



Kvalitatiivisen kemian metrologia

Metrologian neuvottelukunta

Kvalitatiivisen kemian metrologia

Metrologian neuvottelukunta

Tekninen toimittaja

Jaana Järvinen

VTT MIKES

ISBN 978-951-38-8793-3

VTT Technology 429

ISSN-L 2242-1211

ISSN 2242-122X (Verkkójulkaisu)

DOI: 10.32040/2242-122X.2024.T429

Copyright © VTT 2024

JULKAISIJA – PUBLISHER

VTT

PL 1000

02044 VTT

Puh. 020 722 111

<https://www.vtt.fi>

VTT

P.O. Box 1000

FI-02044 VTT, Finland

Tel. +358 20 722 111

<https://www.vttresearch.com>

Alkusanat

Kemian metrologian tavoitteena on parantaa ja varmentaa kemiallisten mittausten luotettavuutta ja jäljitettävyyttä SI-yksiköihin. Aiheeseen liittyviä oppaita on ilmestynyt englannin kielellä mm. Eurachem:n ja CITAC:n toimesta. Tämän oppaan kanssa samaan aikaan päivitettiin alun perin vuonna 2005 julkaistu suomenkielinen Metrologian neuvottelukunnan kemian ja mikrobiologian jaoston kemian työryhmän tekemä ”Kemian metrologian opas”. Edellä mainituissa oppaissa tarkastellaan aihetta lähinnä kvantitatiivisten määrittymenetelmien kannalta. Sen sijaan kvalitatiivisen analyysin metrologia on jäänyt lähes täysin huomiotta. Siksi Metrologian neuvottelukunnan kemian ja mikrobiologian jaosto katsoi vuonna 2005 aiheelliseksi laatia uuden oppaan kvalitatiivisen analyysin metrologiasta. Nyt tehty päivitys pohjautuu tähän vuonna 2006 julkaistuun versioon, ja Metrologian neuvottelukunta antoi sen laatimisen kemian jaoston tehtäväksi. Tässä oppaassa keskitytään tarkastelemaan aihepiiriä lähinnä spektrometristen määrittymenetelmien kannalta ja eniten massaspektrometrian näkökulmasta, mutta periaatteessa oppaassa esitetyt kvalitatiivisen analyysin tunnistamis- ja jäljitettävyydkriteerit soveltuvat noudatettaviksi kaikissa määrittymenetelmissä.



METROLOGIAN NEUVOTTELUKUNTA

Sisällysluettelo

Alkusanat.....	3
Sisällysluettelo	4
Käytetyt lyhenteet.....	5
1 Kvalitatiivisen analyysimenetelmän periaate	7
2 Kvalitatiivisen analyysimenetelmän luotettavuuden perusteet.....	9
2.1 Kvalitatiivisen analyysin tulosten jäljitettävyyksivaatimukset	10
3 Spektrikirjastojen luotettavuuskriteerit	12
3.1 Spektrikirjastojen virhelähteet.....	13
4 Spektrien tunnistamiskriteerit.....	17
4.1 Massaspektrometria	17
4.1.1 Esimerkkejä isotooppilaskelmista	24
4.2 Fouriermuunnosinfrapunaspektroskopia	25
4.3 NMR-spektroskopia	28
5 Spektrien tulkinta	30
5.1 Kirjastospektrien avulla	30
5.2 Vertailuainespekttrin avulla	31
5.3 Spektrien tunnistuksen ongelmia.....	33
5.3.1 Spektriä ei ole kirjastossa.....	33
5.3.2 Spektri kromatografisen piikin eri puolilla	33
5.3.3 Yhdisteet, joiden spektri on mitäänsanomaton	34
5.3.4 Yhdisteet, joilla on samankaltainen spektri.....	35
6 Spektrien tunnistusmenettelyn vaiheet kohdeyhdisteiden analysoinnissa (GC-MS).....	36
Kiitokset.....	38
Linkkejä ja hyödyllistä kirjallisuutta	39
Liite 1 Pikatestien luotettavuuden arvioinnissa huomioitavia asioita	40
Liite 2 Esimerkkejä tulosten jäljitettävyyden ja vertailtavuuden kannalta tarpeellisten tietojen dokumentointivaatimuksista.....	41

Käytetyt lyhenteet

ATR-FTIR	Attenuated Total Reflection Fourier-Transform InfraRed Spectroscopy (vaimennettu kokonaisheijastus Fourier-muunnosinfrapunaspektroskopia)
EI-MS	Electron Ionisation Mass Spectrometry (elektroni-ionisaatio massaspektrometria)
CAS	Chemical Abstracts Service Registry Number
CITAC	Co-operation on International Traceability in Analytical Chemistry. V.1993 perustetun CITAC:n tavoitteena on edistää olemassa olevien organisaatioiden yhteistyötä parantamaan kansainvälistä kemiallisten mittausten jäljitettävyyttä.
FT-ICR-MS	Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry (Fouriermuunnos ionisyklotroniresonanssi massaspektrometria)
FTIR	Fourier-Transform InfraRed Spectroscopy (Fouriermuunnosinfrapunaspektroskopia)
GC	Gas Chromatography (kaasukromatografia)
GC-MS	Gas Chromatography Mass Spectrometry (kaasukromatografia-massaspektrometria)
GC-MS ⁿ	Gas Chromatography multi-stage Mass fragmentation Spectrometry (kaasukromatografia moniulotteinen massapilkkoutumisspektrometria)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (korkean erotuskyvyn nestekromatografia)
HR-MS	High Resolution Mass Spectrometry (korkean erotuskyvyn massaspektrometria)
IP	Identification Point (tunnistuspiste)
IR	InfraRed (infrapuna)

ISO	International Organisation for Standardization (kansainvälinen standardisointiorganisaatio)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC-MS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry (nestekromatografia massaspektrometria)
LC-MS ⁿ	Liquid Chromatography multi-stage Mass fragmentation Spectrometry (nestekromatografia monivaiheinen massapilkoutumisspektrometria)
LR-MS	Low Resolution Mass Spectrometry (matalan erotuskyvyn massaspektrometria)
MS	Mass Spectrometry (massaspektrometria)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (ydinmagneettinen resonanssi)
NIST	National Institute of Standards and Technology (Yhdysvaltain kansallinen metrologialaitos)
OPCW	Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons (Kemiallisten aseiden kieltojärjestö)
Q-TOFMS	Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry (kvadrupolilentoaikamassaspektrometria)
SIM	Selected Ion Monitoring (ionimonitorointitekniikka)
SRM	Selected Reaction Monitoring (reaktiomonitorointitekniikka)
TIC	Total Ion Chromatogram (kokonaisionikromatogrammi)
TLC	Thin Layer Chromatography (ohutkerroskromatografia)
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography (erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia)
UV	Ultraviolet (ultravioletti)
WADA	World Antidoping Agency (Maailman antidopingorganisaatio)

1 Kvalitatiivisen analyysimenetelmän periaate

Kvalitatiivinen eli laadullinen analyysi voidaan määritellä esimerkiksi analyyttiseksi menetelmäksi, joka antaa vastauksen yhdisteen läsnäolosta/poissalosta, onko tulos positiivinen/negatiivinen tai onko tulos yksinkertaisesti kyllä/ei verrattuna johonkin ennalta asetettuun kynnyksarvoon 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 riippuvat menetelmien suorituskyvystä. Suorituskyvyn ja käyttötarkoituksen perusteella menetelmät voidaan jakaa erilaisiin ryhmiin. Kaikissa menetelmissä on lähtökohtana yhdisteen tunnistaminen. 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.

Tunnistusmenetelmillä (engl. identification methods) tutkittava yhdiste voidaan tunnistaa yksiselitteisesti tietyllä pitoisuustasolla. Menetelmät on suunniteltu rutiinikäyttöön ja ne voivat olla sekä kvalitatiivisia että kvantitatiivisia. Orgaanisessa analytiikassa tunnistusmenetelmät perustuvat yleensä kromatografisiin tekniikoihin.

Varmistusmenetelmillä (engl. verification methods) voidaan yksiselitteisesti tunnistaa ja/tai kvantitoida tutkittavat yhdisteet. Varmistusmenetelmät ovat tieteellisesti perusteltuja määritysmenetelmiä, joiden luotettavuus on todettu ja spesifisyys, tarkkuus ja erotuskyky tunnetaan hyvin. Varmistusmenetelmien on perustuttava molekyyli-spektrometriaan, joka antaa suoraa tietoa tutkittavan yhdisteen molekyyli-rakenteesta. Orgaanisen analytiikan menetelmät perustuvat enimmäkseen massaspektrometrisiin tekniikoihin. Varmistusmenetelmiä käytetään esimerkiksi silloin, 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 ja kromatografiset menetelmät, joilla tunnistetaan alkuaineita, yhdisteitä tai yhdisteryhmiä. Näitä ovat mm. UV (ultravioletti)-, IR (infrapuna)- ja NMR (ydinmagneettinen resonanssi)-spektroskopia ja massaspektrometria (MS) sekä niihin liittyvät kaasu (GC)- tai nestekromatografiset (LC) yms. erotusmenetelmät. Tässä oppaassa ei selvitetä eri menetelmien periaatteita vaan oletetaan, että kyseiset menetelmät ovat lukijalle

tunnettuja. Oppaassa tarkastellaan pääasiassa edellä mainittujen menetelmien antamien tulosten metrologisia näkökohtia. Sen sijaan kvalitatiivisen kemiallisen analyysin binääriseen luonteeseen kuuluvia tilastollisia tarkasteluja ei esitetä. Niitä on laajemmin esitetty muun muassa EU:n komission rahoittamassa MEQUALAN-projektin loppuraportissa¹. Pääosa oppaan sisällöstä tarkastelee massaspektrometriin menetelmiin liittyviä metrologisia näkökohtia.

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

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

Koska kvalitatiiviset mittaukset ovat on/ei-analyyseja, 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. Massaspektrometrinen mittausten spesifisyys riippuu suoraan laitteistojen erotuskyvystä. Korkeaa erotuskykyä tarvitaan muun muassa silloin, kun matriisissa on mitattavien yhdisteiden kaltaisia yhdisteitä, jotka häiritsevät mittausta. Toisaalta erilaisilla erillisten ionien seurantaan perustuvilla menetelmillä voidaan spesifisyyttä lisätä merkittävästi.

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

¹ European Commission (2002) Metrology of Qualitative Chemical Analysis (MEQUALAN), Final Report, Contract G6MA-CT2000-01012, <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/afa0233e-7b8e-497e-bce8-b3c17136cd53>.

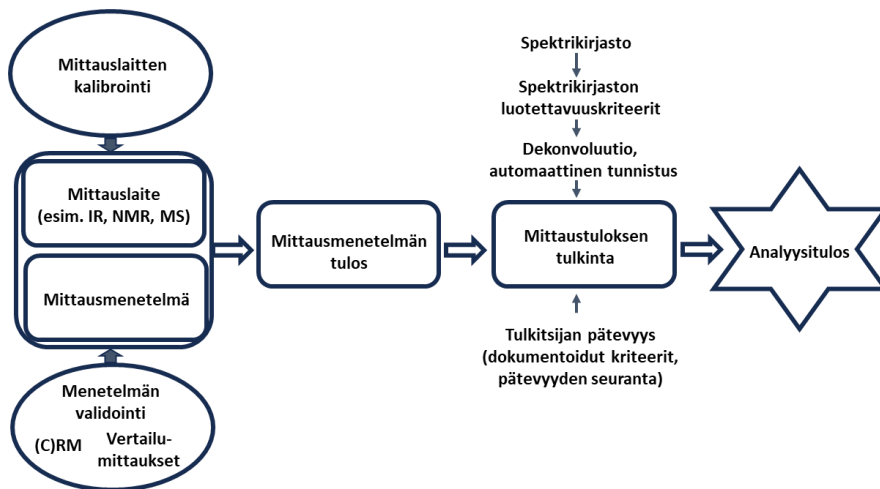
2 Kvalitatiivisen analyysimenetelmän luotettavuuden perusteet

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

- jäljitettävyysskysymykset (näytteenoton jäljitettävyys, analyysimenetelmän jäljitettävyys, laitteiden kalibrointien metrologinen jäljitettävyys)
- menetelmän validointi/verifointi
- kvalitatiivisen analyysin tulosten tulkinnan luotettavuuden arviointi (spektrikirjastot, tulkitsijan pätevyys)
- sisäinen laadunvarmistus ja vertailumittaukset.

Laitteiden kalibroinnissa pätevät samat jäljitettävyysvaatimukset kuin kvantitatiivisissakin analyyseissa. Tarvitaan sertifioituja vertailumateriaaleja tai niiden puuttuessa laboratorion sisäisiä vertailumateriaaleja, joiden luotettavuustaso on tunnistettu. Esimerkiksi massaspektrometrialaitteiston valmistajan laitteen mukana toimittamiin kalibrointiyhdisteisiin tulisi suhtautua kriittisesti, jos niiden puhtautta ja säilyvyyttä ei ole määritelty. Ihanteellisinta olisi, että tällaisetkin yleisesti käytetyt kalibrointiyhdisteet olisivat sertifioituja vertailumateriaaleja, mikä ei ole mahdollista kaikissa tapauksissa. Tämän vuoksi käytettävän vertailumateriaalin säilyvyyttä täytyy tarkkailla vertaamalla tietyllä ajanhetkellä mitattua vertailumateriaalin spektriä lähtötilanteessa mitattuun, mieluiten laitteen asennuksen yhteydessä tuotettuun vertailuaineen spektriin. Kalibroinnin lisäksi myös itse mittausten menetelmä tulee olla validoitu sekä mahdollisuuksien mukaan vertailumittauksin todettu täyttävän vaaditut kriteerit. Metrologiset periaatteet ovat siten samoja kuin kvantitatiivisenkin analyysin kohdalla. Näitä aiheita on käsitelty mm. Metrologian neuvottelukunnan laatimassa kemian metrologian oppaassa². Kuvassa 1 on esitetty erilaisilla spektroskooppisilla menetelmillä saatujen tulosten jäljitettävyystarpeita.

² Metrologian neuvottelukunta (2024) Kemian metrologia, VTT Technology.



Kuva 1. Kvalitatiivisen analyysin jäljitettävyystarpeet.

Kvalitatiivisten analyysien kohdalla ei voida varsinaisesti puhua tulosten mittausepävarmuuden (engl. measurement uncertainty) numeerisesta määrittämisestä vaan pikemminkin mittaustuloksen tulkinnan epävarmuuden arvioinnista (engl. unreliability). Positiivisemmassa mielessä voitaisiin puhua paremminkin luotettavuudesta, eli onko analyysin perusteella tulkittu tulos ”kyllä/ei” katsottava luotettavaksi. Lähtökohtana on luonnollisesti edellä mainittujen kolmen seikan läpikäynti ((metrologinen) jäljitettävyys, validointi, sisäinen laadunvarmistus/vertailumittaukset). Seuraavaksi kysymykseksi tulosten luotettavuuden arvioinnissa nousee yhdisteiden tai funktionaalisten ryhmien tunnistamisessa käytetyt vertailutiedot. Näitä 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, laitetyyppi, 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 tulkittessaan kirjastohaun antamia tuloksia.

2.1 Kvalitatiivisen analyysin tulosten jäljitettävyystvaatimukset

Mitattuun 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 -olosuhteista huomioiden myös kalibrointiaineiden ja käytettyjen reagenssien metrologinen jäljitettävyyden. Tällöin tuotetun spektrin perusteella saadut tulkintatulokset alkuaineista tai yhdisteistä ovat vertailukelpoisia muiden vastaavalla tekniikalla tehtyjen analyysien kanssa.

Analyysitulokseen tulee liittää myös tietoa tavasta, millä kyseessä oleva yhdiste on tunnistettu, esimerkiksi:

- vertaamalla tuloksia vertailumateriaalilla saatuihin tuloksiin
- vertaamalla tuloksia käytettävissä oleviin spektrikirjastoihin
- asiantuntemukseen perustuvan 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 tulkintaan liittyviä kriteereitä.

3 Spektrikirjastojen luotettavuuskriteerit

Kaupallisesti saatavien kirjastojen lisäksi laboratorio voi kerätä omaan tarpeeseensa liittyvien yhdisteiden spektrit sisäiseksi spektrikirjastoksi. Itse kerätyn kirjaston 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 synnyttämiselle olennaiset mittaolosuhteet on dokumentoitu
- 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 tärkeätä tietää, millä menetelmällä (IR, MS, NMR) sisäinen vertailumateriaali on tunnistettu ja puhtaus määritetty)
- yhdisteiden analysoinnissa on osoitettu menetelmän luotettavuus ja sitä kautta spektrin luotettavuus vertailumittauksin
- spektrin on hyväksynyt sisäiseen kirjastoon laboratorion siihen valtuuttama ja pätevoittämä henkilö (vrt. akkreditointivaatimukset henkilöstön dokumentoidusta 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 (katso viiteluettelo).

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 molekyyliässä olevien atomien määrään
- sopivatko yhdisteen nimi, molekyylikaava/molekyylipaino ja spektri yhteen
- käytetäänkö IUPAC-nimistöä
- onko kirjaston yhdisteellä CAS-rekisterinumero.

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

3.1 Spektrikirjastojen virhelähteet

Kirjastojen pohjana on usein joukko monista eri lähteistä koottuja spektrikokoelmia ja spektrien keräys on lisäksi tapahtunut useiden vuosien ajan, joten spektrien laatu saattaa vaihdella. Muun muassa vuonna 1999 NIST:n massaspektrikirjastossa havaittiin sitä tarkastettaessa useita virheellisyyksiä³. Melko yleinen virhe oli se, että kemiallinen molekyylikaava ei ollut yhtäpitävä ilmoitetun yhdisteen molekyyllipainon kanssa. Virheitä oli oletettavasti aiheuttanut tietokoneen ohjelmointivirhe. Seuraavassa on lueteltu joitakin edellä mainitussa NIST:n tutkimuksessa käytettyjä arviointikriteerejä, joiden tunteminen voi auttaa massaspektrometrien spektrikirjastojen käyttäjää 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. 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.

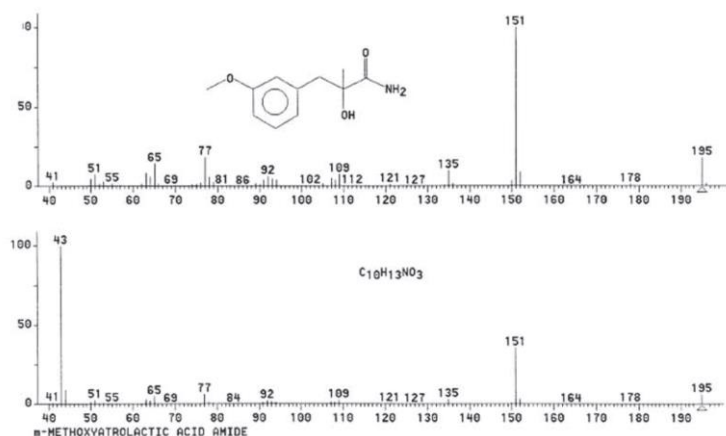
Spektrikirjastojen tarkistuksissa on havaittu useita eri virhelähteitä. Yleisin virhe on epäpuhtauksista johtuvat piikit kirjaston spektrissä. Virheellisyyksiä spektriin voivat aiheuttaa epäpuhtautena olevien vesi- tai ilmamolekyylien aikaansaamat hallitsevat piikit. Epäpuhtaus voi johtua kromatografian 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 2 on esimerkki tällaisesta havainnosta kirjaston spektrissä sekä tarkistettu spektri. Epäpuhtaudesta aiheutuvia piikkejä voi myös olla vanhemmissa spektreissä ajalta, jolloin spektrometrilaitteisiin ei vielä ollut kytketty kromatografeja.

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

Virheen spektrissä voi aiheuttaa myös ns. kemiallinen ionisaatio-efekti. Jos spektri on määritetty sellaisissa olosuhteissa, joissa ionit törmäilevät

³ Ausloos, P., Clifton, C.L., Lias, S.G., Mikaya, A.I., Stein, S.E., Tchekhovskoi, D.V., Sparkman, O.D., Zaikin, V., ja Damo Zhu, (1999) The critical evaluation of a comprehensive mass spectral library, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 10, 287-299.

ionisaatiokammiossa neutraalien molekyylien kanssa ennen niiden havaitsemista, voi tiettyjen yhdisteiden kohdalla tapahtua protonien siirtymistä ionisoidusta molekyylistä neutraaliin molekyyliin. Tällöin spektrissä voi esiintyä protonoituneiden molekyylien aiheuttamana merkittävästi korkeampia isotooppiikkejä molekyyli-onia yhtä yksikköä ylempänä. Kemiallisen ionisaatioefektin ei kuitenkaan ole todettu muuttaneen merkittävästi pääosaa spektristä. Tyypillisesti tällaisia piirteitä voidaan havaita vanhemmissa ioniloukkua hyödyntävissä kaasukromatografi-massaspektrometreissa. Kemiallista ionisaatiota ei pidä sekoittaa elektroni-ionisaatioon. Elektroni-ionisaatiossa korkeaenerginen ionisuihku (50 eV - 150 eV, yleensä 70 eV) kohdistetaan ionisaatiokammiossa kaasumuodossa oleviin näytemolekyyliin. Tämän seurauksena molekyylit ionisoituvat ja pilkkoutuvat yhdisteille tyypillisellä tavalla tuottaen sähköisesti varautuneita fragmentteja.



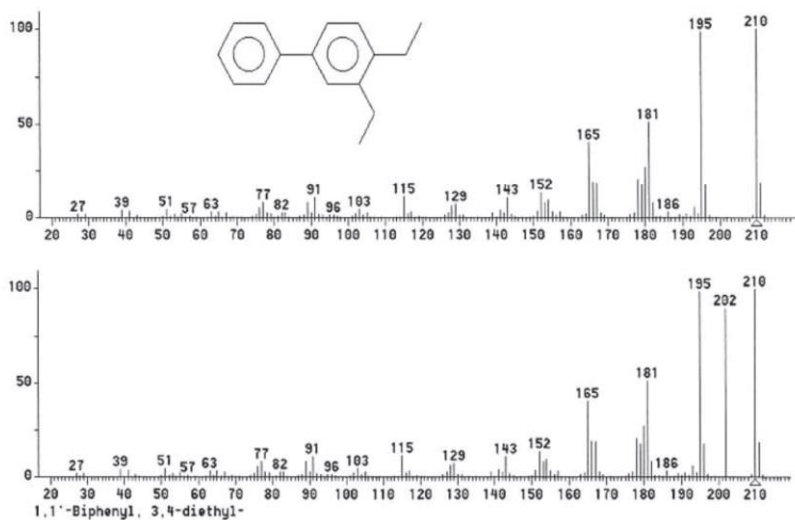
Kuva 2. Alimmaisessa alkuperäisessä kirjastospektrissä oli iso piikki m/z -arvossa 43. Tämä ei vastaa loogisesti yhdisteestä pääteltäviä fragmentteja. Siksi piikki m/z -arvolla 43 poistettiin spektristä (ylin spektri), koska se todennäköisimmin johtuu epäpuhtauksista⁴.

Joissakin spektreissä havaittiin yhden tai useamman piikin siirtyneen yhden yksikön verran niiden loogiselta tai odotetulta paikalta. Nykyaikaisilla laitteilla siirtymävirhe johtuu yleensä virheellisestä kalibroinnista tai liian pitkistä kalibroitivälistä.

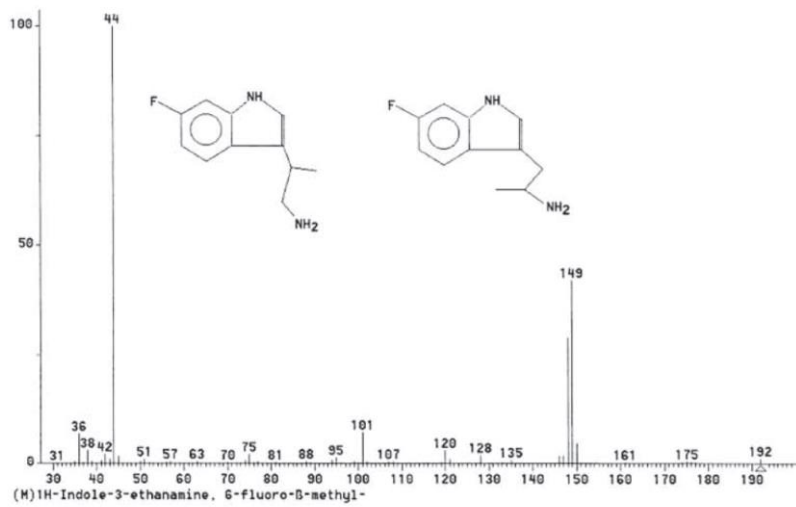
⁴ NIST (1992) spektrikirjasto.

Joskus spektrissä esiintyy laitteen kohinasta johtuvia piikkejä. Tällaiset piikit on helppo havaita, koska ne ovat epäloogisissa paikoissa, eikä niihin liity isotooppiikkejä (kuva 3).

Spektrikirjaston spektreissä havaittiin myös virheitä spektreihin liitettyissä molekyylikaavoissa. Esimerkki tällaisesta virheestä ja tarkistuksesta on kuvassa 4. Lähtökohtaisesti spektristä ei tulisi poistaa piikkejä.



Kuva 3. Spektrikirjaston spektrissä oli intensiivinen piikki m/z -arvolla 202 (alimmainen spektri). Tällä piikillä ei ollut isotooppiikkiä eikä se sijainnut loogisessa paikassa. Kirjastospektristä kyseinen piikki poistettiin kohinapiikkinä (ylimmäinen spektri).⁴



Kuva 4. Kirjastospektri ja yhdisteen nimi vastasivat toisiaan, mutta molekyylikaava ei. Kuvassa vasemmalla puolella oleva virheellinen rakennekaava uusittiin (oikealla)⁴.

4 Spektrien tunnistamiskriteerit

4.1 Massaspektrometria

Massaspektrometrisiä menetelmiä käytetään yhdisteiden ja yhdisteryhmien tunnistamiseen monilla aloilla, kuten ympäristö- ja elintarvikeanalytiikassa, lääketeollisuudessa, orgaanisen ja biokemian tutkimuksessa, prosessihäiriöiden selvittämisessä, tuotteiden laadunvalvonnassa, epäorgaanisen kemian erityisongelmien ratkaisemisessa, kliinisessä kemiassa, öljynjalostuksessa ja petrokemian teollisuudessa sekä kaasujen puhtauden ja koostumuksen määrittämisessä. Joillakin aloilla, kuten elintarvike-, ympäristö- ja dopinganalytiikassa, on massaspektrometriseen tunnistamiseen olemassa kansainvälisiä vaatimuksia. Myös tietyille erityisaloille, kuten kemiallisen aseiden kieltosopimusta valvovalle kansallisille viranomaisille, on annettu tiukat spektrien tunnistamiskriteerit. Huomioimalla näiden eri alojen vaatimukset soveltuvin osin, voidaan massaspektrometrinen tunnistaminen luotettavuutta lisätä myös muilla aloilla. Siksi on hyödyllistä käydä omien määritysten yhteydessä läpi seuraavassa esitetty yhteenveto eri alojen tärkeimmistä tunnistamiskriteereistä.

WADA (Maailman antidopingorganisaatio) määrittelee omassa ohjeistuksessaan massaspektrometrille tunnistamiselle muun muassa seuraavia kriteerejä⁵:

- Yksivaiheisella massaspektrometrialla (MS) tulee löytyä vähintään 3 diagnostista piikkiä ja monivaiheisella massaspektrometrilla (MSⁿ) tulee monitoroida vähintään kahta lähtöioni-tuoteionisiirtymää.
- Diagnostisten piikkien vaste-kohinasuhteen tulee olla > 3:1.
- Verrattaessa tutkittavan yhdisteen diagnostisia ioneja analyysissä käytetyn vertailuaineen spektriin, spektriipiikkien suhteelliset intensiteetit eivät saa erota taulukossa 1 ilmoitettuja arvoja enempää:

⁵ WADA (2023) Technical Document TD2023IDCR: Minimum criteria for chromatographic-mass spectrometric confirmation of the identity of analytes for doping control purposes, 14.2.2023, WADA Laboratory Expert Group.

Taulukko 1. Suurimmat sallitut ionien suhteellisten intensiteettien toleranssit erilaisia massaspektrometrisia menetelmiä käytettäessä (doping-analytiikka).

Suhteellinen intensiteetti (% peruspiikistä)	GC-EI-MS, GC-CI-MS, GC-MS ⁿ , LC-MS, LC-MS ⁿ jne.	Esimerkki näytteen kromatogrammissa	
		Suhteellinen intensiteetti vertailunäytteessä (% peruspiikistä)	Suurin sallittu toleranssi näytteen kromatogrammissa (% vertailunäytteen peruspiikistä)
> 50 %	±10 % (absoluuttinen)	100	100
		95	85–105
		60	50–70
< 50 % ja ≥ 25 %	±20 % (suhteellinen)	40	32–48
< 1–25 %	±5 % (absoluuttinen)	10	5–15
		3	>0–8

Vastaavasti EU:n komissio on antanut ohjeistusta elintarvikeanalytiikan määrittämenetelmiä varten. Taulukoissa 2, 3 ja 4 on esitetty kyseisiä kriteerejä.

Taulukko 2. Suurimmat sallitut ionien suhteellisten intensiteettien toleranssit erilaisia massaspektrometrisia menetelmiä käytettäessä (eläinperäisten elintarvikkeiden analytiikka)⁶.

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

- Diagnostisten ionien ja/tai lähtöioni/tuoteioniparien suhteelliset intensiteetit on tunnistettava vertaamalla spektrejä tai integroimalla yksittäiset massavasteet. Jos käytetään taustakorjausta, sitä on käytettävä samalla tavalla koko sarjassa ja se on ilmoitettava selkeästi.
- Jos kokonaisspektrit (full scan) mitataan yhdellä ainoalla massaspektrometrillä, määrittäksessä on oltava vähintään neljä ionia,

⁶ EU:n Komission päätös 2002/657/EY, neuvoston direktiivin 96/23/EY täytäntöönpanosta määrittämenetelmien suorituskyvyn ja tulosten tulkinnan osalta, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FI/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002D0657>.

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.

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

Taulukko 3. Erilaisten massafragmenttiluokkien ja saatujen tunnistuspisteiden välinen suhde.

MS-menetelmä	Tunnistuspisteitä ionia kohti
Matalan erotuskyvyn massaspektrometri (LR-MS)	1,0
LR-MS ⁿ lähtöioni	1,0
LR-MS ⁿ siirtymätuotteet	1,5
Korkean erotuskyvyn massaspektrometri (HR-MS)	2,0
HR-MS ⁿ lähtöioni	2,0
HR-MS ⁿ siirtymätuotteet	2,5

Jotta varmistuksen edellyttämät tunnistuspisteet voidaan myöntää ja tunnistuspisteiden summa laskea:

- on mitattava vähintään yksi ionisuhde
- kaikkien relevanttien mitattujen ionisuhdeiden on täytettävä yllä kuvatut vaatimukset
- tunnistuspisteiden vähimmäismäärän saavuttamiseksi voidaan yhdistää enintään kolme eri menetelmää.

Huomautuksia taulukkoon 3:

- Kukin ioni voidaan laskea vain kerran.
- GC-MS, jossa käytetään elektroni-ionisaatiota (EI), katsotaan eri menetelmäksi kuin GC-MS, jossa käytetään kemiallista ionisaatiota (CI).
- Eri analyyttejä voidaan käyttää lisäämään tunnistuspisteiden lukumäärää vain, jos johdosten reaktiokemiat ovat erilaisia.
- Jos määrityksessä käytetään jotakin seuraavista tekniikoista: full-scan -diodirividetektoriin (DAD) kytketty HPLC, fluoresenssidetektoriin kytketty HPLC, immunogrammiin kytketty HPLC tai kaksikulotteinen TLC kytkettynä spektrometriseen detektioon; enintään yksi tunnistuspiste voidaan tuottaa, mikäli menetelmien relevantit vaatimukset täyttyvät.

- Siirtymätuotteet sisältävät sekä tuotteet että toisen generaation tuotteet.

Massaspektrometrin yhteydessä käytettävä kromatografinen menetelmä vaikuttaa merkittävästi tunnistuspisteiden saavuttamiseen (taulukko 4).

Taulukko 4. Esimerkkejä eri tekniikoilla ja niiden yhdistelmillä saatavien tunnistuspisteiden määrästä (n = kokonaisluku).

Tekniikka/tekniikat	Ionien lukumäärä	Tunnistus-pisteet
GC-MS (EI tai CI)	N	n
GC-MS (EI tai 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 lähtöioni ja 2 tuoteionia	4
LC-MS-MS	1 lähtöioni ja 2 tuoteionia	4
GC-MS-MS	2 lähtöionia, kummallakin 1 tuoteioni	5
LC-MS-MS	2 lähtöionia, kummallakin 1 tuoteioni	5
LC-MS-MS-MS	1 lähtöioni, 1 tuoteioni ja 2 toisen generaation tuoteionia	5,5
HRMS	N	2n
GC-MS ja LC-MS	2 + 2	4
GC-MS ja HRMS	2 + 1	4

- 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 ylikyllästyminen. (On silti muistettava, että on olemassa yhdisteitä, joissa on luonnostaan kaksi tai useampia lähellä 100 % olevia piikkejä. Näissä tapauksissa on varmistettava spektrin oikeellisuus huolellisesti esimerkiksi isotooppisuhteista.).
- Spektri tulee hylätä, jos se sisältää massoja, joita ei voida tulkita piikkoutumissääntöjen avulla ja jotka eivät sisälly muihin saman yhdisteen tai samanlaisten yhdisteiden spektreihin.
- Spektri on hylättävä, jos massaspektri sisältää isotooppien piikkejä, jotka eivät ole selitettävissä oletetun isotooppijakauman perusteella (engl. isotope pattern). Ohjeena jatkoarvioinnille on, että muiden tekijöiden ohella tulisi tarkistaa tärkeimmän isotoopin absoluuttinen intensiteetti ja laskea vastaava teoreettinen intensiteetti huomioiden seuraavat säännöt:
 - i. kun massapiikki isotooppijakaumassa on ≥ 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.

OPCW:n (Kemiallisten aseiden kieltojärjestö) vertailumittauksissa on käytössä vastaava tunnistuspisteiden arviointi, joskin hieman erilaisella kriteeristöllä kuin EU:n komission ohjeistuksessa. Korkeintaan 3:lla eri tekniikalla tulee saavuttaa vähintään 5 pistettä, jotta tunnistaminen voidaan katsoa riittäväksi.

Taulukko 5. Arviointikriteerit OPCW:n vertailumittausten ohjeistuksen mukaan⁷.

Tekniikka/tekniikat	Ionien lukumäärä	Tunnistuspisteet
Full scan		
GC tai LC-HRMS	-	4
GC-MS (EI)	-	3
GC-MS (CI)	-	2
LC-MS	-	2
SRM		
GC- tai LC-MS-MS (SRM)	2 lähtöioni-tuoteionisiirtymää	3
GC- tai LC-MS-MS (SRM)	1 lähtöioni-tuoteionisiirtymä	2*
Tuote- tai lähtöionien skannaus		
GC- tai LC-MS/MS	1 lähtöioni, 2 tuoteionia	3
GC- tai LC-MS/MS	1 lähtöioni, 1 tuoteioni	2*
GC- tai LC-HRMS/MS	2 HR tuote- tai lähtöionia	4
GC- tai LC-HRMS/MS	1 HR tuote- tai lähtöioni	2*
GC- tai LC-HRMS/MS	1 HR lähtöioni ja 1 HR tuoteioni	4
LC-MS/MS/MS	1 lähtöioni, 1 tuoteioni ja 1 toisen generaation tuoteioni	3
SIM		
GC- tai LC-HRMS	2 HR ionia	4
GC-MS (EI) ja (CI)	2 ionia EI:llä, 2 ionia CI:llä	5
GC-MS (EI) ja LC-MS	2 ionia molemmista	5
Ei-massaspektrometriset menetelmät		
GC tai LC	-	1

*Hyväksytty vain yhden menetelmän raportoinnissa per kierros.

⁷ OPCW Work Instruction for the reporting of the results of the OPCW biomedical proficiency tests.

Huomio taulukkoon 5:

- Vaadittujen ionien ja siirtymien minimimäärä on kerrottu taulukossa. On suositeltavaa valita useampi tunnistettava ioni tai siirtymä ja raportoida ne.
- Tiettyjen massaspektrometrinen menetelmien, kuten HRMS, full scan, SRM ja tuote-/lähtöionit antavat enemmän informaatiota verrattuna SIM:n tai ei-massaspektrometrinen menetelmien antamaan informaatioon.

Lisäksi EU:ssa noudatetaan torjunta-aineiden jäämäanalytiikassa DG SANTE:n ohjeistusta liittyen menetelmien validointiin ja laadunvalvontaan. Ohjeistuksen tarkoituksena on harmonisoida jäämäanalytiikan toteuttamista EU:n virallista valvontaa varten. Ohjeistus keskittyy pääasiassa kvantitatiiviseen analytiikkaan, mutta ottaa myös kantaa seulontamenetelmien käyttöön. Ohjeessa annetaan kriteerit massaspektrometrinen tunnistamisen tekemiseen taulukon 6 mukaisesti⁸:

⁸ DG SANTE (2021) Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, SANTE/11312/2021, https://food.ec.europa.eu/system/files/2022-02/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2021-11312.pdf.

Taulukko 6. Arviointikriteerit SANTE/11312/2021 ohjeistuksen mukaan.

MS detektori		Menettely	Vaatimukset tunnistamiselle	
Resoluutio	Tyypillinen laitteisto (esimerkkejä)		Pienin ionien määrä	Muuta
Yksikkö-resoluutio	MS, kvadrupoli, ioniloukku, TOF	full scan, rajattu <i>m/z</i> -alue, SIM	3 ionia	S/N > 3 ^{a)}
	MS/MS, kolmois-kvadrupoli, ioniloukku, Q-loukku, Q-TOF, Q-Orbitrap		2 tuoteionia	Molempien tuoteionien analyttiipikkien tulee olla täysin kromatografisesti toisensa peittäviä. Näytteestä todetun yhdisteen ionisuhteiden tulee olla ±30 % (suhteellinen) verrattuna vastaavaan kalibrointi-standardiin.
Tarkan massan määrittäminen	Korkean resoluution massaspektrometri: (Q-)TOF (Q-)Orbitrap FT-ICR-MS sektori-MS	full scan, rajattu <i>m/z</i> -alue, SIM, piikkoutuminen lähtöionien suhteen tai ei tai kombinaatio edellä mainituista	2 ionia, joiden massan tarkkuus on < 5 ppm ^{a) b) c) d)}	S/N > 3 ^{a)} Lähtöionien analyttiipikkien tulee olla täysin kromatografisesti toisensa peittäviä. Ionisuhteille ei tekniikasta johtuen vaadita täydellistä vastaavuutta, mutta niitä tulee hyödyntää tunnistamisessa.

- a) mieluiten sisältäen molekyyli-ionin, (de)protonoidun molekyylin tai addukti-ionin
 b) sisältäen vähintään yhden fragmentti-ionin
 c) <1 mDa, kun *m/z* <200
 d) kun kohinaa ei ole, vasteen tulee olla näkyvillä vähintään 5 skannauksessa

4.1.1 Esimerkkejä isotooppilaskelmista

Esimerkki 1⁹: Esimerkki isotooppilaskennasta yhdisteelle C₆H₁₆NO₃P

Mittaustulokset yhdisteelle C₆H₁₆NO₃P:

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 C₆H₁₆NO₃P 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.

⁹ Work Instruction for the evaluation of the results of OPCW proficiency tests: Appendix 1 Analytical Data and Accompanying information, Appendix 1.

Esimerkki 2⁹: Esimerkki isotoopilaskennasta yhdisteelle C₃H₆CIS

Taulukko 7. Yhdisteen C₃H₆CIS massaspektrin ionien mitattu ja teoreettinen suhteellinen intensiteetti, poikkeama ja sovellettu sääntö mitatulle suhteelliselle intensiteetille.

Yhdisteen C ₃ H ₆ CIS spektrin ionirakenne	Mitattu suhteellinen intensiteetti	Teoreettinen suht. intensiteetti	Poikkeama	Mitattu suhteellinen intensiteetti
<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

4.2 Fouriermuunnosinfrapunaspektroskopia

Fouriermuunnosinfrapunaspektroskopia (FTIR) on nopea tunnistuskeino, joka soveltuu olomuodoiltaan vaihteleville näytteille ilman molekyyllipaino-, haihtuvuus- tai varausrajoitteita. FTIR:lle on kuitenkin ominaista tietynasteinen spesifisyyden puute. FTIR-analyysi kohdistetaan yleensä aine-erään ilman kromatografista erottelua. FTIR-mittausta käytetään, koska se on tehokas ja nopea väline erityisesti aineluokkatunnistuksissa, esimerkiksi muovien geneerisen pääluokan toteamisessa. Aineluokkien sisällä FTIR-mittauksen tunnistuskyky yleensä heikkenee. Erilaisiin homologiasarjoihin kuuluvien yhdisteiden erottaminen toisistaan on yleensä mahdotonta. Tunnistus aineluokan sisällä on kuitenkin mahdollista, jos käytettävissä on laaja, aineluokakohtainen vertailuaine- tai spektrikokoelma tai jos toimija tuntee aineluokan piirteet hyvin tai jos mahdollisten vaihtoehtojen määrä on melko suppea ja toimija tuntee FTIR:n erottelukyvyn tässä joukossa.

FTIR-analyysitoimintaa harjoittava laboratorio voi käyttää erilaisia FTIR-mittaustekniikoita. Vaihtoehtoina on tarjolla erilaisia transmissio- ja heijastustekniikoita, joskin nykyisin vaimennettuun kokonaisheijastukseen (ATR) tai transmissioon (ml. FTIR-mikroskooppi) perustuvat tekniikat ovat lähes syrjäyttäneet muut tekniikat. On syytä muistaa, että eri tekniikoilla tuotetuissa FTIR-spektreissä voi olla toisistaan poikkeavat piikkien intensiteettisuhteet. Esimerkiksi ATR-mitatun ja transmissiomitatun näytteen spektrit poikkeavat toisistaan piikkien intensiteettisuhteiden osalta. Nämä perusasiat FTIR-toimijan on tiedostettava.

Kvalitatiivisessa IR-analyysissä voidaan tunnistusta tehdä moneen tarkoitukseen. Tyypillisiä tapauksia ovat esimerkiksi:

- puhtaan yhdisteen tunnistaminen/laadunvarmistus (pääkomponentti, ei juurikaan muita ainesosia)
- pääkomponentin/kiinnostavan komponentin tunnistus epäpuhtaasta näytteestä
- seoksen eri komponenttien tunnistaminen
- yhdisteen tai aineen aineluokkatunnistus
- seulonta; tunnusomaisten funktionaalisuuksien etsiminen
- epäpuhtauksien tunnistaminen tunnetusta näytteestä
- kahden tai useamman näytteen koostumuksellisen samankaltaisuuden määrittäminen IR-aktiivisten aineiden osalta.

FTIR-tunnistus perustuu yleensä vertailuspektrin käyttöön. Eräillä toimialoilla halutaan yhdisteluokkatunnistuksen sijasta 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 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 esimerkiksi:

- epäpuhtaudet näytteessä
- näytekomponenttien pitoisuuserot
- näyteiden pintarakenne yms. (tietyillä mittaustavoilla).

Tunnistuksen apuvälineinä voidaan käyttää tietokonepohjaisia ohjelmistoja, mutta lopullisen samankaltaisuuden voi todeta 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 saatu spektri vain yhdisteluokitteluun.

Toista ongelmaa voidaan hallita siten, että hahmotetaan se yhdistejoukko, jota FTIR-analyysin keinoin voidaan todennäköisesti laboratorion toimialueella joutua tunnistamaan. FTIR:n erotteluvoima tässä joukossa voidaan todeta helposti, vaikka tämä joukko olisi suurikin (>200). Tietynlaisessa toisessa ääripäätilanteessa ollaan laboratorioissa, joissa toimitaan aidosti tuntemattomien näytteiden tunnistustehtävissä ja tuleva näyteaineisto voi olla mitä vain. Näissä tilanteissa FTIR on usein seulontaväline, jonka tuloksen perusteella valitaan seuraavat tunnistusmittausvälineet. ATR-FTIR on mittauksen teknisen helppouden ja nopeutensa takia erinomainen seulontatyökalu.

FTIR-toiminnan kannalta olisi edullisinta, että laboratoriolle olisi käytössään sen yleisimmin käyttämällä mittaustekniikalla tehty oma spektrikirjasto. Käytännössä kuitenkin yleensä hankitaan myös kaupallisia kirjastoja. Tällöin on välttämätöntä, että kaupallinen spektrikirjasto on tuotettu samalla mittaustekniikalla, jota käytetään laboratoriossa.

FTIR-tunnistuksella on lähtökohtainen ja syvenevä epävarmuus, jos yllä olevasta tilanteesta loitotaan. Epävarmuus on syvimmillään, jos aivan tuntemattoman näytteen spektri on tuotettu eri tekniikalla kuin kirjastospektri. Tämä tilanne voi koittaa, jos spektrikirjastona on vain vanha painettu kirja, jossa ei ole spektrikohtaisia piikkitaulukkoja aaltolukuineen ja josta ei ilmene mittaustapa. Yhdisteluokka voidaan kuitenkin silloinkin yleensä todeta harjaantuneen käyttäjän toimesta.

Spektrien laatuun liittyviä vaatimuksia ja toimenpiteitä ovat:

- Minimiresoluution tulisi olla 4 cm^{-1} kondensoidun faasin (engl. condensed phase) spektrille. Resoluution edelleen parantaminen tuo toisaalta harvoin hyötyä.
- Yksikään absorptiopiikki ei saa olla kyllästynyt.
- Analysoitaessa epäorgaanisia yhdisteitä aaltolukualueen tulisi ulottua 400 cm^{-1} asti.
- Tarpeeksi usein tarkastettu valmistajan vaste/kohinasuhdearvoon yltäminen varmentaa pienen intensiteetin piikkien erottumisen.
- Laitteen autodiagnostiikkatoimintoa käytetään riittävän usein.
- Laitteen aaltolukuasteikko kalibroidaan asianmukaisesti.

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

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

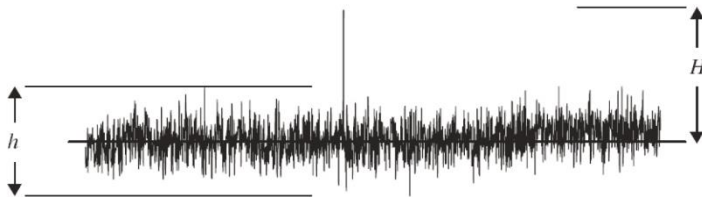
- Itse luodussa kirjastossa spektrit vastaavat hyvin mitattavia, joten ne ovat helposti vertailtavissa.
- Kaupalliset kirjastot yleensä sisältävät eri tavoin ja erilaisin kriteerien mitattuja spektrejä. Tämän lisäksi näytteenvalmistustiedot saattavat olla hyvinkin puutteellisia.
- Kirjamuotoisten spektrien 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.
- Sähköisessä muodossa olevat kirjastot helpottavat spektrien vertailua, koska spektrit voidaan asettaa päällekkäin. Huomattakoon kuitenkin, että asiantuntija ratkaisee samanlaisuuden.
- 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.

Parhaimmillaan FTIR-mittauksella voidaan saavuttaa erittäin luotettava tunnistus (esim. puhdas yhdiste, kaikki funktionaalisuudet näkyvät, hyvä vertailuspektri). On myös mahdollista, että laboratoriolle ja tutkijalle vieraasta näytteestä on vaikea saada muuta kuin karkea aineluokittelutulos. Viimeksi mainitussa tilanteessa FTIR-käyttäjältä edellytetään korostunutta asiantuntemusta.

4.3 NMR-spektroskopia

NMR-spektroskopiassa luotettavan tunnistuksen tulee 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. ^1H 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 5).



Kuva 5. NMR-spektrin resonanssin signaali-kohinasuhteen määrittämiseen käytettävän resonanssin korkeus (H) sekä kohinan korkeus (h).¹⁰

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

¹⁰ Work Instructions for the reporting of the results of OPCW proficiency test; Attachment 10: Reporting Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectrometric data.

5 Spektrien tulkinta

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 kirjastospektrissä on riittävästi piikkejä (vrt. kohta 4.1). Hyväänkin tulokseen on kuitenkin suhtauduttava varauksellisesti, jos kirjastossa olevassa spektrissä on vain yksi tai kaksi piikkiä (isotooppi-*piikkeineen*). 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 tunnistuksen oikeellisuudesta. 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 edellä mainittujen suurimpien piikkien joukossa. Esimerkiksi spektrin piikit molekyyli-*ionia* suuremmilla massoilla (muut kuin isotooppi-*piikit*) johtuvat näytteen tai laitteen epäpuhtauksista ja ovat siis virheellisiä yhdisteen kannalta. Myös epäloogiset neutraalifragmentit, jotka ovat molekyyli-*piikkiä* pienemmillä massoilla, johtuvat epäpuhtauksista. Mikäli edellä mainitut hyväksymiskriteerit eivät toteudu, on kirjastohakuohjelman antama tulos hylättävä ja verrattava spektriä oletetun vertailuaineen spektriin, joka on tuotettu samoissa olosuhteissa.

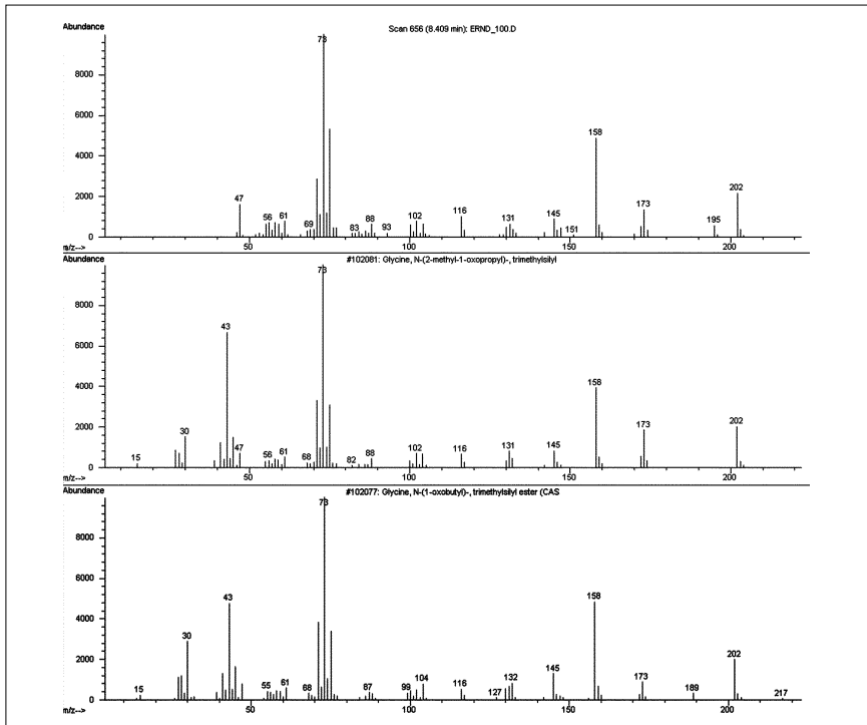
Jos näytespektrin vastaavuus automaattisen haun kirjastospektriin on huono ($Q < 60$), on haettava uusi näytespektri manuaalisesti. Kokonaisionikromatogrammista (TIC) optimoidaan kyseisen piikin kohta, josta spektri otetaan. Tarvittaessa käytetään taustavähennystä ja/tai ”keskiarvospektriä”, jotta saataisiin mahdollisimman hyvä kirjastohaku. Mikäli kirjastoista löytyy näiden toimenpiteiden jälkeen kohtalaisen hyvältä näyttävä spektri ($Q > 60$), tarkastellaan sitä kohdan 4.1 kriteerien perusteella (kuva 6). Tarkistetaan myös, että kirjastospektri on tuotettu samalla spektrialueella kuin näytespektri (eroa saattaa olla varsinkin matalilla *m/z* arvoilla). 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 uusi vertailuspektri oletetusta vastaavasta puhtaasta vertailuaineesta ja tarkistetaan tulos. Tällöin spektrien tulee täsmätä kohdan 4.1 kriteerit huomioiden. Samoin retentioaikojen tulee täsmätä määritellyllä tarkkuudella, yleensä esimerkiksi ($\pm 3-6$) s. Mahdollinen ristikontaminaation mahdollisuus tulee välttää ajamalla tarpeellinen määrä nolla-/liuotinnäytteitä vertailunäytteen ja tutkittavien näytteiden välillä.

Tunnettua puhdasta vertailuainetta käytetään niin sanottujen kohdeyhdisteiden tunnistamisessa. Esimerkiksi GC-MS-maaperäanalyysille on laadittu kansainvälinen ISO-standardi¹¹. Tätä menettelyä ja siihen liittyviä kriteereitä on kuvattu luvussa 6.

¹¹ SFS-EN ISO 22892:2011, Soil quality. Guidelines for the identification of target compounds by gas chromatography and mass spectrometry.



Kuva 6. Esimerkki kirjastohaun tuloksista (derivatisoitu isobutyryyliyksiini). Ylimpänä kuvassa on näytteestä mitattu spektri. Keskimmäisenä on oikean yhdisteen eli isobutyryyliyksiinin spektri Wileyn kirjastosta ja alimpana on n-butyryyliyksiinin spektri. Automaattinen haku ei tunnistanut yhdistettä kirjastosta annetulla Qual-sovituksen tavoitetasolla ≥ 70 , vaan haku siirtyi tunnistamattomien spektrien kirjastoon. Vasta manuaalinen tarkastelu ja tavoitetaso lasku arvoon 60 tuottivat tuloksen. Sovitus näytteen spektrin ja oikean kirjastospektrin välillä antoi Qual-arvoksi 68. Vastaavasti näytteen ja n-butyryyliyksiinin 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 195.¹²

¹² Karjalainen, U. (2003) Spektreistä metaboliaan: Virtsan orgaanisten happojen massaspektrometrinen analyysi, KLIINLAB 6/2003.

5.3 Spektrien tunnistuksen ongelmia

Vääriä tuloksia tai muita ongelmia saattavat aiheuttaa:

- näytteenkäsittelyssä tapahtunut kontaminaatio (esim. likaiset työvälineet)
- ympäristöstä tulevat häiriöt (esim. ilma-analyyseissä)
- ristikontaminaatio mittauksessa: edellisestä mitattavasta näytteestä siirtyy jotakin yhdistettä seuraavaan tai seuraaviin näytteisiin
- näytteen pitoisuus on liian alhainen: spektri on heikkolaatuinen
- näytteen pitoisuus on liian korkea: piikit saturoituvat ja resoluutio heikkenee
- näytteessä on yhdiste, jossa on esim. -OH, -COOH tai -SO-ryhmiä (leveät piikit poolittomalla kolonnilla)
- häiritsevät taustayhdisteet
- ruisku on tukossa tai likainen, siellä on ilmakuplia 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.

5.3.1 Spektriä ei ole kirjastossa

Tavallisin ongelma tunnistuksessa on se, että kirjasto ei sisällä tunnistettavaa spektriä. Spektri voi antaa kuitenkin vihjeen yhdisteestä. Näin voi käydä, kun yhdisteessä on esim. yhden CH₂-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. Spektrikirjasto-ohjelmilla saattaa olla spektritulkintaa helpottavia ominaisuuksia, joita kannattaa hyödyntää, vaikka sopivaa spektriä ei löydykään. Joskus voi riittää, että yhdisteelle määritetään ryhmää ja tulos ilmaistaan esim. muodossa "tuntematon alkoholi".

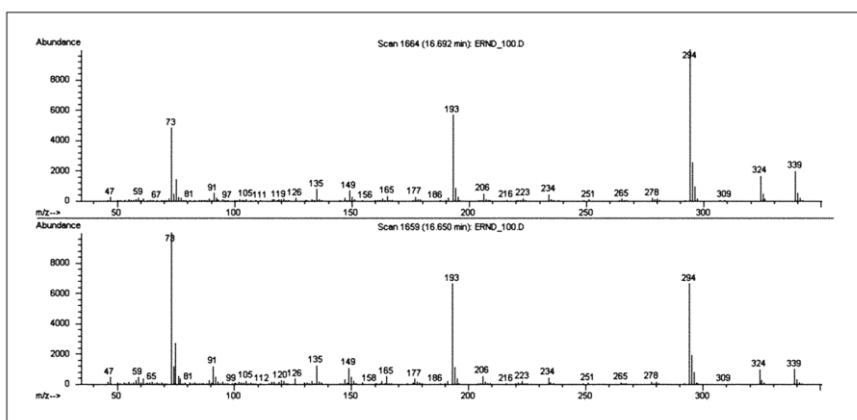
5.3.2 Spektri kromatografisen piikin eri puolilla

Kromatografia vaikuttaa spektrin muotoon; spektrit ovat erilaiset kromatografisen piikin nousu- ja laskupuolella (kuva 7). Tämä johtuu siitä, että yhdisteen pitoisuus muuttuu spektrin rekisteröinnin aikana. Mitä kapeampia kromatografiset piikit ovat,

sitä suurempi on kyseinen 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, voi spektrin vinous aiheuttaa sen, että yhdistettä ei tunnisteta, vaikka sen spektri olisikin kirjastossa.

5.3.3 Yhdisteet, joiden spektri on mitänsanomaton

Oman ongelmansa muodostavat yhdisteet, jotka fragmentoituvat hyvin pieniksi. Saattaa olla, että ainoat silmällä nähtävät merkittävät fragmentit ovat molemmat peräisin esimerkiksi 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 täysin varma siitä, onko jokin matalaintensiteettinen fragmentti peräisin taustasta vai yhdisteestä.



Kuva 7. Spektrit ovat erilaiset kromatografisen piikin nousevalla ja laskevalla osalla. Oheiset spektrit tuottaneessa analysoijassa 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. Esimerkkihdiste on 3-hydroksihippuraatin TMS-johdannainen. Kuvassa alempi spektri (#1659) on nousevalta ja ylempi spektri (#1664) on laskevalla puolelta kromatografista piikkiä.

5.3.4 Yhdisteet, joilla on samankaltainen spektri

Yhdisteet, jotka eroavat toisistaan vain aromaattisessa renkaassa olevan substituentin paikan suhteen (p-, m-, o- eli paikkaisomeerit), 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 massaspektrometria 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.

6 Spektrien tunnistusmenettelyn vaiheet kohdeyhdisteiden analysoinnissa (GC-MS)

Kun tarkoituksena on GC-MS-menetelmää käyttäen tunnistaa tiettyjä kohdeyhdisteitä (engl. target compound) (esim. maaperäanalyseissä PAH- ja PCB-yhdisteet), verrataan analyytin spektriä epäiltyjen kohdeyhdisteiden puhtaiden vertailuaineiden spektreissä esiintyviin diagnostisiin ioneihin. Tavoitteena on, että kyseisellä vertailuaineella tehdyssä vertailuspektrissä olisi vähintään kolme merkittävää diagnostista ionia ja mikäli mahdollista, molekyyli-ioni tulisi valita yhdeksi diagnostiseksi ioniksi. Suositeltavien diagnostisten ionien suhteellisista intensiteeteistä löytyy luettelo esimerkiksi maaperäanalyysiin liittyvässä standardissa (EN ISO 22892:2011).

Kohdeyhdisteiden identifioinnissa on kolme vaihetta:

Vaihe 1: Kaasukromatografian retentioaikojen tarkastelu

Kaasukromatografilla saatujen retentioaikojen tulee täyttää annetut kriteerit. Esimerkiksi 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 (kohdeyhdisteen retentioajan ja vastaavan puhtaan vertailuaineen retentioajan suhde) 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.

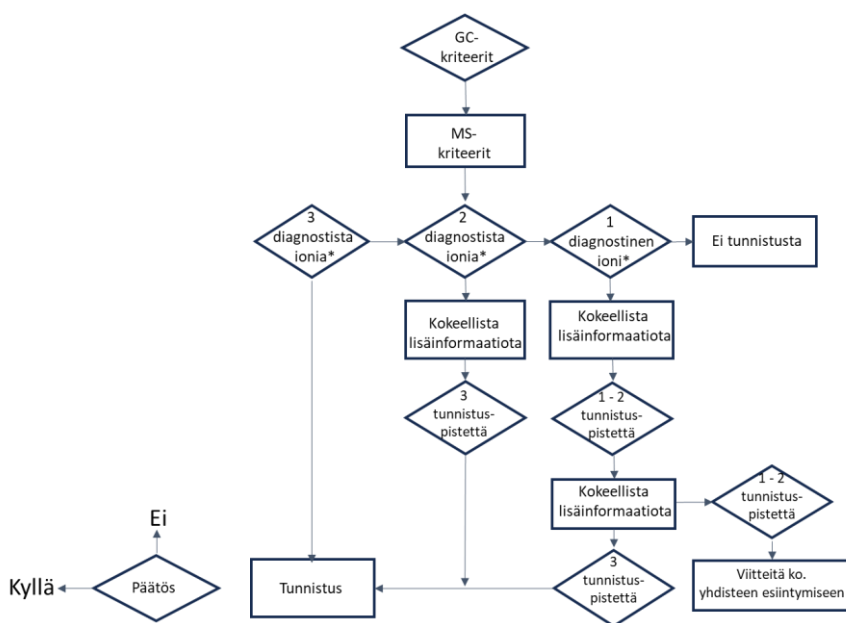
Vaihe 2: Tunnistuspisteiden määrittäminen eri analyysitekniikoita käyttäen

Kohdeyhdisteen määrittämisessä käytetään apuna massaspektrometrillä tuotettuja tunnistuspisteitä eli diagnostisia ioneja (vertaa kohdan 4.1. taulukot 3 ja 4) tai muita analyytisiä keinoja. Jotta analyytistä voitaisiin identifioida tietty kohdeyhdiste, on tunnistettava vähintään kolme tunnistuspistettä. Mikäli ehdot vaiheissa 1 ja 2 täyttyvät (retentioaikakriteerit + vähintään 3 tunnistuspistettä) on kyseessä oleva 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 kyseisen kohdeyhdisteen on indikoitu mahdollisesti sisältyvän analyysiin. Mikäli massaspektreissä ei esiinny yhtään tunnistuspistettä on analyysin tulos kielteinen.

Kuvassa 8 on kuvattu kohdeyhdisteiden tunnistamisen vaiheet. Standardissa EN ISO 22892:2011 on yksityiskohtaisia esimerkkejä menettelystä maaperäanalyysien osalta.



Kuva 8. Toimenpidekaavio kohdeyhdisteiden tunnistamisessa GC-MS-analyysimenetelmällä.⁶ *Analyysin diagnostinen ioni huomioidaan vain, jos vaste-kohinasuhde > 3.

Kiitokset

Oppaan ensimmäisen version (J5/2006) laadinnassa on ollut mukana Metrologian neuvottelukunnan kemian työryhmä: 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) ja Tapio Ehder, siht. (MIKES).

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

Lisäksi oppaasta antoivat 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) ja Sinikka Vainiotalo (TTL).

Tämän version laadinnassa on ollut mukana Metrologian neuvottelukunnan kemian jaoston työryhmä: Sari Hemminki (Tukes), Margareta Hägg (FINAS), Katriina Kyllönen (Ilmatieteen laitos), Sani Marttila (Keskusrikospoliisi), Arto Mustonen (Tullilaboratorio), Satu Mykkänen (Ruokavirasto), Mikael Wasberg (Turun yliopisto), Teemu Näykki (Syke), Evgeny Parshintsev (Työterveyslaitos), Suvi Hietämäki (HUSLAB), Pirjo Sainio (Tullilaboratorio) ja Annikki Welling (Ruokavirasto).

Kutsuttuina asiantuntijoina toimivat Martti Heinonen (VTT MIKES), Jaana Järvinen (VTT MIKES), Raimo Ketola (Terveysten ja hyvinvoinnin laitos), Riitta Koivikko (Syke), Maija-Liisa Mattinen (Tullilaboratorio), Jari Pukkila (Keskusrikospoliisi), Tina Suominen (THL) ja Paula Vanninen (VERIFIN).

Linkkejä ja hyödyllistä kirjallisuutta

Linkkien toimivuus on tarkistettu oppaan julkaisuhetkellä keväällä 2024.

EURACHEM <https://www.eurachem.org/>

CAS <https://www.cas.org/>

CITAC <https://www.citac.cc/>

IUPAC <https://iupac.org/>

NIST <https://www.nist.gov/>

CAS-rekisteri <https://www.cas.org/cas-data/cas-registry>

Otanta kaupallisista kirjastoista:

NIST <https://chemdata.nist.gov/>

Massbank <https://massbank.eu/MassBank/>

Wiley <https://sciencesolutions.wiley.com/solutions/technique/gc-ms/>

Jokaisella laitevalmistajalla on tarjota laitteistoonsa sopivia kirjastoja. Lisäksi tarjolla on useita avoimen lähdekoodin kirjastoja.

Liite 1 Pikatestien luotettavuuden arvioinnissa huomioitavia asioita

Kvalitatiivisia pikatestejä käytetään muun muassa seulontamenetelminä sekä orgaanisten että epäorgaanisten yhdisteiden toteamiseen esimerkiksi ympäristö- ja elintarvikeanalytiikassa sekä kliinisissä määrityksissä. Kaikissa menetelmissä lopputuloksena on tietylle yhdisteelle tyypillinen värireaktio, joka ilmaisee kyseessä olevan yhdisteen läsnäolon tai poissaolon. Värimuutosta 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 kyseisen alan kansainvälisen tai kansallisen järjestön vaatimusten mukaisesti, on pikatestin käyttäjän syytä vielä varmistua sen luotettavuudesta omalla validoinnilla. Tähän kuuluu muun muassa:

- Laitteiston ja mukana tulevien värinmuutosindikaattorien määritysherkkyuden, spesifisyyden ja toteamisrajan määrittäminen metrologisesti jäljitettävillä vertailumateriaaleilla (mikäli mahdollista sertifioituja matriisivertailumateriaaleja käyttäen) tai rinnakkaismäärityksin muiden validoitujen vertailumenetelmien kanssa
- Häiriökestävyyden ja toimintavarmuuden testaaminen
- Laboratoriokohtaisen mittausohjeen laatiminen mukaan lukien sisäisen laadunohjauksen ohjeet
- Henkilöstön koulutus, johon sisältyy eri henkilöiden määritystulosten vertailu.

Validoinnin laajuus määräytyy luonnollisesti paljolti pikatestin käyttötarkoituksesta. Mikäli kyseessä on pelkkä suuntaa antava seulonta-analyysi, voivat 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 esimerkiksi ihmisten terveydentilan diagnosointiin liittyvien pikatestien kohdalla, päätettäessä jonkin elintarvike-erän ominaisuuksista tai luokiteltaessa ympäristön saastuneisuutta.

Pikatestien mukana seuraa usein erilaisia kalibrointiin tarkoitettuja yhdisteitä, varsinkin, jos menetelmään sisältyy pitoisuuden arviointia. Niiden luotettavuuteen tulee aina suhtautua varauksellisesti, ellei valmistajan taholta ole osoittaa dokumentoitua (mieluummin sertifiointia) 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)

Tulosten ilmoittaminen

Seuraavat tiedot tulee liittää soveltuvin osin jokaisen tuotetun spektrin yhteyteen:

Identifioinnin tulos:

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

Tiedot analysoidusta näytteestä:

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

Tiedot analysoinnin suorittajasta

- Laboratorion nimi, analysoijan nimi
- Allekirjoitus

Laitetiedot:

- Laitteen valmistaja
- Malli
- Tiedonkeruujärjestelmä
- Ohjelmistotyyppi

Analysointiolosuhteet:

Näytteensyöttö:

Kaasukromatografi:

- Kolonni (dimensiot, faasi, faasin paksuus)
- Lämpötilaohjelma
- Kantajakaasu
- Kantajakaasun virtausnopeus
- Injektointilämpötila
- Suorasyöttölaite

Muuta:

- Syöttölämpötila
- Ionilähteen lämpötila
- Ionilähteen paine
- Elektronien energia
- Emissiovirta
- Pyyhkäisyalue (amu)
- Pyyhkäisyklin aika
- Ionien kiihdytysjännite
- Analysointipäivämäärä

Lisäksi voidaan dokumentoida referenssimenetelmä (ei pakollinen OPCW:n ohjeessa).

Kaasukromatografian retentioindeksitiedot

Kaasukromatografiassa voidaan käyttää niin sanottua 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.

Seuraavat tiedot tulee liittää jokaisen retentioindeksin yhteyteen:

Identifioinnin tulos:

- Kemiallinen nimi (IUPAC-nimistö)
- CAS rekisterinumero
- Kemiallinen rakenne
- Molekyylikaava
- Identifioinnissa mahd. käytetyn vertailumateriaalin tiedot (spektrikirjaston version numero, kyseisen spektrin identifiointinumero)

Tiedot analysoidusta näytteestä:

- Näytteen laatu (puhtaus, pitoisuus, liuotin)
- Näytteen alkuperä (jäljitettävyyys)

Tiedot analysoinnin suorittajasta:

- Laboratorion nimi, analysoijan nimi
- Allekirjoitus

Laitetiedot:

- Laitteen valmistaja
- Malli
- Tiedonkeruujärjestelmä
- Ohjelmistotyyppi

Analysointiolosuhteet:

- GC-kolonne: dimensiot, kiinteä faasi, faasin paksuus
- Lämpötilaohjelma
- Kantajakaasu
- Injektiosysteemi
- Detektiosysteemi
- Virtausolosuhteet – vakiopaine ja -virtaus
- Retentioindeksistandardit
- Analysointipäivämäärä

Retentioindeksitietoa:

- Tarkkuus

NMR-spektroskopia

Identifioinnin tulos:

- Kemiallinen nimi (IUPAC-nimistö)
- CAS rekisterinumero
- Kemiallinen rakenne (mukaan lukien atomien numerointi)
- Molekyylikaava
- Identifioinnissa mahd. käytetyn vertailumateriaalin tiedot (spektrikirjaston version numero, kyseisen spektrin identifiointinumero)

Tiedot analysoidusta näytteestä:

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

Tiedot analysoinnin suorittajasta:

- Laboratorion nimi, analysoijan nimi
- Allekirjoitus

Laitetiedot:

- Laitteen valmistaja
- Malli
- Spektrometrin frekvenssi
- Tiedonkeruujärjestelmä
- Ohjelmistotyyppi

Analysointiolosuhteet

- Mitatut ytimet (1H, 13C)
- Näytteen lämpötila
- Spektrin leveys (Hz)
- Fourier-muunnospektrin datapisteet
- Toisto aika
- Pulssin kulma (μ s ja asteita)
- Referenssiipikin leveys (esimerkiksi tetrametyylisilaani, TMS)
- FID:n datapisteet (free induction decay)
- Skannausten lukumäärä
- Peruspiikin korjaus, jos käytössä
- Analysointipäivämäärä

Fouriermuunnosinfrapunaspektroskopia (FTIR)

Mittauksen tarkoitus:

- Tuntemattoman näytteen identifiointi
- Kiinnostavan komponentin tunnistus seoksesta
- Identiteetin varmistus
- Tunnetun näytteen puhtauden varmistus
- Pitoisuusmittaus (minkä, mistä)

Identifiointin tulos:

1) jos yhdistetason tunnistustulos:

- Kemiallinen nimi (IUPAC-nimistö)
- CAS rekisterinumero
- Molekyylikaava
- Identifiointinissa mahdollisesti käytetyn vertailumateriaalin tiedot (toimittaja, hankinta-aika) tai vertailuspektrin tiedot (kirjaston nimi, spektrin identifiointinumero)

2) jos aineluokkatason tunnistustulos:

- Tutkimustoimeksiannon kannalta tarkoituksen mukainen nimi/nimitys
- Identifiointinissa käytetyn vertailumateriaalin tiedot (toimittaja, tuotetieto, hankintatapa ja -aika) tai vertailuspektrin tiedot (kirjaston nimi, spektrin identifiointinumero)

Tiedot analysoidusta näytteestä:

- Näytteen lähtötiedot (koostumus tuntematon, oletusarvoisesti tunnettu)
- Olomuoto: kiinteä, liuos, kaasu, mittauksen edellytyksiin vaikuttavat muut tekijät, esim. vahvasti hapant/emäksinen/kovuus/matriisi/monikomponenttinen seos
- Näytteen alkuperä (jäljitettävyys)

Laitetiedot:

- Laitteen valmistaja ja malli

Mittaustiedot:

- Näytteen käsittelytapa
- Mittaustapa (esimerkiksi ATR, transmissio, kaasu-/nestekyvetti)
- Ilmaisintyyppi (esimerkiksi DTGS, MCT)
- Mittausparametrit (resoluutio, aaltolukualue, pyyhkäisyjen määrä)
- Akkreditoitu / ei-akkreditoitu menetelmä

Tiedot analysoinnin suorittajasta:

- Laboratorion nimi, analysoijan nimi
- Allekirjoitus

Tiedonkeruujärjestelmä:

- Ohjelmistotyyppi

Nimeke	Kvalitatiivisen kemian metrologia
Tekijä(t)	Metrologian neuvottelukunta
Tiivistelmä	<p>Kemian metrologian tavoitteena on parantaa ja varmentaa kemiallisten mittausten luotettavuutta ja jäljitettävyyttä SI-yksiköihin.</p> <p>Kvalitatiivinen eli laadullinen analyysi voidaan määritellä esimerkiksi analyttiseksi menetelmäksi, joka tunnistaa yhdisteen sen kemiallisten, biologisten tai fysikaalisten ominaisuuksien perusteella. Oppaassa tarkastellaan aihepiiriä lähinnä spektrometristen määritysmenetelmien kannalta ja eniten massaspektrometrian näkökulmasta, mutta periaatteessa oppaassa esitetyt kvalitatiivisen analyysin tunnistamis- ja jäljitettävyysskriteerit soveltuvat noudatettaviksi kaikissa määritysmenetelmissä.</p> <p>Oppaassa käsitellään kvalitatiivisen analyysimenetelmän periaatteita ja luotettavuuden perusteita, spektrikirjastojen luotettavuuskriteereitä, spektrien tunnistamiskriteereitä, spektrien tulkintaa sekä spektrien tunnistusmenettelyn vaiheita kohdeyhdisteiden analysoinnissa.</p> <p>Opas on laadittu Metrologian neuvottelukunnassa.</p>
ISBN, ISSN, URN	ISBN 978-951-38-8793-3 ISSN-L 2242-1211 ISSN 2242-122X (Verkojulkaisu) DOI: 10.32040/2242-122X.2024.T429
Julkaisu aika	Kesäkuu 2024
Kieli	Suomi
Sivumäärä	39 s. + liitt. 6 s.
Projektin nimi	
Rahoittajat	
Avainsanat	kemian, metrologia, spektrometria, luotettavuus, opas
Julkaisija	Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy PL 1000, 02044 VTT, puh. 020 722 111, https://www.vtt.fi/

Kvalitatiivisen kemian metrologia

Oppaassa tarkastellaan kvalitatiivisen kemian metrologiaa lähinnä spektrometrinen määritysmenetelmien kannalta ja eniten massaspektrometrian näkökulmasta, mutta periaatteessa oppaassa esitetyt kvalitatiivisen analyysin tunnistamis- ja jäljitettävyyuskriteerit soveltuvat noudatettaviksi kaikissa määritysmenetelmissä.

Oppaassa käsitellään kvalitatiivisen analyysimenetelmän periaatteita ja luotettavuuden perusteita, spektrikirjastojen luotettavuuskriteereitä, spektrien tunnistamiskriteereitä, spektrien tulkintaa sekä spektrien tunnistusmenettelyn vaiheita kohdeyhdisteiden analysoinnissa.

Opas on laadittu Metrologian neuvottelukunnassa.

ISBN 978-951-38-8793-3
ISSN-L 2242-1211
ISSN 2242-122X (Verkkajulkaisu)
DOI: 10.32040/2242-122X.2024.T429



beyond the obvious