

Osaamista ja oivallusta tulevaisuuden tekemiseen

Petri Immonen

# V-sarjaan kuuluvien kemiallisten taisteluaineiden rakennetutkimus NMR- ja LC-MS-tekniikoilla

Metropolia Ammattikorkeakoulu Laboratorioanalyytikko (AMK) Laboratorioanalytiikan Tutkinto-ohjelman Opinnäytetyö 11.12.2020



Tekijä Otsikko	Petri Immonen V-sarjaan kuuluvien kemiallisten taisteluaineiden rakennetut- kimus NMR- ja LC-MS-tekniikoilla		
Sivumäärä Aika	86 sivua + 9 liitettä 11.12.2020		
Tutkinto	laboratorioanalyytikko (AMK)		
Tutkinto-ohjelma	laboratorioanalytiikka		
Ohjaajat	Yliopettaja Jukka Niiranen, Metropolia Ammattikorkeakoulu Laboratoriopäällikkö Harri Kiljunen, VERIFIN Laboratoriopäällikkö Harri Heikkinen, VERIFIN Yliopistotutkija Matti Kjellberg, VERIFIN		
Hermomyrkyt ovat kemiallisia aseita, jotka ovat usein organofosfaatti-pohjaisia yhdisteitä. Hermomyrkyt toimivat asetyylikoliiniesteraasin inhibiittorina sitoutumalla siihen, häiriten			

Hermomyrkyt toimivat asetyylikoliiniesteraasin inhibiittorina sitoutumalla siihen, häiriten asetyylikoliinin normaalia hajoamista koliiniksi ja asetaatiksi neuronissa. Koska neuroni ei voi palata lepotilaansa vastaanottamaan uutta signaalia hermomyrkyn sitoutumisen johdosta asetyylikoliiniesteraasiin, neuronin reseptorit stimuloituvat jatkuvasti. Neuronien jatkuva stimuloituminen aiheuttaa esimerkiksi epileptisiä kohtauksia, hikoilua, ripulointia, lihaskouristuksia ja pupillien supistumista. Liian hidas altistumisen hoitaminen voi johtaa kuolemaan.

Opinnäytetyö tehtiin VERIFINille (Kemiallisen aseen kieltosopimuksen instituutti). Opinnäytetyön tavoitteina oli NMR- ja LC-MS-tekniikkaa käyttäen tutkia VG- ja CVX-hermomyrkkyjen rakennetta ja tutkia kuinka kyseiset yhdisteet hajoavat happamissa ja emäksissä olosuhteissa. Näiden tutkimusten avulla oli tarkoitus saada aikaiseksi lista attribuutiomarkkereista, joiden avulla voidaan selvittää yhdisteiden alkuperä. Happamia ja emäksisiä olosuhteita mallinnettiin suolahapolla ja natriumhydroksidilla. VG:n hajoamista tutkittiin niin happamassa kuin emäksisessä olosuhteessa ja CVX:n hajoamista vain emäksisessä.

Hajottamattomista VG:stä ja CVX:stä onnistuttiin selvittämään epäpuhtauksia käytettyjen tekniikoiden avulla. Hajoamistutkimuksessa huomattiin, ettei käytetty suolahapon väkevyys ollut tarpeeksi vahva hajottamaan VG:tä. Natriumhydroksidi osoittautui toimivan hyvin VG:n ja CVX:n hajottamisessa. Hajoamistuotteita saatiin listattua. Tutkimuksessa onnistuttiin listaamaan joitain attribuutiomarkkereita, joilla voidaan selvittää VG:n ja CVX:n alkuperää.

Opinnäytetyössä tutkitut asiat vaativat vielä lisätutkimusta, ja työn aikana löydettiin asioita, joita tulisi vielä tutkia tarkemmin. Lisäksi työn menetelmiä tulisi hieman enemmän miettiä ja optimoida, jotta kyseisiä aineita voitaisiin tutkia tarkemmin ja helpommin. Varsinkin referenssinäytteiden käyttö, helpottaisi työtä merkittävästi tarkentaen edelleen tuloksia. Huolimatta opinnäytetyön laajuudesta, pienistä ongelmista ja osittain tuloksettomuudesta voidaan sanoa, että opinnäytetyössä saavutettiin sille asetetut tavoitteet.

Avainsanat

kemialliset aseet, hermomyrkyt, hajoamistuotteet, NMR, LC-MS



Author Title	Petri Immonen Structural Research of V-series Chemical Weapons Using NMR and LC-MS Techniques.			
Number of Pages Date	86 pages + 9 appendices 11 December 2020			
Degree	Bachelor of Laboratory Services			
Degree Programme	Laboratory Sciences			
Instructors	Jukka Niiranen, Senior lecturer, Metropolia University of Applied Sciences Harri Kiljunen, Laboratory manager, VERIFIN Harri Heikkinen, laboratory manager, VERIFIN Matti Kjellberg, University researcher, VERIFIN			
Neurotoxins are group of chemical weapons that are typically organophosphate com- pounds. Neurotoxins function as an inhibitor of acetylcholinesterase by binding to it, which interferes with normal degradation of acetylcholine to choline and acetate in a neuron. Be- cause acetylcholine can not degrade, the neuron will not receive new signals, and this leads to over stimulation of neuron. Over stimulation can cause many different symptoms, like seizures, sweating, diarrhea, muscle spasms and pupillary contraction. If the exposed person is not treated fast enough, nerve poisoning can result in death.				
The purpose of the thesis work was to research structures of nerve agents VG and CVX and how these compounds degrade in acidic and basic conditions, using NMR and LC-MS techniques. Acidic condition was simulated with hydrochloric acid and basic condition with sodium hydroxide. Nerve agent VG was researched in both conditions and CVX only in basic condition. Goal for this research was to create a list of attribution markers from which it is possible to find the origin of compounds studied.				
Impurities were found from the undegraded compounds using NMR and LC-MS. In the degradation research was discovered that used strength of acid was not enough to de- grade VG. On the other hand, used base was applied to degrade VG and CVX. However, CVX appeared not to degrade as properly as VG. Degradation products and attribution markers were listed.				
Some findings of the thesis work require more study and methods of research require more optimization, so that more accurate information concerning VG and CVX can be collected. Using reference samples would facilitate and improve results. Despite minor problems in the methods and possible improvements that could be made, the objectives set for thesis work were achieved.				

Keywords

Chemical weapons, Neurotoxins, Degradation products, NMR, LC-MS  $\,$ 



# Sisällys

# Lyhenteet

1	Joho	danto	1
2	Kerr	nialliset aseet	4
	2.1	Kemiallisten aseiden luokittelu	4
	2.2	Kemiallisten aseiden dekontaminointi	5
	2.3	Hermomyrkyt	6
3	NMR-spektroskopia		9
	3.1	Atomin ydinspin	10
	3.2	Kemiallinen siirtymä	11
	3.3	Spin-spin –kytkentä	13
	3.4	NMR-laite	16
	3.5	1D ja 2D NMR	19
4	LC-I	MS	20
	4.1	Nestekromatografia LC-MS:ssa	21
	4.2	Massaspektrometria LC-MS:ssa	22
5	Туö	välineet ja reagenssit	25
	5.1	Laitteet ja työvälineet	25
	5.2	Reagenssit	26
6	VG:	n rakenneanalytiikka	27
	6.1	VG:n NMR-tutkimus	27
	6.2	Mitatun VG:n NMR-datan tulkinta	28
	6.3	Epäpuhtaudet VG:ssä	41
7	CVX	(:n rakenneanalytiikka	48
	7.1	CVX:n NMR-tutkimus	48
	7.2	CVX:n LC-MS-tutkimus	55



	7.3	Epäpuhtaudet CVX:ssä	56
8	3 Hajoamistuotteiden analyysi		60
	8.1	VG:n hajoamistuotteiden analyysi	60
	8.2	VG:n hajotuksen tulokset	62
	8.3	CVX:n hajoamistuotteiden analyysi	75
	8.4	CVX:n hajotuksen tulokset	76
	8.5	Hajotustutkimuksen päätelmät	80
9	9 Yhteenveto		82
Läh	iteet		84

Liitteet

Liite 1. VG:n ja CVX:n NMR-ennustespektrit

Liite 2. Hajottamattoman VG:n NMR-spektrit

Liite 3. Hajottamattoman VG:n LC-MS:sta löydetyt tunnistamattomat yhdisteet ja epäpuhtaudet

Liite 4. Hajottamattoman CVX:n NMR-spektrit

Liite 5. Hajottamattoman CVX:n LC-MS:sta löydetyt tunnistamattomat yhdisteet ja eluenttien antamat signaalit

Liite 6. NaOH:lla hajotetun VG:n LC-MS:sta jo ennestään tunnistetut yhdisteet

Liite 7. NaOH:lla hajotetun VG:n MS-LC:sta löydetyt tunnistamattomat yhdisteet ja epä-

puhtaudet sekä HCI:lla hajotetun VG:n MS-LC:sta löydetyt epäpuh-taudet

Liite 8. HCI:lla hajotetusta VG:stä jo ennestään tunnistetut yhdisteet

Liite 9. NaOH:lla hajotetun CVX:n LC-MS:sta tunnistamattomat yhdisteet ja epäpuhtaudet



# Lyhenteet

ACh	Asetyylikoliini			
AChE	Asetyylikoliiniesteraasi			
B <sub>0</sub>	Ulkoinen magneettikenttä, jolla vaikutetaan atomin spinien suuntaan			
CVX	O-Butyyli S-[2-(dietyyliamino)etyyli] metyylifosfonotioaatti, kiinalainen VX (Chinese VX)			
CW	Kemiallinen ase (Chemical weapon)			
ESI	Sähkösumutusionisaatio (Electrospray ionization)			
FID	Vapaasti vaimeneva signaali (Free Induction Decay)			
FINAS	Suomen akkreditointipalvelu (Finnish Accreditation Service)			
h	Plankin vakio (6,62607015 x 10 <sup>-34</sup> J·s)			
HCI	Suolahappo			
I	Spin-kvanttiluku			
J	Skalaarinen kytkentävakio			
k <sub>B</sub>	Bolztmannin vakio			
LC-MS	Nestekromatografi-massaspektrometri (Liquid chromatography-mass spectrometry)			
М	Multiplisiteetti			
m/z	massa/varaus-suhde (mass-to-charge ratio)			



NaOH	Natriumhydroksidi				
NMR	Ydinmagneettinen resonanssi (Nuclear magnetic resonance)				
OPCW	Kemiallisten aseiden kieltojärjestö (Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons)				
Ρ	Liikemäärämomentti				
QC	Laadunvalvonta (Quality Control)				
R <sub>t</sub>	Retentioaika				
TIC	Totaali ioni kromatogrammi (Total Ion Chromatogram)				
TMS	Tetrametyylisilaani				
V	Larmor-taajuus				
VG	O,O-dietyyli S-[2-(dietyyliamino)etyyli] fosfonotioaatti, amiton				
Y	Gyromagneettinen suhde				
δ	Kemiallinen siirtymä (ppm)				



#### 1 Johdanto

Vaikka jo antiikin aikoina luonnosta löytyviä yhdisteitä osattiin käyttää sotatoimissa, vasta 1900-luvulle tultaessa useiden satojen vuosien jälkeen ihminen ryhtyi käyttämään erilaisia yhdisteitä aivan uudella historiaa muuttavalla tavalla. Ensimmäisen maailmansodan taisteluissa käytetyt kemialliset aseet olivat pelottava kokemus, joka jäi Euroopan muistiin yhdessä muiden sodassa tapahtuneiden hirveyksien kanssa. Ensimmäisen maailmansodan aikana käytetyt tukahduttavat taistelukaasut, kuten kloorikaasu ja fosgeeni sekä rakkuloita muodostava sinappikaasu vaikuttivat useiden satojen tuhansien siviilien ja sotilaiden loppuelämään traumaattisesti. Taisteluaineiden takia henkensä menetti noin 100 000 ihmistä ja yli miljoona haavoittui. Vaikka taiteluaineiden avulla saatiin suuri määrä ihmisiä haavoitettua, niitä vastaan opittiin suojautumaan nopeasti mm. kaasunaamarien avulla.

Ensimmäisen maailmansodan loputtua Saksassa huomattiin, kuinka tärkeää on pystyä tuottamaan kotimaista ruokaa, koska Saksan todettiin olevan kohtalaisen helppo saartaa. Kotimaisen ruoantuotannon merkitys sodan aikana korostuu, koska ruokakuljetukset ovat mahdottomia. Tämän johdosta Saksa ryhtyi ottamaan huomioon kotimaan maatalouden sotasuunnitelmissaan. Ruoantuotannon takaamiseksi yhtenä tärkeänä osa-alueena oli hyönteismyrkkyjen kehittäminen, koska tuholaisten aiheuttamat menetykset olisivat merkittävä tekijä ruoantuotannon määrän kannalta. Näissä tutkimuksissa huomattiin organofosfaatti-yhdisteiden potentiaalinen toksisuus, eli kyseisten yhdisteiden potentiaalinen käyttö hyönteismyrkkynä.

Samaan aikaan Saksa halusi kehittää kemiallisia aseita, koska 1. maailmansodan taistelukentillä kemiallisilla aseilla ei saavutettu haluttuja tuloksia, koska vain harvat taisteluista ratkaistiin kemiallisilla aseilla. Tämän lisäksi 1. maailmansodan kemialliset aseet eivät olleet ideaalisia, esimerkiksi fosgeenin homeisen heinän haju toimi hyvänä varoitusmerkkinä lähestyvästä vaarasta. Vuodesta 1938 eteenpäin 2. maailmansodan loppuun mennessä saksalaiset onnistuivat kehittämään uusia hermomyrkkyjä kuten tabuuni, sariini ja somaani hyönteismyrkkytutkimuksen ja kemiallisten aseiden tutkimuksen avulla. [1; 2.]





Toisen maailmansodan jälkeen 1950-luvulla brittitutkijat syntetisoivat organofosfaatti-yhdisteitä hyönteismyrkkykäyttöä varten, kuten saksalaiset 2. maailmansodan aikaan. Näiden tutkimuksien aikana tutkijat löysivät amitoniksi nimetyn hyönteismyrkyn. Nopeasti kuitenkin huomattiin, että amiton oli hyönteisten lisäksi ihmisillekin hengenvaarallinen. Tämä johti tuotteen poistumiseen markkinoilta ja yhdiste sai nykyisin enemmän käytetyn nimensä VG. Samankaltaisten yhdisteiden tutkimus johti myöhemmin vuonna 1955 VXhermomyrkyn löytämiseen. [3.]

OPCW on kansainvälinen järjestö, jonka toimenkuvana on mm. kemiallisten ja biologisten yhdisteiden käytön esto sotatoimissa, Kemiallisten aseiden kieltosopimuksen valvonta, kemiallisten aseiden kanssa työskentelevien laitosten valvonta ja kemiallisen aseen väitetyn käytön tutkintaan liittyviä tehtäviä. Järjestön pääkonttori sijaitsee Haagissa Alankomaissa. Järjestö perustettiin 1997 valvomaan Kemiallisten aseiden kieltosopimusta, joka allekirjoitettiin 1993 vuosien neuvottelun jälkeen. Neuvotteluja edelsi vuonna 1925 allekirjoitettu Geneven protokolla. Jäsenmaita järjestössä on 193.

Järjestön toiminnan tukemiseksi OPCW:n alaisena toimii itsenäisesti toimivia laboratorioita, jotta OPCW voi tutkia kemiallisten aseiden väitettyä käyttöä. Nämä laboratoriot ovat OPCW:n designoituja laboratorioita. Jotta laboratorio voidaan designoida, laboratorion tulee saada akkreditointi kansainvälisesti tunnustetulta akkreditointielimeltä, vakiinnuttaa standardin ISO/IEC 17025:2005 tai vastaavan mukainen laatujärjestelmä ja osallistua OPCW:n järjestämiin pätevyyskokeisiin tarpeeksi hyvällä menestyksellä. Akkreditoinnilla tarkoitetaan kansainvälisiin kriteereihin perustuvaa käytäntöä, jolla toimijan kuten laboratorion pätevyyttä toimia sen tehtävissä ja sen antamien tulosten oikeellisuus ja vertailukelpoisuus todistetaan arviointiprosessin avulla. [4; 5; 6.]

VERIFIN kuuluu Helsingin yliopiston matemaattis-luonnontieteelliseen tiedekuntaan kuuluvan Kemian osaston yksikköön. Vuonna 1994 VERIFIN perustettiin jatkamaan 1973 aloitettua Kemiallisen Aseen tutkimusprojektia. VERIFINin tehtäviin kuuluu tutkimus ja koulutuksen antaminen, toiminta Kemiallisen aseen kieltosopimuksen valvovana kansallisena viranomaisena sekä kehittää kemiallisten aseiden näytteenkäsittely- ja analysointimenetelmiä. VERIFINin laboratoriot ovat akkreditoitu FINAS:n (Suomen akkreditointipalvelu) toimesta ja on saanut designoidun laboratorion statuksen OPCW:ltä. VE-RIFINin akkreditoinnin pätevyysalue on mukautuva ja se käsittää ympäristötestausta,



materiaali- ja tuotetestausta ja kliinistä testausta. Koska VERIFIN on akkreditoitu ja designoitu laboratorio, tulee sen kyetä virheettömästi analysoimaan ja raportoimaan tulokset 15 päivän aikana. VERIFIN osallistuu OPCW:n pätevyystesteihin, joilla varmistetaan VERIFINin toiminnan laatua ja pätevyyttä toimia designoituna laboratoriona. VERIFIN on koordinoinut Recommended operating procedures for analysis in the verification of chemical disarmament –kirjan julkaisua, joka tunnetaan myös Sinisenä kirjana. Sininen kirja on kokoelma suositelluista toimintatavoista kemiallisen aseen kieltosopimuksen alaisien kemikaalien liittyvässä työskentelyssä, kuten niiden analysoinnissa. [7.]

Opinnäytetyössä tutkittiin vähemmän tunnettujen V-sarjaan kuuluvien taisteluaineiden VG (amiton) ja CVX (kiinalainen VX) rakenneanalytiikkaa. Tämän lisäksi tutkittiin kyseisten yhdisteiden hajoamista happamissa ja emäksisissä oloissa, jolla mallinnettiin kyseisten aineiden hajoamista dekontaminaatioliuoksissa. Hajoamistuotteita tunnistettiin ja seurattiin LC-MS-tekniikan ja NMR-spektroskopian avulla.

Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää, minkälaisia hajoamistuotteita tutkittavista taisteluaineista muodostuu happamissa ja emäksissä oloissa, ja lisäksi tutkittiin hajoamisen kinetiikkaa. Hajoamistuotteille määritettiin kemialliset rakennekaavat ja taulukoitiin spesifiset attribuutiomarkkerit, joiden avulla voidaan selvittää yhdisteiden alkuperää. Kiinnostus yhdisteen alkuperää kohtaan on kasvanut jatkuvasti ja se on hyvin ajankohtainen aihe kemiallisten aseiden analytiikassa.

Opinnäytetyö tehtiin osana Metropolia Ammattikorkeakoulun laboratorioanalytiikan tutkinto-ohjelmaa syksyllä 2020. Opinnäytetyön laboratorio-osuus suoritettiin VERIFINin laboratorioissa Helsingin yliopiston Kumpulan kampuksella. Opinnäytetyön ohjaavana opettajana toimi yliopettaja Jukka Niiranen. Työn vastaavina ohjaajina VERIFINissä toimi Harri Kiljunen, Harri Heikkinen (NMR-osuuden ohjaus) ja Matti Kjellberg (LC-MS-osuuden ohjaus). Opinnäytetyötä tehtiin COVID-19-pandemian aikaan, minkä takia työskentelyssä tuli ottaa huomioon riittävät toimenpiteet viruksen leviämisen estämiseksi.



# 2 Kemialliset aseet

Kemiallisen aseen kieltosopimuksen artiklan II mukaan kemiallisiksi aseiksi (CW, engl. chemical weapon) luetellaan

- myrkylliset kemikaalit ja niiden lähtöaineet, ellei niiden käyttöä ole sallittu sopimuksessa erikseen, kunhan kemikaalin tyyppi ja määrä on oikeanmukainen
- ammustarvikkeet ja laitteet, jotka on suunniteltu aiheuttamaan kuolemia tai muita haittoja myrkyllisten kemikaalien kemiallisten ominaisuuksien avulla
- kaikki laitteet, jotka on suunniteltu käytettäväksi ammusten ja muiden laitteiden kanssa.

Myrkyllisiä kemikaaleja ovat yhdisteet, jotka pystyvät ominaisuuksiensa avulla aiheuttamaan kuoleman, hetkellisen toimintakyvyttömyyden tai pysyvän haitan ihmiselle tai eläimelle. Yhdisteen laskemiseen CW:ksi ei vaikuta miten tai missä kemikaali on tuotettu. [8.]

Lähtöaineiksi kieltosopimuksen mukaan lukeutuu kemiallisiin reaktioihin osaa ottavat yhdisteet, joilla tuotetaan kemiallisiksi aseiksi luokiteltuja yhdisteitä. Tähän lukeutuu myös kaikki binäärisen tai monikomponenttisen kemiallisen systeemin avainkomponentit. Nämä ns. avainkomponentit ovat lähtöaineita, jotka aiheuttavat lopputuotteen toksisuuden ja reagoivat voimakkaasti binäärisessä tai monikomponenttisessa systeemissä. [8.] Kemialliset systeemit muodostavat vuorovaikutuksissa olevista molekyyleistä, jotka eivät ole toisistaan eristyksissä. Binäärisissä systeemeissä vuorovaikutuksessa olevia molekyylejä on kaksi ja monikomponenttisessa systeemissä useampi kuin kaksi. [9, s. 1554.]

#### 2.1 Kemiallisten aseiden luokittelu

Kemialliset aseet luokitellaan kolmeen eri listaan sopimuksessa:

- lista 1
- lista 2
- lista 3.



Listaan 1 kuuluvat yhdisteet ovat korkean riskiluokan yhdisteitä. Tämän luokan yhdisteitä on käytetty kemiallisessa sodankäynnissä tai niitä on valmistettu sodankäyntiä varten. Monet 40- ja 50-luvulla kehitellyt CW:t ovat lista 1:n yhdisteitä. Esimerkiksi hermomyrkyt kuten sariini ja VX, rakkuloita aiheuttavat myrkyt kuten sinappikaasu ja lewisiitit sekä saksitoksiini ja risiini, jotka ovat luonnossa esiintyviä toksiineja. Lisäksi lista yhden kemi-kaaleja ovat jotkin kemiallisten aseiden tuotannossa loppuvaiheessa käytetyt lähtöaineet. [8; 10.]

Laillinen käyttö listan 1 yhdisteille on rajoitettua ja niitä käytetään lääketieteellisessä ja farmaseuttisessa tutkimuksessa ja kansainvälisessä CW-vastaisissa ohjelmissa (esim. VERIFIN) tutkimustarkoituksissa. Esimerkiksi risiiniä käytetään tiettyjen syöpien hoidossa, minkä lisäksi sen hyödyntämistä on tutkittu esimerkiksi AIDS:n hoitamisessa. [10.]

Listaan 2 kuuluvat yhdisteet ovat merkittävää riskiä aiheuttavia yhdisteitä. Suurimmaksi osaksi lista 2:n yhdisteet ovat kemiallisten aseiden lähtöaineita. Lisäksi muutama mahdollinen kemiallinen ase kuten VG, perfluori-isobuteeni (PFIB) ja 3-kinuklidinyylibentsilaatti (BZ) kuuluvat listan 2 yhdisteisiin. Monilla kyseisen listan yhdisteillä on laillista käyttöä teollisuudessa, mutta tuotantomäärät ovat usein pieniä teollisen tuotannon näkökulmasta. Esimerkiksi tiodiglykolia, joka on sinappikaasun lähtöaineena käytetty yhdiste, käytetään musteissa ja väriaineissa. [8; 10.]

Listaan 3 kuuluvat yhdisteet aiheuttavat vaaraa ja ne ovat yhdisteitä ja niiden lähtöaineita, joita on käytetty sodankäynnissä. Listan 3 yhdisteet ovat ensimmäisen maailmansodan aikaisia yhdisteitä, jotka ovat korvautuneet nykyaikaisemmilla kemiallisilla aseilla, kuten listan 1 yhdisteet. Listan 3 yhdisteitä ovat mm. fosgeeni ja syanadi-pohjaiset kemialliset aseet. [8; 10.]

## 2.2 Kemiallisten aseiden dekontaminointi

Johtuen kemiallisten aseiden toksisuudesta kemiallisia aseita ei voi jättää luontoon, rakennusten pintaan tai muuhunkaan materiaaliin tai paikkaan, josta sitä löytyy. Kemiallisista aseista päästään eroon esim. dekontaminoimalla, jolla tarkoitetaan prosessia,





jossa kemiallinen tai biologinen aine tehdään vaarattomaksi neutralisoimalla tai poistamalla aine. Yhdisteiden dekontaminointiin vaikuttaa missä myrkyllinen aine on ja mitä ainetta on käytetty. [11, s. 108.]

Kemiallisia aseita voidaan hävittää luonnollisesti esimerkiksi veden avulla, jolloin poistettava yhdiste voidaan poistaa ja laimentaa samaan aikaan. Tällöin ei kuitenkaan välttämättä myrkyllinen yhdiste neutraloidu tai tuhoudu. Tätä varten veteen voidaan lisätä kemiallisia reagensseja, jotka neutraloivat tai tuhoavat myrkyllisen yhdisteen. Veden käyttö dekontaminoinnissa voi olla haastavaa, jos käytetään suuria määriä vettä, johtuen logistiikallisista ongelmista. Lisäksi veden valuminen luontoon voi aiheuttaa ympäristöongelmia. Dekontaminoinnissa voidaan hyödyntää myös ultraviolettisäteilyä ja lämpöä, mutta menetelmä soveltuu vain, jos neutralisoitavat yhdisteet eivät ole liian pysyviä. [11, s. 113 – 115.]

Kemiallisten aseiden myrkyttömäksi tekeminen tehdään usein hydrolyysi- ja hapetusreaktioiden avulla. Hydrolyysireaktio on kemiallinen reaktio, jossa yhdiste reagoi veden, hydroksyyli-ionien tai muiden nukleofiilien kanssa luoden uuden yhdisteen. Hapettumisreaktiossa hapettuva yhdiste luovuttaa elektroneita hapettimelle, joka hapettaa yhdisteen. [11, s.117 – 119, 122; 12, s. 229.]

#### 2.3 Hermomyrkyt

Hermomyrkyt ovat organofosfaattisia yhdisteitä (poikkeuksena karbamaatti-pohjaiset hermomyrkyt), jotka toimivat asetyylikoliiniesteraasin (AChE) inhibiittorina [13, s. 646; 14, s. 1]. AChE-entsyymi hydrolysoi hermojen välittäjäainetta asetyylikoliinia (ACh), joka on kiinnittynyt neuroniin hajottaen asetyylikoliinin koliiniksi ja asetaatiksi. Asetyylikoliinin hajoaminen asetyylikoliiniesteraasin vaikutuksesta neuronissa on kuvattu kuvassa 1. Asetyylikoliinin hajoaminen kolinergisessa neuronissa palauttaa neuronin takaisin lepotilaan uudelleen aktivointia varten, jolloin seuraava signaali pääsee eteenpäin. [15.]







Kuva 1. Asetyylikoliiniesteraasi hydrolysoi neutronin reseptoreihin kiinnittyneen asetyylikoliinin koliiniksi ja asetaatiksi, jolloin neuroni palaa takaisin lepotilaan. Lepotilaan takaisin palannut neuroni voi vastaanottaa uuden signaalin (asetyylikoliinia) lähettävästä neuronista. [16, mukaillen]

Hermomyrkyn sitoutumiseen asetyylikoliiniesteraasin asetyylikoliini-aktiiviseen kohtaan tapahtuu usein fosforyyliryhmän puolelta kohdasta, johon vaikuttaa hermomyrkyn rakenne (kuva 2). Tämä sitoutuminen estää asetyylikoliiniesteraasia hydrolysoimasta vastaanottavan neuronin reseptoreista asetyylikoliinia, mikä johtaa asetyylikoliinin kumuloitumiseen reseptorissa. Kumuloitumisen johtaa jatkuvaan reseptorin stimuloitumiseen. [15; 17.] Jatkuva reseptorien stimuloituminen voi aiheuttaa monenlaisia oireita kuten kohtauksia, voimakkaampaa syljeneritystä, kyynelnesteen vuotoa, virtsaamista, hikoilua, ripulia, oksentelua, pupillien supistumista ja lihaskouristuksia [15].





Kuva 2. Havainne kuva hermomyrkyn (sariini) sitoutumisesta kovalenttisesti AChE:hen fosforyyliryhmän kohdalta. [18, mukaillen].

Useiden hermomyrkkyjen kohdalla AChE:n ja hermomyrkyn välinen sidos on niin vahva, ettei se luonnollisesti katkea, jonka takia ihmisen immuunisysteemin tarvitsee tuottaa uusia entsyymejä menetettyjen tilalle. Ihmisen keho ei pysty kuitenkaan tuottamaan uusia entsyymejä tarpeeksi nopeasti, joten ilman nopeaa hoitoa hermomyrkylle altistuminen johtaa usein altistuneen henkilön kuolemaan. [18.] Hermomyrkkyjen aiheuttamaa myrkytystä voidaan hoitaa mm. atropiinilla, joka aktivoi entsyymin takaisin normaaliksi hajottamalla kovalenttisen sidoksen. Atropiini-hoitoa tulisi altistumisen jälkeen saada hyvin nopeasti jopa parin minuutin sisällä altistumisesta, jotta vasta-aine tehoisi halutulla teholla. [19.]

Hermomyrkyistä G- ja V-sarjan hermomyrkyt ovat merkittävimpiä hermomyrkkyjä. G-sarjan hermomyrkkyihin kuuluu mm. tabuuni (GA), sariini (GB), somaani (GD) ja syklosariini (GF). V-sarjan hermomyrkkyistä tunnetuin on VX, muita V-sarjan hermomyrkkyihin kuuluvia yhdisteitä ovat esimerkiksi opinnäytetyössä tutkitut VG ja CVX sekä VE ja VR. Hermomyrkyt ovat hyvin viskoosisia ja huonosti haihtuvia öljymäisiä nesteitä, mikä antaa niille kyvyn kestää ympäristössä sellaisenaan pitkään. VG:n moolimassa on 269,34 g/mol ja CVX:n moolimassa on 267.37 g/mol. Edellä mainittujen hermomyrkkyjen rakennekaavat on esitetty kuvassa 3. [20.]





Kuva 3. G-sarjan hermomyrkkyjen tabuunin (GA), sariinin (GB), somaanin (GD) ja syklosariinin (GF) sekä V-sarjan hermomyrkkyjen VX:n, CVX:n, VE:n , VR:n ja VG:n rakennekaavat.

## 3 NMR-spektroskopia

NMR-spektroskopia (engl. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) eli ydinmagneettinen resonanssispektroskopia on spektroskopinen menetelmä, jolla voidaan selvittää tutkittavan materiaalin molekyylirakenne. Tekniikka hyödyntää atomin ytimen spinin luontaista ominaisuutta reagoida voimakkaaseen ulkoiseen magneettikenttään, jonka avulla voidaan muodostaa NMR-spektri. [21.]



#### 3.1 Atomin ydinspin

Jokaisen atomin ydintä voidaan kuvailla spin-kvanttiluvulla (I), joka voi saada arvokseen  $I \ge 0$ , jotka ovat puolikkaan kerrannaisia (1/2, 3/2, 5/2...). Atomit, joilla ei ole spiniä omaavat spin-kvanttiluvun nolla (I = 0), jolloin ne eivät tuota NMR-spektriä. Tällaisia atomeja ovat parillisia massalukuja ja järjestyslukuja omaavat ytimet kuten <sup>12</sup>C. Spin-kvanttiluvun omaavat (I  $\ne 0$ ) ytimet voivat taas absorboida/emittoida sähkömagneettista säteilyä, jolloin ne voivat tuottaa NMR-signaalin. Atomit, joilla on parillinen massaluku ja pariton järjestysluku spin-kvanttiluku, saavat arvokseen kokonaisluvun (I = 1,2,3...). Tällaisia ytimiä ovat esimerkiksi <sup>14</sup>N ja <sup>2</sup>H. Parittoman atomimassan omaavat ytimet saavat kvanttiluvukseen puolikkaita (I = 1/2,3/2,5/2...). Atomit, kuten <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C ja <sup>31</sup>P kuuluvat puolikkaan kvanttiluvun ytimiin. [23, s.1 – 2; 24, s. 13.]

Spinin omaava ydin (I  $\neq$  0) omaa liikemäärämomentin P ja varauksen sekä varauksen liikkeen, jotka synnyttävät magneettisen momentin  $\mu$  (kaava 1).

$$\mu = \gamma P \tag{1}$$

jossa  $\gamma$  on gyromagneettinen suhde, joka kuvaa nuklidin magneettisuutta. Magneettisella momentilla ja liikemäärämomentilla on suunta ja suurus, joka aiheuttaa ytimien spinvektoreille sattumanvaraisen suunnan. Tähän suuntaan voidaan vaikuttaa magneettikentällä B<sub>0</sub>. Kuvassa 4 on esitetty magneettikentän vaikutus spinvektoriin. Kun ydin altistetaan magneettikentälle B<sub>0</sub>, spinvektorit asettuvat joko magneettikentän suuntaisesti αtilaan tai vastaisesti β-tilaan. Näiden kahden eri energiatilojen populaatioiden ero on hyvin pieni. [24, s. 13 – 14.]



Kuva 4. Atomin ytimen spinvektorit suuntautuvat sattumanvaraisesti, kun ne eivät ole magneettikentässä. Magneettikenttä B<sub>0</sub> vaikutuksesta spinvektorit kohdistuvat joko α-tilaan tai β-tilaan.





Energiatilojen  $\alpha$  ja  $\beta$  välinen energiaero  $\Delta$ E saadaan kaavan 2 avulla

$$\Delta E = hv \tag{2}$$

jossa h on Plankin vakio (6.62607015×10<sup>-34</sup> J·s) ja v on Larmor-taajuus. Larmor-taajuus kuvaa ytimen magneettisen momentin pyörimisakselin kiertymistä ulkoisen magneettikentän (B<sub>0</sub>) suuntaisen akselin ympäri. Larmor-taajuus saadaan kaavalla 3

$$v = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \tag{3}$$

jossa  $\gamma$  on gyromagneettinen suhde, kuten magneettisen momentin kaavassa. [24, s. 14 – 15; 25.]

Magneettikentän suuntaisen α-tilan energia on hieman pienempi kuin vastakkaissuuntaisen β-tilan, joten tasapainotilassa α-tilassa (joillakin ytimillä tämä on toisinpäin) vallitsee ytimien ylimäärää, kuten Boltzmannin jakaumalla määritetään (kaava 4)

$$\frac{N_{\alpha}}{N_{\beta}} = e^{\Delta E/k_B T} \tag{4}$$

jossa N<sub> $\alpha$ </sub> ja N<sub> $\beta$ </sub> kuvaavat ytimien lukumäärää spinorientaatiossa, k<sub>B</sub> Boltzmannin vakiota (1.380649×10<sup>-23</sup> J·K<sup>-1</sup>) ja T lämpötilaa kelvineinä. [24, s. 15.]

#### 3.2 Kemiallinen siirtymä

NMR-signaalin resonanssi määräytyy siitä, miten kukin ydin kokee ympärillä olevan magneettikentän vaikutuksen. Koska eri kohdassa molekyyliä olevat ytimet kokevat ulkoisen magneettikentän hieman eri tavalla, saadaan aikaan NMR-spektri, joka sisältää useita signaaleita, vaikka kyseessä olisi sama ydin, esim. <sup>1</sup>H. Signaalin paikka osoitetaan kemiallisella siirtymällä miljoonasosa yksikön avulla (ppm), jota kuvataan symbolilla  $\delta$ . Koska ppm-asteikko on universaali eri NMR-laitteiden välillä, voidaan eri laitteilla mitattua dataa verrata keskenään. [26; 27.]



Referenssiyhdisteellä määritetään ppm-asteikon nollakohta. Referenssinäytteen signaaliin voidaan verrata NMR-spektrin muita näytteen yhdisteiden signaaleja kaavan 5 mukaisesti.

$$\delta = \left(\frac{\nu_{sample} - \nu_{ref}}{\nu_{ref}}\right) \times 10^6 \tag{5}$$

jossa  $v_{sample}$  ytimen resonanssitaajuus ja  $v_{ref}$  referenssitaajuus. Referenssinäytteen lasketulle kemialliselle siirtymälle annetaan arvoksi 0,00 ppm.

Käytetyimpiä referenssiyhdisteitä orgaanisissa liuottimissa on tetrametyylisilaani (TMS), jonka rakennekaava on esitetty kuvassa 5. Tetrametyylisilaanilla on useita ominaisuuksia, jotka tekevät siitä hyvän referenssiyhdisteen, esimerkiksi se on inertti kemikaali ja se antaa voimakkaan <sup>1</sup>H NMR -signaalin.



Kuva 5. Tetrametyylisilaanin (TMS) rakennekaava.

Elektronegatiiviset atomit kuten esimerkiksi fosfori (P), typpi (N), happi (O) ja rikki (S) luovat elektronitiheytymiä, jolloin elektronegatiivisten atomien läheiset atomit diamagneettisesti varjostuvat (engl. deshield). Koska protoni on vahvemmin magneettikentän vaikutuksen alaisena, se tarvitsee diamagneettisessa varjostuksessa suuremman taajuuden resonanssin luomiseksi, jolloin kemiallinen siirtymä siirtyy ns. alakenttään suuremmalle ppm-arvolle.

Kun yhdisteessä on vähän elektronegatiivisia atomeja, ulkoinen magneettikenttä pääsee pakottamaan elektroneja tyhjille orbitaaleille (orbitaalit tyhjiä molekyylin perustilassa). Tällöin elektronitiheys jakautuu orbitaaleille. Ytimet ovat tällöin enemmän magneettikentän vaikutuksen alaisena ja niiden sanotaan olevan paramagneettisesti varjostuneita (engl. shielded). Koska protoni on heikomman magneettikentän vaikutuksen alaisena,



se tarvitsee pienemmän taajuuden resonanssin luomiseksi, siirtyy kemiallinen siirtymä yläkenttään pienemmälle ppm-arvolle. [27; 28, s. 13.]

Magneettinen sp<sup>2</sup>-hybridisoidut hiilet ja anisotropia lisäävät myös elektronitiheyttä. Sp<sup>2</sup>orbitaalit pitävät elektroneja lähempänä ydintä kuin sp<sup>3</sup>-orbitaalit, koska ne ovat elektronegatiivisempia. Magneettisella anisotropialla taas tarkoitetaan ilmiötä, jossa esimerkiksi hiilien välisen tuplasidoksen kiertävät  $\pi$ -elektronit luovat paikallisen magneettikentän, joka yhdessä ulkoisen magneettikentän kanssa, synnyttää vahvemman magneettikentän. Täten elektronitiheys lisääntyy. Anisotropiaa esiintyy muillakin ytimillä kuin hiilellä.

Kemialliseen siirtymään vaikuttaa siis ytimen kokema kemiallinen ympäristö, ja täten erilaisille funktionaalisille ryhmille saadaan erilaiset kemialliset siirtymät. Kuvassa 6 on havainnollistettu joitain protoni ydinten kemiallisia siirtymiä [29.]



Kuva 6. Tyypillisesti havaittuja protoni ydinten kemiallisia siirtymiä erilaisille funktionaalisille ryhmille orgaanisessa liuoksessa [27, mukaillen].

#### 3.3 Spin-spin -kytkentä

NMR-spektrissä signaali voi olla yksittäinen tai signaali voi jakaantua. Signaalin jakautumiseen vaikuttava ilmiö on nimeltään spin-spin –kytkentä. Spin-spin kytkentää voi olla samanlaisten, esim. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H, tai erilaisten NMR-aktiivisten ydinten välillä, esimerkiksi <sup>31</sup>P-<sup>1</sup>H. Tällä ilmiöllä tarkoitetaan läheisten, ei-ekvivalenttien, NMR-aktiivisten ja resonoivien



ydinten magneettista vuorovaikutusta toisiinsa. NMR-spektrin piikkien multiplisiteetti voidaan laskea kaavan 6 avulla, jos kytkeytyvät atomit ovat sanankaltaisia.

$$M = n + 1 \tag{6}$$

jossa n on vierekkäisten ydinten määrä. Jos kytkeytyvät NMR-aktiiviset atomit ovat keskenään erilaisia, saa kaava muodon M = (n+1) × (k+1) × (z+1), jossa n, k ja z kuvaavat molekyylissä olevia erilaisia atomeja, kuten esimerkiksi <sup>1</sup>H, <sup>19</sup>F, <sup>31</sup>P. Heterogeenisten multiplisiteettien tulkinta on tyypillisesti hankalampaa verrattuna vain samanlaisten atomien muodostaviin multiplisiteettieihin. Taulukossa 1 on esitetty yksinkertaiset viereisten ydinten vaikutuksesta muodostuneiden piikkien määrä ja multiplisiteettien nimeämiset.

Viereisten ydinten Syntyvien signaalien Multiplisiteetti lukumäärä (n) lukumäärä 0 1 Singletti 1 2 Dubletti 2 3 Tripletti 3 4 Kvartetti 4 5 Kvintetti 5 6 Sekstetti 6 7 Septetti

Taulukko 1. Viereisten ydinten määrä vaikuttaa syntyvien piikkien lukumäärään. Piikkien lukumäärä vaikuttaa multiplisiteettien nimeämiseen.

Signaalien lukumäärän lisäksi signaalin intensiteetti signaalien jakaantuessa on multipliseetin kanssa tärkeä ottaa huomioon. Pascalin kolmion (kuva 7) avulla voidaan kuvata intensiteettien suhteita riippuen millä tavalla signaali jakaantuu. Pascalin kolmiossa numeroiden muodostuminen perustuu binomikehitelmän kaavaan, jota ei käsitellä tässä opinnäytetyössä sen tarkemmin kuin mainintana. Signaalien intensiteetti erojen avulla voidaan myös erottaa päällekkäin olevia signaaleja. [30; 31.]





Kuva 7. Pascalin kolmion avulla voidaan kuvata, kuinka suuri intensiteetti ero jakaantuneiden piikkien välille syntyy.

Muodostuneiden multiplisiteettien signaalien etäisyyttä toisistaan kuvataan suurella kytkentävakio *J*. Kytkentävakion yksikkönä käytetään hertsiä (Hz). Kytkentävakion arvoon vaikuttaa kytkeytyvien atomien etäisyys ja avaruudellinen suuntautuminen toisiinsa nähden. Jos kytkeytyvät atomit ovat lähellä toisiaan, kytkentävakio saa tyypillisesti suuremman arvon, kuin silloin kun atomit olisivat kauempana toisistaan. Kytkentävakioiden arvoihin vaikuttavia asioita on useita ja riippuen yhdisteen rakenteesta ja monimutkikkuudesta, kytkentävakiot voivat vaihdella. Esimerkkinä katsotaan, kuinka kytkennät saavat trans-konformaatiossa pienemmän arvon kuin kytkennät cis-konformaatiossa ja kuinka geminaalisesti (samassa hiilessä kiinni olevat vedyt) kytkeytyvät protonit saavat pienemmän kytkentävakion kuin trans- tai cis-konformaation protonit. Trans- ja cis-konformaation sekä geminaalisesti kytkeytyneiden protonien kytkentävakion eroja on kuvattu buteenissa kuvassa 8. [31; 32.]





Kuva 8. Trans-konformaatio 2-buteenissa antaa suuremman kytkentävakion protonien H<sub>a</sub> ja H<sub>b</sub> välille kuin cis-konformaatio. Isobuteenissa protonien H<sub>a</sub> ja H<sub>b</sub> välinen kytkentävakio on paljon pienempi kuin trans- tai cis-2-buteenissa. [32.]

Etanolin <sup>1</sup>H-spektriä homogeenisen kytkennän selventämiseksi (kuva 9). Etanolin CH<sub>3</sub>osa splittautuu tripletiksi, koska sen viereisessä hiilessä on kiinni kaksi protonia (M = 2+1) ja etanolin CH<sub>2</sub>-osan signaalit näkyvät kvartettina, koska viereisessä hiilessä (CH<sub>3</sub>) on kolme protonia (M = 3+1). Hydroksidin protonilla on vain vähän vaikutusta splittaantumisen kannalta, joten hydroksidin protoni näkyy singlettinä. [31; 33.]





#### 3.4 NMR-laite

NMR-laite (kuva 10) koostuu useasta eri osasta, joista merkittävin on magneetti. Muita osia ovat mittapää, erilaiset signaalin vahvistimet ja muut sähkökomponentit konsolissa sekä tietokone, jolla ohjataan eri osia ja käsitellään saatu data. [22.]







Kuva 10. Havainnekuva NMR-laitteesta, joka koostuu magneettiosasta, mittapäästä, konsolista ja tietokoneesta.

NMR-spektrometrin suprajohteinen magneetti sisältää erikoismetalliseoksesta tehdyn solenoidin, jonka sisällä kulkee suuri sähkövirta ja joka sijaitsee nestemäisessä heliumissa (He). Nestemäisen 4,2-kelvinisen heliumin avulla magneetti saadaan pysymään suprajohteena, jolloin magneetilla voidaan saada aikaiseksi magneettikenttä näytteen ympärille. Jotta helium ei kiehuisi pois, He-kammio on eristetty jäähdytetyllä tyhjiöllä. Helium-kammion ympärillä oleva tyhjiö jäähdytetään nestemäisellä typellä (N<sub>2</sub>) täytetyllä kammiolla, jota myös ympyröi tyhjiöksi tehty tila. Jotta magneetti pysyisi toimivana Heja N<sub>2</sub>-kammioita täytetään tietyn väliajoin. [23, s. 130 – 132.]

Magneetin luoma magneettikenttä näytteen ympärillä tulee olla tasalaatuinen mittauksen ajan, jopa miljardisosan tarkkuudella, jotta saavutetaan hyvä spektrin viivanleveys. Tämä saavutetaan ns. shimmauksen, kenttätaajuuden lukitsemisen ja mahdollisimman homogeenisen näytteen avulla. [23, s. 132.] Shimmauksella tarkoitetaan päämagneettikentän epätäydellisyyksien ja häiriöiden korjaamista näytteen ympärillä olevien sähkökelojen avulla. Näiden resistiivisisten huoneenlämpöisten kelojen paikalliset magneettikentät, jotka sähkövirran avulla luodaan, kumoavat päämagneettikentän epähomogeenisuudet. Kenttätaajuuden lukitsemisen avulla kompensoidaan kenttävoimakkuuden vaihteluita. Näyte sisältää pienen määrän deuteroitua liuotinta, jonka <sup>2</sup>H-signaalin avulla luki-



taan spektrometri tietylle taajuudelle. Jos laitteisto havaitsee kentässä vaihteluita, sähkövirran vaihtelulla korjataan havaittu vaihdos. Lukon seuranta on automatisoitu. [23, s. 132 & 135 – 137; 34; 35.]

Mittapää edesauttaa ydinten spinien virityksessä ja NMR-signaalin havaitsemisessa. Mittapäähän on sijoitettu radiotaajuus kela, joka on viritetty spesifiselle taajuudelle spesifiselle ytimelle. Usein mittapäät on valmistettu niin, että mittapäässä on kaksi, kolme tai neljä kelaa, yksi lähempänä näytettä ja muut kauempana näytettä, jolloin voidaan virittää useampaa ydintä samanaikaisesti, kuitenkin niin, että lähimpänä näytettä oleva kela on kaikista herkin. [23, s. 134; 32.]

Spektrometrissä sijaitsevan lähettimen avulla tuotetaan pulssi, jolla ydinten spinejä manipuloidaan, jolloin luodaan vapaasti vaimeneva signaali (FID, engl. Free Induction Decay). näytteestä. FID (kuva 11) sisältää saman informaation kuin tavallinen NMR-spektri. FID:ssä signaalin taajuus suhteessa spektrometrin taajuuteen on annettu kosiniaallon taajuutena. Intensiteetti on taas annettu kosiniaallon intensiteettinä alussa, ja viivan leveys on annettu vaimenevan kosiniaallon tahdilla. FID-signaali muunnetaan NMR-spektriksi Fourier muunnoksen avulla. [23, s. 12 – 13; 137.]



Kuva 11. Yhden ytimen tuottama vapaasti vaimenevan signaalin (FID) havainnekuva [23, s. 12, mukaillen].





#### 3.5 1D ja 2D NMR

NMR spektroskopiassa mitataan tyypillisesti erilaisia 1D ja 2D NMR spektrejä riippuen tutkittavien yhdisteiden rakenteista ja ominaisuuksista. 1D NMR:n spektri koostuu kahdesta taajuus akselista ja intensiteetti esitetään korkeuskäyrien avulla (aivan kuten topografisissa kartoissa maan korkeuserot). Tämän 1D NMR:n spektri koostuu kahdesta dimensiosta, joista x-akselin suuntainen kuvaa taajuuden akselia (kemiallista siirtymää, [ppm]) ja y-akseli kuvaa signaalin intensiteettiä (I). 2D NMR spektri koostuu tyypillisesti kahdesta taajuus akselista ja intensiteetti esite-tään korkeuskäyrien avulla (aivan kuten topografisissa kartoissa maan korkeuserot). Tämän lisäksi 2D NMR spektrissä voidaan esittää molempien taajuus akseleiden ytimien NMR-spektrit ulkoisina projektioina. Esimerkki Fourier-muunnetuista 1D ja 2D NMR spektrejä on havainnollistettu kuvassa 12. [36.]



Kuva 12. 1D NMR-spektrissä x-akselilla esitetään taajuus akseli, joka esittää kemiallisen siirtymän ppm-arvojen avulla ja y-akselilla esitetään signaalien intensiteetti. Kuvan 1D NMRspektri on <sup>1</sup>H-NMR:n spektri. 2D NMR-spektrissä x- ja y-akselilla kuvataan taajuus akselit, joista x-akseli kuvaa ensimmäisen mitattavan ytimen taajuuksia (kemiallista siirtymää), y-akselilla toisen mitattavan ytimen taajuutta (kemiallista siirtymää) ja intensiteetti korkeuskäyrän avulla. Kuvassa oleva 2D NMR-spektri on 2D [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H]-COSY:n NMRspektri.





# 4 LC-MS

Nestekromatografia-massaspektrometria (LC-MS) on yhdistelmätekniikka, jossa nestekromatografilla näytteen eri komponentit erotellaan, minkä jälkeen erotellut komponentit ionisoidaan massaspektrometrin analysoitavaksi. Massaspektrometrin avulla saadaan ionisoitujen ja eroteltujen komponenttien massa/varaus-suhde (m/z), jonka avulla näytteen sisältämät komponentit voidaan tunnistaa. LC-MS-laitteen yksinkertainen havainnekuva on esitetty kuvassa 13. [37; 38, s. 140.]



Kuva 13. LC-MS-laite koostuu nestekromatografi-puolesta, jossa näyte sekoitetaan liuottimiin ja pumpataan pumppujen avulla kapillaariputkilla kolonniin, jossa näytteessä olevat yhdisteet erottuvat. Erottuneet yhdisteet kulkeutuvat massaspektrometrin puolelle ionisoitavaksi ionisaattorille. Tämän jälkeen ionisoidun näytteen massa/varaus-suhde erotellaan massaspektrometrissä ja havaitaan detektorilla. Kerätty data siirtyy tietokoneelle tulosten käsittelyä varten.

LC-MS-laitteiden nestekromatografia puolella kapillaariputkia pitkin pumppujen avulla eluentit pumpataan kohti kolonnia. Ennen kolonnia injektorin avulla näyte injektoidaan kapillaarissa liikkuvaan eluenttiseokseen. Eluentti-näyte-seos liikkuu kolonniin, jossa näytteen eri komponentit erottuvat. Tämän jälkeen eroteltu näyte siirtyy massaspektrometrin puolelle analysoitavaksi. Ennen massaspektrometrillä analysointia näyte ionisoidaan, jotta massaspektrometri voi analysoida näytteen. Ionisoitu näyte erotellaan massaspektrometrillä ja lopuksi detektorilla mitataan massa/varaus-suhde, minkä jälkeen voidaan saatu data analysoida tietokoneen avulla. [38, s. 122 – 123; 153.]



#### 4.1 Nestekromatografia LC-MS:ssa

Nestekromatografiassa yhdisteiden erottelu toisistaan perustuu tasapainoihin. Yhdisteiden erottelu tapahtuu kahden toisiinsa liukenemattoman faasin, liikkuvan faasin ja stationäärifaasin avulla (kuva 14). Liikkuvassa faasissa olevien yhdisteiden ja stationäärifaasin välisten fysikaaliskemiallisten vuorovaikutusten mukaan, ne yhdisteet, jotka eivät absorboidu voimakkaasti fysikaaliskemiallisten vuorovaikutuksien johdosta stationäärifaasiin liikkuvat liikkuvan faasin kanssa nopeammin kuin ne yhdisteet, joilla absorptio on voimakkaampaa.



Yhdisteet jakaantuvat faasien kesken



Eri yhdisteet kulkevat eri nopeudella

Kuva 14. Liikkuvassa faasissa olevat tutkittavat näytemolekyylit tarttuvat stationäärifaasin pintaan fysikaaliskemiallisten vuorovaikutuksien perusteella. Tähän vaikuttaa se, millaista stationäärifaasia käytetään. Yhdisteet, joilla on voimakkaampia vuorovaikutuksia stationäärifaasiin kiinnittyvät voimakkaammin siihen ja liikkuvat hitaammin liikkuvan faasin mukana kuin ne yhdisteet, joilla ei ole yhtä voimakasta vuorovaikutusta stationäärifaasiin. [39, s. 140, mukaillen.]

Yhdisteiden absorptio- ja partitio-ominaisuudet stationäärifaasiin vaikuttaa stationäärifaasin materiaali. Yhdisteitä voidaan erotella koon perusteella (kokoekskluusiokromatografia), varauksen (ionivaihtokromatrografia), hydrofobisuuden (hydrofobinen vuorovaikutus kromatografia) tai spesifisen sitovien vuorovaikutuksien (affiniteettikromatografia) perusteella. Stationäärifaasin materiaalin valinnan mukaan yhdisteiden erottelu voi tapahtua useamman erilaisen vuorovaikutuksen avulla. Kolonnin sisäpinta on usein pinnoitettu polymeeri- tai silikapohjaisella materiaalilla. [37; 38, s. 140 & 155.]



Ennen kuin näytettä voidaan syöttää kolonniin, tulee kolonni tasapainottaa. Kolonnin tasapainotus suoritetaan ajamalla eluentteja kolonnin läpi 5–10 kolonnitilavuuden verran. Tasapainotuksen jälkeen näyte voidaan syöttää kolonniin samalla eluenttien suhteella kuin tasapainotus tehtiin, jolloin saavutetaan mahdollisimman tehokas vuorovaikutus näytteiden ja stationäärifaasin välille. Näytteen syötön jälkeen kolonni pestään samalla eluenttien suhteella kuin edellisissäkin vaiheissa tai eluenttien suhteella, mikä häiritsee heikkoja vuorovaikutuksia näytteiden ja stationäärifaasin välillä, jolloin yhdisteet, joilla ei ole tai on hyvin heikkoja vuorovaikutussuhteita stationäärifaasiin saadaan poistumaan kolonnista. Kun heikosti vuorovaikutuksessa olevat yhdisteet on poistettu kolonnista, vahvasti stationäärifaasissa olevat yhdisteet eluoidaan kolonnista pois muuttamalla eluenttien suhde sellaiseksi, että loput vahvasti kiinnittyneet yhdisteet saadaan irrotettua stationäärifaasista. Lopuksi kolonni pestään vahvalla eluenttipuskurilla, jolloin kaikki loput yhdisteet, jotka ovat kiinnittyneet stationäärifaasiin saadaan irrotettua. Tämän jälkeen voidaan aloittaa uuden näytteen mittaus toistamalla edellä mainittu protokolla. [37.]

Avataan hieman kolonnin tasapainotusta, eluointia ja pesua ionivaihtokromatografian avulla. Aluksi kolonniin ajetaan heikon ionivahvuuden omaavaa eluenttia, jolloin stationäärifaasin pinnalle muodostuu positiivisesti varautunut pinta. Tämän jälkeen näyte syötetään kolonniin, jolloin negatiivisesti varautuneet yhdisteet kiinnittyvät stationäärifaasiin ja positiivisesti varautuneet tai varauksettomat yhdisteet eluoituvat näytteen syötön tai ensimmäisen pesun aikana. Jotta negatiivisesti varautuneet yhdisteet saadaan irrotettua stationäärifaasista, ionivahvuutta nostetaan eluenteissa eluointivaiheessa. Lopuksi nostetaan vielä ionivahvuutta lisää, jotta voidaan pestä kaikki jäljelle jääneet kiinnittyneet yhdisteet. [37; 39.]

#### 4.2 Massaspektrometria LC-MS:ssa

Massaspektrometriassa mitataan tutkittavaa yhdistettä (LC:lla näytteestä erotellut yhdisteet), jotka ionisoidaan ionisaattorilla, jolloin muodostuu positiivisesti tai negatiivisesti varautuneita ioneja. Muodostuneilla ioneilla on ylimääräistä energiaa, jonka takia ionin sidokset katkeavat ja ioni pilkkoutuu pienemmiksi komponenteiksi, joita kutsutaan massafragmenteiksi. Syntyneet massafragmentit erotellaan massaspektrometrilla massa/varaus-suhteen (m/z) mukaan. [38, s. 122; 40.]



Ionisointitekniikoita on erilaisia, mutta koska työssä käytetty ionisointimenetelmä oli UniSpray-menetelmä, käsitellään vain kyseinen ionisointimenetelmä. UniSpray-tekniikka on uusi menetelmä, joka on samankaltainen sähkösumutusionisointitekniikan (ESI) kanssa. UniSpray-ionisointitekniikassa nestekromatografista tuleva näyte sumutetaan ionisaatiokammioon ohuen kapillaarin läpi, jossa on jännite. Jännitteen takia liuoksesta poistuu elektroneja, ja muodostuu sähköisesti varattuja pisaroita. Muodostuneet pisarat haihdutetaan, koska massaspektrometrillä ei voida analysoida nestemäistä näytettä. Näytepisaroiden neste (liuottimet) haihdutetaan typpivirtauksen ( $N_2$ ) ja kuumennetun sumuttimen avulla. Pisaroiden pienetessä (liuottimien haihtuessa), sähkövaraus keskittyy yhä pienemmälle alueelle, jonka takia pisaran varaustiheys kasvaa. Kun pisarassa oleva sähköinen poistovoima voittaa pintajännityksen pisara hajoaa pienemmiksi aerosolihiukkasiksi, jossa muodostuneet ionit sijaitsevat. [38, s. 210 – 211.] Näyte-aerosolin virtaus ohjataan lieriömäisen elektrodin oikeaan yläkulmaan, joka on kytketty suurjännitelähteeseen. Coandă-ilmiön takia massafragmentit ohjautuvat kaasuvirtauksen avustuksella massaspektrometrin tuloaukosta massaspektrometriin. Coandă-ilmiöllä tarkoitetaan ilmiötä, jossa fluidivirtaus kiinnittyy läheiseen pintaan ja pysyy kiinnittyneenä vaikka pinta kaareutuisi poispäin virtauksen alkuperäisestä suunnasta, muuttaen virtauksen suuntaa. Kuvassa 15 on havainnollistettu unispray-ionisaattorin toimintaa ja coandă-ilmiötä ionisaattorin elektrodissa. [41; 42.]



Kuva 15. UniSpray-ionisointimenetelmässä nestemäinen näyte muutetaan pienemmiksi varautuneiksi aerosolihiukkasiksi, jotka ohjataan massaspektrometrin tuloaukkoon suurjännitteisen elektrodin avulla hyödyntäen coandă-ilmiötä. Coandă-ilmiössä nestevirtaus, joka



kulkee tiettyyn suuntaan x (kuvan kohta 1) virratessaan läheltä suurjännitteistä elektrodia, tässä tapauksessa UniSprayn suurjännitteistä elektrodia (kuvan kohta 2), kaareutuu virtaus pinnan muotoa seuraten kiinnittyneenä siihen (kuva 3) poispäin alkuperäisestä suunnasta (kuvan kohta 4).

Yleensä pieniä molekyylejä analysoituessa syntyy yhdesti varautuneita ioneja. Pooliset ja emäksiset pienet molekyylit tuottavat pääsääntöisesti protonoituneita ioneja ([M+H]<sup>+</sup>), kun taas happamat yhdisteet muodostavat pääsääntöisesti deprotonoituneita ioneja ([M-H]<sup>-</sup>). Myös ns. addukti-ioneja saattaa syntyä riippuen mm. eluenttien koostumuksesta. Esimerkkejä näistä ovat esimerkiksi natrium-adduktit ([M+Na]<sup>+</sup>), ammonium-adduktit ([M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>), ja kloridi-adduktit ([M+CI]<sup>-</sup>). Dimeerien (yhdisteiden, joiden rakenne koostuu kahdesta identtisestä tai samankaltaisesta molekyylistä), kuten [2M+H]<sup>+</sup> ja [2M-H]<sup>-</sup> muodostumisen todennäköisyys kasvaa, kun yhdisteen konsentraatio kasvaa.

Kun näyte on saatu ionisoitua, siirtyy näyte massaspektrometrille analysoitavaksi. LC-MS-laitteissa massaspektrometri on usein tandemmassaspektrometri kolmoiskvadrupolilaitteistolla, jossa kolmen kvadrupolisauvaston avulla voidaan havaita halutut ionit. Kvadrupolisauvasto koostuu neljästä kvadrupolisauvasta, jotka on kytketty sähköisesti toisiinsa. Sauvojen tuottama sähkökentän värähtely ohjaa ionien kulun kvadrupolissa ja sopivalla tasajännitteellä ja radiotaajuudella muuttuvan vaihtojännitteen avulla saadaan tietyn massa/varaus-suhteen ionit lentämään sauvaston läpi, jolloin kaikki muut ionit törmäävät sauvoihin eivätkä pääse detektorille asti. Mitä pidempään ionit lentävät sauvaston läpi, sitä paremmin ionit saadaan erotettua toisistaan. Pienemmät ionit vaativat pienemmän jännitteen sauvaston läpi lentämiseen samalla nopeudella kuin isommat ionit, jotka tarvitsevat taas isomman energian.

Kolmoiskvadrupolin ensimmäiselle kvadrupolille tulevista ioneista voidaan valita mitä ioneja halutaan tarkastella. Ensimmäisellä kvadrupolilla valittuja ioneja kutsutaan äiti-ioneiksi. Valitut äiti-ionit lentävät kvadrupolitörmäyskammioon, jossa ioneihin törmäytetään törmäytyskaasua, jona yleensä toimii typpi- tai argonkaasu. Törmäytyksen johdosta äitiionit fragmentoituvat pienemmiksi ioneiksi, joita kutsutaan tytärioneiksi. Tytärionit lennätetään kolmanteen kvadrupoliin, jossa ne erotellaan massa/varaus-suhteen mukaan ja lennätetään detektorille. Kolmoiskvadrupolin toimintaperiaate on kuvattu kuvassa 16. [38, s. 125 – 126, 213 – 213; 42; 43.]



Kuva 16. Kolmoiskvadrupolissa ensimmäisen kvadrupolin avulla valitaan analysoitava/t ns. äitiioni/t, jotka törmäytetään kvadrupoli-törmäytskammiossa törmäytyskaasun kanssa, jona toimii esimerkiksi typpi- tai argonkaasu. Törmäytyksen takia ionit fragmentoituvat entisestään ns. tytärioneiksi. [39, s. 214, mukaillen]

Massaspektrometrien detektorina käytetään elektronimonistinta, jossa ionien energiat muutetaan sähköpulssiksi. Elektronimonistimen sisäseinään törmäävä ioni synnyttää sekundaarisia elektroneja, jotka vapautuvat elektronin pinnasta. Elektroni törmää tämän jälkeen seinämään ja vapauttaa lisää elektroneja. Törmäyksiä tapahtuu, kunnes elektronit kerätään anodilla, jossa signaali vahvistetaan ja saadaan massaspektrometrinen data kerättyä. [37, s. 128; 44.]

# 5 Työvälineet ja reagenssit

Työssä käytetyt työvälineet, laitteet ja reagenssit on esitetty seuraavissa kappaleissa.

5.1 Laitteet ja työvälineet

Työssä käytettyjä laitteita ja niiden osia sekä työvälineitä on listattu taulukossa 2.

Taulukko 2. Opinnäytetyössä käytetyt laitteet ja niiden osat sekä työvälineet.

Laite / Työväline	Valmistaja	Malli
NMR-spektrometrin konsoli	Bruker AG	500 Mhz Avance III
Magneetti (NMR)	Bruker AG	UltraShield 500 / 54 mm
NMR spektrometri	Bruker	500 Mhz



NMR-mittapää (probe)	Bruker BioSpin	5mm 500MHz TXI ( <sup>1</sup> H, <sup>31</sup> P, <sup>13</sup> C)
Massaspektrometri (LC-MS)	Waters	Waters XEVO TQ-XS
Nestekromatografi (LC-MS)	Waters	Aqcuity I Class
Kolonni (LC-MS)	Waters	Xbridge <sup>®</sup> BEH C18 2,5 μm
Vedenpuhdistuslaite	Millipore	Direct-Q3 UV
Haihdutin	Caliper LifeSciences	TurboVap LV
NMR-näyteputki	Wilmad LabGlass	5 mm High Troughput
NMR-syvyysmittari ja -spinnereitä	Bruker	B-AC560
Pipetti 1–10 ml	Thermo Scientific	Finnpipette F1, 1–10 ml
Pipetti 10–100 μl	Thermo Scientific	FP Focus(A) 10–100 μl
Pipetti 100–1000 μl	Thermo Scientific	FinnPipet Focus STD 100-1000 μl
NMR-pipetti	Sigma-Aldrich	tip L 9 in.
6 ml SPE-putket	Phenomenex	Strata <sup>®</sup> SI-1 Silica (55 μm, 70A)

Lisäksi työssä käytettiin 1,5 ml:n LC-vialeita, 250 µl:n inserttejä vialeissa tarvittaessa ja 10 ml:n koeputkia.

### 5.2 Reagenssit

Työssä käytetyt reagenssit on listattu taulukossa 3. Näytteet (VG ja CVX) olivat VERIFI-Nin synteesilaboratoriossa valmistettuja yhdisteitä.

Taulukko 3. Opinnäytetyössä käytetyt reagenssit.

Reagenssi	Valmistaja	MW (g/mol)	Pitoisuus	CAS	LOT
VG	in-house (VERIFIN)	269,34	7 mg/ml	78-53-5	-
CVX	in-house (VERIFIN)	267,37	7 mg/ml	468712-10-9	-
NaOH (Titrisol <sup>®</sup> )	Merck	39,99	0,1 mol/l	1310-73-2	HC707735
HCI	VWR	36,46	0,1 mol/l	7647-01-0	18G094014
Asetonitriili	Honeywell	41,05	99,9 %	75-05-8	-
НСООН	Merck	46,03	10 %	64-18-6	-
NH₄OH⁻	Sigma Aldrich	35,25	25 %	1336-21-6	-

Työssä käytetty ultrapuhdas vesi saatiin Direct-Q3 UV (valm. Millipore) -vedenpuhdistuslaitteesta.



# 6 VG:n rakenneanalytiikka

Hajottamattoman näytteen määrityksessä käytettiin NMR-tekniikkaa ja LC-massaspektrometriaa. VG-näyte oli valmistettu VERIFINillä.

## 6.1 VG:n NMR-tutkimus

Näyte (0,6 ml:n NMR-putkessa) oli liuotettuna deuteroituun asetoniin (asetoni-d6) ja sen pitoisuus oli 7,0 mg/ml. VG:ta näyte sisälsi 4,2 milligrammaa. NMR-putki asetettiin spinnerin läpi syvyysmittariin, jolla säädettiin näytteen paikka oikeaksi mittapäässä. Samalla voitiin havaita, onko putkessa tarpeeksi näytettä. Tämän jälkeen näyteputki siirrettiin spinnerissä yhä kiinni olevana NMR-laitteen näytetelineeseen.

Ennen kuin näytteestä mitattiin NMR-spektrit, suoritettiin lukitseminen käyttäen hyväksi deuteroitua asetonin <sup>2</sup>H-signaalia, tehtiin automaattinen kanavien viritys, magneettikentän homogenisointi asetonille (shimmaus) ja tarkistettiin lopuksi lukon taso.

Kaikki näytteet ajettiin 17°C:ssa Brukerin Avance III 500 MHz spektrometrillä, johon oli liitetty 5 mm:n TXI mittapää (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C ja <sup>31</sup>P). Koko opinnäytetyön ajan mittaukset tehtiin samassa lämpötilassa ja samoilla laitteilla. Näytteestä ajettiin <sup>1</sup>H NMR, <sup>1</sup>H NMR (liuotin vaimennettuna), <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR, <sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} NMR, 2D [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H] -COSY-NMR, 1D [<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P] - HSQC-NMR, 2D [<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C] -HSQC-NMR, 2D [<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C] -HMQC-NMR ja 2D [<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P] - HMQC-NMR. Kokeiden pulssisarjat on havainnollistettu kuvassa 17.







Kuva 17. Työssä käytettyjen NMR-kokeiden pulssisarjat: 1D <sup>1</sup>H-, 1D <sup>13</sup>C-, 1D <sup>31</sup>P-, 2D [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H] - COSY-, 1D [<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P] -HSQC-, 2D [<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C] -HSQC-, 2D [<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C] -HMQC- ja 2D [<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P] - HMQC-NMR kokeille.

#### 6.2 Mitatun VG:n NMR-datan tulkinta

Kaikki kerätty NMR-data käsiteltiin ja prosessoitiin Brukerin TopSpin 3.6.2-ohjelman avulla. VG:n puhtauden määrityksessä NMR-spektrien tulkinnan apuna käytettiin



metropolia.fi

ACD/Labsin NMR Workbook 2019.2.1 -ohjelmalla tehtyä ennuste-NMR-spektrejä. Ennuste spektrit luotiin 1H, 13C ja 31P-NMR-spektreille. VG:n ennustespektrit löytyvät liitteestä 1.

NMR datan prosessointi piti sisällään spektrin vaiheistuksen, spektrin referoinnin, signaalien poiminnan, signaalien integroinnin ja signaalien assignoinnin eli nimeämisen. VG-kokeiden NMR-spektrit löytyvät liitteestä 2.

NMR-datan tarkastelu aloitettiin <sup>1</sup>H-spektristä. <sup>1</sup>H spektrissä (kuva 16) näkyi seitsemän selkeää signaalia, joista kemiallisella siirtymällä ~ 2 ppm oleva piikki tulee asetonin CH<sub>3</sub>:n vedyistä. Signaalien tunnistus tehtiin 2D NMR-spektrien perusteella. Signaalien tunnistuksessa käytettiin apuna myös heterogeenistä kytkentää tiettyjen protonien ja fosforin välillä.

VG:n dietyyliaminon CH<sub>3</sub>-osat ovat suojassa kaukana elektronegatiivisista atomeista ja ne ovat hyvin samanlaisissa oloissa, joten ne antavat signaalin yhdessä yläkenttään. Täten kyseiset signaalit tulevat H1:ksi ja H2:ksi merkityistä protoneista, ja kyseisten signaalien kemiallinen siirtymä on 1,008 ppm. Organofosfaatin etyylin CH<sub>3</sub>-osan protonit (H3 ja H4 merkityt protonit) ovat myös hyvin suojassa elektronegatiivisilta atomeilta, mutta eivät niin hyvin kuin amiinin, joten kyseiset signaalit tulevat hieman alakentän suunnalle amiinin CH<sub>3</sub>:een nähden ppm-arvolla 1,331.

Organofosfaatin etyylin CH<sub>2</sub>-ryhmä (H7 ja H8) on lähellä elektronegatiivista organofosfaattia, jonka takia kyseiset ryhmät antavat signaalin alakenttään ppm-alueella 4,101– 4,161. Organofosfaatin rikkiin kiinnittynyt CH<sub>2</sub> (H10) ei ole aivan niin alakentässä kuin organofosfaatin etyylin CH<sub>2</sub>:t (H7 ja H8), koska happi on hieman elektronegatiivisempi kuin rikki. Täten rikkiin kiinnittynyt CH<sub>2</sub> antaa signaalin alakenttään päin organofosfaatin etyylin CH<sub>2</sub>:een nähden ppm-alueella 2,810–2,919. Rikkiin kiinnittyneen CH<sub>2</sub>:sen viereinen CH<sub>2</sub> (H9) on diamagneettisesti varjostuneemmassa (deshielded) tilassa kuin amiinin CH<sub>2</sub>:t (H5 ja H6), joten ppm-arvolla 2,717 näkyy H9:llä merkityn protonit ja ppm-arvolla 2,536 näkyy H5:n ja H6:n protonit.


Kuva 18. Hajottamattoman VG:n <sup>1</sup>H NMR-spektri, johon on assignoitu spektrin signaalit vastaamaan rakennekaavaan merkittyjä protoneita. Lisäksi signaalien kemialliset siirtymät on esitetty spektrien alla.

Valituista signaaleista mitattiin kytkentävakiot TopSpinin etäisyys mittaus -työkalun avulla. Taulukkoon 4 on merkitty mitatut kytkentävakiot. Tämän lisäksi taulukkoon on merkitty VG:stä tulleiden signaalien kemialliset siirtymät, protonien määrä signaaleissa ja signaalin multiplisiteetti.



Protoni	δ <sup>1</sup> Η (ppm); <sup>a</sup>	<sup>1</sup> H määrä	<i>J</i> (Hz)
H1, H2	1,008; t	6H	<sup>3</sup> J <sub>H1, H5</sub> = 7,09
H3, H4	1,331; t	6H	${}^{3}J_{\rm H3, \ H7}$ = 6,93
H5, H6	2,536; k	4H	<sup>3</sup> J <sub>H5, H1</sub> = 7,08
H9	2,7174; t	2H	$^{3}J_{\rm H9,  H10}$ = 7,22
H10	2,810–2,919; m	2H	<sup>3</sup> J <sub>H10, H9</sub> = 6,63
H7, H8	4,101–4,161; m	4H	${}^{3}J_{\rm H7,  H3} = 7,08$

Taulukko 4. VG:stä tulleiden <sup>1</sup>H NMR-signaalien kemialliset siirtymät, protonien määrä eri signaaleissa sekä mitatut kytkentävakiot.

<sup>a</sup> t=tripletti, k=kvartetti, m=monikerta

<sup>13</sup>C-NMR:n tulokset käsiteltiin samalla periaatteella kuin <sup>1</sup>H NMR-data. Liuottimen (asetonin) antamat signaalit näkyivät hyvin intensiivisinä signaaleina kemiallisen siirtymän alueilla 205,319 ppm (asetonin C=O-osan hiili) ja 28,977 ppm (CH<sub>3</sub>-osan hiili). C=Oryhmä näkyi alakentässä, koska hiileen kaksoissidoksella sitoutunut happi diamagneettisesti varjostaa hiiltä, kun taas CH<sub>3</sub>:n hiili on elektoronitiheydeltään harvemmassa vedyn heikomman elektroninegatiivisyyden vuoksi.

Spektrissä näkyi asetonin lisäksi kuusi selkeää signaalia (kuva 19). Asetonin alakentässä ollutta signaalia ei näy kuvassa 19, koska kuvaa varten koko spektriä on tarkennettu lähemmäksi haluttua aluetta, jolloin kyseinen piikki jäi näkyvistä pois.

Hiilet C1 ja C2 kuten myös C3 ja C4 ovat kaukana elektronegatiivisista atomeista, joten ne sijoittuvat yläkenttään spektrissä. Hiilet C1 ja C2 ovat kuitenkin suojemmassa elektronegatiivisilta atomeilta enemmän, joten ne näkyvät aivan spektrin alussa. Täten hiilet C1 ja C2 saavat signaalin 11,692 ppm:ssä ja hiilet C3 ja C4 15,491 ppm:ssä. Hiilet C7 ja C8 ovat kiinni hyvin elektronegatiivisessa organofosfaatissa, joten ne sijoittuvat alakenttään, 62,851 ppm:n kohdalle, koska ne diamagneettisesti varjostuvat elektronitiheyden takia. Hiilet C5 ja C6 ovat elektronegatiivisen typen vieressä, mikä siirtää kyseisten hiilien signaalia alakenttään päin. Koska signaali tulee kahdesta hiilestä, kuten myös C1ja C2- sekä C3- ja C4-hiilien signaalit, ovat spektrissä niiden signaalit melkein saman intensiteetin omaavia. Täten C5:n ja C6:n signaali näkyy 46,739 ppm:ssä. Jäljellä olevista signaaleista C9 on elektronegatiivisemman atomin vieressä (typpi elektronegatiivisempi kuin rikki), joten C10 näkyy alakentässä 53,306 ppm:ssä ja C9 alakentässä 24,901 ppm:ssä.





Kuva 19. Hajottamattoman VG:n <sup>13</sup>C NMR-spektri, johon on assignoitu spektrin signaalit vastaamaan rakennekaavaan merkittyjä hiiliä. Lisäksi signaalien kemialliset siirtymät on esitetty spektrien suurennoksien alla.

Kuten <sup>1</sup>H-NMR:n signaaleissa, <sup>13</sup>C-NMR:n signaaleista mitattiin kytkentävakiot fosforiin. Taulukkoon 5 on merkitty mitatut kytkentävakiot ja VG:n antamien <sup>13</sup>C-NMR:n signaalien kemialliset siirtymät.



Hiili	δ <sup>13</sup> C (ppm); <sup>a</sup>	<i>J</i> (Hz)
C1, C2	11,692; s	-
C3, C4	15,491; d	${}^{2}J_{C3,P} = 7,05$
C10	24,901; d	${}^{2}J_{C10, P} = 4,26$
C5, C6	46,739; s	-
C9	53,306; d	${}^{3}J_{C9, P} = 4,86$
C,7 C8	62,851; d	${}^{2}J_{C7, P} = 5,8$

Taulukko 5. VG:stä tulleiden <sup>13</sup>C NMR-signaalien kemialliset siirtymät ja kytkentävakiot hiilen ja fosforin välillä.

<sup>a</sup>. s=singletti, d=dupletti

<sup>31</sup>P NMR spektrissä VG:n signaali tuli intensiivisimmästä piikistä, joka asettui kemiallisella siirtymällä 27,38 ppm. VG:n signaalin vieressä yläkenttään päin 26,46 ppm:ssä näkyi signaali, joka alustavasti assignoitiin VG:n suolaksi. Yläkentässä 1,06 ppm ja alakentässä 67,71 ppm:ssä näkyi kaksi epäpuhtautta, joihin palataan myöhemmin.

2D {<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H}-COSY -kokeen spektrin tarkastelu aloitettiin sijoittamalla <sup>1</sup>H-kokeen perusteella selvityt VG:n protonit (H1, H2, H3...) 2D [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H]-COSY:n spektreihin (kuva 21). COSY-kokeella tutkittiin protonien kytkentää toisiinsa, ja COSY:lla havaittiin 2-3-sidoksen (<sup>3</sup>J<sub>HH</sub>) lyhyitä kytkentöjä. Nämä kytkennät ilmenevät spektrissä korrelaatiosignaaleina diagonaalisignaalin (vinottain) molemmin puolin. Ennen löydettyjen kytkentöjen läpikäyntiä, pohditaan VG:n rakenteen perusteella millaisia kytkentöjä voidaan odottaa kokeesta löytyvän.

VG:n rakennetta (kuva 20) tarkastelemalla voidaan päätellä, että COSY:sta tulisi löytyä kolme 3-sidoksen lyhyttä kytkentää. Protonin H1 tulisi kytkeytyä H5:n kanssa ja protonin H2 kytkeytyä H6:n kanssa. Koska protonit H1 ja H2 antavat samalla kemiallisella siirtymällä signaalin kuten myös protonit H5 ja H6 antavat toistensa kanssa, pitäsi protonien H1 ja H2 signaalista tulla kytkentä protonien H5 ja H6 signaaliin COSY:ssa. Samalla periaatteella protoneista H3 ja H4 muodostuneella signaalilla tulisi olla kytkentä protoneista H7 ja H8:sta muodostuneeseen signaaliin COSY-kokeessa. Viimeinen kytkentä pitäisi tulla protonien H9 ja H10 välille.



Kuva 20. VG:n rakennekaava, johon on merkitty punaisella <sup>1</sup>H-kokeen perusteella eri signaaleista tulleiden protonien paikat. Sinisellä on esitetty protonien välille odotetut 3-sidoksen  $(^{3}J_{HH})$  pituiset lyhyet kytkennät.

2D [1H-1H] -COSY-kokeesta saatiin kytkentöjä, joita odotettiinkin tulevan. Löydetyt kytkennät on esitetty kuvassa 21. Kytkennät löydettiin protonien H1 ja H2 sekä H5 ja H6 välille, protonien H3 ja H4 sekä H7 ja H8 välille, ja viimeiseksi protonien H9 ja H10 välille.





Kuva 21. 2D [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H] -COSY-koe VG:lle, johon on merkitty 3-sidoksen (<sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub>) päässä olevat kytkennät.

Protonien ja hiilien välistä kytkentää tutkittiin 2D [<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C] -HSQC-kokeen avulla. Aiempien <sup>1</sup>H- ja <sup>13</sup>C-kokeiden perusteella määritettyjen VG:n eri atomien korrelaatiosignaaleiden tulisi HSQC:ssa tulla poikittain ja pitkittäin vedettyjen viivojen risteyskohtaan. Tämä on esitetty kuvassa 22. Jokaisen assignoidun protonin kytkentä osui oikeaan hiileen, kun tarkasteltiin protoni-hiili-kytkentöjä.





Kuva 22. VG:n 2D [<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C] -HSQC-kokeen 2D-spektrin protoneista katsottiin kytkennät vastaaviin hiiliin, joissa ne ovat kiinni pitkittäisten ja poikittaisten viivojen avulla.

2D [1H-31P] -HMQC-kokeen spektriä (kuva 23) tarkastelemalla etsittiin VG:n keskusfosforin ja VG:n protonien välistä kytkentää. VG:n antama <sup>31</sup>P-spektrin signaali oli vahvin nähtävä signaali 27,39 ppm:lla. Kytkentöjä fosforille löytyi kolme, protonien H7, H8; H10 ja H3, H4 kanssa. Näiden kytkentöjen tunnistuksen apuna käytettiin ulkoisesti heijastettua <sup>1</sup>H-spektriä. Havaitut kytkennät protoneihin ovat 3 ja 4 sidoksen päässä fosforista, joten havaitut kytkennät ovat lyhyitä kytkentöjä. Tämän lisäksi spektrissä näkyi 3 muuta yhdistettä, jotka sisältävät fosforia. Näistä lisää VG:n epäpuhtauksista käsittelevässä luvussa 6.3.



metropolia.fi



Kuva 23. 2D [<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P] -HMQC NMR spektri, johon <sup>1</sup>H-spektri on ulkoisesti heijastettu mitatusta <sup>1</sup>Hspektristä. Tähdellä (\*) on merkitty muut havaitut yhdisteet näytteessä, jotka sisältävät fosforia ja vetyjä. VG:n antama signaali näkyi fosforisiirtymällä 27,39 ppm.

# 6.2.1 LC-MS-analyysi

VG:n LC-MS-analyysia varten NMR-putkesta otettiin näytettä 500 µl 1,5 ml:n vialiin. Näyteestä haihdutettiin nesteet typpivirran avulla haihduttimessa 7,5 psi:n paineella, kunnes kaikki neste oli haihtunut. Haihdutuksen jälkeen näytteeseen lisättiin 1 ml ultrapuhdasta vettä ja näyte sekoitettiin vorteksin avulla, jonka jälkeen näyte oli valmis mitattavaksi LC-MS:lla.



LC-MS-mittaus suoritettiin Watersin XEVO TQ-XS –massaspektrometrillä, johon oli liitetty Waters:n Aqcuity I Class –nestekromatografi. Kolonnina toimi Waters:n XBridge® BEH C18 2,5 µm -kolonni. Kaikki LC-MS-mittaukset suoritettiin samalla LC-MS-laitteella ja kolonnilla. Ennen VG:n mittausta LC-MS:lla ajettiin QC-näyte (Quality control) eli laadunvalvontanäyte ja QC-näytteen 10-kertainen laimennos. Näyte voitiin mitata tarpeeksi luotettavasti QC-näytteen antamien tulosten perusteella, joten VG:n mittaus voitiin aloittaa. QC-näyte ajettiin joka kerta, kun LC-MS:lla mitattiin näytteitä.

Ensimmäisten ajon jälkeen kromatogrammista huomattiin, että näytteen pitoisuus oli kuitenkin liian suuri laitteelle, koska kromatogrammin piikit saturoituivat liikaa. Tämä huomattiin VG:n (mw 270) ja VG:n rikki-isotoopin (mw 272) piikkien intensiteettien suhteesta, joka oli liian suuri. Rikki-isotoopin tulisi olla noin 5 prosenttia VG:n piikkiin verrattuna ja näytteessä suhde oli noin 9 (kuva 24). Tämän takia näytteestä tehtiin 10-kertainen laimennos (10 µl näytettä ja 90 µl ultrapuhdasta vettä 1,5 ml vialiin, johon oli laitettu sisälle 250 µl:n insertti). 10-kertainen laimennos antoi vieläkin laimentamisen jälkeen liian suuren suhdeluvun, joten näytteestä tehtiin vielä 100-kertainen laimennos. 100-kertaisesta laimennoksesta (1 µl näytettä ja 99 µl ultrapuhdasta vettä 1,5 ml vialiin, johon oli laitettu sisälle 250 µl:n insertti, saatiin kuitenkin jo sopiva suhde VG:n ja rikki-isotoopin välille.





Kuva 24. VG-näytteen VG:n piikki (m/z 270) ja rikki-isotoopin (m/z 272) suhde (noin 9 %) laimentamattomassa näytteessä oli liian suuri, koska näytteen liian korkea pitoisuus aiheutti piikkien saturoitumista. Tämä kuitenkin saatiin korjattua laimentamalla näytettä 100-kertaisesti, jolloin rikki-isotoopin suhde pieneni noin 5 prosenttiin.

Rikki-isotooppi ongelman lisäksi VG:n mittauksessa oli toinenkin suurempi selkeä ongelma. Jokaisessa näytteessä, näkyi vahvana mw:llä 150 selkeä piikki. Tämä näkyi myös ajoissa, joissa ajettiin vain vettä. Kyseinen piikki oli siis selkeä kontaminaatio. Tämän takia mittaukset suoritettiin uudestaan, kunhan ensin laite oli saatu putsattua.

Kun LC-MS:n puhdistus valmistui, voitiin mitata uudelleen hajottamaton VG, josta ajettiin kaikki tehdyt näytteet. Eluentteina käytettiin metanolia ja ultrapuhdasta vettä, joihin oli lisätty 0,1 %:nen määrä muurahaishappoa. LC-MS-ajo ajettiin gradienttiajona, jonka eluenttien prosenttiosuus näkyy taulukossa 6.



Aika (min)	UP-vesi (+ 0,1 % FA) %	Metanoli (+ 0,1 % FA) %
Aloitus	95,0	5,0
0,60	95,0	5,0
2,30	0,0	100,0
4,00	0,0	100,0
4,30	95,0	5,0
5,50	95,0	5,0

Taulukko 6. Gradienttiajon eluenttien prosenttiosuus

Näytteestä ajettiin myös tytärioni-ajo, jossa ensimmäisen kvadrupolin läpi päästettiin vain tietyn massa/varaus-suhteen ionit, jotka fragmentoidaan. Näin nähtiin, millaisia fragmentteja eri ioneista syntyy ja millä retentioajalla tutkittu ioni tulee. Tytär-ioni ajoja ajettiin niistä yhdisteistä, jotka vaikuttivat kiinnostavilta.

LC-MS-data käsiteltiin Waters:n MassLynx V4.2 -ohjelmalla. Saadut spektrit käytiin yksitellen läpi, ja jokainen eri retentioajan omaava piikki tarkasteltiin erikseen siten, että saatiin selville millaisia massa/varaus-suhteita kyseisistä retentioajan piikeistä löytyy. VG:n (m/z 270 [moolimassa 269]) antama piikki positiivipuolella TIC:lla (totaali ioni kromatogrammi, engl. total ion chromatogram) löytyi retentioajalla 1,79 minuuttia. Näytteestä (100-kertainen laimennos) ajettiin tytärioni skannaus positiivipuolella massa/varaus-suhteella 270, jotta voitiin varmistaa, tuleeko VG kyseisellä retentioajalla. Tytär-ioni skannauksessa 270 mw-suhteen omaava ioni antoi vain yhden piikin retentioajalla 1,79 minuuttia. Retentioajalla 1,79 tulevaa massaspektriä tarkistaessa 270 m/z:n vieressä näkyi rikki-isotoopin antama piikki massa/varaus-suhteella 272, joka antoi lisää varmuutta, että yhdiste oli organofosfaatti, ja täten kyseinen piikki oli VG:stä. Kuvassa 25 on esitetty 100-kertaisen laimennoksen positiivisen puolen TIC ja massa/varaus-suhteella 270 (positiivipuolella) ajettu TIC.





Kuva 25. 100-kertaisesti laimennetun VG-näytteen positiivisen puolen TIC, massa/varaus-suhteella 270 mitatun tytärioni skannauksen TIC ja massaspektri, jossa näkyy VG (m/z 270) ja VG:n rikki-isotooppi (m/z 272).

### 6.3 Epäpuhtaudet VG:ssä

NMR:n avulla VG:stä nähtiin kolme selkeää epäpuhtautta, jotka ovat lähtöaineiden epäpuhtauksia. Huomattujen epäpuhtauksien selvityksessä käytetään hyväksi 2D {<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P}-HMQC NMR -kokeen dataa ja LC-MS:lla saatua dataa, jolla voitiin määrittää tarkemmin, millainen rakenne antoi 2D [<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P]-HMQC:ssa signaaleja. Kuvassa 26 on esitetty 2D [<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P] -HMQC-kokeen spektri, johon VG:n ja epäpuhtauksien signaalit on merkitty.





Kuva 26. 2D [<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P] -HMQC NMR-spektri, jossa näkyy VG-näytteessä olevat epäpuhtaudet. HMQC:n avulla voitiin tutkia myös VG:stä löytyneitä epäpuhtauksia.

VG:stä hieman yläkenttään (<sup>31</sup>P dimensio) päin fosforisiirtymällä näkyi signaali, jonka fosforilla oli samanlainen kytkentä protoneihin kuin VG:llä. Tämä signaali tuli luultavasti VG:n suolasta (VG[H<sup>+</sup>]). Epäpuhtaudet 1 ja 2 tulevat sellaisista yhdisteissä, joissa VG:n typpihäntä on katkennut rikin kohdalta. Epäpuhtaudessa 1 ei luultavammin ole rikkiä kiinni, koska fosforisiirtymä on vahvasti yläkentässä (<sup>31</sup>P noin 0 ppm), kun taas epäpuhtaudella 2 on luultavasti kaksoissidoksellinen rikki kiinnittyneenä, koska kyseinen yhdiste on siirtynyt alakenttään (<sup>31</sup>P noin 70 ppm). Tämä on tyypillinen fosforisiirtymä alue P=S sisältäville rakenteille. Tarkastellaan vielä LC-MS:sta saatua dataa.



metropolia.fi

LC-MS:lla saaduista datasta tutkittiin, löytyykö muita yhdisteitä VG-näytteestä kuin VG:tä. 100-kertaisesti laimennetusta näytteestä ajettiin massa/varaus-suhteilla (positiivi puolella) 155, 171 ja 99 yhdisteitä, joita usein V-sarjan homologeista hajoaa Sinisen kirjan seulonnan ohjeistuksien avulla ja niitä soveltaen. Tämän lisäksi 100-kertaisesti laimennetusta VG-näytteen TIC:sta etsittiin tietyillä m/z-suhteilla retentioaikoja, joissa vahvasti näkyi muita yhdisteitä. Massa/varaus-suhteella 155 (dietyylifosfaatti) näkyi kyseisen massa/varaus-suhteen tytärioni mittauksessa retentioajalla 1,26 minuuttia vahva piikki. Dietyylifosfaatti fragmentoitui vahvasti fosforihapoksi (m/z 99), kun se menetti fragmentoituessaan molemmat etyylit. Kuvassa 27 on esitetty 155 m/z-suhteella mitattu TIC, dietyylifosfaatin rakennekaava ja retentioajalla 1,26 minuuttia otettu massaspektri, johon on merkitty fragmentoituminen.



Kuva 27. Dietyylifosfaatin (m/z 155) tytärioni mittauksen TIC, sen rakennekaava ja retentioajalla 1,26 min otettu massaspektri, johon on merkitty dietyylifosfaatin fragmentoituminen fosforihapoksi.

Dietyylifosfaatti ei sisällä rikkiä, jolloin fosforisiirtymä olisi yläkentän puolella, ja sillä näkyisi HMQC:ssa fosforiin kytkentää protoneilla H3; H4 ja H7; H8, kuten VG:n dietyyliosissakin. Täten epäpuhtaus 1 on todennäköisesti dietyylifosfaatti.





Massa/varaus-suhteella 171 (dietyylitiofosforihappo) etsittiin 100-kertaisesti laimennetusta VG:stä tytärioni skannauksen avulla. Kyseisellä massa/varaus-suhteella näkyi useampi kohta, jossa dietyylitiofosforihappoa voisi olla. Retentioajalla 1,57 min näkyvä piikki on luultavimmin dietyylitiofosforihaposta tuleva piikki. Kuvassa 28 on esitetty 171 m/zsuhteella skannattu tytärioni mittaus, dietyylitiofosforihapon rakennekaavat ja retentioajalla 1,57 min otettu massaspektri.



Kuva 28. Dietyylitiofosforihapon (m/z 171) massavarauksella etsitty TIC, dietyylitiofosforihapon isomeriset rakennekaavat ja retentioajalla 2,25 min otettu massaspektri.

Dietyylitiofosforihappo voi olla isomerialtaan joko kaksoissidoksellisen rikin tai hapen sisältämä. Ottaen huomioon, että HMQC:ssa näkyi fosforisiirtymällä alakentässä (<sup>31</sup>P noin 70 ppm) fosforia sisältävä yhdiste (epäpuhtaus 2), jossa on kiinni kaksoissidoksella rikki (fosforisiirtymä alakentässä kertoo tämän), on dietyylitiofosforihappo (kaksoissidoksellisen rikin omaava dietyylitiofosforihappo) todennäköisesti toinen HMQC:ssa näkyvä epäpuhtaus. Koska kyseinen yhdiste sisältää dietyyli-osan, joiden protonit (H3, H4 ja H7, H8) näyttivät kytkentää fosforiin, voidaan olla enemmän varmoja yhdisteen olevan epäpuhtaus 2.





Massa/varaus-suhteella 99 näytteestä yritettiin etsiä tytärioni skannauksella fosforihappoa, joka lohkeaa dietyylifosfaatista ja dietyylitiofosforihaposta. Tytär-ioni skannauksella saatiin TIC, jossa näkyi vain yksi piikki retentioajalla 1,27 minuutin kohdalla. Kuvassa 29 on esitetty m/z-suhteella 99 mitatun tytärioni skannauksen TIC ja retentioajalla 1,27 min otettu massaspektri.



Kuva 29. Fosforihapon (m/z 99) etsimiseksi näytteestä mitattu tytärioni mittauksen TIC ja retentioajalla 1,27 min otettu massaspektri.

Vaikka fosforihappoa etsittäessä muodostunut tytärioni TIC näyttääkin massaspektrin osalta fosforihapolta, tulee kyseinen piikki dietyylifosfaatin lohkeamisesta. Fosforihapon muodostuminen on hyvin hidasta ja sitä muodostuu, kun hermomyrkkyä (tässä tapauksessa VG:tä) on vesiliuoksessa ja silloinkin muodostuminen on vähäistä. Lisäksi fosforihapon retentioaika olisi jossain 0:n 1:n minuutin välillä johtuen yhdisteen vesiliukoisuudesta.

On mahdollista, että VG:n molemmat etyyliesteriryhmät ovat hydrolysoituneet, jolloin VG-näytteessä voi olla hieman N,N-dietyyliaminoetyylitiofosfaatia (m/z 215). Retentioajalla 1,98 nähtiin vahvasti massaspektrissä 215 m/z:lla signaali, joten 100-kertaisesti laimennetun VG:n TIC:sta haettiin 215 m/z:lla kohtia, joissa kyseisen m/z ioneja löytyy. Vain retentioajalla 1,98 näkyi vahva piikki, jolloin kyseisessä kohdassa on luultavasti ky-





seistä yhdistettä. Massaspektrissä näkyi 217 m/z:lla rikki-isotooppi. Kuvassa 30 on esitetty 215 m/z-suhteella etsitty TIC, N,N-dietyyliaminoetyylitiofosfaatin rakennekaava ja retentioajalla 2,25 min otettu massaspektri.



Kuva 30. N,N-dietyyliaminoetyylitiofosfaatin (m/z 215) rakennekaava ja massavarauksella 215 etsitty TIC, josta retentioajalla 1,98 min otettu massaspektri.

2D [<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P]-HMQC NMR spektrissä näkyneet epäpuhtaudet ovat luultavasti dietyylifosfaattia ja dietyylitiofosforihappoa, koska molemmissa epäpuhtauksissa on fosforilla kytkentöjä etyyliryhmiin, kuten VG:lläkin. Näistä kahdesta fosforisiirtymällä -1,02 näkyy dietyylitiofosforihappo, koska 2D [<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P]-HMQC:ssa näkyy <sup>1</sup>H-siirtymällä 3,80 ppm korrelaatiosignaali, joka tulee CH<sub>2</sub>-ryhmästä, jonka siirtymä voi olla 1 – 5 ppm-alueella [27], on epäpuhtaus 1 todennäköisesti dietyylitiofosforihappoa ja epäpuhtaus 2 todennäköisesti dietyylifosfaattia. Taulukossa 7 on vielä listattu löydetyt epäpuhtaudet.



metropolia.fi

Yhdiste	m/z [M+H]⁺	R <sub>t</sub> (min)	Rakennekaava
Dietyylifosfaatti	155	1,26	HO P O
Dietyylitiofosforihappo	171	1,57	
N,N-dietyyliaminoetyylitiofos- faatti	215	1,98	HO P S N

#### Taulukko 7. VG:n näytteestä löydetyt epäpuhtaudet

Löydettyjen ja tunnistettujen epäpuhtauksien lisäksi hajottamattomasta VG:stä löytyi muitakin yhdisteitä. 10-kertaisesti laimennetusta VG:stä löytyi negatiivi-puolella retentioajalla 3,12 min palmitiinihappoa ja retentioajalla 3,24 min steariinihappoa. Kyseiset yhdisteet ovat luultavammin peräisin joko LC-MS:lla aiemmin analysoiduista näytteistä tai ihmisperäisistä orgaanisista kontaminaatiosta esimerkiksi paljaista sormenpäistä. Tämän lisäksi joillakin retentioajoilla nähtiin kiinnostavia piikkejä, joita ei onnistuttu tunnistamaan. Nämä tunnistamattomat piikit ja edellä mainitut yhdisteet, jotka eivät ole VG:seen liittyviä on esitetty liitteessä 3.



# 7 CVX:n rakenneanalytiikka

# 7.1 CVX:n NMR-tutkimus

Kuten VG CVX:kin oli VERIFINillä valmistettu ja se tuli valmiiksi liuotettuna deuteroituun asetoniin NMR-putkessa. CVX:n pitoisuus oli 7 mg/ml ja tilavuus 600 µl. NMR-putki laitettiin spinneriin ja siirrettiin näytetelineeseen, kun oli ensin tarkistettu näytteen kirkkaus. CVX:lle mitattiin samat NMR kokeet kuin VG:stä. Näytteet mitattiin 290 kelvinissä sekä samalla spektrometrillä ja mittapäällä kuin VG:stä. Liitteestä 4 löytyy hajottomattoman CVX:n NMR-kokeiden spektrit, ja CVX:lle tehdyt NMR ennuste spektrit löytyvät liitteestä 1.

Koska CVX on hyvin samankaltainen rakenteeltaan kuin VG, CVX:n NMR-datassa voidaan nähdä samankaltaisuutta. Asetonin CH3-osan antaman signaalin tuli kemiallisella siirtymällä 1,958 ppm. CVX:n <sup>1</sup>H NMR-spektrissä (kuva 31), protoni H3 sijaitsee butyylihännän päässä, jossa se on hyvin paramagneettisessa tilassa, joten H3:n tulee antaa signaali aivan yläkentässä 0,836 ppm:ssä. Samoin protonien H1 ja H2 tulee sijoittua yläkenttään, koska ne ovat kaukana elektronitiheyksistä typpihännän päässä saaden kemiallisella siirtymällä signaalin 0,904 ppm. Protonien H6 ja H7 odotetaan tulevan enemmän yläkentässä, koska molemmat signaalit ovat kohtalaisen kaukana elektronegatiivisista atomeista muihin protoneihin verrattuna, joita ei ole vielä mainittu. Näistä kahdesta signaalista H6 on paramagneettisesti varjostuneempi, koska se on kauempana butyyliin kiinnittyneestä hapesta ja keskusfosforista. Protoni H6 saa siis signaalin kemiallisella siirtymän alueella 1,257–1,378 ppm ja H7 1,546 ppm:llä.

Protonien H8 signaali tulee olla alakentässä, koska se on elektronitiheyksien lähellä johtuen viereisistä hapesta ja fosforista. Täten H8 tulee kemiallisella siirtymä alueella 3,861–3,990 ppm. Protoneista H10, H11 sekä H4, H5 ja H10 on lähellä kaikista elektronitiheintä aluetta (fosfori ja viereinen rikki luovat yhdessä elektronitiheän ympäristön) kyseisistä kolmesta eri kohdasta. H11:n signaali tulisi tulla enemmän alakenttään kuin H4:stä ja H6:sta tulevan piikin, koska se on kahden elektronitiheyden välissä. Täten H10 saa signaalin 2,743–2,873 ppm:n alueella, H11 saa signaalin 2,596 ppm:ssä ja H4 ja H5 saavat signaalin 2,438 ppm:ssä. Protoneista H9 tuleva signaali kemiallisella siirtymällä 1,653 ppm.





Kuva 31. CVX:n <sup>1</sup>H NMR-spektri, johon assignoitu spektrin signaalien vastaamaan rakennekaavaan merkittyjä protoneita ja signaalien kemialliset siirtymät.

Signaaleista mitattiin kytkentävakiot ja mitatut kytkennät on listattu taulukkoon 6. Taulukkoon on tämän lisäksi listattu eri protoneista tulleiden signaalien kemialliset siirtymät ja protonien määrä eri signaaleissa.



Protoni	δ <sup>1</sup> H (ppm); a	<sup>1</sup> H määrä	<i>J</i> (Hz)
H3	0,836; t	3H	<sup>3</sup> Ј <sub>Н3, Н6</sub> = 7,41
H1, H2	0,904; t	6H	<sup>3</sup> J <sub>H1, H4</sub> = 7,04
H6	1,257–1,378; m	2H	${}^{3}J_{\rm H6,  H3} = 7,52$
H7	1,546; q	2H	<sup>3</sup> Ј <sub>H7, H8</sub> = 7,92
Н9	1,653; d	3H	${}^{2}J_{\rm H9,P}$ = 15,70
H4, H5	2,438; k	4H	<sup>3</sup> J <sub>H4, H1</sub> = 6,96
H11	2,596; t	2H	<sup>3</sup> J <sub>H11, H10</sub> = 6,91
H10	2,743–2,873; m	2H	<sup>3</sup> J <sub>H10, H11</sub> = 12,20
H8	3,861-3,990; m	2H	<sup>3</sup> J <sub>H8, H7</sub> = 14,42

Taulukko 8. CVX:stä tulleiden <sup>1</sup>H-signaalien kemialliset siirtymät, protonien määrä eri signaaleissa sekä mitatut kytkentävakiot.

a. d=dupletti, t=tripletti, k=kvartetti, q=kvintetti, m=monikerta

<sup>13</sup>C-NMR-kokeen spektrissä asetonin signaalit (kaksi intensiivisintä) tulivat kemiallisella siirtymällä 205,331 ppm ja 28,986 ppm (liite 4). Hyvin paramagneettisesti varjostuneita hiiliä ovat C3, C6 sekä C1 ja C2. Hiilien C1 ja C2 antama signaali tulee yläkentässä kemiallisella siirtymällä 11,610 ppm, C3 tulee kemiallisella siirtymällä 13,029 ppm ja hiilen C6 signaali kemiallisella siirtymällä 18,599 (kuva 32). Hiilen C9:n antama signaali jakautuu dupletiksi viereisen fosforin vaikutuksesta, joten kyseinen hiili antaa dupletin kemiallisella siirtymällä 19,104 ppm, jossa toinen signaali sijoittuu kemialliselle siirtymällä 19,104 ppm. Hiilen C10 signaali tulee asetonin CH3-osan signaalin kanssa hieman päällekkäin kemiallisella siirtymällä 28,324. Hiilen C10 antama signaalin tunnistamisessa hyödynnettiin vahvasti 2D [<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C]-HSQC-kokeen antama tietoa, josta lisää myöhemmin tässä samassa luvussa.

Hiilen C8 signaali tuli alakenttään diamagneettisen varjostuksen takia, ja signaali sijaitsi kemiallisella siirtymällä 64,130 ppm. Kuten hiilen C8, myös hiilen C11 signaali tuli alakenttään, koska sekin sijaitsee CVX:ssä kohdassa, joka diamagneettisesti varjostuu läheisten fosforin, rikin ja typen takia. Hiilelle C11 tulee signaali 53,864 ppm:n kohdalla. Koska hiilet C4 ja C5 sijaitsevat elektroninegatiivisen typen vieressä, näiden hiilien signaali siirtyy alakenttään, muttei kovin voimakkaasti kemiallisen siirtymän kohtaan 46,715 ppm. Hiilen C7 signaali tulee kemiallisen siirtymän kohtaan 32,191 ppm.





Kuva 32. CVX:n <sup>13</sup>C NMR-spektri, johon on assignoitu spektrin signaalit vastaamaan rakennekaavaan merkittyjä hiiliä. Lisäksi signaalien kemialliset siirtymät on esitetty spektrien suurennoksien alla.

Hiilen signaaleista mitattiin kytkentävakioita, jotka on esitetty taulukossa 7. Taulukossa on esitetty myös <sup>13</sup>C-kokeen antamien signaalien kemialliset siirtymät ja signaalin multiplisiteetti.



	- 12	
Hiili	δ <sup>13</sup> C (ppm); a	J (Hz)
C1, C2	11,610; s	-
C3	13,029: s	-
C9	18,599; d	<sup>1</sup> J <sub>C9, P</sub> = 110,77
C6	19,104; s	-
C10	28,324; s	-
C7	32,191; d	${}^{3}J_{C7, P} = 6,90$
C4, C5	46,715: s	-
C11	53,864; d	<sup>3</sup> <i>J</i> <sub>C11, P</sub> = 3,40
C8	64,130: d	${}^{2}J_{C8, P} = 6,99$

Taulukko 9. CVX:stä tulleiden <sup>13</sup>C NMR-signaalien kemialliset siirtymät, multiplisiteetti ja kytkentävakiot.

a. s=singletti, d=dupletti

2D [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H] -COSY-kokeen spektristä tarkasteltiin, tuleeko assignoitujen signaalien välille korrelaatiosignaaleja, joka näkyy kuvassa 33. COSY:n spektristä nähdään, että protoni signaalien välille tulevat kytkennät menevät CVX:n rakenteeseen nähden siten, että kytkennät ovat kolmen sidoksen päässä toisistaan.





Kuva 33. 2D [1H-1H] -COSY-kokeen NMR-spektri, jossa on tarkasteltu 1H-kytkentöjä.

2D [<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C] -HSQC:n avulla selvitettiin CVX:n vastaavien hiilien ja protonien korrelaatiota. Aiemmissa kokeissa määritetyistä hiilistä ja protoneista tulevien signaalien tulisi kohdata piikkien kohdilta vedettyjen poikittaisten ja pitkittäisten viivojen risteyskohdassa. Jokaisen protonin signaalin vastaava hiilen signaali löydettiin, kun tarkasteltiin 2D [<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C]-HSQC-dataa. HSQC:ssa protonien H9 ja hiilen C9 dupletti antoi molemmille dupletin piikeille omat korrelaatiot. Muuten muille protoneille ja hiilille tuli vain yksi korrelaatio.





Kuva 34. CVX:n 2D [<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C] -HSQC-kokeen 2D-spektrin protoneista katsottiin korrelaatiot vastaaviin hiiliin, joissa ne ovat kiinni pitkittäisten ja poikittaisten viivojen avulla. Protonien H9 ja hiilien C9 dupletti antoi korrelaation dupletin molemmille signaaleille.

2D [<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P] -HMQC-kokeen spektriä (kuva 35) tarkastelemalla katsottiin CVX:n keskusfosforin ja CVX:n protonien välistä kytkentää. CVX:n antama <sup>31</sup>P NMR-spektrin signaali oli vahvin nähtävä signaali 52,21 ppm:lla. Kytkentöjä CVX:n fosforille löytyi neljä, protonien H7, H8; H10 ja H9 kanssa, ja näiden kytkentöjen tunnistuksen apuna käytettiin ulkoisesti heijastettua <sup>1</sup>H-spektriä. Havaitut kytkennät protoneihin ovat 2 – 4 sidoksen



päässä fosforista, joten havaitut kytkennät ovat lyhyitä kytkentöjä. Tämän lisäksi spektrissä näkyi 5 muuta yhdistettä, jotka sisältävät fosforia. Näistä lisää CVX:n epäpuhtauksista käsittelevässä luvussa 7.3.



Kuva 35. 2D [<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P] -HMQC, johon <sup>1</sup>H-spektri on ulkoisesti heijastettu mitatusta <sup>1</sup>H-spektristä. Tähdellä (\*) on merkitty muut havaitut yhdisteet näytteessä, jotka sisältävät fosforia ja CVX:n antama signaali näkyi fosforisiirtymällä 52,21 ppm.

## 7.2 CVX:n LC-MS-tutkimus

NMR:n CVX-näytteestä puolet siirrettiin 1,5 ml:n vialiin NMR-pipetillä NMR-putkesta, ja loput CVX-näytteestä meni CVX:n hajottamistutkimukseen. Näytteen pH tarkistettiin pH-paperin avulla, jolla näytteen pH:ksi saatiin noin 10 – 11. Näytteeseen lisättiin 20 µl 10 % muurahaishappoa ja 100 µl 1 % muurahaishappoa, jonka jälkeen pH:ksi saatiin noin 7. Näytteestä tehtiin 10-, 100- ja 1000-kertaiset laimennokset. 10- ja 100-kertaiset laimennokset tehtiin kuten VG:nkin kanssa. 1000-kertainen laimennos tehtiin ottamalla 10 µl 100-kertaisesti laimennutta näytettä 1,5 ml:n vialiin, johon oli laitettu sisälle 250 µl



metropolia.fi

insertti. Näytteen sekaan lisättiin 90 μl ultrapuhdasta vettä ja näyte sekoitettiin vorteksissa. Näytteet mitattiin LC-MS:lla kuten edellisissäkin ajoissa.

10-kertaisesti laimennetusta CVX:stä saadusta TIC:sta etsittiin CVX:stä tullutta piikkiä hakemalla 268 m/z:lla piikkejä (positiivi puolella). Retentioajalle 2,78 min näkyi vahva piikki, jonka massaspektristä löytyi massa/varaus-suhteella 268 signaali, ja rikki-isotoopin antama signaali näkyi m/z:lla 270.



Kuva 36. 10-kertaisesti laimennetun CVX-näytteen positiivisen puolen TIC massa/varaus-suhteella 268 ja siitä retentioajalla 2,78 min otettu massaspektri. Lisäksi kuvassa näkyy CVX:n rakennekaava

### 7.3 Epäpuhtaudet CVX:ssä

NMR:n avulla CVX:stä nähtiin ainakin viisi selkeää epäpuhtautta. Huomattujen epäpuhtauksien selvityksessä käytettiin hyväksi 2D [<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P] -HMQC-kokeen dataa ja LC-MS:lla





saatua dataa, jolla voitiin määrittää tarkemmin, millainen rakenne antoi 2D {<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P}-HMQC:ssa signaaleja. Kuvassa 37 on esitetty 2D [<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P] -HMQC-kokeen spektri, johon CVX:n ja epäpuhtauksien signaalit on merkitty.



Kuva 37. 2D [<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P] -HMQC NMR-spektri, jonka avulla voitiin tutkia CVX:stä löytyneitä epäpuhtauksia.

Epäpuhtaudet 3, 4 ja 5 sisältävät luultavasti kaksoissidoksellisen rikin, johtuen alakentän siirtymästä fosforisiirtymällä. Epäpuhtauksissa 1 ja 3 näkyi protonin H8 kohdalla kohinaa nostamalla korkeuskäyrä, jota ei näy kuvassa 37, koska kohinaa on laskettu. Epäpuhtaus 1:llä on fosforilla kytkentöjä protoneihin nähtävästi spektristä H9:ään ja H6:een, ja edellä mainittuun H8:aan. Koska epäpuhtaudella 1 on kytkentä H6 ja H8 protoneihin, on sillä kytkentä myös luultavasti protoneihin H7 ja H3, koska butyyli-osa löytyy usein kokonaan sitoutuneena hapen kautta fosforiin tai kokonaan irronneena. Epäpuhtaudella löytyy <sup>1</sup>H-siirtymällä 3,76 ppm, jokin protoni kiinnittyneenä fosforiin ja siirtymällä 1,36 ppm protonin H6 katsoen hieman alakenttään.

LC-MS:lla saaduista datasta tutkittiin, löytyykö muita yhdisteitä CVX-näytteestä kuin CVX:ää. 10-kertaisesti laimennetusta näytteestä ajettiin massa/varaus-suhteilla 153 ja



97 yhdisteitä MS:n positiivipuolella, ja vastaavia yhdisteitä m/z:lla 151, 95 MS:n negatiivipuolella, joita usein V-sarjan homologeista hajoaa Sinisen kirjan seulonnan ohjeistuksien avulla ja niitä soveltaen, kuten VG:n kohdalla. Tämän lisäksi 10-kertaisesti laimennetusta CVX-näytteen TIC:sta etsittiin tietyillä m/z-suhteilla retentioaikoja, joissa vahvasti näkyi muita yhdisteitä. Massa/varaus-suhteella 151 (butyylimetyylifosfonihappo) näkyi kyseisen massa/varaus-suhteen tytärioni mittauksessa retentioajalla 1,95 min vahva piikki. Butyylimetyylifosfonihappo fragmentoitui metyylifosfonihapoksi (m/z 97), kun se menetti fragmentoituessaan butyyliryhmän. Metyylifosfonihappo fragmentoitui vielä metyylifosfaanidioniksi (m/z 79) menettämällä H<sub>2</sub>O-ryhmän. Butyylimetyylifosfonihappo on epäpuhtaus 1 tai 2, koska butyylimetyylifosfonihapossa ei ole fosforiin sitoutunut rikkeä, jonka johdosta butyylimetyylifosfonihappo näkyy HMQC:ssä yläkentässä. Epäpuhtauksista 1 ja 2 ei voida tunnistaa varmasti kumpi niistä tulee butyylimetyylifosfonihaposta, koska molemmat antavat heikosti kytkentöjä oikeanlaisiin protoneihin, joita yhdisteestä löytyy. Kuvassa 38 on esitetty 151 m/z-suhteella ajetun tytärionien TIC, butyylimetyylifosfonihapon rakennekaava ja retentioajalla 1,95 min otettu massaspektri, johon on merkitty fragmentoituminen.



Kuva 38. Butyylimetyylifosfonihapon (m/z 151 negatiivipuolella) tytärioni mittauksen TIC ja retentioajalta 1,95 min otettu massaspektri, johon on merkitty butyylimetyylifosfonihapon fragmentoituminen metyylifosfonihapoksi, joka fragmentoitui vielä metyylifosfaanidioniksi.

Massa/varaus-suhteella 97 (positiivipuolella) ja 95 (negatiivipuolella) etsittiin metyylifosfonihappoa tytär-ionia ajon avulla. Metyylifosforihapon tulisi näkyä alussa TIC:ssa, koska



metyylifosforihappo on vesiliukoinen yhdiste. Positiivi-puolella ei näkynyt alussa piikkejä TIC:ssa, mutta negatiivipuolella retentioajalla 0,48 min näkyi piikki. Tämä voisi mahdollisesti tulla metyylifosforihaposta, mutta yhdisteen muodostuminen on hyvin hidasta, kuten fosforihaponkin kohdalla (katso sivut 43 – 44), joten ei voida olla kovinkaan varmoja. Kuvassa 39 on esitetty tytärioni ajon massa/varaus-suhteella 95 negatiivipuolella otettu TIC, metyylifosforihapon rakennekaava ja retentioajalla 0,48 min otettu massaspektri.



Kuva 39. Metyylifosforihappoa yritettiin etsiä tytärioni mittauksella massa/varaus-suhteella 95 (negatiivipuoli), joka antoi kolme selkeää piikkiä retentioajoilla 0,48 min, 1,96 min ja 2,10 min. 0,48 min kohdalla tullut piikki on todennäköisin vesiliukoiselle näytteelle retentioajaksi, joten siitä kohdalta tarkasteltiin massaspektriä, joka voisi tulla metyylifosforihaposta.

Löydettyjen ja tunnistettujen epäpuhtauksien lisäksi hajottamattomasta CVX:stä löydettiin joitain kiinnostavia piikkejä, joita ei kuitenkaan onnistuttu tunnistamaan. Ne on esitetty liitteessä 5. 1000-kertaisesti laimennetussa hajottamattomassa CVX:ssä nähtiin myös useita taustan antamia piikkejä (esim. retentioajalla 2,20 min ja 2,47 min), jotka näkyivät myös ajetussa vesinäytteessä, ja myös nämä löytyvät liitteestä 5.

# 8 Hajoamistuotteiden analyysi

# 8.1 VG:n hajoamistuotteiden analyysi

Näytteiden hajotusta varten NMR-putkessa ollut VG-näyte jaettiin kahteen NMR-putkeen, jotta toista näytettä voidaan hajottaa emäksellä ja toista näytettä hapolla. Tällä tavalla haluttiin mallintaa hermomyrkkyjen hajoamista hajoamisliuoksissa. Näytteen jakaminen suoritettiin NMR-pipetillä. Pipetillä otettiin näytettä noin puolet toiseen NMRputkeen. Jakamisen jälkeen uudella pipetillä lisättiin, saman verran (n. 300 µl) kuin jaetussa putkessa oli näytettä, 0,1-molaarista suolahappoa toiseen putkeen. Toiseen putkeen samalla periaatteella lisättiin 0,1-molaarista natriumhydroksidia.

NMR-spinneri aseteltiin syvyysmittarin päälle ja NMR-putket vuorotellen painettiin spinnerin läpi syvyysmittarin pohjaan. Syvyysmittarin sivusta varmistettiin mitta-asteikon avulla, että näytettä oli tarpeeksi paljon NMR-putkessa. Lisäksi tarkistettiin, että näyte oli kirkas. Tarkistuksen jälkeen NMR-putket siirrettiin NMR-laitteen näytetelineisiin analysointia varten.

Hapolla hajottaminen aloitettiin päivä myöhemmin kuin emäksellä. Tämä johtui siitä, että kokeiltiin, toimiiko menetelmä (mittaukset) niin kuin pitäisi. Koska menetelmä vaikutti onnistuneelta seuraavana päivänä tuloksia tarkastettaessa, ajettiin toinenkin (hapolla hajotettu) näyte. Näytteistä ajettiin <sup>1</sup>H- ja <sup>31</sup>P NMR-spektri ja ns. kinetiikkamittaus, jossa näytteestä mitattiin kahden minuutin välein <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR-spektri 24 tunnin ajan. 24 tunnin aikana mitattiin siis 720 kappaletta <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR-spektrejä. Näin voitiin seurata fosforia sisältävien yhdisteiden hajoamista ja samalla syntyvien, uusien molekyylien muodostumista ajan funktiona. Näytteestä mitattiin vielä <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR ja 2D {<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P}-HMQC seuraavien viikkojen aikana ensimmäisten mittausten jälkeen, jotta voitiin seurata, hajoaako näytteestä lisää hajoamistuotteita.

Kun hajotusta oli jatkettu kaksi viikkoa, hajotetut VG-näytteet analysoitiin LC-MS:lla. Hajotetuille näytteille tehtiin pH:n tarkastus pH-paperilla ennen kuin näytteelle tehtiin mitään. NMR-putkista otettiin NMR-pipetillä osa näytteestä 1,5 ml:n vialiin, jonka jälkeen pasteur-pipetillä otettiin pieni määrä näytettä pH-paperille. Emäksellä hajotetun näytteen



pH näytti n. 9–10 ja hapolla hajotetulle pH näytti n. 1–2. Emäksellä hajotettuun näytteeseen lisättiin 10 µl 10 % muurahaishappoa, jonka jälkeen vialia sekoitettiin vorteksilla ja pH tarkistettiin, jolloin pH näytti n. 6, joka oli sopiva pH-alue näytteelle. Hapolla hajotettuun VG-näytteeseen lisättiin 10 µl 2,5 % ammoniumhydroksidia, joka tehtiin 25 %:sta NH₄OH:sta, jota laimennettiin 1,5 ml:n vialiin (100 µl 25 % NH₄OH:ta sekoitettiin 900 µl ultrapuhtaan veden kanssa vialissa). Lisäyksen jälkeen vialia vorteksoitiin ja tarkistettiin pH pH-paperilla, joka oli noin 5–6, joka oli sopiva pH-alue. Tämän jälkeen näytteet laimennettiin aivan kuten hajottamatonta VG:täkin tehdessä 10- ja 100-kertaisiksi laimennoksiksi (10 µl näytettä ja 90 µl ultrapuhdasta vettä). Näytteet mitattiin samalla menetelmällä ja eluenteilla kuten hajottamatonkin VG, tosin mittaukset tehtiin niin, että aina kun yksi mittaus oli tehty, mitattiin LC-MS:lla vain ultrapuhdasta vettä, jotta kaikki mahdolliset jäännökset, joita kolonniin ja kapillaareihin on voinut jäädä, saataisiin varmasti pois. Tällä taattiin mahdollisimman hyvät tulokset.

LC-MS-mittauksesta jääneille hajotetusta VG:n näytteistä kokeiltiin, parantaako kiinteäfaasiuutto tuloksien saantia. Loput jääneet emäksellä ja hapolla hajotetut VG-näytteet siirrettiin 1,5 ml:n vialeihin ja täytettiin niin, että näytteitä oli kumpaakin 1 ml ja lopuksi vorteksoitiin, jotta näyte sekoittuu. Muurahaishaposta (10%) tehtiin 10-kertainen laimennos (100 µl muurahaishappoa ja 900 µl ultrapuhdasta vettä) 1,5 ml:n vialiin, jolloin saatiin 1 % muurahaishappoa. Näytteiden pH:t tarkistettiin ja emäksellä hajotetun VG:n pH oli noin 10 ja hapolla hajotetun VG:n pH oli noin 5–6. Näytteiden pH:t säädettiin noin 7:ään. Emäksellä hajotettuun VG:hen lisättiin 20 µl 1 % muurahaishappoa ja 30 µl 10 % muurahaishappoa, jotta pH saatiin noin 7:ään. Hapolla hajotettuun VG:seen lisättiin 20 µl 2,5 % ammoniumhydroksidia, jolloin pH saatiin noin 7:ään. Kun pH oli säädetty, 1 ml kumpaakin näytettä siirrettin 10 ml:n koeputkiin kiinteäfaasiuuttoa varten. Näytteisiin lisättiin 5 ml LC-MS laatuista asetonitriiliä (99,9 %) ja koeputkia sekoitettiin hieman. Nollanäyte valmistettiin 1 ml:n ultrapuhtaasta vedestä, johon lisättiin 5 ml asetonitriiliä. Strata® SI-1 Silica -kolonni kunnostettiin ennen kuin näytteet voitiin syöttää kolonniin. Kunnostus tehtiin ensin 4 ml 25 % vedellä asetonitriilissä, jonka annettiin valua kolonnin läpi, jota seurasi 3 ml LC-MS laatuisella asetonitriilillä kunnostus. Kun asetonitriili oli valunut kolonnin läpi, voitiin nollanäyte, emäksellä hajotettu VG-näyte ja hapolla hajotettu VG-näyte lisättiin eri kolonneihin ja annettiin valua kolonnin läpi. Kolonnin läpi valuva liuotin otettiin talteen 10 ml koeputkiin. Kun koko nestemäärä oli valunut kolonnin läpi pestiin kolonnit kaksi kertaa 1 ml:n LC-MS-laatuisella asetonitriilillä, jonka jälkeen pestiin kolonnit vielä



kaksi kertaa 1 ml 10 % vedellä asetonitriilissä. Pesun jälkeen kolonnit eluoitiin 2,5 ml 25 %:lla vedellä asetonitriilissä ja eluointiuutos otettiin talteen 10 ml koeputkiin. Kerätyt eluentit haihdutettiin evaporaattorissa 7,5 psi:n paineessa, kunnes kaikki nesteet olivat haihtuneet putkista. Haihdutettujen näytteiden sekaan lisättiin 500 µl 0,1 % muurahaishappoa vedessä. Näytteet siirrettiin sekoituksen jälkeen 1,5 ml vialeihin LC-MS-mittausta varten. LC-MS-mittaus suoritettiin samalla laitteistolla ja menetelmällä kuten muutkin ajot tähän mennessä.

# 8.2 VG:n hajotuksen tulokset

Natriumhydroksidilla ja suolahapolla hajotettujen VG-näytteiden ns. kinetiikkamittauksen datan käsittely aloitettiin TopSpin:n puolella, jossa määritä T1/T2 relaksaation ajat -työ-kalun avulla kerätystä datasta luotiin ensin fosforisiirtymää kuvaava spektri (ensimmäinen kinetiikkamittauksen spektri), josta valittiin kaikki löydetyt signaalit, ja signaaleille valittiin integraali alueet, jolloin voitiin kerätä oikealta alueelta suoraan signaalit (719 muista) mitatuista kokeista. Tämän jälkeen TopSpin:n avulla luotiin jokaisen mittauksen jokaisesta valitusta integraalialueesta valitun signaalin intensiteetit taulukkomuotoon, joka voitiin siirtää Excel-ohjelmaan. Excel-ohjelman avulla intensiteetit muutettiin prosenttimuotoon, jolloin voitiin nähdä prosentteina eri yhdisteiden määrä eri hetkinä. Tämän jälkeen luotiin viivadiagrammi, jossa näkyi eri yhdisteiden määrä 24 tunnin mittauksen aikana. Kuvassa 40 on esitetty NaOH:lla hajotetun VG:n kinetiikkamittauksen viivadiagrammi.







Kuva 40. Kinetiikkamittauksen VG:n, hajoamistuotteen 1 ja 2 muutokset prosentteina 24 tunnin mittauksen aikana, kun VG:tä altistettiin emäksisille oloille 0,1 mol NaOH:lla. Lisäksi kuvaajassa näkyy totaalimäärän prosenttiosuus.

Natriumhydroksilla hajotetun VG:n kinetiikka mittauksessa n. 29,3 ppm seurattu signaali väheni, koska kyseinen signaali tuli VG:stä. Kemiallisella siirtymällä 0,3 ppm valittu signaali (nimetty hajoamistuote 1:ksi) antoi kasvavan signaalin. Kolmas valittu signaali kemiallisella siirtymällä -1,0 ppm (nimetty hajoamistuote 2:ksi), pysyi prosenttiosuudeltaan koko ajan samana, joten kyse on epäpuhtaudesta eikä hajoamistuotteesta. VG:n puoliintumisaika oli noin 2,5 tunnin kohdalla, joka nähdään VG:n ja hajoamistuotteen 1 leikkauskohdasta. Puoliintumisen jälkeen hajoaminen hidastui ja lopulta loppui noin 20 tunnin kohdalla. Hajoamistuotteen 1 muodostuminen vastaavasti loppui noin 20 tunnin kohdalla. VG:tä hajosi noin 28 prosenttiin alkuperäisestä noin 100 prosentista ja hajoamistuoteta 1 muodostui alkuperäisesta noin 16 prosentista 95 prosenttiin.

<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR:lla seurattiin fosforia sisältävien yhdisteiden muodostumista. Hetki 0,1 mol NaOH:n lisäyksen jälkeen näkyi kolme selkeää signaalia kemiallisilla siirtymillä 29,3 ppm; 0,2 ppm ja -0,9 ppm. Heti kahden päivän jälkeen hajotuksen aloittamisesta näytteessä ei enää näkynyt yläkentän puolella olevaa signaalia kemiallisella siirtymällä 29,3 ppm, vaan näkyi kaksi signaalia kemiallisilla siirtymillä -2,3 ppm ja -3,4 ppm. Nämä kaksi signaalia eivät kadonneet mittauksen jatkuessa ja mittauksen lopettamisen vaiheessa. Kun hajotuksen aloittamisesta oli kulunut 9 päivää, samat signaalit kemiallisilla siirtymillä





-2,3 ppm ja -3,4 ppm näkyivät yhä. Kuvassa 41 on esitetty <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR-kokeet 0,1 mol NaOH hajotetulle VG:lle hetki NaOH:n lisäyksen jälkeen ja 9 päivää lisäyksen jälkeen.

Kuva 41. <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR-kokeet 0,1 mol NaOH hajotetulle VG:lle hetki NaOH:n lisäyksen jälkeen ja 9 päivää lisäyksen jälkeen.

2D [<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P] -HMQC-kokeella kuten <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR:llakin seurattiin fosforia sisältävien yhdisteiden muodostumista. Ensimmäisessä HMQC:ssa, joka mitattiin kaksi päivää hajotuksen aloituksen jälkeen ja muissakaan mitatuissa HMQC-kokeissa ei näkynyt minkäänlaisia selkeitä eroavaisuuksia. Kuvassa 42 on esitetty 0,1 mol NaOH:lla hajotetun VG:n 2D [1H-31P] -HMQC-kokeet 2 päivän hajotuksen jälkeen ja 9 päivän jälkeen. Fosforin siirtymällä -2,3 ppm ja -3,4 ppm näkyi signaalia, kuten <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR:llakin. Tämän lisäksi näkyi hyvin heikosti muitakin signaaleja, joista vahvin näkyi fosforin siirtymällä 64,4 ppm alakentän puolella. HMQC:ssa voidaan nähdä yli seitsemän erilaisen fosforia sisältävän yhdisteen signaali, jos kokeen kohinan tasoa säädellään. Johtuen hyvin heikosti varmasti tunnistettavien signaalien määrästä, ei voida tarkalleen sanoa montako fosforia sisältävää yhdistettä hajotetussa näytteessä nähdään. Näytteen yhdisteiden määrä on aivan liian pieni selkeään signaaliin.





Kuva 42. 0,1 mol NaOH:lla hajotetun VG:n 2D [1H-31P]-HMQC-kokeet 2 päivän hajotuksen jälkeen ja 9 päivän jälkeen.

LC-MS-dataa käsitellessä NaOH hajotettuun VG:stä ei löydetty VG:tä retentioajalla 1,79 min tai hakemalla TIC:sta m/z:lla 279 minkäänlaista selkeää massaspektriä, mikä kertoisi VG:n läsnäolosta näytteessä. Tämä oli hieman odotettu tulos, koska VG oli hajonnut hyvin ensimmäisen 24 tunnin ajan ja LC-MS-mittausta tehdessä hajotuksen aloittamisesta oli 14 päivää. Näytteestä löytyi kuitenkin aiemmin epäpuhtauksina löytyneitä dietyylifosfaattia, dietyylitiofosforihappoa ja N,N-dietyyliaminoetyylitiofosfaatia samoilla retentioajalla kuin aiemminkin. Kyseisten yhdisteiden määrä vaikutti lisääntyneen näytteessä intensiteettien tarkastelun perusteella, joten hajoamisessa muodostui luultavasti kyseisiä yhdisteitä. Näytteestä muodostui joitain uusia yhdisteitä, joita ei aiemmin löydetty näytteestä. Ennestään tunnistettujen yhdisteiden massaspektrit on esitetty liitteessä 6.

100-kertaisesti laimennetun näytteen positiivisestä TIC:sta löydettiin retentioajalla 2,22 min yhdiste, jonka m/z oli 183. Koska massaspektrissä ei näkynyt selkeää rikki-isotoopin antamaa piikkiä (ei siis sisällä rikkiä yhdiste), saatiin massan perusteella yhdiste tunnistettua trietyylifosfaatiksi. Tätä olettamusta tuki loogiset fragmentit m/z:lla 155, 127 ja 99, etyylihäntien katketessa pois. Yhdisteellä näkyi myös natrium-addukti m/z 205. Olettamuksen varmisti vielä jälkikäteinen referenssinäytteen mittaus, joka antoi samalla reten-


tioajalla samankaltaisen massaspektrin. Kuvassa 43 on esitetty 100-kertaisesti laimennetun näytteen TIC, trietyylifosfaatin rakennekaava ja retentioajalla 2,22 min otettu massaspektri, johon fragmentoituminen on merkitty.



Kuva 43. 100-kertaisesti laimennettu 0,1 mol NaOH:lla hajotettu VG-näytteen TIC, josta retentioajalla 2,22 min löytyi trietyylifosfaattia. Massaspektriin on merkitty trietyylin fragmentoituminen, kun etyylihännät katkeavat. [m+NA]...

100-kertaisesti laimennetusta näytteestä retentioajalla 0,57 min löytyi massaspektri, joka antoi m/z:lla 233 piikin, jossa näkyi m/z:lla 235 rikki-isotooppi. Piikki tuli luultavasti yhdisteestä Bis-(2-dietyyliaminoetyyli) -sulfidi. Kuvassa 44 on esitetty retentioajalla 0,57 min otettu massaspektri ja Bis-(2-dietyyliaminoetyyli) -sulfidin rakennekaava.





Retentioajalla 0,65 min löydettiin m/z:lla 265 luultavammin bis-(2-dietyyliaminoetyyli)disulfidin antama piikki, jota muodostuu 2-(Dietyyliamino)-etaanitiolin oksidaatio-reaktiossa, joka näkyy fragmenttina m/z 143. Koska molemmat yhdisteet sisältävät rikkiä, näkyy molemmissa rikki-isotoopin antama piikki. Kuvassa 45 on esitetty retentioajalla 0,65 min otettu massaspektri ja bis-(2-dietyyliaminoetyyli)-disulfidin ja 2-(dietyyliamino)etaanitiolin rakennekaavat.



Kuva 45. Retentioajalla 0,65 min otettu massaspektri, jossa näkyy bis-(2-dietyyliaminoetyyli)-sulfidin antama piikki m/z:lla 265 ja 2-(Dietyyliamino)-etaanitiolin fragmentti m/z:lla 134. Bis-(2-dietyyliaminoetyyli)-disulfidia muodostuu 2-(dietyyliamino)-etaanitiolin oksidoituessa. Yhdisteiden rakennekaavat on esitetty kuvassa.

Retentioajalla 1,42 min näkyvä piikki antoi massaspektrissä vahvan piikin m/z:lla 242 ja lisäksi 264 näkyi natrium-addukti. Kyseessä voi olla mahdollisesti [2-(etyyliamino)etyylitio]-fosforihapon dietyyliesteri. Kuvassa 46 on esitetty suurennos 100-kertaisesti laimennetun näytteen TIC:sta ja retentioajalla 1,42 min otettu massaspektri ja [2-(etyyliamino)etyylitio]-fosforihapon dietyyliesterin rakennekaava.



Kuva 46. Suurennos 100-kertaisesti laimennetun näytteen TIC:sta, [2-(etyyliamino)etyylitio]-fosforihapon dietyyliesterin rakennekaava ja retentioajalla 1,42 min otettu massaspektri.



Metropolia

Kuva 44. Retentioajalla 0,57 min otettu massaspektri, jossa näkyy bis-(2-dietyyliaminoetyyli) -sulfidin antama signaali m/z:lla 233 ja rakennekaava.

0,1 molaarisella NaOH:lla hajotetusta VG:stä löydetyt hajoamistuotteet on listattu taulukkoon 10.

Yhdiste	m/z [M+H] <sup>+</sup>	Rt (min)	Rakennekaava
Dietyylifosfaatti	155	1,25	HOOO
Dietyylitiofosforihappo	171	1,57	
N,N-dietyyliaminoetyyli- tiofosfaatti	215	1,98	HO P S N
Trietyylifosfaatti	183	2,22	
Bis-(2-dietyyliaminoetyyli) - sulfidi	233	0,57	N s N

Taulukko 10. 0,1 mol NaOH:lla hajotetusta VG:stä löydettyjen hajoamistuotteiden massa/varaus-suhteet (positiivisella puolella), niiden retentioajat ja rakennekaavat.



Bis-(2-dietyyliaminoetyyli)- disulfidi	265	0,65	N S S N
[2-(etyyliamino)etyylitio]-fos- forihapon dietyyliesteri	242	1,41	O S NH

Hajotetuista näytteistä löytyi tunnistettujen yhdisteiden lisäksi myös palmitiini- ja steariinihappoa, kuten hajottamattomasta näytteestä. Joillain retentioajoilla, kuten 1,74 min ja 2,12 min näkyi massaspektrissä "massakeskittymiä", jotka on esitetty liitteessä 7. Ne tulevat syklisistä rikkiyhdisteistä, joiden rakennekaavoja on hankala selvittää, eikä tämän työn laajuudessa ole oleellista edes ryhtyä selvittämään tarkemmin. Sykliset rikkiyhdisteet muodostuvat, kun VG hajoaa ja rikkiä vapautuu. Koska rikki ei katoa ja on reaktiivinen, se muodostaa uusia yhdisteitä, syklisiä rikkiyhdisteitä. Rasvahappojen ja syklisten rikkiyhdisteiden lisäksi löydettiin yhdisteitä, joita ei onnistuttu tunnistamaan. Nämä on esitetty liitteessä 7 yhdessä rasvahappojen ja syklisten rikkiyhdisteiden massaspektrien kanssa.



Kuva 47. VG:n hajotessa vapautuvat rikit muodostavat syklisiä rikkiyhdisteitä, jotka näkyvät massaspektrissä "massakeskittyminä". Kuvan sykliset rikkiyhdisteet on otettu retentioajoilla 1,74 min ja 2,12 min 100-kertaisesti laimennetusta näytteestä.

0,1 molaarisella HCI:lla hajotetun VG:n kinetiikkamittauksesta tehtiin kuvaaja samalla periaatteella kuin NaOH hajotetun. HCI:lla hajotetun VG:n kinetiikkamittauksen viivadiagrammi on esitetty kuvassa 48.





Kuva 48. Kinetiikkamittauksen VG:n, hajoamistuotteen 1 ja 2 muutokset prosentteina 24 tunnin mittauksen aikana, kun VG:tä altistettiin happamille oloille 0,1 mol HCI:n avulla.

Suolahapolla hajotetun VG:n kinetiikkamittauksessa huomattiin, ettei suolahappo ollut 24 tunnin aikana hajottanut VG:tä yhtään. Kemiallisilla siirtymillä 30,5 ja -0,8 ppm valitut signaalit (hajoamistuotteiksi 1 ja 2 nimetyt yhdisteet) eivät myöskään muuttuneet lainkaan. Hajoamista ei kerennyt tapahtua ainakaan ensimmäisen 24 tunnin aikana kinetiikkamittauksen perusteella.

<sup>31</sup>P{1H} NMR:ssa nähtiin hetki 0,1 mol HCI:n lisäyksen jälkeen neljä signaalia, joista isoin VG:n antama signaali nähtiin kemiallisella siirtymällä 27,8 ppm. VG:n signaalista hieman alakenttään 30,5 ppm nähtiin pienempi signaali ja kaksi muuta signaalia kemiallisilla siirtymillä 59,4 ppm ja -0,9 ppm. Seuraavien päivien aikana mitatuissa <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR:ssa ei nähty selkeitä muutoksia, eli VG ei hajonnut melkein lainkaan, vain hieman. Kuvassa 49 on esitetty 0,1 mol HCI:lla hajotetun VG:n <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR:t hetki HCI:n lisäyksen jälkeen ja 8 päivän jälkeen.



70



Kuva 49. 0,1 mol HCI:llä hajotetun VG:n <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR-spektrit hetki HCI:n lisäyksen jälkeen ja 8 päivän jälkeen.

2D [<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P] -HMQC-kokeessa kuten myös <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR:ssakin nähtiin samanlaisia tuloksia. Fosforisiirtymällä näkyy neljä selkeää piikkiä, eikä hajotuksen jatkuessa seuraavien päivien aikana tapahtunut minkäänlaisia muutoksia. Kuvassa 50 on esitetty 0,1 mol HCI:llä hajotetun VG:n 2D [<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P] -HMQC-kokeet yhden päivän jälkeen HCI:n lisäyksestä ja 8 päivän jälkeen.





Kuva 50. 0,1 mol HCI:llä hajotetun VG:n 2D [<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P] -HMQC-kokeet yhden päivän jälkeen HCI:n lisäyksestä ja 8 päivän jälkeen.

Näyte ei ollut hajonnut lainkaan ensimmäisen 24 tunnin aikana, joten LC-MS-mittauksen aikaan (14 päivä hajotuksen aloituksen jälkeen) ei ollut kovin suuri yllätys, että VG:tä löytyi vielä, kun tarkasteltiin 100-kertaisesti laimennetun näytteen TIC:ä retentioajalla 1,79 min. Kuten hajottamattomasta näytteestä ja NaOH:lla hajotetusta näytteestä, löytyi HCI:llä hajotetusta VG:stäkin dietyylifosfaattia, dietyylitiofosforihappoa ja *N*,*N*-dietyy-liaminoetyylitiofosfaatia. Niiden määrässä ei kuitenkaan näkynyt suuria muutoksia piikkien intensiteettien perusteella, joten on hyvin vaikea sanoa, onko kyseisiä yhdisteitä hajonnut lisää. Täten kyseisistä yhdisteistä on vaikea sanoa ovatko ne hajoamistuotteita HCI:lla hajotetussa VG:ssä.

Kuten NaOH hajotetusta VG:stä, HCI hajotetusta VG:stä löytyi trietyylifosfaattia, bis-(2dietyyliaminoetyyli) -sulfidia, bis-(2-dietyyliaminoetyyli)-disulfidia ja [2-(etyyliamino)etyylitio]-fosforihapon dietyyliesteriä. Näiden yhdisteiden massaspektrit on esitetty liitteessä 8. 100-kertaisesti laimennetusta näytteestä retentioajalla 2,34 min näkyi vahva selkeä piikki, jonka massaspektrissä näkyi vahva piikki m/z:lla 199, jossa näkyi rikki-isotoopin piikki m/z:lla 201. Massaspektrissä näkyi fragmentteja (m/z:lla 115, 143 ja 171), jotka viittasivat siihen, että yhdiste olisi O,O,S-trietyylifosforotioaattia tai O,O,O-trietyylifosforotioaattia. 100-kertaisen laimennetun näytteen TIC, O,O,S-trietyylifosforotioaatti ja O,O,O-trietyylifosforotioaatti rakennekaavat ja retentioajalla 2,34 min otettu massaspektri on esitetty kuvassa 51.



72



Kuva 51. 100-kertaisesti laimennetun näytteen TIC, veikatun yhdisteen molemmat muodot (O,O,S-trietyylitiofosfaatin ja O,O,O-trietyylitiofosfaatin rakennekaavat) ja retentioajalla 2,34 min otettu massaspektri, johon on merkitty trietyylitiofosfaatin fragmentoituminen.

Taulukkoon 11 on listattu 0,1 mol HCl:lla hajotetusta VG:stä löydetyt hajoamistuotteet, niiden massa/varaus-suhteet, retentioajat ja rakennekaavat.

Yhdiste	m/z [M+H]⁺	R <sub>t</sub> (min)	Rakennekaava
Trietyylifosfaatti	183	2,22	
Bis-(2-dietyyliaminoetyyli) -sulfidi	233	0,57	N S N

Taulukko 11. 0,1 molaarisella HCI:lla hajotetusta VG:stä löydetyt hajoamistuotteet ja niiden massa/varaus-suhteet, retentioajat ja rakennekaavat.





Myös 0,1 mol HCI:lla hajotetusta näytteessä näkyi palmitiini- ja steariinihappoa, mikä oli arvattavaa, kun sitä löytyi hajottamattomasta ja 0,1 mol NaOH:lla hajotetusta VG:stäkin. HCI:lla hajotetun VG:ssä näkyneet palmitiini- ja steariinihappo on esitetty liitteessä 7. HCI:lla hajotetusta VG:stä ei löydetty merkkejä syklisistä rikkiyhdisteistä. Huolimatta siitä, että 0,1 mol HCI:lla hajotetussa VG:ssä näkyi joitain uusia yhdisteitä, joita ei näkynyt NaOH hajotetussa VG:ssä, on VG:n hajoaminen ollut hyvin vähäistä verrattuna NaOH:lla hajotettuun VG:hen.

Kiinteäfaasiuuttolla yritettiin saada näytteiden taustaa pienemmäksi, erottamalla poolisia yhdisteitä poolittomista yhdisteistä, jolloin ioni suppressio vähenisi ja halutut yhdisteet nähtäisiin taustasta paremmin. Kiinteäfaasiuuton avulla ei saatu kuitenkaan näkyviin mitään merkittävää ja uutta yhdistettä näytteistä. Kuvassa 52 on esitetty NaOH ja HCl hajotetun VG:n positiivisen ja negatiivisen puolen TIC:t ilman kiinteäfaasiuuttoa ja kiinteäfaasiuuton jälkeen.







Kuva 52. NaOH ja HCl hajotetun VG:n postiviisen ja negatiivisen puolen TIC:t ilman kiinteäfaasiuuttoa (vasemmalla) ja kiinteäfaasiuuton jälkeen (oikealla).

#### 8.3 CVX:n hajoamistuotteiden analyysi

Näytteen hajotusta varten NMR-putkessa olevan CVX-näytteeseen lisättiin NMR-pipetillä 0,1-molaarista suolahappoa saman verran (n. 300 µl) kuin näytettä oli putkessa. Lisäyksen jälkeen tarkistettiin vielä näytteen kirkkaus ennen mittausta. Tarkistuksen jälkeen NMR-putki siirrettiin NMR-laitteen näytetelineisiin analysointia varten. Näytteestä ajettiin samat mittaukset kuin (hajottamistutkimuksen) VG:stäkin samanlaisissa oloissa. Hajotettua CVX:ää mitattiin vain kerran, eikä tutkimuksia jatkettu ensimmäisen mittauksen jälkeen.



Metropolia

LC-MS-analyysia varten NMR-mittauksen jälkeen hajotettu CVX-näyte siirrettiin NMRpipetillä 1,5 ml:n vialiin, jonka jälkeen näytteestä tehtiin 10-, 100- ja 1000-kertaiset laimennokset samalla tavalla kuten aiemminkin. Tämän jälkeen näytteet analysoitiin LC-MS:llä kuten ennenkin.

#### 8.4 CVX:n hajotuksen tulokset

Kuten VG:nkin kohdalla kinetiikkamittauksen datan käsittely tehtiin samalla tavalla, tosin CVX:n kinetiikkamittauksessa oli pieniä ongelmia datan käsittelyssä. Piikkien signaalit (varsinkin mahdollisten hajoamistuotteiden) olivat hyvin pieniä ja vaikeasti havaittavia, mutta ne löydettiin kuitenkin. Tämän lisäksi integraalin aluetta jokaiselle signaalille piti hieman kasvattaa hyvinkin paljon laajalle alueelle, jotta signaalit saatiin jokaiseen mittaukseen valittua. Kun data oli siirretty Excel-ohjelman puolelle, tehdystä viivadiagrammista tuli hyvin epäselvä, johtuen integraalialueesta. Tämän takia diagrammin selkeyttämiseksi jokaisen kymmenennen arvon keskiarvoilla tehtiin uusi diagrammi, joka oli helpommin luettava. Tämä selkeämpi viivadiagrammi on esitetty kuvassa 53.



Kuva 53. Kinetiikkamittauksen CVX:n, hajoamistuotteen 1 ja 2 muutokset prosentteina 24 tunnin mittauksen aikana, kun CVX:ää altistettiin emäksisille oloille NaOH:n avulla. Lisäksi kuvaajassa näkyy totaalimäärän prosenttiosuus.

CVX:n signaali näkyi kemiallisella siirtymällä 65,8–52,9 ppm, jonka signaalin intensiteetti väheni mittauksen aikana, minkä perusteella signaali tunnistettiin. Yhdiste (hajoamistuote 2) kemiallisella siirtymällä 29,4 – 21,1 ppm lisääntyi kokeen aikana, ja



76

yhdiste (hajoamistuote 1) kemiallisella siirtymällä 42,9 – 37,7 ppm ei muuttunut mittauksen aikana, joten kyse on epäpuhtaudesta. CVX:n puoliintumisaika oli noin 2,2 tunnin kohdalla ja CVX:n hajoaminen loppui noin 10 tunnin kohdalla. Hajoamisen jälkeen CVX:ää jäi noin 38 prosenttia ja hajoamistuotetta 2 muodostui lisää noin 35 prosentti yksikköä (aluksi noin 30 % ja lopussa noin 65 %).

Koska hajotetusta CVX:stä ei ajettu NaOH:n lisäyksen jälkeisinä päivinä <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR:ä eikä 2D [<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P]-HMQC:a ei voida sanoa NMR:n perusteella minkälaisia muutoksia tapahtui 24 tunnin jälkeen. <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR:ssä nähtiin hetki NaOH:n lisäyksestä VG:n sekaan kolme piikkiä, joista vahvin kemiallisella siirtymällä 59,2 ppm tuli CVX:stä. Kaksi muuta piikkiä nähtiin kemiallisella siirtymällä 74,1 ppm ja 25,5 ppm. 2D [<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P]-HMQC:ssa nähtiin myös näiden kolmen piikin antama signaali ja neljäs signaali fosforisiirtymällä n. 40 ppm. Kuvassa 54 on esitetty <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR ja 2D [<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P]-HMQC CVX:stä, johon juuri on lisätty 0,1 mol NaOH:a.



Kuva 54. <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR ja 2D [<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P] -HMQC CVX:stä, johon juuri on lisätty 0,1 mol NaOH:a.

Hajottamattoman CVX:n ja hajotetun CVX:n TIC:jä vertaamalla huomattiin, että retentioajoilla 1,67 min ja 1,74 min syntyi piikkejä joita ei näkynyt hajottamattomassa CVX:ssä ja retentioajalla 0,61 min piikki kasvoi. Kuvassa 55 on esitetty hajottamattoman CVX:n ja hajotetun CVX:n 100-kertaisten laimennoksien TIC:t.





Kuva 55. Hajottamattoman CVX:n ja hajotetun CVX:n 100-kertaisesti laimennetut TIC:t.

10-kertaisesti laimennetusta hajotetusta CVX:stä retentioajoilla 1,95 min ja 2,09 min näkyi kaksi selkeää piikkiä negatiivipuolella. Retentioajalla 1,95 min näkyvässä massaspektrissä näkyi vahva piikki m/z:lla 151, jossa ei näkynyt rikki-isotoopin antamaa piikkiä. Tämä piikki tulee luultavasti butyylimetyylifosfonihaposta, jota löytyi hajottomattomastakin CVX:stä. Massaspektrissä näkyi m/z:lla 95 metyylifosforihapon fragmentti, joka antaa lisää varmuutta, että yhdiste on butyylimetyylifosfonihappo. On vaikea sanoa, onko butyylimetyylifosfonihapon määrä muuttunut ilman kvantitatiivista analyysiä. Kuvassa 56 on esitetty 10-kertaisesti laimennetun hajotetun CVX:n TIC, butyylimetyylifosfonihapon rakennekaava ja 1,95 min otettu massaspektri, johon on merkitty fragmentoituminen.







Kuva 56. 10-kertaisesti laimennetun hajotetun CVX:n TIC negatiivipuolella, rakennekaava ja 1,95 min otettu massaspektri, johon on merkitty butyylimetyylifosfonihapon fragmentoituminen metyylifosfonihapoksi

Retentioajalla 2,09 min näkyvässä piikissä näkyi massaspektrissä vahva piikki m/z:lla 167 ja rikki-isotoopin antama piikki m/z:lla 169. Kyseinen piikki tulee luultavammin butyylimetyylifosfonotioaattista tai butyylimetyylitiofosfonihaposta. Kuten VG:n kohdalla dietyylitiofosforihapon kanssa ei voida olla oikein varmoja kumpaa isomeeristä yhdistettä näkyy retentioajalla 2,09 min. Kuvassa 57 on esitetty retentioajalla 2,09 min otettu massaspektri ja butyylimetyylifosfonotioaatin ja butyylimetyylitiofosfonihapon rakennekaavat.



Kuva 57. Retentioajalla 2,09 min otettu massaspektri ja butyylimetyylifosfonotioaatin ja butyylimetyylitiofosfonihapon rakennekaavat.



1000-kertaisesti laimennetusta hajotetusta CVX:stä löytyneitä yhdisteitä retentioajoilla 0,61 min, 1,67 min ja 1,74 min olevia yhdisteitä ei pystytty tunnistamaan. Retentioajoilla 1,67 min ja 1,74 min tulleet yhdisteet olivat syklisiä rikkiyhdisteitä. Yhdisteiden, joita ei pystytty tunnistamaan ja syklisesten rikkiyhdisteiden massaspektrit on esitetty liitteessä 9. Taulukkoon on listattu 0,1 mol NaOH:lla hajotetun CVX:n löydetyt hajoamistuotteet ja niiden massa/varaus-suhteet, retentioajat sekä rakennekaavat.

Yhdiste	m/z [M-H] <sup>-</sup>	R <sub>t</sub> (min)	Rakennekaava
Butyylimetyylifosfoni- happo	151	1,95	ОРОН
Butyylimetyylifosfono- tioaatti / Butyylime- tyylitiofosfonihappo	167	2,09	

Taulukko 12. 0,1 mol NaOH:lla hajotetusta CVX:stä löydetyt hajoamistuotteet ja niiden massa/varaus-suhteet, retentioajat sekä rakennekaavat.

#### 8.5 Hajotustutkimuksen päätelmät

VG:n ja CVX:n hajotuksen tuloksia tarkastelemalla oli selkeää, että 0,1 mol NaOH toimi VG:n ja CVX:n hajottamisessa, kun taas 0,1 mol HCI ei toimi VG:n hajottamisessa kuin vain hyvin heikosti, jos edes ollenkaan. Tämä nähtiin hyvin hapon ja emäksen lisäyksen jälkeen tehdystä kinetiikkamittauksissa, joka menetelmänä toimi loistavasti. Natriumhydroksilla hajotettu VG antoi enemmän tunnistettuja hajoamistuotteita kuin CVX, ja tämä johtunee siitä, että VG hajosi paremmin.



80

Hajoamistuotteiden perusteella VG:n ja CVX:n ns. attribuutiomarkkereiksi valittiin sellaisien yhdisteiden/hajoamistuotteiden massa/varaus-suhteita, jotka selkeästi yhdessä antavat viittausta, että kyse on VG:stä tai CVX:stä tulevista hajoamistuotteista tai epäpuhtauksista. Taulukkoon 13 on listattu attribuutiomarkkerit, mistä yhdisteistä niitä löytää ja se löytyykö niitä LC-MS:n positiiviselta vai negatiiviselta puolelta.

Taulukko 13. Hajoamistutkimuksen perusteella koottu taulukko attribuutiomarkkereista, jotka ilmaisevat mitä yhdistettä kyseisien markkerien löytyessä näyte olisi, lisäksi eriteltynä negatiiviselta ja positiiviselta puolelta löytyvät markkerit. Tämän lisäksi taulukkoon on merkitty, löytyykö kyseistä yhdistettä VG:n vai CVX:n hajoamisesta tai niiden epäpuhtauksina.

Yhdiste	Ionis. Puoli	Attribuutiomarkkerit	VG	CVX
Ve	Neg.	-	v	
VG	Pos.	100, 270, 272 (SI)	X	
CVX	Neg.	-		v
	Pos.	99, 267, 269 (SI)		^
Dietwylifosfaatti	Neg.	79, 125, 153	v	
	Pos.	81, 99, 127 155	^	
Diotwlitiofocforibanno	Neg.	95, 141, 169, 171 (SI)	v	
Dietyyiitioiosioimappo	Pos.	97, 143, 171, 173 (SI)	^	
Eosforibanno *	Neg.	97	v	
ισιστηαρμο	Pos.	99	^	
Butwylimetwylifosfonaatti	Neg.	79, 95, 151		v
Butyyimetyyinosionaatti	Pos.	-		^
Metwylifosforihanno *	Neg.	95		v
	Pos.	97		^
Ric-(2-diatradiaminaatradi)-diculfidi	Neg.	-	v	v
Bis-(2-dietyynannioetyyn)-disuniai	Pos.	134, 136 (SI), 265, 267 (SI)	~	^
	Neg.	-		
Bis-(2-dietyyllaminoetyyli) -sulfidi	Pos.	233, 235 (SI)	х	x
Butyylimetyylifosfonotioaatti /	Neg.	167, 169 (SI)		
Butyylimetyylitiofosfonihappo	Pos.	-		х

\* Hyvin vesiliukoinen yhdiste, joten ei välttämättä näy spektrissä

SI = Rikki isotooppi



Yhdisteiden dietyylifosfaatin ja bis-(2-dietyyliaminoetyyli)-disulfidin attribuutiomarkkerit ovat sellaisia markkereita, joita on suositeltavaa tarkkailla, kun seurataan VG:ta ja sen hajoamistuotteita, koska ne ovat todennäköisemmin sellaisia yhdisteitä, joita VG:stä hajoaa. CVX:n osalta butyylimetyylifosfonaatti ja bis-(2-dietyyliaminoetyyli)-disulfidi ovat sellaisia yhdisteitä, joita kannattaa seurata.

#### 9 Yhteenveto

On hyvin selkeää, että 0,1 molaarinen HCI ei ole tarpeeksi suuripitoinen hajottamaan VG:tä tutkimuksen tuloksien perusteella. Ensimmäisen 24 tunnin eikä edes seuraavan 8 päivän aikana hajotuksen aloituksesta VG-näytteessä näkynyt suuria muutoksia. Kun taas 0,1-molaarinen NaOH toimi juuri halutulla tavalla ja aiheutti VG:n hajoamista muiksi yhdisteiksi. Jotta voitaisiin tutkia paremmin happamien olojen vaikutuksia VG:n hajoamiseen, tulisi käyttää väkevämpää suolahappoa.

Työssä käytetty LC-MS-menetelmä ja näytteiden esikäsittely ei ollut täysin optimaalinen tutkittujen yhdisteiden kannalta. NMR-tekniikka toimi niin kuin piti. Koska näytteet sisältävät polaaristen yhdisteiden lisäksi esim. hyvin vesiliukoisia yhdisteitä (fosforihappo), joita on hyvin hankala saada näkyviin käytetyllä menetelmällä. Näytteitä tulisi siis mitata menetelmällä, joka sopii paremmin vesiliukoisten yhdisteiden analysointiin ja muilla menetelmillä, jotta varmasti nähtäisiin hyvin ja selvästi halutut yhdisteet. Näytteenkäsittelykin tulisi miettiä hieman tarkemmin, ja miettiä, pitäisikö jokainen näyte esim. kiinteäfaasiuutolla esikäsitellä siten, että näyte jaettaisiin pienempiin osiin, jotka kiinteäfaasiuutettaisiin, jolloin saataisiin esim. pooliset yhdisteet erikseen poolittomista ja poolittomat erikseen poolisista. Tällöin voitaisiin ajaa kaikki poolittomat ja poolilliset yhdisteet erikseen erilaisissa eluenteissa.

Jotta hajoamistutkimuksessa voitaisiin saada mahdollisimman tarkasti tietoa millaisia hajoamistuotteita VG:stä ja CVX:stä syntyy, tulisi näytteiden olla sellaisia, ettei niissä olisi



82

epäpuhtauksia. Tällaisia näytteitä on kuitenkin mahdotonta saada aikaiseksi optimaalisissakaan tilanteissa. Usein pieni määrä epäpuhtauksia ei haittaa tutkimusta merkittävästi, jos ollenkaan.

Vaikka työssä saatiin jo hyvin tietoa, josta on apua VG:n ja CVX:n samankaltaisissa mahdollisissa jatkotutkimuksissa, VG ja varsinkin CVX vaatii lisää tutkimusta varsinkin hajoamisen käyttäytymisestä happamissa olosuhteissa, koska tässä tutkimuksessa tulokset CVX:stä jäivät hyvin vähäisiksi. Jatkotutkimuksissa voisi kokeilla myös kuinka erilaisissa pitoisuuksissa tapahtuu hajoamisnopeudelle ja muodostuuko joitain erilaisia yhdisteitä, kun hapon ja emäksen pitoisuutta lisätään. Hajoamistuotteet dietyylitiofosforihappo ja butyylimetyylifosfonotioaatti sekä butyylimetyylitiofosfonihappo vaativat myös lisätutkimusta, koska ei olla aivan varmoja syntyykö kaksoissidoksellisen rikin omaavaa yhdistettä vai yksöissidoksellisen rikin omaava yhdiste. Lisäksi tutkimuksen LC-MS-osa tulisi suorittaa mahdollisuuksien mukaan referenssinäytteiden kanssa, jotta voitaisiin olla varmempia, mitä yhdistettä muodostuu. Lisäksi GC-MS-tekniikan (kaasukromatografiamassaspektrometria) voisi ottaa tutkimukseen kolmanneksi tekniikaksi mukaan. Tämä oli tämän opinnäytetyön alussa tavoitteena, mutta se jätettiin pois työn jo melko laajan alueen takia.

Huolimatta siitä, että opinnäytetyön aikana huomattiin, etteivät kaikki menetelmät ole aivan optimaalisia tai tulokset jäivät hieman vajaiksi joiltain osin. Opinnäytetyö on silti onnistunut, VG:n ja CVX:n rakenteet onnistuttiin havaitsemaan NMR:n että LC-MS:n avulla. Lisäksi näistä yhdisteistä onnistuttiin havaitsemaan epäpuhtauksia ja löytämään hajoamistuotteita.



#### Lähteet

- 1 Kaszeta, Dan. 2020. Toxic A history of nerve agents, from nazi Germany to Putin's Russia. Lontoo, Hurst & Company.
- Vilches, Diego; Alburquerque, Germán & Ramirez-Tagle, Rodrigo. 2015. One hundred and one years after a milestone: Modernchemical weapons and World War I. Teoksessa Vázquez, Ana. 2016. Educación Química Vol. 27, Issue 3, s. 233-236. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 3 Chemical Warfare & Nerve Agents Part II: The V Series. Verkkoaineisto. Compound Interest. <a href="https://www.compoundchem.com/2015/02/19/nerveagents-part2/">https://www.compoundchem.com/2015/02/19/nerveagentspart2/</a>. Päivitetty 19.2.2015. Luettu 11.9.2020.
- 4 About us. 2020. Verkkoaineisto. OPCW. <https://www.opcw.org/about-us>. Luettu 22.08.2020.
- 5 Designated Laboratories. 2020. Verkkoaineisto. OPCW. <a href="https://www.opcw.org/designated-laboratories">https://www.opcw.org/designated-laboratories</a>. Luettu 17.10.2020.
- 6 Akkreditointi. 2016. Verkkoaineisto. FINAS. <https://www.finas.fi/akkreditointi/Sivut/default.aspx>. Päivitetty 27.10.2016. Luettu 17.10.2020.
- 7 VERIFIN Kemiallisen aseen kieltosopimuksen instituutti. Verkkoaineisto. Helsingin yliopisto. < https://www.helsinki.fi/fi/verifin-kemiallisen-aseen-kieltosopimuksen-instituutti>. Luettu 22.8.2020.
- 8 Kemialliseen aseen kieltosopimus. 2020. 7.6.2020.
- 9 Kee, Terrence & Monnard, Pierre-Alain. 2017. Chemical systems, chemical contiguity and the emergence of life. Teoksessa: Cronin, Leroy; Evans Amanda & Wnkler David (ed.). 2020. From prebiotic chemistry to molecular evolution, s. 1551–1563. Beilstein Journal of Organic Chemistry.
- 10 Summary of CWC-Schedules and their Relevance to Chemical Warfare. Verkkoaineisto. The Wayback Machine. <a href="https://web.ar-chive.org/web/20130504171002/http://www.dfat.gov.au/cwco/download/ta-ble2\_summary\_schedules\_relevance\_cw\_amended.pdf">https://web.archive.org/web/20130504171002/http://www.dfat.gov.au/cwco/download/table2\_summary\_schedules\_relevance\_cw\_amended.pdf</a>>. Luettu 11.9.2020.
- 11 Wartell, Michael; Kleinman, Michael; Huey, Beverly & Duffy, Laura. 1999. Strategies to Protect the Health of Deployed U.S. Forces: Force Protection and Decontamination. Washington (DC): National Academy Press.



84

- 12 Shammas, Nazih; Yang, John; Yuan, Pao-Chiang & Hung, Yung-Tse. Chemical Oxidation. Teoksessa Wang, Lawrence; Shammas, Nazih & Hung, Yung-Tse. 2005. Handbook of Environmental Engineering Vol. 3, Physicochemical Treatment Processes.
- 13 Dobbs, Michael R. 2009. Clinical Neurotoxicology Syndromes, Substances, Environments, s. 646-659. Kentucky, Yhdysvallat. Saunders.
- 14 Fischer, Audrey; Wolman, Marc; Granato, Michael; Parsons, Michael; McCallion, Andrew; Proescher, Jody & English, Emily. 2015. Carbamate nerve agent prophylatics exhibit distinct toxicological effects in the zebrafish embryo model. Teoksessa: Richardson, Gale. 2020. Neurotoxicology and Teratology Vol. 50, s. 1– 10.
- 15 Čolović, Mirjana; Krstić, Danijela; Lazarević-Pašti, Tamara; Bondžić, Aleksandra & Vasić, Vesna. 2013. Current neuropharmacology vol. 11,3; s. 315-335.
- 16 Using Acetylcholinesterase Inhibitors as Nootropics. Verkkoaineisto. PeakNootropics. <a href="https://peaknootropics.com/using-acetylcholinesterase-inhibitors-nootropics/">https://peaknootropics.com/using-acetylcholinesterase-inhibitors-nootropics/</a>. Luettu 24.8.2020.
- 17 Greathouse, Brian; Zahra, Farah & Brady, Mark20. 16.7.2020. Acetylcholinesterase Inhibitors (Sarin, Soman, VX) Toxicity. Teoksessa StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing 2020. Verkkoaineisto. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535428/>. Luettu 24.8.2020.
- 18 Content Background: Inhibition of Acetylcholinesterase by Nerve Gas. Verkkoaineisto. The Pharmacology Education Partnership. <https://sites.duke.edu/thepepproject/module-4-military-pharmacology-it-takesnerves/content-background-inhibition-of-acetylcholinesterase-by-nerve-gas/>. Luettu 24.8.2020.
- 19 Smythies, John & Golomb, Beatrice. Nerve gas antidotes. Journal of the Royal Society of Medicine vol. 97,1. 2004.
- 20 Hayoun, Michael; Smith, Matthew; Ausman, Chelsea & Swoboda, Henry. 2020. V-Series (Ve, Vg, Vm, Vx) Toxicity. Teoksessa StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing 2020. Verkkoaineisto. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441997/>. Luettu 24.8.2020.
- 21 Munro, Nancy; Talmage, Sylvia; Griffin, Guy; Waters, Larry; Watson, Annetta; King, Joseph & Hauschild, Veronique. The Sources, Fate, and Toxicity of Chemical Warfare Agent Degradation Products. Teoksessa Environmental health perspectives vol. 107, Issue 12, s.933-974. 1996.



- 22 NMR basic knowledge. Verkkoaineisto. JEOL Ltd. <a href="https://www.jeol.co.jp/en/products/nmr/basics.html">https://www.jeol.co.jp/en/products/nmr/basics.html</a>. Luettu 22.9.2020.
- 23 Akitt, James & Mann, Brian. NMR and Chemistry An introduction to modern NMR spectroscopy. 4<sup>th</sup> edition. Cheltenham: Stanley Thornes Publishers Ltd. 2000.
- 24 Claridge, Timothy. High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry, vol.19. Kidlington, Oxford: Elsevier Ltd.
- 25 Murphy, Andrew & Jones, Jeremy. Larmor frequency. Verkkoaineisto. Radiopaedia. <a href="https://radiopaedia.org/articles/larmor-frequency">https://radiopaedia.org/articles/larmor-frequency</a>. Luettu 29.9.2020.
- 26 Reusch, William. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Verkkoaineisto. G. <a href="https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spect-rpy/nmr/nmr1.htm">https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spect-rpy/nmr/nmr1.htm</a>>. Luettu 29.9.2020.
- 27 Dr. Deepak. Factors Influencing Chemical shifts of NMR active nuclei. Verkkoaineisto. Lab-Training. <a href="https://lab-training.com/2015/12/15/factors-influencing-chemical-shifts-of-nmr-active-nuclei/">https://lab-training.com/2015/12/15/factors-influencing-chemical-shifts-of-nmr-active-nuclei/</a>. Päivitetty 15.12.2015. Luettu 29.9.2020.
- 28 Martonen, Henri. 2019. Johdatus kemiallisten siirtymien kvanttimekaaniseen laskemiseen. Pro gradu -tutkielma. Jyväskylän yliopisto. JYX-julkaisuarkisto.
- 29 NMR Chemical Shift Values Table. Verkkoaineisto. Chemistry Steps. <a href="https://www.chemistrysteps.com/nmr-chemical-shift-values-table/">https://www.chemistrysteps.com/nmr-chemical-shift-values-table/</a>. Luettu 3.10.2020.
- 30 Grewal, Jaspreet. Spin-Spin coupling in NMR. Verkkoaineisto. Conduct Science. <a href="https://conductscience.com/spin-spin-coupling-in-nmr/">https://conductscience.com/spin-spin-coupling-in-nmr/</a>. Luettu 4.10.2020.
- 31 Spin-Spin Splitting in <sup>1</sup>H NMR Spectra. Verkkoaineisto. The LibreTexts libraries. <https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic\_Chemistry/Map%3A\_Organic\_Chemistry\_(McMurry)/13%3A\_Structure\_Determination\_-\_Nuclear\_Magnetic\_Resonance\_Spectroscopy/13.06%3A\_Spin-Spin\_Splitting\_in\_H\_NMR\_\_Spectra>. Päivitetty. 11.8.2020. Luettu 4.10.2020.
- 32 Nuclear Magnetic Resonance (NMR) of Alkenes. Verkkoaineisto. The LibreTexts libraries. <a href="https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic\_Chemistry/Supplemental\_Modules\_(Organic\_Chemistry)/Alkenes/Properties\_of\_Alkenes/Nuclear\_Magnetic\_Resonance\_(NMR)\_of\_Alkenes>. Päivitetty 13.9.2020. Luettu 4.11.2020.
- 33 Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. Verkkoaineisto. IB Chemistry Web. <a href="https://ibchem.com/IB16/11.35.htm">https://ibchem.com/IB16/11.35.htm</a>>. Luettu 4.11.2020.



- 34 Shimming. Verkkoaineisto. Washington State University. <a href="http://nmrc.wsu.edu/tu-torials/basics/shimming/">http://nmrc.wsu.edu/tu-torials/basics/shimming/</a>. Luettu 5.10.2020.
- 35 The Lock. Verkkoaineisto. Washington State University. <a href="http://nmrc.wsu.edu/tu-torials/basics/lock/">http://nmrc.wsu.edu/tu-torials/basics/lock/</a>. Luettu 15.10.2020.
- 36 What is probe. Verkkoaineisto. University of Colorado Boulder. <a href="https://www.col-orado.edu/lab/nmr/content/what-probe">https://www.col-orado.edu/lab/nmr/content/what-probe</a>. Luettu 15.10.2020.
- 37 1D vs. 2D NMR spectra (general definitions). Verkkoaineisto. University of Zurich, Department of Chemistry. <a href="http://www.chem.uzh.ch/zerbe/2D-NMR">http://www.chem.uzh.ch/zerbe/2D-NMR</a>. Luettu 20.10.2020.
- 38 Liquid Chromatography Principles. Verkkoaineisto. Bio-Rad. <a href="https://www.bio-rad.com/en-fi/applications-technologies/liquid-chromatography-principles?ID=MWHAS7E8Z">https://www.bio-rad.com/en-fi/applications-technologies/liquid-chromatography-principles?ID=MWHAS7E8Z</a>>. Luettu 20.10.2020.
- 39 Jaarinen, Soili & Niiranen, Jukka. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. 5.–6. painos. Helsinki: Edita.
- 40 Ion Exchange Chromatography Principles and Methods. 2016. Uppsala: GE Healthcare Bio-Sciences AB.
- 41 Reusch, William. Mass Spectrometry. Verkkoaineisto. Michigan State University, Department of Chemistry. <a href="https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/re-usch/virttxtjml/spectrpy/massspec/masspec1.htm">https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/re-usch/virttxtjml/spectrpy/massspec/masspec1.htm</a>>. Luettu 22.10.2020.
- 42 Bajic, S. 2017. Waters UniSpray Ionization Source. Wilmslow, Iso-Britannia: Waters Corporation.
- 43 Schreiber, André. 2017. Advantages of Using Triple Quadrupole over Single Quadrupole Mass Spectrometry to Quantify and Identify the Presence of Pesticides in Water and Soil Samples. Ontario, Kanada: SCIEX.
- 44 Electron Multipliers for Mass Spectrometry. 2014. Yhdysvallat: Restek.



## Liite 1 1 (9)

## Liite 1. VG:n ja CVX:n NMR-ennustespektrit

## VG:n NMR-ennustespektrit

20/Aug/2020 10:21:33 ACD/C+H NMR Predictors 2014 (v.14.00)



Group	nH	Shift	TS	Conf. Limits	Av.Exp	Neural Net
4<">	1	4.22	75.0	0.29	3.874.30	4.20
4<'>	1	4.15	75.0	0.25	3.874.30	4.20
5	3	1.24	66.7	0.25	1.011.51	1.36
6	2	3.04	80.0	0.35	2.683.37	2.98
7	2	2.51	83.3	1.11	2.814.23	2.50
9	2	2.56	62.5	0.11	2.492.67	2.71
10	3	0.98	55.6	0.07	0.971.05	1.09
12<">	1	4.22	75.0	0.29	3.874.30	4.20
12<'>	1	4.15	75.0	0.25	3.874.30	4.20
13	3	1.24	66.7	0.25	1.011.51	1.36
15	2	2.56	62.5	0.11	2.492.67	2.71
16	3	0.98	55.6	0.07	0.971.05	1.09

J	Grp.1	Grp.2	Value	Error
<sup>2</sup> J	4<'>	4<">	-12.50	6.93
<sup>2</sup> J	5	5	-11.44	6.72
<sup>2</sup> J	6	6	-13.35	2.32
<sup>2</sup> J	7	7	12.60	0.00
<sup>2</sup> J	9	9	13.00	0.00
<sup>2</sup> J	10	10	-11.44	6.72
<sup>2</sup> J	12<'>	12<">	-12.50	6.93
<sup>2</sup> J	13	13	-11.44	6.72
<sup>2</sup> J	15	15	13.00	0.00
<sup>2</sup> J	16	16	-11.44	6.72
зJ	4<">	2 <p></p>	11.25	0.00
<sup>3</sup> J	4<">	5	7.04	0.00
³Ј	4<'>	2 <p></p>	11.25	0.00
<sup>3</sup> J	4<'>	5	7.04	0.00
зJ	6	2 <p></p>	15.85	0.50
³Ј	6	7	6.40	0.00
<sup>3</sup> J	9	10	7.04	0.28
³Ј	12<">	2 <p></p>	11.25	0.00
³Ј	12<">	13	7.04	0.00
³Ј	12<'>	2 <p></p>	11.25	0.00
зJ	12<>	13	7.04	0.00

rror	J	Grp.1	Grp.2	Value	Error
.93	³Ј	15	16	7.04	0.28
.72	<sup>4</sup> J	5	2 <p></p>	2.70	0.00
.32	<sup>4</sup> J	7	9	1.50	0.00
.00	<sup>4</sup> J	7	15	1.50	0.00
.00	<sup>4</sup> J	9	15	1.50	0.00
.72	⁴J	13	2 <p></p>	2.70	0.00



Liite 1 2 (9)





metropolia.fi

#### 20/Aug/2020 10:22:13 ACD/C+H NMR Predictors 2014 (v.14.00)



Carbon No.	CHn	Chem. Shifts	TS	Conf. Limits	Av.Exp	Neural Net
4	CH <sub>2</sub>	64.33	75.0	1.90	61.7863.94	63.87
5	CH <sub>3</sub>	16.62	66.7	0.22	16.3616.71	16.55
6	CH <sub>2</sub>	28.03	80.0	5.05	30.3836.42	27.99
7	CH <sub>2</sub>	54.46	83.3	11.72	41.1455.97	55.26
9	CH <sub>2</sub>	47.77	62.5	1.36	46.6749.39	47.99
10	CH <sub>3</sub>	12.58	55.6	0.36	12.4013.00	12.39
12	CH <sub>2</sub>	64.33	75.0	1.90	61.7863.94	63.87
13	CH <sub>3</sub>	16.62	66.7	0.22	16.3616.71	16.55
15	CH <sub>2</sub>	47.77	62.5	1.36	46.6749.39	47.99
16	CH <sub>3</sub>	12.58	55.6	0.36	12.4013.00	12.39

J	Туре	Atom 1	Atom 2	Value	Error	J	Туре	Atom 1	Atom 2	Value	Error
²J	C-H	4	5	4.27	1.07	3	C-C	7	16	8.91	1.66
1J	C-H	4	4<'>	147.44	1.92	2	C-C	7	15	2.11	0.49
1J	C-H	4	4<">	147.44	1.92	3	C-C	7	10	8.91	1.66
<sup>1</sup> J	C-C	4	5	7.40	0.00	2	C-C	7	9	2.11	0.49
<sup>2</sup> J	C-X	4	2	6.30	0.00	3	C-X	7	2	8.00	0.00
<sup>1</sup> J	C-H	5	5	126.57	1.01	3	C-H	9	15	3.10	0.00
<sup>2</sup> J	C-H	5	4<'>	5.00	0.00	2	C-H	9	10	-0.20	5.94
²J	C-H	5	4<">	5.00	0.00	1	C-H	9	9	132.00	0.00
<sup>3</sup> J	C-X	5	2	7.20	0.00	3	C-H	9	7	3.10	0.00
<sup>2</sup> J	C-H	6	7	0.16	6.14	3	C-C	9	16	8.91	1.66
1J	C-H	6	6<'>	141.00	0.00	2	C-C	9	15	2.11	0.49
1J	C-H	6	6<">	141.00	0.00	1	C-C	9	10	37.60	0.00
<sup>3</sup> J	C-C	6	15	8.91	1.66	5	C-X	9	2	3.27	0.00
<sup>3</sup> J	C-C	6	9	8.91	1.66	1	C-H	10	10	125.00	0.00
<sup>1</sup> J	C-C	6	7	35.63	5.67	2	C-H	10	9	-2.83	0.00
²J	C-X	6	2	2.00	0.00	3	C-C	10	15	8.91	1.66
<sup>3</sup> J	C-H	7	15	3.10	0.00	6	C-X	10	2	5.00	0.00
<sup>3</sup> J	C-H	7	9	3.10	0.00	2	C-H	12	13	4.27	1.07
<sup>1</sup> J	C-H	7	7	143.00	0.00	1	C-H	12	12<'>	147.44	1.92
²J	C-H	7	6<'>	4.13	2.30	1	C-H	12	12<">	147.44	1.92
<sup>2</sup> J	C-H	7	6<">	4.13	2.30	1	C-C	12	13	7.40	0.00
						2	C-X	12	2	6.30	0.00
						1	C-H	13	13	126.57	1.01
						2	C-H	13	12<'>	5.00	0.00
						2	C-H	13	12<">	5.00	0.00
						3	C-X	13	2	7.20	0.00
						2	C-H	15	16	-0.20	5.94
						1	C-H	15	15	132.00	0.00
						3	C-H	15	9	3.10	0.00
						3	C-H	15	7	3.10	0.00
						1	C-C	15	16	37.60	0.00
						5	C-X	15	2	3.27	0.00
						1	C-H	16	16	125.00	0.00
						2	C-H	16	15	-2.83	0.00
						6	C-X	16	2	5.00	0.00
						_					



Liite 1 3 (9)

Liite 1 4 (9)





metropolia.fi

# Liite 1

5 (9)

#### 20/Aug/2020 10:20:00 ACD/XNMR 2014 (v.14.00)

 X
 N1
 Value(ppm)
 Error
 Neural Net
 Incr. Value

 31P
 2
 26.55
 5.0
 22.81
 25.39



X	J	N1	N2	Value(Hz)	Error
31P	1J	2	14	166.3	84.34
31P	1J	2	3	88.67	1.89
31P	1J	2	11	88.67	1.89
31P	2J	2	4	4.8	2.2
31P	3J	2	4 H	13.01	9.23
31P	3J	2	5	-9.12	6.47
31P	4J	2	5 H	-3.28	3.12
31P	2J	2	12	4.8	2.2
31P	3J	2	12 H	13.01	9.23
31P	3J	2	13	-9.12	6.47
31P	4J	2	13 H	-3.28	3.12
31P	1J	2	1	751.33	0.13
31P	2J	2	6	-9.62	8.04
31P	3J	2	<u>6 H</u>	13.01	9.23
31P	3J	2	7	-9.12	6.47
31P	4J	2	7 H	-3.28	3.12
31P	5J	2	9	3.42	3.47
31P	6J	2	9 H	2.86	1.35
31P	6J	2	10	2.49	1.77
31P	7J	2	10 H	2.18	0.6
31P	5J	2	15	3.42	3.47
31P	6J	2	15 H	2.86	1.35
31P	6J	2	16	2.49	1.77
31P	7J	2	16 H	2.18	0.6

## CVX:n NMR-ennustespektrit

7:55 ACD/C+H NMR Predictors 2014 (v.14.00)
ser Database 1 C:\ACD2015\EXCLUSION.NMR (1 records) (

	_		_			
Group	nH	Shift	TS	Conf. Limits	Av.Exp	Neural Net
4<">	1	3.93	75.0	0.22	3.814.21	3.99
4<'>	1	3.92	75.0	0.22	3.814.21	3.99
5	2	1.55	77.8	0.08	1.531.61	1.67
6	2	1.36	70.0	0.06	1.36	1.46
7	3	0.90	63.6	0.07	0.810.93	0.90
8<">	1	2.99	85.7	0.36	2.663.39	3.00
8<'>	1	2.97	85.7	0.35	2.653.36	3.00
9	2	2.55	87.5	1.09	2.814.23	2.54
11	2	2.56	70.0	0.10	2.492.67	2.64
12	3	0.98	63.6	0.07	0.971.05	1.09
14	3	1.73	85.7	0.17	1.541.76	1.87
15	2	2.56	70.0	0.10	2.492.67	2.64
16	3	0.98	63.6	0.07	0.971.05	1.09



## Liite 1 6 (9)

<u> </u>				-	1		-	-		_
J	Grp.1	Grp.2	Value	Error		J	Grp.1	Grp.2	Value	Error
<sup>2</sup> J	4<'>	4<">	10.50	0.00		<sup>3</sup> J	15	16	7.04	0.28
<sup>2</sup> J	5	5	6.00	0.00		⁴J	5	2 <p></p>	2.30	0.00
<sup>2</sup> J	6	6	13.70	1.40		⁴J	9	11	1.50	0.00
<sup>2</sup> J	7	7	-11.44	6.72		⁴J	9	15	1.50	0.00
<sup>2</sup> J	8<'>	8<">	-13.28	2.30		⁴J	11	15	1.50	0.00
<sup>2</sup> J	9	9	12.60	0.00		<sup>5</sup> J	6	2 <p></p>	3.80	5.20
<sup>2</sup> J	11	11	13.00	0.00						
<sup>2</sup> J	12	12	-11.44	6.72						
<sup>2</sup> J	14	2 <p></p>	17.18	2.08						
<sup>2</sup> J	14	14	-14.02	1.37						
<sup>2</sup> J	15	15	13.00	0.00	1					
<sup>2</sup> J	16	16	-11.44	6.72						
зJ	4<">	2 <p></p>	5.70	2.60	1					
зJ	4<">	5	7.13	1.17						
зJ	4<'>	2 <p></p>	5.80	2.80						
зJ	4<'>	5	7.13	1.17						
зJ	5	6	7.28	0.00						
зJ	6	7	7.17	0.53						
зJ	8<">	2 <p></p>	13.96	3.17						
зJ	8<">	9	6.40	0.00						
³Ј	8<'>	2 <p></p>	13.96	3.17						
зJ	8<'>	9	6.40	0.00						
зJ	11	12	7.04	0.28						
			-		-					





metropolia.fi

## Liite 1 7 (9)

#### 20/Aug/2020 10:36:53 ACD/C+H NMR Predictors 2014 (v.14.00)

7 8 5 4 3 P 8 10 10 15 16 0 1 10 15 16

Carbon No.	CHn	Chem. Shifts	TS	Conf. Limits	Av.Exp	Neural Net
4	CH <sub>2</sub>	65.41	75.0	2.34	64.8368.79	66.71
5	CH <sub>2</sub>	33.75	77.8	2.55	30.2333.44	33.00
6	CH <sub>2</sub>	19.30	70.0	0.61	19.3920.16	19.29
7	CH <sub>3</sub>	13.90	63.6	0.36	13.6114.31	13.94
8	CH <sub>2</sub>	26.46	85.7	6.38	30.3836.42	26.42
9	CH <sub>2</sub>	54.48	87.5	11.73	41.1455.97	54.94
11	CH <sub>2</sub>	47.85	70.0	1.36	46.6749.39	48.07
12	CH₃	12.58	63.6	0.36	12.4013.00	12.39
14	CH <sub>3</sub>	17.05	85.7	3.42	12.0812.89	17.34
15	CH <sub>2</sub>	47.85	70.0	1.36	46.6749.39	48.07
16	CH <sub>3</sub>	12.58	63.6	0.36	12.4013.00	12.39

J	Туре	Atom 1	Atom 2	Value	Error	J	Туре	Atom 1	Atom 2	Value	Error	J	Туре	Atom 1	Atom 2	Value	Error
<sup>3</sup> J	C-H	4	6	6.40	0.00	зJ	C-H	7	5	4.43	0.32	<sup>2</sup> J	C-C	11	15	2.11	0.49
<sup>2</sup> J	C-H	4	5	4.43	0.31	<sup>5</sup> J	C-X	7	2	1.10	0.00	<sup>1</sup> J	C-C	11	12	37.60	0.00
<sup>1</sup> J	C-H	4	4	147.29	1.66	<sup>2</sup> J	C-H	8	9	0.16	6.14	⁵J	C-X	11	2	3.27	0.00
зJ	C-C	4	7	2.72	0.46	<sup>1</sup> J	C-H	8	8	141.00	0.00	<sup>1</sup> J	C-H	12	12	125.00	0.00
<sup>2</sup> J	C-C	4	6	0.90	0.00	зJ	C-C	8	15	8.91	1.66	<sup>2</sup> J	C-H	12	11	-2.83	0.00
<sup>1</sup> J	C-C	4	5	38.40	0.00	зJ	C-C	8	11	8.91	1.66	<sup>3</sup> J	C-C	12	15	8.91	1.66
<sup>2</sup> J	C-X	4	2	6.81	0.00	<sup>1</sup> J	C-C	8	9	35.63	5.67	۴J	C-X	12	2	5.00	0.00
зJ	C-H	5	7	5.37	0.04	<sup>2</sup> J	C-X	8	2	2.00	0.00	<sup>1</sup> J	C-H	14	14	127.70	0.42
<sup>2</sup> J	C-H	5	6	-4.44	0.56	зJ	C-H	9	15	3.10	0.00	ЗJ	C-C	14	4	8.91	1.66
<sup>1</sup> J	C-H	5	5	126.20	0.62	зJ	C-H	9	11	3.10	0.00	ЗJ	C-C	14	8	8.91	1.66
<sup>2</sup> J	C-H	5	4	-2.02	3.55	<sup>1</sup> J	C-H	9	9	143.00	0.00	<sup>1</sup> J	C-X	14	2	129.64	0.00
<sup>2</sup> J	C-C	5	7	0.90	0.00	<sup>2</sup> J	C-H	9	8	4.13	2.30	<sup>2</sup> J	C-H	15	16	-0.20	5.94
<sup>1</sup> J	C-C	5	6	35.10	0.00	зJ	C-C	9	16	8.91	1.66	<sup>1</sup> J	C-H	15	15	132.00	0.00
зJ	C-X	5	2	5.86	0.00	<sup>2</sup> J	C-C	9	15	2.11	0.49	зJ	C-H	15	11	3.10	0.00
<sup>2</sup> J	C-H	6	7	1.73	3.60	зJ	C-C	9	12	8.91	1.66	зJ	C-H	15	9	3.10	0.00
<sup>1</sup> J	C-H	6	6	125.57	0.61	<sup>2</sup> J	C-C	9	11	2.11	0.49	<sup>1</sup> J	C-C	15	16	37.60	0.00
<sup>2</sup> J	C-H	6	5	-4.44	0.56	зJ	C-X	9	2	8.00	0.00	<sup>5</sup> J	C-X	15	2	3.27	0.00
зJ	C-H	6	4	3.92	1.32	зJ	C-H	11	15	3.10	0.00	<sup>1</sup> J	C-H	16	16	125.00	0.00
<sup>1</sup> J	C-C	6	7	34.06	0.70	<sup>2</sup> J	C-H	11	12	-0.20	5.94	<sup>2</sup> J	C-H	16	15	-2.83	0.00
⁴J	C-X	6	2	1.10	0.00	<sup>1</sup> J	C-H	11	11	132.00	0.00	<sup>6</sup> J	C-X	16	2	5.00	0.00
<sup>1</sup> J	C-H	7	7	125.60	0.77	зJ	C-H	11	9	3.10	0.00						
<sup>2</sup> J	C-H	7	6	-0.15	6.15	<sup>3</sup> J	C-C	11	16	8.91	1.66						



Liite 1 8 (9)





metropolia.fi

## Liite 1

9 (9)

#### 20/Aug/2020 10:38:36 ACD/XNMR 2014 (v.14.00)



Х	N1	Value(ppm)	Error	Neural Net	Incr. Value
31P	2	50.7	5.0	51.08	53.58

X	J	N1	N2	Value(Hz)	Error
31P	1J	2	1	751.33	0.13
31P	1J	2	13	141.6	30.65
31P	1J	2	14	143.2	0.06
31P	2J	2	14 H	-15.62	3.14
31P	1J	2	3	88.67	1.89
31P	2J	2	8	-9.62	8.04
31P	3J	2	8 H	13.01	9.23
31P	3J	2	9	-9.12	6.47
31P	4J	2	9 H	-3.28	3.12
31P	2J	2	4	-6.7	1.14
31P	3J	2	4 H	13.01	9.23
31P	3J	2	5	-9.12	6.47
31P	4J	2	5 H	-3.28	3.12
31P	4J	2	6	-3.36	2.6
31P	5J	2	6 H	3.81	4.92
31P	5J	2	7	3.42	3.47
31P	6J	2	7 H	2.86	1.35
31P	5J	2	11	3.42	3.47
31P	6J	2	11 H	2.86	1.35
31P	6J	2	12	2.49	1.77
31P	7J	2	12 H	2.18	0.6
31P	5J	2	15	3.42	3.47
31P	6J	2	15 H	2.86	1.35
31P	6J	2	16	2.49	1.77
31P	7J	2	16 H	2.18	0.6



## Liite 2 1 (3)

### Liite 2. Hajottamattoman VG:n NMR-spektrit

### <sup>1</sup>H NMR



<sup>13</sup>C NMR









COSY-45 with PURGE: D0854 in Acetone; 200820-21002 [XI\_PT\_COSYpurge\_acetone\_new Acetone (C:\x) Petri 53

#### <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY NMR



#### <sup>31</sup>P NMR

Liite 2 2 (3)

## Liite 2 3 (3)

### <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-HSQC NMR

HC HSQC with PRESAT: D0854 in Acetone; 200821-21008 TXI\_HSQCMEpr\_water\_ST\_new Acetone {C:\x} Petri 53



### <sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P-HMQC NMR





## Liite 3. Hajottamattoman VG:n LC-MS:sta löydetyt tunnistamattomat yhdisteet ja epäpuhtaudet



Tunnistamattomat yhdisteet – Retentioajalla 1,27 min

Epäpuhtaudet hajottamattomassa VG:ssä (palmitiini- ja steariinihappo)





## Liite 4 1 (3)

### Liite 4. Hajottamattoman CVX:n NMR-spektrit

### <sup>1</sup>H NMR

1H NMR with PRESAT: HIK626c in Acetone; 200922-21040 TXI\_lHpr\_acetone\_quant\_new Acetone {C:\x} Petri 43



<sup>13</sup>C NMR




#### <sup>31</sup>P NMR



## <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY NMR



COSY-45 with PURGE: HIK626c in Acetone; 200922-21044 TXI\_PT\_COSYpurge\_acetone\_new Acetone {C:\x} Petri 43



## <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-HSQC NMR



HC HSQC with PRESAT: HIK626c in Acetone; 200922-21046 TXI\_HSQCMEpr\_water\_ST\_new Acetone (C:\x} Petri 43

## <sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P-HMQC NMR





# Liite 5. Hajottamattoman CVX:n LC-MS:sta löydetyt tunnistamattomat yhdisteet ja eluenttien antamat signaalit



Tunnistamattomat yhdisteet – Retentioajalla 2,33 min







1 (1)

Liite 5

# Liite 6. NaOH:lla hajotetun VG:n LC-MS:sta jo ennestään tunnistetut yhdisteet

### Dietyylifosfaatti - Retentioaika 1,22 min



## Dietyylitiofosforihappo - Retentioaika 1,57 min





Liite 6

1 (2)



#### N,N-dietyyliaminoetyylitiofosfaatti - Retentioaika 1,98 min



metropolia.fi

Liite 6 2 (2)

# Liite 7. NaOH:lla hajotetun VG:n LC-MS:sta löydetyt tunnistamattomat yhdisteet ja epäpuhtaudet sekä HCI:llä hajotetun VG: LC-MS:sta löydetyt epäpuhtaudet

NaOH hajotettu VG - Syklisiä rikkiyhdisteitä (Rt 1,74 min ja 2,12 min)





## Epäpuhtaudet (palmitiini- ja steariinihappo)

## NaOH hajotettu VG

## HCL hajotettu VG





## Liite 8. HCI:lla hajotetusta VG:stä jo ennestään tunnistetut yhdisteet



Trietyylifosfaatti - Retentioaika 2,22 min







Liite 8

Liite 8 2 (2)



#### Bis-(2-dietyyliaminoetyyli)-disulfidi - Retentioaika 0,65 min







# Liite 9 – NaOH:lla hajotetun CVX:n LC-MS:sta tunnistamattomat yhdisteet ja epäpuhtaudet



Tunnistamattomat sykliset rikkiyhdisteet - Rt 1,67 min ja 1,74 min





## Muut tunnistamattomat yhdisteet - Retentioaika 0,61 min

