

HIUSNÄYTTEEN STEROIDIPROFIILIN  
MÄÄRITYS NESTEKROMATOGRAFIA-  
TANDEMMASSASPEKTROMETRIALLA

*Lauri Uusitalo*

Tutkielma

Lääketieteen koulutusohjelma

Itä-Suomen yliopisto

Terveystieteiden tiedekunta

Lääketieteen laitos / lastentaudit

Kesäkuu 2017

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Terveystieteiden tiedekunta

Lääketieteen laitos

Lääketieteen koulutusohjelma, Lastentaudit

UUSITALO LAURI A. J.: Hiusnäytteen steroidiprofiilin määrittäminen nestekromatografia-tandemmassaspektrometrialla

Opinnäytetutkielma, 41 sivua

Tutkielman ohjaajat: professori Raimo Voutilainen, professori Seppo Auriola

Kesäkuu 2017

Asiasanat: steroidihormonit, hiusanalyysi, tandemmassaspektrometria

---

Hiusanalyysi on noussut lupaavaksi menetelmäksi selvittämään elimistön endogeenistä steroidiympäristöä. Hiusnäytteestä on arvioitavissa kumulatiivinen steroidihormonieritys retrospektiivisesti. Steroidien määrittäminen hiusnäytteestä tapahtuu parhaiten nestekromatografia-tandemmassaspektrometrialla (LC-MS/MS), sillä menetelmän avulla pystytään havaitsemaan ja mittaamaan pieniäkin steroidipitoisuuksia suurella herkkyydellä ja spesifisyydellä.

Tutkimuksessa selvitettiin hyväksi käytännöksi muodostunut metodologia hiusnäytteen steroidiprofiilin määrittämiseksi: miten hiusnäytteitä otetaan ja varastoidaan, sekä miten hiusnäytteet ja massaspektrometrin asetukset valmistellaan steroidianalyysiin. Lisäksi selvitettiin tekijöitä, jotka voivat aiheuttaa harhatuloksia tai häiriöitä analytiikassa (esim. kontaminaatiotekijät). Tutkimus tehtiin kirjallisuuskatsauksena, joka koottiin viime vuosina tehdyistä kokeellisista tutkimuksista ja metodologiaan liittyvistä katsauksista.

Tämän katsauksen löydöksistä on mahdollista muodostaa ajantasainen ja hyvän käytännön mukainen menetelmä tutkimukseen, jossa arvioidaan elimistön pitkäaikaista steroidihormonieritystä hiusanalyysia hyödyntäen.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND, Faculty of Health Sciences

School of Medicine

Medicine, Pediatrics

UUSITALO LAURI A. J.: Methodology of assessing steroid profile from hair samples with LC-MS/MS

Thesis, 41 pages

Tutors: Raimo Voutilainen, professor, Seppo Auriola, professor

June 2017

Keywords: steroid hormones, hair analysis, liquid chromatography tandem mass spectrometry

---

Hair analysis has received increasing attention in research for quantifying endogenous steroid hormone exposure. The value of hair analysis is that it provides information about long-term steroid secretion retrospectively. Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is the best method for hair samples because of its superior sensitivity and specificity for steroid hormones.

This study investigates practise of assessing steroid profile from hair samples with LC-MS/MS: how to take and store samples and how to prepare samples and mass spectrometry for analysis. The study also investigates factors which may cause bias or disturbances in steroid analytics from hair samples. The data of this review consists of articles and reviews from literature published during the recent years.

With these study results it is possible to set up an up-to-date and best practice method for the evaluation of long-term steroid hormone secretion by measurements of hair steroids.

## LYHENNELUETTELO

APCI = atmospheric pressure chemical ionization, kemiallinen ionisaatio ilmanpaineessa

DHEA = dehydroepiandrosteroni

DHEAS = dehydroepiandrosteronisulfaatti

DHT = 5 $\alpha$ -dihydrotestosteroni

ESI = electrospray ionization, elektronisuihkuionisaatio

FSH = follikkeleita stimuloiva hormoni

H<sub>2</sub>O = ionivaihdettu vesi

HPLC = high pressure liquid chromatography, korkeapaine nestekromatografi

IF = impact factor, julkaisun vaikuttavuuskerroin

IPA = isopropanoli

IS = internal standard, sisäinen standardi

LC = liquid chromatography, nestekromatografi(a)

LC-MS/MS = nestekromatografi(a)-tandemmassaspektrometri(a)

LH = lutenisoiva hormoni

LOD = limit of detection, havaitsemisraja

LOQ = limit of quantification, pitoisuuden määrittämisen raja

m/z = mass-to-charge ratio, massa-varaus-suhde

MeOH = metanoli

MRM = multiple reaction monitoring, useiden reaktioiden monitorointi

MS/MS = tandem mass spectrometry, tandemmassaspektrometri

MS/MS/MS tai MS<sup>3</sup> = triple quadrupole tandem mass spectrometry, kolmoiskvadrupoli tandemmassaspektrometri

NH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub> = ammoniumformiaatti

PBS = phosphate-buffered saline, fosfaattipuskuriliuos

SIM = selected-ion monitoring, yksittäisionimonitorointi

SPE = solid-phase extraction, kiinteäfaasierottelu

UFLC = ultra fast liquid chromatography, erittäin korkean nopeuden nestekromatografia

UPLC = ultra high performance liquid chromatography, erittäin suuren erotuskyvyn nestekromatografia

UV-säteily = ultraviolettisäteily

# SISÄLLYSLUETTELO

1.	JOHDANTO.....	1
2.	TEOREETTINEN TAUSTA.....	2
2.1.	STEROIDIHORMONIT .....	2
2.2.	STEROIDIHORMONIEN TUTKIMUSMENETELMÄT .....	6
2.2.1.	<i>Seerumi-, sylki- ja virtsanäytteet</i> .....	6
2.2.2.	<i>Hiusnäyte</i> .....	7
2.2.3.	<i>Näytetyyppien vertailu</i> .....	9
2.2.4.	<i>Analysointimenetelmät</i> .....	10
3.	TUTKIMUKSEN TAVOITTEET .....	14
4.	AINEISTO JA MENETELMÄT .....	15
4.1.	AINEISTON VALINTA .....	15
4.2.	AINEISTON ARVIOINTI.....	15
5.	TULOKSET .....	17
5.1.	HIUSNÄYTTEIDEN KERÄÄMINEN JA SÄILYTTÄMINEN .....	17
5.1.1.	<i>Näytteenottoalue ja tarvikkeet</i> .....	17
5.1.2.	<i>Analysoitavan hiusnäytteen koko ja näytteiden säilyttäminen</i> .....	17
5.2.	HIUSNÄYTTEIDEN VALMISTELU ENNEN ANALYSOINTIA .....	19
5.2.1.	<i>Puhdistaminen ja kuivakäsittely</i> .....	19
5.2.2.	<i>Steroidiuutto</i> .....	20
5.2.3.	<i>Jälkipuhdistus</i> .....	23
5.3.	MASSASPEKTROMETRISET ASETUKSET JA MÄÄRITETYT STEROIDIHORMONIT .....	24
5.4.	HARHATULOKSIA JA HÄIRIÖITÄ AIHEUTTAVAT TEKIJÄT ANALYTIKASSA .....	26
5.4.1.	<i>Hiusten käsittely ja hiusten luonnollinen väri</i> .....	26
5.4.2.	<i>Ultravioletti säteily ja lämpö</i> .....	27
5.4.3.	<i>Hiusten pesufrekvenssi</i> .....	27
5.4.4.	<i>Hiusten pituuteen liittyvät virhetekijät</i> .....	27
6.	POHDINTA.....	29
6.1.	HIUSNÄYTTEIDEN OTTAMINEN JA VARASTOINTI.....	29
6.2.	HIUSNÄYTTEIDEN VALMISTELU ENNEN ANALYSOINTIA .....	31

6.3.	MASSASPEKTROMETRISET ASETUKSET .....	33
6.4.	HARHATULOKSIA JA HÄIRIÖITÄ AIHEUTTAVAT TEKIJÄT ANALYTIKASSA JA MUUT HUOMIOITAVAT ASIAT .....	34

## 1. JOHDANTO

Steroidihormonit ohjaavat solujen proteiinisynteesiä. Niiden tuottamat soluvasteet vaikuttavat elimistön energia-aineenvaihduntaan, vesi- ja suolatasapainoon sekä tulehdusten hallintaan. Steroidihormonit ovat päivittäisen toiminnan lisäksi tärkeitä tekijöitä ihmisen elinkaaren taitekohdissa, kuten syntymän ja raskauden, puberteetin ja vaihdevuosisien aikoina. Ne ovat avainpelaajia elimistön kyvyssä sopeutua kohtaamiinsa haasteisiin ja muutoksiin. Niillä on myös keskeinen rooli somaattisessa ja henkisessä kasvussa sekä sukupuoliominaisuuksien esiintuomisessa.

Steroidimiljöö käsittää elimistön systeemisen steroidisaatavuuden: mitä steroidihormoneja ja kuinka paljon elimistö on joko tuottanut tai vastaanottanut verenkiertoon kudosten saataville. Steroidimiljöön arvioiminen auttaa ymmärtämään steroidituotannon tilaa, mutta myös elimistön toimintakykyä sen kautta, millaisen vasteen elimistö on tuottanut jollekin sen kohtaamalle altisteelle, esimerkiksi stressille tarkasteltuna ajanjaksona.

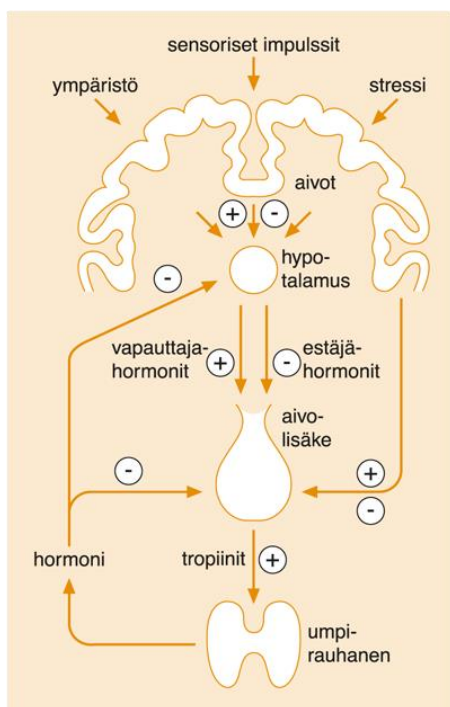
Kun halutaan arvioida elimistön steroidimiljöötä, täytyy ottaa biologinen näyte, joka kertoo steroidien laadun ja määrän näytteessä (steroidiprofiili). Biologinen näyte on tavallisesti joko seerumi-, sylki- tai virtsanäyte. Uutena näytemateriaalina elimistön itsetuottamien eli endogeenisten steroidihormonien havaitsemiseen on esitetty hiusnäytettä (1-6). Hiusten steroidiprofiili edustaa verenkierron vapaata steroidipitoisuutta tietyltä ajanjaksolta. Steroidien oletetaan diffuntoituvan suoraan verenkierrosta hiusfollikkelin kautta kasvavaan hiusmateriaaliin, joten tarkasteltu ajanjakso määrittyy sen mukaan, mitä pituussegmenttiä hiusnäytteestä tarkastellaan (2). Näytteiden steroidimäärityksessä käytetään joko immunokemiallisia tai massaspektrometrisia menetelmiä. Eri steroidien tunnistaminen (spesifisyys) ja niiden pitoisuuksien määrittäminen (kvantifiointi) onnistuu luotettavimmin massaspektrometrisillä menetelmillä (1).

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää ajantasainen metodologia liittyen siihen, miten hiusnäytteitä kerätään ja säilytetään, sekä miten hiusnäytteet ja massaspektrometrinen analyysilaitteisto valmistellaan steroidianalyysiin. Lisäksi selvitettiin tekijöitä, jotka voivat aiheuttaa harhatuloksia tai häiriöitä analytiikassa.

## 2. TEOREETTINEN TAUSTA

### 2.1. Steroidihormonit

Steroidihormoneja tuotetaan kolesterolista pääosin umpirauhasissa, joita ovat lisämunuaiskuori sekä sukurauhaset. Hypotalamus-aivolisäke-umpirauhanen – akseli toimii steroidihormonien tuotannon ohjaajana ympäristöstä ja elimistöstä tulleiden viestien vaikuttamana (pl. aldosteronin säätely, jota ohjaa reniini-angiotensiini-aldosteroni – järjestelmä). Pääasiallinen steroidieritystä ohjaava mekanismi on negatiivinen palautesäätely (kuva 1). Negatiivisessa palautesäätelyssä tuotettu hormoni inhiboi hypotalamuksessa ja aivolisäkkeessä hormonin tuotantoa lisäävien aivolisäkehormonien eritystä (7).



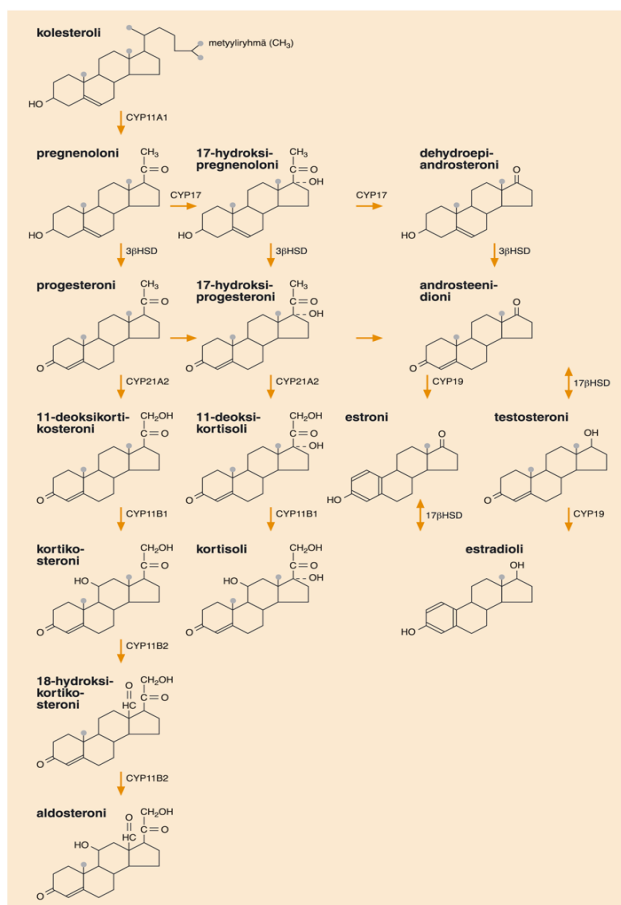
Kuva 1. Endokriinisen palautejärjestelmän periaate (7).

Lisämunuaiskuori tuottaa kolesterolista useita steroidihormoneja (kuva 2). Kortikosteroideiksi kutsuttuja steroidihormoneja ovat gluko- ja mineralokortikoidit.



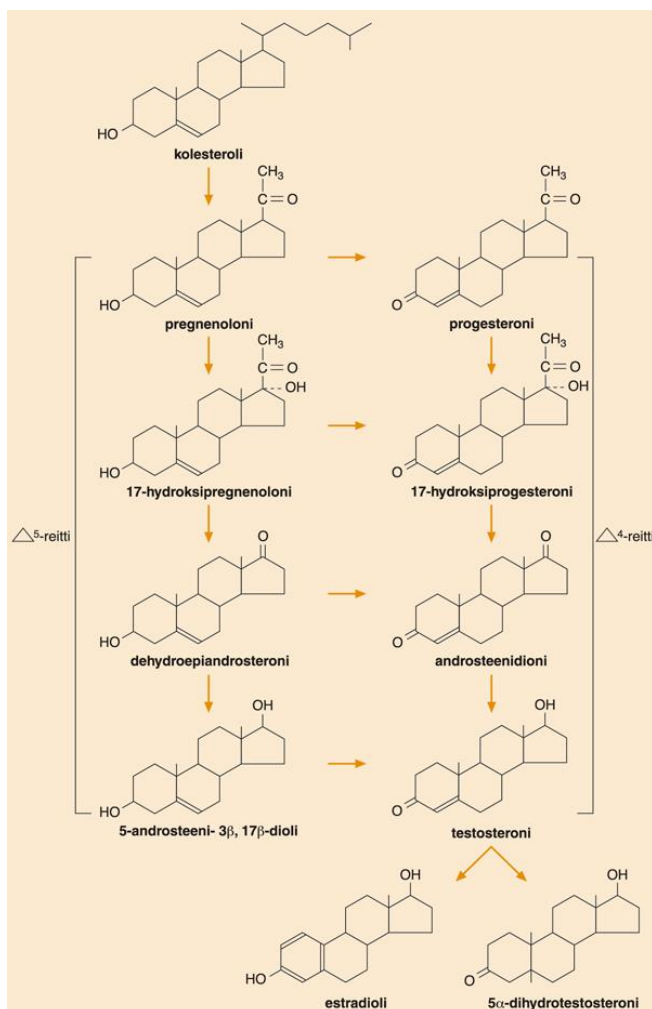
Glukokortikoidit osallistuvat sokeri- ja rasva-aineenvaihduntaan sekä immunologisten toimintojen säätelyyn. Glukokortikoideista tärkein on kortisoli. Aineenvaihdunnassa kortisoli osallistuu maksassa anaboliseen toimintaan ja perifeerisissä kudoksissa sen tehtävät ovat katabolisia. Kortisoli nostaa verensokeria aktivoimalla glukoneogeneesiä, glykolyysiä ja toimii käytännössä insuliinin vastavaikuttajana. Lisäksi kortisolilla on somaattisten vaikutusten lisäksi vaikutuksia henkiseen kehittymiseen ja puolustusjärjestelmässä kortisoli vähentää tulehdusreaktioiden välittäjäaineiden synteesiä ja tätä kautta vaikuttaa immuunivasteen hillitsemiseen (8).

Mineralokortikoidit, tärkeimpänä aldosteroni, lisäävät munuaisissa natriumin ja veden takaisinimeytymistä. Tätä kautta aldosteroni vaikuttaa elimistön neste- ja suolatasapainoon nostamalla verivolyymia ja verenpainetta sekä lisäämällä natriumin määrää veressä. Lisämunuaiskuoren tuottamia sukupuolihormoneja ovat dehydroepiandrosteroni DHEA ja sen sulfaattikonjugaatti DHEAS. Ne ovat itsessään heikkoja androgeeneja ja muuttuvat biologisesti aktiivisemmaksi testosteroniksi vasta kohdekudoksissa (8).



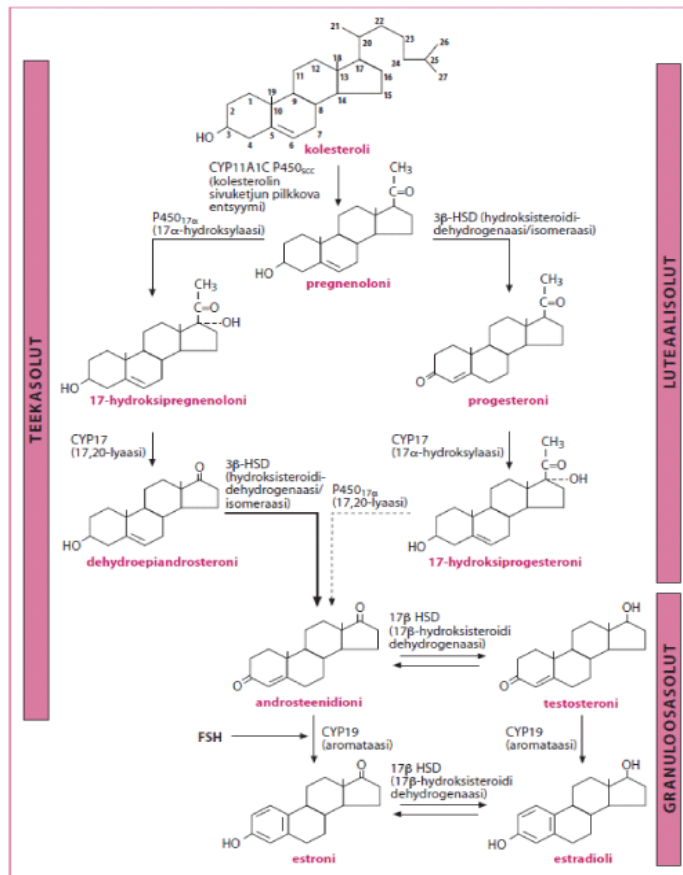
Kuva 2. Lisämunuaiskuoren tuottamien steroidihormonien biosynteesitiet (8).

Sukurauhaset tuottavat sukupuolihormoneiksi kutsuttuja steroidihormoneja. Miesten kiveksissä kolesterolista valmistuu kahta vaihtoehtoista entsyymien ohjaamaa reittiä pitkin päätuotteena testosteronia. Testosteroni voi muuttua kohdekudoksissa estradioliksi tai  $5\alpha$ -dihydrotestosteroniksi (DHT) (kuva 3, (9)).

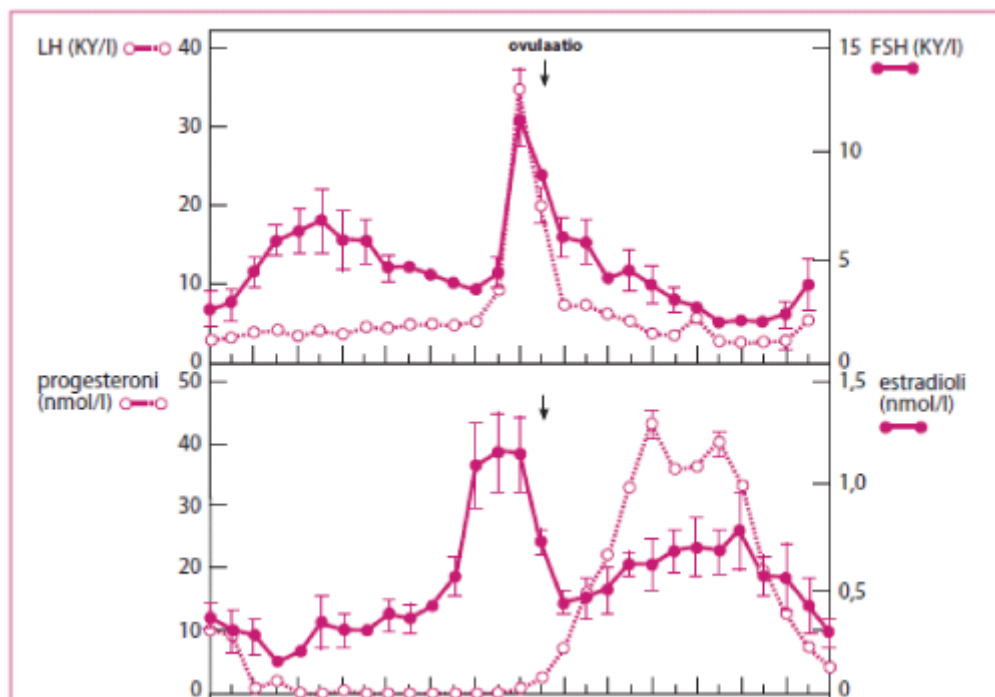


Kuva 3. Kiveksen tuottamien steroidihormonien biosynteesitiet (9).

Naisen munasarjat tuottavat syklittäin (kuukausikierto) eri steroidihormoneja aivolisäkkeen etulohkon tuottamien gonadotropiinien (FSH ja LH) ohjaamina (kuvat 4 ja 5). Follikkelivaiheessa kolesterolista tuotetaan teekasoluissa androsteenidonia ja testosteronia, jotka suurimmalta osin muutetaan granuloosasoluissa estroniksi ja estradioliksi. Luteaalivaiheessa progesteronin määrä lisääntyy kun follikkelisolut muuttuvat keltarauhaseksi (luteaalisolu) ja veren progesteronipitoisuus ylittää estrogeenien (estroni ja estradioli) pitoisuudet (10).



Kuva 4. Munasarjojen tuottamien steroidihormonien biosynteesitiet (10).



Kuva 5. Steroidihormonien tuotanto munasarjoissa kuukautiskierron eri vaiheissa FSH:n ja LH:n ohjaamina (10).

## 2.2. Steroidihormonien tutkimusmenetelmät

### 2.2.1. Seerumi-, sylki- ja virtsanäytteet

Elimistön endo- ja eksogeenisiä steroideja tutkitaan perinteisesti seeruminäytteestä sekä sylki- ja virtsanäytteistä. Näihin näytetyyppeihin liittyvät menetelmät ovat vakiintuneet laboratorioihin. Näytteiden luotettava ottaminen ja analysointi vaatii laboratorion ja sen standardien akkreditointia eli pätevyyden toteamista kansainvälisin kriteerein, jotta laboratorio voidaan tunnustaa päteväksi toimijaksi. Akkreditointia suorittaa Suomessa Turvallisuus- ja kemikaaliviraston yksikkö FINAS, jonka toimintaa ohjaa työ- ja elinkeinoministeriö. FINAS on myös jäsenenä Euroopan akkreditointielinten yhteistyöjärjestössä. Toiminnan riippumattomuus on varmistettu lainsäädännöllä sekä Suomessa ja EU:ssa. Akkreditoinnin lisäksi laboratorioiden laadunvalvonnalle on asetettu viranomaismääräyksiä ja laadunvalvonnan toteutumista tarkkaillaan ja testataan säännöllisesti (11-13).

Veren seeruminäyte otetaan akkreditoitulla protokollalla, jossa invasiivisella pistolla otetaan laskimosta haluttu määrä (usein 1 ml) verta seerumi-geeliputkeen (14). Putki säilötään jääkaapissa, jossa sen säilyvyys on parista päivästä viikkoon. Pidemmän ajan säilytykseen seeruminäyte voidaan pakastaa (15,16). Seeruminäyte kuvastaa steroidihormonien näytteenottohetken pitoisuutta sekä kuljettajaproteiineihin sitoutuneena että sitoutumattomana (vapaa hormonifraktio) (17).

Sylkinäyte kerätään suusta näytemenetelmään kehitetyillä puikoilla (esim. Salivette®). Syljestä vettyneet puikot asetetaan niille tarkoitettuun putkeen, johon sylkikonsentraatti johdetaan. Näyte säilyy käyttökelpoisena huoneenlämmössä vuorokauden, jääkaapissa 3-5 päivää ja pakastettuna pidemmän ajan (18). Sylkinäytteestä on arvioitavissa kuljettajaproteiineihin sitoutumattoman steroidihormonin eli vapaan steroidin pitoisuus verenkierrrossa (17).

Virtsasta määritetään steroidihormoneja useimmiten keräysvirtsametelmällä (19). Keräysvirtsametelmässä määritetään steroidihormonit 24 h:n ajalta kerätystä virtsasta tai yön yli pidätetystä aamuvirtsasta. Pulsatiivisesti erittyvien steroidien (kuten kortisolin) osalta keräysvirtsa antaa seeruminäytettä paremman kuvan tutkittavan steroidituotannon ja

-metabolian keskimääräisestä tilanteesta, koska erityksen vuorokauden sisäinen pulsatiliteetti tai akuutti stressi ei pääse vaikuttamaan yhtä suuresti hormonikonsentraatioon kuin seeruminäytteessä. Virtsaasta määritetäänkin tavallisesti kortisolipitoisuus. Hyvin sekoitettua keräysvirtsa voidaan säilyttää huoneenlämmössä vuorokauden ajan tai jääkapissa viikon, mutta pidempää säilytystä varten virtsa on pakastettava (17,20).

Edellä kuvattujen näytetyyppien tutkimusmahdollisuudet ovat rajalliset. Näytteiden steroidipitoisuudet kuvastavat vain näytteenoton hetkellä vallitsevaa ja mahdollisesti kokonaiskuvasta vääristynyttä pitoisuutta. Esimerkkinä on kortisolipitoisuuden vaihtelu vuorokauden ajan mukaan tai akuutin stressin, liikunnan tai ruokailun seurauksena. Vuorokausivirtsa edustaa steroidituotannon tilaa vuorokauden ajalta, mutta pidemmän ajanjakson tilaa em. näytetyypeistä ei kyetä arvioimaan ellei näytteitä kerätä useaan kertaan ja tarpeeksi tiheästi. Seeruminäyte on myös mielletty invasiiviseksi ja vuorokausivirtsa käytännössä hankalaksi kerätä. Lisäksi näytteet vaativat huonon säilyvyytensä vuoksi pikaista analysointia, ellei näytteitä pakasteta (17,21).

### 2.2.2. Hiusnäyte

Hiusnäytettä on hyödynnetty vuosikymmeniä tutkittaessa elimistön altistumista eksogeenisille yhdisteille, jotka ovat tulleet elimistöön ympäristöstä tai lääke- ja päihdeaineiden käytöstä. Tutkimuksen kohteena on ollut erityisesti myrkkujen tai dopingaineiden, huumeiden ja lääkkeiden käytön toteaminen hiusrätkästä. Tänä päivänä hiustutkimus ottaa ripeitä kehitysaskelia menetelmässä, jossa voidaan todeta ja kvantifioida endogeenisesti tuotettuja steroideja hiusrätkästä. Hiusnäytteitä hyödyntävässä tutkimuksessa ei ole akkreditoitua protokollaa, mutta hiusanalyysissä noudatetaan yleisesti kansainvälisen Society of Hair testing –ryhmän luomaa konsensusta, jossa määritetään pätevän tutkimuksen kriteerit. Endogeenisten steroidihormonien ollessa tutkimuskohteena konsensuksen keskeisiä asiakohtia ovat näytteiden kerääminen ja varastointi, steroidien ekstraktio ja massaspektrometriset kriteerit (22).

Hiusta muodostavat hiusfolliikkelit, jotka sijaitsevat n. 3-5 mm syvyydessä pään epidermisen epiteelissä. Hiusfollikelin pohjassa eli papillassa sijaitsevat keratinosyytit ja

melanosyytit jakautuvat aktiivisesti ja muodostavat erityisesti keratiini- ja melaniinipitoista väliainetta. Kasvun mukana solut työntyvät epidermoksen sylinterimäisestä kanavasta ulos ja muodostavat kolmikerroksisen hiussuortuvan. Rakenteessa on kutikkeli-, korteksi- ja medullakerrokset. Kutikkeli muodostuu n. viidestä solukerroksesta ja antaa hiuksen korteksi- ja medullakerrokselle ensilinjan suojan kemiallisilta ja fysikaalisilta rasitteilta (23,24). Hiusten kasvusyklissä on kolme vaihetta: anageeni-, katageeni- ja telogeenivaiheet, joista ainoastaan anageenivaiheessa oleva hius kasvaa pituutta. Kuitenkin n. 85 % hiuksista on jokaisella hetkellä anageenivaiheessa ja anageenivaihe kestää hiuksella keskimäärin 4-8 vuotta. Anageenivaiheessa olevan hiuksen kasvunopeuteen vaikuttaa henkilön etninen tausta, sukupuoli, ikä ja terveydentila sekä hiuspohjan anatominen alue (23,25). Keskimäärin hiuskasvu on ihmisillä n. 1 cm/kk (26) ja pääläen takalohkon alueella eli posteriorisella vertexillä hiuslaatu on kasvunopeuden ja rakenteensa suhteen tasalaatuisinta, varianssin ollessa posteriorisen vertexin hiusten välillä n. 15 %, kun muualla pään iholla varianssi on n. 30 % (27).

Steroidit päätyvät hiuksen ydin- ja kuorikerroksen soluihin hiusfollikkelin kautta ja jäävät pituutta kasvaviin hiussuortuviin. Hiusfollikkeliin voi päätyä steroideja mahdollisesti ympäröivistä kudoksista, rauhasista tai follikkelin itse tuottamina, mutta pääosin steroidit ovat peräisin systeemisestä verenkierrosta (23,28,29). Rasvaliukoisen luonteen ja diffuntoitumisen takia systeemisestä verenkierrosta follikkeliin päätyvät steroidit edustavat verenkierron vapaata steroidifraktiota (2,3,23,30).

Koska hius kasvaa pituutta keskimäärin 1 cm/kk, pään ihoa lähin eli proksimaalinen 1 cm hiussuortuvasta edustaa suunnilleen yhden kuukauden ajalta hiussegmenttiin päätynyttä steroidikertymää. Tämän johdosta proksimaalinen osa hiusnäytettä antaa mahdollisuuden arvioida elimistön endogeenistä ja systeemistä steroidialtistusta näytteenottoa edeltäneiden kuukausien ajalta (kumulatiivisen steroidituotannon retrospektiivinen tarkastelu). Hiusnäytteeseen ei pääse vaikuttamaan systeemisen steroidipitoisuuden akuutit vaihtelut näytteenottamisen hetkellä. Lisäksi hiusnäytteenotto saksilla leikaten on mielletty hyvin non-invasiiviseksi toimenpiteeksi ja hiusnäyte säilyy huoneenlämmössä jopa useita vuosia (2,3,31).

Hiukset voivat kuitenkin kärsiä vaurioitumisesta, esim. hiusten pesemisen, mekaanisen kulumisen ja esteettisen käsittelyn tai ultraviolettilon ja lämmön vaikutuksesta, jolloin

hiussisältöä kuten steroideja voi hävitä hiusmateriaalista ympäristöön (27,30,32,33). Steroidipitoisuuksien on havaittu olevan suurinta hiusten proksimaalisessa päässä ja pienenevän tasaisesti proksimaalisen ja distaalisen pään välillä (2,34,35), mutta havaintoa ei ole vahvistettu kaikissa tutkimuksissa (36,37).

Hiusnäytteen heikkous on se, ettei hiusanalyysiin ole akkreditoitu standardoitua metodologia endogeenisten steroidihormonien analytiikkaan, vaan laboratoriot kokeilevat vielä erilaisia menetelmiä analytiikassa. Myöskään steroidihormoneille määriteltyjä viitearvoja ei muiden näytetyyppien tavoin ole määritetty hiusnäytteen sisältämille steroideille. Lisäksi on vielä määrittelemättä, miten ja millä voimakkuudella tietyt tekijät kuten hiusten käsittely, mekaaninen rasitus ja UV-säteily vaikuttavat steroidipitoisuuksien säilymiseen hiusmateriaalissa (2-4,38).

### *2.2.3. Näytetyyppien vertailu*

Näytetyyppejä on vertailtu taulukossa 1. Vaikkakin hiusanalyysillä on omat heikkoutensa ja puutteensa, hiusnäyte on joiltain osin muita näytetyyppejä parempi. Hiusnäytteen ottaminen on muihin näytevaihtoehtoihin verrattuna mielletty vähiten invasiiviseksi menetelmäksi. Hiusnäyte on myös erittäin vaatimaton varastointiolosuhteiden suhteen, sillä säilyttämiseen riittää hyvin paikka, jossa näyte on huoneenlämmössä ja valolta suojattuna. Näytteen sisältämiin steroidipitoisuuksiin ei pääse vaikuttamaan veren kuljetusproteiinien pitoisuuden vaihtelut, sillä steroidit päätyvät hiukseen veren vapaasta fraktiosta. Hiusnäytteen erityisominaisuus on se, että hiukset keräävät verenkierrosta steroideja itseensä hiuskasvun mukana. Hiusnäyte edustaa siis steroidimiljöötä jopa useilta kuukausilta, kun muut näytetyypit edustavat vain näytteenotonhetkistä steroidimiljöötä tai korkeintaan vuorokauden aikaista steroidituotannon ja -erityksen tilaa (2).

Taulukko 1. Näytetyyppien ominaisuuksien vertailu kortisolimäärityksissä. Muokattu viitteestä (2).

Ominaisuus	Seeruminäyte	Sylkinäyte	Virtsanäyte	Hiusnäyte
Subjekttiivisesti koettu näytteenoton invasiivisuus	Korkea	Matala	Keskimääräinen	Matala
Näytteen varastointivaatimukset	Kylmäsäilytys tai pakastus	Kylmäsäilytys tai pakastus	Kylmäsäilytys tai pakastus	Huoneenlämpö (näytesisältö pysyy vakaana vuosia)
Näytteestä arvioitava steroidimiljöön aikaikkuna	Näytteenoton hetkinen	Näytteenoton hetkinen	12 – 24 h	Kuukausista mahdollisesti vuoteen
Kuljetusproteiinipitoisuuden vaihtelun vaikutus näytteen steroidisisältöön	Kyllä	Ei	Ei	Ei
Näytteen sisältämille steroidipitoisuuksille on määritetty kliinisesti relevantit pitoisuusarvot	Kyllä	Kyllä	Kyllä	Ei

#### 2.2.4. Analysointimenetelmät

Näytteiden valmistelu (preparointi) analysointia varten vaihtelee riippuen siitä mikä on näytetyyppi ja mitä analysointimenetelmää käytetään. Usein näytteistä täytyy ennen analysointia erottaa tutkittavat hormonit liukseen (ekstraktio), jota sitten syötetään analysoinnin suorittavaan laitteeseen.

Hormonimäärityksissä useimmiten käytettäviä määrittämenetelmiä ovat i) immunokemialliset menetelmät, ii) neste- ja kaasukromatografia sekä iii) neste- tai kaasukromatografiaan yhdistetty massaspektrometria. Steroidimäärityksissä käytetään kliinisesti eniten immunokemiallisia menetelmiä, mutta tutkimustyössä steroidimäärityksissä ollaan siirrytty nestekromatografia-tandemmassaspektrometrian (LC-MS/MS) hyödyntämiseen (39).

##### i) Immunokemialliset menetelmät

Immunokemialliset menetelmät ovat joko inhibitorisia tai immunometrisiä. Ne perustuvat näytteestä eristettyjen hormonien vasta-aine sitoutumiseen. Inhibitiomenetelmässä tutkittava steroidi kilpailee vasta-aine sitoutumisessa saman leimatun steroidin kanssa, jota on lisätty liukseen pieni määrä. Mitä vähemmän vasta-aineeseen sitoutuneesta leimatusta steroidista saadaan signaalia, sitä enemmän näytteessä on ollut tutkittavaa steroidia.



Leimaus voidaan tehdä radioaktiivisuutta, fluoresenssia tai luminesenssia käyttäen. Immunometrinen menetelmä on inhibitiomenetelmälle käänteinen eli siinä vasta-aineeseen sitoutunut tuntematon määrä hormonia saa aikaan signaalin, kun hormoni-vasta-aine – kompleksiin sitoutuu toinen leimattu ko. hormonin vasta-aine. Immunometrisessä menetelmässä signaali vahvistuu sen mukaan, mitä enemmän tutkittavassa näytteessä on hormonia. Immunometrinen menetelmä laajentaa mittausaluetta, jolloin voidaan tutkia paremmin hormoneja, joiden pitoisuuden vaihtelu on suurta tutkittavien kesken (39).

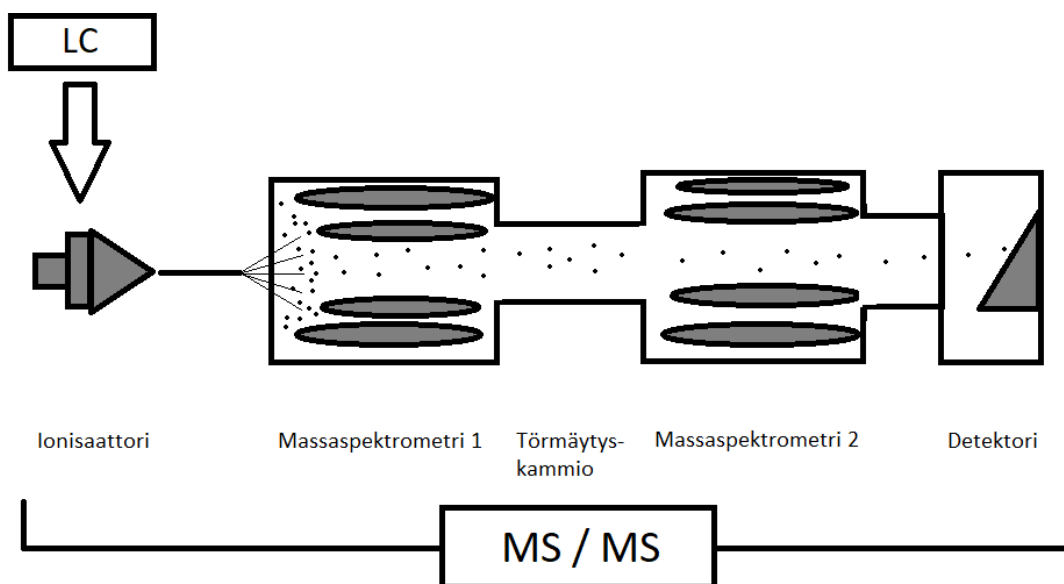
## ii) Kromatografiset menetelmät

Kromatografiassa yhdisteet erotellaan niille ominaisten vuorovaikutusten perusteella, joita yhdisteet muodostavat kahden eri faasin suhteen: kiinteä ja liikkuva. Kiinteä faasi muodostuu tiiviisti, mutta huokoisesti pakatuista partikkeleista, esimerkiksi piioksidista tai hiilen polymeereista. Liikkuva faasi voi olla esimerkiksi neste, mutta myös kaasufaasi on mahdollinen vaihtoehto. Nestekromatografiassa (liquid chromatography, LC) tutkittavasta näytteestä muodostettu näyteliuos ajetaan määrättyllä nopeudella liikkuvan faasin eli eluentin kanssa kiinteän faasin sisältävän pylvään (kolonnin) läpi detektorille. Eluentin ja kiinteän faasin liukoisuustekijät (esim. pH ja polaarisuus) määrittävät eroteltavien yhdisteiden liukoisuuden eri faasien välillä. Eluentin liukoisuustekijät voivat olla joko muuttumattomia koko ajon ajan (isokraattinen ajo) tai muuttuvia (gradientt ajo). Mitä liukoisempia näytteen yhdisteet ovat eluenttiliuokseen, sitä nopeammin ne saapuvat kolonnin läpi yhdisteen tunnistavalle alustalle eli detektorille. Toisin sanoen kromatografiassa yhdisteet saapuvat näytteestä eri nopeuksilla detektorille ja saapumisajan määrittää se, kuinka kauan yhdiste viipyy kiinteässä faasissa. Detektorina toimivia alustoja on useita erilaisia ja ne perustuvat erilaisiin kemiallisiin ja fysikaalisiin menetelmiin yhdisteiden havaitsemiseksi. Detektori voi havaita ja osoittaa yhdisteen saapumisen kolonnista esim. fluoresenssin, absorbanssin tai jonkin muun sähkökemiallisen ilmiön avulla. Mitä enemmän tutkittavaa yhdistettä näytteessä on, sitä isomman vasteen se antaa detektorille saapuessaan. Usein tutkittava näyteliuos ajetaan kolonnin läpi korkealla paineella, joka nopeuttaa analysointiprosessia ja lisää erotuskykyä (resoluutio) (39,40).

### iii) Massaspektrometriset menetelmät

Massaspektrometri (mass spectrometer, MS) liitetään useimmiten neste- tai kaasukromatografian detektoriksi. MS:ssa kromatografissa erottuneet yhdisteet kuten steroidit muutetaan ioneiksi ja tämän jälkeen MS kykenee tunnistamaan ne niiden massa-  
varaus -suhteen perusteella ( $m/z$ ) (41). Massaspektrometrin ensimmäisessä vaiheessa molekyylit höyrystetään ja pommitetaan ionisaatiokammiossa elektroneilla, jolloin ne ionisoituvat. Ionisointimenetelmiä on useita erilaisia, kuten ESI (electrospray ionization eli elektronisuihkuionisaatio), APCI (atmospheric pressure chemical ionization eli kemiallinen ionisaatio ilmanpaineessa), ja ne ovat tehokkuudeltaan erilaisia. Käytettävään menetelmään vaikuttaa kuitenkin eniten tutkittavien yhdisteiden kemiallinen luonne, joten ionisaatiomenetelmä valitaan tutkittavien molekyylin mukaan (42). Toisessa vaiheessa ionisoituneet molekyylit kiihdytetään sähkövoimalla ja suihkutetaan kammioon, jossa molekyylit erotellaan sähkö- tai magneettikentässä niiden  $m/z$ -suhteen perusteella. Useimmiten käytetään kvadrupolikammiota, jossa on neljän elektrodisauvan muodostama sähkökenttä. Kvadrupolissa liikkeessä olevien varauksellisten molekyylin liikerata kaareutuu sähkökentän kohtisuoran voiman vaikutuksesta ja kaareutumisasete (radan säde) määräytyy molekyylin massan perusteella. Tällöin  $m/z$ -suhteen perusteella valitaan molekyylit, jotka päätyvät kvadrupolisauvojen välistä detektorille. Massaspektrometrilla kyetään tunnistamaan useita molekyyleja erittäin herkästi ja spesifisti (43).

Biologisissa näytteissä on useita eri molekyyleja, joilla on läheinen  $m/z$ -suhde tutkittavan molekyylin (analyytin) kanssa. Tällöin analysointimenetelmän herkkyyttä ja spesifisyyttä voidaan parantaa nestekromatografilla yhdistettyyn tandem-massaspektrometriin (LC-MS/MS) (kuva 6). Molekyylit, joilla on haluttu  $m/z$ -suhde, suodatetaan ensimmäisen kvadrupolin avulla törmäytyskammioon. Törmäytyskammiossa voi olla esimerkiksi inertti kaasu, johon nämä ns. lähtöionit törmäytetään. Kun tunnetaan tutkittavan molekyylin hajoamisreaktio törmäytyksessä, voidaan syntyneet tytärionit ajaa toiseen kvadrupoliin, josta tytärionit päätyvät niiden  $m/z$ -suhteen määrittämänä detektorille. LC-MS/MS-menetelmässä näytteestä tuleva taustakohina laskee, kun detektorille saapuu mahdollisimman vähän muita yhdisteitä kuin tutkittavaa analyyttiä. Myös kolmatta (MS/MS/MS) tai useampaa kvadrupolia voidaan käyttää, jolloin sensitiivisyys voi parantua (44).



Kuva 6. LC-MS/MS -analyysilaitteiston toimintaperiaate. LC-MS/MS = nestekromatografi-tandemmassaspektrometri.

Massaspektrometrin suorituskykyä kuvaa hyvin kaksi arvoa. Ensimmäinen on toteamisraja eli LOD (limit of detection), joka kertoo, mikä on pienin määrä tutkittavaa yhdistettä eli analyyttiä, joka voidaan näytteestä havaita. Analyytistä tuleva signaali, joka ylittää kolminkertaisesti taustakohinan keskiarvon ( $S/N \geq 3$ ), pidetään yleisesti hyväksyttynä LOD-arvona (41). Toinen arvo on määrittämisraja eli LOQ (limit of quantification), joka kertoo, mikä on pienin määrä analyyttiä, jonka pitoisuus voidaan luotettavasti määrittää. LOQ on arvo, jolla menetelmän toistettavuus ja täsmävyys saavuttavat vaaditut kriteerit. Toistettavuus kuvaa satunnaisvirhettä ja täsmävyys systemaattista virhettä. Toistettavuus ja täsmävyys saa poiketa mittausten välillä maksimissaan 15 % ja taustakohina täytyy ylittyä kymmenkertaisesti ( $S/N \geq 10$ ) (45-47).

### 3. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Hiusanalyysi on nousemassa kansainvälisessä tutkimuksessa lupaavaksi menetelmäksi tutkittaessa ihmisen altistumista endogeeniselle steroidiympäristölle, koska hiusräyhteestä on arvioitavissa kumulatiivinen steroidihormonieritys retrospektiivisesti (1-6). Lisäksi hiusräyhteen ottaminen on non-invasiivista ja näytteen säilyttäminen huoneenlämmössä erittäin yksinkertaista ja edullista (2). Steroidien määrittäminen hiusräyhteestä tapahtuu parhaiten nestekromatografia-tandemmassaspektrometrialla (LC-MS/MS), sillä menetelmän avulla pystytään tunnistamaan ja määrittämään pieniäkin steroidipitoisuuksia suurella herkkyydellä ja spesifisyydellä verrattuna esimerkiksi immunokemiallisiin menetelmiin (1). Hiusanalyysistä, jossa määritetään endogeenisten steroidien pitoisuudet, ei ole vakiintunut yksimielistä ja standardoitua menetelmää. Menetelmään liittyvistä tekijöistä, jotka voivat aiheuttaa harhatuloksia tai häiriöitä analytiikassa ja niiden vaikutusarvosta ei myöskään olla yksimielisiä.

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää kirjallisuuskatsauksen avulla hiusanalyysin metodologiaa, kun tutkimuksen kohteena on elimistön pitkäaikaisen steroidihormonierityksen arviointi: miten hiusräyhteitä otetaan ja varastoidaan, miten hiusräyhteet ja massaspektrometrin asetukset valmistellaan steroidianalyysiin sekä mitä analytiikkaan vaikuttavia tekijöitä on huomioitava hiusräyhteitä hyödyntävässä tutkimuksessa. Tämän tutkimuksen tuloksista on mahdollista muodostaa ajantasainen ja hyvän käytännön mukainen menetelmä, jolla voidaan arvioida elimistön pitkäaikaista steroidihormonieritystä.

## 4. AINEISTO JA MENETELMÄT

### 4.1. Aineiston valinta

Tutkimus tehtiin kirjallisuuskatsauksena, joka koottiin tietokantahakuna. Käytetyt tietokannat olivat PubMed, Scopus ja Web Of Science. Hakusanoina käytettiin: hair steroids, hair cortisol, hair testosterone, hair analysis, hair AND (cortiso\* OR testost\* OR analys\* OR steroid\*) AND/OR (OR masspec\* OR \*LC-MS/MS\* OR liquidchromato\* OR \*tandemmass\*). Koottu aineisto jaettiin kahteen osaan: kliinisistä tai kokeellisista tutkimuksista kirjoitettuihin artikkeleihin (kokeelliset tutkimukset) ja metodologiasta kirjoitettuihin katsausartikkeleihin (katsaukset).

Seuraavat kriteerit tuli täytyä, jotta kokeellisesta tutkimuksesta kirjoitettu artikkeli valikoitui aineistoon: tutkimus oli tehty 2000-luvulla, tutkimuksessa onnistuttiin havaitsemaan steroideja hiusnäytteestä, tutkimuksessa esiteltiin metodologiaa, tutkimus kohdistui steroideihin, tutkimuksen analysointimenetelmänä käytettiin massaspektrometriaa ja tutkimus tehtiin ihmisen hiusnäytteillä. Kokeellisista tutkimuksista koottuun aineistoon valikoitui yhteensä 17 tutkimusartikkelia.

Katsauksia käytettiin kokeellisten tutkimusten tukena selvittämään ja kokoamaan yhteen, tekijöitä, jotka voivat aiheuttaa harhatuloksia tai häiriöitä analytiikassa. Katsausten inklusiokriteereinä olivat ajankohtaisuus (julkaistu 2010-luvulla) ja hiusnäyte-tandemmassaspektrometria -metodologian käsittely. Katsauksista koottuun aineistoon valikoitui yhteensä 6 tutkimusartikkelia. Lisäksi aineistoon sisällytettiin tutkimusartikkeleita, jotka olivat joko hiusnäytemenetelmän metodologian tai menetelmän virhetekijöiden selvittämisen kannalta keskeisiä tai ne olivat mainittuna katsauksien referensseissä.

### 4.2. Aineiston arviointi

Kokeellisten tutkimusten arviointiin vaikuttavia taustatietoja on esitelty taulukossa 2. Analysoituja hiusnäytteitä oli kaikissa tutkimuksissa yhteensä 7260 kpl eli tutkimusten

yhteenlaskettu tutkimushenkilöiden otos oli 7260. Otokset vaihtelivat tutkimusten välillä 5 – 4460. Mediaaniotos oli 35 tutkittavaa/tutkimus, alakvartiili 19, yläkvartiili 146. Tutkimusten laatua ja arvostusta arvioitiin julkaisun vaikuttavuuskertoimilla (impact factor eli IF), jotka saatiin Thomson Reutersin julkaisemasta Journal Citation Reports – tietokannasta (48). Vaikuttavuuskerroin oli keskimäärin 4,225 ja sen 95 % luottamusväli oli 3,128 – 5,322.

*Taulukko 2. Aineiston kokeellisten tutkimusten keskeiset taustat.*

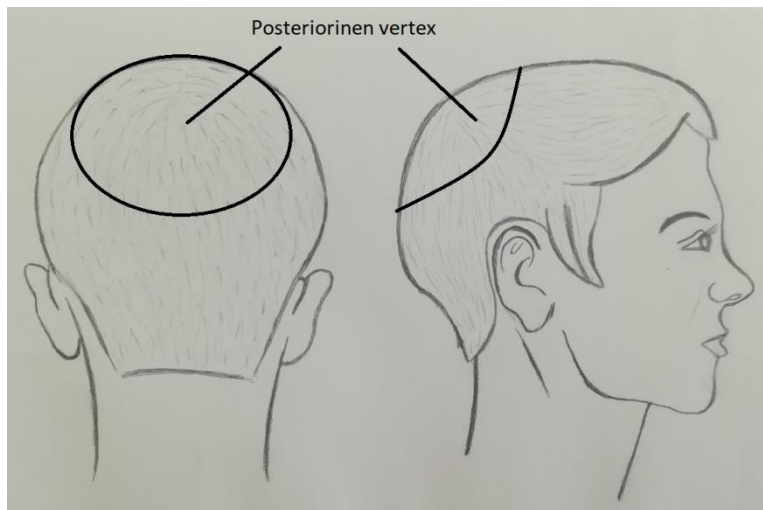
Referenssi	Otos (n)	Julkaisu vuosi	Julkaisun 5 v. IF (2010-2015)
Dettenborn ym. (49)	35	2016	5,183
Abell ym. (50)	4460	2016	5,183
Binz ym. (51)	8	2016	2,729
Gaudi ym. (52)	146	2016	4,150
Wester ym. (53)	9	2016	5,183
Grass ym. (54)	94	2015	5,183
Slominski ym. (38)	16	2015	2,007
Noppe ym. (55)	5	2015	3,469
Staufenbiel ym. (56)	760	2015	5,183
Quinete ym. (57)	33	2015	3,749
Chen ym. (58)	29	2014	2,729
Chen ym. (59)	103	2013	2,729
Steuerte ym. (60)	87	2013	10,779
Xue ym. (64)	19	2013	2,892
Gao ym. (61)	30	2013	2,729
Vanaelst ym. (62)	168	2013	1,882
Stalder ym. (63)	1258	2013	6,061
<b>Yht.</b>	7260		<b>keskiarvo:</b> 4,225 <b>keskihajonta:</b> 2,1339 <b>mediaani:</b> 3,749

## 5. TULOKSET

### 5.1. Hiusnäytteiden kerääminen ja säilyttäminen

#### 5.1.1. Näytteenottoalue ja tarvikkeet

Kaikissa kokeellisissa tutkimuksissa hiushäytteet otettiin hiuspohjan posterioriselta vertexiltä (kuva 7) ja hiushäytteet leikattiin hienoilla saksilla mahdollisimman läheltä pään ihoa. Myös vaaka tarvittiin näytteiden punnitsemiseksi (38,49-64). Muita tarvikkeita olivat näytteiden säilyttämiseen käytettävät muovipussit, muovi- tai lasiputket (38,55,57) tai alumiininen käärefolio (52).



Kuva 7. Posteriorinen vertex on alue päälään takaosassa, superiorisesti ja posteriorisesti korviin nähden.

#### 5.1.2. Analysoitavan hiushäytteen koko ja näytteiden säilyttäminen

Kokeellisten tutkimusten näytekoot ja säilyttämismenetelmät on esitelty taulukossa 3. Analyysia varten hiushäytteitä käytettiin n. 5-50 mg/näyte. Leikattujen hiusten pituus vaihteli eri tutkimuksissa sen perusteella, kuinka pitkältä ajanjaksolta steroidikertymistä haluttiin retrospektiivisesti arvioida. Tutkimuksista yhdeksän käytti hiushäytteen proksimaalista 3 cm:n pituista segmenttiä steroidikertymisen arviointiin. Steroidikertymää lyhyemmältä ajalta arvioitiin kahdessa tutkimuksessa analysoidulla hiushäytteestä proksimaalinen 2 cm (58,59) ja kahdessa muussa tutkimuksessa proksimaalinen 1 cm

(54,64). Pidemmän ajan steroidikertymää analysoitiin käyttämällä pidempää segmenttiä ja eri ajanjaksoja vertailtiin analysoimalla eripituisia segmenttejä (51,62).

Yhdeksässä tutkimuksessa esiteltiin hiusnäytteiden säilyttämistä eli kuvailtiin joko aikaa tai olosuhteita tai molempia. Yksi tutkimusryhmä kertoi säilyttäneensä näytteitä ennen analysointia yli kuukauden (53) ja toinen tutkimusryhmä yli 24 kk (50). Näytteet säilytettiin muovisessa pussissa tai muovi- tai lasiputkissa tai alumiinikääreessä valolta suojassa (38,52,53,57) ja huoneenlämmössä (38,52,55,64). Kahdessa tutkimuksessa näytteet pakastettiin -50 celsiusasteeseen (58,59).

Taulukko 3. Näytteiden koko ja säilyttämismenetelmät kokeellisissa tutkimuksissa. NA = menetelmää ei esitelty.

Referenssi	Analysoitavan näytteen koko	Säilyttäminen
	- proksimaalinen pituus - massa	- aika - olosuhteet
Dettenborn ym. (49)	- 3 cm - 10 mg	NA
Abell ym. (50)	- 3 cm - > 7,5 mg	- > 24 kk - NA
Binz ym. (51)	- 5 cm - 5,6 – 17 mg	NA
Gaudi ym. (52)	- NA - 10-20 mg	- NA - Alumiinikääre ja huoneenlämpö
Wester ym. (53)	- 3 cm - > 5 mg	- > 1 kk - Valolta suojattuna
Grass ym. (54)	- 2 cm - 7,5 mg	NA
Slominski ym. (38)	- NA - 50 mg	- NA - Muovipussi, valolta suojassa, huoneenlämpö
Noppe ym. (55)	- 3 cm - 10 – 30 mg	- NA - Lasiputket, huoneenlämpö
Staufenbiel ym. (56)	- 3 cm - 50 mg	NA
Quinete ym. (57)	- 3 cm - 50 mg	- NA - Muoviputket
Chen ym. (58)	- 1 cm - 20 mg	- NA - Pakastus – 50 °C



Referenssi	Analysoitavan näytteen koko	Säilyttäminen
	- proksimaalinen pituus - massa	- aika - olosuhteet
Chen ym. (59)	- 1 cm - 20 mg	- NA - Pakastus – 50 °C
Steudte ym. (60)	- 6 cm (2 x 3 cm) - NA	NA
Xue ym. (64)	- 1 cm - 30 mg	- NA - Kuivat putket, huoneenlämpö
Gao ym. (61)	- 3 cm - 10 mg	NA
Vanaelst ym. (62)	- 6 cm - 50 mg	NA
Stalder ym. (63)	- 3 cm - 10 mg	NA

## 5.2. Hiusnäytteiden valmistelu ennen analysointia

### 5.2.1. Puhdistaminen ja kuivakäsittely

Kokeellisten tutkimusten näytteiden esivalmistelut eli puhdistaminen ja kuivakäsittely ennen steroidien ekstraktiota ja analyysivaihetta on esitetty taulukossa 4. Hiusnäytteiden puhdistaminen kontaminaatioiden poistamiseksi esiteltiin kaikissa paitsi kolmessa tutkimuksessa (38,62,64). Yksitoista tutkimusta puhdisti näytteet isopropanolilla (IPA) ja pesuvaihe kesti 2-3 min (49,50,52-57,60,61,63). Muita käytettyjä puhdistusmenetelmiä olivat vedellä ja asetonilla suoritettu kaksivaiheinen pesu (51) ja yhden tutkimusryhmän kahdessa eri tutkimuksessa käyttämä metanolipesu (58,59). Hiusnäytteiden annettiin kuivua pesun jälkeen yli 12 h (49-52,57,59,61) tai yli kahden päivän ajan (53,55).

Yhdeksän tutkimusryhmää ei tehnyt näytteille kuivakäsittelyä eli hienontanut hiusnäytteitä mekaanisesti ennen ekstraktiota, mutta kahdeksassa tutkimuksessa hiusnäytteet joko hienonnettiin saksilla tai pulverisoitiin. Näytteen kuivakäsittelyyn päätyneistä tutkimuksista neljä hienonsi saksilla hiussuortuvat pienempiin osiin (56,57,59,62) ja yhdessä tutkimuksessa näytteet pulverisoitiin siihen tarkoitetulla laitteella (58). Kolme tutkimusta käytti ja vertaili molempia vaihtoehtoja näytteen kuivakäsittelyssä (38,51,64).

Taulukko 4. Näytteiden puhdistaminen ja kuivakäsittely kokeellisissa tutkimuksissa. NA = menetelmää ei esitelty.

Referenssi	- Puhdistusaine ja käyttöaika - Kuivaolosuhteet: aika ja lämpötila	Näytteen kuivakäsittely EI = ei käsittely L = leikeltä P = pulverisoitu
Dettenborn ym. (49)	- IPA, 3 min - > 12 h	EI
Abell ym. (50)	- IPA, 3 min - > 12 h	EI
Binz ym. (51)	- H <sub>2</sub> O (3 min) + Asetoni (2 min) - > 12 h (huoneenlämpö)	L + P
Gaudl ym. (52)	- IPA, 3 min - > 12 h	EI
Wester ym. (53)	- IPA - > 2 d (huoneenlämpö)	EI
Grass ym. (54)	- IPA, 3 min x 2 - NA	EI
Slominski ym. (38)	NA	L + P
Noppe ym. (55)	- IPA - > 2 d (huoneenlämpö)	EI
Staufenbiel ym. (56)	- IPA, 2 min - NA	L
Quinete ym. (57)	- IPA, 2 min - yön yli	L
Chen ym. (58)	- MeOH (puhdistus kahdesti) - NA	P
Chen ym. (59)	- MeOH, 2 min - yön yli	L
Steudte ym. (60)	- IPA - NA	EI
Xue ym. (64)	NA	P + EI
Gao ym. (61)	- IPA, 3 min - > 12 h	EI
Vanaelst ym. (62)	NA	L
Stalder ym. (63)	- IPA, 3 min - NA	EI

IPA = isopropanoli, MeOH = metanoli, H<sub>2</sub>O = ionivaihdettu vesi.

### 5.2.2. Steroidiuutto

Kokeellisten tutkimusten uuttamismenetelmät on esitelty taulukossa 5. Kaikissa tutkimuksissa näytteiden steroidiuuton liuottimena käytettiin metanolia. Binz ym. tutkimuksessa kokeiltiin ja vertailtiin uuttoa neljällä eri menetelmällä, joissa yhdessä käytettiin metanolin lisäksi metaanihappoa (51). Slominski ym. tutkimuksessa uuttamismenetelmä oli kaksivaiheinen, jossa ensimmäisen metanoliuuton ja sentrifugoinnin jälkeen toisen vaiheen liuottimena käytettiin asetonia (38).

Näytteitä inkuboitiin eli haudutettiin uuttoluoksessa yleensä 14 tunnista vuorokauteen. Tästä poikkesi kuitenkin erityisellä tavalla kaksi eri tutkimusta, joiden tarkoituksena oli

verrata eri inkubointiaikoja. Xue ym. vertailivat 25 °C lämpötilassa kahtatoista eri inkubaatioaikaa, jotka olivat viidestä minuutista 72 tuntiin (64). Binz ym. vertailivat myös hauduttamisaikoja ja kokeilemissaan neljässä eri menetelmässä hauduttamisaika vaihteli neljästä tunnista 16 tuntiin lämpötilan ollessa 55 °C (51). Yksitoista tutkimusryhmää käytti 18 tunnin inkubointia ja näistä kymmenen tapahtui huoneenlämmössä eli n. 25 °C. Yksi tutkimus ilmoitti lämpötilaksi 45 °C (60). Chen ym. käyttivät ensimmäisessä tutkimuksessaan 24 tunnin inkubaatioaikaa huoneenlämmössä (59) ja jälkimmäisessä tutkimuksessaan 14 tunnin inkubaatioaikaa 40°C lämpötilassa (58). Vanaelst ym. ilmoittivat inkuboineensa näytteitä 24 tuntia, mutta inkubointilämpötilaa ei ilmoitettu (62).

Tutkimuksista 15:ssä ilmoitettiin sentrifugointimenetelmä (taulukko 5). Viisi tutkimusta ilmoitti käyttäneensä 10 000 kierrosta minuutissa (rpm) ja näiden tutkimusten sentrifugointiaika oli 2 min (49,50,52,60,61). Neljä tutkimusta ilmoitti sentrifugoinnin kierrosnopeudeksi 4500 rpm ja ajaksi 10 min (57) tai 5 min (53,55,56). Chen ym. käyttivät molemmissa tutkimuksissaan 12 000 rpm, mutta ensimmäisessä tutkimuksessa sentrifugointiaika oli 5 min ja myöhemmässä 10 min (58,59). Myös Xue ym. käyttivät sentrifugoinnissa 12 000 rpm sentrifugointiajan ollessa 10 min (64). Binz ym. käyttivät nopeutena 9000 rpm ja aikana 10 min (51). Stalder ym. ilmoittivat sentrifugoinnin aiheuttaneen keskimääräisesti 15-kertaisen putoamiskiihtyvyyden näytteisiin kahden minuutin ajan (63). Slominski ym. tutkimuksessa sentrifugointi oli kaksivaiheinen (200 rpm, 2 min), koska ekstraktio tapahtui kahdessa eri vaiheessa (38).

Liuoksesta haihdutettiin eli evaporoitiin liuotin, jolloin jäljelle jäi uuttosakka. 14 tutkimusta esitteli haihduttamisen, ja 13 näistä käytti haihduttamiseen typpivirtaa ja vakuumia (taulukko 5). Yhdessä tutkimuksessa haihduttaminen tapahtui huoneilmassa ja 4 °C lämmössä (38). Haihduttamisen lämpötila ja aika oli viidessä tutkimuksessa 65 °C ja 20 min (49,50,52,61,63). Toiset viisi tutkimusryhmää käyttivät haihduttamiseen 50 °C lämpötilaa, mutta eivät ilmoittaneet käytettyä aikaa (53-56,58). Binz ym. käyttivät 35 °C lämpötilaa ja Steudte ym. 60 °C lämpötilaa, mutta kummatkaan tutkimukset eivät ilmoittaneet käytettyä aikaa (51,60). Xue ym. esittelivät haihduttaneensa liuottimen typpivirrassa, mutta käytettyä lämpötilaa tai aikaa ei ilmoitettu (64).

Haihduttamisen jälkeen uuttosakka liuotettiin uuteen liuokseen (rekonstituutio), joka tultiin syöttämään nestekromatografia-tandemmassaspektrometriin (taulukko 5). Ainoastaan

yhdessä tutkimuksessa ei ilmoitettu käytettyä rekonstituutioliuotinta (57). Rekonstituutioliuottimena käytettiin seitsemässä tutkimuksessa ionivaihdettua vettä (49,50,52,54,60,61,63). Viisi tutkimusryhmää liuotti ekstraktiosakan metanoliin (53,55,56,59,64). Kolme tutkimusta käytti liuotinseosta, joka koostui metanolista, ammoniumformaattista ja metaanihaposta (51) tai metanolista ja ionivaihdetusta vedestä (59) tai asetonitriilistä ja metaanihaposta (62). Slomiski ym. käyttivät rekonstituutioon PBS-puskuriliuosta (38).

Taulukko 5. Steroidiekstraktiomenetelmät kokeellisissa tutkimuksissa. NA = menetelmää ei esitelty.

Referenssi	Uuttoliuotin ja inkubointimenetelmä	Sentrifugointi	Haihduttaminen	Rekonstituutioliuos
Dettenborn ym. (49)	MeOH + IS 18 h, huoneenlämpö	10 000 rpm 2 min	N <sub>2</sub> 65 °C 20 min	H <sub>2</sub> O
Abell ym. (50)	MeOH + IS 18 h, huoneenlämpö	10 000 rpm 2 min	N <sub>2</sub> 65 °C 20 min	H <sub>2</sub> O
Binz ym. (51)	Metodi A: MeOH + IS 16h,55 °C  Metodi B: MeOH 2 h, 55 °C x 2  Metodi C: MeOH + IS + 1% metaanihappo 3 h, 55 °C x 2  Metodi D: MeOH + IS (50 Hz, 90 min) sentrifugointi MeOH 16 h, 55 °C	9000 rpm 10 min	N <sub>2</sub> 35 °C	MeOH NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub> metaanihappo
Gaudl ym. (52)	MeOH + IS 18 h, huoneenlämpö	10 000 rpm 2 min	N <sub>2</sub> 65 °C 20 min	H <sub>2</sub> O
Wester ym. (53)	MeOH + IS 18 h, huoneenlämpö	4500 rpm 5 min	N <sub>2</sub> 50 °C	MeOH
Grass ym. (54)	MeOH + IS 18 h, huoneenlämpö	NA	N <sub>2</sub> 50 °C	H <sub>2</sub> O
Slominski ym. (38)	Kaksivaiheinen: MeOH + IS Asetoni	200 rpm 200 rpm 5 min	ilma 4 °C	PBS
Noppe ym. (55)	MeOH + IS 18 h, huoneenlämpö	4500 rpm 5 min	N <sub>2</sub> 50 °C	MeOH
Staufenbiel ym. (56)	MeOH + IS 18 h, huoneenlämpö	4500 rpm 5 min	N <sub>2</sub> 50 °C	MeOH
Quinete ym. (57)	MeOH + IS 18 h, huoneenlämpö	4500 rpm 10 min	NA	NA

Referenssi	Uuttoliuotin ja inkubointimenetelmä	Sentrifugointi	Haihduttaminen	Rekonstituutioliuos
Chen ym. (58)	MeOH + IS 14 h, 40 °C	12 000 rpm 10 min	N <sub>2</sub> 50 °C	MeOH H <sub>2</sub> O
Chen ym. (59)	MeOH + IS 5 d, 25 °C	12 000 rpm 5 min	NA	MeOH
Stedte ym. (60)	MeOH + IS 18 h, 45 °C	10 000 rpm 2 min	N <sub>2</sub> 60 °C	H <sub>2</sub> O
Xue ym. (64)	MeOH + IS 5 min – 72 h (inkubaatioaikojen vertailu)	12 000 rpm 10 min	N <sub>2</sub>	MeOH
Gao ym. (61)	MeOH + IS 18 h, huoneenlämpö	10 000 rpm 2 min	N <sub>2</sub> 65 °C 20 min	H <sub>2</sub> O
Vanaelst ym. (62)	MeOH + IS 24 h	NA	NA	asetonitriili metaanihappo
Stalder ym. (63)	MeOH + IS 18 h, huoneenlämpö	15 000 G 2 min	N <sub>2</sub> 65 °C 20 min	H <sub>2</sub> O

*MeOH* = metanoli, *IS* = sisäinen standardi, *N<sub>2</sub>* = typpivirta, *H<sub>2</sub>O* = ionivaihdettu vesi, *NH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub>* = ammoniumformiaatti

### 5.2.3. Jälkipuhdistus

Ekstraktion jälkeen rekonstituutioliuokset puhdistettiin vielä kerran mahdollisista epäpuhtauksista kiinteäfaasierottelulla (SPE) ennen siirtämistä LC-MS/MS-analysointilaitteeseen. Tämä vaihe ilmoitettiin 12 tutkimuksessa (taulukko 6).

Taulukko 6. Jälkipuhdistuksen käyttö kiinteäfaasikromatografialla kokeellisissa tutkimuksissa.

Referenssi	Jälkipuhdistus
Dettenborn ym. (49)	-
Abell ym. (50)	SPE
Binz ym. (51)	-
Gaudl ym. (52)	SPE
Wester ym. (53)	SPE
Grass ym. (54)	SPE
Slominski ym. (38)	SPE
Noppe ym. (55)	SPE
Staufenbiel ym. (56)	SPE
Quinete ym. (57)	SPE

Referenssi	Jälkipuhdistus
Chen ym. (58)	SPE
Chen ym. (59)	SPE
Steutde ym. (60)	-
Xue ym. (64)	-
Gao ym. (61)	SPE
Vanaelst ym. (62)	-
Stalder ym. (63)	SPE

*SPE = solid phase extraction, kiinteäfaasierottelu.*

### 5.3. Massaspektrometriset asetukset ja määritetyt steroidihormonit

Massaspektrometriset asetukset eli reaktioiden monitorointimenetelmä, nestekromatografian painevalinta ja käytetty ionisaatio on esitelty taulukossa 7. Nestekromatografi oli 12:ssa tutkimuksessa HPLC (high pressure liquid chromatography), neljässä tutkimuksessa UPLC (ultra high performance liquid chromatography) ja yhdessä tutkimuksessa UFLC (ultra fast liquid chromatography). Kolonnin kiinteä faasi koostui kaikissa tutkimuksissa hiilikolonnista (C<sub>18</sub>). Ionisaatiovaihtoehdoista suosituin oli ESI, jota käytettiin kymmenessä tutkimuksessa. Viisi tutkimusta käytti ionisaatioon APCI-menetelmää. Gaudl ym. vertailivat molempia edellä mainittuja ionisaatiotekniikoita (52). Vanaelst ym. eivät ilmoittaneet käytettyä ionisaatiotekniikkaa (62). Käytetyn ionisaatiotekniikan positiivisuus/negatiivisuus määräytyi sen mukaan, mitä steroidia oli tavoitteena havaita. Kaikissa tutkimuksissa käytettiin useiden reaktioiden monitorointia (multiple reaction monitoring, MRM) eli massa-analyssaattorit säädettiin tuottamaan detektorille useita eri yhdisteitä. Kaksi tutkimusta hyödynsi lisäksi MS<sup>3</sup> -tekniikkaa, jossa tandemmassaspektrometriin lisättiin vielä kolmas kvadrupoli (52,57).

Tutkittuja ja havaittuja steroidihormoneja hiusnäytteissä oli 16 tutkimuksessa kortisoli (38,49-64), 11 tutkimuksessa kortisoni, kolmessa tutkimuksessa testosteroni ja kahdessa DHEAS (taulukko 7). Noppe ym. määrittivät näiden steroidien lisäksi hiusnäytteistä myös 17- $\alpha$ -OH-progesteroni- ja androsteenidionipitoisuudet (55). Gao ym. puolestaan määrittivät edellä mainittujen hormonien lisäksi (pl. DHEAS ja 17- $\alpha$ -OH-progesteroni) progesteroni-, DHEA- ja kortikosteronipitoisuudet (61).

Taulukko 7. Massaspektrometriset asetukset ja kvantifioidut steroidihormonit kokeellisissa tutkimuksissa.

Referenssi	Kromatogrammin paine	Ionisaatio	Monitorointi	Kvantifioidut steroidit
Dettenborn ym. (49)	HPLC	APCI	MRM	Kortisoli Testosteroni
Abell ym. (50)	HPLC	APCI	MRM	Kortisoli
Binz ym. (51)	HPLC	ESI	MRM	Kortisoli
Gaudl ym. (52)	UFLC	ESI + APCI (vertailu)	MRM (MS <sup>3</sup> )	Kortisoli Kortisoni
Wester ym. (53)	UPLC	ESI	MRM	Kortisoli Kortisoni
Grass ym. (54)	HPLC	APCI	MRM	Kortisoli
Slominski ym. (38)	HPLC	APCI	MRM	Kortisoli
Noppe ym. (55)	UPLC	ESI	MRM	Kortisoli Kortisoni Testosteroni 17 $\alpha$ -OH-progesteroni Androsteenidioni DHEAS
Staufenbiel ym. (56)	UPLC	ESI	MRM	Kortisoli Kortisoni
Quinete ym. (57)	HPLC	ESI	MRM (MS <sup>3</sup> )	Kortisoli Kortisoni
Chen ym. (58)	HPLC	ESI	MRM	Kortisoli Kortisoni
Chen ym. (59)	HPLC	ESI	MRM	Kortisoli Kortisoni DHEAS
Stuedte ym. (60)	HPLC	ESI	MRM	Kortisoli
Xue ym. (64)	HPLC	ESI	MRM	Kortisoli Kortisoni
Gao ym. (61)	HPLC	APCI	MRM	Kortisoli Kortisoni Testosteroni Progesteroni Kortikosteroni Androsteenidioni DHEA
Vanaelst ym. (62)	UPLC	-	MRM	Kortisoni
Stalder ym. (63)	HPLC	ESI	MRM	Kortisoli Kortisoni

*HPLC = high pressure liquid chromatography eli korkeapaine nestekromatografi, UPLC = ultra high performance liquid chromatography eli erittäin suuren erotuskyvyn nestekromatografi, UFLC = ultra fast liquid chromatography eli erittäin korkean nopeuden nestekromatografi, ESI = electrospray ionization eli elektronisuihku ionisaatio, APCI = atmospheric pressure chemical ionization eli kemiallinen ionisaatio ilmanpaineessa, MRM = multiple reaction monitoring eli useiden reaktioiden monitorointi, MS<sup>3</sup> = triple quadropole tandem mass spectrometry eli kolmoiskvadrupoli tandemmassaspektrometria.*

Havaittujen steroidien määritysrajat (LOQ) ilmoitettiin kahdeksassa tutkimuksessa (taulukko 8). LOQ ilmoitettiin lukuna, jossa näytteestä havaittu steroidimassa suhteutettiin analysoidun hiusnäytteen massaan eli yksiköksi tuli pg/mg. Seitsemässä tutkimuksessa määritysrajat olivat kortisolille 0,09 – 2,0 (ka. 0,93; med. 1,0) ja seitsemässä tutkimuksessa kortisonille 0,07 – 9,3 (ka. 2,76; med. 1,6). Kaksi tutkimusryhmää määrittä testosteronille

ja androsteenidionille LOQ:n. Testosteronille LOQ oli ensimmäisessä tutkimuksessa 0,08 ja toisessa tutkimuksessa 2,3. Androsteenidionille LOQ oli ensimmäisessä tutkimuksessa 0,08 ja toisessa tutkimuksessa 1,3.

Taulukko 8. Määritetyt LOQ-arvot kvantifioituille steroideille pikogrammoina hiusnäytteen massaa kohden eli yksikössä pg / mg.

Steroidi	Binz ym. (51)	Gaudl ym. (52)	Stalder ym. (63)	Quinete ym. (57)	Gao ym. (61)	Noppe ym. (55)	Chen ym. (58)	Vanaelst ym. (62)	ka.	med.
Kortisoli	1,0	0,8	0,1	2,0	0,09	1,3	1,25		0,93	1,0
Kortisoni		1,6	0,1	2,0	0,07	9,3	1,25	5	2,76	1,6
Kortikosteroni					0,08				0,08	
Testosteroni					0,08	2,3			1,19	
Androsteenidioni					0,08	1,3			0,69	
DHEA					0,9				0,9	
DHEAS						15,9			15,9	
Progesteroni					0,09				0,09	
17- $\alpha$ -progesteroni						1,87			1,87	

Ka. = keskiarvo, med. = mediaani.

## 5.4. Harhatuloksia ja häiriöitä aiheuttavat tekijät analytiikassa

### 5.4.1. Hiusten käsittely ja hiusten luonnollinen väri

Gaudl ym. havaitsivat hiusten värjäyksen johtavan kortisoli- ja kortisonipitoisuuden vähenemiseen 30 ja 60 % verrattuna samojen näytteiden luonnolliseen tilaan (52). Myös Abell ym. ja Quinete ym. raportoivat hiusten värjäyksen vaikuttavan hiusten steroidipitoisuuksiin (50,57). Hiusten voimakas käsittely (värjäys, valkaisu, permanentti yms.) saattaa vaikuttaa steroidipitoisuuksiin hiuksessa (27,63). Hiusta värjättäessä sen rakennetta vaurioitetaan ja sisältöä muutetaan, jolloin hiuksen sisältämät yhdisteet, kuten steroidit saattavat muuntua tai poistua hiuksesta. Hiussuortuviin siirretty hiusväriaine myös kasvattaa hiuksen massaa, joten värjättyjen hiusten massa poikkeaa luonnollisesta massasta ja aiheuttaa steroidipitoisuuksien laskennallisen muutoksen. Katsaukset, jotka ovat tutkineet hiusten värjäysten vaikutusta hiusten steroidipitoisuuksiin, arvioivat vaikutuksen olevan pieni ja peräänkuuluttavat lisätutkimuksia vaikutuksista (3,4,6). Hiuksen



luonnollisen värin tai muotoilutuotteiden käytön ei ole todettu aiheuttavan muutoksia steroidipitoisuuksiin (27,34,65).

#### *5.4.2. Ultraviolettisäteily ja lämpö*

Wester ym. havaitsivat UV-säteilyn pienentävän kortisolin ja kortisonin pitoisuuksia hiusnäytteessä verrattuna samaan natiivinäytteeseen (53). Gaudl ym. havaitsivat UV-säteilyllä kortisolipitoisuuksien kasvavan n. 12 % ja kortisonipitoisuuksien pienenevän hieman. He raportoivat myös hiusnäytteen lämpökäsittelyn hiusraudalla (hiustensuoristaja tai -kihartaja) laskevan n. 20 % näytteiden sisältämiä kortisoli- ja kortisonipitoisuuksia (52). Samanlaisia tuloksia on saatu myös muissa tämän tutkimuksen ulkopuolisissa kokeellisissa tutkimuksissa (32,33).

#### *5.4.3. Hiusten pesufrekvenssi*

Hiusten pesufrekvenssi tarkoittaa sitä, kuinka usein tutkittavat pesevät hiuksensa shampoolla tiettyä ajanjaksona, esimerkiksi viikon aikana. Abell ym. havaitsivat, että hiusten pesufrekvenssi oli kääntäen verrannollinen hiusten steroidipitoisuuksiin. Ne tutkittavat, jotka pesivät hiuksensa useammin, saivat hiusnäytteen kvantitatiivisessä analysoinnissa pienempiä steroidipitoisuuksia verrattuna niihin tutkittaviin, jotka pesivät hiuksensa harvemmin (50). Tosin erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä, mutta tämän tutkimuksen ulkopuolisissa tutkimuksissa Li ym. löysivät samansuuntaisen tilastollisesti merkitsevän eron ihmisen hiusnäytteillä, kuten myös Hamel ym. interventiotutkimuksessa reesusapinoilla (32,33). Wosu ym. tutkimusryhmän katsauksen mukaan suurin osa tutkimuksista ei ole kyennyt havaitsemaan hiusten pesufrekvenssillä olevan vaikutusta hiusten kortisolipitoisuuteen (6).

#### *5.4.4. Hiusten pituuteen liittyvät virhetekijät*

Gaudl ym. havaitsivat hiusten suhteellisen kortisolipitoisuuden laskevan tasaisesti, mitä distaalisemmasta osasta hiusnäytettä analysoitiin. He käyttivät proksimaalisinta 2 cm:n

pituista näytettä vertailukohtana, josta 6 cm:n pituisessa näytteessä suhteellinen steroidipitoisuus oli vertailupisteen arvosta 60-80 %, 8 cm:n näytteessä 50-70 % ja 15 cm:n näytteessä 10-20 % (52). Tämän tutkimuksen ulkopuolisista kokeellisista tutkimuksista on saatu runsaasti samansuuntaisia tuloksia, jossa hiusten steroidipitoisuus laskee distaalisesti (35,66-70). Havaintoa ei olla kuitenkaan kyetty vahvistamaan kaikissa tutkimuksissa (36,37).

Hiusten pituuskasvun nopeuteen liittyy mahdollisesti isoja eroja eri yksilöiden välillä, mutta eroja on havainnointu eri etnisten ryhmien välillä. Kolmen eri maantieteellisen kantaväestön välillä tehdyssä vertailututkimuksessa havaittiin hiusten keskimääräisen kasvunopeuden olevan afrikkalaisilla  $288 \pm 51 \mu\text{m}$ , aasialaisilla  $421 \pm 53 \mu\text{m}$  ja kaukasialaisilla  $371 \pm 59 \mu\text{m}$  vuorokaudessa (71).

## 6. POHDINTA

Tämän katsauksen tulokset osoittavat, että menetelmä hiusnäytteen steroidiprofiilin määrittämiseksi muodostuu osioista hiusnäytteiden ottaminen ja varastointi, hiusnäytteiden valmistelu ennen analysointia ja massaspektrometriset asetukset. Harhatuloksia ja häiriöitä aiheuttavien tekijöiden arvioiminen on tärkeä osa hiusanalyysin metodologiaa, koska nämä tekijät vaikuttavat tulosten analysointiin. Siksi metodologiaan kuuluu myös selvittää tutkimuspotilailta asiat, jotka voivat vaikuttaa näytteen laatuun.

Osiot pitävät sisällään useita vaihtoehtoisia toimia tai eri reagenssien käyttöä, mutta muutamat asiat alkavat vakiintua laboratorioden hyvän käytännön menetelmiksi. Tässä pohdinnassa selvitetään katsausartikkelien avustuksella, mitkä kokeellisten tutkimusten menetelmät nauttivat suurinta suosiota metodologian eri osioissa.

### 6.1. Hiusnäytteiden ottaminen ja varastointi

Näytteenottoalueena toimii parhaiten pääläen posteriorinen vertex, sillä tämä alue edustaa kasvunopeuden suhteen tasaisinta hiusmateriaalia (23). Tärkeää näytteenoton aluevalinnassa on myös se, että tutkimuksen kaikilta tutkittavilta saadaan otettua näyte ja näyte otetaan kaikilta samalta alueelta, jotta eri näytteet ovat keskenään mahdollisimman vertailukelpoiset. Esimerkiksi tutkittaessa vastasyntyneiden hiusnäytteitä ollaan tyydytty asettamaan näytteenottoalue hiuksiin niskarajassa, jossa hiuskasvu on vastasyntyneillä yleisempää (72). Huomionarvoista on myös ottaa näyte niin, ettei siitä jäisi näkyvää jälkeä kampaukseen. Tämän oletetaan kasvattavan tutkittavien tutkimusmyönteisyyttä.

Hiusnäyte leikataan saksilla mahdollisimman läheltä pään ihoa. Hiusnäytteen nyppiminen päästä ei ole vaihtoehto, sillä nyppimällä hiusnäytteeseen voi päätyä hiusfolliikkeleita sekä verta, jolloin steroidianalyysin tulokset saattavat vääristyä, kun näyte ei edusta enää yksinomaan hiussisältöisiä steroidipitoisuuksia. Lisäksi nyppiminen kasvattaa suuresti näytteenoton invasiivisuutta ja on mielletty tutkittavalle subjektiivisesti erittäin

epämiellyttäväksi, varsinkin kun hiussuortuvia tarvitaan jopa satoja riittävän näytemassan saavuttamiseksi (3).

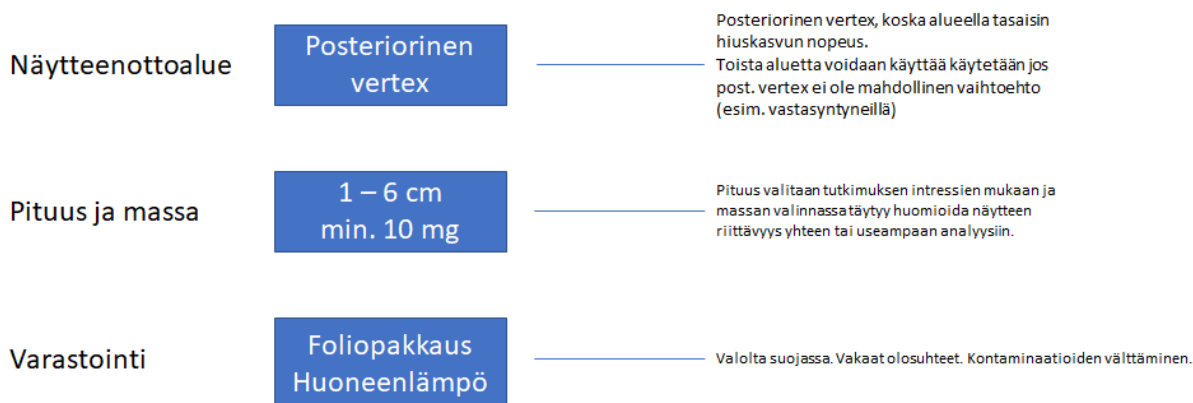
Tutkittavien hiusnäytteiden pituus määrittää sen, mitä ajanjaksoa näytteestä analysoitu steroidiprofiili edustaa. Steroidiprofiilista voidaan sitten arvioida elimistön steroidimiljöön valitulta ajanjaksolta. Suurimmassa osassa tutkimuksia on analysoitu 3 cm:n pituinen proksimaalinen osa hiusta, olettaen sen edustavan steroidiprofiililtaan elimistön steroidimiljöötä näytteenottoa edeltäneeltä kolmelta kuukaudelta. Kuitenkin lisätutkimuksia peräänkuulutetaan seuraavista asioista: kertyykö hiuksiin steroideja oletuksen mukaisesti suoraan verenkierron vapaasta steroidifraktiosta, missä määrin hiusfollikkeli kykenee itse tuottamaan ja muokkaamaan steroideja sekä varastoituuko steroidit tasaisesti hiussuortuvan pituussegmentteihin hiuskasvun mukana. Yhteinen konsensus tällä hetkellä on se, että proksimaalinen 1 - 6 cm hiuksesta edustaa verenkierrossa vapaana olleiden steroidien pitoisuuksia 1 – 6 kk:n ajalta (1,2,73).

Leikatun hiusmäärän eli massan suhteen on huomioitava näytteen riittävyys. Ensimmäinen näytettä tulee olla riittävästi, jotta näyte voidaan analysoida käytössä olevalla LC-MS/MS-laitteistolla. Useimpien valmistajien laitteistot kykenevät havaitsemaan ja kvantifioimaan steroideja kuitenkin melko pienestä määrästä näytettä: jo muutaman milligramman näyte voi riittää ja kymmenien milligrammojen näytteet tuovat mukanaan enemmän kontaminanteja. Kymmenen mg on suositeltu optimaaliseksi määräksi analysoitavaa näytettä (55,61). Toiseksi massan valinnassa on huomioitava, että yhtä näytettä voidaan haluta analysoida useampaan kertaan. Useammalla analyysillä yhdestä näytteestä voidaan määrittää menetelmän luotettavuus. Luotettavuuden määrittäminen tapahtuu mittaamalla samasta näytteestä steroidipitoisuudet, jotka eivät saisi eri analysointikerroilla merkittävästi erota keskenään (74). Lisäksi, jos näytettä on kerätty riittävästi, voidaan siitä käyttää vain osa ja säilöä loppuosa myöhempiä analysointikertoja varten, jos vaikka eri kerralla ollaan kiinnostuneita eri steroideista tai muista näytteen sisältämistä yhdisteistä.

Jos hiusnäytettä säilytetään kuivassa pakkauksessa sekä tasaisessa huoneenlämmössä ja kosteudessa sekä UV-valolta suojassa, oletetaan hiusnäytteen steroidisisällön pysyvän stabiilina (22). Kuivan hiusnäytteen varastointiin riittää suojaisa pakkaus ja pakkauksien arkistointi kaapissa huoneen lämmössä ja kosteudessa. Alumiininen foliopakkaus suojaa hyvin näytettä kontaminoivilta yhdisteiltä sekä valolta. Muovipussit eivät ole hyviä

säilytyspakkauksia lipofiilisten, muovia pehmentävien yhdisteiden takia, sillä ne voivat kontaminoida näytteen ja aiheuttaa häiriöitä analytiikkaan.

### Hiusnäytteiden ottaminen ja varastointi



Kuva 8. Hiusnäytteiden ottamisen ja varastoinnin hyvä käytäntö.

## 6.2. Hiusnäytteiden valmistelu ennen analysointia

Hiusnäytteiden valmistelu ennen analysointia on esitetty kuvassa 9. Useimmissa tutkimuksissa hiusnäytteet puhdistettiin isopropanolilla (IPA). IPA liuottaa hiuksen pinnalta rasvaliukoiset kontaminantit, esimerkiksi hiusmuotoilutuotteet tai kortisonivalmisteet, jotka voisivat häiritä massaspektrometrissä analyysia aiheuttamalla taustakohinaa. Muitakin orgaanisia liuottimia on käytetty puhdistamiseen, mutta huoneenlämmössä metanoli tai muut polaarisemmat yhdisteet voivat tunkeutua hiukseen ja vaurioittaa hiussisältöä sekä vapauttaa steroideja ulos hiusrakenteesta (1,22). Puhdistukseen riittää yksi pesukerta (52). Kokeellisissa tutkimuksissa puhdistamiseen käytetty liuotusaika oli muutama minuutti ja näytteiden kuivumista odotettiin huoneenlämmössä yön yli tai pari päivää.

Hiusnäytteiden kuivakäsittelystä eli näytteiden pilkkomisesta tai pulverisoimisesta koituvasta hyödystä ei ole vakuuttavaa näyttöä. Kuivakäsittelyn oletetaan avaavan paremmin hiusmateriaalia, jolloin steroidihormonit ekstraktoituvat näytteestä paremmin. Kuitenkaan vertailtaessa kuivakäsiteltyjä ja kokonaisia hiuksia hyödyntäviä metodeja, ei ekstraktioissa tai saaduissa steroidikonsentraatioissa ollut merkittävää eroa metodien kesken (51,52,61). Kuivakäsittely aiheuttaa myös paljon lisätyötä ja saattaa aiheuttaa tutkimusmateriaalin häviämistä näytteiden lisäkäsittelyssä, joten kuivakäsittely ei sovellu parhaan käytännön metodologiaan (61,74).

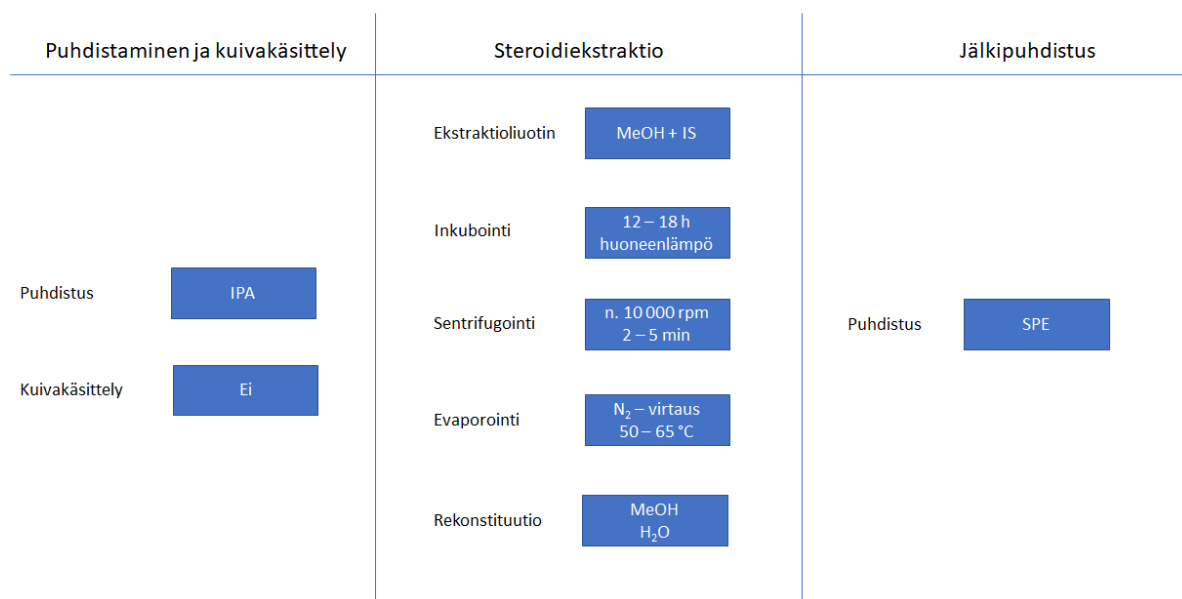
Uuttoliuottimena suosittiin metanolia (MeOH). MeOH on myös Society of Hair Testing -ryhmän suositus uuttoon (22). MeOH tunkeutuu hiukseen vapauttaen steroideja hiusrakenteesta. MeOH ei kuitenkaan aiheuta hydrolyysia ja tutkittavien yhdisteiden hajoamista, toisin kuin vesiliuokoiset hapot (1). Uuttoliuokseen lisättiin myös jokaista tutkittavaa steroidihormonia tunnettu määrä (sisäinen standardi), jotta analyysissä voitiin laskea näytteestä saatu steroidien määrä sen perusteella, kuinka paljon sisäistä standardia voitiin detektorilla havaita.

Kokeellisten tutkimusten välillä oli eroja käytetyssä inkubointiajassa ja -lämpötilassa. Inkubointiaikaa suositellaan annettavan tarpeeksi, jotta hiusmateriaalin kerrostuneisuuden vuoksi metanolille jää riittävästi aikaa tunkeutua hiusmateriaaliin ja uutaa steroidit näytteestä (64). Hyväksi käytännöksi on osoittautunut yön yli (12 – 18 h) inkubointi (1). Inkubointilämpötila vaihteli kokeellisten tutkimusten välillä huoneenlämmöstä 55 °C:een, eikä katsausartikkeleissa ollut suositusta käytettävään lämpötilaan. Binz ym. vertailivat eri inkubointimenetelmiä eivätkä havainneet niiden tuottavan merkittäviä eroja uuton tehokkuuteen ja suosittelivat mahdollisimman yksinkertaista inkubointimenetelmää (51). Inkuboinnin jälkeen neste poistetaan sentrifugoimalla ja haihduttamalla. Suurimmassa osassa kokeellisista tutkimuksista sentrifugointi tapahtui muutaman minuutin ajan nopeudella n. 10 000 kierrosta/min. Haihdutusta voidaan nopeuttaa typpivirralla huoneenlämpöä korkeammassa lämpötilassa (51,52,58,61). Rekonstituutioliuos muodostettiin useimmiten ionivaihdetusta vedestä tai metanolista.

Valitettavasti MeOH:n ekstraktiotehokkuus kasvattaa myös analytiikkaa häiritsevien yhdisteiden määrää ekstraktioliuoksessa. MeOH:n liuottamat epäpuhtaudet minimoitiin useimmissa kokeellisissa tutkimuksissa puhdistamalla rekonstituoitu analyttiliuos

kiinteäfaasierottelulla (SPE) ennen syöttöä nestekromatografi-tandemmassaspektrometriin. SPE vähentää kontaminanttien lisäksi detektorille saapuvaa taustakohinaa ja ionisupressiota, sekä lisää LC-MS/MS-laitteiston puhtautta ja käyttöikää (1).

#### Hiusnäytteiden valmistelu ennen massaspektrometrin analyysia



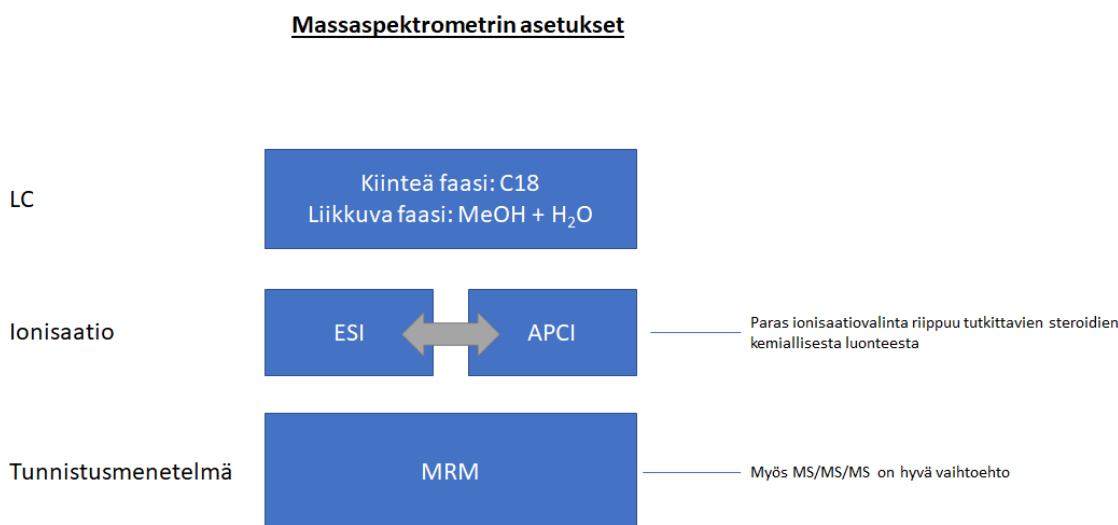
Kuva 9. Hiusnäytteiden valmistelun hyvä käytäntö. IPA = isopropanoli, MeOH = metanoli, IS = internal standard eli sisäinen standardi, N<sub>2</sub>-virtaus = typpivirtaus, H<sub>2</sub>O = ionivaihdettu vesi, SPE = solid-phase extraction eli kiinteäfaasierottelu.

### 6.3. Massaspektrometriset asetukset

Massaspektrometrinen asetusten valinta on esitetty kuvassa 10. Tandemmassaspektrometriin yhdistetään nestekromatografi (LC) yhdisteiden erottelemiseksi. Nestekromatografiin syötetään rekonstituutioliuos ja painetta, jolloin liuos ajautuu kolonniin ja yhdisteet erottuvat toisistaan. Korkealla paineella saadaan yhdisteet eroteltua paremmin ja nopeammin. Kokeellisissa tutkimuksissa käytettiin erilaisia paineita. UPLC-menetelmällä voidaan saavuttaa parempi yhdisteiden erotuskyky kuin tavanomaisella korkeapaineella (HPLC). Paineen valintaan vaikuttaa myös käytettävän kolonnin koko. Käytetyin kiinteäfaasi-kolonne on hiilestä valmistettu C18. Nestefaasiksi valitaan orgaaninen ja vesiliukoinen yhdiste, kuten MeOH tai ionivaihdettu vesi (1).

Tandemmassaspektrometrillä voidaan tunnistaa useita eri steroidihormoneja samanaikaisesti multireaktiomenetelmällä (MRM), joka on herkempi kuin yksittäisionimonitorointi (selected-ion monitoring, SIM). MRM myös nopeuttaa analysointia. Herkkyyttä voidaan parantaa vielä käyttämällä kolmatta kvadrupolia ( $MS^3$  tai  $MS/MS/MS$ ), joka myös toimii multireaktiomenetelmällä (46,52,57). Tämän menetelmän hyödyntämisestä hiusanalyysissä kaivataan vielä lisätutkimuksia (1).

Ionisaatiotekniikka (ESI vs. APCI) riippuu siitä, mitä steroideja halutaan havainnoida, sillä käytetty ionisaatiotekniikka vaikuttaa siihen, kuinka paljon tiettyjä steroideja havaitaan ja kuinka paljon aiheutetaan taustakohinaa. Lisäksi se, käytetäänkö positiivista vai negatiivista moodia, vaikuttaa havainnointiin steroidispesifisesti. ESI:n ja APCI:n tehokkuuden eroista toivotaan lisätutkimuksia (1).



Kuva 10. Hiusanalyysin hyvän käytännön mukaiset massaspektrometriset asetukset. LC = liquid chromatography eli nestekromatografia, C18 = hiilestä valmistettu kiinteäfaasikolonni, MeOH = metanoli, H<sub>2</sub>O = ionivaihdettu vesi, ESI = electrospray ionization eli elektronisuihku ionisaatio, APCI = atmospheric pressure chemical ionization eli kemiallinen ionisaatio ilmanpaineessa, MRM = multiple reaction monitoring eli useiden reaktioiden monitorointi, MS/MS/MS = triple quadropole tandem mass spectrometry eli kolmoiskvadrupoli tandemmassaspektrometri.

#### 6.4. Harhatuloksia ja häiriöitä aiheuttavat tekijät analytiikassa ja muut huomioitavat asiat



Hiusnäytteen steroidisisältö on itsessään stabiili, sillä sen solut eivät ole kykeneviä aineenvaihduntaan ja muokkaamaan steroidisisältöä (24). Ympäristön rasitteet voivat kuitenkin muuttaa hiusten steroidisisältöä. Rasitteita voivat olla UV-säteily, hiusten värjäys, hiusten tiheä pesu ja korkea lämpö, jotka voivat hajottaa hiusrakennetta tai muokata steroideja. Myös kosteus ja rasva-aineet sekä tietyt kemikaalit kuten metanoli voivat liuottaa steroideja hiussuortuvista ympäristöön. Nämä rasitteet ovat huomioitava sekä näytettä otettaessa että varastoitaessa (2-6).

Näytteen luovuttajilta on kysyttävä ainakin seuraavat asiat: ovatko hiukset värjäyty, altistuneet UV-säteilylle tai korkealämpöisille hiustenkäsittelylaitteille ja kuinka usein tutkittava pesee hiuksensa. Tutkimuksen kannalta on olennaista myös selvittää muut tekijät, jotka voivat vaikuttaa endogeeniseen steroidituotantoon ja siten steroidipitoisuuksiin hiuksissa. Hiusta rasittavien asioiden lisäksi on tutkimuksissa selvitetty myös muita hiusten steroidiprofiiliin mahdollisesti vaikuttavia tekijöitä. Tällaisia tekijöitä ovat mm. ikä, sukupuoli, etninen tausta, sairaudet, raskaus, lääkitys, painoindeksi, tupakointi ja päihteiden käyttö. Nämä muuttujat kirjataan ylös ja huomioidaan steroidiprofiilia analysoitaessa.

Hiusnäytettä ei voida ottaa, mikäli tutkimushenkilö ei anna suostumusta näytteen luovuttamiseksi tai tutkimushenkilöllä ei ole hiuksia tai hiukset ovat liian lyhyet näytteen ottamiseksi. Muita poissulkutekijöitä ei ole. Tutkimuksissa kannattaa panostaa siihen, että näytteenottamisen kulku selvitetään huolella potentiaalisille tutkimuspotilaille ja näytteet otetaan esteettinen näkökulma huomioiden. Näin voidaan parantaa tutkimuspotilaiden tutkimusmyönteisyyttä ja kasvattaa tutkimuksen otosta.

## VIITELUETTELO

- (1) Gao W, Kirschbaum C, Grass J, Stalder T. LC–MS based analysis of endogenous steroid hormones in human hair. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2016;162:92-99.
- (2) Russell E, Koren G, Rieder M, ym. Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology* 2012;37:589-601.
- (3) Stalder T, Kirschbaum C. Analysis of cortisol in hair--state of the art and future directions. *Brain Behav Immun* 2012;26:1019-1029.
- (4) Gow R, Thomson S, Rieder M, ym. An assessment of cortisol analysis in hair and its clinical applications. *Forensic Sci Int* 2010;196:32-37.
- (5) Meyer JS, Novak MA. Minireview: Hair cortisol: a novel biomarker of hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity. *Endocrinology* 2012;153:4120-4127.
- (6) Wosu AC, Valdimarsdottir U, Shields AE, ym. Correlates of cortisol in human hair: implications for epidemiologic studies on health effects of chronic stress. *Ann Epidemiol* 2013;23:797-811.
- (7) Koistinen H, Jänne O. Endokriininen järjestelmä: Palautesäätely. Kirjassa: Välimäki M, Sane T, Dunkel L, toim. *Endokrinologia. 2. painos*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim; 2009. s. 12-14.
- (8) Sane T. Lisämunuaisen rakenne ja lisämunuaisen hormonit. Kirjassa: Välimäki M, Sane T, Dunkel L, toim. *Endokrinologia. 2. painos*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim; 2009. s. 351-364.
- (9) Huhtaniemi I. Androgeenit. Kirjassa: Välimäki M, Sane T, Dunkel L, toim. *Endokrinologia. 2. painos*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim; 2009. s. 626-630.
- (10) Huhtaniemi I, Tapanainen J. Kuukautiskierron hormonaalinen säätely. Kirjassa: Ylikorkala O, Tapanainen J, toim. *Naistentaudit ja synnytykset. 5. painos*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim; 2011. s. 35;39-41;44-45.
- (11) Stenman U, Hämäläinen E. Hormonimenetelmän standardointi ja laaduntarkkailu. Kirjassa: Välimäki M, Sane T, Dunkel L, toim. *Endokrinologia. 2. painos*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim; 2009. s. 48.
- (12) Finnish Accreditation Service. 2016; Saatavilla osoitteessa: <https://www.finas.fi/Sivut/default.aspx>. (Luettu 6.6.2017).
- (13) The European co-operation for Accreditation. 2016; Saatavilla osoitteessa: <http://www.european-accreditation.org/home>. (Luettu 6.6.2017).

- (14) Nikiforow M, Kangas H, Mäki T. Laskimoverinäytteenotto. 2015; Saatavilla osoitteessa: [https://huslab.fi/preanalytiikan\\_kasikirja/verinaytteenotto/laskimonaytteenotto.pdf](https://huslab.fi/preanalytiikan_kasikirja/verinaytteenotto/laskimonaytteenotto.pdf). (Luettu 6.6.2017).
- (15) Suvisaari J, Hämäläinen E, Paju A. HUSLAB Tutkimusohjekirja - Kortisoli seerumista. 2016; Saatavilla osoitteessa: <http://huslab.fi/ohjekirja/2129.html>. (Luettu 6.6.2017).
- (16) Suvisaari J, Hämäläinen E, Turpeinen U, Itkonen O. HUSLAB Tutkimusohjekirja - Testosteroni, seerumista. 2016; Saatavilla osoitteessa: <http://huslab.fi/ohjekirja/2735.html>. (Luettu 6.6.2017).
- (17) Stenman U, Hämäläinen E. Hormonimääritysten näytteet. Kirjassa: Välimäki M, Sane T, Dunkel L, toim. Endokrinologia. 2. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim; 2009. s. 46-48.
- (18) Hämäläinen E, Turpeinen U. Syljen kortisoli. 2015; Saatavilla osoitteessa: <http://huslab.fi/ohjekirja/20023.html>. (Luettu 6.6.2017).
- (19) Kangas H, Alppiranta E, Kouri T, ym. Vuorokausivirtsan kerääminen. 2016; Saatavilla osoitteessa: [http://huslab.fi/preanalytiikan\\_kasikirja/virtsanaytteenotto/vuorokausivirtsan\\_keraaminen.pdf](http://huslab.fi/preanalytiikan_kasikirja/virtsanaytteenotto/vuorokausivirtsan_keraaminen.pdf). (Luettu 6.6.2017).
- (20) Hämäläinen E, Turpeinen U. Kortisoli, vapaa, vuorokausivirtsasta. 2012; Saatavilla osoitteessa: <http://huslab.fi/ohjekirja/2130.html>. (Luettu 6.6.2017).
- (21) Stenman U, Hämäläinen E. Hormonimääritysten tulkintaan vaikuttavat tekijät. Kirjassa: Välimäki M, Sane T, Dunkel L, toim. Endokrinologia. 2. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim; 2009. s. 44-46.
- (22) Cooper GAA, Kronstrand R, Kintz P. Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. *Forensic Sci Int* 2012;218:20-24.
- (23) Pragst F, Balikova MA. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clinica Chimica Acta* 2006;370:17-49.
- (24) Harkey MR. Anatomy and physiology of hair. *Forensic Sci Int* 1993;63:9-18.
- (25) Loussouarn G, Lozano I, Panhard S, ym. Diversity in human hair growth, diameter, colour and shape. An in vivo study on young adults from 24 different ethnic groups observed in the five continents. *Eur J Dermatol* 2016;26:144-154.
- (26) Wennig R. Potential problems with the interpretation of hair analysis results. *Forensic Sci Int* 2000;107:5-12.
- (27) Sauve B, Koren G, Walsh G, ym. Measurement of cortisol in human hair as a biomarker of systemic exposure. *Clin Invest Med* 2007;30:183-91.

- (28) Ito N, Ito T, Kromminga A, ym. Human hair follicles display a functional equivalent of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and synthesize cortisol. *FASEB J* 2005;19:1332-1334.
- (29) Barroso M, Gallardo E, Vieira DN, ym. Hair: a complementary source of bioanalytical information in forensic toxicology. *Bioanalysis* 2011;3:67-79.
- (30) Boumba VA, Ziavrou KS, Vougiouklakis T. Hair as a biological indicator of drug use, drug abuse or chronic exposure to environmental toxicants. *Int J Toxicol* 2006;25:143-163.
- (31) Webb E, Thomson S, Nelson A, ym. Assessing individual systemic stress through cortisol analysis of archaeological hair. *Journal of Archaeological Science* 2010;37:807-812.
- (32) Li J, Xie Q, Gao W, ym. Time course of cortisol loss in hair segments under immersion in hot water. *Clinica Chimica Acta* 2012;413:434-440.
- (33) Hamel AF, Meyer JS, Henchey E, ym. Effects of shampoo and water washing on hair cortisol concentrations. *Clinica Chimica Acta* 2011;412:382-385.
- (34) Kirschbaum C, Tietze A, Skoluda N, ym. Hair as a retrospective calendar of cortisol production—Increased cortisol incorporation into hair in the third trimester of pregnancy. *Psychoneuroendocrinology* 2009;34:32-37.
- (35) Gao W, Xie Q, Jin J, ym. HPLC-FLU detection of cortisol distribution in human hair. *Clin Biochem* 2010;43:677-682.
- (36) Thomson S, Koren G, Fraser LA, ym. Hair analysis provides a historical record of cortisol levels in Cushing's syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2010;118:133-138.
- (37) Manenschijn L, Koper JW, Lamberts SWJ, ym. Evaluation of a method to measure long term cortisol levels. *Steroids* 2011;76:1032-1036.
- (38) Slominski R, Rovnaghi CR, Anand KJ. Methodological Considerations for Hair Cortisol Measurements in Children. *Ther Drug Monit* 2015;37:812-820.
- (39) Stenman U, Hämäläinen E. Hormonien määrittäminen: Määrittämenetelmät. Kirjassa: Välimäki M, Sane T, Dunkel L, toim. *Endokrinologia*. 2. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim; 2009. s. 31-38.
- (40) Kostiaainen R. Nestekromatografia-massaspektrometria. Kirjassa: Ketola R, Kostiaainen R, Kotiaho T, Vainiotalo P, toim. *Massaspektrometrian perusteet*. 1. painos. Helsinki: Suomen Massaspektrometrian Seura ry; 2010. s. 171-180.
- (41) Oksman P, Kauppila T, Kotiaho T, Ketola R. Massaspektrometrian peruskäsitteitä. Kirjassa: Ketola R, Kostiaainen R, Kotiaho T, Vainiotalo P, toim. *Massaspektrometrian perusteet*. 1. painos. Helsinki: Suomen Massaspektrometrian Seura ry; 2010. s. 15-23.

- (42) Kostiaainen R. Ionisaatiotekniikat ilmanpaineessa. Kirjassa: Ketola R, Kostiaainen R, Kotiaho T, Vainiotalo P, toim. Massaspektrometrian perusteet. 1. painos. Helsinki: Suomen Massaspektrometrian Seura ry; 2010. s. 68-69.
- (43) Haapala M. Kvadrupolianaalysointit. Kirjassa: Ketola R, Kostiaainen R, Kotiaho T, Vainiotalo P, toim. Massaspektrometrian perusteet. 1. painos. Helsinki: Suomen Massaspektrometrian Seura ry; 2010. s. 27-34.
- (44) Jänis J, Vainiotalo P. Tandemmassaspektrometria. Kirjassa: Ketola R, Kostiaainen R, Kotiaho T, Vainiotalo P, toim. Massaspektrometrian perusteet. 1. painos. Helsinki: Suomen Massaspektrometrian Seura ry; 2010. s. 116-128.
- (45) Ottoila P. Kvantitatiivinen massaspektrometria. Kirjassa: Ketola R, Kostiaainen R, Kotiaho T, Vainiotalo P, toim. Massaspektrometrian perusteet. 1. painos. Helsinki: Suomen Massaspektrometrian Seura ry; 2010. s. 187-191.
- (46) Kushnir MM, Rockwood AL, Roberts WL, ym. Liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of steroids in clinical laboratories. *Clin Biochem* 2011;44:77-88.
- (47) Kushnir MM, Rockwood AL, Bergquist J. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry applications in endocrinology. *Mass Spectrom Rev* 2010;29:480-502.
- (48) Thomson R. ISI Web Of Knowledge: Journal Citation Reports. 2016; Saatavilla osoitteessa: <http://admin-apps.webofknowledge.com/JCR/JCR?PointOfEntry=Home&SID=Q2fBQNJ3SXA5yAr2x6x>. (Luettu 6.6.2017).
- (49) Dettenborn L, Kirschbaum C, Gao W, ym. Increased hair testosterone but unaltered hair cortisol in female patients with borderline personality disorder. *Psychoneuroendocrinology* 2016;71:176-179.
- (50) Abell JG, Stalder T, Ferrie JE, ym. Assessing cortisol from hair samples in a large observational cohort: The Whitehall II study. *Psychoneuroendocrinology* 2016;73:148-156.
- (51) Binz TM, Braun U, Baumgartner MR, ym. Development of an LC-MS/MS method for the determination of endogenous cortisol in hair using <sup>13</sup>C<sub>3</sub>-labeled cortisol as surrogate analyte. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2016;1033-1034:65-72.
- (52) Gaudl A, Kratzsch J, Bae YJ, ym. Liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry for quantitative steroid hormone analysis in plasma, urine, saliva and hair. *J Chromatogr A* 2016;1464:64-71.
- (53) Wester VL, van der Wulp NR, Koper JW, ym. Hair cortisol and cortisone are decreased by natural sunlight. *Psychoneuroendocrinology* 2016;72:94-96.
- (54) Grass J, Kirschbaum C, Miller R, ym. Sweat-inducing physiological challenges do not result in acute changes in hair cortisol concentrations. *Psychoneuroendocrinology* 2015;53:108-116.

- (55) Noppe G, de Rijke YB, Dorst K, ym. LC-MS/MS-based method for long-term steroid profiling in human scalp hair. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2015;83:162-166.
- (56) Staufenbiel SM, Penninx BW, de Rijke YB, ym. Determinants of hair cortisol and hair cortisone concentrations in adults. *Psychoneuroendocrinology* 2015;60:182-194.
- (57) Quinete N, Bertram J, Reska M, ym. Highly selective and automated online SPE LC-MS3 method for determination of cortisol and cortisone in human hair as biomarker for stress related diseases. *Talanta* 2015;134:310-316.
- (58) Chen Z, Li J, Xu G, ym. Simultaneous measurements of cortisol and cortisone in urine and hair for the assessment of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity among methadone maintenance treatment patients with LC-ESI-MS/MS. *Journal of Chromatography B* 2014;969:77-84.
- (59) Chen Z, Li J, Zhang J, ym. Simultaneous determination of hair cortisol, cortisone and DHEAS with liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in negative mode. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2013;929:187-194.
- (60) Steudte S, Kirschbaum C, Gao W, ym. Hair Cortisol as a Biomarker of Traumatization in Healthy Individuals and Posttraumatic Stress Disorder Patients. *Biol Psychiatry* 2013;74:639-646.
- (61) Gao W, Stalder T, Foley P, ym. Quantitative analysis of steroid hormones in human hair using a column-switching LC-APCI-MS/MS assay. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2013;928:1-8.
- (62) Vanaelst B, Michels N, De Vriendt T, ym. Cortisone in hair of elementary school girls and its relationship with childhood stress. *Eur J Pediatr* 2013;172:843-846.
- (63) Stalder T, Kirschbaum C, Alexander N, ym. Cortisol in hair and the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:2573-2580.
- (64) Xue X, Zheng C, Jifeng L, ym. Study on dissolution mechanism of cortisol and cortisone from hair matrix with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta* 2013;421:62-72.
- (65) Raul J, Cirimele V, Ludes B, ym. Detection of physiological concentrations of cortisol and cortisone in human hair. *Clin Biochem* 2004;37:1105-1111.
- (66) Kirschbaum C, Tietze A, Skoluda N, ym. Hair as a retrospective calendar of cortisol production-Increased cortisol incorporation into hair in the third trimester of pregnancy. *Psychoneuroendocrinology* 2009;34:32-37.
- (67) Dettenborn L, Tietze A, Bruckner F, ym. Higher cortisol content in hair among long-term unemployed individuals compared to controls. *Psychoneuroendocrinology* 2010;35:1404-1409.
- (68) Skoluda N, Dettenborn L, Stalder T, ym. Elevated hair cortisol concentrations in endurance athletes. *Psychoneuroendocrinology* 2012;37:611-617.

- (69) Steudte S, Stalder T, Dettenborn L, ym. Decreased hair cortisol concentrations in generalised anxiety disorder. *Psychiatry Res* 2011;186:310-314.
- (70) Xie Q, Gao W, Li J, ym. Correlation of cortisol in 1-cm hair segment with salivary cortisol in human: hair cortisol as an endogenous biomarker. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:2013-2019.
- (71) Loussouarn G, El Rawadi C, Genain G. Diversity of hair growth profiles. *Int J Dermatol* 2005;44:6-9.
- (72) Hoffman MC, D'Anna-Hernandez K, Benitez P, ym. Cortisol during human fetal life: Characterization of a method for processing small quantities of newborn hair from 26 to 42 weeks gestation. *Dev Psychobiol* 2017;59:123-127.
- (73) Russell E, Kirschbaum C, Laudenslager ML, ym. Toward standardization of hair cortisol measurement: results of the first international interlaboratory round robin. *Ther Drug Monit* 2015;37:71-75.
- (74) Stalder T, Steudte S, Miller R, ym. Intraindividual stability of hair cortisol concentrations. *Psychoneuroendocrinology* 2012;37:602-610.