

Pro Gradu

Kemian FM

Materiaalikemia

2019

Valtteri Stenroos

DESINFEKTIOTUOTTEEN AKTIIVIAINEIDEN  
KVANTITATIIVISEN ANALYYSIMENETELMÄN  
KEHITYS

– Pro Gradu



**TURUN  
YLIOPISTO**

# TURUN YLIOPISTO

Kemian laitos

Stenroos Valtteri

Desinfektio tuotteen aktiiviaineiden kvantitatiivisen analyysimenetelmän kehitys

Pro Gradu

63 s., 5 liite s.

Kemia FM

05/2019

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Erikoistyön aiheena oli desinfektio tuotteen aktiiviaineiden kvantitatiivisen analyysimenetelmän kehitys. Tutkimus tehtiin suomalaisen yrityksen, KiiltoClean Oy, eräälle desinfektio tuotteelle. Kokeellisessa työssä verrattiin eri menetelmien soveltuvuuksia aktiiviaineiden kvantitatiivissa analyyseissä. Vertailussa kokeillut menetelmät olivat valittu kirjallisuudesta etsittyjen tutkimusten pohjalta. Nämä menetelmät olivat titraus, NMR, HPLC-MS, TLC sekä fluoresenssi. Tutkielmassa keskitytään aktiiviaineiden, triamiini ja kvaternäärinen ammoniumkloridi, sekä menetelmien teorioihin. Lopussa on kerrottu erikoistyön suorituksesta, keskeisimmistä tuloksista ja työn johtopäätelmistä.

Näytteiden valmistukset ja titraukset suoritettiin yrityksen laadunvalvontalaboratoriossa. Muiden menetelmien suorituspaikkana toimi Turun yliopiston kemian laitoksen laboratoriotilat. Tuotteen aktiiviaineiden analyysitulokset olivat hyvin lähellä teoreettisia arvoja kaikilla analyysimenetelmillä. Muiden valmistettujen näytteiden kohdalla oli toisinaan suurehkoja poikkeamia, mikä saattoi johtua siitä, että näiden näytteiden osalla aktiivianepitoisuudet olivat lineaarisen mittausalueen ulkopuolella. Näytteen 1 osalta voidaan sanoa, että useampi mahdollisesti soveltuva analyysimenetelmä onnistuttiin löytämään. Näistä lupaavimmat olivat HPLC-MS- ja fluoresenssimenetelmät. Menetelmät vaativat kuitenkin vielä jatkokehitystä, sillä niiden toistettavuudet ja tarkkuudet sekä lineaariset alueet olisi määritettävä.

Asiasanat

Kvaternäärinen ammoniumkloridi, triamiini, KiiltoClean, desinfektio tuote, titraus, NMR, HPLC-MS, TLC, fluoresenssi

# SISÄLTÖ

1 Johdanto	6
2 Aktiiviaineet	8
2.1 Triamiini	8
2.2 Kvaternäärinen ammoniumkloridi	9
3 Titraus	11
3.1 Hapan titraus	11
3.2 Emäksinen titraus	12
4 NMR	13
4.1 Ytimien spintilat	13
4.2 Absorption mekanismi (resonanssi)	14
4.3 NMR-kokeen suoritustapa	14
4.4 Kemiallinen siirtymä	15
4.5 Intensiteetit	17
4.6 Spin-spin-kytkytyminen	17
4.7 Kvantitatiivinen NMR	18
5 Kromatografia	20
5.1 Erotusmekanismi	20
5.2 Ohutkerroskromatografia	21
5.2.1 Teoria ja periaate	21
5.2.2 Adsorbentit	22
5.2.3 Näytteiden applikointi	23
5.2.4 Kehitys	23
5.2.5 Erotettujen komponenttien havaitseminen	24
5.3 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia	25
5.3.1 Kolonni	25
5.3.2 Eluentit	27
5.3.3 Detektorit	27

5.3.4 Kvalitatiivinen ja kvantitatiivinen analyysi	28
6 Massaspektrometria	29
6.1 Näytteensyöttö	29
6.2 Ionisaatiotekniikat	30
6.3 Massa-analysaattori	31
6.4 Detektori	32
7 Fluoresenssi	33
7.1 Spektrofluorometrit	33
7.2 Valonlähde	34
7.3 Monokromaattori	35
7.4 Valomonistinputki	36
7.5 Fluorofori	36
7.6 Aikaerotteinen fluoresenssi	39
8 Erikoistyö	40
8.1 Työ	40
8.1.1 Titraus	40
8.1.2 NMR	45
8.1.3 HPLC-MS	48
8.1.4 Fluoresenssi	52
8.1.5 TLC	56
8.2 Tulokset	58
9 LOPPUPÄÄTELMÄT	60
10 VIITELUETTELO	62

## **LIITTEET**

Liite 1. Liuosten valmistus

Liite 2. Mittausten parametrit

# KUVAAJAT

Kuvaaja 1. TA standardisuora.....	42
Kuvaaja 2. Hapantitrausten TA-pitoisuuksien poikkeama-% näytteittäin.....	43
Kuvaaja 3. DDAC standardisuora.....	44
Kuvaaja 4. Emästitrausten DDAC-pitoisuuksien poikkeama-% näytteittäin.....	45
Kuvaaja 5. Näytteen 1 <sup>1</sup> H-NMR-spektri. Vasemmalta oikealle integroidut piikit lueteltuna: 1,3,5-trioksaani, DDAC ja kaksi TA piikkiä. ....	46
Kuvaaja 6. Aktiiviaineiden poikkeama-% näytteissä kvantitatiivisessa NMR-analysissä.....	48
Kuvaaja 7. DDAC standardisuora 1:100 000–1:10 000 laimennoksilla.....	50
Kuvaaja 8. TA standardisuora 1:80 000–1:5 000 laimennoksilla.....	50
Kuvaaja 9. TA-piikki ( <i>vas.</i> ) ja DDAC-piikki ( <i>oik.</i> ) 1:80 000 standardilaimennoksessa kvantitatiivisessa analysissä.....	52
Kuvaaja 10. Näytteiden aktiiviaineiden poikkeama-% HPLC-MS-menetelmällä.....	52
Kuvaaja 11. TA standardisuora 1:8 000-1:800 laimennoksilla.....	54
Kuvaaja 12. DDAC standardisuora näytteistä 1–3.....	55
Kuvaaja 13. Aktiiviaineiden poikkeama-% näytteittäin fluoresenssimenetelmällä.....	55
Kuvaaja 14. Aktiiviaineiden poikkeama-% vertailu näytteessä 1 menetelmittain.....	59

# KUVAT

Kuva 1. Sähkömagneettisen säteilyn osa-alueet [1].....	7
Kuva 2. Triamiini.....	8
Kuva 3. Kvaternäärinen ammoniumkloridi.....	8
Kuva 4. Dimidiumbromidi.....	12
Kuva 5. Disulfiinin sininen VN 150.....	12
Kuva 6. Hyamiini 1622.....	12
Kuva 7. Natriumdodekyylisulfaatti.....	12
Kuva 8. Bromifenolisininen.....	12
Kuva 9. <sup>1</sup> H-NMR kemiallisia siirtymiä (δ) [1].....	17
Kuva 10. Europiumkelaatin viritys- ja emissiospektrit [24].....	38
Kuva 11. Fluoreskamiinin reaktio primäärisen amiinin kanssa [26].....	38
Kuva 12. Fluoreskamiinin ja primäärisen amiinin reaktion viritys- ja emissiospektrit [26].....	38
Kuva 13. Happaman titrauksen vaiheet: a) alku-, b) väli- ja c) päätepiste.....	41
Kuva 14. Emäksisen titrauksen vaiheet: a) alku- ja b) päätepiste.....	43
Kuva 15. Standardilaimennosten valmistaminen näytteestä 1.....	49
Kuva 16. Näytelaimennosten valmistaminen, 1,5 ml eppendorffputkissa ( <i>vas.</i> ) ja 10 ml mittapulloissa ( <i>oik.</i> ).....	49
Kuva 17. Standardilaimennosten valmistaminen näytteestä 1.....	53
Kuva 18. Näytelaimennosten valmistaminen.....	53
Kuva 19. Näytelaimennosten valmistus.....	56
Kuva 20. Raaka-ainelaimennosten valmistus.....	56
Kuva 21. DDAC TLC-levy.....	57
Kuva 22. Näytelaimennosten valmistus.....	58
Kuva 23. Raaka-ainelaimennosten valmistus.....	58
Kuva 24. TA TLC-levy.....	58

# TAULUKOT

Taulukko 1. Pascalin kolmio [15].	18
Taulukko 2. Näytteiden 1–5 kokonaismassat, tiheydet, lasketut tilavuudet ja pH-arvot.	40
Taulukko 3. Standardien titrauskulutukset (ml), keskiarvot ja hajonnat.	41
Taulukko 4. Happaman titrauksen TA poikkeama-% standardeissa.	41
Taulukko 5. Näytteiden titrauskulutukset (ml), keskiarvot ja hajonnat.	42
Taulukko 6. Näytteiden 1–5 happaman titrauksen TA poikkeama-%.	42
Taulukko 7. Titrantin titrauskulutukset (ml), keskiarvot ja hajonnat standardeissa.	43
Taulukko 8. Emäksisen titrauksen DDAC pitoisuudet standardeissa.	44
Taulukko 9. Titrantin kulutukset, keskiarvot ja hajonnat näytteittäin.	44
Taulukko 10. Näytteiden 1–5 happaman titrauksen DDAC poikkeama-%.	44
Taulukko 11. 1,3,5-trioksaanin ainemäärä näyteputkissa.	45
Taulukko 12. DDAC piikin 3,15 ppm siirtymän integraalit.	46
Taulukko 13. TA piikin 2,55 ppm siirtymän integraalit.	46
Taulukko 14. TA piikin 2,35 ppm siirtymän integraalit.	47
Taulukko 15. DDAC-pitoisuudet ja poikkeama-% näytteittäin.	47
Taulukko 16. TA-pitoisuudet ja poikkeama-% näytteittäin (2,55 ppm).	47
Taulukko 17. TA-pitoisuudet ja poikkeama-% näytteittäin (2,35 ppm).	47
Taulukko 18. Gradienttiohjelma molemmille aktiiviaineille.	49
Taulukko 19. Standardilaimennosten DDAC piikkien pinta-alat.	49
Taulukko 20. Standardilaimennosten TA piikkien pinta-alat.	50
Taulukko 21. Näytelaimennosten DDAC piikkien pinta-alat.	51
Taulukko 22. Näytteiden DDAC-pitoisuudet ja poikkeama-%.	51
Taulukko 23. Näytelaimennosten TA piikkien pinta-alat.	51
Taulukko 24. Näytteiden TA-pitoisuudet ja poikkeama-%.	51
Taulukko 25. Standardilaimennosten intensiteetit fluoreskamiinimittauksessa.	53
Taulukko 26. Näytteiden intensiteetit fluoreskamiinimittauksessa.	54
Taulukko 27. Näytteiden TA pitoisuudet ja poikkeama-%.	54
Taulukko 28. Näytteiden intensiteetit Eu-mittauksessa.	55
Taulukko 29. Näytteiden DDAC pitoisuudet ja poikkeama-%.	55
Taulukko 30. Pisteiden kulkemat matkat (cm) ja $R_f$ -arvot DDAC-analyysissä	57
Taulukko 31. Pisteiden kulkemat matkat (cm) ja $R_f$ -arvot TA-analyysissä	58
Taulukko 32. Kvantitatiivisten analyysimenetelmien yhteenveto.	61
Taulukko 33. Manuaalisessa NMR-mittauksessa käytetyt komennot ja niiden selitykset.	66
Taulukko 34. NMR-mittauksen parametrit.	66
Taulukko 35. HPLC-MS-mittauksen parametrit.	67
Taulukko 36. Fluoresenssimenetelmän parametrit, fluoreskamiini.	67
Taulukko 37. Fluoresenssimenetelmän parametrit, Eu-mittaus.	68

## KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO

ACN	Acetonitrile, asetonitriili
atm	Atmospheric pressure, ilmakehän paine
D <sub>2</sub> O	Deuterium oxide, deuteriumoksidi
DDAC	<i>N,N</i> -didecyl- <i>N,N</i> -dimethyl ammonium chloride, <i>N,N</i> -didekyyli- <i>N,N</i> -dimetyyli ammoniumkloridi
DMSO	Dimethyl sulfoxide, dimetyylisulfoksidi
eV	Electronvolt, elektronivoltti
FID	Free Induction Decay, vapaan induktion heikentyminen
FT	Fourier Transform, Fourierin muunnos
HCOOH	Formic acid, muurahaishappo
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, korkean erotuskyvyn nestekromatografia
IR	Infrared, infrapuna
LED	Light-Emitting Diode, valoa emittoiva diodi
PTFE	Polytetrafluoroethylene, polytetrafluorietyleni
<i>m/z</i>	mass-to-charge ratio, massa-varaussuhde
MS	Mass Spectrometry, massaspektrometria
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, ydinmagneettinen resonanssispektroskopia
SDS	Sodium dodecyl sulphate, natriumdodekyylisulfaatti
TA	<i>N</i> -(3-aminopropyl)- <i>N</i> -dodecyl-1,3-propanediamine, <i>N</i> -(3-aminopropyli)- <i>N</i> -dodekyyli-1,3-propaanidiamiini
TLC	Thin-Layer Chromatography, ohutkerros kromatografia
TMS	Tetramethylsilane, tetrametyylisilaani
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography, ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografia
Vis	Visible light, näkyvä valo

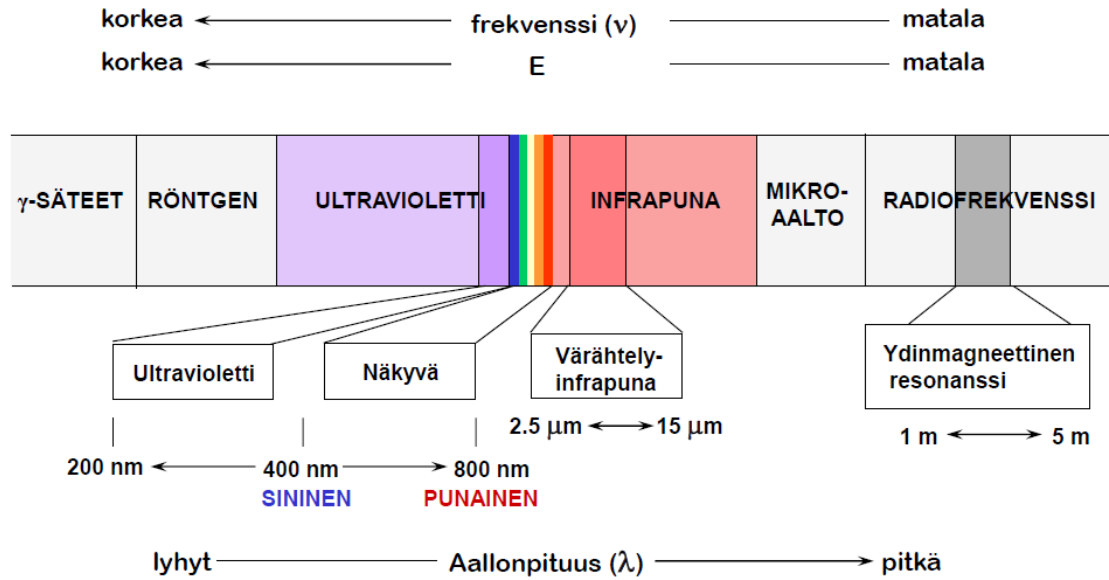
# 1 JOHDANTO

Erikoistyö tehtiin suomalaiselle hygienia- ja puhtausratkaisuja toimittavalle yritykselle, KiiltoClean Oyille. Erikoistyön tavoitteena oli kehittää yrityksen eräälle desinfektio tuotteelle laadunvalvontaan uusi kvantitatiivinen analyysimenetelmä. Tällä menetelmällä pitäisi pystyä analysoimaan kvantitatiivisesti kahden eri aktiiviaineen pitoisuudet, jotka olivat tertiäärinen triamiini *N*-(3-aminopropyli)-*N*-dodekyyli-1,3-propaanidiamiini, TA sekä kvaternäärinen ammoniumkloridi *N,N*-didekyyli-*N,N*-dimetyyliammoniumkloridi, DDAC. Toimivalla menetelmällä oli tarkoitus korvata nykyinen kaksivaiheinen manuaalinen titrausmenetelmä, jossa yhtenä liuottimena oli kloroformi. Ennen työn alkua, kirjoitettiin salassapitosopimus, jolla yritys halusi pitää salaisena desinfektio tuotteen nimen, reseptin, raaka-aineiden nimet, niiden punnitukset ja pitoisuudet. Näin ollen tulokset ovat esitetty poikkeamaprosentteina, joissa analyysituloksia verrattiin teoreettisiin aktiiviainepitoisuuksiin.

Käytössä olevassa aktiiviaineiden analyysimenetelmässä happamissa oloissa titrautui TA ja emäksisissä oloissa DDAC. Happamassa titrauksessa titrauksen päätepisteenä oli kloroformifaasin muuttuminen punaisesta siniseksi ja emäksisessä titrauksessa päätepiste oli sinisessä vesifaasissa havaittava ensimmäinen violetin häivähdys. Molempien päätepisteiden havaitseminen visuaalisesti oli erittäin haastavaa. Yrityksen toivomuksena oli, että uusi analyysimenetelmä olisi luotettavampi sekä analyysintekijälle turvallisempi, sillä kloroformi on haitallinen yhdiste. Yritys oli harkinnut, että toimiva analyysimenetelmä voisi mahdollisesti olla ostopalveluna Turun yliopistolta. Yritys toivoi myös, että he saisivat valmiin analyysimenetelmän työohjeineen erikoistyön päätteeksi.

Kromoforin puuttumisen vuoksi molemmista aktiiviaineista, UV-detektointia ei voitu käyttää. Menetelmät, joista haettiin tietoa kirjalliseen osaan ja joita erikoistyössä kokeiltiin, olivat ydinmagneettiresonanssispektroskopia (NMR), korkean erotuskyvyn kromatografiamassaspektrometria (HPLC-MS), fluoresenssi ja ohutkerroskromatografia (TLC). Kirjallisuushaussa etsittiin tietoa laitteiden toimintaperiaatteista sekä mahdollisista aktiiviaineiden analyysimenetelmistä ja tutkimuksista. Näiden lähteiden avulla laitteiden toimintaan perehdyttiin itsenäisesti, jonka jälkeen ohjaajat antoivat opastusta laitteiden käytössä. Yllä mainituista menetelmistä NMR ja fluoresenssi perustuvat sähkömagneettiseen säteilyyn. Lisäksi kirjallisessa osuudessa kerrotaan UV-valon ja infrapunasäteilyn vaikutuksista menetelmissä. Seuraavalla sivulla on esitetty kuva (*Kuva 1*) sähkömagneettisen säteilyn eri osa-alueista ja niiden eri

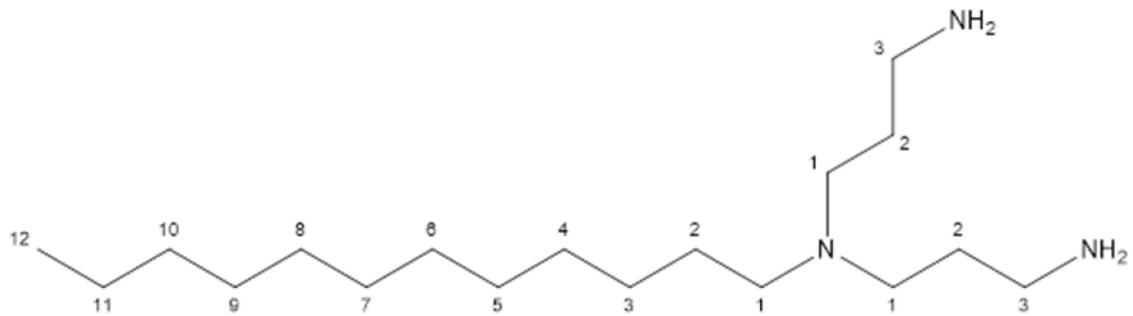
aallonpituusalueista. Tutkielma alkaa kirjallisella osalla, jossa ensin tutustutaan aktiiviaineisiin ja tämän jälkeen eri menetelmiin. Erikoistyöosuudessa on kerrottu menetelmien kvantitatiivisista analyyseistä, analyysien tuloksista ja niiden perusteella tehdyistä johtopäätöksistä.



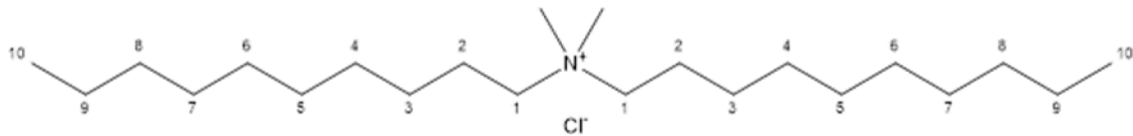
Kuva 1. Sähkömagneettisen säteilyn osa-alueet [1].

## 2 AKTIIVIAINEET

Kvantitatiivista analyysimenetelmää kehitettiin desinfektioaineelle, joka sisälsi kahta erilaista aktiivianetta. Toinen näistä oli triamiini eli *N*-(3-aminopropyyli)-*N*-dodekyyli-1,3-propaanidiamiini (Kuva 2) ja toinen puolestaan kvaternäärinen ammoniumkloridi eli *N,N*-didekyyli-*N,N*-dimetyyli ammoniumkloridi (Kuva 3). Triamiinin ja kvaternäärisen ammoniumkloridin desinfektioaineseoksia käytetään muun muassa leikkaussalien pintojen puhdistukseen sekä desinfiointiin, koska ne omaavat bakteereja ja viruksia tappavia ominaisuuksia [2].



Kuva 2. Triamiini.



Kuva 3. Kvaternäärinen ammoniumkloridi.

### 2.1 Triamiini

Aktiivianneena oleva triamiini on amfoteerinen pinta-aktiivianne [2]. Tämä triamiini on hyvin vakiintunut ja tehokas biosidi, jota käytetään useissa eri kaupallisissa desinfiointi- ja puhdistusaineissa [3]. Biosidi on tuote, jolla pyritään tuhoamaan haitallisia organismeja kemiallisella tai biologisella tavalla. Niillä on laajat käyttökohteet desinfektioaineissa, säilöntäaineissa sekä puhdistusaineissa [4]. Triamiini omaa laajan aktiivisuuden kirjon sekä *gram*-positiivisille että *gram*-negatiivisille bakteereille. Se kykenee ylläpitämään korkean puhdistustehokkuuden raskaille orgaanisille lioille, kuten verelle ja proteiineille. Lisäksi se on aktiivinen vaipallisia viruksia, kuten hepatiitti-B, vastaan. Triamiinilla on hyvät pinta-aktiivianneen ominaisuudet, jotka ovat yhteensopivia valittujen anionisten pinta-aktiivianneiden kanssa, joilla on alhainen viskositeetti [3]. Triamiini on myrkyllistä

nieltynä. Lisäksi se voi aiheuttaa vakavia ihon palovammoja ja silmävaurioita sekä vaurioittaa elimiä pitkäaikaisessa tai toistuvassa altistuksessa [5].

Puhtaan standardin puute on suurin triamiinin kvantitatiivisen analyysin ongelma. Tämä johtuu siitä, että triamiiniraaka-aineen mukana on epäpuhtautena diamiinia (DA) ja monoamiinia (MA). Puhtaan standardin puuttuminen estää yleensä analyttisten menetelmien käytön alkyyli-polyamiinien kvantitoimiseksi. Suora detektointi ja analyysin derivatisointimenetelmät vaativat aktiiviaineen standardiliuokset. Triamiinin ja sen epäpuhtauksien määrittämiselle on kehitetty NMR, HPLC-MS sekä titrausmenetelmät [3].

## 2.2 Kvaternäärinen ammoniumkloridi

Kvaternäärisiin ammoniumyhdisteisiin perustuvat biosidit valmistetaan pääasiassa rasvahapoista, jotka muutetaan rasva-amiineiksi. Lopuksi nämä amiinit kvaternärisoidaan bentsyylikloridilla, metyylikloridilla tai dimetyylisulfaattilla. Positiivisen varauksen vuoksi kationisilla pinta-aktiiviaineilla on suuri affiniteetti negatiivisesti varattuihin pinta-aktiiviaineisiin. Tätä vuorovaikutusta käytetään hyväksi niiden käyttökohteissa [4].

Kvaternääriset ammoniumyhdisteet eli kvatit ovat pinta-aktiiviaineita, jotka sisältävät kvaternäärisen typpikationin. Niiden rakenne ja ominaisuudet vaihtelevat riippuen typpiatomiin liittyneistä radikaaleista [6]. Kemiallisesti nämä yhdisteet ovat substituoituja ammoniumsuoloja, joissa typpiatomiin on liittynyt neljä alkyyli- tai aryylyiryhmää kovalenttisella sidoksella [7]. Molekyylissä on vähintään yksi hydrofobinen hiilivetyketju linkitettyinä positiivisesti varattuun typpiatomiin. Loput alkyyli- tai aryylyiryhmät ovat pääosin lyhytketjuisia substituentteja kuten metyyli- tai bentsyylyiryhmiä. Alkyyliketjun pituus määrittää kvaternääristen ammoniumyhdisteiden fysikaaliskemiallisia ominaisuuksia, kuten vesiliukoisuuden [4]. Näin tuloksena on typpiyhdiste, jolla on positiivinen varaus pH-arvosta riippumatta. Kvaternääriseen ammoniumyhdisteeseen liittynyt negatiivisesti varautunut eli anioninen komponentti on usein bromidi, kloridi tai metyyylisulfaatti. Kaupalliset kvaternääriset ammoniumyhdisteet ovat usein liuotettu veteen, isopropanoliin tai propyleeniglykoliin [7].

Kvaternääriset ammoniumyhdisteet ovat mikrobiologisesti ja antimikrobisesti aktiivisia [2, 6]. Lukuisat aineet sisältävät kvaternäärisiä ammoniumyhdisteitä ja niitä käytetään pääasiassa pinta-aktiiviaineina sekä antimikrobeina. Kvaternäärisillä ammoniumyhdisteillä on hyvin laaja sovelluksien kirjo, sillä niitä käytetään

desinfektioaineiden lisäksi muun muassa kosmetiikka- ja kotitaloustuotteissa estämään tai hidastamaan mikrobien kasvua varastoinnin ja käytön aikana [4, 6, 7]. Vastustuskykyisten bakteerikantojen tai sensitiivisten kantojen resistenttiyttä ollaan pelätty, koska kvaternäärisiä ammoniumyhdisteitä käytetään myös elintarviketeollisuudessa [8]. Kvaternäärinen ammoniumkloridi aiheuttaa vakavia ihon palovammoja ja silmävaurioita, on haitallista nieltynä ja se on nesteinä ja höyrynä syttyvää [5].

### 3 TITRAUS

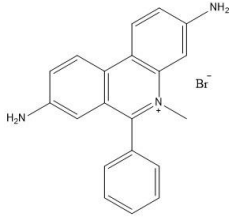
Titraus on menetelmä, jossa tunnettua reagenssia eli titranttia lisätään analyyttiin, kunnes titrantti on kuluttanut analyytin loppuun. Yleisesti titraukset perustuvat happo-emäs-, hapetus-pelkistys-, kompleksin muodostus- tai saostumisreaktioihin. Näitä reaktioita havaitaan usein joko indikaattorin värimuutoksen, jännitteen tai virran muutoksen avulla. Reaktion ekvivalenttipiste saavutetaan, kun lisätyn titrantin tilavuus on juuri stoikiometrisen reaktion vaativa määrä. Reaktion stoikiometrian ja titrantin kulutuksen perusteella voidaan laskea analyytin tuntemattoman aineen pitoisuus. Reaktion ekvivalenttipiste on ihanteellinen tulos, jota titrauksessa etsitään. Reaktion päätepisteessä muun muassa liuoksen fyysiset ominaisuudet muuttuvat [9].

Happo-emästitrauksissa tuntemattoman analyytin happo- tai emäspitoisuus määritetään neutraloimalla se tunnetun pitoisuuden hapolla tai emäksellä eli titrantilla. Neutralointireaktiossa happo ja emäs reagoivat muodostaen neutraalin liuoksen. Volumetrisissä titrauksissa tilavuudella on keskeinen rooli, jonka vuoksi analyytin tilavuuden tulee olla tarkasti tiedossa. Titrantin tunnetun pitoisuuden ja titrauskulutuksen avulla lasketaan tuntemattoman analyytin pitoisuus [10]. Kaksifaasititraus on klassinen titrausmenetelmä ionisten pinta-aktiivisten aineiden määrittämiseksi [11]. Happamalla titrauksella analysoidaan triamiini, emäksisellä titrauksella puolestaan kationinen kvaternäärinen ammoniumkloridi. Molemmissa titrauksissa päätepiste havaitaan värinmuutoksena indikaattoriliuosten läsnä ollessa. Kummassakin titrauksessa analysoitavan aktiiviaineen suhteellinen moolimassa tulee olla tunnettu [12, 13].

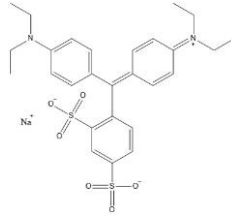
#### 3.1 Hapan titraus

Anionisten pinta-aktiivisten aineiden määrittämiseen käytetty menetelmä on usein kaksifaasititraus happaman sekaindikaattoriliuoksen läsnä ollessa. Indikaattoriliuos on kationisen väriaineen (dimidumbromidi) (Kuva 4) ja anionisen väriaineen (disulfiinin sininen) (Kuva 5) seos [10,12]. Sekaindikaattoriliuos sisältää väriaineiden lisäksi noin 0,1 mol dm<sup>-3</sup> rikkihappoa [9]. Erlenmeyerpullosta olevaan analyytin vesiliuokseen lisätään sekaindikaattoriliuosta ja kloroformia. Voimakkaan ravistelun aikana anioninen pinta-aktiiviaine muodostaa suolan kationisen väriaineen kanssa, joka liukenee kloroformiin muodostaen punertavan pinkin värin. Titranttina käytettävä kationinen pinta-aktiiviaine bentsetoniumkloridi (hyamiini 1622) (Kuva 6) korvaa suolasta dimidumbromidin, jolloin

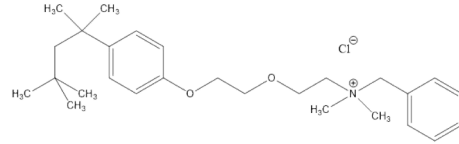
pinkki väri katoaa kloroformifaasista ja väriaine siirtyy vesiliuosfaasiin. Bentsetoniumkloridin ylimäärä muodostaa suolan anionisen väriaineen kanssa, joka liukenee kloroformiin muodostaen sinisen värin. Alfaasin värimuutos siniseksi on tämän kaksivaiheisen titrauksen päätepiste [11, 12].



Kuva 4.  
Dimidiumbromidi.



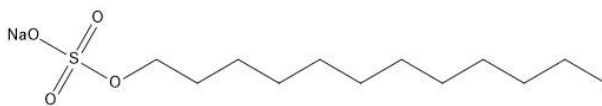
Kuva 5. Disulfiinin  
sininen VN 150.



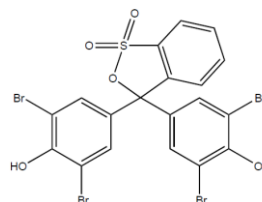
Kuva 6. Hyamiini 1622.

### 3.2 Emäksinen titraus

Emäksisessä titrauksessa kationisen pinta-aktiiviaineen analyysin titranti, natriumdodekyylisulfaatti (Kuva 7), ja indikaattori, bromifenolisininen (Kuva 8), ovat varauksiltaan anionisia. Analyytin vesipitoiseen näyteliuokseen lisätään kloroformia ja emäksistä pH-puskuriliuosta, joiden jälkeen lisätään indikaattoriin. Vapaa väriaine ei liukene kloroformiin, vaan se jää vesifaasiin. Voimakkaan sekoittamisen jälkeen kationinen analyytti ja anioninen väriaine muodostavat keskenään ioniyhdisteen, jonka pooliset ryhmät estetään värisuolamuodostuksella. Vesifaasi värjäytyy voimakkaan siniseksi ja kloroformifaasi on väritön. Anioninen titranti syrjäyttää väriaineen olemassa olevasta seoksesta. Vapautunut väriaine on jälleen vesiliukoinen. Vesifaasin värimuutos violetiksi osoittaa titrauksen päätepisteen [11, 12]. Happo-emäsindikaattorien hapen- ja emäsmuotojen värit poikkeavat toisistaan [9]. Bromifenolisinisellä liuoksen pH-arvon ollessa alle 4,2 väri on keltainen. Emäksisissä liuksissa värimuutos on sininen tai violetti [14].



Kuva 7. Natriumdodekyylisulfaatti.



Kuva 8. Bromifenolisininen.

## 4 NMR

Ydinmagneettisella resonanssispektrometrialla voidaan tutkia atomiytimiä, joista vedyn ja hiilen atomiytimet ovat tutkituimmat. Kun tutkittava näyte asetetaan voimakkaaseen ulkoiseen magneettikenttään, tietty atomiydin värähtelee sille luontaisella taajuudella sähkömagneettisen spektrin radiotaajuusalueella [15]. Pienten taajuusmuutosten avulla saadaan informaatiota näytteen molekyyliarakenteesta. Tekniikalla saatu informaatio perustuu magneettisesti erilaisiin atomiytimiin. Kun tutkitaan vety-ydintä eli protonia, voidaan määrittää kunkin erillisen vety-ydintyyppin lukumäärä sekä saada tietoa kunkin tyyppin ympäristön luonteesta [15, 16].

### 4.1 Ytimien spintilat

Monilla atomiytimillä on ominaisuus nimeltään spin, jolloin atomiytimet käyttäytyvät kuin ne pyörisivät. Useat atomiytimet, joilla on pariton massa tai atomiluku tai molemmat, omaavat kvantittuneen pyörimiskulmamomentin ja magneettisen momentin. NMR-spektroskopian kannalta merkittäviä spinin omaavia atomiytimiä ovat  ${}^1_1\text{H}$ ,  ${}^2_1\text{H}$ ,  ${}^{13}_6\text{C}$ ,  ${}^{14}_7\text{N}$ ,  ${}^{17}_8\text{O}$  ja  ${}^{19}_9\text{F}$ . Hiilen ja hapen tavallisimmat isotoopit  ${}^{12}_6\text{C}$  ja  ${}^{16}_8\text{O}$  eivät kuulu spinin omaaviin isotooppeihin. Kullakin spinin omaavalla atomiytimellä sallittujen spintilojen lukumäärä voidaan kvantitoida ja se määritellään ytimen spinkvanttilukuna,  $I$ . Jokaiselle atomiytimelle lukuarvo  $I$  on vakio. Spintiloja voi olla  $2I+1$  integraalivälillä  $+I$ – $(-I)$ . Esimerkiksi protonin spinkvanttiluku  $I = \frac{1}{2}$  ja sillä on kaksi spintilaa [ $2(\frac{1}{2})+1=2$ ] sen ytimille:  $-\frac{1}{2}$  ja  $+\frac{1}{2}$  [15].

Spintilat eivät ole energioiltaan ekvivalentteja ulkoisessa magneettikentässä, koska atomiydin on varattu hiukkanen ja jokainen liikkuva varaus luo oman magneettikentän. Siispä jokaisella atomiytimellä on sen varauksen ja spinin luoma magneettinen momentti ( $\mu$ ). Protonilla voi olla joko myötäpäivään ( $+\frac{1}{2}$ ) tai vastapäivään ( $-\frac{1}{2}$ ) oleva spin ja ydinmagneettiset momentit osoittavat vastakkaisiin suuntiin. Ulkoisessa magneettikentässä jokaisella protonilla on magneettinen momentti joko kentän suuntaisesti tai sitä vastaan. Kentän suuntaisesti olevalla protonilla on matalampi energia verrattuna sitä vastaan olevalla protonilla [15].

## 4.2 Absorption mekanismi (resonanssi)

Protonit absorboivat energiaa, koska ne alkavat prekessoida eli niiden pyörimisakselit kiertyvät ulkoisessa magneettikentässä. Atomydin alkaa pyöriä akselinsa ympäri kulmataajuudella ( $\omega$ ). Prekession määrää kuvaa termi  $\nu_0$ , jota kutsutaan myös *Larmor*-taajuudeksi. Taajuus, jolla protoni prekessoi, on verrannollinen ulkoisen magneettikentän voimakkuuteen: mitä voimakkaampi ulkoinen magneettikenttä on, sitä suurempi on myös kulmataajuus. Atomytimen varauksen vuoksi, prekessointi synnyttää saman taajuisen värähtelevän sähkökentän. Jos radiotaajuus aallot toimitetaan prekessoivalle protonille, energia voidaan absorboida. Kun tulevan säteilyn värähtelevän sähkökentän komponenttien taajuus vastaa prekessoivan atomytimen tuottaman sähkökentän taajuutta, nämä kaksi kenttää yhdistyvät ja energiaa siirtyy tulevasta säteilystä atomytimelle, mikä aiheuttaa spinin muuttumisen. Tätä tilannetta kutsutaan resonanssiksi ja atomytimellä sanotaan olevan resonanssi lähestyvän sähkömagneettiaallon kanssa [15].

Ydinmagneettinen resonanssi-ilmiö tapahtuu, kun ulkoisen magneettikentän kanssa samansuuntainen atomydin saadaan absorboimaan energiaa, jolloin sen pyörimissuunta muuttuu ulkoiseen kenttään nähden. Energian absorbointi on kvantittunut prosessi ja absorboidun energian tulee olla yhtä suuri kuin kahden tilan välinen ero [15]. Energiatasojen erotusten suuruus riippuu käytetystä atomytimeistä. Jokaisella atomytimellä on eri magneettisen momentin ja liikemäärämomentin suhde, sillä jokaisella on eri massa ja varaus. Tätä suhdetta kutsutaan magnetogyriseksi suhteeksi ( $\gamma$ ) ja se on vakio jokaiselle atomytimelle. Sillä ilmaistaan magneettikentän energiariippuvuutta. Prekession määrä on verrannollinen ulkoisen magneettikentän ja atomytimen magneettiseen voimakkuuteen. Herkkyyttä kasvatetaan magneettikentän voimakkuuden ja energiatilojen välisen energiaerojen suhteella [15, 16].

## 4.3 NMR-kokeen suoritustapa

Näyte liuotetaan deuteroituun liuottimeen, joka ei sisällä häiritseviä protoneja. Laitteiston kalibrointi voidaan suorittaa sisäisellä tai ulkoisella standardilla tai liuottimella. Näyteliuos laitetaan pieneen, sylinterinmuotoiseen lasiputkeen, joka asetetaan magneetin napojen väliin. Magneettien väliin on myös kiinnitetty radiotaajuusgeneraattori käämillä.

Tämä käämi toimittaa protonien spin orientaatiomuutokseen tarvittavan elektromagneettisen energian [15].

NMR-mittauksen suoritustapana on nykyisin käytössä pulssiherätteen *Fourier*-muunnosmenetelmä (*FT*) [1]. Tekniikka perustuu voimakkaan, mutta lyhyen energiapurkauksen eli pulssin käyttöön. Tällä pulssilla viritetään kaikki molekyylin magneettiset atomiytimet samanaikaisesti. 2,1 Teslan magneetikentässä käytetään lyhyttä (1–10  $\mu$ s) 90 MHz energiasykyästä, joka laitetaan päälle ja pois erittäin nopeasti, jolloin saadaan luotua pulssi. Vaikka tämän pulssin tuottava oskillaattori on asetettu 90 MHz taajuuteen, pulssin kesto voi olla hyvin lyhyt. Pulssin taajuussisältö on epävakaa, koska oskillaattori ei ole ollut tarpeeksi kauan päällä vakaan perustaajuuden muodostamiseksi. Siksi pulssi sisältää joukon keskitettyjä taajuuksia. Tämä taajuusalue on tarpeeksi suuri, jotta se viritää kaikki molekyyllissä olevat erilliset vedyt kerrallaan yhdellä energiasykyksellä. Kun pulssi ei ole jatkuva, viritetty atomiydin alkaa menettää viritysendergiaansa ja palaa alkuperäiselle spintilalle eli tapahtuu relaksaatio. Jokaisen viritetyn atomiytimen relaksaatio emittoi elektromagneettista säteilyä. Koska molekyyli sisältää useita erilaisia atomiytimiä, emittoituu myös useaa eri taajuista elektromagneettista säteilyä samanaikaisesti. Tätä kutsutaan vapaan induktion heikentymissignaaliaksi (*FID*) [15].

*FID* on kaikkien emittoituvien taajuuksien päällekkäinen kombinaatio. *Fourierin* muunnos hajottaa *FID*-signaalin sisältämät taajuudet yksittäisiksi sini- tai kosiniaaltokomponenteiksi. *FT*-menetelmä on herkkä ja sillä voidaan mitata heikkojakin signaaleja. *FT*-menetelmä on nopea ja mittauksen voi suorittaa muutamissa sekunneissa. Tietokoneella ja nopealla mittauksella on mahdollista toistaa *FID*-signaalin mittausta, mikä on etu pienissä näytemäärissä. Tällöin *FID*-signaalin intensiteetti on heikko ja siihen on liittynyt paljon taustakohinaa. Taustakohina on satunnaista elektronien signaalia, joka havaitaan usein pohjaviivan signaalin vaihteluna. Kun mittausta toistetaan useita kertoja, pienenee kohinan osuus sen satunnaisuudesta johtuen [15].

#### 4.4 Kemiallinen siirtymä

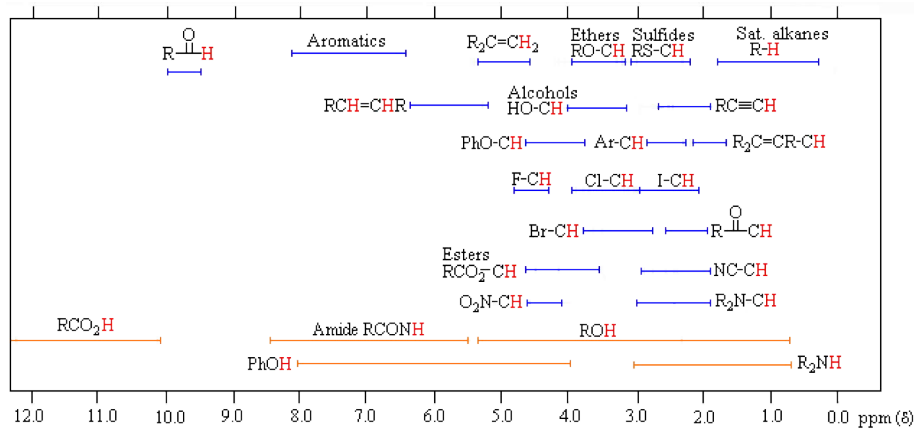
Molekyylin protonit ovat ympäröity elektroneilla ja niiden elektroniset (magneettiset) ympäristöt vaihtelevat protonien välillä. Myös valenssi kuoren elektronitiheys vaihtelee protoneilla ja ne ovat varjostettu ympäröivillä elektroneilla. Ulkoisen magneetikentän vuoksi protonin valenssielektronit alkavat pyöriä, mitä kutsutaan paikalliseksi

diamagneettiseksi virraksi. Tämä luo vastamagneettikentän, joka on vastakkaisuuntainen ulkoiseen magneettikenttään nähden. Tätä efektiä puolestaan kutsutaan diamagneettiseksi varjostukseksi tai anisotropiaksi. Diamagneettisen anisotropian seurauksena jokainen molekyylin protoni on varjostettu ulkoiselta magneettikentältä. Sen ulottuvuus riippuu ympäröivästä elektronitiheydestä. Mitä suurempi atomiytimen elektronitiheys on, sitä suurempi ulkoisen magneettikentän vastakkainen kenttä on. Tästä johtuen atomiytimen prekessoi matalammilla taajuuksilla [15].

On vaikeaa mitata tietyn prekession taajuutta, jonka vuoksi referenssiyhdiste lisätään analysoitavaan yhdisteeseen. Näin mitataan näytteessä jokaisen protonin resonanssitaajuuDET vertaamalla referenssiyhdisteen protonien resonanssitaajuuksiin. Yleisimmin käytetty referenssiyhdiste on tetrametyylisilaani (TMS), sillä sen metyyliryhmien protonit ovat muihin tunnettuihin yhdisteisiin verrattuna enemmän varjostettuja. Kun mitataan jotakin yhdistettä, ilmoitetaan hertseinä (Hz) miten kauaksi protonien resonanssit ovat siirtyneet referenssiin verrattuna. Kemiallinen siirtymä ( $\delta$ ) kertoo, kuinka kauaksi resonanssiprotonei on siirtynyt miljoonasosa yksikössä (ppm) sekä minkälainen protonin kemiallinen ympäristö on. Protonit, jotka löytyvät kemiallisesti samanlaisista ympäristöistä molekyyliSSä, ovat kemiallisesti samanlaisia ja ne näkyvät usein samalla kemiallisella siirtymällä. Kemiallisesti samanlaiset protonit ovat usein myös magneettisesti samanlaiset. Voimakkaasti varjostetut protonit havaitaan NMR-spektrissä oikealla eli yläkentällä, kun taas vähemmän varjostetut havaitaan vasemmalla eli alakentällä [15]. Piikkien kemialliset siirtymät lasketaan taajuuseroina TMS-referenssiin nähden, minkä vuoksi tämän tyyppisiä spektrejä kutsutaan taajuusluokan spektreiksi [12].

Erityyppisten funktionaalisten ryhmien kemiallisia siirtymiä  $^1\text{H}$ -NMR spektroskopiassa on seuraavalla sivulla (*Kuva 9*). Lisäksi on määritelty, että TMS-resonanssiprotoneit ovat siirtymällä 0 ppm. Siirtymä voidaan laskea kaavalla [15]:

$$\delta = \frac{\text{siirtymä (Hz)}}{\text{spektrometrin taajuus (MHz)}} = \text{ppm} \quad (1)$$



Kuva 9. <sup>1</sup>H-NMR kemiallisia siirtymiä (δ) [1].

#### 4.5 Intensiteetit

<sup>1</sup>H-NMR-spektri erottaa molekyylin erityyppisiä protoneja ja osoittaa sen, kuinka monta erilaista protonityyppiä molekyyli sisältää. Piikkien pinta-ala on verrannollinen piikin muodostamien protonien lukumäärään. NMR-spektrometrillä on kyky integroida sähköisesti piikkien pinta-alat, mikä tapahtuu piirtämällä jokaisen piikin yläpuolelle vertikaalisesti nouseva viiva, jota kutsutaan integraaliksi. Intensiteettisuhteet eli integraalit nousevat korkeudessa suhteessa piikkien pinta-alaan. Integraalien korkeudet eivät kerro protonien absoluuttista lukumäärää, vaan tuloksena saadaan erilaisten protonien suhteelliset lukumäärät. Tuntemalla analysoitavan yhdisteen molekyylikaava, saadaan laskettua erilaisten protonien todelliset lukumäärät [15].

#### 4.6 Spin-spin-kytketyminen

Spin-spin-kytketyminen eli *J*-kytkentäilmiö voidaan selittää *n+1*-säännöllä. Kukin protonityyppi "tunnistaa" ekvivalenttien protonien lukumäärän (*n*) vieressä olevilta hiiliatomeilta, joiden protonien resonanssihiikit jaetaan *n+1* komponentteihin. *J*-kytketyminen paljastaa kuinka monta protonia on vierekkäin jokaisen protonityypin kanssa, jotka antavat absorptiopiikin tai näissä tapauksissa absorptiomultipletin. Kun protonilla on *n* naapuriprotonia, joiden *J*-kytkennät ovat yhtä suuria, protonin absorptiopiikki jakautuu *n+1* viivaksi. Näiden viivojen intensiteetit eivät kuitenkaan ole samoja. Viivojen intensiteetit ja niiden mallit saadaan Pascalin kolmiosta (Taulukko 1) [15].

Taulukko 1. Pascalin kolmio [15].

Malli	Intensiteetti					Naapuri protoneja	
Singletti			1				0
Dupletti		1			1		1
Tripletti		1		2		1	2
Kvartetti	1		3		3		3
Kvintetti	1		4		6		4
Sekstetti	1		5		10		5
Septetti	1		6		15		6

#### 4.7 Kvantitatiivinen NMR

NMR-analyyseissä käytetään deuteroituja liuottimia, joissa vetyatomien  $^1H$ -isotoopit ovat korvattu  $^2H$ -isotoopeilla. Tämä auttaa erityisesti  $^1H$ -analyyseissä, jolloin ei havaita liuottimista johtuvia häiritseviä  $^1H$ -piikkejä [17]. NMR-näytteen suositeltu tilavuus on noin 750  $\mu$ l, joka vastaa 6 cm näyteputkessa. Pidemmät detektorikäämit uudemmissa laitteissa mahdollistavat parempien spektrien saamisen suuremmilla näytilavuuksilla. Näytteen syvyys spinnerissä on normaalisti 20 mm. Laitteen lämpötila tulee tarkistaa ennen mittauksen suorittamista. Standardina laitteen lämpötila on 298 K eli 25 °C [18].

Kvantitatiivisen NMR-spektroskopian kvantitatiivisen epätarkkuuden on kerrottu olevan alle 2,0 %, jonka on sovittu olevan tarkan ja täsmällisen kvantifikaation hyväksyttävä raja-arvo. Validointiparametrit kuten tarkkuus, täsmällisyys, lineaarisuus, uusittavuus, selektiivisyys ja spesifisyys, on osoittanut, että NMR-spektroskopia on hyvä analyttinen tekniikka kvantitatiiviseen arviointiin. Muista tekniikoista poiketen, kvantitatiivisella NMR-spektroskopiolla on tietyt saanto- ja prosessointiparametrit sekä vertailutekniikka, jotka vaativat huolellista harkitsemista, jotta saavutetaan korkeat tarkkuudet ja täsmällisyydet. Näytteen valmistusmenetelmät ja kokeelliset menetelmät voivat lisätä huomattavaa virhettä kvantitatiiviseen NMR-analyysiin, mikä voi johtaa tarkkuuden ja täsmällisyyden vähenemiseen [17].

Kvantitatiivisessa NMR-spektroskopiassa keskeisin suhde on se, että NMR-spektrin signaalin voimakkuus on suoraan verrannollinen ydinten lukumäärään tietyllä resonanssilla. Tämä voidaan esittää yhtälönä:  $I_x \propto N_x$ , josta  $I_x = K_s \times N_x$ , jossa  $K_s$  on spektrometrin vakio, joka pysyy samana NMR-spektrissä samana kaikilla resonansseilla. Tähän vakioon vaikuttavia tekijöitä ovat pulssin kiihdytys, toisto-aika sekä laajan alueen irrotus, joka puolestaan aiheuttaa luontaista vääristymistä voimakkuudessa. Kvantitatiivinen NMR-analyysi vaatii vertailu- eli referenssiyhdisteen analyysin konsentraation laskemiseksi. Ihanteellinen sisäinen standardi on puhdas, edullinen, kemiallisesti inertti, pysyvä sekä liukeneva useimpiin käytettyihin NMR-liuottimiin.

Referenssisignaalin pitäisi myös olla helposti erotettavissa sekä mielellään singletti. Referenssiyhdisteen relaksaatioaika tulisi olla lähellä tutkittavan yhdisteen aikaa, jotta vältettäisiin mittauksen tarpeetonta ajankasvua. Tunnettu konsentraatio tai punnittu määrä referenssiyhdistettä liuotetaan tunnettuun tilavuuteen analyyttiä kvantitatiivista analyysiä varten. Sisäisen standardin tärkeimmät edellytykset ovat liukoisuus ja kemiallinen vuorovaikutus analyytin kanssa. On tärkeää tietää analyytin luonteesta valittaessa referenssiyhdistettä kvantitatiivisessa NMR-spektroskopiassa [17].

## 5 KROMATOGRAFIA

Kromatografia on yksi analyttisen kemian tehokkaimmista työkaluista komponenttien erotukselle ja analysoinnille monimutkaisista seoksista. Massaspektrometridetektioinnilla pystytään erotetut komponentit tunnistamaan. Kromatografia on prosessi, jossa eri yhdisteitä pystytään erottamaan toisistaan. Kolonnikromatografiassa tutkittava analytti kuljetetaan kolonnin läpi, jossa analyttin yhdisteet pidättyvät eri pituiset ajat liikkuvan faasin eli eluentin kulkiessa kolonnin läpi. Stationäärifaasi eli aine, joka pysyy kiinnitettynä kolonnissa, on joko kiinteää ainetta tai nestettä. Neste on tällöin usein kovalenttisesti sitoutunut kiinteisiin partikkeleihin tai se on ontton kapillaarin sisäpinnalla. Prosessia, jossa neste tai kaasu kulkee kromatografikolonnin läpi, kutsutaan eluutioksi [8]. Liikkuva faasi voi olla olomuodoltaan neste tai kaasu. Nestekromatografiassa liikkuvana faasina on neste, kun taas kaasukromatografiassa liikkuvana faasina on kaasu. Nestekromatografinen erotus voidaan suorittaa kolonnin lisäksi tasolla, sekä paineenalaisena tai ilman. Analyttisessä kromatografiassa tunnistetaan tai kvantitoidaan erotettava aine. Preparatiivisessa kromatografiassa puolestaan erotettava aine otetaan talteen jatko käyttöä varten [19].

### 5.1 Erotusmekanismi

Kromatografia voidaan luokitella eluentin ja stationäärifaasin vuorovaikutuksen perusteella adsorptio-, jakautumis-, ioninvaihto-, eksklusio- tai affiniteetikromatografiaan. Adsorptiokromatografiassa stationäärifaasi on kiinteä ja liikkuva faasi on nestemäinen tai kaasumainen. Tässä neste tai kaasu adsorboidaan kiinteiden partikkeleiden pinnalle, joiden erotus perustuu eri yhdisteiden erilaiseen kiinnittymiseen stationäärifaasiin. Jakautumis- eli partitiokromatografiassa ohut nestekerros on kiinteän kantajan pinnalla stationäärifaasissa. Liikkuva faasi on neste tai kaasu. Analytti tasapainoilee nestemäisen stationäärifaasin ja liikkuvan faasin välillä, jolloin erotus perustuu komponenttien liukoisuuseroihin. Ioninvaihtokromatografiassa ioniset ryhmät, kuten  $-SO_3^-$  tai  $-N(CH_3)_3^+$ , ovat kovalenttisesti kiinnitettynä kiinteään stationäärifaasiin, joka on usein hartsia. Analyttin ionit houkuttelevat sähköisillä vuorovaikutuksilla stationäärifaasille. Komponentit tarttuvat stationäärifaasiin sitä tiukemmin, mitä suurempi varaus on. Liikkuva faasi on neste [9].

Ekskluusiokromatografia erottaa molekyylit niiden koon mukaisesti, jossa suurimmat molekyylit eluoituvat nopeammin. Analyytin molekyyleillä ja stationäärifaasilla ei tässä tapauksessa ole puoleensa vetäviä vuorovaikutuksia. Stationäärifaasissa on tarpeeksi pieniä huokosia, joihin pienet molekyylit mahtuvat, mutta suuret eivät, jolloin suuret molekyylit virtaavat nopeasti ohitse ja pienemmät molekyylit menevät huokosiin ja pidättyvät kolonnissa. Suuremman tilavuuden pitää virrata kolonnin läpi, jolloin pienemmällä molekyyleillä kestää kauemmin kulkeutua ulos kolonnista. Affiniteetikromatografia on valikoivin, jossa tapahtuu spesifinen vuorovaikutus yhden analyytin molekyylin ja stationäärifaasiin kovalenttisesti kiinnittyneen molekyylin välillä. Tämän kaltainen vuorovaikutus tapahtuu esimerkiksi vasta-aineen ja proteiinin välillä. Tuhansien eri proteiinien seos virtaa kolonnin läpi, jolloin tietty haluttu proteiini kiinnittyy vasta-aineeseen. Kun muut proteiinit huuhtoutuvat kolonnista ulos, haluttu proteiini irrotetaan stationäärifaasista muuttamalla pH-arvoa tai ionivahvuutta [9].

## 5.2 Ohutkerroskromatografia

Tasokromatografisia menetelmiä ovat ohutkerros- ja paperikromatografia. Stationäärifaasi on näissä menetelmissä tasossa. Ohutkerroskromatografiassa esimerkiksi lasilevyn pintaan on kiinnitetty kiinteä stationäärifaasi, kun taas paperikromatografiassa huokoinen paperi toimii kiinteänä stationäärifaasina [19]. Ohutkerroskromatografia (*TLC*) on seosten erotusmenetelmä, jossa yhdisteet erottuvat eluoimalla ne tasokromatografisen kerroksen läpi. Erotettujen komponenttien detektointi tapahtuu visuaalisesti usein fluoresoivan *TLC*-levyn avulla. Erottuneet komponentit on myös mahdollista värjätä tai hiiltää. Tasomainen ohutkerroskromatografia voi olla parhaimmillaan erinomainen kvalitatiivinen ja kvantitatiivinen analyysimenetelmä [20].

### 5.2.1 Teoria ja periaate

*TLC*-levyn resoluutiota ohjaavat tärkeimmät ominaisuudet ovat pistekoko ja levyn fyysinen koko. Pisteiden halkaisijakoolla 0,5 cm ja tyypillisesti 10 cm levyn pituudella pystytään optimaalisesti erottamaan jopa 20 komponenttia. *TLC*- ja paperikromatografiassa saadut tulokset kuvataan hidastustekijällä eli  $R_F$ -arvolla, joka viittaa komponentin keskipisteen kulkeman matkan siirtymisen suhteessa liuotinrintaman nousuun [20].

$$R_f = \frac{\text{Komponentin kulkema matka (cm)}}{\text{Liuotinrintaman kulkema matka (cm)}} \quad (2)$$

Vaikka  $R_f$ -arvo ei ole komponentin absoluuttinen fyysinen arvo, kun olosuhteita valvotaan tarkasti, voi arvo auttaa tunnistamisessa.  $R_f$ -arvoon vaikuttavia muuttujia on useita, esimerkiksi liuotinkoostumuksen vähäinen ero, lämpötila, kehitysastian koko ja adsorbenttikerros. Viittaamalla huolellisesti valittuun standardiin samalla levyllä ajettulla  $R_f$ -arvolla, näitä muuttujia vähennetään.  $R_{st}$ -arvojen yhtäsuuruus ei kuitenkaan ole yksin luotettava todiste, jolloin komponentti on eluoitava adsorbenttikerroksesta jatkotutkimukseen, kuten ydinmagneettiresonanssi ( $^{13}\text{C}$  ja  $^1\text{H}$ ) tai massaspektroskopia, jossa suoritetaan tunnistaminen [20].

$$R_{st} = \frac{\text{Komponentin kulkema matka (cm)}}{\text{Standardin kulkema matka (cm)}} \quad (3)$$

Ohutkerroskromatografiassa haihtuvassa liuotimessa oleva näyte levitetään lasikapillaariputken avulla noin 1–2 cm etäisyydelle levyn alareunasta. Adsorbenttikerros on yhtenäinen ja inertti, kuten silikageeli tai alumiinioksidi, joka on tasaisesti levypinnassa. Kun täplä on kuivunut, levy asetetaan pystysuoraan sopivaan kehitysastiaan, joka on kyllästetty valitulla liikkuvalla faasilla. Liuotinrintama nousee kapillaarivaikutuksesta, ja näin saadaan aikaan kromatografinen erotus, jolloin näyteseos erottuu erillisiksi pisteiksi. Mahdolliset vuorovaikutukset, jotka johtavat molekyylien adsorboitumiseen levyllä, ovat van der Waalsin voimat, dipoli-dipoli-vuorovaikutukset, molekyylien väliset vetysidokset tai kemisorptio. Ajon lopussa liuottimen annetaan haihtua levyltä ja erotetut pisteet merkitään ja tunnistetaan joko fysikaalisilla tai kemiallisilla menetelmillä. Erottamisen jälkeen yksittäinen piste on helppo ottaa talteen kaapimalla adsorboitunut piste pois. Aine voidaan sitten uutaa sopivalla liuottimella [20].

### 5.2.2 Adsorbentit

Ohutkerroskromatografian adsorbenttien yleisten ominaisuuksien tulisi olla samankaltaisia kuin kolonneissa käytetyille adsorbenteille. Adsorbentin kaksi tärkeintä ominaisuutta ovat sen hiukkaskoko ja homogeenisuus, koska vetovoima levyyn riippuu suuresti niistä. Silikageeli on TLC-tutkimuksissa yleisimmin käytetty adsorbentti. Sitä valmistetaan natriumsilikaatin hydrolyysireaktiolla piihapoksi, joka edelleen kondensaatioreaktion ja polymeroinnin tuloksena tuottaa silikageelimateriaalia. Kaupallisesti on saatavilla fluoresoivilla indikaattoreilla esipinnoitettuja levyjä, jotka

emittoivat vihreää fluoresenssia, kun niitä säteilytetään UV-valolla (*Hg*-lamppu) 254 nm aallonpituudella. Absorboivat aineet näkyvät tummina täplinä vihreää fluoresoivaa taustaa vasten. Silikageeliä voidaan käyttää neutraalien, emäksisten ja happamien hydrofiilisten aineiden erottamiseen sopivilla eluenteilla. Tästä käytetään nimitystä normaalifaasikromatografia. Käänteisfaasikromatografiasta on kyse, kun pooliton stationäärifaasi eluoidaan poolisemmalla eluentilla ja analyyttien eluointijärjestys kääntyy. Kuten nestekromatografiassa, suosituin alkyyliketjun pituus on  $C_{18}$  [20].

Alumiinioksidia voidaan valmistaa yhtä puhtaaksi ja spesifioiduksi kuin silikageeliä käyttämällä useita epäyhtenäisiä dehydraatioprosesseja, joissa on erilaisia alumiinihydroksidin kiteisiä modifikaatioita. Reaktio-olosuhteet voidaan säätää tuottamaan alumiinioksidia, jossa on joko hapant, emäksinen tai neutraali pinta. Neutraalia alumiinioksidia käytetään pääasiassa orgaanisten eluenttien kanssa ja se soveltuu käytettäväksi joko labiilien tai vahvoihin alkaleihin sitoutuneisiin yhdisteisiin. Hapanta alumiinioksidia käytetään neutraalien tai happamien materiaalien erottamiseen, jotka eivät ole happolabiileja [20].

### 5.2.3 Näytteiden applikointi

Näytteet on applikoitava TLC-levyihin varovasti rikkomatta adsorbenttikerrosta. Normaalisti näytteet applikoidaan manuaalisesti kapillaariputkella tai mikropipetillä siten, että pisara koskettaa levyn pintaa kärjen ollessa juuri sen yläpuolella. Adsorbenttikerroksen reikä estää yhtenäisen liuotinvirtauksen, mikä aiheuttaa komponenttien vääristymistä ja erotuskyvyn heikentymistä. Pisteiden etäisyys toisistaan pitäisi olla vähintään 1 cm, niiden halkaisijan tulisi olla 2–5 mm, eikä niiden pitäisi olla 1,5 cm lähempänä levyn reunaa. Puoliautomasoidut ja täysin automatisoidut laitteet ovat parantaneet tekniikan toistettavuutta, koska ne voivat tuottaa levyille täsmällisiä tilavuuksia täsmällisesti määriteltyihin paikkoihin, jolloin poistetaan kvantitatiivisesta analyysistä suurin virhelähde [20].

### 5.2.4 Kehitys

Kun näytteet ovat applikoitu levyille, se asetetaan sopivaan kehitysastiaan, jossa levyn alareuna upotetaan eluontiin 0,5–1,0 cm syvyyteen. Sopivan eluentin tulisi antaa  $R_f$ -arvot 0,3–0,7 välillä. Kehitysastian ilmakehän annetaan kyllästyä ja homogenisoitua

liuotinhöyryillä, mikä minimoi eluentin haihtumisen TLC-levyltä kehityksen aikana. Kyllästymistä voidaan helpottaa vuoraamalla astian seinät suodatinpaperilla, joka on kastettu eluenttiin. Säiliön koko ja käytetyn eluentin tilavuus vaikuttavat  $R_f$ -arvoihin, koska näiden kahden tekijän välillä ohjataan säiliössä olevan höyryn koostumusta. Astian tulisi olla mahdollisimman pieni suljetun ilmakehän tilavuuden minimoimiseksi. Ajoaika, lähtöviivan etäisyys eluenttipinnasta ja näytepisteiden sijainnit tulisivat pitää vakioina [20].

Komponenttien erotuksia ohjataan jakautumissuhteilla tietyillä adsorbenttien ja eluentin järjestelmillä. Erotusprofiili voidaan muokata muuttamalla jakautumissuhteita, jotka saavutetaan helposti muuttamalla liuotinkoostumuksen vahvuutta ja poolisuutta. Liuotin valitaan analyyttien poolisuuksien perusteella. Yli kahden komponentin seoksia tulisi välttää, sillä monimutkaiset seokset kokevat helposti faasimuutoksia lämpötilan muuttuessa. Liuottimien puhtausvaatimukset ovat vähäisemmät kuin muissa kromatografian lajeissa, mutta liuottimien tulisi olla edullisia, sillä niitä käytetään usein suuria tilavuuksia. Ne eivät saisi olla runsaasti haihtuvia, koska kehitysastiaan halutaan saada tarkka tasapainotila. Haihtuvuus kuitenkin parantaa liuottimen poistettavuutta levystä ajon jälkeen [20].

### 5.2.5 Erotettujen komponenttien havaitseminen

Kemiallisissa detektointimenetelmissä levy käsitellään jollakin reagenssilla, jota kutsutaan paikannus- eli kromogeeniseksi reagenssiksi. Pienet levyt voidaan käsitellä upottamalla levy nopeasti reagenssiin, mutta suuremmat levyt käsitellään sumutusmenetelmällä, jossa levy sumutetaan reagenssilla. Upotuksessa on mahdollista saada reagenssi tasaisemmin levyille, mutta näytteitä voi hävitä levyiltä ja pisteiden leviämistä voi tapahtua, mikä voi johtaa erotuskyvyn ja herkkyuden heikentymiseen. Näissä menetelmissä levyissä muodostuu värilliset johdannaiset. Reagenssit luokitellaan epäspesifisiksi, jos ne tuottavat värillisiä täpliä useilla eri yhdisteillä. Spesifiset reagenssit reagoivat vain sellaisten yhdisteiden kanssa, jotka sisältävät tietyn funktionaalisen ryhmän. Spesifisiä kromogeenisiä reagensseja voidaan soveltaa pisteiden havaitsemisessa ja komponenttien tunnistamisessa. Levyä on usein tarpeen kuumentaa upotuksen tai sumutuksen jälkeen komponenttien välisen kemiallisen reaktion nopeuttamiseksi. Tämä edellyttää erikoistuneita lämmityskammioita, jotta saadaan aikaiseksi tasaiset olosuhteet pisteiden kehitykselle [20].

Yleisimmin käytetyssä ultraviolettipaikannusmenetelmässä käytetään adsorptiokerrosta, joka sisältää fluoresoivan indikaattorin, joka absorboi valoa 254 nm aallonpituudella. Kun levyä säteilytetään tällä aallonpituudella, havaitaan emittoiva valo vihreänä värinä. Komponentin piste sammuttaa fluoresenssin, jolloin komponentti näkyy tummana pisteenä vihreää taustaa vasten. Tunnistusmenetelmä ei ole spesifinen, mutta etuna on se, että indikaattori ei liukene tavallisiin liuottimiin. Havaitun fluoresenssin intensiteetti on verrattavissa konsentraatioon. Elohopea- tai ksenonlamppuja käytetään niiden korkeiden intensiteettien ja spektrialueiden vuoksi, joissa monokromaattorilla säädetään sopiva aallonpituus. Kvantitatiivisissa analyyseissä on hyvä käyttää kalibrointigraafeja [20].

### 5.3 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia

Korkean erotuskyvyn nestekromatografiassa (*HPLC*) näyte syötetään kapeissa kapillaareissa korkeassa paineessa kulkevaan eluenttivirtaan umpinaisen kolonnin läpi [19]. Kolonni on pakattu mikrometrikokoluokan partikkeleista koostuvalla stationäärifaasilla, joka tarjoaa erinomaisen erotuksen. Eluenttivistä kuljetetaan yhdellä tai useammalla pumpulla sykkeettömästi koko laitteiston läpi. Näyte syötetään injektorin kautta eluenttivirtaan. Analyytin komponenttien erottuminen ja jakaantuminen tapahtuvat kolonnissa. Detektorilla havaitaan komponenttien erottuminen [9].

#### 5.3.1 Kolonni

Normaalifaasikromatografiassa käytetään poolista stationäärifaasia ja poolittomia liuottimia näytteen pidättämiseksi kolonnissa. Eluentin vahvuutta kasvatetaan lisäämällä poolisen liuottimen osuutta. Eluentin vahvuuden lisääntyessä näyte viettää vähemmän aikaa stationäärifaasissa ja siirtyy nopeammin eteenpäin kolonnissa eluenttivirran mukana. Käänteisfaasikromatografiassa stationäärifaasi on pooliton tai heikosti poolinen ja liuotin poolinen ennen eluutiota. Eluentin vahvuutta kasvatetaan lisäämällä poolitonta liuotinta, jolloin pooliton näyte eluoituu nopeammin kolonnista. Nestekromatografiassa yleisimmin silikan pintaan on kovalenttisilla sidoksilla kiinnitettyjä silanoliryhmiä. Oktadekyyli ( $C_{18}$ ) on käytetyin stationäärifaasi. Silikan pintaan kiinnitettyt *Si-O-Si* -ryhmät ovat stabiileja pH-alueella 2–8. Vahvasti happamilla tai emäksisillä eluenteilla silikaa ei voida tavallisesti käyttää, mutta poikkeuksia löytyy.

Eri stationäärifaasit vuorovaikuttavat erilaisesti saman eluentin kanssa. Kun vaihdetaan poolittomasta  $C_{18}$ -kolonnista poolittomaan pentafluorofenyylä kolonniin, retentioajat ja eri yhdisteiden eluutiot voivat vaihdella [9].

Kromatografiassa päämääränä on vähentää tekijät, jotka aiheuttavat piikkien leventymistä. Näytevyöhykkeiden leventymistä tapahtuu niiden virratessa kapillaareissa sekä kolonnissa. Tämän vuoksi kapillaareista tehdään mahdollisimman lyhyitä ja kapeita [21]. Näytevyöhykkeen leventyminen kolonnissa johtuu pitkittäisdiffuusiosta, eripituisista kulkureiteistä ja massansiirrosta pintaan. Analyytillä muodostuu hitaasti tasapaino eluentin sekä stationäärifaasin välille. Äärettömän kapea analyytin vyöhyke kolonnin sisällä alkaa hiljalleen leventyä, sillä molekyylit diffuutoituvat vyöhykkeen keskeltä molempiin suuntiin. Tätä väistämätöntä prosessia kutsutaan longitudinaaliseksi eli pitkittäiseksi diffuusioksi ja se alkaa välittömästi injektoinnin jälkeen. Mitä kauemmaksi vyöhyke on matkannut, sitä pidempi aika sillä on ollut diffuutoitua ja sitä leveämmäksi vyöhyke kasvaa. Leventyminen longitudinaalisella diffuusiolla on kääntäen verrannollinen virtausnopeuteen:  $leventyminen \propto \frac{1}{u}$ , jossa  $u$  on virtausnopeus ja sitä mitataan yksikössä  $ml\ min^{-1}$  [9].

Kun kolonni on ylikuormitettu liialla analyytillä yhdessä vyöhykkeessä, havaittu piikki nousee ensin normaalisti, mutta putoaa yhtäkkiä. Syy tähän on se, että yhdiste on pääosin liennut itseensä. Häntiminen on asymmetrinen piikin muoto, jossa seuraava vyöhyke on pidentynyt. Häntimistä voidaan vähentää erilaisilla kolonneilla, joissa pooliset ryhmät ovat korvattu kemiallisella käsittelyllä poolittomilla. Kolonni tulee vaihtaa uuteen, mikäli piikkien häntiminen lisääntyy. [9].

Korkean erotuskyvyn nestekromatografian kolonnit ovat melko kalliita ja ne heikkenevät helposti näytteiden ja liuottimien epäpuhtauksien irreversiibelistä adsorptiosta [8]. Tämän vuoksi usein käytetään lyhyitä ja kertakäyttöisiä esikolonneja, jotka ovat stationäärifaaseiltaan kolonnien kaltaisia [9, 21]. Tällöin irreversiibelisti kiinnittyvät epäpuhtaudet jäävät esikolonniin ja ne heitetään aika ajoin pois. Kolonnien täyttemateriaali pysyy kolonnin sisällä sen molemmissa päissä olevien huokoisten levyjen avulla [21]. Sisään menevä levy toimii partikkeleiden suodattimena ja jakaa liuoksen tasaisesti koko kolonnin halkaisijan matkalla. Eluentit ja valmistetut näytteet tulee suodattaa  $0,2\text{--}2\ \mu m$  suodattimilla kolonnin kontaminoitumisen, kapillaarien tukkeutumisen ja pumpun vahingoittumisen estämiseksi. Piikkien muodon huonontuminen voi olla merkki siitä, että huokoiset levyt ovat tukossa, jolloin levyt voidaan huuhtoa liuottimella tai vaihtaa uusiin [9].

### 5.3.2 Eluentit

Eluutiota yhdellä eluentilla tai samalla eluenttiseoksella kutsutaan isokraattiseksi eluutioksi. Gradientteluutiiossa kahden tai useamman eluentin pitoisuuksia vaihdellaan jatkuvasti puskuriliuoksen ja orgaanisen eluentin pitoisuuksia muuttamalla. Usein käänteisfaasikromatografiassa käytettävä orgaaninen eluentti on asetonitriili tai metanoli, jotka ovat vettä poolittomampia. Puskuriliuokset ovat ultrapuhtaaseen veteen laimennettuja pH-puskureita [9]. Eluentteihin liuennut ilma aiheuttaa ongelmia pumpussa, kolonnissa ja detektorissa, minkä vuoksi kaikista valmistetuista eluenteista on ilma poistettu ultraäänihauteella tai laitteen omalla ilmanpoistojärjestelmällä. Mikrobit voivat alkaa kasvaa veden ja puskuriliuosten seoksissa, minkä vuoksi käytettävien puskuriliuosten pitäisi olla tuoreita kolonnin ja kapillaarien tukkeutumisen välttämiseksi [21].

### 5.3.3 Detektorit

UV/Vis-detektori mittaa eluution absorbanssia joko yhdellä aallonpituudella tai aallonpituusalueella. Analyytin pitää absorboida UV-säteilyä tai näkyvää valoa, jotta se voidaan havaita [9]. Tekijät, kuten signaali, piikin korkeus ja pinta-ala käyttäytyvät UV/Vis-mittauksessa *Lambert-Beerin* lain mukaisesti. UV/Vis-laitteistot voidaan jakaa riippuen niiden aallonpituusvalintatavasta, jotka ovat suodatin, monokromaattori ja diodirividetektori [21]. Suodattimella rajataan tietty emissioviiva, kuten esimerkiksi elohopealampusta suodatetaan intensiivinen 254 nm aallonpituus. Monokromaattorin avulla voidaan valita mittausaallonpituus portaattomasti, esimerkiksi deuteriumlampulla valitaan analyytille optimaalisin aallonpituus 190–600 nm väliltä. Diodirividetektorilla voidaan tallentaa jokaisen analyytin komponentin eluoituminen UV/Vis-absorptiospektrille erikseen [9, 21].

Sähkökemiallista detektoria voidaan käyttää analyyteille, jotka voidaan hapettaa tai pelkistää elektrodilla [9, 21]. Eluenttiin johdettu jännite aiheuttaa analyyttiliuoksessa sähkökemiallisen muutoksen, joka mitataan sähkövirtana [21]. Mitattava sähkövirta on verrannollinen analyytin konsentraatioon [9]. Fluoresenssidetektorit ovat hyvin herkkiä, mutta niitä voidaan käyttää vain analyyteille, jotka fluoresoivat tai jotka voidaan tehdä fluoresoiviksi. Fluoresenssidetektorin toiminta perustuu siihen, että näyte säteilytetään pienemmällä aallonpituudella ja emissiota tarkkaillaan tätä suuremmalla

aallonpituudella. Emission intensiteetti on verrannollinen analyytin konsentraatioon. Höyrystävällä valon sirontadetektorilla analyytti höyrystetään aerosoliksi. Helposti haihtuvat liuottimet haihtuvat ja jäljelle jäävät hienot partikkelit havaitaan valon sirontana [9].

#### 5.3.4 Kvalitatiivinen ja kvantitatiivinen analyysi

Yksinkertaisin kvalitatiivinen kromatogrammin piikkien tunnistamistapa on retentioaikojen vertailu. Luotettavin tapa kvalitatiiviselle kromatografialle on lisätä tunnettua yhdistettä tuntemattomaan näytteeseen. Jos lisätty yhdiste on identtinen tutkittavan yhdisteen kanssa, niin tämän piikin relatiivinen koko kasvaa. On mahdollista, että kahdella yhdisteellä on sama retentioaika tiettyä kolonnia käyttäessä. On kuitenkin epätodennäköistä, että kahdella yhdisteellä on sama retentioaika eri stationäärifaasilla. Kvalitatiivisessa analyysissä jokainen kromatografian piikki siirtyy massaspektrometrille, josta saadaan kolonnissa eluotujen yhdisteiden massaspektri. Yhdisteet on mahdollista identifioida laitteen omalla kirjastolla [9].

Kvantitatiivisessa analyysissä tutkittavan yhdisteen piikin pinta-alaa verrataan samasta yhdisteestä sovitettuun standardisuoraan. Usein kromatografiassa käytetään sisäistä standardia, sillä injektioilavuus ja täsmälliset kromatografiset olosuhteet voivat jossain määrin vaihdella ajojen välillä. Olosuhteiden vaihtelut vaikuttavat samalla tavoin sisäiselle standardille ja analyyttille. Tulokseksi saadaan analyytin konsentraatiota vertailemalla analyytin piikin pinta-alaa sisäisen standardin vastaavaan. Massaspektrometrillä erotetut komponentit pyritään mahdollisuuksien mukaan detektoimaan kvantitatiivisesti [9].

## 6 MASSASPEKTROMETRIA

Massaspektrometria mittaa kaasufaasissa olevien ionien massoja ja varauksia. Massaspektrometri on kromatografialle tehokkain detektointimenetelmä, sillä se on herkkä pienille konsentraatioille ja sillä saadaan sekä kvalitatiivisia että kvantitatiivisia tuloksia. Lisäksi sillä pystytään erottamaan samalla retentioajalla eluoituvia yhdisteitä [9]. Nestekromatografian haasteena on poistaa liuotin analyytistä, jotta se ei täytä massaspektrometrin vakuumia. Laitteistossa onkin tämän vuoksi liitososa, jota pitkin liuottimet poistuvat [9, 15].

Massaspektrometri koostuu viidestä komponentista, jotka ovat näytteensyötin, ionisaattori, massa-analysaattori, detektori sekä tietokone. Näytteensyöttimellä viedään näyte laboratorio-olosuhteesta (1 atm paineesta) massaspektrometrille korkeaan vakuumiin. Massaspektrometrin sisällä paine vaihtelee ionisaattorin muutamasta elohopeamillimetristä massa-analysaattorin ja detektorin muutamaa elohopeamikrometriin. Näytteensyöttimeltä näyte viedään ionisaattorille, jossa näytemolekyylit muutetaan kaasuioneiksi. Ioneja kiihdytetään sähkömagneettikentällä massa-analysaattorille, joka erottelee ionit niiden massa-varaussuhteen mukaan. Erotellut ionit havaitaan detektorilla ja signaalit tallennetaan ja prosessoidaan tietokoneella [15]. Neutraali- tai radikaalimolekyylejä massaspektrometrillä ei voida havaita [9, 20].

Molekyylin massaspektri tarjoaa informaatiota sen rakenteesta. Fragmentaatiokuvioiden perusteella pystytään havainnollistamaan proteiinien aminohapposekvenssejä sekä monimutkaisten hiilihydraattien rakenteita. Spektrin intensiivisintä eli korkeinta piikkiä massaspekttrissä kutsutaan peruspiikiksi. Se saa suhteellisen arvon 100, johon muiden piikkien intensiteettejä verrataan prosentteina [9, 15]. Massaspektrometrillä pystytään määrittämään muun muassa tutkittavan yhdisteen molekyylimassa ja molekyylikaava. Saatuja massaspektrejä voidaan analysoida vertaamalla laitteen valmiisiin standardispektrien kirjastoihin [15].

### 6.1 Näytteensyöttö

Massaspektrometrillä analysoitava näyte voi olla olomuodoltaan kaasu, neste tai kiinteä. Näyte pitää ensin muuntaa kaasumaiseen olomuotoon kuljettamalla molekyylivirtaus ionisaatiokammioon. Näytemolekyylit ohjataan alipaineiseen ionisaatiokammioon pienen huokosreiän läpi, mitä kutsutaan molekulaariseksi vuoksi. Näin varmistetaan

molekyylien vakaa virtaus. Näyte voidaan syöttää massaspektrometrille suorasyötöllä suoraan ionisaatiokammioon tai liitetyn nestekromatografilaitteiston avulla, jolloin pystytään analysoimaan monimutkaisia näytteitä. Korkean erotuskyvyn nestekromatografi-massaspektrometrissä (HPLC -MS) kolonnissa erotetut aineet havaitaan massaspektrometrillä [15].

## 6.2 Ionisaatiotekniikat

Näytteensyöttömenetelmästä riippumatta, näytemolekyylit tulee muuttaa varatuiksi partikkeleiksi ionisaattorin avulla ennen kuin niitä voidaan analysoida ja detektoida [15]. Kaasufaasissa oleva näyte voidaan ainoastaan ionisoida [8]. Elektroni-ionisaatio on yksinkertainen ionisointitekniikka [15]. Tekniikassa kuumalta hehkulangalta irtoaa elektroneja korkeassa lämpötilassa. Nämä elektronit kiihdytetään 70 V jännitteessä, kunnes ne kohtaavat lähestyvät molekyylit [9, 21]. Osa analyytin molekyyleistä ( $M$ ) absorboi tarpeeksi energiaa, jolloin ne menettävät elektronin ja näin ollen ionisoituvat.  $M^+$ -kationia kutsutaan molekyyli-ioniksi [21]. Positiivisen sähköpotentiaalın omaava repellerilevy ohjaa luodun ionivirran kiihdytinlevyille. Suuri 1–10 kV potentiaaliero kohdistuu kiihdytinlevyille, mikä tuottaa nopeasti liikkuvan ionien säteen. Yhdellä tai useammalla fokusointiraolla ohjataan ionit yhtenäiseksi säteeksi. Jotkut molekyylit muuttuvat negatiivisiksi ioneiksi elektronien absorptiolla ja repellerilevy absorboi nämä anionit [15].

Elektroni-ionisaatiolla pystytään muodostamaan ainoastaan positiivisia ioneja, minkä vuoksi joillekin yhdisteryhmille kyseinen tekniikka ei sovellu. Ionisaatiossa muodostuneet radikaalikationit aiheuttavat spektrien tulkintaa haastavaa toisintumista. Analysoitavan näytteen tulee myös olla haihtuvaa. Haihtumisen vuoksi höyrystyvät molekyylit vaikuttavat spektriin, joten tekniikka ei ole selektiivinen. Spektrikirjasto mahdollistaa tekniikan toistettavuuden [22]. Kemiallisessa ionisaatiossa näytemolekyylit yhdistyvät ionisoituun reagenssikaasuvirtaan, jota on hyvin suuri ylimäärä verrattuna näytteen määrään. Kun näytemolekyylit törmäävät esi-ionisoituun reagenssikaasuun, osa molekyyleistä ionisoituu protonin tai elektronin siirrolla tai adduktin muodostuksella. Kaasua tai helposti höyrystyvää nestettä voidaan käyttää reagenssikaasuna [15].

Sähkösumutus-ionisaatiolla luodaan hieno sumu, josta liuotin haihtuu, ja jäljelle jäävät kaasufaasiin ionisoidut analyyttimolekyylit [9]. Usein käytetyin kaasu sumuttimessa ja kuivauksessa on typpikaasu ( $N_2$ ) [9, 21]. Haihtumattomia puskureita,

kuten fosfaatteja, ei voida käyttää massaspektrometrisissä detektioinneissa, sillä ne tukkivat sisään-tulon massaspektrometrille. Ammoniumformiaatti ja -asetaattipuskureita voidaan käyttää haluttaessa pH-arvoiltaan happamia puskureita. Ammoniumbikarbonaatti on herkästi haihtuva puskuri emäksisille puskureille [9]. Näytemolekyylejä sisältävä liuos suihkutetaan kapillaarilla kammioon, joka on lähes ilmakehän paineessa. Kapillaarin pinnassa on suuri potentiaalijännite, jonka vaikutuksesta pienet ja varatut pisarat ajetaan ionisointikammioon. Varatut pisarat altistetaan kuumen kuivauskaasun vastavirralle (usein  $N_2$ ), joka haihduttaa liuotinmolekyylit pisaroista. Kunkin pisaran varaustiheys kasvaa, kunnes sähköstaattiset voimat ylittävät pisaran pintajännityksen, jolloin pisarat hajoavat yhä pienemmiksi pisaroiksi. Tämä prosessi jatkuu siihen asti, kunnes liuotinvapaita näyteioneja on kaasufaasissa [15].

### 6.3 Massa-analysaattori

Näytteen ionisaation jälkeen ionivirta kiihdytetään sähkökentällä massa-analysaattorille. Tässä vaiheessa ionit erotellaan massa-varaussuhteiden mukaan. Magneettisektori massa-analysaattorilla ionit kuljetetaan magneetin napojen välistä. Magneettikentässä varatut hiukkaset saavat kaarevan lentoradan. Mitä suurempi massa-varaussuhde on, sitä suurempi hiukkasen kaarevan lentoradan säde on. Laitteen analysaattoriputki on rakennettu siten, että sillä on kiinteä kaarevuussäde. Vain oikean massa-varaussuhteen omaavat partikkelit pääsevät analysaattoriputkea pitkin detektorille ja muut partikkelit törmäävät seinämiin. Tämän vuoksi magneettikentän suuruutta voidaan muuttaa jatkuvasti, jotta kaikki ionisoidut partikkelit pystytään havaitsemaan detektorilla [15].

Kvadrupoli massa-analysaattorissa neljä kiinteää sauvaa on järjestetty ionivirran mukaisesti. Sauvojen tulee olla poikkileikkaukseltaan hyperbolin tai lieriön muotoisia [15]. Tasa- ja vaihtovirtajännite liitetään tankoihin, jolloin sauvojen väliin jäävään alueeseen muodostuu värähtelevä sähköstaattinen kenttä [15, 21]. Ionit alkavat värähdellä sähköstaattisessa kentässä, riippuen vaihtovirtajännitteen voimakkuuden ja tasavirtajännitteen suhteesta [15]. Kevyet ionit pystyvät lentämään analysaattorin läpi pienillä jännitteillä, mutta raskaat ionit vaativat suurempia jännitteitä [21]. Värähtelyn voimakkuus jatkaa kasvamista, kunnes partikkeli osuu yhteen sauvasta. Oikean massa-varaussuhteen omaavat ionit kokevat vakaan värähtelyn vakiovoimakkuudella ja matkaavat kvadrupoliaksella alas korkkiruuvityyppisellä lentoradalla. Nämä ionit eivät osu sauvoihin, vaan ne jatkavat analysaattorilta matkaa detektorille [15].

Kvadrupolianaalysointilaitteet ovat helppokäyttöisiä, pienikokoisia, edullisia, luotettavia sekä monipuolisia, kun ne liitetään esimerkiksi nestekromatografiaan [22].

Lentoaika-analysointilaitteet perustuvat kahden erimassaisen ionin nopeuseroon. Vakiojännitteessä ionit saavat saman suuruiset kineettiset energiat [15, 21]. Kevyemmällä ionilla on suurempi nopeus, minkä vuoksi se saapuu detektorille ennen raskaampaa ionia. Lentoaika-analysointilaitteella pystytään analysoimaan jokainen muodostettu ioni. Pidentämällä lentomatkaa, saadaan resoluutiota paremmaksi. Resoluutiota voidaan myös kasvattaa ionireflektoimalla. Reflektori on sähkökenttä, joka käyttäytyy spektrometrissä ionipelinä. Reflektoreilla pystytään uudelleen fokusoimaan ionit, joilla on hieman erisuuruiset kineettiset energiat. Ioneja voidaan ohjata putkessa takaisin tulosuuntaan, jolloin niiden lentomatka saadaan kaksinkertaistettua [15].

#### 6.4 Detektorit

Massaspektrometrin detektorit koostuvat laskurista, jonka tuottama virta on suoraan verrannollinen siihen saapuvien ionien määrään [15]. Elektronimonistimen avulla tätä virtaa pystytään mittaamaan niin tarkasti, että jo yhden detektorille saapuvan ionin aiheuttama virta voidaan mitata. Yhden ionin törmätessä elektronimonistimen sisäpintaan, kaksi elektronia vapautuu [15, 21]. Noin 2 kV potentiaaliero detektorin sisäänmeno- ja ulostulo aukon välillä vetää elektroneja pidemmälle monistimelle, jolloin jokainen sisäpinnalle törmäävä elektroni aiheuttaa kahden uuden elektronin vapautumisen monistimen ohittamiseen asti. Tyypillisesti elektronimonistin vahvistaa signaalia  $10^5$ – $10^6$ . Kaareva elektronimonistin lyhentää ionien lentomatkaa ja tuloksena on pienempi kohina [15].

Valomonistindetektorit toimivat kuten elektronimonistimet, paitsi valomonistimella ionien törmäys tapahtuu fluoresoivaan näyttöön, jonka vuoksi ionien törmäyksien lukumäärä on suoraan verrannollinen fotonien emissioon. Valon intensiteetti analysoidaan ja detektorin signaalit syötetään piirturille, joka tuottaa massaspekttrin [15]. Neutraalien partikkeleiden pääsy detektorille on estetty analysointilaitteen jälkeen liitettyllä poikkeutuslevyllä, joka ohjaa positiivisella moodilla vain kationit ja negatiivisella moodilla anionit detektorille. Ylimääräiset molekyylit saattaisivat lisätä taustankohinaa ja liata detektoria [15, 21].

## 7 FLUORESENSSI

Luminesenssi on valon emissiota mistä tahansa aineesta ja sitä tapahtuu elektronisesti virittyneiltä tiloilta. Fluoresenssi on yksi luminesenssin alaluokka. Virittyneissä singletti-tiloissa, viritetyllä orbitaalilla oleva elektroni on paritettu vastakkaisen spinin omaavan perustilaorbitaalilla olevan elektronin kanssa. Elektronin paluu takaisin perustilalle on spin-sallittu ja tätä tapahtuu nopeasti fotonin emissiona. Fluoresenssin emissionopeudet ovat tyypillisesti  $10^8 \text{ s}^{-1}$  siten, että tyypillinen fluoresenssin elinaika on lähes 10 ns. Fluoroforin elinikä ( $\tau$ ) on keskimääräinen aika sen virityksen ja perustilalle paluun välillä. Koska fluoresenssi on ajallisesti lyhyt, aikaerotetun emission mittaaminen edellyttää hienostunutta optiikkaa ja elektroniikkaa. Aikaerotteista fluoresenssia käytetään laajalti ja tekniikan kehityksen myötä, nämä mittaukset ovat helpottuneet [23].

Jaksollisessa järjestelmässä tärkein ryhmä aikaerotteiselle fluoresenssille on lantanoidiryhmä. Esimerkiksi europium- ja terbium-ionien fluoresenssi syntyy elektronien siirtymisestä *f*-orbitaalien välillä. Nämä orbitaalit ovat suojattuja liuottimelta korkeammilla täytetyillä orbitaaleilla. Lantanoidit omaavat pitkät elinajat suojauksen ja matalan emissionopeuden vuoksi. Fluoresenssispektritiedot esitetään yleisesti emissiospektrinä. Fluoresenssispektri on kuvaaja fluoresenssin intensiteetin suhteesta aallonpituuteen (nm) tai aaltolukuun ( $\text{cm}^{-1}$ ). Emissiospektrit vaihtelevat suuresti ja ovat riippuvaisia fluoroforin ja liuottimen kemiallisista rakenteista. Fluoresenssin tärkeä piirre on sen suuri havaitsemisherkkyys. Prosessit, jotka tapahtuvat valon absorption ja emission välillä, kuvataan *Jablonskin*-kaaviolla. Näitä kaavioita käytetään erilaisissa muodoissa havainnollistamaan erilaisia molekyyliprosesseja, jotka voivat esiintyä virittyneissä tiloissa. [23].

### 7.1 Spektrofluorometrit

Useimmilla spektrofluorometreillä on mahdollista dokumentoida sekä viritys- että emissiospektrit. Emissiospektri on aallonpituuden jakauma yhdellä vakioviritysaallonpituudella. Viritysspektri puolestaan on emissiointensiteetin riippuvuus, joka mitataan yhdellä emissioaallonpituudella viritysaallonpituuden skannauksen jälkeen. Energiasta syntyvää valoa voidaan kuvata aallonpituutena ( $\lambda$ ), taajuutena ( $\nu$ ) tai aaltolukuna. Tavallisesti aallonpituus esitetään nanometrillä (nm) ja aaltoluku aallonpituuden käänteislukuna yksikössä  $\text{cm}^{-1}$ . Laitteiden tärkeimmät osat ovat

valonlähde, monokromaattori ja detektori. Ihanteellisessa tapauksessa detektoidut viritys- ja emissiospektrit edustaisivat fotonien suhteellisia voimakkuuksia aallonpituuksittain. Tällaisten "korjattujen" emissiospektrien saamiseksi yksittäisten osien ominaisuuksien on oltava seuraavat: valonlähteen on saatava aikaan tasainen fotonien tuotto kaikilla aallonpituuksilla, monokromaattorin on läpäistävä kaikkien aallonpituuksien fotonit yhtä tehokkaasti, monokromaattorin tehokkuuden on oltava riippumaton polarisaatiosta ja detektorin (valomonistinputken) on havaittava kaikkien aallonpituuksien fotoneja yhtä suurella tehokkuudella [23].

## 7.2 Valonlähde

Monipuolisin valonlähde on korkeapaineinen ksenon valokaarilamppu. Nämä valaisimet antavat suhteellisen jatkuvan valo tehon 250–700 nm aallonpituuksilla. Ksenon-valokaarilamput emittoivat jatkuvaa valoa elektronien ja ionisoitujen ksenonatomien rekombinaation seurauksena. Nämä ionit syntyvät ksenonatomien törmäyksestä valokaaren poikki kulkevien elektronien kanssa. Jatkuva emissio syntyy, kun elektronit erotetaan täydellisesti atomeista. Kompaktit fluorometrit ja levynlukijat käyttävät usein ksenon-välähdyslamppuja, joiden pulssien huippuintensiteetit ovat yleensä suurempia kuin jatkuvan valokaaren lampuilla. Välähdyslamppujen tuotto on myös korkeampaa UV-alueella. Ksenonlamput sisältävät tavallisesti niille suunnitellut kotelot, jotka suojaavat käyttäjää lampulta ja sen voimakkaalta optiselta tuotolta. Kotelo ohjaa ilmaa lampun yli ja poistaa ylimääräisen lämmön. Kotelon toinen tärkeä rooli on kerätä lampun tuotto, joka sitten kohdistetaan monokromaattorin sisääntuloaukkoon [23].

Korkeapaineisilla elohopealampuilla on yleisesti suurempi intensiteetti kuin ksenonlampuilla, mutta niiden intensiteetti on keskittynyt viivoihin. Yleensä on hyvä valita viritysaallonpituudet fluoroforiin sopiviksi. Nämä lamput ovat hyödyllisiä, jos elohopeaviivat ovat viritukseen sopivia aallonpituuksia. Saatavilla on myös korkeapaineisia elohopea-ksenonlamppuja, joilla on suurempi intensiteetti UV-säteilyssä kuin ksenonlampuilla ja ksenonin läsnäolo yleensä laajentaa spektrin tuottoa. Näiden lamppujen tuottoa hallitsevat elohopeaviivat. Aluksi elohopea-ksenonlampun tuotto on pääosin riippuvainen ksenonista, kun lamppu saavuttaa käyttölämpötilansa, kaikki elohopea höyrystyy, jolloin elohopean tuotto lisääntyy. Matalapaineiset elohopea- ja elohopea-argonlamput tuottavat erittäin teräviä viivaspektrejä, jotka ovat hyödyllisiä

ensisijaisesti kalibroitarkoituksiin. Elohopeaviivat ovat  $< 600$  nm aallonpituudella ja argonlinjat puolestaan  $> 600$  nm aallonpituudella [23].

Kvartsi-volframihalogeenilamput tarjoavat jatkuvan tuoton näkyvän valon ja IR-alueen spektreillä. Aiemmin tällaiset lamput eivät olleet hyödyllisiä fluoresenssille, koska niillä on alhainen tuotto  $< 400$  nm aallonpituuksilla. Tällöin ne eivät ole käyttökelpoisia UV-alueella absorboivien fluoroforien viritykseen. Spektrofluorometreissä LED-lamppuja on vasta hiljattain alettu käyttää valonlähteinä. LED-lamput voidaan sijoittaa lähelle näytteitä ja tarvittava viritysaallonpituus voidaan määrittää paremmin suodattimella. Toisin kuin ksenonlamppu, LED-lamput eivät tuota merkittävästi IR-valoa, jolloin ei vaadita lämpösuodatinta. LED-lamput ovat pitkiä käyttöiältään ja virrankulutuksiltaan alhaisia. Vielä vaihtoehtoinen valonlähde on laseriodi. Toisin kuin LED-lamput, laseriodit emittoivat monokromaattista säteilyä. Laseriodit ovat käytettävissä aallonpituuksilla noin 405–1 500 nm välillä. Ne ovat käteviä, koska tuottoa on helppo fokusoida ja käsitellä [23].

### 7.3 Monokromaattori

Monokromaattoreita käytetään polykromaattisen tai valkoisen valon hajaantumiseen eri väreihin tai aallonpituuksiin. Hajonta voidaan suorittaa käyttämällä prismoja tai diffraktiohilaa. Monokromaattorin toimintaspesifikaatioihin kuuluvat dispersio, tehokkuus ja hajavalon tasot. Dispersio esitetään yleensä yksikössä  $\text{nm mm}^{-1}$ . Fluoresenssispektroskopiassa monokromaattorilla tulee olla alhainen hajavalon taso, jotta vältytään hajavalon aiheuttamilta ongelmilta. Hajavalolla tarkoitetaan monokromaattorin lähettämää valoa valitun aallonpituuden ulkopuolelta. Monokromaattorit valitaan myös korkean hyötysuhteen saavuttamiseksi, jolloin maksimoidaan alhaisen valon tason havainnoinnin kyky. Raon leveydet ovat yleensä muuttuvia ja tyypillisesti monokromaattorissa on sekä sisäänmeno- että ulostulorako. Suurilla raon leveyksillä saadaan suuremmat signaalitasot ja suurempi signaali-kohinasuhde. Pienillä raon leveyksillä saavutetaan korkeampi resoluutio valon intensiteetin kustannuksella [23].

Monokromaattoreissa käytetään joko tasomaisia tai koveria hiloja. Tasomaiset hilat valmistetaan usein mekaanisesti ja koverat hilat holografisilla ja fotoresistisillä menetelmillä. Hilojen epätäydellisyydet ovat hajavalon lähetyksen lähde monokromaattoreissa. Monokromaattorit, jotka perustuvat koveriin hiloihin, voivat omata vähemmän heijastavia pintoja, matalamman hajavalon määrän ja ne voivat olla

tehokkaampia. Kovera hila toimii sekä diffraktio- että tarkennuselementtinä, jolloin muodostuu yksi heijastava pinta kolmen sijaan. Näistä syistä holografiset hilat ovat yleensä edullisempia fluoresenssispektroskopiaan. Yleensä viritysmönokromaattori valitaan UV-alueen ja emissiomönokromaattori näkyvän valon aallonpituuksilla. Optisilla suodattimilla pystytään kompensoimaan mönokromaattorien vähemmän ihanteellista käyttäytymistä. Kun fluoroforin spektriset ominaisuudet tunnetaan, saadaan suurin herkkyys aikaan suodattimilla. Niillä voidaan eristää haluttu aallonpituusalue poistamalla ei toivotut aallonpituudet sekä hajavaloa. Suodattimia voidaan sijoittaa sekä viritys- että emissio valon polulle [23].

#### 7.4 Valomonistinputki

Lähes kaikissa fluoresenssispektrometreissa detektorina toimii valomonistinputki, joiden toiminta perustuu sähkövirtaan, joka on verrannollinen valon intensiteettiin. Valomonistinputken vakuumiputki koostuu fotokatodista ja dynodien sarjasta. Fotokatodi on ohut metallikalvo, joka on ikkunan sisäpuolella. Fotonit aiheuttavat elektronien poistumisen tästä pinnasta. Fotelektronien tuotannon tehokkuus riippuu aallonpituudesta. Fotokatodia pidetään usein negatiivisella potentiaalilla, tyypillisesti -1000–(-2000) V. Myös dynodit pidetään negatiivisella potentiaalilla, mutta nämä potentiaalit lähestyvät kohti nollaa dynodiketjussa. Fotokatodin ja ensimmäisen dynodin välinen potentiaaliero on yleensä vakio, arvoltaan -50–(-200) V välillä. Tämä potentiaaliero aiheuttaa poistetun fotelektronin kiihdyttämisen kohti ensimmäistä dynodia. Törmäyksessä ensimmäisen dynodin kanssa fotelektroni aiheuttaa 5–20 elektronin poistumisen, riippuen jännite-erosta tähän dynodiin. Tämä prosessi jatkuu dynodisarjaa eteenpäin, kunnes sähkövirtapulssi saapuu anodille. Kvantitatiivista mittausta varten anodivirran on oltava verrannollista valon intensiteettiin [23].

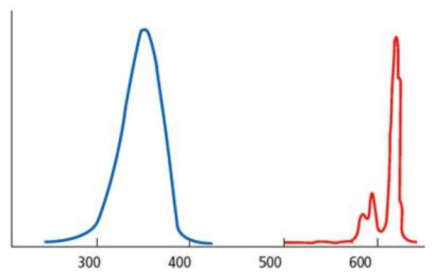
#### 7.5 Fluorofori

Laitteen vaatimat aallonpituuden ja ajan resoluutio määritetään fluoroforien spektristen ja kokeista saadut tiedot määritetään koettimien ominaisuuksien perusteella. Fluoroforin elinaikoihin on oltava verrattavissa kokeen aikaskaalaan. Lantanoidit ovat ainutlaatuisia fluoresoivia metalleja, joiden vesiliuosten emissiot havaitaan 0,5–3 ms heikentymisaikojen välillä. Nämä emissiot ovat seurausta 4f-orbitaalien elektronien

siirtymistä, joita kutsutaan kielletyiksi siirtymiksi. Tämän seurauksena absorptiokertoimet ovat hyvin pieniä, vain alle  $10 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Näiden emissiiviset nopeudet ovat hitaita, mikä johtaa pitkiin elinaikoihin. Lantanoidien heikon absorptiokyvyn vuoksi ne eivät yleensä virity suoraan, vaan kelatoitujen orgaanisten ligandien kautta. Näin ollen muodostunut kompleksi heijastaa ligandin eikä lantanoidin absorptiospektriä [23].

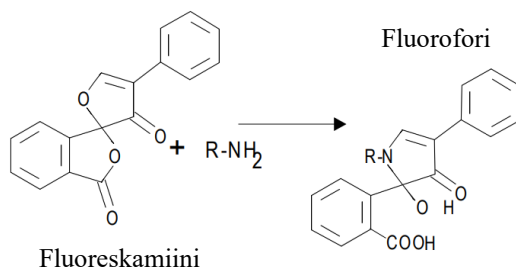
Lantanoideille on löytynyt käyttöä erittäin herkkiin havaitsemisiin, erityisesti immunomäärityksiin. Kaikki biologiset näytteet lähettävät automaattista fluoresenssia, joka on yleensä rajoittava tekijä korkean herkkyyden havaitsemisessa. Autofluoresenssi heikkenee tavallisesti nanosekunnissa, kuten useimmilla fluoroforeilla. Pitkän elinajan vuoksi lantanoidit jatkavat fluoresenssin emissioita autofluoresenssin häviämisen jälkeen. Detektori kytketään päälle virityspulssin jälkeen, jolloin lantanoidin intensiteetti integroidaan. Nämä ajalliset immunomääritykset ovat tasapainotilan intensiteetin mittauksia, joissa intensiteetti mitataan jonkin ajanjakson aikana virityspulssin jälkeen [20]. Lantanoidikelaattien suurimmat edut ovat niiden suuret Stokesin siirtymät, kapeat emissiohuiput sekä optimaaliset emissio- ja viritysaallonpituudet. Lantanoidikelaattien fluoresenssin heikentymisajat ovat noin 10–1 000 ps, kun taas luonnollisen fluoresenssin heikentymisaika on tyypillisessä 1–20 ns luokkaa. Tästä syystä lantanoidikelaatteja käyttävät aikaerotteiset fluorometrit ovat jopa useita kertaluokkia herkempiä kuin tavanomaiset fluorometrit [25].

Lantanoideista erityisesti europium ja terbium ovat ainutlaatuisia fluoresoivia koettimia. Europiumin emissioelinikä on millisekunnin luokkaa. Emissionopeus on matala, koska siirtymät ovat muodollisesti kiellettyjä. Fluoresenssikoettimet ovat yleensä herkkiä ympäröivälle ympäristölle. Lantanoidit voivat olla herkkiä ympäristölle, mutta ne eroavat tyypillisistä fluoroforeista. Koska lantanoidit omaavat matalan virityskertoimen, niitä ei yleensä viritetä suoraan. Lantanoidi-ionit ovat ensin sidottu ligandeihin, jotka muodostavat tällöin luminoivan kelaatin. Ligandin sitova energia voidaan siirtää tehokkaasti lantanoidi-ionille. Viritetyn fluoroforin energian on tämän vuoksi oltava riittävä lantanoidin virittämiseksi [23]. Seuraavalla sivulla on esitetty europiumkelaatin viritys- ja emissiopektrit (*Kuva 10*). Spektrissä x-akselilla on aallonpituus (nm) ja y-akselilla intensiteetti. Spektrien intensiteettihiippujen aallonpituuksia (340 ja 620 nm europiumille) käytetään yleisesti fluoresenssimittauksissa.

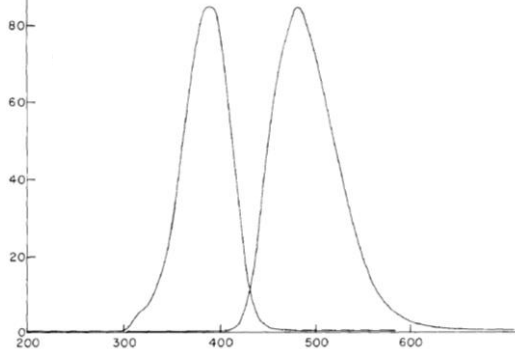


Kuva 10. Europiumkelaatin viritys- ja emissiospektrit [24]

Fluoreskamiini, 4-fenyylispiro[furaani-2(3*H*),1'-ftalaani]-3,3'-dioni, on käyttökelpoinen reagenssi primääristen amiinien fluorometriseen määrittämiseen. Fluoreskamiinin ja primäärisen amiinin välisen reaktion laajuus sekä syntyvien fluoroforien fluoresenssin intensiteetit riippuvat pH-arvosta, liuotteen koostumuksesta ja reagenssin konsentraatiosta. Fluoreskamiini soveltuu myös primääristen amiinien fluorometriseen kvantitointiin. Tämä ei-fluoresoiva yhdiste reagoi primääristen amiinien kanssa muodostaen pyrrolinoniyhdisteitä (Kuva 11), jotka virityksen jälkeen 390 nm aallonpituudella säteilevät voimakasta fluoresenssia 475–490 nm aallonpituuksilla (Kuva 12). Muodostuneita pyrrolinoniyhdisteitä kutsutaan fluoroforeiksi. Reaktio fluoreskamiinin ja primäärisen amiinin välillä etenee tehokkaasti huoneenlämpötilassa vesiliuoksissa ja mahdollistaa amiinien submikromolaaristen konsentraatioiden määrittämisen [26].



Kuva 11. Fluoreskamiinin reaktio primäärisen amiinin kanssa [26].



Kuva 12. Fluoreskamiinin ja primäärisen amiinin reaktion viritys- ja emissiospektrit [26].

## 7.6 Aikaerotteinen fluoresenssi

Fluoresenssispektroskopiassa käytetään aikaerotteisia mittauksia, erityisesti biologisten makromolekyylien tutkimuksissa. Aikaerotteisissa fluoresenssimittauksissa on käytössä kaksi menetelmää, jotka ovat aika-alue ja taajuusalue menetelmät. Aika-alue- tai pulssifluorometriassa näyte viritetään valon pulssilla. Pulssin leveydestä tehdään mahdollisimman lyhyt ja tämä on lyhyempi kuin näytteen fluoresenssin elinaika ( $\tau$ ). Ajasta riippuvainen intensiteetti mitataan virityspulssin jälkeen. Elinaika lasketaan kuvaajan  $\log I(t)$  ajanfunktion kulmakertoimen avulla. Taajuusalueen tai vaihemodulointimenetelmän tapauksessa näyte viritetään moduloidun valon intensiteetin kanssa, joka on tyypillisesti moduloitu siniaalto. Valon intensiteetti vaihtelee suurella taajuudella, tyypillisesti 100 MHz, ja taajuuden käänteisluku on verrattavissa elinajan käänteislukuun. Kun fluoresoiva näyte viritetään tällä tavalla, niin emissio pakotetaan vastaamaan samalla modulaatiotaajuudella. Fluoroforin elinaika aiheuttaa viivästymisen emissiossa virityksen suhteen. Tämä viive mitataan vaihesiirrolla ( $\phi$ ), jota voidaan käyttää elinajan laskemiseen. Spektrofluorometreillä tiedonkeruu ajat vaihtelevat sekunnista minuutteihin. Viive aika ( $\tau$ ) kertoo mittausten välisen ajan erotuksen, mikä on tyypillisesti  $10^{-2}$ – $10^2$  ms välillä [23].

Pysyvät luminesenssinanohiukkaset omaavat pitkäkestoisen jälkihehkun. Nämä hiukkaset voivat varastoida virityksen energiaa ja vapauttaa sen hitaasti fotonisella emissiolla. Pysyvä luminesenssi voi kestää useita tunteja virityksen poistamisen jälkeen, mikä tarjoaa monia soveltuvuuksia optisiin analyyseihin [27]. Kun fluoroforia sisältävä näyte viritetään äärettömän terävällä ( $\delta$ -funktio) valonpulsilla, johtaa tämä fluoroforin alkuperäisen populaation virittyneeseen tilaan. Emissio on satunnainen tapahtuma, jossa jokaisella viritetyllä fluoroforilla on sama todennäköisyys emittoida tietyn ajan. Tämä johtaa eksponentiaaliseen virittyneen tilan heikentymiseen populaatiossa. Fluoresenssikokeessa ei tarkkailla virittyneiden molekyylien lukumäärä, vaan fluoresenssin intensiteettiä, joka on verrannollinen populaation ajan hetkellä. Fluoresenssin elinaika voidaan määrittää kuvaajan  $\log I(t)$  ajanfunktion kulmakertoimen avulla, mutta yleisemmin tiedot voidaan sovittaa oletetuksi heikentymismalliksi. Elinaika on fluoroforin keskimääräinen aika, jonka se pysyy virittyneessä tilassa. Tämä on tilastollinen keskiarvo ja fluoroforit emittoivat satunnaisesti koko heikentymisen ajan [23].

## 8 ERIKOISTYÖ

### 8.1 Työ

Erikoistyö aloitettiin näytteiden valmistuksella yrityksen laadunvalvontalaboratoriossa desinfektio tuotteen reseptin mukaan. Menetelmien soveltuvuuksien vertailuihin valmistettiin viisi näytettä ja aktiiviaineiden titrausstandardisuoria varten valmistettiin vielä neljä näytettä. Desinfektio tuotteen lisäksi muissa valmistetuissa näytteissä aktiiviainepitoisuuksia muutettiin. Näissä toinen aktiiviainepitoisuus pidettiin vakiona ja toisen osuutta vähennettiin tai lisättiin. Kaikista näytteistä mitattiin valmistuksen yhteydessä tiheydet ja pH-arvot, sillä nämä suureet analysoidaan tämän tuotteen kohdalla laadunvalvonnassa. Alla olevassa taulukossa (*Taulukko 2*) on esitetty näytteiden kokonaismassat, tiheydet, lasketut tilavuudet ja pH-arvot. Liuosten valmistukset ovat esitetty liitteessä 1.

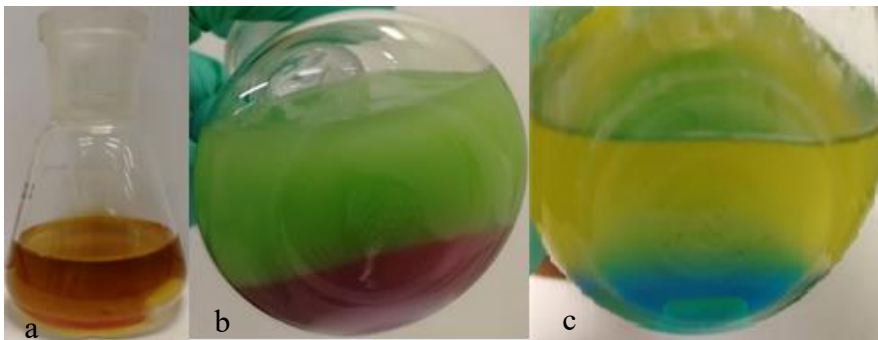
Taulukko 2. Näytteiden 1–5 kokonaismassat, tiheydet, lasketut tilavuudet ja pH-arvot.

Näyte	1	2	3	4	5
m (g)	400,09	400,05	400,04	400,03	400,04
$\rho$ (g dm <sup>-3</sup> )	995,6	1004,2	986,0	997,5	992,8
V (dm <sup>3</sup> )	0,402	0,398	0,406	0,401	0,403
pH	11,28	10,99	11,28	11,04	11,28

#### 8.1.1 Titraus

Näytteiden titraukset suoritettiin yrityksen laadunvalvontalaboratoriossa käytössä olevalla analyysimenetelmällä manuaalisella titraattorilla. Näytteiden käsittelyt ja titraukset suoritettiin vetokaapissa liuottimena olevan kloroformin vuoksi. Lisäksi kloroformipitoiset titrausjätteet kerättiin jätepulloihin. Titraukset aloitettiin valmistetun natriumdodekyylisulfaattiliuoksen (SDS) tarkistamisella kahdella rinnakkaisella mittauksella. Erlenmeyereihin pipetoitiin 20 ml tilavuudet 0,004 M SDS-liuosta, 20 ml tilavuudet hapanta sekaindikaattoriliuosta ja 15 ml tilavuudet kloroformia. Muutaman minuutin voimakkaan sekoituksen jälkeen, liuokset titrattiin kaupallisella 0,004 M hyamiini 1622 liuoksella. Titrauskulutukset kirjattiin ja niiden keskiarvoa käytettiin laskuissa korjauskertoimena. Standardisuoriin käytetyn SDS-liuoksen keskiarvoinen titrauskulutus oli 19,757 ml ja näytteiden 1–5 titrauksissa käytetyn SDS-liuoksen kulutus oli 19,677 ml.

Seuraavaksi happamissa oloissa titrattiin TA-pitoisuudet. Näytteistä valmistettiin 1:1 000 laimennokset täyttämällä 1 l mittapullot lähes täyteen RO-vettä, pipetoimalla 1 ml tilavuudet näytteitä ja täyttämällä mittapullot merkkiin RO-vedellä. Näytteiden 1–5 kvantitatiivisille analyyseille tehtiin kolme rinnakkaista ja TA standardisuoralle kaksi rinnakkaista mittausta. Erlenmeyereihin pipetoitiin 10 ml tilavuudet 1:1 000 näytelaimennoksia, 15 ml tilavuudet kloroformia, 20 ml tilavuudet hapanta sekaindikaattoriliuosta ja 20 ml tilavuudet 0,004 M SDS-liuosta. Näytteitä sekoitettiin voimakkaasti noin minuutin ajan, jonka jälkeen suoritettiin titraukset 0,004 M hyamiini 1622 liuoksella (Kuva 13). Titrauskulutukset kirjattiin (Taulukko 3 ja Taulukko 5) ja niiden avulla laskettiin näytteiden TA-poikkeama-% (Taulukko 4 ja Taulukko 6).



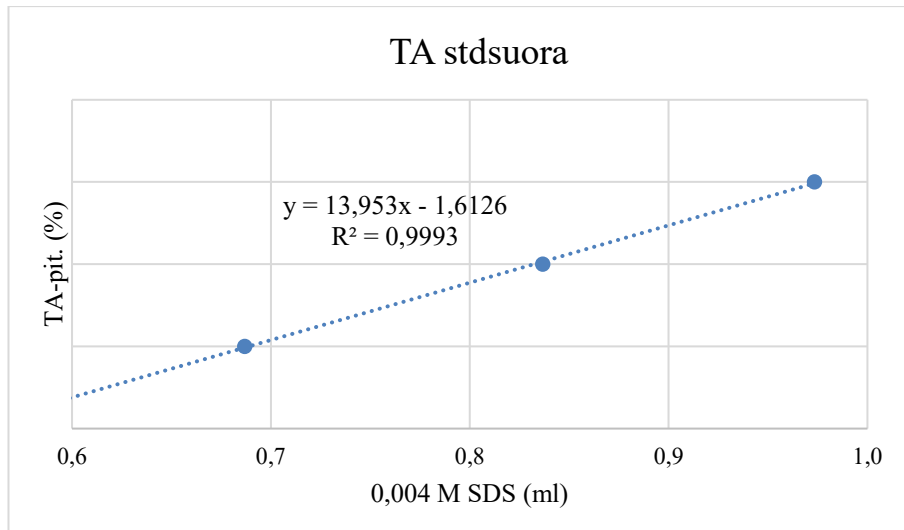
Kuva 13. Happaman titrauksen vaiheet: a) alku-, b) väli- ja c) päätepiste.

Taulukko 3. Standardien titrauskulutukset (ml), keskiarvot ja hajonnat.

Rin	Näyte 8	Näyte 1	Näyte 9
1	19,076	18,904	18,744
2	19,081	18,957	18,847
ka	19,079	18,931	18,796
s	0,002	0,027	0,052
CV %	0,013	0,140	0,274

Taulukko 4. Happaman titrauksen TA poikkeama-% standardeissa.

Näyte	V (ml)	poikkeama-%
8	19,079	0,36
1	18,931	0,64
9	18,796	0,26



Kuvaaja 1. TA standardisuoja.

Taulukko 5. Näytteiden titrauskulutukset (ml), keskiarvot ja hajonnat.

Rin	Näyte 1	Näyte 2	Näyte 3	Näyte 4	Näyte 5
1	18,709	18,836	18,345	18,920	18,425
2	18,853	18,845	18,249	18,824	18,420
3	18,875	18,740	18,256	18,961	18,438
ka	18,812	18,807	18,283	18,902	18,428
s	0,074	0,048	0,044	0,057	0,008
CV %	0,391	0,253	0,239	0,304	0,041

Taulukko 6. Näytteiden 1–5 happaman titrauksen TA poikkeama-%.

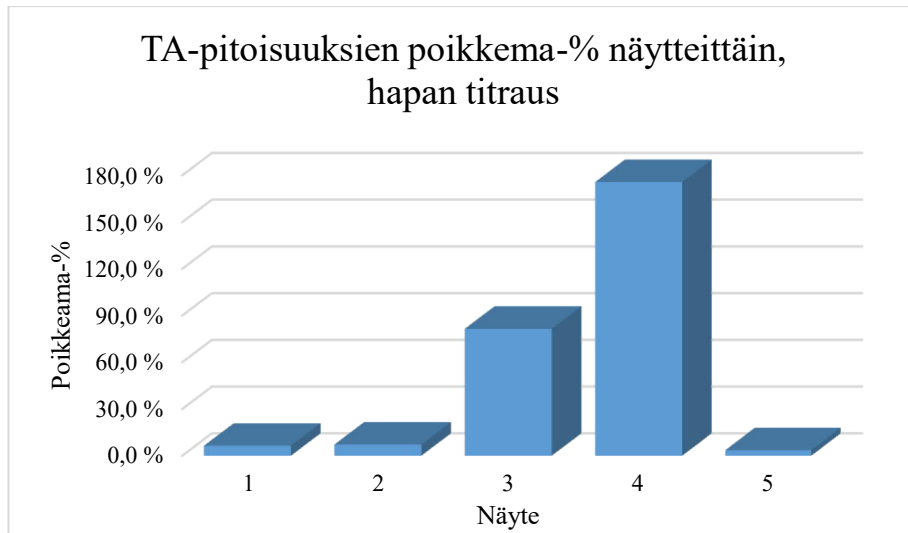
Näyte	V (ml)	poikkeama-%
1	18,812	6,46
2	18,807	7,20
3	18,283	81,6
4	18,902	176
5	18,428	3,59

Laskuesimerkit (Taulukko 4 ja

Taulukko 6) näytteen 1 TA-titrauksille. Standardisuoran yhtälön avulla (Kuvaaja 1) laskettiin TA-pitoisuudet, -massat ja m-%. Poikkeama-% laskettiin kaavalla:

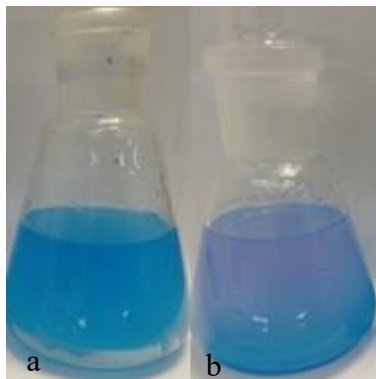
$$\text{poikkeama} - \% = \left( \frac{|m_{TA} - m_{teor.TA}|}{m_{teor.TA}} \right) \times 100 = 6,46 \%$$

Näytteiden 1–5 TA-pitoisuuksien poikkeama-% tehtiin pylväsdiagrammi (Kuvaaja 2).



Kuvaaja 2. Hapanitrausten TA-pitoisuuksien poikkeama-% näytteittäin.

Emäksisissä oloissa titrattiin DDAC-pitoisuudet. Näytteiden 1–5 kvantitatiivisille analyyseille tehtiin kolme rinnakkaista ja DDAC standardisuoralle kaksi rinnakkaista mittausta. Erlenmeyereihin pipetoitiin 20 ml tilavuudet 1:1 000 näytelaimennoksia, 50 ml tilavuudet pH 11 puskuriliuosta, 20 ml tilavuudet kloroformia sekä 5 tippaa bromifenolisinistä indikaattoriliuosta. Näytteitä sekoitettiin kevyesti noin minuutin ajan ennen titrauksia 0,004 M SDS-liuoksella (*Kuva 14*). Titrauskulutukset kirjattiin (*Taulukko 7* ja *Taulukko 9*) ja niiden avulla laskettiin näytteiden DDAC-poikkeama-% (*Taulukko 8* ja *Taulukko 10*).



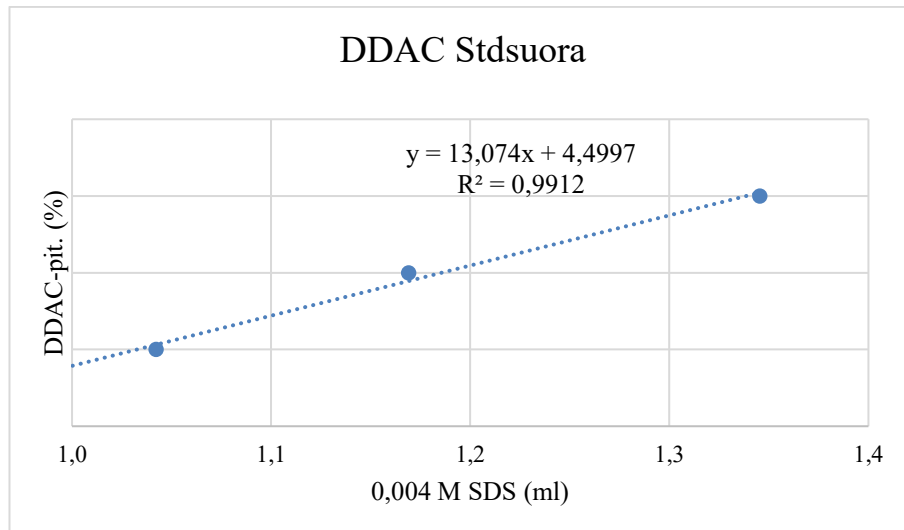
Kuva 14. Emäksisen titrauksen vaiheet: a) alku- ja b) päätepiste.

Taulukko 7. Titrantin titrauskulutukset (ml), keskiarvot ja hajonnat standardeissa.

Rin	Näyte 6	Näyte 1	Näyte 7
1	1,012	1,187	1,358
2	1,098	1,180	1,366
ka	1,055	1,184	1,362
s	0,043	0,004	0,004
CV %	4,076	0,296	0,294

Taulukko 8. Emäksisen titrauksen DDAC pitoisuudet standardeissa.

Näyte	V (ml)	poikkeama-%
6	1,055	0,68
1	1,1835	1,05
7	1,362	0,40



Kuvaaja 3. DDAC standardisuora.

Taulukko 9. Titrantin kulutukset, keskiarvot ja hajonnat näytteittäin.

Rin	Näyte 1	Näyte 2	Näyte 3	Näyte 4	Näyte 5
1	1,626 <sup>a</sup>	0,610	1,938	1,135	1,224
2	1,303	0,638	1,949	1,208	1,281
3	1,196	0,625	1,948	1,200	1,256
ka	1,250	0,624	1,945	1,181	1,254
s	0,054	0,011	0,005	0,033	0,023
CV %	4,282	1,832	0,255	2,768	1,861

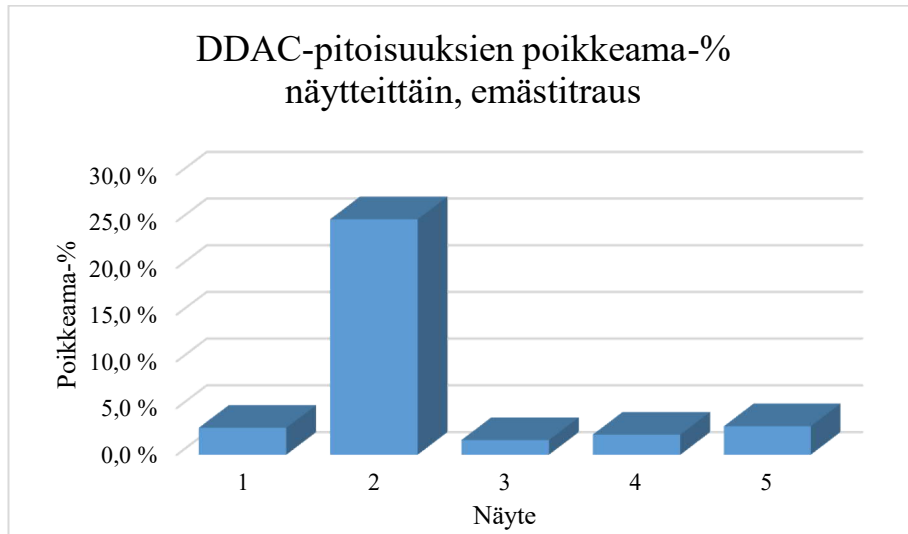
<sup>a</sup>Tätä kulutusta ei huomioitu, sillä titraus meni huomattavasti yli päätepisteen.

Taulukko 10. Näytteiden 1–5 happaman titrauksen DDAC poikkeama-%.

Näyte	V (ml)	poikkeama-%
1	1,250	2,88
2	0,624	25,2
3	1,945	1,58
4	1,181	2,15
5	1,254	3,05

Laskuesimerkit (Taulukko 8 ja Taulukko 10) näytteen 1 DDAC-titrauksille. Standardisuoran yhtälön avulla (Kuvaaja 3) laskettiin DDAC-pitoisuudet, -massat ja m-%. Poikkeama-% laskettiin kaavalla:  $poikkeama - \% = \left( \frac{|m_{DDAC} - m_{teor.DDAC}|}{m_{teor.DDAC}} \right) \times 100 =$

2,88 %. Näytteiden 1–5 DDAC-pitoisuuksien poikkeama-% tehtiin pylvädiagrammi (Kuvaaja 4).



Kuvaaja 4. Emästitrausten DDAC-pitoisuuksien poikkeama-% näytteittäin.

### 8.1.2 NMR

Aluksi testattiin eri sisäisiä standardeja siltä varalta, että  $^1\text{H-NMR}$ -spektrissä ei havaittaisi näytteiden komponenttien kanssa päällekkäisyyksiä. Kokeillut standardit olivat trimetyylisilyyli, maleiinihappo ja 1,3,5-trioksaani, joista viimeistä päädyttiin käyttämään. Trioksaania punnittiin analyysivaa'alla 14,4 mg ja tämä liuotettiin 15 ml tilavuuteen  $\text{D}_2\text{O}$ . Näytteistä valmistettiin 2 rinnakkaista laimennosta pipetoimalla näytteitä 20  $\mu\text{l}$  tilavuudet ja laimentamalla 750  $\mu\text{l}$  tilavuuteen trioksaaniliuoksella, jolloin trioksaanin ainemäärä näyteputkissa oli 7,78  $\mu\text{mol}$  (Taulukko 11).

Taulukko 11. 1,3,5-trioksaanin ainemäärä näyteputkissa.

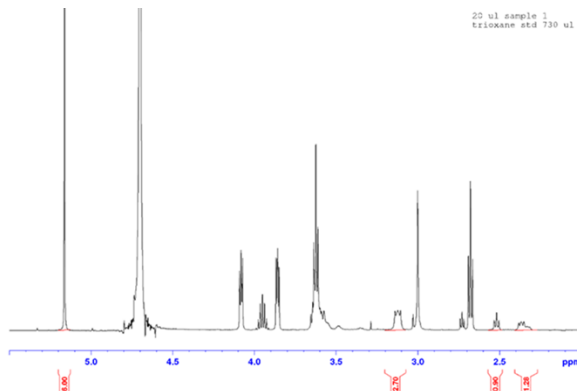
Trioksaani	Arvot
$m_{\text{punnitus}}$	14,4 mg
$M_t$	90,08 $\text{g mol}^{-1}$
$n_{\text{kok t}}$	0,160 mmol
$V_{\text{liuotus}}$	15 ml
$c_t$	0,0107 $\text{mmol ml}^{-1}$
$V_t$	0,73 ml
$n_t$	7,780 $\mu\text{mol}$

Trioksaanin ainemäärälaskut (Taulukko 11) ovat laskettu seuraavasti. Koko ainemäärä laskettiin kaavalla:  $n_{\text{kok t}} = \frac{m_{\text{punnitus}}}{M_t} = \frac{14,4 \text{ mg}}{90,08 \text{ g/mol}} = 0,160 \text{ mmol}$ .

Trioksaanin konsentraatio laskettiin kaavalla:  $c_t = \frac{n_{\text{kok t}}}{V_{\text{liuotus}}} = \frac{0,160 \text{ mmol}}{15 \text{ ml}} =$

$0,0107 \text{ mmol/ml}$ . Lopuksi laskettiin näyteputkessa olevan trioksaanin ainemäärä:  $n_t = c_t V_t = 0,0107 \text{ mmol/ml} \times 0,73 \text{ ml} = 7,780 \text{ } \mu\text{mol}$ .

Näytelaimennokset analysoitiin laitekeskuksen 500 MHz NMR-laitteella. Kvantitatiivisessa NMR-analyysissä käytetyt mittauskomennot ja parametrit ovat esitetty liitteessä 2 (Taulukko 33 ja Taulukko 34). Jokaiselle näytteen  $^1\text{H}$ -NMR-spektrin vesipiikille (4,7 ppm siirtymä) tehtiin manuaalinen faasinkorjaus, jonka jälkeen 1,3,5-trioksaanin, DDAC- ja TA-piikit integroitiin (Kuvaaja 5) ja integraalit taulukoitiin (Taulukko 12, Taulukko 13 ja Taulukko 14). 1,3,5-trioksaanipiikin integraaliksi asetettiin 6 (Calibrate current integral), joka vastasi yhdisteen protonien lukumäärää. Näytteiden integraalien rinnakkaisista laskettiin keskiarvot ja -hajonnat (Taulukko 15, Taulukko 16 ja Taulukko 17).



Kuvaaja 5. Näytteen 1  $^1\text{H}$ -NMR-spektri. Vasemmalta oikealle integroidut piikit luetteluna: 1,3,5-trioksaani, DDAC ja kaksi TA piikkiä.

Taulukko 12. DDAC piikin 3,15 ppm siirtymän integraalit.

Rin	1	2	3	4	5
1	2,704	1,3981	3,4566	2,431	2,5659
2	2,9594	1,5161	3,9524	2,6908	2,7923
ka	2,8317	1,4571	3,7045	2,5609	2,6791
s	0,1277	0,059	0,2479	0,1299	0,1132
CV %	4,51	4,05	6,69	5,07	4,23

Taulukko 13. TA piikin 2,55 ppm siirtymän integraalit.

Rin	1	2	3	4	5
1	0,8978	0,9609	0,7541	0,2669	1,4266
2	0,9575	0,9744	0,8747	0,2767	1,5399
ka	0,92765	0,96765	0,8144	0,2718	1,48325
s	0,02985	0,00675	0,0603	0,0049	0,05665
CV %	3,22	0,70	7,40	1,80	3,82

Taulukko 14. TA piikin 2,35 ppm siirtymän integraalit.

Rin	1	2	3	4	5
1	1,2796	1,3902	1,082	0,3733	2,0394
2	1,4125	1,4645	1,2347	0,4079	2,1821
ka	1,34605	1,42735	1,15835	0,3906	2,11075
s	0,06645	0,03715	0,07635	0,0173	0,07135
CV %	4,94	2,60	6,59	4,43	3,38

Taulukko 15. DDAC-pitoisuudet ja poikkeama-% näytteittäin.

Näyte	Int.	poikkeama-%
1	2,8317	0,13
2	1,4571	1,84
3	3,7045	12,1
4	2,5609	9,87
5	2,6791	5,27

Taulukko 16. TA-pitoisuudet ja poikkeama-% näytteittäin (2,55 ppm).

Näyte	Int.	poikkeama-%
1	0,92765	9,67
2	0,96765	6,60
3	0,8144	19,9
4	0,2718	22,3
5	1,48325	13,3

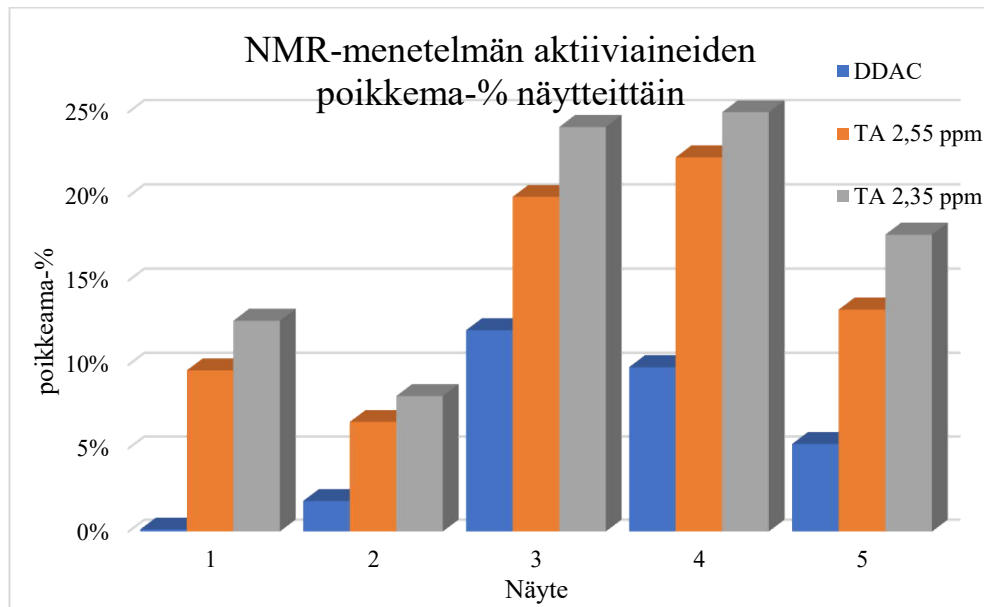
Taulukko 17. TA-pitoisuudet ja poikkeama-% näytteittäin (2,35 ppm).

Näyte	Int.	poikkeama-%
1	1,34605	12,6
2	1,42735	8,15
3	1,15835	24,1
4	0,3906	25,6
5	2,11075	17,7

Piikkien intensiteettien keskiarvoista laskettiin aktiiviaineiden pitoisuudet näytteittäin. DDAC-piikin (Taulukko 15) ja TA-piikin (2,55 ppm) (Taulukko 16) protonien lukumäärä oli 4 ja TA-piikin (2,35 ppm) (Taulukko 17) protonien lukumäärä oli 6. Aktiiviaineiden ainemäärät ( $\mu\text{mol}$ ) laskettiin kaavalla:  $n_x = \frac{\left(\frac{I_x}{N_x}\right)}{\left(\frac{I_t}{N_t}\right)} \times n_t$ , jossa  $I_x$  oli aktiiviaineen integraalin intensiteetti,  $N_x$  aktiiviaineen protonien lukumäärä,  $I_t$  1,3,5-trioksaanin integraalin intensiteetti,  $N_t$  1,3,5-trioksaanin protonien lukumäärä ja  $n_t$  1,3,5-trioksaanin ainemäärä. Näytteiden laimennoskertoimet laskettiin jakamalla näytteen kokonaistilavuudet näytteen tilavuudella laimennoksessa. Laimennoskertoimet olivat 20 093, 19 919, 20 286, 20 052 ja 20 147. Laskuesimerkit (Taulukko 15) näytteen 1 DDAC-analyysille. Näytteessä olevan aktiiviaineen kokonaisainemäärä laskettiin huomioimalla laimennoskerroin. Aktiiviaineen massa ja m-% sekä poikkeama-%

laskettiin lopuksi:  $poikkeama - \% = \frac{|m_{akt.aine} - m_{teor.akt.aine}|}{m_{teor.akt.aine}} \times 100 \% = 0,13 \%$ .

Lasketuista aktiiviaineiden poikkeama-% tehtiin pylväsdiagrammi (Kuvaaja 6).



Kuvaaja 6. Aktiiviaineiden poikkeama-% näytteissä kvantitatiivisessa NMR-analyysissä.

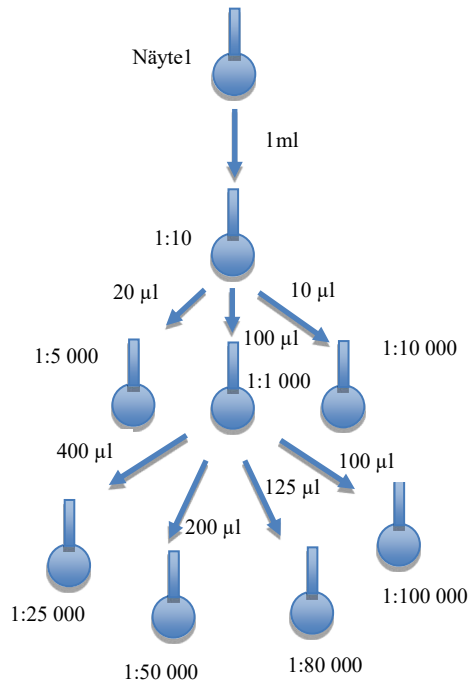
### 8.1.3 HPLC-MS

Aktiiviaineiden samanaikaiselle analysoinnille luotiin gradienttiohjelma (Taulukko 18), jolla TA erottui 3,01 min ja DDAC 3,94 min retentioajoilla (Kuvaaja 9). Eluenteina käytettiin asetonitriiliä ja 0,2 % muurahaishappoliuosta. Liuosten valmistukset ovat liitteessä 1. Näytteestä 1 valmistettiin kvantitatiivisiin analyyseihin standardilaimennokset 10 ml mittapulloissa käyttämällä 10 % ACN/HCOOH-liuosta laimentamiseen. Lisäksi näytteistä valmistettiin 1:20 000 laimennokset eppendorffputkissa aktiiviainepitoisuuksien analyyseihin. Kaikista laimennoksista suodatettiin 1 ml tilavuudet 0,2 µm PTFE-suodattimilla vialeihin. Standardi- (Kuva 15) ja näytelaimennokset (Kuva 16) analysoitiin orgaanisen kemian kvadrupolilaitteella. Mittausparametrit ovat esitetty liitteessä 2 (Taulukko 35)- Kaikista laimennoksista suoritettiin kolme rinnakkaista injektointia. Analysoiduista kromatogrammeista poimittiin TA-piikit moolimassalla 300 ja DDAC-piikit 326 manuaalisesti. Automaattista integrointia apuna käyttäen, piikkien pinta-alat kirjattiin. Standardilaimennosten piikkien pinta-aloista (Taulukko 19 ja Taulukko 20) ja aktiiviainepitoisuuksista sovitettiin standardisuorat (Kuvaaja 7 ja Kuvaaja 8), joiden yhtälöiden avulla laskettiin näytteiden

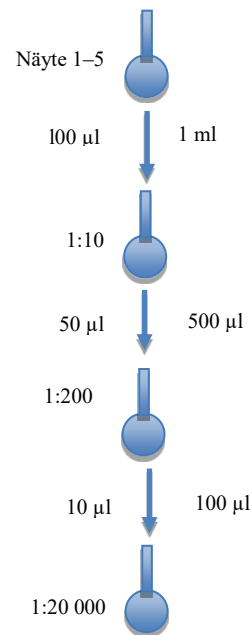
piikkien pinta-aloista (*Taulukko 21* ja *Taulukko 23*) aktiivivainepitoisuudet (*Taulukko 22* ja *Taulukko 24*)

Taulukko 18. Gradienttiohjelma molemmille aktiivivaineille.

Vaihe	Aika (min)	ACN (%)	0,2 % HCOOH (%)
1	0	10	90
2	2,0	100	0
3	4,5	10	90
4	8,0	10	90



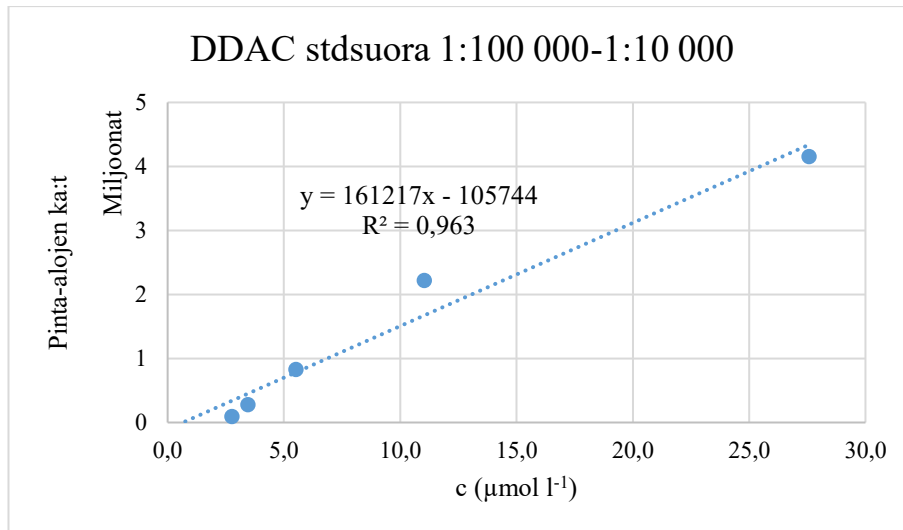
Kuva 15. Standardilaimennosten valmistaminen näytteestä 1.



Kuva 16. Näytelaimennosten valmistaminen, 1,5 ml eppendorffputkissa (*vas.*) ja 10 ml mittapulloissa (*oik.*).

Taulukko 19. Standardilaimennosten DDAC piikkien pinta-alat.

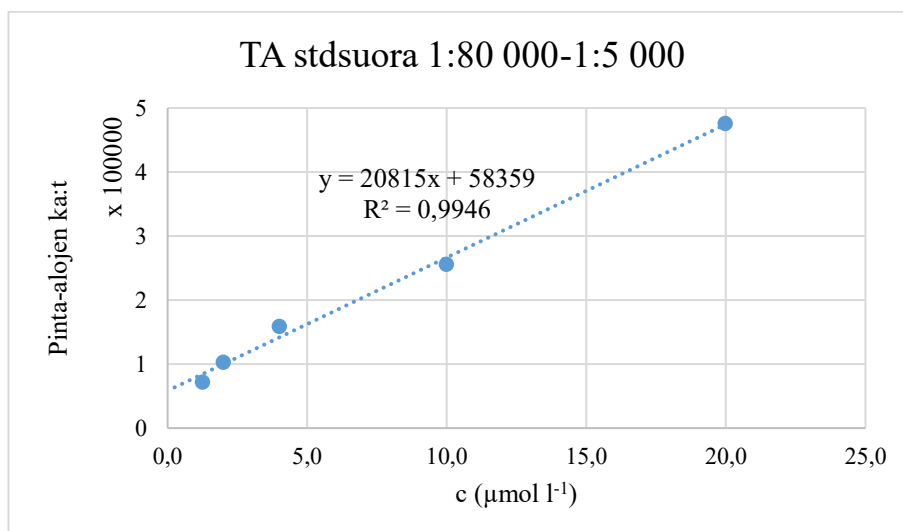
Rin	1:100 000	1:80 000	1:50 000	1:25 000	1:10 000
1	94 399	289 771	852 275	2 273 575	4 329 796
2	89 485	272 335	816 907	2 270 941	4 172 112
3	101 181	281 050	823 436	2 117 824	3 966 241
ka	95 022	281 052	830 873	2 220 780	4 156 049
s	4 795	7 118	15 367	72 809	148 854
CV%	5,046	2,533	1,849	3,279	3,582



Kuvaaja 7. DDAC standardisuora 1:100 000–1:10 000 laimennoksilla.

Taulukko 20. Standardilaimennosten TA piikkien pinta-alat.

Rin	1:80 000	1:50 000	1:25 000	1:10 000	1:5 000
1	72 056	101 927	148 646	247 583	460 129
2	70 276	101 720	162 481	249 362	464 721
3	73 083	105 713	165 447	271 835	503 450
ka	71 805	103 120	158 858	256 260	476 100
s	1 160	1 836	7 322	11 037	19 430
CV%	1,615	1,780	4,609	4,307	4,081



Kuvaaja 8. TA standardisuora 1:80 000–1:5 000 laimennoksilla.

Taulukko 21. Näytelaimennosten DDAC piikkien pinta-alat.

Rin	Näyte 1	Näyte 2	Näyte 3	Näyte 4	Näyte 5
1	2 328 890	1 115 216	3 518 794	2 291 864	2 801 800
2	2 201 087	1 034 618	3 422 605	2 637 600	2 709 925
3	2 232 804	1 001 733	3 604 484	2 385 429	2 661 237
ka	2 254 260	1 050 522	3 515 294	2 438 298	2 724 321
s	54 337	47 674	74 293	146 013	58 280
CV%	2,410	4,538	2,113	5,988	2,139

Taulukko 22. Näytteiden DDAC-pitoisuudet ja poikkeama-%.

Näyte	Pinta-alojen ka:t	poikkeama-%
1	2 254 260	6,18
2	1 050 522	3,09
3	3 515 294	9,66
4	2 438 298	14,2
5	2 724 321	27,7

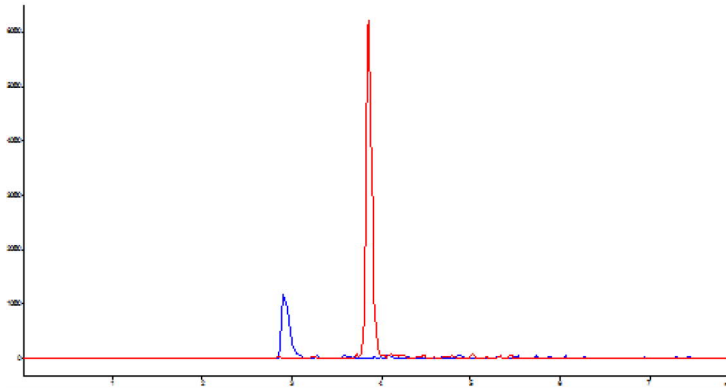
Esimerkkilaskut (Taulukko 22) näytteen 1 DDAC-pitoisuudet. Standardisuoran yhtälön (Kuvaaja 7) avulla laskettiin aktiiviaineiden konsentraatiot näytelaimennoksissa. Aktiiviaineen kokonaiskonsentraatio laskettiin huomioimalla laimennuskerroin. Niiden massat ja m-% sekä poikkeama-% laskettiin lopuksi kaavalla:  $poikkeama - \% = \frac{m_{akt.aine} - m_{teor.akt.aine}}{m_{teor.akt.aine}} \times 100 \% = 6,18 \%$ . Lasketuista aktiiviaineiden poikkeama-% tehtiin pylväsdiagrammi (Kuvaaja 10).

Taulukko 23. Näytelaimennosten TA piikkien pinta-alat.

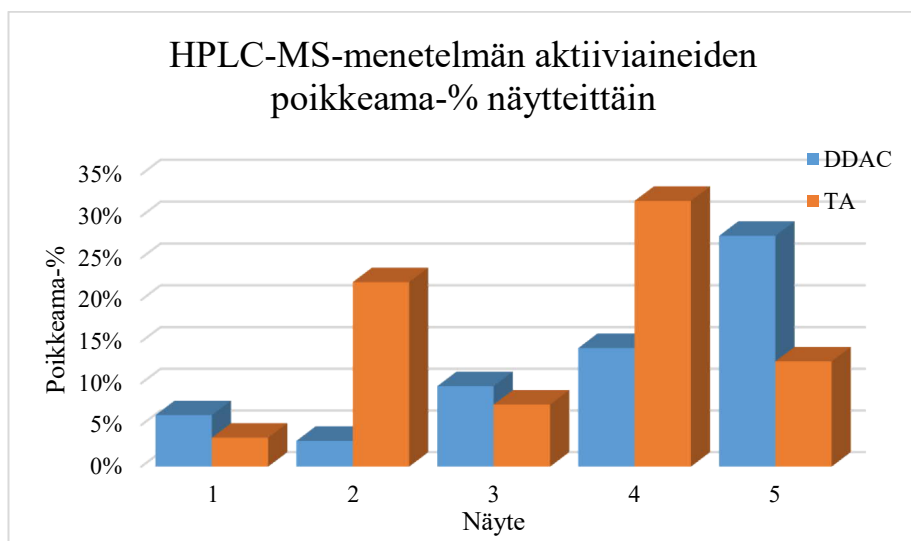
Rin	Näyte 1	Näyte 2	Näyte 3	Näyte 4	Näyte 5
1	156 756	185 306	158 368	87 560	250 880
2	160 167	190 808	173 720	82 569	265 702
3	159 148	183 077	175 008	77 364	243 420
ka	158 690	186 397	169 032	82 498	253 334
s	1 430	3 249	7 559	4 163	9 261
CV%	0,901	1,743	4,472	5,046	3,655

Taulukko 24. Näytteiden TA-pitoisuudet ja poikkeama-%.

Näyte	Pinta-alojen ka:t	poikkeama-%
1	158 690	3,47
2	186 397	22,1
3	169 032	7,45
4	82 498	31,8
5	253 334	12,6



Kuvaaja 9. TA-piikki (vas.) ja DDAC-piikki (oik.) 1:80 000 standardilaimennoksessa kvantitatiivisessa analyysissä.

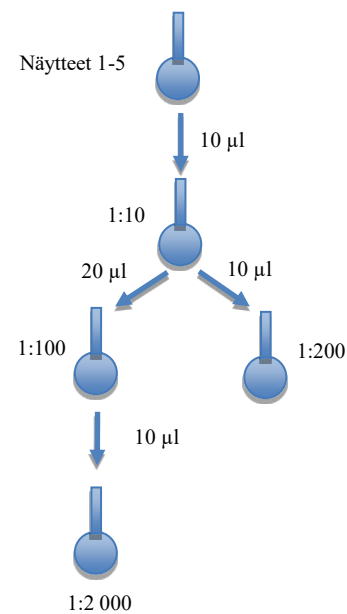
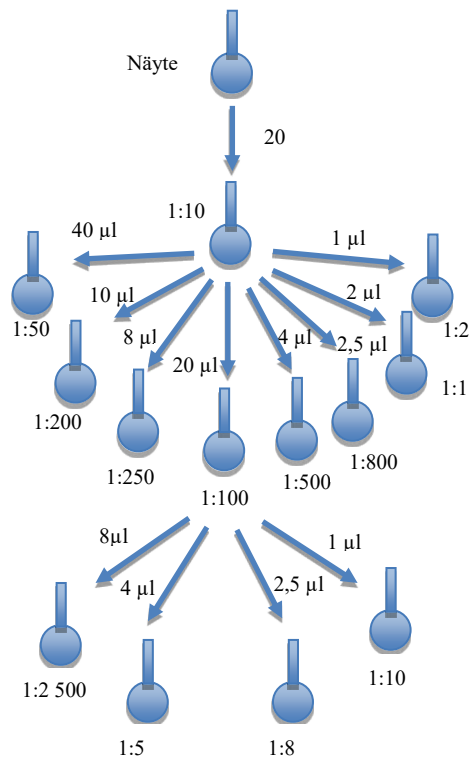


Kuvaaja 10. Näytteiden aktiiviaineiden poikkeama-% HPLC-MS-menetelmällä.

#### 8.1.4 Fluoresenssi

Härmän tutkimusryhmässä tiedettiin, että fluoreskamiini reagoi primäärisen amiinin kanssa. Näin ollen kuoppalevynlukijalla lähdettiin testaamaan tämän toimintaa TA-mittauksissa. Huomattiin, että fluoreskamiini toimi ja käyttämällä liuottimena DMSO, saatiin matalimmat CV %. Seuraavaksi testattiin europiumilla leimattua detektioliuosta DDAC-mittauksiin. Huomattiin, että detektioliuos antoi vasteen DDAC-pitoisuuksille. Kvantitatiiviseen analyysiin punnittiin 1,8 mg fluoreskamiinia, joka liuotettiin 600 µl tilavuuteen DMSO:a. Liuoksen pitoisuus oli tällöin 3,00 mg ml<sup>-1</sup>. Näytteestä 1 valmistettiin standardilaimennokset 200 µl tilavuuksina 500 µl eppendorffputkissa DMSO-liuottimella (Kuva 17). Kaikista näytteistä 1-5 valmistettiin laimennokset 1:200 ja 1:2 000 500 µl eppendorffputkissa DMSO-liuottimella (Kuva 18). 1:10 laimennoksen kokonaistilavuus oli 100 µl ja muilla 200 µl. Detektioliuosta valmistettiin 15 ml tilavuus.

96 kuoppalevyille pipetoitiin DMSO, standardilaimennoksia ja näytelaimennoksia 22,5 µl tilavuudet 3 rinnakkaista. Näihin pipetoitiin 7,5 µl tilavuudet 3,00 mg ml<sup>-1</sup> fluoreskamiiniliuosta. 10 minuutin ravistelun jälkeen suoritettiin fluoreskamiinimittaus. Mittaustulokset taulukoitiin (*Taulukko 25* ja *Taulukko 26*) ja standardilaimennoksista sovitettiin TA standardisuora 1:8 000–1:800 laimennoksille (*Kuvaaja 11*). Näytteiden TA-pitoisuudet ja poikkeama-% ovat laskettu taulukkoon (*Taulukko 27*). Seuraavaksi kuoppiin pipetoitiin 170 µl tilavuudet detektioliuosta. 5 minuutin ravistelun jälkeen suoritettiin Eu-mittaus. Mittaustulokset taulukoitiin (*Taulukko 28*) ja DDAC standardisuora sovitettiin näytteiden 1–3 teoreettisten konsentraatioiden ja Eu-mittauksen intensiteettien keskiarvojen perusteella (*Kuvaaja 12*). Näytteiden DDAC-pitoisuudet ja poikkeama-% ovat laskettu taulukkoon (*Taulukko 29*). Mittausparametrit ovat liitteessä 2 (*Taulukko 36* ja *Taulukko 37*).



Kuva 18. Näytelaimennosten valmistaminen.

Kuva 17. Standardilaimennosten valmistaminen näytteestä 1.

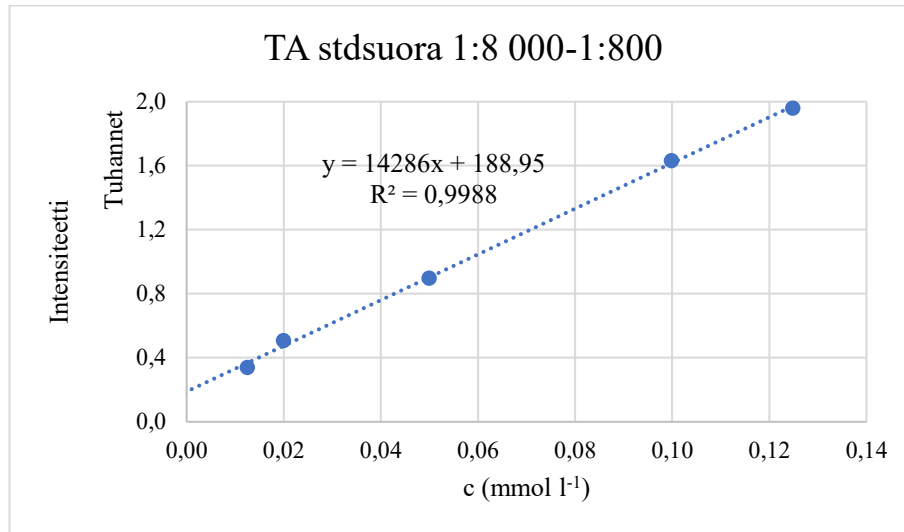
Taulukko 25. Standardilaimennosten intensiteetit fluoreskamiinimittauksessa.

Rin	1:8 000	1:5 000	1:2 500	1:2 000	1:1 000	1:800
1	330	507	847	907	1 617	1 933
2	348	507	903	897	1 605	1 945
3	336	504	861	886	1 672	2 002
ka	338	506	870	897	1 631	1 960
s	7,483	1,414	23,795	8,576	29,170	30,100
CV %	2,21	0,28	2,73	0,96	1,79	1,54

Taulukko 26. Näytteiden intensiteetit fluoreskaminiinimitäyksessä.

1:2 000	1	2	3	4	5
1	944	929	874	401	1 545
2	949	934	695 <sup>a</sup>	405	1 555
3	933	953	880	407	1 535
ka	942	939	877	404	1 545
s	6,683	10,339	3,000	2,494	8,165
CV %	0,71	1,10	0,34	0,62	0,53

<sup>a</sup>Tulosta ei huomioitu laskuissa.



Kuvaaja 11. TA standardisuora 1:8 000-1:800 laimennoksilla.

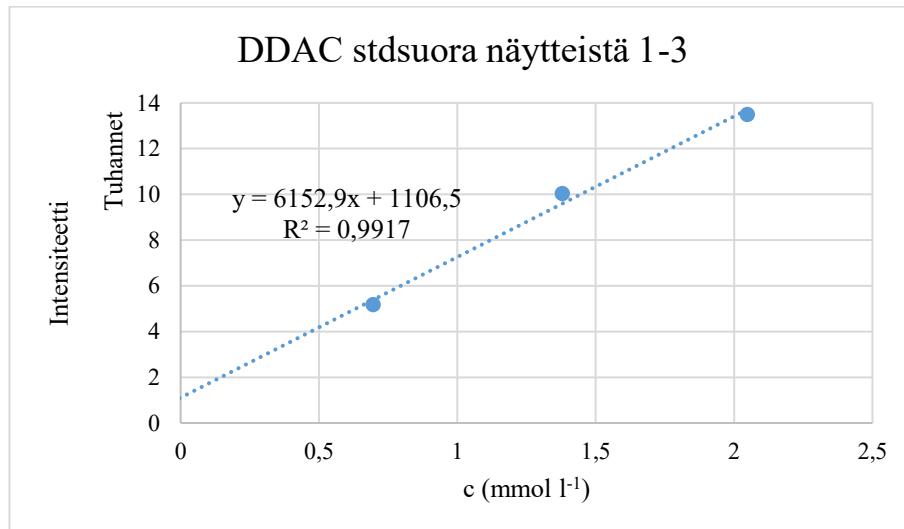
Taulukko 27. Näytteiden TA pitoisuudet ja poikkeama-%.

Näyte	Int <sub>ka</sub>	poikkeama-%
1	942	5,56
2	939	4,18
3	877	2,67
4	404	11,4
5	1 545	14,1

Esimerkkilaskut näytteen 1 TA-pitoisuudet (Taulukko 27). Standardisuoran yhtälön (Kuvaaja 11) avulla laskettiin aktiiviaineiden konsentraatiot näytelaimennoksissa. Aktiiviaineen kokonaiskonsentraatio laskettiin huomioimalla laimennuskerroin. Niiden massat m-% sekä poikkeama-% laskettiin lopuksi kaavalla:  $poikkeama - \% = \frac{|m_{akt.aine} - m_{teor.akt.aine}|}{m_{teor.akt.aine}} \times 100 \% = 5,56 \%$ . Lasketuista aktiiviaineiden poikkeama-% tehtiin pylväsdiagrammi (Kuvaaja 13).

Taulukko 28. Näytteiden intensiteetit Eu-mittauksessa.

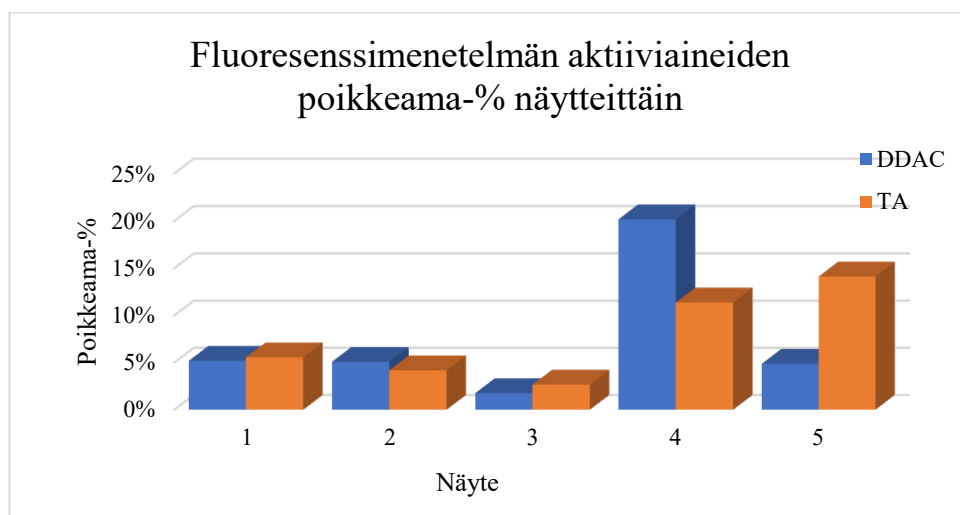
1:200	1	2	3	4	5
1	10 214	5 076	13 651	11 276	9 048
2	9 936	5 107	13 556	11 477	9 278
3	9 937	5 325	13 255	11 209	9 137
ka	10 029	5 169	13 487	11 321	9 154
s	130,82	110,80	168,80	113,88	94,70
CV %	1,30	2,14	1,25	1,01	1,03



Kuvaaja 12. DDAC standardisuora näytteistä 1–3.

Taulukko 29. Näytteiden DDAC pitoisuudet ja poikkeama-%

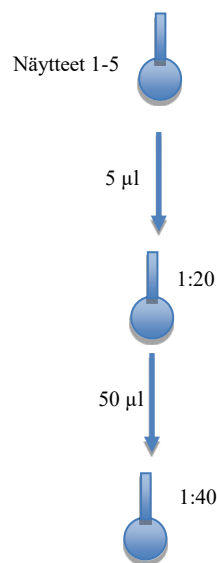
Näyte	Int <sub>ka</sub>	poikkeama-%
1	10 029	5,19
2	5 169	5,09
3	13 487	1,76
4	11 321	20,2
5	9 154	4,88



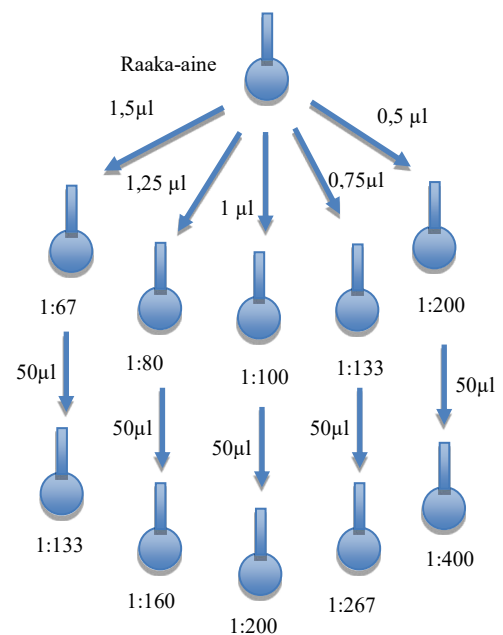
Kuvaaja 13. Aktiiviaineiden poikkeama-% näytteittäin fluoresenssimenetelmillä.

## 8.1.5 TLC

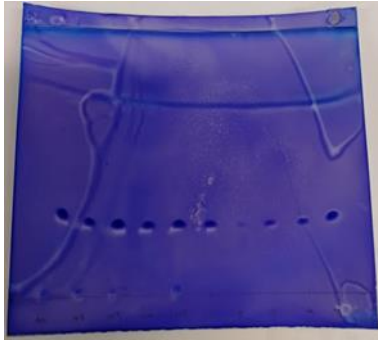
Aktiiviaineiden erotukset TLC-menetelmällä suoritettiin raaka-ainevalmistajan kvalitatiivisilla ohjeilla. DDAC-testissä näytteistä valmistettiin 1:40 laimennokset (*Kuva 19*) ja raaka-aineesta 1:400–1:133 laimennokset (*Kuva 20*) 2-propanoliin. Ajoliuos koostui 65 ml tilavuudesta tolueenia, 26 ml tilavuudesta etikkahappoa, 7,5 ml tilavuudesta asetonia, 3 ml tilavuudesta metanolia ja 2,5 ml tilavuudesta MilliQ-vettä, jolla kehitysastia kyllästettiin. TLC silikageeli 60 F<sub>254</sub> alumiinilevystä leikattiin sopiva levy, johon laimennoksia applikoitiin 3 µl tilavuudet 1 cm etäisyyksiltä toisistaan sekä levyn reunoista. Levy asetettiin kehitysastiaan ja tällä välin valmistettiin värireagenssi. 40,3 mg bromifenolisinistä punnittiin analyysivaa’alla ja liuotettiin 35 ml tilavuuteen MilliQ-vettä. 12,5 g natriumkarbonaattia liuotettiin 50 ml tilavuuteen 0,1 M NaOH-liuokseen. 35 ml tilavuuteen bromifenolisinistä lisättiin 15 ml tilavuus karbonaattiliuosta. 25 min kehittymisen jälkeen levy otettiin pois astiasta ja liuotinrintama merkittiin lyijykynällä. Seuraavaksi levyä kuivattiin keittolevyllä noin 10 min ajan, jolloin etikkahapon tuoksua ei enää havaittu. Jäähtynyt levy kastettiin nopeasti värireagenssiin suuressa petrimaljassa, jonka jälkeen sitä kuivattiin uudelleen keittolevyllä. Pisteiden kulkema matka ja liuotinrintaman kulkema matka mitattiin (cm) ja taulukoitiin (*Taulukko 30*). Liuotinrintaman kulkema matka oli 8,6 cm. Jokaiselle laimennokselle laskettiin myös hidastustekijät eli R<sub>F</sub>-arvot. DDAC-pisteet erottuivat selvästi, mutta näytteiden välisiä värin intensiteettieroja ei havaittu kvantitatiivisesti (*Kuva 21*).



Kuva 19. Näytelaimennosten valmistus.



Kuva 20. Raaka-ainelaimennosten valmistus.

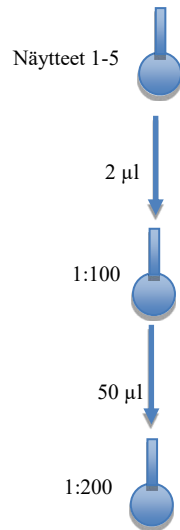


Kuva 21. DDAC TLC-levy.

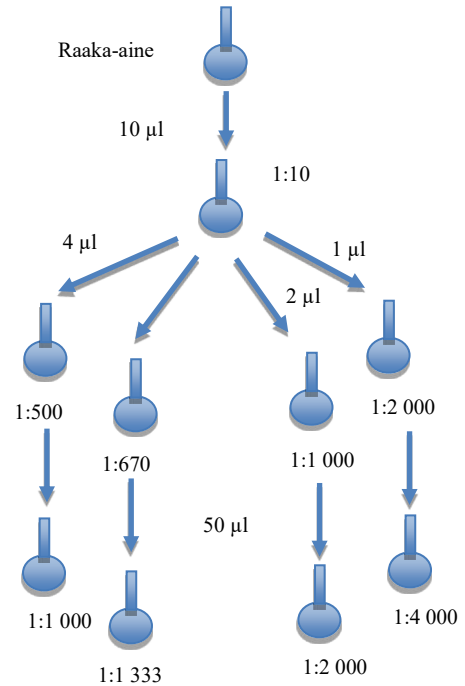
Taulukko 30. Pisteiden kulkemat matkat (cm) ja  $R_f$ -arvot DDAC-analyysissä

Laimennos	Matka (cm)	$R_f$ -arvot
N1	2,5	0,29
N2	2,3	0,27
N3	2,15	0,25
N4	2,1	0,24
N5	2,15	0,25
1:400	2,1	0,24
1:267	2,1	0,24
1:200	2,1	0,24
1:160	2,15	0,25
1:133	2,3	0,27

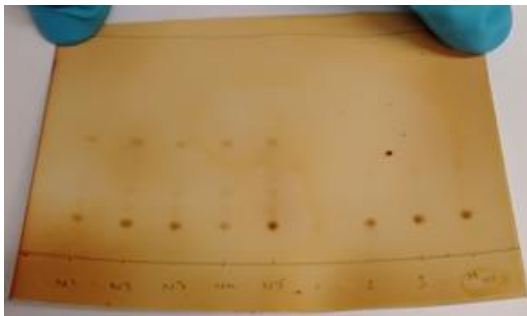
TA-testissä näytteistä valmistettiin 1:200 laimennokset (*Kuva 22*) ja raaka-aineesta 1:4 000–1:1 000 laimennokset (*Kuva 23*) MilliQ-veteen. Ajoliuos koostui 50 ml tilavuudesta tert-butanolia, 30 ml tilavuudesta 1-butanolia, 20 ml tilavuudesta 2-propanolia, 10 ml tilavuudesta MilliQ-vettä ja 10 ml tilavuudesta ammoniakkaa, jolla kehitysastia kyllästettiin. TLC-levystä leikattiin sopiva levy, johon laimennoksia applikoitiin 3  $\mu$ l tilavuudet 1 cm etäisyyksiltä toisistaan sekä levyn reunoista. Levy asetettiin kehitysastiaan, tunnin kuluttua levy nostettiin pois ja merkittiin liuotinrintama lyijykynällä. Levyä kuivattiin keittolevyllä noin 5 min ajan, jolloin ammoniakkin tuoksua ei enää havaittu. Jäähtynyttä levyä sumutettiin valmiilla ninhydriiniväriaineella, jonka jälkeen levyä kuivattiin noin 5 min ajan. Pisteiden kulkema matka ja liuotinrintaman kulkema matka mitattiin (cm) ja taulukoitiin (*Taulukko 31*). Liuotinrintaman kulkema matka oli 5,7 cm. Jokaiselle laimennokselle laskettiin myös hidastustekijät eli  $R_f$ -arvot. TA-pisteet erottuivat selvästi, mutta näytteiden välisiä värin intensiteettieroja ei havaittu kvantitatiivisesti (*Kuva 24*).



Kuva 22. Näytelaimennosten valmistus.



Kuva 23. Raaka-ainelaimennosten valmistus.



Kuva 24. TA TLC-levy.

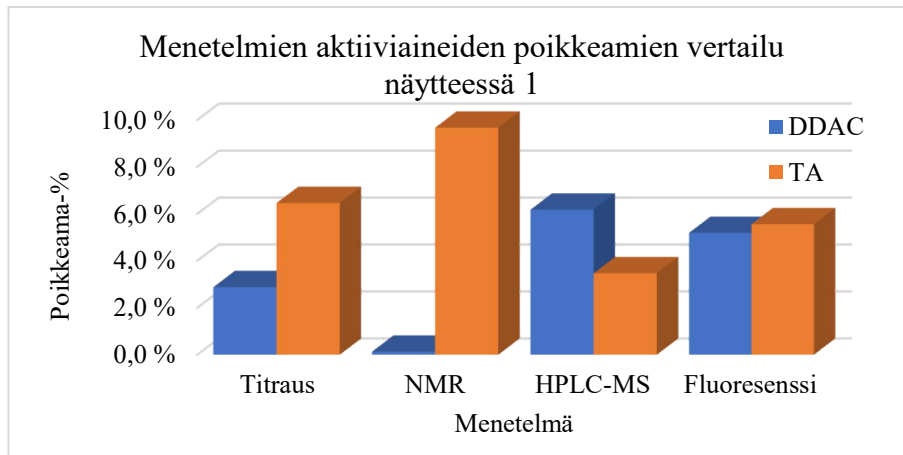
Taulukko 31. Pisteiden kulkemat matkat (cm) ja  $R_f$ -arvot TA-analyysissä

Laimennos	Matka (cm)	$R_f$ -arvot
N1	0,85	0,15
N2	0,85	0,15
N3	0,85	0,15
N4	0,85	0,15
N5	0,85	0,15
1:4 000	0,85	0,15
1:2 000	0,85	0,15
1:1 333	0,85	0,15
1:1 000	0,85	0,15

## 8.2 Tulokset

Saadut tulokset esitettiin yrityksen toiveesta poikkeamaprosentteina, joissa verrattiin analyysimenetelmien antamaa tulosta teoreettiseen tulokseen. Tuotteen eli näytteen 1 aktiiviaineiden analyysitulokset olivat hyvin lähellä teoreettisia arvoja kaikilla analyysimenetelmillä (*Kuvaaja 14*), joten tuotteen analysointiin onnistuttiin löytämään useampi mahdollisesti soveltuva menetelmä jatkokehitystä varten. Näytteissä 2–5 suuret poikkeama-% saattoivat johtua siitä, että näytteen aktiiviainepitoisuudet olivat lineaarisen mittausalueen ulkopuolella. Aktiiviainepitoisuuden ollessa matala, voivat

muut näytteen komponentit muun muassa toisen aktiiviaineen suhteellinen korkeampi pitoisuus, vaikuttaa analyysitulokseen, jolloin tulos poikkeaa huomattavasti teorettisesta pitoisuudesta. Työssä kehitetyt menetelmät vaativat vielä lisää kehitystyötä. Lupaavimmat menetelmät jatkokehitykseen olivat HPLC-MS- ja fluoresenssimenetelmät, joiden toistettavuus ja tarkkuus sekä lineaariset alueet olisi määritettävä.



Kuvaaja 14. Aktiiviaineiden poikkeama-% vertailu näytteessä 1 menetelmittäin.

## 9 LOPPUPÄÄTELMÄT

NMR-menetelmässä onnistuttiin löytämään toimiva sisäinen standardi ja liuotin. DDAC-pitoisuudet saatiin analysoitua hyvin lähelle teoreettisia arvoja, mutta TA-pitoisuudet jäivät huolellisesta integroinnista huolimatta jonkin verran matalammiksi. HPLC-MS-menetelmässä havaittiin ongelma, kun aktiiviaineiden piikkien pinta-alat laskivat standardilaimennosten jälkeen näytelaimennoksilla. Standardilaimennokset valmistettiin lasipulloissa ja näytteet muovisissa eppendorffputkissa. Tämän vuoksi kokeiltiin näytteellä 1 vaikuttiko lasi- tai muovimateriaali pinta-aloihin. Lisäksi testattiin, että vaikuttiko MilliQ-vesi tai HCOOH-liuos pinta-aloihin. Testin perusteella huomattiin, että pinta-alat olivat suuremmat lasipulloissa valmistetuilla näytteillä. Suuremmat pinta-alat havaittiin myös, kun käytettiin 50:50 ACN/HCOOH-liuosta liuottimena.

Fluoresenssimenetelmissä TA-pitoisuuksien analysointiin onnistuttiin kehittämään toimiva menetelmä fluoreskamiinilla. DDAC-pitoisuuksien analysointi Eu-leimatulla detektioliuoksella oli epäspesifinen, jonka vuoksi ei voida olla vielä täysin varmoja, että saadut intensiteetit kuvaavat juuri DDAC-pitoisuuksia. Tämä tarvitsee lisää kehitystä, mutta lyhyessä ajassa onnistuttiin tekemään paljon näillä menetelmillä. TLC-menetelmällä ehdittiin lyhyessä ajassa löytämään sopivat laimennokset, joilla aktiiviaineiden kulkemat matkat (pisteet) olivat pienehköjä ja sieviä. Näistä oli helppo mitata pisteiden keskikohdasta niiden kulkemat matkat. Molemmat ajoliuokset ja värireagenssit näyttivät myös toimivan aktiiviaineiden erottumiselle ja värjäytymiselle. Toisaalta näytteiden pitoisuuksissa ei havaittu juuri eroja, vaan pisteiden intensiteetit ja  $R_f$ -arvot ovat lähes samanlaiset jokaisella näytteellä.

Titrauksissa osa reagensseista oli hyvin vanhoja, varsinkin dimidiumbromidi, disulfiinin sininen ja natriumdodekyylisulfaatti. Lisäksi dimidiumbromidi loppui kesken, jota ohjeen mukaan tarvittaisiin 0,5 g. Sekaindikaattorin varastoliuosta valmistettiin suhteessa pienempi tilavuus: 250 ml sijaan 191 ml. Reagenssien ikä saattoi muun muassa vaikuttaa titraustuloksiin. Seuraavalla sivulla on koottu kaikkien kvantitatiivisten analyysimenetelmien yhteenveto (*Taulukko 32*).

Taulukko 32. Kvantitatiivisten analyysimenetelmien yhteenveto.

Parametri	Titraus	NMR	HPLC-MS	Fluoresenssi
Rinnakkaiset <sup>a</sup>	Kolme	Kaksi	Kolme injektointia	Kolme
Laimennokset <sup>b</sup>	RO-vesi	D <sub>2</sub> O	10 % ACN/HCOOH	DMSO
Aktiiviaineiden pitoisuudet <sup>c</sup>	Stdsuoran yhtälö	Sisäinen std, ainemäärä	Stdsuoran yhtälö	Stdsuoran yhtälö
Analyysi samanaikaisesti / eriaikaan <sup>d</sup>	Eriaikaan. Hapan ja emästitraus	Samanaikaisesti	Samanaikaisesti	Eriaikaan. Ensin TA, sitten DDAC
Esivalmistelut (aika) <sup>e</sup>	1 h	15 min	15 min	20 min
Analyysiaika <sup>f</sup>	20 min	15 min	8 min	muutamia sekunteja
DDAC poikkeama-% <sup>g</sup>	2,88	0,13	6,18	5,19
TA poikkeama-% <sup>h</sup>	6,46	9,67	3,47	5,56

<sup>a</sup> Rinnakkaisnäytteiden lukumäärä työssä. <sup>b</sup> Standardi- ja näytelaimennosten valmistuksessa käytetty liuotin. <sup>c</sup> Aktiiviainepitoisuuksien tulosten laskeminen. <sup>d</sup> Voitiinko aktiiviaineet analysoida samanaikaisesti vai eriaikaan. <sup>e</sup> Esivalmisteluihin kulunut aika, ajat suuntaa antavia. Ajoissa huomioitu analyysiliuosten valmistukset. <sup>f</sup> Yhden näytteen analyysiin kuluva aika. <sup>g</sup> Rinnakkaistentulosten keskiarvo poikkeama-% DDAC näyte 1. <sup>h</sup> Rinnakkaistentulosten keskiarvo poikkeama-% TA näyte 1.

## 10 VIITELUETTELO

- 1 Tähtinen, P. Luentomateriaali, Spektroskopian perusteet, KEMI6121, Turun yliopisto. **2017**.
- 2 Dejobert, Y.; Martin, P.; Piette, F.; Thomas, P.; Bergoend, H. *Contact Dermatitis* **1997**, 37, 95–96. Contact dermatitis from didecyldimethylammonium chloride and bis(aminopropyl)laurylamine in a detergent-disinfectant used in hospital. Saatavilla: <https://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.utu.fi/doi/10.1111/j.1600-0536.1997.tb00050.x> (Viitattu 8.11.2018).
- 3 Mondin, A.; Bogialli, S.; Venzo, A.; Favaro, G.; Badocco, D.; Pastore, P. *Chemosphere* **2014**, 95, 379–386. Characterization and quantification of N-(3-aminopropyl)-N-dodecyl-1,3-propanediamine biocide by NMR, HPLC/MS and titration techniques. Saatavilla: <https://www.sciencedirect.com.ezproxy.utu.fi/science/article/pii/S0045653513012897> (Viitattu 7.11.2018).
- 4 Martínez-Carballo, E.; Sitka, A.; Conzález-Barreiro, C.; Kreuzinger, N.; Fürhacker, M.; Scharf, S.; Gans, O. *Environmental Pollution* **2007**, 145, 489–496. Determination of selected quaternary ammonium compounds by liquid chromatography with mass spectrometry. Part 1. Application to surface, waste and indirect discharge water samples in Austria. Saatavilla: <https://www.sciencedirect.com.ezproxy.utu.fi/science/article/pii/S0269749106003174> (Viitattu 12.11.2018).
- 5 European Chemicals Agency, ECHA. Saatavilla: <https://echa.europa.eu/fi/home> (Viitattu 8.5.2019)
- 6 Slimani, K.; Férest, A.; Pirotais, Y.; Maris, P.; Abjean, J.; Hurtaud-Pessel, D. *J. of Chromatography A* **2017**, 1517, 86–96. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry multiresidue method for the analysis of quaternary ammonium compounds in cheese and milk products. Saatavilla: <https://www.sciencedirect.com.ezproxy.utu.fi/science/article/pii/S0021967317311950> (Viitattu 12.11.2018).
- 7 Toomey, A. B.; Dalrymple, D. M.; Jasperse, J. L.; Manning, M. M.; Schulz, M. V. *J. of Liquid Chromatography & Related Technologies* **1997**, 20, 1037–1047. Analysis of Quaternary Ammonium Compounds by High Performance Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection. Saatavilla: <https://www.tandfonline.com.ezproxy.utu.fi/doi/abs/10.1080/10826079708010956> (Viitattu 7.11.2018).
- 8 Langsrud, S.; Sundheim, G.; Borgmann-Strahsen, R. *J. of Applied Microbiology* **2003**, 95, 874–882. Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compounds in food-related *Pseudomonas* sp. Saatavilla: <https://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.utu.fi/doi/10.1046/j.1365-2672.2003.02064.x> (Viitattu 8.11.2018).
- 9 Harris, D. C. *Exploring Chemical Analysis*. 5. painos; W.H. Freeman and Company; New York, USA. **2013**, 123, 200, 455–462, 464–469, 490–492, 494–495, 497–499, 501.
- 10 Gaffney, J. S.; Marley, N. A. *General Chemistry for Engineers* [online]. Elsevier; Amsterdam, Alankomaat, **2018**. Turun yliopiston kirjasto. 172–173. Saatavilla: <https://www.sciencedirect.com.ezproxy.utu.fi/book/9780128104255/general-chemistry-for-engineers> (Viitattu 21.5.2019).
- 11 Schulz, R. *Titration von Tensiden und Pharmaka. Moderne Methoden für den Praktiker*. Metrohm; Herisau, Schweiz. **1996**, 31–35.
- 12 SFS-EN ISO 2271. *Surface active agents. Detergents. Determination of anionic-active matter by manual or mechanical direct two-phase titration procedure*. 2. painos. Helsinki: Suomen standardisoimisliitto. **1989**.
- 13 SFS-EN ISO 2871-1. *Surface active agents. Detergents. Determination of cationic-active matter content. Part 1: High-molecular-mass cationic-active matter*. Helsinki: Suomen standardisoimisliitto. **2010**.

- 14 Kahlert, H.; Meyer, G.; Albrecht, A. *ChemTexts* **2016**, *2*, 1–28. Colour maps of acid-base titrations with colour indicators: how to choose the appropriate indicator and how to estimate the systematic titration errors. Saatavilla: <https://link.springer.com.ezproxy.utu.fi/article/10.1007/s40828-016-0026-4> (Viitattu 21.5.2019).
- 15 Kriz, G. S.; Lampman, G. M.; Pavia, D. L.; Vyvyan, J. R. *Spectroscopy*. 4. painos: Brooks/ Cole; Belmont, USA. **2010**, 105–110, 112–122, 131, 133, 137, 418–422, 426–432, 434–436.
- 16 Jacobsen N. E. *NMR Spectroscopy Explained*. John Wiley & Sons, Inc; Hoboken, USA. **2007**, 1, 3, 6.
- 17 Bharti, S. K.; Roy, R. *Trends in Analytical Chemistry* **2012**, *35*, 5–26. Quantitative <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. Saatavilla: <https://www.sciencedirect.com.ezproxy.utu.fi/science/article/pii/S0165993612000702> (Viitattu 16.1.2019).
- 18 Mattson, I.; Karskela, T. *New NMR Instruments Guide*, Turun yliopisto. **2018**.
- 19 Hovinen, T. Luentomateriaali, Analyysitekniikat, kromatografian opetusmateriaali, Turun AMK, **2011**.
- 20 Braithwaite, A.; Smith, F. J. *Chromatographic methods*. 5. painos. **1999**. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Alankomaat. 44–46, 49, 51–58, 64–66, 72–73, 75.
- 21 Jaarinen, S.; Niiranen, J. *Laboratorion analyysitekniikka*. 5.-6. painos; Edita Prima Oy; Helsinki, Suomi. **2008**, 122, 124–128, 154–155, 162, 166–168, 209–211.
- 22 Ketola, R.; Kostiainen, R.; Kotiaho, T.; Vainiotalo, P. *Massaspektrometrian perusteet*. 2. painos; Hakapaino; Helsinki, Suomi. **2012**, 27, 34, 59, 67.
- 23 Lakowicz, J. R. *Principle of Fluorescence Spectroscopy* [online]. Springer; Baltimore, USA, **2006**. Turun yliopiston kirjasto. 1, 3, 27–28, 30–35, 38, 44, 63, 87–88, 98–99, 679, 800. Saatavilla: <https://link.springer.com.ezproxy.utu.fi/book/10.1007%2F978-0-387-46312-4> (Viitattu 11.4.2019).
- 24 PerkinElmer: Microplates for Fluorescence Assays. Saatavilla: <http://www.perkinelmer.com/fi/lab-products-and-services/application-support-knowledgebase/microplates/fluorescence-plates.html> (Viitattu 19.4.2019).
- 25 Soini, E.; Kojola, H. *Clinical Chemistry* **1983**, *29*, 65–68. Time-resolved fluorometer for lanthanide chelates: A new generation of nonisotopic immunoassays. Saatavilla: <http://clinchem.aaccjnls.org.ezproxy.utu.fi/content/29/1/65> (Viitattu 6.5.2019).
- 26 De Bernardo, S.; Weigele, M.; Toome, V.; Manhart, K.; Leimgruber, W.; Stein, S.; Udenfriend, S. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1974**, *163*, 390–399. Studies on the reaction of fluorescamine with primary amines. Saatavilla: <https://www.sciencedirect.com.ezproxy.utu.fi/science/article/pii/0003986174904901> (Viitattu 21.3.2019).
- 27 Zhang, L.; Jianping, L.; Liu, J., Ma, F.; Ju, H. *Biomaterials* **2015**, *67*, 323–334. Persistent luminescence nanoprobe for biosensing and lifetime imaging of cell apoptosis via time-resolved fluorescence resonance energy transfer. Saatavilla: <https://www.sciencedirect.com.ezproxy.utu.fi/science/article/pii/S0142961215006195> (Viitattu 6.5.2019).

## **Liuosten valmistus**

### **0,004 M SDS-liuos**

Analyysivaa'alla punnittiin 1,1509 ja 1,1502 g kiinteää SDS-jauhetta ja liuotettiin 1 l tilavuuteen RO-vedellä. Liukenemisen helpottamiseksi liuosta sekoitettiin magneettisekoittimella 1,5 h ja lämmitettiin hieman noin 1 h ajan. Valmis liuos siirrettiin ruskeaan säilöpulloon.

### **Puskuriliuos pH 11**

Tarkkuusvaa'alla punnittiin 7,00 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ja 100,01 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Reagenssit yhdistettiin 1 l mittapullossa, joka oli täytetty puolilleen RO-vettä. Mittapullo täytettiin merkkiin RO-vedellä. Liukenemisen helpottamiseksi liuosta sekoitettiin magneettisekoittimella 15 min ajan. Valmis liuos siirrettiin ruskeaan säilöpulloon.

### **10 til-% EtOH**

50 ml tilavuus 99,5 % Etax Aa etanolia mitattiin mittalasilla 500 ml mittapulloon. Mittapullo täytettiin RO-vedellä merkkiin ja sekoitettiin hyvin.

### **Hapan sekaindikaattorin varastoliuos**

Analyysivaa'alla punnittiin erikseen 50 ml dekanterilaseihin 0,382 g dimidumbromidia ja 0,1930 g disulfinin sinistä. 80 ml tilavuus 10 til-% EtOH-liuosta lämmitettiin keittolevyllä. Lämmintä EtOH-liuosta pipetoitiin kumpaankin dekanterilasiin 30 ml tilavuudet. Reagenssit liuotettiin EtOH-liuokseen, jonka jälkeen ne yhdistettiin 250 ml mittapulloon. Molemmat dekanterilasit huuhdeltiin huolellisesti 10 til-% EtOH-liuoksella siten, että loppu tilavuus oli 191 ml. Liuos sekoitettiin huolellisesti ja siirrettiin ruskeaan säilöpulloon.

### **Hapan sekaindikaattoriliuos**

200 ml tilavuus RO-vettä, 20 ml tilavuus hapan sekaindikaattorin varastoliuosta ja 3 ml tilavuus väkevää rikkihappoa yhdistettiin 500 ml mittapullossa ja sekoitettiin huolellisesti. Kun liuos oli jäähtynyt takaisin huoneenlämpöiseksi, täytettiin mittapullo RO-vedellä merkkiin. Sekoituksen jälkeen liuos siirrettiin ruskeaan säilöpulloon.

**0,2 % HCOOH-liuos**

MilliQ-vettä mitattiin mittalasilla 500 ml tilavuus 500 ml tilavuiseen säilöpulloon ja pipetoitiin 1 ml tilavuus väkevää HCOOH-liuosta. Liuoksesta poistettiin kaasut ultraäänihauteessa noin 5 min ajan.

**0,1 % HCOOH-liuos**

MilliQ-vettä mitattiin mittalasilla 1 l tilavuus 1 l tilavuiseen säilöpulloon ja pipetoitiin 1 ml tilavuus väkevää HCOOH-liuosta. Liuoksesta poistettiin kaasut ultraäänihauteessa noin 5 min ajan.

**10 % ACN/HCOOH-liuos**

LC-MS-laatuista ACN mitattiin 50 ml tilavuus 500 ml tilavuiseen mittapulloon ja täytettiin merkkiin 0,1 % HCOOH-liuoksella. Liuos siirrettiin säilöpulloon.

**50 % ACN/HCOOH-liuos**

50 ml tilavuus LC-MS-laatuista ACN mitattiin mittalasilla 100 ml tilavuuden mittapulloon ja täytettiin merkkiin 0,1 % HCOOH-liuoksella. Liuoksesta poistettiin kaasut ultraäänihauteessa noin 5 min ajan.

**50 % ACN/MilliQ-liuos**

50 ml tilavuus LC-MS-laatuista ACN mitattiin mittalasilla 100 ml tilavuuden mittapulloon ja täytettiin merkkiin MilliQ-vedellä. Liuoksesta poistettiin kaasut ultraäänihauteessa noin 5 min ajan.

**Detektioliuos**

5 til-% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/sitraattipuskuria (100 %), 5 til-% DMSO, 0,001 til-% Tritonia (5 %), 3 µM Quencher 22 (10 mM), 1 nM Eu 23 (1 µM) ja loput MilliQ-vettä

## Mittausten parametrit

### NMR-mittauksen parametrit

Taulukko 33. Manuaalisessa NMR-mittauksessa käytetyt komennot ja niiden selitykset.

Komennot	Selitys
sx #	Näytteen laittaminen sisälle laitteeseen, numerolla näytepaikka
new	Uusi datatiedosto
lock	Liuottimien lista, joista valitaan käytössä oleva. Magneettikentän lukitseminen
atma	Automaattinen viritys ja sovitus
topshim tai fullshim	Shimmauksen makro z tai z, y ja x-akselit
pulsecal	90° pulssien kalibrointi
rga	Automaattisen vastaanottimen hienosäädön edistäminen
zg	Mittaus
ft	<sup>1</sup> H-spektrin prosessointi
efp	Fourier muunnos
apk	Automaattinen faasin korjaus
abs n	Automaattinen pohjaviivan korjaus
ej	Näyte ulos laitteesta

Taulukko 34. NMR-mittauksen parametrit.

Parametri	Arvo
Solvent	D <sub>2</sub> O
Experiment	js-1Hquant
NS	16
DS	4
SWH	7183,908 Hz
FIDRES	0,109618 Hz
AQ	9,1226110 s
RG	23,4
DW	69,600 s
DE	6,50 s
TE	298,0 K
D1	20,0000000
TD0	1
SFO1	500,0827504 MHz
NUC1	1H
P1	10,21 μs
PLW1	21,50799942 W
SI	65536
SF	500,0800000 MHz
WDW	EM
LB	0,30 Hz
PC	1,00

**HPLC-MS-mittauksen parametrit**

Taulukko 35. HPLC-MS-mittauksen parametrit.

Parametri	Arvo
Flow	0,45 ml min <sup>-1</sup>
Low pressure limit	0 bar
High pressure limit	600 bar
Stoptime	8.00 min
Solvent A	0,2 % HCOOH
Solvent B	ACN
Injection volume	10,00 µl
Ionization mode	API-ES
Polarity	Positive
Gas temperature	350 °C
Dryinggas	10,0 l min <sup>-1</sup>
Neb pressure	35 psig
Quad temperature	0 °C
Vcap (pos)	5 000 V
Vcap (neg)	4 500 V
Time between intections	1,50 min
Injection loop flush time	0,20 min

**Flooresenssimenetelmän parametrit, fluoreskamiini**

Taulukko 36. Flooresenssimenetelmän parametrit, fluoreskamiini.

Parametri	Arvo
Plate	96 black
Lid filter	No lid
Humidity Cassette	No humidity cassette
Smooth mode	Not selected
Excitation	Monochromator
Excitation wavelength	390 nm
Excitation bandwidth	20 nm
Emission	Monochromator
Emission wavelength	480 nm
Emission bandwidth	20 nm
Gain	50 Manual
Mirror	Automatic (50 % Mirror)
Number of flashes	30
Integration time	40 µs
Lag time	0 µs
Settle time	0 ms
Z-Position	20 000 µm
Z-Position mode	Manual

**Fluoresenssimenetelmän parametrit, Eu-mittaus**

Taulukko 37. Fluoresenssimenetelmän parametrit, Eu-mittaus.

Parametri	Arvo
Plate	96 black
Lid filter	No lid
Humidity Cassette	No humidity cassette
Smooth mode	Not selected
Excitation	Filter
Excitation wavelength	340 nm
Excitation bandwidth	35 nm
Emission	Filter
Emission wavelength	620 nm
Emission bandwidth	10 nm
Gain	110 Manual
Mirror	Automatic (Dichroic 510)
Number of flashes	30
Integration time	400 $\mu$ s
Lag time	600 $\mu$ s
Settle time	100 ms
Z-Position	20 000 $\mu$ m
Z-Position mode	Manual