



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

2D-nestekromatografia alkaloidien analyysimenetelmänä

Kemia

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

19.5.2026

Turku

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

Pääaine: Kemia

Tekijä: Jenny Aarnio

Otsikko: 2D-nestekromatografia alkaloidien analyysimenetelmänä

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

Sivumäärä: 21 sivua

Päivämäärä: 19.5.2026

Alkaloidit ovat laaja, rakenteellisesti monimuotoinen luonnonyhdisteryhmä, jonka edustajilla on paljon bioaktiivisia ominaisuuksia ja kyky vaikuttaa keskushermostoon. Alkaloidien luokittelulle on monia perusteita, mutta niiden rakenteita yhdistää tyypiatomi sekä emäksinen luonne. Alkaloidien kemiallisten ominaisuuksien ansiosta niitä on hyödynnetty pitkään lääkkeinä erilaisia haastavia sairauksia vastaan. Esimerkiksi vinka-alkaloideihin kuuluvat vinkristiini ja vinblastiini, jotka toimivat mitotoosimyrkkinä syöpää vastaan tai akonitiini, joka toimii lääkkeenä neurotoiminnan häiriöihin.

2D-nestekromatografia (2D-LC) on analyysitapa, jota voidaan hyödyntää monimutkaisten alkaloidirakenteiden analytiikassa. Se koostuu kahdesta eri vaiheesta, joita yhdistää suoraliitännäisen laitteiston tapauksessa vaihtoventiili. Ensimmäisen ja toisen vaiheen kolonnien erotusmenetelmät eroavat toisistaan, jolloin analyysimenetelmästä tulee tarkempi. 2D-LC yhdistetään alkaloidianalyysille optimaaliseen detektoriin ja lisäksi kiinnitetään huomiota laitteiston mahdollisimman hyvään ortogonaalisuuteen. Yhden piikin tarkennusta varten siirretään vain sitä vastaava fraktio 1D-laitteistosta 2D-kolonnille, jolloin kyseessä on pääfraktion siirtomenetelmä. Jos koko näyte halutaan analysoida toisessa vaiheessa, voidaan puhua kattavasta 2D-nestekromatografiasta.

2D-nestekromatografia on oivallinen alkaloidianalytiikkaan, sillä kasvit muodostavat monien yhdisteiden seoksia, joissa alkaloiditkin ovat osana ja sen lisäksi alkaloideilla on itsellään analytiikan osalta haastavia rakenteita. Siksi tarvitaan parempia puhdistusmenetelmiä, jotka lisäävät analyysin selektiivisyyttä, piikkien intensiivisyyttä sekä tarkkuutta. Kun yhdistetään hyvä ortogonaalisuus kummassakin vaiheessa käytettäviin, alkaloideille optimaalisiin liuottimiin, saadaan entistä tarkempia tuloksia. 2D-nestekromatografia on potentiaalinen työkalu monimutkaisten luonnonyhdisteiden analysointiin, joka mahdollistaa tarkempia tuloksia perinteisiin nestekromatografiamenetelmiin verrattuna.

Avainsanat: 2D-nestekromatografia, alkaloidi, erikoistunut metaboliitti, kattava 2D-nestekromatografia, ortogonaalisuus, piikkikapasiteetti, pääfraktion siirtomenetelmä

Sisällys

1	Johdanto.....	1
2	Alkaloidit luonnossa.....	2
2.1	Alkaloidien kemiallisia ominaisuuksia	2
2.2	Alkaloidien pääryhmät ja niiden erot.....	3
2.3	Alkaloidien biosynteesi ja toimintamekanismi kasveissa	5
3	Alkaloidit lääkkeinä.....	6
4	2D-nestekromatografia	9
4.1	Rakenne	9
4.2	Toimintaperiaate	13
4.3	2D-LC:n hyödyntäminen alkaloidianalytiikassa	15
5	Tulevaisuudennäkymät ja loppupäätelmät	18
6	Lähdeluettelo.....	19

Lyhenteet (laita aakkosjärjestykseen)

2D-LC	Kaksivaiheinen nestekromatografia (engl. Two-dimensional liquid chromatography)
ASM	Aktiivinen liuotinmodulaatio (engl. Active solvent modulation)
cAMP	Syklinen adenosiinimonofosfaatti (engl. Cyclic adenosine monophosphate)
ESI	Sähkösumutusionisaatio (engl. Electrospray ionization)
GP	Geelipermeaatiokolonni (engl. Gel permeation column)
HILIC	Hydrofiilinen vuorovaikutuskromatografia (engl. Hydrophilic interaction chromatography)
HPLC	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (engl. High performance liquid chromatography)
IEX	Ioninvaihto(kolonni) (engl. Ion exchange (column))
LC	Nestekromatografia (engl. Liquid chromatography)
LC×LC	Kokonaisvaltainen nestekromatografia (engl. Comprehensive liquid chromatography)
LC-LC	Pääfraktion siirtomenetelmä 2D-nestekromatografiassa (engl. Single heart-cutting 2D-LC method)
MALDI-TOF- MS	Matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio-lentoaikamassaspektrometria (engl. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)
MS	Massaspektrometria (engl. Mass spectrometry)
mLC-LC	Moninkertainen pääfraktion siirtomenetelmä 2D-nestekromatografiassa (engl. Multiple heart-cutting method)
RP-LC	Käänteisfaasinestekromatografia (engl. Reversed-phase liquid chromatography)
SEC	Kokoekskluusiokromatografia (engl. Size exclusion chromatography)

sLC×LC	Selektiivinen kokonaisvaltainen nestekromatografia (engl. Selective comprehensive liquid chromatography)
TLC	Ohutkerroskromatografia (engl. Thin layer chromatography)
DAD-UV	Diodirivi-UV-detektori (engl. Photodiode array UV detector)

1 Johdanto

Monilla kasveilla on ominaisuuksia tuottaa yhdisteitä, joita ihmiset ovat hyödyntäneet vuosikymmenten tai jopa vuosituhansien ajan esimerkiksi lääkkeinä monia sairauksia vastaan. Yksi suurimmista, kasvien tuottamista yhdisteryhmistä on alkaloidit, joilla on paljon erilaisia rakenteita. Kaikille alkaloidiryhmille yhtenäistä on niiden sisältämä tyypiatomi, joka useimmiten sijaitsee yhdisteen heterosyklisessä renkaassa (Aniszewski, 2007). Alkaloideja on suurista yli 800 Da:n painavista vinka-alkaloideista pienimpiin yksirenkaisiin, n. 150 Da:a painaviin alkaloideihin ja ne ovat pH-arvoltaan emäksisiä. Monelle arkipäivästä tuttuja alkaloideja ovat esimerkiksi kahvin sisältämä kofeiini sekä savukkeiden sisältämä nikotiini (Aniszewski, 2007).

Alkaloideilla on usein bioaktiivisia, jopa toksisia ominaisuuksia sekä kyky vaikuttaa keskushermostoon, joka on mahdollistanut niiden laajan hyödyntämisen lääketeollisuudessa. Vaikka kasveista eristettyjen alkaloidien suoranainen lääkekäyttö on vähentynyt, niitä valmistetaan edelleen synteettisesti tai puolisynteettisesti lääketeollisuudessa perinteisten alkaloidilääkkeiden analogeina ja johdannaisina (Bartel et al. 2025).

Nestekromatografia (LC) yhdistettynä esimerkiksi massaspektrometriaan (MS) on hyödyllinen analysointitapa erilaisille luonnonyhdisteille. Kasvien tuottamat alkaloidit ovat useimmiten kuitenkin rakenteeltaan monimutkaisia sekä osana monen eri yhdisteen seosta, jolloin niiden analysoimisesta tulee haastavaa. Ongelmaan on kehitetty ratkaisuksi kaksivaiheinen nestekromatografia, 2D-LC. 2D-nestekromatografia koostuu tyypillisesti kahdesta itsenäisestä LC-laitteistosta, joita usein yhdistää vaihtuventtiili (Ahmad, et al., 2018, Arena et al. 2025).

2-ulotteisella nestekromatografialla analysoidut fraktiot tuottavat kromatogrammiin selkeämmät ja intensiivisemmät piikit, joka mahdollistaa paremman erotusmenetelmän kasvien tuottamille alkaloideille. Eri vaiheiden laitteistoille asetetaan toisistaan eroavat parametrit esimerkiksi liuottimen tai kolonnin suhteen, jolloin analyysit tarkentavat toinen toisiaan vaiheiden välillä. Näyte voidaan analysoida kokonaan, tai siitä voidaan siirtää vain osa toisen vaiheen kolonniin, kun halutaan tarkentaa tietyn fraktion tuottamaa piikkiä kromatogrammissa (Arena et al., 2025, Kumar et al. 2023).

Tässä tutkielmassa käsitellään alkaloidien kemiaa ja niiden hyödyntämistä lääkekehityksessä sekä 2D-nestekromatografian rakennetta ja toimintaperiaatetta. Tutkielman lopuksi syvennytään 2D-nestekromatografian hyödyntämiseen alkaloidien puhdistuksessa sekä

pohditaan, kuinka 2D-nestekromatografia voisi olla ratkaisu yhä tarkempaan ja yksityiskohtaisempaan alkaloidianalytiikkaan.

2 Alkaloidit luonnossa

Alkaloidit ovat suuri luokka luonnossa esiintyviä kemiallisia yhdisteitä, joilla on bioaktiivisia ominaisuuksia. Niiden koot ja muodot eroavat pienimmistä yksirenkaisista yhdisteistä suuriin makrobiomolekyyleihin. Alkaloidien lääketieteellinen historia erilaisina rohdoshoitoina ulottuu pitkälle ihmiskunnan historiaan, ja edelleenkin alkaloideja käytetään parantavien ominaisuuksiensa sekä terveyshyötyjensä vuoksi lääketeollisuudessa (Aniszewski, 2007).

Nykymaailman putkilokasveista jopa 25 % sisältävät alkaloidiyhdisteitä, mutta esiintyvyys muissakin kasviryhmissä on runsasta (Aniszewski, 2007). Nykyisen määritelmän mukaan alkaloidilajeina pidetään kasveja, jotka sisältävät alkaloideja yli 0,01 % kasvin kuivapainosta. Monet kasvit sisältävät kuitenkin evoluution seurauksena hyvin pieniä pitoisuuksia alkaloideja, joten todellista lukua alkaloideja sisältäville kasvilajeille ei voida luotettavasti määrittää (Aniszewski, 2007).

2.1 Alkaloidien kemiallisia ominaisuuksia

Yleisesti kaikkia alkaloidiryhmiä yhdistää niiden sisältämä heterosyklinen rengas, joka sisältää typpiä. Kuten aina, myös sääntöön typpiä sisältävästä heterosyklisestä renkaasta on olemassa poikkeuksia protoalkaloidien luokasta. Alkaloidit ovat luonnollisia emäksiä, ja ne muodostavat vapaiden yhdisteiden lisäksi helposti suoloja (Aniszewski, 2007).

Lisäksi alkaloidit ovat biologisesti aktiivisia molekyylejä ja suurimmalla osalla on myös farmakologisia vaikutuksia, minkä takia niillä on suuri merkitys lääkekehityksessä ja -tuotannossa (Aniszewski, 2007). Aktiivisuus perustuu usein niiden toksikologisiin ominaisuuksiin eli kykyyn toimia myrkkynä. Kasvi tuottaa luonnollisia myrkyjä omiin tarkoituksiinsa puolustautuessaan ympäristön aiheuttamia negatiivisia vaikutuksia vastaan (Kumar et al., 2025).

2.2 Alkaloidien pääryhmät ja niiden erot

Nykypäivänä alkaloidit luokitellaan kolmeen päätyyppiin: todellisiin alkaloideihin, protoalkaloideihin sekä pseudoalkaloideihin. Luokitteluperusteita ovat esimerkiksi niiden muoto, alkuperä, farmakologiset vaikutukset sekä prekursorina toimiva molekyyli, josta kasvi tuottaa valmiin alkaloidin sille ominaisen biosynteesireitin kautta (Aniszewski, 2007, Bhambhani et al. 2021). Alkaloidit voidaan luokitella myös heterosyklisiin tai ei-heterosyklisiin alkaloideihin sen mukaan, onko tyypiatomi rengasrakenteessa vai muualla hiiliketjussa (Bhambhani et al. 2021).

Todelliset tai aidot alkaloidit (engl. true alkaloids) on suurin ja samalla myös merkittävin ryhmä alkaloidien pääluokista. Kuten kaikille alkaloideille on ominaista, todellisten alkaloidien ryhmän edustajilla on tyypiatomin sisältämä heterosyklinen rengas. Ryhmien kaikkien alkaloidien prekursorina toimii jokin aminohappo, ja ne muodostavat helposti kasveissa vesiliukoisia suoloja. Suolayhdisteiden lisäksi aidot alkaloidit esiintyvät kasveissa vapaina yhdisteinä tai N-oksideina. Kyseisen alkaloidiryhmän alkaloidit esiintyvät nikotiinia lukuun ottamatta valkean jauheen muodossa ja niillä on ryhmälle ominainen kitkerä maku (Aniszewski, 2007).

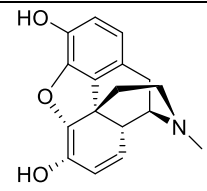
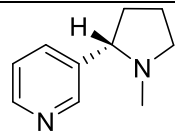
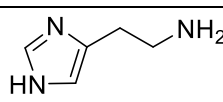
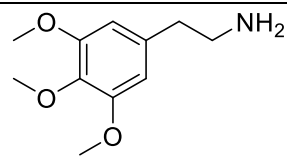
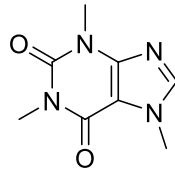
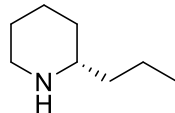
Protoalkaloidit ovat toinen alkaloidien pääryhmistä, ja ne eroavat todellisista alkaloideista molekyylin sisältämän tyypiatomin sijainnin perusteella. Protoalkaloideissa rengasrakenne ei ole heterosyklinen, vaan usein rengas on bentseeni ja tyypiatomi sijaitsee osana hiiliketjua. Protoalkaloidien luokka on suuruudeltaan vain murto-osan todellisten alkaloidien luokan koosta eikä myöskään protoalkaloideja muodostavien kasvien määrä ole suuri (Aniszewski, 2007, Bhakta et al. 2020). Tärkeimpiä protoalkaloidien esiasteita ovat L-tryptofaani ja L-tyrosiini (Bhakta et al. 2020).

Kolmas alkaloidien luokittelun pääryhmistä on pseudoalkaloidit. Toisin kuin todelliset alkaloidit sekä protoalkaloidit, kaikkien pseudoalkaloidien perushiilirunko ei ole aminohappojohdannainen, vaan niitä valmistuu fenyylialaniinien, asetaattien, steroidien tai ketonien biosynteesistä. Edellä mainittujen prekursorien lisäksi pseudoalkaloidit voivat olla aminohapporeaktioteiden, kuten transaminaation, reaktiosivutuotteita. Pseudoalkaloideille ominaista on tyypiatomin liittyminen perusrunkoon synteesin loppuvaiheessa, kun todellisilla alkaloideilla ja protoalkaloideilla tyypiatomi on osana perusrunkoa synteesin ensimmäisestä reaktiosta lähtien (Aniszewski, 2007, Bhakta et al. 2020).

Pääluokkien lisäksi alkaloideja voidaan ryhmitellä alaluokkiin niiden sisältämien kemiallisten pääryhmien sekä prekursoreina toimivien yhdisteiden avulla. Esimerkiksi

pseudoalkaloideihin kuuluva kofeiini on puriinialkaloidi ja sen prekursorina toimii adeniini tai guaniini (Aniszewski, 2007). Taulukossa 1 on lisää esimerkkejä alkaloidien luokittelusta ja erilaisista alkaloidirakenteista.

Taulukko 1. Esimerkkejä alkaloidiluokittelusta.

Alkaloidityyppi	Alaluokka (pääyhdisteen mukaan)	Esimerkkiyhdiste
Aidot alkaloidit	Bentsyyli-isokinoliini	 Morfiini
Aidot alkaloidit	Pyridiinialkaloidi	 Nikotiini
Aidot alkaloidit	Imidatsoliinalkaloidi	 Histamiini
Protoalkaloidit	Fenyylietyyliamiinialkaloidi	 Meskaliini
Pseudoalkaloidit	Puriinialkaloidit	 Kofeiini
Pseudoalkaloidit	Piperidiinialkaloidit	 Koniini

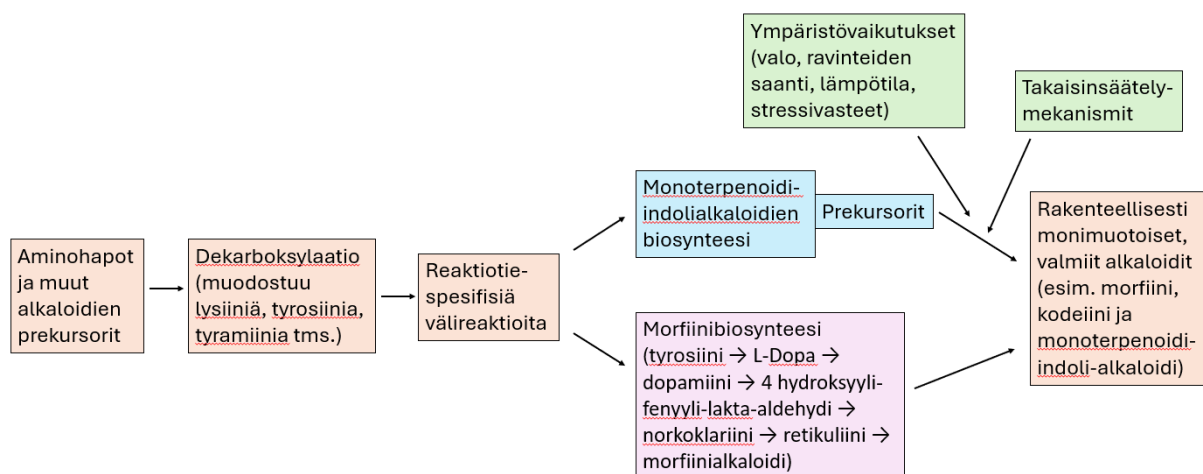
2.3 Alkaloidien biosynteesi ja toimintamekanismi kasveissa

Alkaloidit ovat erikoistuneita metaboliitteja ja niillä on tärkeä osa kasvin omassa puolustautumisjärjestelmässä ympäristön aiheuttamia stressivasteita ja patogeenejä vastaan. Toisin kuin primaariset metaboliitit, jotka vaikuttavat suoraan kasvin kehitykseen ja kasvuun, erikoistuneiden metaboliittien tuotannon on saatava signaalivaste ennen niiden tuotannon käynnistymistä. Signaaleja aiheuttavat bioottiset tekijät, kuten patogeenit ja herbivorit, sekä abioottiset tekijät, kuten UV-säteily, kuivuus ja korkeat lämpötilat. Kasvit hyötyvät itse alkaloidien toksisuudesta sekä niiden karvaasta ominaismausta puolustautumalla patogeenejä vastaan (Kumar et al., 2025).

Alkaloidien biosynteesireaktiot toimivat palautesäätelyllä, jota reaktioiden lopputuotteet ohjailevat. Reaktioteiden lopputuotteet inhiboivat entsyymien toimintaa, jolloin reaktioita ei pääse tapahtumaan, mikäli kyseistä lopputuotetta on jo tarpeeksi kasvin toiminnoille (Kumar et al., 2025).

Alkaloidien biosynteesi alkaa useimmin jonkin aminohapon esiasteen dekarboksylaatioreaktiosta asetaatti-, shikimaatti-, mevalonaatti- tai deoksiksyluloosireittiä pitkin (Aniszewski, 2007, Kumar et al. 2025). Alkaloidien prekursoreita on monia, kuten esimerkiksi L-lysiini piperidiinialkaloidien, L-tryptofaani indolialkaloidien ja adeniini puriinialkaloidien prekursorina. Kaikki alkaloidit eivät muodostu aminohapoista, vaan myös jotkin hapot, kuten pyruvaatti- ja nikotiinihappo, sekä esimerkiksi asetaatti-ioni tai saponiinit toimivat tiettyjen alkaloidien esiasteina (Aniszewski, 2007). Synteesireitit ovat sarja erittäin tarkkaan säädeltyjä kemiallisia reaktioita ennen primaarimetaboliittien muuttumista moniksi eri erikoistuneina metaboliitteina toimiviksi alkaloideiksi. Alkaloidien rakenteet monimutkaistuvat ja ne saavat merkittäviä farmakologisia ominaisuuksia synteesin edetessä kohti valmista alkaloidia (Kumar et al., 2025).

Biosynteesireittien välireaktiot ovat yleensä joko metylaatio- ja hydroksylaatioreaktioita tai yhdisteen rakenteellista uudelleenjärjestäytymistä. Esimerkiksi erään synteesireitin haarautumiskohta on välituotteena toimiva retikuliini, joka jakaa morfiinialkaloidien reaktioreitin monoterpenoidi-indolialkaloidien reaktioreitistä. Indoli ei itsessään ole alkaloidi, mutta se on monien alkaloidien ja kasvihormonien sisäinen rakenne. Kuvassa 1 on kyseisen reaktioreitin eri vaiheet ensimmäisistä prekursoreista rakenteellisesti valmiisiin, monimuotoisiin alkaloideihin. Yhdessä erikoistuneiden metaboliittien kanssa kasvihormonit vaikuttavat kasvin kasvuun, säätelyyn ja toimintoihin (Kumar et al., 2025).



Kuva 1. Monoterpenoidi-indoli-alkaloidien ja morfiini-alkaloidien reaktioreitit alkavat molemmat dekarboksylaatiolla ja haarautuvat myöhemmin. Kuva on mukailtu lähteestä (Kumar et al. 2025).

3 Alkaloidit lääkkeinä

Alkaloideja sisältäviä kasveja sekä yrttejä on hyödynnetty lääketieteellisiin tarkoituksiin jo vuosisatoja ja joitain alkaloidiyhdisteitä käytetään lääkkeinä vielä nykypäivänäkkin. Ensimmäisen lääkekäytössä hyödynnetyn alkaloidin, morfiinin (kuva 2c.), löysi Friedrich Sertürner vuonna 1805 oopiumiunikosta, joka oli merkittävä edistysaskel lääkekehityksessä. Nykyään useiden alkaloidiyhdisteiden rakenteita voidaan myös valmistaa synteettisesti tai muunnella niiden molekyyli-mallien perusteella. Alkaloidilääkkeiden synteettinen valmistaminen parantaa niiden biologista aktiivisuutta ja samalla lisää alkaloidien mahdollisuutta toimia entistä parempina lääkeaineina. Kuten kaikki lääkeaineina käytetyt yhdisteet, myös alkaloidit ovat suurina annoksina tappavia. Ne voivat aiheuttaa useita sivuvaikutuksia ja ovat terveille soluille myrkyllisiä (Aniszewski, 2007).

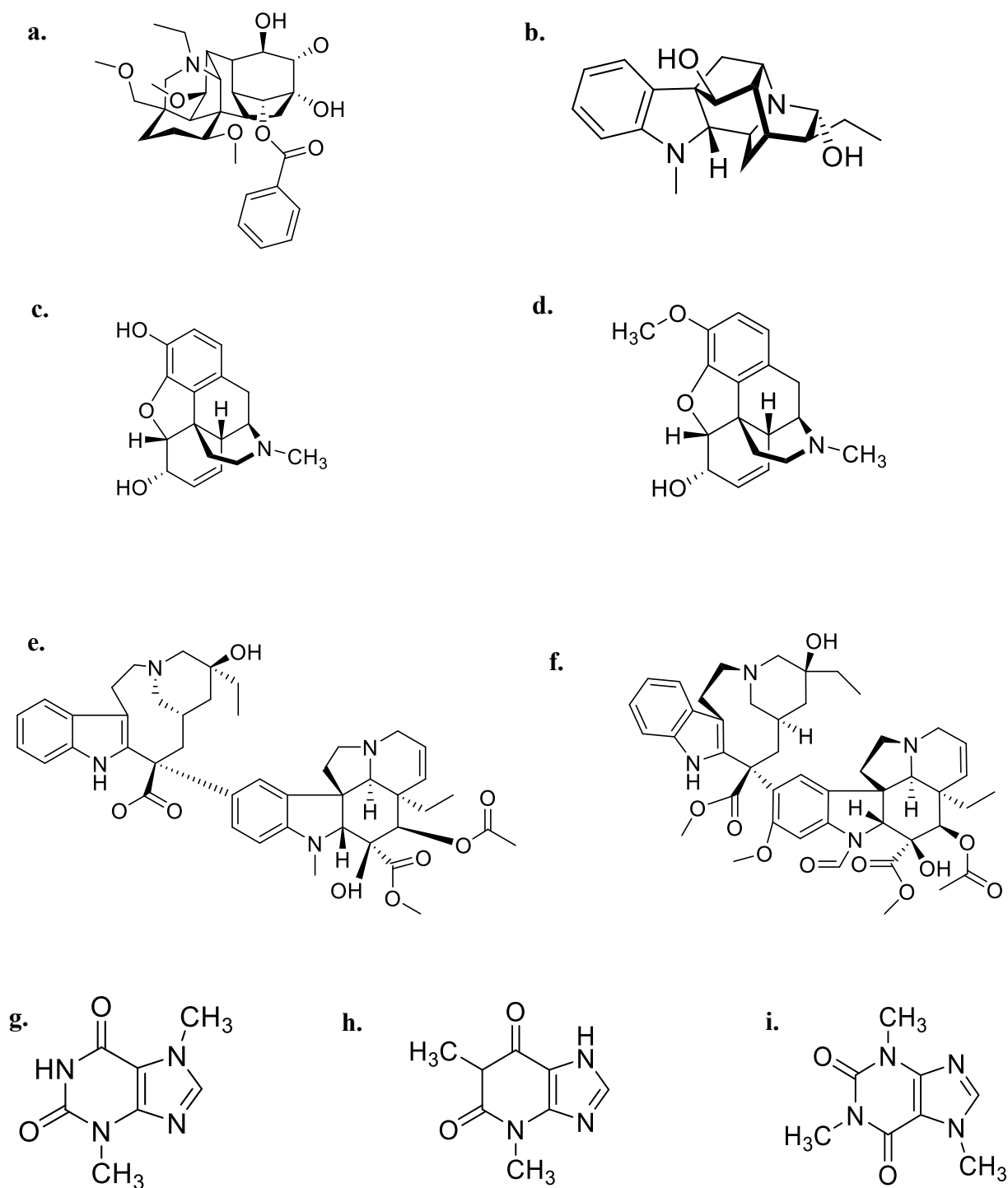
Alkaloidien monipuolinen bioaktiivisuus mahdollistaa sen, että ne voivat toimia aineenvaihdunnassa histologisina säätelijöinä (Aniszewski, 2007) tai paikallispuuduttajina muualla (Letchuman et al. 2025). Ne voivat vähentää tai jopa estää esimerkiksi tietyn reseptorin toimintaa, mikä saattaa hidastaa joidenkin sairauksien etenemistä. Tämän ominaisuuden vuoksi alkaloideja on hyödynnetty lääkeaineina vaikeastikin hoidettavien sairauksien hoitoon (Aniszewski, 2007).

Alkaloidit voivat vaikuttaa kehossa moniin eri reseptoreihin, jotka säätelävät solunsisäisiä ja -välisiä toimintoja. Muun muassa akonitiini (kuva 2a.) ja ajmaliini (kuva 2b.) ovat alkaloidipohjaisia kasvimyrkkyjä, jotka voivat osallistua natriumkanavien säätelyyn.

Akonitiini pystyy ensin aktivoimaan ja myöhemmin inaktivoimaan enstymaattista toimintaa hermosolun reseptorin Na^+ -kanavien kautta. Tämä vaikuttaa hermosolujen väliseen signalointiin, ja siksi akonitiinia on aikoinaan hyödynnetty neurotoiminnallisten häiriöiden parannuskeinona. Ajmaliinin vaikutusperiaate on puolestaan Na^+ -kanavien toiminnan inhiboiminen. Na^+ -kanavien toiminta vaikuttaa sydämen sykkeeseen, johon on ajmaniinilla hidastava vaikutus. Siksi sitä on käytetty pieninä annoksina sydämen rytmihäiriöiden hoitoon (Aniszewski, 2007). Ensimmäisenä löydetty alkaloidi, morfiini (kuva 2c.), on tehokas kipulääke, mutta se aiheuttaa pahaa riippuvuutta. Siksi myös kivunlievityslääkkeenä toimiva kodeiini (kuva 2d.), morfiinin metyylietterijohdannainen, joka löytyy morfiinin tavoin oopiumiunikosta, tarjoaa tehokkaan kivunlievityskeinon pienemmällä riippuvuusriskillä (Letchuman et al. 2025).

Vinblastiini (kuva 2e.) ja vinkristiini (kuva 2f.) ovat syöpälääkkeinä, erityisesti leukemian hoitoon, käytettyjä vinka-alkaloideja, jotka toimivat mitoosimyrkkyinä (Aniszewski, 2007, Letchuman et al. 2025). Ne voivat häiritä solujen mikrotubuluksen toimintaa, joka vastaa mitoosin metafaasivaiheen toiminnasta, eli ne estävät syöpäsolujen hallitsematonta jakautumista (Aniszewski, 2007, Farrell et al., 1993). Vinkristiinillä ja vinblastiinilla on myös muita ominaisuuksia, esimerkiksi vaikutuksia DNA-synteesin sekä aminohappometabolian toimivuuteen (Aniszewski, 2007).

Monet alkaloidit toimivat stimulantteina ja niitä voidaan hyödyntää myös lääkkeenä erilaisia sairauksia vastaan muun muassa kivunlievityksenä. Stimulantit ovat aineita, jotka stimuloivat keskushermoston toimintaa sekä kiihdyttävät verenkiertoa. Esimerkiksi teobromiinilla (kuva 2g.), teofylliinilla (kuva 2h.) sekä tunnetuimpana kofeiinilla (kuva 2i.) on kaikilla elimistössä stimuloivia vaikutuksia. Kofeiini pystyy inhiboimaan fosfodiesterasien vaikutusta, lisäämään cAMP:n aktiivisuutta sekä kilpailemaan adenosiniin kanssa reseptoreista keskushermostossa. Kofeiinilla on myös diureettisten ja verisuonia laajentavien ominaisuuksiensa vuoksi vaikutusta aivojen verisuonissa, mikä vähentää päänsärkyä. Muut yllä mainitut stimulantteina toimivat alkaloidit vaikuttavat keskushermostoon sekä verenkiertoon kofeiinin tavoin (Aniszewski, 2007).



Kuva 2. Tunnettujen alkaloidilääkeyhdisteiden rakenteita: akonitiini (a.), ajmaliiini (b.), morfiini (c.), kodeiini (d.), vinblastiini (e.), vinkristiini (f.), teobromiini (g.), teofylliini (h.), kofeiini (i.).

4 2D-nestekromatografia

Kaksiulotteisia kromatografiatyyppejä on kahta luokkaa: 2D-nestekromatografia (2D-LC) ja 2D-kaasukromatografia (2D-GC). Tässä tutkielmassa perehdytään 2D-LC:n rakenteeseen, toimintaperiaatteeseen ja sovellutuksiin alkaloidianalytiikassa. 2D-LC on kehittyneempi versio tavallisista yksivaiheisista, kuten korkean erotuskyvyn (HPLC), kromatografiamenetelmistä. Erotuskyky on 2D-kromatografiassa huomattavasti parempi perinteisiin kromatografiamenetelmiin verrattuna, mikä takaa helpomman ja nopean puhdistusmenetelmän erityisesti biologisten yhdisteiden tutkimuksessa. Hyvän erotuskyvyn kautta detektiossa muodostuvien kromatogrammien ja spektrien tarkkuus sekä piikkien intensiteetit ovat parempia ja laitteiston selektiivisyys tehokkaampi (Carr et al., 2007).

Uusia analyysimenetelmiä kehitellään ennen kaikkea parantamaan monimutkaisten yhdisteseosten analytiikkaa, mutta myös nopeuttamaan ja helpottamaan tutkimuksen tekemistä. Nykyään myös laitteistojen ympäristöystävällisyys ja kestävyys ovat tärkeitä ominaisuuksia niiden kehityksen kannalta. Kromatografiset menetelmät vähentävät haastavien luonnonyhdisteiden, kuten alkaloidien, tutkimuksessa ympäristön kuormitusta, ja moniulotteiset tekniikat parantavat ympäristöystävällisyyttä entisestään (Kumar et al. 2023).

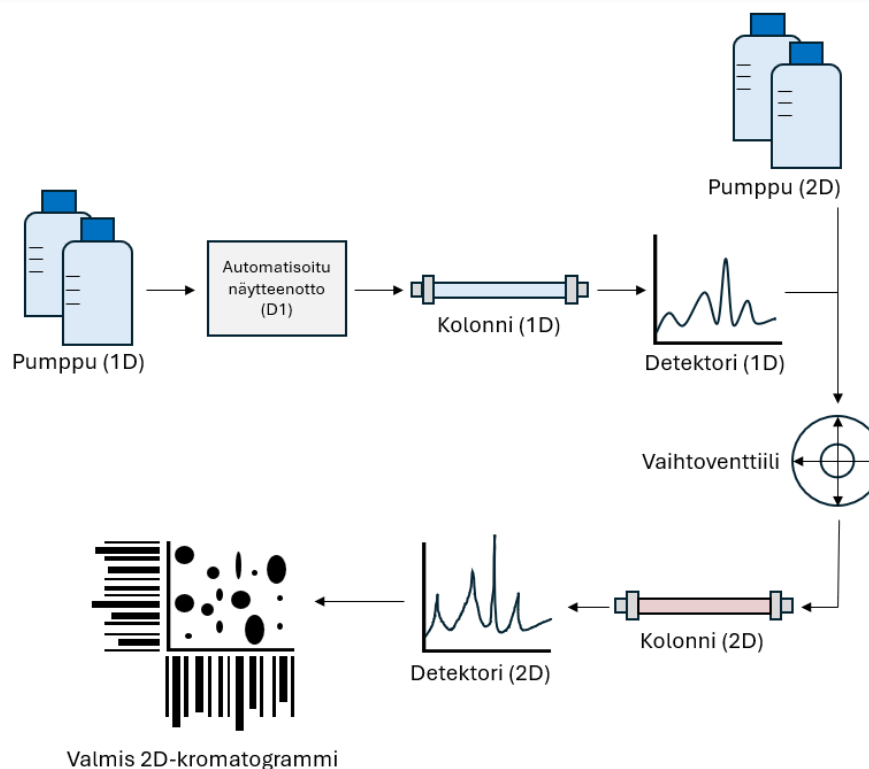
Resoluution tarkkuuden parantamisen lisäksi 2D-kromatografiamenetelmässä täytyy ottaa huomioon kaikki mahdolliset muuttujat, jotta tarkkuuden parantuminen onnistuu. Muuttujia ovat esimerkiksi gradientin sekä faasin väliset vuorovaikutukset, retentioaika, kolonnin pituus ja muoto sekä koeolosuhteet, kuten lämpötila ja ilmankosteus (Ahmad, et al., 2018). Laitteistoa voidaan kutsua kattavaksi 2D-nestekromatografiaksi, mikäli se täyttää seuraavat ehdot: näytteen tutkittavat osat läpikäyvät kaksi erillistä toisistaan riippumatonta erottelumenetelmää, vähintään sama määrä tutkittavista komponenteista kulkee kyseisten erillisten erotusmenetelmien läpi ja ensimmäisen vaiheen analyysissä saavutettu resoluutio vähintäänkin säilyy (Arena et al., 2025).

4.1 Rakenne

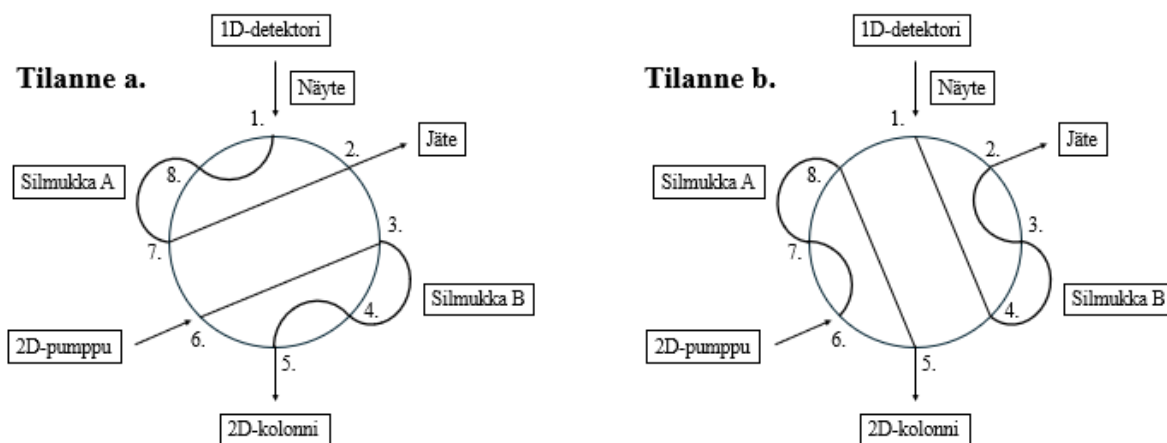
2D-nestekromatografia koostuu kahdesta erillisestä osasta: ensimmäisestä vaiheesta ja toisesta vaiheesta. Tavallisissa kromatografiamenetelmissä, kuten HPLC:ssa käytetään vain yhtä vaihetta. 2D-kromatografialaite ei usein itsessään ole tehokas analyysimenetelmä, vaan siihen on lisätty ominaisuuksia, esimerkiksi massaspektrometri tai UV-detektori, joiden avulla saadaan yhdisteiden analysoinnissa optimaalisempia tuloksia (Arena et al., 2025).

Eri vaiheiden parametrien on erottava toisistaan jotenkin, jotta erottelumenetelmät tarkentavat toisiaan ja fraktioiden muodostamien piikkien intensiteetit paranevat. Kyseistä ilmiötä kutsutaan ortogonaalisuudeksi, jolloin kummassakin vaiheessa käytettävät puhdistusmenetelmät eivät ole riippuvaisia keskenään, vaan parantavat toistensa tuloksia. Optimoitavia parametrejä ovat esimerkiksi kolonnien koko, muoto sekä materiaali, liikkuvat faasit ja gradienttieuutio, näytesilmukan tilavuus sekä eri vaiheiden välinen rajapinta. Esimerkiksi kolonneissa oleva materiaali voi olla sama, mutta niiden koko ja sisäänituloaukko eroavat vaiheiden välillä. Vastakohtana kolonnin materiaali voi vaihdella: ensimmäisen vaiheen kolonni perustuu esimerkiksi hydrofiiliseen vuorovaikutukseen (HILIC) ja toisen vaiheen kolonni käänteiseen faasikoostumukseen (RP-LC). Kolmas tapa muuttaa vaiheiden välistä erottelutapaa on niiden olosuhteiden, kuten pH-arvon, muuttaminen (Arena et al., 2025).

Kummatkin vaiheet sisältävät pumpun, joka pumppaa laitteistoon sopivaa eluenttia, kolonnin sekä detektorin (kuva 3), joka muodostaa analyysistä graafisen kromatogrammin tietokoneen välityksellä. Laitteiden rakenteet vaihtelevat kuitenkin sen mukaan, minkä tyyppisiä osia niissä on käytetty ja minkä tyyppin kromatografia on kyseessä. Tiedettävästi ensimmäinen kahden ulottuvuuden kromatografiamenetelmä oli ohutkerroskromatografia (TLC), joka sisälsi geelipermeaatiokolonnin (GP) 1D-osassa ja RP-LC:n 2D-osassa välissään 8-porttinen vaihtuventtiili (kuva 4). Myöhemmin 1D-laitteiston kolonni muutettiin mikrohuokoiseen ioninvaihtokolonneen (IEX) ja 2D-laitteiston kolonni puolipreparatiiviseen kokoeksklusiokolonneen (SEC), joka antoi ortogonaalisesti parempia tuloksia verrattuna edelliseen laitteistoon. Merkittävä edistysaskel saavutettiin, kun keksittiin liittää UV-detektori matriisiavusteiseen laserdesorptioionisaatio- lentoaikamassaspektrometriin (MALDI-TOF-MS). Uusin kromatografiamenetelmä on HILIC, joka sopii liitettäväksi esimerkiksi RP-LC:n, SEC-LC:n tai IEX-LC:n kanssa (Arena et al., 2025).



Kuva 3. Yksinkertaistettu automatisoitu suoraliitännäinen 2D-nestekromatografian rakenne. Kuva on mukailtu lähteestä (Kumar et al. 2023).



Kuva 4. Kahdeksanporttisen vaihtuventtiilin rakenne ja toimintamekanismi. Kuva mukailtu lähteestä (Erni & Frei, 1978).

1D-kolonne on usein suhteellisen pitkä verrattuna 2D-kolonneihin, n. 10-25 cm pitkä, halkaisijaltaan kapea ja sitä hyödynnetään hitailla virtausnopeuksilla. Halkaisijaltaan kapeammilla kolonneilla on parempi erottelukyky ja herkkyys verrattuna leveämpiin kolonneihin. 2D-kolonne tulisi puolestaan olla sisähalkaisijaltaan 4-8 kertaa suurempi, mitä 1D-

kolonni, jotta 2D:ssa käytetty suuri virtausnopeus ei aiheuta analyysimenetelmän herkkyyden heikkenemistä tai analyyttien laimentumista. 2D-kolonni on valmistettu huokoisesta materiaalikappaleesta, kuten piioksidista, joka tekee siitä monoliittisen kolonnin. Monoliittisilla C18-kolonneilla on keskimäärin 15 % suurempi huokoisuus, kun tavallisimmilla pakatuilla kolonneilla. Toinen 2D-kolonneissa käytetty materiaali koostuu pintahuokoisista partikkeleista, joilla on monoliittisen materiaalin tavoin huokoinen ulkokuori ja lisäksi sisällä kiinteä ydin (Arena et al., 2025).

Myös kromatografiassa tapahtuva eluutio on kummankin vaiheen osalta prosessi, joka säädetään optimaaliseksi, jotta tulokset moniulotteisen kromatografian analyysistä olisivat mahdollisimman tarkkoja. 2D-kromatografialaitteistossa hyödynnetään 1D- tai 2D-gradienttieluutiota tai vastaavasti isokraattista eluutiota. Isokraattisessa eluutiossa liuottimen koostumus pysyy koko ajon aikana samana, kun taas gradienttieluutiossa käytettävien liuottimien keskinäinen suhde muuttuu. Gradientti muuttuu yleensä analysoitavien kohdeyhdisteiden vesiliukoisuuden perusteella poolisemmasta liuottimesta poolittomampaan suuntaan. Gradienttieluutio on yleensä 2D-kromatografiassa optimaalisempi kuin isokraattinen eluutio. Esimerkiksi RP-LC:n käytössä liian vahva eluentti tutkittaville kohdeyhdisteille, kuten alkaloideille, johtaa heikosti stationäärifaasin kanssa vuorovaikuttavien yhdisteiden heikkoon erotteluun, kun taas liian heikko eluentti pidentää analyysiaikoja turhan pitkiksi. Gradienttieluutioon etuna on myös sen muokkaaminen kaikille analyysikerroille optimaaliseksi, jolloin kromatogrammin piikkikapasiteetti paranee (Arena et al., 2025).

Signaalien vastaanottavat detektorit ovat nopeutuneet viime vuosien aikana huomattavasti. Nykyään paljon käytettyjä detektoreja ovat massaspektrometrit (MS), joista yleisimpiä ovat MALDI-TOF-MS ja sähkösumutus-ionisaatio-MS (ESI-MS) sekä diodirivi-UV-detektori (DAD-UV). MALDI-ionilähdettä ei voida liittää laitteistoon, mikäli siinä hyödynnetään online-injektiotekniikkaa. ESI-MS:aa voidaan puolestaan käyttää minkä tahansa injektio-tekniikan yhteydessä. ESI-MS-detektiossa ilmenee helposti signaalin vaimenemisilmiötä, joten oikean liuottimen valitseminen on rajoitetumpaa verrattuna UV-detektioon. UV-DAD-detektio- menetelmät ovat MS-menetelmiä suositumpia 2D-LC:ssa niiden paremman piikki-pinta-alojen suhteellisen tarkkuuden ansiosta. Myös skannausnopeus on seikka, joka aiheuttaa ongelmakohdan detektorin valinnassa: toisen ulottuvuuden LC-kolonni toimii huomattavasti nopeammin perinteiseen LC-kolonniin verrattuna, ja siksi onkin tärkeää, että siihen yhdistetty detektori on nopea havaitsemaan tulleita signaaleja (Carr et al. 2007).

Mikäli kyseessä on automatisoitu linjaan kytketty siirtotekniikka suoraan 1D-LC:sta 2D-LC vaiheeseen, niitä yhdistää kahdeksanporttinen silmukkaventtiili, mikä ohjaa virtausta

eri osioiden välillä (kuva 4). Tilanteessa a. virtaus kulkee 1D-detektorilta silmukan A (täyttö) kautta jätteeseen ja samaan aikaan pumpulta 2 tuleva virtaus injektoidaan 2D-kolonneihin silmukan B (injektointi) kautta. Tilanteessa b. virtaus kuljetetaan detektorilta 1 silmukan B (täyttö) läpi jätteeseen ja pumpulta 2 virtaus kulkee silmukan A (injektointi) kautta toisen vaiheen kolonnille (Erni & Frei, 1978).

4.2 Toimintaperiaate

2D-nestekromatografiassa näytteitä voidaan analysoida kahdella eri tavalla: pääfraktion siirtomenetelmällä tai kokonaisvaltaisella menetelmällä. Valittava tapa riippuu siitä, minkä tyyppistä analyysiä tutkimuksella haetaan. Kummassakin tavassa näyte kulkee ensin ensimmäisen vaiheen laitteiston läpi, jonka jälkeen olevassa vaihtuventtiilissä valitaan toiseen vaiheeseen menevä näytteen osa. Koko näytettä ei ole useinkaan tarpeellista analysoida uudelleen, joten usein valitaan vain yksi tai useampi fraktio 2D-kolonneihin jatkoanalyysiä varten (Kumar et al. 2023).

Usein halutaan analysoida vain tiettyä fraktiota vastaava piikki uudelleen sen intensiteetin ja tarkkuuden parantamista varten. Kyseistä menetelmää kutsutaan yksittäisen pääfraktion siirtomenetelmäksi (LC-LC) (engl. Single heart-cutting method). Yksittäisen pääfraktion siirtomenetelmässä koko näyte injektoidaan aluksi ensimmäisen vaiheen LC:n läpi, jonka jälkeen vain tarkempaa analyysiä vaativaa piikkiä vastaava fraktio johdetaan toisen vaiheen laitteistoon. Näytteen johtaminen voidaan suorittaa automaattisesti vaihtuventtiilin kautta kuvan 4 mukaisesti tai manuaalisesti, jolloin halutut fraktiot kerätään ensin 1D-kromatogrammien perusteella ja injektoidaan sitten 2D-laitteistoon (Arena et al., 2025, Kumar et al., 2023).

Mikäli tutkittavat analyytit sijaitsevat toisistaan eri alueilla kromatogrammissa eikä välittömiä päällekkäisyyksiä esiinny ensimmäisen sekä toisen vaiheen välillä piikkien suhteen, voidaan tarkentaa useamman piikin analyysiä injektoimalla useampi osa samasta näytteestä vaihtuventtiiliin ja kuljettaa 2D-laitteiston läpi 2D-detektorille. Kyseistä analyysimenetelmää kutsutaan moninkertaiseksi pääfraktion siirtomenetelmäksi (mLC-LC) (engl. multiple heart-cutting LC) (Kumar et al. 2023). Jos tutkittavien fraktioiden retentioajat ovat liian lähellä toisiaan, voidaan toinen fraktio väliaikaisesti säilöä näytesilmukkaan vaihtuventtiilissä ja analysoida vasta, kun toinen fraktioista on analysoitu. Tällaisessa tilanteessa vaihtuventtiilin on sisällettävä kaksi lisäventtiiliä, jotta näytteen säilöminen onnistuu (Arena et al., 2025).

Jos analyysissä halutaan tarkentaa koko 1D-kromatografiassa muodostuvaa kromatogrammia, on kyseessä perinteinen eli kokonaisvaltainen 2D-nestekromatografia (LC×LC) (engl. Comprehensive liquid chromatography) (Kumar et al. 2023). Tarkoituksena on tarkentaa kaikkia näytteessä olevien yhdisteiden vastaavia piikkejä kromatogrammissa, ja siksi tekniikan edellytyksenä onkin, että koko näyte kulkee kummankin vaiheen läpi. Pääfraktion siirtomenetelmä on kuitenkin kattavaa 2D-nestekromatografiaa käytetympi analyysimenetelmä, sillä usein koko näytteen kromatogrammia ei ole tarpeellista tarkentaa (Kumar et al. 2023). Sen lisäksi LC-LC on käyttökustannuksiltaan edullisempaa, sillä se tarvitsee yksinkertaisemman laitteiston LC×LC:n verrattuna sekä resurssien kulutus on vähäisempää ajon aikana, kun analysoidaan vain tiettyä fraktiota vastaava osa (Cabooter et al. 2024). Lisäksi on olemassa vielä selektiivinen kattava menetelmä, LC-LC:n ja LC×LC:n välimuoto, jossa haluttu 1D-kromatogrammin piikin muodostanut pääfraktio voidaan fraktioida edelleen ja injektoida erillisenä 2D-kolonneihin. Tekniikka eroaa LC-LC:sta siten, että sLC×LC:ssa koko piikkiä vastaava näytetilavuus injektoidaan 2D-kolonneihin, eikä vain tiettyä osaa siitä (Arena et al., 2025).

Edellä mainituissa 2D-menetelmissä voidaan hyödyntää useampaa eri injektointitapaa, kun halutaan siirtää näyte ensimmäisestä vaiheesta toiseen. Käytetyimmät injektointitekniikat ovat manuaalinen, eri aikaan tapahtuva, tai automaattinen, linjaan kytketty, injektointitekniikka (engl. offline, online technique). Toisistaan erillään olevilla injektointitekniikoilla halutut fraktiot johdetaan manuaalisesti tai joissakin tapauksissa fraktionkerääjän kautta 1D-laitteistosta 2D-laitteistoon. Tämä mahdollistaa sen, etteivät laitteistojen tarvitse välttämättä olla yhdistettynä toisiinsa, jolloin myös kustannukset ovat alhaisempia. Suoraliitännäisessä injektointitekniikassa puolestaan näytteesiirto on automatisoitu ja halutut fraktiot siirtyvät reaaliajassa 2D-kolonneihin. Offline- ja online-tekniikoiden lisäksi on olemassa myös vähemmän käytetyt pysäytetyn virtauksen menetelmä (engl. stop-and-go method) sekä pulssieluutiomenetelmä. Pysäytetyn virtauksen menetelmässä 1D- ja 2D-laitteistojen virtaukset toimivat eriaikoina: kun tietty fraktio siirretään toisen vaiheen laitteistoon, ensimmäisen vaiheen virtaus pysäytetään. Vastaavasti, kun 1D-laitteiston analyysi on käynnissä, 2D-laitteiston virtaus on pysähdyksissä. Pulssieluution toimintamekanismi vastaa pysäytetyn virtauksen menetelmää, mutta eroavaisuutena on, että sen eluentin koostumusta muutetaan muuttamatta sen virtaamisnopeutta, kun taas pysäytetyn virtauksen tekniikassa eluentin koostumus pysyy samana ja virtaamisnopeus muuttuu (Arena et al., 2025).

Kaikissa injektointitekniikoissa on sekä hyötyjä että haittoja, joten tarvittava tekniikka valitaan tarpeiden ja käytössä olevien resurssien mukaan. Manuaalisessa

injektointimenetelmässä riittää kaksi perinteistä LC-laitteistoa, joiden ei tarvitse olla yhteydessä toisiinsa. Tällöin myös kustannukset alenevat verrattuna automaattiseen injektointimenetelmään. *Offline*-tekniikassa voidaan hyödyntää kummassakin vaiheessa erilaisia erotusmenetelmiä ja näytteen pitoisuus voi vaihtua laitteiston vaihdon yhteydessä, kun taas suoraliitännäisessä -tekniikassa erilaisten erotusmenetelmien yhdistäminen voi tuoda haasteita. Automaattinen injektointitekniikka vaatii myös enemmän laitteistoa, kuten eri vaiheiden välisen vaihtuventtiilin, joka lisää kustannuksia entisestään. Suoraliitännäisessä tekniikassa ei kuitenkaan ole eriaikaan tapahtuvassa tekniikassa ilmentyvää kontaminaatoriskiä, joka muodostuu näytteen siirrossa manuaalisesti ulottuvuudesta toiseen (Arena et al., 2025).

4.3 2D-LC:n hyödyntäminen alkaloidianalytiikassa

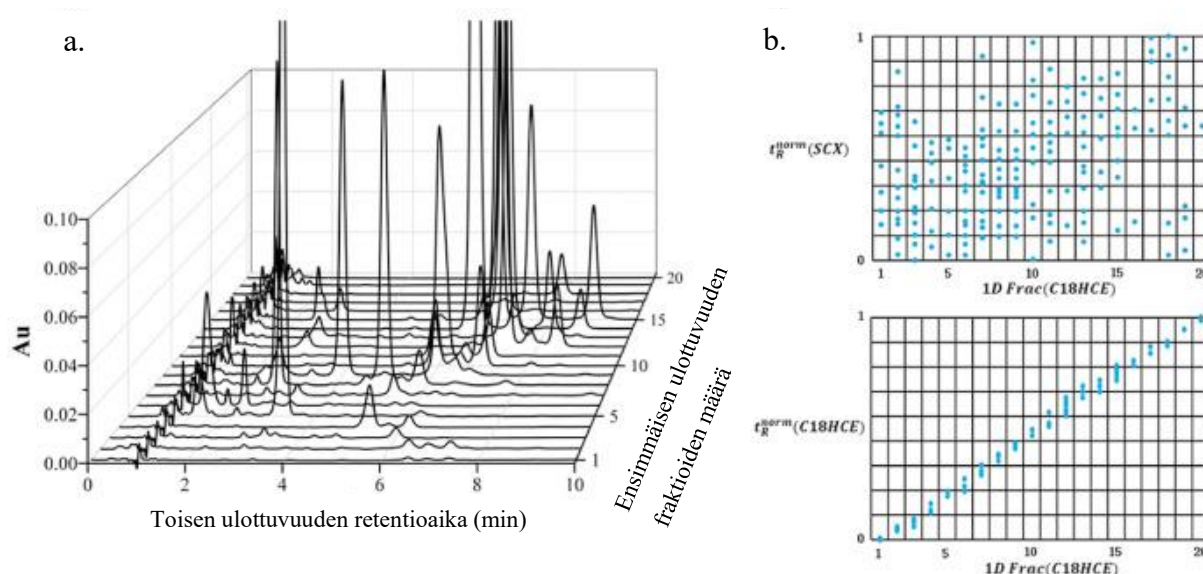
Alkaloidianalytiikassa vaikeinta on niiden rakenteellinen samankaltaisuus ja isomeerit, häntäminen, ko-elutio sekä alkaloidien oleminen osana moniyhdisteisiä kasviseoksia, joita kasvit tuottavat. Edellä mainittujen ongelmien vuoksi pelkästään yksivaiheiset kromatografiamenetelmät liitettynä MS- tai UV-detektoriin eivät aina riitä, vaan tarvitaan herkempiä ja analyysitavoiltaan monimutkaisempia menetelmiä.

Useamman ulottuvuuden nestekromatografiaa on esitetty ratkaisuksi osana vaikeasti erottuvien yhdisteiden, kuten alkaloidien, analytiikkaa. Kahden kromatografialaitteiston taktiikka parantaa kromatografista resoluutiota, yksittäisten piikkien erottuvuutta sekä erotusmenetelmän selektiivisyyttä (Guo et al. 2023). RP-LC-tekniikka on LC-tekniikoista käytetyin ja sitä hyödynnetäänkin yli 80 %:ssa käytetyissä 2D-LC-laitteistoissa ainakin toisena erotusmenetelmänä. Monimutkaisten seosten ja rakenteiden takia tarvitaan kuitenkin usein toiseen vaiheeseen eri erotusmenetelmään perustuva kolonni, jotta ensimmäisessä vaiheessa erottumattomat fraktiot erottuvat toisistaan selkeästi eri piikeillä (Bai et al. 2019). LC×LC-kromatografiassa piikkien intensiteetit ovat ihannetilanteessa ensimmäisessä ja toisessa vaiheessa erottuvien piikkien tulo (kaava 1):

$$n_{c,2D} = {}^1n_c \times {}^2n_c \quad (1)$$

, jossa $n_{c,2D}$ on kokonaispiikkikapasiteetti, 1n_c on ensimmäisen vaiheen piikkikapasiteetti ja 2n_c on toisen vaiheen piikkikapasiteetti. Laboratorio-olosuhteissa kaikissa analyysiajoissa syntyy kuitenkin jonkinlaista häviöitä, eikä todelliset piikkikapasiteetit vastaa teoreettisia kapasiteetteja (Carr et al. 2007, Kumar et al. 2023).

Ortogonaalisuudella, eli eri vaiheiden välisellä riippumattomuudella toisistaan on 2D-LC:ssa suuri merkitys ja sitä voidaankin pitää eräänlaisena 2D-tekniikan toimivuuden mittarina (Camenzuli & Schoenmakers, 2014). Mitä parempi ortogonaalisuus laitteistolla on, sitä tehokkaampi se on erotusmenetelmänä ja sitä parempi on sen kromatogrammien piikkikapasiteetti. Ortogonaalisuus on riippuvainen kolonnissa olevista kiinteistä ja liikkuvista faaseista, lämpötilasta sekä siitä, minkä tyyppisiin erotusmenetelmiin eri vaiheet perustuvat. 2D-laitteistolla, jonka ulottuvuuksilla on esimerkiksi erilaiset erottelutavat tai kolonneissa erilaiset faasiolosuhteet, on luontaisesti suurempi ortogonaalisuus (Guo et al. 2023). Esimerkiksi HILIC-kolonne perustuu hydrofiiliseen vuorovaikutukseen ja RP-kolonne puolestaan poolittomaan kiinteään ja pooliseen liikkuvaan faasiin (Arena et al., 2025). Alkaloidit käyttäytyvät siis eri tavoin eri kolonneissa ominaisuuksiensa perusteella, joten tekniikka tuottaa erilaiset retentioajat eri fraktioille. Kun tiettyä fraktiota vastaavat piikit yhdistetään kummankin ulottuvuuden osalta, saadaan parannettua piikkien intensiteettejä ja samalla eroteltua ne eri yhdisteitä vastaavat piikit, joilla esiintyi ko-eluutiota perinteisillä LC-menetelmillä. Kolonneissa olevat erotusmenetelmät siis täydentävät toisiaan, esimerkiksi piikkien intensiteettien osalta, mutta ne eivät ole riippuvaisia keskenään (Guo et al. 2023). Ortogonaalisuutta voidaan mitata esimerkiksi korrelaatiokerroinmenetelmällä (kuva 5a.), joka kuvaa analyytin pitoisuuden ja detektorille syntyvän signaalin suhdetta (Baldari et al. 2023) tai bin-laskennalla (kuva 5b.), jossa 2D-kromatogrammi jaetaan ruudukolle ”bin-alueiksi”, joista lasketaan piikkejä sisältävien alueiden prosenttiosuus (Gargano et al. 2021).



Kuva 5. 2D-LC-kromatogrammi alkaloideja sisältävästä kasvin *U. rhynchophylla* näytteestä (a.), kaksi erilaista hajontakaaviota eri vaiheiden ortogonaalisuuden arvioimiseen, joissa on hyödynnetty bin-laskentaa (b.). Kuvat on kopioitu lähteestä (Guo et al. 2023): reprinted with permission from *A guide of column selection for two-dimensional liquid chromatography method development of natural alkaloids*, Guo Z., Liang Z., Liu Y., Wang R., Xu Y., Yu D., Zhou H. Talanta 2023, vol. 251, p. 123738, doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123738. Copyright © 2026 with permission from Elsevier (licence number 6246560746866).

Varsinkin luonnollisilla alkaloideilla, niiden alaluokkien rakenteiden samankaltaisuuksien takia, kromatogrammin piikeissä esiintyy häntimistä perinteisillä LC-menetelmillä, mikä vaikeuttaa piikkien tulkintaa ja kohdeyhdisteiden muodostamien piikkien pohjalta niiden rakenteellista tunnistamista. Eri vaiheiden riippumattomuuden, ortogonaalisuuden, lisäksi häntiminen alkaloidien kromatogrammeissa on otettava huomioon 2D-laitteistossa ja esimerkiksi oikeanlaista detektoria valittaessa. Varsinkin RP-kromatografiassa häntiminen aiheuttaa heikkoa erotuskykyä, mikä voi johtaa huonoimmassa tilanteessa kahden eri yhdisteen samanaikaiseen eluoitumiseen varsinkin alkaloidien samankaltaisen rakenteen seurauksena (Guo et al. 2023). Hajoaminen johtuu analysoinnissa protonoitujen alkaloidien sekä kolonnissa olevien kiinteän faasin silanoliryhmien välisistä vuorovaikutuksista tai monipaikkaisesta hajoamisteoriasta (Guo et al. 2023), jonka mukaan absorboituva molekyyli voi miehittää useamman kohdan kiinteällä pinnalla (Budevski et al. 1979). 2D-LC:ssa toisen vaiheen virtaus tapahtuu ensimmäistä vaihetta nopeammin, jolloin myös piikit ovat kapeampia ja intensiivisempiä. Tällöin detektori havaitsee selkeämmät

signaalit, joten myös pienten pitoisuuksien alkaloidiyhdisteet voidaan havaita näytteestä (Arena et al., 2025).

Yksivaiheisen kromatografian tapauksessa, alkaloideja analysoidessa, hyödynnetään usein korkeaa pH-arvoa, jolla saadaan vähennettyä voimakasta kromatogrammille muodostamien piikkien häntimistä. Samalla pyritään minimoimaan vuorovaikutuksia emäksisten analyyttien sekä kolonnimateriaalissa olevien matalalla pH-arvoilla esiintyvien jäännösilanoliryhmien välillä. Eräässä tutkimuksessa (Liu et al. 2016) RP-kolonneilla varustettuun 2D-LC-laitteistoon säädettiin erilaiset pH-arvot, jolla tutkittiin 2D-LC:lle parempaa ortogonaalisuutta alkaloidianalytiikassa. Näytteenä toimi *Corydalis yanhusuo* -kasvista otettu juurinäyte, josta haluttiin tehdä kokonaisalkaloidianalyysi kattavalla RP×RP nestekromatografialla. Ensimmäisen vaiheen RP-kolonnein säädettiin emäksinen, 10,5 pH:n erotteluympäristö ammoniumhydroksidiliuoksella. Toisen vaiheen RP-kolonnissa oli positiivisesti varautunut pinta ja liikkuvana faasina toimi muurahaishappoliuos. Tutkimuksen tulokset osoittivat, että ortogonaalisuus parantui huomattavasti vaiheiden välillä, ja tehollinen piikkikapasiteetti kummankin vaiheen osalta sekä kokonaispiikkikapasiteetti lisääntyvät, kun pH-arvot erosivat vaiheiden kolonneissa. Tutkimuksen sovellusta voitaisiin hyvin käyttää vaikeasti erottuvien alkaloidien analyysimenetelmänä varsinkin yhdisteillä, jotka esimerkiksi ko-eluoituvat tai eivät muuten erotu perinteisissä LC-menetelmissä (Liu et al. 2016).

Monimutkaisen 2D-nestekromatografiatekniikan käyttäminen analyysimenetelmänä tuo monien etujensa lisäksi myös haasteita. Esimerkiksi analyysiaika on huomattavasti pidempi verrattuna perinteisiin nestekromatografisiin menetelmiin ja lisäksi eri vaiheiden välinen aikaero saattaa olla suuri, mikäli analysoitavia fraktioita on useampia. Myös liuottimen valinta, sen määrä sekä faasien yhteensopivuus tuottavat ongelmia, kun laitteistossa on useampi osio. Ensimmäisen vaiheen analyysissa tarvitaan liuotinta vain muutamia millilitroja, kun taas toisessa vaiheessa liuotinta voi kulua moninkertainen määrä ensimmäiseen vaiheeseen verrattuna. Yllä mainittujen haasteiden lisäksi varsinkin yhdistetyn 2D-LC:n laitesuunnittelu on monimutkaisempaa ja detektoriin yhdistetty tietokoneessa oleva kromatogrammien ja spektrien tulkintaohjelman on oltava tarpeeksi kehittynyt (Kumar et al. 2023).

5 Tulevaisuudennäkymät ja loppupäätelmät

Erotusmenetelmien epäsojivuus keskenään vaikeuttaa 2D-LC-laitteiston kolonnien valintaa, kun tavoitteena on tarpeeksi hyvä ortogonaalisuus. Ongelma voitaisiin ratkaista hyödyntämällä aktiivisia modulaatiotekniikoita (Arena et al. 2025), jossa voidaan säädellä laitteiston

parametrejä sen mukaan, miten detektori havaitsee signaalivasteet. Esimerkiksi aktiivinen liuotinmodulaatio (ASM, engl. active solvent modulation) sekä stationääri-faasiavusteinen modulaatio (SPAM, engl. stationary-phase-assisted modulation) vähentävät eri vaiheiden välisiä yhteensopivuusongelmia (Bos et al. 2022). ASM on venttiiliin perustuva menetelmä, jossa hyödynnetään ohitusventtiiliä, jonka avulla 1D-kolonnista tuleva eluentti laimennetaan 2D-kolonnille sopivaksi ennen sen siirtämistä (Cabooter et al. 2024). SPAM:ssa puolestaan 1D-kolonnilta ulostulevat analyytit kerätään suojapylvääseen ennen niiden kuljettamista 2D-kolonneihin. Modulaatiot lisäävät ortogonaalisuutta, joka puolestaan parantaa analyysien tuloksia (Bos et al. 2022).

Myös 2D-LC-laitteiston käytännöllisyys sekä kustannukset nousevat kysymyksiksi laitteistokehityksen kannalta. Varsinkin suoraliitännäiseen 2D-menetelmään perustuvat laitteistot ovat nykypäivänä vielä suhteellisen kalliita ja käyttöjärjestelmät monimutkaisia. Laitteiston kehityksen kannalta on tärkeää, että ohjelmistot ovat käyttäjäystävällisiä ja järjestelmän eri osat kehittyvät toisiinsa nähden tarpeeksi hyvässä suhteessa siten, ettei mikään osa jää kehitykseltään jälkeen (Arena et al. 2025).

2D-nestekromatografian hyödyntäminen luonnonyhdisteiden analytiikassa on lisääntynyt ja kehittynyt huomattavasti viime vuosien aikana sen positiivisten ominaisuuksien ja tarkempien lopputulosten ansioista. 2D-tekniikka parantaa vaikeasti puhdistettavien alkaloidien analytiikkaa lisäämällä selektiivisyyttä, piikkikapasiteettia ja -intensiteettiä sekä analyysimenetelmän herkkyyttä verrattuna perinteisiin yksivaiheisiin nestekromatografiamenetelmiin. Vaikka 2D-tekniikat ovat kehittyneet viime vuosina ja tulokset tarkentuneet, on vielä monia avoimia kysymyksiä, joiden ratkaiseminen vie 2D-nestekromatografian kohti yhä tehokkaampaa ja herkempää puhdistusmenetelmää alkaloideille sekä muille luonnonyhdisteille.

6 Lähdeluettelo

- Ahmad I. A. H., Blasko A., Clarke A., Fakih S. *Two-Dimensional Liquid Chromatography (2D-LC) in Pharmaceutical Analysis: Applications Beyond Increasing Peak Capacity*, 2018. *Chromatographia*, vol. 81, issue 3, p. 401-418.
<https://doi.org/10.1007/s10337-018-3474-8>
- Arena K., Cacciola F., Dugo P., Mondello L., Vinci R. L. *Exploration of comprehensive two-dimensional liquid chromatography: Theoretical aspects and practical*

- considerations - A tutorial*, 2025. *Journal of Chromatography Open*, vol. 7, p. 100222. <https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2025.100222>
- Bai X., Liu S. S., Liu Z. Y., Sun Z., L., Zheng Z., Yang K. *A novel two-dimensional liquid chromatography system for the simultaneous determination of three monoterpene indole alkaloids in biological matrices*, 2019. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 411, p. 3857-3870. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01859-2>
- Baldari G., Migliari S., Ruffini L., Sammartano A., Scarlattei M., Serritelli G. *Validation of the HPLC Analytical Method for the Determination of Chemical and Radiochemical Purity of Ga-68-DOTATATE*, 2023. *Indian Journal of Nuclear Medicine*, vol. 38, issue 1 p. 1-7. https://doi.org/10.4103/ijnm.ijnm_11_22
- Bhakta T., Dash S., Dey P., Gupta M., Kim H. S., Kumar A., Kundu A., Lee B. M. *Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids)*, 2020. *Recent Advances in Natural Products Analysis*, p. 505-567. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816455-6.00015-9>
- Bhambhani S., Giri A. P., Kondhare K. R. *Diversity in Chemical Structures and Biological Properties of Plant Alkaloids*, 2021. *Molecules*, vol. 26, issue 11, p. 3374. <https://doi.org/10.3390/molecules26113374>
- Bartel K., Bracher., Klaubmüller T., Lengauer F., Ngwa C. J., Pradel G., Reiß T. *Synthetic Analogs of the Alkaloid Cassiarin A with Enhanced Antimalarial Activity*, 2025. *Pharmaceuticals*, vol. 18, issue 7, p. 1018. <https://doi.org/10.3390/ph18071018>
- Bos T. S., den Uijl M. J., Pirok B. W. J., Roeland T., Schoenmakers P. J., van Bommel M. R. *Assessing the feasibility of stationary-phase-assisted modulation for two-dimensional liquid-chromatography separations*, 2022. *Journal of Chromatography A*, vol. 1679, p. 46338. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463388>
- Budevski E., Kashchiev D., Lorenz W. J., Staikov G., Van Der Eerden. *Mean field theory and monte carlo simulation of multi-site adsorption*, 1979. *Surface Science*, vol. 82, issue 2, p. 364-382. [https://doi.org/10.1016/0039-6028\(79\)90196-1](https://doi.org/10.1016/0039-6028(79)90196-1)
- Camenzuli M., Schoenmakers P. J. *A new measure of orthogonality for multi-dimensional chromatography*, 2014. *Analytica Chimica Acta*, vol. 838, p. 93-101. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.05.048>
- Cabooter D., Chapel S., de Witte P., Pardon M., Reis R. *Detailed comparison of in-house developed and commercially available heart-cutting and selective comprehensive two-dimensional liquid chromatography systems*, 2024. *Journal of Chromatography A*, vol. 1713, p. 464565. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464565>

- Carr P. W., Li X., Porter S. E. G., Rutan S. C., Stoll, D. R., Wang X., *Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography*, 2007. Journal of Chromatography A, vol. 1168, issues. 1-2, p. 3-43. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.08.054>
- Erni F., Frei R. W. *Two-dimensional column liquid chromatographic technique for resolution of complex mixtures*, 1978. Journal of Chromatography A, vol. 149, p. 561-569. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)81011-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)81011-0)
- Farrell K. W., Jordan M. A., Matsumoto B., Toso R. J., Wilson L. *Kinetic stabilization of microtubule dynamic instability in vitro by vinblastine*, 1993. Biochemistry Biochemistry vol. 32, issue 5, p. 1285–1293. <https://doi.org/10.1021/bi00056a013>
- Gargano A. F. G., Roca L. S., Schoenmakers. *Development of comprehensive two-dimensional low-flow liquid-chromatography setup coupled to high-resolution mass spectrometry for shotgun proteomics*, 2021. Analytica Chimica Acta, vol. 1156, p. 338349. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338349>
- Guo Z., Liang Z., Liu Y., Wang R., Xu Y., Yu D., Zhou H. *A guide of column selection for two-dimensional liquid chromatography method development of natural alkaloids*, 2023. Talanta, vol. 251, p. 123738. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123738>
- Kumar D., Kumar P., Pal S., Singh S. *Plant secondary metabolites in defense against phytopathogens: Mechanisms, biosynthesis, and applications*, 2025. Physiological and Molecular Plant Pathology, vol. 138, p. 102632. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2025.102639>
- Kumar G. K., Kumar K. V., Malarvannan M., Sudheeshna M. *2D Chromatography and 2D Spectroscopy in Analytical Chemistry: an Overview*, 2023. Journal of Analytical Chemistry vol. 78, issue 9, p. 1213-1230. <https://doi.org/10.1134/S1061934823090149>
- Letchuman S., Madhuranga H. D. T., Madhurangi, Premarathna A. D., Saravanan M. *Alkaloids unveiled: A comprehensive analysis of novel therapeutic properties, mechanisms, and plant-based innovations*, 2025. Intelligent Pharmacy, vol. 3, issue 4, p.268-276. <https://doi.org/10.1016/j.ipha.2024.09.007>
- Liu W., Meng Q., Shen H., Wang L., Wei X. *Analyses of Total Alkaloid Extract of Corydalis yanhusuo by Comprehensive RP × RP Liquid Chromatography with pH Difference*, 2016. Journal of Analytical Methods in Chemistry, vol. 2016, issue 1, p. 9752735. <https://doi.org/10.1155/2016/9752735>
- Taniszewski T. *Alkaloids – Secrets of life*, Elsevier: 2007, p. 14-204. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52736-3.X5000-4>