

VALITTUJEN OKSISTEROLIEN JA D-VITAMIINIIN LIITTYVIEN
YHDISTEIDEN DESORPTIOILMANPAINEN
FOTOIONISAATIOMASSASPEKTROMETRINEN TUTKIMINEN ROTAN
AIVOLEIKKEISTÄ

Pasi Säilä
Helsingin yliopisto
Farmasian tiedekunta
Farmaseuttisen kemian ja teknologian osasto

Kesäkuu 2016



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Farmasian tiedekunta		Laitos/Institution – Department Farmaseuttisen kemian ja teknologian osasto	
Tekijä/Författare – Author Pasi Säilä			
Työn nimi / Arbetets titel – Title Valittujen oksisterolien ja D-vitamiiniin liittyvien yhdisteiden fotoionisaatiomassaspektrometrinen tutkiminen rotan aivoleikkeistä			
Oppiaine / Läroämne – Subject Farmaseuttinen kemia			
Työn laji/Arbetets art – Level Pro gradu	Aika/Datum – Month and year Kesäkuu 2016	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 43	
Tiivistelmä/Referat – Abstract <p>Oksisteroleilla ja D-vitamiiniin liittyvillä yhdisteillä on havaittu monia biologisia vaikutuksia aivoissa. Ne voivat liittyä erilaisiin psykiatriisiin ja neurodegeneratiivisiin sairauksiin. Näiden yhdisteiden tutkimiseen kudoksista on perinteisesti käytetty melko työläitä ja aikaa vieviä nestekromatografia- tai kaasukromatografia-massaspektrometrisiä menetelmiä. Näiden menetelmien rinnalle on kehitetty avoimen ympäristön desorptioionisaatiomenetelmiä. Niiden etuna on analyysin nopeus ja helppous. Yleensä näytettä ei tarvitse esikäsitellä tai vain vähäinen esikäsitely riittää. Lisäksi näiden menetelmien avulla voidaan tarkasti selvittää missä päin esimerkiksi kudoksenäytettä tutkittava yhdiste tarkalleen sijaitsee.</p> <p>Työn tarkoituksena oli tutkia havaitaanko valittuja oksisteroleja ja D-vitamiiniin liittyviä yhdisteitä rotan aivoleikkeistä desorptiofotoionisaatiolla ilmanpaineessa (DAPPI). Tutkimukseen valitut yhdisteet olivat kolesteroli, D₃-vitamiini, 25-OH-D₃-vitamiini, 7-dehydrokolesteroli, desmosteroli ja 7-ketokolesteroli. DAPPI soveltuu erityisen hyvin tällaisten neutraalien ja poolittomien yhdisteiden analysointiin. Aivoleikkeistä mitattuja spektrejä vertailtiin standardeihin MS- ja MSⁿ-mittauksilla.</p> <p>Mittausten perusteella voidaan todeta, että D₃-vitamiinia, 25-OH-D₃-vitamiinia, 7-dehydrokolesterolia ja desmosterolia ei havaita rotan aivoleikkeistä DAPPI:lla. D₃-vitamiinia lukuun ottamatta on mahdollista, että edellä mainituista analyytit ovat osana aivoista havaitussa spektrissä, mutta jokin muu samalla massalla esiintyvä yhdiste tekee tutkittavan yhdisteen luotettavan tunnistamisen mahdottomaksi.</p> <p>Tutkituista yhdisteistä aivoleikkeistä havaittiin 7-ketokolesteroli ja kolesteroli. 7-ketokolesterolia voi syntyä auto-oksidation seurauksena paljon kolesterolia sisältävissä näytteissä. Tämän tutkimuksen perusteella oli mahdotonta sanoa, onko havaittu 7-ketokolesteroli endogeenisesti muodostunut vai muodostuuko se näytteiden säilytyksen vai analyysin aikana.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords D-vitamiini, oksisterolit, massaspektrometria, desorptiofotoionisaatio ilmanpaineessa, rotan aivokudos			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Farmaseuttisen kemian osasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Ohjaajat: Anu Vaikkinen ja Risto Kostianen			



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Faculty of pharmacy		Laitos/Institution– Department Division of pharmaceutical chemistry and technology	
Tekijä/Författare – Author Pasi Säilä			
Työn nimi / Arbetets titel – Title Analysis of the oxysterols and vitamin D related compounds from rat brain using desorption atmospheric pressure photoionization mass spectrometry			
Oppiaine /Läroämne – Subject Pharmaceutical chemistry			
Työn laji/Arbetets art – Level Pro gradu	Aika/Datum – Month and year June 2016	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 43	
Tiivistelmä/Referat – Abstract <p>Oxysterols and vitamin D related compounds are found to be biologically active in brain. They might be involved in different psychiatric and neurodegenerative diseases. These compounds have traditionally been analysed from tissues using somewhat laborious and time-consuming gas chromatography and liquid chromatography mass spectrometric methods. To the side of these methods ambient desorption ionization methods have been developed. The advantage of these methods is rapid and easy operation. Usually minimal or no sample pretreatment is required. In addition these methods can be applied to imaging of for example tissues.</p> <p>The aim of this work was to study if it is possible to detect certain oxysterols and vitamin D related compounds from rat brain tissue samples with desorption atmospheric pressure photoionization (DAPPI). The compounds chosen to this study were cholesterol, vitamin D₃, 25-hydroxyvitamin D₃, 7-dehydrocholesterol, desmosterol and 7-ketocholesterol. DAPPI is especially suitable for efficient ionization of this kind of neutral and non-polar compounds. Detected MS and MSⁿ spectras of the brain tissue samples were compared to those obtained from standard compounds.</p> <p>As a result we could not detect vitamin D₃, 25-hydroxyvitamin D₃, 7-dehydrocholesterol, desmosterol from rat brain samples with DAPPI. Excluding vitamin D₃ it is possible that those other analytes are present at the spectras of brain samples but there is some other compound with same mass which makes the reliable identification of studied compounds impossible.</p> <p>7-ketocholesterol and cholesterol were the only compounds we detected from brain tissue sections. 7-ketocholesterol can be formed via auto-oxidation in samples containing excess amount of cholesterol. According to this study it is impossible to say if the detected 7-ketocholesterol is formed endogenously or during sample preparation and analysis.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Vitamin D, oxysterol, mass spectrometry, desorption atmospheric pressure photoionization, rat brain tissue			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Division of pharmaceutical chemistry			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Supervisors: Anu Vaikkinen and Risto Kostianen			

SISÄLLYSLUETTELO

1 KIRJALLISUUSKATSAUS	1
1.1 Johdanto	1
1.2 Oksisterolit ja D-vitamiiniin liittyvät yhdisteet aivoissa	2
1.2.1 D-vitamiini	4
1.2.2 7-dehydrokolesteroli	5
1.2.3 Desmosteroli	5
1.2.4 7-ketokolesteroli	6
1.3 Oksisterolien ja D-vitamiiniin liittyvien yhdisteiden analysointi biologisista näytteistä	6
1.4 Normaalin ilmanpaineen desorptioionisaatiotekniikat	8
1.4.1 Desorptiosähkösumutusionisaatio	9
1.4.2 Desorptiofotoionisaatio ilmanpaineessa	11
1.5 Työn tavoite	15
2 KOKEELLINEN OSA	15
2.1 Analyytit ja liuottimet	15
2.2 Laitteisto	16
2.3 Näytteet	18
3 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	18
3.1. 25-OH-D ₃ -vitamiini	21
3.2 D ₃ -vitamiini	23
3.3 7-Dehydrokolesteroli	25
3.4 Desmosteroli	28
3.5 7-ketokolesteroli	29
3.6 Kolesteroli	31
4 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET	32
KIRJALLISUUSLUETTELO	36

1 KIRJALLISUUSKATSAUS

1.1 Johdanto

Ihmiset saavat D-vitamiinia ravinnosta tai vaihtoehtoisesti sitä voi muodostua ihossa UV-säteilyn vaikutuksesta (Higashi ym. 2010). D-vitamiinilla on merkittävä rooli ihmisen kalsiumaineenvaihdunnassa (Holick 2007). D-vitamiinin puutos voi aiheuttaa osteomalasiaa, riisitautia ja osteoporoosia. D-vitamiininilla on myös havaittu vaikutuksia aivoissa ja sen puutos saattaa liittyä esimerkiksi psykiatrisiin sairauksiin (Hoogendijk ym. 2008) ja Alzheimerin tautiin (Annweiler ym. 2013). Kolesteroli puolestaan on elintärkeä osa solukalvoa ja toimii elimistössä steroidihormonien prekursorina (Faust ja Kovacs 2014). Kolesterolista muodostuvia hapettuneita kolesterolijohdoksia kutsutaan oksisteroleiksi (Olkkonen ja Lehto 2005). Muutokset eri oksisterolien määrässä elimistössä voivat olla yhteydessä moniin neurodegeneratiivisiin sairauksiin (Leoni ja Caccia 2011).

Jotta ymmärrettäisiin paremmin oksisterolien ja D-vitamiiniin liittyvien yhdisteiden roolia erilaisissa sairauksissa, on tärkeää pystyä tutkimaan niitä mahdollisimman tehokkaasti erilaisista biologisista näytteistä. Näiden yhdisteiden tutkimiseen on viime vuosina käytetty kaasukromatografia-massaspektrometria (GC-MS) –menetelmiä sekä sähkösumutus-ionisaatiota (ESI) (Yamashita ja Fenn 1984), ja kemiallista ionisaatiota ilmanpaineessa (APCI) (Covey ym. 1986) hyödyntäviä nestekromatografia-massaspektrometria (LC-MS) -menetelmiä (Griffiths ym. 2013, Higashi ym. 2010). LC-MS-menetelmillä on kuitenkin omat heikkoutensa, joiden vuoksi tarvitaan usein tutkittavien yhdisteiden suhteellisen työlästä ja aikaa vievää derivatisaatiota. Derivatisaation avulla saadaan parannettua menetelmien herkkyyttä ja selektiivisyyttä. Lisäksi derivatisaatiolla voidaan estää oksisterolien analytiikassa ongelmallista säilytyksen ja näytteenkäsittelyn aikana tapahtuvaa kolesterolin auto-oksidaatiota, sillä yleensä kolesterolia on näytteissä 10^3 kertaa enemmän kuin mitään oksisterolia (Griffiths ym. 2013). Tämä tekee oman haasteensa oksisterolien tutkimiseen.

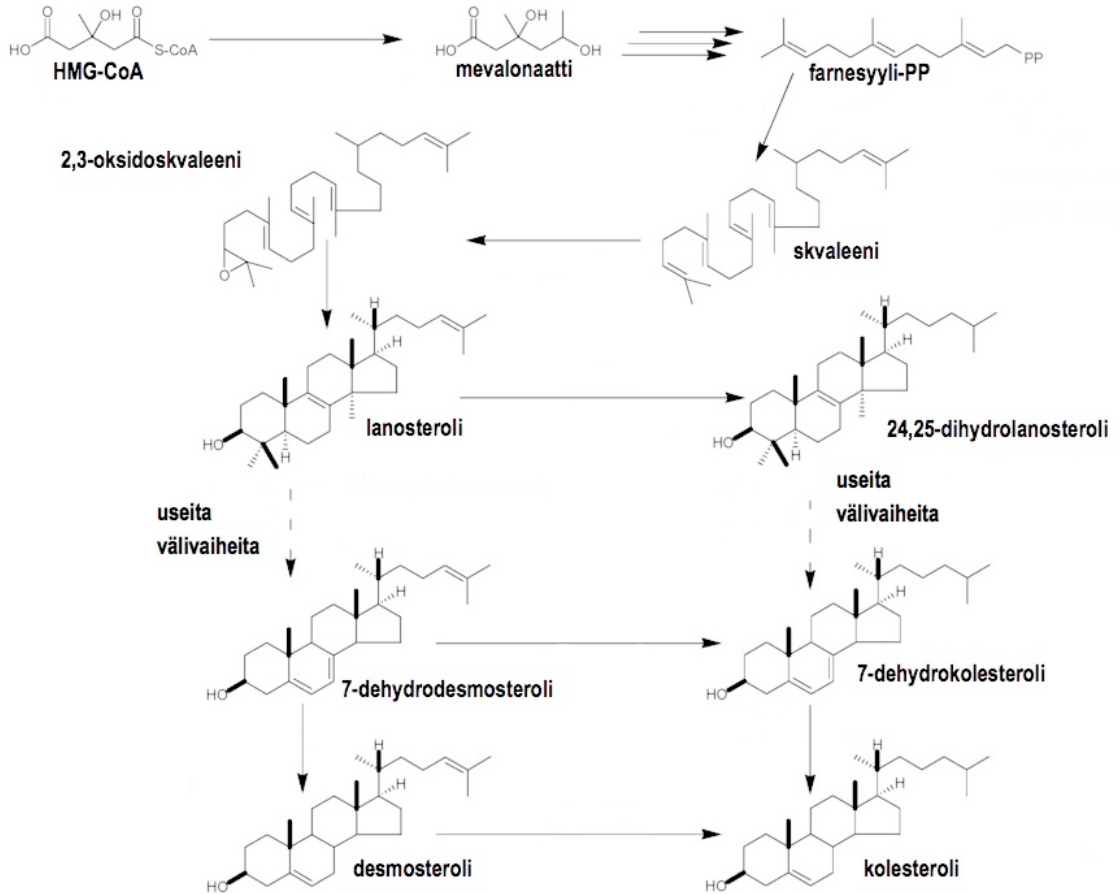
Perinteisesti käytetyillä menetelmillä ei myöskään voida tarkasti määrittää tutkittavan yhdisteen sijaintia näytteessä tai sen suhteellista määrää eri puolilla näytettä. Massaspektrometrisessa kuvantamisessa on perinteisesti käytetty paljon MALDI-MS –menetelmiä, mutta niissä rajoituksena voi olla käytettävän matriisin aiheuttama tausta etenkin pieniä molekyylejä tutkittaessa (Drexler ym. 2007; Hsieh ym. 2007, Hsieh ym. 2006). Massaspektrometrisessa kuvantamisessa voidaan käyttää myös avoimessa ympäristössä tapahtuvia desorptioionisaatiomenetelmiä (Pól ym. 2009; Hsu ym. 2015; Rao ym. 2015). Niillä pystytään analysoimaan erilaisia yhdisteitä ja näytteitä kokonaan ilman esikäsitteilyä suoraan laboratorion huoneilmassa tai näytteiden luonnollisessa ympäristössä (Venter ym. 2008).

1.2 Oksisterolit ja D-vitamiiniin liittyvät yhdisteet aivoissa

Kun puhutaan D-vitamiinista ihmisen elimistössä, tarkoitetaan itse asiassa kolekalsiferolia (D₃-vitamiini) ja ergokalsiferolia (D₂-vitamiini) sekä molempien metaboliitteja (Higashi ym. 2010). Ihminen voi saada D₃- ja D₂-vitamiinia myös ruoasta. D₂-vitamiinin lähteenä ovat pelkästään kasvit ja ravintolisät. Sekä D₃- että D₂-vitamiini metaboloituvat ihmiselimistössä siten, että ne ovat samalla tavoin biologisesti aktiivisia. D-vitamiini hydroksyloituu maksassa 25-hydroksi-D-vitamiiniksi (25-OH-D-vitamiini) (Higashi ym. 2010). 25-OH-D-vitamiini taas metaboloituu edelleen munuaisissa varsinaiseksi aktiiviseksi metaboliitiksi, 1 α ,25-dihydroksi-D-vitamiiniksi (1,25(OH)₂-D-vitamiini). Päämetaboliitti verenkierrossa on 25-OH-D-vitamiini. D-vitamiinin tarkkoja vaikutuksia aivoissa ei tunneta kovin hyvin, mutta se voi olla yhteydessä esimerkiksi psykiatrisiin sairauksiin (Hoogendijk ym. 2008). Lisäksi tiedetään, että D-vitamiinireseptoreita löytyy myös aivokudoksesta (Eyles ym. 2014).

Ravinnosta saadun D-vitamiinin lisäksi D-vitamiinia muodostuu elimistössä myös ihossa kolesterolin esiasteesta, 7-dehydrokolesterolista, UV-säteilyn vaikutuksesta. 7-dehydrokolesteroli on kolesterolisynteesissä viimeinen välituote ennen kolesterolin muodostumista (Acimovic ja Rozman 2013). Kolesterolisynteesiä uskotaan tapahtuvan nisäkkäillä käytännössä kaikissa soluissa asetyylikoentsyymi A:sta monivaiheisen synteesiketjun avulla (Kuva 1). Elimistön kokonaiskolesterolista noin 25% sijaitsee

aivoissa (Leoni ja Caccia 2011). Sen pitoisuus on ihmisen keskushermostossa on keskimäärin jopa noin 23 mg/g (Dietschy ja Turley 2004). Kolesteroli ei juurikaan kulkeudu veri-aivoesteen läpi verenkierrosta aivoihin, vaan *de novo* -synteesi vastaa lähes kaikesta aivojen kolesterolista.



Kuva 1. Kolesterolin biosynteesin vaiheet esitetty yksinkertaistettuna (kuva muokattu artikkelista Acimovic ja Rozman 2013). Kolesterolin biosynteesi voi tapahtua kahta eri reittiä. Kandutsch-Russellin reitin viimeisessä vaiheessa 7-dehydrokolesterolista muodostuu kolesterolia. Vastaavasti Blochin reitin viimeisessä vaiheessa desmosterolista muodostuu kolesterolia.

Sen lisäksi, että kolesteroli on elintärkeä yhdiste solukalvon normaalille toiminnalle, se toimii myös steroidihormonien prekursorina (Acimovic ja Rozman 2013). Tällaisia hormoneja ovat esimerkiksi kortisoli, progesteroni, estrogeeni ja testosteroni. Aivoissa steroidihormonit osallistuvat useisiin toimintoihin kuten kehitykseen, metaboliaan ja käyttäytymiseen (Faust ja Kovacs 2014).

Steroidihormonien lisäksi kolesteroli toimii myös oksisterolien prekursorina. Oksisteroleja voi syntyä elimistössä sekä entsyymattisten että ei-entsyymattisten hapetusreaktioiden seurauksena (Olkkonen ja Lehto 2005). Lisäksi myös länsimaisessa ruokavaliossa arviolta noin 1 % kolesterolista on hapettuneessa muodossa. Aivokudoksessa oksisterolien määrä on tavallisesti alhainen (ng/g - µg/g) kolesterolin määrän ollessa huomattavasti suurempi (mg/g) (Wang ja Griffiths 2008). Eri oksisterolien määrä elimistössä voi olla yhteydessä erilaisiin aivojen toimintaan liittyviin sairauksiin kuten esimerkiksi Alzheimerin tautiin, MS-tautiin ja Huntingtonin tautiin (Leoni ja Caccia 2011). Oksisterolit voivat myös vaikuttaa kehittyvien aivojen neurogeneesiin (Sacchetti ym. 2009).

1.2.1 D-vitamiini

D-vitamiinin on osoitettu vaikuttavan olennaisesti sekä kehittyviin että aikuisten aivoihin (Eyles ym. 2013; Groves ym. 2014; Cui ym. 2015). D-vitamiinin esiintymistä aivokudoksessa on kuitenkin kirjallisuuden mukaan tutkittu vain vähän, mutta sen sijaan D-vitamiinireseptoreita tiedetään olevan aivoissa ainakin hippokampuksen ja aivokuoren alueella (Annweiler ym. 2009). Nämä alueet aivoissa liittyvät vahvasti kognitiivisiin toimintoihin ja onkin havaittu, että D-vitamiini voi olla yhteydessä ihmisen kognitiiviseen suorituskyykyyn (Annweiler ym. 2009, Brouwer-Brolsma ja de Groot 2015). On myös osoitettu, että D-vitamiinista voi olla monia fysiologisia hyötyjä liittyen aivojen toimintaan solutasolla (Brouwer-Brolsma ja de Groot 2015). D-vitamiini saattaa edistää aivojen neurogeneesiä, synaptogeneesiä ja ehkäistä hermosolujen kuolemaa aivoissa. Solutason vaikutusten lisäksi D-vitamiini on yhteydessä moniin aivojen toimintaan liittyviin suhteellisen yleisiin sairauksiin, kuten masennukseen (Hoogendijk ym. 2008), Alzheimerin tautiin (Annweiler ym. 2013) ja Parkinsonin tautiin (Knekt ym. 2010).

1.2.2 7-dehydrokolesteroli

Kolesterolisynteesin viimeistä vaihetta katalysoivan steroli- Δ^7 -reduktaasin heikentynyt aktiivisuus aiheuttaa kudosten alhaisen kolesterolipitoisuuden ja 7-dehydrokolesterolin kohonneen pitoisuuden (Fitzky ym. 1998; Wassif ym. 1998; Waterham ym. 1998). Tätä kolesterolisynteesin häiriötä kutsutaan Smith-Lemli-Opitzin syndroomaksi. Se vaikuttaa esimerkiksi aivoihin aiheuttaen henkistä jälkeenjääneisyyttä (Tint ym. 1995).

7-dehydrokolesterolin on lisäksi osoitettu olevan erittäin altis vapaiden radikaalien aiheuttamalle hapettumiselle (Xu ym. 2009). Se on jopa yli 200 kertaa reaktiivisempi kuin esimerkiksi kolesteroli. 7-dehydrokolesterolin hapettumisen seurauksena syntyneiden oksisterolien on osoitettu olevan biologisesti aktiivisia (Korade ym. 2010). Ne aiheuttavat esimerkiksi morfologisia muutoksia hermosoluissa.

1.2.3 Desmosteroli

Desmosteroli voi toimia nisäkässoluissa kolesterolin tavoin ylläpitäen solujen kasvua ja säätelämällä lipidihomeostaasia (Rodríguez-Acebes ym. 2009). Desmosteroli on tärkeä osa kehittyvien aivojen solujen solukalvoa (Mutka ym. 2004). Nisäkkäillä, myös ihmisillä, kehittyvien aivojen steroleista jopa 30 % on desmosterolia, mutta sen muodostumisen mekanismia ei ole täysin selvitetty (Jansen ym. 2013).

Desmosterolin ylimääräinen kertyminen elimistöön aiheuttaa desmosteroloosiksi kutsutun tilan (Clayton ym. 1996). Kyseessä on kuitenkin hyvin harvinainen sairaus ja todettuja tapauksia ihmisellä löytyykin kirjallisuudesta vain muutamia (FitzPatrick ym. 1998; Andersson ym. 2002; Schaaf ym. 2011). Kaikissa tapauksissa on havaittu epämuodostumia aivoissa. Desmosteroloosissa desmosterolin määrä suhteessa kolesterolin määrään elimistössä on normaalia suurempi. Esimerkiksi aivokudoksessa desmosteroli/kolesteroli-suhde oli tutkittavalla potilaalla 1,06, kun kontrolleilla vastaava luku oli 0,067-0,166 (n=4) (FitzPatrick ym. 1998).

1.2.4 7-ketokolesteroli

7-ketokolesteroli eroaa rakenteeltaan kolesterolista ainoastaan siten, että siinä on ketoryhmä 7-asemassa kahden vetyatomin tilalla (Lyons ja Brown 1999). 7-ketokolesteroli kuuluu ei-entsymaattisten hapetusreaktioiden kautta muodostuviin oksisteroleihin, joita syntyy elimistössä esimerkiksi vapaiden happiradikaalien vaikutuksesta. Lisäksi 7-ketokolesteroli kuuluu yhtenä yleisimpiin ravinnosta löydettyihin oksisteroleihin (Brown ja Jessup 1999).

7-ketokolesterolia on havaittu ihmisen aivokudoksessa (Miayjima ym. 2001). Sen pitoisuus ihmisen aivokudoksessa on 146-1162 µg/g ja sen pitoisuus vaihtelee eri puolilla aivoja. Solutasolla 7-ketokolesterolin on havaittu indusoivan apoptoottista solukuolemaa vaikuttamalla solujen kalsiumtasapainoon ja mitokondrioiden toimintaan haitallisesti (Berthier ym. 2004; Han ym. 2007).

1.3 Oksisterolien ja D-vitamiiniin liittyvien yhdisteiden analysointi biologisista näytteistä

Klassisia menetelmiä oksisterolien tutkimuksessa ovat olleet ohutkerroskromatografia ja nestekromatografia. Ohutkerroskromatografia on yksinkertainen ja nopea erotusmenetelmä, mutta se ei sovellu hyvin monimutkaisten näytteiden kuten kudosten analysointiin (Schroepfer Jr 2000). Nestekromatografiaa on taas käytetty monimutkaisempien oksisteroliseosten erotteluun (Kudo ym. 1989). Menetelmässä on todella työläs esikäsittely, johon kuuluu esimerkiksi saponifikaatio, uutto ja derivatisointi. Johdoksista voidaan tehdä isotooppileimattuja, jolloin voidaan paremmin arvioida analyysissä muodostuneiden oksisterolien määrää. Herkkyydessä päästään ng tasolle, mutta menetelmä on niin työläs, että se ei sovellu hyvin suurten näytemäärien analysointiin. LC-menetelmissä ongelmana voi olla myös oksisterolien heikko vaste paljon käytettyyn UV-detektioon, mutta signaalia pystytään parantamaan derivatisaation avulla jopa nelinkertaiseksi (Zhang ym. 2001).

Oksisterolien tavoin D-vitamiinin ja siihen liittyvien yhdisteiden tutkimuksessa on perinteisesti käytetty nestekromatografisia menetelmiä, mutta lisäksi on käytetty paljon immunologisia menetelmiä (Mawer ym. 1998; Wallace ym. 2010). Immunologiset menetelmät ovat teknisesti yksinkertaisia ja ne ovat myös automatisoitavissa (Wallace ym. 2010). Ne ovat kuitenkin alttiita matriisin vaikutukselle ja eivät siten sovi niin hyvin monimutkaisten biologisten näytteiden analysointiin. Immunologisilla menetelmillä päästään nmol/l luokkaa oleviin havaintoalarajoihin.

Tänä päivänä kaasukromatografia-massaspektrometria (GC-MS) on laajasti oksisterolien tutkimuksessa käytetty menetelmä (Griffiths ym. 2013). GC-MS:n avulla saavutetaan yhdisteille hyvä selektiivisyys ja herkkyys, mutta menetelmä vaatii kuitenkin tutkittavien yhdisteiden työlään ja aikaa vievän esikäsittelyn sekä derivatisaation (Lütjohann ym. 1996; Griffiths ym. 2013). Kudoksia tutkittaessa kromatografisten menetelmien esikäsittely on monivaiheinen ja siihen näytteen homogenisaatio, uutto, suodatus, pesu ja hydrolyysi (Lütjohann ym. 1996). Menetelmällä aivokudoksesta määritetyt oksisterolipitoisuudet ovat 3,8-15,1 ng/mg (kosteaa kudosta).

GC-MS:n lisäksi on kehitetty LC-MS-menetelmiä oksisterolien analysointiin (Griffiths ym. 2013). LC-MS-menetelmillä ongelmana on, että monet isomeeriset yhdisteet saattavat tuottaa samanlaisen spektrin ja lisäksi oksisterolit ionisoituvat heikosti paljon käytetyillä ESI:lla ja APCI:lla. Tämä ongelma on pystytty GC-MS:n tavoin ratkaisemaan derivatisaation avulla. APPI:lla oksisterolit ja D-vitamiiniin liittyvät yhdisteet ionisoituvat tehokkaasti ilman derivatisaatiota (Ahonen ym. 2014). Tämä mahdollistaa nopeamman analyysin kuin esimerkiksi ESI. APPI:lla saavutettavat havaintoalarajat yhdisteille ovat 0,5-25 ng/ml. Edellä mainittujen menetelmien heikkoutena on työläyden lisäksi se, että esimerkiksi aivokudosta tutkittaessa ei voida tarkasti määrittää, missä päin aivoja tutkittava yhdiste sijaitsee.

1.4 Normaalin ilmanpaineen desorptioionisaatiotekniikat

Bioanalytiikassa perinteisesti laajasti käytettyjen GC-MS- ja LC-MS-menetelmien rinnalle on kehitetty avoimen ympäristön desorptioionisaatiomenetelmiä, joista ensimmäiset olivat desorptiosähkösumutusionisaatio (DESI) (Takáts ym. 2004) ja suora analyysi reaaliajassa (DART) (Cody ym. 2005). Niiden jälkeen uusia menetelmiä on julkaistu lukuisia (Alberici ym. 2010). Yksi edellä mainittuja uudempia menetelmiä on desorptiofotoionisaatio (DAPPI) (Haapala ym. 2007). DAPPI:n esittelivät ensimmäisen kerran Haapala ja muut vuonna 2007.

Normaalin ilmanpaineen desorptioionisaatiotekniikat voidaan jakaa luokkiin sen mukaan, minkä massaspektrometrian ionisaatiomenetelmän pohjalta ne on kehitetty (Venter ym. 2008). ESI esimerkiksi sopii hyvin poolisten tai kohtalaisen poolisten yhdisteiden analysointiin. ESI:n pohjalta kehitetty ensimmäinen desorptioionisaatiomenetelmä normaalissa ilmapaineessa on DESI (Takáts ym. 2004). Muita ESI:n pohjalta kehitettyjä desorptioionisaatiomenetelmiä ovat esimerkiksi sähkösumutus laserdesorptioionisaatio (ELDI)(Shiea ym. 2005) ja laser ablaatio sähkösumutusionisaatio (LAESI)(Nemes ja Vertes 2007). ELDI:ssa ja LAESI:ssa ionisaatio noudattaa samoja periaatteita kuin ESI:ssa, mutta desorptiossa hyödynnetään laseria. DESI:ssa puolestaan hyödynnetään liuotinsumua tutkittavien yhdisteiden desorptiossa (Takáts ym. 2004).

Toinen normaalissa ilmanpaineessa tapahtuvien desorptioionisaatiotekniikoiden ryhmä on APCI:in pohjautuvat menetelmät (Venter ym. 2008). Kyseisissä menetelmissä desorptioon käytetään tavallisesti lämmitettyä kaasuvirtausta. Niiden avulla voidaan tehokkaasti ionisoida pieniä poolisia ja poolittomia yhdisteitä. Kemialliseen ionisaatioon ilmanpaineessa liittyviä desorptioionisaatiomenetelmiä ilmanpaineessa ovat esimerkiksi DART (Cody ym. 2005) ja desorptio kemiallinen ionisaatio ilmanpaineessa (DAPCI) (Takáts ym. 2005).

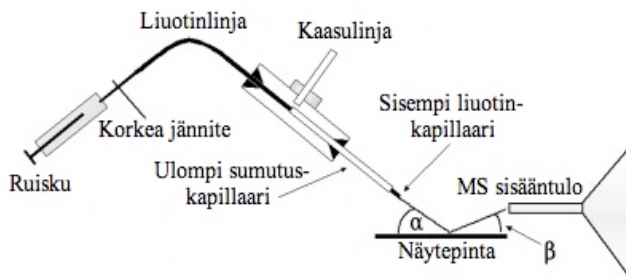
Desorptioionisaatiomenetelmä ilmanpaineessa voi pohjautua myös APPI:in. Esimerkki tällaisesta menetelmästä on DAPPI (Haapala ym. 2007). Menetelmä soveltuu erityisesti

neutraaleille ja poolittomille yhdisteille. DAPPI:a ei ole tutkittu yhtä paljon kuin esimerkiksi DESI:a, mutta DESI:n tavoin sitä voidaan hyödyntää bioanalytiikan sovelluksissa (Pól ym. 2009; Vaikkinen ym. 2015). DAPPI:ssa, kuten muissakin desorptioionisaatiotekniikoissa, on mahdollista käyttää näytealustana monia eri materiaaleja (Luosujärvi ym. 2008; Venter ym. 2008). Näyte voi olla nestemäinen tai kiinteä ja tyypillisiä näytteitä ovat esimerkiksi tabletti (Haapala ym. 2007), kasvin lehti (Kauppila ym. 2011) tai rotan aivoleike (Pól ym. 2009). Autenttista näytettä tutkittaessa matriisi voi vaikuttaa menetelmän herkkyteen heikentäen sitä DAPPI:ssa 2-15-kertaisesti ja DESI:ssa jopa 20-160 kertaisesti (Suní ym. 2011).

Desorptioionisaatiomenetelmien etuja aivokudosta tutkittaessa ovat nopeus ja yksinkertaisuus (Pól ym. 2009; Vismeh ym. 2012). Herkkydessä desorptioionisaatiomenetelmillä ei kuitenkaan päästä samalle tasolle kuin LC-MS- ja LC-MS²-menetelmillä (Suní ym. 2011). Esimerkiksi DAPPI:lla saavutetaan tyypillisesti yksi tai kaksi kertaluokkaa heikompi herkkyys kuin LC-MS-menetelmillä. Lisäksi yksi ongelma analysoitaessa monimutkaisia biologisia näytteitä ilman esikäsitelyä on spektrin monimutkaisuus (Pól ym. 2009). Korkean resoluution laitteistolla voidaan kuitenkin entistä luotettavammin tunnistaa yhdisteitä monimutkaisista biologisista näytteistä. Toiseksi toistettavuus kudosten analysoinnissa voi myös olla huono riippuen käytettävästä laitteistosta ja asemoinnista (Tillner ym. 2016).

1.4.1 Desorptiosähkösumutus-ionisaatio

DESI-laitteistossa (Kuva 2) liuotin sumutetaan näytteen pinnalle (Takáts ym. 2004). Näytepinnalta desorboituneet molekyylit kerätään massaspektrometriin (MS) esimerkiksi kapillaarijatkeen kautta. Laitteistoon on johdettu korkea jännite ja siinä pumpataan liuotinta liuotinlinjaa pitkin sisempään liuotinkapillaariin. Ulompaan sumutuskapillaariin tulee sumutuskaasu, jonka avulla liuotin sumutetaan sovelluksen mukaan valittavassa kulmassa (α , Kuva 2) näytepintaan. Myös MS:n sisääntulon tulee olla sopivassa kulmassa (β , Kuva 2) näytepintaan nähden.



Kuva 2. Kaavakuva DESI-laitteistosta (muokattu artikkelista Costa ja Cooks 2008)

Tietokonemallinnuksen avulla DESI:n desorptiomekanismi on saatu varmennettua (Costa ja Cooks 2007). Pääpiirteissään se koostuu kolmesta eri vaiheesta. Aluksi sumutus- tai sumutettava liuotin muodostaa tutkittavalle pinnalle ohuen kalvon. Tämän jälkeen kiinteässä faasissa olevat analyytit liukenevat liuotinkalvoon. Liuotinpisarat törmäävät kalvoon suurella nopeudella. Optimaalinen nopeus näyttäisi olevan 100 ja 120 m/s välillä (Venter ym. 2006). Törmäyksen seurauksena muodostuu analyyttiä sisältäviä pisaroita (Costa ja Cooks 2007). Muodostuvien pisaroiden koko, nopeus ja lähtökulma vaihtelee. Kuten ESI:ssä, DESI:ssä muodostuneiden varautuneiden pisaroiden pieneneminen johtaa lopulta siihen, että analyytit päätyvät kaasufaasiin (Kearle ja Tang 1993; Costa ja Cooks 2008). Ionit voivat päätyä kaasufaasiin kahden eri mekanismin kautta (Kearle 2000). Toisessa mekanismissa pienentyneiden pisaroiden varaus kasvaa niin, että alkaa tapahtua ionien suoraa emissiota kaasufaasiin (ion evaporation –malli). Toisessa mekanismissa ionit päätyvät kaasufaasiin neutraalien liuotinmolekyylien haihtumisen seurauksena (charged residue –malli).

DESI:ssä paras herkkyys saavutetaan yhdisteille, jotka voivat helposti protonoitua tai deprotonoitua (Kauppila ym. 2006). Matriisi voi vaikuttaa herkkyyteen merkittävästi (Kauppila ym. 2006; Suni ym. 2011). Esimerkiksi virtsanäytteestä tutkituille lääkeaineille havaintoalarajat voivat olla jopa 20-160-kertaiset verrattuna siihen, että lääkeaineita tutkitaan suoraan puhtaasta liuoksesta (Suni ym. 2011). Virtsan lisäksi matriisi voi DESI:ssä olla esimerkiksi tabletti (Leuthold ym. 2006), voide (Weston ym. 2005), kangas (Talaty ym. 2008) tai rotan aivoleike (Wiseman ym. 2008).

Aivokudoksesta DESI:lla voidaan tutkia sekä yhdisteen esiintymistä aivoissa että sen suhteellista ja määrää eri puolilla aivoja (Kertesz ym. 2008; Pól ym. 2009; Hsu ym. 2015; Rao ym. 2015). Suhteellisen määrän lisäksi DESI:lla on mahdollista myös kvantitatiivisesti tutkia yhdisteen esiintymistä aivoissa (Vismeh ym. 2012). Kuvantamisessa DESI:a on hyödynnetty paljon esimerkiksi tutkittaessa erilaisten lipidien, kuten kolesterolin, jakautumista aivokudoksessa (Pól ym. 2009; Eberlin ym. 2010; Eberlin ym. 2012). Eri lipidejä voidaan käyttää kudoksessa esimerkiksi biomarkkereina syöväälle ja niiden erilaisen jakautumisen perusteella pystytään erottelemaan normaali kudoksesta syöpäkudoksesta (Dill ym. 2009) sekä luokittelemaan syöpäkasvaimia eri luokkiin (Eberlin ym. 2012). Syövän lisäksi muutokset kudosten lipideissä voivat liittyä muihinkin sairauksiin, kuten Alzheimerin tautiin (Montine ym. 2002).

1.4.2 Desorptiofotoionisaatio ilmanpaineessa

Fotoionisaatio ilmanpaineessa (APPI) esiteltiin ensimmäisen kerran vuonna 2000 ja sen avulla pystyttiin LC-MS-menetelmällä aiempaa paremmin analysoimaan neutraaleja ja poolittomia molekyyliä (Robb ym. 2000, Syage ym. 2000). APPI-laitteiston tapaan DAPPI-laitteistoon kuuluu kryptonpurkaus UV-lamppu (Haapala ym. 2007). DAPPI:ssa hyödynnetään APPI:sta tuttuja dopanteja ja kaasufaasireaktioita. DAPPI:n avulla pystytäänkin havaitsemaan aiemmin kehitettyjä desorptioionisaatiotekniikoita herkemmin juuri neutraaleja ja poolittomia yhdisteitä (Haapala ym. 2007; Pól ym. 2009).

Kokonaisuudessaan DAPPI-laitteistoon kuuluu xyz-suunnassa liikuteltava näytetaso, lämmitettävä sumutusmikrosiru ja fotonionisaatiolamppu (Haapala 2007)(Kuva 3). Fotoionisaatiolamppu on kryptonpurkaus UV-lamppu, joka emittoi energialtaan 10,0 ja 10,6 eV suuruisia fotoneja. Lisäksi massaspektrometriin kiinnitetään laitteistoa varten erillinen kapillaarijatkke, jonka kautta analysoidtavat ionit kulkevat massaspektrometriin. Myös kuivauskaasuna käytetty typpikaasu tulee MS:sta ulos kapillaarijatkkeen ulomman kanavan kautta. DAPPI:ssa sumutusmikrosirulta tuleva kuuma kaasumainen liuotinvirtaus desorboi tutkittavat yhdisteet näytteestä. Ionisaatio tapahtuu desorption

jälkeen kaasufaasissa fotoionisaatiolampun vaikutuksesta (Luosujärvi ym. 2008). Kaasufaasissa tapahtuviin reaktioihin vaikuttaa olennaisesti käytetty sumutusliuotin.

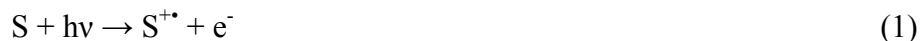
Mikrosiru, josta liuos sumutetaan, on valmistettu lasista ja siinä on kaksi lasilevyä liitettynä toisiinsa (Saarela ym. 2007). Mikrosirussa on kanava liuottimelle ja sumutuskaasulle. Siinä on myös platinasta valmistettu lämmityselementti. Sumutusliuotin tulee mikrosiruun silikakapillaarin kautta ja liuotinkanava yhdistyy sumutuskaasukanavaan. Kaasu avustaa liuottimen sumuttamista sumutinkärjen kautta haluttuun kohteeseen.

Eri näytealustoja vertailtaessa saadut tulokset tukevat sitä ajatusta, että desorptioprosessi DAPPI:ssa on pääasiassa lämpötilariippuvainen (Luosujärvi 2008). Materiaalin alhainen lämmönjohtokyky aiheuttaa sen, että kuuma liuotinkaasu lämmittää näytepisteen tehokkaammin kuin siinä tapauksessa, että lämpöenergia leviäisi helposti koko näytealustan alueelle. Tätä teoriaa tukee myös se, että ohut alumiinifolio toimii näytealustana paremmin kuin paksumpi alumiinilevy, joka pystyy varastoimaan enemmän lämpöenergiaa kuin folio. Tämän vuoksi ohut alumiinifolio kuumenee tehokkaammin pienemmältä alueelta. Lisäksi pienet yhdisteet desorboituvat nopeammin kuin suuremmat molekyylit, joilla on korkeampi kiehumispiste. Suni ja muut ovat havainneet, että suuret molekyylit kuten fosfolipidit ja sfingolipidit vaativat pieniin molekyyleihin verrattuna (4,5W) korkeamman liuottimen lämmitystehon (7W) desorboituakseen (Suni ym. 2012).

DAPPI:ssa ionisaatioon vaikuttavia ominaisuuksia ovat esimerkiksi yhdisteen poolisuus, ionisaatioreitti, ionisaatioenergia (IE), protoniaffiniteetti (PA), elektroniaffiniteetti (EA) ja happamuus kaasufaasissa (Luosujärvi ym. 2008). APPI:ssa ionisaatioon vaikuttavat systeemissä olevat reaktantti-ionit (Kauppila ym. 2002). Reaktantti-ionien koostumus systeemissä riippuu taas monesta eri tekijästä kuten liuottimesta, kantajakaasusta ja epäpuhtauksista. Myös ympäröivän ilman koostumus vaikuttaa reaktantti-ioneihin. DAPPI:ssa desorptioliuotin valitaan tyypillisesti niin, että liuotinmolekyylit ionisoituvat suoraan kryptonpurkauslampun emittoimien 10,0 ja 10,6 eV fotonien vaikutuksesta (Taulukko 1, reaktiot 1) (Luosujärvi ym. 2008).

Liuttimolekyyleistä syntyneet radikaalikationit reagoivat edelleen analyyttimolekyylien kanssa.

Taulukko 1. Positiivi-ioni-DAPPI:n ionisaatioreaktiot. S tarkoittaa sumutusliuotin- ja M analyyttimolekyyliä (Luosujärvi ym. 2008, Kauppila ym. 2002)



Positiivi-ioni-DAPPI:ssa analysoidavan yhdisteen ionisaatio voi tapahtua varauksenvaihdon tai protoninsiirron kautta (Luosujärvi ym. 2008). Radikaalikationit reagoivat varauksenvaihdon kautta analyyttien kanssa muodostaen analyytti-ioneja ($M^{+\bullet}$). Tämä tapahtuu silloin, kun analyytin IE on pienempi kuin sumutusliuottimen IE (Taulukko 1, reaktio 2). Sumutusliuottimena käytetyn tolueenin IE on 8,8 eV ja anisolin IE on 8,2 eV (NIST Chemistry WebBook 69). Jos siis analysoidavan yhdisteen IE on pienempi kuin 8,8 eV, voi siitä muodostua radikaalikationi, kun käytetään tolueenia sumutusliuottimena (Luosujärvi ym. 2008). Jos taas analysoidavan yhdisteen IE on pienempi kuin 8,2 eV, voi siitä muodostua myös radikaalikationi, kun käytetään anisolia sumutusliuottimena.

Jos puolestaan analysoidavan yhdisteen PA on suurempi kuin liuottimen PA, liuottimesta muodostuneet reaktantti-ionit luovuttavat protonin analyyttille, jolloin muodostuu ioni $[M+H]^{+}$ (Taulukko 1, reaktio 3). Ionisaatio voi tapahtua myös sitä kautta, että liuotin itseprotonoituu (Taulukko 1, reaktio 3). Jos tutkittavan yhdisteen protoniaffiniteetti on suurempi kuin liuottimen PA, luovuttaa protonoitunut liuotin protoninsa analyyttimolekyyliä muodostaen protonoidun analyytin $[M+H]^{+}$ (Taulukko 1, reaktio 5).

DAPPI:lla aikaansaataavista harvinaisemmista reaktiomekanismeista voi olla hyötyä kehitettäessä sovelluksia. Esimerkiksi analysoidaessa kannabista, DESI:lla ei voida

erottaa sen vaikuttavaa ainetta tetrahydrokannabinolia ja saman molekyyli­massan inaktiivista kannabidiolia toisistaan, sillä niiden protonoituneet molekyyli­tit fragmentoituvat samalla tavoin (Rodriguez-Cruz 2006). DAPPI:lla edellä mainitut yhdisteet pystytään ionisoimaan siten, että muodostuu molekyyli-ionit, jotka fragmentoituvat eri tavoin (Kauppila ym. 2013).

DAPPI:n ja DESI:n herkkyyttä vertailtaessa on havaittu, että poolisille yhdisteille DAPPI:n havaintoalarajat ovat samaa luokkaa DESI:n kanssa (Kauppila ym. 2006; Haapala ym. 2007). Neutraaleilla yhdisteillä, kuten testostosteronilla, DAPPI:lla havaintoalaraja on fmol luokkaa, kun taas DESI:lla saavutetaan pmol luokkaa oleva herkkyys. DAPPI:lla on pystytty myös selvittämään kolesterolin jakautumista hiiren aivoleikkeissä (Pól ym. 2009). Kuvantamisessa DAPPI:lla saavutettu spatiaalinen resoluutio on noin yhden millimetrin luokkaa, mutta koska se riippuu käytetystä mikrosirusta ja näytealustan lämmönjohtavuudesta, sitä voi olla mahdollista parantaa. Hienomman liuotinsumun tuottava mikrosiru lämmittäisi näytettä kerrallaan pienemmältä alueelta, mikä osaltaan parantaisi resoluutiota. Lisäksi heikommin lämpöä johtava alusta lämpiäisi tehokkaammin lämmitettävästä kohdasta. Tällöin lämpö ei leviä niin herkästi laajalle alueelle ja resoluutio paranisi.

Vaikka DAPPI:lla tehty kuvantamista, on tähän mennessä käytetty pääasiassa kvalitatiivisissa tutkimuksissa. Menetelmällä on kuitenkin pystytty saamaan lineaarinen vaste kuudella eri yhdisteellä eri konsentraatioilla puolentoista kertaluokan alueella (Vaikkinen ym. 2010). Esimerkkejä yhdisteistä ja näytteistä, joita DAPPI:lla on pystytty tutkimaan, on koottu taulukkoon 2.

Taulukko 2. Esimerkkejä yhdisteistä, joita DAPPI:lla on määritetty kvalitatiivisesti erilaisista näytteistä.

Näyte	Tutkittu yhdiste	Viite
tabletti	tematsepaami	Haapala ym. 2007
khat-lehti	katinoni	Kauppila ym. 2011
psilosybiinisieni	psilosiini	Kauppila ym. 2011
virtsa	steroidien metaboliitit	Vaikkinen ym. 2015
vitamiinikapseli	alfa-tokoferoli	Suni ym. 2012
hiiren aivoleike	kolesteroli	Pól ym. 2009

1.5 Työn tavoite

Työn tavoitteena oli tutkia havaitaanko valittuja biologisesti aktiivisia oksisteroleja ja D-vitamiiniin liittyviä yhdisteitä rotan aivoleikkeistä. Niiden tutkiminen DAPPI:lla voisi auttaa ymmärtämään paremmin niiden roolia aivoihin liittyvissä biologisissa vaikutuksissa. Alustavissa tutkimuksissa rotan aivoleikkeistä havaittiin korkean resoluution DAPPI-MS-menetelmällä ioneja, joiden alkuperä haluttiin tässä erikoistyössä selvittää. Havaitut ionit vastaavat tarkalta massaltaan tiettyjä oksisteroleja ja D-vitamiiniin liittyviä yhdisteitä. Tutkimukseen valitut yhdisteet olivat D₃-vitamiini, 25-OH-D₃-vitamiini, 7-dehydrokolesteroli, desmosteroli, 7-ketokolesteroli ja kolesteroli. Työssä käytettiin ioniloukkumassaspektrometriä, koska sillä pystyttiin tekemään MSⁿ mittauksia luotettavampien tulosten saavuttamiseksi. Jatkossa DAPPI:lla olisi mahdollista määrittää myös missä kohdassa aivoja tutkittavia yhdisteitä esiintyy.

2 KOKEELLINEN OSA

2.1 Analyytit ja liuottimet

Tutkimuksessa käytetyt liuottimet sekä niiden laatu on listattu taulukossa 3. Tutkimuksessa käytetty vesi oli puhdistettu Milli-Q vedenpuhdistuslaitteistolla (Millipore, Molsheim, Ranska).

Taulukko 3. Käytetyt liuottimet

Liuotin	Laatu (puhtaus-%)	Valmistaja (kaupunki, maa)
Asetoni	Lichrosolv (≥ 99,9 %)	Merck (Darmstadt, Saksa)
Etanoli	Etax Aa (≥ 99,5 %)	Altia (Rajamäki, Suomi)
Metanoli	Chromasolv (≥ 99,9 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Saksa)
Tolueeni	Chromasolv (≥ 99,9 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Saksa)

Tutkittavia yhdisteitä oli yhteensä kuusi. Tutkittavat yhdisteet ja niiden valmistajat on lueteltu taulukossa 4. Yhdisteistä valmistettiin pitoisuudeltaan 10 mM kantaliuokset

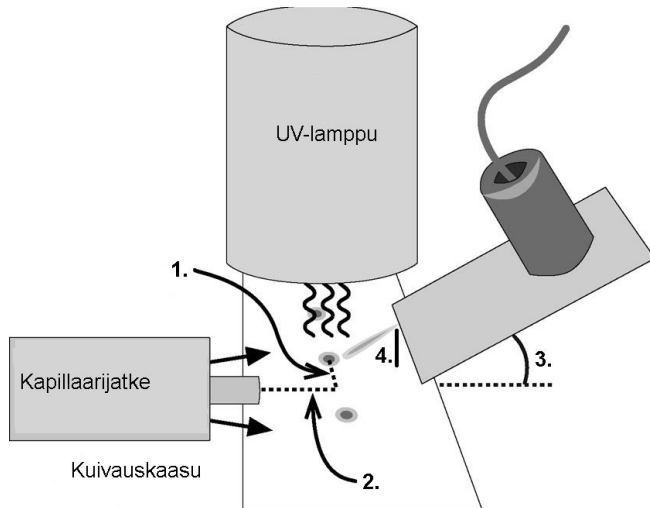
(poikkeuksena 25-OH-D₃-vitamiinin kantaliuoksen pitoisuus oli 100 µM). Kantaliuoksissa käytetyt liuottimet on esitetty taulukossa 4 kunkin tutkittavan yhdisteen kohdalla. Liuokset säilytettiin 25-OH-D₃-vitamiinia lukuun ottamatta pakkasessa -18°C. 25-OH-D₃-vitamiinin kantaliuos säilytettiin -70°C pakkasessa.

Taulukko 4. Tutkittavat yhdisteet ja niiden valmistajat sekä kantaliuoksissa käytetyt liuottimet.

Yhdiste (puhtaus)	Valmistaja (kaupunki, maa)	Liuotin
Desmosteroli (>99%)	Avanti Polar Lipids inc. (Alabaster, USA)	etanoli
D ₃ -vitamiini (≥99%)	Alexis Biochemicals (Lausanne, Sveitsi)	metanoli
25-OH-D ₃ -vitamiini (≥98%)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Saksa)	etanoli
Kolesteroli (99%)	Genzyme pharmaceuticals (Liestal, Sveitsi)	metanoli
7-dehydrokolesteroli (≥98%)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Saksa)	asetoni
7-ketokolesteroli (>99%)	Avanti Polar Lipids inc. (Alabaster, USA)	etanoli

2.2 Laitteisto

DAPPI-MS-laitteistossa massaspektrometrinä käytettiin ioniloukkumassaspektrometriä (Agilent 6330 ioniloukku, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). DAPPI-laitteiston eri komponenttien asemointia ja laitteiston eri parametreja ei optimoitu erikseen tätä tutkimusta varten, vaan käytettiin arvoja, jotka olivat mahdollisimman lähellä aikaisemmassa tutkimuksessa optimoituja parametreja (Luosujärvi ym. 2008). Parametrien arvot on lueteltu taulukossa 5. Tutkimuksessa sumutusmikrosiru ja massaspektrometrin kapillaarinjatke oli samansuuntaisesti asemoitu kuten nähdään DAPPI:n kaavakuvassa (Kuva 3).



Kuva 3. DAPPI-laitteiston kaavakuva. Numeroitujen etäisyyksien ja kulman arvot on listattu taulukossa 5. Kuva on muokattu artikkelista Luosujärvi ym. 2008.

Taulukko 5. Työssä käytetyt DAPPI-MS-laitteiston parametrien arvot. Taulukossa numeroidut parametrit 1.-4. on esitetty kuvassa 3 (Luosujärvi ym. 2008).

parametri	käytetty arvo
1. näytteen x-suuntainen asema	0 mm
2. näytteen y-suuntainen asema	3 mm
3. mikrosirun ja näytealustan välinen kulma	45°
4. mikrosirun kärjen ja näytealustan välinen pystysuora etäisyys	3 mm
mikrosirun lämmitysteho	4,5 W
sumutusliuottimen virtausnopeus	10 µL/min
sumutuskasun virtausnopeus	180 mL/min
kuivauskaasun virtausnopeus	4 L/min
kuivauskaasun lämpötila	285°C
kapillaarin jatkeen jännite	- 4 kV
käytetty mitta-alue	50-600 <i>m/z</i>

Kaasun virtausnopeus rajoitettiin rajoittimen (SMC Pneumatics precision regulator IR1000-F01, Tokyo, Japan) avulla. Erillisen mittarin (Aalborg Mass flow controller gfc, Orangeburg, NY, USA) avulla voitiin varmistua sumutuskasun oikeasta virtausnopeudesta. Mikrosirua lämmitettiin erillisen virtalähteen (Iso-Tech programmable power supply IPS-603, Huntingdon, England) avulla ja liuotinta pumpattiin ruiskupumpulla (Harvard Apparatus PHD 2000 infusion, Holliston, MA,

USA). Datan käsittelyyn käytettiin DataAnalysis -ohjelmaa (versio 6.1) (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

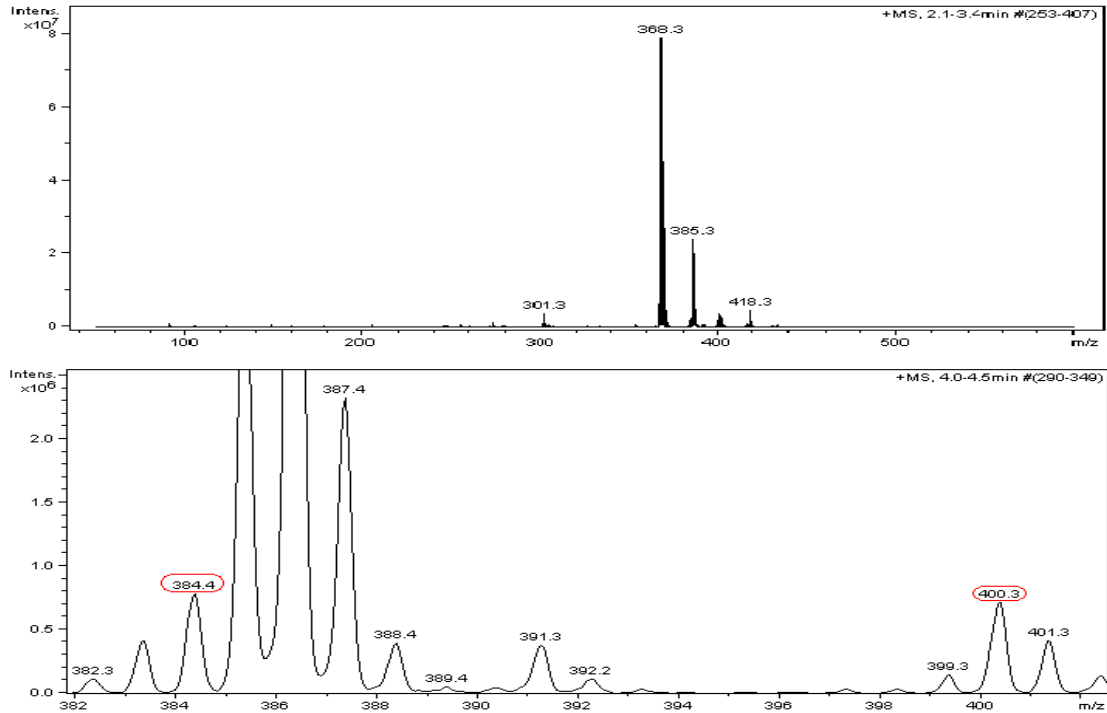
2.3 Näytteet

Aivoleikkeet valmistettiin Helsingin Yliopiston farmaseuttisen tiedekunnan farmakologian ja toksikologian osastolla. Wistar-kannan urosrotat (Harlan, Alankomaat) dekapitoitiin ja rottien aivot jäädettiin kuivajäällä (Susanne Bäck, sähköpostiviesti kirjoittajalle 13.9.2011). Tämän jälkeen aivot siirrettiin -80°C :seen. Jäätäneistä aivoista leikattiin kryostaatilla (Leica CM 3050, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Saksa) $40\ \mu\text{m}$ paksuisia leikkeitä. Leikkeet siirrettiin gelatinoiduille objektilaseille -20°C :seen. Leikkeet otettiin pois pakastimesta huoneenlämpöön juuri ennen analysointia. Vertailumittaukset aivoleikkeiden ja standardien välillä tehtiin aina saman päivän aikana lukuun ottamatta desmosterolia. Aivoleikkeiden tapaan myös kaikki standardit analysoitiin lasilevyille applikoituina. Standardit mitattiin siten, että pipetoitiin $1\ \mu\text{L}$ analyytin liuosta lasilevyille ja annettiin liuottimen haihtua. Käytetyt lasilevyt olivat esipuhdistettua mikroskooppilasia (Thermo Scientific, Braunschweig, Saksa).

3 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Aivoleikkeestä mitatuissa scan-spektreissä intensiivisin ioni oli tolueeni sumutusliuottimena m/z 368 (Kuva 4) ja asetoniliuottimena m/z 369. Kyseessä on todennäköisesti tolueenilla kolesterolista muodostunut $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^{+\bullet}$ ja asetonilla kolesterolista muodostunut $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ (Murphy ym. 2009; Pól ym. 2009; Grün ja Besseau 2016). Toiseksi intensiivisin ioni scan-spektrissä oli tolueenilla 386 ja asetonilla 387. Kyseessä on todennäköisesti tolueenilla kolesterolista muodostunut M^+ ja asetonilla $[\text{M}+\text{H}]^+$. Lisäksi aivoleikkeistä havaittiin tolueenilla ionit m/z 384 ja 400 (Kuva 4). Asetonilla puolestaan havaittiin ionit m/z 385 ja 401. Alustavissa tutkimuksissa korkean resoluution DAPPI-menetelmällä aivoleikkeistä havaittiin ionit

samalla massalla. Tarkalta massaltaan alustavissa tutkimuksissa havaitut ionit vastaavat tutkimukseen valittuja yhdisteitä: 25-OH-D₃-vitamiinia, D₃-vitamiinia, 7-dehydrokolesterolia, desmosterolia, 7-ketokolesterolia. Lisäksi haluttiin tutkia voivatko havaitut ionit johtua kolesterolista.



Kuva 4. Rotan aivoista DAPPI-MS:lla mitattu spektri (yllä) käytetyllä mittausalueella ja sama spektri tarkennettuna tutkitulle alueelle (alla). Sumutusliuottimena käytettiin toluenia.

Sumutusliuottimiksi valittiin tolueni ja asetoni, jotta tutkittavat yhdisteet ionisoituisivat eri tavalla. Erilaisen lähtöionin perusteella olisi mahdollista saada aikaan yhdisteen erilainen fragmentoituminen. Erilaisen fragmentoitumisen avulla pystyttiin entistä luotettavammin toteamaan havaitaanko tutkittava yhdiste aivoleikkeestä. Taulukossa 6 on esitetty tutkittujen yhdisteiden molekyylikaavat ja DAPPI-ionisaatioissa havaitut ionit.

Taulukko 6. Tutkittujen yhdisteiden DAPPI-ionisaatiossa muodostuneet intensiivisimmät ionit, kun sumutusliuottimena käytettiin tolueenia tai asetonia. Mittauksissa käytettiin 25-OH-D₃-vitamiinia ja 7-ketokolesterolia 10 pmol per näytepiste. 7-dehydrokolesterolia, desmosterolia ja kolesterolia käytettiin 100 pmol per näytepiste. D₃-vitamiinin määrä per näytepiste oli 50 pmol. Taulukossa n tarkoittaa sitä, miten monesta näytestä mittaukset tehtiin.

Yhdiste (molekyylikaava) (molekyyli massa)	Havaitut ionit (suhteellinen intensiteetti (%) ± keskihajonta (%))	
	tolueeni	asetoni
25-OH-D ₃ -vitamiini (C ₂₇ H ₄₄ O ₂) (400,64) n = 4	256 (100%) 263 (71% ± 41%), 289 (60% ± 22%), 400 (M ⁺) (53% ± 45%)	271 (100%), 289 (77% ± 4%), 307 (63% ± 2%), 383 ([M-H ₂ O+H] ⁺) (33% ± 19%) 401 ([M+H] ⁺) (12% ± 7%)
D ₃ -vitamiini (C ₂₇ H ₄₄ O) (384,64) n = 6	384 (M ⁺) (100%)	282 (100%) 256 (51% ± 16%) 385 ([M+H] ⁺) (19% ± 13%)
7-Dehydrokolesteroli (C ₂₇ H ₄₄ O) (384,64) n = 5	384 (M ⁺) (100%)	367 ([M-H ₂ O+H] ⁺) (100%)
Desmosteroli (C ₂₇ H ₄₄ O) (384,64) n = 6	271 (100%) 340 (85% ± 21%) 300 (77% ± 2%) 384 (M ⁺) (66% ± 2%) 299 (64% ± 3%) 270 (54% ± 2%) 416 (29% ± 4%) 358 (28% ± 7%) 357 (26% ± 7%)	Ei havaittu
7-ketokolesteroli (C ₂₇ H ₄₄ O ₂) (400,64) n = 8	401 ([M+H] ⁺) (100%) 415 (22% ± 2%)	Ei tutkittu
Kolesteroli (C ₂₇ H ₄₆ O) (386,65) n = 5	386 (M ⁺) (100%) 368 (M ⁺ -H ₂ O) (86% ± 13%) 385 (47% ± 6%) 301 (27% ± 1%) 400 (9% ± 1%)	369 ([M-H ₂ O+H] ⁺) (100%)

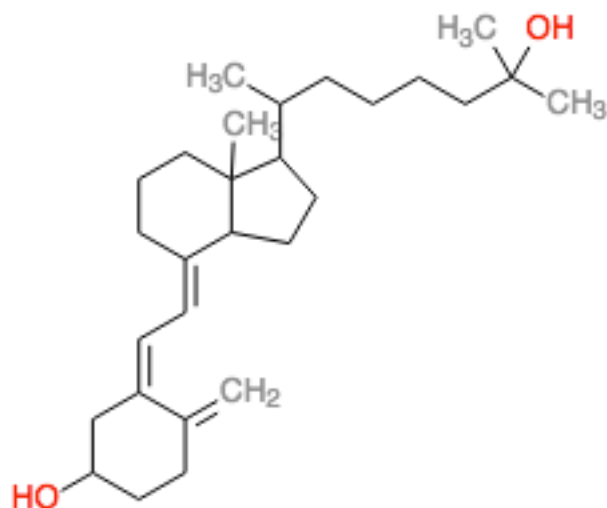
Taulukosta 6 huomataan, että käytettäessä tolueenia sumutusliuottimena, tapahtui kohdeyhdisteiden ionisaatio todennäköisemmin varauksenvaihdon kautta eli muodostui ioni M⁺. Asetonia käytettäessä taas todennäköisemmin muodostui protonoitu molekyyli [M+H]⁺. Tämä tulos on yhteneväinen DAPPI:n

ionisaatiomekanismin teorian kanssa (Kappale 1.4.2). Poikkeuksen edellä mainittuun muodosti 7-ketokolesteroli, josta muodostui tolueenilla $[M+H]^+$.

Taulukosta 6 nähdään, että aivoleikkeen scan-spektreissä tolueenilla havaittu ioni m/z 384 voi johtua D₃-vitamiinista, 7-dehydrokolesterolista tai desmosterolista. Ioni m/z 400 voi puolestaan johtua 25-OH-D₃-vitamiinista tai kolesterolista. Asetoni sumutusliuottimena on mahdollista, että aivoista havaittu ioni m/z 385 johtuu D₃-vitamiinista ja ioni m/z 401 25-OH-D₃-vitamiinista. Aivoleikkeitä ja standardeja tutkittiin kuitenkin vielä tarkemmin MSⁿ-mittausten avulla.

3.1. 25-OH-D₃-vitamiini

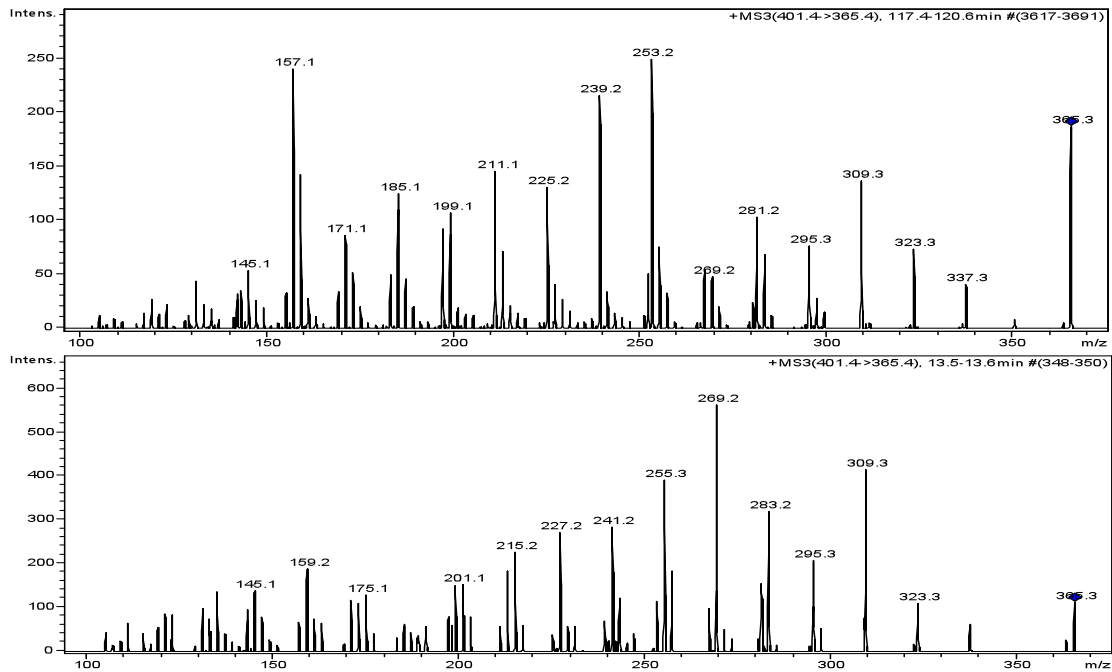
25-OH-D₃-vitamiinin standardin MS²-spektristä ($[M+H]^+ \rightarrow$) havaittiin intensiivisimpinä ionit m/z :lla 383 ja 365, kun käytettiin asetonia sumutusliuottimena. Spektrin intensiivisimpien tuoteionien m/z -ero lähtöioniin nähden oli 18 ja 36 yksikköä. 25-OH-D₃-vitamiinissa on kaksi hydroksyyliiryhmää (Kuva 5), jotka siis todennäköisesti lohkeavat vetenä muodostaen nämä intensiivisimmät fragmentti-ionit ($[M-H_2O+H]^+$ ja $[M-2H_2O+H]^+$). Samat fragmentit havaittiin myös aivoleikkeestä ionin m/z 401 MS²-spektrissä. Koska veden lohkeaminen yhdisteestä on hyvin tavallista, mitattiin näistä kahdesta ionista vielä MS³-spektrit.



Kuva 5. 25-OH-D₃-vitamiinin kemiallinen rakenne.

Ionista 383 mitatussa MS³-spektrissä (401→383→) selkeänä peruspiikkinä oli sekä aivoleikkeistä että 25-OH-D₃-vitamiinista mitatuissa spektreissä 365 ([383-H₂O]⁺). Muiden ionien intensiteetit olivat hyvin alhaiset ja tulokset sen vuoksi epäluotettavia.

Spesifimpien fragmenttien löytämiseksi aivoleikkeistä ja standardista mitattiin lisäksi MS³-spektrit siirtymällä 401→365→. Ne olivat yhteneväiset *m/z* 295 ja tätä suuremmilla *m/z*-suhteilla (Kuva 6). Molemmissa spektreissä ionit olivat pääasiassa 14 *m/z*-yksikön välein, joka viittaisi siihen, että rakenteesta lohkeaa aina CH₂-ryhmä.



Kuva 6. Aivoleikkeestä (yllä) ja 25-OH-D₃-vitamiinin standardista (10 pmol, alla) mitattu MS³-spektri siirtymästä 401 (0,30) →365 (0,60)→. Suluissa on käytetty fragmentaatioenergia. Sumutusliuottimena käytettiin asetonia.

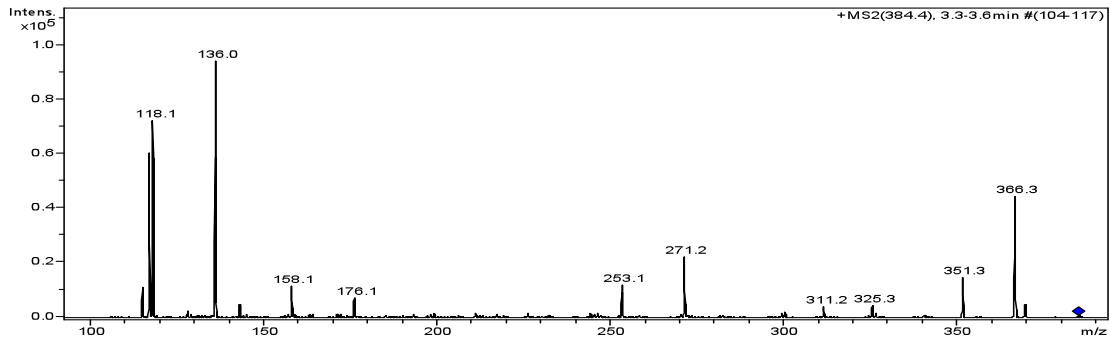
Taulukko 7. Taulukossa on vertailtu kuvan 6 spektreissä havaittavien ionien suhteellisia intensiteettejä. Vertailu on tehty siten, että 25-OH-D₃-vitamiinin standardin intensiivisin ioni m/z 269 on 100 % ja muita ioneja verrattiin siihen. Taulukkoon valittiin standardin 10 intensiivisintä ionia, joista vertailu tehtiin.

Ioni	Havaitun ionin suhteellinen intensiteetti (%)	
	standardi (n = 1)	aivoleike (n =1)
269	100 %	100 %
309	74 %	285 %
255	70 %	158 %
283	57 %	141 %
241	51 %	68 %
227	48 %	81 %
215	40 %	40 %
295	37 %	158 %
159	34 %	298 %
213	33 %	140 %

Pienemmillä m/z -suhteilla kuin 295, ionisuhteet eivät kuitenkaan olleet yhteneväiset (Taulukko 7). Esimerkiksi aivoleikkeestä näkyivät intensiivisinä ionit m/z 253, 239, 225 ja 211. Standardista mitatussa spektrissä näkyivät puolestaan ionit kaksi yksikköä suuremmilla m/z -suhteilla eli ionit m/z 255, 241, 227 ja 213. Tämä voisi mahdollisesti johtua siitä, että aivoleikkeessä oli 25-OH-D₃-vitamiinia muistuttava yhdiste, jonka rakenteessa on esimerkiksi kaksoissidos eri paikassa. Tulosten perusteella voidaan todeta, että aivoista ei havaittu DAPPI:lla 25-OH-D₃-vitamiinia.

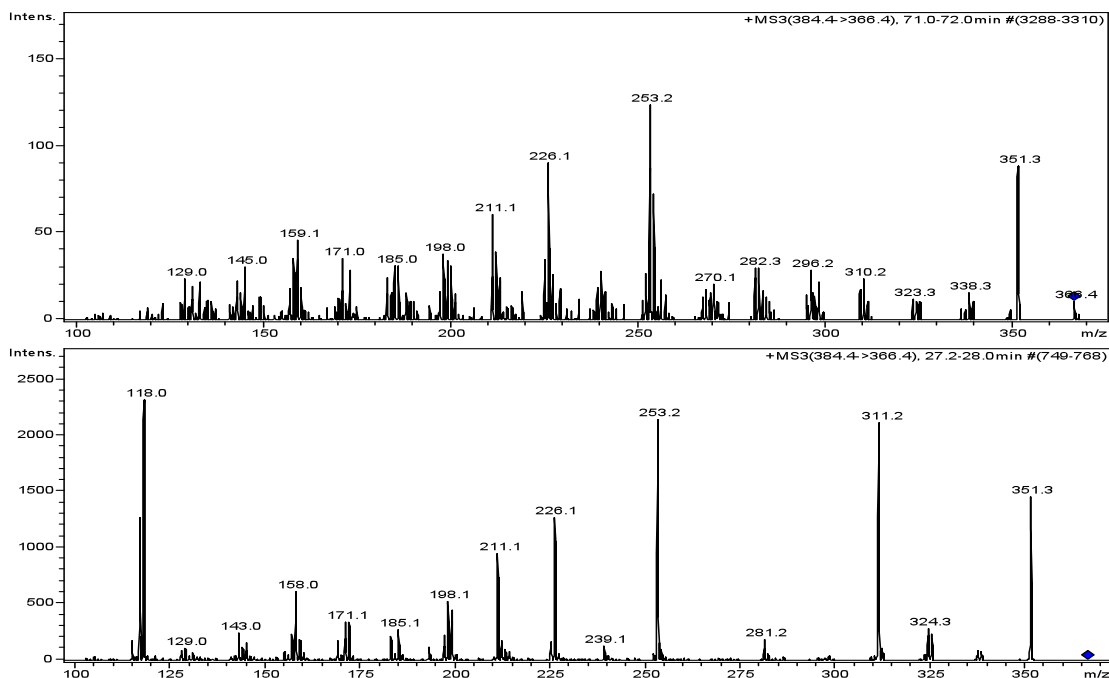
3.2 D₃-vitamiini

D₃-vitamiinin fragmentoitumista tutkittiin MS²- ja MS³-mittauksilla sekä tolueeni että asetonilla sumutusliuottimena. Aluksi tutkittiin tolueenilla ionin M⁺ (m/z 384) ja asetonilla ionin [M+H]⁺ (m/z 385) pilkkoutumista erilaisiksi fragmenteiksi. MS²-spektristä havaitaan tolueenilla ioni m/z 366 (Kuva 7) ja asetonilla ioni m/z 367. Lähtö- ja tuoteionien 18 m/z yksikön ero johtuu todennäköisesti neutraalin veden lohkeamisesta. Tällöin tolueenilla muodostuu ioni [M-H₂O]⁺ ja asetonilla [M-H₂O+H]⁺. Koska veden lohkeaminen yhdisteestä on hyvin tavallista, mitattiin näistä ioneista vielä MS³-spektrit.



Kuva 7. D₃-vitamiinin standardista (määrä 100 pmol) mitattu MS²-spektri (siirtymä 384→). Sumutusliuottimena käytettiin tolueenia. Fragmentaatioenergia oli 0,32 V.

Aivoista havaittiin vastaavien ionien spektreissä samat tuoteionit MS²-mittauksissa. Näistä ioneista mitattiin MS³-spektri tolueenilla (384→366→) (Kuva 8) ja asetonilla (385→367→). Aivoista ja standardista havaittuja spektrejä verrattiin toisiinsa. Asetoni sumutusliuottimena tehdyissä vertailumittauksissa ei saatu toistettavia MS³-spektrejä standardista (määrä 50 pmol), sillä ionien intensiteetit olivat vain noin 100 yksikön luokkaa.



Kuva 8. Aivoleikkeestä (yllä) ja D₃-vitamiinin standardista (100 pmol, alla) mitattu MS³-spektri siirtymästä 384 (0,32) → 366 (0,70)→. Suluissa on mainittu käytetty fragmentaatioenergia. Sumutusliuottimena käytettiin tolueenia.

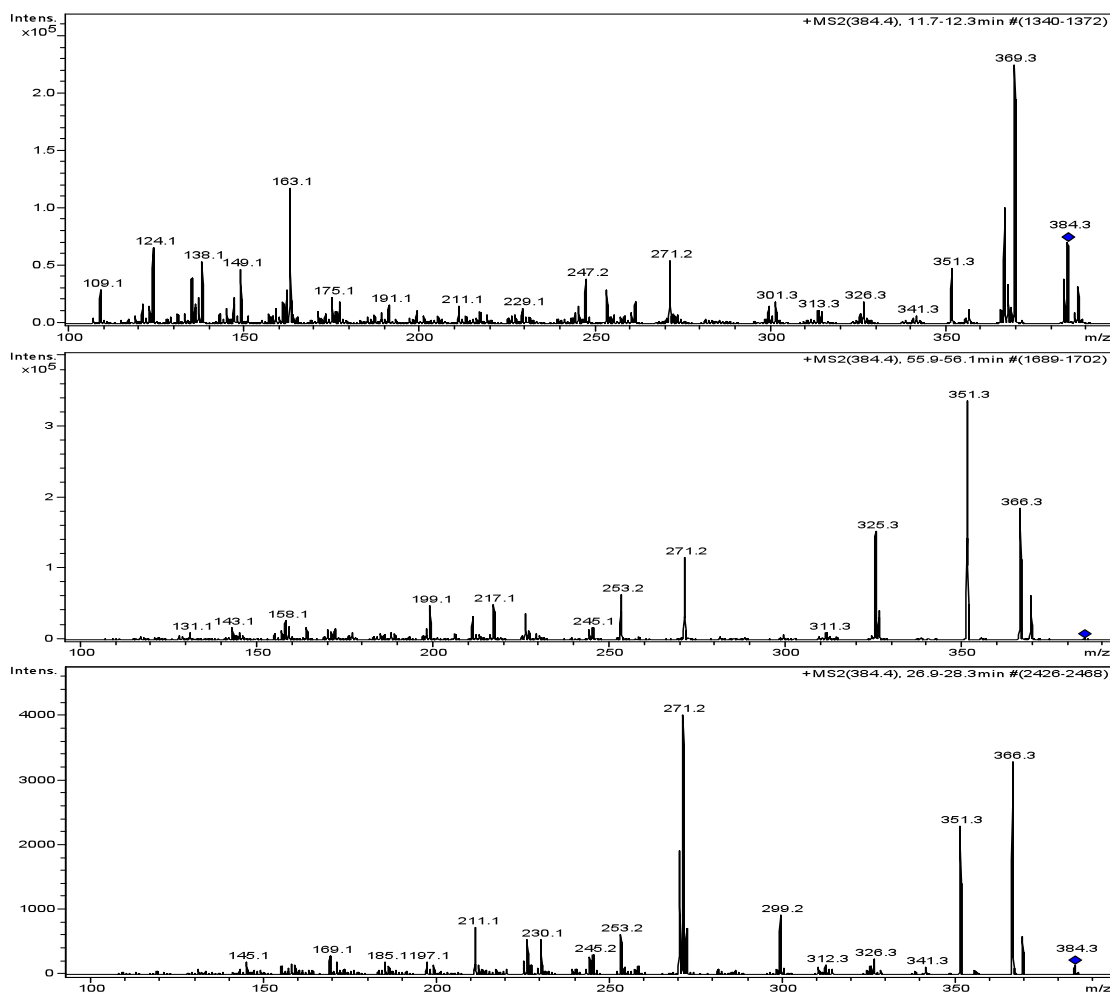
Selkeimpänä erona huomattiin, että standardin intensiivisintä ionia m/z 118 ei havaita aivoleikkeistä ollenkaan. Tämän vuoksi aivoleikkeen spektreistä ionien intensiteettejä verrattiin ioniin m/z 253, joka oli aivoleikkeen spektrin intensiivisin ioni ja D₃-vitamiinin standardin spektrin 2. intensiivinen ioni (79 % ± 24 %, n = 4). Lisäksi ionin m/z 311 suhteellinen intensiteetti standardista mitattaessa oli 78 % (± 39 %, n = 4). Aivoista mitattaessa saman m/z -suhteen ionin suhteellinen intensiteetti oli vain 15 % (± 14 %, n = 4). Nämä erot spektreissä ovat hyvin niin huomattavia, että niiden perusteella voidaan todeta, että rotan aivoleikkeistä ei havaittu D₃-vitamiinia.

Halusimme kuitenkin myös selvittää, mikä on pienin D₃-vitamiinin määrä, joka voitaisiin aivoleikkeestä havaita. Tätä tutkittiin koejärjestelyllä, jossa lisättiin D₃-vitamiinia suoraan aivoleikkeisiin. Aivoleikkeisiin lisätyt absoluuttiset D₃-vitamiinin määrät olivat 10 fmol, 100 fmol ja 1 pmol (1 µL liuosta per kohta). Yhdelle aivoleikkeelle pipetoitiin pelkkää liuotinta, jotta nähtäisiin pelkän liuottimen vaikutus aivoleikkeeseen.

Applikoinnin jälkeen leikkeiden annettiin olla jääkaapissa (2-8°C) noin 2 tuntia ennen analysointia. Aivoleikkeistä mitatuissa spektreissä (scan, MS² ja MS³) ei havaittu merkittäviä eroja oli niihin lisätty sitten pelkkää liuotinta tai 1 pmol D₃-vitamiinia. Tästä voidaan päätellä, että aivoleikkeissä olevan D₃-vitamiinin määrä on niin pieni, että DAPPI-MS:n herkkyys ei riitä havaitsemaan sitä. Toisaalta voi olla myös niin, että jotakin samalla massalla esiintyvää yhdistettä on aivoleikkeissä niin suuri määrä D₃-vitamiiniin verrattuna, että D₃-vitamiinia ei ole mahdollista havaita DAPPI:lla.

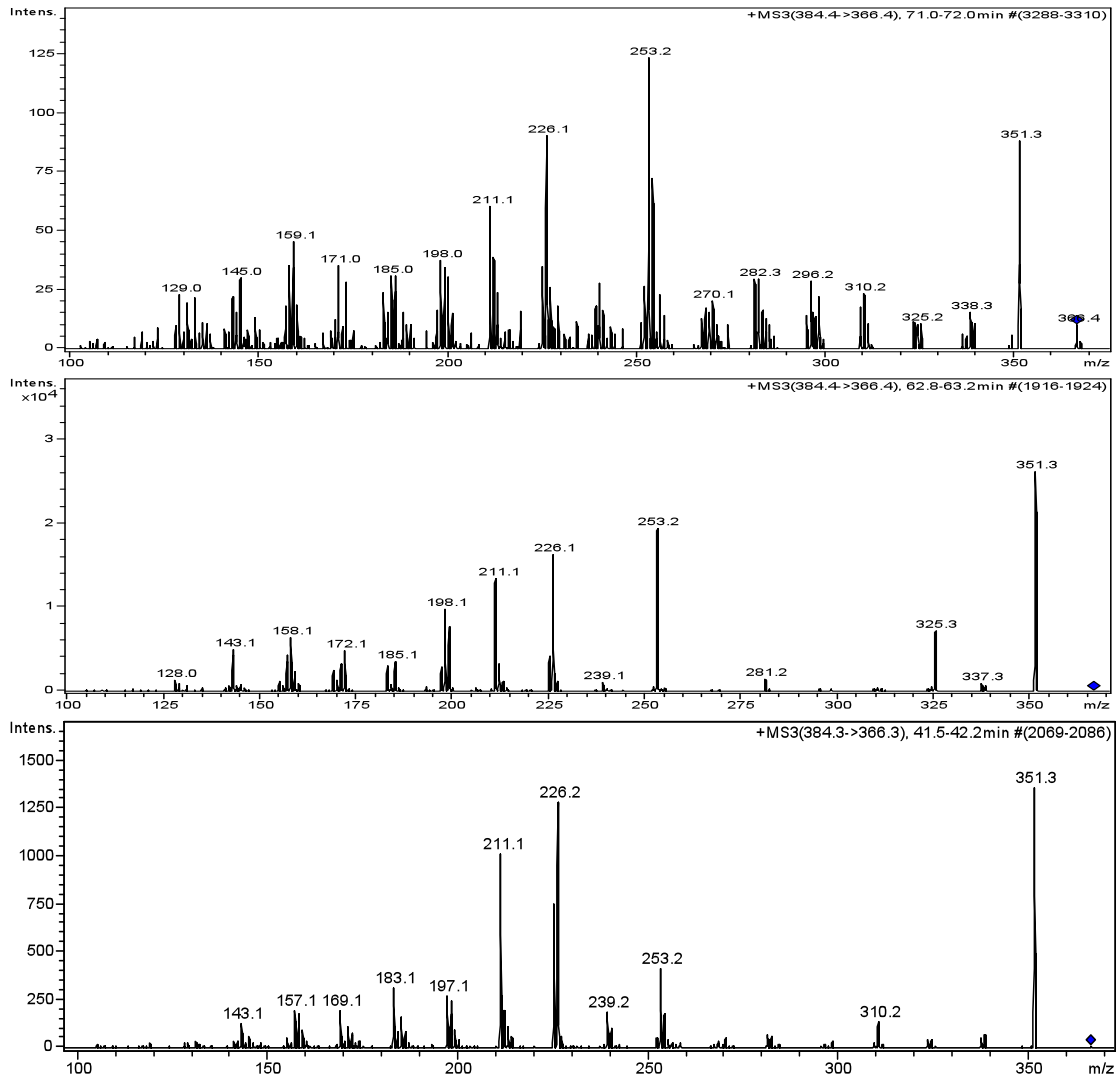
3.3 7-Dehydrokolesteroli

7-dehydrokolesterolin standardista ja aivoleikkeestä havaitusta ionista m/z 384 mitattuja MS²-spektrejä verrattiin toisiinsa (Kuva 9).



Kuva 9. Aivoleikkeestä (yllä), 7-dehydrokolesterolin standardista (100 pmol, keskellä) ja desmosterolin standardista (100 pmol, alla) mitattu MS²-spektri siirtymästä 384 (0,32)→. Suluissa on käytetty fragmentaatioenergia. Sumutusliuottimena käytettiin toluenia.

7-dehydrokolesterolin standardista havaitut ionit havaittiin myös aivoleikkeistä. Standardista mitatussa spektrissä intensiivisin ioni oli m/z 351. Aivoleikkeen spektrissä intensiivisin ioni oli m/z 369, jonka suhteellinen intensiteetti on 554 % (\pm 105 %, $n = 4$), kun verrataan ioniin m/z 351. Tämän lisäksi selkeimmät erot suhteellisissa intensiteeteissä havaitaan ioneilla m/z 366 ja 271. Ionin m/z 366 suhteellinen intensiteetti standardista oli vain 57 % (\pm 2 %, $n = 4$), kun vastaava luku aivoista oli 243 % (\pm 28 %). Puolestaan ionin m/z 271 suhteellinen intensiteetti aivoleikkeistä (125 % \pm 9 %) oli huomattavasti suurempi kuin standardin spektrissä (35 % \pm 2 %). Tarkemman informaation saamiseksi sekä aivoista ja 7-dehydrokolesterolin standardista mitattiin vielä myös MS³-spektrit siirtymillä 384→366→ (Kuva 10).



Kuva 10. Aivoleikkeestä (yllä), 7-dehydrokolesterolin standardista (100 pmol, keskellä) ja desmosterolin standardista (100 pmol, alla) mitattu MS³-spektri siirtymästä 384 (0,32) → 366 (0,70) →. Suluissa käytetty fragmentaatioenergia. Sumutusliuottimena käytettiin toluenia.

MS³-mittauksista saatiin samansuuntaiset tulokset kuin MS²-mittauksista eli standardin spektrissä (n = 4) havaittavat ionit havaittiin myös aivoista (n = 4), mutta ionien suhteelliset intensiteetit eivät olleet yhteneväiset. Standardin spektrissä intensiivisin ioni oli *m/z* 351. Aivoleikkeen spektrissä intensiivisimpänä ionina oli *m/z* 253 ja sen suhteellinen intensiteetti oli 143% (± 33%), kun verrataan ionin *m/z* 351 intensiteettiin. Lisäksi huomattavat eroavaisuudet spektreissä havaittiin ioneilla *m/z* 325 ja 226. Niiden suhteelliset intensiteetit standardista olivat 47 % (± 13 %) ja 61 % (± 2 %). Aivoleikkeistä vastaavat luvut olivat 11 (± 11 %) ja 89 % (± 20 %).

Aivoleikkeistä mitatuissa MS³-spektreissä (siirtymä 384→366→) intensiteetit olivat kuitenkin hyvin pieniä eivätkä spektrit olleet toistettavia. Intensiivisimmän ionin *m/z* 253 intensiteetti oli keskimäärin reilun 100 yksikön luokkaa. Aivoleikkeistä että 7-dehydrokolesterolista mitattiin MS³-spektrit myös siirtymästä 384→ 351→. Aivoista mitattujen spektrien intensiteetit olivat kuitenkin vielä pienempiä kuin siirtymällä 384→366→, eivätkä spektrit olleet toistettavia. Näiden tietojen perusteella voidaan todeta, että DAPPI:lla ei havaittu 7-dehydrokolesterolia rotan aivoleikkeistä.

3.4 Desmosteroli

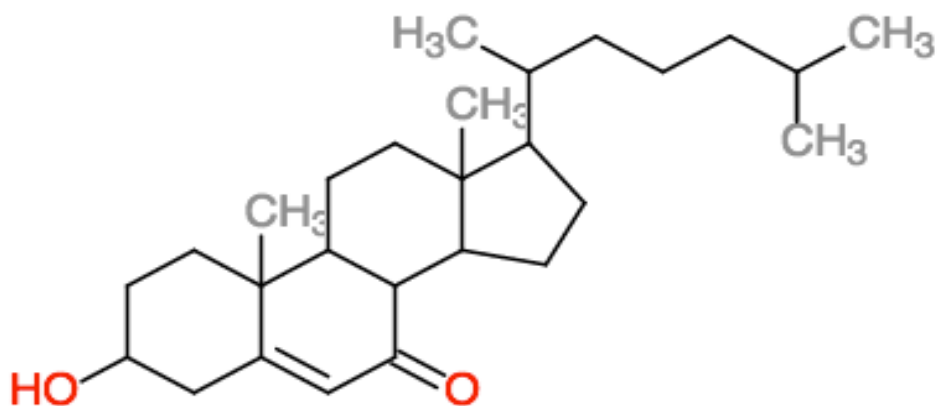
Desmosterolistandardia (100 pmol) ei havaittu DAPPI:lla, kun sumutusliuottimena käytettiin asetonia. Tolueeni sumutusliuottimena desmosterolista havaittiin ioni *m/z* 384 M⁺. Tämän perusteella oli mahdollista, että desmosteroli voitaisiin havaita aivoleikkeistä DAPPI:lla tolueeni sumutusliuottimena. Desmosterolin standardista tehtiin MS²-mittauksia, joita verrattiin aivoleikkeistä tehtyihin MS²-mittauksiin (Kuva 9).

Desmosterolin hajottamiseen tarvittiin vähemmän energiaa, kuin aivoista vastaava ioni tarvitsi (siirtymä 384→). Samaa energiaa käytettäessä intensiivisin ioni desmosterolin spektrissä oli *m/z* 271 (n=1). Aivoleikkeessä puolestaan intensiivisin ioni oli *m/z* 369 ja sen suhteellinen intensiteetti oli 442 % (± 55 %, n = 4) verrattaessa ioniin *m/z* 271. Myös esimerkiksi ionin 366 suhteelliset intensiteetit olivat täysin eri luokkaa: desmosterolin standardista ionin *m/z* 366 suhteellinen intensiteetti oli 82 % ja aivoista 195 % (± 16 %).

Lisäksi vertailtiin aivojen ja desmosterolin MS³-spektrejä siirtymällä 384 →366 → (Kuva 10). Desmosterolin standardin spektrissä intensiivisin ioni oli *m/z* 351 (n = 2). Aivoleikkeiden spektrin intensiivisin ioni oli *m/z* 253 ja sen suhteellinen intensiteetti oli 143 % (± 33 %, n = 4) verrattaessa ioniin *m/z* 351. Standardin spektrissä ionin *m/z* 253 suhteellinen intensiteetti oli pieni, vain noin 31 %. Näiden tietojen perusteella voidaan todeta, että desmosterolia ei havaittu rotan aivoleikkeistä DAPPI:lla.

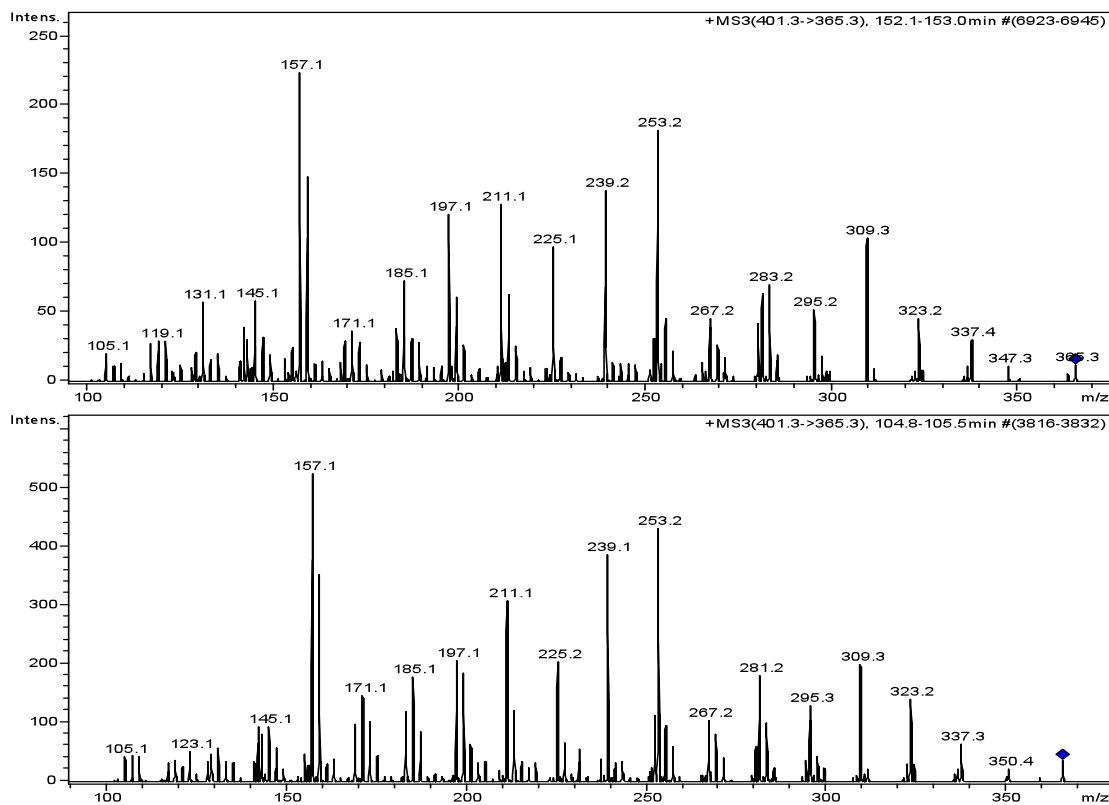
3.5 7-ketokolesteroli

7-ketokolesterolistandardista mitattuja spektrejä verrattiin aivoleikkeistä mitattuihin spektreihin käyttäen asetonia sumutusliuottimena. MS²-spektreissä (siirtymä 401→) aivoista ja 7-ketokolesterolin standardista havaittiin selkeästi intensiivisimpinä fragmentteina ionit m/z 383 ja 365. Spektrin intensiivisimpien tuoteionien m/z -ero on 18 ja 36. 7-ketokolesterolissa on kaksi hydroksyyliiryhmää (Kuva 11), jotka todennäköisesti lohkeavat vetenä muodostaen nämä intensiivisimmät fragmentti-ionit ($[M-H_2O+H]^+$ ja $[M-2H_2O+H]^+$). Koska veden lohkeaminen yhdisteestä on hyvin tavallista, mitattiin näistä kahdesta ionista vielä MS³-spektrit.



Kuva 11. 7-ketokolesterolin kemiallinen rakenne.

Fragmentin m/z 383 tuoteionispektri ei myöskään tuonut juurikaan lisäinformaatiota, koska sekä aivoista että standardista mitatussa spektrissä selkeästi suurimpana piikkinä havaittiin ioni m/z 365 ja seuraavaksi intensiivisimmän ionin suhteellinen intensiteetti oli vain noin 20 %. Spektrit olivat kuitenkin yhteneväiset. Fragmentista 365 mitatut MS³-spektrit taas toivat monipuolisempaa tietoa tutkittavan yhdisteen fragmentoitumisesta (kuva 12).



Kuva 12. Aivoleikkeestä (yllä) ja 7-ketokolesterolin standardista (100 pmol, alla) mitattu MS³-spektri siirtymästä 401 (0,32) →365 (0,68)→. Suluissa on mainittu käytetty fragmentaatioenergia. Sumutusliuottimena käytettiin asetonia.

Taulukko 8. Taulukossa on vertailtu kuvassa 12 esitettyjen spektrien ionien suhteellisia intensiteettejä.

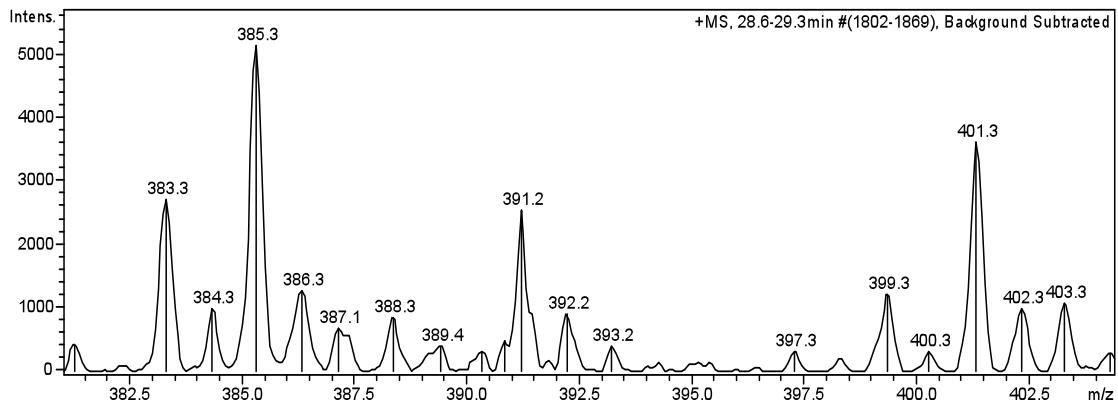
Ioni	Havaitun ionin suhteellinen intensiteetti (%)	
	Standardi (n = 4)	Aivoleike (n = 4)
157	100 %	100 %
253	75 % ± 9 %	89 % ± 9 %
159	55 % ± 5 %	61 % ± 4 %
239	57 % ± 12 %	64 % ± 4 %
211	46 % ± 7 %	68 % ± 12 %
197	43 % ± 9 %	39 % ± 16 %
225	39 % ± 2 %	47 % ± 9 %
309	37 % ± 4 %	48 % ± 14 %
199	37 % ± 5 %	40 % ± 14 %
185	35 % ± 4 %	32 % ± 2 %
281	29 % ± 2 %	35 % ± 5 %
213	26 % ± 4 %	25 % ± 3 %
171	23 % ± 2 %	25 % ± 8 %
183	23 % ± 2 %	22 % ± 3 %
323	22 % ± 3 %	21 % ± 2 %
267	22 % ± 6 %	28 % ± 6 %
252	21 % ± 1 %	16 % ± 3 %
283	21 % ± 5 %	31 % ± 2 %
142	19 % ± 3 %	18 % ± 3 %
145	18 % ± 3 %	20 % ± 7 %
131	10 % ± 2 %	14 % ± 8 %
105	8 % ± 2 %	11 % ± 2 %

Taulukkoon 8 kootuista MS³-spektrien suhteellisista intensiteeteistä havaitaan, että standardin ja aivoleikkeen spektrit ovat hyvin yhteneväiset. Keskimäärin kaikki suhteelliset intensiteetit olivat alle 30 % prosentin sisällä toisistaan standardissa ja aivoleikkeessä, mitä pidetään luotettavana tunnistuksena MSⁿ-mittauksissa esimerkiksi torjuntaineanalytiikan alalla (SANCO/12571/2013). Voidaan siis todeta, että DAPPI:lla havaitaan 7-ketokolesteroli rotan aivoleikkeestä.

3.6 Kolesteroli

Kolesterolista havaittiin asetonin sumutusliuottimena intensiivisimpänä ionina m/z 369 eli $[M-H_2O+H]^+$ (Taulukko 6). Kolesterolista havaittiin asetonilla myös ionit m/z 385 ja 401 (Kuva 13). Ionin 385 suhteellinen intensiteetti kolesterolin spektrissä oli kuitenkin

pieni, vain noin 2 % ($\pm 0,5$ %, $n = 5$) ja ionin 401 suhteellinen intensiteetti vain noin 1 ($\pm 0,5$ %, $n = 5$). Koska aivoistakin havaittiin asetonilla ionit m/z 385 ja 401, haluttiin MS^3 -mittauksilla tutkia voisivatko aivoista havaitut ionit m/z 385 ja 401 johtua kolesterolista.



Kuva 13. Kuvassa on kolesterolista (määrä 500 pmol) asetonilla mitattu spektri. Siitä voidaan havaita ionit m/z 385 ja 401.

Käyttämälläme kolesterolin määrällä (500 pmol per näytepiste) ei kuitenkaan saatu riittävää intensiteettiä MS^3 -spektreihin (401 \rightarrow 365 \rightarrow). Intensiteetit olivat vain alle sadan yksikön luokkaa, minkä vuoksi saadut spektrit eivät olleet toistettavia. Tämän vuoksi spektreistä voitu tehdä mitään johtopäätöksiä.

4 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Aivot ovat monimutkainen biologinen matriisi, jossa voi esiintyä useita yhdisteitä samalla m/z -suhteella. DAPPI:lla näitä yhdisteitä ei ole mahdollista erotella toisistaan. Tämän vuoksi tässä tutkimuksessa mielenkiinnon kohteina olleiden tiettyjen aivoleikkeistä havaittujen ionien alkuperän selvittäminen vaati MS^n -mittauksia. Niiden avulla pystyttiin mahdollisimman luotettavasti toteamaan havaitaanko tutkittava yhdiste aivoleikkeistä. Aivoissa samalla m/z -suhteella esiintyvät yhdisteet voivat kuitenkin johtaa ionisuhteiden muutoksiin aivoista mitatuissa spektreissä verrattaessa standardista

mitattuihin spektreihin. Jos aivoleikkeestä ja standardista havaitaan samat ionit, mutta ionien suhteelliset intensiteetit eivät ole yhteneväiset, voi se johtua aivoleikkeessä olevasta yhdestä tai useammasta samalla m/z -suhteella esiintyvistä yhdisteistä. Tässä tutkimuksessa 25-OH-D₃-vitamiinin, 7-dehydrokolesterolin ja desmosterolin kohdalla samat ionit havaittiin sekä standardista että aivoleikkeistä. Ionien suhteelliset intensiteetit eivät kuitenkaan olleet yhteneväiset. Tämän vuoksi ei voida luotettavasti todeta, että tutkittava yhdiste havaittaisiin aivoleikkeestä. On kuitenkin mahdollista, että aivoista havaitut spektrit ovat yhdistelmä tutkittavasta yhdisteestä ja jostakin toisesta yhdisteestä.

Tutkittavista yhdisteistä 25-OH-D₃-vitamiinia (Ahonen ym. 2014), desmosterolia (Wang ja Griffiths 2008; Ahonen ym. 2014) ja 7-dehydrokolesterolia (Tint ym. 1995) on aiemmin pystytty havaitsemaan aivokudoksesta muilla menetelmillä. Aiemmissä tutkimuksissa desmosterolia on havaittu hiiren aivokudoksesta 7,95-12,3 ng/g pitoisuuksina (Ahonen ym. 2014). Hiiren vasta kehitymässä olevissa aivoissa desmosterolin pitoisuus on huomattavasti suurempi, jopa 10-40 µg/g (Wang ja Griffiths 2008). Jatkossa voitaisiin tutkia, havaitaanko desmosterolia kehittyvistä aivoista. 25-OH-D₃-vitamiinia on aiemmin havaittu aivokudoksesta vain yhdessä tutkimuksessa (Ahonen ym. 2014). Sen pitoisuus hiiren aivokudoksessa oli noin 4 ng/g. Tämä viittaa siihen, että 25-OH-D₃-vitamiinin pitoisuus aivokudoksessa on niin alhainen, että sitä ei ole DAPPI:lla mahdollista havaita.

Myöskään D₃-vitamiinia ei havaittu DAPPI:lla rotan aivoleikkeistä. D₃-vitamiinin kohdalla erot standardin ja aivoleikkeiden spektrien välillä olivat niin selkeät, että todennäköisesti D₃-vitamiini ei ole edes osana aivoista mitatussa spektrissä. Sitä ei tietääksemme ole aiemmin pystytty havaitsemaan aivokudoksesta muillakaan menetelmillä. Halusimme kuitenkin tutkia D₃-vitamiinin standardilisäyksen avulla, mikä olisi pienin määrä, jonka voisimme DAPPI:lla aivokudoksesta havaita. Suurin standardilisäys, jonka teimme oli 1 pmol ja sitä ei havaittu aivoleikkeestä. Aiemmin D₃-vitamiinin analysointiin aivokudoksesta kehitetyn menetelmän havaintoalaraja on 1,0 ng/ml (Ahonen ym. 2014). Tämä viittaa siihen, että D₃-vitamiinin määrä aivokudoksessa on niin pieni, että DAPPI:n herkkyys ei riitä sen havaitsemiseen.

aivokudoksesta. Jo aiemmin on osoitettu, että biologinen matriisi voi heikentää DAPPI:n herkkyyttä ja nostaa havaintoalarajoja jopa 20-160-kertaisiksi, jos verrataan puhtaasta liuoksesta määritettyihin havaintoalarajoihin (Suni ym. 2011). Muiden tutkittavien yhdisteiden kohdalla standardilisäystä aivoleikkeisiin ei kokeiltu.

Valituista yhdisteistä kolesterolia on aiemminkin tutkittu DAPPI:lla aivokudoksesta (Pól ym. 2009). Tutkimuksessamme havaitsimme DAPPI:lla asetoni sumutusliuottimena ionit m/z 369 ja tolueenilla vastaavasti ioni m/z 368. Vaikka emme tutkineet edellä mainittujen ionien MS^n -spektrejä, niin kirjallisuuden perusteella kyseessä on todennäköisesti tolueenilla kolesterolista muodostunut $[M-H_2O]^+$ ja asetonilla kolesterolista muodostunut $[M-H_2O+H]^+$ (Murphy ym. 2009; Pól ym. 2009; Grün ja Besseau 2016). MS^n -mittausten perusteella ei voitu tämän tutkimuksen perusteella sanoa, johtuvatko aivoista asetonilla nähtävät ionit m/z 385 ja 401 kolesterolista. Samat ionit havaittiin kolesterolistandardin scan- ja MS^2 -spektreissä. MS^3 -mittausten avulla saavutettaisiin kuitenkin parempi spesifisyys, mutta käytetyillä pitoisuuksilla ei saatu toistettavia MS^3 -spektrejä.

Käytettyjen tunnistuskriteerien perusteella voidaan todeta, että asetoni sumutusliuottimena rotan aivoleikkeistä havaitaan 7-ketokolesterolia. DAPPI:lla 7-ketokolesterolia ei ole tietääksemme aiemmin havaittu aivokudoksesta. Sitä on kuitenkin pystytty havaitsemaan aivokudoksesta muilla menetelmillä (Miayjima ym. 2011; Cheng ym. 2011; Ahonen ym. 2014).

Oksisteroleja, kuten 7-ketokolesterolia, tutkittaessa ongelmana kuitenkin on, että niitä voi muodostua kolesterolin auto-oksidaation seurauksena tutkittavien näytteiden käsittelyn ja varastoinnin aikana (Griffiths ym. 2013). Endogeenisesti elimistössä muodostuneiden oksisterolien rakenne voi olla täysin samanlainen kuin ilman vaikutuksesta muodostuneiden. Esimerkiksi Diestel ja muut (2003) havaitsivat MS -tautia sairastavien potilaiden selkäydinnesteessä 7-ketokolesterolia jopa noin 7 mg/ml pitoisuuksina. Myöhemmin Leonin ja muiden (2005) tekemässä tutkimuksessa määritetyt 7-ketokolesterolin pitoisuudet olivat jopa 1000 kertaa pienempiä kuin aiemmin Diestelin ja muiden (2003) raportoimat pitoisuudet. Kolesterolin auto-

oksidaatiota voitaisiin vähentää esimerkiksi poistamalla kolesteroli näytteestä mahdollisimman nopeasti ja välttämällä korkeita lämpötiloja (Griffiths ym. 2013). DAPPI:a käytettäessä kumpikaan näistä ei ole mahdollista, sillä desorptio perustuu lämpöön ja tarkoituksena on tutkia aivoleikkeitä suoraan ilman esikäsittelyvaiheita. Tämän takia voidaan epäillä, että DAPPI:lla havaittu 7-ketokolesteroli voi johtua näytteessä olevasta kolesterolista.

Yhteenvedona voidaan sanoa, että tutkituista yhdisteistä 7-ketokolesteroli on ainoa, joka DAPPI:lla havaitaan rotan aivoleikkeistä. Havaitusta 7-ketokolesterolista on tämän tutkimuksen perusteella mahdotonta sanoa, onko se endogeenisesti muodostunut vai muodostuuko se näytteiden säilytyksen ja analyysin aikana.

KIRJALLISUUSLUETTELO

Acimovic J, Rozman D: Steroidal Triterpenes of Cholesterol Synthesis. *Molecules* 18: 4002-4017, 2013

Ahonen L, Maire FBR, Savolainen M, Kopra J, Vreeken RJ, Hankemeier T, Myöhänen T, Kylli P, Kostianen R: Analysis of oxysterols and vitamin D metabolites in mouse brain and cell line samples by ultra-high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry. *J Chromatogr* 1364: 214-222, 2014

Alberici RM, Simas RC, Sanvido GB, Romão W, Lalli PM, Benassi M, Cunha IBS, Eberlin MN: Ambient mass spectrometry: bringing MS into the "real world". *Anal Bionanal Chem* 398: 265-294, 2010

Andersson HC, Kratz L, Kelley R: Desmosterolosis Presenting With Multiple Congenital anomalies and profound developmental delay. *Am J Med Genet* 113: 315-319, 2002

Annweiler C, Llewellyn DJ, Beauchet O: Low serum vitamin D concentrations in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *J Alzheimer's Dis* 33: 659-674, 2013

Berthier A, Lemaire-Ewing S, Prunet C, Monier S, Athias A, Besse de G, Pais de Barros J-P, Laubriet A, Gambert P, Lizard G, Ne'el D: Involvement of a calcium-dependent dephosphorylation of BAD associated with the localization of Trpc-1 within lipid rafts in 7-ketocholesterol-induced THP-1 cell apoptosis. *Cell Death Differ* 11: 897-905, 2004

Brown AJ, Jessup W: Oxysterols and Atherosclerosis. *Atherosclerosis* 142: 1-28, 1999

Cheng D, Jenner AM, Shui G, Cheong WF, Mitchell TW, Nealon JR, Kim WS, McCann H, Wenk MR, Halliday GM, Garner B: Lipid Pathway Alterations in Parkinson's Disease Primary Visual Cortex. *PLOS One* 6: 1-17, 2011

Clayton P, Mills K, Keeling J, FitzPatrick D: Desmosterolosis: a new inborn error of cholesterol biosynthesis. *Lancet* 348: 404, 1996

Cody RB, Laramée JA, Durst HD: New Ion Source for the Analysis of Materials in Open Air under Ambient Conditions. *Anal Chem* 77: 2297-2302, 2005

Costa AB, Cooks RG: Simulations of atmospheric transport and droplet-thin film collision in desorption electrospray ionization. *Chem Commun* 38: 3915-3917, 2007

Costa AB, Cooks RG: Simulated splashes: Elucidating the mechanism of desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Chem Phys Lett* 464: 1-8, 2008

Covey TR, Lee ED, Bruins AP, Henlon JD: Liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 58: 1451A-1461A, 1986

Cui X, Gooch H, Groves NJ, Sah P, Burne TH, Eyles DW, McGrath JJ: Vitamin D and the brain: Key questions for future research. *J Steroid Biochem* 148: 305-309, 2015

Diestel A, Aktas O, Hackel D, Häke I, Meier S, Raine CS, Nitsch R, Zipp F, Ullrich O: Activation of Microglial Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 by Cholesterol Breakdown Products during Neuroinflammation: a Link between Demyelination and Neuronal Damage. *J Exp Med* 198: 1729-1740, 2003

Dietschy JM, Turley SD: Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res* 45: 1375–1397, 2004

Dill AL, Ifa DR, Manicke NE, Costa AB, Ramos-Vara JA, Knapp DW, Cooks RG: Lipid Profiles of Canine Invasive Transitional Cell Carcinoma of the Urinary Bladder and Adjacent Normal Tissue by Desorption Electrospray Ionization Imaging Mass Spectrometry. *Anal Chem* 81: 8758-8764, 2009

Drexler DM, Garreth TJ, Cantone JL, Diters RW, Mitroka JG, Prieto Conaway MC, Adams SP, Yost RA, Sanders M: Utility of imaging mass spectrometry (IMS) by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) on an ion trap mass spectrometer in the analysis of drugs and metabolites in biological tissues. *J Pharmacol Toxicol* 55: 279-288, 2007

Eberlin LS, Ifa DR, Wu C, Cooks RG: Three-Dimensional Visualization of Mouse Brain by Lipid Analysis Using Ambient Ionization Mass Spectrometry. *Angew Chem Int Edit* 49: 873-876, 2010

Eberlin LS, Norton I, Dill AL, Golby AJ, Ligon KL, Santagata S, Cooks RG, Agar YR: Classifying Human Brain Tumors by Lipid Imaging with Mass Spectrometry. *Cancer Res* 72: 645-654, 2012

Eyles DW, Liu PY, Josh P, Cui X: Intracellular distribution of the vitamin D receptor in the brain: Comparison with classic target tissues and redistribution with development. *Neuroscience* 268: 1-9, 2014

Faust PL, Kovacs WJ: Cholesterol biosynthesis and ER stress in peroxisome deficiency. *Biochimie* 98: 75-85, 2014

Fitzky BU, Witsch-Baumgartner M, Erdel M, Lee JN, Paik Y-K, Glossmann H, Utermann G, Moebius FF: Mutations in the 7-sterol reductase gene in patients with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8181-8186, 1998

FitzPatrick DR, Keeling JW, Evans MJ, Kan AE, Bell EJ, Porteous MEM, Mills K, Winter RM, Clayton PT: Clinical Phenotype of Desmosterolosis. *Am J Med Genet* 75: 145-152, 1998

- Griffiths WJ, Crick PJ, Wang Y: Methods for oxysterol analysis: Past, present and future. *Biochem Pharmacol* 86: 3-14, 2013
- Groves NJ, McGrath JJ, Burne THJ: Vitamin D as Neurosteroid Affecting the Developing and Adult Brain. *Annu Rev Nutr* 34: 117-141, 2014
- Grün CH, Besseau S: Normal-phase liquid chromatography-atmospheric-pressure photoionization-mass spectrometry analysis of cholesterol and phytosterol oxidation products. *J Chrom A* 1439: 74-81, 2016
- Haapala M, Pól J, Saarela V, Arvola V, Kotiaho T, Ketola RA, Franssila S, Kauppila T, Kostiaainen R: Desorption Atmospheric Pressure Photoionization. *Anal Chem* 79: 7867-7872, 2007
- Han JH, Kim YJ, Han ES, Lee CS: Prevention of 7-ketocholesterol-induced mitochondrial damage and cell death by calmodulin inhibition. *Brain Res* 1137: 11-19, 2007
- Higashi T, Shimada K, Toyo'oka T: Advances in determination of vitamin D related compounds in biological samples using liquid chromatography-mass spectrometry: A review. *J Chrom B* 878: 1654-1661, 2010
- Holick MF: Vitamin D Deficiency. *N Engl J Med* 357: 266-281, 2007
- Hoogendijk WJG, Lips P, Dik MG, Deeg DJH, Beekman ATF, Penninx BWJH: Depression Is Associated With Decreased 25-Hydroxyvitamin D and Increased Parathyroid Hormone Levels in Older Adults. *Arch Gen Psychiatry* 65: 508-512, 2008
- Hsieh Y, Casale R, Fukuda E, Chen J, Knemeyer I, Wingate J, Morrison R, Korfmacher W: Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry for direct measurement of clozapine in rat brain tissue. *Rapid Commun Mass Sp* 20: 965-972, 2006
- Hsieh Y, Chen J, Korfmacher WA: Mapping pharmaceuticals in tissues using MALDI imaging mass spectrometry. *J Pharmacol Toxicol* 55: 193-200, 2007
- Hsu C-C, Chou P-T, Zare RN: Imaging of Proteins in Tissue Samples Using Nanospray Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal Chem* 87: 11171-11175, 2015
- Jansen M, Wang W, Greco D, Bellenchi GC, di Porzio U, Brown AJ, Ikonen E: What dictates accumulation of desmosterol in the developing brain? *FASEB J* 27: 865-870, 2013
- Kauppila TJ, Flink A, Haapala M, Laakkonen U-M, Aalberg L, Ketola RA, Kostiaainen R: Desorption atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry in routine analysis of confiscated drugs. *Forensic Sci Int* 210: 206-212, 2011

- Kauppila TJ, Flink A, Laakkonen U-M, Aalberg L, Ketola RA: Direct analysis of cannabis samples by desorption atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry. *Drug Test Analysis* 5: 186-190, 2013
- Kauppila TJ, Kuuranne T, Meurer EC, Eberlin MN, Kotiaho T, Kostianen R: Atmospheric Pressure Photoionization Mass Spectrometry. Ionization Mechanism and the Effect of Solvent on the Ionization of Naphtalenes. *Anal Chem* 74: 5470-5479, 2002
- Kauppila TJ, Talaty N, Salo PK, Kotiaho T, Kostianen R, Cooks RG: New surfaces for desorption electrospray ionization mass spectrometry: porous silicon and ultra-thin layer chromatography plates. *Rapid Commun Mass Sp* 20: 2143-2150, 2006
- Kebarle P: A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 35: 804-817, 2000
- Kebarle P, Tang L: From Ions in Solution to Ions in Gas Phase The Mechanism of Electrospray Mass Spectrometry. *Anal Chem* 65: 972A-986A, 1993
- Kertesz V, Van Berkel GJ, Vavrek M, Koeplinger KA, Schneider BB, Covey TR: Comparison of Drug Distribution Images from Whole-Body Thin Tissue Sections Obtained Using Desorption Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry and Autoradiography. *Anal Chem* 80: 5168-5177, 2008
- Knekt P, Kilkkinen A, Rissanen H, Marniemi J, Sääksjärvi K, Heliövaara M: Serum Vitamin D and the Risk of Parkinson Disease. *Arch Neurol* 67: 808-811, 2010
- Korade Z, Xu L, Shelton R, Porter NA: Biological Activities of 7-dehydrocholesterol derived oxysterols: implications for Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Lipid Res* 51: 3259-3269, 2010
- Kudo K, Emmons GT, Casserly EW, Via DP, Smith LC, St. Pyrek J, Schroepfer Jr GJ: Inhibitors of sterol synthesis. Chromatography of acetate derivatives of oxygenated sterols. *J Lipid Res* 30: 1097-1111, 1989
- Leoni V, Caccia C: Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases. *Chem Phys Lipids* 164: 515-524, 2011
- Leoni V, Lütjohann D, Masterman T: Levels of 7-oxocholesterol in cerebrospinal fluid are more than one thousand times lower than reported in multiple sclerosis. *J Lip Res* 46: 191-195, 2005
- Leuthold LA, Mandscheff J-F, Fathi M, Giroud C, Augsburg M, Varesio E, Hopfgartner G: Desorption electrospray ionization mass spectrometry: direct toxicological screening and analysis of illicit Ecstasy tablets. *Rapid Commun Mass Sp* 20: 103-110, 2006

Luosujärvi L, Arvola V, Haapala M, Pól J, Saarela V, Franssila S, Kotiaho T, Kostiaainen R, Kauppila TJ: Desorption and Ionization Mechanisms in Desorption Atmospheric Pressure Photoionization. *Anal Chem* 80: 7460-7466, 2008

Lütjohann D, Breuer O, Ahlborg G, Nennesmo I, Sidén Å, Diczfalusy U, Björkhem I: Cholesterol homeostasis in human brain: Evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from brain into the circulation. *PNAS* 93: 9799-9804, 1996

Lyons MA, Brown AJ: 7-Ketocholesterol. *Int J Biochem Cell B* 31: 369-375, 1999

Mawer EB, Jones G, Davies M, Still PE, Byford V, Schroeder NJ, Makin HLJ, Bishop CW, Knutson JC: Unique 24-hydroxylated metabolites represent a significant pathway of metabolism of vitamin D2 in humans: 24-hydroxyvitamin D2 and 1,24-dihydroxyvitamin D2 detectable in human serum. *J Clin Endocr Metab* 83: 2156-2166, 1998

Miyajima H, Adachi J, Kohno S, Takahashi Y, Ueno Y, Naito T: Increased oxysterols associated with iron accumulation in the brains and visceral organs of aceruloplasminaemia patients. *QJM* 94: 417-422, 2001

Montine TJ, Neely MD, Quinn JF, Beal MF, Markesbery WR, Roberts II LJ, Morrow JD: Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease. *Free Radical Bio Med* 33: 620-626, 2002

Murphy RC, Hankin JA, Barkley RM: Imaging of lipid species by MALDI mass spectrometry. *J Lip Res* 50: 317-322, 2009

Mutka A-L, Lusa S, Linder MD, Jokitalo E, Kopra O, Jauhiainen M, Ikonen E: Secretion of Sterols and the NPC2 Protein from Primary Astrocytes. *J Biol Chem* 279: 48654-48662, 2004

Nemes P, Vertes A: Laser Ablation Electrospray Ionization for Atmospheric Pressure, in Vivo, and Imaging Mass Spectrometry. *Anal Chem* 79: 8098-8106, 2007

NIST Chemistry WebBook, Nist Standard Reference Database Number 69 (online)(viitattu 28.2.2016). Saatavilla Internetissä: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

Olkkonen V, Lehto M: Oksisterolien merkitys rasva-aineenvaihdunnassa ja valtimonkovettumistaudin kehitymisessä. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 121: 515-522, 2005

Pól J, Vidová V, Kruppa G, Kobliha V, Novák P, Lemr K, Kotiaho T, Kostiaainen R, Havlíček V, Volný M: Automated Ambient Desorption-Ionization Platform for Surface Imaging Integrated with a Commercial Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometer. *Anal Chem* 81: 8479-8487, 2009

Rao W, Scurr DJ, Burston J, Alexander MR, Barrett DA: Use of imaging multivariate analysis to improve biochemical and anatomical discrimination in desorption

electrospray ionization mass spectrometry imaging. *Analyst* 137: 3946-3953, 2015

Robb DB, Covey TR, Bruins AP: Atmospheric Pressure Photoionization: An Ionization Method for Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal Chem* 72: 3653-3659, 2000

Rodríguez-Acebes S, De La Cueva P, Fernandez-Hernando C, Ferruelo AJ, Lasuncion MA, Rawson RB, Martínez-Botas J, Gómez-Coronado D: Desmosterol can replace cholesterol in sustaining cell proliferation and regulating the SREBP pathway in a sterol- Δ^{24} -reductase deficient cell line. *Biochem J* 420: 305-315, 2009

Rodriguez-Cruz SE: Rapid analysis of controlled substances using desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp* 20: 53-60, 2006

Saarela V, Haapala M, Kostianen R, Kotiaho T, Franssila S: Glass microfabricated nebulizer chip for mass spectrometry. *Lab Chip* 7: 644-646, 2007

Sacchetti P, Sousa KM, Hall AC, Liste I, Steffensen KR, Theofilopoulos S, Parish CL, Hazenberg C, Åhrlund Richter L, Hovatta O, Gustafsson J-Å, Arenas E: Liver X Receptors and Oxysterols Promote Ventral Midbrain Neurogenesis In Vivo and in Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 5: 409-419, 2009

SANCO/12571/2013 (2013). Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate, 19 November.

Schaaf CP, Koster J, Katsonis P, Kratz L, Shchelochkov OA, Scaglia F, Kelley RI, Lichtarge O, Waterham HR, Shinawi M: Desmosterolosis—phenotypic and molecular characterization of a third case and review of the literature. *Am J Med Genet Part A* 155: 1597-1604, 2011

Schroepfer Jr GJ: Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev* 80: 361-554, 2000

Shiea J, Huang M-Z, Hsu H-J, Lee C-Y, Yuan C-H, Beech I, Sunner J: Electrospray-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for direct ambient analysis of solids. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 19: 3701-3704, 2005

Suni NM, Lindfors P, Laine O, Östman P, Ojanperä I, Kotiaho T, Kauppila TJ, Kostianen R: Matrix effect in the analysis of drugs of abuse from urine with desorption atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry (DAPPI-MS) and desorption electrospray ionization-mass spectrometry (DESI-MS). *Analytica Chim Acta* 699: 73-80, 2011

Syage JA, Evans MD, Hanold KA: Photoionization mass spectrometry. *Am Lab* 32: 24-29, 2000

Takáts Z, Cotte-Rodriguez I, Talaty N, Chen HW, Cooks RG: Direct, trace level detection of explosives on ambient surfaces by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Chem Commun*: 1950-1952, 2005

Takáts Z, Wiseman JM, Gologan B, Cooks RG: Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization. *Science* 306: 471-473, 2004

Talaty N, Mulligan CC, Justes DR, Jackson AU, Noll RJ, Cooks RG: Fabric analysis by ambient mass spectrometry for explosives and drugs. *Analyst* 133: 1532-1540, 2008

Tillner J, McKenzie JS, Jones EA, Speller AVM, Walsh JL, Veselkov KA, Bunch J, Takats Z, Gilmore IS: Investigation of the Impact of Desorption Electrospray Ionization Sprayer Geometry on Its Performance in Imaging of Biological Tissue. *Anal Chem* 88: 4808-4816, 2016

Tint GS, Seller M, Hughes-Benzie R, Batta AK, Shefer S, Genest D, Irons M, Elias E, Salen G: Markedly increased tissue concentrations of 7-dehydrocholesterol combined with low levels of cholesterol are characteristic of the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Lipid Res* 36: 89-95, 1995

Vaikkinen A, Kotiaho T, Kostianen R, Kauppila TJ: Desorption atmospheric pressure photoionization with polymethylsiloxane as extraction phase and sample plate material. *Analytica Chim Acta* 682: 1-8, 2010

Vaikkinen A, Rejsek J, Vrkoslav V, Kauppila TJ, Cvacvka J, Kostianen R: Feasibility of desorption atmospheric pressure photoionization and desorption electrospray ionization mass spectrometry to monitor urinary steroid metabolites during pregnancy. *Analytica Chim Acta* 880: 84-92, 2015

Venter A, Nefliu M, Cooks RG: Ambient ionization mass spectrometry. *Trends Anal Chem* 27: 284-290, 2008

Venter A, Sojka PE, Cooks RG: Droplet Dynamics and Ionization Mechanisms in Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal Chem* 78: 8549-8555, 2006

Vismeh R, Waldon DJ, Teffera Y, Zhao Z: Localization and Quantification of Drugs in Animal Tissues by Use of Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging. *Anal Chem* 84: 5439-5445, 2012

Wallace AM, Gibson S, de la Hunty A, Lamberg-Allardt C, Ashwell M: Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: current procedures, performance characteristics and limitations. *Steroids* 75: 477-488, 2010

Wang Y, Griffiths JW: Capillary liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry for the study of neurosteroids and oxysterols in brain. *Neurochem Int* 52: 506-521, 2008

Wassif CA, Maslen C, Kachilele-Linjewile, Lin D, Linck LM, Connor WE, Steiner RD, Porter FD: Mutations in the Human Sterol Δ^7 -Reductase Gene at 11q12-13 Cause Smith-Lemli-Opitz Syndrome. *Am J Hum Genet* 63: 55-62, 1998

Waterham RH, Wijburg FA, Hennekam RCM, Vreken P, Poll-The BT, Dorland L, Duran M, Jira PE, Smeitink JAM, Wevers RA, Wanders RJA: Smith-Lemli-Opitz Syndrome Is Caused by Mutations in the 7-Dehydrocholesterol Reductase Gene. *Am J Hum Genet* 63: 329-338, 1998

Wiseman JM, Ifa DR, Zhu Y, Kissinger CB, Manicke NE, Kissinger PT, Cooks RG: Desorption electrospray ionization mass spectrometry: Imaging drugs and metabolites in tissues. *PNAS* 105: 18120-18125, 2008

Weston DJ, Bateman R, Wilson ID, Wood TR, Creaser CS: Direct Analysis of Pharmaceutical Drug Formulations Using Ion Mobility Spectrometry/Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry Combined with Desorption Electrospray Ionization. *Anal Chem* 77: 7572-7580, 2005

Xu L, Davis TA, Porter NA: Rate Constants for Peroxidation of Polyunsaturated Fatty Acids and Sterols in Solution and in Liposomes. *J Am Chem Soc* 131: 13037-13044, 2009

Yamashita M, Fenn JB: Electrospray Ion Source. Another Variation on Free-Jet Theme. *J Phys Chem-US* 88: 4451-4459, 1984

Yu H, Patel SB: Recent insights into the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Clin Genet* 68: 383-391, 2005

Zhang Z, Li D, Blanchard DE, Lear SR, Erickson SK, Spencer TA: Key regulatory oxysterols in liver: analysis of Δ^4 -3-ketone derivatives by HPLC and response to physiological perturbations. *J Lipid Res* 42: 649-658, 2001