



Monosakkaridien derivatisointi ja analysointi kaasukromatografialla

Sinikka Konttila
Kandidaatintutkielma
Kemian tutkinto-ohjelma
Oulun yliopisto
2021

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	1
2. MONOSAKKARIDIT JA NIIDEN DERIVATISOINTI.....	2
2.1. Monosakkaridien rakenne- ja stereoisomeriat	2
2.2. Derivatisointi.....	5
2.2.1. Yksivaiheiset derivatisointimenetelmät.....	6
2.2.2. Kaksivaiheiset derivatisointimenetelmät.....	8
3. MONOSAKKARIDIEN ANALYSOINTI KAASUKROMATOGRAFIALLA....	10
3.1. Kaasukromatografian toimintaperiaate.....	10
3.2. Monosakkaridien analysointiolosuhteet.....	13
3.2.1. Kolonnit.....	14
3.2.2. Lämpötila.....	16
3.2.3. Detektorit.....	18
4. YHTEENVETO	20
5. VIITELUETTELO.....	21

1. JOHDANTO

Monosakkaridit ovat tärkeä osa kaikkia eliökuntia. Ne ovat muun muassa osa DNA- ja RNA-ketjujen rakennetta ja ovat selluloosan rakenneyksikköjä. Lisäksi ne toimivat energianlähteinä aineenvaihdunnassa. Monosakkaridien ja muiden sokereiden analytiikkaa tarvitaan monella tieteen alalla. Esimerkiksi elintarvikkeiden laatumäärittämisessä, lääketieteessä, biopolttoaineiden ja kasvien jalostuksessa hyödynnetään sokereiden analytiikkaa. Useasti sokerit ovat monimutkaisissa matriiseissa, jonka takia analyysimenetelmältä vaaditaan hyvää erottelukykä. Yleisimpiä analyysimenetelmiä ovat kaasukromatografia, nestekromatografia sekä kapillaarielektroforeesi.

Kaasukromatografia on analyysimenetelmä, jossa analyytit erottuvat toisistaan jakaantuessaan kaasufaasin ja kiinteän faasin välillä. Menetelmä on erittäin hyvä orgaanisten yhdisteiden erotteluun monimutkaisista matriiseista. Lisäksi kaasukromatografiin sopii laaja valikoima detektoreita. Jotta monosakkaridit voidaan analysoida kaasukromatografilla, niiden haihtuvuutta täytyy parantaa derivatisoimalla. Derivatisoinnissa analyyttejä muokataan, jotta saavutetaan jotkin halutut fysikaaliset tai kemialliset ominaisuudet. Kaasukromatografiassa derivatisointi kohdistuu usein poolisiin funktionaalisiin ryhmiin ja aktiivisiin vetyihin.

Tässä tutkielmassa tarkastellaan monosakkaridien analysointia kaasukromatografialla. Aluksi esitellään monosakkaridit ja niiden isomeerit. Seuraavaksi otetaan tarkasteluun yleisimpiä yksi- ja kaksivaiheisia derivatisointimenetelmiä. Lopuksi tarkastellaan analyysiolosuhteita, joita ovat kolonni, lämpötila-alue ja detektor.

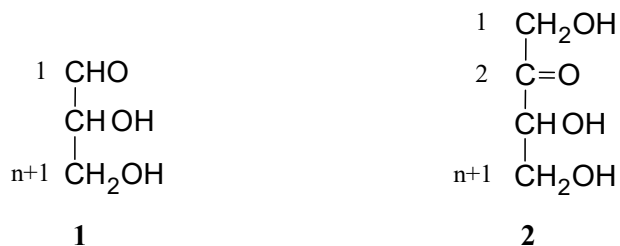
2. MONOSAKKARIDIT JA NIIDEN DERIVATISOINTI

Sokerit ovat hiilihydraatteja, joita muodostuu vedestä ja hiilidioksidista fotosynteesissä. Hiilihydraatit jaetaan mono-, oligo- ja polysakkarideihin, riippuen kuinka monta monosakkaridiyksikköä molekyyli sisältää. Oligosakkarideissa on 2–10 monosakkaridiyksikköä ja ne voidaan jakaa homo-oligosakkarideihin ja hetero-oligosakkarideihin. Homo-oligosakkarideissa on vain yhtä monosakkaridiyhdistettä ja hetero-oligosakkarideissa useampia monosakkaridiyhdisteitä. Polysakkaridit sisältävät enemmän kuin 10 monosakkaridiyksikköä.¹

Monosakkaridit sisältävät paljon funktionaalisia ryhmiä, jotka ovat suurimmaksi osaksi hydroksyyli ryhmiä. Lisäksi ne voivat esiintyä kahdessa eri muodossa: ketjuna tai renkaana. Funktionaalisten ryhmien ja stereoisomeeristen muotojen ansiosta niillä on monia tärkeitä tehtäviä eliöstössä.²

2.1. Monosakkaridien rakenne- ja stereoisomeriat

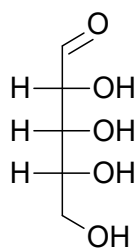
Ketjuna ollessaan monosakkaridit sisältävät yhden karbonyyliryhmän, jonka sijainnin perusteella ne jaetaan kahteen ryhmään. Karbonyyliryhmän ollessa hiiliketjun ensimmäisessä hiilessä, monosakkaridia kutsutaan aldoosiksi (**1**) ja sen ollessaan hiiliketjun toisessa hiilessä, monosakkaridia kutsutaan ketoosiksi (**2**). Näistä aldoosi on yleisempi muoto ja näin ollen monesti, kun puhutaan monosakkarideista, viitataan aldooseihin kuuluviin yhdisteisiin.²



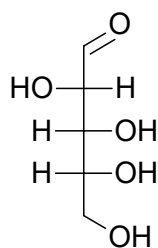
Monosakkaridit sisältävät 3–6 hiiltä. Kolmehiilistä monosakkaridia kutsutaan trioosiksi, neljähiilistä tetraosiksi, viisihiilistä pentoosiksi ja kuusihiilistä heksoosiksi. Hiilten numeroimisjärjestys alkaa karbonyylipäästä. Kaikki hiiliketjussa olevat sekundääriset alkoholit ovat kiraalisia, eli monosakkaridit sisältävät useita stereokeskuksia. Monosakkaridit, jotka eroavat yhden tai useamman stereokeskuksen konfiguraatiolla, ovat keskenään

diastereomeerejä. Diastereomeereillä on lisäksi peilikuvaisomeerit eli enantiomeerit. Eri diastereomeereillä on omat nimensä ja niiden enantiomeerit on merkitty D- ja L-etuliitteellä. Samalla etuliitteet kertovat kauimmaisena karbonyyliryhmästä olevan sekundäärisen alkoholin konfiguraation. D-sokereilla kauimmaisen sekundäärisen alkoholin konfiguraatio on R, ja L-sokereilla S. Luonnossa sokeryyhdisteet esiintyvät pääasiassa D-muodossa.²

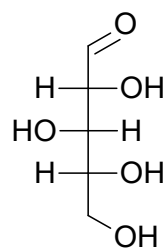
Stereoisomeerien määrä noudattaa yleensä kaavaa 2^n , jossa n on kiraalisten hiilien lukumäärä. Esimerkiksi aldopentoosilla on kolme kiraalista hiiltä, jolloin stereoisomeerejä on yhteensä $2^3 = 8$. Aldopentoosin diastereomeereja ovat riboosi (**3**), arabinoosi (**4**), ksyloosi (**5**) ja lyksoosi (**6**). Näillä neljällä on enantiomeerit D ja L, jolloin stereoisomeerien lukumäärä on kahdeksan. Aldoheksosilla on neljä kiraalista hiiltä, jolloin stereoisomeerejä on 16. Ne ovat alloosin (**7**), altoosin (**8**), glukoosin (**9**), mannoosin (**10**), guloosin (**11**), idoosin (**12**), galaktoosin (**13**) ja taloosin (**14**) D- ja L-enantiomeerit.²



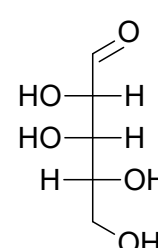
3



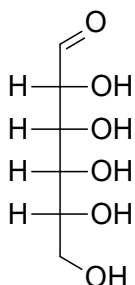
4



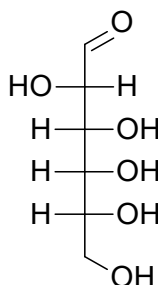
5



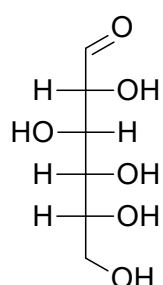
6



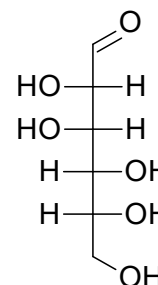
7



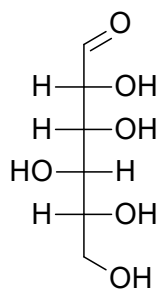
8



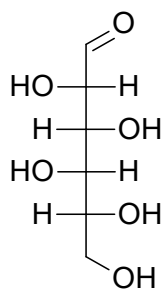
9



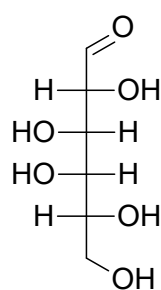
10



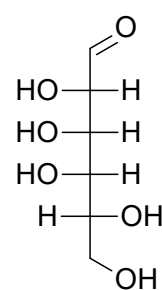
11



12

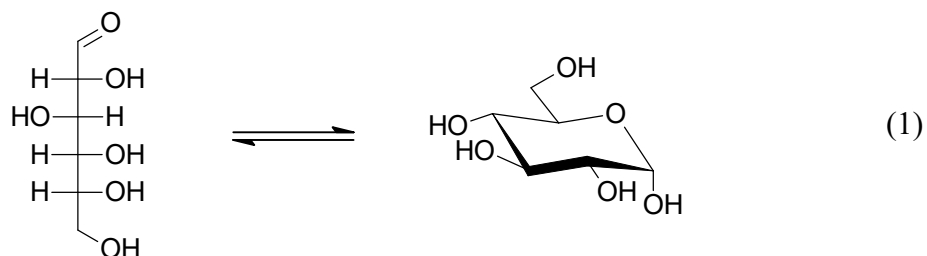


13

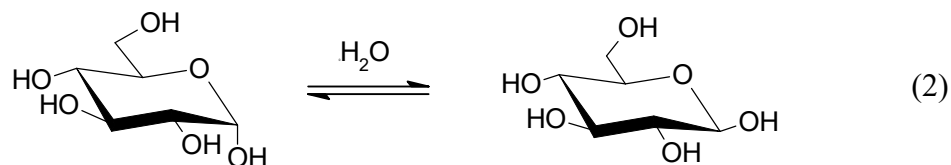


14

Viisi ja kuusihiiliset monosakkaridit pystyvät muodostamaan viisi- tai kuusiatomisen rengasrakenteen. Intramolekulaarisessa reaktiossa syntyy hemiasetaali tai hemiketaali, riippuen onko monosakkaridi aldoosi vai ketoosi. Kuusiatomisia rengasrakenteisia monosakkarideja kutsutaan pyranooseiksi ja viisiatomisia renkaita furanooseiksi. Rengas- ja ketjurakenteen välillä vallitsee tasapaino, joka on vahvasti rengasrakenteen puolella. Renkaan aukeaminen on reversiibeli reaktio vesiliuoksissa.² Reaktio on esitetty reaktioyhtälössä 1.



Renkaan muodostuessa syntyy kahta diastereoisomeeria riippuen kummalta puolelta hydroksyyliiryhmän vapaa elektronipari hyökkää karbonyyliiryhmään, jolloin karbonyylihiileen syntyvä hydroksyyliiryhmä kääntyy renkaan vastakkaiselle puolelle. Samalla syntyy uusi stereokeskus, jota voidaan kutsua anomeerikeskukseksi. Hydroksyyliiryhmän ollessa tasosta alaspäin ja aksiaalisessa asemassa, diastereoisomeeria kutsutaan α -isomeeriksi. Hydroksyyliiryhmän ollessa tasosta ylöspäin ja ekvatoriaalisessa asemassa, diastereoisomeeria kutsutaan puolestaan β -isomeeriksi. Näiden diastereoisomeerien välillä vallitsee myös tasapaino, jos vettä on läsnä.² Tasapainoreaktio on esitetty reaktioyhtälössä 2.



Sokerit voidaan myös jakaa pelkistäviin ja ei-pelkistäviin sokereihin. Pelkistäviä sokereita ovat kaikki sokeryhdisteet, jotka sisältävät vapaan aldehydiryhmän tai pystyvät muodostamaan sellaisen liuoksessa. Näitä ovat kaikki monosakkaridit sekä muutamat disakkaridit.¹

2.2. Derivatisointi

Monosakkaridien kaasukromatografiseen analysointiin liittyy monia haasteita. Yhdisteissä olevien funktionaalisten ryhmien ja isomeerien suuri määrä hankaloittavat yhdisteiden erottelua ja tunnistamista. Yhdisteillä on samankaltaiset fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet, joiden takia retentioajat ovat lähellä toisiaan. Jos detektorina käytetään massaspektrometria, yhdisteiden samanlainen fragmentoituminen tuottaa ongelmia. Sokereilla on erittäin huono haihtuvuus, jonka takia ne täytyy derivatisoida ennen kuin ne voidaan analysoida kaasukromatografialla.³

Derivatisoinnilla tarkoitetaan yhdisteiden kemiallista muokkaamista eli johdannaisten muodostamista. Sitä käytetään hyödyksi muun muassa kaasukromatografiassa muokkaamaan tutkittujen yhdisteiden fysikaalisia tai kemiallisia ominaisuuksia, jotta erottelukyky olisi parempi tai yhdiste olisi ylipäänsä analysoitavissa laitteella. Derivatisoinnilla voidaan vaikuttaa analyyttien polaarisuuteen, erotustehokkuuteen, signaalipiikkien muotoon ja analyyttien stabiilisuuteen. Myös detektointiherkkyyttä, yhdisteiden kvantitatiivista määrittystä sekä tunnistamista voidaan parantaa derivatisoimalla.⁴

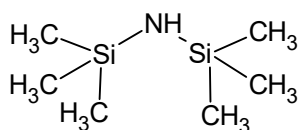
Kaasukromatografisissa analyyseissä derivatisoinnilla pyritään usein korvaamaan aktiiviset vedyt, jolloin vetysidosten mahdollinen muodostuminen estetään. Aktiivisia vetyjä esiintyy muun muassa -COOH, -OH ja -NH₂ funktionaalisissa ryhmissä. Vetysidosten muodostuminen stationäärifaasin ja analyytin välillä vaikuttaa suoraan erotteluprosessiin. Derivatisointi yleensä kasvattaa analyytin molekyylipainoa nostamalla sen kiehumispistettä, mikä ei ole yleensä toivottua. Poikkeuksena ovat analyytit, joiden

polaarisuus vähenee derivatisoitaessa; niillä kiehumispiste laskee. Tätä käytetään hyödyksi yhdisteille, joita ei voitaisi muuten analysoida kaasukromatografialla niiden huonon haihtuvuuden takia.⁴ Sokereita derivatisoitaessa niiden polaariset ryhmät eli hydroksyyli- ja karbonyyliryhmät substituoidaan, jolloin yhdisteiden polaarisuus ja kiehumispiste laskee.

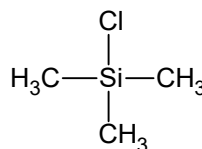
Derivatisoinnilla voidaan mahdollistaa myös erilaisten isomeerien erottelu ja erottelukykyä voidaan parantaa vaihtamalla vetyjen tilalle suurempi substituentti. Tätä menetelmää on kokeiltu sokereille, joilla isomeerien suuri määrä tuottaa analyyseissä vaikeuksia. Derivatisoinnilla voidaan siis parantaa erottelukykyä korvaamalla aktiivisia vetyjä, vähentämällä polaarisuutta ja kasvattamalla molekyylipainoa. Derivatisointi voi myös häiritä analyysia, jos reaktio ei etene loppuun saakka tai jos se tapahtuu väärään paikkaan tai väärän yhdisteen kanssa.⁴

2.2.1. Yksivaiheiset derivatisointimenetelmät

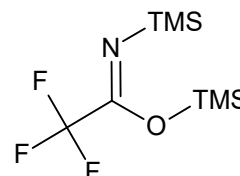
Yleisimpiä sokereiden derivatisointimenetelmiä kaasukromatografisessa analysoinnissa ovat silylointi, asylointi ja alkylointi. Silylointi⁵ on yksi suosituimmista derivatisointimenetelmistä siinä syntyneiden johdannaisten hyvän haihtuvuuden ja stabiilisuuden takia. Menetelmää voidaan käyttää yksittäiseen analyyttiin tai monimutkaiseen analyyttiseokseen. Silylointireagensseja on useita, esimerkiksi heksametyylidisilatsaani³ (**15**) (HMDS), trimetyylikloorisilaani⁶ (**16**) (TMCS tai TMSCl) ja N,O-bis(trimetyylisilyyli)trifluoriasetamidi⁷ (**17**) (BSTFA). Silyloinnissa voidaan käyttää yhtä reagenssia tai kahden tai kolmen reagenssin seosta.⁴ Sokereiden derivatisoinnissa yleisimpiä reagenssiseoksia ovat BSTFA:n ja TMCS:n seos⁶ sekä HMDS:n ja TMCS:n seos.³ Useat reagenssit reagoivat helposti veden kanssa, minkä takia silylointi suoritetaan mahdollisimman vedettömissä oloissa.



15

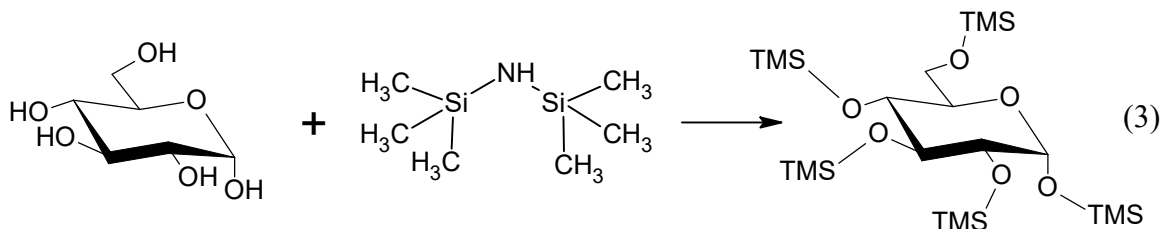


16

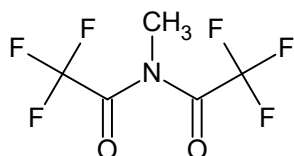


17

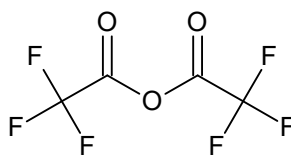
Jotta reaktion tasapaino saadaan pidettyä tuotteiden puolella, reagensseja laitetaan ylimäärä ja reaktioseosta lämmitetään. Reaktion lämpötilat ja reaktioajat vaihtelevat riippuen valituista reagensseista.³ α -D-glukopyranoosin silylointireaktio HMDS:lla on esitetty reaktioyhtälössä 3.



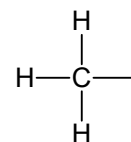
Asyloinnissa trimetyylisilyyliryhmän tilalle laitetaan trifluoriasetaatti (TFA). Reagensseina käytetään N-metyyli-bis(trifluoriasetamidi):a⁸ (**18**) (MBTFA) ja trifluoretikkahappoanhydridiä⁹ (**19**) (TFAA). Johdannaiset ovat hieman haihtuvampia kuin trimetyylisilyyli johdannaiset, joten analyysi voidaan suorittaa hieman matalammissa lämpötiloissa. Alkyloinnissa aktiiviset vedyt vaihdetaan alkyyliryhmään, esimerkiksi metyyliin. Reagenssina käytetään esimerkiksi metyylijodidia (**20**) natriumhydroksidin NaOH tai kaliumhydroksidin KOH toimiessa katalyyttinä.¹⁰



18



19



20

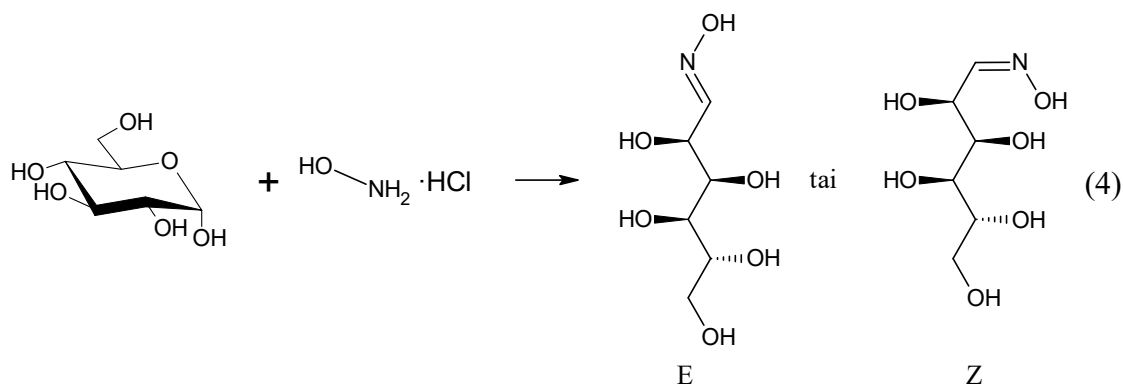
Derivoitaessa tutkittava näyte liuotetaan liuotinseokseen, jossa on valitut reagenssit. Käytetyin liuotin on pyridiini, jolla on katalyyttinen vaikutus, sillä se toimii samalla hapon vastaanottajana. Reaktiossa syntyvä sivutuote voi olla happo, jolloin liuoksen toimiessa hapon vastaanottajana, se edistää derivatisointireaktiota. Esimerkiksi TMCS:a käytettäessä reagenssina, sivutuotteena saadaan vetykloridia HCl. Myös aniliini on todettu toimivaksi liuottimeksi, jolla silylointireaktio voidaan suorittaa huoneenlämmössä ja sillä on sama stabiloiva vaikutus kuin pyridiinillä.⁷ Alkyloinnissa näyte ja derivatisointireagenssit liuotetaan dimetyylisulfoksidiin (DMSO).¹⁰ Liuotin voidaan myös korvata käyttämällä reagensseja liuottimena. Joskus voi olla tarpeellista poistaa liuoksista ylimääräiset reagenssit, esimerkiksi

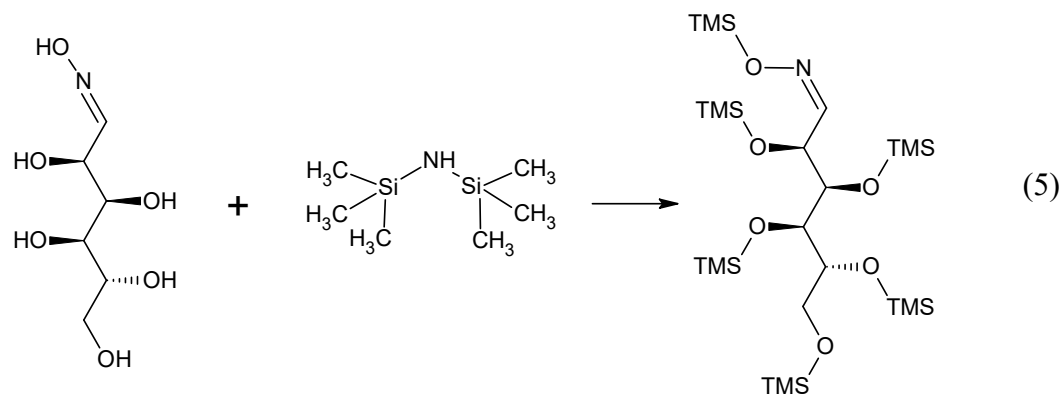
kolonnin suojaamisen takia. Analyysi voidaan suorittaa suoraan reagenssiseoksista, ellei mahdollisia laimennoksia tarvitse tehdä kalibrointialueen takia.

Pelkistävällä sokerilla voi olla viisi isomeeria: alfa- ja beta-furanosidi, alfa- ja beta-pyranosidi sekä ketjurakenne. Silyloinnissa, asyloinnissa sekä alkyloinnissa muodostuu jokaiselle isomeerille erilainen johdannainen, jotka tuottavat oman signaalin jokaiselle isomeerille ja tätä myöten monimutkaisen kromatogrammin. Tätä ongelmaa voidaan ratkaista muilla derivatisointimenetelmillä.¹¹

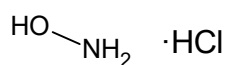
2.2.2. Kaksivaiheiset derivatisointimenetelmät

Kaksivaiheisissa derivatisointimenetelmissä ensimmäisellä vaiheella eli oksiimin muodostuksella vähennetään isomeerien lukumäärää, jolloin saadaan selkeämpiä kromatogrammeja. Oksiimi muodostuu pelkistävien sokereiden karbonyyliryhmän tilalle. Oksiimiksi kutsutaan yhdistettä, jossa on C=N-kaksoissidos. Oksiimin muodostuksessa rengasrakenteiden isomeerit häviävät, jolloin jäljelle jää vain ketjurakenteet.¹¹ Tämän jälkeen sokerin hydroksyyliyhdyt silyloidaan tai asyloidaan, kuten aiemmin esitettiin. Tässä menetelmässä syntyy kaksi uutta isomeeriä E ja Z, jotka tuottavat pelkistäville sokereille eli kaikille monosakkarideille kaksi signaalia. Trimetyylisilyylioksiimien muodostaminen soveltuu aldooseille ja ketooseille. α -D-glukopyranoosin oksimointireaktio on esitetty reaktioyhtälössä 4 ja sen jälkeen tehtävä silylointireaktio reaktioyhtälössä 5. Trifluoriasylaattioksiimi-johdannaiset on todettu sopiviksi aldooseille, mutta ei ketooseille, sillä niillä esiintyy analyyttien hajoamista derivatisoinnin aikana.¹²

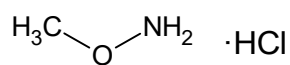




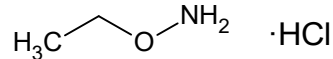
Oksiimin muodostukseen käytetään usein hydroksyyliammoniumkloridia³ (**21**) (HACl), mutta myös O-metoksiamiinihydrokloridia¹³ (**22**) (MeOx) ja O-etoksiamiinihydrokloridia (**23**) (EtOx).¹¹ TMSO ja TMS-metoksioksiimeja verrattaessa on todettu TMSO-johdannaisten olevan parempi vaihtoehto perustuen muun muassa johdannaisten stabiilisuuteen, ja reaktion tehokkuuteen.⁷ Lisäksi metoksimaatio on kalliimpi ja enemmän aikaa vievä prosessi.¹³ Erilaisilla oksiimin muodostajilla on pyritty parantamaan yhdisteiden erottelua ja tunnistamista, suurentamalla oksiimissa olevan alkyyliryhmän kokoa.



21



22

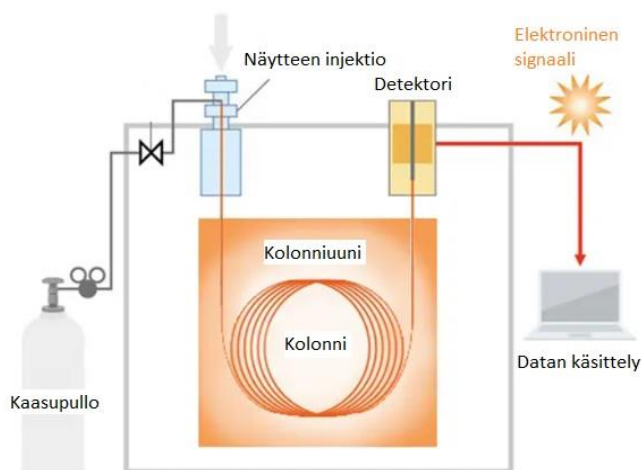


23

3. MONOSAKKARIDIEN ANALYSOINTI KAASUKROMATOGRAFIALLA

3.1. Kaasukromatografian toimintaperiaate

Kaasukromatografia (GC) on yleinen eri yhdisteiden erottelumenetelmä ja sitä käytetään laajasti eri aloilla kvalitatiivisiin ja kvantitatiivisiin määrittäksiin. Menetelmä perustuu yhdisteiden yksilölliseen vuorovaikutukseen stationäärifaasin kanssa, jolloin yhdisteet erottuvat toisistaan. Laitteen rakenne on esitetty kuvassa 1. Analysointi on mahdollista vain yhdisteille, jotka ovat riittävän haihtuvia ja termisesti stabiileja analyysin aikana vallitsevalla lämpötila-alueella. Analyyttien haihtuvuutta ja stabiilisuutta voidaan parantaa muodostamalla niiden johdannaisia, eli derivatisoimalla.¹⁴



Kuva 1. Kaasukromatografian rakenne.¹⁵

Kaasukromatografiassa näyte kulkeutuu kaasufaasissa inertin kantajakaasun mukana kolonnin läpi, joka sisältää stationäärifaasin. Yleisimmin käytetty kaasu on helium. Muita käytettyjä kaasuja ovat argon- ja typpikaasu. Kantajakaasun virtausnopeudella vaikutetaan analyysiaikaan. Mitä suurempi virtausnopeus sitä lyhyempi analyysiaika, mutta samalla kolonnin erotustehokkuus heikkenee.¹⁴

Näyte injektoidaan nestemäisenä injektoriin, jossa se höyrystetään kuumentamalla kaasuksi ja johdetaan kolonniin. Näytteen injektioille on olemassa erilaisia injektoreita, mutta yleisin on jako/jaoton injektio. Jaollisessa injektiossa vain pieni osa näytteestä päätyy kolonniin ja loput näytteestä huuhdotaan pois injektorista. Tätä käytetään analyyseissa, joissa analysoitavan

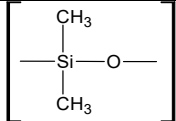
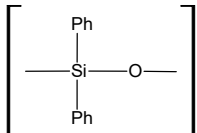
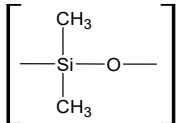
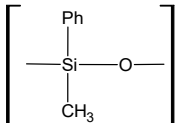
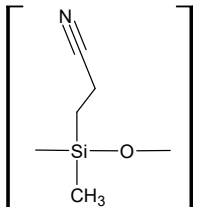
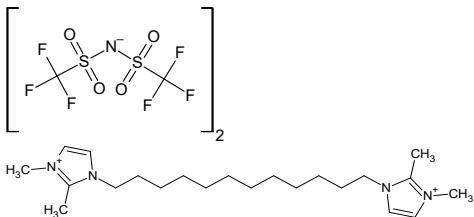
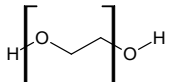
yhdisteen pitoisuus on korkea. Jaottomassa injektiossa vain liuotin poistetaan näytteestä ja analysoitavat yhdisteet ohjataan kolonniin. Tällöin analyttien konsentraatioiden tulee olla matalat. Osa liuottimesta ei poistu injektorista, joten kolonniin pääsee myös suhteellisen suuri määrä liuotinta, mikä täytyy huomioida stationäärifaasin valinnassa. Injektorin ja injektioasetusten valinnassa vaikuttavat analysoitavien yhdisteiden konsentraatiot, kiehumispisteet ja terminen stabiilisuus.¹⁶

Injektorin jälkeen näyte siirtyy kantajakaasun mukana kolonniin, jossa itse erottuminen tapahtuu. Kolonni sijaitsee kolonniuunin sisällä, joka on isoterminen tai lämpötilaohjelmoitu riippuen analyysistä. Lämpötilaohjelmassa uunin lämpötilaa nostetaan asteittain valitulla lämmitysnopeudella. Kolonnit ovat kapeita putkia, jotka sisältävät stationäärifaasin. Kolonnit jaetaan kahteen ryhmään: kapillaarikolonneihin, joiden sisäpinta on vuorattu stationäärifaasilla ja pakattuihin kolonneihin, jotka ovat nimensä mukaisesti pakattu kokonaan stationäärifaasilla. Nykyään käytetään pääasiassa vain kapillaarikolonneja niiden hyvän erotustehokkuuden takia. Stationäärifaasi voi olla nestemäinen tai kiinteä. Yleisesti kuitenkin lyhenteellä GC tarkoitetaan kaasu-neste-kromatografiaa (GLC), eli menetelmää, jossa stationäärifaasi on nestemäinen. Kapillaarikolonnit voidaan jakaa kolmeen ryhmään sen mukaan, millaisella stationäärifaasilla kolonnin sisäpinta on vuorattu. WCOT (eng. wall-coated open tubular) -kolonneissa seinät on vuorattu nestemäisellä faasilla, PLOT (eng. porous layer open tubular) -kolonnin seinät on vuorattu huokoisella, hienojakoisella kiinteällä aineella ja SCOT (eng. support coated open tubular) -kolonnin seinä on vuorattu huokoisella tukimateriaalilla, joka on päällystetty nestemäisellä faasilla.¹⁴

Stationäärifaasin valinnalla vaikutetaan yhdisteiden retentioaikoihin, eli yhdisteiden erottuvuuteen. Erilaisia stationäärifaaseja on runsaasti, mutta niin sanotuiksi yleiskolonneiksi ovat vakiintuneet sellaiset kolonnit, joissa on dimetyylipolysiloksaani- tai 5%-difenyyl- 95%-dimetyylipolysiloksaanifaasi. Nämä faasit ovat poolittomia ja erottelevat yhdisteet toisistaan niiden kiehumispisteiden perusteella. Jos yhdisteillä on samansuuruiset kiehumispisteet, mutta erilainen poolisuus, selektiivisempi faasi voi olla tarpeen.¹⁶ Kolonnien tuottajat myyvät kolonneja omilla kauppanimillään, joten kolonneilla, joilla on samanlaiset ominaisuudet, on valmistajasta riippuen eri kauppanimet. Taulukossa 1 on esitetty joitakin stationäärifaaseja,

niiden rakenne, kolonniin kaupanimiä, joissa on kyseinen faasi sekä niiden yleisimpiä käyttökohteita.

Taulukko 1. Stationäärifaasin rakenne, kaupanimet ja yleisimmät käyttökohteet.¹⁷

Stationäärifaasi	Rakenne	Kaupanimet	Käyttökohteita
100%-dimetyylipolysiloksaani		HP-1, DB-1, Rtx-1, OV-1, BP-1, ZB-1	Hiilivedyt, PCB, PAH, rikkiyhdisteet, aromaattiset yhdisteet, torjunta-aineet
5%-difenyyl-95%- dimetyylipolysiloksaani	 5 %  95 %	HP-5, SE-52, DB-5, Rtx-5, BP-5,	alkaloidit, lääkkeet, halogenoidut yhdisteet, torjunta-aineet, rasvahappome- tyyliesterit
50% - syanopropyylimet- yyli-50%- fenyylimetyylipo- lysiloksaani	 50 %  50 %	DP-225, OV- 225, BP-225, Rtx-225	Rasvahappome- tyyliesterit, alditoliasetaatit, neutraalit sterolit
1,12-di(2,3- dimetyyli- imidatsolium) dodekaani, bis(trifluorimetyy- lisulfonyyli)imidi		SLB-IL82	Neutraalit ja hieman emäksiset yhdisteet
polyetyleeniglykoli		HP-INNO-Wax, SPELCO- WAX10	Alkoholit, vapaat rasvahapot, aromaattiset yhdisteet, eetteriset öljyt

Eri stationäärifaasin lisäksi tärkeitä kolonnien ominaisuuksia ovat kolonnin pituus ja halkaisija sekä stationäärifaasin paksuus. Yleensä käytetään mahdollisimman lyhyttä kolonnia, jolloin analyysiaika on mahdollisimman lyhyt. Kolonnin sisähalkaisija vaikuttaa kolonnin tehokkuuteen käänteisesti, eli pienennettäessä halkaisijaa tehokkuus paranee.¹⁶ Stationäärifaasin paksuus vaikuttaa retentioaikojen pituuteen. Paksumpi kerros pidättelee eluotuvia yhdisteitä kauemmin, jolloin retentioajat pitenevät. Erittäin haihtuvat yhdisteet voivat vaatia paksumman stationäärifaasin, jotta yhdisteet ehtivät erottua toisistaan.¹⁴

Kolonnin jälkeen yhdisteet saapuvat detektorille, jossa eluoituneet yhdisteet tunnistetaan. Kaasukromatografia on siitä hyvä erottelumenetelmä, että sille sopii laaja valikoima detektoreita. Ideaalin detektorin kaasukromatografialle pitäisi olla stabiili ja pystyä analysoimaan pitkiä analyysiketjuja häiriöttä. Detektorin pitäisi antaa joko samatapainen vaste kaikille yhdisteille, tai olla erittäin selektiivinen tietyille yhdisteelle tai yhdisteryhmälle. Lisäksi detektorin pitäisi antaa lineaarinen vaste tutkituille yhdisteille laajalla konsentraatioalueella. Jotta detektori sopisi mahdollisimman monen yhdisteen analysointiin, täytyy sen toimintalämpötila-alueen olla laaja, huoneenlämmöstä 400 asteeseen. Jos halutaan vielä yhdistää toinen detektori mukaan, on ensimmäisen detektorin oltava sellainen, joka ei tuhoa näytettä. Yleisimmin kaasukromatografissa käytettyjä detektoreita ovat liekki-ionisaatiotektori (FID), lämmönjohtokykydetektori (TCD), elektroninsieppausdetektori (ECD) sekä massaspektrometri (MS). Näistä liekki-ionisaatiotektorilla on laaja lineaarinen vaste, mutta detektori tuhoaa näytteen. Lämmönjohtotektori on hyvä yleisdetektori, joka ei tuhoa näytettä, mutta ei ole erityisen herkkä. Elektroninsieppausdetektori taas on erittäin herkkä eikä tuhoa näytettä, mutta lineaarisen vasteen alue on rajallinen.¹⁴ Kaikkia haluttuja ominaisuuksia ei välttämättä pystytä saavuttamaan yhdellä detektorilla, jolloin detektorin valinnassa täytyy tehdä kompromisseja ja ottaa huomioon mahdolliset käyttötarkoitukset.

3.2. Monosakkaridien analysointiolosuhteet

Eri johdannaisille ei ole vakiintunut tiettyjä analyysiolosuhteita, vaan käytössä on monia vaihtoehtoja, joista voidaan valita. Olosuhteiden valintaan vaikuttaa myös mitä vaatimuksia analyysille on asetettu ja halutaanko analysoida monosakkaridien lisäksi joitakin muita samantyyllisiä yhdisteitä samanaikaisesti, esimerkiksi di- ja trisakkarideja. Yleisesti

monosakkaridien analysoinnissa kantajakaasuna käytetään heliumia, jonka käyttö on vakiintunut muidenkin yhdisteiden analyysissä sen hyvän erotustehokkuuden ja lyhyen analyysiajan takia.

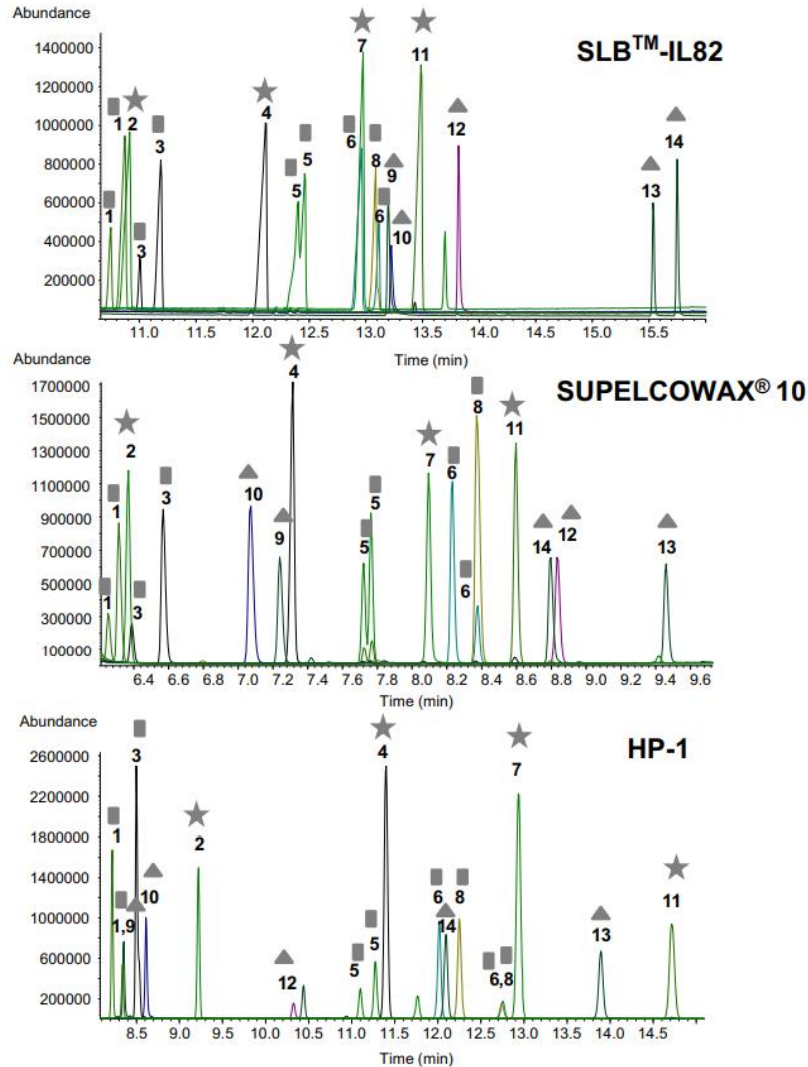
3.2.1. Kolonnit

Monosakkaridien analysoinnissa käytetään yleisesti vain muutamaa stationäärifaasia. Joissain tapauksissa analyysiä pyritään parantamaan hieman selektiivisemmällä stationäärifaasilla, jos valittu johdannainen sitä vaatii. Stationäärifaasin valintaa rajoittavat analysoinnin korkeat lämpötilat, joten vain hyvän termisen stabiilisuuden omaavat kolonnit ovat soveltuvia analyysiin. Käytetyt kolonnit ovat usein 25 tai 30 metrin pituisia ja halkaisijaltaan 0,25 millimetriä. Lisäksi stationäärifaasin paksuus on usein 0,25 mikrometriä.

Poly(dimetyylisiloksaani)-faasi ja 5%-difenyyl-95%-dimetyylipolysiloksaanifaasi ovat yleisimmin käytetyt stationäärifaasit. Ensin mainittua on käytetty sekä monosakkaridien TMS-että TMSO-johdannaisille.^{16,18,19} Hieman polaarisempaa 5%-difenyyl-95%-dimetyylipolysiloksaanifaasia on käytetty TMSO-johdannaisille ja muille TMS-alkyylioksimaattijohdannaisille.^{11,13,20} Sekä TFA-, että TFA-oksimaattijohdannaisille sopii hieman selektiivisempi ja polaarisempi faasi. Näille on käytetty muun muassa syanopropyylimetyyli-fenyylimetyylipolysiloksaania ja syanopropyylifenyylimetyylipolysiloksaania erilaisilla pitoisuuksilla.¹² TMSO-johdannaisille on myös kokeiltu ionisia stationäärifaaseja.¹⁸ Vaikka näitä on käytetty useiden orgaanisten yhdisteiden analysoinnissa, monosakkaridien sekä muiden hiilihydraattien analysoimisesta on vähän informaatiota. Eri ionisia stationäärifaaseja testaamalla pyrittiin parantamaan analyysin erotustehokkuutta, sillä ioniset stationäärifaasit omaavat monimutkaisemman erotusprosessin kuin normaalit poolittomat stationäärifaasit. Kokeilluista faaseista parhaaksi todettiin SLB-IL82.

Kuvassa 2 on esitetty kolmella eri kolonnilla analysoitujen monosakkaridien, inositolien ja iminosokerien TMSO-johdannaisten kromatogrammit. Inositolit sekä iminosokerit ovat monosakkaridien kaltaisia yhdisteitä. Inositolit ovat sykloheksanoleja, joissa on jokaisessa hiilessä hydroksyyli-ryhmä ja iminosokerit ovat sakkarideja, joissa rengasrakenteen hapen paikalla on typpi. Lämpötilaohjelma on analyysissä ollut sama. Tutkittuja monosakkarideja olivat arabinoosi, riboosi, fruktoosi, galaktoosi ja glukoosi, joiden eluoitusjärjestys on

yhdenmukainen kaikilla kolmella kolonnilla. Ensimmäisinä eluoutuivat pentoosit ja sitten heksoosit. Pienenä erona oli, että HP-1 kolonnilla galaktoosin ja glukoosin Z-isomeerit eivät erottuneet. HP-1 kolonnissa eluotumisjärjestykseen vaikuttavat pääasiassa funktionaalisten ryhmien lukumäärä. Tässä tapauksessa funktionaalisten lukumäärä kasvaa samalla kun hiilien lukumäärä kasvaa, sillä monosakkarideissa jokaisessa hiilessä on kiinni yksi funktionaalinen ryhmä. SUPELCOWAX10 kolonnissa stationäärifaasin ja analyysin välillä vaikuttavat enemmän pooliset vuorovaikutukset. SUPELCOWAX10 kolonnilla, jossa on polaarimpi stationäärifaasi, saavutettiin lyhyempi analyysiaika kuin HP-1 tai SLB-IL82 kolonnilla, mutta sillä havaittiin huomattavaa taustan nousua. SLB-IL82 kolonnin analyysiajat olivat samaa luokkaa kuin HP-1:llä, mutta SLB-IL82 kolonnilla erottuivat kaikki isomeerit.¹⁸



Kuva 2. Eri kolonneilla analysoitujen yhdisteiden kromatogrammit. Monosakkaridit on merkitty suorakulmiolla, inositolit tähdellä ja iminosokerit kolmiolla. Analysoidut monosakkaridit: arabinoosi (1), riboosi (3), fruktoosi (5), galaktoosi (6) ja glukoosi (8).¹⁸

3.2.2. Lämpötila

Kolonneiuunin lämpötilaan vaikuttavat käytetty kolonni ja analysoidut johdannaiset. TMS- ja TMSO-johdannaisten analytiikassa kolonneiuunin lämpötila-alueena käytetään 50–250 astetta. TFA- ja TFA-oksimaattijohdannaiset ovat vaihtoehtoisista johdannaisista kaikkein haihtuvimpia, joten ne eivät vaadi yhtä korkeita lämpötiloja. Kolonneiuunin lämpötila voi olla ohjelmoitu, sitä voidaan nostaa lineaarisesti tai analyysi voi olla isoterminen. Lämpötilaohjelman vaikutusta piikkien leveyteen ja yhdisteiden häntimistekijän (eng. tailing factor) arvoon on tutkittu käyttäen samaa kolonnia.¹⁸ Häntimistekijä kuvaa signaalipiikkien symmetrisyyttä ja ideaalisessa tapauksessa sen arvo on yksi. Tutkimuksessa analysoitiin

mono-, di-, trisakkaridien sekä iminosokereiden ja inositolien TMSO-johdannaisia ja päädyttiin tulokseen, että lämpötilaohjelmoidulla analyysillä saatiin parhaimmat tulokset. Lämpötilaohjelmoidulla ja lineaarisella lämpötilan nostolla saavutettiin kapeammat piikkien leveydet, kuin isotermisellä analyysillä. Lämpötilaohjelmoidulla, lineaarisella lämpötilan nostolla ja isotermisellä analyysillä saavutettiin kaikille monosakkarideille yleisesti hyvät häntimistekijät, muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta. Yhdisteiden retentioajat olivat lyhyempiä isotermisissä oloissa, kuin lämpötilaohjelmoidulla ja lineaarisella nostolla. Lineaarilla nostolla retentioajat olivat muutamia minuutteja lyhyempiä kuin lämpötilaohjelmoidussa analyysissä. Taulukossa 2 on mainittu erilaisia kolonneja ja niillä käytettyjä lämpötilaohjelmia, joilla sokereita on analysoitu. Taulukosta voidaan päätellä, että monosakkaridien lisäksi analysoidut di- ja trisakkaridit laajentavat analyysin lämpötila-alueita, sillä johdannaisten haihtuvuus heikkenee yhdisteen kasvaessa. Monosakkaridien EtOx-TFA-johdannaiset vaativat vain 200 °C lämpötilan, kun taas mono-, di- ja trisakkaridien TMSO-johdannaiset vaativat 320 °C lämpötilan. Näitä ei kuitenkaan voida täysin verrata keskenään, koska analyyseissä on ollut erilaiset johdannaiset ja kolonnit.

Taulukko 2. Sakkaridien analysoinneissa käytettyjä kolonneja, niissä käytetyt lämpötilaohjelmat sekä analysoidut yhdisteet.

Kolonne	Lämpötila-alue (°C)	Lämpötilaohjelma	Analysoidut yhdisteet
DB-5 (30 m) ¹³	60–320	60 °C (2 min), nosto 155 °C (13 °C/min), 155 °C (10 min), nosto 250 °C (13 °C/min), 250 °C (12 min), nosto 320 °C (20 °C/min), 320 °C (10 min)	mono-, di- ja trisakkaridien TMSO-johdannaiset
Rtx-5 (30 m) ²⁰	100–300	100 °C (5 min), nosto 300 °C (10 °C/min), 300 °C (5 min)	mono- ja disakkaridien TMSO-johdannaiset
SLB-IL82 (30 m) ¹⁸	80–250	80 °C (5 min), nosto 220 °C (10 °C/min), 220 °C (10 min), nosto 250 °C (10 °C/min)	mono-, di-, trisakkaridien, inositolien, iminosokereiden TMSO-johdannaiset
OV-225 (30 m) ¹²	80–200	80 °C (5 min), nosto 160 °C (2 °C/min), nosto 200 °C (10 °C/min), 200 °C (12 min)	monosakkaridien EtOx-TFA- johdannaiset

3.2.3. Detektorit

Massaspektrometri (MS) on ylivoimaisesti yleisin detektorit monosakkaridien analysoinnissa. Siinä kolonnista tulevat yhdisteet ionisoidaan ja erotellaan toisistaan massa-varaussuhteen perusteella. Tämän jälkeen ne johdetaan detektorille. Massaspektrometrin heikkoutena on stereokemiallisten eroavaisuuksien havainnointi, joita monosakkarideilla, erityisesti pentooseilla ja heksooseilla, on paljon. Analyysijä vaikeuttavat monosakkaridien läheiset molekyyli-massat ja samanlaiset fragmentoitumiset. Näiden takia tunnistaminen tapahtuu pääasiassa retentioaikojen ja kromatogrammisen käyttäytymisen perusteella. Kun detektorina käytetään massaspektrometriä, derivatisoinnista voi olla hyötyä analyttien termisen stabiilisuuden parantamisessa ja yksilöllisemmän fragmentoitumisen saavuttamisessa.⁴ Monosakkaridien tapauksessa derivatisointia käytetään myös yksinkertaistamaan kromatogrammeja, joita erilaiset isomeerit tuottavat. Isomeerien määrää voidaan siis pienentää derivatisoimalla. Tässä täytyy kuitenkin tiedostaa, mitä informaatiota voidaan mahdollisesti menettää.³

Muita hyviä vaihtoehtoja ovat ultravioletti (UV)- ja infrapunadetektorit (IR). Niiden toimintaperiaatteet ovat melko samanlaiset, mutta käytettävän säteilyn aallonpituus on eri. UV-säteilyn aallonpituusalue on 200–700 nm ja IR-säteilyn 750–1000 nm. Vakuumi-ultraviolettidetektorilla (VUV) päästään alle 200 nm aallonpituuksiin. Näytteeseen kohdistetaan säteilyä, jota molekyylien valenssielektronit absorboivat. Näytteen läpäisseet säteet kulkeutuvat detektorille, jonka signaalit muodostavat absorptiospektrin. UV-detektorit sopii erityisen hyvin orgaanisten yhdisteiden havainnointiin, sillä kaikilla niillä on valenssielektroneja, jotka kykenevät nousemaan korkeammalle energiatasolle. Vakuumiultraviolettidetektorin soveltuvuutta monosakkaridien analysointiin on tutkittu tähän mennessä vain yhdessä tutkimuksessa, jossa detektorit osoittautui erittäin sopivaksi vaihtoehdoksi. Monosakkaridit tuottavat yksilöllisen ja karakteristisen yhdistespektrin. Vaikka yhdisteiden signaalipiikit menisivät osittain päällekkäin, voidaan signaalien käsittelyllä saada erilleen yksittäisen yhdisteen signaali. Tämä on mahdollista vain, kun tietokannassa on saatavilla absorptiospektrit puhtaille yhdisteille.²⁰

IR-detektorin ominaisuudet ovat päinvastaiset kuin massaspektrometrin. Se identifioi yhdisteet hyvin stereokemiallisten eroavaisuuksien perusteella ja huonosti molekyylikoon

perusteella. Absorptiospektrit ovat jokaiselle yhdisteelle ominaisia. Samalla tavalla kuin ultraviolettidetektorilla, osittain päällekkäin olevien yhdisteiden piikit voidaan erottaa toisistaan signaalin käsittelyllä. IR-detektorin tapauksessa johdannaisen valinnassa täytyy ottaa huomioon niiden kyky absorboida infrapunasäteilyä. Mitä parempi kyky absorboida säteilyä, sitä herkempi detektori on johdannaisten suhteen. IR- detektorilla ei kuitenkaan saavuteta yhtä hyvää herkkyyttä kuin liekki-ionisaatiodetektorilla ja massaspektrometrillä. Kuten UV-detektorista, ei IR-detektoreistakaan ole paljon tutkimusta monosakkaridien analysoinnista.¹⁹

Liekki-ionisaatiodetektori antaa hyvän vasteen kaikille orgaanisille yhdisteille. Sen vaste riippuu yhdisteen hiiliatomien määrästä. FID:llä näyte sekoitetaan vetykaasuun, ja syötetään liekkiin. Näytteen palaessa se tuottaa elektroneita, jotka kerätään kerääjäelektrodille, mikä aiheuttaa signaalin. Tällä detektorilla on hyvä herkkyys ja vähäinen taustan häirintä. Huonona puolena on se, että detektori tuhoaa näytteen, mikä estää muiden detektoreiden yhdistämisen liekki-ionisaation jälkeen.¹⁴ FID vaatii hieman suuremman kaasuvirtauksen mitä kolonnista tulevalla seoksella on, minkä takia on tarpeellista käyttää korvauskaasua (eng. makeup gas). Silyloituja yhdisteitä analysoitaessa voi liekissä muodostuva piidioksidi SiO_2 häiritä pitkällä aikavälillä analyysiä.⁴

4. YHTEENVETO

Monosakkarideilla on useita isomeerejä ja ne ovat usein monimutkaisissa matriiseissa, mikä tuottaa ongelmia niiden analysoinneissa. Jotta monosakkarideja voidaan analysoida kaasukromatografilla, niitä täytyy derivatisoida. Derivatisoinnilla vähennetään monosakkaridien polaarisuutta, jolloin niiden kiehumispisteet alenevat. Yleisimmät johdannaiset ovat TMSO ja TFA-oksiimit. Kaksivaiheiset derivatisointimenetelmät on todettu toimivimmiksi, sillä ne antavat selkeämpiä kromatogrammeja kuin yksivaiheiset menetelmät. Eri oksiiminmuodostusreagensseilla on pyritty parantamaan isomeerien erottuvuutta ja tunnistamista.

Tarkasteltuja monosakkaridien analysointiolosuhteita olivat kolonnien stationäärifaasit, lämpötila-alueet ja analyyseissä käytetyt detektorit. Monosakkaridien analyyseissä käytetyimmät stationäärifaasit TMS- ja TMSO-johdannaisille ovat 100%-dimetyylipolysiloksaani ja 5%-difenyyl-95%-dimetyylipolysiloksaani. TFA-johdannaisia analysoitaessa, käytetään hieman polaarisempia faaseja. TMSO-johdannaisten analysointiin on myös kokeiltu ionisia nestefaaseja, joiden todettiin olevan sopivia. Analyysien lämpötila-alue monosakkarideille on noin 50–250 °C. Lämpötila-alueeseen vaikuttaa myös käytetyn kolonnin stationäärifaasi sekä mitä johdannaisia analysoidaan. Usein tutkimuksissa analyysiolosuhteita ei optimoitu pelkästään monosakkarideille, vaan haluttiin analysoida muitakin sokereita, esimerkiksi oligosakkarideja ja iminosokereita, jolloin lämpötilat ovat analyyseissä korkeammat. Vallitseva detektori analyyseissä on massaspektrometri ja toiseksi käytetyin on liekki-ionisaatiotektori. Monosakkaridien tunnistamiseen on myös kokeiltu VUV- ja IR-detektoreita, jotka todettiin molemmat hyväksi vaihtoehdoiksi.

Sokerianalytiikassa on paljon erilaisia analyysi- ja derivatisointimenetelmiä. Tutkimuksissa näitä menetelmiä ei ole suoraan verrattu toisiinsa suuremmassa mittakaavassa. Ainoastaan muutamaa derivatisointimenetelmää ja stationäärifaasia on verrattu toisiinsa. Nykyisissä tutkimuksissa ei juurikaan keskitytä pelkästään monosakkaridien analysointiin, vaan mukana on myös muita sokereita. Tämä vaikeuttaa eri tutkimustulosten vertailua, sillä analyysiolosuhteet on optimoitu eri yhdisteille. Monosakkaridien analysoinnista olisi siis tarpeellista tehdä enemmän vertailevaa tutkimusta, etenkin detektoreiden osalta.

5. VIITELUETTELO

1. Ouellette, R. J., Rawn, J. D., *Principles of organic chemistry: Carbohydrates*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, **2015**, 343-370.
2. Davis, B. G., Fairbanks, A. J., *Carbohydrate chemistry*. Oxford University Press, Oxford, **2002**, 1-11.
3. Ruiz-Matute, A., Hernandez-Hernandez, O., Rodriguez-Sanchez, S., Sanz, M. L., Martinez-Castro, I., *J. Chromatogr. B.* **2011**, 879, 1226-1240.
4. Moldoveanu, S., David, V. *Modern Sample Preparation for Chromatography*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, **2014**, 307-391.
5. Sweeley, C. C., Bentley, R., Makita, M., Wells, W. W., *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2497-2507.
6. Knapp, D. R., *Handbook of analytical derivatization reactions: Carbohydrates*. John Wiley & Sons, New York, **1979**, 561-562.
7. Rojas-Escudero, E., Alarcón-Jiménez, A. L., Elizalde-Galván, P., Rojo-Callejas, F., *J. Chromatogr. A.* **2004**, 1027, 117-120.
8. Sullivan, J. E., Schewe, L. R., *J. Chromatogr. Sci.* **1977**, 15, 196-197.
9. Cooper, G., Yim, S., Lanoiselée, J., Sorden, S., Ramirez, F. G., *J. Chromatogr. B.* **2019**, 1126-1127, 121761.
10. Ciucanu, I., Kerek, F., *Carbohydr. Res.* **1984**, 131, 209-217.
11. Becker, M., Liebner, F., Rosenau, T., Potthast, A., *Talanta* **2013**, 115, 642-651.
12. Haas, M., Lamour, S., Trapp, O., *J. Chromatogr. A.* **2018**, 1568, 160-167.
13. Molnár-Perl, I., Horváth, K., *Chromatographia* **1997**, 45, 321-327.
14. Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R., *Principles of instrumental analysis*. Thomson Brooks/Cole, Belmont, CA, **2007**, 788-809.
15. Shimadzu, *What is Gas Chromatography: GC System Configuration*, <https://www.ssi.shimadzu.com/products/gas-chromatography/fundamental-guide-to-gas-chromatography/what-is-gas-chromatography.html> (haettu 23.2.2021).
16. Sparkman, O. D., Penton, Z., Kitson, F. G., *Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide*. Elsevier, Boston, **2011**, 15-70, 407.
17. Agilent Technologies, *GC Column Phase Selection Guide*, https://www.agilent.com/cs/library/Support/Documents/FAQ1383_F03070.pdf (haettu 29.5.2021).
18. Rodríguez-Sánchez, S., Soria, A. C., Lebrón-Aguilar, R., Sanz, M. L., Ruiz-Matute, A. I., *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, 411, 7461-7472.
19. Veness, R. G., Evans, C. S., *J. Chromatogr. A* **1996**, 721, 165-172.
20. Schenk, J., Nagy, G., Pohl, N. L. B., Leghissa, A., Smuts, J., Schug, K. A., *J. Chromatogr. A* **2017**, 1513, 210-221.