

NANONESTEKROMATOGRAFIA-MIKROSIRUSÄHKÖSUMUTUS-
TANDEMMASSASPEKTROMETRIA-MENETELMÄN
KEHITTÄMINEN VALITTUJEN STEROIDIEN MÄÄRITTÄMISEEN
PLASMASTA

Taija Saarelainen
Helsingin yliopisto
Farmasian tiedekunta
Farmaseuttisen kemian osasto

Toukokuu 2010

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET – UNIVERSITY OF HELSINKI

| | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Tiedekunta – Fakultet – Faculty Farmasian tiedekunta | | Osasto – Sektion – Department Farmaseuttisen kemian osasto | |
| Tekijä – Författare – Author Taija Saarelainen | | | |
| Työn nimi – Arbetets titel – Title Nanonestekromatografia-mikrosirusähkösumutus-tandemmassaspektrometria-menetelmän kehittäminen valittujen steroidien määrittämiseen plasmasta | | | |
| Oppiaine – Läroämne – Subject Farmaseuttinen kemia | | | |
| Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu | | Aika – Datum – Month and year Toukokuu 2010 | Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 57 |
| Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>Steroidihormonit osallistuvat moniin elintoimintoihin, kuten stressin sietoon sekä suola-vesitasapainon ja raskauden ylläpitoon. Niiden pitoisuudet elimistössä ovat yleensä erittäin alhaiset (alle ng/ml). Steroidihormonien biosynteesit ovat toisiinsa kytkettyjä ja muutokset keskinäisissä pitoisuussuhteissa voivat olla merkki sairaudesta. Analyysimenetelmillä, joilla voidaan samanaikaisesti määrittää usean eri steroidin pitoisuus, on tärkeä rooli steroidimetabolian osuuden selvittämisessä muun muassa syövän synnyssä.</p> <p>Erikoistyön tavoitteena oli kehittää herkkä ja selektiivinen kvantitointimenetelmä 16 erilaisen steroidin samanaikaiseen määrittämiseen plasmasta. Jotta saavutettaisiin hyvä herkkyys, päädyttiin käyttämään nanonestekromatografia-mikrosirusähkösumutus-tandemmassaspektrometria-menetelmää (nanoLC-μESI-MS/MS). Tutkimuksessa käytettiin mikrosirua, johon oli integroitu C₁₈-faasin esikolonne ja erotuskolonne sekä sähkösumutuskärki. Massaspektrometrinen parametrien optimointiin käytettiin erillistä optimointimikrosirua.</p> <p>Tutkimuksessa havaittiin, että steroidin rakenne vaikuttaa merkittävästi yhdisteen käyttäytymiseen sähkösumutuksessa. 4,5-eeeni-3-oni-rakenteellisten steroidien havaintoalarajat puhdasaineseoksessa olivat huomattavasti paremmat kuin steroidien, joiden rakenteessa ei ole konjugoituneita kaksoissidoksia (0,075–0,5 ng/ml ja 5–25 ng/ml vastaavasti). Valittu esikäsittelymenetelmä steroidien erottamiseksi plasmasta ei ollut hyvä, koska sillä pystyttiin uuttamaan vain noin kolmasosa yhdisteen todellisesta pitoisuudesta. Lisäksi plasmasta tullut taustakohina vaikeutti joidenkin yhdisteiden analysointia. Tämän seurauksena menetelmän kehittämistä jatkettiin kahdeksalla hyvin detektoitavalla 4,5-eeeni-3-oni-rakenteellisella steroidilla. Havaintoalarajat näille yhdisteille biologisessa matriisissa olivat 0,075–0,5 ng/ml. Validoidulla menetelmällä analysoitiin kahdeksan geneettisesti muunnellun ja seitsemän villin-tyyppin hiiren plasmanäytettä. Menetelmällä pystyttiin määrittämään aldosteronin, kortikosteronin ja androsteenidionin pitoisuudet.</p> <p>Kehitetty menetelmä ei täyttänyt kaikkia asetettuja tavoitteita. Jotta tavoitteeseen päästäisiin, täytyisi siirtyä käyttämään derivatisoituja yhdisteitä, vaihtaa laitteistoa tai kehittää kokonaan uusi kromatografiamenetelmä.</p> | | | |
| Avainsanat – Nyckelord – Keywords Steroidit, mikrosiru, nanonestekromatografia, massaspektrometria, sähkösumutus, plasma | | | |
| Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Farmaseuttisen kemian osasto | | | |
| Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Ohjaajat: Linda Ahonen ja Risto Kostiainen | | | |

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET – UNIVERSITY OF HELSINKI

| | | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|--|
| Tiedekunta – Fakultet – Faculty Faculty of Pharmacy | | Osasto – Sektion – Department Division of Pharmaceutical Chemistry | |
| Tekijä – Författare – Author Taija Saarelainen | | | |
| Työn nimi – Arbetets titel – Title Nano liquid chromatography-microchip electrospray ionization-tandem mass spectrometry method development for the analysis of selected steroids in plasma | | | |
| Oppiaine – Läroämne – Subject Pharmaceutical chemistry | | | |
| Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu | Aika – Datum – Month and year May 2010 | Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 57 | |
| Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>Steroid hormones are involved in many physiological functions such as stress response and the maintenance of salt-water balance and pregnancy. Concentrations of steroids in the body fluids are generally very low (below ng/ml). Steroid hormones are metabolically associated and changes in mutual concentration levels of different steroids may signify a disease. Methods that allow the measurement of various steroids simultaneously are of great importance in investigating the role of steroid metabolism for example in formation of cancer.</p> <p>The aim of this work was to develop a sensitive and selective method for simultaneous quantification of 16 steroids in plasma. Nano liquid chromatography-microchip electrospray ionization-tandem mass spectrometry (nanoLC-μESI-MS/MS) was used in order to achieve good sensitivity. C₁₈ enrichment column and separation column, and an electrospray tip were integrated onto the chip that was used in this work. Mass spectrometric parameters were optimized by using a MS calibration and diagnostic chip.</p> <p>It was noticed that the structure of steroids plays an important role on how the compound behave in electrospray ionization. Steroids with 4,5-ene-3-one-structure had much lower limits of detection than steroids without conjugated double bonds (0,075-0,5 ng/ml and 5-25 ng/ml respectively). The chosen sample pretreatment method to extract the steroids from plasma did not work properly, because it was able to extract only a third of the compound's real concentration. Analysis of some compounds was also difficult because of the background noise coming from plasma. The method development was therefore decided to continue with eight steroids that were well detectable and had 4,5-ene-3-one-structure. The limits of detection were 0,075-0,5 ng/ml in biological matrix for these compounds. Eight knock out and seven wild type mouse plasma samples were analyzed using the validated method. The method was able to quantify aldosterone, corticosterone and androstenedione.</p> <p>Developed method did not meet all the aims of this work. Derivatized compounds, different equipment or totally new method should be used in order to accomplish the aims.</p> | | | |
| Avainsanat – Nyckelord – Keywords Steroids, microchip, Nano liquid chromatography, mass spectrometry, electrospray ionization, plasma | | | |
| Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Division of Pharmaceutical Chemistry | | | |
| Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Supervisors: Linda Ahonen and Risto Kostainen | | | |

LYHENNELUETTELO

| | |
|------------------|-------------------------------------------|
| APCI | kemiallinen ionisaatio ilmanpaineessa |
| API | ilmanpaineionisaatio |
| APPI | fotoionisaatio ilmanpaineessa |
| BSA | naudan seerumin albumiini |
| CAH | synnynnäinen lisämunuaishyperplasia |
| CE | törmäysenergia |
| EI | elektronipommitusionisaatio |
| ESI | sähkösumutusionisaatio |
| GC | kaasukromatografia |
| H ₂ O | vesi |
| HPLC | korkean erotuskyvyn nestekromatografia |
| HSD | hydroksisteroidien dehydrogenaasi |
| ISTD | sisäinen standardi |
| KO | geneettisesti muunneltu (knock out) |
| LC | nestekromatografia |
| LLE | neste-neste uutto |
| LOD | havaintoalaraja |
| LOQ | määrittäjäalaraja |
| MS | massaspektrometria |
| MS/MS | tandemmassaspektrometria |
| MTBE | tert-butyylimetyylieetteri |
| <i>m/z</i> | massan ja varauksen suhde |
| μESI | sähkösumutusionisaatio mikrosirulla |
| Na | natrium |
| nanoLC | nanonestekromatografia |
| QqQ | kolmoiskvadrupoli |
| QTOF | kvadrupolilentoaika-analysointilaitteisto |
| R ² | korrelaatiokerroin |
| RIA | radioimmunoanalyysi |
| RSD % | suhteellinen keskihajonta |

| | |
|-------|---------------------------------|
| S/N | signaali-kohina-suhde |
| SPE | kiinteäfaasiuutto |
| SRM | valittujen reaktioiden seuranta |
| t_R | retentioaika |
| UV | ultravioletti |
| WT | villi-tyyppi (wild type) |

STEROIDIEN LYHENTEITÄ

| | |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 11-DC | 11-Deoksikortisoli (17,21-dihydroksipregn-4eeni-3,20-dioni) |
| 17-OH-PREG | 17-Hydroksipregnenoloni (3 β ,17 α -dihydroksipregn-5-en-20-oni) |
| 5 α -DHP | 5 α -Dihydroprogesteroni (5 α -pregnaani-3,20-dioni) |
| 5 α -THDOC | 5 α -Tetrahydrodeoksikortikosteroni (3 α -21-dihydroksi-5 α -pregnan-20-oni) |
| A | Aldosteroni (11 β ,21-dihydroksi-pregn-4-eeeni-3,18,20-trioni) |
| AN | Androsteenidioni (androst-4eeni-3,17-dioni) |
| AP | Allopregnanoloni (3 α -hydroksi-5 α -pregnan-20-oni) |
| d ₃ -T | d ₃ -Testosteroni (17 β -hydroksiandrost-4-en-3-oni-16,16,17-d ₃) |
| d ₄ -AP | d ₄ -Allopregnanoloni (3 α -hydroksi-5 α -pregnan-20-oni-17,21,21,21-d ₄) |
| CORT | Kortikosteroni (11 β ,21-dihydroksipregn-4-eeeni-3,20-dioni) |
| CS | Kortisoni (17 α ,21-dihydroksipregn-4-eeeni-3,11,20-trioni) |
| DHEA | Dehydroepiandrosteroni (3 β -hydroksiandrost-5-en-17-oni) |
| DHT | Dihydrotestosteroni (17 β -hydroksi-5 α -androstan-3-oni) |
| HC | Hydrokortisoni/Kortisoli (11 β ,17 α ,21-trihydroksipregn-4-eeeni,3,20-dioni) |
| IP | Isopregnanoloni / Epiallopregnanoloni (3 β -hydroksi-5 α -pregnan-20-oni) |
| PREG | Pregnenoloni (3 β -hydroksipregn-5-en-20-oni) |
| PROG | Progesteroni (pregn-4-eeeni-3,20-dioni) |
| T | Testosteroni (17 β -hydroksiandrost-4-en-3-oni) |

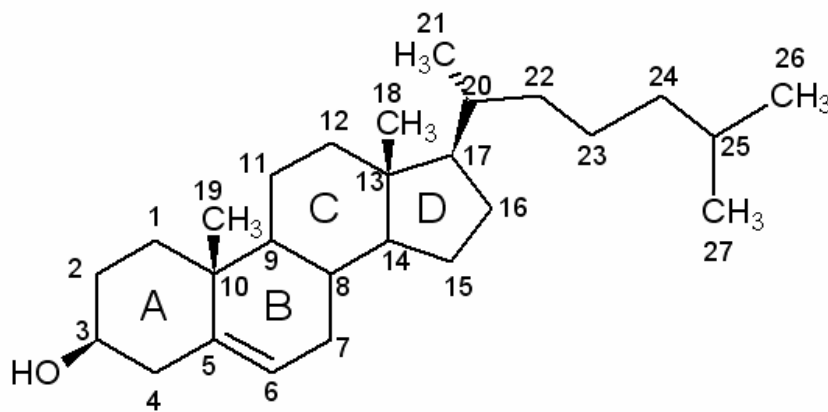
SISÄLLYSLUETTELO

| | | |
|-------|-------------------------------------------------------------|----|
| 1 | KIRJALLISUUSKATSAUS | 1 |
| 1.1 | Steroidien rakenne | 1 |
| 1.2 | Steroidihormonien biosynteesi, metabolia ja fysiologia..... | 2 |
| 1.3 | Steroidihormonien analytiikka..... | 5 |
| 1.3.1 | Kaasukromatografia-massaspektrometria..... | 7 |
| 1.3.2 | Nestekromatografia-massaspektrometria..... | 8 |
| 1.3.3 | Miniatyrisointi | 14 |
| 1.4 | Työn tarkoitus | 16 |
| 2 | KOKEELLINEN OSUUS | 17 |
| 2.1 | Reagenssit ja tutkittavat yhdisteet..... | 17 |
| 2.2 | Standardinäytteet ja ajoliuokset..... | 20 |
| 2.3 | Esikäsittely..... | 21 |
| 2.4 | Laitteistot | 22 |
| 2.4.1 | Nanonestekromatografi ja HPLC-mikrosiru..... | 22 |
| 2.4.2 | Massaspektrometri | 22 |
| 2.5 | Validointi | 23 |
| 2.6 | Autenttiset näytteet | 23 |
| 3 | TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU | 24 |
| 3.1 | Massaspektrometria | 24 |
| 3.1.1 | MS-optimointi..... | 24 |
| 3.1.2 | MS/MS-optimointi..... | 28 |
| 3.2 | Nanonestekromatografia | 32 |
| 3.3 | Esikäsittely..... | 38 |
| 3.4 | Validointi | 39 |
| 3.5 | Autenttisten näytteiden analysointi..... | 42 |
| 4 | JOHTOPÄÄTÖKSET | 44 |
| 5 | KIITOKSET..... | 46 |
| 6 | KIRJALLISUUSLUETTELO | 47 |

1 KIRJALLISUUSKATSAUS

1.1 Steroidien rakenne

Steroidit ovat joukko yhdisteitä, johon kuuluvat mm. sterolit, sappihapot, sukupuoli-hormonit, sydän glykosidit sekä lisämunuaisen kuorikerroksen tuottamat hormonit. Niille on yhteistä perhydro syklopentanofenantreni runko.¹ Steroidit voidaan jakaa kuuteen eri ryhmään hiilivetyrungon rakenteen mukaan: estraaneilla on 18 hiiliatomia, androstaaneilla 19, pregnaaneilla 21, kolaaneilla 24, kolestaaneilla ja D-vitamiinilla sekä sen johdannaisilla 27.² Tässä erikoistyössä keskitytään lähinnä androstaanien ja pregnaanien tutkimiseen.



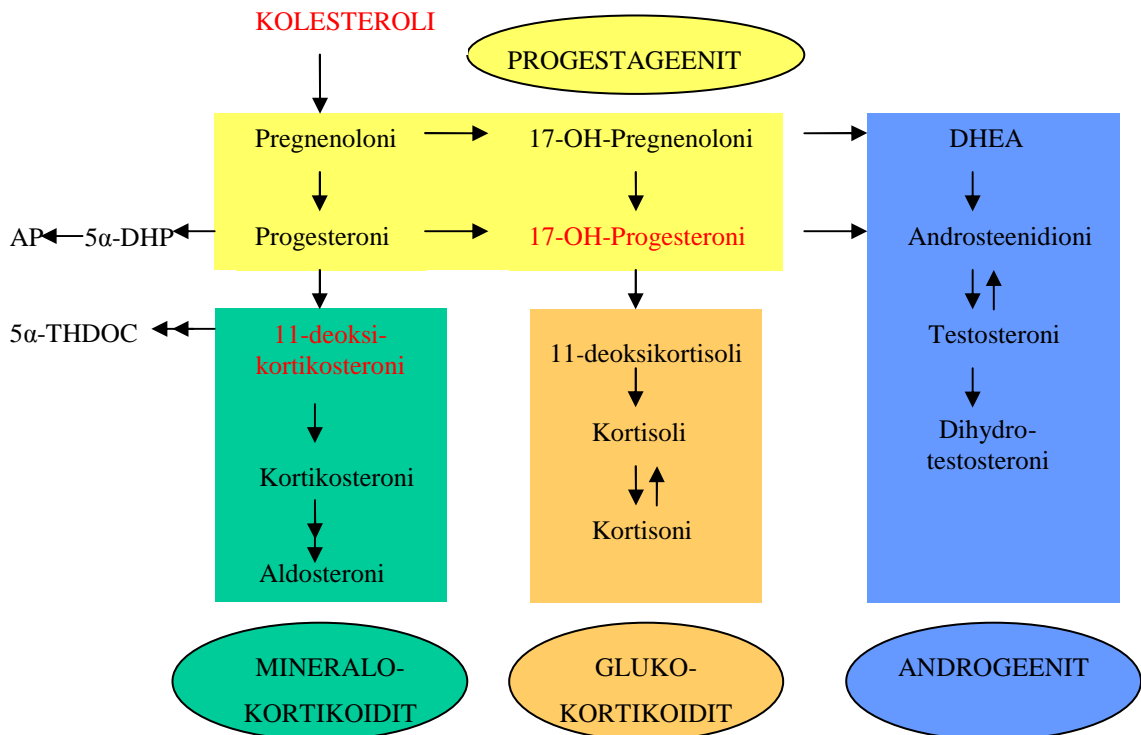
Kuva 1. Kolesterolin rakennekaava

Elimistön steroidihormonien lähtöaine on kolesteroli, jonka rakenne ja atomien numerointi on esitetty kuvassa 1. Steroidirungon kolmea sykloheksaanirengasta merkitään kirjaimilla A, B ja C ja syklopentaanirengasta kirjaimella D. Useilla steroideilla on renkaassa A tai B yksi tai useampi kaksoissidos.² Steroidin perusrakenteessa on kuusi asymmetriakeskusta (C-5, -8, -9, -10, -13 ja -14), jolloin mahdollisten stereoisomeerien määrä on 64. Kiraalisten hiilien ja täten stereoisomeerien lukumäärää kasvattaa runkoon liittyneet substituentit, jotka voivat sijoittua tasomaisen molekyylin ylä- tai alapuolelle (β - tai α -konfiguraatio). Funktionaalisista ryhmistä yleisimpiä ovat hydroksi- ja karbonyyliryhmät, jotka ovat steroidirungossa tyypillisesti paikoissa C-3, C-11, C-17 ja C-21. Rakenteestaan johtuen steroidimolekyylit ovat

suhteellisen poolittomia, ja siksi ne liukenevat yleensä hyvin orgaanisiin liuottimiin, kuten metanoliin.³ Steroidirungon hydrofobisuuden vuoksi steroidit liukenevat erittäin heikosti veteen.

1.2 Steroidihormonien biosynteesi, metabolia ja fysiologia

Steroidien biosynteesi elimistössä on monimutkainen prosessi ja se on tarkasti säännöstellä. Ensimmäinen, synteessin nopeutta rajoittava vaihe (rate-limiting step), on kolesterolin muuntuminen pregnenoloniksi.⁴ Tämä voi tapahtua vain tietyissä elimistön soluissa kiveksissä, munasarjoissa, keltarauhasessa, istukassa, lisämunuaisen kuorikerroksessa ja aivojen hermosoluissa.⁵ Synteesiin osallistuu joukko entsyymejä, joista tärkeimpiä ovat sytokromi P450-perhe sekä hydroksisteroidien dehydrogenaasit (hydroxysteroid dehydrogenase, HSD) ja reduktaasit. Solussa olevista entsyymeistä riippuu kuinka synteesi jatkuu ja mitä steroidia se voi valmistaa. Näin ollen sukupuolirauhasissa olevat entsyymit valmistavat pregnenolonista sukupuolihormoneja, kun taas lisämunuaisen kuorikerros valmistaa siitä gluko- ja minerolokortikoideja. Myös muut elimet, kuten maksa ja iho, voivat osallistua biologisesti aktiivisten steroidien valmistukseen metaboloimalla verenkierrossa olevia steroidien esiasteita.⁵ Tämän tutkimuksen kannalta tärkeimpien steroidihormonien biosynteesireitit on esitetty kuvassa 2.



Kuva 2. Tässä työssä tutkittavien steroidihormonien biosynteesireitit sekä vaikutustavan mukainen kategoria.^{4,6} Punaisella merkityt steroidit eivät ole mukana tutkimuksen kokeellisessa osuudessa. Lyhenteet: DHEA=dehydroepiandrosteroni, AP=allopregnanoloni, 5 α -DHP=5 α -dihydroprogesteroni, 5 α -THDOC=5 α -tetrahydrodeoksikortikosteroni.

Biologisesti aktiiviset steroidit sekä niiden esiasteet kuljetetaan kohdesoluihin endokriinisesti ja parakriinisesti.⁷ Lipofiilisinä yhdisteinä ne läpäisevät helposti soluseinämän ja siirtyvät verenkiertoon, missä suurin osa steroidihormoneista sitoutuu ei-kovalenttisesti seerumin proteiineihin, kuten albumiiniin ja globuliiniin. Kuitenkin pieni osa (2-10 %) steroideista pysyy vapaana ja yleensä vain tämä vapaa fraktio on biologisesti aktiivista, sillä se pystyy läpäisemään kohdesolun soluseinämän ja sitoutumaan solun sisällä olevaan reseptoriin.⁸ Klassisessa, genomi-välitteisessä, hormonin toiminnassa hormoni-reseptori-kompleksi siirtyy tumaan, jossa se säätelee kohdegeenin transkriptiota ja saa aikaan halutun vasteen.⁹ Tämä tapahtuu joskus jopa päivien viiveellä.¹⁰ Keskushermostoon vaikuttavat hormonit, niin sanotut neuroaktiiviset steroidit, saavat taasen aikaan nopean vasteen sitoutumalla soluseinämän neurotransmitterireseptoreihin. Steroidihormonien inaktivaatio tapahtuu pääosin maksassa, jolloin molekyyli tehdään hydrofiilisemmäksi hydroksylaatiolla, hapetus-pelkistys-reaktiolla tai liittämällä molekyyliin glukuronihappo tai sulfaattiryhmä.⁷ Inaktivoidut steroidit poistuvat elimistöstä sappihappoina sappeen tai munuaisten kautta virtsaan.

Taulukko 1. Steroidihormonien jaottelu hiilivetyrungon rakenteen ja vaikutustavan mukaan.^{2,4}

| Hiilten lkm | Hiilivetyrungon nimi | Vaikutustavan mukainen kategoria | Esimerkki yhdiste | Pääasiallinen vaikutus |
|--------------------|-----------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| C ₁₉ | Androstaani | Androgeeni | Testosteroni | Sukupuolitoiminnot |
| C ₂₁ | Pregnaani | Mineralokortikoidi Glukokortikoidi Progestageeni | Aldosteroni Kortisoli Progesteroni | Suola-vesi tasapaino Stressin sieto Prekursori muille hormoneille, raskauden ylläpito |

Steroidihormonit osallistuvat moniin elintärkeisiin fysiologisiin toimintoihin, kuten kasvuun, kehitykseen, stressin sietoon sekä suola-vesi-tasapainon ja raskauden ylläpitoon. Esimerkkejä tutkimuksen kannalta tärkeimmistä hormoneista ja niiden vaikutuksista sekä jaotteluperiaatteista on lueteltu taulukossa 1. Steroidit vaikuttavat kohde-elimen toimintoihin jo hyvin pieninä pitoisuuksina. Näin ollen plasmassa olevan steroidin pitoisuus on yleensä alle 100 ng/ml (Taulukko 2). Pitoisuuden luonnollista vaihtelua esiintyy esimerkiksi hydrokortisonilla vuorokauden ajan mukaan.¹¹ Sen pitoisuus aamulla kello 7 voi olla yli viisinkertainen verrattuna keskiyön pitoisuuteen. Sukupuolihormoneilla, kuten progesteronilla, esiintyy puolestaan pitoisuuden vaihtelua kuukautiskierron mukaan.¹² Normaalista poikkeavat steroidipitoisuudet voivat olla merkki sairaudesta. Erilaiset geenivirheet ja kasvaimet umpirauhasissa aiheuttavat ongelmia steroidien biosynteesiin, jolloin voidaan havaita joko yhden tai useamman steroidin osalta poikkeava pitoisuus plasmassa.^{4,13} Eri steroidien synteesit ovat toisiinsa kytkettyjä (Kuva 2), joten jos jonkun steroidin muodostus on syystä tai toisesta estynyt, voi toista steroidia muodostua liian paljon. Näin tapahtuu esimerkiksi synnynnäisessä lisämunuaishyperplasiassa (congenital adrenal hyperplasia, CAH), jossa potilailta puuttuu useimmiten entsyymi, joka muuttaa progesteronin 11-deoksikortikosteroniksi ja 17-hydroksiprogesteronin 11-deoksikortisoliksi.⁴ Näin ollen aldosteronin ja hydrokortisonin tuotanto estyy ja androgeenien tuotanto lisääntyy. Endokriinisten sairauksien tutkimisessa ja toteamisessa on siis eduksi, jos voidaan mitata samanaikaisesti useamman eri steroidin pitoisuus biologisessa näytteessä. Steroidiprofiilin määrittystä on käytetty kliinisessä tutkimustyössä muun muassa synnynnäisen lisämunuaishyperplasian ja lisämunuaisten vajaatoiminnan toteamiseen sekä kroonisen eturauhastulehduksen patologian selvittämiseen.¹⁴ Lisäksi esimerkiksi

eturauhaskudoksen steroidiprofiilin määrittämisellä voidaan tutkia eri androgeenien roolia eturauhassyövän synnyssä.¹⁵ Viime vuosina on tutkittu paljon neuroaktiivisten steroidien pitoisuuksia aivoissa sekä niiden roolia fysiologisissa ja patofysiologisissa toiminnoissa.¹⁶⁻²⁴ Esimerkiksi alzheimer-potilailla on havaittu olevan normaalia alhaisemmat steroidipitoisuudet aivoissa.²⁵ Analyysimenetelmillä, joilla voidaan samanaikaisesti määrittää usean eri steroidin pitoisuus, on tärkeä rooli niin endokriinisten sairauksien tutkimisessa kuin myös steroidimetabolian osuuden selvittämisessä eri tautien synnyssä.

Taulukko 2. Esimerkkejä steroidien pitoisuuksista ihmisen, rotan ja hiiren plasmassa. M=miehillä tai uroksilla, N=naisilla tai naarailla, R=kantava naaras

| Steroidi | Ihmisen plasma (ng/ml) | Rotan plasma (ng/ml) | Hiiren plasma (ng/ml) |
|------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Kortikosteroni | 0,8-8 ²⁶ | 17,6 ²⁷ | 20 ²⁷ |
| Allopregnanoloni | 0,07 ²² | 0,12 ²² | |
| Pregnanoloni | 4,18 ²² | 0,15 ²² | |
| Progesteroni | | 2,5 (M) 16 (N) 139,6 (R) ²⁸ | 9,9 (N) 35,5-112,7 (R) ²⁹ |
| Dehydroepiandrosteroni | 1,8 (N) ³⁰ | | 0,58 (N) ³¹ |
| Testosteroni | 2,7 (M) ²² 0,13 (N) ³⁰ | 2,64 ²² | 4,8 (M) ³² |
| Androsteenidioni | 7,1 (M) ³³ 0,36 (N) ³⁰ | 0,24-0,49 (M) ³⁴ 0,46 ³¹ | 0,14 (M) 0,23 (N) ³¹ |
| Aldosteroni | 0,04-0,18 ²⁶ | 0,08 ³⁵ | 0,27 ³⁶ |
| Hydrokortisoni | 25-100 ²⁶ | 3,3 (M) ³¹ | 4,0 (M) 2,2 (N) ³¹ |

1.3 Steroidihormonien analytiikkaa

Steroidihormonien kvantitatiivisen analyysimenetelmän kehittämiseen liittyy monta haastetta. Kuten jo aikaisemmin todettiin, steroidit esiintyvät biologisissa nesteissä ja kudoksissa sängen pieninä pitoisuuksina (Taulukko 2). Myös näytetilavuudet saattavat jäädä alhaisiksi, kun koe-eläiminä käytetään pienikokoisia jyrsojia, kuten rottia ja hiiriä. Steroidit ovat rakenteeltaan samankaltaisia, jolloin erotustekniikalta vaaditaan hyvää resoluutiota. Lisäksi steroidin erottaminen matriisista voi osoittautua haastavaksi. Esimerkiksi plasmassa on muita samankaltaisia lipidejä, jotka voivat esikäsittelyn aikana siirtyä steroidihormonien kanssa näytteeseen ja täten häiritä steroidien

analyysiä.³ Näin ollen analyysimenetelmän täytyy olla herkkä ja selektiivinen. Steroidien adsorptio lasin ja muovin pintaan voi aiheuttaa ongelmia luotettavaan kvantitointiin.³ Siksi steroidia sisältäviä näytteitä ei saisi haihduttaa täysin kuiviin.

Detektorin valintaa rajoittaa hyvien kromoforien puuttuminen steroidien rakenteessa. 1950-luvulla steroidien kvantitatiiviseen määrittämiseen käytettiin muun muassa ultravioletti (UV) spektroskopiaa.³⁷ Tällä menetelmällä pystytään kuitenkin mittaamaan vain steroideja, joiden rakenteessa on UV-valoa absorboivia ryhmiä, kuten konjugoituneita kaksoissidoksia. Lisäksi UV spektroskopian käyttöä rajoittaa sen sopivuus vain yksinkertaisille näytteille, jotka sisältävät muutamia analyyttejä. Mutta jos UV-detektorin yhdistää kromatografiseen erotukseen, voidaan sillä määrittää steroideja esimerkiksi virtsasta ng/ml pitoisuuksina.³⁸ Vaikka UV spektroskopia ei ole herkkä menetelmä, voidaan sitä hyödyntää esimerkiksi CAH-seulonnoissa ja lääkevalmisteiden stabiilisuusmäärittämisessä.³⁹ Nykyään steroidianalytiikassa käytetään kuitenkin detektorina useimmiten massaspektrometria (MS), koska se on herkkä ja se soveltuu myös erilaisten molekyylien analysoimiseen. Molekyyli saatetaan ionimuotoon käyttämällä eri ionisaatiotekniikoita ja syntyneen ionin massa/varaus-suhde analysoidaan. Massaspektrometria voidaan hyödyntää tuntemattoman molekyylin rakenteen määrittämisessä ja kvantitatiivisessa analytiikassa. Kun käytetään tandemmassaspektrometria (MS/MS), voidaan seurata molekyylin tyypillistä hajoamistuotetta, joka lisää entisestään spesifisyyttä ja herkkyyttä alentaen havaintoalarajoja verrattuna pelkkään MS-detektoriin. Yleisimpiä tandemmassaspektrometreja ovat kolmoiskvadrupoli (QqQ), kvadrupolilentoaika-analysaattori (QTOF) ja ioniloukku. Välineistön kehittymisen myötä massaspektrometrin käyttö on yleistynyt, sillä se voidaan kytkeä lukuisiin erilaisiin erotustekniikoihin kuten kaasus- ja nestekromatografiaan sekä kapillaarielektroforeesiin.¹⁰ Tänä päivänä käytetyimpiä analyysimenetelmiä steroidianalytiikassa ovat radioimmunoanalyysi (radioimmunoassay, RIA), kaasukromatografia-massaspektrometria (GC-MS) ja nestekromatografia-massaspektrometria (LC-MS).

Radioimmunoanalyysin käyttö steroidien kvantitoimisessa keksittiin 1970-luvulla, jonka seurauksena pystyttiin määrittämään myös alhaisia steroidipitoisuuksia.⁴⁰

Esimerkiksi allopregnanolonin havaintoalaraja seerumista Bicikovan työryhmineen kehittämällä menetelmällä on 20 pg.⁴¹ Immunologisia menetelmiä käytetään edelleen tutkimustyössä ja varsinkin laajasti kliinisessä laboratoriotyössä.⁴⁰ Radioimmunoanalyysin ongelmana on kuitenkin huono tarkkuus ja selektiivisyys vasta-aineen ristiinsitoutumisen vuoksi. Tämän vuoksi näytteelle täytyy suorittaa ennen analyysiä kattava esikäsitely, joka lisää työmäärää ja kuluttaa aikaa.¹⁰ Lisäksi menetelmä ei sovi steroidiprofiilin määrittämiseen, koska sillä voidaan analysoida kerrallaan vain yhden steroidihormonin pitoisuus.

1.3.1 Kaasukromatografia-massaspektrometria

Kaasukromatografia yhdistettynä massaspektrometriin tuli käyttöön steroidianalytiikassa 1960-luvun puolivälissä.³ Kaasukromatografialla saadaan yleensä aikaiseksi erinomainen erotus. Lisäksi GC-MS-menetelmä on herkkä ja sillä voidaan päästä alhaisiin määritysalarajoihin.^{22-24,42} Esimerkiksi Hubbard tutkimusryhmineen saavutti alle 1 pg /injektio havaintoalarajan virtsan kortisonille ja hydrokortisonille käyttämällä negatiivista kemiallista ionisaatiota.⁴² Yleisin käytetty ionisaatiomenetelmä GC-MS-steroidianalytiikassa on kuitenkin elektronipommitus (EI).³ GC-MS-menetelmää on käytetty laajasti muun muassa doping-analytiikassa sekä seulontaan että tuloksen varmistukseen.⁴³⁻⁴⁶ Marcos työtovereineen kehitti GC-MS/MS-menetelmän, jolla pystyttiin seulomaan 55 doping-ainetta virtsasta alle kahdeksassa minuutissa.⁴⁶ Lisäksi GC-MS-menetelmää käytetään kliinisessä diagnostiikassa, esimerkiksi synnyntäisen lisämunaishyperplasian toteamisessa,⁴⁷ sekä keskushermostossa syntetisoitujen steroidien, niin sanottujen neurosteroidien, analytiikassa.²²⁻²⁴ Yhtenä esimerkkinä voisi mainita Valleen työtovereineen tekemän tutkimuksen, jossa käytettiin elektronisieppaus-negatiivista ionisaatiota ja saavutettiin viidelle neurosteroidille 0,3 ng/ml määritysalaraja plasmasta.²⁴

GC-MS-menetelmän käytössä on kuitenkin useita ongelmakohtia. Kaasukromatografiassa analyytin täytyy olla haihtuva ja lämpöstabiili, sillä kromatografinen erotus tapahtuu kaasufaasissa korkeissa lämpötiloissa. Jos analyytillä ei ole luonnostaan näitä ominaisuuksia, täytyy molekyylistä tehdä johdannainen

derivatisoimalla. Tämä luonnollisesti lisää näytteen esikäsittelyvaiheita ja siihen kulunutta aikaa. Steroideista vain androgeenit ja estrogeenit voidaan analysoida GC-MS-menetelmällä ilman derivatisointia.³ Tällöinkin päädytään usein käyttämään derivatisointia resoluution parantamiseksi, ajoajan lyhentämiseksi ja veden lohkeamisen välttämiseksi. Erilaisille funktionaalisille ryhmille käytetään eri derivatisointireagensseja. Hydroksyyli-ryhmät voidaan tehdä trimetyylisilyyli-, tert-butyylisilyyli- tai perfluoroasyyli-johdannaisiksi käyttäen muun muassa N,O-bis(trimetyylisilyyli)trifluoroasetamidia, tert-butyylidimetyylisilyyliklorosilaania tai heptafluorobutyryylihydrogenidraattia, ja karbonyyli-ryhmät voidaan derivatisoida oksimeiksi käyttäen metoksiamiinihydrokloridia.^{3,10} Lisäksi GC-MS-menetelmissä steroidien sulfaatti- ja glukuronidikonjugaatteja ei voida analysoida sellaisenaan, vaan ne joudutaan hydrolysoimaan.^{23,48} Näin ollen biologinen näyte joudutaan jakamaan konjugoituihin ja konjugoitumattomiin steroideihin esimerkiksi kiinteäfaasiuutolla.²³ GC-MS-menetelmän ongelmakohtien vuoksi kiinnostus on kasvanut viime vuosina LC-MS-menetelmän kehittämiseen steroidien kvantitatiivisissa analyyseissä.

1.3.2 Nestekromatografia-massaspektrometria

Nestekromatografia yhdistettynä massaspektrometriin otettiin käyttöön steroidien kvantitoinnissa 1980-luvulla.¹⁰ Alussa menetelmä oli epätarkka, ja se toimi vain tietyillä virtausnopeuksilla ja eluentikoostumuksilla. Ongelmana oli nestekromatografian liittäminen vakuumissa toimivaan massaspektrometriin.³ Ratkaisun ongelmaan toi ilmanpaineessa tapahtuvan ionisaatiotekniikka (atmospheric pressure ionization, API), joka keksittiin jo vuonna 1973.⁴⁹ API-tekniikka tuli yleiseen käyttöön kuitenkin vasta 1990-luvun alussa, jonka jälkeen LC-MS-menetelmää on käytetty laajasti steroidien kvantitoinnissa,^{16-19,50-57} ympäristöanalytiikassa,^{58,59} lääkekehityksessä⁶⁰ ja biomolekyylien karakterisoinnissa.⁶¹ Myös massaspektrometrien hintojen alentuminen ja käytön helpottuminen ovat olleet syynä LC-MS-menetelmän yleistymiseen. Tänä päivänä menetelmää pidetään yhtenä tehokkaimmista analyttisistä menetelmistä, joka soveltuu hyvin myös usean rakenteeltaan samankaltaisen yhdisteen samanaikaiseen analyysiin. LC-MS-menetelmällä voidaan saavuttaa yhtä hyvä herkkyys kuin GC-MS-menetelmällä ja radioimmunoanalyysillä.^{62,63} Nestekromatografian yhdistäminen tandemmassa-

spektrometriin (LC-MS/MS) lisää menetelmän herkkyyttä ja spesifisyyttä verrattuna LC-MS-menetelmään matriisista tulevan taustan vähenemisen vuoksi. Esimerkiksi Leinonen työtovereineen saavutti 2-10 kertaa alhaisemman havaintoalarajan virtsan anabolisille steroideille tandemmassaspektrometrillä kuin massaspektrometrillä.⁶⁴

LC-MS-menetelmä sopii hyvin myös haihtumattomien tai polaaristen yhdisteiden kvantitointiin toisin kuin GC-MS.³ Nestekromatografiassa ei tarvitse käyttää korkeita lämpötiloja, jolloin termolabiilien yhdisteiden ja steroidikonjugaattien analysointi sellaisenaan on mahdollista. Näin ollen näytteen esikäsittely on yksinkertaisempaa ja kuluttaa vähemmän aikaa kuin GC-MS-menetelmän näytteen esikäsittely. LC-MS-menetelmässä käytetään joskus derivatisointia herkkyyden ja selektiivisyyden parantamiseksi. Esimerkiksi Higashin työryhmä derivatisoi pregnenolonin, progesteronin, 5 α -dihydroprogesteronin, allopregnanolonin ja isopregnanolonin 2-nitro-4-trifluorometyylifenyyli-hydratsinilla, jolloin herkkyys parani 20-kertaisesti.²⁰ Tämän seurauksena aivojen alhaiset steroidipitoisuudet saatiin määritettyä. Sama työryhmä kehitti uuden derivatisointireagenssin karbonyyliryhmän sisältäville steroideille ja saavutti 70–1600-kertaa paremman herkkyyden verrattuna derivatisoimattomiin steroideihin.⁶⁵ Derivatisoinnissa on kuitenkin omat ongelmansa. Derivatisointiprosessit voivat olla työläitä ja aikaavieviä, jonka seurauksena näytteen kokonaisanalysointiaika kasvaa. Derivatisointi ei sovellu universaalien menetelmien kehittämiseen, sillä ei ole universaalia derivatisointireagenssia. Derivatisoitaessa tarkkuus voi huonontua, kun esikäsittelyprosessiin tulee lisävaiheita.¹⁴ Näin ollen usean eri steroidin tarkkaan analysoimiseen samalla ajokerralla olisi hyvä käyttää LC-MS/MS-menetelmää ilman derivatisointia. Uuden LC-MS/MS-menetelmän kehittämiseen kuuluu muun muassa näytteelle ja analyyteille sopivan esikäsittelyn, kolonnin, eluentikoostumuksen ja ionisaatiomenetelmän valitseminen.

Esikäsittelymenetelmiä

Analyytin erottamiseen biologisesta matriisista voidaan käyttää lukuisia eri menetelmiä. Näistä yleisimpiä steroidianalytiikassa ovat neste-neste uutto (liquid-liquid extraction, LLE)^{21,51,53-55,57,66} ja kiinteäfaasiuutto (solid-phase extraction, SPE).^{52,63,67-69} Esikäsitte-

lyn aikana menetetään aina osa tutkittavista yhdisteistä riippumatta esikäsitteilyn valinnasta. Jotta voitaisiin varmuudella tietää menetetyt analyytin suuruus, täytyy uutta menetelmää kehitettäessä tutkia esikäsitteilyn saanto. Tämä käy parhaiten käyttämällä sisäistä standardia (internal standard, ISTD), joka pitäisi lisätä näytteeseen jo esikäsitteilyn alussa. Sisäisen standardin pitäisi käyttäytyä mahdollisimman samankaltaisesti kuin tutkittavat yhdisteet. Toisin sanoen, esimerkiksi ISTD:n sitoutuminen plasman proteiineihin pitäisi olla samanlainen kuin tutkittavien steroidien. Lisäksi sisäisellä standardilla tulisi olla samankaltaiset fysikokemialliset ominaisuudet ja sen tulisi eluoitua analyytin lähellä, mutta kuitenkin olla erotettavissa tutkittavista yhdisteistä. Näin ollen deuteroidut yhdisteet ovat ideaaleja sisäisiä standardeja, sillä niillä on samanlaiset kemialliset ominaisuudet ja ne pystytään erottamaan analyyteistä massaspektrometrisesti eri massaluvun perusteella.

Neste-neste-uutto oli käytetyin uuttomenetelmä steroidianalytiikan alkuvuosina.¹⁰ Sen käyttö on kuitenkin vähentynyt tehokkaampien uuttomenetelmien tullessa markkinoille. Uuttoliuotin pitäisi valita niin, että sen polaarisuus vastaisi analyyttien polaarisuutta ja että vain tutkittavat steroidit liukenisivat siihen. Käytännössä tämä on mahdotonta, sillä usein matriisissa olevat muut lipidit uuttuvat yhdessä steroidien kanssa häiriten steroidien analyysia. Yleisimpiä uuttoliuottimia ovat muun muassa metanoli, asetonitriili, etyyliasettaatti ja heksaani.^{21,51,53-55,66} Myös tert-butyylimetyylietteriä (MTBE) on käytetty joissakin tutkimuksissa steroidien uuttamiseen plasmasta.^{70,71} Joskus parhaimpaan tulokseen päädytään käyttämällä eri liuottimien sekoituksia. Esimerkiksi etyyliasettaatti-heksaani-seoksia on käytetty varsinkin testosteronin ja dihydrotestosteronin uuttamiseen biologisista nesteistä.^{54,55,66} Orgaanisen liuottimen lisäämisellä näytteeseen saadaan myös steroidien ei-kovalenttinen sidos proteiineihin katkeamaan. Esimerkiksi Guo työryhmineen käytti asetonitriiliä proteiinien denaturoimiseen ja yhdeksän eri steroidien uuttamiseen plasmasta.⁵¹ Proteiinien saostamista orgaanisilla liuottimilla voidaan käyttää myös alustavana esikäsitteilymenetelmänä ennen kiinteäfaasiuuttoa.^{52,68,69} Koska LLE:lla saadaan uutettua useita steroideja samanaikaisesti, voidaan sitä hyvin käyttää esikäsitteilymenetelmänä steroidiprofiilin määrittämisessä.^{51,53} Esimerkiksi Harwood työryhmineen käytti heksaani-etyyliasettaatti-seosta (3:2) androgeenien ja estrogeenien

samanaikaiseen uuttamiseen seerumista.⁵³ Työryhmä kokeili tutkimuksessaan myös proteiinien saostamista asetonitriilillä, mutta huomasi heksaani-etyyliasetaatti-uuton tuottavan puhtaamman uutoksen ja paremman herkkyuden. LLE:n huonona puolena on pidetty myrkyllisten ja haihtuvien orgaanisten liuottimien käsittelyä ja suurta kulutusta.¹⁰ Kuitenkin esimerkiksi Shiraishi työtovereineen päätyi käyttämään LLE:ta tutkimuksessaan, sillä SPE kulutti enemmän eluenteja ja aikaa sekä saanto oli vain puolet siitä mitä LLE:llä.⁵⁵

Kiinteäfaasiuutto tuli markkinoille 1980-luvun alussa ja sen jälkeen se on saavuttanut laajan suosion steroidianalytiikan esikäsittelymenetelmänä.¹⁰ Yleensä SPE:lla saavutetaan parempi saanto ja näytteenkäsittelykapasiteetti sekä pienempi eluenttikulutus ja näytetilavuus kuin LLE:lla. SPE:ssa tutkittavat yhdisteet retentoituvat kiinteään faasiin ja epäpuhtaudet saadaan huuhdottua pois sopivilla eluenteilla. Nykyisin on tarjolla laaja valikoima erilaisia stationäärifaaseja, joista C₁₈ on yksi yleisimmin käytetyistä steroidianalytiikassa.^{22-24,72} SPE on suhteellisen helppo käyttää ja toiminnan pystyy helposti automatisoimaan.⁷³ Automatisointi säästää aikaa ja lisää näytteenkäsittelykapasiteettia, kun useita näytteitä voidaan käsitellä yhtä aikaa. Esimerkiksi Rule ja Henion käyttivät 96-kuoppaista kiinteäfaasiuuttoa virtsan progesteronin analysoimiseen ja tällä tavalla pystyivät analysoimaan 384 näytettä vuorokaudessa.⁷⁴ SPE soveltuu myös usean eri steroidin uuttamiseen. Cegralek työryhmineen pystyi uuttamaan asetonitriilisaostuksen jälkeen 13 steroidia on-line kiinteäfaasiuutolla saannon ollessa 78–111%.⁷⁵ Myös toisen polven SPE – materiaaleja, kuten partikkeleilla pakattuja ohuita kalvoja, on kokeiltu steroidien uuttamiseen.⁷⁶ Lensmeyer työtovereineen kehitti ohuen SPE-kalvon, joka oli pakattu pienillä C₈ – silikapartikkeleilla, ja saavutti 5-kertaa paremman herkkyuden kortisonille, hydrokortisonille, kortikosteronille, prednisonille ja prednisolonille kuin isoilla C₈ – silikapartikkeleilla pakatuilla SPE-patruunoilla.

Kolonnit ja eluentit

Uutta LC/MS-menetelmää kehitettäessä kannattaa ottaa huomioon, että sopivan kolonnin ja eluentin valinnoilla voidaan vaikuttaa kromatografiseen erotukseen.

Nykyisin steroidianalytiikassa käytetään enimmäkseen käänteisfaasikolonneja, jotka on pakattu 1,7-5 μm C₈- tai C₁₈-silikapartikkeleilla.^{16,51-53,68} Täydellisen erotuksen aikaansaaminen useille eri steroideille voi kuitenkin osoittautua haastavaksi, sillä samanlaisen polarisuuden omaavat steroidit eluoituvat yleensä samaan aikaan ryhmissä.³ Tällaisen laajan steroidijoukon erotukseen sopii parhaiten gradienttiajo. Steroidianalytiikassa eluenteina käytetään yleisimmin metanoli-vesi- ja asetonitrili-vesi-seoksia. Lisäksi eluenttiseokseen voidaan lisätä ionisaatiota parantavia aineita, kuten etikkahappoa, muurahaishappoa, ammoniumhydroksidia, -asetaattia tai -formaattia. Eluenttikoostumuksen on havaittu vaikuttavan merkittävästi ionisaatiotehokkuuteen ilmanpaineessa tapahtuvissa ionisaatiomenetelmissä.⁷⁷

Ionisointi normaali-ilmanpaineessa

Ilmanpaineionisaation kolme yleisimmin käytettyä tekniikka ovat sähkösumutus (electrospray ionization, ESI),^{19,20,55,65,78} kemiallinen ionisaatio ilmanpaineessa (atmospheric pressure chemical ionization, APCI),^{17,18,57} ja fotoionisaatio ilmanpaineessa (atmospheric pressure photoionization, APPI).⁵¹⁻⁵³ ESI sopii hyvin polaaristen yhdisteiden analysointiin, kun taas neutraalit tai vähän polaariset steroidit saadaan ionisoitua parhaiten käyttämällä APCI:a tai APPI:a.⁵¹ ESI on pehmeä ionisointitekniikka ja MS-spektrissä nähdään usein positiivi-ionimoodissa protonoitunut molekyyli ja negatiivi-ionimoodissa deprotonoitunut molekyyli.^{19,54,78} APCI:ssa ja APPI:ssa ionisaatioprosessi on energisempi ja yhdisteiden fragmentoituminen on voimakkaampaa kuin ESI:ssä.^{79,80}

Sähkösumutusionisaatiota on käytetty muun muassa polaaristen steroidikonjugaattien analysoimiseen.⁵⁰ ESI:lla saavutetaan yleensä paras herkkyys, kun analyytti ionisoituu jo ajoliuoksessa.⁸¹ Tähän voidaan vaikuttaa muun muassa säätämällä ajoliuoksen pH:ta.⁷⁷ ESI:n ionisaatioprosessi on kuitenkin monimutkainen ja ionisaatiotehokkuuteen vaikuttaa monta tekijää, kuten ajoliuoksen koostumus, analyytin kemialliset ja fysikaaliset ominaisuudet sekä laitteiston operointiparametrit. Konjugoitumattomat steroidit, joilla on 4,5-ene-3-oni-rakenne, saadaan ionisoitua ESI:lla suhteellisen hyvin.¹⁹ Näiden steroidien epätavallisen korkea emäksisyys johtuu

varauksen delokalisoitumisesta ja protonoituneen molekyylin stabilisuudesta.⁸² Esimerkiksi Higashi työryhmineen käytti ESI:ä 4,5-enei-3-oni-rakenteellisten steroidien ionisoitiin ja saavutti androsteenidionin, testosteronin ja progesteronin havaintoalarajaksi aivoista 0,05 ng/g.¹⁹ Neutraalit steroidit, joilla ei ole 4,5-enei-3-oni-rakennetta, voidaan ionisoida kaasufaasissa esimerkiksi ammoniumadduktin muodostuksella, kun ajoliuokseen lisätään ammoniumasetaattia.⁷⁷ Kuitenkin esimerkiksi Cai ja Syage havaitsivat tutkiessaan lipidejä ESI:lla, APCI:lla ja APPI:lla, että ESI:ssa ammoniumadduktien signaali oli epästabiili ja aiheutti joko epälineaarisen vasteen tai huomattavasti muita ionisaatiomenetelmiä kapeamman lineaarisuusalueen.⁸³

APCI:ssa käytetään suhteellisen korkeita lämpötiloja analyttien haihduttamiseen (300–500 °C), joten tutkittavan yhdisteen täytyy olla suhteellisen lämpöstabiili.⁷⁷ Verrattuna ESI:in, APCI:lla saadaan ionisoitua paremmin myös neutraalit tai vähän polaariset yhdisteet. Ceglarek työryhmineen päätyi käyttämään APCI:a steroidiprofiilin määrittämisessä plasmasta, sillä se kykeni parhaiten ionisoimaan 13 tutkimuksessa mukana ollutta steroidia.⁷⁵ APCI:lla on saavutettu ESI:ä parempi herkkyys myös kortikosteronien analyysissä.⁵⁶ Ionisaatioteho saattaa kuitenkin jäädä suhteellisen alhaiseksi, jolloin herkkyyden parantamiseksi on käytetty derivatisointia.^{17,18} Esimerkiksi Higashi työryhmineen derivatisoi tetrahydrokortikosteronin isomeerit, jolloin herkkyys parani 60-kertaisesti.¹⁸

APPI LC-MS:ssa tuli markkinoille vuonna 2000,⁸⁴ ja se on saavuttanut nopeasti suosion myös steroidien analysoimisessa.⁵¹⁻⁵³ APPI:lla voidaan ionisoida neutraaleja yhdisteitä paremmin kuin ESI:lla tai APCI:lla, ja näin ollen saavuttaa parempi herkkyys.⁵¹ Cai ja Syage vertailivat ESI:a, APCI:a ja APPI:a lipidien tutkimisessa ja havaitsivat, että APPI on 2-4 kertaa herkempi kuin APCI ja paljon herkempi kuin ESI.⁸³ APPI:a on käytetty myös steroidiprofiilin määrittämiseen.^{51,52} Esimerkiksi Guo työtovereineen pystyi määrittämään samanaikaisesti 12 steroidin pitoisuuden plasmasta havaintoalarajojen ollessa 1,5–10 pg/ml.⁵²

1.3.3 Miniaturisointi

Analyttisen kemian uusin kehityssuunta viimeisen parinkymmenen vuoden aikana on ollut perinteisten analyysimenetelmien miniaturisointi.⁸⁵ Miniaturisoinnilla tavoitellaan erittäin pienten näytemäärien nopeata ja herkkää analyysiä. Päämääränä on kehittää automatisoituja laitteistoja, joihin on integroituna koko analyysin eri vaiheet, kuten näytteen esikäsittely, kemialliset reaktiot, analyttinen erotus, detektointi ja tiedon käsittely. Pieniä mikrosiruja on kätevä kantaa mukana ja ne voivat olla kertakäyttöisiä. Miniaturisoinnilta odotetaan myös kasvanutta analysointinopeutta. Mikrosiruihin voi rakentaa rinnakkaisia näytteenkäsittelykanavia, jotka lisäävät entisestään analysointikapasiteettia. Miniaturisoinnin tavoitteena on myös näytteen ja reagenssien kulutuksen vähentyminen. Miniaturisoituja laitteistoja on käytetty muun muassa aminohappojen, peptidien, proteiinien ja DNA:n analysointiin. Tutkittavien yhdisteiden erotukseen on useimmiten käytetty kapillaarielektroforeesia, koska sen virtausnopeus sopii hyvin mikrosirun mittakaavaan.⁸⁶ Vaikka nestekromatografinen erotus mikrosirulla on vaikeampi toteuttaa kuin kapillaarielektroforeettinen erotus, on sitä käytetty esimerkiksi proteomiikassa.^{85,87-90} Alussa miniaturisoiduissa laitteistoissa käytettiin lähinnä fluoresenssidetektoria tai elektrokemiallista detektoria.⁸⁵ Kuluneella vuosikymmenellä on kuitenkin keskitytty massaspektrometrinen menetelmien miniaturisointiin. Kiinnostuksen kohteena on ollut mm. ionilähteiden miniaturisointi. Yleisin mikrosiruilla käytetty ionisaatiomenetelmä on ESI. Mikrosiruilla käytetyt virtausnopeudet ($\leq \mu\text{l}/\text{min}$) sopivat ideaalisesti hyvän herkkyuden saavuttamiseen ESI-MS:lla. Virtausnopeuden alentuessa ionisaatio tehostuu ja ionien siirtyminen massaspektrometriin paranee.⁹¹ Wilm ja Mann kehittivät vuonna 1994 nano-ESI-ionilähteen, jossa alhaisen virtausnopeuden (noin 20 nl/min) saavuttamiseksi käytettiin ohutta kapillaaria.⁹² Kyseisellä nano-ESI-ionilähteellä pystyttiin määrittämään proteiinien sekvenssejä puhtasainestandeilla jopa alle 5 fmol/ μl pitoisuudesta. Nykyisin nano-sähkösumun aikaansaamiseksi voidaan käyttää myös kaupallisia mikrosiruja, joihin on integroitu erotuskolonne ja ESI-lähde.⁹¹

Miniatyrisointi steroidianalytiikassa

Myös steroidianalytiikassa on havaittu, että nano-ESI-lähde tarjoaa hyvän herkkyuden.^{93,94} Esimerkiksi Chatman työtovereineen saavutti pregnenoloni- ja allopregnanolonisulfaatin havaintoalarajaksi 200 amol/ μ l biologisista nesteistä käyttämällä nano-ESI-lähdettä.⁹⁴ Myös nestekromatografiakolonneja on miniatyrisoitu paremman herkkyuden aikaansaamiseksi.^{95,96} Nanonestekromatografia (nanoLC)-ESI-massaspektrometrilla voidaan saavuttaa alhaisemmat määritysalarajat kuin perinteisellä LC-ESI-MS-menetelmällä, sillä analyyttien konsentraatio on suurempi eluoituviissa piikeissä ja alhaisilla virtausnopeuksilla ionisaatiotehokkuus on parempi.⁹⁵ Esimerkiksi Liu työtovereineen tutki neurosteroideja rotan aivoista nanoLC-ESI-MS/MS-menetelmällä ja saavutti derivatisoidulle steroideille (d_3 -testosteronille, pregnenolonille, dehydroepiandrosteronille, pregnanolonille ja progesteronille) 0,1–0,5 pg/injektio havaintoalarajat puhtasaineseoksesta. Steroideja on analysoitu myös mikrosiruilla, vaikka niiden käyttö steroidianalytiikassa on vielä harvinaista.^{97,98} Koutnyn tutkimusryhmä kehitti mikrosirulla olevan elektroforeettisen immunoanalyysimenetelmän seerumin hydrokortisonin määrittämiseen.⁹⁷ Shen työtovereineen käytti taasen mikrosirulla olevaa misellaarista elektrokineettistä kromatografiaa kortisonin, hydrokortisonin, progesteronin, 17-hydroksiprogesteronin ja korteksolonin erottamiseen.⁹⁸ Yhdisteet detektoitiin UV-detektorilla ja havaintoalarajat puhtasaineseoksesta olivat steroidista riippuen 3,89–8,70 μ g/ml. Steroideja on käytetty myös poolittomina malliyhdisteinä uusien mikrosiruionisaatiotekniikoiden kehittämiseen Helsingin yliopistossa.⁹⁹⁻¹⁰¹ Esimerkiksi Östman et al. kehitti uuden mikrosiru-APCI-lähteen ja tutki sen toimivuutta testosteronilla, dehydroepiandrosteronilla, pregnenolonilla ja progesteronilla.¹⁰⁰ Mikrosirulla saavutetut havaintoalarajat ilman biologista matriisia (0,01–0,5 μ mol/l) olivat kertaluokkaa paremmat kuin normaali APCI-lähteellä.

Mikrosiruilla tapahtuva näytteiden esikäsittely on toistaiseksi erittäin harvinaista. Thorslund kehitti tutkimusryhmineen mikrosirun, jota voidaan käyttää verinäytteiden esikäsittelyyn ja testosteronin seulontaan.¹⁰² Toistaiseksi ei ole myöskään julkaistu yhtään tutkimusta, jossa steroidien nestekromatografinen erotus ja ionisaatio olisivat tapahtuneet samalla mikrosirulla. Tässä tutkimuksessa steroidien analysoimiseen

käytetään kaupallista mikrosirua, johon on integroitu korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC)-erotuskolonne ja sähkösumutuslähde. Samanlaista mikrosirua on käytetty aikaisemmin lähinnä proteiinien, peptidien, glykoproteiinien ja oligosakkaridien analysoimisessa.^{87,88,90,103-108}

1.4 Työn tarkoitus

Kuten jo aikaisemmin todettiin, eri steroidihormonien biosynteesi on toisiinsa kytketty ja niiden keskinäisissä pitoisuussuhteissa tapahtuneet muutokset voivat olla merkki sairaudesta. Näin ollen analyysimenetelmillä, joilla voidaan samanaikaisesti määrittää useamman steroidin pitoisuus, saadaan luotettavampi ja laajempi kuva elimistön toiminnasta. Tällaiselle analyysimenetelmälle on tarvetta, jotta voidaan esimerkiksi selvittää steroidimetabolian ja siihen osallistuvien entsyymien roolia eri taudeissa sekä kehittää uusia lääkkeitä.

Steroideja on perinteisesti analysoitu käyttäen radioimmunoanalyysia ja GC-MS-menetelmiä. Radioimmunoanalyysillä ei voida kuitenkaan analysoida kuin yhden steroidin pitoisuus kerrallaan. GC-MS-menetelmissä steroidit joudutaan usein derivatisoimaan ja universaalia derivatisointireagenssia ei ole olemassa. Kirjallisuudesta löytyy myös useita erilaisia LC-MS-menetelmiä steroidien kvantitointiin biologisesta matriisista.^{16-21,51-56,72,75,109-113} Herkkyyden parantamiseksi yhdisteet ovat usein derivatisoitu, jolloin ei voida analysoida kuin tietyn rakenteen omaavia steroideja. Tutkimuksissa, joissa yhdisteitä ei ole derivatisoitu, on keskitytty lähinnä hyvin ionisoituvien steroidien, kuten estrogeenien, steroidikonjugaattien ja 4,5-enei-3-onirakenteellisten steroidien analysoimiseen.^{19,51-53,55,109-112} Kirjallisuudesta ei löytynyt tutkimuksia, joissa samalla ajolla olisi pystytty määrittämään sekä 4,5-enei-3-onirakenteellisten steroidien että useiden huonosti ionisoituvien neutraalien steroidien pitoisuudet. Näin ollen tämän tyyppiselle analyysimenetelmälle, jolla voidaan samanaikaisesti määrittää useamman steroidin pitoisuus, on huomattava tarve.

Tämän erikoistyön tavoitteena oli kehittää herkkä ja selektiivinen kvantitointimenetelmä usean erilaisen steroidien samanaikaiseen määrittämiseen plasmasta.

Tutkimus on ainutlaatuinen, sillä mukana on sekä 4,5-enei-3-oni-rakenteellisia steroideja että useita huonosti ionisoituvia steroideja, joiden rakenteessa ei ole konjugoituneita kaksoissidoksia. Jotta derivatisoimattomille steroideille saavutettaisiin hyvä herkkyys, päädyttiin käyttämään nanonestekromatografia-mikrosirusähkösumutus-tandemmassaspektrometria-menetelmää (nanoLC- μ ESI-MS/MS). Kyseessä oleva menetelmä valittiin, koska nanoLC-ESI-MS-menetelmällä voidaan saavuttaa alhaisemmat määritysalarajat kuin perinteisellä LC-ESI-MS-menetelmällä.⁹⁵ Tandemmassaspektrometrin käyttö parantaa myös menetelmän spesifisyyttä ja herkkyyttä.⁶⁴ Tämä tutkimus on merkittävä myös sen puolesta, että kirjallisuudessa ei ole toistaiseksi yhtään julkaisua, jossa steroidien nestekromatografinen erotus ja ionisaatio olisivat tapahtuneet samalla mikrosirulla. Jos menetelmän kehityksessä onnistutaan, voidaan sitä jatkossa soveltaa myös kudoksenäytteiden analysointiin, joka osaltaan parantaisi ymmärtämystä steroidimetabolian ja siihen osallistuvien entsyymien roolista muun muassa syövän synnyssä.

2 KOKEELLINEN OSUUS

2.1 Reagenssit ja tutkittavat yhdisteet

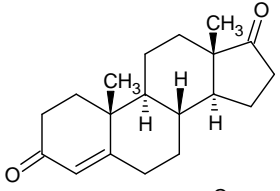
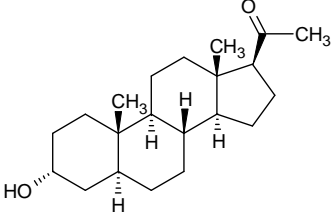
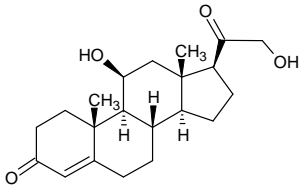
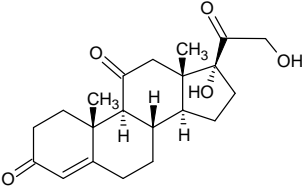
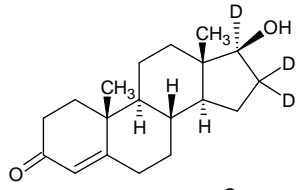
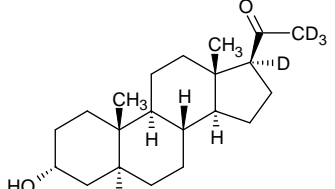
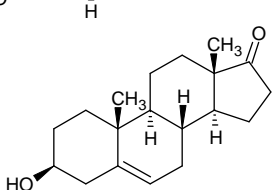
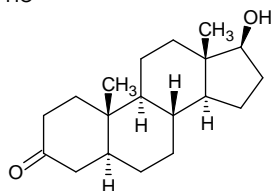
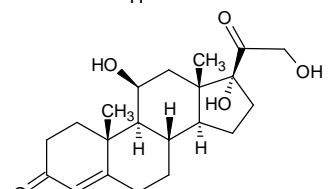
Eluenteina käytettiin HPLC-laatuista asetonitriiliä (Rathburn Chemicals Ltd., Walkerburn, Skotlanti ja VWR International, Ranska) ja metanolia (J. T . Baker, Mallinckrodt Baker B. V., Deventer, Alankomaat). Vesi tislattiin ja deionisoitiin Milli-Q-laitteistolla (Millipore, Molsheim, Ranska). Puskurin valmistamiseen käytettiin analyttistä laatua olevaa ammoniumasetaattia ja 75 % etikkahappoa (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze, Germany). Neste-nesteuutto suoritettiin tert-butyylimetyyli-etterillä, joka oli peräisin Sigma-Aldrichilta (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany). Ringerin liuos oli valmistettu jo aiemmin Helsingin yliopistossa. Valmistukseen oli käytetty natriumkloridia, kalsiumkloridi dihydraattia ja magnesiumkloridi heksahydraattia (Merck, Darmstadt, Saksa) sekä kaliumkloridia (Riedel-de Haën, Seelze, Saksa) ja askorbiinihappoa (Yliopiston Apteekki, Helsinki, Suomi). Lyofilisoitu naudan seerumin albumiini (bovine serum albumin, BSA) oli peräisin

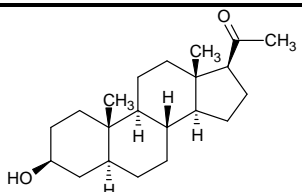
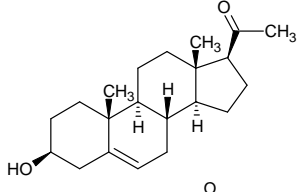
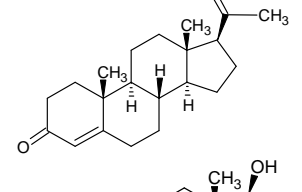
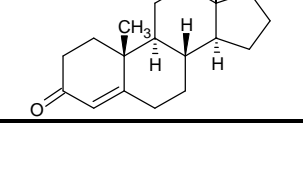
Sigma-Aldrichilta ja puulattu humaaniplasma Yhtyneestä Laboratoriosta (Yhtyneet Laboratoriot Oy, Helsinki, Suomi).

Kaikki tutkittavat yhdisteet on lueteltu taulukossa 3 ja ne olivat peräisin Sigma-Aldrichilta (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) lukuun ottamatta deuteroitua d4- allopregnanolonia (Steraloids Inc., Newport, RI, USA) ja androsteenidionia (Cambridge Isotope Laboratories Inc., Andover, MA, USA).

Taulukko 3. Tutkittavien yhdisteiden lyhenteet, triviaalinimet, kemialliset nimet, molekyyli-painot ja rakennekaavat.

| Lyhenne | Triviaalinimi <i>Kemiallinen nimi</i> | Molekyyli- paino (g/mol) | Rakennekaava |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------|
| 11-DC | 11-Deoksikortisoli <i>17,21-dihydroksipregn-4eeni-3,20-dioni</i> | 346,46 | |
| 17-OH-PREG | 17-Hydroksipregnenoloni <i>3β,17α-dihydroksipregn-5-en-20-oni</i> | 332,48 | |
| 5α-DHP | 5α-Dihydroprogesteroni <i>5α-pregnaani-3,20-dioni</i> | 316,48 | |
| 5α-THDOC | 5α-Tetrahydro- deoksikortikosteroni <i>3α-21-dihydroksi-5α-pregnan-20-oni</i> | 334,49 | |
| A | Aldosteroni <i>11β,21-dihydroksi-pregn-4-eeni-3,18,20-trioni</i> | 360,44 | |

| | | | |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| AN | Androsteenidioni <i>androst-4eeni-3,17-dioni</i> | 286,41 |  |
| AP | Allopregnanoloni <i>3α-hydroksi-5α-pregnan-20-oni</i> | 318,49 |  |
| CORT | Kortikosteroni <i>11β,21-dihydroksipregn-4-eeni-3,20-dioni</i> | 346,46 |  |
| CS | Kortisoni <i>17α,21-dihydroksipregn-4-eeni-3,11,20-trioni</i> | 360,44 |  |
| d ₃ -T | d ₃ -Testosteroni <i>17β-hydroksiandrost-4-en-3-oni-16,16,17-d₃</i> | 291,44 |  |
| d ₄ -AP | d ₄ -Allopregnanoloni <i>3α-hydroksi-5α-pregnan-20-oni-17,21,21,21-d₄</i> | 322,49 |  |
| DHEA | Dehydroepiandrosteroni <i>3β-hydroksiandrost-5-en-17-oni</i> | 288,42 |  |
| DHT | Dihydrotestosteroni <i>17β-hydroksi-5α-androstan-3-oni</i> | 290,44 |  |
| HC | Hydrokortisoni / Kortisoli <i>11β,17α,21-trihydroksipregn-4-eeni,3,20-dioni</i> | 362,46 |  |

| | | | |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| IP | Isopregnanoloni / Epiallo-pregnanoloni <i>3βhydroksi-5α-pregnan-20- oni</i> | 318,49 |  |
| PREG | Pregnenoloni <i>3β-hydroksipregn-5-en-20- oni</i> | 316,48 |  |
| PROG | Progesteroni <i>pregn-4-eeni-3,20-dioni</i> | 314,46 |  |
| T | Testosteroni <i>17β-hydroksiandrost-4-en- 3-oni</i> | 288,42 |  |

2.2 Standardinäytteet ja ajoliuokset

Tutkittavista yhdisteistä valmistettiin 1 mg/ml kantaliuokset asetonitriiliin. 17-hydroksipregnenoloni (17-OH-PREG) ei liennut asetonitriiliin, joten se liuotettiin metanoliin. Kantaliuoksista valmistettiin 100 μ g/ml laimennokset asetonitriiliin (17-OH-PREG metanoliin) ja laimennoksista valmistettiin yhdisteseos, jossa kunkin tutkittavan yhdisteen pitoisuus oli 1 μ g/ml asetonitriilissä. Kantaliuokset, laimennokset ja yhdisteseos säilytettiin lasivialeissa pakastimessa (-20 °C).

Ajoliuos A sisälsi vettä ja 50 mM ammoniumasetaattia (pH 4,5) ($\text{H}_2\text{O}:\text{NH}_4^+\text{CH}_3\text{COO}^-$, 9:1, v/v) ja ajoliuos B asetonitriiliä, metanolia ja 50 mM ammoniumasetaattia (pH 4,5) suhteessa 6:3:1 (v/v/v). Massaspektrometriarvojen optimoinnissa yhdisteen pitoisuus oli 10 μ g/ml eluenttiseoksessa A:B 3:7 (v/v). Menetelmän kehityksessä käytettiin yhdisteseosta, jossa kunkin yhdisteen pitoisuus oli joko 500 ng/ml tai 100 ng/ml eluenttiseoksessa A:B 95:5 (v/v). Alustavassa menetelmän validoinnissa, jossa oli mukana 18 yhdistettä, käytettiin havaintoalarajan ja lineaarisuuden tutkimiseen laimennossarjaa 0,075ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,25 ng/ml, 0,5 ng/ml, 0,75 ng/ml, 1 ng/ml, 2,5

ng/ml, 5 ng/ml, 7,5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 75 ng/ml ja 100 ng/ml eluenttiseoksessa A:B 95:5 (v/v).

2.3 Esikäsitely

Koska puulattu humaaniplasma sisälsi tutkittavia steroidihormoneja, valmistettiin validointia ja kalibrointisuoraa varten keinoplasmaa, jossa oli 4 % BSA:ta (w/v) laimennetussa Ringerin liuoksessa. Laimennettu Ringerin liuos sisälsi 7350 μM natriumkloridia, 60 μM kalsiumkloridi dihydraattia, 135 μM kaliumkloridia, 50 μM magnesiumkloridi heksahydraattia ja 2 μM askorbiinihappoa.

150 μl plasmaa, Ringer + BSA -liuosta tai eluenttiseosta (A:B 95:5, v/v) mitattiin muoviseen Eppendorf-putkeen. Näyte spiikattiin haluttuun pitoisuuteen ja 5 μl sisäistä standardia lisättiin pitoisuudessa 25 ng/ml, jonka jälkeen näytettä ravisteltiin vortex-sekoittajalla noin 30 sekunnin ajan. Näytteet laitettiin jääkaappiin diffundoitumaan kahdeksi tunniksi. Tämän jälkeen suoritettiin neste-nesteeutto lisäämällä näytteisiin 1 ml MTBE:a, joka samalla denaturoi näytteessä olevat proteiinit. Näytteitä ravisteltiin minuutin ajan vortex-sekoittajalla ja sitten faasit erotettiin toisistaan sentrifugoimalla (2000 rpm, 5 minuuttia). Orgaaninen faasi otettiin pinnalta huolellisesti neulan ja ruiskun avulla, suodatettiin Milliporen 0,2 μm nailonsuodattimella (Millipore, Bedford, MA, USA) ja siirrettiin lasivaleihin. MTBE haihdutettiin typpikaasulla huoneenlämmössä TurpoVap LV-haihduttimella (Caliper LifeScience, Hopkinton, MA, USA). Haihdutusjäännökseen lisättiin 50 μl eluenttiliuosta A:B 95:5 (v/v) ja ravisteltiin vortex-sekoittajalla.

Esikäsitelyn toimivuutta tutkittiin spiikkaamalla viisi Ringer + BSA-näytettä pitoisuuteen 25 ng/ml ennen esikäsitelyä ja esikäsitelyn jälkeen. Samoin kuhunkin näytteeseen lisättiin 5 μl sisäistä standardia pitoisuudessa 25 ng/ml. Jokaiselle yhdisteelle määritettiin uuton saantoprosentti vertaamalla ennen esikäsitelyä spiikattujen näytteiden pinta-aloja esikäsitelyn jälkeen spiikattujen näytteiden pinta-aloihin.

2.4 Laitteistot

2.4.1 Nanonestekromatografi ja HPLC-mikrosiru

Nanonestekromatografiaa suoritettiin Agilentin 1200-sarjan laitteistolla, johon kuuluivat nanopumppu, degasseri, näytteensyöttösystemi (microwell-plate autosampler) ja HPLC-mikrosiru-MS-liitäntäosa (chipcube) (Agilent Technologies, Waldbronn, Saksa). Näytteen syöttämiseen käytettiin Agilentin 1100-sarjan kapillaaripumppua. Yhdisteiden kromatografinen eroaminen tapahtui Agilentin HPLC-sirulla (G4240-62001, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), jossa oli esikolonne (4 mm, 40 nl) näytteen konsentroimista varten sekä varsinainen erotuskolonne (50 μm x 75 μm x 43 mm). Molemmat kolonnit olivat pakattu ZORBAX 300SB-C18 faasilla, jonka partikkelikoko oli 5 μm .

0,75 μl näytettä injektoidiin ja kapillaaripumppu kuljetti näytteen HPLC-mikrosirun esikolonneen virtausnopeudella 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ 3 % B. Alustavassa menetelmän validoinnissa, jossa mukana oli 18 yhdistettä, injektioilavuus oli 1 μl . Kun näyte oli kuljetettu esikolonneen, sitä huuhdeltiin hetki, ennen kuin mikrosirussa oleva pyörivä venttiili kytki automaattisesti esikolonneen erotuskolonneen ja gradientti pääsi alkamaan. Käytetty gradientti oli 5-40 % B 0-0,3 min, 40-40,2 % B 0,3-3,9 min, 40,2-76 % B 3,9-4 min, 76-80 % B 4-6,6 min, 80-100 % B 6,6-7,8 min, jonka jälkeen kolonnin pestiin 100 % B neljän minuutin ajan. Ajon jälkeen kolonnin annettiin tasapainottua 25 minuuttia gradientin alkuolosuhteissa. Virtausnopeus oli 0,3 $\mu\text{l}/\text{min}$.

2.4.2 Massaspektrometri

Työssä käytettiin detektorina Agilent 6410–kolmoiskvadrupolimassaspektrometria (Agilent Technologies, Waldbronn, Saksa). Nanosähkösumutus saatiin aikaiseksi Agilentin optimointiin tarkoitetun mikrosirun (G4240-61001, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) ja HPLC-mikrosirun (G4240-62001) ESI-lähteellä. Kuivauskaasuna käytettiin typpikaasugeneraattorilla (Parker Balston N2-22 nitrogen generator, Parker Hannifin, Haverhill, MA, USA) tuotettua typpeä, jonka virtausnopeus

oli 4 l/min ja lämpötila 150 °C. Tutkittaville yhdisteille ajettiin suorasyötöllä positiiv-ionimoodissa MS- ja MS/MS-spektrit käyttäen ruiskupumppua (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) ja optimointiin tarkoitettua Agilentin mikrosirua (G4240-61001). Kapillaari- ja fragmentor-jännitteet sekä MS/MS-ajoissa törmäysenergiajännitteet optimoitiin kullekin yhdisteelle erikseen. Pyyhkäisyalue oli m/z 50-390. Spektrien perusteella valittiin intensiivisimmät lähtöioni-tuoteioni-parit, joille optimoitiin fragmentor- ja törmäysenergiajännitteet suorasyötöllä. Käytetty virtausnopeus oli 0,3 µl/min. Kromatografiset mittaukset suoritettiin valittujen reaktioiden seurannalla (selected reaction monitoring, SRM). Kapillaarijännite oli 1950 V. Mikrosirun kärjen paikkaa säädettiin, kunnes saatiin aikaiseksi tasainen sumu.

2.5 Validointi

Lopullisen menetelmän validointi suoritettiin valmistamalla näytteet Ringer + BSA-matriisiin. Havaintoalarajojen ja lineaarisuuden tutkimista varten sekä kalibroitisuorien määrittämistä varten näytteet spiikattiin pitoisuuteen 0,075 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,25 ng/ml, 0,5 ng/ml, 0,75 ng/ml, 1 ng/ml, 2,5 ng/ml, 5 ng/ml, 7,5 ng/ml, 10 ng/ml, 15 ng/ml, 20 ng/ml, 25 ng/ml, 30 ng/ml, 50 ng/ml, 65 ng/ml, 75 ng/ml ja 100 ng/ml. Sisäisen standardin (d_3 -T) pitoisuus jokaisessa näytteessä oli 0,83 ng/ml. Havaintoalarajana pidettiin pitoisuutta, jossa yhdisteen signaali-kohina (S/N)-suhde oli yli 3. Kalibroitisuorat määritettiin ulkoisen standardin menetelmällä vertaamalla yhdistepiikin pinta-alaa konsentraatioon. Saatua suoraa ei painotettu. Injektion toistettavuus tutkittiin kahtena peräkkäisenä päivänä injektoimalla kullakin kertaa kuusi kertaa samaa näytettä, jonka pitoisuus oli 25 ng/ml. Tuloksista laskettiin piikkien pinta-alojen ja retentioaikojen suhteellinen keskihajonta (relative standard deviation, RSD %).

2.6 Autenttiset näytteet

Turun yliopistolta saatiin kahdeksan geneettisesti muunnellun (knock out, KO) ja seitsemän villin-tyyppin (wild type, WT) hiiren plasmanäytettä. Geneettisesti muunneltujen hiirten plasmanäytteistä neljä oli urosten ja neljä naaraiden näytettä. Villin-tyyppin hiirten plasmanäytteissä oli kolme uroksen ja neljä naaraan näytettä.

Plasmanäytteet analysoitiin käyttäen validoitua menetelmää ja näytteissä olevat steroidipitoisuudet määritettiin ulkoisen standardin menetelmällä.

3 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

3.1 Massaspektrometria

3.1.1 MS-optimointi

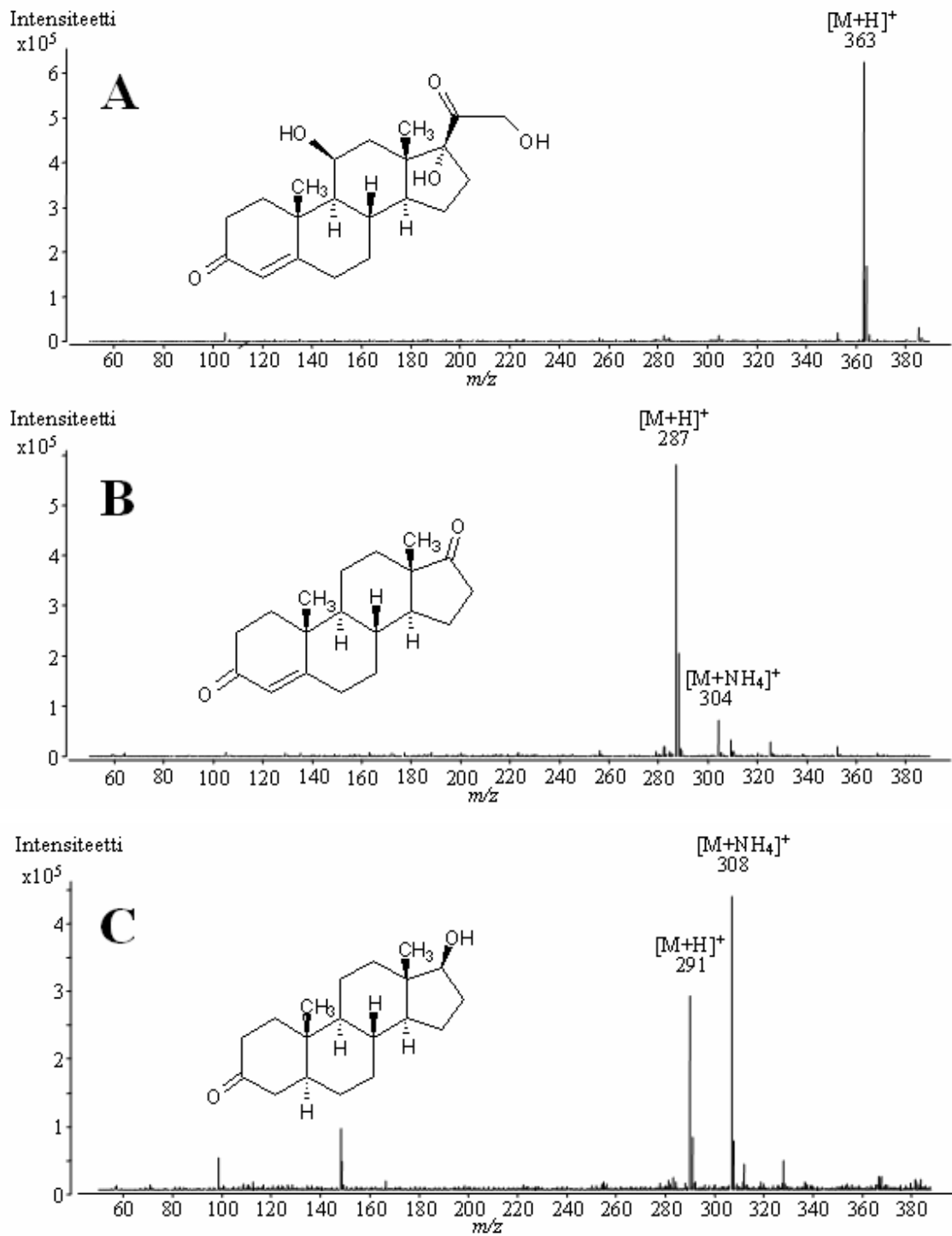
Tässä työssä tutkitut steroidihormonit ovat neutraaleja ja ne eivät ionisoidu käytetyssä eluentissa. Ionisaatio tapahtuu näin ollen ilmeisesti protoninsiirtoreaktiona kaasufaasissa.¹¹⁴ Yhdisteen rakenne ja protoniaffineetti vaikuttavat merkittävästi yhdisteen ionisoitumistehokkuuteen sähkösumutuksessa.¹⁹ 4,5-eeni-3-oni-rakenteelliset steroidit näkyvät suhteellisen intensiivisinä positiivi-ionimoodissa, sillä niiden rakenteessa oleva konjugoitunut kaksoissidos stabiloii protonoitunutta molekyyli-ionia.¹¹⁵ Steroidit, joiden rakenteessa ei ole konjugoituneita kaksoissidoksia, saatiin ionisoitua ammoniumadduktin muodostuksella, kun ajoliuokseen lisättiin ammoniumasetaattia. Ajoliuoksiksi valittiin vesi-ammoniumasetaatti (50 mM, pH 4,5) ($\text{H}_2\text{O}:\text{NH}_4^+\text{CH}_3\text{COO}^-$, 9:1, v/v) ja asetonitriili-metanoli-ammoniumasetaatti (50 mM, pH 4,5) ($\text{ACN}:\text{MeOH}:\text{NH}_4^+\text{CH}_3\text{COO}^-$, 6:3:1, v/v/v), sillä samaa koostumusta oli käytetty jo aikaisemmin Helsingin yliopistossa steroidiglukuronidien tutkimisessa.^{116,117}

Taulukko 4. MS-spektrissä näkyvät ionit ja niiden suhteelliset intensiteetit; m/z (suhteellinen intensiteetti, %). Tummennettuna on merkitty 4,5-eeeni-3-oni-rakenteelliset steroidit.

| Yhdiste | $[M+Na]^+$ | $[M+NH_4]^+$ | $[M+H]^+$ | $[M+H-H_2O]^+$ | $[M+H-2H_2O]^+$ |
|------------------------|----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|
| A | 383 (6) | 378 (9) | 361 (100) | 343 (56) | |
| HC | | | 363 (100) | | |
| CS | | | 361 (100) | | |
| CORT | | | 347 (100) | | |
| 11-DC | | | 347 (100) | | |
| T | | | 289 (100) | | |
| d₃-T | | | 292 (100) | | |
| AN | 309 (6) | 304 (13) | 287 (100) | | |
| 17-OH-PREG | | 350 (100) | 333 (34) | 315 (39) | 297 (19) |
| DHEA | 311 (9) | 306 (100) | 289 (32) | 271 (9) | |
| DHT | | 308 (100) | 291 (65) | | |
| 5 α -THDOC | 357 (41) | 352 (100) | 335 (48) | 317 (9) | |
| PREG | | 334 (100) | 317 (86) | 299 (17) | |
| PROG | | | 315 (100) | | |
| AP | 341 (10) | 336 (100) | 319 (88) | 301 (44) | |
| d ₄ -AP | 345 (11) | 340 (91) | 323 (100) | 305 (46) | 287 (20) |
| IP | 341 (10) | 336 (81) | 319 (100) | 301 (73) | |
| 5 α -DHP | 339 (12) | 334 (100) | 317 (97) | 299 (7) | |

Tutkittavista yhdisteistä mitattiin MS-spektrit positiivi-ionimoodissa. MS-spektrien intensiivisimmät ionit ja niiden suhteelliset intensiteetit ovat lueteltu taulukossa 4. MS-spektrissä steroidihormonista voidaan nähdä joko pelkästään protonoitunut molekyyli ($[M+H]^+$) tai sekä protonoitunut molekyyli että ammoniumaddukti ($[M+NH_4]^+$). Lisäksi spektrissä voi näkyä yhdisteen natriumaddukti ($[M+Na]^+$) ja veden lohkeamisia ($[M+H-nH_2O]^+$). Vesi lohkeaa helpommin steroideista, joiden rakenteessa ei ole konjugoituneita kaksoissidoksia. Yhdisteen rakenne ja protoniaffiniteetti vaikuttaa myös protonoituneen molekyylin ja ammoniumadduktin intensiteettisuhteeseen.⁶⁴ Steroidilla, jolla on konjugoitunut kaksoissidos, on korkea protoniaffiniteetti johtuen positiivisen varauksen delokalisoitumisesta.⁸² Tyypillisesti näistä 4,5-eeeni-3-oni-rakenteellisesta steroideista muodostuu protonoitunut molekyyli,^{19,64} mikä oli huomattavissa myös tässä työssä tutkituilla yhdisteillä. Aldosteronilla (A), hydrokortisonilla (HC), kortisolilla (CS), kortikosteronilla (CORT), 11-deoksikortisolilla (11-DC), testosteronilla (T), d₃-testosteronilla (d₃-T), androsteenidionilla (AN) ja progesteronilla (PROG) on 4,5-eeeni-3-oni-rakenne ja nämä yhdisteet näkyivät MS-spektreissä intensiivisesti protonoituneena. Aldosteroni ja androsteenidioni muodostivat lisäksi intensiteetiltään

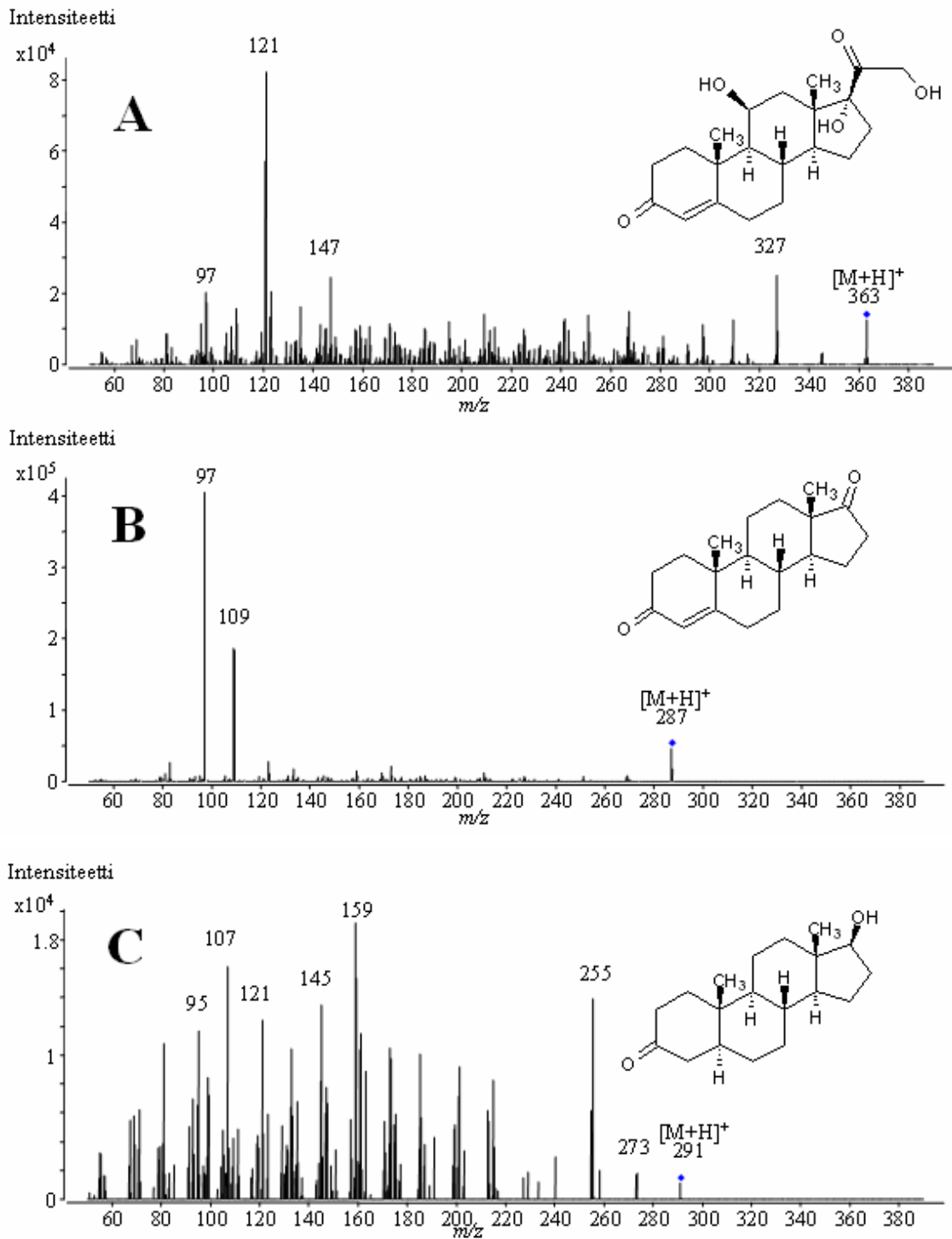
huomattavasti heikomman ammoniumadduktin (Taulukko 4 ja Kuva 3). Dihydrotestosteronilla (DHT), dehydroepiandrosteronilla (DHEA), 5 α -tetrahydrodeoksikortikosteronilla (5 α -THDOC), 17-hydroksipregnenolonilla, d₄-allopregnanolonilla (d₄-AP), allopregnanolonilla (AP), isopregnanolonilla (IP), 5 α -dihydroprogesteronilla (5 α -DHP) ja pregnenolonilla (PREG) ei ole rakenteessa konjugoituneita kaksoissidoksia ja siksi niillä on matalampi protoniaffiniteetti. Nämä yhdisteet näkyivät MS-spektrissä sekä protonoituneena molekyylinä että ammoniumadduktina. Kuvassa 3 on esitetty muutamien yhdisteiden MS-spektrejä.



Kuva 3. Esimerkkejä MS-spektreistä: (A) hydrokortisoni, (B) androsteenidioni, (C) dihydrotestosteroni

3.1.2 MS/MS-optimointi

MS/MS-spektrien mittaamista varten yhdisteille valittiin MS-spektrien perusteella lähtöioniksi protonoitunut molekyyli ja osalle yhdisteistä tämän lisäksi ammoniumaddukti. Hydrokortisonille, kortisonille, kortikosteronille, 11-deoksikortisolille, testosteronille, d₃-testosteronille ja progesteronille valittiin lähtöioniksi ainoastaan protonoitunut molekyyli. Sitä vastoin aldosteronille, androsteenidionille, dihydrotestosteronille, dehydroepiandrosteronille, 5 α -tetrahydrodeoksikortikosteronille, 17-hydroksipregnenolonille, d₄-allopregnanolonille, allopregnanolonille, isopregnanolonille, 5 α -dihydroprogesteronille ja pregnenolonille valittiin lähtöioniksi sekä protonoitunut molekyyli että ammoniumaddukti. Tuoteionispektrien ajoissa fragmentor- ja törmäysenergiajännitteet optimoitiin kullekin yhdisteelle erikseen. Aikaisemmin menetelmää kehitettäessä oli huomattu, että tarvittavat fragmentor-jännitteet ovat korkeammat mikrosirulla tapahtuvassa sähkösumutuksessa (100–300 V) kuin normaalissa sähkösumutuksessa (100 V). Esimerkkejä muutamien yhdisteiden MS/MS-spektreistä on kuvassa 4.



Kuva 4. Esimerkkejä MS/MS-spektreistä: (A) hydrokortisoni; fragmentor 100 V, CE 20 V (B) androsteenidioni; fragmentor 100 V, CE 18 V (C) dihydrotestosteroni; fragmentor 200 V, CE 23 V.

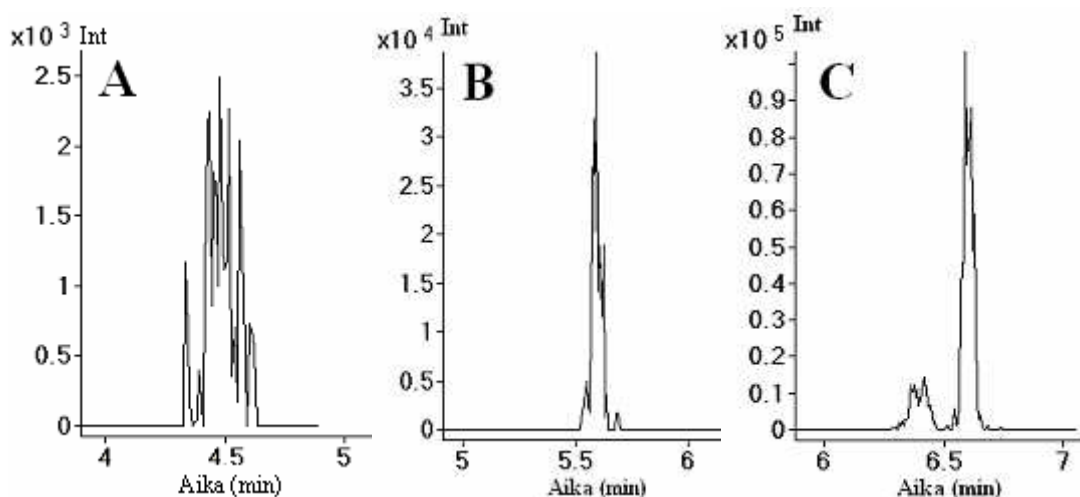
Yhdisteen rakenne vaikuttaa myös sen fragmentoitumiseen tuoteionispektrin ajossa. Tässä työssä tutkitut steroidit voidaan jakaa kolmeen ryhmään rakenteen ja fragmentoitumisen perusteella. Steroidit, joiden rakenteessa on konjugoitunut kaksoissidos ja ei substituenttia 11-asemassa, fragmentoituvat vähiten muodostaen steroideille tyypilliset m/z 97 ja 109 tuoteionit (Kuva 4).¹⁹ Steroidit, joilla on konjugoitunut kaksoissidos sekä lisäksi substituentti 11-asemassa, fragmentoituvat edellistä ryhmää enemmän. Eniten fragmentoituvat kuitenkin steroidit, joiden rakenteessa ei ole konjugoituneita kaksoissidoksia, sillä ne ovat kaasufaasissa epästabiilimpia kuin 4,5-ene-3-oni-rakenteelliset steroidit.¹¹⁵ Ammoniumaddukteilla käytettiin pienempiä törmäysenergiajännitteitä kuin protonoituneilla molekyyyleillä, sillä addukteista lohkesi ammoniakki ja vesi jo alhaisilla jännitteillä (CE alle 15 V). Tuoteionispektrien perusteella jokaiselle yhdisteelle valittiin intensiivisimmät ioniparit, joille optimointiin fragmentor- ja törmäysenergiajännitteet. Varsinaiseen menetelmään kullekin yhdisteelle valittiin kaksi intensiivisintä ioniparia. Aldosteronilla seurattiin kahta protonoitunutta ja kahta ammoniumaddukti lähtöioni-tuoteioni-paria, koska ei oltu varmoja, kumpi toimisi parhaiten varsinaisia näytteitä analysoidessa. Valitut lähtöioni-tuoteioni-parit sekä niiden optimoidut parametrit ovat taulukossa 5.

Taulukko 5. Valitut lähtöioni-tuoteioni-parit sekä niiden optimoidut parametrit.

| Yhdiste | Lähtöioni (<i>m/z</i>) | Tuoteioni (<i>m/z</i>) | Frag- men- tor | CE (V) |
|--------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-----------|
| A | [M + H] ⁺ (361) | (315) | 225 | 12 |
| | [M + H] ⁺ (361) | [M + H – H ₂ O] ⁺ (343) | 275 | 8 |
| | [M + NH ₄] ⁺ (378) | (315) | 100 | 12 |
| | [M + NH ₄] ⁺ (378) | [M + NH ₄ – NH ₄ – H ₂ O] ⁺ (343) | 150 | 1 |
| HC | [M + H] ⁺ (363) | (121) | 225 | 20 |
| | [M + H] ⁺ (363) | (147) | 200 | 28 |
| CS | [M + H] ⁺ (361) | (121) | 225 | 28 |
| | [M + H] ⁺ (361) | (163) | 250 | 18 |
| CORT | [M + H] ⁺ (347) | (121) | 200 | 24 |
| | [M + H] ⁺ (347) | [M + H – H ₂ O] ⁺ (329) | 225 | 8 |
| 11-DC | [M + H] ⁺ (347) | (97) | 250 | 32 |
| | [M + H] ⁺ (347) | (109) | 250 | 32 |
| T | [M + H] ⁺ (289) | (97) | 250 | 22 |
| | [M + H] ⁺ (289) | (109) | 225 | 24 |
| d ₃ -T | [M + H] ⁺ (292) | (97) | 225 | 20 |
| | [M + H] ⁺ (292) | (109) | 225 | 22 |
| AN | [M + H] ⁺ (287) | (97) | 225 | 20 |
| | [M + H] ⁺ (287) | (109) | 225 | 22 |
| 17-OH-PREG | [M + NH ₄] ⁺ (350) | [M + NH ₄ – NH ₄ – 2H ₂ O] ⁺ (297) | 225 | 6 |
| | [M + NH ₄] ⁺ (350) | [M + NH ₄ – NH ₄ – H ₂ O] ⁺ (315) | 250 | 1 |
| DHEA | [M + NH ₄] ⁺ (306) | [M + NH ₄ – NH ₄ – 2H ₂ O] ⁺ (253) | 225 | 6 |
| | [M + NH ₄] ⁺ (306) | [M + NH ₄ – NH ₄ – H ₂ O] ⁺ (271) | 225 | 1 |
| DHT | [M + NH ₄] ⁺ (308) | [M + NH ₄ – NH ₄ – 2H ₂ O] ⁺ (255) | 225 | 18 |
| | [M + NH ₄] ⁺ (308) | [M + NH ₄ – NH ₄] ⁺ (291) | 225 | 1 |
| 5α-THDOC | [M + NH ₄] ⁺ (352) | [M + NH ₄ – NH ₄ – H ₂ O] ⁺ (317) | 275 | 6 |
| | [M + NH ₄] ⁺ (352) | [M + NH ₄ – NH ₄] ⁺ (335) | 275 | 1 |
| PREG | [M + H] ⁺ (317) | [M + NH ₄ – NH ₄ – 2H ₂ O] ⁺ (281) | 275 | 8 |
| | [M + H] ⁺ (317) | [M + NH ₄ – NH ₄ – H ₂ O] ⁺ (299) | 275 | 2 |
| PROG | [M + H] ⁺ (315) | (97) | 225 | 18 |
| | [M + H] ⁺ (315) | (109) | 225 | 22 |
| AP | [M + H] ⁺ (319) | (257) | 300 | 6 |
| | [M + H] ⁺ (319) | [M + H – 2H ₂ O] ⁺ (283) | 300 | 9 |
| d ₄ -AP | [M + H] ⁺ (324) | [M + H – 2H ₂ O] ⁺ (287) | 300 | 8 |
| | [M + H] ⁺ (324) | [M + H – H ₂ O] ⁺ (305) | 300 | 1 |
| IP | [M + NH ₄] ⁺ (336) | (135) | 225 | 14 |
| | [M + NH ₄] ⁺ (336) | [M + NH ₄ – NH ₄ – 2H ₂ O] ⁺ (283) | 225 | 14 |
| 5α-DHP | [M + NH ₄] ⁺ (334) | [M + NH ₄ – NH ₄ – 2H ₂ O] ⁺ (281) | 250 | 16 |
| | [M + NH ₄] ⁺ (334) | [M + NH ₄ – NH ₄ – H ₂ O] ⁺ (299) | 250 | 10 |

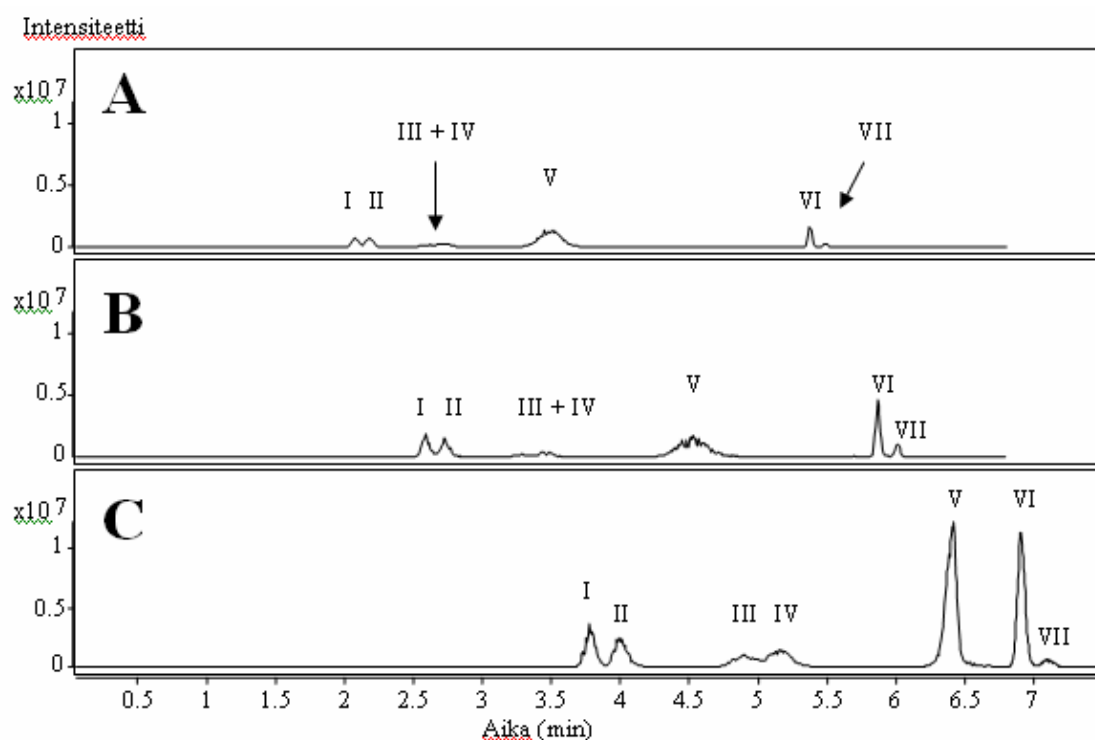
3.2 Nanonestekromatografia

Menetelmään oli kehitetty jo alustava gradientti, jonka virtausnopeus oli 0,7 $\mu\text{l}/\text{min}$. Gradienttia yritettiin optimoida niin, että samanmassaiset yhdisteet saataisiin eroamaan kromatografisesti. Tässä ei täysin onnistuttu, sillä stereoisomeerit isopregnanoloni ja allopregnanoloni ja isobaariset testosteroni ja dehydroepiandrosteroni eluoutuivat samaan aikaan. Virtausnopeutta päätettiin alentaa, sillä käytetyllä mikrosirulla saavutetaan paras kromatografinen erotus virtausnopeudella 0,2–0,3 $\mu\text{l}/\text{min}$.¹⁰³ Alhaisella virtausnopeudella saavutetaan lisäksi parempi herkkyys ja sähkösumun stabiilisuus. Tämä havaittiin myös tässä työssä: virtausnopeuden alentaminen 0,7 $\mu\text{l}/\text{min}$ ensin 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ ja sitten 0,3 $\mu\text{l}/\text{min}$ paransi havaintoalarajoja ja intensiteettiä sekä joidenkin yhdisteiden piikkien muotoa (Kuvat 5 ja 6). Herkkyyden paraneminen johtui pisarakoon pienentymisestä. Virtausnopeudella 0,7 $\mu\text{l}/\text{min}$ muodostui enimmäkseen liian suuria pisaroita, jolloin suuret pisarat eivät ehtineet haihtua ja herkkyys jäi alhaiseksi. Alhaisemmalla virtausnopeudella muodostui pienempiä pisaroita, jonka seurauksena herkkyys parani. Virtausnopeuden alentaminen 0,7 $\mu\text{l}/\text{min}$ 0,3 $\mu\text{l}/\text{min}$ ei kuitenkaan parantanut kromatografista erotusta.



Kuva 5. Dihydrotestosteronin piikin muodon paraneminen virtausnopeuden laskiessa. Virtausnopeus (A) 0,7 $\mu\text{l}/\text{min}$, (B) 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$, (C) 0,3 $\mu\text{l}/\text{min}$. Yhdisteen pitoisuus jokaisessa virtausnopeudessa on 50 ng/ml.

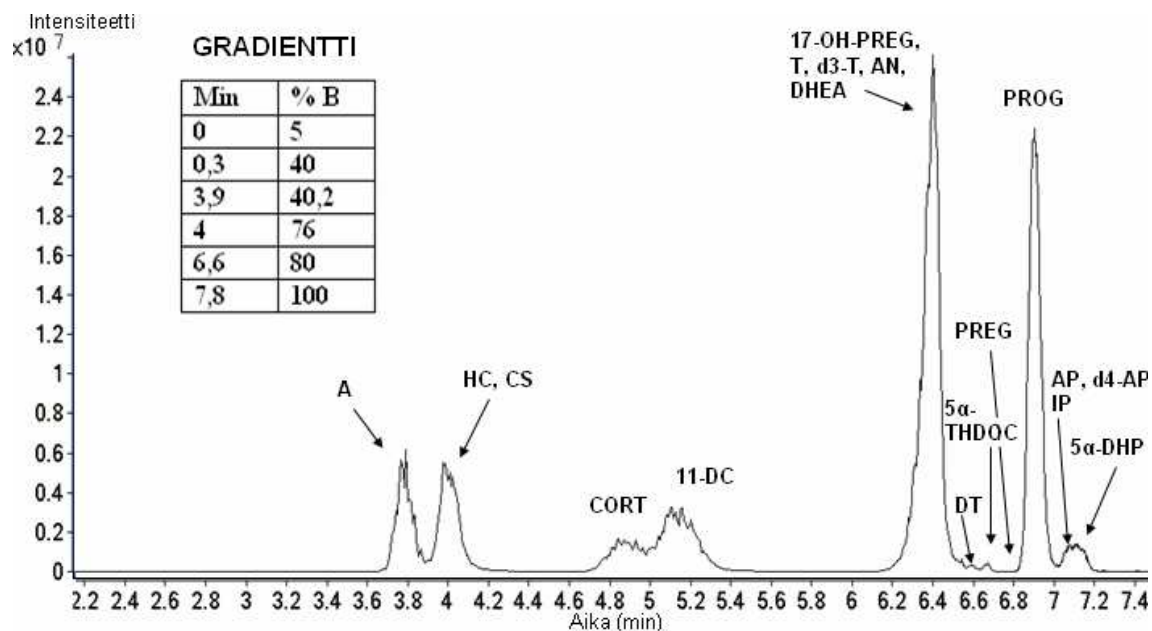
Yhdistepiikkien pinta-alat kasvoivat 1,4–56,2-kertaisesti virtausnopeuden alentuessa 0,7 $\mu\text{l}/\text{min}$:sta/min 0,3 $\mu\text{l}/\text{min}$:aan/min. Pinta-ala kasvoi eniten huonosti ionisoituvilla yhdisteillä, joilla ei ole rakenteessa konjugoituneita kaksoissidoksia. Näillä yhdisteillä pinta-ala kasvoi keskimäärin 13-kertaisesti kun taas 4,5-enei-3-oni-rakenteellisilla steroideilla kasvu oli noin 8-kertainen. Menetelmässä päädyttiin käyttämään optimivirtausnopeutta 0,3 $\mu\text{l}/\text{min}$ eikä virtausnopeuden alentamista alemmaksi enää kokeiltu, sillä jo tässä virtausnopeudessa sähkösumu oli hankala säätää stabiiliksi.



Kuva 6. Kokonaisionikromatogrammi virtausnopeudella (A) 0,7 $\mu\text{l}/\text{min}$, (B) 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ ja (C) 0,3 $\mu\text{l}/\text{min}$. Jokaisen yhdisteen pitoisuus näytteessä 100 ng/ml. Yhdisteet piikissä (I) A, (II) HC, CS, (III) CORT, (IV) 11-DC, (V) 17-OH-PREG, T, d_3 -T, AN, DHEA (VI) PROG, (VII) AP, IP, d_3 -AP, 5α -DHP

Kuvassa 7 on esitetty tutkittavien yhdisteiden kokonaisionikromatogrammi käyttäen lopullista gradienttia ja virtausnopeutta. Käänteisfaasikromatografiassa analyytit eluoituvat sitä aiemmin mitä poolisemmasta analyytistä on kyse. Näin ollen pooliset, paljon karbonyyli- ja hydroksyyli-ryhmiä sisältävät, analyytit eluoituvat ensimmäisinä. Tutkittavat yhdisteet jaettiin neljään ikkunaan retentioaikojensa perusteella. Ensimmäisessä ikkunassa eluoituvat aldosteroni, hydrokortisoni ja kortisoni, jotka sisäl-

tävät viisi poolista ryhmää. Seuraavan ikkunan kortikosteronilla ja 11-deoksikortisolilla on rakenteessaan neljä poolista ryhmää. Ikkunassa kolme eluoituvat 17-hydroksipregnenoloni, testosteroni, d₃-testosteroni, androsteenidioni, dehydroepiandrosteroni, dihydrotestosteroni ja 5 α -tetrahydrodeoksikortikosteroni, joilla on rakenteessa kaksi tai kolme poolista ryhmää. Viimeisenä eluoituvat pregnenoloni, progesteroni, d₄-allopregnanoloni, allopregnanoloni, isopregnanoloni ja 5 α -dihydroprogesteroni, joilla on vain kaksi poolista ryhmää. Virtausnopeuden alentamisesta huolimatta yhdisteiden kromatografinen erotus jäi huonoksi, sillä monta yhdistettä eluoituu samaan aikaan. Isobaarisia yhdisteitä, testosteronia ja dehydroepiandrosteronia sekä allopregnanolonia ja isopregnanolonia, ei saatu eroamaan kromatografisesti. Näin ollen niitä ei pystytä kvantitoimaan luotettavasti. Samanmassaiset kortikosteroni ja 11-deoksikortisoli saatiin eroamaan osittain niin, että kvantitointi onnistuu. Huono resoluutio johtuu siitä, että mikrosirussa olevan erotuskolonnin partikkelikoko (5 μ m) on liian suuri verrattuna kolonnin pituuteen (43 mm). Kyseistä mikrosirua on kuitenkin käytetty suurten molekyylien, kuten proteiinien ja peptidien analytiikassa, jolloin on saavutettu hyvä herkkyys ja erotus.^{87,88,90,103-108} Tässä tutkimuksessa kokeiltiin myös toista mikrosirua, jonka stationäärifaasin huokoskoko oli pienempi (300 Å vrt. 80 Å). Tällä ei kuitenkaan saatu merkittävää eroa kromatografiseen erotukseen isompi huokoiseen mikrosiruun verrattuna. Agilent on kehittänyt pienten molekyylien analysoimista varten uuden korkean kapasiteetin mikrosirun, joka on samanlainen kuin tässä tutkimuksessa käytetty mikrosiru paitsi esikolonnin tilavuus on 500 nl, erotuskolonnin pituus 150 mm ja stationäärifaasin huokoskoko 80 Å.¹¹⁸ Isompi esikolonnin tilavuus mahdollistaa suurempien injektio-tilavuuksien käytön, jolloin voidaan päästä alhaisimpiin havaintoalarajoihin, ja pidemmällä erotuskolonnilla voidaan saavuttaa parempi kromatografinen erotus. Kyseinen mikrosiru voisi soveltua tähän tutkimukseen paremmin kuin nyt käytetty mikrosiru.



Kuva 7. Kokonaisionikromatogrammi käyttäen lopullista gradienttia ja virtausnopeutta. Jokaisen yhdisteen pitoisuus on 100 ng/ml.

Menetelmälle suoritettiin alustava validointi, jossa kullekin yhdisteelle määritettiin havaintoalarajat ja lineaarisuusalue, sekä injektion toistettavuus. Taulukon 6 tuloksissa huomataan merkittävä ero eri rakenteellisten steroidien välillä. Havainto- ja määrittysalarajat puhtasaineseoksessa ovat 0,075–0,5 ng/ml ja injektion toistettavuus 5,6–11,9 % yhdisteillä, joiden rakenteessa on konjugoituneita kaksoissidoksia (merkitty tummennettuna taulukkoon), kun taas vastaavat luvut yhdisteillä, joiden rakenteessa ei ole konjugoituneita kaksoissidoksia, ovat 5–25 ng/ml ja 9,3–36,4 %. Myös aikaisemmissa tutkimuksissa on havaittu, että steroidin rakenne vaikuttaa menetelmän herkkyyteen.^{19,115} 4,5-enei-3-oni-rakenteellinen steroidi on kaasufaasissa stabiilimpi kuin steroidi, jonka rakenteessa ei ole konjugoituneita kaksoissidoksia.¹¹⁵ Tämä osaltaan selittää merkittävät erot havaintoalarajoissa. Lisäksi lineaarisuus oli hyvä 4,5-enei-3-oni-rakenteellisilla steroideilla (regressiokerroin välillä 0,995 ja 0,999). Sen sijaan riittävää lineaarisuutta ($r^2 \geq 0,995$) konsentraatioalueella 0,075–100 ng/ml ei pystytty saavuttamaan yhdisteillä, joiden rakenteessa ei ole konjugoituneita kaksoissidoksia. Näillä yhdisteillä lineaarisuus voisi olla parempi, jos konsentraatioalueella 25–100 ng/ml olisi käytetty useampaa mittapistettä. Injektion toistettavuus tutkittiin injektoimalla kuusi kertaa samaa näytettä, jonka pitoisuus oli 75 ng/ml. Menetelmä oli hyvin toistettava retentioaikojen suhteen suhteellisen keskihajonnan ollessa 0–0,6,

mutta toistettavuus oli huono piikin pinta-alaa seurattaessa (RSD 5,6–36,4 %). Piikin intensiteetti ja pinta-ala kasvoi ajosta toiseen, joka saattoi johtua edellisestä ajosta tulleesta kontaminaatiosta. Tämä muistiefekti havaittiin, kun 500 ng/ml yhdisteseoksen jälkeen injektoitiin 0-näyte ja siinä havaittiin intensiivisiä yhdistepiikkejä. Testosteronin yhdistepiikki näkyi jopa 14 ajon jälkeen. Tämän seurauksena gradientin loppua muutettiin niin, että orgaanisen eluentin ajoaikaa pidennettiin kahdesta minuutista neljään minuuttiin. Tämä ei kuitenkaan auttanut, joten kontaminaation lähde on todennäköisesti injektorin tai jokin liitos. Ongelma saattaisi poistua, jos kapillaaripumpun isokraattista gradienttia (3 % B) muutettaisiin niin, että näytteen syöttämisen jälkeen injektorin ja esikolonnia huuhdeltaisiin korkeammalla orgaanisen eluentin osuudella.¹¹⁸

Taulukko 6. Menetelmän alustavan validoinnin tulokset, johon kuului havaintoalarajan, lineaarisuuden ja injektion toistettavuuden määrittäminen. Tummennettuna on merkitty 4,5-eeeni-3-oni-rakenteelliset steroidit.

| Yhdiste | SRM-ioni- pari | LOD ng/ml | Lineaari- suusalue (ng/ml) | R ² | Mitta- pisteet (n) | Toistettavuus (% RSD) | |
|--------------------|-------------------|--------------|----------------------------------|----------------|--------------------------|--------------------------|-------------------|
| | | | | | | Piikin pinta- ala | Reten- tioaika |
| A | 378 → 315 | 0,25 | 0,25-100 | 0,999 | 12 | 7,9 | 0,3 |
| | 378 → 343 | 0,5 | 0,5-100 | 0,995 | 11 | 6,2 | 0,2 |
| HC | 363 → 121 | 0,1 | 0,1-100 | 0,997 | 13 | 6,7 | 0,2 |
| | 363 → 147 | 0,5 | 0,5-100 | 0,997 | 11 | 7,0 | 0,2 |
| CS | 361 → 121 | 0,075 | 0,075-75 | 0,999 | 13 | 7,3 | 0,4 |
| | 361 → 163 | 0,075 | 0,075-100 | 0,997 | 14 | 6,6 | 0,2 |
| CORT | 347 → 121 | 0,075 | 0,075-100 | 0,996 | 14 | 7,1 | 0,6 |
| | 347 → 329 | 0,1 | 0,1-75 | 0,996 | 12 | 11,9 | 0,4 |
| 11-DC | 347 → 97 | 0,075 | 0,075-50 | 0,995 | 12 | 7,5 | 0,3 |
| | 347 → 109 | 0,075 | 0,075-100 | 0,995 | 14 | 7,2 | 0,5 |
| T | 289 → 97 | 0,075 | 0,075-100 | 0,995 | 14 | 7,4 | 0,2 |
| | 289 → 109 | 0,075 | 0,075-100 | 0,995 | 14 | 7,2 | 0,2 |
| d ₃ -T | 292 → 97 | 0,25 | 0,25-7,5 | 0,997 | 7 | 7,9 | 0,1 |
| | 292 → 109 | 0,1 | 0,1-75 | 0,996 | 12 | 8,9 | 0,3 |
| AN | 287 → 97 | 0,25 | 0,25-100 | 0,995 | 12 | 11,4 | 0,1 |
| | 287 → 109 | 0,1 | 0,1-100 | 0,998 | 13 | 9,3 | 0,1 |
| 17-OH- PREG | 350 → 297 | 7,5 | ei riittävää | 0,987 | 6 | 9,8 | 0,2 |
| | 350 → 315 | 10 | ei riittävää | 0,978 | 5 | 9,6 | 0,2 |
| DHEA | 306 → 253 | 10 | ei riittävää | 0,951 | 5 | 10,1 | 0,2 |
| | 306 → 271 | 25 | ei riittävää | 0,874 | 4 | 15,4 | 0,3 |
| DHT | 308 → 256 | 7,5 | ei riittävää | 0,939 | 5 | 18 | 0,2 |
| | 308 → 291 | 5 | ei riittävää | 0,983 | 6 | 15,9 | 0 |
| 5α- THDOC | 351 → 317 | 10 | ei riittävää | 0,959 | 5 | 20,2 | 0,1 |
| | 351 → 336 | 25 | ei riittävää | 0,962 | 5 | 14,1 | 0,1 |
| PREG | 317 → 281 | 25 | ei riittävää | 0,981 | 4 | 36,4 | 0,1 |
| | 317 → 299 | 25 | ei riittävää | 0,984 | 4 | 13,9 | 0,1 |
| PROG | 315 → 97 | 0,5 | 0,5-100 | 0,999 | 11 | 5,9 | 0,1 |
| | 315 → 109 | 0,5 | 0,5-100 | 0,997 | 11 | 5,6 | 0,1 |
| AP | 319 → 257 | 25 | ei riittävää | 0,982 | 4 | 13,9 | 0,1 |
| | 319 → 283 | 25 | 25-100 | 0,999 | 4 | 10,2 | 0,2 |
| d ₄ -AP | 324 → 287 | 25 | ei riittävää | 0,993 | 4 | 12,4 | 0,1 |
| | 324 → 305 | 10 | ei riittävää | 0,984 | 5 | 9,8 | 0,1 |
| IP | 336 → 135 | 25 | ei riittävää | 0,984 | 4 | 9,3 | 0,2 |
| | 336 → 283 | 25 | ei riittävää | 0,973 | 4 | 10,1 | 0,1 |
| 5α-DHP | 334 → 281 | 25 | ei riittävää | 0,985 | 4 | 12,9 | 0,1 |
| | 334 → 299 | 25 | ei riittävää | 0,981 | 4 | 11,5 | 0,2 |

3.3 Esikäsitely

Esikäsitelyn ja matriisin vaikutusta yhdisteiden detektointiin tutkittiin esikäsittelemällä eluentti- ja plasmanäyte, jotka oli spiihattu pitoisuuteen 100 ng/ml. Esikäsitellyssä eluenttinäytteessä pregnenolonin, d₄-allopregnanolonin, allopregnanolonin, isopregnanolonin ja 5 α -dihydroprogesteronin intensiteetit olivat laskeneet aivan havaintoalarajoille, ja muidenkin yhdisteiden intensiteetit olivat vain kolmanneksen siitä, mitä niiden olisi pitänyt olla standardinäytteisiin nähden. Esikäsitelyn seurauksena menetettiin siis osa yhdisteistä. Tämä tuli todistettua myöhemmin, kun tutkittiin uuton saantoa yhdeksällä yhdisteellä ja huomattiin, että saantoprosentit jäivät alhaisiksi (21,7–54,7 %). Esikäsitellyssä plasmanäytteessä näkyivät enää ainoastaan ne yhdisteet, joiden rakenteessa on konjugoitunut kaksoissidos. Tämä saattoi johtua plasmasta tulleen taustakohinan noususta. Myös matriisiin aiheuttamaa ionisaation suppressiota ei voida poissulkea.¹¹⁹ Plasmassa oleva haihtumaton materiaali on voinut hakeutua neste-neste-uuton aikana orgaaniseen faasiin ja estää analyyttien ionisaatiota. Esikäsitelyprosessia ei haluttu muuttaa, sillä se yritettiin pitää mahdollisimman samankaltaisena kuin samaan projektiin kuuluvassa tutkimuksessa Kuopion yliopistossa. Koska havainto- ja määritysalarajat huonosti detektoituville yhdisteille olisivat olleet liian korkeat tutkimuksen tarkoitusta ajatellen, menetelmän kehittämistä päätettiin jatkaa vain hyvin detektoituville 4,5-enei-3-oni-yhdisteillä eli aldosteronilla, hydrokortisonilla, kortisolilla, kortikosteronilla, 11-deoksikortisolilla, testosteronilla, d₃-testosteronilla, androsteenidionilla ja progesteronilla.

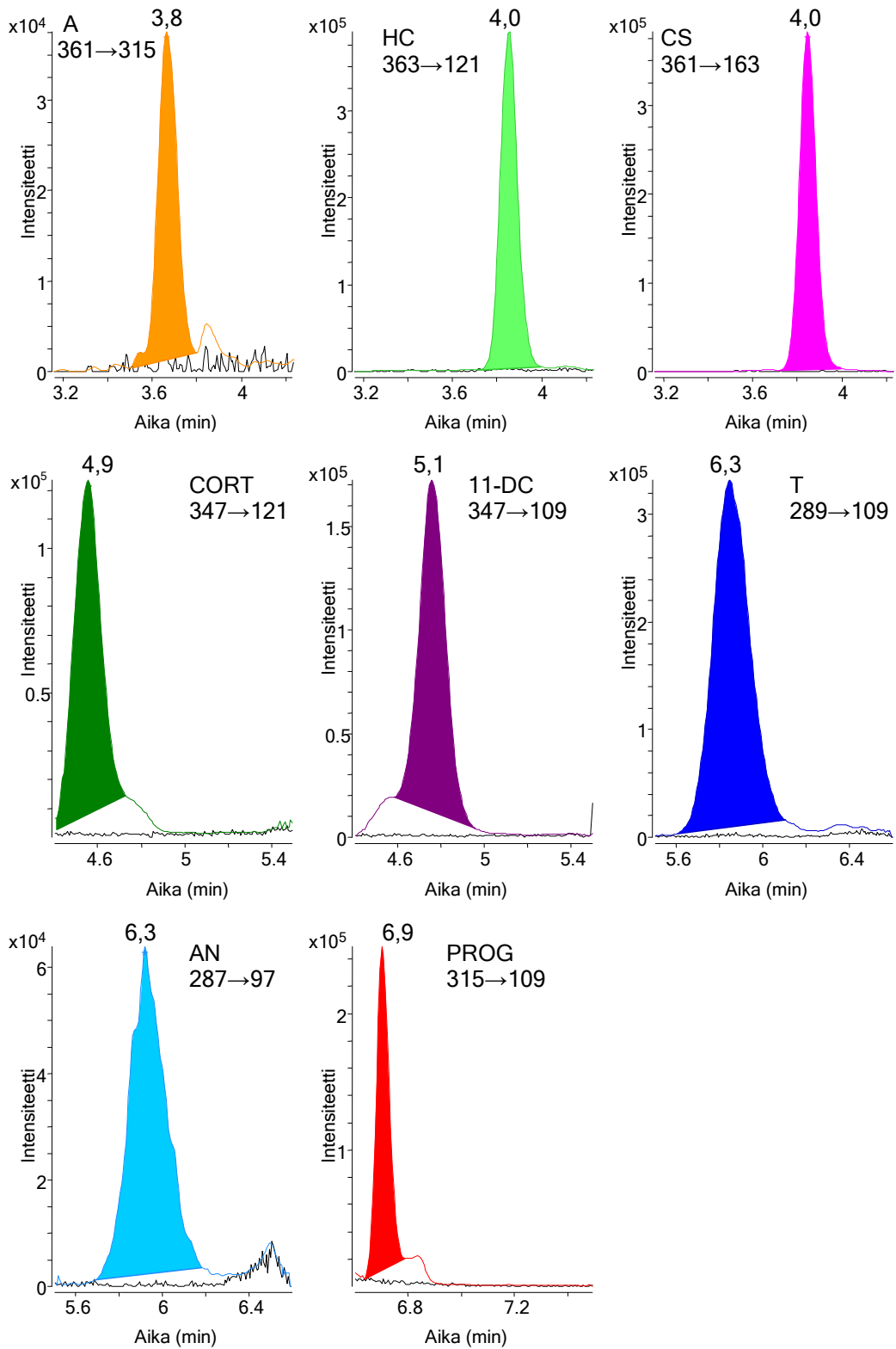
Esikäsitelyn toimivuutta tutkittiin määrittämällä yhdeksälle steroidille uuton saantoprosentit (Taulukko 7). Saantoprosentit jäivät erittäin alhaisiksi ollen välillä 21,7 (androsteenidioni) ja 54,7 (progesteroni). Uttoliuottimena käytetty tert-metylibutyylieetteri ei siis uuttanut tehokkaasti tässä työssä tutkittuja steroideja. Joissakin tutkimuksissa on päädytty käyttämään erilaisia orgaanisten liuosten seoksia hyvän uuton saannon saavuttamiseksi.^{54,55,66} Myös tässä työssä olisi mahdollisesti saavutettu parempi uuton saanto käyttämällä erilaisten liuottimien sekoituksia. Toinen vaihtoehto olisi esikäsitelymenetelmän vaihtaminen neste-neste-uutosta kiinteäfaasiuuttoon.

Taulukko 7. Uuton saanto. Tuloksia ei ole suhteutettu sisäiseen standardiin.

| Yhdiste | SRM-pari | Uuton saanto % |
|---------|-----------|----------------|
| A | 361 → 315 | 42,8 |
| HC | 363 → 121 | 22,6 |
| CS | 361 → 163 | 26,2 |
| CORT | 347 → 121 | 27,5 |
| 11-DC | 347 → 109 | 36,9 |
| T | 289 → 109 | 23,3 |
| AN | 287 → 97 | 21,7 |
| PROG | 315 → 109 | 54,7 |

3.4 Validointi

Lopullisessa menetelmässä käytettiin 7,8 minuuttia kestävää gradienttiajoa ja tutkittavat steroidit eluoituivat 3,8–6,9 minuutin kohdalla (Kuva 8). Yhdisteipiikit olivat suhteellisen kapeita piikkien puolikorkeuksien leveyden (W_h) ollessa välillä 0,040 ja 0,155. Yhdisteiden havaintoalarajat, kalibrointisuorien lineaarisuudet sekä piikkien puolikorkeuksien leveydet on lueteltu taulukossa 8. Havaintoalaraja on yhdisteestä riippuen 0,075–0,5 ng/ml, mikä ei ole vielä riittävän hyvä kaikkien steroidien määrittämiseen hiiren plasmasta. Alhaisempiin havaintoalarajoihin voitaisiin päästä nostamalla injektio-tilavuutta. Validoinnissa käytetty injektio-tilavuus oli 0,75 μ l, mutta samalla mikrosirulla on käytetty jopa 5,05 μ l tilavuuksia.⁸⁷ Tässä työssä saatuja tuloksia esikäsittelyn saannosta ja validoinnista ei ole voitu suhteuttaa sisäiseen standardiin (d_3 -T), sillä sisäisen standardin piikin pinta-ala ei pysynyt vakiona sarjojen aikana. Sisäisen standardin pitoisuus näytteissä (0,83 ng/ml) oli todennäköisesti liian alhainen ja lähellä havaintoalarajaa. d_3 -Testosteronin havaintoalaraja oli 0,5 ng/ml, kun matriisina oli plasma. Kun sisäisen standardin pitoisuutta nostettiin, se antoi valheellisen yhdisteipiikin myös testosteronille. Tässä työssä käytetty sisäinen standardi ei ilmeisesti ollut tarpeeksi puhdasta vaikka d_3 -testosteronin MS-spektrissä ei näkynyt testosteronin massaluvulla piikkiä. Sisäisen standardin puuttumisen vuoksi näytteen esikäsittelyssä tai injektioinnissa tapahtuneita pieniä eroja ei voitu kompensoida ja siksi kalibrointisuorien lineaarisuudet eivät ole kovin hyvät (r^2 välillä 0,987 ja 0,997).



Kuva 8. Lopullisessa menetelmässä mukana olleiden yhdisteiden valittujen tuoteionien kromatogrammit. Jokaisen yhdisteen pitoisuus Ringer + BSA -liuoksessa 5 ng/ml.

Taulukko 8. Menetelmän lopullisen validoinnin tulokset, johon kuului havaintoalarajan ja lineaarisuuden määrittäminen. Piikin puolikorkeuden leveys (W_h) on laskettu pitoisuudessa 25 ng/ml.

| Yhdiste | SRM-ionipari | LOD (ng/ml) | Lineaarisuusalue (ng/ml) | R^2 | Mittapisteet (n) | W_h |
|---------|--------------|-------------|--------------------------|-------|------------------|-------|
| A | 361 → 315 | 0,5 | 0,5-65 | 0,997 | 10 | 0,050 |
| HC | 363 → 121 | 0,1 | 0,1-75 | 0,991 | 13 | 0,070 |
| CS | 361 → 163 | 0,075 | 0,075-75 | 0,995 | 14 | 0,075 |
| CORT | 347 → 121 | 0,1 | 0,1-75 | 0,995 | 13 | 0,135 |
| 11-DC | 347 → 109 | 0,1 | 0,1-65 | 0,990 | 12 | 0,100 |
| T | 289 → 109 | 0,1 | 0,1-65 | 0,987 | 12 | 0,155 |
| AN | 287 → 97 | 0,075 | 0,075-65 | 0,997 | 13 | 0,125 |
| PROG | 315 → 109 | 0,25 | 0,25-65 | 0,942 | 11 | 0,040 |

Injektion toistattavuus on hyvä kaikilla yhdisteillä ensimmäisenä päivänä sekä retentioajan että pinta-alan suhteen (Taulukko 9). Piikin pinta-alan vaihtelu on suurinta aldosteronilla ollen 14,3 %, mikä saattaa johtua yhdisteen huonosta erottumisesta ja muutoksista manuaalisessa integroinnissa. Seuraavana päivänä injektoidujen näytteiden toistettavuus on todella huono pinta-alojen suhteen (41,1-66,7 %). Myös piikkien pinta-alat ovat pienentyneet yli puolella ensimmäiseen päivään verrattuna, mikä todennäköisesti johtuu steroidien adsorboitumisesta lasivialin seinämiin ja korkkiin. Tämä havaittiin myös Axelsonin tekemässä tutkimuksessa, jossa tutkittiin derivatisoitujen ja vapaiden steroidien adsorboitumista teräksen ja lasin pintaan.¹²⁰ Jotta steroidien menetykseltä vältyttäisi, esikäsitellyt näytteet kannattaisi analysoida saman päivän aikana.

Taulukko 9. Injektion toistettavuus (% RSD) kahtena peräkkäisenä päivänä pitoisuudessa 25 ng/ml.

| Yhdiste | SRM-pari | 1. päivä (% RSD) | | 2. päivä (% RSD) | |
|---------|-----------|------------------|-----------|------------------|-----------|
| | | t_R | Pinta-ala | t_R | Pinta-ala |
| A | 361 → 315 | 0,5 | 14,3 | 0,7 | 46,8 |
| HC | 363 → 121 | 0,2 | 3,3 | 0,3 | 60,7 |
| CS | 361 → 163 | 0,3 | 4,9 | 0,3 | 60,8 |
| CORT | 347 → 121 | 0,3 | 6,5 | 0,3 | 50,8 |
| 11-DC | 347 → 109 | 0,3 | 6,5 | 0,4 | 45,0 |
| T | 289 → 109 | 0,2 | 3,0 | 0,1 | 66,7 |
| AN | 287 → 97 | 0,2 | 2,7 | 0,1 | 45,8 |
| PROG | 315 → 109 | 0,1 | 4,1 | 0,3 | 41,1 |

3.5 Autenttisten näytteiden analysointi

Hierren plasmanäytteistä pystyttiin määrittämään aldosteronin, kortikosteronin, testosteronin, androsteenidionin ja progesteronin pitoisuudet (Taulukko 10). Yllättävää kyllä, vain naarashiirten plasmanäytteistä pystyttiin määrittämään aldosteronin pitoisuus, joka geneettisesti muunnelluilla hiirillä oli keskimäärin 1,16 ng/ml ja villintyyppin hiirillä 1,45 ng/ml. Perrierin työryhmineen tekemässä tutkimuksessa uroshiirten aldosteronin pitoisuustaso oli 0,27 ng/ml, joka alittaa tässä työssä saavutetun määritysalarajan (0,5 ng/ml).³⁶ Selitystä tässä tutkimuksessa havaittuun sukupuolten väliseen eroon ei pystytty löytämään. Kortikosteronin pitoisuus pystyttiin määrittämään jokaisesta näytteestä ollen 2,7–88,7 ng/ml. Geneettisesti muunnellun ja villintyyppin välillä ei ollut merkittävää eroa pitoisuuksien keskiarvoissa (27,5 ng/ml vrt. 28,4 ng/ml). Sen sijaan sukupuolten välinen ero oli merkittävä keskimääräisen pitoisuuden ollessa 7,5 ng/ml uroksilla ja 45,8 ng/ml naarailla. Tämä saattaa johtua esimerkiksi stressitilan eroista. Kortikosteronin pitoisuus hiiren plasmassa on havaittu nousevan akuutin ja kroonisen stressin seurauksena noin 20 ng/ml jopa 237 ng/ml.²⁷ Naarashiiret ovat siis voineet altistua stressitekijöille enemmän kuin uroshiiret. Myös yksilölliset erot steroidimetaboliassa voivat aiheuttaa vaihtelua pitoisuustasoihin. Tässä työssä määritetyt kortikosteronin pitoisuudet ovat tästä huolimatta jonkin verran alhaisemmat kuin muissa tutkimuksissa (20 ng/ml ja 108,1 ng/ml).^{27,31} Osa näytteistä analysoitiin vasta seuraavan vuorokauden puolella näytteen valmistuksesta, jolloin osa kortikosteronista on voinut adsorboitua lasivialin seinämiin. Vain yksi uroshiiren näyte (WT2) antoi testosteronin ioniparille kvantitoitavissa olevan piikin. Pitoisuudeksi saatiin 16,5 ng/ml, joka on yli kolminkertainen verrattuna Lurian työryhmin tutkimuksessa saatuun arvoon (4,8 ng/ml).³² Samaisesta uroshiiren näytteestä pystyttiin määrittämään myös progesteronin pitoisuus (15,0 ng/ml), joka on korkeampi kuin naarashiirillä saadut pitoisuudet (9,9 ng/ml).²⁹ Kyseisen näytteen esikäsittelyssä oli tapahtunut virhe ja uutun jälkeen ylimmäistä faasia talteen otettaessa orgaanisen faasin joukkoon oli suodatuksesta huolimatta päässyt muutama tippa plasmaa. Mitä todennäköisimmin plasmasta tulleet yhdisteet saivat aikaan signaalin sekä testosteronille että progesteronille tämän näytteen kohdalla, ja näin ollen tulokset eivät ole luotettavia. Kehitetyllä menetelmällä ei pystytäkään joka tapauksessa määrittämään

luotettavasti testosteronin pitoisuutta, sillä sitä ei saatu eroamaan kromatografisesti samanmassaisesta dehydroepiandrosteronista. Androsteenidionin pitoisuus voitiin määrittää kaikista uroshiirten näytteistä paitsi yhdestä. Määritetty keskimääräinen pitoisuus (0,49 ng/ml) on yli kolminkertainen verrattuna van Weerdenin työryhmän tutkimuksessa saatuun tulokseen (0,14 ng/ml).^{31,121} Sama työryhmä määrittä myös naarashiirten androsteenidionin pitoisuuden, joka oli aavistuksen korkeampi kuin uroshiirillä (0,23 ng/ml vrt. 0,14 ng/ml). Kuitenkin tässä tutkimuksessa ei kyetty määrittämään ollenkaan naarashiirten androsteenidionin pitoisuutta. Myös kortisonin, hydrokortisonin ja 11-deoksikortisolin pitoisuudet näytteissä jäivät alle havaintoalarajojen, joten niiden pitoisuuksia ei pystytty määrittämään kehitetyllä menetelmällä.

Taulukko 10. Turun yliopistosta tulleiden hiirenplasmanäytteiden tulokset.

(-) = Yhdisteen pitoisuus alle havaintoalarajan, (*) = Pitoisuus lineaarisuusalueen ulkopuolella.

| Hiiri | Yhdisteen pitoisuus näytteessä (ng/ml) | | | | | | | |
|------------|----------------------------------------|----|----|-------|-------|------|------|------|
| | A | CS | HC | CORT | 11-DC | T | AN | PROG |
| WT1 uros | - | - | - | 4,9 | - | - | 0,55 | - |
| WT2 uros | - | - | - | 6,6 | - | 16,5 | 0,36 | 15,0 |
| WT3 uros | - | - | - | 13,0 | - | - | 0,75 | - |
| KO1 uros | - | - | - | 9,7 | - | - | 0,38 | - |
| KO2 uros | - | - | - | 2,8 | - | - | 0,56 | - |
| KO3 uros | - | - | - | 6,8 | - | - | - | - |
| KO4 uros | - | - | - | 9,0 | - | - | 0,33 | - |
| WT1 naaras | 1,25 | - | - | 44,4 | - | - | - | - |
| WT2 naaras | 1,58 | - | - | 45,9 | - | - | - | - |
| WT3 naaras | 2,08 | - | - | 54,0 | - | - | - | - |
| WT4 naaras | 0,91 | - | - | 30,0 | - | - | - | - |
| KO1 naaras | 2,46 | - | - | 88,7* | - | - | - | - |
| KO2 naaras | 0,60 | - | - | 27,6 | - | - | - | - |
| KO3 naaras | 0,82 | - | - | 27,3 | - | - | - | - |
| KO4 naaras | 0,74 | - | - | 48,0 | - | - | - | - |

4 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tässä työssä huomattiin, että steroidien rakenne vaikuttaa merkittävästi niiden käyttäytymiseen sähkösumutuksessa. 4,5-enei-3-oni-rakenteellisista steroideista muodostuu pääasiassa protonoituneita molekyyli-ioneja ja steroideista, joiden rakenteessa ei ole konjugoituneita kaksoissidoksia, muodostuu sekä protonoituneita molekyyli-ioneja että ammoniumaddukteja. Steroidien rakenne vaikuttaa myös fragmentoitumiseen törmäyskammiossa. Kaasufaasissa stabiilimmat 4,5-enei-3-oni-rakenteelliset steroidit fragmentoituvat vähemmän kuin neutraalit steroidit muodostaen yleensä vain muutaman tyypillisen hajoamistuotteen.

Nanonestekromatografian kehittämisessä havaittiin, että virtausnopeuden alentaminen 0,7 µl:sta/min 0,3 µl:aan/min paransi huomattavasti yhdisteiden ionisaatiotehokkuutta. Näin ollen havaintoalarajat alentuivat ja piikkien pinta-alat kasvoivat jopa 16-kertaisesti. Myös joidenkin yhdisteiden piikkien muoto parani. Kromatografista erotusta ei kuitenkaan pystytty parantamaan virtausnopeuden alentamisella, vaan useat steroidit eluoituivat samaan aikaan. Huono erotuskyky johtuu siitä, että mikrosirussa olevan erotuskolonnin partikkelikoko on liian suuri verrattuna kolonnin pituuteen. Samanmassaisista yhdisteistä yhtä aikaa eluoituvat testosteroni ja dehydroepiandrosteroni sekä allopregnanoloni ja isopregnanoloni. Näin ollen niitä ei pystytä kvantitoimaan luotettavasti. Menetelmän alustavassa validoinnissa pystyttiin jälleen huomaamaan steroidien rakenteen merkitys ionisaatiotehokkuuteen. 4,5-enei-3-oni-rakenteellisten steroidien havaintoalarajat ja lineaarisuudet olivat huomattavasti paremmat kuin steroidien, joilla ei ole 4,5-enei-3-oni-rakennetta. Sähkösumutuksessa yhdisteet kilpailevat ionisoitumisesta, jolloin yhdisteet, joilla on korkea protoniaffiniteetti ionisoituvat helpommin. Niiden steroidien, joiden rakenteessa ei ole konjugoituneita kaksoissidoksia, havaintoalarajat ovat liian korkeat (5-25 ng/ml) jo ilman biologista matriisia, jotta menetelmällä pystyttäisiin analysoimaan kyseisiä steroideja fysiologisesti relevanteista pitoisuuksista. Alustavassa menetelmän validoinnissa huomattiin myös piikin pinta-alan ja intensiteetin kasvu ajosta toiseen. Tästä muistiefektistä ei päästy eroon ja se saattoi vaikuttaa näytteiden kvantitointiin.

Valittu esikäsittelemenetelmä steroidien erottamiseksi plasmasta ei ollut hyvä, koska sen seurauksena menetettiin noin kaksi kolmasosaa yhdisteiden pitoisuuksista. Todisteena tästä ovat alhaiset uuton saantoprosentit (21,7–54,7). Esikäsitteilyn jälkeen viisi steroidia, joilla ei ole konjugoituneita kaksoissidoksia, ei enää näkynyt kromatogrammissa. Kun tutkittiin steroidien näkyvyyttä biologisissa matriisissa, huomattiin, että esikäsitellyssä plasmanäytteessä näkyivät enää ainoastaan ne yhdisteet, joiden rakenteessa on konjugoitunut kaksoissidos. LLE on uuttomenetelmänä suhteellisen universaali, jolloin plasmassa olevat lipidit voivat siirtyä steroidihormonien kanssa näytteeseen ja täten häiritä steroidin analyysiä.³ Näin kävi todennäköisesti myös tässä työssä. MTBE:n käyttö steroidien uuttoliuottimena ei ole kovin yleistä ja siksi ei tiedetä kuinka hyvin se sopii tässä työssä käytettyjen steroidien uuttamiseen. Koska esikäsittelemenetelmää ei haluttu muuttaa, jouduttiin tekemään kompromissi tutkimuksen tavoitteen kanssa. Usean erilaisen steroidin samanaikaisesta analysoinnista luovuttiin ja menetelmän kehittämistä päätettiin jatkaa yhdeksällä 4,5-ene-3-oni-rakenteellisilla steroideilla, jotka näkyivät hyvin kromatogrammissa myös esikäsitteilyn jälkeen.

Lopullisella menetelmällä päästiin suhteellisen alhaisiin havainto- ja määritysalarajoihin (0,075–0,5 ng/ml). Määritysalarajat ovat riittävän alhaiset ainakin hydrokortisonin, kortikosteronin, testosteronin, androsteenidionin ja progesteronin pitoisuuden määrittämiseen hiiren plasmasta. Menetelmä on hyvin toistettava retentioaikojen suhteen. Myös piikkien pinta-alojen suhteellinen keskihajonta ensimmäisenä päivänä on tyydyttävä muistiefektistä huolimatta. Toisena päivänä mitattujen steroidien pitoisuudet ovat vain puolet siitä mitä ensimmäisenä päivänä johtuen todennäköisesti steroidien adsorboitumisesta lasivialin seinämiin ja korkkiin. Myös silyloituja lasivialeja kokeiltiin, mutta niillä ei huomattu olevan merkittävää eroa. Parhainta olisi siis analysoida näytteet samana päivänä kuin ne on esikäsitelty. Kalibroitaisuorien määrittämisessä saatuja tuloksia ei ole voitu suhteuttaa sisäiseen standardiin, joka luonnollisesti huonontaa suorien lineaarisuutta. d₃-Testosteronin pitoisuudelle tulisikin löytää optimiarvo, jossa se erottuisi selvästi taustasta, muttei aiheuttaisi piikkiä testosteronille. Autenttiset näytteet jouduttiin siis analysoidaan käyttäen ulkoisen standardin menetelmää. Tämä menetelmä ei anna yhtä luotettavia tuloksia kuin sisäisen

standardin menetelmä, sillä ulkoisen standardin menetelmällä ei voida tietää kuinka suuri osa yhdisteistä menetetään esikäsittelyn aikana.

Tässä työssä onnistuttiin siis kehittämään nanoLC- μ ESI-MS/MS-menetelmä kahdeksan steroidin määrittämiseen plasmasta. Kehitetyllä menetelmällä pystyttiin kvantitoimaan aldosteronin, kortikosteronin ja androsteenidionin pitoisuudet hiiren plasmasta. Muiden yhdisteiden pitoisuudet näytteissä jäivät alle havaintoalarajojen, joten niiden pitoisuuksia ei pystytty määrittämään. Kehitetyn menetelmän ongelmana olikin huono herkkyys. Heikosti ionisoituvien yhdisteiden havaintoalarajat ilman biologista matriisia jäivät aivan liian korkeiksi, jotta menetelmää voisi käyttää autenttisten näytteiden analysointiin näiden yhdisteiden osalta. Kehitetty menetelmä ei siis täyttänyt kaikkia tutkimukselle asetettuja tavoitteita. Jotta tavoitteeseen päästäisiin, täytyisi siirtyä käyttämään derivatisoituja yhdisteitä, mikä parantaa menetelmän herkkyyttä ja selektiivisyyttä myös huonosti ionisoituvien yhdisteiden kohdalla. Toinen vaihtoehto on kokonaan uuden menetelmän kehittäminen, sillä esimerkiksi APPI voisi soveltua paremmin neutraalien steroidien ionisointiin kuin ESI.

5 KIITOKSET

Ensiksi haluan kiittää Taivaallista Isääni voimasta ja viisaudesta, jota Hän antoi koko erikoistyön tekemisen ajan. Suuret kiitokset kärsivällisyydestä ja kallisarvoisista neuvoista kuuluvat myös erikoistyön ohjaajalle, Linda Ahoselle. Kiitän farmaseuttisen kemian osaston henkilökuntaa, erityisesti professori Risto Kostiaista, Laura Hintikkaa ja Päivi Uutelaa, saamastani tuesta ja rohkaisusta työn aikana sekä nauruntäyteisistä kahvitauoista. Lämpimät kiitokset myös vanhemmilleni, sukulaisilleni ja ystävilleni kannustuksesta pitkällä opintielläni.

6 KIRJALLISUUSLUETTELO

1. Klyne W: Introduction. Kirjassa: Chemistry of the steroids, ss. 1-24, 1. painos. Toim. Peters R and Young FG, Methuen, London 1957
2. Kirk DN, Marples BA: The structure and nomenclature of steroids. Kirjassa: Steroid Analysis, ss. 1-24, 1. painos. Toim. Makin HLJ, Gower DB and Kirk B, Blackie, Glasgow 1995
3. Makin HLJ, Honour JW, Shackleton CHL: General methods of steroid analysis. Part 1. Extraction, purification and measurement of steroids by high-performance liquid chromatography, gas-liquid chromatography and mass spectrometry. Kirjassa: Steroid Analysis, ss. 114-184, 1. painos. Toim. Makin HLJ, Gower DB and Kirk B, Blackie, Glasgow 1995
4. BIASON-LAUBER A: Molecular medicine of steroid hormone biosynthesis. Mol Aspects Med 19: 155-220, 1998
5. GHAYEE HK, AUCHUS RJ: Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis. Rev Endocr Metab Disord 8: 289-300, 2007
6. MELLON SH, GRIFFIN LD, COMPAGNONE NA: Biosynthesis and action of neurosteroids. Brain Res Brain Res Rev 37: 3-12, 2001
7. YOU L: Steroid hormone biotransformation and xenobiotic induction of hepatic steroid metabolizing enzymes. Chem Biol Interact 147: 233-246, 2004
8. LU NZ, WARDLE SE, BURNSTEIN KL, DEFranco D, FULLER PJ, GIGUERE V, HOCHBERG RB, MCKAY L, RENOIR JM, WEIGEL NL, WILSON EM, MCDONNELL DP, CIDLOWSKI JA: International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. Pharmacol Rev 58: 782-797, 2006
9. FALKENSTEIN E, TILLMANN HC, CHRIST M, FEURING M, WEHLING M: Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. Pharmacol Rev 52: 513-556, 2000
10. APPELBLAD P, IRGUM K: Separation and detection of neuroactive steroids from biological matrices. J Chromatogr 955: 151-182, 2002
11. NOMURA S, FUJITAKA M, SAKURA N, UEDA K: Circadian rhythms in plasma cortisone and cortisol and the cortisone/cortisol ratio. Clin Chim Acta 266: 83-91, 1997
12. REDEI E, FREEMAN EW: Daily plasma estradiol and progesterone levels over the menstrual cycle and their relation to premenstrual symptoms. Psychoneuroendocrinology 20: 259-267, 1995

13. Holst JP, Soldin SJ, Tractenberg RE, Guo T, Kundra P, Verbalis JG, Jonklaas J: Use of steroid profiles in determining the cause of adrenal insufficiency. *Steroids* 72: 71-84, 2007
14. Soldin SJ, Soldin OP: Steroid hormone analysis by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 55: 1061-1066, 2009
15. Higashi T, Yamauchi A, Shimada K, Koh E, Mizokami A, Namiki M: Determination of prostatic androgens in 10 mg of tissue using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with charged derivatization. *Anal Bioanal Chem* 382: 1035-1043, 2005
16. Caruso D, Scurati S, Maschi O, De Angelis L, Roglio I, Giatti S, Garcia-Segura LM, Melcangi RC: Evaluation of neuroactive steroid levels by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in central and peripheral nervous system: effect of diabetes. *Neurochem Int* 52: 560-568, 2008
17. Higashi T, Takido N, Shimada K: Studies on neurosteroids XVII.: Analysis of stress-induced changes in neurosteroid levels in rat brains using liquid chromatography-electron capture atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Steroids* 70: 1-11, 2005
18. Higashi T, Yokoi H, Maekubo H, Honda A, Shimada K: Studies on neurosteroids: XXIII. Analysis of tetrahydrocorticosterone isomers in the brain of rats exposed to immobilization using LC-MS. *Steroids* 72: 865-874, 2007
19. Higashi T, Nagahama A, Mukai Y, Shimada K: Studies on neurosteroids XXII. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for profiling rat brain 3-oxo-4-ene-neuroactive steroids. *Biomed Chromatogr* 22: 34-43, 2008
20. Higashi T, Ninomiya Y, Iwaki N, Yamauchi A, Takayama N, Shimada K: Studies on neurosteroids XVIII LC-MS analysis of changes in rat brain and serum testosterone levels induced by immobilization stress and ethanol administration. *Steroids* 71: 609-617, 2006
21. Higashi T, Ninomiya Y, Shimada K: Studies on neurosteroids XX. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for simultaneous determination of testosterone and 5 α -dihydrotestosterone in rat brain and serum. *J Chromatogr Sci* 46: 653-658, 2008
22. Kim YS, Zhang H, Kim HY: Profiling neurosteroids in cerebrospinal fluids and plasma by gas chromatography/electron capture negative chemical ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* 277: 187-195, 2000
23. Liere P, Akwa Y, Weill-Engerer S, Eychenne B, Pianos A, Robel P, Sjoval J, Schumacher M, Baulieu EE: Validation of an analytical procedure to measure trace amounts of neurosteroids in brain tissue by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 739: 301-312, 2000

24. Vallee M, Rivera JD, Koob GF, Purdy RH, Fitzgerald RL: Quantification of neurosteroids in rat plasma and brain following swim stress and allopregnanolone administration using negative chemical ionization gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Biochem* 287: 153-166, 2000
25. Schumacher M, Weill-Engerer S, Liere P, Robert F, Franklin RJ, Garcia-Segura LM, Lambert JJ, Mayo W, Melcangi RC, Parducz A, Suter U, Carelli C, Baulieu EE, Akwa Y: Steroid hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of the nervous system. *Prog Neurobiol* 71: 3-29, 2003
26. Mason PA, Fraser R: Estimation of aldosterone, 11-deoxycorticosterone, 18-hydroxy-11-deoxy-corticosterone, corticosterone, cortisol and 11-deoxycortisol in human plasma by gas-liquid chromatography with electron capture detection. *J Endocrinol* 64: 277-288, 1975
27. Shu P, Chou S, Lin C: Determination of corticosterone in rat and mouse plasma by gas chromatography-selected ion monitoring mass spectrometry. *J Chromatogr B* 783: 93-101, 2003
28. Corpechot C, Young J, Calvel M, Wehrey C, Veltz JN, Touyer G, Mouren M, Prasad VV, Banner C, Sjovall J: Neurosteroids: 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one and its precursors in the brain, plasma, and steroidogenic glands of male and female rats. *Endocrinology* 133: 1003-1009, 1993
29. Murr SM, Stabenfeldt GH, Bradford GE, Geschwind II: Plasma progesterone during pregnancy in the mouse. *Endocrinology* 94: 1209-1211, 1974
30. Labrie F, Belanger A, Belanger P, Berube R, Martel C, Cusan L, Gomez J, Candas B, Chaussade V, Castiel I, Deloche C, Leclaire J: Metabolism of DHEA in postmenopausal women following percutaneous administration. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103: 178-188, 2007
31. van Weerden WM, Bierings HG, van Steenbrugge GJ, de Jong FH, Schroder FH: Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens. *Life Sci* 50: 857-861, 1992
32. Luria A, Morisseau C, Tsai HJ, Yang J, Inceoglu B, De Taeye B, Watkins SM, Wiest MM, German JB, Hammock BD: Alteration in plasma testosterone levels in male mice lacking soluble epoxide hydrolase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E375-83, 2009
33. Tomei G, Ciarrocca M, Capozzella A, Rosati MV, Vacca D, Ursini A, Cangemi C, Monti C, Tomei F: Effects on androstenedione in male workers exposed to urban stressors. *Inhal Toxicol* 18: 501-506, 2006
34. Leal AM, Moreira AC: Daily variation of plasma testosterone, androstenedione, and corticosterone in rats under food restriction. *Horm Behav* 31: 97-100, 1997

35. Brudieux R, Rakotondrazafy J: Effect of aging and sodium deprivation on plasma concentration of aldosterone and on plasma renin activity in the rat. *Gerontology* 42: 229-234, 1996
36. Perrier R, Richard S, Sainte-Marie Y, Rossier BC, Jaisser F, Hummler E, Benitah JP: A direct relationship between plasma aldosterone and cardiac L-type Ca²⁺ current in mice. *J Physiol* 569: 153-162, 2005
37. Klyne W: The separation of steroids. Kirjassa: *Chemistry of the steroids*, ss. 183-198, 1. painos. Toim. Peters R and Young FG, Methuen, London 1957
38. Hay M, Mormede P: Improved determination of urinary cortisol and cortisone, or corticosterone and 11-dehydrocorticosterone by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 702: 33-39, 1997
39. Volin P: High-performance liquid chromatographic analysis of corticosteroids. *J Chromatogr B Biomed Appl* 671: 319-340, 1995
40. Barnard G, Read GF, Collins WP: General methods of steroid analysis. Part 2. Immunoassay. Kirjassa: *Steroid Analysis*, ss. 185-228, 1. painos. Toim. Makin HLJ, Gower DB and Kirk B, Blackie, Glasgow 1995
41. Bicikova M, Lapcik O, Hampl R, Starka L, Knuppen R, Haupt O, Dibbelt L: A novel radioimmunoassay of allopregnanolone. *Steroids* 60: 210-213, 1995
42. Hubbard WC, Bickel C, Schleimer RP: Simultaneous quantitation of endogenous levels of cortisone and cortisol in human nasal and bronchoalveolar lavage fluids and plasma via gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* 221: 109-117, 1994
43. Becchi M, Aguilera R, Farizon Y, Flament MM, Casabianca H, James P: Gas chromatography/combustion/isotope-ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids to detect misuse of testosterone in sport. *Rapid Commun Mass Spectrom* 8: 304-308, 1994
44. Bowers LD, Borts DJ: Separation and confirmation of anabolic steroids with quadrupole ion trap tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Appl* 687: 69-78, 1996
45. Munoz-Guerra J, Carreras D, Soriano C, Rodriguez C, Rodriguez AF: Use of ion trap gas chromatography-tandem mass spectrometry for detection and confirmation of anabolic substances at trace levels in doping analysis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 704: 129-141, 1997
46. Marcos J, Pascual JA, de la Torre X, Segura J: Fast screening of anabolic steroids and other banned doping substances in human urine by gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 37: 1059-1073, 2002

47. Caulfield MP, Lynn T, Gottschalk ME, Jones KL, Taylor NF, Malunowicz EM, Shackleton CH, Reitz RE, Fisher DA: The diagnosis of congenital adrenal hyperplasia in the newborn by gas chromatography/mass spectrometry analysis of random urine specimens. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3682-3690, 2002
48. Gomes RL, Meredith W, Snape CE, Sephton MA: Analysis of conjugated steroid androgens: deconjugation, derivatisation and associated issues. *J Pharm Biomed Anal* 49: 1133-1140, 2009
49. Horning EC, Horning MG, Carroll DI, Dzidic I, Stillwel.Rn: New Picogram Detection System Based on a Mass-Spectrometer with an External Ionization Source at Atmospheric-Pressure. *Anal Chem* 45: 936-943, 1973
50. Bowers LD, Sanaullah: Direct measurement of steroid sulfate and glucuronide conjugates with high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Appl* 687: 61-68, 1996
51. Guo T, Chan M, Soldin SJ: Steroid profiles using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with atmospheric pressure photoionization source. *Arch Pathol Lab Med* 128: 469-475, 2004
52. Guo T, Taylor RL, Singh RJ, Soldin SJ: Simultaneous determination of 12 steroids by isotope dilution liquid chromatography-photospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 372: 76-82, 2006
53. Harwood DT, Handelsman DJ: Development and validation of a sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay to simultaneously measure androgens and estrogens in serum without derivatization. *Clin Chim Acta* 409: 78-84, 2009
54. Kalthorn TF, Page ST, Howald WN, Mostaghel EA, Nelson PS: Analysis of testosterone and dihydrotestosterone from biological fluids as the oxime derivatives using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21: 3200-3206, 2007
55. Shiraishi S, Lee PW, Leung A, Goh VH, Swerdloff RS, Wang C: Simultaneous measurement of serum testosterone and dihydrotestosterone by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 54: 1855-1863, 2008
56. Stolker AAM, Schwillens PLWJ, van Ginkel LA, Brinkman UAT: Comparison of different liquid chromatography methods for the determination of corticosteroids in biological matrices. *J Chromatogr A* 893: 55-67, 2000
57. Wu Z, Zhang C, Yang C, Zhang X, Wu E: Simultaneous quantitative determination of norgestrel and progesterone in human serum by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *Analyst* 125: 2201-2205, 2000

58. Cappiello A, Famigliani G, Palma P, Termopoli V, Trufelli H, Di Mento R, Mannozi M: LC-ESI-MS determination of diethylene glycol pollution in sea water samples collected around gas extraction platform plants. *Talanta* 80: 257-262, 2009
59. Pedrouzo M, Borrull F, Marce RM, Pocurull E: Simultaneous determination of macrolides, sulfonamides, and other pharmaceuticals in water samples by solid-phase extraction and LC-(ESI) MS. *J sep sci* 31: 2182-2188, 2008
60. Gorog S: Recent advances in the analysis of steroid hormones and related drugs. *Anal Sci* 20: 767-782, 2004
61. Gelpi E: Biomedical and biochemical applications of liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 703: 59-80, 1995
62. Wang C, Catlin DH, Demers LM, Starcevic B, Swerdloff RS: Measurement of total serum testosterone in adult men: comparison of current laboratory methods versus liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 534-543, 2004
63. Wudy SA, Hartmann M, Svoboda M: Determination of 17-hydroxyprogesterone in plasma by stable isotope dilution/benchmark liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Horm Res* 53: 68-71, 2000
64. Leinonen A, Kuuranne T, Kostianen R: Liquid chromatography/mass spectrometry in anabolic steroid analysis--optimization and comparison of three ionization techniques: electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization. *J Mass Spectrom* 37: 693-698, 2002
65. Higashi T, Yamauchi A, Shimada K: 2-hydrazino-1-methylpyridine: a highly sensitive derivatization reagent for oxosteroids in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 825: 214-222, 2005
66. Wang C, Shiraishi S, Leung A, Baravarian S, Hull L, Goh V, Lee PW, Swerdloff RS: Validation of a testosterone and dihydrotestosterone liquid chromatography tandem mass spectrometry assay: Interference and comparison with established methods. *Steroids* 73: 1345-1352, 2008
67. Draisci R, Palleschi L, Ferretti E, Lucentini L, Cammarata P: Quantitation of anabolic hormones and their metabolites in bovine serum and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 870: 511-522, 2000
68. Licea-Perez H, Wang S, Szapacs ME, Yang E: Development of a highly sensitive and selective UPLC/MS/MS method for the simultaneous determination of testosterone and 5 α -dihydrotestosterone in human serum to support testosterone replacement therapy for hypogonadism. *Steroids* 73: 601-610, 2008

69. Singh RJ: Validation of a high throughput method for serum/plasma testosterone using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Steroids* 73: 1339-1344, 2008
70. Moal V, Mathieu E, Reynier P, Malthiery Y, Gallois Y: Low serum testosterone assayed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Comparison with five immunoassay techniques. *Clin Chim Acta* 386: 12-19, 2007
71. Kushnir MM, Rockwood AL, Roberts WL, Pattison EG, Bunker AM, Fitzgerald RL, Meikle AW: Performance characteristics of a novel tandem mass spectrometry assay for serum testosterone. *Clin Chem* 52: 120-128, 2006
72. Yamashita K, Miyashiro Y, Maekubo H, Okuyama M, Honma S, Takahashi M, Numazawa M: Development of highly sensitive quantification method for testosterone and dihydrotestosterone in human serum and prostate tissue by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Steroids* 74: 920-926, 2009
73. Rossi DT, Zhang N: Automating solid-phase extraction: current aspects and future prospects. *J Chromatogr A* 885: 97-113, 2000
74. Rule G, Henion J: High-throughput sample preparation and analysis using 96-well membrane solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of steroids in human urine. *J Am Soc Mass Spectrom* 10: 1322-1327, 1999
75. Ceglarek U, Kortz L, Leichtle A, Fiedler GM, Kratzsch J, Thiery J: Rapid quantification of steroid patterns in human serum by on-line solid phase extraction combined with liquid chromatography-triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 401: 114-118, 2009
76. Lensmeyer GL, Onsager C, Carlson IH, Wiebe DA: Use of particle-loaded membranes to extract steroids for high-performance liquid chromatographic analyses improved analyte stability and detection. *Journal of Chromatography A* 691: 239-246, 1995
77. Kostianen R, Kauppila TJ: Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 1216: 685-699, 2009
78. Bowers LD, Sanaullah: Direct measurement of steroid sulfate and glucuronide conjugates with high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Appl* 687: 61-68, 1996
79. Dooley KC: Tandem mass spectrometry in the clinical chemistry laboratory. *Clin Biochem* 36: 471-481, 2003
80. Raffaelli A, Saba A: Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 22: 318-331, 2003

81. Gao S, Zhang ZP, Karnes HT: Sensitivity enhancement in liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry using derivatization and mobile phase additives. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 825: 98-110, 2005
82. Dzidic I, McCloskey JA: Chemical ionization mass spectrometry using ammonia reagent gas. Selective protonation of conjugated ketones. *Org Mass Spectrom* 6: 939-940, 1972
83. Cai SS, Syage JA: Comparison of atmospheric pressure photoionization, atmospheric pressure chemical ionization, and electrospray ionization mass spectrometry for analysis of lipids. *Anal Chem* 78: 1191-1199, 2006
84. Robb DB, Covey TR, Bruins AP: Atmospheric pressure photoionisation: An ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Chem* 72: 3653-3659, 2000
85. Huikko K, Kostiainen R, Kotiaho T: Introduction to micro-analytical systems: bioanalytical and pharmaceutical applications. *Eur J Pharm Sci* 20: 149-171, 2003
86. Manz A, Harrison DJ, Verpoorte EMJ, Fettinger JC, Paulus A, Lüdi H, Widmer HM: Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems: Capillary electrophoresis on a chip. *J Chromatogr A* 593: 253-258, 1992
87. Horvatovich P, Govorukhina NI, Reijmers TH, van der Zee AG, Suits F, Bischoff R: Chip-LC-MS for label-free profiling of human serum. *Electrophoresis* 28: 4493-4505, 2007
88. Fortier MH, Bonneil E, Goodley P, Thibault P: Integrated microfluidic device for mass spectrometry-based proteomics and its application to biomarker discovery programs. *Anal Chem* 77: 1631-1640, 2005
89. Ghitun M, Bonneil E, Fortier MH, Yin H, Killeen K, Thibault P: Integrated microfluidic devices with enhanced separation performance: application to phosphoproteome analyses of differentiated cell model systems. *J sep sci* 29: 1539-1549, 2006
90. Callipo L, Foglia P, Gubbiotti R, Samperi R, Lagana A: HPLC-CHIP coupled to a triple quadrupole mass spectrometer for carbonic anhydrase II quantification in human serum. *Anal Bioanal Chem* 394: 811-820, 2009
91. Covey TR, Thomson BA, Schneider BB: Atmospheric Pressure Ion Sources. *Mass Spectrom Rev* 28: 870-897, 2009
92. Wilm M, Neubauer G, Mann M: Parent ion scans of unseparated peptide mixtures. *Anal Chem* 68: 527-533, 1996

93. Liu S, Sjoval J, Griffiths WJ: Analysis of oxosteroids by nano-electrospray mass spectrometry of their oximes. *Rapid Commun Mass Spectrom* 14: 390-400, 2000
94. Chatman K, Hollenbeck T, Hagey L, Vallee M, Purdy R, Weiss F, Siuzdak G: Nanoelectrospray mass spectrometry and precursor ion monitoring for quantitative steroid analysis and attomole sensitivity. *Anal Chem* 71: 2358-2363, 1999
95. Liu SY, Sjoval J, Griffiths WJ: Neurosteroids in rat brain: Extraction, isolation, and analysis by nanoscale liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Anal Chem* 75: 5835-5846, 2003
96. Liu S, Griffiths WJ, Sjoval J: Capillary liquid chromatography/electrospray mass spectrometry for analysis of steroid sulfates in biological samples. *Anal Chem* 75: 791-797, 2003
97. Koutny LB, Schmalzing D, Taylor TA, Fuchs M: Microchip electrophoretic immunoassay for serum cortisol. *Anal Chem* 68: 18-22, 1996
98. Shen S, Li Y, Wakida S, Takeda S: Determination of adrenal steroids by microfluidic chip using micellar electrokinetic chromatography. *Environ Monit Assess* 153: 201-208, 2009
99. Pol J, Kauppila TJ, Haapala M, Saarela V, Franssila S, Ketola RA, Kotiaho T, Kostianen R: Microchip sonic spray ionization. *Anal Chem* 79: 3519-3523, 2007
100. Ostman P, Jantti S, Grigoras K, Saarela V, Ketola RA, Franssila S, Kotiaho T, Kostianen R: Capillary liquid chromatography-microchip atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Lab chip* 6: 948-953, 2006
101. Haapala M, Luosujarvi L, Saarela V, Kotiaho T, Ketola RA, Franssila S, Kostianen R: Microchip for combining gas chromatography or capillary liquid chromatography with atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry. *Anal Chem* 79: 4994-4999, 2007
102. Thorslund S, Klett O, Nikolajeff F, Markides K, Bergquist J: A hybrid poly(dimethylsiloxane) microsystem for on-chip whole blood filtration optimized for steroid screening. *Biomed Microdevices* 8: 73-79, 2006
103. Yin H, Killeen K, Brennen R, Sobek D, Werlich M, Goor VD: Microfluidic Chip for Peptide Analysis with an Integrated HPLC Column, Sample Enrichment Column, and Nanoelectrospray Tip. *Anal Chem* 77: 527-533, 2005
104. Hardouin J, Duchateau M, Joubert-Caron R, Caron M: Usefulness of an integrated microfluidic device (HPLC-Chip-MS) to enhance confidence in protein identification by proteomics. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20: 3236-3244, 2006

105. Vollmer M, Horth P, Rozing G, Coute Y, Grimm R, Hochstrasser D, Sanchez JC: Multi-dimensional HPLC/MS of the nucleolar proteome using HPLC-chip/MS. *J sep sci* 29: 499-509, 2006
106. Robotti KM, Yin H, Brennen R, Trojer L, Killeen K: Microfluidic HPLC-Chip devices with integral channels containing methylstyrenic-based monolithic media. *Journal of Separation Science* 32: 3379-3387, 2009
107. Brennen RA, Yin H, Killeen KP: Microfluidic gradient formation for nanoflow chip LC. *Anal Chem* 79: 9302-9309, 2007
108. Groleau PE, Desharnais P, Cote L, Ayotte C: Low LC-MS/MS detection of glycopeptides released from pmol levels of recombinant erythropoietin using nanoflow HPLC-chip electrospray ionization. *J Mass Spectrom* 43: 924-935, 2008
109. Xu X, Roman JM, Issaq HJ, Keefer LK, Veenstra TD, Ziegler RG: Quantitative measurement of endogenous estrogens and estrogen metabolites in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 79: 7813-7821, 2007
110. Xu X, Veenstra TD, Fox SD, Roman JM, Issaq HJ, Falk R, Saavedra JE, Keefer LK, Ziegler RG: Measuring fifteen endogenous estrogens simultaneously in human urine by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Chem* 77: 6646-6654, 2005
111. Nassar AE, Varshney N, Getek T, Cheng L: Quantitative analysis of hydrocortisone in human urine using a high-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric-atmospheric-pressure chemical ionization method. *J Chromatogr Sci* 39: 59-64, 2001
112. Zhao M, Baker SD, Yan X, Zhao Y, Wright WW, Zirkin BR, Jarow JP: Simultaneous determination of steroid composition of human testicular fluid using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Steroids* 69: 721-726, 2004
113. Visser SA, Smulders CJ, Gladdines WW, Irth H, van der Graaf PH, Danhof M: High-performance liquid chromatography of the neuroactive steroids alphaxalone and pregnanolone in plasma using dansyl hydrazine as fluorescent label: application to a pharmacokinetic-pharmacodynamic study in rats. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 745: 357-363, 2000
114. Niessen WM: State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 856: 179-197, 1999
115. Ma Y, Kim H: Determination of Steroids by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 8: 1010-1020, 1997
116. Kallonen SE, Tammimäki A, Piepponen P, Raattamaa H, Ketola RA, Kostiaainen R: Discovery of neurosteroid glucuronides in mouse brain. *Anal Chim Acta* 651: 69-74, 2009

117. Jantti SE, Kiriazis A, Reinila RR, Kostianen RK, Ketola RA: Enzyme-assisted synthesis and characterization of glucuronide conjugates of neuroactive steroids. *Steroids* 72: 287-296, 2007
118. Buckenmaier S, Vollmer M, Trojer L, Emotte C: A Small Molecule HPLC-Chip for the High-sensitivity Quantification of Pharmaceuticals using Triple Quadrupole MS. *LC-GC Europe* 25-27, 2008
119. King R, Bonfiglio R, Fernandez-Metzler C, Miller-Stein C, Olah T: Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *J Am Soc Mass Spectrom* 11: 942-950, 2000
120. Axelson M: Deactivation of gas chromatographic systems for quantitative analysis of MO-TMS derivatives of steroids at the picogram level. *J Steroid Biochem* 8: 693-698, 1977
121. Lau IF, Saksena SK, Chang MC: Effects of hCG on serum levels of testosterone, dihydrotestosterone and androstenedione in male mice. *Horm Res* 9: 169-175, 1978