

Meritähtien tuottamat steroidipohjaiset erikoistuneet metaboliitit

massaspektrometrinen karakterisointi

Emma Säkkinen

Luonnonyhdisteiden kemia

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

15.6.2026

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Pääaine: Kemia

Tekijä: Emma Säkkinen

Otsikko: Meritähntien tuottamat steroidipohjaiset erikoistuneet metaboliitit

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

Sivumäärä: 34 sivua

Päivämäärä: 15.6.2026

Voidaan ajatella, että meritähntien tuottamilla erikoistuneilla metaboliiteilla on merkittäviä tehtäviä eliöiden biologisissa toiminnoissa kuin tulevaisuuden lääketeollisuuden potentiaalisina ratkaisuina. Kaksi merkittävää polaarisiin steroideihin kuuluvaa ryhmää, joita meritähdet tuottavat ovat asterosaponiinit ja polyhydroksisteroidit ja niiden glykosidit. Meritähntien tuottamat steroidiset glykosidit on yhdistetty niiden puolustus-, ruoansulatus- ja lisääntymistehtäviin. Lääkekehityksen kannalta kiinnostavimpina biologisina aktiivisuuksina voidaan pitää sytotoksisuutta, hemolyyttisyyttä, tubuliinipolymerisaation aktivointia ja anti-inflammatorisuutta.

Meritähdistä saatavien uutteen esikäsittely on olennainen osa kvantitatiivista ja kvalitatiivista analyysiä, sillä raakauutteen sisältävät usein paljon epäpuhtauksia. Näytteiden esipuhdistus ja fraktiointi suoritetaan usein kolonnikromatografialla (CC), erillisellä kiinteäfaasiutolla (SPE), neste-nesteuuttamisella (LLE) tai näiden yhdistelmillä. Massaspektrometriset (MS) menetelmät yhdessä nestekromatografian (LC) kanssa ovat osoittautuneet tehokkaiksi polaaristen steroidien karakterisoinnissa ja metaboliaprofiilin laadullisessa ja määrällisessä selvittämisessä. Tandemmassaspektrometriset (MS/MS) menetelmät antavat tarkempaa tietoa yhdisteiden kemiallisesta rakenteesta ja niiden biosynteesireiteistä. Suosituimpina ionisaatiotekniikoina polaaristen steroidien ionisoinnissa pidetään sähkösumutus-ionisaatiota (ESI) ja matriisiavusteista laserdesorptio-ionisaatiota (MALDI).

Merieliöiden tuottamat erikoistuneet metaboliitit tulevat tarjoamaan uusia potentiaalisia lääkeaineita, jonka vuoksi analyttisten menetelmien kehittäminen on tärkeää. Suurimpana haasteena polaaristen steroidien karakterisoinnissa voidaan pitää yhdisteiden monimuotoisuutta sekä valtavaa yhdistekirjoa. Tulevaisuudessa tietokantojen laajentuminen sekä LC-MS menetelmien kehitys tulee mahdollistamaan polaaristen steroidien yhä tarkemman karakterisoinnin.

Avainsanat: Asterosaponiinit, erikoistuneet metaboliitit, meritähdet, MS/MS-karakterisointi polaariset steroidit, polyhydroksidisteroidit, polyhydroksisterodiglykosidit,

Sisällysluettelo

1	Johdanto.....	1
2	Meritähtien tuottamat erikoistuneet metaboliitit.....	2
2.1	<i>Asterosaponiinit.....</i>	3
2.2	<i>Polyhydroksisteroidit ja polyhydroksisteroidiglykosidit.....</i>	5
3	Näytteiden esikäsittely	9
3.1	<i>Kiinteäfaasiuutto.....</i>	10
3.2	<i>Neste-nesteuutto</i>	11
3.3	<i>Kromatografia.....</i>	12
4	Ionisaation vaikutus meritähtien metaboliittien karakterisointiin	14
4.1	<i>Matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio</i>	14
4.2	<i>Sähkösumutusionisaatio.....</i>	16
4.3	<i>Nopeilla atomeilla pommitus.....</i>	17
5	MS/MS-karakterisointi	19
5.1	<i>Asterosaponiinit.....</i>	21
5.2	<i>Polyhydroksisteroidit & niiden glykosidit.....</i>	24
6	Yhteenveto	28
	Viitteet	29

Lyhenneluettelo

Agl	Aglykoni (eng. aglycone)
API	Ilmakehn paineessa tapahtuva ionisaatio (eng. atmospheric pressure ionization)
CC	Kolonnikromatografia (eng. column chromatography)
CID	Törmäyksen aiheuttama hajoaminen (eng. collision-induced dissociation)
ESI	Sähkösumutusionisaatio (eng. electrospray ionization)
ESI-MS	Sähkösumutusionisaatio-massaspektrometria (eng. electrospray ionization massspectrometry)
FAB	Nopeilla atomeilla pommitus (eng. fast atom bombardment)
FDA	Yhdysvaltain ruoka- ja lääkintävirasto (eng. food and drug administration)
Fuc	Fukoosi (eng. Fucose)
Gal	Galaktoosi (eng. galactose)
Glc	Glukoosi (eng. glucose)
GPC	Geelipermeaatiokromatografia (eng. gel permeation chromatography)
HPLC	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (eng. high-performance liquid chromatography)
LC	Nestekromatografia (eng. liquid chromatography)
LLE	Neste-nesteuutto (eng. liquid-liquid extraction)
LSIMS	Nestemäinen sekundaari-ionimassaspektrometria (eng. liquid secondary-ion mass spectrometry)
MALDI	Matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio (eng. matrix-assisted laser desorption/ionization)
MALDI-MS	Matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio massaspektrometria (eng. matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry)
MS	Massaspektrometria (eng. mass spectrometry)
MS/MS	Tandemmassaspektrometria (eng. tandem mass spectrometry)
NMR	Ydinmagneettinen resonanssispektroskopia
Qui	Kvinoosi (quinovose)

ROS	Reaktiiviset happiyhdisteet (eng. reactive oxygen species)
RP-LC	Käänteisfaasinestekromatografia (eng. reverse phase liquid chromatography)
RP-SPE	Käänteisfaasikiinteäfaasiuutto (eng. reverse phase solid phase extraction)
SEC	Kokoekskluusiokromatografia (eng. size-exclusion chromatography)
SID	Pinnan aiheuttama hajoaminen (eng. surface-induced dissociation)
SIMS	Sekundaari-ionimassaspektrometria (eng. secondary-ion mass spectrometry)
SPE	Kiinteäfaasiuutto (eng. solid phase extraction)
UPHLC	Erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia (eng. ultra high-performance liquid chromatography)
Xyl	Ksyloosi (eng. xylose)

Tutkielman teossa on käytetty ChatGPT:tä kielenhuollossa sekä Scopus AI:ta tieteellisten artikkelien etsimiseen.

1 Johdanto

Kolmasosa Yhdysvaltain ruoka- ja lääkintäviraston (eng. food and drug administration, FDA) hyväksymistä uusista lääkeainemolekyyleistä on peräisin luonnontuotteista tai niiden johdannaisista (Patridge ym., 2016). FDA oli hyväksynyt kolme ja Euroopan Unioni vain yhden meriperäisen lääkeyhdisteen vuoteen 2012 mennessä (Dias ym., 2012). Meristä on löydetty bioaktiivisia yhdisteitä, joita ei esiinny lainkaan maaperässä, mikä kertoo niiden ainutlaatuisesta kemodiversiteetistä. Vuoteen 2022 mennessä useita kymmeniä meren luonnontuotteita tai niiden johdannaista on raportoitu olevan lääkekehityksen I, II ja III lääkekehitysvaiheessa (Popov ym., 2022). Ottaen huomioon, että yli 70 % maapallon pinta-alasta on merenpeitossa, jonka pohjasta vain 28 % on tutkittu (NOAA Ocean Exploration, 2026) merissä piilee valtava potentiaali uusien lääkeaineiden löytämiseksi.

Meritähdet (Asteroidea) kuuluvat meren selkärangattomiin piikkihahkaisiin (Echinodermata). Meritähtien tuottamien erikoistuneiden metaboliittien laaja kirjo tekee niistä kiinnostavan tutkimuksen kohteen. Erikoistuneet metaboliitit ovat kasvien ja eläinten tuottamia aineenvaihduntatuotteita, jotka eivät ole välttämättömiä eliön kasvulle, kehitykselle tai lisääntymiselle, mutta suojaavat eliöitä bioottisilta ympäristötekijöiltä (Maplestone ym., 1992). Kaksi merkittävää polaarisiin steroideihin kuuluvaa ryhmää, joita meritähdet tuottavat ovat asterosaponiinit ja polyhydroksisteroidiglykosidit. Kaikista tutkituista meritähtilajeista on löydetty steroidisia glykosideja, jonka vuoksi meritähtiä voidaan pitää rikkaimpana steroidiglykosidien lähteenä (Ivanchina ym., 2011).

Bioaktiivisten yhdisteiden kemiallisen rakenteen määrittäminen on edellytys kasvien ja eläinten biosynteesireittien selvittämiseksi, eikä myöskään yhdisteiden fysiologisten vaikutusten ja biologisten toimintojen tutkiminen ole mahdollista ilman kemiallisen rakenteen määrittämistä (Popov, Ivanchina, Kicha, Malyarenko, & Dmitrenok, 2019). Kasvien ja eläinten tuottamien erikoistuneiden metaboliittien karakterisoinnissa analyysivaiheiden oikeanlainen optimointi on perusta kvalitatiiviselle ja kvantitatiiviselle analyysille. Meritähtien uutteen kompleksisia ja yhdisteiden rakenteellinen samankaltaisuus tuottaa hankaluuksia yhdisteiden profiloinnissa ja rakenneanalyysissä (Popov ym., 2014). Tandemmassaspektrometriset (MS/MS) menetelmät ovat vaikuttaneet lupaavilta steroidisten glykosidien karakterisoinnissa. Tässä tutkielmassa keskitytään siihen, miten erilaiset MS-menetelmät toimivat meritähtien tuottamien polaaristen steroidien karakterisoinnissa.

2 Meritähtien tuottamat erikoistuneet metaboliitit

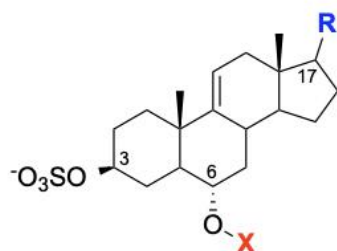
Meritähdet tuottavat laajan joukon erikoistuneita metaboliitteja kuten steroideja, steroidiglykosidejä, alkaloideja, antrakinoneja, peptidejä, fosfolipidejä ja rasvahappoja (Lu ym., 2025). 800 raportoiduista meritähtien erikoistuneista metaboliiteista 80 % on steroideja, joista 27 % on saponiineja, 17 % polyhydroksisteroideja ja 9 % sulfanoituja polyhydroksisteroideja (Lawrence, 2013). Meritähtien tuottamat polaariset steroidit on yhdistetty merieliöiden puolustus-, ruoansulatus- ja lisääntymistehtäviin (Popov, Ivanchina, Kicha, Malyarenko, Grebnev, ym., 2019), mutta näiden biologisten tehtävien varmistaminen vaatii lisää tutkimusta. Polaaristen steroidien jakautumista meritähtien ruumiinosien välillä on esitetty taulukossa 1. Metabolomiikan tutkiminen on mahdollistanut laajemman ymmärryksen erikoistuneiden metaboliittien vaikutuksesta merieliöiden ekologisiin vuorovaikutuksiin, kuten puolustusmekanismeihin, allelopaattisiin vuorovaikutuksiin ja lisääntymissignaaleihin (Bayona ym., 2022). Nykytutkimus on kiinnostunut etenkin meritähtien tuottamien erikoistuneiden metaboliittien biologisista aktiivisuuksista. Polaaristen steroidien käyttö terapeutteina perustuu niiden sytotoksisuuteen, antimikrobisuuteen, -fungalisuuteen ja -viraalisuuteen sekä hemolyyttisyyteen (Stonik ym., 2020; Xia ym., 2020). Voidaan ajatella, että meritähtien tuottamilla erikoistuneilla metaboliiteilla on merkittäviä tehtäviä niin eliöiden biologisissa toiminnoissa kuin tulevaisuuden lääketeollisuuden potentiaalisina ratkaisuina.

Taulukko 1. Polaaristen steroidien jakautuminen meritähtien ruumiinosien välillä *L.fusca* -lajissa. Taulukko on mukailtu kirjallisuuslähteestä.(Popov, Ivanchina, Kicha, Malyarenko, Grebnev, ym., 2019).

Sijainti	Asterosaponiinit ja niiden johdannaiset	Polyhydroksisteroidit	Polyhydroksisteroidiset glykosidit	Yhteensä
Ulkokuori (µg/g)	59,7	0,5	6,3	66,5
Sukurauhaset (µg/g)	68,4	0,7	9,8	78,9
Ruoansulatusrauhaset (µg/g)	23,8	23,1	267,5	314,4
Maha (µg/g)	561,1	1,9	14,5	577,5
Kelomineste (µg/g)	0,14	-	0,02	0,16

2.1 Asterosaponiinit

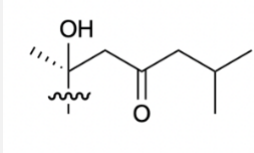
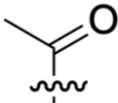
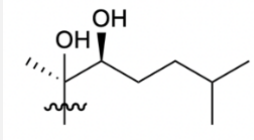
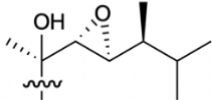
Asterosaponiineille, jotka kuuluvat saponiinien alaryhmään, on tyypillistä steroidirengas, jossa on kiinni penta- tai heksaglykoosi C6:ssa, sulfaattiryhmä C3:ssa ja aglykoniosan C17:ssa sivuhiiliketju. Sivuhiiliketjun pituus voi vaihdella 7-10 hiileen ja sen hiiliatomit ovat voineet muodostaa hapen kanssa sidoksen. Hiilihydraattiketju sisältää usein heksooseja, pentooseja ja deoksihydroheksooseja, jotka ovat kiinni toisissaan β -glykosididisidoksella (Popov, Ivanchina, Kicha, Malyarenko, & Dmitrenok, 2019). Heksaglykoosi on usein glukoosi tai galaktoosi ja pentaglykoosi taas arabinoosi tai ksyloosi. Deoksihydroheksosot puolestaan ovat usein kinovoosi tai fukoosi. Sivuhiiliketjuissa yleisimpiä happiryhmiä ovat hydroksi-, ketoni- ja epoksiryhmät (Demeyer ym., 2014). C3-aseman sulfaattiryhmällä on korkea affiniteetti positiiviseen kationiin ja ottaen huomioon meritähtien elinympäristön, on rakenteessa usein kiinni natriumioni. Taulukossa 2 on esitetty eräitä asterosaponiinien rakenteita.



X= hiilihydraattiketju
R= sivuhiiliketju

Kuva 1. Asterosaponiinin yleinen rakenne. Kuva on mukailtu lähteestä (Stonik ym., 2020).

Taulukko 2. Asterosaponiinien mahdollisia sivuketjuja ja hiilihydraattiketjuja. Taulukko on mukailtu lähteestä (Stonik ym., 2020). Hiilihydraattiketju on kiinni aglykoniosassa (agl) ja voi muodostua fukoosista (Fuc), glukoosista (Glc), ksyloosista (Xyl), galaktoosi (Gal), kvinoosista (Qui).

Meritähti	Sivuketju	Hiilihydraattiketju	Nimi
<i>Patiria pectinifera</i>		$\text{Fuc}_p - \text{Glc}_p - \text{Xyl}_p - \text{Qui}_p - \text{Agl}$ $\quad \quad \quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad \text{Gal}_p \quad \text{Qui}_p$	Pectinosidi F
<i>Acanthaster planci</i>		$\text{Fuc}_p - \text{Qui}_p - \text{Qui}_p - \text{Qui}_p - \text{Agl}$ $\quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad \text{Qui}_p$	Akantaglykosidi G
<i>Pentaceraster regulus</i>		$\text{Fuc}_p - \text{Qui}_p - \text{Xyl}_p - \text{Qui}_p - \text{Agl}$ $\quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad \text{Qui}_p$	Pentaregulosidi D
<i>Hippasteria kurilensis</i>		$\text{Fuc}_p - \text{Qui}_p - \text{Xyl}_p - \text{Qui}_p - \text{Agl}$ $ \quad \quad $ $\text{Xyl}_p \quad \text{Qui}_p$	Hippasteriosidi A

Asterosaponiinit ovat meritähtien myrkyllisin yhdisteryhmä ja niitä esiintyykin meritähtien kaikissa elimissä (Demeyer ym., 2014, 2015; Popov, Ivanchina, Kicha, Malyarenko, Grebnev, ym., 2019). Asterosaponiinien monimuotoisuus ja pitoisuudet vaihtelevat elinten ja yksilöiden välillä. Meritähtien ulkokuorten, vatsojen ja sukrauhasten uutteista löydettiin suurimmat pitoisuudet asterosaponiineja, vaikkakin yksilöiden välillä havaittiin suuriakin pitoisuuseroja. Asterosaponiinien löytyminen meritähden ulkopintaa peittävästä limakerroksesta viittaa näiden osallistumisesta meritähtien puolustukseen petoja, kuten kaloja, vastaan. (Popov, Ivanchina, Kicha, Malyarenko, Grebnev, ym., 2019) Asterosaponiinit vaikuttavat myös sukusolujen

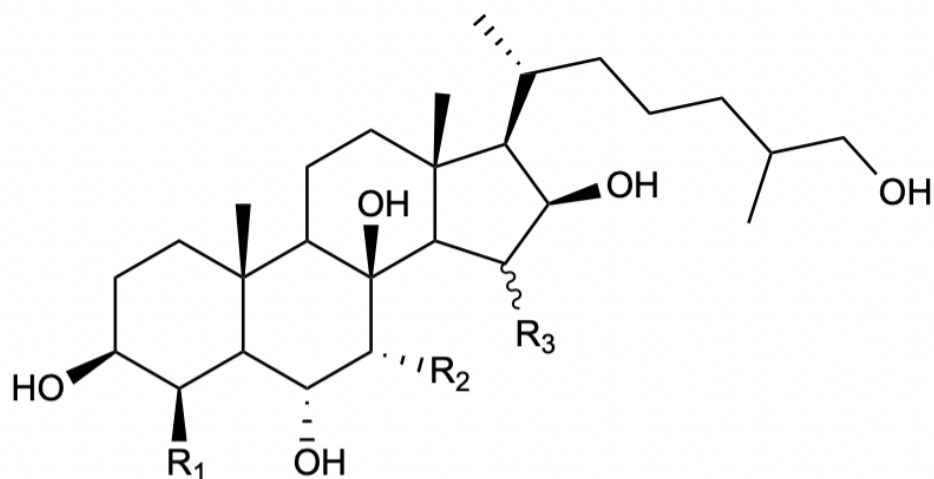
kypsymiseen ennen lisääntymiskautta, ja auttavat ravinnon sisältämien lipidien ja sterolien liukenemisessa (Stonik ym., 2020).

Asterosaponiineilla on todettu olevan myös lääkekehitykselle hyödyllisiä biologisia aktiivisuuksia, kuten kasvainsolujen lisääntymisen estäminen, hemolyyttinen aktiivisuus, tubuliinipolymerisaation aktivointi, antimykoottisuus ja vaikutukset natriumkanavien toimintaan (Chludil ym., 2002; Ivanchina ym., 2000; Ma ym., 2009; Tang ym., 2009; Yang ym., 2007).

2.2 Polyhydroksisteroidit ja polyhydroksisteroidiglykosidit

Polyhydroksisteroidit ja polyhydroksisteroidiglykosidit sijaitsevat pääasiassa meritähtien mahassa ja ruuansulatusrauhasissa, jonka vuoksi biologisen tehtävän arvellaan liittyvän ruuansulatukseen (Kicha ym., 2003). Ruuansulatusrauhaset sisälsivät *L.fusca* -lajissa 314,4 ug/g polaarisia steroideja, joista polyhydroksisteroidiglykosidien osuus oli noin 85 %, asterosaponiinien ja polyhydroksisteroidien osuus oli noin 15 % (Popov, Ivanchina, Kicha, Malyarenko, Grebnev, ym., 2019).

Polyhydroksisteroidien (kuva 2.) hydroksiryhmien määrä steroidirenkaassa vaihtelee laajasti neljästä yhdeksään ryhmään. Useimmiten hydroksyyli ryhmät sijaitsevat 3 β -, 6 α / β -, 8 α -, 15 α / β - ja 16 β -asemissa ja harvemmin asemissa 4 β , 5 α ja 7 α / β . Niiden sivuketjujen rakenteet vaihtelevat, mutta useimmista niistä koostuvat kolestaanista, jonka sivuketju sisältää hydroksyyli ryhmän C26- tai C24-asemassa. (Popov, 2016; Popov, Ivanchina, Kicha, Malyarenko, & Dmitrenok, 2019)

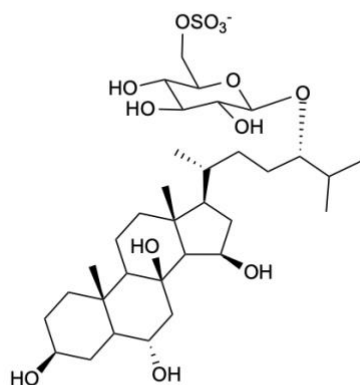


	R₁	R₂	R₃
(1) 5 α -kolestaani-3 β ,4 β ,6 α ,7 α ,8,15 α ,16 β ,26-oktaoli	OH	OH	OH
(2) 5 α -kolestaani-3 β ,4 β ,6 α ,7 α ,8,15 β ,16 β ,26-oktaoli	OH	OH	β -OH
(3) 5 α -kolestaani-3 β ,6 α ,7 α ,8,15 α ,16 β ,26-heptanoli	H	OH	OH
(4) 5 α -kolestaani-3 β ,6 α ,8,15 α ,16 β ,26-heksanoli	H	H	OH
(5) 5 α -kolestaani-3 β ,6 α ,8,15 β ,16 β ,26-heksanoli	H	H	β -OH

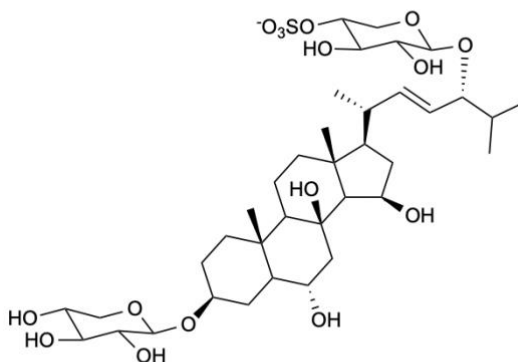
Kuva 2. Polyhydroksisteroidien rakenteita. Kuva mukailtu lähteestä (Popov, 2016).

Polyhydroksisteroidiglykosidit sisältävät polyhydroksyloidun ytimen lisäksi usein yksi tai kaksi monosakkaridia, jotka ovat kiinni steroidirenkaassa, sivuketjussa tai molemmissa samanaikaisesti (Popov, Ivanchina, Kicha, Malyarenko, & Dmitrenok, 2019). Yleisimpänä sokeriyksikköinä esiintyvät arabinoosi, ksyloosi ja sen johdannaiset, jotka voivat olla sulfanoituja tai metyloituja (Popov ym., 2014). Sulfaattiryhmä voi olla kiinni myös steroidirenkaassa. Kuvissa 3 ja 4 on esitetty eräiden polyhydroksisteroidiglykosien rakenteita.

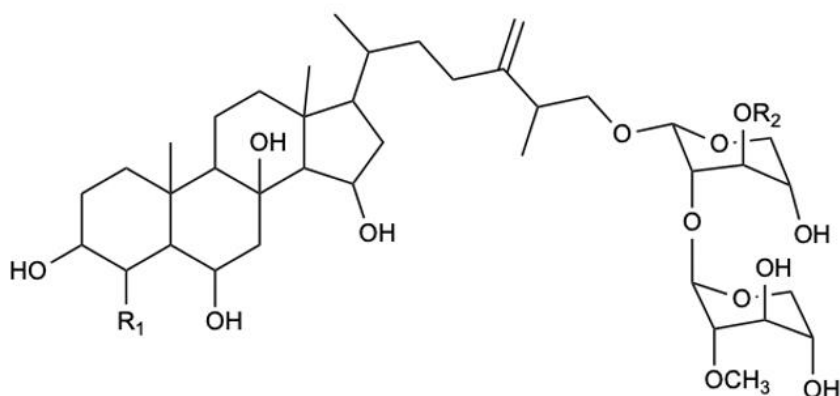
a)



b)



Kuva 3. a) Pyknopodiosidi C b) Asteriidosidi H (Popov, Ivanchina, Kicha, Malyarenko, & Dmitrenok, 2019).



	R ₁	R ₂
Rakenne I	OH	SO ₃ Na
Rakenne II	H	SO ₃ Na
Rakenne III	OH	H

Kuva 4. Polyhydroksisteroidiglykosidien rakenne aiemmin kuvaamattomille yhdisteille I-III (Gil ym., 2006).

Prokof'eva ym. (2023) tutkivat eri meritähtilajeista puhdistettujen polyhydroksisteroidiglykosidien hemolyyttisiä ja sytostaattisia vaikutuksia merisiilin (*Strongylocentrotus intermedius*) alkioon. Tutkimuksessa havaittiin, että polyhydroksisteroidiglykosidien aktiivisuus riippui hydroksyyliyhymien määrän, hiilihydraattiketjun ja sivuketjun rakenteen lisäksi myös käytetystä konsentraatiosta, suolapitoisuudesta, lämpötilasta ja pH-arvosta. Toksiset ja sytotoksiset ominaisuudet perustuvat polyhydroksisteroidiglykosidien solukalvoon kohdistuvaan vaikutukseen (Prokof'eva ym., 2003). Polyhydroksisteroideilla ja niiden glykosideilla on osoitettu olevan neurotrofisia ja neuroprotektiivisiä vaikutuksia, vaikkakin näiden tehokkuus on rakenteesta riippuvainen (Palyanova ym., 2013).

3 Näytteiden esikäsittely

Meriekosysteemissä elävien meritähtien näytteiden esikäsittely eroaa maalla elävien kasvien ja eläinten esikäsittelystä huomattavasti (Bayona ym., 2022). Näytteiden keruu saattaa olla hyvinkin haastavaa, sillä eliöt voivat sijaita maantieteellisesti hankalassa sijainnissa (Popov ym., 2022) ja populaatio saattaa olla suhteellisen suppea (Bayona ym., 2022). Myös lajin sijainti, meritähtien fysiologinen kunto ja sukupuoli sekä vuodenaika vaikuttavat erikoistuneiden metaboliittien määrään, mikä täytyy ottaa huomioon suoritettussa analyysissä ja sen toistettavuudessa (Popov ym., 2022). Luotettavien näytteiden keräämiseksi ja tulosten saamiseksi, on otettava huomioon myös meriekosysteemien ominaisuudet, kuten valon määrä, lämpötila ja happipitoisuus (Bayona ym., 2022), sillä meriperäiset uutteen saattavat sisältää epästabiileja yhdisteitä (Sarker & Nahar, 2012). Käsittelystä aiheutuva stressi ei ole suotavaa eläinten hyvinvoinnin tai analyysien kannalta, sillä stressi johtaa tyypillisesti lisääntyneeseen hapen kulutukseen ja reaktiivisten happiyhdisteiden (eng. reactive oxygen species, ROS) tuotantoon (Tonn ym., 2016). Metabolian pysäyttämiseksi käytetään nestemäistä typpeä, kuivajäätä, lyofilisaatiota tai suoraa uuttamista (Bayona ym., 2022).

Meren eliöiden uutteen sisältävät usein merkittäviä määriä suoloja, mikä on usein ei-toivottua, vaikka uuttamiseen käytettäisiinkin ei-polaarista liuotinta (Bayona ym., 2022). Pienikin konsentraatio natriumkloridia voi aiheuttaa odottamattomien adduktien syntymisen sähkösumutus-ionisaatiomassaspektrometrialla (eng. electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS) (Popov ym., 2022). Suuret konsentraatiot johtavat ionisaation estymiseen sekä suolakiteiden kertymiseen ionilähteeseen ja kapillaariputkeen (Popov ym., 2022). Osa merieliöistä sisältää suuria määriä lipidejä, jotka aiheuttavat ongelmia etenkin kromatografisessa analyysissä, sillä ne voivat sitoutua yleisesti käytettyihin lipofiilisiin stationäärifaaseihin, mikä haittaa analyysin toistettavuutta (Bayona ym., 2022). Analysoitavien näytteiden sisältämät lipidiepäpuhtaudet, proteiinit ja suuret suolapitoisuudet haittaavat siis niin ionisaatiota kuin kromatografista erottelukykä (Bayona ym., 2022; Popov ym., 2022).

Yleisimpinä uuttoliuottimina polaaristen steroidien eristämisessä meritähdistä voidaan pitää metanolin ja etanolin vesiliuoksia sekä muita vesialkoholiliuoksia (Popov ym., 2022). Uutteen sisältämien erikoistuneiden metaboliittien alustava esikartoitus voidaan suorittaa matriisiavusteisen laserdesorptio-ionisaatiomassaspektrometrian (eng. matrix assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry, MALDI-MS) avulla ilman erillistä puhdistusta. Massaspektrometristä analyysiä on vaikea soveltaa puhdistamattomiin meriuutteisiin, mutta puolipuhdistettujen seoksien tutkimiseen se on jo hyödyllinen (Sarker & Nahar, 2012). ESI-

MS-tekniikkaan vaadittava näytteiden esipuhdistus suoritetaan usein kolonnikromatografialla (eng. column chromatography, CC), erillisellä kiinteäfaasiuutolla (engl. solid phase extraction, SPE) tai neste-nesteuuttamisella (eng. liquid-liquid extraction, LLE) (Popov ym., 2022).

Potentiaalisten metaboliittien esiintyvyys vähäisinä pitoisuuksina (Bayona ym., 2022) voi vaikeuttaa uutto- ja eristysprosessia, sillä bioaktiivisten yhdisteiden tutkimiseen tarvitaan paljon eläinperäistä ainetta, jotta sen pitoisuus olisi riittävä rakenteen selvittämistä varten.

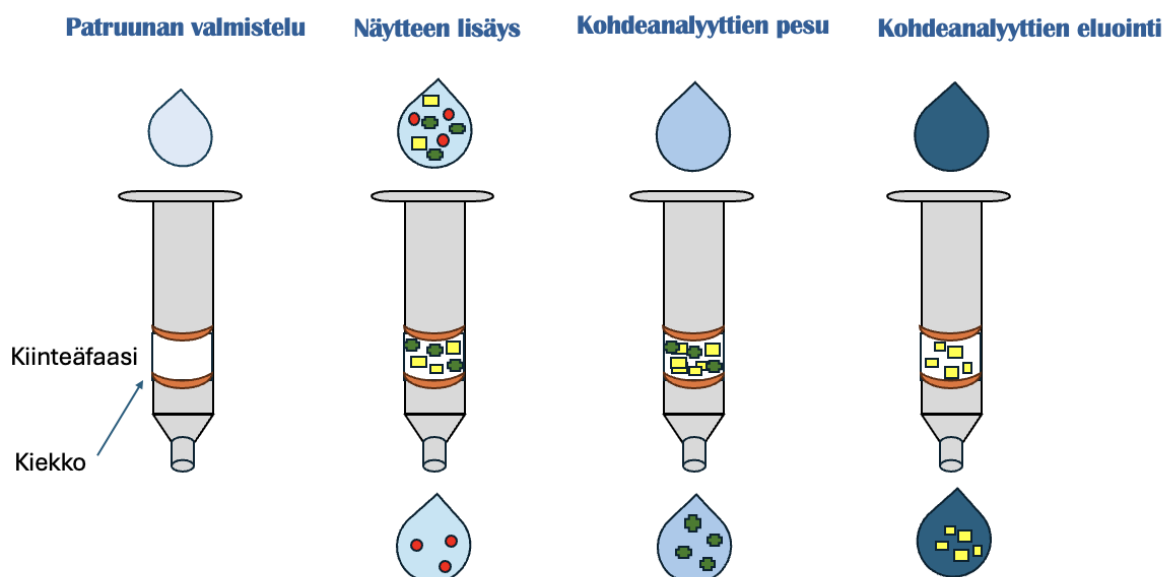
3.1 Kiinteäfaasiuutto

SPE perustuu kiinteän faasin kykyyn pidättää haluttuja kohdeyhdisteitä. Kohdeyhdisteiden sitoutuminen kiinteään faasiin perustuu niiden korkeaan affiniteettiin, kun sen läpi pumpataan kohdeyhdisteitä sisältävää liuotinta. SPE koostuu usein neljästä vaiheesta: kolonnin kiinteän faasin esikäsitteleminen, näytteen lataus, kiinteän faasin jälkipesu epäpuhtauksien poistamiseksi ja näytteen desorptio sopivalla liuottimella. SPE:llä saadaan puhdistettua näytettä ja rikastettua analyyttejä, sillä eluutiossa käytettävät tilavuudet ovat yleensä pienempiä kuin alkuperäisen näytteen tilavuus. SPE:n etuna voidaan pitää automatisoinnin mahdollisuutta, näytteen tehokasta konsentrointia sekä selektiivistä analyyttien eristämistä ja fraktiointia (Suomi, 2009).

Yleisimpiä SPE-malleja ovat patruunat, kiekot, pipetit ja mikrotiitterilevyt sekä pieni kolonni, joka on yhdistettynä nestekromatografiaan (LC). SPE-patruunan suodatinkiekot on yleensä tehty polyeteenistä, ruostumattomasta teräksestä tai teflonista (PTFE). Ne sijaitsevat patruunan tai kolonnin kiinteän faasin ylä- ja alapuolella. (Buszewski & Szultka, 2012) Kiinteän faasin valinta perustuu kohdeyhdisteiden kemiallisiin ominaisuuksiin, ja siksi sen valinta onkin yksi kriittisimmistä vaiheista. Kuvassa 5 on esitetty SPE:n toimintamekanismi.

Polaaristen steroidien fraktioiden puhdistus on nopeinta ja tehokkainta käänteisfaasi (engl. reverse phase, RP) -sorbenteilla varustetuilla SPE-patruunoilla. RP-SPE:ssä kiinteät faasit ovat poolittomia, kuten oktadekyyli (C18) -, oktyyli (C8) - tai fenyyliipohjaiset kiinteät faasit (Suomi, 2009). Popov ym. (2014) tutkimuksessa polymeeripohjaiset (Strata-X) RP-SPE-patruunat esikäsiteltiin 5 ml:lla asetonitriiliä ja 5 ml:lla vettä. Patruunaan lisättiin 100 µl:aa uutetta pisaroittain, jonka jälkeen tämä pestiin 2,5 ml:lla vettä. Steroidisten glykosidien eluointi tapahtui 1,5 ml:lla asetonitriiliä, jonka jälkeen asetonitriiliuutteet kuivattiin ja liuotettiin 400

μl:aan 50 % asetonitriiliä (v/v). Popov ym. (2014) karakterisoivat yhteensä 33 eri asterosaponiinia ja 35 polyhydroksisteroidia *Aphelasterias japonica* -lajista LC-ESI-MS:lla.



Kuva 5. Kiinteäfaasiuuton toimintaperiaate.

3.2 Neste-nesteuutto

Asterosaponiinien puhdistuksissa suositetaan LLE:ta (Popov ym., 2022). Neste-nesteuutto on yksi perinteisistä erotusmenetelmistä, jossa puhdistus perustuu aineen liukoisuuseroihin kahden nesteen välillä. LLE:n haittapuolia ovat orgaanisten liuottimien runsas kulutus sekä uutossa emulsion muodostuksen, pinta-aktiivisten aineiden aiheuttaman vaahtoamisen tai saostumisen vuoksi ilmenevät ongelmat (Suomi, 2009). Menetelmää voidaan käyttää myös epäsuotuisten rasvojen ja suolojen poistamiseen (Sarker & Nahar, 2012).

Polaaristen steroidien neste-nesteuutossa käytettyjä hydrofobisia tai heikosti polaarisia uuttoliuottimia ovat kloroformi (CHCl_3), dikloorimetaani (CH_2Cl_2) ja n-heksaani, kun taas metanoli, etanoli ja vesi toimivat neste-nesteuutossa polaarisisena liottimena (Popov ym., 2022). Meritähntien sisältämät lipidiepäpuhtaudet jakautuvat neste-nesteuutossa alempaan faasiin hydrofobisten ominaisuutensa vuoksi. Alempana faasina toimii suuremman tiheyden omaava kloroformi ja dikloorimetaani. Kohdeyhdisteet eli polaariset steroidit sijaitsevat uuttoliuoksen ylemmässä polaarisessa vesimetanolifaasissa (Popov, Ivanchina, Kicha, Malyarenko, &

Dmitrenok, 2019). Myös n-butanolin käyttö polaarisenä liottimena neste-nesteuutossa on yleistä (Sarker & Nahar, 2012; Zhang ym., 2025).

3.3 Kromatografia

Kromatografiassa seoksen yhdisteet erotetaan yhdisteryhmiksi tai kokonaan erilleen toisistaan, jolloin myös kohdeyhdisteet saadaan konsentroitua kapeaksi vyöhykkeeksi (Suomi, 2009). Ennen kromatografiaa näyte täytyy saada nestemäiseen muotoon uuttamalla tai liuottamalla. Kromatografisia menetelmiä ovat muun muassa pylväskromatografia ja nestekromatografia, jotka molemmat koostuvat kiinteästä kolonnimateriaalista ja liikkuvasta nestemäisestä faasista. Kromatografiassa yhdisteiden erottelu voi perustua adsorptioon, varaukseen, affiniteettiin tai partikkelien kokoon kuten geelipermeaatiokromatografia (GPC eng. gel permeation chromatography) tai kokoeksklusiokromatografia (SEC eng. size exclusion chromatography) (McMaster, 2007).

Perinteisessä pylväskromatografiassa stationaarifaasina käytetään yleensä silikaa, alumiinioksidia ja agarosia, jotka mahdollistavat erottelun jakautumis-, adsorptio-, ioninvaihto-, koko- ja affiniteettimenetelmillä (McMaster, 2007). Yksinkertaisimmillaan pylväskromatografia voidaan suorittaa sylinterimäisessä lasiputkessa, jonka pohja on tukittu lasivillalla tai huokoisella levyllä. Yhdisteet adsorboituvat putken materiaaleissa eri kohtiin. Kun pylvääseen lisätään sopivaa eluenttia, ne desorboituvat. Haasteena pylväskromatografiassa on sen suhteellisen heikko erottelukyky, hidas eluutionopeus ja alhaisten eluutiolämpötilojen optimointi. Toisaalta tekniikka on verrattain halpa ja erotusmenetelmien monipuolisuus suosivat pylväskromatografiaa (McMaster, 2007).

Sephadex LH-20 on yleisin stationaarifaasimateriaali, jota käytetään lipidien poistamiseen uutesta, yhdessä eluentin MeOH:CH₂Cl₂ (1:1 v/v) kanssa (Sarker & Nahar, 2012). Muita yleisiä stationaarifaaseja, joita käytetään polaaristen steroidien puhdistuksessa ja fraktioinnissa, ovat silika, erilaiset polymeeripohjaiset hartsit (XAD-hartsit, Diaion HP20 ja Strata X) sekä Sephadex LH-60. Yleisesti ottaen polaaristen steroidien eluointi pylväskromatografiasta tapahtuu eluointiliuoksien dikloorimetaanin (DCM) ja metanolin suhdelukuja muuttamalla (Demeyer ym., 2015; Kicha ym., 2024; Lu ym., 2025; Maier ym., 2006; Zhang ym., 2025).

Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (eng. high-performance liquid chromatography, HPLC) eroaa perinteisestä nestekromatografiasta stationaarifaasin hiukkasten

koon ja koostumuksen perusteella. Mitä pienempi hiukkaskoko stationäärifaasissa on, sitä korkeampi erottelukyky ja vaadittava paine on. HPLC:ssa pakkausmateriaalin partikkelikoko on 3-10 μm :n välillä, kun taas perinteisessä pylväskromatografiassa 10-200 μm :n välillä (Sarker & Nahar, 2012). HPLC tarjoaa perinteistä nestekromatografiaa paremman herkkyyden, toistettavuuden ja nopeuden (McMaster, 2007). Vuosina 2003 ja 2004 markkinoille saapuneet erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografian (eng. ultra high performance liquid chromatography, UPHLC) laitteet mahdollistavat jopa 1,8 μm partikkelikoon erottelun, mikä puolestaan parantaa näytekomponenttien kapean huipun muodostamista kromatogrammiin, ja siten parantaa kromatografista erottelukykyä (Dunn & Lewis, 2019).

HPLC:ssa näyte injektoidaan liikkuvaan faasiin injektorin avulla. Yleisimpinä kolonnimateriaaleina on käytetty poolittomia käänteisfaaseja, joista yli 80% on C_{18} (McMaster, 2007). RP-LC:ssä elutentin poolisuus on suurempi kuin stationaarifaasin (Ketola ym., 2010), jolloin polaaristen steroidien tapauksessa, kohdeyhdisteet eluoituvat nopeammin. Nestekromatografiassa käytetyt kiinteät faasit ovat usein samantyyppisiä SPE:ssä käytettyjen kiinteiden faasien kanssa, jonka vuoksi tekniikoita käyttäessä, on mielekkäintä valita erityyppiset kiinteät faasit parhaan tuloksen saamiseksi (Suomi, 2009). Polaaristen steroidien karakterisoinnissa käytetään yleisesti pitkiä kolonneja (10-20 cm), joiden partikkelikoko on 2-5 μm 22.6.2026 6.09.00. Kolonnissa erottuneet yhdisteet havaitaan ultraviolett-, fluoresenssi-, MS- ja sähkökemiallisella detektorilla. UV-detektorin käyttö on suosituin menetelmä luonnontuotteiden HPLC-analyysissä, mutta sen rajoitteena on yhdisteet, joissa kromoforia ei ole (Sarker & Nahar, 2012). Massaspektrometrin yhdistäminen nestekromatografiaan rajoittaa eluenttien valintaa, sillä haihtumattomien eluenttien käyttö ei ole suotavaa (Ketola ym., 2010). HPLC:n tuloksena saadaan kromatogrammi, jonka x-akselilla on retentioaika eli yhdisteen eluoitumiseen kuluva aika ja y-akselilla signaalin voimakkuus.

4 Ionisaation vaikutus meritähtien metaboliittien karakterisointiin

Massaspektrometrisiä menetelmiä voidaan pitää suosittuina menetelminä luonnon tuottamien erikoistuneiden metaboliittien määrittämisessä niiden korkean herkkyyden, nopean analyysiajan ja selektiivisyyden vuoksi (Popov ym., 2014). Massaspektrometriassa ionisoitu näyte erottuu massa-analyysaattorin sähkö- tai magneettikentässä massa-varaus-suhteen (m/z) perusteella minkä jälkeen eri m/z -arvot ja niiden intensiteetit mitataan sekä kvalitatiivisesti että kvantitatiivisesti. Ennen massa-analyysaattoria yhdisteiden neutraalit molekyylit on siis ionisoitava. Yhdisteiden ionisaatio voi tapahtua useilla eri tavoilla kuten pommittamalla niitä elektroneilla, ioneilla, ryväsioneilla, fotoneilla tai neutraaleilla atomeilla alakappaleissa esitetyn mukaisesti. Yhdisteitä voidaan myös ionisoida ioniplasman, sähkökentän ja radioaktiivisen säteilyn avulla. Massaspektrissä on kuvattu intensiteetti m/z -suhteen funktiona. (Ketola ym., 2010)

Meritähtien erikoistuneiden metaboliittien tunnistaminen ja rakenteen perustavanlaatuisen selvittäminen on edelleen hyvin haastavaa, sillä polaariset steroidit ovat hyvin monimuotoisia ja fraktiot sisältävät valtavan yhdistekirjon (Popov ym., 2014). Vaikka eliön koko erikoistuneiden metaboliittien kirjon määrittäminen on mahdotonta käyttämällä ainoastaan yhtä analyttistä menetelmää, ovat massaspektrometriset menetelmät osoittautuneet tehokkaiksi metaboliatuotteiden määrittämisessä (Bayona ym., 2022; Popov ym., 2022).

4.1 Matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio

Matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio (eng. matrix assisted laser desorption/ionisation, MALDI) on suhteellisen pehmeä ionisaatiotekniikka, joka synnyttää negatiivisesti ja positiivisesti varautuneita ioneja, jotka ovat pääasiassa yhdesti varautuneita. Positiivisella ionisaatiolla muodostuu usein addukti-ioneita, kuten $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ ja $[M+A]^+$, missä A on matriisi. Kyseinen ionisaatiotekniikka mahdollistaa lähes kaikkien kemiallisten yhdisteiden analysoinnin, ja onkin siksi yksi ESI:n kanssa kilpailevista ionisaatiotekniikoista. Monimutkaisten seosten tulkitsemiseen MALDI sopii erityisen hyvin, koska useasti varautuneita ioneja ei juurikaan synny, ja siten spektrin tulkinta on yksinkertaisempaa. Etuna MALDI:ssa on sen biologisille näytteille tyypillisten suolojen ja puskureiden sietokyky (Ketola ym., 2010).

MALDI:n herkkä ja suhteellisen pehmeä ionisaatiotekniikka perustuu orgaanisten yhdisteiden laserdesorptioionisaatioon. Massa-aluetta saadaan laajennettua yli tuhanteen

daltoniin, kun analyytit sekoitetaan kiinteään matriisiaineeseen (Ketola ym., 2010). Matriisin valinta on yksi kriittisimmistä tekijöistä, joka vaikuttaa analyysin onnistumiseen. Matriisin valinnassa tulisi ottaa huomioon signaalin-kohinasuhde (S/N), minimaalinen analyytin fragmentaatio ja kohtuulliset taustasignaalit, jotta matriisin antamat signaalit eivät häiritse analysoitavien yhdisteiden tulkintaa (Leopold ym., 2023). Matriiseina käytetään pienimolekyyllisiä, heikosti haihtuvia, kiinteitä yhdisteitä, jotka absorboivat energiaa käytettävän laserin aallonpituudella. Matriisi toimii liuottimena ja eristää analyyttimolekyylit toisistaan, mikä vähentää desorptioon tarvittavaa energiaa. Matriisi absorboi laserpulssin energiaa ja virittyy, ja termisen relaksaation kautta haihtumattomat analyytit siirtyvät kaasufaasiin ilman merkittävää virittymistä ja pilkkoutumista (Ketola ym., 2010).

Tyypillisiä orgaanisia matriiseja ovat kanelihapon ja bentsoehapon johdannaiset. Näiden aromaattinen rengas ja happamat funktionaaliset ryhmät mahdollistavat UV-absorption ja analyyttien ionisoitumisen (Leopold ym., 2023). Meritähtien tuottamien hydroksisteroidien ja niiden glykosidien karakterisoinnissa matriisina on käytetty α -syanohydroksikanelihappoa (CHCA) ja UV-laserin emissioaallonpituutena 337 nm:ä (Kicha ym., 2008; Levina ym., 2006). Asterosaponiinien MALDI-analyysissä matriiseina on käytetty N,N-dimetyylianiiliinia (DMA) ja genitsiinihappoa (DHB), sillä niiden yhdistelmä antaa paremman herkkyyden natriumioneina havaittaville yhdisteille (Demeyer ym., 2014).

MALDI-MS tulokset vaativat usein muita massaspektrometriä tai ydinmagneettista resonanssia (eng. nuclear magnetic resonance, NMR) hyödyntäviä menetelmiä tuloksien tulkintaan ja niiden tukemiseen. Koska näytteiden puhdistaminen ei ole välttämätöntä, pelkkää MALDI:a yhdistettynä massa-analysaattoriin käytetään ensisijaisena erikoistuneiden metaboliittien seulojana, jonka jälkeen muita menetelmiä, kuten LC-MS-tekniikkaa käytetään isomeerien kromatografiseen erotteluun (Demeyer ym., 2014).

Demeyer yms. (2014) tutkimuksessa käytettiin MALDI-MS-kuvantamista apuna selventämään *A. rubens* -uutteista löydettyjen asterosaponiinien elinten välistä ja sisäistä jakautumista. Tutkimuksessa osoitettiin, että MALDI-MS-kuvantaminen on varteenotettava vaihtoehto, kun halutaan tutkia erikoistuneiden metaboliittien jakautumista kudoksissa (Demeyer ym., 2015). MALDI-MS:ää käytetään myös laajasti monimutkaisten seoksien nopeaan seulontaan ja kemialliseen karakterisointiin (Popov ym., 2022).

4.2 Sähkösumutus-ionisaatio

Sähkösumutus-ionisaatio (eng. electrospray ionization, ESI) on yksi pehmeimmistä ja suosituimmista ionisaatiotekniikoista. ESI perustuu ilmakehän paineessa tapahtuvaan ionisaatioon (eng. atmospheric pressure ionization, API), jossa neste sumutetaan pieniksi pisaroiksi korkean jännitteen avulla. Poolisen tai keskipoolisen liuottimeen liuotettu näyte syötetään 2-10 µl/min virtausnopeudella halkaisijaltaan 0,1-0,2 mm:n teräskapillaarin läpi. Teräskapillaariin on kohdistettu korkea jännite (3-5 kV), joka muodostaa voimakkaan sähkökentän kapillaarin kärkeen ja jonka seurauksena vastaionit ajautuvat kapillaarin seinämille. Teräskapillaarin päästä syntyneiden pisaroiden varaus riippuu valitusta ionisaatiosta, joka voi olla positiivinen tai negatiivinen. Varautuneen pisaran muodostuessa, siitä haihtuu liuotinta, jonka seurauksena varausaste pisaran pinnalla kasvaa. Liuottimen haihtuminen pisarasta tapahtuu usein kuivauskaasun, typen, ja korkean lämpötilan (300-350 °C) avulla (Popov, 2016; Popov ym., 2014, 2016). Suurentunut varaustiheys ja repulsio pisaran pinnalla aiheuttaa pisaran hajoamisen. Pisaroista haihtuu jälleen liuotinta, jolloin sama prosessi toistuu uudelleen, kunnes pisara kykenee tuottamaan yksittäisen kaasufaasi-ionin. Muodostuneet kaasufaasi-ionit siirretään keräysaukon kautta massa-analysaattorille (Ketola ym., 2010).

ESI-MS:lla havaitaan suuria biomolekyyliä analysoitaessa useasti varautuneita ioneja kuten $[M+nNa]^{n+}$, $[M-nH]^{n-}$ tai $[M+nH]^{n+}$, mitkä eivät kerro suoraan yhdisteen moolimassaa. Tällöin yhdisteen moolimassa on laskettava moninkertaisten ionien avulla. Positiivisella ionisaatiolla addukti-ionien, kuten $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ ja $[M+NH_4]^+$ syntyminen on yleistä. Negatiivisella ionisaatiolla puolestaan $[M+HCOO]^-$, $[M+CH_3OO]^-$ ja $[M+Cl]^-$ addukti-ionien syntyminen on mahdollisia (Ketola ym., 2010). On todettu, että ESI-MS ja ESI-MS/MS antavat erinomaiset mahdollisuudet asterosaponiinien ja muiden polaaristen steroidien tutkimiseen (Ivanchina ym., 2011). ESI:ä voidaan pitää yleisimpänä ionisaatiotekniikkana, ja ESI-teknikkaa käytetään laajasti myös muiden luonnonyhdisteiden, kuten triterpenoidien ja lipidien karakterisoinnissa. Verrattuna elektroni-ionisaatioon, ESI:ssä tapahtuva fragmentaatio on vähäistä, mikä mahdollistaa suurten biomolekyylien ja haihtumattomien yhdisteiden analysoinnin (Popov ym., 2022). ESI-teknikassa on kuitenkin huomioitava näytteiden esikäsitely, sillä kuten aiemmin on jo todettiin: kapillaariputki kestää heikommin suoloja ja heikentää ionisaatiota.

Meritähtien tuottamien polaaristen steroidien analysoinnissa sekä positiivinen että negatiivinen ESI ionisaatio antavat hyviä tuloksia. Ei-sulfanoitujen

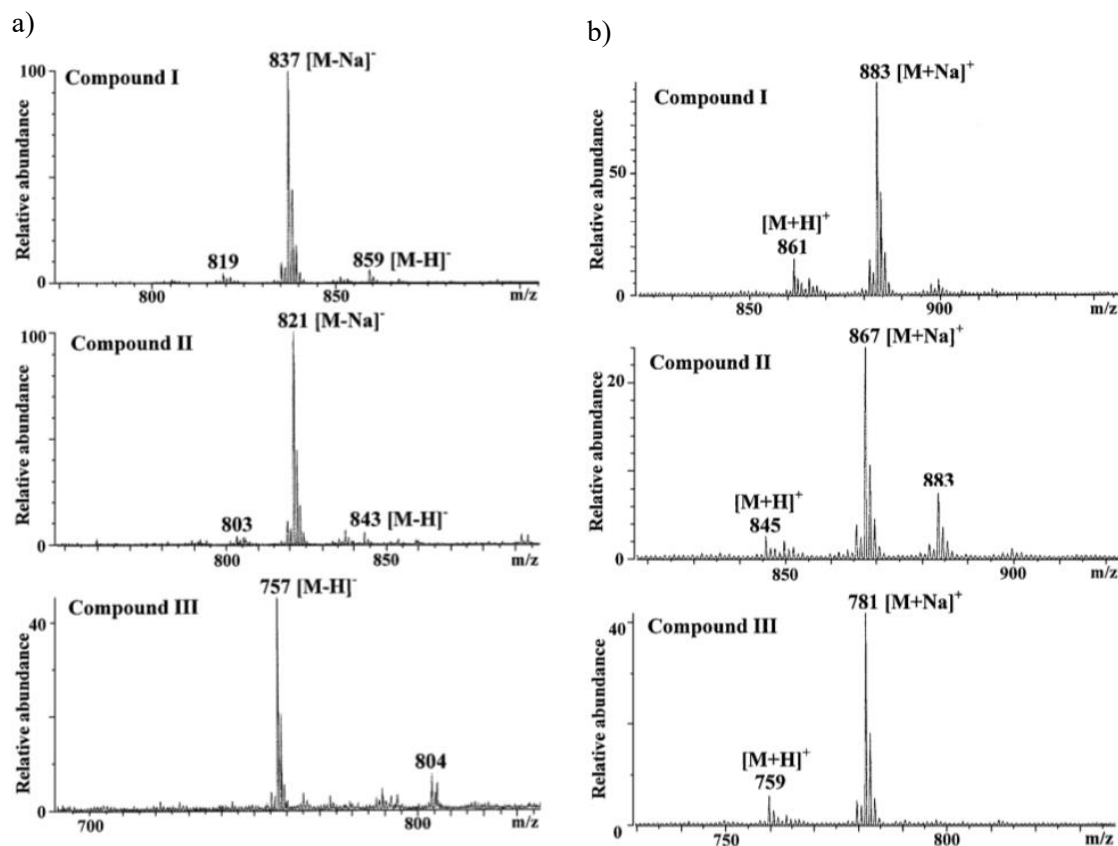
polyhydroksisteroidiglykosidien karakterisoinnissa yleisimmät ESI-tekniikalla havaitut ionit ovat $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$ ja $[M+HCOO]^-$ (Kicha ym., 2024; Popov, 2016). Sulfanoiduille polaarille steroideille tyypilliset ESI:n tuottamat ionit ovat deprotonaation ja protonaation lisäksi natriumin menettänyt ioni tai sen synnyttämä addukti-ioni $[M-Na]^-$ ja $[M+Na]^+$ (Popov ym., 2014). Popov ym. (2016) tutkimuksessa kolonnin jälkeinen natriumkloridiliuoksen lisäys suoritettiin virtausnopeudella 0,3 ml/h, jotta saatiin muodostettua stabiileja natriumaddukti-ioneja ESI-ionisaatiolla. Myös polyhydroksisteroidien karakterisoinnissa käytettiin 1% muurahaishappoa sisältävää metanolia apuna intensiivisten $[M+H]^+$ ionien aikaansaamiseksi MS/MS-spektriin (Popov, 2016).

4.3 Nopeilla atomeilla pommitus

Nopeilla atomeilla pommitus (eng. fast atom bombardment, FAB) on pehmeä ionisaatiomenetelmä, jolla voidaan tuottaa sekä positiivisia että negatiivisia ioneja 6000 Da:n molekyylipainon omaaville polaarille molekyyleille. FAB-ionisaation suurin haittapuoli on matriisi-ionien näkyminen spektrissä, mikä heikentää herkkyyttä ja peittää alleen pienien analyttien ja suurempien yhdisteiden fragmentti-ionien signaaleja (Habbab ym., 2022). Ionisaatiomekanismi ei suosi moninkertaisesti varautuneiden ionien muodostumista ja siksi ionisaatio tuottaa usein yksinkertaisesti varautuneita ioneja, joka johtaa yksinkertaisempaan spektriin (Weinberger, 2000). FAB on helppo yhdistää korkean resoluution omaavaan massa-analysaattoriin (Weinberger, 2000). On kuitenkin huomioitava, että FAB:n herkkyys on huomattavasti pienempi kuin edellä mainittujen ESI:n ja MALDI:n herkkyys, jonka vuoksi nämä ovat suositumpia ionisaatiotekniikkoja (Siuzdak, 2004).

Ensimmäisenä ionisoitava näyte liotetaan haihtumattomaan matriisiin. Erikoistuneiden metaboliittien tapauksessa käytetään pääasiassa kahta matriisia: glyserolia ja *m*-nitrobentsyylialkoholia (*m*-NBA). Glyserolin tapauksessa apuliuottimena käytetään metanolia tai sen vesiseosta, kun taas *m*-NBA:n tapauksessa dikloorimetaania käytetään helpottamaan näytteen lisäämistä matriisiin (Claeys & Claereboudt, 1999). Molekyylien ionisaatio tapahtuu erittäin matalassa paineessa, jossa se altistetaan korkeaenergisille ksenon- tai argonatomeille, jolloin matriisi ja analytti desorboituvat kaasufaasiin. Kaasufaasin varautuneet molekyylit siirtyvät sähköstaattisesti massa-analysaattoriin (Siuzdak, 2004). Nestemäinen sekundaari-ionimassaspektrometria (eng. liquid secondary ion mass spectrometry, LSIMS) eroaa FAB-ionisaatiotekniikasta siten, että atomien sijaan, korkeaenergisiä cesiumioneja käytetään näytteen ionisoimiseen (Claeys & Claereboudt, 1999).

Polaaristen steroidien karakterisoinnissa FAB-massaspektristä voidaan havaita molekyyli-ionien $[M-Na]^-$, $[M+Na]^+$, $[M-H]^-$ ja $[M+H]^+$ lisäksi fragmentaatiotuotteita (Popov ym., 2022). Niin LSIMS- kuin FAB-tekniikalla matriisi-ionien syntyminen on yleistä (Siuzdak, 2004). Kuvassa 6 on esitetty LSIMS-tekniikalla ionisoituja yhdisteitä, joiden rakenteet on esitetty kuvassa 3.

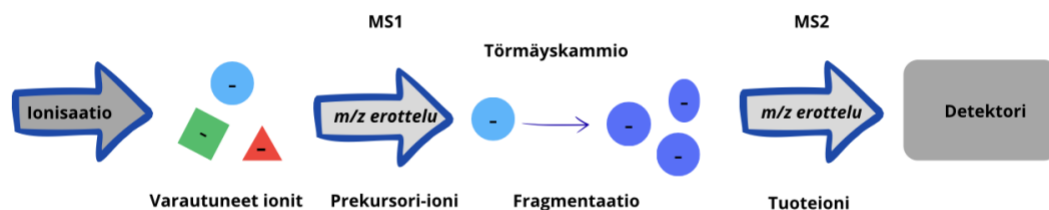


Kuva 6. Sekundaari-ionimassaspektrometrian (LSIMS) a) negatiivisen ionisaation massaspektrit ja b) positiivisen ionisaation massaspektrit. Saadut ionit tuotettiin cesiumpommituksella 25 kV:n jännitteellä ja 10 kV:n kiihdytysjännitteellä massaresoluution ollessa 1500. Näytteet liuotettiin metanoliin ja sekoitettiin 1 μ l:an m-NBA:ta. Natriumadduktien $[M+Na]^+$ muodostamiseen käytettiin m-NBA-matriisia, joka oli kyllästetty NaI:lla. Kuva on kopioitu avoimen julkaisun artikkelista Gil ym. (2006), jonka on julkaissut Analytical Sciences The Japan Society'n puolesta, ja jota voidaan jatkolevittää ja muokata Creative Commons Attribution License 4.0 -lisenssillä (CC BY-NCND).

5 MS/MS-karakterisointi

Tandemmassaspektrometriassa (MS/MS, MSⁿ) hyödynnetään kahta tai useampaa massa-analysaattoria tai niiden vaiheita. Luonteeltaan se on spesifinen mittausten menetelmä, jonka avulla saadaan tietoa ioneista. Se mahdollistaa monimutkaisten seoksien ja epäpuhtaiden näytteen, kuten meritähtien uutteen tutkimisen, sillä hyödytön tieto voidaan suodattaa pois jo ensimmäisessä massa-analyysissä. Hyvä signaali-kohinasuhde (S/N) tekee analyysistä herkän, minkä vuoksi analyysiin tarvittava näytemäärä on pieni. Kahden tai useamman massa-analysaattorin käyttö kuitenkin heikentää signaalia, verrattuna yksivaiheiseen massa-analysaattoriin. Kaikki MS/MS-menetelmät noudattavat samaa kaavaa: ionien tuottaminen ionilähteen avulla, ionin eristäminen ja siihen tietyn reaktion kohdistaminen ja viimeisenä reaktiotuotteiden analysointi. Käytettyjä reaktioita tandemmassaspektrometriassa ovat muun muassa törmäyksen aiheuttama hajoaminen (eng. collision-induced dissociation, CID) ja pinnan aiheuttama hajoaminen (eng. surface-induced dissociation, SID). Hajoamisreaktioissa ioni aktivoidaan muuttamalla törmäyksen kineettinen energia analysoidun ionin sisäiseksi energiaksi (Ketola ym., 2010).

Tandemmassaspektrometriassa on useita skannaustapoja MS/MS-spektrin aikaansaamiseksi (Ketola ym., 2010). Inertillä kaasulla toteutettavia skannaustapoja ovat muun muassa tuoteioniskannaus ja lähtöioniskannaus. Tuoteioniskannauksessa valitut prekursori-ionit ohjataan ensimmäiselle massa-analysaattorille, jossa ne erottuvat m/z -suhteen perusteella. Törmäyskammiossa on inerttiä kaasua, johon valitut prekursori-ionit törmäilevät tuottaen yhä pienempiä fragmentteja, tuoteioneita. Tuoteionit erottuvat toisella massa-analysaattorilla m/z -suhteen perusteella. Yleisimpinä prekursori-ioneina sulfanoiduille steroidisille glykosideille voidaan pitää $[M-Na]^+$ tai $[M+Na]^+$ ioneja (Kicha ym., 2024). Ei-sulfanoiduille steroidisille glykosideille yleisimpinä prekursori-ioneina voidaan pitää molekyylien protonoitunutta $[M+H]^+$ ja deprotonoitunutta $[M-H]^-$, muotoa.



Kuva 7. Tandemmassaspektrometriassa (MS/MS) lähtöioniskannauksissa valitut prekursori-ionit ohjataan ensimmäiselle massa-analysaattorille, jossa ne erottuvat massa-varaus (m/z)-suhteen perusteella. Törmäyskammiossa on inerttiä kaasua, johon valitut prekursori-ionit törmäilevät tuottaen yhä pienempiä fragmentteja, tuoteioneja. Tuoteionit erottuvat toisella massa-analysaattorilla m/z -suhteen perusteella.

MS/MS-spektristä saadaan arvokasta tietoa niin asterosaponiinien kuin polyhydroksisteroidien ja niiden glykosidien rakenteesta. MS/MS:lla voidaan selvittää rakenteelliset epäselvyydet, jotka liittyvät yhdisteiden aglykoniosaan ja oligosakkaridiketjujen sisäiseen sokerijärjestykseen (Popov ym., 2014). Rakenteellisiä epäselvyyksiä syntyy, kun eri rakenteen omaavat polaariset steroidit antavat massaspektrissä saman m/z -suhteen. Polaaristen steroidien fragmentoituminen antaa tietoa niiden mahdollisista biosynteesireiteistä, sillä seuraamalla yhdisteissä tapahtuvia peräkkäisiä molekyyli-ionien lohkeamisia, voidaan tunnistaa yhdisteiden biosynteesin välituotteita ja havaita kullekin yhdisteryhmälle tyypillisiä biosynteesipolkuja. Näiden selvittäminen on tutkimukselle oleellista, kun haluamme valmistaa luonnonlääkeaineita semisynteettisesti tai synteettisesti.

Suurin osa meritähtien polaarista steroidisista sisältää sulfaattiryhmän, jonka vuoksi negatiivinen ionisaatio antaa suuremman intensiteetin kuin positiivinen ionisaatio (Popov, Ivanchina, Kicha, Malyarenko, & Dmitrenok, 2019). Sulfanoidut polaariset steroidit havaitaan massaspektrissä usein $[M+Na]^+$ -addukteina positiivisella ja $[M-Na]^-$ -addukteina negatiivisella ionisaatiolla. Ei-sulfanoidut polaariset steroidit havaitaan negatiivisella ionisaatiolla deprotonoituneena muotona $[M-H]^-$ ja klooriaddukteina $[M+Cl]^-$. Positiivisella ionisaatiolla natriumadduktit $[M+Na]^+$ ovat yleisiä myös ei-sulfanoiduille polaarille steroideille (Popov ym., 2022).

Kuten on aiemmin jo mainittu, meritähtien uutteen kompleksisuus aiheuttaa haasteita erikoistuneiden metaboliittien karakterisoinnissa. Tandemmassaspektrometrian yhdistäminen

nestekromatografiaan on osoittautunut soveltuvat hyvin steroidiyhdisteiden profilointiin. Etenkin LC-ESI-MS- ja LC-ESI-MS/MS-menetelmät ovat osoittautuneet hyödyllisiksi eri meritähtien lajien ja populaatioiden steroidien metaboliittiprofiilien vertailussa (Popov ym., 2014, 2016). LC-MS on tehokas työkalu uutteen laadulliseen ja määrälliseen koostumuksen selvittämiseen sekä metaboliaprofiilin tarkasteluun, kun tarkastellaan ympäristötekijöiden ja muiden ärsykkeiden vaikutuksia (Popov ym., 2014). On kuitenkin huomioitava, ettei LC-MS anna riittävästi tietoa yhdisteiden molekyyliarakenteesta tai stereokemiasta ilman standardien, MS/MS:n tai esimerkiksi NMR:n hyödyntämistä (Bayona ym., 2022; Popov, Ivanchina, Kicha, Malyarenko, & Dmitrenok, 2019). Tietokannat, kuten NIST 20, MassBank ja METLIN tarjoavat MS/MS-spektrejä, joita voidaan käyttää apuna oletettujen yhdisteiden tunnistamiseen molekyylimassan ja MS/MS-spektrien avulla (Bayona ym., 2022).

5.1 Asterosaponiinit

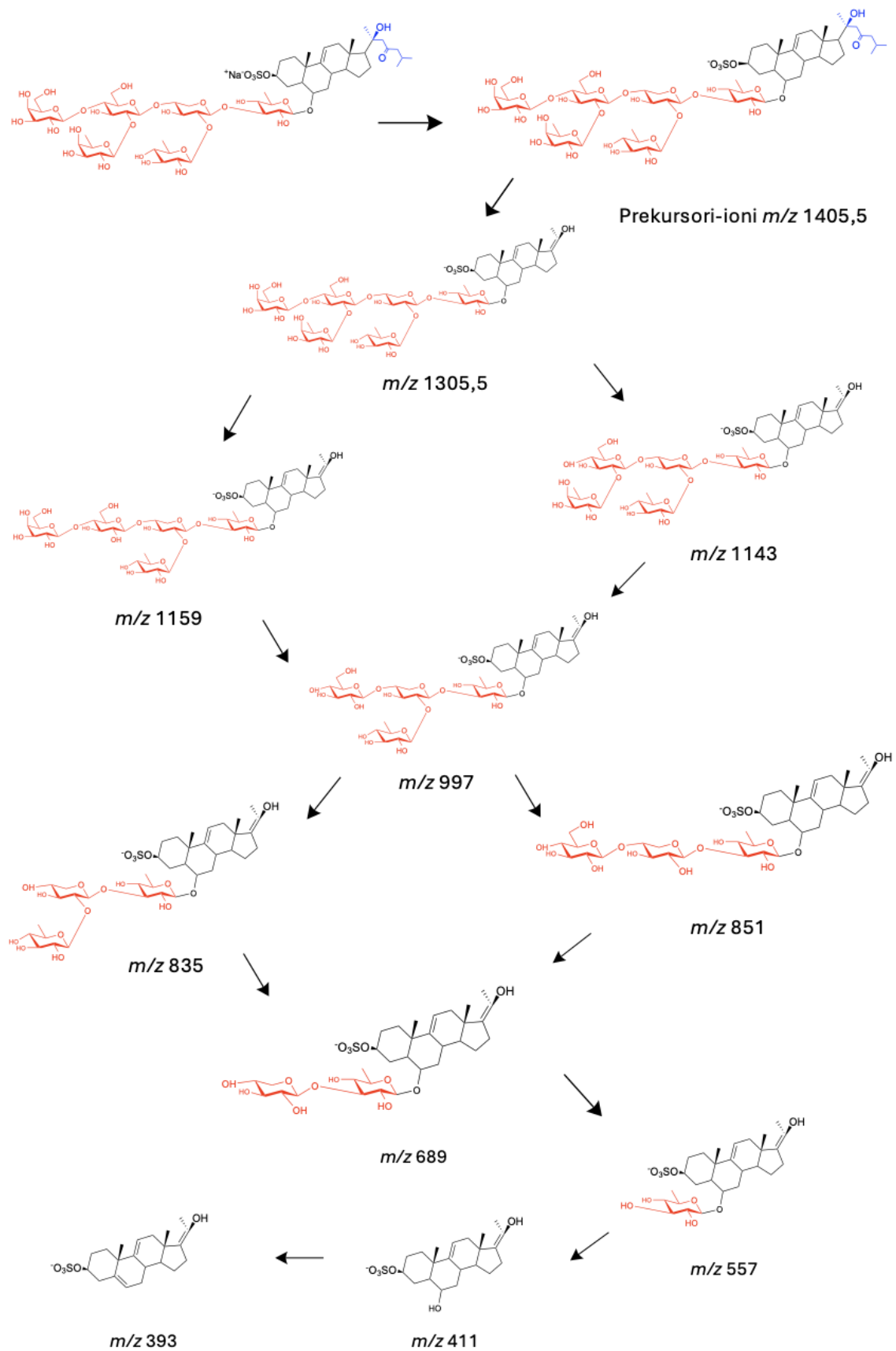
Asterosaponiinien MS/MS-spektristä saadaan tietoa aglykoniosaan kiinnittyneen oligosakkaridiketjun monosakkaridiyksiköiden järjestyksestä, sulfaattiryhmien sijainnista ja sivuhiiliketjun pituudesta (Popov, Ivanchina, Kicha, Malyarenko, & Dmitrenok, 2019). Oligosakkaridiketjujen sokerijärjestys voidaan selvittää seuraamalla prekursori-ionin monosakkaridien peräkkäisiä fragmentoitumisia. Mikäli negatiivinen varaus on lokalisoitunut aglykoniosan sulfaattiryhmään, on valitun prekursori-ionien tuotettava fragmentteja, jotka sisältävät aglykoniosan tai osia siitä. Tämä tarkoittaa sitä, että oligosakkaridiketjun on hajottava CID:n seurauksena, siten että hajoaminen johtaa kohti aglykoniosaa (Demeyer ym., 2014). Tällöin voidaan myös karakterisoida asterosaponiinien hiilihydraattiketjun eri isomeerejä. Sokeriketjun eri epimeeriset monosakkaridit ja aglykonisidosten stereokemia eivät ole kuitenkaan selvitettävissä ainoastaan MS-menetelmillä (Zaia, 2010).

Kaikkien asterosaponiinien negatiivisella ionisaatiolla mitatuissa MS/MS-spektreissä havaittiin fragmentti-ionit m/z 96,9 ja m/z 79,9; mitkä viittaavat sulfaattiryhmän $[HSO_4]^-$ ja $[SO_3]^-$ -ionien esiintymiseen. Positiivisella ionisaatiolla saaduissa MS/MS-spektreissä sulfaattiryhmien esiintymiseen viittasivat ionit m/z 120 ja m/z 142,9; jotka ovat seurausta $[NaHSO_4]^+$ ja $[Na_2HSO_4]^+$ -ionien fragmentoitumisesta aglykoniosasta (Popov ym., 2016). Asterosaponiinit, joiden rakenteessa on sulfaattiryhmä C-3-asemassa sekä sokeriketjussa, tuottavat intensiivisiä piikkejä massaspektriin kahdesti varautuneelle ionille $[M-2Na]^{2-}$, kun taas yhdesti varautuneet $[M-Na]^-$ -ionit esiintyvät matalammalla intensiteetillä (Popov ym., 2014).

Demeyer ym. (2014) tekemässä tutkimuksessa LC-MS/MS-menetelmän avulla onnistuttiin selvittämään asterosaponiinin eri stereoisomeerit mittaamalla ensin eriävät retentioajat nestekromatografialla ja seuraamalla sitten peräkkäisiä sokerifragmentoitumisia ja kullekin sivuketjulle tyypillistä fragmentoitumista (Demeyer ym., 2014). Polaaristen steroidien retentioajat vaihtelevat suuresti kromatogrammissa. Hiilihydraattiketjulla ei ole osoitettu olevan merkittävää vaikutusta, mutta aglykoniosan sivuketjun on havaittu vaikuttavan yhdisteiden retentioaikoihin huomattavasti (Popov ym., 2016). Sivuhiiliketjun ominaisuudet kuten sen pidentyminen tai kaksoissidosten ja funktionaalisten ryhmien, kuten sulfaattiryhmän tai hydroksiryhmän, lisääminen pidentää retentioaikaa (Popov ym., 2016). Voidaan siis sanoa, että nestekromatografian yhdistäminen tandemmassaspektrometriaan on osoittanut sopivaksi menetelmäksi yhdisteiden stereokemialliseen karakterisointiin.

Asterosaponiinin analyysi *P. pectinifera* -lajista paljasti, että kyseinen yhdisteryhmä on mosaiikkityypisen biosynteesin tuotteita (Popov ym., 2016). Tämä tarkoittaa, että hiilihydraattien ja aglykoniosien biosynteesi ovat toisistaan riippumattomia. Popov ym. (2016) tutkimuksessa todettiin, että asterosaponiinin biosynteesi voi edetä kahdella eri tavalla. Ensimmäisessä tavassa tetrasakkaridisen hiilihydraattiketjun muodostumisesta seuraa sen haarautuminen ja pidentyminen fukoosin tai galaktoosin kiinnittymisenä. Toisessa biosynteesitavassa muodostuu ensin penta- tai heksasakkaridinen hiilihydraattiketju, jota seuraa aglykonin sivuketjun muuntuminen.

Kuvassa 8 on esitetty asterosaponiinissa esiintyvän pectinosidi F:n MS/MS-fragmentoituminen negatiivisella ionisaatiolla. Kuvan 8 mukainen MS/MS-fragmentoituminen on tyypillistä asterosaponiineille, joiden kolestaatin C20:ssa on hydroksiryhmä ja C23:ssa ketoniryhmä (Popov ym., 2016).



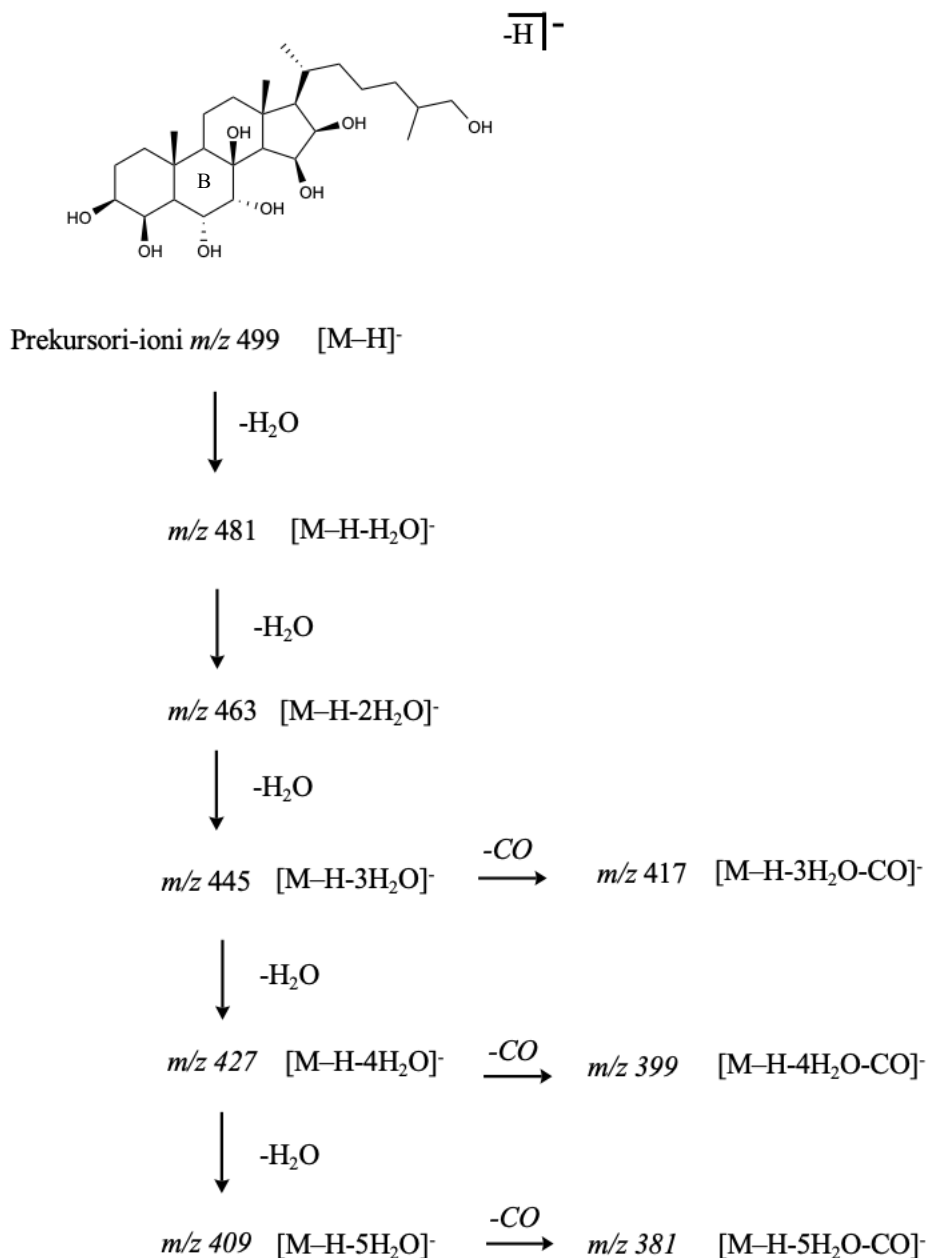
Kuva 8. Pectinosidi F:n MS/MS fragmentoituminen, kun prekursori-ioniksi on valittu m/z 1405,5. Fragmentoituminen on piirretty kirjallisuuslähteen mukaan (Popov ym., 2016).

5.2 Polyhydroksisteroidit & niiden glykosidit

Yleisesti ottaen polyhydroksisteroidien ja niiden glykosidien karakterisointi tuottaa haasteita, sillä etenkin tämän yhdisteryhmän rakenteet ovat monimuotoisia. Prekursori-ionien $[M-H]^-$, $[M+H]^+$, $[M+Cl]^-$ ja $[M+Na]^+$ fragmentoitumista seuraamalla saadaan tietoa polyhydroksisteroidien ja niiden glykosidien hydroksyyli ryhmien lukumäärästä, sulfaattiryhmän läsnäolosta ja sivuketjun pituudesta (Popov, 2016).

Polyhydroksisteroideille tyypillinen tandemmassaspektrometrinen fragmentoituminen CID-olosuhteissa on vesimolekyylien lohkeaminen steroidirungosta (Popov, Ivanchina, Kicha, Malyarenko, & Dmitrenok, 2019). Kuvassa 9 on esitetty polyhydroksisteroidin 5α -kolestaani- $3\beta,4\beta,6\alpha,7\alpha,8,15\beta,16\beta,26$ -oktaanin steroidiytimen MS/MS fragmentoitumista, kun prekursori-ioniksi on valittu m/z 499 $[M-H]^-$. Negatiivisen ionisaation synnyttämän prekursori-ionin $[M-H]^-$ fragmentoituminen antoi intensiivisiä piikkejä $[M-H-nH_2O]^-$ (kuva 9) ja $[M-H-nH_2O-2H]^-$ ($n=1,2,3$) ioneille. Näiden piikkien intensiteetit vaihtelevat C15-asemassa sijaitsevan hydroksyyli ryhmän diastereomeerin mukaan. Tämän vuoksi voidaan todeta, että MS/MS-menetelmät soveltuvat myös stereospesifiseen rakenneanalyysiin. Mekanismia kahden vetyatomin irtoamisesta deprotonoidusta molekyylistä ei täysin vielä tunneta (Popov, 2016).

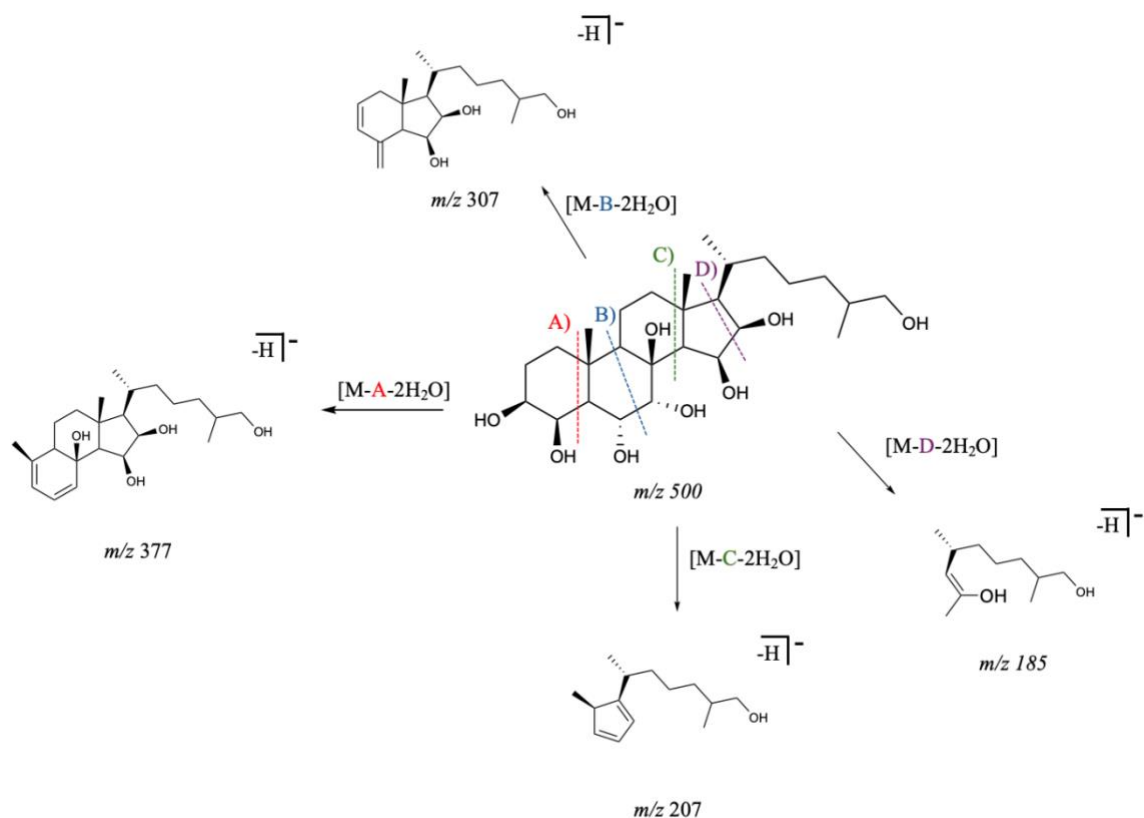
Hydroksyyli ryhmän happi yhdessä steroidirungon hiilen kanssa muodostaa $[M+H-nH_2O-CO]^+$ ja $[M-H-nH_2O-CO]^-$ ($n\geq 3$) -fragmentti-ionit (kuva 9). Tällainen fragmentoituminen voidaan olettaa olevan tyypillinen polyhydroksisteroidiyhdisteille, joiden koko rakenteessa on kahdeksan hydroksyyli ryhmää sekä B-steroidirenkaassa kolme hydroksyyli ryhmää C6:ssa, C7:ssa ja C8:ssa. Siksi voidaan olettaa CO_2 :n eliminoituvan steroidirungon B-renkaasta. (Popov, 2016). Kyseisten fragmentti-ionien syntyminen on seurausta kaksoissidosten muodostumisesta useiden vesimolekyylien lohkeamisen jälkeen.



Kuva 9. Polyhydrosisteroidin fragmentoituminen MS/MS-analyysissa, kun prekursori-ioniksi on valittu m/z 499 $[M-H]^-$ joka on törmäytetty törmäyskammiossa tyypikaasuun 30 eV. Fragmentoituminen on piirretty kirjallisuuslähteen mukaan (Popov, 2016).

Steroidirunkojen A-D MS/MS-fragmentoitumisesta syntyneet fragmentti-ionit havaitaan MS/MS-spektrissä keskimääräisillä tai suhteellisen alhaisilla intensiteeteillä. Kuten asterosaponiinien sivuhiiliketjun fragmentoituminen, polyhydroksisteroidien MS/MS-spektrissä sivuhiiliketjun ja steroidirungon välisen sidoksen katkeaminen havaitaan melko voimakkaana piikkinä (Popov, 2016). Polyhydroksisteroidien glykosidien diagnostisia ioneja oli vaikea tunnistaa rakenteellisen monimuotoisuuden vuoksi ja näiden yhdisteiden

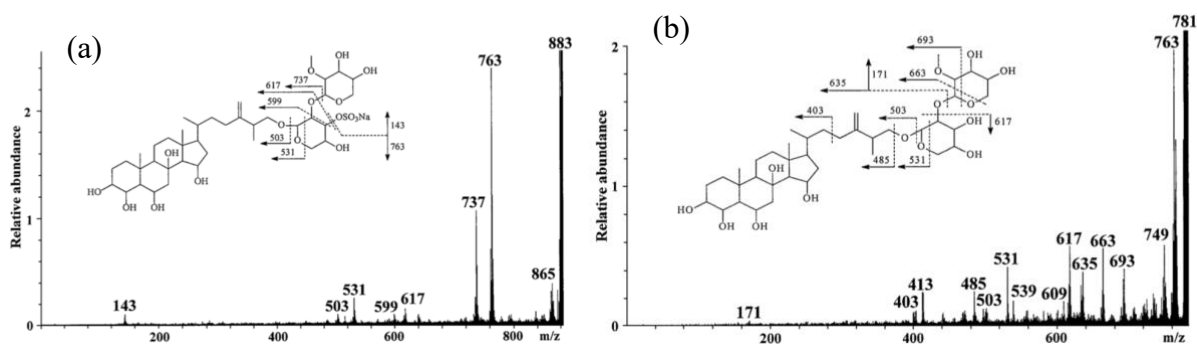
steroidiytimien hajoaminen oli useimmiten heikkoa ja epäspesifistä (Popov, Ivanchina, Kicha, Malyarenko, & Dmitrenok, 2019). Kuvassa 10 on esitetty erään polyhydroksisteroidin steroidirungon fragmentoituminen.



Kuva 10. Polyhydroksisteroidi 5α -kolestaani- $3\beta,4\beta,6\alpha,7\alpha,8,15\beta,16\beta,26$ -oktaanin steroidiytimen MS/MS-fragmentoituminen negatiivisella ionisaatiolla. Prekursori-ioniksi on valittu m/z 499, $[M-H]^-$ joka on törmäytetty törmäyskammiossa typpikaasuun 30 eV. Fragmentoituminen on piirretty kirjallisuuslähteen mukaan (Popov, 2016).

Yhdisteet, joissa sulfaattiryhmä sijaitsi C3-asemassa tai sivuketjussa, antoivat tarkempaa tietoa kuin yhdisteet, joissa sulfaattiryhmä sijaitsi C15- tai C16-asemassa (Popov, Ivanchina, Kicha, Malyarenko, & Dmitrenok, 2019). Kicha ym. (2024) tutkimuksessa sulfanoiduille polyhydroksisteroidiglykosideille havaittiin MS/MS-spektreissä karakteristiset ionit: negatiivisella ionisaatiolla m/z 96,9 $[HSO_4]^-$ ja positiivisella ionisaatiolla m/z 143 $[Na_2HSO_4]^+$. Kyseisiä ioneja voidaan pitää tunnusomaisina sulfaattiryhmälle, sillä kuten asterosaponiinien kohdallakin, C3-asemassa tai sivuhiiliketjussa sijaitsevat sulfaattiryhmät antavat tälle funktionaaliselle ryhmälle tyypilliset fragmenit MS/MS-spektriin: m/z 96,9

$[\text{HSO}_4]^-$ ja m/z 79,9 $[\text{SO}_3]^-$ (Popov ym., 2016). Sulfanoitujen polyhydroksisteroidiglykosidien monosakkarideja voidaan havaita ja tunnistaa MS/MS-spektreistä seuraamalla molekyyli-ioneille $[\text{M}-\text{Na}]^-$ ja $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ominaisia massahäviöitä (Kicha ym., 2024). Joissain tapauksissa monosakkarien oletettiin olevan arabinooseja tai metyloituja arabinooseja, sillä aiemmin lajista eristetyt glykosidit olivat muodostuneet näistä (Popov ym., 2016). Gil ym. (2006) tutkimuksen mukaan aglykonirenkaassa olevien hiilihydraatti- ja sivuketjujen tunnistaminen oli helpompaa vertaamalla natriumaddukti-ionista saatua MS/MS-spektriä kemiallisesti muokattuun rakenteeseen. Syntyneistä fragmentti-ioneista onnistuttiin saamaan tietoa aglykoniosan luonteesta, siihen kiinnittyneiden sokerien tyypeistä ja niiden kiinnittymiskohdista (Gil ym., 2006). Popov ym. (2019) tekemässä tutkimuksessa tiettyjen funktionaalisten ryhmien sijainnit määritettiin kirjallisuustietojen ja biosyntetisten oletusten perusteella, sillä steroidirenkaiden ja sivuketjujen hajoaminen oli epäinformatiivista. Kuvan 11a MS/MS-spektrissä on esitetty sulfanoidun polyhydroksidisteroidiglykosidin fragmentoituminen prekursori-ionista $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 883. Kuvan 11b MS/MS-spektrissä on esitetty polyhydroksidisteroidin fragmentoituminen prekursori-ionista $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 871.



Kuva 11. (a) Kuvassa 3 esitetyn rakenteen I MS/MS-fragmentoituminen prekursori-ionille $[\text{M} + \text{Na}]^+$ m/z 883. (b) Kuvassa 3 esitetyn rakenteen III MS/MS-fragmentoitumisen prekursori-ionista $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 871. Kuva on kopioitu avoimen julkaisun artikkelista (Gil ym., 2006), jonka on julkaissut Analytical Sciences The Japan Society'n puolesta, ja jota voidaan jatkolevittää ja muokata Creative Commons Attribution License 4.0 -lisenssillä (CC BY-NCND).

6 Yhteenveto

Koska meren eliöiden biologinen monimuotoisuus on suurempi kuin maaeläinten ja -kasvien, ja koska vain murto-osa merieläimissä esiintyvistä erikoistuneista metaboliiteista on tutkittu (Popov ym., 2022), voidaan olettaa, että tulevaisuudessa uusien yhdisteiden määrä kasvaa edelleen ja tarjoaa uusia hoitovaihtoehtoja. Jotta voimme saavuttaa syvemmän ymmärryksen meritähtien tuottamista steroidisista glykosideista ja niiden koostumuksista eri ruumiinosien välillä, meritähtien metaboliaprofiilia ja niiden laajempia ekologisia vaikutuksia on tutkittava lisää. Etenkin asterosaponiinien ja polyhydroksisteroidien biologisen tehtävien varmistaminen vaatii tutkimusta. Meritähtien raakauutteet sisältävät suuren määrän epäpuhtauksia, mikä hankaloittaa steroidisten glykosidien kvalitatiivista ja kvantitatiivista analyysiä. SPE, LLE, kolonninkromatografia ja näiden yhdistelmät ovat osoittautuneet varsin spesifisiksi ja välttämättömiksi meritähtien uutteen puhdistusmenetelmiksi.

MALDI-MS-kuvantaminen on osoittautunut tehokkaaksi menetelmäksi, kun halutaan tutkia steroidisten glykosidien jakautumista kudosten ja elinten välillä. MS-menetelmät yhdessä nestekromatografian kanssa tarjoavat varteenotettavan menetelmän steroidisten glykosidien rakenneanalyysiin ja metaboliaprofiilin tutkimisen niiden korkean herkkyyden, nopean analysointiajan ja selektiivisyyden vuoksi. Nykyaikaisten menetelmien, kuten erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografian, yhdistäminen huippuluokan MS-tekniikoihin, kuten fragmentointitekniikkaan, mahdollistaa yhdessä korkean resoluution massa-analysointorin kanssa yhä tarkemman rakenneanalyysin. Myös tietokantojen laajentuminen tulevaisuudessa mahdollistaa yhä tehokkaamman kemiallisten rakenteen karakterisoinnin. Voidaan siis sanoa, että MS-menetelmät toimivat varsin hyvin polaaristen steroidien kvalitatiivisessa sekä kvantitatiivisessa määrittämisessä, ja siksi ovatkin yksi keskeisimmistä analyttisistä menetelmistä meritähtien tuottamien polaaristen steroidien karakterisoinnissa.

Viitteet

- Bayona, L. M., De Voogd, N. J., & Choi, Y. H. (2022). Metabolomics on the study of marine organisms. *Metabolomics*, 18(3), 17. <https://doi.org/10.1007/s11306-022-01874-y>
- Buszewski, B., & Szultka, M. (2012). Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42(3), 198–213. <https://doi.org/10.1080/07373937.2011.645413>
- Chludil, H. D., Seldes, A. M., & Maier, M. S. (2002). Antifungal Steroidal Glycosides from the Patagonian Starfish *Anasterias m inuta*: Structure–Activity Correlations. *Journal of Natural Products*, 65(2), 153–157. <https://doi.org/10.1021/np010332x>
- Claeys, M., & Claereboudt, J. (1999). Fast Atom Bombardment Ionization in Mass Spectrometry*. Teoksessa *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* (s. 566–572). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374413-5.00320-1>
- Demeyer, M., De Winter, J., Caulier, G., Eeckhaut, I., Flammang, P., & Gerbaux, P. (2014). Molecular diversity and body distribution of saponins in the sea star *Asterias rubens* by mass spectrometry. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 168, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.10.004>
- Demeyer, M., Wisztorski, M., Decroo, C., De Winter, J., Caulier, G., Hennebert, E., Eeckhaut, I., Fournier, I., Flammang, P., & Gerbaux, P. (2015). Inter- and intra-organ spatial distributions of sea star saponins by MALDI imaging. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(29), 8813–8824. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9044-0>
- Dias, D. A., Urban, S., & Roessner, U. (2012). A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites*, 2(2), 303–336. <https://doi.org/10.3390/metabo2020303>
- Dunn, W. B., & Lewis, M. R. (2019). The Role of Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Metabolic Phenotyping. Teoksessa *The Handbook of Metabolic*

- Phenotyping* (s. 97–136). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812293-8.00003-7>
- Gil, J. H., Jung, J. H., Kim, K.-J., Kim, M.-S., & Hong, J. (2006). Structural Determination of Saponins Extracted from Starfish by Fast Atom Bombardment Collision-Induced Dissociation Mass Spectrometry. *Analytical Sciences*, 22(4), 641–644. <https://doi.org/10.2116/analsci.22.641>
- Habbab, A., Belboukhari, N., & Sekkoum, K. (2022). Mass spectrometry. Teoksessa *Analytical Techniques in Biosciences* (s. 115–124). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822654-4.00016-6>
- Ivanchina, N. V., Kicha, A. A., Kalinovsky, A. I., Dmitrenok, P. S., Stonik, V. A., Riguera, R., & Jiménez, C. (2000). Hemolytic Polar Steroidal Constituents of the Starfish *Aphelasterias j. aponica*. *Journal of Natural Products*, 63(8), 1178–1181. <https://doi.org/10.1021/np000030f>
- Ivanchina, N. V., Kicha, A. A., & Stonik, V. A. (2011). Steroid glycosides from marine organisms. *Steroids*, 76(5), 425–454. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2010.12.011>
- Ketola, R., Kostainen, R., Kotiaho, T., & Vainiotalo, P. (2010). Massaspektrometrian perusteet. (Vol. 2010). Suomen Massaspektrometrian Seura ry.
- Kicha, A. A., Ivanchina, N. V., & Stonik, V. A. (2003). Seasonal variations in the levels of polyhydroxysteroids and related glycosides in the digestive tissues of the starfish *Patiria (Asterina) pectinifera*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 136(4), 897–903. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2003.09.003>
- Kicha, A. A., Kapustina, I. I., Ivanchina, N. V., Kalinovsky, A. I., Dmitrenok, P. S., Stonik, V. A., Pal'yanova, N. V., Pankova, T. M., & Starostina, M. V. (2008). Polyhydroxylated steroid compounds from the Far Eastern starfish *Distolasterias nipon*. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 34(1), 118–124. <https://doi.org/10.1134/S1068162008010160>

- Kicha, A. A., Tolkanov, D. K., Malyarenko, T. V., Malyarenko, O. S., Kuzmich, A. S., Kalinovsky, A. I., Popov, R. S., Stonik, V. A., Ivanchina, N. V., & Dmitrenok, P. S. (2024). Sulfated Polyhydroxysteroid Glycosides from the Sea of Okhotsk Starfish *Henricia leviuscula spiculifera* and Potential Mechanisms for Their Observed Anti-Cancer Activity against Several Types of Human Cancer Cells. *Marine Drugs*, 22(7), 294. <https://doi.org/10.3390/md22070294>
- Lawrence, J. M. (2013). *Starfish: Biology and ecology of the Asteroidea*. John Hopkins university press.
- Leopold, J., Prabutzki, P., Engel, K. M., & Schiller, J. (2023). A Five-Year Update on Matrix Compounds for MALDI-MS Analysis of Lipids. *Biomolecules*, 13(3), 546. <https://doi.org/10.3390/biom13030546>
- Levina, E. V., Kalinovsky, A. I., & Levin, V. S. (2006). New steroid glycosides from the starfish *Fromia milleporella*. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 32(1), 84–88. <https://doi.org/10.1134/S1068162006010092>
- Lu, Z., Wang, D., Li, X., Yan, Z., Yin, X., Xu, Y., Wang, S., & Li, K. (2025). Chemical Warfare in the Environment—Secondary Metabolites From Starfish (*Asterias amurensis*) Induce Teratogenicity in Medaka Embryos (*Oryzias melastigma*). *Chemistry & Biodiversity*, 22(4), e202402115. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202402115>
- Ma, X. G., Tang, H. F., Zhao, C. H., Ma, N., Yao, M. N., & Wen, A. D. (2009). Two new 24-hydroxylated asterosaponins from *Culcita novaeguineae*. *Chinese Chemical Letters*, 20(10), 1227–1230. <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2009.05.031>
- Maier, M. S., Centurión, R., Muniain, C., Haddad, R., & Eberlin, M. N. (2006). Identification of sulfated steroidal glycosides from the starfish *Heliaster helianthus* by electrospray ionization mass spectrometry. *Arkivoc*, 2007(7), 301–309. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0008.726>

- Maplestone, R. A., Stone, M. J., & Williams, D. H. (1992). The evolutionary role of secondary metabolites—A review. *Gene*, 115(1–2), 151–157. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90553-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90553-2)
- McMaster, M. C. (2007). HPLC a practical user's guide (2. p.). John Wiley & Sons.
- NOAA Ocean Exploration. (2026). *How much of the ocean has been explored?* [Dataset]. <https://oceanexplorer.noaa.gov/ocean-fact/explored/>
- Palyanova, N., Pankova, T., Starostina, M., Kicha, A., Ivanchina, N., & Stonik, V. (2013). Neuritogenic and Neuroprotective Effects of Polar Steroids from the Far East Starfishes *Patiria pectinifera* and *Distolasterias nipon*. *Marine Drugs*, 11(5), 1440–1455. <https://doi.org/10.3390/md11051440>
- Patridge, E., Gareiss, P., Kinch, M. S., & Hoyer, D. (2016). An analysis of FDA-approved drugs: Natural products and their derivatives. *Drug Discovery Today*, 21(2), 204–207. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.01.009>
- Popov, R. S. (2016). Stereospecific fragmentation of starfish polyhydroxysteroids in electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, 71(14), 1368–1376. <https://doi.org/10.1134/S1061934816140124>
- Popov, R. S., Ivanchina, N. V., & Dmitrenok, P. S. (2022). Application of MS-Based Metabolomic Approaches in Analysis of Starfish and Sea Cucumber Bioactive Compounds. *Marine Drugs*, 20(5), 320. <https://doi.org/10.3390/md20050320>
- Popov, R. S., Ivanchina, N. V., Kicha, A. A., Malyarenko, T. V., & Dmitrenok, P. S. (2019). Structural Characterization of Polar Steroid Compounds of the Far Eastern Starfish *Lethasterias fusca* by Nanoflow Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 30(5), 743–764. <https://doi.org/10.1007/s13361-019-02136-3>

- Popov, R. S., Ivanchina, N. V., Kicha, A. A., Malyarenko, T. V., Dmitrenok, P. S., & Stonik, V. A. (2014). Metabolite profiling of polar steroid constituents in the Far Eastern starfish *Aphelasterias japonica* using LC–ESI MS/MS. *Metabolomics*, 10(6), 1152–1168. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0654-x>
- Popov, R. S., Ivanchina, N. V., Kicha, A. A., Malyarenko, T. V., Dmitrenok, P. S., & Stonik, V. A. (2016). LC-ESI MS/MS profiling of polar steroid metabolites of the Far Eastern starfish *Patiria* (=Asterina) *pectinifera*. *Metabolomics*, 12(2), 21. <https://doi.org/10.1007/s11306-015-0939-8>
- Popov, R. S., Ivanchina, N. V., Kicha, A. A., Malyarenko, T. V., Grebnev, B. B., Stonik, V. A., & Dmitrenok, P. S. (2019). The Distribution of Asterosaponins, Polyhydroxysteroids and Related Glycosides in Different Body Components of the Far Eastern Starfish *Lethasterias fusca*. *Marine Drugs*, 17(9), 523. <https://doi.org/10.3390/md17090523>
- Prokof'eva, N. G., Chaikina, E. L., Kicha, A. A., & Ivanchina, N. V. (2003). Biological activities of steroid glycosides from starfish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 134(4), 695–701. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(03\)00029-0](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(03)00029-0)
- Sarker, S. D., & Nahar, L. (2012). *Natural Products Isolation* (3rd ed. 2012). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1>
- Siuzdak, G. (2004). An Introduction to Mass Spectrometry Ionization: An Excerpt from *The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology*, 2nd ed.; MCC Press: San Diego, 2005. *JALA: Journal of the Association for Laboratory Automation*, 9(2), 50–63. <https://doi.org/10.1016/j.jala.2004.01.004>
- Stonik, V. A., Kicha, A. A., Malyarenko, T. V., & Ivanchina, N. V. (2020). Asterosaponins: Structures, Taxonomic Distribution, Biogenesis and Biological Activities. *Marine Drugs*, 18(12), 584. <https://doi.org/10.3390/md18120584>

- Suomi, J. (2009). Kemiällisen näytteen esikäsittely (1.painos, Vol. 2009). Kustannus-
osakeyhtiö Otava.
- Tang, H.-F., Cheng, G., Wu, J., Chen, X.-L., Zhang, S.-Y., Wen, A.-D., & Lin, H.-W. (2009).
Cytotoxic Asterosaponins Capable of Promoting Polymerization of Tubulin from the
Starfish *Culcita novaeguineae*. *Journal of Natural Products*, 72(2), 284–289.
<https://doi.org/10.1021/np8004858>
- Tonn, N., Novais, S. C., Silva, C. S. E., Morais, H. A., Correia, J. P. S., & Lemos, M. F. L.
(2016). Stress responses of the sea cucumber *Holothuria forskali* during aquaculture
handling and transportation. *Marine Biology Research*, 12(9), 948–957.
<https://doi.org/10.1080/17451000.2016.1218030>
- Weinberger, R. (2000). Detection. Teoksessa *Practical Capillary Electrophoresis* (s. 365–421).
Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012742356-2/50011-0>
- Xia, J., Miao, Z., Xie, C., Zhang, J., & Yang, X. (2020). Chemical Constituents and
Bioactivities of Starfishes: An Update. *Chemistry & Biodiversity*, 17(1), e1900638.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.201900638>
- Yang, S.-W., Chan, T.-M., Buevich, A., Priestley, T., Crona, J., Reed, J., Wright, A. E., Patel,
M., Gullo, V., Chen, G., Pramanik, B., & Chu, M. (2007). Novel steroidal saponins, Sch
725737 and Sch 725739, from a marine starfish, *Novodinia antillensis*. *Bioorganic &
Medicinal Chemistry Letters*, 17(20), 5543–5547.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.08.025>
- Zaia, J. (2010). Mass Spectrometry and Glycomics. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*,
14(4), 401–418. <https://doi.org/10.1089/omi.2009.0146>
- Zhang, R., Lu, Z., Wang, D., Yan, Z., Sun, X., Li, X., Yin, X., & Li, K. (2025). Polyhydroxy
steroids isolated from starfish (*Asterina pectinifera*) and their embryotoxicity. *Natural*

Product Research, 39(19), 5643–5649.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2024.2350639>