

Opinnäytetyö (AMK)

Prosessi- ja materiaalitekniikka

Kevät 2020

Ville-Pekka Manninen

**OLIGOMEERISEN
ELLAGITANNIININ
PUHDISTAMINEN JA
RAKENTEEN TUTKIMINEN
MASSASPEKTROMETRIALLA**

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Prosessi- ja materiaalitekniikan koulutusohjelma

2020 | 46 sivua

Ville-Pekka Manninen

OLIGOMEERISEN ELLAGITANNIININ PUHDISTAMINEN JA RAKENTEEN TUTKIMINEN MASSASPEKTROMETRIALLA

Tämä opinnäytetyö käsittelee oligomeerisia ellagitanniineja, jotka ovat kasvin sekundäärisen metabolian tuotteita. Tanniinit ovat monimutkaisin polyfenolisten yhdisteiden luokka ja niillä on esimerkiksi kyky liittyä proteiiniin. Tutkittu oligomeerinen ellagitanniini oli oenoteiini B, joka on dimeerinen makrosyklinen yhdiste.

Opinnäytetyön tavoitteena oli puhdistaa kasvinäytteestä uutettua oenoteiini B:tä sekä tutkia sen rakennetta. Puhdistamiseen käytettiin korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa. Preparatiivista kromatografiaa käytettiin ensin karkeaan puhdistamiseen, jonka jälkeen semipreparatiivista kromatografiaa tarkempaan puhdistamiseen. Puhdistamisen jälkeen näytteet analysoitiin erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografian avulla yhdistettynä diodirividetktooriin (UPLC-DAD), jolla saatiin näytteille kromatogrammit. Kromatogrammeista määritettiin näytteiden puhtaus sekä laskettiin puhtausprosentti. Puhtaan oenoteiini B -näytteen rakenne analysoitiin massaspektrometrilla. Käytetty massaspektrometri oli tandemmassaspektrometri, jossa oli kvadrupoli ja orbiloukku yhdistettynä. Chemdraw- ohjelman fragmentointityökalun ja massaspektrien avulla muodostettiin fragmenteille rakenteita.

Opinnäytetyön tulosten perusteella saadut oenoteiini B näytteet olivat hyvin puhtaita. Puhdasta oenoteiini B:tä eristettiin yhteensä 1 g.

ASIASANAT:

ellagitanniini, hydrolysoituva tanniini, kromatografia, massaspektrometria, rakennekemia, tanniini

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Chemical and Materials Engineering

2020 | 46 pages

Ville-Pekka Manninen

PURIFICATION OF OLIGOMERIC ELLAGITANNIN AND MASS SPECTROMETRIC STUDY OF ITS STRUCTURE

In this thesis, oligomeric ellagitannins were used, which are secondary metabolites of plants. Tannins are the most complicated class of polyphenolic compounds and have, for example, an ability to bind with proteins. The Studied oligomeric ellagitannin was oenothain B, which is a dimeric macrocyclic compound.

The objective of this thesis was to purify oenothain B from an extracted plant sample and to study its structure. High-performance liquid chromatography was used for purification. First, coarse purification was conducted with preparative chromatography, followed by semipreparative chromatography for more precise purification. After that, the samples were analysed with an ultra-high-performance liquid chromatograph coupled with a diode-array detector (UPLC-DAD) to obtain chromatograms for the samples. From the chromatograms, the purity of the samples and the purity percentage could be calculated. The structure of the pure oenothain B sample was analysed with a mass spectrometer. The mass spectrometer was a tandem mass spectrometer which had a quadrupole coupled with an Orbitrap. With the Chemdraw fragmentation tool and the mass spectra measured, structures for the fragments could be formed.

Based on the results of the thesis, the obtained oenothain B samples were very pure. A total amount of 1 g of pure oenothain B was obtained.

KEYWORDS:

chromatography, ellagitannin, hydrolysable tannin, mass spectrometry, structural chemistry, tannin

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO	7
1 JOHDANTO	1
2 TANNIINIT	2
2.1 Tanniinit	2
2.2 Ellagitanniinit	3
3 NESTEKROMATOGRAFIA	5
3.1 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)	5
3.1.1 Stationaarifaasit	6
3.1.2 Preparatiivinen ja semipreparatiivinen kromatografia	6
3.1.3 Detektorit	7
3.2 UPLC (Ultra-Performance Liquid Chromatography)	8
4 MASSASPEKTROMETRIA	9
4.1 Toimintaperiaate	9
4.2 Sähkösumutus-ionisaatio ESI (Electrospray Ionization)	9
4.3 Kvadrupoli	10
4.3.1 Kolmoiskvadrupoli	11
4.4 Orbiloukku (Orbitrap)	11
4.5 Tandemmassaspektrometria MS/MS	12
4.6 LC-MS	12
5 KÄYTÄNNÖN OSUUS	14
5.1 Näytteiden esikäsittely	15
5.2 Preparatiivinen kromatografia	15
5.2.1 Näytteiden valmistelu	15
5.2.2 Preparatiivinen puhdistus	16
5.2.3 UPLC-DAD-MS-analyysit	17
5.2.4 Fraktioiden haihdutus ja kylmäkuivaus	20
5.3 Semipreparatiivinen kromatografia	20
5.3.1 Näytteiden valmistelu	21
5.3.2 Käytetyt olosuhteet ja gradientti	21

5.3.3 UPLC-DAD-MS-analyysit	22
5.3.4 Fraktioiden haihdutus ja kylmäkuivaus	24
5.4 Massaspektrometria	24

6 TULOKSET **26**

6.1 Puhtauden analysointi	26
6.2 Oenoteiini B:n tarkan massan laskeminen	30
6.3 Rakenne analyysit	32
6.4 Tulosten arviointi	39

7 POHDINTA JA YHTEENVETO **42**

LÄHTEET **44**

KAAVAT

Kaava 1. Puhtausprosentin laskeminen.	26
Kaava 2. Tarkan massan laskeminen kahdesti varautuneelle ionille.	31
Kaava 3. Tarkan massan laskeminen yhdesti varautuneelle ionille.	32
Kaava 4. Virheen laskeminen.	32
Kaava 5. Aritmeettinen keskiarvo.	40
Kaava 6. Keskihajonta.	40

KUVAT

Kuva 1. Gallushappo	2
Kuva 2. Pentagalloyyliglukoosi	3
Kuva 3. Heksahydroksidifenoyyliryhmä	3
Kuva 4. Oenoteiini B	4
Kuva 5. Kaaviokuva HPLC-laitteistosta.	5
Kuva 6. Kvadrupoli ja sen toimintaperiaate.	10
Kuva 7. Kolmoiskvadrupolin toimintaperiaate.	11
Kuva 8. Orbiloukku.	11
Kuva 9. Käytännön työ vaiheet.	14
Kuva 10. Preparatiivisen HPLC:n kromatogrammi aallonpituudella 280 nm.	17
Kuva 11. UPLC-DAD-MS-menetelmällä preparatiivisesta puhdistuksesta analysoitu puhdas näyte aallonpituudella 280 nm.	18
Kuva 12. UPLC-DAD-MS-menetelmällä preparatiivisesta puhdistuksesta analysoitu näyte, jossa on huomattavasti epäpuhtautta mukana aallonpituudella 280 nm.	19
Kuva 13. Semipreparatiivisen HPLC:n kromatogrammi aallonpituudella 280 nm.	22
Kuva 14. UPLC-DAD-MS-menetelmällä analysoitu semipreparatiivisen puhdistuksen puhdas näyte aallonpituudella 280 nm.	23

Kuva 15. UPLC-DAD-MS-menetelmällä analysoitu semipreparatiivisen puhdistuksen näyte aallonpituudella 280 nm, jossa on epäpuhtautta mukana.	23
Kuva 16. Semipreparatiivisten HPLC-fraktiointien 1 ja 2 puhtain oenoteiini B.	27
Kuva 17. Semipreparatiivisten HPLC-fraktiointien 3 ja 4 puhtain oenoteiini B.	27
Kuva 18. Semipreparatiivisten HPLC-fraktiointien 5 ja 6 puhtain oenoteiini B.	28
Kuva 19. Semipreparatiivisten HPLC-fraktiointien 7 ja 8 puhtain oenoteiini B.	28
Kuva 20. Kevään semipreparatiivisten HPLC-fraktiointien 1, 2 ja 3 puhtain oenoteiini B.	29
Kuva 21. Kevään semipreparatiivisten HPLC-fraktiointien 4, 5 ja 6 puhtain oenoteiini B.	29
Kuva 22. Kevään semipreparatiivisten HPLC-fraktiointien 7, 8 ja 9 puhtain oenoteiini B.	30
Kuva 23. Kevään semipreparatiivisten HPLC-fraktiointien 10, 11, 12 ja 13 puhtain oenoteiini B.	30
Kuva 24. Oenoteiini B:n massaspektri.	31
Kuva 25. oenoteiini B:n pilkkoutuminen kahdeksi yhdesti varautuneeksi molekyyliksi-ioniksi.	33
Kuva 26. veden lohkeaminen ionista.	33
Kuva 27. Oenoteiini B:n hajoaminen kahdeksi yhdesti varautuneeksi ioniksi.	34
Kuva 28. Veden lohkeaminen fragmentti-ionista m/z 633,07.	35
Kuva 29. Muita mahdollisia lohkeamisia molekyyli-ionista.	35
Kuva 30. Fragmentti-ioni m/z 935,08 pilkkoutuminen sekä HHDP-ryhmän laktonisaation seurauksena muodostuvat fragmentti-ionit m/z 301,00 ja 275,02.	36
Kuva 31. Veden lohkeaminen pilkkoutuneesta molekyylistä.	37
Kuva 32. Massaspektri, jossa ohjearvo lähtöioni valitsemiseen on m/z 783 ja törmäysenergia 25 eV.	38
Kuva 33. Massaspektri, ohjearvo lähtöioni valitsemiseen on m/z 1567 ja törmäysenergia 20 eV.	38
Kuva 34. Massaspektri, ohjearvo lähtöioni valitsemiseen on m/z 1075, SID on 25 eV ja törmäysenergia 25 eV.	39
Kuva 35. Massaspektri, jossa näkyy m/z 753. Ohjearvo lähtöioni valitsemiseen on m/z 1075, SID on 25 eV ja törmäysenergia 25 eV.	39

TAULUKOT

Taulukko 1. Preparatiivisen puhdistuksen gradientti, jossa A tarkoittaa metanolia.	16
Taulukko 2. UPLC-DAD-MS-analyysin gradientti, jossa A tarkoittaa asetonitriliä.	18
Taulukko 3. Semipreparatiivisen puhdistuksen gradientti, jossa A tarkoittaa asetonitriliä.	22

KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO

DAD	Diodirividetektori
ESI	Sähkösumutusionisaatio
ET	Ellagitanniini
Fragmentti	Hajoamisesta syntynyt ioni
GT	Gallotanniini
HHDP	Heksahydroksidifenoyyli
HPLC	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia
LIT	Lineaarinen ioniloukku, Linear Ion Trap
LC-MS	Nestekromatografia-massaspektrometria
NMR	Ydinmagneettinen resonanssi
NP-HPLC	Normaalifaasi-HPLC
Makrosykli	Rengasmaisen makromolekyylin
MS	Massaspektrometria
MS/MS	Tandemmassaspektrometria
Oligomeeri	Useammasta monomeeristä rakentunut yhdiste
RP-HPLC	Käänteisfaasi-HPLC
UV	Ultravioletisäteily
UV/VIS	Ultravioletti/näkyvän valon spektrometri
UPLC	Erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia

1 JOHDANTO

Opinnäytetyön suorituspaikkana toimi Turun yliopiston luonnonyhdistekemian tutkimusryhmä. Opinnäytetyön käytännön toteutus tehtiin Turun yliopiston luonnonyhdistekemian laboratoriossa. Luonnonyhdistekemian tutkimusryhmässä pääpaino on analyyttisissä menetelmissä keskittyen moderneihin kromatografisiin, massaspektrometriin ja kuopalevytekniisiin sovelluksiin. Suurin osa tutkimuskohteista käsittelee luontoa ja luonnontieteellisiä ilmiöitä. (Salminen, 2020)

Opinnäytetyön tarkoituksena oli puhdistaa kasvinäytteestä uutettua oenoteiini B:tä ja tämän jälkeen määrittää sen tarkka rakenne sekä tutkia, miten yhdiste pilkkoutuu massaspektrometrissä. Muodostuneille fragmenteille määritettiin rakenne ja mahdollinen pilkkoutumismekanismi oenoteiini B:stä. Puhdasta oenoteiini B:tä käytetään jatkotutkimuksissa, sillä yleisesti tanniineja ja niiden vaikutuksista kasveihin ja esimerkiksi kasvien puolustusmekanismiin vaatii lisää tutkimusta. Tutkittaessa fragmentteja, pyrittiin tutkimaan, olisiko massaspektrissä mahdollisesti jotain sellaisia fragmentteja, joita ei ole ennen havaittu.

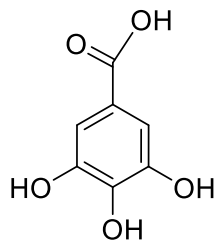
Opinnäytetyön pääasiallinen tavoite oli saada mahdollisimman paljon mahdollisimman puhdasta oenoteiini B:tä. Toisena tavoitteena voidaan pitää kokemuksen ja taidon kerääminen analyyttisestä tutkimuksesta sekä analyyttisten menetelmien toteuttamisesta. Opinnäytetyössä käsitellään ensin tanniinien teoriaa, tämän jälkeen käsitellään käytettyjen laitteiden ja menetelmien teoriaa, jonka jälkeen siirrytään varsinaiseen työn suoritusosaan. Lopuksi käsitellään tuloksia ja esitetään pohdintoja.

Kiitokset menevät koko luonnonyhdistekemian tutkimusryhmälle, joka loi positiivisen ja mukavan työympäristön. Tutkimusryhmän kanssa käytyjen hedelmällisten keskustelujen ja avun ansiosta tämä opinnäytetyö eteni moitteettomasti. Erityiset kiitokset menevät Turun yliopiston puolelta ohjaajalleni dosentti Maarit Karoselle sekä laitteiden ja menetelmien käytön aikana paljon auttaneelle tohtorikoulutettava Valtteri Virtaselle.

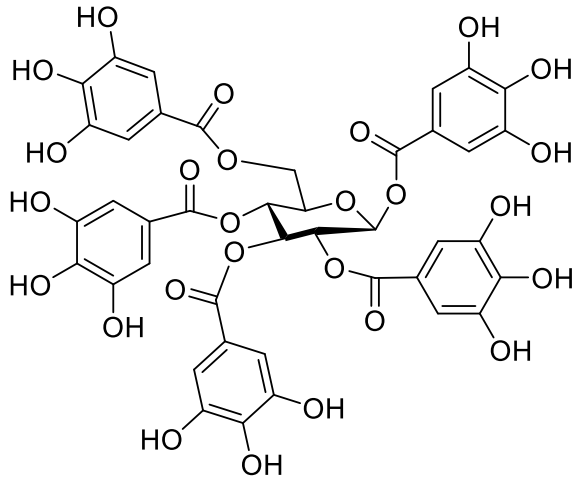
2 TANNIINIT

2.1 Tanniinit

Tanniinit ovat kasvien sekundäärisiä aineenvaihduntatuotteita sekä samalla monimutkaisin polyfenolisten yhdisteiden luokka. Monet kasvit sisältävät tanniineja, jonka takia myös tanniineilla on monia erilaisia kemiallisia rakenteita. Tanniinit suojaavat kasvia esimerkiksi patogeenejä ja kasvinsyöjiä vastaan. (Salminen & Karonen, 2011) Tanniineilla on kyky liittyä proteiineihin. Tanniinien rakenne vaikuttaa niiden kykyyn liittyä proteiineihin, mikä osaltaan selittää tanniinien ominaisuutta suojata kasvia. (Engström, 2016) Tanniinit voidaan jakaa kolmeen pääryhmään: hydrolysoituvat tanniinit, proantosyanidiinit ja floratanniinit. Hydrolysoituvat tanniinit voidaan vielä jakaa yksinkertaisiin gallushappojohdannaisiin, gallotanniineihin (GT) ja ellagitanniineihin (ET). Hydrolysoituvat tanniinit ovat estereitä, jotka rakentuvat gallushapoista (Kuva 1.) sekä polyoleista eli useamman hydroksyyliiryhmän omaavista alkoholeista. (Moilanen, 2015) (Wolf;L. Yeap;Norbert;Christa;& Kurt, 2001) Yleensä polyoloina toimii glukoosi. Pentagalloyyyliglukoosi (Kuva 2.) on esimerkiksi galloyyyliglukoosi, joka rakentuu glukoosi polyolista ja siihen liittyneistä viidestä gallushaposta.



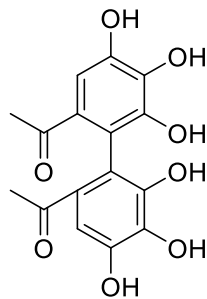
Kuva 1. Gallushappo



Kuva 2. Pentagalloyyylglukoosi

2.2 Ellagitanniinit

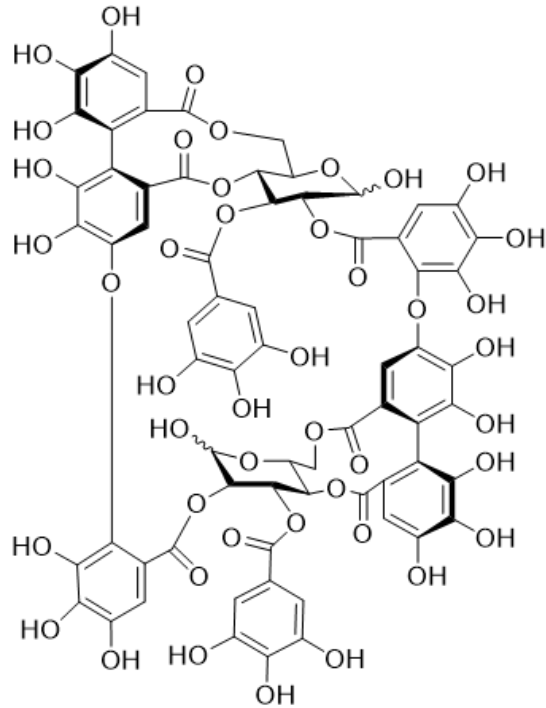
Ellagitanniinit ovat rakenteeltaan monimutkaisia yhdisteitä. ET rakentuu heksahydroksidifenoyyli (HHDP) -ryhmistä (Kuva 3.) sekä galloyyli-ryhmistä. HHDP-ryhmä syntyy, kun kaksi galloyyilia liittyvät toisiinsa hiili-hiilidoksilla. (Salminen & Karonen, 2011)



Kuva 3. Heksahydroksidifenoyyliryhmä

Oligomeeriset ellagitanniinit ovat yhdisteitä, joissa on yhteen liittyneenä kaksi tai useampi monomeerinen ellagitanniini. Monomeerit muodostavat hiili-happi- tai hiili-hiilidoksia keskenään, jolloin monomeerit muodostavat uuden yhdisteen. Hiili-happiparin muodostumistapoja on kolmenlaisia: GOG-tyyppi, DOG-tyyppi ja GOD-tyyppi. GOG-tyypin yhdistymisessä kaksi galloyyliryhmää liittyvät toisiinsa hiili-happidoksella. DOG-tyypin yhdistymisessä hapen luovuttavana ryhmänä toimii HHDP-ryhmä ja hapen vastaanottavana ryhmänä toimii galloyyliryhmä. GOD-tyypin liittymisessä puolestaan galloyyli luovuttaa hapen ja HHDP-ryhmä ottaa sen vastaan. (Baert, 2017) Esimerkiksi oenoteiini B

(Kuva 4.) on oligomeerinen ellagitanniini. Tarkemmin esitettynä se on dimeeri, joka koostuu kahdesta tellimagrandiini I -monomeeristä, jotka ovat kahden DOG-tyyppin yhdistymisen kautta muodostaneet makrosyklisen rakenteen. (Baert, 2017)

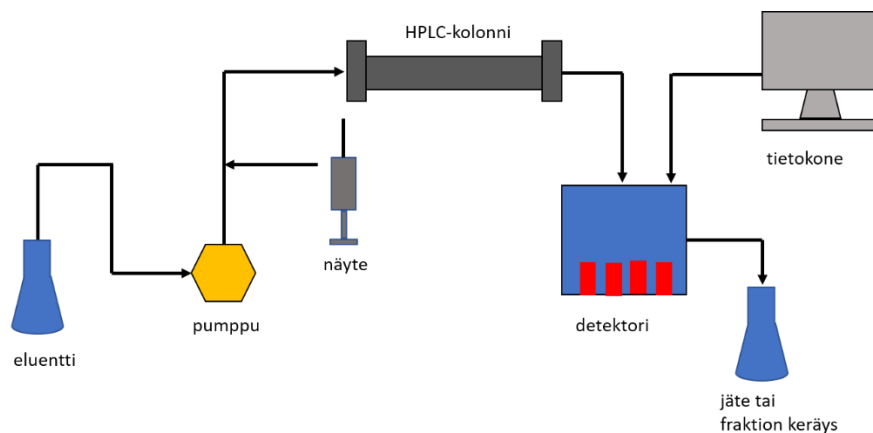


Kuva 4. Oenoteiini B

3 NESTEKROMATOGRAFIA

Kromatografia on noin sata vuotta vanha menetelmä. Sen kehitti venäläinen Mikhail Tswett 1900-luvun alussa. Hän erotti kasvien lehtien väriaineseoksesta eri komponentteja liuottamalla liuottimella väriaineseosta adsorbenssivyövään läpi. (Gurdeep R. & Madhu, 2005) (Opetushallitus, 2020). Kromatografia voidaan määritellä menetelmäksi, jolla erotetaan komponenttisekoituksesta yksittäiset komponentit. Kromatografiaa käytetään yhdisteiden erottamiseen, puhdistamiseen sekä analysointiin. Kromatografiassa ominaista on, että käsiteltävä näyte jakaantuu joko paikallaan pysyvän stationaarifaasin tai liikkuvan faasin välille. Liikkuvana faasina voidaan käyttää kaasua tai nestettä, mutta liikkuva faasi täytyy valita sen mukaan, ettei stationaarifaasi liukene siihen. Stationaarifaasi voi olla joko nestemäisessä tai kiinteässä muodossa. (Opetushallitus, 2020)

3.1 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)



Kuva 5. Kaaviokuva HPLC-laitteistosta.

HPLC-laitteisto (Kuva 5.) koostuu yleensä eluenteista ja niiden toimitusyksiköstä, pumpusta, injektorista, kolonnista, detektorista sekä ohjaus- ja tiedonkeräysjärjestelmästä. HPLC:n ideana on se, että eluentti eli ajoliuos pakotetaan korkealla paineella kulkemaan hyvin hienojakoisilla materiaaleilla pakotun pylväskolonin läpi. Materiaalien partikkelikoko on tavallisesti 5-10 µm. (Opetushallitus, 2020) (Waters, 2020) Korkean paineen ansiosta yhdisteet erottuvat nopeammin ja resoluutio on parempi. Pumppu pumpkaa eluenttia kolonin läpi, jonka jälkeen näyte menee detektorin kautta joko keräysastiaan

tai jätteeseen. Systeemissä ei saa olla ilmaa, minkä takia liuottimiin yleensä ohjataan heliumia, joka poistaa ilman. Ilma voi aiheuttaa paine-eroja kolonnissa ja pumpun toiminta häiriintyy. Lisäksi happi absorboi UV-valoa. (Gurdeep R. & Madhu, 2005) (Harris, 2010)

3.1.1 Stationaarifaasit

Nestekromatografia voidaan jakaa normaalifaasinestekromatografiaan (NP-HPLC, normal phase), käänteisfaasinestekromatografiaan (RP-HPLC, reversed phase), ioninvaihtokromatografiaan (IEX, ion exchange), hydrofiiliseen vuorovaikutuskromatografiaan (HILIC, hydrophilic interaction chromatography), kokoekskluusiokromatografiaan (SEC, size exclusion chromatography) sekä affiniteettikromatografiaan. Yleisesti käytetyin on käänteisfaasinestekromatografia, joka sopii orgaanisille yhdisteille. Stationaarifaasin ja liikkuvan faasin poolisuudet määrittävät, onko kyseessä NP-HPLC vai RP-HPLC. Jos stationaarifaasi on poolisempi kuin eluentti, on kyseessä NP-HPLC ja jos liikkuva faasi on poolisempi, on kyseessä RP-HPLC. Poolisuus ilmenee sidoselektronien jakautumisena atomien muodostamassa molekyyllisessä. Sidoselektronit eivät jakaudu tasaisesti kaikkien atomien kanssa, vaan ne pyrkivät molekyylin elektronegatiivisinta atomia kohti. (Antila;Karppinen;Leskelä;Mölsä;& Pohjakallio, 2014) Mitä poolisempi molekyyli on, sitä kovemmin se vetää puoleensa toisia poolisia yhdisteitä.

RP-HPLC:ssä kolonni materiaalina on yleensä käytetty joko C₁₈ - tai C₈ -ketjua, joka on liittyneenä silikaan. (Gurdeep R. & Madhu, 2005) Näille kolonneille optimaalinen pH-alue on kahden ja kahdeksan välillä. (Opetushallitus, 2020) Kun pooliton hiilyhdiste on stationaarifaasina ja liikkuvana faasina käytetään poolisia veden ja asetonitriliin tai veden ja metanolin sekoituksia, ei-halutut poolittomat yhdisteet eluoituvat hitaammin ja liikkuvan faasin mukana eluoituvat nopeammin halutut pooliset yhdisteet. Puskureina RP-HPLC:ssä käytetään heikkoja happoja tai emäksiä, jotka kontrolloivat näytteen ionisoitumista.

3.1.2 Preparatiivinen ja semipreparatiivinen kromatografia

Preparatiivinen kromatografia tarkoittaa kromatografialla tehtävää tietyn yhdisteen puhdistusta ja eristystä näytteestä jatkoprosesseja varten. (Waters, 2020) Laitteisto on muuten samanlainen kuin tavallisessa HPLC:ssä, mutta laitteistoon on liitetty

näytteenkeräysyksikkö. Kolonnit preparatiivisessa kromatografiassa ovat isompia kuin analyttisessä HPLC:ssä, mikä mahdollistaa isompien näyte-erien käsittelyn. (Vitha, 2016) Kuten myös analyttisessä HPLC:ssä, myös preparatiivisessa HPLC:ssä käänteisfaasikromatografia on käytetyin menetelmä. (Wellings, 2006) Preparatiivisen kromatografian onnistuminen voidaan päätellä saannon ja puhtauden perusteella. Tärkeää preparatiivisessa HPLC:ssä on, että puhdistettava näyte liukenee nesteeseen, jolloin siitä saadaan eristettyä haluttuja yhdisteitä.

Semipreparatiivinen kromatografia on käytännössä sama menetelmä, kuin preparatiivinen kromatografia, mutta näytemäärät ja käytettävä kolonni ovat pienemmät. Preparatiivisessa kromatografiassa kolonnin halkaisija on noin 25 mm ja partikkelikoko on 15-100 µm, kun taas semipreparatiivisessa kromatografiassa se on noin 10 mm ja partikkelikoko on 5-15 µm. (Waters, 2020) Näytemäärät preparatiivisessa kromatografiassa ovat maksimissaan noin 5 g kun taas semipreparatiivisessa se on noin 100 mg. Semipreparatiivisella HPLC:llä saadaan valmiiksi puhdistetusta näytteestä vielä entistä puhtaampi.

3.1.3 Detektorit

Yleisimmät detektorit, joita käytetään HPLC:ssä ovat UV-, UV/VIS-, fluoresenssi-, sähkökemialliset ja taitekerroindetektorit. (Harris, 2010) Nykyään myös massaspektrometria käytetään paljon detektorina. Yleisin näistä on UV-detektori, koska monet näytteet absorboivat UV-valoa. Yksinkertaisimmissa UV-detektoreissa käytetään elohopealamppuja, jolloin mittausaallonpituus on 254 nm. Monipuolisemmissa laitteissa aallonpituusalue voidaan valita analysoitavan näytteen perusteella ja näissä käytetään esimerkiksi deuterium-, xenon- tai volframilamppuja. Lisäksi näissä laitteissa on monokromaattori, joka jakaa valon halutuille aallonpituuksille. (Harris, 2010)

PDA-detektorit (diodirividetektorit, photodiode array detector) tallentavat spektrin jokaisesta näytteestä, kun se on eluoinut. PDA-detektorissa diodeja on useampi rivissä, joka mahdollistaa spektrofotometriset mittaukset eri aallonpituuksilla samanaikaisesti, koko näytteen spektrin ajamisen sekä korkean signaalin suhteessa taustakohinaan. (Harris, 2010)

3.2 UPLC (Ultra-Performance Liquid Chromatography)

Toimintaperiaate on UPLC:ssä sama kuin HPLC:ssä, mutta UPLC on nopeampi, herkempi ja resoluutio on parempi mitä tavallisessa HPLC:ssä. UPLC:tä käytetään tavallisesti näytteiden analysointiin. Menetelmä tuottaa vähemmän jätettä, sillä tarvittavien näytteiden ja liuottimien määrä on pienempi. (Vitha, 2016)

Menetelmästä nopeamman tekee kolonnimateriaalin pienempi partikkelikoko, kovempi käyttöpaine sekä lyhyen kolonnin käyttö. Tällöin analytyillä kuluu vähemmän aikaa kolonnissa liikkumiseen. Kolonnimateriaalin partikkelien pienellä koolla on suurin vaikutus nopeuteen sekä resoluution. Partikkelikoko on 1,7 µm luokkaa ja pienemmän partikkelikoon takia näytteellä on lyhyempi matka kolonnin läpi. (Waters, 2020)

4 MASSASPEKTROMETRIA

Massaspektrometria (MS) on keskeinen orgaanisten materiaalien tutkimusmenetelmä. (Antila;Karppinen;Leskelä;Mölsä;& Pohjakallio, 2014) MS:llä saadaan selville näytteen sisältävien ionien moolimassa sekä tietokoneen avulla saadaan massaspekttri. Korkean erotuskyvyn massaspektrometreillä voidaan lisäksi ennustaa ionille molekyylikaavaa. Massaspekttri ilmoittaa ionien massat m/z -arvoina eli massan suhde varaukseen. Jos varausaste on esimerkiksi 1, on tällöin m/z -arvo sama, kuin alkuperäinen massa. Jos varausaste onkin 2, tällöin m/z -arvo on puolet alkuperäisestä massasta. (Harris, 2010)

4.1 Toimintaperiaate

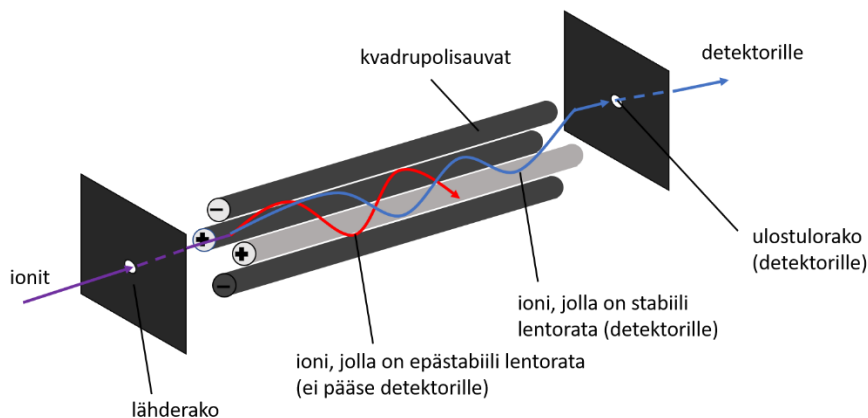
Perusideana massaspektrometrissa on, että ionit eroavat toisistaan m/z -arvon mukaan. Massaspektrometri rakentuu kolmesta osasta: ionilähteestä, massa-analysaattorista sekä detektorista. Aluksi näyte muutetaan nestemäisestä muodosta kaasumaiseen muotoon ja näytteen sisältämät molekyylit ionisoidaan ionilähteessä, jossa näytteen molekyyleistä irtoaa yksi tai useampi varautunut hiukkanen, muodostaen näin molekyyli-ioneita. Osa molekyyleistä saattaa hajota pienempiin osiin. (Opetushallitus, 2020) Sähkökentässä muodostuneet ionit kootaan yhteen ja kiihdytetään kohti sähkö- tai magneettikenttää, jossa ionit jakautuvat massansa mukaan. Ionit analysoidaan detektorilla ja tämän perusteella saadaan määritettyä m/z -arvot ioneille. Detektori siis rekisteröi ionien lukumäärän sekä massan.

4.2 Sähkösumutus-ionisaatio ESI (Electrospray Ionization)

ESI on ionisaatiotekniikka, jota usein käytetään nestemäisille ja biologisille näytteille. (Stroobant & de Hoffmann, 2007) Näyte ohjataan kapillaariin ja kapillaari on varattu tarpeeksi suurella jännitteellä, jolloin kapillaarin päähän muodostuu pintajännityksen avulla Taylorin kartio. Taylorin kartio taas mahdollistaa pisaroiden muodostumisen nesteestä normaalissa ilmanpaineessa korkean jännitteen ja sumutuskaasun avulla. Jännite-ero on 3-6 kV:a kapillaarin ja vastaelektrodin välillä. (Stroobant & de Hoffmann, 2007) Pisaroiksi muodostuneesta näytteestä halutaan poistaa liuotin, jotta jäljelle jäisi vain kaasufaasissa olevat ionit. Haihdutus tapahtuu ohjaamalla lämmitettyä inerttiä kaasua,

yleensä tyyppiä, pisaroihin tai pisarat ohjataan lämmitetyn kapillaarin läpi. (Stroobant & de Hoffmann, 2007) Haihdutuksessa varautuneesta pisarasta poistuu liuotinta ja suhteellinen varaus kasvaa. Kun sähköinen vetovoima voittaa pisaran pintajännityksen, pisara hajoo pienemmäksi ja pisaran suhteellinen varaus kasvaa. Lopulta liuotin on haihdutettu pois ja varautuneet kaasufaasi-ionit voidaan kerätä massa-analysaattorille. (Vitha, 2016) Ionit ohjataan alhaisen paineen avulla kapillaariin, josta ne kulkeutuvat sitten massa-analysaattoreille.

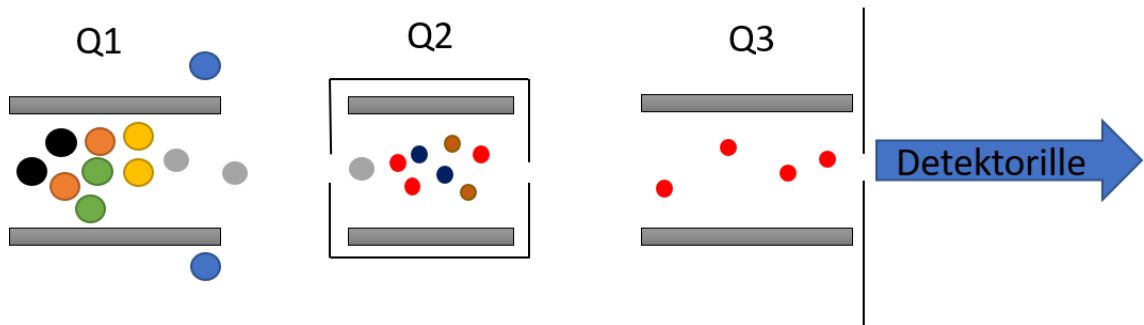
4.3 Kvadrupoli



Kuva 6. Kvadrupoli ja sen toimintaperiaate.

Kvadrupoli (Kuva 6.) on analysaattorilaitte, jonka toiminta perustuu ionien stabiiliin liikerataan oskilloivassa sähkökentässä. Ionit erottuvat niiden m/z -arvon perusteella. (Stroobant & de Hoffmann, 2007). Ennen kvadrupoliin kulkeutumista, ionit kulkeutuvat sähköisesti varautuneiden linssien läpi, jotka keräävät ionit tiiviiksi suihkuksi. Kvadrupoli rakentuu neljästä sauvasta, jotka ovat täydellisesti vastakkain. Vastakkaiset sauvat ovat yhteydessä sähköisesti toisiinsa. Vastakkaisissa sauvoissa kulkee tasavirta samaan suuntaan ja ei vastakkaisissa erisuuntaan. Tasavirran lisäksi sauvojen välillä on radiotaajuus. Virran suuntaa saadaan äkisti vaihdettua tietyllä radiotaajuudella. Radiotaajuuden vaihtamisen avulla ionit saavat spiraalimaisen liikkeen tankojen välillä ja halutut ionit pääsevät detektorille asti ja ei-halutut osuvat tankoihin. (Stroobant & de Hoffmann, 2007) Linssien jännitettä, tankojen virran voimakkuutta tai muutostaajuutta säätämällä saadaan suodatettua halutut ionit suihkusta.

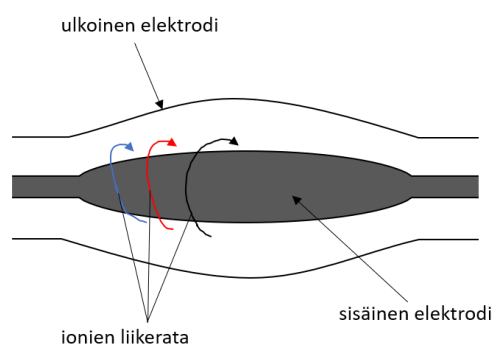
4.3.1 Kolmoiskvadrupoli



Kuva 7. Kolmoiskvadrupolin toimintaperiaate.

Kolmoiskvadrupolin (Kuva 7.) idea on se, että kolme kvadrupolia on laitettu sarjaan. Ensimmäisessä kvadrupolissa (Q1) valitaan halutut ionit ja muut ionit suodatetaan pois tai voidaan myös skannata, jolloin valitaan kaikki ionit. Toisessa kvadrupolissa (Q2) valittu ionit hajotetaan tuoteioneiksi. Toinen kvadrupoli on siis törmäyskammio. Ionit törmäävät typpi, argon tai helium kaasuun matalassa paineessa. Kolmannessa kvadrupolissa (Q3), halutut tai valitut tuoteionit analysoidaan ja ohjataan detektorille. Kolmoiskvadrupolin etu yhteen kvadrupoliin on se, että se on hyvin selektiivinen halutulle analyyttille. (Stroobant & de Hoffmann, 2007) (Antila;Karpinen;Leskelä;Mölsä;& Pohjakallio, 2014)

4.4 Orbiloukku (Orbitrap)



Kuva 8. Orbiloukku.

Orbiloukku (Kuva 8.) on korkean erotuskyvyn massa-analysaattori. Orbiloukussa on sisäinen elektrodi ja ulkoinen elektrodi, jotka sieppaavat ionit niiden väliin. Ionit oskilloivat

massa-varausasteensa mukaisesti tietyllä taajuudella orbiloukun akselin mukaisesti. Tämä aiheuttaa sähkövirran muutoksen ulkoiselle elektrodille. Sähkövirta muunnetaan massaspektriaksi Fourierin muunnoksen avulla taajuussignaaleista. (Vitha, 2016) Sisäiseen elektrodiin johdetaan muutaman kilovoltin suuruinen vaihtovirta ja ulkoisen elektrodin virta on lähellä nollaa. Orbiloukussa ei siis käytetä magneettikenttää tai radiotaajuutta. Ioneilla pitää injektoinnin jälkeen olla muutaman kiloelektronivoltin kineettinen energia, jotta ne alkavat oskilloida sisäisen elektrodin ympärillä. (Stroobant & de Hoffmann, 2007) (Harris, 2010)

Ionit pitää injektoida orbiloukkuun pieninä paketteina. Tätä varten ennen orbiloukkuun ionit ohjataan C-loukulle. C-loukku tekee esivalinnan orbiloukulle ja ohjaa ioneja törmäyskammioon ja orbiloukulle. C-loukulla ionit puristetaan sähködynaamisesti pieneen pakettiin, joka voidaan tämän jälkeen ohjata orbiloukulle. (Harris, 2010) (Stroobant & de Hoffmann, 2007) Orbiloukuissa voidaan lisäksi käyttää lineaarista ioniloukkuun (LIT, linear ion trap). LIT on kvadrupoli, joka käyttää radiotaajuutta ionin saamiseksi loukkuun ja sen päissä on jännitteelliset linssit, joilla ionit saadaan menemään edestakaisin LIT:ssä. LIT:ssä ionit kerätään yhteen, minkä jälkeen ionit kuljetetaan yhtenä eränä orbiloukkuun (Harris, 2010) (Stroobant & de Hoffmann, 2007)

4.5 Tandemmassaspektrometria MS/MS

Tandemmassaspektrometriassa ionilähteen ja detektorin välillä on kaksi massa-analysaattoria. Esimerkiksi edellä esitelty kolmoiskvadrupoli on MS/MS menetelmä. Yleisin tapa käyttää tätä menetelmää on se, että ensimmäisessä analysaattorissa eristetään tietty ioni, joka hajotetaan tuoteioneiksi ja neutraaleiksi fragmenteiksi. Toisen analysaattorin tehtävänä on analysoida tuoteionit. Tandemmassaspektrometrialla on monta käyttökohdetta ja sitä voidaan käyttää esimerkiksi fragmentointimekanismin tutkimiseen sekä rakenteiden havainnollistamiseen. (Stroobant & de Hoffmann, 2007)

4.6 LC-MS

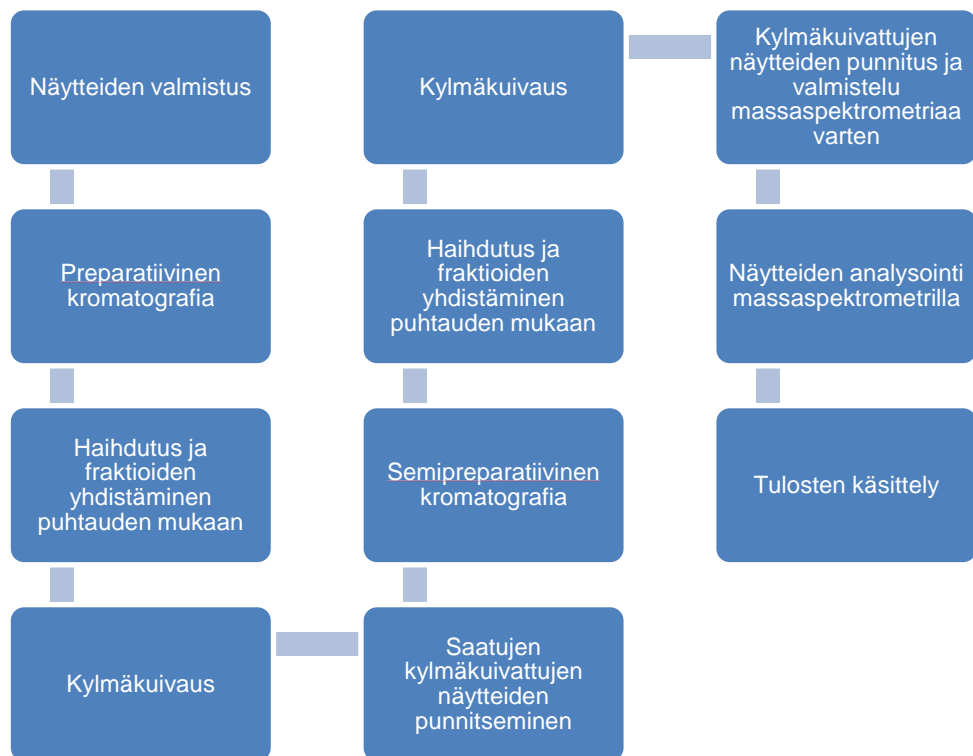
LC-MS tarkoittaa sitä, että nestekromatografi on kytketty massadetektoriin. Tätä tekniikkaa käytetään monimutkaisten yhdisteseosten analysointiin. Nestekromatografialla saadaan näytteen sisältämistä monista yhdisteistä eroteltua haluttu yhdiste ja massaspektrometrialla saadaan analysoitua yhdisteen rakenne ja massa. (Stroobant & de Hoffmann,

2007) Menetelmän avulla näytteelle saadaan sekä kromatogrammi että yksittäisille yhdisteille massaspektri.

5 KÄYTÄNNÖN OSUUS

Käytännön osuus alkoi sillä, että punnittiin maitohorsmasta valmistettuja ja valmiiksi kuivattuja fraktioita. Näytteet piti punnita ja jakaa preparatiivista kromatografiaa varten noin 0,5 g:n osiin, jotta näytteen konsentraatio ja näytetilavuus pysyisivät tarpeeksi pienenä kromatografiavaiheessa. Näytteitä tuli preparatiivista kromatografiaa varten yhteensä 8 kappaletta eli noin 4 g.

Preparatiivisessa kromatografiassa käytettiin 1 %:sta muurahaishappoa ja semipreparatiivisessa 0,1 %:sta muurahaishappoa eluenttina. Nämä valmistettiin itse 99-100 %:sesta muurahaishaposta. Lisäksi preparatiivisessa puhdistuksessa käytettiin valmista HPLC-laatuista metanolia sekä semipreparatiivisessa HPLC-laatuista asetonitriiliä. Kuva 9 on esitelty koko opinnäytetyön kulku. Alussa oli näytteiden käsittelyt ja puhdistukset, jonka jälkeen tehtiin analyysit ja käsiteltiin tulokset.



Kuva 9. Käytännön työ vaiheet.

5.1 Näytteiden esikäsittely

Kasvit oli kerätty ja esikäsitelty valmiiksi ennen opinnäytetyöt. Kasvit oli liuotettu asetonissa 48 tuntia 4 °C:een lämpötilassa. Tämän jälkeen nestefaasi oli poistettu ja tilalle oli vaihdettu saman verran asetoni-vesi liuosta suhteessa 4:1 (v/v). Näytteet pidettiin näin 8 viikkoa 4 °C:ssa, jonka jälkeen saatu uute suodatettiin suodatinpaperin läpi ja asetoni haihdutettiin alipaineessa. Saatu vesifaasi jäädytettiin ja kylmäkuivattiin. Seuraavaksi kasviuute sekoitettiin Sephadex LH-20-materiaaliin vedessä, jolloin muodostui liete. Liete suodatettiin Büchner-suppilossa ja jäljelle jäänyt Sephadex LH-20-materiaali suspensioitiin veteen, veden ja metanolin liuokseen sekä veden ja asetonin liuokseen. Aina uuden liuottimen lisäyksen jälkeen liuosta sekoitettiin ja annettiin tämän jälkeen vuorovaikuttaa. Tämän jälkeen materiaali suodatettiin ja käytettiin uutta liuotinta. Fraktioita kerättiin joka näytteen liuotuksesta, joten näin saatiin eri fraktioita, kun eri liuottimia oli käytetty. Näistä analysoitiin UPLC-DAD-ESI-MS/MS-menetelmällä ellagitanniinit ja niiden määrä sekä valittiin ellagitanniinirikkaat fraktiot jatkokäsittelyä varten. Fraktioista haihdutettiin asetoni pois, jäädytettiin ja kylmäkuivattiin. Tämän jälkeen näytteet ladattiin lasikoloniin, jossa oli Sephadex LH-20-materiaali. Näytteet laimennettiin ultrapuhtaalla vedellä ja eluoiitiin kolonnista. Tämän jälkeen vielä toistettiin analysointi UPLC-DAD-ESI-MS/MS-menetelmällä sekä kylmäkuivattiin näytteet edelliseen tapaan. Tämä oli tehty ennen opinnäytetyön aloittamista ja seuraavat menetelmät ja toimenpiteet on tehty tässä opinnäytetyössä. (Baert, 2017)

5.2 Preparatiivinen kromatografia

5.2.1 Näytteiden valmistelu

Ennen fraktiointia näytteet piti laimentaa ja suodattaa. Näytteet liuotettiin 2,5 ml:aan ultrapuhtaasta vettä. Näytteitä käytettiin ravistelijassa ennen suodatusta. Tällä pyrittiin saamaan liuoksesta mahdollisimman homogeeninen. Maksimi näytetilavuus oli 5 ml, sillä näytesilmukan tilavuus oli 5 ml. Suodatukseen käytettiin 0,2 µm:n huokoskoon kertakäyttöistä PTFE-suodatinta ja yhden millilitran kertakäyttöistä ruiskua.

5.2.2 Preparatiivinen puhdistus

Preparatiivisia puhdistuksia tehtiin yhteensä kahdeksan. Puhdistukset tehtiin joka kerta samalla ohjelmalla ja menetelmä toistettiin samalla tavalla joka kerta. Laitteistona käytettiin Waters 2535 Quaternary Gradient Module -nestekromatografia yhdistettynä Waters 2998 diodirividetektoriin. Näytteet kerättiin Waters Fraction Collector III -automaattikerääjällä. Ennen näytteen injektointia laitteeseen laitteistosta poistettiin ilma, linjastot huuhdeltiin ja kolonni tasapainotettiin. Tasapainotettaessa huolehdittiin siitä, että paine nostetaan tasaisesti virtausta nostamalla asteittain haluttuun virtausnopeuteen 8 ml/min. Kolonnin pituus oli 30 cm ja halkaisija 2,5 cm. Kolonni oli pakattu RP-18-materiaalilla, jonka partikkelikoko oli 40-63 µm.

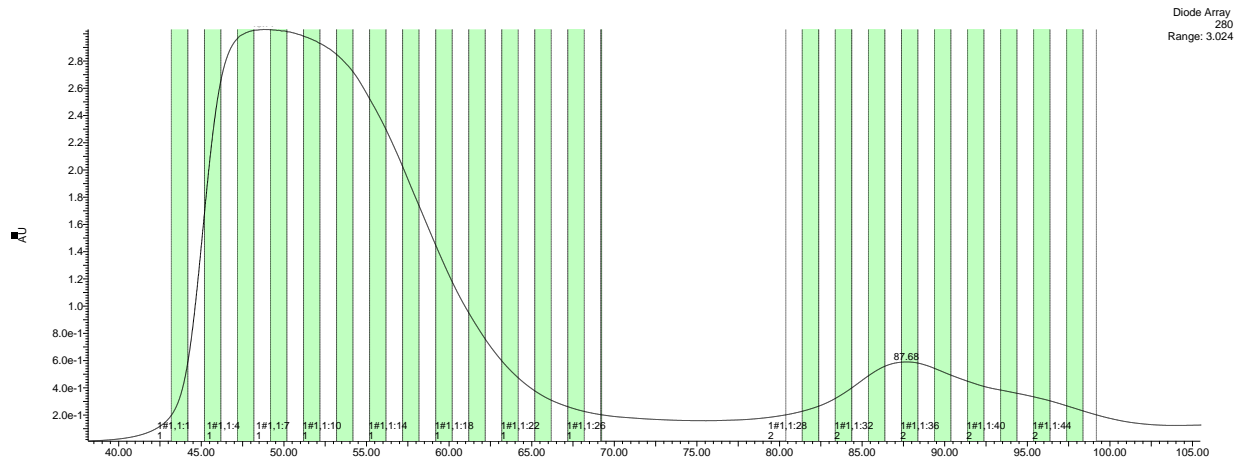
Näyte injektointiin 10 millilitran ruiskulla näytesilmukkaan. Ennen injektointia näytesilmukka huuhdeltiin metanolilla ja ultrapuhtaalla vedellä, jolloin vältettiin mahdolliset laitteistoon jääneet kontaminantit. Näyte injektointiin näytesilmukkaan silmukan ollessa latausasennossa. Latausasennossa pumppu pumppaa liikkuvan faasin suoraan kolonniin. Kun näyte oli ladattu näytesilmukkaan, käännettiin näytesilmukka injektioasentoon, jolloin liikkuva faasi kulkeutuu näytesilmukan läpi ja työntää näytteen kolonniin. Ajossa käytettiin lineaarista gradienttia näytteiden eluimiseen. (Taulukko 1.) Eluenteina käytettiin metanolia (A) ja 1 %:sta muurahaishappoa (B).

Taulukko 1. Preparatiivisen puhdistuksen gradientti, jossa A tarkoittaa metanolia.

aika (min)	A-eluentin osuus (%)
0-5	0
5-180	0-40
180-220	40-60
220-240	60-80

Tämän jälkeen kolonni huuhdeltiin ja tasapainotettiin tunnin ajan. Yhteensä puhdistus kesti 5 tuntia. PDA-detektori toimi 190-500 nm:n aallonpituusalueella ja näytteet detektoitiin 280 nm:n aallonpituudella, sillä ellagitanniinit absorboivat tällä aallonpituudella UV-valoa ja erottuvat näin parhaiten UV-spektristä. Näytteen keräämisen aloittamiseen käytettiin threshold-arvoa, eli kun näytteen absorbanssi ylitti asetetun raja-arvon, laite alkoi automaattisesti keräämään 8 ml:n fraktioita 10 ml:n koeputkiin. Koeputket laitettiin yöksi

kylmiöön sen jälkeen, kun valituista koeputkista oli otettu näytteet UPLC-DAD-MS-analyysiä varten. Näytteen eluotumista seurattiin kromatogrammista (Kuva 10.), jossa y-akselilla on absorbanssi ja x-akselilla on retentioaika.



Kuva 10. Preparatiivisen HPLC:n kromatogrammi aallonpituudella 280 nm.

5.2.3 UPLC-DAD-MS-analyysit

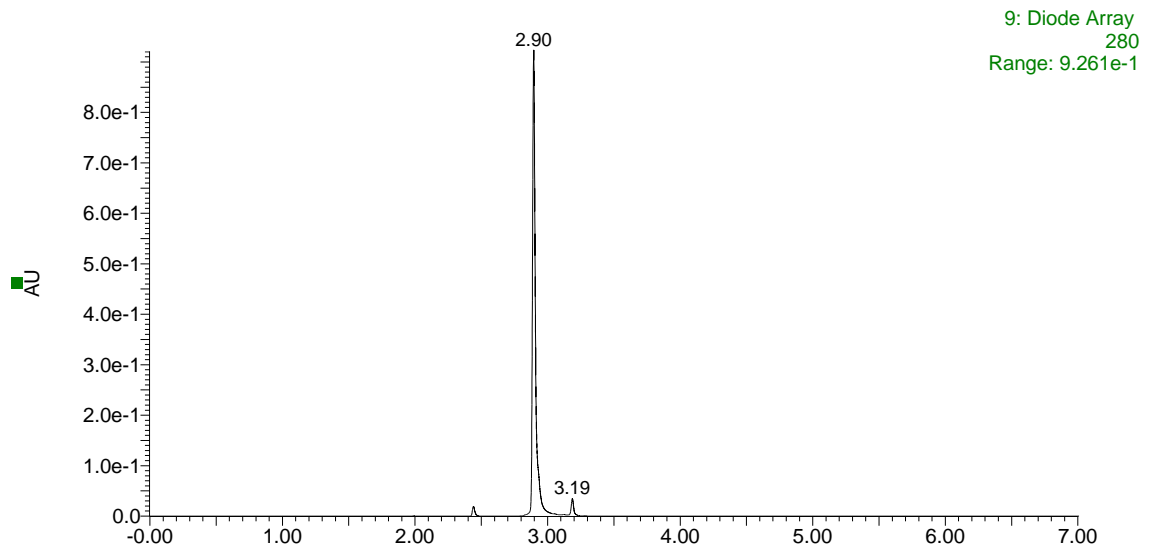
Preparatiivisella kromatografialla puhdistettujen näytteiden karakterisointiin ja puhtauden analysointiin käytettiin UPLC-DAD-MS-menetelmää. Laitteena käytettiin Waters Acquity UPLC-laitteistoa, joka oli yhdistetty Waters Xevo TQ -kolmoiskvadrupoli-massaspektrometriin. Laitteessa käytettiin Waters Acquity UPLC BEH Phenyl 100 mm x 2,1 mm -kolonnia, jossa partikkelikoko oli 1,7 μm . Näytteistä tarkasteltiin kromatogrammeja aallonpituudella 280 nm (Kuva 11.) ja piikkien perusteella näytteet jaettiin eriin. Laitte analysoi yhdisteille myös massaspektrit, mutta tätä ominaisuutta ei käytetty fraktioiden yhdistämiseen. Samanlaisen profiilin omaavat fraktiot yhdistettiin samaan erään, jolloin saatiin rajattua puhtaat näytteet, epäpuhtaammat ja kaikkein epäpuhtaimmat näytteet. Ensimmäisen analyysin jälkeen seuraavat analysoitavat näytteet valittiin edellisten analyysien ja preparatiivisesta puhdistuksesta saadun kromatogrammin perusteella.

UPLC-DAD-MS-laitteessa käytettiin eluentin virtausnopeutena 0,5 ml/min ja eluentti koostui asetoniitrilistä (A) ja 0,1 % muurahaishaposta (B). Ennen analysointia kolonnin paineen annettiin tasaantua, kunnes paineen vaihtelun delta-arvo oli 1. Aloitettaessa A:n osuus oli 0,1 % ja B:n 99,9 %. Ajossa käytettiin lineaarista gradienttia Taulukko 2 mukaisesti.

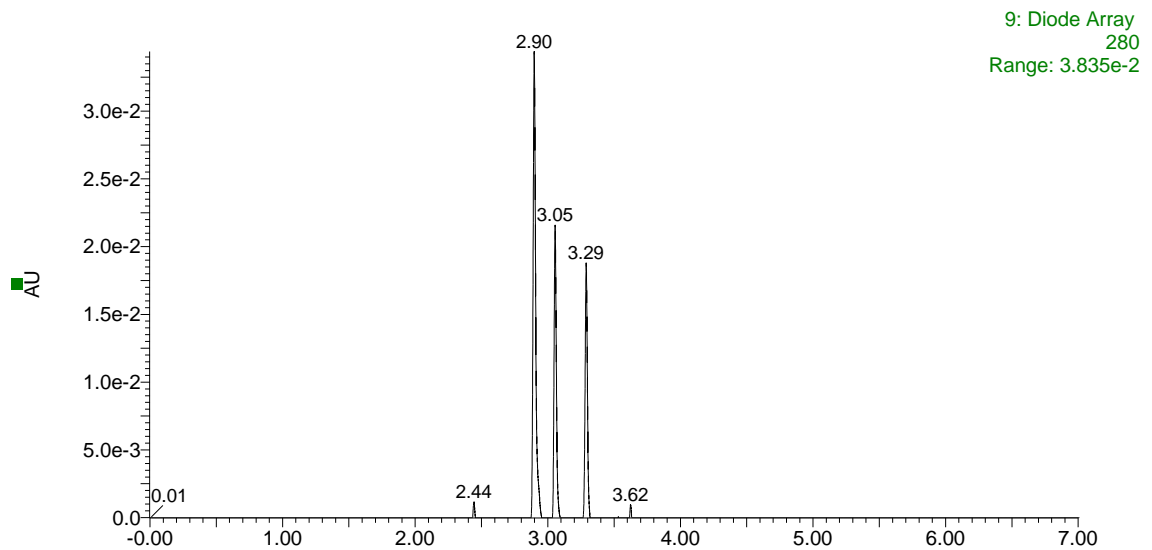
Taulukko 2. UPLC-DAD-MS-analyysin gradientti, jossa A tarkoittaa asetonitriliä.

aika (min)	A-eluentin osuus (%)
0-0,5	0,1
0,5-5	0,1-30
5-6	30-35

Kuuden minuutin jälkeen oli kolonnin pesu ja tasapainotus. Laite analysoi UV- ja massaspektrit näytteistä ja dataa kerättiin aikavälillä 0-6 minuuttia. Massa-analyyseissa käytettiin negatiivista ionisaatiota. Sähkösumutus-ionisaatiossa käytettiin kapillaarijännitettä 3,4 kV, pois lukien viimeisessä analyysissä, jolloin kapillaarijännite täytyi laskea 1,8 kilovoltiin. Desolvaatiolämpötila oli 650 °C, ionilähteen lämpötila 150 °C sekä kartio- ja desolvaatiokaasuina käytettiin typpeä, jonka virtausnopeudet olivat 100 ja 1000 l/h, tässä järjestyksessä. Näytteet analysoitiin massa-alueella m/z 150 - 2000 ja UV-analyyseissä käytettiin aallonpituusalueena 190 - 500 nm, josta ellagitanniini detektoitiin aallonpituudella 280 nm. Yhden näytteen analyysi kesti 9,5 minuuttia. Seuraavissa kuvissa (Kuva 11. ja Kuva 12.) on UPLC-DAD-MS-analyyseistä saadut puhtas näyte (Kuva 11.) ja epäpuhtauksia sisältävä näyte (Kuva 12.)



Kuva 11. UPLC-DAD-MS-menetelmällä preparatiivisesta puhdistuksesta analysoitu puhtas näyte aallonpituudella 280 nm.



Kuva 12. UPLC-DAD-MS-menetelmällä preparatiivisesta puhdistuksesta analysoitu näyte, jossa on huomattavasti epäpuhtautta mukana aallonpituudella 280 nm.

Ennen näytteiden analysointia UPLC-DAD-MS-menetelmällä, näytteitä laimennettiin. Preparatiivisen kromatogrammin (Kuva 10.) avulla valittiin analysoitavat näytteet. Kromatogrammista pyrittiin päättämään, missä kohtaa olisi muutoskohta, eli näytteessä lisääntyisi epäpuhtaus huomattavasti. Kromatogrammissa yksi pylväs vastaa yhtä fraktiota. Kromatogrammin huippukohtaan näytteet laimennettiin ultrapuhdalla vedellä 1/40 (v/v) -laimennoksella ja muut 1/20 (v/v). Sellaisenaan näytteet olisivat olleet liian väkeviä ja yli mittausalueen. Laimennokset 1/40 valmistettiin siten, että ensin pipetoitiin 2 ml:n eppendorf-putkeen 780 µl ultrapuhdasta vettä ja 20 µl näytettä, minkä jälkeen näytteet laitettiin ravistelijaan noin 5 minuutiksi, jotta näyte olisi mahdollisimman homogeenistä. Laimennokset 1/20 valmistettiin siten, että ensin pipetoitiin 2 ml:n eppendorf-putkeen 475 µl ultrapuhdasta vettä ja tämän jälkeen näytettä 25 µl. Näytteet pidettiin ravistelijassa 5 minuuttia.

Laimennettuja näytteitä pipetoitiin 100 µl lasiputkeen, josta laite otti tarvittavat näytteet UPLC-DAD-MS-analyysiä varten. Näytteet tehtiin aina samana päivänä preparatiivisen puhdistuksen kanssa, jolloin säästettiin suodattamiseen kuluva aika, koska näytteet oli jo suodatettu preparatiivista puhdistusta varten.

5.2.4 Fraktioiden haihdutus ja kylmäkuivaus

Preparatiivista kromatografiaa seuraavana päivänä fraktiot otettiin pois kylmiöstä ja aloitettiin metanolin haihduttaminen pois näytteistä. Metanoli estää näytettä jäätymästä pakastimessa, mikä puolestaan estää näytteiden kylmäkuivauksen.

Yön yli analysoidut UPLC-DAD-tulokset tulkittiin ja näiden perusteella fraktiot yhdistettiin sekä jaettiin haihdutuseriin ja haihdutettiin pyöröhaihduttimessa. Koeputkista kaadettiin näytteet haihdutuspulloon ja koeputket huuhdeltiin ultrapuhdalla vedellä siten, että ensimmäiseen koeputkeen laitettiin ultrapuhdasta vettä ja siitä kaadettiin seuraavaan koeputkeen ja erän viimeisestä koeputkesta kaadettiin haihdutuspulloon. Näin pyrittiin varmistamaan, että mahdollisimman vähän näytettä menisi hukkaan. Lämmitys säädettiin 40 °C:een pyöröhaihduttimessa. Haihdutus kesti noin tunnin, mutta pääasia oli, että kaikki metanoli oli haihtunut.

Haihdutuksen jälkeen näytteet laitettiin 100 ml:n dekanttereihin. Haihdutuspullot huuhdeltiin joka erän välillä, jotta vältettiin seuraavien erien kontaminoituminen. Näytteet peitettiin foliolla, joihin tehtiin reiät ja sen jälkeen näytteet laitettiin pakastimeen.

Kun näytteet olivat jäätyneet, siirrettiin ne kylmäkuivaajaan. Kylmäkuivaus kesti päivästä kolmeen päivään. Näytteet pyrittiin laittamaan kylmäkuivaukseen viikonlopuksi, mutta välillä osa näytteistä ei ollut täysin kuivunut, minkä takia näytteitä kuivattiin vielä lisää. Kylmäkuivaajan kammiossa oli – 92 °C ja paine oli noin 0,25 mbar.

Kylmäkuivauksen jälkeen näytteet jaettiin noin 80 mg:n eriin 10 ml:n lasipulloihin semipreparatiivista kromatografiaa varten. Koska kaikkea näytteestä ei saatu kaavittua dekantterista, dekantterit huuhdeltiin 2 ml:lla ultrapuhdasta vettä, joka pipetoitiin tämän jälkeen 2 ml:n eppendorf-putkiin. Nämä eppendorf-putket laitettiin pakastimeen jäätymään, minkä jälkeen ne kylmäkuivattiin. Kylmäkuivatut näytteet punnittiin ja yhdistettiin samaa näytettä sisältäviin 10 ml:n lasipulloihin. Tällä varmistettiin, että näytettä menisi mahdollisimman vähän hukkaan. Näytteet säilytettiin pakastimessa ennen seuraavaa käsittelyä.

5.3 Semipreparatiivinen kromatografia

Semipreparatiivisen kromatografian osuus oli hyvin samanlainen, kuin preparatiivinen kromatografia. Semipreparatiiviset fraktioinnit tehtiin sen takia, että saatiin

mahdollisimman puhdasta näytettä. Yhteensä semipreparatiivisia puhdistuksia tehtiin 28. Koska semipreparatiivinen fraktiointi kesti huomattavasti vähemmän aikaa, kuin preparatiivinen fraktiointi, tehtiin niitä peräkkäin kaksi tai kolme ja pyrittiin siihen, että puhdistettavat fraktiot olisivat samasta preparatiivisesta puhdistuksesta, jolloin ne olisivat rinnakkaiset ja UPLC-DAD-MS-analysointiin tehtäviä näytteitä ei tarvitsisi tehdä jokaisesta näytteestä.

5.3.1 Näytteiden valmistelu

Ennen puhdistusta näytteet otettiin pakastamisesta pois ja liuotettiin 2,5 ml:aan ultra-puhdasta vettä, sekoitettiin ravistelijassa ja suodatettiin 0,2 µm:n huokoskoon kertakäyttöisen PTFE-suodattimen läpi. Tämän jälkeen näytteet olivat valmiit puhdistusta varten.

5.3.2 Käytetyt olosuhteet ja gradientti

Valmistelut tehtiin samalla tavalla kuin preparatiivisessa kromatografiassa ja samaa laitteistoa käyttäen. Virtausnopeus oli myös 8 ml/min. Erona preparatiiviseen kromatografiassa oli se, että näytteitä injektoitiin useampi saman kerran aikana, sillä käytetty kolonni oli pienempi ja näytettä injektoitiin vähemmän. Gradientti oli semipreparatiivisessa kromatografiassa nopeampi. Kolonnina käytettiin Phenomenexin Gemini C18, jonka pituus oli 150 mm ja halkaisija 21,2 mm. Partikkelikoko oli 10 µm.

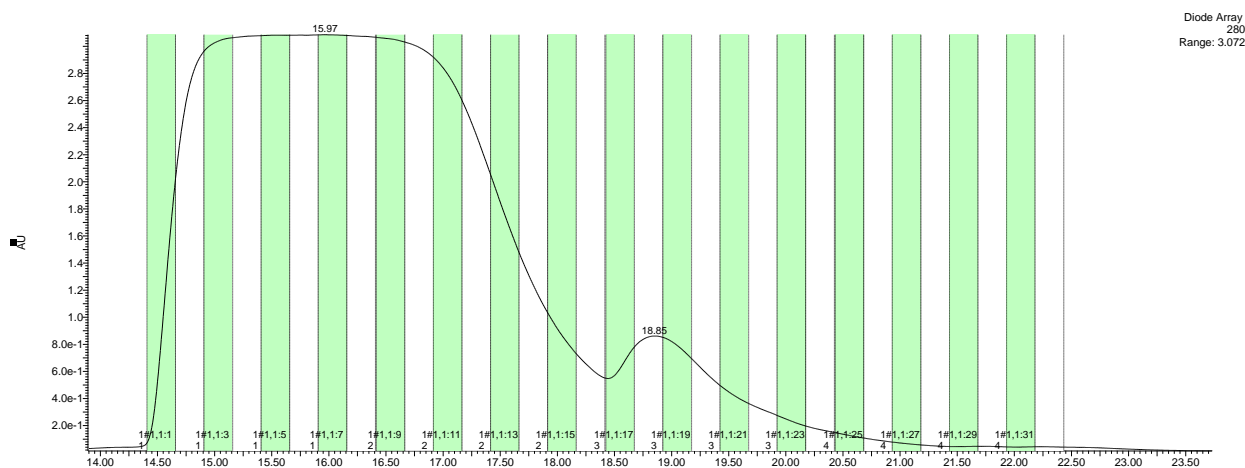
Kun edellinen näyte oli fraktioitu, näytesilmukka käännettiin taas latausasentoon ja seuraava näyte injektoitiin sekä aloitettiin uusi fraktiointi. Näytesilmukkaa ei huuhdeltu saman päivän eri ajojen välillä, mutta päivän päätteeksi tehtiin tarvittavat näytesilmukan huuhtelut. Threshold-raja-arvoa käytettiin taas näytteiden keräämisen aloittamiseen ja fraktiot kerättiin automaattisesti 2 ml:n eppendorf-putkiin.

Poiketen preparatiivisesta analyysistä, semipreparatiivisessa analyysissä käytettiin eluenteina asetonitriliä (A) sekä 0,1 %:sta muurahaishappoa (B). Analyyseissä käytettiin Taulukko 3 mukaista lineaarista gradienttia fraktioiden eluoimiseen.

Taulukko 3. Semipreparatiivisen puhdistuksen gradientti, jossa A tarkoittaa asetonitriliä.

aika (min)	A-eluentin osuus (%)
0-5	10
5-51	10-40
51-55	40-70

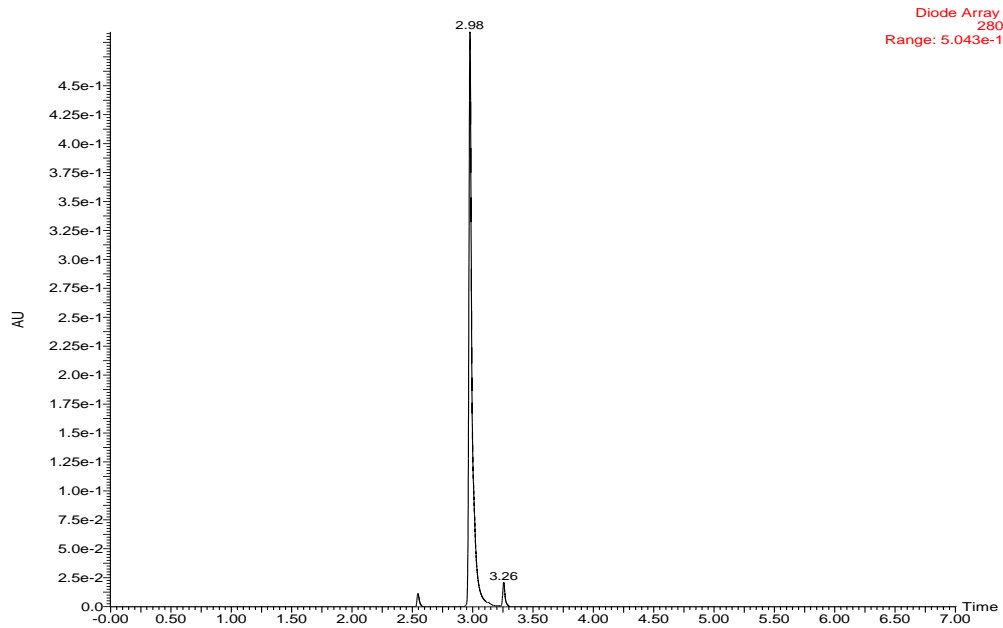
Tämän jälkeen oli kolonnin huuhtelu ja tasapainotus, joka kesti tunnin. Yhteensä yksi semipreparatiivinen fraktiointi kesti kaksi tuntia. PDA-detektori toimi 190-500 nm:n aallonpituusalueella ja näytteet detektoitiin 280 nm:n aallonpituudella.



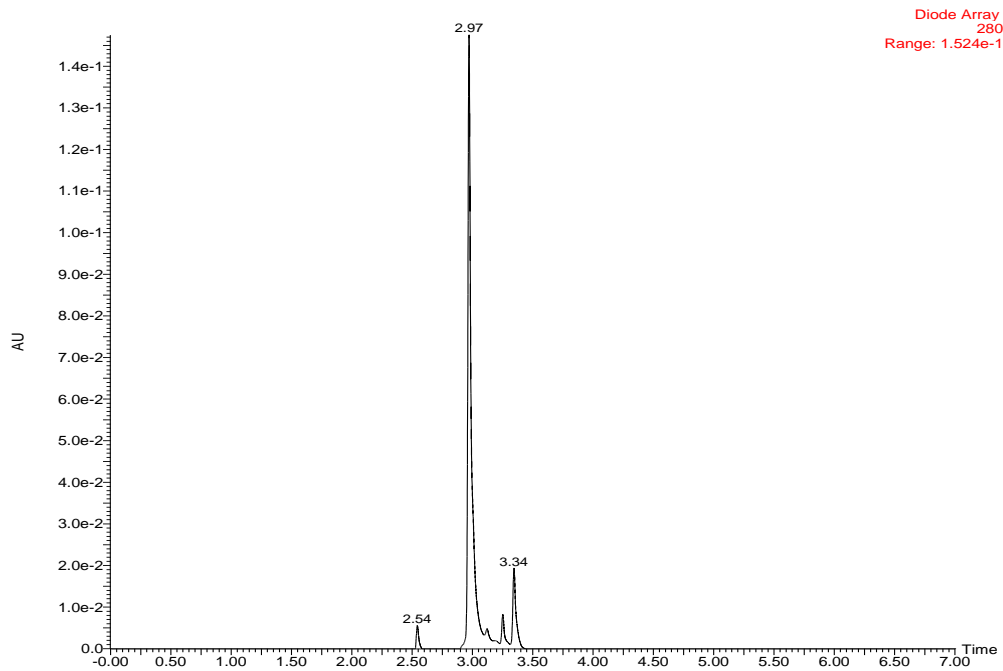
Kuva 13. Semipreparatiivisen HPLC:n kromatogrammi aallonpituudella 280 nm.

5.3.3 UPLC-DAD-MS-analyysit

Näytteiden keräämisen jälkeen ne valmisteltiin saman tien UPLC-DAD-MS-analyysiä varten, jotta puhtaat fraktiot saataisiin yhdistettyä yhdeksi näytteeksi, epäpuhtaat yhdeksi ja kaikkein epäpuhtaimmat yhdeksi näytteeksi. UPLC-DAD-MS-analyysissä käytettiin samaa kolonnia ja samaa ohjelmaa kuin preparatiivisille näytteille. Myös laite oli sama. Analysoitavat näytteet valittiin taas sen mukaan, kun arveltiin kromatogrammissa (Kuva 13.) olevan muutoskohta puhtaudessa. Ensimmäisestä semipreparatiivisesta näytteestä analysoitiin joka toinen fraktio. Seuraaviin analyysihin valittiin analysoitavat näytteet semipreparatiivisesta analyysistä saadun kromatogrammin sekä edellisten analyysien kromatogrammien sekä UPLC-DAD-MS-analyysien perusteella. Kuva 14 on puhtaan näytteen kromatogrammi ja Kuva 15 on epäpuhtaan näytteen kromatogrammi.



Kuva 14. UPLC-DAD-MS-menetelmällä analysoitu semipreparatiivisen puhdistuksen puhdas näyte aallonpituudella 280 nm.



Kuva 15. UPLC-DAD-MS-menetelmällä analysoitu semipreparatiivisen puhdistuksen näyte aallonpituudella 280 nm, jossa on epäpuhtautta mukana.

Analysoitavat näytteet valmistettiin siten, että piikin huipun ajankohtana erottuneet näytteet laimennettiin ultrapuhdalla vedellä 1/20-laimennokseen ja muut näytteet analysoitiin

laimentamattomina. Laimennos tehtiin samalla tavalla kuin preparatiivisen HPLC:n näytteille. Kun analyysinäytteet oli tehty, laitettiin kerätyt fraktiot yöksi kylmiöön. Analyyseissä käytettiin 100 µl laimennettuja näytteitä ja 50 µl laimentamattomia näytteitä.

5.3.4 Fraktioiden haihdutus ja kylmäkuivaus

Seuraavana päivänä fraktiota haihdutettiin eppendorf-kondensaattorilla 2 tuntia ilman lämmitystä vakuuissa. Tämän jälkeen fraktiot yhdistettiin UPLC-DAD-MS-analyyseihin perusteella ja laitettiin riippuen lopullisesta tilavuudesta joko 100 ml:n tai 50 ml:n dekanttereihin. Dekantterit peitettiin foliolla, johon tehtiin reikiä ja ne laitettiin pakastimeen jäätymään. Jäätyneen jälkeen näytteet kylmäkuivattiin samalla tavalla kuin preparatiivisen puhdistuksen näytteet.

Kylmäkuivatut näytteet punnittiin ja laitettiin uusiin 10 ml:n lasipulloihin jatkotutkimuksia varten. Dekanttereihin jäänyt näyte, jota ei saatu kaavittua pois, huuhdeltiin 2 ml:lla ultrapuhdasta vedellä ja pipetoitiin 2 ml:n eppendorf-putkiin, minkä jälkeen ne pakastettiin ja kylmäkuivattiin. Ennen kuin näytteet punnittiin lasipulloissa olevien näytteiden joukkoon, näistä eppendorf-putkissa olevista näytteistä otettiin hyvin vähän näytettä, joka liuotettiin yhteen millilitraan ultrapuhdasta vettä. Tämän jälkeen näytteet ravisteltiin ravistelijalla, suodatettiin 0,2 µm:n PTFE-suodattimen läpi ja analysoitiin UPLC-DAD-MS-menetelmällä näytteiden puhtaus. Loput eppendorf-putkiin jääneet näytteet punnittiin ja yhdistettiin näytettä vastaavaan 10 ml:n lasipulloon.

5.4 Massaspektrometria

Massaspektrometriset mittaukset tehtiin orbiloukku-laitteella. Analysoitaviksi näytteiksi valittiin yksi puhdas näyte. Analysointi tehtiin suorasyötöllä. Parametrejä muutettiin analysoinnin aikana kokeilumielessä, kun haettiin sopivia parametrejä mahdollisimman tarkan tuloksen saamiseksi. Näytteet piti laimentaa ensin 1 mg/ml, minkä jälkeen näytteitä laimennettiin laimennossuhteessa 1/10 (v/v), kunnes saavutettiin pitoisuus 1 µg/ml. Ensin punnittiin noin 1 mg näytettä eppendorf-putkeen, jolloin se laimennettiin yhteen millilitraan ultrapuhdasta vettä. Tämän jälkeen näytettä ravisteltiin ravistelijassa, minkä jälkeen näytettä pipetoitiin 100 µl 900 µl:aan ultrapuhdasta vettä. Tämän jälkeen näytettä ravisteltiin ja tehtiin uusi laimennos. Laimennoksia tehtiin varmuuden vuoksi 5 kappaletta, jotta saataisiin sopivan vahvuinen näyte analysoitavaksi.

Laimentamisen jälkeen näyte suodatettiin ja laitettiin ruiskuun, josta se sitten injektoidiin massaspektrometriin ruiskupumpulla. Analyysin aikana vaihdeltiin parametreja, jotta saatiin mahdollisimman hyvin ionit näkyviin.

Orbiloukulle asetettiin tietokoneella seuraavat ionisaatio-olosuhteet. Skannaustyyppinä käytettiin täysskannausta (Full MS) ja alueeksi valittiin ionit m/z -arvoilla 150 – 2000. Resoluutio oli 35 000 ja polaarisuus oli negatiivinen, eli skannattiin negatiivisia ioneja. AGC (automatic gain control) oli asetettu 1×10^6 ja mikroskannauksia oli 3. Sähkösumutusionisaatiossa käytettiin 3 kilovoltin kapillaarijännitettä ja kapillaarin lämpötila oli 380 °C. S-linssien RF-taso oli 60. Verhokaasun (sheath gas) virtaus oli 60 ja apukaasun 20.

MS/MS-analyyseissä käytettiin AIF (all ion fragmentation). AIF asetettiin sen mukaan, että ei annettu valikoida kaikkia ioneja, vaan valittiin haluttu ioni tarpeeksi pienellä alueella. Kvadrupoli hoitaa valinnan ja tämän jälkeen laitteisto valitsi itse lähtöionin mukaan kerättävän m/z -alueen. Ionilähteessä tapahtuvaan pilkkoutumiseen käytettiin energioita (SID) 25 eV ja 50 eV. Törmäyskammiossa käytettiin 10-14 eV.

6 TULOKSET

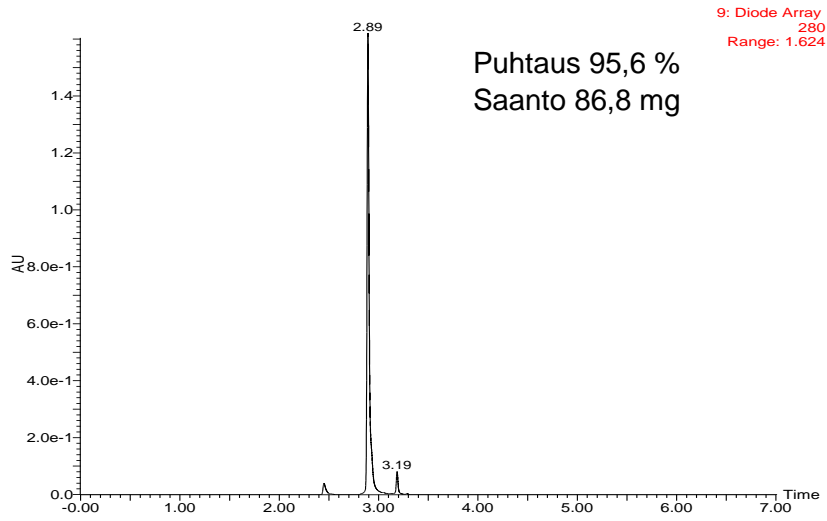
6.1 Puhtauden analysointi

Näytteiden puhtaus analysoitiin TargetLynx- ohjelmalla. Ohjelma integroi UPLC-DAD-analyysista saadut piikit ja antaa tälle pinta-alan. Integroitujen piikkien pinta-alojen avulla lasketaan näytteen puhtausprosentti Kaava 1 mukaan. Kaavassa pääpiikki on oenoteiini B:n isomeeri, jota esiintyy noin 95 %, jälkimmäinen piikki on toinen isomeeri, jota esiintyy noin 5 %. Ensimmäinen piikki viittaa pieneen piikkiin, jota esiintyy puhtaan oenoteiini B:n kromatogrammissa ennen oenoteiini B:n pääpiikkiä. (Karonen;Parker;Agrawal;& Salmi-
nen, 2010)

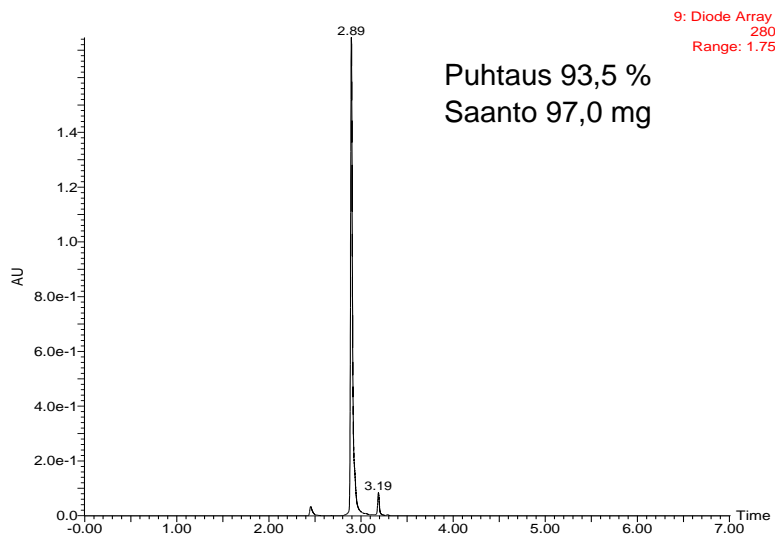
$$P - \% = \frac{A_{\text{pääpiikki}} + A_{\text{jälkimmäinen piikki}} + A_{\text{ensimmäinen piikki}}}{A_{\text{koko alueen pinta-ala}}} \cdot 100 \%$$

Kaava 1. Puhtausprosentin laskeminen.

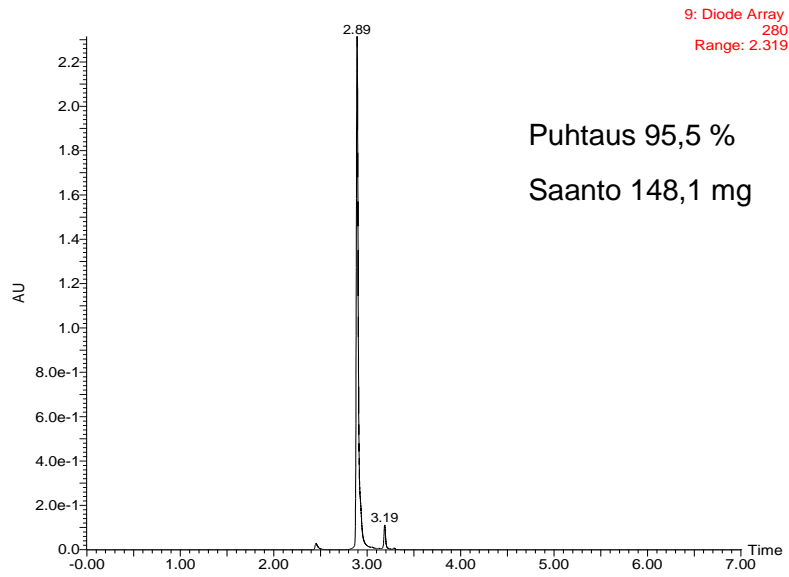
Seuraaviin kromatogrammeihin (Kuva 16.-Kuva 23.) on merkitty piikkien perusteella laskettu puhtausprosentti sekä lisätty lopullinen punnittu saanto kyseiselle näytteelle. Puhdistetun oenoteiini B:n puhtaus vaihtelee laskujen mukaan 93 %:n ja 95 %:n välillä. Kromatogrammeja tulkittaessa ei havaita epäpuhtauksien piikkejä, joten voidaan todeta kromatogrammien perusteella, että oenoteiini B on hyvin puhdasta. Kromatogrammeja tarkennettaessa pohjaviivaan huomataan, että pohjaviiva nousee ja havaitaan kohinaa. Tämä luultavasti aiheuttaa virhettä integroinnissa, jolloin laskettaessa piikkien pinta-aloja ja niiden suhdetta kokonaispinta-alaan virhe kasvaa ja aiheuttaa puhtausprosentin laskun.



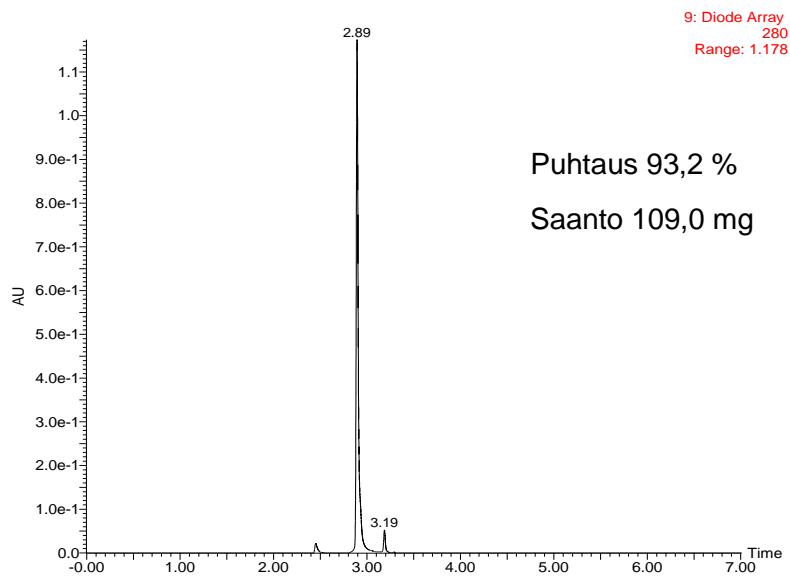
Kuva 16. Semipreparatiivisten HPLC-fraktiointien 1 ja 2 puhtain oenoteiini B.



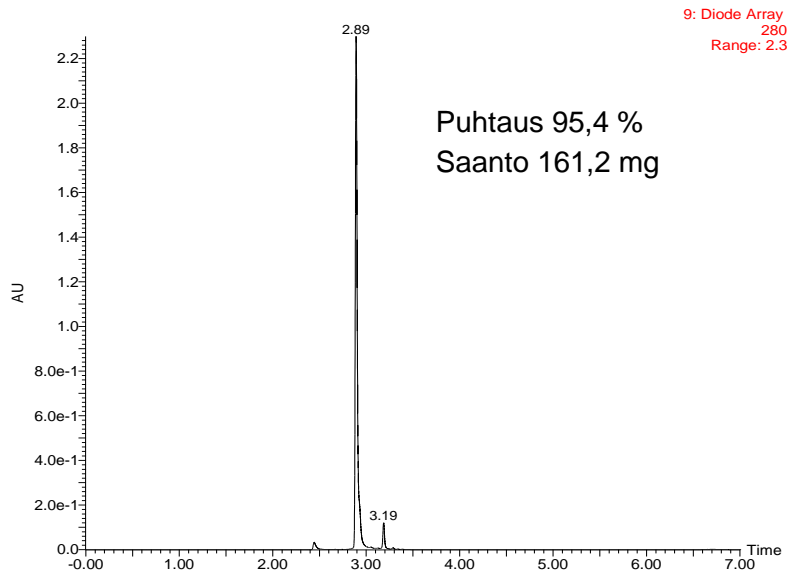
Kuva 17. Semipreparatiivisten HPLC-fraktiointien 3 ja 4 puhtain oenoteiini B.



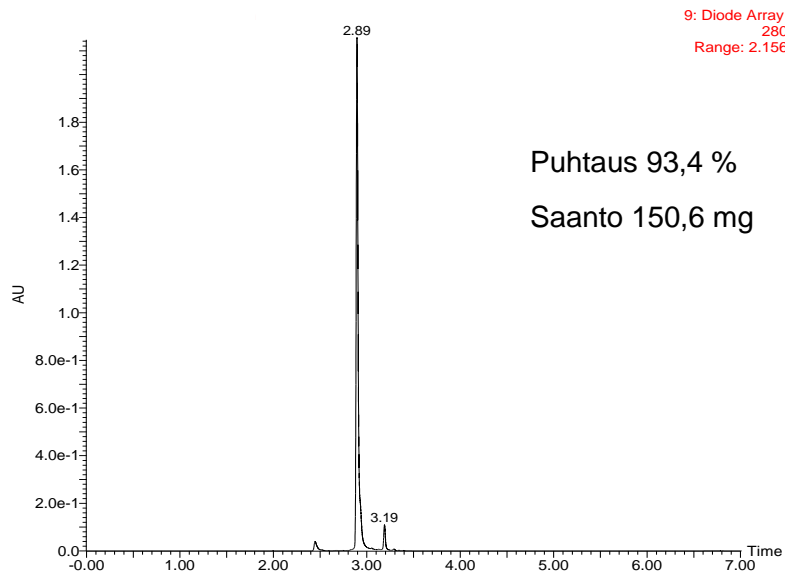
Kuva 18. Semipreparatiivisten HPLC-fraktiointien 5 ja 6 puhtain oenoteiini B.



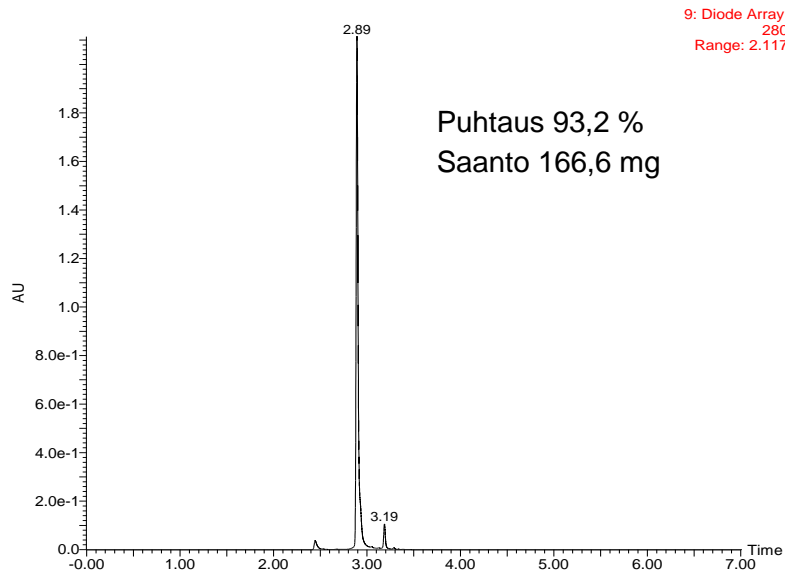
Kuva 19. Semipreparatiivisten HPLC-fraktiointien 7 ja 8 puhtain oenoteiini B.



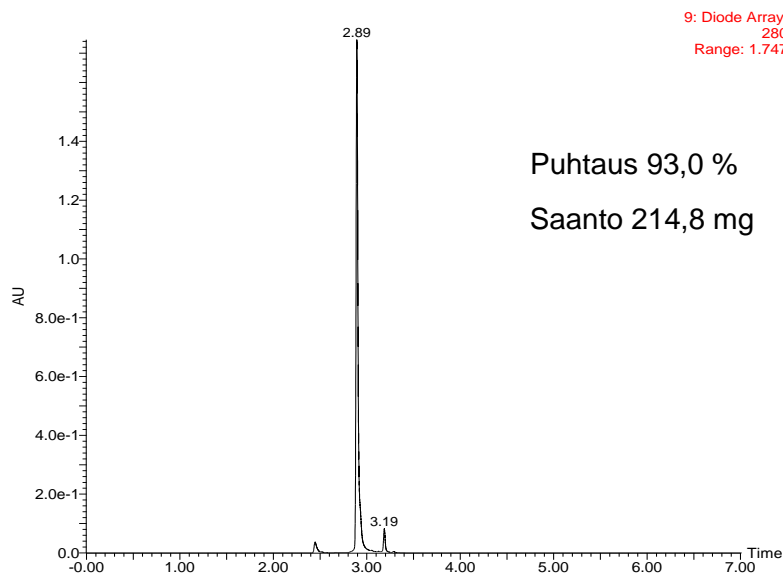
Kuva 20. Kevään semipreparatiivisten HPLC-fraktiointien 1, 2 ja 3 puhtain oenoteiini B.



Kuva 21. Kevään semipreparatiivisten HPLC-fraktiointien 4, 5 ja 6 puhtain oenoteiini B.



Kuva 22. Kevään semipreparatiivisten HPLC-fraktiointien 7, 8 ja 9 puhtain oenoteiini B.

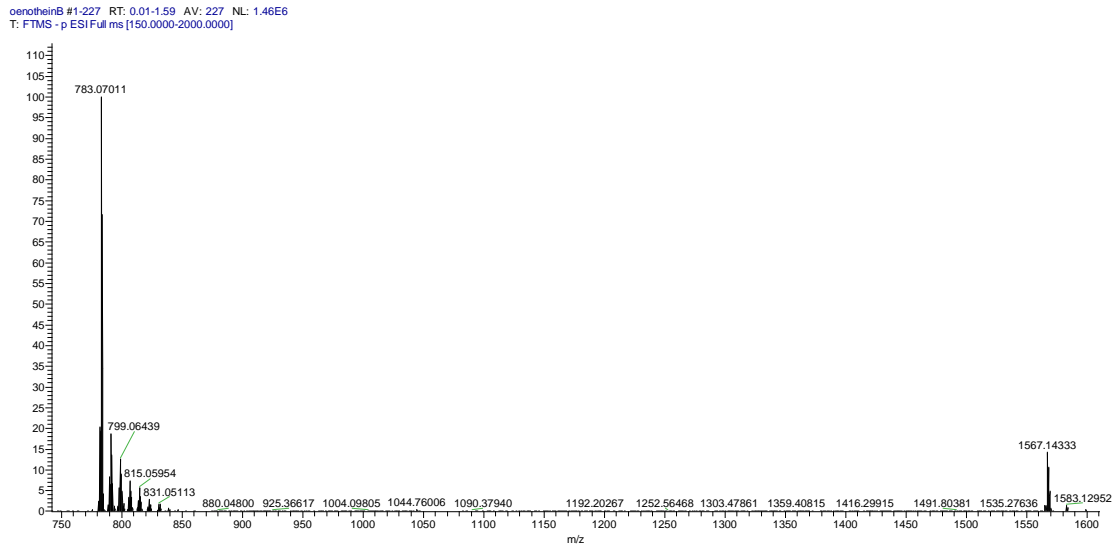


Kuva 23. Kevään semipreparatiivisten HPLC-fraktiointien 10, 11, 12 ja 13 puhtain oenoteiini B.

6.2 Oenoteiini B:n tarkan massan laskeminen

Massaspektrometrillä analysoitiin oenoteiini B:stä syntyvien ionien m/z -arvoja. m/z -arvosta saadaan laskettua oenoteiini B:lle mitattu tarkka massa ja tätä massaa voidaan verrata molekyylikaavan perusteella laskettuun arvoon, jolloin saadaan laskettua virhe

mitatun ja lasketun arvon välille. Seuraavassa kuvaajassa (Kuva 24.) on massaspektri, jossa on oenoteiini B:stä muodostuneet molekyyli-ionit.



Kuva 24. Oenoteiini B:n massaspektri.

Kuvaajasta nähdään, että oenoteiini B:lle muodostuu kaksi molekyyli-iona, joiden m/z -arvot ovat 783,07011 ja 1567,14333. Massaspektriä tarkennettaessa saadaan selville, että m/z -arvo 783,07011 on kahdesti varautunut, sillä m/z -arvojen ero isotooppien välillä on 0,5 ja 1567,14333 on yhdesti varautunut, sillä m/z -arvojen ero isotooppien välillä on 1.

Kahdesti varautuneen ionin tarkka massa lasketaan kaavalla

$$[M - 2H]^{-2} = m/z \cdot 2 + 2 \cdot H$$

Kaava 2. Tarkan massan laskeminen kahdesti varautuneelle ionille.

m/z on kuvaajasta saatu m/z -arvo ja H on protonin tarkka massa, joka on 1,0072765 Da (Seppänen;Kervinen;Parkkila;Karkela;& Meriläinen, 2011). Kuvaajasta saadulla m/z -arvolla 783,07011 laskettaessa saadaan, että molekyyliin tarkka massa on 1568,15477 Da. Lasketaan kahdesti varautuneelle ionille tarkka massa:

$$[M - 2H]^{-2} = 780,07011 \cdot 2 + 2 \cdot 1,0072765 \text{ Da} = 1568,154773 \text{ Da}$$

Yhdesti varautuneen ionin tarkka massa lasketaan Kaava 3 mukaan.

$$[M - H]^- = m/z \cdot 1 + 1 \cdot H$$

Kaava 3. Tarkan massan laskeminen yhdesti varautuneelle ionille.

Kuvaajasta saadulla m/z -arvolla 1567,14333 laskettaessa saadaan, että molekyylin tarkka massa on 1568,15061 Da.

Oenoteiini B:n molekyylikaava on $C_{68}H_{48}O_{44}$ ja sen laskettu massa on 1568,15184 Da. Molekyylikaava ja tarkka massa saatiin ChemDraw- ohjelmalla piirrettäessä oenoteiini B. Virhe mitatun ja lasketun arvojen välillä saadaan laskettua Kaava 4 mukaan.

$$\Delta m(ppm) = \frac{(m_{mitattu} - m_{laskettu}) \cdot 10^6}{m_{laskettu}}$$

Kaava 4. Virheen laskeminen.

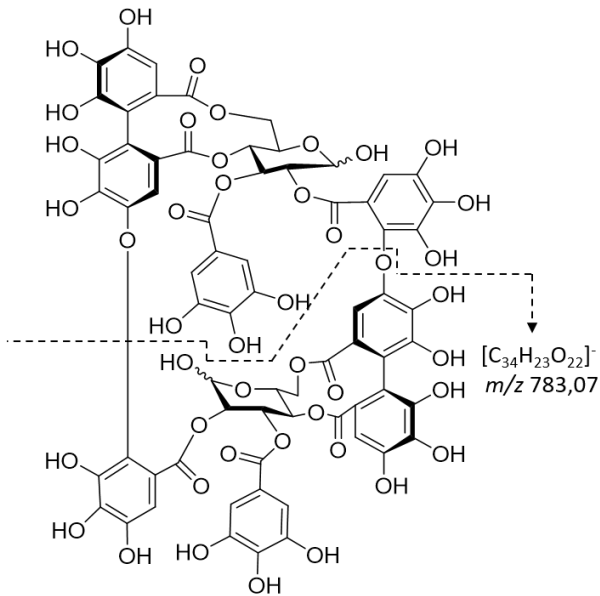
Lasketaan kahdesti varautuneesta ionista saadun tarkan massan virhe:

$$\Delta m(ppm) = \frac{(1568,15477 \text{ Da} - 1568,15184 \text{ Da}) \cdot 10^6}{1568,15184 \text{ Da}} = 1,86844 \dots ppm \approx 1,7 ppm$$

eli mitattu arvo on laskettua arvoa 1,7 ppm suurempi. Lasketaan myös samalla tavalla virhe yhdesti varautuneen ionin tarkalle massalle, jolloin saadaan, että virhe on -0,78 ppm, eli mitattu arvo on pienempi kuin laskettu arvo.

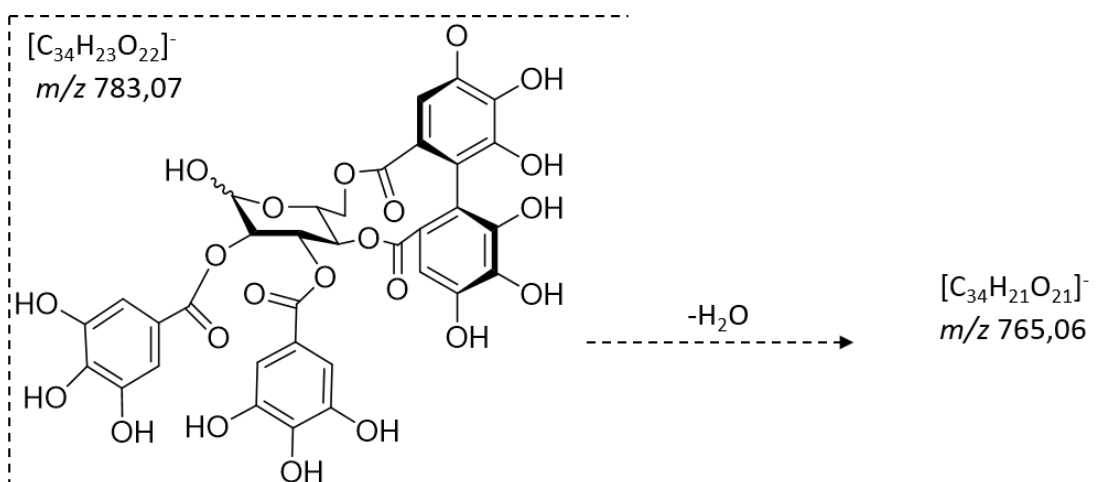
6.3 Rakenne analyysit

Rakenneanalyysia tehtiin tandemmassaspektrometrilla ja apuna käytettiin Chemdraw-ohjelmaa sekä orbiloukulta saatua massaspekttriä. Rakenneanalyysiä varten tandemmassaspektrometrilla mitattiin useita massaspektrejä käyttäen erilaisia törmäysenergioita. Näin saatiin muodostettua erilaisia tuoteioneja. Seuraavissa kuvissa (Kuva 25.-Kuva 31.) on esitetty mahdollisia fragmentoitumisia ja fragmentteja.



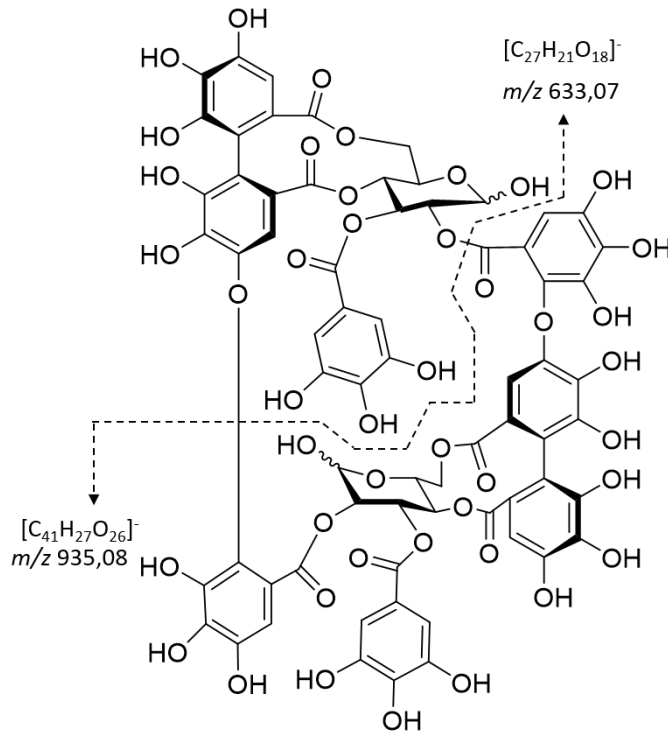
Kuva 25. oenoteiini B:n pilkkoutuminen kahdeksi yhdesti varautuneeksi molekyyliksi-ioniksi.

Oenoteiini B:stä muodostunut molekyyli-ioni voi pilkkoutua Kuva 25 tapaan DOG-tyypin sidosten katketessa. Tästä voi muodostua aiemmin havaitut yhdesti varautunut fragmentti-ioni m/z -arvolla 783,07 tai kahdesti varautunut molekyyli-ioni m/z -arvolla 783,07. Kuva 24 nähdään kahdesti varautuneen molekyyli-ionin piikki. Yhdesti varautuneesta fragmentti-ionista m/z -arvolla 783,07 voi lohjeta yksi vesimolekyyli (Baert;Karonen;& Salminen, 2015), jolloin muodostuu ioni m/z -arvolla 765,06. (Kuva 26.) Koska ei ole varmuutta, mistä kohtaa vesi irtoaa, rakennekaavaa ole esitetty.

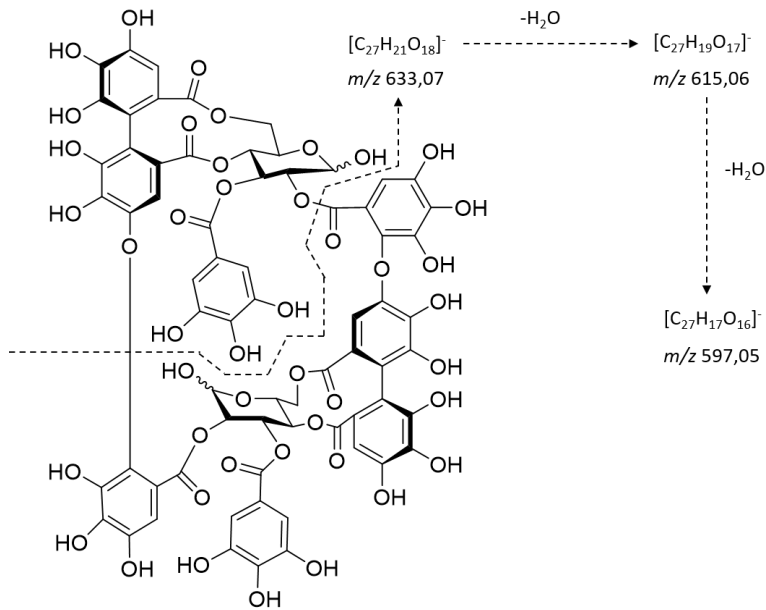


Kuva 26. veden lohkeaminen ionista.

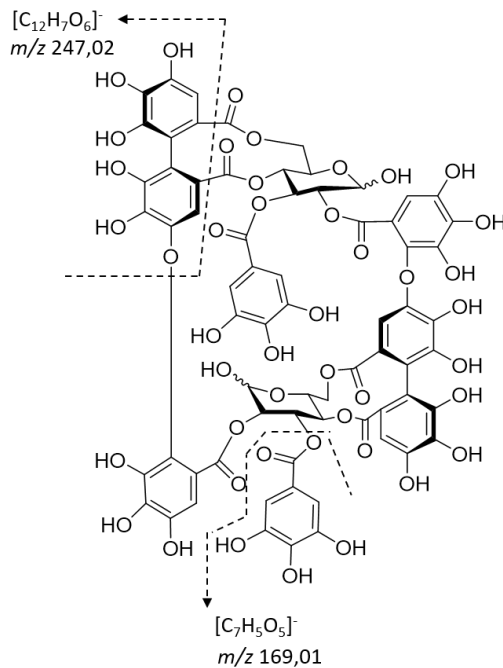
Oenoteiini B voi pilkkoutua myös Kuva 27 esitetyllä tavalla muodostaen fragmentti-ionit m/z -arvoilla 935,08 ja 633,07. Tästä pilkkoutumisesta syntyneestä yhdesti varautuneesta ionista m/z -arvolla 633,07 voi myös lohjeta vesimolekyyli (Baert;Karonen;& Salminen, 2015). Yksi vesimolekyyli on noin 18 Da. Lohkeamisen jälkeen muodostuu ioni m/z -arvolla 615,06, josta voi vielä lohjeta vesimolekyyli. (Kuva 28.)



Kuva 27. Oenoteiini B:n hajoaminen kahdeksi yhdesti varautuneeksi ioniksi.



Kuva 28. Veden lohkeaminen fragmentti-ionista m/z 633,07.

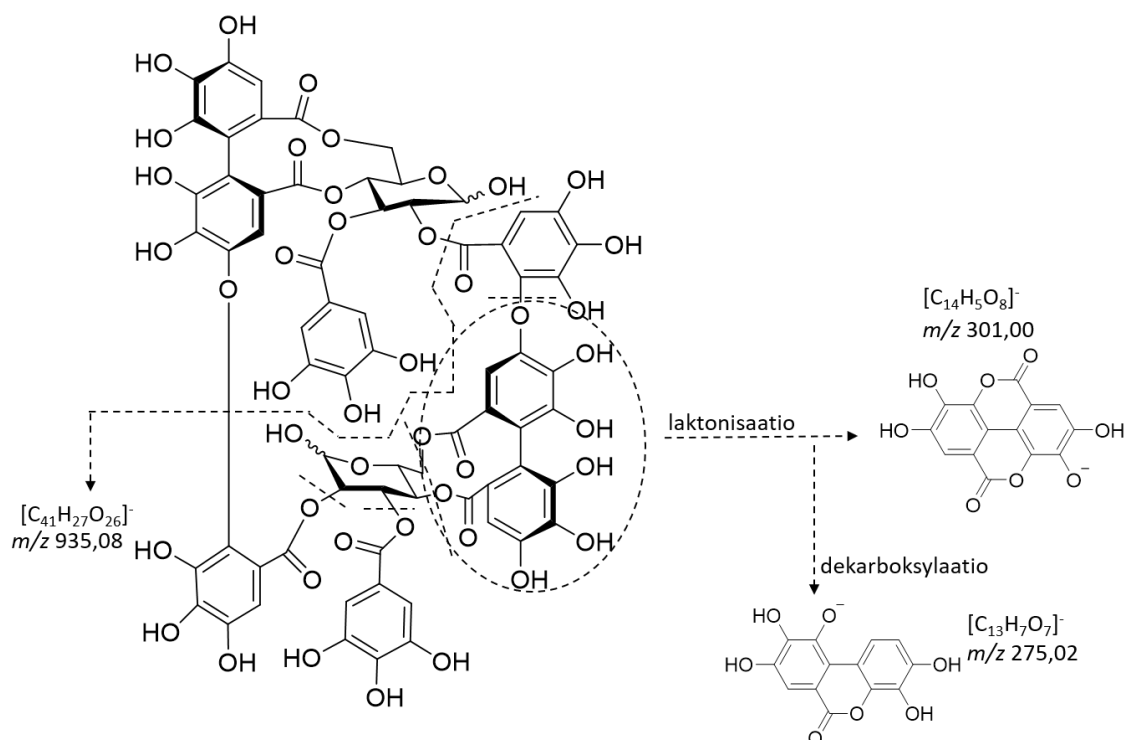


Kuva 29. Muita mahdollisia lohkeamisia molekyyli-ionista.

Massaspektristä havaittiin Kuva 29 mukaan muodostuvien fragmentti-ionien piikkejä. Ennestään havaittu m/z 169,01 on gallushappo, joka voi lohjeta molekyyli-ionista. (Poay Tan; Ling; & Chuah, 2011) Näiden lisäksi havaittiin uusi piikki m/z 247,02, joka on yhdesti

varautunut. Esitetty fragmentaatiomekanismi on vain alustava ehdotus, sillä muut eivät ole havainneet sitä aikaisemmin. Fragmentti-ionin mahdollinen muodostuminen voisi ehkä tapahtua esimerkiksi ellagihaposta, jonka m/z -arvo on 301. Jos ellagihappo menettää kolme vesimolekyyliä kuten edellisissä havainnoissa esitelty, jäljelle jäävän fragmentti-ionin m/z -arvo tällöin 247.

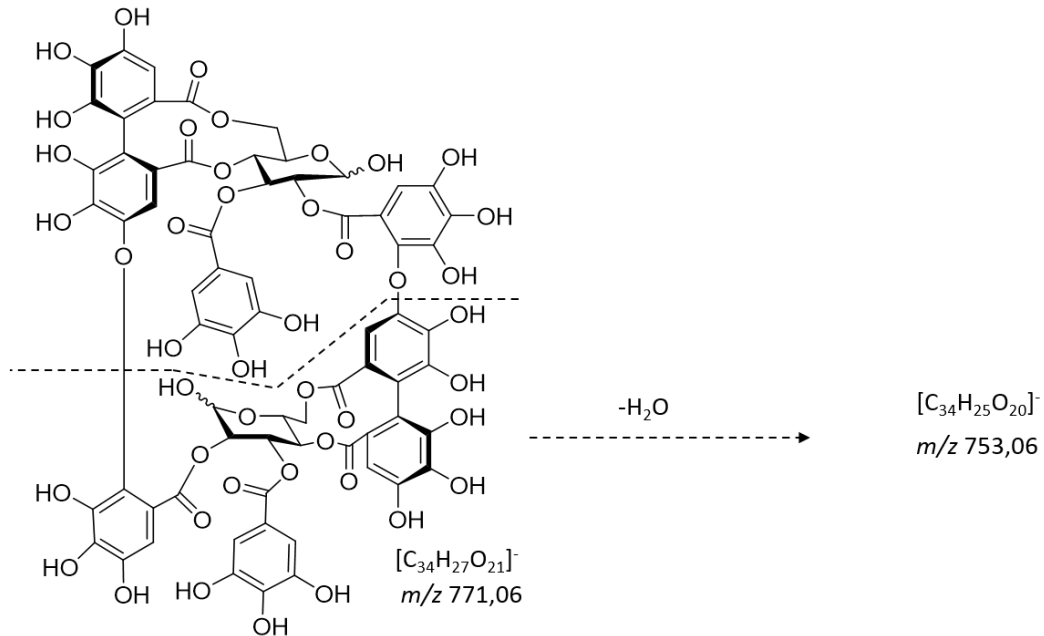
Fragmentti-ioni m/z 935,08 (Kuva 27.) voi pilkkoutua edelleen. (Poay Tan;Ling;& Chuah, 2011) Fragmentti-ionista m/z 935,08 voi irrota gallushappoja kolme kappaletta, kunnes muodostuu HHDP-glukoosi. Glukoosin irtoamisen jälkeen HHDP-ryhmä voi kahden spontaanin laktonisaation kautta muodostaa ellagihapon, jonka m/z -arvo on 301. HHDP ryhmän osittainen laktonisaatio ja sitä seuraava dekarboksylaatio muodostavat fragmentti-ionin m/z 275,02. (Poay Tan;Ling;& Chuah, 2011) Kuva 30 on esitelty fragmentti-ionin m/z 935,08 pilkkoutumista pienemmiksi fragmenteiksi. Ympyrän sisällä on HHDP-ryhmä ja nuolilla on esitetty, että kahden laktonisaation kautta syntyy ellagihappo ja laktonisaation ja dekarboksylaation kautta syntyy fragmentti-ioni m/z 275,02.



Kuva 30. Fragmentti-ioni m/z 935,08 pilkkoutuminen sekä HHDP-ryhmän laktonisaation seurauksena muodostuvat fragmentti-ionit m/z 301,00 ja 275,02.

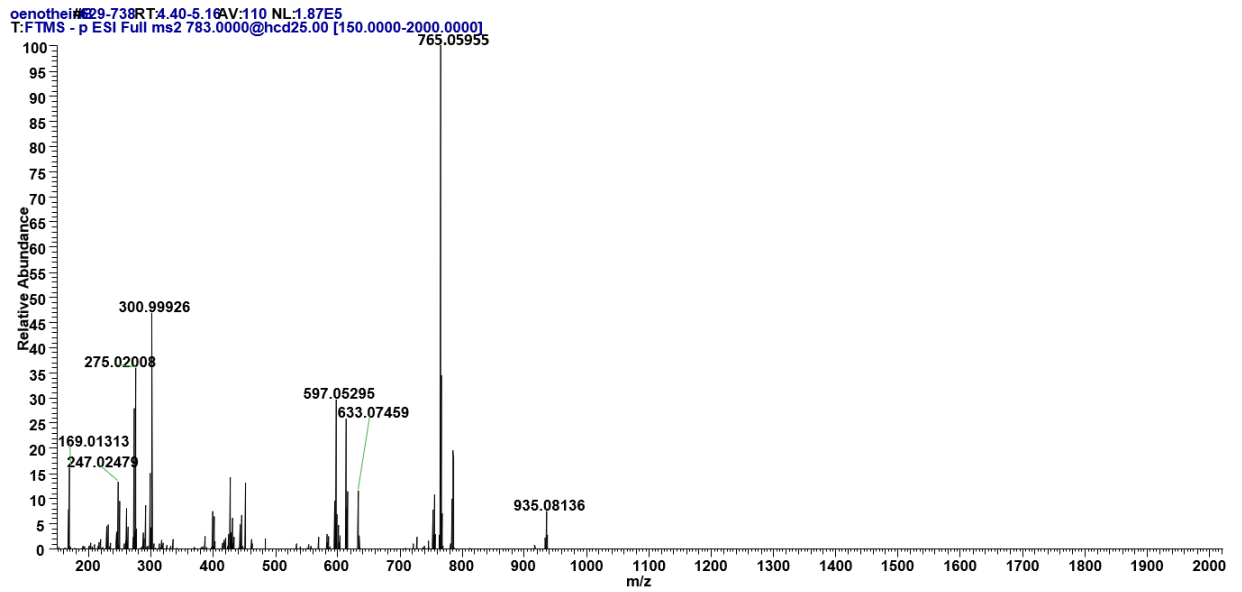
Kuva 31 on esitetty mahdollinen uusi havainto. Massaspektrissä esiintyy m/z -arvo 753,06, jota ei ole aikaisemmin havaittu. Mahdollinen vesimolekyylin lohkeaminen

fragmentti-ioni m/z 771 voi johtaa fragmentti-ioniin 753,06. Tästä ei tosin ole täyttä varmuutta, sillä massaspektriä tarkennettaessa huomattiin pieni piikki m/z -arvolle 771, mutta ei voida varmasti sanoa, onko kyseessä piikki vai taustakohinaa. Veden lohkeaminen voi myös vaikuttaa siihen, että m/z 771 ei havaita massa spektrissä.

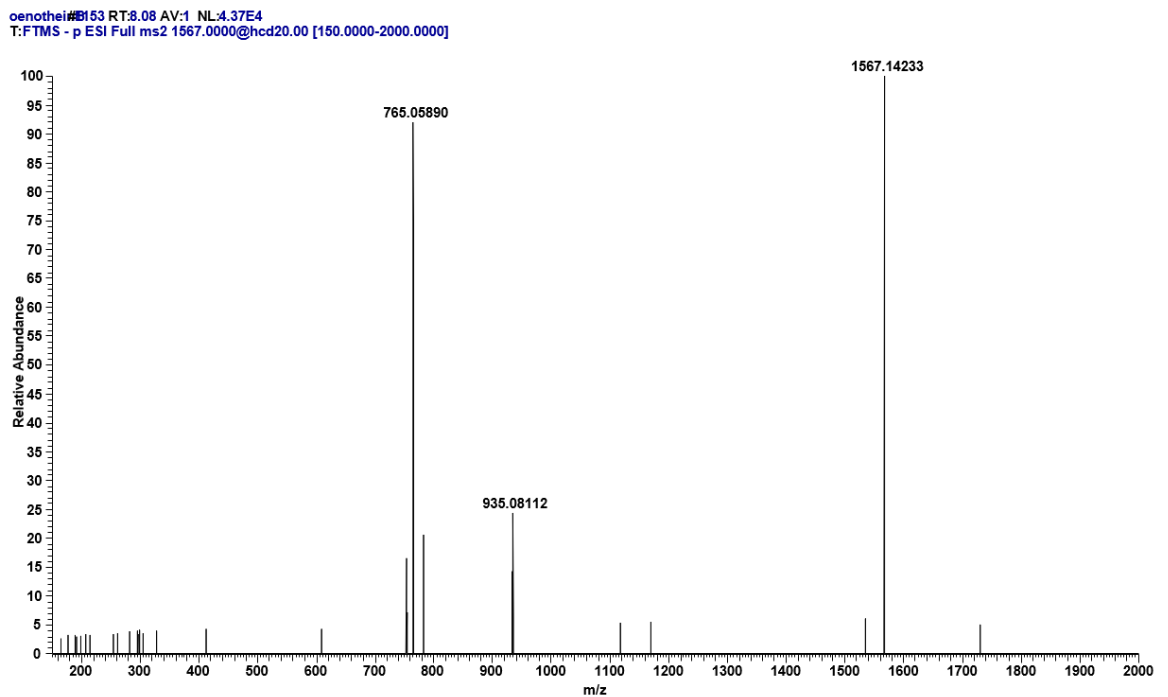


Kuva 31. Veden lohkeaminen pilkkoutuneesta molekyylistä.

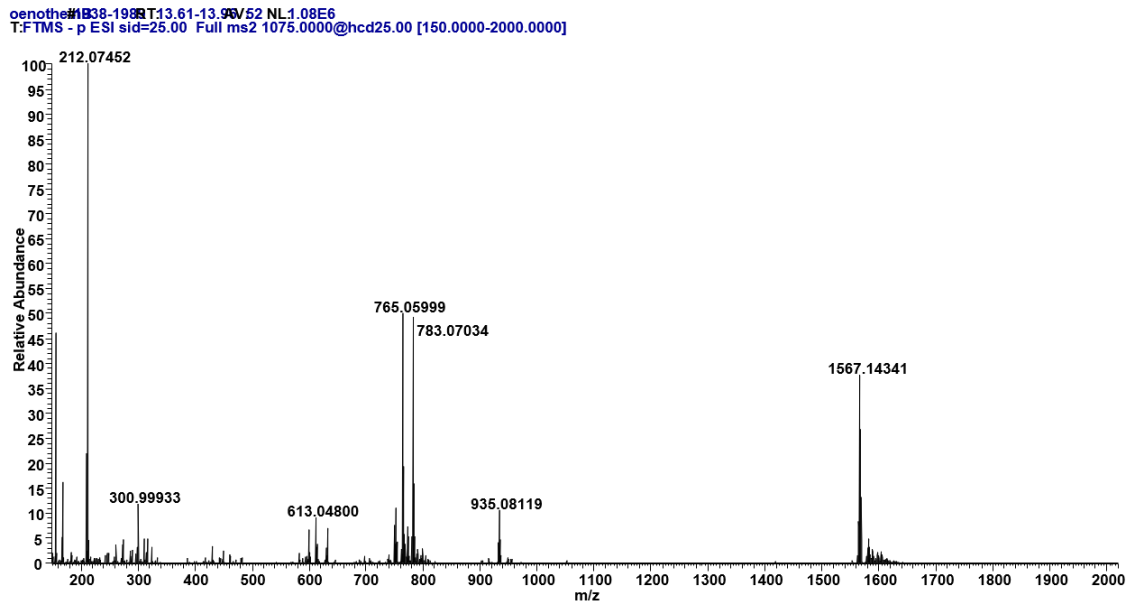
Seuraavissa massaspektreissä (Kuva 32.-Kuva 35.) on fragmentaatiokuvia vastaavat piikit näkyvillä. Massaspekttrissä (Kuva 34.) huomataan voimakas piikki m/z -arvolla 212,07452. Tämä piikki ei kuitenkaan tule oenoteiini B:stä, vaan piikin aiheuttaa laitteistossa oleva kontaminantti n-butyylibentseenisulfonamidi.



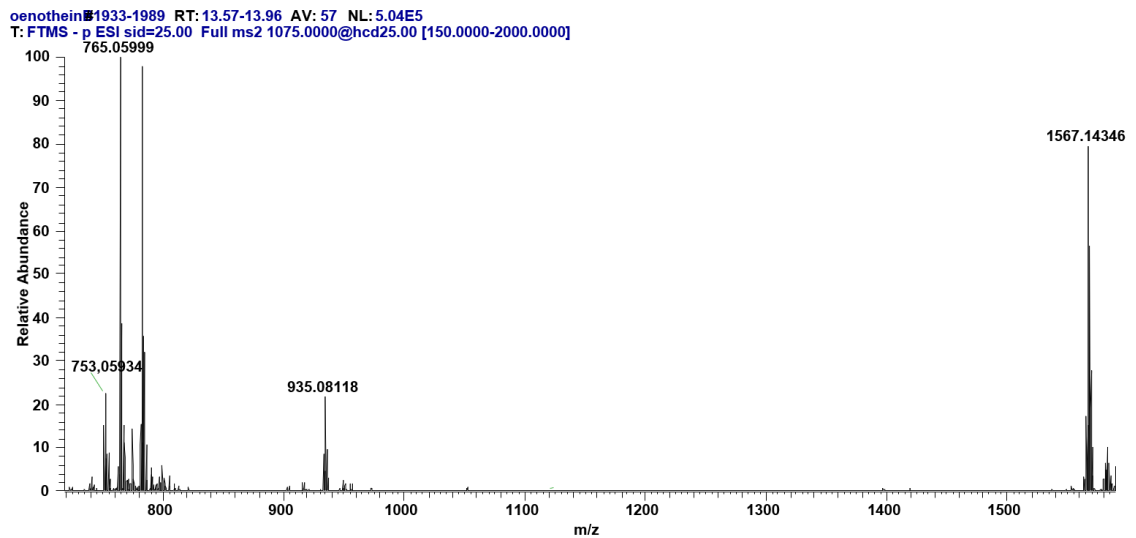
Kuva 32. Massaspektri, jossa ohjearvo lähtöioni valitsemiseen on m/z 783 ja törmäysenergia 25 eV.



Kuva 33. Massaspektri, ohjearvo lähtöioni valitsemiseen on m/z 1567 ja törmäysenergia 20 eV.



Kuva 34. Massaspektri, ohjearvo lähtöioni valitsemiseen on m/z 1075, SID on 25 eV ja törmäysenergia 25 eV.



Kuva 35. Massaspektri, jossa näkyy m/z 753. Ohjearvo lähtöioni valitsemiseen on m/z 1075, SID on 25 eV ja törmäysenergia 25 eV.

6.4 Tulosten arviointi

Tavoitteena oli saada mahdollisimman puhdasta oenoteiini B:tä puhdistettua maitohorsmasta. Puhtausprosenttien mukaan olisi vielä ollut mahdollista saada puhtaampaa tuotetta, mutta kromatogrammeja arvioidessa ja ottaen huomioon pohjaviivan vaikutuksen

integrointiin, tuotteen voidaan todeta olevan erittäin puhdasta. (95 %) Verrattaessa kaupallisesti saavaan oenoteiini B:hen, puhdistuksessa onnistuttiin hyvin, sillä kaupalliselle oenoteiini B:lle luvataan 80 %:n puhtaus. (Merck, 2020)

Keskiarvo näytteiden puhtaudelle voidaan laskea aritmeettisen keskiarvon (Kaava 5.) mukaan.

$$\bar{x} = \frac{x_1 + \dots + x_n}{n} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Kaava 5. Aritmeettinen keskiarvo.

Kaavalla laskettaessa saadaan, että puhtausprosentin keskiarvo oli 94,1 %. Lasketaan vielä keskihajonta tuotteiden puhtausprosentteille.

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Kaava 6. Keskihajonta.

Puhtausprosenttien keskihajonnaksi saadaan 1,2 %. Keskihajonta on ihan hyvä, sillä puhdistuksia oli useampi ja prosentin heitto ei ole niin iso. Työn teki sama henkilö samalla menetelmällä, samoilla laitteilla ja samaan tapaan joka kerta sekä lähtömateriaaleissa on voinut olla pieniä eroja, sillä lähtömateriaali ei ollut laboratorion valmistettua tuotetta, vaan itse luonnosta kerättyä ja puhdistettua kasvinäytettä. Jokainen erä on siis ollut vähän erilainen.

Massaspektrejä tutkittaessa löydettiin jo aikaisemmin havaitut ja oletetut ionit ja niiden piikit. Tavoitteena oli vielä tehdä NMR-spektroskopiset mittaukset, mutta poikkeustilan ja ajan loppumisen takia nämä analyysit jäivät tekemättä, jolloin rakennetta ei saatu halutulla tavalla selville. Mahdollisia fragmentteja ja lohkeamia pystyttiin päätelemään massaspektrien perusteella sekä Chemdraw-ohjelmaa käyttäen. Uusia fragmenttejakin löydettiin, tosin vaatii lisää tutkimusta, jotta saadaan varmistettua kyseisille fragmenteille fragmentaatiomekanismit. Lasketut ja mitatut ionien m/z -arvot eivät poikenneet toisistaan kovin paljoa, mikä viittaa siihen, että ionit ovat muodostuneet oletetusti ja laite on suorittanut mittaukset tarkasti. Tulos kertoo myös siitä, että laite toimii

moitteettomasti, sillä laite on korkean resoluution massaspektrometri, joka pitääkin olla tarkka ja kalibrointi on suoritettu hyvin. Myös laitteen käsittely on suoritettu tarkasti.

Ottaen huomioon tulokset, oenoteiini B:tä saatiin hyvin puhdistettua. Alkuperäistä näytettä oli noin neljä grammaa, josta saatiin puhdasta tuotetta vähän päälle yksi gramma eli noin neljännes alkuperäisestä massasta saatiin puhdistettua.

7 POHDINTA JA YHTEENVETO

Opinnäytetyön aikana perehdyttiin kasvien kemiaan sekä laitteisiin, jotka olivat osittain vieraita minulle. Laitteiden toimintaperiaatteet olivat osittain tuttuja, mutta alussa olisi saanut työstä enemmän irti, jos olisi perehtynyt aiheeseen ennestään enemmän. Haastavaa oli rakenteen analysointi, sillä pohjaa ei ollut juuri ollenkaan rakenteen analysointiin. Tarvittavaa apua saatiin, jolloin analyysit onnistuivat. Paremmalla pohjatiedolla ja työn aikana paremmin perehtymällä olisin ymmärtänyt paremmin, mitä tapahtuu missäkin vaiheessa ja olisin pystynyt suunnittelemaan työskentelyään paremmin. Tulosten analysointi olisi ollut helpompaa ja ehkä rohkeammin olisin pystynyt tekemään päätelmiä ja etsimään uusia näkökulmia.

Työ oli luonteeltaan tutkimustyötä ja samalla yhdisteiden puhdistamista muuta käyttöä varten. Puhdistettuja yhdisteitä tullaan käyttämään jatkossa. Opinnäytetyön suunnitelma sekä prosessi muuttui ja muokkaantui opinnäytetyön edetessä. Alkuperäisen suunnitelman mukaan tarkoitus oli analysoida oligomeerisiä ellagitanniineja, mutta saaduissa näytteissä ei pitänytkään olla dimeeristä oenoteiini B:tä isompia yhdisteitä, mutta tätä ei huomattu alussa. Jos alussa olisi katsottu UPLC-DAD-MS-analyysin tuloksista MS-analyysejä, olisi voitu todeta, että saadut näytteet eivät sisällä trimeeristä oenoteiini A:ta, jota oletettiin fraktion sisältävän. Tämän havainnon avulla olisi voitu välttää turhaa työtä ja aikaa olisi luultavasti jäänyt NMR-analyyseihiin. Pidempiä yhdisteitä oli tarkoitus puhdistaa toisesta fraktiosta, mutta aika ei riittänyt tähän. Opinnäytetyö muuttui siis aika paljon sen edetessä vaihe kerrallaan.

Parannuskohtana tässä opinnäytetyössä olisi selvästi se, että MS-analyysejä olisi heti alusta asti katsottu, jolloin olisi aikaa säästynyt enemmän analysointia varten. NMR-analyysien avulla olisi pystytty määrittämään tarkkaa rakennetta fragmenteille, jonka avulla olisi voitu varmistua massaspektrometristä saaduista tuloksista. Myös mahdollisia pidempiä yhdisteitä olisi keretty puhdistamaan sekä tämän jälkeen analysoimaan niitä massaspektrometrillä ja etsimään esimerkiksi uusia fragmentteja.

Opinnäytetyön tavoitteet tuli saavutettua. Opin käyttämään HPLC-laitteistoa, sekä tekemään preparatiivista sekä semipreparatiivista puhdistusta. Tämän lisäksi fragmentoitumisia pystyttiin määrittämään ja mahdollisia uusia fragmentti-ioneja löydettiin. Sain myös uutta tietoa analyttisestä kemiasta sekä tutustuin itselleni uuteen

massaspektrometriaan. Tutkimusryhmän kannalta opinnäytetyö oli hyödyllinen, sillä tutkimusryhmä sai käyttöönsä puhdasta oenoteiini B:tä, mikä oli yksi toimeksiannon tavoitteista.

LÄHTEET

- Antila, A.-M.;Karppinen, M.;Leskelä, M.;Mölsä, H.;& Pohjakallio, M. (2014). *Tekniikan Kemia* (10.-13. p.). Porvoo: Edita Publishing Oy.
- Baert, N. (2017). *Oligomeric ellagitannins of Epilobium angustifolium: quantification and bioactivity assessment*. Turku: Painosalama Oy.
- Baert, N.;Karonen, M.;& Salminen, J.-P. (2015). Isolation, characterisation and quantification of the main oligomeric macrocyclic ellagitannins in *Epilobium angustifolium* by ultra-high performance chromatography with diode array detection and electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 26-36. Haettu 12. Huhtikuu 2020 osoitteesta <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.09.050>
- Engström, M. (2016). *Understanding the bioactivity of plant tannins: developments in analysis methods and structure–activity studies*. Turku: Painosalama Oy.
- Gurdeep R., C.;& Madhu, A. (2005). *Analytical Chromatography*. Global Media. Haettu 30. Maaliskuu 2020
- Harris, D. C. (2010). *Quantitative Chemical Analysis* (Kahdeksas painos p.). New York: Clancy Marshall.
- Karonen, M.;Parker, J.;Agrawal, A.;& Salminen, J.-P. (2010). First evidence of hexameric and heptameric ellagitannins in plants detected by liquid chromatography/electrospray ionisation mass spectrometry. *RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY*(24), 3151–3156. doi:10.1002/rcm.4756
- Merck. (2020). *Oenothrin B analytical standard*. Haettu 24. Huhtikuu 2020 osoitteesta <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/03805?lang=fi®ion=FI>
- Moilanen, J. (2015). *Ellagitannins in Finnish plant species – Characterization, distribution and oxidative activity*. Turku: Painosalama Oy.
- Opetushallitus. (31. Maaliskuu 2020). *Laboratorioanalyysit*. Haettu 31. Maaliskuu 2020 osoitteesta 2.6 Nestekromatografia:

http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_2-6_nestekromatografia.html

Opetushallitus. (6. Huhtikuu 2020). *Laboratorioanalyysit*. Haettu 6. huhtikuu 2020 osoitteesta [5.5. Massaspektrometria:](http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_5-5_massaspektrometria.html)
http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_5-5_massaspektrometria.html

Opetushallitus. (30. Maaliskuu 2020). *Laboratorioanalyysit*. Haettu 30. Maaliskuu 2020 osoitteesta [2.2. Kromatografiset menetelmät:](http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_2-2_kromatografiset_menetelmat.html)
http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_2-2_kromatografiset_menetelmat.html

Poay Tan, H.; Ling, S. K.; & Chuah, C. H. (2011). Characterisation of Galloylated Cyanogenic Glucosides and Hydrolysable Tannins from Leaves of *Phyllagathis rotundifolia* by LC-ESI-MS/MS. *Phytochemical Analysis*, 516-525. doi:10.1002/pca.1312

Salminen, J.-P. (2020). *Kemian Kevät 2020*. Turku.

Salminen, J.-P.; & Karonen, M. (2011). EVOLUTIONARY ECOLOGY OF PLANT DEFENCES Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. *Functional Ecology*. doi: 10.1111/j.1365-2435.2010.01826.x

Seppänen, R.; Kervinen, M.; Parkkila, I.; Karkela, L.; & Meriläinen, P. (2011). *maol taulukot matematiikka fysiikka kemia* (2.-9. painos p.). Keuruu: Otava.

Stroobant, V.; & de Hoffmann, E. (2007). *Mass Spectrometry Principles and Applications* (Kolmas painos p.). John Wiley & Sons, Incorporated.

Waters. (6. Huhtikuu 2020). *Beginner's Guide to UPLC*. Haettu 6. Huhtikuu 2020 osoitteesta https://www.waters.com/waters/en_GB/UPLC---Ultra-Performance-Liquid-Chromatography-Beginner%27s-Guide/nav.htm?cid=134803622&locale=en_GB

Waters. (2020). *Identifying and Quantitating Compounds*. Haettu 29. Huhtikuu 2020 osoitteesta https://www.waters.com/waters/en_US/Identifying-and-Quantitating-Compounds/nav.htm?cid=10049064&locale=en_US

Waters. (1. Huhtikuu 2020). *Preparative Liquid Chromatography Primer*. Haettu 1. Huhtikuu 2020 osoitteesta https://www.waters.com/waters/en_US/Preparative-Liquid-Chromatography-Primer/nav.htm?locale=en_US&cid=134929140

Wellings, D. A. (2006). *A Practical Handbook of Preparative HPLC* (Ensimmäinen painos p.). Elsevier Science & Technology.

Vitha, M. F. (2016). *Chromatography : Principles and Instrumentation* (Ensimmäinen painos p.). John Wiley & Sons, Incorporated.

Wolf, B.;L. Yeap, F.;Norbert, H.;Christa, M.;& Kurt, S. (2001). Chemical Studies of Proanthocyanidins and Hydrolyzable Tannins. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*(3), 995 - 1008. Haettu 30. Maaliskuu 2020