



Juho Kemppainen

# **POLYMEERISTEN UUTEAINEIDEN NESTEKROMATOGRAFINEN MÄÄRITTÄMINEN**

# **POLYMEERISTEN UUTEAINEIDEN NESTEKROMATOGRAFINEN MÄÄRITTÄMINEN**

Juho Kemppainen  
Opinnäytetyö  
Kevät 2013  
Laboratorioalan koulutusohjelma  
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

## TIIVISTELMÄ

Oulun seudun ammattikorkeakoulu  
Laboratorioalan koulutusohjelma, laboratorioanalytiikan suuntautumisvaihtoehto

---

Tekijä(t): Juho Kemppainen

Työn nimi: Polymeeristen uuteaineiden nestekromatografinen määrittäminen

Työn ohjaaja(t): Jaana Käkölä, Tom Hultholm, Eija Hakala

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Kevät 2013 Sivumäärä: 28 + 14 liitettä

---

Tässä opinnäytetyössä otettiin käyttöön Turun Åbo Akademiassa kehitetty analyysimenetelmä, jolla analysoitiin polymeerisiä uuteaineita. Käyttöönottossa oli tarkoitus siirtää menetelmä UPM Lappeenrannan tutkimuskeskuksen käyttöön. Menetelmää oli kehitetty Åbo Akademiassa, jossa oli käytetty saman tehtaan näytteitä, joita tässä työssä käytettiin. Puussa on yleisesti uuteaineita, jotka valtaosin poistuvat sellusta, mitä pidemmälle prosessia viedään sellun valmistuksessa. Joskus uuteaineet saattavat olla haitallisia sellun laadulle ja ne saattavat haitata myös prosessilinjaston toimintaa.

Menetelmässä näytteinä oli lehtipuuselluja sekä yksi havupuusellu vertailun vuoksi. Näytteiden käsittelyssä kuivat selluarkit piti ensin saada uuttamista varten sopivaan muotoon IKA:n valmistamalla analyyttisellä myllyllä. Näytteet uutettiin asetoni-vesi-etikkahapposeoksella ASE-uuttolaitteella. Uutetut näytteet kuivattiin ja liuotettiin uudestaan THF:lla (tetrahydrofuraani). Tämän jälkeen näytteet mitattiin HPLC-ELS-analyysilaitteella. ELS on lyhennys sanoista evaporative light scattering.

Åbo Akademin menetelmässä tulokset oli mitattu ELS-detektorilla. ELS-detektoria ei ollut aiemmin käytetty tutkimuskeskuksen laboratoriossa, mutta se oli hankittu laboratorioon aiemmin. Työssä perehdyttiin samalla myös ELS-detektorin toimintaan ja sen vaatimiin olosuhteisiin. ELS-detektorilla mitattiin molekyylijakaumaa valonsironnan avulla.

Menetelmän siirto onnistui hyvin, ja kun varsinaiset sellunäytteet oli mitattu, koetettiin menetelmän toimivuutta toisenlaisilla näytteillä menestyksekkäästi. Ohjelmistossa onnistuttiin myös ratkaisemaan tulosten integrointia vaivaava ongelma. Sellunäytteet antoivat oletuksen mukaisia tuloksia. Kaikki tulokset olivat kvalitatiivisia.

Menetelmä auttaa kehittämään ja ylläpitämään kestävästä selluntuotantosta tulevaisuudessa, kun sen avulla voidaan tarkkailla uuteaineita selluntuotantoa osalta.

---

Asiasanat:

polymeerinen uuteaine, sellu, HPLC, SEC, GPC, ELSD, THF, ASE, asetoni

# SISÄLLYS

TIIVISTELMÄ	3
SISÄLLYS	4
1 JOHDANTO	5
2 PUUN UUTEAINEET	6
3 TYÖSSÄ KÄYTETYT LAITTEET	7
3.1 ASE-200-uuttolaite	7
3.2 HPLC-ELS	8
3.3 ELSD - Evaporative light scattering detector	9
4 ASE-UUTTO JA NÄYTTEIDEN KÄSITTELY	14
4.1 Näytteen esikäsittely	14
4.2 Näytteiden uuttaminen	15
4.3 Näytteiden jatkokäsittely	15
4.4 Tehdasnäytteet	16
5 HPLC-ELS	18
5.1 Sumuttimen lämpötila	18
5.2 Standardit	19
5.3 Näytteiden mittaus	21
6 MITTAUSTULOKSET	22
6.1 N-näytteet	22
6.2 Näyte N1 eri vaiheista	23
6.3 P-näytteet	24
6.4 Tulosten yhteenveto	24
7 POHDINTA	25
LÄHTEET	27
LIITTEET	28

# 1 JOHDANTO

Opinnäytetyön tarkoituksena oli ottaa käyttöön Turun Åbo Akademiassa kehitetty nestekromatografinen menetelmä, jolla voidaan analysoida polymeerisiä uuteaineita esimerkiksi sellunäytteistä. Aiemmin näytteitä on analysoitu kaasukromatografilla (GC) sekä gravimetrisesti. GC ei pysty havaitsemaan kaikkia molekyyliä, koska sen rajat tulevat vastaan, kun kyseessä on isot polymeeriset molekyylit. Gravimetrisessä analyysissä uuteaineiden määrät ovat huomattavasti isompia kuin GC-analyysissä olleilla samoilla näytteillä. Uudella menetelmällä pyrittiin analysoimaan polymeeriset uuteaineet, joita ei voida havaita GC:lla.

Menetelmällä oli tarkoitus havaita sellunäytteissä olevia uuteaineita, jotka yleisesti heikentävät sellun laatua. Näytteinä oli sellunäytteitä samalta tehtaalta, kuin Åbo Akademin menetelmän kehityksessä. Tämä mahdollisti vertailun menetelmän toimivuudesta tutkimuskeskuksen ja Åbo Akademin välillä. Näytteitä oli myös muilta tehtailta. Tulokset olivat kvalitatiivisia, jotenka tuloksista ei tehty tilastollisia laskelmia. Työ tehtiin UPM:lle Lappeenrannan Kaukaan tutkimuskeskuksessa kevättalvella 2013 ja menetelmää oli tarkoitus hyödyntää myöhemmissä tutkimuksissa sekä analyyseissä.

Näytteinä käytettiin kuivia selluarkkeja. Näytteet uutettiin ASE (accelerated solvent extraction) -uuttolaitteella, asetoni-vesi-etikkahapposeoksella ennen analyysijä. Nestekromatografissa käytettiin ELS detektoria (evaporative light scattering), joka pystyi havaitsemaan yhdisteet, jotka eivät anna tai antavat heikon vasteen PDA (photo diode array)- ja RI (refractive index) -detektorilla. ELS pystyy myös havaitsemaan isot molekyylit, jotka eivät ionisoidu kunnolla massaspektrometridetektorissa. Käytetty analyysilaitteisto oli *HPLC-ELSD* eli korkean erotuskyvyn nestekromatografi valonsirontadetektorilla. Molekyylien erottelu perustui kokoekskluusiokromatografiaan eli SEC:iin (size exclusion chromatography). GPC-kolonneilla pystytään erottelemaan tutkittavan näytteen sisältämät erikokoiset molekyylit.

## 2 PUUN UUTEAINEET

Puu sisältää uuteaineita vain pieniä määriä, mutta niiden vaikutus on moninainen sellun valmistuksen eri vaiheissa. Yleisesti ne ovat haitallisia paperin valmistuksessa. Uuteaineista osa liukenee orgaanisiin liuottimiin, osa on vesiliukoisia ja osa saippuoituvia. Polymeeriset uuteaineet ovat suurimolekyylisiä orgaanisia yhdisteitä, jotka saattavat koostua monesta eri molekyylistä.

Puun uuteaineilla tarkoitetaan yhdisteitä, jotka liukenevat puusta orgaanisiin liuottimiin esimerkiksi dietyylieetteriin, metanoliin, veteen ja asetoniin. Uuteaineet muodostavat normaalisti korkeintaan viisi prosenttia puusta, mutta niillä on usein merkittävä vaikutus puun ominaisuuksiin, esimerkiksi kestävyyteen, väriin ja puun käyttökelpoisuuteen selluloosan raaka-aineena. (Pensar 1977, 186.)

Uuteaineet kuuluvat hyvin erilaisiin yhdistetyyppeihin, kuten lipidit, terpenoidit, fenolit, glykosidit, pienimolekyyliset hiilihydraatit, pektiini, tärkkelys ja proteiiniyhdisteet. Kun on uutettu poolisilla liuottimilla kuten asetoni, on ilmennyt, että myös soluseinämän rakenneosat, toisin sanoen polysakkaridit ja ligniini, voivat tietyssä määrin hajota ja liueta. (Pensar 1977, 186.)

Prosessiperäinen uuteaine sisältää uuteainekomponentteja, jotka muuttuvat eri prosessivaiheissa hydrolysoitumalla, hapettumalla, kloorautumalla ja muilla vastaavilla tavoilla. Uuteaineet saattavat sisältää myös puulle vieraita, prosessiin käytettyjen prosessikemikaalien mukana tulleita ainesosia. (Pensar 1977, 186.)

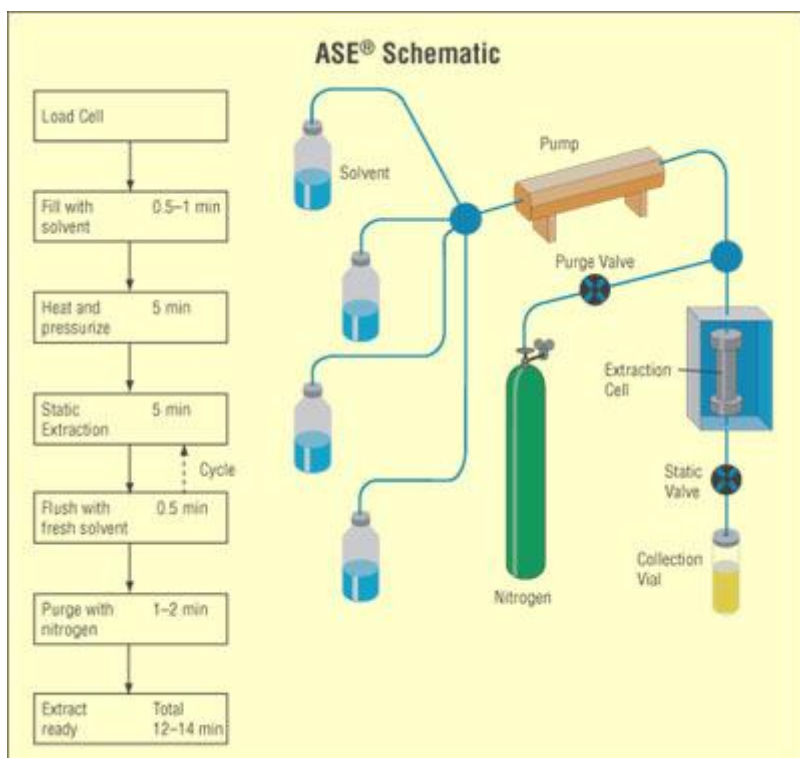
Sellun valmistuksessa on monia eri pesu- ja kuivatusvaiheita. Valtaosa uuteaineista poistuu tietyssä prosessin vaiheissa, mutta joskus prosessissa on jokin heikko lenkki ja uuteaineet pääsevät häiritsemään lopullisen sellun laatua. Tämä uuteaineiden hydrofobinen osa aiheuttaa usein vaikeuksia erityisesti lehtipuu-sellun valmistuksessa. Uuteaine saattaa kerrostua prosessilaitteisiin ja lopputuotteeseen. Uuteaineiden koostumus ja ominaisuudet ovat täten erittäin tärkeä tekijä sellun, erityisesti hienopaperin ja viskoosin valmistuksessa. (Pensar 1977, 186.)

### 3 TYÖSSÄ KÄYTETYT LAITTEET

Tässä luvussa kerrotaan menetelmässä käytetyistä laitteista. Laitteet ovat ASE-200-uuttolaite, HPLC ja sen ELS-detektori.

#### 3.1 ASE-200-uuttolaite

Näytteet käsiteltiin menetelmässä uuttamalla näytteistä uuteaineet asetonivesi-etikkahapposeoksella. Uuttaminen suoritettiin Dionexin valmistamalla ASE-200-uuttolaitteella, jonka suorittama uutto on hyvin verrattavissa perinteisempään Soxhlet-uuttomenetelmään. ASE on lyhennys sanoista accelerated solvent extractor. Toimintaperiaatteen voi nähdä kuvasta 1.

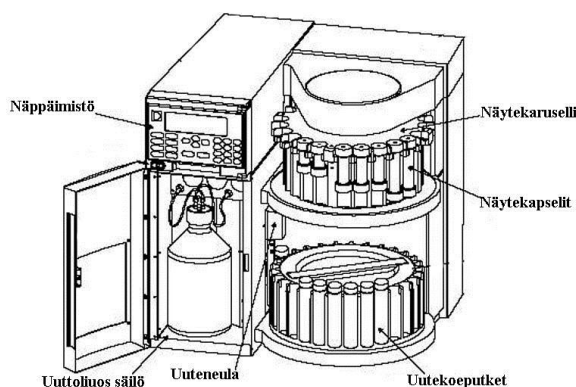


KUVA 1 ASE:n toimintaperiaate

ASElla voi käyttää samoja liuottimia ja menetelmiä kuin esimerkiksi Soxhlet-uutossa, mutta ASE:n suurin etu on sen nopeus. Kun Soxhlet-uutossa kuluu noin neljä tuntia, voidaan sama näyte uuttaa samoilla liuottimilla ASE:lla noin 15 minuutissa. Samalla kun aikaa säästyy, myös liuottimen kulutus on huomattavasti pienempää.

Laitteen yhteydessä oli myös automaattinen liuottimien annostelija. Siihen mahtuu normaalisti neljä kahden litran säilöpulloa, ja se sijaitsee uuttolaitteen vasemmalla puolella.

ASE-laitteisto (kuva 2) tarvitsee toimiakseen myös paineilmaa sekä puhdasta tyypeä. Paineilmalla laite säätelee mekaanisia osia, ja tyypeä tarvitaan paineen tuottamiseen näyttekapselin sisälle.



KUVA 2 Dionex ASE-200

### 3.2 HPLC-ELS

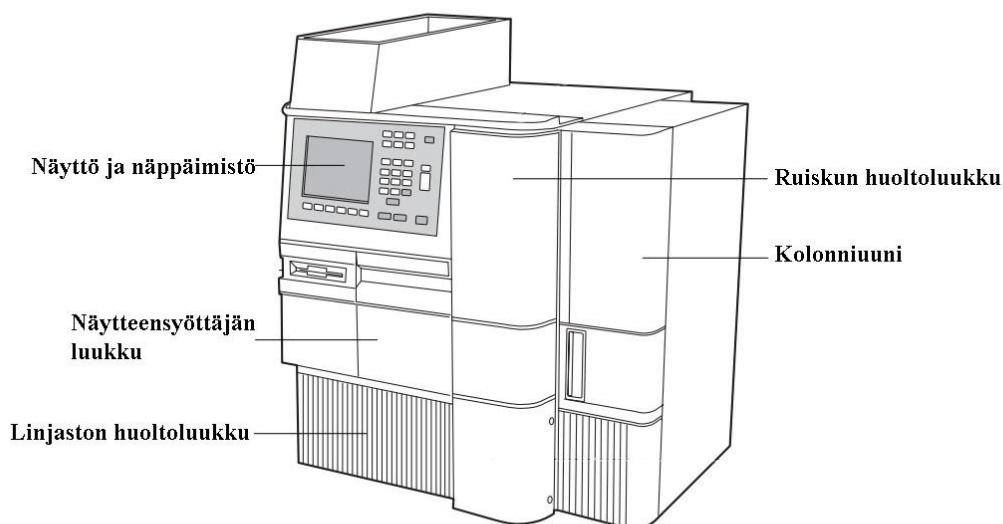
HPLC-ELS-analysilaitteisto (mallinumero oli 2695) oli Watersin valmistama (kuva 3). Laitteistoon kuului degaseri, automaattinen 120-paikkainen näytteen-syöttäjä ja iso kolonniuuni. Erottelussa käytettiin 50 mm:n esikolonnia sekä kah-ta 300 mm:n GPC-kolonnia. Tulokset mitattiin ELS-detektorilla (mallinumero 2424). Kolonnit olivat Jordin valmistamat DVB-kolonnit (divinyylibentseeni). Geelin huokosten koko oli 500 Å kaikissa kolonneissa. Laitteistoa ohjattiin tieto-koneella Empower3-ohjelmistolla.

Detektoria varten tarvittiin myös tyypeä, koska näytteet sumutettiin, kun ne tuli-vat kolonnista detektorille. Tyyppi toimi myös detektorin kantajakaasuna. Työssä käytettiin puhdasta tyypeä pullosta.

Eluettina käytettiin tetrahydrofuraania (THF), johon oli lisätty yhden tilavuus-prosentin verran väkevää (96–100 %) etikkahappoa. Etikkahapon tehtävänä oli estää THF:ssa tapahtuvan säilöntäaineen hajoaminen. Säilöntäaine alkaa hajo-



ta tetrahydrofuraanissa, kun pullo on ollut avattuna jonkin aikaa. Åbo Akademiassa oli testattu etikkahapon pitoisuuden riittävyys THF:ssä. THF on orgaaninen liuotin ja sitä käsiteltäessä käytettiin barrier- tai butyylikumihansikkaita.



*KUVA 3 Waters HPLC 2695*

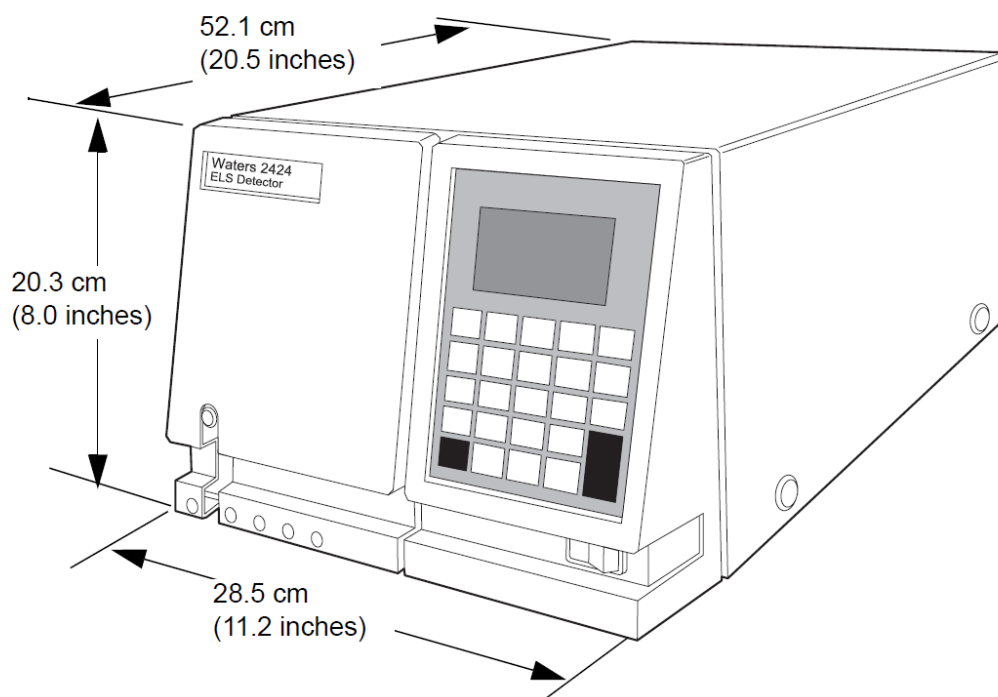
Kolonnit olivat Jordi Gel DVB 500Å - 300 x 7,8 mm ja Jordi Gel DVB 500Å Guard - 50 x 7,8 mm. Analyyttisiä kolonneja oli kaksi peräkkäin. Ne oli tehtaalla säilötty THF:iin.

### **3.3 ELSD - Evaporative light scattering detector**

Valonsirontadetektori soveltuu käytettäväksi parhaiten suurten molekyylien detektointiin ( $MW > 10000$  g/mol). Tulosten tarkkuus kärsii selvästi, kun analyyttien moolimassa on alle 500 g/mol. Detektorin toiminnan kannalta on tärkeää, että sarjaan kytkettyjen detektorien välinen tyhjä tilavuus on minimoitu ja tarkasti tiedossa, koska pieninkin epätarkkuus aiheuttaa poikkeamia moolimassan ja konsentraation väliseen korrelaatioon. (Hyötyläinen–Riekkola 2002, 161.)

ELSD on haihduttava valonsirontadetektor (kuva 4). ELS:n detektointi tapahtuu, kun mobiilifaasi, jossa on analyytti, ensin sumutetaan ja sumutuksesta jäljelle

jäävät pisarat kulkeutuvat kaasuvirtaan, minkä jälkeen mobiilifaasin liuotin haihdutetaan pisaroista. Jäljelle jäänyt analyyttiliuos jää kaasuvirtaukseen. Analyyttiliuos pääsee kulkemaan valonsirontadetektorille, jolloin sen valonsironta mitataan. (2424 Evaporative Light Scattering Detector Operator's Guide 2009, 1-2.)



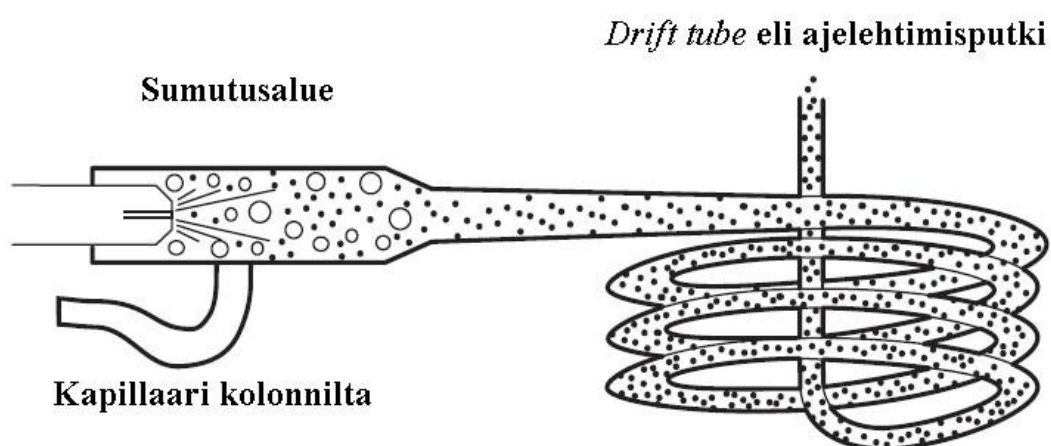
*KUVA 4 Waters ELS-detektori, mallinumero 2424*

ELS-detektori pystyy havaitsemaan kaikki yhdisteet, jotka ovat liuenneina liikkuvaan faasiin ja ovat haihtumattomia mittausolosuhteissa. Sillä pysytään havaitsemaan yhdisteitä, jotka eivät anna tai antavat heikon UV/Vis -vasteen sekä huonosti massaspektrometrissä ionisoituvia yhdisteitä. ELSiä on mahdollista käyttää yhdessä absorbanssidetektorin kanssa. Se toimii myös hyvin isokraattisessa- että gradienttiajossa monilla eri liikkuvilla faaseilla ja lisäaineilla. (2424 Evaporative Light Scattering Detector Operator's Guide 2009, 1-2.)

ELS käsittää kolme erillistä pääaluetta: sumutus, mobiilifaasin poisto ja näytteen havaitseminen. Kaikissa ELS-detektoreissa nämä alueet on sijoitettu niin, että kromatografista tuleva liuos ensin sumuttuu ja sitten mobiilifaasi haihdutetaan

pois, minkä jälkeen kaasuvirtaan jää pelkkä analyytti, josta mitataan valonsiron-  
ta. (2424 Evaporative Light Scattering Detector Operator's Guide 2009, 1-2.)

Näyte sumutetaan yleensä typpellä, jonka jälkeen se kulkeutuu ajelehtimisput-  
keen, jossa siitä haihdutetaan liikkuva faasi eli eluentti (kuva 5). Voimakas kaa-  
suvirta tuottaa pieniä pisaroita, joiden haihdutukseen kuluu vähemmän aikaa.  
Matalalla kaasuvirtauksella syntyy vastavuoroisesti suuria pisaroita, jotka taas  
vaativat enemmän lämpöä, jotta liuotin/eluentti saadaan haihdutettua pois.  
(2424 Evaporative Light Scattering Detector Operator's Guide 2009, 1-3.)



*KUVA 5 Detektorin sumutusalue*

Kun aerosolipisarot poistuvat sumuttimesta ajelehtimisputkeen, niiden koko pie-  
nenee mitä pidemmälle putkessa ne kulkeutuvat. Kuljettajakaasu kuljettaa ana-  
lyytin detektointialueelle ajelehtimisputken jälkeen. Haihtuminen tapahtuu ajan,  
lämpötilan ja kaasunpaineen funktiona. Tämän vuoksi on tärkeää käyttää mobiilifaasina sellaista eluenttia, joka haihtuu ja hajoaa nopeasti. (2424 Evaporative  
Light Scattering Detector Operator's Guide 2009, 1-4.)

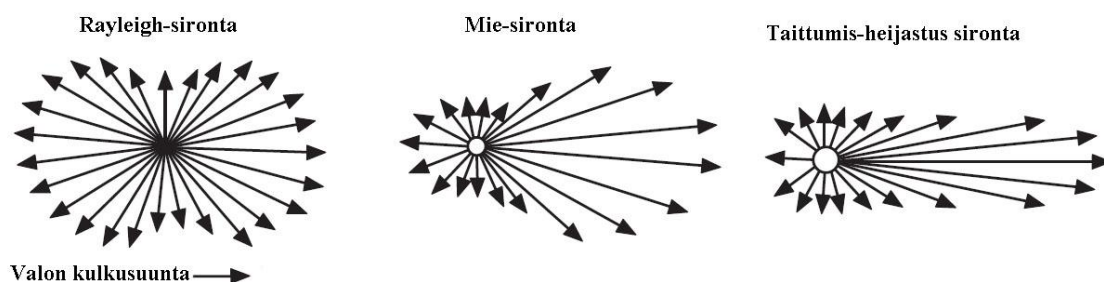
Yleisesti parhaimmat mobiilifaasit ovat eluenteja, joilla on suhteellisen matala  
kiehumispiste ja alhainen viskositeetti. Näihin lukeutuu yleisiä HPLC:ssä käytet-  
tyjä eluenteja kuten vesi, asetonitrilli, metanoli, etanoli ja THF. Eluenteit, joilla on  
korkea kiehumispiste ja korkea viskositeetti saattavat jäädä kiinni tutkittavaan

analyttiin, jolloin tuloksiin tulee taustakohinaa ja analyytin signaali heikkenee, mikä taas johtaa matalaan herkkyteen ja korkeaan toteamisrajaan (LOD). Haihtunut eluentti kondensoituu liuotinloukkuun, ja sieltä se pääsee haihtumaan ilmanpoistoon. (2424 Evaporative Light Scattering Detector Operator's Guide 2009, 1-4.)

Detektointi tapahtuu, kun valosäde törmää näyteanalyytin partikkeleihin ja tästä hajoava valo kulkeutuu valomonistimelle. Valomonistimessa mitataan intensiteetti tämän jälkeen. Analyytin partikkeleiden halkaisijan koko määrittää, miten valo siroaa. Detektori mittaa intensiteetin sironneesta valosta 60 asteen kulmassa suhteessa viritysäteeseen, jotta voidaan minimoida polarisaation vaikutukset ja hajavaloa. Eri kokoisilla partikkeleilla on erilaisia jakautumiskulmia sironneelle valolle, ja partikkeleilla, joiden koot ja muodot vaihtelevat, voi olla erilaisia valonsirontaristeymiä. Yleisesti isommista kappaleista siroaa enemmän valoa, jonka myötä signaalin intensiteetti ja piikin vaste ovat korkeammat. (2424 Evaporative Light Scattering Detector Operator's Guide 2009, 1-4.)

Valomonistin muuttaa sironneen valon signaalin jännitteeksi, joka pystytään tallentamaan ja analysoimaan. Sironnut valo antaa kromatogrammissa karkean mitan näytteen massan määrästä. Massan arvio voi olla täysin yhdisteestä riippumaton, mutta siihen voi toisaalta vaikuttaa myös näytteen tiheys. Esimerkiksi jos sama näyte on tiukassa kimpussa, kuten nyrkki, sen pinta-ala on pieni, mutta jos sama näyte on auenneena, kuten avoin kämmen, on sen pinta-ala suurempi, jolloin sen on mahdollista hajauttaa valoa enemmän. ELS-detektorin antamalla tuloksella ei ole suoraa yhteyttä näytteen molekyylipainon kanssa. (2424 Evaporative Light Scattering Detector Operator's Guide 2009, 1-4.)

Sirontatyyppejä on kolme: Rayleigh-, Mie- ja taittumis-heijastussironta (kuva 6). Pienimmät partikkelit tuottavat eniten Rayleigh-sirontaa, kun taas suurimmat partikkelit tuottavat taittumis-heijastussirontaa. Kaikista partikkeleista lähtee jokaista sirontatyyppiä koosta riippumatta. (2424 Evaporative Light Scattering Detector Operator's Guide 2009, 1-6.)



KUVA 6 ELS-detektorissa tapahtuvia valon sironnan eri muotoja

ELS-detektorin heikkouksiksi luetellaan seuraavaa:

- Lineaarisuuden heikkous laajalla konsentraatioalueella, voi vaatia laajaa kokeilua, jotta saadaan riittävän lineaarinen tulos.
- Näyte tuhoutuu, kun se haihdutetaan.
- Kaikki partikkelit voivat haitata detektorin näytesignaalia. Tästä voi aiheutua haitallista taustakohinaa.
- Detektorin herkkyys hiukkasiin nostaa kohinaa ja sitä myöten signaalikohinavaihtelua. Tähän voi vaikuttaa liikkuvanfaasin laatu. Myös stationaarifaasin osasia voi huuhtoutua kolonnista ja kasautua liikkuvanfaasin hiukkaskuormaan. Mahdollisia ylimääräisiä hiukkasia voidaan estää suodattamalla eluentti, kuljettajakaasu ja näytteet.
- Detektori ei pysty havaitsemaan analyyttimolekyylejä, joiden haihtuvuus on lähellä liikkuvanfaasin haihtuvuutta. Molemmat vain haihtuvat pois, eikä pisaroihin jää analyyttiä.
- Pohjaviivan ryömintään voi vaikuttaa nestekromatografissa tehtävä gradienttija, jolloin esimerkiksi eluenttisuhteita muutetaan. (2424 Evaporative Light Scattering Detector Operator's Guide 2009, 1-7.)

## 4 ASE-UUTTO JA NÄYTTEIDEN KÄSITTELY

Menetelmä, jota käytettiin tässä työssä, oli kehitetty jo aikaisemmin Åbo Akademiassa sellunäytteiden analysointiin, kun haluttiin tutkia uuteainepitoisuuksia sellussa. Menetelmässä oli myös perehdytty näytteen käsittelyyn ennen uuttoa ja sen jälkeen, joten sen käyttöönotto oli suhteellisen sujuvaa myös toisessa laboratoriossa.

Åbo Akademiassa menetelmän tuloksista oli laskettu pitoisuuksia, mutta koska tarkat pitoisuudet eivät olleet kiinnostuksen kohteena tämän työn tuloksista, ei matemaattisia pitoisuuksia laskettu. Muutenkin pitoisuuksien laskeminen molekyylikromatografiassa on vain suuntaa antava, koska tulokset ovat suhdelukuja erikokoisten molekyylien suhteesta, eikä tällöin voida sanoa varmuudella, että jotain tiettyä molekyyliä on jokin tietty määrä. Tuloksista näki suhteen oliko esimerkiksi jotain pienikokoista molekyyliä enemmän näytteessä X kuin näytteessä Y.

Varsinainen työ aloitettiin asentamalla ASE-uuttolaite paikoilleen. Laitetta käytettiin uuttolaitteessa olevalla hallintanäppäimistöllä. Laite sijoitettiin vetokaappiin ja laitteella käytettiin paineilmaa sekä typpikaasua. Typpeä tarvittiin paineen muodostamiseen uuton yhteydessä. Uuttolaite vaati 15 baarin paineen. Laitteistoon kuuluivat uuttokapselit, näytepullot, uuttoliuospullot ja muut tarpeelliset välineet.

### 4.1 Näytteen esikäsittely

Menetelmässä oli käytetty näytteen määränä 7–9 grammaa kuivaa sellua. Koska mitattavaksi tarkoitetut näytteet olivat kuivia selluarkkeja, jouduttiin perehtymään, kuinka ne saadaan parhaiten mahtumaan uuttokapseliin. Kuivaa selluarkkia ei voitu taitella vaadittua 7–9 grammaa suoraan uuttokapseliin, jonka halkaisija oli noin 15 mm. Sellun sai pumpulin kaltaiseksi pehmeäksi ja pieneksi vanuksi pienellä IKA:n valmistamalla analyyttisellä myllyllä (kuva 7). Kun sellu oli pumpulina, se oli helppo asetella uuttokapseliin.



*KUVA 7 IKA:n valmistama analyttinen mylly*

## **4.2 Näytteiden uuttaminen**

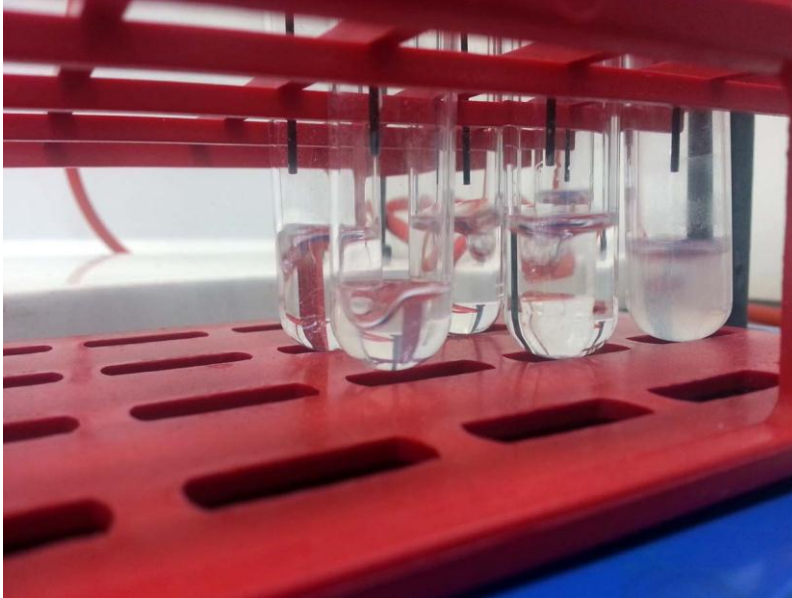
Kun tutkittava sellunäyte oli kapselissa, voitiin tehdä itse uuttoliuos. Menetelmässä uuttoliuos oli seuraavanlainen, 95 osaa asetonia, viisi osaa vettä ja yksi osa väkevää etikkahappoa, eli yhteensä 101 osaa. Liuos tehtiin ottamalla ensin 950 ml asetonia, johon sitten lisättiin 50 ml vettä ja lopuksi vielä 10 ml väkevää etikkahappoa (96–100 %). Tämä liuos tehtiin erikseen, vaikkakin uuttolaitteen yhteydessä oli uuttoliuosten annostelija, jolla olisi voitu annostella halutut osuudet.

Uutto-ohjelma oli tehty jo testiajon yhteydessä. Syklejä oli kolme ja niiden staattinen pitoaika oli 10 minuuttia, eli uuton kesto oli noin 30 minuuttia. Paineeksi asetettiin 2000 psi ja lämpötila oli 100 °C. Näytteistä saatiin uutettua uuttoliuosta eri määriä 45–60 ml

## **4.3 Näytteiden jatkokäsittely**

Seuraavaksi uutetut näytteet siirrettiin 50 ml:n mittapulloihin. Jos näytettä oli tullut enemmän kuin 50 ml, sitä piti haihduttaa hetki typpivirtauksessa, jotta se saatiin mahtumaan 50 ml:n mittapulloon. Kun näytteet olivat 50 ml:n mittapulloissa, täytettiin mittapullot merkkiin asti asetonilla. Tämä tehtiin sen vuoksi, että tiedettiin näytteiden pitoisuus. Jos näytettä oli esimerkiksi punnittu 7 grammaa uuttoon, 50 ml:n tilavuudessa sen konsentraatio oli 140 mg/ml.

Mittapulloista otettiin näytettä 10 ml koeputkiin ja koeputket asetettiin sen jälkeen typpivirtaukseen (kuva 8), jossa ne kuivatettiin. Koska uuttoeluentissa oli vettä, kuivatus kesti noin kolme tuntia. Kun koeputkissa ollut liuos oli kuivunut, ne voitiin liuottaa uudestaan 1 ml:aan tetrahydrofuraania. Tämän jälkeen näytteet olivat valmiita mittausta varten.



*KUVA 8 Näytteet typpikuivauksessa*

#### **4.4 Tehdasnäytteet**

Varsinaisia analysoitavia sellutehdasnäytteitä oli kuusi kappaletta. Niihin viitataan nimillä N1, N2, N3, N4, N5 ja N6. Näytteiden punnitukset voi nähdä taulukosta 1.

*TAULUKKO 1 Tehdasnäytteiden punnitukset*

	Punnittu (gramma)
N1	7,109
N2	7,027
N3	7,124
N4	8,040
N5	7,901
N6	7,999



Näyte N6 oli havusellua ja muut näytteet olivat lehtipuusellua. Kun näytteet oli punnittu, ne asetettiin myllyyn. Pumpuliksi jauhettu sellunäyte laitettiin säilöpurkkiin odottamaan ASE-uuttoa.

Kun näytteet oli saatu kuivatettua ja uudelleen liuotettua THF:lla, ne piti suodattaa ruiskusuodattimella. Ruiskusuodatin oli Millipore IC Millex-LH Hydrophilic PTFE 0,45 µm. THF kestävässä ruiskussa ei saanut olla ruiskumännässä kumia. Jos ruiskumännässä oli kumia, se liukeni THF:iin ja aiheutti ylimääräisen suuren piikin HPLC-ELS-mittauksissa.

## 5 HPLC-ELS

Laitteen säätämiseen ja käyttöön saattamiseen käytettiin tuntimääräisesti suurin osa opinnäytetyössä kuluneesta työajasta. Tämä aika sisälsi myös ohjelmistolla tapahtuvan integroinnin säätämiset ja muut ohjelmistoon liittyneet ongelmien ratkomiset. Ongelmien ratkaisussa saatiin myös ratkaistua jo aiemmin ongelmiksi olleita ongelma-kohtia.

Ensimmäiseksi vaihdettiin kolonnit. Aiemmin samaisella HPLC:lla oli mitattu NaOH-liuoksessa olevia näytteitä, eivätkä kolonnit sen vuoksi sopineet uuteen menetelmään. Kun kolonnit oli vaihdettu, liitettiin kapillaari kulkemaan kolonnista suoraan ELS-detektorille. Seuraavana laitteeseen ajettiin THF (joka sisälsi 1-prosentin verran väkevää etikkahappoa (96–100 %)) ja testattiin, miten ELS havaitsi pelkän THF-eluentin ja GC-standardin. Standardi sisälsi neljä eri molekyyliä: Tridecanoic acid, heneicosanoic acid, cholesteryl heptadecanoate ja 1,3-dipalmitoyl-2-oleyl glycerol. Samalla yritettiin selvittää, kuinka ELS-detektorin sumuttimen lämmitys toimii, koska menetelmässä oli sumuttimeen asetettu lämpötila 40 °C. Empower3-ohjelmistossa sumuttimen lämpötila ilmoitettiin tehopro-senttina, eikä se suoraan antanut lukua, kuinka lämpimäksi sumutin tulee kyseisellä teholla.

### 5.1 Sumuttimen lämpötila

Sumuttimen lämpötilan säätöä selvittäessä koeajot suoritettiin Åbo Akademin menetelmää mukaillen. Åbo Akademin menetelmässä sumuttimen lämpötilaksi oli säädetty 40 °C, ja koska käytössä olleessa laitteessa lämpötila säädettiin oudosti tehopro-senttina, piti säätö kokeilla eri tehoilla. Testimittausnäytteenä käytettiin neljä standardia sisältävää GC-standardia, jotta koeajoissa näkyisi muutakin kuin pohjaviiva.

Tehopro-sentiksi laitettiin kevyesti 10 %, mutta lämpötila jäi noin 25 °C:n lämpötilaan. Seuraavaksi laitettiin tehoksi 40 % ja lämpötila oli noin 32 °C. Itse tuloksissa ei näkynyt juurikaan mitään eroa, koska sumuttimen lämpötilan korkeus vaikuttaa siihen, miten paljon mahdollista näytteen massaa kulkeutuu ajelehtimisputkeen. Koenäytteen kohdalla ei enää tapahtunut muutoksia, vaikka sumu-

tinta lämmitettiin. Seuraava tehoprosentti oli 60 ja lämpötila jäi hiukan alle 40 asteen, noin 37 asteeseen. Lopulta ei enää tehty koeajoja, kun haluttiin selvittää lämpötilaa, koska sumuttimen tehon pystyi laittamaan suuremmalle ilman erillistä ajon valmistelua ja koska näytteissä ei näkynyt mitään eroja vaikka sumuttimen lämpötilaa nostettiin. Lähes 40 °C:n lämpötilaan päästiin, kun tehoksi asetettiin 67 %.

Menetelmän muut yleisimmät muutettavat asetukset näkyvät taulukosta 2. Näytteenottotilavuus oli 50 µl. Näitä asetuksia ei muutettu enää työn aikana.

*TAULUKKO 2 W2690/5 Instrument Setup*

Stroke Volume	50uL (flow rates <= 1.23 mL/min)
Syringe Draw Rate	Normal
Degas Mode	On
Pump Mode	Isocratic
Flow	0.800 (ml/min)
%A	100.0
%B	0.0
%C	0.0
%D	0.0
High Limit	4000.0 psi
Low Limit	0.0 psi
Spurge A	0.0
Spurge B	0.0
Spurge C	0.0
Spurge D	0.0
Column Temp Target	40.0 °C
Needle Wash	Normal
Solvent A	THF + 1% Acetic Acid
Solvent B	
Solvent C	
Solvent D	

## 5.2 Standardit

Sumutinkoeajojen yhteydessä käytettiin GC-standardia, joka sisälsi neljä pientä molekyyliä, mutta sitä ei käytetty suoraan sellaisenaan, vaan sen eri molekyylit mitattiin erikseen omina mittauksina. Tämä siksi, että oli mahdollista käyttää polystyreenistandardeja, joiden molekyylipainoalue oli 580–17000.

Polystyreenistandardeille (kuva 9 ja tauluko 3) tehtiin liukenemiskoe, jotta saatiin selville, liukenevatko ne THF:iin. Kaikki 10 polystyreenistandardia liukenevat THF:iin erinomaisesti. Seuraavaksi tehtiin koeliuos yhdestä standardista, jotta nähtiin, kuinka se sijoittuisi kromatogrammille ja kuinka vahva liuoksen kannattaisi olla.



KUVA 9 Polystyreenistandardit

TAULUKKO 3 Polystyreenistandardit

	Mp	Mw/Mn
1	580	1,14
2	1050	1,21
3	1240	1,08
4	1770	1,06
5	2470	1,06
6	3770	1,04
7	5100	1,04
8	7600	1,04
9	12500	1,04
10	17000	1,04

Koe suoritettiin standardilla, joka oli Mp 1240. Ensin sitä punnittiin noin 50 mg 10 ml:n tilavuuteen. Tästä vielä laimennettiin 1:10 (1 ml/10 ml), jolloin lopullinen konsentraatio oli noin 0,5 mg/ml (taulukko 4). Koeajo näytti hyvältä, joten muut-

kin standardit oli hyvä liuottaa THF:iin. Kaikista standardeista tehtiin samanlaiset laimennokset.

*TAULUKKO 4 Standardien laimennos*

1. laimennos	1. konsentraatio.	2.laimennos	Lopullinen konsentraatio
Punnittu ~50 mg 10 ml:n mittapulloon	5 mg/ml	1 ml 10 ml:n mittapulloon	0,5 mg/ml

Kun kaikki standardit oli mitattu, niistä tehtiin kalibrointisuora. Mukaan otettiin myös neljä yksittäin mitattua GC-standardin sisältämää ainetta. Kalibrointisuorasta jätettiin pois Mp 580 -standardi, koska sen mittaustulokset olivat vaihtelevia. Standardisuoran tulokset voi nähdä liitteestä 1. Suora oli ensimmäisen asteen sovitus ja selitysaste oli 0,989, joka on erinomainen SEC-standardisuoraksi.

### **5.3 Näytteiden mittaus**

Kun standardisuora oli saatu ajettua sisään ja integroitua mittausta varten, voitiin siirtyä näytteiden analysointiin. Näytteet suodatettiin ruiskusuodattimella suoraan näytepulloihin (1,5 ml:n kokoisia) ja suljettiin pulloihin kuuluvilla korkeilla, joissa oli septumi, jonka läpi HPLC:n automaattinen näyteruisku oli mahdollista mennä.

Näyte N1:stä oli myös näyte eri valmistuserästä sekä prosessin eri vaiheesta. Näiden kahden näytteen käsittely ja mittaus oli sama kuin muissa sellunäytteissä.

Sellunäytteet olivat tämän työn tärkein näyte. Näiden lisäksi menetelmää kokeiltiin myös toisenlaisiin näytteisiin joihin viitataan nimillä P1, P2, P3 ja P4, sekä kolmea niiden kaltaista näytettä joiden nimet ovat LMW, HMW ja PO. Nämä näytteet liuotettiin myös THF:iin. Niihin käytettiin samaa standardisuoraa kuin sellunäytteisiin.

## 6 MITTAUSTULOKSET

Tulosten tulkinta on hyvin tuloksen tarkastelijan silmissä, koska mittaukset suoritettiin kvalitatiivisesti. Eroja eri selluissa oli selvästi nähtävissä ja ne sellut, joiden tiedettiin jo etukäteen olevan puhtaampia uuteaineista, antoivat oletuksen mukaisia tuloksia mittauksissa. Myös likaisiksi oletetuista näytteistä löytyi selviä viitteitä uuteaineista. Tulosten käsittelyssä jouduttiin suorittamaan käsin integrointia jonkin verran, jotta menetelmän integrointiparametrit saatiin kohdilleen. Kun parametrit olivat kohdillaan, pystyttiin näytteiden tulokset integroimaan automaattisesti.

Lisäksi mitatut P -näytteet antoivat oletuksen mukaisia tuloksia, mutta niiden tulosten tarkempi tulkinta ei kuulu tämän opinnäytetyön piiriin. Niiden tulokset antoivat kuitenkin hyvän viitteen siitä, että menetelmän ajo-olosuhteet olivat hyvät myös niiden kaltaisille näytteille.

### 6.1 N-näytteet

N1 oli tässä työssä mielenkiintoisin näyte. Sen tulokset antoivat viitteitä mahdollisesta ongelmasta sellunvalmistuksessa. N1-näytteen tuloksia pystyttiin myös vertaamaan Åbo Akademiassa tehtyjen mittausten tuloksiin, koska heillä oli siellä samalta tehtaalta ja samasta valmistuksen vaiheesta otettuja näytteitä. Muut N-näytteet antoivat vertailukohtia N1-näytteelle ja todistivat myös menetelmän toimivuutta.

Liitteestä 2 voi nähdä näytteen N1 kromatogrammin. Sen korkein piikki ylitti 2000 LSU:n (light scattering unit) arvon, vaikka se oli laimennettu menetelmän mukaisesti. Tämä yksistään antoi ymmärtää, että näyte sisälsi tavallista korkeamman pitoisuuden uuteaineita.

Näytteet N2 ja N3 olivat eri yritysten valmistamia selluja. Näytteet N1, N4, N5 ja N6 ovat saman yrityksen valmistamia. Näytteen N2 tulokset ovat näkyvillä liitteessä 3. Kokonaisjakauman muoto on osittain sama kuin näytteessä N1 mutta pitoisuudet ovat selvästi alhaisemmat ja pienien molekyylien osuus on matalampi.

Näyte N3:a on yleisesti pidetty puhtaana selluna. Kromatogrammi on liitteessä 4. Molekyylijakauman muoto on aivan erilainen kuin aiemmissa näytteissä. Se näytti sisältävän huomattavasti enemmän isompia molekyyliä kuin näytteet N1 ja N2.

Näytteen N4 molekyylijakauman näkee kromatogrammista (liite 5). Se on osittain saman muotoinen kuin N1:ssä, mutta pitoisuudet ovat selvästi alhaisemmat, eikä pienien molekyylien osuus ole niin korkea. Näyte N5 on osittain samanmuotoinen, mutta pienten molekyylien osuus on korkeampi suhteessa isoihin, kuin näyte N4:ssä. N5:n kromatogrammi on liitteessä 6. Näyte N5 muistuttaa enemmän muodoltaan N1:tä mutta pitoisuudet ovat selvästi alhaisemmat, jopa alhaisemmat kuin N4:ssä.

Näyte N6 oli havupuusellua. Sen tulos on hyvä vertailukohta menetelmän soveltuvuudesta havaita uuteaineita sellusta. Havupuusellu puhdistuu lähes kaikesta ylimääräisestä uuteaineesta prosessin edetessä, eivätkä sen uuteainepitoisuudet ole tällöin korkeat. Kromatogrammista (liite 7) näkee, että pitoisuudet ovat matalat, eikä jakauma ole järin suuri, lähinnä pienempiä polymeerisiä molekyyliä painoluokaltaan noin 300–1600 mw (molecular weight).

Kaikki N-näytteet ovat nähtävissä samassa kromatogrammissa liitteessä 8. Näytteen N1 uuteainepitoisuuden korkeus on hyvin nähtävissä, kun kaikki kuusi eri näytettä ovat samassa kuvaajassa. Vastaavasti näyte N6, joka oli havupuusellua, on selvästi matalampi kuin yksikään muu näytteistä. Myös molekyylijakaumat näkyvät selvästi. Saman yrityksen valmistamat lehtipuusellut N1, N4 ja N5 näyttävät olevan hyvin samanmuotoisia molekyylijakaumaltaan. Pitoisuusero näytteeseen N1 on huomattavan suuri. Näyte N1 uutettiin myös uudestaan, ja tulos oli sama. Uuteaineista hyvin pestynä pidetty sellu N3 antoi hyvin erimuotoisen molekyylijakauman, ja sen näkee hyvin, kun verrataan kaikkia näytteitä.

## **6.2 Näyte N1 eri vaiheista**

Näyte N1:stä oli sellunäytteitä prosessin eri vaiheista. Liite 9:ssä on kuvattuna kaikki kolme eri vaiheen ja eri prosessointipäivien näytteitä. Lisäksi varsinaisesta N1 näytteestä oli summittainen laimennos tehty ja mitattu kromatografilla.

Näiden mittausten merkitys oli, että nähtiin, että samalta tehtaalta tulevien sel-lunäytteiden molekyylijakauma on samansuuntainen. Pitoisuuserot johtuvat sii-tä, että näytteet on otettu prosessin eri vaiheista. Uuteaineiden pitoisuus vähe-nee, mitä pidemmälle prosessia viedään. Prosessissa on useita eri pesuvaihei-ta, jotka poistavat uuteaineita. Molekyylijakauma näyttää muuttuvan enemmän pienten molekyylien suuntaan, mitä pidemmälle prosessi etenee. Näyte N1-2 on pisimmälle prosessoitu ja N1 on vähiten prosessoitu näyte. Laimennetusta N1-näytteestä voi nähdä vielä saman muodon kuin alkuperäisestä N1 näytteestä. Se myös antaa paremman näkymän siihen, missä suhteessa pieniä molekyyliä on suhteessa isoihin. Liitteessä 10 on näytteet erillisillä kromatogrammeilla.

### **6.3 P-näytteet**

P-näytteet olivat hyvin toistensa kaltaisia. Niitä varten mitattiin myös kolme nii-den kaltaista referenssiainetta, jotta tuloksista saatiin suuntaa antavia. Liitteestä 11 voidaan nähdä näytteet P1, P2, P3 ja P4 samassa kromatogrammissa, jossa niiden molekyylijakauman vertailu paljastaa niiden olevan lähellä toisiaan. Liite 12 näyttää jokaisen P-näytteen erikseen.

P-näytteitä varten mitatut referenssiaineet voidaan nähdä liitteissä numero 13 ja 14. Muodot ja jakaumat ovat hyvin samankaltaisia kuin P-näytteissä. Tarkem-mat analyysit näytteistä teki toinen tutkija. Tulokset kuitenkin antoivat hyvän vaikutelman menetelmän toimivuudesta myös toisenlaisille näytteille.

### **6.4 Tulosten yhteenveto**

N- ja P-näytteiden mittaus sujui HPLC:llä mallikkaasti. Tulokset olivat odotus-tenmukaisia ja näytteiden käsittely oli sujuvaa. Mielenkiintoisin näyte N1 oli täsmälleen sellainen kuin sen pitikin olla, kun sitä verrattiin Åbo Akademin tu-loksiin.



## 7 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli tarkoitus ottaa käyttöön Turun Åbo Akademiassa kehitetty menetelmä, jolla havaittiin polymeerisiä uuteaineita sellunäytteistä. Menetelmässä käytettiin HPLC-ELS-analyysilaitteistoa.

Opinnäytetyön ajatusprosessi lähti käyntiin jo kesällä 2012, kun tuli tieto mahdollisesta opinnäytetyöstä UPM:n tutkimuskeskuksella. Olin tutkijaharjoittelijana tutkimuskeskuksella kesän ja syksyn ajan, jolloin oli mahdollista suunnitella etukäteen opinnäytetyötä ja samalla varata HPLC työtä varten. Samalla kun varattiin HPLC, tilattiin tarvittavat kolonnit työtä varten. Itse työ oli tarkoitus aloittaa tammikuussa 2013.

Työ aloitettiin ASE-laitteen ylösajolla. ASEa ei ollut käytetty useaan kuukauteen ja se oli siirretty uudelle paikalle, joten se piti kytkeä alusta alkaen uusiksi. Hoitin henkilökohtaisesti suurimman osan kytkennöistä ja kytkentöjen jälkeen suoritin koeajot. ASEN ylösajo sujui hyvin ja koeajot sujuivat mallikkaasti. Mittaus-työn aloitus viivästyi, koska opinnäytetyötä varten varattu HPLC oli vielä varattu toiseen työhön, joka oli viivästynyt. Itse HPLC-mittauksiin päästiin helmikuun alussa. Tämän väliajan käytin teoriapohjan kartuttamiseen uuteaineista. Harmillisesti kunnollista, selvää tietoa, ei ollut saatavilla. Suullista tietoa uuteaineista oli paljon, mutta tätä raporttia varten ei ollut helppoa löytää kirjallista taustaa.

HPLC-laite itsessään oli sujuva käyttää, mutta ohjelmisto, jolla laitetta ohjattiin tietokoneella, oli hiukan erikoinen. Aluksi ohjelmistossa kummastutti detektorin sumuttimen lämpötilansäätö. Sumuttimen lämpötila ilmoitettiin koko ajan celsius-asteissa, mutta sen lämpötila säädettiin silti tehoprosenttina, mille ei löytynyt selitystä. Kaikki muut asetukset olivat selkeitä syöttää, eivätkä ne vaatineet erillistä perehtymistä. Varsinaiset kromatografiset mittaukset sujuivat hyvin, eikä menetelmä vaatinut erillistä säätämistä.

Tulosten integroinnissa oli aluksi ongelmia ohjelmiston erityislaatuisen logiikan vuoksi. Tätä integrointiongelmia oli jo aiemmin yritetty ratkoa laitekouluttajien avulla. He olivat yrittäneet selvittää ongelmaa ulkomaita myöten, tuloksetta. Sain ratkaistua tämän erikoisen toimintatavan integroinnissa ja pääsimme on-

nistuneesti eteenpäin. Tästä on hyötyä myös tulevaisuudessa muissakin mittauksissa kyseisellä ohjelmistolla.

Työn mittaustulokset olivat toivotun kaltaisia. Näyte N1 antoi korkeat pitoisuudet, jota sen oletettiin sisältävän. Myös P-näytteet olivat oletuksen mukaisia, vaikka menetelmän soveltuvuudesta kyseisille näytteille ei ollut mitään varmuutta. Menetelmän toimivuus antoi mahdollisuuden käyttää kyseistä menetelmää myös tulevaisuudessa ja P-näytteiden toimivuus samalla menetelmällä mahdollistaa menetelmän laajemman käytön.

Ajankäyttö sujui erinomaisesti kokeellisessa osuudessa, vaikka mittausten aloitus viivästy. Mittausten sujuvuus paikkasi myöhästyneen aloituksen ja antoi myös mahdollisuuden kokeilla menetelmää toisiin näytteisiin. Mittausten sujuvuus antoi myös todellisen onnistumisen tunteen, eikä opinnäytetyön kokeellinen osuus ollut turhaa. Opinnäytetyön kirjoittamista hidasti teorian tiedon löytämisen vaikeus. Tästä huolimatta työ onnistui kokonaisuutena hyvin.

## LÄHTEET

Hyötyläinen, Tuula – Riekkola, Marja-Liisa 2002. Kolonnikromatografia ja kapillaarielektromigraatiotekniikat. 2. painos. Helsinki: Yliopistopaino

Pensar, Göran 1977. Puun uuteaineet. Teoksessa Jensen, Waldemar (toim.) Puukemia Suomen Paperi-insinöörien Yhdistyksen oppi- ja käsikirja I. 2. uudistettu painos. Turku: Polytypos.

2424 Evaporative Light Scattering Detector Operator's Guide. 2009. Ohje-manuaali. Waters

## LIITTEET

Liite 1 HPLC-ELS kalibrointikuvaaja Empower3 ohjelmistolla.

Liite 2 Näyte N1 kromatogrammi ja molekyylijakaumataulukko.

Liite 3 Näyte N2 kromatogrammi ja molekyylijakaumataulukko.

Liite 4 Näyte N3 kromatogrammi ja molekyylijakaumataulukko.

Liite 5 Näyte N4 kromatogrammi ja molekyylijakaumataulukko.

Liite 6 Näyte N5 kromatogrammi ja molekyylijakaumataulukko.

Liite 7 Näyte N6 kromatogrammi ja molekyylijakaumataulukko.

Liite 8 Näytteet N1-N6 yhdessä kromatogrammissa.

Liite 9 Näytteet N1, N1-2, N1-3 ja N1 laimennettuna, kuvattuna yhdessä kromatogrammissa.

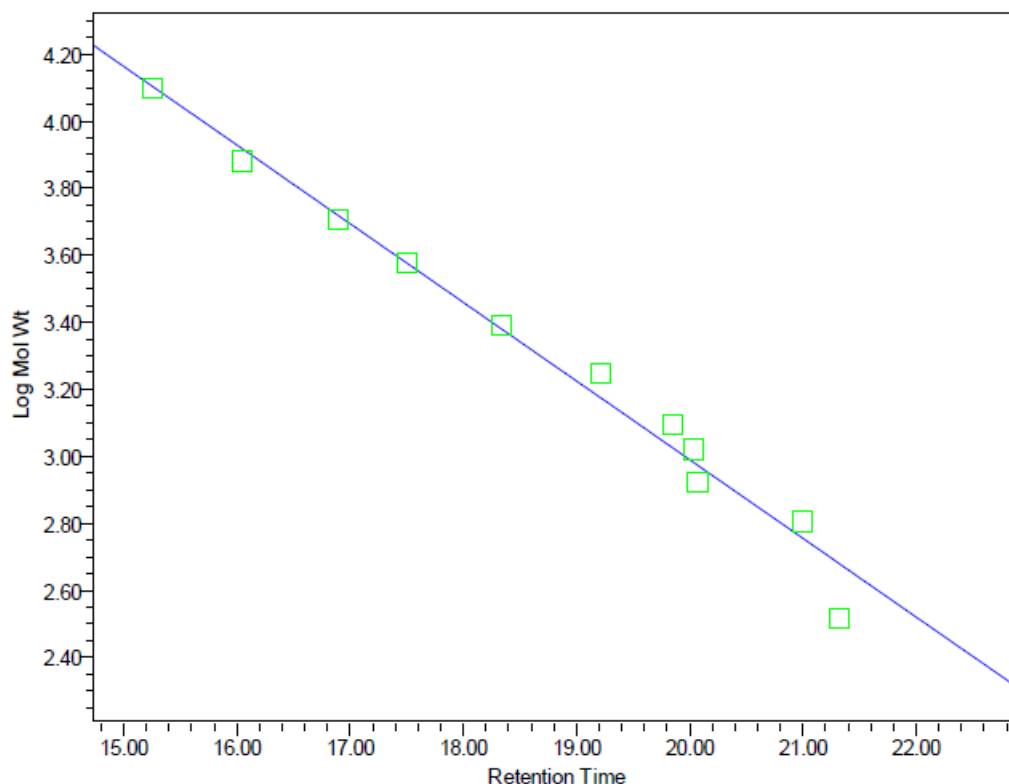
Liite 10 Näytteet N1, N1-2, N1-3 ja N1 laimennettuna, neljässä erillisessä kromatogrammissa.

Liite 11 Näytteet P1-P4 samassa kromatogrammissa.

Liite 12 Näytteet P1-P4 erillisissä kromatogrammeissa.

Liite 13 Näytteet LMW, HMW ja PO samassa kromatogrammissa.

Liite 14 Näytteet LMW, HMW ja PO erillisissä kromatogrammeissa.



**GPC Calibration Table**

	Mol Wt (Daltons)	Retention Time (min)	Calculated Weight (Daltons)	% Residual
1	17000	14.728	16873	0.753
2	12500	15.260	12660	-1.265
3	7600	16.044	8285	-8.267
4	5100	16.894	5236	-2.591
5	3770	17.505	3762	0.204
6	2470	18.337	2400	2.937
7	1770	19.213	1495	18.433
8	1240	19.852	1058	17.171
9	1050	20.034	959	9.450
10	833	20.070	941	-11.442
11	639	20.997	570	12.091
12	327	21.325	477	-31.511
13	214	22.911	203	5.623

Fit Type Linear (1st Order)

Equation  $\text{Log Mol Wt} = s - 2.35e-001 T^{*1}$

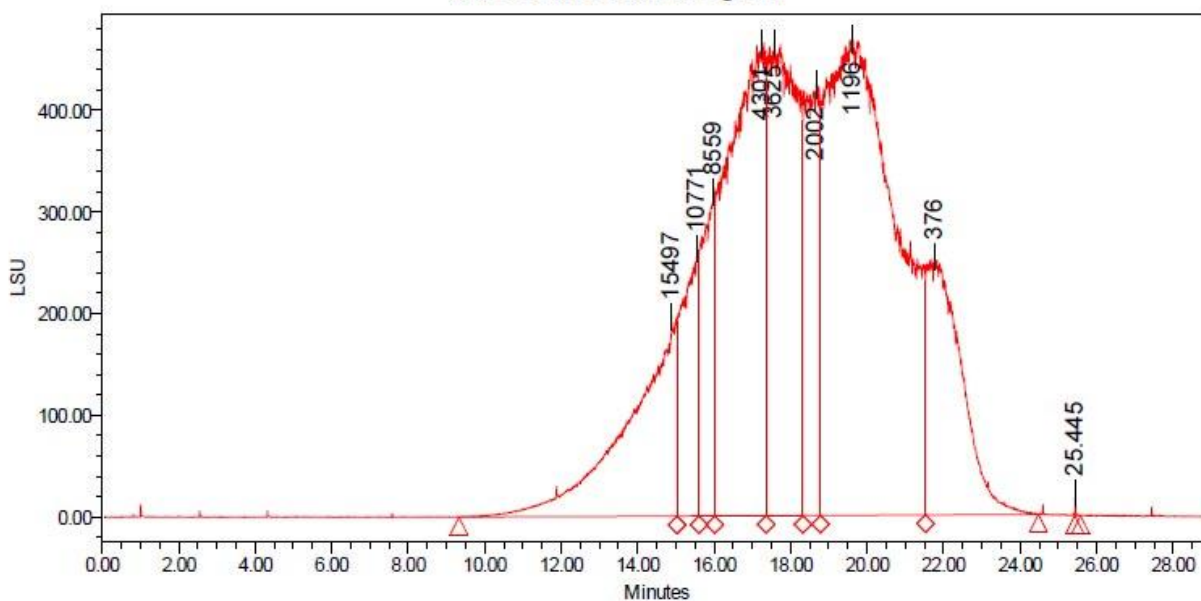
R<sup>2</sup> 0.988879





SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	<b>N3</b>	Acquired By:	u018hplc
Sample Type:	Broad Unknown	Sample Set Name:	
Vial:	2	Acq. Method Set:	Juho_ELS_uuteaineet
Injection #:	1	Processing Method:	Apex iso kalib uutteet
Injection Volume:	50.00 ul	Channel Name:	ELSD Signal
Run Time:	29.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	ELSD Signal
Date Acquired:	3/1/2013 1:42:38 PM EET		
Date Processed:	3/12/2013 9:55:28 AM EET		

Auto-Scaled Chromatogram



GPC Results

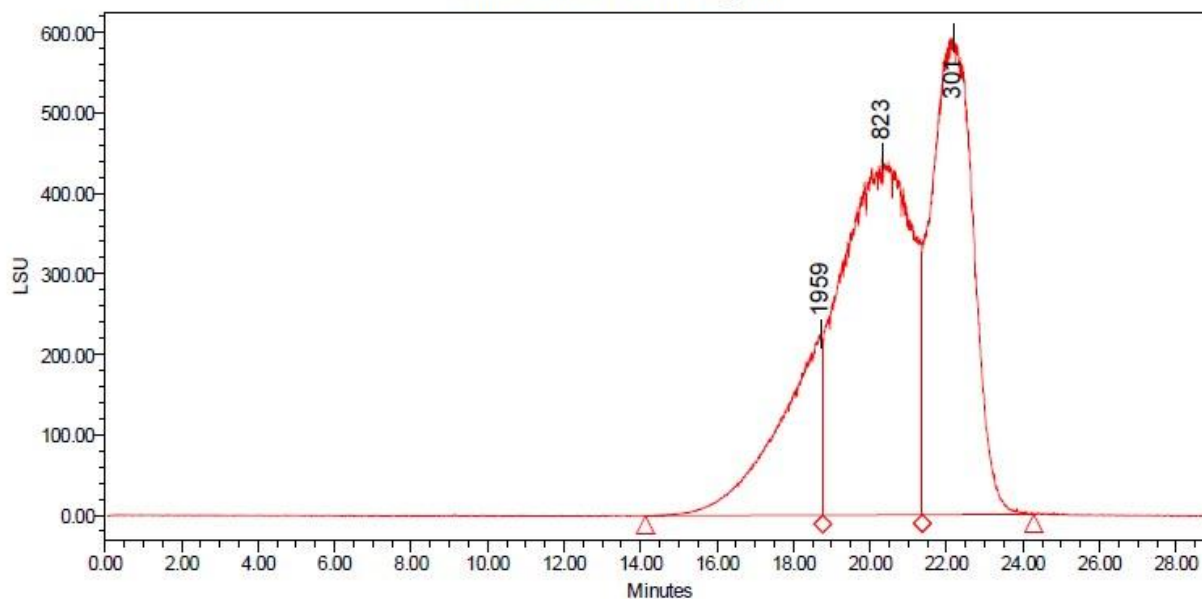
	Dist Name	Mn	Mw	MP	Mz	Mz+1	Mv	Polydispersity	MW Marker 1	MW Marker 2
1										
2		15489	15524	15497	15559	15593		1.002233		
3		12128	12226	10771	12326	12426		1.008110		
4		9352	9391	8559	9430	9469		1.004142		
5		5589	5835	4301	6093	6349		1.043941		
6		3118	3189	3625	3259	3328		1.022585		
7		2129	2140	2002	2152	2163		1.005263		
8		900	1058	1196	1211	1340		1.176083		
9		312	323	376	334	345		1.037765		





SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	<b>N5</b>	Acquired By:	u018hplc
Sample Type:	Broad Unknown	Sample Set Name:	
Vial:	5	Acq. Method Set:	Juho_ELS_uuteaineet
Injection #:	1	Processing Method:	Apex iso kalib uutteet
Injection Volume:	50.00 ul	Channel Name:	ELSD Signal
Run Time:	29.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	ELSD Signal
Date Acquired:	3/4/2013 11:18:41 AM EET		
Date Processed:	3/12/2013 9:56:03 AM EET		

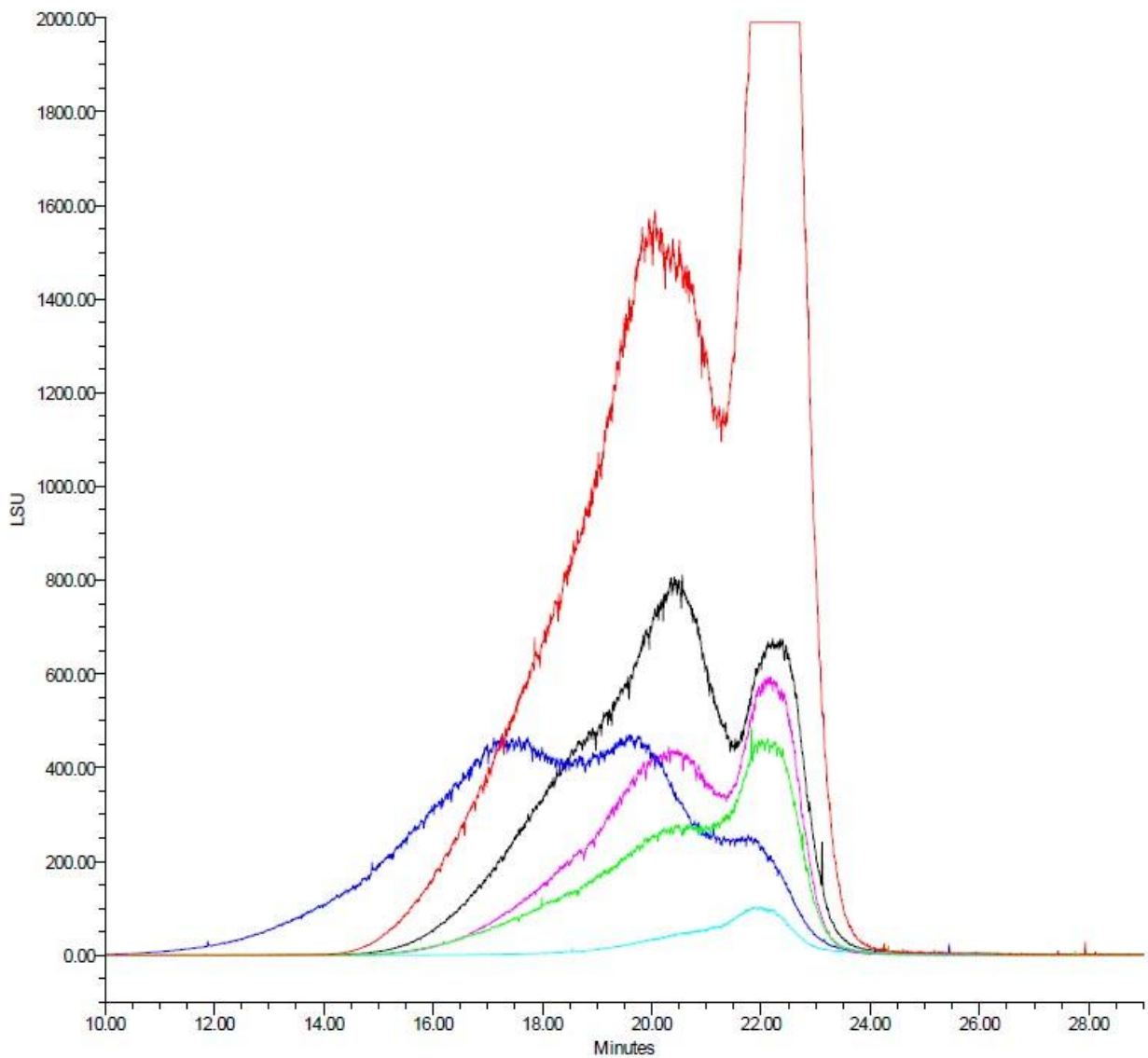
Auto-Scaled Chromatogram



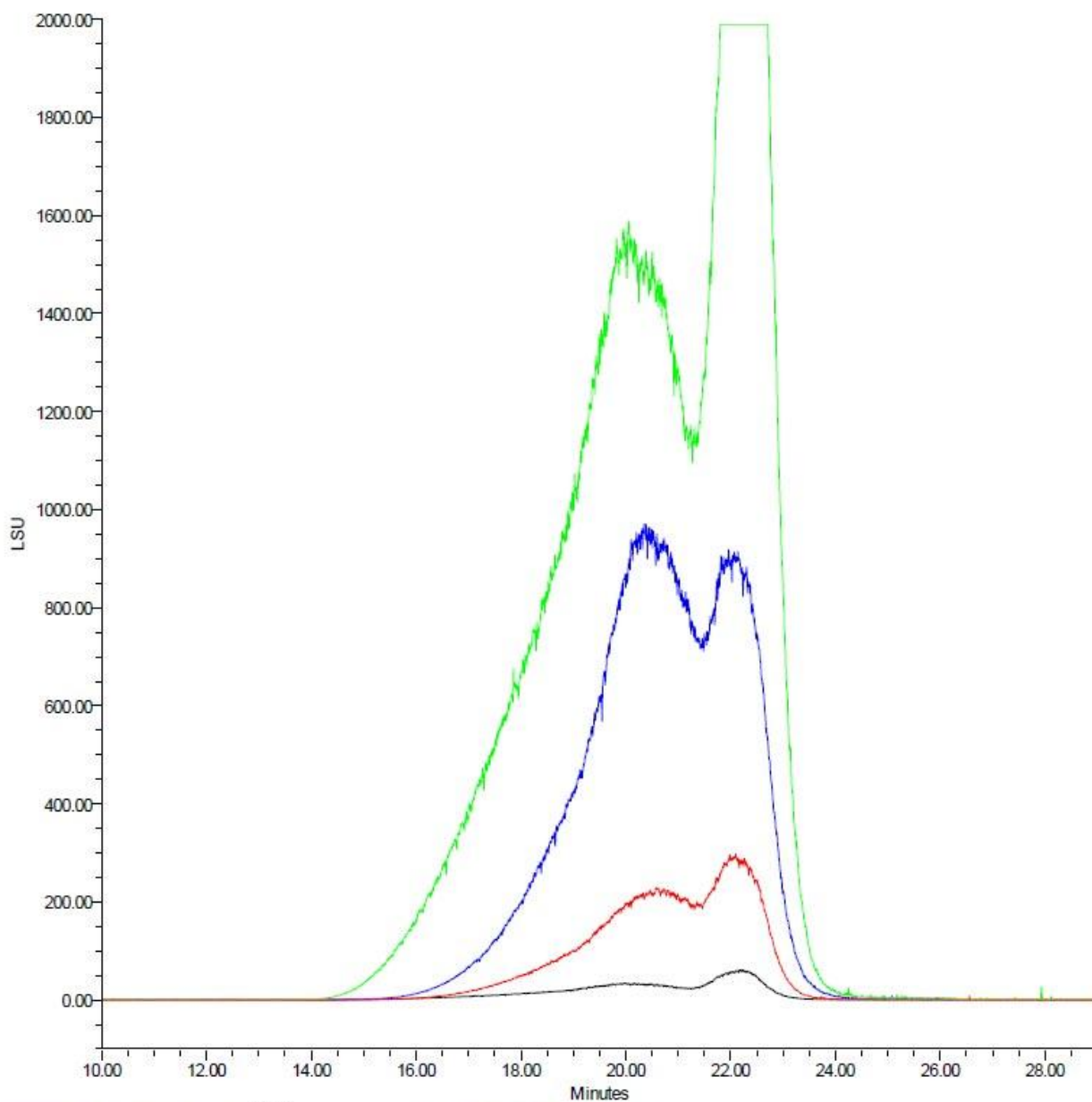
GPC Results

	Dist Name	Mn	Mw	MP	Mz	Mz+1	Mv	Polydispersity	MW Marker 1	MW Marker 2
1										
2										
3		2985	3549	1959	4520	6005		1.188647		
4		843	972	823	1111	1256		1.153201		
5		303	317	301	332	346		1.046809		



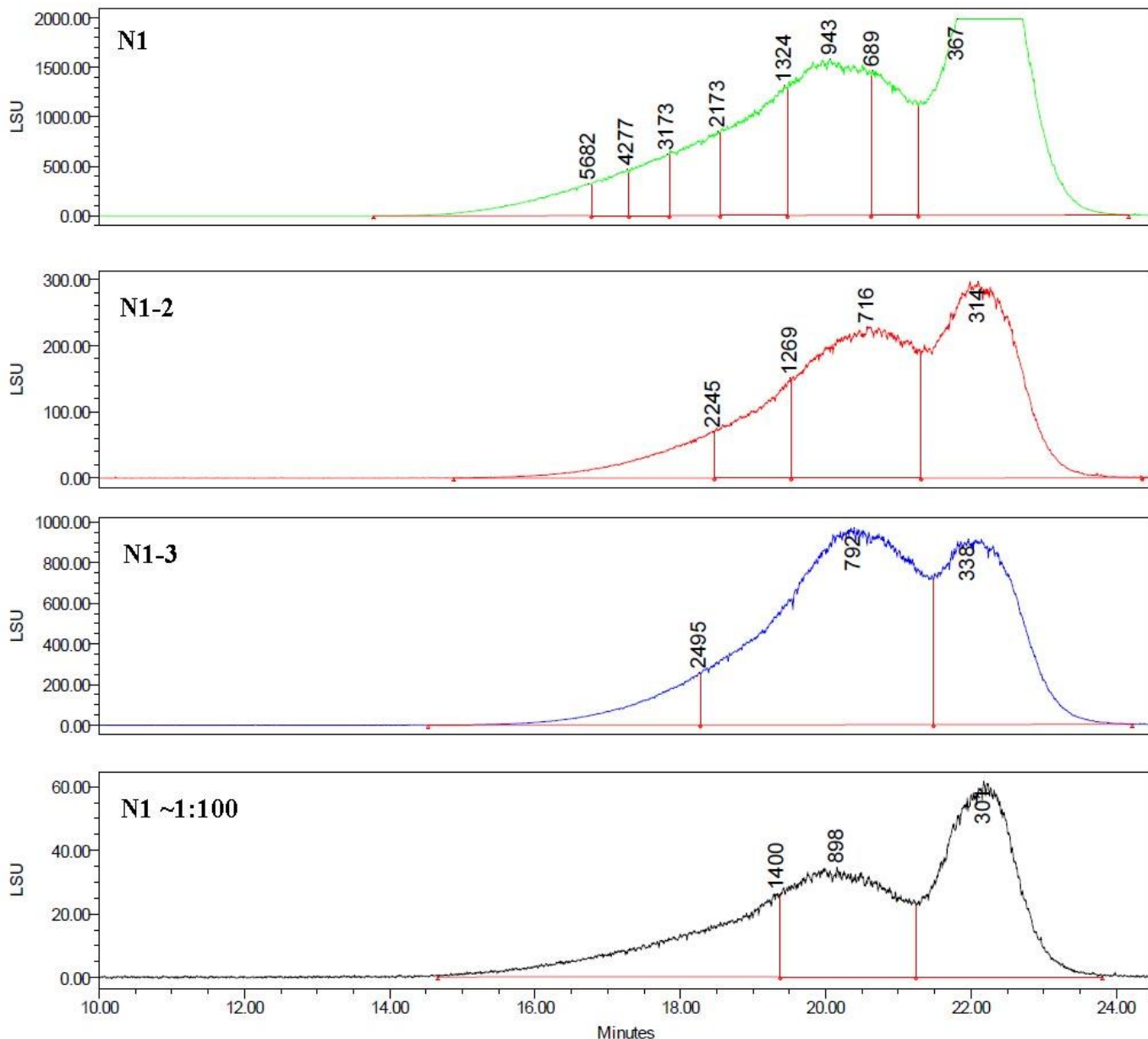


- |  |                       |
|--|-----------------------|
| <span style="color: red;">—</span> SampleName: <b>N1</b>     | Channel: ELSD Signal; |
| <span style="color: green;">—</span> SampleName: <b>N2</b>   | Channel: ELSD Signal; |
| <span style="color: blue;">—</span> SampleName: <b>N3</b>    | Channel: ELSD Signal; |
| <span style="color: blue;">—</span> EET                      |                       |
| <span style="color: black;">—</span> SampleName: <b>N4</b>   | Channel: ELSD Signal; |
| <span style="color: black;">—</span> AM EET                  |                       |
| <span style="color: magenta;">—</span> SampleName: <b>N5</b> | Channel: ELSD Signal; |
| <span style="color: magenta;">—</span> AM EET                |                       |
| <span style="color: cyan;">—</span> SampleName: <b>N6</b>    | Channel: ELSD Signal; |
| <span style="color: cyan;">—</span> EET                      |                       |

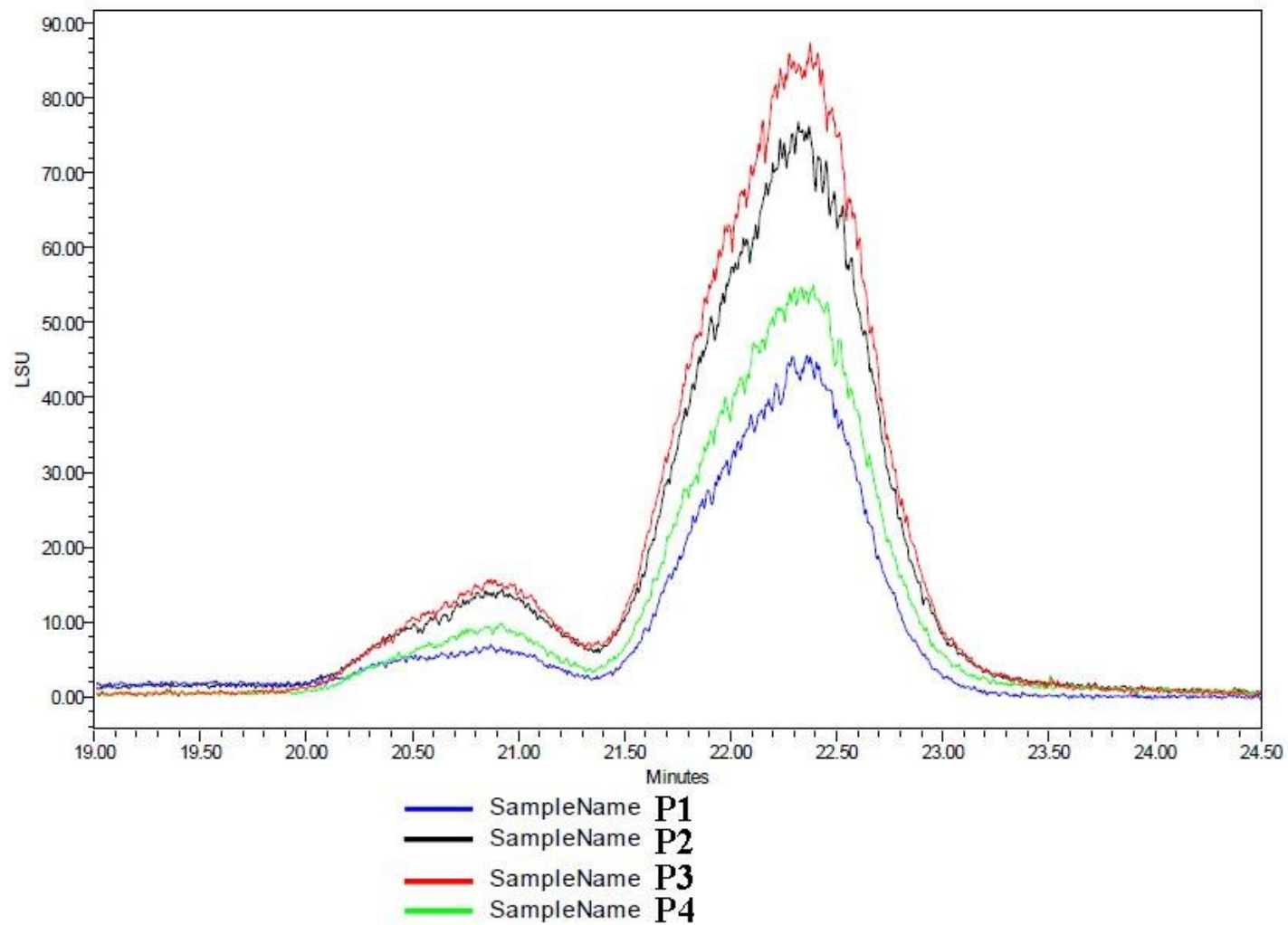


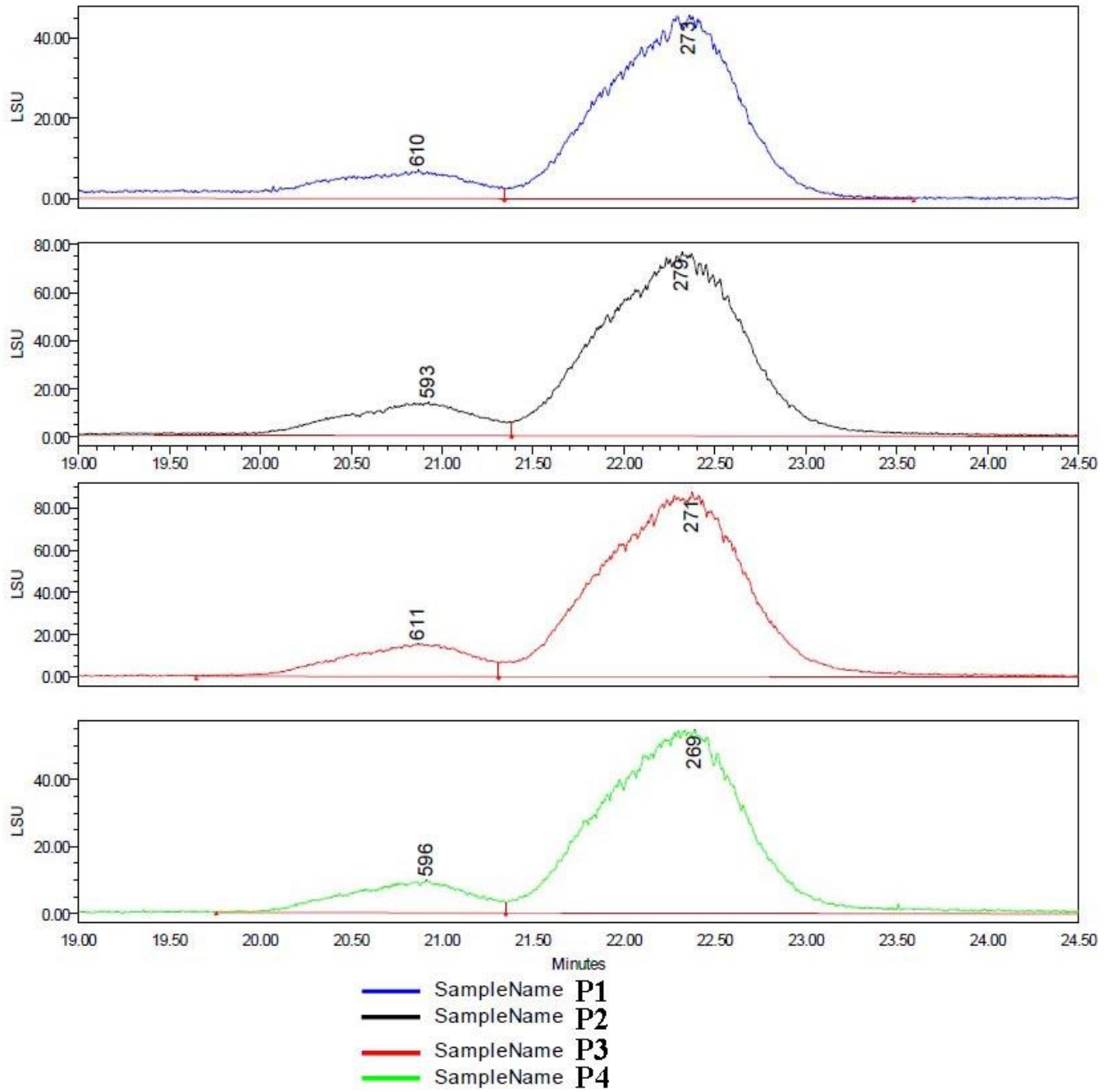
<p>— SampleName: <b>N1</b></p> <p>— SampleName: <b>N1-2</b></p> <p>— SampleName: <b>N1-3</b></p> <p>— SampleName: <b>N1 ~1:100</b></p>	<p>Channel: ELSD Signal;</p> <p>Channel: ELSD Signal;</p> <p>Channel: ELSD Signal;</p> <p>Channel: ELSD Signal;</p>
--	---

Näytteet N1,N1-2,N1-3 ja N1 laimennettuna. erilliset kromatogrammit LIITE 10

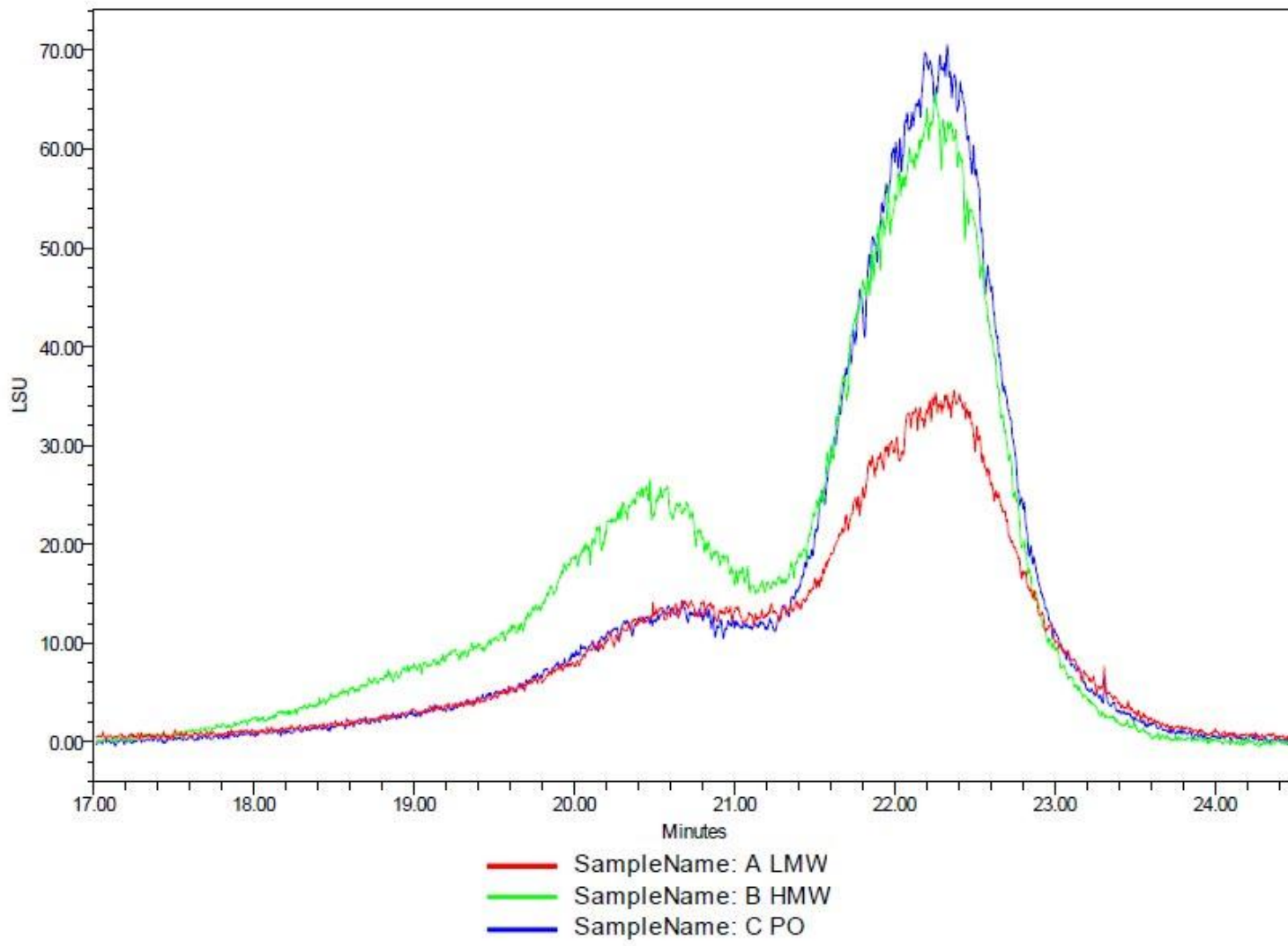


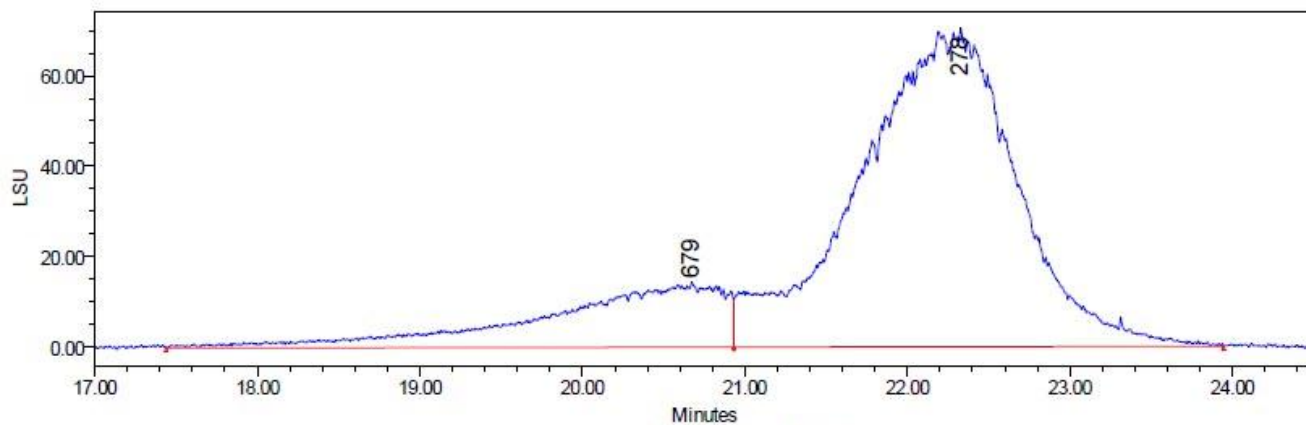
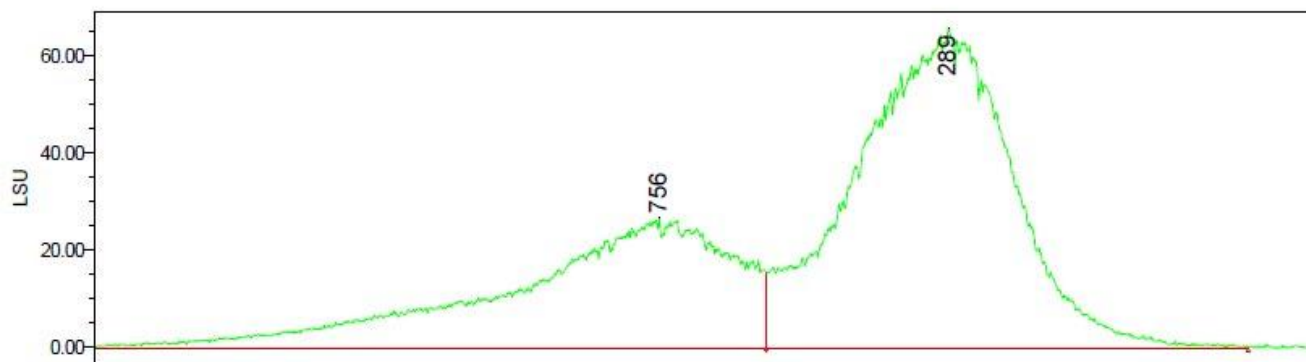
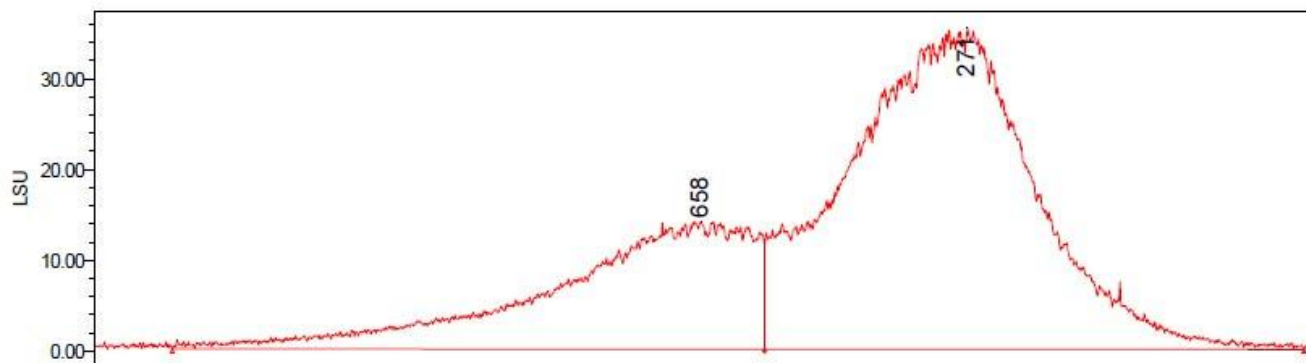
- SampleName: **N1**
- SampleName: **N1-2**
- SampleName: **N1-3**
- SampleName: **N1 ~1:100**











- SampleName: A LMW
- SampleName: B HMW
- SampleName: C PO