

Anna Johansson

# Dieetin vaikutus S-5-HIAA-pitoisuuteen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko AMK

Bioanalytiikka

Opinnäytetyö

22.10.2013

Tekijä Otsikko	Anna Johansson Dieetin vaikutus S-5-HIAA-pitoisuuteen
Sivumäärä Aika	24 sivua + 2 liitettä 22.10.2010
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaajat	Kemisti Outi Itkonen Bioanalytiikan lehtori Tuula Kurkinen
<p>Tämän työn tarkoituksena oli tutkia dieetin vaikutusta seerumin 5-HIAA-pitoisuuteen. Aikaisemmissa tutkimuksissa on osoitettu, että serotoniinipitoiset ruoka-aineet nostavat 5-HIAA-pitoisuutta merkittävästi virtsassa. Tavoitteena oli tarvittaessa uudistaa näytteenottoon liittyvä ohjeistus dieetin osalta. Tutkimus suoritettiin HUSLAB:n Naistenklinikan laboratoriossa.</p> <p>Tutkimukseen osallistuvat henkilöt välttivät serotoniinipitoisia ruoka-aineita kolmen vuorokauden ajan. Tämän jälkeen tutkimushenkilöiltä (ryhmät A ja B) otettiin verinäyte, jonka jälkeen he söivät yhden serotoniinipitoisen ruoka-aineen päivän tai vastaavasti tunnin kuluessa. Tutkittavat ruoka-aineet olivat banaani, ananas, kiivi, tomaatti ja saksanpähkinä. Tämän jälkeen heistä otettiin verinäyte vuorokauden välein kolmen vuorokauden ajan. Lisäksi ryhmältä B otettiin näytteitä ensimmäisen vuorokauden aikana tiheämmin. Tulokset mitattiin nestekromatografia-tandemmassaspektrometrialla käyttäen AB SCIEX 4000 QTRAP<sup>®</sup> -laitteistoa. Tämän jälkeen saaduista seerumin 5-HIAA-pitoisuuksista piirrettiin ruoka-ainekohtaiset käyrät ajan funktiona Microsoft<sup>®</sup> Excel-taulukkolaskentaohjelmassa ja laskettiin parillisen t-testin avulla, eroavatko tulokset eri ajankohtina merkittävästi toisistaan.</p> <p>Tuloksista kävi ilmi, etteivät seerumin 5-HIAA-pitoisuudet eroa toisistaan merkittävästi verrattaessa lähtöarvoa 24, 48 ja 72 tunnin pitoisuuksiin. Sen sijaan seerumin 5-HIAA-pitoisuus nousee jo muutamassa tunnissa ruoka-aineen syömisen jälkeen. Kun ruoka-aineen syömisestä on kulunut vuorokausi, eroa ei enää ole havaittavissa. Näin S-5-HIAA-määrityksen näytteenotto-ohjeistusta voidaan muuttaa siten, että serotoniinipitoisia ruoka-aineita tulee välttää vain näytteenottopäivänä eikä kolmivuorokautista dieettiä tarvita.</p>	
Avainsanat	S-5-HIAA, serotoniinidieetti, nestekromatografia-tandemmassaspektrometria, LC-MS/MS

Author Title	Anna Johansson The effects of diet on 5-HIAA concentration
Number of Pages Date	24 pages + 2 appendices 22 October 2013
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Outi Itkonen, Chemist Tuula Kurkinen, Principal Lecturer
<p>It has been shown in previous studies that serotonin-containing food increases 5-HIAA concentration in urine. The purpose of this study was to demonstrate the effect of diet on serum 5-HIAA concentration and, when necessary, to revise patient instructions concerning the diet prior to sampling. This study was done at HUSLAB Laboratory Division, Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital District of Helsinki and Uusimaa, Helsinki, Finland.</p> <p>The participants in this study were asked to avoid foodstuffs containing serotonin for 72 hours. Then, blood samples were taken on the participants divided into test groups A and B. The participants were given serotonin-containing food to be eaten within a day or within one hour, respectively. Blood samples were taken after 24, 48 and 72 hours. Additional blood samples were taken on the participants in group B during the first 24 hours. The foodstuffs studied were banana, pineapple, kiwi fruit, tomato and walnut. The concentrations of serum 5-HIAA were measured with an AB SCIEX 4000 QTRAP<sup>®</sup>. The results were analyzed using paired t-test for differences between the various time-points.</p> <p>There were no significant differences in serum 5-HIAA concentrations at time points 0, 24, 48 and 72 hours. On the other hand, the concentration rose significantly in two hours after the intake of serotonin-containing food and then declined within 24 hours. Thus, the patient instructions prior to sampling should be changed so that the patient must avoid food which includes serotonin only during the day of sampling. The three-day restriction applied now is not necessary.</p>	
Keywords	S-5-HIAA, serotonin diet, liquid chromatography mass spectrometry, LC-MS/MS

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Seerumin 5-hydroksi-indoliasetaatti(5-HIAA)-määrityksen indikaatiot ja aikaisemmat tutkimukset	2
3	Nestekromatografia-tandemmassaspektrometria (LC-MS/MS)	3
3.1	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (High pressure liquid-solid chromatography, HPLC)	3
3.2	Sähkösumutus-ionisaatio (ESI)	5
3.3	Kolmoisvadrupolilaitteisto ja MRM-tekniikka	5
3.4	Detektori ja spektrien analysointi	6
4	Työn tarkoitus, tavoite ja tutkimusongelmat	7
5	Työtavat ja -menetelmät	7
5.1	Näytteiden keräys tutkimukseen osallistuvilta henkilöiltä	8
5.2	Näytteiden esikäsittely	9
5.3	Näytteiden analysointi LC-MS/MS-menetelmällä	10
5.4	Tulosten käsittely	12
6	Työn tulokset	13
6.1	Mitatut seerumin 5-HIAA-pitoisuudet	14
6.2	Parillisen t-testin tulokset	18
7	Johtopäätökset ja pohdinta	19
	Lähteet	23
	Liitteet	
	Liite 1. Tarkistusajot ja vakiosuorat	
	Liite 2. Mitatut seerumin 5-HIAA-pitoisuudet	

## 1 Johdanto

Tässä työssä tutkitaan dieetin vaikutusta seerumin 5-hydroksi-indoliasetaatti (5-HIAA) -pitoisuuteen. Työ tehtiin HUSLAB:n Naistenklinikan laboratorioissa ja ohjaajina toimivat Outi Itkonen (HUSLAB) ja Tuula Kurkinen (Metropolia AMK). Seerumin 5-HIAA-määritystä käytetään neuroendokriinisten kasvainten (NET) laboratoriodiagnostiikassa. Toisinaan kasvainta osataan epäillä vasta karsinoidisyndroomaksi kutsutun tilan oireiden perusteella. Karsinoidisyndrooma syntyy, kun potilaan kasvain on tehnyt metastaaseja eli etäpesäkkeitä maksaan. 5-HIAA on serotoniinin aineenvaihduntatuote ja sen erityks vereen ja munuaisten kautta virtsaan kasvaa karsinoidioireiyhtymässä. (Jonsuu - Roberts - Lyly - Tenhunen 2007: 398.)

Koska 5-HIAA on serotoniinin aineenvaihduntatuote, serotoniinipitoisten ruoka-aineiden nauttiminen nostaa virheellisesti seerumin 5-HIAA-pitoisuutta. Näitä ruoka-aineita ovat muun muassa banaani, maapähkinä, luumu, kiivi, avokado, homejuusto, tomaatti, ananas ja punaviini. Tässä työssä kerätään näytteet vapaaehtoisilta henkilöiltä, esikäsittellen seeruminäytteet ja analysoidaan 5-HIAA-pitoisuus AB SCIEX:n 4000 Q-TRAP LC-MS/MS -laitteistolla. Työssä tutkitaan kuinka serotoniinipitoiset ruoka-aineet vaikuttavat seerumin 5-HIAA-pitoisuuteen ja kuinka kauan vaikutus kestää. Tavoitteena on poistaa tarpeeton dieettirajoitus tai lyhentää sitä esimerkiksi kolmesta päivästä yhteen päivään.

Tämä työ on osa käynnissä olevaa tuotekehityshanketta, jossa kehitetään uusia LC-MS-tekniikkaan perustuvia lääkeaine-, hormoni- ja peptidimäärityksiä sekä parannetaan vanhoja menetelmiä. HUSLAB:ssa seerumista tehtävä 5-HIAA-määritys kehitettiin edellisessä tuotekehitysprojektissa ja se on korvannut keräysvirtsaasta tehtävän 5-HIAA-määrityksen. Edellisessä tuotekehitysprojektissa menetelmä validoitiin ja siihen osallistuivat Metropolia opiskelijat opinnäytetyönä (Elolähde - Keijama 2011: 1).

## 2 Seerumin 5-hydroksi-indoliasetaatti(5-HIAA)-määrityksen indikaatiot ja aikaisemmat tutkimukset

Neuroendokriinisiä kasvaimia voidaan tavata kaikissa ihmisen elimissä. Suomessa tämän tyyppisiä uusia tapauksia todetaan noin 230 vuodessa. Kasvaimet saattavat tehdä etäpesäkkeitä viereisiin kudoksiin, maksaan, luustoon ja imusolmukkeisiin. Neuroendokriiniset kasvaimet erittävät usein serotoniinia (5-HT), jota on myös terveillä ihmisillä muun muassa trombosyyteissä ja suoliston sekä peräsuolen soluissa. Kun neuroendokriininen kasvain tekee etäpesäkkeitä maksaan, saattaa syntyä karsinoidioireyhtymäksi kutsuttu ilmiö, jolloin maksa ei suodata kasvaimen erittämiä aineita pois verenkierrasta. (Joensuu - Roberts - Lyly - Tenhunen 2007:398)

5-HIAA eli 5-hydroksi-indoliasetaatti on serotoniinin aineenvaihdunnan lopputuote, jolloin sen pitoisuus kertoo serotoniinivaikutuksesta elimistössä. Karsinoidisyndroomaa sairastavilla potilailla elimistön serotoniinipitoisuus moninkertaistuu. Koska 5-HIAA hajoaa munuaisissa ja erittyy virtsaan, käytettiin karsinoidisyndrooman diagnosoinnissa pitkään vuorokausivirtsan 5-HIAA-pitoisuuden määrittämistä. Massaspektrometrian kehityksen myötä haastavasta vuorokausivirtsan keräyksestä ollaan luopumassa ja 5-HIAA-pitoisuus voidaan määrittää seeruminäytteestä. Viitearvo seerumin 5-HIAA-pitoisuudelle on alle 123 nmol/l (HUSLAB. 2013).

On osoitettu, että serotoniinipitoisten ruoka-aineiden nauttiminen juuri ennen näytteenottoa nostaa 5-HIAA-pitoisuutta virtsassa. Tämän vuoksi potilaita pyydetään välttämään kolme vuorokautta ennen näytteenottoa avokadon, banaanin, maapähkinöiden, homejuuston, luumun, tomaatin, ananaksen ja punaviinin nauttimista. Suhteellisen pitkä lista saattaa olla potilaalle haasteellinen. Lisäksi näytteenottajan pitää muistaa ohjeistaa potilas tarkasti. HUSLAB:ssa seerumin 5-HIAA -tutkimus otettiin käyttöön joulukuussa 2012. Tämän työn tarkoitus on jatkaa määrityksen preanalyttisten tekijöiden selvitystä edelleen ja tutkia dieetin vaikutusta seerumin serotoniinipitoisuuteen 1-3 vuorokauden kuluttua näiden ruoka-aineiden nauttimisesta. Kun tutkimus loppuu, voidaan dieettisuosituksia mahdollisesti muuttaa.

Elintarvikkeiden serotoniinipitoisuuksia LC-MS/MS (nestekromatografia-tandemmassaspektrometria) -teknologian avulla ovat tutkineet muun muassa Huang ja Mazza, jotka ovat tutkimustensa pohjalta laatineet *Journal of Chromatography A* -julkaisuun artikkelin vuonna 2011. Ruoka-aineiden vaikutusta virtsan 5-HIAA-

pitoisuuteen on tutkittu vähän (esimerkiksi Garrido - Espino-Gomez - Lozano- Barriga - Paredes- Rodriguez 2012). Vuonna 2010 Miller, Brown, Degg, Allen ja Keevil julkaisivat artikkelin, jossa mitattuja 5HIAA-pitoisuuksia vertailtiin kahdella eri menetelmän mittattuna, mutta tutkimuksessa ei otettu huomioon dieetin vaikutusta. Tämä työ eroaa aikaisemmista tutkimuksista siten, että työssä tutkitaan dieetin vaikutusta seerumin 5-HIAA-pitoisuuteen Naistenklinikan laboratorion käyttämällä menetelmällä kolmen vuorokauden ajanjaksolla. Tarkoitus on tehdä tutkimus, johon näytteenotto-suositukset pohjautuvat ja mahdollisesti uudet suositukset saadaan jo 2013 lopulla.

### 3 Nestekromatografia-tandemmassaspektrometria (LC-MS/MS)

Massaspektrometrinen määrittäminen on lisääntynyt kliinisissä laboratorioissa sen jälkeen, kun massaspektrometri pystyttiin liittämään nestekromatografiin. Tätä teknologiaa käytetään muun muassa lääkaineiden ja huumeaineiden määrittämiseen sekä peptidien, proteiinien ja sokereiden tunnistukseen. Massaspektrometriä sovelluksia on käytetty Suomen kliinisissä laboratorioissa reilun kymmenen vuoden ajan. Nestekromatografia-massaspektrometrian etuna on, että sillä voidaan analysoida poolisia, ionimuotoisia, termisesti epätasapainoisia ja hyvin suuria yhdisteitä, kuten biomolekyyliä. (Itkonen, 2012: 262; Jaarinen - Niiranen. 2008: 209.)

#### 3.1 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (High pressure liquid-solid chromatography, HPLC)

Nestekromatografia (liquidchromatography, LC) on menetelmä, joka perustuu erotettavien molekyylien erilaisiin vuovaikutuksiin liikkuvan nestefaasin ja stationaarifaasin välillä. Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (High-pressureliquid-solidchromatography, HPLC) on yleisin orgaanisten molekyylien erottamiseen käytetty menetelmä. Yhdisteiden tulee liueta johonkin liuottimeen. Nestekromatografiassa liikkuva faasia (eluentti) pumpataan stationaarifaasia sisältävän kolonnin läpi halutulla virtausnopeudella. Nestettä pumppaavilla pumpuilla on suuri merkitys, sillä niiden tulee pumpata eluenttia tarkasti määritellyissä olosuhteissa. Niiden tulee olla lisäksi paineenkestäviä ja pitää virtaus mahdollisimman tasaisena. (Ketola - Kostianen - Kotiaho - Vainiotalo 2010: 171)

Nestekromatografia periaate on esitetty kuviossa 1 (Jaarinen - Niiranen, 2008: 140). Näytteen sisältämät molekyylit sitoutuvat eri tavoin stationaarifaasiin, jolloin heikosti

stationäärifaasiin liikkuvat nopeasti liikkuvan faasin mukana ja erottuvat ensin. Voimakkaammin stationaarifaasiin sitoutuvat molekyylit liikkuvat hitaammin ja erottuvat viimeisenä.



Kuvio 1. Nestekromatografian periaate. Näytteen komponentit jakautuvat ja kulkevat eri nopeuksilla kolonnin läpi. (Jaarinen- Niiranen, 2008: 140)

Nestekromatografian pääosa on kolonni, johon näyte injektoidaan joko suoraan tai syöttölaitteen avulla. Kolonnin pituus voi vaihdella muutamista senttimetreistä kolmeen kymmeneen senttimetriin ja ne on täytetty stationaarifaasilla, joka koostuu tavallisimmin piioksidi(silika)- tai aluminapartikkeleista. Partikkeleiden koko on tavallisimmin 3-10  $\mu\text{m}$  ja usein käytetään kemiallisesti modifioitua stationaarifaasia, jossa partikkeleita on erotuskyvyn parantamiseksi muokattu esimerkiksi ionisilla ryhmillä tai alkyyliryhmillä. (Ketola - Kostiainen - Kotiaho - Vainiotalo, 2010: 171-172.)

Nestekromatografiset menetelmät jaotellaan stationaarifaasin mukaisesti normaalifaasi-, käänteisfaasi-, ioninvaihto- ja eksluusiokromatografiaan. Tässä työssä käsitellään vain käänteisfaasinestekromatografia, sillä se on yleisin menetelmä, kun nestekromatografi on yhdistetty massaspektrometriin. Käänteisfaasikromatografiassa (RP-LC) yhdisteiden erotus perustuu poolittomiin, heikkoihin ja epäspesifisiin vuorovaikutuksiin, joita analysoitava yhdiste, stationaarifaasi ja liikkuvafaasi muodostavat keskenään. Eluentin poolisuus on suurempi kuin käänteisfaasin ja yhdisteet erottuvat poolisuusjärjestyksessä poolisimman yhdisteen eluoituessa ensin. RP-LC soveltuu kaikenlaisille orgaanisille yhdisteille pois lukien sokerit ja pitkäketjuiset hiilivedyt. (Ketola - Kostiainen - Kotiaho - Vainiotalo, 2010: 174.)



### 3.2 Sähkösumutusionisaatio (ESI)

Nestekromatografiassa voidaan käyttää erilaisia detektoreita, joista tässä työssä käsitellään massaspektrometriä. Nestekromatografian ja massaspektrometrin yhdistäminen vaatii erillisen liitosmenetelmän, jossa nestekromatografisesti erotettu tuote ionisoidaan. Eniten käytetyt ionisointitekniikat ovat ilmanpaineessa kemiallinen ionisointi (APCI) ja sähkösumutusionisointi (ESI). Tässä työssä käytetään AB SCIEX 4000 QTRAP<sup>®</sup> -laitteistoa, jossa ionisointitekniikkana on sähkösumutusionisaatio (ESI).

Sähkösumutusionisaatiossa (ESI) nestekromatografissa käsiteltyä liuosta syötetään ohuen kapillaarin läpi normaalilla HPLC:n virtausnopeudella. Sumuttimessa käytetään tyyppikaasua, joka toimii myös kuivauskaasuna. Kapillaarin ja sumutuskammion välillä on jännite-ero, jolloin liuksesta poistuu elektroneja, protoneja tai muita varautuneita hiukkasia. Eluointiliuoksesta muodostuu sähköisesti varattuja pisaroita, jotka pienenevät liuottimen haihtuessa, jolloin sähkövaraus keskittyy entistä pienempään tilaan. Tutkittavan yhdisteen ionit vapautuvat samassa muodossa, jossa ne ovat eluointiliuoksessa olleet. Sähkösumutusionisaatio on pehmeä tekniikka, jolla voidaan analysoida heikkoja sidoksia sisältäviä yhdisteitä. (Jaarinen - Niiranen, 2008: 210-211.)

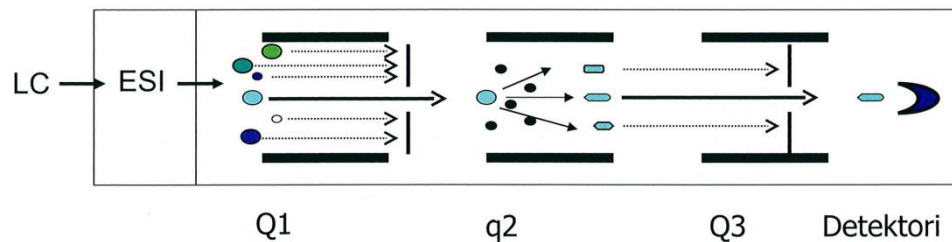
### 3.3 Kolmoisvadrupolilaitteisto ja MRM-tekniikka

Nestekromatografia-massaspektrometrialla voidaan analysoida monia erilaisia yhdisteitä. Jos tutkittavilla yhdisteillä on samantyyppinen massaspektri ja nestekromatografiasa toisiaan lähellä olevat retentioajat, voidaan käyttää tandemmassaspektrometriä, jossa massa-analysaattori on yhdistetty toiseen massa-analysaattoriin. Ionisaation jälkeen ionit suodatetaan niiden massa-varaussuhteen ( $m/z$ ) perusteella (Jaarinen - Niiranen, 2008: 213). Tässä työssä käsitellään laitetta, joiden massa-analysaattorina toimii kolmoisvadrupoli.

Yksittäinen kvadrupoli koostuu neljästä yhdensuuntaisista elektrodista, joiden välillä on sähkökenttä. Ionien saapuessa elektrodien väliin ne joutuvat kulkusuuntaansa nähden kohtisuoraan värähtelyliikkeeseen. Värähtelyn aiheuttaa elektrodien välinen sähkökenttä, jonka vain tietyn  $m/z$ -suhteen omaavat ionit voivat läpäistä. Kentän jännitettä muuttaessa muuttuu myös sen läpäisevien ionien  $m/z$ -suhde. Näin toimien voidaan niin sanotusti pyyhkäistä läpi tietty  $m/z$ -alue ja mitata halutun  $m/z$ -suhteen omaavien yhdisteiden massaspektri. Kolmoiskvadrupolissa voidaan käyttää useaa eri pyyhkäisytek-

niikkaa, joista tässä työssä käsitellään tarkemmin MRM (multiplereactionmonitoring, useiden reaktioiden seuranta) -menetelmää, sillä työssä käytettävää AB SCIEX:n 4000 QTRAP® LC-MS/MS -laitteistoa on käytetty tällä periaatteella. (Ketola - Kostiainen - Kotiaho - Vainiotalo, 2010: 171-172.)

Kuviossa 2 on esitetty MRM-tekniikkaan perustuva pyyhkäisy (Itkonen, 2012: 263). Kromatografilta tulevat näytteet ionisoidaan sähkösumutusionisaation avulla ja saadut ionit kulkeutuvat ensimmäiselle kvadrupolille (Q1). Ionit, joilla on tietty  $m/z$ -suhde, läpäiset ensimmäisen kvadrupolin ja siirtyvät törmäyskammiona toimivaan seuraavaan kvadrupoliin (q2). Törmäyksessä syntyy alkuperäisestä ionista pilkeioneja, jotka kulkeutuvat kolmannelle kvadrupolille. Se suodattaa ionit jälleen halutun  $m/z$ -suhteen mukaan, jolloin vain tietyt ionit päätyvät detektorille. MRM-pyyhkäisy soveltuu erinomaisesti kvantitatiivisiin mittauksiin siksi, että sillä voidaan mitata erittäin spesifisesti haluttua analyyttiä myös alhaisina pitoisuuksina matalan taustakohinan takia.



Kuvio 2. MRM-tekniikkaan perustuva kolmoiskvadrupolilaitteen toimintaperiaate (Itkonen, 2012: 263)

### 3.4 Detektori ja spektrien analysointi

Massaspektrometrin detektorina käytetään elektronimonistinta, joka muuttaa mitattavien ionien energian sähköimpulssiksi. Törmätessään elektronimonistimen sisäpintaan yksi ioni irrottaa useita elektroneja, jotka lentävät monistimen perää kohti ja törmäävät pian tämän jälkeen uudelleen seinämään. Uuden törmäyksen jälkeen kukin elektroni vapauttaa useita elektroneja. Näin detektorille saapunut signaali moninkertaistuu ja se on suuruudeltaan verrannollinen detektorille saapuneiden ionien määrään. (Jaarinen - Niiranen, 2008: 128.)

Laitteiston ohjelman avulla voidaan laskea analyttien pitoisuudet detektorin signaalista. Laskennassa otetaan huomioon ionin antaman piikin sijainti massaspektrometrissä sekä sen pinta-ala. Näytteestä saatua kromatogrammia voidaan muokata selkeämmäksi asettamalla parametreja manuaalisesti tärkeysjärjestykseen esimerkiksi silloin, kun halutaan tarkastella jotain tiettyä piikkiä tarkemmin (MRM (Multiplereaction Monitoring). 2013; Ardrey, 2003: 68-69).

#### 4 Työn tarkoitus, tavoite ja tutkimusongelmat

Tämän työn tarkoituksena on tutkia dieetin vaikutusta seerumin 5HIAA-määrittelyyn ja tavoitteena on päästä tarpeettomasta dieetistä eroon. Tutkimukseen liittyvät kysymykset ja niiden alakysymykset ovat seuraavat:

1. Muuttuvatko seerumin 5HIAA-pitoisuudet nautittaessa serotoniinipitoisia ruoka-aineita verrattuna lähtötilanteeseen, jossa dieettiä on noudatettu?
  - Muuttuvatko seerumin 5HIAA-tasot, kun syödään pähkinöitä 100 g/kolme banaania/neljä kiivi-hedelmää/ puolikas tuoretta ananasta/neljä tomaattia?
2. Kuinka kauan serotoniinipitoisten ruoka-aineiden vaikutus kestää?
  - Ovatko tasot samat vielä kahden/kolmen päivän jälkeen?
  - Kuinka nopeasti 5HIAA-tasot seerumissa muuttuvat?

#### 5 Työtavat ja -menetelmät

Tämän opinnäytetyön kokeellinen osuus suoritettiin Naistenklinikan laboratorioissa keväällä 2013 viikoilla 22-23 kemisti Outi Itkosen ohjauksessa. Työryhmään kuului lisäksi väitöskirjatyöntekijä Niina Tohmola, sillä kyseinen tutkimus liitettiin osaksi hänen väitöskirjatyötään. Tässä luvussa kuvaillaan tarkemmin tämän opinnäytetyön kokeellista osuutta, joka on selkeyden vuoksi jaettu neljään eri vaiheeseen. Vaiheet ovat:

1. Näytteiden keräys tutkimukseen osallistuvilta henkilöiltä
2. Näytteiden esikäsittely
3. Näytteiden analysointi
4. Tulosten käsittely

Viikolla 22 kerättiin näytteet tutkimukseen osallistuvilta henkilöiltä ja esikäsiteltiin ne. Tutkimukseen osallistui 35 henkilöä, joista 31 oli naisia ja 4 miehiä. Heidät oli jaettu tutkimusta varten kahteen ryhmään (A ja B), jolloin 5-HIAA:n metaboliaa elimistössä pystyttiin tutkimaan sekä lyhyellä että pitkällä aikavälillä. Ryhmistä on kerrottu tarkemmin kappaleessa 5.1. Viikolla 23 näytteet analysoitiin AB SCIEX:n 4000 QTRAP® -laitteistolla. Esitutkimusta ei suoritettu, sillä laiteaika kyseisellä nestekromatografi-tandemmassaspektrometrillä on rajallista, sillä sitä käytetään paljon rutiinityöskentelyyn sekä muuhun tutkimustyöhön.

Työtä varten saatiin opinnäytetyön tekemistä koskeva Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiriltä ( HUS) tutkimuslupa. Varsinaiselle tuotekehitysprojektille (Uusien LC-MS-menetelmien kehittäminen Naistenklinikalla) oli haettu lupa aikaisemmin. Työtä varten laadittiin myös sen tekemistä koskeva sopimus, jonka allekirjoittivat Metropolia Ammattikorkeakoulun ja HUSLAB:n edustajat. Työ ei aiheuttanut HUSLAB:lle lisäkustannuksia ja kustannuksia ei syntynyt myöskään Metropolia AMK:lle. Eettisen lautakunnan lupaa ei tarvittu, sillä työssä käytettiin vapaaehtoisten henkilöiden näytteitä, joita käsiteltiin anonymisti. Henkilöiden näytteiden analysoinnissa käytettiin numerointia henkilötietojen sijaan.

### 5.1 Näytteiden keräys tutkimukseen osallistuvilta henkilöiltä

Tutkimukseen pyydettiin terveitä vapaaehtoisia henkilöitä pääasiassa Naistenklinikan laboratorion henkilökunnasta ja Helsingin yliopistosta. Näytteitä kerättiin 35 henkilöltä, jotka jaettiin viiden ruoka-aineryhmän mukaan. Näytteet otettiin 9 millilitran (ml) geelittömiin seerumiputkiin. Tutkimukseen käytettävät ruoka-aineet olivat banaani, ananas, kiivi, tomaatti ja saksanpähkinät ja niitä syötävät määrät on arvioitu siten, että päivittäinen ruoka-aineannos on hieman ”tavanomaista” suurempi. Lähtötason mittaamiseksi henkilöt, jotka osallistuivat tutkimuksiin, välttivät tutkittavia ruoka-aineita kolmen päivän ajan. Syötävät ruoka-ainemäärä ovat seuraavat:

3 banaania

½ tuoretta ananasta

4 kiiviä

4 tomaattia

100 g saksanpähkinöitä

Näytteenotto ajoittui seuraavasti (ryhmä A):

1. Rajoitettiin yllämainittujen ruoka-aineiden ja kaikkien pähkinöiden nauttimista 3 vuorokautta ennen näytteenottoa.
2. Otettiin näyte ennen ruoka-aineiden nauttimista ja ennen klo 9 (0-näyte). Elin-  
tarvikkeet nautittiin vapaasti päivän mittaan.
3. Otettiin näyte seuraavana aamuna (1-näyte).
4. Otettiin näyte kaksi vuorokautta ruoka-aineiden nauttimisen jälkeen (2-näyte).
5. Otettiin näyte kolme vuorokautta ruoka-aineiden nauttimisen jälkeen (3-näyte).

Lisäksi 5HIAA-pitoisuuden vuorokausivaihtelun tutkimista varten tutkimukseen otettiin ryhmä B, johon kuuluvat henkilöt välttivät ohjeiden mukaisesti ruoka-aineiden nauttimista kolmen päivän ajan. Ensimmäisen näytteenoton jälkeen he söivät serotoniinipitoisia ruoka-aineita koko annoksen (esimerkiksi 3 banaania) puolen tunnin kuluessa. Ruoka-aineiden nauttimisen jälkeen ryhmään B kuuluvilta henkilöiltä verinäytteet klo 10, klo 12 ja klo 14. Tämän jälkeen heistä otettiin seuraavina päivinä näytteet kuten muistakin tutkittavista henkilöistä (yllä mainitut kohdat 3-5). Ainoastaan kiiviryhmässä ei ollut yhtään B ryhmään kuuluvaa henkilöä, sillä serotoniinipitoisuus kiivissä on lähes sama kuin tomaatissa. Nautittavat ruoka-aineet kustannettiin tuotekehitysprojektin varoista ja ne jaettiin tutkimukseen osallistuville henkilöille henkilökohtaisesti.

Hedelmien kuoret ja muut mahdollisesti syömättä jääneet osat palautettiin punnittaviksi, jotta pystyttiin laskemaan ruoka-aineiden todellinen syöty määrä. Ruoka-aineita ei saanut keittää ja määriteltyä annosta ei saanut ylittää.

## 5.2 Näytteiden esikäsittely

Näytteet esikäsiteltiin laittamalla ne ensin noin tunniksi pöydälle seisomaan hyytymän muodostumista varten. Tämän jälkeen näytteet laitettiin sentrifugiin kymmeneksi minuutiksi, jonka jälkeen seerumi eroteltiin 10 ml säilöntäaineettomiin muoviputkiin. Sentrifugin kierrosluku oli 3000 rpm ja lämpötila 10 °C. Erottelun jälkeen näytteet jaettiin pieniin lasisiin analyysipulloihin, sillä muoviastioista näytteissä oleva analyyyti saattaa pitkäaikaisessa säilytyksessä haihtua. Edellisessä tuotekehitysprojektissa näytteille oli tehty säilyvyystutkimus.

Näytteet laitettiin heti erottelun jälkeen pakastimeen (-20 °C) odottamaan analyysia. Tutkimusohjekirjan mukaan näytteet voidaan lähettää huoneenlämpöisenä, mutta pidempiaikainen säilytystä varten näytteet tulee laittaa pakkaseen. Näytteet säilytetään ainakin tutkimusprojektin ajan Naistenlinikalla. (HUSLAB. 2013.)

### 5.3 Näytteiden analysointi LC-MS/MS-menetelmällä

Näytteet analysoitiin AB SCIEX:n 4000 QTRAP<sup>®</sup> -laitteistolla, joka on yksi neljästä Naistenklinikan laboratorion LC-MS/MS-laitteistosta. Tässä opinnäytetyössä käytettiin menetelmää, jossa 5-HIAA eristetään seerumista kiintofaasiuutolla ja kvantitoidaan HILIC-kromatografian jälkeen massaspektrometrialla. Analysoinnissa käytettiin Niina Tohmolan 12.4.2013 laatimaa menetelmäohjetta, jonka on tarkastanut Outi Itkonen. Lisäksi AB SCIEX:n 4000 QTRAP<sup>®</sup> -laitteistoon soveltuvat Naistenlinikalla Sirpa Rannan 2005 laatimat ja Seija Mäki-Mikkilän 2007 päivittämät HPLC-massaspektrometrin yleisohjeet.

Kokeellinen osa aloitettiin viikolla 23 tekemällä 5-HIAA-pitoisuuden määrittämiseen tarvittavat liuokset. Määrittäksessä käytettiin kahta ajoliuosta, jotka ovat (A) asetoniiriili (ACN) ja (B) veteen liuotettu ammoniumformiaatti ( $\text{HCOONH}_4$ ). Ammoniumformiaatin pH säädettiin arvoon 3 muurahaishapolla ( $\text{HCOOH}$ ). Muita tarvittavia liuoksia ovat 60 % ACN, 2% muurahaishappo ja 0,2 % muurahaishappo. Lisäksi näytteiden uuttoon tarvitaan eluointiliuosta ja näytteiden määrittämisessä nollanäytettä (blank), jotka molemmat ovat ajoliuosten seoksia ( 5 % $\text{HCOONH}_4$  - 95 % ACN) . Liuokset tehtiin valmiiksi ensimmäistä näytesarjaa edeltävänä päivänä, jotta ne olivat ajoa varten valmiina.

Näytteiden analysointi aloitettiin ensimmäisenä päivänä vaihtamalla HILIC-kolonnei laitteistoon ja poistamalla ilmakuplat HPLC:n letkuista huuhtelemalla sitä ajoliuoksilla muutamien minuuttien ajan. HILIC-kolonnei sisältää stationäärifaasin, jonka pinnalla analyytin ja eluentin erottuminen tapahtuu hydrofiilisten ja sähköisten vuorovaikutusten avulla. Tämän jälkeen asetettiin HPLC:n virtausolosuhteet tasapainotustilaan, jolloin ajoliuosten suhde oli menetelmäohjeen mukainen (95 % A ja 5 % B) virtausnopeus HPLC-laitteistossa oli 0,1 ml/min. Näillä asetuksilla kolonnei tasapainotettiin noin 30 minuuttia, minkä jälkeen tasapainotusta jatkettiin vielä 30 minuuttia virtausnopeudella 0,3 ml/min.

Laitteen toimivuus tarkistettiin tarkastelemalla HPLC:lta massaspektrometrille tulevan näytesuihkun laatua silmämääräisesti ja lisäksi ajettiin tarkistusliuosnäyte, joka sisälsi 5-HIAA-analyyttiä 25 nmol/l. Näytesuihkun tulee olla tasainen ja isoja erillisiä pisaroita ei saa näkyä. Suihkun on suuntauduttava riittävän alas ja sähköiset vetovoimat imevät tutkittavan näytteen kvadrupoleille. Ionilähteen pystyruuvien tulee olla 6 millimetrin ja vaakaruuvien 5 millimetrin kohdalla. Laitteiston kolonniuunin lämpötila on 30 °C ja laitteiston injektointitilavuus 20 µl. Tarkistusajon S/N (signal/noise, signaali/kohina)-suhde tulee olla samaa suuruusluokkaa kuin edellisten ajojen. Kolonnin paine oli 30 bar. Tarkistusajojen parametrit jokaisesta sarjasta on esitetty liitteessä 1 taulukossa 2.

Tasapainottumisen aikana pipetoitiin standardit, laadunohjausnäytteet ja potilasnäytteet kuoppalevyille suunnitellussa numerojärjestyksessä siten, että vakiodien lopussa, sarjan keskellä tietyin välein ja sarjan lopussa olivat kontrollinäytteet. Kaikkiin kaivoihin pipetoitiin lisäksi sisäinen standardi. Tulosten luotettavuutta voitiin laadunohjausnäytteiden avulla seurata sarjan alussa, keskellä ja lopussa. Näytteiden esipuhdistusta varten koottiin mikroelutiolaite, joka koostui pohjalla olevasta jätekaukalosta, välikehikosta, kannesta ja Oasis WAX (weak anion-exchange) -mikroelutiiolevystä, joka perustuu kiintoaasi-nesteuuttoon. Näin analyytti suodattuu muusta näytteestä. Kiintoainepartikkelit ovat hyvin huokoisia, jotta suodattumispinta-ala on mahdollisimman suuri. Laitteistoon kytkettiin imu vesisuihkupumpun avulla ja varmistettiin, että systeemi on tiivis. Tarvittaessa laitteistoa voi painaa kevyesti kädellä tiiviimmäksi. Alipainetta pidettiin arvossa -100 mmHg ja painetta muutettiin tarpeen mukaan.

Esipuhdistus aloitettiin pipetoimalla mikroelutiopatruneihin 12-kanavaisella pipetillä ensin 200 µl metanolia ja sen jälkeen saman verran vettä. Patruunoiden kostuttaminen on tärkeää, sillä tämä mahdollistaa analyytin mahdollisimman hyvän sitoutumisen huokoiseen kiintoaineeseen. Seuraavaksi pipetoitiin vakiot, kontrollit ja näytteet omille paikoilleen mikroelutiiolevylle. Patruunoita pestiin 200 µl 2 % muurahaishappoa, samalla määrällä vettä ja vielä 60 % ACN-liuosta, jotta päästään eroon patruunoihin sitoutumattomista epäpuhtauksista. Viimeisessä sarjassa suoritimme hieman menetelmäkehitystä ja vaihdoimme veden ja muurahaishapon paikkaa, sillä huomasimme muurahaishapon helposti saostavan näytteen proteiinia kiintoaasin pintaan, jolloin mikroelutiopatruneiden tukkeutui helpommin. Ainakin näiden opinnäytetyönäytteiden kohdalla vaihdos oli onnistunut. Jokaisen pipetoinnin välissä oli tärkeää antaa patruunoiden imeytyä kuiviin rauhassa suodatustehokkuuden varmistamiseksi. Näin myös tuli varmistettua, että patruunat eivät tukkeutuneet ja liukset menivät kiintoaasiin oikeassa järjestyksessä.

Pipetointien jälkeen vesihana suljettiin ja annettiin alipaineen poistua. Seuraavaksi vaihdettiin jäteastian paikalle mikrotiiterilevy. Oikean korkeuden varmistamiseksi systeemiin asetettiin korkelevy. Kansi ja mikroelutiolevy laitettiin takaisin ja kytkettiin systeemiin alipaine. Patruunoihin pipetoitiin edelleen 12-lanavaisella pipetillä kaksi kertaa 75 µl eluointiliuosta, joiden välissä annettiin systeemin imeytyä kuiviin. Tämän jälkeen poistettiin alipaine ja annettiin sen poistua. Mikrotiiterilevyn päälle liimattiin polyolefiinisilikonikalvo, jonka läpi näyteneula pääsee ottamaan näytettä. Näin estettiin näytteen haihtuminen.

Mikrotiiterilevy asetettiin HPLC-laitteiston näytteensyöttäjään sille varatulle paikalle ja laitteiston ohjelmistoon laadittiin ja tallennettiin näytelistä. Näytteet ajettiin neljässä sarjassa siten, että viimeinen sarja oli varattu mahdollisille laimennuksille ja uusinoille. Vaikka menetelmä on lineaarinen 10000 nmol/l asti, päädyttiin korkeiden pitoisuuksien laimentamiseen 0,2 % muurahaishapolla, sillä korkein laadunohjausnäyte on pitoisuudeltaan 1000 nmol/l. Näyteajot käynnistettiin päivällä siten, että näytteiden analysointi jatkui yön yli. Laitteisto sammuttaa itsensä automaattisesti, jos näytteitä ole listalla analysoitavana kahteen tuntiin. Näin laitetta ei tarvitse huoltaa tai valvoa öisin.

Näytteiden 5-HIAA -pitoisuudet laskettiin Analyst<sup>®</sup> -ohjelmiston QuantationWizardilla, joka laskee vakiodien kromatogrammeista 5-HIAA- ja IS-piikin pinta-alojen suhteen ja sovittaa standardisuoran, jonka tulisi olla mahdollisimman lineaarinen. Suoran kulmakertoa verrattiin aikaisimpien ajojen suorien kulmakertoimiin. IS-piikin tulee olla oikean korkuinen ja oikealla kohdalla. Näytepiikkiä voidaan integroida tarvittaessa manuaalisesti ja tarkoituksena on, että kaikki piikit ovat mahdollisimman samanlaisia. Piikkien tulee olla yksihuippuisia ja kapeita. Piikit integroi normaalisti laboratoriohoitaja kemistin avustuksella, mutta tässä opinnäytetyössä lopullisen integroinnin teki kemisti tulosten luotettavuuden varmistamiseksi.

Sarjojen analysoinnin jälkeen HPLC:n ja massaspektrometrin yhdistävä letku irrotettiin, HPLC-laitteistoa ja kolonnia huuhdeltiin asetonitriilillä virtausnopeuden ollessa 0,25 ml/min. Näytteet pakastettiin analysoinnin jälkeen ja niitä säilytetään tuotekehitysprojektin loppuun Naistenklinikalla.

#### 5.4 Tulosten käsittely

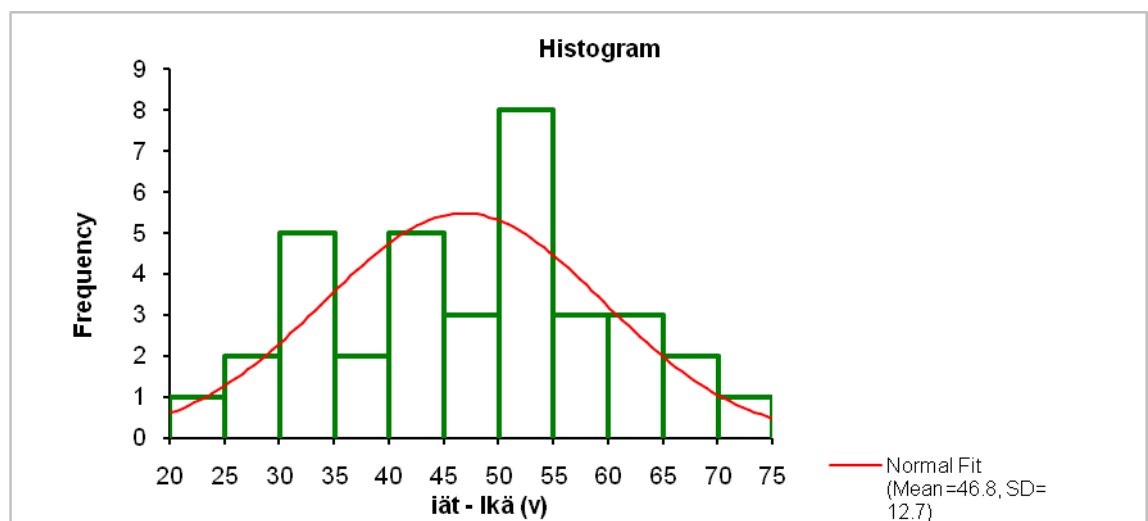


Työstä saatu mittausdata siirrettiin Microsoft® Excel -taulukkolaskentaohjelmaan. Mittausdata on esitetty liitteessä 2. Excel-ohjelman Analyse-it-lisäosan avulla tuloksille laskettiin kaksisuuntaisen t-testin avulla merkitsevyystaso, josta voidaan päätellä, onko seerumin 5HIAA-pitoisuuden muutos eri näytteenottoajankohtina tilastollisesti merkittävä. Ohjelmistoon päädyttiin sen helppokäyttöisyyden vuoksi ja lisäksi toista vaihtoehtoa eli SPSS-ohjelmistoa ei ollut kesällä käytettävissä.

Kaksisuuntaista t-testiä voidaan käyttää vertailtaessa samojen henkilöiden kahta eri tulosta. Tässä työssä vertailtiin koehenkilöiden seerumin 5-HIAA-pitoisuuksia eri ajan-kohtina siten, että 0 h -näytettä verrattiin 24h -, 48 h- ja 72 h- näytteisiin. Nollahypoteesina käytettiin olettamusta, että dieetillä ei ole vaikutusta seerumin 5-HIAA-pitoisuuteen. Nollahypoteesi hylätään, jos laskettu p-arvo on alle 0.05. P-arvo ilmaisee todennäköisyyden sille, että nollahypoteesi on voimassa. Jos p-arvo on alle 0.05, ero on merkitsevä. Todennäköisyys sille, että tulos johtuu pelkästä sattumasta, on alle 5%. (Miller - Miller 2010: 43.)

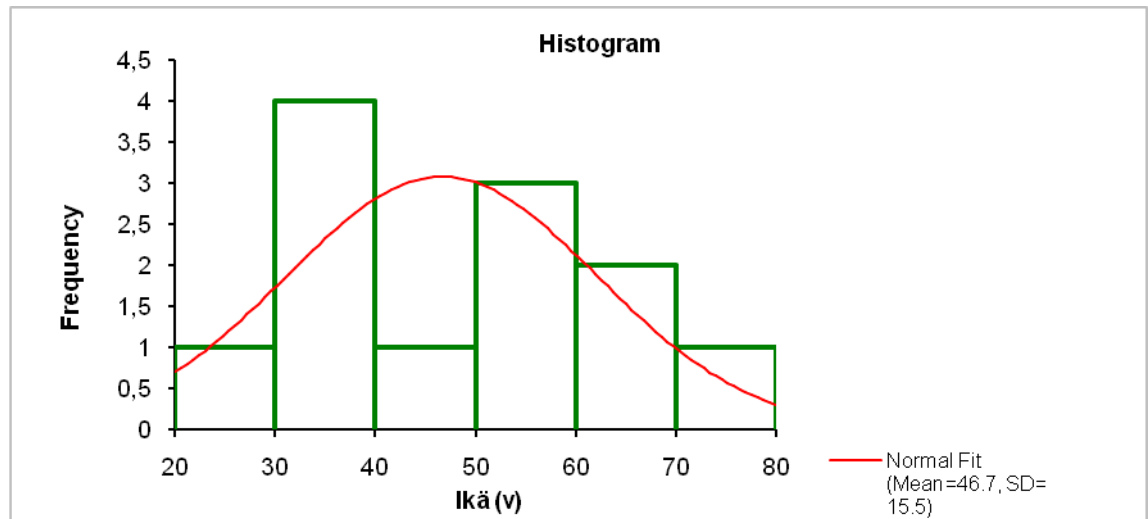
## 6 Työn tulokset

Tutkimukseen osallistui 35 henkilöä ja heidän keski-ikänsä oli 46,8 vuotta ja mediaani 49 vuotta. Keskihajonta oli 12,6 vuotta. Kuviossa 1 on esitetty ikäjakauma histogrammina, johon on sovitettu normaalijakauma. Tämä ryhmä A sisältää myös ryhmän B henkilöt.



Kuvio 1. Tutkimukseen osallistuneiden henkilöiden ikäjakauma (ryhmä A).

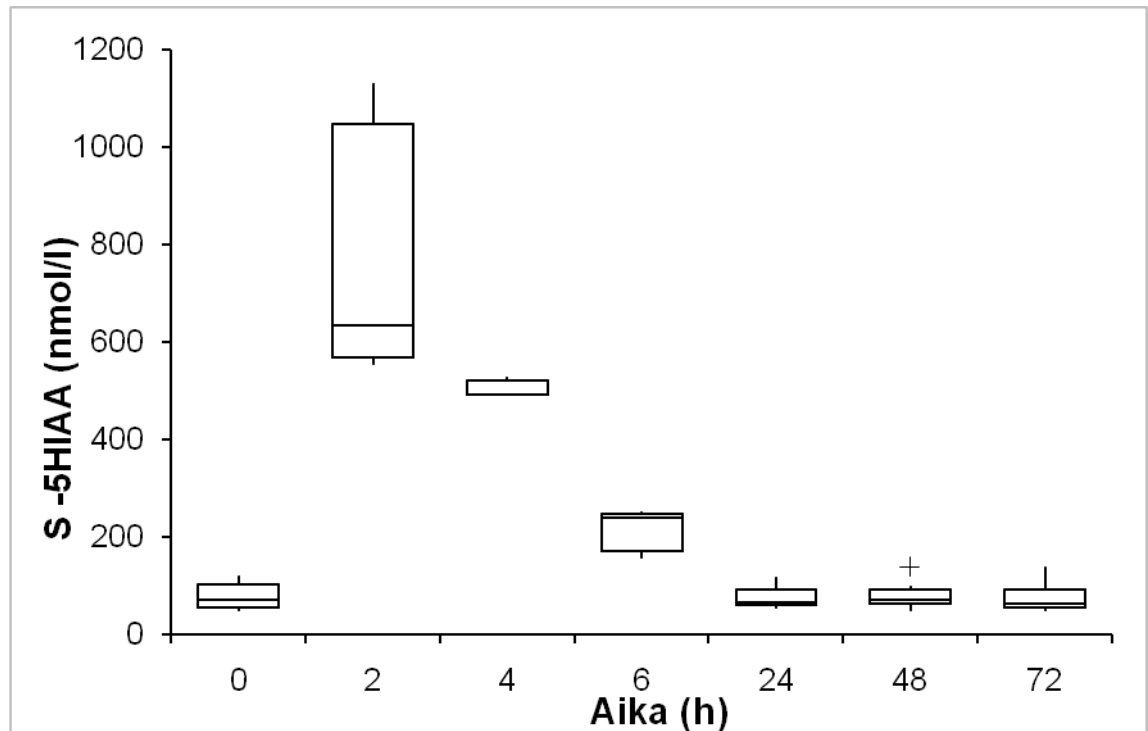
Ryhmään B kuului 12 henkilöä, joiden keski-ikä oli 46,7 vuotta ja mediaani 46,5 vuotta. Keskihajonta oli 15,5 vuotta. Ryhmästä otettiin ensimmäisenä päivänä tiheämmin näytteitä, joten ryhmään B osallistuvilta henkilöiltä edellytettiin näytteenottoon tulemista ensimmäisenä päivänä kahden tunnin välein (0h, 2h, 4h ja 6h). Kuviossa 2 on esitetty ryhmän B ikäjakauma histogrammina, johon on sovitettu normaalijakauma.



Kuvio 2. Ryhmän B ikäjakauma.

### 6.1 Mitatut seerumin 5-HIAA-pitoisuudet

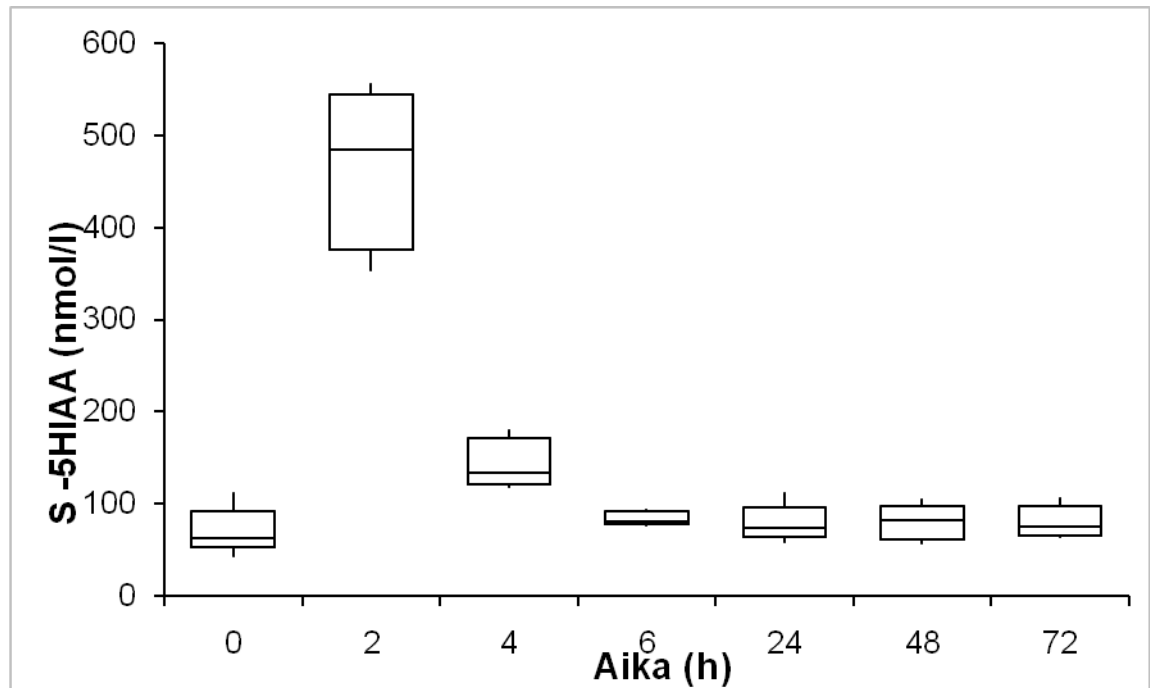
Ensimmäisenä tutkittavista ruoka-aineista voidaan tarkastella banaania. Banaaniryhmään kuului kahdeksan henkilöä, joista kolme kuului ryhmään B. Keskiarvo todellisesta syödyistä banaanimäärästä oli 370 grammaa (304-420 g). Ryhmän tulokset on esitetty kuviossa 3.



Kuvio 3. Banaaniryhmän seerumin 5-HIAA-pitoisuudet (nmol/l) eri ajankohtina. Kuviossa on yhdistetty ryhmät A ja B eli hetkellä 2 h, 4 h ja 6 h n=3. Muina ajankohtina n=8.

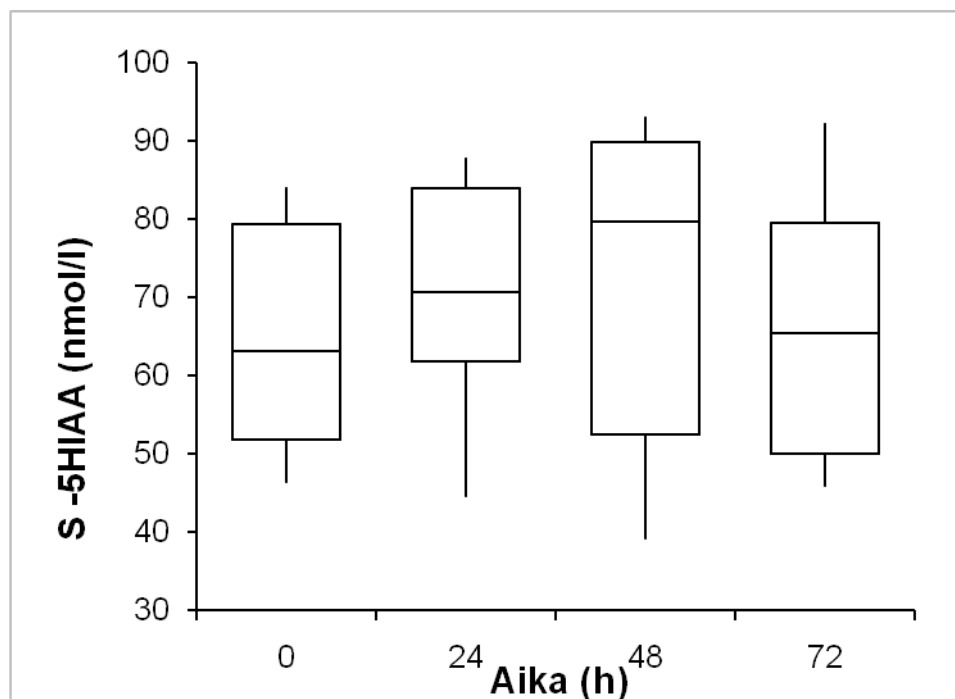
Kuvio on muodostettu siten, laatikoiden sisään mahtuu 50 % normaalijakauman mittapisteistä. Laatikon halkaiseva viiva on mittapisteistä laskettu mediaani. Niin sanotut viikset laatikoiden ylä- ja alapäissä ovat mittapisteet, jotka eivät osu 50 % alueelle, mutta mahtuvat 95 % sisään. Normaalijakauman ulkopuoliset havainnot (outlier) on merkitty +-merkillä.

Seuraavaksi voidaan tarkastella ananasta syöneiden henkilöiden ryhmää, jossa oli 7 henkilöä. Henkilöistä kolme kuului ryhmään B. Tutkimushenkilöiden todellisen syödyn ananasmäärän keskiarvo oli 314 g (246-370 g). Kuviossa 4 on esitetty mitatut seerumin 5-HIAA-pitoisuudet eri ajankohtina.



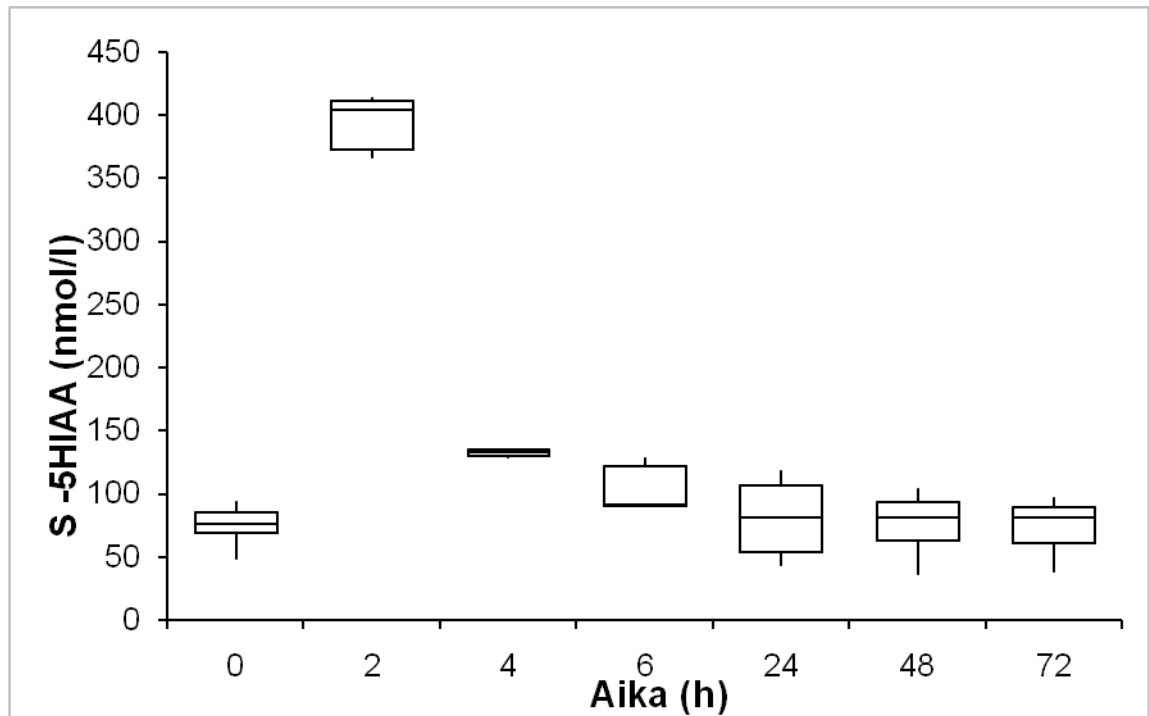
Kuvio 4. Ananasryhmän seerumin 5-HIAA-pitoisuudet (nmol/l) eri ajankohtina. Kuviossa on yhdistetty ryhmät A ja B eli hetkellä 2 h, 4 h ja 6 h n=3. Muina ajankohtina n=7

Kolmantena tutkittavista ruoka-aineista voidaan tarkastella kiiviä syöneiden ryhmää, johon kuului seitsemän henkilöä. Kiiviryhmässä ei ollut ryhmään B kuuluvia henkilöitä. Keskiarvo todellisesta syödystä kiivimäärästä oli 335 grammaa (319-364 g). Ryhmän tulokset on esitetty kuviossa 5.



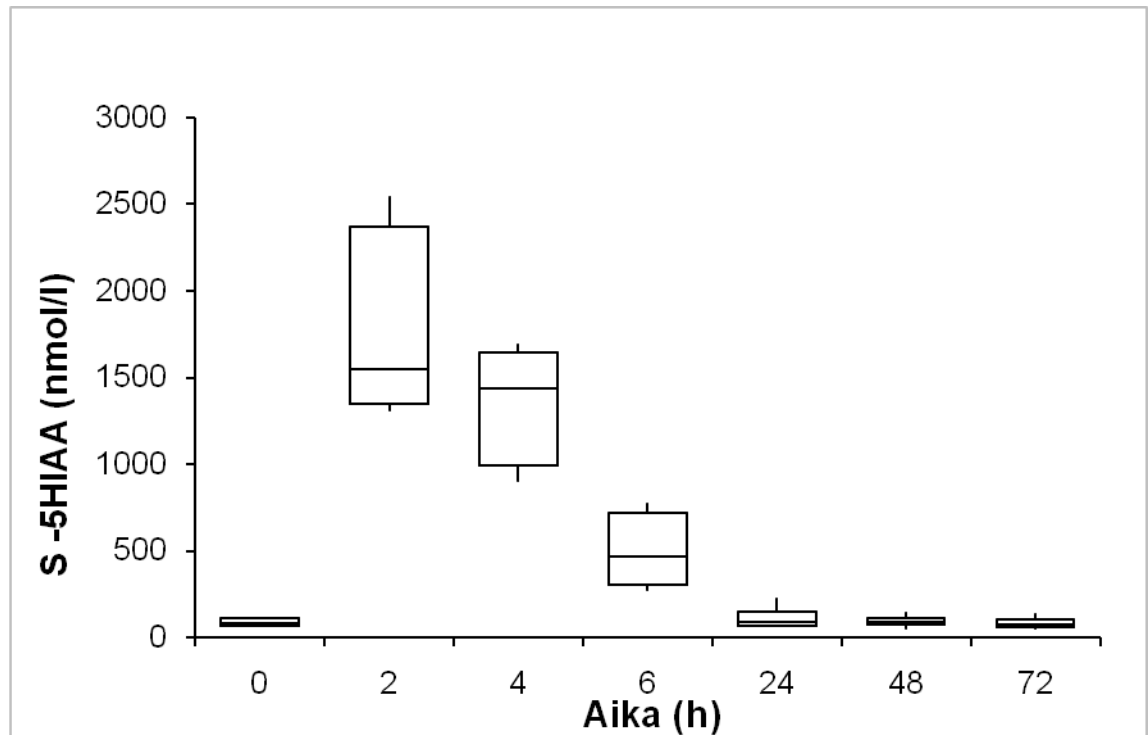
Kuvio 5. Kiiviryhmän seerumin 5-HIAA-pitoisuudet (nmol/l) eri ajankohtina (n=7).

Seuraavaksi voidaan tarkastella tomaattia syöneiden henkilöiden ryhmää, jossa oli kuusi henkilöä. Henkilöistä kolme kuului ryhmään B. Tutkimushenkilöiden todellisen syödyn tomaattimäärän keskiarvo oli 362 g (355-375 g). Ryhmän tulokset on esitetty kuviossa 6.



Kuvio 6. Tomaattiryhmän seerumin 5-HIAA-pitoisuudet (nmol/l) eri ajankohtina. Kuviossa on yhdistetty ryhmät A ja B eli hetkellä 2 h, 4 h ja 6 h  $n=3$ . Ajankohtina 0 h, 24 h ja 48 h  $n=6$  ja ajanjaksolla 72 h  $n=5$ .

Seuraavaksi tarkastellaan pähkinää syöneiden henkilöiden ryhmää, jossa oli seitsemän henkilöä. Ryhmään B kuului kolme tutkimukseen osallistuvaa henkilöä. Keskiarvo todellisesta syödyistä pähkinämäärästä oli 102 grammaa (101-102 g). Ryhmän tulokset on esitetty kuviossa 7.



Kuvio 7. Pähkinäryhmän seerumin 5-HIAA-pitoisuudet (nmol/l) eri ajankohtina. Kuviossa on yhdistetty ryhmät A ja B eli hetkellä 2 h, 4 h ja 6 h n=3. Muina ajankohtina n=7

## 6.2 Parillisen t-testin tulokset

Kaksisuuntaisessa t-testissä verrattiin lähtöarvoa (0 h) yhden, kahden ja kolmen päivän (24 h, 48 h ja 72 h) 5-HIAA-pitoisuuksiin seerumissa. Testissä on käytetty 95 % normaalijakaumaa. Jos testisuureen p-arvo arvo on pienempi kuin 0,05, on 5-HIAA:n pitoisuus seerumissa muuttunut tilastollisesti merkitsevästi. Kaksisuuntaisen t-testin tulokset on esitetty taulukossa 1. Taulukossa on yhdistetty kaikki ruoka-aineiden p-arvot eri ajanjaksoina ja lisäksi esitetty käytetty vapausaste (n-1).

Taulukko 1. Kaksisuuntaisella t-testillä lasketut p-arvot ja käytetyt vapausasteet.

	vapausasteet	0-24 h	0-48 h	0-72 h
<b>banaani</b>	7	0,8026	0,8755	0,6462
<b>ananas</b>	6	0,2199	0,2427	0,3013
<b>kiivi</b>	6	0,1047	0,0782	0,6820
<b>tomaatti</b>	4-5	0,6564	0,9079	0,5813
<b>pähkinä</b>	6	0,1549	0,7800	0,4689

Tomaattiryhmässä käytetyt vapausasteet, jäivät pienemmäksi, koska tutkittavaryhmä jäi pienemmäksi. Tomaattiryhmässä vapausasteet ensimmäisessä (0-24 h) ja toisessa (0-48 h) ajanjaksossa olivat viisi ja viimeisessä ajanjaksossa (0-72 h) neljä. Seuraavassa luvussa käsitellään tuloksista tehtyjä johtopäätöksiä.

## 7 Johtopäätökset ja pohdinta

Tämän työn tavoitteena oli selvittää, miten serotoniinipitoiset ruoka-aineet vaikuttavat seerumin 5-HIAA-pitoisuuteen ja kuinka kauan vaikutus kestää. Opinnäytetyön tavoitteet täyttyivät hyvin ja tulokset olivat selkeitä. Tuloksista voidaan päätellä, että vuorokauden sisällä seerumin 5-HIAA tulokset nousivat nopeasti ruoka-aineiden nauttimisen jälkeen. Alkuoletuksena oli, että pitoisuus nousisi ehkä vasta vuorokauden jälkeen. Lopputuloksena kuitenkin oli, että seerumin 5-HIAA pitoisuus nousi kahdessa tunnissa ruoka-aineiden nauttimisen jälkeen. Pitoisuudet nousivat reilusti yli viitearvon (123 nmol/l), josta voidaan päätellä, että serotoniinipitoiset ruoka-aineet todella häiritsevät tutkimusta. Kuitenkin pitoisuudet laskevat normaalitasolle jo ensimmäisen vuorokauden jälkeen. Tästä voidaan tehdä johtopäätös, että kolmen vuorokauden dieetti on tarpeeton ja vain serotoniinipitoisten ruoka-aineiden välttely näytteenottopäivänä riittää.

Minkään ruoka-aineen kohdalla p-arvot eivät olleet alle 0,05. Esimerkiksi pienin p-arvoista eli kiiviryhmän arvo 0,0782 (0-48 h) on yli arvon 0,05 ja linjassa muiden tulosten kanssa. Testiryhmän koko oli tämän tyyppiseen tutkimukseen sopiva, sillä potilasnäytteiden saaminen on haastavaa. Tutkimus vaati siihen osallistuvilta henkilöiltä tarkkaa dieettiä, mikä osoittautui haastavaksi. Yllättävän moni ruoka sisältää tomaattia tai pähkinää, jonka vuoksi jatkoarvioinnissa on se, muutetaanko tutkimus kokonaan paasto tutkimukseksi. Tämän työn jälkeen ohjeistuksen muuttaminen siirtyy tutkimuksesta vastaavien lääkäreiden arvioitavaksi.

Tutkimuksen koejärjestely toimi erittäin hyvin. Aluksi oli tarkoitus ottaa näytteitä vain vuorokauden välein, mutta sopivan tutkimusryhmän (B) löydyttyä, päätettiin tästä ryhmästä ottaa näytteitä tiheämmin. Ilman ryhmää B 5-HIAA-pitoisuuksien nousu seerumissa ei olisi näkynyt lainkaan. Tutkimusryhmien koostumukset olivat myös sopivia, sillä molemmissa ryhmissä oli sekä miehiä että naisia ja ikäryhmiä oli useita. Koejärjestely oli huolellisesti suunniteltu, mikä helpotti toteutusta huomattavasti. Osallistujat oli huolellisesti informoitu ja heille oli laadittu ohjeistus, joka jaettiin kirjallisesti jokaiselle. Näytteet käsiteltiin luottamuksellisesti ja tietosuojaa kunnioittaen. Jokainen tutkimukseen osallistunut sai tulokset omista näytteistään sekä oman ryhmän tuloksista piirretyn käyrän. Koska osallistujat olivat vapaaehtoisia ja kyseessä eivät olleet potilasnäytteet, ei eettisen lautakunnan erillistä lupaa tutkimukselle tarvittu.

Näytteiden analysointi oli haastavaa ja mielenkiintoista. Suurempia virhelähteitä ei ilmaantunut siitä huolimatta, että tekijällä ei ollut menetelmästä aikaisempaa kokemusta. Tarkistusajopiikit olivat selkeitä ja niiden korkeus ja S/N-suhteet olivat hyvin rinnastettavissa aikaisempiin ajoihin. Tarkistusajojen ja vakiosuorien tiedot on esitetty liitteessä 2. Kontrollit olivat hieman korkeita edellisiin ajoihin verrattuna, mutta toisaalta käytössä olivat uudet vakio-liuokset, joita ei rutiinissa ollut vielä käytetty. Myös tekijän kokemattomuudella oli tässä varmasti osuutensa, sillä työ vaatii suurta tarkkuutta ja kokemus menetelmästä on hyödyksi. Myös liuokset vaihtuivat ensimmäisen ja toisen sarjan välillä, sillä liuosten kulutusta ei huomattu arvioida ennen ensimmäisen sarjan analysointia. 5.6. analysoidusta sarjasta jätettiin yksi vakiosuoran piste huomioimatta, jotta vakiosuoran lineaarisuus olisi mahdollisimman hyvä. Vakiosuoran kulmakertoimet poikkesivat hieman aikaisemmista suorista, mutta olivat hyväksyttävällä tasolla.

Tulosten käsittelyyn kuului mitattujen seerumin 5-HIAA-piikkien tarkastelu ja integrointi tarvittaessa. Tarkastelussa verrattiin sisäisen standardin piikkiä ja analyytin antamaa piikkiä toisiinsa sekä pyrittiin vakiomaan integrointi tapa näytteiden välillä siten, että koko sarjassa on samanlainen integrointityyli. Tulosten luotettavuuden takaamiseksi lopullisen integroinnin teki kemisti, koska hänellä on huomattava kokemus massaspektrometrin antamien piikkien tarkastelusta. Toisaalta oli hyvä, että sama ihminen teki piikkien integroinnin, jotta käsiala ei vaihdu näytteiden tai sarjojen välillä. Piikkien integrointi vaatii runsaasti kokemusta ja henkilön tulee säilyttää sama käsiala sarjasta toiseen. Aloittelijalle tämä voi olla haastavaa.



Työhön kuului myös tulosten analysointi tilastollisesti. Valittu menetelmä parittainen t-testi soveltui hyvin tämän tyyppisen tulossarjan analysointiin ja myös Microsoft® Excelin valinta oli perusteltua, sillä kesän aikana käytössä ei ollut SPSS-ohjelmistoa. Lisäksi oli tarkoituksenmukaista laskea tähän opinnäytetyöhön p-arvot vain vuokausien välillä, sillä pitoisuudet vuokauden sisällä ylittävät joka tapauksessa viitearvon (123 nmol/l) ja näin serotoniinipitoisia ruoka-aineita joudutaan välttelemään ainakin vuorokauden ajan. Tilastollista volyyymia voisi aina kasvattaa tietysti lisäämällä tutkimushenkilöiden määrää, mutta tutkimukseen käytettävään aikaan ja resursseihin nähden tutkittavan ryhmän koko oli riittävän hyvä. Toisaalta tutkimukseen ei voitu dieetin takia rekrytoida ihmisiä lyhyellä varoitusaajalla.

Käytössä oleva seerumin 5-HIAA-menetelmä on ympäristöystävällinen, sillä käytettävät kemikaalit voidaan hävittää viemäriin ja kemikaalimäärät ovat vähäisiä. Massaspektrometrialaitteisto myös säästää energiaa, sillä laitteistolla voidaan analysoida suuria sarjoja ja massaspektrometri osaa käytön jälkeen sammuttaa itsensä. Ergonomia monikanavapipetillä työskennellessä on tärkeää, sillä pipetointi saattaa kuluttaa käden ja etenkin ranteiden niveliä.

Potilaan kannalta seerumista määritetty 5-HIAA ilman usean päivän rajoittavia dieettiä on helpottava ja lisää tuloksien luotettavuutta. Myös näytteenottajan ja lääkärin työ helpottuu, kun monimutkainen ohjeistus selkiytyy. Tulokset ovat hyvin hyödynnettävissä ja tulokset tulevat olemaan osa artikkelia, joka pyritään julkaisemaan kliinisen kemian alan kansainvälisessä lehdessä. Tulokset julkaistiin myös Naistenklinikalla toimipaikkakoulutuksena PowerPoint-esityksen muodossa.

Tässä työssä toteutuivat bioanalytiikan eettiset periaatteet. Tutkimukseen osallistuvilta henkilöiltä hankittiin vain tutkimuksen kannalta välttämättömät tiedot, joita olivat esimerkiksi dieetin noudattaminen ja ikä. Tutkimukseen osallistuvia henkilöitä informoitiin erillisellä ohjeella tutkimuksen kulusta ja osallistuminen oli vapaaehtoista. Lisäksi kaikki henkilöt saivat tietää omat tuloksensa, jotka jaettiin heille yksilöidyillä papereilla. Tutkimuksen laatua ja luotettavuutta seurattiin kaikissa vaiheissa. Kaikkea tutkimukseen liittyvää materiaalia käsiteltiin tutkimukseen osallistuvien henkilöiden yksityisyyttä ja oikeuksia kunnioittaen. Lisäksi tutkimuksessa pyrittiin edistämään yksilön ja väestön terveyttä siten, että potilaat saisivat mahdollisimman hyvää hoitoa.

Opinnäytetyö on ollut haastava ja mielenkiintoinen projekti, joka on syventänyt kliinisen biokemian osaamistani. Vaikeinta oli aikataulussa pysyminen, sillä se suunniteltiin melko tiukaksi. Kirjoitustyö kesätöiden lisäksi oli voimavaroja vievää. Huomasin, että huolellinen projektin suunnittelu kannattaa ja näin opinnäytetyön tekeminen onnistui tiukallakin aikataululla. Olen lisäksi oppinut, kuinka LC-MS/MS-laitteistolla työskennellään, josta on varmasti hyötyä tulevaisuudessa.

Haluan lopuksi kiittää Naistenklinikan henkilökuntaa ja erityisesti kemisti Outi Itkosta ja väitöskirjatyöntekijä Niina Tohmolaa siitä, että annoitte minun olla osa projektianne. Perehdytite minut työn tekemiseen ja sain aina apua, kun sitä tarvitsin. Lisäksi haluan kiittää Metropolia Ammattikorkeakoulusta bioanalytiikan lehtori Tuula Kurkista tuesta ja opastuksesta opinnäytetyöprosessissa. Kiitän myös muita projektiin osallistuneita ja perhettäni, joka on tehnyt tästä uudesta urasta bioanalytiikan parissa mahdollista.

## Lähteet

Ardrey, Robert (Bob) E 2003. Liquid chromatography - mass spectrometry: an introduction. Huddersfield, United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd.

Arsenault, Joseph C 2012. SPE Solid-phase extraction. USA: Waters Corporation

BroadInstitute of MIT and Harvard 2013.MRM (Multiple reaction Monitoring).<<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/platforms/proteomics/mrm-multiple-reaction-monitoring>>. Verkko-dokumentti. Luettu 1.3.2013.

Elolähde, Arja - Keijama, Jonna 2011. Seerumin MOMA, HVA ja 5-HIAA LC-MS/MS-menetelmän osavaliointi. Opinnäytetyö.Helsinki: Metropolia Ammattikorkeakoulu.

Garrido, Maria - Espino, Javier, Gonzales-Gomez, David - Lozano, Mercedes- Barriga, Carmen - Paredes, Sergio D, Rodriguez, Ana B. 2012. The consumption of a Jerte Valley cherry product in humans enhances mood, and increases 5-hydroxyindoleacetic acid but reduces cortisol levels in urine. Experimental Gerontology 47.573-580

Huang, Xin - Mazza, Giuseppe 2011. Simultaneous analysis of serotonin, melatonin, piceid and reveratrol in fruits using liquid chromatography tandem mass spectrometry.Journal of Chromatography A 1218. 3890-3899.

Hydroksi-indolyliasettaatti (5-), seerumista 2013. Tutkimusohjekirja. HUSLAB, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti. <<http://huslab.fi/ohjekirja/6262.html>>. Luettu 18.2.2013.

Itkonen, Outi 2012.Modernit massaspektrometriset tekniikat kliinisessä laboratoriossa. Moodi 2. 262-268.

Jaarinen, Soili - Niiranen, Jukka 2008. Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki: Edita Prima Oy.

Joensuu, Heikki - Roberts, Peter J. - Lyly, Teppo - Tenhunen, Mikko (toim.) 2007.Syöpätaudit. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim

Ketola, Raimo - Kostiainen, Risto- Kotiaho, Tapio - Vainiotalo, Pirjo (toim.) 2010. Massaspektrometrian perusteet. Suomen Massaspektrometrian Seura ry. Helsinki: Haka-paino.

Miller, Adrien G. - Brown, Heather - Degg, Tim - Allen, Keith- Keevil, Brian G. 2010. Measurement of plasma 5-hydroxyindole acetic acid by liquid chromatography tandem mass spectrometry - Comparison with HPLC methodology.Journal of Chromatography B 878.695-696.

Miller, James N. - Miller, Jane C. 2010. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry.United Kingdom: AshfordColour Press Ltd.

## Tarkistusajot ja vakiosuorat

Taulukko 2. Tarkistusajojen S/N-suhteet ja piikkien intensiteetit sekä vakiosuorien yhtälöt

päivämäärä	S/N-suhde	piikin intensiteetti (x10 <sup>3</sup> )	vakiosuoran yhtälö
4.6.2013	96,5	7,1	$y=0,00185x + 0,0159$
5.6.2013	270,7	26,0	$y=0,00171x + 0,000891$
6.6.2013	127,1	15,0	$y=0,00166x + 0,00358$
7.6.2013	128,0	11,0	$y=0,00131x + 0,0127$

### Mitatut seerumin 5-HIAA-pitoisuudet

Taulukko 3. Mitatut seerumin 5-HIAA-pitoisuudet (4.6.2013)

SampleName	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Peak Height (cps)	IS Peak Area (counts)	IS Peak Height (cps)	Calculated Concentration (nmol/l)	Accuracy (%)
STD 10 nM	7520	1540	216000	35400	10,3	103
STD 50 nM	20900	3500	220000	33300	42,8	85,5
STD 100 nM	41500	6020	212000	32200	97,3	97,3
STD 500 nM	214000	32100	215000	33900	529	106
STD 1000 nM	406000	60300	201000	29600	1080	108
5HIAA1	13800	2110	99500	14700	66,3	N/A
5HIAA2	93600	13900	79400	12500	629	N/A
101	14700	2810	85200	12300	84,8	N/A
102	81100	11500	104000	14400	413	N/A
103	29900	4590	114000	15400	133	N/A
104	18400	2740	100000	13000	90,8	N/A
105	22100	3150	94400	12300	118	N/A
106	17200	2740	95500	14700	89,1	N/A
107	2720	793	7690	1020	183	N/A
108	18600	2510	116000	16300	78,4	N/A
109	96300	13900	92300	11900	556	N/A
110	37400	5060	108000	14500	179	N/A
111	16200	2570	103000	14400	76,8	N/A
112	14000	1920	92700	13600	73,4	N/A
113	13700	2170	104000	14300	62,5	N/A
114	12200	1780	89700	13800	65,3	N/A
115	14000	2030	89300	14600	76,6	N/A
116	58300	9090	76400	11600	404	N/A
117	27100	4030	102000	13200	135	N/A
118	15200	2620	82800	11900	90,7	N/A
119	11100	1690	94500	14100	55	N/A
120	15200	2100	110000	15500	65,8	N/A
121	17400	2140	89900	14600	96,3	N/A
5HIAA1	21000	2550	106000	15600	98,8	N/A
122	24200	3000	104000	13100	117	N/A
123	94000	14500	90100	12000	556	N/A
124	116000	15500	117000	16600	526	N/A
125	44200	6620	96100	13700	240	N/A
126	19400	2530	102000	13900	94,5	N/A
127	20400	2500	105000	13400	96	N/A

128	19600	2840	101000	14300	96,5	N/A
129	20900	2890	95900	14600	109	N/A
130	370000	53000	96100	13900	2070	N/A
131	287000	40200	86400	11500	1790	N/A
132	117000	16500	81600	11900	768	N/A
133	20900	2330	70300	10500	152	N/A
134	21800	2590	80900	11800	137	N/A
135	20100	2570	77700	12000	131	N/A
136	23200	2500	122000	15000	94,2	N/A
137	72000	9900	107000	14700	354	N/A
138	21800	2630	93200	11900	118	N/A
139	16500	2110	87500	12800	93,4	N/A
140	20400	2480	92100	11800	111	N/A
141	19600	3000	94300	12400	104	N/A
142	19700	2490	101000	13500	96,8	N/A
5HIAA2	95200	15000	77000	12300	661	N/A
143	20500	3000	95000	12300	108	N/A
144	224000	30200	91500	11900	1320	N/A
145	80100	11700	86600	11700	492	N/A
146	36300	5050	76100	10700	250	N/A
147	23100	3050	100000	13700	116	N/A
148	24300	2480	90100	11200	138	N/A
149	27500	2870	101000	12500	138	N/A
150	22500	2360	102000	13500	111	N/A
151	532000	77100	96300	12900	2980	N/A
152	327000	44900	95800	12000	1840	N/A
153	87100	11300	99900	12800	463	N/A
154	23000	3050	93600	12200	125	N/A
155	19600	2580	90400	11300	109	N/A
156	20600	2550	98200	13400	105	N/A
5HIAA1	11500	1700	74500	10900	74,9	N/A
5HIAA2	105000	13700	88400	12000	635	N/A

Taulukko 4. Mitatut seerumin 5-HIAA-pitoisuudet (5.6.2013)

SampleName	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Peak Height (cps)	IS Peak Area (counts)	IS Peak Height (cps)	CalculatedConcentration (nmol/l)	Accuracy (%)
STD 10 nM	5,23E+03	9,51E+02	2,89E+05	5,26E+04	10	100
STD 50 nM	2,13E+04	3,44E+03	2,96E+05	4,69E+04	41,6	N/A
STD 100 nM	5,12E+04	8,52E+03	3,09E+05	5,31E+04	96,1	96,1
STD 500 nM	1,51E+05	2,12E+04	1,78E+05	2,53E+04	494	98,9
STD 1000 nM	3,48E+05	5,12E+04	1,94E+05	2,75E+04	1050	105
5HIAA1	1,27E+04	2,53E+03	1,13E+05	1,99E+04	65	N/A
5HIAA2	1,35E+05	2,48E+04	1,28E+05	2,16E+04	613	N/A
157	1,89E+04	3,73E+03	1,53E+05	2,34E+04	71,2	N/A
158	8,00E+04	1,27E+04	1,27E+05	1,81E+04	366	N/A
159	3,30E+04	6,12E+03	1,48E+05	2,29E+04	129	N/A
160	2,50E+04	3,91E+03	1,13E+05	1,45E+04	128	N/A
161	2,42E+04	3,82E+03	1,34E+05	1,90E+04	105	N/A
162	1,87E+04	3,16E+03	1,06E+05	1,61E+04	103	N/A
163	1,29E+04	4,24E+03	1,03E+05	2,01E+04	72,5	N/A
164	9,98E+03	1,87E+03	7,78E+04	1,37E+04	74,4	N/A
165	7,91E+04	1,32E+04	7,27E+04	1,15E+04	634	N/A
166	5,92E+04	1,02E+04	7,03E+04	1,12E+04	491	N/A
167	1,89E+04	3,52E+03	6,97E+04	1,13E+04	158	N/A
168	6,96E+03	1,51E+03	6,17E+04	1,10E+04	65,3	N/A
169	1,00E+04	2,47E+03	8,75E+04	1,37E+04	66,2	N/A
170	1,35E+04	2,67E+03	1,30E+05	2,07E+04	59,9	N/A
171	1,04E+04	1,87E+03	1,14E+05	1,71E+04	52,8	N/A

172	7,81E+0 4	1,23E+0 4	9,39E+0 4	1,41E+0 4	485	N/A
173	2,67E+0 4	5,12E+0 3	1,16E+0 5	1,97E+0 4	134	N/A
174	9,95E+0 3	3,48E+0 3	7,08E+0 4	2,09E+0 4	81,4	N/A
175	1,15E+0 4	2,16E+0 3	1,01E+0 5	1,28E+0 4	66,1	N/A
176	5,09E+0 3	1,97E+0 3	4,81E+0 4	1,26E+0 4	61,2	N/A
177	7,96E+0 3	2,24E+0 3	6,38E+0 4	1,44E+0 4	72,2	N/A
178	1,22E+0 4	1,88E+0 3	9,56E+0 4	1,44E+0 4	73,7	N/A
179	1,52E+0 5	4,66E+0 4	6,50E+0 4	1,62E+0 4	1360	N/A
180	1,59E+0 5	2,33E+0 4	9,11E+0 4	1,28E+0 4	1020	N/A
181	3,79E+0 4	6,18E+0 3	8,14E+0 4	1,19E+0 4	271	N/A
182	9,11E+0 3	1,69E+0 3	7,77E+0 4	1,15E+0 4	67,9	N/A
5HIAA1	6,95E+0 3	1,42E+0 3	6,53E+0 4	9,26E+0 3	61,5	N/A
183	1,01E+0 4	1,76E+0 3	8,50E+0 4	1,16E+0 4	69,1	N/A
184	1,32E+0 4	2,11E+0 3	1,02E+0 5	1,41E+0 4	74,8	N/A
185	3,87E+0 3	7,18E+0 2	3,81E+0 4	5,59E+0 3	58,7	N/A
186	6,97E+0 3	2,14E+0 3	4,68E+0 4	1,55E+0 4	86,4	N/A
187	8,80E+0 3	1,27E+0 3	6,01E+0 4	7,42E+0 3	84,9	N/A
188	6,53E+0 3	1,21E+0 3	7,27E+0 4	9,82E+0 3	51,9	N/A
189	1,54E+0 4	2,19E+0 3	1,14E+0 5	1,40E+0 4	78,4	N/A
190	1,09E+0 4	1,89E+0 3	7,32E+0 4	1,08E+0 4	86,4	N/A
191	8,80E+0 3	2,34E+0 3	5,73E+0 4	1,44E+0 4	89,1	N/A
192	6,76E+0 3	1,37E+0 3	7,05E+0 4	9,04E+0 3	55,4	N/A
193	1,07E+0 4	1,59E+0 3	9,83E+0 4	1,41E+0 4	62,8	N/A
194	9,17E+0 3	1,58E+0 3	7,29E+0 4	9,82E+0 3	72,9	N/A
195	1,07E+0 4	1,62E+0 3	8,52E+0 4	1,09E+0 4	72,5	N/A
196	1,38E+0 4	2,20E+0 3	1,14E+0 5	1,70E+0 4	70	N/A



197	1,61E+0 4	2,68E+0 3	8,32E+0 4	1,12E+0 4	112	N/A
198	3,45E+0 4	4,81E+0 3	8,94E+0 4	1,15E+0 4	225	N/A
199	3,62E+0 3	4,86E+0 2	7,04E+0 3	1,47E+0 3	299	N/A
200	1,25E+0 4	2,02E+0 3	7,89E+0 4	1,08E+0 4	91,7	N/A
201	1,66E+0 4	2,49E+0 3	9,91E+0 4	1,24E+0 4	97,3	N/A
202	8,14E+0 3	1,24E+0 3	8,17E+0 4	1,04E+0 4	57,6	N/A
203	9,12E+0 3	1,56E+0 3	7,93E+0 4	1,20E+0 4	66,5	N/A
5HIAA2	7,67E+0 4	1,64E+0 4	8,18E+0 4	1,37E+0 4	547	N/A
204	9,11E+0 3	2,10E+0 3	6,26E+0 4	1,45E+0 4	84,3	N/A
205	6,48E+0 3	1,01E+0 3	7,05E+0 4	9,50E+0 3	53,1	N/A
206	7,93E+0 3	1,23E+0 3	7,42E+0 4	1,04E+0 4	61,8	N/A
207	2,77E+0 3	5,81E+0 2	2,19E+0 4	3,07E+0 3	73,1	N/A
208	8,49E+0 3	1,37E+0 3	8,97E+0 4	1,28E+0 4	54,7	N/A
209	8,79E+0 3	2,31E+0 3	8,05E+0 4	1,48E+0 4	63,1	N/A
210	5,81E+0 3	9,70E+0 2	4,29E+0 4	6,10E+0 3	78,5	N/A
211	1,04E+0 4	3,89E+0 3	7,55E+0 4	2,45E+0 4	79,7	N/A
212	9,68E+0 3	1,26E+0 3	7,14E+0 4	8,96E+0 3	78,5	N/A
213	5,82E+0 3	8,73E+0 2	7,23E+0 4	9,32E+0 3	46,4	N/A
214	8,95E+0 3	1,10E+0 3	8,33E+0 4	1,07E+0 4	62,2	N/A
215	8,43E+0 3	1,39E+0 3	1,24E+0 5	1,61E+0 4	39,3	N/A
216	8,90E+0 3	1,33E+0 3	1,12E+0 5	1,39E+0 4	46	N/A
5HIAA1	9,95E+0 3	1,74E+0 3	9,79E+0 4	1,40E+0 4	58,8	N/A
5HIAA2	1,07E+0 5	1,32E+0 4	9,61E+0 4	1,11E+0 4	647	N/A

Taulukko 5. Mitatut seerumin 5-HIAA-pitoisuudet (6.6.2013)

SampleName	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Peak Height (cps)	IS Peak Area (counts)	IS Peak Height (cps)	CalculatedConcentration (nmol/l)	Accuracy (%)
STD 10 nM	5,89E+03	1,05E+03	2,87E+05	5,26E+04	10,2	102
STD 50 nM	2,24E+04	3,53E+03	2,94E+05	4,70E+04	43,8	87,6
STD 100 nM	5,24E+04	8,60E+03	3,07E+05	5,31E+04	101	101
STD 500 nM	1,53E+05	2,14E+04	1,77E+05	2,53E+04	521	104
STD 1000 nM	3,38E+05	5,11E+04	1,94E+05	2,76E+04	1050	105
5HIAA1	9,80E+03	3,07E+03	5,09E+04	1,88E+04	114	N/A
5HIAA2	1,33E+05	1,73E+04	1,03E+05	1,42E+04	780	N/A
217	2,84E+04	4,28E+03	1,31E+05	1,72E+04	111	N/A
218	2,57E+04	3,62E+03	1,54E+05	1,87E+04	98,5	N/A
219	2,02E+04	3,22E+03	1,20E+05	1,34E+04	98,9	N/A
220	2,78E+04	4,35E+03	1,55E+05	2,28E+04	106	N/A
221	1,89E+04	3,36E+03	1,55E+05	2,27E+04	71,4	N/A
STD 100 nM	2,75E+04	3,56E+03	1,93E+05	2,30E+04	83,9	N/A
5HIAA1	8,31E+03	2,45E+03	4,05E+04	1,68E+04	122	N/A
221	1,35E+04	2,97E+03	1,05E+05	1,50E+04	75,7	N/A
222	9,12E+03	2,12E+03	1,20E+05	1,72E+04	43,9	N/A
223	7,54E+03	2,10E+03	1,18E+05	1,64E+04	36,3	N/A
224	8,34E+03	1,92E+03	1,25E+05	1,44E+04	38,3	N/A
225	1,88E+04	2,92E+03	1,18E+05	1,47E+04	93,8	N/A
226	1,12E+04	2,32E+03	7,28E+04	8,79E+03	90,6	N/A
227	1,90E+04	2,97E+03	1,22E+05	1,52E+04	91,9	N/A
228	1,83E+04	3,07E+03	1,25E+05	1,60E+04	85,9	N/A
229	1,15E+04	2,47E+03	1,51E+05	1,75E+04	43,8	N/A

	4	3	5	4		
230	1,22E+0 4	2,49E+0 3	1,13E+0 5	1,38E+0 4	63,1	N/A
231	1,44E+0 4	2,37E+0 3	1,47E+0 5	1,64E+0 4	56,9	N/A
232	1,48E+0 4	2,88E+0 3	1,36E+0 5	1,66E+0 4	63,5	N/A
237	1,66E+0 4	3,25E+0 3	1,22E+0 5	1,50E+0 4	79,8	N/A
238	1,35E+0 4	4,50E+0 3	9,04E+0 4	3,30E+0 4	87,8	N/A
239	1,98E+0 4	3,12E+0 3	1,29E+0 5	1,58E+0 4	91,1	N/A
240	1,58E+0 4	2,37E+0 3	1,41E+0 5	1,66E+0 4	65,5	N/A
241	1,01E+0 4	2,38E+0 3	1,20E+0 5	1,68E+0 4	48,6	N/A
242	1,34E+0 4	2,41E+0 3	1,10E+0 5	1,35E+0 4	71,2	N/A
243	1,61E+0 4	2,62E+0 3	1,30E+0 5	1,52E+0 4	72,2	N/A
245	1,26E+0 4	2,68E+0 3	1,17E+0 5	1,72E+0 4	63	N/A
246	1,21E+0 4	2,46E+0 3	1,20E+0 5	1,50E+0 4	58,6	N/A
247	1,97E+0 4	2,90E+0 3	1,24E+0 5	1,38E+0 4	93,9	N/A
5HIAA1	1,37E+0 4	2,57E+0 3	1,04E+0 5	1,25E+0 4	77,5	N/A
249	1,76E+0 4	2,78E+0 3	1,33E+0 5	1,54E+0 4	77,3	N/A
250	1,55E+0 4	2,67E+0 3	1,13E+0 5	1,38E+0 4	80,1	N/A
251	1,90E+0 4	3,28E+0 3	1,33E+0 5	1,65E+0 4	83,9	N/A
252	1,97E+0 4	3,09E+0 3	1,45E+0 5	1,75E+0 4	79,8	N/A
253	1,25E+0 4	2,25E+0 3	1,33E+0 5	1,52E+0 4	54,7	N/A
254	1,37E+0 4	2,46E+0 3	1,22E+0 5	1,53E+0 4	65,4	N/A
255	1,37E+0 4	2,75E+0 3	1,34E+0 5	1,51E+0 4	59,3	N/A
256	1,18E+0 4	2,43E+0 3	1,39E+0 5	1,74E+0 4	49,3	N/A
257	1,12E+0 4	1,99E+0 3	1,33E+0 5	1,67E+0 4	48,8	N/A
258	1,33E+0 4	2,69E+0 3	1,14E+0 5	1,53E+0 4	68,2	N/A
259	9,76E+0 3	2,14E+0 3	1,14E+0 5	1,31E+0 4	49,6	N/A

260	1,20E+0 4	2,50E+0 3	1,24E+0 5	1,52E+0 4	56,4	N/A
261	1,69E+0 4	3,15E+0 3	1,19E+0 5	1,37E+0 4	83,9	N/A
262	1,34E+0 4	2,78E+0 3	9,28E+0 4	1,17E+0 4	84,7	N/A
263	1,04E+0 4	2,36E+0 3	6,87E+0 4	8,34E+0 3	89	N/A
264	1,18E+0 4	2,65E+0 3	9,08E+0 4	9,86E+0 3	76,1	N/A
265	9,51E+0 3	2,41E+0 3	8,53E+0 4	9,52E+0 3	65,2	N/A
266	8,11E+0 3	2,23E+0 3	8,70E+0 4	1,02E+0 4	54,1	N/A
267	1,12E+0 4	2,56E+0 3	8,95E+0 4	1,14E+0 4	73,3	N/A
268	9,02E+0 3	2,19E+0 3	7,96E+0 4	9,00E+0 3	66,2	N/A
269	8,01E+0 3	1,95E+0 3	8,23E+0 4	1,17E+0 4	56,6	N/A
5HIAA2	8,90E+0 4	1,17E+0 4	7,38E+0 4	8,42E+0 3	726	N/A
270	1,08E+0 4	2,44E+0 3	7,73E+0 4	8,94E+0 3	81,9	N/A
271	1,37E+0 4	2,25E+0 3	9,77E+0 4	1,15E+0 4	82,6	N/A
272	8,98E+0 3	2,40E+0 3	6,74E+0 4	7,95E+0 3	78,3	N/A
273	8,54E+0 3	2,47E+0 3	9,57E+0 4	1,14E+0 4	51,7	N/A
274	4,96E+0 3	1,69E+0 3	6,40E+0 4	7,14E+0 3	44,6	N/A
275	5,19E+0 3	1,72E+0 3	5,96E+0 4	8,20E+0 3	50,3	N/A
276	5,08E+0 3	1,55E+0 3	5,98E+0 4	6,71E+0 3	49,1	N/A
277	7,21E+0 3	1,69E+0 3	6,39E+0 4	8,59E+0 3	66	N/A
278	8,70E+0 3	1,85E+0 3	8,04E+0 4	1,07E+0 4	63,1	N/A
279	6,99E+0 3	1,66E+0 3	7,68E+0 4	1,03E+0 4	52,7	N/A
280	7,51E+0 3	1,82E+0 3	8,36E+0 4	9,71E+0 3	52,1	N/A
5HIAA1	9,11E+0 3	2,63E+0 3	9,03E+0 4	1,35E+0 4	58,7	N/A
5HIAA2	1,10E+0 5	1,50E+0 4	9,28E+0 4	1,39E+0 4	715	N/A

Taulukko 6. Mitatut seerumin 5-HIAA-pitoisuudet (7.6.2013)

SampleName	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Peak Height (cps)	IS Peak Area (counts)	IS Peak Height (cps)	CalculatedConcentration (nmol/l)	Accuracy (%)
STD 10 nM	7,81E+03	1,44E+03	3,01E+05	4,01E+04	10,1	101
STD 50 nM	2,06E+04	2,63E+03	2,71E+05	3,37E+04	48,3	96,6
STD 100 nM	3,48E+04	4,74E+03	2,63E+05	3,71E+04	91,3	91,3
STD 500 nM	1,91E+05	2,35E+04	2,87E+05	3,68E+04	500	100
STD 1000 nM	3,79E+05	4,41E+04	2,60E+05	3,43E+04	1110	111
5HIAA1	1,02E+04	1,82E+03	1,22E+05	1,32E+04	53,8	N/A
5HIAA2	1,14E+05	1,39E+04	1,25E+05	1,49E+04	689	N/A
107	1,50E+04	2,61E+03	1,26E+05	1,51E+04	81,4	N/A
130 (laim 1:3)	1,31E+05	1,61E+04	1,91E+05	2,08E+04	515	N/A
131 (laim 1:3)	1,28E+05	1,52E+04	2,00E+05	2,23E+04	479	N/A
144 (laim 1:3)	3,57E+04	4,22E+03	7,05E+04	7,44E+03	377	N/A
151 (laim 1:3)	2,23E+05	2,69E+04	1,99E+05	2,35E+04	846	N/A
152 (laim 1:3)	1,48E+05	1,68E+04	1,98E+05	2,17E+04	563	N/A
179 (laim 1:3)	1,14E+05	1,38E+04	1,95E+05	2,37E+04	436	N/A
180 (laim 1:3)	7,46E+04	9,49E+03	1,84E+05	2,24E+04	300	N/A
199	1,42E+04	2,55E+03	1,03E+05	1,30E+04	95,5	N/A
207	7,92E+03	1,62E+03	8,26E+04	1,16E+04	63,5	N/A
210	1,08E+04	2,07E+03	1,02E+05	1,24E+04	70,7	N/A
263	1,33E+04	2,50E+03	9,92E+04	1,21E+04	93	N/A
264	1,26E+04	2,47E+03	9,45E+04	1,12E+04	92,2	N/A
5HIAA1	9,25E+03	2,04E+03	8,96E+04	1,08E+04	69,2	N/A
5HIAA2	9,33E+04	1,17E+04	8,45E+04	9,88E+03	834	N/A