



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

Analyyttisen menetelmän kehittäminen ja validointi kliinisessä käytössä olevien sydänglykosidien terapeuttiseen monitorointiin

Maija Laitimo

Luonnonyhdisteiden kemian

LuK-tutkielma

6 op

15.6.2025

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu
Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

Oppiaine: Kemia

Tekijä: Maija Laitimo

Otsikko: Analyyttisen menetelmän kehittäminen ja validointi kliinisessä käytössä olevien sydänglykosidien terapeuttiseen monitorointiin

Ohjaaja(t): Juha-Pekka Salminen, Maarit Karonen

Sivumäärä: 27 sivua

Päivämäärä: 15.6.2025

Sydänglykosidit ovat steroidien yhdisteryhmään kuuluvia yhdisteitä, joita käytetään lääkkeenä erilaisissa sydän- ja verisuonitaudeissa kuten sydämen vajaatoiminnassa. Ne inhiboivat Na⁺/K⁺-ATPaasia, mikä parantaa sydämen supistuvuutta. Sydänglykosideilla on kuitenkin kapea terapeuttinen alue eli pitoisuusväli veressä, milloin ne tuottavat halutun hoitovaikutuksen ilman vakavia haittavaikutuksia, minkä takia niiden lääkekäytön yhteydessä tarvitaan terapeuttista monitorointia. Siinä analyttisen menetelmän avulla määritetään tutkitun sydänglykosidin pitoisuus veressä, jotta potilaan lääkitystä voidaan säädellä.

Nykyiset analyttiset menetelmät ovat liian monimutkaisia käytettäväksi klinisiin laboratorioihin, joten uuden menetelmän kehittäminen on tärkeää. Nestekromatografia-tandemmassaspektrometria eli LC-MS/MS-menetelmä on hyvä vaihtoehto, koska menetelmän kehittämisen ja optimoinnin jälkeen sen käyttö on yksinkertaista ja nopeaa. Analyysiä varten biologinen näyte pitää esikäsitellä, johon on useampi eri menetelmä, kuten kiinteäfaasiuutto, neste-nesteuutto ja proteiinien saostus. Menetelmät eroavat spesifisyyden ja puhdistustarkkuuden perusteella. Sydänglykosidien pitoisuudet lääkekäytössä ovat pienet, joten puhdistustarkkuuden on oltava tarpeeksi tarkka, mutta yksinkertaisen menetelmän takia myös käytännöllinen klinisiin laboratorioihin.

LC-MS/MS-menetelmässä on paljon parametrejä, jotka pitää optimoida sydänglykosideille sopiviksi. Optimointi onnistuu kokeilemalla ja tuloksia vertailemalla. Parametrien optimaaliset arvot riippuvat käytetystä menetelmästä, analysoitavista yhdisteistä sekä näytteen koostumuksesta. Optimoinnin lisäksi analyttinen menetelmä pitää validoida eli varmistaa, että menetelmä on tarkka, luotettava, toistettavissa ja soveltuu tarkoitettuun käyttöön. Validoinnissa yritetään löytää kaikki osat ja vaiheet, jotka vaikuttavat analyysin tulokseen ja tarkistaa niistä syntyneiden virheiden suuruus.

Sydänsairaudet ovat hyvin yleisiä, joten niiden hoitojen tulisi olla hyvin tutkittuja ja tehokkaita. Tästä syystä uusien hoidossa auttavien menetelmien kehittäminen on tärkeää. Kliinisessä käytössä olevien sydänglykosidien analysointi LC-MS/MS-menetelmällä yksinkertaistaa ja nopeuttaa potilaiden hoitoa.

Avainsanat: nestekromatografia-tandemmassaspektrometria, sydänglykosidi, validointi

Sisällysluettelo

Käytetyt lyhenteet	4
1 Johdanto	5
2 Näytteiden esikäsittely	6
2.1 Sydänglykosidien standardiliuokset	6
2.2 Biologiset näytteet	7
2.2.1 SPE	8
2.2.2 LLE	10
2.2.3 Proteiinien poisto	11
3 LC-MS/MS analyysi	11
3.1 Menetelmän periaate	11
3.1.1 LC – Nestekromatografia	12
3.1.2 MS – Massaspektrometria	13
3.2 Kromatografiset parametrit	15
3.3 MS/MS - parametrit	18
4 Validointi	20
4.1 Lineaarisuus ja määrittämissrajat	20
4.2 Tarkkuus ja toistettavuus	21
4.3 Selektiivisyys	22
4.4 Stabiilisuus	22
4.5 Menetelmän soveltuvuus ja kliiniset näytteet	24
5 Johtopäätökset ja yhteenveto	24
Viitteet	25

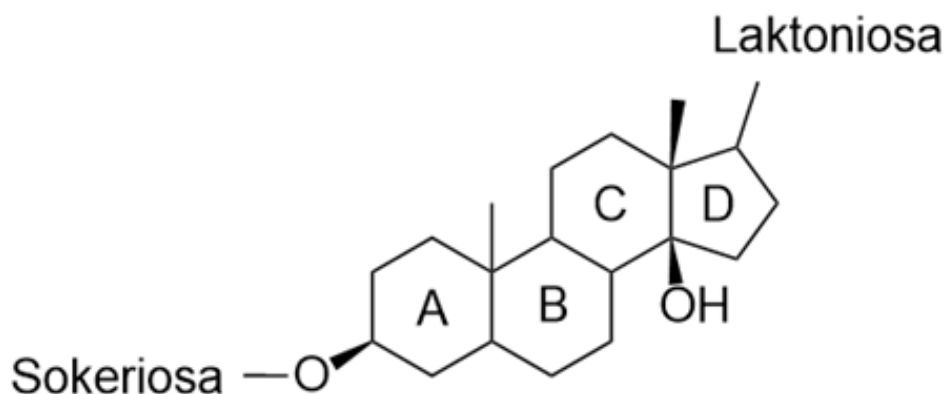
Käytetyt lyhenteet

APCI	Ilmanpaineessa tapahtuva kemiallinen ionisaatio (engl. atmospheric pressure chemical ionization)
CID	Törmäysindusoitu hajoaminen (engl. collision-induced dissociation)
ESI	Sähkösumutus-ionisaatio (engl. electrospray ionization)
HPLC-MS/MS	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia-tandemmassaspektrometria (engl. high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry)
LC	Nestekromatografia (engl. liquid chromatography)
LC-MS/MS	Nestekromatografia-tandemmassaspektrometria (engl. liquid chromatography-tandem mass spectrometry)
LLE	Neste-nesteuutto (engl. liquid-liquid extraction)
LOD	Havaitsemisraja (engl. limit of detection)
LOQ	Määrittäysraja (engl. limit of quantitation)
MALDI	Matriisi-avusteinen laserdesorptio/ionisaatio (engl. matrix-assisted laser desorption/ionization)
MRM	Useamman reaktion seuraamiseen perustuva menetelmä (engl. multiple reaction monitoring)
MS	Massaspektrometria (engl. mass spectrometry)
MTBE	Metyylitertiääributyleetteri (engl. methyl <i>tert</i> -butyl ether)
SMR	Valikoidun reaktion seuraamiseen perustuva menetelmä (engl. selected reaction monitoring)
SPE	Kiinteäfaasiuutto (engl. solid phase extraction)
TDM	Terapeuttinen lääke-monitorointi (engl. therapeutic drug monitoring)
UHPLC-MS/MS	Ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografia-tandemmassaspektrometria (engl. ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry)

Tutkielman teossa on käytetty merkittyjen viitteiden lisäksi Mendeley Reference Manager-ohjelmaa viitteiden merkinnässä sekä tekoälysovelluksia tukiälynä. ChatGPT:tä on käytetty apuna artikkelien suomennoksessa sekä selittämisessä paremmin ymmärrettävämmäksi. NotebookLM-tekoälyohjelmaa on käytetty asiansanojen löytämiseen annetuista lähteistä.

1 Johdanto

Sydänglykosidit ovat steroidien yhdisteryhmään kuuluvia yhdisteitä, joita löytyy luonnosta useista eri kasveista. Sydänglykosidit koostuvat steroidirenkaasta, jossa on substituenttina tyydyttymätön laktoniosa sekä sokeriosa, jotka on esitetty kuvassa 1. Steroidiosa määrittää yhdisteen aktiivisuuden ja laktoniosa yhdisteen yhdisteluokan. Sydänglykosidit voidaan jakaa kahteen luokkaan, kardenolideihin ja bufadienolideihin, niiden laktoniosan perusteella. Kardenolideilla on viisijäseninen tyydyttymätön butyrolaktonirengas ja bufadienolideilla kuusijäseninen tyydyttymätön pyronirengas.^{1,2}



Kuva 1. Sydänglykosidin perusrakenne.

Sydänglykosideja käytetään eri sydän- ja verisuonisairauksien, kuten sydämen vajaatoiminnan, hoidossa, koska ne muuttavat natriumin ja kaliumin tasapainoa sydänsoluissa, mikä puolestaan johtaa sydämen kalsiuminpitoisuuden lisääntymiseen ja sydämen puristumisen paranemiseen.³ Osalla sydänglykosideista, kuten digoksiinilla, on kapea terapeuttinen alue eli suurimman turvallisen ja pienimmän tehoavan hoitoannoksen välinen ero (0,5–2 ng/ml), minkä takia niiden pitoisuuksia veressä pitää mitata.^{4,5} Tätä kutsutaan terapeuttiseksi lääkehoidon seurannaksi (TDM). TDM on kliininen käytäntö, jolla voidaan estää vakavia hoitovirheitä mittaamalla kapean terapeuttisen alueen lääkkeiden pitoisuuksia veressä.⁴ Vakavia hoitovirheitä voi syntyä käytettyjen lääkkeiden myrkyllisyydestä.⁶

TDM:n alalla kliinisissä laboratorioissa on käytetty massaspektrometriaa (MS) analyysitekniikkana, mutta ongelmana on sen vaativuus. Sen käyttö vaatii asiantuntijoita klinisiin laboratorioihin, koska vielä ei ole olemassa käyttäjäystävällistä laboratoriomenetelmää, jonka näytteenkäsittely sekä MS-parametrien asetukset olisivat yksinkertaisia. Nestekromatografia-tandemmassaspektrometria (LC-MS/MS) on edistyksellinen tekniikka, joka yhdistää korkean erotuskyvyn kromatografisen erottelun spesifiseen ja erittäin herkkään detektiioon. Jotta LC-MS/MS:n käyttöä kliinisissä laboratorioissa voidaan hyödyntää laajemmin, pitää kehittää yksinkertainen analyysimenetelmä. Analyysimenetelmän pitäisi tunnistaa samanaikaisesti useampia sydänglykosideja, jotta hoidosta saataisiin tehokkaampaa ja nopeampaa. Menetelmän tavoitteena on olla kustannustehokas ja kestävä vaihtoehto klinisiin laboratorioihin.⁴

Analyttisen menetelmän kehittämisessä ja validoinnissa tarvitaan tietoa tutkittavista yhdisteistä, tässä tapauksessa sydänglykosideista. Näistä tutkittavista yhdisteistä tehdään standardiliuoksia eli liuoksia, joiden tarkka konsentraatio tiedetään. Standardiliuokset toimivat kalibroinnissa, vertailussa ja kvantitatiivisissa analyysissä. Standardiliuosten valmistamisen lisäksi pitää löytää paras keino puhdistaa ja valmistaa analysoitavat näytteet, kuten veri- tai plasmanäytteet.⁷ Näytteiden käsittelyn jälkeen optimoidaan LC-MS/MS-olosuhteet.⁴ Kehitetty menetelmä pitää myös validoida, eli tieteellisen näytön perusteella pitää vahvistaa, että menetelmä toimii käyttötarkoituksen mukaisesti.⁸ Validointiin kuuluu lineaarisuus, selektiivisyys, tarkkuus, toistettavuus, muistijälki ja matriisivaikutukset.⁴

2 Näytteiden esikäsittely

Näytteiden esikäsittely on olennainen osa kemiallista analyysiä. Näytettä voidaan harvoin analysoida sellaisena kuin se on otettu vaan sitä pitää käsitellä. Näytteen esikäsittely parantaa analyysin selektiivisyyttä, toistettavuutta, määrityksen herkkyyttä ja yhdisteiden erottumista kromatografiassa. Esikäsittelyllä voidaan myös helpottaa analyysiä muuttamalla analyytit sellaiseen muotoon, joka sopii analyysilaitteiston käytettäväksi paremmin.⁹ Esikäsittelemättömät tai huonosti käsitellyt näytteet voivat rikkoa kalliita analyysilaitteita, kuten nestekromatografian. Liian suuret kiinteät partikkelit voivat tukkia kromatografissa olevan kolonnin ja sen puhdistaminen on aikaa vievää ja työlästä.⁷ Sopivan näytevalmistusolosuhteen löytäminen on olennainen osa analyttisen menetelmän kehittämistä. On löydettävä mahdollisimman yksinkertainen ja kustannustehokas menetelmä puhdistaa näytteet ilman kohdeyhdisteiden näytehävikkiä.⁴

2.1 Sydänglykosidien standardiliuokset

Standardiliuokset LC-MS/MS-analyysissä ovat laimennoksia varastoliuoksista. Varastoliuoksia laimennetaan sopivalla liuottimella haluttuun pitoisuuteen. Laimennoksista syntyneitä kantaliuoksia käytetään kalibroinnissa, biologisten näytteiden laimentamisessa LC-MS/MS-analyysiin sopiviksi sekä sisäisissä standardeissa.⁴ Kalibraatiosuoraa käytetään sopivan lineaarisen alueen määrittämisessä. Jokaisesta eri sydänglykosidista tehdään useita kantaliuoksia ja kalibraatiosuoria.⁴ Sisäinen standardi on standardiliuos, jota lisätään suoraan analysoitavaan näytteeseen ja sen tarkoituksena on korjata analyysin virheitä, kuten näytteen haihtumista. Se valitaan tutkittavien näytteiden perusteella ja sen tulisi käyttäytyä samalla tavalla kuin analyyttien, mutta se ei saa reagoida analyyttien kanssa tai häiritä signaalia. Sisäisen standardin pitää myös erottua selkeästi LC-MS/MS-analyysin tuloksista eikä sitä saa esiintyä näytteessä luonnostaan.^{10,11}

Abady työryhmineen tutki seitsemää eri sydän- ja verisuonilääkettä, joista kolme oli sydänglykosideja.⁴ Standardinäytteet valmistettiin pitoisuuteen 1 mg/g käyttämällä metanolia

liuottimena. Sydänglykosidien sisäisenä standardina oli digoksiini-21,21,22-d₃. Sisäinen standardi liuotettiin ensin metanoliin pitoisuuteen 100 µg/ml, jonka jälkeen se sekoitettiin ja liuotettiin vielä tislattuun veteen, jolloin saatiin 0,05 µg/ml:n pitoisuus. Valmistuksen jälkeen kantaliuokset säilytettiin -20 °C:ssa ja ne käytettiin yhden kuukauden aikana. Näistä kantaliuoksista valmistettiin 20 kalibraatioliuosta pitoisuusvälille 0,05–50 000 ng/ml.⁴ Ballotari työryhmineen kehitti ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografia-tandemmassaspektrometria-menetelmän (UHPLC-MS/MS) digoksiinin ja digitoksiinin määrittämiseen plasmasta.¹² Näiden sydänglykosidien standardiliuokset valmistettiin metanoliin pitoisuuteen 1,0 mg/ml, ja sisäisenä standardina käytettiin digoksiini-D3:a. Standardiliuokset säilytettiin -20 °C:ssa.¹²

Li työryhmineen kehitti LC-MS/MS-menetelmän digoksiinin määrittämiseen seerumista.¹³ Digoksiinin ja käytetyn standardin (digoksiini-D3) standardiliuokset valmistettiin laimentamalla niitä metanoliin pitoisuuteen 0,1 mg/ml. Valmistetut standardiliuokset säilytettiin +4°C:ssa. Kalibraatiokäyrää varten valmistettiin neljä kalibraatiopistettä: 0,1; 0,4; 1,4 ja 10 ng/ml, lisäämällä sopiva määrän digoksiinin standardiliuosta tyhjään seerumiin. Sisäisen standardin työliuos valmistettiin pitoisuuteen 10 ng/ml liuottamalla sitä 40 % metanoliin.¹³ Kanno työryhmineen kehitti lämpöherkän LC-MS/MS-menetelmän sydänglykosidien samanaikaiseen analyysiin verestä ja virtsasta.¹⁴ Sydänglykosidit laimennettiin metanoliin pitoisuuteen 1 mg/ml ja liuokset säilytettiin -20°C:ssa. Työliuokset valmistettiin laimentamalla varastoliuoksia nestekromatografian liikkuvaan faasiin.¹⁴ Josephs työryhmineen kehitti LC-MS/MS-menetelmän sydänglykosidien samanaikaiseen määrittämiseen digoksiinin puhtauden arvioimiseksi.¹⁵ Varastoliuokset valmistettiin metanoliin ja standardiliuosten liuottimeksi valittiin puhtaan veden ja metanolin 50:50 (v/v) seos, koska se oli lähellä nestekromatografian liikkuvan faasin koostumusta. Liuotinvalintaa perusteltiin sillä, että metanoli parantaa ionisaatiota paremmin kuin asetonitriili, mikä on tärkeää LC-MS-analyysissä.¹⁵

2.2 Biologiset näytteet

Biologisissa näytteissä, kuten veri- ja plasmanäytteissä, on tutkittavien yhdisteiden lisäksi paljon muita rakenneosia, kuten proteiineja ja verisoluja. Näyte ja sen sisältämät komponentit määrittävät tarvittavan esikäsittelyn. Esimerkiksi punasolut hävitetään yleensä käyttämällä sentrifugia.⁷ Terapeuttisessa lääkemonitoroinnissa on yleisesti käytetty kiinteäfaasiuuttoa (SPE) ja neste-nesteuuttoa (LLE) näytteiden puhdistuksessa niiden hyvän valikoivuuden ja tehokkaan matriisin poistokyvyn vuoksi. Myös proteiinisaostus on yleistynyt menetelmä näytteiden puhdistuksessa, koska toisin kuin SPE ja LLE, se on vähemmän selektiivinen, mikä tekee siitä yksinkertaisemmän, nopeamman ja käytännöllisemmän.⁴

Abadyn työryhmä valmisti biologiset näytteet lisäämällä tunnetun määrän standardiliuoksia seerumiin ja sekoittamalla niitä tunnin ajan.⁴ Standardiliuoksien määrä oli noin 0,4 g ja seeruminäytteiden noin 6 g. Tarkat konsentraatiot riippuivat sydänglykosidien terapeuttisista ja lineaarisista alueista. Jokaiselle lääkkeelle valmistettiin neljä näytettä, joista kaksi oli terapeuttisella

alueella ja kaksi lineaarisella alueella. Työryhmä tutki useampaa näytteenkäsittelymenetelmää, kuten kiinteäfaasiuuttoa, orgaanista kiinteäfaasiuuttoa, neste-nesteuuttoa, proteiinien saostusta sekä seuraavaa seeruminäytteen valmistusmenetelmää: 1,5 ml seeruminäytettä ja 100 µl sisäistä standardia sekoitettiin keskenään, minkä jälkeen asetonitriiliä ja metanolia suhteessa 2:1 (v/v) sisältävää uuttoliuosta lisättiin 13,5 ml. Liuosta sekoitettiin 30 minuuttia. Sekoituksen jälkeen liuosta sentrifugoitiin 20 minuutin ajan 16 200 g:n voimalla. Nestekerros haihdutettiin tyhjiösentrifugissa kuivaksi 55 °C:ssa. Lopuksi kuivunut näyte liuotettiin 150 µl:aan 50 % metanolia ja suodatettiin 0,22 µm:n PVDF-suodattimella.⁴

Guan työryhmineen kehitti sydänglykosidien tunnistus- ja kvantitointimenetelmän verestä ja virtsasta käyttämällä HPLC-MS/MS-analyysiä.¹⁶ Tutkitut sydänglykosidit ja sisäiset standardit lisättiin veri- ja virtsanäytteisiin, jonka jälkeen testattiin LLE:tä sekä SPE:tä eri materiaaleilla sydänglykosidien erottamiseksi näytteistä. SPE:ssä kokeiltiin C18- ja HLB-kolonneja, joista HLB osoittautui parhaaksi. Käytettiin Oasis HLB-patruunaa ja sen aktivointiin ja tasapainottamiseen käytettiin metanolia, tislattua vettä ja ammoniumasetaattipuskuria. Eluutio tehtiin kloroformi/2-propanoli (95:5, v/v) seoksella. LLE:ssä käytettiin liuottimena kloroformi/2-propanoli (95:5) liuosta. Kokeilluista uutomenetelmistä LLE tuotti parhaimman tuloksen, mutta päädyttiin käyttämään SPE:tä, koska se käytti vähiten orgaanisia liuottimia, se voitiin suorittaa nopeasti eräprosessina ja se on ympäristöystävällisempi ja käytännöllisempi kliinisessä työssä.¹⁶

2.2.1 SPE

SPE eli kiinteäfaasiuutto on näytteen puhdistusmenetelmä, jossa analysoitavat yhdisteet saadaan eristettyä näytteestä perustuen analyyttien selektiiviseen sitoutumiseen kiinteän faasin kanssa. SPE:ssä näyte kulkeutuu kiinteän faasin läpi SPE-patruunassa ja analyytit pidättäytyvät siihen johtuen kiinteän faasin ja analyytin välisistä vuorovaikutuksista (kuva 2). Analyytin pidättäytymistä kiinteään faasiin kutsutaan retentioksi. SPE:n tavoitteena on poistaa näytteestä kaikki halutut yhdisteet. Nämä halutut yhdisteet saadaan talteen kiinteästä faasista liuottimella eli eluution avulla. Eluutio on käänteinen prosessi retention kanssa. Siinä kiinteän faasin läpi kulkeutuu liuotinta, jolla on voimakkaammat vuorovaikutukset analyytin kanssa kuin kiinteällä faasilla, minkä takia analyytti irtoaa kiinteästä faasista ja siirtyy liuottimeen. Yleensä liuottimien tilavuudet ovat pienemmät kuin alkuperäisen näytteen tilavuus, jolloin SPE myös rikastuttaa näytettä. SPE perustuu yhdisteiden välisiin vuorovaikutuksiin, joten kiinteän faasin ja liuottimen valinta on todella tärkeää. Analyytin on vuorovaikutettava kiinteän faasin kanssa tarpeeksi, jotta ne pidättäytyvät täysin eivätkä eluoidu jo pesuvaiheessa. Mutta pidättäytyminen ei saa olla liian voimakasta, koska analyytit on saatava eluoitumaan järkevillä määrillä liuotinta.⁹



Kuva 2. Kiinteäfaasiuutossa käytettäviä patruunoita. Kuva: Jeff Dahl, lisensoitu CC BY-SA 3.0 -lisenssillä. <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>

Abadyn työryhmä testasi SPE:tä, mutta totesi sen hankalaksi.⁴ Se ei tuottanut tarpeeksi hyvää uuttoa kaikille kohdelääkkeille ja sen optimointi kaikille lääkeaineille erikseen on aikaa vievää ja monivaiheista. Menetelmä ei heidän mielestään sovi rutiininomaiseen kliiniseen analytiikkaan.⁴ Kannon työryhmä käytti SPE:tä sydänglykosidien määrittämiseksi kokoverinäytteestä.¹⁴ Tutkittavaan näyteseokseen laitettiin kokoverta, ammoniumasetaattipuskuria, sydänglykosidiseosta, jossa oli neljää eri sydänglykosidia sekä digitoksigeeniiniä sisäisenä standardina. Uuttoon käytettiin Oasis HLB-patruunaa, joka aktivoitiin ja tasapainotettiin metanolilla, tislatulla vedellä ja ammoniumasetaattipuskurilla. Eluutiossa käytettiin metanolia ja lopuksi jäännös liuotettiin liikkuvan faasin ja metanolin seokseen.¹⁴ Frommherz työryhmineen kehitti LC-MS/MS-menetelmän sydänglykosidien digoksiinin ja digitoksiinin kvantitatiiviseen määrittämiseen biologisista näytteistä, erityisesti verinäytteistä.¹⁷ SPE:tä käytettiin sydänglykosidien erottamiseen verestä, plasmasta, virtsasta ja mahalaukun sisällöstä. Biologisiin näytteisiin lisättiin natriumasetaattipuskuria ja käytettyjä sisäisiä standardeja. SPE-patruunat aktivoitiin ja tasapainotettiin metanolilla, vedellä ja natriumasetaattipuskurilla. Eluutio tehtiin asetonilla ja lopullinen liuottaminen tapahtui käytettävään liikkuvaan faasiin.¹⁷

SPE perustuu spesifisiin vuorovaikutuksiin, joten useamman yhdisteen samanaikaiseen analysointiin se on haastava. Kehitettävän menetelmän on tarkoitus olla yksinkertainen, jota voitaisiin hyödyntää kliinisissä laboratorioissa, joten käytettävän puhdistusmenetelmän tulisi sopia useille eri kohdeyhdisteille. Mutta toisaalta SPE on tarkka menetelmä, jota kliinisessä käytössä olevat sydänglykosidit tarvitsevat, koska niiden pitoisuuden ovat pieniä. Valitun puhdistusmenetelmän on poistettava häiriötekijät, kuten rasvat ja proteiinit, tehokkaasti. Todennäköisesti suurin vaikuttava tekijä

SPE:n toimivuuteen on tutkittavien sydänglykosidien määrä. Jos tutkitaan vain muutamaa kemiallisesti samankaltaista yhdistettä SPE on hyvä valinta. Useamman kemiallisesti erilaisen yhdisteen analysointiin SPE on liian haastava.

2.2.2 LLE

LLE eli neste-nesteutto on näytteen puhdistusmenetelmä, jossa yhdisteet jakaantuvat kahden toisiinsa sekoittumattoman nesteen välillä perustuen niiden liukoisuuksiin eri nesteissä. Näytteen sisältämä liuos yhdistetään valittuun toiseen nesteeseen, ja seosta ravistellaan, jolloin halutut yhdisteet siirtyvät alkuperäisestä liuotimesta toiseen. Toinen liuotin on valittava niin, että mahdollisimman suuri määrä analyyttejä siirtyy siihen mutta epäpuhtauksien siirtyminen olisi mahdollisimman vähäistä. Tärkeintä on kuitenkin, että näyteliuos ja valittu liuotin eivät sekoitu keskenään vaan erottuvat selkeästi. LLE on yksinkertainen menetelmä eikä se vaadi kalliita laitteita, mutta tarvittava uuttoliuottimen määrä on yleensä suuri. Tarvittavaan uuttoliuottimen määrään vaikuttavat analyyttien jakaantumiskertoimet. Jakaantumiskerroin kuvaa analyytin jakaantumista liuottimien välillä. Mitä suurempi jakaantumiskerroin, sitä pienempi määrä uuttoliuotinta tarvitaan. Suuren uuttoliuottimen määrän takia uute on konsentroitava ennen jatkokäsittelyä.⁹

Abadyn työryhmä testasi LLE:tä ja totesi myös sen liian monimutkaiseksi.⁴ Yksikään orgaaninen liuotin ei onnistunut liuottamaan kaikkia tutkittavia kohdelääkkeitä samanaikaisesti, joten vaadittaisiin useampia uuttoliuottimia. Jotkin lääkkeet myös vaativat useampia uuttokertoja, mikä lisää työmäärää. Koska menetelmä on työläs ja aikaa vievä, se ei työryhmän mukaan sovellu kliinisiin laboratorioihin rutiininomaiseen työhön.⁴ Ballotarin työryhmä valmisti biologiset näytteet, tässä tapauksessa plasmanäytteet, käyttämällä neste-nesteuttoja sen nopeuden ja kätevyyden takia.¹² Plasmanäytettä siirrettiin 200 µl polypropeeniputkeen ja siihen lisättiin 1 ml metyyli-tertääributyleetteriä (MTBE), joka toimi orgaanisena liuottimena. Putkeen lisättiin myös 10 µl digoksiini-D3-liuosta, jolloin saatiin lopulliseksi konsentraatioksi 10 ng/ml. Seosta vorteksoitiin 2 minuuttia, minkä jälkeen se sentrifugoitiin 130 000 rpm 15 minuutin ajan. Nestekerros kerättiin ja siirrettiin lasiputkiin, joissa ne haihdutettiin typpivirran avulla huoneenlämmössä. Lopuksi näytteet liuotettiin 100 µl:n nestekromatografiassa käytettyyn liikkuvaan faasiin.¹² Linin työryhmä käytti LLE:tä heidän tutkimuksessaan sydänglykosidien erottamiseen seerumista.¹³ Työryhmä lisäsi 200 µl:n seerumia 20 µl:a isotoopilla leimattua sisäisen standardin liuosta. Uuttoliuottimena käytettiin myös MTBE:tä. Uuton jälkeen jäännös liuotettiin 100 µl:aan 40 % metanolia.¹³

LLE:ssä on samat huonot puolet kuin SPE:ssä eli useamman kemiallisesti erilaisen yhdisteen puhdistaminen on haastavaa. Sen lisäksi LLE vaatii suuren määrän liuotinta, mikä ei ole taloudellisesti järkevää. LLE:ssä on myös samat hyvät puolet eli puhdistus tarkkuus on hyvä. Todennäköisesti juuri tarkan puhdistustarkkuuden takia SPE ja LLE ovat laajalti käytössä terapeuttisessa monitoroinnissa sekä LC-MS/MS-analyseissa.

2.2.3 Proteiinien poisto

Biologisissa näytteissä on varautuneita yhdisteitä, jotka häiritsevät tutkittavien yhdisteiden analysointia. Näistä varautuneista yhdisteistä suurin osa on proteiineja. Proteiinien poistomenetelmiä on erilaisia, kuten ultrasuodatus, ultrasentrifugointi ja proteiinisaostus.⁷ Kohdeyhdisteiden kemiallisten ominaisuuksien mukaan saostukseen käytetään joko happoja tai orgaanisia liuottimia. Näytteeseen lisätty happo, kuten trikloorietikkahappo (TCA), trifluorietikkahappo (TFA) tai 5-sulfosalisyylihappo (SSA) saostaa proteiineja denaturoimalla tai häiritsemällä vetysidoksia, mikä johtaa sekundäärirakenteen häviämiseen. Orgaaniset liuottimet puolestaan häiritsevät hydrofobisia vuorovaikutuksia polaarittomien aminohapposivuketjujen välillä, mikä muuttaa proteiinien natiivirakennetta ja johtaa proteiinien sakkautumiseen. Ne myös aiheuttavat elektrostaattisia ja dipolisia vuorovaikutuksia, mitkä myös johtavat proteiinien saostumiseen.⁴ Saostuneet proteiinit voidaan poistaa näytteestä sentrifugoimalla.

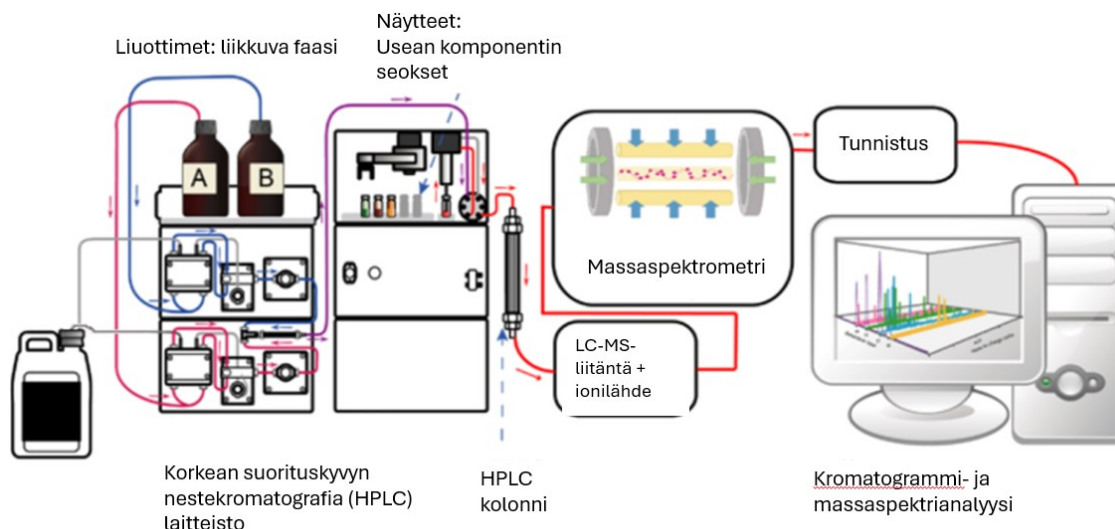
Abadyn työryhmä kokeili happosaostusta ja orgaanisen liuottimen käyttöä ja päätyi orgaaniseen liuottimeen.⁴ Happosaostus toimi tehokkaasti vain polaarille yhdisteille eli ei sydänglykosideille. Asetonitriilin ja metanolin 2:1 (v/v) -seos antoi kaikista parhaimman tuloksen kaikille tutkituille lääkeaineille. Työryhmä huomasi myös, että liuottimen määrä suhteessa näytteeseen on merkittävässä asemassa. Parhaan tuloksen antoi 90 % asetonitriilin ja metanolin 2:1 (v/v) -seos. Työryhmä valitsi proteiinien saostuksen esikäsitteilymenetelmäksi, koska se toimii parhaiten kaikille tutkituille lääkkeille, on yksinkertainen, edullinen ja sopii käytännön kliiniseen analytiikkaan.⁴

Proteiinisaostus ei ole yhtä yleinen LLE:hen ja SPE:hen verrattuna, vaikka se vaikuttaa hyvältä vaihtoehdolta. Proteiinisaostus ei ole niin spesifinen, jolloin se toimisi useampien yhdisteiden samanaikaiseen puhdistamiseen. Toki haittapuolena epäspesifisyydessä on puhdistuksen tehokkuus. Sydänglykosidien pienien pitoisuuksien takia olisi tarpeen saada näytteistä mahdollisimman paljon häiritseviä tekijöitä pois.

3 LC-MS/MS-analyysi

3.1 Menetelmän periaate

LC-MS-analyysissä on kaksi osaa, nestekromatografia ja massaspektrometria (kuva 3). Nestekromatografia erottelee näytteen yhdisteet toisistaan niiden kemiallisten ominaisuuksien perusteella, jolloin yhdisteet tulevat ulos kromatografista eri aikaan.⁷ Kromatografista tulevat näytteet siirtyvät massaspektrometriin, jossa ne ionisoidaan ja nämä ionit erotetaan toisistaan niiden massa-varaus-suhteen mukaan ja ne näkyvät suhteessa niiden runsauteen.¹⁸ Tuloksena saadaan kromatogrammeja ja massaspektrejä, joissa nähdään ionien massa-varaus-suhte, niiden määrä sekä retentioaika eli aika, milloin yhdiste on tullut kromatografista.



Kuva 3. LC-MS-analyysilaitteisto. Alkuperäinen kuva: julkinen omistusoikeus (CC0), lähde: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Liquid_Chromatography_Mass_Spectrometer.png

3.1.1 LC – Nestekromatografia

Kromatografian tavoitteena on erottaa seoksen yhdisteet joko yhdisteryhmiksi tai kokonaan erilleen toisistaan.⁹ Erotus perustuu yhdisteiden jakaantumiseen kahden eri faasin, liikkuvan faasin ja kiinteään faasin, välillä. Tutkittava näyte liuotetaan liuottimeen ja sitä pumpataan kolonniin, joka on täytetty kiinteällä hienojakoisella aineella. Näytteen yhdisteet jakaantuvat liikkuvan faasin eli liuottimen ja kiinteään faasin eli stationääri-faasin välillä johtuen yhdisteiden ja faasien vuorovaikutuksista.^{7,19} Yksinään jokainen yhdiste saavuttaisi tasapainokonsentraation nestefaasin ja kiinteään faasin välillä, mutta kun olosuhteita muutetaan pumppaamalla tuoretta liuotinta kolonniin, yhdisteet irtoavat kiinteästä faasista ja kulkeutuvat ulos kolonnista liuottimen mukana. Yhdiste, jolla on suurin affiniteetti kiinteään faasiin, kulkeutuu viimeisenä pois.⁷

Stationääri-faasin koostumus vaihtelee käyttökohteen mukaan ja sen laatu määrää onko kyseessä normaalifaasi-, eksklusio-, ioninvaihto- vai käänteiskromatografia.¹⁹ Normaalifaasikromatografiassa stationääri-faasi on poolinen ja liikkuvafaasi pooliton eli pooliset yhdisteet vuorovaikuttavat kiinteään faasin kanssa ja eluoituvat viimeisenä.²⁰ Käänteiskromatografia on yleisin käytössä olevista menetelmistä. Se on nimensä mukaisesti käänteinen normaalifaasikromatografia. Siinä on poolinen liikkuva faasi ja polaariton stationääri-faasi. Pooliset yhdisteet eluoituvat ensimmäisenä.²¹ Kolonnista liuotin ja näyte kulkeutuu detektoriin, joka mittaa konsentraation muutoksia signaalien muutoksina. Nämä signaalien muutokset siirtyvät tallentimeen ja tietokoneeseen, joka piirtää kromatogrammin.¹⁹

HPLC eli korkean erotuskyvyn nestekromatografia on kehitetty versio tavallisesta LC:stä. Sen toimintaperiaate on sama, mutta materiaalit ja näytteiden liikkuvuus eroavat hieman. Yksinkertaisen HPLC systeemi koostuu korkeapaineisesta liuotinpumpusta, injektorista, kolonnista, detektorista ja datan käsitteijästä. HPLC:ssä näyte ja liuotin ovat erikseen ja näytettä injektoidaan liuottimen sekaan ennen kolonnia. HPLC:ssä kiinteän faasipartikkelien koko on pienempi kuin tavallisessa LC:ssä, mikä

parantaa erotuskykyä. HPLC käyttää myös suurempaa painetta liuotinta pumpatessa, mikä nopeuttaa analyysiä. HPLC-analyysit saattavat kestää vain 15 minuuttia. Kehittynyt laitteisto on toisaalta myös vienyt sen hintaa korkeammalle verrattuna tavalliseen LC:hen.⁷ UHPLC eli ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografia on HPLC:stä vielä kehittyneempi versio, jossa on samat parannukset kuin LC:n ja HPLC:n välissä eli pienempi partikkelikoko, parempi erotuskyky, korkeampi paine sekä lyhyempi analyysiaika, mutta se on myös kalliimpi menetelmä.²²

3.1.2 MS – Massaspektrometria

Massaspektrometria on analyttinen menetelmä, jota voidaan käyttää molekyylien karakterisointiin sekä kvantifointiin.²³ Massaspektrometri koostuu näytteensyötöstä, ionilähteestä, massa-analysaattorista, detektorista sekä datan prosessointisysteemistä. Näytteensyöttöaukosta siirtyneet yhdisteet ionisoidaan ionilähteessä, jonka jälkeen syntyneet ionit erotetaan toisistaan massa-analysaattorissa niiden massa-varaus-suhteen perusteella. Massa-analysaattorista näytteet siirtyvät detektoriin, joka mittaa ionien runsautta muuttamalla ionit sähköisiksi signaaleiksi. Lopuksi sähköiset signaalit käsitellään ja ne välitetään tietokoneelle, jossa syntyy massaspektri.¹⁸ Massaspekttrin yhdistäminen molekyylien erotusmenetelmään, kuten nestekromatografiaan, mahdollistaa monimutkaisempien yhdisteiden analysoimisen.²³ MS/MS eli tandemmassaspektrometria on tarkempi menetelmä, joka eroaa tavallisesta massaspektrometriasta massa-analyysien määrän suhteen. Yleisimmin MS/MS:ssä on kaksi massa-analysaattoria ja niiden välissä on fragmentointivaihe. Ensimmäisen massa-analysaattorin jälkeen valitut ionit fragmentoidaan ja nämä fragmentit analysoidaan jälkimmäisessä massa-analysaattorissa, jolloin saadaan tarkempaa tietoa yhdisteiden rakenteista.²⁴

Ionilähteessä tapahtuvalle ionisaatiolle on olemassa useampia erilaisia menetelmiä, kuten sähkösumutus-ionisaatio (ESI), ilmanpaineessa tapahtuva kemiallinen ionisaatio (APCI) ja matriisiavusteinen laserdesorptio/ionisaatio (MALDI). ESI on yleinen ja pehmeä ionisaatiomenetelmä, jossa ionit muodostuvat normaalissa ilmanpaineessa. Siinä liuokseen liuotettu näyte kulkee pienen kapillaarin läpi, johon on kytketty korkea jännite. Kapillaarin päässä tapahtuu sähköstaattinen sumutus eli nestenäyte hajoaa pieniksi varatuiksi pisaroiksi. Pisarot sisältävät liuotinta ja analysoitavia molekyyliä. Pisaroiden varaus riippuu käytetyn jännitteen polariteetistä. Erityisesti biologisesti merkityksellisille ioneille protonaatio tai deprotonaatio on ESI:ssä tärkein ionisaatiotapa. Vapaat ionit irtoavat pisaroista, kun liuotinta haihtuu riittävästi, minkä jälkeen ne siirtyvät massa-analysaattoriin analysoitavaksi. ESI on herkkä menetelmä, joka sopii polaarille ja termisesti labiileille yhdisteille, kuten biomolekyylielle ja lääkkeille.²⁴

APCI tapahtuu myös ilmanpaineessa ja siinä ionisaatio tapahtuu ioni/molekyylireaktioiden kautta. Samalla tavalla kuin ESI:ssä, nestenäyte kulkeutuu kapillaarin läpi, mutta APCI:ssä sumutus tapahtuu sumutuskaasun (N₂) ja lämmön avulla. Ionisaatio käynnistyy hyvin pienestä neulasta lähtevästä koronapurkauksesta. Siinä neulaan kohdistetaan jännite, joka synnyttää sähkökentän, mikä puolestaan

ionisoi neulan ympärillä olevia reaktiivisia molekyylejä, kuten N_2 , O_2 ja H_2O . Reaktiiviset ionit jatkavat reagoimista, mikä lopulta johtaa analyyttien ionisaatioon, kun ne kulkeutuvat purkausalueelle. Purkauksessa muodostuu sekä positiivisia että negatiivisia ioneja. APCI ei ole yhtä herkkä suolojen aiheuttamille matriisihäiriöille kuin ESI, mutta koska APCI:ssä käytetään lämpöä sumutuksessa, lämpöherkät yhdisteet voivat hajota.²⁴ MALDI:ssa näyte sekoitetaan kiinteään matriisiin kanssa ja sitä säteilytetään pulssilaserilla. Laser saa näytteen desorboitumaan ja ionisoitumaan, jolloin syntyy kaasuvaiheessa olevia ioneja, jotka ohjataan analysoitaviksi massa-analyysaattorille. Toisin kuin ESI, MALDI on hyvin tolerantti suoloille ja puskureille ja sillä voidaan saavuttaa erittäin korkea herkkyys. MALDI on erityisen hyödyllinen suurmolekyyliainesten yhdisteiden, kuten proteiinien, analysoimisessa.²⁴

ESI:n on ajateltu olevan paras ionisaatiomenetelmä sydänglykosideille, koska se on pehmeä menetelmä. Sydänglykosidit voivat olla hauraita molekyylejä, mikä johtaa niiden liialliseen fragmentoitumiseen liian kovissa ionisaatiomenetelmissä, joten pehmeänä menetelmänä ESI on hyvä vaihtoehto. ESI:ä käyttämällä on myös huomattu sydänglykosidien muodostavan $[M+NH_4]^+$ -ioneja, kun analysissa on käytetty ammoniumformiaattipuskuria.¹⁶ Nämä ammoniumadduktit ovat runsaita ja stabiileja tuoteioneja.¹² Useat eri lähteet mainitsevat ESI:n käyttämisen ionisaatiomenetelmänä sydänglykosideja tutkittaessa biologisista näytteistä.^{4,13-16}

Fragmentaatiovaiheen tarkoituksena on pilkkoa ensimmäisessä massaspektrometrissä eristettyjä ioneja. Se perustuu ionien sisäisen energian lisäämiseen, kunnes ne hajoavat. Fragmentaatioon on useampi menetelmä, joista törmäysindusoitu hajoaminen (CID) on yleisin. Siinä ioni törmää neutraalin kohdekaasun kanssa ja osa sen kineettisestä energiasta muuttuu sisäiseksi energiaksi, mikä auttaa fragmentoitumisessa. Muita menetelmiä on pintaindusoitu hajoaminen (SID) ja valohajoaminen. SID:ssä ioni törmää muokatun pinnan kanssa, mikä muuntaa sen kineettisen energian sisäiseksi energiaksi. Valohajoamisessa puolestaan ionit aktivoituvat absorboimalla fotoneja.²⁴

MS/MS-analysissa on useampi analyysitekniikka, kuten SMR (selected reaction monitoring) ja MRM (multiple reaction monitoring), jotka eroavat seurattavien reaktioiden määrässä. Molemmat perustuvat siihen, että ensimmäinen massa-analyysaattori valitsee ionin, joka fragmentoidaan ja sitten monitoroi siitä syntyviä tuoteioneja. Eroa SMR:n ja MRM:n välillä on se, kuinka monta ionia ensimmäinen massa-analyysaattori valitsee ja kuinka montaa tuoteionia toinen massa-analyysaattori monitoroi. SRM keskittyy yhden ionin fragmentoitumiseen yhdeksi tuoteioniksi ja MRM voi keskittyä yhden ionin fragmentoitumiseen useammiksi tuoteioneiksi. MRM on SRM:n kehittyneempi versio, joka mahdollistaa useamman reaktion samanaikaisen monitoroinnin.²⁴ Useampi tutkimus on käyttänyt MRM:ää sydänglykosideja tutkiessa biologisista näytteistä.^{4,12,13,15,25} Kannon työryhmä käytti SRM:ää sydänglykosidien samanaikaisessa analysissa verestä ja virtsasta lämpöherkällä nestekromatografia-massaspektrometrialla (LC-MS/MS).¹⁴ Frommherzin työryhmä käytti SIM:iä (selected/single ion monitoring) sydänglykosidien määrälliseen määrittämiseen ihmisen verinäytteistä LC-MS-

menetelmällä, koska heidän analyysissään syntyi vakaita natriumaddukteja, joita ei voitu fragmentoida, minkä takia SIM tarjosi paremmat signaalin voimakkuudet.¹⁷

3.2 Kromatografiset parametrit

Nestekromatografiassa on paljon muuttuvia tekijöitä, joita voidaan säädellä parhaan tuloksen saamiseksi. Kromatografia perustuu näytteen ja faasien vuorovaikutuksiin, joten erottelun parantamiseksi pitää faasit valita hyvin. Liikkuvan faasin muokkaaminen on helpompaa, nopeampaa ja halvempaa kuin kolonnin muokkaaminen, joten muutokset yleensä tehdään siihen. Itse faasin muokkaamisen lisäksi sen nopeutta on mahdollista säädellä. Faasien polaarisuus vaikuttaa analyysin kestoon. Kun faasien polarisuudet ovat lähellä toisiaan, eluotuminen tapahtuu nopeammin ja jos polarisuudet eroavat toisistaan paljon, yhdisteen tarttuvat faaseihin tiukemmin ja eluotuvat hitaammin.⁷

Kolonneja on eri kokoisia niin pituudelta, kuin halkaisijaltaan. Käyttötarkoitus määrää mikä kolonneista on paras. Esimerkiksi ioninvaihto- ja affiniteetikromatografiassa kolonnien pitäisi olla lyhyitä ja leveitä, jotta erotuspinta olisi suuri ja erotuskolonnien pitäisi olla puolestaan pitkiä ja kapeita, jotta erotusreitti olisi mahdollisimman pitkä.⁷ Eri tutkimukset osoittavat, että sydänglykosidien analysointiin käytetään käänteisfaasikolonnia. Kolonnin mitat vaihtelevat analyysilaitteiston ja analyysin tarpeiden mukaan. Kolonnien koot vaihtelevat välillä $2,0\text{--}2,1 \times 50\text{--}150$ mm, $1,7\text{--}5$ μm .^{4,12,16,17,26} Kolonnin koon ja rakenteen lisäksi myös sen lämpötilaa voidaan säädellä. Kannon työryhmä käytti uutta lämpöherkkää polymeerierotuskolonnia sydänglykosidien analysointiin verestä ja virtsasta.¹⁴ He muuttivat kolonnin lämpötilaa 50°C :sta 10°C :seen 8 minuutin aikana. Lämpötilan muutos paransi viiden eri sydänglykosidin erottelua. Heidän työnsä yksi tärkeimmistä havainnoista oli, että kolonnin lämpötilaa muuttamalla voidaan säätää kromatografista erotusta ja retentioaikoja.¹⁴ Eri tutkimusten perusteella ei ole yhtä tiettyä kolonnin lämpötilaa, joka tuottaisi parhaimman tuloksen sydänglykosideille. Lämpötilat vaihtelivat huoneenlämmön ja 50°C :een välillä.^{4,12,13,16,17}

Koska nestekromatografia perustuu näytteen yhdisteiden jakaantumiseen kahden faasin välillä, on kolonnin valinnan lisäksi tärkeää löytää oikea liikkuva faasi. Kuten aiemmin todettiin, käänteisfaasikromatografia on yleisin menetelmä, joten käytetyt liikkuvat faasit ovat poolisia liuoksia. Liikkuva faasi vaikuttaa esimerkiksi yhdisteiden erottumiseen, retentioaikaan ja detekointiin. Liikkuvat faasit koostuvat yleensä veden ja orgaanisen liuottimen, kuten metanolin tai asetonitriilin, seoksesta. Vesipohjaista liuosta kutsutaan liikkuva faasi A:ksi ja orgaanista liuosta liikkuva faasi B:ksi. Orgaanisen liuottimen valinta vaikuttaa erotuksen selektiivisyyteen liuottimien erilaisten ominaisuuksien takia. Liuotinseoksiin voidaan myös lisätä pH:seen ja ionisoitumiseen vaikuttavia liuoksia, kuten erilaisia happoja ja emäksiä. Eluentin pH:n säätämällä voidaan optimoida selektiivisyyttä ja parantaa toistettavuutta.²⁷

Liikkuvan faasin lisäksi pitää päättää miten sen koostumusta vaihdellaan eluution aikana. Isokraattisessa eluutiosta liuottimen koostumus pysyy vakiona koko analyysin ajan. Koska erottelu perustuu vuorovaikutuksiin, eluentin vahvuus määrää retentioajan. Sen vahvuus puolestaan määräytyy eluentin koostumuksesta. Esimerkiksi käänteiskromatografiassa vahvemman eluentin voi tehdä suurempi määrä orgaanista liuotinta. Vahvempi eluentti lyhentää kaikkien yhdisteiden retentioaikaa ja heikompi pidentää niitä. Isokraattinen eluutio on yksinkertainen vähäisten muuttujien takia, mutta se ei ole tarpeeksi tehokas monimutkaisimmille yhdisteille, joilla on laaja retentioalue.²⁸ Toinen gradienttiohjelma on gradienttieluutio. Siinä liikkuvan faasin koostumusta muutetaan analyysin aikana. Yleensä liuottimen vahvuutta kasvatetaan ajan myötä. Käänteisfaasikromatografiassa tämä tarkoittaa orgaanisen liuottimen pitoisuuden kasvattamista vesipitoisessa liikkuvassa faasissa. Taulukossa 1 on esimerkki pitoisuuksien muutoksista. Gradienttieluutiota käytetään monikomponenttinäytteiden analysoimiseen, joiden komponentit kattavat laajan retentioalueen. Gradienttieluutio voi tehdä analyysistä nopeamman kuin isokraattista eluutiota käytettäessä. Se voi myös parantaa herkkyyttä ja erottelua. Sen optimointi on kuitenkin monimutkaisempaa, koska siinä on useampia selektiivisyyteen vaikuttavia muuttujia, kuten aloitusgradientti ja gradientin jyrkkyys. Gradienttieluutiota käytettäessä kolonni pitää pestä alkuperäisellä eluenttikoostumuksella ennen seuraavaa analyysiä.²⁸

Taulukko 1. Abadyn työryhmän gradienttieluutio.⁴

Aika (min)	% B (liikkuva faasi B)	Eluutiotyyppi
0–1	4 %	Isokraattinen eluutio
1–3	4 % → 40 %	Lineaarinen gradientti
3–6	40 %	Isokraattinen eluutio
6–7	40 % → 50 %	Lineaarinen gradientti
7–9	50 %	Isokraattinen eluutio
9–10	50 % → 100 %	Lineaarinen gradientti
10–13	100 %	Isokraattinen eluutio
13–14	100 % → 4 %	Lineaarinen gradientti
14–16	4 %	Kolonnin uudelleen tasapainotus

Sydänglykosideja tutkittaessa biologisista näytteistä käyttämällä gradienttieluutiota eri työryhmät ovat käyttäneet liikkuva faasi A:ssa ammoniumformiaattia pitoisuuksilla 2–10 mM, joko vedessä tai veden ja orgaanisen liuottimen (asetonitriili tai metanoli) seoksessa. Siihen on myös usein lisätty formiaattihappoa tai muurahaishappoa pitoisuuksilla 0,01–0,1 %. Liikkuva faasi B:ssä on yleensä käytetty orgaanista liuotinta, kuten asetonitriiliä tai metanolia, sellaisenaan tai seoksena veden kanssa. Faasi B:hen on myös usein lisätty ammoniumformiaattia yleensä 2 mM tai muurahaishappoa (0,1 %). Seossuhteet ovat vaihdelleet, mutta faasi B on selkeästi orgaanisempi kuin faasi A.^{4,12,15,16,26}

Gradientteliuution valitsivat työryhmät, jotka tutkivat useampaa sydänglykosidia samanaikaisesti. Vain muutamaa sydänglykosidia tutkineet työryhmät käyttivät isokraattista eluutiota, jonka liikkuvana faasina käytettiin vettä, orgaanisen liuottimen ja ionisaatiota parantavien aineiden seosta. Orgaanisena liuottimena on käytetty metanolia tai asetonitriiliä ja ionisaatiota parantavina aineina muurahaishappoa ja ammoniumasetaattia.^{13,17}

Eluutioliuoksen ja gradienttiohjelman lisäksi voidaan säädellä virtausnopeutta eli nopeutta, jolla liuotinta pumpataan kolonnin läpi. Virtausnopeus vaikuttaa analyysiin, erotustehoon, kromatogrammin piikkien leveyteen ja liuottimen kulutukseen. Fosterin työryhmä kertoo optimaalisen virtausnopeuden mittaamista ja määrittämistä gradientteliuutio nestekromatografiassa.²⁹ Heidän mukaansa parhaan mahdollisen erotuksen saavuttamiseksi on tärkeää valita optimaalinen virtausnopeus. He suosittelevat virtausnopeuden määrittämistä gradientteliuutiota käytettäessä suoraan erotustehokkuuden perusteella eli tarkastelemalla kromatogrammia ja mittaamalla, mikä virtausnopeus antaa parhaimman erottelun yhdisteille.²⁹ Sydänglykosideja tutkittaessa virtausnopeus eri tutkimusten perusteella vaihtelee välillä 0,1–0,4 ml/min, mutta on keskimäärin 0,2–0,3 ml/min.^{4,12–17,26} Taulukkoon 2 on vielä koottu nestekromatografian parametrejä, niiden arvoja sekä vaikutusta analyysiin.

Taulukko 2. LC-analyysin parametrit ja niiden arvot.

Parametri	Tutkimuksissa käytetyt menetelmät	Vaikutus analyysin laatuun
Kolonne	C18 ^{12,13,26,30} , C8 ¹⁷	Erotustapaan
Kolonnin mitat	2,0–2,1 mm × 50–150 mm, 1,7–5 μm ^{4,12,16,17,26}	Erottelukykyyn, aikaan ja paineeseen
Kolonnin lämpötila	Huoneenlämpö → 50 °C ^{4,12,13,16,17}	Analyysin nopeuteen ja tarkkuuteen
Liikkuva faasi	Vesi + metanoli/asetonitriili + pH-säätöaineet (ammoniumformiaatti, muurahaishappo) ^{4,12,13,15,16,17,26}	Kuljettaa näytteen laitteiston läpi ja vaikuttaa erottumiseen
Eluutiotyypit	Isokraattinen/gradientti ^{4,12,13,15,16,17,26}	Määrittää, miten yhdisteet erottuvat kolonnissa
Virtausnopeus	0,1–0,4 ml/min ^{4,12–17,26}	Analyysin kesto, erottelukyky ja laitteiston paine
Injektio-tilavuus	2–25 μL ^{4,12,13,15,16,26}	Erottelu, piikin muoto ja tarkkuus

Myös injektio-tilavuus pitää päättää eli miten paljon näytettä injektoidaan liikkuvaan faasiin analysoitavaksi. Injektio-tilavuuksista voidaan tehdä kalibraatiosuora, josta nähdään detektorin vaste injektoidun näytteen suhteen. Kalibraatiosuoran avulla voidaan mitata tuntemattoman näytteen pitoisuus sekä arvioida analyytin menetelmän suorituskykyä. Suurempi injektio-tilavuus voi parantaa

toistettavuutta, koska signaalien korkeus on suurempi taustakohinaan verrattuna, mutta liian suuri tilavuus voi aiheuttaa kolonnin ylikuormitusta, mikä puolestaan heikentää erotustehoa.²⁸ Optimaalinen injektio-tilavuus on tilavuus, joka tuottaa tarpeeksi hyvän vasteen ja toistettavuuden, mutta estää ylikuormittumisen. Käytetty injektio-tilavuus riippuu laitteistosta, kuten kolonnin koosta, sekä käytetystä menetelmästä. Esimerkiksi UHPLC:ssä riittää pienempi näytilavuus. Eri tutkimusten perusteella sydänglykosideja tutkittaessa injektio-tilavuus vaihtelee välillä 2–25 μL , joista 2 μL :aa käyttänyt työryhmä käytti analysoinnissaan UHPLC:tä ja muut HPLC:tä.^{4,12,13,15,16,26}

3.3 MS/MS-parametrit

MS/MS-analyysin alussa tapahtuu ionisaatio jollakin ionisaatiomenetelmällä, joka pitää valita analysoitavien yhdisteiden mukaan. Esimerkiksi sydänglykosideille parhaaksi tavaksi todettiin olevan ESI. ESI:ssä sekä massaspektrometrian muissa vaiheissa on paljon parametrejä, jotka pitää optimoida analyyteille ja laitteistolle sopiviksi. Ionisaatiomenetelmän lisäksi tulee valita ionisaatiotila eli tuotetaanko positiivisia vai negatiivisia ioneja. Abadyn työryhmä totesi, että positiivinen ionisaatio osoitti parhaan intensiteetin sydänglykosideille, mikä oli heidän mukaansa yhtenevä aikaisempien tutkimusten mukaan.⁴ Myös Josephsin¹⁵ ja Guanin¹⁶ työryhmät valitsivat positiivisen ionisaation sydänglykosideille. Ionisaatiossa molekyylit muodostavat ioneja, jotka sydänglykosidien tapauksessa ovat monien eri lähteiden mukaan joko $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ -, $[\text{M}+\text{H}]^+$ -, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ - tai $[\text{M}+\text{K}]^+$ -ioneja.^{4,15,16} $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ -ionin on huomattu olevan runsain^{12,13} ja se parantaa analyysin toistettavuutta ja uudelleen tuotettavuutta, koska stabiilit ja runsaat ionit johtavat luotettavampiin signaaleihin.¹⁵ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ -ionien runsautta ja muodostumisen helppoutta on parannettu lisäämällä ammoniumformiaattia LC-liuottimiin.¹²

ESI:n kapillaarilla, jonka läpi nestemäinen näyte kuljetetaan, on potentiaaliero (+500V - +4500V) vastakkaisen elektrodin kanssa. Tarvittava jännite riippuu neulan sisähalkaisijasta ja liuoksen muodostavista liuottimista.²⁴ Frommherzin työryhmä käytti HPLC-MS-menetelmässään sydänglykosidien tutkimiseksi verinäytteistä kapillaarijännitteenä 3300 V:a digoksiiniin ja digitoksiiniin $[\text{M}+\text{Na}]^+$ -ionien muodostamiseen.¹⁷ Muutama tutkimus käytti 4500 V:n jännitettä.^{14,16} Kapillaarin lämpötila, joka vaikuttaa liuottimen haihtumiseen, voidaan myös valita. Guanin työryhmä tutki 175°C, 200°C, 225°C ja 250°C kapillaarilämpötiloja sydänglykosidien analysointiin ja huomasi 200°C olevan paras.¹⁶ 200°C:ssa kaikkien heidän tutkimiensa sydänglykosidien SIM-signaalit, eli tietyn massa-varaussuhteen määrästä näytteessä kertovat intensiteettiarvot, olivat korkeimmat.¹⁶ Myös Kannon työryhmä käytti kapillaarilämpötilana 200°C tutkiessa sydänglykosideja verestä ja virtsasta HPLC-MS/MS-menetelmällä.¹⁴ Taulukkoon 3 on koottu massaspektrometrian parametrejä, niiden arvoja sekä vaikutusta analyysiin.

Taulukko 3. MS/MS-analyysin parametrit ja niiden arvot.

Parametri	Tutkimuksissa käytetyt arvot	Yleisimmin käytetty arvo	Vaikutus analyysin laatuun
Ionisaatiomenetelmä	ESI ^{4,13-16}	ESI ^{4,13-16}	Paras herkkyys sydänglykosideille
Ionimoodi	Positiivinen ^{4,15,16}	Positiivinen ^{4,15,16}	Tuottaa voimakkaamman signaalin
Muodostuvat ionit	[M+NH ₄] ⁺ , [M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺ , [M+K] ⁺ ^{4,15,16}	[M+NH ₄] ⁺ ^{12,13,15}	Runsain ja parantaa toistettavuutta
Kapillaarijännite	3300 V, 4500 V ^{14,16,17}	3300–4500 V ^{14,16,17}	Vaikuttaa ionisaatioon
Kapillaarin lämpötila	175–250 °C ¹⁶	200 °C ¹⁶	Parantaa ionisaatiota
Suojakaasun tyyppi	Typpi ¹⁶	Typpi ¹⁶	Auttaa pisaroiden muodostumisessa
Suojakaasun paine	50–75 psi ¹⁶	70 psi ¹⁶	Parantaa ionisaatiota
Apukaasun virtaus	2–10 ml/min ¹⁶	10 ml/min ¹⁶	Fokusoii pisarat ja pitää suihkukammion kuivana
Hajotuspotentiaali	50–106 V ^{4,12,25}	Riippuu sydänglykosidista	Säätää ionien fragmentaatiota
Törmäysenergia (CID)	15–28 eV ^{4,12}	Riippuu sydänglykosidista ja sen siirtymästä	Liian matala → heikko fragmentaatio, liian korkea → epästabiilit ionit

Massaspektrometria hyödyntää kaasuja useammassa vaiheessa analyysiä. Suojakaasua käytetään auttamaan nestemäisen näytteen hajoamista pisaroiksi. Guanin työryhmä käytti suojakaasuna tyyppiä tutkiessa sydänglykosideja verestä ja virtsasta HPLC-MS/MS-menetelmällä, ja he testasivat paineita 50, 60, 65, 70 ja 75 psi.¹⁶ Parhaimmat tulokset he saivat sydänglykosideille 70 psi:llä.¹⁶ Suojakaasun lisäksi on apukaasu, jonka tarkoituksena on auttaa pisaroiden fokusoinnissa kohti kapillaaria ja pitämään suihkukammion kuivana. Guanin työryhmä käytti siinäkin tyyppiä ja he tutkivat eri virtausnopeuksia: 2, 5, 8 ja 10 ml/min. Virtausnopeuksista he totesivat 10 ml/min olevan paras.¹⁶ Yksi massaspektrometrian parametreista on hajotuspotentiaali ja se säätää ionien hajotusta ja fragmentaatiota.³¹ Käytetyt hajotuspotentiaalivaihtelevat arvot sydänglykosideille vaihtelevat riippuen valitusta tuoteionista, sisäisestä standardista sekä analysoidavasta sydänglykosidista. Hajotuspotentiaalivaihtelevat eri tutkimusten mukaan välillä 50–106 V.^{4,12,25}

Toinen fragmentaatioon, erityisesti CID:iin, liittyvä parametri on törmäysenergia. Se on energia, joka kohdistetaan ensimmäisessä massaspektrometrissä valittuihin ioneihin ja siten määrittelee millä voimalla ionit törmäyvät kaasuun ja fragmentoituvat. Törmäysenergian säätely on tärkeää, koska sen suuruus vaikuttaa muodostuvien tuoteionien määrään. Jos energia on liian alhainen, fragmentaatio ei välttämättä ole tarpeeksi tehokas ja puolestaan, jos energia on liian korkea, fragmentaatio voi olla

liian voimakasta tai syntyneet tuoteionit ovat epästabiileja.³² Guanin työryhmä tutki sydänglykosidien fragmentoitumista eri CID-olosuhteissa.¹⁶ He huomasivat, että alhaisella törmäysenergialla ja törmäyskaasun paineella sydänglykosidien $[M+NH_4]^+$ -ionit fragmentoituivat tuottaen yhden tuoteionin, ja kun törmäysenergiaa kasvatettiin yhdestä ionista syntyi useampi tuoteioni. Heidän mukaansa vahvat CID-olosuhteet ovat tarpeelliset stabiilien prekursori-ionien fragmentoimiseksi.¹⁶ Ballotarin työryhmän käyttämät törmäysenergiat vaihtelivat 21 V:n ja 27 V:n välillä riippuen monitoroiduista siirtymistä.¹² Digitoksiinille he käyttivät 16–28 V:n törmäysenergioita.¹² Abadyn työryhmä käytti törmäysenergiaina digoksiinille 19 V ja digitoksiinille 15 V.⁴ Käytettävä törmäysenergia siis vaihtelee tutkittavan sydänglykosidin ja sen siirtymän mukaan.

4 Validointi

Validoinnilla tarkoitetaan analyysimenetelmän luotettavuuden ja pätevyysominaisuuksien testaamista, varmistamista ja osoitusta systemaattisesti, että menetelmä soveltuu siihen, mihin se on tarkoitettu.³³ Siihen kuuluu menetelmän suorituskyvyn ja sen soveltuvuuden arviointi ja sillä saadaan tietoa, millä varmuudella määrittäminen voidaan suorittaa.^{33,34} Analyyttisen menetelmän validointi on tärkeää tulosten luotettavuuden varmistamiseksi, koska analyysillä ei ole arvoa, jos sen tulokseen ei voida luottaa.³⁴ Validointi koostuu suunnitelmasta, kokeiden suorituksesta, tulosten tilastollisesta arvioinnista ja dokumentoinnista. Menetelmän validoinnissa voidaan tutkia selektiivisyyttä, spesifisyyttä, lineaarisuutta, mittausaluetta, toteamisrajaa, määrittämissuoraa, poikkeamaa, saantoa, häiriökestävyyttä, toimintavarmuutta, tarkkuutta, satunnaisvirhettä, toistettavuutta tai uusittavuutta. Kun menetelmä tuottaa tarkkoja tuloksia ja on asianmukaisesti osoitettu, että määrittäminen on tilastollisessa valvonnassa, menetelmä on validoitu.³³ Validointiin on useampia ohjeistuksia, kuten ICH (International Council for Harmonisation) ja FDA (U.S Food and Drug Administration).^{4,12} Abadyn työryhmä testasi lineaarisuutta, selektiivisyyttä ja matriisivaikutusta, tarkkuutta ja toistettavuutta, stabiilisuutta, siirtovaikutusta ja käyttökelpoisuutta.⁴ Heidän saamansa tulokset osoittivat, että menetelmä on selektiivinen, tarkka, toistettava ja stabiili, ja se soveltuu erilaisten seeruminäytteiden analysointiin.⁴

4.1 Lineaarisuus ja määrittämissuorat

Lineaarisuus tarkoittaa sitä, että analyytin pitoisuuden ja mittaustuloksen suhde on lineaarinen tietyn pitoisuusalueen välillä.³⁵ Lineaarisuutta tutkittaessa yritetään selvittää se mittausalueen pitoisuusalue, jossa kalibraatio-suora on lineaarinen.³⁶ Kalibraatio-suoran lineaarisuutta kuvaa korrelaatiokerroin, jonka tulisi olla $>0,99$.¹³ Suoraa hyödynnetään tuntemattomien näytteiden pitoisuuksien määrittelyssä. Suoran yhtälö on muotoa $y=ax+b$, jossa y on analyytin ja sisäisen standardin huippupinta-alojen suhde, x on analyytin ja sisäisen standardin pitoisuuksien suhde, a on kalibraatio-suoran kulmakerroin ja b on y -akselin leikkauspiste. Yhtälön perustella on mahdollista laskea havaitsemisraja (LOD) ja määrittämissuora

(LOQ).⁴ Havaitsemisraja tarkoittaa määritettävän komponentin pienintä pitoisuutta, joka voidaan todeta luotettavasti. Määritysraja puolestaan tarkoittaa alinta pitoisuutta, joka voidaan ilmaista kvantitatiivisesti.⁸

Abadyn työryhmä valmisti standardiliuoksia kalibraatiota varten kolmena toistona kolmena eri päivänä toistettavuuden takia.⁴ Havaitsemisrajan he määrittivät kaavalla:

$$LOD = \frac{3,3 \sigma}{S} \quad (1)$$

ja määritysrajan kaavalla:

$$LOQ = \frac{10 \sigma}{S} \quad (2)$$

missä σ on kalibrintisuoran y-leikkauspisteiden keskihajonta ja S kalibrintisuoran kulmakerroin. Heidän tutkimansa lääkkeet osoittivat hyvää lineaarisuutta ja korrelaatiokertoimet olivat $>0,999$. Määritysrajan arvot olivat 0,5–1 ng/ml, mitkä ovat verrattaessa aiempiin tuloksiin.⁴

4.2 Tarkkuus ja toistettavuus

Tarkkuus tarkoittaa mitatun arvon ja mittaussuureen todellisen arvon yhtäpitävyyttä ja toistettavuus mittaustulosten yhtäpitävyyttä, kun määritys tehdään toistettavissa olosuhteissa.^{8,36} Tarkkuuteen vaikuttavat systemaattiset ja satunnaiset virheet. Niiden summaa kutsutaan kokonaisvirheeksi, johon tarkkuutta yleensä rinnastetaan.³³ Systemaattisella virheellä tarkoitetaan mittausvirheen osaa, joka pysyy vakiona tai vaihtelee ennustettavalla tavalla mittausta toistettaessa. Satunnaisvirheellä puolestaan tarkoitetaan mittausvirheen osaa, joka vaihtelee ennustamattomalla tavalla mittausta toistettaessa.⁸ Systemaattisen virheen esiintymiseen vaikuttavat esimerkiksi virheellinen nollanäytteen arviointi, virheellinen kalibrointi tai näytteen mahdollinen muuttuminen ennen analysointia.³³

Tarkkuuden määritys onnistuu silloin, kun näytteen todellinen pitoisuus tunnetaan ja se ilmoitetaan yleensä prosentteina. Tarkkuutta voidaan arvioida myös osallistumalla vertailukokeisiin tai vertaamalla tuloksia toisella menetelmällä saatuihin tuloksiin. Systemaattista virhettä voidaan arvioida standardin lisäyksen avulla saantokokeella. Siinä näytteeseen lisätään tunnettu määrä määritettävää yhdistettä ja se analysoidaan alkuperäisen näytteen lisäksi. Menettelyn tarkoituksena on osoittaa, onko analysoitavassa näytteessä yhdisteitä, jotka voivat häiritä määritystä. Toistettavuutta voidaan määrittää analyysin mukaan joko rinnakkaismäärityksellä tai ilman. Vaikeissa ja monivaiheisissa analyyseissä rinnakkaismääritys ei onnistu, jolloin toistettavuus määritetään analysoimalla erityyppisiä näytteitä useampana päivänä. Silloin toistettavuus arvioidaan keskihajonnan avulla ja se ilmoitetaan usein prosentteina keskiarvosta. Rinnakkaismääritysten avulla tehdyssä toistettavuuden arvioinnissa käytetään tulosten keskihajontaa.³³

Abadyn työryhmä arvioi toistettavuutta ja tarkkuutta suorittamalla päivän sisäisiä ja päivien välisiä analyysejä seeruminäytteille, johon oli lisätty tunnettuja määriä standardiliuoksia.⁴ Analyysit suoritettiin neljällä eri pitoisuudella, kuudella rinnakkaisnäytteellä ja kolmena peräkkäisenä päivänä. Päivän sisäisillä testeillä tarkistettiin, antaako menetelmä samanlaisia tuloksia lyhyellä aikavälillä.

Päivien välisillä testeillä puolestaan arvioidaan menetelmän pitkäaikaista toistettavuutta. Tuloksia arvioitiin suhteellisen keskihajonnan ja saannon perusteella.⁴ Saannolla tarkoitetaan prosenttiosuutta lisätyistä standardiliuoksista, jotka voidaan mitata takaisin näytteestä. Saannot työryhmä laski mitatun ja lisätyn pitoisuuden suhteena ja kaikkien heidän tutkimiansa lääkeaineiden tulokset olivat 96,3 %-102,8 %, mikä osoitti hyvää tarkkuutta ± 5 %:n sisällä.⁴ Päivien sisäiset ja päivien väliset toistettavuuden arvot eivät ylittäneet 5,9 %:a, joten tarkkuus- ja toistettavuustulokset täyttivät kansainväliset hyväksyttävyysskriteerit, jotka ovat ≤ 15 %.⁴

4.3 Selektiivisyys ja matriisivaikutus

Selektiivisyydellä tarkoitetaan miten hyvin menetelmällä voidaan määrittää tiettyjä analyyttejä ilman, että samankaltaisesti käyttäytyvät yhdisteet aiheuttavat häiriöitä.³⁴ Matriisivaikutuksella tarkoitetaan näytteen muiden komponenttien, kuten proteiinien, vaikutusta mitattavan suureen arvoon.⁸ Selektiivisyyden testaamisella tarkistetaan, että havaittu kromatografian piikki on vain mitatusta yhdisteestä, eivätkä eri yhdisteiden signaalit mene päällekkäin.⁴ Näytematriisi voi sisältää aineita, jotka häiritsevät analyysiä vahvistamalla tai heikentämällä yhdisteen signaalia. Selektiivisyyskokeilla pyritään selvittämään erilaisten taustatekijöiden aiheuttamaa systemaattista virhettä. Niitä voidaan tutkia esimerkiksi vertaamalla standardiliuoksen signaalia ennen näytematriisilisäystä ja sen jälkeen.³³

Abadyn työryhmä testasi selektiivisyyttä vertailemalla ja tarkistamalla, ettei puhdistettujen seeruminäytteiden kromatogrammeissa ollut päällekkäisiä piikkejä lääkeaineiden piikkien kanssa.⁴ Kvantitatiivista matriisin selektiivisyyttä tutkittiin standardiliuoksen ja nollaseerumin seoksen avulla. Analyysi tehtiin kuudella rinnakkaisella näytteellä, mikä varmistaa menetelmän toistettavuuden. Matriisiefektia tutkittiin myös kolonnin jälkeisellä infuusiolla, jossa lääkeaineiden ja sisäisten standardien määritysrajan pitoisuuksia pumpattiin jatkuvasti LC-MS/MS-laitteeseen tasaisella virtausnopeudella (10 $\mu\text{L}/\text{min}$) samalla, kun tyhjiä seeruminäytteitä analysoitiin.⁴ Tulokset matriisiefektin tarkkuudessa olivat 15 %:n sisällä, mikä täyttää FDA:n vaatimukset.⁴ Kolonnin jälkeisellä infuusiolla saadut tulokset osoittivat, että signaalin voimakkuus pysyi vakiona, eikä seerumi vaikuttanut siihen. Tulosten perusteella valittu näytteenkäsittelymenetelmä todettiin soveltuvaksi, koska ei havaittu häiriöitä, palautumisprosentti oli hyvä eikä ollut matriisivaikutusta.⁴

4.4 Stabiilisuus

Stabiilisuus tarkoittaa mittauslaitteen kykyä pitää mittaustarkkuus ja toimintakyky ennallaan ajan kuluessa.⁸ Menetelmän validoinnin yhteydessä stabiilisuuteen kuuluu myös käytettävien reagenssien ja näytteiden säilyvyys, joita voidaan arvioida esimerkiksi tutkimalla niiden valoherkkyyttä ja käyttäytymistä eri lämpötiloissa.³⁵ Abadyn työryhmä arvioi tutkimiansa lääkkeiden standardiliuosten stabiilisuutta metanolissa, deionisoidussa vedessä, puhdistetussa seerumissa ja käsittelemättömässä

seerumissa.⁴ Näihin liuoksiin tehtyjen stabiilisuustestien tarkoituksena oli varmistaa, että lääkkeet eivät hajoa näytteiden käsittelyn, säilytyksen ja analyysin aikana.⁴

Analyysissä käytetyt standardiliuokset valmistettiin laimentamalla metanoliin liuotettua varastoliuosta deionisoidulla vedellä, minkä takia lääkkeiden stabiilisuutta piti arvioida metanolissa sekä deionisoidussa vedessä. Standardiliuokset valmistettiin laimentamalla varastoliuoksia metanoliin ja deionisoituun veteen, siten että pitoisuudet olivat kalibraatiosuoran lineaarisella alueella. Saatuja liuoksia verrattiin vastavalmistettuihin kalibraatioliuoksiin stabiilisuuden testaamiseksi. Metanoliin laimennetuilla standardiliuoksilla testattiin varastoliuosten stabiilisuutta ja deionisoituun veteen laimennetuilla kalibraatioliuosten stabiilisuutta. Varastoliuoksia käsitellään huoneenlämmössä, mutta niitä säilytetään yleensä -20°C :ssa, joten stabiilisuuden takia nämä olosuhteet pitää testata. Lämpötilasyklin stabiilisuutta arvioitiin sekä metanoliin että deionisoituun veteen laimennetuille näytteille. Ensin näytteitä pidettiin kolme tuntia -20°C :ssa ja sitten kaksi tuntia huoneenlämmössä. Sykli toistettiin neljä kertaa. Lämpötilasyklin lisäksi stabiilisuutta tutkittiin myös valossa. Siinä standardiliuokset jätettiin näkyvän valon alle 10 tunniksi, jonka jälkeen niitä verrattiin alumiinifoliolla suojattuihin kontrollinäytteisiin. Kuutta rinnakkaisnäytettä käytettiin jokaiselle olosuhteelle. Testien tulokset osoittivat, että standardiliuokset molemmissa liuottimissa pysyivät vakaina sekä lämpötilasykleissä että fotostabiilisuustesteissä, mikä kertoo, että niitä voidaan käyttää uudelleen ilman merkittävää hajoamista.⁴

Stabiilisuutta puhdistetussa seerumissa tutkittiin lisäämällä standardiliuoksia seerumiin ja puhdistamalla näytteet optimoidulla puhdistusmenetelmällä eli proteiinien saostuksella. Sen jälkeen näyte haihdutettiin ja rekonstruoiduttiin 50 % metanoliin (v/v). Rekonstruoidut näytteet jätettiin 4°C :een 24 tunniksi, jonka jälkeen ne analysoitiin testaamalla automaattisen näytteensyöttäjän (engl. autosampler) stabiilisuutta. Lämpötila valittiin sen takia, että se on automaattisen näytteenottajan yleinen lämpötila-asetus. Testi kertoo mahdollisesta epävakaudesta näytteen valmistuksen ja LC-MS/MS-injektion välillä. Tässäkin määrityksessä käytettiin kuutta rinnakkaisnäytettä jokaista olosuhdetta varten. Saatujen tuloksien mukaan puhdistetun seerumin stabiilisuus oli 95–98 % eli näytteet pysyivät stabiileina vähintään 24 tuntia näytteenpuhdistuksen jälkeen.⁴

Stabiilisuutta käsittelemättömässä seerumissa arvioitiin eri stabiilisuustesteillä. Niitä tehtiin analysoimalla testinäytteitä, jotka sisälsivät neljä eri pitoisuustasoa. Ensimmäinen stabiilisuustesti oli testi, jossa näytteitä pidettiin huoneenlämmössä neljä tuntia, mikä vastaa laboratorioskäsitelyä (engl. bench-top stability). Toinen testi oli jäädytys-sulatusstabiilisuus (engl. freeze-thaw stability). Siinä toistettiin neljä kertaa sykli, jossa ensin näytteet olivat kolme tuntia -20°C :ssa ja sitten huoneenlämmössä kaksi tuntia. Kolmas testi oli lyhytaikainen stabiilisuus (engl. short-term stability), jossa näytteet olivat ensin kolme päivää huoneenlämmössä ja sitten yhden viikon 4°C :ssa. Lyhytaikaista stabiilisuutta arvioitiin näytteiden säilytystä ja kuljetusta muihin laboratorioihin varten. Viimeinen eli neljäs testi oli pitkäaikainen stabiilisuus (engl. long-term stability), jossa näytteitä säilytettiin yhden kuukauden ajan -20°C :ssa. Myös tässä määrityksessä oli kuusi rinnakkaisnäytettä jokaista

testiolosuhdetta varten. Saadut tulokset osoittivat, että lääkkeet pysyivät stabiileina viikon ajan 4°C:ssa, mikä kertoo, että alhainen lämpötila on tarpeen näytteiden kuljetuksessa. Myös pitkä- ja lyhytaikaiset stabiilisuustestit täyttivät FDA:n kriteerit. Kokonaisuudessaan stabiilisuustestien tulokset antavat ohjeistuksia kliinisten näytteiden käsittelyyn.⁴

4.5 Menetelmän soveltuvuus ja kliiniset näytteet

Menetelmän tarkoituksena on analysoida sydänglykosideja seeruminäytteistä, ja koska seeruminäytteet voivat vaihdella esimerkiksi rasva-, sokeri- ja proteiinipitoisuuksien perusteelle, on tarpeen tutkia, miten menetelmä toimii erilaisissa seeruminäytteissä. Abadyn työryhmä testasi kehittämäänsä menetelmää hyperlipidemisissä, hyperglykeemisissä ja hyperalbuminemisissä seerumeissa, jotta voitiin varmistaa menetelmän soveltuvuus, vaikka seerumin kemiallinen koostumus olisi epänormaali.⁴ Erityisen tärkeää on varmistaa menetelmän tarkkuus hyperlipidemiaseerumissa, koska korkea kolesterolipitoisuus liittyy usein sydänsairauksiin. Tulokset osoittivat, että eri seerumityyppien mittaustulosten tarkkuus ja toistettavuus olivat hyväksyttävän rajan alapuolella, mikä osoittaa, että menetelmä soveltuu laajalti kliinisiin näytteisiin, koska se kestää seerumin mahdollisesti sisältävät häiritsevät aineet.⁴ Ballotarin työryhmä tutki 20 plasmanäytettä terveiltä vapaaehtoisilta, 20 plasmanäytettä >65-vuotiailta sisältäen maksan vajaatoimintaa sairastavia ihmisiä sekä 10 näytettä ruumiin verestä tutkiessa digoksiinia ja digitoksiinia plasmasta käyttämällä UHPLC-MS/MS-menetelmää.¹² Tutkimuksessa ei huomattu päällekkäisiä piikkejä tai häiriösignaaleja tutkituilla retentioajoilla.¹²

5 Johtopäätökset ja yhteenveto

LC-MS/MS-analyysi on hyvä vaihtoehto kliinisiin laboratorioihin sydänglykosidien analysointiin. Menetelmä on kehittynyt nopeaksi ja suhteellisen yksinkertaiseksi. Kehittämisvaiheessa menetelmä vaikuttaa monimutkaiselta, koska siinä on paljon parametrejä valittavana ja optimoitavana. Kehittyneen laitteiston takia, itse analysointi ei vaadi asiantuntijuutta, mikä on ollut ongelmana nykyisissä menetelmissä kliinisissä laboratorioissa. Menetelmän kehittämisen tarkoituksena on löytää parhaat parametrit sydänglykosideille, mitkä voidaan asettaa analyysilaitteistolle, eikä niitä tarvitse käytön yhteydessä muuttaa tai ymmärtää. Yksinkertaisesti sydänglykosidien pitoisuudet saadaan tietää esikäsittelemällä näytteet ja laittamalla ne analyysilaitteistoon.

Ei ole yhtä selkeästi parasta näytteenpuhdistusmenetelmää, vaan kaikissa on omat hyvät ja huonot puolet. SPE ja LLE ovat tarkkoja puhdistusmenetelmiä, mitä sydänglykosidit pienien pitoisuuksien takia tarvitsevat, mutta ne ovat myös spesifisiä, mikä hankaloittaa useamman yhdisteen samanaikaista puhdistusta. Vastakohtaisesti proteiinisaostus on hyvä vaihtoehto useamman yhdisteen puhdistamiseen, mutta se ei ole yhtä tarkka ja puhdistuksesta voi jäädä epäpuhtauksia, jotka voivat haitata sydänglykosidien analysointia. Yleisesti ottaen mitä parempi puhdistustehokkuus, sitä

spesifisemmin menetelmä on optimoitava eli menetelmä käy samanaikaisesti harvemmalle eri yhdisteelle.

Menetelmän parametreista jotkin ovat selkeitä vaihtoehtoja sydänglykosideille, kuten ionisaatiomenetelmänä ESI tai ionisaatiotilana positiiviset ionit. Osa parametreista on kuitenkin todella spesifisiä tietyille sydänglykosideille, kuten hajotuspotentiaali tai törmäysenergia, joten niille on haastava määrittää yhtä tiettyä parasta arvoa. Parametreihin vaikuttavat myös käytettävät laitteistot ja näytteen koostumus. Oikeat parametrit löydetään kokeellisilla testeillä. Parametrejä vaihdellaan ja parhaan tuloksen tuottanut parametri valitaan. Analyyttisen menetelmän kehittämisessä oikeiden parametrien valinnan lisäksi validoinnilla on todella tärkeä rooli. Ilman validointia menetelmään ei voida luottaa eikä sitä voida käyttää analysoinnissa. Validoinnissa koitetaan ottaa huomioon kaikki analyysin tulokseen vaikuttavat asiat, kuten mittausvirheet ja stabiilisuus. Menetelmä hyväksytään käyttöön, kun kaikki validointitestien tulokset ovat hyväksytyjä.

LC-MS/MS-menetelmän optimointi vielä paremmin soveltuvaksi kliinisiin laboratorioihin vaatisi vielä uuden ja yksinkertaisen näytteenkäsittelymenetelmän kehittämisen, jotta sillä voitaisiin puhdistaa useita eri yhdisteitä sisältäviä näytteitä, niin että puhdistustarkkuus pysyisi hyvänä, koska terapeuttisessa monitoroinnissa analyysit ovat usein kvantitatiivisia.

Viitteet

1. Botelho, A. F. M., Pierezan, F., Soto-Blanco, B. & Melo, M. M. A review of cardiac glycosides: Structure, toxicokinetics, clinical signs, diagnosis and antineoplastic potential. *TOXICON* **158**, 63–68 (2019).
2. Prassas, I. & Diamandis, E. P. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 926–935 (2008).
3. Swami, A., Ganpiseti, R., Chandluri, P., Lakshmi, B. V. S. & Aravinda Swami, P. *CARDIAC GLYCOSIDES USES IN HEART CARDIAC GLYCOSIDES USES IN HEART INTRODUCTION AND HISTORY*. www.wjpmr.com (2016).
4. Abady, M. M., Jeong, J. S. & Kwon, H. Development and validation of an analytical method using liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the therapeutic drug monitoring of seven cardiovascular drugs in clinical usage. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B-ANALYTICAL TECHNOLOGIES IN THE BIOMEDICAL AND LIFE SCIENCES* **1214**, (2023).
5. Doudecim terveyskirjasto. (2024).
6. Adaway, J. E. & Keevil, B. G. Therapeutic drug monitoring and LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* vols 883–884 33–49 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.09.041> (2012).
7. McMaster, M. C. *HPLC: A Practical User's Guide*. (John Wiley & Sons, New Jersey, 2007).
8. Kuitunen, M.-L., Nuutinen, J., Näykki, T. & Ruismäki, M. Laatusanasto. *Finntesting* (2022).

9. Suomi, J. *Kemiallisen Näytteen Esikäsittely*. (Otava, Keuruu, 2009).
10. Dolan, J. W. When Should an Internal Standard be Used? *LCGC North America* **30**, 474–480 (2012).
11. Orpana, S. Nestekromatografia-massaspektrometrinen analyysimenetelmän kehitys lyhytketjuisille karboksyylihapoille vesi- ja bioöljypohjaisista näytteistä. (Metropolia Ammattikorkeakoulu, 2014).
12. Ballotari, M. *et al.* Development of a new ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of digoxin and digitoxin in plasma: Comparison with a clinical immunoassay. *Electrophoresis* **43**, 1019–1026 (2022).
13. Li, S. *et al.* Therapeutic monitoring of serum digoxin for patients with heart failure using a rapid LC-MS/MS method. *Clin Biochem* **43**, 307–313 (2010).
14. Kanno, S. *et al.* Simultaneous analysis of cardiac glycosides in blood and urine by thermoresponsive LC-MS-MS. *Anal Bioanal Chem* **399**, 1141–1149 (2011).
15. Josephs, R. D., Daireaux, A., Westwood, S. & Wielgosz, R. I. Simultaneous determination of various cardiac glycosides by liquid chromatography-hybrid mass spectrometry for the purity assessment of the therapeutic monitored drug digoxin. *J Chromatogr A* **1217**, 4535–4543 (2010).
16. Guan, F. *et al.* Identification and quantification of cardiac glycosides in blood and urine samples by HPLC/MS/MS. *Anal Chem* **71**, 4034–4043 (1999).
17. Frommherz, L., Köhler, H., Brinkmann, B., Lehr, M. & Beike, J. LC-MS assay for quantitative determination of cardio glycoside in human blood samples. *Int J Legal Med* **122**, 109–114 (2008).
18. de Hoffmann, E. & Stroobant, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. (John Wiley & Sons, 2007).
19. Niemi, M., Vitanen, I., Virtanen, I. & Vuorio, E. *Solu- Ja Molekyylibiologia*. (Weilin + Göös, Espoo, 1994).
20. Horváth, C. Reversed-phase chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **1**, 6–12 (1981).
21. Boyes, B. E. & Dong, M. W. Modern Trends and Best Practices in Mobile-Phase Selection in Reversed-Phase Chromatography. *LCGC North America* **36**, 752–768 (2018).
22. Fekete, S., Schappler, J., Veuthey, J. L. & Guillarme, D. Current and future trends in UHPLC. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **63**, 2–13 (2014).
23. *Mass Spectrometry*. (IntechOpen, 2017).
24. Glish, G. L. & Vachet, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 2 140–150 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrd1011> (2003).

25. Kohls, S., Scholz-Böttcher, B., Rullkötter, J. & Teske, J. Method validation of a survey of thevetia cardiac glycosides in serum samples. *Forensic Sci Int* **215**, 146–151 (2012).
26. Ravi, B. G., Guardian, M. G. E., Dickman, R. & Wang, Z. Q. Profiling and structural analysis of cardenolides in two species of *Digitalis* using liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1618**, (2020).
27. Taylor, T. Reversed-Phase HPLC Mobile-Phase Chemistry — Explained. *LCGC North America* **32**, 894 (2014).
28. Schellinger, A. P. & Carr, P. W. Isocratic and gradient elution chromatography: A comparison in terms of speed, retention reproducibility and quantitation. *J Chromatogr A* **1109**, 253–266 (2006).
29. Foster, S. W., Wright, N., Grinias, J. P. & Blumberg, L. M. Measurement of optimal flow rate in gradient elution liquid chromatography. *J Chromatogr A* **1659**, 462645 (2021).
30. Tracqui, * A, Kintz, P., Ludes, B., Mangin'', P. & Mangin'', M. *High-Performance Liquid Chromatography-Ionspray Mass Spectrometry for the Specific Determination of Digoxin and Some Related Cardiac Glycosides in Human Plasma*. *Journal of Chromatography B* vol. 692 (1997).
31. Corr, J. J. & Anacleto, J. F. *Analysis of Inorganic Species by Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry and Ion Exchange Chromatography-Mass Spectrometry Using an Ion Spray Source*. *J. S. Ion Chromatography* vol. 9 <https://pubs.acs.org/sharingguidelines> (1967).
32. Mörlein, S., Schuster, C., Paal, M. & Vogeser, M. Collision energy-breakdown curves – An additional tool to characterize MS/MS methods. *Clinical Mass Spectrometry* **18**, 48–53 (2020).
33. Mäkinen, I., Suortti, A.-M., Saares, R. & Niemi ja Jari Marjanen, R. J. *Ohjeita Ympäristönäytteiden Kemiallisten Analyysimenetelmien Validointiin*.
34. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods : A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. (Eurachem, 2014).
35. Nyman, N. *Orgaanisen hiilen määrittämissuomenetelmän validointi*. (Metropolia Ammattikorkeakoulu, 2011). doi:10.5.2011.
36. Koivuniemi, L. *ISOSYANAATTIEN OMINAISMIGRAATIOANALYYSIN*. (2007).

Kuvat

Kuva 2: Wikimedia commons, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SPE_Cartridges.jpg

Kuva 3: Wikimedia commons,

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Liquid_Chromatography_Mass_Spectrometer.png