



TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO  
TAMPERE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

VILLE HEINONEN  
KAASUKROMATOGRAFISEN MENETELMÄN KEHITTÄMINEN JA  
ALUSTAVA VALIDOINTI POLYMEERIMATERIAALIEN LAKTIDIPI-  
TOISUUDEN MÄÄRITYKSEEN

Diplomityö

Tarkastaja: professori Minna Kello-  
mäki ja dosentti Terttu Hukka  
Tarkastajat ja aihe hyväksytyt Luon-  
nontieteiden tiedekunnan tiedekun-  
taneuvoston kokouksessa 6. touko-  
kuuta 2015

## TIIVISTELMÄ

**VILLE HEINONEN:** Kaasukromatografisen menetelmän kehittäminen ja alustava validointi polymeerimateriaalien laktidipitoisuuden määrittämiseksi

Tampereen teknillinen yliopisto

Diplomityö, 88 sivua, 72 liitesivua

Joulukuu 2015

Teknis-luonnontieteellisen diplomi-insinöörin tutkinto-ohjelma

Pääaine: Kemia

Tarkastajat: professori Minna Kellomäki ja dosentti Terttu Hukka

Avainsanat: Kaasukromatografia, GC, kaasukromatografia-massaspektrometria, GCMS, laktidipitoisuus, laktidi, monomeeripitoisuus, validointi

Tämän diplomityön tarkoituksena oli kehittää ja testata kaasukromatografisen menetelmä polymeerimateriaalien, erityisesti lääketieteelliseen käyttöön tarkoitettujen polylaktidien, laktidipitoisuuden määrittämiseksi. Työssä käytetty kaasukromatografialaitteisto oli Tampereen teknillisen yliopiston Elektroniikan ja tietoliikennetekniikan laitokselle hankittu Shimadzun GCMS-QP2010 Ultra, joka otettiin käyttöön työn yhteydessä. Työhön kuului myös laitteiston ja kehitetyn menetelmän käyttöön liittyvien käyttöohjeiden laatiminen.

Ennen tätä opinnäytetyötä tehdyssä laitteiston hankinnassa oli huomioitu laitteiston sopivuus NatureWorks-yrityksen kehittämään polylaktidien laktidipitoisuuden määrittämismenetelmään, johon työssä kehitetyt ja testatut menetelmät perustuivat. Työssä kehitettiin kyseisestä NatureWorks:n menetelmästä kaksi menetelmää, joiden pääasiallinen ero oli eri detektorien käyttö. Toisessa menetelmässä käytettiin detektorina laitteiston massaspektrometria ja toisessa NatureWorks:n menetelmän mukaisesti liekki-ionisaatiodetektoria. Molempien menetelmien näytteenkäsittelyt ja kalibrointitavat kehitettiin NatureWorks:n menetelmästä käyttökohteeseen sopivammiksi, sillä kehitetyllä menetelmällä haluttiin pystyä määrittämään pienempiä laktidipitoisuuksia kuin NatureWorks:n menetelmällä. Näytteenkäsittelyjen periaate oli kuitenkin NatureWorks:n menetelmän mukainen. Kaasukromatografiseen analyysiin liittyvien parametrien arvot valittiin ja optimoitiin laitteistolle sopiviksi.

Kehitettyjen menetelmien alustavissa validoinneissa, eli niiden suorituskykyjen testauksessa, määritettiin menetelmien lineaariset alueet, toistettavuudet, tarkkuudet ja määrittämissuhteet. Lineaarisuuden, toistettavuuden ja määrittämissuhteiden suhteen menetelmien suorituskyvyt olivat hyväksyttävät. Menetelmillä määritetyt laktidipitoisuudet erosivat kuitenkin huomattavasti. Liekki-ionisaatiodetektoria käytettäessä määritettiin noin kaksinkertaiset laktidipitoisuudet massaspektrometrilla määritettyihin arvoihin verrattuna. Tarkkuuksia ei voitu määrittää luotettavasti ilman polylaktidimateriaalia, jonka laktidipitoisuus olisi tunnettu.

## ABSTRACT

**VILLE HEINONEN:** Development and initial validation of analytical method for quantitation of lactide in polymer materials by gas chromatography

Tampere University of Technology

Master of Science Thesis, 88 pages, 72 Appendix pages

December 2015

Master's Degree Programme in Science and Engineering

Major: Chemistry

Examiner: professor Minna Kellomäki and adjunct professor Terttu Hukka

Keywords: Gas chromatography, GC, gas chromatography-mass spectrometry, GCMS, lactide content, lactide, monomer content, validation

The main objective of this Master of Science Thesis was to develop and to test a gas chromatography method for quantitation of lactide in polymer materials, especially in medical grade Polylactide. The method was to be developed for a Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra gas chromatograph-mass spectrometer which was a newly acquired analytical instrument at the Department of Electronics and Communications Engineering in Tampere University of Technology. The instrument was used for the first time during this thesis work and as a part of this thesis instructions were written for the use of the developed method and for the use of the instrument.

Prior to this thesis the instrument was chosen to be suitable in the use of a lactide quantitation method developed by NatureWorks. Two methods were developed during this thesis work and they were both based on the method by NatureWorks. The main difference between the developed methods was the use of different detectors. Mass spectrometer was used as a detector in one method and flame-ionization detector was used in the other method similarly to the method developed by NatureWorks. The sample preparation and calibration methods were changed in both methods in order to better suit the desired application. The objective was to be able to measure lower lactide contents than which was possibly in the method developed by NatureWorks. The principle of the sample preparation was preserved from the method by NatureWorks. The parameters of the gas chromatography analysis were chosen and optimized to be suitable with the used instrument.

Initial validation was performed to test the performance of the developed methods. Linear range, precision, accuracy and quantitation limit of the methods were determined. The linear range, precision and quantitation limit of both methods were found to be acceptable. However, the measured lactide contents were different from one method to the other. Lactide contents measured when using flame-ionization detector were about twice the lactide contents measured when mass spectrometer was used. The accuracy of the methods could not be determined reliably without the use of a Polylactide material with a known lactide content.

## ALKUSANAT

Tämän diplomityön kokeellinen osa tehtiin Tampereen teknillisen yliopiston (TTY) Elektroniikan ja tietoliikennetekniikan laitoksen (ELT) Biomateriaalien ja kudosteknologian laboratoriossa 1. maaliskuuta 2015 ja 3. heinäkuuta 2015 välisenä aikana.

Haluan kiittää tutkija Kaisa Lainetta käytännön avusta laboratoriossa ja työn kirjoitukseen liittyvistä neuvoista sekä professori Minna Kellomäkeä ja dosentti Terttu Hukkaa työn ohjauksesta ja diplomityön järjestämisestä.

Haluan lisäksi kiittää perhettä ja ystäviä työn aikaisesta tuesta ja ymmärryksestä.

Kiitos.

# SISÄLLYSLUETTELO

1.	JOHDANTO .....	1
2.	TEOREETTINEN TAUSTA .....	3
2.1	Kaasukromatografia .....	3
2.1.1	Kaasukromatografialaitteiston toimintaperiaate .....	4
2.1.2	Kaasukromatografisen erottumisen teoria .....	6
2.1.3	Kolonni.....	10
2.1.4	Injektori ja injektointimenetelmät.....	14
2.1.5	Kantajakaasu .....	17
2.1.6	Detektori.....	18
2.1.7	Kvalitatiivinen ja kvantitatiivinen analyysi .....	22
2.2	Polymeerimateriaalin monomeeripitoisuuden määrittäminen .....	26
2.3	Analysimenetelmän validointi.....	28
2.3.1	Lineaarisuus .....	28
2.3.2	Toistettavuus .....	29
2.3.3	Tarkkuus.....	30
2.3.4	Määrittäysraja .....	30
3.	TYÖSSÄ KÄYTETYT MATERIAALIT JA MENETELMÄT .....	32
3.1	Materiaalit .....	32
3.2	Kaasukromatografi-massaspektrometrialaitteisto.....	33
3.3	NatureWorks:n laktidipitoisuuden määrittäminen.....	34
3.4	Työssä käytetyt GCMS- ja GCFID-menetelmät .....	36
3.4.1	Käytetty GCMS-menetelmä.....	37
3.4.2	Käytetty GCFID-menetelmä.....	41
4.	LAKTIDIPIITOISUUDEN MÄÄRITYSMENETELMÄN KEHITTÄMINEN.....	45
4.1	GCMS-menetelmän kehittäminen.....	45
4.1.1	Mitattavan massakonsentraatioalueen määrittäminen ja tutkittavien pükkien tunnistaminen .....	46
4.1.2	GC-analyysin ajoasetusten säätö.....	48
4.1.3	Menetelmän spesifisyyden testaus .....	53
4.2	GCFID-menetelmän kehittäminen .....	54
5.	MENETELMIEN ALUSTAVA VALIDOINTI .....	57
5.1	GCMS-menetelmän alustava validointi .....	57
5.1.1	Lineaarisuus .....	58
5.1.2	Toistettavuus .....	60
5.1.3	Tarkkuus.....	63
5.1.4	Määrittäysraja .....	65
5.2	GCFID-menetelmän alustava validointi.....	66
5.2.1	Lineaarisuus .....	66
5.2.2	Toistettavuus .....	69
5.2.3	Tarkkuus.....	71

5.2.4	Määrittäysraja .....	74
5.2.5	Standardikantaliuoksen säilyvyys .....	75
5.3	Tulosten vertailu.....	77
5.4	Menetelmien tarkastelu ja niiden käyttöön liittyvät havainnot .....	80
6.	YHTEENVETO .....	83
	LÄHTEET .....	85

LIITE A: GCMS-menetelmällä mitattavan massakonsentraatioalueen selvittäminen ja piikkien tunnistaminen

LIITE B: GC-analyysin lämmitysnopeuden optimoinnin kromatogrammeja

LIITE C: Spesifisyyden tutkimisessa mitatut massaspektrit

LIITE D: GCMS-menetelmän lineaarisuuden määrittäminen

LIITE E: GCMS-menetelmän kalibrointisuorat jokaisena mittauspäivänä

LIITE F: GCMS-menetelmän toistettavuuden määrittäminen

LIITE G: GCMS-menetelmän tarkkuuden määrittäminen

LIITE H: GCFID-menetelmän lineaarisuuden määrittäminen

LIITE I: GCFID-menetelmän kalibrointisuorat jokaisena mittauspäivänä

LIITE J: GCFID-menetelmän toistettavuuden määrittäminen

LIITE K: GCFID-menetelmän tarkkuuden määrittäminen

LIITE L: GCMS-menetelmällä 3. heinäkuuta tehdyt mittaukset

LIITE M: GCMS-QP2010 Ultra:n laitekansio

## YKSIKÖT, SUUREET JA LYHENTEET

SI-järjestelmään kuulumattomat yksiköt:

$\text{cm s}^{-1}$	Kantajakaasun lineaarisen virtausnopeuden yksikkö GCMS-QP2010 Ultra:ssa
$\text{ml min}^{-1}$	Kantajakaasun virtausnopeuden yksikkö GCMS-QP2010 Ultra:ssa
$\mu\text{l}$	Injektoitavan tilavuuden yksikkö GCMS-QP2010 Ultra:ssa

$\alpha$	Suhteellinen retentio
$[\text{Yhdiste}]_g$	Yhdisteen konsentraatio kaasufaasissa
$[\text{Yhdiste}]_n$	Yhdisteen konsentraatio nestefaasissa
$A(\text{IS})$	Sisästandardipiikin pinta-ala
$A(\text{La})$	Laktidipiikin pinta-ala
$A(x)$	Tutkittavan yhdisteen $x$ piikin pinta-ala
$c(\text{IS})$	Sisästandardin massakonsentraatio
$c(x)$	Tutkittavan yhdisteen $x$ massakonsentraatio
$c_{kl}(\text{La})$	Laktidin massakonsentraatio kantaliuoksessa
$c_{kl}(\text{IS})$	Sisästandardin massakonsentraatio sisästandardikantaliuoksessa
$c_{v1}(\text{La})$	Laktidin massakonsentraatio Vial 1 -liuoksessa
$c_{v2}(\text{La})$	Laktidin massakonsentraatio Vial 2 -liuoksessa
$c_{v3}(\text{La})$	Laktidin massakonsentraatio Vial 3 -liuoksessa
$c_{v3}(\text{IS})$	Sisästandardin massakonsentraatio Vial 3 -liuoksessa
$D_g$	Yhdisteen diffuusiokerroin kantajakaasussa
$D_s$	Yhdisteen diffuusiokerroin stationaarifaasissa
$d_f$	Stationaarifaasin filmin paksuus
$F_c$	Kantajakaasun virtausnopeus kolonnissa ( $\text{ml min}^{-1}$ )
$H$	Pohjan korkeus
$I$	Retentioindeksi
$K_c$	Jakaantumiskerroin
$k$	Jakaantumissuhde
$k_{kk}$	Sovitesuoran kulmakerroin
$L$	Kolonnin pituus
$LOQ(s')$	Määrittäysraja yhtälöllä 7 laskettuna
$LOQ(s_b)$	Määrittäysraja yhtälöllä 8 laskettuna
$m_{kl}(\text{La})$	Laktidin massa kantaliuoksessa
$m_{kl}(\text{IS})$	Sisästandardin massa kantaliuoksessa
$m_{v1}(\text{La})$	Laktidin massa Vial 1 -liuoksessa. Näyteliuoksen tapauksessa vastaa laktidin massaa polymeerinäytteessä.
$m_{näyte}$	Polymeerinäytteen massa
$m_{v1, \text{polym}}(\text{La})$	Polymeeristä Vial 1 -liuokseen vapautuvan laktidin massa
$m_{spike}(\text{La})$	Laktidin massa <i>spiking</i> -lisäyksessä
$m/z$	Ionin massa-varaussuhde
$N$	Pohjaluku
$N_c$	Alkaanin hiililuku eli molekyylin hiiliatomien lukumäärä
$n_g$	Yhdisteen ainemäärä kaasufaasissa
$n_n$	Yhdisteen ainemäärä nestefaasissa
$R$	Resoluutio
$Rec_a$	Suhteellinen saanto yhtälöllä 5 laskettuna
$Rec_b$	Suhteellinen saanto yhtälöllä 6 laskettuna

<i>RRF</i>	Engl. response factor tai relative response factor
<i>r<sub>c</sub></i>	Kapillaarikolonnin sisäsäde
<i>s</i>	Keskihajonta
<i>s<sub>b</sub></i>	Sovitesuoran y-akselin leikkauspisteen keskivirhe
<i>T</i>	Lämpötila
<i>dT/dt</i>	Lämmitysnopeus
<i>t</i>	Aika
<i>t<sub>m</sub></i>	Pidättymättömän yhdisteen retentioaika
<i>t<sub>r</sub></i>	Retentioaika
<i>t<sub>r</sub><sup>2</sup></i>	Redusoitu retentioaika
<i>ū</i>	Kantajakaasun lineaarinen virtausnopeus kolonnissa (cm s <sup>-1</sup> )
<i>V<sub>g</sub></i>	Kaasufaasin tilavuus
<i>V<sub>kl</sub></i>	Kantaliuoksen tilavuus
<i>V<sub>n</sub></i>	Nestefaasin tilavuus
<i>w<sub>1/2av</sub></i>	Keskiarvo kromatogrammin piikkien leveyksistä piikkien puolessa korkeudessa
<i>w(La)</i>	Laktidipitoisuus massasprosenttiosuutena
<i>X</i>	Mittausarjan mittausten lukumäärä
<i>x<sub>c</sub></i>	Yhdisteen vyöhykkeen kulkema matka kolonnissa
DSC	Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria
EI	Elektroni-ionisaatio
ELT	Elektroniikan ja tietoliikennetekniikan laitos
EPC	Sähköinen paineen kontrollointi
FID	Liekki-ionisaatiodetektor
FTIR	Fourier-muunnos infrapunaspektroskopia
GC	Kaasukromatografia
GCMS	Kaasukromatografia-massaspektrometria
GLC	Kaasu-nestekromatografia
GSC	Kaasu-kiinteäkromatografia
HPLC	Nestekromatografia
LOQ	Määrittäysraja
MDQ	(Engl. Minimum detectable quantity)
MHS-SDME	(Engl. Multiple headspace single-drop microextraction)
MHS-SPME	Engl. Multiple headspace solid-phase microextraction
NMR	Ydinmagneettinen resonanssispektroskopia
PDMS	Poly(dimetyylisiloksaani)
PLA	Polylaktidi (yleistermi)
PLOT-kolonne	Engl. Porous layer open tubular column
SCAN	Jatkuva pyyhkäisy (engl. Continuous scan)
SCOT-kolonne	Engl. Support-coated open tubular column
SEC	Kokoerottelukromatografia
SIM	Valittujen ionien seuranta (engl. selected ion monitoring)
TGA	Termogravimetria
TIC	Kokonaisionivirta
TTY	Tampereen teknillinen yliopisto
WCOT-kolonne	Engl. Wall-coated open tubular column



# 1. JOHDANTO

Polymeerimateriaaliin jää materiaalin polymeroinnin yhteydessä monomeeria. Kyseinen niin sanottu jäännösmonomeeri voi vaikuttaa materiaalin sulaprosessointiin ja sen käytön aikaisiin ominaisuuksiin. [1] Sulaprosessoitavan polylaktidimateriaalin laktidipitoisuudella on havaittu olevan suuri merkitys prosessoidun materiaalin mekaanisiin ominaisuuksiin ja hajoamiseen hydrolyyttisissä olosuhteissa [2]. Jäännöslaktidin lisäksi myös polylaktidimateriaalin sulaprosessoinnissa termisen hajoamisen johdosta muodostuneen laktidin on havaittu vaikuttavan prosessoidun materiaalin hajoamiseen hydrolyyttisissä olosuhteissa. Kyseisten syiden takia lääkinnällisiin käyttökohteisiin, kuten implantteihin, valmistettavista polymeerimateriaaleista on tärkeää määrittää monomeeripitoisuus, jotta materiaalin käytön aikaiset ominaisuudet, kuten hajoaminen ihmiskehossa, tunnetaan. [3]

Laktidipitoisuuden määrittämiseen on käytetty kaasukromatografiaa (GC) [4], joka on yleisesti käytetty analyysimenetelmä. Kaasukromatografialla voidaan oikeita analyysiolosuhteita käyttämällä erottaa näytteiden komponentit, eli yhdisteet, erilleen. Kaasukromatografiaa voidaan käyttää erotettujen yhdisteiden kvalitatiiviseen ja kvantitatiiviseen analyysiin. [3]

Tämän diplomityön päätavoitteena oli kehittää ja testata menetelmä polymeerimateriaalien, erityisesti lääketieteelliseen käyttöön tarkoitetun poly-L/D-laktidi 96L/4D -kopolymerin, laktidimonomeerin pitoisuuden määrittämiseen Tampereen teknillisen yliopiston (TTY) Elektroniikan ja tietoliikennetekniikan laitokselle (ELT) hankitulle Shimadzun GCMS-QP2010 Ultra -kaasukromatografi-massaspektrometrille. Tavoitteena oli myös laatia menetelmän ja laitteiston käyttöön liittyvät ohjeet. Kyseiseen laitteistokokoonpanoon oli ennen tätä diplomityötä valittu NatureWorks:n kehittämää laktidipitoisuuden määrittämismenetelmää [4] vastannut kapillaarikolonne. Kyseisestä NatureWorks:n menetelmästä kehitettiin kyseiselle laitteistolle sopivat menetelmät laitteiston molemmille detektoreille, eli massaspektrometrille (MS) ja liekki-ionisaatiodektoerille (FID).

Työn kirjallisuusosassa, eli luvussa 2, on ensin kuvattu kaasukromatografia yleisenä analyysimenetelmänä. Kaasukromatografian käyttökokemus oli ELT-laitoksella entuudestaan hyvin vähäistä, joten kyseisen alaluvun 2.2 tarkoituksena on toimia perehdytyksenä kaasukromatografian teoriaan ja käyttöön. Alaluvussa 2.2 on sen jälkeen kuvattu lyhyesti, miksi polymeerimateriaalien monomeeripitoisuuden määrittäminen on tärkeää erityisesti lääketieteellisten materiaalien tapauksessa ja mitä menetelmiä siihen on käytetty kirjallisuudessa. Alaluvussa 2.3 on sitten kuvattu yleisesti kvantitatiivisen analyysimenetelmän validointi, eli sen suorituskyvyn testaaminen. Luvussa 3 on kuvattu työn kokeellisessa

osassa käytetyt materiaalit ja laitteisto, jolle laktidipitoisuuden määrittämenetelmät kehitettiin. Luvussa 3 on seuraavaksi kuvattu yksityiskohtaisesti kehitettyjen menetelmien lähtökohtana käytetty NatureWorks:n menetelmä. NatureWorks:n menetelmän kuvauksen jälkeen on kuvattu työssä kehitetyt ja testatut menetelmät. Menetelmien kehittämiseen liittyvät yksityiskohdat, kuten GC-analyysin ajoasetusten optimointi, on kuvattu luvussa 4. Lopuksi luvussa 5 on kuvattu menetelmien testaamiseen eli alustavaan validointiin liittyvät mittaukset ja niiden tulokset. Samassa luvussa on sitten verrattu alustavien validointien tuloksia ja arvioitu menetelmiin liittyviä jatkokehittämisen tarpeita.

## 2. TEOREETTINEN TAUSTA

Tässä luvussa kuvataan työn teoreettista taustaa. Ensin kuvataan kaasukromatografia analyysimenetelmänä alaluvussa 2.1, jossa on käytetty kaasukromatografialaitteiston esimerkkinä työssä käytettyä Shimadzun GCMS-QP2010 Ultra -kaasukromatografi-massaspektrometria.

Alaluvussa 2.2 on tarkasteltu, miksi on tärkeää pystyä määrittämään polymeerimateriaalin monomeeripitoisuus. Kyseisessä alaluvussa on myös selvitetty kirjallisuusselvityksellä, mitä analyysimenetelmiä on käytetty polymeerimateriaalien laktidipitoisuuksien määrittämiseen. Alaluvussa 2.3 kerrotaan analyysimenetelmän suorituskyvyn testaamisesta ja validoinnista.

### 2.1 Kaasukromatografia

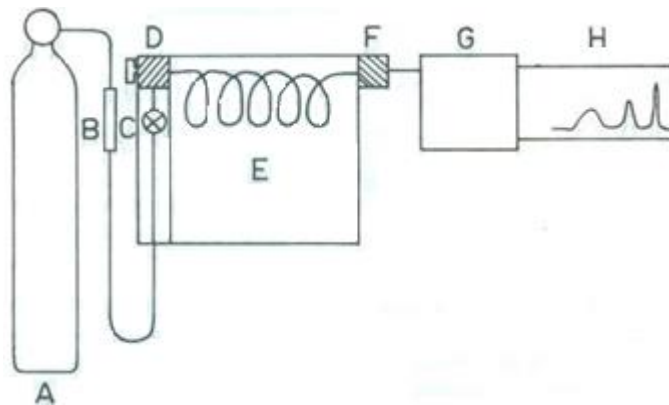
Kaasukromatografia (GC) on monimutkaisten näytteiden sisältämien yhdisteiden erottamiseen ja analysointiin käytetty kromatografinen menetelmä. Kromatografia määritellään yleisesti fysikaalisena erotusmenetelmänä, jossa erotettavat yhdisteet jakaantuvat paikallaan olevan faasin ja tiettyyn suuntaan etenevän liikkuvan faasin välillä [5]. Nimensä mukaisesti kaasukromatografian liikkuvana faasina on kaasu. Paikallaan oleva faasi, eli stationaarifaasi, voi kaasukromatografiassa olla kiinteä tai neste. Menetelmä voidaan nimetä stationaarifaasin mukaan kaasu-kiinteäkromatografiaksi (GSC) tai kaasu-nestekromatografiaksi (GLC), mutta usein käytetään kaasukromatografia nimitystä riippumatta stationaarifaasin olomuodosta. Nestemäisten stationaarifaasien käyttö on paljon yleisempää kuin kiinteiden, joten tässä luvussa keskitytään pääsääntöisesti kaasu-nestekromatografiaan. GCMS QP2010 Ultra:ssa käytetyssä kolonnissa oli nestemäinen stationaarifaasi. [6, s. 289]

Kaasukromatografia kehitettiin vuonna 1952 ja se on nykyään hyvin yleisesti käytetty erotus- ja analyysimenetelmä [6, s. 289]. Kaasukromatografialla voidaan erottaa näytekomponentit toisistaan, joten sitä voidaan käyttää preparatiivisena menetelmänä. Huomattavasti merkittävämpää on kuitenkin kaasukromatografian käyttö analyysimenetelmänä näytteiden komponenttien, eli yhdisteiden, tunnistamiseen ja niiden pitoisuuksien määrittämiseen. Kaasukromatografian etuja ovat suhteellisen lyhyet analyysit (minuutteja), analyysien herkkyys, erottumisen tehokkuus, mahdollisesti näytteiden tuhoutumattomuus, pienet näytemäärät ja monien erilaisten detektorien käyttömahdollisuus. Kaasukromatografian suurin haitta on se, että tutkittavien yhdisteiden on oltava joko kaasuja tai riittävän haihtuvia analyysin korotetussa lämpötilassa, joka voi tyypillisesti olla maksimissaan noin 400 °C [6, s. 289]. Yhdisteiden täytyy lisäksi olla termisesti stabiileja. [7, s. 9, 11]

Kaasukromatografialaitteisto ja toimintaperiaate kuvataan alaluvussa 2.1.1. Laitteiston pääkomponenteista kerrotaan tarkemmin alaluvuissa 2.1.3 - 2.1.6. Teknisten kuvauksien sijaan laitteiston pääkomponenttien kuvauksessa keskitytään kuitenkin tarkastelemaan, mikä on komponenttien merkitys yhdisteiden erottumiseen ja analyysiin.

### 2.1.1 Kaasukromatografialaitteiston toimintaperiaate

Kuvassa 2.1 on esitetty tyypillisen kaasukromatografialaitteiston eli kaasukromatografian kaaviokuva. Kaasukromatografian pääkomponentit ovat kantajakaasu linjastoineen, kantajakaasun paineensäätö, injektori näytteen syöttämistä varten, kolonni uunissaan, detektori ja tietokone erikoisohjelmineen laitteiston hallintaa ja tiedon käsittelyä ja tallentamista varten. Kantajakaasu toimii liikkuvana faasina ja se on yleensä  $N_2$ , He,  $H_2$  tai Ar [6, s. 290] ja se johdetaan injektoriin kaasukromatografian ulkopuolisesta kaasupullosta tai kaasugeneraattorista kaasulinjaston avulla. Kantajakaasun virtauksen ja paineen säätö tapahtuu tyypillisesti ensin kaasukromatografian ulkopuolella, esimerkiksi kaasupullon paineenalennusventtiilin avulla, ja lopuksi kaasukromatografian toimesta esimerkiksi sähköisen paineen kontrolloinnin (EPC, engl. *electronic pressure control*) avulla. Kantajakaasuvirtauksen kontrollointi voidaan tavallisesti tehdä kolmella eri tavalla. Kyseisissä tavoissa pidetään vakiona joko paine injektorissa; kantajakaasun virtausnopeus kolonnissa,  $F_c$  ( $ml\ min^{-1}$ ), tai lineaarinen virtausnopeus,  $\bar{u}$  ( $cm\ s^{-1}$ ), kolonnissa. Kantajakaasun vaikutuksesta erottumiseen ja analyysiin kerrotaan lisää luvussa 2.1.5. [7, s. 11 - 18][8, s. 566]



**Kuva 2.1.** Kaasukromatografian laitteiston kaaviokuva. A = kantajakaasu, B ja C = kaasun paineen ja virtauksen säätö, D = injektori, E = kolonni uunissaan, F = detektori, G = tietokone ja H = kromatogrammi.[9, s. 75]

Kaasumainen tai nestemäinen näyte syötetään kaasukromatografiin injektioneulalla injektorin kaasutiiviin kumiseptumin läpi. Kiinteät näytteet tulee ensin liuottaa sopivaan liuottimeen. Injektointi voidaan tehdä manuaalisesti mikroruiskulla, mutta automaattinen näytteesyöttö on myös mahdollinen. Injektoitavat nestetilavuudet ovat tyypillisesti 0,1 - 2  $\mu l$  [8, s. 577]. Valitusta injektointimenetelmästä ja injektorin rakenteesta riippuen näyte

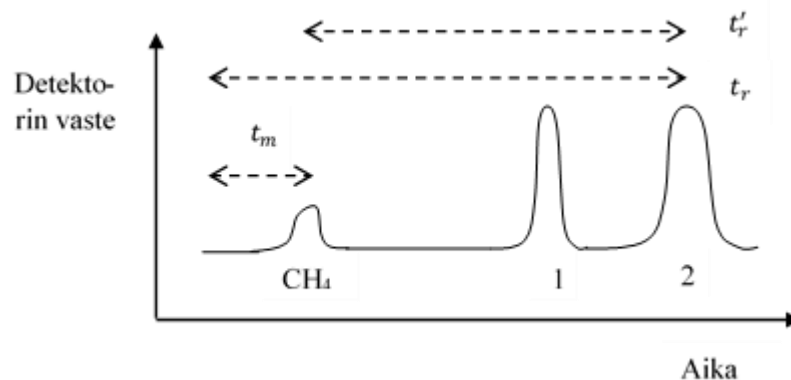
injektoidaan joko injektorin höyrystyskammioon tai suoraan kolonniin. Injektorin höyrystyskammion lämpötila on kontrolloitavissa ja se on yksi analyysiin vaikuttavista parametreista. Eri injektorityypit ja injektointimenetelmät on kuvattu tarkemmin luvussa 2.1.4. Höyrystynyt näyte kulkee höyrystyskammioon virtaavan kantajakaasun mukana kolonniin. [7, s. 14 - 25]

Yhdisteiden erottuminen toisistaan tapahtuu kolonnissa, jonka läpi näyte virtaa kantajakaasun mukana. Kolonniin menevää kaasuseosta sanotaan eluentiksi ja edellä mainittua prosessia eluotumiseksi. [7, s. 542 - 543] Kolonnit ovat pakattuja tai nykyään tyypillisemmin kapillaarisia. Pakatut kolonnit ovat täynnä inertin kiinteän materiaalin partikkeleita, joiden pintaan stationaarifaasi on sidottu. Kapillaarikolonnit ovat pakattuja kolonneja ohuempia putkia, joissa nestemäinen stationaarifaasi on yleensä kemiallisesti sidottu putken sisäpintaan. [6, s. 294 - 295] Kolonni sijaitsee tyypillisesti kiertoilmauunissa ja sen lämpötilan kontrollointi on yksi helpoimmista ja tehokkaimmista tavoista vaikuttaa analyyttien erottumiseen. Kolonnin lämpötila on tyypillisesti huoneenlämpötilan ja 360 °C:een välillä. [7, s. 24] Kolonnit ja stationaarifaasit kuvataan tarkemmin alaluvussa 2.1.3.

Yhdisteiden erottuminen kolonnissa perustuu niiden erilaiseen jakaantumiseen kantajakaasun ja stationaarifaasin välillä. Jokaisella ajanhetkellä osa yhdisteestä on liuenneena nestemäiseen stationaarifaasiin ja osa höyrystyneenä virtaavassa kaasufaasissa, jonka mukana yhdisteen kuljetus kolonnissa tapahtuu. Mitä suurempia ovat vuorovaikutus ja liukeneminen nestefaasin kanssa ja mitä pienempi on yhdisteen höyrypressio kolonnin lämpötilassa, sitä hitaammin yhdiste liikkuu kolonnissa. Yhdisteet liikkuvat kolonnissa eri nopeuksilla ja eluotuvat kolonnista eri aikoihin. Yhdisteet erottuvat niiden suhteellisten höyrypressioiden ja suhteellisten liukenevuuksien mukaisesti, joihin vaikuttavat erityisesti yhdisteen ja stationaarifaasien poolisuudet. [7, s. 6 - 7, 14][9, s. 86] Erottumisen teoreettista taustaa on tarkasteltu luvussa 2.1.2.

Kolonnista jatkuvasti eluoituva eluentti johdetaan detektoriin. Detektorin vaste riippuu siihen johdettavan eluentin koostumuksesta. Detektorin vaste eluointiin kuluneen ajan funktiona esitetään kuvaajana, eli niin sanottuna kromatogrammista, kaasukromatografiin liitettyllä tietokoneella. Kuvassa 2.2 on esitetty yksinkertaistettu esimerkki kromatogrammista. Eri aikoihin kolonnista eluotuvat yhdisteet näkyvät kromatogrammissa omina piikkeinä. Kromatogrammin piikkien sijaintia ja pinta-alaa voidaan käyttää näyttöön sisältyneiden yhdisteiden tunnistamiseen ja niiden pitoisuuksien määrittämiseen, kuten

alaluvussa 2.1.7 on kuvattu. Kuvan 2.2 kromatogrammissa esiintyvät yhdisteiden retentioon liittyvät suureet on esitetty alaluvussa 2.1.2 [8, s. 545; 566]



**Kuva 2.2.** Yksinkertaistettu esimerkki kromatogrammista.  $t_r$  on retentioaika,  $t_m$  pidättymättömän yhdisteen retentioaika ja  $t'_r$  treditioaika. Kolonnista eri aikoihin eluoituvat yhdisteet 1 ja 2 näkyvät kuvaajassa piikkeinä.

## 2.1.2 Kaasukromatografisen erottumisen teoria

Kaasukromatografiassa yhdisteiden erottuminen perustuu yhdisteiden erilaiseen jakaantumiseen liikkuvan kantajakaasun ja nestemäisen stationaarifaasin välillä. Yhdisteet voivat liueta nestemäiseen stationaarifaasiin. [7, s. 6 - 7] Liikkuvassa faasissa ja stationaarifaasissa olevien tietyn yhdisteen molekyylien systeemi pyrkii kohti dynaamista tasapainoa [10, s. 445]. Kromatografinen erottuminen ei kuitenkaan ole todellinen tasapainoprosessi liikkuvan faasin virtauksen takia, mutta kromatografiset systeemit voivat toimia hyvin lähellä tasapainotilannetta olosuhteista riippuen [7, s. 30]. Tasapainotilanteessa yhdisteen jakaantumiskerroin,  $K_c$ , kertoo yhdisteen konsentraatiot neste- ja kaasufaaseissa,  $[yhdiste]_n$  ja  $[yhdiste]_g$  ( $\text{mol cm}^{-3}$ ), yhtälön

$$K_c = \frac{[yhdiste]_n}{[yhdiste]_g}$$

mukaisesti. Mitä suurempi yhdisteen jakaantumiskerroin on, sitä suurempi osa yhdisteestä on stationaarifaasissa kullakin ajanhetkellä ja sitä hitaammin yhdisteen vyöhyke liikkuu kolonnissa. Siis yhdisteiden erottumiseksi toisistaan täytyy niiden jakaantumiskertoimien olla eri suuret. [9, s. 86]

Tutkittavien yhdisteiden tasapainottumiseen liikkuvan faasin ja stationaarifaasin välillä eli niiden erottumiseen vaikutetaan käytännössä stationaarifaasin tyypin valinnalla ja kolonin lämpötilalla [7, s. 53]. Pohjimmiltaan yhdisteen jakaantumisen tasapainon eri faaseihin määräävät vuorovaikutusvoimat yhdisteen molekyylien ja eri faasien molekyylien

välillä [11, s. 513]. Kyseisistä vuorovaikutuksista dipoli-dipolivoimat ja vetysitoutuminen määräävät stationaarifaasin poolisuuden, jota käytetään stationaarifaasin selektiivisyyden mittana. Stationaarifaasin polaarisuuden määrittelyyn ei kuitenkaan ole yksinkertaista tapaa eikä yksittäistä polaarisuus-numeroarvoa voida antaa. Stationaarifaasien polaarisuuksien luokitteluun on kuitenkin käytetty esimerkiksi Rohrscheiderin ja McReynoldin parametrejä. [7, s. 55 - 63] Esimerkiksi poolitonta stationaarifaasia käytettäessä vuorovaikutusvoimat stationaarifaasin ja yhdisteen välillä ovat heikkoja ja enimmäkseen ei-selektiivisiä dispersiovoimia. Tällöin yhdisteen höyrynpaine kuvaa kyseisten voimien suuruutta ja yhdisteet eluoituvat puhtaiden yhdisteiden kiehumispisteiden mukaisessa järjestyksessä siten, että matalimman kiehumispisteen yhdisteet eluoituvat ensin. Poolisilla stationaarifaaseilla tilanne on paljon monimutkaisempi johtuen dipoli-dipolivoimien ja vetysitoutumisen selektiivisyydestä. Tällöin yhdisteet eivät siis eluoidu enää pelkästään höyrynpaineiden mukaisessa järjestyksessä, vaan yhdisteen ja stationaarifaasin poolisuudet vaikuttavat eluoitumiseen. [10, s. 465 - 467] Stationaarifaasin valinnasta on kerrottu alaluvussa 2.1.3.

Yhdisteiden erottumista toisistaan, niiden retentiota eli pidättäytymistä kolonnissa ja erottumisen tehokkuutta voidaan kuvata monin eri suurein. Seuraavaksi esitetään joitakin tällaisia suureita. Osa suureista oli esillä jo kuvassa 2.2.

### **Retentioon ja eluoitumiseen liittyvät suureet**

Yhdisteen retentioaika,  $t_r$  (s), on aika näytteen injektoinnista yhdisteen eluoitumiseen asti eli kuvan 2.2 mukaisesti piikin maksimiin asti. Yhdisteen eluoitumiseen kolonnin läpi kuluu minimissään aika, joka kantajakaasulta kuluu siihen. Kyseistä retentioaikaa kutsutaan pidättymättömän yhdisteen retentioajaksi,  $t_m$  (s), joka on kantajakaasun tai muun pidättymättömän kaasun, kuten ilman tai metaanin, retentioaika kolonnin läpi. Yhdisteen redusoitu retentioaika,  $t'_r$  (s), saadaan retentioajan ja pidättymättömän yhdisteen retentioajan erotuksena,

$$t'_r = t_r - t_m.$$

Redusoitu retentioaika tarkoittaa siis aikaa, jonka yhdiste viettää stationaarifaasissa. [7, s. 7 - 8][8, s. 544 - 545] Kahden yhdisteen (yhdisteet 1 ja 2) erottumisen suuruutta kuvaa suhteellinen retentio,  $\alpha$ , joka määritellään yhdisteiden 2 ja 1 redusoitujen retentioaikojen suhteena eli

$$\alpha = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}} > 1.$$

Mitä suurempi  $\alpha$  on, sitä paremmin kyseiset kaksi yhdistettä eroavat kolonnissa. Suhteelliseen retentioon voidaan vaikuttaa vaihtamalla stationaarifaasia. Suhteellinen retentio pysyy lähes vakiona kantajakaasun virtausnopeuden muuttuessa toisin kuin edellä mainitut muut retentioparametrit, jotka ovat riippuvaisia virtausnopeudesta. [8, s. 545]

Eluoituvan yhdisteen jakaantumissuhde,  $k$ , määritellään

$$k = \frac{t'_r}{t_m} = \frac{[\text{yhdiste}]_n V_n}{[\text{yhdiste}]_g V_g} = \frac{n_n}{n_g}$$

eli yhdisteen stationaarifaasissa ja liikkuvassa faasissa vietettyjen aikojen tai niissä olevien ainemäärien,  $n_n$  ja  $n_g$  (mol), suhteena.  $V_n$  ja  $V_g$  ovat neste- ja kaasufaasin tilavuudet. Jakaantumissuhteesta on käytetty myös nimeä kapasiteettisuhde. Jakaantumissuhde ei riipu kolonnin koosta, esimerkiksi pituudesta, vaan se on stationaarifaasi-yhdiste-kanta-jakaasu systeemin ominaispiirre. Tasapainotilanteessa konsentraatioiden suhde on yhdisteen  $K_c$ , joten jakaantumissuhde on suoraan verrannollinen  $K_c$ :een. Koska lisäksi  $t'_r$  on suoraan verrannollinen  $k$ :een, voidaan suhteellinen retentio esittää muodossa

$$\alpha = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_2}{K_1}.$$

Kyseinen yhtälö kuvaa kromatografian fysikaalisen perustan. Siis kuten aiemmin mainittiin kaksi yhdistettä erottuvat sitä paremmin mitä enemmän niiden jakaantumiskertoimet stationaarifaasin ja liikkuvan faasin välillä eroavat. [8, s. 545 - 546]

### **Erottumisen tehokkuus**

Kromatografisen erottumisen onnistumista voidaan tarkastella kuvan 2 kromatogrammin avulla. Yhdisteiden piikkien keskikohtien etäisyys toisistaan ja piikkien leveydet määräävät kuinka hyvin piikit eroavat toisistaan eli kuinka hyvä resoluutio,  $R$ , on. Kahden peräkkäisen piikin välinen resoluutio määritellään yhtälöllä

$$R = 0,589 \frac{\Delta t_r}{w_{1/2av}},$$

jossa  $\Delta t_r$  (s) on retentioaikojen ero eli piikkien keskikohtien välinen etäisyys ja  $w_{1/2av}$  (s) on keskiarvo piikkien leveyksistä piikkien korkeuden puolivälissä. Kyseisessä yhtälössä oletetaan piikkien noudattavan normaalijakauman mukaista käyrää. Resoluution arvo 1,5 vastaa tilannetta, jossa kaksi piikkiä menevät toistensa kanssa päällekkäin vain noin 0,1 % verran [10, s. 465]. Kvantitatiivisessa analyysissä resoluution tulisi olla  $\geq 1,5$ . [8, s. 548 - 549]

Näytteen yhdisteet kulkevat kolonnissa vyöhykkeinä. Näiden vyöhykkeiden leviäminen kolonnin ulko- ja sisäpuolisten tekijöiden johdosta aiheuttaa kromatogrammin piikkien leveyden. Kolonnin ulkopuolisia tekijöitä on ennen kolonnia ja kolonnin jälkeen. Näytettä ei voida injektoida kolonnin alkupäähän äärettömän ohuena vyöhykkeenä vaan sillä on aina jokin leveys. Lisäksi kulku detektorin läpi vaatii tietyn ajan, mikä on toinen kolonnin ulkopuolinen syy piikkien leveydelle. [8, s. 554 - 556]



Kolonnin sisäpuolella vyöhykkeiden levenemisen määrää kolonnin tehokkuus, johon vaikuttavat kolonnin rakenne ja erotuksessa käytetyt olosuhteet. Kolonnin tehokkuutta kuvataan usein pohjan korkeuden,  $H$ , avulla. Pohjan korkeudesta käytetään myös nimeä teoreettisen pohjan korkeusekvivalentti (HETP, engl. *Height Equivalent to a Theoretical Plate*). [9, s. 77] Kunkin yhdisteen oletetaan kulkevan kolonnissa omana vyöhykkeenään normaalijakauman mukaisesti varianssilla  $\sigma^2$ . Tällöin pohjan korkeus määritellään yhtälöllä

$$H = \frac{\sigma^2}{x_c},$$

jossa  $\sigma^2$  on vyöhykkeen varianssi ja  $x_c$  vyöhykkeen kulkema matka kolonnissa. Pohjan korkeus on teoreettinen suure ja se on peräisin tislauksen teoriasta. Se kuvaa yhdisteen yhteen tasapainotukseen liikkuvan ja stationaarifaasin välillä vaadittavaa kolonnin pituutta. Sillä on siis pituuden yksikkö. Mitä pienempi pohjan korkeus on sitä vähemmän yhdisteiden vyöhykkeet ja niiden kromatogrammin piikit leviävät eli sitä suurempi on resoluutio. Pohjan korkeuden tulisi olla alle 1 mm hyvässä kolonnissa [9, s. 82]. Kaasukromatografiassa kolonnien pohjankorkeuksien suuruusluokka on tyypillisesti välillä 0,1 - 1 mm. [8, s. 548 - 552]

Kolonnin ja kantajakaasun lineaarisen virtausnopeuden, eli  $\bar{u}$ :n, vaikutusta pohjan korkeuteen kuvaa van Deemterin yhtälö

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u},$$

jossa  $A$ -,  $B$ - ja  $C$ -termit ovat käytettävälle kolonnille ja stationaarifaasille ominaisia vakioita [8, s. 555 - 557]. Kolonnin tehokkuuden maksimoimiseksi, eli pohjan korkeuden minimoimiseksi, kyseiset vakiot tulisi minimoida kolonnin ja stationaarifaasin ominaisuuksia muuttamalla. Kapillaarikolonneilla  $A = 0$ , sillä kapillaarikolonnissa liikkuvalla faasilla on vain yksi kulkureitti. Kapillaarikolonneille voidaan kyseisestä yhtälöstä johtaa Golayn yhtälö

$$H = \frac{2D_G}{\bar{u}} + \left( \frac{2kd_f^2}{3(1+k)^2D_S} + \frac{(1+6k+11k^2)r_C^2}{24(1+k)^2D_G} \right) \bar{u}, \quad (1)$$

jossa  $D_G$  on yhdisteen diffuusiokerroin kantajakaasussa,  $D_S$  on yhdisteen diffuusiokerroin stationaarifaasissa,  $d_f$  on stationaarifaasin filmin paksuus ja  $r_C$  on kapillaarikolonnin sisäsäde. [7, s. 41, 48]  $B$ -termi sisältää kolonnin pituussuunnassa tapahtuvan diffuusion vaikutuksen. Diffuusion nopeuden määrää yhdisteen diffuusiokerroin kaasufaasissa. Koska eri yhdisteillä on erisuuret diffuusiokertoimet kantajakaasussa, pohjan korkeus eli kolonnin tehokkuus on erisuuri saman kolonnin läpi eluoituville eri yhdisteille [8, s. 552].  $C$ -termi sisältää puolestaan massan kuljetukseen faasien välillä ja tasapainottumisaikaan

liittyvät tekijät. Erottuminen vaatii yhdisteiden tasapainottumista stationaarifaasin ja liikkuvan faasin välillä. Tasapainottuminen taas vaatii massan kuljetusta faasien sisällä ja välillä, mikä vaatii aikaa. Kapillaarikolonissa massan kuljetukseen vaadittua aikaa voidaan lyhentää pienentämällä stationaarifaasin kerroksen paksuutta ja kolonnin sädettä, mikä pienentää pohjan korkeutta eli suurentaa resoluutiota.  $C$ -termiin  $\bar{u}$  vaikuttaa päinvastoin kuin  $B$ :hen. On siis olemassa optimi  $\bar{u}$ :n arvo eli optimi kantajakaasun lineaarinen virtausnopeus, jolla pohjan korkeus voidaan minimoida ja resoluutio maksimoida. Koska suurempi  $\bar{u}$  nopeuttaa yhdisteiden eluoitumista, käytännön erotusten ja analyysien kannalta on järkevää käyttää hieman optimia suurempaa arvoa, mikä ei kuitenkaan vaikuta resoluutioon merkittävästi. [8, s. 555 - 557][9, s. 83 - 86]

Pohjan korkeudesta voidaan johtaa kolonnin pituuden,  $L$  (m), avulla toinen kolonnin tehokkuutta kuvaava suure pohjaluku,  $N$ , yhtälön

$$N = \frac{L}{H} = \frac{5,55 \times t_r^2}{w_{1/2}^2}$$

mukaisesti. Pohjaluku kertoo siis, kuinka monta (teoreettista) välipohjaa tietyn pituisessa kolonissa on. Kolonnin pohjaluku on pohjan korkeuden ohella erisuuri eri yhdisteille. Pohjaluvun vaikutus resoluutioon käy ilmi yhtälöstä

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k}{1 + k} \right), \quad (2)$$

jossa  $k$  on tarkasteltavan piikkiparin jälkimmäisen piikin jakaantumissuhde tai tarkasteltavien piikkien jakaantumissuhteiden keskiarvo. Siis sekä  $N$ :n,  $\alpha$ :n ja  $k$ :n arvojen maksimoinnilla voidaan kasvattaa erottumisen resoluutiota.  $N$ :n maksimointiin voidaan vaikuttaa käyttämällä mahdollisimman pitkää ja tehokasta kolonnia eli kolonnia, jonka  $H$  on mahdollisimman pieni.  $\alpha$ :n maksimointiin voidaan puolestaan vaikuttaa stationaarifaasia vaihtamalla.  $k$ :n arvo voidaan maksimoida tietyllä analyttiparille käyttämällä mahdollisimman pientä kolonnin lämpötilaa. Arvon 10 yläpuolella  $k$  kasvattaminen ei kuitenkaan enää vaikuta tehokkaasti resoluutioon, mutta se pidentää retentioaikoja. [7, s. 58 - 59] Erotuksen optimoinnissa tulisi ensin  $k$ :n arvo optimoida välille 1 - 10 sopivaa lämpötilaa käyttämällä. Jos vaadittavaa resoluutiota ei saavuteta, voidaan  $\alpha$ :aa ja  $N$  yrittää kasvattaa. [11, s. 523 - 524] Kolonnin ominaisuuksien vaikutuksesta resoluutioon kerrotaan tarkemmin alaluvuissa 2.1.3.

### 2.1.3 Kolonni

Kuten alaluvussa 2.1.1 mainittiin, kolonnit voivat olla pakattuja tai kapillaarisia. GCMS-QP2010 Ultra:ssa voidaan käyttää vain kapillaarikolonneja. Kapillaarikolonien käyttö on nykyään paljon yleisempää johtuen niiden paremmasta suorituskyvystä pakattuihin

kolonneihin verrattuna. Käytettäessä kapillaarikolonnia pakatun kolonnin sijaan on erottumisen resoluutio yleensä parempi ja analyysiin kuluva aika lyhempi. Kapillaarikolonneissa stationaarifaasin tilavuus on paljon pienempi kuin pakatuissa kolonneissa, minkä kapillaarikolonneilla ei voida yksittäisellä analyysillä erottaa yhtä suuria ainemääriä kuin pakatuilla kolonneilla. Toisin sanottuna kapillaarikolonnien näytekapasiteetti on paljon pienempi kuin pakatuilla kolonneilla. Tästä syystä pakatut kolonnit ovat säilyttäneet hyödyllisyytensä erityisesti preparatiivisissa tarkoituksissa esimerkiksi näytteiden puhdistamisessa. [8, s. 566, 571] Korkea näytekapasiteetti sallii suurempien näytemäärien erottamisen ja voi sallia yksinkertaisemman injektointitekniikan käytön [7, s. 92]. Tässä luvussa tarkastellaan seuraavaksi vain kapillaarikolonneja.

Kapillaarikolonneja kutsutaan myös avoputkikolonneiksi (engl. *open tubular column*) ja ne ovat tavallisesti kvartsilasiputkia. Kvartsilasilla on eri valmistusmateriaaleista paras inerttisyys näytteen yhdisteiden suhteen. Kvartsilasiputkea peittää tyypillisesti suojaava polyimidi-pinnoite. Kolonnien sisähalkaisijat ovat noin 0,1 – 0,53 mm ja pituudet noin 15 – 100 m. [8, s. 566 - 567] Kapillaarikolonneja ei voi helposti valmistaa itse, toisin kuin pakattuja kolonneja, vaan ne täytyy ostaa valmistajilta [6, s. 294 - 295]. Kapillaarikolonnit voidaan luokitella kolmeen luokkaan stationaarifaasin tyyppin mukaan. WCOT-kolonneissa (engl. *wall-coated open tubular*) yhtenäinen ohut kerros, eli filmi, stationaarifaasia pinnoittaa kapillaarin sisäpintaa. Nykyään stationaarifaasi on yleensä sidottu kovalenttisin sidoksin putken pintaan ja silloittamalla itseensä, mikä parantaa filmin termistä stabiilisuutta. WCOT-kolonnien parantuneen stabiilisuuden takia SCOT-kolonnien (engl. *support-coated open tubular*) merkitys on laskenut. SCOT-kolonneissa stationaarifaasi on pinnoitettu kvartsilasiputken sisäpintaa peittävään kiinteään materiaaliin ja niiden suorituskyky sijaitsee WCOT-kolonnien ja pakattujen kolonnien välissä. Kolmas kapillaarikolonnityyppi on PLOT-kolonnit (engl. *porous layer open tubular*), joissa SCOT-kolonnin kvartsilasiputken sisäpintaa peittävä kiinteä adsorbentti on myös stationaarifaasi. PLOT-kolonnit kuuluvat siis kaasukiinteäkromatografiaan ja ne soveltuvat esimerkiksi normaaliolosuhteissa pysyvien kaasujen erottamiseen. Jatkossa tarkastellaan vain WCOT-kolonneja. [7, s. 54, 84 - 86]

Kolonne ja sen lämpötila ovat tärkeimmät erottumiseen ja siten analyysiin vaikuttavat kontrolloitavissa olevat parametrit. Siten sopivan kolonnin valinta on hyvin tärkeää. Kolonnin valintaan sisältyy kolonnin rakenteen, eli sen pituuden ja sisähalkaisijan sekä stationaarifaasin filmin paksuuden, ja stationaarifaasin koostumuksen valinta. [7, s. 91] Edellä mainittujen suureiden valinnalla ja optimoinnilla vaikutetaan yleensä erottumisen resoluutioon, analyysin nopeuteen ja näytekapasiteettiin samanaikaisesti, mutta käänteisellä vaikutuksella. [11, s. 560 - 561]

## Stationaarifaasin valinta ja vaikutus erottumiseen

Kaasu-nestekromatografiassa nestemäisen stationaarifaasin valinnassa pätee yleisesti liukenemiseenkin liittyvä sääntö: samanlainen liuottaa samanlaisen. Siis poolittomien yhdisteiden erottamiseen sopii pooliton stationaarifaasi, keskisuuren poolisuuden yhdisteille sopii keskisuuren poolisuuden faasi jne. Kapillaarikolonneilla tarkan stationaarifaasin koostumuksen valinta ei ole kriittisen tärkeää toisin kuin pakatuilla kolonneilla, koska korkeamman kolonnin tehokkuuden ansiosta erottumisen resoluutio on helpommin riittävän korkea. [6, s. 296][8, s. 568]

Tutkittavien yhdisteiden suhteellinen retentio,  $\alpha$ , on erisuuri erilaisilla stationaarifaaseilla. Koska yhtälön 2 mukaisesti  $\alpha$  vaikuttaa resoluutioon, myös stationaarifaasin koostumus vaikuttaa siihen. Kapillaarikolonneilla stationaarifaasin vaihtamista ei kuitenkaan tavallisesti käytetä resoluution parantamiseksi toisin kuin pakatuilla kolonneilla. Sopivalle stationaarifaasille riittää, että  $\alpha$  on riittävän suuri analyttien erottumiseen. Hyvin tehokkaalla kolonnilla tietyissä olosuhteissa jopa 1,02 voi olla riittävä arvo  $\alpha$ :lle. [7, s. 58 - 59]

Kolonne nimetään yleensä sen sisältämän stationaarifaasin mukaan, jolloin koko kolonnin nimenä on yleensä stationaarifaasin valmistajan tuotenimi kyseiselle faasille. Kolonnin nimen ohella kolonnin kuvauksessa täytyy siis mainita myös kolonnin fyysiset mitat. Nykyään yleisimmin käytetyt stationaarifaasit ovat joko polysiloksaaneja tai polyetyleeniglykoleita. Polysiloksaanifaaseja on saatavilla eri poolisuuksilla. Poly(dimetyylisiloksaani) (PDMS) on pooliton ja siitä käytetään valmistajasta riippuen nimenä esimerkiksi OV-1, SE-30 tai DB-1. Poolisissa polysiloksaaneissa osa poly(dimetyylisiloksaanin) metyyli-ryhmistä on korvattu joillakin muilla funktionaalisilla ryhmillä, kuten fenyyli-ryhmillä tai syanopropyli-ryhmillä. Stationaarifaasin poolisuuteen vaikuttavat lisättyjen funktionaalisten ryhmien kemiallinen koostumus ja rakenne ja niiden suhteelliset määrät. Polysiloksaanin poolisuuden kasvaessa faasin stabiilius pienenee ja faasi voi helpommin vuotaa (engl. *bleed*) eli faasista voi irrota haihtuvia yhdisteitä, mikä voi haitata analyysiä. Polyetyleeniglykolin (nimenä esimerkiksi Carbowax 20M, Superox tai DB-wax) polymeeriketjussa ei ole sivuryhmiä ja se on hyvin poolinen stationaarifaasi. Näiden faasien lisäksi on olemassa paljon erilaisia erikoisfaaseja esimerkiksi nestekidefaasit, jotka soveltuvat erityisesti rakenneisomeerien erottamiseen. [7, s. 4, 65 - 66, 94][12, s. 157]

## Kolonnin rakenteen valinta ja vaikutus erottumiseen

Kolonneja on saatavilla kaupallisesti 0,10 mm, 0,20 mm, 0,25 mm, 0,32 mm ja 0,53 mm sisähalkaisijoilla. 0,25 ja 0,32 mm sisähalkaisijat on tavallisimpia ja niillä savutetaan hyvä tasapaino resoluution, analyysin ajan, näytekapasiteetin ja käytön helppouden välillä. Sisähalkaisijan pieneneminen nopeuttaa stationaarifaasin ja liikkuvan faasin välillä tapahtuvaa analyttien tasapainottumista yhtälön 1 mukaisesti. Tällöin siis kolonnin tehokkuus ja resoluutio kasvavat. Lisäksi samalla retentioaika lyhenee. Huonona puolena on,

että näytekapasiteetti pienenee. [7, s. 91] Tavallista selvästi ohuempi 0,10 mm sisähalkaisija asettaa koko kolonnin rakenteelle ja sen valmistukselle korkeammat vaatimukset [6, s. 296].

Kolonnin tehokkuutta kuvaava pohjaluku on suoraan verrannollinen kolonnin pituuteen. Koska resoluutio on verrannollinen pohjaluvun neliöjuureen yhtälön 2 mukaisesti, resoluutio kasvaa kolonnin pituuden kasvaessa. Esimerkiksi nelinkertaistamalla kolonnin pituus resoluutio kaksinkertaistuu. Pitempi kolonni kasvattaa kuitenkin myös retentioaikoja, joten analyysin aika pitenee. [8, s. 552 - 553, 567]. 60 - 100 m pituiset kolonnit soveltuvat yli 50 eri analyyttiä sisältävien näytteiden analyysiin korkean resoluution takia. 25 m ja 30 m pituiset kolonnit ovat tyypillisimmin käytettyjä ja niillä saavutetaan hyvä resoluutio, mutta myös suhteellisen lyhyt analyysin aika. [7, s. 91 - 92]

Stationaarifaasin filmin paksuus voi tyypillisesti olla 0,1 - 5  $\mu\text{m}$ . [8, s. 566] Filmin paksuuden kasvaessa näytekapasiteetti ja retentioaika kasvavat. Yhtälön 2 mukaisesti resoluutioon vaikuttavat pohjaluku ja jakaantumissuhteet. Koska filmin paksuus vaikuttaa sekä pohjalukuun yhtälön 1 mukaisesti että retentioaikoihin ja siis jakaantumissuhteisiin, sen vaikutus resoluutioon on monimutkaisempi kuin pituudella ja sisähalkaisijalla. 0,25  $\mu\text{m}$  on tavallisin paksuus ja se tarjoaa hyvän kompromissin näytekapasiteetin ja resoluution välillä. Kyseisellä filmin paksuudella stationaarifaasin vuotaminen ei myöskään rajoita liikaa kolonnin lämpötilaa. Koska vuotaminen on verrannollista stationaarifaasin paksuuteen, se voi olla ongelma 1  $\mu\text{m}$  tai paksummilla kolonneilla. [7, s. 92 - 93] Pienillä retentioajoilla eluoituvilla piikeillä, joilla  $k \leq 5$ , resoluutio kasvaa filmin paksuuden kasvaessa. Paksut filmit sopivat siis paremmin helposti haihtuville analyyyteille. Paksumpi filmi voi myös paremmin suojata analyyttejä vuorovaikuttamasta kolonnin kvartsilasipinnan kanssa ja siten vähentää piikkien hännänmuodostumista. [8, s. 567]

### **Kolonnin lämpötilan vaikutus erottumiseen**

Kolonnin lämpötilan nousu lyhentää retentioaikoja ja pienentää jakaantumissuhdetta  $k$  johtuen jakaantumiskertoimen  $K_c$  pienenemisestä eli analyyttien stationaarifaasissa olevien osuukien pienenemisestä. Yleensä lämpötilan nousu myös pienentää suhteellista retentiotta  $\alpha$ , eli pienentää kolonnin selektiivisyyttä. Vaikkakin se voi suurentaa kolonnin tehokkuutta hiukan, lämpötilan nousulla on yhtälön 2 mukaisesti siis heikentävä vaikutus erottumisen resoluutioon. Kolonnin lämpötila valitaan yleensä riittävän matalaksi erottumisen takia ja riittävän korkeaksi analyysin nopeuden kannalta. [7, s. 25, 145 - 147]

Analyysi voidaan tehdä joko isotermisesti, eli kolonnin vakio­lämpötilalla, tai lämpötilaohjelmoidusti, eli kolonnin lämpötilaa muuttamalla eluoitumisen aikana. Isotermisen toiminnan ongelmana on se, että lämpötila voidaan optimoida vain tietyille analyyttiparille. Tällöin nopeasti eluoituvat piikit ovat hyvin lähellä toisiaan johtuen niille liian suuresta lämpötilasta ja hitaasti eluoituvat piikit taas ovat hyvin leveitä, kaukana toisistaan ja niiden eluoitumiseen kuluu liian pitkä aika. Yleensä lämpötilaohjelma koostuu alun isotermisestä osiosta, lineaarisen lämmitysnopeuden osiosta ja lopun isotermisestä osiosta.

Lämpötilaohjelmoinnin lämmitysnopeus on kompromissi korkeaan resoluutioon tarvittavan matalan lämmitysnopeuden ja lyhyeen analyysiin kuluvaan aikaan tarvittavan korkean lämmitysnopeuden välillä. [6, s. 304] Lämpötilaohjelmoinnin etuja ovat lyhyemmät analyysihin kuluvat ajat, parempi erottuminen laajalla höyrynpainealueella ja muun muassa paremmat piikkien muodot hitaasti eluoituville yhdisteille. [7, s. 147 - 149]

Tavallisesti uusille kolonneille on asetettu kaksi käyttölämpötilarajaa: maksimilämpötila pitkäkestoisessa isotermisessä käytössä ja maksimilämpötila lyhytkestoisessa lämpötilaohjelmoidussa käytössä. Liian korkeat lämpötilat lisäävät stationaarifaasin vuotamista, mikä voi näkyä kromatogrammin pohjaviiivan nousuna, piikkien levenemisenä, hännänmuodostumisena ja retentioaikojen muuttumisena. [8, s. 574][12, s. 158]

### 2.1.4 Injektori ja injektointimenetelmät

Näyte tulee syöttää kolonniin mahdollisimman kapeana vyöhykkeenä, jotta kromatogrammin piikit ovat kapeita ja resoluutio mahdollisimman korkea. Monia eri näytteen-syöttömenetelmiä eli injektointimenetelmiä on kehitetty. Injektointimenetelmän valinta riippuu kaasukromatografista, näytteestä, tutkittavista yhdisteistä, yhdisteiden pitoisuuksista ja analyysin tavoitteesta. Kvantitatiivisen analyysin kannalta injektointimenetelmä vaikuttaa muun muassa analyysin toistettavuuteen ja tarkkuuteen. [12, s. 159 - 162] Automaattisten näytteesyöttäjien (engl. *autosampler*) käytöllä voidaan pienentää injektointista johtuvaa satunnaisvirhettä. Automaattiset näytteesyöttäjät ovat tyypillisesti kaasukromatografian päälle liitettäviä mekanisoituja yksiköitä, joita hallitaan kaasukromatografian tietokoneen avulla. Niiden avulla voidaan automatisoida niin injektioneulan pesu liuottimella ja näytteellä kuin halutun näytetilavuuden injektointikin. [7, s. 23]

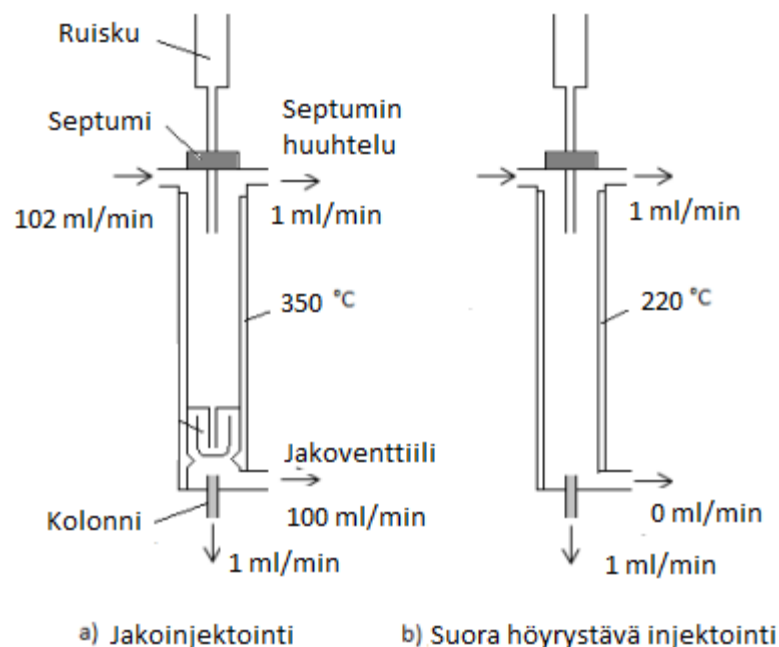
Eri injektioimenetelmät voivat vaatia kokonaan erilaisten injektoreiden tai erilaisten injektorin sisäputkien käyttöä. Injektorin sisäputki eli lineri on tyypillisesti valmistettu lasista tai kvartsista ja se on vaihdettava tietyin väliajoin, koska se likaantuu esimerkiksi haihtumattomien näytekomponenttien takia. Sisäputken vaihdon lisäksi muita injektointiin liittyviä laitteiston huoltotoimenpiteitä ovat injektorin septumin vaihto ja injektioneulan vaihto automaattista näytteesyöttäjää käytettäessä. [8, s. 577]

Tavallisimmat injektointimenetelmät ovat jakoinjektointi (engl. *split injection*), suora höyrystävä injektointi (engl. *splitless injection*) ja suoraan kolonniin injektointi (engl. *on-column injection*). Kahdessa ensimmäisessä menetelmässä näyte injektoidaan injektorin höyrystyskammioon, jossa se höyrystyy ja siirtyy kantajakaasun mukana kolonniin. Nimensä mukaisesti suoraan kolonniin injektoinnissa injektioneula ohjataan septumin ja injektorin läpi suoraan kolonniin sisälle. [8, s. 577 - 579][12, s. 159 - 161]

#### Jakoinjektointi (split)

Jakoinjektointiin ja suoraan höyrystävään injektointiin voidaan yleensä käyttää samaa injektoria, niin sanottua split/splitless-injektoria. Kyseisen injektorin kaaviokuva on esitetty

kuvassa 2.3. GCMS-QP2010 Ultra:ssa on tällainen injektori. Kyseisessä injektorissa lasista tai kvartista valmistettu lineri toimii höyrystyskammiona. [12, s. 159 - 160] Injektorin lämpötilan täytyy olla tarpeeksi suuri näytteen nopeaan höyrystymiseen esimerkiksi 350 °C, mutta se ei saa olla liian suuri näytteen termisen stabiiliuden kannalta. Jakoinjektioinnissa vain pieni osa välittömästi höyrystyvistä näytteestä ja höyrystyskammiosta virtaavasta kantajakaasusta virtaa kolonniin. Pieni osa kaasuseoksesta virtaa höyrystyskammiosta pois septumia huuhtelevan neulaventtiilin kautta ja suurin osa jakoventtiilin kautta kuten kuvasta 2.3 nähdään. Kromatografian käyttäjä valitsee jakosuhteen (engl. *split ratio*) ja kolonnissa virtaavan kantajakaasun vakiovirtausnopeuden tai vakioapaineen. Jakosuhde on tyypillisesti pienimmillään 20:1, eli virtausnopeus jakoventtiilin kautta on noin 20-kertainen kolonniin verrattuna [12, s. 159]. Jakoinjektioinnissa kaikki näyte poistuu höyrystyskammioista nopeasti muutaman sekunnin aikana. [8, s. 577 - 578]



**Kuva 2.3.** Kaaviokuva tyypillisestä split/splitless-injektorista käytettäessä a) jakoinjektointia tai b) suoraa höyrystävää injektointia. Suorassa höyrystävässä injektioinnissa injektoriin tuleva kantajakaasu poistuu injektorista vain kolonnin ja septumia huuhtelevan venttiilin kautta splitless-jakson aikana. Muokattu lähteestä [8, s. 578].

Jakoinjektioinnissa siis vain pieni osa näytteestä päätyy kolonniin. Se soveltuu siten hyvin näytteille, joissa tutkittavan yhdisteen osuus on yli 0,1 % näytteessä. Jakoinjektointi sopii myös likaisten näytteiden analyysiin, jos lineri täytetään adsorbentilla. [8, s. 577, 589] Muita jakoinjektioinnin hyviä puolia ovat muun muassa liuottimen ja lämpötilan pieni vaikutus injektointiin ja nopeiden isotermisten analyysien mahdollisuus, sillä kolonnin lämpötila voi olla jo valmiiksi halutussa korkeassa lämpötilassa [12, s. 159, 162].

Ongelmana jakoinjektioinnissa on, että toistettavuus voi olla huono jakosuhteen vaihteluiden takia. Jakosuhte voi muuttua muun muassa näytteen räjähdysmäisestä höyrystymisestä johtuvien paineen muutosten takia tai höyrystymisen tapahtuessa epätäydellisesti [12, s. 159]. Jakoinjektointi voi siten sopia huonosti kvantitatiiviseen analyysiin. Lisäksi jakoinjektioinnissa on huonona puolena se, että analyytit voivat hajota injektorin korkeassa lämpötilassa. [8, s. 578, 589]

### **Suora höyrystävä injektointi (splitless)**

Suoraan höyrystävään injektointiin eli *splitless*-injektointiin soveltuu sama injektorin kuin jakoinjektointiin, mutta sitä käytetään hieman eri tavalla. Jakoventtiili pidetään suljettuna injektioinnin ajan. Suurin injektioitava näytetilavuus on kantajakaasun paineesta riippuen 1,0 - 3,0 µl [12, s. 160]. Koska jakoventtiili on kiinni, höyrystävä näyte virtaa höyrystyskammioista pois kantajakaasun mukana suhteellisen hitaasti vain septumia huuhtelevan neulaventtiilin kautta ja kolonnin läpi kuten kuvasta 2.3 nähdään. Tämä tarkoittaa sitä, että näyte viettää jakoinjektointia pidemmän ajan höyrystyskammiossa. Kun virtausnopeus kolonnissa on 1 ml min<sup>-1</sup>, suurin osa näytteestä on virrannut pois höyrystyskammioista noin 1 minuutissa. Siksi suorassa höyrystävässä injektioinnissa injektorin lämpötilana käytetään matalampaa lämpötilaa, tyypillisesti noin 220 °C, kuin jakoinjektioinnissa, jotta näyte ei hajoaisi termisesti. [8, s. 578]

Jakoventtiili avataan yleensä noin 40 - 90 s kuluessa injektioinnista riippuen kolonnissa käytettävästä virtausnopeudesta [12, s. 160]. Aikaa injektioinnista jakoventtiilin avaamiseen sanotaan *splitless*-jakson ajaksi. Jos jakoventtiiliä ei avata, höyrystynyttä näytettä virtaisi vähenevässä määrin jatkuvasti lisää kolonniin aiheuttaen hyvin leveän näytevyöhykkeen ja hyvin leveät yhdisteiden piikit eli huonon resoluution. Piikit ovat hyvin leveät myös silloin, kun kolonni on jo injektioinnin aikana korkeassa lämpötilassa. Sen sijaan kolonnin lämpötila pidetään jakamattoman jakson aikana alhaisena, jotta yhdisteet jäisivät loukkuun kolonnin alkupäähän ja näytevyöhyke pysyisi kapeana. Tämä voidaan tehdä kahdella tavalla: liuotinloukulla ja kylmäloukkuefektillä. Yhdisteiden eluoituminen aloitetaan jakamattoman jakson jälkeen kolonnin lämpötilaa nostamalla halutun lämpötilaohjelman mukaisesti. Suora höyrystävä injektointi ei siis sovellu isothermiseen kromatografiaan. [8, s. 578 - 579, 589]

Edellä mainittua liuotinloukkuä käytettäessä kolonnin lämpötilan tulee olla noin 40 °C matalampi kuin liuottimen kiehumispiste. Tällöin liuotin tiivistyy kolonnin alkupäähän kapeaksi vyöhykkeeksi, johon yhdisteet pidättyvät ja konsentroituvat. Liuotinloukkuä käytettäessä täytyy liuottimen määrän olla 10000-kertainen analyyttien määrään nähden. Kylmäloukkuefektissä kolonnin lämpötila on puolestaan 150 °C matalampi kuin tutkittavien analyyttien kiehumispisteet. Tällöin yhdisteet pidättyvät kolonnin alkupään stati-onaarifaasiin kapeaksi vyöhykkeeksi. Tällöin liuottimet ja matalassa lämpötilassa kiehu-



vat analyytit voivat alkaa eluotua nopeastikin jo ennen lämpötilan nostamista. Kylmä-loukkuefektia hyödynnettäessä kolonnin stationaarifaasin filmin paksuuden tulee olla vähintään 2  $\mu\text{m}$ . [8, s. 578]

Suoran höyrystävän injektoinnin suorituskyky riippuu menetelmän eri vaiheiden, kuten injektoinnin ja jakamattoman jakson, ajastuksesta [6, s. 291 - 292]. Menetelmänä se soveltuu hyvin muun muassa näytteille, joissa tutkittavien yhdisteiden pitoisuudet ovat alle 0,01 % eli ppm-suuruusluokassa. Se mahdollistaa myös korkean resoluution ja soveltuu jakoinjektointia paremmin kvantitatiiviseen analyysiin. Kyseinen menetelmä on kuitenkin monimutkaisempi käyttää kuin jakoinjektointi muun muassa liuotinefektien hyödyntämisen takia. [8, s. 578, 589]

### **Suoraan kolonniin injektointi (on-column)**

Suoraan kolonniin injektointiin eli *on-column*-injektointiin on kehitetty erilaisia kaupallisia injektoreita, joissa septumin lävistämä injektioneula ohjataan kolonnin sisälle. Tyyppillinen näytetilavuus on noin 1 - 3  $\mu\text{l}$  ja kolonnin lämpötila aluksi tarpeeksi matala, jotta tutkittavat analyytit pidättäytyvät tiivistyvään liuottimeen. Eluotuminen aloitetaan tällöin kolonnin kuumentamalla. Kyseisessä menetelmässä analyytit altistetaan siis mahdollisimman pienille lämpötiloille ja näytehaviötä ei juurikaan tapahdu. [12, s. 161]

Suoraan kolonniin injektointi sopii siten hyvin helposti hajoaville analyyteille [8, s. 579] ja edellä mainituista injektointimenetelmistä se sopii parhaiten kvantitatiiviseen analyysiin hyvän tarkkuutensa ja toistettavuutensa takia. Likaisten näytteiden analyysi voi kuitenkin olla ongelmallista, sillä haihtumattomat epäpuhtaudet voivat kertyä kolonnin alkupäähän. Yhdisteitä pidättämättömän esikolonnin käyttö voi siis olla hyödyllistä. Lisäksi tavallisen injektioneulan koko voi rajoittaa käytettävän kolonnin sisähalkaisijan koon, jos ei käytetä suuremman halkaisijan esikolonnin tai erikoisneuloja [8, s. 579]. [12, s. 161 - 162]

### **2.1.5 Kantajakaasu**

Kantajakaasu toimii erotusprosessin liikkuvana faasina. Yleensä kantajakaasuna on  $\text{N}_2$ , He,  $\text{H}_2$  tai Ar [6, s. 290] ja sen tulee olla inertti tutkittavia analyyttejä ja stationaarifaasia kohtaan. Kantajakaasun puhtausasteen tulee olla vähintään 99,995 % [12, s. 156]. Epäpuhtaudet kuten  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  ja orgaaniset yhdisteet voivat hajottaa kolonnin stationaarifaasia ja vaikuttaa detektorin tehokkuuteen. Esimerkiksi stationaarifaasin hapettumisesta johtuva hajoaminen voi näkyä kromatogrammin piikkien levenemisenä ja hännänmuodostumisena. [8, s. 574 - 575]  $\text{H}_2\text{O}$  ja orgaaniset yhdisteet voidaan poistaa kaasusta esimerkiksi käyttämällä kaasupullon ja kaasukromatografian välissä 5 Å molekyyliuodatinta (engl. *molecular sieve filter*), mutta hapen poistaminen vaatii erikoissuodatimen [7, s. 16].

Kantajakaasun valinta määräytyy pääasiassa detektorin valinnan mukaan. Eri kantajakaasut mahdollistavat erilaiset herkkyudet eri detektoreissa. He on yleisimmin käytetty kantajakaasu, sillä se on hyvin yhteensopiva useimpien detektorien kanssa. Virtausnopeus on kantajakaasuun liittyvä tärkeä parametri kaasukromatografisessa menetelmässä. Kapillaarikolonneja käytettäessä virtausnopeuden suuruusluokka on noin  $1 \text{ ml min}^{-1}$ . Yhtälön 1 mukaisesti kantajakaasun virtausnopeudella on optimiarvo, jolla tietyn kolonnin tehokkuus on suurimmillaan. Kyseiseen optimiarvoon vaikuttaa analyytin diffuusio kaasussa. Koska diffuusio He:ssä on nopeampaa kuin  $\text{N}_2$ :ssä, He:lla voidaan käyttää suurempaa virtausnopeutta kuin  $\text{N}_2$ :llä. Koska eluotumiseen kuluva aika vähenee virtausnopeuden kasvaessa, optimiarvoa suurempien virtausnopeuksien käyttö on käytännön kannalta suositeltavaa. Lisäksi He:lla virtausnopeuden vaikutus erottumisen tehokkuuteen on vähäisempää kuin  $\text{N}_2$ :llä.  $\text{H}_2$  on virtausnopeuden kannalta He:a parempi kantajakaasu, mutta se voi muodostaa räjähtäviä seoksia ilman kanssa. Räjähdyksivaara on kuitenkin vähäinen, sillä kapillaarikolonneilla käytetään hyvin pieniä virtausnopeuksia ja  $\text{H}_2$  voidaan tuottaa  $\text{H}_2$ -generaattorilla kaasupullon sijaan. [8, s. 566, 574 - 575]

### 2.1.6 Detektori

Detektorin tehtävänä kaasukromatografissa on ilmaista muutokset eluentin koostumuksessa eluentin virratessa jatkuvasti kolonnista. Sähköinen detektorin vaste on verrannollinen yhdisteen määrään eluentissa ja se esitetään tietokoneella ajan funktiona kromatogrammissa. Yli 60 mahdollisesta detektorista suuri osa perustuu toiminnaltaan ionien muodostumiseen. Kaasukromatografissa yleisesti käytetyt detektorit ovat lämmönjohtavuusdetektori (TCD), liekki-ionisaatiodetektori (FID), elektronikaappausdetektori (ECD) ja massaspektrometri (MS). Työssä käytetty GCMS-QP2010 Ultra on ensisijaisesti kaasukromatografi-massaspektrometri, mutta siinä on myös FID-detektori. [7, s. 27, 104]

Detektorin lämpötila on yksi analyysin kontrolloitavista parametreista. Detektorin lämpötilan täytyy olla tarpeeksi suuri, jotta näyte säilyy kaasumaisena eikä tiivistymistä tapahdu. [9, s.77] Tiivistyminen voi aiheuttaa piikkien levenemisen tai katoamisen. TCD:tä käytettäessä detektorin lämpötila on kontrolloitava hyvin tarkasti ( $\pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ), jotta kromatogrammin pohjaviiva olisi tasainen. Ionisaatioon perustuvilla detektoreilla, kuten FID:llä, lämpötilan kontrolloinnin ei tarvitse olla yhtä tarkkaa. [7, s. 26 - 27]

Kaasukromatografisen menetelmän kannalta detektorin valinta on hyvin tärkeä, sillä kaikilla detektoreilla ei voida havaita kaikkia yhdisteitä. Jos analyysin tarkoituksena on esimerkiksi identifioida tuntemattomaan näytteeseen sisältyvät yhdisteet, niin detektorin täytyy olla universaali. Jos vain tietyillä tunnetuilla yhdisteillä on väliä, niin voidaan käyttää selektiivistä detektoria, joka havaitsee vain tietyntyyppisiä yhdisteitä. [7, s. 108] Selektiivisen detektorin käyttö voi yksinkertaistaa kromatogrammia huomattavasti ja mahdollisesti poistaa tutkittavan yhdisteen piikin kanssa päällekkäin menevät piikit [6, s. 298].

Universaalisuuden lisäksi detektorit voidaan luokitella myös muiden ominaisuuksien suhteen esimerkiksi näytettä tuhoaviin ja tuhoamattomiin detektoreihin. Lisäksi detektorit voivat mitata joko yhdisteen konsentraation eluentissa tai suoraan analyytin absoluuttisen määrän riippumatta eluentin tilavuudesta detektorissa. Jälkimmäisen kaltainen detektori mittaa massavirtaa ja muutokset kantajakaasun virtausnopeudessa eivät vaikuta sen vasteesta tuotetun kromatogrammin piikkien pinta-alaan. Konsentraation mittaavilla detektoreilla virtausnopeus vaikuttaa piikkien pinta-alaan. [7, s. 106 - 107]

### **Detektorin suorituskyky**

Tärkeitä detektorin suorituskykyyn liittyviä ominaisuuksia ovat herkkyys, toteamisraja, lineaarinen alue ja dynaaminen alue. Herkkyys määrittellään detektorin vasteen, eli piikin pinta-alan tai korkeuden, ja analyytin konsentraation tai massan suhteen riippuen, onko kyseessä konsentraation vai massavirran mittaava detektori. [7, s. 111 - 112] Suuri herkkyys johtaa kvantitatiivisessa analyysissä suureen kalibrointisuoran kulmakertoimeen ja suureen analyysin tarkkuuteen [6, s. 297]. Toteamisrajalle on useita eri määritelmiä ja sitä kuvaavia suureita. Periaatteessa ne kuitenkin kaikki vastaavat kysymykseen, mikä on pienin havaittava analyytin määrä tai pitoisuus. MDQ (engl. *minimum detectable quantity*) on analyytin pienin massa, jonka aiheuttama piikki kromatogrammissa voidaan havaita. Tällöin signaali-kohinasuhde on 2. MDQ:ta voidaan verrata eri detektoreiden kesken. [7, s. 113]

Lineaarinen alue kuvaa analyytin konsentraatioaluetta, jolla detektorin vaste on suoraan verrannollinen analyytin massaan tai konsentraatioon. Lineaarinen alue on yksikötön suure, sillä se määrittellään lineaarisuuden ylärajan ja toteamisrajan suhteen. Mitä suurempi lineaarinen alue on, sitä suuremmalla konsentraatioalueella kalibraatiokäyränä on suora [6, s. 297]. Lineaarista aluetta suuremmilla konsentraatioilla mittauksen herkkyys laskee. Dynaamisen alueen ulkopuolella detektorin vaste ei enää kasva analyytin konsentraation kasvaessa. [7, s. 114]

### **Liekki-ionisaatiodetektori (FID)**

Liekki-ionisaatiodetektori (FID, engl. *Flame-ionization detector*) on käytetyin detektori kaasukromatografiassa. Se perustuu orgaanisten analyyttien hajoamiseen radikaaleiksi ja ioneiksi liekissä, johon syötetään H<sub>2</sub>:ä ja synteettistä ilmaa. FID:llä havaitaan vain orgaanisia analyyttejä, joiden suhteen FID on lähes universaali. Tavallisesti H<sub>2</sub> sekoitetaan eluaatin kanssa, ja muodostunut seos johdetaan pienen polttimen kärjen läpi. Ilma syötetään suurena virtana polttimen kärjen ympärille liekin ylläpitämiseksi. Ilman ja H<sub>2</sub>:n täytyy olla puhdasta. Detektorin lämpötilan on oltava vähintään 125 °C, koska polttoprosessissa muodostuu vettä. [7, s. 115, 117]

Hiilivetyjen hajoamismekanismia radikaaleiksi ja ioneiksi ei tunneta täysin, mutta ilmeisesti liekissä muodostuu CHO<sup>+</sup>-ioneja ja elektroneja. Vain hyvin pieni osa orgaanisen

analyytin molekyyleistä tuottaa ioneja, mutta muodostuvien ionien määrä on verrannollinen analyytin määrään. Polttimen kärki toimii negatiivisena elektrodina ja sen ja kollektorielektrodin välillä on tyypillisesti noin 300 V jännite. Hajoavan analyytin läsnä ollessa elektrodien välillä kulkeva noin  $10^{-14}$  A virta, joka johtuu epäpuhtauksista  $H_2$ :n ja ilman syötössä, kasvaa noin  $10^{-12}$  A virraksi muodostuneiden ionien ja elektronien johdosta. Virta muutetaan jännitteeksi, ja saatu detektorin vaste vahvistetaan, suodatetaan ja muutetaan digitaaliseksi signaaliksi. Detektorisignaali esitetään sitten kromatogrammissa ajan funktiona. Jos kaksi hiilivety-yhdistettä eluoituu samaan aikaan kolonnista FID:iin, ne tuottavat vain yhden yhteenlasketun detektorisignaalin. Täsmälleen samaan aikaan eluoituvat yhdisteet näkyvät kromatogrammilla vain yhtenä piikkinä. [7, s. 117 - 118]

FID:n herkkyys on suurimmillaan käytettäessä  $N_2$ -kantajakaasua. Jos käytetään He:a kantajakaasuna, niin herkkyyttä voidaan kasvattaa lisäämällä eluaatin sekaan  $N_2$ :ä detektorikaasuna (*makeup gas*). Detektorikaasun lisäyksen tarkoituksena on myös suurentaa eluaatin virtausnopeus detektorille paremmin sopivaksi. [8, s. 575, 581] Eluaatin virtausnopeus suurennetaan tyypillisesti noin  $1 \text{ ml min}^{-1}$ :sta, joka on tyypillinen kapillaarikolonneilla, noin  $30 \text{ ml min}^{-1}$ . FID:n etuja ovat korkea herkkyys, erittäin laaja lineaarinen alue (noin  $10^6$ ) ja soveltuvuus käytettäväksi kaikenkokoisten kolonnien kanssa. FID:n MDQ on tyypillisesti noin 0,01 ng. [7, s. 117 - 118]

### **Kaasukromatografia-massaspektrometria (GCMS)**

Massaspektrometrin käyttö kaasukromatografian detektorina on nykyään yleistä. Tällöin menetelmästä käytetään yleensä omaa nimeään kaasukromatografia-massaspektrometria (GCMS). GCMS:ssä kaasukromatografian tarkoitus on erottaa näytteessä olevat yhdisteet toisistaan ja syöttää ne yksitellen massaspektrometriin. Massaspektrometri toimii GCMS:ssä detektorina, ja GCMS:llä voidaan näytteestä mitata kaasukromatografialle tyypillinen kromatogrammi. Massaspektrometri toimii GCMS:ssä kuitenkin myös massa-analysointina ja sen avulla voidaan näytteestä ja sen yhdisteistä saada paljon muutakin tietoa, erityisesti mitattujen massaspektrien avulla. Massaspektrometriä voidaan käyttää muun muassa analyyttien rakenteen tutkimiseen ja analyyttien identifiointi on sillä paljon luotettavampaa kuin ”tavallisten” detektorien avulla. GCMS soveltuu myös kvantitatiiviseen analyysiin. Sen herkkyys on myös todella suuri ja MDQ on noin 25 fg - 100 pg. [7, s. 156 - 157][8, s. 502, 519, 580]

Massaspektrometrin (MS) pääosat ovat tietokone, ionisaatiokammio ja ionilähde, massa-analysointori, detektori, vakuumpumput ja näytteesyöttölaite, joka GCMS:ssä on siis kaasukromatografi. GCMS:ssä kaasukromatografian kapillaarikolonne on yleensä liitetty suoraan massaspektrometrin ionisaatiokammioon, sillä kantajakaasun virtausnopeudet ovat tarpeeksi pieniä nykyisille vakuumpumpuille. Tavallisesti ionisaatiokammiossa, massa-analysointorissa ja detektorissa vallitsee vakuumiolosuhteet mittausten aikana. Näytteen yhdisteet ensin ionisoidaan ionisaatiokammiossa. Sitten muodostuneet ionit erotetaan toisistaan niiden massa-varaussuhteen,  $m/z$ , perusteella massa-analysointorissa.

Lopuksi eri  $m/z$ -arvojen ionien intensiteetit mitataan detektorilla. Mitatut intensiteetit esitetään  $m/z$ -suhteen funktiona massaspektrissä. Massaspektrissä intensiteetti esitetään yleensä suhteellisenä intensiteettinä eli suhteutettuna massaspektrin intensiivisimmän piikin intensiteettiin. GCMS:ssä ionisaatiokammion ionilähteenä on yleensä elektroni-ionisaatiolähde. Elektroni-ionisaatiossa (EI) yhdisteitä pommitetaan korkea-energisillä (yleensä 70 eV) elektroneilla, jolloin yhdisteistä muodostuu monia erilaisia ioneja. Ionien muodostuminen tapahtuu yleensä labiilin molekyyli-ionin pilkkoutumisen johdosta. Molekyyli-ioni muodostuu, kun molekyyli menettää elektroni-ionisaatiossa yhden elektronin. Yhdisteestä riippuen molekyyli-ioni ei välttämättä havaita ollenkaan mitatussa massaspektrissä. Yhdisteiden pilkkoutuminen ja ionisoituminen EI:ssä on fyysikaalinen tapahtuma ja sen toistettavuus on hyvin suuri, minkä takia GCMS:llä mitattua massaspektriä voidaan käyttää analyysin tunnistamiseen vertaamalla spektriä johonkin spektrikirjastoon. [8, s. 504 - 505] [12, s. 163 - 165] [13, s. 15, 17 - 18]

Massa-analyysaattorina GCMS:ssä on yleensä kvadrupolianalyysaattori. Kvadrupolianalyysaattori toimii suodattimena, joka tietyllä ajanhetkellä päästää vain tietyn  $m/z$ -arvon ionit läpi detektorille. Yhden kvadrupolianalyysaattorin sisältävillä GCMS-laitteistoilla, kuten GCMS-QP2010 Ultra:lla, voidaan massaspektrit ja kromatogrammit mitata kahdella perustavalla: jatkuvalla pyyhkäisyllä (engl. *continuous scan*) eli SCAN:lla tai valittujen ionien seurannalla (engl. *selected ion monitoring*) eli SIM:lla. Molemmilla mittaustavoilla kromatogrammi koostuu erillisistä mittauspisteistä, jotka on mitattu noin 0,2 s aikaikkunoissa. Jokaisen aikaikkunan aikana SCAN:lla mitataan valitulta  $m/z$ -alueelta, esimerkiksi 40 - 400, kaikkia  $m/z$ -arvoja vastaavat intensiteetit eli detektorisignaalit. Tällöin kvadrupolianalyysaattori päästää siis kaikki valitun massa-alueen ionit vuorotellen läpi MS:n detektorille yhden aikaikkunan aikana, joten mittaustuloksena on kyseisen aikaikkunan aikana mitattu massaspektri. Laskemalla yhteen kaikki detektorisignaalit yhden aikaikkunan aikana, eli kyseisen aikaikkunan massaspektrin kaikkien ionien intensiteetit, tuloksena on kokonaisionivirta eli TIC. TIC vastaa periaatteessa GC:n ”tavallisen” detektorin, esimerkiksi FID:n, detektorisignaalia ja esittämällä se mittaustuloksena on tyypillinen kromatogrammi. Erona tavalliseen esimerkiksi FID:llä mitattuun kromatogrammiin on kuitenkin se, että jokaiselle kromatogrammin mittauspisteelle on mitattu massaspektri, sillä kromatogrammin jokaisen mittauspisteen detektorisignaali (TIC) on laskettu kyseisen mittauspisteen aikaikkunan aikana mitatuista ionien intensiteeteistä. Mittauspisteen TIC:stä voidaan ”suodattaa” massaspektri esiin, joten kromatogrammin piikin kohdalla mitattuja massaspektrejä voidaan käyttää yhdisteen tunnistamiseen. SCAN:lla mitattua dataa voidaan myös ”suodattaa” siten, että TIC:n sijaan kromatogrammi muodostetaan vain jonkin tietyn mitatulle massa-alueelle kuuluvan  $m/z$ -arvon intensiteeteistä. [12, s. 165 - 166][14, s. 187][15, s. 27 - 28][16, s. 104 - 105]

SIM eroaa SCAN:sta siinä, että massa-alueen sijaan mitataan vain muutaman tietyn  $m/z$ -arvon intensiteettiä jokaisen aikaikkunan aikana. Tällöin intensiteetin mittaukseen on

käytettävissä paljon enemmän aikaa yksittäistä  $m/z$ -arvoa kohti kuin SCAN:lla mitattaessa. Tästä syystä SIM:llä saavutetaan SCAN:a parempi signaalikohinasuhde, mikä näkyy SIM-mittausten suurempana herkkyytenä ja 100 - 1000-kertaisesti pienempänä toteamisrajana. Myös SIM:llä voidaan mittauksista muodostaa TIC ja esittää se kromatogrammissa ajan funktiona, mutta tällöin TIC on muodostettu vain mittaukseen valittujen  $m/z$ -arvojen intensiteeteistä. SIM:llä mitatussa kromatogrammissa havaitaan vain siis yhdisteet, joiden massaspektrien piikkien  $m/z$ -arvoja on mitattu. Käyttämällä kvantitatiiviseen analyysiin vain tutkittaville yhdisteille ominaisten ionien kromatogrammeja voidaan lisätä menetelmän spesifisyyttä, sillä vain kyseisiä ioneja muodostavat yhdisteet havaitaan ja kvantitoidaan. SIM:ä on käytetty esimerkiksi polystyreenin sisältämän styreenin kvantitatiiviseen analyysiin [17]. [8, s. 522 - 523, 582][14, s. 187, 188][16, s. 104 - 105]

GCMS-analyyseissä voidaan tavallisesti käyttää kaasukromatografiselle erottumiselle optimoituja injektorin, kolonnin ja kantajakaasun parametrien arvoja. Massaspektrometrin asetukset, kuten ionisaatiokammion ja liitososan lämpötilat ja ionisaatiojännite, ovat yleensä eri GCMS-analyyseissä samankaltaiset. Massaspektrometrin toiminta täytyy kuitenkin tietyn väliajoin tarkistaa kalibroinnilla, jossa referenssiyhdisteen kuten perfluorotributyylamiinin mitatun massaspekttrin piikkien  $m/z$ -arvoja verrataan teoreettisiin arvoihin. Jos arvot poikkeavat määritetyistä rajoista, tulee laitteisto virittää (*tuning*) uudelleen. Virittämisessä referenssiyhdisteen massaspekttri mitataan ja sen piikkien  $m/z$ -arvot asetetaan oikeille paikoilleen teoreettisten arvojen mukaisesti. [12, s. 165][13, s. 18 - 19]

### 2.1.7 Kvalitatiivinen ja kvantitatiivinen analyysi

Kaasukromatografiaa voidaan käyttää kvalitatiivisessa analyysissä näytekomponenttien tunnistamiseen. Jos jonkin kromatogrammin piikin odotetaan aiheutuvan jostain tietyistä yhdisteestä, voidaan mitata referenssiyhdisteen, joksi tuntematonta luullaan, kromatogrammi samoissa olosuhteissa ja verrata retentioaikoja toisiinsa. Referenssiyhdistettä voidaan myös lisätä näytteen sekaan, jolloin tuntemattoman piikin suhteellisen pinta-alan pitäisi kasvaa tuntemattoman ja referenssin ollessa samoja yhdisteitä. Tällainen identifiointi on varmempaa, kun käytetään monia erilaisia stationaarifaaseja. [8, s. 579]

Kvalitatiivisessa analyysissä absoluuttisia retentiosuureita parempia ovat suhteelliset retentiosuureet, kuten Kovatsin retentioindeksi  $I$ . Lineaarisen alkaanin, jossa on  $n$ -määrä hiiliatomeja, retentioindeksi on määritelmän mukaan  $100n$ . Siis esimerkiksi heksaanin retentioindeksi on 600. Tuntemattoman yhdisteen retentioindeksi voidaan määrittää mittaamalla muutaman lineaarisen alkaanin ja tuntemattoman yhdisteen redusoidut retentioajat niiden kromatogrammeista, jotka on mitattu samoissa olosuhteissa. Kun lineaaristen alkaanien redusoitujen retentioaikojen logaritmi esitetään retentioindeksin funktiona, on kuvaajana suora. Yhdisteen retentioindeksi saadaan tällöin selville kyseiseltä suoralta lukemalla redusoidun retentioajan logaritmin avulla. [7, s. 60] Retentioindeksi voidaan myös laskea yhtälöllä

$$I = 100 \left[ N_{c1} + (N_{c2} - N_{c1}) \frac{\log t'_r(x) - \log t'_r(N_{c1})}{\log t'_r(N_{c2}) - \log t'_r(N_{c1})} \right],$$

jossa  $N_{c2}$  ja  $N_{c1}$  ovat yhdistettä x suuremman ja pienemmän retentioindeksin omaavan alkaanin hiililuku,  $t'_r(x)$ ,  $t'_r(N_{c1})$  ja  $t'_r(N_{c2})$  ovat yhdisteen x ja alkaanien redusoidut retentioajat. Retentioindeksit riippuvat käytettävästä stationaarifaasista, mutta ne ovat silti taulukoitavia arvoja stationaarifaasin mukaan ja niitä voidaan käyttää identifiointiin. [8, s. 573]

GCMS:ssa SCAN:illa mitattuja massaspektrejä voidaan verrata laitteiston tietokoneen spektrikirjastoon ja identifioida tuntematon yhdiste. Tietokoneen avulla kirjastovertaus tapahtuu sekunneissa [7, s. 167]. Väärät identifioinnit voivat olla kuitenkin yleisiä, mutta niiden määrää voidaan vähentää esimerkiksi käyttämällä retentioindeksejä toisena identifiointimenetelmänä. SIM:ä voidaan myös käyttää kvalitatiiviseen analyysiin siten, että verrataan analyytin kahden intensiivisen ja karakteristisen piikin intensiteettien suhdetta, eli niin sanottua ionisuhdetta, standardiyhdisteen ionisuhteeseen. Ionisuhde saa poiketa vain 20 - 30 % standardiyhdisteen ionisuhteesta. Jos referenssiyhdistettä tai kirjastospektriä ei ole, identifiointi voi olla haastavaa, mutta analyytin massaspekttrin pilkkoutumisesta voidaan saada vihjeitä analyytin rakenteesta. [8, s. 573, 579][12, s. 165 - 166]

Kvantitatiivinen analyysi perustuu siihen, että kromatogrammin piikkien pinta-alat ovat verrannollisia yhdisteiden määrään mitattavassa näyteliuksessa. Piikin pinta-ala voidaan määrittää nykyaikaisilla laitteistoilla helposti laitteistoon kytketyn tietokoneen ja laitteiston tuottaman tiedon käsittelyyn tarkoitetun ohjelman avulla. Detektorisignaali ja siis piikin pinta-ala voivat olla erisuuria eri yhdisteillä, vaikka kyseisten yhdisteiden määrät näytteessä olisivatkin yhtä suuret. Tämän takia kvantitatiivisessa analyysissä täytyy aina käyttää tutkittavia yhdisteitä vastaavia puhtaita standardiyhdisteitä kalibroinnissa. Kvantitatiivinen analyysi voidaan tehdä tavallisen kalibroitikuvaajan avulla eli niin sanotulla ulkoisen standardin menetelmällä. Tällöin tutkittavaa yhdistettä, eli analyyttiä, vastavasta standardista valmistetaan useita eri massakonsentraation kalibroitinäytteitä, joiden kromatogrammit mitataan samoissa olosuhteissa kuin tutkittava näytekkin. Mitattavien näytetilavuuksien on oltava samat. Kalibroitinäytteiden analyytin piikin pinta-ala esitetään kalibroitikuvaajassa massakonsentraatioiden funktiona ja analyytin massakonsentraatio tuntemattomassa näytteessä määritetään vertaamalla mitattua piikin pinta-alaa kalibroitikuvaajaan. [6, s. 305][11, s. 530 - 531]

Ulkoisen standardin menetelmä on kuitenkin altis sekä käyttäjistä että laitteistosta johtuville virheille. Esimerkiksi laitekomponenttien lämpötilat ja kantajakaasun virtausnopeus voivat vaihdella kromatogrammin mittauksen aikana erilailla standardinäytteillä ja tutkittavalla näytteellä, joten korrelaatio detektorisignaalin ja massakonsentraation välillä voi olla erisuuri eri mittauksissa. Jotkin tällaiset puutteet voidaan poistaa tai minimoida sisäisen standardin menetelmällä, jossa edellä mainittuihin kalibroitinäytteisiin ja tutkitta-

vaan näytteeseen lisätään sama tarkoin tunnettu määrä sisästandardiyhdistettä. Sisästandardin (IS) tulee olla eri yhdiste kuin tutkittava analyytti. Sisäisen standardin menetelmässä sekä tutkittavat näytteet että tunnetut kalibrointinäytteet sisältävät tutkittavaa analyyttiä ja sisästandardiyhdistettä. Sisästandardin tulee erottua kromatogrammeissa omana piikkinään, jonka pinta-alan suuruusluokan tulee olla sama kuin analyytillä, ja sitä ei saa olla näytteissä ennestään. Sen tulee myös eluoitua mahdollisimman lähellä analyyttiä, jotta olosuhteet kolonnissa ja detektorissa olisivat niille mahdollisimman samanlaiset. Tutkittavan yhdisteen, eli analyytin, massakonsentraatio voidaan määrittää ulkoisen standardin menetelmän tapaan kalibrointikuvaajan avulla. Kalibrointikuvaajan y-akselin suurena on kuitenkin nyt analyytin ( $x$ ) piikin pinta-alan,  $A(x)$ , ja sisästandardin piikin pinta-alan,  $A(\text{IS})$ , suhde eli suure  $A(x)/A(\text{IS})$ . Kuvaajan x-akselina on analyytin massakonsentraation,  $c(x)$ , ja sisästandardin massakonsentraation,  $c(\text{IS})$ , suhde eli suure  $c(x)/c(\text{IS})$ . Jos tutkittavaan näyteliuokseen on lisätty täsmälleen sama määrä sisästandardia kuin kalibrointistandardeihin voidaan kuvaajan x-akselina käyttää pelkkää analyytin massakonsentraatiota  $c(x)$ , sillä  $c(\text{IS})$  on sama kaikissa mittauksissa. Sisäisen standardin menetelmää pidetään yleisesti luotettavimpana menetelmänä kvantitatiiviseen analyysiin kromatografiassa. [6, s. 305 - 306][7, s. 141 - 142]

Toinen yleinen tapa tuntemattoman näytteen kvantitatiiviseen analyysiin sisäisen standardin menetelmällä on niin sanotun *response factor*:n,  $RRF$ , avulla. Tällöin mitataan ensin vähintään yhden standardiliuoksen kromatogrammista analyytin ja sisästandardin piikkien pinta-alat eli suureet  $A_{\text{st}}(x)$  ja  $A_{\text{st}}(\text{IS})$ . Koska standardiliuoksen analyytin ja sisästandardin massakonsentraatiot,  $c_{\text{st}}(x)$  ja  $c_{\text{st}}(\text{IS})$ , tunnetaan, voidaan  $RRF$ :n arvo laskea yhtälöllä [8, s. 109]

$$RRF = \frac{A_{\text{st}}(x)}{A_{\text{st}}(\text{IS})} \times \frac{c_{\text{st}}(\text{IS})}{c_{\text{st}}(x)} . \quad (3)$$

Tuntemattoman näyteliuoksen analyytin konsentraatio,  $c_n(x)$ , voidaan laskea  $RRF$ :n avulla yhtälöllä

$$c_n(x) = \frac{A_n(x)}{A_n(\text{IS})} \times \frac{c_n(\text{IS})}{RRF} , \quad (4)$$

jossa  $c_n(\text{IS})$  on tuntemattoman näyteliuoksen sisästandardin massakonsentraatio ja  $A_n(x)$  ja  $A_n(\text{IS})$  ovat tuntemattoman näyteliuoksen kromatogrammista mitatut analyytin ja sisästandardin piikkien pinta-alat. Yhtälön 3 perusteella  $RRF$  vastaa siis kalibrointisuoran kulmakertoimen arvoa sisäisen standardin menetelmässä, kun y-akselina on suure  $A(x)/A(\text{IS})$  ja x-akselina suure  $c(x)/c(\text{IS})$  ja kun kalibrointisuora kulkee origon kautta. Yhtälöiden 3 ja 4 mukainen määrittäminen voidaan tehdä vain menetelmän lineaarisella alueella, jolloin  $RRF$  on vakio. [8, s. 109, 580]

1-pistekalibroinnilla tarkoitetaan sitä, että yhtälön 3 mukainen *response factor* määritetään yhden standardiliuoksen mittauksesta. Määritettyä arvoa käytetään sitten analyytin



massakonsentraation laskemiseen yhtälöllä 4 tuntemattoman näytteen mittaustulosten avulla. Toinen yleisesti käytetty, mutta luotettavampi, kalibrointitapa on 3-pistekalibrointi. Siinä määritetään kolmella eri standardiliuoksella *response factor*, ja kolmesta määritetystä arvosta lasketaan keskiarvo [18]. Kolmessa standardiliuoksessa on eri massakonsentraatiot analyyttiä, mutta samat massakonsentraatiot sisästandardia. Tällainen 3-pistekalibrointi vastaa lähes kalibrointisuoran, joka on mitattu kolmella standardiliuoksella ja joka on pakotettu kulkemaan origon kautta, käyttöä. [19, s. 25]

## 2.2 Polymeerimateriaalin monomeeripitoisuuden määrittäminen

Polymeerimateriaalin monomeeripitoisuuden määrittäminen on tärkeää materiaalia polymerisoitaessa polymerisaatioreaktion etenemisen seuraamiseksi. Se on tärkeää myös sen jälkeen, sillä monomeeripitoisuus voi vaikuttaa materiaalin prosessointiin ja käytönaikaisiin ominaisuuksiin. Kosteuden lisäksi jäännösmonomeeri (engl. *residual monomer*) ja muut polymeerimateriaalin epäpuhtaudet, kuten oligomeerit ja erityisesti metallikatalyytit, lisäävät termisesti epästabiliin polymeerimateriaalin, kuten polylaktidien (PLA), termistä hajoamista sulaprosessoinnin aikana [1]. Lisääntynyt terminen hajoaminen johtaa muun muassa prosessoitavan polymeerimateriaalin moolimassan pienenemiseen. Moolimassalla on hyvin suuri merkitys esimerkiksi lääketieteellisiin käyttökohteisiin tarkoitettujen polymeerimateriaalien käyttöön, sillä se vaikuttaa muun muassa materiaalien mekaanisiin ominaisuuksiin ja hydrolyyttiseen hajoamiseen esimerkiksi ihmiskehossa. [2][3]

Jäännösmonomeerin vaikutus prosessointiin ja siten materiaalin käytönaikaisiin ominaisuuksiin voidaan minimoida käyttämällä prosessoinnissa hyvin puhdistettuja polymeerejä [2]. Monomeeriä ja muita polymeerin hajoamistuotteita muodostuu kuitenkin myös sulaprosessoinnin aikana termisen hajoamisen takia. Myös prosessoinnissa muodostuneella laktidilla on havaittu olevan merkittävä vaikutus polylaktidimateriaalien käytönaikaiseen hajoamiseen hydrolyyttisissä olosuhteissa [3][20]. Tämän takia polymeerimateriaalin monomeeripitoisuuden määrittäminen on hyvin tärkeää myös sulaprosessoinnin jälkeen.

Polymeerimateriaalien monomeeripitoisuuksien määrittämiseen on käytetty monia erilaisia menetelmiä. Monomeeri täytyy yleensä ensin erottaa polymeerinäytteestä jollakin erotusmenetelmällä näytteenkäsittelyssä ennen varsinaisen analyysimenetelmän käyttöä. Yleisesti käytettyjä erotusmenetelmiä ovat erilaiset headspace-menetelmät, uuttomenetelmät ja liuotusmenetelmät. Headspace-menetelmissä, kuten MHS-SDME:ssä (engl. *Multiple headspace single-drop microextraction*) tai MHS-SPME:ssä (engl. *Multiple headspace solid-phase microextraction*), haihtuva monomeeri kerätään analyysiä varten kiinteän polymeerinäytteen tai polymeeriliuosfaasin yläpuolisesta kaasufaasista ja niitä on käytetty muun muassa polystyreenin styreenin [21] ja polyvinyylikloridin vinyylidikloridin [22] pitoisuuksien määrittämisessä. [23] Erilaisista uuttomenetelmistä on käytetty esimerkiksi Soxhlet-uuttoa polyamidien kaprolaktaamin ja laurolaktaamin pitoisuuksien määrittämisessä [18]. Liuotusmenetelmissä polymeerinäyte liuotetaan johonkin sopivaan liuottimeen ja kyseinen liuos analysoidaan. Analyysimenetelmästä ja sen laitteistosta riippuen liuotusmenetelmissä voidaan joutua saostamaan ja suodattamaan polymeeri pois liuoksesta ennen liuoksen analysointia. [17][18]

Polylaktidien monomeerin, eli laktidin, pitoisuuden määrittämisen analyysimenetelmänä on käytetty termogravimetriä (TGA) [24], kokoerottelukromatografiaa (SEC) [25], nestekromatografiaa (HPLC) [26], Fourier-muunnos infrapunaspektroskopiaa (FTIR) [27],

ydinmagneettista resonanssispektroskopiaa (NMR) [28] ja GC:tä [4][23][25]. Laktidi on maitohapon syklinen dimeeri, jolla on kolme stereoisomeeriä: enantiomeerit L-laktidi ja D-laktidi sekä niiden diastereomeeri meso-laktidi. [29] L- ja D-laktidin raseemisesta seoksesta on käytetty nimeä D,L-laktidi [25][30]. Feng et al. määrittivät laktidipitoisuuden TGA:lla olettaen, että kaikki massahäviö lämmityksen aikana johtuu näytteestä poistuvasta laktidista. Kyseinen menetelmä on hyvin nopea ja yksinkertainen suorittaa, mutta se soveltuu vain hyvin suurille laktidipitoisuuksille. [24] HPLC:n käyttöä laktidin määrittämiseen rajoittaa se, että laktidin erottamiseen muista yhdisteistä vaaditaan liikkuvaksi nestefaasiksi veden ja orgaanisen liuottimen seos, mikä johtaa laktidin hydrolyysiin analyysin aikana. Kyseisen ongelman ratkaisemiseksi Feng et al. ovat käyttäneet HPLC-analyysissä laktidin hydrolyysin kinetiikan matemaattista mallia laktidin kvantitointiin. [23][26] FTIR-spektroskopiaa on myös käytetty laktidipitoisuuden määrittämiseen, mutta se soveltuu paremmin polymerisaatioreaktion konversion seuraamiseen [27]. SEC:ä on käytetty polylaktidien polymerisaatioreaktion konversion seuraamiseen. Sitä ei kuitenkaan voida käyttää laktidipitoisuuden määrittämiseen yli 90 % konversioilla, koska kyseisillä konversioilla merkittävässä määrin muodostuneet pieni moolimassaiset hajoamistuotteet koeluoituvat laktidin kanssa. [25]

NatureWorks-yhtiö on julkaissut polylaktidien laktidipitoisuuden määrittämiseen tarkoitettua menetelmän, jossa näytteenkäsittely perustuu liuotus-saostusmenetelmään ja analyysi tehdään GC:llä FID-detektorilla [4]. Tässä työssä käytetyt laktidipitoisuuden määrittäminen menetelmät perustuivat kyseiseen menetelmään, joka on esitetty tarkemmin luvussa 3.3. Kyseistä menetelmää on käytetty polylaktidista prosessoitujen filmien noin 1 - 3 m-% laktidipitoisuuksien määrittämiseen [23]. Alan kirjallisuudessa on käytetty myös edellä mainitun menetelmän kaltaista liuotus-saostukseen ja GC:n FID-detektorin käyttöön pohjautuvaa menetelmää, mutta erilaisilla GC-analyysin olosuhteilla [25]. Prosessoitujen polylaktidien laktidipitoisuutta on yritetty määrittää GC:llä FID-detektorilla käyttäen näytteenkäsittelyyn MHS-SPME:ää, jotta näytteenkäsittelyssä minimoitaisiin liuottimien käyttö. Määritetyt laktidipitoisuudet olivat kuitenkin vain noin tuhannesosan suuruisia NatureWorks:n kehittämään liuotus-saostusmenetelmään verrattuna, joten kyseisellä headspace-näytteenotolla ei voitu kvantitoida näytteen laktidia täysin. [23]

## 2.3 Analyysimenetelmän validointi

Analyysimenetelmän validoinnilla tarkoitetaan prosessia, jossa kokeellisesti todistetaan menetelmän tuottamien tulosten oikeellisuus ja luotettavuus sille tarkoitettussa käyttökohdassa. Menetelmän testaaminen ja alustava validointi onkin osa menetelmän kehittämistä. Joidenkin analyysimenetelmien validoinneille, esimerkiksi lääkeainepitoisuuksien määrittämiselle lääketeollisuudessa, on asetettu tarkat vaatimukset viranomaisten toimesta. Tällöin formaalin validoinnin suorittaminen ja dokumentointi ovat välttämättömiä. [19, s. 15 - 25][31, s. 5 - 7]

Validoinnin tyypistä riippumatta validointiin liittyy oleellisesti määritettävien validointiparametrien valitseminen ja niiden määrittäminen. Validointiparametrit valitaan analyysimenetelmän tyyppiin ja käyttökohteen mukaan. Validointiparametreja on olemassa lukuisia ja niihin on erilaisia määritelmiä ja määrittämissuhteita. Pitoisuutta määrittävän menetelmän validointiparametreja ovat yleensä ainakin menetelmän spesifisyys (engl. *specificity*), lineaarisuus (engl. *linearity*), toistettavuus (engl. *precision*), tarkkuus (engl. *accuracy*), määrittämissuhteiden eli LOQ (engl. *limit of quantitation*) ja toiminta-alue (engl. *range*). [31, s. 14][32, s. 119 - 121] Kyseiset parametrit määritettiin tässä työssä kehitetyille menetelmille ja ne kuvataan tarkemmin alaluvuissa 2.3.1 – 2.3.4. Parametrit on kuvattu työn menetelmän eli kaasukromatografisen pitoisuuden määrittämisen näkökulmasta. Spesifisellä määrittämissuhteen menetelmällä tarkoitetaan menetelmää, joka mittaa vain haluttua yhdistettä. Tässä työssä menetelmän spesifisyys saavutettiin kromatografialla ja MS:ää käytettäessä myös selektiivisen detektoinnin avulla. [14, s. 188] Toiminta-alue tarkoittaa menetelmällä mitattavaa pitoisuusaluetta, jolla tarkkuus ja toistettavuus ovat riittävän hyvät menetelmän tarkoitusta varten. Kyseisen alueen täytyy myös kuulua menetelmän lineaariseen alueeseen. Määrittämissuhteiden on toiminta-alueen alaraja. Siten toiminta-alue on siis monen määrittämissuhteen summa. [8, s. 100 - 105][31, s. 27 - 29][33, s. 4 - 5]

### 2.3.1 Lineaarisuus

Kaasukromatografisen pitoisuusmäärittämisen tapauksessa lineaarisuus kuvaa, kuinka hyvin kaasukromatografian detektorin vaste on suoraan verrannollinen analyysin massakonsentraatioon jollakin massakonsentraatioalueella. Yleensä menetelmää käytetään vain massakonsentraatioalueella, jolla lineaarisuus on riittävän hyvä tarkoitusta varten, eli menetelmän lineaarisella alueella. Lineaarisuuden määrittämiseen liittyy siis sekä lineaarisen alueen laajuuden että lineaarisuuden ”hyvyyden” määrittäminen. [8, s. 101][31, s. 27 - 29]

Lineaarisuuden määrittämiseksi mitataan yleensä tunnettuja standardiliuoksia 5 - 6 eri massakonsentraatiolla, jotka kattavat koko menetelmällä käytettävän massakonsentraatioalueen. Rinnakkaismäärittämissuhteet jokaisella massakonsentraatiotasolla ovat suotavia. Mittapisteiden joukkoon voidaan sovittaa suora pienimmän neliösumman menetelmällä

esimerkiksi Excel:ssä. Lineaarisuuden arviointiin käytetään yleensä ensin mittapistejoukon ja sovitesuoran silmämääräistä tarkastelua ja korrelaatiokertoimen neliötä  $R^2$ , jonka arvo lähenee yhtä lineaarisuuden parantuaessa.  $R^2$ :n arvoa 0,999 pidetään riittävän hyvänä useimpiin käyttötarkoituksiin [34, s. 12]. Lisäksi suoran y-akselin leikkauspiste ei saa poiketa huomattavasti origosta paitsi, jos sillä ei havaita olevan vaikutusta tuloksiin. [8, s. 101 - 102][33, s. 3 - 4]

Lineaarisuuden arviointiin käytetään myös mittapisteiden residuaalien tarkastelua. Mittapisteiden residuaalit lasketaan mittapisteen y-arvon ja sovitesuoran y-arvon erotuksena samalla x-arvolla eli mittapisteen y-akselin suuntaisena etäisyytenä suorasta. Residuaalit esitetään yleensä kuvaajassa mittapisteen massakonsentraation funktiona. Tällöin residuaalimittapisteiden tulee sijoittua sattumanvaraisesti x-akselin molemmin puolin, jotta lineaarinen sovitus on paras valinta sovitekäyräksi. [31, s. 27 - 29][35, s. 20 - 21]

Lisäksi voidaan verrata mittapisteiden takaisin laskettuja massakonsentraatioita niiden standardiliuosten tunnetuihin massakonsentraatioihin. Mittapisteen mitatusta y-arvosta lasketaan siis sovitesuoran yhtälöllä mitatulle standardiliuokselle massakonsentraatio, jota verrataan liuoksen tunnettuun massakonsentraatioon. Tällainen arviointi on tärkeää erityisesti massakonsentraatioalueen alapäässä, jossa esimerkiksi  $R^2$ -arvo ei välttämättä kuvaa sovituksen hyvyttä riittävästi. [14, s. 188] Hyväksyttävänä arvoina standardiliuosten takaisinlasketuille konsentraatioille voidaan pitää esimerkiksi 85 - 115 % liuosten tunnetuista massakonsentraatioista [14, s. 191]

### 2.3.2 Toistettavuus

Toistettavuus kuvaa, kuinka lähellä toisiaan rinnakkaismittausten tulokset ovat eli se kuvaa menetelmän satunnaisvirhettä. Toistettavuus ilmoitetaan yleensä mittaussarjan keskihajontana ja suhteellisena keskihajontana, joka lasketaan jakamalla keskihajonta mittaussarjan keskiarvolla. Jos mittaussarja mitataan saman näyteliuoksen useana eri rinnakkaismäärityksenä, on kyseessä mittalaitteen toimintakuntoa kuvaava instrumentin toistettavuus eli injektointitoistettavuus. Koko menetelmän toistettavuuden määrittämiseksi on mittaussarjan jokainen mittaus tehtävä erillisillä näytteillä, jotka kaikki valmistetaan menetelmän näytteenkäsittelyn mukaisesti. [8, s. 102][34, s. 13 - 15]

Toistettavuus voidaan määritellä monella tavalla riippuen siitä, minkälaisia olosuhteita mittaussarjassa on käytetty. Mitä enemmän olosuhteissa on variaatiota mittaussarjan sisällä, sitä suurempaa satunnaisvirhe on. Kun mittauslaitteisto ja mittaja ovat samat mittaussarjan sisällä, lyhyellä aikavälillä mitatun mittaussarjan toistettavuus (*repeatability*) on esimerkiksi parempi kuin usean päivän aikana mitatun mittaussarjan toistettavuus (*intermediate precision*). [8, s. 102][31, s. 35]

### 2.3.3 Tarkkuus

Tarkkuus kuvaa menetelmän systemaattista virhettä. Näytteen pitoisuuden määrittämisen tapauksessa tarkkuus kertoo siis, kuinka paljon pitoisuuden rinnakkaismittausten keskiarvo eroaa näytteen todellisesta pitoisuudesta. Tarkkuuden määrittämiseen on monia tapoja. Varmin tapa on analysoida menetelmällä sertifioidusta referenssimateriaalista valmistettuja näytteitä, joiden pitoisuus tunnetaan tarkasti. Tällaisia näytteitä ei kuitenkaan ole aina saatavissa, kuten tämän työn polymeerinäytteiden tapauksessa. Menetelmän tuloksia voidaan myös verrata jollakin toisella hyväksytyllä menetelmällä mitattuihin tuloksiin. Tarkkuus voidaan lisäksi määrittää *spiking*-mittausten avulla eli näytematriisiin lisätään tunnettu määrä tutkittavaa analyytin. *Spiking* tulee tehdä samaan näytematriisiin kuin mitä menetelmällä mitataan, joten työn tapauksessa polymeerinäytteisiin. Tarkka menetelmä pystyy mittaamaan lisätyn analyytin määrän. [8, s. 102][31, s. 30 - 31]

Tarkkuutta voidaan kuvata *spiking*-mittausten tulosten avulla lasketulla suhteellisella saannolla,  $Rec_a$  (%), joka voidaan laskea esimerkiksi yhtälöllä

$$Rec_a = \frac{m'(x) - m(x)}{m_{spike}(x)} \times 100 \%, \quad (5)$$

jossa  $m'(x)$  on määritetty analyytin  $x$  massa *spiking*-näytteessä,  $m(x)$  on analyytin  $x$  määritetty massa puhtaassa näytteessä ilman *spiking*:ä ja  $m_{spike}(x)$  on analyytin  $x$  massa *spiking*-lisäyksessä. [8, s. 102][31, s. 31] Suhteellinen saanto voidaan laskea myös yhtälöllä

$$Rec_b = \frac{m'(x)}{m_{spike}(x) + m(x)} \times 100 \%, \quad (6)$$

jossa suureet ovat vastaavat kuin yhtälössä 5 [4]. Yhtälön 6 osoittajana on analyytin  $x$  määritetty massa *spiking*-näytteessä ja nimittäjänä on kyseisen *spiking*-näytteen tunnettu massa. Yhtälöllä 6 lasketusta arvosta esimerkiksi 105 %:sta saadaan suoraan mittauksen systemaattiseksi virheeksi 5 %, sillä havaittu mittaustulos on suhteutettu suoraan tunnettuun arvoon. Jos  $m_{spike}(x)$  on suuri verrattuna  $m(x)$ :ään, yhtälöt 5 ja 6 antavat lähes samat tulokset.

### 2.3.4 Määrittäysraja

Määrittäysrajalla eli LOQ:lla (engl. *limit of quantitation*) tarkoitetaan menetelmän pienintä mitattavissa olevaa massakonsentraatiota, jossa tarkkuus ja toistettavuus ovat riittävän hyvät. Määrittäysrajaan liittyy suure toteamisraja (engl. *limit of detection*), joka on pienin massakonsentraatio, jossa analyytin voidaan riittäväällä varmuudella havaita. Määrittäysraja kertoo siis menetelmän massakonsentraatioalueen alarajan kvantitatiiviselle analyysille

ja toteamisraja kvalitatiiviselle analyysille. Määritysraja on aina suurempi kuin toteamisraja. [31, s. 24][32, s. 71]

Mittalaitteen määritysrajan arviointiin on olemassa yleissääntö. Sen mukaan määritysraja on analyytin massakonsentraatio, jossa analyytin aiheuttaman detektorisignaalin ja detektorisignaalin taustakohinan suhde eli signaalikohinasuhde on suurempi kuin 10. Kromatogrammilta signaalikohinasuhde voidaan arvioida esimerkiksi analyytin piikin korkeuden ja kromatogrammin *baseline*:n kohinan korkeuden suhteena. [32, s. 71]

Määritysraja voidaan määrittää myös mittaamalla näytteitä, joissa analyytin pitoisuus on lähellä määritysrajan arvoa. Näytteiden pitoisuuden tulee olla korkeintaan 1 - 5 kertainen määritysrajaan nähden. Määritysraja voidaan tällöin laskea mittaussarjan keskihajonnan,  $s$ , avulla yhtälöllä

$$\text{LOQ}(s') = 10 s' = \frac{10 s}{\sqrt{X}}, \quad (7)$$

jossa  $X$  on menetelmässä käytettävä rinnakkaismittausten lukumäärä jokaiselle tutkittavalle näytteelle. [8, s. 103][31, s. 24 - 25]

Vaihtoehtoisesti määritysrajan suuruus voidaan arvioida kalibrointisuoran avulla. Tällöin määritysraja lasketaan esimerkiksi yhtälöllä

$$\text{LOQ}(s_b) = \frac{10 s_b}{k_{kk}}, \quad (8)$$

jossa  $k_{kk}$  on kalibrointisuoran kulmakerroin ja  $s_b$  on kalibrointisuoran y-akselin leikkauspisteen keskiarvo.  $s_b$  saadaan selville kalibrointisuoran regressioanalyysillä esimerkiksi Excel:ssä LINREGR-funktiolla. [32, s. 71 - 72][33, s. 8 - 9]

## 3. TYÖSSÄ KÄYTETYT MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Työn kokeellisen osan tarkoituksena oli kehittää TTY:n ELT-laitokselle maaliskuussa 2015 asennetulle Shimadzun GCMS-QP2010 Ultra -kaasukromatografi-massaspektrometrille analyysimenetelmä polymeerinäytteiden, erityisesti lääketieteellisen laadun polylaktidien, laktidipitoisuuden määrittämiseen. Polymeerimateriaalin laktidipitoisuudella tarkoitetaan tässä työssä laktidin massaprosenttisuutta polymeerinäytteessä. Alaluvussa 3.1 on ensin kuvattu kokeellisessa työssä käytetyt polymeerimateriaalit, liuottimet ja standardiyhdisteet. Alaluvussa 3.2 on sitten kuvattu työssä käytetty GCMS-laitteisto.

Tässä luvussa kuvataan lisäksi työssä kehitetyt ja testatut menetelmät laktidipitoisuuden määrittämiseen. Kehitetyt menetelmät perustuvat NatureWorks:n kehittämään menetelmään [4], joka on kuvattu alaluvussa 3.3. Kyseisestä menetelmästä kehitettiin omat menetelmänsä käytetyn GCMS-laitteiston MS- ja FID-detektoreille. Kehitetyistä menetelmistä käytetään jatkossa nimiä GCMS-menetelmä ja GCFID-menetelmä käytetyn detektorin mukaan. Kehitetyt menetelmät on kuvattu alaluvussa 3.4. Menetelmien kehittäminen ja GC-analyysin ajoasetusten optimointi on kuvattu luvussa 4. Työn tavoitteena oli myös luoda GCMS-QP2010 Ultra -laitteiston käyttöohjeet kyseisen laitteiston laitekansion. Työssä luodut laitekansion osat on esitetty liitteessä M. Kehitettyjen menetelmien testaus eli alustava validointi on esitetty luvussa 5.

### 3.1 Materiaalit

Kokeellisessa työssä käytettiin sekä TTY:n ELT-laitokselle hankittuja granulaattisia polymeerimateriaaleja että ELT-laitoksen biomateriaalien prosessointilaboratoriossa prosessoituja polymeerimateriaaleja. Granulaattiset polymeerimateriaalit olivat lääketieteellisen laadun poly-L/D-laktidi 96L/4D -kopolymeeri (Purac Biochem, Purasorb, PLD9620, lot 1405002058) ja bulkkilaatuinen polylaktidi (Revode 190, L130). Edellä mainituista materiaaleista käytetään jatkossa nimiä PLDLA96/4 ja BulkkiPLA.

Työssä käytetyt TTY:llä prosessoidut polymeerimateriaalit oli prosessoitu ennen työn aloittamista eikä niiden prosessointi kuulunut tähän työhön. Prosessointiin oli käytetty lääketieteellisen laadun poly(L-laktidi-ko-ε-kaprolaktoni) 70/30 -kopolymeeriä. Kokeellisessa työssä käytettiin kahta kyseisestä materiaalista tankomaiseksi näytteeksi ekstruusiolla prosessoitua materiaalia: sellaisenaan vuonna 2013 prosessoitua materiaalia (prosessointi TSE131216), josta käytetään jatkossa nimeä PLCL, ja kyseisestä kopolymeeristä ja trikalsiumfosfaattikeraamista vuonna 2014 prosessoitua 50/50-massaprosenttista komposiittia (prosessointi TSE140204), josta käytetään jatkossa nimeä PLCL/TCP.



PLCL-materiaalin laktidipitoisuudeksi oli mitattu 0,16 m-% kaupallisella GCFID-analyysimenetelmällä (Rambol Analytics Oy, Lahti, Finland, 2014) ja PLCL/TCP-materiaalin laktidipitoisuudeksi 0,08 m-% koko näytteen massasta (Rambol Analytics Oy, Lahti, Finland, 2014). PLCL/TCP:n laktidipitoisuudeksi oli mitattu siis 0,16 m-%, kun massa-prosentti lasketaan huomioiden vain polymeerin massa koko näytteen massan sijaan. Kyseiset PLCL- ja PLCL/TCP-materiaalit olivat ainoat työhön saadut materiaalit, joiden laktidipitoisuus tunnettiin entuudestaan.

Kokeellisessa työssä käytetyt liuottimet olivat dikloorimetaani, asetoni ja sykloheksaani (Sigma-Aldrich). Liuottimet olivat MS-analyysiin tarkoitettua puhtausluokkaa. Määrittymenetelmien kalibroinnin standardiliuosten valmistukseen käytettiin kiinteää L-laktidia (Purac Biochem). Työn aikana käytetty L-laktidi säilöttiin vakuumissa. Määrittymenetelmien sisästandardina käytettiin kiinteää analyysilaatuista 2,6-dimetyyli- $\gamma$ -pyronia (Sigma-Aldrich), joka säilöttiin työn aikana jääkaapissa.

### 3.2 Kaasukromatografi-massaspektrometrilaitteisto

Työssä käytetyn GCMS-laitteiston, eli Shimadzun GCMS-QP2010 Ultra:n, pääosat ovat kapillaarikaasukromatografi GC-2010 Plus, kvadrupolimassaspektrometri, esivakuumpumppu, nestemäisten näytteiden 12-paikkainen automaattinen näytteensyöttäjä AOC-20i ja PC-tietokone laitteiston hallintaan. Kapillaarikaasukromatografi sisälsi *split/splitless*-injektorin nestemäisille näytteille ja FID-2010 Plus -liekki-ionisaatiodektorin. Massaspektrometri sisälsi lisäksi kaksivaiheisen turbomolekulaarisen vakuumpumpun ja sen ionilähde toimi elektroni-ionisaatiolla 70 eV:n ionisaatioenergialla. Automaattinen näytteensyöttäjä sisälsi 10  $\mu$ l Hamilton ruiskun näytteiden injektointiin ja siinä käytettiin 1,5 ja 4  $\text{cm}^3$ :n näytepulloja, jotka oli varustettu haihtumisen estävillä septumeilla. Injektorissa käytettiin Shimadzun GCMS-laitteiston kulutustarvikkeisiin kuuluvia *splitless*-injektioon tarkoitettuja deaktivoituja linereita (*part number* 221-48876-03), joissa oli pohjalla deaktivoitua lasivillaa ja kapeneva pohja (*tapered bottom*) [36]. Deaktivoitua lasivillaa käytettiin linereissa suojelemaan kolonnia epäpuhtauksilta kuten septumin partikkeleilta [37, s. 11].

GCMS-QP2010 Ultra:n kantajakaasuna ja FID:n detektorikaasuna käytettiin heliumia (He 5.0 eli 99,999 %:n puhtausluokka), joka johdettiin laitteistoon kaasupullosta. Myös FID:n käyttöön vaadittu ilma johdettiin kaasupullosta, joka sisälsi typen ja hapen muodostamaa kuivaa ”synteettistä” ilmaa. FID:n vaatima vety tuotettiin sen sijaan Peak Scientific:n Precision Hydrogen -vetygeneraattorilla tislatusista vedestä.

Laitteistoon oli hankittu ja asennettu *switching unit*, jonka avulla kolonnista tuleva kaasuvirtaus voidaan jakaa joko MS:lle tai FID:lle. *Switching unit*:a ei kuitenkaan asennuksessa saatu toimimaan laitteiston myyjän toimesta, joten sitä ei käytetty tämän työn aikana. Tässä työssä kolonni kiinnitettiin manuaalisesti kulkemaan kaasukromatografian injektorilta joko MS:lle tai FID:lle.

GCMS-QP2010 Ultra:ssa käytetään kapillaarikolonneja ja tässä työssä käytettiin Phenomenex:n keskipoolisuuden ZB-50 kapillaarikolonna, jonka stationaarifaasina on poly(50%-fenyyl-50%-dimetyylisiloksaani). Kolonnin pituus oli 30 m, sisähalkaisija 0,25 mm ja stationaarifaasin filmin paksuus 0,25  $\mu\text{m}$ . Kolonni oli hankittu vastaamaan NatureWorks:n määritysmenetelmässä käytettyä kolonna.

Laitteistoa hallittiin tietokoneen GCMSsolution-ohjelmiston GCMS Real Time Analysis -ohjelmalla. Massaspektrometrin mittaustulosten käsittely tehtiin GCMS Postrun Analysis -ohjelmalla ja FID:n mittaustulosten käsittely GCSolution-ohjelmistolla. Tietokone sisälsi myös NIST11 EI-massaspektrikirjaston, jota käytettiin GCMS:llä mitattujen massaspektrien tunnistamiseen.

### 3.3 NatureWorks:n laktidipitoisuuden määritysmenetelmä

Työssä kehitetyt laktidipitoisuuden määritysmenetelmät perustuivat NatureWorks:n menetelmään [4]. Kyseinen menetelmä on tarkoitettu polylaktidien laktidipitoisuuden määrittämiseen laktidipitoisuuksilla 0,1 - 5 m-% ja siinä näyteliuosten kvantitatiivinen analyysi tehdään GC:llä FID-detektorilla. Se on lisäksi sisäisen standardin menetelmä ja näytteenkäsittelyn osalta se voidaan luokitella liuotus-saostus-menetelmäksi, sillä polymeerinäyte ensin liuotetaan dikloorimetaaniin ja sitten saostetaan sykloheksaanilla. Kalibrointiin menetelmässä käytetään 1-pistekalibrointia eli jokaista näyteliuosten mittaussarjaa varten valmistetaan yksi mitattava standardiliuos. Pysyvää kalibrointia ei siis käytetä. Standardiliuoksen varsinaisena standardiyhdisteenä on L-laktidi ja sisästandardina 2,6-dimetyyli- $\gamma$ -pyroni. [4]

NatureWorks:n menetelmässä mitattava standardiliuos valmistuu kolmessa vaiheessa: kantaliuosten, Vial 1 -liuoksen ja Vial 2 -liuoksen valmistuksella. Vial 2 -liuos on GC:iin injektointi mitattava liuos. Menetelmässä valmistetaan L-laktidista ja sisästandardista kantaliuokset, joissa liuottimena on dikloorimetaani. Kantaliuosten massakonsentraatiot ovat noin 10 000  $\mu\text{g cm}^{-3}$ . Vial 1 -vaiheen standardiliuos valmistetaan pipetoimalla automaattipipetillä 1  $\text{cm}^3$  sekä L-laktidin että sisästandardin kantaliuosta 20  $\text{cm}^3$ :n näytepulloon, ja lisäämällä 18  $\text{cm}^3$  dikloorimetaania pulloannostelijan avulla. Mitattava standardiliuos, eli Vial 2 -vaiheen liuos, valmistetaan lisäämällä uuteen näytepulloon 3  $\text{cm}^3$  asetonia, 1  $\text{cm}^3$  Vial 1 -liuosta automaattipipetillä ja 16  $\text{cm}^3$  sykloheksaania. Asetonin ja sykloheksaanin lisäykset on menetelmässä tehty pulloannostelijoilla. Asetonin lisäyksen syytä ei ole mainittu menetelmän ohjeessa. Mahdollinen syy sen lisäykseen pulloon ennen polymeeriliuoksen pipetointia on estää pipetoitavan dikloorimetaanin pienen tilavuuden haihtuminen, mikä voisi haitata laktidin liukenemistä lisäävään nestefaasiin. Asetonin käyttö voi myös liittyä GC:hen injektointi liuoksen poolisuuden suurentamiseksi kolonnin poolisuuteen paremmin sopivaksi, mikä liuotinloukun käytön takia voi johtaa parempaan kromatogrammiin piikkien muotoihin. Polymeerinäytteestä valmistetaan näyte-liuos Vial 1 ja Vial 2 -liuosvaiheiden mukaisesti kuten standardiliuoksen valmistuksessa. Näyteliuoksen tapauksessa Vial 1 -liuoksen näytepulloon punnitaan kuitenkin noin 1000

mg:n polymeerinäyte ja valmistetuista kantaliuoksista sinne lisätään vain sisästandardin kantaliuosta. Vial 1 -liuosta lisäksi sekoitetaan tasoravistelijassa kunnes polymeerinäyte on liuennut. Sykloheksaanin lisäys saostaa polymeerin Vial 2 -liuoksessa. Saostuksen tarkoituksena on minimoida mitattavaan näyteliuokseen päätyvien polymeeri- ja oligomeerimolekyylien määrät. GC:n injektoidut haihtumattomat epäpuhtaudet voivat kertyä injektorin lineriin ja kolonniin. Epäpuhtaudet voivat vaikuttaa mittaukseen muun muassa adsorption takia ja ne voivat heikentää kolonnin elinikää [18]. Oligomeerit voivat lisäksi hajota termisesti laktidiksi injektorissa, jonka takia menetelmässä käytetään injektorin lämpötilana poikkeuksellisen alhaista 200 °C:een lämpötilaa. Vial 2 -liuosvaiheen standardiliuoksesta siirretään osa suoraan GC:n näytepulloon, mutta näyteliuoksesta siirretään osa GC:n näytepulloon 0,45 µm:n ruiskusuodattimella varustetulla kertakäyttöisellä injektoriruiskulla. Polymeerinäytteestä, jonka laktidipitoisuus on 1,0 m-%, valmistetun mitattavan näyteliuoksen laktidin ja sisästandardin massakonsentraatiot ovat 25 µg cm<sup>-3</sup>. Myös mitattavan standardiliuoksen vastaavat massakonsentraatiot ovat 25 µg cm<sup>-3</sup>. [4]

NatureWorks:n menetelmän ohjeessa GC-analyysi tehdään Agilentin 6890 -kaasukromatografilla käyttäen FID-detektoria, suoraa höyrystävää injektointia ja automaattista näytteenottoa. Kantajakaasuna on käytetty vetyä, jonka vakiovirtausnopeus kolonnissa on 1,8 ml min<sup>-1</sup>. *Splitless*-jakson aikana on käytetty 60 sekuntia. Injektorin lämpötilana on 200 °C ja injektioilavuutena 1 µl. Menetelmässä käytetään Agilentin DB-17MS-kapillaarikolonnia, jonka pituus on 30 m, sisähalkaisija 0,25 mm ja stationaarifaasin paksuus 0,25 µm. Kyseisellä kolonnilla laktidienantiomeerit, eli L- ja D-laktidi, eluoituvat kromatogrammin samana piikkinä. Kolonnin lämpötila on *splitless*-jakson aikana 50 °C, jolloin injektoinnin aikana hyödynnetään liuotinloukkuja. Jakoventtiilin avauksen jälkeen kolonnin lämpötilaa nostetaan nopeudella 25 °C min<sup>-1</sup> loppulämpötilaan 320 °C, jossa kolonnin lämpötila pidetään 5 minuutin ajan. FID:n lämpötilana on käytetty 335 °C:tta. Kyseisissä olosuhteissa L- ja D-laktidin piikin retentioaika on noin 5,47 min. Meso-laktidi eluoituu kuitenkin ennen enantiomeerejä retentioajalla 5,20 min. Sisästandardi eluoituu retentioajalla 5,73 min. [4]

NatureWorks:n menetelmässä standardiliuokselle mitatusta kromatogrammista mitataan laktidi- ja sisästandardipiikkien pinta-alat ja lasketaan yhtälön 3 mukaisesti *response factor*:n arvo. Massakonsentraatioiden sijaan laskuissa käytetään kuitenkin massoja. Laktidi- ja sisästandardipiikit tunnistetaan niiden retentioaikojen perusteella. Määritettyä *response factor*:n arvoa käytetään sen jälkeen yhtälön 4 tapaan näytteen sisältämän laktidin massan ja näytteen laktidipitoisuuden laskemiseen, mihin käytetään näyteliuoksella mitatun kromatogrammin piikkien pinta-aloja. Meso-laktidin massa näytteessä ja pitoisuus on laskettu vastaavasti meso-laktidin piikin pinta-alan avulla yhtälön 4 mukaisesti, jolloin *response factor*:n oletetaan olevan sama kaikille laktidi-isomeereille. [4]

### 3.4 Työssä käytetyt GCMS- ja GCFID-menetelmät

Työssä polymeerinäytteen laktidipitoisuuden määrittämiseen kehitetyt ja käytetyt GCMS- ja GCFID-menetelmät perustuivat aluvuossa 3.3 kuvattuun NatureWorks:n menetelmään. Käytetyt menetelmät erosivat kuitenkin joltain osin NatureWorks:n menetelmästä. Käytetyissä menetelmissä kalibrointi tehtiin 1-pistekalibroinnin sijaan 3-pistekalibroinnilla eli yhden standardiliuoksen sijaan mitattiin kolme standardiliuosta, sillä se on luotettavampi [19, s. 25]. Lisäksi laktidipitoisuus haluttiin pystyä määrittämään noin 0,05 - 1,0 m-% alueella. Kummassakin kehitetyssä menetelmässä kolmen standardiliuoksen laktidin massakonsentraatiot vastasivat noin 0,1; 0,25 ja 0,5 m-%:a polymeerinäytteen laktidipitoisuudeksi muunnettuna. Standardiliuoksista käytetään nimiä standardi 1, 2, ja 3 laimeimmasta väkevimpään. Jokaisen saman mittaussarjan standardi- ja näyteliuoksen valmistukseen käytettiin aina samaa sisästandardin kantaliuosta, ja kyseinen kantaliuos valmistettiin siten, että sisästandardin massakonsentraatio vastasi noin standardin 2 laktidin massakonsentraatiota.

NatureWorks:n menetelmästä poiketen molemmissa käytetyissä menetelmissä käytettiin kalibrointitapana origon kautta kulkevaa ja kolmen standardiliuoksen mittauspisteiden joukkoon sovitettua kalibrointisuoraa *response factor*:ien laskemisen sijaan. Tämä osoitautui käytännön kannalta paremmaksi tavaksi, sillä mittaustulosten tarkasteluun käytetyissä ohjelmissa oli sisään rakennettu kalibrointisuoran määrittäminen ja käyttö. Kolmen standardiliuoksen mittauksien perusteella voidaan vaihtoehtoisesti myös laskea yhtälön 3 mukainen *response factor* kyseisten mittausten keskiarvona ja käyttää sitä yhtälön 4 mukaisesti tuntemattoman näytteen mittaustuloksen laskemiseen. Molempien tapojen havaittiin antavan kuitenkin samat tulokset. NatureWorks:n menetelmän tapaan kalibrointi määritettiin aina ennen varsinaisten näyteliuosten mittaamista jokaisena mittauspäivänä. Kalibrointisuora määritettiin mittaamalla kolme standardiliuosta, jotka valmistettiin aina kyseisenä mittauspäivänä joko säilötyistä tai uusista kantaliuoksista. Säilötyjä kantaliuoksia ei käytetty yhtä arkiviikkoa kauempaa. Saman mittauspäivän aikana valmistettuihin ja mitattuihin standardiliuoksiin ja näyteliuoksiin lisättiin aina samaa sisästandardinkantaliuosta. Pysyvää kalibrointia ei käytetty, mikä on yleistä kyseisenkaltaisissa määrittämenetelmissä [4][18][22].

GC-analyysiin käytetty laitteisto, joka kuvattiin aluvuossa 3.2, erosi NatureWorks:n menetelmässä käytetystä laitteistosta. Kolonniksi oli laitteistoon valittu NatureWorks:n menetelmässä käytettyä DB-17MS kolonnia vastaava eri valmistajan ZB-50 kolonni. Laitteiston kantajakaasuksi oli laitteistoa hankittaessa puolestaan valittu helium NatureWorks:n menetelmässä käytetyn vedyn sijaan. Helium soveltuu vetyä paremmin GCMS-laitteistoilla käytettäväksi, koska muun muassa vakuumpumppujen tulee olla tehokkaampia käytettäessä vetyä heliumin sijaan [12, s. 156]. Myös käytetty injektorin lineri erosi NatureWorks:n menetelmän linerista siten, että käytetyt linerit olivat kapenevia vain pohjasta ja ne sisälsivät deaktivoitua lasivillaa. Lasivilla voi joidenkin yhdisteiden ta-

pauksessa vaikuttaa yhdisteen hajoamiseen ja adsorptioon injektorissa [38, s. 2]. NatureWorks:n menetelmässä käytettiin molemmista päistä kavennettua (*double tapered*) lineria, jolla voidaan mahdollisesti minimoida analyyttien hajoaminen injektorissa paremmin kuin työssä käytetyllä linerilla [37, s. 11]. GCMS-menetelmää käytettäessä linereissa oli vielä tehdaspakatut lasivillat paikallaan, mutta GCFID-menetelmää käytettäessä lasivillat oli vaihdettu linerin puhdistuksen yhteydessä ja pakattu lineriin itse, mikä voi ehkä aiheuttaa enemmän hajontaa GCFID-mittauksiin. Myös GC-analyyseissä käytetyt ajoasetukset erosivat joidenkin parametrien osalta NatureWorks:n menetelmästä. Ajoasetusten säätö ja optimointi on kuvattu luvussa 4. Laitteiston ylläpitoon liittyviä toimenpiteitä olivat näytteenäytteen ruiskun pesu, septumin vaihtaminen, linerin vaihtaminen ja kolonin puhdistus, jotka tehtiin liitteessä M (laitekansio) esitetyillä tavalla.

Laktidin massakonsentraatiolla ja laktidipitoisuudella tarkoitetaan jatkossa L- ja D-laktidien yhteistä massakonsentraatiota ja pitoisuutta, sillä käytetyillä menetelmillä niitä ei voida erottaa toisistaan ja meso-laktidia ei työn mittauksissa havaittu. Myös laktidipiikillä tarkoitetaan L- ja D-laktidin piikkiä kromatogrammilla.

Standardiliuosten ja näyteliuosten valmistus tehtiin GCMS- ja GCFID-menetelmissä NatureWorks:n menetelmän periaatteen mukaisesti. GCMS- ja GCFID-menetelmissä käytetyt näytteenkäsittelyt, GC-analyysin ajoasetukset ja laskentakaavat on kuvattu tarkemmin alaluvuissa 3.4.1 ja 3.4.2. GCMS-menetelmässä käytetty näytteenkäsittely erosi NatureWorks:n menetelmän näytteenkäsittelystä enemmän kuin GCFID-menetelmässä johtuen muun muassa siitä, että MS:llä ei voida mitata yhtä suuria massakonsentraatioita kuin FID:llä. GCMS- ja GCFID-menetelmien näytteenkäsittelyissä käytettiin myös joitakin eri laboratoriovälineitä. Tämä johtui siitä, että GCFID-menetelmän näytteenkäsittelyssä käytettyjä välineitä ei ollut vielä käytettävissä, kun GCMS-mittauksia tehtiin. GCMS-laitteiston FID-detektori saatiin käyttöön vasta työn loppuvaiheessa. Molemmissa menetelmissä polymeerinäytteistä valmistettiin noin puolet laimeammat polymeeriliuokset kuin NatureWorks:n menetelmässä, sillä suuri viskoosisuus haittasi polymeeriliuosten pipetointia käytetyillä lasisilla täyspipeteillä. Käytettyjä liuottimia kestäviä automaattipipettejä ei ollut saatavilla.

### 3.4.1 Käytetty GCMS-menetelmä

Tässä alaluvussa kuvataan ensin GCMS-mittauksissa käytetty näytteenkäsittely. GCMS-menetelmässä standardiliuokset valmistettiin neljässä vaiheessa, jotka olivat kantaliuosten; Vial 1 -liuosten; Vial 2 -liuosten ja Vial 3 -liuosten valmistaminen. Polymeerinäytteestä valmistettiin näyteliuos edellä mainittujen kolmen viimeisen vaiheen avulla. GCMS-menetelmään lisättiin Vial 3 -liuosvaihe ylimääräiseksi laimennusvaiheeksi.

Näytteen käsittelyn jälkeen on kuvattu GCMS-analyyseissä käytetyt ajoasetukset. Lopuksi on kuvattu mittaustulosten käsittely.

## Kantaliuosten valmistaminen

Standardeille 1, 2, ja 3 valmistettiin omat laktidin kantaliuokset punnitsemalla analyysivaakalla 20 cm<sup>3</sup>:n mittapulloihin kiinteää L-laktidia eri massat. Myös sisästandardista valmistettiin oma kantaliuos punnitsemalla 50 cm<sup>3</sup>:n mittapulloon kiinteää 2,6-dimetyyli- $\gamma$ -pyronia. Kantaliuosten valmistus on esitetty taulukossa 3.1. Taulukossa esitetyt punnitut laktidin massat,  $m_{kl}(La)$  (mg), sisästandardin massat,  $m_{kl}(IS)$  (mg), ja niistä lasketut kantaliuosten laktidin massakonsentraatio,  $c_{kl}(La)$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ), ja sisästandardin massakonsentraatio,  $c_{kl}(IS)$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ), ovat likimääräisiä arvoja, joihin punnituksissa pyrittiin. Massakonsentraatio on laskettu punnitun massan ja kantaliuoksen tilavuuden,  $V_{kl}$  (cm<sup>3</sup>), suhteena. Kantaliuosten punnitut analyytit liuotettiin dikloorimetaaniin kuten Nature-Works:n menetelmässä.

**Taulukko 3.1.** *Kantaliuosten valmistaminen GCMS-menetelmässä.  $m_{kl}(La)$  ja  $m_{kl}(IS)$  ovat laktidin ja sisästandardin massat kantaliuoksessa,  $c_{kl}(La)$  ja  $c_{kl}(IS)$  ovat niiden kantaliuosten massakonsentraatiot ja  $V_{kl}$  on kantaliuoksen tilavuus.*

Kantaliuos	$m_{kl}(La)$ (mg)	$m_{kl}(IS)$ (mg)	$V_{kl}$ (cm <sup>3</sup> )	$c_{kl}(La)$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	$c_{kl}(IS)$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )
Standardi 1	10,00	-	20,0	500	-
Standardi 2	25,00	-	20,0	1250	-
Standardi 3	50,00	-	20,0	2500	-
Sisästandardi	-	62,50	50,0	-	1250

## Mitattavien standardiliuosten valmistaminen

Standardien 1, 2 ja 3 kantaliuoksista valmistettiin Vial 1 -liuokset pipetoimalla täyspipetillä 1 cm<sup>3</sup> vastaavaa kantaliuosta 20 cm<sup>3</sup>:n mittapulloon. Jokaiseen Vial 1 -liuokseen pipetoitiin täyspipetillä lisäksi 1 cm<sup>3</sup> sisästandardin kantaliuosta. Mittapullot täytettiin merkkiin asti dikloorimetaanilla.

Standardien 1, 2 ja 3 Vial 1 -liuoksista valmistettiin Vial 2 -liuokset pipetoimalla täyspipetillä 1 cm<sup>3</sup> vastaavaa Vial 1 -liuosta 25 cm<sup>3</sup>:n lasipulloon, johon oli lisätty ensin täyspipetillä 3 cm<sup>3</sup> asetonia. Pulloihin lisättiin vielä 16 cm<sup>3</sup> sykloheksaania mittapipetillä, jolloin liuostilavuus oli yhteensä 20 cm<sup>3</sup>.

Standardien 1, 2 ja 3 Vial 2 -liuoksista valmistettiin mitattavat Vial 3 -liuokset pipetoimalla täyspipetillä 1 cm<sup>3</sup> vastaavaa Vial 2 -liuosta 10 cm<sup>3</sup>:n mittapulloon, johon lisättiin 1 cm<sup>3</sup> asetonia ja joka täytettiin sykloheksaanilla. Vial 3 -liuoksista siirrettiin osa GC:n näytepulloihin, ja kyseiset standardiliuokset analysoitiin GCMS:llä.

Taulukossa 3.2 on esitetty tavoitteelliset mitattavien Vial 3 -liuosten laktidin massakonsentraatiot,  $c_{v3}(La)$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ) ja sisästandardin massakonsentraatiot,  $c_{v3}(IS)$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ). Massakonsentraatiot lasketaan kantaliuosten punnitustulosten avulla yhtälöllä

$$c_{v3}(La) = \frac{c_{v2}(La)}{10} = \frac{c_{v1}(La)}{20 \times 10} = \frac{c_{kl}(La)}{20 \times 20 \times 10} = \frac{m_{kl}(La)}{4000V_{kl}}, \quad (9)$$

jossa  $c_{v2}(La)$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ) ja  $c_{v1}(La)$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ) ovat laktidin massakonsentraatiot Vial 1 ja Vial 2 -liuoksissa. Yhtälössä on huomioitu laimennuskertoimet 1/20, 1/20 ja 1/10 kantaliuoksen ja Vial 3 -liuoksen välillä. Taulukon 3.2 arvot on laskettu taulukon 3.1 tavoitteellisten punnitustulosten perusteella. Sisästandardin massakonsentraatio on sama kaikissa standardeissa ja se voidaan laskea kuten laktidin massakonsentraatio.

**Taulukko 3.2.** GCMS-menetelmän standardiliuosten tavoitteelliset massakonsentraatiot.  $c_{v3}(La)$  ja  $c_{v3}(IS)$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ) ovat mitattavien Vial 3 -liuosten laktidin ja sisästandardin massakonsentraatiot.

Standardi	Kantaliuos	Mitattava Vial 3 -liuos	
	$c_{kl}(La)$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	$c_{v3}(La)$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	$c_{v3}(IS)$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )
1	500	0,125	0,313
2	1250	0,313	0,313
3	2500	0,625	0,313

## Näyteliuoksen valmistaminen

Polymeerinäytteestä valmistettiin näyteliuos standardiliuosten tapaan Vial 1, Vial 2 ja Vial 3 -liuosvaiheiden avulla. Vial 1 -liuosvaiheessa näytettä punnittiin analyysivaa'alla 500 mg (suure  $m_{\text{näyte}}$ ) 20  $\text{cm}^3$ :n mittapulloon, joka täytettiin sitten hieman yli puolen välin dikloorimetaanilla. Polymeerin annettiin liueta dikloorimetaaniin yön yli, jonka jälkeen liuosta sekoitettiin mittapulloa heiluttaen. Liukenemisen jälkeen lisättiin 1  $\text{cm}^3$  sisästandardin kantaliuosta täyspipetillä ja sekoituksen jälkeen mittapullo täytettiin merkkiin asti dikloorimetaanilla.

Vial 1 -liuoksesta valmistettiin Vial 2 ja Vial 3 -liukset kuten standardiliuosten tapauksessa. Sykloheksaanin lisäys kuitenkin saostaa polymeerin Vial 2 -liuosvaiheessa. Siksi osa Vial 2 -liuoksen liuosfaasista suodatettiin ensin 0,45  $\mu\text{m}$  GHP-ruiskusuodattimella ja 10  $\text{cm}^3$ :n BD:n kertakäyttöisellä injektioruiskulla ennen pipetointia Vial 3 -liukseen. Saostumisen annettiin tapahtua noin 20 - 30 min ajan.

## GCMS-analyysin ajoasetukset

GCMS-mittauksissa standardi- ja näyteliuokset injektointiin automaattisen näytteensyöttäjän avulla, ja 1 µl käytettiin injektointitulavuutena kaikissa mittauksissa. Näytteensyöttäjän ruisku huuhdeltiin automaattisesti yhteensä 15 kertaa eri mittausten välillä, ja huuhdelun liuottimina käytettiin asetonia ja sykloheksaania. Injektointi tehtiin suoralla höyrystävällä injektoinnilla, jonka *splitless*-jakson pituus oli 60 sekuntia. Kantajakaasun virtauksen lineaarisena virtausnopeutena käytettiin 35 cm s<sup>-1</sup> ja se pidettiin vakiona analyysin ajan. *Splitless*-jakson aikana virtausta kontrolloitiin kuitenkin injektorin 100 kPa:n vakiopaineella laitteiston niin sanotun *High Pressure Injection* -toiminnon avulla. Injektorin septumin huuhteluun käytettiin virtausnopeutta 3 ml min<sup>-1</sup>. Injektorin lämpötilana käytettiin 200 °C:ta.

Kolonnin lämpötilana käytettiin 50 °C:tta *splitless*-jakson aikana, jonka jälkeen kolonnin lämpötilaa nostettiin nopeudella 15 °C min<sup>-1</sup> lämpötilaan 200 °C:tta asti. Tämän jälkeen lämpötilaa nostettiin vielä nopeudella 50 °C min<sup>-1</sup> loppulämpötilaan 320 °C:tta asti, jona lämpötila pidettiin analyysin loppuun asti 5 minuutin ajan. Analyysin kesto injektoinnista lämpötilaohjelman loppuun asti oli siis yhteensä 18,4 min.

Kolonnin ja MS:n välisen liitoksen lämpötilana käytettiin 310 °C:tta ja ionisaatiokamion lämpötilana 200 °C:tta. MS-mittaus aloitettiin 3,2 min kuluttua injektoinnista, jotta liuotinpiikki ei saturoinut MS:n detektoria, ja sitä jatkettiin analyysin loppuun asti. Mittaus tehtiin SIM:llä, ja yksittäisen mittauspisteen aikaikkunana käytettiin 0,20 sekuntia. SIM:llä mitattiin ioneja *m/z*-arvoilla 124, 69, 56, 45 ja 43. Massaspektrometri viritettiin laitteiston automaattisella *Autotuning*-toiminnolla viikoittain laitteiston valmistajan ohjeiden mukaisesti. Virityksen toimintakunto tarkistettiin mittauspäivien mittauksia ennen *SystemCheck*-toiminnon avulla.

Laktidipiikki eluoitui kyseisillä ajoasetuksilla noin 8,9 min retentioajalla ja sisästandardin piikki noin 9,5 min retentioajalla. Meso-laktidin piikin retentioaikaa ei tiedetä, sillä sitä ei havaittu missään mittauksessa ja meso-laktidistandardia ei ollut saatavilla. Laktidipiikki havaittiin hyvin symmetrisenä piikkinä, mutta sisästandardipiikissä havaittiin pientä hännänmuodostusta kuten NatureWorks:n menetelmäohjeessa esitetystä kromatogrammissakin [4].

## Mittaustulosten käsittely

Mitattujen kromatogrammien laktidi- sisästandardipiikit integroitiin laitteiston GCMS Postrun Analysis -ohjelmalla automaattisella integroinnilla, jossa käytettiin aina samoja integrointiparametrien arvoja. Laktidin kvantitointi-ionina käytettiin ionia *m/z* = 56 ja tunnisteioneina ioneja *m/z* = 45 ja 43. Siis laktidipiikin pinta-ala määritettiin ionin *m/z* = 56 kromatogrammista. Tunnisteionien avulla tunnistettiin oikea piikki integrointia varten. Tunnistukset tehtiin retentioaikaväleillä 8,9 ± 0,3 min ja 9,5 ± 0,3 min, ja tunnisteionien



ionisuhde, eli ionin suhteellinen intensiteetti kvantitointi-ioniin nähden, sai poiketa standardiliuoksella mitatusta ionisuhdesta maksimissaan 30 % [12, s. 166]. Sisästandardin kvantitointi-ionina käytettiin ionia  $m/z = 124$  ja tunnisteioneina ioneja  $m/z = 69$  ja  $43$ . Sisästandardipiikin tunnistus ja integrointi tehtiin vastaavasti kuin laktidipiikin tunnistus ja integrointi. Automaattisen integroinnin onnistuminen ja integrointirajojen järkevyyden tarkistettiin aina visuaalisesti. Piikkien tunnistaminen ensimmäisissä mittauksissa on kuvattu luvussa 4.

Standardiliuosten kromatogrammien integrointituloksista määritettiin GCMS Postrun Analysis -ohjelmalla kalibrointisuora, jonka yhtälö oli muotoa

$$\frac{A(\text{La})}{A(\text{IS})} = k_{kk} \times c_{v3}(\text{La}) , \quad (10)$$

jossa  $k_{kk}$  on suoran kulmakerroin,  $A(\text{La})$  on laktidipiikin pinta-ala ja  $A(\text{IS})$  on sisästandardipiikin pinta-ala. Koska sisästandardin massakonsentraatio eli  $c_{v3}(\text{IS})$  oli sama kalibrointiin käytetyissä standardiliuoksissa ja näyteliuoksissa, voitiin kalibrointikuvaajan x-akselina käyttää pelkästään  $c_{v3}(\text{La})$ :a suhteen  $c_{v3}(\text{La})/c_{v3}(\text{IS})$  sijaan. GCMS Postrun Analysis -ohjelma laski mitatun näyteliuoksen laktidin massakonsentraation,  $c_{v3}(\text{La})$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ), integrointitulosten ja kalibrointisuoran yhtälön avulla.

Määritetystä näyteliuoksen massakonsentraatiosta laskettiin laktidin massa Vial 1 -liuoksessa,  $m_{v1}(\text{La})$  (mg), eli koko polymeerinäytteen laktidin massa yhtälöllä

$$m_{v1}(\text{La}) = \frac{c_{v1}(\text{La}) \times V_{v1}}{1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}} = \frac{20 \times c_{v2}(\text{La}) \times V_{v1}}{1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}} = \frac{200 \times c_{v3}(\text{La}) \times V_{v1}}{1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}} , \quad (11)$$

jossa  $V_{v1}$  ( $\text{cm}^3$ ) on Vial 1 -liuoksen tilavuus. Yhtälössä on huomioitu laimennuskertoimet 1/20 ja 1/10 Vial 1 ja Vial 3 -liuosten välillä ja yksikkömuunnos  $\mu\text{g}$ :sta  $\text{mg}$ :aan. Polymeerinäytteen laktidipitoisuus massaprosenttiosuutena,  $w(\text{La})$  (m-%), laskettiin sitten yhtälöllä

$$w(\text{La}) = \frac{m_{v1}(\text{La})}{m_{\text{näyte}}} \times 100 \text{ m\%} , \quad (12)$$

jossa  $m_{\text{näyte}}$  (mg) on Vial 1 -liuokseen punnitun polymeerinäytteen massa.

### 3.4.2 Käytetty GCFID-menetelmä

GCFID-menetelmässä standardiliuosten valmistus tehtiin kolmessa vaiheessa kuten NatureWorks:n menetelmässä. Näyteliuokset valmistettiin kahdessa vaiheessa. Käytetyt kanta-, Vial 1 ja Vial 2 -liuosvaiheiden massakonsentraatiot olivat hieman suurempia kuin

GCMS-menetelmässä, jotta mittausalueen alaraja pysyisi FID:n määrittäjärajan yläpuolella. Käytettyjä massakonsentraatioita ei kuitenkaan voitu suurentaa paljoa, sillä polymeeriliuosten viskoosisuus olisi aiheuttanut käytännön ongelmia pipetointiin.

Liuosten valmistuksessa pyrittiin minimoimaan kuluva liuottimen määrä, joten GCFID-menetelmän mittauksissa käytettiin mahdollisuuksien mukaan pienempiä liuostilavuuksia kantaliuosten ja Vial 1 -liuosten tapauksessa. Laimennuskertoimet haluttiin kuitenkin pitää samoina, joten kantaliuosten pipetointitilavuuksina käytettiin  $0,5 \text{ cm}^3$ . Vial 2 -liuosten tilavuutta ei kuitenkaan voitu pienentää, sillä polymeeriliuosten viskoosisuus haittasi liikaa  $0,5 \text{ cm}^3$ :n pipetointia täyspipetillä.

### Kantaliuosten valmistus

Standardien kantaliuokset valmistettiin periaatteessa kuten GCMS-menetelmässä. Tavoitteelliset punnitut massat ja massakonsentraatiot on esitetty taulukossa 3.3.

**Taulukko 3.3.** Kantaliuosten valmistaminen GCFID-menetelmässä. Suureet vastaavat taulukon 3.1 suureita.

Kantaliuos	$m_{kl}(La)$ (mg)	$m_{kl}(IS)$ (mg)	$V_{kl}$ ( $\text{cm}^3$ )	$c_{kl}(La)$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	$c_{kl}(IS)$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )
Standardi 1	12,00	-	20,0	600	-
Standardi 2	15,00	-	10,0	1500	-
Standardi 3	30,00	-	10,0	3000	-
Sisästandardi	-	30,00	20,0	-	1500

### Mitattavien standardiliuosten valmistaminen

Standardien kantaliuoksista valmistettiin Vial 1 ja Vial 2 -liuokset periaatteessa kuten GCMS-menetelmässä. Vial 1 -liuokset valmistettiin kuitenkin  $10 \text{ cm}^3$ :n mittapulloissa, joihin kantaliuosten pipetoinnit tehtiin  $0,5 \text{ cm}^3$ :n täyspipeteillä. Kantaliuoksen ja Vial 1 -liuoksen välinen laimenemiskerroin oli siis sama kuin GCMS-menetelmässä. Vial 2 -liuoksen, joka siis oli mitattava liuos, valmistus tehtiin täysin kuten GCMS-menetelmässä.

Standardien tavoitteellisten punnitustulosten avulla lasketut massakonsentraatiot on esitetty taulukossa 3.4. Mitattavan liuoksen laktidin massakonsentraatio,  $c_{v2}(La)$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ), on laskettu yhtälöllä

$$c_{v2}(La) = \frac{c_{v1}(La)}{20} = \frac{c_{kl}(La)}{20 \times 20} = \frac{m_{kl}(La)}{400V_{kl}}, \quad (13)$$

Sisästandardin massakonsentraatio mitattavassa liuoksessa,  $c_{v2}(IS)$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ), lasketaan vastaavasti.

**Taulukko 3.4.** GCFID-menetelmän standardiliuosten tavoitteelliset massakonsentraatiot.  $c_{v2}(La)$  ja  $c_{v2}(IS)$  ovat mitattavien Vial 2 -liuosten laktidin ja sisästandardin massakonsentraatiot.

Standardi	Kantaliuos	Mitattava Vial 2 -liuos	
	$c_{kl}(La)$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	$c_{v2}(La)$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	$c_{v2}(IS)$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )
1	600	1,50	3,75
2	1500	3,75	3,75
3	3000	7,50	3,75

### Näyteliuoksen valmistaminen

GCFID-menetelmässä näyteliuoksen Vial 1 -liuos valmistettiin kuten standardiliuosten tapauksessa, mutta laktidistandardin kantaliuoksen pipetoinnin sijaan mittapulloon punnittiin analyysivaa'alla 300 mg:n polymeerinäyte (suure  $m_{\text{näyte}}$ ). Polymeerinäyte liuotettiin pieneen määrään dikloorimetaania kuten GCMS-menetelmässä. Polymeerin liukeneamisen jälkeen lisättiin sisästandardin kantaliuosta ja dikloorimetaania kuten standardiliuosten tapauksessa. Näyteliuoksen mitattava Vial 2 -liuos valmistettiin Vial 1 -liuoksesta täysin kuten standardiliuosten tapauksessa. Osa mitattavasta Vial 2 -liuoksesta suodatettiin ruiskusuodatuksella, joka tehtiin kuten GCMS-menetelmässä, suoraan GC:n näytepulloon.

### GCFID-analyysin ajoasetukset

GCFID-analyysin näytteensyöttäjään ja injektoriin liittyvinä ajoasetuksina käytettiin samoja asetuksia kuin GCMS-menetelmässä paitsi *High Pressure Injection* -toimintoa ei käytetty. Myös kolonnin lämpötila noudatti samaa lämpötilaohjelmaa kuin GCMS-menetelmässä, joten yksittäisen analyysin kokonaisaika oli jälleen 18,4 min.

Kantajakaasun vakio lineaarisena virtausnopeutena käytettiin myös samaa  $35 \text{ cm s}^{-1}$  arvoa, mutta samaa heliumkaasua käytettiin myös FID:n detektorikaasuna virtausnopeudella  $30 \text{ ml min}^{-1}$ . FID:n liekkiin syötettiin vetyä virtausnopeudella  $40 \text{ ml min}^{-1}$  ja ilmaa virtausnopeudella  $400 \text{ ml min}^{-1}$ . FID:n lämpötilana käytettiin  $320 \text{ }^\circ\text{C}$ :tta. FID:llä mitattiin kromatogrammi injektointihetkestä analyysin loppuun asti. FID:n signaali nollattiin aina ennen uutta mittausta.

Kyseisillä ajoasetuksilla laktidipiikin havaittiin eluoituvan noin retentioajalla 8,9 min ja sisästandardipiikin noin retentioajalla 9,5 min. Meso-laktidin piikkiä ei oletettavasti ha-

vaittu eikä sitä olisi voitu tunnistakaan GCFID-mittauksilla ilman puhtaan meso-laktidistandardin käyttöä. GCFID-mittausten kromatogrammien piikkien muodot vastasivat GCMS-menetelmän kromatogrammien piikkejä.

### Mittaustulosten käsittely

GCFID-mittaustulosten käsittely tehtiin laitteiston GCSolution-ohjelmalla. Kromatogrammien laktidi- ja sisästandardipiikkien integrointiin käytettiin automaattista integrointia käyttäen kaikissa mittauksissa samoja testattuja integrointiparametrien arvoja. Automaattinen integrointi integroi piikit, joiden pinta-ala oli vähintään 1000 (ei yksikköä) ja *slope*-arvo eli piikin käyrän kulmakerroin vähintään 1500  $\mu\text{V min}^{-1}$ . Piikit tunnistettiin ensin standardiliuosten kromatogrammeista ja niiden retentioaikoja käytettiin sitten näyteliuosten piikkien tunnistamiseen.

Standardiliuosten mittauksista määritettiin kalibrointisuora kuten GCMS-menetelmässä, mutta kalibrointisuora noudatti nyt kuitenkin yhtälöä

$$\frac{A(\text{La})}{A(\text{IS})} = k_{kk} \times c_{v2}(\text{La}). \quad (14)$$

Näyteliuoksen kromatogrammin integrointituloksien ja kalibrointisuoran avulla määritettiin GCSolution-ohjelmalla laktidin massakonsentraatio mitattavassa liuoksessa eli  $c_{v2}(\text{La})$ . Laktidin massa polymeerinäytteessä ja polymeerinäytteen laktidipitoisuus massaprosentteina laskettiin yhtälöillä 11 ja 12. Yhtälöä 11 voidaan käyttää myös GCFID-menetelmässä, koska näytteenkäsittelyn laimentumiskertoimet Vial 1 ja Vial 2 -liuosten välillä ovat samat kyseisissä menetelmissä.

## 4. LAKTIDIPITOISUUDEN MÄÄRITYSMENETELMÄN KEHITTÄMINEN

GCMS-QP2010 Ultra -kaasukromatografi-massaspektrometrille kehitettiin GCMS- ja GCFID-menetelmät polymeerinäytteiden laktidipitoisuuksien määrittämiseen. Kehitetyt menetelmät ja niiden perustana käytetty NatureWorks:n menetelmä on kuvattu luvussa 3. Tässä luvussa on kuvattu, miten NatureWorks:n menetelmää sovellettiin käyttötärpeisiin paremmin sopivaksi. Menetelmällä haluttiin muun muassa pystyä mittaamaan pienempiä laktidipitoisuuksia kuin mitä NatureWorks:n menetelmällä voidaan mitata. Menetelmän määritysrajan haluttiin olevan maksimissaan noin 0,05 m-%. Tämän takia oli tärkeää tietää laitteiston asettamat rajat mitattavissa oleville massakonsentraatioille.

Lisäksi menetelmän GC-analyysin ajoasetuksille testattiin käytettävälle laitteistolle parhaimmin sopivat parametrien arvot. Laitteiston detektoreista otettiin käyttöön ensin MS, sillä sitä voitiin hyödyntää paremmin kromatogrammien piikkien tunnistamiseen ja niiden puhtauksien tarkistamiseen. FID-detektorin käyttöönotto myöhästyi työhön liittymättömistä syistä paljon odotettua myöhäisemmäksi, joten kaikki GC-analyysin ajoasetuksien säätöön liittyvät mittaukset tehtiin GCMS-menetelmällä. Samoja ajoasetuksia voitiin käyttää sitten myöhemmin myös GCFID-menetelmässä, koska menetelmissä oli kromatografian kannalta erona vain detektorin valinta ja MS:n käyttö ei yleensä rajoita kromatografiassa käytettäviä asetuksia [12, s. 164 - 165].

### 4.1 GCMS-menetelmän kehittäminen

GCMS-menetelmässä käytettiin aluksi erilaista näytteenkäsittelyä kuin mitä alaluvussa 3.4.1 on kuvattu. Sekä standardi- että näyteliuosten valmistuksessa ei valmistettu ollenkaan Vial 3 -liuoksia. Näytteenkäsittely tehtiin aluksi siis kuten NatureWorks:n menetelmässä kantaliuosten, Vial 1 ja Vial 2 -liuosten valmistuksella. Kantaliuokset valmistettiin kuitenkin laimeampina, ja näyteliuosten Vial 1 -liuoksiin punnittiin vastaavasti pienemmät polymeerinäytteet kuin NatureWorks:n menetelmässä, jotta liuokset olivat mitattavissa GCMS:llä.

GCMS-menetelmällä mitattavissa olevien massakonsentraatioiden selvittämiseksi määritettiin ensin karkea arvio laitteiston lineaariselle alueelle, mikä on kuvattu alaluvussa 4.1.1. Menetelmän näytteenkäsittely haluttiin luoda sellaiseksi, että laktidipitoisuuksia 0,05 - 1,0 m-% vastaavat mitattavien liuosten massakonsentraatiot kuuluvat lineaariselle alueelle ja ovat laitteiston määritysrajan yläpuolella. Alaluvun 4.1.1 mittaustulosten perusteella GCMS-menetelmän näytteenkäsittely tehtiin aluksi kuten NatureWorks:n menetelmässä, mutta 10 kertaa pienemmillä punnittavilla massoilla eli mitatut liuokset olivat

10 kertaa laimeampia. Alaluvussa 4.1.2 on kuvattu GC-analyysin ajoasetusten säätäminen ja optimointi, jossa käytettiin PLDLA96/4-näytteestä valmistettuja näyteliuoksia, jotka valmistettiin siis noin 100 mg:n näytteistä.

Ajoasetusten optimoinnin jälkeen aloitettiin GCMS-menetelmän alustava validointi eli koko menetelmän testaaminen. Alustavien mittausten perusteella näytteenkäsittelyä jouduttiin vaihtamaan, sillä PLDLA96/4-näytteiden laktidipitoisuuksien määrityksissä havaittiin todella suuri hajonta jopa saman näyteliuoksen eri injektioiden välillä. Mahdollisena syynä siihen oletettiin olevan ruiskusuodatuksen aiheuttamat epäpuhtaudet, jotka havaittiin alaluvun 4.1.2 mittauksissa, ja ruiskusuodatuksen mahdollinen vaikutus adsorption takia. Näytteenkäsittely vaihdettiin tällöin alaluvun 3.4.1 mukaiseksi eli näytteenkäsittelyyn lisättiin Vial 3 -liuosvaihe. Ruiskusuodatuksen jälkeisen ylimääräisen laimennusvaiheen takia näyteliuokset voitiin valmistaa ja suodattaa väkevämpinä kuten NatureWorks:n menetelmässä, jolloin edellä mainittujen ongelmien merkityksen oletettiin vähenevän. Vaihtoehtoisia käytännön kannalta tehokkaita suodatustapoja ei ollut saatavilla. Näytteenkäsittelyn muutoksen jälkeen, eli alaluvussa 3.4.1 kuvatulla menetelmällä, mitatut alustavan validoinnin mittaustulokset, jotka on esitetty luvussa 5, olivat huomattavasti paremmat.

#### **4.1.1 Mitattavan massakonsentraatioalueen määrittäminen ja tutkittavien piikkien tunnistaminen**

Lineaarisen alueen alustavaksi arvioimiseksi valmistettiin seitsemän mitattavaa standardiliuosta, joiden laktidin massakonsentraatiot vaihtelivat välillä 0,04283 - 7,966  $\mu\text{g cm}^{-3}$  ja sisästandardin massakonsentraatio oli 1,669  $\mu\text{g cm}^{-3}$ . Kyseiset standardiliuokset valmistettiin alaluvussa 3.4.1 esitettyyn tapaan kantaliuosten, Vial 1 ja Vial 2 -liuosten valmistuksella, mutta kantaliuoksiin punnitut massat olivat erisuuret. Lisäksi mitattavina liuoksina oli Vial 2 -liuokset eli Vial 3 -liuoksia ei vielä valmistettu GCMS-mittauksissa. Kyseisten standardiliuosten valmistaminen on esitetty liitteen A taulukossa A.1. GC-analyysissä käytetyt ajoasetukset on esitetty saman liitteen taulukossa A.2. Ajoasetuksia ei ollut vielä säädetty vaan mittauksissa käytettiin NatureWorks:n menetelmän mukaisia ajoasetuksia paitsi kantajakaasun ja sen virtauksen osalta.

Kromatogrammit mitattiin sekä SCAN:lla että SIM:llä. SCAN:lla mitattiin  $m/z$ -aluetta 35 - 350. Standardien 3 ja 4 SCAN:lla mitatut kromatogrammit on esitetty liitteen A kuvassa A.1. Kromatogrammeissa retentioajalla 6,659 min eluoituva piikki tunnistettiin L- ja D-laktidista johtuvaksi laktidipiikiksi, sillä sen pinta-ala on paljon suurempi väkevemmän standardin kromatogrammissa. Laktidipiikkiä seuraava piikki retentioajalla 7,059 min tunnistettiin sisästandardipiikiksi. Tutkittavia piikkejä ennen eluoituvat merkittävimmät piikit johtuivat liuottimien, eli pääasiassa sykloheksaanin ja asetonin, sisältämistä epäpuhtauksista. Laktidipiikin tunnistus varmistettiin vertaamalla kyseisen piikin kohdalla SCAN-mittauksessa mitattua massaspektriä NIST11-massaspektirikirjastosta löytyvään

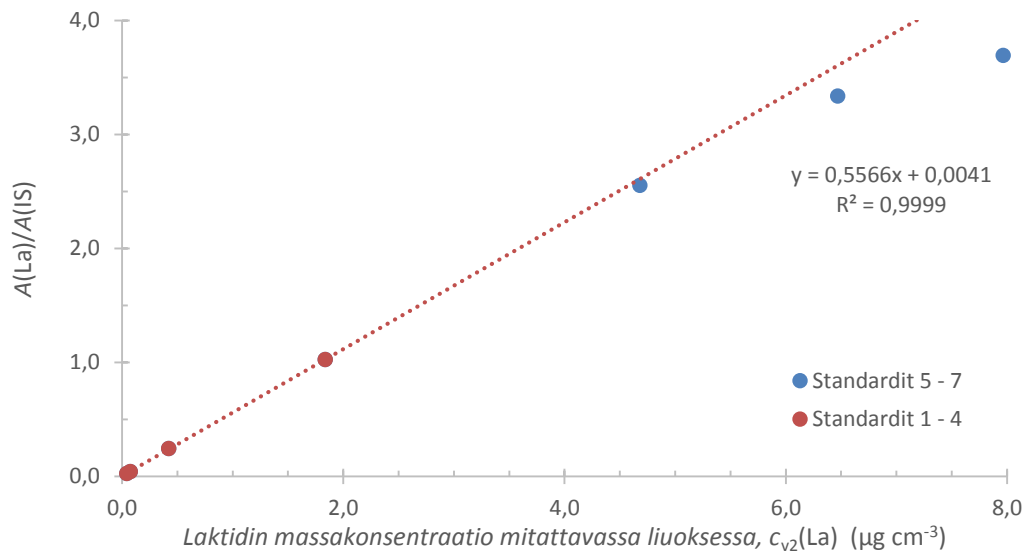
referenssispektriin L- ja D-laktidille. Myös sisästandardipiikki tunnistettiin sitä vastaavan referenssispektrin avulla. Mitatut massaspektrit ja referenssispektrit on esitetty liitteen A kuvissa A.2 ja A.3. Mitatut spektrit vastaavat referenssispektrejä erittäin hyvin ja GCMS Postrun Analysis -ohjelman laskema *similarity index* -suure oli 98 laktidipiikin massaspektrille ja 99 sisästandardin massaspektrille. Kyseinen suure kuvaa mitatun ja referenssispektrin yhtäläisyyttä ja sen arvo 100 vastaa täydellistä yhtäläisyyttä. Sisästandardin massaspektrissä merkittävin piikki, eli  $m/z = 124$ , johtuu todennäköisesti molekyyli-ionista. 2,6-dimetyyli- $\gamma$ -pyronin moolimassa on  $124,138 \text{ g mol}^{-1}$  [39, no.4289] eli sen molekyylin massa on 124,138 u. Laktidipiikin massaspektristä löytyy hyvin pieni piikki arvolla  $m/z = 144$ , joka todennäköisesti vastaa molekyyli-onia johtuen laktidi molekyylien massasta 144,126 u eli moolimassasta  $144,126 \text{ g mol}^{-1}$  [39, no.4043].

Laktidin massaspektrin intensiivisimmät piikit ovat  $m/z$ -arvoilla 56, 45 ja 43. Sisästandardin massaspektrin intensiivisimmät piikit ovat puolestaan  $m/z$ -arvoilla 124, 43 ja 69. Kvantitatiivisen analyysin kvantitointi-ioniksi valittiin laktidipiikille  $m/z = 56$  ja sisästandardipiikille  $m/z = 124$ . Tunnisteioneiksi valittiin laktidipiikille  $m/z = 45$  ja 43 ja sisästandardipiikille  $m/z = 43$  ja 69. Liitteen A taulukossa A.1 esitetyt mitattujen kromatogrammien laktidi- ja sisästandardipiikkien pinta-alat,  $A(\text{La})$  ja  $A(\text{IS})$ , on siis määritetty ionien  $m/z = 56$  ja 124 piikkien pinta-aloina. Tunnisteionien suhteellinen intensiteetti kvantitointi-ioniin nähden sai poiketa korkeintaan 30 % referenssispektrin arvoihin verrattuna. Samat standardiliuokset mitattiin SCAN:n lisäksi myös SIM:llä, jolla mitattiin vain edellä mainittuja ioneja  $m/z = 124, 69, 56, 45, 43$ . [12, s. 165 - 166]

Liitteen A kuvissa A.4 ja A.5 on esitetty standardin 1 SCAN ja SIM-mittauksen laktidi- ja sisästandardipiikkien pinta-alojen määrittäminen GCMS Postrun Analysis -ohjelmalla. Piikkien integrointi tehtiin ohjelman automaattisella integroinnilla. Ohjelmalla määritettiin myös arviot piikkien signaalikohinasuhteelle,  $S/N$ . Kuten kuvista A.4 ja A.5 huomataan, SCAN-mittauksessa kohina on huomattavasti suurempaa kuin SIM-mittauksessa piikin kokoon nähden. SCAN-mittaukselle määritettiin signaalikohinasuhteeksi noin 15 ja SIM-mittaukselle noin 130. Standardin 1 massakonsentraatio  $0,04283 \mu\text{g cm}^{-3}$  on siis SCAN-mittauksissa hyvin lähellä instrumentin määrittämissä, jonka arviona pidetään signaalikohinasuhdetta 10. SIM:llä voidaan sen sijaan mitata paljon pienempiäkin massakonsentraatioita.

Kuvassa 4.1 on esitetty standardien SCAN-mittauksen laktidipiikin ja sisästandardipiikin pinta-alojen suhde,  $A(\text{LA})/A(\text{IS})$ , mitattavan standardiliuoksen massakonsentraation,  $c_{v2}(\text{La})$ , funktiona. Kuvaajaan on sovitettu suora standardien 1 - 4 mittauspisteisiin. Kuvaajasta nähdään, että standardien 5 - 7 mittauspisteet ovat kaikki suoran alapuolella. Standardien 5 - 7 SCAN-mittauksissa detektori saturoitui laktidipiikin kohdalla kvantitointi-ionin  $m/z = 56$  liian suuren intensiteetin takia, mikä havaittiin laitteiston varoituksesta. Sama havaittiin myös vastaavissa SIM-mittauksissa. SIM-mittauksista ei saatu integrointituloksia standardeille 5 - 7 johtuen detektorin saturoitumisesta, sillä laitteistossa

oli käytössä automaattinen varoimenpide saturoitumista vastaan. Tällöin detektori sammutettiin tietyllä retentioajalla, jos saturoituminen tapahtui useaan kertaan mittaussarjassa kyseisellä samalla retentioajalla.



**Kuva 4.1.** GCMS:n lineaarisen alueen alustava määrittäminen standardien 1 - 7 SCAN-mittauksista. Y-akselilla on laktidi- ja sisästandardin piikkien pinta-alojen suhde  $A(la)/A(IS)$  ja x-akselilla standardiliuoksen laktidin massakonsentraatio. Suora on sovitettu standardien 1 - 4 mittauspisteiden joukkoon. Mittauspisteiden arvot on esitetty liitteen A taulukossa A.1.

GCMS-menetelmän mitattavaksi laktidin massakonsentraatioalueeksi valittiin edellä mainittujen SCAN- ja SIM-mittauksien perusteella noin  $0,01 - 2 \mu\text{g cm}^{-3}$ . Mittauksena valittiin SIM, koska sillä voitiin mitata huomattavasti pienempiä massakonsentraatioita kuin SCAN:illa. GCMS-menetelmän näytteenkäsittely täytyi siis muokata NatureWorks:n menetelmästä tuottamaan polymeerinäytteistä, joiden laktidipitoisuudet ovat noin  $0,05 - 1,0 \text{ m-\%}$ , näyteliuoksia kyseisellä massakonsentraatioalueella. NatureWorks:n menetelmässä  $0,05 - 1,0 \text{ m-\%}$ :n laktidipitoisuuden polymeerinäytteitä vastaavien näyteliuosten massakonsentraatiot ovat noin  $1,25 - 25 \mu\text{g cm}^{-3}$  NatureWorks:n menetelmässä. Siten GCMS-mittauksia varten näytteenkäsittelyssä tulisi valmistaa noin 10-kertaisesti laimeampia mitattavia liuoksia kuin NatureWorks:n menetelmässä.

#### 4.1.2 GC-analyysin ajoasetusten säätö

Kehitettävän GCMS-menetelmän GC-analyysin ajoasetuksina käytettiin ensin NatureWorks:n menetelmän asetuksia soveltuvin osin. Injektointitapana käytettiin samaa suoraa höyrystävää injektointia, mutta kantajakaasun virtauksen hallinta tehtiin erilailla ja sen virtausnopeutena käytettiin eri arvoa. Ajoasetuksista kantajakaasun virtausnopeuden vaikutus testattiin ensimmäisenä. Tällöin kolonin lämpötilaohjelma noudatti vielä NatureWorks:n menetelmää. Lämpötilaohjelman lämmitysnopeus optimoitiin seuraavaksi.



*Splitless*-jakson aikana käytettiin 60 s NatureWorks:n menetelmän mukaisesti. Myös kyseisen ajan soveltuvuus käytetylle laitteistolle testattiin. *Splitless*-jakson jälkeen injektorin tyhjennettiin analyyteistä käyttämällä jakosuhteena 50:1 arvoa, joka vaihdettiin laitteiston *Carrier Gas Saver* -toiminnolla 10:1 arvoon 1 minuutin kuluttua kantajakaasun säästämiseksi [40].

*Splitless*-jakson aikana käytettiin laitteiston niin sanottua *High Pressure Injection* -toimintoa, jossa injektorin paine pidettiin injektoinnin ajan 100 kPa:ssa 48 kPa:n sijaan. 48 kPa oli laitteiston laskema injektorin paine, jolla saavutettiin valittu vakio lineaarinen virtausnopeus kolonnissa kolonnin lämpötilaohjelman alussa. *Splitless*-jakson jälkeen injektorin paine noudatti laitteiston laskemaa arvoa, jolla lineaarinen virtausnopeus kolonnissa pysyi vakiona kolonnin lämpötilan kasvaessa. Kyseisen toiminnon tarkoituksena oli varmistaa, että paine injektorissa on riittävän suuri injektoinnin aikana, mikä voi parantaa kromatogrammin piikkien terävyyttä suorassa höyrystävässä injektiossa. Sen hyödyllisyyttä ei kuitenkaan testattu.

Ionisaatiokammion lämpötilana käytettiin sille tyypillistä 200 °C:tta, koska käytetyn spektrikirjaston spektrit olivat mitattu käyttäen kyseistä lämpötilaa. GC:n ja MS:n välisen liitoksen lämpötilana käytettiin 310 °C:tta, joka valittiin laitteiston asennuksen yhteydessä hieman matalammaksi kuin lämpötilaohjelman loppulämpötila. Tyypillisenä arvona sille on ilmoitettu 200 - 300 °C:tta [12, s. 164].

### **Kantakaasun virtausnopeus**

Kantajakaasuna käytettiin NatureWorks:n menetelmän vedyn sijaan heliumia. Laitteistossa oli kantajakaasun virtausnopeuden kontrollointiin käytettävissä vain vakio paineen tai vakio lineaarisen virtausnopeuden asetukset, kun sillä käytettiin injektointitapana suoraa höyrystävää injektointia. Kontrollointiin valittiin vakio lineaarinen virtausnopeus ja sen arvoksi valittiin laitteiston asennuksessa ja käyttökoulutuksessa suositeltu arvo 35 cm s<sup>-1</sup>, joka vastaa käytetyllä laitteistolla noin 0,93 ml min<sup>-1</sup> (laitteiston laskema arvo). Heliumin optimi lineaarinen virtausnopeus erottumisen kannalta, eli van Deemterin ja Golayn yhtälöiden (yhtälö 1) mukaisesti erotuskyvyn maksimoiva nopeus, on noin 20 cm s<sup>-1</sup>. Käytetty arvo on siis suurempi kuin optimi arvo, mutta tyypillisen van Deemterin kuvaajan [7, s. 49, Fig. 3.13] mukaan erotuskyky ei kuitenkaan merkittävästi laske käytetyn arvon tasolla. NatureWorks:n menetelmässä käytetyllä vedyllä virtausnopeuden kasvattamisella on vieläkin pienempi vaikutus erotuskyvyn pienemiseen kuin heliumilla. Kehitettävälle menetelmälle analyysin aika ei ollut yhtä tärkeä parametri ajoasetusten säädössä kuin erotuskyky, joten 35 cm s<sup>-1</sup> suurempia lineaarisia virtausnopeuksia ei testattu. 32 ja 30 cm s<sup>-1</sup> lineaarisia virtausnopeuksia testattiin, mutta niillä ei saavutettu havaittavaa eroa piikkien muotoihin tai erotuskykyyn. Pienempiä nopeuksia ei testattu, koska injektorin paine laski tällöin laitteistolle liian alhaiseksi. Todennäköisesti lineaarista virtausnopeutta voisi vielä nostaa käytetystä arvosta analyysin ajan pienentämiseksi ilman merkittävää muutosta piikkien erotuskyvyssä. [7, s. 48 - 49]

## Lämpötilaohjelma

Lämpötilaohjelman lämmitysnopeudelle,  $\frac{dT}{dt}$  ( $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ), voidaan arvioida optimiarvo yhtälöllä

$$\left(\frac{dT}{dt}\right)_{\text{op}} = \frac{10^{\circ}\text{C}}{t_m}. \quad (15)$$

$t_m$  voidaan arvioida kolonnin pituuden,  $L$  (cm), ja kolonnin läpi virtaavan kantajakaasun lineaarisen virtausnopeuden,  $\bar{u}$  ( $\text{cm s}^{-1}$ ), avulla seuraavasti [7, s. 222][41]:

$$t_m = \frac{L}{\bar{u}} = \frac{3000 \text{ cm}}{35 \frac{\text{cm}}{\text{s}}} \times \frac{\text{min}}{60 \text{ s}} \approx 1,43 \text{ min}.$$

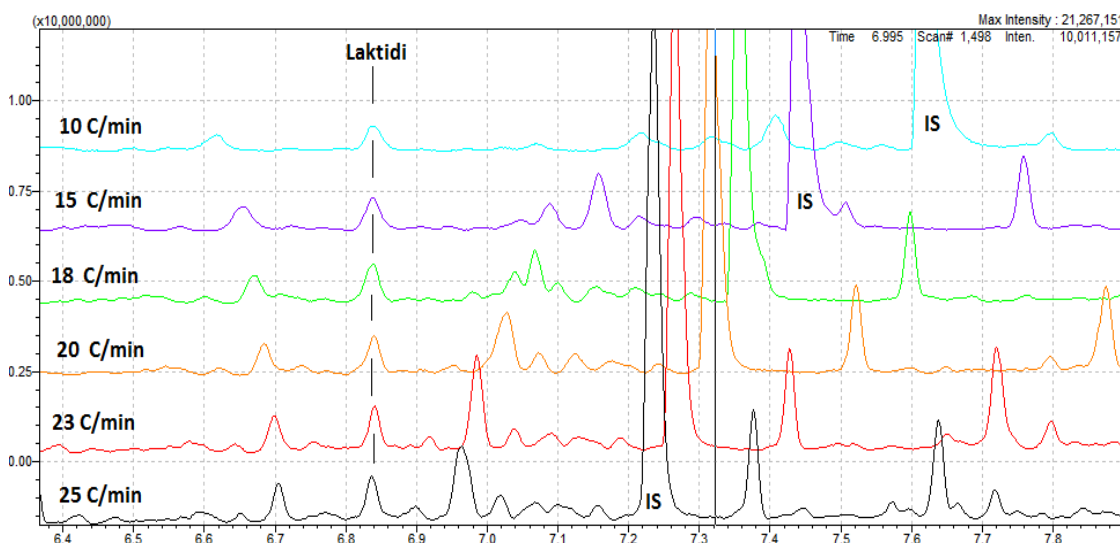
Siten käytettävissä olosuhteissa lämmitysnopeuden optimiksi voidaan arvioida yhtälön 15 mukaisesti

$$\left(\frac{dT}{dt}\right)_{\text{op}} = \frac{10^{\circ}\text{C}}{1,43 \text{ min}} \approx 7,0 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{min}}.$$

Koska kolonnille ja mittausolosuhteille arvioitu lämmitysnopeuden optimi oli merkittävästi pienempi kuin NatureWorks:n menetelmässä käytetty  $25^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , testattiin lämpötilaohjelman lämmitysnopeudelle arvoja 10, 15, 18, 20, 23 ja  $25^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . Kyseisillä lämmitysnopeuden arvoilla SCAN:lla mitatut kromatogrammit on esitetty kuvassa 4.2. Mittaukset tehtiin PLDLA96/4-näytteestä valmistetulla näyteliuksella. Kromatogrammeista on esitetty vain rajatut retentioaika-alueet laktidi- ja sisästandardipiikkien ympäriltä. Kaikkia muita paitsi suurimman lämmitysnopeuden kromatogrammia on siirretty x-akselin suunnassa siten, että niiden laktidipiikit ovat samalla retentioajalla vertailun helpottamiseksi. Retentioajan arvot x-akselilla pätevät siis vain  $25^{\circ}\text{C min}^{-1}$  lämmitysnopeuden kromatogrammeille. Akselin skaalaus on kuitenkin sama kaikille, joten kuvasta voidaan esimerkiksi nähdä kuinka laktidi- ja sisästandardipiikkien retentioaikojen ero kasvaa noin 0,4 minuutista noin 0,8 minuuttiin verrattaessa suurimman ja pienimmän lämmitysnopeuden kromatogrammeja.

Kuvasta 4.2 nähdään, että laktidi- ja sisästandardipiikin lähettyvillä eluoituu myös muita piikkejä. Kuvan 4.3 perusteella kyseiset muut piikit johtuvat näyteliuksen valmistuksesta peräisin olevista epäpuhtauksista. Epäpuhtauksia liukenee näyteliukseen kuvan 4.3 perusteella erityisesti suodatukseen käytetystä ruiskusuodattimesta ja vähemmissä määrin kertakäyttöruiskusta. Kertakäyttöruiskusta irtoavien epäpuhtauksien määrän havaittiin kasvavan, jos suodatukseen käytettyä aikaa kasvatettiin. Tämän takia suodatus pyrittiin tekemään mahdollisimman nopeasti. Kuvan 4.3 kaikki kromatogrammit on mitattu SCAN:lla välillä 35 - 350  $m/z$  ja lämmitysnopeutena on käytetty  $15^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . Epäpuhtausyhdisteitä ei saatu tunnistettua massaspektrien avulla riittävällä varmuudella. Kysei-

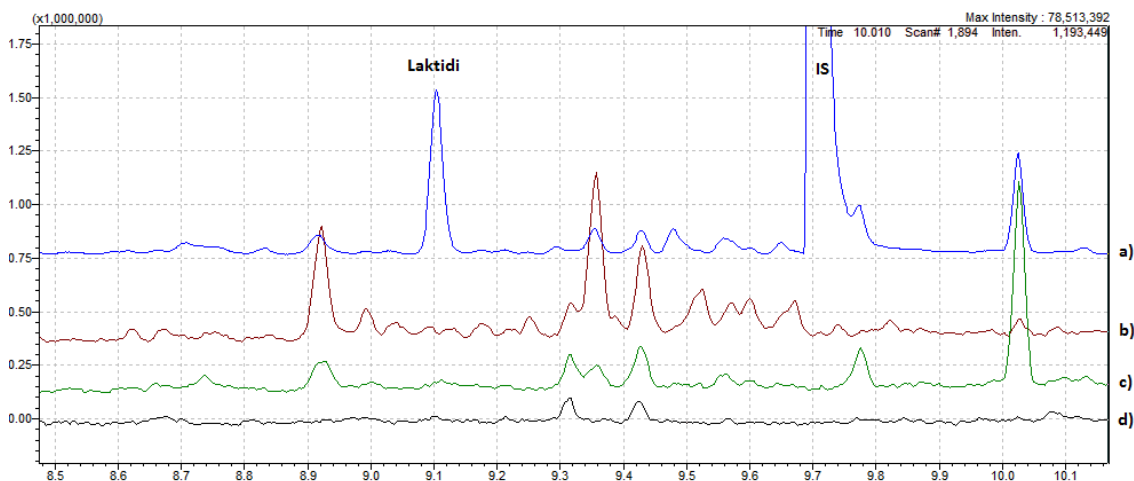
sisä mittauksissa näyteliuksen massakonsentraatiot olivat pienemmät suodatuksen aikana kuin alaluvussa 3.4.1 esitettyssä kehitetyssä menetelmässä, minkä takia epäpuhtauspiikit ovat merkittävämpiä tutkittavien yhdisteiden piikkeihin nähden.



**Kuva 4.2.** Eri lämmitysnopeuksilla SCAN:lla mitatut TIC-kromatogrammit. SCAN:ssa mitattiin  $m/z$ -aluetta 35 - 350. Kromatogrammeja on siirretty  $x$ -akselin suunnassa, jotta laktidipiikit ovat samassa kohtaa kuvassa.

Kuvasta 4.2 nähdään, että lämmitysnopeuden muutos ei vaikuta pelkästään piikkien väliin etäisyyksiin, eli retentioaikojen eroihin, vaan myös niiden järjestykseen. Siis myös yhdisteiden suhteelliset retentiot,  $\alpha$ , muuttuvat. Esimerkiksi suurilla lämmitysnopeuksilla sisästandardipiikin alla eluoituva kertakäyttöruiskusta johtuva epäpuhtauspiikki siirtyy sisästandardipiikkiä suuremmalle retentioajalle lämmitysnopeudella  $15\text{ °C min}^{-1}$ . Tämä on nähtävissä paremmin liitteen B kuvista B.1 ja B.2, joissa on esitetty osa kuvan 4.2 kromatogrammeista erillään. Kyseisissä kuvissa on nähtävissä TIC-kromatogrammin lisäksi TIC-signaalista suodatettuja yksittäisten ionien kromatogrammeja, joiden avulla pienet epäpuhtauspiikit ovat helpommin erotettavissa. Mitattujen kromatogrammien perusteella kolonnin lämpötilaohjelman lämmitysnopeudeksi valittiin  $15\text{ °C min}^{-1}$ , sillä sen avulla saavutettiin vaihtoehdoista paras mahdollinen erotuskyky molemmille integroitaville piikeille ja samalla kuitenkin suhteellisen nopea analyysi ja terävät piikit integrointia varten.

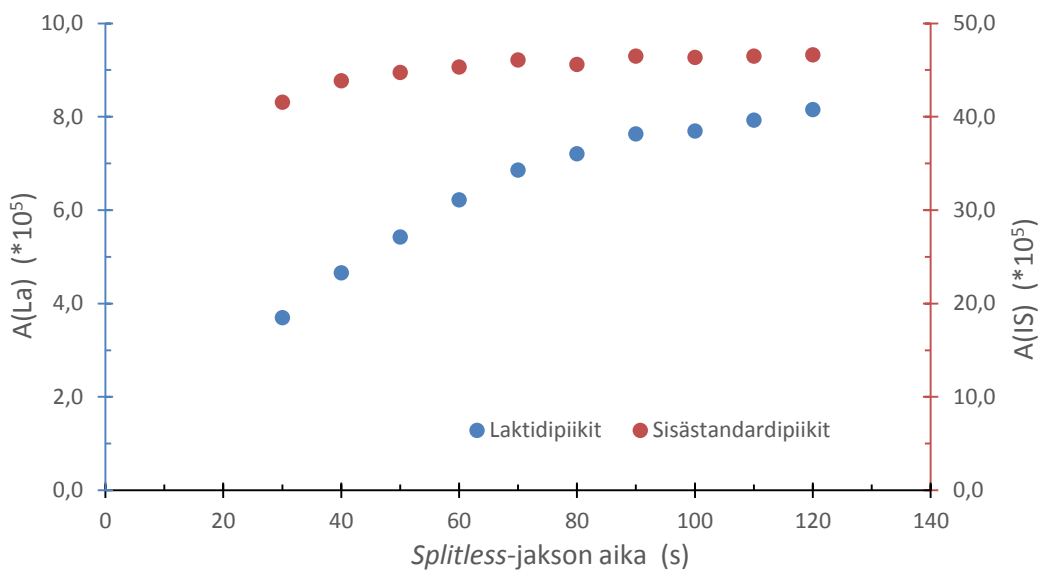
Kuvasta 4.3 nähdään, että tutkittavat laktidi- ja sisästandardipiikit eluoituvat  $15\text{ °C min}^{-1}$  lämmitysnopeudella ennen 10 minuutin retentioaikaa. Kyseisellä kolonnin lämpötilaohjelmalla 10 minuutin retentioaikaa vastaa noin  $185\text{ °C}$ :een lämpötila kolonnissa. GC-analyysin nopeuttamiseksi lämpötilaohjelman lopun lämmitysnopeudeksi valittiin suurin mahdollinen  $50\text{ °C min}^{-1}$ , kun kolonnin lämpötila on välillä  $200 - 320\text{ °C}$ :tta. Kyseisellä muutoksella pienennettiin yksittäiseen mittaukseen kuluva aika yli 5 minuutilla. Lopulämpötilan, eli  $320\text{ °C}$ :een, aikana käytettiin 5 min, sillä suuremmilla ajoilla ei havaittu eluoituvan mitään piikkejä.



**Kuva 4.3.** Ruiskusuodattimesta ja kertakäyttöruiskusta johtuvien epäpuhtauspiikkien selvittäminen. A-kromatogrammi on mitattu PLDLA96/4-näyteliuksella, joka on suodatettu normaaliin tapaan ruiskusuodattimella varustetulla kertakäyttöruiskulla. B-, c- ja d-kromatogrammien mittaukseen käytettiin puhtaista sykloheksaanista ja asetonista valmistettua liuosta. B-kromatogrammissa liuottimista valmistettu liuos on suodatettu ja siirretty GC-näytepulloon ruiskusuodattimella varustetulla lasiruiskulla, c-kromatogrammissa liuos on siirretty GC-näytepulloon kertakäyttöruiskulla ja d-kromatogrammissa liuos on siirretty GC-näytepulloon lasisella Pasteur-pipetillä. Kaikki TIC-kromatogrammit on mitattu SCAN:lla alueella 35 - 350 m/z ja lämmitysnopeudella 15 °C min<sup>-1</sup>.

### Splitless-jakson aika

Splitless-jakson ajaksi testattiin aikoja välillä 30 - 120 s jokaisen 10 s välein. NatureWorks:n menetelmässä käytetään 60 s aikaa. Mittauksiin käytettiin PLDLA96/4-näytteestä valmistettua näyteliuosta. Jokaisella splitless-jakson ajalla mitattiin SIM:llä mitattua kromatogrammista laktidi- ja sisästandardipiikkien pinta-alat kahtena rinnakkaismäärityksenä. Piikkien pinta-alat on esitetty kuvassa 4.4 splitless-ajan funktiona. Kuvassa on käytetty laktidi- ja sisästandardipiikkien pinta-aloille omia y-akseleitaan. Jotta piikkien pinta-alat olisivat mahdollisimman toistettavat, Splitless-jakson ajaksi tulisi valita kuvaajan tasaiselta osalta eli kun piikin pinta-alat eivät enää muutu splitless-jakson aikaa kasvatettaessa [40]. Kuvasta nähdään, että sisästandardipiikin pinta-ala pysyy lähes muuttumattomana 60 s jälkeen. Laktidipiikin pinta-ala kuitenkin kasvaa vielä 60 s jälkeenkin, joten 60 s:lla ei välttämättä saavuteta parasta mahdollista toistettavuutta mittauksiin. Splitless-jakson ajaksi valittiin kuitenkin NatureWorks:n menetelmän mukaisesti 60 s, sillä suurempien aikojen vaikutuksesta laktidin muodostumiseen injektorissa termisesti hajoavista oligomeereistä ei ollut tietoa.



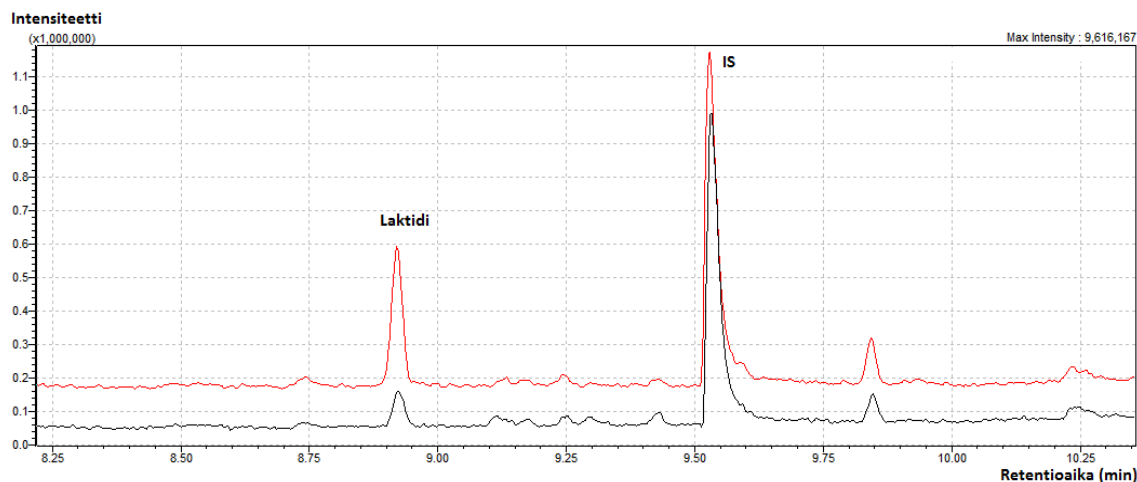
**Kuva 4.4.** Splitless-jakson ajan vaikutus laktidi- ja sisästandardipiikkien pinta-aloihin. Piikkien pinta-aloille on omat y-akselinsa. Mittauspisteet on laskettu kahden rinnakkaismäärityksen keskiarvona.

#### 4.1.3 Menetelmän spesifisyyden testaus

Kun menetelmän näytteenkäsittely oli muutettu alaluvun 3.4.1 mukaiseksi, testattiin vielä menetelmän spesifisyyttä PLDLA96/4- ja PLCL-näytteillä. Mittauksilla varmistettiin siis, että laktidi- ja sisästandardipiikkeissä ei eluoidu samaan aikaan muita yhdisteitä. Menetelmässä kvantitointi tehtiin SIM:llä mitattujen yksittäisten ionien kromatogrammien piikkien mukaan, mikä lisää menetelmän spesifisyyttä, sillä mahdolliset muut yhdisteet eivät välttämättä tuota kvantitoinnissa tarkasteltuja ioneja. SIM:llä mitatusta PLDLA96/4-näyteliuoksen kromatogrammista tutkittavien piikkien lähellä on esitetty esimerkki liitteen F kuvassa F.1, josta on nähtävissä, että kvantitointi-ionien kromatogrammeissa ei esiinny piikkien integrointia häiritseviä piikkejä. Vaikka esimerkiksi laktidipiikin kohdalla eluoituva jokin muu yhdiste ei ionisaatiokammiossa tuottaisikaan laktidin kvantitointi-ionia, se voi kuitenkin mahdollisesti vaikuttaa laktidin ionisoitumiseen ja siten kvantitointi-ionin intensiteettiin ionisaation aikaisten kemiallisten reaktioiden takia [14, s. 188 - 190]. Siksi edellä mainituilla näytteillä mitattiin TIC-kromatogrammit SCAN:lla ja tutkittiin niiden laktidi- ja sisästandardipiikkien massaspektrejä. Polymeerinäytteistä valmistettiin näyteliuokset luvun 3.4.1 mukaisesti. Massaspektrejä tutkittiin piikin huipun kohdalta ja molemmilta puolilta huippua kohdasta, jossa piikin korkeus oli noin puolet koko piikin korkeudesta. Massaspektrejä verrattiin toisiinsa ja referenssispektreihin mahdollisten samaan aikaan eluoituvien yhdisteiden havaitsemiseksi. [14, s. 16 - 17]

Kuvassa 4.5 on esitetty PLDLA96/4- ja PLCL-näytteistä valmistetuista näyteliuoksista SCAN:lla mitatut kromatogrammit laktidi- ja sisästandardipiikin sisältävällä retentioaikavälillä. Laktidi- ja sisästandardipiikkien retentioajat ovat noin 8,92 min ja 9,53 min. Kromatogrammeissa havaitaan näytteenkäsittelyn muutoksen johdosta vähemmän muita

merkittäviä piikkejä kuin esimerkiksi kuvan 4.2 vastaavalla näytteellä ja lämmitysnopeudella  $15\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  mitatusta kromatogrammista.



**Kuva 4.5.** Spesifisyyden eli piikkien puhtauden tutkimiseen SCAN:lla mitatut kromatogrammit. Musta käyrä on mitattu PLDLA96/4-näytteestä ja punainen käyrä PLCL-näytteestä valmistetusta näyteliuksesta. Punainen käyrä on nostettu mustan käyrän yläpuolelle selkeyden takia.

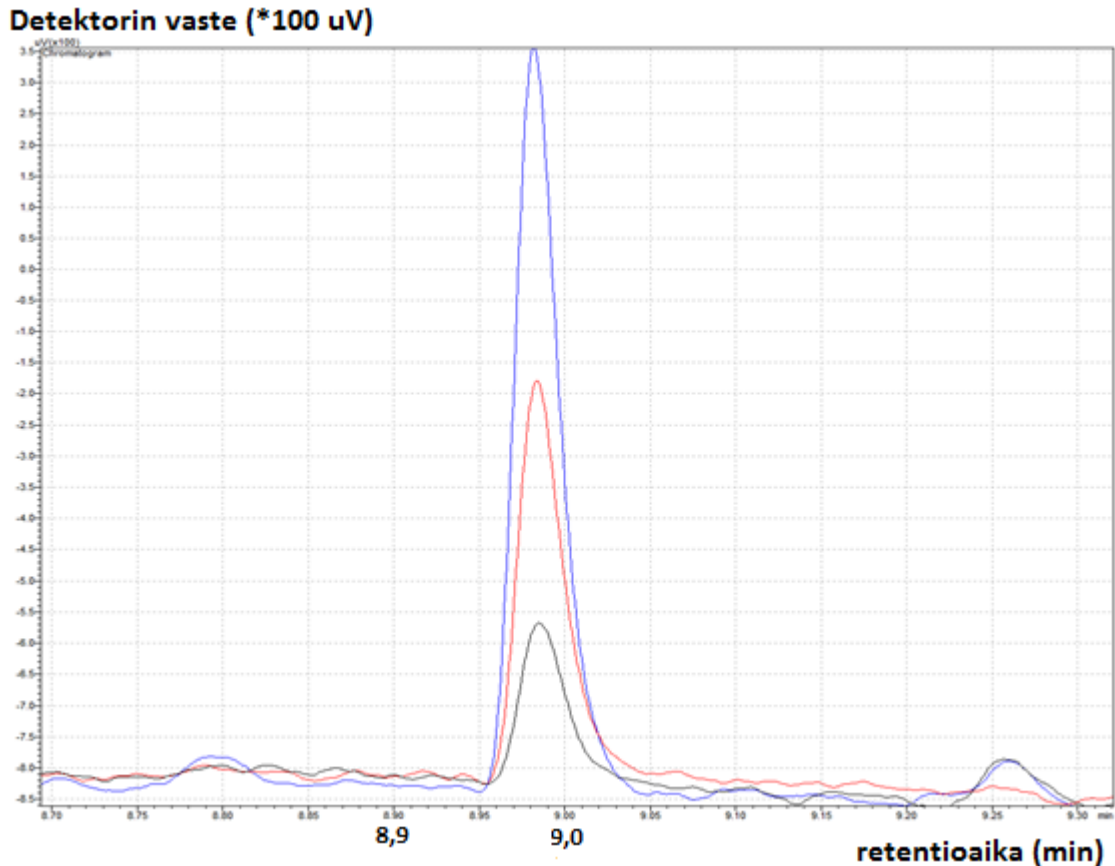
Kuvan 4.5 kromatogrammien SCAN-mittauksen aikana mitatut massaspektrit on esitetty liitteessä C. Kyseisen liitteen kuvissa C.1 ja C.2 on esitetty massaspektrit laktidi- ja sisästandardipiikin eri kohdista PLDLA96/4-näyteliuksen mittaukselle. Kuvissa C.3 ja C.4 on esitetty vastaavat massaspektrit PLCL-näyteliuksen mittaukselle. Molempien näytteiden tapauksessa massaspektrit sekä laktidi- että sisästandardipiikin eri kohdissa vastaavat todella hyvin toisiaan ja myös liitteen A kuvien A.2 ja A.3 referenssispektrejä. Siten kyseisenkaltaisilla näytteillä menetelmän voidaan todeta olevan spesifinen.

## 4.2 GCFID-menetelmän kehittäminen

GCFID-menetelmässä käytettiin GC-analyysissä samoja ajoasetuksia kuin mitä GCMS-menetelmälle optimoitiin injektioon ja kromatografian osalta. FID:n detektorikaasuna käytettiin heliumia  $30\text{ ml min}^{-1}$  virtausnopeudella. FID:n liekkiin johdettiin vetyä ja ilmaa virtausnopeuksilla  $40\text{ ml min}^{-1}$  ja  $400\text{ ml min}^{-1}$ . FID:n lämpötilana käytettiin  $320\text{ }^{\circ}\text{C}$ :tta. Kyseiset parametrien arvot valittiin FID:n asennuksen yhteydessä laitteiston myyjän asiantuntijoiden suosituksesta, eikä muita arvoja ehditty testaamaan tämän työn aikana. Kyseiset arvot ovat kuitenkin hyvin tavallisesti käytettyjä. Vedyn virtausnopeuden optimoinnilla voisi mahdollisesti parantaa FID:n herkkyyttä, joten laitteiston määrittämisrajaa voisi mahdollisesti vähän parantaa. [7, s. 115 - 117] FID:n käytön tiedettiin rajoittavan mitattavan laktidin massakonsentraatioalueen alarajaa toisin kuin MS:ää käytettäessä. Tästä syystä GCFID:llä määritettiin ensin arvio laitteiston määrittämisrajalle.

Laitteiston määrittämisrajan arvioimiseksi valmistettiin standardiliuokset, joiden kantaliuosten punnitustuloksista lasketut laktidin massakonsentraatiot olivat 0,1455, 0,3275 ja

0,6175  $\mu\text{g cm}^{-3}$ . Kyseisistä standardiliuoksista GCFID:llä mitatut kromatogrammit on esitetty kuvassa 4.6. Kromatogrammeista on esitetty vain laktidipiikin läheinen retentioaika-alue. Laktidipiikki ja sisästandardipiikki tunnistettiin retentioaikojen avulla, sillä kromatografian kannalta GCFID-mittaukset vastasivat GCMS-mittauksia. Kuvasta 4.6 on myös havaittavissa laktidipiikin suureneminen mitattavan standardiliuoksen laktidin massakonsentraation kasvaessa.



**Kuva 4.6.** GCFID-mittausten laitteiston määrittämisen arvioiminen laimeiden standardiliuosten mittauksista. Mitatuista kromatogrammeista on esitetty vain laktidipiikin lähi-alue. Mustan käyrän mittauksessa liuoksen laktidin massakonsentraatio oli 0,1455  $\mu\text{g cm}^{-3}$ , punaisen käyrän mittauksessa se oli 0,3275  $\mu\text{g cm}^{-3}$  ja sinisen käyrän mittauksessa se oli 0,6175  $\mu\text{g cm}^{-3}$ .

GCFID:llä mitattujen kromatogrammien tarkasteluun käytetyllä GCSolution-ohjelmalla ei voitu määrittää signaalikohinasuhdetta kuten GCMS-mittausten tapauksessa. Signaalikohinasuhde arvioitiin kuvan 4.6 kromatogrammeista piikin korkeuden ja *baseline*:n kohinan vaihteluvälin korkeuden, joka arvioitiin kuvan perusteella noin 50  $\mu\text{V}$ :ksi, suhteena. Kuvan laktidipiikkien korkeuksiksi arvioitiin noin 1200, 650 ja 300  $\mu\text{V}$ . Siten mitattujen piikkien signaalikohinasuhteiden arvioiksi saatiin noin 24, 13 ja 6. Laitteiston määrittämisen tarkkuus arvioitiin mitattavalle laktidin massakonsentraatiolle voi siis pitää noin 0,3  $\mu\text{g cm}^{-3}$ . Kyseinen massakonsentraatio vastaa luvun 3.4.1 GCMS-menetelmän näytteenkäsittelyohjeen mukaisesti laktidipitoisuudeltaan 0,02 m-%:n näytteestä valmis-

tetun näyteliuksen massakonsentraatioita Vial 2 -liuosvaiheessa. Siten GCMS-menetelmän näytteenkäsittelyn Vial 2 -liuokset kelpaavat normaalin suodatuksen jälkeen sellaisinaan GCFID-mittauksiin. GCFID-menetelmään kasvatettiin kuitenkin punnittavia massoja GCMS-menetelmään nähden, jotta mittauksia ei tehtäisi niin lähellä laitteiston määrittämissä rajoja. Polymeeriliuosten kasvava viskoosisuus, joka hankaloitti pipetointia täyspipteillä, kuitenkin rajoitti punnittavien massojen kasvattamista lisää.

GCFID:llä mitattujen kromatogrammien piikkien integrointiin oli GCSolution-ohjelmassa erilainen automaattinen integrointi kuin GCMS Postrun Analysis -ohjelmassa. Automaattisen integroinnin parametrit jouduttiin testaamaan tutkituille piikeille sopiviksi. Testaaminen tehtiin alaluvussa 5.2.2 ja liitteessä J esitetyn injektointitoistettavuuden määrityksen yhteydessä. Testatut integrointiparametrien arvot olivat *slope*-arvot 1500, 5000, 10000 ja 15000  $\mu\text{V min}^{-1}$ . Erot tuloksissa olivat hyvin pienet, mutta paras injektointitoistettavuus saavutettiin, kun mitatut kromatogrammit integroitiin arvoa 1500  $\mu\text{V min}^{-1}$  käyttäen. Kyseistä arvoa käytettiin kaikkien mittaustulosten käsittelyssä.



## 5. MENETELMIEN ALUSTAVA VALIDOINTI

Sekä GCMS- että GCFID-menetelmille tehtiin alustava validointi menetelmien suorituskykyjen testaamiseksi ja vertailemiseksi. Määritettävät validointiparametrit olivat lineaarinen alue ja lineaarisuus, toistettavuus, tarkkuus ja määrittäysraja. GCFID-menetelmällä pyrittiin myös saamaan varmuus laktidikantaliuosten säilyvyydelle niiden normaalin käytön pituisella ajanjaksolla. Menetelmien spesifisyyttä tutkittiin PLDLA96/4- ja PLCL-näytteillä alaluvussa 4.1.3 vertaamalla GCMS-menetelmällä SCAN:lla mitattuja massaspektrejä, jotka oli mitattu kromatogrammin laktidi- ja sisästandardipiikkien eri kohdissa, toisiinsa ja referenssispektreihin. Kyseisillä näytteillä menetelmä oli spesifinen tutkittavien analyttien suhteen eli analyytit erottuivat muista yhdisteistä kolonnissa.

Alaluvussa 5.1 on kuvattu GCMS-menetelmän alustavassa validoinnissa tehdyt mittaukset ja niiden tulokset. Alaluvussa 5.2 on sitten kuvattu vastaavat tiedot GCFID-menetelmälle. Kaikki näytteenkäsittelyt ja mittaukset on tehty alalukujen 3.4.1 ja 3.4.2 mukaisesti, jos toisin ei ole mainittu. Alaluvussa 5.2.5 on kuvattu kantaliuosten säilyvyyden arvioimiseksi tehdyt GCFID-mittaukset ja niiden tulokset. Koska GCMS- ja GCFID-menetelmissä valmistettavien laktidistandardin kantaliuosten massakonsentraatiot ovat lähes samat, ovat kantaliuoksen säilyvyyteen liittyvät tulokset päteviä myös GCMS-menetelmälle. Jokaisena mittauspäivänä määritettiin uusi kalibroitaisuora alalukujen 3.4.1 ja 3.4.2 mukaisesti. GCMS- ja GCFID-mittauksissa määritetyt kalibroitaisuorat on esitetty liitteissä E ja I. Menetelmien alustavien validointien tuloksia on vertailtu alaluvussa 5.3. Alaluvussa 5.4 on lisäksi tarkasteltu molempia menetelmiä ja esitetty niiden käyttöön liittyviä havaintoja, joita mittauksissa tuli esille.

### 5.1 GCMS-menetelmän alustava validointi

GCMS-menetelmän alustavan validoinnin mittauksia tehtiin seuraavina päivinä: lineaarisuus 26.5., PLDLA96/4-näytteiden toistettavuus 27.5., tarkkuus *spiking*-näytteillä 28.5. ja 29.5. ja BulkkiPLA-näytteiden toistettavuus 5.6. Mittauksia tehtiin lisäksi GCFID-mittausten jälkeen 3.7. Laitteiston ylläpitoon liittyvistä toimenpiteistä tehtiin näytteenäytteen ruiskun manuaalinen pesu ja toiminnan tarkistus sekä septumin vaihto 26.5., 28.5., 5.6. ja 3.7. mittauksia ennen. Injektorin lineri vaihdettiin 26.5., 5.6. ja 3.7. mittauksia ennen. Kolonni puhdistettiin katkaisemalla injektorin puoleisesta päädyistä noin 15 cm ja paahtamalla sitä liitteen M mukaisesti ensimmäistä mittauspäivää varten ja 3.7. mittauspäivää varten. Massaspektrometri viritettiin laitteiston automaattisen *autotuning*-toiminnon avulla 26.5., 5.6. ja 3.7. mittauksia ennen. Muina mittauspäivinä viritys tarkistettiin laitteiston *SystemCheck*-toiminnon avulla mittauksia ennen.

### 5.1.1 Lineaarisuus

Lineaarisuuden määrittämiseksi valmistettiin ja mitattiin GCMS-menetelmällä 26. toukokuuta kuusi mitattavaa standardiliuosta eli standardit 1 - 6, joiden laktidin massakonsentraatiot  $c_{v3}(La)$  olivat noin 0,025 - 1,25  $\mu\text{g cm}^{-3}$ . Standardiliuokset valmistettiin alaluvun 3.4.1 mukaisesti, mutta kantaliuoksiin punnitut L-laktidin massat olivat eri suuret. Edellä mainitut massakonsentraatiot vastaavat polymeerinäytteen laktidipitoisuutena 0,02 - 1,0 m-%:a, jos polymeerinäytteestä valmistetaan näyteliuos alaluvun 3.4.1 mukaisesti. Mitattujen standardiliuosten valmistus ja niille lasketut tarkat laktidin ja sisästandardin massakonsentraatiot on kuvattu liitteen D taulukossa D.1. Valmistetut standardit 3, 4 ja 5 vastasivat GCMS-menetelmässä normaalisti valmistettavia standardiliuoksia. Kyseisten standardien kantaliuoksista valmistettiin kaksi mitattavaa rinnakkaisliuosta (standardiliuokset 3a ja 3b, 4a ja 4b, 5a ja 5b). Rinnakkaisliuokset valmistettiin Vial 1, Vial 2 ja Vial 3 -liuosvaiheissa omina liuoksinaan. Standardeista 1, 2 ja 6 valmistettiin vain yhden mitattavat liuokset laboratoriotarvikkeiden puutteen vuoksi.

Taulukossa 5.1 on esitetty mitattujen standardiliuosten laktidin massakonsentraatiot,  $c_{v3}(la)$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ), niille mitatuista kromatogrammeista GCMS Postrun Analysis -ohjelmalla määritetyt laktidipiikin ja sisästandardipiikin pinta-alat,  $A(La)$  ja  $A(IS)$ , ja piikkien pinta-aloista laskettu suhde  $A(La)/A(IS)$ . Liitteen D kuvassa D.1 on esitetty esimerkkinä standardin 4a kromatogrammin laktidi- ja sisästandardipiikkien pinta-alojen määrittäminen. Standardeille määritetyt  $A(La)/A(IS)$ -arvot on esitetty standardin laktidin massakonsentraation funktiona kuvassa 5.1. Kuvan 5.1 mittauspisteisiin sovitettiin suora Excelissä pienimmän neliösumman menetelmällä. Sovitus tehtiin mittauspisteiden keskiarvoihin standardien 3, 4 ja 5 rinnakkaismäärittysten tapauksessa. Lineaarisuus-suoralle määritettiin yhtälö

$$\frac{A(La)}{A(IS)} = (3,0485 \text{ ml } \mu\text{g}^{-1}) \times c_{v3}(La) + 0,014 \quad (16)$$

ja korrelaatiokertoimen neliölle,  $R^2$ , arvo 0,9996.  $R^2$ -arvo on riittävän hyvä kyseisellä konsentraatioalueella lineaariselle sovitukselle [4, s. 101]. Lisäksi y-akselin leikkauspisteen poikkeama origosta on hyvin pieni verrattaessa sitä mitattuihin arvoihin.

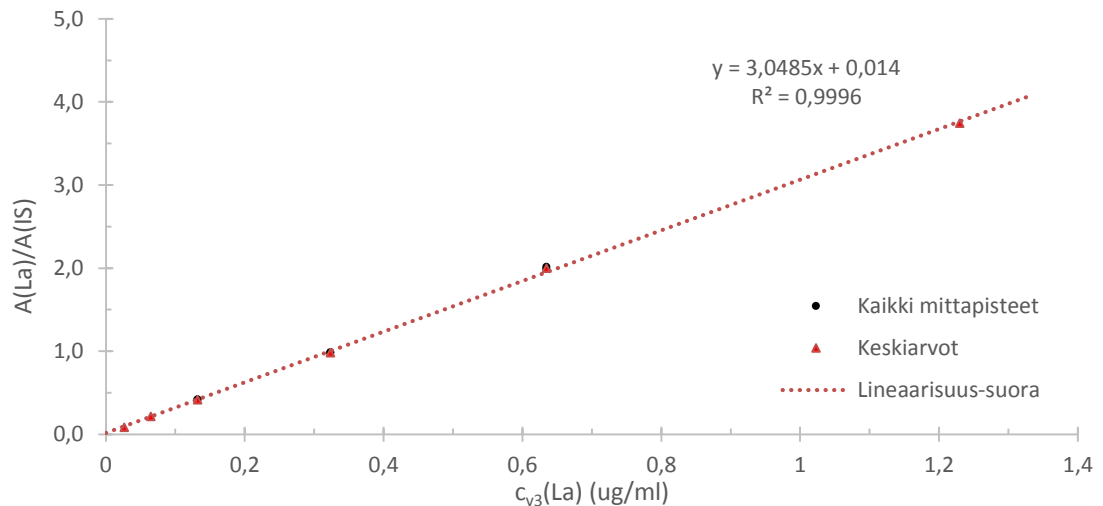
Taulukkoon 5.1 on lisäksi laskettu yhtälön 16 avulla jokaiselle standardille mitattua  $A(La)/A(IS)$ -arvoa vastaava laktidin massakonsentraatio kuvan 5.1 lineaarisuus-suoralla,  $c'_{v3}(La)$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ), eli niin sanottu takaisin laskettu massakonsentraatio. Taulukkoon on sitten laskettu, kuinka monta prosenttia takaisin laskettu arvo on standardin tunnettuun massakonsentraatioon,  $c_{v3}(la)$ , verrattuna. Lineaarisuus-suoran lisäksi standardien takaisin lasketut massakonsentraatiot,  $c'_{v3}(La)$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ), on laskettu myös standardien 3, 4 ja 5 mittauksista määritetyn kalibrointisuoran avulla. Kyseinen kalibrointisuora määritettiin alaluvun 3.4.1 mukaisesti ja se siis vastaa GCMS-menetelmässä käytettyä kalibrointisuoraa. Kyseisen kalibrointisuoran määrittäminen on esitetty liitteessä E ja sen yhtälöksi määritettiin yhtälön 10 mukaisesti

$$\frac{A(\text{La})}{A(\text{IS})} = (3,127462 \text{ cm}^3 \mu\text{g}^{-1}) \times c_{v3}(\text{La}). \quad (17)$$

Myös yhtälön 17 avulla takaisin laskettua massakonsentraatiota,  $c'_{v3}(\text{La})$ , verrattiin standardin tunnettuun massakonsentraatioon. Edellä mainituista laskuista on esitetty esimerkki liitteessä D. Lineaarisuus-suoralta takaisin lasketut massakonsentraatiot ovat 98 - 103 %:a tunnetuista massakonsentraatioista paitsi standardilla 1, jolla se on 84 %. Kalibrointisuoralta takaisin lasketut massakonsentraatiot ovat puolestaan 97 - 105 %:a standardien tunnetuista massakonsentraatioista. Kalibrointisuora on pakotettu kulkemaan origon kautta eikä siinä huomioida suurimman konsentraation mittauspistettä, jonka vaikutus painottamattomassa suoran sovituksessa on suurin. Nämä seikat selittävät kalibrointisuoran antaman paremman vastaavuuden takaisin lasketun ja tunnetun arvon välillä pienillä massakonsentraatioilla. Molemmissa tapauksissa standardien takaisin lasketut massakonsentraatiot vastaavat riittävän hyvin niiden tunnettuja massakonsentraatioita [B15, s. 191].

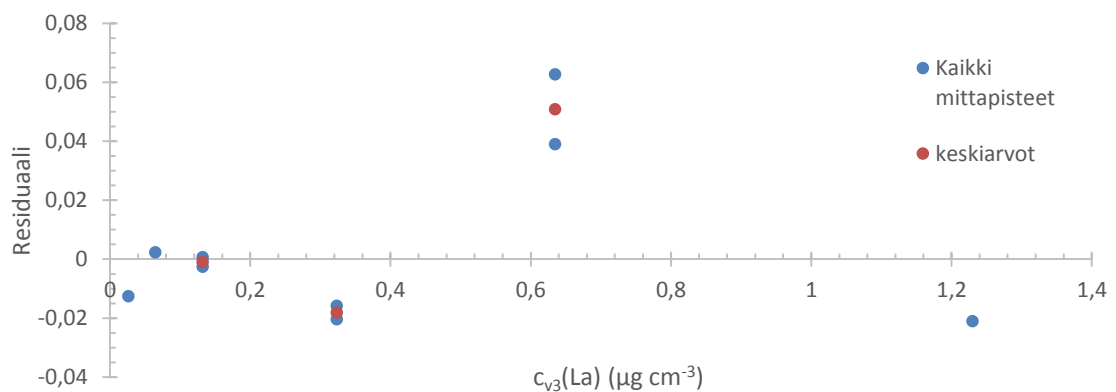
**Taulukko 5.1.** GCMS-menetelmän lineaarisuuden määrittämisen mittaustulokset.  $c'_{v3}(\text{La})$  ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) on lineaarisuus-suoran yhtälön (yhtälö 16) avulla laskettu standardin takaisin laskettu massakonsentraatio ja  $c''_{v3}(\text{La})$  on kyseisen mittauspäivän (26.5.) kalibrointisuoran yhtälön (yhtälö 17) avulla laskettu standardien takaisin laskettu massakonsentraatio. Sekä  $c'_{v3}(\text{La})$ :a että  $c''_{v3}(\text{La})$ :a on verrattu prosentuaalisesti tunnettuun arvoon  $c_{v3}(\text{La})$ . Residuaalit on laskettu mitatun  $A(\text{La})/A(\text{IS})$ -arvon poikkeamana lineaarisuus-suoralta y-akselin suunnassa. Laskuesimerkit on esitetty liitteessä D. Sisästandardin massakonsentraatio oli kaikissa standardeissa  $0,3080 \mu\text{g cm}^{-3}$ .

Standardi	Tunnettu $c_{v3}(\text{La})$ $\mu\text{g cm}^{-3}$	Mitatut piikkien pinta-alat			Takaisin laskettu massakonsentraatio ja sen suhde $c_{v3}(\text{La})$ :iin				Residuaali
		$A(\text{La})$ (*10 <sup>5</sup> )	$A(\text{IS})$ (*10 <sup>5</sup> )	$A(\text{La})/A(\text{IS})$	$c'_{v3}(\text{La})$ $\mu\text{g cm}^{-3}$	(%)	$c''_{v3}(\text{La})$ $\mu\text{g cm}^{-3}$	(%)	
1	0,0265	0,42599	5,1948	0,0820	0,0223	84	0,0262	99	-0,01261
2	0,0647	0,87115	4,0813	0,2134	0,0654	101	0,0682	105	0,00223
3a	0,1323	1,8312	4,4176	0,4145	0,1314	99	0,1325	100	-0,00262
3b	0,1323	1,82054	4,3583	0,4177	0,1324	100	0,1336	101	0,00057
4a	0,3235	4,64037	4,7367	0,9797	0,3168	98	0,3132	97	-0,02052
4b	0,3235	4,5655	4,6387	0,9842	0,3183	98	0,3147	97	-0,01596
5a	0,6348	8,76111	4,4071	1,9880	0,6475	102	0,6356	100	0,03894
5b	0,6348	8,7720	4,3606	2,0117	0,6553	103	0,6432	101	0,06266
6	1,2299	18,3032	4,8912	3,7421	1,2229	99	1,1965	97	-0,02116



**Kuva 5.1.** GCMS-menetelmän alustavan validoinnin lineaarisuuden määrittäminen.  $A(La)/A(IS)$  on laktidi- ja sisästandardipiikkien pinta-alojen suhde.  $c_{v3}(La)$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ) on mitattavan standardiliuoksen laktidin massakonsentraatio. Suora on sovitettu mittauspisteiden keskiarvoihin rinnakkaismääritysten (standardit 3, 4 ja 5) tapauksessa.

Taulukkoon 5.1 on lisäksi laskettu lineaarisuus-suoran yhtälön (yhtälö 16) avulla jokaisen kuvan 5.1 mittauspisteen residuaali eli mittapisteen poikkeama y-akselin suunnassa lineaarisuus-suorasta. Kuvassa 5.2 on esitetty residuaali standardiliuoksen laktidin massakonsentraation funktiona. Residuaalit ovat jakautuneet nollan eri puolin eivätkä ne muodosta mitään selkeää käyrää. Siten lineaarinen sovitus kelpaa mittauspisteiden joukkoon kyseisellä konsentraatiovälillä.



**Kuva 5.2.** Residuaalien jakautuminen nollan eri puolin GCMS-menetelmän lineaarisuuden määrittämisessä.

### 5.1.2 Toistettavuus

GCMS-menetelmän toistettavuuden määrittämiseksi mitattiin viidellä rinnakkaismäärittäyksellä polymeerinäytteiden PLDLA96/4 ja BulkkiPLA laktidipitoisuudet. Toistettavuus-

den mittana käytettiin kyseisten mittausten suhteellista keskihajontaa. Polymeerinäytteistä valmistettiin mitattavat näyteliuokset alaluvun 3.4.1 mukaisesti. Myös kalibrointiin käytetyt standardiliuokset valmistettiin edellä mainitun alaluvun mukaisesti. PLDLA96/4-näytteet mitattiin 27. toukokuuta ja BulkkiPLA-näytteet 5. kesäkuuta. Lisäksi määritettiin laitteiston injektointitoistettavuus injektoimalla sama PLDLA96/4-näyteliuos viiteen kertaan PLDLA96/4-näytteiden mittausten yhteydessä.

Taulukossa 5.2 on esitetty PLDLA96/4- ja BulkkiPLA-näytteiden punnitut massat,  $m_{\text{näyte}}$  (mg), näytteistä valmistetuilla näyteliuoksilla mitatut laktidi- ja sisästandardipiikin pintaalat ja niistä lasketut suhteet. Liitteen F kuvissa F.1 ja F.2 on esitetty esimerkkinä pintaalan määrittäminen PLDLA96/4-näytteen 1 ja BulkkiPLA-näytteen 1 kromatogrammeista. Mittattujen  $A(\text{La})/A(\text{IS})$ -arvojen ja määritetyn kalibrointisuoran avulla määritettiin GCSolution-ohjelmalla mitattujen näyteliuosten laktidin massakonsentraatiot,  $c_{\text{v3}}(\text{La})$ . Näyteliuoksen massakonsentraatiosta laskettiin yhtälöllä 11 laktidin massa Vial 1 -liuoksessa eli laktidin massa näytteessä,  $m_{\text{v1}}(\text{La})$  (mg). Taulukkoon on lopuksi laskettu yhtälöllä 12 laktidin massan ja näytteen massan avulla näytteen laktidipitoisuus massaprosenttiosuutena,  $w(\text{La})$  (m-%). Taulukkoon liittyvistä laskuista on esitetty laskuesimerkit liitteessä F. PLDLA96/4-näytteen 1 näyteliuos injektointiin ja mitattiin taulukon 5.2 mittauksen lisäksi vielä neljä kertaa. Viidestä saman näyteliuoksen injektoinnista määritettiin laitteiston injektointitoistettavuus, mikä on esitetty liitteen F taulukossa F.1.

Taulukon 5.2 mukaisesti GCMS-menetelmän lyhyen aikavälin toistettavuudeksi määritettiin suhteellisena keskihajontana 2,0 %, joka on melko pieni arvo menetelmän toistettavuudelle. Mittaukset tehtiin PLDLA96/4-näytteillä saman päivän aikana, joten mittauspäivän vaikutus ei näy määrittelyssä toistettavuudessa. Lisäksi laitteiston osien likaantuminen, kuten injektorin linerin likaantuminen näytteiden epäpuhtauksien ja septumipartikkelien johdosta, voi huonontaa toistettavuutta pitemmän aikavälin mittausarjoissa, jos lineria ei vaihdeta tarpeeksi usein. Kyseisenä mittauspäivänä lineri oli kuitenkin oletettavasti puhdas, sillä sitä oli käytetty vain edeltävän mittauspäivän lineaarisuusstandardien mittauksiin. PLDLA96/4:lle määritettiin laktidipitoisuus 0,033 m-%. Injektointitoistettavuudeksi PLDLA96/4-näytteellä, joka oli taulukon 5.2 näyte 1, määritettiin suhteellisena keskihajontana 1,8 %.

Taulukosta 5.2 nähdään, että BulkkiPLA-näytteillä mitattiin huomattavasti suurempi lyhyen aikavälin toistettavuus kuin PLDLA96/4-näytteillä. Kyseinen arvo eli 9,8 % on jo melko suuri toistettavuudelle. BulkkiPLA on huomattavasti epäpuhtaampaa kuin lääketieteellistä laatua oleva PLDLA96/4, millä voi ehkä olla vaikutusta eroon. Esimerkiksi BulkkiPLA:sta valmistettu näyteliuos voi sisältää suhteessa enemmän oligomeerejä, jotka voivat injektorissa hajota termisesti laktidiksi. Lisäksi BulkkiPLA-näytteiden ei silmämääräisesti havaittu saostuvan yhtä selkeästi kuin PLDLA96/4-näytteiden. BulkkiPLA-näytteiden jälkeen mitatuissa puhtaan liuottimen injektioinneissa havaittiin lisäksi suurempi epäpuhtauspiikki laktidin retentioajoilla, mikä voi mittaussarjan sisällä aiheuttaa

suuremman hajonnan tuloksiin. Kyseessä oli mahdollisesti polymeerinäyteliuoksen mitauksen jälkeen injektorissa termisesti muodostunutta laktidia. BulkkiPLA-näytteelle mitatun kromatogrammin piikkien puhtautta ei lisäksi tutkittu SCAN-mittauksilla kuten PLDLA96/4:llä, joten muut yhdisteet ovat voineet vaikuttaa laktidin ja sisästandardin piikkien aloihin. Detektointi tehtiin kuitenkin selektiivisesti, ja kvantitointi-ionien SIM-kromatogrammeissa (liite F) ei havaittu häiritseviä piikkejä. BulkkiPLA:n laktidipitoisuudeksi määritettiin massaprosenttiosuutena noin 0,31 m-%, joka on noin kymmenkertainen pitoisuus PLDLA96/4:ään nähden.

**Taulukko 5.2.** GCMS-menetelmän toistettavuuden määrittäminen. Näytteinä käytetty PLDLA96/4- ja BulkkiPLA-näytteitä.  $m_{\text{näyte}}$  (mg) on näytteen massa,  $c_{v3}(\text{La})$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ) on mitattu laktidin massakonsentraatio mitattavassa näyteliuoksessa (Vial 3 -liuos) ja  $m_{v1}(\text{La})$  (mg) on mitatusta massakonsentraatiosta yhtälöllä 11 laskettu laktidin massa näytteessä eli Vial 1 -liuoksessa. Näytteen laktidipitoisuus massaprosenttiosuutena,  $w(\text{La})$  (m-%), on laskettu yhtälöllä 12. Määritetyistä laktidipitoisuuksista on laskettu keskiarvot, keskihajonnat ja suhteelliset keskihajonnat.

Näyte (PLDLA96/4)	$m_{\text{näyte}}$ (mg)	Mitatut piikkien pinta-alat			Mitattu $c_{v3}(\text{La})$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	Näytteen sisältämä laktidi	
		A(La) (*10 <sup>4</sup> )	A(IS) (*10 <sup>4</sup> )	A(La)/A(IS)		$m_{v1}(\text{La})$ (mg)	$w(\text{La})$ (m-%)
1	498,55	5,1380	35,016	0,14673	0,04073	0,1629	0,0327
2	506,44	5,4254	35,189	0,15418	0,04280	0,1712	0,0338
3	501,14	5,2373	34,837	0,15034	0,04173	0,1669	0,0333
4	499,5	5,0679	34,822	0,14554	0,04040	0,1616	0,0324
5	502,13	5,2222	35,771	0,14599	0,04052	0,1621	0,0323
Näyte (BulkkiPLA)						Keskiarvo	<b>0,033</b>
						K.hajonta	<b>0,00065</b>
						Suht.k.hajonta (%)	<b>2,0</b>
1	502,81	76,492	58,474	1,30814	0,4217	1,687	0,335
2	504,04	64,512	56,287	1,14614	0,3695	1,478	0,293
3	496,42	61,243	59,039	1,03732	0,3344	1,338	0,269
4	507,72	65,677	56,967	1,15290	0,3717	1,487	0,293
5	496,39	79,143	60,824	1,30117	0,4195	1,678	0,338
					Keskiarvo	<b>0,31</b>	
					K.hajonta	<b>0,030</b>	
					Suht.k.hajonta (%)	<b>9,8</b>	

### 5.1.3 Tarkkuus

GCMS-menetelmän tarkkuus määritettiin pelkästään *spiking*-näytteiden mittauksilla kolmella laktidipitoisuuden tasolla kuten NatureWorks:n menetelmän validoinnissa [4]. Näytematriisina käytettiin PLDLA96/4-näytteitä, koska kyseisen materiaalin laktidipitoisuuden havaittiin olevan hyvin pieni toistettavuusmittauksissa. PLDLA96/4-näytteistä valmistettiin mitattavat näyteliuokset alaluvun 3.4.1 mukaisesti, mutta polymeerinäytteiden liuettua Vial 1 -liuoksiin lisättiin tunnetut massat L-laktidia ennen sisästandardikantaliuoksen ja liuottimen lisäystä. Mitattavien näyteliuosten laktidista oli siis osa peräisin polymeerinäytteestä ja osa *spiking*-lisäyksestä. Mitattavat näyteliuokset sisälsivät normaaliin tapaan myös sisästandardia eli 2,6-dimetyyli- $\gamma$ -pyronia. *Spiking*-lisäykset tehtiin pipetoimalla täyspipetillä  $1 \text{ cm}^3$  L-laktidin liuoksia, joiden massakonsentraatiot tunnettiin tarkasti. Lisätyt massat olivat liian pieniä punnittaviksi suoraan riittävällä tarkkuudella. Tarkkuus määritettiin kolmella laktidipitoisuuden tasolla (*spiking*-näytteet 1, 2 ja 3), jolla jokaisella tehtiin kolme rinnakkaismäärittystä (a, b ja c). *Spiking*-näytteet 1a - 1c ja 3a - 3c mitattiin 28. toukokuuta ja *Spiking*-näytteet 2a - 2c 29. toukokuuta.

**Taulukko 5.3.** GCMS-menetelmän tarkkuuden määrittämiseen valmistetut *spiking*-näytteet.  $c_{\text{spike}}(\text{La})$  on *spiking*-lisäykseen käytetyn liuoksen laktidin massakonsentraatio.  $m_{\text{v1, spike}}(\text{La})$  on *spiking*-lisäyksen laktidin massa.  $w_{\text{spike}}(\text{La})$  on *spiking*-lisäyksen laktidin massaprosenttiosuus PLDLA96/4-näytteen massaun,  $m_{\text{näyte}}$ , nähden.  $w(\text{La})$  on PLDLA96/4-näytteen laktidipitoisuus, joka määritettiin alaluvussa 5.1.2.  $m_{\text{v1, polym}}(\text{La})$  on PLDLA96/4-näytteestä *spiking*-näytteeseen vapautuva laktidin massa.  $m_{\text{v1, polym+spike}}(\text{La})$  on laktidin tunnettu kokonaismassa *spiking*-näytteen Vial 1 -liuoksessa.

Spiking-näyte	PLDLA96/4			Spiking-lisäys			Vial 1 -liuoksessa laktidia yhteensä
	$m_{\text{näyte}}$ (mg)	$w(\text{La})$ (m-%)	$m_{\text{v1, polym}}(\text{La})$ (mg)	$c_{\text{spike}}(\text{La})$ (mg/ml)	$m_{\text{v1, spike}}(\text{La})$ (mg)	$w_{\text{spike}}(\text{La})$ (m-%)	$m_{\text{v1, polym+spike}}(\text{La})$ (mg)
1a	499,78	0,033	0,1649	0,1058	0,1058	0,021	0,2707
1b	496,9	0,033	0,1640	0,1058	0,1058	0,021	0,2698
1c	496,68	0,033	0,1639	0,1058	0,1058	0,021	0,2697
2a	494,41	0,033	0,1632	0,5290	0,5290	0,107	0,6922
2b	502,8	0,033	0,1659	0,5290	0,5290	0,105	0,6949
2c	501,11	0,033	0,1654	0,5290	0,5290	0,106	0,6944
3a	500,73	0,033	0,1652	2,539	2,539	0,507	2,7042
3b	499,64	0,033	0,1649	2,539	2,539	0,508	2,7039
3c	496,32	0,033	0,1638	2,539	2,539	0,512	2,7028

Taulukossa 5.3 on esitetty *spiking*-näytteiden valmistus. Taulukkoon on laskettu punnittujen polymeerinäytteiden massoista, eli  $m_{\text{näyte}}$ , polymeerinäytteen laktidipitoisuuden, eli  $w(\text{La})$ , avulla polymeerinäytteestä Vial 1 -liuokseen vapautuvan laktidin massa,  $m_{\text{v1, polym}}(\text{La})$  (mg). *Spiking*-näytteisiin lisätyt tunnetut liuokset olivat kalibroinnin standardien valmistamiseen käytettyjä kantaliuoksia tai niiden laimennoksia. *Spiking*-näytteisiin 2a, 2b ja 2c lisättiin standardin 1 laktidikantaliuosta ja *spiking*-näytteisiin 3a, 3b ja 3c lisättiin

standardin 3 laktidikantaliuosta. *Spiking*-näytteisiin 1a, 1b ja 1c lisättiin standardin 1 laktidikantaliuoksesta laimennuskertoimella 1/5 laimennettua liuosta. Koska *spiking*-lisäysten massakonsentraatiot,  $c_{\text{spike}}(\text{La})$  ( $\text{mg cm}^{-3}$ ), tunnettiin, tunnettiin myös Vial 1 -liuoksiin lisätyt laktidin massat,  $m_{\text{v1, spike}}(\text{La})$  (mg). Taulukkoon on laskettu lisäksi *spiking*-lisäyksen massan massaprosenttiosuus polymeerinäytteen massaan nähden,  $w_{\text{spike}}(\text{La})$  (m-%). *Spiking*-lisäykset vastasivat laktidin massaprosenttiosuutena noin 0,02 m-%, 0,11 m-% ja 0,51 m-% lisäyksiä. Huomioiden polymeerinäytteen laktidipitoisuuden 0,033 m-% määritettiin tarkkuus siis noin laktidipitoisuuksilla 0,05 m-%, 0,14 m-% ja 0,54 m-%. Taulukkoon on lisäksi laskettu laktidin kokonaismassa Vial 1 -liuoksessa,  $m_{\text{v1, polym+spike}}(\text{La})$  (mg), eli *spiking*-lisäyksen massan ja polymeeristä vapautuvan laktidin massan summa. Taulukkoon 5.3 liittyvät laskuesimerkit on esitetty liitteessä G.

Taulukossa 5.4 on esitetty taulukon 5.3 *spiking*-näytteiden mittaustulokset. Mitatut näyteliuokset valmistettiin Vial 1 -liuoksista ja mitattiin normaaliin tapaan. Laktidi- ja sisästandardipiikin integrointituloksista määritettiin kalibroinnin avulla normaaliin tapaan mitattavan näyteliuoksen laktidin massakonsentraatio,  $c_{\text{v3}}(\text{La})$ . Mitatusta massakonsentraatiosta laskettiin yhtälöllä 12 laktidin massa Vial 1 -liuoksessa,  $m_{\text{v1}}(\text{La})$ . Suhteellinen saanto,  $Rec_b$  (%), laskettiin yhtälöllä 6 Vial 1 -liuoksen mitatun ja tunnetun laktidin massan suhteena. Kolmen määrittelyn keskiarvona määritettyä suhteellista saantoa käytettiin tarkkuuden mittana. Suhteellisen saannon eroa 100 % arvoon nähden voidaan käyttää systemaattisen virheen arviona. Taulukkoon liittyvistä laskuista on esitetty laskuesimerkki liitteessä G.

Taulukosta 5.4 nähdään, että määritetyt tarkkuudet eli suhteelliset saannot olivat 105,6 %, 97,1 % ja 107,4 % laktidipitoisuuksilla 0,05 m-%, 0,14 m-% ja 0,54 m-%. Kaikilla laktidipitoisuuksilla kolmen rinnakkaismäärittelyn välillä on hajontaa, joka on suurempaa kuin toistettavuusmittauksissa. *Spiking*-lisäyksen pipetointivirhe suurentaa hajontaa toistettavuusmittauksiin verrattuna. Laktidipitoisuudella 0,14 m-% määritetty suhteellinen saanto 97,1 % on alle 100 % toisin kuin kahdella muulla laktidipitoisuudella määritetyt arvot. Kyseinen ero johtuu todennäköisesti eri mittauspäivästä, sillä molempina mitauspäivinä mitattiin uusi kalibrointisuora ennen *spiking*-näytteiden mittaamista. Menetelmän suhteelliseksi systemaattiseksi virheeksi voidaan arvioida 5,6 %, 2,9 % ja 7,4 % eri laktidipitoisuuksilla. Kyseiset virheet ovat hyväksyttäviä menetelmän käyttökohteen huomioiden, sillä 10 %:n suhteellista systemaattista virhettä voidaan pitää hyväksyttävänä materiaalissa noin 0,1 m-%:n pitoisuudella esiintyvien yhdisteiden kvantitatiivisessa analyysissä [8, s. 102].



**Taulukko 5.4.** GCMS-menetelmän spiking-näytteiden mittaustulokset.  $m_{v1, \text{polym+spike}}(\text{La})$  (mg) on laktidin tunnettu massa spiking-näytteen Vial 1 -liuoksessa.  $c_{v3}(\text{La})$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ) on mitattu laktidin massakonsentraatio mitattavassa näyteliuoksessa ja  $m_{v1}(\text{La})$  (mg) on massakonsentraatiosta laskettu havaittu laktidin massa Vial 1 -liuoksessa. Suhteellinen saanto,  $Rec_b$  (%), on laskettu yhtälöllä 6 laktidin mitatun ja tunnetun massan suhteena.

Spiking-näyte	Tunnettu $m_{v1, \text{polym+spike}}(\text{La})$ (mg)	Mitatut piikkien pinta-alat			Mitattu		Suhteellinen saanto $Rec_b$ (%)
		$A(\text{La})$ (*10 <sup>4</sup> )	$A(\text{IS})$ (*10 <sup>4</sup> )	$A(\text{La})/A(\text{IS})$	$c_{v3}(\text{La})$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	$m_{v1}(\text{La})$ (mg)	
1a	0,2707	8,2646	31,0835	0,26588	0,06949	0,2780	102,7
1b	0,2698	8,4573	30,584	0,27653	0,07227	0,2891	107,2
1c	0,2697	8,2522	29,9244	0,27577	0,07208	0,2883	106,9
					<b>Keskiarvo</b>		<b>105,6</b>
2a	0,6922	20,1559	28,1155	0,71690	0,15968	0,6387	92,3
2b	0,6949	18,2112	22,3072	0,81638	0,18184	0,7273	104,7
2c	0,6944	20,5996	28,0298	0,73492	0,16369	0,6548	94,3
					<b>Keskiarvo</b>		<b>97,1</b>
3a	2,7042	82,7675	30,6979	2,69619	0,70469	2,8188	104,2
3b	2,7039	82,9204	29,9865	2,76526	0,72274	2,8910	106,9
3c	2,7028	83,5782	29,1344	2,86871	0,74978	2,9991	111,0
					<b>Keskiarvo</b>		<b>107,4</b>

### 5.1.4 Määrittäysraja

Määrittäysrajalle määritettiin arvio kahdella tavalla: PLDLA96/4-näytteiden toistettavuusmittauksista yhtälön 7 avulla ja lineaarisuus-suoran regressioanalyysin tuloksista yhtälön 8 avulla. PLDLA96/4:n laktidipitoisuudeksi määritettiin 0,033 m-% massaprosenttiosuutena. Kyseinen arvo on tarpeeksi pieni yhtälön 7 käytölle, sillä käytännössä alle 0,02 m-% laktidipitoisuuksien mittaamiseen ei ole tarvetta.

Taulukon 5.2 keskihajonnan 0,00065 m-% eli noin 0,001 m-% avulla saadaan määrittäysrajan arvioksi yhtälöllä 7 laskettua

$$\text{LOQ}(s') = \frac{10 s}{\sqrt{X}} = \frac{10 \times 0,001 \text{ m}\%}{\sqrt{3}} \approx 0,005774 \text{ m}\% ,$$

eli noin 0,01 m-%. Laskussa on käytetty arvoa  $X = 3$  olettaen siis, että menetelmällä tehtävien määrittäysten tulokset lasketaan kolmen rinnakkaismäärittäyksen keskiarvona.

Kuvan 5.1 lineaarisuus-suoran yhtälö on esitetty yhtälössä 16. Suoran kulmakerroin,  $k_{kk}$ , on  $3,0485 \text{ cm}^3 \mu\text{g}^{-1}$  ja Excelissä regressioanalyysillä määritetty y-akselin leikkauspisteen keskivirhe,  $s_b$ , on  $0,01672$ . Kyseisillä arvoilla saadaan yhtälöllä 8 laskettua määritysrajan arvioksi

$$\text{LOQ}(s_b) = \frac{10 s_b}{k_{kk}} = \frac{10 \times 0,01672}{3,0485 \text{ cm}^3 \mu\text{g}^{-1}} \approx 0,05485 \frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^3} = c_{v3,\text{LOQ}}(\text{La}),$$

joka tarkoittaa laktidin massakonsentraatiota mitattavassa näyteliuoksessa. Kyseisestä massakonsentraatiosta voidaan laskea sitä vastaava näytteen laktidipitoisuus,  $w_{\text{LOQ}}(\text{La})$  (m-%), yhtälöillä 11 ja 12

$$w_{\text{LOQ}}(\text{La}) = \frac{m_{v1,\text{LOQ}}(\text{La})}{m_{\text{näyte}}} \times 100 \text{ m}\% = \frac{200 \times c_{v3,\text{LOQ}}(\text{La}) \times V_{v1} \times 10^{-3} \frac{\text{mg}}{\mu\text{g}}}{m_{\text{näyte}}} \times 100 \text{ m}\%$$

$$w_{\text{LOQ}}(\text{La}) = \frac{200 \times 0,05485 \frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^3} \times 20 \text{ cm}^3 \times 10^{-3} \frac{\text{mg}}{\mu\text{g}}}{500 \text{ mg}} \times 100 \text{ m}\% \approx 0,044 \text{ m}\% .$$

Lineaarisuus-suoran avulla määritettyä määritysrajan arviota voidaan pitää liian suurena, sillä toistettavuus ja tarkkuus ovat hyvät vielä  $0,033 \text{ m}\%:$ n ja  $0,05 \text{ m}\%:$ n laktidipitoisuuksilla. Lisäksi menetelmässä käytetään 3-pistekalibroinnin avulla määritettyä suoraa, joka pakotetaan origoon, eikä lineaarisuus-suoran tapaista painottamatonta ja pakottamatonta kalibrointisuoraa. Myös taulukkoon 5.1 lasketut standardien suhteelliset saannot olivat paremmat origoon pakotetulla 3-pistekalibroinnilla kuin lineaarisuus-suoralla. Kun huomioidaan erityisesti toistettavuudesta tehty arvio, voidaan menetelmän määritysrajan arvioida olevan korkeintaan  $0,02 \text{ m}\%$ .

## 5.2 GCFID-menetelmän alustava validointi

GCFID-menetelmän alustavan validoinnin mittauksia tehtiin seuraavina päivinä: 18.6., 21.6., 24.6., 25.6., 26.6. ja 29.6. Laitteiston ylläpitoon liittyvistä toimenpiteistä tehtiin näytteensyöttäjän ruiskun manuaalinen pesu ja toiminnan tarkistus sekä septumin vaihto 18.6., 21.6., 25.6., 26.6. ja 29.6. mittauksia ennen. Injektorin lineri vaihdettiin 18.6. ja 26.6. mittauksia ennen. Kolonni puhdistettiin katkaisemalla injektorin puoleisesta päädyistä noin  $15 \text{ cm}$  ja paahtamalla ensimmäistä mittauspäivää varten.

### 5.2.1 Lineaarisuus

GCFID-menetelmän lineaarisuuden määrittämiseksi valmistettiin ja mitattiin 18. kesäkuuta viisi standardiliuosta eli standardit 1 - 5, joiden laktidin massakonsentraatiot  $c_{v2}(\text{La})$  olivat noin  $0,375 - 15 \mu\text{g cm}^{-3}$ . Kyseiset massakonsentraatiot vastaavat polymeerinäytteen laktidipitoisuutta  $0,025 - 1,0 \text{ m}\%:$ a, jos polymeerinäytteestä valmistetaan näyteliuos ala-

luvun 3.4.2 mukaisesti. Standardiliuokset valmistettiin alaluvun 3.4.2 mukaisesti ja niiden valmistus on kuvattu tarkemmin liitteen H taulukossa H.1. Valmistetuista standardeista 2, 3 ja 4 vastasivat GCFID-menetelmässä normaalisti valmistettavia standardiliuoksia. Kaikkien standardien kantaliuoksista valmistettiin kaksi mitattavaa rinnakkaisliuosta (liuokset a ja b).

Taulukossa 5.5 on esitetty kaikki vastaavat mittaustulokset kuin taulukossa 5.1 esitettiin GCMS-menetelmän lineaarisuuden määrittelykselle. Mitatuista kromatogrammeista määritettiin laktidi- ja sisästandardin piikkien pinta-alat GCSolution-ohjelmalla. Liitteen H kuvassa H.1 on esitetty esimerkkinä standardin 3a kromatogrammin piikkien pinta-alojen määrittely. Standardeille määritetyt  $A(La)/A(IS)$ -arvot on esitetty  $c_{v2}(La)$ :n funktiona kuvassa 5.3. Kuvan 5.3 mittauspisteisiin sovitettiin suora Excelissä pienimmän neliösumman menetelmällä. Sovitus tehtiin mittauspisteiden keskiarvoihin. Lineaarisuus-suoralle määritettiin yhtälö

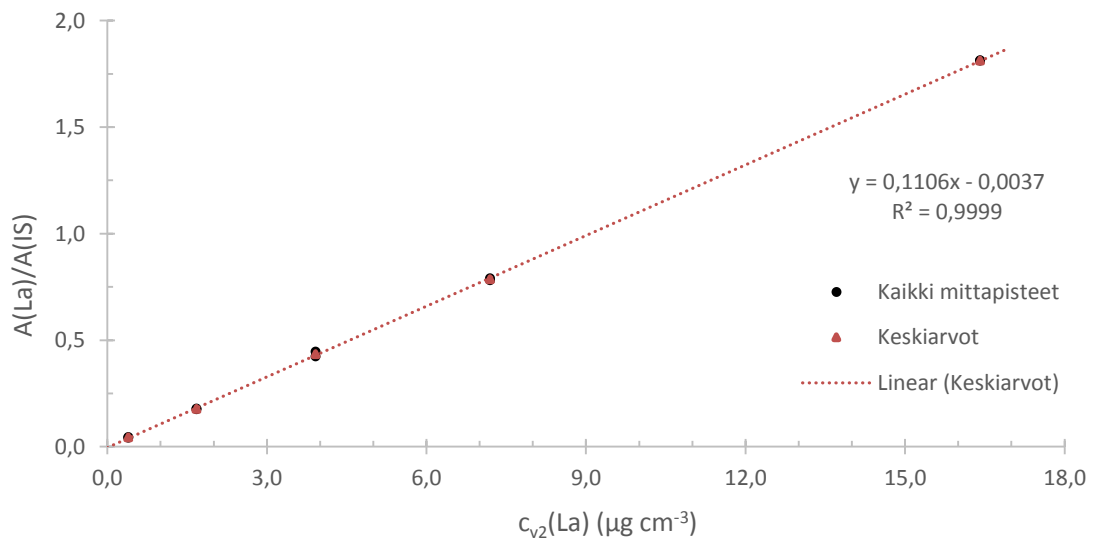
$$\frac{A(La)}{A(IS)} = (0,1106 \text{ ml } \mu\text{g}^{-1}) \times c_{v2}(La) - 0,0037 \quad (18)$$

ja korrelaatiokertoimen neliölle,  $R^2$ , arvo 0,9999, joka on riittävän hyvä arvo lineaariselle sovitukselle.

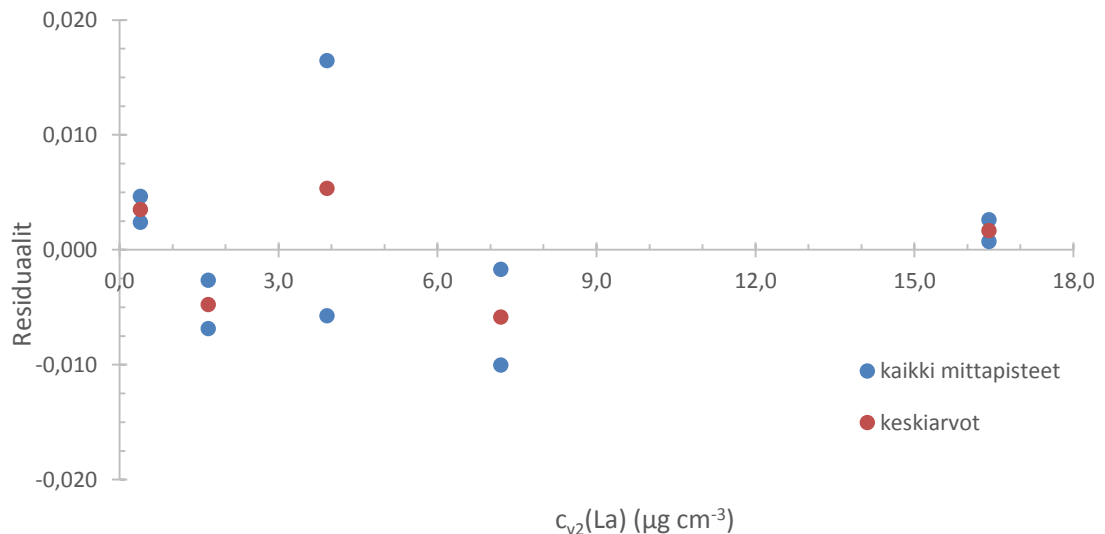
**Taulukko 5.5.** GCFID-menetelmän lineaarisuuden määrittelyksen mittaustulokset.  $c_{v2}(La)$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ) on mitatun standardiliuoksen laktidin massakonsentraatio.  $c'_{v2}(La)$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ) on lineaarisuus-suoralta (yhtälö 18) takaisin laskettu massakonsentraatio ja  $c''_{v2}(La)$  on kyseisen mittauspäivän (18.6.) kalibrointisuoralta takaisin laskettu massakonsentraatio. Sekä  $c'_{v2}(La)$ :a että  $c''_{v2}(La)$ :a on verrattu prosentuaalisesti tunnettuun arvoon  $c_{v2}(La)$ . Residuaalit on laskettu mitatun  $A(La)/A(IS)$ -arvon poikkeamana lineaarisuus-suoralta y-akselin suunnassa.

Liuos	$c_{v2}(La)$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	Mitatut piikkien pinta-alat			Takaisin laskettu massakonsentraatio ja sen suhde $c_{v2}(La)$ :iin				Residuaali
		A(La)	A(IS)	A(La)/A(IS)	$c'_{v2}(La)$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	(%)	$c''_{v2}(La)$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	(%)	
1a	0,3913	1383	31281	0,0442	0,4335	111	0,4038	103	0,0047
1b	0,3913	1319	31451	0,0419	0,4129	106	0,3831	98	0,0024
2a	1,6763	5654	31586	0,1790	1,6525	99	1,6350	98	-0,0026
2b	1,6763	5549	31749	0,1748	1,6143	96	1,5964	95	-0,0069
3a	3,9125	14051	31549	0,4454	4,0614	104	4,0681	104	0,0165
3b	3,9125	13176	31136	0,4232	3,8607	99	3,8653	99	-0,0057
4a	7,1925	25237	31949	0,7899	7,1774	100	7,2152	100	-0,0017
4b	7,1925	24369	31179	0,7816	7,1020	99	7,1391	99	-0,0100
5a	16,408	56740	31326	1,8113	16,414	100	16,544	101	0,0007
5b	16,408	57040	31459	1,8132	16,431	100	16,562	101	0,0026

Taulukkoon 5.5 on laskettu standardien takaisin lasketut massakonsentraatiot,  $c'_{v_2}(La)$  ja  $c''_{v_2}(La)$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ), lineaarisuus-suoran (yhtälö 18) ja kalibrointisuoran yhtälöiden avulla vastaavasti kuten alaluvussa 5.1.1 laskettiin GCMS-menetelmälle. Kalibrointisuoran määrittäminen tehtiin standardien 2, 3 ja 4 mittauksista. Lineaarisuus-suoralta takaisin lasketut massakonsentraatiot ovat 96 - 111 %:a standardien tunnetuista massakonsentraatioista ja rinnakkaismääritysten keskiarvot 98 - 109 %:a tunnetuista massakonsentraatioista. Kalibrointisuoralta takaisin lasketut massakonsentraatiot ovat 95 - 104 %:a standardien tunnetuista massakonsentraatioista ja rinnakkaismääritysten keskiarvot 97 - 102 %:a tunnetuista massakonsentraatioista. Molemmissa tapauksissa takaisin lasketut massakonsentraatiot vastaavat hyvin niiden tunnettuja arvoja kaikilla massakonsentraatioilla, mikä tukee lineaarisen sovituksen käyttöä kyseisellä massakonsentraatioalueella.



**Kuva 5.3.** GCFID-menetelmän alustavan validoinnin lineaarisuuden määrittäminen.



**Kuva 5.4.** Residuaalien jakautuminen nollan eri puolin GCFID-menetelmän lineaarisuuden määrittämisessä.

Kuvan 5.3 mittapisteiden residuaalit on esitetty kuvassa 5.4  $c_{v2}(La)$ :n funktiona. Residuaalit ovat jakautuneet x-akselin molemmin puolin ilman selvää käyrää, mikä tukee lineaarisen sovituksen käyttöä.

## 5.2.2 Toistettavuus

GCFID-menetelmän toistettavuus määritettiin eri tavalla kuin GCMS-menetelmälle. PLDLA96/4-näytteiden laktidipitoisuus määritettiin usean eri päivän aikana. Toistettavuuden mittana käytettiin kyseisten laktidipitoisuuden mittausten suhteellista keskihajontaa. GCFID-menetelmälle määritettiin siis pitemmän aikavälin toistettavuus kuin GCMS-menetelmälle. PLDLA96/4-näytteistä valmistettiin mitattavat näyteliuokset alaluvun 3.4.2 mukaisesti. 18. kesäkuuta mitattiin kuusi näytettä, 21. kesäkuuta kolme, 24. kesäkuuta kuusi ja 25. kesäkuuta kolme näytettä. Mittauksissa käytettiin injektorissa samaa lineria sen likaantumisen vaikutuksen arvioimiseksi. Kolonni puhdistettiin ensimmäistä mittauspäivää varten leikkaamalla injektorin puoleisesta päädyistä irti noin 15 cm. Joka mittauspäivän mittausarjalle mitattiin oma kalibroitisuusoransa, jotka on esitetty liitteessä I, alaluvun 3.4.2 mukaisesti. Jokaisena mittauspäivänä näyteliuosten valmistuksessa käytettiin samaa sisästandardin kantaliuosta kuin kyseisen mittauspäivän kalibrointistandardiliuosten valmistuksessa käytettiin. Taulukossa 5.6 on esitetty toistettavuuden määrittämisen mittaustulokset. Taulukossa esitetyt suureet ja niiden laskenta vastaavat GCMS-menetelmän taulukkoa 5.2. Mitatun näyteliuoksen laktidin massakonsentraatio,  $c_{v2}(La)$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ), on kuitenkin nyt mitattavan Vial 2 -liuoksen laktidin massakonsentraatio. Liitteen J kuvassa J.1 on esitetty esimerkkinä pinta-alan määrittäminen PLDLA96/4-näytteen 1 kromatogrammista. Lisäksi määritettiin injektointitoistettavuus injektoimalla sama PLDLA96/4-näyte, joka oli taulukon 5.6 näyte 7, laitteeseen kuusi kertaa. Injektointitoistettavuuden mittaustulokset on esitetty liitteen J taulukossa J.1.

Kuten taulukosta 5.6 on nähtävissä, GCFID-menetelmän pitkän aikavälin toistettavuudeksi määritettiin 9,9 % suhteellisena keskihajontana, joka on melko suuri arvo. PLDLA96/4:n laktidipitoisuudeksi määritettiin 0,066 m-% eli noin kaksinkertainen pitoisuus GCMS-menetelmällä määritettyyn pitoisuuteen nähden. Mittauspäivien sisäiset keskiarvot laktidipitoisuudelle, eli 0,071 m-%, 0,068 m-% ja 0,064 m-%, ovat kolmelle ensimmäiselle mittauspäivälle melko lähellä kokonaiskeskiarvoa. Neljännen mittauspäivän keskiarvo 0,057 m-% eroaa kuitenkin jo lähes 14 % kokonaiskeskiarvosta. Mittauspäivien sisäiset suhteelliset keskihajonnat eli lyhyen aikavälin toistettavuudet ovat 4,7 %, 4,5 %, 10 % ja 4,1 %, mutta mittauspäivien 2 ja 4 rinnakkaismäärittysten lukumäärä on liian pieni tarkempaa tarkastelua varten. Mittauspäivän 1 suhteellinen keskihajonta 4,7 % on melko hyvä menetelmän tarkoituksiin. Kyseinen arvo kuvaa menetelmän lyhyen aikavälin toistettavuutta parhaiten, sillä se määritettiin täysin puhtaalla laitteistolla. Mittauspäivän 3 suhteellinen keskihajonta on kuitenkin jopa 10 % eli hyvin suuri, mikä johtuu todennäköisesti linerin likaantumisesta.

**Taulukko 5.6.** GCFID-menetelmän toistettavuuden mittaustulokset. Näytteet valmistettiin PLDLA96/4:stä.  $c_{v2}(La)$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ) on näyteliuoksesta määritetty laktidin massakonsentraatio kalibroitisuoran (liite I) avulla. Näytteen sisältämä laktidin massa eli  $m_{v1}(La)$  (mg) on laskettu yhtälöllä 11. Näytteen laktidipitoisuus massaprosenttiosuutena eli  $w(La)$  on laskettu yhtälöllä 12. Näytteet 1 - 6 mitattiin 18. kesäkuuta, 7 - 9 mitattiin 21. kesäkuuta, 10 - 15 mitattiin 24. kesäkuuta ja 16 - 18 mitattiin 25. kesäkuuta.

Näyte (PLDLA96/4)	$m_{\text{näyte}}$ (mg)	Mitatut piikkien pinta-alat			Mitattu $c_{v2}(La)$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	Näytteen sisältämä laktidi	
		A(La)	A(IS)	A(La)/A(IS)		$m_{v1}(La)$ (mg)	$w(La)$ (m-%)
1	290,74	3533	30944	0,1142	1,032	0,206	0,0710
2	293,09	3651	29912	0,1221	1,104	0,221	0,0753
3	292,20	3289	31005	0,1061	0,959	0,192	0,0657
4	302,20	3900	33879	0,1151	1,041	0,208	0,0689
5	295,05	3703	32477	0,1140	1,031	0,206	0,0699
6	293,20	3821	32299	0,1183	1,070	0,214	0,0730
7	296,45	2945	23711	0,1242	0,9621	0,192	0,0649
8	310,90	3564	25074	0,1421	1,101	0,220	0,0708
9	299,96	3416	25486	0,1340	1,038	0,208	0,0692
10	303,03	3704	37294	0,09932	0,9120	0,182	0,0602
11	300,25	3330	35646	0,09342	0,8578	0,172	0,0571
12	301,48	3526	37140	0,09494	0,8718	0,174	0,0578
13	311,42	4243	37592	0,1129	1,036	0,207	0,0666
14	296,09	4329	36710	0,1179	1,083	0,217	0,0731
15	299,26	4285	37746	0,1135	1,042	0,208	0,0697
16	299,06	3828	39524	0,09685	0,8689	0,174	0,0581
17	292,20	3699	38815	0,09530	0,8550	0,171	0,0585
18	296,38	3400	37925	0,08965	0,8043	0,161	0,0543
						<b>Keskiarvo</b>	0,066
						<b>K.hajonta</b>	0,0065
						<b>Suht.k.haj. (%)</b>	9,9

Liitteen J taulukkoon J.2 on laskettu taulukkoa 5.6 vastaavat toistettavuusmittausten tulokset käyttäen jokaisen mittauspäivän kalibroitisuorana ensimmäisenä mittauspäivänä (18.6.) mitattua lineaarisuussuoraa (yhtälö 18) eri mittauspäivien kalibroitisuorien sijaan. Vertaamalla taulukon 5.5 ja J.2 tuloksia voidaan arvioida, johtuuko taulukon 5.5 tuloksissa havaittavat erot mittauspäivien laktidipitoisuuksien keskiarvoissa eroista mittauspäivien kalibroinneissa. Samaa kalibroitusta käyttäen laktidipitoisuuksien kokonaiskeskiarvoksi laskettiin 0,069 m-% ja suhteelliseksi keskihajonnaksi 11,2 %, joka on vielä suurempi kuin taulukossa 5.5. Lisäksi mittauspäivien keskiarvot poikkesivat hieman

enemmän kokonaiskeskiarvosta kuin taulukon 5.6 mittaustuloksissa. Siten erot mittauspäivien kalibroinneissa eivät ole syynä mittauspäivien keskiarvojen hajontaan.

Mahdollisena osasyynä mittauspäivien keskiarvojen hajontaan ja erityisesti myöhempien mittauspäivien suuriin sisäisiin hajontoihin on laitteiston injektorin ja kolonnin likaantuminen. Luultavasti linerin vaikutus on huomattavasti merkittävämpi, sillä se on pakattu lasivillalla, johon epäpuhtaudet voivat kertyä. Epäpuhtaudet kuten septumipartikkelit ja näytteen mahdolliset haihtumattomat komponentit ovat voineet vaikuttaa analyyttien massakonsentraatioihin. Kyseinen vaikutus on luultavasti merkittävämpi pienen laktidipitoisuuden näytteillä kuten PLDLA96/4-näytteillä.

GCFID-menetelmän injektointitoistettavuudeksi määritettiin liitteen J taulukon J.1 mukaisesti kuuden injektoinnin suhteellisena keskihajontana 2,9 %. Injektointitoistettavuus on 2,0 %, jos sen määrittämiseen huomioidaan vain perättäin mitatut injektoinnit 2 - 6. Ensimmäinen injektointi mitattiin kyseisen päivän automaattisen mittaussarjan alussa ja injektoinnit 2 - 6 mittaussarjan lopussa vasta noin 4 - 6 tunnin kuluttua ensimmäisestä injektoinnista.

### 5.2.3 Tarkkuus

GCFID-menetelmän tarkkuus määritettiin GCMS-menetelmän tavoin *spiking*-näytteiden mittauksilla kolmella eri laktidipitoisuudella. Tarkkuus määritettiin jokaisella laktidipitoisuudella kolmen rinnakkaismäärittämisen keskiarvona. GCFID-menetelmällä mitattiin lisäksi näytteitä, joiden laktidipitoisuus oli määritetty muilla menetelmillä.

*Spiking*-näytteiden valmistus on esitetty taulukossa 5.7, jossa suureet ja niiden laskenta vastaavat taulukkoa 5.3. *Spiking*-näytteistä valmistettiin mitattavat näyteliuokset normaalisti, kuten alaluvussa 3.4.2 on kuvattu. *Spiking*-lisäykset tehtiin kuten GCMS-menetelmän mittauksissa, mutta lisäys tehtiin 0,5 cm<sup>3</sup> täyspipetillä. *Spiking*-näytteisiin 1a - 1c lisättiin 0,0570 mg cm<sup>-3</sup> massakonsentraation liuosta, joka valmistettiin laimentamalla kalibrointiin käytetyn standardin 1 kantaliuos laimennuskertoimella 1/10. *Spiking*-näytteisiin 3a - 3c lisättiin standardin 2 laktidikantaliuosta, jonka massakonsentraatio oli 1,645 mg cm<sup>-3</sup>. Edellä mainitut *spiking*-näytteet mitattiin 21. kesäkuuta. *Spiking*-näytteisiin 2a, 2b ja 2c lisättiin standardin 1 laktidikantaliuosta, jonka massakonsentraatio oli 0,5585 mg cm<sup>-3</sup>. *Spiking*-näytteet 2a - 2c mitattiin 25. kesäkuuta. Polymeerinäytteestä vapautuvan laktidin massa,  $m_{v1, \text{polym}}(\text{La})$ , laskettiin GCFID:n toistettavuusmittauksissa kaikki mittauspäivät huomioiden määritetyn laktidipitoisuuden perusteella. Kun huomioidaan sekä polymeerinäytteestä vapautuvan laktidin että *spiking*-lisäyksen laktidin massaprosenttiosuus näytteen massaan nähden, tarkkuus määritettiin noin laktidipitoisuuksilla 0,08 m-%, 0,16 m-% ja 0,35 m-%.

**Taulukko 5.7.** GCFID-menetelmän tarkkuuden määrittämiseen valmistetut spiking-näytteet.  $w(La)$  on PLDLA96/4-näytteen laktidipitoisuus, joka määritettiin alaluvussa 5.2.2.  $m_{v1, polym+spike}(La)$  on laktidin tunnettu kokonaismassa spiking-näytteen Vial 1 -liuoksessa. Suureet ja niiden laskenta vastaavat taulukkoa 5.2.

Spiking-näyte	PLDLA96/4			Spiking-lisäys			Vial 1 -liuoksessa laktidia yhteensä
	$m_{näyte}$ (mg)	$w(La)$ (m-%)	$m_{v1, polym}(La)$ (mg)	$c_{spike}(La)$ $mg\ cm^{-3}$	$m_{v1, spike}(La)$ (mg)	$w_{spike}(La)$ (m-%)	$m_{v1, polym+spike}(La)$ (mg)
1a	296,57	0,066	0,1957	0,0570	0,0285	0,010	0,2242
1b	298,2	0,066	0,1968	0,0570	0,0285	0,010	0,2253
1c	297,74	0,066	0,1965	0,0570	0,0285	0,010	0,2250
2a	296,06	0,066	0,1954	0,5585	0,2793	0,094	0,4746
2b	292,15	0,066	0,1928	0,5585	0,2793	0,096	0,4721
2c	293,1	0,066	0,1934	0,5585	0,2793	0,095	0,4727
3a	295,46	0,066	0,1950	1,645	0,8225	0,278	1,0175
3b	295,3	0,066	0,1949	1,645	0,8225	0,279	1,0174
3c	293,72	0,066	0,1939	1,645	0,8225	0,280	1,0164

Taulukossa 5.8 on esitetty spiking-näytteiden mittaustulokset. Integrointituloksista on määritetty Vial 1 -liuoksen laktidin massa,  $m_{v1}(La)$ , kuten alaluvussa 5.2.2. Tarkkuuden mittana käytetty suhteellinen saanto,  $Rec_b$ , on laskettu yhtälöllä 6. Näyteliuoksilla 2b ja 2c määritetyt suhteelliset saannot poikkeavat 2a:n määrittämisestä yli 20 %. Kaikki kolme näyteliuosta mitattiin saman illan ja yön aikana mitatussa mittaussarjassa automaattisella näytteenäytötyöllä, joka kuitenkin keskeytyi ennen näyteliuosten 2b ja 2c mittausta. Mittaussarjan keskeytymiseen oli mahdollisesti syynä hetkellinen sähkökatkos. Näyteliuokset 2b ja 2c mitattiin vasta seuraavana aamuna ja niiden tulosten laskentaan käytettiin samaa 25.6. määritettyä kalibrointia kuin näyteliuokselle 2a. Tavallista pitempi aika näyteliuoksen valmistuksen ja mittaamisen välillä on voinut vaikuttaa näyteliuosten laktidin massakonsentraatioon tai kalibroinnin oikeellisuuteen. Taulukosta 5.8 nähdään, että kolmen rinnakkaismäärittämisessä keskiarvona määritetyt tarkkuudet ovat 106,1 %, 96,4 % ja 105,1 % laktidipitoisuuksilla 0,08 m-%, 0,16 m-% ja 0,35 m-%. Määrittämisestä tarkkuuksista arvioidut systemaattiset virheet ovat siis 6,1 %, 3,6 % ja 5,1 % kyseisillä laktidipitoisuuksilla. Määritetyt arvot ovat hyväksyttäviä menetelmän käyttökohteen huomioiden [4, s. 102].



**Taulukko 5.8.** GCFID-menetelmän spiking-näytteiden mittaustulokset.  $m_{v1, \text{polym+spike}}(\text{La})$  (mg) on laktidin tunnettu massa spiking-näytteen Vial 1 -liuoksessa.  $c_{v2}(\text{La})$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ) on mitattu laktidin massakonsentraatio mitattavassa näyteliuoksessa ja  $m_{v1}(\text{La})$  (mg) on massakonsentraatiosta laskettu havaittu laktidin massa Vial 1 -liuoksessa. Suhteellinen saanto,  $Rec_b$  (%), on laskettu yhtälöllä 6 laktidin mitatun ja tunnetun massan suhteena.

Spiking-näyte	Tunnettu $m_{v1, \text{polym+spike}}(\text{La})$ (mg)	Mitatut piikkien pinta-alat			Mitattu		Suhteellinen saanto
		$A(\text{La})$ (*10 <sup>4</sup> )	$A(\text{IS})$ (*10 <sup>4</sup> )	$A(\text{La})/A(\text{IS})$	$c_{v2}(\text{La})$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	$m_{v1}(\text{La})$ (mg)	$Rec_b$ (%)
1a	0,2242	4186	25723	0,16273	1,26054	0,2521	112,4
1b	0,2253	3790	24842	0,15256	1,18177	0,2364	104,9
1c	0,2250	3680	25117	0,14651	1,13490	0,2270	100,9
					<b>Keskiarvo</b>		<b>106,1</b>
2a	0,4746	11227	37657	0,29814	2,67482	0,5350	112,7
2b	0,4721	9081	39680	0,22886	2,05323	0,4106	87,0
2c	0,4727	9102	38624	0,23566	2,11425	0,4228	89,5
					<b>Keskiarvo</b>		<b>96,4</b>
3a	1,0175	17558	26168	0,67097	5,19737	1,0395	102,2
3b	1,0174	16732	24085	0,69471	5,38121	1,0762	105,8
3c	1,0164	16809	23893	0,70351	5,44942	1,0899	107,2
					<b>Keskiarvo</b>		<b>105,1</b>

GCFID-menetelmän tarkkuuden määrittämiseksi mitattiin lisäksi TTY:llä prosessoituja kopolymeerinäytteitä, joista oli teetetty laktidipitoisuuden määrittäminen kaupallisella GCFID-analyysimenetelmällä (Ramboll Analytics, Lahti). Kyseiset alaluvussa 3.1 esitellyt materiaalit olivat PLCL, jonka laktidipitoisuudeksi oli määritetty massaprosenttiosuutena 0,16 m-%, ja PLCL/TCP, jonka laktidipitoisuudeksi oli määritetty massaprosenttiosuutena kopolymeerin massaan nähden 0,16 m-%. Kyseiset tunnetut polymeerinäytteet oli prosessoitu ja niiden laktidipitoisuudet määritetty noin 1 - 2 vuotta ennen tämän työn mittauksia, minkä takia aiemmin määritettyjen laktidipitoisuuksien oikeellisuudesta ei ole varmuutta tämän työn ajankohdalla. PLCL-materiaalia riitti vain yhtä 300 mg:n näytettä varten. PLCL/TCP-materiaalin näytekokona oli 600 mg, jotta kopolymeerin massa, eli 300 mg, vastasi menetelmässä normaalisti käytettävää polymeerinäytteen massaa. PLCL-näytteestä ja PLCL/TCP-näytteistä valmistettiin näyteliuokset alaluvun 3.4.2 mukaisesti ja ne mitattiin 21. kesäkuuta. PLCL/TCP-näytteiden liukenematon keraami aiheuttaa tilavuutensa takia pienen virheen Vial 1 -liuoksen 10 cm<sup>3</sup>:n tilavuuteen ja liukenevan laktidin massakonsentraatioon. Kyseisen virheen oletettiin olevan kuitenkin mitättömän pieni keraamin pienen määrän takia. Lisäksi sisästandardin massakonsentraatio kokee saman virheen, joten sisästandardin käytön pitäisi minimoida kyseinen virhe.

PLCL- ja PLCL/TCP-näytteiden mittausten tulokset on esitetty taulukossa 5.9. Kyseisessä taulukossa on esitetty lisäksi 24. kesäkuuta mitattujen BulkkiPLA-näytteiden kolmen rinnakkaismäärityksen mittaustulokset. Myös BulkkiPLA-näytteistä valmistettiin näyteliuokset normaaliin tapaan. Liitteessä K on esitetty esimerkit mitatuista kromatogrammeista ja laktidi- ja sisästandardipiikkien pinta-alojen määrittämisestä PLCL-näytteelle, PLCL/TCP-näytteelle 1 ja BulkkiPLA-näytteelle 1. Tunnetuille näytteille määritettiin GCFID-menetelmällä tunnettuja arvoja paljon suuremmat laktidipitoisuudet. PLCL-näytteestä tehtiin vain yksi määrittäminen, joten satunnaisvirheen merkitys määritettyyn arvoon on tavallista suurempi. Suuruusluokaltaan määritetty arvo, eli 0,33 m-%, on kuitenkin noin kaksinkertainen tunnettuun arvoon, eli 0,16 m-%:iin, nähden. PLCL/TCP-näytteiden määrittäysten keskiarvo, eli 0,27 m-%, on lähes kaksinkertainen tunnettuun arvoon, eli 0,16 m-%:iin, nähden. BulkkiPLA-näytteiden määrittäysten keskiarvo oli 0,53 m-%, joka on myös lähes kaksinkertainen GCMS-menetelmällä määritettyyn laktidipitoisuuteen. BulkkiPLA-näytteiden kolmessa määrittäyksessä havaittiin jälleen suuri hajonta.

**Taulukko 5.9.** Tunnettujen PLCL- ja PLCL/TCP-näytteiden tarkkuusmittaukset GCFID-menetelmällä. Taulukossa on lisäksi BulkkiPLA-näytteiden mittaukset.  $w'(La)$  (m-%) on tunnetulle näytteelle ennen tätä työtä määritetty laktidipitoisuus massaprosenttiosuutena.  $w(La)$  on vastaavan suureen mitattu arvo näytteille. PLCL/TCP-näytteiden massoina on ilmoitettu puolet Vial 1 -liuoksiin punnituista massoista, sillä materiaalin massasta 50 % oli kopolymeerin massaa.

Näyte	Tunnettu $w'(La)$ (m-%)	$m_{\text{näyte}}$ (mg)	Mitatut piikkien pinta-alat			Mitattu $c_{v2}(La)$ ( $\mu\text{g cm}^3$ )	Näytteen sisältämä laktidi	
			A(La)	A(IS)	A(La)/ A(IS)		$m_{v1}$ (mg)	$w(La)$ (m-%)
PLCL	<b>0,16</b>	298,30	16854	26148	0,6446	4,993	0,9986	<b>0,33</b>
PLCL/TCP	<b>1</b>	299,14	14289	27506	0,5195	4,024	0,8048	0,269
	<b>2</b>	295,25	11950	25204	0,4741	3,673	0,7345	0,249
	<b>3</b>	296,03	13602	25434	0,5348	4,143	0,8285	0,280
						<b>Keskiarvo</b>		<b>0,27</b>
Bul- kkiPLA	<b>1</b>	-	34325	37150	0,9240	8,484	1,697	0,545
	<b>2</b>	-	36242	38170	0,9495	8,718	1,744	0,586
	<b>3</b>	-	309,4	28159	36896	0,7632	7,008	1,402
						<b>Keskiarvo</b>		<b>0,53</b>

## 5.2.4 Määrittäysraja

GCFID-menetelmän määrittäysrajan arviointi tehtiin kuten GCMS-menetelmällä. Koska taulukon 5.6 mittaussarjojen sisäiset keskihajonnat vaihtelevat paljon mittauspäivästä

riippuen, käytetään yhtälön 7 suureen  $s$  arvona kokonaiskeskihajontaa eli arvoa 0,0065 m-%. Yhtälöllä 7 lasketuksi menetelmän määrittärajaksi saadaan

$$\text{LOQ}(s') = \frac{10 s}{\sqrt{X}} = \frac{10 \times 0,0065 \text{ m}\%}{\sqrt{3}} \approx 0,038 \text{ m}\% .$$

Kuvan 5.3 lineaarisuus-suoran kulmakerroin on  $0,1106 \text{ cm}^3 \text{ ug}^{-1}$  ja Excelissä regressioanalyysillä laskettu  $s_b$  on 0,003724. Sijoittamalla kyseiset arvot yhtälöön 8 saadaan menetelmän määrittärajaksi laskettua

$$\text{LOQ}(s_b) = \frac{10 s_b}{k_{kk}} = \frac{10 \times 0,003724}{0,1106 \text{ cm}^3 \text{ ug}^{-1}} \approx 0,3367 \frac{\text{ug}}{\text{cm}^3} = c_{v2,\text{LOQ}}(\text{La}) ,$$

joka tarkoittaa laktidin massakonsentraatiota mitattavassa näyteliuoksessa. Kyseisestä massakonsentraatiosta voidaan yhtälöillä 11 ja 12 laskea sitä vastaavaksi näytteen laktidipitoisuudeksi

$$w_{\text{LOQ}}(\text{La}) = \frac{m_{v1,\text{LOQ}}(\text{La})}{m_{\text{näyte}}} \times 100 \text{ m}\% = \frac{20 \times c_{v2,\text{LOQ}}(\text{La}) \times V_{v1} \times 10^{-3} \frac{\text{mg}}{\text{ug}}}{m_{\text{näyte}}} \times 100 \text{ m}\%$$

$$w_{\text{LOQ}}(\text{La}) = \frac{20 \times 0,3367 \frac{\text{ug}}{\text{cm}^3} \times 10 \text{ cm}^3 \times 10^{-3} \frac{\text{mg}}{\text{ug}}}{300 \text{ mg}} \times 100 \text{ m}\% \approx 0,022 \text{ m}\% .$$

GCFID-menetelmän määrittäraja on alle 0,05 m-% laskettujen arvioiden mukaan, mitä voi pitää menetelmän käyttökohteeseen nähden riittävänä.

### 5.2.5 Standardikantaliuoksen säilyvyys

GCFID-menetelmällä pyrittiin varmentamaan laktidikantaliuosten säilyvyys laboratorioolosuhteissa yhden arkiviikon aikana. Menetelmien näytteenkäsittelyohjeiden mukaiset kantaliuostilavuudet, eli  $10 \text{ cm}^3$  tai  $20 \text{ cm}^3$ , riittävät jatkuvassa käytössä korkeintaan yhdeksi arkiviikoksi, kun otetaan huomioon lasipipettien huuhteluun kuluvat liuostilavuudet. Sisästandardikantaliuoksen säilyvyys ei ole yhtä tärkeässä asemassa menetelmän tulosten kannalta, koska samaa sisästandardikantaliuosta käytetään aina kaikkiin saman mittausarjan standardi- ja näyteliuoksiin. NatureWorks:n menetelmän ohjeessa on mainittu, että sen mukaisesti valmistettuja kantaliuoksia voidaan säilöä noin 1 kk ajan. Jos menetelmää ei käytetä rutiininomaisesti, niin ohjeen mukaan kantaliuokset tulisi valmistaa uudestaan.

Säilyvyyden varmistamiseksi valmistettiin yksi GCFID-menetelmän standardin 2 kantaliuosta vastaava säilöttävä kantaliuos punnitsemalla analyysivaa'alla  $14,60 \text{ mg}$  L-laktidia  $10 \text{ cm}^3$  mittapulloon. Kyseisen säilöttävän kantaliuoksen tunnettu laktidin massakonsentraatio,  $c_{kl}'(\text{La})$  ( $\text{ug cm}^{-3}$ ), oli  $1460 \text{ ug cm}^{-3}$ . Kyseinen massakonsentraatio vastaa lähes

GCMS-menetelmän standardin 2 kantaliuoksen konsentraatiota. Kyseisen säilöttävän kantaliuoksen oletettiin edustavan hyvin kaikkia GCFID- ja CGMS-menetelmissä valmistettavia kantaliuoksia. Säilötyn kantaliuoksen laktidin massakonsentraatio mitattiin GCFID-menetelmällä kolmena mittauspäivänä: kantaliuoksen valmistuspäivänä (25. kesäkuuta), 1 vrk kuluttua valmistuksesta (26. kesäkuuta) ja 4 vrk kuluttua valmistuksesta (29. kesäkuuta). Mittausten välillä kyseinen kantaliuos säilöttiin tiiviisti suljetussa mittapullossaan jääkaapissa.

Säilöttävästä kantaliuoksesta valmistettiin jokaisena mittauspäivänä kolme mitattavaa liuosta, jotka valmistettiin kuten alaluvun 3.4.2 mitattavat standardit. Säilöttävän kantaliuoksen havaittu laktidin massakonsentraatio,  $c_M(La)$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ), määritettiin jokaisena mittauspäivänä siten kolmen rinnakkaismäärityksen keskiarvona. Jokaisena mittauspäivänä valmistettiin alaluvun 3.4.2 mukaisesti normaaliin tapaan uudet kalibroitistandardiliuokset eri kantaliuoksista kuin säilötty kantaliuos. Jokaisena mittauspäivänä kalibroitistandardit valmistettiin samana päivänä valmistetuista uusista kantaliuoksista. Säilötyn kantaliuoksen mitattavien rinnakkaisliuosten valmistuksessa käytettiin aina samaa kyseisenä mittauspäivänä valmistettua sisästandardin kantaliuosta, jota käytettiin myös kalibroitistandardien valmistuksessa.

Mittaustulokset on esitetty taulukossa 5.10. Säilötystä kantaliuoksesta valmistettujen mitattavien liuosten laktidin massakonsentraatiot,  $c_{V2}(La)$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ), määritettiin kuten muissakin GCFID-mittauksissa. Kyseisistä massakonsentraatioista laskettiin kuitenkin  $m_{V1}(La)$ :n sijaan kyseistä massakonsentraatiota vastaava kantaliuoksen massakonsentraatio  $c_M(La)$  yhtälön 13 avulla. Rinnakkaismäärityksille laskettiin keskiarvo. Keskiarvona määritettyä säilötyn kantaliuoksen massakonsentraatiota verrattiin kantaliuoksen tunnettuun alkuperäiseen massakonsentraatioon  $1460 \mu\text{g cm}^{-3}$ .

Taulukon 5.10 mittaustuloksista nähdään, että säilötyn kantaliuoksen laktidin massakonsentraatio määritettiin hyvin tarkasti ensimmäisenä mittauspäivänä. Suhteellinen poikkeama tunnettuun arvoon oli tuolloin -0,93 % ja muina mittauspäivinä 2,5 % ja -0,16 %. Eri säilöntäajoilla mitatut arvot ovat hyvin lähellä alkuperäistä tunnettua arvoa. Mitatut suhteelliset poikkeamat ovat pienempiä kuin GCFID-menetelmän mittauserävarmuus alalukujen 5.2.2 ja 5.2.3 perusteella. Kyseisten mittausten perusteella voidaan sanoa, että säilötyn kantaliuoksen massakonsentraatio on pysynyt muuttumattomana säilöntäajan eli yhden arkiviikon ajan.

**Taulukko 5.10.** Laktidikantaliuoksen säilyvyys yhden arkiviikon ajan.  $c_{kl}'(La)$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ) on kantaliuoksen tunnettu alkuperäinen massakonsentraatio ja  $c_{kl}(La)$  ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ) on kantaliuoksen havaittu massakonsentraatio. Suhteellinen poikkeama on laskettu suurena  $[c_{kl}(La) - c_{kl}'(La)]/c_{kl}'(La)$ .

Säilöntäaika	Tunnetut	Mitatut piikkien pinta-alat			Mitatut	
	$c_{kl}'(La)$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	A(La)	A(IS)	A(La)/A(IS)	$c_{v2}(La)$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	$c_{kl}(La)$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )
0 vrk	1460	16064	40045	0,40115	3,599	1440
		16014	39836	0,40200	3,607	1443
		16167	39824	0,40596	3,642	1457
		<b>Keskiarvo</b>				1446
		<b>Suhteellinen poikkeama tunnettuun (%)</b>				-0,93
1 vrk	1460	16267	41026	0,39650	3,685	1474
		16948	41181	0,41155	3,824	1530
		16185	40519	0,39944	3,712	1485
		<b>Keskiarvo</b>				1496
		<b>Suhteellinen poikkeama tunnettuun (%)</b>				2,5
4 vrk	1460	15654	28073	0,55762	3,618	1447
		15853	27955	0,56709	3,680	1472
		15736	28091	0,56018	3,635	1454
		<b>Keskiarvo</b>				1458
		<b>Suhteellinen poikkeama tunnettuun (%)</b>				-0,16

### 5.3 Tulosten vertailu

Taulukossa 5.11 on esitetty kootusti GCMS- ja GCFID-menetelmien alustavien validointien tulokset alaluvuista 5.1 ja 5.2. Molempien menetelmien toiminta-alueeksi määritettiin vähintään 0,05 - 1,0 m-% polymeerinäytteen laktidipitoisuutena, mikä oli tavoitteena. GCMS-menetelmän määrittäjärajaksi määritettiin GCFID-menetelmää pienempi 0,02 m-%. GCMS-menetelmän lyhyen aikavälin toistettavuudeksi määritettiin suhteellisena keskihajontana 2,0 % PLDLA96/4-näytteillä eli toiminta-alueen alapäässä. GCFID-menetelmän pitkän aikavälin toistettavuudeksi määritettiin usean mittauspäivän suhteellisena kokonaiskeskihajontana 9,9 % PLDLA96/4-näytteillä eli toiminta-alueen alapäässä. Mittauspäivien sisäiset lyhyen aikavälin toistettavuudet vaihtelivat välillä 4 - 10 %, mutta ensimmäisenä mittauspäivänä se oli 4,7 %. Ensimmäisen mittauspäivän toistettavuus, eli

4,7 %, on parhaiten verrattavissa GCMS-menetelmän toistettavuuteen, sillä lineri oli vaihdettu kyseisenä mittauspäivänä. GCFID-menetelmän huonompi toistettavuus GCMS-menetelmään nähden saattoi johtua siitä, että GCFID-menetelmällä mittaukset tehtiin hyvin lähellä laitteiston määrittämissä eli huonoilla signaali-kohinasuhteilla verrattuna GCMS-menetelmään. GCFID-menetelmän toistettavuus voi olla parempi suurempia laktidipitoisuuksia mitattaessa. GCFID-menetelmän näytteenkäsittelyssä käytettiin myös hieman erilaisia laboratoriovälineitä kuin GCMS-menetelmässä kuten alaluissa 3.4.1 ja 3.4.2 on kuvattu. GCFID-menetelmässä käytettiin esimerkiksi kantaliuosten pipetointiin 0,5 cm<sup>3</sup> täyspipettejä 1 cm<sup>3</sup> täyspipettien sijaan, mikä on luultavasti lisännyt pipetointivirheen merkitystä erityisesti sisästandardikantaliuoksen pipetointeihin. Molemmissa menetelmissä käytetyt näytemassat olivat suuria ja näytteet koostuivat lukuisista granulaateista, joten näytemateriaalien mahdollinen heterogeenisyys ei todennäköisesti vaikuttanut toistettavuusmittauksiin. *Spiking*-näytteillä määritetyt tarkkuudet olivat 97,1 - 107,4 % GCMS-menetelmällä ja 96,4 - 106,1 % GCFID-menetelmällä, mitkä ovat hyväksyttäviä.

**Taulukko 5.11.** GCMS- ja GCFID-menetelmien alustavien validointien tulokset. Taulukkoon on lisäksi koottu eri polymeerimateriaaleille määritetyt laktidipitoisuudet kyseisillä menetelmillä.

Validointiparametri	GCMS	GCFID
<b>Toiminta-alue</b>	0,02 - 1,0 m-% 0,025 - 1,25 µg cm <sup>-3</sup>	0,05 - 1,0 m-% 0,75 - 15 µg cm <sup>-3</sup>
<b>Määrittämissä</b>	0,02 m-%	0,05 m-%
<b>Toistettavuus</b> (suht. k.hajontana)	2,0 % (PLDLA96/4) 9,8 % (BulkkiPLA)	4,7 % (1. mittauspäivä) 9,9 % (pitkä aikaväli)
<b>Tarkkuus</b> (spiking-mittausten suhteellisena saantona)	105,6 % (0,05 m-%) 97,1 % (0,14 m-%) 107,4 % (0,54 m-%)	106,1 % (0,08 m-%) 96,4 % (0,16 m-%) 105,1 % (0,35 m-%)
<b>Laktidipitoisuudet</b>	<b>GCMS</b>	<b>GCFID</b>
<b>PLDLA96/4</b>	0,033 m-%	0,07 m-%
<b>BulkkiPLA</b>	0,31 m-%	0,53 m-%
<b>PLCL (0,16 m-%)</b>	-	0,33 m-%
<b>PLCL/TCP (0,16 m-%)</b>	(0,29 m-% *) (0,17 m-% **)	0,27 m-% -

Taulukkoon 5.11. on lisäksi koottu eri polymeerimateriaaleille GCMS- ja GCFID-menetelmillä määritetyt laktidipitoisuudet. Taulukosta nähdään, että GCFID-menetelmällä määritetyt arvot ovat noin kaksinkertaisia GCMS-menetelmällä määritettyihin arvoihin

nähdän. Kun kyseinen ristiriita huomattiin, GCFID-mittausten jälkeen mitattiin GCMS-menetelmällä uudestaan kyseisiä polymeerinäytteitä 3. heinäkuuta. Kyseisillä mittauksilla selvitettiin, johtuivatko määritysten väliset erot standardien valmistukseen käytetyn L-laktidin ”vanhentumisesta”. L-laktidi oli säilötty GCMS- ja GCFID-mittausten välillä noin 1 kk ajan vakuuissa. 3. heinäkuuta tehdyissä GCMS-mittauksissa käytettiin standardien valmistukseen samaa säilöttyä L-laktidia kuin GCFID-mittauksissa. Kyseiset mittaukset on esitetty liitteessä L. Kyseisissä mittauksissa määritettiin myös ensimmäistä kertaa PLCL/TCP:n laktidipitoisuus GCMS-menetelmällä. PLCL-näytettä ei ollut enää riittävästi jäljellä GCMS-menetelmällä mitattavaksi. PLCL/TCP:stä valmistettiin mitattavia näyteliuoksia kahdella tavalla: alaluvun 3.4.1 tapaan normaalisti (tapa A) ja muuten normaaliin tapaan, mutta Vial 2 -liuosvaiheessa ei lisätty asetonia ja sykloheksaania lisättiin 16 cm<sup>3</sup>:n sijaan 19 cm<sup>3</sup> (tapa B) eli liuostilavuus pidettiin samana. Myös tavan B määrittämissä käytettiin kuitenkin alaluvun 3.4.1 mukaisesti valmistetuista standardiliuoksista määritettyä kalibrointisuoraa. Kyseisten 3. heinäkuuta tehtyjen määritysten mitaussarjassa havaittiin puhtaan liuottimen mittauksissa merkittävän suuruinen epäpuhtauspiikki laktidipiikin retentioajalla, minkä takia PLDLA96/4-näytteiden laktidipitoisuutta ei voitu määrittää luotettavasti. BulkkiPLA:n laktidipitoisuus on kuitenkin paljon suurempi, joten epäpuhtaus ei vaikuttanut sen laktidipitoisuuden määrittämiseen yhtä merkittävästi. BulkkiPLA:n laktidipitoisuudeksi määritettiin kahden rinnakkaismäärittäyksen keskiarvona 0,35 m-%, minkä perusteella erot GCMS- ja GCFID-menetelmien määrittämisissä ei johtunut standardien valmistukseen käytetystä L-laktidista.

GCMS-menetelmällä määritettiin 3. heinäkuuta PLCL/TCP:n laktidipitoisuudeksi kolmen rinnakkaismäärittäyksen keskiarvona 0,29 m-% normaaliin tapaan käsitellyistä näytteistä ja 0,17 m-% muutetulla näytteenkäsittelytavalla eli tavalla B. Tavalla B määritetty arvo vastaa lähes tunnettua arvoa 0,16 m-%. Kyseisiin määrittämiin vaikutti kuitenkin sama virhelähde kuin edellä mainittuihin muihin saman päivän mittauksiin, joten määritettyjä arvoja ei voi pitää täysin menetelmien tarkkuutta kuvaavina. Tavan B mukaisesti valmistettujen näyteliuosten Vial 2 -liuokset poikkesivat kalibrointistandardien Vial 2 -liuoksista asetonin lisäyksen suhteen, mutta kalibroinnin oletettiin silti pitävän paikkansa myös kyseisille näyteliuoksille, koska asetonin lisäyksellä ei oletettavasti ollut vaikutusta laktidin ja sisästandardin massakonsentraatioihin standardien Vial 2 -liuoksissa. Kyseisten määritysten perusteella asetonin lisäyksen poistaminen polymeeriliuoksen Vial 2 -liuosvaiheesta pienentää poly(L-laktidi-ko-ε-kaprolaktoni) 70/30 -kopolymeereillä määritettävää laktidipitoisuutta. Ero voi johtua kyseisenkaltaisten kopolymeerien suuremmasta liukenevuudesta asetoniin verrattuna polylaktideihin, joiden laktidipitoisuuden määrittämiseen NatureWorks:n menetelmä on kehitetty. Tavalla B valmistetuissa näyteliuoksissa saostumisen havaittiin tapahtuvan silmämääräisesti selkeämmin kuin normaaliin tapaan valmistetuissa näyteliuoksissa, mikä on voinut pienentää injektoitavaan liuokseen päätyvien epäpuhtauksien määrää ja injektorissa termisesti muodostuvan laktidin määrää. Toisaalta ero on voinut johtua myös pipetoitavasta polymeeriliuoksesta sykloheksaaniin

liukenevan laktidin saannon pienentymisestä. Joka tapauksessa kyseisten määritysten perusteella NatureWorks:n menetelmän näytteenkäsittelyn soveltuvuus poly(L-laktidi-ko-ε-kaprolaktoni) -kopolymeereille tulisi selvittää jatkoselvityksin. Koska kaikki työhön saadut tunnetut polymeerinäytteet, eli PLCL ja PLCL/TCP, olivat poly(L-laktidi-ko-ε-kaprolaktoni) 70/30 -kopolymeerejä, tunnettujen polymeerinäytteiden määrittämiä ei voida luotettavasti käyttää menetelmien tarkkuuksien arviointiin.

GCMS- ja GCFID-menetelmillä määritettyjen laktidipitoisuuksien eroavuus ei todennäköisesti johdu eroista näytteenkäsittelyissä, sillä ne ovat hyvin samanlaiset. Laktidin ja sisästandardin massakonsentraatiot ovat melkein samanlaiset koko näytteenkäsittelyn ajan. GCMS-menetelmän ylimääräisen laimennusvaiheen ei pitäisi aiheuttaa havaittua eroa, sillä standardit valmistetaan kuten näyteliuoksetkin. Määritettyjen arvojen ero johtuu todennäköisesti siten detektorista. GCMS-menetelmä on spesifisempi selektiivisen detektoinnin takia. GCFID-menetelmässä kaikki yhdisteet, jotka antavat detektorisignaalin laktidipiikin retentioajalla, määritetään laktidina. SCAN:lla mitattujen kromatogrammien ja niiden massaspektrien (alaluku 4.1.3) perusteella laktidi- ja sisästandardipiikin aikana ei kuitenkaan eluoidu muita yhdisteitä havaittavissa määrin. Tehtyjen määritysten perusteella on mahdotonta sanoa varmasti, kumpi menetelmä tuottaa tarkempia tuloksia. Kyseisen ristiriidan selvittämiseksi pitäisi tarkkuusmäärittäminen tehdä tunnetuilla polylaktidinäytteillä, joiden laktidipitoisuus on määritetty jollakin muulla menetelmällä.

## 5.4 Menetelmien tarkastelu ja niiden käyttöön liittyvät havainnot

Työssä havaittiin, että laitteiston linerin puhtaus on hyvin tärkeää mittauksissa. GCFID-menetelmän pitkän aikavälin toistettavuuden mittaukset (alaluku 5.2.2) tehtiin samalla ensimmäisenä mittauspäivänä (18.6.) vaihdetulla linerilla, jotta voitiin havaita linerin likaantumisen vaikutus määrittämiin. Kyseinen vaikutus on oletettavasti suurempi pienillä laktidipitoisuuksilla. Kyseisten mittausten perusteella linerin likaantuminen on vaikuttanut mahdollisesti sekä mittaussarjojen sisäiseen hajontaan että mittaussarjojen väliseen hajontaan. Tästä syystä menetelmissä käytettiin pysyvän kalibroinnin sijaan mittaussarjan yhteydessä mitattavaa kalibroitisuuraa. Kyseinen kalibrointitapa ei kuitenkaan täysin poista linerin ja mahdollisesti myös kolonnin likaantumisen vaikutusta mittauksiin. Lineri tulisikin vaihtaa mahdollisimman usein, mikä alaluvun 5.2.2 mittausten perusteella on jo kahden mittaussarjan jälkeen. Kolmannen mittaussarjan sisäinen keskihajonta oli hyvin suuri ja neljännen mittaussarjan määritysten keskiarvo poikkesi aiemmista määrittämisistä liikaa. Käytetyt linerit puhdistettiin työssä, kuten liitteen M laitekansiossa on kuvattu, alan kirjallisuuden [37, s. 19] ja GCMS Real Time Analysis -ohjelmasta löytyneiden Shimadzun huolto-ohjeiden mukaisesti. Puhdistaminen sisälsi linerin lasivillan poiston, linerin huuhtelun kaikilla kolmella käytetyllä liuottimella ja uuden puhtaan deaktivoituneen lasivillan lisäyksen. 3. heinäkuuta tehdyissä mittauksissa havaittu epäpuhtaus kromatogrammeissa johtui kuitenkin todennäköisesti linerista. Jos kyseinen ongelma havaitaan



uudestaan, puhdistukseen voisi käyttää lisäksi Shimadzun ohjeissa mainittua ultraäänipuhdistusta esimerkiksi dikloorimetaanissa.

GCMS-menettelyn mittauksissa käytettiin samaa lineria 26.5. - 29.5. välisenä aikana tehdyissä mittauksissa. Kyseisten mittausten kalibrointisuorien (liite E) kulmakertoimien havaitaan kasvavan huomattavasti mittauspäivästä toiseen. Kun lineri vaihdettiin 5.6. tehtyihin mittauksiin, kalibrointisuoran kulmakerroin oli lähes sama kuin 26.5. kalibrointisuorassa. Kyseinen kalibrointisuoran muutos on voinut johtua saman linerin käytöstä. 26.5. - 29.5. kalibrointistandardit valmistettiin samoista kantaliuoksista, mutta 5.6. ne valmistettiin uusista kantaliuoksista. Laktidin kantaliuoksen säilyvyys kyseisellä aikajaksolla osoitettiin alaluvun 5.2.5 mittauksissa. Sisästandardin kantaliuoksen säilyvyyttä ei testattu, joten sen kantaliuoksen massakonsentraation pieneneminen voisi myös selittää kyseisen kalibrointisuoran kulmakertoimen kasvun. Sisästandardikantaliuoksen massakonsentraation mahdollisen muutoksen ei kuitenkaan pitäisi vaikuttaa kyseisten mittauspäivien tuloksiin, sillä mittauspäivän standardeissa ja näyteliuoksissa käytettiin samaa kantaliuosta eli sisästandardin massakonsentraatio oli sama kaikissa saman päivän mittauksissa.

Jatkuvassa rutiinikäytössä olevan menetelmän laitteiston toimintakunnon tarkastaminen voitaisiin tehdä kuten NatureWorks:n menetelmässä eli tunnetun tarkistusnäytteen laktidipitoisuuden määrittämisellä. Tarkistusnäyte voisi olla esimerkiksi PLDLA96/4-näyte ja jokin toinen suuremman laktidipitoisuuden polymeerinäyte. BulkkiPLA:ta ei tulisi käyttää, sillä se todennäköisesti likaa linerin nopeammin kuin lääketieteellisen laadun materiaalit. NatureWorks:n menetelmäohjeessa toimintakunnon takeeksi riittää, että tarkistusnäytteelle mitattu yksittäisen määrittäksen laktidipitoisuus on  $k.a \pm 3 \times s$ , jossa  $k.a.$  on aiempien määrittästen keskiarvo ja  $s$  niiden keskihajonta. Jos tarkistusnäytteen tulos ei ole hyväksyttävä, tulisi ensin lineri vaihtaa puhtaaseen. Jos linerin vaihto ei paranna tarkistusnäytteen määrittäksen tulosta, niin tulisi puhdistaa kolonni leikkaamalla sen injektorin puoleisesta päästä osa pois. GCMS- ja GCFID-menettelyjen PLDLA96/4-näytteiden toistettavuusmittausten ensimmäisten mittauspäivien tuloksia voi käyttää tarkistusnäytteen tuloksina, sillä ne on mitattu puhtaita linereita käyttäen ja kolonnin puhdistuksen jälkeen. Tarkistusnäytteen toistettavuusmittauksia tulisi kuitenkin tehdä myös muina mittauspäivinä täysin puhtaalla laitteistolla, jotta mittauspäivän vaikutus näkyisi tarkistusnäytteen tulosten hajonnassa. Jos tarkistusnäytteen määrittästä ei käytetä laitteiston rutiininomaiseen toimintakunnon tarkistukseen, tulisi linerin vaihto ja kolonnin puhdistus leikkaamalla tehdä säännöllisin väliajoin. [4]

GCFID-menettelyn injektointitoistettavuus (liite J) oli 2,9 %, jos huomioidaan kaikki samasta PLDLA96/4-näyteliuoksesta tehdyt injektoinnit. Ensimmäisen injektoinnin ja muiden viiden injektoinnin välinen aika oli kuitenkin noin 4 - 6 tuntia, sillä ensimmäisen injektoinnin jälkeen mitattiin mittaussarjan muita mittauksia. Injektoinneista 2 - 6 määritetty injektointitoistettavuus on 2,0 %. Lisäksi ensimmäisestä injektoinnista määritetyn

laktidipitoisuuden arvon suhteellinen poikkeama muiden injektointien arvojen keskiarvosta on noin 6 %. Näyteliuoksesta mitatun laktidipitoisuuden arvo muuttuu siten hieman pitkissä mittausarjoissa. Kyseinen ilmiö voi johtua näyteliuoksen säilyvyydestä tai muutuneista olosuhteista, esimerkiksi linerin likaantuessa. Mittausarjat tulisi siten pitää suhteellisen lyhyinä. Luultavasti tämä ei tule olemaan merkittävä ongelma, sillä automaattiseen näytteensyöttäjään mahtuu vain 11 näytepulloa kerrallaan, kun käytetään kolmea liuotin pulloa ruiskun pesuun.

Molemmissa menetelmissä näytteenkäsittely koettiin työlääksi. Pulloannostelijoiden käyttöönotto helpotti näytteenkäsittelyä liuottimien lisäyksissä. Työläin vaihe näytteenkäsittelyssä oli täyspipeteillä tehdyt pipetoinnit erityisesti polymeeriliuosten tapauksessa. Pipetoinnit ovat lisäksi yksi merkittävä virhelähde menetelmissä, jos samoja pipettejä käytettäessä niitä ei huuhdella riittävän huolellisesti eri liuosten pipetointien välillä. Näytteenkäsittelyn eri liuosvaiheisiin käytettiin omia pipettejä sekä standardeille että polymeeriliuoksille. Pipetin kontaminoitumisen virhelähteen, erityisesti polymeeriliuosten tapauksessa, ja pipetointiin kuluvan ajan voisi minimoida käyttämällä automaattipipettejä, kuten NatureWorks:n menetelmässä [4]. Tässä työssä käytettävissä ei kuitenkaan ollut työn liuottimia kestäviä automaattipipettejä. Automaattipipettien kärjistä irtoavien epäpuhtauksien vaikutus mittauksiin tulisi myös selvittää automaattipipettejä käytettäessä erityisesti GCMS-menetelmän viimeisessä pipetointi vaiheessa, jolloin tutkittavien analyttien massakonsentraatiot ovat pienimmillään.

GCMS-menetelmä on käytännössä työläämpi kuin GCFID-menetelmä näytteenkäsittelyn ylimääräisen laimennusvaiheen takia. GCMS-menetelmää voisi kehittää lisää korvaamalla laimennusvaiheen jakoinjektioinnin käytöllä, jolloin laimentuminen tapahtuisi laitteen sisällä injektorissa. Jakoinjektioinnissa käytetään yleensä suurempaa injektorin lämpötilaa kuin 200 °C, mikä voi lisätä termistä hajoamista injektorissa. Jakoinjektointi ei lisäksi sovellu yhtä hyvin kvantitatiiviseen analyysiin kuin suora höyrystävä injektointi. Jakoinjektointia on kuitenkin käytetty laktidin kvantitatiivisessa analyysissä 200 °C:een injektorin lämpötilalla [25], joten jakoinjektioinnin käytön testaaminen voisi olla hyödyllistä näytteenkäsittelyn helpottamiseksi. GC-analyysin ajoasetuksia kannattaisi tällöin muuttaa lämpötilaohjelman osalta, sillä jakoinjektioinnissa ei ole tarvetta liuotinloukun käytölle. Kolonnin lämpötila voisi olla jo injektioinnin aikana korkeampi.

## 6. YHTEENVETO

Kokeellisessa työssä kehitettiin NatureWorks:n julkaisemasta menetelmästä polylaktidien laktidipitoisuuden määrittäminen GCMS-laitteiston MS- ja FID-detektoreille. Menetelmän kehityksen tavoitteena oli pystyä määrittämään NatureWorks:n menetelmää pienempiä laktidipitoisuuksia. Molemmista menetelmistä näytteenkäsittely tehtiin NatureWorks:n menetelmän periaatteen mukaisesti, mutta GCMS-menetelmään lisättiin ylimääräinen laimennusvaihe. Lisäksi menetelmien kalibrointi perustui 1-pistekalibroinnin sijaan kolmen standardiliuoksen mittaukseen, jota pidetään yleisesti luotettavampana kalibrointitapana. Menetelmistä käytettyjen kalibrointistandardien laktidin ja sisästandardin massakonsentraatiot valittiin lisäksi vastaamaan pienempiä laktidipitoisuuksia kuin NatureWorks:n menetelmässä, jotta pienempien laktidipitoisuuksien määrittäminen olisi mahdollista. Menetelmistä käytettävät GC-analyysin ajoasetukset valittiin ja optimoitiin käytettävälle laitteistolle sopiviksi. Työssä laadittiin menetelmien ja laitteiston käyttöön liittyvät ohjeet.

GCMS- ja GCFID-menetelmien suorituskykyä testattiin niiden alustavissa validoinneissa kvantitatiivisille analyysimenetelmille yleisesti käytettyjen tapojen mukaisesti. Menetelmän lineaarisuus, toistettavuus, tarkkuus ja määrittämissärajat määritettiin molemmille menetelmille. Lineaarisuuden, toistettavuuden ja määrittämissärajajen osalta menetelmien suorituskyvyt olivat hyväksyttävissä. Molemmilla menetelmillä pystyttiin määrittämään laktidipitoisuus vähintään alueella 0,05 - 1,0 m-%, mikä oli tavoitteena. Lyhyen aikavälin toistettavuuden havaittiin olevan parempi GCMS-menetelmällä kuin GCFID-menetelmällä. Molemmilla menetelmillä se oli suhteellisen keskihajontana määritettynä alle 5 %. Toistettavuudet määritettiin lähellä toiminta-alueen alarajaa, joten suuremmilla laktidipitoisuuksilla menetelmien toistettavuudet voivat olla parempia. Tarkkuuden määrittäminen tehtiin poly-L/D-laktidi 96L/4D -materiaalin *spiking*-näytteiden avulla, sillä tunnettuja polylaktidi näytteitä ei ollut saatavilla. *Spiking*-näytteiden mittaustuloksien perusteella menetelmät tuottivat tarkkoja tuloksia, mutta polymeerimateriaaleille määrittämissärajajissa oli ristiriita menetelmien välillä. GCFID-menetelmällä määritettiin noin kaksinkertaisia laktidipitoisuuksia GCMS-menetelmään verrattuna, mitä ei työssä tehtyjen mittausten perusteella voitu selittää.

Työssä mitattiin polylaktidinäytteiden lisäksi prosessoituja poly(L-laktidi-ko-ε-kaprolaktoni) 70/30 -kopolymeerimateriaaleja, joiden laktidipitoisuus oli määritetty noin 1 - 2 vuotta ennen työn suorittamista. Myös kyseisten materiaalien laktidipitoisuuksiksi määritettiin GCFID-menetelmällä noin kaksinkertaiset arvot tunnettuihin arvoihin nähden. Jatkomäärittämissä havaittiin kuitenkin, että kehitettyjen menetelmien näytteenkäsittelyt eivät välttämättä sovellu kyseisenkaltaisille materiaaleille. Siksi kyseisten näytteiden mittausta ei voitu luotettavasti käyttää menetelmien tarkkuuksien arviointiin.

Työssä ei siten saatu varmaa käsitystä siitä, kummalla menetelmistä määritetään laktidipitoisuus tarkemmin. Kyseisen ristiriidan selvittämiseksi tulisi menetelmillä mitata laktidipitoisuudet polylaktidimateriaaleista, joiden laktidipitoisuus on määritetty jollakin hyväksytyllä kaupallisella menetelmällä. Myös näytteenkäsittelyn soveltuvuus  $\epsilon$ -kaprolaktonin ja laktidin kopolymeereille tulisi varmistaa jatkotutkimuksin.

Menetelmät on mahdollista kehittää käytännön laboratoriotyön kannalta vähemmän työläiksi. Menetelmissä käytettäviä liuottimia kestävien automaattipipettien käytöllä voitaisiin nopeuttaa standardi- ja näyteliuosten valmistusta huomattavasti. Automaattipipettien käyttö vähentäisi myös täyspipettien kontaminaation riskiä erityisesti polymeeriliuoksia pipetoitaessa. Lisäksi säädettävien automaattipipettien käytöllä voitaisiin standardit valmistaa yhdestä laktidikantaliuoksesta pipetoimalla standardien Vial 1 -liuoksiin eri tilavuudet valmistettua laktidikantaliuosta. GCMS-menetelmän ylimääräinen laimennusvaihe voitaisiin mahdollisesti korvata jakoinjektioinnissa tapahtuvalla näytteiden laimentumisella. Jakoinjektioinnin vaikutus menetelmän toistettavuuteen tulisi kuitenkin selvittää.

## LÄHTEET

- [1] D. Cam, M. Marucci, Influence of residual monomers and metals on poly (L-lactide) thermal stability. *Polymer*, Vol. 38, No. 8., 1997, pp. 1879-1884.
- [2] S.-H. Hyon, K. Jamshidi, Y. Ikada, Effects of Residual Monomer on the Degradation of DL-Lactide Polymer. *Polymer International*, 46, 1998, pp. 196-202
- [3] K. Paakinaho, V. Ellä, S. Syrjälä, M. Kellomäki, Melt spinning of poly(L/D)lactide 96/4: Effects of molecular weight and melt processing on hydrolytic degradation. *Polymer Degradation and Stability*, 94, 2009, pp. 438-442.
- [4] Quantification of Residual Lactide in Polylactide (PLA) by Gas Chromatography (GC) Using a Flame Ionization Detector (FID)-External Release Version, NatureWorksLLC, 2010, verkkosivu. Saatavissa (viitattu 15.4.2015):  
[http://www.natureworksllc.com/~media/Technical\\_Resources/Analytical\\_Methods/GC%20Method%20for%20Residual%20Lactide%20in%20PLA\\_2010\\_pdf.pdf](http://www.natureworksllc.com/~media/Technical_Resources/Analytical_Methods/GC%20Method%20for%20Residual%20Lactide%20in%20PLA_2010_pdf.pdf)
- [5] IUPAC Gold Book [WWW]. [viitattu 21.1.2015]. Saatavissa: <http://gold-book.iupac.org/index.html>.
- [6] J. Mendham, R.C. Deney, J.D. Barnes, M.J.K Thomas, Vogel's Textbook of Quantitative Chemical Analysis, 6th ed., Pearson Education Limited, 2000, 806 p.
- [7] H.M. McNair, J.M. Miller, Basic Gas Chromatography, 2nd ed., Hoboken, NJ, USA: Wiley-Interscience, 2009, ProQuest Ebrary, Web, 255 p., Ebook ISBN 9780470480090.
- [8] D.C. Harris, Quantitative Chemical Analysis, 8th ed., W. H. Freeman and Company, New York, USA, 2010, 719 p.
- [9] K. Hästbacka, Kaasukromatografia, teoksessa: Kivalo P. (toim.), *Instrumentti-analytiikka 3, Kromatografia, Termoanalyysi*, Teknillisten tieteiden akatemia ry., Jyväskylä, Suomi, 1980, s. 75 - 180.
- [10] G.D. Christian, Analytical Chemistry, 4th ed., John Wiley & Sons, New York, USA, 1986, 676 p.
- [11] H.H. Willard, L.L. Jr. Merrit, J.A. Dean, F.A. Jr. Settle, Instrumental Methods of Analysis, 7th ed., Wadsworth Publishing Company, Belmont, California, USA, 1988, 895 p.

- [12] T. Hyötyläinen, M-L. Riekkola, Kaasukromatografia-massaspektrometria, teoksessa: Ketola R., Kostiainen R., Kotiaho T., Vainiotalo P., *Massaspektrometrian perusteet*, Suomen Massaspektrometrian Seura ry., Helsinki, Suomi, 2010, s. 155 - 166.
- [13] P. Oksman, T. Kauppila, T. Kotiaho, R. Ketola, Massaspektrometrian peruskäsitteitä, teoksessa: Ketola R., Kostiainen R., Kotiaho T., Vainiotalo P., *Massaspektrometrian perusteet*, Suomen Massaspektrometrian Seura ry., Helsinki, Suomi, 2010, s. 15 - 23.
- [14] P. Ottoila, Kvantitatiivinen massaspektrometria, teoksessa: Ketola R., Kostiainen R., Kotiaho T., Vainiotalo P., *Massaspektrometrian perusteet*, Suomen Massaspektrometrian Seura ry., Helsinki, Suomi, 2010, s. 187 - 191.
- [15] M. Haapala, Kvadrupolianaalysointitekniikat, teoksessa: Ketola R., Kostiainen R., Kotiaho T., Vainiotalo P., *Massaspektrometrian perusteet*, Suomen Massaspektrometrian Seura ry., Helsinki, Suomi, 2010, s. 27 - 34.
- [16] E. Karjalainen, U. Karjalainen, Massaspektrometrisen tiedon käsittely, teoksessa: Ketola R., Kostiainen R., Kotiaho T., Vainiotalo P., *Massaspektrometrian perusteet*, Suomen Massaspektrometrian Seura ry., Helsinki, Suomi, 2010, s. 104 - 115.
- [17] M.C. Garrigos, M.L. Marín, A. Canto, A. Sanchez, Determination of residual styrene monomer in polystyrene granules by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1061, 2004, pp. 211–216.
- [18] SFS-EN ISO 11337. PLASTICS. POLYAMIDES. DETERMINATION OF E-CAPROLACTAM AND W-LAUROLACTAM BY GAS CHROMATOGRAPHY (ISO 11337:2010). Helsinki 2011, Suomen standardisoimisliitto. 14 p.
- [19] C.C. Chan, H. Lam, X-M. Zhang. *Practical Approaches to Method Validation and Essential Instrument Qualification*, Hoboken, NJ, USA, John Wiley & Sons, 2010, 415 p.
- [20] V. Ellä, L. Nikkola, M. Kellomäki, Process-Induced Monomer on a Medical-Grade Polymer and Its Effect on Short-Term Hydrolytic Degradation. *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 119, 2011, pp. 2996–3003.
- [21] E. Hansson, M. Hakkarainen, Multiple headspace single-drop microextraction—a new technique for quantitative determination of styrene in polystyrene. *Journal of Chromatography A*, 1102, 2006, pp. 91–95.

- [22] SFS-EN ISO 6401. Plastics. Poly(vinyl chloride). Determination of residual vinyl chloride monomer. Gas-chromatographic method (ISO 6401:2008). Helsinki 2009, Suomen standardisoimisliitto. 9 p.
- [23] Romulo Vinicio Salazar Gonzalez. Impact of polylactide (PLA) on the quality of bio-products in contact. Food engineering. AgroParisTech, 2013. English. <NNT : 2013AGPT0029>.<pastel-01017900>
- [24] L. Feng, G. Li, X. Bian, Z. Chen, Y. Liu, Y. Cui, X. Chen, Rapid determination of residual monomer in polylactide using thermogravimetric analysis. *Polymer Testing*, 31, 2012, pp. 660–662.
- [25] D. R. Witzke, R. Narayan, Reversible Kinetics and Thermodynamics of the Homopolymerization of L-Lactide with 2-Ethylhexanoic Acid Tin(II) Salt. *Macromolecules*, 30, 1997, pp. 7075-7085
- [26] L. Feng, Z. Gao, X. Bian, Z. Chen, X. Chen, W. Chen, A quantitative HPLC method for determining lactide content using hydrolytic kinetics. *Polymer Testing*, 28, 2009, pp. 592–598.
- [27] B. Braun, J. R. Dorgan S. F. Dec, Infrared Spectroscopic Determination of Lactide Concentration in Polylactide: An Improved Methodology. *Macromolecules*, 39, 2006, pp. 9302-9310.
- [28] K. A. M. Thakur, R. T. Kean, E. S. Hall, M. A. Doscotch, E. J. Munson, A Quantitative Method for Determination of Lactide Composition in Poly(lactide) Using <sup>1</sup>H NMR. *Analytical Chemistry*, Vol. 69, No. 21, 1997, pp. 4303-4309.
- [29] M. Rissanen, A. Puolakka, T. Hukka, V. Ellä, M. Kellomäki, P. Nousiainen, Effect of Hot Drawing on Properties of Wet-Spun Poly(L,D-Lactide) Copolymer Multifilament Fibers. *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 115, 2010, pp. 608–615.
- [30] L. S. Nair, C. T. Laurencin, Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, 32, 2007, pp. 762-798.
- [31] B. Magnusson and U. Örnemark (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. Saatavissa <http://www.eurachem.org>
- [32] Swartz, M.E., Krull, I.S. *Handbook of Analytical Validation*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2012, 216 p.

- [33] Guidance for Industry Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, ICH, 1996, verkkosivu. Saatavissa (viitattu 15.4.2015): <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm073384.pdf>
- [34] Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods, Center for Drug Evaluation and Research, U.S. Food and Drug Administration, 1994, verkkosivu. Saatavissa (viitattu 15.4.2015): <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM134409.pdf>
- [35] Huber, L., Validation of Analytical Methods, Agilent Technologies, verkkosivu. Saatavissa (viitattu 15.4.2015): <http://www.chem.agilent.com/Library/primers/Public/5990-5140EN.pdf>
- [36] Shimadzu GCMS consumables brochure [WWW]. [viitattu 30.10.2015]. Saatavissa: [https://store.shimadzu.com/documents/GCMS\\_Consumables\\_Brochure.pdf](https://store.shimadzu.com/documents/GCMS_Consumables_Brochure.pdf)
- [37] Operating Hints for Using Split/Splitless Injectors. Restek.com [WWW]. [viitattu 30.10.2015]. Saatavissa: <http://www.restek.com/pdfs/59880A.pdf>
- [38] Adams, S., How to Choose a GC Inlet Liner: Simplify Selection Based on Injection Type. Restek.com [WWW]. [viitattu 30.10.2015]. Saatavissa: <http://www.restek.com/pdfs/GNAR1991-UNV.pdf>
- [39] "Physical Constants of Organic Compounds," in CRC Handbook of Chemistry and Physics, 96th Edition (Internet Version 2016), W. M. Haynes, ed., CRC Press/Taylor and Francis, Boca Raton, FL.
- [40] Taylor, T., The LCGC Blog: Split Later and the Case of the Infinite Dilution Tube. [WWW]. [viitattu 6.11.2015]. Saatavissa: <http://www.chromatographyonline.com/lcgc-blog-split-later-and-case-infinite-dilution-tube>
- [41] Taylor, T., The LCGC Blog: The Heat is On! Insights into a More Logical Approach to GC Temperature Program Development. [WWW]. [viitattu 5.11.2015]. Saatavissa: <http://www.chromatographyonline.com/lcgc-blog-heat-insights-more-logical-approach-gc-temperature-program-development>



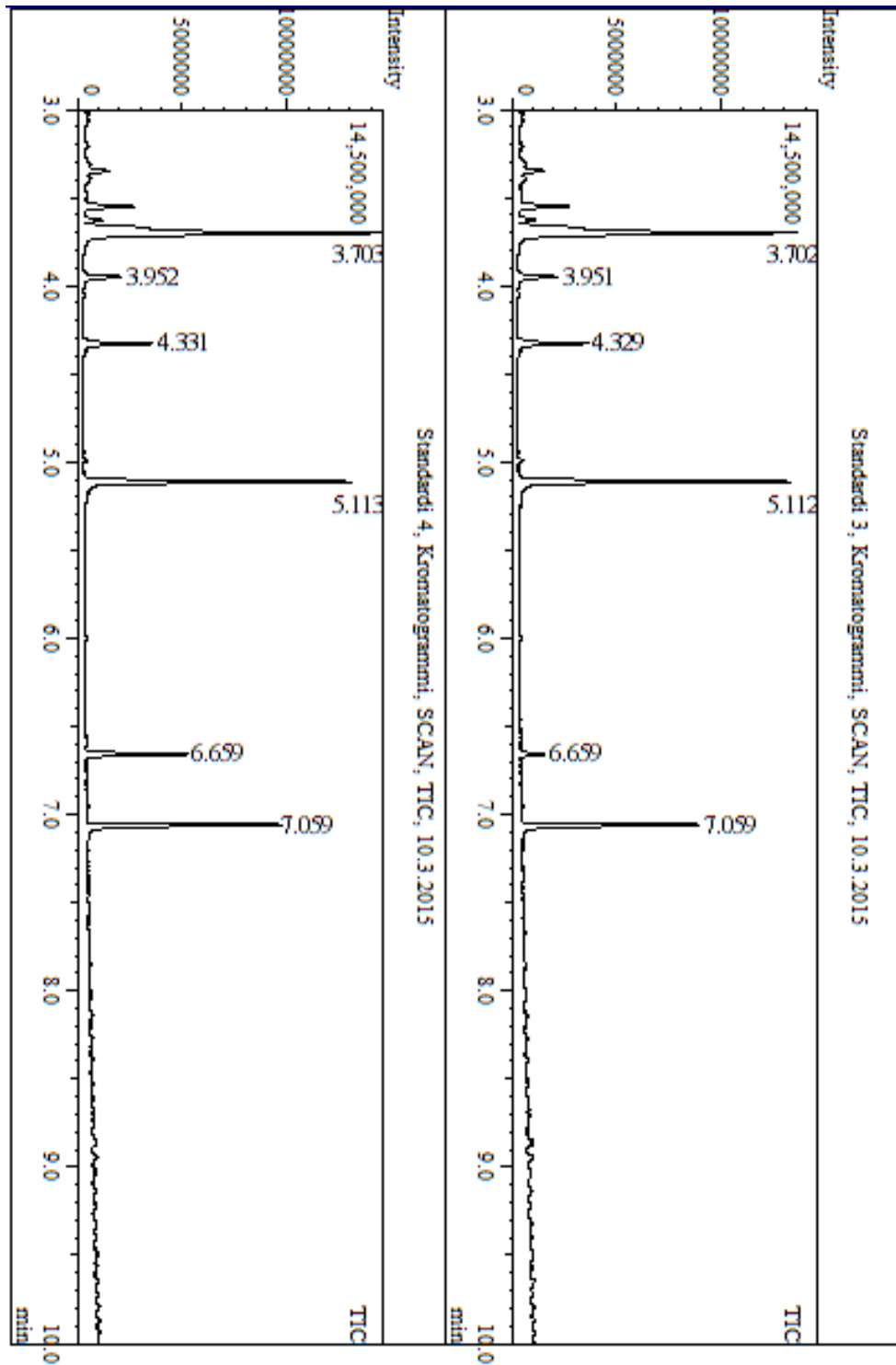
## LIITE A: GCMS-MENETELMÄLLÄ MITATTAVAN MASSAKONSENTRAATIOALUEEN SELVITTÄMINEN JA PIIKKIEN TUNNISTAMINEN

**Taulukko A.1.** GCMS-menetelmän lineaarisen alueen alustava määrittäminen standardidiliuksilla. Mitattavat Vial 2 -liuokset valmistettiin, kuten alaluvussa 3.4.1 on kuvattu. Mitattavien standardiliuosten massakonsentraatiot on laskettu yhtälöllä 13. Sisästandardia punnittiin 33,37 mg 50 cm<sup>3</sup>:n kantaliuokseen, joten sen massakonsentraatio oli 667,4 µg cm<sup>-3</sup>. \*) Standardin 1 kantaliuos valmistettiin punnitsemalla ilmoitettu massa L-laktidia 50 cm<sup>3</sup> mittapulloon ja laimentamalla 1 ml mittapullossa 20 cm<sup>3</sup>:n kantaliuokseksi. \*\*) Standardien 2 ja 3 kantaliuokset valmistettiin kuten standardin 1 kantaliuos, mutta taulukossa ilmoitettu punnitus tehtiin 20 cm<sup>3</sup>:n mittapulloon.

Standardiliuos	Kantaliuos		Mitattava liuos		SCAN-mittaus			SIM-mittaus		
	m <sub>kl</sub> (La) (mg)	c <sub>kl</sub> (La) (µg/ml)	c <sub>v2</sub> (La) (µg/ml)	c <sub>v2</sub> (IS) (µg/ml)	A(La) (*10 <sup>5</sup> )	A(IS) (*10 <sup>5</sup> )	A(La)/A(IS)	A(La) (*10 <sup>5</sup> )	A(IS) (*10 <sup>5</sup> )	A(La)/A(IS)
1	17,13 *	17,13	0,04283	1,669	0,7422	27,252	0,02723	1,025	38,440	0,02667
2	12,26**	30,65	0,07663	1,669	1,192	27,258	0,04372	1,496	37,419	0,03997
3	67,71**	169,275	0,4232	1,669	6,620	27,082	0,2444	8,374	37,355	0,2242
4	14,69	734,5	1,836	1,669	28,34	27,647	1,025	37,139	39,227	0,9468
5	37,45	1872,5	4,681	1,669	70,46	27,607	2,552	-	-	-
6	51,77	2588,5	6,471	1,669	90,13	27,009	3,337	-	-	-
7	63,73	3186,5	7,966	1,669	103,76	28,101	3,692	-	-	-

**Taulukko A.2.** GC-analyysin ajoasetukset SCAN- ja SIM-mittauksissa.

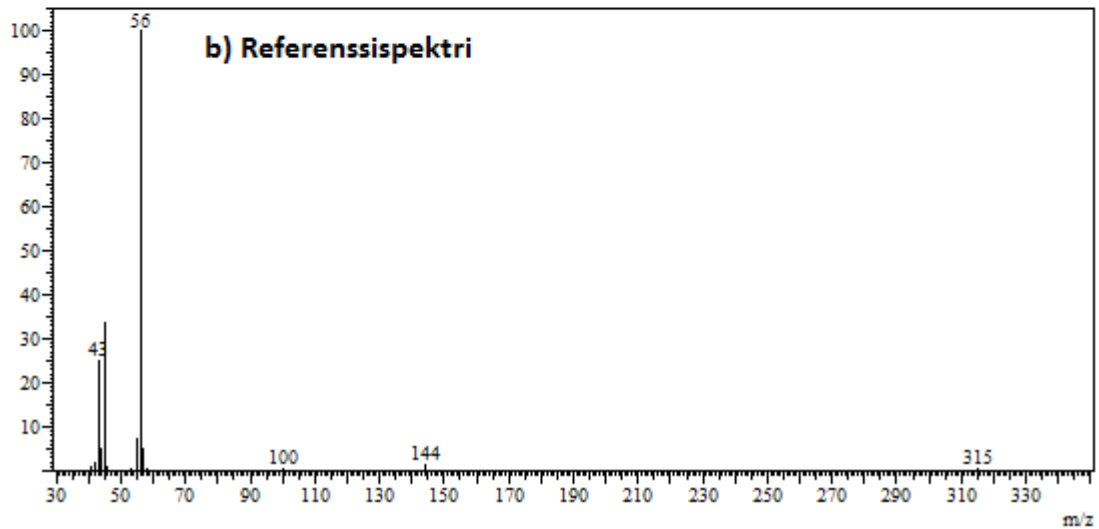
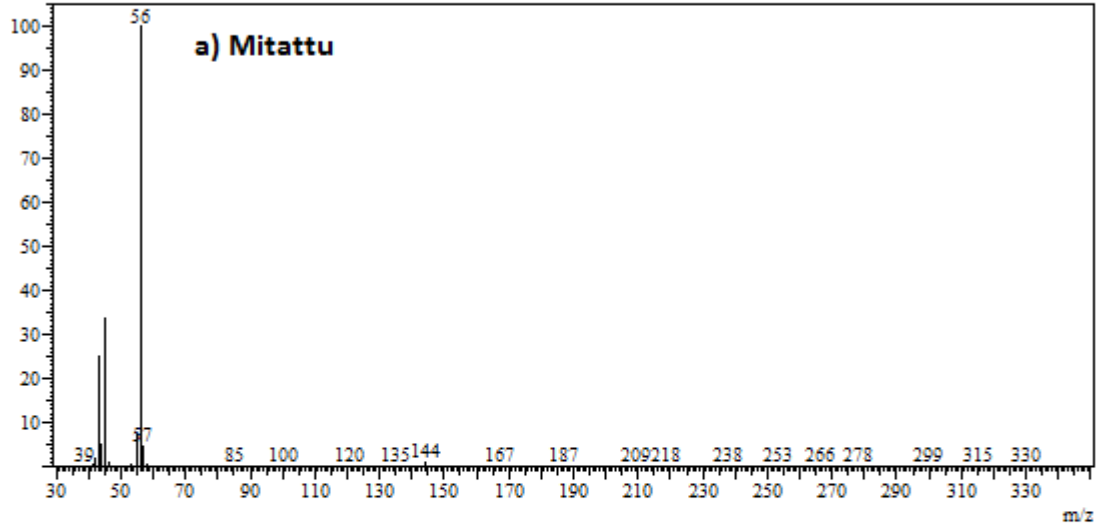
GC:n ajoasetukset SCAN- ja SIM-mittauksissa	SCAN-mittauksien MS:n asetukset	SIM-mittauksien MS:n asetukset
==== Analytical Line 1 =====	==== Analytical Line 1 =====	==== Analytical Line 1 =====
[GC-2010]	[GCMS-QP2010 Ultra]	[GCMS-QP2010 Ultra]
Column Oven Temp. :50.0 °C	IonSourceTemp :200.00 °C	IonSourceTemp :200.00 °C
Injection Temp. :200.00 °C	Interface Temp. :310.00 °C	Interface Temp. :310.00 °C
Injection Mode :Splitless		
Sampling Time :1.00 min	[MS Table]	[MS Table]
Flow Control Mode :Linear Velocity	--Group 1 - Event 1--	--Group 1 - Event 1--
Pressure :48.0 kPa	Start Time :3.00min	Start Time :3.20min
Column Flow :0.93 mL/min	End Time :16.00min	End Time :16.00min
Linear Velocity :35.0 cm/sec	ACQ Mode :Scan	ACQ Mode :SIM
Purge Flow :3.0 mL/min	Event Time :0.10sec	Event Time :0.10sec
Split Ratio :10.0	Scan Speed :5000	Ch1-m/z :56.00
High Press. Inj. Pressure :100.0 kPa	Start m/z :35.00	Ch2-m/z :45.00
High Press. Inj. Time :1.00 min	End m/z :350.00	Ch3-m/z :43.00
Oven Temp. Program		Ch4-m/z :124.00
Rate Temperature(°C) Hold Time(min)	Sample Inlet Unit :GC	Ch5-m/z :69.00
- 50.0 1.00		
25.00 320.0 5.00		Sample Inlet Unit :GC



**Kuva A.1.** Standardiliuksilla 3 ja 4 mitatut kromatogrammit. Mitattu SCAN:lla ja näkyvissä on TIC eli kokonaisionivirta. Standardit on valmistettu muuten samoin, mutta laktidin massakonsentraatio standardissa 4 on noin nelikertainen standardiin 3 verrattuna, mikä näkyy retentioajalla 6,659 min olevan piikin pinta-alan kasvuna. Kromatogrammeista jätetty pois retentioaikaväli 10 - 16 min, jolla ei havaittu piikkejä. Piikit retentioajoilla 6,659 ja 7,059 min tunnistettiin L-laktidista ja sisästandardista johtuviksi.

Standardi 4, Massaspektri, retentioaika 6,658 min, SCAN, a) mitattu, b) referenssispektri (NIST11) L- ja D-laktidille

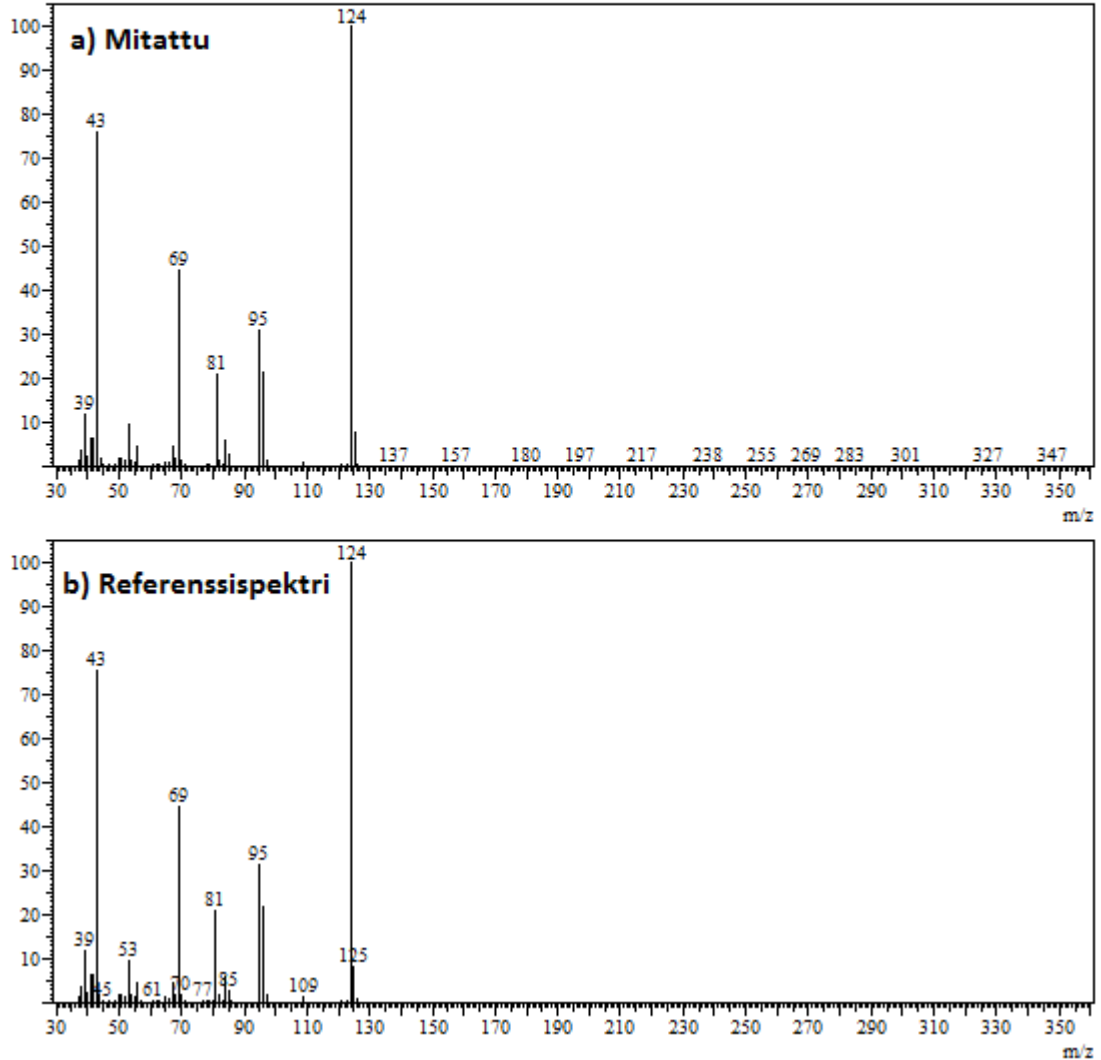
ID#:1 R.Time:6.658(Scan#:2196)  
 MassPeaks:161  
 RawMode:Averaged 6.657-6.660(2195-2197)  
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan  
 Similarity Index: 98



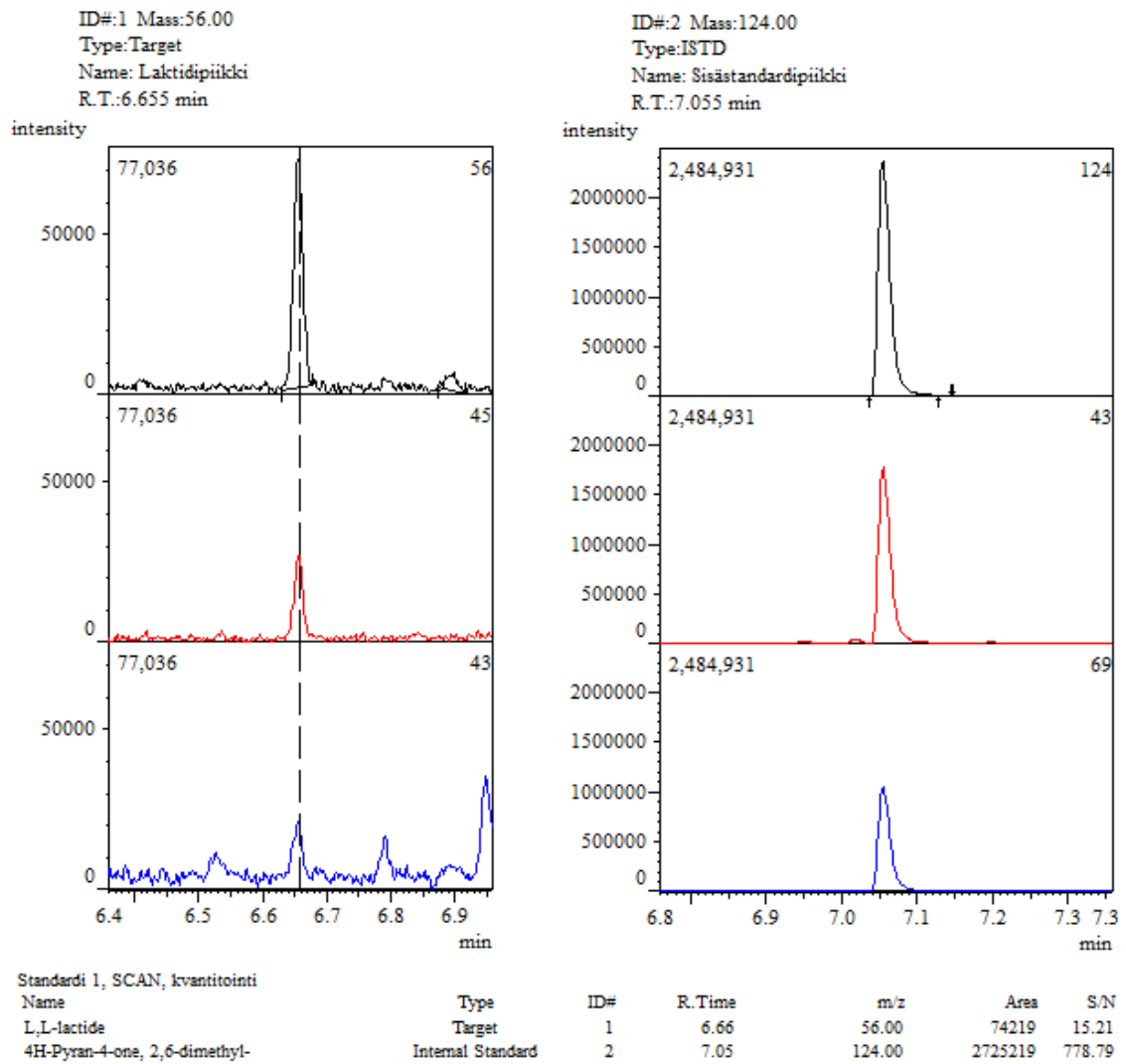
**Kuva A.2.** Standardin 4 SCAN-mittauksen kromatogrammin retentioajan 6,658 min piikin kohdalta a) mitattu massaspektri  $m/z$ -alueella 35 - 350. b) Referenssispektri NIST11-massaspektrikirjastosta L-laktidille ja D-laktidille. Spektrien yhtäläisyyttä kuvaava similarity index:n arvo on 98 (/100). Y-akselina suhteellinen intensiteetti suurimpaan piikkiin nähden.

Standardi 4, Massaspektri, retentioaika 7,058 min, SCAN, a) mitattu, b) referenssispektri (NIST11) 2,6-dimetyyli- $\gamma$ -pyronille

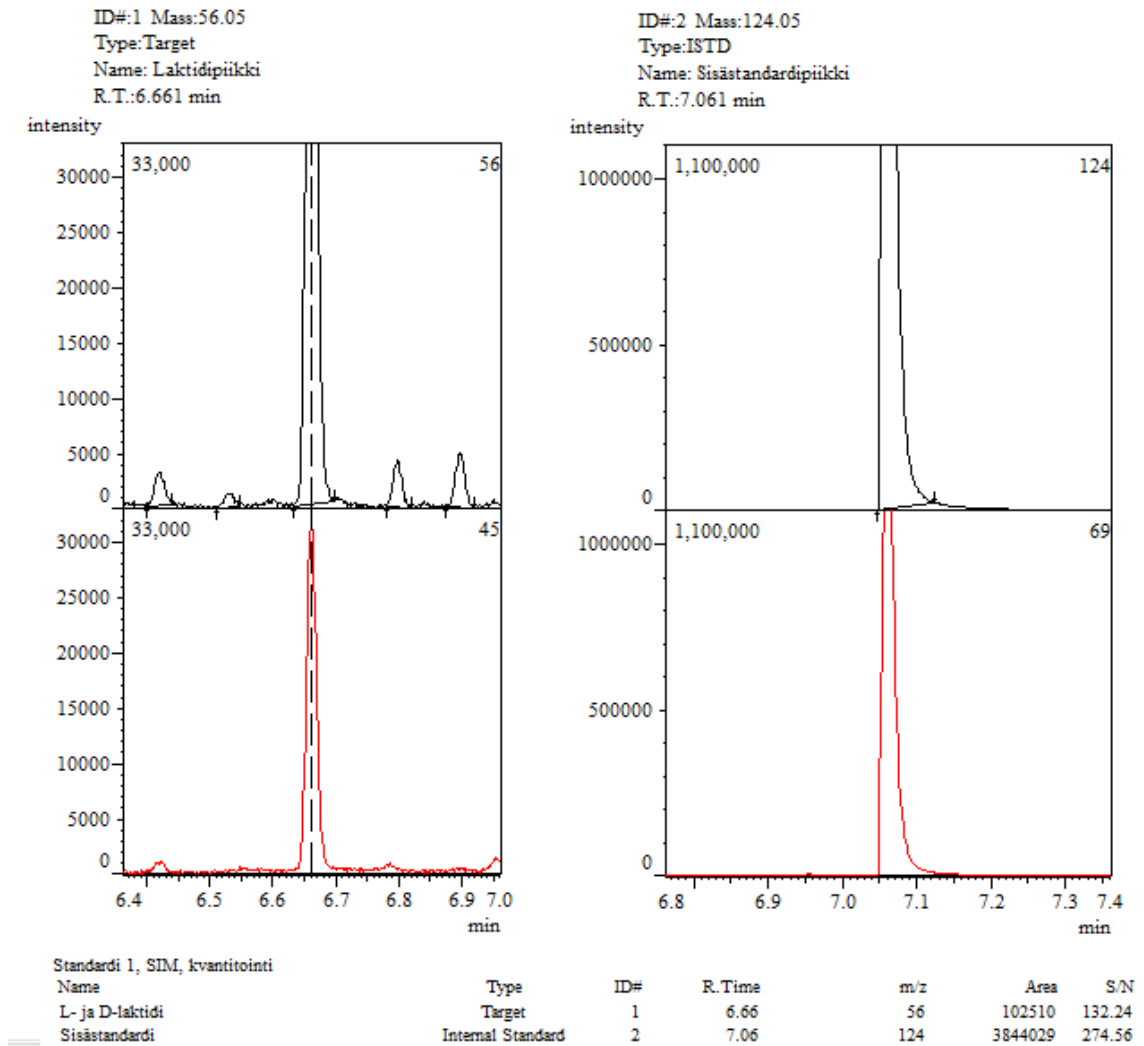
ID#:2 R.Time:7.058(Scan#:2436)  
 MassPeaks:200  
 RawMode:Averaged 7.057-7.060(2435-2437)  
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan  
 Similarity Index: 99



**Kuva A.3.** Standardin 4 SCAN-mittauksen kromatogrammin retentioajan 7,058 min pinnan kohdalta a) mitattu massaspektri  $m/z$ -alueella 35 - 350. b) Referenssispektri NIST11-massaspektrikirjastosta 2,6-dimetyyli- $\gamma$ -pyronille. Spektrien yhtäläisyyttä kuvaava similarity index:n arvo on 99 (/100). Y-akselina suhteellinen intensiteetti suurimpaan piikkiin nähden.

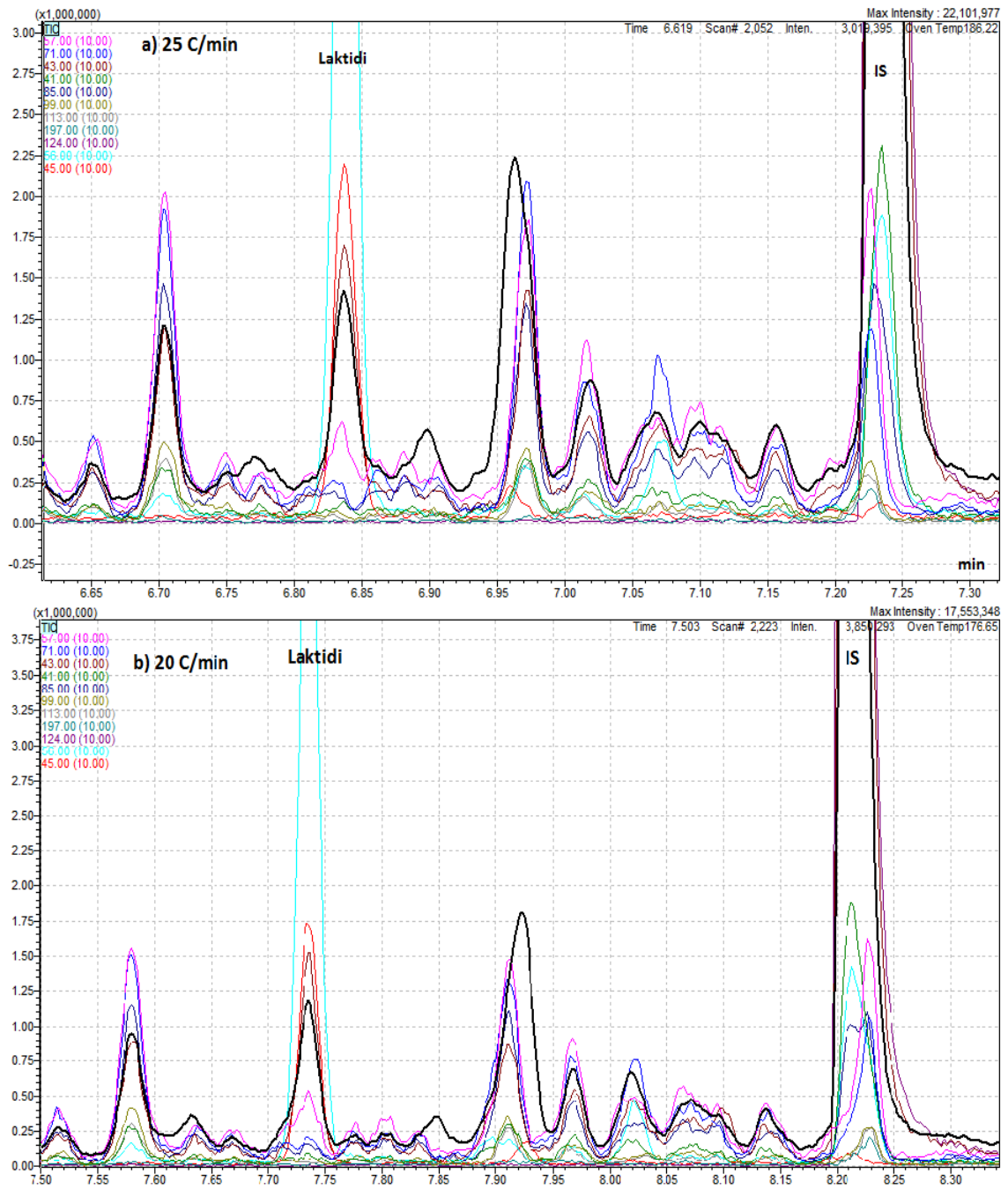


**Kuva A.4.** Standardin 1 SCAN-mittauksen laktidi- (vasemmalla) ja sisästandardipiikin (oikealla) pinta-alan määrittäminen. Molemmille pikeille esitetty kvantitointi-ionien ja tunnistus-ionien kromatogrammit piikin läheisyydessä. Ohjelmalla laskettiin myös kvantitointi-ionien piikkien signaali-kohinasuhteet S/N. Määritetyt alat on esitetty taulukossa A.1.

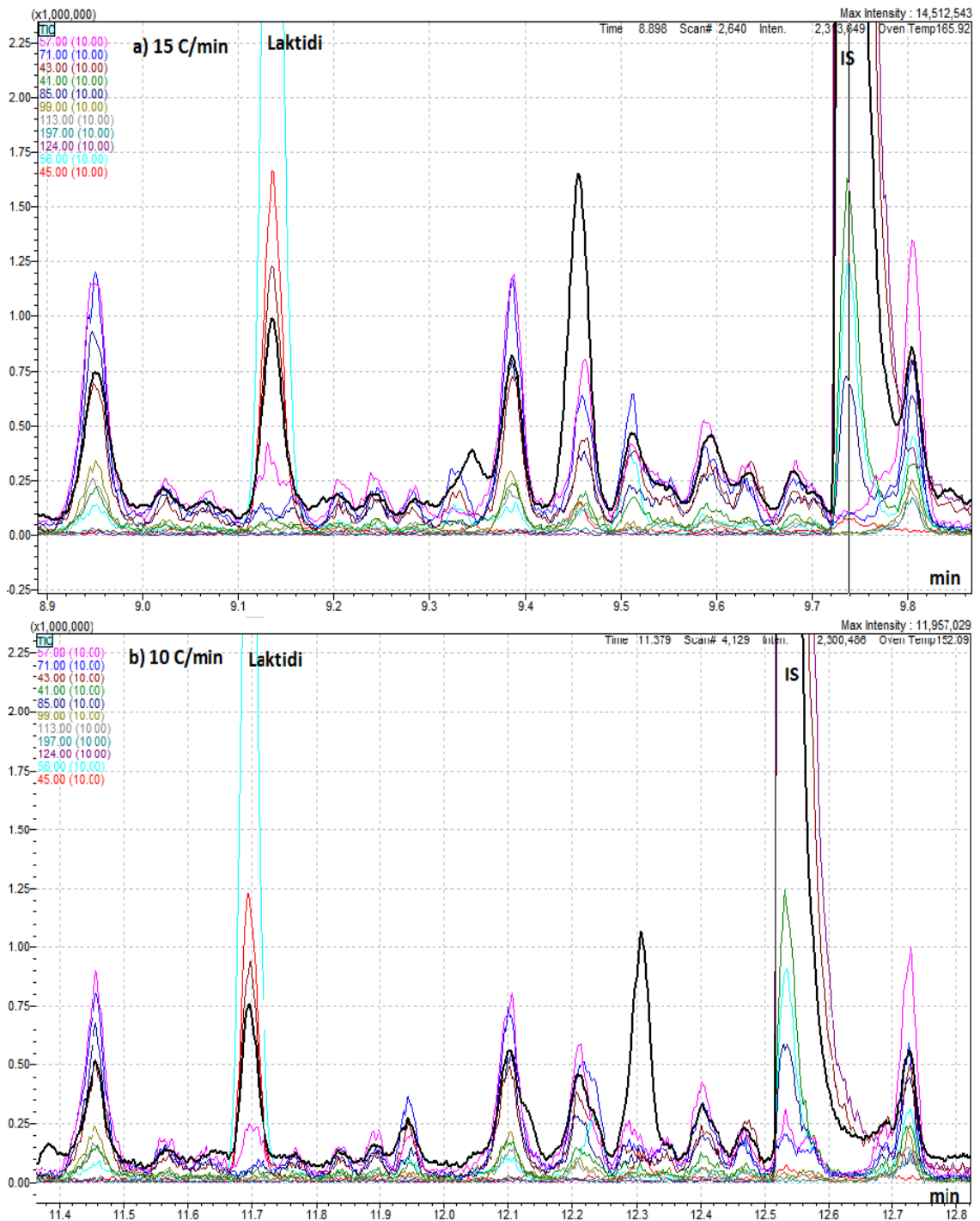


**Kuva A.5.** Standardin 1 SIM-mittauksen laktidi- (vasemmalla) ja sisästandardipiikin (oikealla) pinta-alan määrittäminen. Molemmille piikeille esitetty kvantitointi-ionien ja tunnisteionien kromatogrammit piikin läheisyydessä. Y-akselit on skaalattu siten, että kvantitointi-ionin piikistä näkyy vain noin kolmasosa sen korkeudesta, jotta mittauksen hyvin heikko kohina saatiin näkyviin laktidipiikin tapauksessa. Tunniste-ionina ei ole poikkeuksellisesti käytetty  $m/z = 43$  ionia, koska sitä mitattiin jokaisessa SIM:n aikaikkunassa vahingossa kahteen kertaan, jolloin sen intensiteetti mitattiin kaksinkertaisena. Ohjelmalla laskettiin myös kvantitointi-ionien piikkien signaali-kohinasuhteet S/N. Laktidipiikin kuvaajassa esiintyviä todella pieniä piikkejä (intensiteetti noin 2000 - 5000) ei ole huomioitu kohinaksi S/N:n määrittämisessä. Määritetyt alat on esitetty taulukossa A.1.

## LIITE B: GC-ANALYYSIN LÄMMITYSNOPEUDEN OPTIMOINNIN KROMATOGRAMMEJA



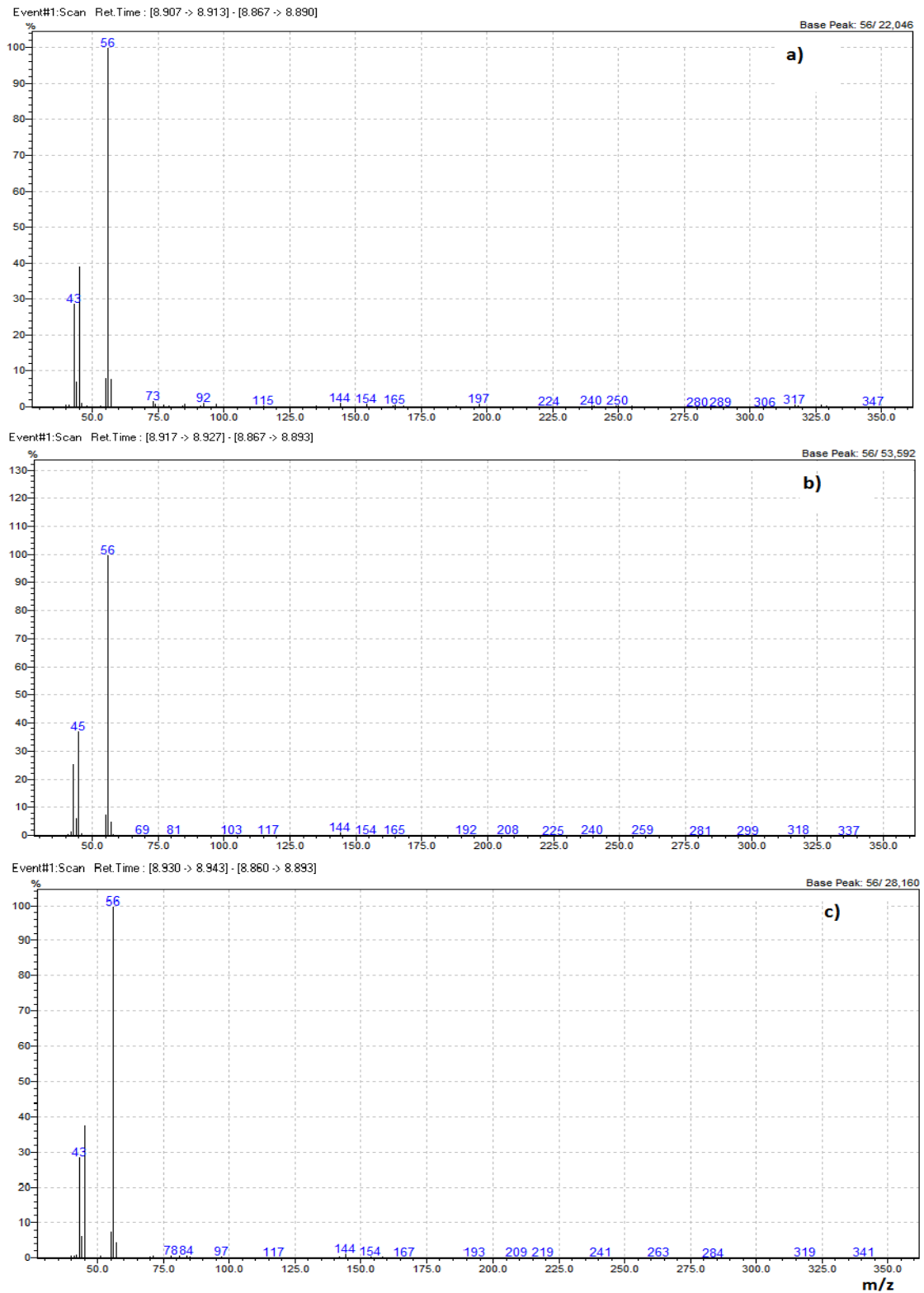
**Kuva B.1.** Lämmitysnopeuksilla a) 25 °C min<sup>-1</sup> ja b) 20 °C min<sup>-1</sup> SCAN:lla mitatut kromatogrammit PLDLA96/4-näyteliuoksesta. TIC-signaalin (paksu musta käyrä) lisäksi näkyviin on suodatettu joidenkin yksittäisten ionien käyriä, joiden selite on vasemmassa kulmassa ja joiden intensiteetit on skaalattu 10-kertaisiksi TIC-signaaliin nähden.



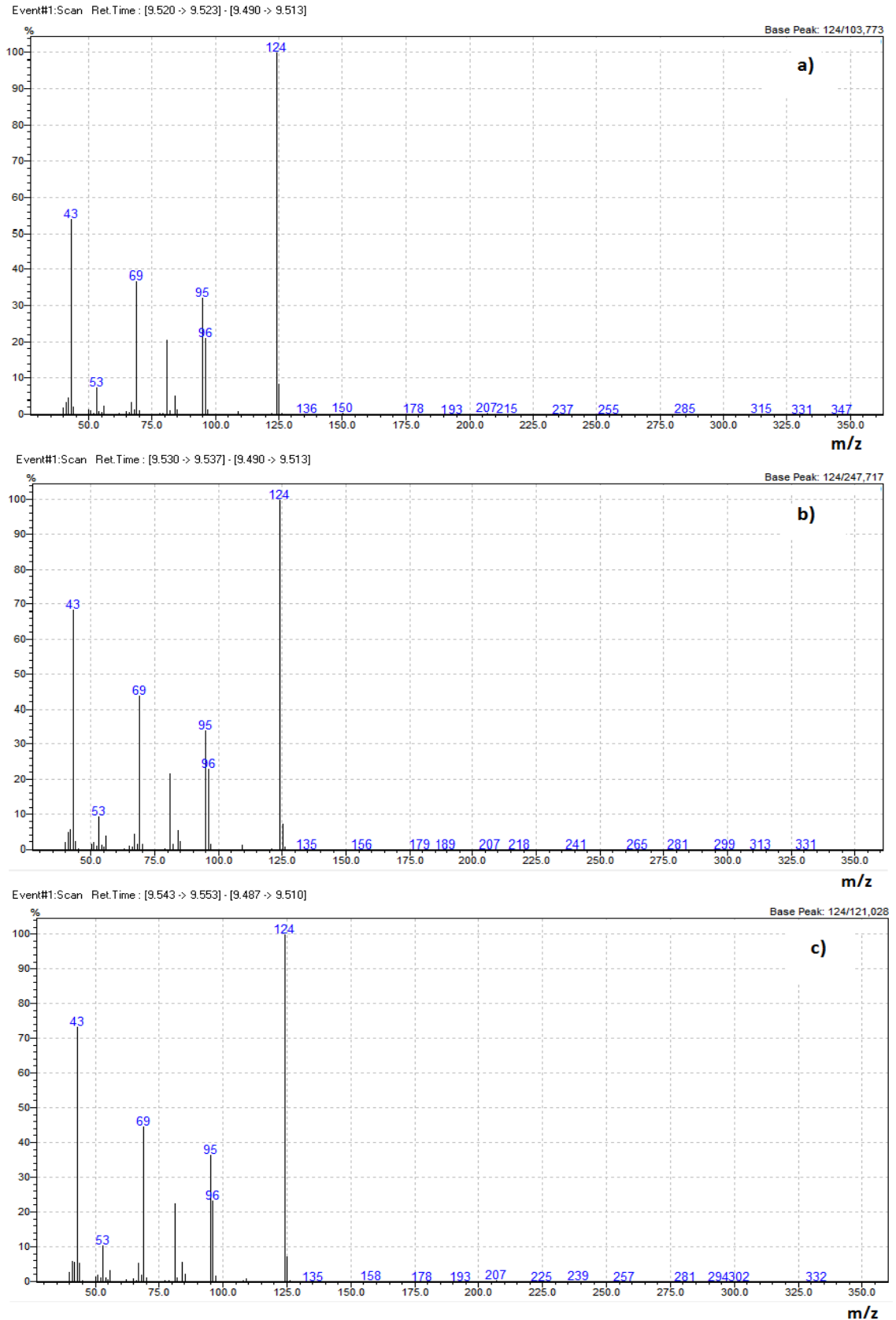
**Kuva B.2.** Lämmitysnopeuksilla a) 15 °C min<sup>-1</sup> ja b) 10 °C min<sup>-1</sup> SCAN:lla mitatut kromatogrammit PLDLA96/4-näyteliuoksesta. TIC-signaalin (paksu musta käyrä) lisäksi näkyviin on suodatettu joidenkin yksittäisten ionien käyriä, joiden selite on vasemmassa kulmassa ja joiden intensiteetit on skaalattu 10-kertaisiksi TIC-signaaliin nähden.



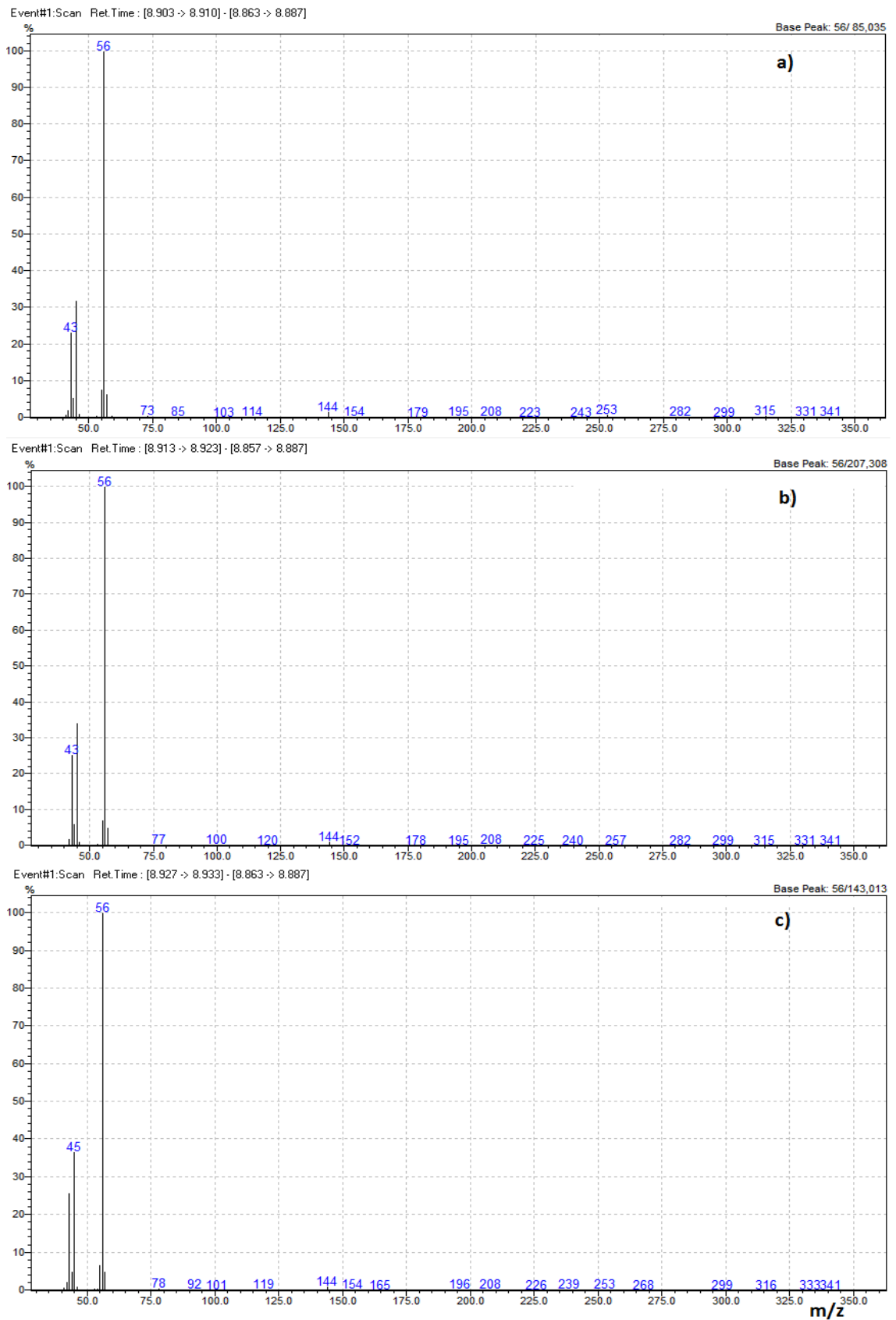
## LIITE C: SPESIFISYYDEN TUTKIMISESSA MITATUT MASSA-SPEKTRIT



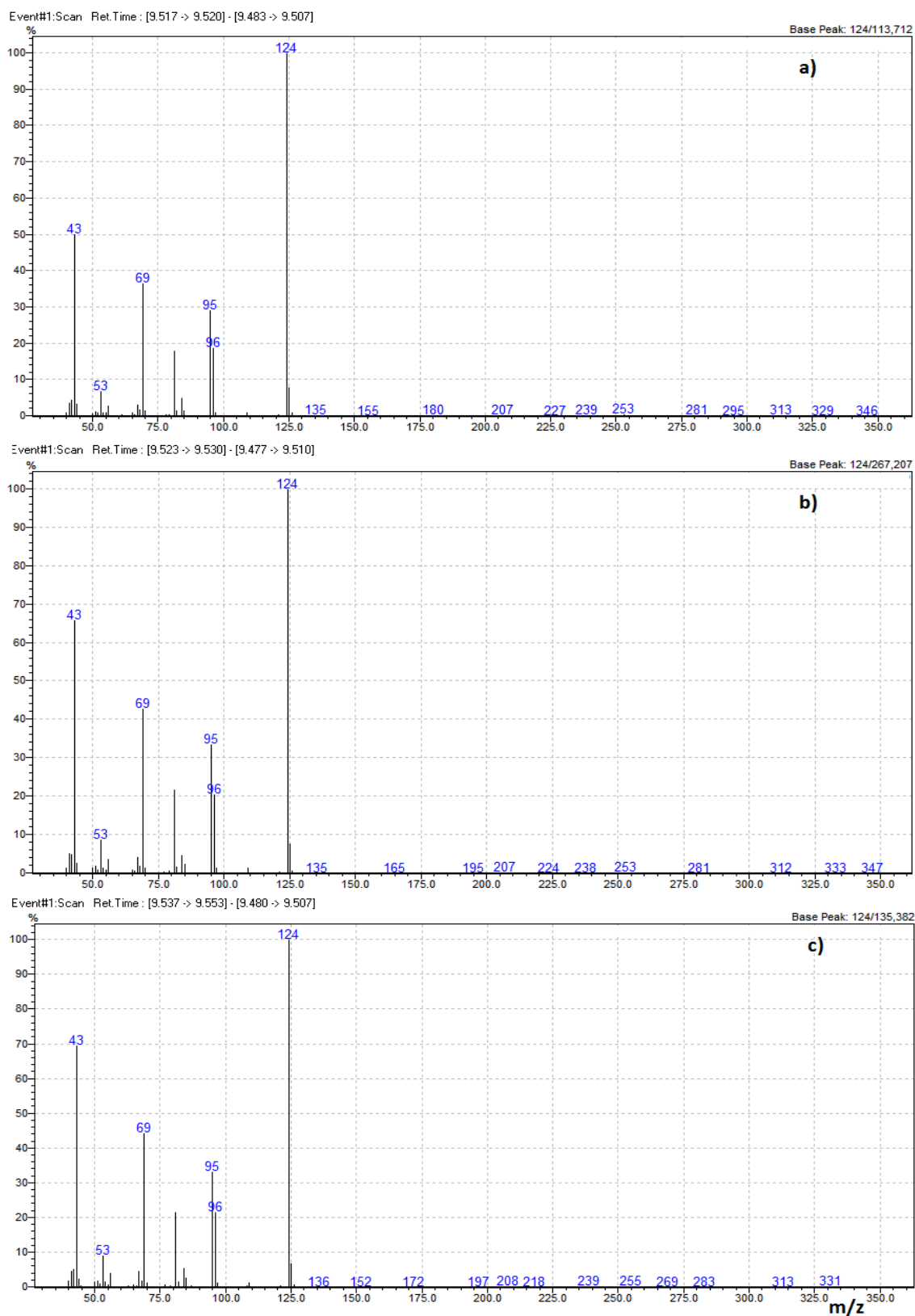
**Kuva C.1.** PLDLA96/4-näytteen laktidipiikin massaspektrit a) ennen piikin huippua, b) piikin huipun kohdalla ja c) piikin huipun jälkeen.  $m/z = 56$  piikin intensiteetit ovat noin a) 22000, b) 54000 ja c) 28000.



**Kuva C.2.** PLDLA96/4-näytteen sisästandardipiikin massaspektrit a) ennen piikin huippua, b) piikin huipun kohdalla ja c) piikin huipun jälkeen.  $m/z = 124$  piikin intensiteetit ovat noin a) 104000, b) 248000 ja c) 121000.



**Kuva C.3.** PLCL-näytteen laktidipiikin massaspektrit a) ennen piikin huippua, b) piikin huipun kohdalla ja c) piikin huipun jälkeen.  $m/z = 56$  piikin intensiteetit ovat noin a) 85000, b) 207000 ja c) 143000.



**Kuva C.4.** PLCL-näytteen sisästandardipiikin massaspektrit a) ennen piikin huippua, b) piikin huipun kohdalla ja c) piikin huipun jälkeen.  $m/z = 124$  piikin intensiteetit ovat noin a) 114000, b) 267000 ja c) 135000.

## LIITE D: GCMS-MENETELMÄN LINEARISUUDEN MÄÄRITYS

**Taulukko D.1.** Linearisuuden määrittämiseen valmistetut standardiliuokset.  $m_{kl}(La)$  ja  $m_{kl}(IS)$  ovat laktidin ja sisästandardin punnitut massat kantaliuoksessa,  $c_{kl}(La)$  ja  $c_{kl}(IS)$  ovat niiden kantaliuosten massakonsentraatiot. Standardien 3 - 6 kantaliuosten tilavuudet  $V_{kl}$  olivat  $20,0 \text{ cm}^3$  ja sisästandardin  $50,0 \text{ cm}^3$ . Standardin 1 kantaliuos valmistettiin standardin 3 kantaliuoksesta laimentamalla  $1 \text{ cm}^3$  mittapullossa  $5 \text{ cm}^3$ :ksi. Standardin 2 kantaliuos valmistettiin vastaavasti standardin 4 kantaliuoksesta. Mitattavien liuosten laktidin ja sisästandardin massakonsentraatiot,  $c_{v3}(La)$  ja  $c_{v3}(IS)$ , on laskettu yhtälöllä 9.

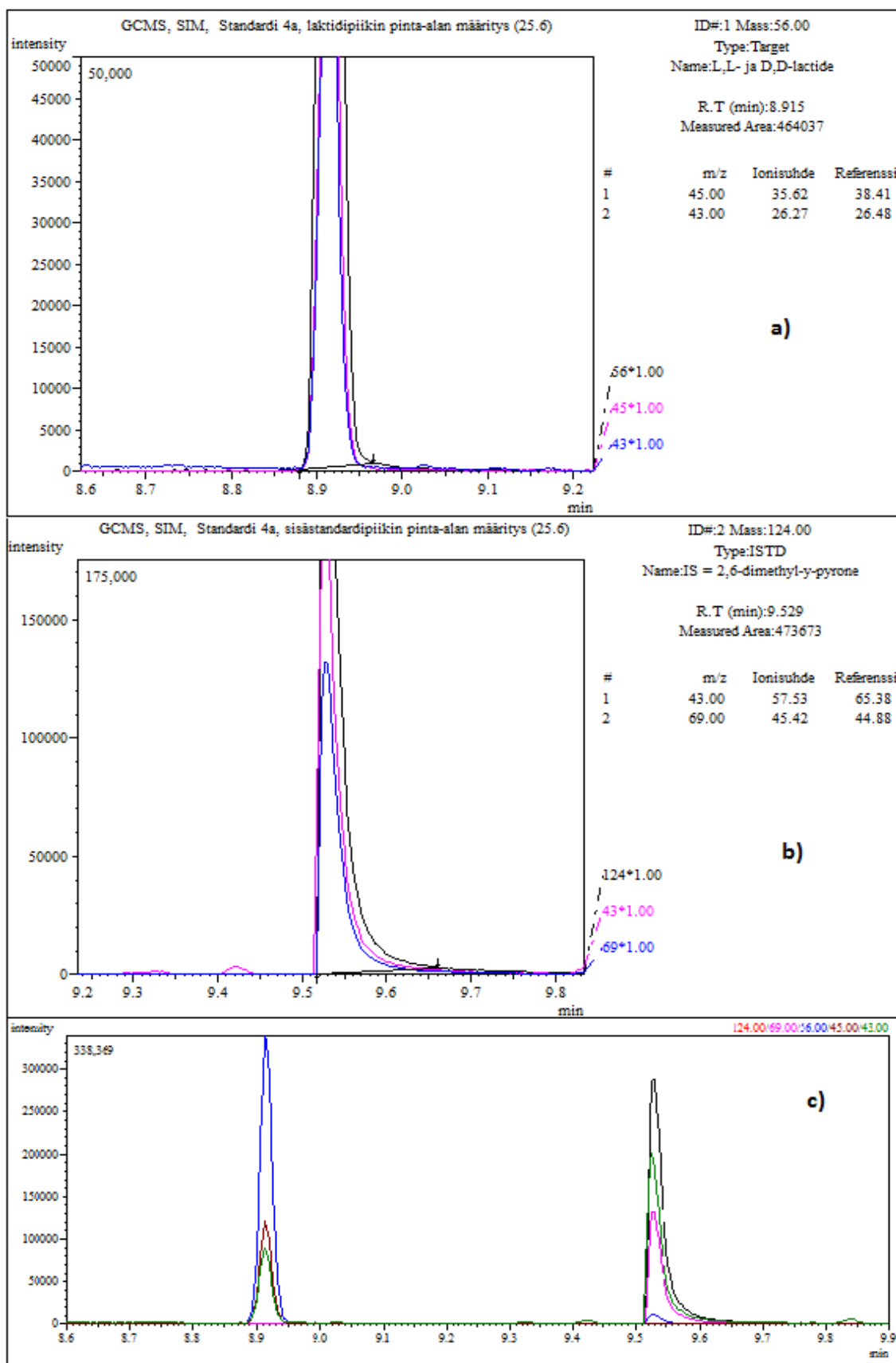
Liuos	Kantaliuos				Mitattava Vial 3 -liuos	
	$m_{kl}(La)$ (mg)	$m_{kl}(IS)$ (mg)	$c_{kl}(La)$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	$c_{kl}(IS)$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	$c_{v3}(La)$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	$c_{v3}(IS)$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )
Standardi 1	-	-	105,8	-	0,0265	0,3080
Standardi 2	-	-	258,8	-	0,0647	0,3080
Standardi 3	10,58	-	529,0	-	0,1323	0,3080
Standardi 4	25,88	-	1294,0	-	0,3235	0,3080
Standardi 5	50,78	-	2539,0	-	0,6348	0,3080
Standardi 6	98,39	-	4919,5	-	1,230	0,3080
Sisästand- ardi	-	61,60	-	1232,0	-	-

### Esimerkkilaskut taulukkoon D.1 liittyen:

Standardin 3 laktidikantaliuoksen ja mitattavan liuoksen massakonsentraatioiksi voidaan laskea yhtälöllä 9

$$c_{kl}(La) = \frac{m_{kl}(La)}{V_{kl}} = \frac{10,58 \text{ mg}}{20,0 \text{ cm}^3} = 0,529 \frac{\text{mg}}{\text{cm}^3} = 529,0 \frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^3}$$

$$c_{v3}(La) = \frac{c_{kl}(La)}{4000} = \frac{529 \frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^3}}{4000} = 0,13225 \frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^3}$$



**Kuva D.1.** Standardista 4a SIM:llä mitattu kromatogrammi (c-kohta) laktidi- ja sisästandardipiikin läheisellä retentioaikaalueella. Laktidipiikin (a-kohta) ja sisästandardipiikin (b-kohta) pinta-alojen määrittäminen. Kvantitointi-ionit ovat  $m/z = 56$  ja  $124$ .

**Esimerkkilaskut taulukkoon 5.1 liittyen:**

Standardin 4a takaisin laskettu massakonsentraatio lineaarisuus-suoran avulla laskettuna on (yhtälön 16 avulla)

$$c'_{v3}(\text{La}) = \frac{\left(\frac{A(\text{La})}{A(\text{IS})} - 0,014\right)}{3,0485 \text{ cm}^3 \mu\text{g}^{-1}} = \frac{0,9797 - 0,014}{3,0485 \text{ cm}^3 \mu\text{g}^{-1}} \approx 0,3168 \mu\text{g cm}^{-3},$$

joka standardin tunnettuun arvoon suhteutettuna on

$$\frac{c'_{v3}(\text{La})}{c_{v3}(\text{La})} \times 100 \% = \frac{0,3168 \mu\text{g cm}^{-3}}{0,3235 \mu\text{g cm}^{-3}} \approx 98 \%.$$

Standardin 4a takaisin laskettu massakonsentraatio kalibrointisuoran avulla laskettuna on (yhtälön 17 avulla)

$$c'_{v3}(\text{La}) = \frac{\left(\frac{A(\text{La})}{A(\text{IS})}\right)}{3,127462 \text{ cm}^3 \mu\text{g}^{-1}} = \frac{0,9797}{3,127462 \text{ cm}^3 \mu\text{g}^{-1}} \approx 0,3133 \mu\text{g cm}^{-3},$$

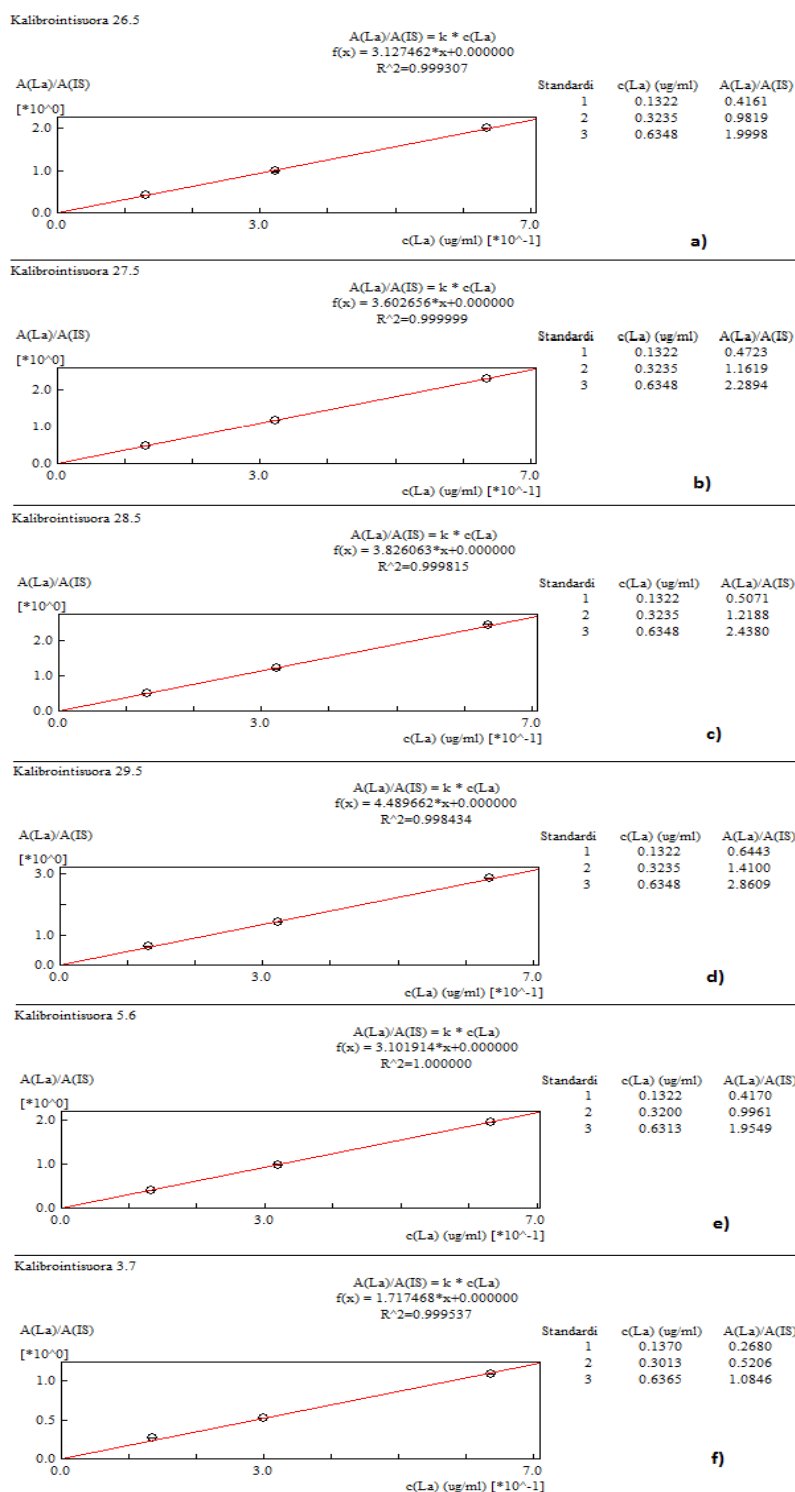
joka standardin tunnettuun arvoon suhteutettuna on

$$\frac{c'_{v3}(\text{La})}{c_{v3}(\text{La})} \times 100 \% = \frac{0,3133 \mu\text{g cm}^{-3}}{0,3235 \mu\text{g cm}^{-3}} \approx 97 \%.$$

Standardin 4a mittauspisteen residuaaliksi saadaan laskettua lineaarisuus-suoran yhtälön avulla

$$\begin{aligned} \text{residuaali} &= \frac{A(\text{La})}{A(\text{IS})} - [(3,0485 \text{ cm}^3 \mu\text{g}^{-1}) \times c_{v3}(\text{La}) + 0,014] \\ &= 0,9797 - [(3,0485 \text{ cm}^3 \mu\text{g}^{-1}) \times 0,3235 \mu\text{g cm}^{-3} + 0,014] \\ &\approx -0,0205. \end{aligned}$$

## LIITE E: GCMS-MENETELMÄN KALIBROINTISUORAT JOKAISENA MITTAUSPÄIVÄNÄ



**Kuva E.1.** GCMS-menetelmän mittauspäivinä a) 26.5, b) 27.5, c) 28.5, d) 29.5, e) 5.6 ja f) 3.7 GCMS Postrun Analysis -ohjelmalla määritetyt kalibrointisuorat. Suorat on määritetty yhtälön 10 mukaisesti pakkotamalla ne kulkemaan origon kautta. 26.5 - 29.5 mittauspäivinä standardit valmistettiin 26.5 valmistetuista kantaliuksista. Standardiliuosten  $c_{V3}(IS)$ :t olivat  $0,3080 \mu\text{g cm}^{-3}$  (26.-29.5),  $0,3071 \mu\text{g cm}^{-3}$  (5.6) ja  $0,6195 \mu\text{g cm}^{-3}$  (3.7). Näkyvissä on kahden injektoinnin keskiarvot jokaiselle standardille paitsi 26.5, jossa näkyvissä on kahden rinnakkaisliuoksen keskiarvot.



## LIITE F: GCMS-MENETELMÄN TOISTETTAVUUDEN MÄÄRITYS

### Esimerkkilaskut taulukkoon 5.2 liittyen:

Mitatun näyteliuksen laktidin massakonsentraatio on määritetty GCSolution ohjelmalla kalibroitaisuoran avulla automaattisesti. Se voidaan laskea mitatuista piikkien aloista kalibroitaisuoran yhtälöllä, joka on (ks. Liite E, 27.5) (yhtälön 10 mukainen)

$$\frac{A(\text{La})}{A(\text{IS})} = (3,602656 \text{ cm}^3 \mu\text{g}^{-1}) \times c_{v3}(\text{La}) .$$

PLDLA96/4-näytteestä 1 valmistetun näyteliuksen laktidin massakonsentraatio on

$$c_{v3}(\text{La}) = \frac{A(\text{La})}{A(\text{IS})} \times \frac{1}{(3,602656 \text{ cm}^3 \mu\text{g}^{-1})} = \frac{51380}{350160} \times \frac{1}{(3,602656 \text{ cm}^3 \mu\text{g}^{-1})} \approx 0,04073 \mu\text{g cm}^{-3} .$$

Määritetystä massakonsentraatiosta on sitten laskettu yhtälöllä 11 laktidin massa näytteessä (esimerkkinä sama näyte 1)

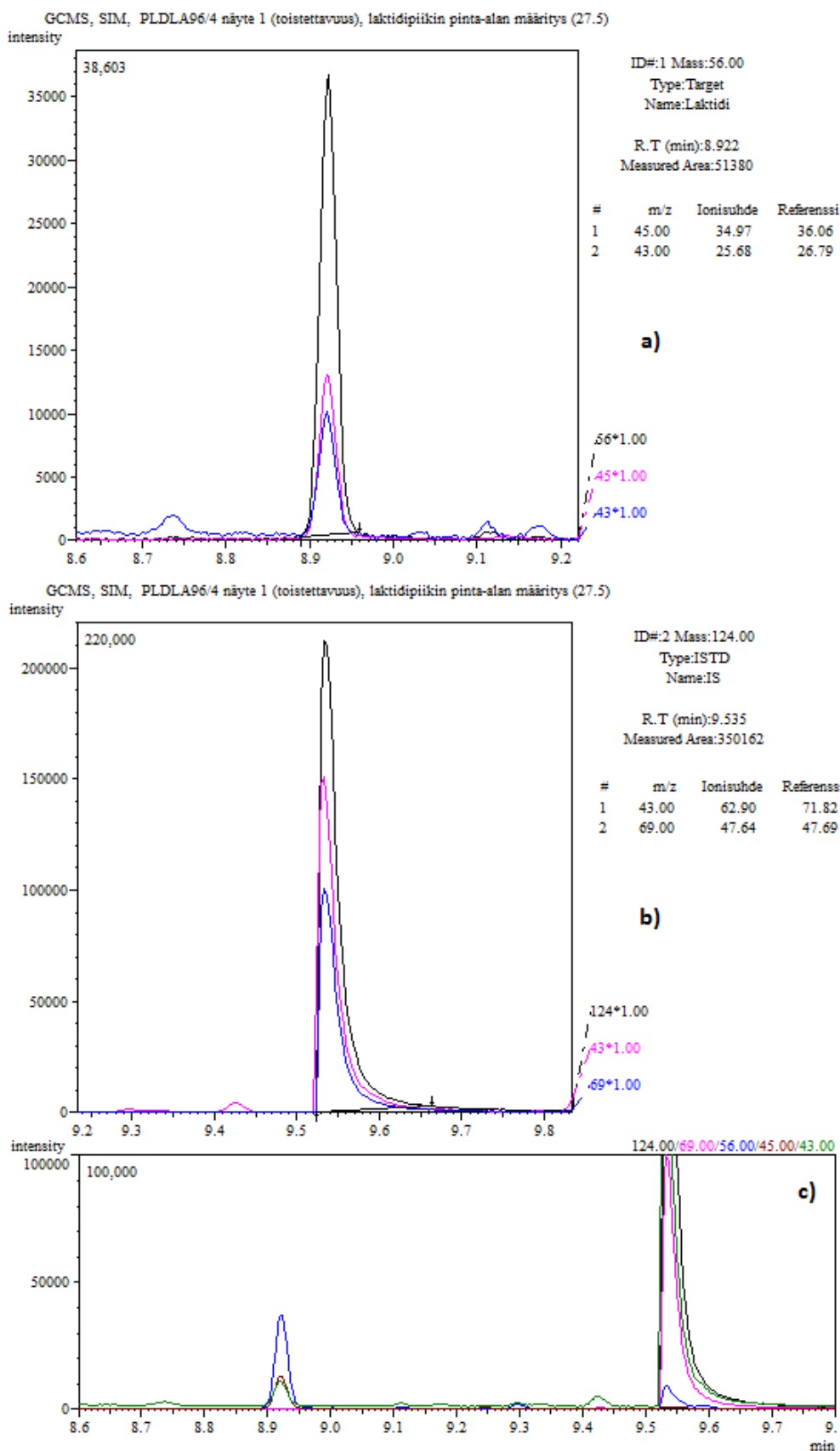
$$m_{v1}(\text{La}) = \frac{200 \times c_{v3}(\text{La}) \times V_{v1}}{1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}} = \frac{200 \times 0,04073 \mu\text{g cm}^{-3} \times 20 \text{ cm}^3}{1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}} \approx 0,1629 \text{ mg} .$$

Näytteen 1 laktidipitoisuudeksi massaprosenttiosuutena on sitten laskettu yhtälöllä 12

$$w(\text{La}) = \frac{m_{v1}(\text{La})}{m_{\text{näyte}}} \times 100 \text{ m}\% = \frac{0,1629 \text{ mg}}{498,55 \text{ mg}} \times 100 \text{ m}\% \approx 0,0327 \text{ m}\% .$$

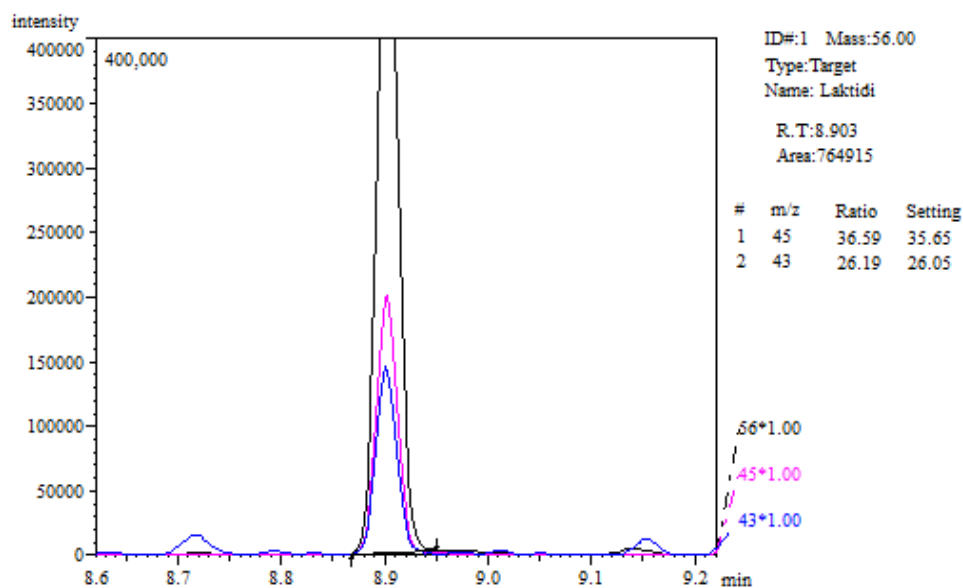
**Taulukko F.1.** GCMS-menetelmän injektointitoistettavuus. Injektointiin käytetty samaa PLDLA96/4-näytteestä 1 valmistettua näyteliuosta (ks. Taulukko 5.2). Laskenta on tehty kuten esimerkkilaskuissa yllä.

Injektointi (PLDLA96/4 näyte 1)	m <sub>näyte</sub> (mg)	Mitatut piikkien pinta-alat			Mitattu c <sub>v3</sub> (La) (μg cm <sup>-3</sup> )	Näytteen sisältämä laktidi	
		A(La) (*10 <sup>4</sup> )	A(IS) (*10 <sup>4</sup> )	A(La)/A(IS)		m <sub>v1</sub> (La) (mg)	w(La) (m-%)
1	498,55	5,1380	35,016	0,14673	0,04073	0,1629	0,0327
2	498,55	5,1614	34,420	0,14995	0,04162	0,1665	0,0334
3	498,55	5,1024	34,680	0,14713	0,04084	0,1634	0,0328
4	498,55	5,1050	33,369	0,15299	0,04247	0,1699	0,0341
5	498,55	5,1651	34,133	0,15132	0,04200	0,1680	0,0337
						<b>Keski- arvo</b>	0,033
						<b>K.hajonta</b>	0,00060
						<b>Suht.k.hajonta (%)</b>	1,8

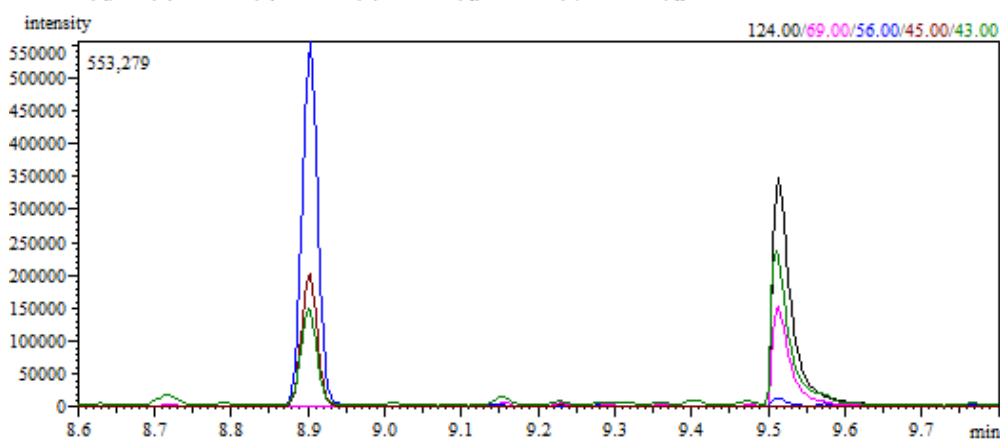
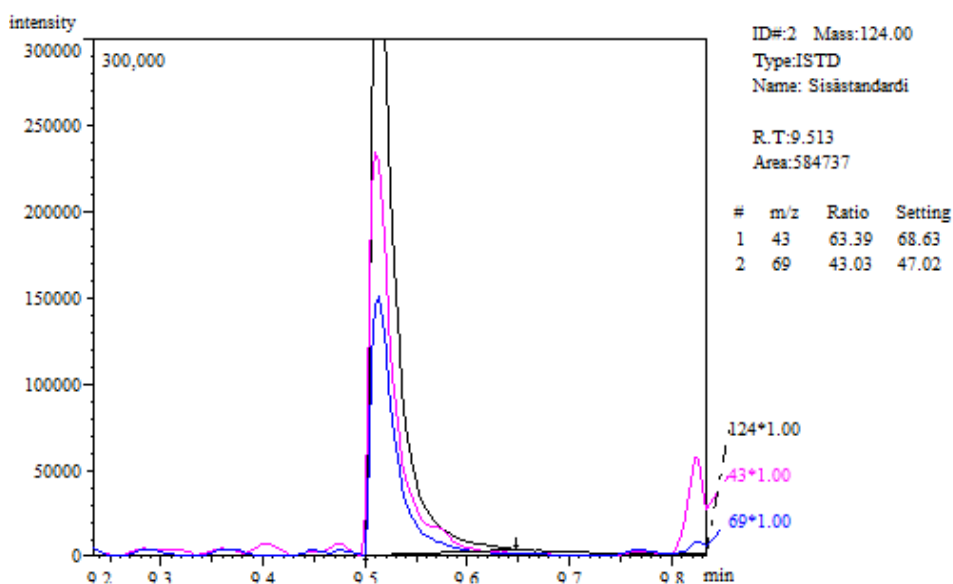


**Kuva F.1.** PLDLA96/4-näyteliuoksesta 1 SIM:llä 27. toukokuuta mitattu c) kromatogrammi laktidi- ja sisästandardipiikin läheisellä retentioaika-alueella. a) Laktidipiikin ja b) sisästandardipiikin pinta-alojen määrittäminen. Kvantitointi-ionit ovat  $m/z = 56$  ja  $124$ .

GCMS, SIM, BulkkiPLA näyte 1 (toistettavuus), laktidipiikin pinta-alan määrittäminen, 5.6



GCMS, SIM, BulkkiPLA näyte 1 (toistettavuus), sisästandardipiikin pinta-alan määrittäminen, 5.6



**Kuva F.2.** BulkkiPLA-näytelioksesta 1 SIM:llä 5. kesäkuuta mitattu c) kromatogrammi laktidi- ja sisästandardipiikin läheisellä retentioaika-alueella. a) Laktidipiikin ja b) sisästandardipiikin pinta-alojen määrittäminen. Kvantitointi-ionit ovat  $m/z = 56$  ja  $124$ .

## LIITE G: GCMS-MENETELMÄN TARKKUUDEN MÄÄRITYS

### Laskuesimerkit taulukkoon 5.3 liittyen:

*Spiking*-näyte 1a:

$$m_{v1,polym}(La) = \frac{w(La)}{100 \text{ m}\%} \times m_{näyte} = \frac{0,033 \text{ m}\%}{100 \text{ m}\%} \times 499,78 \text{ mg} \approx 0,1649 \text{ mg.}$$

$$w_{spike}(La) = \frac{m_{v1,spike}(La)}{m_{näyte}} \times 100 \text{ m}\% = \frac{0,1058 \text{ mg}}{499,78 \text{ mg}} \times 100 \text{ m}\% \approx 0,021 \text{ m}\%.$$

$$\begin{aligned} m_{v1,polym+spike}(La) &= m_{v1,polym}(La) + m_{v1,spike}(La) = 0,1649 \text{ mg} + 0,1058 \text{ mg} \\ &= 0,2707 \text{ mg.} \end{aligned}$$

### Laskuesimerkit taulukkoon 5.4 liittyen:

*Spiking*-näyte 1a:

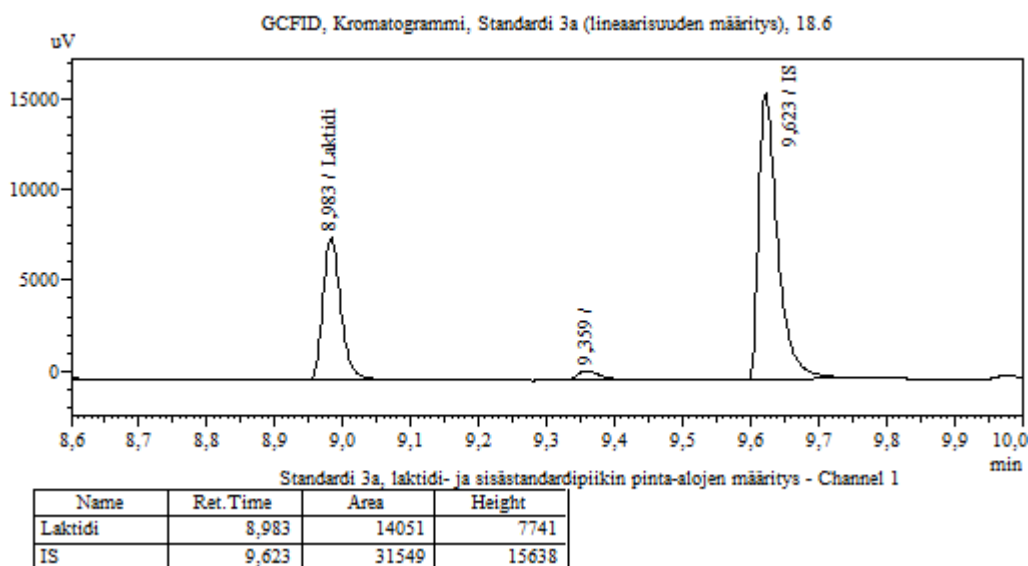
Yhtälöllä 6 laskettiin

$$Rec_b = \frac{m_{v1}(La)}{m_{v1,polym+spike}(La)} \times 100\% = \frac{0,2780 \text{ mg}}{0,2707 \text{ mg}} \times 100\% \approx 102,7 \text{ \%}.$$

## LIITE H: GCFID-MENETELMÄN LINEAARISUUDEN MÄÄRITYS

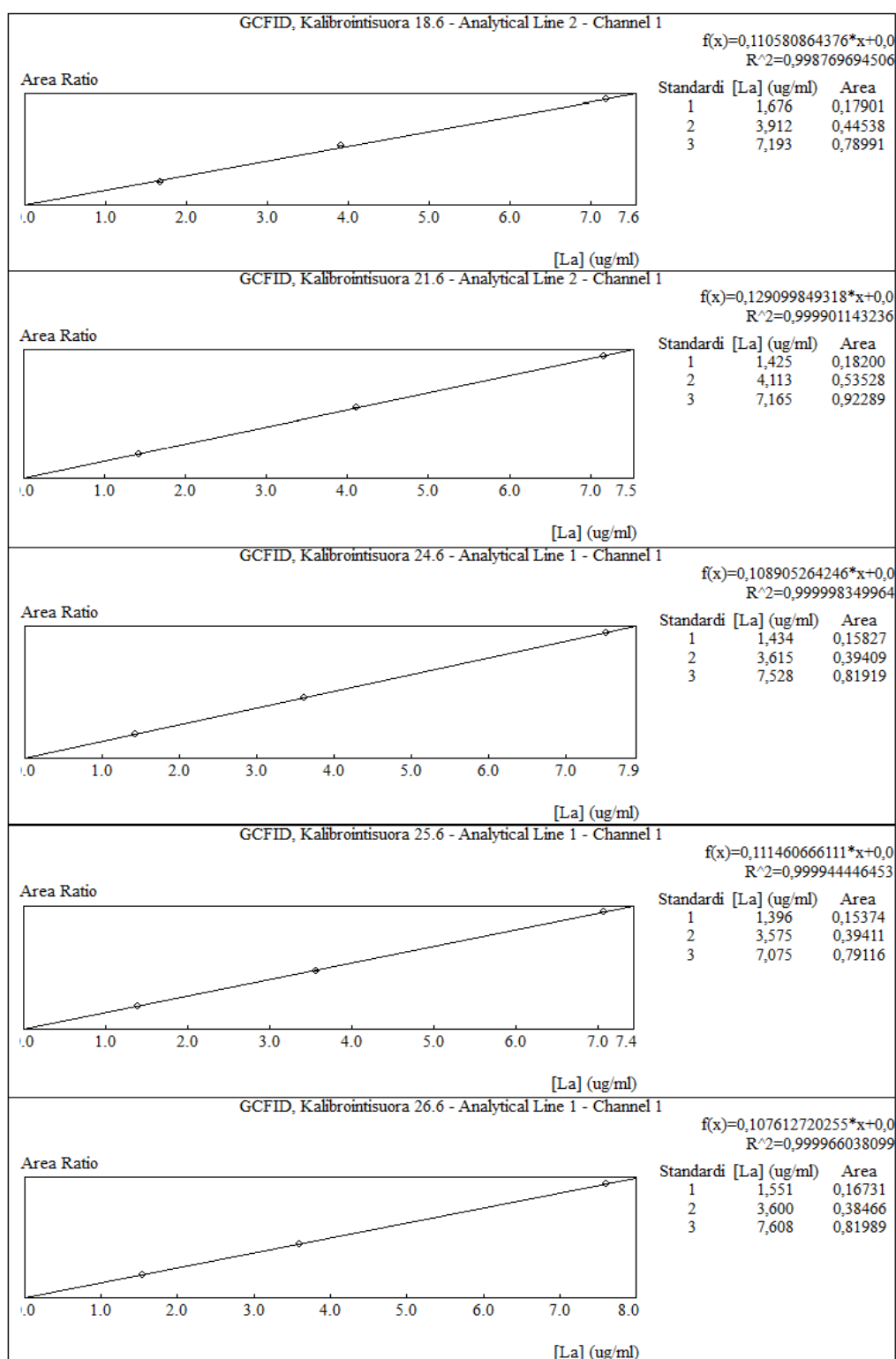
**Taulukko H.1.** GCFID-menetelmän lineaarisuuden määrittämiseen valmistetut standardiliuokset.  $m_{kl}(La)$  ja  $m_{kl}(IS)$  ovat laktidin ja sisästandardin punnitut massat kantaliuoksessa,  $c_{kl}(La)$  ja  $c_{kl}(IS)$  ovat niiden kantaliuosten massakonsentraatiot. Standardien 3 - 5 kantaliuosten tilavuudet  $V_{kl}$  olivat  $10,0 \text{ cm}^3$  ja standardin 2 ja sisästandardin  $20,0 \text{ cm}^3$ . Standardin 1 kantaliuos valmistettiin standardin 3 kantaliuoksesta laimentamalla  $1 \text{ cm}^3$  mittapullossa  $10 \text{ cm}^3$ :ksi. Mitattavien liuosten laktidin ja sisästandardin massakonsentraatiot,  $c_{v2}(La)$  ja  $c_{v2}(IS)$ , on laskettu yhtälöllä 13.

Liuos	Kantaliuos				Mitattava Vial 2 -liuos	
	$m_{kl}(La)$ (mg)	$m_{kl}(IS)$ (mg)	$c_{kl}(La)$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	$c_{kl}(IS)$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	$c_{v2}(La)$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	$c_{v2}(IS)$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )
Standardi 1	-	-	156,5	-	0,3913	4,006
Standardi 2	13,41	-	670,5	-	1,6763	4,006
Standardi 3	15,65	-	1565	-	3,9125	4,006
Standardi 4	28,77	-	2877	-	7,1925	4,006
Standardi 5	65,63	-	6563	-	16,408	4,006
Sisästandardi	-	32,05	-	1603	-	-



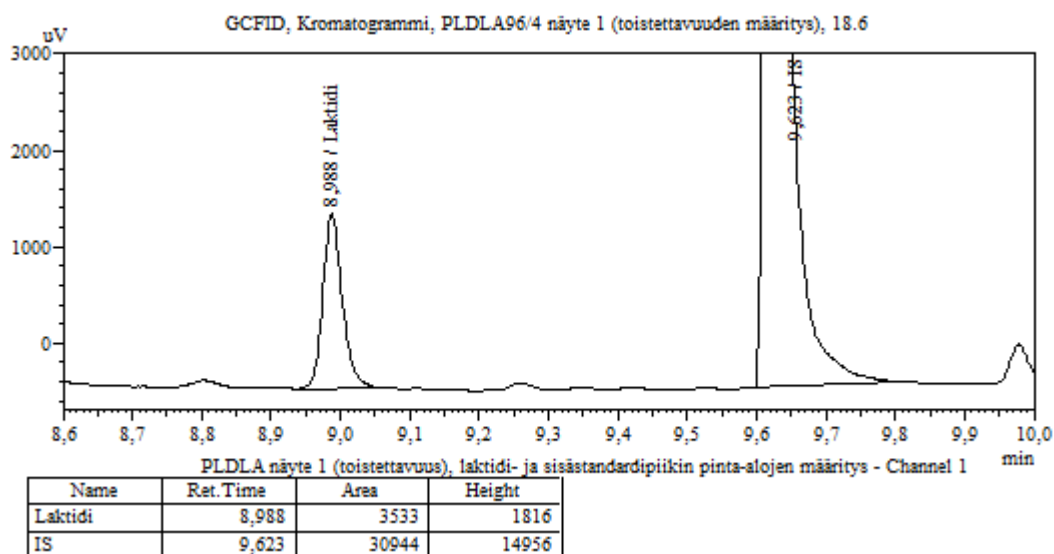
**Kuva H.1.** GCFID-menetelmän lineaarisuuden määrittämisen standardin 3a kromatogrammi laktidi- ja sisästandardipiikkien läheisellä retentioaika-alueella. Piikkien pinta-ala on määritetty GCSolution-ohjelmalla. Laktidin ja sisästandardin massakonsentraatiot on esitetty taulukossa H.1.

# LIITE I: GCFID-MENETELMÄN KALIBROINTISUORAT JOKAISENA MITTAUSPÄIVÄNÄ



**Kuva I.1.** GCFID-menetelmän mittauspäivinä GCSolution-ohjelmalla määritetyt kalibrointisuorat. Suorat on määritetty yhtälön 14 mukaisesti. 26.5 - 29.5 mittauspäivinä standardit valmistettiin 26.5 valmistetuista kantaliuksista. Standardiliuosten  $c_{v3}(IS)$ :t olivat  $4,006 \mu\text{g cm}^{-3}$  (18.6),  $3,808 \mu\text{g cm}^{-3}$  (21.6),  $4,003 \mu\text{g cm}^{-3}$  (24.6),  $3,975 \mu\text{g cm}^{-3}$  (25.6) ja  $4,213 \mu\text{g cm}^{-3}$  (26.6).

## LIITE J: GCFID-MENETELMÄN TOISTETTAVUUDEN MÄÄRITYS



**Kuva J.1.** GCFID-menetelmän toistettavuuden määrittäksen PLDLA96/4-näytteen 1 kromatogrammi laktidi- ja sisästandardipiikkien läheisellä retentioaika-alueella. Piikkien pinta-aloja on määritetty GCSolution-ohjelmalla.

**Taulukko J.1.** GCFID-menetelmän injektointitoistettavuus. Injektointiin käytetty samaa PLDLA96/4-näyttestä 7 valmistettua näyteliuosta (ks. Taulukko 5.6). Keskiarvot ja keskihajonnat on laskettu joko huomioiden sarjan ensimmäisen mittauksen tai ei. Injektoinnit 2 - 6 mitattiin automaattisesti mitatussa mittaussarjassa noin 4-6 tuntia injektoinnin 1 jälkeen.

Injektointi (PLDLA96/4 näyte 7)	m <sub>näyte</sub> (mg)	Mitatut piikkien pinta-aloja			Mitattu c <sub>v2</sub> (La) (µg cm <sup>-3</sup> )	Näytteen sisältämä laktidi	
		A(La)	A(IS)	A(La)/A(IS)		m <sub>v1</sub> (La) (mg)	w(La) (m-%)
1	296,45	2945	23711	0,1242	0,9621	0,1924	0,0649
2	296,45	3064	23325	0,1314	1,018	0,2035	0,0686
3	296,45	3028	23035	0,1315	1,018	0,2036	0,0687
4	296,45	2822	22064	0,1279	0,9907	0,1981	0,0668
5	296,45	3056	23414	0,1305	1,011	0,2022	0,0682
6	296,45	2866	21175	0,1353	1,048	0,2097	0,0707
Injektoinnit 1-6						Keskiarvo	0,068
						K.hajonta	0,0020
						Suht.k.haj. (%)	2,9
Injektoinnit 2-6						Keskiarvo	0,069
						K.hajonta	0,0014
						Suht.k.haj. (%)	2,0

**Taulukko J.2.** GCFID-menetelmän toistettavuusmittausten tulokset 18. kesäkuuta mitatun lineaarisuus suoran avulla laskettuna.  $c_{v2}(IS)$  on sisästandardin massakonsentraatio mitattavassa näyteliuoksessa.  $c_{v2}(La)$  on näyteliuoksen laktidin massakonsentraatio ja se on laskettu lineaarisuus-suoran (yhtälö 18) avulla. Laskuesimerkki on esitetty alla.

Näyte (PLDLA96/4)	$m_{näyte}$ (mg)	Tunnettu	Mitattu	Mitattu	Näytteen sisältämä laktidi	
		$c_{v2}(IS)$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	$A(La)/A(IS)$	$c_{v2}(La)$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	$m_{v1}(La)$ (mg)	$w(La)$ (m-%)
1	290,74	4,006	0,1142	1,066	0,213	0,0733
2	293,09	4,006	0,1221	1,137	0,227	0,0776
3	292,20	4,006	0,1061	0,9930	0,199	0,0680
4	302,20	4,006	0,1151	1,075	0,215	0,0711
5	295,05	4,006	0,1140	1,065	0,213	0,0722
6	293,20	4,006	0,1183	1,104	0,221	0,0753
7	296,45	3,808	0,1242	1,100	0,220	0,0742
8	310,90	3,808	0,1421	1,254	0,251	0,0806
9	299,96	3,808	0,1340	1,184	0,237	0,0789
10	303,03	4,003	0,09932	0,9310	0,186	0,0614
11	300,25	4,003	0,09342	0,8777	0,176	0,0585
12	301,48	4,003	0,09494	0,8914	0,178	0,0591
13	311,42	4,003	0,1129	1,053	0,211	0,0677
14	296,09	4,003	0,1179	1,099	0,220	0,0742
15	299,26	4,003	0,1135	1,059	0,212	0,0708
16	299,06	3,975	0,09685	0,9024	0,180	0,0604
17	292,20	3,975	0,09530	0,8885	0,178	0,0608
18	296,38	3,975	0,08965	0,8378	0,168	0,0565
					<b>Keskiarvo</b>	0,069
					<b>K.hajonta</b>	0,0077
					<b>Suht.k.haj. (%)</b>	11,2

### Laskuesimerkit taulukkoon J.2 liittyen:

Taulukon J.2 näyteliuosten laktidin massakonsentraatiot,  $c_{v2}(La)$ , on laskettu integrointituloksista lineaarisuus-suoran yhtälön (yhtälö 18) avulla. Suoran yhtälössä täytyy nyt kuitenkin huomioida myös sisästandardin massakonsentraatio,  $c_{v2}(IS)$ , sillä suoran määrittämisessä mitattujen standardiliuosten  $c_{v2}(IS)$  erosi hieman eri päivinä mitattujen näyteliuosten  $c_{v2}(IS)$ :sta. Ero johtui siitä, että liuosten valmistuksessa käytettiin uusia kantaliuoksia eri päivinä. Standardien  $c_{v2}(IS)$  oli  $4,006 \mu\text{g cm}^{-3}$ . Lineaarisuussuoran x-akselina on tällöin  $c_{v2}(La)/c_{v2}(IS)$  ja sen yhtälönä

$$\frac{A(La)}{A(IS)} = (0,1106 \text{ cm}^3 \mu\text{g}^{-1}) \times 4,006 \mu\text{g cm}^{-3} \times \frac{c_{v2}(La)}{c_{v2}(IS)} - 0,0037$$

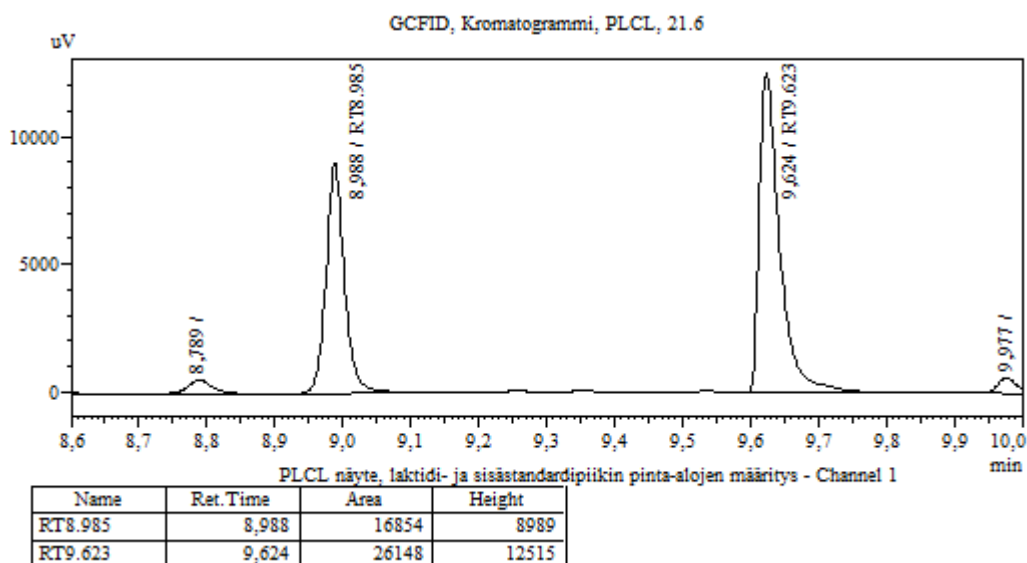


$$\frac{A(\text{La})}{A(\text{IS})} = 0,44306 \times \frac{c_{\text{v}_2}(\text{La})}{c_{\text{v}_2}(\text{IS})} - 0,0037.$$

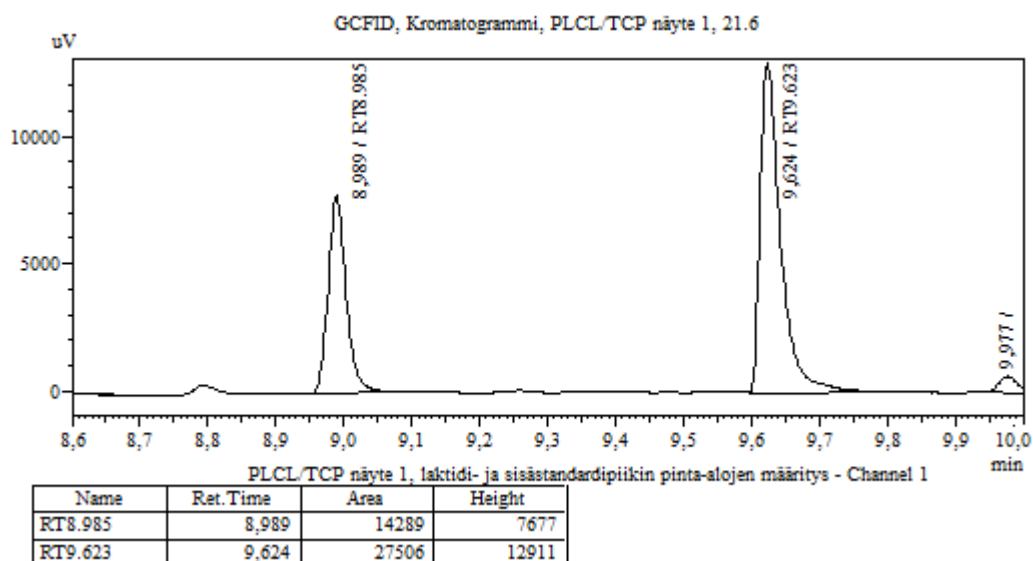
Esimerkiksi näytteen 1  $c_{\text{v}_2}(\text{La})$ :ksi voidaan siten laskea edeltävän yhtälön avulla

$$c_{\text{v}_2}(\text{La}) = \left( \frac{A(\text{La})}{A(\text{IS})} + 0,0037 \right) \times \frac{c_{\text{v}_2}(\text{IS})}{0,44306} = (0,1142 + 0,0037) \times \frac{4,006}{0,44306} \approx 1,066 \mu\text{g cm}^{-3}.$$

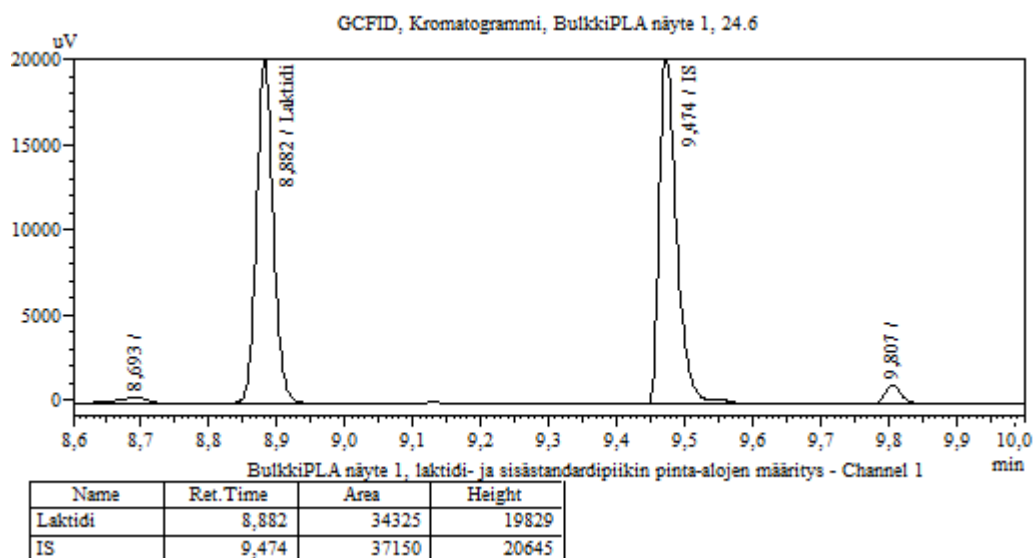
## LIITE K: GCFID-MENETELMÄN TARKKUUDEN MÄÄRITYS



**Kuva K.1.** GCFID-menetelmällä PLCL-näytteen näyteliuksesta mitattu kromatogrammi ja sen laktidi- ja sisästandardipiikkien pinta-alojen määrittäminen. Laktidipiikki on eluoinut retentioajalla 8,985 min ja sisästandardipiikki retentioajalla 9,623 min.



**Kuva K.2.** GCFID-menetelmällä PLCL/TCP-näytteen 1 näyteliuksesta mitattu kromatogrammi ja sen laktidi- ja sisästandardipiikkien pinta-alojen määrittäminen. Laktidipiikki on eluoinut retentioajalla 8,989 min ja sisästandardipiikki retentioajalla 9,624 min.



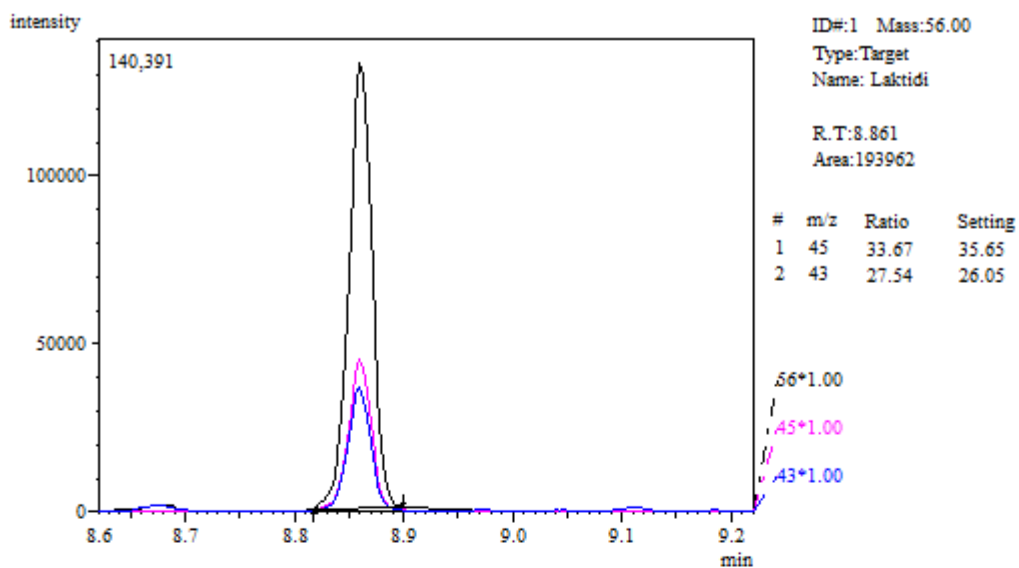
**Kuva K.3.** GCFID-menetelmällä BulkkiPLA-näytteen 1 näyteliuksesta mitattu kromatogrammi ja sen laktidi- ja sisästandardipiikien pinta-alojen määrittäminen. Laktidipiikki on eluoinut retentioajalla 8,882 min ja sisästandardipiikki retentioajalla 9,474 min.

## LIITE L: GCMS-MENETELMÄLLÄ 3. HEINÄKUUTA TEHDYT MITTAUKSET

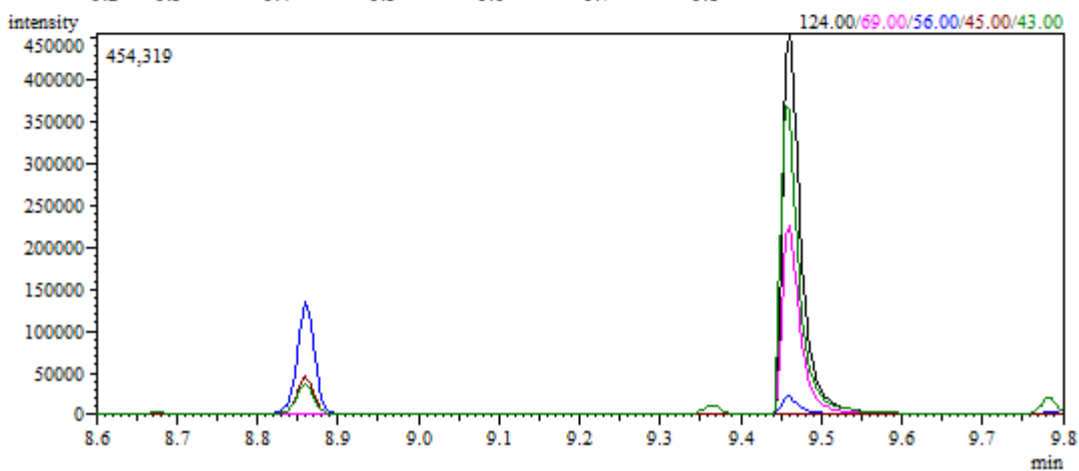
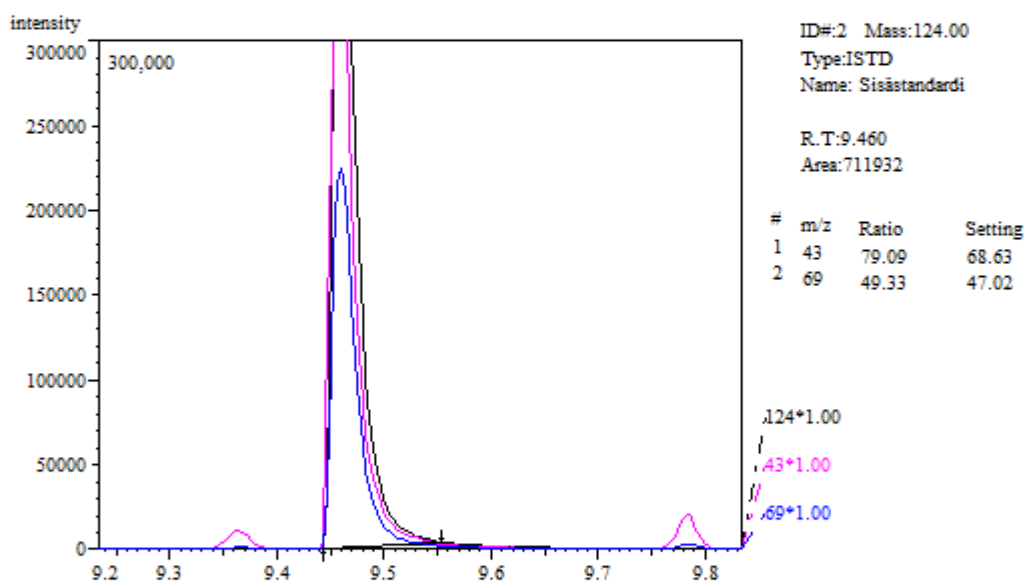
**Taulukko L.1.** GCMS-menetelmällä 3. heinäkuuta tehdyt määritykset. Suureet vastaavat ja ne on laskettu kuten alaluvussa 5.1. Näytteenkäsittely tehtiin alaluvusta 3.4.1 poiketen siten, että Vial 1 -liuoksen tilavuutena käytettiin  $10 \text{ cm}^3$ :ä. Näytteiden massat puolitettiin tästä syystä. Lisäksi kantaliuoksia pipetoitiin  $0,5 \text{ cm}^3$ , jotta näytteenkäsittelyn massakonsentraatiot vastasivat alalukua 3.4.1. Mittaukset tehtiin samassa mittaussarjassa yön yli. Mittaussarjassa havaittiin puhtaan liuottimen mittauksessa epäpuhtauspiikki laktidipiikin retentioajalla. Kyseisen piikin suuruus oli merkittävä määritysten piikkien pinta-alojen määrittäisiin, joten PLDLA96/4-näytteiden laktidipitoisuuksia ei voitu määrittää. Suuremman laktidipitoisuuden BulkkiPLA-näytteillä epäpuhtaus piikin merkitys ei ollut yhtä suuri. Määritetyt arvot ovat kuitenkin hieman vääristyneitä epäpuhtauden takia (liian suuria). PLCL/TCP-materiaalia riitti vain yhteen Vial 1 -liuokseen, josta valmistettiin 3 rinnakkaisliuosta Vial 2 -liuosvaiheeseen molemmilla näytteenkäsittely tavoilla A ja B (ks. alaluku 5.3). Tapa A vastasi alaluvun 3.4.1 normaalia näytteenkäsittelyä. Tavalla A ja B valmistettujen näyteliuosten 1 mitatut SIM-kromatogrammit on esitetty kuvissa L.1 ja L.2. Kyseisen mittauspäivän kalibrointistandardien ja näyteliuosten sisästandardin massakonsentraatio oli poikkeuksellisen suuri  $0,6195 \mu\text{g cm}^{-3}$ , sillä sisästandardin kantaliuokseen punnittiin vahingossa kaksinkertainen massa tavoitteeseen nähden. Suuremmalla sisästandardin massakonsentraatiolla ei kuitenkaan pitäisi olla vaikutusta mittauksiin, sillä se on sama kaikissa standardeissa ja näyteliuoksissa.

Näyte	Tunnus	w'(La) (m-%)	m <sub>näyte</sub> (mg)	Mitatut piikkien pinta-alat			Mitattu c <sub>v3</sub> (La) ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	Näytteen sisältämä laktidi	
				A(La) (*10 <sup>5</sup> )	A(IS) (*10 <sup>5</sup> )	A(La)/ A(IS)		m <sub>v1</sub> (mg)	w(La) (m-%)
BulkkiPLA	1	-	254,17	5,377	7,045	0,7633	0,4444	0,8888	0,350
	2	-	256,80	5,169	6,696	0,7719	0,4494	0,8989	0,350
							<b>Keskiarvo</b>		<b>0,35</b>
PLCL/TCP (Tapa A)	1	<b>0,16</b>	241,43	1,940	7,119	0,2724	0,1586	0,3173	0,263
	2	<b>0,16</b>	241,43	2,092	7,345	0,2848	0,1658	0,3316	0,275
	3	<b>0,16</b>	241,43	2,618	7,410	0,3533	0,2057	0,4114	0,341
							<b>Keskiarvo</b>		<b>0,29</b>
PLCL/TCP (Tapa B)	1	<b>0,16</b>	241,43	1,303	7,390	0,1763	0,1026	0,2053	0,170
	2	<b>0,16</b>	241,43	1,533	7,557	0,2029	0,1181	0,2363	0,196
	3	<b>0,16</b>	241,43	1,206	7,338	0,1643	0,0957	0,1913	0,158
							<b>Keskiarvo</b>		<b>0,17</b>

GCMS, SIM, PLCL/TCP näyte 1a, laktidiipikin pinta-alan määrittys, 7.3

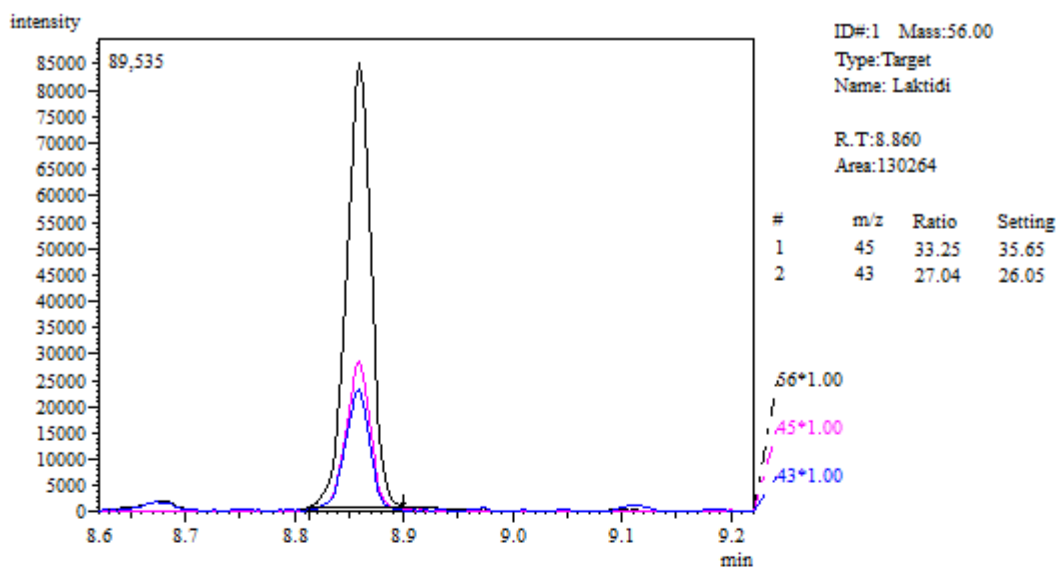


GCMS, SIM, PLCL/TCP näyte 1a, sisästandardiipikin pinta-alan määrittys, 7.3

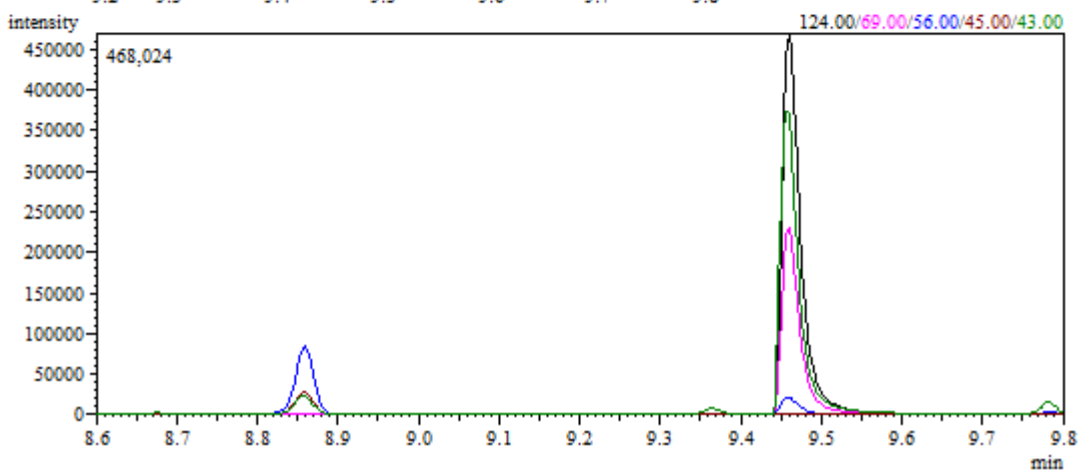
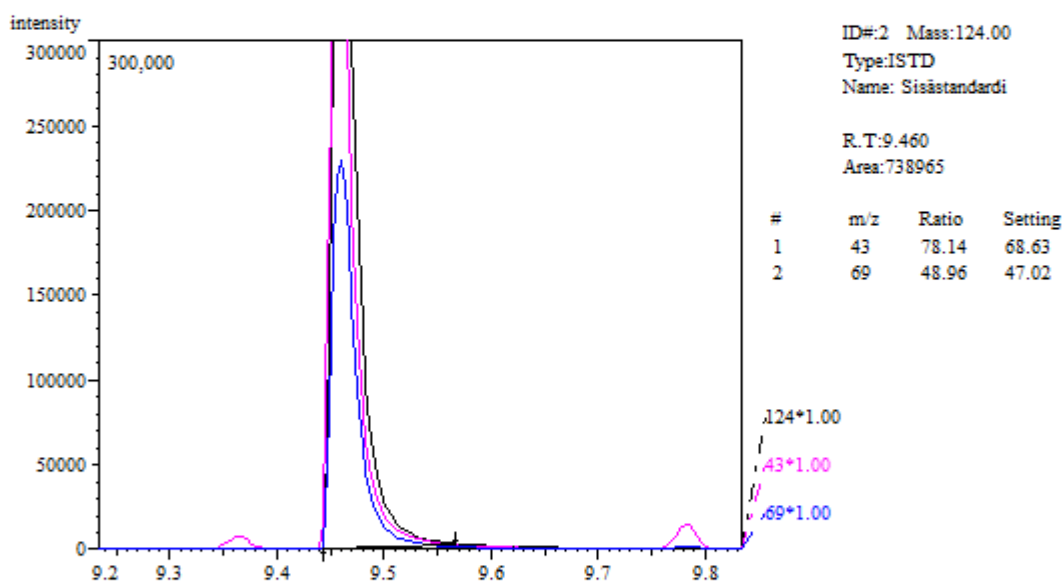


Kuva L.1. PLCL/TCP-näytteen 1 (tapa A) SIM-kromatogrammi ja pinta-alojen määrittys.

GCMS, SIM, PLCL/TCP näyte 2a, laktidiipikin pinta-alan määrittäminen, 7.3



GCMS, SIM, PLCL/TCP näyte 2a, sisästandardiipikin pinta-alan määrittäminen, 7.3



Kuva L.2. PLCL/TCP-näytteen 1 (tapa B) SIM-kromatogrammi ja pinta-alojen määrittäminen.

# LIITE M: GCMS-QP2010 Ultra:n laitekansio



TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO

**Ohjeen nimi:** Laitekansio – GCMS-QP2010 Ultra -kaasukromatografi-massaspektrometri

<b>Ohjetyyppi:</b>	<b>Työohje</b>
<b>Versio:</b>	<b>24.11.2015</b>
<b>Laatija(t):</b>	
<b>Hyväksyjä:</b>	

1. Käyttötarkoitus .....	4
2. Laiterekisteritiedot .....	4
3. Pätevyysvaatimukset laitteen käyttöön.....	4
4. Vastuut.....	4
5. Menetelmäohje .....	5
5.1 Menetelmän sovellusalue .....	5
5.2 Periaate .....	5
5.3 Laitteisto .....	6
5.4 Tulosten laskeminen.....	7
5.4.1 GCMS-menetelmä .....	7
5.4.2 GC-FID-menetelmä.....	7
5.5 Tuloksiin mahdollisesti vaikuttavat häiriötekijät .....	8
5.6 Menetelmän jatkokehittäminen/lisäselvitysten tarve.....	8
6. Näytteen valmistus.....	10
6.1 Näytteen valmistus GCMS-analyysiin .....	10
6.1.1 Kantaliuosten valmistus, GCMS: .....	10
6.1.2 Mitattavien standardiliuosten valmistaminen, GCMS:.....	10
6.1.3 Näyteliuoksen valmistaminen, GCMS: .....	11
6.2 Näytteen valmistus GC-FID analyysiin.....	12
6.2.1 Kantaliuosten valmistus, GC-FID: .....	12
6.2.2 Mitattavien standardiliuosten valmistaminen, GC-FID: .....	12
6.2.3 Näyteliuoksen valmistaminen, GC-FID:.....	13
6.3 Toimenpiteet näytteenkäsittelyn jälkeen .....	13
7. Laitteohje I. käyttöohje .....	14
7.1 Yleiset ohjeet laitteen käyttöön .....	14
7.1.1 Ohjelmien käyttö .....	14
7.1.2 Laitteen käynnistäminen ja sammuttaminen .....	14
7.1.3 Eri detektorien käyttäminen .....	15
7.1.4 Switching unit:n käyttöön liittyvät asetukset.....	15
7.1.5 MS-detektorin käyttöönotto ilman switching unit:a .....	18
7.1.6 FID-detektorin käyttöönotto ilman switching unit:a.....	19
7.1.7 Näytepullojen asettelu näytteensyöttäjässä.....	21
7.2 <i>Method</i> :ien mittaussparametrit switching unit:a käytettäessä.....	23
7.2.1 Mittausparametrit GCMS-menetelmässä käytettäessä switching unit:a.....	23
7.2.2 Mittausparametrit GCFID-menetelmässä käytettäessä switching unit:a .....	25
7.3 <i>Method</i> :ien mittaussparametrit ilman switching unit:a .....	27
7.3.1 Mittausparametrit GCMS-menetelmässä ilman switching unit:a .....	27
7.3.2 Mittausparametrit GCFID-menetelmässä ilman switching unit:a.....	28
7.4 Laitteen käyttöohje laktidipitoisuuden määrittämiseen GCMS-menetelmällä.....	30
7.4.1 Alkuvalmistelut, GCMS.....	30
7.4.2 Mittaaminen, GCMS .....	31



7.4.3 Mittaustulosten käsittely, GCMS.....	32
7.5 Laitteen käyttöohje laktidipitoisuuden määrittämiseen GC-FID-menetelmällä .....	34
7.5.1 Alkuvalmistelut, GC-FID .....	34
7.5.2 Mittaaminen, GC-FID .....	35
7.5.3 Mittaustulosten käsittely, GC-FID .....	35
7.6 Toimenpiteet käytön jälkeen .....	38
8. Huolto .....	39
8.1 Septumin ja linerin vaihto.....	39
8.1.1 <i>Auto Shutdown</i> :n avulla.....	40
8.1.2 <i>EasyStop</i> :n avulla .....	40
8.2 Linerin puhdistaminen.....	40
8.3 Ruiskun vaihto ja puhdistaminen .....	41
8.5 Kolonnin irrottaminen/kiinnittäminen .....	41
8.6 Kolonnin puhdistaminen .....	41
9. Kalibrointi ja virittäminen .....	42
9.1 Kalibrointi .....	42
9.2 MS:n virittäminen .....	42
10. Toimintakunnon tarkistus .....	42
11. Laittevalmistajan ohjekirja .....	42
Lähteet.....	42

## **1. Käyttötarkoitus**

## **2. Laiterekisteritiedot**

## **3. Pätevyysvaatimukset laitteen käyttöön**

## **4. Vastuut**

Jokaisen käyttäjän vastuulla

Laitevastaavan vastuulla

## 5. Menetelmäohje

Laitetta voidaan käyttää laktidipitoisuuden määrittämiseen GCMS- tai GC-FID-menetelmillä. Menetelmien näytteenkäsittelyt ovat samankaltaisia (GCMS-menetelmässä näytteitä joudutaan laimentamaan lisää) ja niiden kromatografiset olosuhteet ovat samanlaiset, mutta detektorit ovat erilaiset.

Huom. GC-FID:n on havaittu mittaavan korkeammat tulokset kuin GCMS:n (n. kaksinkertaiset). Syy ei ole tiedossa.

### 5.1 Menetelmän sovellusalue

GCMS-menetelmä:

- mitattavissa laktidipitoisuudet 0,02 – 1,0 m-% (vastaavat 0,025 – 1,25 µg/ml konsentraatioita mitattavissa liuksissa eli Vial3-liuksissa)
- testattu PLDLA 96/4 –polymeerillä

GC-FID-menetelmä:

- mitattavissa laktidipitoisuudet 0,05 – 1,0 m-% (vastaavat 0,75 – 15 µg/ml konsentraatioita mitattavissa liuksissa eli Vial2-liuksissa)
- testattu PLDLA 96/4 –polymeerillä

### 5.2 Periaate

Menetelmät perustuvat NatureWorks:n menetelmään, johon löytyy linkki laitekansion lopun lähteistä [1].

Näytteenkäsittelyssä polymeerinäyte liuotetaan ensin dikloorimetaaniin, jotta laktidi saadaan siirrettyä liuosfaasiin. Polymeeriliuokseen lisätään sisästandardia (2,6-dimetyyli-γ-pyrone) pipetoimalla siihen sisästandardikantaliuosta. Kaikkiin standardi- ja näyteliuoksiin tulee pipetoida sama tilavuus samaa sisästandardikantaliuosta! Sisästandardin (IS) käyttö vähentää näytteenkäsittelyssä (IS:n lisäyksen jälkeiset vaiheet) tapahtuvien virheiden ja kromatografian mittaolosuhteiden muutoksista aiheutuvien virheiden merkitystä, sillä kyseiset tekijät vaikuttavat yhtä lailla sekä laktidistandardiin että IS:ään. Menetelmän kalibrointi tehdään siten ns. sisäisenstandardin menetelmällä eli kromatogrammilla havaittu laktidipiikin pinta-ala, joka on verrannollinen laktidikonsentraatioon, jaetaan samalla kromatogrammilla havaitulla IS:n pinta-alalla. Polymeeriliuoksesta pipetoidaan pieni tilavuus toiseen astiaan, jossa on asetonia ja johon lisätään ylimäärin sykloheksaania. Sykloheksaanin tarkoitus on saostaa polymeeri, jotta kapillaarissa huonosti eteneviä polymeeriketjuja ei päädy laitteeseen injektoitavaan liuokseen. Laktidimonomeeri ja IS kuitenkin säilyvät liuenneena.

Saostettu liuos suodatetaan ruiskusuodatuksella. GC-FID-menetelmässä liuos suodatetaan suoraan GC:n näytepulloon ja injektoidaan GC:iin. GCMS-menetelmässä liuoksen suodatusta seuraa yksi ylimääräinen laimennusvaihe. Ero johtuu siitä, että MS:lla ei voida mitata yhtä korkeita konsentraatioita kuin FID:llä, sillä detektorin dynaaminen alue ei riitä. Lisäksi ohjeen punnittavia massoja pienennettäessä ruiskusuodatuksesta irtoavat epäpuhtaudet haittaavat pienten konsentraatioiden mittaamista.

Molemmissa menetelmissä kalibrointi tehdään 3-pistekalibrointina näytteiden mittauksen ohessa, jolloin kalibrointi vastaa aina näytteiden mittaolosuhteita (linerin ja kolonnin puhtaus yms.). Standardina käytetään puhtaasta L-laktidista valmistettuja ajoliuoksia, jotka valmistetaan samalla tavalla kuin näytteiden ajoliuokset. Koska mitattavat konsentraatiot ovat hyvin pieniä, ovat standardit valmistettava kuitenkin ensin kantaliuoksina, jotta lisättävät laktidimassat ovat punnittavissa. Valmistettuja standardiliuoksia ei tarvitse suodattaa ruiskusuodatuksella.

## 5.3 Laitteisto

Laitteistoon kuuluvat:

- GCMS-QP2010 Ultra
  - GC2010-kapillaarikaasukromatografi
    - Split/splitless-injektori
    - Kapillaarikolonne (Phenomenex ZB-50)
    - Liekki-ionisaatiodekto (FID)
    - *Switching unit*
  - Massaspektrometri
    - Elektroni-ionisaatio (EI)
    - Kvadrupolianalysoittori
    - Kaksivaiheinen turbomolekulaarinen pumppu
- Esivakuumpumppu
  - Vaatii öljynvaihdon
- AOC-20i -näytteensyöttäjä
  - Nestemäiset näytteet
  - 10 µl Hamilton ruisku
  - 11 näytepulloa (1,5 mL) + 3\*(liuotin- ja jätepullo)
  - tai 11 näytepulloa (1,5 mL) + 4 näytepulloa (4 mL) + 1\*(liuotin- ja jätepullo)
- Precision Hydrogen -vetygeneraattori (Peak Scientific)
  - Vety FID:n liekkiin
  - Vaatii tislattua vettä
- Kaasupullot (paineenlennusventtiileineen)
  - Helium
    - Vähimmäispuhtaus 99,999 % (He 5.0)
    - Syöttöpaineen oltava 300 – 980 kPa (ks. paineenlennusventtiili)
    - Kantajakaasuna ja FID:n ”make-up” eli dektekto-kaasuna
  - Synteettinen ilma
    - Kuiva ilma, typi ja happi (FID:n liekkiin)
    - Syöttöpaineen oltava 300 – 980 kPa (ks. paineenlennusventtiili)
- Tietokone
  - Laitteiston ohjaus ja mitattujen kromatogrammien ja tulosten tarkastelu
  - Ohjelmat:
    - GCMS Real Time Analysis (ohjaus)
    - GCMS Postrun Analysis (MS-tulosten tarkastelu)
    - GCSolution (FID-tulosten tarkastelu)

### Split/splitless-injektori:

GC2010 sisältää split/splitless-injektorin, jossa voidaan käyttää menetelmästä riippuen joko split- tai splitless-lineria. Lineri on deaktivoitu lasiputki, johon näyteliuos injektoidaan ruiskulla ja josta näyte kulkeutuu kantajakaasun mukana kolonnein. Menetelmä on testattu käytettäväksi splitless-injektorilla, joka sisältää deaktivoitua lasivillaa kolonnin suojelemiseksi epäpuhtauksilta. Splitless-injektiossa lähes 100% injektoidusta näytteestä päätyy kolonnein. Split-injektiossa vain osa näytteestä päätyy kolonnein, joten jakosuhdetta (split ratio) muuttamalla näyteliuos voidaan ”laimentaa” dektekto-ille sopivammaksi.

### Kolonne:

Kolonnina menetelmässä käytetään Phenomenex:n ZB-50 -kapillaarikolonna, joka kemialliselta koostumukseltaan on 50%-fenyyl-50%-dimetyylipolysiloksaania eli se on

keskipolaarinen. Kolonnin pituus on 30 m, sisähalkaisija 0,25 mm ja stationaarifaasin paksuus 0,25  $\mu\text{m}$ . Stationaarifaasi on kemiallisesti sidottu kapillaariin.

## 5.4 Tulosten laskeminen

### 5.4.1 GCMS-menetelmä

#### Standardiliuosten konsentraatio, GCMS:

Ohjeen mukaisesti valmistetut standardiliuokset laimennetaan kaksi kertaa kertoimella 1/20 (kantaliuoksesta Vial1-liuokseksi ja siitä edelleen Vial2-liuokseksi) ja kerran kertoimella 1/10 (Vial2-liuoksesta Vial3-liuokseksi).

Siten laktidin massakonsentraatio mitattavissa standardiliuoksissa,  $c_{V3}(\text{La})$  ( $\mu\text{g/ml}$ ), (Vial3-liuokset) lasketaan yhtälöllä

$$c_{V3}(\text{La}) = \frac{m_{kl}(\text{La})}{V_{kl}} \times \frac{1}{20} \times \frac{1}{20} \times \frac{1}{10} = \frac{m_{kl}(\text{La})}{V_{kl}} \times \frac{1}{4000} = \frac{m_{kl}(\text{La})}{V_{kl}} \times \frac{1}{4000}, \quad (5.1)$$

jossa

$m_{kl}(\text{La})$  ( $\mu\text{g}$ ) on kantaliuokseen punnittu massa L-laktidia ja  $V_{kl}$  (ml) on kantaliuoksen mittapullon tilavuus.

#### Näytteen laktidipitoisuus, GCMS:

Näyteliuoksen laktidin massakonsentraatio,  $c_{V3}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ), lasketaan GCMS Postrun Analysis -ohjelmalla. Ohjelma vertaa näyteliuoksen kromatogrammin laktidi- ja IS-piikkien pinta-alojen suhdetta kalibrointisuoraan ja ilmoittaa konsentraation ( $\mu\text{g/ml}$ ) kyseisen näytteen *data*-tiedoston *compound table*:ssa (ks. Luku 7.2.3).

Konsentraatiosta voidaan laskea laktidin massa näytteessä,  $m_{V1}(\text{La})$  ( $\mu\text{g}$ ), yhtälöllä

$$m_{V1}(\text{La}) = c_{V1}(\text{La})V_{V1} = c_{V3}(\text{La}) \times 10 \times 20 \times V_{V1} = c_{V3}(\text{La})V_{V1} \times 200,$$

jossa  $V_{V1}$  (ml) on Vial1-liuoksen tilavuus (polymeerin liuotus). Yhtälössä on huomioitu laimentumiskertoimet (10 ja 20).

Massasta voidaan laskea siten koko polymeerinäytteen laktidipitoisuus (m-%) yhtälöllä

$$\text{Laktidipitoisuus (m\%)} = \frac{c_{V3}(\text{La})V_{V1} \times 200}{m_{\text{näyte}}} \times 100 \text{ m\%}, \quad (5.2)$$

jossa

$m_{\text{näyte}}$  ( $\mu\text{g}$ ) on Vial1-liuokseen punnittu polymeerinäytteen massa,

$c_{V3}(\text{La})$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) on havaittu laktidin massakonsentraatio näyteliuoksessa (Vial3-liuos) ja  $V_{V1}$  (ml) on Vial1-liuoksen tilavuus (polymeerin liuotusvaihe).

### 5.4.2 GC-FID-menetelmä

#### Standardiliuosten konsentraatio, GC-FID:

Ohjeen mukaisesti valmistetut standardiliuokset laimennetaan kaksi kertaa kertoimella 1/20 (kantaliuoksesta Vial1-liuokseksi ja siitä edelleen Vial2-liuokseksi). Siten laktidin massakonsentraatio mitattavissa standardiliuoksissa,  $c_{V2}(\text{La})$  ( $\mu\text{g/ml}$ ), (Vial2-liuokset) lasketaan yhtälöllä

$$c_{V2}(\text{La}) = \frac{m_{kl}(\text{La})}{V_{kl}} \times \frac{1}{20} \times \frac{1}{20} = \frac{m_{kl}(\text{La})}{V_{kl}} \times \frac{1}{400} = \frac{m_{kl}(\text{La})}{V_{kl}} \times \frac{1}{400}, \quad (5.3)$$

jossa

$m_{kl}$  ( $\mu\text{g}$ ) on kantaliuokseen punnittu massa L-laktidia ja  $V_{kl}$  (ml) on kantaliuoksen mittapullon tilavuus.

#### Näytteen laktidipitoisuus, GC-FID:

Näyteliuoksen laktidikonsentraatio,  $c_{V_2}(\text{La})$  ( $\mu\text{g/ml}$ ), lasketaan GCSolution –ohjelmalla. Ohjelma vertaa näyteliuoksen kromatogrammin laktidi- ja IS-piikkien pinta-alojen suhdetta kalibroitaisuoraan ja ilmoittaa massakonsentraation ( $\mu\text{g/ml}$ ) kyseisen näytteen *data-*tiedoston *compound table*:ssa (ks. Luku 7.3.3).

Massakonsentraatiosta voidaan laskea laktidin massa näytteessä,  $m_{V_1}(\text{La})$  ( $\mu\text{g}$ ), yhtälöllä

$$m_{V_1}(\text{La}) = c_{V_1}(\text{La})V_{V_1} = c_{V_2}(\text{La}) \times 20 \times V_{V_1} = c_{V_2}(\text{La})V_{V_1} \times 20 ,$$

jossa  $V_{V_1}$  (ml) on Vial1-liuoksen tilavuus (polymeerin liuotus). Yhtälössä on huomioitu laimentumiskerroin (20).

Massasta voidaan laskea siten koko polymeerinäytteen laktidipitoisuus (m-%) yhtälöllä

$$\text{Laktidipitoisuus (m\%)} = \frac{c_{V_2}(\text{La})V_{V_1} \times 20}{m_{\text{näyte}}} \times 100 \text{ m\%} , \quad (5.4)$$

jossa

$m_{\text{näyte}}$  ( $\mu\text{g}$ ) on Vial1-liuokseen punnittu polymeerinäytteen massa,  $c_{V_2}(\text{La})$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) on havaittu laktidin massakonsentraatio näyteliuoksessa (Vial2-liuos) ja  $V_{V_1}$  (ml) on Vial1-liuoksen tilavuus (polymeerin liuotusvaihe).

## 5.5 Tuloksiin mahdollisesti vaikuttavat häiriötekijät

Näytteenkäsittelyn virhelähteitä:

- Pipetointivirheet (erityisesti standardi- ja IS-kantaliuokset)
- Täyspipettien puhtaus (erityisesti viskoosisten polymeeriliuosten pipetointi)
- Polymeerin tulee saostua asetoniin ja sykloheksaanin seokseen.

GC-mittauksen virhelähteitä:

- Linerin ja kolonnin epäpuhtaudet (adsorptio, haamupiikit, termisesti oligomeereistä yms. muodostuva laktidi, ...)
- Lineri tulisi vaihtaa mahdollisimman usein
- Analyyttien piikkien integrointi (tarkista integrointirajat)
- Integroidaanko oikea piikki (piikin tunnistus)
- Onko kalibroitaisuora määritetty oikein

## 5.6 Menetelmän jatkokehittäminen/lisäselvitysten tarve

#### MS- ja FID-mittausten eri tulokset:

GCMS- ja GC-FID-mittauksissa on havaittu eri tulokset samoilla näytteillä (n. kaksinkertaiset FID:llä). Syy ei ole tiedossa. Polylaktidinäytteiden mittauttaminen jollain toisella menetelmällä (esim. ulkopuolisella) auttaisi saamaan selville, kumpi menetelmistä on tarkempi.

#### Split-injektion käyttö:

GCMS-menetelmässä viimeisen ylimääräisen laimennuskerran voisi mahdollisesti korvata käyttämällä split-injektiota splitless-injektion tilalla. Split-injektiossa näyte laimenee laitteen sisällä johtuen siitä, että vain osa näytteestä kulkee injektorista kolonniin ja suurin osa

poistuu injektorista jakoventtiilin kautta pois. Jakoventtiilin jakosuhteella (ei välttämättä vastaa laimentumissuhdetta) voidaan säätää kuinka suuri osa näytteestä päätyy kolonniin. Esimerkiksi 1:15 ja 1:20 jakosuhteilla voitaisiin saada GCMS-menetelmän näytteestä (Vial2-vaihe) riittävän pieni osa kolonniin, jotta detektori ei saturoidu. Split-injektio voi vähentää injektioitoistettavuutta, mutta näytteenkäsittelystä aiheutuva hajonta on silti todennäköisesti paljon merkittävämpää. Periaatteessa samat kromatografiset olosuhteet kuin splitless-injektiossa käyvät myös split-injektioon. Kolonnin lämpötilaohjelmaa voisi muuttaa, sillä split-injektiossa ei ole tarvetta liuotin- ja kylmäloukkuefektin käytölle. Kylmäloukkuefektissä analyytti vangitaan kolonnin alkuosaan splitless-jakson ajaksi käyttämällä matalaa kolonnin lämpötilaa. Kolonnin lämpötilaohjelma voitaisiin muuttaa alkamaan korkeammasta lämpötilasta (esim. 100 °C), jos halutaan lyhentää analyysi-aikaa.

#### **PLCL-kopolymeerien määritykset:**

PLCL-kopolymeereillä asetonin lisäyksen (Vial 2 -liuosvaiheet) on havaittu vaikuttavan määritettyyn laktidipitoisuuteen. Asetonin lisäys kasvattaa havaittu laktidipitoisuutta. Näytteenkäsittelyn osalta tulisi testata asetonin vaikutus tunnetuilla PLCL-näytteillä. Asetonin lisäyksen vaikutus voi johtua PLCL-kopolymeerien paremmasta liukenevuudesta asetoniin, jolloin saostamisessa käytetty liuotinsuhde 1:3:16 (dikloorimetaani : asetoni : sykloheksaani) ei välttämättä saosta PLCL:ää riittävän hyvin. Suurentunut laktidipitoisuus voi johtua saostumattomien komponenttien suuremmasta määrästä injektorissa, mikä voi lisätä termisesti muodostuvan laktidin määrää. Toisaalta se voi selittyä myös sillä, että laktidi ei pääse liukenemaan 1 ml pipetoitavasta saostuvasta polymeeriliuoksesta sykloheksaaniin, jos polymeeriliuoksen pipetointia ei tehdä asetoniin.

#### **Muiden polymeerien määritykset:**

Edellytyksinä muille polymeerinäytteille on, että polymeeri liukenee ja saostuu näytteenkäsittelyssä ja että laktidi ja IS eroavat kromatogrammissa omiksi piikeikseen. MS:n scan-mittausmoodi mahdollistaa myös kromatogrammin piikkien massaspektrin tulkitsemisen ja piikkien (laktidi ja IS) puhtauksien tarkistamisen eli erottuuko näytteen muut komponentit analyyteistä.

#### **Lisäaineita sisältävät polymeerit:**

Näyte punnitaan polymeerin massan mukaan ja lisäaineen massaa ei huomioida. Liukenemattoman lisäaineen (keraami yms.) tiheys on usein suuri, joten sen aiheuttaman ylimääräinen tilavuus on hyvin pieni verrattuna Vial1-mittapullon tilavuuteen. Lisäksi sisästandardi kokee saman virheen, joten sen pitäisi minimoitua.

## 6. Näytteen valmistus

GC-FID ja GCMS-analyyseihin on omat näytteenvalmistustapansa. Mitattavat standardiliuokset valmistetaan säilytyistä kantaliuoksista. Kantaliuoksia on yhteensä 4: yksi L,L-laktidikantaliuos jokaista standardiliuos konsentraatiota kohti (yht. 3) ja yksi sisästandardikantaliuos. Sisästandardikantaliuosta käytetään myös näyteliuosten valmistuksessa. Jos kantaliuoksia ei ole riittävästi tai ne ovat vanhentuneet, on ne tehtävä uudelleen. Samaa sisästandardikantaliuosta on käytettävä kaikissa standardi- ja näyteliuoksissa.

Huom. Näytteenkäsittelyssä on hyvin tärkeää, että samoja täyspipettejä ei käytetä huomattavasti eri vahvuisten liuosten pipetointiin. Erityisesti hyvin viskoosisten polymeeriliuosten pipetoinnissa pipetti pitää huuhdella dikloorimetaanilla pipetointien välissä. Viskoosisuus vaikeuttaa pipetointia erityisesti pienillä pipeteillä, minkä takia polymeeriliuosten pipetointiin on käytetty 1 ml pipettejä 0,5 ml pipettien sijaan.

### 6.1 Näytteen valmistus GCMS-analyysiin

#### 6.1.1 Kantaliuosten valmistus, GCMS:

##### Sisästandardikantaliuoksen valmistaminen, GCMS:

- Punnitse 25 mg ( $\pm 2$  mg) sisästandardia (2,6-dimethyl- $\gamma$ -pyrone) 20 ml mittapulloon tarkalla analyysivaa'alla.
- Ota tarkka punnitustulos ylös (vähintään 0,1 mg tarkkuus).
- Lisää dikloorimetaania ja ravista pulloa kunnes sisästandardi on liennut.
- Lisää dikloorimetaania mittapullon merkkiin asti (joko suoraan annostelijan tai lasisen pasteur-pipetin avulla).

##### L,L-laktidikantaliuosten valmistaminen, GCMS:

- Punnitse L,L-laktidia eri massat kolmeen erilliseen 20 ml mittapulloon tarkalla analyysivaa'alla. Punnittavat massat ovat:
  - standardi 1 = 10 mg ( $\pm 1$  mg)
  - standardi 2 = 25 mg ( $\pm 2$  mg)
  - standardi 3 = 50 mg ( $\pm 2$  mg).
- Ota tarkat punnitustulokset ylös (vähintään 0,1 mg tarkkuus).
- Jos käytät 10 ml:n pulloja, puolita massat (massakonsentraatioiden täytyy säilyä).
- Lisää dikloorimetaania ja ravista pulloja kunnes L,L-laktidi on liennut.
- Lisää dikloorimetaania mittapullon merkkiin asti (joko suoraan annostelijan tai lasisen pasteur-pipetin avulla).

##### Kantaliuosten säilyttäminen

Kantaliuoksia voi säilyttää jääkaapissa ainakin 1 arkiviikon.

#### 6.1.2 Mitattavien standardiliuosten valmistaminen, GCMS:

##### Vial 1 –liuokset, 10 ml mittapullo:

- Siirrä 10 ml mittapullon 0,5 ml L,L-laktidikantaliuosta 0,5 ml lasisella täyspipetillä. Kullekin standardikonsentraatiolle oma mittapullonsa, joten standardiliuoksia on yhteensä kolme kappaletta koko ajan.
- Siirrä jokaiseen standardiliuokseen 0,5 ml sisästandardikantaliuosta 0,5 ml täyspipetillä.
- Täytä mittapullot merkkiin asti dikloorimetaanilla.



**Vial 2 –liuokset, 25 ml lasinen ruskea pullo:**

- Lisää 25 ml ruskeisiin pulloihin (**Vial 2** –pullot) tarkasti 3 ml asetonia annostelijan avulla.
- Siirrä 1 ml kutakin **Vial 1** -liuosta eri **Vial 2** –pulloihin 1 ml täyspipetillä.
- Lisää **Vial 2** -pulloihin tarkasti 16 ml sykloheksaania annostelijan avulla ja sekoita pulloa ravistamalla. Liuostilavuus on yhteensä 20 ml.

**Vial 3 –liuokset, 5 ml mittapullo, ajoliuokset:**

- Siirrä 0,5 ml kutakin **Vial 2** -liuosta 5 ml mittapulloihin (**Vial 3** -pullot), lisää 0,5 ml asetonia annostelijan avulla, täytä sykloheksaanilla merkkiin asti ja sekoita.
- Siirrä **Vial 3** -liuosta GC-näytepulloon (1,5 tai 4 mL pullo; ks. laiteohje) lasisella pasteur-pipetillä yli  $\frac{3}{4}$  pullon tilavuudesta.
- Laske standardien tarkat laktidikonsentraatiot punnitustulosten perusteella yhtälöllä 5.1. Standardien konsentraatiot ovat n.:
  - standardi 1 = 0,125 µg/ml
  - standardi 2 = 0,3125 µg/ml
  - standardi 3 = 0,625 µg/ml.

**6.1.3 Näyteliuoksen valmistaminen, GCMS:****Vial 1 –liuos, 10 ml mittapullo, polymeerin liuottaminen:**

- Punnitse 250 mg ( $\pm$  10 mg) polymeerinäytettä (huom. Huomioi vain polymeerin massa) 10 ml mittapulloon tarkalla analyysivaa'alla. Ota tarkka punnitustulos ylös (vähintään 0,1 mg tarkkuus).
- Lisää mittapulloon dikloorimetaania yli puolen välin ja anna näytteen liueta. Liukenemisaika saa olla korkeintaan yön yli.
- Näytteen liuettua lisää mittapulloon 0,5 ml sisästandardikantaliuosta 0,5 ml täyspipetillä, täytä merkkiin asti dikloorimetaanilla ja sekoita pulloa ravistamalla.

**Vial 2 –liuos, 25 ml lasinen ruskea pullo, polymeerin saostaminen:**

- Lisää 25 ml ruskeaan pulloon (**Vial 2** -pullo) tarkasti 3 ml asetonia annostelijan avulla.
- Siirrä 1 ml **Vial 1** -liuosta **Vial 2** -pulloon 1 ml täyspipetillä.
- Lisää **Vial 2** -pulloon tarkasti 16 ml sykloheksaania annostelijan avulla ja sekoita pulloa ravistamalla. Polymeerin tulee saostua.

**Vial 3 –liuos, 5 ml mittapullo, ajoliuos:**

- Ota n. 5 ml **Vial 2** -liuosta 10 ml kertakäyttöiseen injektioruiskuun ja injektoida se 0,45 µm ruiskuudattimen läpi. Päästä osa suodatteesta ensin jäteastiaan ja kerää loput (vähintään 2 ml) liuoksesta erilliseen astiaan (esim. pestyyn käytettyyn 4 ml GC-pesupulloon tai puhtaaseen 25 ml ruskeaan pulloon).
- Siirrä 0,5 ml suodatettua liuosta 5 ml mittapulloon (**Vial 3** -pullo), lisää 0,5 ml asetonia annostelijan avulla, täytä sykloheksaanilla merkkiin asti ja sekoita ravistamalla.
- Siirrä **Vial 3** -liuosta GC-näytepulloon (1,5 tai 4 mL pullo; ks. laiteohje) lasisella pasteur-pipetillä yli  $\frac{3}{4}$  pullon tilavuudesta.

## 6.2 Näytteen valmistus GC-FID analyysiin

### 6.2.1 Kantaliuosten valmistus, GC-FID:

#### Sisästandardikantaliuoksen valmistaminen, GC-FID:

- Punnitse 30 mg ( $\pm 2$  mg) sisästandardia (2,6-dimethyl- $\gamma$ -pyrone) 20 ml mittapulloon tarkalla analyysivaa'alla.
- Ota tarkka punnitustulos ylös (vähintään 0,1 mg tarkkuus).
- Lisää dikloorimetaania ja ravista pulloa kunnes sisästandardi on liennut.
- Lisää dikloorimetaania mittapullon merkkiin asti (joko suoraan annostelijan tai lasisen pasteur-pipetin avulla).

#### L,L-laktidikantaliuosten valmistaminen, GC-FID:

- Punnitse L,L-laktidia eri massat kolmeen erilliseen 10 ml mittapulloon tarkalla analyysivaa'alla. Punnittavat massat ovat:
  - standardi 1 = 6 mg ( $\pm 1$  mg)
  - standardi 2 = 15 mg ( $\pm 2$  mg)
  - standardi 3 = 30 mg ( $\pm 2$  mg).
- Ota tarkat punnitustulokset ylös (vähintään 0,1 mg tarkkuus).
- Jos käytät 20 ml pulloja 10 ml sijaan, kaksinkertaista massat (jotta massakonsentraatiot säilyvät).
- Lisää dikloorimetaania ja ravista pulloja kunnes L,L-laktidi on liennut.
- Lisää dikloorimetaania mittapullon merkkiin asti (joko suoraan annostelijan tai lasisen pasteur-pipetin avulla).

#### Kantaliuosten säilyttäminen

Kantaliuoksia voi säilyttää jääkaapissa tai vetokaapissa ainakin 1 arkiviikon.

### 6.2.2 Mitattavien standardiliuosten valmistaminen, GC-FID:

#### Vial 1 –liuokset, 10 ml mittapullo:

- Siirrä 0,5 ml L,L-laktidikantaliuosta (0,5 ml lasisella täyspipetillä) 10 ml mittapulloon. Kullekin standardikonsentraatiolle on oma pullonsa, joten standardiliuoksia on yhteensä kolme kappaletta koko ajan.
- Siirrä jokaiseen **Vial 1** -standardiliuokseen 0,5 ml sisästandardikantaliuosta (0,5 ml täyspipetillä).
- Täytä mittapullot merkkiin asti dikloorimetaanilla ja sekoita ravistamalla.

#### Vial 2 –liuokset, 25 ml lasinen ruskea pullo, ajoliuokset:

- Lisää 25 ml ruskeisiin pulloihin (**Vial 2** –pullot) tarkasti 3 ml asetonia annostelijan avulla.
- Siirrä 1 ml kutakin **Vial 1** -liuosta eri **Vial 2** –pulloihin 1 ml täyspipetillä.
- Lisää **Vial 2** -pulloihin tarkasti 16 ml sykloheksaania annostelijan avulla ja sekoita pulloja ravistamalla. Liuostilavuus on yhteensä 20 ml.
- Siirrä **Vial 2** -liuosta GC-näytepulloon (1,5 tai 4 mL pullo; ks. laiteohje) lasisella pasteur-pipetillä yli  $\frac{3}{4}$  pullon tilavuudesta.
- Laske standardien tarkat laktidikonsentraatiot punnitustulosten perusteella yhtälöllä 5.3. Standardien konsentraatiot ovat n.:
  - standardi 1 = 1,5  $\mu\text{g/ml}$
  - standardi 2 = 3,75  $\mu\text{g/ml}$
  - standardi 3 = 7,5  $\mu\text{g/ml}$ .

### 6.2.3 Näyteliuoksen valmistaminen, GC-FID:

#### Vial 1 –liuos, 10 ml mittapullo, polymeerin liuottaminen:

- Punnitse 300 mg ( $\pm$  10 mg) polymeerinäytettä (huom. Huomioi vain polymeerin massa) 10 ml mittapulloon. Ota tarkka punnitustulos ylös (0,1 mg tarkkuus).
- Lisää mittapulloon dikloorimetaania yli puolen välin ja anna näytteen liueta. Liukenemisaika saa olla korkeintaan yön yli.
- Näytteen liuettua lisää mittapulloon 0,5 ml sisästandardikantaliuosta 0,5 ml täyspipetillä, täytä merkkiin asti dikloorimetaanilla ja sekoita pulloa ravistamalla.

#### Vial 2 –liuos, 25 ml lasinen ruskea pullo, polymeerin saostaminen, ajoliuos:

- Lisää 25 ml ruskeaan pulloon (**Vial 2** -pullot) tarkasti 3 ml asetonia annostelijan avulla.
- Siirrä 1 ml **Vial 1** -liuosta **Vial 2** -pulloon 1 ml täyspipetillä.
- Lisää **Vial 2** -pulloon tarkasti 16 ml sykloheksaania annostelijan avulla ja sekoita pulloa ravistamalla. Polymeerin tulee saostua.
- Ota n. 5 ml **Vial 2** -liuosta 10 ml kertakäyttöiseen injektioruiskuun ja injektoi se 0,45  $\mu$ m ruiskusuodattimen läpi. Päästä osa liuoksesta ensin jäteastiaan ja siirrä osa suodatetusta liuoksesta GC-näytepulloon (1,5 tai 4 mL pullo; ks. laiteohje) yli  $\frac{3}{4}$  pullon tilavuudesta.

### 6.3 Toimenpiteet näytteenkäsittelyn jälkeen

- Pese käytetyt täyspipetit huolellisesti.
  - Polymeeriliuosten pipetointiin käytetyt pipetit on ensin huuhdeltava huolellisesti kloroformilla (tai dikloorimetaanilla) heti, kun niitä ei enää käytetä.
  - Huuhtelee pesun jälkeen MS-laatusella asetonilla.
- Polymeeriliuosten astioiden peseminen:
  - Tyhjennä jättepulloon.
  - Vial 1 ja Vial 2 -mittapullot ja ruskeat pullot täytetään kloroformilla (tai dikloorimetaanilla) ja annetaan liota yön yli. Liuotuksessa on hyvä käyttää standardiliuoksia (Vial 1 vaihe, joka on dikloorimetaania).
  - Pese astiat tiskikoneessa.
- Standardiliuosten astioiden peseminen:
  - Käytä Vial 1 vaiheiden liukset polymeeriliuosten astioiden täyttämiseen.
  - Tyhjennä loput liukset jättepulloon.
  - Pesu tiskikoneessa.
- Huolehdi, että annostelijoiden hanat on suljettu ja tulpattu.
- Haihduta ruiskut, suodattimet ja pasteur-pipetit kuiviksi vetokaapissa ja hävitä.

## 7. Laiteohje I. käyttöohje

Tässä osiossa viitataan laitteen manuaaleihin, jotka löytyvät paperiversiona ja PDF-muodossa laitteeseen yhdistetyn tietokoneen työpöydän kansioista *TTY*. Manuaaleista tärkeimmät ovat *GCMS-2010 Ultra Instruction Manual* (jatkossa *Instruction Manual*) ja *GCMS-2010 Series Operation Guide* (jatkossa *Operation Guide*).

### 7.1 Yleiset ohjeet laitteen käyttöön

#### 7.1.1 Ohjelmien käyttö

Laitteen käyttöön laitetietokoneen avulla liittyy kolme ohjelmaa: *GCMS Real Time Analysis*, *GCMS Postrun Analysis* ja *GCsolution*. Kaikki kolme ohjelmaa voidaan avata laitetietokoneen työpöydältä. Kaikki laitteiston ohjaamiseen tehtävät komennot tehdään laitteiston tietokoneen *GCMS Real Time Analysis* -ohjelmalla, ellei toisin mainita. HUOM. Ohjelmaa ei saa turhaan sammuttaa eikä USB-yhteyttä tietokoneen ja laitteen välillä katkaista!

Massaspektrometridetektorilla tehtyjen mittausten tulosten käsittely ja analysointi tehdään *GCMS Postrun Analysis* -ohjelmalla, kun taas FID-detektoria käytettäessä vastaavat tehdään *GCsolution*:lla. Kyseiset kaksi tulostenkäsittelyohjelmaa voidaan sammuttaa haluttaessa.

Ohjelmiin ja laitteiston ohjaamiseen liittyy kolme tiedostomuotoa: *method*-, *data*- ja *batch*-tiedostot. Laitteen parametrien (lämpötilat, paineet, yms.) ohjaaminen tapahtuu *method*-tiedoston avulla. *Method*-tiedosto sisältää siis kaiken tiedon siitä, miten laite tekee mittauksen (kromatografiset olosuhteet, detektorin asetukset yms.). Lisäksi *method*:iin tallentuu myös mittaustulosten käsittelyyn *GCMS Postrun Analysis*:ssa käytetyt parametrien (kromatogrammin piikkien tunnistaminen, integrointi yms.) arvot (*GCsolution*:ssa ei).

Jokainen jonkin *method*:n mukainen mittaus (injektointi, ajo) tuottaa *data*-tiedoston, joka sisältää mitatun kromatogrammin ja jota voidaan sen jälkeen analysoida joko *GCMS Postrun Analysis*:ssa tai *GCsolution*:ssa. MS- ja FID-mittaukset tuottavat *data*-tiedostot eri tiedostopäätteillä. Batch-tiedosto on käytännössä lista suoritettavista/suoritetuista mittauksista (ajoista), jossa kullekin mittaukselle voidaan määrittää haluttu *method*- ja *data*-tiedosto. Ajettaessa batch-tiedosto *Real Time Analysis*:ssa laite mittaa listan mittaukset kyseisessä järjestyksessä *batch*:n mukaisesti.

Huom. Kaikissa ohjelmissa käytetään desimaalipilkun sijaan desimaalipistettä!

#### 7.1.2 Laitteen käynnistäminen ja sammuttaminen

Normaalikäytössä koko laitteisto (massaspektrometri, GC, kaasupullo, tietokone, vakuumpumppu) pidetään käynnissä. Syynä tähän on massaspektrometrin vakuumin muodostumiseen ja stabiloitumiseen kuluva aika (useita tunteja). Aina käytön jälkeen *GCMS*-laite asetetaan ns. ECO-tilaan odottamaan laitteiston seuraavaa käyttöä. Laitteisto kannattaa sammuttaa vain pidempien lomien yms. ajaksi. ECO-tilan asetukset käytettäessä switching unit:a löytyvät luvusta 7.1.4.

Ohjeet käynnistämiseen: ks. *Instruction Manual*:n sivut 14 – 23. Ohjeet sammuttamiseen: ks. *Instruction Manual*:n sivu 24.

### 7.1.3 Eri detektorien käyttäminen

Laitteeseen on asennettu kaksi eri detektoria: massaspektrometri (kiinteästi osana GCMS-laitetta) ja FID-detektori (erillinen vaihtoehtoinen detektori). Laite on GCMS-laite eli massaspektrometri, MS, on ensisijainen detektori. Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, että massaspektrometrin on oltava mittauskunnossa (ei virheilmoituksia, esim. vakuumin on oltava sopiva) vaikka kolonni olisikin asetettu kulkemaan suoraan injektorilta FID-detektorille.

Laitteessa on ns. *switching unit*, joka mahdollistaa kolonnista ulostulevan kantajakaasuvirtauksen jakamisen joko MS- tai FID-detektorille. Sitä voidaan käyttää myös vaihtamaan virtaus detektorilta toiselle ajon aikana. *Switching unit*:a käytettäessä kolonnin toinen pää on kiinnitetty injektoriin ja toinen pää *Switching unit*:iin. *Switching unit*:sta kulkee deaktivoitua kapillaarikolonni (ei stationaarifaasia) MS:lle ja FID:lle.

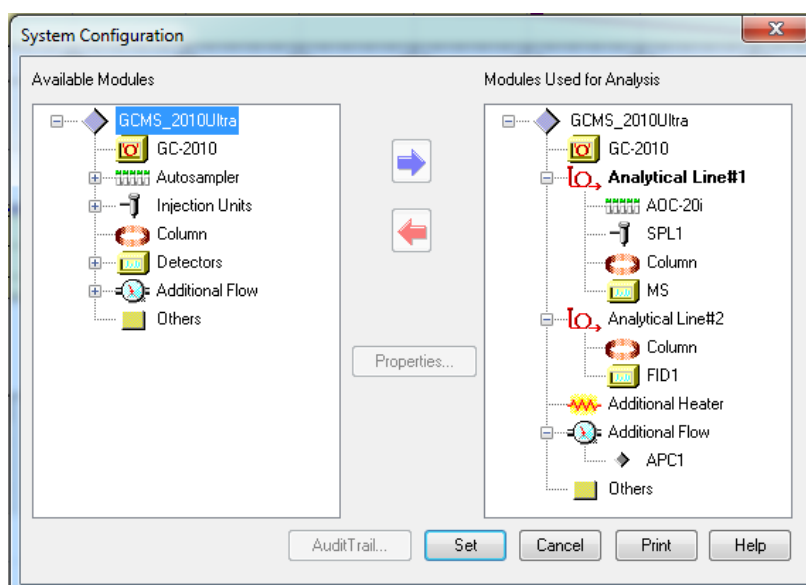
Ilman *switching unit*:a vaihtaminen MS- ja FID-detektorien välillä on tehtävä manuaalisesti ja MS:n vakuumin on ajettava alas. Myös laitteen käyttöön liittyvät ohjeet ovat erilaiset eri detektoria käytettäessä.

### 7.1.4 Switching unit:n käyttöön liittyvät asetukset

Switching unit:a käytettäessä on mahdollista helposti vaihtaa MS- ja FID-detektorin välillä mittauksesta toiseen. Tällöin kolonni kulkee injektorilta switching unit:n oikean päädyn liitokseen (edestä katsottuna). Vasemman päädyn liitoksesta kulkee deaktivoitu kapillaari (sisähalkaisija 0,15 mm; pituus 2 m) MS:n liitokseen. Switching unit:n alapuolella olevasta liitoksesta taas kulkee toinen deaktivoitu kapillaari (0,15 mm; 0,5 m) FID:lle. Huom. switching unit:n liitoksiin on omat ohjeensa *Switching unit*:n manuaalissa. Switching unit:n puoleisiin päihin kapillaareja ja kolonnia käytetään *siltite*-ferruleita.

#### System configuration, kun switching unit on käytössä:

*Real Time Analysis* -ohjelman *System Configuration*:n (yläpalkki: *Instrument*> *System Configuration*) asetusten tulee olla kuvan 1 mukaiset, kun *switching unit* on käytössä. *System Configuration*:ssa oleva komponentti *Additional flow* -> *APC1* on *switching unit*:iin liittyvä.



Kuva 1. System Configuration -asetukset switching unit:a käytettäessä.

**Switching unit:n käyttö rajoittaa kaasun virtaukseen liittyviä mittaussparametrejä:**

Seuraavat kaasujen virtaukseen liittyvät parametrit asetettiin switching unit:n asennuksessa kyseisiin arvoihinsa, jotta switching unit toimisi oikein (jotta kaasuvirtaus jakautuu kokonaisuudessaan toiselle detektorille). Muiden parametrien toimivuutta ei ole testattu.

Switching unit jakaa kolonnista tulevan kantajakaasu virtauksen ylimääräisen paineen (*switching pressure*) avulla joko MS:lle tai FID:lle. *Switching pressure*:n tulee olla 120 kPa (ks. oikean palkin *Detail*; = APC1 additional flow) ja APC1:n käytössä.

Injektorin paineen (*inlet pressure*) tulee method:ssa olla aina 250 kPa ja toimintamoodina *constant pressure*.

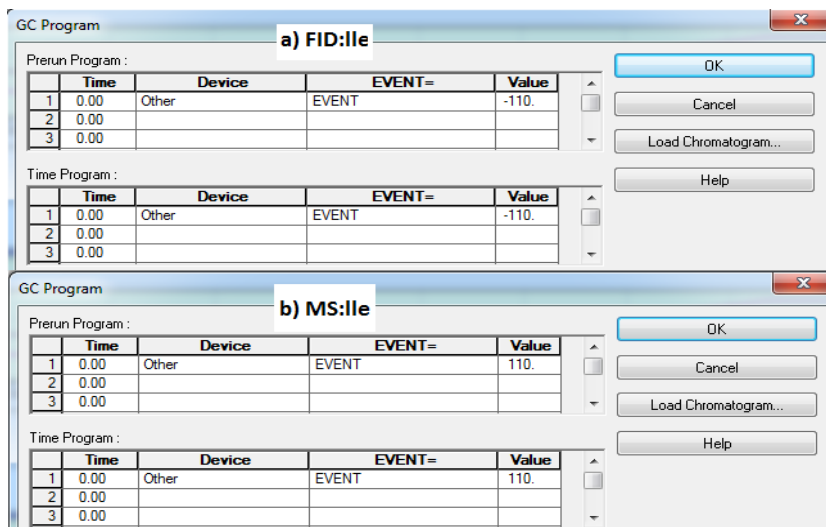
FID:n kaasuvirtauksien tulee olla seuraavat method:ssa:

- *make-up gas* 5 ml/min,
- $H_2$  40 ml/min,
- Ilma 400 ml/min.

**Kantajakaasun virtauksen suunnan ja käytettävän detektorin valinta:**

Kantajakaasuvirtauksen suunta (MS tai FID) voidaan valita joko käytettyyn *method*:iin tai manuaalisesti:

- *Method*:ssa:
  - Avaa käytettävä *method* Data Acquisition -valikossa.
  - Valitse GC-välilehdeltä *GC Program*.
  - Täytä avautuvan ikkunan taulukko kuvan 2 mukaisesti. Huom. EVENT -110 = virtaus FID:lle  
EVENT 110 = virtaus MS:lle
- Manuaalisesti:
  - GCMS-laitteen käyttöpaneelin avulla seuraavasti
    1. Paina *Func*.
    2. Paina 5.
    3. Syötä numeronäppäimillä 110 (virtaus MS:lle) tai -110 (virtaus FID:lle).
    4. Paina *Enter* ja paina *Execute*.
 Ei haittaa, jos näppäillään 110 edellä olevan ohjeen mukaisesti, vaikka virtaus kulkisi jo MS:lle.



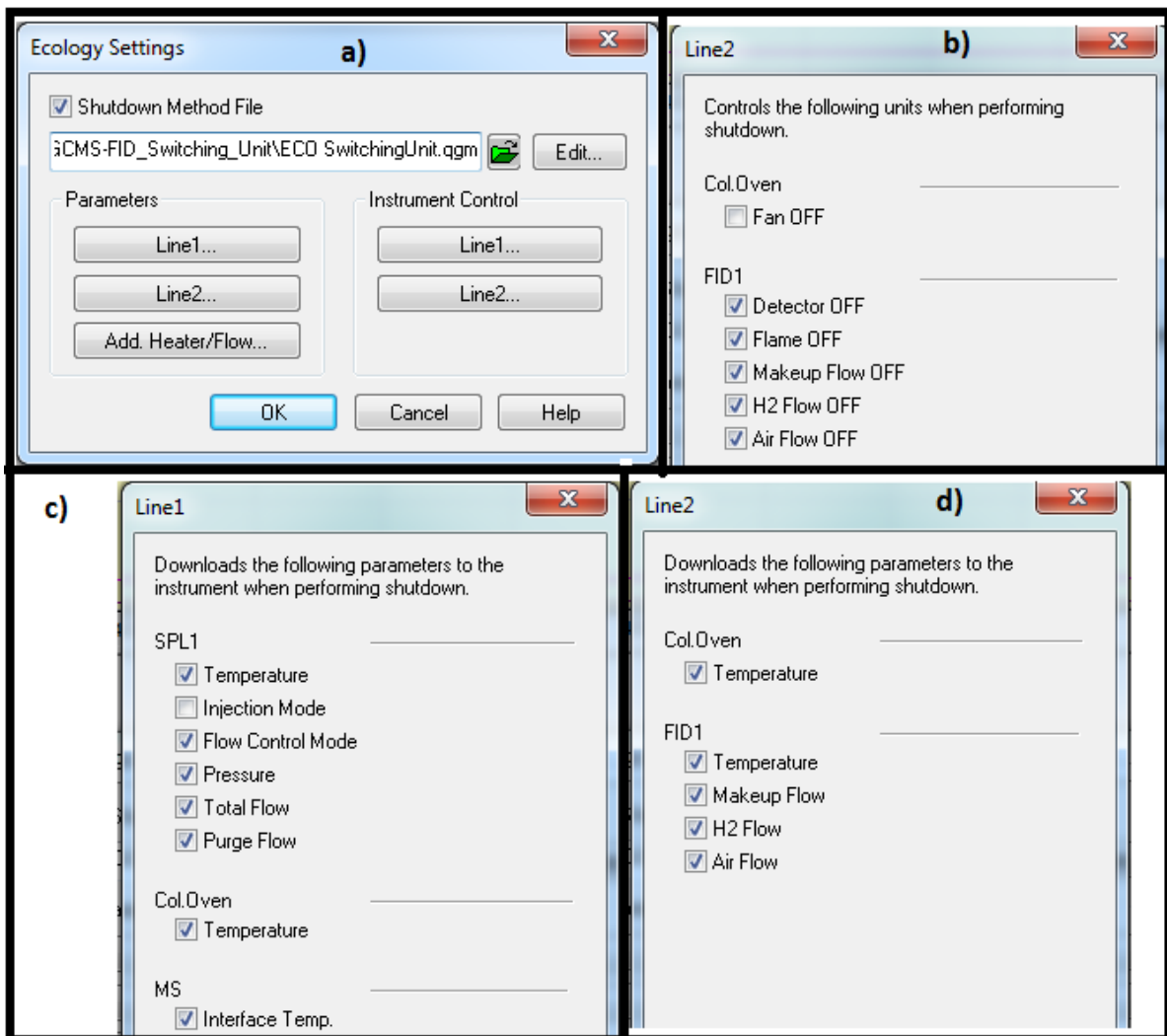
**Kuva 2.** Method:n GC Program -valikon asetukset switching unit:a käytettäessä, kun detektorina käytetään a) FID:ä tai b) MS:ää.

**ECO-tilan asetukset switching unit:a käytettäessä:**

Switching unit:a käytettäessä käytettävä ECO-tilan *method*-tiedosto on "ECO SwitchingUnit" (C:\GCMSsolution\Data\GCMS-FID\_Switching\_Unit).

ECO-tilan asetukset: ks. kuva 3.

- Valitse kyseinen ECO-method käyttöön yläpalkista *Tools > Ecology Settings*. (ks. kuva 3 a-kohta)
- Valitse *Ecology Settings* -ikkunasta seuraavat asetukset kuvan 3 mukaisesti.
  - *Instrument control line 2 (FID)* ks. kuvan 3 b-kohta (FID ja siihen liittyvät kaasuvirtaukset sammutetaan ECO-tilassa).
  - *Parameters line 1 (MS)* ks. kuvan 3 c-kohta.
  - *Parameters line 2 (FID)* ks. kuvan 3 d-kohta.

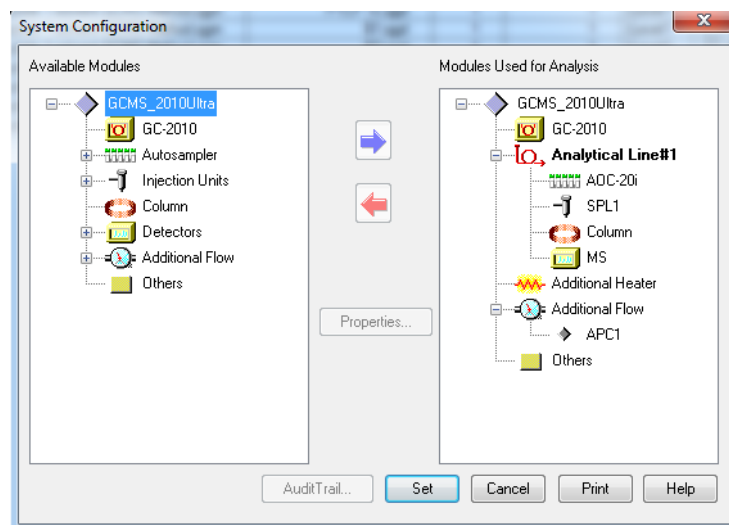


**Kuva 3.** ECO-tilan asetukset switching unit:a käytettäessä. Käytettävä ECO-method on "ECO SwitchingUnit" (C:\GCMSsolution\Data\GCMS-FID\_Switching\_Unit).

### 7.1.5 MS-detektorin käyttöönotto ilman switching unit:a

Seuraavaksi kuvataan, miten MS-detektori otetaan käyttöön manuaalisesti, jos switchin unit:a ei haluta tai ei voida käyttää. Oletuksena, että laite on ECO-tilassa edeltävän käytön jäljiltä.

1. Sulje synteettisen ilman kaasupullon pääventtiili.
2. Poistu ECO-tilasta. Klikkaa *Cancel Ecology Mode* -ikkunassa. Laite palaa edellisen ajatun *Method*-tiedoston olosuhteisiin.
3. Valitse yläpalkista *File* ja *Close Method File*.
4. Valitse GCMS Real Time Analysis -ohjelman sivupalkista *Vacuum control*. Klikkaa *Auto Shutdown*. Tällöin vakuumi ajetaan alas ja lämpötilat laskevat. Klikkaa *Close*, kun toimenpiteen ilmoitetaan olevan valmis.
5. Varmista, että lämpötilat (uuni, injektori, FID, MS-interface) ovat laskeneet alas (vähintään n. 70 °C) ohjelman oikeasta sivupalkista tai sen *Detail*-valikosta.
6. Avaa uuni ja irrota kolonnin pää FID-detektorilta tai switching unit:lta. Ks. luku 8.5.
  - a. Jos kolonni oli kiinnitetty switching unit:iin, irrota deaktivoitu kapillaari GC-MS-liitoksesta. Deaktivoitu kapillaari saa jäädä toisesta päästä switching unit:iin kiinnitettynä uuniin (ei sisällä stationaarifaasia).
  - b. Jos kolonni oli kiinnitettynä suoraan FID:lle, poista MS-GC-liitoksen tulppa.
7. Kiinnitä kolonnin pää MS-GC-liitokseen. Sulje uuni. MS-liitoksessa käytetään Vespel-ferrulia. Ks. luku 8.5.
8. Klikkaa *Vacuum control*:a sivupalkissa ja klikkaa avautuvassa ikkunassa *Auto Startup*. Klikkaa *close*, kun vakuumi on valmis.
9. Valitse yläpalkista *Instrument* ja *system configuration*. Ks. system configuration:n käyttöön liittyvät ohjeet *Instruction Manualista* sivuilta 36 – 37. *System Configuration*:n asetusten tulee olla kuvan 4 mukaiset.
  - a. Valitse *GC-2010* ja klikkaa *properties*. Aseta avautuvassa ikkunassa *Analytical line* -lukumäärä yhteen. Palaa *system configuration*:iin ja klikkaa *Set*.



**Kuva 4.** System Configuration asetukset MS-detektoria käytettäessä ilman switching unit:a.



10. Valitse yläpalkista *Tools* ja *Ecology Settings* (ikkuna avautuu). Vaihda ECO-tilan method:ksi ECO kansioista GCMSSolution > Data >GCMS Determination of Lactide. Älä kuitenkaan ota ECO-tilaa käyttöön!
11. Vähintään 10 min kuluttua Auto Startup:sta tee *Leakage Check*. Noudata ohjetta *Operation Guide*:ssa sivuilla 10 – 12. Jos *Leakage check* -vaatimukset täyttyivät, vuotoja ei ole.
12. Valitse yläpalkista *File* ja *Open Method File*. Avaa method-tiedosto *SIM L,L-lactide 1 solvent GCMS method* (GCMSSolution > Data >GCMS Determination of Lactide). Tai muu käyttämäsi method.
13. Valitse yläpalkista *Acquisition ja Download Initial Parameters*. Method:n olosuhteet latautuvat laitteeseen ja lämpötilat alkavat nousta.
14. Kun GC ja MS ovat *ready* statuksessa oikealla sivupalkissa, valitse vasemmasta sivupalkista *Data acquisition* ja *Sample Login*. Avautuvaan ikkunaan on annettava näytteelle ja tallennettavalle *data*-tiedostolle nimet (esim. kolonnin\_kiinnitys\_pvm) ja näytepullon paikaksi räkissä 0 (Vial # = 0 eli mitään ei injektoida). Klikkaa OK.
15. Valitse vasemmasta sivupalkista *Download*, jolloin laite ajaa *method*:n olosuhteet läpi ilman injektointia.
16. Kun ajo on suoritettu eli *ready*-status on saavutettu, laske MS-interface:n lämpötila alhaiseksi (esim. 70 °C) manuaalisesti oikean palkin *Detail*-valikosta. Odota kunnes lämpötila on laskenut.
17. Avaa uuni ja varmista avaimella, että MS-interface:n pään kolonnin liitos on kunnolla kiinni ja kiristä hieman (n. 10 - 20°). Sulje uuni.
18. Valitse jälleen yläpalkista *Acquisition ja Download Initial Parameters*. Odota, että mittausolosuhteet on saavutettu eli *ready*-status voimassa (MS-interface:n lämpötila nousee method:n arvoon). Älä kuitenkaan käynnistä uutta ajoa!
19. Tee jälleen *Leakage Check* kuten kohdassa 11.
20. Tee *Autotuning* väh. 4 h kuluttua (vakuumin käynnistyksestä) normaaliin tapaan. Ks. luku 9.2.

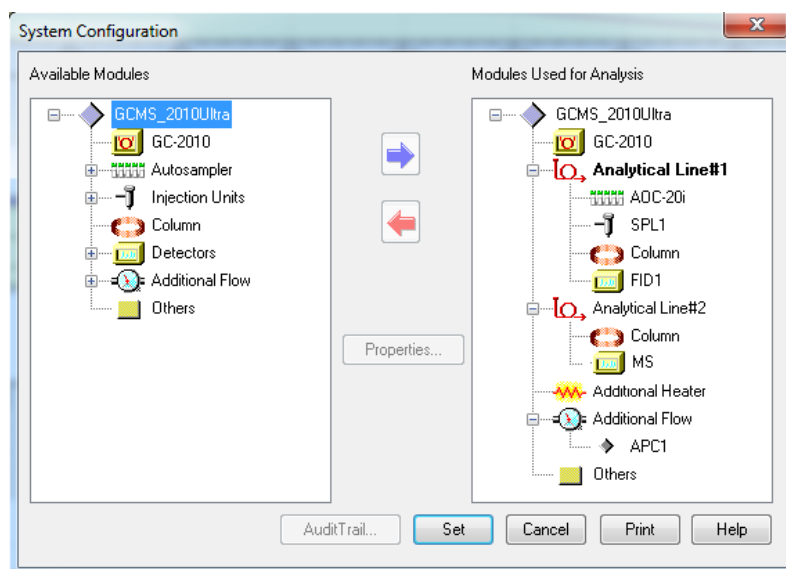
### 7.1.6 FID-detektorin käyttöönotto ilman switching unit:a

Seuraavaksi kuvataan puolestaan, miten FID-detektori otetaan käyttöön MS:n sijaan (ei sisällä FID:n liekkiä sytyttämistä), jos switchin unit:a ei haluta tai ei voida käyttää.

Oletuksena, että laite on ECO-tilassa edeltävän käytön jäljiltä.

1. Poistu ECO-tilasta. Klikkaa *Cancel Ecology Mode* -ikkunassa. Laite palaa edellisen *Method*-tiedoston olosuhteisiin.
2. Valitse yläpalkista *File* ja *Close Method File*.
3. Valitse GCMS Real Time Analysis -ohjelman sivupalkista *Vacuum control*. Klikkaa *Auto Shutdown*. Tällöin vakuumi ajetaan alas ja lämpötilat laskevat. Klikkaa *Close*, kun toimenpiteen ilmoitetaan olevan valmis.
4. Varmista, että lämpötilat (uuni, injektorin, ionisaatiokammio, MS-interface) ovat laskeneet alas (vähintään n. 70 °C) ohjelman oikeasta sivupalkista tai sen *Detail*-valikosta.
5. Avaa uuni ja irrota kolonnin pää MS-detektorilta tai switching unit:lta.

- a. Jos kolonni oli kiinnitetty switching unit:iin, irrota deaktivoitu kapillaari GC-MS-liitoksesta ja kiinnitä tulppa tilalle tiukasti avaimella kiristäen. Irrota toinen deaktivoitu kapillaari FID:stä.
  - b. Jos kolonni oli kiinnitetty suoraan MS:lle, kiinnitä MS-GC-liitoksen tulppa tiukasti paikoilleen avaimella kiristäen.
6. Kiinnitä kolonnin pää FID-detektorille. Sulje uuni. FID-liitoksessa käytetään grafiittiferrulia. Ks. luku 8.5 kolonnin kiinnittämiseen.
7. Valitse yläpalkista *Instrument* ja *system configuration*. Ks. system configuration:n käyttöön liittyvät ohjeet *Instruction Manualista* sivuilta 36 – 37. *System Configuration*:n asetuksien tulee olla kuvan 5 mukaiset.
    - a. Vaihda *Analytical line#1*:lle detektoriksi FID (poista MS). Huom. FID:n tulee olla samalla *Analytical line*:lla kuin näytteensyöttäjän ja injektorin.
    - b. *Analytical line* -lukumäärän tulee olla 2. (Valitse *GC-2010 > Properties*)
    - c. Lisää *Analytical line#2*:lle kolonni ja MS, kuten kuvassa 4. Huom. MS:n on oltava toisella linjoista vaikka vain FID:ä käytettäisiin.
8. Paina system configuration –ikkunassa *Set* ja poistu.



**Kuva 5.** System Configuration asetukset FID-detektoria käytettäessä ilman switching unit:a.

9. Valitse yläpalkista *Tools* ja *Ecology Settings* (ikkuna avautuu). Vaihda ECO-tilan method:ksi *GC-FID ECO method* kansioista *GCMSSolution > Data >GC-FID Determination of Lactide*. Valitse *Ecology Settings* –ikkunasta *Instrument Control Line 1*. Ikkuna avautuu. Tarkista, että FID:lle on valittuna seuraavat asetukset: *Detector OFF*, *Flame OFF*, *Makeup Flow OFF*, *H2 Flow OFF*, *Air Flow OFF* (eli FID, liekki ja kaasuvirtaukset sammutetaan ECO-tilassa).
10. Klikkaa *Vacuum control*:a sivupalkissa ja klikkaa avautuvassa ikkunassa *Auto Startup*. Klikkaa *close*, kun vakuumi on valmis.
11. Valitse yläpalkista *File* ja *Open Method File*. Avaa method-tiedosto *GCFID method* tai muu käyttämäsi method (*GCMSSolution > Data >GC-FID Determination of Lactide*).
12. Valitse yläpalkista *Acquisition* ja *Download Initial Parameters*. Odota, että mittausolosuhteet on saavutettu.

### 7.1.7 Näytepullojen asettelu näytteensyöttäjässä

**Näytteensyöttäjän räkki:** Näytteensyöttäjän räkkiin mahtuu kaksi 6-paikkaista telinettä pienille (1,5 mL) näytepulloille ja kolme 2-paikkaista telinettä isoille (4 mL) näytepulloille. Oikein asetettuina räkin toiseen pätyyn, josta puuttuu osa pohjasta, jää tyhjä paikka ruiskun liikettä varten. Toisessa päädyssä yksi pieni näytepullopaikka ylittää räkin kiskon päädyn (paikka ei ole hyödynnettävissä). Kolme 2-paikkaista telinettä sijaitsevat ruiskun päästä nähden ensimmäisinä peräkkäin, jonka jälkeen kaksi isompaa telinettä. Ks. kuva 6.

**Irrutus ja kiinnitys:** Irrotetaan vetämällä vasemmalle (edestä katsottuna) ja kiinnitetään työntämällä päinvastaisesti oikealle niin, että hammasratas pyörii hieman räkin kiskon vaikutuksesta. Näytteensyöttäjän kisko kulkee räkin kyljessä olevassa urassa. Kiinnityksen jälkeen paina näytteensyöttäjän etupaneelista *Reset*-nappia, jolloin räkki ja ruisku siirtyvät lepoasemaan.

**Pesupullot I. liuotinpullot:** Mahdollisuus käyttää joko kolmea tai yhtä liuotinpulloa ruiskun pesuun injektointien välissä. Kolmen pesupullon käyttö on suositeltavaa. Pesupullojen määrä valitaan *method*:iin. Kutakin pesupulloa kohti on oltava oma tyhjä jättepullo samassa 2-paikkaisessa telineessä pesupullon jälkeen.

**Liuottimet:** Pesupullojen liuottimina tulee käyttää MS- tai GC-laatuisia liuottimia (analyysilaadut). Liuottimina tulisi käyttää näytteenkäsittelyssä käytettyjä liuottimia. Käytettävät liuottimet: (ks. kuva 6)

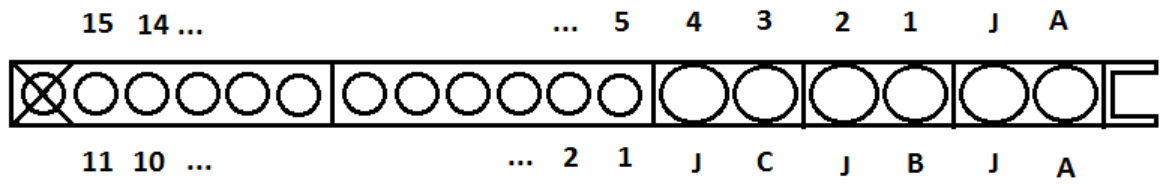
- kun käytössä 1 pesupullo (ja siis 1 jättepullo):
  - liuotin A = asetoni tai dikloorimetaani
- kun käytössä 3 pesupulloa (ja 3 jättepulloa):
  - liuotin A = dikloorimetaani
  - liuotin B = asetoni
  - liuotin C = sykloheksaani.

**Näytepullopaikkojen lukumäärä:** Käytettäessä vain yhtä liuotin- ja jättepulloa lopuissa neljässä 2-paikkaisten telineiden paikoissa voi käyttää näyte- tai standardiliuoksia isoissa näytepulloissa. Siten näytepullopaikkojen lukumäärä:

- kun käytössä 1 pesupullo (ja siis 1 jättepullo):
  - vapaita paikkoja näyte- ja standardiliuoksille on:  $2 \cdot 6 - 1$  (räkin ulkopuolella) +  $2 \cdot 2 = 15$  kpl.
- kun käytössä 3 pesupulloa (ja 3 jättepulloa)
  - vapaita paikkoja näyte- ja standardiliuoksille on:  $2 \cdot 6 - 1$  (räkin ulkopuolella) = 11 kpl.

**Pullojen asettelu ja numerointi:** Näyte-, jäte- ja pesupullojen asettelujärjestys riippuu käytettävien pesupullojen määrästä (3 tai 1). Pullojen numerointi alkaa ensimmäisestä näytepullosta eli räkissä oikealta ja jatkuen vasemmalle. Pesu- ja jättepulloja ei siis huomioida automaattisen näytteenoton numerointiin. Kuvassa 6 on esitetty kaaviokuva räkistä ylhäältäpäin. Kuvassa näkyy pullojen oikea numerointi ja siinä A, B ja C ovat pesupulloja ja J:t ovat jättepulloja.

## a) 1 pesupullo:



## b) 3 pesupulloa:

**Kuva 6.** Kuvassa on esitetty näyte-, pesu- ja jätepullojen asettelu räkkiin ja niiden numerointi a) yhdellä pesupullolla ja b) kolmella pesupullolla. Räkki on kuvattu ylhäältäpäin. Räkin oikeasta päädystä puuttuu pohja ruiskun liikettä varten. Vasemman päädyn paikka ei ole käytettävissä.

## 7.2 **Method:**ien mittausparametrit switching unit:a käytettäessä

Switching unit:a käytettäessä *method:t* sisältävät mittausparametrit sekä MS:lle (analytical line 1) että FID:lle (analytical line 2). *Method:n* eri detektorien mittausparametrit saa näkyviin *Data Acquisition* –valikossa välilehtien 1 ja 2 valinnan avulla (ks. kuva 7).

### 7.2.1 Mittausparametrit GCMS-menetelmässä käytettäessä switching unit:a

MS-detektoria käytettäessä eli GCMS-menetelmässä mittausparametrien arvojen tulee olla kuten kuvassa 7. Kuvan kohdissa a), b) ja c) on MS:n mittausparametrit (analytical line 1) ja kohdassa d) FID:n (analytical line 2). Kyseiset parametrien arvot ovat *method:sta* "MS\_SIM method SwitchingUnit 3 solvent" (C:\GCMSsolution\Data\GCMS-FID\_Switching\_Unit).

#### Lisäyksiä kuvan 7 parametreihin liittyen:

##### Sampler (line 1): (kuvan a-kohta)

- Joko yhden tai kolmen pesupullon (ja jätepullon) käyttö valitaan kohdasta *Advanced*. Käytä kolmea, jos paikat riittävät näytteille (ks. luku 7.1.7). Edellä mainitussa *method:ssa* vakiona kolmen pesupullon käyttö.

##### GC (line 1): (kuvan b-kohta)

- Uunin alkulämpötila 50 °C (täytyy olla alhainen analytyttien pidättymiseksi splitless-jakson ajaksi kolonnin alkuosaan).
- Lämpötilaohjelma 15 °C/min on sopiva laktidin erottumiseen (testattu PLDLA 96/4). Analyysin nopeuttamiseksi 50 °C/min välillä 200 – 320 °C (analytytit eluoituneet jo).
- Injektiotapana splitless 1 minuutin ajalla (lähes 100 % laktidista ja ISTD:stä ehtii haihtumaan, testattu PLDLA 96/4)
- Injektorin lämpötila 200 °C (alhainen, jotta laktidin muodostuminen termisen hajoamisen kautta minimoidaan)
- Kantajakaasun virtauksen kontrollointi vakioapaineen 250 kPa avulla, koska käytetään switching unit:a (huom. ohjelma laskee virtausnopeudet paineen arvosta automaattisesti, mutta ohjelma ei osaa huomioida switching unit:n vaikutusta, joten lukemat eivät pidä paikkaansa!)
- *Purge flow* 3 mL/min septumin huuhteluun
- *Split ratio* -1.0 (käytettäessä vakioapainetta)
- *GC Program* täytä kuten kuvassa 2 (b-kohta).

##### MS (line 1): (kuvan c-kohta)

- Ionisaatiokammion lämpötila 200 °C (tyypillinen arvo)
- *Interface:n* lämpötila 280 °C (tulee olla vähän pienempi kuin lämpötilaohjelman loppulämpötila)
- *Detector Voltage* 0,2 kV lisättynä tuning-tulokseen
- *Solvent Cut Time* 4.3 min (jotta alun suuri liuotinpiikki ei ylikuormita detektoria, mikä on haitallista)
- Mittaustapana SIM aikavälillä 4,4 – 18,4 min. Mitattavat ionit (m/z):
  - 56, 45, 43 (laktidin kvantitointi-, ja tunnisteionit)
  - 124, 69, 43 (sisästandardin kvantitointi-, ja tunnisteionit)
- Yksittäisen SIM-mittauksen aikaikkuna 0,20 s (riittävän pieni, jotta kromatogrammin piikeissä tarpeeksi mittauspisteitä ja riittävän suuri herkkyyttä varten)

##### FID (line 2): (kuvan d-kohta)

- FID:n lämpötila 320 °C (tyypillinen arvo)
- Make-up kaasu (detektorikaasu) = He = 0 ml/min (FID:ä ei käytetä)
- H<sub>2</sub> kaasu = 0 ml/min (FID:ä ei käytetä)
- Synt. ilma = 0 ml/min (FID:ä ei käytetä)
- Auto Flame On – Ei valittuna! (FID:ä ei käytetä)
- Reignite – Ei valittuna! (FID:ä ei käytetä)

Select Line  Line1  Line2

Sampler  GC  MS

AOC-20

# of Rinses with Solvent (Pre-run) :  a)

# of Rinses with Solvent (Post-run) :

# of Rinses with Sample :

Plunger Speed(Suction) :  High  Middle  Low

Viscosity Comp. Time :  sec

Plunger Speed(Injection) :  High  Middle  Low

Syringe Insertion Speed :  High  Low

Injection Mode :

Advanced...

Select Line  Line1  Line2

Sampler  GC  MS

Inj. Port : SPL1 Inj. Heat Port : INJ1 b)

Column Oven Temp. :  °C

Injection Temp. :  °C

Injection Mode :

Sampling Time :  min

Carrier Gas : He Prim. Press. : 500-900

Flow Control Mode :

Pressure :  kPa

Total Flow :  mL/min

Column Flow :  mL/min

Linear Velocity :  cm/sec

Purge Flow :  mL/min

Split Ratio :

Detail of Injection Port...

High Press. Injection Carrier Gas Saver

Splitter Hold Fan

GC Program...

Program :

	Rate	Final Temperature	Hold Time
0	-	50.0	1.00
1	15.00	200.0	0.00
2	50.00	320.0	5.00
3	0.00	0.0	0.00

Total Program Time : 18.40 min

Column Name ZB-50 Thickness : 0.25 um

Length : 30.0 m Diameter : 0.25 mm Set...

Ready Check... Add. Flow...

Select Line  Line1  Line2

Sampler  GC  MS

GCMS-QP2010 c)

Ion Source Temp. :  °C

Interface Temp. :  °C

Solvent Cut Time :  min

Micro Scan Width :  u

Detector Voltage :  Relative to the Tuning Result  Absolute

Threshold :  kV

Use MS Program : Set...

GC Program Time : 18.40 min

Group#1 - Event#1

	Start Time (min)	End Time (min)	Acq. Mode	Event Time(sec)	Scan Speed	Start m/z	End m/z	Ch1 m/z	Ch2 m/z	Ch3 m/z	Ch4 m/z	Ch5 m/z	Ch6 m/z
1	4.40	18.10	SIM	0.20				124.00	56.00	43.00	45.00	69.00	0.00
2	0.00	0.00	Scan	0.00	0	0.00	0.00						

Select Line  Line1  Line2

Sampler  GC  MS  FID1 d)

Temperature :  °C

Makeup Gas : He

Makeup Flow :  mL/min

H<sub>2</sub> Flow :  mL/min

Air Flow :  mL/min

Program :

	Rate	Final Flow	Hold Time
0	-	0.0	0.00
1	0.00	0.0	0.00
2	0.00	0.0	0.00
3	0.00	0.0	0.00

Total Program Time : 0.00 min

Signal Acquire

Sampling Rate :  msec

Stop Time :  min

Subtract Detector :

Delay Time :  min

Auto  Auto Flame On  Reignite

**Kuva 7.** GCMS-menetelmän mittausparametrien arvot, kun switching unit on käytössä. Method = "MS\_SIM method SwitchingUnit 3 solvent" (C:\GCMSsolution\Data\GCMS-FID\_Switching\_Unit).

## 7.2.2 Mittausparametrit GCFID-menetelmässä käytettäessä switching unit:a

FID-detektoria käytettäessä eli GCFID-menetelmässä mittausparametrien arvojen tulee olla kuten kuvassa 8. Kuvan kohdassa a) on MS:n mittausparametrit (analytical line 1) ja kohdassa b) ja c) FID:n (analytical line 2). Kyseiset parametrien arvot ovat *method*:sta "FID method SwitchingUnit 3\_solvent" (C:\GCMSsolution\Data\GCMS-FID\_Switching\_Unit).

### Lisäyksiä kuvan 8 parametreihin liittyen:

#### Sampler (line 1):

- Kuten GCMS-menetelmässä. ks. luku 7.2.1 (kuva 7 a-kohta).

#### GC (line 1):

- Muuten kuten GCMS-menetelmässä ks. luku 7.2.1 (kuva 7 b-kohta),
- paitsi GC Program = kuten kuvan 2 a-kohta. (virtaus FID:lle)

#### MS (line 1): (kuvan a-kohta)

- MS:lle ei kulje kaasuvirtausta, joten ei väliä mitä aikaväliä mitataan

#### GC (line 2): (kuvan b-kohta)

- Auto Zero after Ready – valittuna! (nollaa FID:n detektorisignaalin ennen uutta mittausta, jolloin kromatogrammin baseline siirtyy mittauksen alussa nollan tasolle)

#### FID (line 2): (kuvan c-kohta)

- FID:n lämpötila 320 °C (tyypillinen arvo)
- Make-up kaasu (detektorikaasu) = He = 5 ml/min (switching unit:a käytettäessä matalampi)
- H<sub>2</sub> kaasu = 40 ml/min (tyypillinen arvo)
- Synt. ilma = 400 ml/min (tyypillinen arvo)
- Auto Flame On – Valittuna!
- Sampling rate 120 ms (oletusarvo 40 ms, joka käy myös)
- Stop time = 18.30 min (mittauksen lopetusaika, hieman ennen ajon kokonaisajan päättymistä)

Select Line  Line1  Line2

**a)**

Sampler GC MS

GCMS-QP2010

Ion Source Temp.: 200 °C

Interface Temp.: 280 °C Detector Voltage:  Relative to the Tuning Result  Absolute

Solvent Cut Time: 4.3 min 0.2 kV

Micro Scan Width: 0 u Threshold: 0

Use MS Program: Set... GC Program Time: 18.40 min

Group#1 - Event#1

	Start Time (min)	End Time (min)	Acq. Mode	Event Time(sec)	Scan Speed	Start m/z	End m/z	Ch1 m/z	Ch2 m/z
1	4.40	18.10	Scan	0.20	2500	40.00	500.00		
2	0.00	0.00	Scan	0.00	0	0.00	0.00		

---

Select Line  Line1  Line2

**b)**

GC FID1

Inj. Port: Inj. Heat Port:

Column Oven Temp.: 50.0 °C °C

Injection Temp.: 25.0 °C

Injection Mode:

Sampling Time: 1.00 min

Carrier Gas

Flow Control Mode:

Pressure: 0.0 kPa

Total Flow: 0.0 mL/min

Column Flow: 0.00 mL/min

Linear Velocity: 0.0 cm/sec

Purge Flow: 0.0 mL/min

Split Ratio: 0.0

Program: Column Oven Temperature

	Rate	Final Temperature	Hold Time
0	-	50.0	1.00
1	15.00	200.0	0.00
2	50.00	320.0	5.00
3	0.00	0.0	0.00

Total Program Time: 18.40 min

Column

Name ZB-50-II Thickness: 0.25 um

Length: 30.0 m Diameter: 0.25 mm Set...

Ready Check... Add. Flow...

Auto Zero after Ready

GC Program...

High Press. Injection Carrier Gas Saver

Splitter Hold Fan

---

Select Line  Line1  Line2

**c)**

GC FID1

Temperature: 320.0 °C

Makeup Gas: He

Makeup Flow: 5.0 mL/min

H2 Flow: 40.0 mL/min

Air Flow: 400.0 mL/min

Program: Makeup Flow

	Rate	Final Flow	Hold Time
0	-	5.0	0.00
1	0.00	0.0	0.00
2	0.00	0.0	0.00
3	0.00	0.0	0.00

Total Program Time: 0.00 min

Signal Acquire

Sampling Rate: 120 msec

Stop Time: 18.30 min

Subtract Detector: None

Delay Time: 0.00 min

Auto

Auto Flame On

Reignite

Kuva 8. GCFID-menetelmän mittausparametrit käytettäessä switching unit:a.



## 7.3 *Method*:ien mittausparametrit ilman switching unit:a

### 7.3.1 Mittausparametrit GCMS-menetelmässä ilman switching unit:a

Kun switching unit:a ei käytetä, GCMS-menetelmän mittausparametrit *method*:ssa ovat kuvan 9 mukaiset. Tällöin *system configuration*:iin on valittu vain 1 analytical line (MS). Parametrit ovat *method*:sta "SIM L,L-lactide 1 solvent GCMS method" (GCMSSolution > Data >GCMS Determination of Lactide).

Lisäksiä kuvan 9 parametreihin liittyen:

#### **Sampler:** (kuvan a-kohta)

- Kuten luvuissa 7.2.1 ja 7.2.2 ks. kuva 7.

#### **GC:** (kuvan b-kohta)

Kuten luvussa 7.2.1 ks. kuva 7, paitsi:

- GC Program:ssa ei EVENT:jä (switching unit ei käytössä)
- Kantajakaasun virtaus vakio lineaarisella nopeudella 35 cm/sec (paineet ja virtausnopeudet lasketaan tästä automaattisesti)
- *Purge flow* 6 mL/min septumin huuhteluun (suositeltu MS:käytettäessä)
- *Split ratio* 50:1 splitless-jakson jälkeen (korkea aluksi analyttien poistamiseksi linerista)
- *Detail of Injection Port* –kohdasta valittuna lisäksi:
  - *High Pressure Injection* 100 kPa paineella (splitless-jakson aikana korkeampi paine parantaa piikkien muotoa)
  - *Carrier Gas Saver* valittu 2 – 2,5 min jälkeen (säästää kantajakaasua mittausten aikana)

#### **MS:** (kuvan c-kohta)

Kuten luvussa 7.2.1 ks. kuva 7, paitsi:

- *Interface*:n lämpötila 280 °C (tulee olla vähän pienempi kuin lämpötilaohjelman loppulämpötila) (kuvassa oleva 310 °C käy myös)
- *Solvent Cut Time* 3 min (jotta alun suuri liuotinpiikki ei ylikuormita detektoria, mikä on haitallista)

**a)**

AOC-20

# of Rinses with Solvent (Pre-run): 8

# of Rinses with Solvent (Post-run): 9

# of Rinses with Sample: 3

Plunger Speed(Suction):  High  Middle  Low

Viscosity Comp. Time: 0.2 sec

Plunger Speed(Injection):  High  Middle  Low

Syringe Insertion Speed:  High  Low

Injection Mode: 0: Normal

Advanced...

**b)**

Inj. Port: SPL1 Inj. Heat Port: INJ1

Column Oven Temp.: 50.0 °C

Injection Temp.: 200.0 °C

Injection Mode: Splitless

Sampling Time: 1.00 min

Carrier Gas: He Prim. Press.: 500-900

Flow Control Mode: Linear Velocity

Pressure: 48.0 kPa

Total Flow: 53.5 mL/min

Column Flow: 0.93 mL/min

Linear Velocity: 35.0 cm/sec

Purge Flow: 6.0 mL/min

Split Ratio: 50.0

Program: Column Oven Temperature

	Rate	Final Temperature	Hold Time
0	-	50.0	1.00
1	15.00	200.0	0.00
2	50.00	320.0	5.00
3	0.00	0.0	0.00

Total Program Time: 18.40 min

Column Name: ZB-50 Thickness: 0.25 um Length: 30.0 m Diameter: 0.25 mm

Ready Check... Add. Flow...

GC Program...

**c)**

GCMSS-QP2010

Ion Source Temp.: 200 °C

Interface Temp.: 310 °C

Solvent Cut Time: 3 min

Micro Scan Width: 0 u

Detector Voltage:  Relative to the Tuning Result  Absolute

Threshold: 0

Use MS Program:  Set...

GC Program Time: 18.40 min

Group#1 - Event#1	Start Time (min)	End Time (min)	Acq. Mode	Event Time(sec)	Scan Speed	Start m/z	End m/z	Ch1 m/z	Ch2 m/z	Ch3 m/z	Ch4 m/z	Ch5 m/z
1	3.20	18.20	SIM	0.20				124.00	69.00	56.00	45.00	43.00
2	0.00	0.00	Scan	0.00	0	0.00	0.00					

**Kuva 9.** Method:n (SIM L,L-lactide 1 solvent GCMS method (GCMSSolution > Data >GCMS Determination of Lactide) mittauseroavien arvot GCMS-menetelmässä. a) Näytteensyöttäjän, b) GC:n ja c) MS:n parametrit.

### 7.3.2 Mittausparametrit GCFID-menetelmässä ilman switching unit:a

Käytettäessä FID:ä ilman switching unit:a *method* sisältää myös MS:n parametrit, koska MS:n on oltava *system configuration*:ssa *Analytical Line#2*:ssa. Analytical line 1 sisältää siis FID:n parametrit ja analytical line 2 MS:n.

Esimerkki parametreistä löytyy *method*:sta *GCFID method* (GCMSSolution > Data >GC-FID Determination of Lactide).

Parametrien arvot:

#### Sampler:

- Kuten luvussa 7.2.1, ks. kuva 7.

#### GC:

Kuten kuvan 9 b-kohdassa, paitsi:

- High Pressure Injection* ei käytössä (injektorin paine on jo valmiiksi suuri)
- Purge Flow* voi olla 3 mL/min
- Auto Zero at Ready* valittuna (nollaa detektorin vasteen automaattisesti mittausten välillä, kun laite saavuttaa *Ready*-tilan seuraavaa mittausta varten).

#### MS:

Kuten kuvassa 9, paitsi:

- Start Time* 3,20 min ja *End Time* 3,5 min (koska MS:lle ei eluoidu mitään, oltava kuitenkin päällä)

#### FID:

Kuten kuvassa 8, paitsi:

- Kaasut:
  - Make-up 30 mL/min (detektorikaasu, He)
  - H<sub>2</sub> 40 mL/min
  - Air 400 mL/min

## 7.4 Laitteen käyttöohje laktidipitoisuuden määrittämiseen GCMS-menetelmällä

Seuraavissa ohjeissa on otettu huomioon sekä käyttö *switching unit*:n avulla että käyttö ilman *switching unit*:a.

Huom. ohjelmaan ja laitteeseen ladattava *method* eroaa sen mukaan käytetäänkö *switching unit*:a vai ei.

Huom. oletuksena on, että laite on ECO-tilassa edellisen käytön jäljiltä.

### 7.4.1 Alkuvalmistelut, GCMS

1. **Poistu ECO-tilasta.** Klikkaa *Cancel Ecology Mode* -ikkunassa. Laite palaa edellisen ajatun *Method*-tiedoston olosuhteisiin.
2. **Avaa haluttu *method*.** Valitse *File* ja *Open Method*. Avaa *method*-tiedosto:
  - i. **Käyttö *switching unit*:lla:** "MS\_SIM method SwitchingUnit 3 solvent" (C:\GCSSolution\Data\GCMS-FID\_Switching\_Unit). *Method*:n parametrien arvot on esitetty luvussa 7.2.1.
  - ii. **Käyttö ilman *switching unit*:a:** "SIM L,L-lactide 1 solvent GCMS method" (GCSSolution > Data > GCMS Determination of Lactide). *Method*:n parametrien arvot on esitetty luvussa 7.3.1.
3. **Valitse yhden tai kolmen pesupullon käyttö.** Valitse vasemmasta palkista *Data Acquisition*. Avaa *Sampler*-välilehdeltä valikko *Advanced*. Pyri käyttämään kolmea liuotinpulloa. i) *Method*:ssa oletuksena kolmen käyttö, ii) *method*:ssa oletuksena 1.
4. **Lataa *method*:n olosuhteet laitteeseen.** Valitse yläpalkista *Acquisition ja Download Initial Parameters*. *Method*:n olosuhteet latautuvat laitteeseen ja lämpötilat alkavat nousta.
5. **Valmistele näytteensyöttäjä mittauksia varten.**
  - i. Irrota näytteensyöttäjän räkki vetämällä vasemmalle.
  - ii. Täytä 4 ml pesupullot  $\frac{3}{4}$  täyteen puhtaalla liuottimella (MS-laatu) ja aseta täytetyt pesupullot ja tyhjät jätöpullot paikoilleen räkkiin. Ks. ohjeet käytettävistä liuottimista ja pullojen paikoista luvusta 7.1.7.
  - iii. Aseta näyte- ja standardiliuosten näytepullot paikoilleen haluttuun järjestykseen. Ks. luku 7.1.7.
  - iv. Työnnä räkki paikoilleen ja paina *Reset* näytteensyöttäjän etupaneelista.
6. **Odota, että laite on *Ready*-tilassa.** Kun *method*:n olosuhteet on saavutettu, oikean sivupalkin merkkivalot ovat vihreitä ja statuksena lukee *Ready*.
7. ***Switching unit*:a käytettäessä varmista manuaalisesti, että kaasuvirtaus menee MS:lle** (ks. Luku 7.1.4)
8. **Kolonnin conditioning- ja koeajot.** Ennen varsinaisia mittauksia on hyvä ajaa vähintään yksi ns. *conditioning*-ajo *method*:lla, joka voi olla sama kuin mittauksissakin. Valitse vasemman sivupalkin *Data acquisition ja Sample Login*. Syötä avautuvaan ikkunaan näytteen nimi, tallennettavan *data*-tiedoston nimi ja näytepullon paikka räkissä. Mittauksessa tulisi käyttää puhdasta liuotinta näytteenä. Käyttämällä näytepullon paikkana 0 mittauksessa ei injektoida mitään. Tarkasta löytyykö mitatuista kromatogrammista häiritseviä piikkejä laktidin ja sisästandardin retentioajoilta (n. 8,9 min ja 9,5 min). Häiritsevät piikit johtuvat todennäköisesti linerin tai ruiskun epäpuhtauksista. Jos epäpuhtaudet eivät katoa uusillakaan koeajoilla, vaihda lineri ja puhdista ruisku lukujen 8.1 ja 8.3 mukaisesti ja toista kohta 7.

## 7.4.2 Mittaaminen, GCMS

### 9. Mittauksiin käytettävän *method*:n luominen.

- i. Valitse yläpalkista *Method* ja *Quantitative Parameters*. Valitse avautuvasta ikkunasta välilehti *Compound Table*.
- ii. Kirjoita ensimmäiselle riville (laktidi) standardiliuosten laktidin massakonsentraatiot (ajettava liuos) sarakkeisiin *Conc 1*, *Conc 2* ja *Conc 3* (pienimmästä suurimpaan) yksiköissä µg/ml. Laske massakonsentraatiot yhtälöllä 5.1. Toiselle riville (sisästandardi, ISTD) kirjoita vastaaviin sarakkeisiin massakonsentraatioksi 1 (sallittua, jos samaa sisästandardiliuosta käytetty kaikkiin standardeihin ja näytteisiin). Paina *OK*.
- iii. Tallenna *Method* samaan kansioon kuin mihin tulet tallentamaan mittauksen *data*-tiedostot (esim. luo uusi kansio omalla nimellä). Valitse *File* ja *Save Method File As*. Käytä *method*-tiedoston nimessä päivämäärää, jotta voit yhdistää tietyt *data*-tiedostot tiettyyn *method*:iin.

10. **Project-folderin valinta.** Valitse yläpalkista *File* ja *Select Project(Folder)* ja hae sama kansio, johon tallensit mittauksissa käytettävän *method*:n kohdassa 8.

11. **Mittaussarjan luominen.** Valitse vasemmasta sivupalkista *Batch Processing*.

Täytä *batch*-taulukkoon tiedot tehtävistä mittauksista halutussa mittausjärjestyksessä kuvan 10 ja seuraavien ohjeiden mukaisesti:

Huom. taulukon järjestys vastaa mittausjärjestystä!

Huom. switching unit:a käytettäessä jokaista mittausta kohti on kaksi riviä (esi. 1-1 ja 1-2), jolloin ensimmäinen rivi vastaa MS-mittausta (line 1) ja toinen FID:ä (line 2).

**Vial#** = kirjoita näytepullon paikka näytteensyöttäjässä. Ks. luku 7.1.7.

**Sample Name** = anna näytteelle nimi.

**Sample Type** = Klikkaa. Valitse 1. mitattavalle standardille *Initialize Calibration Curve* ja lopuille *Add Calibration Level*. Näytteille valitse *Unknown*.

**Analysis Type** = Klikkaa. Valitse kaikille *Integrations for Quantitative* ja *Quantitative Calculation*.

**Method File** = Klikkaa. Hae haluttu *method*-tiedosto mittaukseen (kohdassa 8 tallennettu).

**Data File** = Klikkaa. Valitse sama kansio, johon *method* tallennettiin kohdassa 9, (ellei jo valmiina) ja anna *data*-tiedostolle nimi. Sisällytä päivämäärä nimeen.

Huom. Myös FID:n riveille on annettava *data*-tiedostot (anna eri tiedostonimet kuin MS:lle)

**Level#** = Valitse standardeille taso (1, 2 tai 3) niiden konsentraation mukaan (laimeimmalle 1 jne.). Muille näytteille 1.

**Inj. Volume** = Kaikkiin 1 (µl) (oletuksena valmiiksi).

**ISTD Amt** = Kaikkiin (Level 1 Conc.) (oletuksena valmiiksi).

**Tuning File** = Valitse viimeisin *tuning*-tiedosto tai jätä tyhjäksi (käyttää oletuksena viimeisintä).

**Data Description** = Käytettävissä vapaasti näytteen kuvaukseen (tunnistetiedot, näytteen massa yms.).

	Vial#	Sample Na	Sampl	Sample Type	Analysis Ty	Method File	Data File	Level#	Inj. Vol	ISTD Amt.	Report O	Report F	Tuning File	Data Desc
1	2	standardi 2		1:Standard (I)		Method.qgm	st2.qgd	2	1	(Level1 Co	<input type="checkbox"/>	Print		
2	1	standardi 1		1:Standard		Method.qgm	st1.qgd	1	1	(Level1 Co	<input type="checkbox"/>	Print		
3	3	standardi 3		1:Standard		Method.qgm	st3.qgd	3	1	(Level1 Co	<input type="checkbox"/>	Print		
4	4	Näyte 1		0:Unknown		Method.qgm	Näyte 1.qgd	1	1	(Level1 Co	<input type="checkbox"/>	Print		
5	5	Näyte 2		0:Unknown		Method.qgm	Näyte 2.qgd	1	1	(Level1 Co	<input type="checkbox"/>	Print		
6	6	Näyte 3		0:Unknown		Method.qgm	Näyte 3.qgd	1	1	(Level1 Co	<input type="checkbox"/>	Print		

**Kuva 10.** Esimerkki batch-taulukon täyttämisestä. Huom. ei sisällä toisia (FID:n) rivejä, jotka näkyvät *switching unit*:a käytettäessä.

12. **Tallenna Batch-tiedosto.** Valitse yläpalkista *File* ja *Save Batch File As* ja tallenna batch-tiedosto samaan kansioon kuin edellä (kohdat 8 - 10). Tallennettua *batch*:a voi käyttää jatkossa pohjana.
13. **Käynnistä mittaussarjan mittaaminen.** Käynnistä mittaussarja valitsemalla vasemmasta sivupalkista *Start*. Ennen aloitusta ohjelma kysyy meneekö laite ECO-tilaan mittaussarjan jälkeen. Valitse kyllä, mikäli laitetta ei käytetä heti mittaussarjan päätyttyä.

### 7.4.3 Mittaustulosten käsittely, GCMS

Kappaleen 7.4.2 kohdan 8 *method*:n kvantitatiivisten parametrien muuttamisen ja batch-taulukon *Sample Type* ja *Analysis Type* -asetusten valitsemisen avulla ohjelma tekee suuren osan mittaustulosten (kromatogrammien) käsittelystä automaattisesti. Ohjelman pitäisi tunnistaa tutkittavat piikit (laktidi ja ISTD) *method*:n *compound table*:n retentioajan ja massaspektrin avulla, integroida ne, laskea kalibraatiosuora, verrata tuntemattomia näytteitä kalibraatiosuoraan ja ilmoittaa tuntemattomien näytteiden konsentraatio.

14. **Käynnistä ohjelma GCMS Postrun Analysis.**
15. **Valitse Project-folderi.** Valitse yläpalkista *File* ja *Select Project(Folder)* ja hae sama kansio, johon tallensit mittausten *data*-tiedostot.
16. **Tarkista kalibroitisuoran määrittäminen.** Valitse vasemman sivupalkin *Calibration Curve* ja klikkaa *Data Explorer* -valikosta mittauksissa käyttämäsi *method*:a. Kalibroitisuoran tulee olla järkevä. Tarkista myös, että alhaalla keskellä on valittuna oikeat *data*-tiedostot kullekin kalibroitisuoran konsentraatitasolle. Vaihda tai lisää oikeat *data*:t tarvittaessa ja tallenna *method*. Valitut *data*:t pitää olla integroituna, jos eivät ole valitse vasemmasta sivupalkista *Peak Integration for All Data*.
17. **Valitse vasemmasta sivupalkista Quantitative.** *Data Explorer* -kentässä näkyy lista kaikista kansioon kuuluvista *data*-tiedostoista. Klikkaamalla *data*:a tulee ylhäälle näkyviin kyseisen *data*:n kromatogrammi, oikealle alhaalle *method*:n *compound table* ja vasemmalle alhaalle *method*:n kalibraatiosuora. Vasemmalla alhaalla näkyy lisäksi *compound table*:ssa valittuna olevan rivin (analyytin) tunnistettava piikki ja sen integrointiväli. Integrointiväli näkyy piikin alla punaisilla nuolilla (siirrettävissä) ja kyseiseksi analyytiksi massaspektrin avulla tunnistettu piikki on merkitty sinisellä kolmiolla. *Compound table*:n välilehdeltä *Results* näkyy integroitujen piikkien pinta-alat.
18. **Tarkista tuntemattomien näytteiden mittaustulokset.** Avaa *Quantitative*:ssa vuorollaan jokainen mitattu *data*-tiedosto kohdan 16 mukaisesti ja tarkista seuraavat asiat:
  - i. Valitse *compound table*:sta alhaalta välilehti *Results*.
  - ii. Tarkista, että laktidi- ja sisästandardipiikit on tunnistettu ja integroitu järkevästi. (klikkaa *compound table*:n riviä saadaksesi kyseisen analyytin piikki näkyviin).

- iii. Jos *data*-tiedoston piikkejä ei ole integroitu, *Results*-välilehdellä ei ole *compound table*:n rivejä ja integroituja pinta-aloja ja piikeissä ei näy integrointiväliä ja kolmiota piikin kohdalla. Valitse tällöin vasemmasta sivupalkista *Peak Integration* ja tallenna *data*.
  - iv. Tarkista, että kalibrointisuora on sama kaikissa ja se vastaa kohdassa 15. tarkistettua suoraa.
19. Mikäli kohdissa 15 - 17 mainitut tarkistukset ovat kunnossa ja manuaalisia integrointeja ei ole tarvinnut tehdä, on automaattinen datankäsittely toiminut oikein.
20. **Ota ylös laktidin massakonsentraatio ( $\mu\text{g/ml}$ )** *compound table*:n *Results*-välilehden sarakkeesta *Conc* jokaisen tuntemattoman näytteen *data*-tiedostosta. Koska kalibrointisuorassa on käytetty sisästandardin massakonsentraationa arvoa 1, on ilmoitettu arvo suoraan laktidin massakonsentraatio mitattavassa liuoksessa.
21. **Laske polymeerinäytteen laktidipitoisuus (m-%) yhtälön 5.2 avulla.**

## 7.5 Laitteen käyttöohje laktidipitoisuuden määrittämiseen GC-FID-menetelmällä

Seuraavissa ohjeissa on otettu huomioon sekä käyttö switching unit:n avulla että käyttö ilman switching unit:a.

Huom. ohjelmaan ja laitteeseen ladattava *method* eroaa sen mukaan käytetäänkö switching unit:a vai ei.

Huom. oletuksena on, että laite on ECO-tilassa edellisen käytön jäljiltä.

### 7.5.1 Alkuvalmistelut, GC-FID

1. **Poistu ECO-tilasta.** Klikkaa *Cancel Ecology Mode* -ikkunassa. Laite palaa edellisen ajatun *Method*-tiedoston olosuhteisiin.
2. **Avaa haluttu *method*.** Valitse *File* ja *Open Method*. Avaa *method*-tiedosto:
  - i. **Käyttö switching unit:lla:** "FID method SwitchingUnit 3\_solvent" (C:\GCMSsolution\Data\GCMS-FID\_Switching\_Unit). *Method*:n parametrien arvot on esitetty luvussa 7.2.2.
  - ii. **Käyttö ilman switching unit:a:** "*GCFID method*" (GCMSsolution > Data > GC-FID Determination of Lactide). *Method*:n parametrien arvot on esitetty luvussa 7.3.2.
3. **Valitse yhden tai kolmen pesupullon käyttö.** Valitse vasemmasta palkista *Data Acquisition*. Avaa *Sampler*-välilehdeltä valikko *Advanced*. Pyri käyttämään kolmea liuotinpulloa. i) *Method*:ssa oletuksena yhden käyttö, ii) *method*:ssa oletuksena 1.
4. **Lataa *method*:n olosuhteet laitteeseen.** Valitse yläpalkista *Acquisition ja Download Initial Parameters*. *Method*:n olosuhteet latautuvat laitteeseen ja lämpötilat alkavat nousta.
5. **Näytepullojen asettelu** kuten GCMS-menetelmässä (kohta 5)
6. **Switching unit:a käytettäessä varmista manuaalisesti, että kaasuvirtaus menee MS:lle** (ks. Luku 7.1.4)
7. **Avaa synteettisen ilman kaasupullon pääventtiili.**
8. **Varmista, että vetygeneraattori on päällä ja toimintakunnossa** (tislattua vettä tarpeeksi, laite ei varoita mistään yms.). Paina kosketusnäytöltä *Start*.
9. **Odota, että laitteiston lämpötilat ovat nousseet *method*:n mukaisiksi.** Klikkaa oikean sivupalkin kohtaa *Detail* ja varmista, että FID:n, injektorin, kolonnin ja MS:n lämpötilat ovat nousseet *method*:n määräämälle tasolle.
10. **FID:n käyttöönotto mittauksiin.** Oikean sivupalkin *Detail*-valikosta klikkaa ensin FID-detektori päälle. Sen jälkeen klikkaa make-up-kaasun, ilman ja vedyn virtaukset päälle. Odota n. 30 s ja klikkaa FID:n liekki päälle (kuuluu poksahdus GC:n sisältä ja kaasuvirtaukset alkavat nousta). Varmista, että kaasuvirtaukset vakiintuvat *method*:n lukemiin (n. 1 min).
11. **FID:n signaalin nollaus.**
  - i. Odota noin 5 - 10 min, että FID-detektorin mittaama baseline vakiintuu. Tarkastele GC:n käyttöpaneelin avulla kohdasta *Monitor* tai *Det* (painamalla *Det* useaan kertaan voi vaihtaa seurantaa FID:n ja MS:n välillä). Tarkkaile detektorisignaalin hetkellistä lukemaa.
  - ii. Kun baseline on vakiintunut (pieni tasainen muutos sallittua), valitse *Zero Adjustment* (signaalin nollaus) joko ohjelmasta tai käyttöpaneelistä.



12. **Kolonnin conditioning- ja koeajot.** Kuten GCMS-ohjeen kohta 8. Huomaa, että *Sample Login*:ssa on syötettävä tiedot molemmille *Analytical Line*:lle. Nyt line 2 on tarkasteltavana (FID-mittaus).

### 7.5.2 Mittaaminen, GC-FID

13. **Mittaussarjan luominen.** Valitse vasemmasta sivupalkista *Batch Processing*. Täytä *batch*-taulukko kuten GCMS-menetelmän ohjeissa (luku 7.4.2, kohta 11) seuraavat lisäohjeet huomioiden.

Huomioitavaa:

FID:ä käytettäessä ohjelma ei voi käsitellä mittaustuloksia automaattisesti kuten MS-mittauksilla (kromatogrammin piikkien integrointi, kalibroitisuuden määrittäminen ja konsentraatioiden laskenta).

**Sample Type** = Kaikkiin *Unknown*.

**Analysis Type** = Oletusasetus tai tyhjä.

**Method File** = Klikkaa. Hae haluttu *method*-tiedosto mittaukseen (kohdassa 2 valittu).

**Data File** = Klikkaa. Anna *data*-tiedostolle nimi ja sijainti (esim. luo uusi kansio nimelläsi). Sisällytä *data*-tiedoston nimeen päivämäärä. FID- ja MS-mittaukset tuottavat eri *data*-tiedostot eri tiedostopäätteillä.

**Level#** = Kaikille oletusasetus (1).

14. **Tallenna Batch-tiedosto.** Valitse yläpalkista *File* ja *Save Batch File As* ja tallenna *batch*-tiedosto samaan kansioon kuin edellä. Tallennettua *batch*:a voi käyttää jatkossa pohjana.
15. **Käynnistä mittaussarjan mittaaminen.** Käynnistä mittaussarja valitsemalla vasemmasta sivupalkista *Start*. Ennen aloitusta ohjelma kysyy meneekö laite ECO-tilaan mittaussarjan jälkeen. Valitse kyllä mikäli laitetta ei käytetä heti mittaussarjan päätyttyä.

### 7.5.3 Mittaustulosten käsittely, GC-FID

Tuntemattomien näytteiden laktidin massakonsentraatioiden määrittämiseksi on ensin määritettävä kalibroitisuus standardien mittausten perusteella. Sekä kalibroitisuuden määrittämiseen että näytteiden massakonsentraatioiden määrittämiseen on tunnistettava ja integroitava mitattujen kromatogrammien laktidi- ja sisästandardipiikit. Tunnistusta ja integrointia varten on tehtävä *method*-tiedosto, joka sisältää integroinnin ja *compound table*:n parametrien arvot.

16. **Avaa GCSolution-ohjelma.** Valitse avautuvasta ikkunasta *Postrun* (*Operation*-valikosta), *GC Postrun* -ohjelma käynnistyy.
17. **Valitse Project-folderi.** Valitse yläpalkista *File* ja *Select Project(Folder)* ja hae sama kansio, johon tallensit *data*:t.
18. **Valitse vasemmasta sivupalkista Data Analysis.** Klikkaa *Data Explorer* -kentästä auki jonkin mitatun standardin *data*-tiedosto. Oikealla näkyy kyseisen *data*:n mittaustiedot kolmessa kentässä: *Chromatogram* (yllä), *Results* (alla vasen) ja *Method* (alla oikea).

**Method:n luonti mittaustulosten käsittelyyn (kohdat 19 - 28):**

19. Valitse yläpalkista *File* ja *Save Method As* ja tallenna *method* samaan kansioon kuin mihin tallensit mittausten *data:t*. Nimeä *method* esim. FID kalibrointi pvm. *Method*:iin tullaan tallentamaan integrointi- ja compound table -parametrit ja kalibrointisuora tulosten käsittelyä varten.

- i. **Käytettäessä switching unit:a:** Valitse *Line2*, jos kysyy (FID on line2:llä system configuration:ssa).
- ii. **Käyttö ilman switching unit:a:** Valitse *Line1*, jos kysyy (FID on line1:llä system configuration:ssa).

20. **Integroinnin ja kalibrointisuoran parametrit.** Paina *Method*-kentässä *Edit*-painiketta (oikealla) ja tee seuraavat muutokset *Method*-kentässä:

- *Integration parameters* -välilehti:
  - muuta *slope* = 1500
- *Quantitative parameters*-välilehti:
  - *Kuvan 11 mukaisesti*.

**Kuva 11.** *Quantitative Parameters* -välilehden asetukset.

21. **Piikkien integrointi.** Paina *Method*-kentässä *View*-painiketta (oikealla). Ohjelma integroi kromatogrammin piikit asetettujen parametrien mukaisesti (näkyvät kromatogrammissa ja *Results*-kentässä)

22. Tallenna *method* (samaa tiedostoon) *Save Method As* -toiminnolla.

23. **Compound table:n luominen.**

- i. Valitse vasemmasta sivupalkista *Compound Table Wizard*. Klikkaa avautuvassa ikkunassa *Next*. Esiin tulevien integroinnin ja kalibrointisuoran parametrien tulee olla kuten edellä kohdassa 20.

- ii. Klikkaa *Next* ja valitse integroitujen piikkien listalta laktidi- (retentioaika n. 8,9 min) ja IS-piikit (retentioaika n. 9,5 min).
- iii. Klikkaa *Next* ja täytä avautuva *compound table* kuvan 12 mukaisesti siten, että laktidin rivin sarakkeisiin *Conc1*, *Conc2* ja *Conc3* tulee mitattujen standardiliuosten laktidin massakonsentraatiot yksikössä µg/ml. Laske massakonsentraatiot yhtälöllä 5.3.
- iv. Klikkaa *valmis* ja hyväksy tallennus käytettyyn *method*:iin.

ID#	Name	Type	Ret. Time	Conc.1	Conc.2	Conc.3	Band	ISTD Gr
1	Laktidi	Target	8.873	1.5	3.75	7.5	Default	1
2	IS	ISTD	9.470	1	1	1	Default	1
3		Target	0.001	1	1	1	Default	1

Kuva 12. *Compound table*:n täyttö.

- 24. Klikkaa **method**-kentässä jälleen **View**-painiketta. *Method*- ja *Results*-kentässä pitäisi näkyä nyt täytetty *compound table* (ks. välilehti). *Results*:n *compound table*:ssa näkyy laktidi- ja IS-piikin alat (*Area*) ja lasketut massakonsentraatiot (*Conc*) (konsentraatiot vielä nollassa, koska kalibroitisuoraa ei ole).
- 25. Tallenna **data**-tiedosto valitsemalla yläpalkista *Save Data File*.
- 26. Sulje **data**-tiedosto valitsemalla yläpalkista *Close Data File*.
- 27. Kalibroitisuuden luominen.
  - i. Valitse vasemmasta sivupalkista *Calibration Curve* ja avaa *Data Explorer*:sta kohdissa 19 - 26 luotu *method*. Alhaalla keskellä *data files* -kentässä näkyy mitä *data*-tiedostoja kyseisen *method*:n kalibroitisuorassa on käytetty kullakin tasolla.
  - ii. Vaihda *Data Explorer*:n välilehdeksi (alhaalta) *Data*. Vedä mitatut standardien *data*:t niitä vastaaville tasoille *data files* -kenttään. Klikkaa *Yes*, jos kysyy vaihdetaanko *data*:n parametrit vastaamaan *method*:n arvoja.
  - iii. Ylhäällä näkyy määritetty kalibroitisuus. Tarkista, että suora on järkevää.
- 28. Tallenna **method** ja **data**:t valitsemalla yläpalkista **Save Method (Data) File**. *Method*:a voidaan nyt käyttää tuntemattomien näytteiden konsentraatioiden määrittämiseen.

#### Näytteiden mittaustulosten analysointi luodulla **method**:lla (kohdat 29 - 34):

- 29. Avaa tuntemattoman näytteen **data**. Valitse vasemmasta sivupalkista *Data Analysis*. Klikkaa *Data Explorer* -kentästä auki jonkin mitatun tuntemattoman näytteen *data*-tiedosto.
- 30. Avaa luotu **method**. Valitse yläpalkista *Load Method* ja avaa edellä tallentamasi kalibroitisuuden sisältävä *method*. Ohjelma integroi piikit ja vertaa *compound table*:n piikkien alaa kalibroitisuoraan automaattisesti.
- 31. Tallenna **data**-tiedosto valitsemalla *File* ja *Save Data File*.
- 32. Ota ylös määritetty laktidin massakonsentraatio. Avaa *Results*-kentästä *compound*-välilehti. Näyteliuoksen laktidikonsentraation laskettu arvo (µg/ml) on luettavissa *Conc*-sarakkeesta ensimmäiseltä (laktidi) riviltä.
- 33. Laske polymeerinäytteen laktidipitoisuus (m-%) yhtälön 5.4 avulla.
- 34. Toista kohdat 29 - 33 jokaiselle tuntemattoman näytteen *data*:lle.

## 7.6 Toimenpiteet käytön jälkeen

Kun mittaussarja on mitattu loppuun asti ja mittauksia ei enää jatketa,

- aseta laite ECO-tilaan painamalla oikealta sivupalkista ECO-kuvaketta (batch:n jälkeen ECO-tila tulee automaattisesti käyttöön, jos niin on valittu batch:ä käynnistettäessä),
- sulje synteettisen ilman kaasupullon pääventtiili (jos FID:ä käytetty),
- poista näyte- ja liuotinpullot näytteensyöttäjästä ja tyhjennä niiden sisältö jätepulloon,
- sulje käynnissä olevat tulosten tarkasteluun käytetyt *GCMS tai GC Postrun* -ohjelmat (älä sulje *GCMS Real Time Analysis* -ohjelmaa).

## 8. Huolto

GCMS-laitteiston tärkeimmät käyttäjien itse tekemät huoltotoimenpiteet ovat: (yleisin ensin)

- septumin vaihto (n. 50 - 70 injektioinnin välein),
- linerin vaihto ja puhdistus (jos mahdollista vaihto joka mittausarjalle)
- ruiskun vaihto ja puhdistaminen (n. 50-100 ajon välein),
- kolonnin puhdistaminen (paahto ja katkaisu),
- vakuumpumpun öljynvaihto (n. 4000 - 5000 h välein),
- ja ionisaatiokammion vaihto (n. ½-1 vuoden välein) ja puhdistaminen.

Septumin ja linerin käyttökerrat edellisestä vaihdosta lähtien sekä vakuumpumpun käyttötunnit saa selville viemällä hiiren kursorin ohjelman oikeassa sivupalkissa olevien ikoneiden päälle. Tarkemmat tiedot löytyy valitsemalla sivupalkista *Detail*. *Detail*-valikosta voi myös vaihtaa kunkin tarvikkeen tai osan maksimi käyttölukumäärän tai –tunnit.

Ylläpitoon liittyvät tarkistukset voi tehdä *System Check* –toiminnolla, joka löytyy yläpalkista kohdasta *Instrument*. *System Check* tarkistaa kaikkien laitteistoon liittyvien esineiden käyttökerrat ja –tunnit ja kertoo ovatko ne *Detail*-valikossa annettujen spesifikaatioiden mukaiset. Ohjeet *System Check*:iin löytyvät *Instruction Manual*:n sivuilta 38 – 50.

Lisäksi vetygeneraattoriin liittyvät omat huoltotoimenpiteensä, joista tärkeimpänä tislattun veden vaihto n. 2-3 vko välein.

### 8.1 Septumin ja linerin vaihto

Injektorin kumiseptumi tulee vaihtaa n. 50 - 70 injektioinnin välein liiallisen septumipartikkelien irtoamisen takia. Linerin vaihtoon ei ole selvillä tarkkaa aikarajaa. Linerin ja sen sisältämän lasivillan likaantuminen on todennäköisesti yksi merkittävimmistä kromatogrammiin ja analyyttien kvantitointiin vaikuttavista tekijöistä. Lineri tulisi vaihtaa siis mahdollisimman usein.

Linereita on kahta tyyppiä: split- ja splitless-injektiota varten. Samat ohjeet vaihtoon pätevät molemmille linereille.

Septumin ja linerin vaihdon voi tehdä kahdella tavalla:

1. *Auto Shutdown*:in avulla (vaihdetaan, kun paine on tasaantunut ja lämpötilat ovat alle 70 °C),
2. *EasyStop*-ominaisuuden avulla (vakuumi säilytetään).

*Auto Shutdown*:n käyttö on suositeltavaa silloin, kun kolonni on yhdistetty suoraan FID:lle. *EasyStop* taas silloin, kun kolonni on yhdistetty MS:lle tai kun *switching unit* on käytössä.

Molemmissa tapauksissa itse septumin ja linerin vaihto tapahtuu samalla tavalla. Tarkat ohjeet löytyvät tietokoneen työpöydän kansioista TTY ja GCMS Real Time Analysis ohjelman yläpalkin Help ja Maintenance-valikosta.

Käytetty septumi hävitetään (roskiin). Lineri puhdistetaan luvun 8.2 ohjeiden mukaisesti.

Vaihdot on hyvä tehdä etukäteen esim. edellisenä päivänä ennen mittauksia ”haamu”-piikkien eli epäpuhtauksien poistamiseksi. Ennen varsinaisia mittauksia on syytä tehdä vähintään kaksi (mieluummin useampi) koeajoja esim. puhtaalla liuottimella, jotta selviää näkyykö kromatogrammilla epäpuhtauksia erityisesti tutkittavien analyyttien kohdalla. Yleensä ainakin ensimmäisessä ajossa näkyy paljon epäpuhtauksia (ei välttämättä analyyttien retentioajoilla).

### 8.1.1 Auto Shutdown:n avulla

*Auto Shutdown* eli laitteiston vakuumin ja lämmitysten poistaminen suoritetaan sivupalkin kohdasta *Vacuum Control*. Tällöin vakuumi poistuu ja laitteiston lämpötilat alkavat laskea. Kun *Auto Shutdown* on valmis ja injektorin ja kolonnin lämpötilat ovat laskeneet alle 70 °C:een, vaihdot voidaan tehdä normaaliin tapaan.

Koska vakuumin palautus mittauskuntoon kestää monta tuntia, tämä ei ole kätevä tapa pelkän septumin ja linerin vaihtoon käytettäessä MS-detektoria. Jos kolonni on yhdistetty suoraan FID:lle, vakuumin stabiloitumisella (MS mittauksen vaatimalle tasolle) ei ole väliä vaan FID-mittauksia voidaan tehdä heti *Auto Startup*:n valmistuttua.

### 8.1.2 EasyStop:n avulla

*EasyStop*:n avulla vakuumi pysyy ennallaan ja vain injektorin ja kolonnin lämpötilat lasketaan sekä kantajakaasun virtaus pysäytetään. Tämä on kätevin tapa pelkkien septumien ja linerien vaihtoon käytettäessä MS-detektoria tai *switching unit*:a.

*EasyStop*:n käyttö:

1. Valitse ohjelman oikean sivupalkin *Detail*.
2. Avautuvasta ikkunasta klikkaa alhaalta *EasyStop*-ikonia. Tällöin laitteiston injektorin ja kolonnin lämpötilat lasketaan tarpeeksi alhaisiksi (alle 70 °C).
3. Kun lämpötilat ovat laskeneet, tulee ilmoitus *Ready*. Klikkaa *Replace*, jolloin kantajakaasun virtaus pysäytetään. (HUOM. laitteistoa ei saa jättää tähän tilaan pitkäksi aikaa).
4. Vaihda septumi ja/tai lineri ohjeiden mukaisesti (ks. 8.1.1).
5. Kun vaihdot on tehty, klikkaa *Complete*. MS-laitteisto tarkistaa, ettei ilmaa vuoda kantajakaasun sekaan. Jos vuotoa ei havaita, lämpötilat alkavat nousta takaisin vaihtoa edeltäneisiin arvoihin.
6. Nollaa vaihdettujen osien käyttölukumäärän laskurin arvo sivupalkin *Detail*-valikossa (Detail-valikko aukeaa automaattisesti).

## 8.2 Linerin puhdistaminen

Linerit voidaan puhdistaa käytön jälkeen ja niitä voidaan käyttää uudelleen. Lisäohjeita puhdistukseen löytyy *GCMS Real Time Analysis* ohjelman yläpalkin *Help* ja *Maintenance*-valikosta (etsi haulla "Wrench for INJ, Glass Insert") ja lähteestä [3, s. 19].

1. Poista o-rengas linerin ympäriltä. O-rengasta voidaan käyttää uudelleen muutaman kerran.
2. Poista likainen lasivilla linerista esim. puhdistus langalla.
3. Huuhtelee septumipartikkelit pois linerista (kapeasta päästä leveään) asetonilla.
4. Jos sisäseinissä on likaa, puhdistaa asetonilla kostutetulla nukkaamattomalla paperilla (esim. puhdistus lankaan kiedottuna).
5. Puhdistaa ulkopinta asetonilla kostutetulla nukkaamattomalla paperilla.
6. Huuhtelee sisäpinta ja ulkopinta dikloorimetaanilla, sykloheksaanilla ja asetonilla.
7. Anna kuivua suojassa pölyltä.
8. Ennen käyttöä lisää uusi puhdas deaktivoitu lasivilla. Pakkaa noin 5 mm (splitless) tai noin 1 cm (split) kerros oikeaan kohtaan lineria (ks. linerin vaihto ohjeet). Huom. älä pakkaa lasivillaa liian tiiviisti ja varo ettei lineri naarmuunnu.

Huom. Maintenance-ohjeissa on mainittu myös ultraäänipuhdistuksen käyttö, jota voisi käyttää esimerkiksi dikloorimetaanissa kylvyssä edellä mainitun ohjeen kohtien 4 ja 5 sijaan. Edellä mainitulla puhdistuksella ei välttämättä lineri puhdistu täysin.

Itse pakattujen linerien käyttö tehdaspakattujen sijaan voi huonontaa menetelmän kvantitoinnin toistettavuutta. Lisäksi riski linerin käyttöä edeltävään likaantumiseen lisääntyy.

### 8.3 Ruiskun vaihto ja puhdistaminen

Automaattisessa näytteensyöttäjässä käytetään 10 µL Hamilton-ruiskua. Ruiskuja on kaksi kappaletta. Ruisku voi vaikuttaa injektoiden toistettavuuteen ja ”haamu”-piikkien esiintymiseen. Ruiskun männän toiminta pitää tarkistaa ja ruisku pestä n. 50 - 100 ajon/mittauksen välein. Ruiskun vaihtoon ja pesuun liittyvät ohjeet löytyvät *GCMS Real Time Analysis* ohjelman yläpalkin *Help* ja *Maintenance*-valikosta (klikkaa kuvaa *AOC-20i*, klikkaa uudesta kuvasta *AOC-20i*).

Täsmennyksiä ohjeisiin:

- käytä pesussa dikloorimetaania, asetonia ja sykloheksaania,
- puhdistu ruiskun mäntä liuottimella kostutetulla nukkaamattomalla paperilla,
- varo ettei männän varsi taitu,
- tiettyä mäntää voi käyttää vain tietyssä ruiskussa,
- anna ruiskun kuivua suojassa pölyltä (voi tukkia neulan).

### 8.5 Kolonnin irrottaminen/kiinnittäminen

Kolonnin irrottaminen/kiinnittäminen on ajankohtaista kolonnin puhdistamisen tai manuaalisen detektorien vaihdon yhteydessä.

Kolonnin irrottamiseen, kiinnittämiseen ja leikkaamiseen liittyvät tarkat ohjeet löytyvät tietokoneen työpöydän kansioista *TTY* ja *GCMS Real Time Analysis* ohjelman yläpalkin *Help* ja *Maintenance*-valikosta (hae: ”Column Replacement Procedure”). Ks. myös ohjeet *Instruction Manual*:n sivuilla 18 – 21. Lisäohjeita löytyy myös Phenomenex:n ohjeesta [2]. Käytä kolonnin leikkaamiseen siihen tarkoitettua veistä. Leikkaus tulee tehdä kevyellä viiltävällä liikkeellä 90 ° kulmassa kolonnin pituussuuntaan nähden ja siten, että veitsen terä on 45° kulmassa pöydän tasoon nähden. Viillon jälkeen kolonnin pään tulee katketa siististi, kun sitä painaa alaspäin.

Injektorin ja MS:n liitoksissa tulee käyttää vespel-ferrulia taustakohinan minimoimiseksi. FID:n liitoksessa voidaan käyttää grafiitti-ferrulia. *Switching unit*:n liitoksissa käytetään puolestaan siltite-ferruleja.

### 8.6 Kolonnin puhdistaminen

Huonosti haihtuvat yhdisteet voivat kertyä kolonniin ja voivat vaikuttaa kromatogrammiin ja kvantitointiin. Lisäksi kolonnin vuoto (bleed) eli stationaarifaasin hajoaminen voi vaikuttaa erityisesti MS-detektorin taustakohinaan (siten herkkyyteen).

Haihtumattomien epäpuhtauksien poistamiseksi kolonnin injektorin puoleisesta päädyistä tulee leikata irti noin 10 - 20 cm.

Kolonnin paahtolla voidaan pienentää kolonnin vuodon vaikutusta. Paahto on hyvä tehdä erityisesti kun kolonnia ei ole käytetty pitkään aikaan (useaan viikkoon). Paahto voi kuitenkin olla haitallista, sillä se voi aiheuttaa haihtumattomien epäpuhtauksien kulkeutumisen eteenpäin kolonnissa. Paahtossa kolonniuuni asetetaan 300 °C lämpötilaan noin 2-3 tunniksi. MS-detektoria käytettäessä (ilman *switching unit*:a) tähän löytyy *Paahto Column Baking* –method (GCMSSolution > Data >GCMS Determination of Lactide).

## 9. Kalibrointi ja virittäminen

### 9.1 Kalibrointi

GCMS- ja GC-FID-menetelmässä kalibrointi tehdään mittausten yhteydessä 3-pistekalibraationa eikä erillistä laitteiston kalibrointia tarvitse tehdä.

### 9.2 MS:n virittäminen

MS vaatii kuitenkin virittämisen (*tuning*) herkkyuden ja m/z-arvojen oikeellisuuden takaamiseksi. GCMS-laite sisältää valmiiksi virittämiseen käytettävän referenssiaineen. Virittämiseen referenssiaineen massaspekttrin mitattuja m/z-arvoja verrataan teoreettisiin arvoihin ja säädetään oikeiksi. Virittäminen voi myös muuttaa mm. detektorin jännitettä. Laitetta käytettäessä ionisaatiokammio likaantuu väistämättä ja virittäminen nostaa pikkuhiljaa detektorin jännitettä. Jännitteen noustessa yli 1,5 kV:iin tulisi ionisaatiokammio vaihtaa vaihtoionisaatiokammioon ja likaantunut kammio pestä.

Virittäminen tapahtuu laitteessa automaattisesti *Autotuning*-toiminnolla. *Autotuning* tulee suorittaa 2 vko välein MS:ää käytettäessä. *Autotuning* suoritetaan seuraavasti:

1. Varmista, että kolonni kulkee MS:lle. *Switching unit*:a käytettäessä varmista, että kantajakaasu ohjataan MS:lle (110-asetus paneelista).
2. Varmista, että käytettävän *method*:n parametrit ovat ladattuna laitteeseen ja laite on *Ready*-tilassa. MS:n olosuhteiden tulee olla samat viritettäessä ja mitattaessa.
3. Valitse vasemmasta sivupalkista *Tuning*.
4. Valitse yläpalkista *File* ja *New Tuning File*. Klikkaa OK.
5. Valitse sivupalkista *Start Auto Tuning* (vaatii n. 5 min.).
6. Kun *tuning* on valmistunut, valitse yläpalkista *Save Tuning File*. Tallenna *tuning*-tiedosto kansioon (GCMSSolution > Data) päivämäärällä nimettynä.

## 10. Toimintakunnon tarkistus

## 11. Laitevalmistajan ohjekirja

### Lähteet

- [1] NatureWorks:n menetelmäohje:  
[http://www.natureworksllc.com/~media/Technical\\_Resources/Analytical\\_Methods/GC%20Method%20for%20Residual%20Lactide%20in%20PLA\\_2010\\_pdf](http://www.natureworksllc.com/~media/Technical_Resources/Analytical_Methods/GC%20Method%20for%20Residual%20Lactide%20in%20PLA_2010_pdf)
- [2] Phenomenex:n ohje kolonneihin liittyen:  
[http://phx.phenomenex.com/lib/gu61770409\\_1.pdf](http://phx.phenomenex.com/lib/gu61770409_1.pdf)
- [3] Operating Hints for Using Split/Splitless Injectors. Restek.com [WWW]. [viitattu 30.10.2015]. Saatavissa: <http://www.restek.com/pdfs/59880A.pdf>