

TAMPEREEN AMMATTIKORKEAKOULU  
Tampere University of Applied Sciences

## **SPEKTRIKIRJASTON LUOMINEN NESTEKROMATOGRAFI- MASSASPEKTROMETRILLE**

**Soja Leskinen**

Opinnäytetyö  
Syyskuu 2010  
Laboratorioalan koulutusohjelma  
Tampereen ammattikorkeakoulu

## TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Laboratorioalan koulutusohjelma

LESKINEN, SOJA:  
Spektrikirjaston luominen nestekromatografi-massaspektrometrille

Opinnäytetyö 69 s., liitteet 11 s.  
Marraskuu 2010

---

Opinnäytetyö tehtiin Kemfine Oy:n laadunvalvontalaboratoriossa Kokkolan toimipisteessä. Opinnäytetyön tarkoituksena oli luoda spektrikirjasto nestekromatografi-massaspektrometrille Kemfine Oy:n 14 nykytuotannossa olevasta tuotteesta sekä laatia ohjeistus spektrikirjaston käytöstä laitteen tuleville käyttäjille. Tarkoituksena oli myös vertailla kahta eri ionisaatiotekniikkaa ja erilaisia eluentikoostumuksia sekä tutkia sitä miten erilaiset tekijät vaikuttavat tuotteiden ionisoitumiseen ja massaspektreihin.

Opinnäytetyön kokeellisessa osuudessa laadittiin menetelmät nestekromatografille ja massaspektrometrille ja analysoitiin tuotteet käyttäen kahta eri ionisaatiotekniikkaa: sähkösumutus-ionisaatiota (Electrospray Ionization, ESI) ja ilmanpaineista kemiallista ionisaatiota (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI). Lisäksi tutkittiin fragmentorijännitteen vaikutusta tuotteiden ionisoitumiseen ja kokeiltiin eluenteina metanolia ja asetonitriiliä.

Laaditut menetelmät sekä nestekromatografille että massaspektrometrille osoittautuivat onnistuneiksi, koska kaikki tuotteet yhtä lukuun ottamatta saatiin ionisoitumaan käytetyillä parametreilla. Tuloksien perusteella pääteltiin, että näillä parametreilla kyseiset tuotteet ionisoituvat paremmin APCI-tekniikalla. Lisäksi tuotteiden käyttäytymisestä erilaisissa ajo-olosuhteissa saatiin arvokasta informaatiota yritykselle jatkotutkimuksia ja menetelmänkehitystä varten.

Tulevaisuudessa olisi hyvä jatkaa tutkimuksia vielä menetelmän kehityksen parissa ja kiinnittää huomiota esimerkiksi ESI- ja APCI-tekniikan samanaikaiseen käyttöön. Myös selvityksiä metanolin kanssa olisi syytä jatkaa, koska opinnäytetyötä tehdessä kävi ilmi, että metanoli toimii eluenteina tällä laitteella paremmin kuin asetonitriili.

## ABSTRACT

Tampere University of Applied Sciences  
Degree Programme in Laboratory Sciences

LESKINEN, SOJA:  
Creating spectral library for liquid chromatograph-mass spectrometer

Bachelor's thesis 69 pages, appendix 11 pages  
November 2010

---

This Bachelor's thesis was made at the quality control laboratory of Kemfine Kokkola. The purpose of this Bachelor's thesis was to create a spectral library for high performance liquid chromatograph-mass spectrometer (HPLC-MS) from 14 chemicals now in production and write instructions for the future operators of the instrument. The aim of the thesis was also to compare different ionization techniques and eluent formulas. In addition, the different parameters of the instrument's run conditions were explored and how they affect ionization and mass spectrums.

In the experimental part of this thesis, methods were created for HPLC and mass spectrometer. After that, products were analyzed using two different ionization techniques: electrospray ionization, ESI, and atmospheric pressure chemical ionization, APCI. The influence of fragmentor voltage was examined and also methanol and acetonitril were tried as eluents

Methods that were developed for HPLC and mass spectrometer were successful. All products except one ionized well with the parameters used. Based on the results of this thesis, it was concluded that these products ionized better when APCI-technique was used. Valuable information on the behavior of these products under different conditions was received for future method development.

In the future it would be important to continue studies with method development and pay attention to using ESI- and APCI techniques together at the same time. Researches with methanol should also continue to be carried out, because it occurred that methanol would be better eluent than acetonitril for this instrument.

---

Keywords: HPLC, mass spectrometer, ESI, APCI, mass spectrum, spectral library

## SISÄLLYS

1 JOHDANTO .....	6
2 NESTEKROMATOGRAFIA.....	7
2.1 HPLC-laitteisto .....	8
2.1.1 Eluentit.....	9
2.1.2 Pumppu .....	9
2.1.3 Injektori .....	10
2.1.4 Kolonni.....	10
2.1.5 Detektori .....	11
2.2 HPLC-menetelmän kehitys.....	12
2.2.1 pH .....	12
2.2.2 Isokraattinen ja gradienttiajo .....	13
2.2.3 Lämpötila .....	14
2.2.4 Virtaus ja paine .....	15
3 MASSASPEKTROMETRIA.....	16
3.1 MS-laitteisto.....	16
3.1.1 Näytteen ionisaatio .....	17
3.1.2 Ionioptiikka.....	22
3.1.3 Massa-analysaattori.....	23
3.1.4 Detektori .....	24
3.2 Menetelmän kehitys massaspektrometrille.....	24
3.2.1 Fragmentorijännite.....	24
3.2.2 Polaarisuus .....	25
3.2.3 Kapillaarin jännite .....	25
3.2.4 Kuivauskaasun virtaus ja lämpötila .....	25
3.2.5 Sumuttimen paine .....	26
3.2.6 Haihduttajan lämpötila .....	26
3.2.7 Koronaneulan virta.....	26
4 NESTEKROMATOGRAFIN JA MASSASPEKTROMETRIN YHDISTELMÄ ..	27
5 SPEKTRIKIRJASTO .....	28
6 TYÖN SUORITUS .....	29
6.1 Esivalmistelut .....	29

6.1.1 Kolonnin valinta .....	29
6.1.2 Eluentit ja HPLC-laitteen puhdistus.....	30
6.1.3 Näytteiden käsittely .....	30
6.2 HPLC-menetelmä .....	31
6.2.1 Asetonitrili eluenttina .....	31
6.2.2 Metanoli eluenttina.....	33
6.3 MS-menetelmä .....	33
7 TULOKSET .....	35
7.1 Massaspektrien kvalitatiivinen tulkinta.....	35
7.2 Asetonitrilianalyysien tulokset.....	37
7.2.1 ESI-tekniikka asetonitrilianalyseissa.....	37
7.2.2 APCI-tekniikka asetonitrilianalyseissa .....	39
7.2.3 ESI- ja APCI- tekniikan vertailu asetonitrilianalyseissa.....	41
7.3 Metanolianalyysien tulokset.....	43
7.3.1 ESI-tekniikka metanolianalyseissa .....	44
7.3.2 APCI-tekniikka metanolianalyseissa .....	46
7.3.3 ESI- ja APCI- tekniikan vertailu metanolianalyseissa .....	48
7.4 Eluenttikoostumuksen vaikutus tuotteiden ionisoitumiseen .....	49
7.5 Fragmentorijännitteen vaikutus tuotteiden fragmentoitumiseen .....	52
7.6 Tulosten yhteenveto .....	53
8 PÄÄTÄNTÄ .....	54
LÄHTEET.....	55
LIITTEET .....	57

## 1 JOHDANTO

Opinnäytetyö tehtiin Kemfine Oy:n Kokkolan toimipisteen laadunvalvontalaboratoriossa kevään ja kesän 2010 aikana. Kemfine Oy on maatalouskemikaaleja ja lääkeaineiden välituotteita tuottava kansainvälinen yritys. Kemfinella on pitkä historia kansainvälisessä hienokemikaaliteollisuudessa: orgaanisten hienokemikaalien valmistus alkoi Kokkolassa jo vuonna 1984 silloisen Kemiran alaisena. Kemfinen päämarkkina-alueet ovat Eurooppa ja Yhdysvallat. Kokkolan tehtaassa laadunvalvonnan laboratoriossa keskitytään lähinnä orgaanisten hienokemikaalien tuotantoprosessien raaka-aine-, reaktionseuranta-, ja lopputuoteanalytiikkaan.

Opinnäytetyön tavoitteena oli luoda spektrikirjasto nestekromatografi-massaspektrometrille (Liquid Chromatography- Mass Spectrometer, LC-MS), johon tallennettaisiin Kemfinen 14 nykytuotannossa olevaa tuotetta sekä laatia ohjeistus spektrikirjaston käytöstä laitteen tuleville käyttäjille. Samalla vertailtiin kahta eri ionisaatiotekniikkaa ja erilaisia eluenttikoostumuksia. Tarkoituksena oli tutkia, miten erilaiset tekijät vaikuttavat tuotteiden ionisoitumiseen ja massaspektreihin, jotta työntekijöiden olisi helpompi jatkaa tutkimuksia ja menetelmän kehitystä tulevaisuudessa.

Ennen tutkimusta LC-MS-laitteella ajettujen yhdisteiden tunnistus oli aikaa vievää ja tieto esimerkiksi ajoparametreista hajanaista. Tutkimus antaa pohjatietoa yhdisteiden tunnistustyön nopeuttamiseksi ja helpottaa ajo-olosuhteiden laatimista. NIST-spektrikirjaston käyttöohje saa työskentelyyn rutiininomaisuutta laitteen tuleville käyttäjille.

Korkean erotuskyvyn nestekromatografia liitettynä massaspektrometriaan on analyyttisen kemian uusinta tekniikkaa, joka yhdistää nestekromatografian erotuskyvyn ja massaspektrometrian valmiudet tunnistaa lukemattomia yhdisteitä. Kemfinelle Agilentin LC-MS-laite hankittiin tammikuussa 2009 ja sitä käytetään laboratoriossa lähinnä tuntemattomien epäpuhtauksien tunnistamiseen sekä kvalitatiivisiin ja kvantitatiivisiin analyyseihin.

## 2 NESTEKROMATOGRAFIA

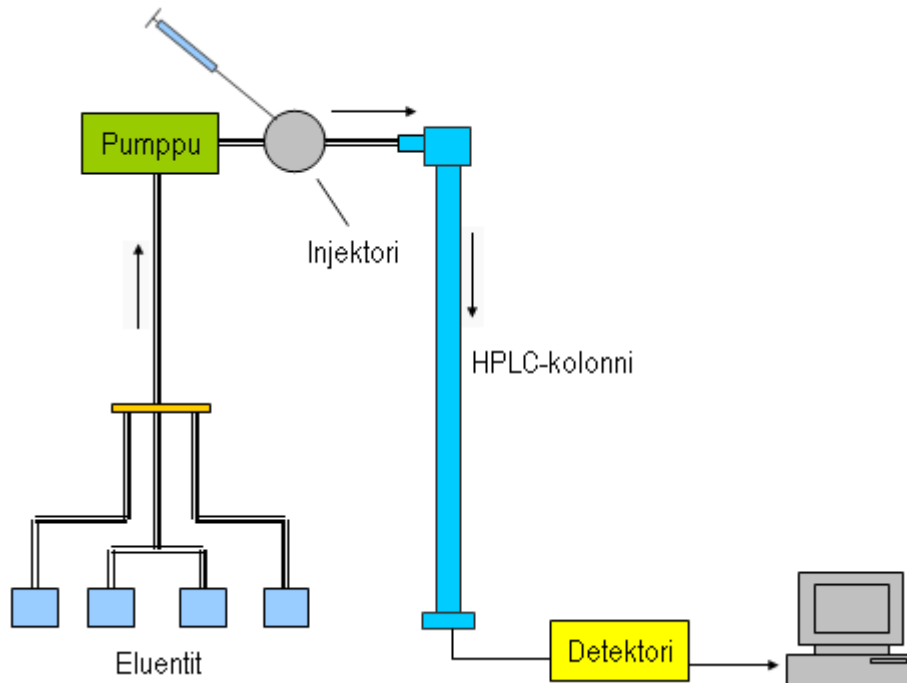
Kromatografia on tutkimusmenetelmä, jossa näyte jaetaan analyysin aikana komponenteikseen tunnistamista varten. Jakautuminen tapahtuu kolonnissa, jossa kaksi toisiinsa liukenematonta faasia, stationäärifaasi ja liikkuva faasi, ovat vuorovaikutuksessa toistensa kanssa. Nestekromatografiassa liikkuvana faasina on neste. Nestekromatografia voidaan jakaa esimerkiksi normaali- ja käänteisfaasikromatografiaan sekä ionikromatografiaan, joista käänteisfaasikromatografia on nykyään käytetyin muoto. (Meyer 2004, 7,14.)

Näytemolekyylit ovat dynaamisessa tasapainossa faasien välillä eli ne tarttuvat toistuvasti stationäärifaasiin ja irtoavat siitä liikkuvaan faasiin. Yhdisteet kulkevat eteenpäin kolonnissa liikkuvan faasin mukana. Heikosti stationäärifaasiin tarttuvat yhdisteet etenevät nopeasti, koska ne ovat suurimmaksi osaksi liikkuvassa faasissa. Voimakkaasti stationäärifaasiin sitoutuvat yhdisteet kulkeutuvat hitaammin liikkuvan faasin mukana. Eri yhdisteillä on erilainen tasapaino liikkuvan ja stationäärifaasin välillä, joten yhdisteet on mahdollista erottaa toisistaan. (Meyer 2004, 16-19.)

Korkean erotuskyvyn nestekromatografiassa liuotin pakotetaan korkean paineen avulla tiukkaan pakatun kolonnin läpi, joka mahdollistaa yhdisteiden erottumisen korkealla resoluutiolla (Harris 2007, 556). Korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) käytetään sekä epäorgaanisten että orgaanisten yhdisteiden analysoimiseen. Tekniikka mahdollistaa muiden kromatografisten menetelmien tavoin monen yhdisteen samanaikaisen analysoinnin. Lisäksi nestekromatografian avulla voidaan analysoida suurikokoisia orgaanisia molekyylejä. Periaatteessa ainoa edellytys nestekromatografian käyttämiselle on se, että näyte saadaan liukenemaan johonkin liuottimeen. Käytännössä voi ilmetä muitakin ehtoja, kuten sopivan detektorin puute tai näytteen ja liuottimen välinen analysointia haittaava reaktio. (Jaarinen & Niiranen 2005, 153.)

## 2.1 HPLC-laitteisto

LC-MS-yhdistelmän nestekromatografiosa koostuu injektorista, liuotinpumpusta, kolonnista ja detektorista sekä näitä yhdistävistä kapillaareista. Pieni määrä näytettä syötetään injektorin kautta korkean paineen alaisena olevaan, kapeissa kapillaareissa liikkuvaan nestefaasiin. Näyte siirtyy eluentin mukana kolonniin, joka on pakattu tiukasti pienikokoisilla partikkeleilla, stationäärifaasilla. Eluentti kulkee tasaisena virtana tiiviisti pakatun kolonnin läpi, joka mahdollistetaan sykkeettömästi pumppaavan pumpun avulla. Kulkiessaan kolonnin läpi eluentin mukana, näyte jakaantuu komponenteikseen, jotka tulevat vuorollaan ulos kolonnista detektorille. Detektori mittaa yhdisteen antamaa signaalia ajan funktiona, jolloin saadaan kromatogrammi. (McMaster 2005, 9; Jaarinen & Niiranen 2005, 154.)



KUVIO 1. HPLC-laitteisto (Opetushallitus 2004)



### 2.1.1 Eluentit

Tavallisesti eluentti koostuu vähintään kahdesta komponentista. Niiden välistä suhdetta muuttamalla etsitään analyysiolosuhteet, joissa saadaan näytteen yhdisteille paras erotuskyky. Käytettäessä C-18-kolonnia eluenttien tulee olla poolisia, koska kolonnin stationäärifaasi on pooliton. Näissä olosuhteissa poolisimmat näytekomponentit eluoituvat ensin, joten eluentin poolisuuden lisääminen kasvattaa neutraalien yhdisteiden retentioaikaa. (Jaarinen & Niiranen 2005, 161.) Tyypillisimpiä eluenteja käänteisfaasikromatografiassa ovat hapotettu vesi, metanoli ja asetonitrili.

Käytettäessä poolisia eluenteja, monet näytekomponentit ionisoituvat. Käänteisfaasikromatografiassa ionimuodossa oleva yhdiste kulkee poolisen eluentin mukana liian nopeasti eikä erottumista tapahdu. Tämä voidaan estää puskuroimalla eluentin pH sellaiseksi (yleensä 2-8), että yhdiste saadaan neutraaliin muotoon. (Jaarinen & Niiranen 2005, 161.)

### 2.1.2 Pumppu

HPLC-laitteiston olennainen osa on pumppu, jonka on pystyttävä pumppaamaan eluenttia pulssittomasti, toistettavasti ja tasaisella virtausnopeudella laitteiston ja kolonnin tuottamaa vastapainetta (n. 200-350 laitteesta riippuen) vastaan. Materiaaliltaan pumput ovat mahdollisimman puhdasta terästä. Yleisimmin käytetään resiprookkipumppua, jonka kammioista edestakaisin liikkuva mäntä työntää eluenttia yksitievientiilin kautta kolonniin. Binääripumpulla voidaan tuottaa hyvin tarkasti kahden liuottimen seoksia ja kvarternääripumpulla jopa neljän eluentin seoksia siten, että liuosten tilavuussuhteita voidaan analysoinnin aikana portaattomasti muuttaa. (Meyer 2004, 52-55.) Tässä työssä käytetyssä HPLC-laitteessa oli binääripumppu.

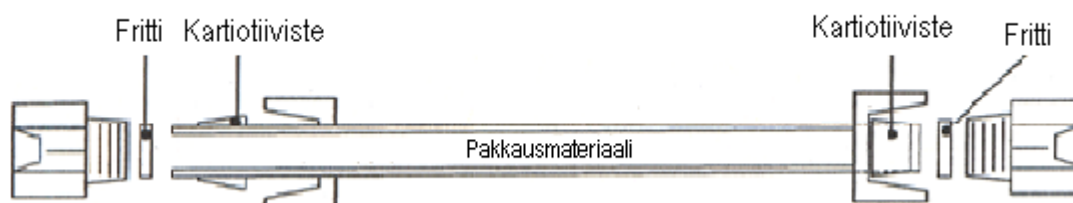
### 2.1.3 Injektori

Nykyaikaisessa nestekromatografialaitteistossa näyte syötetään suuripaineiseen nestevirtaan automaattisen injektorin avulla. Injektorissa oleva ruisku injektioi halutun määrän näytettä eluointiliuokseen, joka kuljettaa näytteen kolonniin. (Jaarinen & Niiranen 2005, 165.)

Näytteen syöttäminen kolonniin on yksi tärkeimmistä asioista HPLC-laitteissa. Jopa parhaimmallakin kolonnilla saadaan aikaan huono erotuskyky, jos näytettä ei syötetä oikealla tavalla kolonniin: pieni määrä näyteliuosta injektoidaan varoen sammalla, ettei ilmaa pääse kolonniin. Nykyaikaisessa laitteistossa näytteen injektoinnista huolehtii automaattinen injektiosysteemi eli autosampleri. (Meyer 2004, 67.)

### 2.1.4 Kolonni

HPLC-kolonnin tehtävä on erotella näytteessä olevat yhdisteet toisistaan. HPLC-kolonnien ulkopinta on valmistettu ruostumattomasta teräksestä ja ne ovat tavallisesti 3–30 cm pitkiä. Kolonnin sisähalkaisija on yleensä 2-8 mm ja pakkausmateriaalin partikkelikoko on yleensä 3-10  $\mu\text{m}$ . Mitä pienempiä partikkelit ovat, sitä tehokkaampaa on yhdisteiden erottuminen kolonnissa, koska tällöin kolonnin aktiivinen pinta-ala on suuri. (Jaarinen & Niiranen 2005, 154.) Kuviossa 2 on esitetty kolonnin molemmissa päissä olevat huokoiset levyt, fritit, jotka pitävät kolonnin sisällä olevan pakkausmateriaalin paikallaan, sekä kartiotiivisteet, joiden avulla kolonni saadaan tiiviisti liitettyä kapillaariin. (McMaster 2005, 21.)



KUVIO 2. HPLC-kolonni (McMaster 2005, 22)

Tässä työssä käytettiin käänteisfaasikromatografiaa, jossa stationäärifaasi on pooliton ja eluentit poolisia. Käänteisfaasikromatografiassa kolonni on täytetty kemiallisesti sidotulla silikapohjaisella faasilla, jossa suurin osa silikan hydrok-syyliiryhmistä on korvattu suoraketjuisilla hiilivedyillä tai hiilivetyketjuilla, joissa on poolisia substituutioryhmiä. Tyypillisin sidottu ryhmä on oktadekyyliiryhmä, jolloin vastaava faasi on oktadekyylisilaani, ODS. Oktadekyylisilaania kutsutaan usein C-18-materiaaliksi. (Jaarinen & Niiranen 2005, 156.)

### 2.1.5 Detektori

Nestekromatografiassa yleisesti käytettyjä detektoreja ovat UV- (ultraviolet-tisäteily), UV/VIS- (näkyvä valo), fluoresenssi-, sähkökemialliset ja taitekerroin-detektorit (Refraction Index, RI). UV/VIS-detektori on paras vaihtoehto silloin, kun tutkittava yhdiste absorboi UV- tai näkyvän valon aallonpituusalueella, mut-ta sitä ei voida käyttää, jos yhdiste ei absorboi UV- tai näkyvää valoa lainkaan. Yleensä laitteissa on käytössä diodirividetektori, jolloin voidaan mitata useita aallonpituuksia samanaikaisesti. (Snyder, Kirkland & Glajch 1997, 59-60.) Tai-tekerroindetektoria voidaan pitää nestekromatografian yleisdetektorina, mutta se on paljon epäherkempi kuin esimerkiksi UV/VIS-detektori ja reagoi herkem-min kromatografisen ajon aikana mm. lämpötilan vaihteluille. Massaspektromet-ria on myös yksi detektorimuoto nestekromatografiassa ja sen käyttö on koko aja yleistymässä. Taulukossa 1 on vertailtu erilaisten detektorien ominaisuuksia. Tässä työssä käytetyssä Agilentin HPLC-laitteessa on UV/VIS-diodirividetektori sekä laitteen yhdistettynä massaspektrometri. (Opetushallitus 2004.)

TAULUKKO 1. Nestekromatografialaitteistossa yleisimmin käytettyjen detektorien ominaisuuksia (Opetushallitus 2004)

Detektori	Sovellusalue	Lineaarinen alue	Gradienttiajo
Taitekerroindetektori	Hyvin laaja	$10^4$	Ei sovellu
Johtokykydetektorit	Suppea	$10^5$	Huono
UV/VIS	Laaja	$10^5$	Hyvä
Fluoresenssi	Rajattu	$10^4$	Hyvä
Amperometriset detektorit	Rajattu	$10^6$	Huono
Kulometriset detektorit	Rajattu	$10^6$	Huono
Johtokykydetektorit	Rajattu	$10^5$	Huono
Massaspektrometri	Laaja	Hyvin suuri	Hyvä

## 2.2 HPLC-menetelmän kehitys

HPLC-menetelmän kehityksellä on tärkeä rooli analysoitaessa erilaisia yhdisteitä. Huolimatta merkittävästä edistymisestä kromatografisten menetelmien kehityksessä ja automatiikassa viime vuosikymmenillä, spesifisen HPLC-menetelmän luomiseen tarvitaan vielä paljon tietoa analyysin tekijältä. Menetelmää luotaessa tutkijan täytyy ottaa huomioon monia analyysiin vaikuttavia tekijöitä (parametreja), kuten esimerkiksi näytteen ja liuottimen väliset interaktioid, lämpötila, kolonnin ominaisuudet, eluentin virtaus, pH ja paine. (I ym. 2002, 28.)

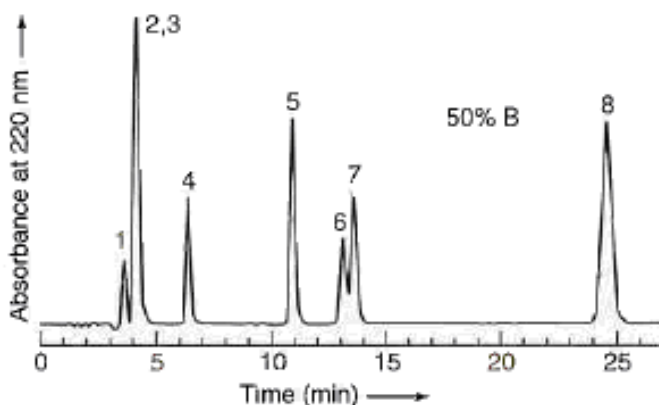
### 2.2.1 pH

Käänteisfaasikromatografiassa eluentin pH täytyy usein puskuroida sopivaksi, jotta tutkittava yhdiste saadaan neutraaliin muotoon. Muutoin ionina oleva yhdiste kulkee poolisen eluentin mukana liian nopeasti kolonnin läpi eikä tarvittavaa erottumista tapahdu. Käytännössä pH:n muutos saadaan aikaiseksi lisäämällä eluenttiin happoa. (Jaarinen & Niiranen 2005, 157.) LC-MS-analyysissä puskurina käytetään orgaanista happoa, esimerkiksi muurahaishappoa, koska epäorgaaniset hapot, kuten muutoin yleisesti käytetty fosforihappo, likaavat ioni-

lähteen ja siten huonontavat herkkyyttä ja lopulta hävittävät signaalin kokonaan (McMaster 2005, 43).

### 2.2.2 Isokraattinen ja gradienttiaojo

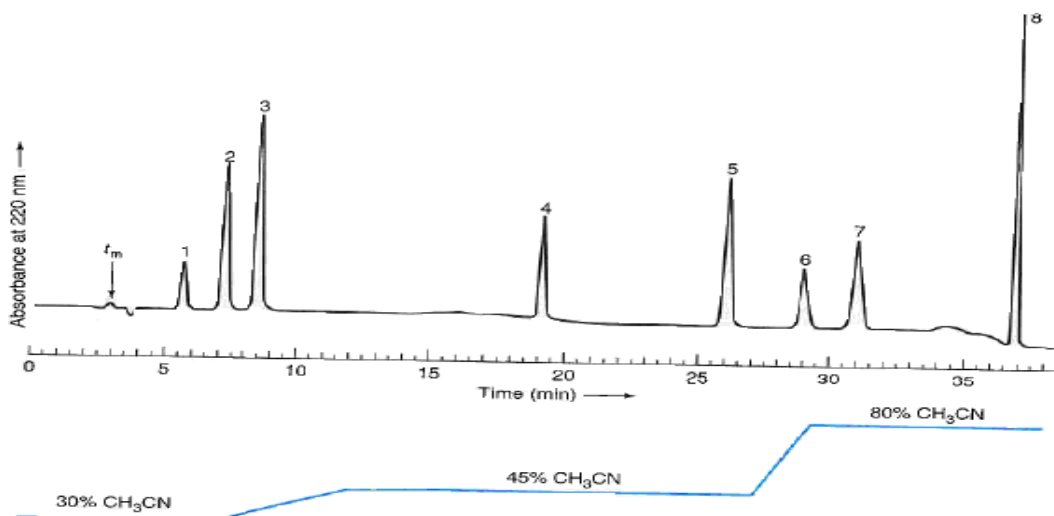
Isokraattinen ajo tarkoittaa analyysiä, jossa eluointiliuoksen koostumusta ei muuteta ajon aikana. Usein isokraattisella ajolla ei saada näytekomponentteja eluoitumaan ulos kolonnista tarpeeksi nopeasti tai komponenttien retentioajat menevät päällekkäin. Tällöin voidaan käyttää gradienttiaojoa, jossa eluointiliuoksen koostumusta muutetaan ajon aikana. Kuviosta 3 nähdään, että käytettäessä isokraattista ajoa, jossa eluointiliuoksesta koostuu asetonitriliä ja happovettä (50:50), piikit retentoituvat osittain päällekkäin. Jos taas käytettäisiin vettä ja asetonitriliä suhteessa 70:30, analyysiin menevä aika pidentyisi huomattavasti. (Harris 2007, 565.)



KUVIO 3. Esimerkki isokraattisen ajon kromatogrammista (Harris 2007, 564.)

Kuviossa 4 on käytetty gradienttiaojoa, eli eluointiliuoksen koostumusta on muutettu vaiheittain kromatografisen ajon aikana. Analyysi on aloitettu ajamalla 8 minuutin ajan asetonitriliä ja happovettä suhteessa 30:70, jolloin piikit 1, 2 ja 3 erottuivat. Sitten eluointiliuoksen suhdetta on muutettu tasaisesti 5 minuutin ajan siten, että asetonitriliä ja happovettä on ollut suhteessa 45:55, jota on ajettu 15 minuuttia piikkien 4 ja 5 tullessa ulos. Lopuksi eluointiliuoksen suhdetta on muutettu suhteeseen 80:20, kunnes viimeisetkin piikit ovat tulleet ulos. Tässä tapauksessa gradient-

tiajolla on saatu nopeampi analyysi kuin isokraattisella ajolla. (Harris 2007, 565.)



KUVIO 4. Esimerkki gradienttiajon kromatogrammista (Harris 2007, 565.)

### 2.2.3 Lämpötila

Ei ole mahdollista tehdä yleispäteviä ohjeita siitä, miten lämpötila vaikuttaa HPLC-analyysiin. Voidaan kuitenkin sanoa, että kolonnin lämpötila voi vaikuttaa erilaisten yhdisteiden retentoitumiseen ja lämpötilan nostaminen saattaa nopeuttaa analyysia. Kuitenkin pH:lla ja eluentin koostumuksella on suurempi vaikutus menetelmän kehityksessä, joten usein lämpötila säädetään vakiomuuttujaksi. Lämpötilan ollessa vakio, saadaan toistettavampia tuloksia, kun tällä tavoin eliminoidaan esimerkiksi huoneenlämpötilan vaihtelut. (Dolan ym. 1998, 1-31.)

Jos on mahdollista, ihanteellisen erotusmenetelmän saamiseksi kannattaa aina kuitenkin tarkistaa lämpötilan vaikutus analyysiin. Joskus menetelmä voi toimia paremmin korkeammissa tai matalammissa lämpötiloissa. Esimerkiksi, jos analysoidaan korkean molekyyli­massan omaavia yhdisteitä, kuten proteiineja, kiinnostuksen kohteena on n. 80°C lämpötilat. (Meyer 2004, 45.)

#### 2.2.4 Virtaus ja paine

Eluentin virtausnopeus on yleensä säädettävissä 0,1 ml/min välein 15 ml/min nopeuteen saakka. Tyypillinen eluentin virtausnopeus on kuitenkin 1 ml/min. Laitteiston paineeseen vaikuttavia tekijöitä ovat mm. virtausnopeus, eluentin viskositeetti, kolonnin pituus ja täytemateriaali sekä lämpötila. (Jaarinen & Niiranen 2005, 162-163.)

### 3 MASSASPEKTROMETRIA

Massaspektrometri (Massspectrometer, MS) on herkkyytensä ansiosta tehokkain detektori kromatografialaitteisiin ja sitä käytetään sekä kvalitatiivisissa että kvantitatiivisissa tutkimuksissa. Massaspektrometrian avulla voidaan tunnistaa eri yhdisteitä, vaikka niillä olisi sama retentioaika. (Harris 2007, 474.) Massaspektrometri onkin tyypillisesti kytketty kromatografiin, jolloin yhdisteiden erotelu ja kromatografinen analyysi tukevat massa-analyysia (Jaarinen & Niiranen 2005, 122).

Massaspektrometria on tutkimusmenetelmä, jolla tutkitaan massaspektristä yhdisteiden massoja (Harris 2007, 474). Massaspektri antaa kuvan molekyylin rakenteesta ja spektrin pohjalta yhdiste on mahdollista tunnistaa (Jaarinen & Niiranen 2005, 122). Massaspektrin saamiseksi yhdisteet ionisoidaan ja fragmentoidaan, jonka jälkeen saadut ionit kiihdytetään sähköiseen kenttään ja erotellaan niiden massa-varaussuhteen ( $m/z$ ) mukaan (Harris 2007, 474).

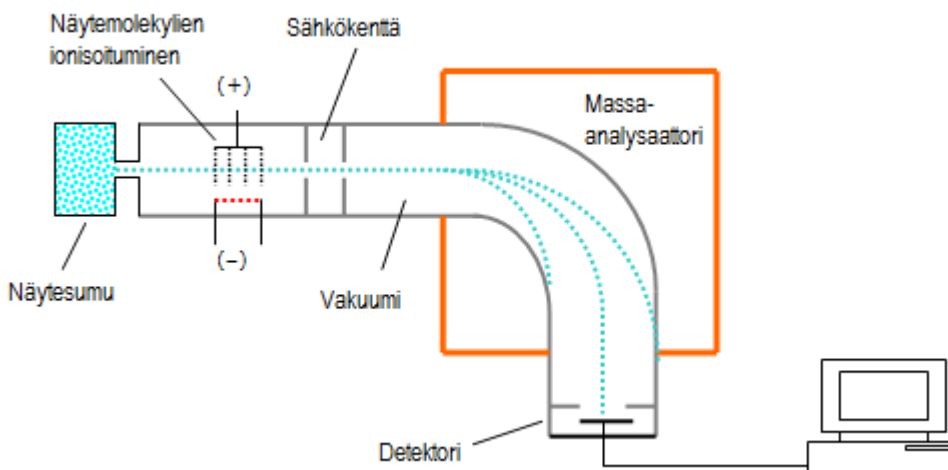
Käytännössä yhdisteiden tunnistus tapahtuu vertaamalla mitattua massaspekttriä kirjastospektriin, jolloin tuntemattoman näytteen analysointi tapahtuu automaattisesti (Jaarinen & Niiranen 2005, 122). LC-MS:lle valmista spektrikirjastoa Kemfinen tuotteista ei ole olemassa, joten sellainen täytyy luoda itse.

#### 3.1 MS-laitteisto

Kun näytteen sisältämät yhdisteet on ensin eroteltu nestekromatografilla, ne siirretään massaspektrometrille analysoitavaksi. Massaspektrometrille siirtyvät analysoitavien komponenttien lisäksi eluentti sekä muutkin haihtuvat reagenssit. Liuotin ja muut analyysissä käytetyt reagenssit täytyy poistaa systeemistä tässä vaiheessa, jotta vain näytekomponentit siirtyvät analysoitavaksi. (McMaster 2005, 51.)



Massaspektrometria perustuu vakuumin läpi kulkevien ionien erittelyyn ja tarkasteluun. Erittelyn tuloksena saadaan massaspektri, joka antaa tietoa yhdisteen molekyylimassasta, rakenteesta, määrästä ja puhtaudesta. Massaspektrometri soveltuu sekä kvantitatiivisiin että kvalitatiivisiin analyysiin. (Agilent Technologies 2007, 10.)



KUVIO 5. Kaaviokuva massaspektrometrin rakenteesta (Opetushallitus 2004)

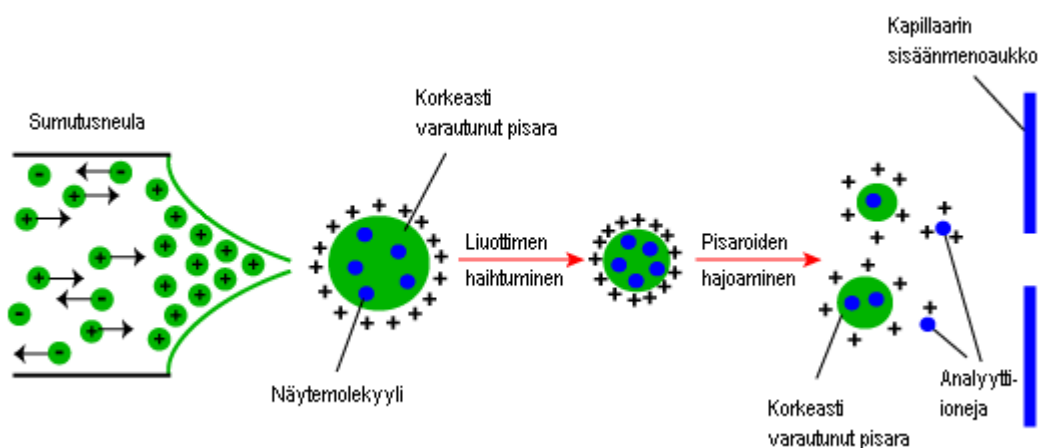
Kuviossa 5 on näytetty pelkistetty kaaviokuva massaspektrometrin rakenteesta. Näyte johdetaan HPLC-laitteesta ionisaatiokammioon, jossa tapahtuu näytteen ionisaatio normaalissa ilmanpaineessa. Syntyneet ionit kulkevat kapillaarin ja useiden eri ionioptisten osien, kuten skimmerin ja oktopolin, läpi massa-analysaattoriin, joka erottelee ionit. Analysaattorista ionit kulkevat detektorille, joka rekisteröi kunkin ionin lukumäärän ja massan. Kun ionit siirtyvät lentoradalla ionisaatiokammioista detektorille, laitteen sisäinen paine pienenee vaiheittain ilmanpaineesta (760 torr) vakuumpaineeseen  $10^{-6}$  torr. (Agilent Technologies 2007, 10–12.)

### 3.1.1 Näytteen ionisaatio

Yleisimmät HPLC:n liitännäsystemit massaspektrometriin ja ionisaatiomenetelmät LC-MS:lla ovat sähkösumutus-ionisaatio (Electrospray Ionization, ESI) ja ilmanpaineinen kemiallinen ionisaatio (Atmospheric Pressure Chemical Ionization).

on, APCI). Uusimpana tekniikkana on ilmanpaineessa tehtävä fotoionisaatio (Atmospheric Pressure Photo Ionization, APPI). APPI:n käyttö on toistaiseksi hyvin vähäistä, mutta se saattaa yleistyä tulevaisuudessa. APCI- ja ESI-ionisaatiota kutsutaan pehmeiksi ionisointitekniikoiksi, koska niiden avulla on mahdollista analysoida kokonaisia yhdisteitä vähäisen fragmentoitumisen takia. (Hämäläinen & Turpeinen 2006, 25; Harris 2007, 488.) Työssä käytetyssä Agilentin 6120 Quadrupole MS-yksikössä on molemmat, ESI- ja APCI-tekniikka, joten niiden teoriaa on käsitelty lähemmin seuraavaksi.

Sähkösumutus-ionisaatiossa nestekromatografialiuos johdetaan yhdessä kuivauskaasun ( $N_2$ ) kanssa ruostumattomasta teräksestä valmistetun sumutusneulan kautta ionisaatiokammioon, jossa on vahva sähkökenttä. Kuivauskaasun ja sähkökentän vaikutuksesta neulasta sumutetusta nesteestä muodostuu hienojakoinen aerosoli, joka koostuu varautuneista pisaroista. (Niessen 2003, 415.) Varautuneet pisarat pienenevät liuottimen haihtuessa ja pisaroiden varaustiheys kasvaa niin suureksi, että sähköinen poistovoima voittaa pisaroiden pintajännityksen ja ne hajoavat vielä pienemmiksi korkeasti varautuneiksi aerosolihiukkasiksi (kuvio 6) (Jaarinen & Niiranen 2005, 211).



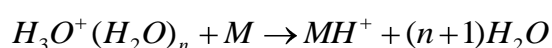
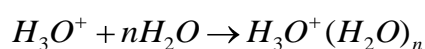
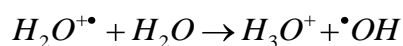
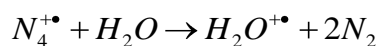
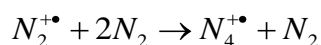
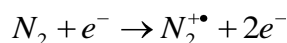
KUVIO 6. ESI-tekniikka (Gates 2004)

Kun liuotin on haihtunut, analysoitavan yhdisteen ionit vapautuvat siinä muodossa, missä ne ovat olleet eluointiliuoksessa. Liuoksessa on voinut muodostua esimerkiksi protonoitunut molekyyli,  $MH^+$  (massa  $M + 1$ ), tai molekyyliaddukti, johon on liittynyt esimerkiksi natriumioni,  $MNa^+$  (massa  $M + 23$ ), jotka näkyvät massaspektrissä. ESI-tekniikalla voidaan luoda sekä positiivisia että negatiivisia

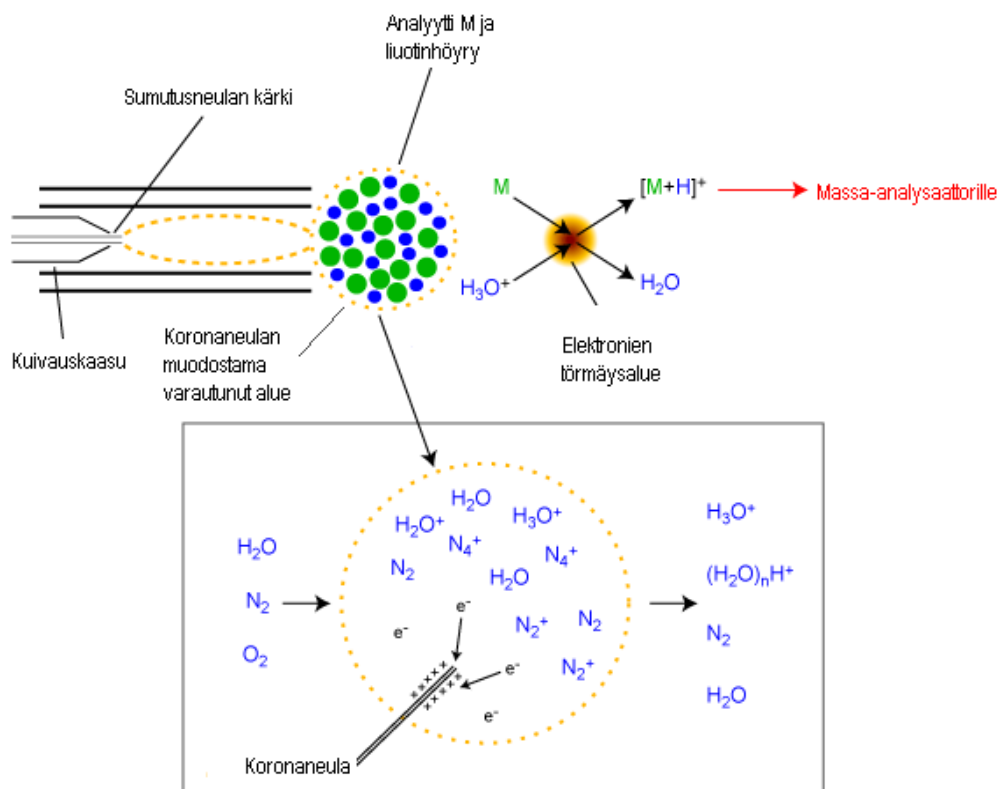
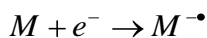
ioneja lähinnä sen mukaan, ovatko molekyylit protonin luovuttajia vai vastaanottajia. (Jaarinen & Niiranen 2005, 211.)

Muodostuneet näyteionit kulkeutuvat kapillaarin kautta eteenpäin massa-analysaattorille ja haihtunut liuotin ajautuu pumpun avulla ulos systeemistä (Agilent Technologies 2007, 24). Sähkösumutus-ionisaatio (ESI) soveltuu parhaiten yhdisteille, jotka ovat liuoksessa ioneina. Sillä voidaan kuitenkin ionisoida myös neutraaleja yhdisteitä, jos eluenttiin lisätään puskuria. ESI:llä voidaan analysoida yhtä hyvin positiivisia kuin negatiivisiakin ioneja. (Hämäläinen & Turpeinen 2006, 25.) Sähkösumutus-ionisaatio on käytännöllinen analysoitaessa erityisesti suuria yhdisteitä, kuten proteiineja, mutta sitä voidaan käyttää myös pienemmille yhdisteille, esimerkiksi pestisideille ja lääkeaineille.

Yhdisteet, jotka eivät ionisoidu tehokkaasti ESI:llä, saadaan usein ionisoitumaan APCI:llä. Se soveltuu parhaiten melko pienille ja stabiileille sekä neutraaleille molekyyleille. (Hämäläinen & Turpeinen 2006, 25.) Ilmanpaineinen kemiallinen ionisaatio, APCI, tapahtuu kaasufaasissa, jossa muodostuu uusia ioneja apukaasun ( $N_2$ ) ja höyrystyneen eluentin reagoitessa näytemolekyylien kanssa. APCI:ssa, nestekromatografialiuos ajetaan lämmitetyn ( $350-500^\circ C$ ) sumutusneulan läpi ionisaatiokammiossa sijaitsevalle korkeajännitteiselle koronaneulalle. (Niessen 2003, 416.) Koronaneulan ympärille muodostuu varautuneita partikkeleita sisältävä reunus. Tässä reunuksessa syntyy elektroneja, jotka törmäilevät sumutusneulasta tulevaan näytesumuun ionisoiden näytemolekyylejä (kuvio 7). Esimerkiksi protonoitu analyyytti  $MH^+$  voi muodostua seuraavalla tavalla:



Analyytti M voi muodostaa myös negatiivisen ionin elektronisieppauksella (Harris 2007, 490–491.):



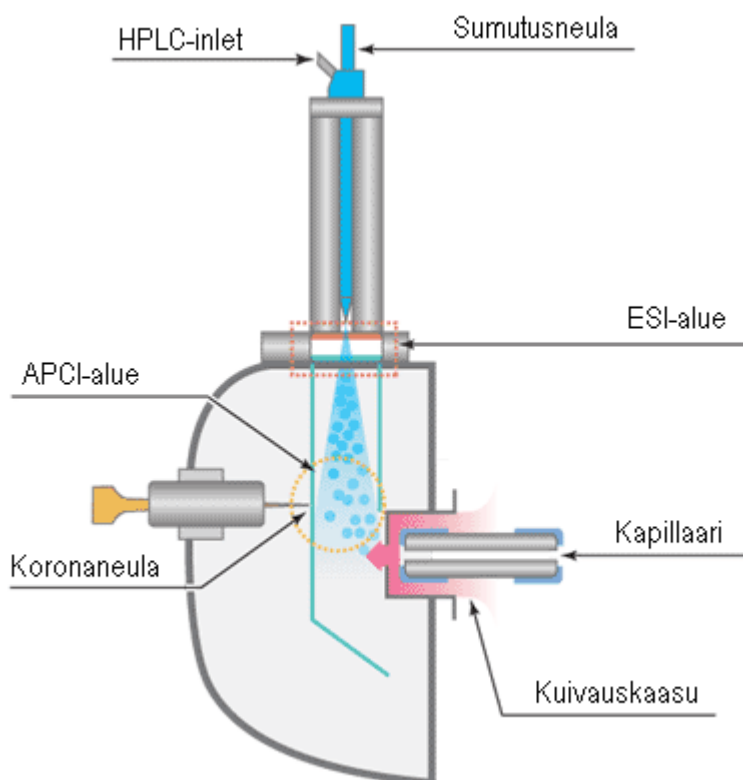
KUVIO 7. APCI-tekniikka (Gates 2004)

Myös APCI-tekniikalla voidaan luoda sekä positiivisia että negatiivisia ioneja lähinnä sen mukaan, ovatko molekyylit protonin luovuttajia vai vastaanottajia. APCI-tekniikalla saadaan luotua yhdenarvoisia ioneja, joten se soveltuu hyvin lukuisille molekyyleille lukuun ottamatta proteiineja. (Harris 2007, 490–491.)

Agilentin 6120 Quadrupole MS-yksikössä ESI- ja APCI-tekniikkaa on mahdollista käyttää myös samanaikaisesti yhdistetyllä ionisaatiolla (Multimode Ionization, MMI). MMI-tekniikka on käytännöllinen tutkittaessa tuntemattomia yhdisteitä, joista ei voida varmuudella tietää, ionisoituvatko yhdisteet ESI- vai APCI-tekniikalla. Tämänkaltaisissa tapauksissa MMI-tekniikka on paras vaihtoehto, koska tällöin näytteitä ei tarvitse analysoida kahteen kertaan. Haittapuolena MMI-tekniikalla analysoitaessa on se, että laitteen herkkyys kärsii. (Agilent

Technologies 2007, 29.) Tässä työssä näytteet analysoitiin erikseen sekä ESI-että APCI-tekniikalla, koska yksi opinnäytetyön kohde oli tutkia nimenomaan sitä, että mikä ionisaatiotekniikka on paras kullekin yhdisteelle.

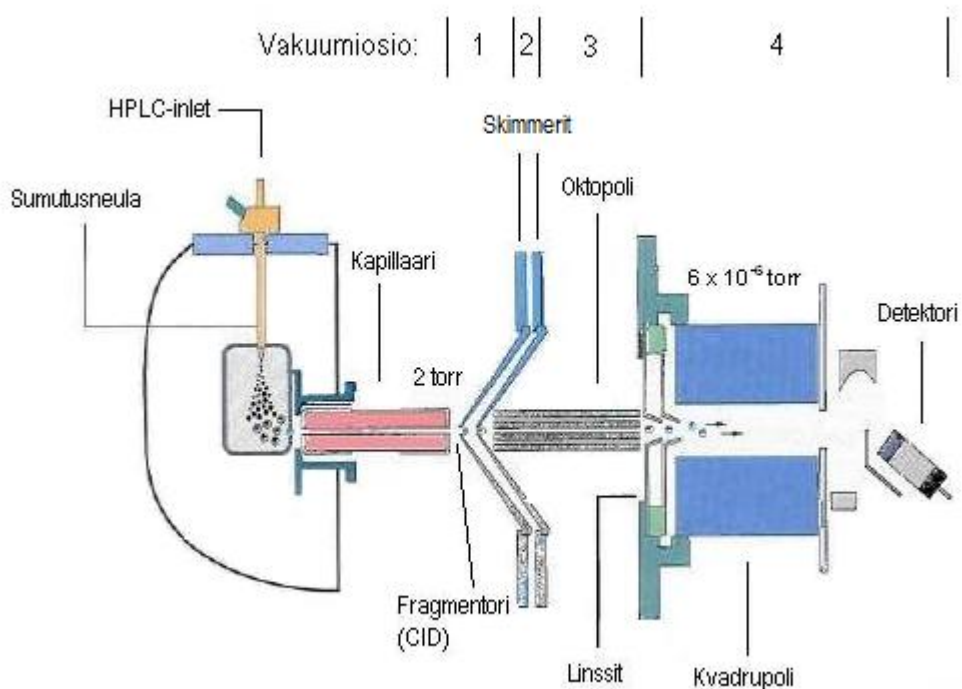
Kuviossa 8 on esitetty Agilentin 6120 Quadrupole MS-yksikön MMI-toimintaperiaate. Ensimmäiseksi tapahtuu sähkösumutus-ionisaatio varautuneen elektrodin avustuksella. ESI-tekniikalla muodostuneet ionit sekä ionisoitumattomat näyte- ja liuotinmolekyylit kulkeutuvat kuivauskaasun mukana vastaanottavalle elektrodille, joka luo uuden APCI:lle sopivan sähkökentän. Seuraavaksi jo ionisoituneet molekyylit erotetaan ionisoitumattomista näyte- ja liuotinmolekyyleistä. Ionisoitumattomat molekyylit kulkeutuvat koronaneulalle ja ionisoituvat APCI-tekniikalla. Lopuksi sekä ESI-että APCI-tekniikalla ionisoituneet molekyylit kulkeutuvat kapillaarin läpi eteenpäin analysoitavaksi. (Agilent Technologies, 2010.)



KUVIO 8. Yhdistetty ionisaatio (Agilent Technologies 2010)

### 3.1.2 Ionioptiikka

Ionisaatiokammiossa muodostuneet ionit kuljetetaan elektrostaattisesti kuivauskaasun ja kapillaarin läpi ensimmäiseen vakuumiosioon, jossa on noin 2 torr paine (kuvio 9). Pehmeillä ionisaatiotekniikoilla saadaan yleensä luotua ioneja, jotka pysyvät kokonaisina ja antavat tietoa yhdisteen molekyyli­massasta. Usein tarvitaan kuitenkin yksityiskohtaisempaa tietoa yhdisteen rakenteesta. Tällöin ioneja voidaan fragmentoida ensimmäisessä vakuumiosiossa. (Agilent Technologies 2007, 13.) Fragmentointi tapahtuu siten, että ioneihin johdetaan ylimääräistä energiaa lisäämällä kapillaarin ja skimmerin jännite-eroa, jolloin ne lähtevät törmäilemään systeemissä oleviin neutraaleihin molekyyli­ihin ja saavat aikaan ionien fragmentoitumista. Mitä suurempi jännite-ero on kapillaarin ja skimmerin välillä, sitä enemmän ionit fragmentoituvat. Prosessi on fysikaalinen ilmiö, jota kutsutaan törmäys-indusoiduksi dissosiaatioksi (collision-induced dissociation, CID). (Niessen 2003, 418.)



KUVIO 9. Massayksikön vakuumitilat (Agilent Technologies 2007, 12.)

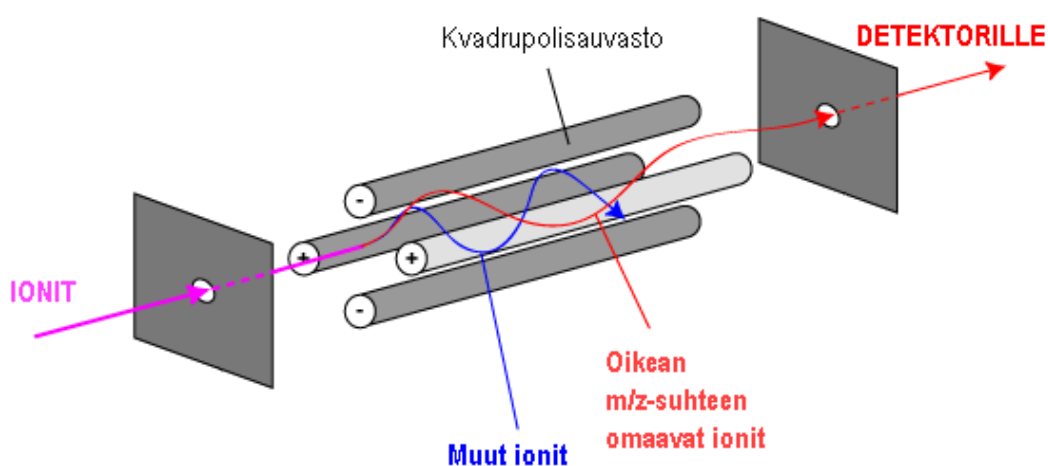
Lähellä kapillaarin ulostulopäätä on metalliset levyt, skimmerit, joissa on pieni reikä. Ionit, jotka kulkevat suuremmalla nopeudella ja ovat painavampia, siirty-

vät reiän läpi eteenpäin. Suurin osa kevyemmistä ioneista, kuten kuivauskaasusta ionisoituneista molekyyleista, kulkevat skimmerien ohitse ja poistuvat systeemistä pumpun avulla. Skimmerien jälkeen paineen vähentyessä ionit ohjautuvat oktopolin läpi ja läpäisevät sen jälkeen kaksi fokusoivaa linssiä, josta ne siirtyvät neljänteen vakuumiosioon. Oktopolin tehtävä on johdattaa tietyn massasuhteen omaavat ionit eteenpäin ja se koostuu varautuneista sauvoista kuten varsinainen massa-analysaattori, joka sijaitsee neljännessä vakuumiosiossa  $6 \times 10^{-6}$  torr paineessa. (Agilent Technologies 2007, 13-14.)

### 3.1.3 Massa-analysaattori

Massa-analysaattorin tehtävä on erottaa ionit niiden massa-varaussuhteen ( $m/z$ ) perusteella, jonka jälkeen ne siirtyvät detektorille. Massa-analysaattoreista yleisin on kvadrupolianalysaattori, mutta myös mm. ioniloukku (Ion Trap) ja lentoaika-analysaattoria (Time Of Flight, TOF) käytetään, joskin vähemmässä määrin niiden kalliimman hinnan takia. (Harris 2007, 484.)

Kvadrupolianalysaattori koostuu neljästä yhdensuuntaisesta sauvasta, joiden tuottama värähtelevä sähkökenttä ohjailee ionien kulkua. Sopivilla vaihto- ja tassaajännitteillä tietyn massa-varaussuhteen omaavat ionit lentävät sauvaston läpi ja fokusoituvat detektorille. Muut ionit törmäävät sauvoihin, eivätkä pääse detektorille. (Jaarinen & Niiranen 2005, 125-126.)



KUVIO 10. Kvadrupolianalysaattori (Gates 2009)

### 3.1.4 Detektori

Detektorina massaspektrometrissa toimii elektronimonistin, joka muuttaa ionien energian sähköpulsiksi. Elektronimonistimen sisäpintaan törmäävät ionit irrottavat elektroneja, jotka lentävät monistimen toiselle seinustalle ja törmäävät uudelleen seinämään. Törmäyksessä purkautuu lisää elektroneja, jolloin elektronien tuottama signaali vahvistetaan ja johdetaan tietokoneelle. Signaali on verrannollinen analysaattorin läpi tulevien ionien määrään. (Jaarinen & Niiranen 2005, 128.)

## 3.2 Menetelmän kehitys massaspektrometrille

Massaspektrometrissa on monia ionisoitumiseen vaikuttavia tekijöitä, jotka vaativat erilaisia säätöjä riippuen siitä, mitä ionisaatiotekniikkaa käytetään. Sen sijaan esimerkiksi massa-analysaattoriin ja fragmentoriin liittyvät parametrit toimivat samoilla säädöillä riippumatta ionisaatiotekniikasta. (Fischer & Duncan 2007, 5.)

### 3.2.1 Fragmentorijännite

Laadittaessa menetelmää massaspektrometrille, tärkeä tekijä on fragmentorijännite. Korkeilla fragmentorijännitteillä törmäys indusoitu dissosiaatio, CID, lisääntyy, jolloin myös yhdisteen fragmentoituminen kasvaa. (Choi & Song 2008, 1847.) Yhtenä tutkimuksen kohteena tässä työssä oli fragmentorijännitteen vaikutus yhdisteiden massaspektreihin. Fragmentorijännite on parametri, joka ei vaikuta yhdisteen ionisoitumiseen.

Ihanteellinen fragmentorijännite, jolloin massaspektriin saadaan näkyviin sekä molekyyli-ioni että fragmentoitumista, riippuu tutkittavan yhdisteen rakenteesta. Tästä syystä oikean fragmentorijännitteen löytämiseksi tarvitsee tehdä testianalyseja. (Agilent Technologies 2007, 18.)



### 3.2.2 Polaaraisuus

ESI- ja APCI-tekniikoilla voidaan muodostaa sekä positiivisia että negatiivisia ioneja. Hallitseva ionien polaaraisuus eli napaisuus riippuu tutkittavan yhdisteen kemiallisesta rakenteesta ja liuoksen pH:sta. Koska sekä positiivisia että negatiivisia ioneja voi muodostua, ionien kuljetusjärjestelmän ja ionioptiikan, erityisesti kapillaarin polaaraisuus määrää, kumpaa ionityyppiä detektoidaan. Työssä käytetyllä massaspektrometrilla on mahdollista detektoida sekä positiivisia että negatiivisia signaaleja samanaikaisesti. Tämä tapahtuu siten, että systeemi säädetään vaihtelevaan polaaraisuutta todella nopeasti analyysin aikana. Signaalien samanaikaisesta detektoinnista on hyötyä tuntemattomien yhdisteiden analysoimisessa, koska tieto saadaan yhdellä analyysillä, mutta toiminto vähentää laitteen herkkyyttä. (Agilent Technologies 2007, 18-19.)

### 3.2.3 Kapillaarin jännite

Kapillaarin jännite on parametri, jota käytetään vain ionien ohjaamiseen eikä sillä ole merkitystä ionien muodostumisprosessissa. Yleensä kapillaarin jännitteeksi säädetään 2000 V sekä ESI- että APCI-analyyseissa. (Fischer & Duncan 2007, 5.)

### 3.2.4 Kuivauskaasun virtaus ja lämpötila

Kuivauskaasuna käytettiin typpeä ( $N_2$ ) ja sen virtaus 5 l/min ja lämpötila 300-350°C toimivat yleensä kummallakin ionisointitekniikalla, mutta molempia parametreja voidaan säätää tarvittaessa. ESI-tekniikalle voidaan säätää korkeampi virtaus, koska kuivauskaasun on tarkoitus haihtua kokonaan. Sen sijaan APCI-tekniikalla kuivauskaasu toimii yhtenä tekijänä ionisoitumisessa, joten korkeampi virtaus vähentää ionisaatiota ja voi häiritä signaalin stabiiliutta. (Fischer & Duncan 2007, 5.)

### 3.2.5 Sumuttimen paine

Sumuttimen paine on riippuvainen nestekromatografian eluentin virtausnopeudesta. ESI-tekniikalla toimii parhaiten 60 psi:n (Pounds per Square Inch) paine, jolloin eluenttivirtauksen olisi hyvä olla yhtä suuri tai suurempi kuin 800 µl/min. APCI-tekniikalla hyvä lähtöarvo on 30 psi 400 µl/min eluenttivirtauksella. (Fischer & Duncan 2007, 5.)

### 3.2.6 Haihduttajan lämpötila

Agilentin 6120 Quadrupole MS-yksikön yhdistetyssä ionisaatiokammiossa on infrapunasäteilijöitä, jotka aiheuttavat HPLC:sta tulleen liuottimen haihtumisen. Infrapunasäteilijöiden aluetta kutsutaan haihduttajaksi. Systeemi seuraa haihduttajan lämpötilaa ja se pysyy aina samana riippumatta liuottimen määrästä analyysin aikana. ESI-tekniikalla haihduttajan lämpötila säädetään yleensä 150°C:een, koska suhteellisen matala lämpötila auttaa suojelemaan termisesti heikkoja molekyyleja. APCI-tekniikka vaatii korkeamman lämpötilan, joka on tavallisesti 250°C. (Fischer & Duncan 2007, 6.)

### 3.2.7 Koronaneulan virta

Koronaneula on käytössä vain APCI-tekniikalla. Hyvä lähtöarvo koronaneulan virraksi on 4-5 µA, joka toimii hyvin monille yhdisteille. Koronaneulan virtaa voidaan kuitenkin säätää tarvittaessa. ESI-tekniikalla analysoitaessa koronaneula kytkeytyy automaattisesti pois päältä. MMI-tekniikalla analysoitaessa koronaneulan virraksi säädetään yleensä 2 µA. (Fischer & Duncan 2007, 5.)

#### 4 NESTEKROMATOGRAFIN JA MASSASPEKTROMETRIN YHDISTELMÄ

Nestekromatografian ja massaspektrometrin yhdistelmää on kehitetty jo 1970-luvulta lähtien. Päähuomio keskittyi aluksi ns. ”interface”-ongelmaan eli miten saataisiin nestekromatografista tuleva nestemäinen eluentti ja sen mukana tulevat analysoitavat yhdisteet kaasumaisiksi ioneiksi, jotta ne voitaisiin analysoida massaspektrometrilla. Tämän asian ratkaiseminen vei yhteensä parikymmentä vuotta ja nyt ionilähteeseen liittyvät tekniset ongelmat on suurelta osin selvitetty. Uusien ionisaatiotekniikkojen avulla nestekromatografian ja massaspektrometrin yhdistelmä (LC-MS) on levinnyt useille analyysialueille, kuten ympäristöanalytiikkaan, lääkekehitykseen, eläinlääketieteeseen ja yleensä biomolekyylien karakterisointiin. LC-MS-yhdistelmässä käytetyin kromatografinen erotusmenetelmä on käänteisfaasikromatografia ja eluenteina vesi, metanoli ja/tai asetonitrili. (Hämäläinen & Turpeinen 2006, 25.)

LC-MS-yhdistelmän avulla voidaan erottaa toisistaan melkein mitä tahansa yhdisteitä, jotka liukenevat johonkin liuottimeen. Massaspektrometrilla voidaan tunnistaa HPLC:n jo erottamat piikit käyttämällä avuksi jokaiselle molekyylille luonteenomaista fragmentoitumismallia. (McMaster 2005, 1.)

LC-MS-yhdistelmällä voidaan analysoida enemmän erityyppisiä yhdisteitä verrattuna esimerkiksi perinteisempään kaasukromatografi-massatekniikkaan, koska kaasukromatografilla voidaan tutkia vain haihtuvia ja korkeita lämpötiloja kestäviä yhdisteitä. LC-MS-tekniikalla voidaan tutkia mm. poolisia, ionimuotoisia, termisesti stabiileja tai hyvin suuria yhdisteitä, kuten biomolekyyliä, torjunta-aineita, räjähteitä ja rikosteknillisesti tärkeitä yhdisteitä. (Schreiber, A., Efer, J. & Engewald 2000, 411.) Muita yhdistelmätekniikkoja ovat esimerkiksi induktiivisesti kytketty plasma-massaspektrometri (ICP-MS) ja MS-MS-tekniikat.

## 5 SPEKTRIKIRJASTO

Tuntemattomien epäpuhtauksien tunnistaminen näytesyhdisteistä helpottuu huomattavasti ja on käyttäjäystävällisempää, kun tunnistuksen apuna käytetään spektrikirjastoja. Kuitenkin jo olemassa olevia GC-MS-spektrikirjastoja on mahdotonta käyttää hyväksi LC-MS:lla, koska näillä laitteilla on täysin erilaiset ionisaatio- ja fragmentointitekniikat. Näin ollen on luotava uusi spektrikirjasto LC-MS:lle. (Schreiber, Efer & Engewald 2000, 411.) Tässä opinnäytetyössä kirjaston luomiseen käytettiin National Institute of Standards and Technologyn (NIST) valmistamaa tietokantaa NIST Standard Reference Database 1A.

Vuonna 1901 perustettu National Institute of Standards and Technology (NIST) on yhdysvaltalainen kauppaministeriön alainen virasto, jonka tehtävänä on kehittää ja edistää mittaustekniikoita, standardeja ja tekniikkaa. NIST:n päämaja sijaitsee Gaithersburgissa, Marylandissä. (National Institute of Standards and Technology 2010.)

Monet tekijät voivat vaikuttaa massaspektrin rakenteeseen. Merkitystä on esimerkiksi sillä, muodostaako tutkittava yhdiste positiivisen vai negatiivisen molekyyli-ionin. Massaspektrin rakenteeseen vaikuttavat myös ionisaatiotekniikka, fragmentorijännite ja eluenttikoosumus. Tämän vuoksi on hyödyllistä tallentaa spektrikirjastoon useita spektrejä kustakin yhdisteestä erilaisissa olosuhteissa. (Schreiber, Efer & Engewald 2000, 411.)

## 6 TYÖN SUORITUS

Työssä käytettiin Agilentin 1200 sarjan binääripumpulla varustettua HPLC-laitetta yhdistettynä sarjan 6120 Single Quadrupole MS-yksikköön. Opinnäytetyön kokeellisessa osuudessa liuosmuotoon käsitellyt näytteet analysoitiin useita kertoja LC-MS-laitteella erilaisissa ajo-olosuhteissa. Massaspektrit tallennettiin spektrikirjastoon ja laadittiin käyttöohje NIST-spektrikirjaston tuleville käyttäjille.

### 6.1 Esivalmistelut

#### 6.1.1 Kolonnin valinta

Työhön valittiin Agilentin ZORBAX Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution HT 4,6mm x 50mm x 1,8µm kolonni. Kemfinen laboratoriossa käytetään tavallisesti 25, 15 ja 5 cm kolonneja. Kolonni valittiin siksi, että se on hyvä yleiskolonni monien erilaisten yhdisteiden analysoimiseen ja lyhyellä kolonnilla mahdollistettiin nopeammat analyysit. Lisäksi HPLC-menetelmän kehitykseen ei tarvinnut käyttää juurikaan aikaa, koska tutkimus oli kvalitatiivinen ja näyteliuoksissa oli vain yhtä tutkittavaa ainetta kerrallaan. Kolonnia oli aikaisemmin käytetty reaktion-seurannassa.

Eclipse XDB-C18 RRHT täytetty kolonni on suunniteltu laitteisiin, joissa on korkea paine. Kolonni on pakattu korkean erotuskyvyn C-18 mikropartikkeleilla käänteisfaasinestekromatografiaa varten. Kolonnissa on käytetty teknologiaa, jossa oktadekyylisilaanipartikkelit ovat hyvin tiheästi sitoutuneet (eXtra-Dense Bonding, XDB). Oktadekyylipartikkelien koko vaihtelee 1,8 mikrometrinä 7,0 mikrometriin. (Agilent EclipseXDB-C18 RRHT Threaded Column Datasheet. 2006.)

Eclipse XDB-C18 RRHT täytetty kolonni on käytännöllinen erityisesti happamien, emäksisten ja muiden korkeasti polaaristen yhdisteiden erotukseen. Kolon-

nin stationäärifaasi on pooliton, joten eluenteiksi sopivat erinomaisesti esimerkiksi metanoli-vesi- sekä asetonitriili-vesi-seokset. (Agilent EclipseXDB-C18 RRHT Threaded Column Datasheet. 2006.)

### 6.1.2 Eluentit ja HPLC-laitteen puhdistus

Laitteen HPLC-osan letkut puhdistettiin ensin ajamalla milliQ-vettä systeemissä ilman kolonnia, koska HPLC:lla oli aikaisemmin ajettu fosforihappo-vesi-seosta eikä sitä saanut joutua massaspektrometrille (kts. luku 2.2.1). Tämän jälkeen asennettiin kolonni. Kolonnin läpi ajettiin puhdasta asetonitriiliä, jotta aiemmassa käytössä mahdollisesti jääneet epäpuhtaudet saatiin ulos kolonnista. Samalla tarkistettiin, ettei kolonni vuoda. Työssä käytettiin eluenteina asetonitriiliä, metanolia ja milliQ-vettä, johon oli lisätty 0,01 % massaspektrometriaa varten puhdistettua muurahaishappoa.

Työssä käytetyt reagenssit olivat

- Asetonitriili (Merck KGaA, HPLC grade)
- Metanoli (Merck KGaA, HPLC grade)
- Muurahaishappo (Fluka Formic acid puriss.p.a. for mass spectroscopy)

### 6.1.3 Näytteiden käsittely

Näyteliuoksiin käytettiin kunkin tuotteen valmistajan antamaa puhdasta standardimateriaalia. Jokaista standardia punnittiin 50 ml:n mittapulloon noin 25 mg ja liuotettiin milliQ-asetonitriiliseokseen (1:1). Näin saatiin näyteliuokset, joiden pitoisuudet olivat noin 0,5 mg/ml. Sama konsentraatio kaikilla näytteillä takaa sen, että tulokset ovat verrattavissa toisiinsa. Taulukossa 2 on näkyvissä tuotteiden ominaisuuksia.

TAULUKKO 2. Työssä analysoidut tuotteet

Tuote nro	Molekyyli-massa (g/mol)	Monoisotooppinen massa (Da)	Molekyyli-kaava	Sulamis-piste (°C)	Kiehumis-piste (°C)	Tiheys (kg/dm <sup>3</sup> )
P46	285.29	285.10	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub>	141-142	>263	1.31
P591	248.68	247.99	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> ClO <sub>4</sub> S	229	403	1.59
P59	346.71	345.99	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> ClF <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S	155	-	1.77
P561	166.17	166.06	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	145	-	-
P56	409.27	408.06	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> BrO <sub>5</sub>	100	-	-
P38	195.28	195.07	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> NOS	87	>280	1.07
P382	228.38	228.06	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> SSi	137	250-255	0.5
P381	170.23	170.04	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> S	-18.5	225	1.14
P281	236.21	236.01	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> F <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	192	314	1.62
P282	302.31	302.06	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> F <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	57-63	Hajoaa ennen kiehumista	1.36
P28	359.32	359.04	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>4</sub> S	135-136	-	1.42
P52	288.78	288.11	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub>	55-65	202-208	1
P67	233.65	233.02	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> ClNO <sub>2</sub>	67	174	-
P06	213.66	213.06	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> ClNO <sub>2</sub>	36-49	256-258	1.29

## 6.2 HPLC-menetelmä

HPLC-menetelmän tavoitteena oli saada luotua vain yksi toimiva yleismenetelmä, jolla kaikki tuotteet saataisiin nopeasti ulos kolonnista ja analyysiajat lyhyeksi. Tuotteiden päällekkäisillä retentioajoilla yms. seikoilla ei ollut tässä työssä merkitystä, koska näyteliuoksissa oli vain yhtä tutkittavaa ainetta ja tässä työssä keskityttiin enemmän massaspektreihin kuin ihanteellisen HPLC-menetelmän kehitykseen.

### 6.2.1 Asetonitrili eluentina

Tuotteet ajettiin ensin vain HPLC-yksikön läpi, koska haluttiin testata menetelmän toimivuutta HPLC:llä rasittamatta massayksikköä turhaan. Ensimmäisessä testianalysissa kokeiltiin isokraattista ajoa: muurahaishapolla hapotettua vettä

ja asetoniiriä pumpattiin systeemiin samassa suhteessa (50:50) koko analyysin ajan virtauksella 1 ml/min. Laitte säädettiin mittaamaan absorbanssia kahdella aallonpituudella 230 ja 260 nm, koska tuotteilla voi olla erilaiset UV-spektrit ja näkyvyysalueet. Injektio-tilavuudeksi säädettiin 2 µl kaikille näytteille, jolloin myöhemmin massaspektrometrille saapuva näytteen määrä olisi vakio eli n. 1 µg. Systeemin lämpötilaksi laitettiin 30°C, jolloin lämpötila oli kontrolloitu kaikilla näytteillä. Näillä parametreilla ajoajaksi tuli 10 minuuttia (taulukko 3).

TAULUKKO 3. Testiajon parametrit

Isokraattinen ajo	50% H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> , 50% ACN
Detektio	UV 260 ja 230 nm
Injektio	2 µl
Virtaus	1 ml/min
Lämpötila	30°C
Ajoaika	10 min

Testiajon jälkeen menetelmää muokattiin muuttamalla isokraattinen ajo gradienttiajoksi, jossa eluenttien suhteellinen määrä vaihtelee ajon aikana (taulukko 4). Gradienttiajoon päädyttiin, koska osa tuotteista ei ehtinyt tulla kolonnista ulos ja osa retentoitui liian aikaisin. Muita parametreja ei muutettu. Analyysiajaksi gradienttiajolla saatiin 8 minuuttia. Kromatogrammien tarkastelun jälkeen gradienttiajolla tehty analyysi todettiin toimivaksi.

TAULUKKO 4. ACN-gradienttiajo

Aika (min)	H <sub>2</sub> O (%)	ACN (%)
0	70	30
5	0	100
6	0	100
6.01	70	30
Tasaantumisaika 2 min		



### 6.2.2 Metanoli eluenttina

Metanolia pumpattiin kolonnin läpi n. 1 tunti, jotta HPLC-yksikkö puhdistui asetonitriilistä. Isokraattinen ajo jätettiin metanolilla testaamatta, koska oli todennäköistä, ettei se toimisi metanolillakaan. Tuotteet ajettiin HPLC:n läpi muutoin samoilla ajo-olosuhteilla, mutta virtaukseksi vaihdettiin 0,8 ml/min, koska metanoli loi laitteeseen suuremman paineen. Analyysin gradienttia muutettiin siten, että alkugradientti oli 40% metanolia ja 60% happovettä (taulukko 5).

TAULUKKO 5. MeOH-gradienttiajo

Aika (min)	H <sub>2</sub> O (%)	MeOH (%)
0	60	40
5	0	100
6	0	100
6.01	60	40
Tasaantumisaika 2 min		

### 6.3 MS-menetelmä

HPLC-menetelmien testauksen jälkeen HPLC kytkettiin massayksikköön ja luotiin menetelmä massayksikölle. Kaikki tuotteet analysoitiin erikseen sekä ESI:lla että APCI:lla ja vertailtiin tuotteiden ionisoitumista kummallakin ionisointitekniikalla. Massaparametrit määritettiin valmistajan antamien tyypillisten ajo-olosuhteiden avulla (taulukko 6). Fragmentorijännitteen vaikutusta massaspektreihin tutkittiin ajamalla tuotteet fragmentorijännitteellä 70, 120 ja 170 V. Polaarisuus säädettiin mittaamaan sekä positiivista että negatiivista signaalia samanaikaisesti.

TAULUKKO 6. Massayksikön parametrit

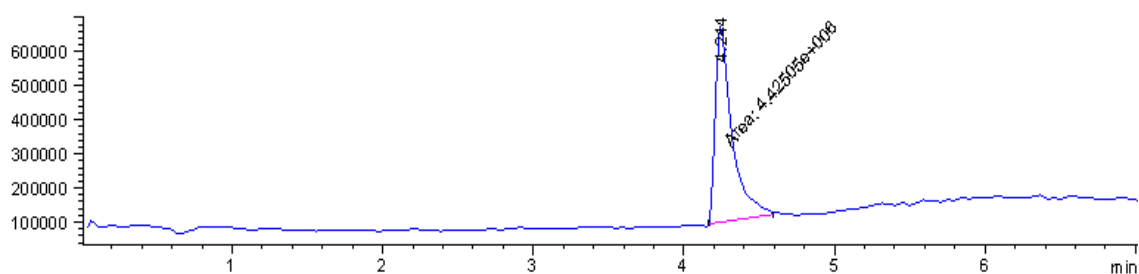
Parametri	ESI	APCI
Kuivauskaasun virtaus	13,0 l/min	5,0 l/min
Kuivauskaasun lämpötila	350°C	350°C
Sumuttimen paine	60 psi	20 psi
Haihduttajan lämpötila	150°C	250°C
Kapillaarin jännite	2000 V	2000 V
Koronaneulan virta	0 µA	5,0 µA
Fragmentorin jännite	70/120/170 V	70/120/170 V

## 7 TULOKSET

Tuotteet analysoitiin LC-MS-laitteella erilaisissa ajo-olosuhteissa. Kaikista ionisoituneista tuotteista saatiin useita spektrejä, joista parhaimmat tallennettiin NIST-spektrikirjastoon (spektrien tallennus on kuvattu liitteessä 1). Tuotteet poikkesivat kemialliselta rakenteeltaan toisistaan ja käyttäytyivät erilailla eri olosuhteissa. Tästä syystä tuloksista oli vaikea vetää yleistä linjaa. Massaspektrejä saatiin tuotteista yhteensä yli 200 kappaletta, joten kaikkia spektrejä ei esitellä tässä työssä yksitellen työn liiallisen laajenemisen takia.

### 7.1 Massaspektrien kvalitatiivinen tulkinta

Tuotteen ionisoitumisesta LC-MS-laitteella kertoo kokonaisionikromatogrammi (Total Ion Chromatogram, TIC), jossa näkyy kaikki ionilähteessä ionisoituneet ionit joko positiivisella tai negatiivisella polarisuudella tietyllä ajan hetkellä (Kuvio 11). (Agilent Technologies 2007, 80.) Mitä suurempi piikki TIC-kromatogrammissa esiintyy, sitä paremmin tutkittava yhdiste on ionisoitunut. Piikin suuruudesta kertoo sen pinta-ala, jonka laite laskee automaattisesti. TIC-kromatogrammissa näkyvästä piikistä saadaan otettua yhdisteen massaspektri.

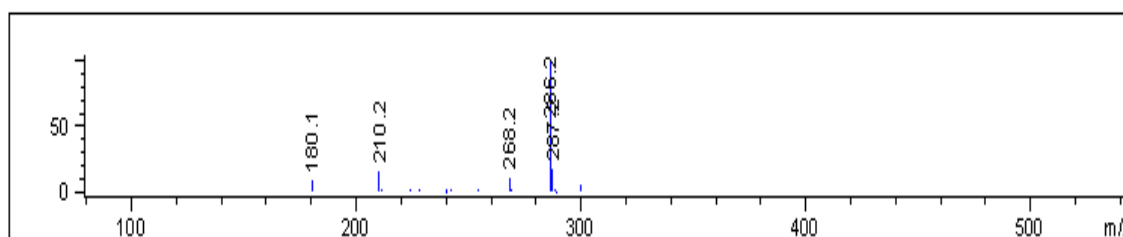


KUVIO 11. Tuotteen P46 TIC-kromatogrammi

Nopein tapa tulkita massaspektrejä on verrata niitä tietokoneen avulla kirjasto-spektreihin. Tässä tapauksessa kirjastoa oltiin vasta luomassa, joten spektrejä tarkasteltiin manuaalisesti. Spektristä haettiin molekyyli-ionia vastaava piikki. Molekyyli-ioni tarkoittaa yhdisteestä kokonaisena ionisoitunutta yksittäistä mole-

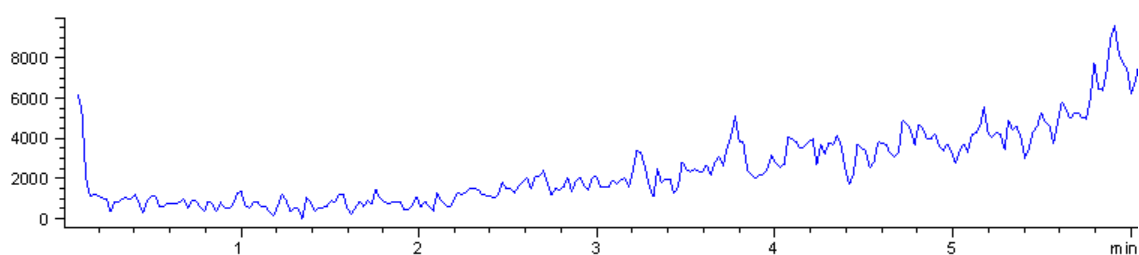
kyyliä. Molekyyli-ionin massa on positiivisella polaarisuudella otetussa massaspektrissä molekyylin monoisotooppinen massa + 1. Negatiivisella polaarisuudella molekyyli-iona vastaava piikki on molekyylin monoisotooppinen massa - 1. Lisäksi tarkasteltiin molekyyli-ionista lohjenneita ioneja eli fragmentteja sekä molekyyliaddukteja, joita molekyyli-ioni on mahdollisesti muodostanut esimerkiksi natriumionin kanssa ( $M + 23$ ). Fragmentoitumisella on merkitystä etenkin, jos tutkitaan tuntemattomia yhdisteitä, koska fragmenteista voi päätellä esimerkiksi, mitä funktionaalisia ryhmiä yhdiste sisältää.

Esimerkiksi onnistuneesta negatiivisesta ionisoitumisesta sekä informatiivisesta massaspektristä voidaan ottaa tuote P46. TIC-kromatogrammista kuviossa 11 voidaan todeta, että piikki on muodoltaan hyvä ja sen pinta-ala on riittävän suuri. Massaspektrissä (kuvio 12) on näkyvissä fragmentoitumista sekä molekyyli-ioni.



KUVIO 12. Tuotteen P46 massaspektri

Vertailun vuoksi tarkastellaan tuotteen P381 ionisoitumista. TIC-kromatogrammissa (Kuvio 13) ei ole nähtävissä selkeää piikkiä. Piikin puuttumisesta ja rosoisesta pohjaviivasta voidaan päätellä, että tuote P381 ei ole ionisoitunut eikä tuotteesta näin ollen saatu massaspektriä käytetyillä parametreilla.



KUVIO 13. Tuotteen P381 TIC-kromatogrammi

## 7.2 Asetonitriliianalyysien tulokset

Tässä osiossa esitellään tulokset, jotka saatiin, kun eluentina käytettiin asetoniiriä (ACN) ja happovettä sekä fragmentorijännitettä 70 V. Erisuuruisten fragmentorijännitteiden vaikutuksia massaspektreihin käsitellään myöhemmin. Tarkastelun kohteena tässä osiossa on ionisaatiotekniikoiden vaikutus tuotteiden ionisoitumiseen ja fragmentoitumiseen, kun eluentina käytettiin asetoniiriin ja happoveden seosta. Lisäksi kiinnitetään huomiota polaarisuuteen, eli onko hallitseva ionityyppi positiivinen vai negatiivinen.

### 7.2.1 ESI-tekniikka asetoniiriianalyyseissa

Taulukoissa 7 ja 8 on esitetty tutkittavien tuotteiden TIC-kromatogrammien piikkien pinta-alat, kun käytettiin ESI-tekniikkaa. Pinta-alat kertovat kunkin tuotteen ionisoitumisesta vallitsevissa ajo-olosuhteissa. Lisäksi taulukoissa 7 ja 8 on informaatiota tuotteiden fragmentoitumisesta ja adduktien muodostumisesta sekä molekyyli-ionin esiintyvyydestä. Yleisesti ottaen voidaan sanoa, että ajo on onnistunut, jos TIC-kromatogrammin piikin pinta-ala on suuri, massaspektristä löytyy molekyyli-ioni ja fragmentoitumista on havaittavissa.

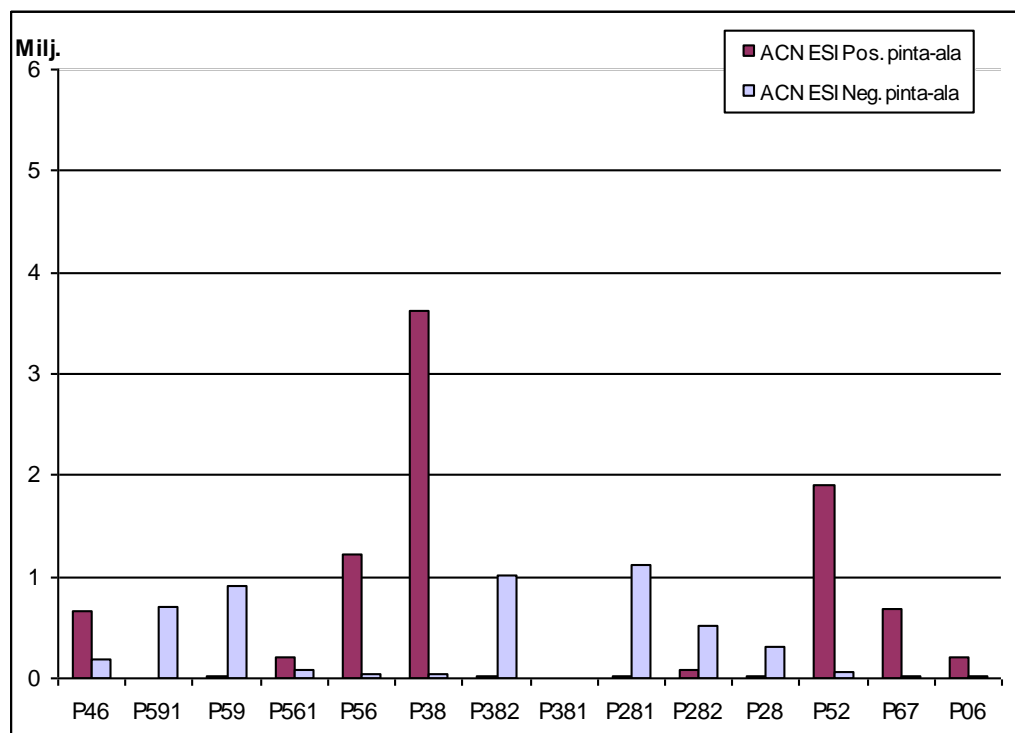
TAULUKKO 7. ACN-ajot ESI-tekniikalla, positiivinen ionisoituminen

Tuote	Monoisotooppinen massa (Da)	ACN ESI Pos. pinta-ala	Fragmentteja (kpl)	Molekyyli-ioni (massa)	Addukteja (kpl)
P46	285,1	653044	2	286	3
P591	247,99	0	-	-	-
P59	345,99	24146	15	-	4
P561	166,06	208864	3	167	4
P56	408,06	1224834	1	409	-
P38	195,07	3611634	-	196	3
P382	228,06	29655	10	-	8
P381	170,04	0	-	-	-
P281	236,01	15494	8	-	5
P282	302,06	73271	4	303	3
P28	359,04	25395	7	360	-
P52	288,11	1898339	-	289	-
P67	233,02	690439	2	-	-
P06	213,06	210430	4	-	1

TAULUKKO 8. ACN-ajot ESI-tekniikalla, negatiivinen ionisoituminen

Tuote	Monoisotooppinen massa (Da)	ACN ESI Neg. pinta-ala	Fragmentteja (kpl)	Molekyyli-ioni	Addukteja (kpl)
P46	285,1	193457	1	-	-
P591	247,99	708322	1	247	1
P59	345,99	905877	4	345	-
P561	166,06	72477	1	165	3
P56	408,06	51580	14	-	2
P38	195,07	39396	7	-	11
P382	228,06	1011957	-	227	-
P381	170,04	0	-	-	-
P281	236,01	1117679	1	235	-
P282	302,06	517755	-	301	-
P28	359,04	306827	-	358	-
P52	288,11	56025	8	-	11
P67	233,02	24781	7	-	15
P06	213,06	26107	9	212	23

Kuviossa 14, joka on tehty taulukoiden 7 ja 8 pohjalta, on selkeästi nähtävissä, että tuotteiden P46, P561, P56, P38, P52, P67 ja P06 hallitseva ionityyppi on positiivinen, kun taas tuotteet P591, P59, P382, P281, P282 ja P28 ionisoituvat paremmin negatiivisiksi ioneiksi. Tuote P381 ei ole ionisoitunut lainkaan.



KUVIO 14. Tuotteiden ionisoituminen ESI-tekniikalla, ACN eluenttina

### 7.2.2 APCI-tekniikka asetonitriliianalyseissa

Taulukoissa 9 ja 10 on kuvattu tutkittavien tuotteiden TIC-kromatogrammien piikkien pinta-aloja, kun käytettiin APCI-tekniikkaa. Taulukoista 9 ja 10 sekä kuviossa 15 voidaan todeta, että tuotteet P591 ja P59 eivät ole muodostaneet lainkaan positiivisia ioneja, mutta negatiivista ionisoitumista on tapahtunut. Tuote P381 ei ole ionisoitunut ollenkaan. Tuote P67 muodostanut runsaasti positiivisia fragmentteja, mutta positiivista molekyyli-ioniä ei ole. Negatiivinen ionisoituminen on ollut parempaa ja molekyyli-ioniä on muodostunut, mutta fragmentoitumista ei ollut havaittavissa. P06 on muodostanut positiivisia ioneja heikosti.

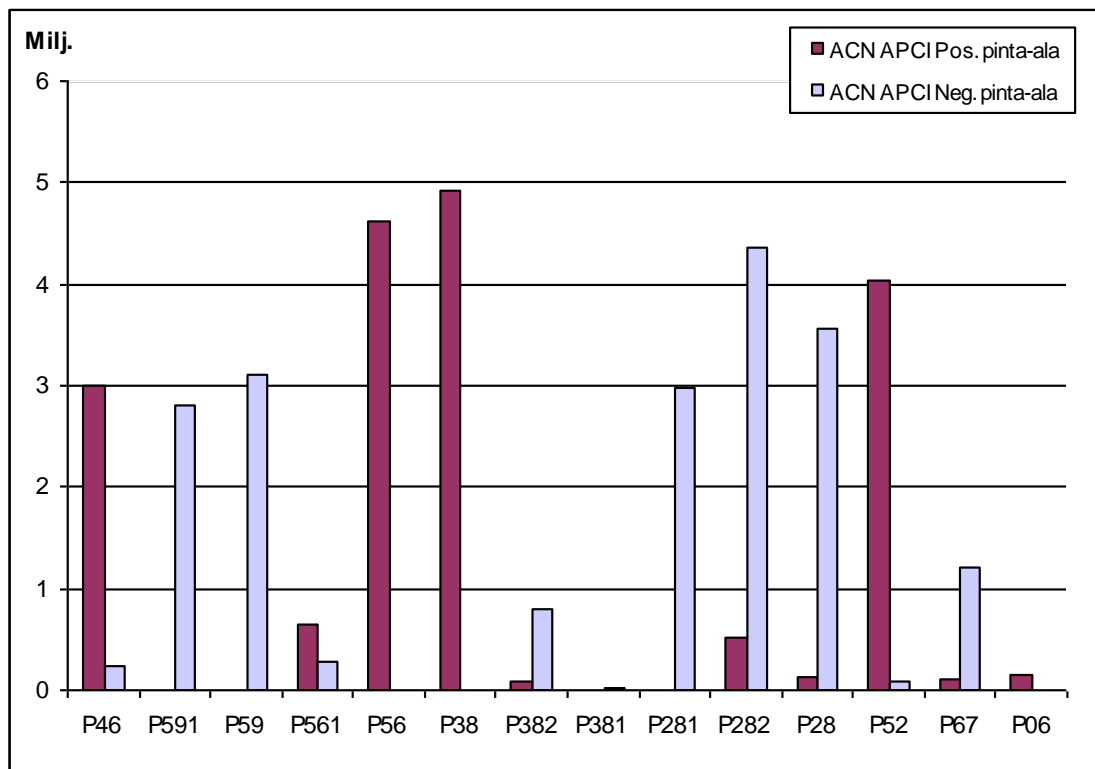
TAULUKKO 9. ACN-ajot APCI-teknikalla, positiivinen ionisoituminen

Tuote	Monoisotooppinen massa (Da)	ACN APCI Pos. pinta-ala	Fragmentteja (kpl)	Molekyyli-ioni (massa)	Addukteja (kpl)
P46	285,1	3001600	2	286	2
P591	247,99	0	-	-	-
P59	345,99	0	-	-	-
P561	166,06	648121	2	167	-
P56	408,06	4626296	2	409	-
P38	195,07	4913346	-	196	2
P382	228,06	82664	6	-	1
P381	170,04	0	-	-	-
P281	236,01	0	-	-	-
P282	302,06	507729	2	303	-
P28	359,04	122822	9	360	1
P52	288,11	4026886	-	289	-
P67	233,02	115946	12	-	1
P06	213,06	147552	3	-	-

TAULUKKO 10. ACN-ajot APCI-teknikalla, negatiivinen ionisoituminen

Tuote	Monoisotooppinen massa (Da)	ACN APCI Neg. pinta-ala	Fragmentteja (kpl)	Molekyyli-ioni (massa)	Addukteja (kpl)
P46	285,1	230650	3	-	-
P591	247,99	2802016	2	247	2
P59	345,99	3115755	3	345	1
P561	166,06	283144	1	165	-
P56	408,06	0	-	-	-
P38	195,07	0	-	-	-
P382	228,06	807166	-	227	-
P381	170,04	29062	-	-	-
P281	236,01	2985436	2	235	-
P282	302,06	4353721	1	302	-
P28	359,04	3571739	1	358	-
P52	288,11	94218	1	-	3
P67	233,02	1205007	-	233	-
P06	213,06	0	-	-	-

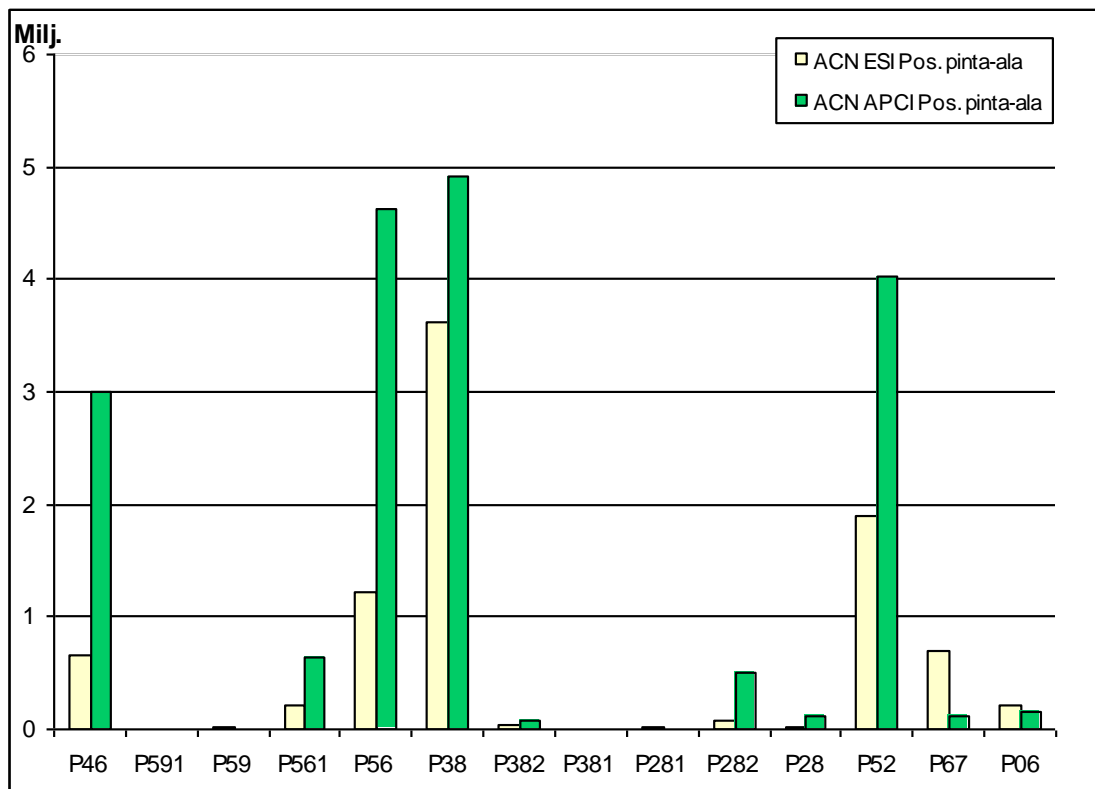




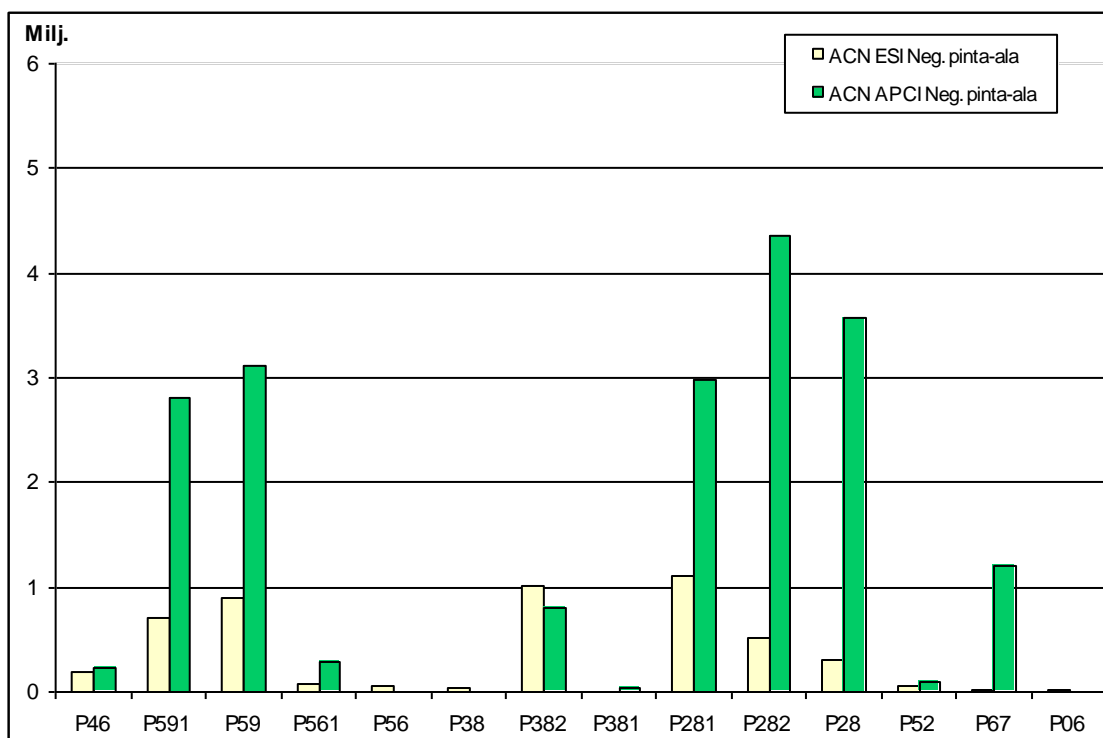
KUVIO 15. Tuotteiden ionisoituminen APCI-tekniikalla, ACN eluentina

### 7.2.3 ESI- ja APCI- tekniikan vertailu asetonitriilianalyseissa

Kun verrataan APCI- ajojen tuloksia (kuviot 16 ja 17) ESI-tekniikalla ajettuihin ajoihin asetonitriilin ollessa eluentina, voidaan TIC-kromatogrammien piikkien pinta-aloista havaita, että tuotteiden ionisoituminen on onnistunut huomattavasti paremmin APCI-tekniikalla kuin ESI-tekniikalla. Voidaan tehdä myös huomio, että kaikki tuotteet, jotka ovat ionisoituneet ESI-tekniikalla positiivisesti tai negatiivisesti, ovat ionisoituneet samalla tavoin myös APCI-tekniikalla, mutta pinta-alat ovat suuremmat.

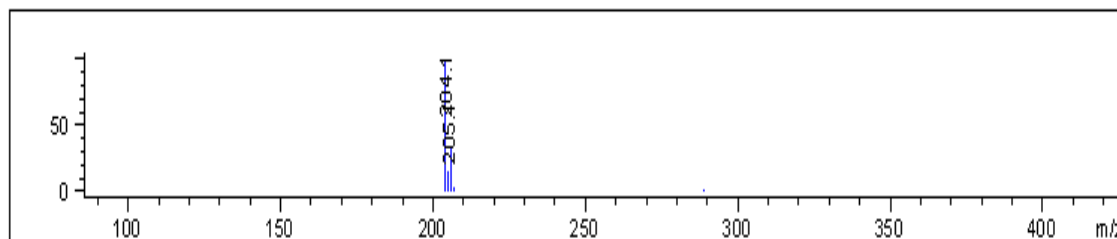


KUVIO 16. Positiivisesti ionisoituneet tuotteet: ESI- ja APCI-tekniikan vertailu

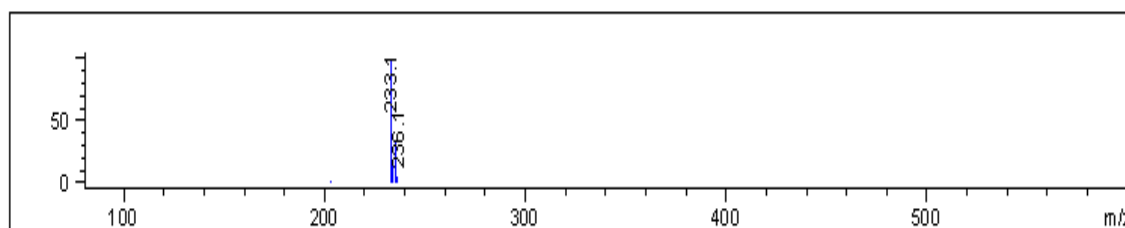


KUVIO 17. Negatiivisesti ionisoituneet tuotteet: ESI- ja APCI-tekniikan vertailu

Ainoa poikkeus on tuote P67, joka on ionisoitunut ESI-tekniikalla positiivisesti, mutta APCI-tekniikalla negatiivisesti. Tosin vain APCI-tekniikalla saadussa massaspektrissä on saatu näkyviin molekyyli-ioni (kuviot 18 ja 19). Tämä voidaan todeta siitä, että negatiivisesti ionisoituneen tuotteen P67 massaspektrissä on piikki kohdassa 233, kun tuotteen monoisotooppinen massa on 233.



KUVIO 18. Positiivisesti ionisoituneen tuotteen P67 massaspektri ESI-tekniikalla



KUVIO 19. Negatiivisesti ionisoituneen tuotteen P67 massaspektri APCI tekniikalla

### 7.3 Metanolianalyysien tulokset

Tässä osiossa käsitellään tuloksia, jotka saatiin, kun eluentina käytettiin metanolia (MeOH) ja happovettä sekä fragmentorijännitettä 70 V. Myös metanoliajot tehtiin sekä ESI- että APCI-tekniikalla. Erisuuruisten fragmentorijännitteiden vaikutuksia massaspektreihin käsitellään myöhemmin. Tarkastelun kohteena tässäkin osiossa on ionisaatiotekniikoiden vaikutus tuotteiden ionisoitumiseen ja fragmentoitumiseen sekä positiivinen ja negatiivinen ionisoituminen

## 7.3.1 ESI-tekniikka metanolianalyseissa

Taulukoissa 11 ja 12 sekä kuviossa 20 on esitetty tutkittavien tuotteiden TIC-kromatogrammien piikkien pinta-alat, kun käytettiin ESI-tekniikkaa. Taulukosta 11 on nähtävissä, että tuotteet P591, P381 ja P281 eivät ole ionisoituneet positiivisesti lainkaan. Molekyyli-ioni on muodostunut vain tuotteilla P46, P561, P56, P282, P28 ja P52. TIC-kromatogrammien piikkien pinta-alat ovat vallitsevissa olosuhteissa jääneet varsin pieniksi.

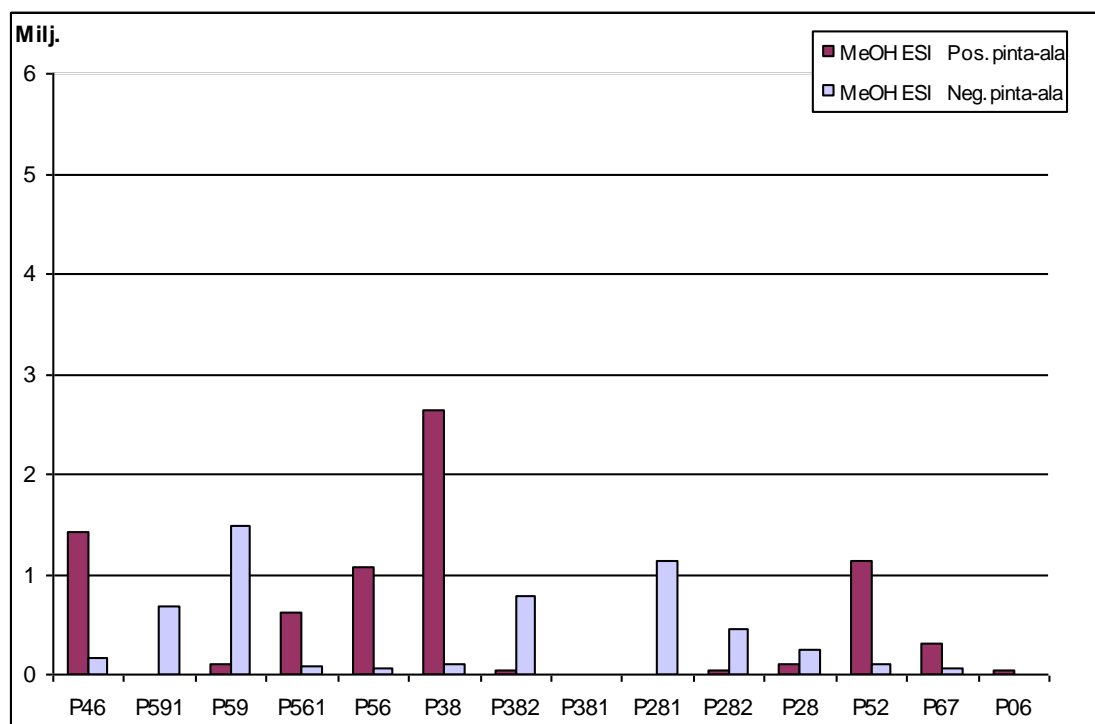
TAULUKKO 11. MeOH-ajot ESI-tekniikalla, positiivinen ionisoituminen

Tuote	Monoisotooppinen massa (Da)	MeOH ESI Pos. pinta-ala	Fragmentteja (kpl)	Molekyyli-ioni (massa)	Addukteja (kpl)
P46	285,1	1422356	1	286	1
P591	247,99	0	-	-	-
P59	345,99	112676	2	-	2
P561	166,06	612443	1	167	2
P56	408,06	1071671	1	409	1
P38	195,07	2636269	-	-	3
P382	228,06	33983	3	-	7
P381	170,04	0	-	-	-
P281	236,01	0	-	-	-
P282	302,06	46436	2	303	2
P28	359,04	95396	1	360	1
P52	288,11	1123788	-	289	-
P67	233,02	312972	1	-	1
P06	213,06	39949	2	-	4

Taulukosta 12 ja kuviosta 20 voidaan havaita, että MeOH-ajoissa ESI-tekniikalla tuotteet P591, P59, P561, P38, P382, P281, P282 ja P28 ionisoituvat paremmin ja muodostavat molekyyli-ionin negatiivisesti. TIC-kromatogrammien piikkien pinta-alat ovat kuitenkin jokseenkin pienet.

TAULUKKO 12. MeOH-ajot ESI-tekniikalla, negatiivinen ionisoituminen

Tuote	Monoisotooppinen massa (Da)	MeOH ESI Neg. pinta-ala	Fragmentteja (kpl)	Molekyyli-ioni (massa)	Addukteja (kpl)
P46	285,1	161023	1	-	-
P591	247,99	687284	2	247	1
P59	345,99	1486667	4	345	1
P561	166,06	72288	1	165	2
P56	408,06	56374	-	-	-
P38	195,07	106846	3	195	22
P382	228,06	786149	-	227	1
P381	170,04	0	-	-	-
P281	236,01	1142695	1	235	1
P282	302,06	451682	-	301	-
P28	359,04	257620	-	358	-
P52	288,11	98779	6	-	12
P67	233,02	62712	4	-	12
P06	213,06	0	-	-	-



KUVIO 20. Tuotteiden ionisoituminen ESI-tekniikalla, MeOH eluentina

## 7.3.2 APCI-tekniikka metanolianalyseissa

Taulukoissa 14 ja 15 on kuvattu tutkittavien tuotteiden TIC-kromatogrammien piikkien pinta-aloja, kun käytettiin APCI-tekniikkaa. Taulukosta 14 voidaan huomata, että positiivisen molekyyli-ionin ovat muodostaneet tuotteet P46, P561, P56, P38, P282, P28 ja P52. Tuotteella P28 on havaittavissa huomattavaa fragmentoitumista verrattuna muihin tuotteisiin.

TAULUKKO 14. MeOH-ajot APCI-tekniikalla, positiivinen ionisoituminen

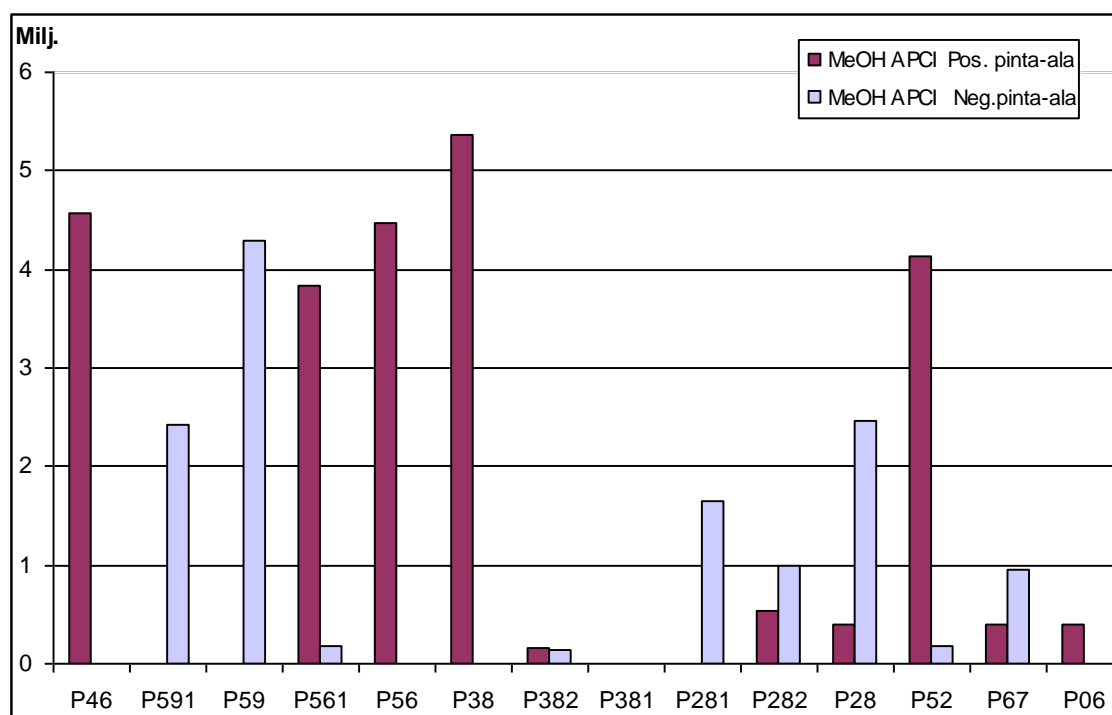
Tuote	Monoisotooppinen massa (Da)	MeOH APCI Pos. pinta-ala	Fragmentteja (kpl)	Molekyyli-ioni (massa)	Addukteja (kpl)
P46	285,1	4568886	3	286	-
P591	247,99	0	-	-	-
P59	345,99	0	-	-	-
P561	166,06	3824707	1	167	1
P56	408,06	4478758	3	409	-
P38	195,07	5369599	1	196	3
P382	228,06	152596	1	-	2
P381	170,04	0	-	-	-
P281	236,01	0	-	-	-
P282	302,06	527954	-	303	1
P28	359,04	392939	6	360	1
P52	288,11	4128242	-	289	-
P67	233,02	398144	2	-	-
P06	213,06	407003	3	214	-

Taulukosta 15 on nähtävissä, että negatiivisen molekyyli-ionin ovat muodostaneet tuotteet P591, P59, P561, P382, P281, P282, P28, P67 ja P06. Tuotteiden fragmentoituminen on kohtalaista. Tuote P06 on muodostanut runsaasti molekyliaddukteja.

TAULUKKO 15. MeOH-ajot APCI-tekniikalla, negatiivinen ionisoituminen

Tuote	Monoisotooppinen massa (Da)	MeOH APCI Neg. pinta-ala	Fragmentteja (kpl)	Molekyyli-ioni (massa)	Addukteja (kpl)
P46	285,1	0	-	-	-
P591	247,99	2425470	2	247	3
P59	345,99	4297636	3	345	2
P561	166,06	177093	1	165	-
P56	408,06	0	-	-	-
P38	195,07	0	-	-	-
P382	228,06	145446	1	227	3
P381	170,04	0	-	-	-
P281	236,01	1643155	1	235	-
P282	302,06	991093	1	301	-
P28	359,04	2470707	1	358	-
P52	288,11	177320	3	-	3
P67	233,02	946780	2	233	-
P06	213,06	4657	4	212	13

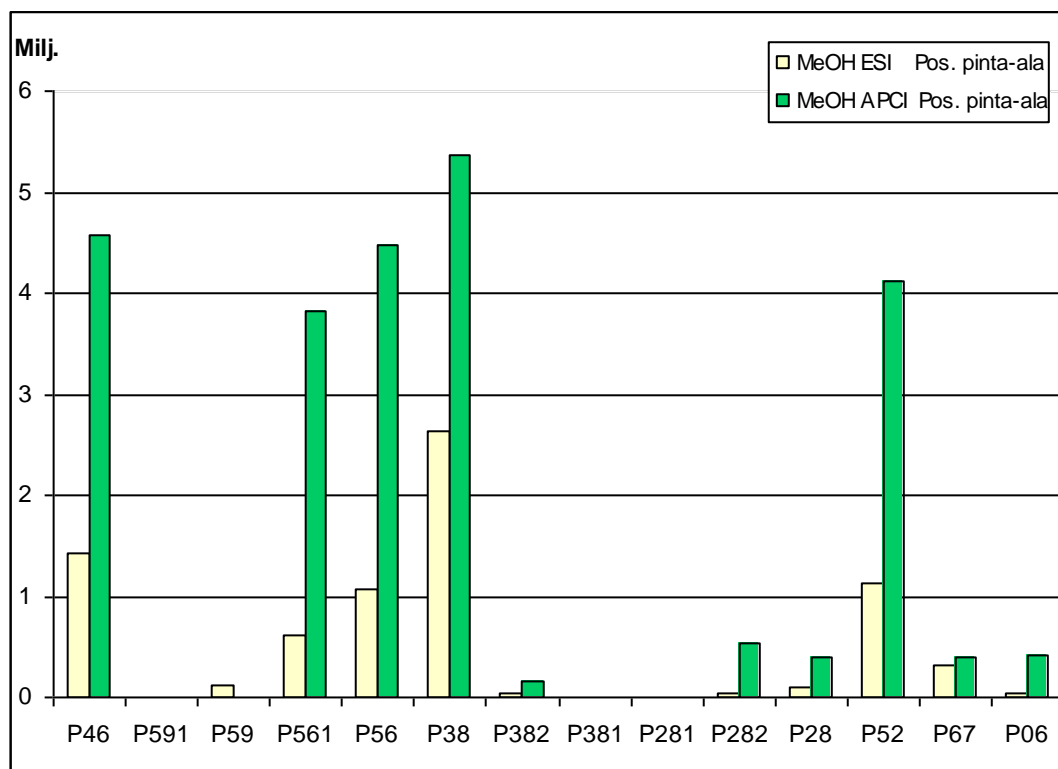
Kuviosta 21 voidaan havaita, että käytetyillä parametreilla paremmin positiivisesti ionisoituvilla tuotteilla on huomattavasti suuremmat TIC-kromatogrammien pinta-alat.



KUVIO 21. Tuotteiden ionisoituminen APCI-tekniikalla, MeOH eluentina

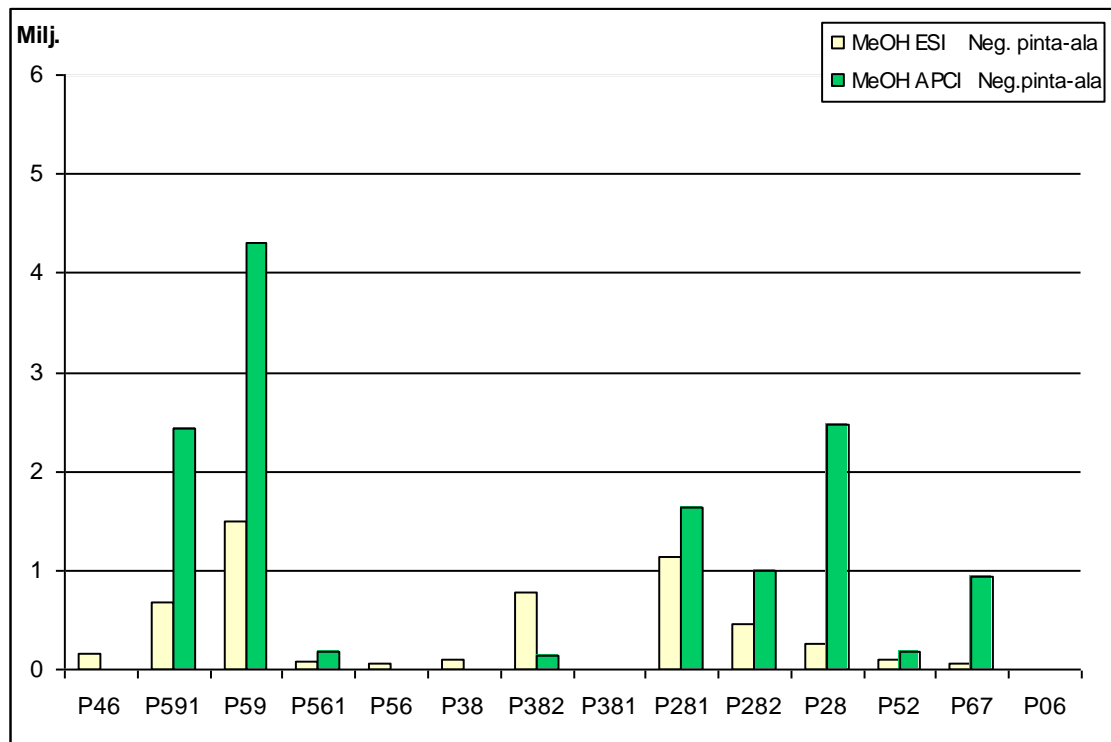
### 7.3.3 ESI- ja APCI- tekniikan vertailu metanolianalyseissa

Kuvioissa 22 ja 23 on havainnollistettu ESI- ja APCI-tekniikan toimivuutta sekä positiivisesti että negatiivisesti ionisoituneilla tuotteilla, kun eluenttina käytettiin metanolia ja happovettä. Kun verrataan ESI- ajojen tuloksia (kuviot 22 ja 23) APCI-tekniikalla ajettuihin ajoihin metanolin ollessa eluenttina, voidaan TIC-kromatogrammien piikkien pinta-aloista havaita, että tuotteiden ionisoituminen on onnistunut huomattavasti paremmin APCI-tekniikalla kuin ESI-tekniikalla sekä positiivisesti että negatiivisesti ionisoituvilla tuotteilla. Kuvioista 22 ja 23 on myös nähtävissä, että tuotetta P381 ei ole edelleenkään saatu ionisoitumaan testatuilla menetelmillä. Myöskään tuotteet P67 ja P06 eivät ole ionisoituneet kovin hyvin.



KUVIO 22. Positiivisesti ionisoituneet tuotteet: ESI- ja APCI-tekniikan vertailu

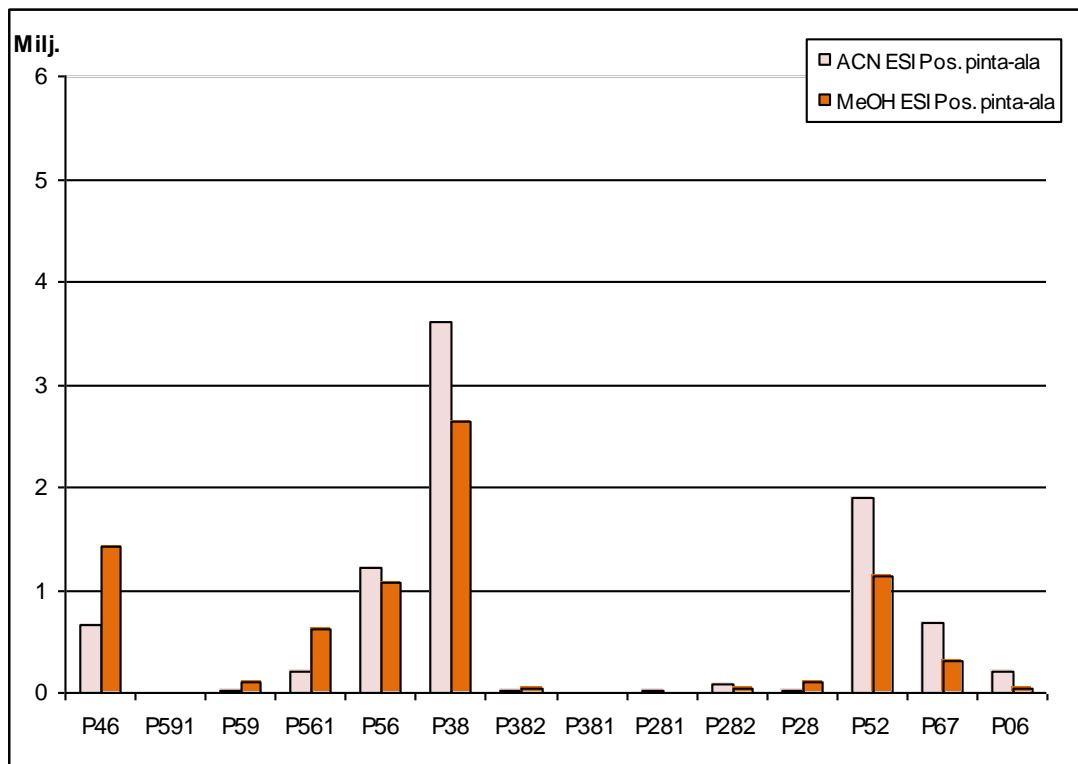




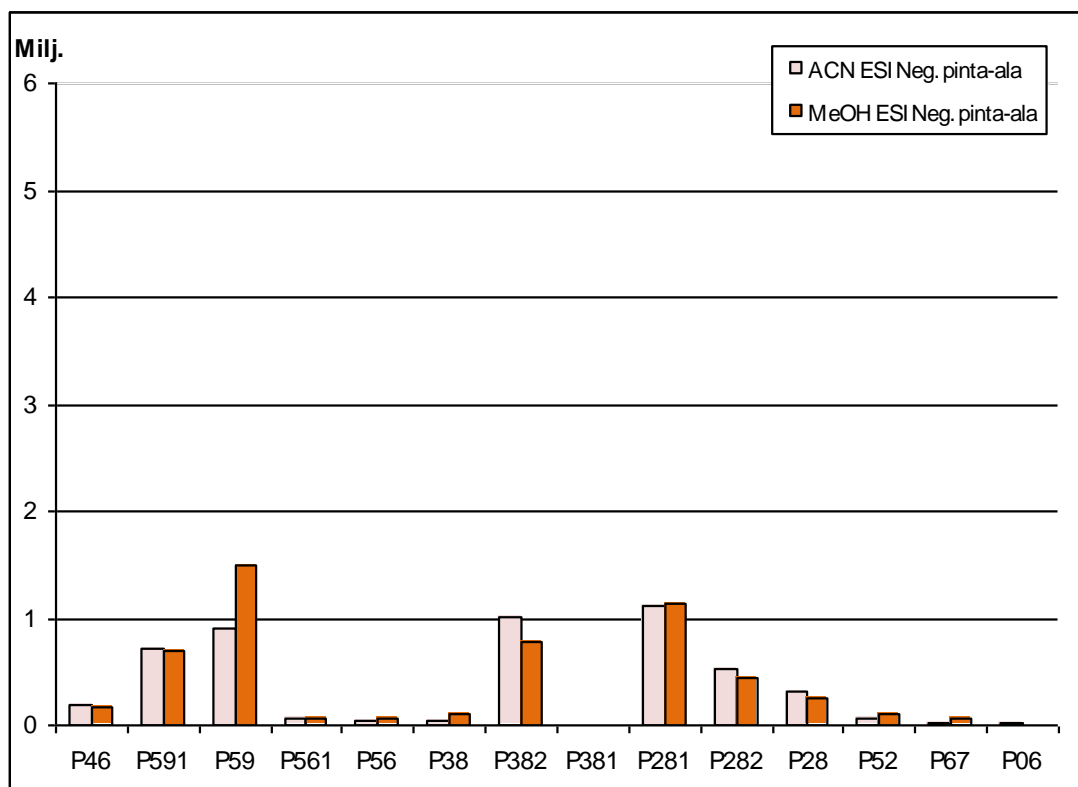
KUVIO 23. Negatiivisesti ionisoituneet tuotteet: ESI- ja APCI-tekniikan vertailu

#### 7.4 Eluenttikoostumuksen vaikutus tuotteiden ionisoitumiseen

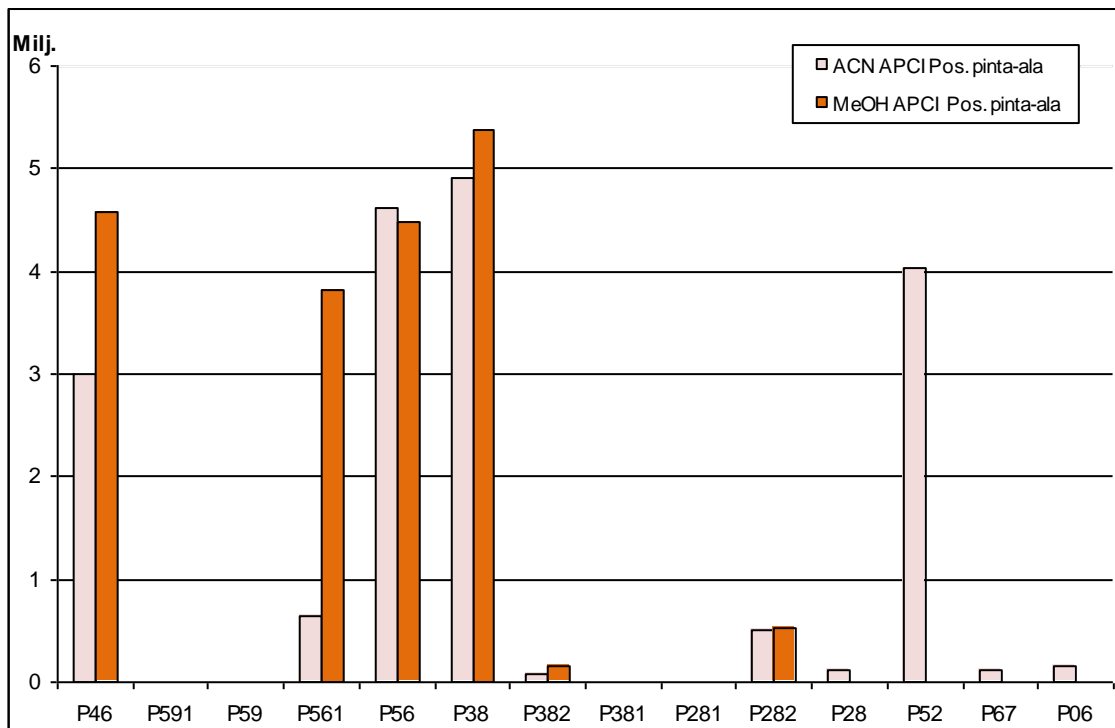
Kuvioissa 24, 25, 26 ja 27 on havainnollistettu eluenttikoostumuksen vaikutusta tuotteiden ionisoitumiseen. Kun tarkastellaan kuvioita tarkemmin, voidaan havaita, että tuotteet P591, P56, P38, P382, P281, P282, P28, P52, P67 ja P06 ovat ionisoituneet paremmin, kun ajoissa käytettiin eluenttina asetonitriliä. Ainoastaan tuotteet P46, P59 ja P561 ionisoituivat paremmin, kun eluenttina käytettiin metanolia. Tuotetta P381 ei saatu ionisoitumaan käytetyillä parametreilla lainkaan. Todennäköisesti kyseessä on todella helposti hajoava tuote, joka on hajonnut jo ennen analysoimista.



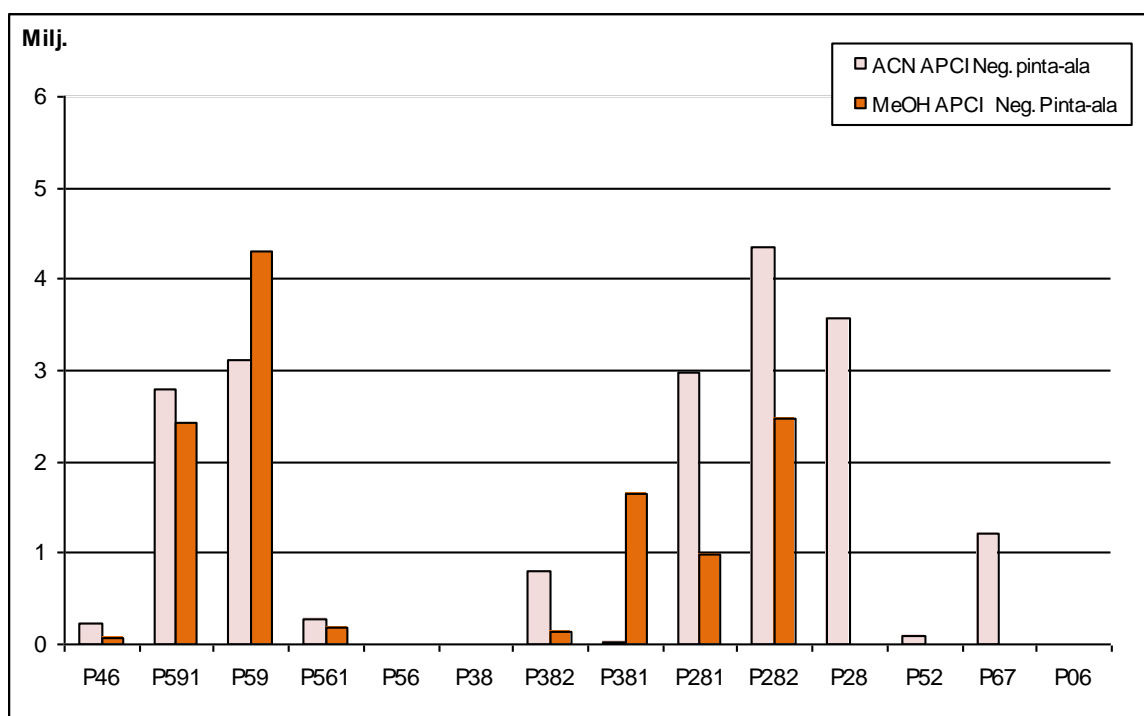
KUVIO 24. Positiivisesti ionisoituneet tuotteet: ACN- ja MeOH-ajojen vertailu ESI-teknikalla



KUVIO 25. Negatiivisesti ionisoituneet tuotteet: ACN- ja MeOH-ajojen vertailu ESI-teknikalla



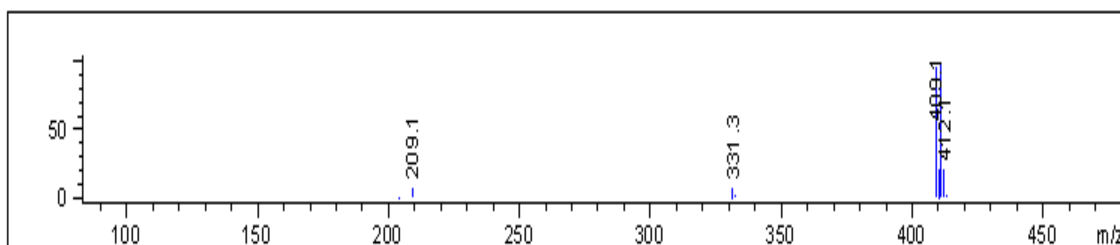
KUVIO 26. Positiivisesti ionisoituneet tuotteet: ACN- ja MeOH-ajojen vertailu APCI-tekniikalla



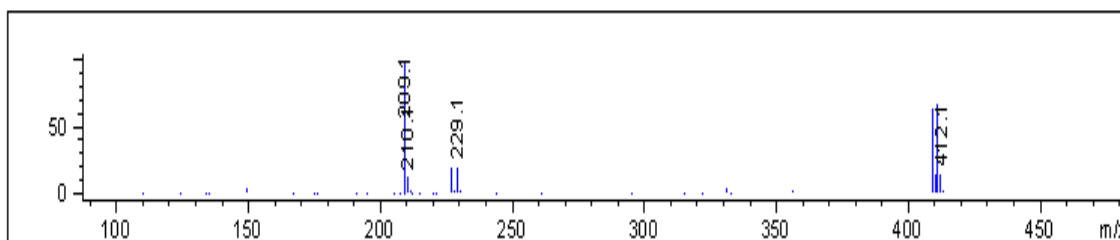
KUVIO 27. Negatiivisesti ionisoituneet tuotteet: ACN- ja MeOH-ajojen vertailu APCI-tekniikalla

## 7.5 Fragmentorijännitteen vaikutus tuotteiden fragmentoitumiseen

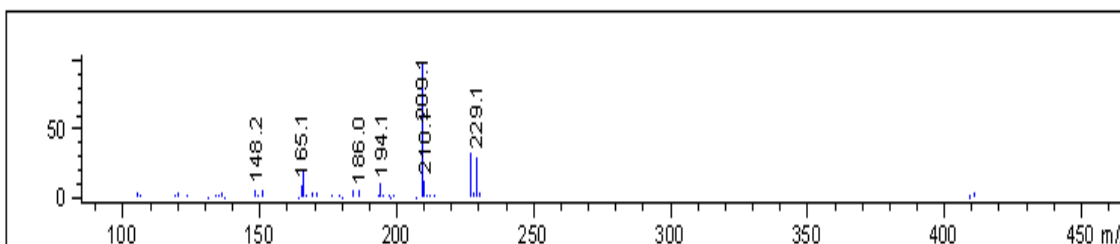
Kaikki tuotteet ajettiin fragmentorijännitteillä 70 V, 120 V ja 170 V, koska haluttiin tutkia, miten fragmentorijännitteen muuttaminen vaikuttaa tutkittavien tuotteiden fragmentoitumiseen. Fragmentorijännitteen nostaminen lisäsi selkeästi fragmentoitumista kaikilla ionisoituvilla tuotteilla. Etenkin fragmentorijännitteellä 170 V ja usein myös jännitteellä 120 V molekyyli-ioni hajosi kokonaan eikä näkynyt spektrissä lainkaan. Fragmentorijännitteen suuruuden vaikutuksesta hyvä esimerkki on tuote P56. Massaspektreissä (kuviot 28, 29 ja 30) on nähtävissä selkeää fragmentoitumista jännitettä nostettaessa.



KUVIO 28. Tuotteen P56 massaspektri fragmentorijännitteellä 70 V



KUVIO 29. Tuotteen P56 massaspektri fragmentorijännitteellä 120 V



KUVIO 30. Tuotteen P56 massaspektri fragmentorijännitteellä 170 V

## 7.6 Tulosten yhteenveto

Taulukossa 16 on esitetty yhteenveto saaduista tuloksista. Saatujen tulosten perusteella voidaan todeta, että jatkossa näitä tuotteita tai samankaltaisia yhdisteitä analysoitaessa LC-MS-laitteella olisi hyvä käyttää ionisaatiotekniikkana APCI-tekniikkaa tai kokeilla MMI-tekniikkaa. Tuloksien perusteella voidaan sanoa, että positiivinen ja negatiivinen ionisoituminen oli yhdisteestä riippuvainen ja näin ollen jatkossakin olisi hyvä käyttää positiivista ja negatiivista detektointia samanaikaisesti. Tässä työssä asetonitriili osoittautui selkeästi paremmaksi eluentiksi, mutta tutkimuksia metanolin kanssa olisi syytä jatkaa, koska ainakin Fischerin ja Duncanin (2007, 3) mukaan asetonitriilillä ei saataisi optimaalisia tuloksia.

TAULUKKO 16. Yhteenveto saaduista tuloksista

Tuote	Pos./Neg. ionisoituminen	Ionisaatiotekniikka	MeOH/ACN
P46	POS	APCI	MeOH
P591	NEG	APCI	ACN
P59	NEG	APCI	MeOH
P561	POS	APCI	MeOH
P56	POS	APCI	ACN
P38	POS	APCI	ACN
P382	NEG	APCI	ACN
P381	Ei ionisoitunut	Ei ionisoitunut	Ei ionisoitunut
P281	NEG	APCI	ACN
P282	NEG	APCI	ACN
P28	NEG	APCI	ACN
P52	POS	APCI	ACN
P67	NEG	APCI	ACN
P06	POS	APCI	ACN

## 8 PÄÄTÄNTÄ

Opinnäytetyön tavoitteena oli luoda LC-MS-spektrikirjasto 14 Kemfinen tuotannossa olevasta tuotteesta NIST-tietokantaan sekä laatia ohjeistus spektrikirjaston tuleville käyttäjille. Tavoite toteutui ja lisäksi tuotteiden ionisoitumisesta erilaisissa olosuhteissa saatiin runsaasti informaatiota jatkotutkimuksia varten

Tutkittavasta 14 tuotteesta kaikki muut saatiin ionisoitumaan paitsi tuotteet P381 ja P06. Lopuista tuotteista saatiin useita kelvollisia massaspektrejä, jotka tallennettiin NIST-spektrikirjastoon tulevia tutkimuksia varten. NIST-spektrikirjaston käyttöohje testattiin kokeneella laborantilla, joka hyväksyi ohjeistuksen muutaman muutosehdotuksen jälkeen. Käyttöohje on nykyään saatavilla työntekijöille, jotka laitetta tulevaisuudessa käyttävät.

Opinnäytetyöstä saatiin arvokasta informaatiota menetelmän kehitykseen LC-MS:lle. Tässä työssä menetelmän laatimiseen käytettiin laitteen valmistajan antamia yleisiä parametreja, mutta jatkossa olisi vielä hyvä tehdä tutkimuksia laiteparametrien parissa. HPLC-menetelmää tarvitsee vielä kehittää sellaiseksi, että se toimii näyteliuoksille, jotka sisältävät useita tutkittavia yhdisteitä. Tällöin yhdisteiden piikit eivät saa retentoitua päällekkäin, kuten tällä menetelmällä olisi käynyt esimerkiksi tuotteille P591 ja P59.

Koska työssä käytetyllä massaspektrometrilla on mahdollista detektoida sekä positiivisia että negatiivisia signaaleja samanaikaisesti, olisi suositeltavaa käyttää kyseistä asetusta jatkossakin, etenkin, jos näyte sisältää enemmän kuin yhtä analyyttia. Tämä sen takia, koska positiivinen ja negatiivinen ionisoituminen jakautuu suhteellisen tasaisesti tuotteiden kesken. MMI-tekniikkaa ei ehditty tässä työssä kokeilla ja olisikin mielenkiintoista tietää, miten paljon laitteen herkkyys kärsii, kun ESI- ja APCI-tekniikkaa käytetään samanaikaisesti.

LC-MS-spektrikirjastoa pyritään jatkossa kartuttamaan uusilla tuotteilla sekä tuotteista löytyneillä epäpuhtauksilla. Spektrikirjastoon voidaan tulevaisuudessa lisätä myös mm. tuotteiden raaka-aineita ja välivaiheiden yhdisteitä.

## LÄHTEET

Agilent Eclipse XDB-C18 RRHT Threaded Column Datasheet. 2006. USA: Agilent Technologies.

Agilent Technologies. 2007. Agilent 6100 series Quadrupole LC/MS Systems Concepts Guide. Germany: Agilent Technologies, Inc.

Agilent Technologies. 2010. Double Your Productivity with Innovative Source for Simultaneous ESI/APCI. Luettu 29.6.2010.

<http://www.chem.agilent.com/en-us/newsletters/pharmaanalysis/issue8/pages/g31035.aspx>

Choi, S. & Song, M. 2008. Influence of Fragmentor Voltage and Solvent on Negative Ionization Behaviors of Uvinul 3039 Using LC/APCI-MS. Bulletin of the Korean Chemical Society 29, 1847-1849.

Dolan, J.W., Snyder, L.R., Djordjevic, N.M., Hill, D.W., Saunders, D.L., Van Heukelem, L. & Waeghe, T.J. 1998. Simultaneous variation of temperature and gradient steepness for reversed-phase high-performance liquid chromatography method development: I. Application to 14 different samples using computer simulation. Journal of Chromatography A 803, 1-31.

Fischer, S. & Duncan, W. 2007. Optimizing the Agilent Multimode Source. California, Santa Clara: Agilent Technologies, Inc.

Gates, P. 2004. Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI). University of Bristol. Luettu 28.6.2010.

<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/apci-ionisation.html>

Gates, P. 2004. Electrospray Ionisation (ESI). University of Bristol. Luettu 28.6.2010.

<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/esi-ionisation.html>

Gates, P. 2009. Quadruple & Triple Quadrupole (QQQ) Mass Analysis. University of Bristol. Luettu 29.6.2010.

<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/quad-massspec.html>

Harris, D. C. 2007. Quantative Chemical Analysis. 7th edition. New York: W. H. Freeman and Company.

Hämäläinen, E & Turpeinen, U. 2006. Steroidien määrittämisestä nestekromatografiatandem-massaspektrometrialla (LC-MS/MS). Kliinlab, Suomen Kliinisen Kemian Yhdistyksen Jäsenlehti 23 (2), 24-29

I, T-P., Smith, R., Guhan, S., Taksen, K., Vavra, M., Myers, D. & Hearn, M.T.W. 2002. Intelligent automation of high-performance liquid chromatography method development by means of a real-time knowledge-based approach. *Journal of Chromatography A* 972, 27-43.

Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2005. *Laboratorion analyysitekniikka*. 5. uudistettu painos. Helsinki: Edita Publishing Oy.

McMaster, M.C. 2005. *LC/MS A Practical User's Guide*. New Jersey: John Wiley & Sons.

Meyer, V. R. 2004. *Practical high-performance liquid chromatography*. 4th edition. Weinheim: John Wiley & Sons.

Niessen, W.M.A. 2003. Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. *Journal of Chromatography A* 1000, 413-436.

National Institute of Standards and Technology. 2010. NIST General Information. Luettu 10.7.2010.  
[http://www.nist.gov/public\\_affairs/general\\_information.cfm](http://www.nist.gov/public_affairs/general_information.cfm)

Opetushallitus. 2004. Laboratorianalyysit: Massaspektrometria. Luettu 6.9.2010.  
[http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat\\_5-5\\_massaspektrometria.html](http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_5-5_massaspektrometria.html)

Opetushallitus. 2004. Laboratorianalyysit: Nestekromatografia. Luettu 29.6.2010.  
[http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat\\_2-6\\_nestekromatografia.html](http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_2-6_nestekromatografia.html)

Schreiber, A., Efer, J. & Engewald. 2000. Application of spectral libraries for high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry to the analysis of pesticide and explosive residues in environmental samples. *Journal of Chromatography A* 869, 411-425.

Snyder, L., Kirkland, J. & Glajch. 1997. *Practical HPLC method development*. 2th edition. Canada: John Wiley & Sons.



## LIITTEET

LIITE 1: NIST-spektrikirjaston käyttöohje

LIITE 1: 1 (11)

## NIST MS-search 2.0

## PIKAOHJE

NIST MS Search 2.0 - [Ident, Presearch Default - InLib = 721, 23 spectra]

File Search View Tools Window Help

1. MSD2 SPC, time=6.106 C:\CHEM32\1\DATA

#	Src.	Name
1	A	MSD2...

Names Structures Spec List

lc-ms-kirjasto; 84 total spectra

(Text File) MSD2 SPC, time=6.106 C:\CHEM32\1\DATA

Name: MSD2 SPC, time=6.106 C:\CHEM32\1\DATA  
 Formula:  
 MW: N/A CAS#: N/A NIST#: N/A ID#: 4 DB: Text File  
 Other DBs: None  
 Comment: P382  
 10 largest peaks:  
 183 999 | 227 681 | 184 152 | 228 97 | 185  
 531 74 | 229 63 | 155 37 | 211 31 | 153  
 Synonyms:

#	Lib.	Match	R.Match	Prob.	Narr.
1	lc	850	907	98.9	
2	lc	677	697	98.9	
3	lc	583	661	98.9	
4	lc	571	666	98.9	
5	lc	568	631	98.9	
6	lc	384	408	98.9	
7	lc	308	357	98.9	
8	lc	266	296	0.98	
9	lc	264	269	0.98	
10	lc	182	191	0.09	
11	lc	160	161	0.03	
12	lc	150	151	0.03	
13	lc	144	162	0.02	

Names Structures InLib = 721, Hit List

Lib. Search Other Search Names Compare Librarian

For Help, press F1

Ident Ident

100 50 0 0 50 100

110 150 200 250 300 350 400 450 500 550 590

183 227 531

Name: MSD2 SPC, time=6.106 C:\CHEM32\1\DATA  
 Formula:  
 MW: N/A CAS#: N/A NIST#: N/A ID#: 4 DB: Text File  
 Other DBs: None  
 Comment: P382  
 10 largest peaks:  
 183 999 | 227 681 | 184 152 | 228 97 | 185  
 531 74 | 229 63 | 155 37 | 211 31 | 153  
 Synonyms:

100 50 0 0 50 100

110 150 200 250 300 350 400 450 500 550 590

184 228 531 581

MSD2 SPC, time=6.106 C:\CHEM32\1\DATA  
 Difference ESI-NEG-F120-ACN  
 850 907R 98.9P

100 50 0 0 50 100

110 150 200 250 300 350 400 450 500 550 590

183 227 581

(lc-ms-kirjasto) ESI-NEG-F120-ACN




Name: -ESI-NEG-F120-ACN  
 Formula: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>Si  
 MW: 228 CAS#: N/A NIST#: N/A ID#: 76  
 Other DBs: None  
 Comment: H2O+FAACN, (LC\_MS\_KIRJ\_ES\_F120  
 10 largest peaks:  
 183 999 | 227 682 | 184 141 | 228 109 | 185  
 229 65 | 155 35 | 153 28 | 211 23 | 581  
 Synonyms:

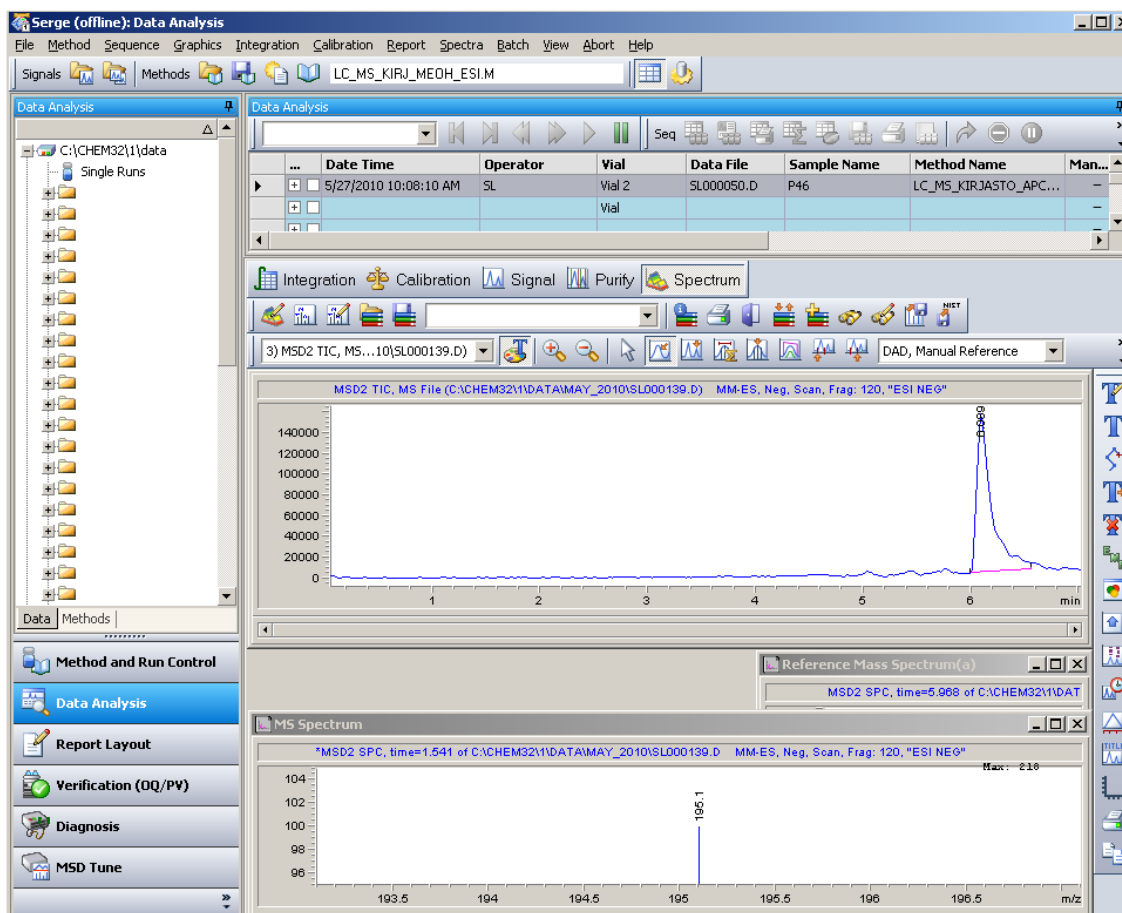
Soja Leskinen

16.6.2010

## LIITE 1: 2 (11)


## KIRJASTOHAKU

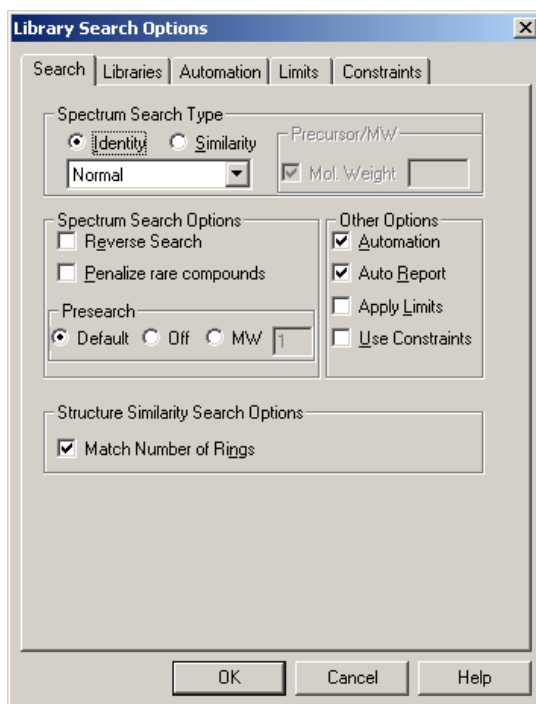
1. Nist-kirjaston avaamiseksi täytyy ensin valita ms-spektristä piikki klikkaamalla ensin työkalurivistä  piikin alusta ja sitten  piikin lopusta ja lopuksi valita piikki klikkaamalla .



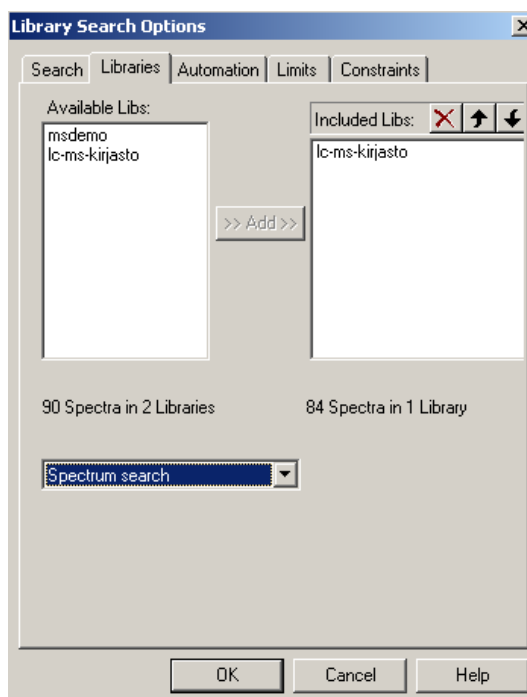
2. Seuraavaksi ladataan valittu piikki Nist-kirjastoon klikkaamalla  ja avataan Nist-kirjasto painamalla .

## LIITE 1: 3 (11)

3. Haussa käytettävän kirjaston voi valita  näppäimellä.  
→ Avautuu ikkuna, jossa voi muuttaa kirjastoasetuksia:



Ikkunasta painetaan **Libraries** ja valitaan haluttu kirjasto. Kirjastoja voi valita myös useampia. Kirjasto valitaan, painetaan **Add** ja **OK**.



## LIITE 1: 4 (11)

4. kuvan ikkunat on numeroitu ja selitetty alla:

The screenshot displays the NIST MS Search 2.0 interface with several numbered windows:

- Window 1:** Search results table showing a list of compounds with their library IDs, match scores, and probabilities.
- Window 2:** Mass spectrum plot of the sample peak at 6.106 minutes, showing major peaks at m/z 183 and 227.
- Window 3:** Metadata for the sample spectrum, including name, formula, molecular weight, and comment.
- Window 4:** Comparison of the sample spectrum (red) with a library reference spectrum (blue) for -NEG-F120-ACN.
- Window 5:** A zoomed-in view of the match table from window 1, highlighting the top results.
- Window 6:** Reference mass spectrum for -ESI-NEG-F120-ACN, showing characteristic peaks at m/z 183 and 227.
- Window 7:** Metadata for the library reference spectrum, including name, formula, molecular weight, and comment.

1. Speclist-ikkunassa näkyy ladatun spektrin datafile.
2. Ikkunassa on näkyvässä ladatun piikin spektri.
3. Ladatun spektrin tiedot.
4. Tässä ikkunassa voidaan valita, miten ladattua tuntematonta spektriä ja ohjelman ehdottamaa spektriä tarkastellaan. Kuvassa on avoinna välilehti **Head to Tail**, jossa ylhäällä näkyy ladattu spektri punaisella ja alhaalla ohjelman ehdottama spektri sinisellä. **Difference**-välilehdellä ohjelma näyttää vain spektrien eroavaisuudet. **Side by Side**-välilehdellä ohjelma laittaa spektrit rinnakkain.
5. Ikkunassa on näkyvässä lista ohjelman ehdottamista yhdisteistä todennäköisyysjärjestyksessä. Samalla yhdisteellä voi olla useita spektrejä, jotka on saatu erilaisia parametreja käyttäen.
6. Ohjelman suurimmalla todennäköisyydellä ehdottama spektri, nimi ja rakennekaava.
7. Ohjelman suurimmalla todennäköisyydellä ehdottaman spektrin tiedot.

## LIITE 1: 5 (11)

## 5. PIKANÄPPÄIMET:



→ käynnistetään kirjastohaku



→ haetaan tiettyä rakennekaavaa



→ tyhjennetään  valikko



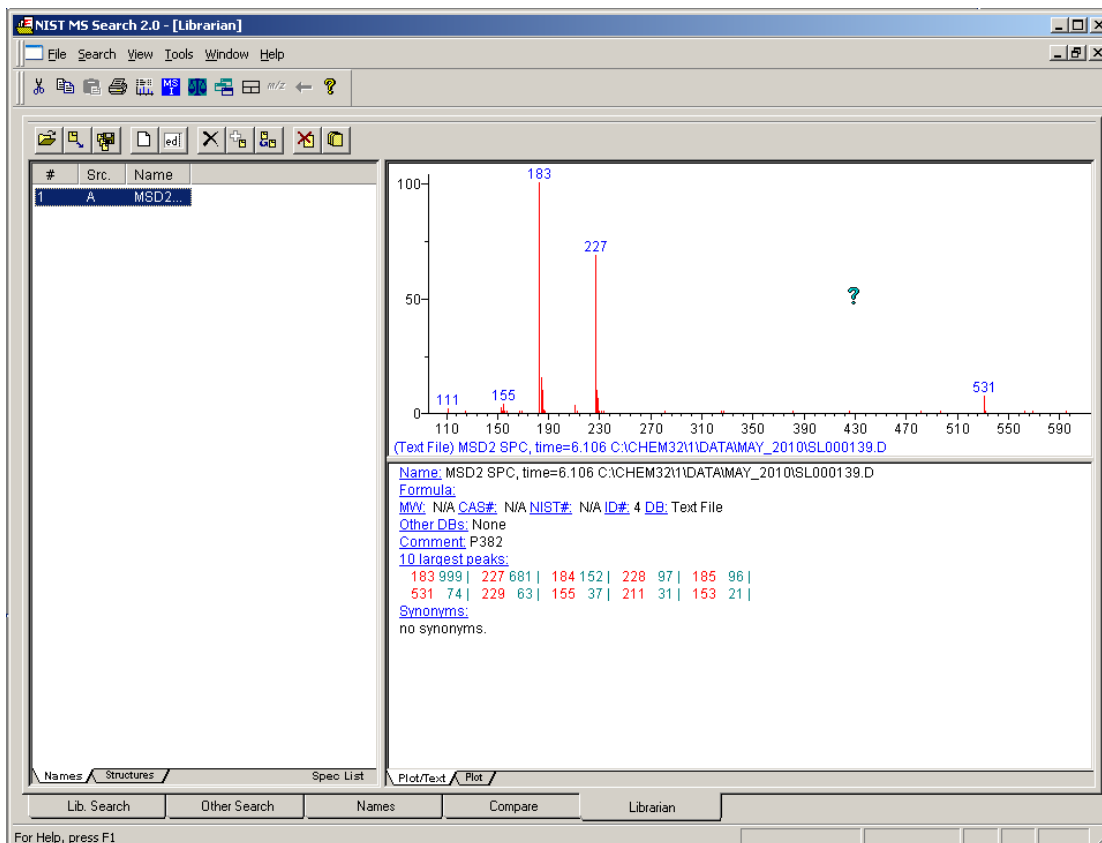
→ Kun näppäin on pohjassa, esille tulee vain yksi samalla CAS-numerolla varustettu spektri, kun näppäin ei ole pohjassa, näkyviin tulee kaikki samalla CAS-numerolla varustetut spektrit. Samalla CAS-numerolla on tallennettu useita spektrejä, jotka voivat olla hyvin samanlaisia.

Spektrit on luotu eri parametreja käyttäen (esim. APCI/ESI, POS/NEG, fragmentorijännitteet 70, 120 ja 170 V)

## LIITE 1: 6 (11)

## YHDISTEIDEN TALLENNUS KIRJASTOON

1. Yhdisteen spektri ladataan samalla lailla kuin kirjasto haussa. Sen jälkeen valitaan librarian välilehti. Näkyvässä on ohjelmaan ladattu tuntematon spektri.



## PIKANÄPPÄIMET:



→ kirjastoon tallennettujen spektrien haku



→ voidaan muokata valittua spektriä



→ valitun spektrin deletointi




→ uuden kirjaston luominen



→ kirjaston deletoiminen

## LIITE 1: 7 (11)

## 2. Yhdisteen lisääminen kirjastoon:

Klikataan  näppäintä, jolloin avautuu ikkuna:

**Spectrum Information**

Name: MSD2 SPC, time=6.106 C:\CHEM32\1\D

Formula:  From structure

Other Names (Synonyms):

Comments: P382

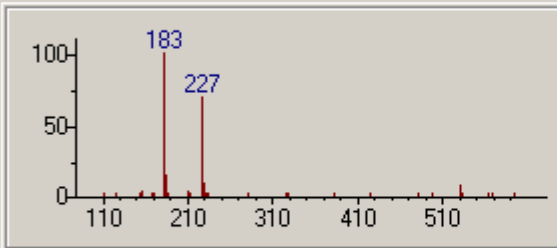
Mol. Weight:  ID Number: 4


CAS Number:  Peaks: 34

Library: Text File

**Peak information**

m/z	Abund.
111	20
125	4
153	21
154	3
155	37
156	2
157	3
167	3
169	2
183	999
184	152





Structure: No structure



## LIITE 1: 8 (11)

## 3. Esimerkki kirjastoon lisäämisestä:

**Spectrum Information**

Name: .....

Formula:

Other Names (Synonyms):  
  
 .....  
 .....

Comments:

Mol. Weight:  ID Number: 85

CAS Number:  Peaks: 31

Library: lc-ms-kirjasto

**Peak information**

m/z	Abund.
110	20
111	113
112	14
125	98
127	24
153	39
155	57
168	20
169	8
183	999
184	131

Structure:

**Name:** Automaattisesti nimen kohdalla on datafile, joka voidaan poistaa. Datafilen tilalle kirjoitetaan yhdisteen nimi, sekä perään lisättynä käytetty ionisointimenetelmä, positiivinen vai negatiivinen, fragmentorijännite, eluentti. Olisi suositeltavaa käyttää aina samanlaista nimeämisjärjestelmää aina kirjastoon lisättäessä uutta tuotetta.

**Formula:** Yhdisteen molekyyli saadaan suoraan rakennekaavasta painamalla  (rakennekaavan lisääminen myöhemmin)

## LIITE 1: 9 (11)

**Other Names:** Yhdisteen mahdolliset muut nimet seuraavassa järjestyksessä:

1. Tuotenumero
2. Muu yleisesti käytetty nimi
3. IUPAC-nimi

**Comments:** Tähän kirjoitetaan, millä menetelmällä yhdiste on ajettu ja mitä parametreja on käytetty seuraavanlaisessa järjestyksessä (max. 1000 merkkiä):

1. Eluentti
2. Menetelmä
3. Pääparametrit

**Mol. Weight:** saadaan myös painamalla  näppäintä

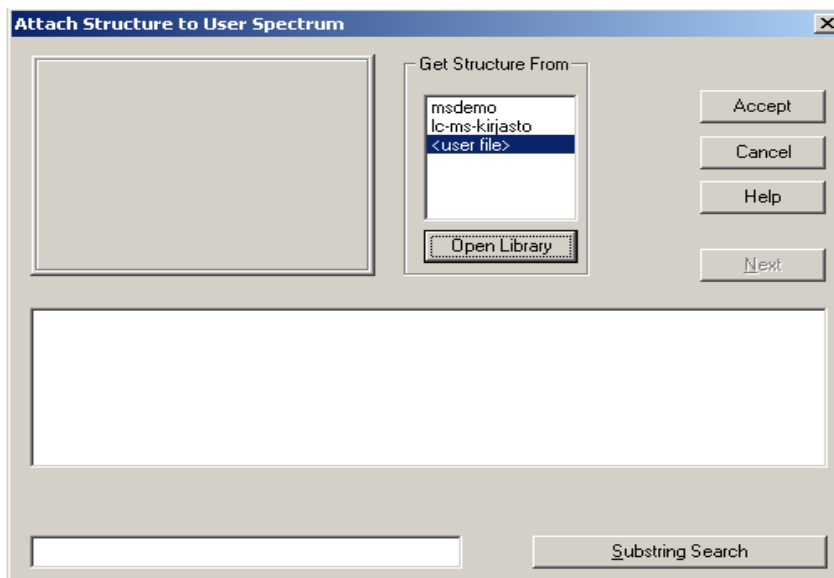
**CAS-number:** Yhdisteen CAS-numero

**Peak information:** Tässä kohdassa voidaan jättää spektrin piikkejä huomioiden valitsemalla kyseinen signaali ja painamalla delete, mutta se ei yleensä ole suositeltavaa.

## LIITE 1: 10 (11)

**Attach Struct:** Tässä kohdassa voidaan lisätä yhdisteen rakennekaava.


Klikkaamalla **Attach Struct** avautuu ikkuna:

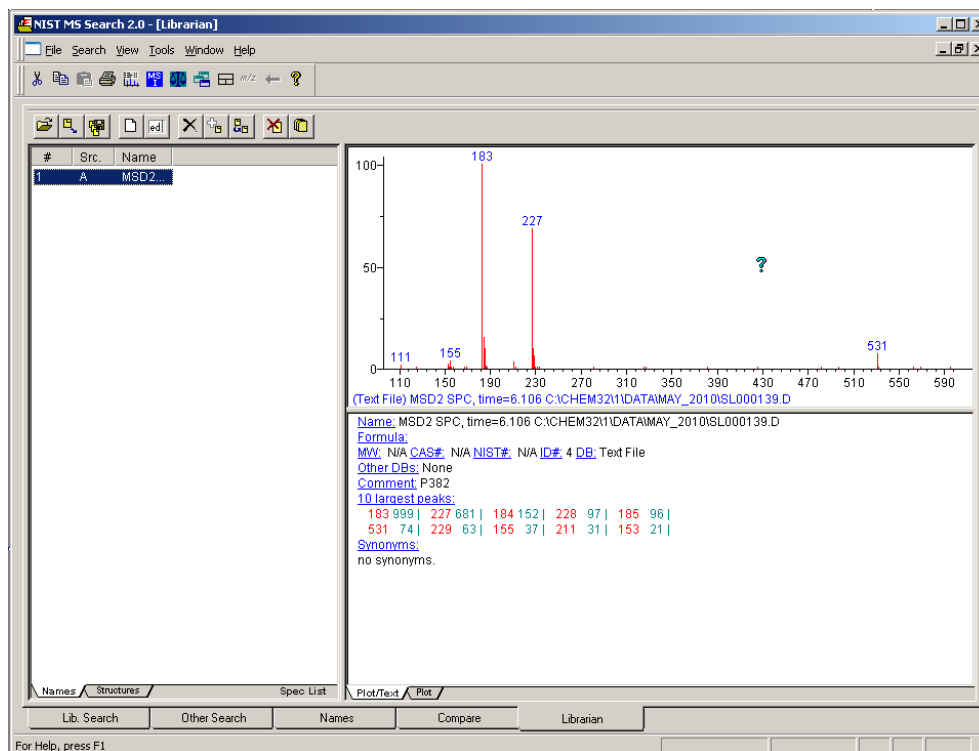


Valitsemalla <user file> ja klikkaamalla **Open Library** päästään valitsemaan mikä tahansa kovalevyllä oleva tiedosto. Jos rakennekaava on piirretty esim. ChemScetch-ohjelmalla, se täytyy tallentaa .mol-muotoon, jotta Nist-ohjelma pystyy avaamaan sen. (Rakennekaavat mol-muodossaan on tallennettu xxx-kansioon) Tiedosto valitaan ja klikataan **Accept**, jolloin rakennekaava tallentuu yhdisteen tietoihin.

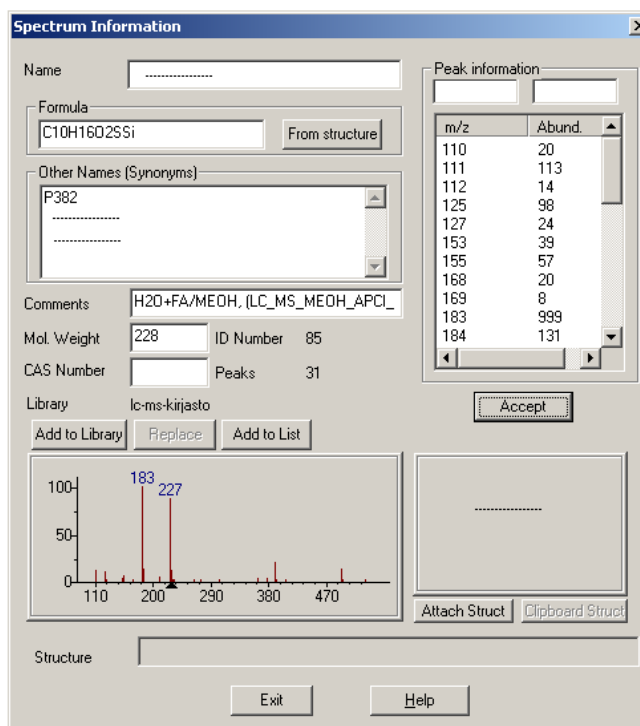
**Add to library:** Kun halutut tiedot on kirjoitettu, painetaan **Add to Library** ja tallennetaan yhdiste haluttuun kirjastoon.

## LIITE 1: 11 (11)

4. Jos halutaan muokata jo valmiiksi kirjastossa olemassa olevaa spektriä, haetaan spektri klikkaamalla  alla olevasta ikkunasta, jolloin näkyviin tulee valitun kirjaston kaikki spektrit.



Valitaan haluttu spektri ja klikataan , jolloin avautuu ikkuna:



Muokataan haluttu tieto ja painetaan **Replace**.