

Polyfenolien metabolia hyönteisissä

Pro gradu -tutkielma
Erika Alander
Turun yliopisto
Luonnonyhdistekemia
Toukokuu 2022

TURUN YLIOPISTO

Kemian laitos

ALANDER, ERIKA:

Pro gradu -tutkielma, s. 1–35

Kemia

Toukokuu 2021

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

Hyönteisherbivorit metaboloivat kasvien puolustusyhdisteitä monin eri tavoin, mutta metabolian erityispiirteitä ei tunneta hyönteiskunnassa kovinkaan hyvin. Tässä työssä kehitettiin globaaliin käyttöön kvantitatiivinen MetaboKIT-työkalu, jonka avulla voidaan profiloida satojen hyönteislajien polyfenolimetabolialia kahdeksan malliyhdisteen avulla. Yhdisteille ja niiden metaboliiteille kehitettiin herkät UHPLC-MS/MS menetelmät kahdella eri massaspektrometrilla ja yhdisteiden metaboliaa tutkittiin 11 eri pH:ssa kineettisten mittausten avulla. Lisäksi kehitettiin tapa, jolla hyönteisen suolen pH voidaan mallintaa malliyhdisteiden metaboliaa tuntemalla. Valmiin MetaboKIT-työkalun toimivuus testattiin lopuksi neljän hyönteislajin avulla.

Valmis MetaboKIT-työkalu mahdollisti hyönteisten suolen pH:n arvioinnin vertaamalla kasviravinnon ja ulostenäytteen kahveoyylikviinihappoisomeerien määriä toisiinsa; mitä korkeampi pH, sitä pidemmälle isomerisaatio oli edennyt. Tutkimalla malliyhdisteiden metaboliaa ko. pH:ssa *in vitro* ja vertaamalla sitä yhdisteiden todelliseen metaboliaan *in vivo*, oli mahdollista päätellä, kuinka merkittävä rooli pH:lla oli erityyppisten yhdisteiden hapettumisessa ja hydrolyysin tai depolymerisaation kautta tapahtuneessa hajoamisessa. Metaboliittiprofiilieroista voitiin alustavasti päätellä, millaisia yhdisteitä todennäköisimmin oli siirtynyt suolesta esimerkiksi hemolymfan puolelle, tai jos tutkitulla hyönteislajilla oli mahdollisesti jokin muu poikkeuksellinen kyky käsitellä tietyn tyyppisiä malliyhdisteitä.

Asiasanat: herbivori, polyfenoli, metabolia

Sisällysluettelo

1. Johdanto	1
1.1 Polyfenolien metabolia hyönteisissä	1
1.2 Hyönteisherbivorien ruuansulatuskanavan pH ja polyfenolien hapettuminen.....	2
1.3 Polyfenolien hapettuminen entsyymaattisesti	3
1.4 Polyfenolien hydrolyysi ja depolymerisaatio.....	4
1.5 Polyfenolien konjugaatioreaktiot	5
1.6 Polyfenolien metabolian tutkimiseen käytetyt menetelmät	6
1.7 Tutkimuksen tavoitteet.....	7
2. Materiaalit ja menetelmät.....	7
2.1 Kemikaalit.....	7
2.2 UPLC-MS/MS menetelmät.....	8
2.3 Puhtaat malliyhdisteet	9
2.3.1 Yhdisteiden puhdistus Sephadex LH-20 geelikromatografialla	10
2.3.2 Yhdisteiden puhdistus preparatiivisella ja semipreparatiivisella HPLC:llä...	11
2.4 MRM -menetelmän luominen UPLC-MS/MS:lle.....	12
2.5 Klorogeenihapon isomerisaatioasteen määrittäminen.....	13
2.6 Kineettiset mittaukset.....	14
2.7 Hyönteiskokeet.....	15
2.7.1 Näyteputkien valmistus	15
2.7.2 Toukkien syöttäminen ja näytteiden keräys.....	16
2.8 MetaboKIT työkalun lopullinen testaaminen.....	16
3. Tulokset.....	17
3.1 Malliyhdisteiden puhtaus	17
3.2 Metaboliitit.....	19
3.3 pH-mallinnus.....	20
3.5 MetaboKIT -työkalun lopullinen testaaminen	25
4. Tulosten tarkastelu	32
5. Johtopäätökset.....	34
6. Viitteet.....	35

1. Johdanto

1.1 Polyfenolien metabolia hyönteisissä

Kasvit tuottavat erilaisia yhdisteitä puolustusyhdisteikseen. Nämä puolustusyhdisteet ovat erikoistuneita metaboliitteja, jotka mahdollistavat kasvin puolustautumisen ulkoisia tekijöitä, kuten hyönteisherbivoreja vastaan. Kasvin puolustusyhdisteinä toimivat esimerkiksi polyfenolit. Erilaisia polyfenoleita ovat hydrolysoituvat tanniinit, kondensoituneet tanniinit, flavonoidit ja kahvihappojohdannaiset. Kasvien polyfenolit voivat muokkautua hyönteisherbivorien metaboliassa monella eri tavalla. Hyönteisen suolessa on erilaisia vaikuttavia tekijöitä, jotka voivat vaikuttaa yhdisteiden muokkaantumiseen, kuten pH ja eri ruuansulatusentsyymit. Muokkaamalla ravinnon yhdisteitä hyönteinen pystyy hyödyntämään tarvittavia yhdisteitä omissa soluissaan ja muokkaamaan haitalliset yhdisteet haitattomiksi ja poistamaan nämä yhdisteet ruuansulatuksesta.

Hyönteisen suolisto koostuu kolmesta osasta. Ruuansulatus alkaa ensimmäisessä osassa eli etusuolella. Keskisuoli on toinen osa, jossa pääsääntöisesti tapahtuu koko ruuansulatus, ravinnon yhdisteet muokkaantuvat ja ravintoaineet voivat imeytyä hemolymfan puolelle. Kolmas hyönteisen osa on takasuoli, jossa hyönteisen uloste muodostuu ja yhdisteet poistetaan hyönteisen suoletta. Hyönteiset ovat kehittyneet evolutiivisesti, jonka vuoksi osalla hyönteislajeista on erilaisia kykyjä toimia kasvien puolustusyhdisteitä vastaan. Näitä ovat esimerkiksi hyönteisten taipumus välttää tiettyjä kasveja tai kasvinosia, joissa on paljon puolustusyhdisteitä.¹ Tai kyky syödä ravinnokseen haitallisiakin puolustusyhdisteitä.² Lisäksi osa hyönteisistä pystyy eristämään puolustusyhdisteitä kudokseensa, jotta ne välttäisivät yhdisteistä johtuvan myrkytyksen, mutta lisäksi voivat käyttää näitä yhdisteitä hyödykseen esimerkiksi hyönteisen muita vihollisia vastaan.³ Esimerkiksi sahapistiäisen tiedetään varastoivan ravinnon puolustusyhdisteitä hemolymfaan ja käyttävän niitä muurahaisia vastaan.⁴ Näiden kykyjen lisäksi yleisin tapa, mitä hyönteiset käyttävät kasvipuolustusyhdisteitä vastaan, on kolmivaiheinen prosessi, jossa hyönteinen muokkaa yhdisteet metaboliiteiksi. Ensimmäisessä vaiheessa hyönteinen muokkaa kasvin puolustusyhdisteitä hapetuksen, pelkistyksen ja hydrolyysin avulla. Jos ensimmäinen vaihe ei riitä, voi hyönteinen

muokata yhdisteitä vielä toisessa vaiheessa. Toisen vaiheen reaktiot ovat konjugaatioreaktiota esimerkiksi sokeryyksikön kanssa. Kolmas vaihe on kuonaneritys hyönteisen suolesta.⁵ Näiden reaktioiden lisäksi aiemmissa tutkimuksissa on huomattu, että yhdisteet voivat myös isomerisoida suolella.⁶ Mutta vasta vähän on tutkittu, miten hyönteiset käsittelevät kasvien puolustusyhdisteitä ja mitä eri metaboliitteja hyönteinen voi tuottaa metaboliassaan. Lisäksi monimutkaiset kasvihyönteisvuorovaikutukset eivät ole kovin hyvin tunnettuja ennestään.

1.2 Hyönteisherbivorien ruuansulatuskanavan pH ja polyfenolien hapettuminen

Eri hyönteislajeilla ja -lahkoilla metabolia ja siihen liittyvät olosuhteet, kuten suolen pH, ovat erilaisia. Hyönteisen suolen pH voi vaihdella 6.0–11.8 välillä. Korkea pH suolessa on tärkeänä tekijänä useassa metaboliareaktiossa, jotka vaikuttavat organismien protoniaktiivisuuteen.⁷ Suolen pH:n aiheuttamia reaktioita ovat esimerkiksi yhdisteiden hapettuminen hyönteisen metaboliassa.⁸ Hapettuminen on tärkeä reaktio hyönteisen suolessa. Polyfenolien hapettumista emäksisessä ympäristössä on tutkittu *in vitro* ja *in vivo*, ja tuloksien on huomattu olevan monesti samanlaisia. Suolen pH edistää tiettyjen yhdisteiden auto-oksidaatiota, sekä haitallisten metaboliittien muodostumista.⁹ Polyfenolien hapetustuotteet voivat aiheuttaa oksidatiivista stressiä hyönteisille.¹⁰ Yhdisteiden hapettuminen hapellisessa ympäristössä muodostaa haitallisia ja reaktiivisia happiyhdisteitä, ns. ROS-yhdisteitä (reactive oxygen species). ROS-yhdisteet ovat solukalvolle haitallisia vapaita happiradikaaleja ja niiden on todettu aiheuttavan vaurioita hyönteisen suolen epiteelikudokseen, lipideihin, proteiineihin ja DNA:han.^{9,11} Hyönteiset voivat suojautua happiradikaaleja vastaan antioksidanttimekanismeillaan, sillä ROS-yhdisteet neutralisoidaan, kun antioksidantti luovuttaa elektronin.¹² Hyönteisen suolessa on yhdisteitä, jotka toimivat antioksidanteina, mutta myös osa hyönteisen ravinnon yhdisteistä, kuten esimerkiksi C-vitamiini, voi toimia antioksidanteina radikaaleja vastaan.^{13,14}

Hyönteisen suolessa osa yhdisteryhmistä on herkkiä hapettumiselle, kun taas osaan yhdisteistä pH ei vaikuta.¹⁰ Tanniinit ovat yhdisteryhmä, jotka helposti auto-oksidoituvat hyönteisen suolessa.^{9,15} Hydrolysoituvien ja kondensoituneiden tanniinien hapettumista emäksisen pH:n vaikutuksesta on tutkittu *in vitro* ja *in vivo*. Osa hydrolysoituvista tanniineista hapettuu pH:n vaikutuksesta hyönteisen metaboliassa.^{9,10,16} Tämän lisäksi myös tietyt kondensoituneet tanniinit voivat hapettua pH:n vaikutuksesta. Flavonoidien

hapettuminen on harvinaisempaa, mutta flavonoidit, joiden rakenteessa on B-renkaassa kolme OH-ryhmää voivat hapettua. Näiden lisäksi kahvihappojohdannaisetkin voivat hapettua hyönteisen suolessa.⁶

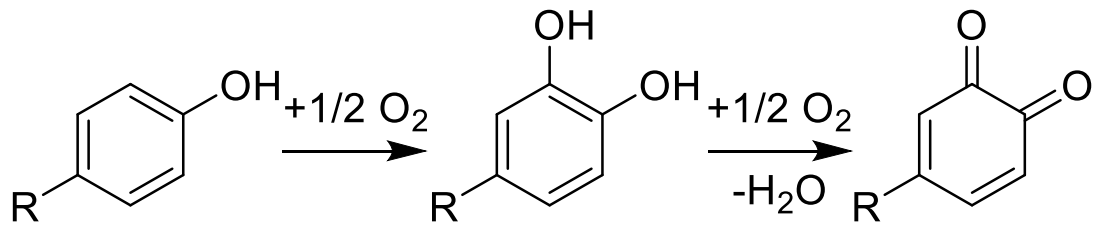
Koska hyönteisen suolen pH voi vaikuttaa moneen eri reaktioon hyönteisen metaboliassa halutaan sitä myös mitata mahdollisimman tarkasti. Tätä varten on kehitetty uusi menetelmä, jonka avulla voidaan selvittää hyönteisen suolen pH:ta kahvihappojohdannaisten avulla. Aikaisemmin hyönteisen suolen pH:ta on mitattu pH-indikaattoripaperilla tai mikroelektrodeilla (pH mittari) suoraan hyönteisestä.^{9,17} Uusi menetelmä perustuu klorogeenihapon isomerisaatioon. Metodia on testattu tähän mennessä *in vitro* ja viidellä eri hyönteislajilla. Hyönteisen ulosteesta voidaan mitata klorogeenihapon kolmen eri isomeerin suhdetta, jonka avulla voidaan siten päätellä hyönteisen suolen pH, kun isomeerejä muodostuu tietyssä pH:ssa tietyssä tunnetussa suhteessa toisiinsa.¹⁵

1.3 Polyfenolien hapettuminen entsyymaattisesti

Hyönteisen suolessa yhdisteet voivat hapettua pH:n lisäksi entsyymien vaikutuksesta.¹⁸ Entsyymit, jotka voivat hapettaa yhdisteitä hyönteisen suolessa ovat mikrosomaalisia sytokromi P450 mono-oksigenaaseja (CYP-entsyymi).¹⁸ Näitä entsyymejä löytyy laajasti mm. nisäkkäistä, hyönteisistä, linnuista, kaloista ja bakteereista. Sytokromi P450 entsyymit sijaitsevat eukaryoottisolun solulimakalvostossa. P450-järjestelmä koostuu kolmesta osasta. CYP-entsyymin lisäksi järjestelmään kuuluu molekulaarinen happi ja elektroneja siirtävä NADPH-sytokromi P450-reduktaasi.¹⁹ Kaikki yksityiskohdat sytokromi P450 toiminnasta ei ole täysin selvillä, mutta sitä tiedetään löytyvän useissa eri muodoissa. Sen monimuotoisuuden vuoksi sytokromi P450 pystyy hapettamaan useiden yhdisteiden funktionaalisia ryhmiä, kuten flavonoidien, klorogeenihapon, kumariinien, glukosinolaattien ja lipofiilisten polyfenoliyhdisteiden.^{18,20,21} Sytokromi P450 esiintyy hyönteisen keskisuolessa. Yleisesti mitään hyönteisen entsyymeistä ei esiinny kuin pienissä määrissä valmiiksi, kunnes hyönteisen suolistoon tulee haitallisia yhdisteitä, milloin entsyymien aktiivisuus lisääntyy.²² Samoin käyttäytyy P450 entsyymi, jonka turhaan irtoaminen tuottaa haitallisia happiyhdisteitä.²⁰

Hyönteinen voi myös aiheuttaa kasvien polyfenolien entsyymaattista hapettumista syödessään kasvia, jolloin kasvin polyfenolit esiintyvät valmiiksi hapettuneina suolessa. Kasveissa esiintyy polyfenoli-oksidaasi entsyymiä (PPO), joka aktivoituu kasvin

altistuessa ulkoiselle stressitekijälle, kuten hyönteisille tai UV-valolle. Aktivoituessaan PPO entsyymi hapettaa kasvin polyfenoleita ja muodostaa kinoneita (Kuva 1).²³



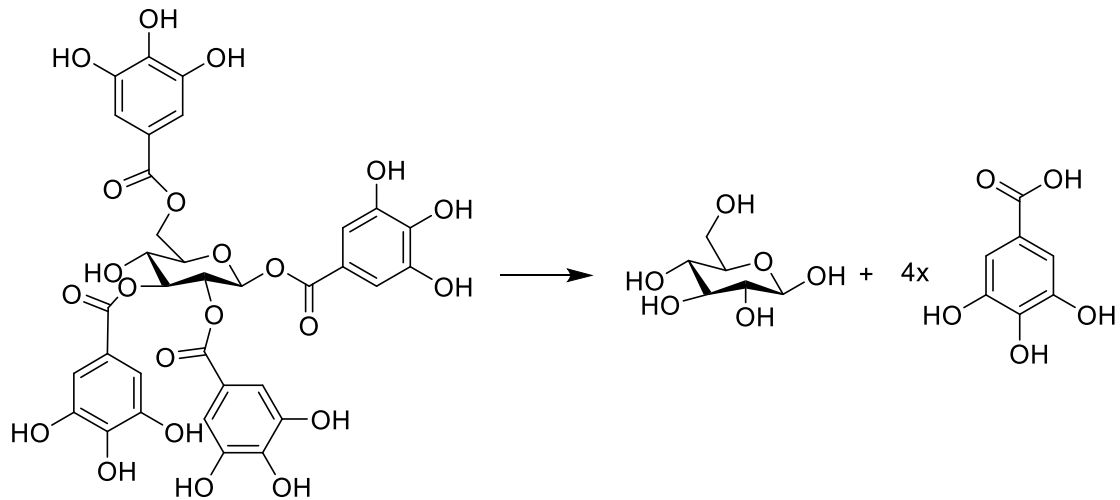
Kuva 1. Polyfenolien hapettumisreaktio. R kuvaa polyfenolien funktionaalista ryhmää.

1.4 Polyfenolien hydrolyysi ja depolymerisaatio

Ensimmäisessä vaiheessa hyönteisten metaboliassa hapetuksen lisäksi tapahtuu hydrolyysiä ja depolymerisaatiota. Polyfenolien hydrolyysi ja depolymerisaatio voivat tapahtua hyönteisen suolessa eri yhdisteryhmille. Mitkä yhdisteet hajoavat näiden reaktioiden kautta riippuu tekijöistä, kuten suolen olosuhteista, yhdisteen rakenteesta ja entsymaattisesta aktiivisuudesta.²⁴ Hydrolyysi on hapetusreaktion lisäksi tärkeä haitallisten yhdisteiden detoksifointimenetelmä hyönteisen suolessa. Haitalliset yhdisteet voivat hydrolysoitua hyönteisen metaboliassa ilman entsyymejä tai entsyymien avulla. Hydrolyyttiset entsyymit vaikuttavat etenkin yhdisteiden ester- ja amidisidoksiin.¹⁹ Yleisemmin hydrolyysi tapahtuu ilman entsyymejä, jolloin hydrolyysiin vaikuttavat tekijät ovat suolen pH, hapetuspotentiaali ja pinta-aktiiviset aineet.¹⁶ Hydrolysoivia entsyymejä tiedetään löytyvän myös hyönteisten lisäksi kasveista.²⁵ Nämä hyönteisen metaboliassa hydrolysoivat entsyymit ovat nimeltään karboksyyliesteraseja. Sen avulla hyönteinen pystyy hydrolysoimaan esimerkiksi haitallisia estereitä vesiliukoisiksi yhdisteiksi, jotka poistuvat soluista nopeammin.

Yhdisteryhmien välillä on eroja hydrolyysin suhteen. Osa yhdisteryhmistä ei hydrolysoitu ollenkaan, toiset hydrolysoituvat huonosti ja toiset paremmin. Esimerkiksi tiettyjen yhdisteiden monomeerit hydrolysoituvat helpommin kuin polymeerit.²⁴ Tutkituin hydrolyysireaktio hyönteisen suolessa on hydrolysoituvien tanniinien hydrolyysi. Ne hydrolysoituvat pH:n, sekä mahdollisesti esteraasin vaikutuksesta muodostaen gallus- ja/tai ellagihappoa (Kuva 2).¹⁰ Hydrolysoituvien tanniinien lisäksi kondensoituneet tanniinit voivat hydrolysoitua suolessa. Kondensoituneet tanniinit depolymerisoituvat kuitenkin hieman huonommin kuin hydrolysoituvat tanniinit.²⁴ Tanniinien hydrolysoitumista pidetään tärkeänä detoksifointireaktiona hyönteisen

suolessa.^{16,26} Muissa yhdisteryhmissä, flavonoideissa ja kahvihappojohdannaisissa ei tiedettävästi tapahdu hydrolyysiä.



Kuva 2. Polyfenolien hydrolyysireaktio, jossa hydrolysoitava tanniini, tetragalloyyyliglukoosi, hajoaa sokeriksi ja gallushapoksi.

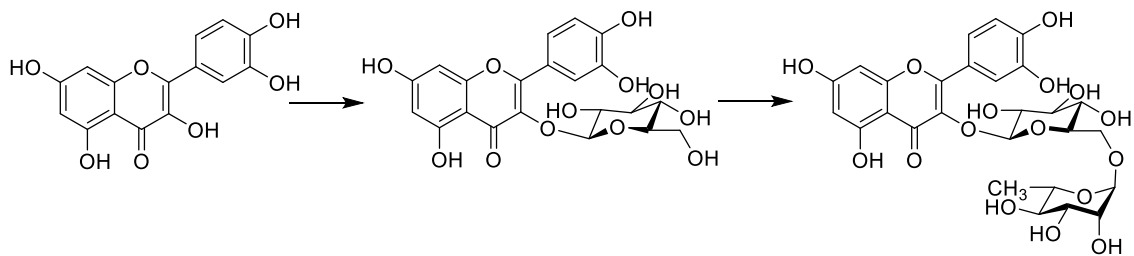
1.5 Polyfenolien konjugaatioreaktiot

Polyfenolien konjugaatioreaktiot tapahtuvat hyönteisen metabolian toisessa vaiheessa hyönteisen hapetettua tai hydrolysoitua yhdisteet. Hyönteinen konjugoii yhdisteitä lisätäkseen yhdisteiden vesiliukoisuutta ja helpommin poistettavuutta, sekä vähentääkseen niiden haitallisuutta.^{18,24,27} Lisäksi hyönteinen voi mahdollisesti konjugoida yhdisteitä ja varastoida ne myöhempää käyttöä varten metaboliassa.²⁸ Hyönteisissä voi tapahtua kolmea erilaista konjugaatiota. Tyypin 1 konjugaatioreaktiot vaativat funktionaaliseksi ryhmäksi OH, NH₂, COOH tai SH, milloin voi tapahtua glukoosin, sulfaatin tai fosfaatin konjugointi. Tyypin 2 reaktiot vaativat COOH-ryhmän, jotta aminohappo voi konjugoitua rakenteeseen. Lisäksi tyypin 3 reaktiot vaativat halogeenin, alkeenin, NO₂-ryhmän, epoksidin, eetterin tai esterin glutationin konjugaatioon.¹⁸ Näistä konjugoitireaktioista ainoastaan tyypin 1 reaktioiden tiedetään tapahtuvan polyfenoleille.

Konjugoidakseen yhdisteitä hyönteisen suolessa on erilaisia konjugoivia entsyymejä. Yleisin hyönteisissä esiintyvä polyfenoleja konjugoiva entsyymi on UDP-glukosyyli transferaasi. Tämän lisäksi osassa hyönteislajeissa tiedetään esiintyvän myös UDP-galaktosyyli transferaasia.²⁹ Näistä UDP-glukosyyli transferaasi liittyy polyfenolin rakenteeseen glukoosin ja UDP-galaktosyyli transferaasi galaktoosin. Entsyymit toimivat

katalysoiden reaktiota, jossa UDP-glukoosin luovuttama sokeryyksikkö liittyy yleensä rasvaliukoiseen polyfenoliin, jotka muuttuvat näin helpommin poistettaviksi.²⁷

Tutkittaessa hyönteisiä, glykosylaation on huomattu olevan tärkeä konjugaatioreaktio hyönteisen metaboliassa flavonoideja vastaan. Hyönteiset voivat glykosyloidia haitallisia rasvaliukoisia flavonoideja liittämällä niihin sokeryyksion, jolloin niistä tulee vesiliukoisia (Kuva 3).^{6,30,31} Harvinaisempi galaktoosin liittyminen voi tapahtua myös flavonoideihin.²⁹ Rasvaliukoiset flavonoidiaglykonit hyönteinen detoksifioi glykosylaatiolla metaboliassaan.³² Mutta hyönteinen ei glykosyloi kaikkia flavonoidiaglykoneja. Tutkimuksissa on huomattu, että vain noin 22 % aglykoneista glykosyloituu.⁶ Hyönteinen pystyy myös rakentamaan flavonolioligoglykosideja metaboliassaan. Näiden uskotaan rakentuvan flavonolimonoglykosideista metaboliassa.³³ Flavonoidien lisäksi glykosylaatiota voi tapahtua kumariinihappojohdannaisissa.³⁴ Tanniineissa tai kahvihappojohdannaisissa ei ole havaittu tapahtuvan konjugaatioreaktioita.



Kuva 3. Polyfenolien glykosylaatioreaktio.

1.6 Polyfenolien metabolian tutkimiseen käytetyt menetelmät

Hyönteisen suolessa tapahtuvat reaktiot muokkaavat ravinnon polyfenoleja monella eri tavalla. Polyfenolien metaboloituessa muodostuu useita erilaisia metaboliitteja. Polyfenolien muodostamia uusia metaboliitteja ei tunneta kovin hyvin ennestään. Suolen metaboliaa ja siellä vaikuttavia tekijöitä voidaan tutkia monin eri tavoin. Polyfenolien metaboliaa tutkiessa voidaan keskittyä suolen olosuhteiden vaikutukseen eli pH-asteeseen ja entsyymeihin. Tai voidaan suoraan tutkia mitä hyönteisen syömille yhdisteille on tapahtunut suolessa.

Polyfenolien metaboliaa voidaan tutkia *in vitro* tai *in vivo*. *In vitro* tutkimisella voidaan selvittää esimerkiksi, miten yhdisteet käyttäytyvät eri pH-asteissa, entsyymien vaikutuksesta, tai yhdisteiden aktiivisuuksia. Kuten aiemmin mainittiin, hyönteisen

suolen pH:ta on voitu tutkia mittaamalla indikaattoripaperilla tai pH-mittarilla, mutta uusin menetelmä perustuu klorogeenihapon isomerisaatiosuhteen seuraamiseen *in vivo*. Tämän menetelmän luomiseen on rakennettu malleja, tutkien ensin klorogeenihapon isomerisaatiota eri pH-asteissa *in vitro*. Samalla tavalla voidaan tutkia polyfenolien käyttäytymistä entsyymien kanssa. Polyfenolien aktiivisuutta voidaan mitata esimerkiksi erilaisilla kuoppalevymittauksilla. Kuoppalevymittauksilla voidaan mitata kokonaisfenolipitoisuutta^{15,35}, oksidatiivista aktiivisuutta¹⁰ tai proteiininsitomiskykyä³⁵. Näillä *in vitro* mittauksilla voidaan ennustaa polyfenolien käyttäytymistä hyönteisen suolessa, jonka jälkeen voidaan tutkia, miten polyfenolit käyttäytyvät *in vivo*.

In vivo mittauksissa usein käytetään hyönteisen isäntäkasvia ja sen polyfenoleja, joita seurataan metaboliassa. Isäntäkasvin polyfenolien metaboliaa voidaan tutkia keräämällä hyönteisen uloste näytteeksi ja/tai itse hyönteinen.^{6,36} Analysoimalla hyönteinen ja/tai sen uloste isäntäkasvin lisäksi saadaan selville isäntäkasvin polyfenolien metaboliatuotteet. Lisäksi hyönteisen metaboliaa on aiemmin tutkittu käyttämällä ¹⁴C-leimattua yhdistettä, jolloin radioaktiivisuutta seuraamalla voidaan tutkia tietyn polyfenolin metaboliaa mm. suolessa.²⁶

1.7 Tutkimuksen tavoitteet

Tutkimuksessa käytettiin polyfenolien metabolian tutkimiseen kahdeksaa mallipolyfenoliyhdistettä, joiden metaboliaa tutkittiin ensin *in vitro* luomalla klorogeenihapon avulla pH-mallinnus uudella menetelmällä¹⁵, sekä selvittämällä niiden käyttäytymistä eri pH-asteissa 9.0–11.0 välillä. Lopuksi selvitettiin seitsemän isäntäkasvin ja neljän hyönteislajin avulla polyfenolien todellinen metabolia *in vivo* käyttämällä näytteinä isäntäkasvia, hyönteisen ulostetta ja hyönteistä. Näiden menetelmien avulla rakennettiin MetaboKIT työkalu, jolla voidaan tutkia ja mallintaa kasvihyönteisvuorovaikutuksia ympäri maailmaa.

2. Materiaalit ja menetelmät

2.1 Kemikaalit

Vesi oli puhdistettu Millipore Synergy UV (Merck KGaA, Saksa) vedenpuhdistuslaitteella. Uutettaessa ja Sephadex LH-20 geelikromatografiassa käytettiin asetonia (analyttinen laatu, VWR, Ranska). Sephadex LH-20:ssa käytettiin

myös metanolia (analyttinen laatu, VWR, Ranska). Vihreä tee oli Pirkan vihreää pussiteetä. Oenothiini B oli aiemmin tutkimusryhmässä valmistettu puhtasaine. 3 mM HCl-liuos valmistettiin 34 % NORMATOM® vetykloridista (VWR, Belgia). 3 mM HCl-liuokseen tehdyn 8 % asetonitriili-liuos pohjana oli myös preparatiivisessa HPLC:ssä käytetty analyttisen laadun asetonitriiliä (Sigma-Aldrich, Ranska). Preparatiivisessa HPLC:ssä käytettiin HPLC metanolia (VWR, Ranska). Puskuriliuosten valmistukseen käytettiin vedetöntä Na₂CO₃:a (VWR, Belgia) ja NaHCO₃:a (Merck, Germany). 0,4–0,8 % HCOOH pH-ajoihin valmistettiin AnalaR NORMAPUR 99–100 % haposta (VWR, Ranska). Näytteille käytettiin analyttisen laadun etanolia (ALTIA Oyj, Suomi). Massaspektrometreillä käytettiin muurahaishappoa (HCOOH) (Sigma-Aldrich, Saksa) ja LC-MS Chromasolv asetonitriilia (ACN) (Sigma-Aldrich, Saksa).

2.2 UPLC-MS/MS menetelmät

Tutkimuksessa käytettiin kahta eri massaspektrometrilaitteistoa. Laitteistot olivat Xevo kolmoiskvadrupolimassaspektrometrilaitte (Waters Corp., Yhdysvallat), johon oli liitetty Acquity UPLC (Waters Corp., Yhdysvallat), sekä kvadrupoli-Orbitrap massaspektrometri, joka koostui Acquity UPLC (Waters Corp., Yhdysvallat) laitteistosta, johon oli liitetty Q ExactiveTM kvadrupoli-Orbitrap massaspektrometri (Thermo Fisher Scientific GmbH, Germany). Kolonneina mittauksissa käytettiin myös kahta eri kolonnia, lyhyttä ja pitkää. Lyhyenä kolonnina toimi Acquity UPLC BEH Phenyl 1.7 µm, 2.1 x 30 mm kolonni (Waters, Irlanti), sekä pitkänä kolonnina Acquity UPLC BEH Phenyl 1.7 µm, 2.1 × 100 mm (Waters, Irlanti). Lyhyellä kolonnilla eluenttien virtausnopeutena käytettiin 0,65 ml/min ja pitkällä kolonnilla 0,5 ml/min. Eluenteina mittauksissa käytettiin asetonitriiliä (A) ja 0,1 % HCOOH:ta (B).

Analyysimenetelmä 1. Menetelmässä käytettiin 100 mm kolonnia ja gradienttiohjelmanä: 0–0,5 min 0,1 % A, 0,5–5,0 min 0,1–30 % A (lineaarinen gradientti), 5,0–6,0 min 35–90 % A (lineaarinen gradientti), 6,0–9,5 min kolonnin pesu ja stabilisointi.

Analyysimenetelmä 2. Menetelmässä käytettiin 100 mm kolonnia ja gradienttiohjelmanä oli: 0,0–3,2 min 0,1 % A, 3,2–3,3 min 0,1–19 % A (lineaarinen gradientti), 3,3–3,8min 19–90 % A (lineaarinen gradientti), 3,8–5,2 min kolonnin pesu ja stabilisointi.

Analyysimenetelmä 3. Menetelmässä käytettiin 30 mm kolonnia ja gradienttiohjelmaksi oli: 0–0,1 min 1 % A, 0,1–3,8 min 1–33 % A (lineaarinen gradientti), 3,8–3,9 min 33–90 % A (lineaarinen gradientti), 3,9–5,0 min kolonnin pesu ja stabilisointi.

Malliyhdisteseosten mittaamiseen käytettiin osaluoppi-injektointia (PLNO, partial loop needle overfill), jolla voitiin mitata standardille laimennossarjasuorat jokaiselle mittauspäivälle. Ensimmäinen injektio oli aina standardin laimennossarjan laimein piste, joka injektointiin PLNO:lla eli UPLC-laitteen näytteenkäsittelijä injektioi 2 µl. Toinen ja kolmas piste saatiin mittaamalla 3 µl ja 4 µl PLNO:lla. Viimeinen piste mitattiin injektioimalla standardiseosta täydellä silmukalla eli 5 µl.

2.3 Puhtaat malliyhdisteet

Malliyhdisteet, klorogeenihappo, prosyaniidiini B2, akasetiini, kemferidi ja kversetiini-3-*O*-glukosidi olivat kaupallisesti hankittuja. Lisäksi klorogeenihapon isomeerit, neoklorogeenihappo (3-CQA) ja kryptoklorogeenihappo (4-CQA), olivat myös kaupallisesti hankittuja. Puhtaista malliyhdisteistä pentagalloyyyliglukoosi (PGG) ja epigallokatekiinigallaatti (EGCG) puhdistettiin Sephadex LH-20 geelikromatografiapylväällä, sekä preparatiivisella ja semipreparatiivisella HPLC-DAD systeemillä.³⁷

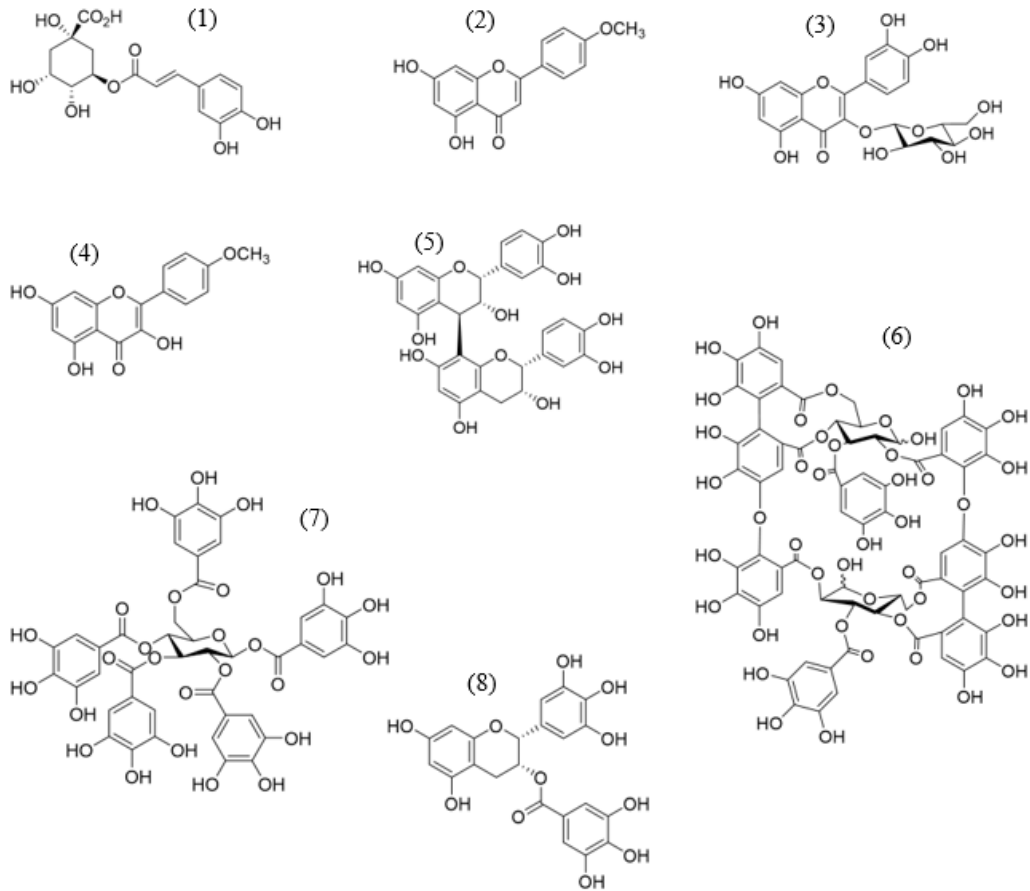
Nämä yhdisteet (Kuva 4) valittiin tutkimukseen, koska jokaisella niistä on jokin ominaisuus, jonka avulla voidaan tutkia tiettyä osa-aluetta hyönteisen polyfenolimetaboliassa. Klorogeenihapon isomerisaatioasteen avulla voidaan määrittää hyönteisen suolen pH.¹⁵ Kverstiini-3-*O*-glukosidi on vesiliukoinen ja hyönteisen metaboliassa siihen voi liittyä lisää sokeryyksikköjä, mikä kertoo hyönteisen metaboliassa tapahtuvasta glykosylaatiosta. Akasetiini ja kemferidi ovat rasvaliukoisia yhdisteitä, jotka voivat saada rakenteeseensa sokeryyksikön hyönteisen metaboliassa, jolloin niistä tulee vesiliukoisia. Prosyaniidiini B2 on PCPC-dimeeri ja EGCG on flavan-3-oli, johon on liittynyt galloyyliryhmä. Nämä yhdisteet havainnoivat proantosyanidiinien metaboliaa hyönteisessä. Oenothiini B ja PGG ovat hydrolysoituvia tanniineja. Näistä oenothiini B on stabiilimpi

ja

PGG

hydrolysoituu

helpommin.



Kuva 4. Kahdeksan mallipolyfenoliyhdistettä: (1) klorogeenihappo, (2) akasetiini, (3) kversetiini-3-O-glukosidi, (4) kemferidi, (5) prosyanidiini B2, (6) oenotheiini B, (7) pentagalloyyilglukoosi, (8) epigallokatekiinigallaatti.

2.3.1 Yhdisteiden puhdistus Sephadex LH-20 geelikromatografialla

Vihreää teetä uutettiin 60 g 800 ml:ssa asetoni/vesi (80/20, v/v) liuosta yön yli tasevavistelijassa 4°C:ssa. Uute imusuodatettiin ja ensimmäisestä uutteesta pyöröhaihdutettiin asetoni pois, jonka jälkeen uute imusuodatettiin uudestaan ja kylmäkuivattiin. Vihreää teetä uutettiin samoin vielä neljä kertaa ja kaikki uutteet käsiteltiin samoin. Uutteiden yhdistekoostumukset tarkistettiin UHPLC-MS/MS:llä ja jatkopuhdistuksiin valittiin ensimmäinen uute, joka sisälsi eniten haluttua EGCG:tä.

Kuivaa PGG:tä liuotettiin 7,49 g 30 ml 50 % metanolin vesiliuosta. PGG liuos lisättiin Sephadex LH-20 geelikromatografia pylvääseen. Fraktioita kerättiin 300–500 ml seuraavasti: kaksi fraktiota 50 % MeOH:lla ja 65 fraktiota 30 % asetoni. Trigalloyyilglukoosia (triGG), tetragalloyyilglukoosia (tetraGG), PGG:tä ja

heksagalloyyylglukoosia (heksaGG) seurattiin ottamalla fraktioista näytteitä ja analysoimalla ne Xevo massaspektrometrilla. Samankaltaiset fraktiot yhdistettiin. Yhdistetyistä fraktioista pyöröhaihdutettiin asetoni, jonka jälkeen fraktiot kylmäkuivattiin.

Taulukko 1. TriGG:n, tetraGG:n ja PGG:n punnitustulokset kylmäkuivauksen jälkeen.

yhdiste	fraktiot	massat (mg)	kokonaismassat (mg)
TriGG	10–11	1,5	1,5
TetraGG	15–17, 18–19	400, 700	1100
PGG	20–23, 29–32, 33–36,	1277, 600, 570,	3876
	37–44, 45–50, 51–52, 53–57, 58–59, 60–65	800, 400, 87, 87, 28, 27	

Teeuutetta liuotettiin 6,07 g 50 ml vettä. Vihreästä teestä puhdistettiin samalla tavalla EGCG:tä Sephadex LH-20 geelikromatografiolla. Fraktioita kerättiin 500 ml seuraavasti: seitsemän fraktiota vedellä, viisi fraktiota 10 % MeOH:lla, kuusi fraktiota 20 % MeOH:lla, viisi fraktiota 30 % MeOH:lla, kuusi fraktiota 40 % MeOH:lla, yksi fraktio 50 % MeOH:lla ja kymmenen fraktiota 70 % MeOH:lla. EGCG:n puhdistusta seurattiin Xevo massaspektrometrillä, jonka perusteella EGCG:tä sisältävät fraktiot olivat 70 % MeOH:lla otetut fraktiot, jotka valittiin jatkopuhdistukseen (Taulukko 2) EGCG fraktioista pyöröhaihdutettiin metanoli ja fraktiot kylmäkuivattiin.

Taulukko 2. Jatko puhdistukseen, joka suoritetaan preparatiivisella HPLC:llä, valittujen vihreän teen fraktioiden punnitustulokset.

fraktiot	2	3	4	5	6	7
massat (mg)	144,6	121,5	536,0	573,3	66,5	22,7

2.3.2 Yhdisteiden puhdistus preparatiivisella ja semipreparatiivisella HPLC:llä

Vihreän teen Sephadex LH-20 -fraktioista jo lähes puhtaat fraktiot, fraktiot 4 ja 5, puhdistettiin preparatiivisella HPLC:llä. HPLC laitteisto koostui Waters 2535 Quaternary Gradient yksiköstä, johon oli liitetty Waters 2998 DAD. Fraktioiden kerääminen tapahtui automaattisella Waters Fraction Collector III kerääjällä 10 ml koeputkiin. Ajossa käytetyt liuokset olivat 14 % metanoli ja 1 % muurahaishapon vesiliuos, sekä virtausnopeus oli 8 ml/min. Erotuskolonne (30 cm x 2,5 cm) oli pakattu LiChroprep RP-18:lla (40–63 µm,

Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Kerättyjen fraktioiden yhdistekoostumus tarkistettiin Xevo massaspektrometrilla. Puhdistetuista ja kerätyistä fraktioista yhdistettiin fraktiot, jotka olivat yhtä puhtaita. Tämän jälkeen fraktioista pyöröhaihdutettiin metanoli pois ja ne kylmäkuivattiin.

Vihreän teen fraktiot 2, 3, 6 ja 7 puhdistettiin semipreparatiivisella HPLC:llä. Laitteisto oli muuten sama kuin preparatiivisessa HPLC:ssä, mutta kolonnina oli Gemini® 10 µm C18 110 Å AXIA™ (150 mm x 212 mm). Gradientteina olivat 0,1 % muurahaishappo ja 14 % asetonitriili. Fraktiot kerättiin 2 ml eppendorf-putkiin. Kerättyjen fraktioiden yhdistekoostumus tarkistettiin Xevo massaspektrometrilla, minkä jälkeen fraktioista haihdutettiin asetonitriili pois Eppendorf-konsentraattorissa (Fisher scientific, USA). Lopuksi yhtä puhtaat fraktiot yhdistettiin ja kylmäkuivattiin.

2.4 MRM -menetelmän luominen UPLC-MS/MS:lle

MRM (Multiple Reaction Monitoring) menetelmä luotiin Xevo massaspektrometrille käyttäen analyysimenetelmää 1. Menetelmä luotiin kuudelle malliyhdisteelle ja niiden metaboliiteille. MRM menetelmää ei luotu akasetiinille ja kemferidille, rasvaliukoisille yhdisteille, koska lopullisella menetelmällä tulee pystyä seuraamaan näiden yhdisteiden glykosylaatiota eikä alkuperäisiä yhdisteitä sinällään. Tästä samasta syystä akasetiini ja kemferidi jätettiin pois myös kineettisistä mittauksista.

Puhtaille malliyhdisteille luotiin MRM menetelmä käyttämällä näyteliuoksena kahta eri kantaliuosta. Ensimmäinen kantaliuos (liuos A) sisälsi yhdisteet PGG ja kversetiini-3-*O*-glukosidi, ja toinen (liuos B) koostui oenotheiini B:stä, EGCG:stä, prosyaniidiini B2:sta ja klorogeenihaposta. Kantaliuokset valmistettiin niin, että jokaista yhdistettä oli liuoksissa 50 µg/ml. Liuottimina käytettiin 25 % etanolin vesiliuosta (A) ja 10 % etanolin vesiliuosta (B). Näytteet analysoitiin Xevo -massaspektrometrilla menetelmällä, joka detektoi näytteen yhdisteet retentioajan ja molekyyli-ionin massan perusteella eri kartiojännitteillä välillä 10–100 V. Jokaiselle yhdisteelle valittiin sopiva kartiojännite, joka antoi suurimman intensiteetin prekursori-ionille. Seuraavaksi analysoitiin näytteet uudestaan metodilla, joka analysoi tuoteionit. Menetelmä detektoi prekursori-ionit retentioajan ja ionin massan perusteella ja mittasi siitä muodostuvat tuoteionit valitulla kartiojännitteellä eri törmäysenergioille välillä 5–50 V. Sopiva törmäysenergia valittiin kahdelle eri tuoteionille valitsemalla törmäysenergia, joka antoi

tuoteionille suurimman intensiteetin. Tuoteioneista suuremman intensiteetin antanut ioni valittiin kvantitatiiviseksi siirtymäksi ja pienemmän intensiteetin antanut kvalitatiiviseksi siirtymäksi. Näiden siirtymien suhde pitää olla aina samalla määritysalueella, jotta tiedetään detektion olevan oikea. Kun jokaiselle prekursori-ionille oli määritetty kartiojännite ja jokaisen prekursori-ionin kahdelle tuoteionille törmäysenergiat, voitiin luoda lopullinen metodi.

Malliyhdisteiden metaboliiteille luotiin MRM metodi hapettamalla yhdisteitä pH 10 puskuriliuoksella 55–115 minuutin ajan. Jokaiselle pääyhdisteelle valmistettiin hapetusta varten oma kantaliuos, jossa oli tarpeeksi korkeassa konsentraatiossa pääyhdistettä, jotta sen hajotessa metaboliitteja muodostuu detektointia varten tarpeeksi paljon liuokseen. Kantaliuoksista valmistettiin yhdistepitoisuudeltaan 10 mg/ml. Liuottimina käytettiin 10 % tai 25 % etanolin vesiliuosta riippuen yhdisteestä. Yhdisteitä hapetettiin samalla analysoimalla näytteitä, jotta voitiin seurata yhdisteiden hajoamista. Kun pääyhdiste oli hajonnut ja metaboliitteja muodostunut tarpeeksi, pysäytettiin reaktio 0,6 % HCOOH:lla. Hapetettuja liuoksia käyttämällä saatiin luotua MRM menetelmät muodostuneille metaboliiteille samalla tavalla kuin puhtaille pääyhdisteille.

2.5 Klorogeenihapon isomerisaatioasteen määrittäminen

Klorogeenihapon isomerisaatiota tutkittiin myös Xevo massaspektrometrilla käyttäen analyysimenetelmää 2. Klorogeenihapon isomeerien suhdetta mitattiin 11 eri pH:ssa 180 min inkuboinnin ajan. pH-asteet olivat 0.2 asteen välein 9.0–11.0 välillä. Mittauksissa käytettiin kolmea lähtötilannetta. Jokaisessa lähtötilanteessa oli vain yhtä kolmesta isomeerista. Klorogeenihapon isomeerit olivat 4CQA ja 3CQA. Kantaliuokset valmistettiin jokaisesta isomeerista niin, että liuoksessa oli 1 mg/ml yhdisteitä. Yhdisteet liuotettiin ensin 100–200 µl etanolia, jolla varmistettiin yhdisteen liukeneminen kokonaan, jonka jälkeen laimennettiin 10 % etanolin vesiliuoksella oikeaan pitoisuuteen. Kantaliuoksia pipetoitiin kuoppalevylle 20 µl kolmeen kuoppaan, joista saatiin mitattua rinnakkaiset näytteet. Kuoppiin lisättiin 180 µl pH 10 puskuria saman aikaisesti 12-kanavapipetillä. Yhdisteitä hapetettiin tasan 180 min ajan, jonka jälkeen hapetus pysäytettiin 100 µl HCOOH:ta 12-kanavapipetillä. HCOOH:n pitoisuus riippui pH:sta. Reaktion pysäytyksessä käytettiin pH-asteille 9.0–9.4 0,4 % HCOOH:ta, pH-asteille 9.6–10.2 0,6 % HCOOH:ta ja pH-asteille 10.4–11.0 0,8 % HCOOH:ta. Mittauksissa standardina käytettiin 1 mg/ml kantaliuoksia, joista oli tehty 15-kertaiset laimennokset.

2.6 Kineettiset mittaukset

Kineettiset mittaukset tehtiin analyysimenetelmällä 3. Xevo massaspektrometrilla ja kvadrupoli-Orbitrap massaspektrometrilla. Kineettisten mittausten näyteliuokset valmistettiin kantaliuoksista, jotka valmistettiin ensin punnitsemalla 2 mg jokaista yhdistettä omaan eppendorf-putkeen. Tämän jälkeen yhdisteet liuotettiin ensin 50–200 µl EtOH:ta ja lopuksi liuotettiin 1000 µl tilavuuteen 10 % EtOH:lla. Näistä liuoksista yhdistettiin PGG, kversetiini-3-*O*-glukosidi ja klorogeenihappo (A-liuos) suodattamalla (0.2 µm PTFE) ne uuteen 5 ml eppendorf-putkeen. Samoin yhdistettiin EGCG, oenothiini B ja prosyaniidiini B2 (B liuos). Kantaliuoksiin lisättiin vielä 1 ml 10 % etanolin vesiliuosta, jotta saatiin yhdisteiden pitoisuuksiksi 0,5 mg/ml. Kantaliuoksia pipetoitiin kuoppalevylle, jossa kuopan tilavuus oli 700 µl. Yhdelle riville pipetoitiin 20 µl yhtä kantaliuosta kolmeen kuoppaan ja toista kantaliuosta toiselle riville. Pipetoitiin aina rivi kerrallaan 12-kanavapipetillä samanaikaisesti 180 µl pH puskuria kuoppiin juuri ennen UHPLC-MS/MS:lle injektointia. Injektoitiin jokaisesta kolmesta kuopasta viisi kertaa. Pipetoitiin yksi rivi kerrallaan tarkasti samaan aikaan kuin edellinen. Molemmille massaspektrometreille käsiteltiin näytteet samalla tavalla. pH puskureina käytettiin samoja liuoksia kuin klorogeenihapon isomerisaation mittauksissa pH:t 9.0–11.0 välillä 0.2 asteen välein. Standardeina mittauksissa käytettiin näyteputkia, joissa kaikkia kahdeksaa malliyhdistettä oli 25 µg. Näyteputkien yhdisteet liuotettiin ensin 50 µl EtOH:ta ja laimennettiin 500 µl tilavuuteen 10 % EtOH:lla. Standardien pitoisuus oli näin 50 µg/ml. Standardit mitattiin PLNO:lla paitsi vahvimman pitoisuuden piste, joka mitattiin täydellä silmukalla, jolloin tämän pisteen pitoisuus tiedettiin ja sitä voitiin pitää luotettavana. Täydellä silmukalla mitatun pisteen yhdistepitoisuus oli 50 µg/ml. Tämän avulla korjatut pitoisuudet voitiin laskea muillekin pisteille UV -pinta-aloista. Jokaisen pisteen UV -pinta-ala jaettiin vahvimman pitoisuuden pisteen UV -pinta-alalla ja kerrottiin sen pitoisuudella (50 µg/ml). Jokaiselle malliyhdisteelle saatiin näin omat standardisuorat jokaisessa pH-asteessa, kun kahden standardisetin korjattujen pitoisuuksien keskiarvot esitettiin integroitujen massapinta-alojen keskiarvojen suhteen. Tietyn malliyhdisteen standardisuoraa käytettiin aina saman malliyhdisteen ja sen metaboliittien näytetuloksien muuttamiseen pitoisuuksiksi.

2.7 Hyönteiskokeet

2.7.1 Näyteputkien valmistus

Hyönteiskokeita varten valmistettiin näyteputkia, joissa oli tunnettu määrä kahdeksaa malliyhdistettä. Näyteputkiin pipetoitiin valmistettua liuosta, jossa jokaisen yhdisteen pitoisuus oli 40 µg/ml. Liuos valmistettiin ensin liuottamalla erikseen jokaista yhdistettä 2 mg 5 ml asetonia, jonka jälkeen jokaista yhdisteliuosta pipetoitiin 1 ml korkilliseen 10 ml lasipurkkiin. Tämän jälkeen laimennettiin vielä 2 ml asetonia, jotta lopullisen liuoksen yhdistepitoisuudeksi saatiin 40 µg/ml. Liuosta pipetoitiin 100 µl 463 kpl 0,5 ml Eppendorf-putkiin ja näyteputket konsentroitiin kuivaksi Eppendorf-konsentraattorilla käyttäen 1,5–2 ml Eppendorf-putkia telineenä. Näin saatiin toukkakokeita varten näyteputkia, joissa oli jokaista kahdeksaa malliyhdistettä 4 µg. Valmiita näyteputkia säilytettiin -20°C:ssa.

Myöhempiä hyönteiskokeita varten ja standardiliuoksiksi mittauksiin valmistettiin näyteputkia, joissa oli 25 µg malliyhdistettä. Kahdeksaa malliyhdistettä punnittiin 12,50 mg lasipunnitusruuhiin ja yhdisteet huuhdeltiin punnitusruuhista Pasteur-pipetillä 2–4 ml asetonia 50 ml mittapulloon. Yhdisteet liuotettiin ensin noin 45 ml asetonia. Osa yhdisteistä ovat heikosti liukenevia, joten lämmitettiin mittapulloa lämpimässä vedessä, kunnes saatiin yhdisteet kokonaan liukenemaan. Lämmittämisen jälkeen odotettiin, että liuos on taas huoneenlämpöinen ja pullo voitiin täyttää merkkiin asti. Mittapulloon valmistetussa liuoksessa oli näin 250 µg/ml kahdeksaa malliyhdistettä. Mittapullon sisältö siirrettiin huolellisesti 50 ml korkilliseen lasipulloon, josta liuos voitiin pipetoida 0,5 ml Eppendorf-putkiin. Asetonia pipetoitaessa piti olla tarkka ja nopea, koska liuos haihtui herkästi, joten pipetoitiin 10–12 Eppendorf-putkea kerralla elektronisella pipetillä aina 100 µl yhteen Eppendorf-putkeen. Liuoksen säilytyspurkin kansi pidettiin mahdollisimman paljon kiinni, jotta liuosta ei haihdu turhaan, jolloin putkia voitiin valmistaa sen verran kuin liuosta riitti eli 471 kpl. Eppendorf-putkiin lisättiin 100 µl ultra puhdasta vettä, jonka jälkeen putkista konsentroitiin asetoni pois Eppendorf-konsentraattorilla käyttäen 1,5–2 ml Eppendorf-putkia telineenä 0,5 ml Eppendorf-putkille. Konsentroidut näyteputket jäädytettiin -20°C:ssa, jonka jälkeen ne kylmäkuivattiin kuivaksi. Kuivauksen jälkeen näyteputket säilytettiin -80°C:ssa.

2.7.2 Toukkien syöttäminen ja näytteiden keräys

Toukat ja niiden isäntäkasvit kerättiin Turun Ruissalosta kesäkuun alussa. Neljää eri toukkalajia kerättiin yhdeksästä isäntäkasvista. Jokaista isäntäkasvia kohden kerättiin vähintään kymmenen toukkaa. Kerätyt toukat olivat perhosten toukkia ja kuuluivat mittarien heimoon (Geometridae). Isäntäkasveja olivat tunturikoivu, pähkinäpensas, keltakoivu, metsävaahtera, tammi, sokerivaahtera ja hevostakanja. Toukat kerättiin muovirasioihin isäntäkasvin lehtien kanssa, missä ne kuljetettiin laboratorioon. Isäntäkasveista otettiin mukaan runsaslehtiset oksat, joita pidettiin mahdollisimman tuoreina antamalla niille vettä. Laboratoriossa toukat siirrettiin omiin reikäkorkillisiin muovipurkkeihin. Isäntäkasvien lehdistä leikattiin 15 mm halkaisijaltaan olevia lehtikiekkkoja neljä kappaletta jokaiselle toukalle. Toukkien annettiin yön yli syödä kontrollilehtiä, jonka jälkeen kerättiin ylimääräinen lehtimateriaali pois. Kontrolliuloste kerättiin talteen vasta seuraavana päivänä, kun toukat olivat olleet yhden yön ilman ravintoa. Kontrolliulosteen keräämisen jälkeen annettiin toukille näytelehti, joka valmistettiin jokaisen toukkalajin isäntäkasvin lehdestä. Lehtikiekkon (\varnothing 15 mm) pinnalle maalattiin näyteputken sisältö, joka liuotettiin 50 μ l 80 % asetonia. Näyteputket ravisteltiin ja sentrifugoitiin, jonka jälkeen näyteputken sisältö maalattiin lehtikiekkon pinnalle tarkasti pipetin kärjellä, jotta liuosta ei valu lehden pinnalta pois. Asetonin annettiin haihtua lehtien pinnalta ennen kuin kiekkot syötettiin toukille, mutta varottiin ettei lehti pääse kuivumaan ennen syöttämistä. Toukat saivat syödä yön yli näytelehteä. Seuraavana aamuna annettiin toukille kontrollilehteä ja vasta myöhemmin päivällä kerättiin näyteuloste talteen, jotta saatiin kerättyä kaikki toukan tuottama näyteuloste. Lopuksi kerättiin myös toukat reikäkorkillisiin Eppendorf-putkiin ja säilöttiin syväjähän. Kaikki näytteet kylmäkuivattiin ennen uuttoja.

2.8 MetaboKIT työkalun lopullinen testaaminen

Lopullisessa testauksessa analysoitiin kvadrupoli-Oritrap massaspektrometrillä isäntäkasvit, kontrolli- ja näyteulosteet, sekä toukat. Kylmäkuivatut näytteet punnittiin, jauhettiin ja uutettiin ennen analysointia. Näytteet jauhettiin kuulamyllyllä yhden kuulan kanssa, jonka jälkeen näytteisiin lisäitiin 200 μ l d5-fenyylialaniini 100 μ g/ml sisäistä standardia, sekä 1200 μ l 93:7 asetoni/vesi liuosta (v/v). Liuoksien lisäämisen jälkeen kuulat poistettiin näyteputkista niin, että kuulan mukana ei poistunut näytemateriaalia. Näytteitä ravisteltiin Vortex-ravistajalla 5 minuutin ajan ja annettiin maseroitua kylmässä

(4°C) yön yli. Näytteet uutettiin seuraavana päivänä kaksi kertaa kolmen tunnin ajan. Ensimmäisen uuton jälkeen näytteet sentrifugoitiin, dekantoiitiin uuteen putkeen ja lisättiin 1400 µl asetoni/vesi liuosta (80:20 v/v) näytemateriaaliin. Näytteet ravisteltiin Vortexilla ennen seuraavaa kolmen tunnin uuttoa. Uuton jälkeen näytteet sentrifugoitiin ja dekantoiitiin. Dekantointi tehtiin samoihin putkiin kuin aiemmin, joista oli konsentroitunut asetoni pois. Lopuksi asetoni konsentroidiin kokonaan pois näytteistä, jonka jälkeen näytteet pakastettiin ja kylmäkuivattiin.

Kylmäkuivauksen jälkeen näytteet valmisteltiin analysointia varten. Näytteet liuotettiin ensin 3 mM HCl liuokseen. Liuotintilavuus määräytyi näytteen punnitun massan mukaan. Tilavuudet menivät seuraavasti: <2,5 mg 100 µl, 2,5-4,5 mg 200 µl, 4,5-6,5 mg 300 µl, 6,5-8,5 mg 400 µl, 8,5-10,5 mg 500 µl, 10,5-12,5 mg 600 µl, 12,5-14,5 mg 700 µl, 14,5-16,5 mg 800 µl, 16,5-19,5 mg 900 µl, >19,5 mg 1000 µl. Liuotuksen jälkeen näytteet ravisteltiin Vortex-ravistelijalla, sentrifugoitiin ja suodatettiin (0,2 PTFE-suodatin). Suodatettuja näytteitä pipetoitiin 25 µl kuoppalevyille ja kuoppiin lisättiin 475 µl 8 % asetonitriiliä (valmistettu 3 mM HCl liuokseen) 12-kanavapipetillä. Kuoppien sisältö sekoitettiin 12-kanavapipetillä ottamalla liuos pipetin kärkeen ja takaisin vähintään kolmesti. Näytteet analysoitiin kvadrupoli-Orbitrap massaspektrometrillä analyysimenetelmällä 3. Standardeina lopullisissa mittauksissa käytettiin 50 µg/ml kahdeksan malliyhdisteen liuosta, joka oli valmistettu samoin kuin kineettisissä mittauksissa.

Lopullisten mittausten tulokset käsiteltiin lopulta MZ-mine ohjelmalla, joka käsitteli negatiivisella ionisaatiolla mitatun raakadatan ja löysi valmiiksi kaikki löydettyt ionit. Lisäksi Xcalibur -ohjelmalla integroitiin UV:lta jokapäiväiset standardit. Yhdiste seoksesta, jossa oli kaikkia kahdeksaa malliyhdistettä, integroitiin viiden yhdisteen UV:n antaman piikin pinta-alat, klorogeenihappo käsiteltiin erikseen. Jokaisella yhdisteellä käytettiin yhdisteille parasta UV aallonpituutta.

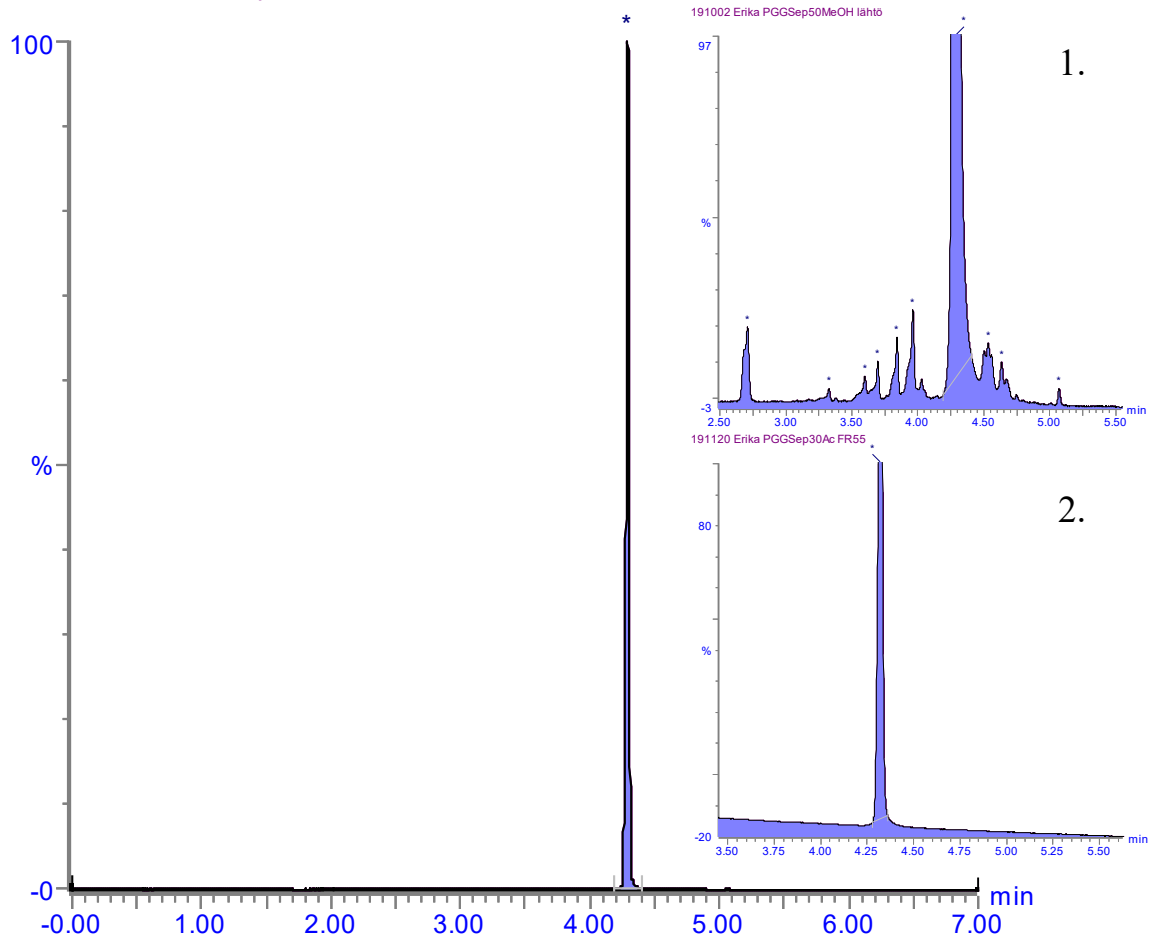
3. Tulokset

3.1 Malliyhdisteiden puhtaus

Malliyhdisteistä puhdistettiin PGG ja EGCG Sephadex LH-20 geelikromatografialla. Karkean puhdistuksen tuloksena saatiin suoraan puhdasta PGG:tä, mutta EGCG vaati

vielä lisää puhdistusta HPLC:llä. PGG:n punnitustulokset ovat listattu Taulukkoon 1.

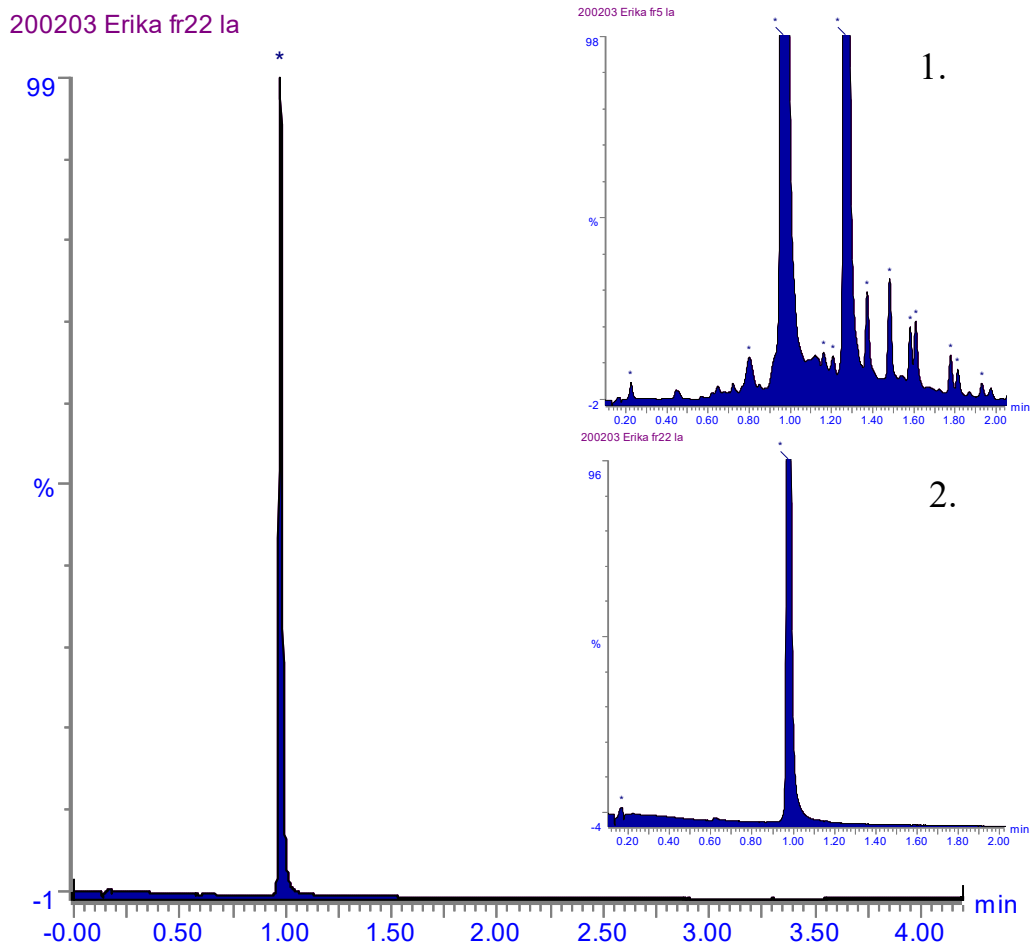
191002 Erika PGGSep50MeOH lähtö



Kuva 5. Puhdistetun pentagalloyyliglukoosin UV-kromatogrammi. Lähtöaine (1) ja puhdistettu (2) pentagalloyyliglukoosi.

EGCG:tä puhdistettiin preparatiivisella ja semipreparatiivisella HPLC:llä, joista saatiin puhdasta EGCG:tä 161,5 mg. Vielä jatkopuhdistusta tarvitsevaa EGCG:tä jäi 371 mg. HPLC puhdistuksen jälkeen saatiin kuitenkin riittävästi puhdistettuja yhdisteitä MetaboKIT työkalun valmistelua ja käyttöönottoa varten.

PGG:n ja EGCG:n puhdistus HPLC:llä esitetty kuvissa 5 ja 6.



Kuva 6. Puhdistetun EGCG:n UV-kromatogrammi. Lähtöaine (1) ja puhdistettu (2) EGCG.

3.2 Metaboliitit

Xevo massaspektrometrilla tehtyjen malliyhdisteinkubointien avulla MRM-menetelmää luodessa saatiin esiin malliyhdisteiden metaboliitit. Metaboliittien m/z -arvot ja retentioajat on esitetty Taulukossa 3, sekä UV-kromatogrammit ja massaspektromit Liittessä 1 Näiden arvojen avulla luotiin lopullinen MRM-menetelmä mittauksia varten.

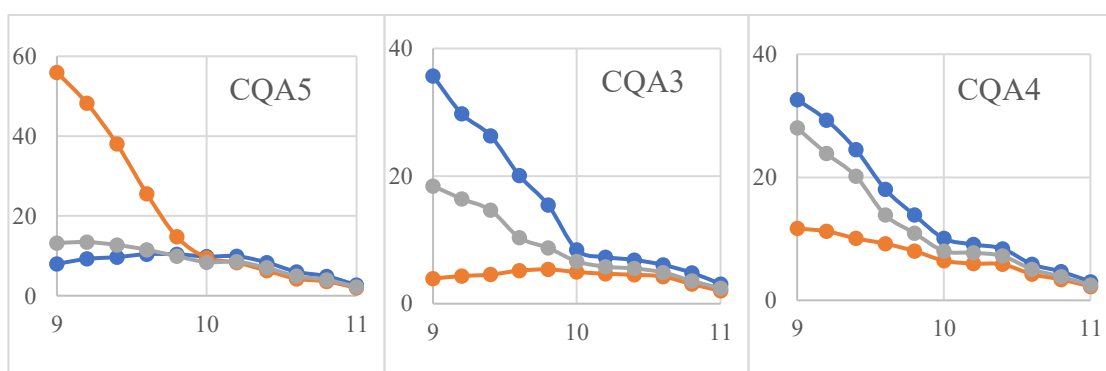
Taulukko 3. MRM metodin avulla tunnistetut malliyhdisteet ja niiden metaboliitit.

pääyhdiste			metaboliitti		
m/z	R_t	nimi	m/z	R_t	nimi
			787,10	1,78	tetraGG
939,11	2,24	PGG	635,09	1,22	triGG
			301,00	1,80	ellagihappo
463,09	1,93	kversetiini-3- <i>O</i> -glukosidi	-	-	-
353,09	1,10	CQA	487	1,93	-

457,08	1,46	EGCG	169,01	2,20	gallushappo
			713,12	1,98	-
			913,15	1,39	theasinensin A
577,14	1,33	prosyaniidiini B2	289,07	1,02	katekiini
			575,12	2,06	prosyaniidiini dimeeri
			591,11	1,14	-
			865,20	1,65	prosyaniidiini trimeeri
783,07	1,16	oenothiini B	754,07	1,22	-

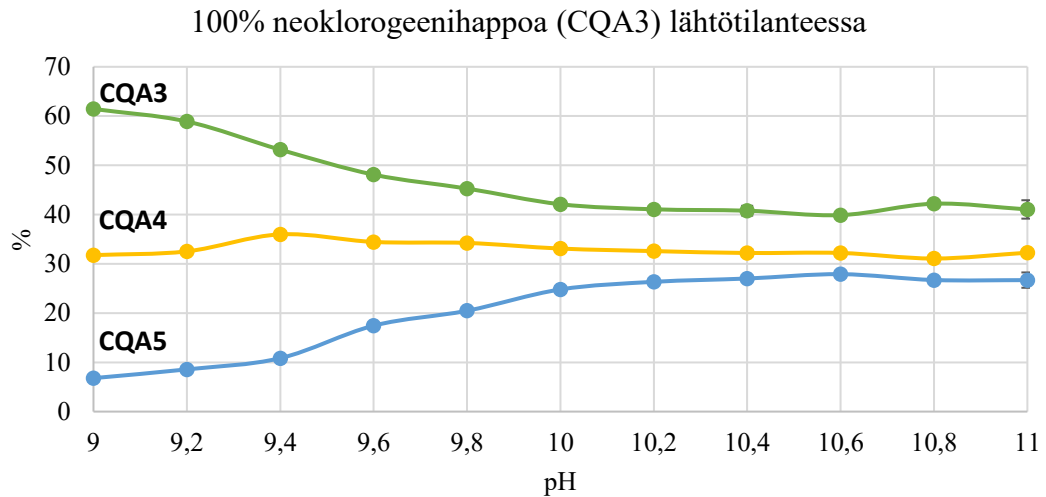
3.3 pH-mallinnus

Klorogeenihapon ja sen isomeerien isomerisaatioasteen määrittämisen tuloksista saatiin tehtyä pH-mallinnus, jonka avulla voidaan mallintaa hyönteisen suolen pH:ta. Mittausten tuloksista integroitiin TargetLynx -ohjelmalla klorogeenihapon isomeerien UV pinta-alat standardeista ja näytteistä. Jokaisesta pH-asteesta saatiin kolme rinnakkaisarvoa, joiden keskiarvon avulla voidaan esittää tulokset kvantitatiivisesti varsinaista pH-mallinnusta varten lopullisten mittausten tuloksiin. Kvantitatiivisessa suorassa esitettiin kuinka isomeerien pitoisuus laskee prosentuaalisesti eri pH-asteissa lähtötilanteesta, jossa aina yhtä isomeeriä on 100 %. Tulokset kvantitatiivisiin suoriin saatiin laskemalla eri pH-asteissa muodostuneiden isomeerien rinnakkaisarvojen keskiarvot UV pinta-aloista. Nämä keskiarvot voitiin jakaa standardien täydellä silmukalla mitatun pisteen UV pinta-alalla, joka on sama kuin lähtötilanne, ja tulokset muutettiin prosenteiksi, jolloin saatiin esitettyä nämä arvot kvantitatiivisessa suorassa pH-asteiden suhteen (Kuva 7).

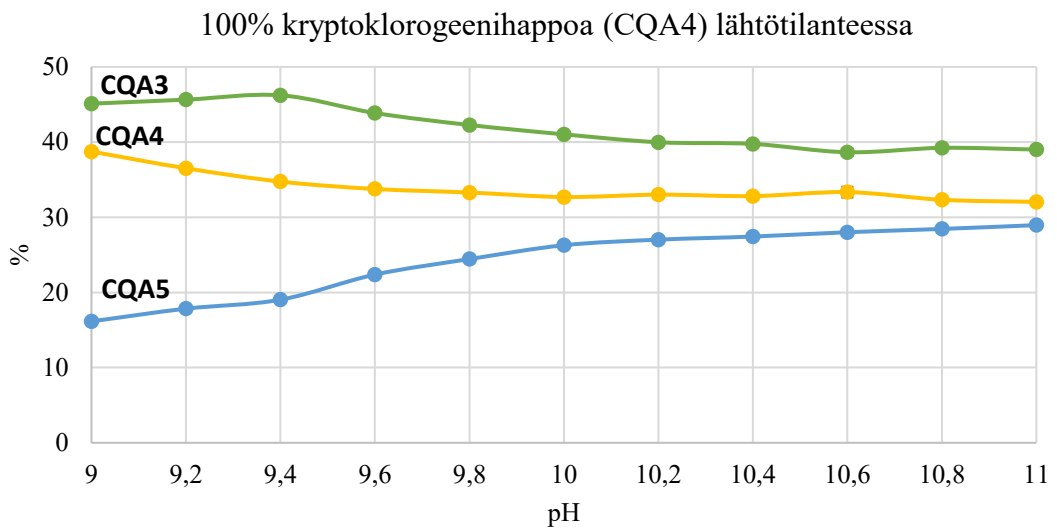


Kuva 7. Klorogeenihapon pH-mallinnuksen kvantitatiiviset suorat. Y-akselilla isomeerien määrä prosenteissa, kun lähtötilanne on 100 % ja x-akselilla pH-asteet. Sininen suora on CQA3, oranssi CQA5 ja harmaa CQA5.

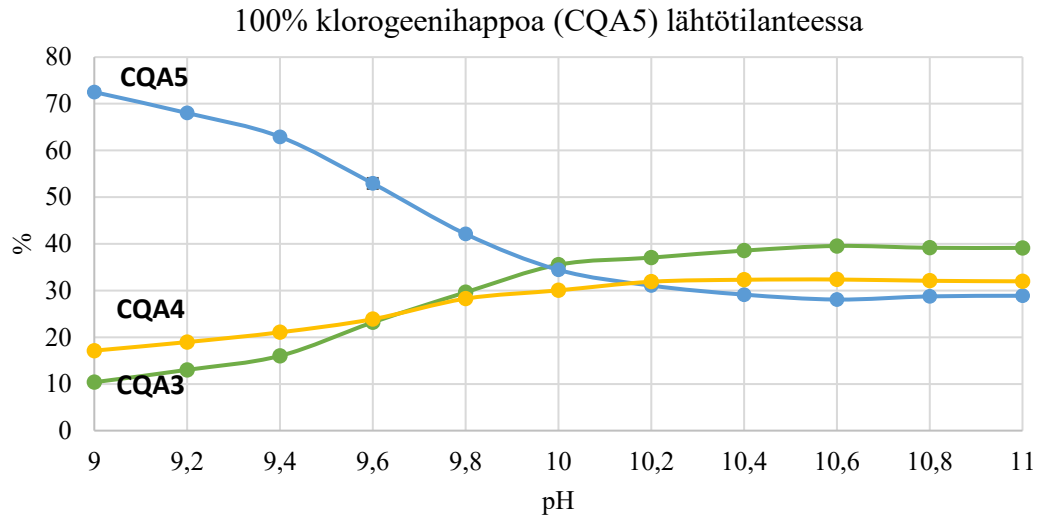
Aina yhdessä mittauspisteessä muodostuneet kahveoylikviinihappoisomeerien UV pinta-alat voitiin laskea yhteen, tällä arvolla voitiin jakaa yksittäisten isomeerien UV pinta-alat ja muuttaa nämä arvot prosenteiksi, jolloin saatiin prosenttiosuus jokaiselle isomeerille eri pH-asteissa Näin klorogeenihapon pH-mallinnus voitiin esittää myös kvalitatiivisilla suorilla (Kuva 8–10).



Kuva 8. Kahveoylikviinihappoisomeerien isomeerisuhteiden kehitys pH:n funktiona, kun neoklorogeenihappoa inkuboidaan eri pH-asteissa kolmen tunnin ajan.



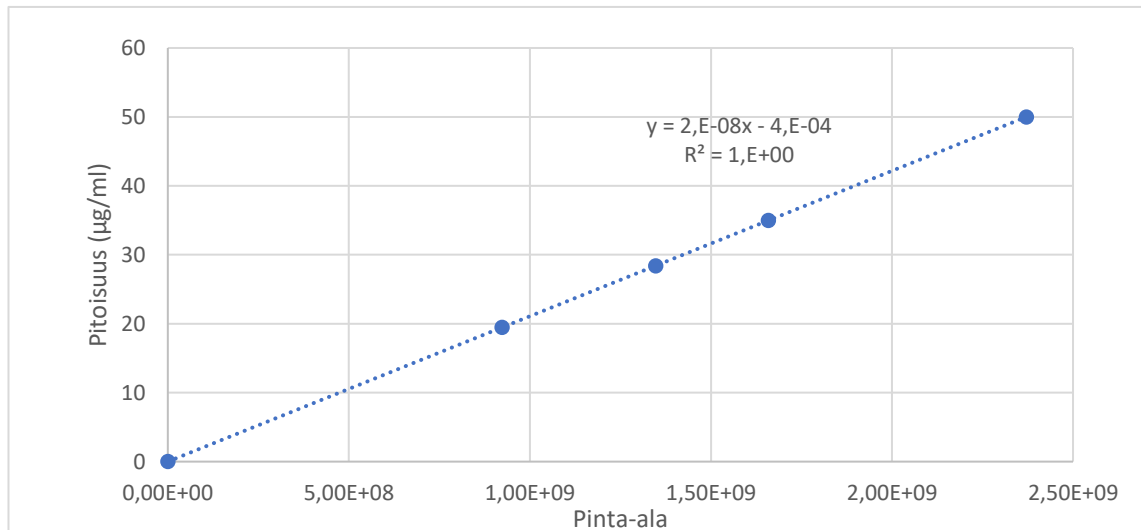
Kuva 9. pH-mallinnuksen kvalitatiivinen suora, kun inkuboidaan kryptoklorogeenihappoa eri pH-asteissa kolmen tunnin ajan.



Kuva 10. pH-mallinnuksen kvalitatiivinen suora, kun inkuboidaan klorogeenihappoa eri pH-asteissa kolmen tunnin ajan.

3.4 Malliyhdisteiden mallinnus pH-asteittain

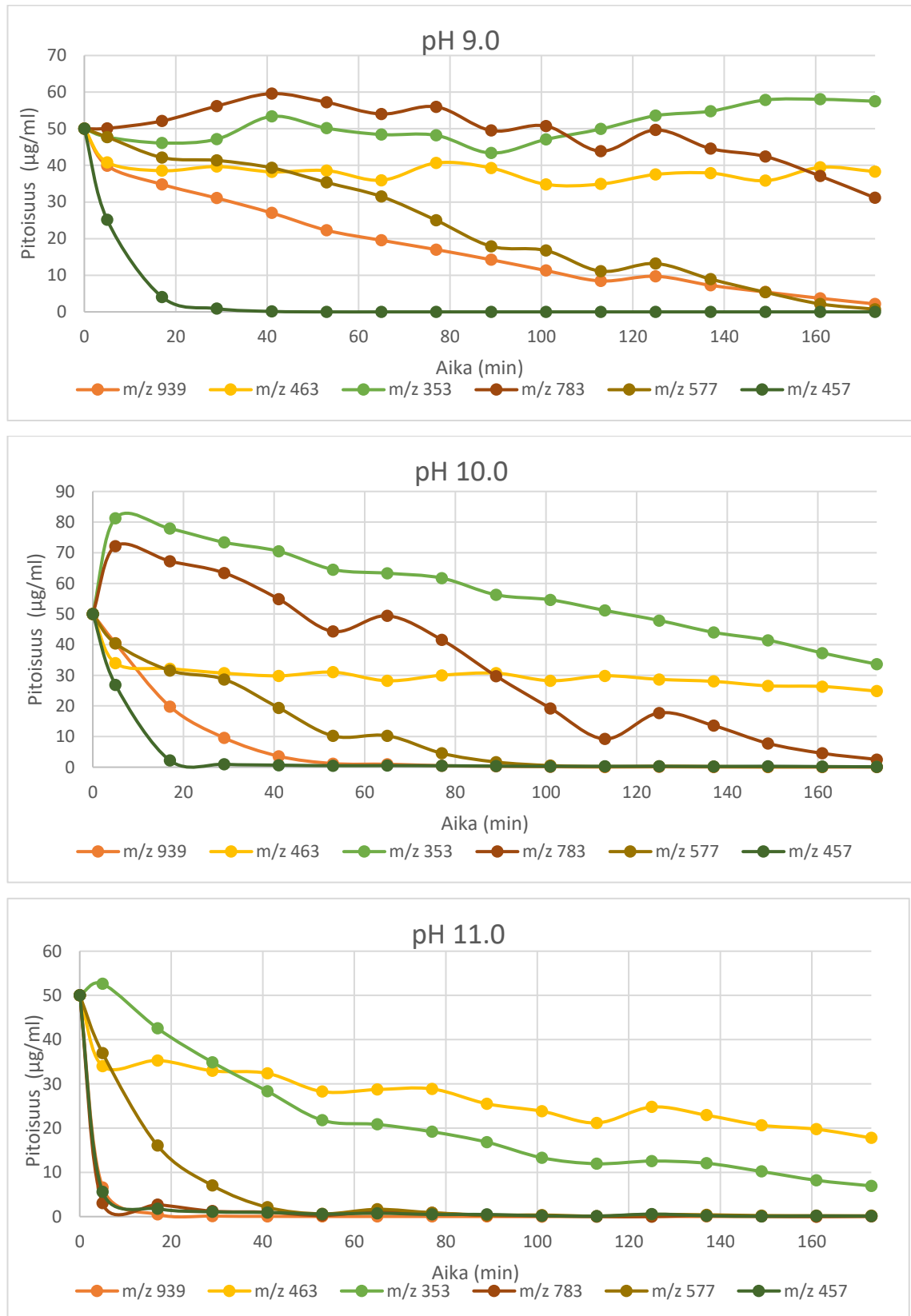
Kineettisten mittausten raakadata saatiin integroitua Xevo massaspektillä mitattaessa TargetLynx -ohjelmalla. TargetLynx -ohjelmalla integroitiin standardien UV -pinta-alat ja äiti-ionien massapinta-alat, sekä näytteen MRM:llä tunnistetut malliyhdisteiden massapinta-alat. Yhden mittauspäivän aikana mitattujen standardisuorien keskiarvon avulla saatiin muutettua näytteen massapinta-alat pitoisuuksiksi (Kuva 11).



Kuva 11. Yhden mittauspäivän aikana mitattujen standardisuorien keskiarvo PGG:lle, jonka avulla muutettiin PGG:n massapinta-alat pitoisuuksiksi.

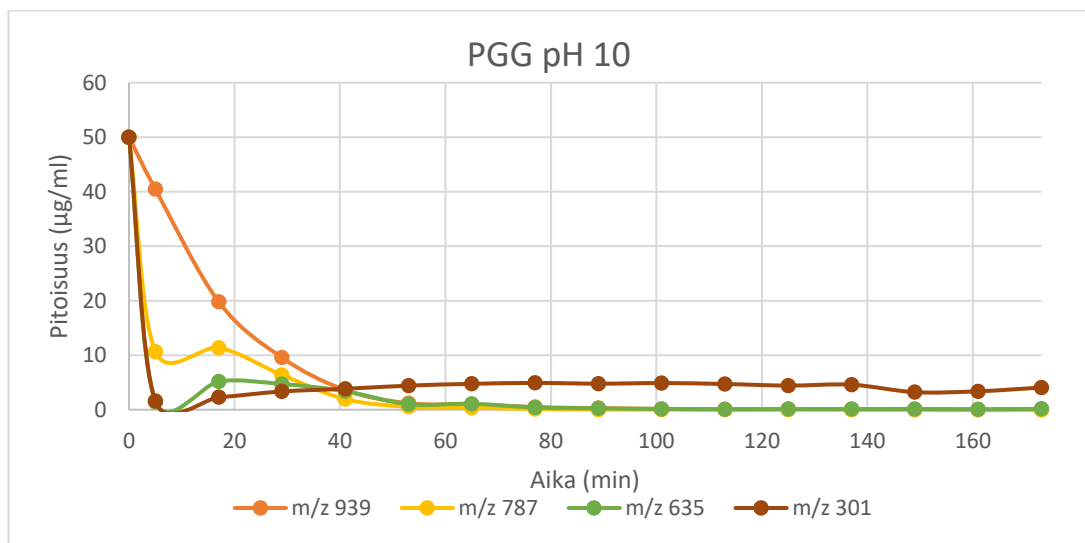
Pitoisuudet saatiin käyttämällä standardisuoran yhtälöä, jossa y on pitoisuus ja x on massapinta-ala. Näin saatiin mallinnettua, miten malliyhdisteet käyttäytyvät 11 eri pH-

asteessaajansuhteen (Kuva 12, Liite 2), sekä malliyhdisteiden hajoamista metaboliiteiksi ajan suhteen (Kuva 12-15).

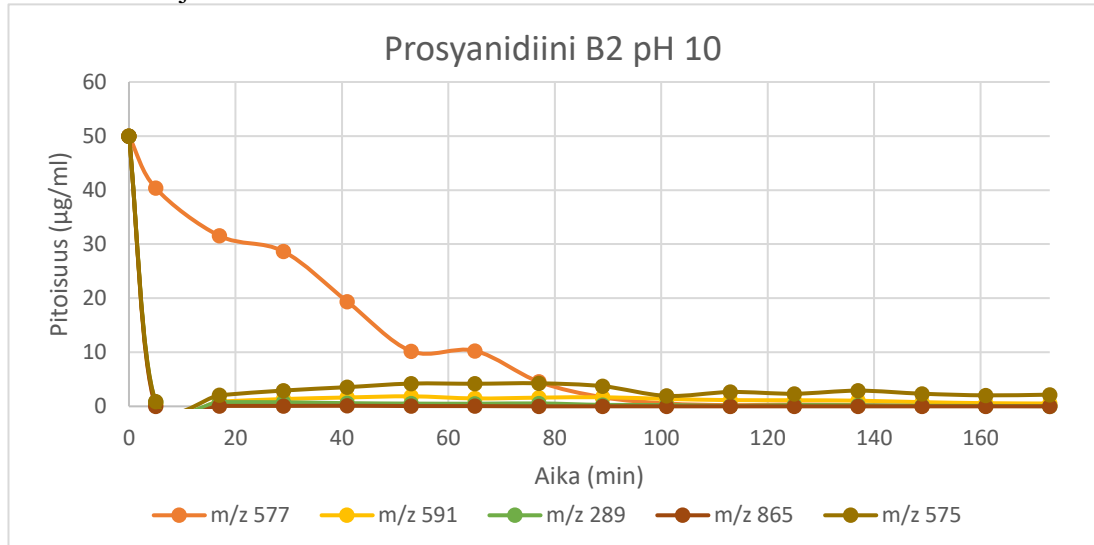


Kuva 12. Malliyhdisteiden pH-mallinnus, jossa yhdisteiden hajoamista seurataan kolmen tunnin ajan 11 eri pH-asteessa. Tassa kuvattu yhdisteiden hajoaminen kolmessa pH-asteessa, loput pH-aste mallinnukset Liittessa 1.

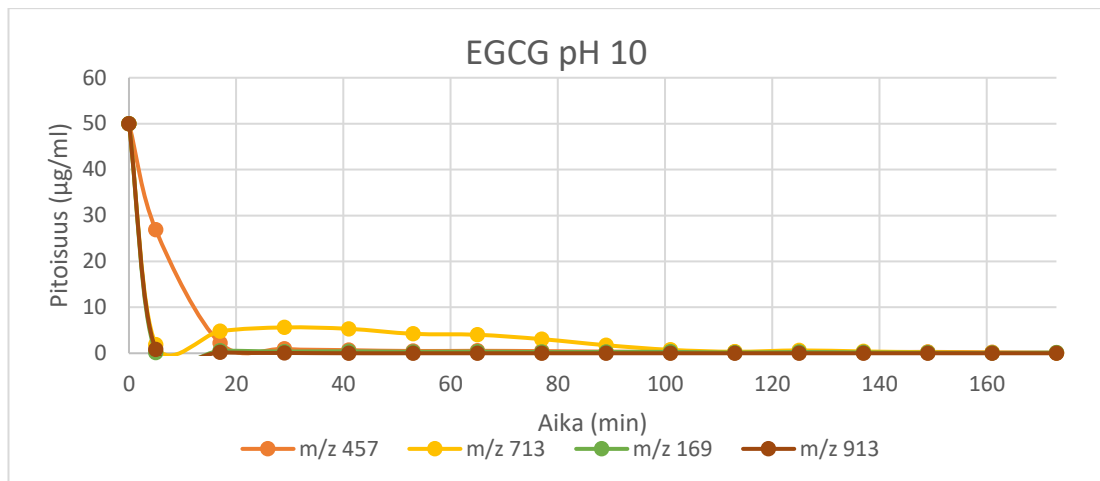
Orbitrap massaspektrollä mitattujen kineettisten mittausten tulokset käsiteltiin MZmine -ohjelmalla, minkä avulla saatiin ohjelman löytämien ionien piikkien massapinta-alat. Lisäksi Xcalibur -ohjelmalla integroitiin UV:lta jokapäiväiset standardit. Standardien UV pinta-alojen avulla korjattiin pitoisuudet oikeiksi samoin kuin aiemmin, jonka jälkeen standardisuorat saatiin jokaiselle pH-asteelle erikseen. Standardisuorien avulla EGCG:n ja sen metaboliittien massapinta-alat voitiin muuntaa pitoisuuksiksi. Tämän jälkeen tulokset voitiin esittää ajan tai pH-asteen suhteen. Esitettiin EGCG:n hajoaminen metaboliiteiksi pH10:ssä ajan suhteen, sekä EGCG:n pitoisuuden lasku ajan suhteen kolmessa eri pH-asteessa (Kuva 16).



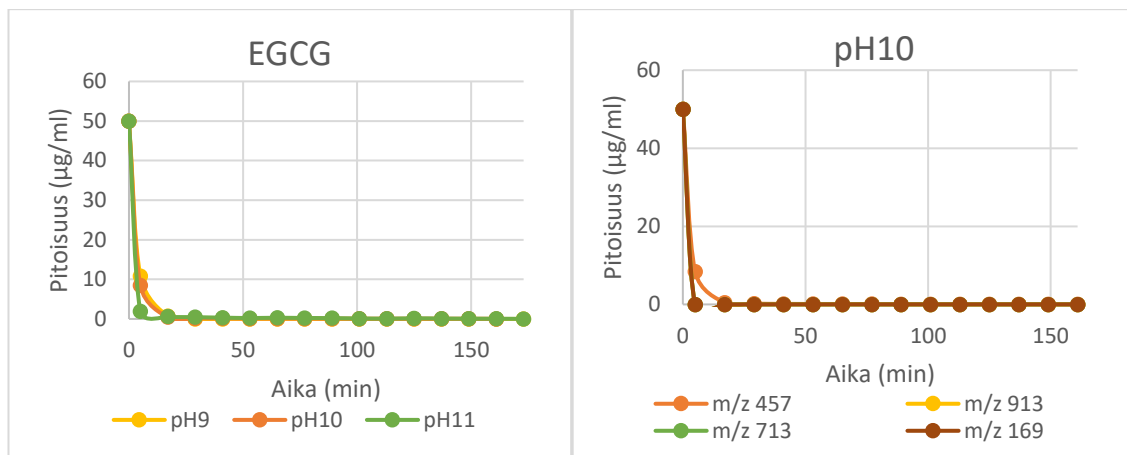
Kuva 13. PGG:n kineettisen mittauksen tulokset pH:ssa 10. Mitattiin Xevo UPLC-MS/MS:llä PGG:n hajoamista kuuden minuutin välein kolmen tunnin ajan.



Kuva 14. Prosyaniidiini B2:n kineettisen mittauksen tulokset pH:ssa 10. Mitattiin Xevo UPLC-MS/MS:llä prosyaniidiini B2:n hajoamista kuuden minuutin välein kolmen tunnin ajan.



Kuva 15. EGCG:n kineettisen mittauksen tulokset pH:ssa 10. Mitattiin Xevo UPLC-MS/MS:llä EGCG:n hajoamista kuuden minuutin välein kolmen tunnin ajan.



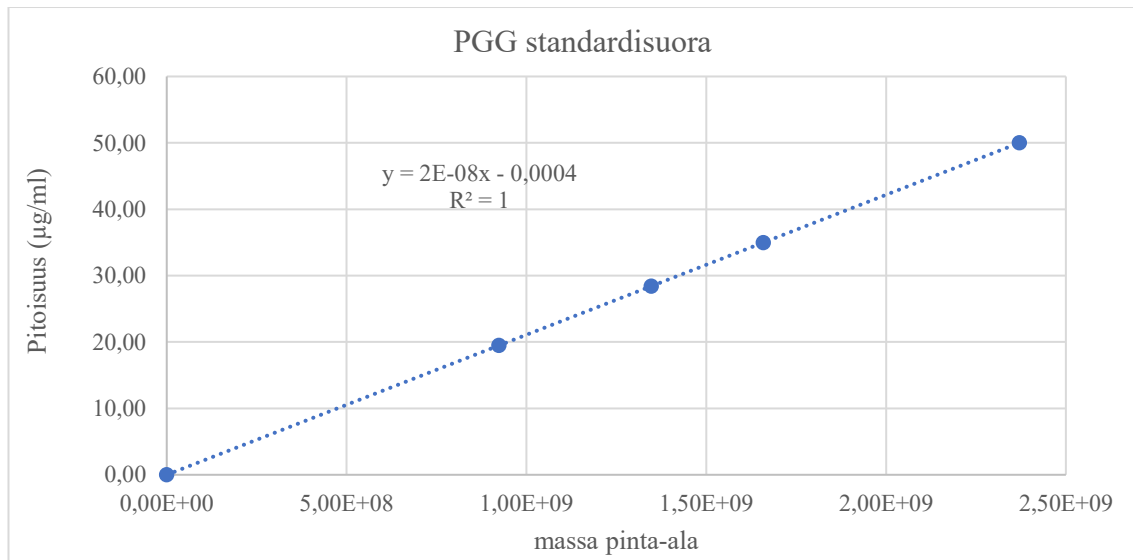
Kuva 16. Kvadrupoli-Orbitrap UPLC-MS/MS:llä mitatut tulokset EGCG:n kineettisistä mittauksista kolmen tunnin ajalta. Mallinnettu miten EGCG käyttäytyy eri pH-asteissa, sekä miten EGCG hajoaa pH:ssa 10 metaboliiteiksi.

3.5 MetaboKIT -työkalun lopullinen testaaminen

MZ-mine -ohjelmalla käsiteltiin myös lopullisten mittausten tulokset. Ensimmäisen päivän standardisuorat olivat onnistuneet, mutta muiden päivien standardeja mitattaessa oli tapahtunut virhe ja saadut UV pinta-alat eivät antaneet todellisia tuloksia mitattaessa PLNO:lla, mutta täydellä silmukalla saatiin luotettavampi tulos eli muiden päivien standardisuorista saimme mitattua vain yhden pisteen.

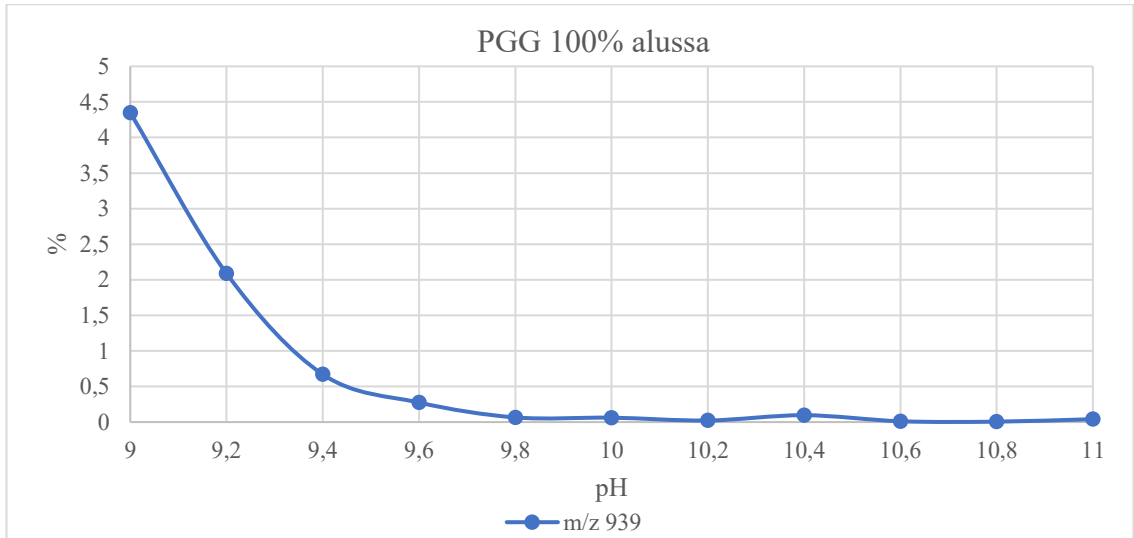
Standardien UV pinta-alojen avulla voitiin laskea korjatut pitoisuudet kuten kineettisten mittausten tuloksissakin oli tehty. Suorat, joista vain yksi mittauspiste oli onnistunut, suhteutettiin ensimmäisen päivän onnistuneeseen standardisuoraan laskemalla jokaisen standardisetin vahvimman pitoisuuden massapinta-alan suhde ensimmäisen päivän vahvimman pitoisuuden mittauspisteeseen. Tämän jälkeen loput pisteet epäonnistuneille suorille saatiin kertomalla ensimmäisen päivän onnistuneen

suoran mittauspisteet jokaiselle suoralle erikseen lasketun suhdeluvun kanssa. Jokaiselle päivälle oli mitattu kaksi standardisuoraa, mittauspäivän alussa ja lopussa, joiden keskiarvosta voitiin piirtää standardisuorat. Epäonnistuneiden standardisuora mittausten suorat piirrettiin ensimmäisen päivän onnistuneen suoran korjattuja pitoisuuksia ja jokaiselle suoralle suhteutettuja massapinta-aloja käyttäen. Lopulta saatiin jokaiselle päivälle omat standardisuorat jokaiselle yhdisteelle (Kuva 17). Standardisuorien avulla voitiin muuttaa MZ-mine massapinta-alat pitoisuuksiksi.

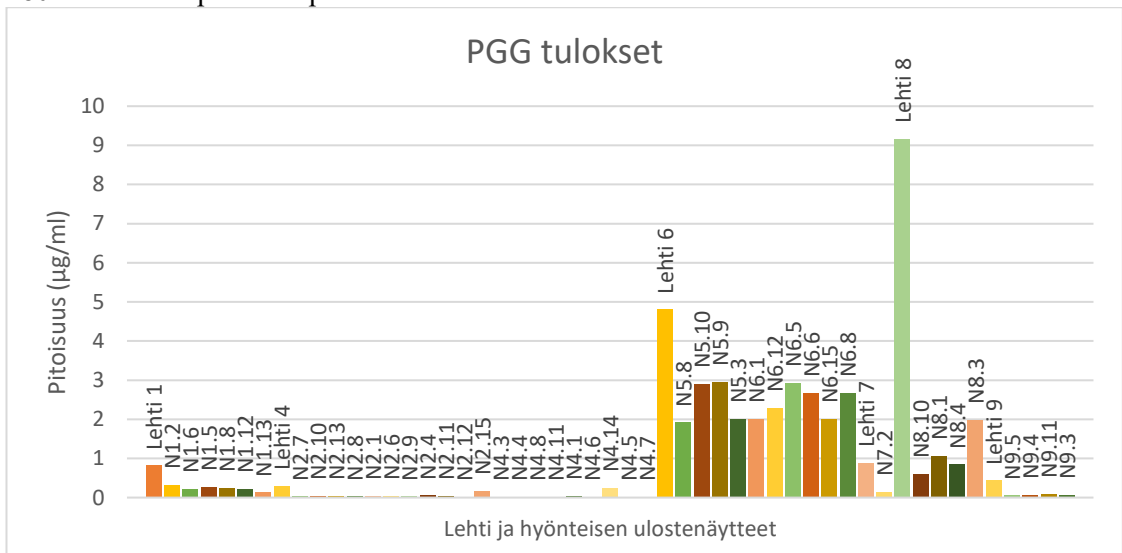


Kuva 17. Lopullisten mittausten PPG standardisuora yhdeltä mittauspäivältä, jossa on esitetty pitoisuus massapinta-alan suhteen.

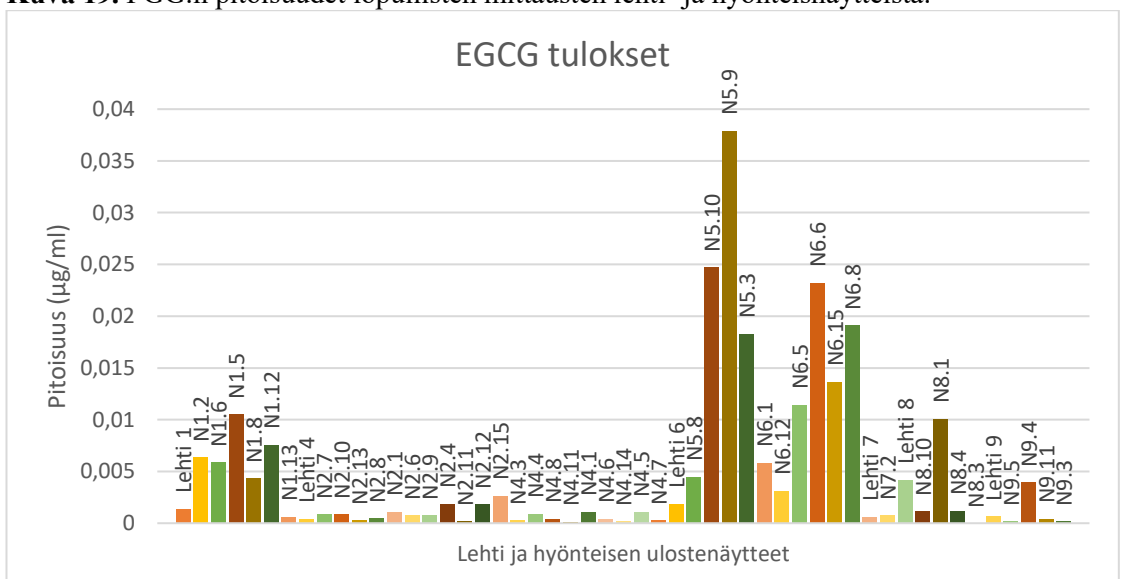
Lehtinäytteiden pitoisuuksien ja kineettisten mittausten tulosten (Kuva 18) avulla voitiin ennustaa, mitä yhdisteen pitoisuudelle pitäisi tapahtua. Kineettisistä mittauksista saatiin kuudelle malliyhdisteelle kvantitatiiviset kuvaajat, joista nähtiin miten yhdistepitoisuus laskee prosentuaalisesti pH:n suhteen. Lehtinäytteiden pitoisuus voitiin kertoa jokaisen pH:n prosentuaalisella kertoimella ja saatiin ennuste siitä mitä jokaisen lehti näytteen yhdistepitoisuudelle tapahtuu jokaisessa pH-asteessa. Tätä ennustetta voidaan verrata klorogeenihapon pH-mallinukseen ja selvittää käytäykö yhdisteet samoin *in vitro* ja *in vivo*. Lopullisista mittauksista viidestä malliyhdisteestä vain PGG:lle, EGCG:lle, prosyanidiini B2:lle ja kversetiini-3-O-glukosidille saatiin tulokset (Kuva 19-22). Oenothiini B:n standardisuorat eivät olleet tarpeeksi luotettavia, jotta näytetulokset olisi saatu muutettua pitoisuuksiksi. Näin ollen ei saatu mallinnettua oenothiini B:n tuloksia.



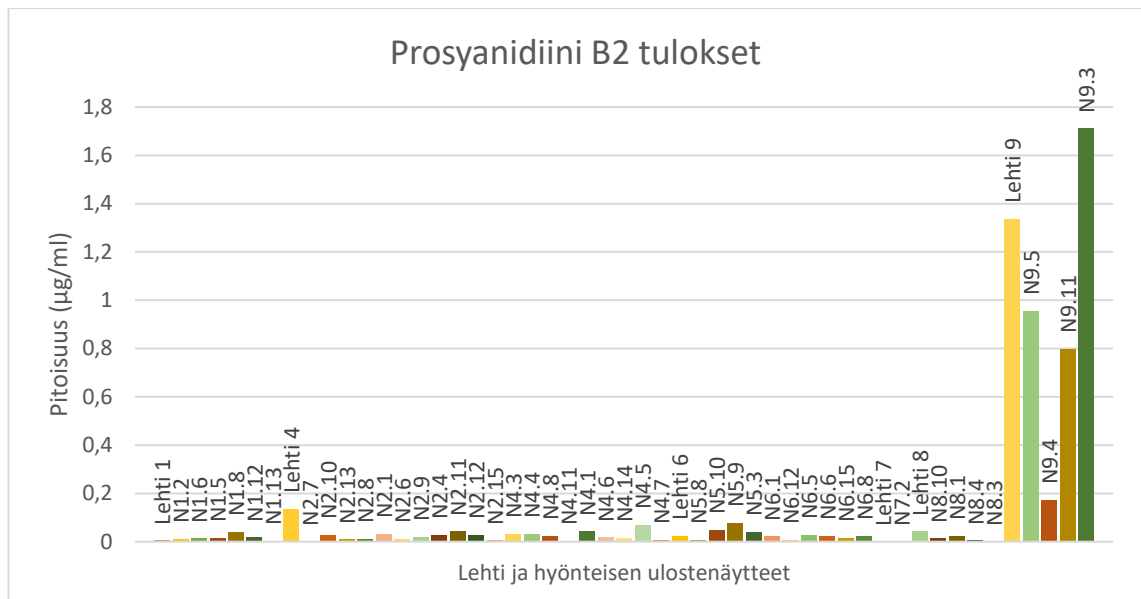
Kuva 18. PGG kineettisten mittausten kvantitatiivinen kuvaaja, jossa on PGG:n prosenttiosuus 180 min mittauspisteessä pH-asteen suhteen.



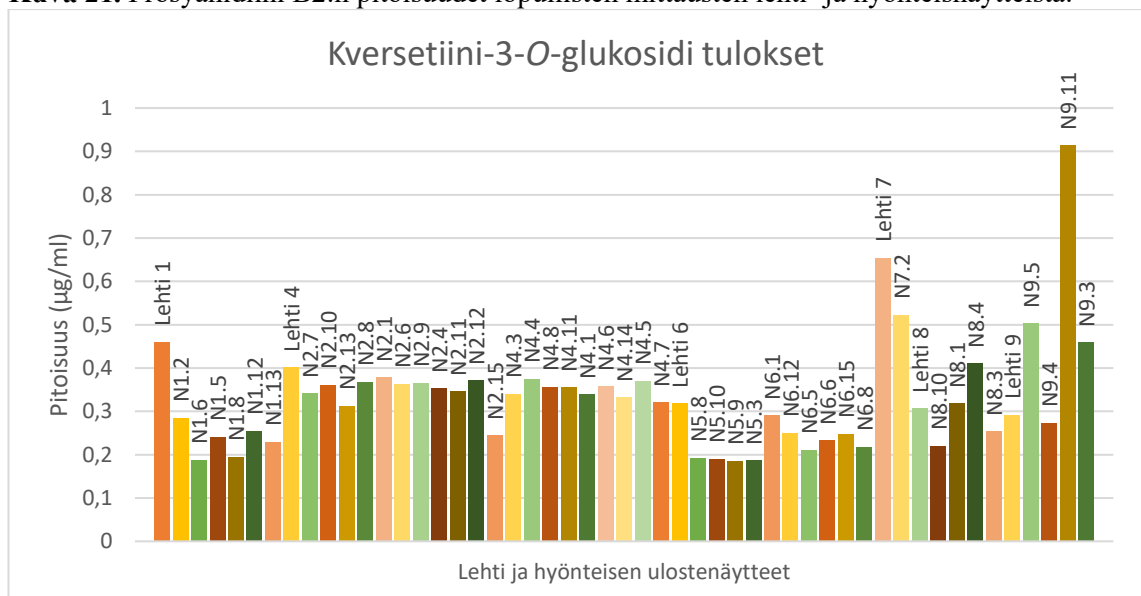
Kuva 19. PGG:n pitoisuudet lopullisten mittausten lehti- ja hyönteisnäytteistä.



Kuva 20. EGCG:n pitoisuudet lopullisten mittausten lehti- ja hyönteisnäytteistä.



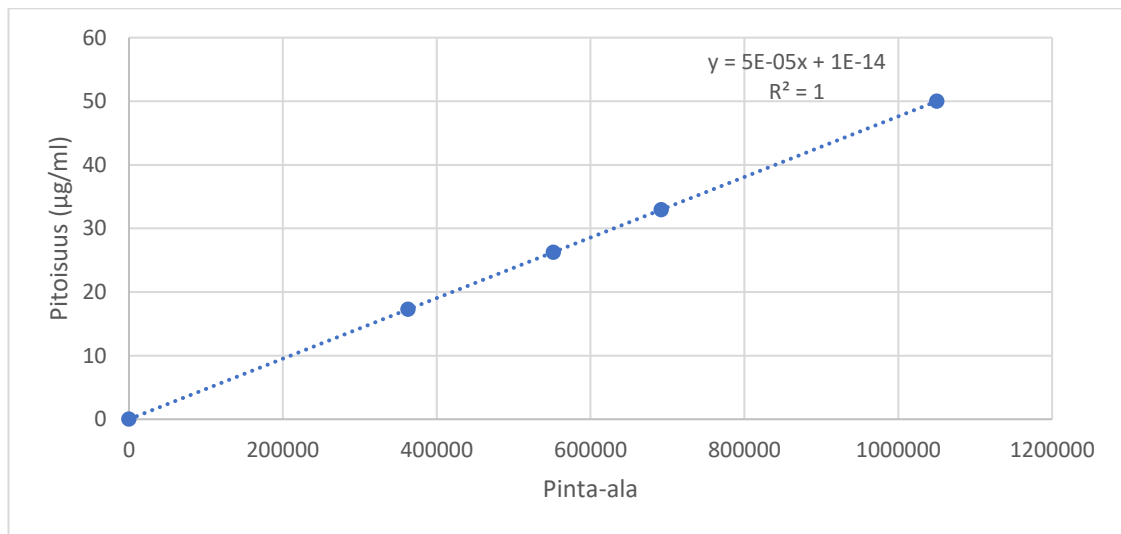
Kuva 21. Prosyaniidiini B2:n pitoisuudet lopullisten mittausten lehti- ja hyönteisnäytteistä.



Kuva 22. Kversetiini-3-O-glukosidin pitoisuudet lopullisten mittausten lehti- ja hyönteisnäytteistä.

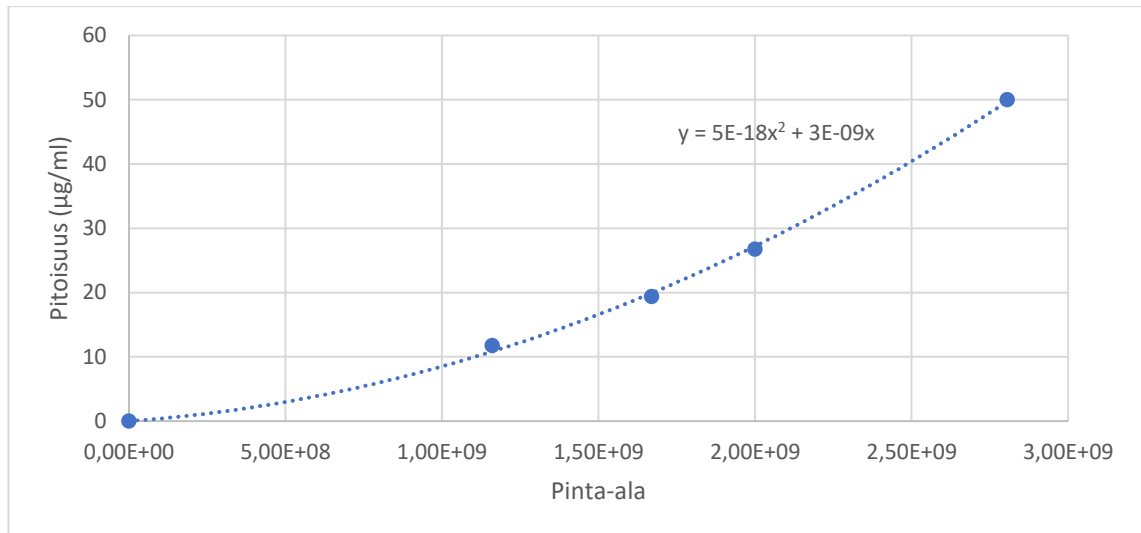
Lopullisista mittauksista klorogeenihapon isomerisaation avulla ennustettiin hyönteisen suolen pH:ta. Klorogeenihapon standardisuorat, pitoisuus näytteissä ja pH:n ennustaminen tehtiin lähes samoin kuin muillekin yhdisteille. Erona oli klorogeenihapon isomeerien pitoisuuksien määrittäminen ja pH:n ennustaminen. Lopullisten mittausten standardiseoksessa oli yhdiste CQA5, mutta ei sen isomeerejä CQA3 ja CQA4. Jotta CQA3 ja CQA4 pitoisuudet voitiin määrittää CQA5:n avulla, määritettiin laimennossarjat kaikille kolmelle isomeerille. Laimennossarjat saatiin käyttämällä kineettisten mittausten pH10:tä 0–180 min ajalta muodostaen kuvaaja UV:n ja massanpinta-alan suhteesta. Kineettisten mittausten pH10 mittauksien standardeina käytettiin klorogeenihapon kolmen isomeerin laimennossarjaa, joka on mitattu PLNO:n avulla. Standardisarjoja oli

mitattu neljä samana mittauspäivänä. Näistä standardeista integroitiin UV:t aallonpituudella 324,5–325,5 nm ja massapinta-alat jokaiselle kolmelle klorogeenihapon isomeerille. UV pinta-alan avulla laskettiin korjatut pitoisuudet samoin kuin aiemmin, kun tiedettiin vahvimman pitoisuuden olevan 50 µg/ml. Korjattujen pitoisuuksien ja massapinta-alojen keskiarvoista saatiin kineettisten mittausten standardisuorat isomeereille ja näiden suorien yhtälöiden avulla voitiin muuttaa kineettisten mittausten aikapisteiden UV pinta-alat isomeereille pitoisuuksiksi (Kuva 23). Laimennossarjasuorat saatiin jokaiselle CQA-isomeerille, kun esitettiin kineettisten mittausten UV:sta muutetut pitoisuudet massapinta-alojen suhteen (Kuva 24). Laimennossarjasuorista (Kuva 25) saadaan suhde CQA5:lle ja sen isomeereille CQA3:lle ja CQA4:lle.

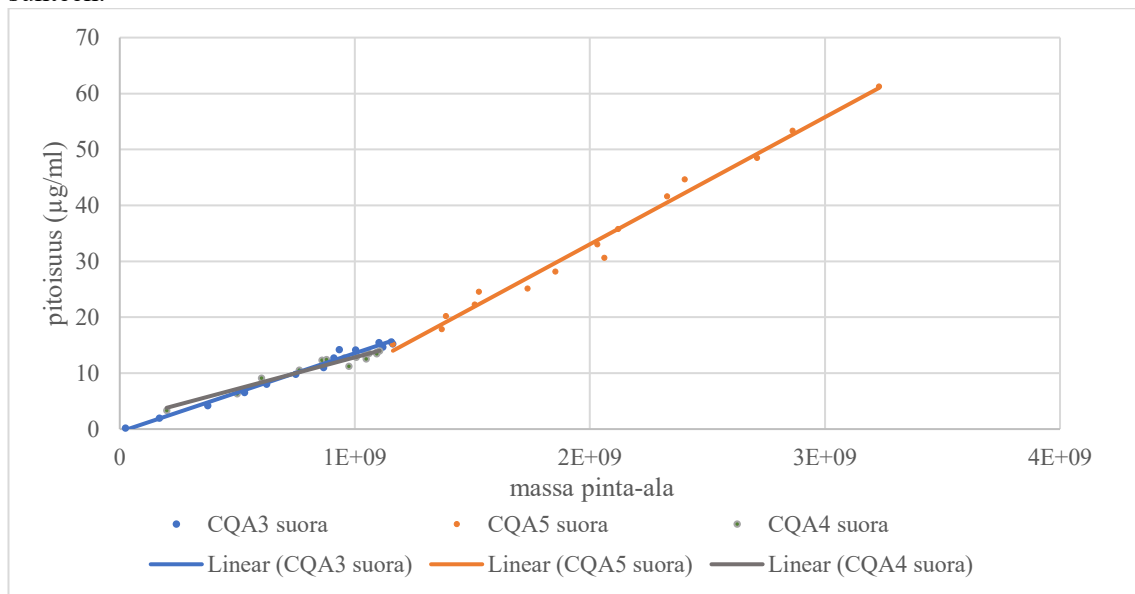


Kuva 23. Kineettisten mittausten standardisuorien keskiarvo CQA5:lle, jonka avulla muutettiin UV pinta-alat pitoisuuksiksi.

Klorogeenihappo käsiteltiin samoin kuin muutkin yhdisteet lopullisten mittausten standardisuoria tehdessä. Näin saatiin joka päivälle CQA5:n standardisuorat, joiden yhtälöiden avulla voitiin muuttaa lopullisten mittausten CQA5 MZ-mine tulokset pitoisuuksiksi. CQA3 ja CQA4 tulokset muutettiin pitoisuuksiksi käyttämällä hyväksi laimennossarjan suoria ja CQA5:n jokapäiväisiä standardisuoria. Esimerkiksi CQA3:n yhtälössä, jolla muutettiin massapinta-alat pitoisuuksiksi, oli CQA3:n laimennossarjan yhtälö jaettuna CQA5:n laimennossarjan yhtälöllä ja tämä kerrottuna CQA5:n jokapäiväisellä standardisuoran yhtälöllä. Samanlainen yhtälö muodostettiin CQA4:lle. Kaikki lopullisten mittausten MZ-mine massapinta-ala tulokset muutettiin näiden yhtälöiden avulla pitoisuuksiksi.



Kuva 24. Kineettisten mittausten UV pinta-alojen avulla saadut pitoisuudet massapinta-alojen suhteen.



Kuva 25. Klorogeenihapon isomeerien laimennossarjojen suorat.

Pitoisuudet eri pH-asteissa saatiin pH-mallinnuksen avulla. Klorogeenihapon isomeerien kvantitatiivisten suorien suhdeluvuilla kerrottiin lehtinäytteiden pitoisuudet. Näin saatiin kolme ennustetta, joissa jokaisessa on yhden isomeerin kvantitatiivista suoraa käytetty ennustamaan pitoisuuden muutosta eri pH-asteissa. Lopuksi laskettiin yhteen jokaisen ennusteen antamat CQA3, CQA4 ja CQA5 tulokset eri pH-asteissa ja muutettiin nämä tulokset suhdeluvuiksi eli esimerkiksi, missä suhteessa CQA3:a on verrattuna CQA4 ja CQA5:een. Samoin muutettiin näyteulosteiden tuloksien pitoisuudet suhdeluvuiksi. Näitä suhdelukuja vertailemalla voidaan mallintaa hyönteisen suolen pH-aste.

Mallinnusta varten vertailtiin malliyhdisteiden ennustettuja pitoisuuksia ja mitattuja pitoisuuksia hyönteisen näyteulosteesta. Klorogeenihapon ennuste ja mitatut

pitoisuudet muutettiin suhdeluvuiksi, joita voitiin vertailla toisiinsa. Näytteiden pH-asteen määrittäminen oli suuntaa antava, jolla saatiin tietää, onko hyönteisen suolen pH-aste matala, keskivahva vai korkea. Matala pH-aste oli välillä 9.0–9.4, keskivahva välillä 9.6–10.2 ja korkea välillä 10.4–11.0.

Taulukko 4. Lopullisten mittausten pH-tulokset. Eri toukka lajien suolen mallinnettu pH-aste CQA:n avulla puulajeittain.

puulaji	toukkien näytepapanat	CQA:n ennustama pH-aste
Tunturikoivu	N1.2	korkea
	N1.5	korkea
	N1.6	korkea
	N1.8	korkea
	N1.12	korkea
	N1.13	korkea
Pähkinäpensas	N3.8	korkea
Keltakoivu	N2.1	ei määritettävissä
	N2.4	ei määritettävissä
	N2.6	ei määritettävissä
	N2.7	ei määritettävissä
	N2.8	ei määritettävissä
	N2.9	ei määritettävissä
	N2.10	ei määritettävissä
	N2.11	ei määritettävissä
	N2.12	ei määritettävissä
	N2.13	ei määritettävissä
	N4.1	ei määritettävissä
	N4.3	ei määritettävissä
	N4.4	ei määritettävissä
	N4.5	ei määritettävissä
N4.6	ei määritettävissä	
N4.7	ei määritettävissä	
N4.8	ei määritettävissä	
N4.11	ei määritettävissä	
N4.14	ei määritettävissä	
Metsävaahtera	N5.3	matala
	N5.8	matala
	N5.9	matala
	N5.10	matala
	N6.1	matala
	N6.5	matala
	N6.6	matala
	N6.8	matala
	N6.12	matala
N6.15	matala	
Tammi	N7.2	matala
Sokerivaahtera	N8.1	korkea
	N8.3	korkea

	N8.4	korkea
	N8.10	korkea
Hevoskastanja	N9.3	keskivahva
	N9.4	matala
	N9.5	matala
	N9.11	matala

Tuloksia määrittäessä osalle näytteistä ei pystytty määrittämään pH-astetta, kun ennustettu yhdistepitoisuus ja mitattu -pitoisuus erosivat toisistaan liian suuresti. Myös tulokset, joille määritettiin, pH-aste olivat hieman poikkeavia yhdistepitoisuuksiltaan verrattuna ennustettuihin pitoisuuksiin, kuten voidaan huomata Taulukon 5 ja 6 esimerkistä.

Taulukko 5. Klorogeenihapon pH-mallinnuksen ennuste pitoisuudet muutettu suhdeluvuiksi isomeerien välillä tunturikoivun näytteille.

	matala			keskivahva				korkea			
	9	9.2	9.4	9.6	9.8	10	10.2	10.4	10.6	10.8	11
CQA3	11	14	17	22	30	36	37	39	40	39	39
CQA5	71	67	62	53	42	34	31	29	28	29	29
CQA4	18	19	21	24	28	30	32	32	32	32	32

Taulukko 6. Tunturikoivua syöneiden toukkien näyteulosteiden klorogeenihappoyhdistepitoisuudet muutettuna suhdeluvuiksi.

	N1.2	N1.5	N1.6	N1.8	N1.12	N1.13
CQA3	43	43	44	43	42	38
CQA5	10	10	11	11	12	10
CQA4	46	46	45	46	46	53

Taulukon 6 tuloksia vertailtiin taulukon 5 ennustettuihin tuloksiin ja valittiin pH-aste, jonka kanssa suhdeluvut olivat lähimpänä toisiaan.

4. Tulosten tarkastelu

Tutkimuksen alussa puhdistettiin PGG:tä ja EGCG:tä pylväsgeelikromatografialla tavoitteena puhdistaa yhdisteitä riittävästi MetaboKIT työkalun testausta ja käyttöönnottoa varten. Loput malliyhdisteet olivat kaupallisia, paitsi oenothiini B, jota oli jo aikaisemmin puhdistettu. PGG:n ja EGCG:n puhdistuksessa saatiin tuotettua yhdisteitä useita satoja milligrammoja, joka oli riittävästi tutkimuksen tarpeisiin ja lopulliseen työkalun käyttöön. Yhdisteiden lopullinen puhtaus voitiin nähdä kuvista 5 ja 6, joissa on vertailtu yhdisteiden puhtautta ennen ja jälkeen puhdistuksen. Näistä kuvista voitiin huomata puhdistuksen onnistuneen.

Malliyhdisteille luotiin seuraavaksi MRM-menetelmät. Tämän menetelmän luomista varten yhdisteitÄ inkuboitin pH10:llÄ, jolloin saatiin selville myös yhdisteiden metaboliitit. Malliyhdisteiden ja metaboliittien m/z -arvoja ja retentioaikoja (Taulukko 3) käyttÄmÄllÄ luotiin MRM-menetelmä, jota voitiin käyttää muissa mittauksissa hyödyksi. Metaboliitteja löydettiin PGG:lle, EGCG:lle ja prosyaniidiini B2:lle, mitkä on tunnistettu taulukossa 3.

Tutkimuksen keskeisessä osassa oli pH-mallinnus, joka tehtiin klorogeenihapon isomeerien avulla. pH-mallinnus tehtiin kolmella rinnakkaisnäytteellä jokaiselle isomeerille. Rinnakkaisnäytteille saatiin, jokaisella samat tulokset, jolloin voitiin pitää tuloksia luotettavina. Kuvista 8-10 nähdään isomeerien muodostuminen pH-asteittain toisiinsa suhteutettuna, kuinka pH -aste vaikuttaa yhdisteiden hajoamiseen ja muiden isomeerien muodostumiseen. Kvantitatiivisen mallinnuksen avulla (Kuva 7) voitiin ennustaa hyönteisen suolen pH:ta lopullisen mittauksen tuloksista.

Malliyhdisteiden pH-mallinnus tehtiin kineettisten mittausten avulla, jolloin saatiin selville, miten malliyhdisteet käyttäytyvät eri pH-asteissa. Kuvassa 12 nähdään yhdisteiden hajoaminen kolmessa pH-asteessa ja jokaisella yhdisteellä huomataan selkeä ero yhdisteen hajoamisnopeudessa, kun pH kasvaa. pH:ssa 9 hajoaminen on hidasta ja suurin osa yhdisteitÄ ei kerkeä hajoamaan kokonaan edes kolmen tunnin aikana. pH:ssa 10 yhdisteet hajoavat nopeammin ja huomataan, että osa yhdisteistä, kuten klorogeenihappo ja kversetiini-3-O-glukosidi, kestää paremmin hapettumista kuin muut yhdisteet. pH:ssa 11 malliyhdisteet hajoavat jo huomattavasti nopeammin. EGCG:n huomataan hajoavan poikkeuksellisen nopeasti jokaisessa pH-asteessa verrattuna muihin yhdisteisiin. Malliyhdisteiden PGG, EGCG ja prosyaniidiini B2 hajoamista ja niiden metaboliittien muodostumista voitiin seurata myös ajan suhteen eri pH-asteissa (Kuvat 13–15). PGG:n hajoamista seurattaessa pH 10:ssä huomataan, että metaboliitteja muodostuu PGG:n hajotessa, mutta ajan kuluessa myös metaboliitit hajoavat. Samoin käyttäytyy prosyaniidiini B2, mutta verrattaessa prosyaniidiini B2:n hajoamista PGG:n ja EGCG:n hajoamiseen, kestää se huomattavasti pidempään hapettamista. PGG ja EGCG molemmat hajosivat pH:ssa 10 jo 30 min kohdalla lähes kokonaan, kun taas prosyaniidiini B2 hajosi kokonaan vasta 90 min kohdalla.

pH-mallinnus mittaukset suoritettiin kahdella eri massaspektrometrillä. Tulokset ovat Xevo massaspektrometrillä mitattuja, mutta kvadrupoli-Orbitrap massaspektrometrin tuloksia on esitetty (Kuva 16) vertailun vuoksi. Kuvasta 16 nähdään

kvadrupoli-Orbitrap massaspektrometrin mitaamat tulokset EGCG:lle. Kuvaajissa on esitetty EGCG:n hajoaminen kolmessa eri pH-asteessa, sekä metaboliittien muodostuminen. Kun näitä kuvia vertaillaan Xevo massaspektrometrin antamiin tuloksiin (Kuva 12 ja 15), huomataan EGCG:n pitoisuuksien olevan pienimpiä kvadrupoli-Orbitrap massaspektrometrillä mitattaessa, mutta yhdisteet käyttäytyvät samoin eri pH-asteissa ajan suhteen.

Lopullisten mittausten tuloksia käsiteltäessä huomattiin mittausten aikana tapahtuneesta virheestä, joka johti siihen, että standardisuoria piti manuaalisesti muokata, koska osat arvoista eivät olleet luotettavia. Vaikka standardisuorat korjattiin, niin oenothiini B:n suorista ei saatu tuloksia. Muille yhdisteille saatiin pitoisuudet lehti- ja hyönteisenulostenäytteille. Pääsääntöisesti huomattiin hyönteisenulostenäytteen yhdistepitoisuuden olevan alhaisempi kuin lehtinäytteen, mutta voitiin huomaata myös eri malliyhdisteillä paljon poikkeavuutta, jolloin hyönteisenulostenäytteen yhdistepitoisuus oli korkeampi kuin lehdessä.

Lopulta hyönteisen suolen pH-aste näytteissä ennustettiin klorogeenihapon avulla Osalle näytteistä pH-astetta ei voitu määrittää pitoisuuksien liian suuren poikkeavuuden vuoksi. pH-aste voitiin määrittää vain arvion matala-keskivahva-korkea avulla, koska pitoisuus erot ennustuksen ja todellisen pitoisuuden välillä olivat liian suuret.

5. Johtopäätökset

Tutkimuksen tuloksena saatiin onnistuneesti puhdistettua PGG:tä ja EGCG:tä MetaboKIT työkalun valmistamista ja käyttöönottoa varten. Luotiin MRM-menetelmä malliyhdisteille ja niiden metaboliiteille mittaamenetelmäksi Xevo massaspektrometrille, sekä mittaamenetelmä ja standardiliuos kvadrupoli-Orbitrap massaspektrometrille. Onnistuttiin luomaan klorogeenihapon pH-mallinnus, jota voidaan käyttää hyönteisen suolen pH-asteen ennustamiseen, sekä mallinnettiin malliyhdisteiden käyttäytymistä eri pH-asteissa. Lopuksi testattiin luotu menetelmä hyönteisnäytteillä. Tuloksien avulla voidaan jatkaa MetaboKIT työkalun hiomista ja käyttöä. Lopulliseen MetaboKIT menetelmään voidaan tehdä muutoksia, joiden avulla voidaan saada luotettavampia tuloksia.

MetaboKIT työkalua valmistaessa kokeiltiin erilaisia menetelmiä ja tapoja, joiden avulla saataisiin luotettavin tulos toistettavasti. Tutkimuksessa käytettiin hyönteiskokeita

tehdessä näyteputkia, joiden yhdistepitoisuus oli 4 µg, joka oli lopulta liian laimea pitoisuus, koska yhdisteet hajoavat hyönteisen suolessa. Lopulliseen MetaboKIT menetelmään hyönteiskokeiden näyteputkien yhdistepitoisuus nostetaan 25 µg, jonka avulla toivottavasti nähdään yhdisteet ja niiden metaboliitit paremmin hyönteisistä. Lisäksi menetelmään muutettiin hyönteiskokeita tehdessä näyteputkien sisällön liuottaminen. Tutkimuksessa näyteputket liuotettiin 100 µl 80 % asetonia, ravisteltiin Vortexilla ja sentrifugoitiin. Lopullisessa menetelmässä näyteputket liuotetaan 100 µl 80 % asetonia ja yhdisteet liuotetaan napauttamalla näyteputkea, kunnes nähdään, että sisältö on liennut kokonaan. Näin vältetään turhia väli vaiheita ja varmistetaan ettei liuos materiaalia jää putken korkkiin. Tutkimuksen lopullisissa mittauksissa käytettiin standardina malliyhdisteiden seosta. Tämän lisäksi lopulliseen menetelmään lisätään standardiseos, jossa on metaboliitteja, kuten gallushappo, triGG ja tetraGG.

Tutkimusta voidaan vielä viedä eteenpäin. Seuraava askel tutkimukselle on selvittää yhdisteiden aktiivisuutta isäntäkasveissa ja hyönteisen suolessa kehittämällä kuoppalevy menetelmä. Lisäksi kehitetään menetelmä rasvaliukoisille yhdisteille ja niiden mittaamiselle.

MetaboKIT työkalu on jo osittain otettu käyttöön hyönteiskokeiden puolella. Hyönteiskokeita on voitu aloittaa jo ympäri maailmaa, kuten Teksasissa ja Pohjois-Suomessa.

6. Viitteet

1. Shroff, R., Vergara, F., Muck, A., Svatos, A. & Gershenzon, J. Nonuniform distribution of glucosinolates in *Arabidopsis thaliana* leaves has important consequences for plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 6196–6201 (2008).
2. Zhen, Y., Aardema, M. L., Medina, E. M., Schumer, M. & Andolfatto, P. Parallel molecular evolution in an herbivore community. *Science (80-.)*. **337**, 1634–1637 (2012).
3. Petschenka, G. & Agrawal, A. A. Milkweed butterfly resistance to plant toxins is linked to sequestration, not coping with a toxic diet. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **282**, (2015).
4. Boevé, J. L. & Müller, C. Defence effectiveness of easy bleeding sawfly larvae towards invertebrate and avian predators. *Chemoecology* **15**, 51–58 (2005).
5. Boeckler, G. A., Paetz, C., Feibicke, P., Gershenzon, J. & Unsicker, S. B. Metabolism of poplar salicinoids by the generalist herbivore *Lymantria dispar* (Lepidoptera). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **78**, 39–49 (2016).

6. Salminen, J. P., Lahtinen, M., Lempa, K., Kapari, L., Haukioja, E. & Pihlaja, K. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **2004**.
7. Harrison, J. F. *Annu. Rev. Entomol.* **2001**, *46*, 221–250.
8. Johnson, K. S. & Felton, G. W. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **1996**, *32*, 85–105.
9. Gross, E. M., Brune, A. & Walenciak, O. *J. Insect Physiol.* **2008**, *54*, 462–471.
10. Vihakas, M., Gómez, I., Karonen, M., Tähtinen, P., Sääksjärvi, I. & Salminen, J. P., *J. Chem. Ecol.* **2015**.
11. Joannisse, D. & Storey, K. *Journal of Experimental Biology* **1996**, *199*.
12. Lalouette, L., Williams, C. M., Hervant, F., Sinclair, B. J. & Renault, D. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* **2011**, *158*, 229–234.
13. Barbehenn, R. V., Jones, C. P., Karonen, M. & Salminen, J.-P. *J. Chem. Ecol.* **2006**, *32*, 2235–2251.
14. Barbehenn, R. V., Jaros, A., Yip, L., Trans, L., Kanellis, A. K. & Constabel, C. P. *J. Chem. Ecol.* **2008**, *34*, 1331–1340.
15. Kim, J., Pälijärvi, M., Karonen, M. & Salminen, J. P. *J. Chem. Ecol.* **2018**.
16. Salminen, J. P. & Lempa, K. *Chemoecology* **2002**, *12*, 203–211.
17. Berenbaum, M. *Am. Nat.* **1980**, *115*, 138–146.
18. Cumming, J. M., Sinclair, B., Triplehorn C., Aldryhim, Y., Glante, E., Marcos-Gracia, M. A., Edmunds, M., Lounihos, L. P., Frank, J. H., Showler, A. T., Yu, S. J., Capinera, J. L., Heppner J. B., Philogène, B. J. R., Lapointe, S. L., Nayar, J. K., Goette, M. S., Nation, J. L., Negron, J. F., Kondratieff, B. C., Schöning, C., Stewart, K. W. & Hangay, G. *Encyclopedia of Entomology* **2008**, 1187–1201.
19. Koulu, M. & Mervaala, E. *Farmakologia ja toksikologia*. 10. painos, Medicina Oy, **2012**, 89-100.
20. Giraud, M., Hiliou, F., Fricaux, T., Audant, P., Feyereisen, R. & Le Goff, G. *Insect Mol. Biol.* **2015**, *24*, 115–128.
21. Li, X., Baudry, J., Berenbaum, M. R. & Schuler, M. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 2939–2944.
22. Zhang, Y. E., Ma, H. J., Feng, D. D., Lai, X. F., Chen, Z. M., Xu, M. Y., Yu, Q. Y. & Zhang, Z. *J. Econ. Entomol.* **2012**, *105*, 1034–1042.
23. Bibhuti Bhusan Mishra, B. X. *Enzym. Eng.* **2016**, *05*, 1–9.
24. Appel, H. M. & Schultz, J. C. *Plant Polyphenols* **1992**, 609–620.
25. Lü, F. G., Fu, K. Y., Li, Q., Guo, W. C., Ahmat, T. & Li, G. Q. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2015**, *122*, 86–95.
26. Salminen, J.-P. *Austral Entomol.* **2018**, *57*, 255–264.
27. Ahn, S. J., Vogel, H. & Heckel, D. G. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2012**, *42*, 133–147.
28. Vihakas, M., Tähtinen, P., Ossipov, V. & Salminen, J. P. *J. Chem. Ecol.* **2012**,

- 38, 538–546.
29. Hirayama, C., Ono, H., Meng, Y., Shimada, T. & Daimon, T. *Phytochemistry* **2013**, *94*, 108–112.
 30. Lahtinen, M., Lempa, K., Salminen, J. P. & Pihlaja, K. *Phytochem. Anal.* **2006**, *17*, 197–203.
 31. Lahtinen, M. *et al.* Defensive effect of surface flavonoid aglycones of *Betula pubescens* leaves against first instar *Epirrita autumnata* larvae. *J. Chem. Ecol.* **30**, 2257–2268 (2004).
 32. Lahtinen, M., Salminen, J. P., Kapari, L., Lempa, K., Ossipov, V., Sinkonen, J., Valkama, E., Haukioja, E. & Pihlaja, K. *Chemoecology* **2005**.
 33. Vihakas, M. A., Kapari, L. & Salminen, J. P. *J. Chem. Ecol.* **2010**, *36*, 864–872.
 34. Ahmad, S. A. & Hopkins, T. L. *Insect Biochem. Molec. Biol* **1993**, *23*.
 35. Segar, S. T., Volf, M., Isua, B., Siso, M., Redmond, C. M., Rosati, M. E., Gewa, B., Molem, K., Dahl, C., Holloway, J. D., Basset, Y., Miller, S. E., Weiblen, G. D., Salminen, J. P. & Novotny, V. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2017**, *284*.
 36. Geuder, M., Wray, V., Fiedler, K. & Proksch, P. *Journal of Chemical Ecology* **1997**, *23*.
 37. Baert, N., Karonen, M. & Salminen, J. P. *J. Chromatogr. A* **2015**

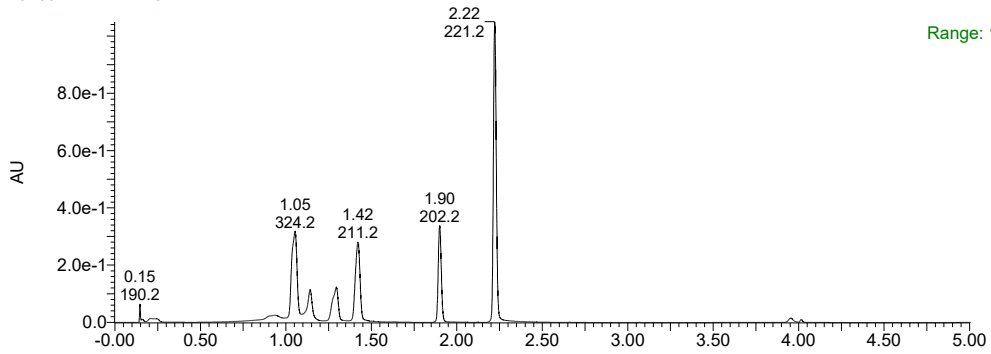
Liite 1.

Malliyhdisteiden UV-kromatogrammit ja massaspektrometrit.

10:09:13

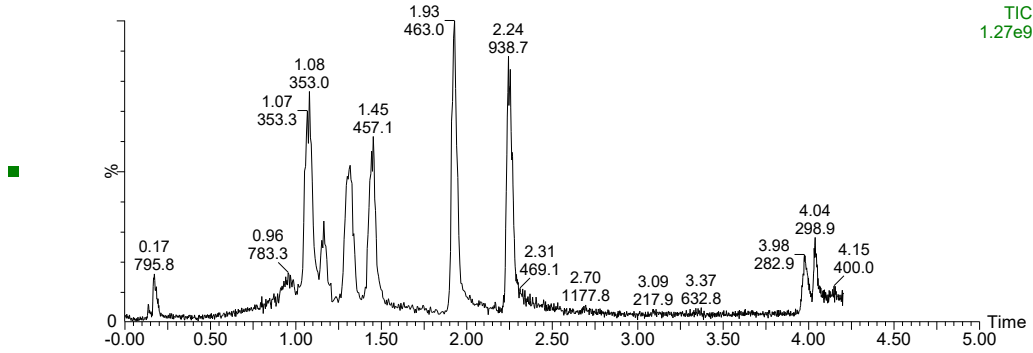
210209 standardi 1 5ul

24: Diode Array
280
Range: 1.05



210209 standardi 1 5ul

23: MS2 ES-TIC
1.27e9

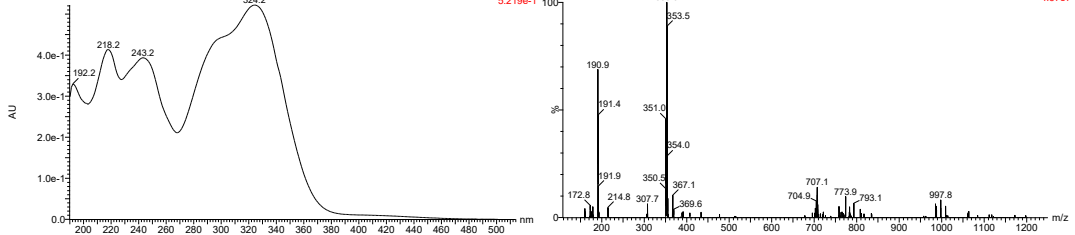


Klorogeeni happo (CQA5)

210209 standardi 1 5ul 1261 (1.050)

24: Diode Array 210209 standardi 1 5ul 417 (1.079)

23: MS2 ES-4.67e7

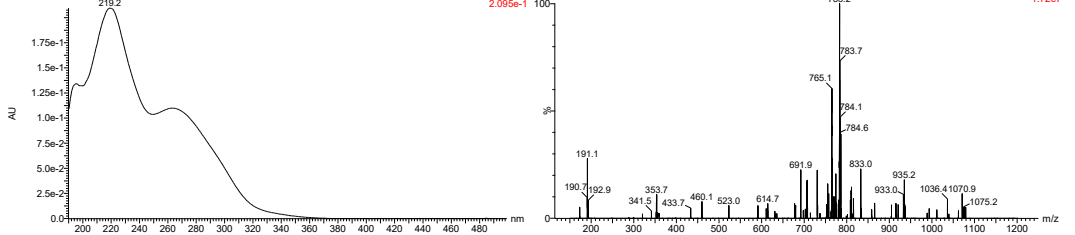


Oenothiini B

210209 standardi 1 5ul 1362 (1.134)

24: Diode Array 210209 standardi 1 5ul 432 (1.163)

23: MS2 ES-1.72e7

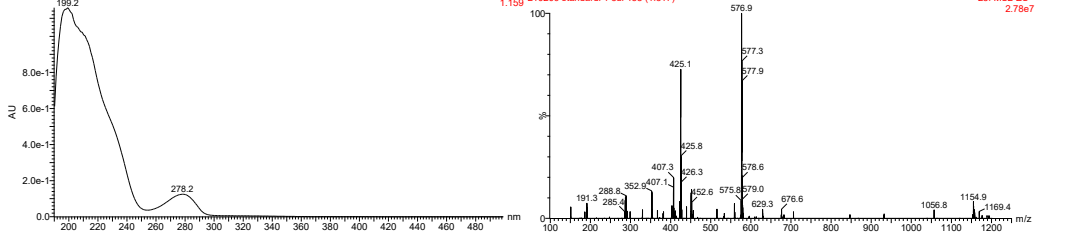


Prosyaniidiini B2

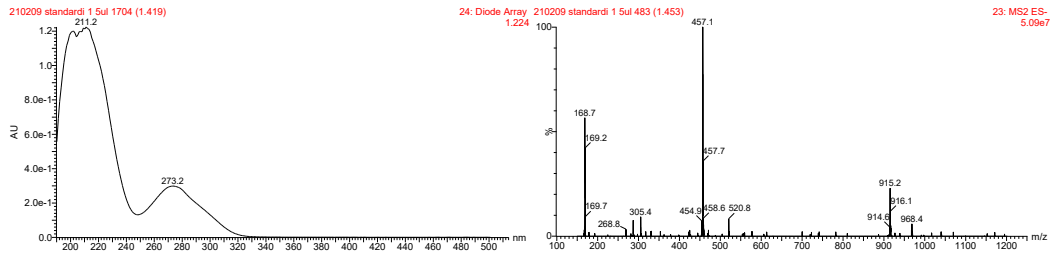
210209 standardi 1 5ul 1556 (1.296)

24: Diode Array 210209 standardi 1 5ul 458 (1.317)

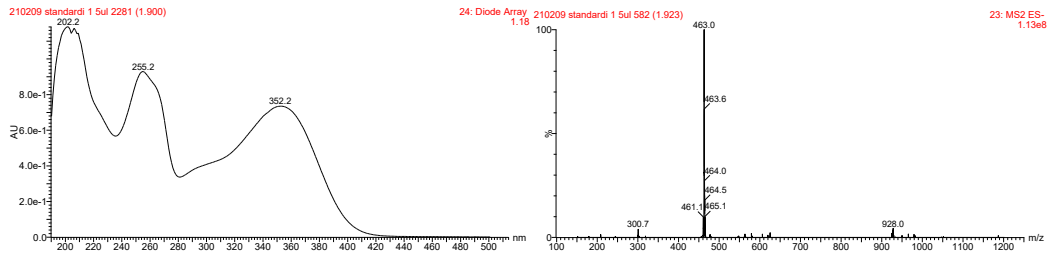
23: MS2 ES-2.76e7



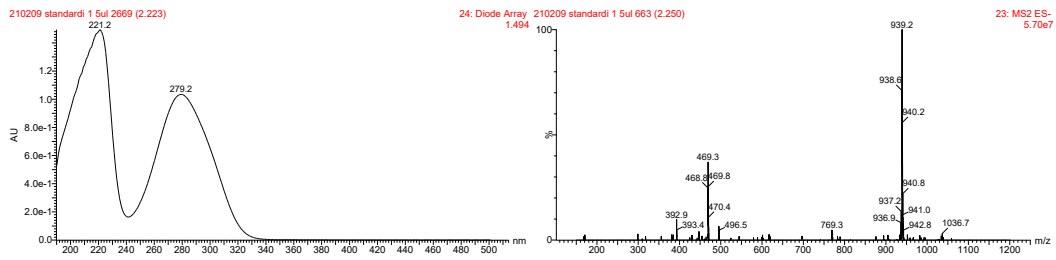
EGCG



Kversetiini-3-O-glukosidi



PGG



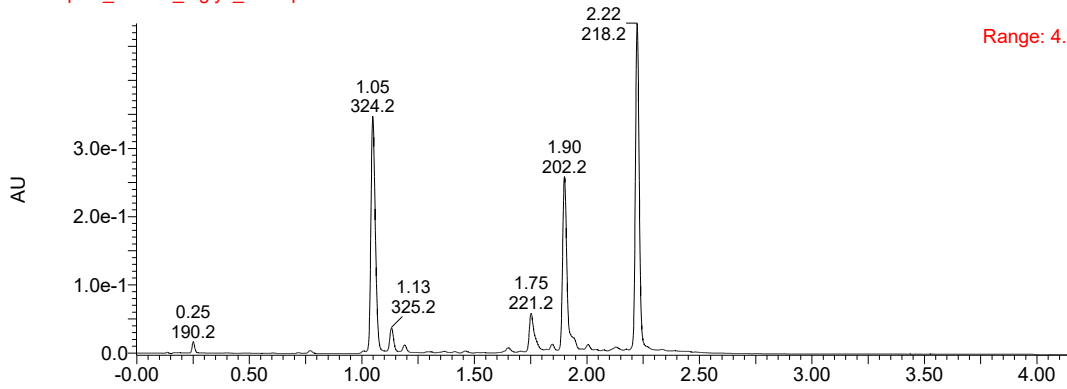
Meataboliitit

TetraGG

17:39:03

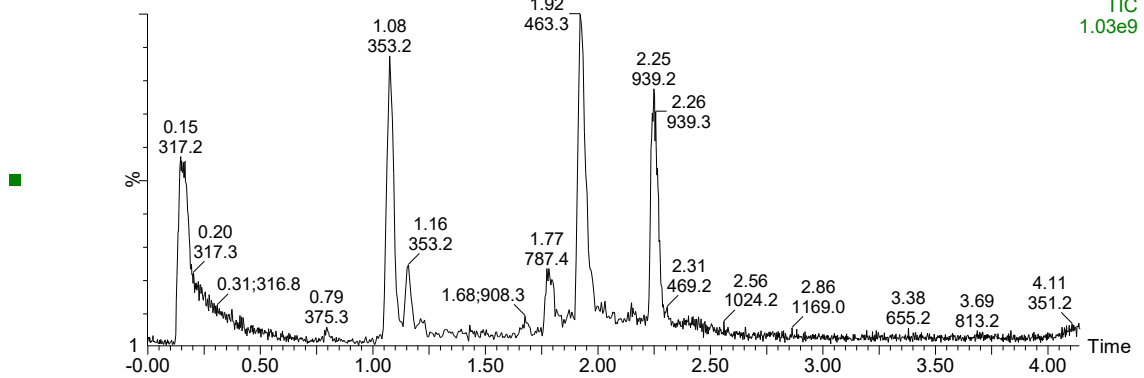
210209 pH9_4 PGG_Qglyk_CQA point3

24: Diode Array
280
Range: 4.861e-1



210209 pH9_4 PGG_Qglyk_CQA point3

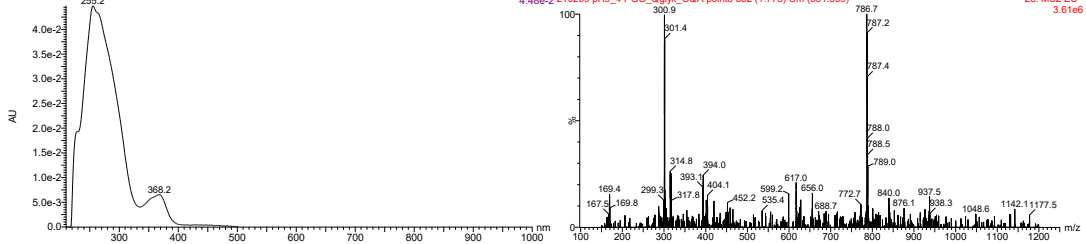
23: MS2 ES-
TIC
1.03e9



210209 pH9_4 PGG_Qglyk_CQA point3 2104 (1.753) Cm (2094-2138)

24: Diode Array 4.48e-2 210209 pH9_4 PGG_Qglyk_CQA point3 552 (1.773) Cm (551-559)

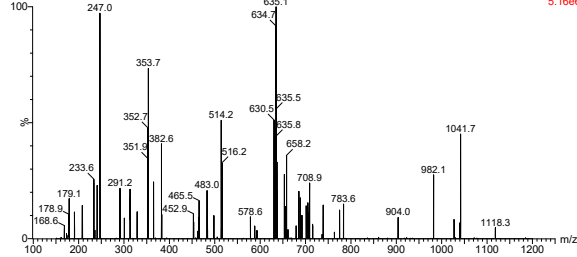
23: MS2 ES-
3.61e6



TriGG

210209 pH9_0 PGG_Qglyk_CQA point15 441 (1.217)

23: MS2 ES-
5.16e6

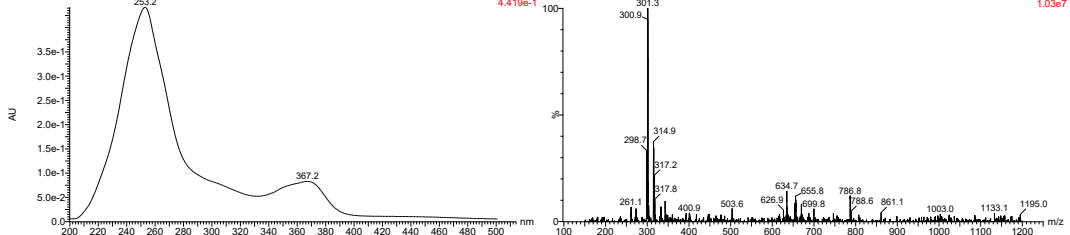


Ellagihappo

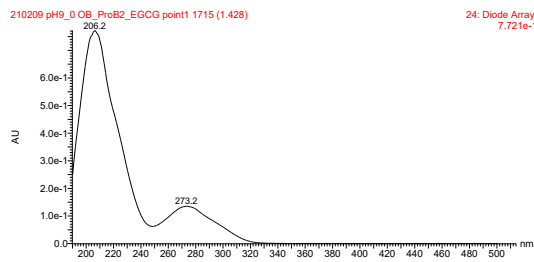
210209 pH9_0 PGG_Qglyk_CQA point15 2116 (1.763)

24: Diode Array 4.419e-1 210209 pH9_0 PGG_Qglyk_CQA point15 559 (1.799) Cm (554-562)

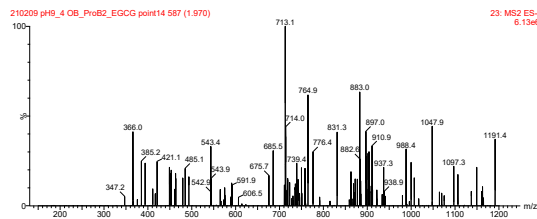
23: MS2 ES-
1.03e7



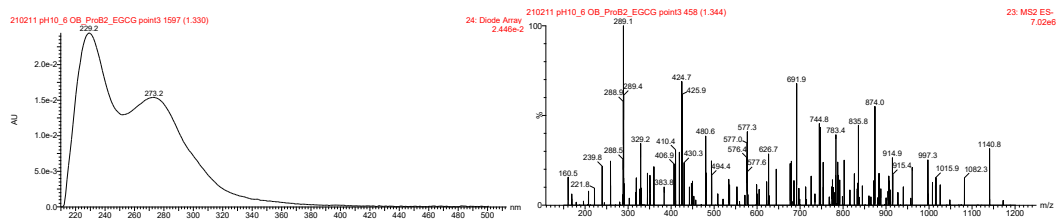
Gallushappo



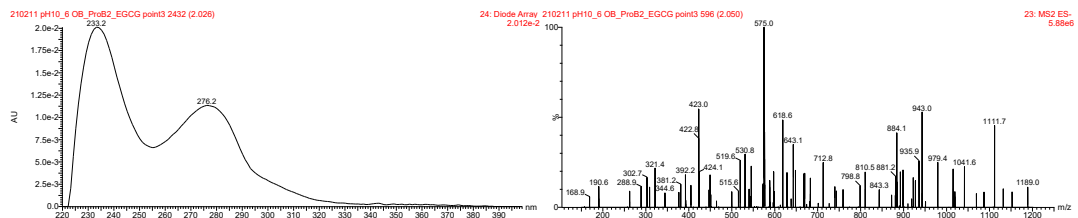
EGCG metaboliitti m/z 713



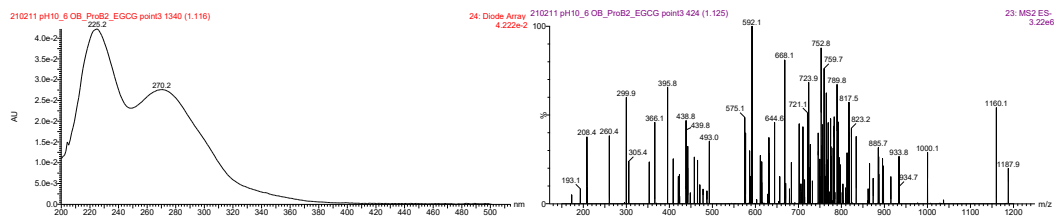
Katekiini



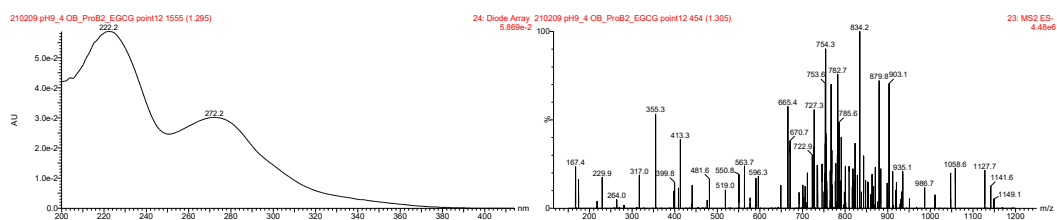
Prosyaniidiini dimeeri



Prosyaniidiini B2 metaboliitti m/z 591



Oenothiini B metaboliitti m/z 754



Liite 2.

Malliyhdisteiden pH-mallinus kolmen tunnin ajalta 11 eri pH-asteessa. Kolme pH-astetta, 9.0, 10.0 ja 11.0, on esitetty Kuvassa 11.

