



Menetelmäkehitys puun uuteai- neiden analysointiin metsäteol- lisuuden jätevesistä GC-MS - menetelmällä

Santeri Salonen

OPINNÄYTETYÖ
Huhtikuu 2022

Laboratoriotekniikka

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratoriotekniikan tutkinto-ohjelma

SALONEN, SANTERI:

Menetelmäkehitys puun uuteaineiden analysointiin metsäteollisuuden jätevesistä GC-MS -menetelmällä

Opinnäytetyö 50 sivua, joista liitteitä 11 sivua
Huhtikuu 2022

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää esikäsitely- ja laitemenetelmä puun uuteaineiden analysoimiseksi metsäteollisuuden jätevesistä kaasukromatografia-massaspektrometrialla. Opinnäytetyö tehtiin Tampereen yliopiston tekniikan ja luonnontieteiden tiedekunnassa materiaali- ja ympäristötekniikan yksikössä tammi-helmikuussa 2022. Kehitettyä menetelmää tullaan käyttämään metsäteollisuuden jätevesien kvalitatiiviseen ja kvantitatiiviseen tarkasteluun yliopiston tutkimuksissa ja projekteissa.

Laite- ja esikäsitelymenetelmä kehitettiin tutkimusartikkelien pohjalta. Laitemenetelmän kehitys aloitettiin tutkimalla tutkittavien aineiden käyttäytymistä käytetyllä GC-MS -laitteistolla. Suotuisten tuloksien jälkeen tutkittaville yhdisteille tehtiin standardisuorat. Esikäsitelymenetelmän perustana toimi kiinteäfaasiuutto, johon käytetyt kolonnit ja liuottimet sovitettiin muuhun menetelmään sopivaksi.

Kehitettyllä menetelmäkokonaisuudella analysoitiin kolme erilaista metsäteollisuuden prosessi- ja jätevesinäytettä. Tulosten perusteella menetelmällä voidaan suorittaa melko luotettavaa kvalitatiivista tutkimusta vastaaville vesinäytteille. Kvantitatiivinen analyysi vaatii jatkokehitystä tarkempien tuloksien takaamiseksi, mutta nykyisellään sillä voidaan arvioida tutkittavien aineiden pitoisuuksia suuri-
piirteisesti.

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Engineering

SALONEN, SANTERI:

Development of GC-MS Method for Analysis of Wood Extractives from Forest Industry Wastewaters

Bachelor's thesis 50 pages, appendices 11 pages
April 2021

The purpose of this thesis was to develop a GC-MS method – including sample pretreatment – for analysing wood extractives from forest industry wastewaters. The thesis was carried out at the Faculty of Engineering and Natural Sciences of the University of Tampere, at the unit of Materials Science and Environmental Engineering. The developed method will be used for quantitative and qualitative analysis of forest industry wastewaters.

The GC-MS and sample treatment methods developed in this study were based on research articles of similar nature. Development of the GC-MS method began with studying the behavior of selected substances with the GC-MS equipment selected for this study. Standard curves for the substances were made after favorable results. Based on other studies, solid phase extraction (SPE) was selected as the sample pretreatment method. The solvents and equipment used in the SPE were adapted to match the GC-MS method.

Three different forest industry wastewater samples were analyzed with the developed method. Based on the results, it can be said that the method can be used for qualitative analysis of this type of samples. Accurate quantitation of similar samples requires further study, but the method can be used as it is for rough estimation of wood extractive concentrations.

Key words: forest industry, wood extractives, method development, GC-MS

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	7
2	TEORIA	8
2.1	Puun uuteaineet yleisesti	8
2.1.1	Uuteaineet teollisuudessa	9
2.1.2	Uuteaineet ympäristössä	9
2.2	Tutkittavat aineet.....	9
2.2.1	Steariinihappo.....	10
2.2.2	Palmitiinihappo	10
2.2.3	Abietiinihappo.....	11
2.2.4	Skvaleeni.....	11
2.2.5	β -Sitosteroli	12
2.3	Kiinteäfaasiuutto.....	12
2.4	Derivatisointi silylaatiolla	14
2.5	Kaasukromatografia-massaspektrometria.....	15
2.5.1	Toimintaperiaate.....	15
2.5.2	Ionisointi, massaerottelu ja detektointi.....	17
2.6	Tulosten käsittely	19
3	MITTAUS- JA MÄÄRITYSMENETELMÄT	20
3.1	Käytetyt kemikaalit	20
3.2	Kiinteäfaasiuutto ja näytekäsittely	20
3.3	GC-MS	23
4	TYÖN SUORITUS	25
4.1	Menetelmäkehitys	25
4.2	Esikokeet puhtailla yhdisteillä	25
4.3	Näytteiden analysointi ja esikäsittelymenetelmän kehitys.....	26
5	TULOKSET JA TARKASTELU	29
5.1	Esikokeiden tulokset	29
5.2	Näyte C.....	31
5.3	Näyte B	33
5.4	Näyte A	34
6	YHTEENVETO JA POHDINTA.....	36
	LÄHTEET.....	38
	LIITTEET	40
	Liite 1. Tutkittavien aineiden standardisuorat.....	40
	Liite 2. Tunnistetut yhdisteet näytteestä B	41
	Liite 3. Tunnistetut yhdisteet näytteestä A	42

Liite 4. Menetelmäohje standardisuoran tekemiseen	43
Liite 5. Menetelmäohje näytteiden käsittelyyn ja analysointiin	46

LYHENTEET JA TERMIT

BSTFA	N,O-bis(trimetyylisilyyli)trifluori-asetamidi
EI	Elektronipommitus-ionisaatio / Electron Ionization
NIST	National Institute of Standards and Technology
SI	Tunnistetun yhdisteen vastaavuus NIST-kirjaston kanssa / Similarity Index
SIM	Valitun ionin valvonta / Selected Ion Monitoring
TMS derivative	Trimetyylisilyyli -johdos / Trimethylsilyl derivative

1 JOHDANTO

Puun uuteaineet ovat erilaisia orgaanisilla liuottimilla uutettavia yhdisteitä, joita esiintyy puissa luonnostaan. Uuteaineet ovat hyvin monipuolinen ja laaja ryhmä keskenään erilaisia yhdisteitä, ja niiden määrittely ei ole yksiselitteistä. Uuteaineiden tehtävänä puissa on toimia erilaisissa biokemiallisissa tehtävissä; esimerkiksi suojata puita sienitaudeilta ja hyönteisiltä, toimia soluseinämien rakenteissa tai säädellä kasvisolujen toimintaa ja mahdollistaa monimutkaisempien yhdisteiden synteesi soluissa. (Vuorinen 2021; Routa ym. 2017, 9–10.)

Uuteaineet kulkeutuvat metsäteollisuuden ja biojalostamoiden prosesseissa mukana alusta loppuun. Esimerkiksi puuaineksen hienontaminen ja sellunkeitto, saa uuteaineet erottumaan puuaineksesta ja sekoittumaan prosessivesiin. Suljetuissa vesikiertoissa aineet rikastuvat ja kulkeutuvat biojalostamoiden jätevedenkäsittelylaitoksille. Suuri osa näistä yhdisteistä saadaan eroteltua vedestä aktiivilietekäsittelyllä, mutta osa aineista saattaa jäädä vesiin, jotka lopultaan lasketaan vesistöihin. Vesistöihin päätyvät rikastuneet uuteaineet haittaavat esimerkiksi kalojen lisääntymistä ja kasvattavat veden COD-arvoja. (Kostamo, Kukkonen & Holmblom 2004; Vuorinen 2021.)

Opinnäytetyö tehtiin Tampereen yliopiston materiaalitieteen ja ympäristötekniikan yksikössä tammi-helmikuussa 2022. Yksikössä tutkitaan muun muassa teollisuuden prosessi- ja jätevesiä, sekä kiertotalouden edistämistä näillä osa-alueilla.

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää menetelmä GC-MS-laitteistolle, millä voitaisi analysoida metsäteollisuuden jätevesiä ja erityisesti niissä esiintyviä puun uuteaineita. Tarkoituksena oli kehittää hankkeen tarpeisiin vastaava näytekäsittely- ja laitemenetelmä tutkimusartikkelien perusteella. Menetelmää tullaan käyttämään metsäteollisuuden jätevesien karakterisointiin ja tutkittavien aineiden kvantitointiin osana yksikön tutkimusta.

2 TEORIA

2.1 Puun uuteaineet yleisesti

Puun uuteaineet ovat laaja joukko kemiallisesti erilaisia yhdisteitä, jotka voidaan erottaa puuaineksesta uuttamalla erilaisilla orgaanisilla liuottimilla. Uuteaineiden määrä puissa on yleensä pieni; alle 10 % kuiva-aineesta, mutta trooppisilla puilla pitoisuudet voivat olla korkeampia. Niiden määrä ja koostumus vaihtelee eri puulajien, puun eri osien ja jopa yksittäisten puiden välillä. Uuteaineet voidaan luokitella eri ryhmiin niiden kemiallisen luonteen ja rakenteen perusteella. Alla esitetyssä taulukossa uuteaineet on eritelty alifaattisiin ja alisyklisiin yhdisteisiin, fenolisiin yhdisteisiin ja muihin. (Routa ym. 2017, 11–26.)

TAULUKKO 1. Puun uuteaineiden luokittelu (Alen 2011 & Routa ym. 2017)

Alifaattiset ja alisykliset yhdisteet	Fenoliset yhdisteet	Muut
Terpeenit ja terpenoidit (mukaan lukien hartsihapot ja steroidit) Rasvahapot ja niiden esterit (rasvat ja vahat) Alkaanit	Fenolit Stilbeenit Lignaanit Isoflavonit Flavonoidit Kondensoidut tanniinit Hydrolysoituvat tanniinit	Sokerit Syklitolit Tropoleenit Aminohapot Alkaloidit Kumariinit Kinonit

Uuteaineiden tehtävät puissa ovat hyvin erilaisia, mutta tyypillisesti ne toimivat puissa ei-rakenteellisina yhdisteinä, toisin kuin selluloosa. Hartsihappojen ja terpenoidien tehtävä on puun suojaaminen hyönteisiltä ja sienitaudeilta. Rasvahapot ja niiden esterit toimivat energiavarastona ja soluseinien funktionaalisissa rakenteissa. (Vuorinen 2021.)

2.1.1 Uuteaineet teollisuudessa

Paperi- ja sellutehtailla uuteaineet liukenevat sellunkeitossa prosessivesiin ja kulkeutuvat veden ja massan mukana. Vesikierron ovat suljettuja, mikä johtaa osaltaan uuteaineiden konsentraation kasvamiseen. Niiden keskittyminen ja kerääntyminen lisää ongelmia tuotannossa ja jätevesien käsittelyssä. Rikastuneet uuteaineet voivat vaikuttaa esimerkiksi sellun laatuun, aiheuttaa hajuhaittoja ja lisätä veden toksisuutta. Esimerkiksi vahat, rasvat, triglyseridit ja sterolit eivät ole saippuoitavissa ja voivat aiheuttaa ongelmia sellutuotteiden, kuten paperin, valmistuksessa. (Lindholm-Lehto 2015; Knuutinen, Ahkola, & Herve 2015.)

2.1.2 Uuteaineet ympäristössä

Suurin osa uuteaineista saadaan eroteltua vesistä tehtaiden jätevedenkäsittelylaitoksilla aktiivilietekäsittelyllä, jossa uuteaineet hajoavat, muuttuvat toisiksi yhdisteiksi tai absorboituvat lietteeseen. Käsittelyn jälkeen vesi lasketaan vesistöihin. Päästövedet sisältävät happea kuluttavia yhdisteitä, jotka ovat vaarallisia vesielioille. Uuteaineista on haittaa kaikille vesielioille kaloista pohjaeliöihin. Jopa alhaisilla rasvahappo-, hartsihappo- ja sterolipitoisuuksilla voi olla merkittäviä pitkäkestoisia vaikutuksia vesistöissä. (Lindholm-Lehto ym. 2015; Kostamo ym. 2004.)

Kasvisterolit voivat häiritä kalojen hormonaalista toimintaa, mikä vaikuttaa kalojen lisääntymiseen. Sterolit voivat myös helposti imeytyä pohjasedimenttiin, mikä on haitallista pohjaeliöille. Uuteaineet voivat myös ajautua virtauksen tai tulvimisen seurauksena useiden kilometrien päähän jätevesilaitoksesta. (Lindholm-Lehto ym. 2015.)

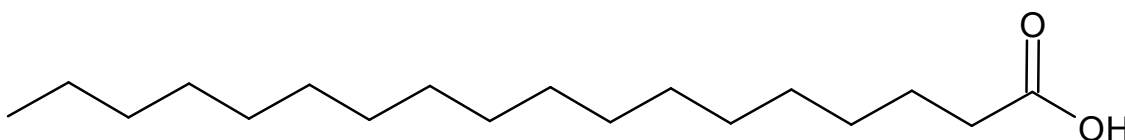
2.2 Tutkittavat aineet

Puun uuteaineiden laaja-alaisuuden takia opinnäytetyöhön valittiin viisi tutkittavaa ainetta edustamaan eri uuteaineryhmiä, joiden avulla menetelmää lähdettiin kehittämään. Tutkittavat aineet valittiin toimeksiantajan toimesta.

Uuteaineissa esiintyviä rasvahappoja edustamaan valittiin steariini- ja palmitiinihappo. Hartsihappoja edustaa abietiinihappo. Terpeenejä ja niiden johdannaisia edustamaan valittiin skvaleeni ja β -sitosteroli. Tutkittavien aineiden rakenteet on esitelty seuraavissa luvuissa.

2.2.1 Steariinihappo

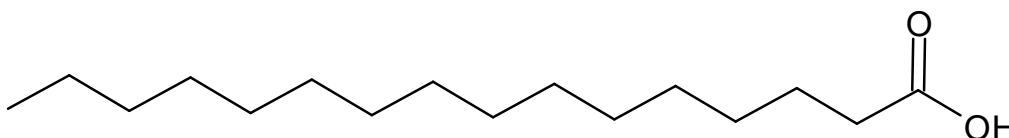
Steariinihappo, eli oktadekaanihappo ($C_{18}H_{36}O_2$), on tyydyttynyt pitkäketjuinen rasvahappo. Sitä esiintyy yleisesti luonnossa eläin- ja kasvirasvoissa, jälkimmäisessä huomattavasti vähemmän. Sen molekyylipaino on 284,5 g/mol, sulamispiste 69,6 °C ja kiehumispiste 376,1 °C. Steariinihapon rakenne on esitetty alla. (Alén 2009, 381.)



KUVIO 1. Steariinihapon rakenne (Alén 2009, muokattu)

2.2.2 Palmitiinihappo

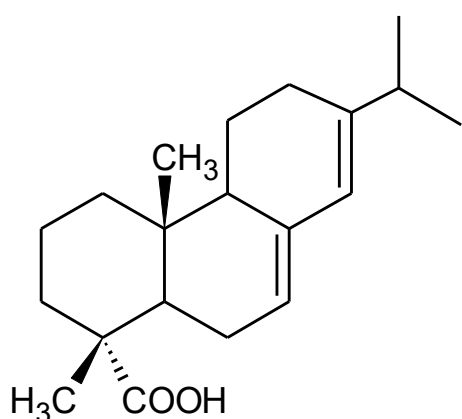
Palmitiinihappo, eli heksadekaanihappo ($C_{16}H_{32}O_2$), on tyydyttynyt pitkäketjuinen rasvahappo. Sitä tavataan kemiallisesti sitoutuneena lukuisissa eläin- ja kasvirasvoissa yhdessä steariinihapon kanssa. Sen molekyylipaino on 256,43 g/mol, sulamispiste 63,1 °C ja kiehumispiste 351,5 °C. Palmitiinihapon rakenne on esitetty alla. (Alén 2009, 378.)



KUVIO 2. Palmitiinihapon rakenne (Alén 2009, muokattu)

2.2.3 Abietiinihappo

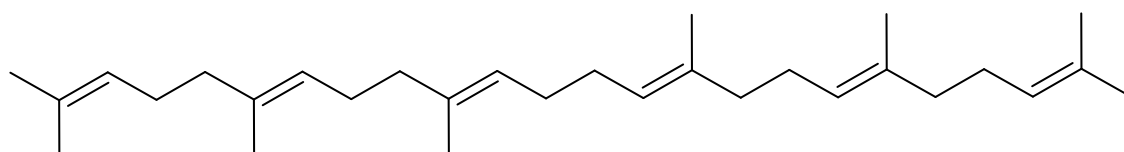
Abietiinihappo ($C_{20}H_{30}O_2$) on rakenteeltaan trisyklinen diterpenoidi; sen molekyyli­paino on 302,46 g/mol, sulamispiste noin 173 °C ja kiehumispiste 250 °C. Se on primaarihapon ohella havupuupihkan merkittävimpiä hartsihappoja. Tämän takia pihkan happokomponentit luokitellaan rakenteellisesti usein primaarihappo- ja abietiinihappotyyppeihin johdannaisiin. Abietiinihappoa muodostuu vastaavanlaisen hiiliketjun sisältämistä rakenteista kaksoissidosten isomerisoinnista seurauksena. Abietiinihapon rakenne on esitetty alla. (Alén 2009, 402.)



KUVIO 3. Abietiinihapon rakenne (Alén 2009, muokattu)

2.2.4 Skvaleeni

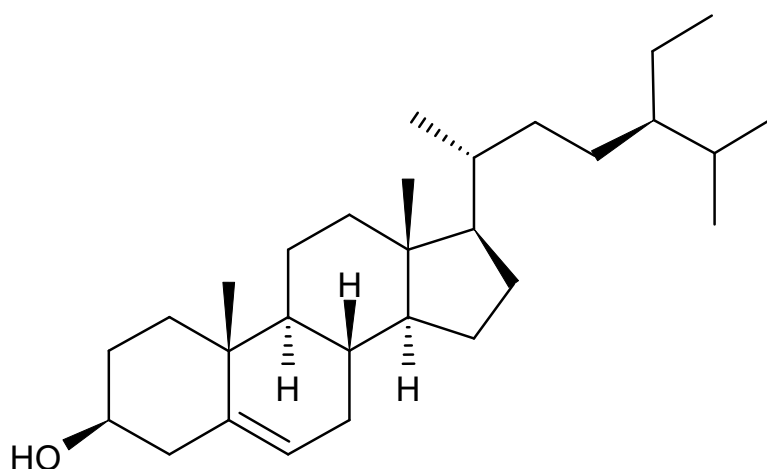
Skvaleeni ($C_{30}H_{50}$) on triterpeeninen hiilivety. Se on luonnossa yleinen yhdiste, jota tavataan merkittävässä määrin erityisesti kasviöljyissä. Skvaleenia syntetisoi­tuu kaikentyyppisissä soluissa, koska se on keskeinen väli­tuote eukaryoottisten sterolien ja bakteeri-hopanoidien muodostumisessa. (Spanova & Daum 2011.) Sen molekyyli­paino on 410,7 g/mol, sulamispiste -75 °C ja kiehumispiste 285 °C. Skvaleenin rakenne on esitetty alla. (Pubchem: Squalene & Sigma-Aldrich 2021.)



KUVIO 4. Skvaleenin rakenne (Pubchem: Squalene, muokattu)

2.2.5 β -Sitosteroli

β -Sitosteroli ($C_{29}H_{50}O$) on kasveissa ja kasviöljyissä esiintyvä triterpenoidin johdannainen. Se lukeutuu kasvisteroleihin, jotka ovat osa kasvisolujen rakennetta ja osallisena niiden toimintojen säätelyssä. Kasvisterolit ovat rakenteeltaan kolesterolin kaltaisia rengasrakenteisia alkoholeja, mikä osaltaan vaikuttaa merkittävästi niiden biologiseen aktiivisuuteen vesieliöissä. (Weingärtner, Böhm & Laufs. 2009). Sen molekyylipaino on 414,71 g/mol, sen sulamisalue on 136–140 °C. (Sigma-Aldrich). β -Sitosterolin rakenne on esitetty alla.



KUVIO 5. β -Sitosterolin rakenne (Pubchem: beta-Sitosterol, muokattu)

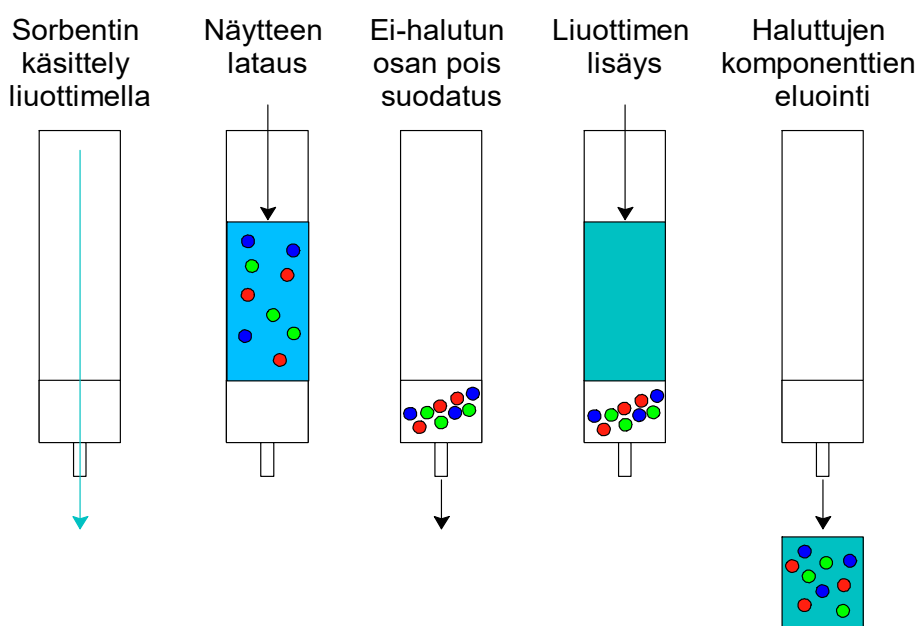
2.3 Kiinteäfaasiuutto

Kiinteäfaasiuutto (*Solid Phase Extraction – SPE*) on laajalti käytetty näytteenkäsittelymenetelmä. Sen avulla näyte voidaan puhdistaa tai näytteestä analysoitavat komponentit voidaan uutaa erilleen näytematriisista. Kiinteäfaasiuutossa neste- tai kaasufaasista erotellaan osa näyteliuoksen komponenteista kiinteänä faasina toimivaan sorbenttiin. (Anderson, Berthod, Estévez & Stalcup 2015, 1571.)

Kiinteäfaasiuutto perustuu analyytin ja sorbentin välisiin kemiallisiin vuorovaikutuksiin. Erilaisia vuorovaikutustyypppejä analyytin ja sorbentin välillä ovat esimerkiksi ioniset vuorovaikutukset ja molekyylien väliset poolisuuteen perustuvat vuorovaikutukset, kuten vetysidokset ja dipoli-dipolisidokset. Sorbentteja on erilaisia

erityyppisille näytematriiseille; esimerkiksi poolisia, poolittomia ja ioninvaihtoon perustuvia. (Anderson ym. 2015, 1573–1576; Jaarinen & Niiranen 2005, 170–171.)

Ennen näytteen siirtämistä sorbentti yleensä käsitellään pienellä määrällä liuotinta (*conditioning*). Tämän jälkeen näyte siirretään kolonniin (*loading*) ja ei-haluttu osa näytematriisia suodattuu pois. Tutkittavat aineet pidättyvät sorbenttiin, josta ne sopivalla liuottimella eluoidaan ulos kolonnista. Näyte voidaan myös fraktoida haluttaessa, jolloin sorbentista eluoidaan tietyt komponentit erilleen sopivalla liuottimella, minkä jälkeen vaihdetaan liuotinta toiselle komponentille sopivaksi ja eluoidaan seuraavat komponentit erilliseen fraktioon. Perustyövaiheet kiinteäfaasiuuton soveltamiseen näytekomponenttien uuttamiseen on esitetty kuviossa 6. (Anderson ym. 2015, 1575–1576.)



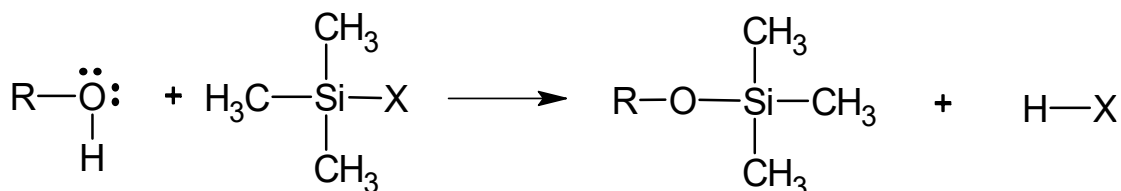
KUVIO 6. Kiinteäfaasiuuton vaiheet (Jaarinen & Niiranen 2005, muokattu)

SPE – menetelmää voidaan myös soveltaa näytteen puhdistamiseen (*clean up*), jolloin näyte huuhdellaan ennen sorbentista eluointia. Vastaavasti menetelmää voidaan käyttää pidättämään ei-haluttu osa näytematriisia sorbenttiin, jolloin ensimmäinen näytesuodos ilman liuottimella eluointia sisältää halutut komponentit. (Anderson ym. 2015, 1576.)

2.4 Derivatisointi silylaatiolla

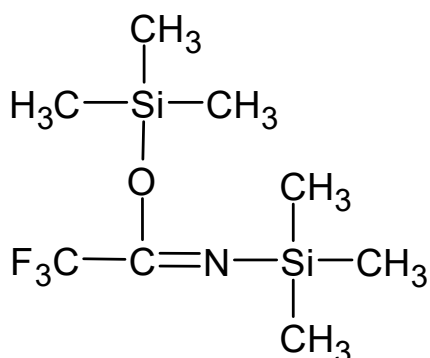
Derivatisointi tarkoittaa kemiallisen yhdisteen muokkaamista helpommin analysoitavaan muotoon. Kaasukromatografiassa tutkittavat yhdisteet täytyy derivatisoida, mikäli ne eivät täytä näytteelle asetettuja vaatimuksia. Näytteen on oltava riittävän helposti haihtuva (*volatile*) ja kestettävä analyysissa käytetyt lämpötilat. (Jaarinen & Niiranen 2005, 195.)

Silylointi on tyypillinen kaasukromatografiassa käytetty derivatisointimenetelmä. Sitä voidaan soveltaa, kun molekyylin funktionaalisena ryhmänä on esimerkiksi alkoholi-, fenoli-, karboksyylihappo-, amiini- tai amidiryhmä. Kuviossa 7 on esitetty silylaatioreaktion periaate.



KUVIO 7. Silylaatioreaktion toimintaperiaate (Sigma Aldrich 1997, muokattu)

Silylaatio-reaktiossa aktiivinen vety, eli voimakkaasti elektronegatiivisempaan atomiin kiinnittynyt vetyatomi, korvataan silyyliryhmällä; tyypillisesti trimetyylisilyyllillä. Reaktion seurauksena syntyvä trimetyylisilyyli johdannainen (*TMS derivative*) on alkuperäiseen molekyyliin verrattuna vähemmän poolinen, paremmin haihtuva ja termisesti vakaampi. Tässä työssä silylointireagenssina käytetään BSTFA:ta (N,O-bis(trimetyylisilyyli)trifluori – asetamidi), jonka rakenne on esitetty kuviossa 8. (Knapp 1979, 269; Sigma Aldrich 1997.)



KUVIO 8. BSTFA:n rakenne (Sigma Aldrich 1997, muokattu)

2.5 Kaasukromatografia-massaspektrometria

Kaasukromatografia-massaspektrometria (*GC-MS; Gas Chromatography Mass Spectrometry*) on yksi yleisimmin käytetyistä laiteanalytiikan menetelmistä orgaanisten yhdisteiden tunnistamiseen ja kvantitoimiseen monimutkaisista näytematriiseista. Menetelmää käytetään laaja-alaisesti esimerkiksi ympäristötutkimuksessa, lääketieteellisessä tutkimuksessa, elintarviketeollisuudessa ja monilla muilla aloilla. (Sparkman, Kitson, Fulton & Penton 2011, 3.)

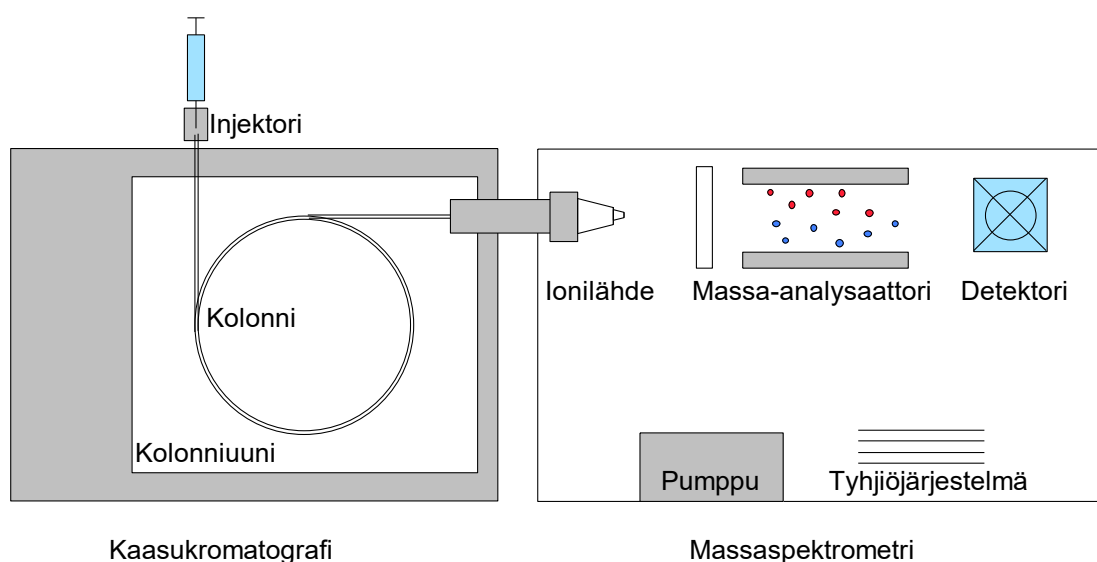
Menetelmä on kaasukromatografian ja massaspektrometrian yhdistelmä. Kaasukromatografialla erotellaan näyteliuoksen komponentit ajallisesti ja massaspektrometri tuottaa tietoa, jonka avulla yksittäisten komponenttien rakenteellinen tunnistaminen on mahdollista. Menetelmän merkittävimpana etuna on kvalitatiivista analyysia ajatellen yksittäisten komponenttien erottelu monimutkaisesta näytematriisista, ja niiden luotettava tunnistaminen massaspektristä. Menetelmällä on mahdollista suorittaa myös tarkkaa kvantitatiivista analytiikkaa pienistä näytemääristä tai -konsentraatioista. (Sparkman ym. 2011, 3; Hübschmann 2015, 3.)

Kaasukromatografia–massaspektrometriaa sovelletaan näytteisiin ja yhdisteisiin, jotka höyrystyvät riittävän helposti (*volatile*). Yhdisteen on höyrystyttävä kaasukromatografialla erottelua varten, mutta se ei saa hajota menetelmän lämpötilaolosuhteissa. Tätä voidaan toisaalta pitää menetelmää rajoittavana tekijänä näytematriisin sisältäessä haihtumattomia komponentteja (*involatiles*). Analyysin mahdollistamiseksi näyte voidaan puhdistaa ei-halutuista komponenteista esimerkiksi kiinteäfaasiuutolla (*SPE*) tai kiinteäfaasimikrouutolla (*SPME*). Näytematriisin komponentit voidaan myös derivatisoida analyysin kannalta sopivampaan muotoon. (Hübschmann 2015, 3-4.)

2.5.1 Toimintaperiaate

Kaasukromatografia-massaspektrometria on kahden analyysimenetelmän yhdistelmä. Kuviossa 9 on esitetty laitteiston perusrakenne yksinkertaistettuna. Kaasukromatografialaitteiston keskeisimmät osat ovat: injektor, kolonni ja uuni; lisäksi oleellisia tekijöitä ovat kantajakaasu sekä virtausnopeuden ja lämpötilan

säätö. Massaspektrometrin oleelliset osat ovat ionilähde, massa-analysaattori ja detektori. Tyhjiöjärjestelmä ja siihen kuuluva pumppu ovat myös merkittävä osa laitteistoa, koska massa-analysaattorin toiminta edellyttää tyhjiötä. Kaasukromatografi ja massaspektrometri yhdistetään toisiinsa siirtolinjalla (*transfer line*). Massaspektrometrin tuottama tieto tallennetaan ja käsitellään laitteistoon kytketyllä tietokoneella. (Sparkman ym. 2011, 8.)



KUVIO 9. Kaasukromatografi-massaspektrometri, GC-MS (Hussain & Maqbool 2014, muokattu)

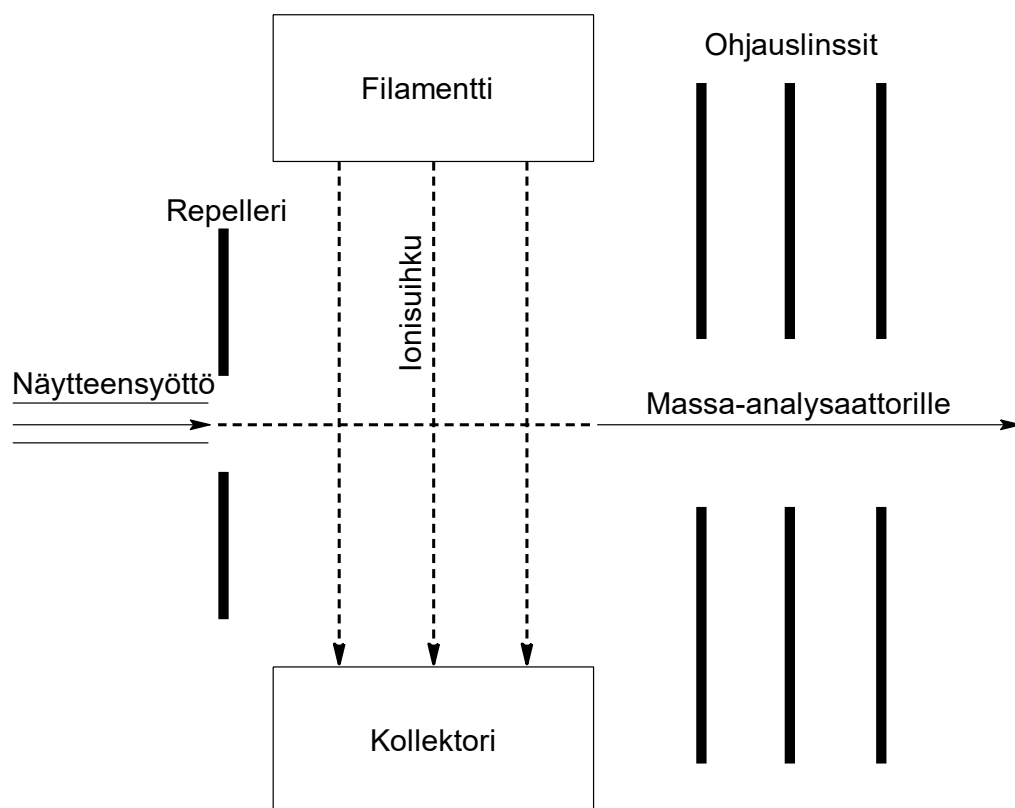
Injektorilla näyte injektoidaan kolonneihin, jossa se sekoittuu kantajakaasuun, joka kuljettaa näytteen kolonnin läpi. Kantajakaasu toimii inerttinä liikkuvana faasina (*mobile phase*) ja kolonnin sisäpinta pysyvänä faasina (*stationary phase*). Näytteen komponentit erottuvat liikkuvan ja pysyvän faasin vuorovaikutusominaisuuksien perusteella. Erottumisen seurauksena näytteen eri komponentit kulkeutuvat ulos kolonnista eri aikoina, eli komponenteilla on yksilölliset retentioajat. Virtausnopeus, uunin lämpötila ja kolonni valitaan kuhunkin analyysiin sopivaksi riittävän erottelun takaamiseksi. (McNair & Miller 2009, 14–15.)

Kaasukromatografilla erotellut näytteen komponentit kulkeutuvat siirtolinjaa pitkin massaspektrometrille, jossa erottuneet komponentit ionisoidaan. Syntyneet ionit kulkeutuvat massa-analysaattorille, jossa ionit erotellaan niiden massan ja varauksen suhteen (m/z). Massa-analysaattorilla tapahtuvan erottelun jälkeen ionit kulkeutuvat detektorille, joka tietokoneen avulla tuottaa massaspekttrin havaittu-

jen ionien määrän ja massa-varaussuhteen perusteella. Spektrissä näkyvien piikkien korkeus on suoraan verrannollinen havaittujen ionien määrään. Vertaamalla mitattua massaspektriä olemassa oleviin tietokantoihin ja kirjastoihin, voidaan yhdiste tunnistaa piikkien perusteella. Kvalitatiivisessa ajossa laite on tyypillisesti SCAN-tilassa, jolloin massaspektrometri havaitsee tietyllä massavälillä kaikki ionit. Näin on mahdollista havaita ja tunnistaa kaikki näytteessä olevat komponentit. Kvantitatiiviseen tutkimukseen käytetään yleensä SIM-tilaa (*Selective Ion Monitoring*), jossa rajataan massaspektrometri mittaamaan vain tiettyjä m/z -arvoja, jolloin mittauksen määrällinen tarkkuus kasvaa merkittävästi. (Hoffman & Stroobant 2007, 228–230; Jaarinen & Niiranen 2005, 123.)

2.5.2 Ionisointi, massaerottelu ja detektointi

Kaasukromatografien erottelemat näytekomponentit ionisoidaan ennen massa-analysaattorilla tapahtuvaa erottelua. Yleisin käytetty ionisointimenetelmä on elektroni-ionisaatio (*electron ionization, EI*), jossa ionilähteenä toimii filamentti, josta korkeassa lämpötilassa irtoaa elektroneja. Irronneet elektronit kiihdytetään tyypillisesti 70 V:n jännitteellä, ja ne ohjataan elektronisuihkuna kollektorina toimivalle anodille. Suihkun läpi kulkeutuvat näytemolekyylit ionisoituvat ja fragmentoituvat korkeaenergistien elektronien vaikutuksesta. Syntyneet molekyyli-ionit ja fragmentit ovat tyypillisesti positiivisesti varautuneita, ja ne ohjataan massa-analysaattorille ohjauslinssien avulla. Lisäksi ionilähteen rakenteessa on mukana positiivisesti varautunut repelleri, joka pakottaa varautuneet ionit massa-analysaattorin suuntaan. Kuviossa 10 on esitetty elektroni-ionisaation periaate.



KUVIO 10. Elektroni-ionisaation periaate (Jaarinen & Niiranen 2005, muokattu)

Muita ionisointimenetelmiä ovat esimerkiksi kemiallinen ionisaatio (*chemical ionization, CI*), negatiivinen kemiallinen ionisaatio (*negative chemical ionization, NCI*) ja nopea atomipommitus (*fast atom bombardment, FAB*). (McNair & Miller 2009, 159 – 160; Hoffman & Stroobant 2007, 15–16; Jaarinen & Niiranen 2005, 124.)

Yleisimmin käytetty massa-analysaattori on kvadrupolianalysaattori, joka koostuu neljästä yhdensuuntaisesta kvadrupolisauvasta. Kvadrupolianalysaattorissa käytetään tasavirran ja vaihtovirran yhdistelmää radiotaajuuden sähkökentän muodossa ohjaamaan analysaattoriin johdettujen ionien kulkua, niiden massavaruksen perusteella. Sauvat vuoroin vetävät ioneja puoleensa ja vuoroin hylkivät niitä. Sopivalla radiotaajuuden ja tasavirtapotentialin yhdistelmällä vain tietyn massavaruksen omaavat ionit kulkeutuvat sauvaston läpi detektorille. Muut ionit törmäävät sauvoihin tai imeytyvät pois tyhjiön vaikutuksesta. Muita massa-analysaattorityyppejä ovat esimerkiksi ionien lentoaikaan perustuva TOF (*Time of flight*) ja ioniloukkumenetelmät (*ion trap*). (McNair & Miller 2009, 161–162; Sparkman ym. 2011, 114; Jaarinen & Niiranen 2005, 125–126.)

Massa-analysointilaitteilla valikoituneet ionit kulkeutuvat detektorille, jolle osuessaan syntyy intensiteetiltään suoraan ionien määrään verrannollinen signaali, joka tietokoneen avulla muutetaan massaspektriiksi. Tyypillisin käytetty detektorityyppi on elektronimonistin, jonka sisäpintaan iskeytyessään ionit aiheuttavat elektroniryöpyä. Syntyneet elektronit kiihtyvät potentiaalieron seurauksena osuen toiseen kohtaan detektoria synnyttäen uuden ryöpyä. Tämä prosessi toistuu useita kertoja, kunnes alkuperäinen signaali on vahvistunut moninkertaiseksi alkuperäisestä. (McNair & Miller 2009, 164; Jaarinen & Niiranen 2005, 128.)

2.6 Tulosten käsittely

Kiinteäfaasiuutolla esikäsitellyt näytteet kuivataan työttämällä ja suspensoidaan liuottimeen, minkä jälkeen ne analysoidaan kaasukromatografia-massaspektrometrillä. Laitteelta saadut tulokset kertovat vain suspension konsentraation, joten alkuperäisen näytteen konsentraatio saadaan laskettua kaavalla (1)

$$c_1 V_1 = c_2 V_2 \quad (1)$$

jossa c_1 on alkuperäisen näytteen konsentraatio, V_1 on alkuperäisen näytteen tilavuus, c_2 on mitattu suspension konsentraatio, ja V_2 on suspension tilavuus. Alkuperäisen näytteen konsentraatio saadaan ratkaistua johtamalla kaavasta (1)

$$c_1 = \frac{c_2 V_2}{V_1} \quad (2)$$

3 MITTAUS- JA MÄÄRITYSMENETELMÄT

3.1 Käytetyt kemikaalit

Taulukossa 2 on esitetty työssä käytetyt kemikaalit valmistajineen ja puhtauksiineen. Kaikki kemikaalit otettiin käyttöön menetelmäkehityksen aikana, paitsi steariinihappo, joka oli otettu käyttöön vuonna 2016. Tutkittavista aineista valmistettiin kantaliuokset pitoisuudella 1000 mg/l, paitsi β -sitosterolille, jonka kantaliuos valmistettiin pitoisuudella 100 mg/l yhdisteen vähäisen määrän ja korkean hinnan vuoksi. Kantaliuosten ja laimennosten valmistukseen käytettiin asetonia. 1-Eikosanolia ja kolesterolia käytettiin sisäisinä standardeina ja BSTFA-TMCS -liuos toimi derivatisointireagenssina. Kiinteäfaasiuutossa näytteiden eluointiin käytettiin asetonia ja metanolia.

TAULUKKO 2. Työssä käytetyt kemikaalit

Yhdiste	Valmistaja	Laatu
1-Eikosanoli	TCI	$\geq 95,0 \%$
β -Sitosteroli	Sigma-Aldrich	$\geq 95 \%$
Abietiinihappo	Sigma-Aldrich	$\sim 75 \%$
Asetoni	Honeywell	$\geq 95 \%$
BSTFA-TMCS (99:1)	TCI	$>95,0 \%$
Kolesteroli	TCI	$\geq 95 \%$
Metanoli	Fisher Scientific	$\geq 99,8 \%$
Palmitiinihappo	Sigma-Aldrich	$\geq 99 \%$
Skvaleeni	Sigma-Aldrich	$\geq 98 \%$
Steariinihappo	Alfa Aesar	$\geq 98 \%$

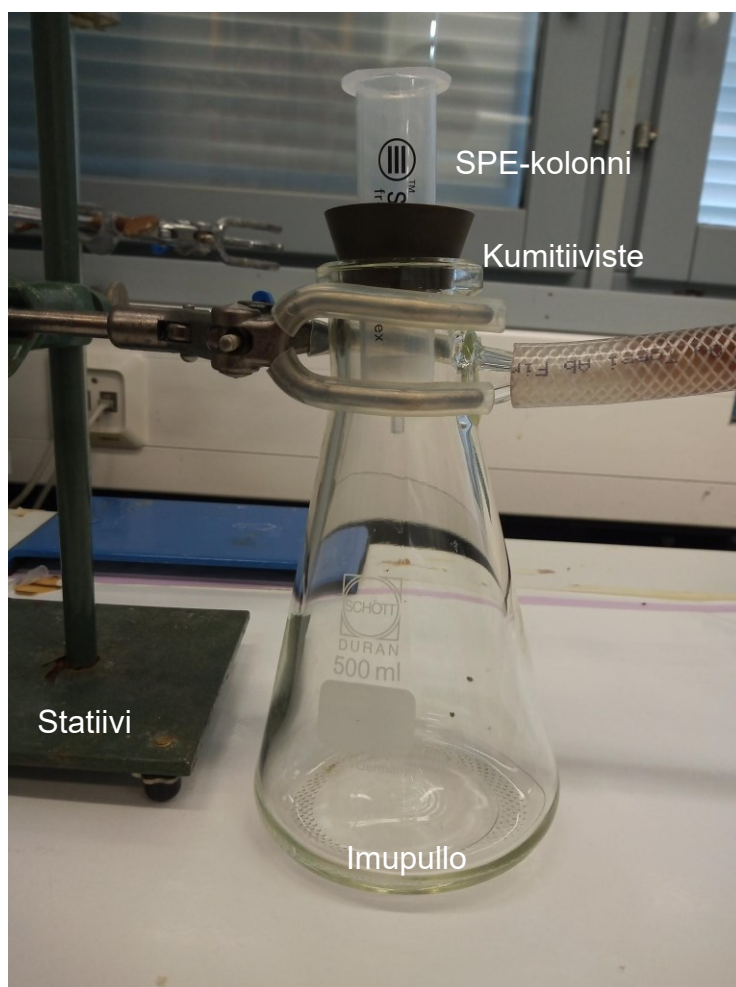
3.2 Kiinteäfaasiuutto ja näytekäsittely

Kiinteäfaasiuuttoa varten tilattiin Strata C18-E 1g/20 ml Giga Tube- SPE-kolonnit, joista esimerkki on esitetty kuvassa 1. Toimeksiantajalla ei ollut vakuumijärjestelmää kiinteäfaasiuuttoa varten, joten sellainen koottiin saatavilla olevista materiaaleista. Työssä käytetty vakuumijärjestelmä on esitetty kuvissa 2 ja 3. Se koostui imupullosta, kumitiivisteestä ja SPE-ruiskusta, sekä statiivista ja kaasunpesu-

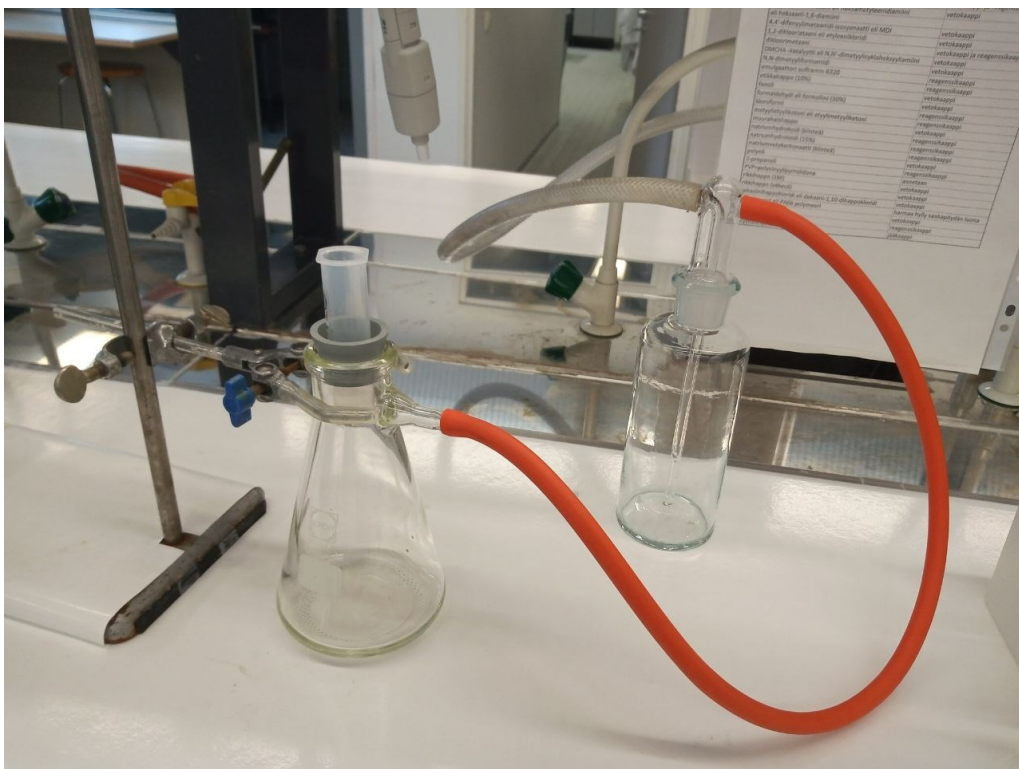
pullosta. Laitteistossa päädyttiin käyttämään kaasunpesupulloa Wulffin pullon sijasta, koska sopivan kokoisia Wulffin pulloja tai sen osia ei ollut saatavilla. Kaasunpesupullon tehtävänä on estää veden päätyminen imupulloon. Uutetut näytteet konsentroidiin kuivaamalla liuotin typpikaasulla (KUVA 4.)



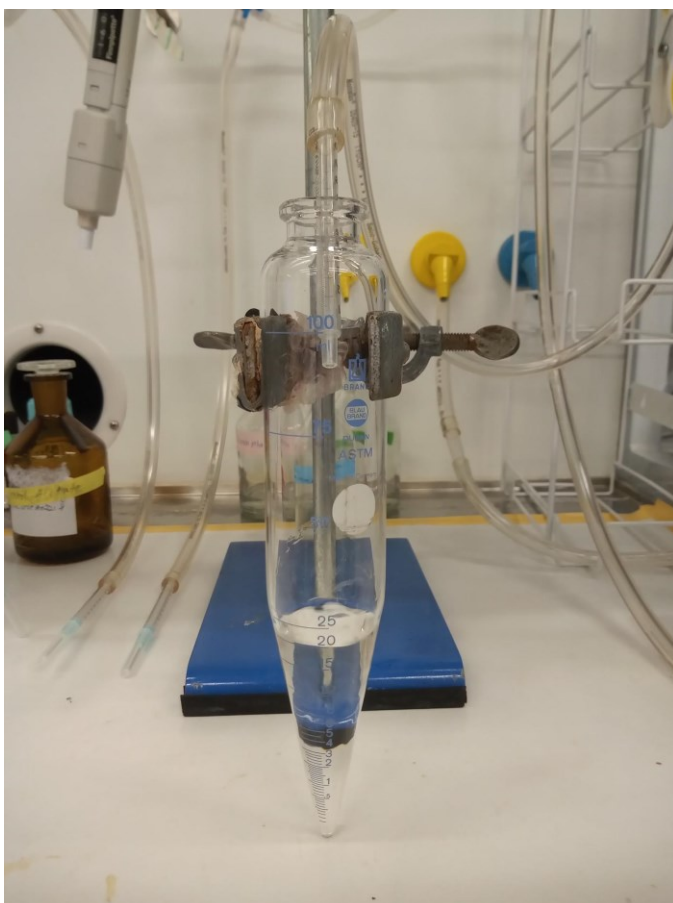
KUVA 1. SPE – kolonni; Strata C18-E 1g/20 ml Giga Tube



KUVA 2. SPE-laitteisto



KUVA 3. SPE-laitteisto, jossa mukana kaasunpesupullo



KUVA 4. Näytteen typitys

3.3 GC-MS

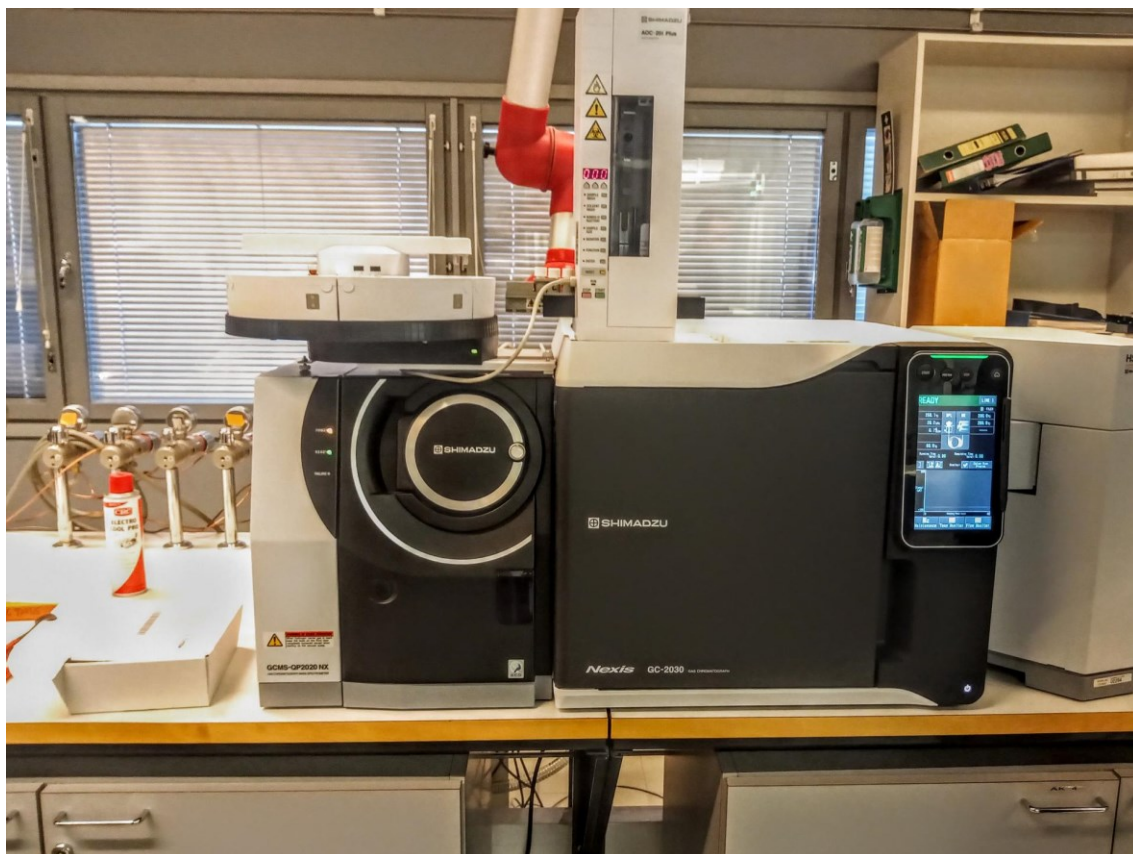
Menetelmäkehityksessä käytetty kaasukromatografi oli Shimadzu Nexis GC-2030, johon oli kytketty Shimadzun GCMS-QP2020 NX massaspektrometri (KUVA 5.). Käytetty kolonni oli Zebronin ZB-5MSi, jonka stationäärifaasi oli 95 % dimetyylipolysiloksaania ja 5 % fenyyliä. Kolonnin pituus oli 30 m, sisähalkaisija 0,25 mm ja stationäärifaasin paksuus 0,25 µm. Kolonnin ilmoitetut lämpötilarajat olivat -60 °C – 325 °C. (Zebron 2022). Laiteparametrit ja lämpötilaohjelma on esitetty taulukoissa 3 ja 4. Parametrit valittiin tutkimusartikkelien perusteella ja muokattiin menetelmään sopivaksi. (Herold-Majumdar, Pita, Estevez, Wawrzynczyk, Loureiro & Felby 2021; Doddapaneni, Jain, Ramasamy, Rintala, Romar & Konttinen 2017; Mosbye, Harstad & Fiksdahl 2000.)

TAULUKKO 3. Kolonniuunin lämpötilaohjelma

Ramppi (°C /min)	Lämpötila (°C)	Pito (min)
	60	2
10	100	2
5	180	2
20	280	3
5	310	5

TAULUKKO 4. Laiteparametrit

Kantajakaasun virtausnopeus	He, 1 ml/min
Injektorin lämpötila	300 °C
Injektiotilavuus	1 µl
Split suhde	1 : 20
Siirtolinjan lämpötila	280 °C
Detektorin ionilähteen lämpötila	250 °C
Solvent cut time	5 min
Massaväli	35 – 500 m/z



KUVA 5. Shimadzu Nexis GC-2030 ja Shimadzu GCMS-QP2020 NX

4 TYÖN SUORITUS

4.1 Menetelmäkehitys

Tavoitteena oli kehittää GC-MS –laitteelle menetelmä, jolla kyettäisiin analysoidaan metsäteollisuuden ja erilaisten biojalostamoiden jätevesiä; keskittyen erityisesti puun uuteaineisiin. Menetelmän tarkoituksena oli saada erilaiset puun uuteaineet erottumaan tunnistamista varten, sekä kvantitoida erikseen määritellyt tutkittavat aineet. Menetelmäkehityksen pohjana käytettiin artikkeleita vastaavista tutkimuksista (Herold–Majumdar ym. 2021; Doddapaneni ym. 2018.). Artikkelien perusteella valittiin laiteparametrit ja lämpötilaohjelma, mitkä on esitetty luvussa 3.3. Artikkelien pohjalta päädyttiin myös käyttämään derivatisointiin silylaatiota BSTFA:lla (Herold–Majumdar ym. 2021; Mosbye, Harstad & Fiksdahl 2000). Menetelmäkehitys aloitettiin puhtailla yhdisteillä ja niiden yhdistelmäliuoksella ennen varsinaisten näytteiden analysointia. Varsinaisten näytteiden esikäsittelyyn kehitettiin menetelmä, kun laitemenetelmä oli osoitettu toimivaksi.

4.2 Esikokeet puhtailla yhdisteillä

Menetelmän kehittäminen aloitettiin selvittämällä tutkittavien aineiden retentioajat ja massaspektrit työssä käytetyllä laitteistolla. Tutkittavista aineista ja käytetyistä sisäisistä standardeista valmistettiin aluksi kullekin oma näytteensä pitoisuudella 5 mg/l, jotka derivatisoitiin BSTFA-TMCS –liuoksella. Valmistettua näytettä ruiskusuodatettiin noin 0,5 ml näytepulloon ja lisättiin 100 µl derivatisointireagenssia. Näytepulloja pidettiin 70 °C lämpöhauteessa 20 minuuttia. Tämän jälkeen näytteet jäähdytettiin huoneenlämpöön ja analysoitiin.

Yksittäin tutkituilla aineilla saatiin suotuisia tuloksia ja ne pystyttiin selkeästi tunnistamaan NIST-kirjaston avulla. Laiteparametrit koettiin toimiviksi, eikä niitä päätetty muuttaa kuin detektorin käynnistysajan suhteen liuotinpiikkien suodattamiseksi kromatogrammista. Tämän jälkeen tutkittavista aineista valmistettiin yh-

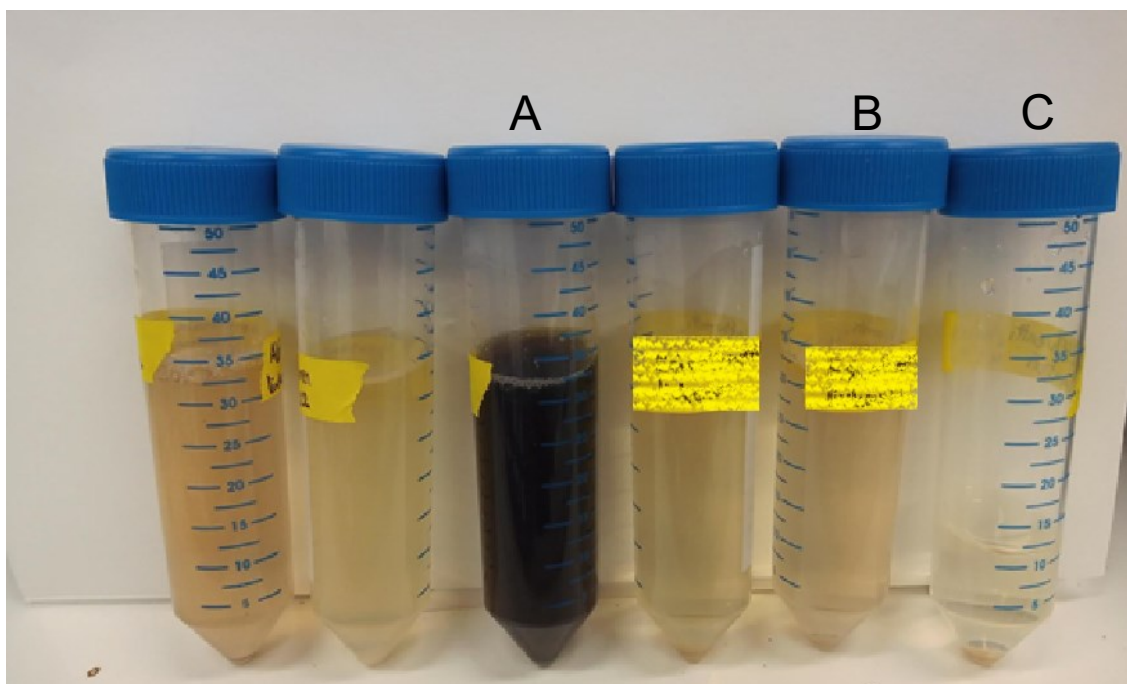
distelmästandardinäyte, jossa tutkittavien aineiden ja käytettyjen sisäisten standardien pitoisuudet olivat kullekin 5 mg/l. Yhdistelmänäyte käsiteltiin samoin kuin yksittäisnäytteet.

Suotuisten esikoetulosten perusteella päätettiin tutkittavista aineista ajaa standardisuorat, joissa standardien pitoisuudet kullekin tutkittavalle aineelle olivat 0,2; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 ja 10,0 mg/l. Standardeihin lisättiin ISTD-liuosta, joka sisälsi 1-eikosanolia ja kolesterolia kumpaakin pitoisuudella 50 mg/l, niin että sisäisten standardien pitoisuudet kaikissa näytteissä olivat 4 mg/l. Näytteet ajettiin duplikaatteina. Standardisuorat on esitetty liitteessä 1.

4.3 Näytteiden analysointi ja esikäsittelymenetelmän kehitys

Varsinaiset näytteet olivat peräisin erään biojalostamon prosessi- ja jätevesistä. Vesinäytteet oli kerätty syksyllä 2021 ja säilötty pakastimessa 4.2.2022 asti. Raakanäytteet oli suodatettu ennen säilytystä 0,45 µm ruiskusuodatuksella kiintoaineksen poistamiseksi, joten näytteistä tutkittiin vain niihin liuenneita yhdisteitä.

Kuudesta näytteestä analysoitiin kolme. Kuvassa 6 on esitetty kaikki kuusi näytettä ja merkitty työssä tutkitut näytteet kirjaimin: A, B ja C. Näyte A on teollisuusprosessin alkupäästä, B prosessin keskivaiheilta ja C prosessin loppupäästä. Näytteet analysoitiin teoreettisesti puhtaimmasta likaisimpaan järjestyksessä C, B ja A.



KUVA 6. Erilaisia prosessivesinäytteitä; kuvaan merkitty näytteet A, B ja C

Esikäsittelymenetelmän pohjana toimivat tutkimusartikkelit (Herold-Majumdar ym. 2021; Mosbye ym. 2000) joiden perusteella päädyttiin kiinteäfaasiuuttoon ja C18 sorbentin käyttämiseen. Näytteiden esikäsittelyn tarkoituksena oli uuttaa tutkittavat aineet erilleen vesifaasista, jotta ne voitiin analysoida GC-MS:llä. Puh-tailla aineilla suoritettavat esikokeet osoittivat derivatisointi- ja laitemenetelmien toi-mivuuden, joten niitä sovellettiin vastaavasti varsinaisille näytteille. Esikäsittely-menetelmän kehityksessä käytettiin biojalostamolta kerättyjä näytteitä. Varsinai-sista näytteistä analysoitiin ensimmäisenä puhtain, prosessin loppupäästä otettu, näyte C. Sisäisenä standardeina toimivia 1-eikosanolia ja kolesterolia käytettiin kvantitoinnin lisäksi tulosten suhteuttamiseen. Ajatuksena oli, että kyseiset aineet käyttäytyvät SPE-käsittelyssä ja derivatisoinnissa samalla tavalla kuin tutkittavat aineet, eli niiden hävikki olisi samaa suuruusluokkaa tutkittavien aineiden kanssa.

Näytettä siirrettiin 25 ml mittapulloon, lisättiin 2 ml ISTD-liuosta ja täytettiin merk-kiin asti näytteellä. SPE-kolonnit käsiteltiin valuttamalla 10 ml metanolia ja 10 ml MQ-vettä kolonnien läpi, minkä jälkeen näyte, johon sisäinen standardi oli lisätty, ladattiin kolonniin. Näytteestä eluoiitiin vesifaasi ulos, noin 5 ml/min virtauksella, ja kolonnin annettiin kuivua imulla 30 minuuttia. Imupullo vaihdettiin puhtaaseen

ja kolonniin lisättiin 15 ml metanolia ja 15 ml asetonia, jotka eluointiin ulos kolonnista. Eluentti sisälsi tutkittavat aineet asetoni-metanoli-liuoksessa ja se siirrettiin säilöpulloon ja säilytettiin jääkaapissa analysointiin asti.

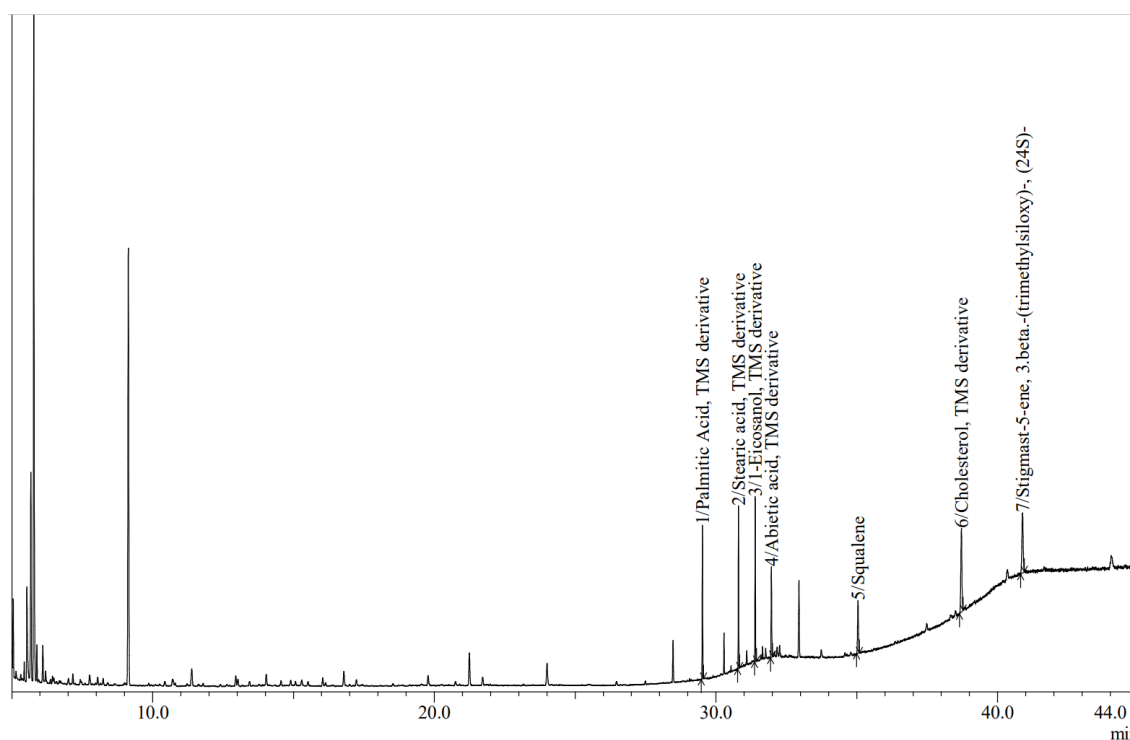
Ajan säästämiseksi kokeiltiin analysoida puun uuteaineita suoraan eluentista. Käsitellystä näytteestä pipetoitiin 100 µl GC-näytepulloon ja lisättiin 100 µl derivointireagenssia. Näytteitä pidettiin 70 °C vesihauteessa 20 minuuttia, minkä jälkeen ne jäähdytettiin ja analysoitiin samalla menetelmällä kuin esikoenäytteet. Suoraan eluentista analysoidut tulokset näytteille eivät olleet suotuisia, minkä takia näyte päätettiin konsentroida kuten artikkeleissa oli kuvattu.

Näyte siirrettiin kartiopohjaiseen sentrifugiputkeen ja konsentroitettiin haihduttamalla liuotin typpikaasulla (KUVA 4.). Kuivunut näyte suspensoitiin 2 ml:aan asetonia käsiteltiin samoin kuin suoraan eluentista otettu näyte.

5 TULOKSET JA TARKASTELU

5.1 Esikokeiden tulokset

Puhtailla yhdisteillä suoritettujen yksittäisanalyyysien jälkeen suoritettiin kokeet yhdistelmästandardilla, joka sisälsi tutkittavat aineet ja sisäiset standardit. Yhdistelmästandardista analysoitu kromatogrammi on esitetty kuviossa 11.



KUVIO 11. Yhdistelmästandardin kromatogrammi, johon merkitty tutkittavien aineiden (1, 2, 4, 5 ja 7) ja sisäisten standardien (3 ja 6) piikit

Kromatogrammissa esiintyvät piikit ennen 10 minuuttia ovat todennäköisesti peräisin derivatisointireagenssista ja liuottimesta; pienemmät piikit välillä 10 – 29 minuuttia ovat todennäköisesti peräisin tutkittavista aineista. Esimerkiksi abietihapon laatu oli >75.0%, mikä voi selittää erinäisiä epäpuhtauksia näytteessä. Epäpuhtauksista suurin osa oli erilaisia trimetyylisilyylijohtannaisia, mikä tarkoittaa epäpuhtauksien olleen läsnä näytteissä jo ennen derivatisointia. Osa piikeistä tunnistettiin myös erilaisiksi siloksaaneiksi, jotka ovat peräisin kolonnista.

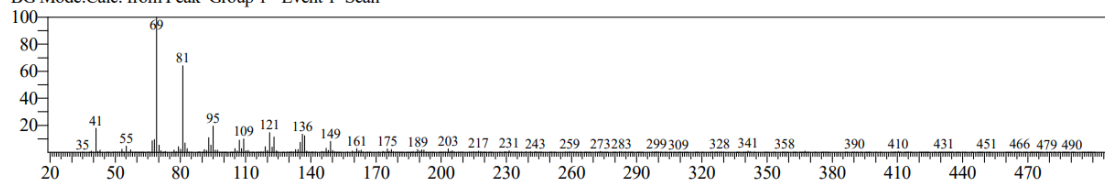
Tutkittavat aineet tunnistettiin vertaamalla niistä mitattuja massaspektrejä NIST-tietokantaan. Vertailutulokset NIST -kirjaston kanssa, yhdisteiden retentioajat ja niiden peruspiikit, eli tärkeimmät massafragmentit, on esitetty taulukossa 5. Kuviossa 12 on esitetty esimerkkinä skvaleenin mitattu massaspektri ja NIST – tietokannan massaspektri. Esikokeiden jälkeen tutkittaville aineille ajettiin standardisuorat, jotka on esitetty liitteessä 1.

TAULUKKO 5. Esikokeiden tulokset tutkittaville aineille ja sisäisille standardeille

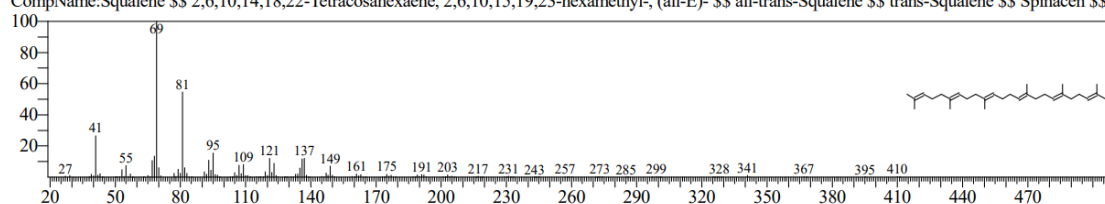
Yhdiste	Johdos	Retentioaika (min)	Peruspiikki	SI
Palmitiinihappo	TMS derivative	29,49	117	92
Steariinihappo	TMS derivative	30,832	117	93
Abietiinihappo	TMS derivative	32,007	256	89
Skvaleeni	-	35,12	69	96
β -Sitosteroli	TMS derivative	40,993	129	87
1-Eikosanoli	TMS derivative	31,393	355	93
Kolesteroli	TMS derivative	38,717	129	92

<< Target >>

Line#:4 R.Time:35.117(Scan#:9141) MassPeaks:320
RawMode:Averaged 35.113-35.120(9140-9142) BasePeak:69.05(167190)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:6116 Library:NIST20M2.lib
SI:96 Formula:C30H50 CAS:111-02-4 MolWeight:410 RetIndex:2914
CompName:Squalene SS 2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-, (all-E)- SS all-trans-Squalene SS trans-Squalene SS Spinacen SS S



KUVIO 12. Mitattu skvaleenin massaspektri ja NIST-tietokannan massaspektri

Tutkittavat aineet tunnistettiin kromatogrammista automaattisesti NIST – tietokantaan vertaamalla, jolloin β -sitosterolin trimetyylisilyyli -johdannainen tulkittiin Stigmast-5-ene, 3β -(trimethylsiloxy)-, (24S)- -yhdisteeksi, joka on stereoisomeeri β -sitosterolin trimetyylisilyyli -johdannaiselle. Standardikuvaajia ajettaessa yhdiste tunnistettiin manuaalisesti β -sitosterolin trimetyylisilyyli -johdannaisiksi.

5.2 Näyte C

Suoraan SPE-eluentista analysoidusta näytteestä havaittiin minimaalisia vasteita 1-eikosanolille ja muutamille orgaanisille yhdisteille. Kuviossa 13 on esitetty suoraan eluentista analysoitu kromatogrammi. Suoraan eluentista otettu näyte oli liian laimeaa luotettavien laatu- ja määränalyysien tekemiseksi, joten näyte konsentroidiin. Konsentroidusta eluentista analysoidun näytteen kromatogrammi on esitetty kuviossa 14.

Kromatogrammista havaittiin selkeinä piikkeinä sisäisinä standardeina käytetyt 1-eikosanoli ja kolesteroli. Lisäksi pystyttiin tunnistamaan ja kvantitoimaan steariini- ja palmitiinihappo, joita ei entuudestaan tiedetty näytteessä olevan. Steariini- ja palmitiinihapon mittaustulokset ja niistä lasketut alkuperäisen näytteen pitoisuudet on esitetty taulukoissa 6 ja 7.

TAULUKKO 6. Näytteen C suspensiosta mitatut pitoisuudet

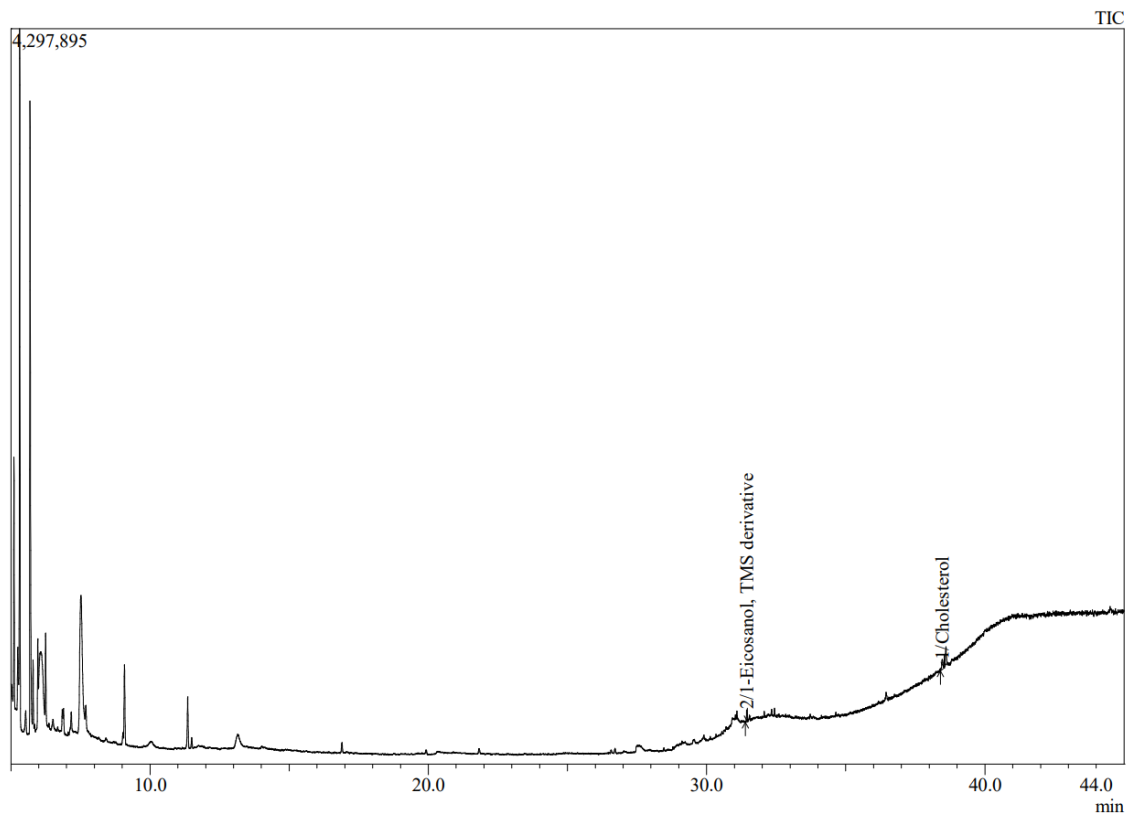
Yhdiste	Mitattu pitoisuus (mg/l)
Steariinihappo	0,425
Palmitiinihappo	0,282

Sijoittamalla mittaustulokset kaavaan (2) saadaan laskettua steariini ja palmitiinihapon pitoisuudet alkuperäisessä näytteessä. Alla kaavaan sijoitettuna palmitiinihapon mittaustulos ja alkuperäisen näytteen konsentraatio laskettuna:

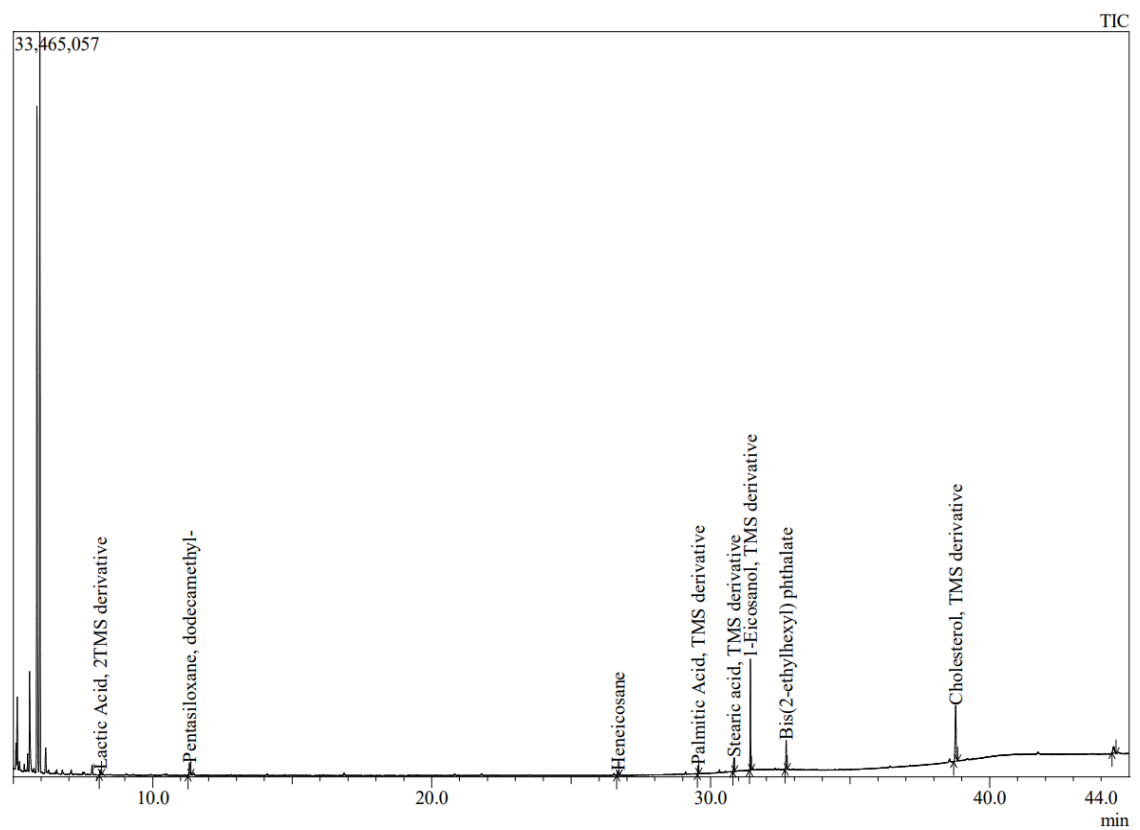
$$\begin{aligned}
 c_1 &= \frac{0,282 \frac{mg}{l} * 2 ml}{23 ml} \\
 &= 0,0245217 \dots \frac{mg}{l} \\
 &\approx 25 \mu g/l
 \end{aligned}$$

TAULUKKO 7. Näytteen C laskennalliset pitoisuudet

Yhdiste	Alkuperäisen näytteen pitoisuus ($\mu g/l$)
Steariinihappo	37
Palmitiinihappo	25



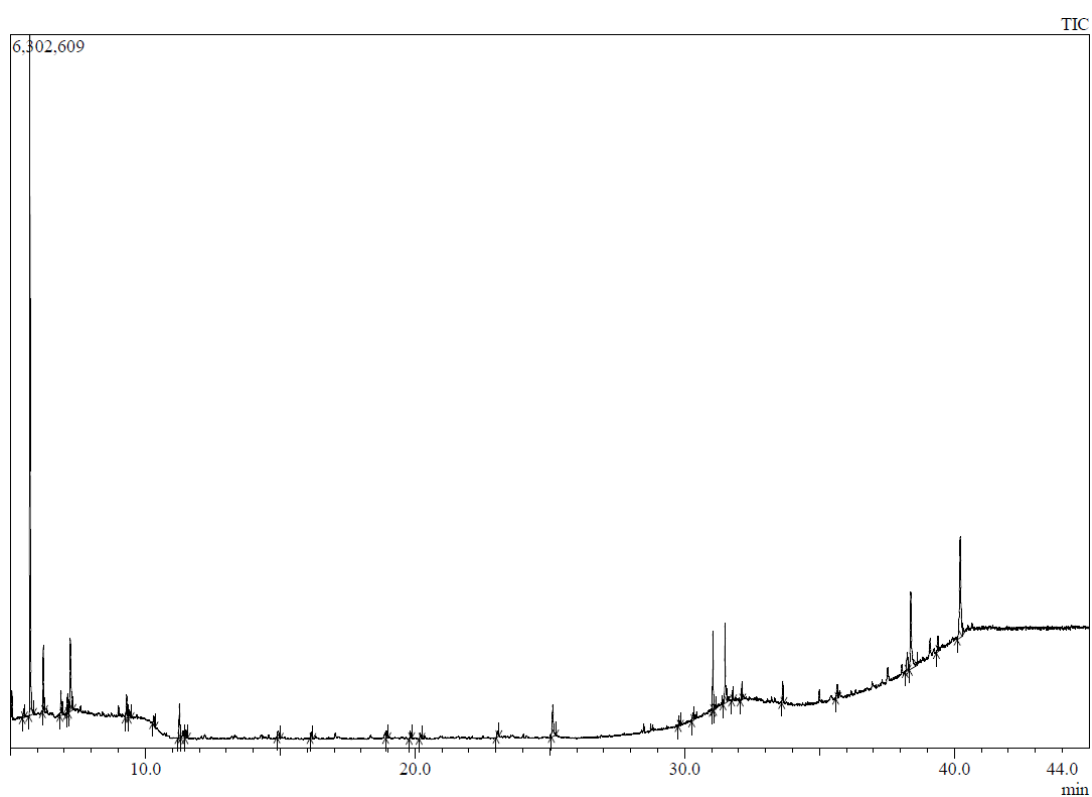
KUVIO 13. Suoraan näyte C:n eluentista analysoitu kromatogrammi



KUVIO 14. Konsentroidun näyte C:n kromatogrammi

5.3. Näyte B

Näyte B käsiteltiin ja mitattiin vastaavalla menetelmällä. Kuviossa 15 on esitetty näytteen konsentraatista mitattu kromatogrammi ja taulukossa 8 on esitetty kvantitoinnin tulokset steariini- ja abietiinihapolle. Näytteestä B tunnistettiin NIST-kirjaston avulla erilaisia amideja, rasva-alkoholeja, rasvahappoja ja niiden estereitä sekä fenoleja. Yhdisteiden vastaavuus NIST tietokantaan (SI) vaihteli välillä 70–96 %. Esimerkkejä havaituista yhdisteistä on esitetty taulukossa 9; yhdisteet on esitetty automaattisesti tunnistetuilla englanninkielisillä nimillä. Laitetuloste tunnistetuista yhdisteistä kokonaisuudessaan on esitetty liitteessä 2.



KUVIO 15. Näyte B:n konsentraatista mitattu kromatogrammi

TAULUKKO 8. Näyte B:n mitatut ja lasketut pitoisuudet havaituille aineille

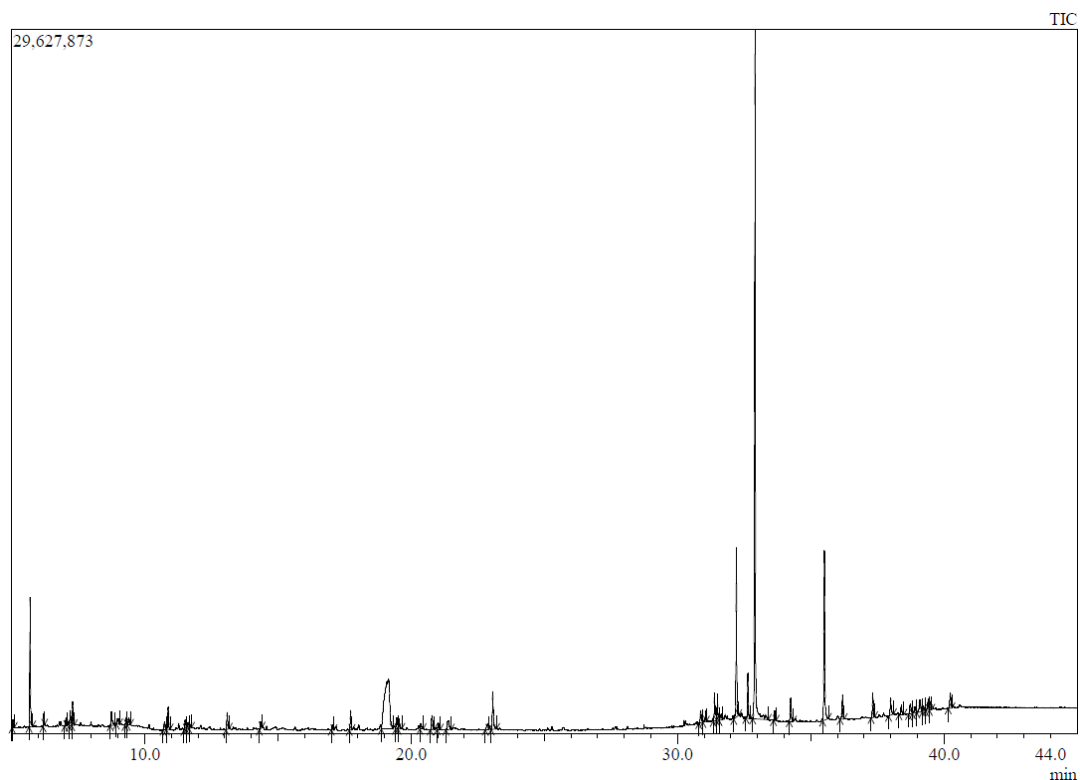
Yhdiste	Mitattu pitoisuus (mg/l)	Alkuperäisen näytteen pitoisuus (µg/l)
Steariinihappo	0,38351	33
Abietiinihappo	1,67187	145

TAULUKKO 9. Esimerkkejä näytteestä B havaituista yhdisteistä

Yhdiste	SI
Formamide, N,N-diethyl-	96
1-Hexanol,2-ethyl-	94
L-.alpha.-Terpineol	86
2,4-Di-tert-butylphenol	92
Benzoic acid, 4-ethoxy-,ethyl ester	90
1-Heptacosanol	96
Palmitoleamide	91

5.4. Näyte A

Näyte A käsiteltiin ja mitattiin vastaavalla menetelmällä. Kuviossa 16 on esitetty näytteen konsentraatista mitattu kromatogrammi ja taulukossa 10 on esitetty kvantitoinnin tulokset. Näytteestä A tunnistettiin NIST-kirjaston avulla näytteestä B havaittujen yhdisteiden lisäksi erilaisia aromaattisia yhdisteitä ja terpeenin johdannaisia. Esimerkkejä havaituista yhdisteistä on esitetty taulukossa 11 ja laiteluoste tunnistetuista yhdisteistä kokonaisuudessaan on esitetty liitteessä 3.



KUVIO 16. Näyte A:sta mitattu kromatogrammi

TAULUKKO 10. Näyte A:sta mitatut ja lasketut pitoisuudet

Yhdiste	Mitattu pitoisuus (mg/l)	Alkuperäisen näyteen pitoisuus (µg/l)
Palmitiinihappo	1,22148	106
Steariinihappo	5,36629	467
Abietiinihappo	3,47163	302

TAULUKKO 11. Esimerkkejä näytteestä havaituista yhdisteistä

Yhdiste	SI
(+)-4-Carene	93
p-Cymene	91
Cyclobutane, 1,2-bis(1-methylethelnyl)-,trans-	92
L-.alpha.-Terpineol	86
Phenol, 4-(2-propenyl)-	90
Vanilin	91
D-allose	96
Benzenepropanol, 4-hydroxy-,alpha,-methyl	96
3,4-Divanillyltetrahydrofuran	92
Pinoresinol	90

6 YHTEENVETO JA POHDINTA

Opinnäytetyön tavoite saavutettiin; puun uuteaineiden analysointiin ja näytteiden esikäsittelyyn onnistuttiin kehittämään menetelmät. Esikäsittelyyn käytettävällä kiinteäfaasiuutolla ja typetyksellä on mahdollista eristää ja konsentroida näytteet GC-MS-analyysia varten. Näytteiden derivatisointi silyloimalla osoittautui myös helpoksi ja toimivaksi menetelmäksi. Suoritettujen analyysien perusteella laitemenetelmällä on mahdollista erottaa ja analysoida laaja joukko erilaisia yhdisteitä biojalostamon prosessivesistä. Ohjeet standardisuoran tekemisestä ja liuosvalmistuksesta, sekä näytteiden käsittelystä ja analysoinnista on esitetty liitteissä 4 ja 5.

Menetelmän jatkokehitystä ajatellen kiinteäfaasiuuttoa voisi kokeilla muilla liuottimilla. Tässä työssä uuttoa kokeiltiin vain asetonilla ja metanolilla. Esikäsittelymenetelmän pohjana toimineissa artikkeleissa (Mosbye ym. 2000) käytettiin edellä mainittujen liuottimien lisäksi dikloorimetaania, tai eluointi suoritettiin pyriidiinillä (Herold-Majumdar ym. 2021). Kiinteäfaasiuutto mahdollistaisi myös näytteen fraktioinnin käyttämällä erilaisia liuottimia.

Kiinteäfaasiuuttoa ei kokeiltu puhtailla aineilla ennen näytteiden ajamista aikataulun ja työn luonteen perusteella. Näytteiden avulla oli tarkoitus tutkia laitemenetelmän toimivuutta ja yhdisteiden riittävää erottumista, sillä riittävän monipuolisesti uuteaineet huomioivan synteettisen matriisin tuottaminen olisi ollut haastavaa ja kallista. Lisäksi näytteiden pitoisuuksia eri aineille ei tunnettu ja vastaavien tutkimusten (Kostamo ym. 2004) perusteella uuteaineiden konsentraatio vaihtelee merkittävästi.

Menetelmää ei validoitu, eikä esimerkiksi esikäsittelymenetelmän saantoa arvioidu. Pohja uuteaineiden analysointiin ja käsittelyyn onnistuttiin kuitenkin luomaan. Menetelmällä on mahdollista ajaa erilleen laaja joukko erilaisia orgaanisia puun uuteaineita ja tunnistaa ne NIST-kirjaston avulla melko luotettavasti; tunnistusindeksin (*similarity index, SI*) arvojen ollessa korkeimmillaan 96% ja alimillaan 70 %. Menetelmää sovellettiin näytteille vain SCAN-tilassa, koska pääpaino menetelmän kannalta tässä vaiheessa oli saada erilaiset uuteaineet analysoitavaan

muotoon ja erottumaan selkeästi tunnistusta varten. Tutkittavia aineita on mahdollista kvantitoida SCAN-tilassa, mutta luotettavien kvantitatiivisten tulosten saamiseksi tulee laitteella käyttää SIM-tilaa. Erityisesti analyysin viimeisen 10 minuutin sisällä esiintyvien biomolekyylien, kuten sterolin ja skvaleenin, kvantitointi edellyttää selektiivisempää detektointia, koska niiden massaspektrit peittyvät näytematriisiin muiden komponenttien toimesta.

Näytteet A, B ja C olivat peräisin erään biojalostamon prosessin alusta, keskivaiheilta ja lopusta. Näytteiden kromatogrammeja verrattaessa havaitaan erilaisten uuteaineiden väheneminen yhdistepiikkien vähenemisenä siirryttäessä alkupään prosesseista loppuun, mikä kertoo osaltaan erilaisten puhdistusprosessien toimivuudesta. Mitatut pitoisuudet tutkittaville aineille vaihtelevat suuruusluokiltaan merkittävästi, mutta ovat muihin vastaaviin tutkimuksiin (Kostamo ym. 2004; Herold – Majumdar ym. 2021.) verrattaessa uskottavia. Uuteaineiden koostumus ja määrä puissa ja sitä kautta biojalostamoiden prosesseissa kuitenkin vaihtelee riippuen käytetystä puuaineksesta, sen alkuperästä, sekä muista uuteaineiden määrään vaikuttavista tekijöistä (Routa ym. 2017; Kostamo ym. 2004). Kostamon tutkimuksessa todettiin myös uuteaineiden konsentraation vaihtelevan merkittävästi eri prosessien lisäksi myös eri jalostamoilla, joten uuteaineiden konsentraatiosta tai prosessivesimatriiseista ei voida sanoa alalle yleispätevää arvoa tai koostumusta. Tutkitun jalostamon vesiä tulisi tarkkailla pidempään, selkeiden trendien havaitsemiseksi.

LÄHTEET

Alén, R. & Consalen Consulting, 2009. Kokoelma orgaanisia yhdisteitä. Ominaisuudet ja käyttökohteet. Jyväskylä; Gummerus

Anderson, J.L., Berthod, A, Estévez, V.P. & Stalcup A.M. (2015). Analytical Separation Science, 5 Volume Set. John Wiley & Sons.

Doddapaneni, T., Jain, R., Ramasamy, P., Rintala, J., Romar, H. & Konttinen, J. 2017. Adsorption of furfural from torrefaction condensate using torrefied biomass. Chemical Engineering Journal. 334.

Herold-Majumdar, O.M., Pita, S.L., Dominguez Estevez, F., Wawrzynczyk, J., Loureiro P. & Felby, C. 2021. Removal of hard COD from acidic eucalyptus kraft pulp bleach plant effluent streams using oxidoreductases. Biotechnology and Applied Biochemistry, 10

Hoffman, E. & Stroobant, V. 2007. Mass Spectrometry, Principles and Applications, Third Edition, Wiley.

Hussain, S. Z. & Maqbool, K. 2014. GC-MS: Principle, Technique and its application in Food Science. Luettu 22.2.2022. <https://www.semanticscholar.org/paper/GC-MS%3A-Principle%2C-Technique-and-its-application-in-Hussain-Ma-qbool/77cae8dde08d6eb6c8d26e50bd19c63da7deda3>

Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. 5. Painos. Edita.

Knapp, D. 1979. Handbook of analytical derivatization reactions. 1979. Wiley.

Kostamo, A., Holmbom, B. & Kukkonen, J.V.K. 2004. Fate of wood extractives in wastewater treatment plants at kraft pulp mills and mechanical pulp mills. Water Research, 38.

Lindholm-Lehto, P., Knuutinen, J., Ahkola, H., & Herve, S. H. 2015. Refractory organic pollutants and toxicity in pulp and paper mill wastewaters. Environmental Science and Pollution Research, 22.

McMurry, J. & Simanek, E. 2007. Fundamentals of Organic Chemistry, Sixth edition. Belmont, USA: Thomson Brooks/Cole

McNair, H., Miller, J. & Snow, N. 2019. Basic Gas Chromatography. Wiley.

Mosbey, J., Harstad, B. & Fiksdahl, A.. 2000. Solid phase extraction (SPE) of hydrophobic components from a model white water. Nordic Pulp and Paper Research Journal, 15.

Phenomenex. 2022. ZB-5;Si Phase Detail. Luettu. 1.2.2022. <https://www.phenomenex.com/Products/GCDetail/Zebon/ZB-5MSi>

Pubchem. beta-Sitosterol. Luettu 15.2.2022 . <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-Sitosterol>

Pubchem. Squalene. Luettu 15.2.2022.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Squalene>

Routa, J., Brännström, H., Anttila, P., Mäkinen, M., Jänis, J. & Asikainen, A. 2017. Wood extractives of Finnish pine, spruce and birch – availability and optimal sources of compounds. *Natural resources and bioeconomy studies*, 73/2017

Sigma-Aldrich. BSTFA Product specification. 1997.

Sigma-Aldrich. Squalene. Safety Data Sheet. 2022.

Spanova, M. & Daum, G. 2011. Squalene - biochemistry, molecular biology, process biotechnology, and applications. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 101

Sparkman, O., Penton, Z. & Kitson, F. 2011. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*. Elsevier.

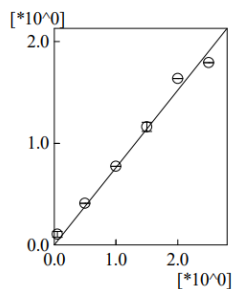
Vuorinen, T. 2021. Biomass chemistry and physiology, Extractives. *Forest Biofacts*. Luettu 17.2.2022.
<https://forestbiofacts.com/biomass-chemistry-and-physiology/chemical-composition-of-biomass/extractives/>

LIITTEET

Liite 1. Tutkittavien aineiden standardisuorat

C:\GCMSsolution\Data\Santeri\Woodextractives\Extractives_220214\Wood_extractive_220215_ISTD.qgm

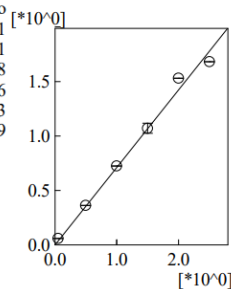
ID#:1 Mass:117.00 Name:Palmitic Acid, TMS derivative
 $f(x)=0.761672*x+0.000000$
 $rr2=0.990132$



#	Conc. Ratio (mg/l)	Mean Area Ratio
1	0.050	0.11
2	0.500	0.41
3	1.000	0.78
4	1.500	1.16
5	2.000	1.63
6	2.500	1.79

Calibration

ID#:2 Mass:117.00 Name:Stearic acid, TMS derivative
 $f(x)=0.710959*x+0.000000$
 $rr2=0.990197$



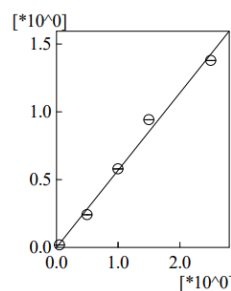
#	Conc. Ratio (mg/l)	Mean Area Ratio
1	0.050	0.06
2	0.500	0.36
3	1.000	0.72
4	1.500	1.07
5	2.000	1.53
6	2.500	1.68

ID#:3 Mass:355.00 Name:1-Eicosanol, TMS derivative
 $f(x)=?$
 $rr2=0.000000$

ID#:3 Mass:355.00 Name:1-Eicosanol, TMS derivative
 $f(x)=?$
 $rr2=0.000000$

ID#:4 Mass:256.00 Name:Abietic acid, TMS derivative
 $f(x)=0.570389*x+0.000000$
 $rr2=0.990057$

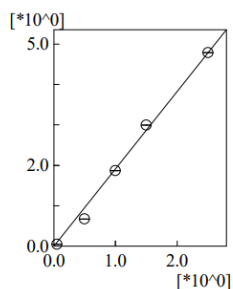
ID#:4 Mass:256.00 Name:Abietic acid, TMS derivative
 $f(x)=0.570389*x+0.000000$
 $rr2=0.990057$



#	Conc. Ratio (mg/l)	Mean Area Ratio
1	0.050	0.02
2	0.500	0.24
3	1.000	0.58
4	1.500	0.94
6	2.500	1.38

ISTD

ID#:5 Mass:69.00 Name:Squalene
 $f(x)=1.914849*x+0.000000$
 $rr2=0.995391$

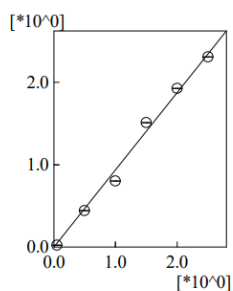


#	Conc. Ratio (mg/l)	Mean Area Ratio
1	0.050	0.05
2	0.500	0.68
3	1.000	1.87
4	1.500	3.00
6	2.500	4.79

ID#:6 Mass:129.00 Name:Cholesterol, TMS derivative
 $f(x)=?$
 $rr2=0.000000$

ISTD

ID#:7 Mass:129.00 Name:.beta.-Sitosterol, TMS derivative
 $f(x)=0.937869*x+0.000000$
 $rr2=0.991988$



#	Conc. Ratio (mg/l)	Mean Area Ratio
1	0.050	0.02
2	0.500	0.44
3	1.000	0.80
4	1.500	1.51
5	2.000	1.92
6	2.500	2.30

Liite 2. Tunnistetut yhdisteet näytteestä B

Peak#	Ret. Time	Name	CAS #	SI
1	5.493	1-Octen-3-one	4312-99-6	80
2	5.719	Formamide, N,N-diethyl-	617-84-5	96
3	6.216	Acetamide, N-ethyl-	625-50-3	86
4	6.873	Acetamide, N,N-diethyl-	685-91-6	88
5	7.121	Acetamide, N-ethyl-	625-50-3	81
6	7.223	1-Hexanol, 2-ethyl-	104-76-7	94
7	9.307	1,3-Dioxolane-4-carboxaldehyde, 2,2-dimethyl-, (R)-	15186-48-8	85
8	9.418	3-Heptyne-2,6-dione, 5-methyl-5-(1-methylethyl)-	63922-44-1	71
9	10.308	Cyclotetrasiloxane, octamethyl-	556-67-2	79
10	11.267	Pentasiloxane, dodecamethyl-	141-63-9	93
11	11.403	3-Dodecanol	10203-30-2	76
12	11.513	L- α -Terpineol	10482-56-1	86
13	14.930	3-Acetyl-cyclopentanone	75359-72-7	80
14	16.154	4-Methyl-4-(tetrahydropyran-2-yl)oxypentane-2,3-dione	118006-75-0	82
15	18.927	D-Allose	2595-97-3	80
16	19.832	2,4-Di-tert-butylphenol	96-76-4	92
17	20.197	Benzoic acid, 4-ethoxy-, ethyl ester	23676-09-7	90
18	23.059	Benzenepropanol, 4-hydroxy-3-methoxy-	2305-13-7	92
19	25.109	(E)-4-(3-Hydroxyprop-1-en-1-yl)-2-methoxyphenol	32811-40-8	93
20	29.794	n-Nonadecanol-1	1454-84-8	92
21	30.301	Octadecanoic acid	57-11-4	83
22	31.049	1-Heptacosanol	2004-39-9	96
23	31.090	Behenyl acrylate	18299-85-9	71
24	31.497	Palmitoleamide	106010-22-4	91
25	31.774	Isobutyl dehydroabietate	0-00-0	73
26	32.121	Dehydroabietic acid	1740-19-8	83
27	33.637	(E)-3,3'-Dimethoxy-4,4'-dihydroxystilbene	7329-69-3	89
28	35.652	Allylescaline	39201-76-8	71
29	38.250	2(3H)-Furanone, dihydro-3,4-bis[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methyl]-, (580-72-3	75
30	38.386	Cholesterol	57-88-5	84
31	39.393	Phenol, 4,4'-(tetrahydro-1H,3H-furo[3,4-c]furan-1,4-diyl)bis[2-methoxy-	7452-03-1	80
32	40.220	Naphtho[2,3-c]furan-1(3H)-one, 3a,4,9,9a-tetrahydro-6-hydroxy-4-(4-hy	518-55-8	83

Liite 3. Tunnistetut yhdisteet näytteestä A

Peak#	Ret. Time	Name	CAS #	SI
1	5.061		0-00-0	0
2	5.696	Formamide, N,N-diethyl-	617-84-5	96
3	6.213	Acetamide, N-ethyl-	625-50-3	86
4	7.041	(+)-4-Carene	29050-33-7	93
5	7.208	p-Cymene	99-87-6	91
6	7.300	Cyclobutane, 1,2-bis(1-methylethenyl)-, trans-	19465-02-2	92
7	8.754	Cyclohexene, 3-methyl-6-(1-methylethylidene)-	586-63-0	89
8	9.000		0-00-0	0
9	9.307	CH3C(O)OCH(CH2CH3)C(CH3)3	39511-81-4	81
10	9.414		0-00-0	0
11	10.748	2-(Isobutoxymethyl)oxirane	3814-55-9	83
12	10.884	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,7,7-trimethyl-, (1S-endo)-	464-45-9	96
13	11.523	L- α -Terpineol	10482-56-1	86
14	11.636	N'-(2-Furylmethylene)-2-phenylacetylhydrazide	113906-59-5	72
15	11.703	Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene-2-methanol, 6,6-dimethyl-	515-00-4	88
16	13.098	Phenol, 4-(2-propenyl)-	501-92-8	90
17	14.351		0-00-0	0
18	17.047	Vanillin	121-33-5	91
19	17.731	Phenol, 3,4-dimethoxy-	2033-89-8	95
20	19.156	D-Allose	2595-97-3	96
21	19.466	Ethanol, 2-(3,3-dimethylbicyclo[2.2.1]hept-2-ylidene)-	2226-05-3	79
22	19.543	Bicyclo[3.1.1]heptan-2-one, 3,6,6-trimethyl-	16022-08-5	84
23	20.374	3-(p-Hydroxyphenyl)-1-propanol	10210-17-0	91
24	20.788	4-(p-Acetoxyphenyl)-2-butanone	3572-06-3	90
25	21.025	Benzenepropanol, 4-hydroxy- α -methyl-	69617-84-1	96
26	21.389	1,6-Anhydro- β -D-glucopyranose	7425-74-3	96
27	22.872	2-O-Methyl-D-mannopyranosa	36864-61-6	79
28	23.066	Benzenepropanol, 4-hydroxy-3-methoxy-	2305-13-7	95
29	30.872	Benzenepropanol, 4-hydroxy-3-methoxy-	2305-13-7	78
30	31.053	1-Heptacosanol	2004-39-9	94
31	31.387	Cyclopentanecarboxylic acid, 3-isopropylidene-, bomyl ester	0-00-0	79
32	31.502	Palmitoleamide	106010-22-4	91
33	31.640	(1R,4aR,5S)-5-[(E)-5-Hydroxy-3-methylpent-3-enyl]-1,4a-dimethyl-6-met	1214984-94-7	81
34	32.210	Phenol, 4-octyl-	1806-26-4	81
35	32.641	(E)-1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)tetradec-3-en-5-one	1278586-98-3	80
36	32.911	Guaiacol, 4-butyl-	59832-96-1	74
37	33.645	(E)-3,3'-Dimethoxy-4,4'-dihydroxystilbene	7329-69-3	90
38	34.247	Resveratrol, trans-	501-36-0	88
39	35.512	Rhapontin	155-58-8	76
40	36.194	3,4-Divanillyltetrahydrofuran	34730-78-4	92
41	37.330	2,3-Bis[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methyl]butane-1,4-diol, tetraacetat	41025-80-3	76
42	38.003	(E)-4-(3-Hydroxyprop-1-en-1-yl)-2-methoxyphenol	32811-40-8	71
43	38.400	Cholesterol	57-88-5	84
44	38.736		0-00-0	0
45	38.911	5-Benzofuranpropanol, 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-7-methoxy-	17375-66-5	74
46	39.094		0-00-0	0
47	39.237	Pinoresinol	487-36-5	90
48	39.406	Phenol, 4,4'-(tetrahydro-1H,3H-furo[3,4-c]furan-1,4-diyl)bis[2-methoxy-	7452-03-1	91
49	39.491		0-00-0	0
50	40.240	Naphtho[2,3-c]furan-1(3H)-one, 3a,4,9,9a-tetrahydro-6-hydroxy-4-(4-hy	518-55-8	85

Liite 4. Menetelmäohje standardisuoran tekemiseen

GC-MS_metsäjäte_v1.0.0_Standardisuoran tekeminen
Santeri Salonen

16.2.2022
1(3)

1. Tarvittavat kemikaalit

- Liuotin: Asetoni
- Derivatisointiaine: BSTFA+TMCS, 99:1
- Tutkittavat yhdisteet: Steariinihappo, Palmitiinihappo, Abietiinihappo, Skvaleeni & β -Sitosteroli
- Sisäiset standardit: 1-Eikosanoli & Kolesteroli

2. Laiteparametrit (Shimadzu GCMS-QP2020 NX)

- Kolonni: ZB-5MSi
- Injektori/ SPL1
 - Injection mode: Split
 - Split Ratio: 20
 - Injection volume: 1 μ l (säädetään Batch Tablessa)
 - Temperature: 300 °C
 - Flow Control Mode; Column Flow
 - Column Flow: 1ml/min
 - Valitsemalla Flow Control Modeksi: Column Flow, ja säätämällä Column Flow: 1 ml/min, laite säätää muut injektorin parametrit automaattisesti
- Massadetektorin parametrit (MS)
 - Ion Source Temp: 250 °C
 - Interface Temp: 280 °C
 - Solvent Cut Time: 4,5 min
 - Detector Voltage: Relative to Tuning Result (0,2 kV)
 - Start Time: 5 min
 - End Time: 45min
 - Acq. Mode: Scan
 - Event Time: 0,2 s
 - Scan Speed: 2500
 - Start: 35 m/z
 - End: 500 m/z
- Lämpötilaohjelma (GC)

Rate (°C/min)	Temp. (°C)	Hold time (min)
	60	2
10	100	2
5	180	2
20	280	3
5	310	5

3. Standardit

- Valmista tutkittavien aineiden ja sisäisten standardien (ISTD) kantaliuokset asetoniin
 - Kaikkiin laimennoksiin käytetään asetonia
- Valmista tutkittavien aineiden kantaliuoksista (välilaimennosten kautta) yhdistelmästandardi sopivalle pitoisuudelle
 - Huom! β -Sitosterolin voi tarvittaessa lisätä standardiliuoksiin erikseen, mikäli sen kantaliuos ei sovellu pitoisuudeltaan yhdistelmästandardiin
- Valmista 1-Eikosanolin ja Kolesterolin kantaliuoksista ISTD- yhdistelmästandardi sopivilla pitoisuuksilla
- Valmista tutkittavien aineiden yhdistelmästandardista standaradiliuokset tutkittaville aineille pitoisuuksilla 0,2; 2; 4; 6; 8 & 10 mg/l. Lisää kaikkiin standardeihin ISTD- yhdistelmästandardia niin, että 1-Eikosanolin ja Kolesterolin pitoisuus standardeissa on 4mg/l

4. Derivatisointi

- Standardiliuoksia ruiskusuodatetaan GC-vialiin 0,1 – 0,5 ml
- GC-vialeihin lisätään derivatisointireagenssia (BSFTA+TCMS) 100 μ l
- Vialit suljetaan ja niitä pidetään 70 °C lämpöhauteessa 20 min
- Derivatisoidut liuokset jäädytetään huoneenlämpöön ja analysoidaan GC-MS:llä
 - Tutkittavat aineet detektoidaan trimetyylisilylijohdannaisina
 - esim. Abietic Acid -> Abietic Acid, TMS derivative

Kirjallisuutta:

Doddapaneni et al. 2018. Adsorption of furfural from torrefaction condensate using torrefied biomass

Herold-Majumdar et al. 2021. Removal of hard COD from acidic eucalyptus kraft pulp bleach plant effluent streams using oxidoreductases

Kostamo et al. 2004. Fate of wood extractives in wastewater treatment plants at kraft pulp mills and mechanical pulp mills

Mosbey et al. 2000. Solid phase extraction (SPE) of hydrophobic components from a model white water

Liite 1. Esimerkki liuosten valmistuksesta

- Tutkittavien aineiden kantaliuosten valmistus:
 - **Abietiinihapon kantaliuos 1000 mg/l:** Punnitaan 100 mg abietiinihappoa ja liuotetaan se asetoniin 100 ml:n mittapullossa. Täyttö merkkiin asti asetonilla.
 - **Steariinihapon kantaliuos 1000 mg/l:** Punnitaan 100 mg steariinihappoa ja liuotetaan se asetoniin 100 ml:n mittapullossa. Täyttö merkkiin asti asetonilla.
 - **Palmitiinihapon kantaliuos 1000 mg/l:** Punnitaan 100 mg palmitiinihappoa ja liuotetaan se asetoniin 100 ml:n mittapullossa. Täyttö merkkiin asti asetonilla.
 - **Skvaleenin kantaliuos 1000 mg/l:** Pipetoidaan 116,6 µl skvaleenia 100 ml:n mittapulloon ja liuotetaan se asetoniin. Täyttö merkkiin asti asetonilla.
 - Skvaleenin tiheys on 0,858 g/ml; 116,6 µl skvaleenia vastaa ~100 mg
 - **β-Sitosterolin kantaliuos 100 mg/l:** Punnitaan 5 mg β-sitosterolia ja liuotetaan se asetoniin 50 ml:n mittapullossa. Täyttö merkkiin asti asetonilla
- Sisäisten standardien kantaliuosten valmistus:
 - **1-Eikosanolin kantaliuos 1000 mg/l:** Punnitaan 100 mg 1-eikosanolia ja liuotetaan se asetoniin 100 ml:n mittapullossa. Täyttö merkkiin asti asetonilla.
 - **Kolesterolin kantaliuos 1000 mg/l:** Punnitaan 100 mg kolesterolia ja liuotetaan se asetoniin 100 ml:n mittapullossa. Täyttö merkkiin asti asetonilla.
- **Tutkittavien aineiden yhdistelmästandardin 50 mg/l valmistus:**
 - Pipetoidaan abietiinihapon, steariinihapon, palmitiinihapon ja skvaleenin kantaliuoksia kutakin 2,5 ml 50 ml:n mittapulloon. Täyttö merkkiin asti asetonilla
 - β-Sitosteroli lisätään standardeihin erikseen
- **Sisäisten standardien yhdistelmäliuoksen (ISTD-liuos) 50 mg/l valmistus:**
 - Pipetoidaan 1-eikosanolin ja kolesterolin kantaliuoksia 2,5 ml 50 ml:n mittapulloon. Täyttö merkkiin asti asetonilla.
- **Standardiliuosten valmistus:**
 - **0,2 mg/l:** Pipetoidaan yhdistelmästandardia 0,1 ml ja β-Sitosterolin kantaliuosta 0,05 ml 25 ml:n mittapulloon. Lisätään ISTD-liuosta 2 ml. Täyttö merkkiin asti asetonilla.
 - **2 mg/l:** Pipetoidaan yhdistelmästandardia 1 ml ja β-Sitosterolin kantaliuosta 0,5 ml 25 ml:n mittapulloon. Lisätään ISTD-liuosta 2 ml. Täyttö merkkiin asti asetonilla.
 - **4 mg/l:** Pipetoidaan yhdistelmästandardia 2 ml ja β-Sitosterolin kantaliuosta 1 ml 25 ml:n mittapulloon. Lisätään ISTD-liuosta 2 ml. Täyttö merkkiin asti asetonilla.
 - **6 mg/l:** Pipetoidaan yhdistelmästandardia 3 ml ja β-Sitosterolin kantaliuosta 1,5 ml 25 ml:n mittapulloon. Lisätään ISTD-liuosta 2 ml. Täyttö merkkiin asti asetonilla.
 - **8 mg/l:** Pipetoidaan yhdistelmästandardia 4 ml ja β-Sitosterolin kantaliuosta 2 ml 25 ml:n mittapulloon. Lisätään ISTD-liuosta 2 ml. Täyttö merkkiin asti asetonilla.
 - **10 mg/l:** Pipetoidaan yhdistelmästandardia 5 ml ja β-Sitosterolin kantaliuosta 2,5 ml 25 ml:n mittapulloon. Lisätään ISTD-liuosta 2 ml. Täyttö merkkiin asti asetonilla.

Liite 5. Menetelmäohje näytteiden käsittelyyn ja analysointiin

GC-MS_metsäjäte_näytekäsittelySPE_v1.0
Santeri Salonen

21.2.2022
1(5)

1. Laitteisto ja kemikaalit

- SPE -laitteisto ja -kolonni
 - Imupullo, vakuumiletku, Wulffin pullo (kaasunpesupullo toimii tarvittaessa) ja kumitiiviste
 - SPE-kolonni: C 18 (end-capped & 1 g sorbent)
- MQ-vettä, Metanolia & Asetonia
- ISTD -liuos; 1-eikosanoli + kolesteroli 50 mg/l
- Näytteet (vähintään 25 ml)
- Esimerkki ISTD-liuoksen valmistuksesta
 - **Sisäisten standardien kantaliuosten valmistus:**
 - **1-Eikosanolin kantaliuos 1000 mg/l:** Punnitaan 100 mg 1-eikosanolia ja liuotetaan se asetoniin 100 ml:n mittapullossa. Täyttö merkkiin asti asetonilla.
 - **Kolesterolin kantaliuos 1000 mg/l:** Punnitaan 100 mg kolesterolia ja liuotetaan se asetoniin 100 ml:n mittapullossa. Täyttö merkkiin asti asetonilla.
 - **Sisäisten standardien yhdistelmäliuoksen (ISTD-liuos) 50 mg/l valmistus:**
 - Pipetoidaan 1-eikosanolin ja kolesterolin kantaliuoksia 2,5 ml 50 ml:n mittapulloon. Täyttö merkkiin asti asetonilla.

2. Ennen kiinteäfaasiuttoa

- Kokoa laitteisto (ks. kuvat 1 ja 2 ohjeen lopussa)
- Näytettä kaadetaan 25 ml mittapulloon n. 10 ml, lisätään 2 ml ISTD -liuosta ja täytetään merkkiin asti näytteellä
 - 2 ml ISTD-liuosta vastaa loppukonsentraationa 4 mg/l
- Sekoitetaan voimakkaasti 1 – 5 min

3. Kiinteäfaasiutto

- Kolonnin aktivointi
 - lisätään kolonniin 10 ml metanolia, joka eluoidaan ulos imulla (5 ml/min)
 - lisätään kolonniin 10 ml MQ-vettä, joka eluoidaan ulos imulla (5 ml/min)
- Näytteen lataaminen
 - ISTD-lisätty näyte ladataan kolonniin
 - Vesifaasi eluoidaan ulos imulla (5 ml/min)
 - Kolonnin annetaan kuivua imulla 30 minuuttia
 - Mikäli vesifaasi halutaan kerätä talteen; tyhjennä tai vaihda imupullo ennen näytteen latausta ja kaada vesifaasi säilytysastiaan kuivauksen jälkeen
- Näytteen eluoiminen
 - Tyhjennä tai vaihda imupullo; eluoitava fraktio sisältää tutkittavat komponentit
 - lisätään kolonniin 15 ml metanolia, joka eluoidaan ulos imulla (5 ml/min)
 - lisätään kolonniin 15 ml asetonia, joka eluoidaan ulos imulla (5 ml/min)

4. Uutetun näytteen käsittely

- Eluoitu näyte kuivataan työttämällä sopivassa astiassa
- Kuivattu näyte suspensoidaan 2 ml:aan asetonia
- Käsitelty näyte voidaan säilyttää jääkaapissa analysointiin asti

5. Derivatisointi ja GC-MS

- Kemikaalit ja välineet: derivatisointireagenssi BSTFA + TMCS (99:1); GC-vialeja ja inserttejä niihin
- Aseta insertti GC-vialiin
- Pipetoi 100 µl näytettä GC-vialiin ja lisää 100 µl derivatisointireagenssia
- Sulje viali(t)
- Pidä GC-vialeja 70 °C lämpötilassa 20 minuuttia
 - esim. laita vialit pieneen dekantterilasiin tms. ja tue ne paperilla pystyyn; aseta vialit sisältävä astia vesihauteeseen, niin että se pysyy pystyssä
- Vialit jäädytetään huoneen lämpöön ja analysoidaan GC-MS:llä
 - Ennen näytteitä on hyvä ajaa pelkkä liuotin (asetoni), jolloin nähdään, onko kolonnissa selkeitä epäpuhtauksia
- Laitteella valmis menetelmä; Laitteen "Data" -kansiossa "**Wood_extractive2022_ISTD**"

6. Laitteparametrit (Shimadzu GCMS-QP2020 NX)

- Kolonni: ZB-5MSi
- Injektori/ SPL1
 - Injection mode: Split
 - Split Ratio: 20
 - Injection volume: 1 µl (säädetään Batch Tablessa)
 - Temperature: 300 °C
 - Flow Control Mode; Column Flow
 - Column Flow: 1ml/min
- Massadetektorin parametrit (MS)
 - Ion Source Temp: 250 °C
 - Interface Temp: 280 °C
 - Solvent Cut Time: 4,5 min
 - Detector Voltage: Relative to Tuning Result (0,2 kV)
 - Start Time: 5 min
 - End Time: 45min
 - Acq. Mode: Scan
 - Event Time: 0,2 s
 - Scan Speed: 2500
 - Start: 35 m/z
 - End: 500 m/z
- Lämpötilaohjelma (GC)

Rate (°C/min)	Temp. (°C)	Hold time (min)
	60	2
10	100	2
5	180	2
20	280	3
5	310	5

7. Tulokset

- GC-MS:ltä mitatut tulokset kertovat suspensoidun näytteen konsentraation
- Alkuperäisen näytteen konsentraatio saadaan kaavalla:

$$c_1 V_1 = c_2 V_2$$

$$c_1 = \frac{c_2 V_2}{V_1}$$

- Jossa: c_1 on alkuperäisen näytteen konsentraatio
 c_2 on suspensoidusta näytteestä mitattu konsentraatio
 V_1 on alkuperäisen näytteen tilavuus (23 ml)
 V_2 on suspensoidun näytteen tilavuus (2ml)

Esim. GC-MS:llä mitattu konsentraatio palmitiinihapolle suspensoidussa näytteessä on 0,282 mg/l. Konsentraatio näytteessä on:

$$c_1 = \frac{0,282 \frac{mg}{l} * 2 ml}{23 ml}$$

$$= 0,0245217 \dots \frac{mg}{l}$$

$$\approx 25 \mu g/l$$

Koska tilavuudet ovat vakioita, ja konsentraatiot riippuvaisia mitatusta konsentraatiosta, voidaan koko kaava sieventää muotoon:

$$c_{alkup} = \frac{2 ml}{23 ml} * c_{mitattu}$$

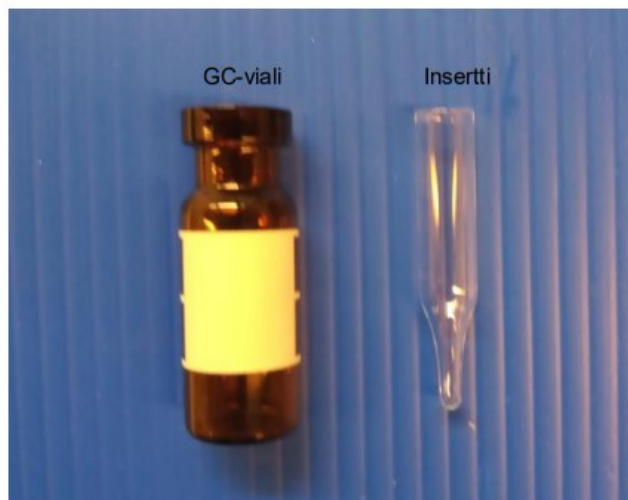
KUVA 1. SPE-laitteisto



KUVA 2. SPE-laitteisto, jossa kaasunpesupullo estämässä nesteen päätymistä imupulloon



KUVA 3. GC-viali ja insertti vialiin



KUVA 4. Esimerkki näytteen työtuksesta

