



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

Bufonidae-konnien erittämät bufadienolidit: analysointi LC-MS/MS-menetelmillä

Terhi Värri

Luonnonyhdistekemian tutkimusryhmä

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

29.9.2025

Turku

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

Pääaine: Kemia

Tekijä: Terhi Värri

Otsikko: Bufonidae-konnien erittämät bufadienolidit: analysointi LC-MS/MS menetelmillä

Ohjaajat: Juha-Pekka Salminen ja Maarit Karonen

Sivumäärä: 20 sivua

Päivämäärä: 29.9.2025

Bufadienolidit ovat Bufonidae-heimoon kuuluvien rupikonnien eritteistä löydettäviä steroidirakenteisia yhdisteitä, joilla on havaittu voimakkaita biologisia vaikutuksia, kuten kardiotonisia, syöpäsoluja estäviä ja anti-inflammatorisia ominaisuuksia. Niiden rakenteelle on ominaista steroidirunko, jossa C17-asemassa on kuusihiilinen laktonirengas. Bufadienolidit voivat esiintyä vapaina (bufageniinit) tai konjugoituneina (bufotoksiinit), mikä vaikuttaa niiden farmakologisiin ja kemiallisiin ominaisuuksiin.

Näiden yhdisteiden pitoisuudet ja koostumukset vaihtelevat lajeittain, yksilöittäin ja ympäristötekijöiden mukaan, mikä tekee niiden analysoinnista haastavaa. Näytteiden esikäsittelyllä, erityisesti kuivausmenetelmällä on suuri merkitys yhdisteiden säilyvyyteen. Bufadienolideja tutkitaan yleisimmin perinteisistä valmisteista, kuten Chan Su:sta, ja niiden laadunvarmistus on välttämätöntä kapean terapeuttisen alueen ja toksisuuden vuoksi.

Analytiikassa nestekromatografiaan perustuvat massaspektrometriset menetelmät, erityisesti LC-MS/MS, ovat keskeisiä. Ne mahdollistavat sekä kvantitatiivisen että kvalitatiivisen analyysin, fragmentaatioreittien tarkastelun sekä rakenteellisesti samankaltaisten yhdisteiden erottamisen. DAD-, TOF-MS- ja Orbitrap-MS-tekniikoita käytetään usein parantamaan analyysin tarkkuutta ja erottelukykä. DAD (diodirividetektio) perustuu UV-absorptioon ja soveltuu erityisesti kohdennettuihin, tunnettuihin yhdisteisiin, mutta se ei tarjoa tietoa yhdisteen massasta. TOF-MS (Time-of-Flight Mass Spectrometry, lentoaikamassaspektrometria) tarjoaa korkean tarkkuuden m/z -mittauksia, mutta sen herkkyys matalissa pitoisuuksissa on rajallinen. Orbitrap-MS puolestaan tunnetaan erittäin korkeasta massatarkkuudesta ja erinomaisesta kyvystään analysoida metaboliitteja ja rakenteellisia muutoksia. Näiden menetelmien yhdistäminen mahdollistaa syvällisemmän analyysin ja laajemman profiloinnin, mikä on tarpeen tällaisilla yhdisteillä, jotka esiintyvät pääsääntöisesti pieninä pitoisuuksina ja niillä on monimutkaisia metaboliitteja.

LC-MS/MS ja siihen yhdistetyt korkean erotuskyvyn kromatografiset menetelmät tarjoavat tehokkaimmat työkalut bufadienolidien havaitsemiseen ja karakterisointiin. Tulevaisuudessa tutkimus keskittyy entistä enemmän yhdisteiden synteettiseen muokkaamiseen, farmakologisen tehon parantamiseen ja *in vivo*-metabolomiikan hyödyntämiseen, mikä voi avata mahdollisuuksia lääkekehitykselle.

Avainsanat: bufadienolidi, Bufonidae-rupikonna, fragmentaatio, nestekromatografia, tandemmassaspektrometri

1	JOHDANTO	1
2	BUFONIDAE-RUPIKONNIEN ERITTÄMÄT KEMIALLISET YHDISTEET	2
3	BUFADIENOLIDIEN KEMIALLINEN RAKENNE	3
3.1	Vapaat bufadienolidit (bufogeniinit).....	4
3.2	Konjugoituneet bufadienolidit (bufotoksiinit)	5
4	BUFADIENOLIDINÄYTTEIDEN VALMISTUS JA LC-MS/MS-ANALYYSI.....	7
4.1	Näytteiden esikäsittely ja kromatografia.....	8
4.2	Detektio bufadienolidien analytiikassa	11
5	YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET	17
6	VIITTEET.....	19

Lyhenteet

Bg	<i>Bufo gargarizans</i>
Bm	<i>Bufo melanostictus</i>
DAD	Diode array detection = Diodirividetektio
DAD-MS	Diode array detection with tandem mass spectrometry = Diodirividetektio yhdistettynä massaspektrometriin
HPLC	High-performance liquid chromatography = Korkean erotuskyvyn nestekromatografia
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry = Nestekromatografia-tandem-massaspektrometria
LLE	Liquid-liquid extraction = Neste-neste-uuto
MeOH	Methanol = Metanoli
TCM	Traditional Chinese Medicine = Perinteinen kiinalainen lääketiede
TLC	Thin layer chromatography = Ohutkerroskromatografia
TOF-MS	Time-of-flight mass spectrometry = lentoaikamassaspektrometria
TV	Toad venom = Rupikonnamyrkky
UHPLC	Ultra-high-performance liquid chromatography = Erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia
YTYLW	Ya-tong-yi-li-wan

1 Johdanto

Bufadienolidit ovat sydänglykosideihin kuuluvia steroidirakenteisia yhdisteitä, joita esiintyy *Bufo*-heimoon kuuluvien rupikonnien eritteissä. Bufadienolidit ovat tunnettuja voimakkaista farmakologisista vaikutuksistaan, kuten sytotoksisuudesta ja kardiotoxisuudesta, mutta myös niiden potentiaalista lääkekehityksessä. Bufadienolideja käytetään sydänlääkkeinä, kivun hoidossa ja nykyään myös kehitellään syöpälääkitykseen soveltuvia bufadienolidipohjaisia lääkkeitä. Perinteisessä kiinalaisessa lääketieteessä toad venom (TV) eli rupikongan eritteistä valmistettu Chan Su-valmiste tai Venenum Bufonis-valmiste on ollut käytössä jo pitkään ja sen bioaktiivisilla yhdisteillä on vaikutusta esimerkiksi kasvainten kasvuun, tulehdusreaktioihin sekä virustulehduksiin.^{1,2} Moderni analytiikka, kuten LC-MS/MS, mahdollistaa yhdisteiden tarkan tunnistamisen ja kvantifioinnin jopa monimutkaisissa seoksissa, joissa on paljon bioaktiivisia yhdisteitä.

Bufadienolidien analysointi ja standardointi on kuitenkin haastavaa, sillä yhdisteitä esiintyy sekä vapaina että konjugoituneina muotoina ja niiden koostumus vaihtelee lajin, yksilön, lajin maantieteellisen alkuperän ja ympäristötekijöiden mukaan.^{3,4} Haasteita analysointiin tuo näytteiden esikäsittely erityisesti kuivausmenetelmien osalta. Kuivausmenetelmän valinnalla on suurta merkitystä yhdisteiden säilyvyyteen sekä pitoisuuksiin, joka vaikuttaa edelleen yhdisteiden tunnistamiseen sekä profiloimiseen. Perinteinen huoneenlämmössä ilmakehään kuivaaminen voi johtaa jopa 70 %:n menetyksiin tiettyjen bufadienolidien osalta verrattuna nykyaikaisempiin menetelmiin, kuten alipainekuivaukseen tai kylmäkuivaukseen.³

Yhtenä keskeisenä haasteena on bufadienolidistandardien luotettavuus. Nämä yhdisteet ovat kemiallisesti hyvin monimutkaisia ja usein hyvin herkkiä rakenteellisille muutoksille. Esiin nouseekin kysymys, että miten nämä standardit eristetään ja voiko niiden analytiikkaan tai havaittuihin bioaktiivisuuksiin täysin luottaa.⁵ Kiinan farmakopean 2015:n mukaan bufadienolidipitoisuus standardoidaan kinobufagiinin ja resibufogeniinin yhteenlasketun määrän perusteella, jonka on oltava vähintään 6 %.⁶ Sen sijaan Kiinan farmakopea 2020:ssa määrätään, että bufaliinin, kinobufagiinin ja resibufogeniinin pitoisuus yhteensä tulee olla vähintään 7 % ja kaksi tärkeintä Chan Su-valmisteen tuotantoon hyväksyttyä lajia ovat *Bufo gargarizans* (Bg) ja *Bufo melanostictus* (Bm). Fang et al. (2024) tekivät tutkimuksen 28 kaupallisesta TV-erästä, jotka ovat peräisin muun muassa näistä kahdesta hyväksytyistä lajista. Tarkoitus oli selvittää, täyttävätkö nämä näytteet Kiinan farmakopean laatuvaatimukset.

Tulosten perusteella yksikään kaupallisista Bm-näytteistä ei täyttänyt vaadittua farmakopean standardia, kun taas monet Bg-näytteistä täyttivät sen.⁷ Bufadienolidien toksisuuden vuoksi on siis hyvin tärkeää saada tarkkaa tietoa yhdisteiden pitoisuuksista ja rakenteista, jotta niitä voidaan turvallisesti käyttää lääketeollisuudessa. Bufadienolidit ovat rakenteellisesti monimuotoisia ja niitä esiintyy matalissa pitoisuuksissa, joten analyysimenetelmien valinta on hyvin tarkkaa ja niiden optimointi on keskeisessä asemassa. Analytiikan kehittymisen myötä erityisesti nestekromatografiaan liitetyt tandemmassaspektrometriset menetelmät (LC-MS/MS), ovat nousseet keskeiseen rooliin bioaktiivisten yhdisteiden analysoinnissa. LC-MS/MS mahdollistaa yhdisteiden tarkan tunnistamisen ja kvantifioinnin korkealla herkkyydellä sekä tarjoaa tietoa rakenteellisista ominaisuuksista fragmentaatiomallien avulla. Tämän tutkielman tavoitteena on selvittää, voidaanko LC-MS/MS-menetelmillä saavuttaa riittävä tarkkuus ja herkkyys bufadienolidien luotettavaan analysointiin lääketurvallisuuden näkökulmasta, erityisesti kun otetaan huomioon yhdisteiden rakenteellinen monimuotoisuus ja matalat pitoisuudet.

2 Bufonidae-rupikonnien erittämät kemialliset yhdisteet

Bufonidae-sammakkoeläinheimoon kuuluu noin 630 rupikonnalajia. Lajit ovat levittäytyneet maailmanlaajuisesti, pois lukien Oseanian alue. Rupikonnien elinympäristöt ja ulkonäkö saattavat olla hyvinkin erilaisia. Yksi tunnetuimmista Bufonidae-heimon suvuista on *Rhinella*, joka on levittäytynyt muun muassa ympäri Etelä-Amerikkaa. Kyseisen suvun lajeja on havaittu noin 90, ja niitä löytyy useista eri ympäristöistä, kuten Andien vuoristosta, rannikkoalueilta ja kosteikoista.⁸

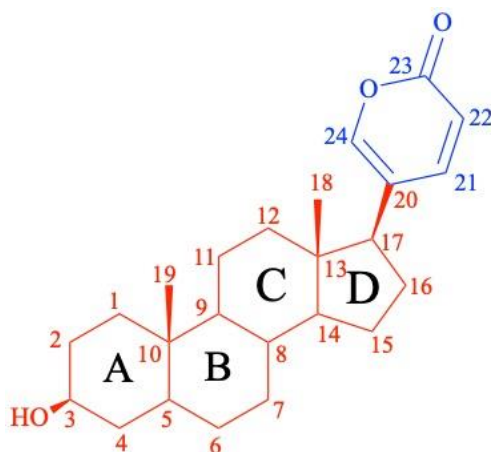
Bufonidae-heimon rupikonnaa yhdistää kyky puolustautua petoeläimiä, bakteereja ja sieniä vastaan sekä saalistaa erittämillään myrkyllisillä bufadienolideilla. Rupikonnien erittämät myrkyt voivat olla kohtalokkaita saalistajille ja aiheuttaa kardiotoksisia, neurotoksisia tai anestesiavaikutuksia. Rupikonna myös suojaa itseään säätelemällä ihon mikrobeja erittämillään bufadienolideilla ja inhiboiden haitallisia sieni- ja bakteeritartuntoja.^{9,10} Bufonidae-heimon konnat, kuten *Bufo bufo garganzans*, *Bufo melanosticus*, *Bufo raddei* ja *Bufo andrewsi* erittävät näitä myrkkyjä ihonsa sekä korvan takana sijaitsevien rauhasien kautta. Bufadienolidien lisäksi näiden konnien eritteissä on havaittu alkaloideja sekä aminohappoja.¹⁰ Fang-Jie Li ja Jing-Hong Hu (2021) ovat raportoineet löytäneensä 96 bufadienolidiyhdistettä rupikonnien myrkystä.¹¹

Rupikonnalajeilla on havaittu eroja yhdisteiden pitoisuuksissa eri kehitysvaiheissa. Eroja on myös siinä, tuottaako rupikonna yhdisteet itse vai siirtyvätkö yhdisteet naaraskonnalta jälkeläisiin.¹² Esimerkiksi lajeilla, kuten *Rhinella marina*, *Incilius valliceps* ja *Bufo japonicus formosus*, naaras siirtää yhdisteet muniin ennen munimista, jolloin suurimmat pitoisuudet bufadienolideja ovat naaraan munasarjoissa sekä munissa ja vähenevät kehityksen mennessä kohti nuijapäävaihetta.¹² Sen sijaan *Bufo bufo* -rupikonnat tuottavat yhdisteet *de novo* nuijapäävaiheessa, jolloin pitoisuudet ovat korkeimmillaan.¹² Bufadienolidien pitoisuudet, tuotanto ja varastointi eri rupikonnalajeilla vaihtelevat suuresti ja riippuvat lajin elinympäristöstä, mutta lajien sukulaissuhteella ei ole havaittua merkitystä.¹²

3 Bufadienolidien kemiallinen rakenne

Bufadienolidit ovat C24-steroidirunkoisia yhdisteitä, jotka tunnetaan erityisesti niiden kardiotonisista vaikutuksista. Yhdisteen steroidirungossa on neljä toisiinsa kytkeytynyttä rengasta A, B, C ja D (kolme kuusihiilistä ja yksi viisihiilinen rengas). Renkaiden B ja C välillä on trans-liitos ja renkaiden C ja D välillä cis-liitos¹³ (Kuva 1). Yhdisteen steroidirungon C17-asemassa on kiinni yhdisteelle ominainen kuusihiilinen laktonirengas, α -pyroni.¹⁴ Tällä perusrakenteella on ratkaiseva merkitys yhdisteen biologiselle aktiivisuudelle, kuten vuorovaikutukselle solujen Na^+/K^+ -ATPaasin kanssa, joka on vastuussa niiden kardiotonisista ja sytotoksisista vaikutuksista.¹⁵ Yhdisteen perusrungossa voi esiintyä myös hydroksyyliiryhmiä (-OH). Yleisimmin nämä ovat liittyneenä C3-, C5-, C11- ja C14-asemiin. Hydroksyyliiryhmä vaikuttaa yhdisteen liukoisuuteen ja reaktiivisuuteen.¹⁵ Bufadienolidit voivat esiintyä vapaina yhdisteinä tai konjugoituneina. Rakenteellinen vaihtelu vaikuttaa merkittävästi yhdisteen biologiseen aktiivisuuteen ja farmakokinetiikkaan.

Bufadienolidien rakennetta voidaan muuttaa myös kemiallisesti laboratorioolosuhteissa, jolloin näiden yhdisteiden suorituskykyä voidaan parantaa ja potentiaalisia sovellusalueita laajentaa. Rakenteeseen on mahdollista tehdä muutoksia esimerkiksi esteröinnillä, kuten Liu et al. (2016)¹⁶ tekivät bufaliinille parantaakseen sen vesiliukoisuutta ja stabiilisuutta sekä samalla säilyttäen sen sytotoksisia vaikutuksia, joita tarvitaan syöpäsoluja vastaan. Yhdisteisiin voidaan tehdä synteettisiä muutoksia myös hapettamalla. C14-aseman hydroksyyliiryhmä on keskeinen kohde selektiiviselle hapettamiselle, koska se vaikuttaa suoraan yhdisteen biologiseen aktiivisuuteen. Synteetissä voidaan hapettaa esimerkiksi hydroksyyliiryhmä ketoniksi, jolloin saadaan aikaiseksi reaktiivinen kohta, johon voidaan myöhemmin kiinnittää uusia rakenteita.¹⁷



bufadienolidi

Kuva 1 Bufadienolidin perusrakenne, jossa punaisella on merkittynä yhdisteen steroidirunko ja sinisellä α -pyronilaktonirengas.

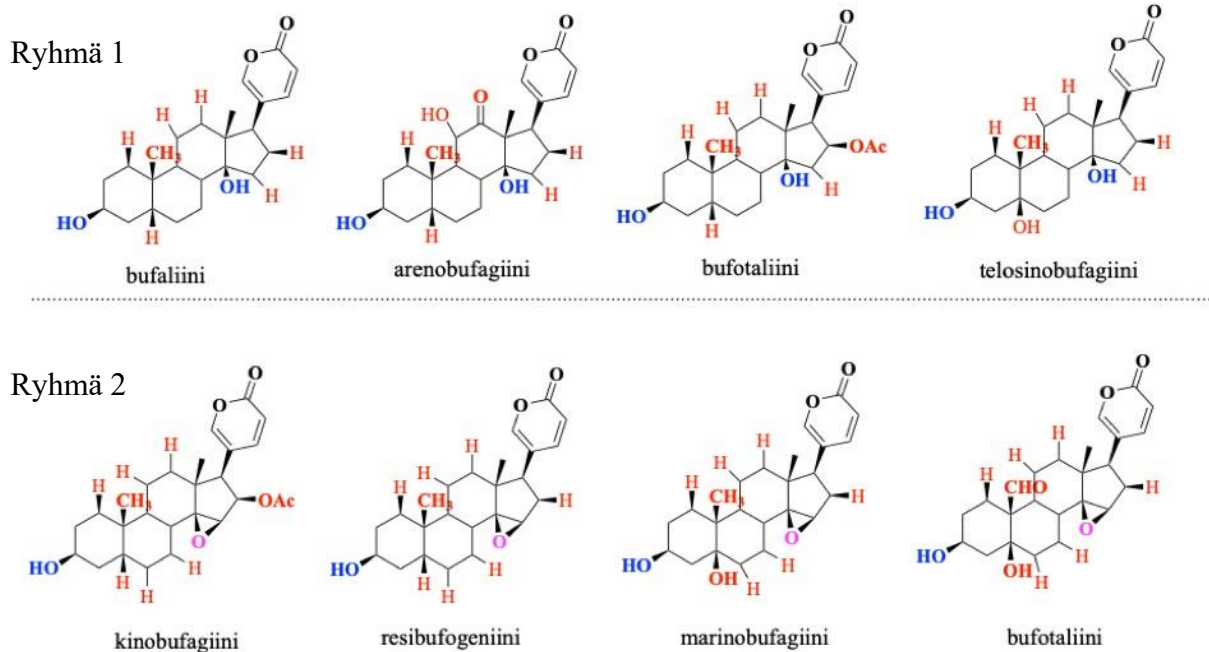
3.1 Vapaat bufadienolidit (bufogeniinit)

Vapaat eli konjugoimattomat bufadienolidit tunnetaan myös nimellä bufogeniinit. Näiden yhdisteiden tunnuspiirteenä on substituomaton α - tai β -aseman hydroksyyliiryhmä C3-asemassa, mikä tekee niistä rakenteellisesti yksinkertaisia, mutta erittäin bioaktiivisia.¹⁸ Bufogeniinit muodostavat rupikonnien eritteiden ensisijaisen bioaktiivisen komponenttiryhmän, ja niitä esiintyy vapaassa muodossa erityisesti *Bufo*-lajissa, kuten *Bufo bufo gargarizans*.

Bufogeniinit voidaan jakaa vielä kahteen ryhmään sen perusteella, onko yhdisteen C14-asemassa β -OH vai muodostavatko C14- ja C15-asetat yhdessä β -epoksirakenteen. Yhdisteet voidaan jakaa vielä näissä kahdessa ryhmässä alaluokkiin sen mukaisesti, mitä funktionaalisia ryhmiä ne sisältävät (Kuva 2).¹⁹ Tunnetuimpia vapaita bufadienolideja ovat bufaliini, kinobufagiini ja resibufogeniini. Näillä yhdisteillä on osoitettu olevan voimakkaita sytotoksia, apoptoosia indusoivia ja kardiotonisia vaikutuksia erityisesti syöpäsolumalleissa.¹⁸

Rakenteensa vuoksi bufogeniinit ovat melko lipofiilisiä, mikä mahdollistaa niiden imeytymisen ja kulkeutumisen biologisten kalvojen läpi. Samalla ne kuitenkin metaboloituvat nopeasti, mikä johtaa lyhyempään puoliintumisaikaan elimistössä verrattuna konjugoituihin muotoihin, kuten bufotoksiineihin. Tästä syystä yhdisteisiin kohdistetaan usein synteettisiä

modifikaatioita, joiden avulla voidaan muun muassa pidentää vaikutusaikaa tai vähentää kardiotoksisuutta lääkesovelluksia varten¹⁸



Kuva 2 Esimerkkejä vapaista bufadienolidiyhdisteistä. Ryhmän 1 yhdisteillä on C14-asemassa hydroksyyliiryhmä (-OH) ja ryhmän 2 yhdisteiden C14 -ja C15-asetat muodostavat epoksirakenteen.

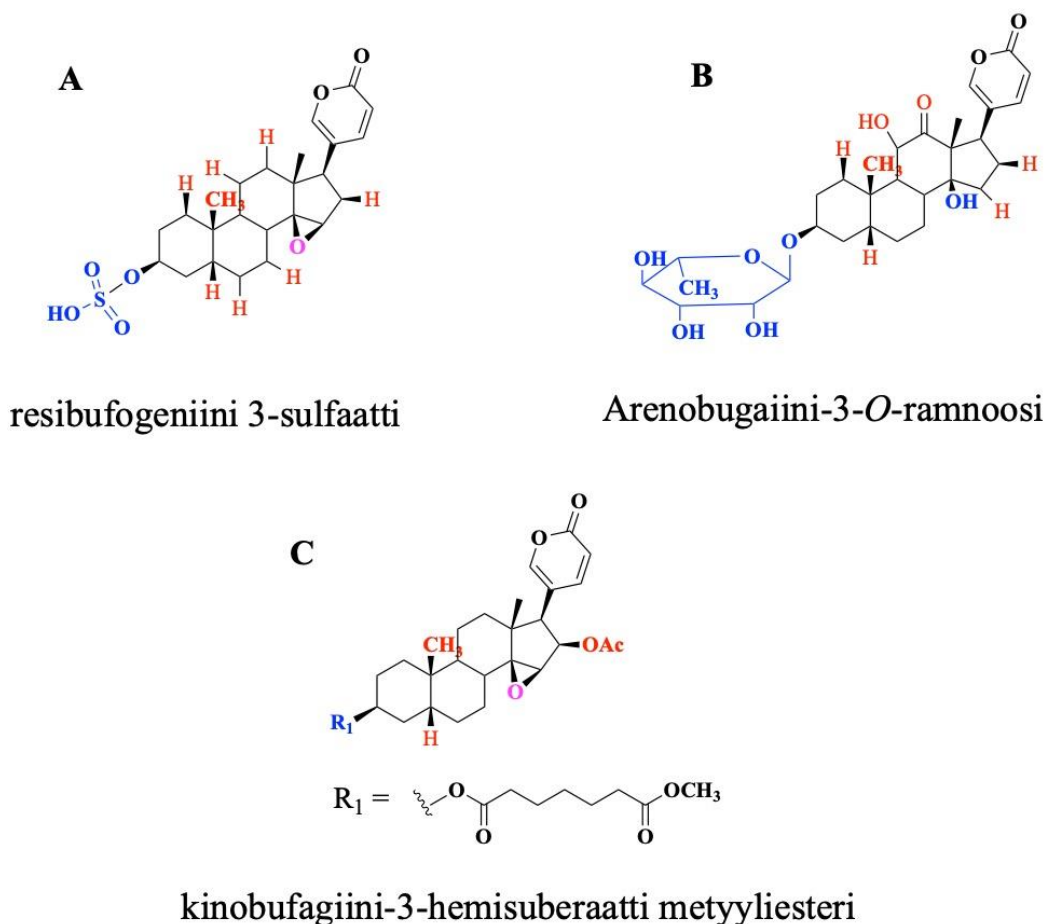
3.2 Konjugoituneet bufadienolidit (bufotoksiinit)

Konjugoituneet bufadienolidit, joita kutsutaan myös bufotoksiineiksi, muodostuvat, kun vapaan bufadienolidien (bufogeniini) C-3-aseman hydroksyyliiryhmä on esteröitynyt esimerkiksi sokeriin, sulfaattiin tai rasvahappoon. Tämä rakenteellinen muutos vaikuttaa merkittävästi yhdisteen kemiallisiin ja farmakologisiin ominaisuuksiin, kuten vesiliukoisuuteen, lipofiilisyyteen, toksisuuteen ja biologiseen aktiivisuuteen.^{19,20}

Sulfaatti- ja glukuronidikonjugaatit (Kuva 3A) lisäävät yhdisteen hydrofiilisyyttä ja vähentävät toksisuutta, jolloin bufadienolidit erittyvät helpommin.²¹ Tällaisia sulfaatti- ja glukuronidikonjugaattimuotoja on havaittu erityisesti *Bufo melanostictus* ja *Bufo bufo gargarizans* -konnalajeissa.⁵ Myös sokerikonjugaatit, kuten glukoosi- tai ramnoosisidokset,

vaikuttavat merkittävästi yhdisteen farmakologiseen profiiliin (Kuva 3).²² Niiden uskotaan esimerkiksi muuttavan bufadienolidien imeytymistä ja metabolista stabiilisuutta. Glykosyloituneet bufadienolidit ovat kuitenkin yleisimpiä kasveissa kuin eläimissä.^{13,22} Rasvahappoihin konjugoituneita bufadienolideja (Kuva 3 B) on tunnistettu muun muassa *Bufo gargarizans*-lajin munista. Rasvahappoihin konjugoituneet bufadienolidit ovat lipofiilisempia ja niiden puoliintumisaika on pidempi. Näiden lisäksi konjugoituneilla yhdisteillä on havaittu olevan jopa suurempi toksisuus kuin niiden vapailla vastineilla, mikä tekee niistä kiinnostavia myös farmakologisen tehon näkökulmasta.²³

Konjugoituminen voi siis muuttaa merkittävästi yhdisteiden käyttäytymistä elimistössä: ne voivat toimia varastomuotoina, jotka vapauttavat aktiivisen metaboliitin myöhemmin, tai ne voivat toimia vähemmän aktiivisina kuljetusmuotoina, joilla on vähemmän sivuvaikutuksia.^{19,24} Tällaiset ominaisuudet tekevät konjugoituista bufadienolideista kiinnostavia sekä terapeuttisesti että toksikologisesti.



Kuva 3 Kolme erilaista rakennetta konjugoituneesta bufadienolidista. A = sulfaattikonjugoitunut, B = rasvahappoon konjugoitunut ja C = sokerikonjugoitunut.

4 Bufadienolidinäytteiden valmistus ja LC-MS/MS-analyysi

Perinteisessä kiinalaisessa lääketieteessä (TCM) on jo pitkään käytetty rupikonnien erittämiä bufadienolideja sydänsairauksien, haavojen, kipujen sekä nykyään myös erilaisten syöpien hoitamiseen.²⁴ Chan Su-valmiste (Kiina) ja Senso-valmiste (Japani) ovat kuivattua rupikonnin myrkyllistä eritettä, jotka sisältävät bufadienolidi-yhdisteitä. Chan Su-valmistetta on käytetty jo Tang-dynastian aikana (618–907) ja se on käytössä vielä tänä päivänäkin. Chan Su:n valmistuksessa, Kiinan farmakopean mukaan, sallitaan vain kahden eri Bufo-lajin, *Bufo bufo gargarizansin* ja *Bufo melanostictuksen* tuottamat eritteet. Bufadienolideita sisältävien valmisteiden laadunvalvonta perustuu nykyisen Kiinan farmakopean mukaan erityisesti kahteen yhdisteeseen, kinobufagiiniin ja resibufogeniiniin. Nämä yhdisteet toimivat vertailukohtina, joiden avulla muiden mahdollisten lääkevalmistukseen soveltuvien bufadienolidien pitoisuuksia ja profiileja voidaan arvioida. Koska kuivatun rupikonnin myrkyllisyydestä ei ole mahdollista päätellä sen alkuperää on bufadienolidien tarkalle analysoinnille tarvetta. Bufadienolidit ovat toksineja, joten niiden käyttäminen lääkkeinä ja kliinisessä tutkimuksessa vaatii asianmukaista laadunvalvontaa sekä väärennösten havaitsemista muiden Bufo-lajien eritteiden avulla. Bufadienolidien kemiallinen koostumus ja pitoisuudet vaihtelevat huomattavasti eri lajien välillä sekä saman lajin yksilöiden välillä.⁵ Bufadienolidien terapeuttinen alue on hyvin kapea, joten niiden kliininen teho ja turvallisuus varmistetaan tarkalla analysoinnilla.²⁴ Aanalyysien avulla saadaan tarkempaa tietoa yhdisteiden rakenteista ja pitoisuuksista sekä saadaan luotua vahvempaa datapohjaa bufadienolidien farmakologisten vaikutusten, turvallisuuden ja soveltuvuuden arvioimiseksi lääkevalmistuksessa.

Bufadienolidien analysointi rupikonnin myrkyllisyydestä perustuu yhä enemmän edistyneisiin LC-MS/MS-menetelmiin, jotka tarjoavat korkean herkkyuden, erotuskyvyn sekä mahdollisuuden yhdisteiden rakenteelliseen tunnistamiseen.²⁵ LC-MS/MS-menetelmien avulla voidaan erottaa toisistaan rakenteeltaan hyvin samankaltaisia bufadienolideja ja vahvistaa niiden rakennespesifisten fragmentaatiokaavioiden avulla. Lisäksi LC-MS/MS-menetelmä on hyödyllinen bufadienolidien tutkimisessa, sillä niiden pitoisuudet voivat olla hyvinkin pieniä ja ne esiintyvät usein muiden steroidiyhdisteiden kanssa, joten niiden erottaminen on haastavaa.¹⁸ Ennen LC-MS/MS-analyysiä näytteet esikäsitellään usein neste-neste-uutolla (LLE) tai

kiinteäfaasiuutolla (SPE), jotta bufadienolidit saadaan erotettua biologisesta massasta.²⁶ Nämä vaiheet ovat tärkeitä häiriötekijöiden minimoiseksi, mitkä voivat vaikuttaa fragmentaatiotuloksiin tai kvantifioinnin tarkkuuteen.

4.1 Näytteiden esikäsittely ja kromatografia

Bufadienolidien tutkimista varten voidaan kerätä näytteitä suoraan rupikonnista tai tutkia jo olemassa olevista kaupallisista lääkkeistä niiden sisältämiä yhdisteitä. Yleisimmin bufadienolideja uutetaan Chan Su-valmisteesta, joka on *Bufo bufo gargarizans*- tai *Bufo melanostictus*-lajin kuivattua eritettä. Tutkimuksiin voidaan siis käyttää tuoretta tai kuivattua näytettä.^{27,28}

Näytteiden kuivaaminen on tutkimusten kannalta kriittisin vaihe, jotta yhdisteet saadaan pysymään näytteessä. Näytteitä voidaan tyhjiökuivata, ilmakeivata sekä kylmäkuivata, mutta kyseisillä menetelmillä on havaittu olevan huomattavia eroja yhdisteiden pitoisuuksien kannalta.²⁶ Tyhjiökuivaus voidaan suorittaa eri lämpötiloissa, mutta 60 °C:ssa kuivaamisen on huomattu lisäävän konjugoituneiden bufadienolidien pitoisuutta ja vähentävän hieman vapaiden bufadienolidien pitoisuuksia. Ilmakeivaus huoneenlämmössä taas johtaa bioaktiivisten yhdisteiden, kuten gamabufotaliinin ja kinobufagiinin hajoamiseen ja näin ollen biologisen aktiivisuuden vähenemiseen.²⁷ Tuoreiden eritenäytteiden analysoimiseen tehokas menetelmä on kylmäkuivaus. Schmeda-Hirschmann et al. (2017)²⁹ tutkivat Rhinella-rupikongan parotoidirauhasten eritettä ja valitsivat kuivausmenetelmäksi kylmäkuivauksen. Kylmäkuivattujen näytteiden sisältämät bufadienolidit säilyttivät aktiivisuutensa täysin.^{29,30} Näytteiden kylmäkuivaus minimoi yhdisteiden hajoamisen, säilyttää bioaktiiviset yhdisteet ja vesiliukoiset peptidit eli pitää näytteet hyvin alkuperäisessä koostumuksessaan.²⁹

Kuivauksen jälkeen näytteet yleensä jauhetaan ja uutetaan valitulla orgaanisella liuottimella. Metanoli on yleisimmin käytetty liuotin uuttamiseen sen tehokkuuden ja poolisuuden vuoksi, mikä mahdollistaa myös heikosti poolisten yhdisteiden, kuten bufogeniinien liukenemisen.²⁴ Näytteen analysoinnin helpottamiseksi voidaan käyttää ultrasonikointia, jossa metanolissa olevaa näytettä sonikoidaan 30 minuuttia tyypillisesti alle 30 °C:ssa, jotta näytteelle ei tapahtuisi termistä hajoamista. Tämän jälkeen näyte suodatetaan liukenemattomien jäämien poistamiseksi. Prosessin tuloksena saadaan raakauute, jossa on helpommin havaittavissa bufadienolideja ja muita näytteessä olleita bioaktiivisia yhdisteitä.^{28,31}

Bufadienolidipitoisuuksien rikastamiseksi voidaan vielä käyttää nestefaasierotusta. Kuivattu näyte liuotetaan veteen ja uutetaan useamman kerran orgaanisella liuottimella, kuten

kloroformilla tai etyyliasetaatilla. Tässä hyödynnetään yhdisteiden erilaisia polaarisuuksia. Bufadienolidit ovat suhteellisen poolittomia ja siirtyvät orgaaniseen faasiin, kun taas pooliset epäpuhtaudet siirtyvät vesifaasin puolelle. Erottelu parantaa uutotehokkuutta ja mahdollistaa bufadienolidien rikastumisen orgaaniseen faasiin. Orgaaninen faasi konsentroidaan alipaineessa ja näin saatu näyte voidaan analysoida.^{31,32}

Korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa (HPLC:tä) käytetään bufadienolidien erottelussa sekä kvantitatiivisessa analysoinnissa.²⁴ Zhang et al. (2005) kehittivät HPLC-menetelmän, jolla he pystyivät analysoimaan eri alueilta ja lajeista peräisin olevista rupikongan eritteistä 10 bufadienolidia ja neljä indoli alkaloidia. Menetelmä osoitti merkittäviä kemiallisia profiilieroja lajien *Bufo bufo gargarizans* ja *Bufo melanostictus* välillä, ja tulokset tukivat keskikiinalaisen *B. bufo gargarizans* -lajin pitämistä laadunvalvonnan vertailustandardina Chan Su-valmisteen terapeuttisessa käytössä.³³ Kyseisen menetelmän kehittämisessä testattiin kolmea erilaista käänteisfaasimenetelmää. Yhdisteiden eristämiseksi *Bufo Bufo gargarizans*-rupikongan eritettä uutettiin ensin kloroformissa ja tämä uute käsiteltiin pylväskromatografialla käyttäen silicageeliä stationääri faasina ja CHCl₃-asetoniliuosta liikkuvana faasina, jolla saatiin 12 erilaista fraktiota. Näiden fraktioiden puhdistamiseen käytettiin semipreparatiivista HPLC-menetelmää, jossa liuottimena käytettiin metanoli-vesi liuosta eri suhteissa (Taulukko 1).³³ Toisessa uutovaiheessa alkuperäistä uutetta käsiteltiin HP-20-kolonnilla (MeOH:H₂O = 20:80) ja näyte eroteltiin TLCllä käyttäen butanoli-ammoniakki-H₂O (9:1:1) -liuosta, jolla saatiin viisi uutta fraktiota. Nämä fraktiot analysoitiin edelleen HPLC-menetelmällä käyttäen ODS-kolonnia, jolla saatiin puhdistettua loput bufadienolidiyhdisteet. Suoraan preparatiivisella HPLC:llä puhdistettiin vielä pieni määrä näytettä, jolla saatiin puhdistettua yksi näyte (Taulukko 2).³⁴ Tällä HPLC-menetelmällä pystyttiin siis onnistuneesti tunnistamaan ja kvantifioimaan bufadienolideja kuivatetusta rupikongan eritteestä.

Taulukko 1 Zhang et al. kehittämällä HPLC-menetelmällä saadut yhdisteet metanoli–vesi liuottimella.³³

yhdiste	MeOH : H ₂ O (v/v)	erotusmenetelmä
bufalin	7:3	Semipreparatiivinen HPLC + uudelleen kiteyttäminen
resinobufogeniini	7:3	Semipreparatiivinen HPLC + uudelleen kiteyttäminen
kinobufagiini	7:3	Semipreparatiivinen HPLC + uudelleen kiteyttäminen
hellebrigeniini	3:2	Semipreparatiivinen HPLC
bufotaliini	3:2	Semipreparatiivinen HPLC
telosinobufagiini	3:2	Semipreparatiivinen HPLC
kinobufotaliini	3:2	Semipreparatiivinen HPLC
gamabufotaliini	1:1	Semipreparatiivinen HPLC
deasetyylikinobufotaliini	1:1	Semipreparatiivinen HPLC
19-Hydroksibufaliini	1:1	ODS kolonni (<i>B. melanostictus</i>)

Taulukko 2 Zhang et al. kehittämällä HPLC-menetelmällä saadut yhdisteet asetonitriili–vesi–trifluoretikkahappo-liuottimella.^{33,35}

yhdiste	CH ₃ CN- H ₂ O-TFA	erotusmenetelmä
bufotenidiini	10:90:0,05	ODS kolonni TLC:n jälkeen
bufobutaanihappo	10:90:0,05	ODS kolonni TLC:n jälkeen
bufoteniini	10:90:0,05	ODS kolonni TLC:n jälkeen
bufoteniinioksidi	10:90:0,05	ODS kolonni TLC:n jälkeen

Myös Kawahara ja Mikage (2000) hyödynsivät omassa tutkimuksessaan käänteisfaasi-HPLC-analyysiä tutkiessaan kuivauksen merkitystä bufadienolidien pitoisuuksien määrittämisessä rupikongan eritteistä. Tutkimuksessa tutkittiin 12 yleisimmin tunnettua bufadienolidia ja niiden pitoisuuksia vertailtiin eri tavoin kuivatetuissa rupikongan eritteissä.²⁹

Korkean erotuskyvyn kvalitatiiviseen ja kvantitatiiviseen analysointiin voidaan käyttää HPLC-analyysiä tarkempaa UHPLC-analytiikkaa. UHPLC-menetelmällä on parempi erotuskyky sekä herkkyys verrattuna HPLC-menetelmään.³⁴ Meng et al. (2016) tekemässä tutkimuksessa tutkijat profiloivat 56 bufadienolidia rupikonnan eritteestä sekä nahasta ja tunnistivat ensimmäistä kertaa kahdeksan uutta bufotoksiinia. He vertailivat tutkimuksessaan tuoreiden, ilmakeivattujen sekä tyhjiökuivattujen rupikonnan eritteiden bufadienolidipitoisuuksia käyttäen UHPLC-TOF-MS-analytiikkaa. Tutkimuksessa selvisi, että tyhjiökuivauksessa pystyttiin säilyttämään bufadienolidit näytteessä parhaiten.¹⁸ UHPLC voidaan yhdistää erilaisiin massaspektrometriin menetelmiin, kuten UHPLC-ESI-Orbitrap, joka soveltuu erinomaisesti metaboliaprofilointiin. Menetelmällä voidaan luotettavasti havaita biotransformaation aikana syntyviä metaboliitteja, kuten hydroksyloituneita ja dehydrogenoituja yhdisteitä, erityisesti in vitro-olosuhteissa.³⁴

Vaikka HPLC tarjoaa hyvin perustan bufadienolidien erottelulle ja kvantifioinnille, voidaan merkittävästi parantaa analyysin tarkkuutta ja herkkyyttä yhdistämällä se massaspektrometriseen detektioon (LC-MS/MS). LC-MS/MS-menetelmä hyödyttää HPLC:n kykyä erottaa yhdisteet tehokkaasti ennen massaspektrometristä tunnistamista, jolloin myös rakenteellisesti samankaltaiset tai matalissa pitoisuuksissa esiintyvät bufadienolidit voidaan havaita luotettavasti.^{3,36} Tämä yhdistelmä menetelmistä on osoittautunut keskeiseksi erityisesti laadunvalvonnassa ja farmakopean vaatimusten täyttämiseksi, koska sen avulla voidaan tunnistaa ja määrittää myös konjugoituneita ja heikosti esiintyviä komponentteja.^{31,35}

4.2 Detektio bufadienolidien analytiikassa

Bufadienolidien kemiallisten rakenteiden monimutkaisuus ja niiden esiintyminen matalina pitoisuuksina vaativat tehokkaita ja selektiivisiä analyysimenetelmiä. Vaikka perinteiset kromatografiset tekniikat, kuten HPLC yhdistettynä diodirividetektoriin (DAD), tarjoavat käyttökelpoisen lähestymistavan yhdisteiden kvantitatiiviseen määrittämiseen, ne eivät kykene antamaan riittävästi rakenteellista tietoa erityisesti silloin, kun näytteessä on useita samankaltaisia yhdisteitä tai epäpuhtauksia.³³

DAD mittaa näytteiden valon absorptiota eri aallonpituuksilla, mikä mahdollistaa yhdisteiden tunnistamisen niiden UV-spektrien perusteella. Tämä menetelmä soveltuu erityisesti tilanteisiin, joissa tutkittavat yhdisteet tunnetaan entuudestaan ja ne absorboivat riittävästi valitulla aallonpituudella (bufadienolideilla 296 nm). DAD:n rajoitteena on kuitenkin kyvyttömyys erottaa samankaltaisia yhdisteitä tai analysoida täysin uusia yhdisteitä ilman

vertailustandardeja.³¹ HPLC-kromatografiaan voidaan yhdistää myös DAD tai DAD-MS riippuen siitä, halutaanko yhdisteistä tietää tarkalleen niiden rakenne vai pyritäänkö vain kvantitatiiviseen analyysiin. Ma et al. (2009) hyödynsivät tutkimuksessaan HPLC-DAD-menetelmää seitsemän yleisimmän bufadienolidin kvantifiointiin kolmesta TCM näytteestä. Bufadienolidien UV-absorptiomaksimeiden perustella DAD:iin asetettiin maksimi aallonpituudeksi 296 nm ja tällä aallonpituusalueella voitiin havaita ja erotella samanaikaisesti useita yhdisteitä niiden UV-spektrien perusteella.²⁴ DAD ei siis tarkastele vain yhtä aallonpituutta, vaan mittaa useita eri aallonpituuksia koko UV-alueella. DAD:n avulla saadaan UV-spektrit jokaiselle piikille, vaikka retentioaika olisikin sama. DAD-detektori mittaa jokaiselle yhdisteelle sen ominaisen UV-spektrin, jolloin voidaan erottaa samassa retentioajassa esiintyvät yhdisteet toisistaan.²⁴ DAD sopii siis kohdennettujen yhdisteiden tutkimiseen, vaikka tarkkaa massaa ei saataisi selville, vain mahdollinen retentioaika ja UV-spektri, joita voidaan verrata aikaisempiin tuloksiin ja kirjallisuuteen. DAD-MS-detektioinnissa saadaan absorbanssien lisäksi myös yhdisteiden tarkka massa ja tietoa sen rakenteesta massaspektrometrin avulla. Liu et al. (2013) tutkivat Kiinalaista Ya-tong-yi-li-wan (YTYLW) lääkettä HPLC-DAD-MS-menetelmän avulla, sillä näytteestä haluttiin saada sekä kvantitatiivinen että kvalitatiivinen analyysi. Tutkimuksessa oli tarpeen lisätä massaspektrometri, sillä yhdisteet eivät olleet kohdennettuja ja monella bufadienolidilla on samankaltaiset UV-spektrit sekä retentioaika, joten massaspektrometrin avulla pystyttiin selvittämään yhdisteiden tarkempaa rakennetta fragmenttien avulla.³⁶

Nestekromatografia voidaan yhdistää myös TOF-MS:n (time-of-flight mass spectrometry). TOF-MS:llä voidaan erittäin suurella tarkkuudella ja erotuskyvyllä mitata ionien massa/varaus-suhdetta (m/z) sen perusteella kuinka nopeasti ionit lentävät tyhjiöputkessa.³⁷ Erityisesti UHPLC-TOF-MS-tekniikkaa on hyödynnetty bufadienolidien tutkimuksessa ja rakenteiden varmistuksessa, sillä se tarjoaa korkean erotuskyvyn ja tarkan massa-analyysin.³⁴ Tässä tekniikassa yhdistyvät UHPLC:n nopeus ja erottelukyky sekä TOF-MS:n tarkkuus ja kyky havaita ionien massa-varaus-suhde (m/z) täsmällisesti

Orbitrap-MS tarjoaa korkean erotuskyvyn ja massatarkkuuden yhdistettynä nestekromatografiaan.³⁸ Orbitrap-analysaattoriin liitetty injektio-laite kaappaa ionit RF-taajuudella toimivaan kaasulla täytettyyn kvadrupoliin (C-trap). Ionit injektoidaan analysaattoriin lyhyinä pulsseina, jolloin jokainen muodostuva massa/varaus (m/z) -suhde muodostuu alle millisekunnissa. Orbitrap erottuu muista korkean erotuskyvyn analysaattoreista sillä, että sen herkkyys säilyy myös nopeimmilla mittaussopeuksilla.³⁸ Ren et al. (2018) tekemässä tutkimuksessa hyödynnettiin UPLC:tä yhdistettynä LTQ-Orbitrap-MS ja Qtrap MS-

analyysiin. Näillä menetelmillä tunnistettiin 93 yhdistettä rupikonnan myrkystä: 40 bufogeniiniä ja 34 bufotoksiinia. Orbitrap-MS mahdollisti yhdisteiden tarkkojen molekyyli massasojen määrittämisen.³⁹

Kuitenkin vielä informatiivisempia tuloksia saadaan käyttämällä tandem-massaspektrometriaa (MS/MS), jossa hyödynnetään myös fragmentaatiotietoa rakenteen määrittämisessä.³⁴ Tandemmassaspektrometria (MS/MS) koostuu kahdesta peräkkäisestä massaspektrometrisestä analyysistä. Analyysin ensimmäisessä vaiheessa (MS1) valitaan lähtöioni (prekursori-ioni) massan ja varauksen suhteeseen (m/z) perustuen ja tämä arvo vastaa tutkittavan bufadienolidin ionisoitunutta muotoa, esimerkiksi $[M+H]^+$. Valittu ioni ohjataan törmäyskammioon, jossa se törmäytetään inerttiin kaasuun ja näiden törmäyksen seurauksena ioni absorboi kineettistä energiaa, mikä johtaa sen hajoamiseen pienemmiksi fragmentti-ioneiksi. Nämä syntyneet fragmentti-ionit analysoidaan toisessa vaiheessa (MS2), jolloin valitulle bufadienolidi-yhdisteelle voidaan muodostaa sille ominainen fragmentaatiokaavio.³⁵ Tämän menetelmän avulla voidaan erottaa toisistaan rakenteellisesti samankaltaisia bufadienolidia ja vahvistaa tutkittavat yhdisteet vertailemalla havaittuja fragmentaatiomalleja viiteaineisiin tai kirjallisuustietoihin.¹⁸ LC-MS/MS yhdistää tehokkaan nestekromatografisen erotuksen (HPLC tai UHPLC) herkkään ja spesifiseen massaspektrometriseen detektioon, mikä mahdollistaa myös rakenteellisesti samankaltaisten yhdisteiden analyysin. Ren et al. (2018) hyödynsivät myös MS/MS-menetelmää tutkimuksesta löytyneiden yhdisteiden, kuten rakenteellisten isomeerien varmistamiseksi.⁴⁰

Q-Orbitrap-MS/MS sopii hyvin monimutkaisten bufadienolidien tunnistamiseen sekä rakenteelliseen karakterisointiin.⁴⁰ Chen et al. (2025) käyttämän Orbitrap-Fusion-laitteiston avulla pystytään saavuttamaan jopa 60 000 resoluution tarkkuus, mikä mahdollistaa hyvinkin lähekkäin olevien yhdisteiden massojen erottamisen toisistaan. Korkean massatarkkuuden, suuren erotuskyvyn sekä tarkkojen fragmentaatiokuvien avulla isomeritoituneita bufadienolideja pystytään analysoimaan pienissäkin pitoisuuksissa.⁴⁰

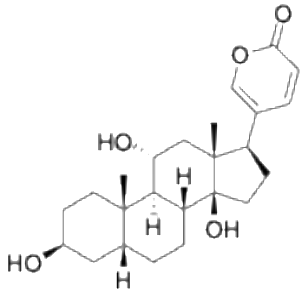
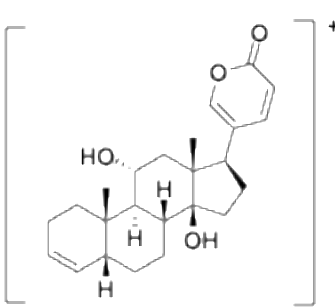
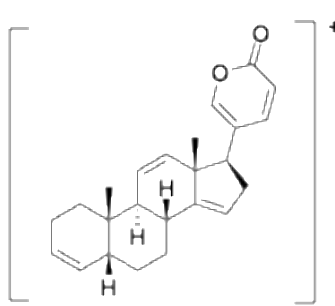
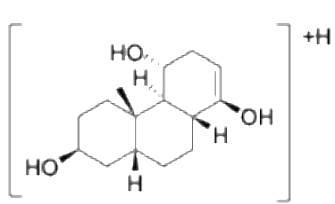
TOF-MS/MS-analyysiä ovat hyödyntäneet Lin et al. (2024) bufadienolidien tunnistamiseen Shexiang Tongxin Dropping Pillistä, joka on *Venenum Bufonis*-tuotteesta (TCM) valmistettu lääke, jonka alkuperä on *Bufo gargarizans* ja *Bufo Melanostictus* -lajien eritteistä.³⁵ HPLC-Q-TOF-MS/MS-menetelmän avulla tutkijat tunnistivat 23 bufadienolidia, muun muassa bufaliinin, kinobufagiinin ja telosinobufagiinin käyttämällä tarkkoja massoja ja MS/MS-fragmentaatiomalleja kohdennettuun ja kohdentamattomaan analysointiin. Kohdentamattomassa analysoinnissa vertaamalla TOF-MS/MS:n tuloksia kirjallisuusarvoihin tutkijat löysivät näytteestä esimerkiksi gamabufotaliinin ja sen fragmentoitumisreitit

(Taulukko 3). TOF-MS on siis tehokas tunnistamaan rakenteellisesti samankaltaisia yhdisteitä biologisissa seoksissa.²⁴ UHPLC-TOF-MS/MS-analyysimenetelmä sopii sekä kohdennettuun että kohdentamattomaan analysointiin. Tätä analyysimenetelmää voidaan käyttää kohdennetusti esimerkiksi tutkittavien yhdisteiden retentioaikojen sekä m/z -arvojen vahvistamiseen kirjallisuusarvoihin verrattessa, mutta myös kattavien metabolisten sormenjälkien luomiseen ja näiden metaboliittien seulomiseen.²⁹

Useille bufadienolideille on kuvattu tunnusomaisia fragmentaatioreittejä. Esimerkiksi Lin et al. (2024)^{35,41} osoittivat, että gamabufotaliinin $[M+H]^+$ -ionin m/z 403.2 tuotti fragmentteja m/z 385.2 ja 349.2, jotka vastasivat peräkkäisiä vesimolekyylin (18 Da) menetyksiä. Vastaavasti kinobufagiinista havaittiin m/z 443.3 ja sen fragmentteina m/z 425.2 ja 407.2. Nämä molempien yhdisteiden fragmentit vahvistavat yhdisteiden steroidirakenteen.⁴¹ Fragmentaatiotiedot ovat erityisen tärkeitä eroteltaessa yhdisteitä, joilla on sama molekyyli massa, mutta erilainen rakenne, kuten bufalin ja resibufogeniini. Molemmat pystytään kuitenkin tunnistamaan ja kvantitifoimaan MS/MS-menetelmillä.⁴² Taulukossa 4 on esitetty bufaliinin ja resibufogeniinin $[M+H]^+$ -arvot sekä m/z -arvot ja mahdollisia fragmenttioneja.

LC-MS/MS-menetelmän kyky tuottaa sekä laadullista että määrällistä tietoa tekee siitä erinomaisen työkalun bufadienolidien tutkimuksessa. Menetelmä mahdollistaa pieninä pitoisuuksina esiintyvien yhdisteiden havaitsemisen, hajoamistuotteiden tunnistamisen sekä koostumuksen vertaamisen eri lajeissa, olosuhteissa tai käsittelymenetelmissä.⁴² Koska bufadienolidit ovat farmakologisesti ja toksikologisesti merkittäviä, LC-MS/MS tukee niiden standardointia, laadunvalvontaa sekä potentiaalisten lääkekäyttöjen arviointia. Taulukkoon 5 on koottu bufadienolidien detektoimiseen käytettäviä menetelmiä sekä niiden toimintatapoja ja parhaita puolia bufadienolidien analysoimiseksi.

Taulukko 3 Lin et al. (2024) tutkimuksessa havainnoidun gamabufotaliinin ($C_{24}H_{34}O_5$) MS/MS-spektrissä havaittu massa/varaus (m/z) -suhde, mahdollinen ioni sekä rakenne.^{35,42}

m/z	ioni	rakenne
403,2	$[M+H]^+$	
385,2	$[M+H-H_2O]^+$	
349,2	$[M+H-3H_2O]^+$	
253,2	$[M+H-C_9H_{10}O_2]^+$	

Taulukko 4 Bufaliinin ja resibufogeniinin mahdollisia ioneja ja fragmentteja sekä massa/varaus (m/z) -suhde. Bufaliini on taulukossa merkittynä B-kirjaimella ja resibufogeniini R-kirjaimella.⁴²

m/z (B)	m/z (R)	ioni	rakenne (B)	rakenne (R)
387,2	403,2	$[M+H]^+$		
369,2	385,2	$[M+H-H_2O]^+$		
351,2	367,2	$[M+H-2H_2O]^+$		
409,2	425,2	$[M+Na]^+$		

Taulukko 5 Bufadienolidien detektoimiseen käytetyt menetelmät, niiden tarkoitus ja menetelmän avaintekijät.

menetelmä	avaintekijät	haittapuolet/haasteet
DAD	- Perustuu UV-absorptioon - Edullinen ja nopea	- Ei massatietoa - Soveltuu vain tunnetuille yhdisteille
TOF-MS	- Hyvä tarkkuus <i>m/z</i> -mittauksissa - Nopea kohdentamattomaan analyysiin	- Heikompi herkkyys matalissa pitoisuuksissa - Melko kallis
Orbitrap-MS	- Erittäin korkea massatarkkuus - Soveltuu metabolomiikkaan	- Hidas skannaus - Hyvin kallis
QTOF-MS/MS	- Kohdennettu ja kohdentamaton analyysi	- Fragmentoinnin optimointi vie aikaa - Hyvin kallis
QOrbitrap-MS/MS	- Tarkka rakenneanalyysi fragmentaatiolla - Korkea erottelukyky	- Vaatii laaja osaamista ja analysointitaitoa - Erittäin kallis

5 Yhteenveto ja johtopäätökset

Bufadienolidit muodostavat farmakologisesti merkittävän luonnonaineiden ryhmän, jolla on havaittu olevan syöpäsoluja estävää aktiivisuutta, vaikutuksia sydämen toimintaan sekä anti-inflammatorisia ominaisuuksia.¹³ Bufo-sukuisten rupikonnien myrkkyeritteet tarjoavat erityisen rikkaan ja monimuotoisen lähteen näille yhdisteille ja niiden kemiallisten sisällön tarkka tuntemus on olennaista sekä farmaseuttisessa tutkimuksessa että laadunvalvonnassa.

Tässä tutkielmassa tarkasteltiin bufadienolidien analysointia nestekromatografiaan perustuvilla massaspektrometrisillä menetelmillä. Erityisesti LC-MS/MS- ja UPHLC-QTOF-MS-menetelmien merkitys korostuu analysoitaessa matalapitoisia yhdisteitä monimutkaisissa biologisissa näytteissä, kuten rupikonnien eritteissä.¹⁸ Nämä menetelmät mahdollistavat sekä yhdisteiden tunnistamisen että rakenteellisen karakterisoinnin perustuen fragmentaatiokäyttämiseen, mikä on olennaista tutkittaessa esimerkiksi luonnonaineiden biotransformaatioreittejä tai niiden metaboliitteja.

LC-MS/MS ja UHPLC-TOF-MS muodostavat tehokkaan ja joustavan yhdistelmän erityisesti bufadienolidien kaltaisten yhdisteiden analysoimiseksi. Menetelmien avulla voidaan paitsi kartoittaa toksiinien kemiallista profiilia myös mahdollisesti ohjata jatkotutkimusta terapeuttisesti aktiivisten yhdisteiden kehittämiseen. Bufadienolideihin kohdistuva tutkimus on siten myös esimerkki siitä, kuinka luonnonaineiden analysointi yhdistyy moderneihin bioanalyttisiin menetelmiin sekä farmakologiseen sovellettavuuteen. Tulevaisuudessa tutkimus tulee varmasti suuntautumaan yhä vahvemmin yhdisteiden rakenteelliseen muokkaamiseen ja puolisynteettiin, jolla voidaan optimoida yhdisteiden terapeuttista tehoa ja saavuttaa turvallisempia lääkeaineita. Myös metabolomiikan in vivo-seuranta on osa tulevaisuutta, jolloin pystytään seuraamaan bufadienolidien vaikutuksia yksityiskohtaisemmin ja samalla luomaan parempia keinoja esimerkiksi lääkeaineiden kuljeutukseen. Bufadienolidien tutkimus on siirtymässä vaiheeseen, jossa luonnosta peräisin olevat yhdisteet yhdistyvät synteettiseen kemiaan, kehittyneeseen analytiikkaan ja mahdollisesti myös bioteknologiaan. Bufadienolidit ovat loistavia kandidaatteja tulevaisuuden lääkeaineiksi varsinkin syöpähoidossa.

6 Viitteet

- (1) Asrorov, A. M., Kayumov, M., Mukhamedov, N., Yashinov, A., Mirakhmetova, Z., Huang, Y., Yili, A., Aisa, H. A., Tashmukhamedov, M., Salikhov, S., Mirzaakhmedov, S. *Drug Development Research*. John Wiley and Sons Inc August 1, 2023, pp 815–838.
- (2) Li, B. J., Tian, H. Y., Zhang, D. M., Lei, Y. H., Wang, L., Jiang, R. W., Ye, W. C. *Fitoterapia* **2015**, *105*, 7–15.
- (3) Zhou, J., Gong, Y., Ma, H., Wang, H., Qian, D., Wen, H., Liu, R., Duan, J., Wu, Q. *J Pharm Biomed Anal* **2015**, *114*, 482–487.
- (4) Inoue, T., Nakata, R., Savitzky, A. H., Yoshinaga, N., Mori, A., Mori, N. *J Chem Ecol* **2020**, *46* (10), 997–1009.
- (5) Gao, H., Zehl, M., Leitner, A., Wu, X., Wang, Z., Kopp, B. *J Ethnopharmacol* **2010**, *131* (2), 368–376.
- (6) Wei, W. L., Hou, J. J., Wang, X., Yu, Y., Li, H. J., Li, Z. W., Feng, Z. J., Qu, H., Wu, W. Y., Guo, D. A. *Journal of Ethnopharmacology*. Elsevier Ireland Ltd June 12, 2019, pp 215–235.
- (7) Fang, Y., Chen, L., Wang, P., Liu, Y., Wang, Y., Wang, Z., Ma, Y., Gao, H. *Toxins (Basel)* **2024**, *16* (3).
- (8) Guevara, J. P., Lara, F. S., Alarcón-Muñoz, J., Buldrini, K. E., Soto-Acuña, S., Rubilar-Rogers, D. *J South Am Earth Sci* **2022**, *115*, 1–5.
- (9) Barnhart, K., Forman, M. E., Umile, T. P., Kueneman, J., McKenzie, V., Salinas, I., Minbiole, K. P. C., Woodhams, D. C. *Microb Ecol* **2017**, *74* (4), 990–1000.
- (10) Fang, Y., Chen, L., Wang, P., Liu, Y., Wang, Y., Wang, Z., Ma, Y., Gao, H. *Toxins (Basel)* **2024**, *16* (3), 1–18.
- (11) Asrorov, A. M., Kayumov, M., Mukhamedov, N., Yashinov, A., Mirakhmetova, Z., Huang, Y., Yili, A., Aisa, H. A., Tashmukhamedov, M., Salikhov, S., Mirzaakhmedov, S. *Drug Development Research*. John Wiley and Sons Inc August 1, 2023, pp 815–838.
- (12) Okamiya, H., Takai, K., Kishida, O. *Curr Herpetol* **2021**, *40* (1), 103–106.
- (13) Krenn, L., Kopp, B. *BUFADIENOLIDES FROM ANIMAL AND PLANT SOURCES**, 1998, Vol. 48.
- (14) Kolodziejczyk-Czepas, J., Stochmal, A. *Phytochemistry Reviews*. Springer Netherlands 2017, pp 1155–1171.

- (15) Deng, L. J., Li, Y., Qi, M., Liu, J. S., Wang, S., Hu, L. J., Lei, Y. H., Jiang, R. W., Chen, W. M., Qi, Q., Tian, H. Y., Han, W. L., Wu, B. J., Chen, J. X., Ye, W. C., Zhang, D. M. *European Journal of Pharmacology*. Elsevier B.V. November 15, 2020.
- (16) Liu, T., Yuan, X., Jia, T., Liu, C., Ni, Z., Qin, Z., Yuan, Y. *Int J Pharm* **2016**, *506* (1–2), 382–393.
- (17) Shao, H. Y., Yu, S. N., Zhu, L. Y., Chen, J. J., Yu, S. P., Sun, M., Wang, Z. X., Yang, J., Li, Q. Q., Yu, Y. C., Sun, S. L., Shi, Z. H., Duan, J. A., Li, N. G. *Tetrahedron* **2025**, *178*.
- (18) Meng, Q., Yau, L. F., Lu, J. G., Wu, Z. Z., Zhang, B. X., Wang, J. R., Jiang, Z. H. *J Ethnopharmacol* **2016**, *187*, 74–82.
- (19) Zou, D., Wang, Q., Chen, T., Sang, D., Yang, T., Wang, Y., Gao, M., He, F., Li, Y., He, L., Longzhu, D. *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A. October 19, 2022.
- (20) Puschett, J. B., Agunanne, E., Uddin, M. N. *American Journal of Kidney Diseases* **2010**, *56* (2), 359–370.
- (21) Qi, J., Zulfiker, A. H. M., Li, C., Good, D., Wei, M. Q. *Toxins*. MDPI AG August 20, 2018.
- (22) Szymczak, K., Bonikowski, R. *Biotechnology and Food Science Bufadienolides-natural, biologically active compounds for medicines and cosmetics. A review*, Vol. 2023.
- (23) Chen, Z., Yu, Q., Chen, J., Yu, X., Cao, J., Zhai, Y., Tan, Y., Zhan, Z., Li, W., Zou, X., Guo, X., Xie, J., Huang, W., Zhang, Z., Tian, H. *J Agric Food Chem* **2024**, *72* (31), 17377–17391.
- (24) Ma, X. C., Zhang, B. J., Xin, L., Huang, S. S., Deng, S., Zhang, H. L., Shu, H., Diao, Y. P., Cui, J. *Simultaneous Quantification of Seven Major Bufadienolides in Three Traditional Chinese Medicinal Preparations of ChanSu by HPLC-DAD*.
- (25) Inoue, T., Nakata, R., Savitzky, A. H., Yoshinaga, N., Mori, A., Mori, N. *J Chem Ecol* **2020**, *46* (10), 997–1009.
- (26) Zou, D., Zhu, X., Zhang, F., Du, Y., Ma, J., Jiang, R. *J Agric Food Chem* **2018**, *66* (4), 1008–1014.
- (27) Ma, H., Niu, H., Cao, Q., Zhou, J., Gong, Y., Zhu, Z., Lv, X., Di, L., Qian, D., Wu, Q., Duan, J. *J Sep Sci* **2016**, *39* (24), 4681–4687.
- (28) Gao, H., Zehl, M., Kaehlig, H., Schneider, P., Stuppner, H., Moreno Y. Banuls, L., Kiss, R., Kopp, B. *J Nat Prod* **2010**, *73* (4), 603–608.

- (29) Kawahara Kazuhito, Mikage Masayuki. *Studies on Toad Venom (2): Examination of the Drying Processing Method*, 2000.
- (30) Schmeda-Hirschmann, G., Gomez, C. V., Rojas de Arias, A., Burgos-Edwards, A., Alfonso, J., Rolon, M., Brusquetti, F., Netto, F., Urrea, F. A., Cárdenas, C. *J Ethnopharmacol* **2017**, *199*, 106–118.
- (31) Li, J., Zhang, Y., Lin, Y., Wang, X., Fang, L., Geng, Y., Zhang, Q. *PREPARATIVE SEPARATION AND PURIFICATION OF BUFADIENOLIDES FROM ChanSu BY HIGH-SPEED COUNTER-CURRENT CHROMATOGRAPHY COMBINED WITH PREPARATIVE HPLC*, 2013, Vol. 36.
- (32) Li, X., Guo, Z., Wang, C., Shen, A., Liu, Y., Zhang, X., Zhao, W., Liang, X. *J Pharm Biomed Anal* **2014**, *92*, 105–113.
- (33) Ping Zhang, Zheng Cui, Yashu Liu, Dong Wang, Na Liu, Masayuki Yoshikawa. **2005**, 1582–1586.
- (34) Han, L., Si, N., Gao, B., Wang, H., Zhou, Y., Yang, J., Zhao, H., Bian, B. *Int J Mass Spectrom* **2017**, *422*, 88–93.
- (35) Lin, M., Xu, C., Pan, H., Song, Y., Ma, Y., Liu, X., Yao, J., Wang, R. *J Chromatogr Sci* **2024**.
- (36) Liu, K. Di, Qiao, X., Wang, Q., Song, W., Guo, D. A., Ye, M. *Analytical Methods* **2013**, *5* (19), 5241–5247.
- (37) Zulfiker, A. H. M., Sohrabi, M., Qi, J., Matthews, B., Wei, M. Q., Grice, I. D. *J Pharm Biomed Anal* **2016**, *129*, 260–272.
- (38) Makarov, A., Scigelova, M. *Journal of Chromatography A*. June 2010, pp 3938–3945.
- (39) Ren, W., Han, L., Luo, M., Bian, B., Guan, M., Yang, H., Han, C., Li, N., Li, T., Li, S., Zhang, Y., Zhao, Z., Zhao, H. *Anal Bioanal Chem* **2018**, *410* (18), 4419–4435.
- (40) Chen, J., Xue, F., Xie, Y., Cui, W., Tan, L., Niu, Y., Shi, L., Wang, L., Liu, L., Wang, B., Jiao, Y., Lin, Y. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2025**, *1254*.
- (41) Wei, W. long, An, Y. ling, Zhang, Y. zhi, Li, Z. wei, Zhou, Y., Lei, M., Zhang, J. qing, Qu, H., Da, J., Wu, W. ying, Guo, D. an. *J Ethnopharmacol* **2020**, *251*.
- (42) Inoue, T., Nakata, R., Savitzky, A. H., Yoshinaga, N., Mori, A., Mori, N. *J Chem Ecol* **2020**, *46* (10), 997–1009.