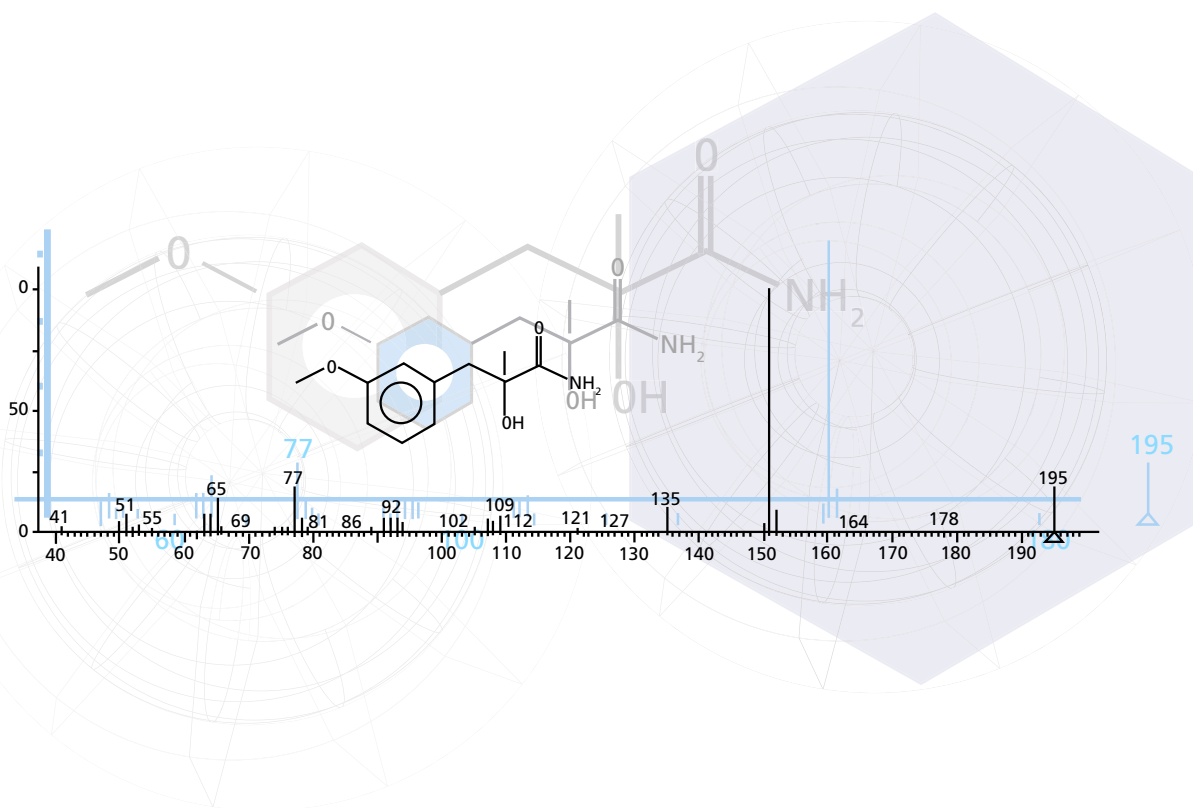


# METROLOGIA

J5/2006



Kvalitatiivisen kemian metrologian opas  
orgaanisten yhdisteiden tunnistukseen

toimittanut  
Tapio Ehder

Espoo 2006

Julkaisu J5/2006

**Kvalitatiivisen kemian metrologian opas  
orgaanisten yhdisteiden tunnistukseen**



**METROLOGIAN  
NEUVOTTELUKUNTA**

Kemian ja mikrobiologian jaosto  
Kemian työryhmä

toimittanut  
Tapio Ehder

Mittatekniikan keskus

Espoo 2006



## Alkusanat

Kemian metrologian tavoitteena on parantaa ja varmentaa kemiallisten mittausten luotettavuutta ja jäljitettävyyttä SI-yksiköihin. Aiheeseen liittyviä oppaita on ilmestynyt englannin kielellä mm. EURACHEMIN ja CITACin toimesta sekä v. 2005 suomenkielinen MNK:n Kemian ja mikrobiologian jaoston kemian työryhmän toimesta julkaistu ”Kemian metrologian opas” (MIKESin julkaisu J6/2005). Näissä oppaissa tarkastellaan aihetta lähinnä kvantitatiivisten määrittämenetelmien kannalta. Sen sijaan kvalitatiivisen analyysin metrologia on jäänyt lähes täysin huomiotta. Siksi MNK:n kemian ja mikrobiologian jaosto katsoi aiheelliseksi antaa ”Kvalitatiivisen kemian metrologian oppaan” laatimisen alaiselle kemian työryhmälle. Oppaassa keskitytään tarkastelemaan aihepiiriä lähinnä spektrometristen määrittämenetelmien kannalta ja eniten massaspektrometrian näkökulmasta, mutta periaatteessa oppaassa esitetyt kvalitatiivisen analyysin tunnistamis- ja jäljitettävyydkriteerit soveltuvat noudattaviksi kaikissa määrittämenetelmissä.

### **Oppaan laadinnassa on ollut mukana kemian työryhmän jäsenet sekä kutsutut asiantuntijat:**

Katri Matveinen, pj. (Keskusrikospoliisi)  
Heikki Isotalo (MIKES)  
Marja Leena Kantanen (KTL)  
Vuokko Karlsson (Ilmatieteen laitos)  
Irma Mäkinen (SYKE)  
Kirsti Nuotio (Tullilaboratorio)  
Veijo Pohjola (Ilmatieteen laitos)  
Oili Riutta (Ekokem Oy Ab)  
Eija-Riitta Venäläinen (Evira)  
Tapio Ehder, siht. (MIKES)

### **Kutsutut asiantuntijat:**

Timo Hirvi (MIKES)  
Vesa Häkkinen (VERIFIN)  
Harri Koskela (VERIFIN)  
Solveig Linko (HUS-Yhtymä, HUSLAB)  
Jari Pukkila (Keskusrikospoliisi)  
Martin Söderström (VERIFIN)  
Paula Vanninen (VERIFIN)  
Jari Walden (Ilmatieteen laitos)

### **Lisäksi oppaasta ovat antaneet lausuntoja työryhmän jäsenten kautta seuraavat henkilöt:**

Antti Hesso (TTL)  
Mervi Hämeilä (TTL)  
Ulla Karjalainen (HUSLAB)  
Hannu Kiviranta (KTL)  
Jari Nuutinen (SYKE)  
Jarkko Tornaesus (TTL)  
Christina Rosenberg (TTL)  
Sinikka Vainiotalo (TTL)



# Sisällysluettelo

Käytetyt lyhenteet	7
1 Kvalitatiivisen analyysimenetelmän periaate	8
2 Kvalitatiivisen analyysimenetelmän luotettavuuden perusteet	11
2.1 Kvalitatiivisen analyysin tulosten jäljitettävyyksivaatimukset	13
3 Spektrikirjastojen luotettavuuskriteerit	14
3.1 Spektrikirjastojen virhelähteet	15
4 Spektrien tunnistamiskriteerit	20
4.1 Massaspektrometria	20
Esimerkkejä isotooppilaskelmista	24
4.2 Infrapunaspektroskopia	25
4.3 NMR-spektroskopia	28
5 Spektrien tulkinta (GC-MS)	29
5.1 Kirjastospektrien avulla	29
5.2 Vertailuainespektrin avulla	30
5.3 Spektrien tunnistuksen ongelmia	32
Spektriä ei ole kirjastossa	32
Spektri kromatografisen piikin eri puolilla	33
Yhdisteet, joiden spektri on mitäänsanomaton	33
Yhdisteet, joilla on samankaltainen spektri	34
6 Spektrien tunnistusmenettelyn vaiheet kohdeyhdisteiden analysoinnissa (GC-MS)	35
Liite 1 Pikatestien luotettavuuden arvioinnissa huomioitavia asioita	39
Liite 2 Esimerkkejä tulosten jäljitettävyyden ja vertailtavuuden kannalta tarpeellisten tietojen dokumentointivaatimuksista	41



## Käytetyt lyhenteet

EI-MS	Electron Ionisation Mass Spectrometry (elektroni-ionisaatio massaspektrometria)
EURACHEM	Eurooppalaisten analyttisten laboratorioden v. 1989 perustama järjestö, jonka tavoitteena on edistää kemiallisten mittausten jäljitettävyyttä ja hyvää laadunhallintaa ( <a href="http://www.eurachem.ul.pt/">http://www.eurachem.ul.pt/</a> )
CAS	Chemical Abstracts Service Registry Number ( <a href="http://www.cas.org/EO/regsys.html">http://www.cas.org/EO/regsys.html</a> )
CITAC	Co-operation on International Traceability in Analytical Chemistry. V.1993 perustetun CITACin tavoitteena on edistää ole-massa olevien organisaatioiden yhteistyötä paranta-maan kansainvälistä kemiallisten mittausten jäljitetävyyt-tä ( <a href="http://www.citac.cc/">http://www.citac.cc/</a> )
GC	Gas Chromatography (kaasukromatografia)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (korkean erotuskyvyn nestekromatografia)
HR-MS	High Resolution Mass Spectrometry (korkean erotuskyvyn massa-spektrometria)
IP	Identification Point (tunnistuspiste)
IR	Infra Red (infrapuna)
ISO	International Organisation for Standardization (kansainvälinen standardisointiorganisaatio)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry ( <a href="http://www.iupac.org/">http://www.iupac.org/</a> )
LC-MS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry (nestekro-matografia massaspektrometria)
LR-MS	Low Resolution Mass Spectrometry (matalan erotuskyvyn massa-spektrometria)
MS	Mass Spectrometry (massaspektrometria)
NMR	Nuclear Magnetic Resonans (ydinmagneettinen reso-nanssi)
NIST	National Institute of Standards and Technology (Yhdys-valtain kansallinen metrologialaitos) ( <a href="http://www.nist.gov">www.nist.gov</a> )
SIM	Selected Ion Monitoring (ionimonitorointitekniikka)
TIC	Total Ion Chromatogram (kokonais-ionikromatogrammi)
TLC	Thin Layer Chromatography (ohutkerroskromatografia)
UV	Ultravioletti



# 1 Kvalitatiivisen analyysimenetelmän periaate

Kvalitatiivinen analyysi määrittellään "analyyttiseksi menetelmäksi, joka tunnistaa yhdisteen sen kemiallisten, biologisten tai fysikaalisten ominaisuuksien perusteella."<sup>1</sup> Kvalitatiivisella analyysillä on siten binäärinen luonne, joka antaa vastauksen yhdisteen läsnäolosta/poissalosta, onko tulos positiivinen/negatiivinen tai onko tulos yksinkertaisesti kyllä/ei verrattuna johonkin ennalta asetettuun kynnsarvoon nähden. Erilaisilla testiyhdisteillä tai testimenetelmillä voidaan varmistaa ja osoittaa laitteen toimintakunto, varsinkin kun kyseessä on negatiivinen tulos. Kvalitatiivisen analyysin tarkoitus on joko tunnistaa itse yhdiste tai yhdisteryhmä.

Analyysimenetelmien kvalitatiivisuus ja kvantitatiivisuus riippuu menetelmien suorituskyvystä. Suorituskyvyn ja käyttötarkoituksen perusteella menetelmät voidaan jakaa erilaisiin ryhmiin. Kaikissa menetelmissä on yhdisteen tunnistaminen lähtökohtana. Usein menetelmät jaetaan seulontamenetelmiin, tunnistusmenetelmiin ja varmistusmenetelmiin. Seulonta- ja tunnistusmenetelmät ovat rutiinimenetelmiä.

**Seulontamenetelmät (engl. screening methods)** ovat yleensä varsinaisia kvalitatiivisia menetelmiä. Niillä osoitetaan yhdisteen tai yhdisteryhmän olemassaolo. Seulontamenetelmät on suunniteltu suurien näytemäärien tutkimiseen ja seulontaan. Erityisenä vaatimuksena on mahdollisimman pieni väärin negatiivisten tunnistusten määrä. Orgaanisessa analytiikassa seulontamenetelmät perustuvat tiettyyn yhdisteen tai yhdisteryhmän ominaisuuteen esimerkiksi reaktioon spesifisen vasta-aineen kanssa.

**Tunnistusmenetelmällä (engl. identification methods)** tutkittava yhdiste voidaan tunnistaa yksiselitteisesti tietyllä tasolla. Menetelmät on suunniteltu rutiinikäyttöön ja ne ovat sekä kvalitatiivisia että kvantitatiivisia. Orgaanisessa analytiikassa tunnistusmenetelmät perustuvat yleensä kromatografiin tekniikoihin.

**Varmistusmenetelmillä (engl. verification/ reference methods)** voidaan yksiselitteisesti tunnistaa ja kvantifioida tutkittavat yhdisteet. Varmistuksen menetelmät ovat tieteellisesti perusteltuja määritysmenetelmiä, joiden luotettavuus on todettu ja todenmukaisuus, spesifisyys, tarkkuus ja erotuskyky tunnetaan hyvin. Varmistusmenetelmien on perustuttava molekyyli-spekt-

---

<sup>1</sup> EU:n Komission päätös, 12.8.2002, neuvoston direktiivin 96/23/EY täytäntöönpanosta määritysmenetelmien suorituskyvyn ja tulosten tulkinnan osalta, Euroopan yhteisöjen virallinen lehti, L 221/8, 17.8.2002

rometriaan, joka antaa suoraa tietoa tutkittavan yhdisteen molekyyli- rakenteesta. Orgaanisen analytiikan menetelmät perustuvat enimmäkseen massaspektrometriin tekniikoihin. Varmistusmenetelmiä käytetään esimerkiksi kun seulonta- tai tunnistusmenetelmien tuloksia kiistetään.

Perinteinen, jo historiaan jäänyt kvalitatiivinen analyysi oli alun perin erilaisiin saostus- ja värireaktioihin perustuvaa ionien tai yhdisteiden määrittämistä. Nykyaikaisia kvalitatiivisia kemiallisten yhdisteiden tunnistusmenetelmiä ovat pääasiassa erilaiset spektrometriset kromatografiset menetelmät, joilla tunnistetaan alkuaineita, yhdisteitä tai yhdisteryhmiä. Näitä ovat mm. UV-, IR- ja NMR-spektroskopia ja massaspektrometria (MS) sekä niihin liittyvät kaasus- tai nestekromatografiset yms. erotusmenetelmät (GC, LC). Tässä oppaassa ei selvitetä eri menetelmien periaatteita vaan oletetaan, että ko. menetelmät ovat lukijalle tunnettuja. Oppaassa tarkastellaan pääasiassa em. menetelmien antamien tulosten metrologisia näkökohtia. Sen sijaan kvalitatiivisen kemiallisen analyysin binääriseen luonteeseen kuuluvia tilastollisia tarkasteluja ei esitetä. Niitä on laajemmin esitetty mm. EU:n komission rahoittamassa MEQUALAN-projektin loppuraportissa.<sup>2</sup> Pääosa oppaan sisällöstä tarkastelee massaspektrometriin menetelmiin liittyviä metrologisia näkökohtia.

Oman ryhmänsä muodostavat nykyään erilaiset pikatestit (engl. test kits), joilla voidaan saada esim. värinmuutoksen perusteella vastaus jonkin yhdisteen tai yhdisteryhmän esiintymiseen tai poissaoloon varsinkin kliinissä kemiassa. Tässä oppaassa tarkastellaan kvalitatiivisen analyysin luotettavuusnäkökohtia lähinnä massaspektrometristen määritysten kannalta. Kuitenkin liitteessä 1 on lyhyesti kuvattu näkökohtia, joiden avulla voidaan tarkastella pikatestien luotettavuutta.

Kvalitatiivisiin kemiallisiin analyysimenetelmiin voidaan katsoa kuuluvan myös joillakin erityisalueilla, kuten esim. ympäristöstä kerättyjen öljynäytteiden tunnistamisessa käytetyt tietynlaiset tuoteprofiloinnit. Tässä oppaassa tällaisia menetelmiä ei kuitenkaan tarkastella.

Koska kvalitatiiviset mittaukset ovat on/ei-analyysseja, niillä on omat erityisvaatimuksensa. Kvalitatiivisten mittausten keskeisiä kriteerejä ovat selektiivisyys, spesifisyys, herkkyys ja toteamisraja. Erityisesti spesifisyys on kvalitatiivisessa mittauksessa kriittinen tekijä. Spesifisyys on menetelmän kyky erottaa tutkittava yhdiste muista yhdisteistä. Spesifisyys on erityisen kriittinen tekijä, kun tutkitaan analogeja, homologeja tai erilaisia hajoamistuotteita. Massaspektrometristen mittausten spesifisyys riippuu suoraan laitteistojen erotuskyvystä. Korkeaa erotuskykyä tarvitaan mm silloin, kun matriisissa on mitattavien yhdisteiden kaltaisia yhdisteitä, jotka häiritsevät mitta-

---

<sup>2</sup> Metrology of Qualitative Chemical Analysis (MEQUALAN), Final Report, Contract G6MA-CT2000-01012, Published by European Commission, 2002

ta. Toisaalta erilaisilla erillisten ionien seurantaan perustuvilla menetelmillä voidaan spesifisyyttä lisätä merkittävästi.

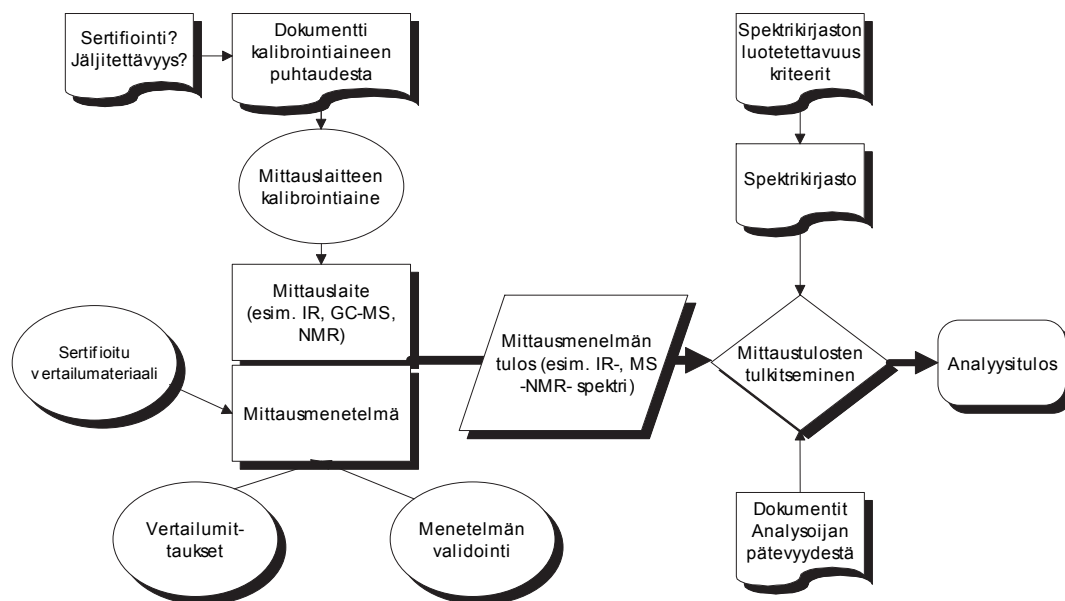
Menetelmän herkkyys tai toteamis- eli detektoraja ovat kriittisiä kun tunnistetaan kiellettyjä yhdisteitä. Esimerkiksi doping-analytiikassa voi riittää kielletyn yhdisteen tunnistaminen, koska niille ei ole sallittuja enimmäispitoisuusrajoja. Tällöin oleellista on laitteiston detektiokyky. Detektiokyky on pienin tutkittavan yhdisteen pitoisuus, joka voidaan havaita ja tunnistaa sovitulla virhetodennäköisyydellä.

## 2 Kvalitatiivisen analyysimenetelmän luotettavuuden perusteet

Samoin kuin kvantitatiivisten analyysimenetelmien kohdalla myös kvalitatiivisten menetelmien luotettavuutta voidaan tarkastella ainakin osittain samoin periaattein. Näitä ovat:

- jäljitettävyyksykysymykset (näytteenoton jäljitettävyys, menetelmän jäljitettävyys, laitteiden kalibrointien jäljitettävyys)
- menetelmän validointi
- kvalitatiivisen analyysin tulosten tulkinnan luotettavuuden arviointi (spektrikirjastot, tulkitsijan pätevyys)
- vertailumittaukset

Laitteiden kalibroinnissa pätevät samat jäljitettävyysvaatimukset kuin kvantitatiivisissakin analyyseissa. Tarvitaan sertifioituja vertailumateriaaleja tai niiden puuttuessa laboratorion sisäisiä vertailumateriaaleja, joiden luotettavuustaso on tunnistettu. Esimerkiksi massaspektrometri-laitteiston valmistajan laitteen mukana toimittamiin kalibrointiyhdisteisiin tulisi suhtautua kriittisesti ja tarkistaa laitevalmistajalta miten kalibrointiyhdisteeseen liittyvät yhdisteen puhtautta ja säilyvyyttä kuvaavat parametrit on määritelty. Ihanteellisinta olisi, että tällaisetkin yleisesti käytetyt kalibrointiyhdisteet olisivat sertifioituja vertailumateriaaleja, mikä ei ole mahdollista kaikissa tapauksissa. Tämän vuoksi käytettävän vertailumateriaalin säilyvyyttä täytyy tarkkaila vertaamalla tietyllä ajanhetkellä mitattua vertailumateriaalin spektriä lähötötilanteessa mitattuun mieluiten laitteen asennuksen yhteydessä tuotettuun vertailuaineen spektriin. Kalibroinnin lisäksi myös itse mittausmenetelmä tulee olla validoitu sekä mahdollisuuksien mukaan vertailumittauksin todettu täyttävän vaaditut kriteerit. Metrologiset periaatteet ovat siten samoja kuin kvantitatiivisenkin analyysien kohdalla. Näitä aiheita on käsitelty Metrologian neuvottelukunnan kemian ja mikrobiologian jaoston toimesta laaditussa ja MIKESin julkaisemassa Kemian metrologian oppaassa (MIKESin julkaisu J6/2005). Kaaviossa 1 on esitetty erilaisilla spektroskooppisilla menetelmillä saatujen tulosten jäljitettävyystarpeet.



Kaavio 1. Kvalitatiivisen analyysin jäljitettävyystarpeet

Kvalitatiivisten analyysien kohdalla ei voida varsinaisesti puhua tulosten mittausepävarmuuden (engl. measurement uncertainty) numeerisesta määrittämisestä vaan pikemminkin mittaustuloksen tulkinnan epäluotettavuuden arvioinnista (engl. unreliability). Positiivisemmassa mielessä voitaisiin puhua paremminkin luotettavuudesta, eli onko analyysin perusteella tulokseksi "kyllä/ei" katsottava luotettavaksi. Lähtökohtana on luonnollisesti edellä mainittujen kolmen seikan läpikäynti (jäljitettävyys, validointi, vertailumittaukset). Seuraavaksi kysymykseksi tulosten luotettavuuden arvioinnissa nousee yhdisteiden tai funktionaalisten ryhmien identifioinnissa käytetyt vertailutiedot, joita ovat mm. UV-, IR- ja NMR-spektroskopiassa sekä massaspektrometriassa spektrien tunnistamisessa käytetyt sekä omat että kaupalliset spektrikirjastot. Spektrikirjastoissa esitettyjen spektrien luotettavuuteen vaikuttavat sekä spektrin muodostamiseen käytetyn yhdisteen puhtaus, laitetyppi, mittausmenetelmä sekä luonnollisesti myös tietyn spektrin hyväksyneiden henkilöiden pätevyys. Samoin myös spektrikirjaston tietoja hyväksikäyttävän henkilön pätevyys on ratkaiseva. Käyttäjän tulee ymmärtää spektrin ja yhdisteen rakenteen välinen yhteys tulkitessaan onko spektri oikea.

Luotettavuuteen liittyviä tekijöitä tarkasteltaessa tulee myös huomioida kvalitatiivisten analyysien tulosten vertailukelpoisuus ja jäljitettävyys käytettyihin menetelmiin ja spektrikirjastoihin. Tällöin on tärkeää, että tietyn tuloksen takana on dokumentoitua tietoa käytetystä menetelmästä ja laitteistos-

ta, vertailuaineistosta sekä tietyistä mittaustapahtumaan liittyvistä tärkeistä parametreista.

## 2.1 Kvalitatiivisen analyysin tulosten

### jäljitettävyyksivaatimukset

Tuotettuun spektriin ja sen perusteella tehtyyn tunnistamiseen liittyy monia tärkeitä tulokseen vaikuttavia tietoja, jotka on kirjattava analyysituloksen yhteyteen. Ilman riittävää tietomäärää, ei synny vertailukelpoisuutta ja jäljitettävyyttä. Saatuaan analyysitulokseen tulee liittää riittävä määrä tietoa näytteenotosta, analysointitekniikasta ja analysointiolosuhteista, jotta tuotetun spektrin perusteella saadut tulkintatulokset alkuaineista tai yhdisteistä olisivat vertailukelpoisia muiden vastaavalla tekniikalla tehtyjen analyysien kanssa.

Analyysitulokseen tulee liittää myös tietoa tavasta, millä ko. yhdiste on tunnistettu, esim.:

- vertaamalla tuloksia vertailumateriaalilla saatuihin tuloksiin
- vertaamalla käytettävissä oleviin spektrikirjastoihin
- spektrin tulkinnan avulla; tulkinnassa voidaan hyödyntää kemiallisesti mahdollisimman samankaltaisten yhdisteiden spektrejä

Liitteessä 2 on esitetty esimerkkejä tulosten jäljitettävyyden ja vertailtavuuden kannalta tarpeellisten tietojen dokumentointivaatimuksista. Seuraavassa on esitetty spektrien tunnistamiseen liittyviä kriteereitä.

### 3 Spektrikirjastojen luotettavuuskriteerit

Laboratorio voi kerätä omaan tarpeeseen liittyvien yhdisteiden spektrit sisäiseksi spektrikirjastoksi. Etuna on, että yhdisteistä saadaan spektrit juuri sellaisina johdannaisina ja samoilla laitteilla ja menetelmillä, joita omassa analyysissä käytetään. Edellytykset sisäiseen spektrikirjastoon ottamisella tulisi olla seuraavat:

- spektri on tuotettu laboratorion validoimalla menetelmällä ja jäljitettävyyuskriteerit täyttävällä kalibroiduilla laitteistoilla
- kaikki spektrin synnyttämiseksi olennaiset mittausolosuhteet on kirjattu
- spektri on tuotettu sopivaa sertifioitua referenssimateriaalia tai sen puuttuessa laboratorion määrittämää sisäistä vertailumateriaalia käyttäen eli mitattava yhdiste on sertifioitu referenssi tai laboratorio on itse jollain tavalla varmistanut dokumentoidusti kemikaalin oikeellisuuden ja puhtauden (mm. on tärkeää tietää, millä menetelmällä (IR, MS, NMR) sisäinen vertailumateriaali on tunnistettu)
- varsinkin monimutkaisempien yhdisteiden analysoinnissa vertailumittauksin on osoitettu menetelmän luotettavuus ja sitä kautta spektrin luotettavuus
- spektrin on hyväksynyt sisäiseen kirjastoon laboratorion siihen valtuuttama ja pätevoittämä henkilö (vrt. akkreditointivaatimukset henkilöstön pätevydestä)

Laboratorion tulisi laatia omat spektrien arviointikriteerit, jollei laboratorio noudata muuta ohjeistusta. Oman spektrikirjaston kerääminen vaatii paljon työtä ja resursseja. Ostettavissa on useita kaupallisia yleiskirjastoja, joissa on useimmiten satojen tuhansien yhdisteiden spektritietoja.

Spektrikirjastoissa olevien tietojen luotettavuutta arvioitaessa tulisi huomioida mm. seuraavat seikat:

- tulisi olla tietoa siitä, millä kriteereillä spektrit on hyväksytty kirjastoon
- onko kemiallisen rakenteen oikeellisuuden tarkastelussa käytetty sekä manuaalisia että tietokonepohjaisia menetelmiä
- onko saatavissa vertailua eri stereoisomeerien välillä

- onko spektrissä riittävästi piikkejä suhteessa molekyyllissä olevien atomien määrään
- sopivatko yhdisteen nimi, molekyylikaava/molekyylipaino ja spektri yhteen
- käytetäänkö IUPAC-nimistöä
- onko kirjaston yhdisteellä CAS-rekisterinumero<sup>3</sup>

Spektrikirjaston luotettavuuden mittana voisi siten pitää edellä olevien kriteerien täyttymistä. Mitä suurempi prosenttiosuus em. kriteereistä täyttyy, sitä luotettavampana voidaan spektrikirjastoa pitää.

### 3.1 Spektrikirjastojen virhelähteet

Kirjastojen pohjana on usein joukko monista eri lähteistä koottuja spektrikokoelmia ja lisäksi spektrien keräys on tapahtunut useiden vuosien ajan, joten spektrien laatu saattaa vaihdella. Mm. NISTin massaspektrikirjastossa havaittiin sitä tarkastettaessa useita virheellisyyksiä.<sup>4</sup> Melko yleinen virhe oli se, että kemiallinen molekyylikaava ei ollut yhtäpitävä ilmoitetun yhdisteen molekyylipainon kanssa. Virheitä oli oletettavasti aiheuttanut tietokoneen ohjelmointivirhe. Seuraavassa on lueteltu eräitä em. NISTin tutkimuksessa käytettyjä arviointikriteerejä, joiden tunteminen voi edesauttaa myös spektrikirjastojen käyttäjäakin suhtautumaan kriittisesti erilaisten kirjastojen spektreihin.

- Verrataan ilmoitettua nimeä, molekyylikaavaa ja itse spektriä ja varmistetaan niiden yhtäpitävyydestä.
- Tarkistetaan piikkien määrä spektrissä. Spektrin tulisi sisältää kaikki mitatut piikit, ellei jokin/jotkin piikeistä ole ilmiselvästi taustasta johtuvia. Periaatteessa epätäydellisessäkin spektrissä tulisi olla vähintään 10 kaikkein tyypillisintä piikkiä. Spektrikirjastossa esiintyvä epätäydellinen vain suurimmat piikit sisältävä spektri ei ole käyttökelpoinen kirjastohaussa. Tällainen spektri voidaan hyväksyä kirjastoon vain, jos kyseessä on jostain erityisyydestä kiinnostava yhdiste, eikä muuta spektriä ole käytettävissä.
- Tarkistetaan molekyyli-ionien ja suurimpien fragmenttien isotooppisuhteet. Poikkeamat isotooppisuhteista huonontavat spektrin laatua.
- Varmistetaan, että suurimmat piikit todella edustavat ilmoitettua molekyyli-rakennetta.

<sup>3</sup> CAS = CAS- rekisterinumero on "Chemical Abstracts Service Registry Number", joka on kullekin aineelle ja sen rakenteelle ominainen yksilöllinen numerotunniste. Kullakin isomeerillä ja kunkin isomeerin kullakin suolalla on oma CAS-rekisterinumero. <http://www.cas.org/EO/regsys.html>

<sup>4</sup> The Critical evaluation of a Comprehensive Mass Spectral Library, P. Ausloos, C.L. Clifton, S.G. Lias, A.I. Mikaya, S.E. Stein, D.V. Tchekhovskoi, O.D. Sparkman, V. Zaikin, Damo Zhu, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1999, 10, 287-299.



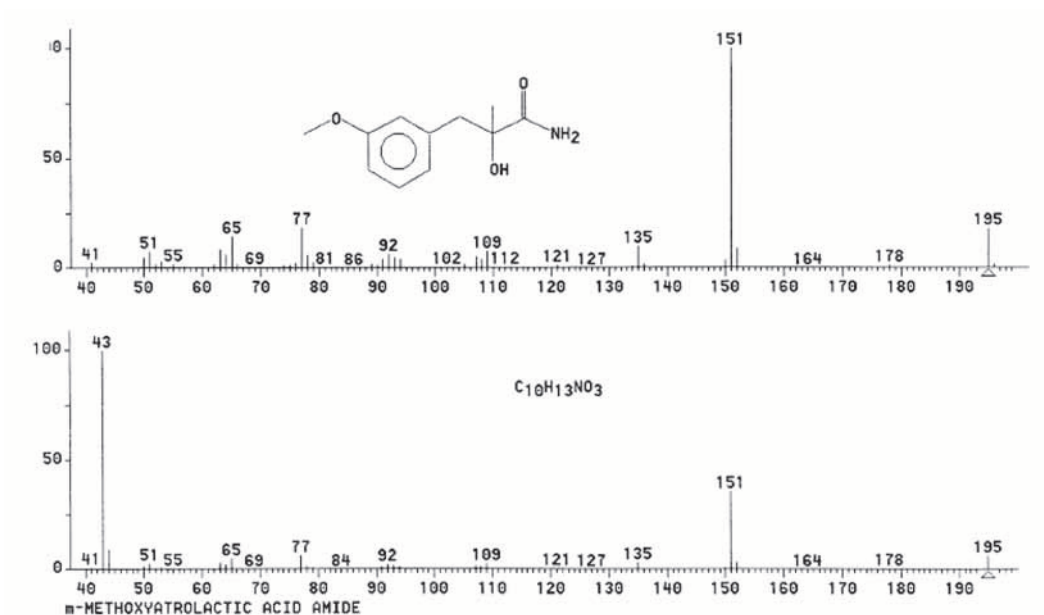
Spektrikirjastojen tarkistuksissa on havaittu useita eri virhelähteitä. Yleisin virhe on epäpuhtauksista johtuvat piikit kirjaston spektrissä. Virheellisyyksiä spektriin voivat aiheuttaa epäpuhtautena olevien vesi- tai ilmamolekyylien aikaansaamat hallitsevat piikit. Epäpuhtaus voi johtua kromatografian kolonnin "vuotavasta" stationäärifaasimateriaalista (engl. column bleeding) tai kun aikaisempien määritysten yhdisteitä on jäänyt mittalaitteen pinoille, mistä ne lähtevät liikkeelle uusien analyysien yhteydessä (ns. "memory effect"). Kuvassa 1 on esimerkki tällaisesta havainnosta kirjaston spektrissä sekä tarkistettu spektri. Epäpuhtaudesta aiheutuvia piikkejä voi myös olla vanhemmissa spektreissä ajalta, jolloin spektrometrilaitteisiin ei vielä ollut kytketty kromatograafeja.

Yleensä voidaan todeta spektrin piikkejä näytteen tai laitteen epäpuhtaudesta johtuviksi, jos piikit ovat molekyyli-ionin yläpuolella (muut kuin isotooppi- tai adduktiipiikit).

Virheen spektrissä voi aiheuttaa myös ns. kemiallinen ionisaatio-efekti<sup>5</sup>. Jos spektri on määritetty sellaisissa olosuhteissa, jossa ionit ionisaatiokammiossa törmäilevät neutraalien molekyylien kanssa ennen niiden havaitsemista, on mahdollista tiettyjen yhdisteiden kohdalla että tapahtuu protonien siirtymistä ionisoidusta molekyylistä neutraaliin molekyyliin. Tällöin voi esiintyä protonoituneiden molekyylien aiheuttamana merkittävästi korkeampia isotooppipiikkejä spektrissä molekyyli-onia yhtä yksikköä ylempänä. Kemiallisen ionisaatio-efektin ei kuitenkaan ole todettu muuttaneen merkittävästi pääosaa spektristä. Tyypillisesti tällaisia piirteitä voidaan havaita vanhemmissa ioniloukkua hyödyntävissä kaasukromatografi-massaspektrometreissa.

---

<sup>5</sup> Kemiallista ionisaatiota ei pidä sekoittaa elektroni-ionisaatioon. Elektroni-ionisaatiossa korkeaenerginen ioinisuihku (50 - 150 eV, yleensä 70 eV) kohdistetaan ionisaatiokammiossa kaasumuodossa oleviin näytemolekyyliin. Tämän seurauksena molekyylit ioinisoituvat ja pilkkoutuvat yhdisteille tyypillisellä tavalla tuottaen sähköisesti varatutuneita fragmentteja.



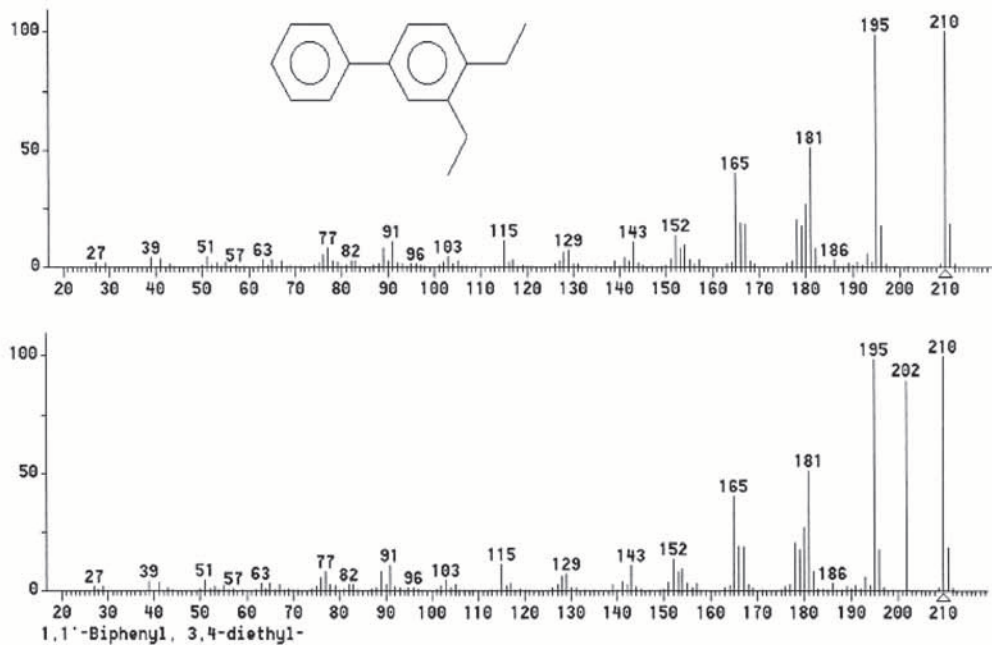
Kuva 1. Alimmaisessa alkuperäisessä kirjastospektrissä oli iso piikki  $m/z$ -arvossa 43. Tämä ei vastaa loogisesti yhdisteestä pääteltäviä fragmentteja. Siksi piikki  $m/z$ -arvolla 43 poistettiin spektristä (ylin spektri), koska se todennäköisimmin johtuu epäpuhtauksista (lähde: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1999**, 10, 287-299).

Joissakin spektreissä havaittiin yhden tai useamman piikin siirtyneen yhden yksikön verran niiden loogiselta tai odotetulta paikalta. Tällainen siirtymävirhe on yleisintä vanhojen spektrien kohdalla ajalta ennen kuin massaspektrometreihin liitettiin tietokoneet. Manuaalisesti tehtynä voi pieniä epä-tarkkuuksia tulla spektrin viivojen sijaintiin. Nykyaikaisilla laitteilla siirtymävirhe voi johtua virheellisestä kalibroinnista tai liian pitkistä kalibroitivälistä.

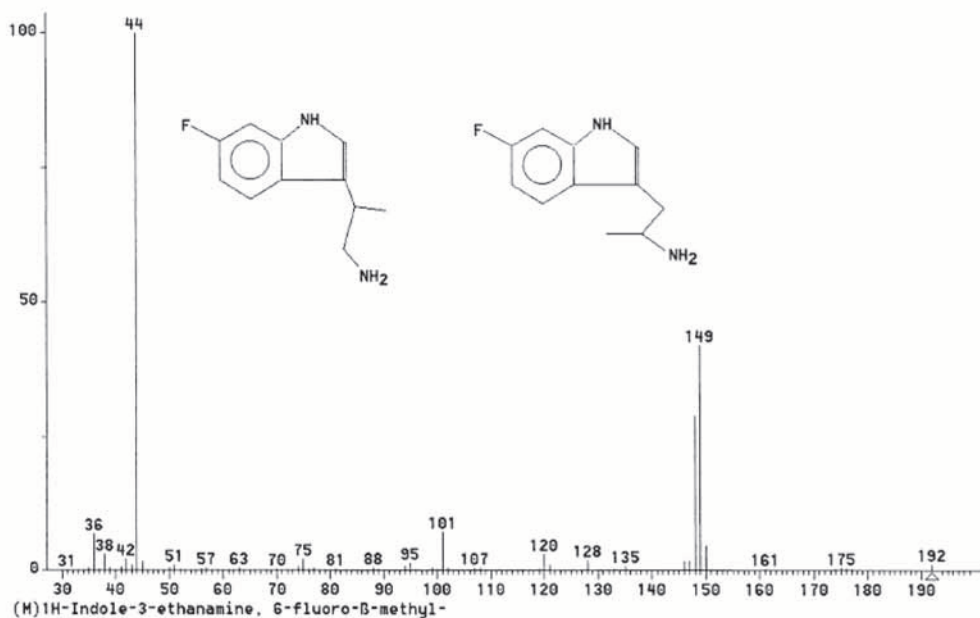
Joskus spektrissä esiintyy laitteen kohinasta johtuvia piikkejä. Tällaiset piikit on helppo havaita, koska ne ovat epäloogisissa paikoissa, eikä niihin liity isotooppiikkejä (kuva 2).

Spektrikirjaston spektreissä havaittiin myös virheitä spektreihin liitetyissä molekyylikaavoissa. Esimerkki tällaisesta virheestä ja tarkistuksesta on kuvassa 3.

Periaatteessa spektristä ei saisi poistaa piikkejä!



Kuva 2. Spektrikirjaston spektrissä oli intensiivinen piikki  $m/z$ -arvolla 202 (alimmainen spektri). Tällä piikillä ei ollut isotooppiipiikkiä eikä se sijainnut loogisessa paikassa. Kirjastospektristä poistettiin ko. piikki kohinapiikkinä (ylimmäinen spektri) (lähde: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1999**, 10, 287-299).



Kuva 3. Kirjastospektri ja yhdisteen nimi vastasivat toisiaan, mutta molekyylikaava ei. Kuvassa vasemmalla puolella oleva virheellinen rakennekaava uusittiin (oikealla). (lähde: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1999, 10, 287-299).

## 4 Spektrien tunnistamiskriteerit

### 4.1 Massaspektrometria<sup>6</sup>

Massaspektrometriä määrityksiä käytetään yhdisteiden ja yhdisteryhmien tunnistamiseen monilla aloilla mm. ympäristö- ja elintarvikeanalytiikassa, lääketeollisuudessa, orgaanisen ja biokemian tutkimuksessa, prosessihäiriöiden selvittelyssä, tuotteiden laadunvalvonnassa, epäorgaanisen kemian erityisongelmien ratkaisemisessa, kliinisessä kemiassa, öljynjalostuksessa ja petrokemian teollisuudessa sekä kaasujen puhtauden ja koostumuksen määrittämisessä. Joillekin aloille, kuten elintarvike-, ympäristö-, ja doping-analytiikassa, on massaspektrien tunnistamiseen olemassa kansainvälisiä vaatimuksia. Myös tietyillä erityisaloilla, kuten kemiallisen aseiden kieltosopimusta valvoville kansallisille viranomaisille on annettu tiukat spektrien tunnistamiskriteerit. Näiden eri alojen vaatimuksien huomioimisella soveltuvin osin, voidaan kaikilla aloilla lisätä massaspektrometristen tunnistamisen luotettavuutta. Siksi on hyödyllistä omissa määrityksissään käydä läpi seuraavassa esitettyä yhteenvetoa tärkeimmistä eri alojen tunnistamiskriteereistä.

- Piikkiä voidaan pitää merkittävänä kun signaali-kohinasuhde > 3:1
- Verrattaessa tutkittavan yhdisteen spektriä analyysissä käytetyn vertailuaineen täydelliseen spektriin (ns. full scan-menetelmä) tai kirjastospektriin, on kaikkien diagnostisten ionien, joiden suhteellinen intensiteetti vertailuspektrissä on yli 10 %, löydyttävä tutkittavan yhdisteen spektristä. Näitä ovat molekyyli-ioni (kaikki yhdisteet eivät EI-MS:ssä tuota molekyyli-ioniä), sen karakteristiset adduktiotuotteet, karakteristiset fragmentti-ionit ja isotooppi-ionit. Lisäksi vähintään kolmen diagnostisen ionin spektripiikkien suhteelliset intensiteetit eivät saa erota taulukossa 1 ilmoitettuja arvoja enempää.<sup>7</sup>

<sup>6</sup> Lähteet: Work Instruction for the evaluation of the results of OPCW proficiency tests; Appendix 1 Analytical Data and Accompanying information, Appendix 2 Evaluation Criteria of Analytical data; Criteria for the identification of compounds by LC-MS and LC-multiple MS in forensic toxicology and doping analysis, Laurent Rivier, *Analytica Chimica Acta* 492 (2003)69 - 82; EU:n Komission päätös, 12.8.2002, neuvoston direktiivin 96/23/EY täytäntöönpanosta määritysmenetelmien suorituskyvyn ja tulosten tulkinnan osalta, Euroopan yhteisöjen virallinen lehti, L 221/8, 17.8.2002

<sup>7</sup> International Standard for Laboratories, Version 2, World Anti-Doping Agency, February 20, 2003

Suhteellinen intensiteetti (% peruspiikistä)	GC-EI-MS	GC-CI-MS, GC-MS <sup>n</sup> , LC-MS, LC-MS <sup>n</sup>
> 50 %	± 10 % (absoluuttinen)	±15 % (absoluuttinen)
< 50 % ja ≥ 25 %	± 20 % (suhteellinen)	± 25 % (suhteellinen)
< 25 %	± 5 % (absoluuttinen)	± 10 % (absoluuttinen)

Taulukko 1. Suurimmat sallitut ionien suhteellisten intensiteettien toleranssit erilaisia massaspektrometrisia menetelmiä käytettäessä (doping-analytiikka)<sup>8</sup>

Vastaavasti taulukossa 2 on esitetty elintarvikeanalytiikassa säädetyt suurimmat sallitut ionien suhteellisten intensiteettien toleranssit erilaisia massaspektrometrisia menetelmiä käytettäessä.<sup>9</sup>

Suhteellinen intensiteetti (peruspiikistä)	GC-EI-MS (suhteellinen)	GC-CI-MS, GC-MS <sup>n</sup> , LC-MS, LC-MS <sup>n</sup> (suhteellinen)
> 50 %	± 10 %	± 20 %
> 20 % - 50 %	± 15 %	± 25 %
> 10 % - 20 %	± 20 %	± 30 %
≤10 %	±50 %	± 50 %

Taulukko 2. Suurimmat sallitut ionien suhteellisten intensiteettien toleranssit erilaisia massaspektrometrisia menetelmiä käytettäessä (eläinperäisten tuotteiden analytiikka)

- Diagnostisten ionien ja/tai prekursori/tuoteioniparien suhteelliset intensiteetit on tunnistettava vertaamalla spektrejä tai integroimalla yksittäiset massasignaalit. Jos käytetään taustakorjausta, sitä on käytettävä samalla tavalla koko erässä ja se on ilmoitettava selkeästi.
- Jos täydelliset spektrit (full scan) mitataan yhdessä ainoassa massaspektrometrissä, määrittämisessä on oltava vähintään neljä ionia, joiden suhteellinen intensiteetti verrattuna peruspiikkiin on vähintään 10 %. Molekyyli-ionin on oltava mukana, jos sen suhteellinen intensiteetti vertailuspektrissä on vähintään 10 %. Vähintään neljän ionin on oltava suhteellisten ioni-intensiteettien maksimaalisten sallittujen toleranssien rajoissa.

<sup>8</sup> Esim. absoluuttinen ± 5 % eroavaisuus merkitsee 50% intensiteetin piikille 45 - 55 %. Suhteellinen ± 20 % eroavaisuus merkitsee 50% intensiteetin piikille 40 - 60 %.

<sup>9</sup> EU:n Komission päätös, 12.8.2002, neuvoston direktiivin 96/23/EY täytäntöönpanosta määrittämenetelmien suorituskyvyn ja tulosten tulkinnan osalta, Euroopan yhteisöjen virallinen lehti, L 221/8, 17.8.2002

- Jos massafragmenteja mitataan muilla kuin full-scan-menetelmillä (esim. SIM)-menetelmällä, tuloksia on tulkittava tunnistuspisteiden avulla.<sup>10</sup> Viranomaisvaatimuksissa useimmiten vaaditaan vähintään kolmen tunnistuspisteen (IP) avulla tapahtuvaa yhdisteen tunnistamista. Taulukossa 4 esitetyistä eri MS-tekniikoilla saavutettavista tunnistuspisteiden määrästä voidaan todeta, että helpoimmin 3 tunnistuspisteen vaatimus saavutetaan LC-MS<sup>n</sup> ja HR-MS-tekniikoita käyttäen.

MS-menetelmä	Tunnistuspisteitä ionia kohti
Matalan erotuskyvyn massaspektrometri (LR)	1,0
LR- MS <sup>n</sup> prekursori-ioni	1,0
LR- MS <sup>n</sup> siirtymätuotteet	1,5
Korkean erotuskyvyn massaspektrometri (HR)	2,0
HR- MS <sup>n</sup> prekursori-ioni	2,0
HR- MS <sup>n</sup> siirtymätuotteet	2,5

Taulukko 3 Erilaisten massafragmenttiluokkien ja saatujen tunnistuspisteiden välinen suhde.<sup>11,12</sup> MS<sup>n</sup> = kaksi tai useampaa peräkkäistä massaspektrometristä erottelua.

Jotta varmistuksen edellyttämät tunnistuspisteet voidaan myöntää ja tunnistuspisteiden summa laskea:

- a) on mitattava vähintään yksi ionisuhde;
  - b) kaikkien relevanttien mitattujen ionisuhteiden on täytettävä yllä kuvatut vaatimukset;
  - c) tunnistuspisteiden vähimmäismäärän saavuttamiseksi voidaan yhdistää enintään kolme eri menetelmää
- Tunnistuspisteiden saavuttamiseen vaikuttaa merkittävästi mitä kromatografista menetelmää massaspektrometrin yhteydessä käytetään kuten taulukossa 4 on esitetty

<sup>10</sup> Esim. Direktiivin 96/23/EY liitteen I ryhmän A aineiden varmistukseen on vaadittava vähintään neljä tunnistuspistettä. Direktiivin 96/23/EY liitteen I ryhmän B aineiden varmistukseen vaaditaan vähintään kolme tunnistuspistettä

<sup>11</sup> Lähde: EU:n Komission päätös, 12.8.2002, neuvoston direktiivin 96/23/EY täytäntöönpanosta määritysmenetelmien suorituskyvyn ja tulosten tulkinnan osalta, Euroopan yhteisöjen virallinen lehti, L 221/8, 17.8.2002

<sup>12</sup> Huomautuksia:

(1) Kukin ioni voidaan laskea vain kerran.

(2) GC-MS, jossa käytetään elektroni-pommitusionisaatiota (EI), katsotaan eri menetelmäksi kuin GC-MS, jossa käytetään kemiallista ionisaatiota (CI).

(3) Eri analyyttejä voidaan käyttää lisäämään tunnistuspisteiden lukumäärää vain, jos johdosten reaktiokemiat ovat erilaisia.

(4) Jos määrittäksessä käytetään jotakin seuraavista tekniikoista: full-scan -diodirividetktooriin (DAD) kytketty HPLC, fluoresenssidetktooriin kytketty HPLC, immunogrammiin kytketty HPLC tai kaksiulotteinen TLC kytkettynä spektrometriseen detektioon; enintään yksi tunnistuspiste voidaan tuottaa, mikäli menetelmien relevantit vaatimukset täyttyvät.

(5) Siirtymätuotteet sisältävät sekä tytärtuotteet että niiden tytärtuotteet.

Tekniikka /tekniikat	Ionien lukumäärä	Tunnistuspisteet
GC-MS (EI tai CI)	N	n
GC-MS (EI ja CI)	2 (EI) + 2 (CI)	4
GC-MS (EI tai CI) 2 johdosta	2 (johdos A) + 2 (johdos B)	4
LC-MS	N	n
GC-MS-MS	1 prekursori ja 2 tytärtä	4
LC-MS-MS	1 prekursori ja 2 tytärtä	4
GC-MS-MS	2 prekursori-onia, kummallakin 1 tytär	5
LC-MS-MS	2 prekursori-onia, kummallakin 1 tytär	5
LC-MS-MS-MS	1 prekursori, 1 tytär ja 2 tyttärentytärtä	5,5
HRMS	N	2n
GC-MS ja LC-MS	2 + 2	4
GC-MS ja HRMS	2 + 1	4

Taulukko 4. Esimerkkejä eri tekniikoilla ja niiden yhdistelmillä saatavien tunnistuspisteiden määristä (n = kokonaisluku)<sup>11</sup>

- Sellaisia piikkejä, joiden pinta-ala on pienempi kuin 1 % suurimman spektrissä olevan piikin pinta-alasta, ei tule huomioida.
- Spektri tulee hylätä, jos massaspektrissä on kaksi tai useampi piikki joiden suhteellinen intensiteetti on 100 %, koska kyseessä yleensä on spektrin ylikyllästymisen. (On silti muistettava, että on olemassa yhdisteitä, joissa on luonnostaan kaksi tai useampia lähellä 100 % olevia piikkejä. Näissä tapauksissa on varmistettava huolellisesti, että spektri on oikeellinen esimerkiksi isotooppisuhteista.)
- Spektri tulee hylätä, jos se sisältää massoja, joita ei voida tulkita fragmentointisääntöjen avulla ja jotka eivät sisälly muihin saman tai samanlaisten yhdisteiden spektreihin.
- Spektri on hylättävä, jos massaspektri sisältää isotooppien piikkejä, jotka eivät ole selitettävissä oletetun isotooppijakauman kanssa (isotope pattern). Ohjeena jatkoarvioinnille muiden tekijöiden ohella tulisi tarkistaa tärkeimmän isotoopin absoluuttinen intensiteetti ja laskea vastaava teoreettinen intensiteetti huomioiden seuraavat säännöt:
  - i. kun massapiikki isotooppijakaumassa on  $\geq 10$  % peruspiikistä, voi mitattu suhteellinen intensiteetti poiketa enintään 10 % sen teoreettisesta arvosta.



- ii. kun massapiikki isotooppijakaumassa on < 10 % peruspiikistä, voi mitattu suhteellinen intensiteetti poiketa enintään 1 %-yksikköä sen teoreettisesta arvosta.
- iii. suhteellinen intensiteetti on määritetty intensiteettinä ilmaistuna prosentteina peruspiikistä.

### Esimerkkejä isotooppilaskelmista<sup>13</sup>

Esimerkki 1:

Mittaustulokset yhdisteelle C<sub>6</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>3</sub>P:

*m/z*- arvolla 181 oleva piikki on 13,9 % peruspiikistä

*m/z*-arvolla 182 oleva piikki on 1,2 % peruspiikistä

Koska ioni *m/z*-arvolla 182 on pienempi kuin 10 % peruspiikistä, sovelletaan sääntöä ii.

Laskennallisiksi arvoiksi yhdisteen C<sub>6</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>3</sub>P alkuaineille:

*m/z*- arvolla 181 oleva piikki on 13,9 % peruspiikistä

*m/z*-arvolla 182 oleva piikki on 1,0 % peruspiikistä

Poikkeama on 1,2 % - 1,0 % = 0,2 %, mikä on sallituissa ± 1 % rajoissa mitatusta arvosta.

Esimerkki 2:

Yhdisteen C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> ClS spektrin ionirakenne	Mitattu suhteellinen intensiteetti	Teoreettinen suht. intensiteetti	Poikkeama	Isotooppisäännön soveltaminen
<i>m/z</i> 109	100 %	100 %		
<i>m/z</i> 110	6,1 %	4,2 %	1,9 %-yksikköä	sovelletaan sääntöä ii: poikkeama suurempi kuin sallittu 1 %-yksikkö
<i>m/z</i> 111	32,2 %	36,5 %	4,3 %-yksikköä = 11,8 % teoreettisesta	sovelletaan sääntöä i: poikkeama suurempi kuin sallittu 10 % teoreettisesta intensiteetistä
<i>m/z</i> 112	1,1 %	1,5 %	0,4 %-yksikköä	sovelletaan sääntöä ii: poikkeama pienempi kuin 1 %-yksikkö
<i>m/z</i> 113	1,0 %	1,5 %	0,5 %-yksikköä	sovelletaan sääntöä ii: poikkeama pienempi kuin 1 %-yksikkö

<sup>13</sup> Work Instruction for the evaluation of the results of OPCW proficiency tests; Appendix 1 Analytical Data and Accompanying information, Appendix 1.

## 4.2. Infrapunaspektroskopia<sup>14</sup>

Infrapunaspektrometrialle (IR) on ominaista spesifisyyden puute. IR-analyysi kohdistetaan yleensä aine-erään ilman kromatografista erottelua, jolloin spesifisyysvaje korostuu. Sama IR-analyysitoimintaa harjoittava laboratorio voi toisaalta käyttää erilaisia transmissio- ja heijastusmittaustekniikoita. Harvinaisemmat kromatografiset IR-tekniikat ovat usein toistettavampia, koska niissä saadaan aikaan sekä erottelu että hallittu näytteen syöttö mittauspisteeseen. On syytä muistaa, että eri tekniikoilla tuotetuissa spektreissä voi olla toisistaan poikkeavat piikkien intensiteettitoistettavuudet. Nämä tekijät IR-toimijan on tiedostettava, jotta kvalitatiivisen tunnistuksen oikeellisuutta voidaan arvioida. IR-analyysi tunnistaa kuitenkin yhdisteluokat melko suurella varmuudella.

Kvalitatiivisessa IR-analyysissä voidaan tunnistusta tehdä monella tasolla. Tyypillisiä tapauksia ovat esim:

- puhtaan yhdisteen tunnistaminen (pääkomponentti, ei juurikaan epäpuhtauksia)
- pääkomponentin tunnistus epäpuhtaasta näytteestä
- seoksen komponenttien tunnistaminen
- yhdisteen tai näytteen luokittelu
- seulonta; tunnusomaisten funktionaalisuuksien etsiminen
- epäpuhtauksien tunnistaminen tunnetusta näytteestä
- kahden tai useamman näytteen samankaltaisuuden määrittäminen.

IR-tunnistus perustuu usein tunnetun aineen vertailuspektrin käyttöön. Eräillä toimialoilla halutaan todeta kahden näytteen keskinäinen koostumuksellinen samanlaisuus. Molemmissa tapauksissa lähtökohtaisena ongelmana on:

määrittellä milloin kaksi spektriä ovat samanlaiset

että kahden spektrin samanlaisuuskään ei aina takaa, että kysymyksessä on sama yhdiste

Ensimmäiseen ongelmaan voidaan pureutua tuntemalla toistomittauksien kautta mittaustavalle, näytetyypille ja näytteenvalmistustavalle ominainen piikkien lukumääräinen ja intensiteettitoistettavuus. Jos kahden spektrin erot mahtuvat toistohajonnan sisään, voidaan spektrit tulkita samanlaisiksi. Kaikkien vertailuspektrissä esiintyvien selvien, vaikkakin intensiteetiltään

<sup>14</sup> Teksti perustuu Jari Pukkilan (KRP) ja Martin Söderströmin (VERIFIN) yhteenvetoon kriteereistä. Aiheesta on lisäksi seuraavissa lähteissä: EU:n Komission päätös, 12.8.2002, neuvoston direktiivin 96/23/EY täytäntöönpanosta määrittämenetelmien suorituskyvyn ja tulosten tulkinnan osalta, Euroopan yhteisöjen virallinen lehti, L 221/8, 17.8.2002 ja Work Instruction for the evaluation of the results of OPCW proficiency tests; Appendix 1 Analytical Data and Accompanying information;

heikkojen piikkien tulee esiintyä näytespektrissä. On osattava antaa luonnollinen selitys, jos näytespektrissä on enemmän piikkejä kuin vertailuspektrissä. Kahden IR-spektrin samanlaisuuden määrittäminen perustuu hahmon tunnistukseen. Hieman toisistaan poikkeavat spektrit voidaan tunnistaa samoiksi, mikäli poikkeavuuden syy voidaan selittää. Tällaisia syitä voivat olla esim:

- faasien erilaisuus
- epäpuhtaudet näytteessä
- näytekomponenttien pitoisuuserot
- näytteiden pinta-rakenne yms. (tietyillä mittaustavoilla)

Tunnistuksen apuvälineinä voidaan käyttää tietokonepohjaisia ohjelmistoja, mutta lopullisen samankaltaisuuden voi määrittää vain asiantuntija. Asiantuntijalla on oltava riittävästi kokemusta kyseisen tyyppisistä näytteistä ja yhdisteistä, jotta hän pystyy arvioimaan spektri-informaation riittävyyden: voidaanko yhdiste/näyte todella tunnistaa vai riittääkö spektrin vain kategorisointiin.

Toista ongelmaa voidaan hallita siten, että hahmotetaan se yhdistejoukko, jota IR-analyysin keinoin voidaan todennäköisesti laboratorion toimialueella joutua tunnistamaan. IR:n erotteluvoima tässä joukossa voidaan todeta helposti, vaikka tämä joukko olisi suurikin (>200).

Sekä toistettavuuden että yhdistejoukon hallinnan kannalta olisi edullisinta, että laboratoriollla olisi käytössään sen yleisimmin käytämällä mittaustekniikalla tehty oma spektrikirjasto. Tällöin minimoidaan mittaustekniikoiden ero.

IR-tunnistuksella on lähtökohtainen ja syvenevä epäluotettavuus, jos yllä olevasta tilanteesta loitotaan. Epäluotettavuus on syvimmillään, jos vertailuspektri on tuotettu aivan tuntemattomasta näytteestä erilaisella mittaustavalla ja tämän spektrin intensiteettitaulukkoa ei ole käytettävissä (useimmat painetut spektrikirjastot). Yhdisteluokka on kuitenkin silloinkin yleensä veraten luotettavasti ja helposti todettavissa.

Spektrien laatuun liittyviä vaatimuksia ovat:

- Minimiresoluution tulisi olla  $4 \text{ cm}^{-1}$  kondensoidun faasin (engl. condensed phase) spektrille. Resoluution edelleen parantaminen tuo toisaalta harvoin hyötyä.
- Yksikään absorptiopiikki ei saa olla kyllästynyt.
- Aaltolukualueen tulisi ulottua  $400 \text{ cm}^{-1}$  asti, jos analysoidaan epäorgaanisia yhdisteitä.
- Laitteen tarpeeksi usein tarkastettu valmistajan signaali/kohinasuhdearvoon yltäminen varmentaa pienen intensiteetin piikkien erottumisen.

Vesi-, hiilidioksidi- ja liuotinpiikit tulee tunnistaa spektristä ja huomioida tai eliminoida vertailua tehtäessä.

Koska IR-spektrien ulkonäkö ja laatu riippuvat suuresti mittaustavasta, spektrien vertailuun ja kirjastohakuun on syytä kiinnittää huomiota menetelmiä laadittaessa:

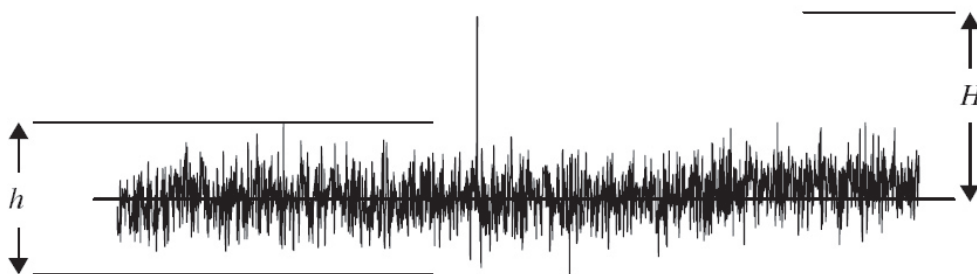
- Itse luodulla kirjastossa spektrit vastaavat hyvin mitattavia, joten ne ovat helposti vertailtavissa.
- Kaupalliset kirjastot yleensä sisältävät eri tavoin ja erilaisin kriteerien mitattuja spektrejä. Tämän lisäksi näytteenvalmistustiedot saattavat olla hyvinkin puutteellisia.
- Kirjamuotoisten spektrien vertailu saattaa olla vaikeaa, koska niiden ulkonäkö ei useinkaan vastaa omalta laitteelta saatavaa. Vertailu voidaan useimmiten tehdä piikki piikiltä, mutta tällöin ei pystytä täysin näkemään spektrikäyrien todellista vastaavuutta. Eräs suurimmista ongelmista on eri faaseissa mitattujen spektrien vertailu.
- Sähköisessä muodossa olevat kirjastot helpottavat spektrien vertailua, koska spektrit voidaan asettaa päällekkäin.
- Erilaiset kirjastohakualgoritmit toimivat hieman eri tavoin. Osa algoritmeista painottaa piikkien tarkkaa paikkaa ja muotoa, toiset taas sallivat enemmän vaihtelua spektreissä. Erilaisten kondensoitujen faasien vertailu (liuokset, nesteet, kiinteät) voidaan suorittaa rajoitetusti, mutta esimerkiksi kaasufaasispektrejä ei voi verrata muissa faaseissa mitattuihin.

Eräs suurimmista ongelmista IR-menetelmissä on se, että niistä saatavan tunnistuksen laatu vaihtelee suuresti. Parhaimmillaan IR-spektrin perusteella voidaan tehdä erittäin luotettava tunnistus (esim. puhdas yhdiste, kaikki funktionaalisuudet näkyvät, hyvä vertailuspektri). Toisaalta laboratorioille ja tutkijalle vieraasta näytteestä on vaikea saada muuta kuin karkea luokittelutulos.

## 4.3 NMR-spektroskopia<sup>15</sup>

NMR-spektroskopiassa voidaan noudattaa seuraavia kriteerejä:

- Näytteenvalmistuksessa käytetty liuotin, pH (mikäli mitattavissa), tutkittavan yhdisteen määrä näytteessä (mikäli määritettävissä), sekä käytetty kemiallisen siirtymän referenssi on raportoitava.
- Riittävät tiedot spektrin tuottamiseen käytetystä laitteistosta sekä ajoparametreista on raportoitava.
- Tunnistettavan yhdisteen resonanssin signaali-kohinasuhde on oltava vähintään 3:1 (lasketaan yhtälön  $S:N = 2.5 \times H/h$  mukaan, missä  $H$  on signaalin korkeus kohinan keskikohdasta, ja  $h$  on kohinan korkeus). Voimakkaan multiplisiteetin omaavilla resonansseilla (esim.  $^1\text{H}$  NMR-spektrissä) signaali-kohinasuhde on oltava sellainen, että multipletin viivan, jonka suhteellinen intensiteetti on yli 10 % multipletin korkeimman viivan intensiteetistä, signaali-kohinasuhteen on oltava yli 3:1.



Kuva 4. NMR-spektrin resonanssin signaali-kohinasuhteen määrittämiseen käytettävän resonanssin korkeus ( $H$ ) sekä kohinan korkeus ( $h$ )<sup>15</sup>

- Tunnistettavan yhdisteen resonanssit eivät saa olla päällekkäin näytteen liuotimpiikin tai epäpuhtauksien resonanssien kanssa, vaan niiden on erotuttava selkeästi spektrissä.
- Resonanssien kemialliset siirtymät, multiplisiteetit, sekä ensimmäisen kertaluvun kytkentävakiot on raportoitava.
- Spektristä tulkitut resonanssit, niiden siirtymät sekä multiplisiteetit on oltava yhtäpitäviä tunnistettavan yhdisteen rakenteen kanssa.

<sup>15</sup> Lähde: Work Instructions for the evaluation of the results of OPCW proficiency test; Attachment 4: Evaluation Criteria for Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectrometric Analyses

## 5 Spektrien tulkinta (GC-MS)

### 5.1 Kirjastospektrien avulla

Laboratorioilla on useimmiten käytettävänään spektrikirjasto-ohjelmia, jotka tulostavat automaattisesti raportin näytespektriä vastaavasta kirjastospektristä. Rutiinianalytiikassa näytespektrin ja kirjastospektrin vastaavuutta kuvataan spektrien yhteensopivuusprosentilla, joka voidaan määrittää eri tavoilla riippuen laitevalmistajasta. Osuman luotettavuus voidaan jakaa karkeasti kolmeen kategoriaan (usein käytetään tavoitetasoarvoa ns. Q eli Qual-arvoa, 0-100).

Jos vastaavuus kirjastospektrin kanssa on hyvä ( $Q \geq 95$ ), kirjastospektri-ohjelman tulos voidaan hyväksyä ilman erillistä tulkintaa edellyttäen, että kirjastospektrossä on riittävästi piikkejä (vrt. kohta 4.1). Hyväänkin tulokseen on kuitenkin suhtauduttava varauksellisesti, jos kirjastossa olevassa spektrissä on vain yksi tai kaksi piikkiä (isotooppiikkein). Tuloksena voi olla korkea Q-arvo, vaikka suurin osa näytteen spektristä jää vastineetta. Periaatteessa massaspektrihaun hyväksyminen olisi hyvä varmentaa visuaalisesti vaikka hakutulos olisi kuinka hyvä. Tulosta on myös aina tarkasteltava retentioaikatietojen valossa. Vain vertailuaineesta tuotettu spektri + retentioaika antaa 95-100 % varmuuden. Yhdistejoukoilla asia saattaa olla monimutkaisempi.

Kun vastaavuus kirjastospektrin ja näytespektrin välillä on kohtalainen ( $60 \leq Q < 95$ ), on tarkistettava, että näytespektri sisältää kaikki kirjastospektrin suurimmat piikit likimain samoissa intensiteettisuhteissa huomioiden kohdassa 4.1 esitetyt tunnistamiskriteerit. Näytespektri ei saa sisältää ylimääräisiä piikkejä em. suurimpien piikkien joukossa. Esim. spektrin piikit molekyyli-onia suuremmilla massoilla (muut kuin isotooppiikit) johtuvat näytteen tai laitteen epäpuhtauksista ja ovat siis virheellisiä yhdisteen kannalta. Myös epäloogiset neutraalifragmentit, jotka ovat molekyyli-ioneita pienemmillä massoilla, johtuvat epäpuhtauksista. Mikäli em. hyväksymiskriteerit eivät toteudu, on kirjastohakuohjelman antama tulos hylättävä ja verrattava spektriä oletetun vertailuaineen spektriin, joka on tuotettu samoissa olosuhteissa.

Jos näytespektrin vastaavuus automaattisen haun kirjastospektriin on huono ( $Q < 60$ ), on haettava uusi näytespektri manuaalisesti. Kokonaisioni-

kromatogrammista (TIC) optimoidaan ko. piikin kohta, josta spektri otetaan. Tarvittaessa käytetään taustavähennystä ja/tai ”keskiarvospektriä”, jotta saataisiin mahdollisimman hyvä kirjastohaku. Mikäli kirjastoista löytyy em. Toimenpiteiden jälkeen kohtalaisen hyvältä näyttävä spektri ( $Q < 60$ ), tarkastellaan sitä kohdan 4.1 kriteerien perusteella. Mikäli kriteerit eivät toteudu, on tulos hylättävä ja verrattava spektriä oletetun vertailuaineen spektriin, joka on tuotettu samoissa olosuhteissa.

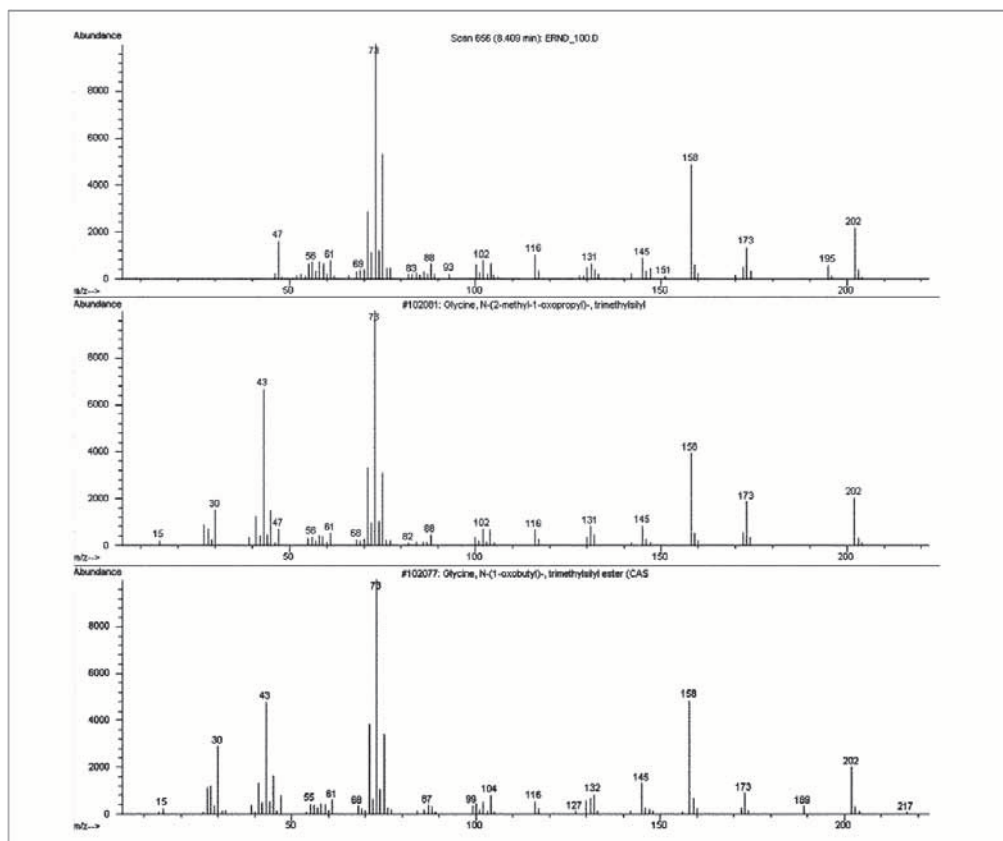
## 5.2 Vertailuainespektrin avulla

Mikäli riittävää samankaltaisuutta näyte- ja kirjastospektrien välillä ei saavuteta, ajetaan tarvittaessa oletettu vastaava puhdas vertailuaine ja tarkistetaan tulos. Tällöin spektrien tulee täsmätä kohdan 4.1 kriteerit huomioiden. Samoin retentioaikojen tulee täsmätä määritellyllä tarkkuudella, yleensä esim  $\pm (3 - 6)$  s. Mahdollinen ristikontaminaation mahdollisuus tulee välttää ajamalla tarpeellinen määrä nolla/liuotinnäytteitä vertailunäytteen ja tutkittavien näytteiden välillä.

Tunnettua puhdasta vertailuainetta käytetään ns. kohdeyhdisteiden tunnistamisessa. Esimerkiksi GC-MS-maaperäanalyysille on laadittu kansainvälinen ISO-standardi.<sup>16</sup> Tätä menettelyä ja siihen liittyviä kriteereitä on kuvattu luvussa 7.

---

<sup>16</sup> ISO 22892: 2006, Soil quality-Guidelines for the identification of target compounds by gas chromatography and mass spectrometry



Kuva 5. Esimerkki kirjastohaun tuloksista (derivatisoitu isobutyryyliglysiini). Ylimpänä kuvassa on näytteestä mitattu spektri. Keskimmäisenä on oikean yhdisteen eli isobutyryyliglysiinin spektri Wileyn kirjastosta, Alimpana on *n*-butyryyliglysiinin spektri. Automaattinen haku ei tunnistanut yhdistettä kirjastosta annetulla Qual-sovituksen tavoitetasolla  $\geq 70$ , vaan haku siirtyi tunnistamattomien spektrien kirjastoon. Vasta manuaalinen tarkastelu ja tavoitetason lasku arvoon 60 tuottivat tuloksen. Sovitus näytteen spektrin ja oikean kirjastospektrin välillä antoi Qual-arvoksi 68. Vastaavasti näytteen ja *n*-butyryyliglysiinin välillä Qual-arvo oli 37. Silmämääräisesti erot spektrien välillä eivät ole kovin suuria. Näytteen spektri on mitattu *m/z*-arvosta 46 alkaen, kun taas kirjastospektri on rekisteröity alemmista *m/z*-arvoista lähtien. Lisäksi näytteen spektrissä on mukana jotain muuta yhdistettä, josta on peräisin ioni 195.<sup>17</sup>

<sup>17</sup> Kuva lainattu artikkelista: Spektreistä metaboliaan: Virtsan orgaanisten happojen massaspektrometrinen analyysi, Ulla Karjalainen, *KLIINLAB* 6/2003



## 5.3 Spektrien tunnistuksen ongelmia

Vääriä tuloksia tai muita ongelmia saattavat aiheuttaa:

- näytteenkäsittelyssä tapahtunut kontaminaatio (likaiset työvälineet)
- ympäristöstä tulevat häiriöt (esim. ilma-analyyseissä)
- ristikontaminaatio mittaauksessa: edellisestä mitattavasta näytteestä siirtyy jotakin yhdistettä seuraavaan tai seuraaviin näytteisiin
- näytteen pitoisuus on liian alhainen: spektri on heikkolaatuinen
- näytteen pitoisuus on liian korkea: piikit ylikuormittuvat ja resoluutio heikkenee
- näytteessä on yhdiste, jossa on esim. -OH, -COOH tai -SO-ryhmiä (leveät piikit)
- häiritsevät taustakemikaalit
- ruisku on tukossa, likainen tai näytettä liian vähän (ylimääräisiä tai ei piikkejä lainkaan)
- GC:n injektori on likainen tai septumi vuotaa
- GC:n injektoripaine ei ole asetetun mukainen
- kolonnin injektorin tai MS:n puoleinen kiinnitys vuotaa
- MS (ionilähde) on likaantunut
- kolonni on likaantunut
- hallintaketjun katkeaminen (esim. virheellisiä näytetietoja)
- väärä tai viallinen vertailumateriaali
- analyysien välinen laitteen stabilointiaika on liian lyhyt

### Spektriä ei ole kirjastossa

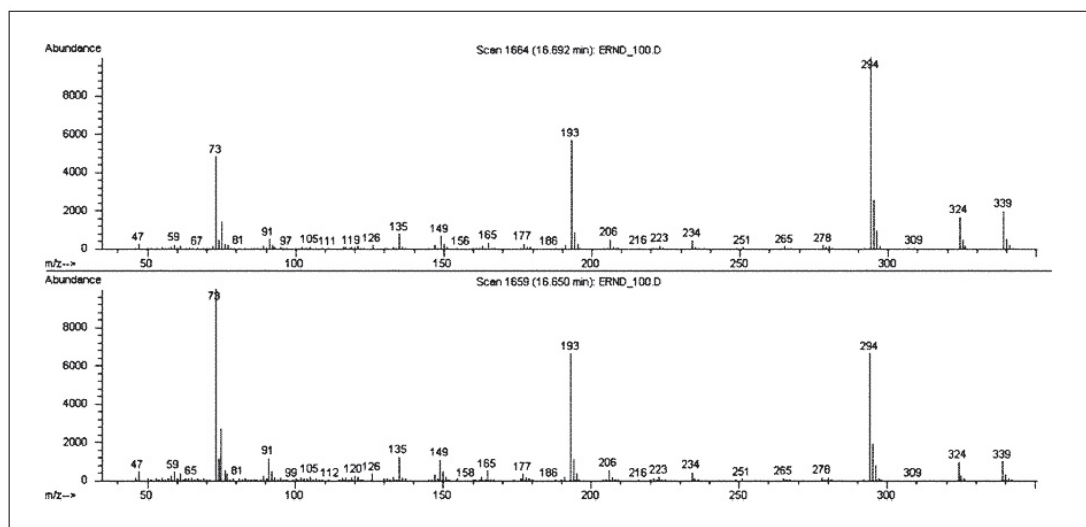
Tavallisin ongelma tunnistuksessa on se, että kirjasto ei sisällä tunnistettavaa spektriä. Tarjolle saattaa tulla spektri, joka antaa vihjeen yhdisteestä. Näin voi käydä, kun yhdisteessä on yhden CH<sub>2</sub>-ryhmän verran pitempi (tai lyhyempi) hiilivetyketju kuin kirjastossa olevassa yhdisteessä. Tällöin molekyyli-ioni ja joukko muita fragmentteja spektrissä eroavat 14 massayksikköä vastaavista fragmenteista toisessa spektrissä. Valitettavasti useimmiten ei käy näin hyvin, vaan lopputoteamukseksi jää ”tuntematon yhdiste”. Täysin vääräkin yhdiste saattaa tällaisessa tapauksessa antaa kohtalaisen hyvän osuvuuden, joten on syytä olla varuillaan, kun tapaa uusia outoja yhdiste-ehdokkaita.

## Spektri kromatografisen piikin eri puolilla

Kromatografia vaikuttaa spektrin muotoon; spektrit ovat erilaiset kromatografisen piikin nousu- ja laskupuolella (kuva 6). Tämä johtuu siitä, että yhdisteen pitoisuus muuttuu spektrin rekisteröinnin aikana. Mitä kapeampia kromatografiset piikit ovat, sitä suurempi on vaikutus. Osa laitteista pyyhkäisee spektrin suuremmista massa-arvoista pienempiin päin, osa toimii päinvastoin. Kromatografisen piikin nousevalla osalla spektrin alemmat  $m/z$ -arvot korostuvat, kun pyyhkäistään suuremmasta pienempään päin. Laskevalla piikin osalla taas korostuvat suuremmat massaluvut. Jos kromatografinen piikki ei ole puhdas ja tunnistukseen haluttava spektri joudutaan ottamaan kromatografisen piikin kyljestä, tämä spektrin vinous voi aiheuttaa sen, että yhdistettä ei tunnisteta, vaikka sen spektri olisikin kirjastossa.

## Yhdisteet, joiden spektri on mitäänsanomaton

Oman ongelmansa muodostavat yhdisteet, jotka fragmentoituvat hyvin pieniksi. Saattaa olla, että ainoat silmällä nähtävät merkittävät fragmentit ovat molemmat esim. derivatisoinnista. Esimerkiksi trimetyylisilaani(TMS)-johdannaisilla on tyypillinen peruspiikki  $m/z$ -arvolla 73. Tämän ja  $m/z$ -arvolla 75 olevan piikin lisäksi ei spektrissä välttämättä ole yhtään yli 10 % spektriviivaa. Kun tällaista spektriä vertaa kirjaston spektriin, ei voi koskaan olla varma siitä, onko jokin matalaintensiteettinen fragmentti peräisin taustasta vai yhdisteestä.<sup>18</sup>



<sup>18</sup> Spektreistä metaboliaan: Virtsan orgaanisten happojen massaspektrometrinen analyysi, Ulla Karjalainen, *KLIINLAB 6/2003*

Kuva 6 Spektrit ovat erilaiset kromatografisen piikin nousevalla ja laskevalla osalla. Oheisen spektrit tuottaneessa analysaattorissa spektrit pyyhkäistään suuremmasta massaluvusta pienempään. Tämän vuoksi kromatografisen piikin nousevalla puolella alemmat massaluvut korostuvat, koska yhdisteen pitoisuus kasvaa pyyhkäisyn aikana. Piikin laskevalla osalla taas korkeat massaluvut korostuvat, koska pitoisuus vähenee alemmille massaluvuille tultaessa. Esimerkkiyhdiste on 3-hydroksihippuraatin TMS-johdannainen. Kuvassa alempi spektri (#1659) on nousevalta ja ylempi spektri (#1664) on laskevalta puolelta kromatografista piikkiä.<sup>16</sup>

## Yhdisteet, joilla on samankaltainen spektri

Yhdisteet, jotka eroavat toisistaan vain aromaattisessa renkaassa olevan substituentin paikan suhteen (p-, m-,o-), antavat hyvin samankaltaisen spektrin. Ionisoituneen yhdisteen molekyyli-ioni on kaikilla kolmella yhdisteellä sama. Kaikista yhdisteistä muodostuu sivuryhmien lohjetessa samankokoisia fragmentteja. Eri asennoissa olevat sivuryhmät ovat jossain määrin eri suhteessa herkkiä lohkeamisen suhteen. Nämä erot näkyvät fragmentti-ionien piikkien intensiteeteissä. Itse aromaattinen rengas on hyvin kestävä rakenteeltaan, eikä se juuri pilkkoudu. Aivan samanlainen ongelma on cis-trans-isomeriaa omaavilla yhdisteillä. Käytettäessä matalan erotuskyvyn massa- spektrometria ei edellä mainittuja yhdisteitä voi luotettavasti tunnistaa pelkän spektrin perusteella. Monista yhdisteistä löytyy kaupallisissa kirjastoissa kaksi tai useampiakin spektrejä. Kun niitä katselee, voi vain todeta, että yhden yhdisteen sisällä tällaiset intensiteettierot ovat suurempia kuin yhdisteiden välillä. Kromatografinen erotus saattaa auttaa tunnistuksessa. Toisinaan erot myös retentioajoissa jäävät kovin pieniksi.<sup>19</sup>

---

<sup>19</sup> Spektreistä metaboliaan: Virtsan orgaanisten happojen massaspektrometrinen analyysi, Ulla Karjalainen, *KLIINLAB 6/200*

## 6 Spektrien tunnistusmenettelyn vaiheet kohdeyhdisteiden analysoinnissa (GC-MS)<sup>20</sup>

Kun tarkoituksena on GC-MS-menetelmää käyttäen tunnistaa tiettyjä kohdeyhdisteitä (engl. target compound) (esim. maaperäanalyseissä PAH- ja PCB-yhdisteet), verrataan analyysin spektriä epäiltyjen kohdeyhdisteiden puhtaiden vertailuaineiden spektreissä esiintyviin diagnostisiin ioneihin. Tavoitteena on, että ko. vertailuaineella tehdyssä kalibrointispektrissä olisi vähintään kolme merkittävää diagnostista ionia ja mikäli mahdollista, molekyyli-ioni tulisi valita yhdeksi diagnostiseksi ioniksi. Suositeltavien diagnostisten ionien suhteellisista intensiteeteistä löytyy luettelo esim. maaperäanalyseihin liittyvässä standardissa.<sup>20</sup>

Kohdeyhdisteiden identifioinnissa on kolme vaihetta:

### Vaihe 1: Kaasukromatografian retentioaikojen tarkastelu

Kaasukromatografilla saadut retentioaikatuloksien tulee täyttää annetut kriteerit. Esim. GC-MS-maaperäanalyseille on annettu seuraavat retentioaikavaatimukset:

- Absoluuttinen retentioaika ei saa erota enempää kuin 1 s jos absoluuttinen retentioaika on < 500 s; tai
- Suhteellinen retentioaika<sup>21</sup> ei saa erota enempää kuin  $\pm 0,2\%$  suhteellisesti jos absoluuttinen retentioaika on > 500 s ja < 5000 s; tai
- absoluuttinen retentioaika ei saa erota enempää kuin 6 s jos absoluuttinen retentioaika > 5000 s; tai
- retentioaika on muulla tavoin määritetty tietyssä käytössä olevassa ohjeessa.

### Vaihe 2: Tunnistuspisteiden määrittäminen eri analyysitekniikoita käyttäen

Kohdeyhdisteen määrittämisessä käytetään apuna massaspektrometrillä tuotettuja tunnistuspisteitä eli diagnostisia ioneja (vrt. kohdan 4.1. taulukot 3 ja 4) tai myös muita analyyttisiä keinoja käyttäen. Jotta analyttistä voitai-

<sup>20</sup> Lähde: ISO 22892: 2006, Soil quality-Guidelines for the identification of target compounds by gas chromatography and mass spectrometry

<sup>21</sup> Suhteellinen retentioaika on kohdeyhdisteen retentioajan ja vastaavan puhtaan vertailuaineen retentioajan suhde.

siin identifioida tietty kohdeyhdiste, on tunnistettava vähintään kolme tunnistuspistettä<sup>22</sup>. Mikäli ehdot vaiheissa 1 ja 2 täyttyvät (retentioaikakriteerit + vähintään 3 tunnistuspistettä) on ko. kohdeyhdiste hyväksyttävästi identifioitu.

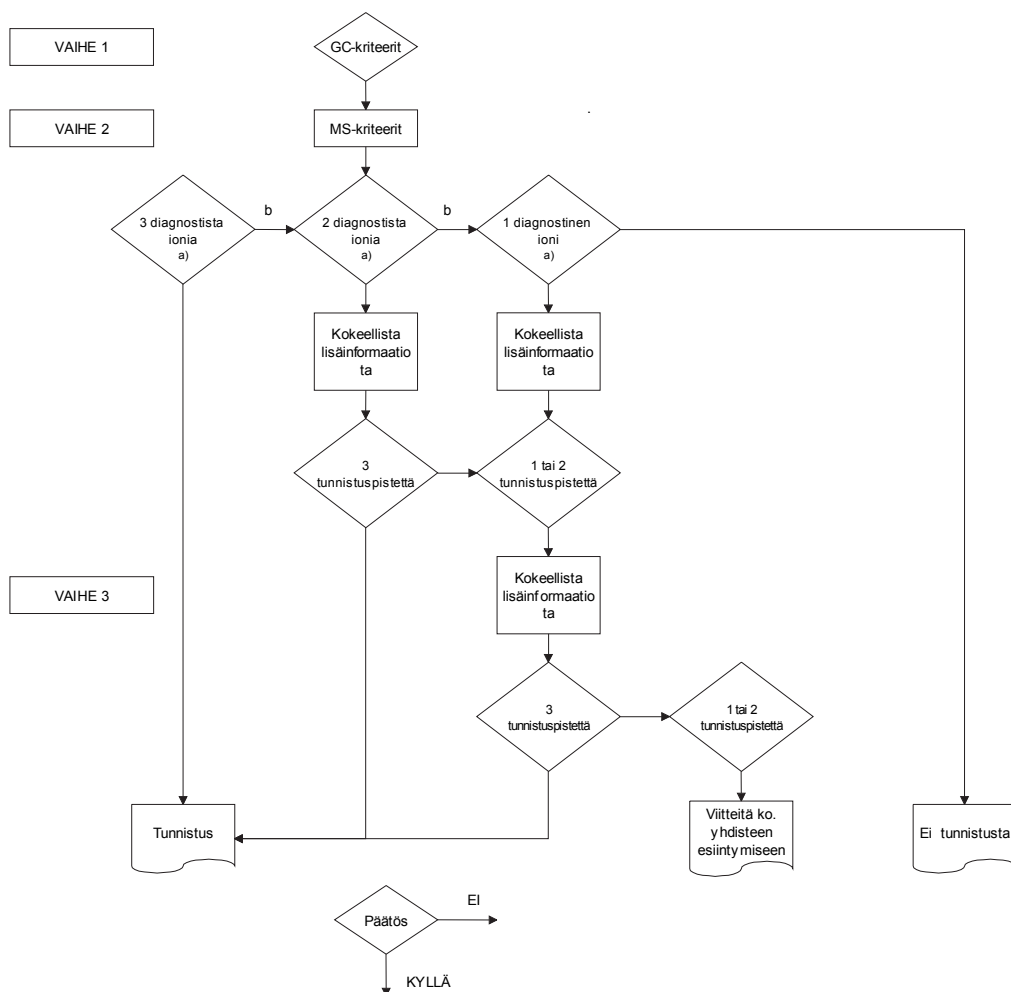
### **Vaihe 3:** Lisätunnistuspisteiden hankinta.

Mikäli vaihe 2 ei tuota hyväksyttävää identifiointitulosta, tarvitaan lisää tunnistuspisteitä. Mikäli tämä ei ole mahdollista ja tunnistuspisteiden määrä rajoittuu yhteen tai kahteen, voidaan todeta, että ko. kohdeyhdisteen on indikoitu mahdollisesti sisältyvän analyysiin. Mikäli massaspektreissä ei esiinny yhtään tunnistuspistettä on analyysin tulos kielteinen.

Kaaviossa 2 on kuvattu kohdeyhdisteiden tunnistamisen vaiheet. Standardissa ISO 22892: 2006 on yksityiskohtaisia esimerkkejä menettelystä maaperäanalyysien osalta.

---

<sup>22</sup> Esim. GC-MS-maaperäanalyysia koskevassa standardissa (viite 20) ehtona on, että analyysin spektrissä diagnostisen ioinin piikin suhteellinen intensiteetti ei saa poiketa enempää kuin  $\pm (0.1 \times I_{std} + 10)$  % kalibrointiyhdisteen spektrin suhteellisista intensiteeteistä. Suhteellinen intensiteetti lasketaan voimakkaimpaan diagnostiseen piikkiin vertaamalla.  $I_{std}$  = kalibrointiliuoksen diagnostisen ionin spektrin suhteellinen intensiteetti.



Kaavio 2. Toimenpidekaavio kohdeyhdisteiden tunnistamisessa GC-MS-analyysimenetelmällä. (lähde: ISO 22892: 2006, Soil quality-Guidelines for the identification of target compounds by gas chromatography and mass spectrometry)

- a) Analyytin diagnostinen ioni huomioidaan vain jos signaali-kohinasuhde  $> 3$   
 b) Sallittu vain jos puuttuvan ionilla on kaikkein pienin intensiteetti ja signaali-kohinasuhde  $< 3$ .



# Liite 1

## Pikatestien luotettavuuden arvioinnissa huomioitavia asioita

Kvalitatiivisia pikatestejä käytetään mm. seulontamenetelminä sekä orgaanisten että epäorgaanisten yhdisteiden toteamiseen mm. ympäristö- ja elintarvikeanalytiikassa sekä kliinisissä määrityksissä. Kaikissa menetelmissä lopputuloksena on tietylle yhdisteelle tyypillinen värireaktio, joka ilmaisee ko. yhdisteen läsnäolon tai poissaolon. Värinmuutosta verrataan joko testin mukana seuraavaan värikarttaan tai värin intensiteetti mitataan fotometrisesti. Usein on vaikea rajata määritystä pelkästään kvalitatiiviseksi, koska pikatestit antavat monesti myös tietoa analysoidun yhdisteen pitoisuudesta. Myös pikatestien luotettavuuden määrittelyyn pätee yleiset kemian metrologiset periaatteet. Vaikka pikatestin valmistaja useimmiten vakuuttaa tuoteselosteessa, että menetelmä on validoitu ko. alan kansainvälisen tai kansallisen järjestön vaatimusten mukaisesti, on pikatestin käyttäjän syytä vielä varmistua sen luotettavuudesta omalla validoinnilla. Tähän kuuluu mm. :

Laitteiston ja mukana tulevien värinmuutosindikaattorien määritysherkkyiden, spesifisyyden ja toteamisrajan määrittäminen jäljitettävillä vertailumateriaaleilla (mikäli mahdollista sertifioituja matriisivertailumateriaaleja käytäen) tai rinnakkaismäärityksin muiden validoitujen vertailumenetelmien kanssa<sup>23</sup>

Häiriökestävyyden ja toimintavarmuuden testaaminen

Laboratoriokohtaisen mittausohjeen laatiminen ml. sisäisen laadunohjauksenohjeet

Henkilöstön koulutus johon sisältyy eri henkilöiden määritystulosten vertailu

Validoinnin laajuus määräytyy luonnollisesti paljon pikatestin käyttötarkoituksesta. Mikäli kyseessä on pelkkä suuntaa antava seulonta-analyysi, voi validointitoimenpiteet olla suppeampia. Sen sijaan jos pikamenetelmää käytetään johonkin ratkaisevaan päätöksentekoon eikä muita tarkempia analyyseja tehdä, on syytä minimoida laajalla validoinnilla väärin negatiivisten tai väärin positiivisten tulosten synty. Näin on laita esim. ihmisten terveydentilan diagnosointiin liittyvien pikatestien kohdalla, päätettäessä jonkin elintarvike-erän ominaisuuksista tai luokiteltaessa ympäristön saastuneisuutta.

---

<sup>23</sup> Esim. valmistajan validointiraportissaan ilmoittama vertailumenetelmä.



Pikatestien mukana seuraa usein erilaisia kalibrointiin tarkoitettuja yhdisteitä, varsinkin jos menetelmään sisältyy pitoisuuden arviointia. Niiden luotavuuteen tulee aina suhtautua varauksellisesti, ellei valmistajan taholta ole osoittaa dokumentoitua (mieluummin sertifioitua) todistetta yhdisteen ominaisuuksista. Mikäli valmistajan antama informaatio ei ole riittävää, on syytä määrittää kalibrointiyhdisteen koostumus ja pitoisuus jollakin kvantitatiivisella menetelmällä.

## Liite 2

# Esimerkkejä tulosten jäljitettävyyden ja vertailtavuuden kannalta tarpeellisten tietojen dokumentointivaatimuksista

### Massaspektrometria (EI-MS)<sup>24</sup>

#### *Tulosten ilmoittaminen*

Seuraavat tiedot tulee liittää jokaisen tuotetun spektrin yhteyteen:

#### **Identifioinnin tulos:**

- Kemiallinen nimi (IUPAC-nimistö)
- CAS rekisterinumero
- Kemiallinen rakenne
- Molekyylikaava
- Identifioinnissa mahdollisesti käytetyn vertailumateriaalin tiedot (spektrikirjaston version nro, ko. spektrin identifiointinumero)

#### **Tiedot analysoidusta näytteestä:**

- Näytteen laatu (puhtaus, esim. pitoisuus, liuotin)
- Näytteen alkuperä (jäljitettävyys)
- Näytteen käsittely

#### **Tiedot analysoinnin suorittajasta:**

- Laboratorion nimi, analysoija nimi
- Allekirjoitus

#### **Laitetiedot:**

- Laitteen valmistaja
- Malli
- Tiedonkeruujärjestelmä
- Ohjelmistotyyppi

#### **Analysointiolosuhteet:**

Näytteensyöttö:

Kaasukromatografi: kolonni (dimensiot, faasi, faasin paksuus)  
lämpötilaohjelma

---

<sup>24</sup> Lähde: VERIFINiltä saatu aineisto: Work Instruction for the evaluation of the results of OPCW proficiency tests; Appendix 1 Analytical Data and Accompanying information, Appendix 2 Evaluation Criteria of Analytical data;

kantajakaasu  
kantajakaasun virtausnopeus  
injektointilämpötila

Suorasyöttölaite:

Muuta:

Syöttölämpötila

Ionilähteenlämpötila

Ionilähteen paine

Elektronien energia

Emissiovirta

Pyyhkäisyalue (amu)

Pyyhkäisyklin aika

Ionien kiihdytysjännite

Analysointipäivämäärä

- Lisäksi voidaan dokumentoida referenssimenetelmä (ei pakollinen OPCW\_ohjeessa)

### **Kaasukromatografian retentioideksitiedot**

Seuraavat tiedot tulee liittää jokaisen retentioindeksin<sup>25</sup> yhteyteen:

#### **Identifioinnin tulos**

- Kemiallinen nimi (IUPAC-nimistö)
- CAS rekisterinumero
- Kemiallinen rakenne
- Molekyylikaava
- Identifioinnissa mahdollisesti käytetyn vertailumateriaalin tiedot (spektrikirjaston version nro, ko. spektrin identifiointinumero)

#### **Tiedot analysoidusta näytteestä:**

- Näytteen laatu (puhtaus, esim. pitoisuus, liuotin)
- Näytteen alkuperä (jäljitettävyyden)

#### **Tiedot analysoinnin suorittajasta:**

- Laboratorion nimi, analysoija nimi

---

<sup>25</sup> Kaasukromatografiassa käytetään ns. lineaarista retentioindeksiä. Tämän mukaan n-paraffiineilla retentioaika on suoraan verrannollinen yhdisteen hiilien lukumäärään. Tämän asteikon mukaisesti määritetään muille aineille retentioindeksi. Kaasukromatografiassa yhdisteiden tunnistaminen voi perustua niiden retentioindekseihin, jotka lasketaan käyttäen apuna vertailuaineita, retentioindeksistandardeja. Hyvän toistettavuuden saavuttamiseksi retentioindeksistandardien tulisi olla kemiallisilta ominaisuuksiltaan tutkittavien yhdisteiden kaltaisia, ja ne tulisi voida injektoida jokaisen näytteen mukana kaasukromatografiin (sisäisen standardin menetelmä). Retentioindeksistandardisarja voidaan määrittää myös eri ajossa kuin näyte (ulkoisen standardin menetelmä), mutta tällöin ei saavuteta yhtä hyvää toistettavuutta ja tarkkuutta.

- Allekirjoitus

**Laitetiedot:**

- Laitteen valmistaja
- Malli
- Tiedonkeruujärjestelmä
- Ohjelmistotyyppi

**Analysointiolosuhteet:**

- GC-kolonne: dimensiot, kiinteä faasi, faasin paksuus
- Lämpötilaohjelma
- Kantajakaasu
- Injektiosysteemi
- Detektiosysteemi
- virtausolosuhteet - vakioaine ja - virtaus
- retentioindeksi standardit
- Analysointipäivämäärä

**Retentioindeksitietoa:**

- Tarkkuus

**NMR spektroskopia****Identifioinnin tulos:**

- Kemiallinen nimi (IUPAC-nimistö)
- CAS rekisterinumero
- Kemiallinen rakenne (ml. atomien numerointi)
- Molekyylikaava
- Identifioinnissa mahdoll. käytetyn vertailumateriaalin tiedot (spektrikirjaston version nro, ko. spektrin identifointinumero)

**Tiedot analysoidusta näytteestä:**

- Näytteen laatu (puhtaus, esim. pitoisuus, liuotin)
- Näytteen konsentraatio
- Käytetty liuotin
- pH
- Vertailuaineen kemiallinen siirtymä (sisäinen/ulkoinen)

**Tiedot analysoinnin suorittajasta:**

- Laboratorion nimi, analysoija nimi
- Allekirjoitus

**Laitetiedot:**

- Laitteen valmistaja
-

- Malli
- Spektrometrin frekvenssi
- Tiedonkeruujärjestelmä
- Ohjelmistotyyppi

#### **Analysointiolosuhteet:**

- Mitatut ytimet ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )
- Näytteen lämpötila
- Spektrin leveys (Hz)
- Fourier-muunnospektrin datapisteet
- Toisto aika
- Pulssin kulma ( $\mu\text{s}$  ja asteita)
- Referenssiipikin leveys (esim. Tetrametyylisilaani, TMS)
- FID:in datapisteet (free induction decay)
- scannausten lukumäärä
- peruspiikin korjaus jos käytössä
- Analysointipäivämäärä

#### **Infrapunaspektroskopia (IR)**

##### **Identifioinnin tulos:**

- Kemiallinen nimi (IUPAC-nimistö)
- CAS rekisterinumero
- Kemiallinen rakenne (ml. atomien numerointi)
- Molekyylikaava
- Identifioinnissa mahdollisesti käytetyn vertailumateriaalin tiedot (spektrikirjaston version nro, ko. spektrin identifiointinumero)

##### **Tiedot analysoidusta näytteestä:**

- Näytteen laatu (puhtaus, esim. pitoisuus, liuotin)
- Näytteen alkuperä (jäljitettävyyys)
- Näytteen faasimuoto

##### **Tiedot analysoinnin suorittajasta:**

- Laboratorion nimi, analysoija nimi
- Allekirjoitus

##### **Laitetiedot:**

- Laitetyyppi (Fourier/grating/prism)
  - Laitteen valmistaja
  - Malli
  - Tiedonkeruujärjestelmä
  - Ohjelmistotyyppi
-

## **Analysointiolosuhteet:**

- Näytetyyppi (nestemäinen, kiinteä, liuos, kaasu)
  - Mittaustapa (transmittanssi, absorbanssi, reflektanssi)
  - Perusviivan korjaus (manuaalinen/automaattinen/ei korjausta)
  - Matriisi
  - Detektori
  - Aaltolukualue
  - Ordinaatta-akselin skaala
  - Resoluutio
  - Skannausten lukumäärä
  - Analysointipäivämäärä
-

## Viimeisimmät julkaisut

- J3/2004 V. Esala, *Pituuden vertailumittaus D6, loppuraportti*
- J4/2004 J. Halttunen, *Coriolis-mittarin vertailumittaus, syksy 2002. Interlaboratory comparison of a Coriolis flowmeter, Autumn 2002*
- J5/2004 L. Uusipaikka, *Suhteellisen kosteuden kalibrointien vertailu, loppuraportti.*
- J6/2004 K. Riski, *Mass Comparison: 2 kg, 100 g, 20 g, 2 g and 100 mg weights.*
- J7/2004 M. Rantanen, S. Semenoja, *Intercomparison in gauge pressure range from 20 Pa to 13 kPa*
- J8/2004 R. Rajala, *Yleismittarin vertailumittaus, loppuraportti*
- J1/2005 T. Ehder (Toim.), *Mikrobiologiset vertailukannat*
- J2/2005 M. Rantanen, G. Peterson, *Pressure comparisons between MIKES and Metrosert: Ranges 95 kPa to 105 kPa absolute and 0,5 MPa to 1,75 MPa gauge*
- J3/2005 M. Rantanen, S. Semenoja, *Calibration of a 130 Pa CDG: comparison of the results from MIKES and PTB*
- J4/2005 T. Weckström, *Lämpötilan mittaus*
- J5/2005 M. Rantanen, S. Semenoja, *Results on the effective area of a DHI piston-cylinder unit with the nominal area of 196 mm<sup>2</sup>*
- J6/2005 T. Ehder (Toim.), *Kemian metrologian opas*
- J7/2005 M. Heinonen, J. Järvinen, A. Lassila, A. Manninen (Eds.), *Finnish National Standards Laboratories Annual Report 2004*
- J8/2005 T. Weckström, *Thermometer comparison L12 in the range from -80 °C to 400 °C*
- J9/2005 V. Esala, *Pituuden vertailumittaus D7, loppuraportti*
- J1/2006 M. Rantanen, S. Semenoja, *Intercomparison in Gauge Pressure Range from -95kPa to +100 kPa*
- J2/2006 M. Heinonen, J. Järvinen, A. Lassila, A. Manninen (Eds.), *Finnish National Standards Laboratories Annual Report 2005*
- J3/2006 K. Riski, L. Stenlund, *Mass Comparison: 610 g laboratory balance*
- J4/2006 M. Heinonen, *Uncertainty in humidity measurements - Publication of the EU-ROMET Workshop P758*