

Anni Mäkelä

# Ligniini-peräisten fenolikomponenttien analysointi kaasukromatografisesti

Metropolia Ammattikorkeakoulu  
Laboratorioanalyttikko (AMK)  
Laboratorioalan koulutusohjelma  
Opinnäytetyö  
4.12.2013

<p>Tekijä Otsikko</p> <p>Sivumäärä Aika</p>	<p>Anni Mäkelä Ligniini-peräisten fenolikomponenttien analysointi kaasukromatografisesti</p> <p>15 sivua + 5 liitettä 4.12.2013</p>
<p>Tutkinto</p>	<p>Laboratorioanalyttikko (AMK)</p>
<p>Koulutusohjelma</p>	<p>Laboratorioalan koulutusohjelma</p>
<p>Ohjaajat</p>	<p>Tutkija Anne Ruonakangas Laboratorioinsinööri Miika Kuivikko</p>
<p>Tämä opinnäytetyö tehtiin Neste Oilin Tutkimus- ja kehitysyksikön Kemian osaston kaasukromatografian laboratoriossa Porvoon Kilpilahdessa.</p> <p>Työn tavoitteena oli kehittää menetelmä monofenoleiden määrittämiseen kaasukromatografilla. Aikaisemmin käytetty lyhyempi kolonni haluttiin korvata toisella laitteella ja pidemmällä kolonnilla. Lisäksi menetelmästä haluttiin tehdä virallinen laboratorion käyttöön.</p> <p>Näytteinä analysoitiin olkijhydrolysaatteja, jotka hajotettiin monofenoleiksi prosessin aikana. Fenolit määritettiin vesiliuoksesta uuttamalla. Prosessituotteista analysoitiin monofenoleita sekä kvalitatiivisesti että kvantitatiivisesti.</p> <p>Tehtyjen mittausten perusteella menetelmää voitiin pitää luotettavana. Testausten perusteella voitiin suositella puolen tunnin ravistelu-aikaa. Liuottimen valinnan havaittiin vaikuttavan näytteiden analysointiin. Liuottimena suositellaan käytettäväksi etyyliasettaatti-tolueneeni-seosta.</p>	
<p>Avainsanat</p>	<p>Fenolit, kaasukromatografia, ligniinit</p>

Author Title	Anni Mäkelä Analysis of phenols by gas chromatography
Number of Pages Date	15 pages + 5 appendices 29 November 2013
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructor(s)	Anne Ruonakangas, Reseacher Miika Kuivikko, Laboratory engineer
<p>This thesis was made at Neste Oil's research and development unit in Kilpilahti, Porvoo.</p> <p>The aim of the study was to investigate a method how to determinate monophenols with gas chromatography. Before similar analysis has been made with shorter column, but now the analysis was made with another device and longer column. The aim was also to make the method official to be used in laboratory.</p> <p>As samples, straw hydrolysate, dissolved to monophenols, were analysed. The phenols were determinated to water solution with extraction. The process products were analyzed as to monophenols both quantitatively and qualitatively.</p> <p>With these measurements the method can be consider reliable. After testing, a half an hour shaking time is recommended. The choice of the solvent is detected to affect the result when analysing samples. As solvent, ethyl acetate and toluene mixture is recommended.</p>	
Keywords	Phenols, gas chromatography, lignins

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Lignoselluloosa ja ligniinit	2
3	Fenolien analysointimenetelmät	3
3.1	Kaasukromatografia	3
3.2	Massaspektrometria	5
4	Laitteet ja niiden ajo-ohjelmat	6
5	Malliaineiden valinta ja puhtauksien määrittäminen	7
6	Mittaustulokset	8
6.1	Malliaineiden puhtaudet	8
6.2	Ravisteluajan ja liuottimen vaikutus	9
6.3	Näytteet	12
6.4	Silylointi	14
7	Päätelmiä ja jatkokehitystä	14
	Lähteet	15
	Liitteet	
	Liite 1. Punnitustulokset malliseoksessa	
	Liite 2. Malliaineiden tulokset liuottimena etyyliasetaatti	
	Liite 3. Malliaineiden tulokset liuottimena etyyliasetaatti-tolueeni-seos (1:1)	
	Liite 4. Näyte 2 liuottimena etyyliasetaatti	
	Liite 5. Näyte 2 liuottimena etyyliasetaatti-tolueeni-seos (1:1)	

## Lyhenteet

BSTFA	N,O-Bis(trimetyylisilyyli)trifluoroasetoamidi (N,O-Bis(trimethylsilyl)- trifluoroacetamide)
DB-1701	Matalapolaarinen (14%-syanopropyylifenyyli)-metyylipolysiloxaanikolonne
DB-WAX	Korkeapolaarinen polyetyleeniglykolikolonne
FID	Liekki-ionisaatiodektektori (flame ionization detector)
GC	Kaasukromatografi (gas chromatography)
ISTD	Sisäinen standardi (internal standard)
MS	Massaspektrometri (mass spectrometry)

## 1 Johdanto

Tämä opinnäytetyö tehtiin Neste Oilin Tutkimus- ja Kehitysyksikön Kemian osaston kaasukromatografian laboratoriossa Porvoon Kilpilahdessa. Neste Oil on korkealaatuisiin liikenteen polttoaineisiin keskittyvä jalostus- ja markkinointiyhtiö.

Työn tarkoituksena oli kehittää menetelmä monofenoleiden määrittämiseen kaasukromatografilla. Aikaisemmin vastaavaa mittausta oli tehty lyhyemmällä poolisella kolonnilla, mutta nyt menetelmä haluttiin vaihtaa toiselle laitteelle ja pidemmälle kolonnille. Lisäksi menetelmästä haluttiin tehdä virallinen laboratorion käyttöön.

Näytteinä analysoitiin olkijhydrolysaatteja, jotka hajotettiin hiilihydraateiksi ja monofenoleiksi prosessin aikana. Nämä monofenolit halutaan analysoida niiden mikrobien toimintaa inhiboivan ominaisuutensa takia [1]. Fenolit määritettiin vesiliuoksesta. Prosessituotteista analysoitiin monofenoleita sekä kvalitatiivisesti että kvantitatiivisesti. Kvantitatiivinen määrittäminen tehtiin malliaineiden avulla, jolloin vastaavien malliaineiden vastetta käytettiin muiden samankaltaisten yhdisteiden vasteena.

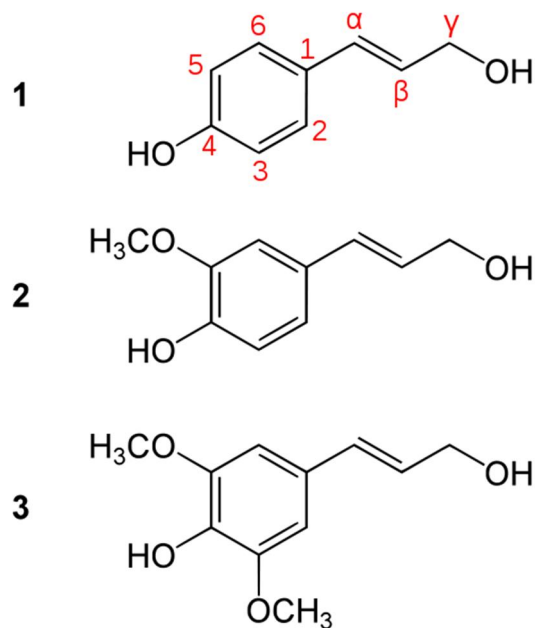
Vesiliuoksessa olevat fenolit uutettiin neste-neste-utolla liuotinfasiin, minkä jälkeen ne analysoitiin kaasukromatografilla. Jotta erottuminen tapahtuisi mahdollisimman täydellisesti, näytteitä ravisteltiin ennen varsinaista uuttoa.

Työssä tutkittiin ensin malliaineiden avulla eri fenoleiden vasteita ja retentioaikoja. Näiden avulla analysoitiin näytteiden eri komponentteja.

## 2 Lignoselluloosa ja ligniinit

Lignoselluloosa on luonnon polymeeri, jota voidaan käyttää raaka-aineena kemiallisissa prosesseissa muun muassa biopolttoaineena. Lignoselluloosa koostuu kolmesta pääkomponentista: selluloosasta, hemiselluloosasta ja ligniineistä. Selluloosan osuus biomassasta on 40–50 %, hemiselluloosan 25–30 % ja ligniinien 15–20 %. [2, s. 1.]

Ligniinejä on tutkittu paljon, mutta niiden todellista rakennetta ei ole pystytty selvittämään. Ligniini on amorfinen aine, jolla tarkoitetaan, ettei sen kiinteän olomuodon rakenneyksiköillä ole tarkkaa järjestystä. Ligniinit ympäröivät polysakkarideja biomassassa tehden niistä vahvempia ja kestävämpiä. Lisäksi ne tekevät kasvien soluseinämistä vettä läpäisemättömiä mahdollistaen veden kuljetuksen. Ligniinit koostuvat kolmesta monolignolista. Nämä kolme monolignolia ovat esitettyinä kuvassa 1. Monolignolit ovat sitoutuneet toisiinsa eetterisidoksin. [2, s. 5–7.]



**Kuva 1:** Trans-p-kumaryylialkoholi, koniferyylialkoholi ja sinapyylialkoholi ovat ligniinien perusrakennusyksiköitä.

Lignoselluloosaa voidaan hydrolysoida joko entsyymien tai happojen avulla. Hydrolysoinnin avulla lignoselluloosassa voidaan erottaa ligniinikomponentit hiilihydraateista. [2, s. 9.]

### 3 Fenolien analysointimenetelmät

Fenolit voidaan eristää vesiliuoksesta uuttamalla. Kun pH on alle 2, fenolit ovat protonoituneessa muodossa. Tällöin ne voidaan eristää käyttämällä liuottimena joko dietyylieetteriä tai dietyylieetterin ja etyyliasetaatin seosta. [3, s. 22–23.] Fenolien kokonaismäärän kvantitatiivisessa analysoinnissa käytetään yleensä spektrometrisiä menetelmiä. Kvantitatiivisiin ja kvalitatiivisiin määrittäisiin käytetään yleensä kromatografisia menetelmiä. Tässä työssä käytetään monofenoleille sopivaa kaasukromatografista menetelmää. Isompien polyfenolisten yhdisteiden analysoinnissa käytetään yleensä HPLC-menetelmiä. [4.]

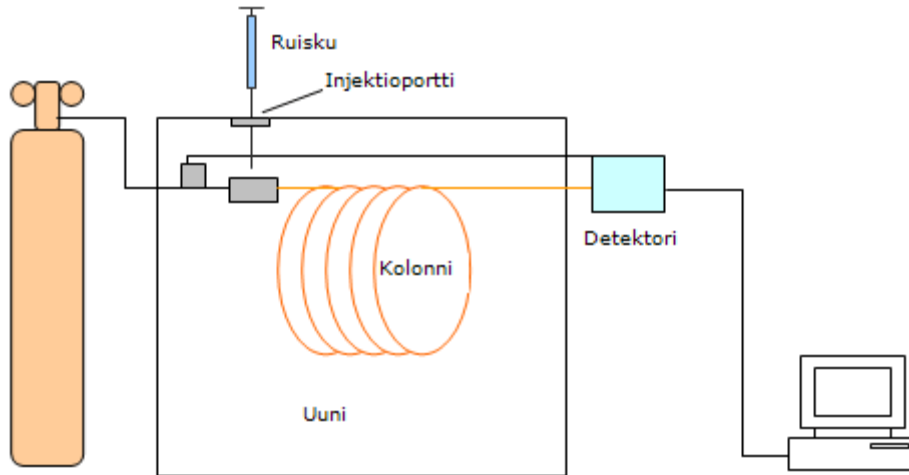
#### 3.1 Kaasukromatografia

Kromatografiassa tutkittava yhdiste jakautuu komponentteihin ominaisuuksiensa perusteella. Yhdisteen erottuminen perustuu tasapainotiloihin. Itse jakauminen tapahtuu stationäärifaasin sekä liikkuvan faasin avulla. Yhdisteen komponentit liikkuvat liikkuvan faasin mukana kiinnittyen välillä stationäärifaasiin. Yhdisteet erottuvat sen mukaisesti, kuinka paljon ne viettävät aikaa kiinnittyneenä stationäärifaasiin. [5, s. 140–141.]

Kaasukromatografiassa liikkuvana faasina on kaasu ja stationäärifaasina neste. Näyte syötetään septumin läpi injektoriin, jossa se höyrystyy. Kantajakaasun mukana näyte liikkuu kolonniin, jossa se erottuu kiehumispisteen mukaisesti osiin. Detektorilla näytteen komponentit tunnistetaan. Kiehumispisteen lisäksi kolonnilla erottumiseen voi vaikuttaa stationäärifaasin poolisuus. [5, s. 183–184.] Kaasukromatografian rakenne on esitetty kuvassa 2.

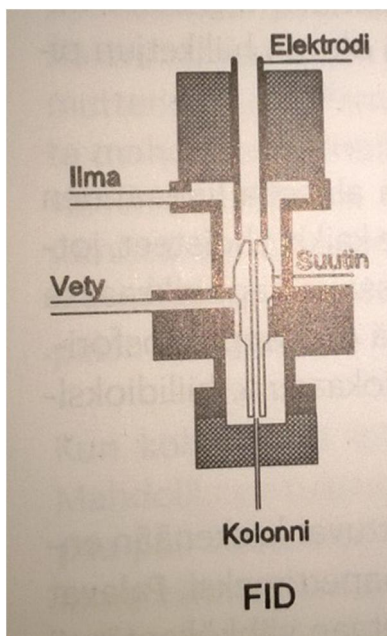
Injektio kolonniin voidaan suorittaa joko jakoinjektiona, suorana injektiona tai kolonniin injektiona. Sekä suorassa injektiossa että kolonniin injektiossa koko näyte ohjataan kolonniin. Jakoinjektiossa sen sijaan vain pieni määrä päätyy kolonniin. Tässä tekniikassa injektorin lämpötila on lähellä näytteen korkeimman komponentin kiehumispistettä. Näyte ajautuu kantajakaasun mukana osa kolonniin ja osa ohi kolonnin pään. [5, s. 186–188.]





Kuva 2: Kaasukromatografien rakenne [6].

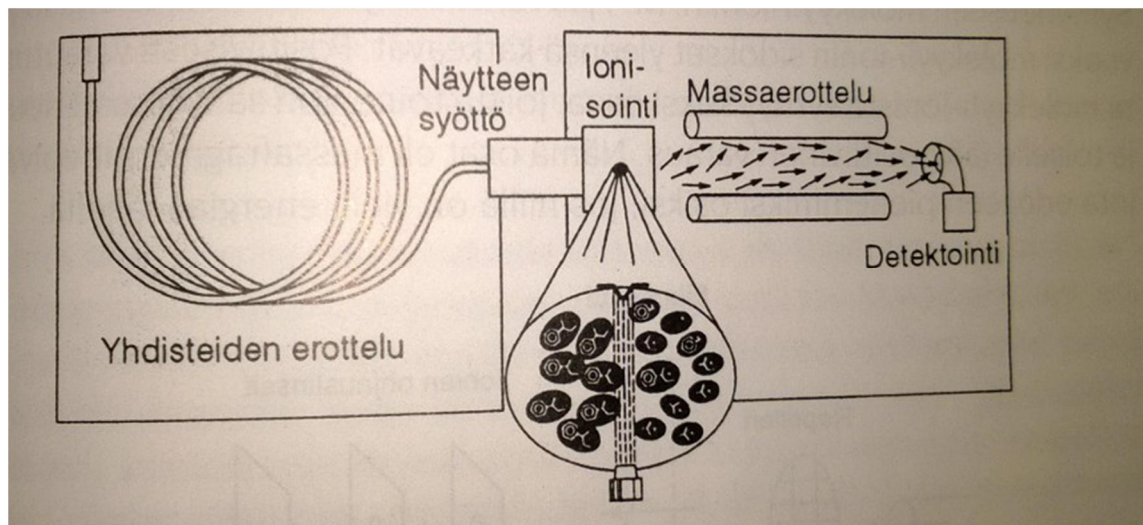
Detektori havaitsee kolonnista saapuvat yhdisteet. Laite tulee kalibroida tunnetuilla yhdisteillä pitoisuuden selvittämiseksi. Yksi käytetyimmistä detektoreista kaasukromatografiassa on liekki-ionisaatiodetektori (kuva 3). Tällä detektorilla yhdisteet poltetaan happirikkaassa vetyliekissä, jolloin yhdisteet muodostavat sähköisesti varattuja hiukkasia. Näiden hiukkasten sähkövaraus mitataan johtamalla erottuneet elektronit ja ionit sähkökentässä kollektorielektrodille. Kollektorielektrodilla mitataan syntynyt sähkövirta. [5, s. 193–195.]



Kuva 3: Liekki-ionisaatiodetektori [5, s. 194].

### 3.2 Massaspektrometria

Kaasukromatografiassa näytteet voidaan detektoida myös massaspektrometrillä, jonka rakenne on esitetty kuvassa 4. Massaspektrometri on tehokas tapa yhdisteiden tunnistamiseen. Siinä tutkittava yhdiste ionisoidaan positiiviseksi molekyyli-ioniksi ja samalla siihen muodostuu ylimääräistä energiaa. Tämän energian vaikutuksesta molekyyli-ioni hajoaa osiin, joita kutsutaan massafragmenteiksi. Massafragmentit erotetaan toisistaan niiden massa-varaussuhteen mukaisesti. [5, s. 122.]



Kuva 4: GC-MS-laitteen rakenne [5, s. 123].

Massafragmentit kerätään spektriiksi, joka kuvaa molekyylin rakennetta. Massaspekttrin perusteella yhdiste voidaan tunnistaa tutkimalla, minkä kokoisiin osiin molekyyli on hajonnut. Lisäksi spektrin perusteella havaitaan massafragmenttien esiintyvyys, mitä voidaan käyttää myös apuna tunnistuksessa. [5, s. 122.]

Massaspektrometrissa ionisoidaan joko elektronipommituksella tai kemiallisella ionisaatiolla. Elektronipommituksessa ionisaattorissa on hehkulanka, josta irtoaa korkean lämpötilan vaikutuksesta elektroneja. Elektronit kiihdytetään sähkökentän avulla. Tutkitavista molekyyleistä irtoaa elektroneja ja niistä syntyy molekyyli-ioneita. Molekyyli-ionin hajotessa siitä muodostuu kaksi osaa, joista toinen on neutraali ja toinen positiivisesti varautunut. Jos energiaa on vielä jäljellä, osat voivat hajota uudelleen. Kemiallisessa ionisaatiossa erottelu suoritetaan ionisoituneen kaasun avulla. Tällöin kaasua elektronipommitetaan ja siitä muodostuu positiivisia molekyylejä, jotka sitten reagoivat näytemolekyylin kanssa luovuttaen näytemolekyylille yhden protonin. Syntynyt mole-

kyyli-ioni hajoaa protonin ansiosta hieman eri tavalla kuin elektronipommituksessa. [5, 124–125.]

Yleisin käytetty massa-analysointilaitteisto on kvadrupolianalysointilaitteisto. Tämä analysointilaitteisto koostuu neljästä saman suuntaisesta sauvasta, joiden tuottama sähkökenttä ohjaa ionien kulkua. Tasa- ja vaihtojännitteen avulla halutun massa-varaussuhteen omaavat ionit lentävät linjaston läpi muiden törmätessä sauvoihin. [5, s. 125–128.]

Detektointi tapahtuu elektronimonistimella, joka muuttaa ionien energian sähköpulsseiksi. Ionien törmätessä elektronimonistimen seinämään irtoaa ionista elektroneja. Uudessa törmäyksessä ionista irtoaa lisää elektroneja. Irronneet elektronit detektoidaan sähkövarauksen perusteella. [5, s. 128.]

#### **4 Laitteet ja niiden ajo-ohjelmat**

Mittauksissa käytettiin GC-FID-laitteena Agilentin kaasukromatografia 6890N. Laitteessa käytettiin kolonnia 60 metristä DB-1701. DB-1701 on matalapolaarinen (14%-syanopropyylifenyyli)-metyylipolysiloksaanikolonne. Sen halkaisija on 0,25 mm ja stationäärifaasin paksuus on 1 µm. Mittauksissa vertailtiin mittaustuloksia saman tyyppisellä GC-FID-laitteella tehtyihin mittauksiin. Tässä laitteessa käytössä oli 30-metrinen DB-WAX-kolonne, jonka halkaisija on 0,25 mm ja stationäärifaasin paksuus 0,25 µm. DB-WAX on korkeapolaarinen polyetyleeniglykolikolonne. Näytteiden käsittely tehtiin Agilentin ChemStation-ohjelmistolla.

Käytetyssä massaspektrometreissä käytettiin samanlaista kolonnia kuin GC-FID-laitteissa. Laitteena käytettiin Agilent 5975 MSD-laitetta. Laitteessa ionisointitekniikkana käytettiin elektronipommitusta. Kvantitatiiviset määritykset tehtiin GC-FID-laitteella ja kvalitatiiviset GC-MS-laitteella.

Ajo-ohjelmassa käytettiin ohjelmaa, jossa injektorin lämpötila oli 250 °C:tta. Split-suhteena käytettiin 1:50. Uunin lämmitys aloitettiin pitämällä uunia 4 min 50 °C:ssa. Tämän jälkeen uuni lämmitettiin 280 °C:seen nopeudella 5 °C/min. Loppulämpötilassa kolonnia lämmitettiin vielä 15 min. [7, s. 2–4.]

Liekki-ionisaatiodetektorin lämpötilana käytettiin 280 °C:tta. Detektorin ilmavirtaus oli 350 ml/min, vetyvirtaus 35 ml/min sekä heliumvirtaus 30 ml/min.

## 5 Malliaineiden valinta ja puhtauksien määrittäminen

Malliaineiksi valittiin 15 näytteille tyypillistä fenoliyhdistettä. Malliaineiden valinnassa tarkasteltiin fenoliryhmään liittyneitä ryhmiä ja valittiin erilaisia liittyneitä ryhmiä, jotta kromatogrammien vasteita voitiin käyttää muiden yhdisteiden analysoinnissa.

Puhtauksien määrittäminen aloitettiin määrittämällä malliaineiden puhtaudet. Lisäksi määriteltiin puhtaudet myös kahdesta valitusta ISTD-vaihtoehtoehdosta. Liuosten puhtaudet määritettiin ajamalla tutkittava aine sellaisenaan GC:llä. Kiinteät malliaineet liuotettiin joko tolueeniin tai dikloorimetaaniin liukoisuuden mukaan. Saaduista kromatogrammeista integroitiin kaikki piikit ja laskettiin pääpiikin suhde kaikkiin piikkeihin. Liuotettujen malliaineiden kohdalla huomioitiin liuottimesta tulevat piikit, jotka jätettiin laskun ulkopuolelle.

Malliaineista tehtiin aluksi koeliuos, johon kaikkia malliaineita lisättiin 10 mg:aa ja nämä malliaineet liotettiin 20 ml:aan etyyliasettaattia. Saadut kantaliuoksen malliaineiden pitoisuudet olivat 500 mg/kg. Tämä malliliuos ajettiin sekä 60-metrisellä DB-1701-kolonnilla että 30-metrisellä DB-Wax-kolonnilla. Lisäksi liuos ajettiin GC-MS-laitteilla, joissa oli samat kolonnit. MS-laitetta käytettiin yhdisteiden tunnistamiseen ja pelkkää GC-laitetta malliaineiden kvantitointiin.

Uuttokokeita varten tehtiin malliaineseos punnitsemalla kutakin malliainetta 100 mg ja liuttamalla ne 50 ml testattavaa liuotinta. Tällöin malliaineseoksen malliainepitoisuudet olivat 2000 mg/kg. Uuttokokeisiin testattaviksi liuottimiksi valittiin etyyliasettaatti sekä etyyliasettaatti-tolueeni-seos suhteella 1:1. Uuttokokeissa testattiin uutun vaikutusta saantoihin malliaineiden avulla. Liuoksia varten valmistettiin ISTD-liuos, jossa ISTD:t asetofenoni ja 3-isopropyylifenoli laimennettiin etyyliasettaattiin. Uuttokoeliuokset valmistettiin 2 ml:sta malliaineseosta, 200 µl:sta ISTD-liuosta, 10 ml:sta 0,5 M suolahappoa ja 2 g:sta natriumkloridia. Uuttokokeilla testattiin ravisteluaajan vaikutusta kertovasteisiin. Ravisteluajoina testattiin 30 min, 60 min ja 120 min. Ravistelun jälkeen vesikerros uutettiin ja jäljellä jäänyt liuotinkerros kuivattiin natriumsulfaattilla.

Jatkomittauksiin liuottimeksi valittiin tolueeni-etyyliasettaatti-seos paremman saantoprosentin perusteella. Malliaineilla tehtiin silylointikokeita käyttäen reagenssina BSTFA:ta. Silylointikokeissa liuottimeen lisättiin 100 µl BSTFA:ta.

Aikaisemmin vastaavaa mittausta suoritettiin 30-metrisellä DB-Wax-kolonnilla. Tämä kolonni on kuitenkin erotuskyvyltään heikompi ja kaikki fenoliyhdisteet eivät erotu toisistaan. Käyttöön haluttiin 60-metrinen DB-1701-kolonni, jotta erottuminen paransi.

Malliaineseoksesta tehtiin kolmen pisteen kalibroititaulukko. Tätä varten 2000 ppm:n malliaineseoksesta tehtiin 500 ppm:n ja 100 ppm:n laimennokset. Kalibroitiliuokset käsiteltiin näytteen tapaan.

Menetelmää testattiin kahdella eri testinäytteellä. Näytettä punnittiin 10 g ja joukkoon lisättiin 200 µl ISTD-liuosta. Seoksen pH täsmähtiin pH 2:ksi 0,5 M suolahapon avulla. Tämän jälkeen lisättiin 2 g natriumkloridia ja 5 ml liuotinta. Näytteen kanssa testattiin sekä tolueenin ja etyyliasettaatin seosta että pelkkää etyyliasettaattia. Näytteitä ravisteltiin tunnin ajan. Vesikerros uutettiin pois erotussuppilossa ja liuotinkerros kuivattiin natriumsulfaatilla. Lopuksi liuos suodatettiin tarvittaessa ja ajettiin GC-FID-laitteella sekä GC-MS-laitteella.

## **6 Mittaustulokset**

### **6.1 Malliaineiden puhtaudet**

Malliaineiksi valittiin alun perin 15 yhdistettä. Lisäksi tutkittiin kahta eri ISTD:tä: 2-propyyliifenolia ja asetofenonia. ISTD:t sekä suurin osa malliaineista liukeni joko tolueeniin tai dikloorimetaaniin. Ongelmia tuotti kaksi tyyppiyhdistettä ja kolme happoa. 2-formyylipyrroli liukeni kuitenkin riittävässä määrin, jotta puhtaus saatiin määritettyä. Ongelmallisten aineiden liukoisuutta tutkittiin kirjallisuuden avulla, mutta sopivaa liuotinta ei löydetty. Taulukkoon 1 on kerätty malliaineet ja niiden määritetyt puhtaudet.

Taulukko 1: Valitut malliaineet sekä ISTD:t ja niiden puhtaudet.

Malliaine	Puhtaus
2-formyylipyrroli	99,20 %
2,6-dimetyylifenoli	99,44 %
2-metoksi-4-metyylifenoli	99,83 %
Eugenoli	98,78 %
2,6-dimetoksifenoli	99,79 %
Vanilliini	99,89 %
Asetovanilloni	98,85 %
4-hydroksibentsaldehydi	98,35 %
Syngaldehydi	99,89 %
Asetosyngoni	99,20 %
Coniferyylialdehydi	99,31 %
3-hydroksipyridiini	Ei liennut
Sinappihappo	Ei liennut
Kumarihappo	Ei liennut
Ferulahappo	Ei liennut
3-isopropyylifenoli	96,05 %
Asetofenoni	99,33 %

Testattujen ISTD:iden välillä ei havaittu merkittäviä eroavaisuuksia kromatografisesti. Molemmat ISTD:t erottuivat omaksi piikikseen erilleen malliaineista. Käsittelyvaiheessa asetofenoni oli kuitenkin helpompi käsiteltävä verrattuna 3-isopropyylifenoliin. 3-isopropyylifenolia ei voitu mitata ruiskun avulla, koska korkean viskositeetin takia sitä ei saatu imaistua ruiskuun. Tämän takia päädyttiin jatkossa käyttämään ISTD:nä asetofenonia.

## 6.2 Ravisteluaajan ja liuottimen vaikutus

Malliaineilla testattiin sekä ravisteluaikoja että liuottimen valinnan vaikutusta. Malliaineseoksen valmistuksessa saadut punnitustulokset on esitetty liitteessä 1. Liuottimena testattiin etyyliasetaattia sekä etyyliasetatiin ja tolueenin seosta. Seossuhteena käytettiin 1:1. Ravisteluaikoina testattiin 30 min, 60 min sekä 120 min ravistelua. Saantoprosentit on esitetty liuottimena tolueeni-etyyliasetatti-seos taulukossa 2 ja liuottimena etyyliasetatti taulukossa 3. Tarkemmat tulokset liittyen laskuihin on kerätty liitteisiin 2 ja 3. Malliaineiden saantoprosentit laskettiin seuraavalla tavalla:

$$\text{Malliaine näytteessä (g)} = \frac{\text{puhtaus} * \text{malliseosta näytteessä (g)} * \text{malliaine(g)}}{\text{Koko malliseos (g)}}$$

Saantoprosentit laskettiin vertaamalla laitteen antamaa tulosta punnitusten perusteella laskettuun malliaineen määrään.

$$\text{Saantoprosentti (\%)} = \frac{\text{malliaineen määrä kromatografisesti (g)}}{\text{malliaineen määrä punnitusten perusteella (g)}} * 100 \%$$

Formyylipyrrolin saantoprosentti jäi muita alhaisemmaksi. Koska kyseessä oli epäfenolinen typpiyhdiste, se jätettiin tarkastelun ulkopuolelle.

Käytettäessä liuottimena etyyliasettaattia saatiin osalle malliaineista selkeästi yli 100 %:n saantoja. Syyksi epäiltiin, että ISTD:nä käytetty asetofenoni ei liuennut täydellisesti liuotinfaasiin, vaan osa ISTD:stä olisi siirtynyt ravistelun aikana vesifaasiin.

Tulosten perusteella etyyliasettaatilla saadut saantoprosentit olivat lähempänä optimaalista 100 %:n saantoa. Toisaalta taas tolueeni-etyyliasettaatti-seoksen avulla saatu keskihajonta vaihteli huomattavasti vähemmän. Näin ollen päädyttiin suositteluun tolueeni-etyyli-asettaattiseosta liuottimeksi.

Eri ravisteluajkojen välillä ei havaittu merkittäviä eroavaisuuksia. Ravisteluajkojen tuloksissa havaittiin jonkin verran satunnaisuutta. Taulukoihin 2 ja 3 laskettujen keskiarvojen ja keskihajontojen perusteella päädyttiin suositteluun 30 min uuttoaikaa.

**Taulukko 2: Malliaineiden saantoprosentit eri ravisteluajoilla liuottimena tolueni-etyyliasetatti-seos.**

	Ravisteluaika (min)		
	30	60	120
<b>Yhdiste</b>	<b>Saantoprosentti</b>		
(2-formyylipyrroli)	71,79 %	72,43 %	67,17 %
2,6-dimetyylifenoli	101,03 %	101,80 %	101,43 %
2-metoksi-4-metyylifenoli	100,37 %	101,07 %	100,92 %
Eugenoli	101,32 %	102,22 %	102,23 %
2,6-dimetoksifenoli	94,76 %	94,85 %	95,41 %
Vanilliini	96,11 %	96,98 %	110,40 %
Asetovanilloni	96,44 %	95,71 %	103,55 %
4-hydroksibentsaldehydi	90,91 %	90,30 %	111,64 %
Syringaldehydi	93,38 %	87,65 %	95,83 %
Asetosyringoni	94,09 %	87,45 %	99,79 %
Coniferyylialdehydi	98,91 %	97,96 %	109,18 %
Keskiarvo	96,73 %	95,60 %	103,04 %
Keskihajonta	3,56 %	5,56 %	5,72 %
Suhteellinen keskihajonta	3,68 %	5,81 %	5,55 %

**Taulukko 3: Malliaineiden saantoprosentit eri ravisteluajoilla liuottimena etyyliasetatti.**

	Ravisteluaika (min)		
	30	60	120
<b>Yhdiste</b>	<b>Saantoprosentti</b>		
(2-formyylipyrroli)	89,40 %	80,89 %	78,97 %
2,6-dimetyylifenoli	97,43 %	96,79 %	97,29 %
2-metoksi-4-metyylifenoli	100,68 %	99,85 %	100,33 %
Eugenoli	101,55 %	100,60 %	100,85 %
2,6-dimetoksifenoli	86,61 %	85,49 %	84,79 %
Vanilliini	109,80 %	107,38 %	107,07 %
Asetovanilloni	103,44 %	102,27 %	101,64 %
4-hydroksibentsaldehydi	113,26 %	113,34 %	112,03 %
Syringaldehydi	113,17 %	112,22 %	112,16 %
Asetosyringoni	98,32 %	96,90 %	96,34 %
Coniferyylialdehydi	108,36 %	107,34 %	107,82 %
Keskiarvo	103,26 %	102,22 %	102,03 %
Keskihajonta	8,25 %	8,32 %	8,29 %
Suhteellinen keskihajonta	7,99 %	8,14 %	8,12 %



### 6.3 Näytteet

Toisesta yksiköstä saatiin testattavaksi kaksi näytettä. Molemmilla näytteillä tehtiin kaksi rinnakkaismäärittystä käyttäen kumpaakin vaihtoehtoista liuotinta. Tulokset on esitetty taulukoissa 4 ja 5. Liitteissä 4 ja 5 on näytteen kromatogrammit kummallakin liuottimella.

Kumpikaan näytteistä ei käyttäytynyt optimaalisesti määrittelyn aikana. Näyte 1 sakaantui osittain ravistelun aikana. Seokseen muodostui mustia kiinteitä palasia. Tällöin liuotinkerros jäi kovin pieneksi. Osan liuottimesta oletettiin jääneen sakan joukkoon.

Näyte 2:sta saatiin erotettua kaksi kerrosta, mutta ravistelun jälkeen liuotinkerroksen joukossa oli puuromaista sakkaa. Liuotinta yritettiin eristää suodattamalla, mutta suodatin tukkeutui prosessissa saman tien. Lopulta päädyttiin ottamaan liuottimen päältä kirkasta liuotinta GC-mittauksiin. Jotta kummankin näytteen pienet näytemäärät saatiin riittämään analysointiin sekä GC-FID-laitteella että GC-MS-laitteella käytettiin näytepulloissa kaventajia. Tällöin yksi mittaus voitiin suorittaa alle 0,5 ml:lla näytettä.

Taulukoiden 4 ja 5 tulosten perusteella voidaan todeta, että pääasiassa rinnakkaismäärittelyt vastasivat hyvin toisiaan. Näytteiden kromatogrammeista voitiin havaita näytteiden sisältävät paljon muita yhdisteitä fenolisten yhdisteiden lisäksi sekä paljon pieniä pitoisuuksia fenolisia yhdisteitä. Vain merkittävimmät piikit integroitiin ja tunnistettiin GC-MS-laitteen avulla.

Näytteiden vasteina käytettiin malliaineiden avulla saatuja vasteita. Muille tunnistetuille yhdisteille oli hyvin löydettävissä vastaava yhdiste. Ainoastaan 1,4-bentseenidiolille ei ollut sellaista. Jatkossa suunniteltiin, että tätä yhdistettä hankitaan varastoon ja se lisätään niiden malliaineiden joukkoon, joilla laite kalibroidaan.

Taulukko 4: Näytteen 1 tulokset.

	Etyyliasettaatti	Tolueeni+etyyliasettaatti
	$K_A \pm S$ (ppm)	$KA \pm S$ (ppm)
3,4-dihydroksiasetofenoni	25,21 ± 0,02	20,97 ± 0,29
2-metoksi-4-vinyylifenoli	43,95 ± 0,02	34,53 ± 0,47
2,6-dimetoksifenoli	20,51 ± 0,01	18,53 ± 0,02
1,4-bentseenidioli	4,28 ± 0,38	2,46 ± 0,06
Vanilliini	37,97 ± 0,03	33,74 ± 0,13
Homo-vanilliini	3,85 ± 0,04	3,85 ± 0,08
Asetovanilloni	2,19 ± 0,04	2,83 ± 0,03
4-hydroksibentsaldehydi	4,91 ± 0,02	5,06 ± 0,17
Hydroksiasetofenoni	2,65 ± 0,06	2,99 ± 0,19
Metyylivanillyliketoni	3,70 ± 0,03	4,54 ± 0,26
Hydroksiasetofenoni	8,44 ± 0,02	6,92 ± 0,18
Syringaldehydi	9,20 ± 0,01	7,88 ± 0,15
Asetosyringoni	6,66 ± 0,07	5,93 ± 0,18

Taulukko 5: Näytteen 2 tulokset.

	Etyyliasettaatti	Tolueeni+etyyliasettaatti
	$K_A \pm S$ (ppm)	$KA \pm S$ (ppm)
3,4-dihydroksiasetofenoni	60,72 ± 0,26	44,78 ± 0,20
2-metoksi-4-vinyylifenoli	160,16 ± 0,11	108,78 ± 0,11
2,6-dimetoksifenoli	86,03 ± 0,07	78,46 ± 0,01
1,4-bentseenidioli	60,72 ± 0,64	31,87 ± 0,42
Vanilliini	325,34 ± 0,01	304,17 ± 0,04
Homo-vanilliini	41,74 ± 0,05	15,28 ± 0,03
Asetovanilloni	51,71 ± 0,04	50,53 ± 0,03
4-hydroksibentsaldehydi	59,79 ± 0,02	46,73 ± 0,03
Metyylivanillyliketoni	67,25 ± 0,01	62,60 ± 0,04
Hydroksiasetofenoni	640,47 ± 0,08	365,30 ± 0,01
Syringaldehydi	111,27 ± 0,03	83,70 ± 0,03
Asetosyringoni	81,48 ± 0,03	73,01 ± 0,03
Syringyyliasetoni	85,70 ± 0,02	67,16 ± 0,14

## 6.4 Silylointi

Silylointia testattiin sekä malliaineiden avulla että näytteiden kanssa. Malliaineiden kanssa silylointia testattiin lisäämällä silylointireagenssi BSTFA:ta heti liuottimeen sekä haihduttamalla typen avulla ensin liuotin pois ja sitten silyloimalla näyte ja lopuksi lisäämällä taas liuotinta haluttuun näytemäärään.

Silylointi epäonnistui kaikilla yritetyillä tavoilla. Malliaineet eivät silyloituneet olleenkaan tai silyloituivat vain osittain. Ongelmien syyksi oletettiin reaktio-olosuhteita. Tarkempaa tarkasteluun asian tiimoilta ei kuitenkaan ryhdytty, koska analyysi toimi riittävällä tarkkuudella myös ilman silylointia.

## 7 Päätelmiä ja jatkokehitystä

Työn tavoitteena oli kehittää menetelmä fenolien analysoimiseksi kaasukromatografisesti. Menetelmä haluttiin vaihtaa toiselle laitteelle ja kolonnille. Työssä analysoitiin ravisteluaajan ja liuottimen valinnan vaikutusta analyysiin.

Työn perusteella voidaan todeta menetelmän olevan luotettava. Liuottimen valintana voidaan suositella tolueenin ja etyyliasetaatin seosta parempien saantoprosenttien perusteella. Testauksen perusteella voidaan myös suositella menetelmässä käytettävän puolen tunnin ravistelu-aikaa.

Silylointia testattiin, mutta sen käyttöönotto vaatisi runsaasti jatkotestausta ja kehitystä. Lisäksi opinnäytetyön yhteydessä suunniteltiin SPE-uuton testausta, mutta sitä ei ehditty testaamaan annetussa ajassa. Myöskään menetelmän toistettavuutta ei ehditty tutkimaan.

Työn yhteydessä mietittiin ravistelun jälkeen erotussuppilossa tapahtuneen uuton korvaamista sentrifugilla, jolloin kerrosten erottuminen voitaisiin varmistaa ja muodostuneista kerroksista päällimmäinen pipetoitaisiin talteen

## Lähteet

1. Jönssön, L. F. & Alriksson, B. & Nilvebrant, N. O. 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. Article. *Biotechnology for Biofuels*.
2. Nurttila, S. 2013. Catalytic upgrading of lignocellulose-derived platform molecules – Screening of homogenous catalysts, Master's thesis. Helsingin yliopisto.
3. Vuorela, S. 2005. Analysis, isolation, and bioactivities of repressed phenolics. Academic dissertation.
4. Svärd, L. 2013. Oljen ligniinin analysointi- ja karakterisointimenetelmät. Pro gradu. Helsingin yliopisto.
5. Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2008. Laboratorion analyysitekniikka, 5.–6. painos. Helsinki:Edita.
6. Kaasukromatografia. Opetushallitus. Verkkodokumentti.  
[http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat\\_2-5\\_kaasukromatografia.html](http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_2-5_kaasukromatografia.html) Luettu 10.11.2013
7. Meier, D. Technical PyNE Group Report, Characterization and Analysis. Hamburg, Germany.

**Punnitustulokset malliseoksessa**

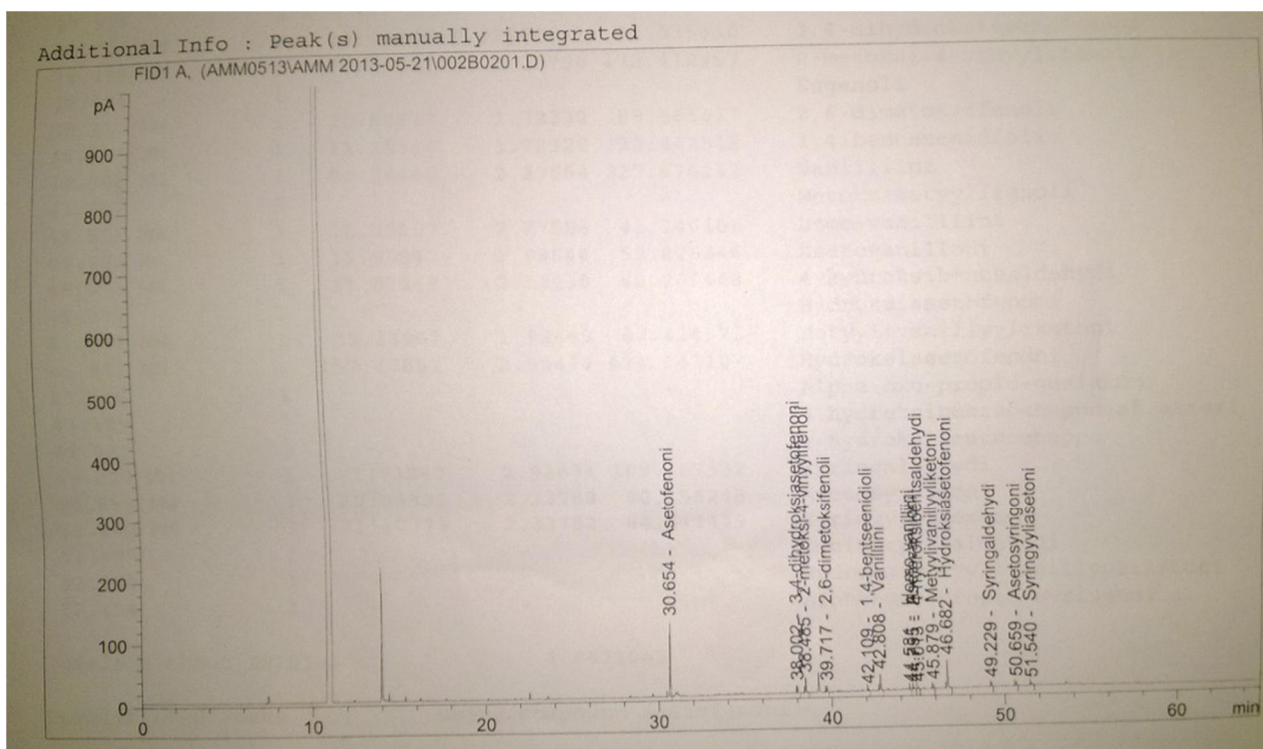
		<b>EA</b>	<b>EA+T</b>
	puhtaus	2000 ppm	2000 ppm
		(mg)	(mg)
2-formyylipyrroli	99,20 %	101,1	100,9
2,6-dimetyylifenoli	99,44 %	100,7	99,0
2-metoksi-4-metyylifenoli	99,83 %	99,0	103,5
Eugenoli	98,78 %	102,6	99,6
2,6-dimetoksifenoli	99,79 %	100,2	101,6
Vanilliini	99,89 %	101,3	102,3
Asetovanilloni	98,85 %	101,5	108,2
4-hydroksibentsaldehydi	98,35 %	100,2	103,8
Syringaldehydi	99,89 %	101,4	99,4
Asetosyringoni	99,20 %	110,0	100,2
Coniferyylialdehydi	99,31 %	100,0	99,5
3-hydroksipyridiini			
3-isopropyylifenoli	96,05 %		
Asetofenoni	99,33 %		



**Malliaineiden tulokset liuottimena etyyliasetaa tti-tolueni-seos (1:1)**

Retentioaika (min)	Yhdiste	Uuttoaika (min)			Uuttoaika (min)			Uuttoaika (min)		
		30	60	120	30	60	120	30	60	120
		Malliaineen mitattu määrä (ppm)	Malliaineen määrä näyttemäärässä (mg)	Malliainelisyys (mg)	Malliaineen laskettu määrä (mg)					
30,998	2-fornyliipyrroli	2261	1623	1637	1519	2,85	2,88	2,68	3,97	3,99
32,611	2,6-dimetyylifenoli	2224	2247	2264	2255	3,94	3,98	3,98	3,91	3,93
34,469	2-metoksi-4-metyylifenoli	2334	2342	2359	2355	4,11	4,15	4,16	4,10	4,12
39,098	Eugenoli	2223	2252	2272	2272	3,95	3,99	4,01	3,91	3,92
39,735	2,6-dimetoksisfenoli	2290	2170	2172	2185	3,81	3,82	3,86	4,02	4,04
42,826	Vanilliini	2309	2218	2239	2548	3,90	3,93	4,50	4,06	4,08
44,773	Asetovanilioni	2416	2330	2312	2502	4,09	4,06	4,42	4,24	4,27
45,030	4-hydroksibentsaldehydi	2306	2096	2082	2574	3,68	3,66	4,55	4,05	4,07
49,252	Syringaldehydi	2242	2094	1966	2149	3,68	3,46	3,79	3,94	3,96
50,683	Asetosyringoni	2245	2112	1963	2241	3,71	3,45	3,96	3,94	3,95
51,992	Coniferylialdehydi	2232	2208	2186	2437	3,88	3,84	4,30	3,92	3,94
		Koko malliseos (g)			44,2716					
		Malliseos 30 min (g)			1,7558					
		Malliseos 60 min (g)			1,7577					
		Malliseos 120 min (g)			1,7656					

### Näyte 2 liuttomena etyyliasetaatti





### Näyte 2 liuottimena etyyliasettaatti-tolueni-seos (1:1)

