatiotekniikka (Greaves ja Roboz 2013). FAB oli herkkä menetelmä polaaristen yhdisteiden ionisointiin, mutta johtuen matriisien käytöstä spektrien tulkinta hankaloitui (de Hoffmann ja Stroobant 2007). FAB:n käyttöä ionilähteenä vähennettiin 1990-luvulta sähkösumutusionisaation (ESI) ja matriisiavusteisen laserdesorptioionisaation (MALDI) kehittämisen myötä. ESI mahdollisti nestekromatografisten menetelmien käytön massaspektrometriassa, mikä helpotti huomattavasti polaaristen bioaktiivisten yhdisteiden analysointia. Lisäksi ESI ja MALDI pehmeinä ionisaatiomenetelminä sallivat ehjien yhdisteiden tutkimisen (van der Gugten, 2020).

Massaspektrometriassa analysoidaan nimestään huolimatta oikeastaan ionisoitujen yhdisteiden massavaraussuhteita (m/z), jossa verrataan ionien runsautta havaittuun varaukseen, jotka muunnetaan molekyyli-massaksi (Da), kun huomioidaan useasti varautuneiden ionien vaikutus eli varausasteet sekä mahdolliset adduktit (Allewell, Narhi ja Rayment, 2013). Koska yksittäisten ionien analyseissä mitataan massavaraussuhteita, on hyvä myös ottaa alkuaineiden isotooppijakaumat huomioon, jotka massaspektrometrin analysaattori havaitsee (Glish ja Vachet 2003). Nämä isotooppijakaumat aiheuttavat spektri-kaavioihin lisäpiikkejä. Massaspektrometrinen menetelmä koostuu näytteensyötöstä, ionilähteestä, analysaattorista ja detektorista (kaavio 1).



Kaavio 1. Massaspektrometrin menetelmän yleinen kaaviokuva.

Tandemmassaspektrometriassa eli MS/MS-spektrometrian analyysivaiheessa on kaksi peräkkäistä vaihetta käyttäen kahta massa-analysaattoria (Glish ja Vachet 2003). Ensimmäisessä vaiheessa massa-analysaattorissa eristetään ionit, joilla on haluttu m/z -suhde. Tämän jälkeen nämä eristetyt ionit pilkkotaan, jonka jälkeen ne analysoidaan MS/MS:n toisella massa-analysaattorilla. Yhdisteen rakenne voidaan päätellä fragmenttien ja fragmentaatiokaavioiden perusteella. Käytetyin pilkkomismenetelmä on törmäyksen aiheuttama dissosiaatio (collision induced dissociation, CID) (Glish ja Vachet 2003).



Kaavio 2. MS/MS-menetelmän yleinen kaaviokuva.

Ennen kuin sydänglykosideja voidaan analysoida massaspektrometrin menetelmin, täytyy näitä yhdisteitä sisältäviä näytteitä käsitellä tietyillä tavoilla. Tapoja, joilla sydänglykosideja voidaan eristää, on monta, mutta eristäminen voidaan tehdä esimerkiksi seuraavalla tavalla. Ensiksi näytteet on kuivattava. Kuivaus voidaan suorittaa käyttämällä kylmäkuivausta (Ravi, Guardian, Dickman, ja Wang, 2020) tai uunia (Singh, Nimoriya, Rawat, ja Mishra D. K. ja Kanojiya, 2021). Tämän jälkeen näytteet tulee maseroida. Maserointiin voidaan käyttää erilaisia liuottimia, esimerkiksi metanolia, jonka jälkeen näytteseokset jätetään huoneenlämpöön. Liuokset voidaan jättää useiksi päviksi maseroitumaan (Ravi et al., 2020; Singh et al., 2021). Maseroinnin jälkeen näytteet sentrifugoidaan ja suodatetaan, jonka jälkeen ne voidaan analysoida MS/MS:llä (Singh et al., 2021).

3.1 Näytteen syöttö

Näytteen syöttönä käytetään usein jotakin kromatografista menetelmää, jolla voidaan erotella yhdisteitä toisistaan samalla kun niitä syötetään massaspektrometrille. Näistä nestekromatografiset menetelmät ovat muodostuneet yleisimmiksi erotusmenetelmäksi MS/MS-analyysien yhteydessä (van der Gugten, 2020).

Nestekromatogrammissa (LC) käytetään pumppua sekä kahta faasia yhdisteiden erotteluun. Faaseina LC:ssä ovat ajoliuotin eli liikkuva faasi sekä kolonni eli kiinteä faasi. Näyte injektoidaan liikkuvaan faasiin, joka koostuu vedestä ja jostakin orgaanisesta liuottimesta. Kolonnin materiaalina käytetään usein piidioksidipohjaisia yhdisteitä, joissa on kiinni eripituisia ja erilaisia hiiliketjuja. Tyypillisimpinä hiilirunkoina ovat C8- ja C18-rakenteet (Cielecka-Piontek, Zalewski, Jelińska, ja Garbacki, 2013). Analysoitavat yhdisteet vuorovaikuttavat kolonnimateriaalin kanssa riippuen kyseisen yhdisteen rakenteesta, sekä käytetystä ajoliuottimesta, jolloin yhdisteet erottuvat toisistaan.

LC:tä voidaan käyttää normaali-ilmanpaineessa tai tätä suuremmissa paineissa, jolloin kromatografian erotuskyky paranee. Tällöin puhutaan korkean erotuskyvyn nestekromatografiasta (HPLC) tai erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografiasta (UHPLC). Erotukset nimissä riippuvat käytetyistä paineista ja kolonnimateriaalin partikkelikoosta. HPLC kykenee käyttämään 400 baarin painetta, kun taas UHPLC kykenee käyttämään jopa 1500 baarin painetta (Anette M., Thomas R. ja Yvonne P., 2016).

3.2 Ionisaatiomenetelmät

Ionisaatiomenetelmiä on kehitetty useita, mutta biomolekyylien tutkimisessa näistä yleisimmäksi ovat muodostuneet sähkösumutus-ionisaatio (ESI) ja matriisiavusteinen laserdesorptio-ionisaatio (MALDI) (Glish ja Vachet 2003). Näistä erityisesti ESI on muodostunut hyvin yleiseksi ionisaatiomenetelmäksi 1980-luvulta lähtien (van der Gugten, 2020).

ESI käyttää sähkövirtaa ionien muodostamiseen. Ionien muodostus tapahtuu kolmessa vaiheessa. Ensimmäiseksi näyteliuos sumutetaan sähköisesti varautuneiksi pisaroiksi. ESI:ssä käytetään sumutuskaasuna usein tyypeä nopeuttamaan näytteen virtausnopeutta. Toiseksi ionit erotellaan pisaroista. Erotteleminen tapahtuu ensin haihduttamalla pisaroita, mikä kasvattaa pintavaraustiheyttä. Kun sähköinen varaus saavuttaa kriittisen pisteen, pisaroissa olevat ionit siirtyvät kaasufaasiin. Kolmanneksi kaasufaasissa olevat ionit siirretään näytteenottokartiolle, josta ne kiihdytetään massa-analysointoriin (Bruins, 1998).

ESI:n eräänä tunnusomaisena piirteenä on sen kyky tehdä useasti varautuneita ioneja, mikä puolestaan antaa massa-analysointoreille kyvyn analysoida suurempia ioneja kuin mitä ne normaalisti kykenisivät havaitsemaan (Glish ja Vachet 2003). ESI:n etuna on myös sen liittäminen eri nestekromatografisiin menetelmiin, jolloin HPLC- ja UHPLC-tekniikoita voidaan hyödyntää massaspektrometrin analyysin tukena. Haittapuolena ESI:ssä on sen herkkyys suoloja vastaan. Tämän takia syötettävästä näytteestä on poistettava suoloja. Lisäksi johtuen ESI:n virtaavasta luonteesta osa näytteestä menee hukkaan, mikä haittaa kvantitatiivista määrittystä (Glish ja Vachet 2003).

MALDI:ssa ionien muodostaminen saadaan aikaiseksi ajoitetuilla lasersäteilytyksillä (Siuzdak, 1994). Näyte kiinnitetään kiinteäfaasimatriisiksi käyttämällä esimerkiksi 2,5-dihydroksibentsoehappoa, joka kykenee absorboimaan laserin emittoimaa tiettyä valon aallonpituutta pienentäen samalla lasersäteilyn näytteeseen aiheuttamaa vahinkoa. Säteilytyksen seurauksena syntyy yleensä yksinkertaisesti varautuneita ioneja, jotka ovat kaasufaasissa. Tämän jälkeen kaasufaasissa olevat ionit ohjataan sähköstaattisesti massa-analysointorille (Siuzdak, 1994).

MALDI:n hyvinä puolina on sen menetelmä ionisoida näytteitä ajoittain, mikä pienentää näytehävikkiä (Glish ja Vachet 2003). MALDI:n eräänä haittapuolena on sen yhteiskäytön hankaluus tiettyjen massa-analysointoreiden kanssa. MALDI:a käytetäänkin usein lentoaika-analysointoreiden (TOF) kanssa (Glish ja Vachet 2003).

3.3 Massa-analysointorit

Massa-analysointorit erottelevat ioneja toisistaan m/z -suhteen perusteella. Yleisesti ottaen ionisoitujen molekyylien erottelu perustuu niiden ioniseen liikerataan sähkö- ja magneettikentässä.

Tämä seikka on johtanut siihen, että massa-analysaattoreita on kehitetty useita erilaisia (Allewell et al., 2013). Tässä tutkielmassa keskitytään seuraaviin massa-analysaattoreihin ja näiden yhdistelmiin sydänglykosidien analysoinnissa: lentoaika (TOF), kolmoiskvadrupoli (QQQ), orbitrap sekä kvadrupoli ioniloukku. TOF on periaatteellisesti yksinkertaisin massa-analysaattori (Glish ja Vachet 2003). TOFissa ionit kiihdytetään vakiojännitteellä (1–20 kV) kammioon. Kammio, jossa lennot tapahtuvat, on tietyn mittainen, yleensä noin 0,5–2 m riippuen valmistajasta. Ionit liikkuvat eri nopeudella riippuen niiden massasta. Kuluneesta ajasta ja matkasta vakiojännitelähteeltä detektorille saadaan m/z -suhde selvitettyä. (Glish ja Vachet 2003). TOF-analysaattorin resoluutio on jopa 60 000 (Greaves ja Roboz 2013).

TOF:n etuina on sen laaja massa-alue, hyvä herkkyys ja toistonopeus sekä korkea resoluutio (Glish ja Vachet 2003). TOF:n haittoja ovat verrattain suuri analysaattorin koko. Kvadrupoli on laite, joka koostuu jännitteellä varatuista kohdistuvista linseistä sekä neljästä keskenään kohtisuorasta tangosta, joiden väliseen tilaan muodostetaan sähkökenttä xy -tasossa. Sähkökenttään saapuessaan ionisoidut molekyylit lentävät kiertoradalla. Linssien jännitettä ja kvadrupolien sähkökentän voimakkuutta säätämällä saadaan kvadrupolista suodatettuja ioneja, joilla on haluttu m/z -suhde (de Hoffmann ja Stroobant, 2007).

Kvadrupoleja voidaan laittaa useampi peräkkäin. Yleensä käytetään kolmea kvadrupolia, jolloin voidaan suorittaa tandemmassaspektrometrisiä mittauksia. QQQ-massaspektrometriassa ensimmäinen kvadrupoli asetetaan lähettämään ioneja, toinen kvadrupoli asetetaan törmäyskammioksi ja kolmas asetetaan lähettämään pilkkoutuneet ionit detektorille (Allewell et al., 2013).

Kvadrupolien haittapuolina on rajallinen massa-alue, noin 4000 Da, mikä haittaa suurempien yhdisteiden analysointia (Allewell et al., 2013). Lisäksi kvadrupolien resoluutiokyky on suhteellisen matala, noin 2000 (de Hoffmann ja Stroobant, 2007), mikä haittaa kvantitatiivista määrittystä. Kvadrupolien etuina ovat matala hinta sekä automaation helppous, mistä johtuen QQQ on yleisesti käytetty MS/MS-menetelmä (Glish ja Vachet 2003). Lisäksi kvadrupolien etuina ovat hyvä herkkyys (Allewell et al., 2013), jonka takia kvadrupoleja käytetäänkin usein muiden massa-analysaattoreiden kanssa MS/MS-järjestelmässä.

Ioniloukku on massa-analysaattori, joka muuttuvia sähkökenttiä käyttämällä pyrkii varastoimaan ioneja. Ioniloukku toimii samanlaisin periaattein kuin kvadrupolitkin (Glish ja Vachet 2003). Erotuksena kvadrupoleihin on kuitenkin se, että ioniloukussa sähkökenttä muodostetaan kolmiulotteiseksi myös z -akselille, jolloin analysaattorille tuotuja ioneja voidaan pitää loukussa. Eräs ioniloukun ominaisia piirteitä on sen kyky pilkkoa loukossa olevia ioneja ja selektiivisesti valikoida

fragmentit, jotka halutaan pilkkoa. Tällöin ioniloukulla voidaan muodostaa MS^n -spektrejä ionisoiduille yhdisteille (de Hoffmann ja Stroobant 2007).

Ioniloukun hyviin puoliin kuuluvat hyvä massaherkkyys sekä käytön suhteellinen helppous (Glish ja Vachet 2003). Vastaavasti huonoja puolia ioniloukulla ovat matala resoluutio, noin 4000, sekä rajallinen massa-alue, noin 6000 Da (Glish ja Vachet 2003; de Hoffmann ja Stroobant 2007).

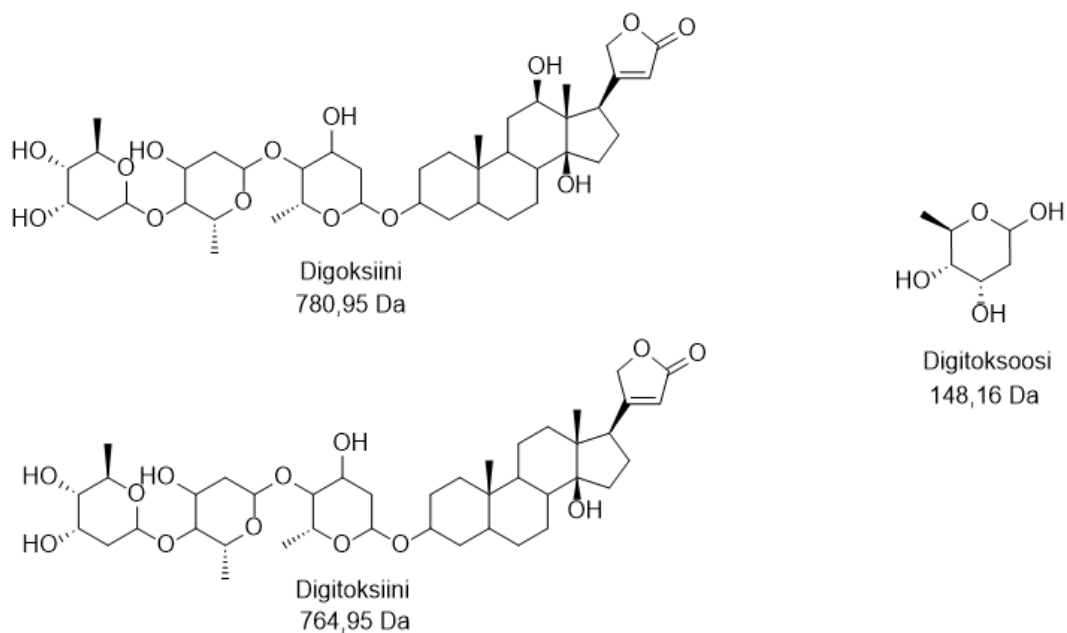
Orbitrap on massa-analysaattori, jonka avulla kyetään suorittamaan korkean resoluution massa-analyysiä. Orbitrap muodostuu kahdesta elektrodista, ulko- ja sisäelektrodista. Ionit syötetään kohtisuorasti elektrodien välistä usean kilovoltin kineettisellä energialla, jolloin ionit alkavat värähdellä monimutkaisina spiraaleina sisäelektrodin ympärillä. Nämä värähtelyt saadaan puolestaan muunnettua m/z -arvoksi Fourier-muunnoksen avulla (de Hoffmann ja Stroobant 2007).

Orbitrapin etuina on sen suuri resoluutiokyky, jopa 560 000, mikä mahdollistaa yhdisteiden tarkan m/z -arvon määrittämisen (de Hoffmann ja Stroobant 2007). Orbitrapilla on myös laaja massa-alue, jopa 50 000 Da. Orbitrapin käytön haasteena on analysaattorin korkea hinta, mikä hankaloittaa analysaattorin hankkimista.

4. MS/MS-fragmentaatio

Sydänglykosidien MS/MS-pilkkoutumisreitit riippuvat tutkitusta yhdisteestä ja ionimoodista. Sydänglykosidien massaspektristä voidaan havaita $[M+H]^+$ ja $[M+Na]^+$ -addukteja positiivisella ionimoodilla (Ravi et al., 2020). Näiden lisäksi voidaan havaita myös $[M+NH_4]^+$ -addukteja, mikäli nestekromatografian liikkuvana faasina on käytetty ammoniumia sisältäviä yhdisteitä (Kanojiya ja Madhusudanan 2012). Vastaavasti negatiivisella ionimoodilla voidaan havaita $[M-H]^-$, $[M+HCOO]^-$ - ja $[M+CH_3COO]^-$ -addukteja, mikäli nestekromatografian liikkuvana faasina on käytetty muurahaishappoa tai etikkahappojohdannaisia sisältäviä yhdisteitä. Lisäksi $[M+Cl]^-$ -addukteja voidaan havaita myös havaita. Positiivinen ionimoodi on yleisin käytetty moodi sydänglykosidien MS/MS-mittauksessa.

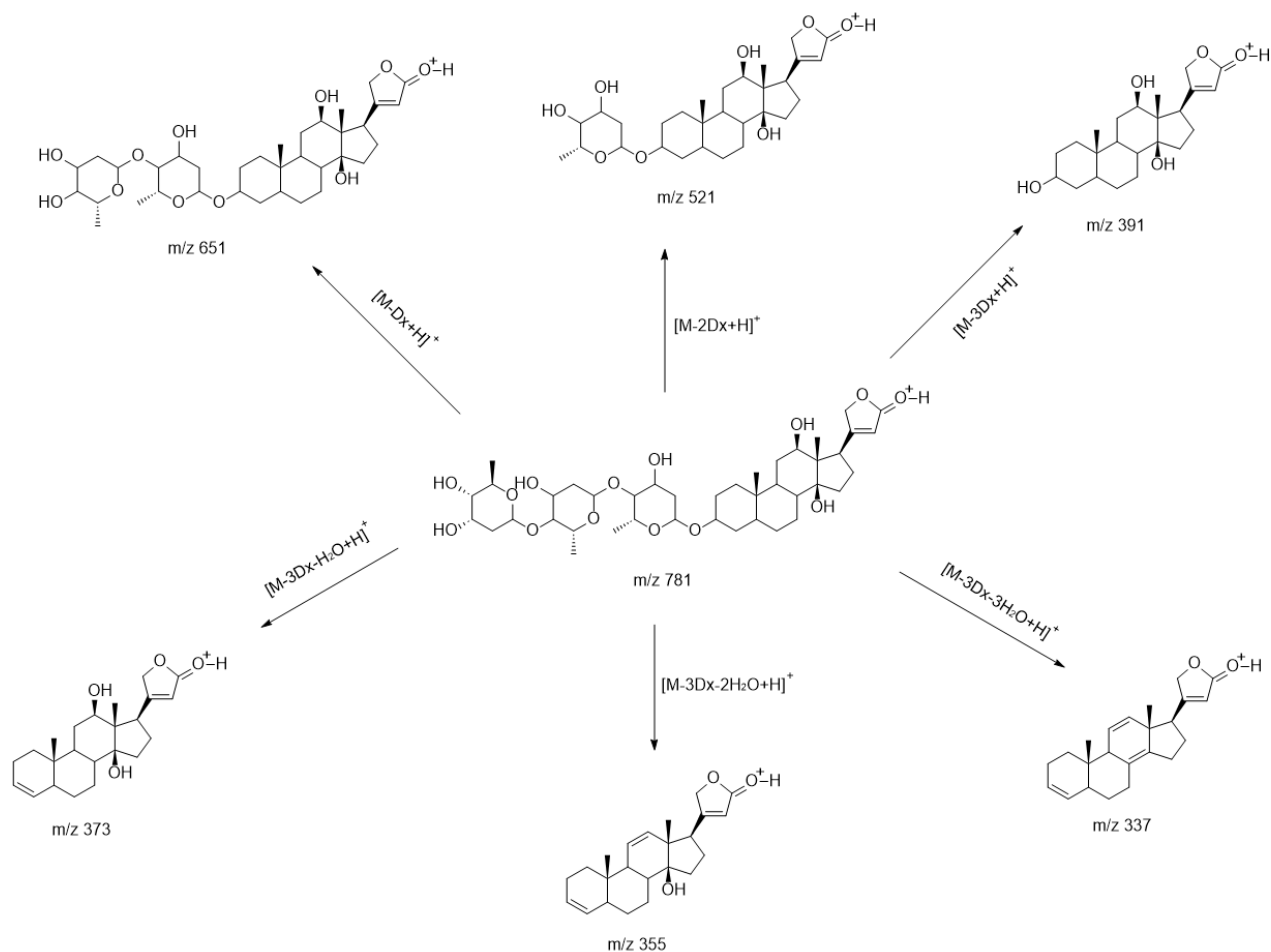
Sydänglykosidien pilkkoutumisreiteillä on tiettyjä samankaltaisuuksia, jotka voidaan havaita. Sydänglykosideille sokerienyksiköiden pilkkoutuminen on tunnusomaista. Sokerienyksiköiden pilkkoutumiset havaitaan *O*-glykosididostosten katkeamisena, jotka voivat tapahtua joko yksitellen tai useamman sokerienyksikön ryhmissä. Otetaan alustaviksi esimerkeiksi digoksiini ja digitoksiini, joiden rakenteet on esitetty kuvassa 2.



Kuva 2. Digoksiinin, digitoksiinin ja digitoksoosin rakennekaavat sekä näiden vastaavat molekyylipainot.

Digoksiinin tapauksessa voidaan havaita positiivisella ionimoodilla yhden, kahden ja kolmen digitoksoosiyksikön (lyhennys Dx) pilkkoutumiset $[M-Dx+H]^+$, $[M-2Dx+H]^+$, $[M-3Dx+H]^+$ (Ravi et al., 2020). MS/MS-spektristä nämä pilkkoutumiset havaitaan m/z -arvoilla 651, 521 ja 391 Da. Näiden lisäksi voidaan myös havaita kolmen OH-ryhmän pilkkoutumiset H_2O -molekyylin lohkeamisina $[M-3Dx-H_2O+H]^+$, $[M-3Dx-2H_2O+H]^+$, $[M-3Dx-3H_2O+H]^+$ steroidirungosta, jotka havaitaan m/z -arvoilla 373, 355 ja 333 Da.

Vastaavasti digitoksiinin tapauksessa massaspektristä havaitaan digitoksoosiyksiköiden pilkkoutumiset $[M-Dx+H]^+$, $[M-2Dx+H]^+$, $[M-3Dx+H]^+$ m/z -arvoilla 635, 505 ja 375. OH-ryhmien pilkkoutumisia steroidirungosta havaitaan vain kaksi, $[M-3Dx-H_2O+H]^+$, $[M-3Dx-2H_2O+H]^+$, m/z -arvoilla 357 ja 339 Da (Ravi et al., 2020). Molempien yhdisteiden spektrikaavioista voidaan havaita myös $[Dx-H_2O+H]^+$, eli protonoitunut digitoksoosiyksikkö, josta on lohjennut H_2O -molekyyli, m/z -arvolla 131 (Ravi et al., 2020). Kuvassa 3 on esitetty digoksiinin erilaisia pilkkoutumisreittejä.



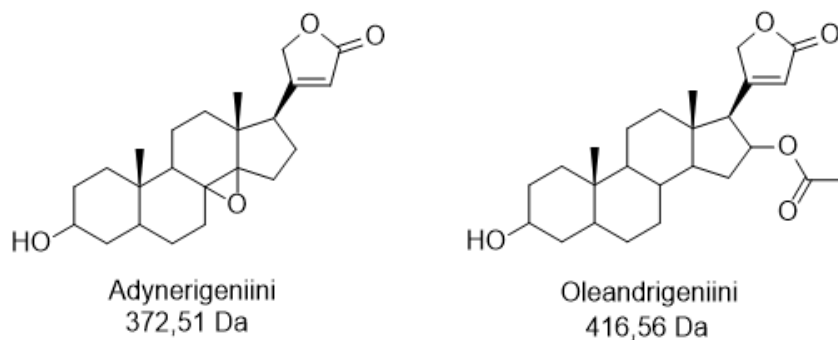
Kuva 3. Digoksiinista havaitut fragmentit MS-spektrien perusteella (Ravi et al., 2020).

Mielenkiintoinen havainto on se, että näiden spektrioppiikkien suhteelliset intensiteetit vaihtelevat. Digoksiinilla [M-Dx+H]⁺ piikki havaitaan vahvimpana, kun taas digitoksiinilla [M-3Dx+H]⁺ havaitaan vahvimpana (Ravi et al., 2020).

Sydänglykosideista irronneet sokeriosat voivat edelleen pilkkoutua. Sokeriosista voidaan havaita OH-ryhmän pilkkoutuminen, joka havaitaan H₂O-molekyylin lohkeamisena. (Ravi et al., 2020). Singh et al. (2021) puolestaan ovat havainnoineet sokeriosien pilkkoutumista tarkemmin. Kaksiketjuisesta heksoosisokerista, β-D-glukopyranosyyli-β-D-diginopyranosidi, voidaan havaita OH-ryhmän pilkkoutuminen, joka havaitaan H₂O-ryhmän lohkeamisena. Tämä havaitaan kuitenkin varsin heikosti MS/MS-spektrissä (Singh et al., 2021). Heksoosisokerien O-glykosidisidoksen pilkkoutuminen havaitaan puolestaan hyvin voimakkaina, mitkä havaitaan MS/MS-spektrissä *m/z*-arvoilla 145 ja 163 Da. Pilkkoutuneista sokeriryksiköistä puolestaan havaitaan OH-ryhmien ja eetterihappien pilkkoutumisia H₂O-molekyyleinä.

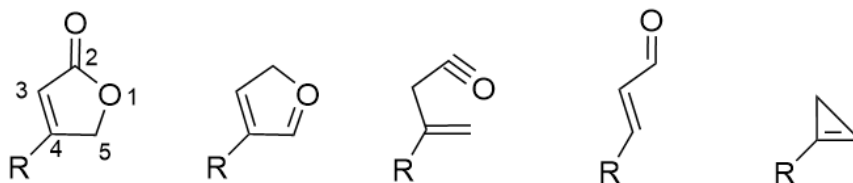
Steroidirunkoon liittyneet erilaiset substituentit pilkkoutuvat erilaisilla herkkyksillä. Esimerkiksi oleandrigeniinista havaitaan OH-ryhmien lisäksi myös AcO-ryhmän pilkkoutuminen

C16-hiilestä (Singh et al., 2021). AcO-ryhmän pilkkoutuminen tapahtuu helpommin kuin OH-ryhmien pilkkoutuminen, mikä havaitaan massaspektrissä CH₃COOH:n pilkkoutumisena. Vastaavasti adynerigeniinin β-8,14 epoksidiryhmä pilkkoutuu OH-ryhmiä hankalammin. Tämä havaitaan H₂O-molekyylin lohkeamisena (Singh et al., 2021). Metyyliryhmien lohkeamista ei ole havaittu. Oleandrigeniinin ja adynerigeniinin rakennekaavat on esitetty kuvassa 4.



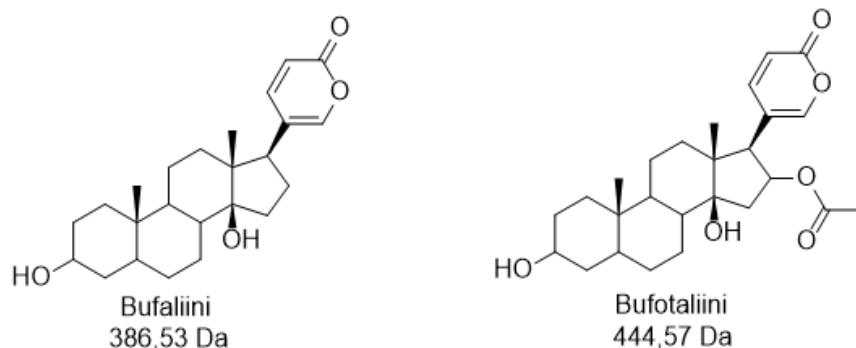
Kuva 4. Adynerigeniinin ja oleandrigeniinin molekyylikaavat.

Sydänglykosidien laktoniosat voivat myös pilkkoutua. Kardenoliineissa C17-hiilessä on kiinni 2-furanoni (Taulukko 1.), jonka pilkkoutuminen voidaan havaita eri tavoilla. Esimerkiksi 2-furanonin ketohapen pilkkoutuminen C2-aseasta voidaan havaita MS/MS-spektrissä H₂O-molekyylin lohkeamisena (Singh et al., 2021). Tämä säilyttää rengasrakenteen. Lisäksi 2-furanonin pilkkoutumisessa voidaan myös havaita eetterihapen H₂O-lohkeaminen ja CO-molekyylin lohkeaminen saman aikaisesti 2-furanonin C5-aseasta. Tällöin rengasrakenne puolestaan purkautuu tyydyttymättömäksi kolmen hiilen ketjuksi, jonka päässä on ketoniryhmä (Singh et al., 2021). Lisäksi 2-furanonista voi pilkkoutua myös eetterihappi ja ketonihappi C2-aseasta, mikä havaitaan MS/MS-spektrissä CO₂-molekyylin lohkeamisena (Li et al., 2010). Tällöin rakenne purkautuu tyydyttymättömäksi kolmen hiilen rengasrakenteeksi. Huomioitavaa on, että 2-furanonin ei havaita pilkkoutuvan kokonaan. 2-furanonin pilkkoutumista on kuvattu kuvassa 5.



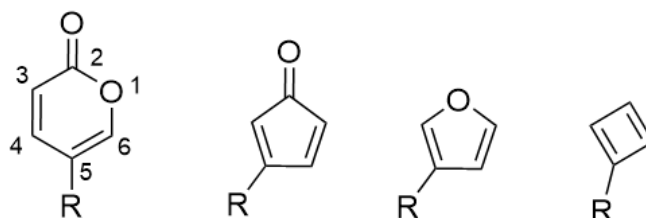
Kuva 5. 2-futanonin havaitut pilkkoutumiset MS/MS-spektrissä, jossa R on jonkin sydänglykosidin steroidirunkojohdannainen.

Bufadienolideissa on C17-hiilessä kiinni 2-pyroni (Taulukko 1.) Bufadienolideissa havaitaan samoja lainalaisuuksia kuin kardenoliineissakin. Otetaan esimerkeiksi bufaliini ja bufotaliini (kuva 6).



Kuva 6. Bufaliinin ja Bufotaliinin molekyylikaavat sekä molekyylipainot.

Bufaliinin MS/MS-spektristä havaitaan kahden OH-ryhmän pilkkoutumiset, jotka havaitaan H₂O-molekyylien lohkeamisina ($[M-H_2O+H]^+$, $[M-2H_2O+H]^+$) (Wong, Tsui, ja Kwan 2002). 2-pyronin havaitaan pilkkoutuvan kokoaan. Vastaavasti bufotaliinin MS/MS-spektrissä havaitaan AcO-pilkkoutuminen C16-hiilestä sekä kahden OH-ryhmän lohkeamiset H₂O-molekyyleinä (Liu et al., 2024). Tämän lisäksi voidaan havaita joko H₂O:n lohkeaminen 2-pyronin eetterihapesta tai CO:n lohkeaminen. Tällöin muodostuu joko tyydyttymätön syklopentadienoni tai furaani. Tästä edelleen voidaan havaita H₂O:n tai CO:n lohkeamiset riippuen edellisistä lohkeamista, jolloin muodostuu tyydyttynyt nelirengas 1,3-syklobutadieeni. 2-pyronin voidaan myös havaita lohkeavan kokonaan (Liu et al., 2024).



Kuva 7. 2-pyronin havaitut pilkkoutumiset MS/MS-spektrissä, jossa R on jonkin sydänglykosidin steroidirunkojohdannainen.

5. Datan hyödyntäminen

Kuten tässäkin tutkielmassa on esitetty eivät sydänglykosidien pilkkoutumiskaaviot ole yksiselitteisiä. Bioyhdisteiden todentaminen ESI-MS/MS:llä on hankalaa, mikä johtuu tarkkojen mitattujen spektrien tulkinnan hankaluudesta (Allen, Greiner ja Wishart, 2013). Perinteisesti käytetyt menetelmät yhdisteiden tunnistamiseen perustuvat MS/MS-spektrien vertailuun. Ongelmaksi tässä muodostuu tietokantojen niukkuus, joihin spektrejä voisi verrata. Tietokantojen lisäys voisi olla eräs keino mittaustiedon hyödyntämiseksi vastaisuudessa, mutta tämä puolestaan vie aikaa.

Tätä ongelmaa helpottamaan on kehitetty useita laskennallisia menetelmiä (Bremer, Vaniya, Kind, Wang, ja Fiehn, 2022). Nämä menetelmät pohjautuvat säännönmukaisiin pilkkoutumisen mallintamisen työkaluihin, jotka pohjautuvat orgaanisen kemian ja kvanttikemian sääntöihin. Muita vaihtoehtoja ovat esimerkiksi koneoppimisen hyödyntäminen MS/MS-spektrien ennustamisessa, jossa tilastollisille malleille annetaan parametrit, joiden avulla muodostetaan spektrejä yhdisteiden spektrisuhteiden perusteella (Bremer et al., 2022).

Eräs tällainen koneoppimista käyttävä menetelmä on kilpaileva fragmentaatiomallinnus (CFM) (Allen, Greiner ja Wishart, 2014; Bremer et al., 2022). ESI/MS/MS-fragmentaatiokaaviot mallinnetaan stokastisena ja homogeenisena markovin prosessina, johon sisällytetään varautuneiden fragmenttien tilanmuutokset. Nämä mallinnukset tehdään CID:ä käyttämällä, jolloin mallinnukset ja laskut pitävät sisällään myös hajoamistaipuvuuden eli kuinka helposti jokin osa saattaisi irrota CID:ssä yhdellä tietyllä törmäysenergialla. Tällöin puhutaan yhden energian kilpailevasta fragmentaatiomallinnuksesta eli SE-CFM:stä. Edellinen prosessi toistetaan useammalla törmäysenergialla, jolloin puolestaan puhutaan useamman energian kilpailevasta fragmentaatiomallinnuksesta eli CE-CFM:stä (Allen, Greiner ja Wishart, 2013).

CFM:n avulla voidaan tehdä kolme eri toimintoa, joiden avulla voidaan ennustaa yhdisteiden MS/MS-spektrejä (Allen, Pon, Wilson, Greiner, ja Wishart, 2014). Ensimmäiseksi CFM ennustaa spektrin tietylle yhdisteelle useammalla törmäysenergialla. Ohjelma asettaa prekursori-ionien muutokset riippuen käytetystä ionimoodista joko $[M-H]^-$ tai $[M+H]^+$ -ionille. Yleiset adduktit otetaan tässä myös huomioon. Tämän jälkeen algoritmi luettelee mahdolliset fragmentit todennäköisyyksien perusteella käyttäen määritettyä SE-CFM mallia. On kuitenkin hyvä huomata, että CFM ei kykene ennustamaan MS/MS-spektrin piikkien intensiteettiä, jolloin intensiteetit määräytyvät $[M-H]^-$ tai $[M+H]^+$ -ioneille asetettujen intensiteettien mukaan (Allen et al., 2014).

Toiseksi CFM asetetaan määrittämään piikkejä (Allen et al., 2014). Tämä saadaan aikaiseksi siten, että CFM luettelee kaikki mahdolliset fragmentit alkuperäisestä molekyylistä ja määrittelee massatoleranssirajat kullekin piikille. Piikeille voidaan asettaa useita eri vaihtoehtoisia rakenteita,

jolloin ne järjestellään todennäköisyyksien mukaan. Tämän jälkeen kustakin spektristä muodostetaan graafinen esitys (Allen et al., 2014).

Kolmanneksi CFM asetetaan tunnistamaan yhdisteitä, jolloin yhdistetään ensimmäisen ja toisen vaiheen tulokset (Allen et al., 2014). Näitä tuloksia voi verrata käyttäjän asettamiin ehdokasrakenteisiin tai olemassa oleviin tietokantoihin. Tietokantoja verratessa käyttäjän tulee määrittää prekursori-ionin massa, mahdolliset adduktit sekä massatoleranssit, josta edelleen massatoleranssit voidaan asentaa sen mukaisiksi, millaista MS/MS-laitteistoa käytetään (Allen et al., 2014).

CFM:n on kykenevä ennustamaan hyvin pienikokoisia tyydyttymättömiä hiilirengasrakenteita (Bremer et al., 2022). CFM ei kuitenkaan ole toistaiseksi kykenevä ennustamaan tätä monimutkaisempia rakenteita ja esimerkiksi heterosyklisen hiilirengasrakenteiden ennustaminen ei onnistu suurella tarkkuudella. CFM voi kuitenkin toimia yhdisteiden tunnistuksen tukena, koska CFM kykenee antamaan vaihtoehtoisia ehdokasrakenteita havaituille spektrien piikeille (Bremer et al., 2022).

6. Yhteenveto ja johtopäätökset

Sydänglykosideja käytetään edelleen sydämen vajaatoiminnan hoidossa, vaikka niiden käyttöä onkin vähennetty. Sydänglykosideilla on myös potentiaalia syöpälääkkeinä. MS/MS:n käyttö on muodostunut tehokkaaksi menetelmäksi sydänglykosidien kvalitatiivisessa analysoinnissa. Erityisesti ESI-MS/MS:n käyttö on muodostunut yleiseksi menetelmäksi. Tämä johtuu ESI:n kyvystä tuottaa runsaasti $[M+H]^+$ tai $[M-H]^-$ ioneja riippuen ionimoodista rikkomatta analysoitavia yhdisteitä ionisoimisvaiheessa. ESI voidaan myös kytkeä nestekromatografisiin laitteisiin, jolloin kyetään erottelemaan polaarisia bioaktiivisia yhdisteitä.

Sydänglykosidien MS/MS-fragmentaatiokaaviosta havaitaan tiettyjä samankaltaisuuksia riippumatta käytetystä MS/MS-laitteistosta eli käytetyillä analysointilaitteilla ja törmäyskammioilla ei ole merkittävää vaikutusta fragmentaatioon. Sydänglykosideilla sokerien pilkkoutumiset ovat hyvin tavanomaisia. Sokeriosien havaitaan pilkkoutuvan joko yksittäin tai useamman sokerin ryhmissä riippuen yhdisteessä olevista sokeriosien määristä. Sydänglykosidien steroidirungossa kiinni olevat muut substituentit voivat myös pilkkoutua.

Sydänglykosidien määrittämisessä voidaan spektrikirjastojen lisäksi hyödyntää koneoppimista saman aikaisesti CFM:ää, vaikka CFM itsessään ei välttämättä kykene riittävän tarkkaan analyysiin. Kuitenkin CFM voisi olla potentiaalisesti hyvä apu sydänglykosidien sokeriosien ja steroidirungossa olevien substituenttien pilkkoutumisten määrittämisessä.

Viitteet

- Allen, F., Pon, A., Wilson, M., Greiner, R., & Wishart, D. (2014). CFM-ID: A web server for annotation, spectrum prediction and metabolite identification from tandem mass spectra. *Nucleic Acids Research*, 42(W1). <https://doi.org/10.1093/nar/gku436>
- Allewell, N. M., Narhi, L. O., & Rayment, I. (2013). *Biophysics for the Life Sciences Molecular Biophysics for the Life Sciences*. Retrieved from <http://www.springer.com/series/10230>
- Anette M., Thomas R., & Yvonne P. (2016). *Analytical Techniques in the Pharmaceutical Sciences* (A. Müllertz, Y. Perrie, & T. Rades, Eds.). New York, NY: Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-4029-5>
- Botelho, A. F. M., Pierezan, F., Soto-Blanco, B., & Melo, M. M. (2019, February 1). A review of cardiac glycosides: Structure, toxicokinetics, clinical signs, diagnosis and antineoplastic potential. *Toxicon*, Vol. 158, pp. 63–68. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.11.429>
- Bremer, P. L., Vaniya, A., Kind, T., Wang, S., & Fiehn, O. (2022). How well can we predict mass spectra from structures? benchmarking Competitive Fragmentation Modeling for metabolite identification on untrained tandem mass spectra. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 62(17), 4049–4056. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.2c00936>
- Bruins, A. P. (1998). Mechanistic aspects of electrospray ionization. *Journal of Chromatography A*, 794, 345–357.
- Cielecka-Piontek, J., Zalewski, P., Jelińska, A., & Garbacki, P. (2013). UHPLC: The greening face of liquid chromatography. *Chromatographia*, 76(21–22), 1429–1437. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2434-6>
- Dashti, F., Jamshed, F., Ouyang, X., Mehal, W. Z., & Banini, B. A. (2023). Digoxin as an emerging therapy in noncardiac diseases. *CellPress*, 44(4), 199–203.
- de Hoffmann, E., & Stroobant, V. (2007). *Mass spectrometry principles and applications* (3rd ed.). John Wiley & Sons, Inc.,
- Felicity, A., Greiner, R., & Wishart, D. (2014). *Competitive Fragmentation Modeling of ESI-MS/MS spectra for putative metabolite identification*. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0676-4>
- Glish, G. L., & Vachet, R. W. (2003). The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(2), 140–150. <https://doi.org/10.1038/nrd1011>
- Greaves, J., & Roboz, J. (2013). *Mass Spectrometry for the Novice*.
- Grovesa, M. J., & Bissett, N. G. (1991). A note on the use of topical *Digitalis* prior to William Withering. *Journal of Ethnopharmacology*, 35, 99–102.

- Kanojiya, S., & Madhusudanan, K. P. (2012). Rapid identification of calotropagenin glycosides using high-performance liquid chromatography electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 23(2), 117–125. <https://doi.org/10.1002/pca.1332>
- Kumavath, R., Paul, S., Pavithran, H., Paul, M. K., Ghosh, P., Barh, D., & Azevedo, V. (2021). Emergence of cardiac glycosides as potential drugs: Current and future scope for cancer therapeutics. *Biomolecules*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/biom11091275>
- Li, Y., Wu, X., Li, J., Wang, Y., Yu, S., Lv, H., ... Du, D. (2010). Identification of cardiac glycosides in fractions from *Periploca forrestii* by high-performance liquid chromatography/diode-array detection/electrospray ionization multi-stage tandem mass spectrometry and liquid chromatography/nuclear magnetic resonance. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878(3–4), 381–390. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.12.008>
- Liu, R., Zhang, Y., Zhang, R., Zeng, H., Shen, Y., Li, X., ... Ye, J. (2024). Identification of anti-tumor constituents from toad skin and toad venom by UPLC-QTOF/MS in-depth chemical profiling combined with bioactivity-based molecular networking. *Arabian Journal of Chemistry*, 17(1). <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.105427>
- Prassas, I., & Diamandis, E. P. (2008). Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(11), 926–935. <https://doi.org/10.1038/nrd2682>
- Ravi, B. G., Guardian, M. G. E., Dickman, R., & Wang, Z. Q. (2020). Profiling and structural analysis of cardenolides in two species of *Digitalis* using liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1618, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.460903>
- Ren, Y., Anderson, A. T., Meyer, G., Lauber, K. M., Gallucci, J. C., & Douglas Kinghorn, A. (2024). Digoxin and its Na⁺/K⁺-ATPase-targeted actions on cardiovascular diseases and cancer. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 114, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2024.117939>
- Singh, Y., Nimoriya, R., Rawat, P., Mishra D. K. & Kanojiya, S. (2021). Structural analysis of diastereomeric cardiac glycosides and their genins using ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 32(5), 1205–1214. <https://doi.org/10.1021/jasms.1c00017>
- Siuzdak, G. (1994). Review the emergence of mass spectrometry in biochemical research. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 11290–11297. Retrieved from <https://www.pnas.org>

- van der Gugten, J. G. (2020, January 1). Tandem mass spectrometry in the clinical laboratory: A tutorial overview. *Clinical Mass Spectrometry*, Vol. 15, pp. 36–43. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.clinms.2019.09.002>
- Whayne Jr, T. F. (2018). Clinical use of Digitalis: A State of the Art Review. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 18(6), 427–440. <https://doi.org/10.1007/s40256-018-0292-1>
- Wong, S.-K., Tsui, S.-K., & Kwan, S.-Y. (2002). Analysis of proprietary Chinese medicines for the presence of toxic ingredients by LC/MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 161–170. Retrieved from www.elsevier.com/locate/jpba
- Ziff, O. J., & Kotecha, D. (2016). Digoxin: The good and the bad. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 26(7), 585–595. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2016.03.011>