



**TEKNIikka JA LIIKENNE**

**Laboratorioala**

**OPINNÄYTETYÖ**

**LC-SPE-NMR -SPEKTROSKOPIAN SOVELTAMINEN HERMOKAASUJEN  
HAJOAMISTUOTTEIDEN SEOSNÄYTEANALYTIKASSA**

**Työn tekijä: Mia Ervasti  
Työn ohjaaja: Jukka Niiranen  
Työn ohjaaja: Harri Koskela**

**Työ hyväksytty: \_\_. \_\_. 2008**

**Jukka Niiranen  
Yliopettaja**



## **ALKULAUSE**

Tämä tutkimus tehtiin Kemiallisen aseiden kielto- ja valvontalaitoksen (VERIFIN) NMR-laboratoriossa. Tutkimuksen tekeminen oli erittäin mielenkiintoista ja palkitsevaa. Haluan kiittää kaikkia prosessiin osaltaan vaikuttaneita ja koko VERIFIN:in henkilökuntaa. Erityisesti haluan kiittää tutkimusta ohjannutta Harri Koskelaa. Sydämelliset kiitokset tuesta myös Sinulle Sampsa.

Helsingissä 5.11.2008

Mia Ervasti

## OPINNÄYTETYÖN TIIVISTELMÄ

<b>Työn tekijä:</b> Mia Ervasti	
<b>Työn nimi:</b> LC-SPE-NMR -spektroskopian soveltaminen hermokaasujen hajoamistuotteiden seosnäyteanalytiikassa	
<b>Päivämäärä:</b> 10.11.2008	<b>Sivumäärä:</b> 76 s. + 1 liite
<b>Koulutusohjelma:</b> Laboratorioala	
<b>Työn ohjaaja:</b> Jukka Niiranen	
<b>Työn ohjaaja:</b> Harri Koskela	
<p>Tämä tutkimus tehtiin Kemiallisen asean kieltosopimuksen valvontalaitoksen (VERIFIN) NMR-laboratoriossa. Tutkimuksessa selvitettiin LC-SPE -menetelmän soveltuvuutta NMR-spektrometrin menetelmien kehitykseen taisteluaineanalytiikassa. Tutkimuksen tavoitteena oli helpottaa NMR-spektrometrillä seosnäytteiden analysointia nestekromatografisella erotuksella ja parantaa menetelmän herkkyyttä kiinteäfaasiuutolla. Tutkimuksen mallikemikaaleina käytettiin metyyli-, etyylimetyyli- ja pinakolyylimetyylifosfonihappoa sekä dimetyylifosfonaattia. Käytetyt kemikaalit ovat myrkyttämiä hermokaasujen hajoamistuotteita.</p> <p>Tutkimus toteutettiin vaiheittain. Ensin optimoitiin mallikemikaalien nestekromatografinen erotus ja kiinteäfaasiuutto. LC-SPE -menetelmän testausta varten määritettiin yhdisteiden piikin poiminta-ajat käyttäen LC-NMR -menetelmiä. Osittain automatisoitu kiinteäfaasiuutto toteutettiin pienellä patruunaformaattilla (Prospekt) mahdollisimman hyvän rikastuksen aikaansaamiseksi. Lopuksi yhdistelmätekniikan LC-SPE toimivuus testattiin saantokokeiden avulla optimoiduissa olosuhteissa käyttäen NMR-spektrometriä ja 1D <sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P HSQC -tekniikkaa yhdisteiden pitoisuusmäärytyksissä.</p> <p>Testit osoittivat LC-SPE-NMR -menetelmän teknisen toimivuuden mallikemikaaleina käytettyjen fosfonihappojen osalta. Fosfonihappojen takaisinsaantokokeissa päästiin keskimäärin 50%:in. Saannot jäivät suhteellisen alhaisiksi johtuen yhdisteiden huonosta kromatografisesta erottumisesta, mikä ilmeni voimakkaana piikkien levenemisenä. Fosfonihapot saatiin kuitenkin erotettua toisistaan ja niiden rikastus kiinteäfaasiuutolla onnistui hyvin. Lisäksi nestekromatografinen erotus helpotti olennaisesti NMR-spektrometrillä analytyttien tunnistusta.</p> <p>LC-SPE-NMR -menetelmän käyttömahdollisuuksien tutkimus oli alustava selvitys ja sen tulokset suuntaa-antavia. Tutkimuksessa käytettyjä olosuhteita ei siksi voida suoraan soveltaa muille yhdisteille, vaan menetelmän käyttö analyttisenä menetelmänä edellyttää tutkimustyötä ja validointia kullekin analysoitavalle yhdisteelle erikseen.</p>	
<b>Avainsanat:</b> SPE, LC-NMR, LC-SPE, NMR, fosfonihapot, fosfonaatit	

## ABSTRACT

**Name:** Mia Ervasti

**Title:** Evaluation of hyphenated LC-SPE-NMR technique in analysis of organophosphorus compounds related to the Chemical Weapons Convention

**Date:** 10 November 2008

**Number of pages:** 77

**Department:** Laboratory Sciences

**Instructor:** Jukka Niiranen

**Supervisor:** Harri Koskela

This research was carried out at the NMR laboratory of Finnish Institute for Verification of the Chemical Weapons Convention (VERIFIN). The aim of this study was the development of NMR-spectroscopic analyses of mixtures containing treaty-related organophosphorus compounds. Although being a powerful technique in identification and quantification, NMR sets some limitations when working at trace level and with mixtures. The idea of this study was to separate compounds by liquid chromatography (LC) in order to facilitate NMR-spectrometric analyses of mixtures. Solid phase extraction (SPE) was used to improve the sensitivity of the NMR spectroscopic methods. Methylphosphonic acid, ethylmethylphosphonic acid, dimethylmethylphosphonate and pinacolylmethylphosphonic acid were used as test chemicals.

This research was executed in phases. First, chromatographic separation and solid phase extraction of the test chemicals were optimized. For LC-SPE-tests, the peak picking times of the analytes were determined using LC-NMR techniques. Partly automated solid phase extraction was carried out using small cartridges (Prospekt) to gain the most effective concentration of analytes. Finally, the functionality of the hyphenated technique LC-SPE was tested using an NMR-spectrometer and 1D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC technique for quantification of analyte recoveries.

The technical functionality of the LC-SPE technique was established in this evaluation. Analyte recoveries gained in LC-SPE-NMR-tests were about 50% for phosphonic acids. The recoveries were rather low due to line broadening during chromatographic separation. Regardless of the low recoveries, the concentration of phosphonic acids was successful. In addition, chromatographic separation of the test chemicals facilitated the NMR-spectroscopic analyses in identification.

This research was a preliminary evaluation and the methods introduced in this paper may not be applied to analyses of other compounds. Therefore further use of LC-SPE-NMR technique requires research and method validation for the compounds investigated.

**Keywords:** SPE, LC-SPE, LC-NMR, NMR, phosphonic acid, phosphonate

# SISÄLLYS

## ALKULAUSE

## TIIVISTELMÄ

## ABSTRACT

## SYMBOLILUETTELO

<b>1</b>	<b>JOHDANTO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>NMR-SPEKTROSKOPIA</b>	<b>4</b>
<b>2.1</b>	<b>Teoria</b>	<b>4</b>
2.1.1	<i>Kemiallinen siirtymä</i>	8
2.1.2	<i>Spin-spin -kytkentä</i>	10
<b>2.2</b>	<b>NMR-laitteisto</b>	<b>15</b>
<b>2.3</b>	<b>NMR-spektrin mittaus</b>	<b>17</b>
<b>2.4</b>	<b>NMR-näytteen valmistus</b>	<b>18</b>
<b>2.5</b>	<b>Kvantitatiivinen NMR</b>	<b>19</b>
2.5.1	<i>Kvantitointiin liittyviä haasteita</i>	19
2.5.2	<i>1D <sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P HSQC -tekniikka</i>	20
<b>3</b>	<b>LC-NMR -TEKNIIKAT</b>	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Jatkuva virtaus</b>	<b>23</b>
<b>3.2</b>	<b>Näytteenkeräisyksikkö</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>KIINTEÄFAASIUUTTO</b>	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>Kiinteäfaasiuuton vaiheet</b>	<b>29</b>
<b>4.2</b>	<b>NH<sub>2</sub>-sorbentti kiinteäfaasiuutossa</b>	<b>30</b>
<b>5</b>	<b>HERMOKAASUT JA NIIDEN HAJOAMINEN</b>	<b>31</b>

<b>6</b>	<b>KOKEELLINEN OSA JA TULOKSET</b>	<b>34</b>
6.1	Työn tavoitteet	34
6.2	Tarvikkeet ja reagenssit	35
6.3	Laitteistot ja ajo-olosuhteet	37
6.3.1	<i>Jatkuva virtaus</i>	37
6.3.2	<i>Näytteenkeräysyksikkö</i>	38
6.3.3	<i>LC-SPE</i>	39
6.3.4	<i>NMR</i>	41
6.4	Kiinteäfaasiuuton testaus	41
6.4.1	<i>Suoritus</i>	42
6.4.2	<i>Tulokset</i>	43
6.5	Nestekromatografiset olosuhteet	48
6.5.1	<i>Suoritus</i>	48
6.5.2	<i>Tulokset</i>	49
6.6	Fraktion siirron optimointi	56
6.6.1	<i>Siirtoaika</i>	56
6.6.2	<i>SPE-testit</i>	57
6.7	LC-SPE -testit	60
6.7.1	<i>PMPA:n piikin poiminta-aika</i>	60
6.7.2	<i>MPA:n, EMPA:n ja DMMP:n piikin poiminta-ajat</i>	63
6.7.3	<i>LC-SPE -menetelmän testaus</i>	67
<b>7</b>	<b>YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET</b>	<b>70</b>
	<b>VIITELUETTELO</b>	<b>73</b>
	<b>LIITTEET</b>	

**LIITE 1** Mallikemikaalien resonanssit  $^1\text{H}$  NMR -spektrissä

## SYMBOLILUETTELO

1D $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$ HSQC	<i>One Dimensional Proton-Phosphorus Heteronuclear Single Quantum Coherence Experiment.</i> Protoniydinten mittaukseen käytettävä NMR-spektrometrinen korrelaatiokoe, jossa protonin magnetisaatio siirretään fosforille ja takaisin J-kytkentää pitkin.
DMMP	<i>Dimethylmethylphosphonate.</i> Dimetyylimetyylifosfonaatti.
EMPA	<i>Ethylmethylphosphonic acid.</i> Etyylimetyylifosfonihappo.
FID	<i>Free Induction Decay.</i> Vapaasti vaimeneva signaali.
$^1\text{H}$ NMR	Protoniytimiä mittaava NMR-spektroskopinen koe.
LC-NMR	<i>Liquid Chromatography - Nuclear Magnetic Resonance.</i> Yhdistelmätekniikka, jossa nestekromatografi yhdistetään NMR-spektrometriin.
LC-SPE	<i>Liquid Chromatography - Solid Phase Extraction.</i> Yhdistelmätekniikka, jossa nestekromatografi yhdistetään kiinteäfaasiuuttoyksikköön.
MPA	<i>Methylphosphonic acid.</i> Metyylifosfonihappo.
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance.</i> Ydinmagneettinen resonanssi.
$^{31}\text{P}$ $\{^1\text{H}\}$ NMR	Protoni-irtautettu fosforytimiä mittaava NMR-spektroskopinen koe.
$^{31}\text{P}$ NMR	Fosforytimiä mittaava NMR-spektroskopinen koe.
PMPA	<i>Pinacolylmethylphosphonic acid.</i> Pinakolyylimetyylifosfonihappo.
SPE	<i>Solid Phase Extraction.</i> Kiinteäfaasiuutto.
TMS	Tetrametyylisilaani.

## 1 JOHDANTO

Kemiallisia taisteluaineita käytettiin ensimmäistä kertaa laajassa mittakaavassa ensimmäisessä maailmansodassa. Sodan jälkeen vastustus kemiallisia aseita kohtaan kasvoi ja vuonna 1925 allekirjoitettiin Geneven sopimus, joka kielsi kemiallisten aseiden käytön, mutta ei aseiden hallussa pitoa. Geneven sopimuksesta huolimatta tutkimusta kemiallisten aseiden kehittämiseksi tehtiin erityisesti Saksassa. Tutkimukset johtivat hermokaasujen kehitystyöhön ja erittäin myrkyllisen hermokaasun tabuunin keksimiseen ja teolliseen tuotantoon 1930-luvulla Saksassa. [1, s. 5, 6]

Toisen maailmansodan jälkeen Saksan laajat kemiallisten aseiden varastot tuhottiin liittoutuneiden toimesta ja hermokaasuja hävitettiin kymmeniä tuhansia tonneja. Eteläiseen Itämereen heitettiin arvion mukaan 50 000 tonnia kemiallisia aseita. [1, s. 7] Itämeren pohjassa makaavien asehautojen ympäristövaikutuksia arvioidaan parhaillaan muun muassa EU:n MERCW-hankkeen muodossa. Osa toisen maailmansodan aikaisista kemiallisista aseista jäi liittoutuneiden käyttöön tutkimustyötä varten. Sittemmin kemiallisten aseiden kehitystyötä on tehty ympäri maailman ja se on johtanut tuhoisiin seurauksiin muun muassa Pohjois-Irakissa Halabjan kaupungissa 1980-luvulla. [1, s. 9]

Huolimatta heikkouksistaan vuonna 1925 allekirjoitettu Geneven sopimus oli tärkein kemialliset aseet kieltävä sopimus aina 1990-luvulle saakka. [1, s. 10] Vuonna 1997 astui voimaan tiukat rajoitukset asettava Kemiallisen aseiden kieltosopimus (*Chemical Weapons Convention, CWC*). Sopimus kieltää kemiallisten aseiden käytön, tuottamisen, kehittämisen ja varastoinnin [2, s. 2].

Kemiallisen aseiden kieltosopimuksen noudattamista valvoo kansainvälinen kieltosopimuksen valvontajärjestö OPCW (*Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons*). OPCW:n jäsenmaat ovat sitoutuneet noudattamaan Kemiallisen aseiden kieltosopimusta. Lokakuussa 2008 kieltosopimuksen oli allekirjoittanut 184 valtiota. [3] OPCW:n alaisena Suomen kansallisena viranomaislaitoksena toimii Kemiallisen aseiden kieltosopimuksen valvontalaitos (VERIFIN).



Viranomaisvelvollisuuksien ohella laitos tukee kieltosopimuksen valvontaa kehittämällä uusia tutkimusmenetelmiä kemiallisten taisteluaineiden tunnistamiseen ja analysointiin. [4]

Kemialliset aseet ovat taisteluaineita, jotka aiheuttavat ihmiselle elimellisiä vaurioita, väliaikaisen tai pysyvän toimintakyvyttömyyden, vammautumisen tai jopa kuoleman. Taisteluaineita voidaan jaotella muun muassa myrkyllisyytensä mukaan. Myrkyllisimpiä taisteluaineita ovat hermokaasut, joista yleisimpiä ovat sariini, somaani, tabuuni ja VX. Hermokaasut hydrolysoituvat helposti luonnossa tai kudoksissa veden vaikutuksesta ja usein niiden hajoamistuotteita käytetäänkin taisteluaineiden merkkikemikaaleina taisteluaineanalytiikassa [5]. Hydrolyysituotteet ovat myrkyttömiä organofosforiyhdisteitä, joiden analysointi on turvallista sekä ympäristön että tutkijan kannalta.

Taisteluaineanalytiikka on jämäanalytiikkaa ympäristönäytteistä, eli taisteluaineen läsnäolo näytteessä tulee pystyä varmentamaan pienistä pitoisuuksista. Taisteluaineiden tuhoamiseen eli hajottamiseen käytetään monenlaisia tuhoamisliuoksia [6]. Tällaisia ovat esimerkiksi natriumhypokloriitti (NaOCl), kaliumhydroksidi-etanoli (KOH/EtOH) ja PEG eli NaOH/polyetyleeniglykoli. Tuhoamisliuokset tuottavat näytteille mutkikkaan analyysimatriisin, samoin kuin ympäristön maa- ja vesinäytteet tai teollisuuden jätevedet, jotka voivat sisältää lähes mitä tahansa.

OPCW:n jäsenmaiden analyttisten laboratorioiden tulee pystyä varmistamaan Kemiallisen aseiden kieltosopimukseen listatut kemikaalit laboratorioon OPCW:n toimittamista näytteistä. Tarkastajat ottavat näytteitä kansallisten valvojien kanssa ja niitä voidaan kerätä alueilta, joilla epäillään kehitettävän tai tuotettavan kieltosopimukseen listattuja aineita. Tehokkaita analyysimenetelmiä hajoamistuotteiden määrittämisessä ovat kaasua- ja nestekromatografiset menetelmät yhdistettynä massaspektrometriin; GC-MS (lyhenne tulee sanoista *Gas Chromatography-Mass spectrometry*) ja LC-MS (lyhenne tulee sanoista *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) [7, 8]. Näiden menetelmien käyttö taisteluaineanalytiikassa vaatii kuitenkin usein monenlaista näytteiden esikäsittelyä ja johdoksenmuodostusta monimutkaisten näytematriisien vuoksi. [9 - 11].

Taisteluaineanalytiikassa hyödynnetään myös ydinmagneettista resonanssi-spektroskopiaa (*Nuclear Magnetic Resonance, NMR*) [12]. Näytteenkäsittelyn osalta NMR:n rajoitukset ovat kaasu- ja nestekromatografisiin menetelmiin verrattuna vähäiset. Analyysi ei edellytä monimutkaista näytteenkäsittelyä, mikä säästää runsaasti analyysiaikaa. Menetelmänä NMR on monipuolisia tekniikoita hyödyntävä analyysimenetelmä, joka mahdollistaa erilaisten yhdisteiden rakenne- ja pitoisuusmäärittämisen. Taisteluaineiden hajoamistuotteita analysoidaan muun muassa perinteisillä  $^1\text{H}$  NMR- ja  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR -kokeilla. [13] Perinteisten menetelmien rinnalle ovat nousseet selektiiviset ja herkät  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  -korrelaatiokokeet [14 - 16].

Haasteita NMR-spektrometriin menetelmiin luo seosnäytteiden analysointi, jossa resonanssien päällekkäisyydet vaikeuttavat yhdisteiden tunnistusta ja pitoisuusmäärittämistä. Erityisesti  $^1\text{H}$  NMR -spektrin mittauksessa ongelmia tuottaa voimakas liuotintausta, jonka vuoksi näyteliuottimen suuret signaalit saattavat peittää tutkittavien yhdisteiden protonisignaalit alleen [13]. Myös jäämätasolla työskentely asettaa omat vaatimuksensa analytiikalle. NMR-spektrometriassa spektri saadaan useiden keräysten summana. Signaalin intensiteetti on suoraan verrannollinen näytteen konsentraatioon, joten keräysten lukumäärä riippuu mitattavan yhdisteen ainemäärästä. Keräyksiä tarvitaan sitä enemmän, mitä pienempi mitattavan yhdisteen konsentraatio näytteessä on. Näytteen konsentroida vähentää näin tarvittavien keräysten lukumäärää ja lyhentää samalla analyysiaikaa.

Tutkimuksen lähtökohtana on NMR-spektroskopisten menetelmien kehittäminen kieltosopimuksen kannalta tärkeiden organofosforyyhdisteiden seosnäyteanalytiikassa. Tavoitteena on helpottaa seosnäytteen komponenttien tunnistusta. Tähän pyritään mallikemikaalien selektiivisellä rikastuksella käyttämällä yhdistelmätekniikkaa LC-SPE (lyhenne tulee sanoista *Liquid Chromatography - Solid Phase Extraction*), jossa nestekromatografinen erotus yhdistetään kiinteäfaasiuuttoon. LC-SPE-NMR -spektrometrinen menetelmän kehityksessä hyödynnetään myös LC-NMR:ää; nestekromatografisen erotuksen ja NMR-spektrometrisen analyysin yhdistelmätekniikkaa (lyhenne tulee sanoista *Liquid Chromatography - Nuclear Magnetic Resonance*).

## 2 NMR-SPEKTROSKOPIA

NMR on spektrometrinen analyysitekniikka, joka hyödyntää atomiydinten magneettisia ominaisuuksia. Menetelmä perustuu magneettisia ominaisuuksia omaavien atomiydinten manipulointiin homogeenisessa magneettikentässä radiotaajuisen säteilyn avulla. Menetelmän tarkempi kuvaus yleisimpien mitattavien ydinten näkökulmasta on esitetty tässä luvussa. Teoria on esitetty työn kannalta oleellisin osin ja lisätietoa analytiikasta on saatavilla runsaasti kirjallisuudesta.

### 2.1 Teoria

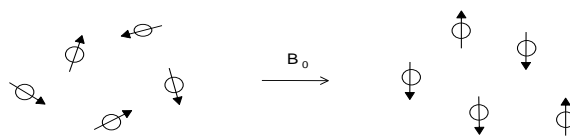
Tietyt luonnon isotoopit omaavat magneettisia ominaisuuksia, jotka mahdollistavat niiden analysoinnin NMR-spektrometrillä. Magneettisilla ytimillä on ominaisuus spin, joka määrittyy atomin ytimen spin-kvanttilukuna  $I$ . [17, s.1] Spin-kvanttiluku noudattaa seuraavia säännönmukaisuuksia:

- Ytimet, joiden atomimassa ja järjestysluku ovat parilliset, omaavat spin-kvanttiluvun 0 ( $^{12}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}$ ).
- Ytimillä, joilla massaluku on parillinen ja järjestysluku pariton, spin-kvanttiluku on kokonaisluku ( $^{14}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$ ).
- Ytimillä, joiden atomimassa on pariton, kvanttiluku on ei-kokonaisluku ( $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{3}{2}$ ,  $\frac{5}{2}$ ...). Esimerkiksi ytimillä  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{19}\text{F}$  ja  $^{13}\text{C}$  kvanttiluku on  $\frac{1}{2}$ .

Ainoastaan ne ytimet, joiden spin-kvanttiluku on  $I \neq 0$ , voivat absorboida/emittoida sähkömagneettista säteilyä.

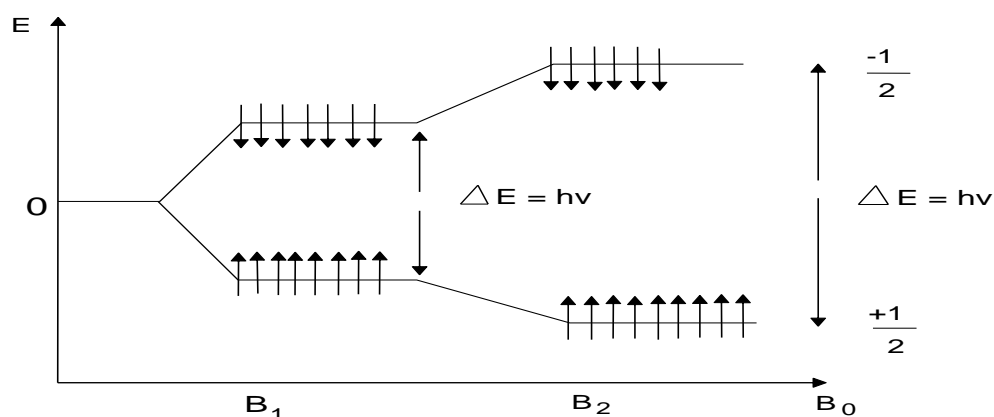
Yleisimmin mitattuja luonnon isotooppeja ovat alkuaineet, joiden spin-kvanttiluku on  $\frac{1}{2}$ . Tällaisilla ytimillä on homogeenisessa magneettikentässä kaksi mahdollista spin-tilaa kaavan  $2I + 1$  mukaisesti. Luonnossa yleisesti esiintyvien  $^{12}\text{C}$ - ja  $^{16}\text{O}$ -isotooppien ydinten spin-kvanttiluku on 0, mikä tekee näistä ytimistä magneettisesti ei-aktiivisia. Tämä yksinkertaistaa huomattavasti erityisesti orgaanisten molekyylien NMR-spektrejä. [17, s. 1, 2]

Ydin, jonka spin on  $\neq 0$ , omaa magneettisen momentin, jota voidaan kuvata spinvektorilla. Kun näyte ei ole magneettikentässä, magneettisten ydinten spinvektorit osoittavat sattumanvaraiseen suuntaan. Kun näyte tuodaan voimakkaaseen magneettikenttään  $B_0$ , magneettisten ydinten spin-vektorit suuntautuvat joko magneettikentän suuntaisesti tai sitä vastaan. Tilannetta havainnollistaa kuva 1.



*Kuva 1. Ydinten spinvektorit osoittavat sattumanvaraiseen suuntaan, kun ne eivät ole magneettikentässä. Kun ytimet ovat magneettikentässä, ydinten spinvektorit suuntautuvat joko magneettikentän suuntaisesti tai sen suunnan vastaisesti.*

Spinien ajatellaan järjestäytyvän energiatasolle  $\alpha$  ja  $\beta$  spinvektorin suunnan mukaisesti. Magneettikentän suuntaisesti järjestäytyneiden spinien ajatellaan olevan alemmalla energiatasolla  $\alpha$  ( $+\frac{1}{2}$ ), kun taas magneettikentän suunnan vastaisesti järjestäytyneet spinit ovat ylemmällä energiatasolla  $\beta$  ( $-\frac{1}{2}$ ). Alemman energiatason populaatio on hieman suurempi noudattaen *Boltzmanin jakaumaa* [18, s. 6]. Populaatioiden välinen ero riippuu lämpötilasta ja magneettikentän voimakkuudesta. Mitä suurempi spinpopulaatioiden välinen ero on, sitä intensiivisempi signaali saadaan. Intensiivisimmät piikit saadaan matalissa lämpötiloissa ja voimakkailla magneettikentillä. Tilannetta havainnollistaa kuva 2. Todellisuudessa alemman tason spinpopulaation koko on vain hitusen verran suurempi kuin ylemmän energiatason [18, s. 7].



Kuva 2.  $\frac{1}{2}$ -spinpopulaatioiden välinen energiaero suhteessa magneettikentän voimakkuuteen: magneettikentän suunnan mukaisesti järjestäytyneiden spinien ajatellaan olevan alemmalla energiatasolla  $\alpha$ . Ylemmän energiatason  $\beta$  spinit suuntautuvat magneettikentän suunnan vastaisesti. Alemman energiatason populaatio on hieman suurempi kuin ylemmän energiatason. Populaatioiden välinen ero riippuu magneettikentän voimakkuudesta  $B_0$ . Kun magneettikentän voimakkuus kasvaa, ero populaatioiden välillä kasvaa. Spektrissä tämä havaitaan signaalin intensiteetin kasvuna. [lähde 18, s. 5 mukailen]

Energiatilojen välinen energiaero lasketaan kaavalla 1 [12, s. 25].

$$\Delta E = h\nu \quad (1)$$

jossa  $h$  on Planckin vakio ja  $\nu$  mitattavan ytimen resonanssi- eli Larmor-taajuus. Larmor-taajuus on jokaiselle ytimelle ominainen taajuus, joka lasketaan kaavalla 2 [12, s. 35].

$$\nu = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (2)$$

jossa  $\gamma$  on ytimelle ominainen vakio; niin sanottu gyromagneettinen suhde ja  $B_0$  magneettikentän voimakkuus.

Ytimen resonanssitaajuuteen vaikuttaa sen kokeman magneettikentän voimakkuus, joka riippuu resonoivan ytimen kemiallisesta ympäristöstä. Kemiallisen ympäristön aiheuttama varjostus muuttaa ytimen kokemaa magneettikentän voimakkuutta. Varjostuksen aiheuttavat suurelta osin ydintä ympäröivät elektronit, jotka kiertävät elektronikuorillaan magneettikentässä tuottaen sekundaarisen kentän. Tämä kenttä on vastakkaisuuntainen magneettikentän suuntaan verrattuna. Sekundaarinen kenttä alentaa ytimien kokemaa magneettikentän voimakkuutta.

Pieni elektronitiheys aiheuttaa pienemmän varjostuksen, jolloin ydin kokee voimakkaamman magneettikentän. Varjostuksen aiheuttama muutos Larmor-taajuudessa otetaan huomioon kaavalla 3 [18, s. 20].

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi}(1 - \sigma)B_0 \quad (3)$$

jossa  $\sigma$  on varjostusvakio.

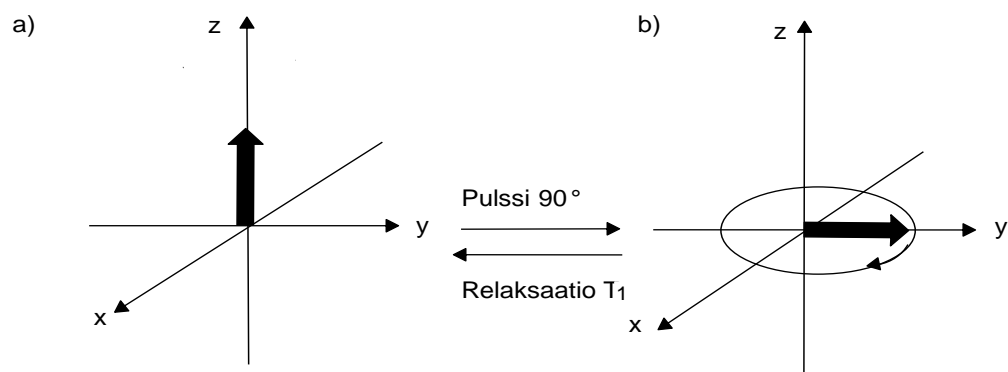
### *Nettomagnetisaatio*

Magneettikentässä olevaa spinsysteemiä voidaan tarkastella avaruuskoordinaatistossa. Spinsysteemissä vastakkaisuuntaiset spinvektorit kumoavat toisensa, jolloin muodostuu *nettomagnetisaatio*. Näin tasapainotilassa magneettikentässä olevien ydinten nettospinvektori on magneettikentän suuntainen (z-akselin suuntainen), koska alemman energiatason spinpopulaatio on hieman suurempi kuin ylemmän energiatason. [18, s. 6] Kun tasapainotilassa olevaan systeemiin lähetetään radiotaajuista säteilyä mitattavan ytimen Larmor-taajuudella, spinit voivat absorboida energiatilojen eroa vastaavan määrän energiaa ja virittyä. Tämän seurauksena nettomagnetisaatiovektori kääntyy pois z-akselilta muodostaen sen kanssa kulman, jonka suuruus riippuu lähetetyn signaalin kestosta [19, s. 64].

Radiotaajuus-signaali voidaan lähettää näytteeseen lyhytkestoisena pulssina [18, s. 10 - 11]. Kun käytetään 90°:n pulssia (esimerkiksi  $^1\text{H}$  NMR), nettomagnetisaatiovektori kääntyy z-akselilta xy-tasoon. [19, s. 65] Vektori pyörii xy-tasossa z-akselin ympäri. Tilannetta havainnollistaa kuva 3. Magnetisaatiovektori xy-tasossa tuottaa radiotaajuisen signaalin näytettä ympäröivään vastaanotinkelaan. Vastaanotettu signaali mitataan ja vahvistetaan.

Ytimen virittynyt tila ei ole pysyvä. Nettomagnetisaatiovektori palaa lopulta tasapainotilaansa z-akselin suuntaiseksi. Syynä viritystilan päättymiseen ovat ytimessä tapahtuvat relaksaatioprosessit. Eräs merkittävä relaksaatioprosessi on magneettikentän suuntainen, niin sanottu *pitkittäinen relaksaatio* (engl. *longitudinal relaxation*), jota kuvataan relaksaatiovakiolla  $T_1$ . Relaksaatiovakio kuvaa virittyneen tilan kestoa. [18, s. 161, 162]

Tasapainotilan palautuminen on suhteellisen hidas prosessi ja voi kestää useita sekunteja [12, s. 54]. Virityksen jälkeen kestää noin  $5 \times T_1$  kaikilta kohdeytimiltä palata tasapainotilaan [20]. Relaksaatiovakio määrää pitkälti käytettävän pulssisarjan toistovälin, jota käsitellään tarkemmin luvussa 2.3.



*Kuva 3. Nettomagnetisaatio kuvattuna avaruuskoordinaatistossa tasapainotilassa ja pulssin lisäyksen jälkeen: tasapainotilanteessa (a) mitattavien ydinten nettomagnetisaatiovektori on z-akselin suuntainen. Lisätty radiotaajuinen pulssi ( $90^\circ$ ) kääntää nettomagnetisaatiovektorin xy-tasoon (b). Tällöin vektori pyörii xy-tasossa tuottaen signaalin näytettä ympäröivään vastaanotinkelaan ja signaali mitataan. Relaksaatiossa nettomagnetisaatiovektori palaa tasapainotilaansa z-akselille. [lähde: 19, s. 65 mukailen]*

### 2.1.1 Kemiallinen siirtymä

NMR -spektrissä havaitaan mitatun ytimen resonanssiviiva sille tyypillisellä resonanssitaajuudella (kaava 2). Koska ytimen varjostus muuttaa sen kokeaman magneettikentän voimakkuutta, erilaisissa kemiallisissa ympäristöissä olevat ytimet resonovat hieman eri taajuuksilla (kaava 3). Ytimen resonanssitaajuus riippuu siten magneettikentän voimakkuudesta  $B_0$  ja ytimen varjostusvakioista  $\sigma$ . Esimerkiksi 4,7 T:n magneetilla protonin resonanssitaajuus on 200 MHz ja 9,4 T:n magneetilla 400 MHz. Jotta voimakkuuksiltaan erilaisien magneettien mittaustulokset olisivat vertailukelpoisia, on taajuuden käyttö mitta-asteikkona korvattu *kemiallisella siirtymällä*  $\delta$ .

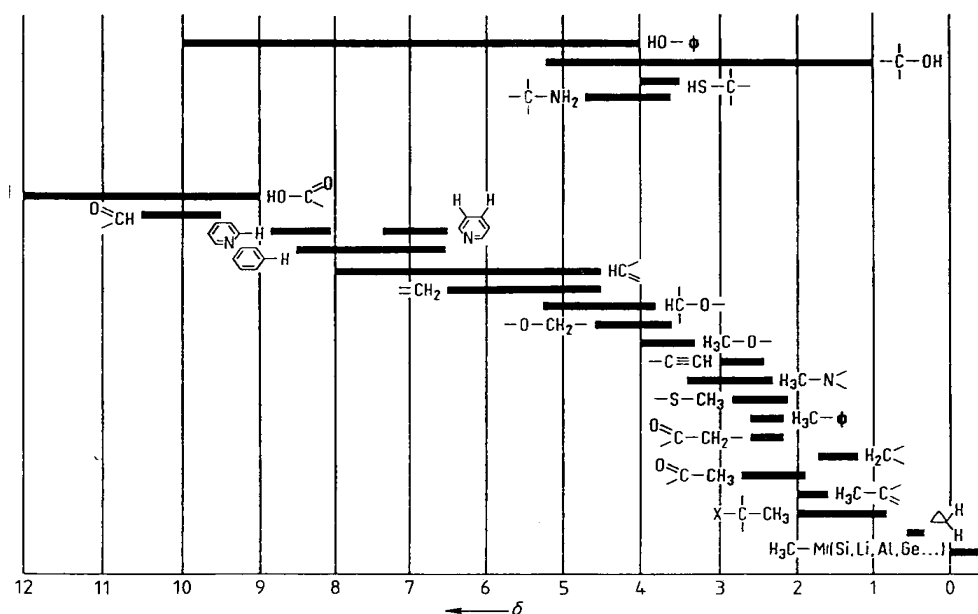
Kemiallinen siirtymä on riippumaton magneettikentän voimakkuudesta ja se lasketaan kaavalla 4 [12, s. 6].

$$\delta(\text{ppm}) = \frac{\nu - \nu_{\text{ref}}}{\nu_{\text{ref}}} \cdot 10^6 \quad (4)$$

jossa  $\nu$  on ytimen resonanssitaajuus ja  $\nu_{\text{ref}}$  on referenssitaajuus.

Usein protonille ja hielle käytetty referenssiyhdiste on TMS eli tetrametyylisilaani [17, s. 33], jonka siirtymä kalibroidaan kohtaan 0 ppm. Kaikkien muiden resonanssien kemialliset siirtymät saadaan vertaamalla niiden taajuuksia referenssin kemialliseen siirtymään. Kemiallinen siirtymä määritetään spektristä resonanssin keskikohdasta.

Resonanssin kemiallinen siirtymä riippuu vahvasti ytimen kemiallisesta ympäristöstä. Toisin sanoen erilaiset funktionaaliset ryhmät esiintyvät yleensä niille ominaisilla kemiallisilla siirtymäalueilla. Tämän perusteella saadaan tietoa yhdisteen kemiallisesta rakenteesta. Tyypillisiä funktionaalisia ryhmiä kemiallisine siirtymäalueineen on esitetty kuvassa 4. Myös eri liuottimille tyypillisiä kemiallisia siirtymiä on taulukoitu niiden tunnistuksen helpottamiseksi. [21, s. 68, 69]



Kuva 4.  $^1\text{H}$ -ydinten kemiallisia siirtymäalueita orgaanisissa yhdisteissä [18, s. 42]



### 2.1.2 Spin-spin -kytkentä

Magneettinen ydin saa tietoa naapuriydinten energiatiloista atomien välisten kovalenttisten sidosten välityksellä [17, s. 45]. Tästä vuorovaikutuksesta käytetään nimitystä spin-spin -kytkentä ja se muuttaa ytimen kokemaa magneettikentän voimakkuutta [18, s. 24]. Tällä on vaikutusta mitattavan ytimen resonanssitaajuuteen, jolloin kemiallisessa siirtymässä havaitaan pieni muutos. Kytkeytymisen seurauksena signaali jakaantuu kahdeksi tai useammaksi resonanssiiviksi. Tämä havaitaan spektrissä signaalin hienorakenteena. Mitattava ydin ”näkee” naapurinsa vain tietyn matkan päähän, joka on enintään viidestä kuuteen sidosta [17, s. 45]. Organofosforiyhdisteiden kytkennät ulottuvat useimmiten 2 - 3 sidoksen päähän. Lisäksi on huomattava, että ydin voi kytkeytyä vain magneettisiin ytimiin, ei esimerkiksi hiilen isotooppiin <sup>12</sup>C.

*Multiplisiteetilla M* tarkoitetaan ytimen signaalin jakaantumisessa syntyvien spektriviivojen lukumäärää. Multiplisiteetti voidaan laskea kaavalla  $M = n + 1$ , jossa  $n$  kuvaa naapuriydinten lukumäärää. Apuna multiplisiteetin määrittämisessä voidaan käyttää *Pascalin kolmiota*, jonka mukaisesti jakaantuneiden signaalien intensiteettisuhteet määräytyvät. [18, s. 28] Pascalin kolmio on esitetty kuvassa 5.

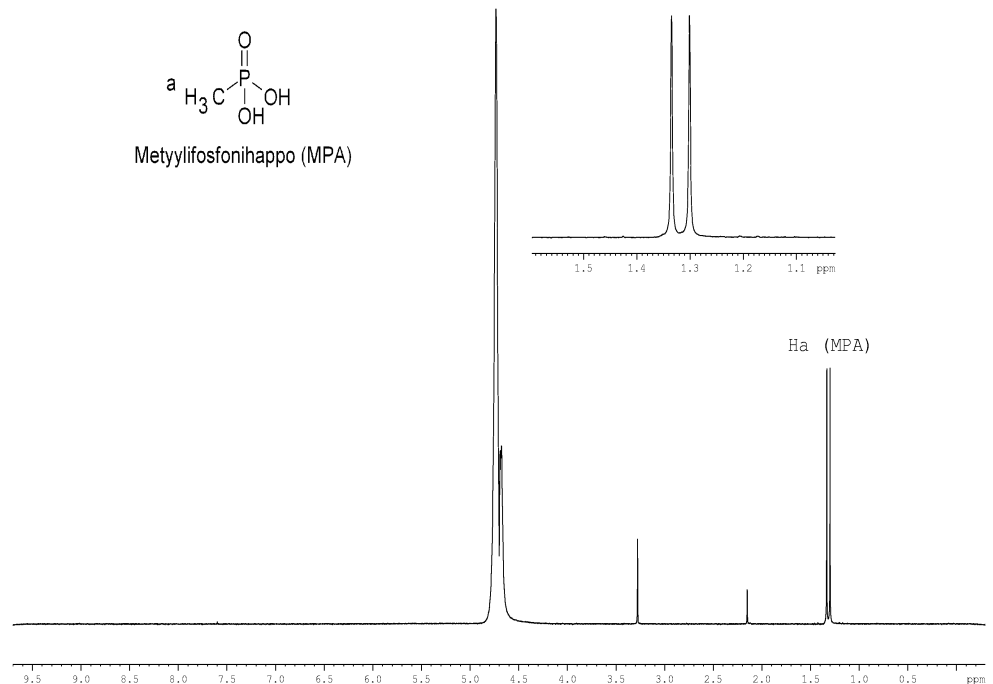
Naapuriydinten lkm (n)	Intensiteettisuhte	Multiplisiteetti
n = 0	1	singletti
n = 1	1 1	dubletti
n = 2	1 2 1	tripletti
n = 3	1 3 3 1	kvartetti
n = 4	1 4 6 4 1	kvintetti

*Kuva 5. Resonanssiviivojen suhteelliset intensiteetit noudattavat Pascalin kolmiota. Multiplisiteeteista voidaan käyttää erityisiä nimiä, jotka määräytyvät viivojen lukumäärän mukaan. [lähde 18, s. 28 mukaillen]*

Ajatellaan esimerkiksi metyylifosfonihappoa (MPA), jolla on kolme protonia metyyli ryhmässään H<sub>a</sub> (kuva 6). Näillä protoneilla on samanlainen kemiallinen ympäristö, joten ne ovat ympäristönsä suhteen ekvivalentteja. Siten näiden protonien resonanssien tulisi näkyä samalla kemiallisella siirtymällä eli yhtenä viivana spektrissä. Metyyli ryhmän protonit kuitenkin ”näkevät” kahden sidoksen päässä olevan magneettisen fosforiytimen.

Metyyliprotonilla on siis yksi naapuri, jonka spinit saattavat olla lähes samalla todennäköisyydellä joko ylemmällä tai alemmalla energiatasolla. Kytkeytymisen seurauksena metyyliprotonien signaali jakaantuu *kahteen* yhtä suureen resonssiviivaan ja signaalin multiplisiteetti on siis dubletti. Tilannetta havainnollistaa kuva 6.

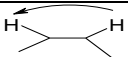
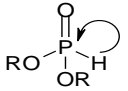
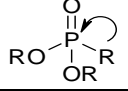
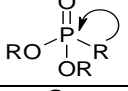
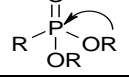
<sup>1</sup>H NMR with PRESAT: I103ME38S1 (20µg MPA referenssi) in D2O; 080512-7785



*Kuva 6. 500 MHz:n liuotinvaimennettu <sup>1</sup>H NMR -spektri metyylifosfonihaposta (MPA) 1 mg/ml:n vesiliuoksessa: MPA:n metyyliiryhmän protonit (H<sub>a</sub>) ovat kytkeytyneet kahden sidoksen päässä olevaan fosforiytimeen kovalenttisten sidosten kautta. Fosforiytimellä voi olla kaksi erilaista spintilaa; ylempi ja alempi energiataso. Tämän seurauksena metyyliprotonien signaali nähdään kahtena resonanssiviivana protonispektrissä. Metyyliprotonien resonanssi on levitetty kuvaan. Kemiallisella siirtymällä 4.75 ppm nähdään intensiivinen signaali vedestä. Pienet signaalit kemiallisilla siirtymillä 2.15 ppm ja 3.25 ppm ovat peräisin näytteen epäpuhtauksista.*

Spin-spin -kytkentää kuvataan kytkentävakion suuruudella *J*. Kytkentäväkio ilmaisee jakaantuneiden signaalien piikkien huippujen välisen etäisyyden hertzeinä (Hz). Kytkentävakion suuruus riippuu kytkeytyvistä ytimistä ja siitä, kuinka monen sidoksen päässä ytimet ovat toisistaan. Tyypillisiä kytkentävakioiden suuruuksia orgaanisissa yhdisteissä on taulukoitu ja organofosforiyhdisteille tyypillisiä kytkentävakioita on esitetty taulukossa 1. Kytkentäväkio ei riipu magneettikentän voimakkuudesta, joten se on tietyille yhdisteille aina sama. [18, s. 25] Tietoa voidaan hyödyntää spektrin tulkinnessa ja yhdisteiden tunnistuksessa.

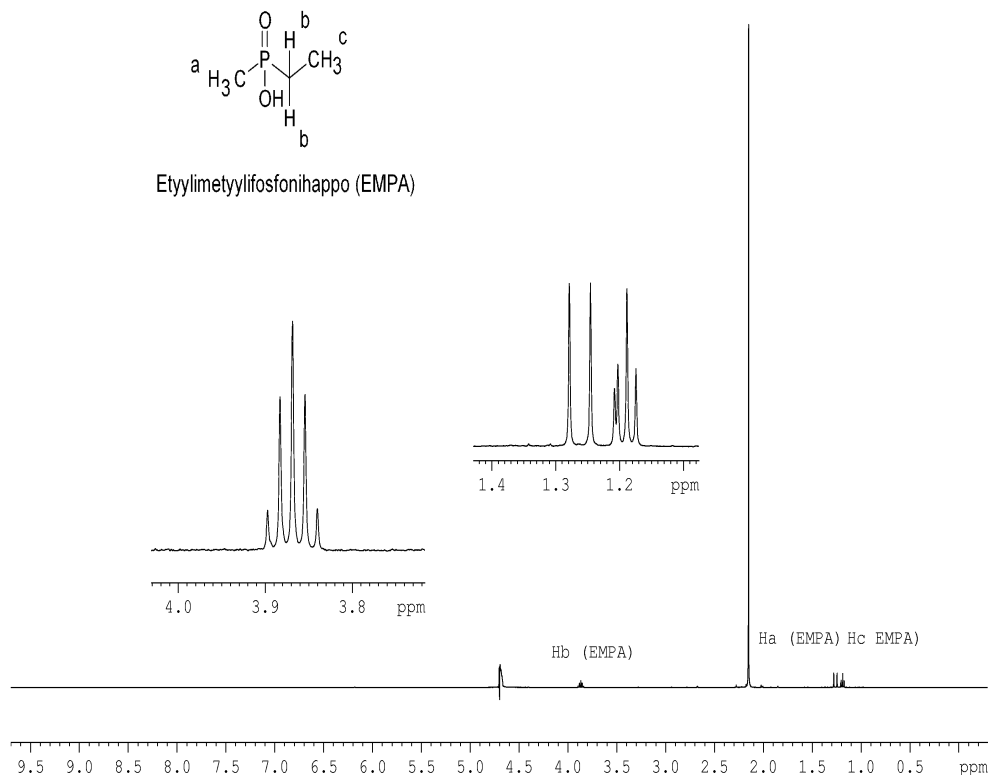
Taulukko 1. Tyypillisiä orgaanisten yhdisteiden  $J$ -kytkentävakioita: sidosten lukumäärä kytkeytyneiden ydinten välillä on merkitty numerolla yläindeksiin. Kytkeytyneet ytimet on merkitty alaindeksiin kirjaimin.[22]

Rakenne	$J$ -kytkentäväkio (Hz)
	$^3J_{HH} \approx 7$
	$^1J_{PH} \approx 700$
	$^2J_{PH} \approx 15 - 17$
	$^3J_{PH} \approx 19 - 21$
	$^3J_{PH} \approx 7 - 11$

Mitä monimutkaisempi kytkentäverkko on, sen useampaan osaan signaali jakaantuu. Pascalin kolmion avulla pystytään määrittämään melko hyvin multiplisiteetteja *ensimmäisen kertaluvun* spektreille. Tällaisissa tapauksissa spinsysteemin muodostavat sellaiset ytimet, joiden resonanssitaajuuksien välinen ero on paljon suurempi kuin niiden välisen kytkentävakion suuruus ( $\Delta\nu \gg J$ ) [18, s. 31]. Spektrissä ilmenevät resonanssit noudattavat useimmiten intensiteettisuhteiltaan Pascalin kolmiota ja ovat selvästi erottuneet toisistaan. Poikkeustilanne voi syntyä, kun kytkentäverkko koostuu useista kytkennöistä muihin ytimiin.

Ajatellaan esimerkiksi etyyylimetyylifosfonihapon (EMPA) etyyliyhdyntien protonit  $H_b$  (kuva 7). Näillä protoneilla kytkentäverkko koostuu  $H_c$ -ytimestä ja fosforista. Kytkeytyminen ytimiin  $H_c$  jakaa ydinten  $H_b$  signaalin neljään osaan (kvartetti). Kytkeytyminen fosforiin jakaa kvartetin edelleen kahteen osaan. Tuloksena saadaan kvartettien dupletti, joka spektrissä näkyy kuitenkin kvintettinä. Tämä johtuu siitä, että EMPA:n protonien ( $H_b$ )  $J$ -kytkentävakiot  $^3J_{H_b-H_c}$  ja  $^3J_{H_b-P}$  ovat lähes yhtä suuret (taulukko 1), jolloin resonanssiviivat menevät osittain päällekkäin. Kuva 7 havainnollistaa tilannetta.

<sup>1</sup>H NMR with PRESAT: I103ME39s1 (20µg EMPA-referenssi) in D2O; 080515-7809

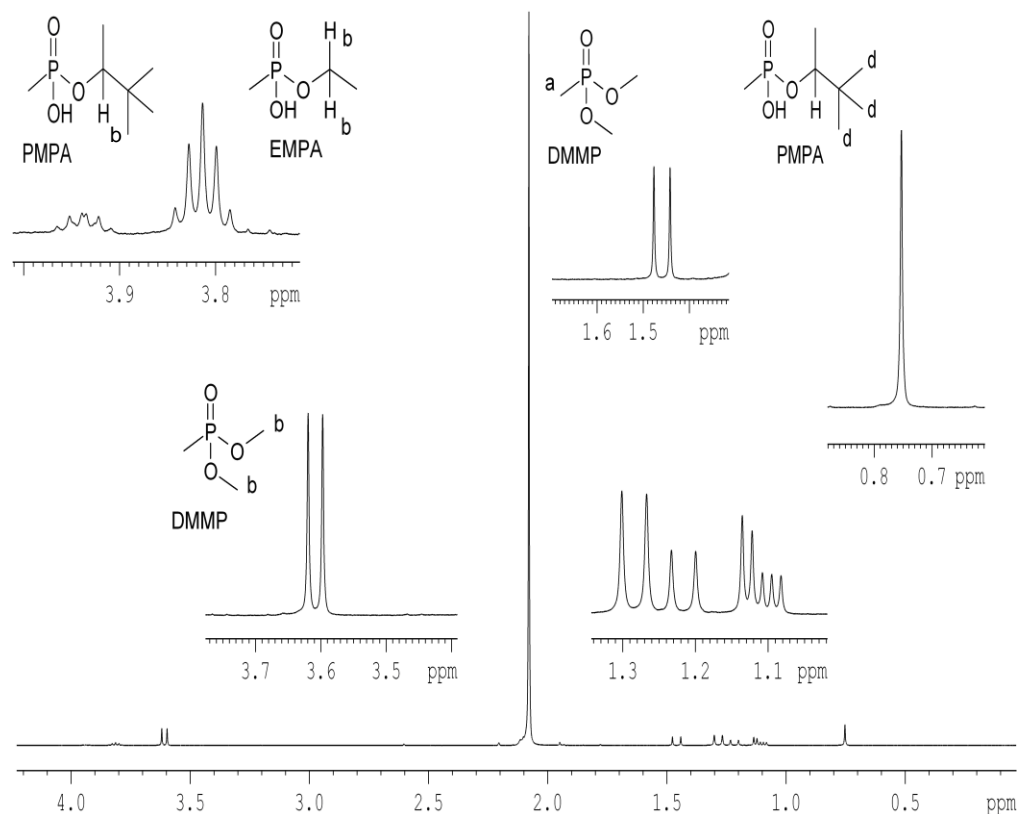


*Kuva 7. 500 MHz:n liuotinvaimennettu <sup>1</sup>H NMR -spektri ettyylimetyylifosfonihaposta (EMPA) 1 mg/ml vesiliuoksessa: EMPA:n protonien (H<sub>b</sub>) J-kytkentä protoneihin (H<sub>c</sub>) jakaa H<sub>b</sub>-ydinten signaalin kvartetiksi ja kytkentä fosforiin jakaa signaalin edelleen kahteen osaan. Tuloksena saadaan kvartetien dubletti, joka kuitenkin nähdään spektrissä kvintettinä. Metyyliryhmän protonit (H<sub>a</sub>) tuottavat spektriin dubletin, joka syntyy metyyliryhmän protonien J-kytkennästä fosforiin. Etyyliryhmän protonit (H<sub>c</sub>) tuottavat spektriin tripletin seurauksena kytkennästä ettyyliryhmän protoneihin H<sub>b</sub>. Tripletin vieressä on epäpuhtaus, mikä havaitaan ylimääräisenä viivana tripletin vasemmalla puolella. Spektrissä havaitaan myös intensiivinen signaali asetonista, johon kantaliuos oli valmistettu.*

Metyylifosfonihapon (MPA), ettyylifosfonihapon (EMPA), dimetyylimetyylifosfonaatin (DMMP) ja pinakolyylimetyylifosfonihapon (PMPA) 1 mg/ml seosvesinäytteen <sup>1</sup>H NMR- spektri on esitetty kuvassa 8. Kuvaan on merkitty yhdisteiden rakenteet ja protonit on merkitty kirjaimin a - d tunnistusta varten. Protonit a - d on jaoteltu kemiallisen ympäristönsä perusteella, eli esimerkiksi a-protonit ovat ekvivalentteja keskenään. Kuhunkin signaaliin on merkitty mistä yhdisteestä ja protonista se on peräisin. Kuvassa kemiallisella siirtymäalueella 1.0 ppm - 1.35 ppm havaitaan joukko signaaleja, joiden tunnistusta ei ole voitu varmistaa.

Näiden protonien kemialliset siirtymät ovat niin lähellä toisiaan, että resonanssiivat menevät osittain päällekkäin, mikä hankaloittaa resonanssien tunnistusta  $^1\text{H}$  NMR -spektrissä. Tämä on tyypillinen NMR-spektroskopian ongelma analysoitaessa seosnäytteitä, jotka sisältävät rakenteeltaan samantyyppisiä yhdisteitä. Resonanssiivojen päällekkäisyys vaikeuttaa myös kohdeyhdisteiden pitoisuuksien määrittystä. Tunnistamattomat piikit ovat peräisin MPA:n, EMPA:n ja PMPA:n protonien  $\text{H}_a$ -dubleteista, EMPA:n etyyli-ryhmän protonien  $\text{H}_c$  tripletista, sekä PMPA:n protonien  $\text{H}_c$  dubletista.

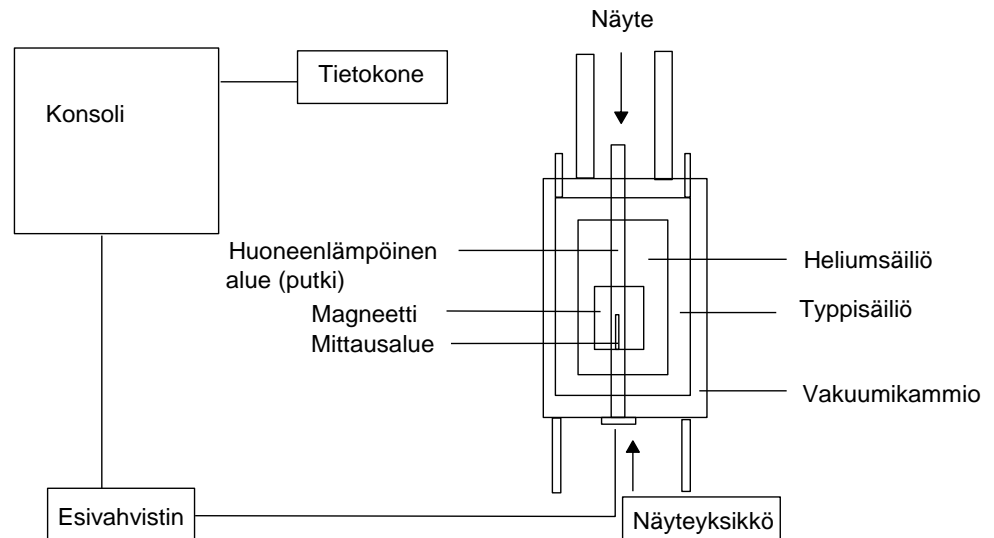
$^1\text{H}$  NMR with presat: I103ME63S1 (20  $\mu\text{g}$  MPA, EMPA, DMMP, PMPA reference) in  $\text{D}_2\text{O}$ ; 080828-8665



Kuva 8. 500 MHz:n liuotinvaimennettu  $^1\text{H}$  NMR-spektri MPA:n, EMPA:n, DMMP:n ja PMPA:n 1 mg/ml seosvesinäytteestä. Mallikemikaalien rakennekaavat ja ne protonit, joista signaali on peräisin, on merkitty kuvaan. Siirtymäalueella 1.0 ppm - 1.35 ppm havaitaan joukko päällekkäisiä signaaleja, joiden tunnistus  $^1\text{H}$  NMR-menetelmällä on epävarmaa.

## 2.2 NMR-laitteisto

Kuvassa 9 on esitetty suprajohtavan magneetin perusrakennetta havainnollistava kaaviokuva. Magneetin keskeisiä osia ovat itse magneetti, typpi- ja heliumsäiliöt, sekä huoneenlämpöinen alue näytettä ja näyteyksikköä varten.



Kuva 9. Suprajohtavan magneetin perusrakenne

Modernissa NMR-spektroskopiassa käytetään suprajohtavaa magneettia  $B_0$ -kentän luomiseen. Magneetti koostuu laajasta solenoidin muotoisesta kelasta, jossa virta kulkee luoden magneettikentän. [12, s. 429] Magneetti sijaitsee heliumsäiliössä, jonka lämpötila on 4 K (-269 °C) tai sen alapuolella [23, s. 45], jolloin magneetista tulee suprajohtava.

Suprajohtavaa tilaa pidetään yllä säännöllisin väliajoin tapahtuvien typpi- ja heliumtankkausten avulla. Kalliin heliumin kulutusta hidastetaan sitä ympäröivän typpisäiliön avulla, joka estää heliumsäiliön lämpötilan nousun. Lämpötila typpisäiliössä on noin 77 K (-196°C). [12, s. 430]

Näyte ohjataan näyteputkessa näyteyksikköön ilmanpaineen avulla magneetin yläpuolelta huoneenlämpöisenä pidettävää putkea pitkin. Näyteyksikkö asetetaan magneetin sydämeen magneetin alapuolelta. Erilaisia näyteyksiköitä on useita ja niiden koot vaihtelevat. Näyteyksikön koko ilmoitetaan niihin sopivien näyteputkien kokona.

Yleisimmin käytettyjä ovat 5 mm:n ja 10 mm:n näyteyksiköt. Massaherkän mikronäyteyksikön koko on vain 1.7 mm. Näyteyksikkö valitaan käyttötarkoitukseen sopivaksi eli mitattavan ytimen mukaan. [23, s. 51] Selektiiviset näyteyksiköt on suunniteltu tiettyjen ydinten havainnointiin. On olemassa myös näyteyksiköitä, jotka mahdollistavat useiden ydinten havainnoinnin laajalla kaistalla.

Mittausaluetta ympäröivät radiotaajuuskelat (engl. RF eli *radio frequency*), joiden tehtävä on tuoda virityssäteily näytteeseen ja vastaanottaa emittoituva säteily viritystilän purkautuessa [23, s. 49] Radiotaajuuslähetin tuo radiotaajuisen pulssin radiotaajuuskelaan kaapelia pitkin. NMR-signaali siirtyy näyteyksiköstä esivahvistimeen, jossa se vahvistetaan ennen siirtämistä spektrometrin konsoliin [12, s. 434]. Konsoli koostuu useista yksiköistä, joiden tehtävänä on tuottaa ja vastaanottaa radiotaajuista säteilyä, sekä vahvistaa ja muuttaa signaali digitaaliseen muotoon [23, s. 39].

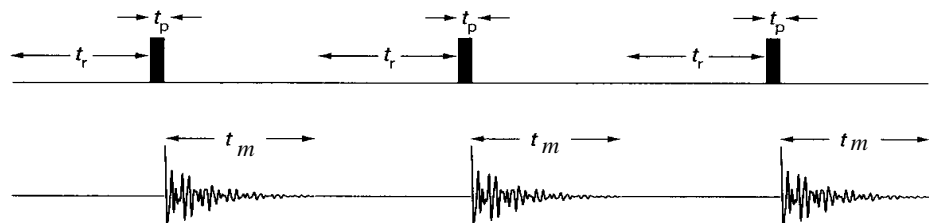
Magneettikentän tulee olla homogeeninen, jotta spektriviivoista saadaan kapeita. Hyvälaatuisessa spektrissä viivat ovat leveydeltään vain 1 Hz tai alle. [12, s. 430] Epähomogeeninen kenttä aiheuttaa spektriviivojen leventymisen, joka voi vaikeuttaa spektrin tulkintaa. Suprajohtava magneetti ei itse pysty tuottamaan näin homogeenista kenttää. Homogeenisuutta parannetaan näytettä ympäröivien kelojen avulla. Kukin näistä keloista tuottaa pienen magneettikentän, joiden avulla epähomogeenisuuksia kentässä voidaan korjata. [12, s. 430, 431] Magneettikentän homogeenisuutta korjataan säätämällä säädinkelojen virtaa, kunnes viivan muoto saadaan kapeaksi ja symmetriseksi. Tuotetuilla korjaavilla magneettikentillä on kullakin tietty kenttäprofiili, jonka mukaan ne on nimetty. Esimerkiksi x-, y-, ja z-suuntaiset kelat tuottavat magneettikentän, jota pystytään säätämään kyseisissä kentän suunnissa. Näytteen ydinten kokeman magneettikentän homogeenisuus pystytään säätämään moderneissa laitteissa osittain automaattisesti käyttämällä gradienttisäätöä.

Kenttävoimakkuuden vaihteluiden kompensoimiseksi käytetään niin sanottua kenttä-taajuuslukkoa (engl. *field-frequency lock*), jonka tarkoitus on pitää magneettikenttä stabiilina. [12, s. 431]

Lukkoa varten näytteeseen lisätään pieni määrä deutoitua liuotinta, jonka  $^2\text{H}$  NMR-signaalia käytetään spektrometrin lukitsemiseen kyseiselle taajuudelle. Lukkosysteemi korjaa pieniä muutoksia magneettikentässä säätämällä virtaa magneettikentän muuttuessa pitkällä aikavälillä. Kun kentässä tapahtuu muutos, virhe taajuudessa korjataan automaattisesti.

### 2.3 NMR-spektrin mittaus

Kuvassa 10 on esitetty tyypillisen NMR-spektrin mittauksen vaiheet. Ennen radiotaajuuden pulssin lisäämistä mitattavan ytimen spintilojen annetaan asettua tasapainotilaansa. Tämä relaksaatioviive ( $t_r$ ) kestää tyypillisesti muutamia sekunteja. Relaksaatioviiveen jälkeen lisätään lyhyt, voimakas radiotaajuinen pulssi, joka kestoaltaan on yleensä alle  $20\ \mu\text{s}$ . Tuloksena saadaan vapaasti vaimeneva signaali (engl. *Free Induction Decay, FID*), jonka aikana spektri mitataan. Mittausaika kestää yleensä  $50\ \text{ms}$ :sta muutamiin sekunteihin. [12, s. 14]



Kuva 10. NMR-spektrin mittauksen vaiheet: mustat pylväät edustavat lisättyjä lyhyitä radiotaajuisia pulsseja, joiden kestoja kuvataan ajalla  $t_p$ . Ajalla  $t_m$  kuvataan mittausaikaa, joka alkaa heti pulssin lisäyksen jälkeen. Ennen uuden pulssin lisäystä systeemin annetaan asettua tasapainotilaansa. Tasapainottumiseen kuluvaa aikaa kuvataan relaksaatioviiveellä  $t_r$ . [12, s. 14]

Koska NMR-signaalit ovat heikkoja signaaleja, yhden spektrin mittauksen tuloksena ei useinkaan saada tyydyttävää signaali/kohina -suhdetta. Toistamalla spektrin mittaus useita kertoja, saadaan S/N -suhdetta parannettua. Mittausten lukumäärä on suoraan verrannollinen signaalin intensiteettiin. Kohinan määrä, joka on sattumanvaraista, nousee hitaammin. Toistettaessa mittaus  $N$  kertaa, signaalin intensiteetti nousee kertoimella  $N$  ja kohina kertoimella  $\sqrt{N}$ . [12, s. 14, 15]



Spektri mitataan siis useiden FID-signaalien summana. Mittauksen toistoväli saadaan relaksaatioviiveen ja mittausajan summana. Tyypillisesti toistoväli on  $1 - 5 \times T_1$ .

Spektrometri tallentaa FID-signaalin ajan funktiona eli signaalin intensiteetti muuttuu ajan myötä. Vaimeneva signaali kuvaa spinien värähtelyä niille ominaisilla taajuuksilla. FID-signaali muutetaan spektrimuotoon Fouriermuunnoksella [23, s. 36]. Resonanssin intensiteetti spektrissä on suoraan verrannollinen mitattavan ytimen määrään näytteessä eli analysoitavan yhdisteen konsentraatioon. Siksi konsentraatiota kasvattamalla voidaan mittauksen lukumäärää vähentää ja säästää analyysiaikaa.

## 2.4 NMR-näytteen valmistus

NMR-spektrometriassa näytteille asetetut vaatimukset ovat usein vähäisemmät kuin muissa analyttisen kemian tekniikoissa. Näytteen perusvaatimus on homogeenisuus, minkä vuoksi näytteen tulee olla kunnolla liennut liuottimeensa. Näytteiden puhtaus on toivottavaa häiritsevien signaalien määrän minimoimiseksi. Kiinteiden partikkelien poistoon voidaan käyttää suodatusta. [23, s. 57]

NMR-näytteet valmistetaan usein deuteroituun liuottimeen, koska deuterium on yleisin käytetty lukkoydin [23, s. 57]. Tällöin näytteeseen lisätään pieni määrä deuteroitua liuotinta spektrometrin lukitsemista varten. Usein käytettyjä liuottimia ovat asetoni- $d_6$ , bentseeni- $d_6$ , kloroformi- $d$  ja deuteriumoksidi eli  $D_2O$ . Liuotin valitaan näytteelle sopivaksi. Deuteroidut liuottimet ovat kalliita, mutta niiden käytöllä on etunsa. Jos näyte liuotetaan deuteroituun liuottimeen, saadaan liuottimesta aiheutuvat intensiiviset taustasignaalit minimoitua.

Näyte valmistetaan käytettävään näyteyksikköön sopivaan näyteputkeen (esimerkiksi 5 mm tai 1.7 mm), joka on valmistettu lasista. Näyte sekoitetaan huolellisesti ennen analyysiä epähomogeenisuuksien välttämiseksi. Mahdolliset epäpuhtaudet, kuten rasva tai pöly pyyhitään putken pinnalta juuri ennen mittausta naarmuttamatta lasia.

## 2.5 Kvantitatiivinen NMR

Kvalitatiivisen spektrin tulkinnan perustana ovat signaalien kemialliset siirtymät, pinta-alat, J-kytkennät ja signaalien multiplisiteetit. NMR-spektroskopisia menetelmiä voidaan käyttää myös näytteiden kvantitointiin eli pitoisuusmäärittelyyn [20, 24]. Pitoisuuden määrittelyssä voidaan käyttää sisäisen standardin menetelmää [25]. Myös ulkoisen standardin käytöstä kvantitoinnissa on raportoitu [26, 27]. Tässä yhteydessä keskitytään käsittelemään kvantitointia ulkoisen standardin käytön näkökulmasta käyttäen  $^1\text{H}$  NMR- ja 1D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC -tekniikoita.

### 2.5.1 Kvantitointiin liittyviä haasteita

Protonispektrissä ( $^1\text{H}$  NMR) havaitaan näytteen sisältämien protonien ( $^1\text{H}$ ) resonanssihiivat. Tämä tarkoittaa ei-toivottujen resonanssihiivojen suurta määrää spektrissä. Orgaaniset liuottimet ja vesi sisältävät paljon vetyä, jonka seurauksena suurimmat piikit spektreihin aiheutuvat matriisin komponenteista. Tällöin vaarana on pienten näytesignaalien peittyminen liuotinpiikkien alle [13], jolloin analyyttien pitoisuusmäärittelyjen suoritus on luonnollisesti mahdotonta.

Liuotintaustaa voidaan pienentää käyttämällä deuteroituja liuottimia tai vaimentamalla liuottimen signaali. Liuottimen vaimentaminen tarkoittaa kyllästävän säteilyn lähettämistä näytteeseen mittauksen aikana liuottimen taajuudella. Tällöin liuottimen signaali kyllästyy, eli kyseisten ydinten energiatilojen väliset populaatioerot tasoittuvat eikä FID-signaalia synny tällä taajuudella pulssin lisäyksen jälkeen [28, s.15]. Signaalien vaimentaminen ei kuitenkaan kokonaan poista liuottimen signaalia spektristä. Käyttämällä 1D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC -tekniikkaa pitoisuusmäärittelyssä voidaan organofosforiyhdisteiden protoniresonanssit detektoida täysin ilman taustan häiritsevää vaikutusta [26].

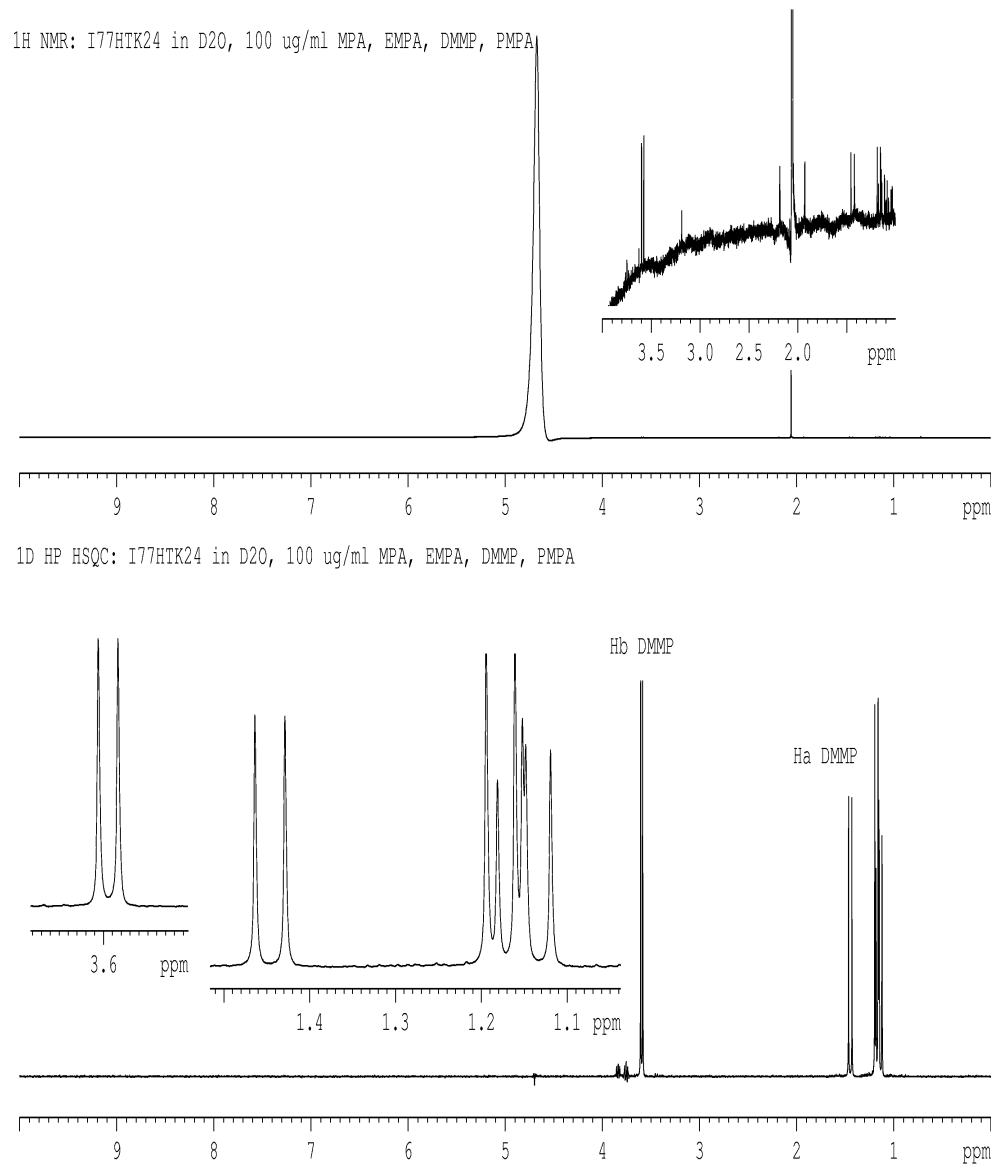
Samankaltaisten analyyttien resonanssihiivoissa ilmenee usein päällekkäisyyksiä, mikä vaikeuttaa pitoisuusmäärittelyä huomattavasti (kuva 8). Kun resonanssihiivat ovat päällekkäin, kohdeyhdisteiden resonanssien integrointi on vaikeaa, ellei mahdotonta. Ihanteellisessa tilanteessa spektri voidaan mitata näytteestä, joka sisältää vain yhtä määritettävää yhdistettä.

Kvantitatiivisessa NMR-spektrometrisessä mittauksessa on otettava huomioon relaksaatiovakio  $T_1$ . Pitoisuusmäärittämisessä käytetään pitkää relaksaatioviivettä ( $t_r$ ), jotta nettomagnetisaatio ehtii kokonaisuudessaan palautua tasapainotilaansa ennen seuraavan pulssin lisäystä. Pitkä relaksaatioviive pidentää mittausaikaa, mutta on välttämätön signaalin intensiteetin laskun esittämiseksi. NMR-spektrometrisessä pitoisuusmäärittämisessä pulssisarjan toistoväli lasketaan kaavalla  $5 \times T_1$  (max), jossa  $T_1$  (max) kuvaa pisintä mahdollista relaksaatiovakioita analysoitavan näytteen kohdeytimille. [20]

### 2.5.2 $1D\ ^1H\text{-}^{31}P\ \text{HSQC}$ -tekniikka

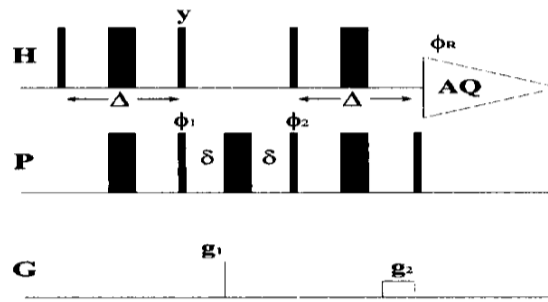
LC-SPE-NMR -menetelmän kehityksessä pitoisuusmäärittäykseen käytetään selektiivistä ja herkkää  $1D\ ^1H\text{-}^{31}P\ \text{HSQC}$  -tekniikkaa. Tässä luvussa on esitelty tekniikan pääpiirteet, jotka perustuvat pääosin Harri Koskelan tutkimukseen, johon liittyen on julkaistu artikkeli *Determination of Trace Amounts of Chemical Warfare Agent Degradation Products in Decontamination Solutions with NMR Spectroscopy* [26].

$1D\ ^1H\text{-}^{31}P\ \text{HSQC}$  -koe perustuu sellaisten protoniresonanssien mittaukseen, joilla on kytkentä fosforiin. Organofosforiyhdisteille tyypillinen fosforiin kiinnitynyt metyyliiryhmä ( $H_a$ ) mahdollistaa protoni-fosfori -korrelaatiokokeet käytettäville yhdisteille. Koe on siinä mielessä selektiivinen, että ainoastaan fosforiin kytkeytyneet protonit havaitaan spektrissä. Tällöin ei havaita matriisin aiheuttamia signaaleja, kuten liuottimen tai epäpuhtauksien aiheuttamia piikkejä. Tilannetta havainnollistaa kuva 11. Kuvassa on esitetty samasta  $100\ \mu\text{g/ml}$  MPA:n, EMPA:n, DMMP:n ja PMPA:n seosvesinäyttestä mitatut  $^1H$  NMR (ylhällä) ja  $1D\ ^1H\text{-}^{31}P\ \text{HSQC}$  (alla) -spektrit. Perinteisellä  $^1H$  NMR -menetelmällä mitatussa spektrissä havaitaan voimakas näyteliuotinresonanssi vedestä ja pienempi epäpuhtaus asetonista. Ainoastaan intensiteettiä kasvattamalla voidaan havaita pienet analyyttiresonanssit, jotka on suurennettu kuvaan. Alemmassa  $1D\ ^1H\text{-}^{31}P\ \text{HSQC}$  -tekniikalla mitatussa spektrissä havaitaan protoni-fosfori -kytkennän omaavat resonanssit;  $H_a$  (MPA),  $H_a$  (EMPA),  $H_a$  (DMMP),  $H_a$  (PMPA) ja  $H_b$  (DMMP). Taustan aiheuttamia resonansseja ei havaita lainkaan ja yhdisteiden viivat näkyvät spektrissä intensiivisinä.



Kuva 11. 500 MHz:n  $^1\text{H}$  NMR- ja  $1\text{D } ^1\text{H}-^{31}\text{P}$  HSQC -spektrit MPA:n, EMPA:n, DMMP:n ja PMPA:n 100  $\mu\text{g/ml}$  seosvesinäytteestä: protonispektrissä (ylhäällä) havaitaan voimakas vesipiikki näyteliuotimesta ja pienempi epäpuhtaus asetonista. Kuvaan on suurennettu pienet näyteresonanssit siirtymäalueella 1.0 ppm – 4.0 ppm, joita ei voida havaita ilman intensiteetin kasvattamista. Alemmassa  $1\text{D } ^1\text{H}-^{31}\text{P}$  HSQC -spektrissä havaitaan ainoastaan analyyttien ne resonanssit, joissa protonilla on kytkentä fosforiin. Taustan signaaleja ei havaita lainkaan ja havaitut resonanssit ovat intensiivisiä. DMMP:n  $\text{H}_a$ - ja  $\text{H}_b$ -resonanssit on merkitty kuvaan. Siirtymä-alueella 1.0 ppm – 1.2 ppm MPA:n, EMPA:n ja PMPA:n  $\text{H}_a$ -resonanssit ovat osittain päällekkäin, minkä vuoksi niiden tunnistus on vaikeaa.

$1\text{D } ^1\text{H}-^{31}\text{P}$  HSQC -kokeessa protonien magnetisaatio siirretään fosforille ja takaisin J-kytkentää pitkin. Kokeessa käytettävä pulssisarja on esitetty alla.



Kuva 12.  $1D\ ^1H\text{-}^{31}P$  HSQC -kokeessa käytettävä pulssisarja [26, kuva 1]

Polarisaation siirtoviiveellä  $\Delta$  tarkoitetaan aikaa, joka kuluu magnetisaation siirtämiseen protonilta fosforille. Siirtoviive lasketaan kaavalla  $\Delta = 1/(2J_{opt})$ . Metyyliprotonien ja fosforin väliselle kytkennälle  $J_{opt}$  on noin 17 Hz (taulukko 1). Todellisen kytkentävaktion ja asetetun  $J_{opt}$ -arvon välillä vallitseva ero saa aikaan siirretyn magnetisaation pienenemisen, jonka seurauksena osa signaalista menetetään mittauksen aikana. Pitoisuusmäärityksen yhteydessä integroidun resonanssin intensiteetti korjataan kaavalla 5 [26, kaava 1].

$$I_{korjattu} = I_{havaittu} \left( \sin \left( \pi \frac{J_{HP}}{2 \cdot J_{opt}} \right) \right)^{-2} \quad (5)$$

jossa  $I_{havaittu}$  on havaittu  $H_a$ -resonanssin integraali,  $J_{HP}$  spektristä mitattu protonien ( $H_a$ ) ja fosforin välinen kytkentävakio ja  $J_{opt}$  mittauksessa käytetty optimaalinen kytkentävakio. Ero havaitun ja korjatun integraalin välillä on sitä suurempi, mitä kauempana todellinen kytkentävakio  $J_{HP}$  on käytetystä  $J_{opt}$ -arvosta.

Kun näytteiden kvantitoinnissa käytetään ulkoista standardia, tulee sekä näyte että standardi mitata vertailukelpoisissa olosuhteissa. Huolimatta optimoiduista olosuhteista NMR-signaalin intensiteetti saattaa heikentyä käytettävän näyteyksikön *laatutekijän*  $Q$  vaikutuksesta.  $Q$ -tekijä on kääntäen verrannollinen protonipulssin pituuteen, joka edelleen riippuu signaalin intensiteetistä. [29] Protonipulssin pituutta voidaan siis käyttää  $Q$ -tekijän vaikutuksen mittana [27] ja virhe konsentraatiossa korjata kaavalla 6 [26, kaava 2].

$$C_{näyte} = C_{ref} \frac{M_{näyte} \cdot I_{näyte}^{korjattu} \cdot p_{näyte}^{90}}{M_{ref} \cdot I_{ref}^{korjattu} \cdot p_{ref}^{90}} \quad (6)$$

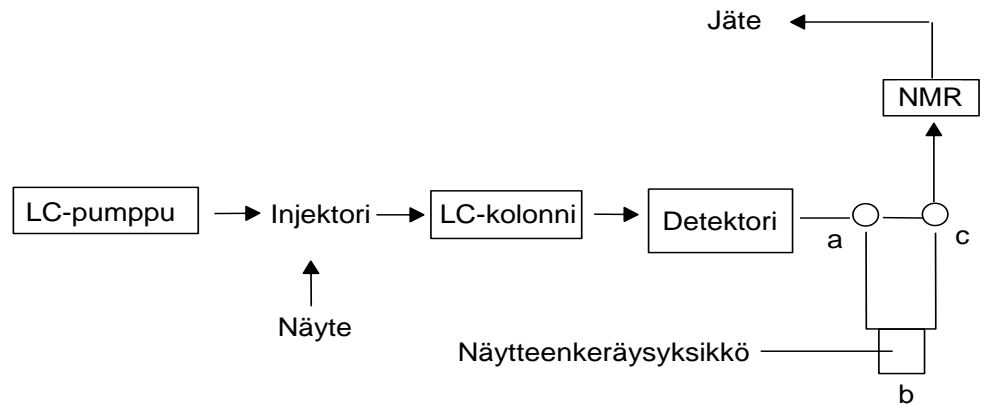
jossa  $C_{ref}$ ,  $M_{ref}$ ,  $I_{ref}$  ja  $p_{ref}^{90}$  ovat referenssinäytteen tunnettu konsentraatio, moolimassa, korjattu integraali ja mittauksessa käytetty protonipulssin pituus. Määritettävän yhdisteen vastaavia arvoja edustavat  $C_{näyte}$ ,  $M_{näyte}$ ,  $I_{näyte}$  ja  $p_{näyte}^{90}$ .

### 3 LC-NMR -TEKNIIKAT

LC-NMR on yhdistelmätekniikka, jossa yhdistyvät nestekromatografinen erotus ja NMR-spektrometrinen analyysitekniikka. Menetelmää on käytetty muun muassa lääkemetaabolisissa tutkimuksissa [30, 31] ja ympäristöanalyseissä [32]. Erilaisia LC-NMR –tekniikoita on useita [33], joista tässä yhteydessä keskitytään käsittelemään *jatkuva virtaus* –menetelmää (engl. *on flow*) [28, s. 24 – 25] ja LC-NMR -sovellusta, jossa nestekromatografi on varustettu näytteenkeräyksiköllä [28, s. 27 – 28].

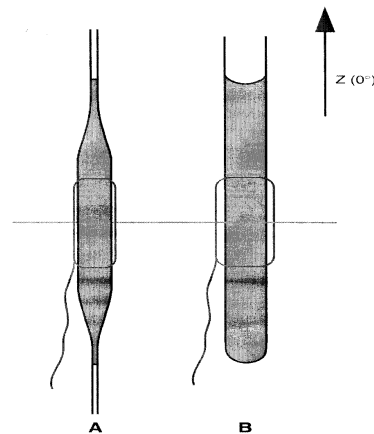
#### 3.1 Jatkuva virtaus

Kuvassa 13 on esitetty kaavio jatkuva virtaus -menetelmän toteutuksesta ja käytetystä laitteistosta. Menetelmässä NMR-spektrometri varustetaan tekniikkaan soveltuvalla virtausnäyteyksiköllä, johon nestekromatografi yhdistetään kapillaarin välityksellä. Nestekromatografarin injektoriin injektoitu näyte erotetaan komponenteikseen kolonnissa, josta virtaus ohjataan detektorin ja venttiilien (a ja c) kautta virtausnäyteyksikön kyvetiin ja sieltä jätteisiin jatkuvana virtauksena. [28, s. 24, 25] Ajoliuoksen virtaus ohjataan kyvetiin näyteyksikön alapuolelta ilmakuplien syntymisen estämiseksi. Ilmakuplat aiheuttavat magneettikenttään epähomogeenisuuksia, mikä havaitaan spektrissä viivojen levenemisenä.



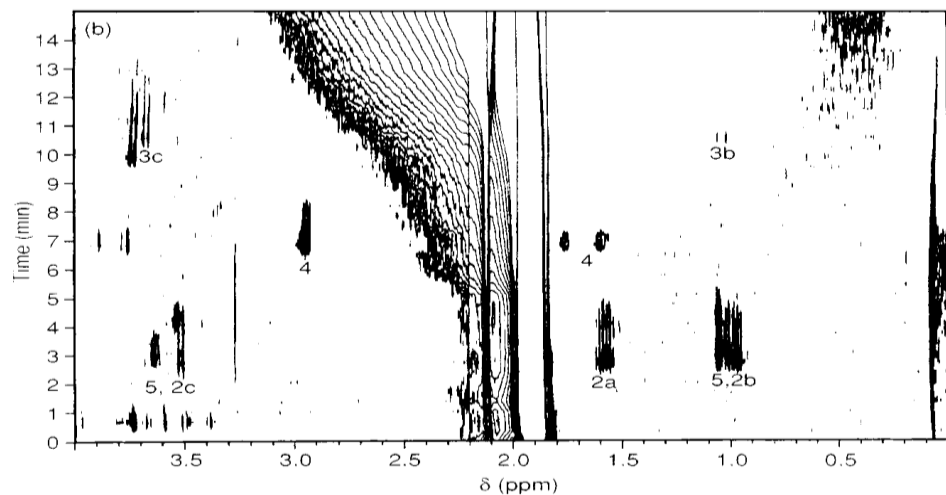
Kuva 13. LC-NMR -laitteiston kaaviokuva: pallot a ja c kuvaavat ohjausventtiilejä. Näytteenkeräysyksikkö on merkitty kirjaimella b. Virtaus voidaan ohjata joko venttiilin a ja c kautta NMR-spektrometrin läpivirtauskyvettiin tai venttiilin a kautta näytteenkeräysyksikköön ja sieltä venttiilin c kautta NMR-spektrometriin. [lähde 33, s. 23 mukaillen]

Mittausalueen eli virtausnäytekyvetin aktiivinen tilavuus vaihtelee käytettävän näyteyksikön mukaan. Käyttämällä aktiivista tilavuutta 120  $\mu$ l saavutetaan hyvä kompromissi NMR-spektrometrin ja kromatografisten vaatimusten suhteen [28, s. 8 – 9]. Kuva 14 havainnollistaa virtausnäytekyvetin rakennetta verrattuna tavanomaiseen NMR-näyteputkeen.



Kuva 14. Virtausnäytekyveti (A) ja tavanomainen 5 mm:n NMR-näyteputki (B): virtausnäytekyvetissä virtaussuunta on alhaalta ylöspäin. Kyveti on virtausnäyteyksikön kiinteä osa. Virtausnäyteyksikkö asetetaan magneetin sisään sen alapuolelta. NMR-putki asetetaan näyteyksikköön magneetin yläpuolelta. Aktiivinen mittausalue on merkitty kuvaan. Näytteen virtaussuunta näyteyksikössä on alhaalta ylöspäin ilmakuplien syntymisen estämiseksi. Ilmakuplat aiheuttavat magneettikentän epähomogeenisuutta, jonka seurauksena spektriviivat leventyvät. [33, s. 6].

Virtausnäyteyksikköön ohjattu näytevirta analysoidaan NMR-spektrometrillä, joka kerää mittausdataa koko siirron ajan. 1D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC -tekniikan käyttö mittauksessa poistaa intensiivisen liuotintaustan. Mittauksen tuloksena saadaan joukko yksi-dimensionaalisia NMR-spektrejä koko kromatogrammin mittausajalta [28, s. 24]. LC-NMR -grammi esitetään 2-dimensionaalisena matriisina, jossa y-dimensiossa kuvataan NMR-retentioaika (s) ja x-dimensiossa resonanssin kemiallinen siirtymä (ppm). LC-NMR -grammi koostuu pisteistä, joista jokainen saadaan yhden tai useamman keräyksen summana. LC-NMR -grammissa signaalit kuvataan korkeuskäyrinä, jolloin käyrän korkeimmalla kohdalla signaalin intensiteetti on suurin. Grammin perusteella saadaan tieto yhdisteen NMR-retentioajasta, joka mitataan tietokoneohjelman aputyökalulla signaalin intensiivisimmästä kohdasta. LC-NMR -grammin perusteella saadaan tietoa myös yhdisteen kromatografisesta erottumisesta; piikkien leveneminen havaitaan grammissa signaalin valumisena. Terävästi eluotuvien piikkien signaalit ovat vastaavasti muodoltaan selkeitä ja intensiivisiä. Esimerkki LC-NMR -grammista on esitetty kuvassa 15.



Kuva 15. 500 MHz:n jatkuva virtaus –menetelmällä (LC-NMR) mitattu LC-NMR –grammi ( $^1\text{H}$  NMR) maanäytteestä, johon oli lisätty kaksi Kemiallisen aseiden kieltosopimukseen listattua organofosforiyhdistettä. Yhdiste numerolla 2 on metyylietyylifosfonihappo (MEPA) ja yhdiste 3 dimetyylietyylifosfonaatti (DMEP). MEPA tuottaa grammiin kolme signaalia; 2a - 2c. DMEP tuottaa grammiin signaalit 3b ja 3c. LC-NMR -grammi oli mitattu olosuhteissa 1 ml/min ACN/1% HCOOH  $\text{D}_2\text{O}$ -liuoksessa gradienttiajolla käyttäen 4 mm:n LC-näyteyksikköä (TXI  $^1\text{H} / ^{13}\text{C} / ^{31}\text{P}$ ), 64 keräystä/rivi. [28, s.163]



Virtaava neste luo vaihtelevan matriisin NMR-spektrin mittauksessa. Virtausnäytekyvettiin saattaa muodostua pyörteitä, jotka vaikuttavat magneettikentän homogeenisuuteen ja sitä kautta spektraaliseen erotuskykyyn. *Gradienttiajossa* liuotinkoostumuksen jatkuva muuttuminen aiheuttaa muutoksia resonanssitaajuudessa kemiallisen ympäristön muuttuessa [28, s. 24 - 25]. *Isokraattisessa ajossa* liuotinkoostumus pysyy samana, mikä vähentää magneettikentän alttiutta epähomogeenisuuksille. Ongelmia saattaa kuitenkin muodostua kromatografisesti erotetuista näytefraktioista, jotka saapuesaan näytekyvettiin voivat niin ikään muodostaa liuosgradientteja, jotka altistavat magneettikentän epähomogeenisuuksille.

Kun LC-NMR -grammin mittaukseen käytetään  $^1\text{H}$  NMR -menetelmää, haasteita yhdistelmätekniikalle asettavat myös liuottimen suuret signaalit [28, s. 12]. NMR-signaalin vastaanottimella on rajallinen dynaaminen erotuskyky. Liuotinsignaalit voivat olla yli 1000 kertaa suurempia kuin pienet näytesignaalit. Tämän vuoksi signaalin vastaanotin ei pysty käsittelemään näyte- ja liuotinsignaaleja samanaikaisesti. Vastaanottimen dynaamista erotuskykyä voidaan parantaa kyllästäväällä liuottimen signaali mittauksen aikana [28, s. 13 - 16]. Nyt vastaanotin pystyy havaitsemaan pienetkin näytesignaalit. Deuteroitujen liuottimien käyttö helpottaa liuotinsignaalin vaimennusta pienentämällä liuottimen signaalia.

#### *Kromatografiset olosuhteet*

LC-NMR -menetelmissä kromatografiset olosuhteet tulee optimoida käytettäville yhdisteille soveltuviksi ottaen huomioon mittauksen NMR-spektrometriset vaatimukset. Kun käytetään 1D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC -tekniikkaa, ovat NMR-spektrometriset vaatimukset ajoliuoksen suhteen vähäiset.

Jatkuva virtaus -menetelmää käytettäessä kromatografisia olosuhteita voidaan arvioida erotusta kuvaavilla parametreilla retentiotekijä ( $k$ ) ja erotustekijä ( $\alpha$ ). Retentiotekijä kuvaa analyytin pidättymistä kolonnin stationäärifaaasiin. Kun pidättyminen on optimaalisella tasolla,  $k > 1$ . Retentiotekijä laskeaan kaavalla 7.

$$k = \frac{t'_r \text{ NMR}}{t_M \text{ NMR}} = \frac{t_r \text{ NMR} - t_M \text{ NMR}}{t_M \text{ NMR}} \quad (7)$$

Todellinen retentioaika  $t'_r$  kuvastaa aikaa, jonka analyytti on kiinnittynyt stationäärifaasiin. Viiveajalla  $t_M$  tarkoitetaan aikaa, jona liikkuva faasi kulkee systeemin läpi. Viiveaika määritetään yleensä stationäärifaasiin pidättymättömän yhdisteen avulla. Viiveaika riippuu lineaarisesti virtausnopeudesta.

Erotustekijä kuvaa kahden analyytin kromatografista erottumista toisistaan. Erotustekijä on määritelmän mukaan aina yli 1. Mitä suurempi erotustekijä, sen paremmin vierekkäiset piikit erottuvat toisistaan. Erotustekijä lasketaan kahden eluoituvan yhdisteen todellisten retentioaikojen suhteena kaavalla 8.

$$\alpha = \frac{t'_{r2} NMR}{t'_{r1} NMR} \quad (8)$$

### 3.2 Näytteenkeräisyksikkö

LC-NMR -menetelmän eräs sovellutus on näytteenkeräisyksikön liittäminen osaksi yhdistelmätekniikkaa (kuva 13). Menetelmässä nestekromatografi varustetaan näytteenkeräisyksiköllä (b), johon kromatografisesti erotetut piikit siirretään ajoliuoksessa säilytettäväksi venttiilin (a) kautta myöhempää käsittelyä varten. Edelleen erillisiin silmukoihin säilötyt fraktiot voidaan ohjata yksi kerrallaan venttiilin (b) kautta NMR-spektrometrin virtausnäytekyvetiin käyttäen optimoitua siirtoaikaa.

Näytteenkeräisyksikkö sijoitetaan nestekromatografian yhteyteen kolonnin jälkeen. Yksikkö koostuu erillisistä näytesilmukoista, joiden tilavuus on valittavissa näyteyksikön hankinnan yhteydessä. Systeemiä ohjataan venttiilijärjestelmällä, jota operoidaan nestekromatografian ohjelmistolla. Seosnäytteiden kromatografista erotusta seurataan tarkoitukseen soveltuvalla detektorilla, joka tyypillisesti on UV-detektori. Kromatogrammista valitaan ne piikit, jotka halutaan analysoida NMR-spektrometrillä. Nämä piikit siirretään ajoliuoksessa näytteenkeräisyksikön näytesilmukoihin, kukin omaansa. Näytesilmukat pestään ennen jokaista käyttökertaa ristikontaminaation välttämiseksi. Analyyttifraktioiden siirtovaihe näyteyksiköstä NMR-spektrometrin virtausnäytekyvetiin suoritetaan erikseen. Siirtoaika näyteyksiköstä kyvetin aktiiviselle alueelle optimoidaan käytettävälle virtausnopeudelle.

Optimoitu aika tallennetaan käytettävään metodiin, jolloin siirron operointi nestekromatografian ohjelmistolla on mahdollista. Kun siirtoaika on optimaalinen, ohjelmisto pysäyttää HPLC-pumpun hetkellä, jona fraktion konsentroidun osa on kyvetin aktiivisella alueella. [28, s. 27] Fraktiot analysoidaan NMR-spektrometrillä valitulla tekniikalla.

Käänteisfaasikromatografiassa olosuhteet suunnitellaan tyypillisesti vesipohjaisille ajoliuksille. NMR-spektrometriset olosuhteet vaativat usein deuteroidujen liuottimien käyttöä spektrin hyvän laadun takaamiseksi. Deuteroidujen liuottimien käyttö saattaa aiheuttaa muutoksia ajoliuksen pH:ssa, mikä puolestaan voi vaikuttaa yhdisteiden kromatografiseen erottumiseen. [28, s.27]

Fraktioiden siirto kapeaa kapillaaria pitkin hillitsee piikkien levenemistä. Tekniikalla on etunsa lähellä toisiaan eluoituvien piikkien analysoinnissa. Kun tällaiset fraktiot siirretään erillisiin näytesilmukoihin, niiden analysointi virtausnäytekyvetillä helpottuu, koska fraktiot saadaan täysin erilleen toisistaan. Peräkkäin eluoituvat piikit eivät myöskään pääse kontaminoimaan toisiaan. Tämä estetään pesemällä siirtokapillaari ajoliuksella jokaisen siirron välillä. [28, s. 28]

#### 4 KIINTEÄFAASIUUTTO

Kiinteäfaasiuutto on fysikaalinen erotusmenetelmä, jonka käyttöalue on laaja. Menetelmää käytetään yhdisteiden erottamiseen toisistaan, näytteiden puhdistukseen ja konsentroituihin. SPE on edullinen ja suhteellisen nopea näytteenkäsittelymenetelmä, jota käytetään myös taisteluaineanalytiikassa, kun käytettävä menetelmä vaatii näytteen puhdistamista tai konsentroitua [34]. Uusia SPE-menetelmiä kehitetään jatkuvasti näytematriisien moninaisuuden ja jäämätasolla työskentelyn vuoksi. Tässä yhteydessä kiinteäfaasiuuttoa tullaan käsittelemään konsentroidun näkökulmasta menetelmän käyttötarkoituksen vuoksi. Menetelmää on käsitelty laajasti kirjallisuudessa. Tutkimuksen teoreettinen pohja uuton osalta perustuu pääosin uuttoa käsittelevään käsikirjaan *Sorbent Extraction Technology Handbook* [35].

#### 4.1 Kiinteäfaasiuuton vaiheet

Kiinteäfaasiuutto perustuu näytteen jakautumiseen kiinteän ja liikkuvan faasin välille. Selektiivisessä uutossa näytteen komponenteista haluttu yhdiste saadaan pidättymään sorbenttiin, jolloin yhdiste voidaan eristää seosnäytteestä. Sorbenttimateriaalin valinta riippuu siten uuton käyttötarkoituksesta ja eristettävästä/konsentroitavasta yhdisteestä.

Sorbentit ovat yleensä silikapohjaisia funktionaalisilla ryhmillä sidottuja faaseja, joiden ominaisuuksien perusteella käytettävä sorbentti valitaan. Kiinteäfaasiuutto voi perustua esimerkiksi polaarisiin tai poolittomiin vuorovaikutuksiin sekä kationin- tai anioninvaihtoon. Tässä yhteydessä perehdytään tarkemmin ionisiin vuorovaikutuksiin.

Kiinteäfaasiuuton vaiheet ovat:

- Sorbentin kunnostus ja tasapainotus
- Näytteen lisääminen ja analyytin pidättyminen sorbenttiin
- Sorbentin pesu/kuivaus
- Analyytin eluointi sorbentista

Sorbentin kunnostus ennen uuttoa on välttämätöntä toistettavien tulosten saavuttamiseksi. Sorbentti kunnostetaan lisäämällä useita sorbenttitilavuuksia liuotinta, joka kastelee sorbentin. Metanoli on yleisesti käytetty liuotin kunnostukseen, koska se pystyy vuorovaikutukseen sekä silikan silanoliryhmien että hiiliketjun kanssa. Kunnostukseen voidaan käyttää mitä tahansa liuotinta, joka pystyy kastelemaan kaikki faasin funktionaaliset ryhmät. Kun sorbentti on kasteltu, sitä ei saa päästää kuivumaan ennen näytteen lisäystä. Kunnostuksen jälkeen sorbenttimateriaali tasapainotetaan liuottimella, joka liukenee kunnostuksessa käytettyyn liuottimeen. Ionisiin vuorovaikutuksiin perustuva sorbentti tasapainotetaan vesipohjaisella puskuriliuoksella/vedellä uutossa käytettävän pH:n mukaan.

Näyte lisätään sorbenttiin halutussa tilavuudessa liuotinta, joka valitaan käyttötarkoituksen mukaan. Ioninvaihdossa käytetään vettä tai sopivaa puskuriliuosta, jonka ionivahvuus on pieni, ja jolle sorbentti on mahdollisimman epäselektiivinen.

Näytteen konsentraatio tulee olla sorbentin kapasiteetin rajoissa ja suuri verrattuna liuottimen ionivahvuuteen. Näytteen lisäyksen jälkeen sorbentti voidaan kuivata ylimääräisen liuottimen poistamiseksi esimerkiksi typpivirralla. Pesuvaiheen tarkoitus on poistaa selektiivisesti mahdolliset epätoivotut sorbenttiin pidäytyneet yhdisteet. Pesuvaihe ei ole välttämätön, kun uuttoa käytetään konsentroituihin ja näytematriisi on puhdas.

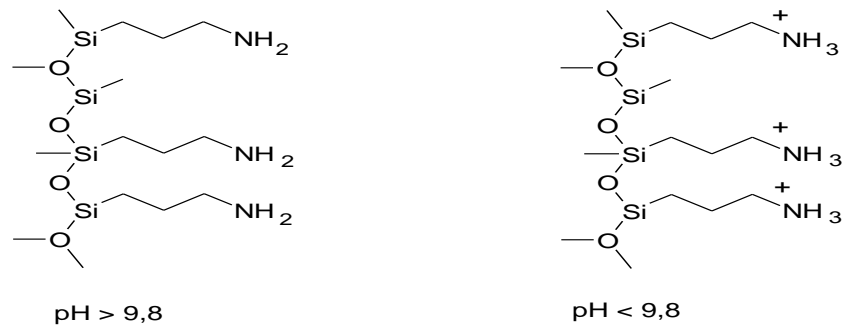
Kohdeanalyytit eluoidaan sorbentista mahdollisimman pienessä tilavuudessa, joka mieluiten on 1 – 5 sorbenttitilavuutta. Parhaan eluutin löytäminen on tärkeää tehokkaan uuton saavuttamiseksi. Liuottimen valinta riippuu analyytin ominaisuuksista. Ioninvaihdossa eluointiin käytetään selektiivisiä vastaioneja suuressa ionivahvuudessa tai analyytin/sorbentin neutralointia.

#### 4.2 **NH<sub>2</sub>-sorbentti kiinteäfaasiuutossa**

Tässä tutkimuksessa on käytetty silikapohjaista sidottua sorbenttimateriaalia NH<sub>2</sub>. Sorbenttimateriaali on valittu kohdeanalyyttien ominaisuuksia ajatellen ja aikaisempien VERIFIN:issä tehtyjen tutkimusten perusteella. Alkyylihydrofoni- ja alkyylifosfonihappojen uutosta NH<sub>2</sub>-materiaalilla on saatu hyviä tuloksia myös muualla [36].

NH<sub>2</sub>-sorbenttimateriaalissa silikaan sidottu funktionaalinen ryhmä on aminopropyyliryhmä. NH<sub>2</sub>-sorbenttien rakenne on esitetty kuvassa 16. Sorbenttien primääriset vuorovaikutukset ovat polaariset interaktiot ja ioniset vuorovaikutukset. Sekundaarisia vuorovaikutuksia voivat olla poolittomat interaktiot hiiliketjuun ja kationinvaihto silanoliryhmissä. Sekundääriset vuorovaikutukset ovat kuitenkin vähäiset aminopropyyliryhmän lyhyen hiiliketjun ja dominoivan poolisuuden vuoksi.

Aminopropyyliryhmä on tehokas vedyn sitoja. Sorbenttien  $pK_a$  on 9,8, joten NH<sub>2</sub> on positiivisesti varautunut, kun sorbenttien pH < 9,8. NH<sub>2</sub>-sorbentti soveltuu erityisen hyvin molekyyleille, joilla on anionisia ominaisuuksia. Ioniset vuorovaikutukset perustuvat varattujen ryhmien väliseen vetovoimaan. Vuorovaikutuksen edellytyksenä sekä aminopropyyliryhmän, että analyytin tulee olla varautuneessa muodossaan. Tällöin *näyteliuottimen* pH tulee olla suurempi tai yhtä suuri kuin analyytin  $pK_a + 2$ . Kun käytetään puskuriliuoksia näyteliuottimena, tulee liuoksen ionivahvuuden olla pieni (< 0,1 M).



Kuva 16.  $\text{NH}_2$ -sorbentti: silikaan sidottu funktionaalinen ryhmä on aminopropyyli. Sorbentin  $\text{p}K_a$  on 9,8, joten sorbentti on positiivisesti varautunut, kun  $\text{pH} < 9,8$ .

$\text{NH}_2$ -sorbenttiin pidättyneet yhdisteet voidaan eluoida useilla eri tavoilla. Sidottu silikafaasi on stabiili pH-alueella 2,0 – 7,5. Eluoitavan yhdisteen tai sorbentin neutralointi saattaa edellyttää toimimista silikan stabiilin pH-alueen ulkopuolella. Tätä voidaan harkita, jos muut menetelmät eivät toimi. Stabiilin pH-alueen ulkopuolella toimiminen voi aiheuttaa silikan liukenemistä ja silylieetterisidosten labiiliutta.

Toinen tapa eluoida analyytti sorbentista on lisätä eluenttiin aminopropyyliryhmien sitoutumispaikoista kilpaileva vastaioni ionivahvuudessa  $> 0,1$  M. Vastaionin konsentraation lisäksi merkitystä on sen selektiivisyydellä. Kilpailevan ionin tulee olla sorbentille selektiivisempi kuin analyytin funktionaalinen ryhmä, jolloin se voi syrjäyttää analyytin retention sorbenttiin.

## 5 HERMOKAASUT JA NIIDEN HAJOAMINEN

Hermokaasut kuuluvat tappaviin taisteluaineisiin. Ne ovat erittäin myrkyllisiä yhdisteitä, jotka vaikuttavat lamauttavasti ihmisen hermojärjestelmään estämällä hermoimpulssien häiriöttömän siirtymisen elimistössä. [1, s. 22]. Hermokaasut voidaan jaotella G- ja V-tyyppin hermokaasuihin rakenteensa mukaan. Hermokaasujen jaottelu on esitetty taulukossa 2. G-ryhmään kuuluvat hermokaasut tabuuni (GA), sariini (GB), somaani (GD) ja syklosariini (GF). G-tyyppin hermokaasut ovat helposti haihtuvia ja vaikuttavat elimistöön hengitysilman tai ihon välityksellä [37].

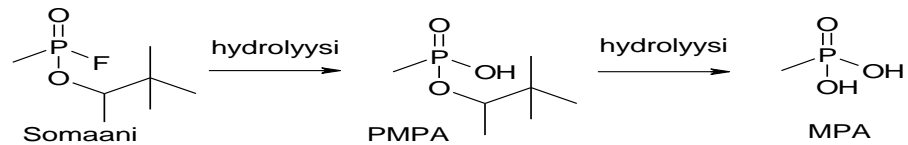
Hermokaasuista myrkyllisin ja huonoimmin haihtuva on VX. Sen vaikutusmekanismit ihmiskehoon välittyvät pääasiassa ihon kautta. [38] Tutkimuksen mallikemikaaleina käytetään eräitä somaaniin ja VX:n hajoamistuotteita. Taistelukaasut hajoavat pääasiassa hydrolysoitumalla.

Taulukko 2. Hermokaasujen jaottelu G- ja V-tyypin mukaan

Koodinimi	Triviaalinimi	Kemikaalin nimi	Rakennekaava
GA	tabuuni	O-etyyli-N,N-dimetyylifosforoamidotsyanaatti	
GB	sariini	Isopropyylimetyylifosfonofluoridaatti	
GD	somaani	Pinakolyylimetyylifosfonofluoridaatti	
GF	syklosariini	Sykloheksyylimetyylifosfonofluoridaatti	
VE		O-etyyli-S-2-(dietyyliamino)etyylietyylifosfonotiolaatti	
VM		O-etyyli-S-2-(dietyyliamino)etyylimetyylifosfonotiolaatti	
VX		O-etyyli-S-2-(diisopropyyliamino)etyylimetyylifosfonotiolaatti	

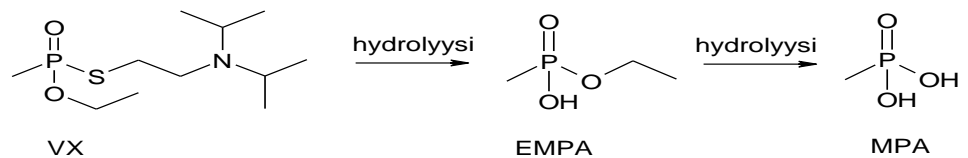
Hermokaasuista somaani kuuluu alifaattisiin alkyylifosfonofluoridaatteihin. Yhdiste hydrolysoituu luonnossa ja kudoksissa jo neutraaleissa vesipitoisissa olosuhteissa. Hydrolyysin ensimmäinen vaihe on nopea ja reaktionopeus kasvaa hydroksyyli-ionikonsentraation kasvaessa.

Somaanin ensisijainen hydrolyysituote on pinakolyylimetyylifosfonihappo eli PMPA, joka edelleen hydrolysoituu metyyllifosfonihapoksi. [39] Somaanin hydrolysoituminen on esitetty kuvassa 17.



Kuva 17. Somaanin hydrolyysi: somaanin primaarinen hydrolyysituote on pinakolyylimetyylifosfonihappo. Hermokaasun sekundaarinen hydrolyysituote on metyyllifosfonihappo.

VX kuuluu alkyylifosfonotiolaatteihin. Yhdiste hajoaa hitaasti jo pienen vesimäärän läsnä ollessa. Reaktion päätuotteena syntyy etyylimetyylifosfonihappoa (EMPA). Reakti nopeus kasvaa veden määrän lisääntyessä ja lämpötilan kohotessa. [40] VX:n sekundaarinen hajoamistuote on MPA. VX:n hydrolyysireitti on esitetty kuvassa 18.



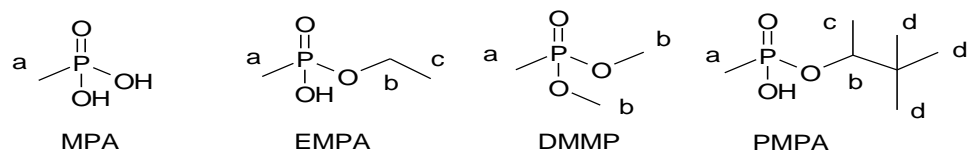
Kuva 18. VX:n hydrolysoituminen etyylimetyylifosfonihapoksi ja edelleen metyyllifosfonihapoksi

Hermokaasujen hydrolyysituotteet alkyylifosfonihapot ovat myrkyttömiä, suhteellisen vahvoja happoja. Neutraaleissa olosuhteissa alkyylifosfonihapot esiintyvät anionisessa muodossaan [41]. Yhdisteillä on myös polaarista luonnetta. Polariteetti riippuu elektronegatiivisten atomien määrästä ja hiiliketjun pituudesta ja vähenee hiiliketjun pituuden kasvaessa.



### Tutkimukseen valitut mallikemikaalit

Tutkimukseen valittiin mallikemikaaleiksi edustava joukko taistelukaasujen hajoamistuotteita; sariinin ja somaenin sekundaarinen hajoamistuote MPA, VX:n primaarinen hajoamistuote EMPA ja somaenin primaarinen hajoamistuote PMPA. Mukaan valittiin myös dimetyylimetyylifosfonaatti DMMP, joka on tuhoamisliuoksissa esiintyvä hermokaasujen hajoamistuote. DMMP:a syntyy myös taistelukaasusynteesin sivutuotteena. Käytettyjen hajoamistuotteiden MPA, EMPA, DMMP ja PMPA kemialliset rakenteet on esitetty kuvassa 19. Rakenteisiin on merkitty protonit kirjaimin a - d NMR -spektrometrissä tunnistusta varten. Kaikki mallikemikaalien protoniresonanssit  $^1\text{H}$  NMR -spektrissä on esitetty liitteen 1 kuvassa 1.



Kuva 19. NMR- spektrometrin menetelmien kehityksessä käytettävät mallikemikaalit MPA, EMPA, DMMP ja PMPA: protonit on merkitty kirjaimin a-d NMR -spektrometrissä tunnistusta varten.

## 6 KOKEELLINEN OSA JA TULOKSET

Työn kokeellisessa osiossa on kuvattu työssä käytetyt kemikaalit, tarvikkeet ja menetelmäkohtaiset ajo-olosuhteet. Työn eteneminen ja tulokset on kuvattu vaiheittain.

### 6.1 Työn tavoitteet

LC-SPE-NMR -spektrometrin menetelmänkehityksen tavoitteena on helpottaa seosnäytteiden analysointia NMR-spektroskopisilla menetelmillä. Tähän pyritään soveltamalla LC-SPE -menetelmää. Tutkimuksen tarkoituksena on testata yhdistelmätekniikan toimivuus ja käyttömahdollisuudet. Tutkimus on alustava selvitys ja tulokset suuntaa antavia eikä menetelmän validointia suoriteta tässä yhteydessä.

LC-SPE -menetelmässä on tarkoitus poimia nestekromatografisesti erotellut seosnäytteen komponentit näytteenkeräisyksikköön omaan näytesilmukoihin- sa, josta ne voidaan ohjata SPE-patruunaan ja rikastaa.

Työ suoritetaan vaiheittain testaamalla ensin mallikemikaalien kiinteäfaasi- uutto NH<sub>2</sub>-sorbentilla manuaalisin kokein. Tämän jälkeen optimoidaan yhdis- teiden nestekromatografiset olosuhteet parhaan mahdollisen erottumisen saavuttamiseksi. Yhdisteiden piikin poiminta-ajat määritetään LC-SPE - menetelmän testausta varten. Määrittämissä käytetään LC-NMR - menetelmiä mallikemikaalien vähäisen UV-aktiivisuuden vuoksi. Lopuksi LC- SPE -menetelmän toimivuus tutkitaan saantokokeiden avulla käyttäen NMR- spektrometriä yhdisteiden pitoisuusmäärittäisiin.

## 6.2 Tarvikkeet ja reagenssit

Tutkimuksen kokeellisen osion suorituksessa käytetyt kemikaalit on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Työssä käytetyt kemikaalit

Kemikaali	Kaava	M (g/mol)	Valmistaja	CAS- numero
metyylifosfonihappo	CH <sub>5</sub> O <sub>3</sub> P	96,02	Fluka	993-13-5
etyylimetyylifosfonihappo	C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> P	124,07	Spiez, Sveitsi	1832-53-7
dimetyylimetyylifosfonaatti	C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> P	124,07	Fluka	756-79-6
pinakolyylimetyylifosfonihappo	C <sub>7</sub> H <sub>17</sub> O <sub>3</sub> P	180,18	Spiez, Sveitsi	616-52-4
UHQ-vesi	H <sub>2</sub> O	18,02	*	7732-18-5
metanoli, pro analyysi	CH <sub>3</sub> OH	32,04	Merck	67-56-1
99,999% ammoniumasetaatti	NH <sub>4</sub> Ac	77,08	Sigma-Aldrich	631-61-8
> 98% ammoniumasetaatti	NH <sub>4</sub> Ac	77,08	Merck	631-61-8
99 % - 100% etikkahappo, p. a.	CH <sub>3</sub> COOH	60,05	J. T. Baker	64-19-7
25% ammoniumhydroksidi	NH <sub>4</sub> OH	35,05	J. T. Baker	1336-21-6
0,1 M hapen metanoli **	CH <sub>3</sub> OH		Fluka	
99,8% D deuteriumoksidi	D <sub>2</sub> O	2,01	Spectra Stable Isotopes	7789-20-0
99% muurahaishappo	HCOOH	46,03	ACROS	64-18-6
Asetonitrili, NMR CHRO- MASOLV	ACN	41,0	Riedel-de Haën	75-05-8
Trimetoksibentseeni	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	168,12	Sigma-Aldrich	621-23-8
Metyylivioletti	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> N <sub>3</sub> Cl	393,96	Merck	8004-87-3
Metanoli-d <sub>4</sub>	CD <sub>3</sub> OD	36,05	Euriso-top	811-98-3

\* UHQ-vesi on Elgan Elgastat-systeemillä puhdistettua käänteisosmoosivettä.

\*\* Metanoli oli tehty happamaksi HCl-kuplituksella.

Työn suoritukseen käytettiin alla listattuja tarvikkeita ja pienlaitteita.

Kiinteäfaasiuutto (SPE):

- NH<sub>2</sub>-sorbentti (100 mg, 5 mm x 10 mm), Varian, Bond Elut
- NH<sub>2</sub>-sorbentti (Prospekt: 16 mg, 2 mm x 10 mm), Varian, Bond Elut
- adapterit 100 mg:n sorbenteille manuaalisia kokeita varten
- sorbenttipatruunoihin kiinnitettävät hanat manuaalisia kokeita varten
- teline 100 mg:n patruunoille manuaalista kiinteäfaasiuuttoa varten
- 20 ml:n muoviruisku, Becton Dickinson, Plastipak
- 0,5 ml:n injektio-ruisku, Hamilton
- prospekt-formaatille soveltuva adapteri
- N<sub>2</sub>-linja kuivaukseen
- statiivit 2 kpl
- koura 2 kpl

Lasitavarat ja muut tarvikkeet:

- 1,5 ml:n näytepulloja, Brown
- kaulalla varustettuja mikronäytepulloja, Waters
- 5 mm:n NMR-näyteputkia, Wilmad (HIP-7)
- 1.7 mm:n NMR-näyteputkia, Bruker BioSpin
- 0,1 ml:n injektioruisku, Hamilton
- automaattipipetti 10 µl – 100 µl, Finnpipette
- automaattipipetti 200 µl – 1000 µl, Socorex

Pienlaitteet:

- pH-mittari, Mettler Delta 345
- analyysivaaka, Sartorius Handy
- ultraäänilaite, Branson 2210
- työtasoon kiinnitettävä käsivoimin käytettävä sentrifugi

### 6.3 Laitteistot ja ajo-olosuhteet

Kokeellisen osion suorituksessa käytetyt analyysitekniikat laitteistoineen ja ajo-olosuhteineen on kuvattu seuraavissa luvuissa.

#### 6.3.1 *Jatkuva virtaus*

LC-NMR –menetelmää käytettiin nestekromatografisten olosuhteiden tutkimiseen ja yhdisteiden piikin poiminta-aikojen määrittämiseen. Yhdistelmätekniikan laitteisto koostui Brukerin nestekromatografista ja Brukerin DRX 500 NMR-spektrometrinä. Nestekromatografi koostui liuotinjärjestelmästä (4 linjaa), injektorista 50 µl:n näytesilmukalla, HPLC-pumpusta (Bruker, LC-22), UV-detektorista (BISCHOFF Lambda 1010 UV) ja näytteenkeräysyksiköstä (Bruker, BPSU-36), joka oli varustettu 36:lla 250 µl:n näytesilmukalla. Kaasunpoisto ajoliuoksista suoritettiin ultraäänihauteessa ja nestekromatografian helium-kuplitusjärjestelmällä. Kolonnina käytettiin silikapohjaista käänteisfaasikolonnia (4,6 mm x 150 mm Atlantis T3, Waters). Kolonni on suunniteltu erityisesti pienten polaaristen yhdisteiden erottamiseen. Tätä on helpotettu sitomalla stationäärifaasiin polaarisia komponentteja.

Nestekromatografi yhdistettiin NMR-spektrometriin kapillaarin välityksellä. NMR-spektrometri varustettiin Brukerin virtausnäyteyksiköllä (LC-TXI). Läpivirtauskyvetin tilavuus oli 250 µl ja aktiivinen tilavuus 120 µl. Systemiä ohjattiin nestekromatografian HyStar 2.1 -ohjelmistolla (Bruker) ja NMR-spektrometrin TOPSPIN 1.3 –ohjelmistolla (Bruker).

Jatkuva virtaus -menetelmässä käytetyt ajo-parametrit on kuvattu taulukossa 4.

Taulukko 4. LC-NMR -menetelmän (jatkuva virtaus) ajoparametrit: yhdistelmätekniikan ajo-parametrit on esitetty kummallekin käytetylle menetelmälle erikseen.

Laitteisto 1	HPLC
Ajoliuokset	1. 0,1% HCOOH/ACN 2. 10 mM asetaattipuskuri/ACN 3. H <sub>2</sub> O/ACN
Ajoliuoksen komponenttien suhde (%)	60/40, 65/35, 70/30, 75/25, 80/20
Virtausnopeus	Isokraattinen 1,0 ml/min
Injektioilavuus	50 µl
Systeemiaika UV-detektorilta NMR-detektorille	26 s
Kokonaismittausaika	10 min
Laitteisto 2	NMR-spektrometri
Mittausmenetelmä	1D <sup>1</sup> H- <sup>31</sup> P HSQC, <sup>1</sup> H NMR
Protonipulssin kalibroitimenetelmä	360°:n menetelmä
Lukkoydin	Spektrometriä ei lukittu
Lähttimen taajuudet	4,7 ppm protonille, 30 ppm fosforille
Lämpötila	290 K
Spektrin leveys	12 ppm
Toistoväli	1 s
Keräysten lukumäärä/piste	2
Kokonaismittausaika	10 min

### 6.3.2 Näytteenkeräisyksikkö

Näytteenkeräisyksikköä hyödynnettiin mallikemikaalien piikin poiminta-aikojen määrittämisessä. Menetelmässä MPA:n, EMPA:n, DMMP:n ja PMPA:n seosvesinäyte erotettiin komponenteikseen nestekromatografian kolonnissa ja fraktiot poimittiin näytteenkeräisyksikön näytesilmukoihin asetetuilla poiminta-ajoilla. Fraktiot ohjattiin edelleen NMR-spektrometrin virtausnäytekyvetiin, jossa ne analysoitiin NMR-spektrometrillä. Mittauksissa käytetyt ajo-parametrit on kuvattu taulukossa 5.

Taulukko 5. LC-NMR -menetelmän (näytteenkeräysyksikkö) parametrit: ajoparametrit on esitetty kummallekin laitteistolle erikseen.

<i>Laitteisto 1</i>	<i>HPLC</i>
Ajoliuos	0,1% HCOOH D <sub>2</sub> O-liuoksessa/ACN
Ajoliuoksen komponenttien suhde (%)	70/30
Virtausnopeus	Isokraattinen 1 ml/min
Injektiotilavuus	50 µl
Näytteenkeräysyksikön näytesilmukan tilavuus	250 µl
Systeemiaika näytteenkeräysyksiköstä NMR-detektorille	26 s
<i>Laitteisto 2</i>	<i>NMR-spektrometri</i>
Käytetyt mittaustekniikat	<sup>1</sup> H NMR, liuotinvaimennettu <sup>1</sup> H NMR, 1D <sup>1</sup> H- <sup>31</sup> P HSQC
Protonipulssin kalibroitimenetelmä	360°:n menetelmä
Lukkoydin	D <sub>2</sub> O
Lähttimen taajuudet	4,7 ppm protonille, 30 ppm fosforille
Lämpötila	290 K
Spektrin leveys	10 - 12 ppm
Toistoväli (mittausaika + relaksaatioviive)	10 s (5 x 2 s)
Keräysten lukumäärä	32
Tyhjien keräysten lukumäärä	8
Polaarisaaion siirtoviive (J <sub>opt</sub> ) 1D <sup>1</sup> H- <sup>31</sup> P HSQC-kokeessa	17 Hz
Kokonaismittausaika	6,7 min

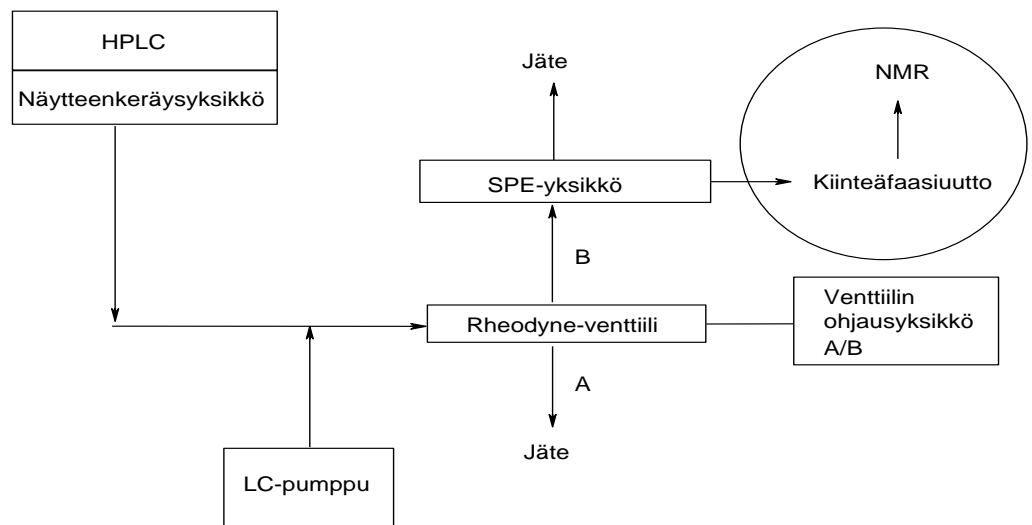
### 6.3.3 LC-SPE

LC-SPE -menetelmää käytettiin mallikemikaalien selektiiviseen konsentroitettiin. Menetelmässä nestekromatografinen erotus yhdistettiin kiinteäfaasiuuttoon, joka automatisoitiin sorbentin kunnostuksen ja tasapainotuksen osalta. Tekniikassa hyödynnettiin nestekromatografian näytteenkeräysyksikköä eroteltujen fraktioiden varastointiin myöhempää käsittelyä varten. Kiinteäfaasiuuttoa sovellettiin käyttämällä pientä patruuna-formaattia (NH<sub>2</sub>, Prospekt).

Kuva 20 havainnollistaa käytettyä laitteistoa. Yhdistelmätekniikka koostui näytteenkeräysyksiköllä varustetusta nestekromatografista, erillisestä HPLC-pumpusta (Merck Hitachi Intelligent Pump), SPE-yksiköstä ja sen ohjausyksiköstä sekä NMR-spektrometristä. Nestekromatografian, SPE-yksikön ja erillisen HPLC-pumpun yhdistämiseen käytettiin rheodyne-venttiiliä (H.S. Valve 7000E, Lab Source) ja kapillaariputkia.

SPE-yksikkö koostui pienestä patruunalle soveltuvasta adapterista, johon käytettävä  $\text{NH}_2$ -sorbentilla pakattu patruuna liitettiin. Adapteri kiinnitettiin staatiivin kouraan ja kapillaarin välityksellä edelleen rheodyne-venttiiliin. Myös adapterin toiseen päähän kiinnitettiin kapillaari jätevirtausta varten. Erillistä LC-pumppua käytettiin sorbentin automatisoituun kunnostamiseen. Pumppu oli varustettu liuotinjärjestelmällä (3 linjaa) ja automatiikalla, joka mahdollisti erilaisten metodien ohjelmoinnin laitteeseen.

Nestekromatografiaa käytettiin seosnäytteen erottamiseen komponenteikseen ja fraktioiden keräykseen näytesilmukoihin. Näytteenkeräysyksiköstä fraktioita siirrettiin kunnostettuun ja tasapainotettuun patruunaan käyttäen nestekromatografian ohjelmistoa ja optimoitua siirtoaikaa. LC-SPE -systeemi rakennettiin siten, että virtaus nestekromatografista voitiin ohjata joko patruunaan tai patruunan ohi jätteisiin rheodyne-venttiiliin ja sen ohjausyksikön avulla. NMR-spektrometriä ei liitetty SPE-yksikköön, vaan sitä käytettiin manuaalisesti eluotujen näytteiden analyysipitoisuuksien määrittämiseen.



*Kuva 20. Kaaviokuva LC-SPE –menetelmän toimintaperiaatteesta: mahdolliset virtaussuunnat on merkitty nuolin ja kirjaimin A/B. Virtaus ohjataan systeemiin joko näytteenkeräysyksiköstä (HPLC) tai erillisestä LC-pumpusta. Virtausreittiä ohjataan rheodyne-venttiilin ohjausyksiköstä. Asennossa A virtaus kulkee patruunan ohi venttiilin kautta jätteisiin. Asennossa B virtaus ohjataan patruunaan venttiilin kautta ja sieltä jätteisiin. Virtaus HPLC-laitteen näytteenkeräysyksiköstä ja erillisestä LC-pumpusta voidaan ajastaa asettamalla virtauksen kesto aika laitteeseen. Venttiilin ohjausyksiköllä virtauksen reittiä voidaan muuttaa koska tahansa ajon aikana. Ympyröityä aluetta ei ole liitetty systeemiin. Kiinteäfaasiuuton eluointivaihe suoritetaan manuaalisesti ja NMR-analyysi erikseen uutteen valmistetusta näytteestä.*

#### 6.3.4 NMR

NMR-spektrometriä käytettiin *erillisenä tekniikkana* näytteiden analyyttipitoisuuksien määrittämiseen. Saantokokeissa (SPE ja LC-SPE) käytettiin kahta eri näyteyksikköä. Kiinteäfaasiuuton manuaalisissa testeissä 100 mg:n sorbenttipatruunoilla käytettiin 5 mm:n laajakaista-näyteyksikköä (BBI, Bruker). Näissä mittauksissa näytteet valmistettiin pipetoimalla 500 µl uutetta ja 100 µl lukkoliuotinta (D<sub>2</sub>O) 5 mm:n näyteputkiin. Näytteet sekoitettiin ravistelemalla putkia voimakkaasti. Pienemmällä patruunakoolla (16 mg) suoritettujen uuttojen näytteet analysoitiin 1.7 mm:n mikronäyteyksiköllä (TXI (<sup>1</sup>H, <sup>31</sup>P, <sup>13</sup>C), Bruker). Näytteet valmistettiin lisäämällä 20 µl uutetta ja 10 µl deuteriumoksidia 1.7 mm:n näyteputkiin. Mikronäytteet sekoitettiin manuaalisesti käyttäen sentrifugia. Pitoisuusmäärittämiseen käytetyt ajoparametrit vastaavat NMR-spektrometrille jo aiemmin kuvattuja ajoparametreja (taulukko 5). Pitoisuusmäärittäykset suoritettiin 1D <sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P HSQC -spektrien perusteella.

#### 6.4 Kiinteäfaasiuuton testaus

Kiinteäfaasiuuton testaus suoritettiin manuaalisin kokein käyttäen 100 mg:n NH<sub>2</sub>-sorbenttipatruunoita. Kaikissa testeissä sorbentit kunnostettiin metanolilla. Testit suoritettiin käyttäen kahta eri tasapainotusliuosta ja kolmea eluenttivaltoehdotusta kahtena rinnakkaismäärittämisenä/olosuhteet. Näytteenä käytettiin 100 µg/ml MPA:n, EMPA:n, DMMP:n ja PMPA:n seosvesiliuosta. Näytteille valmistettiin seosnäyttereferenssi sekoittamalla 500 µl seosnäytettä ja 100 µl lukkoliuotinta (D<sub>2</sub>O) 5 mm:n NMR-putkessa. Taulukossa 6 on kuvattu kiinteäfaasiuuton vaiheet ja testatut olosuhteet.

Sorbentin tasapainotukseen valittiin vaihtoehdoiksi vesi ja 50 mM NH<sub>4</sub>Ac. Eluenttivaltoehdoiksi valittiin hapan metanoli (pH = 1,1), 1% NH<sub>4</sub>Ac MeOH/H<sub>2</sub>O -liuoksessa (1/1, pH = 7,2) ja 1% NH<sub>4</sub>OH MeOH/H<sub>2</sub>O -liuoksessa (1/1, pH = 11,6). Eluointi happamalla metanolilla perustuu happojen neutralointiin ja emäksisen 1% NH<sub>4</sub>OH:n käyttö sorbentin neutralointiin. 1% NH<sub>4</sub>Ac:n käyttö eluoinnissa perustuu asetaatti-ioneihin, jotka kilpailevat sorbentin pidättymispaikoista analyyttien kanssa.



Taulukko 6. Kiinteäfaasiuuton testaus: testeissä käytettiin viittä erilaista olosuhdevaihtoehtoa. Kaikissa testeissä 100 mg:n NH<sub>2</sub>-sorbentti kunnostettiin metanolilla. Sorbentin tasapainotukseen käytettiin joko vettä tai 50 mM:sta ammoniumasetaattia. Eri eluenttivaihtoehtoja olivat hapan metanoli, 1% ammoniumasetaatti MeOH/H<sub>2</sub>O -liuoksessa (1/1) ja 1% ammoniumhydroksidi MeOH/H<sub>2</sub>O -liuoksessa (1/1). Näytteenä käytettiin 100 µg/ml MPA:n, EMPA:n, DMMP:n ja PMPA:n seosvesinäytettä.

Vaihtoehto	Vaihe 1.	Vaihe 2.	Vaihe 3.	Vaihe 4.
	Sorbentin kunnostus	Sorbentin tasapainotus	Analyytin lisäys	Analyytin eluointi sorbentista
1.	1 ml MeOH	1 ml H <sub>2</sub> O	1 ml 100 µg/ml MPA, EMPA, DMMP, PMPA	1 ml hapan MeOH (pH = 1,1)
2.	Kuten edellä	1 ml H <sub>2</sub> O	Kuten edellä	1ml 1% NH <sub>4</sub> Ac MeOH/H <sub>2</sub> O-liuoksessa (1/1) (pH = 7,2)
3.	Kuten edellä	1 ml 50 mM NH <sub>4</sub> Ac	Kuten edellä	1 ml hapan MeOH
4.	Kuten edellä	1 ml 50 mM NH <sub>4</sub> Ac	Kuten edellä	1 ml 1% NH <sub>4</sub> Ac MeOH/H <sub>2</sub> O-liuoksessa (1/1)
5.	Kuten edellä	1 ml 50 mM NH <sub>4</sub> Ac	Kuten edellä	1% NH <sub>4</sub> OH MeOH/H <sub>2</sub> O-liuoksessa (1/1) (pH = 11,6)

#### 6.4.1 Suoritus

Testattavat patruunat kiinnitettiin tarkoitukseen soveltuvaan telineeseen siten, että patruunan alapäähän kiinnitettiin sopivan kokoinen hana ja yläpäähän adapteri ruiskua varten. Kussakin testissä patruuna kunnostettiin pipe-toimalla 1 ml metanolia patruunaan hanan ollessa kiinni. Tämän jälkeen patruunan yläpäähän kiinnitettiin 20 ml:n muoviruisku, joka oli vedetty täyteen ilmaa. Hana avattiin ja patruuna paineistettiin painamalla ilmaa patruunaan. Nestepinnan annettiin laskeutua sorbentin yläreunaan saakka. Tämän jälkeen hana suljettiin. Toisessa vaiheessa lisättiin käytettävä tasapainotusliuos tilavuudessa 1 ml. Tämä vaihe suoritettiin edellä kuvatulla tavalla. Kolmannessa vaiheessa lisättiin näyte; 1 ml 100 µg/ml MPA:n, EMPA:n, DMMP:n ja PMPA:n seosvesiliuosta. Läpi mennyt näyteliuotin otettiin talteen 1,5 ml:n näytepulloon. Näytteen lisäyksen jälkeen patruuna kuivattiin ilmanpaineella.

Neljännessä vaiheessa näyte eluoiitiin 1 ml:lla käytettävää eluenttia ja uute kerättiin 1,5 ml:n näytepulloon. Sorbentti kuivattiin ilmanpaineella, jotta kaikki uute saatiin talteen.

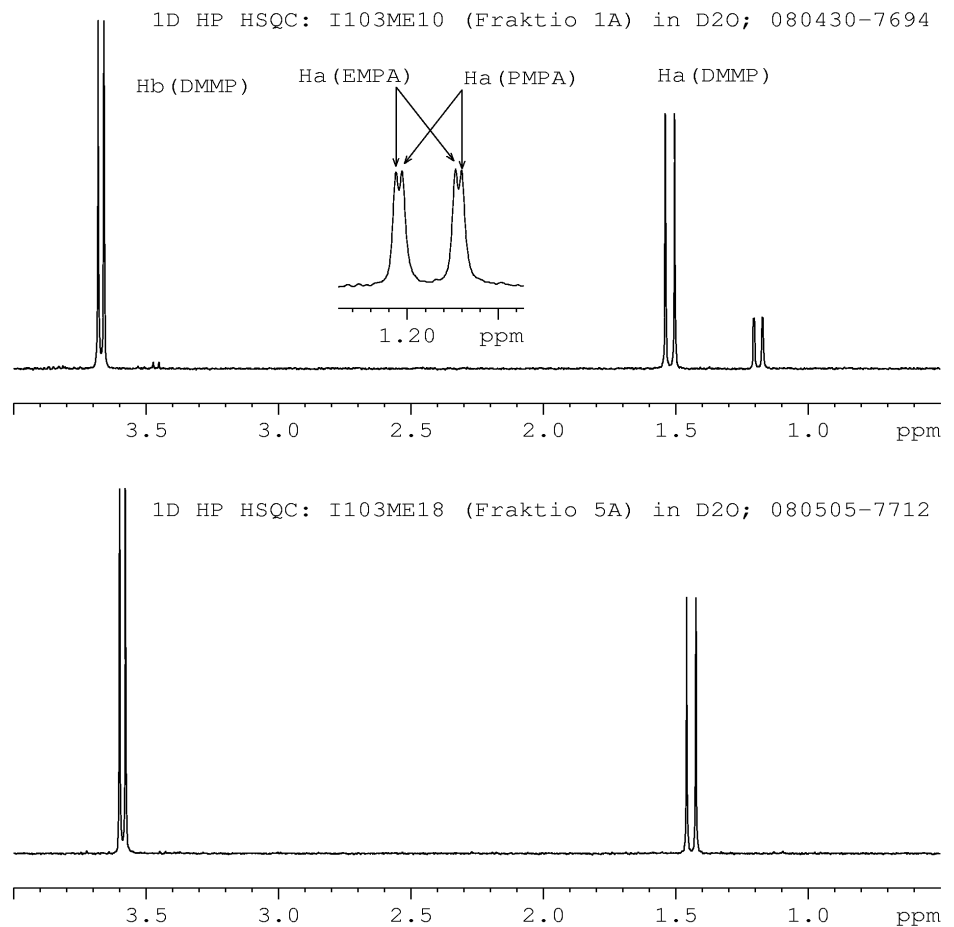
Talteen otetuista näyteliuotinfraaktioista ja uutteista valmistettiin kustakin NMR-näyte 5 mm:n näyteputkeen (näytteenvalmistuksen tarkempi kuvaus luku 6.3.4). Näytteiden analyyttipitoisuudet määritettiin käyttäen NMR-spektrometriä ja 1D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC-spektrejä.

#### 6.4.2 Tulokset

Testeissä käytettäville organofosforyyhdisteille määritettiin optimaalinen eluentti ja sorbentin tasapainotustapa tutkimalla NMR-spektreistä kohdeanalyyttien saantoja. Sorbentin läpäisseistä näyteliuotinfraaktioista analysoitiin mallikemikaalien pidättymistä patruunaan. Uutetuista fraktioista tutkittiin mallikemikaalien eluoitumistehokkuutta eri eluenttivaihtoehdoilla.

##### *Retentiotestit*

Tasapainotusliuoksina käytettiin vettä tai 50 mM ammoniumasetaattia. Esimerkkispektrit kummallekin tasapainotustavalle on esitetty alla kuvassa 21. Kun tasapainotus tehtiin vedellä, spektrissä havaittiin DMMP:n, EMPA:n ja PMPA:n resonanssiiviivat. EMPA:n ja PMPA:n kemialliset siirtymät ovat niin lähellä toisiaan, että signaalit menevät osittain päällekkäin. Nämä yhdisteet eivät pidäytyneet sorbenttiin. Ainoastaan vahvasti polaarinen MPA pidättyi sorbenttiin. Kun tasapainotus tehtiin 50 mM:lla ammoniumasetaatilla, spektrissä havaittiin vain DMMP:n resonanssiiviivat. Muut yhdisteet pidättyivät sorbenttiin täysin.



Kuva 21. 500 MHz:n  $1D\ ^1H\text{-}^{31}P$  HSQC -spektrit mallikemikaalien MPA, EMPA, DMMP ja PMPA  $100\ \mu\text{g/ml}$  seosvesinäytteestä näytteenlisäyksen yhteydessä kerätyistä liuotinfraکتioista: spektrit havainnollistavat mallikemikaalien pidättymistä  $\text{NH}_2$ -sorbenttiin, kun metanolilla kunnostettu sorbentti on tasapainotettu vedellä (yllä) tai 50 mM ammoniumasetaatilla (alla). Kun tasapainotukseen käytettiin vettä, ainoastaan MPA pidättyi sorbenttiin täysin. Tasapainotettaessa 50 mM ammoniumasetaatilla, sorbenttiin pidättyivät MPA:n lisäksi EMPA ja PMPA.

Rinnakkaisten mittausten perusteella tehdyn kvantitoinnin tulokset on esitetty taulukossa 7. EMPA:n ja PMPA:n integraalit määritettiin puolittamalla yhdisteiden signaalien yhteispinta-ala. Integraalit korjattiin kaavalla 5, ja pitoisuudet määritettiin kaavalla 6.

Taulukko 7. Mallikemikaalien MPA, EMPA, DMMP ja PMPA retentio  $\text{NH}_2$ -sorbenttiin: taulukkoon on koottu tulokset fraktioista, jotka kerättiin näytteen lisäyksen yhteydessä (1 ml 100  $\mu\text{g/ml}$  seosvesinäyte) kahdelle eri tasapainotustavalle. Sorbentin läpäisseiden liuotinfraktioiden pitoisuudet määritettiin mallikemikaalien suhteen ( $1\text{D } ^1\text{H-}^{31}\text{P HSQC}$ ). Havaitut ja korjatut integraalit edustavat määritettyjä piikkien pinta-aloja. Päällekkäisyyden vuoksi EMPA:n ja PMPA:n integraalit puolitettiin. Konsentraatio kuvaa näytteen analyttipitoisuutta sorbentin läpäisseessä fraktiossa. Retentio-% kuvaa analyytin pidättymistä sorbenttiin. Konsentraatio ja retentio-% määritettiin rinnakkaisten mittausten keskiarvona.

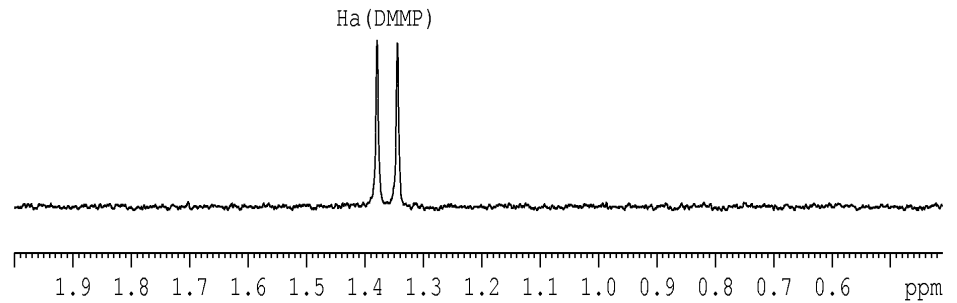
Konditiointi		$I_{\text{havaittu}}$ sarja 1	$I_{\text{korjattu}}$ sarja 1	$I_{\text{havaittu}}$ sarja 2	$I_{\text{korjattu}}$ sarja 2	$C_{\text{ka}}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Retentio-% (ka)
MeOH + $\text{H}_2\text{O}$	MPA					0,00	100
	EMPA	0,1303	0,1307	0,0852	0,0855	10,75	89
	DMMP	0,7259	0,7275	0,6894	0,6905	70,54	29
	PMPA	0,1303	0,1308	0,0852	0,0857	10,76	89
MeOH + 50 mM $\text{NH}_4\text{Ac}$	MPA					0,00	100
	EMPA					0,00	100
	DMMP	0,7031	0,7044	0,7272	0,7287	72,23	29
	PMPA					0,00	100

Taulukon 7 tulosten perusteella havaitaan selkeä ero kahden käytetyn tasapainotustavan välillä. Kun tasapainotukseen käytetään ammoniumasettaattia veden sijaan, analyytit lukuun ottamatta DMMP:a pidättyvät sorbenttiin täysin. Kun tasapainotukseen käytetään vettä, EMPA:n ja PMPA:n retentio jää alle 90%:n. DMMP:n huono pidättyminen sorbenttiin (29%) oli odotettavissa ja se johtuu yhdisteen vähäisemmästä poolisuudesta seurauksena OH-ryhmien puuttumisesta.  $\text{NH}_2$ -sorbentti ei sovellu DMMP:n kiinteäfaasiuuttoon.

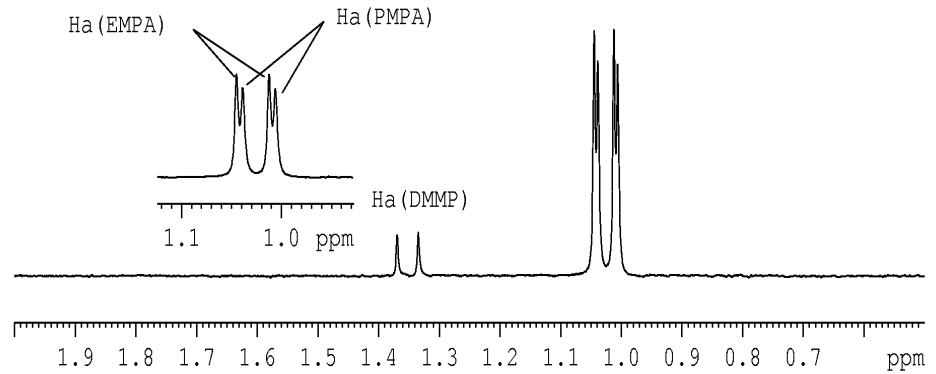
#### Eluointitestit

Esimerkkispektrit eri eluointivaihtoehdoille on esitetty kuvassa 22. Spektrit kuvaavat tilannetta, jossa sorbentin kunnostus ja tasapainotus on tehty käyttäen 1 ml metanolia ja 1 ml 50 mM ammoniumasettaattia.

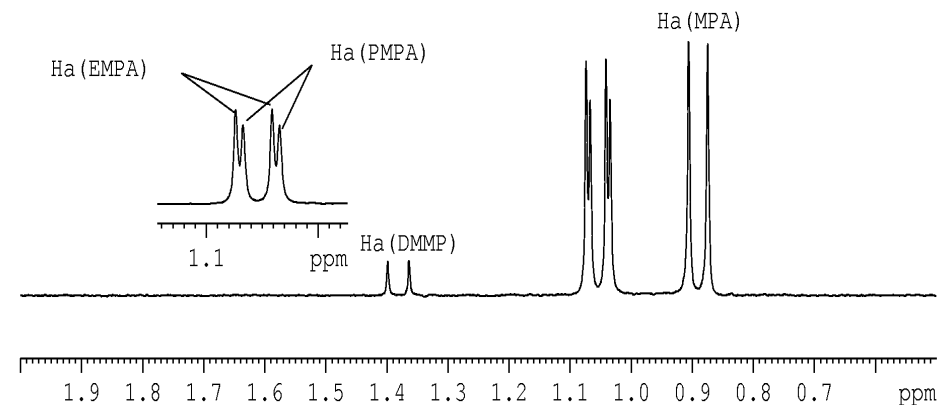
1D HP HSQC: I103ME19 (Fraktio 5B) in D2O; 080506-7737



1D HP HSQC: I103ME23 (Fraktio 7B) in D2O; 080506-7743



1D HP HSQC: I103ME34 (Fraktio 1b) in D2O; 080508-7776



Kuva 22. 500 MHz:n 1D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC-spektrit mallikemikaalien MPA, EMPA, DMMP ja PMPA 100  $\mu\text{g/ml}$  seosvesinäytteestä näytteen eluoinnin yhteydessä kerätyistä uutteista: spektrit havainnollistavat kolmen eri eluuttivaihtoehdon eroja uuttoprosessissa. Eluutteina käytettiin hapanta metanolia (yllä), 1%  $\text{NH}_4\text{Ac}$ :a  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ -liuoksessa 1/1 (keskellä) ja 1%  $\text{NH}_4\text{OH}$ :a  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ -liuoksessa 1/1 (alalla). Viimeiseksi mainitulla eluutilla saatiin parhaat tulokset; MPA, EMPA ja PMPA eluoutuivat sorbentista. DMMP:n saanto jäi vähäiseksi.

Pitoisuusmäärityksen tulokset on esitetty taulukossa 8. Tulokset on esitetty integraalien osalta rinnakkaisille mittauksille erikseen. Konsentraatio ja saanto-% on laskettu rinnakkaisten tulosten keskiarvona.

*Taulukko 8. Kvantioinnin tulokset kolmelle eri eluentivaihtoehdolle, kun NH<sub>2</sub>-sorbenttiin kunnostukseen käytettiin metanolia ja tasapainotukseen 50 mM ammoniumasetaattia: integraalit on korjattu käyttäen kaavaa 5 ja konsentraatiot kaavaa 6. Konsentraatio kuvaa analyttipitoisuutta eluoidussa näytteessä ja saanto-% analyttin prosentuaalista osuutta näytteessä verrattuna injektoituun analyttimassaan. Konsentraatio ja saanto-% on laskettu kahden rinnakkaisen määrityksen tuloksena.*

Eluointi *	Yhdiste	I <sub>havaittu</sub> sarja 1	I <sub>korjattu</sub> sarja 1	I <sub>havaittu</sub> sarja 2	I <sub>korjattu</sub> sarja 2	c (µg/ml) (ka)	Saanto- % (ka)
Hapan MeOH	MPA					0,0	0
	EMPA					0,0	0
	DMMP	0,1819	0,1822	0,1710	0,1713	17,8	18
	PMPA					0,0	0
1 % NH <sub>4</sub> Ac **	MPA					0,0	0
	EMPA	0,9361	0,9397	0,8929	0,8964	104,5	104
	DMMP	0,1754	0,1757	0,1544	0,1547	18,8	19
	PMPA	0,9361	0,9402	0,8929	0,8964	104,5	104
1 % NH <sub>4</sub> OH **	MPA	1,2322	1,2535	1,1442	1,1632	128,4	128
	EMPA	0,9240	0,9276	0,8737	0,8770	95,7	96
	DMMP	0,1395	0,1397	0,1040	0,1042	12,9	13
	PMPA	0,9240	0,9276	0,8737	0,8770	95,7	96
* Tasapainotus 50 mM NH <sub>4</sub> Ac							
** MeOH/H <sub>2</sub> O-liuoksessa 1/1							

Kuvan 22 spektrien ja taulukon 8 tulosten perusteella havaittiin selkeä ero myös eluenttien välillä. MPA saatiin eluoitua ainoastaan NH<sub>4</sub>OH:lla, joka neutraloi sorbenttiä tehokkaasti. Saannot EMPA:lle ja PMPA:lle olivat samaa luokkaa sekä ammoniumasetaatilla, että ammoniumhydroksidilla. Asetaatti-ionien käyttö eluoinnissa oli tehokasta yhdenarvoisten happojen kohdalla, mutta teho ei riittänyt polaarisen MPA:n eluointiin. Hapan metanoli soveltui ainoastaan DMMP:n eluointiin. Tämä perustuu DMMP:n vähäisempään polarisuuteen.

Optimaaliset mallikemikaalien uutto-olosuhteet saavutettiin, kun sorbentti kunnostettiin 1 ml:lla metanolia, tasapainotettiin 1 ml:lla 50 mM NH<sub>4</sub>Ac:a ja eluoiitiin 1 ml:lla 1 %:sta NH<sub>4</sub>OH:a MeOH/H<sub>2</sub>O -liuoksessa (1/1). Näissä olosuhteissa käytettyjen organofosforihappojen saanto-%:t olivat hyväksyttävällä tasolla ja olosuhteet otettiin käyttöön LC-SPE -testeissä.

## 6.5 Nestekromatografiset olosuhteet

Nestekromatografisten olosuhteiden optimointi on tärkeää seosnäytteen komponenttien erottamiseksi. Yhdisteiden tulee erottua riittävästi toisistaan, jotta ne voidaan poimia näytteenkeräysyksikön näytesilmukoihin testien myöhemmässä vaiheessa (luku 6.7). Optimaalisissa olosuhteissa piikit eluoi-tuvat terävinä eikä päällekkäisyyttä esiinny. Myöhemmissä testeissä käytet-tävän näytteenkeräysyksikön silmukoiden tilavuus on 250 µl. Yhden silmu-kan täyttymiseen virtausnopeudella 1 ml/min kuluu noin 15 s. Eluoituva yh-diste saadaan poimittua näytesilmukkaan *kokonaisuudessaan*, kun piikin pohjanleveys on korkeintaan 15 s ja kahden peräkkäisen piikin huipun väli-nen etäisyys on vähintään 15 s.

### 6.5.1 Suoritus

Nestekromatografiset olosuhteet optimoitiin käyttäen pienille polaarille yh-disteille tarkoitettua ATLANTIS T3 -käänteisfaasikolonnia. Testit suoritettiin testaamalla kolmea eri ajoliuosyhdistelmää useissa eri seossuhteissa. Tar-koituksena oli löytää mallikemikaalien kromatografiselle erottumiselle edulli-nen pH ja retentio stationäärifaasiin LC-SPE -menetelmän testausta varten. Käytettävien *fosfonihappojen* pK<sub>a</sub>-arvot ovat noin 2, jolloin neutraaleissa olo-suhteissa ne ovat anionisessa muodossaan. Testit suoritettiin kolonnin sta-biililla pH-alueella 2 - 8. Tällä pH-alueella yhdisteitä ei voitu saada täysin neutraaliin muotoon.

Testeissä käytettiin jatkuva virtaus -menetelmää (luku 6.3.1) ja 1D <sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P HSQC-tekniikkaa. Kaikki ajot suoritettiin isokraattisina muuttaen ajoliuoksen komponenttien suhdetta seuraavasti: 60/40, 65/35, 70/30, 75/25, 80/20. Näytteenä käytettiin MPA:n, EMPA:n, DMMP:n ja PMPA:n 1,0 mg/ml seos-vesiliuosta ja injektio-tilavuutta 50 µl. Testatut olosuhteet on kuvattu taulu-kossa 9.

Taulukko 9. Nestekromatografisten olosuhteiden testauksessa käytetyt olosuhteet

Ajoliuosyhdistelmä	Virtausnopeus	pH
Testi 1. 0,1% HCOOH/ACN	1 ml/min	2,5
Testi 2. H <sub>2</sub> O/ACN	1 ml/min	neutraali
Testi 3. 10 mM asetaattipuskuri/ACN	1 ml/min	4,5

Viiveaika  $t_M$  NMR määritettiin varsinaisten testien yhteydessä kromatografisten parametrien määrittämistä varten. Viiveaika määritettiin LC-NMR -grammin perusteella käyttäen testeissä saatua MPA:n lyhintä NMR-retentioaikaa, joka oli 131 s.

### 6.5.2 Tulokset

Mallikemikaalien nestekromatografista erottumista tutkittiin LC-NMR -grammeista parametrien retentiotekijä ( $k$ ) ja erotustekijä ( $\alpha$ ) avulla. Retentiotekijä määritettiin kaavalla 7 ja erotustekijä kaavalla 8. Optimaalisissa olosuhteissa retentiotekijä on yli 1. Mitä suurempi erotustekijä on, sen paremmin yhdisteet erottuvat toisistaan.

#### Testi 1

Tulokset ajo-olosuhteille isokraattinen 0,1% HCOOH/ACN on esitetty taulukossa 10. Taulukkoon on koottu kunkin yhdisteen NMR-retentioajat käytetyissä olosuhteissa sekä viiveajan perusteella lasketut todelliset NMR-retentioajat. Erotustekijät on laskettu kahdelle peräkkäin eluoituvalle yhdisteelle.

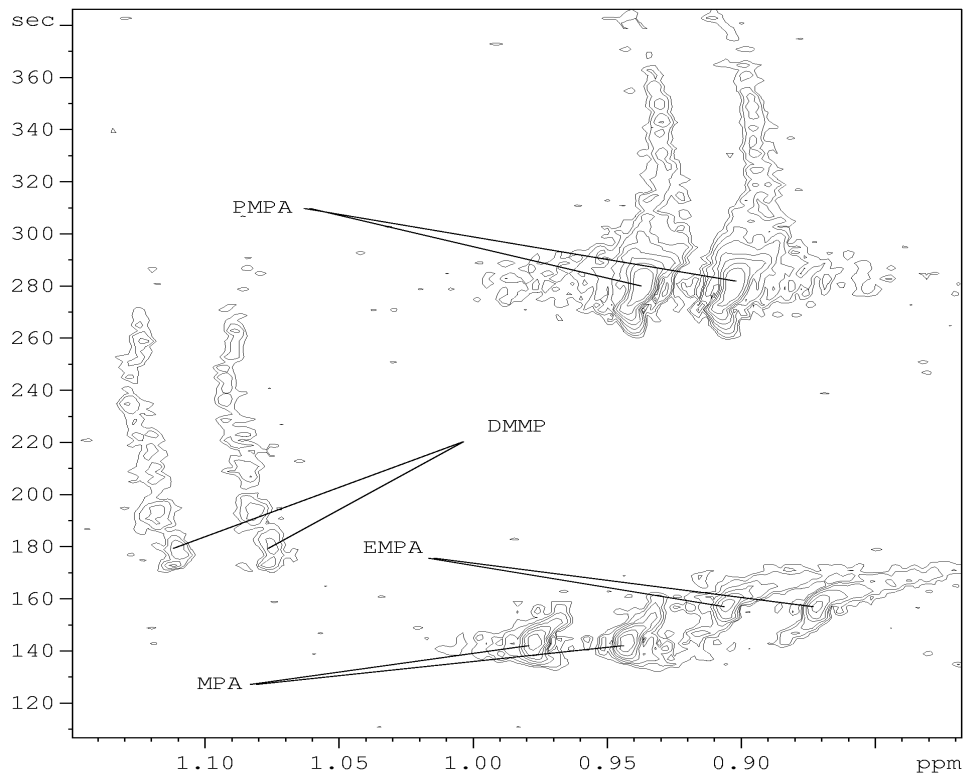


Taulukko 10. LC-NMR -grammien perusteella määritetyt nestekromatografiset parametrit mallikemikaaleille MPA, EMPA, DMMP ja PMPA: testit suoritettiin olosuhteissa isokraattinen 0,1% HCOOH/ACN (1 ml/min) injektioilavuudessa 50 µl. Todellinen retentioaika (NMR) määritettiin viiveajan 131 s avulla, ja se kuvaa aikaa, jonka yhdiste viettää stationäärifaasissa. Retentiotekijä laskettiin todellisen NMR-retentioajan perusteella ja se kuvaa yhdisteen pidättymistä kolonnin stationäärifaasiin. Taulukossa erotustekijät on laskettu kahdelle vierekkäiselle piikille; esimerkiksi MPA:n ja EMPA:n erotustekijä on 3,33, kun käytettävien ajoliuoskomponenttien suhde on 60/40.

pH = 2,5		$t_r$ NMR (s)	$t'_r$ NMR (s)	$k$	$\alpha$
60/40	MPA	137	6	0,05	
	EMPA	151	20	0,2	3,33
	DMMP	165	34	0,3	1,70
	PMPA	231	100	0,8	2,94
65/35	MPA	143	12	0,1	
	EMPA	157	26	0,2	2,17
	DMMP	177	46	0,4	1,77
	PMPA	281	150	1,2	3,26
70/30	MPA	143	12	0,1	
	EMPA	163	32	0,2	2,67
	DMMP	179	48	0,4	1,50
	PMPA	343	212	1,6	4,42
75/25	MPA	143	12	0,1	
	EMPA	167	36	0,3	3,00
	DMMP	183	52	0,4	1,44
	PMPA	479	348	2,7	6,69
80/20	MPA	145	14	0,1	
	EMPA	175	44	0,3	3,14
	DMMP	187	56	0,4	1,27
	PMPA				

Tulosten perusteella nähdään, että MPA:n, EMPA:n ja DMMP:n pidättymisen stationäärifaasiin on vähäistä. Ainoastaan PMPA:n retentiotekijä on optimaalisella tasolla. Kun veden osuutta ajoliuoksessa lisätään, PMPA:n retentio stationäärifaasiin kasvaa. Muiden yhdisteiden osalta erot eri ajoliuosuhteilla ovat vähäisiä. Yhdisteet kuitenkin erottuvat toisistaan jonkin verran. Erotustekijät ovat pienimmät kaikilla ajoliuosuhteilla EMPA:lla ja DMMP:lla. Kuva 23 havainnollistaa tilannetta. Kuvan LC-NMR -grammi on mitattu käytetyissä olosuhteissa ja siihen on merkitty kunkin yhdisteen NMR-retentioaika eli piikin huippukohta.

LC-gram., 1D HP HSQC: I77HTK27 (1mg/ml MPA, EMPA, PMPA, DMMP)  
in CH<sub>3</sub>CN+H<sub>2</sub>O; 080331-7521, 65/35 0.1% HCOOH/ACN, 1 ml/min



Kuva 23. LC-NMR -grammi (1D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC) MPA:n, EMPA:n, DMMP:n ja PMPA:n seosvesinäytteestä: kromatografinen erotus suoritettiin olosuhteissa isokraattinen 0,1% HCOOH/ACN (65/35), 1 ml/min. Kuvaan on merkitty yhdisteiden NMR-retentioajat, jotka on määritetty piikkien huippukohdasta.

Kuvasta havaitaan, että pienimmät fosfonihapot MPA ja EMPA eluotuvat terävimmän. DMMP:n signaali valuu pitkälle ja piikin pohjaviivan leveys on yli 100 s. Myös PMPA häntii jonkin verran. Piikkien leveneminen saattaa liittyä yhdisteiden molekyyliarakenteiden välisiin eroihin. PMPA:lla on sekä polaarista että poolittonta luonnetta. Yhdisteellä on mallikemikaalien pisin hiiliketju, joka mahdollistaa retention poolittomaan C18-faasiin. DMMP:n polarisuus on vähäisempää kuin muiden yhdisteiden. Sillä voi kuitenkin olla poolittomia vuorovaikutuksia, jotka lienevät kuitenkin vähäiset. Piikkien levenemiseen vaikuttavat osaltaan pitkittäinen diffuusio ja kolonnin kunto. Nämä vaikutukset ovat luonnollisesti vähäisimmät yhdisteillä, joiden retentio stationäärifasiin on huono.

## Testi 2

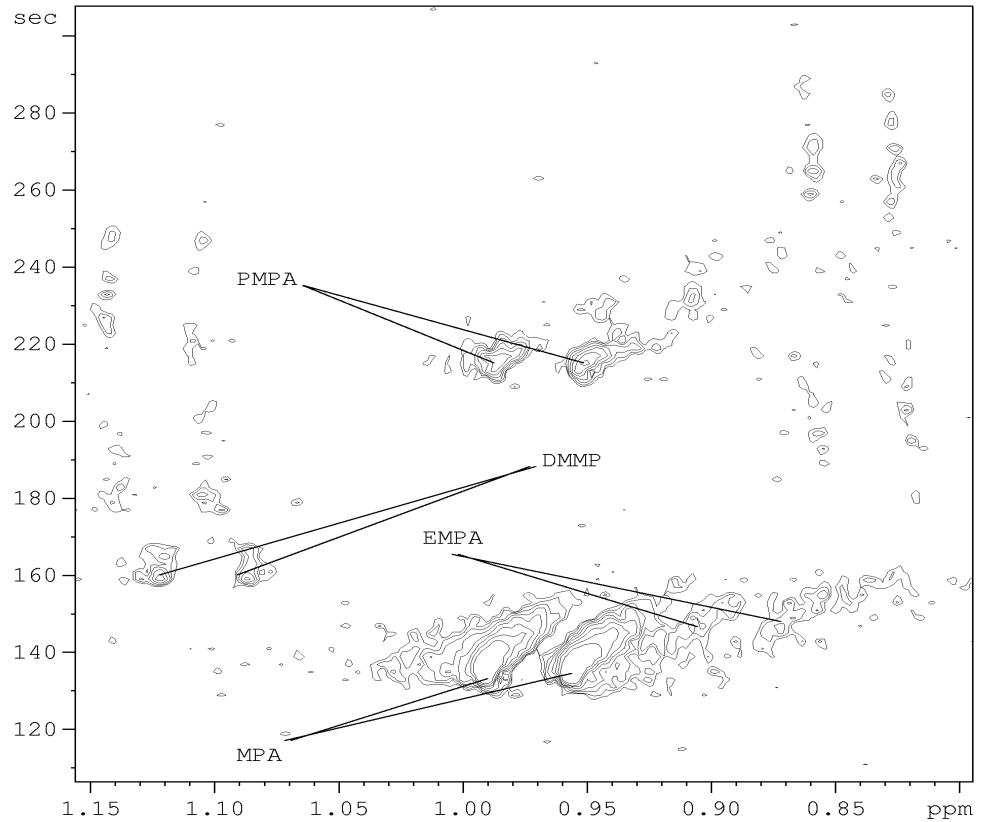
Tulokset olosuhteille isokraattinen H<sub>2</sub>O/ACN on esitetty taulukossa 11.

Taulukko 11. LC-NMR -grammien perusteella lasketut kromatografiset parametrit ajo-olosuhteissa isokraattinen H<sub>2</sub>O/ACN, 1 ml/min

pH = neutraali		tr NMR (s)	t'r NMR (s)	k	α
60/40	MPA	135	4	0,0	
	EMPA	145	14	0,1	3,50
	DMMP	159	28	0,2	2,00
	PMPA	215	84	0,6	3,00
65/35	MPA	139	8	0,1	
	EMPA	149	18	0,1	2,25
	DMMP	169	38	0,3	2,11
	PMPA	241	110	0,8	2,89
70/30	MPA	139	8	0,1	
	EMPA	151	20	0,2	2,50
	DMMP	177	46	0,4	2,30
	PMPA	309	178	1,4	3,87
75/25	MPA	143	12	0,1	
	EMPA	159	28	0,2	2,33
	DMMP	183	52	0,4	1,86
	PMPA	373	242	1,9	4,65
80/20	MPA	145	14	0,1	
	EMPA	169	38	0,3	2,71
	DMMP	187	56	0,4	1,47
	PMPA	517	386	3,0	6,89

Taulukon perusteella retentiotekijöissä tai erotustekijöissä ei havaita suuria muutoksia verrattuna edellisiin testeihin. Retentio stationäärifaasiin on kuitenkin hieman vähäisempää kaikilla yhdisteillä. Neutraalissa pH:ssa fosfonihapot ovat anionisessa muodossaan. Ionisoituneen molekyylin retentio stationäärifaasiin on todennäköisesti vähäisempää kuin neutraalin, polaari- sen molekyylin. Kuva 24 havainnollistaa tilannetta. LC-NMR -grammi on mitattu käytetyissä olosuhteissa ajoliuoksen komponenttien suhteella 60/40.

LC-gram., 1D HP HSQC: I77HTK27 (1mg/ml MPA, EMPA, PMPA, DMMP)  
in CH<sub>3</sub>CN+H<sub>2</sub>O; 080402-7535, 60/40 H<sub>2</sub>O/ACN, 1 ml/min



Kuva 24. LC-NMR -grammi (1D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC) olosuhteissa isokraattinen H<sub>2</sub>O/ACN (60/40), 1 ml/min: grammiin on merkitty yhdisteiden NMR-retentioajat piikkien huipukohdissa.

Kuvasta havaitaan, että LC-NMR -grammin laatu on heikentynyt olennaisesti verrattuna testiin 1. EMPA:n signaali on pirstaloitunut ja piikki on hyvin leveä. Grammi on epäselvä ja EMPA:n NMR-retentioajan määrittäminen vaikeaa. LC-NMR -grammin laadun on oltava hyvä, jotta piikien poiminta-aikojen määrittäminen myöhemmissä testeissä olisi mahdollista.

## Testi 3

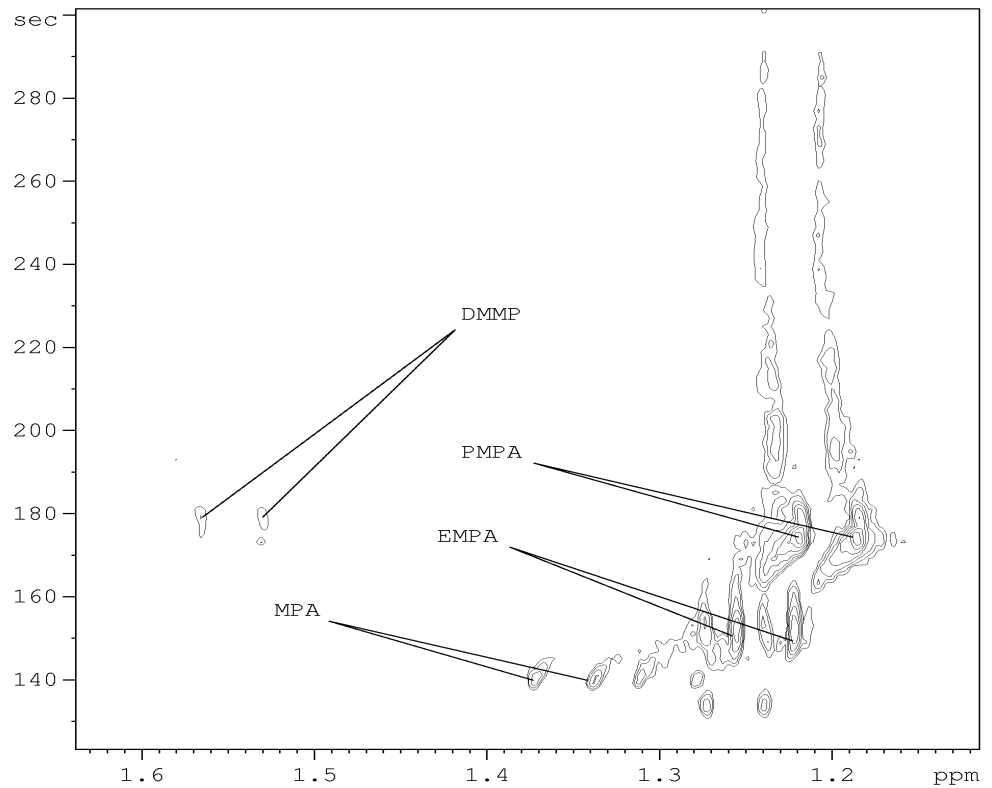
Tulokset olosuhteissa 10 mM asetaattipuskuri/ACN on kuvattu taulukossa 12.

Taulukko 12. LC-NMR -grammien perusteella lasketut kromatografiset parametrit olosuhteissa 10 mM asetaattipuskuri/ACN, 1ml/min

pH = 4,5		tr NMR (s)	t'r NMR (s)	k	$\alpha$
60/40	MPA	139	8	0,1	
	EMPA	149	18	0,1	2,25
	DMMP	169	38	0,3	2,11
	PMPA	167	36	0,3	1,06
65/35	MPA	141	10	0,1	
	EMPA	153	22	0,2	2,20
	DMMP	179	48	0,4	2,18
	PMPA	173	42	0,3	1,14
70/30	MPA	145	14	0,1	
	EMPA	155	24	0,2	1,71
	DMMP	183	52	0,4	2,17
	PMPA	179	48	0,4	1,08
75/25	MPA	141	10	0,1	
	EMPA	151	20	0,2	2,00
	DMMP	183	26	0,4	2,60
	PMPA	191	60	0,5	1,15
80/20	MPA	143	12	0,1	
	EMPA	153	22	0,2	1,83
	DMMP	187	56	0,4	2,55
	PMPA	209	78	0,6	1,39

Taulukosta havaitaan, että PMPA:n retentioajat ovat selvästi huonommat kuin happamissa ja neutraaleissa olosuhteissa tehdyissä testeissä ja yhdiste erottuu huonommin DMMP:sta kuin aikaisemmissa testeissä. Erottuminen paranee hiukan korkeassa vesipitoisuudessa. MPA:n ja EMPA:n erotustekijät ovat näissä testeissä huonommat kuin testeissä 1 ja 2. Kuva 25 havainnollistaa tilannetta.

LC-gram., 1D HP HSQC: I77HTK27 (1mg/ml MPA, EMPA, PMPA, DMMP)  
in CH<sub>3</sub>CN+H<sub>2</sub>O; 080404-7548, 65/35 10 mM Acetic buffer/ACN, 1 ml/min



Kuva 25. LC-NMR -grammi ( $1D\ ^1H\text{-}^{31}P\text{ HSQC}$ ) mallikemikaalien 1 mg/ml seosvesinäytteestä ajo-olosuhteissa 10 mM ammoniumasetaattipuskuri/ACN (65/35), 1 ml/min.

Kuvasta havaitaan PMPA:n signaalin voimakas venyminen. DMMP:n signaali näkyy LC-NMR -grammissa huonosti ja yhdiste eluoituu päällekkäin PMPA:n kanssa. MPA:n ja EMPA:n signaalit näyttävät jakaantuneen kahteen osaan. Tämä vaikeutti NMR-retentioaikojen määrittystä. On mahdollista, että osa ionisoituneista fosfonihappo-molekyyleistä on muodostanut ionipareja ajoliuoksen ammoniumionien kanssa. Tämä havaitaan grammissa piikin jakaantumisena.

Nestekromatografisten olosuhteiden optimointitulosten perusteella parhaimmat olosuhteet mallikemikaalien MPA, EMPA, DMMP ja PMPA erotukseen seosnäytteestä saavutettiin, kun ajoliuoksena käytettiin hapanta 0,1% HCOOH/ACN -yhdistelmää.

Arvioimalla tuloksia ja LC-NMR –grammien laatua ajoliuoksen eri komponenttisuhteilla päädyttiin valitsemaan jatkotesteihin ajoliuos, jossa muura-haishapon ja asetonitriliin seossuhde on 70/30.

## 6.6 Fraktion siirron optimointi

Mallikemikaalien siirto näytesilmukoista SPE-patruunaan optimoitiin määrittämällä systeemiaika, joka kului yhden näytefraktion siirtämiseen näytteenkeräysyksikön näytesilmukasta SPE-patruunaan kokonaisuudessaan. Siirtovaihe optimoitiin LC-SPE -menetelmän testausta varten. Testeissä käytettiin nestekromatografia näytteenkeräysyksiköllä yhdistettynä SPE-systeemiin (kuva 20). Indikoivana yhdisteenä käytettiin UV-aktiivista metyylliviolettiä ja injektioilavuutta 50 µl. Siirrossa käytettiin ajoliuoksena UHQ-vettä. Fraktion siirtoa testattiin SPE-testein mallikemikaaleilla MPA, EMPA, DMMP ja PMPA. Testeissä käytettiin optimoituja nestekromatografisia olosuhteita. Uutossa käytettiin pientä patruunaformaattia (Prospekt) ja aikaisemmin optimoituja olosuhteita (luku 6.4). Eluoinnissa käytettiin deuteroitua liuosta (1% NH<sub>4</sub>OH MeOH<sub>4</sub>/D<sub>2</sub>O (1/1)) NMR-näytteiden valmistuksen helpottamiseksi (lukkoydin <sup>2</sup>H). Mittaukset suoritettiin ilman kolonnia ja näytteiden pitoisuudet määritettiin NMR-spektrometrillä käyttäen 1.7 mm:n mikronäyteyksikköä ja 1D <sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P HSQC NMR -spektrejä.

### 6.6.1 Siirtoaika

Metyyllivioletin UV-retentioajaksi stabiileissa olosuhteissa määritettiin 0,38 min. Retentioaikaa käytettiin metyyllivioletin piikin poimintaan ja 5 perättäistä injektiota poimittiin perättäisiin näytesilmukoihin. Tämän jälkeen määritettiin keskimääräinen aika, joka kuluu metyyllivioletti-fraktion siirtämiseen näytesilmukasta siirtokapillaarin päähän, eli käytännössä SPE-patruunan alkupäähän. Siirto käynnistettiin nestekromatografian ohjelmistolla ja ajanotto aloitettiin samalla käyttäen sekuntikelloa. Kun värillinen metyylliviolettifraktio saapui kapillaarin päähän, ajanotto pysäytettiin. Viiden siirron keskiarvona siirtoaikaksi saatiin 11 s.

Näytesilmukan laskennallinen täyttyminen/tyhjentyminen tilavuudessa 250 µl kestää noin 15 s virtausnopeudella 1 ml/min. Siirtoaikaan lisättiin 2 s silmukan tyhjentymisen varmistamiseksi. Fraktion siirtämiseen näytesilmukasta SPE-patruunaan kului siis kokonaisuudessaan 17 s + 11 s = 28 s.

### 6.6.2 SPE-testit

Fraktion siirtoa testattiin kullekin mallikemikaalille erikseen. Yhdisteille valmistettiin omat 1 mg/ml liuokset 0,1% HCOOH/ACN -liuokseen (70/30). Kusakin testissä näyteliuosta injektoidiin 50 µl nestekromatografian injektoriin ja siirrettiin näytesilmukkaan metyyli violetin poiminta-ajalla 0,38 min.

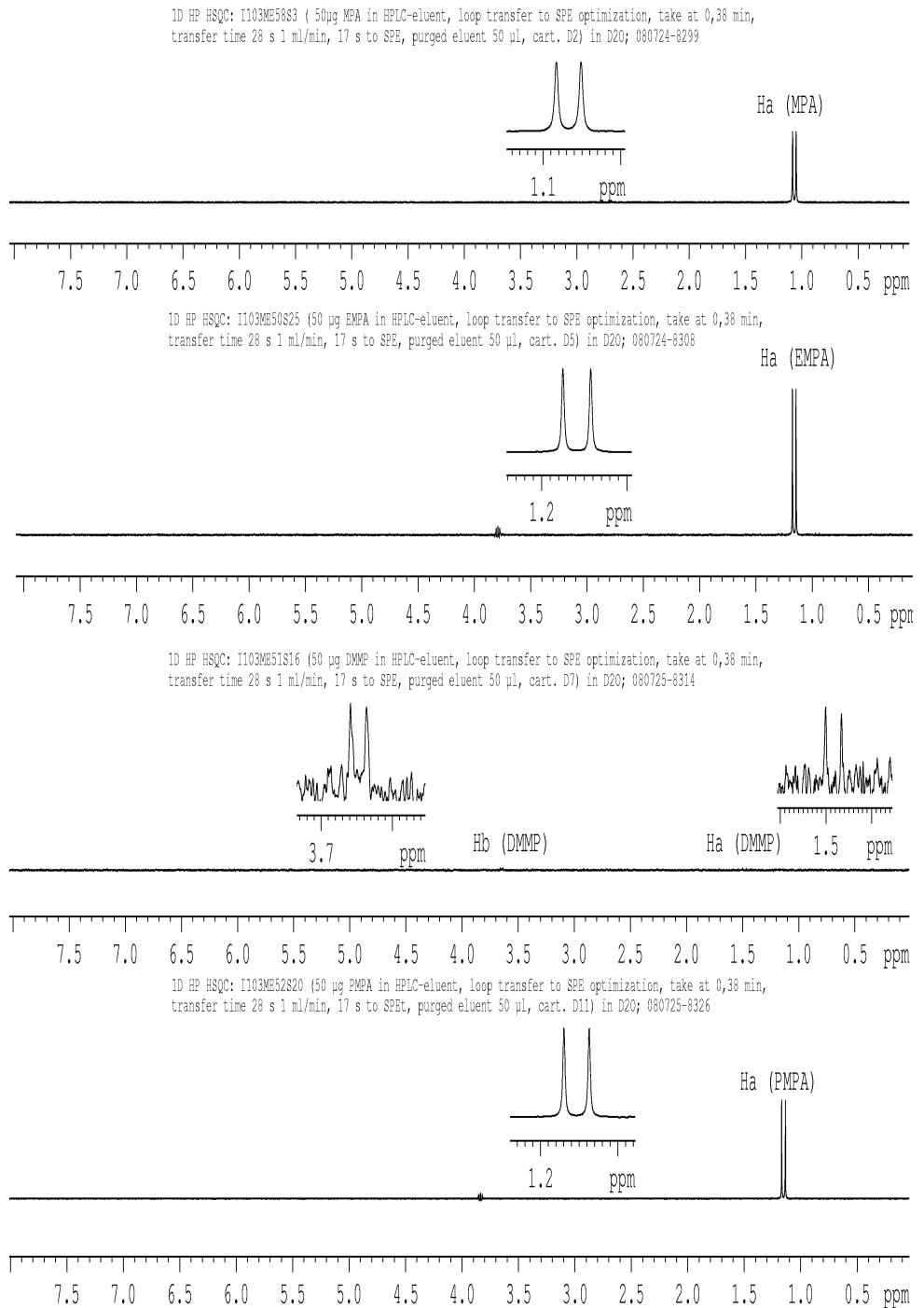
Fraktion siirtoa testattiin suorittamalla kolme rinnakkaismäärittystä/yhdiste. Prospekt-patruunat kunnostettiin ennen testien suoritusta käyttäen erillistä LC-pumppua. Kunnostuksessa patruunaan ohjattiin automatisoidusti metanolia 1 minuutin ajan ja 50 mM NH<sub>4</sub>Ac:a 2 minuutin ajan virtausnopeudella 1 ml/min. Nestekromatografian mittaussparametreihin tallennettiin siirtoaika 28 s ja fraktio siirrettiin näytteenkeräisyksiköstä kunnostettuun sorbenttiin ohjaamalla näytevirtaus patruunaan 17 s:n ajan. Siirron jälkeen adapteri irrotettiin systeemistä ja kiinnitettiin statiivin kouraan. SPE-patruunan adapterin yläpäähän kiinnitettiin typpikaasulinja ja sorbentti kuivattiin noin 1,5 bar:in paineessa muutaman sekunnin ajan. Tämän jälkeen adapteri käännettiin ylösalaisin (virtaussuunnan vastaisesti) ja sorbenttiin siirretty yhdiste uutettiin 50 µl:lla eluenttia. Sorbentti kuivattiin edellä kuvatulla tavalla ja uute kerättiin talteen kapeakaulaiseen mikronäytepulloon. Uutteiden tilavuudet mitattiin Hamilton-ruiskulla ja näytteistä valmistettiin 30 µl:n NMR-näytteet 1.7 mm:n NMR-putkiin. Näytteille valmistettiin omat referenssinäytteet siirtämällä 20 µl kantaliuosta ja 10 µl D<sub>2</sub>O:a 1.7 mm:n NMR-putkeen. Saantokokeiden tulokset mittaussparametreineen on esitetty taulukossa 13.



Taulukko 13. Fraktion siirron testaus mallikemikaaleille MPA, EMPA, DMMP ja PMPA injektioilavuudessa 50  $\mu$ l: taulukkoon on koottu pitoisuusmääritykseen käytetyt mittausparametrit. Injektoidun näytteen analyytimassa oli 50  $\mu$ g. Tilavuudella tarkoitetaan uutetun näytteen lopullista tilavuutta. Konsentraatio kuvaa analyytin konsentraatiota uutteen tilavuudessa ja saantoprosentti analyytin massaa uutetussa näytteessä suhteessa injektoituun analyytimassaan.

Analyytti	V ( $\mu$ l)	$I_{havaittu}$	$I_{korjattu}$	c ( $\mu$ g/ $\mu$ l)	Saanto-%
MPA	42	0,3961	0,3982	0,29	24
MPA	42	1,3176	1,3312	0,97	81
MPA	40	1,2245	1,2383	0,92	74
EMPA	43	1,6583	1,6651	1,24	107
EMPA	42	1,7283	1,7354	1,27	107
EMPA	41	1,8020	1,8094	1,32	108
DMMP	43	0,0122	0,0122	0,01	1
DMMP	38	0,0121	0,0121	0,01	1
DMMP	40	0,0167	0,0167	0,01	1
PMPA	43	1,3524	1,3580	1,01	87
PMPA	42	1,4410	1,4461	1,08	91
PMPA	40	1,4331	1,4390	1,07	85

Taulukosta havaitaan, että fraktion siirto näytteenkeräysyksiköstä SPE-patruunaan onnistui hyvin fosfonihappojen osalta. Parhaimmat saannot saatiin EMPA:lla, jonka saanto-%:t olivat yli 100%. PMPA:n ja MPA:n saannot olivat hiukan huonommat, mutta kuitenkin hyväksyttävällä tasolla. MPA:n alhainen saanto ensimmäisessä siirtokokeessa (24%) selittynee mittauskohtaisena nestekromatografian toiminnan häiriönä. Jo ikääntyneen laitteiston venttiilijärjestelmä osoitti aika ajoin toimintansa epävakauden. Esimerkiksi-spektrit (1D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC) kullekin analyytille on esitetty kuvassa 26. Kuvaan on merkitty pitoisuusmääritykseen käytetyt metyyliiryhmien protonien  $\text{H}_a$  resonanssit. Signaalit on levitetty spektriin.



**Kuva 26.** 500 MHz:n  $1D\ ^1H\text{-}^{31}P$  HSQC-spektrit 1 mg/ml MPA:n, EMPA:n, DMMP:n ja PMPA:n 0,1% HCOOH/ACN-liuoksesta (70/30): fraktion siirto näytesilmukasta sorbenttiin testattiin kullekin mallikemikaalille erikseen injektioilavuudessa 50 µl ja pitoisuudessa 1 mg/ml kolmena rinnakkaisena määrittämisnä. Kuvassa on esitetty esimerkkispektri kunkin yhdisteen mittaussarjasta. Kvantitointiin käytetyt mallikemikaalien  $H_a$ -resonanssit on merkitty kuvaan.

## 6.7 LC-SPE -testit

Mallikemikaalien piikin poiminta-ajat määritettiin LC-SPE -menetelmän testausta varten. Koska yhdisteet eivät ole UV-aktiivisia tai aktiivisuus on hyvin vähäistä, ei nestekromatografian UV-detektoria voitu käyttää piikin poiminta-aikojen määrittämiseen. Tämän vuoksi poiminta-aikojen määrittämisessä käytettiin NMR-spektrometriä nestekromatografian detektorina ja mittauksissa LC-NMR –sovelluksia sekä 1D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC -tekniikkaa.

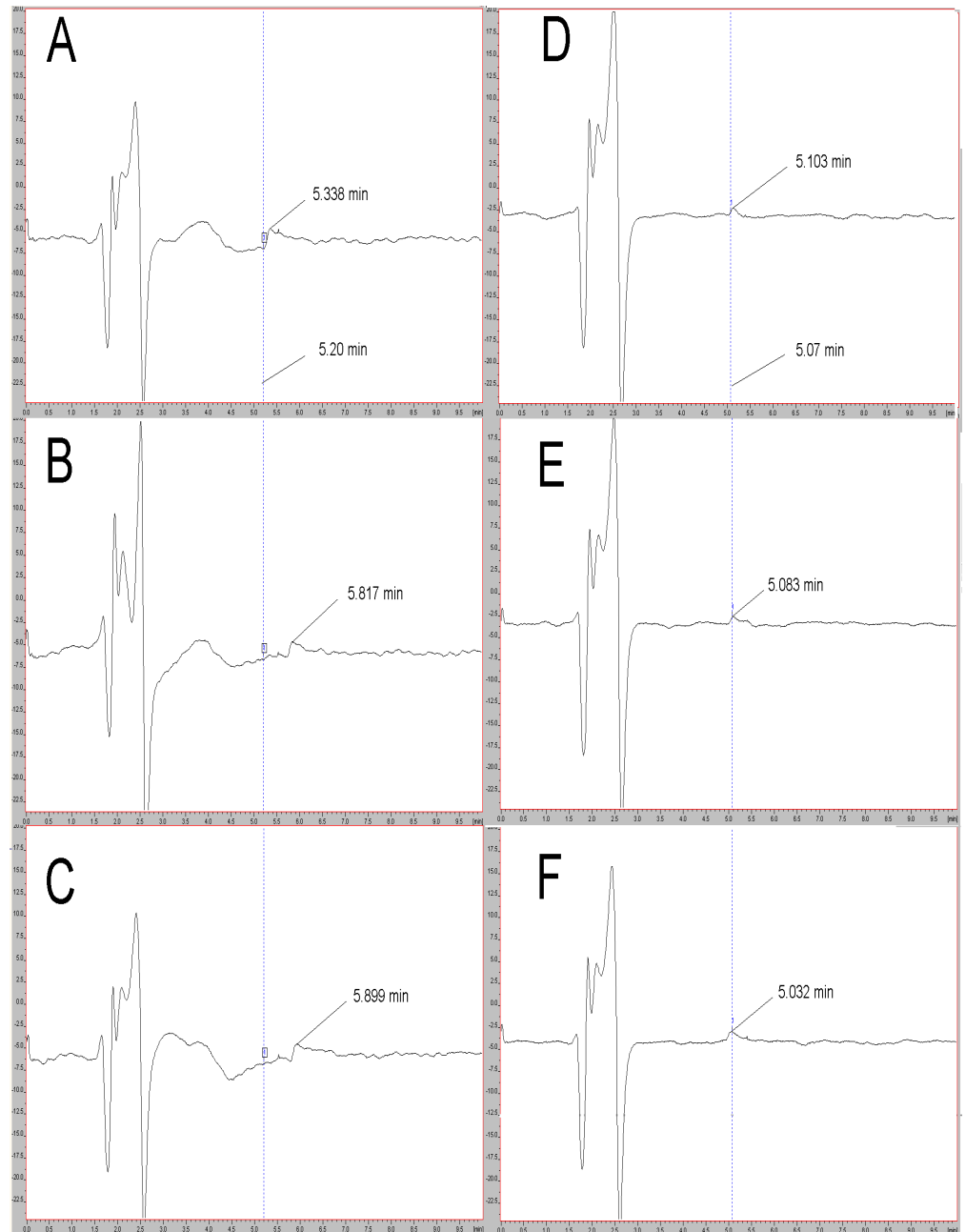
### 6.7.1 PMPA:n piikin poiminta-aika

Ennen piikin poiminta-aikojen määrittämistä tutkittiin nestekromatografisen erottumisen toistettavuus ajamalla useita LC-NMR –ajoja ja tutkimalla LC-NMR –grammeista yhdisteiden NMR-retentioaikoja. Lukuisista yrityksistä huolimatta PMPA:n NMR-retentioajasta ei saatu toistettavaa. Tutkittaessa mitattuja LC-NMR -grammeja havaittiin, että PMPA:n retentioajan vaihtelu on jatkuvaa, kun taas pienempien organofosforiyhdisteiden kromatografinen erottuminen on riittävän toistettavaa. Syyksi PMPA:n NMR-retentioajan vaihteluun epäiltiin jo ikääntyneen HPLC-laitteen heikentyneitä toimintoja. Isokraattisessa ajossa kahden tai useamman käytetyn ajoliuoksen komponentin tulee sekoitua pumpun sekoituskammiossa niin hyvin, että ajoliuoksen koostumus säilyy muuttumattomana koko ajon ajan. Ajoliuoskoostumuksen muuttuminen vaikuttaa suoraan yhdisteen kromatografiaan. Vähäisen retentionsa vuoksi pienet mallikemikaalit MPA, EMPA ja DMMP eluoituvat lähes samanaikaisesti liuotimpiikin kanssa, jolloin ajoliuoksen homogeenisuudella ei ole merkittävää vaikutusta näiden yhdisteiden kromatografiseen erottumiseen. Sen sijaan myöhään eluoituvalla PMPA:lla retentio stationäärifaasiin on paljon suurempi, jolloin ajoliuoksen homogeenisuuden merkitys korostuu.

Tutkimalla seosnäytteiden kromatogrammeja ja vertaamalla niitä LC-NMR -grammeihin havaittiin kromatogrammien pohjaviivassa pieni piikki niillä poiminta-ajoilla, joilla PMPA:n näyrefraktio poiminta näytesilmukkaan oli onnistunut. Piikin paikka kromatogrammissa vaihteli suhteessa PMPA:n NMR-retentioaikaan. Havainnot olivat säännönmukaisia ja pienen piikin epäiltiin aiheutuvan PMPA:n heikosta UV-absorbtiosta.

Pumpun vaikutus kromatografiseen erottumiseen eliminoitiin valmistamalla valmiiksi sekoitettu eluentiyhdistelmä käyttäen 0,1% HCOOH:n D<sub>2</sub>O-liuosta ja ACN:ä seossuhteessa 70/30. Kromatografisten olosuhteiden stabiilius varmistettiin ajamalla useita perättäisiä ajoja seosnäytettä kolonniin ja tutkimalla pienen piikin retentioaikaa kromatogrammien perusteella. Kun piikin retentioaika saatiin toistettavaksi, tässä vaiheessa vielä tuntematon yhdiste eluoitui retentioajalla 5,07 min. Myöhemmissä testeissä piikki varmistui PMPA:n piikiksi.

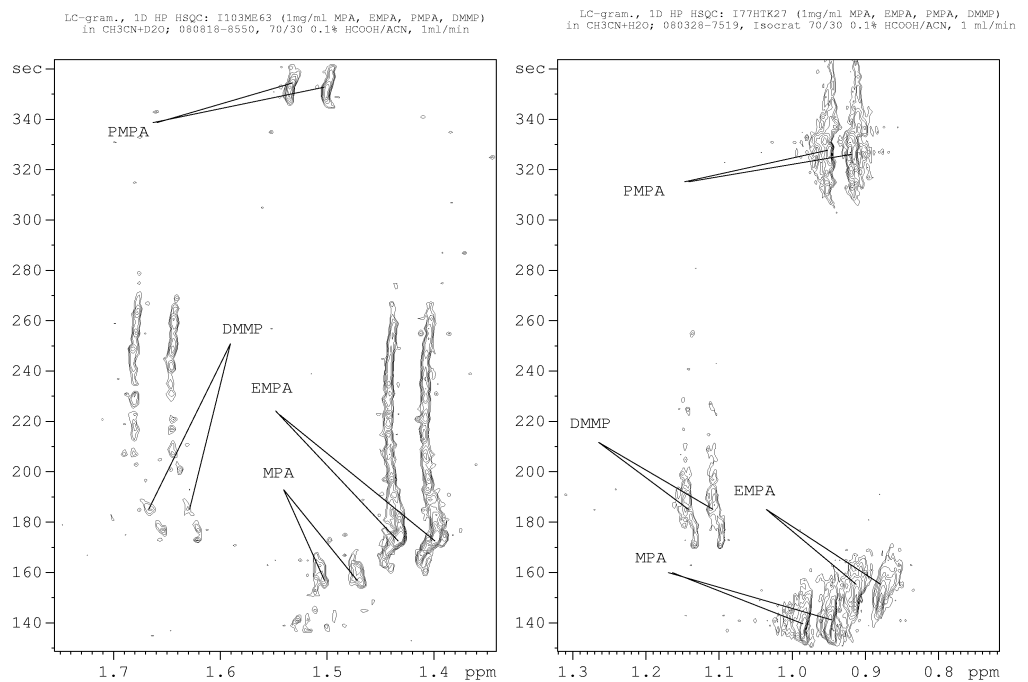
PMPA:n UV-retentioajan määrittämistä havainnollistava kromatogrammien sarja on esitetty kuvassa 27. Kuvan vasen puoli edustaa tilannetta, jossa kromatogrammit on ajettu olosuhteissa, joissa ajoliuoksen komponenttien sekoitus tapahtui pumpun sekoituskammiossa. Oikean puolen kromatogrammeissa seosnäytteen kromatogrammit on ajettu valmiiksi sekoitetulla eluentiyhdistelmällä pumpun vaikutuksen eliminoimiseksi. Viiva, joka leikkaa kromatogrammit, osoittaa kulloinkin käytetyn PMPA:n piikin poiminta-ajan. PMPA:n piikin retentioajat on merkitty kuvaan. Kuvasta havaitaan selvästi, kuinka PMPA:n retentioaika muuttuu, kun eluentiyhdistelmän komponentit sekoitetaan pumpun sekoituskammiossa. Erotus poiminta-ajan ja piikin huippukohdan välillä on näissä olosuhteissa enimmillään noin 42 s. Kun poimittavan alueen pituus on 15 s, on selvää, että yhdistettä ei pystytty poimimaan silmukkaan käytetyllä poiminta-ajalla 5,20 min. Kuvassa oikealla esitetyissä kromatogrammeissa käytetty piikin poiminta-aika oli 5,07 min, jolloin ero PMPA:n piikin huippukohdan ja poiminta-ajan välillä on enimmillään 2 s. Ero on riittävän pieni toistettavaan piikin poimintaan; kahden sekunnin vaihtelu ei vaikuta merkittävästi analyysin takaisinsaanto-%:in. LC-SPE –testejä varten PMPA:n piikin poiminta-ajaksi valittiin onnistuneiden testien perusteella 5,07 min.



*Kuva 27. Kromatografisten olosuhteiden vaikutus myöhemmin eluoituvan PMPA:n retentioaikaan: kuvissa A - C on käytetty pumpun sekoittamaa eluenttiyhdistelmää. Perättäisissä ajoissa pienen piikin retentioaika muuttuu merkittävästi piikin poiminta-ajatellen. Kuvissa D - F on käytetty valmiiksi sekoitettua eluenttiyhdistelmää. Tällöin PMPA:n retentioaika on riittävän toistettava piikin poiminta varten. Pystyviiva leikkaa kromatogrammit piikin poiminta-ajan kohdalla. PMPA:n retentioajat on merkitty kuvaan. Ero kromatogrammeja leikkaavan viivan ja piikin huippukohdan välillä havainnollistaa piikin poiminnan tarkkuutta.*

### 6.7.2 MPA:n, EMPA:n ja DMMP:n piikin poiminta-ajat

Piikin poiminta-aikojen määrittämisessä havaittiin toinenkin määrittästä vaikeutava ongelma. Mitatuissa LC-NMR -grammeissa havaittiin erotuskyvyn heikentyminen; varsinkin MPA:n ja PMPA:n signaalit näkyivät vain osittain. Nestekromatografisten olosuhteiden optimoinnin yhteydessä mitatuissa LC-grammeissa laatu oli selvästi parempi (luku 6.5.). Tilannetta havainnollistaa kuva 28, jossa on esitetty kaksi LC-NMR -grammia. Kuvassa vasemmanpuoleinen grammi on uudempi ja siinä eluentin vesikomponentissa on käytetty D<sub>2</sub>O:a. Oikeanpuoleinen grammi on mitattu vastaavissa olosuhteissa, mutta siinä ajoliuoksen vesikomponentti on deuterioimaton. Nämä mittaukset suoritettiin käyttäen pumppua ajoliuoksen komponenttien sekoitukseen.



Kuva 28. LC-NMR -grammit ( $1D\ ^1H\text{-}^{31}P\ HSQC$ ) ajo-olosuhteissa 0,1% HCOOH D<sub>2</sub>O-liuoksessa/ACN (70/30) 1 ml/min (vasen) ja 0,1% HCOOH/ACN (70/30) 1 ml/min (oikea): ajo-olosuhteet eroavat ainoastaan eluentin osalta, joka vasemmanpuoleisessa LC-grammissa on deuterioitu. NMR-retentioajat vasemman puolen grammissa ovat 157 s (MPA), 173 s (EMPA), 185 s (DMMP) ja 353 s (PMPA). Oikean puolen grammissa NMR-retentioajat ovat 142 s (MPA), 153 s (EMPA), 185 s (DMMP) ja 327 s (PMPA).

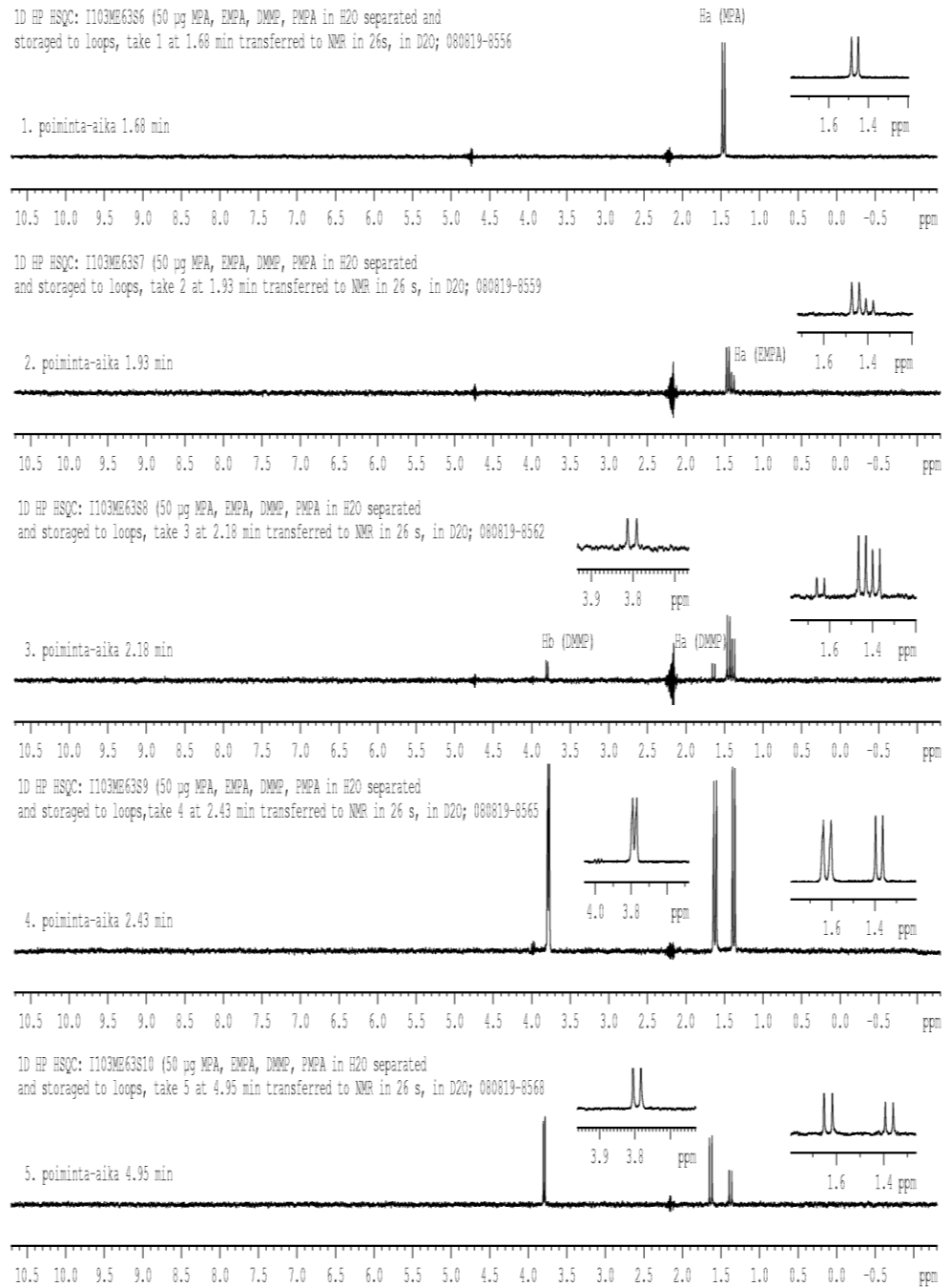
Kuvasta havaitaan, että uudemmassa LC-NMR -grammissa (vasen) signaalit näkyvät vain osittain. Tämä vaikeutti NMR-retentioaikojen määrittystä huomattavasti. Vanhemmassa grammissa (oikea) signaalit sen sijaan näkyvät hyvin ja piikit eluotuvat terävämmin. Osittain näkyvät signaalit voivat johtua magneettikentän epähomogeenisuuksista, jotka syntyvät kun analyyttifraktiot saapuvat NMR-spektrometrin virtausnäytekyvetin aktiiviselle alueelle. Tällöin osa signaalista voidaan menettää. Magneettikenttä oli viritetty optimaaliseksi deuterioitua ajoliuosta käyttäen, joten näyteliuottimena käytetty vesi saattoi pilata virityksen saapuessaan kyvetiin. Deuteroidun vesikomponentin käyttö ajoliuoksessa saattoi osaltaan vaikuttaa yhdisteiden kromatografiseen erottumiseen.

Testien suoritusta varten arvioitiin systeemiaika, joka kuluu näytteen etenemiseen UV-detektorilta NMR-detektorille. Systeemiaika määritettiin virtausnopeudelle 1 ml/min. Systeemiajan määrittämisessä käytettiin indikoivana yhdisteenä UV-aktiivista trimetoksibentseeniä (5 mg/ml), jolla on UV-absorptio maksimi aallonpituudella 280 nm. Systeemiaika määritettiin kolmena rinnakkaisena LC-NMR -ajona (jatkuva virtaus:  $^1\text{H}$  NMR). Ajoparametrit on esitetty luvussa 6.3.1. Taulukon 4 tiedoista poiketen kokeessa käytettiin lukkoytimenä deuteriumia. Ajot suoritettiin nestekromatografisissa olosuhteissa 40/60  $\text{D}_2\text{O}/\text{ACN}$  ja injektioilavuudessa 50  $\mu\text{l}$ . LC-NMR -grammien perusteella määritettiin trimetoksibentseenin NMR-retentioaika ja kromatogrammien perusteella yhdisteen UV-retentioaika. Systeemiaika laskettiin edellisten erotukseksi ( $t_{\text{NMR}} - t_{\text{UV}}$ ) ja kolmen mittauksen keskiarvoksi saatiin 26 s.

Pienten organofosforyyhdisteiden MPA, EMPA ja DMMP piikkien poiminta-ajat määritettiin keräämällä näytteenkeräysikköön joukko fraktioita eri poiminta-ajoilla. Poiminta-aikojen määrittämisessä käytettiin apuna vanhempaa LC-NMR -grammia ja määritettyä systeemiaikaa UV-detektorilta NMR-detektorille (26 s). LC-NMR -grammista arvioitiin yhdisteiden NMR-retentioajat, joista vähennettiin 26 s. Näin arvioidut poiminta-ajat asetettiin nestekromatografian ohjelmistoon piikin poimintaa varten.

Kussakin testissä nestekromatografisesti erotetut yhdisteet poimittiin asetuilla poiminta-ajoilla näytteenkeräysyksikön näytesilmukoihin. Silmukoiden analyttisisällöt tutkittiin ohjaamalla fraktioita yksitellen NMR-spektrometrin virtausnäytekyvettiin ja ajamalla fraktioista spektrit (mittausparametrit on kuvattu taulukossa 5). Kustakin ajetusta spektristä tutkittiin mitä yhdistettä fraktio sisälsi ja kuinka paljon käyttäen 1D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC -spektrejä. Tarkkaa pitoisuusmäärittystä ei kuitenkaan tehty. Analyyttien integraaleja verrattiin kunkin testisarjan suurimman intensiteetin omaavaan resonanssiiviivaan. Tällä perusteella saatiin tietoa piikin poiminta-ajan tarkkuudesta. Poiminta-aikoja optimoitiin tulosten perusteella edelleen toistamalla testit korjatuilla poiminta-ajoilla. Näin toimien saatiin määritettyä yhdisteille optimaaliset piikin poiminta-ajat. MPA:lle määritettiin poiminta-aika 1,72 min. EMPA ja DMMP eluotuvat samassa fraktiossa ja niille määritettiin poiminta-aika 2,41 min. Näillä poiminta-ajoilla saatiin toistettavuudeltaan riittäviä tuloksia ja niitä käytettiin LC-SPE -testeissä. Esimerkkispektrit piikin poiminta-aikojen määrittämisestä on esitetty kuvassa 29.





Kuva 29. 500 MHz:n 1D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC-spektrit (LC-NMR: näytteenkeräysyksikkö) mallikemikaalien MPA, EMPA, DMMP ja PMPA 1mg/ml seosvesinäytteestä: Spektrejä hyödynnettiin MPA:n, EMPA:n ja DMMP:n piikin poiminta-aikojen määrittämiseksi. Intensiivisin fraktio (DMMP) saatiin poiminta-ajalla 2,43 min ja samassa fraktiossa eluoitui suurin osa EMPA:sta. DMMP:n  $\text{H}_a$ -protonien dublettia käytettiin muiden spektrien resonanssiivivojen integraalien suuruuksien arviointiin. Suurin osa MPA:n fraktiosta eluoituu käytetyllä poiminta-ajalla 1,68 min. Tarkkaa kvatitointia ei tehty.

### 6.7.3 LC-SPE -menetelmän testaus

LC-SPE -testien tarkoitus oli tutkia menetelmän toimivuus mallikemikaalien selektiiviseen konsentroiintiin käyttäen NMR-spektrometriä näytteiden kvantitoinnissa. Näytteiden rikastusmahdollisuudet tutkittiin LC-SPE -testein, joissa useita nestekromatografisesti eroteltuja analyttifraktioita siirrettiin samaan patruunaan eluointitilavuuden säilyessä samana. Yhdisteiden takaisinsaannot määritettiin NMR-spektrometrin 1.7 mm:n mikronäyteyksiköllä. Testit suoritettiin optimoiduissa nestekromatografisissa olosuhteissa käyttäen injektio-tilavuutta 50 µl. Ajoliuoksessa käytettiin deuterioitua vesikomponenttia. Uuton vaiheet suoritettiin optimoiduissa olosuhteissa ja pienellä patruunaformaattilla, kuten on kuvattu luvussa 6.6.2. Näytteenä käytettiin MPA:n, EMPA:n, DMMP:n ja PMPA:n 1 mg/ml seosvesinäytettä.

LC-SPE -testien suorittamista varten injektioitiin kuusi perättäistä 50 µl:n seosvesinäytettä kromatografian injektoriin. Seosnäytteet erotettiin komponenteikseen ja kerättiin näytesilmukoihin optimoiduilla poiminta-ajoilla 1,72 min (MPA), 2,41 min (EMPA, DMMP) ja 5,07 min (PMPA). Fraktiot siirrettiin kunnostettuihin patruunoihin käyttäen UHQ-vettä ajoliuoksena ja optimoitua siirtoaikaa 28 s, josta 17 s:n ajan virtaus ohjattiin kunnostettuun patruunaan. Siirtoja tehtiin 1 - 3 yhdistettä ja patruunaa kohden. Yhdisteet eluoiitiin ja uutteista valmistettiin NMR-näytteet 1.7 mm:n NMR-putkiin. Näytteiden pitoisuudet määritettiin käyttäen 1D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC -tekniikkaa ja referenssinäyteitä, joiden valmistus on kuvattu luvussa 6.6.2. Testien tulokset on esitetty taulukossa 14.

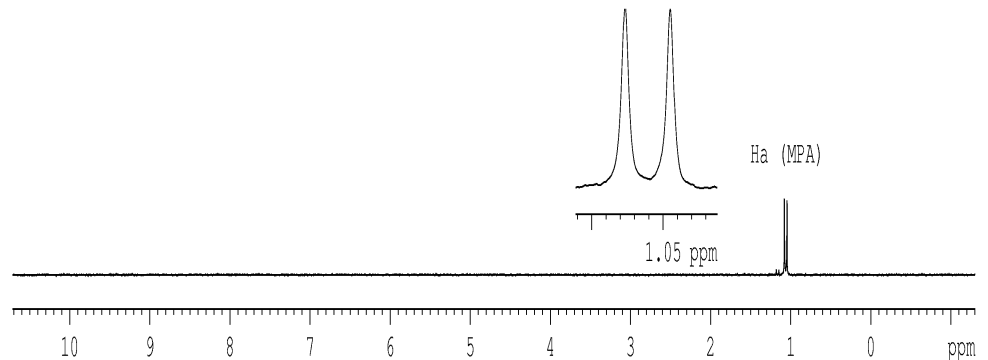
Taulukko 14. LC-SPE -testien tulokset: testeissä siirrettiin 1 - 3 kromatografisesti erotettua analyttifraktiota/patruuna. Kromatografisessa erotuksessa käytettiin injektio-tilavuutta 50 µl, jolloin SPE-patruunaan yhdellä kertaa siirretty analyttimassa oli enintään 50 µg. Pitoisuusmääritys suoritettiin 1D <sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P HSQC -kokeiden perusteella. Integraalit on korjattu kaavalla 5 ja konsentraatiot kaavalla 6. Tilavuus kuvaa uutetun näytteen tilavuutta ja konsentraatio analyysin pitoisuutta uutteen tilavuudessa. Saanto-% kuvaa takaisin saadun analyttimassan suhdetta injektioituun analyttimassaan.

Injektoitu m (µg)	Analyytti	Poiminta-aika (min)	V (µl)	I <sub>havaittu</sub>	I <sub>korjattu</sub>	c (µg/µl)	Saanto-%
1 x 50	MPA	1,72	42	0,6714	0,6789	0,49	41
2 x 50	MPA	1,72	41	1,3159	1,3294	0,97	40
3 x 50	MPA	1,72	42	2,1116	2,1334	1,50	42
1 x 50	EMPA	2,41	42	0,9173	0,9211	0,64	54
2 x 50	EMPA	2,41	41	2,1418	2,1506	1,52	62
3 x 50	EMPA	2,41	44	3,3112	3,3230	2,30	67
1 x 50	DMMP	2,41	42				
2 x 50	DMMP	2,41	41	0,0653	0,0653	0,05	2
3 x 50	DMMP	2,41	44	0,0524	0,0524	0,04	1
1 x 50	PMPA	5,07	42	0,8471	0,8501	0,57	48
2 x 50	PMPA	5,07	42	1,5267	1,5330	1,05	44
3 x 50	PMPA	5,07	42	2,1124	2,1199	1,45	41

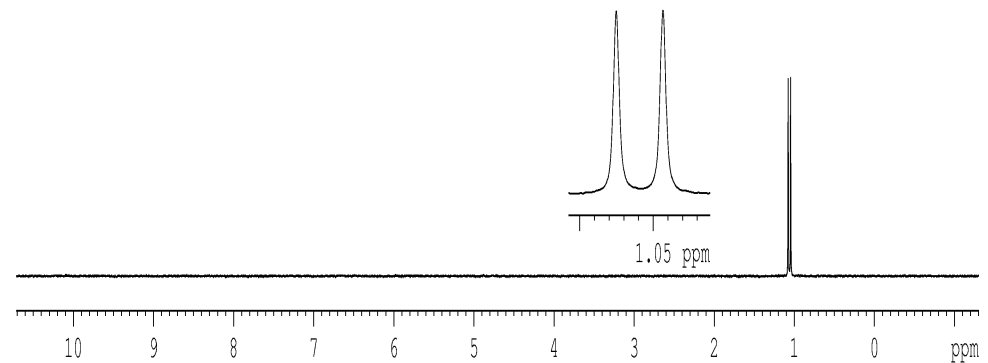
Tulokset vaikuttivat lupaavilta MPA:n, EMPA:n ja PMPA:n osalta. Kuten aikaisemmin on jo todettu, käytetty sorbenttimateriaali ei sovellu dimetyylifosfonaatin (DMMP) konsentroituihin. Muiden yhdisteiden saannot sijoittuvat 40% - 67%:n välille. Sorbenttimateriaalin soveltuvuus näille fosfonihapoille todennettiin kiinteäfaasiuuton optimoinnin yhteydessä. Merkittävää ennenaikaista eluoitumista ei ole havaittavissa; saantoprosentit eivät laske, kun suoritetaan useita siirtoja peräkkäin.

Saantoprosentin pienuus johtuu suurelta osin yhdisteiden huonosta kromatografiasta, jonka seurauksena näyterintamat levenevät eikä piikkejä saada poimittua kokonaisina näytesilmukoihin. Saantoa tärkeämpi parametri menetelmän käyttökelpoisuuden mittarina on kuitenkin konsentraatio, joka on suoraan verrannollinen NMR-signaalin intensiteettiin. Konsentraatio kasvaa, kun suoritetaan useampia siirtoja/patruuna. Tilannetta havainnollistaa kuva 30.

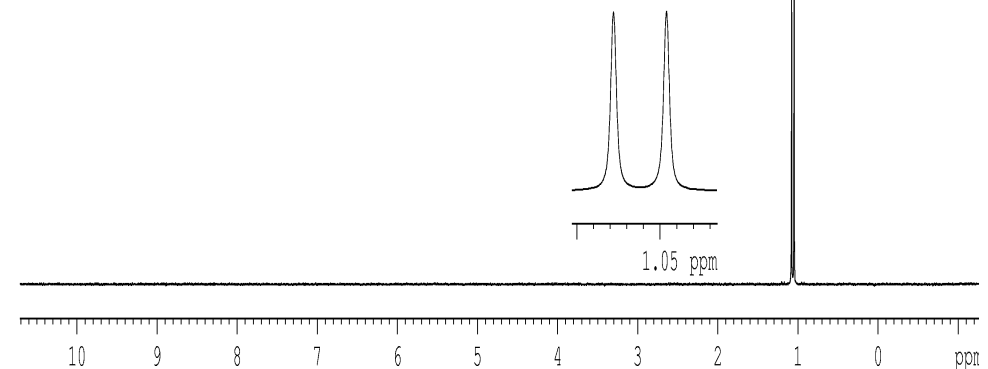
1D HP HSQC: I103ME63S32 (LC-separation and loop transfer to SPE, 50 µg MPA, take at 1.72 min 1 ml/min, loop transfer to SPE in H2O 1 ml/min, transfer time 28 s, 17 s to SPE, cartridge F5) in D2O; 080826-8638



1D HP HSQC: I103ME63S35 (LC-separation and multitraping to SPE, 2 x 50 µg MPA, take at 1.72 min 1 ml/min, loop transfer to SPE in H2O 1 ml/min, transfer time 28 s, 17 s to SPE, cartridge F8) in D2O; 080826-8647



1 D HP HSQC: I103ME63S38 (LC-separation and multitraping to SPE, 3 x 50 µg MPA, take at 1.72 min 1 ml/min, loop transfer in H2O 1ml/min, transfer time to SPE 17 s, cartridge F11) in D2O; 080826-8656



**Kuva 30.** 500 MHz:n  $1D\ ^1H\text{-}^{31}P$  HSQC-spektrit metyylifosfonihaposta (MPA): neste-kromatografisesti erotetut MPA-fraktiot siirrettiin SPE-patruunaan ja konsentroidiin. Mallikemikaalien seosvesinäyte (1 mg MPA, EMPA, DMMP, PMPA) erotettiin neste-kromatografisesti komponenteikseen injektioilavuudessa 50 µl. MPA-fraktiot poimitiin näytesilmukoihin ajan hetkellä 1,72 min ja siirrettiin yhdestä kolmeen fraktiota sorbenttiin/testi. Ylimmässä spektrissä sorbenttiin siirrettiin yksi fraktio, jolloin enimmäisanalyyttipitoisuus oli 50 µg. Tästä saatiin takaisin 20,5 µg. Keskimmaisessä spektrissä sorbenttiin siirrettiin kaksi MPA:n fraktiota, jolloin analyytin enimmäismäärä oli 100 µg. Tästä saatiin takaisin 40% eli 60 µg. Alimmassa spektrissä sorbenttiin siirrettiin kolme fraktiota eli 150 µg MPA:a, josta takaisin saatiin 63 µg. MPA:n  $H_a$ -resonanssin intensiteetin kasvu osoittaa näytteen rikastumisen.

## 7 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimuksen tavoitteena oli tutkia LC-SPE -menetelmän käyttömahdollisuuksia NMR-spektrometrisessä analyysissä hajoamistuotteiden seosnäytteenanalytiikassa. Tutkimus toteutettiin vaiheittain ja tekniikan käyttökelpoisuus testattiin NMR-spektrometrillä saantokokeiden avulla. Tuloksissa keskityttiin tekniikan toimivuuden testaamiseen.

Yleisiä hermokaasujen hajoamistuotteita ovat fosfonihapot, jotka ovat pieniä, polaarisia yhdisteitä. Kemikaalien UV-aktiivisuus on vähäistä tai sitä ei ole lainkaan. Fosfonihappojen MPA, EMPA ja PMPA lisäksi mallikemikaaleihin valittiin dimetyylimetyylifosfonaatti (DMMP), jota syntyy tuhoamisliuoksissa hermokaasujen hajoamisen yhteydessä välituotteena ja taistelukasujen synteesissä sivutuotteena.

Fosfonihappojen uutossa aminopropyylisorbentilla ( $\text{NH}_2$ ) saatiin hyviä tuloksia ja analyyttien takaisinsaannot lähentelivät 100 %:a optimoiduissa olosuhteissa. Käytetty sorbentti ei soveltunut DMMP:n kiinteäfaasiuuttoon. Tämän vuoksi yhdisteen rikastaminen käytetyllä LC-SPE -menetelmällä ei ole mahdollista ja myöhemmissä testeissä keskityttiin optimoimaan olosuhteita erityisesti fosfonihapoille.

Nestekromatografisten olosuhteiden optimoinnissa ongelmia tuotti yhdisteiden huono kromatografia. Huono erottuminen selittyy useiden tekijöiden summana. Fosfonihappoja ei pystytty saattamaan täysin neutraaliin muotoon nestekromatografisen erottumisen aikana johtuen yhdisteiden  $\text{pK}_a$ -arvoista ( $\sim 2$ ) ja kolonnille soveltuvasta pH-alueesta (2 – 8). Tästä johtuen osa fosfonihapoista oli ajon aikana ionisoituneessa muodossaan, minkä seurauksena yhdisteiden polaariset vuorovaikutukset kolonnin stationäärifaasiin eivät olleet optimaalisella tasolla. Kromatografiaan saattoi vaikuttaa myös analyytin suuri määrä injektioinnissa, mikä mahdollisesti aiheutti piikkien levenemistä. Piikkien leveys puolestaan aiheutti ongelmia piikkien poiminnassa näytesilmukoihin.

Yhdisteiden huono kromatografinen erottuminen johtuu osaltaan käytetystä näyteliuottimesta (vesi), jossa analyytit injektoidiin kolonniin. Optimaalisissa olosuhteissa näyteliuotin vastaa käytetyn eluutin koostumusta ja yhdisteiden kromatografinen erottuminen olisi voinut onnistua paremmin, jos näytteet olisi injektoitu kolonniin ajoliuoksessa. Tehokkaampaan kromatografiaan olisi voitu päästä myös käyttämällä gradienttiajoa. Tämä ei kuitenkaan ollut mahdollista NMR-spektrometrinen vaatimusten vuoksi LC-NMR -menetelmässä.

Ongelmia LC-NMR -menetelmän käytössä tuottivat huonolaatuiset LC-NMR -grammit piikin poiminta-aikojen määrittämisessä. Näissä testeissä LC-NMR -grammien huono laatu saattoi johtua käytetystä deuteroidusta ajoliuoksesta ja näyteliuottimena käytetystä vedestä. Tällä yhdistelmällä saatiin laadultaan huonoimmat LC-NMR -grammit. On mahdollista, että virtausnäytekyvetin mittausalueelle saapuva liuotinpää pilasi optimaaliseksi viritetyn magneettikentän homogeenisuuden, jolloin osa näytesignaaleista menetettiin. Deuteroidun ajoliuoksen käyttö yhdistettynä näyteliuottimena käytettyyn veteen saattoi osaltaan vaikuttaa myös yhdisteiden kromatografiaan. Menetelmän kehityksen kannalta yhdisteet kuitenkin erottuivat riittävästi. DMMP:n ja EMPA:n päällekkäisestä eluotumisesta ei ollut haittaa, koska menetelmä ei soveltunut DMMP:n konsentroitumiseen  $\text{NH}_2$ -sorbentilla.

Yhdistelmätekniikan LC-SPE-NMR -testauksessa tutkittiin mahdollisuutta rikastaa näytteitä selektiivisesti osittain automatisoidulla kiinteäfaasiuutolla. Sorbenttimateriaalin soveltuvuus käytetyille fosfonihapoille oli todettu hyväksi, mutta silti saannot rikastustesteissä jäivät verrattain alhaisiksi. Yhdellä siirrolla saavutettiin takaisinsaannot 41%:sta 54%:n. Alhaiset saannot johtuivat useista eri tekijöistä. Huonon kromatografisen erottumisen seurauksena analyyttien piikit olivat leveitä, jolloin fraktioita ei saatu poimittua näytesilmukoihin kokonaisuudessaan. Tämä lienee suurin syy saantojen tippumiseen. Saantojen vaihtelu saattoi johtua myös vaikeudesta määrittää tarkka piikin poiminta-aika, kun UV-detektoria ei voitu käyttää yhdisteiden detektointiin. Piikin poiminta-aikojen määrittäminen NMR-detektorilla vaikeutui entisestään LC-NMR -grammien huonon laadun vuoksi. Ikääntyneen laitteiston toiminnan epävakaudesta ja vaihtelut erottumisessa vaikuttivat osaltaan menetelmän tarkkuuteen.

Näytteiden konsentroidi kuitenkin onnistui. Kun siirrettiin useita analyyttifraktoita samaan patruunaan, kasvoivat kaikkien fosfonihappojen (MPA, EMPA, PMPA) konsentraatiot.

LC-NMR -menetelmän käyttö piikin poiminta-aikojen määrittämisessä hankaloittaa yhdistelmätekniikan käyttöä taisteluaineanalytiikassa. Kun työskennellään jäämätasolla, ongelmia saattavat aiheuttaa myös LC-NMR -menetelmän NMR-spektrometriset vaatimukset. Nestekromatografinen erotus suosii pieniä ainemääriä kolonnin kyllästymisen estämiseksi. NMR-spektrometrin käyttö detektorina sen sijaan vaatii huomattavasti suuremman analyttimassan. Tässä tutkimuksessa esitettyä LC-SPE -menetelmää ei myöskään voida suoraan soveltaa kaikille hermokaasujen hajoamistuotteille, vaan menetelmä tulee optimoida ja validoida kullekin yhdisteelle erikseen sekä kiinteäfaasiuuton, että nestekromatografisen erotuksen osalta.

Tässä tutkimuksessa esitetyn yhdistelmätekniikan LC-SPE soveltuvuus fosfonihappojen selektiiviseen rikastukseen NMR-spektrometristä analyysiä varten pystyttiin todentamaan käytännössä. Menetelmän käyttö NMR-spektrometrisessä seosnäyteanalytiikassa helpottaa olennaisesti yhdisteiden tunnistusta ja pitoisuusmäärittystä. Useimmat tutkimuksen aikana havaituista ongelmista voidaan korjata yksinkertaisin toimenpitein ja menetelmää kehitetään tällä tavoin edelleen. Menetelmän kehitystyötä tullaan jatkamaan laitoksella ja tutkimustuloksia hyödynnetään myös uusien menetelmien kehityksessä taisteluaineiden tunnistamiseksi.

**VIITELUETTELO**

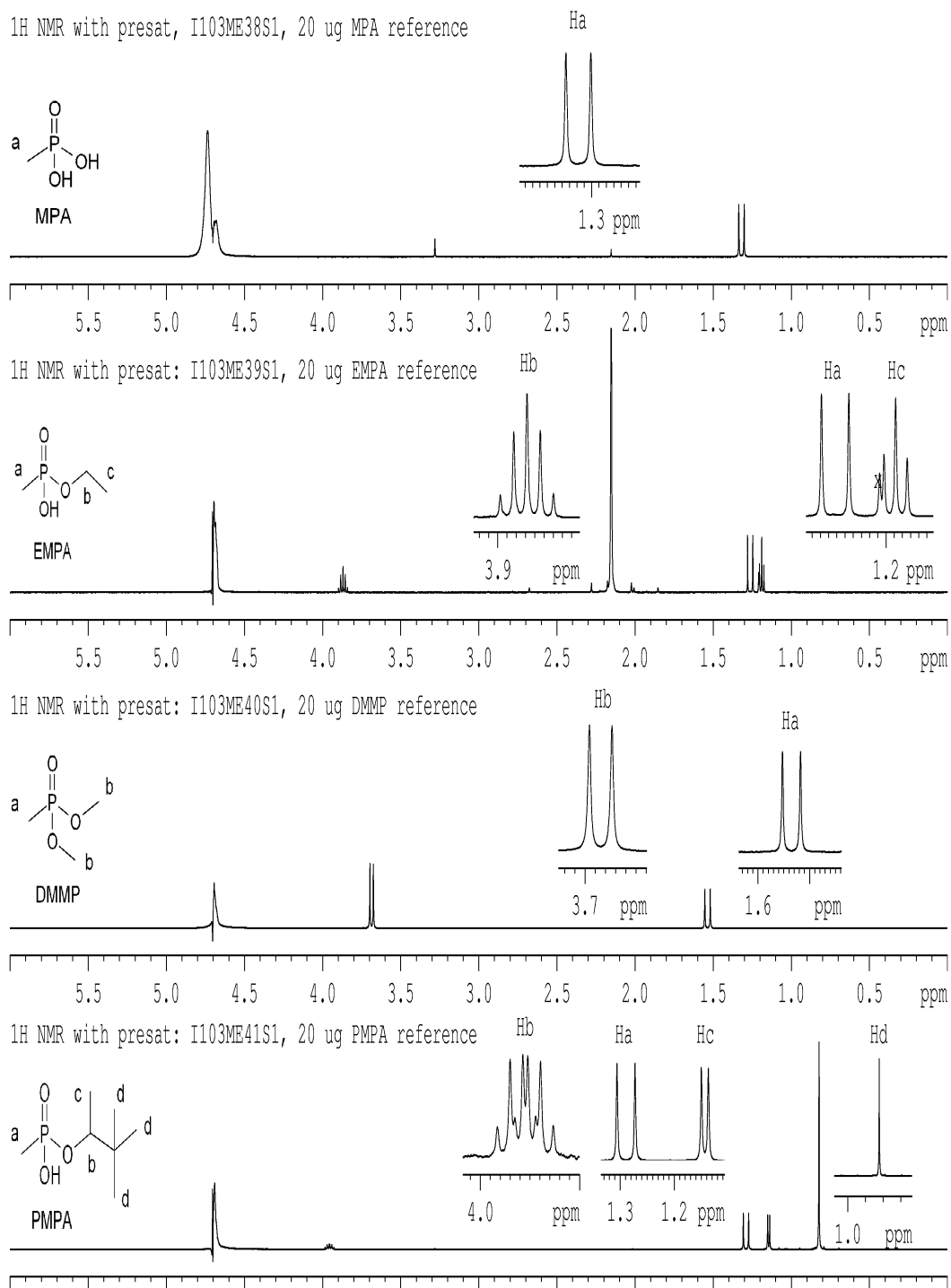
- [1] Ivarsson, Ulf; Nilsson, Helena; Santesson, Johan, Ed. *A Foa Briefing book on Chemical Weapons – Threat, Effects and Protection, no 16*. Ljungföretagen, Örebro: 1992. Tilattavissa: FOA, 17290 Sundbyberg, Sweden
- [2] *Convention on The Prohibition of the Development, Production, Stockpiling and Use of Chemical Weapons and on Their Destruction*. Corrected version in accordance with Depository Notification C.N.246.1993. TREATIES-5 and the corresponding Procés-Verbal of Rectification of the Original of the Convention, 1994.
- [3] Organization for the Prohibition of Chemical Weapons (OPCW) 1996 - 2008. *OPCW Member States* [verkkodokumentti], päivitetty 9.10.2008 [viitattu 27.10.2008].  
Saataavissa: <http://www.opcw.org/>
- [4] Kemiallisen aseiden kieltosopimuksen valvontalaitos (VERIFIN) [verkkodokumentti]. 2005 [viitattu 27.10.2008].  
Saataavissa: <http://www.helsinki.fi/verifin/VERIFIN/suomi/index.html>
- [5] Rautio, M.; Ed. *Methodology and Instrumentation for Sampling and Analysis in the Verification of Chemical Disarmament; H.1 First Interlaboratory Comparison Test 1994; H. Interlaboratory Comparison Test Coordinated by the Provisional Technical Secretariat for the Preparatory Commission for the Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons*. Helsinki: The ministry for Foreign Affairs of Finland 1994.
- [6] Yang, Y.- C.; Baker, J. A.; Ward, J. R. *Chem. Rev.* **1992**, 92, 1729 - 1743
- [7] Hooijschuur, E. W. J.; Kientz, C. E.; Brinkman, U. A. Th. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 982, 177 - 200
- [8] Kientz, Ch. E. *J. Chromatogr. A* **1998**, 814, 1 - 23



- [9] Black, R. M.; Muir, B. *J. Chromatogr. A* **2003**, 1000, 253 – 281
- [10] Black, R. M.; Read, R. W. *J. Chromatogr. A* **1997**, 759, 79 – 92
- [11] Black, R. M.; Read, R. W. *J. Chromatogr. A* **1998**, 794, 233 – 244
- [12] Keeler, James, *Understanding NMR Spectroscopy*. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd 2005.
- [13] Mesilaakso, M.; Tolppa, E. – L. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 2313 - 2318
- [14] Meier, U. C. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 392 - 398
- [15] Albaret, C.; Loeillet, D.; Fortier, P. - L. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 2694 - 2700
- [16] Koskela, H.; Grigoriou, N.; Vanninen, P. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 3715 – 3722
- [17] Akitt, J. W.; Mann, B. E., *NMR and Chemistry – An introduction to modern NMR spectroscopy*. Fourth edition. Cheltenham: Stanley Thornes Publishers Ltd: 2000 (1973).
- [18] Friebolin, Horst, *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*. Second, enlarged edition. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH 1993.
- [19] Williams, Dudley H.; Fleming Ian, *Spectroscopic methods in organic chemistry*, Fourth edition. Berkshire, England: McGRAW-HILL Book Company (UK) Limited 1987 (1966).
- [20] Pauli, G. F.; Jaki, B. U.; Lankin, D. C. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 133 - 149

- [21] Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512 - 7515
- [22] OPCW [3], *Analytical Database*, version 8. Dec. 2004.
- [23] Butler, Eamon, Ed. Avance<sup>tm</sup> – Beginners guide, version 003. Germany: Bruker Biospin GmbH 2003.
- [24] Henderson, T. J. *Anal Chem.* **2002**, *74*, 191 - 198
- [25] Miyata, Y.; Ando, H. *J. Health Sci.* **2001**, *47* (1), 75 – 77
- [26] Koskela, H.; Rapinoja M.-L.; Kuitunen M.-L., Vanninen, P. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 9098 - 9106
- [27] Burton, I. W.; Guillian, M. A.; Walter, J. A. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3123 – 3131
- [28] Albert, Klaus, Ed. *On-line LC-NMR and Related Techniques*. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd 2002.
- [29] Hoult, D. I.; Richards, R. E. *J. Magn. Reson.* **1976**, *24*, 71-85
- [30] Sohda, K.; Minematsu, t.; Hashimoto, T.; Suzumura, K.; Funatsu, M.; Suzuki, K.; Imai, H.; Usui, T.; Kamimura, H. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 1322 - 1325
- [31] Mistry, N.; Ismail, I. M.; Smith, M. S.; Nicholson, J. K.; Lindon, J. C. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, *16*, 697 - 705
- [32] Cardoza, L. A.; Cutak, B. J.; Ketter, J.; Larive, C. K. *J. Chromatogr. A*, **2004**, *1022*, 131 – 137

- [33] Keifer, P. A., *Flow Techniques in NMR Spectroscopy*, Annual Reports on NMR Spectroscopy Vol. 62, 1 - 47. Elsevier Ltd: 2007.
- [34] Reddy, Jagadeshwar, T.; Saradhi, Vijaya, U. V. R.; Prabhakar, S.; Vairamani, M. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1038*, 225 – 230
- [35] Analytichem International, Inc., *Sorbent Extraction Technology Handbook*. Harbor City, USA: 1985.
- [36] Tornes, J. Aa.; Johnsen, B.A. *J. Chromatogr. A* **1989**, *467*, 129 - 138
- [37] WebMD, eMedicine, *CBRNE – Nerve agents, G-series: Tabun, Sarin, Soman* [on-line tietokanta]. 1996 – 2008, päivitetty 8.7.2008 [viitattu 19.8.2008].  
Saatavissa: <http://www.emedicine.com/emerg/topic898.htm>
- [38] WebMD, eMedicine, *CBRNE – Nerve agents, V-series: VE, VG, VM, VX* [on-line tietokanta]. 1996 – 2008, päivitetty 19.12.2007 [viitattu 19.8.2008].  
Saatavissa: <http://www.emedicine.com/emerg/topic899.htm>
- [39] Larsson, L. *Acta Chem. Scand.* **1957**, *11*, 1131 - 114
- [40] Yang, Y.-C.; Szafraniec, L.L.; Beaudry, W.T.; Rohrbaugh, D.K.; Procell, L.R.; Samuel, J.B. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8407 - 8413
- [41] Wils, E.R.J.; Hulst, A.G. *J. Chromatogr. A* **1988**, *454*, 261 - 272



Kuva 1. Mallikemikaalien MPA, EMPA, DMMP ja PMPA resonanssit 500 MHz:n  $^1\text{H}$  NMR -spektrissä (liuottimen signaali vaimennettu): kuvaan on merkitty yhdisteiden rakenteet ja  $^1\text{H}$ -resonanssit on levitetty spektriin. EMPA:n spektrissä tripletin vieressä on epäpuhtaus, joka on merkitty ruksilla.