

Toni Grandell

HS-GC-MS-menetelmän kehitys ja validointi nitrometaanin määrittämiseksi *in vitro* -näytteistä

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Laboratorioanalyttikko (AMK)
Laboratorioalan koulutusohjelma
Opinnäytetyö
4.12.2013

<p>Tekijä Otsikko</p> <p>Sivumäärä Aika</p>	<p>Toni Grandell HS-GC-MS-menetelmän kehitys ja validointi nitrometaanin määrittämiseksi <i>in vitro</i> -näytteistä</p> <p>35 sivua + 6 liitettä 4.12.2013</p>
<p>Tutkinto</p>	<p>Laboratorioanalyytikko</p>
<p>Koulutusohjelma</p>	<p>Laboratorioalan koulutusohjelma</p>
<p>Ohjaajat</p>	<p>FL Jukka Niiranen FM Mia Halme FT Paula Vanninen</p>
<p>Tämä opinnäytetyö tehtiin Kemiallisen aseiden kiellettyjen aineiden tutkimuskeskuksessa, VERIFINissä. Opinnäytetyössä kehitettiin ja validoitiin kvantitatiivinen HS-GC-MS-määritysmenetelmä klooripikriinin metaboliatuotteelle, nitrometaanille <i>in vitro</i> -näytteistä. Klooripikriinin on todettu metaboloituvan nitrometaaniksi veressä (<i>in vitro</i>). Klooripikriini on kemiallisen aseiden kiellettyjen aineiden kiellettyjen aineiden määrittelyllä kemikaalien listalla kolme.</p> <p>Menetelmän kehitys aloitettiin selvittämällä deuteroidun nitrometaanin soveltuvuutta sisäiseksi standardiksi. Se kuitenkin havaittiin epäsovellyksi epästabiilisuuden vuoksi. Paremmaksi ja hyvin toimivaksi sisäiseksi standardiksi osoittautui ¹³C-leimattu nitrometaani, jota käytettiin validointimittauksissa ja <i>in vitro</i> -näytteiden kvantitoinnissa.</p> <p>Menetelmä validoitiin mittaamalla kolme kalibrointinäytesarjaa kolmena päivänä ja <i>in vitro</i> -näytteiden nitrometaanipitoisuudet määritettiin kahden kalibrointinäytesarjan avulla.</p> <p>Menetelmän luotettavaksi kvantitointialueeksi osoittautui valituilla pitoisuuksilla 0,3 – 6,0 µg/ml, vaikkakaan ylempää kvantitointirajaa ei menetelmälle määritetty. <i>In vitro</i> -näytteistä yhdelle saatiin tällä alueella tulos, josta on hyötyä <i>in vitro</i> -tutkimukselle.</p> <p>Kalibrointisuoran mittaustulokset vaihtelevat niin vähän, että y-akselin leikkauspisteen keskihajonnalla laskennallisesti määritettävä toteamisraja on nollanäytteelle laskettua pitoisuutta alempana. Vaikka menetelmälle saatiin laskettua toteamisraja ja määritysraja, niin suositeltavaa olisi arvioida se erikseen jokaisen kalibrointisuoran ohella mitatuilla nollanäytteillä.</p>	
<p>Avainsanat</p>	<p>HS-GC-MS, höyrytila, manuaalinen injektointi, validointi, <i>in vitro</i></p>

Author Title	Toni Grandell Development and Validation of HS-GC-MS Method for Nitromethane from <i>in vitro</i> Samples
Number of Pages Date	35 pages + 6 appendices 4 December 2013
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Jukka Niiranen, LPh Mia Halme, M.Sc. Paula Vanninen, Ph.D.
<p>This graduate study was carried out at the Finnish Institute for Verification of the Chemical Weapons Convention, VERIFIN. The objective was to develop and validate the headspace gas chromatography–mass spectrometry method for quantifying nitromethane - a degradation product of chloropicrin - from <i>in vitro</i> samples. Chloropicrin has been discovered to metabolize into nitromethane in blood (<i>in vitro</i>). Chloropicrin is listed as a schedule 3 chemical in the Chemical Weapons Convention.</p> <p>The development of the method was started by studying the suitability of deuterated nitromethane for an internal standard. The deuterated nitromethane was found to be unfit for the purpose. Subsequently, ¹³C-labeled nitromethane revealed to be a better, well suited as an internal standard and it was used for the validation and in quantitation of the <i>in vitro</i> samples.</p> <p>The method was validated by measuring three series of calibration samples on three days and the nitromethane concentration of the <i>in vitro</i> samples were quantified by using the results of two measured calibration series.</p> <p>A reliable concentration range for the method was found to be 0,3 – 6,0 µg/ml for the used measuring range, although the highest reliable quantitation concentration was not determined. One <i>in vitro</i> sample was quantified reliably on this range. The result from the <i>in vitro</i> samples will be useful for the <i>in vitro</i> study.</p> <p>The standard deviation of the y –axel's intercept on calibration curves was so low that the calculated limit of detection and limit of quantitation were found to be lower than the quantified concentration of the blank samples. This is why, according to the study, it is preferable to estimate the limits of detection and quantitation separately with blank samples measured with each calibration curve.</p>	
Keywords	HS-GC-MS, headspace, manual injection, validation, in vitro

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Validoinnissa tutkittavat parametrit	2
2.1	Selektiivisyys, spesifisyys	2
2.2	Lineaarisuus	2
2.3	Toteamis- ja määrittäysraja	2
2.4	Herkkyys	3
2.5	Toistettavuus	3
2.6	Mittausepävarmuus	4
3	Tutkittavat yhdisteet	5
3.1	Klooripikriini	5
3.2	Nitrometaani	7
4	<i>In vitro</i> -menetelmät	9
5	Analyysimenetelmät	10
5.1	Kaasukromatografia	10
5.2	Höyrytilatekniikka	11
5.3	Massaspektrometria	12
6	Työn kokeellinen osuus	15
6.1	Laitteet, tarvikkeet ja reagenssit	15
6.2	Standardiliuosten valmistus	16
6.3	Menetelmän kehitys	17
6.4	GC-ajoparametrit	19
6.5	Validointi	20
6.6	Manuaalinen höyrytilainjektointi	20
6.7	<i>In vitro</i> -näytteet ja näytteiden käsittely	21

7	Tulokset ja tulosten tarkastelu	22
7.1	Menetelmän kehityksen tulokset	22
7.2	Validoinnin tulokset	26
7.3	<i>In vitro</i> -näytteiden tulokset	29
8	Päätelmät	30
	Lähteet	32
	Liitteet	
	Liite 1: GC-MS-metodi	
	Liite 2: Termostoinnin optimointi	
	Liite 3: Validointimittausten tulokset ja niistä lasketut arvot	
	Liite 4: Validointimittausten kalibrointikuvaajat	
	Liite 5: Validointimittausten ANOVA-taulukot	
	Liite 6: <i>In vitro</i> -näytteiden mittaustulokset ja niistä lasketut arvot	

Lyhenteet

ACN	Asetonitrili (acetonitrile)
amu	Atomimassayksikkö (atomic mass unit)
DCM	Dikloorimetaani (dichloromethane)
DMSO	Dimetyylisulfoksidi (dimethyl sulfoxide)
GC	Kaasukromatografia (gas chromatography)
GSH	Glutationi (glutathione)
HS	Höyrytila (headspace)
ISTD	Sisäinen standardi (internal standard)
LOD	Toteamisraja (limit of detection)
LOQ	Määrittäysraja (limit of quantitation)
MS	Massaspektrometria (mass spectrometry)
m/z	Massa/varaus-suhde (mass-to-charge ratio)
NADPH	Nikotiiniadeniinidinukleotidifosfaatti (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
Nm	Nitrometaani (nitromethane)
QC	Laatukontrolli (quality control)
RSD	Suhteellinen keskihajonta (relative standard deviation)
RT	Retentioaika (retention time)

SD	Keskihajonta (standard deviation)
SIM	Valittujen ionien seuranta (selected ion monitoring)
S/N	Signaali/kohina-suhde (signal-to-noise ratio)
TIC	Kokonaisionivirta (total ion current)
USEPA	Yhdysvaltain ympäristönsuojeluvirasto (United States Environmental Protection Agency)
WHO	Maailman terveysjärjestö (World Health Organization)

1 Johdanto

Nitrometaani on yksi trikloorinitrometaanin, eli klooripikriinin metaboliatuote. Klooripikriini kuuluu kemiallisen aseiden kielto­sopimuksen määrittelemään kemikaalien listaan kolme. Listalle kolme kuuluvat kemikaalit ovat riski kemiallisen aseiden kielto­sopimukselle: niitä on käytetty kemiallisen aseena, tai ne ovat lähtöaineita muiden kemiallisten aseiden valmistuksessa, ja niitä valmistetaan suuria määriä teollisesti. [1.]

Ainakin saksalaisten, englantilaisten ja venäläisten tiedetään käyttäneen klooripikriiniä kemiallisena aseena ensimmäisessä maailmansodassa [2]. Nykyisin klooripikriiniä käytetään suuria määriä muihin kuin kemiallisen aseiden kielto­sopimuksessa kiellettyihin tarkoituksiin esimerkiksi torjunta-aineena ja teollisuuskemikaalina. Klooripikriinin käyttö on kuitenkin riskialtista sen myrkyllisyyden vuoksi ja monia onnettomuuksia on tapahtunut. Esimerkiksi Japanissa tupakkaviljelmän kasvinsuojeluun käytetty klooripikriini aiheutti lähitöillä asuville oireita, jotka kestivät muutamassa tapauksessa yli kuukauden [3, s. 27], ja syyskuussa 2005 Kaliforniassa 320 henkilöä kärsi oireista, joiden todettiin aiheutuneen lähitöillä käytetystä klooripikriinistä [3, s. 29].

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää ja validoida analyysimenetelmä nitrometaanin määrittämiseksi höyrytilakaasukromatografia-massaspektrometria-tekniikalla *in vitro* -näytteistä. Menetelmä luo pohjan muiden samankaltaisten määrittämenetelmien kehitykselle erilaisista matriiseista. Valmiin menetelmän tarkoitus on toimia osana tutkimuksia, joilla tuotetaan muun muassa lisää tietoa nitrometaanin ja klooripikriinin yhteydestä toisiinsa sekä mahdollisesti solutason toimintamekanismista ja metaboliareiteistä. Lisäksi menetelmää voidaan käyttää osana klooripikriinille altistumisen todentamista esimerkiksi työtapaturmissa tai toisaalta kemiallisen aseiden kielto­sopimuksen vastaisissa tilanteissa.

2 Validoinnissa tutkittavat parametrit

2.1 Selektiivisyys, spesifisyys

Selektiivisyydellä tarkoitetaan menetelmän kykyä määrittää näytteen analyytit ilman, että muut näytteen sisältämät komponentit häiritsevät määrittystä. Menetelmä on spesifinen, jos se on selektiivinen määritettäville analyyteille [4, s. 31]. ”Spesifinen” -sanon käyttöä ei kuitenkaan suositella, koska hyvin harvat menetelmät ovat spesifisiä. Selektiivisyydelle ei ole tarkasti määriteltyä ilmaisutapaa. [5.]

2.2 Lineaarisuus

Kvantitatiivisen menetelmän lineaarisuus määritetään mittaamalla standardiliuoksia oletetun mitta-alueen pitoisuuksilla ja tuloksista lasketaan pienimmän neliösumman avulla suora [4, s. 31], jonka x-akselilla on näytteiden pitoisuudet ja y-akselilla on vasteet. Suoran yhtälöstä ratkaistaan jokaista pitoisuutta vastaavat y:n arvot, joiden erotus saaduista mittaustuloksista (residuaali) muodostavat residuaalikäyrän pitoisuuden funktiona. Mittausalue on lineaarinen, jos residuaalikäyrä saa satunnaisesti yhtä paljon arvoja nollan molemmin puolin.

2.3 Toteamis- ja määrittäysraja

Toteamisrajalla (LOD, limit of detection) tarkoitetaan analyytin alinta luotettavana pidettävää pitoisuutta. Yleensä toteamisraja määritetään mittaamalla nollanäytteitä ja laskemalla näiden antama keskiarvoinen analyytin pitoisuus + 3 kertaa nollanäytteen antaman analyytin pitoisuuden keskihajonta [4, s. 32]. Toisaalta toteamisrajan voi laskea myös esimerkiksi seuraavalla tavalla:

$$\text{LOD} = 3\left(\frac{\text{SD}_b}{m}\right) \quad (1)$$

SD_b on y-akselin leikkauspisteen keskihajonta
m on suoran kulmakerroin. [6.]

Vaikka laskutapoja on erilaisia, niin tilastollisesti ajateltuna nollanäytteelle lasketun pitoisuuden tulisi olla alle toteamisrajan n. 95-99 %:ssa kaikista mitatuista nollanäytteistä [7].

Määritysraja (LOQ, limit of quantitation) on analyytin alin pitoisuus, joka voidaan määrittää riittävän luotettavasti. Määritysraja saadaan yleensä laskemalla nollanäytteen antama pitoisuus analyytille + 10 kertaa nollanäytteen pitoisuuden keskihajonta [4, s. 32]. Määritysrajan voi laskea myös kaavan 1 tavalla seuraavanlaisesti:

$$\text{LOQ} = 10\left(\frac{\text{SD}_b}{m}\right) \quad (2)$$

2.4 Herkkyys

Menetelmän herkkyydellä tarkoitetaan sen kykyä tuottaa kahden näytteen analyytin vasteeseen muutos, kun näytteiden pitoisuudessa on eroa. Mitä herkempi menetelmä, sitä paremmin pieni pitoisuuden vaihtelu havaitaan. Tätä kuvaa kalibroitisuoran kulmakerroin, kun suora on muodostettu lineaarisen alueen arvoilla. [8, s. 28.]

2.5 Toistettavuus

Toistettavuudella tarkoitetaan menetelmällä saatujen toisistaan riippumattomien mittaustulosten pysyvyyttä, kun mittaaja on sama ja mittaus tehdään samoissa olosuhteissa, samalla laitteella lyhyellä aikavälillä [8, s. 48]. Toistettavuutta ja toistotarkkuutta voidaan arvioida mittaustulosten keskihajontaa (kaava 3) tai variansseja (kaava 4) tarkastelemalla. Joissakin tapauksissa toistettavuus voidaan ilmoittaa mittaustulosten suurimmalla odotetulla itseisarvoisella erolla jollain määritellyllä todennäköisyydellä. [9.]

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (3)$$

x_i on mittaustuloksen arvo

\bar{x} on tarkkailtavien mittaustulosten keskiarvo

n on tarkkailtavien mittaustulosten määrä. [10, s. 69.]

Tulosten vaihtelua voidaan tutkia myös käyttämällä Microsoft Office Excel -ohjelman Analysis ToolPak -lisäosan ANOVA-taulukon (analysis of variance) laskemia arvoja. Taulukko laskee valittujen dataryhmien välisen ja sisäisen vaihtelun ja tekee F-testin sillä oletuksella, että ryhmien (päivien) välinen vaihtelu voidaan selittää mittausepävarmuudesta johtuvana.

Varianssi voidaan laskea seuraavalla tavalla:

$$\text{Varianssi} = s^2 \quad (4)$$

s on mittausten keskihajonta. [10, s. 69.]

Suhteellinen keskihajonta saadaan seuraavalla kaavalla:

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \% \quad (5)$$

s on keskihajonta. [10, s. 69.]

2.6 Mittausepävarmuus

Mittaustulokseen liittyy aina epävarmuutta, jota aiheutuu jokaisessa näytteenkäsittelyn ja analyysin vaiheessa [11, s. 4]. Mittausepävarmuutta voidaan ilmaista tulosten keskihajonnalla (standardiepävarmuus) tai se voidaan ilmoittaa jollakin luottamustasolla (yleensä 95 %). [11, s. 24.]

Jokaisella suoralta lasketulla pitoisuudella on epävarmuus, joka voidaan laskea seuraavalla kaavalla:

$$s_x = \frac{s_y}{|m|} \sqrt{\frac{1}{k} + \frac{1}{n} + \frac{(y-\bar{y})^2}{m^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (6)$$

s_y on y -arvojen keskihajonta y -akselin suunnassa (residuaalin hajonta)

m on suoran kulmakerroin

k on toistomittausten määrä

n on kalibrointisuoran pisteiden määrä

y on mitatusta näytteestä saatu vaste

\bar{y} on kalibrointisuoran pisteiden vasteiden keskiarvo

x_i on kalibrointisuoran pisteen pitoisuus

\bar{x} on kalibrointisuoran pisteiden pitoisuuksien keskiarvo. [10, s. 89.]

Lasketun s_x -arvon avulla voidaan laskea saadun pitoisuuden luottamusväli halutulla todennäköisyydellä (95 % on laajennettu epävarmuus) seuraavalla kaavalla:

$$ts_x \quad (7)$$

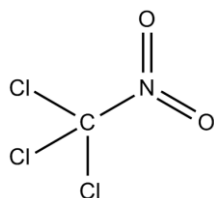
t on studentin taulukon arvo vapausasteella $n - 2$ ja valitulla luottamustasolla. [10, s. 89.]

Tulos ilmoitetaan muodossa $x \pm ts_x$.

3 Tutkittavat yhdisteet

3.1 Klooripikriini

Klooripikriini (trikloorinitrometaani, CCl_3NO_2 , 164,38 g/mol, CAS: 76-06-2) on huoneenlämmössä väritön öljymäinen neste, jolla on pistävä haju. Klooripikriinin höyrynpaine on 20 °C:ssa 18,3 mmHg, kiehumispiste normaalipaineessa 112 °C ja liukoisuus veteen on n. 2,2 g/l. [12, s. 156.] Kuvassa 1 on esitettyä trikloorinitrometaanin molekyyli rakenne ja moolimassa.



M: 164.38

Kuva 1. Klooripikriinin molekyyli rakenne (trikloorinitrometaani).

Klooripikriinin alimman oireita aiheuttavan pitoisuuden (lievän altistumisen) vaikutukset ovat silmien ärsyntyminen ja refleksinomainen sulkeutuminen, kyynelnesteen tuoton voimakas lisääntyminen (lakrimaatio), yskiminen ja hengenahdistus. Pitoisuuden kasvaessa (vakava altistus) silmien pysyvä vaurio on mahdollinen. Myös pahoinvointia, päänsärkyä, ihon ärsyntymistä ja huimausta esiintyy. Hengitysteiden ärsyntyneisyys lisääntyy ja johtaa edelleen vakavaan tulehtumiseen ja lopulta kuolettavaan nesteen kerääntymiseen keuhkoihin (keuhkoödeema). [13.]

Klooripikriini syntetisoitiin ensimmäisen kerran vuonna 1848 ja se patentoitiin hyönteismyrkyksi vuonna 1908 [3]. Ensimmäisessä maailmansodassa sitä käytettiin kyynelkaasuna ja ammuksissa sekoitettuna esimerkiksi fosgeenin kanssa. Klooripikriiniä käytettiin sekoituksissa, koska se aiheutti voimakasta pahoinvointia ja sitä suodattavia hengityssuojaimia oli vielä tuolloin vaikea kehittää [1, s. 27].

Klooripikriinin pääasiallisena käyttötarkoituksena on viime vuosikymmeninä ollut kuitenkin torjunta-aineena. Sitä on käytetty mm. USA:ssa hyönteisten, sukkulamatojen, bakteerien, sienien ja tuhoeläinten hävittämiseen viljelysmaista ja säilytetystä viljasta. [1; 14.] Vuonna 1997 klooripikriiniä käytettiin yhdysvalloissa maanviljelyyn liittyen n. 6,3 miljoonaa kg [15] ja vuonna 2007 n. 4,5 miljoonaa kg [16].

Klooripikriinin käyttö nisäkkäiden hävittämiseen on kyseenalaistettu Australiassa ja Uudessa Seelannissa sen aiheuttamien kärsimysten vuoksi, eikä sitä enää nykyisin ole rekisteröity selkärankaisten torjumiseen USA:ssa. EU:ssa klooripikriiniä sisältävien tuotteiden myynti on kielletty kesäkuun 2012 jälkeen, ja niiden säilytys ja käyttö ei ole ollut 23.6.2013 jälkeen luvallista. [14; 17.] Tuholaistorjunnassa kemikaalia on käytetty tehokkuutensa lisäksi myös laimeana varoituskaasuna ennen varsinaisen torjunta-aineen levittämistä, sillä klooripikriini aiheuttaa jo pieninä pitoisuuksina helposti huomattavaa hajua ja alle hajuaistimuksen tuottavalla pitoisuudella se aiheuttaa silmien

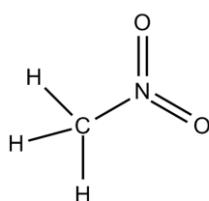
ärsyntymistä [12]. Jollekin haitallisemmalle tai vaikeammin huomattavalle aineelle tarkoituksettoman altistumisen todennäköisyyttä saadaan näin laskettua. [18.]

Klooripikriiniä on todettu syntyvän pieniä määriä myös juomaveden kloorauksen seurauksena muiden haihtuvien sivutuotteiden ohella. Yhdysvaltain ympäristönsuojeluvirasto USEPA (United States Environmental Protection Agency) on asettanut juomaveden kokonaistrihalometaanipitoisuudelle 80 µg/l:n enimmäispitoisuuden [19]. Trihalometaanien kokonaispitoisuudelle on monissa maissa asetettu ohjearvoja välillä 25-250 µg/l [20].

Klooripikriini hajoaa lämmön vaikutuksesta pääasiassa typpioksideiksi ja fosgeeniksi. Myös hiilitetrakloridia ja hiilimonoksidia muodostuu [21]. Luontoon levitetyn klooripikriinin pääasiallinen hajoaminen tapahtuu valon vaikutuksesta. Fotolysin seurauksena syntyy kloorikaasua ja typen oksideja. Kloori voi vielä edelleen reagoida ilmakehän muiden orgaanisten yhdisteiden kanssa ja muodostaa sitä kautta otsonia. [22.]

3.2 Nitrometaani

Nitrometaani (CH_3NO_2 , 61,04 g/mol, CAS: 75-52-5) on väritön ja hajuton, syttyväksi luokiteltu neste. Sen kiehumispiste on normaalipaineessa 101 °C ja höyrynpaine 20 °C:ssa on 27,3 mmHg. Se on tehokas typen luovuttaja, ja on sen vuoksi paljon käytetty orgaanisissa synteeseissä lääkeaineiden ja maatalouskemikaalien valmistukseen. Nitrometaania käytetään myös polttoaineena erityisesti kiihdytysautoissa ja muissa moottorin suorituskykyä parantavissa polttoainesekoituksissa. [23.] Kuvassa 2 on esitettyä nitrometaanin molekyyli rakenne ja moolimassa.



M: 61.04

Kuva 2. Nitrometaanin molekyyli rakenne.

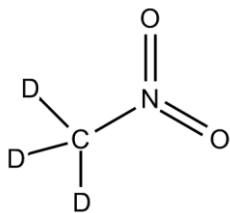
Nitrometaani on räjähdysherkkä kemikaali, erityisesti nestemäisenä suljetuissa tiloissa, joissa räjähdysten voi aiheuttaa riittävän voimakas paineaalto. Lisäksi nitrometaani muodostaa räjähdysherkkiä suoloja voimakkaiden emäksien ja etenkin raskasmetallijäämien läsnäollessa [24]. Nämä seikat asettavat huomattavia rajoituksia nitrometaanin valmistukselle, käytölle ja kuljetukselle.

Nitrometaania pidetään yhtenä klooripikriinin metaboliatuotteista. Klooripikriinin on hiirikokeissa todettu metaboloituvan virtsaan ja ulosteeseen ainakin tiofosgeeniksi sekä kloorin luovuttaneeksi dikloorinitrometaaniksi, kloorinitrometaaniksi ja nitrometaaniksi. Lisäksi on todettu, että *in vitro* -kokeissa klooripikriini metaboloituu nopeasti kloorin luovuttaneeksi tuotteeseen ja NADPH:n (nikotiinadeniiniidinukleotidifosfaatti) lisääminen reaktioseokseen kiihdyttää tuotteiden syntymistä. [25.] Nitrometaani ei kuitenkaan yksistään täysin vahvasta klooripikriinille altistumista, sillä nitrometaania muodostuu elimistössä peroksinitriitin vaikutuksesta [25] ja myös muiden halonitrometaanien metaboliatuotteina.

Isotooppileimattu nitrometaani

Isotooppileimattuja kemikaaleja käytetään usein sisäisenä standardina (ISTD, internal standard) analyysimenetelmien kehityksessä. Näissä leimatuissa yhdisteissä on käytetty yhden tai useamman atomin muuta stabiilia luonnossa vähemmän esiintyvää isotooppia. Isotooppileimatut ja leimaamattomat yhdisteet ovat kemiallisilta ja fysikaalisilta ominaisuuksiltaan hyvin samanlaisia, minkä vuoksi leimattu molekyyli käyttäytyy analyysin aikana lähes samalla tavalla kuin leimaamaton. Tämä on toivottu ominaisuus sisäiseltä standardilta, jos analyysimenetelmä pystyy erottamaan sen ja analyytin vasteet toisistaan. [26, s. 34.]

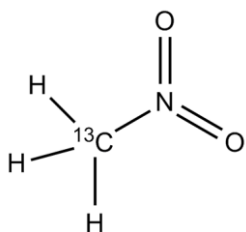
Opinnäytetyössä käytetyt isotooppileimatut analyytit olivat deuteroitu nitrometaani (D_3CNO_2 , 64,06 g/mol) ja ^{13}C -leimattu nitrometaani ($^{13}CH_3NO_2$, 62,03 g/mol). Deuterium on vedyn isotooppi, jossa on protonin lisäksi yksi neutroni. Deuteriumin atomimassa on 2.014 amu:a (atomic mass unit) ja sen esiintyvyys luonnossa on n. 0.015 atomi- % [27]. Kuvassa 3 on esitettyä deuteroidun nitrometaanin rakenne ja moolimassa.



M: 64.06

Kuva 3. Deuteroidun nitrometaanin molekyyli rakenne.

^{13}C -nitrometaanin metyyliryhmän hiili on hiilen stabiilia isotooppia 13. Tässä isotoopissa on kuuden neutronin sijasta seitsemän neutronia, ja koska molekyylissä on vain yksi hiili, on yhdisteen massaluku yhden yksikön suurempi kuin ^{12}C -nitrometaanin (kuva 4). Luonnossa esiintyvistä hiilestä n. 1,1 % on ^{13}C -isotooppia.



M: 62.03

Kuva 4. ^{13}C -nitrometaanin molekyyli rakenne.

4 *In vitro* -menetelmät

In vitro (latinaksi ”lasissa”) -menetelmillä tarkoitetaan elimistön ulkopuolella tehtäviä kokeita, joissa mallinnetaan jossakin elimessä tapahtuvia luonnollisia aineenvaihduntareaktioita hyvin rajatussa ympäristössä. Aineiden toksikologisissa tutkimuksissa saadaan *in vitro* -menetelmien avulla tietoa esimerkiksi aineen toimintamekanismista [28] tai/ja solumetaboliasta [29]. Uusien lääkkeiden kehityksessä *in vitro* -tutkimukset ovatkin ensimmäisiä kokeita lääkeaineen soveltuvuuden selvittämiseksi [29].

In vitro -kokeet ovat eettisesti hyväksytympiä kuin elävillä eläimillä tehtävät kokeet (*in vivo*), vaikkakaan ne eivät aina voi korvata koe-eläimen käyttöä. Sen lisäksi niiden

avulla saadaan spesifisempää tietoa aineiden vaikutuksista tai toiminnasta solutasolla yksinkertaistetussa ympäristössä. [30.]

Maksasolujen entsyymaattista toimintaa hyödyntäviä toksikologisia *in vitro* -menetelmiä on erilaisia. Kokonaisista elimistä eristettyjen tai viljeltyjen maksasolujen, ja niistä tehtyjen entsyymifraktioiden käyttö on usein [29] *in vitro* -näytteissä käytetty tekniikka. Soluista saadaan eroteltua eri tyyppisiä entsyymifraktioita sentrifugoimalla maksasoluhomogenaattia eri nopeuksilla. Entsyymifraktioiden avulla saadaan tietoa solun biokemiallisista reaktioista.

Työssä käytetty maksaentsyymifraktio, S9, on valmistettu sentrifugoimalla maksasoluhomogenaattia 9000 g:llä. S9 -fraktio sisältää sekä mikrosomit että sytosolin (solunesteen). Mikrosomit ja sytosoli sisältävät suuren osan solun aineenvaihdunta-entsyymeistä. *In vitro* -kokeet tehdään pääosin fosfaattipuskurissa, pH:ssa 7,4. Tällä mallinnetaan solun sisäistä ympäristöä ja solunestettä.

Entsyymireaktioiden edistämiseksi *in vitro* -koeseokseen lisätään ylimäärin soluissa jo ennestään olevia glutationia (GSH) ja NADPH:ta. Glutationi on soluissa esiintyvä tripeptidi, joka koostuu glutamaatista, kysteiinistä ja glysiinistä [31, s. 450]. Glutationi on tärkeä osa solun suojautumismekanismeja vapaista radikaaleista aiheutuvia vaurioita vastaan. Hapettuessaan glutationi ei pysty suojaamaan solua yhtä hyvin kuin pelkistyneenä. [31, s. 445.] NADPH pystyy pelkistämään hapettuneen glutationin ja on siten myös tärkeä osa solun suojautumismekanismeja vapaita radikaaleja vastaan. [31, s. 450.]

5 Analyysimenetelmät

5.1 Kaasukromatografia

Kaasukromatografia (GC) erotustekniikkana orgaanisessa analytiikassa perustuu yhdisteiden erilaisiin jakautumisvakioihin stationäärifaasin ja valitun liikkuvan faasin välillä. Kapillaarikaasukromatografiassa stationäärifaasi on polyimidikapillaarin sisäpinnan peittävä viskoosi polymeeri. Yleisimmin käytettyjä polymeerejä ovat polysiloksaanit, polyfenolieetterit ja polyetyleeniglykolit. Stationäärifaasi valitaan analyttien mukaan (poolinen stationäärifaasi poolisille analyteille). [26, s. 77.]

Kaasukromatografi -laitteiston pääkomponentit ovat injektori, kolonniuuni ja detektori. Analysoitava näyteliuos (tai kaasu) syötetään ruiskulla injektoriin, jossa se höyrystetään ja injektointitekniikasta riippuen osa näytteestä päätyy kolonniin kantajakaasun (liikkuvan faasin) mukana. Injektointitekniikoita on monia, ja valinnalla on suuri merkitys esimerkiksi menetelmän herkkyyteen ja toistettavuuteen [26, s. 92].

Injektorista näytekomponentit siirtyvät kolonniin, jossa varsinainen erottuminen tapahtuu. Yhdisteiden jakaantumismvakioon faasien välillä voidaan vaikuttaa lämpötilaa muuttamalla. Lämpötila lisää yhdisteiden kineettistä energiaa kolonnissa, jolloin todennäköisyys molekyylin siirtymiselle stationäärifaasista kaasufaasiin kasvaa. [26, s. 74.] Liikkuvana faasina kaasukromatografiassa käytetään yleensä vetyä (H₂), heliumia (He), typpeä (N₂) tai argonia (Ar).

5.2 Höyrytilatekniikka

Höyrytilatekniikassa alkuperäinen näyte laitetaan kaasutiiviiseen astiaan, niin että sillä on riittävästi tilaa kaasufaasille. Yhdisteet diffundoituvat höyrytilaan, kunnes faasien välillä on niiden suhteen tasapainotila. Höyrytilasta otetaan analysoitava osanäyte joko manuaalisesti kaasutiiviillä ruiskulla tai automaattista näytteensyöttöä käyttäen. [32, s. 2].

Yhdisteen jakaantumismvakiota faasien välillä voidaan havainnollistaa seuraavalla kaavalla:

$$K = \frac{C_s}{C_g} \quad (8)$$

C_s on pitoisuus kondensaatissa (nestemäinen tai kiinteä faasi)

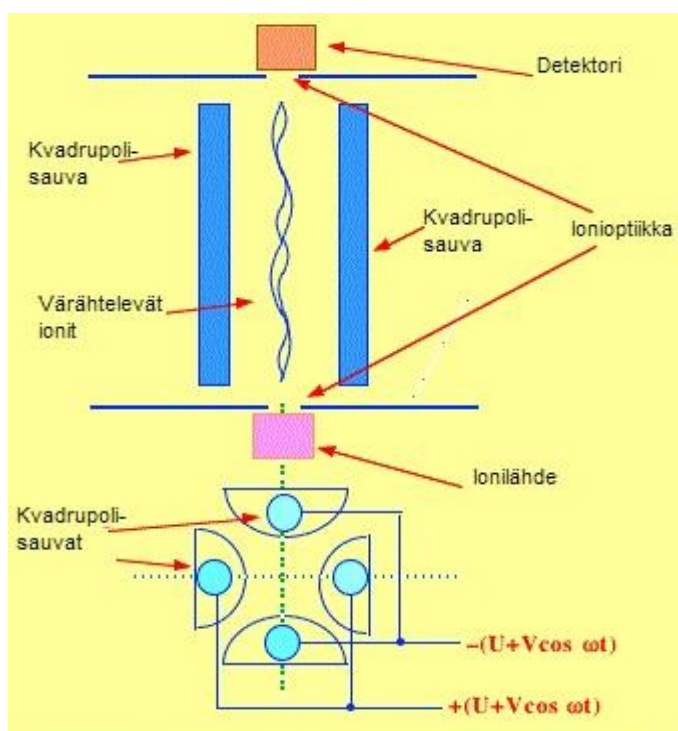
C_g on pitoisuus kaasufaasissa. [32, s. 15.]

Höyrytilatekniikoissa haihtumattomat komponentit eivät päädy laitteistoon eivätkä siten aiheuta häiriöitä. Höyrytilatekniikoissa ei useinkaan tarvitse erillistä näytteenkäsittelyä analyttien siirtämiseksi matriisista toiseen, mikä nopeuttaa ja yksinkertaistaa analyysiä. Edellä lueteltujen seikkojen vuoksi höyrytilakaasukromatografia (HS-GC) on usein käytetty höyrystyvien yhdisteiden analyysitekniikka.

Höyrytilamenetelmässä analyytin tasapainotilaan faasien välillä pyritään vaikuttamaan niin, että höyrytilaan saataisiin mahdollisimman suuri pitoisuus tutkittavaa analyyyttiä näytteen määritysrajan alentamiseksi. Pitoisuuteen höyrytilassa vaikuttavat näytematriisin tilavuus (verrattuna kaasufaasin tilavuuteen), lämpötila sekä näytematriisin ominaisuudet kuten suolapitoisuus. [32, s. 19.] Lämpötilan vaikutus höyrynpaineeseen on eksponentiaalinen [32, s. 20] ja on siten tärkeä menetelmän havaitsemiskykyyn vaikuttava parametri.

5.3 Massaspektrometria

Massaspektrometriassa näytteen sisältämät yhdisteet ionisoidaan positiivisiksi tai negatiivisiksi ioneiksi, jotka ohjataan valitun varauksen mukaisesti massa-analysaattoriin. Massaerottelutekniikoista yleisimmin käytetty on kvadrupoli-massaspektrometria, jossa analysaattorina toimii neljän rinnakkaisen metallisauvan muodostama kokonaisuus. Kuvassa 5 on esitettyä kvadrupolisauvastosta esimerkki kaavakuvana.



Kuva 5. Kaavakuva kvadrupolisauvastosta [33].

Kvadrupolin metallisauvat on kytketty sähköisesti niin, että vastakkaiset sauvat muodostavat parin. Toiseen sauvapariin johdetaan positiivinen tasajännite ja toiseen pariin negatiivinen tasajännite. Lisäksi kumpaankin sauvapariin johdetaan radiotaajuuksinen vaihtojännite, joka on 180 asteen vaihe-erossa näiden sauvaparien välillä. [26, s. 49.] Sauvaparien jännitteiden potentiaaleja sekä vaihtojännitteen taajuutta muuttamalla saadaan eri massa/varaus-suhteiset (m/z) ionit vuorotellen ohjautumaan detektorille ajan funktiona stabiiliin lentoradan ansiosta [34, s. 48].

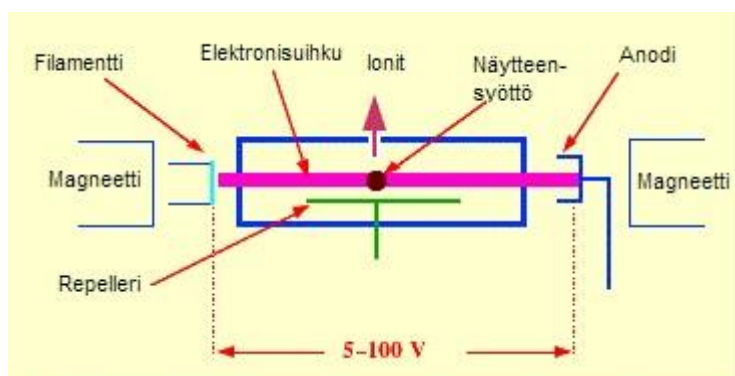
Kun kvadrupolissa erotellaan koko valitun m/z -alueen ionit, muodostuu kokonaisonivirta (TIC, total ion current) -kromatogrammi, jossa on esitettyä kaikkien detektorille päätyneiden ionien yhteenlaskettu intensiteetti ajan funktiona [35, s. 200]. Mitä suurempi m/z -arvojen alue kvadrupolille säädetään erotettavaksi, sitä harvemmin se kykenee erottamaan yksittäisen ionin detektorille, mikä johtaa siihen, että tietyn ionin havaitsemisherkkyys laskee [36].

Toisaalta voidaan valita tietyt m/z -ionit, jotka kvadrupoli erottaa koko analysaattorille tulevasta ionivirrasta. Valittujen ionien seurannassa (SIM, selected ion monitoring) saadaan herkkyys seurattaville ioneille huomattavan paljon paremmaksi, koska kvadrupolilta ei kulu muiden ionien erottamiseen aikaa ja kromatogrammiin saadaan näin valituille ioneille enemmän mittauspisteitä. Lisäksi signaali/kohina-suhde (S/N) suurenee. Tuloksena saatava kromatogrammi on valittujen ionien kokonaisonivirta ajan funktiona. [37].

Elektroni-ionisaatio

Yhdisteiden erottuminen toisistaan ja liikkuminen massaspektrometrin sisällä perustuu siihen, että yhdisteet ovat ionisoituneessa muodossa. Varaukseltaan neutraalien molekyylien elektroni-ionisaatio (EI) tapahtuu ionilähteessä. Filamentin läpi johdettu sähkövirta kuumentaa metallin, ja elektronien lämpövärähtelyn lisääntyä siitä irtoaa elektroneja (termioninen emissio) [38]. EI:ssä irronneet elektronit kiihdytetään yleensä 70 eV:n kineettiseen energiaan ja osa niistä törmää näytemolekyyliin. Törmäyksessä molekyylistä irtoaa elektroni, jolloin siitä tulee positiivisesti varautunut ioni. Ionille jää yleensä vielä ylimääräistä energiaa, jolloin se hajoaa kahdeksi pienemmäksi osaksi, joista toisella on positiivinen varaus. [39, s. 124.]

Positiivisesti varautunut molekyyli työnnetään positiivisesti varatun elektrodin (repeller plate) avulla varsinaiselle analysaattorille – esimerkiksi kvadrupolille. [39, s. 124]. Kuvassa 6 on esitettyä esimerkki elektroni-ionisaatio -ionilähteestä kaavakuva.



Kuva 6. Elektroni-ionisaatio -ionilähteen kaavakuva [40].

6 Työn kokeellinen osuus

6.1 Laitteet, tarvikkeet ja reagenssit

Taulukkoon 1 on koottu työssä käytetyt laitteet, tarvikkeet ja reagenssit sekä niiden mallit, ominaisuudet ja valmistajat.

Taulukko 1. Käytetyt laitteet, tarvikkeet ja reagenssit.

Laitteet	Valmistaja, Malli, Ominaisuudet			
kaasukromatografi kolonni	Agilent 6890N Agilent J&W, DB5-ms; dimensiot: 30 x 0,25 x 0,25 (m x mm x μ m)			
kantajakaasu massaspektrometri	Helium, AGA, puhtaus: 4.6 (99,996 %) Agilent Technologies 5975B			
analyysivaaka	Mettler Toledo, AG204			
pH-mittari	Mettler Toledo, MP225			
lämpöhaude	Labnet Accublock			
Tarvikkeet	Valmistaja, Malli, Ominaisuudet			
kaasutiivis ruisku	Hamilton, Sample Lock, 500 μ l			
GC -ruisku	Hamilton, Manual injection, 10 μ l			
höyrytilänäytepullo	Supelco, 2 ml			
näytepullon korkki	Supelco, Alumiininen septumilla (teflon-silikoni-teflon)			
automaattipipetti	Transferpettor, 5-50 μ l (lasikapillaari)			
automaattipipetti	Transferpettor, 20-100 μ l (lasikapillaari)			
automaattipipetti	Finnpipette, 100-1000 μ l			
Reagenssit	Kaava	Puhtaus	Valmistaja	CAS
klooripikriini	CCl_3NO_2	99,0 %	Fluka	76-06-2
nitrometaani	$^{13}\text{CH}_3\text{NO}_2$	98,5 %	Sigma Aldrich	75-52-5
D_3 -nitrometaani	CD_3NO_2	99 atomi % D	Sigma Aldrich	13031-32-8
^{13}C -nitrometaani	CH_3NO_2	99 atomi % ^{13}C	Sigma Aldrich	32480-00-5
dimetyylisulfoksidi	$\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$	99,5 %	Lab-Scan	67-68-5
dikloorimetaani	CH_2Cl_2	99,8 %	Merck	75-09-2
UHQ -vesi	H_2O	18 M Ω		
Fosfaattipuskuri	0,1 M; pH 7,4; MgCl_2 3 mM			
monokaliumfosfaatti	KH_2PO_4	99,0 %	Sigma Aldrich	7778-77-0
dikaliumfosfaatti	K_2HPO_4	99,0 %	Sigma Aldrich	7758-11-4
magnesiumkloridi	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		Merck	7791-18-6

6.2 Standardiliuosten valmistus

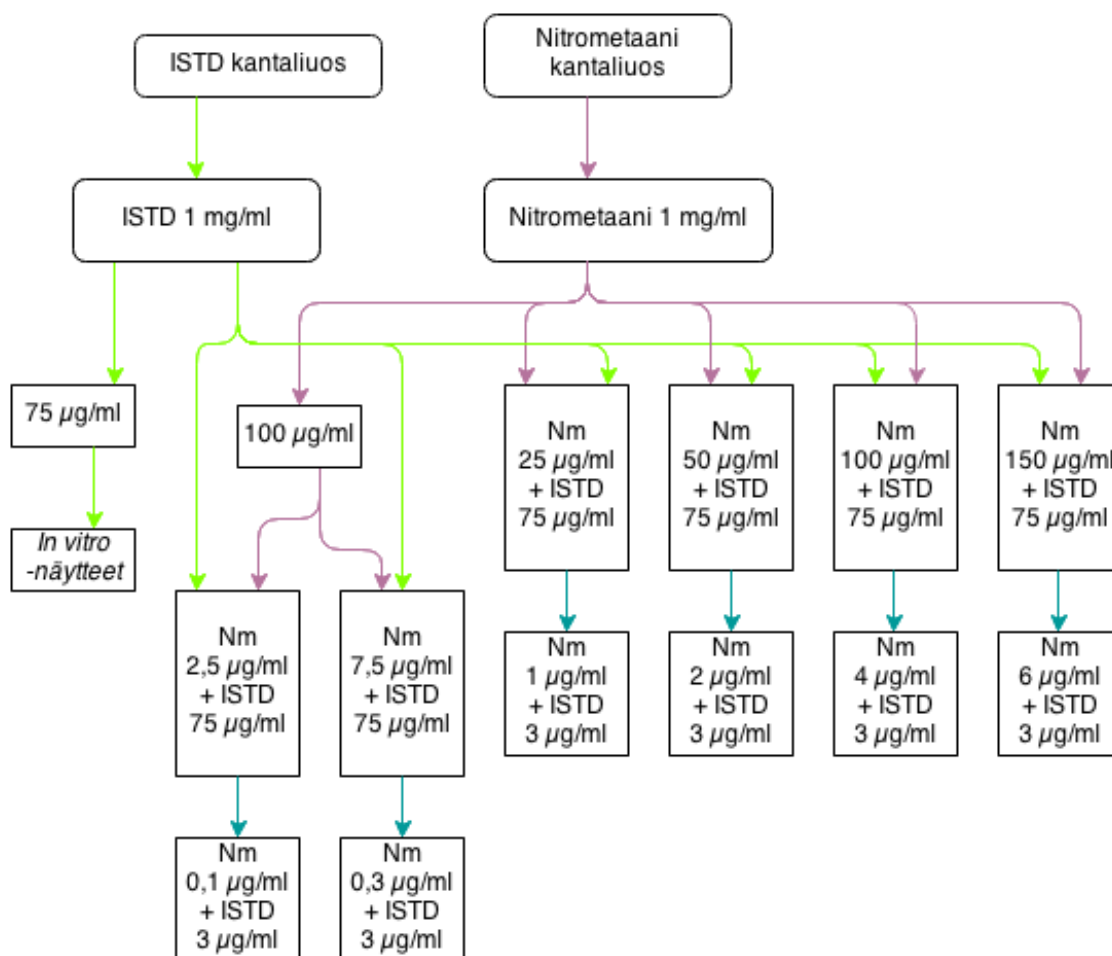
Työ aloitettiin tekemällä kantaliuokset kummastakin puhtasaineesta. Kantaliuokset tehtiin 1 ml:n mittapulloihin ja siirretty määrä puhtasainetta punnittiin. Punnittu määrä laimennettiin dimetyylisulfoksidilla (DMSO) 1 ml:ksi. Molemmista kantaliuoksista tehtiin tämän jälkeen 1 mg/ml:n välilaimennokset.

Kaikissa standardiliuosten laimennoksissa käytettiin liuottimena DMSO:a ja kaikki standardiliuokset tehtiin 1 ml:n mittapulloihin.

Sisäisen standardin välilaimennoksesta tehtiin 75 µg/ml:n vahvuinen liuos *in vitro* -näytteisiin lisättäväksi ja nitrometaanin välilaimennoksesta tehtiin vielä 100 µg/ml:n laimennos, josta valmistettiin standardisuoran kahden alimman pitoisuuden spiikkausliuokset.

Sisäisen standardin 1 mg/ml:n liuosta lisättiin kaikkiin spiikkausliuoksiin 75 µl. Neljään vahvimpaan pitoisuuteen lisättiin nitrometaanin 1 mg/ml:n liuosta 25, 50, 100, 150 µl ja kahteen laimeimpaan pitoisuuteen lisättiin 100 µg/ml:n liuosta 25 ja 50 µl.

Jokaista spiikkausliuosta lisättiin 10 µl:aa näytepulloihin, joihin oli valmiiksi pipetoitu 250 µl fosfaattipuskuria. Standardisuoran mittausliuosten pitoisuudet olivat: 0,1; 0,3; 1; 2; 4; 6 µg/ml. Lisäyksen jälkeen näytepullo suljettiin teflon/silikoni-septumilla varustetulla alumiinikorkilla. Kuvassa 7 havainnollistetaan liuosten valmistusta.



Kuva 7. Standardiliuosten valmistuskaavio. Nm tarkoittaa nitrometaania.

6.3 Menetelmän kehitys

Menetelmän kehityksen alussa ajettiin GC-MS-erotus nitrometaanin ja deuteroidun nitrometaanin puhtasaineista. Myös klooripikriini dikloorimetaanissa analysoitiin. Kokonaisonivirran kromatogrammista (TIC) saatiin selville yhdisteiden retentioajat ja massaspektreistä valittiin kvantitointi-ionit sekä tunnistusionit SIM:iä varten. Taulukossa 2 on lueteltuna analyttien retentioajat sekä spektreistä valitut ionit.

Taulukko 2. Puhdasaineiden retentioajat ja m/z-ionit. Vahvin fragmentti on alleviivattu.

Analyytti	Retentioaika (min)	Vahvimmat ionit (m/z)	Valitut ionit (m/z)	Mitatut suhteelliset runsaudet
Klooripikriini	5,4	121, 117, 82	121, <u>117</u> , 82	82: 33 %; 121: 30 %
D ₃ -Nitrometaani	2,2	<u>64</u> , 48, 30	<u>64</u> , 48, 30	30: 81 %; 48: 12 %
Nitrometaani [¹³ C]	2,2	<u>61</u> ,46,30 <u>[62]</u>	<u>61</u> ,46,30 <u>[62,(46,30)]</u>	30: 77 %; 46: 50 % [30: 80 %; 46: 60 %]

Koska analyytin jakautuminen ja konsentraatio kaasufaasissa riippuu lämpötilasta, näytteitä lämmitettiin 70 °C:seen 20 minuuttia. Näytteiden termostoimiseen käytettiin lämmitysblokkia, jossa oli 20 näytekaivoa 2 ml:n näytepullolle. Näytekaivoissa pidettiin vettä lämmön siirtymisen parantamiseksi, mutta sen tarpeellisuutta ei tutkittu. Hauteen lämpötilaa säädettiin elohopealämpömittarin osoittaman arvon mukaisesti.

Termostointia optimoitiin vertailemalla kolmen pitoisuuden ulkoisen standardin suoria ja vasteita eri lämpötila- ja aika-asetuksilla. Näytematriisina käytettiin puhdistettua (UHQ, ultra high quality) vettä. Spiikkausliuottimena oli asetonitriili ja osassa DMSO. Asetonitriiliä käytettiin sen vuoksi, että se oli kokeilun vuoksi vaihtoehtona DMSO:lle.

Termostointiajaksi ja lämpötilaksi valitut 20 min ja 70 °C olivat kompromissi, koska lämmitysblokin kaivoissa ollut vesi haihtui ja pidemmällä ajalla tai korkeammalla lämpötilalla sitä olisi pitänyt lisätä kesken termostoitumisen ja veden lisääminen olisi vaikuttanut lämpötilaan. Vettä tosin lämmitettiin blokin vapaissa kaivoissa termostoinnin aikana ja sisäisellä standardilla saatiin suurin osa näistäkin vaihteluista poistettua.

Koska näytteiden tilavuus oli ennalta määrätty 250 µl, ei faasien tilavuuksien suhteen muuttamisen vaikutusta erikseen tutkittu.

6.4 GC-ajoparametrit

Seuraaviin kaasukromatografian parametreihin päädyttiin testimittausten perusteella. Taulukossa 3 on esitettyä injektorin asetukset.

Taulukko 3. Injektorin asetukset.

Injektori	
jakoinjektio	
lämpötila	250 °C
paine	0,460 bar
jakosuhde	10:1
jakovirtaus	9,9 ml/min
kokonaisvirtaus	13,7 ml/min

Uuniohjelma koottiin testimittausten perusteella niin, että nitrometaanin ja klooripikriinin vasteet saatiin selkeästi näkyviin. Alkulämpötila oli alunperin 40 °C, mutta se muutettiin 35 °C:seen, jotta nitrometaanin piikki saatiin erottumaan paremmin alkupään muista häiritsevistä piikeistä. Taulukossa 4 on esitettyä GC-uuniohjelma ja kantajakaasun virtausnopeus.

Taulukko 4. GC-uunin asetukset.

Uuniohjelma	aika (min)	
alkulämpötila	35 °C	4,00
nostonopeus	lämpötila	
15 °C/min	70 °C	6,33
jälkilämpötila	200 °C ⁽¹⁾	8,00
kaasun virtausnopeus	1,0 ml/min	

⁽¹⁾ Uuni ehtii nostaa lämpötilan 160 °C:seen, minkä jälkeen lämpötila laskee 35 °C:seen.

Kaikki parametrit löytyvät liitteestä 1.

6.5 Validointi

Menetelmän validointimittaukset suoritettiin kolmena päivänä. Työt aloitettiin injektoimalla laboratorion laatuohjeen mukaisesti laaduntarkkailunäyte (QC, quality control), jolla seurataan kolonnin toimintakuntoa sekä massaspektrometrin virityksen oikeellisuutta. QC-ajojen aikana valmistettiin saman päivän aikana mitattavat kolme sarjaa standardiliuoksia. Lisäksi jokaista standardisuoraa kohden valmistettiin testinäyte toiseksi alimman standardin pitoisuudella. Testinäytteen valmistukseen käytettiin standardipisteen spiikkausliuosta, eikä omaa erikseen tehtyä liuosta.

6.6 Manuaalinen höyrytilainjektointi

Injektoinnissa käytetty kaasutiivis ruisku ja neula huuhdeltiin ottamalla septumin läpi termostoidun näytteen höyrytilasta n. 200 µl kahteen kertaan. Näin neulaan jäänyt kuollut tilavuus ilmaa sekoittuu näytteen höyrytilaan ja aiheuttaa pienemmän häviön kaasun sisältämään nitrometaanin pitoisuuteen. Huuhtelun jälkeen ruiskuun otettiin 500 µl näytteen kaasufaasia, suljettiin kaasulukko, irroitettiin näytepullosta ja esipaineistettiin ruiskun kaasu 400 µl:aan. Välittömästi ennen injektointia avattiin ruiskun kaasulukko ja injektoitiin.

Kaasunäytteen ottamisen ja injektoinnin välinen aika pyrittiin pitämään mahdollisimman lyhyenä, koska ruiskua ei termostoitua ja kaasun kondensoituminen ruiskun sisäseinälle oli mahdollista. Mitään kondensoitumiseen viittaavaa ei kuitenkaan havaittu tapahtuvan työn missään vaiheessa ja ruiskun termostoimista ei siksi pidetty välttämättömänä.

Injektoinnin jälkeen pestiin ruisku täyttämällä ja tyhjentämällä kahdeksan kertaa huoneilmalla. Injektorin septumi vaihdettiin kahden standardisuoran mittaamisen välein, koska ruiskun neula on paksumpi ja käsin injektoitaessa septumi kuluu nopeammin.

Uuniohjelma kesti uunin jäähtyöksineen n. 15 min, jonka aikana seuraava näyte oli lämpenemässä, ja n. 5 min ennen injektointia laitettiin jonon seuraava näyte termostoitumaan.

6.7 *In vitro* -näytteet ja näytteiden käsittely

Tällä *in vitro* -kokeella oli tarkoitus tutkia klooripikriinin metaboliaa ja selvittää, syntykö siitä nitrometaania entsyymaattisissa aineenvaihduntareaktioissa. *In vitro* -näytteet oli valmistettu etukäteen Itä-Suomen yliopistolla, Farmakologian ja toksikologian laitoksella. Taulukossa 5 on havainnollistettu näytteiden koostumusta. ("+" tarkoittaa: on lisätty.)

Taulukko 5. *In vitro* -näytteiden koostumus (Itä-Suomen yliopisto).

	0_9G	0_S	1	2	3	4	5
30 mM kaliumfosfaatti puskuri pH 7,4	+	+	+	+	+	+	+
9G-supernatantti (1 mg)	+	-	+	+	-	-	+
NADPH (0,5 mM)	+	+	+	+	+	+	+
Sytosoli (1 mg)	-	+	-	-	+	+	-
Klooripikriini (10 µM) 10 µl	-	-	+	-	+	-	-
Klooripikriini (100 µM) 10 µl	-	-	-	+	-	+	+
DMSO 10µl	+	+	-	-	-	-	-
GSH (1 mM)	-	-	-	-	-	-	+

Näytteitä oli inkuboitu 1 h 37 °C:ssa, minkä jälkeen ne oli sentrifugoitu 13 400 RPM:ssa 20 min ja 1 ml:n supernatantti otettu talteen.

GC-MS-analyysiä varten 500 µl:sta otettiin 250 µl:n osanäyte. Näytteitä ei käsitelty muuten kuin siirtämällä osanäyte headspace-näytepulloon ja lisäämällä sisäinen standardi. Sisäisen standardin lisäys oli 10 µl ja pitoisuus 75 µg/ml, jolloin sen pitoisuudeksi tuli 3 µg/ml ¹³C-nitrometaania.

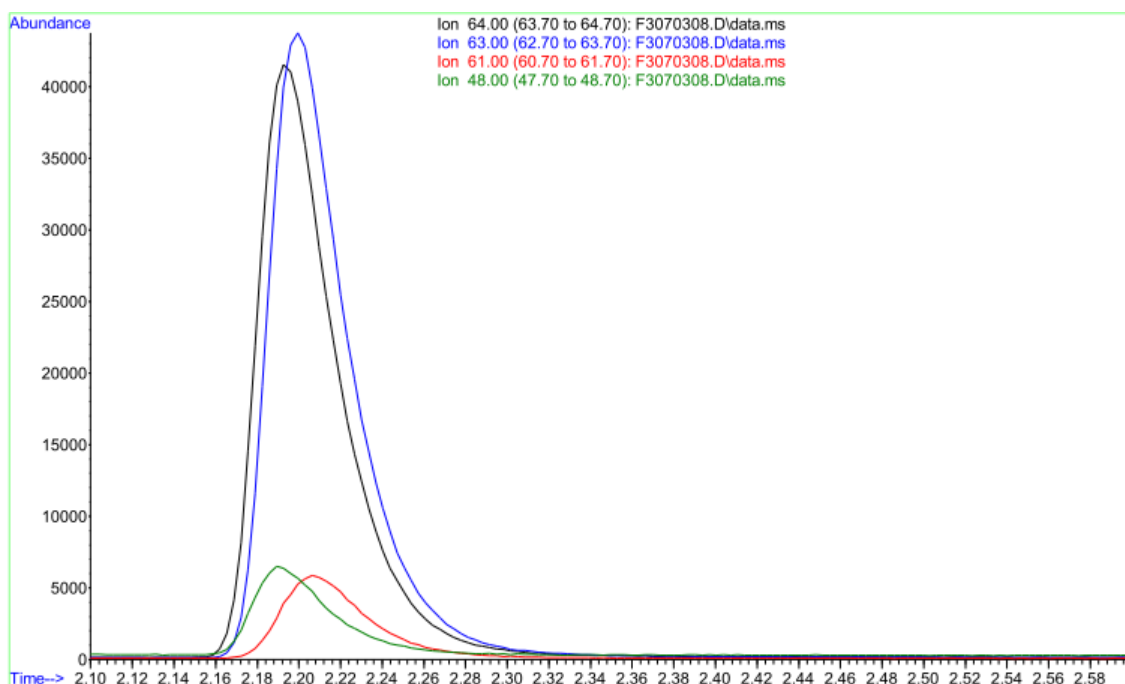
Näytteille tehtiin kaksi standardisuoraa, joita ennen mitattiin kaksi tyhjää näytettä, joista toiseen oli lisätty pelkkää DMSO:a ja toiseen sisäistä standardia.

7 Tulokset ja tulosten tarkastelu

7.1 Menetelmän kehityksen tulokset

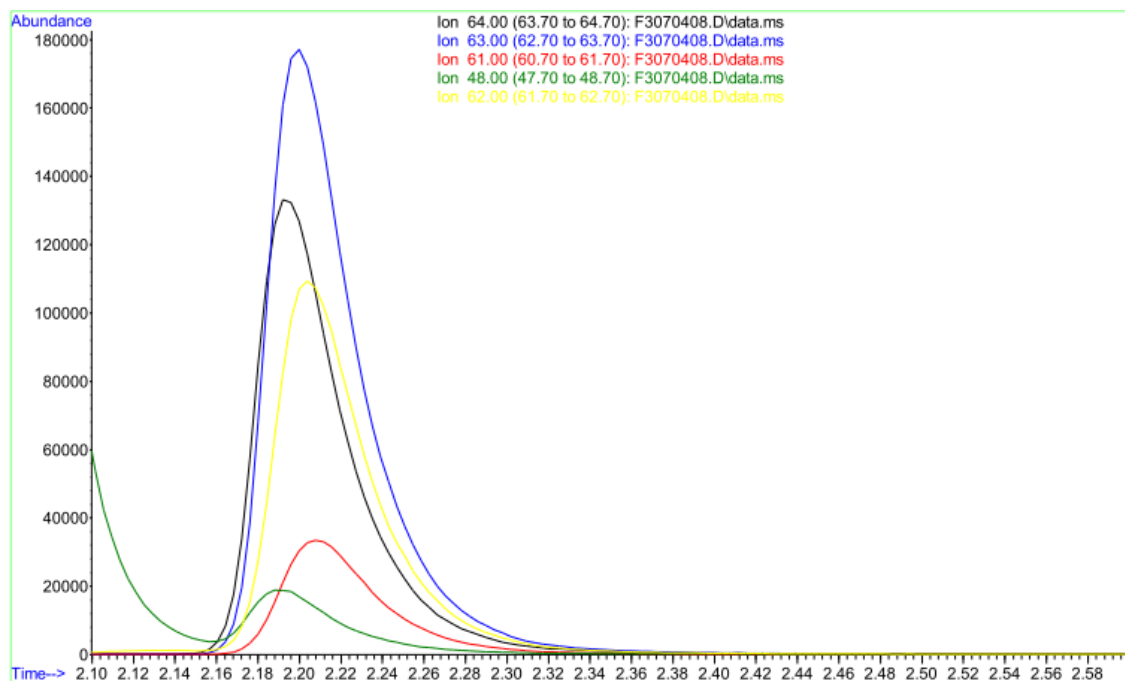
Menetelmän testaus aloitettiin käyttämällä sisäisenä standardina deutoitua nitrometaania (D_3CNO_2). Testausta varten tehtiin kuvan 7 kaavion mukaisesti höyrytilamittausliuokset ja niistä standardisuora. Testisuoran mittaustuloksista huomattiin, että sisäisen standardin antama vaste (m/z 64) oli paljon odotettua pienempi. Aluksi syyksi epäiltiin liuosten laimennosvirhettä, mutta sama toistui uudestaan valmistetuilla liuoksilla.

Myöhemmin huomattiin, että pelkästään deutoitua nitrometaania sisältävän liuoksen ionien 64, 63, 61 m/z -arvojen suhteelliset runsaudet olivat erilaiset, kuin samasta liuoksesta aikaisemmin mitatut. Asia varmistettiin vielä tekemällä kantaliuoksesta tuore laimennos, josta injektioitiin n. 0,2 μ l:aa. Liuos jätettiin yöksi huoneenlämpöön ja mittaus toistettiin. Mitattavien ionien suhteet olivat muuttuneet selvästi. Kuvassa 8 on esitettyä kantaliuoksesta tehdyn uuden laimennoksen SIM-kromatogrammi.



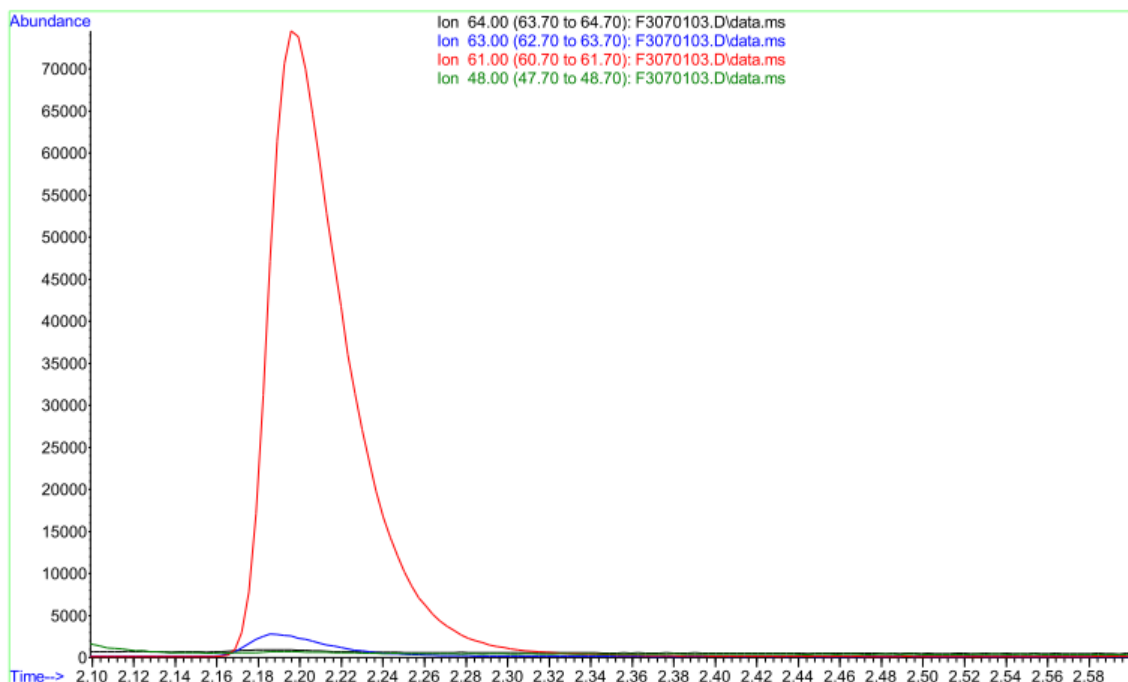
Kuva 8. Deuteroidun nitrometaanin (RT 2,20 min) SIM-kromatogrammi tuoreesta laimennoksesta.

Kuvassa 9 on esitettyä saman huoneenlämmössä säilytetyn liuoksen SIM-kromatogrammi n. 20 h myöhemmin.



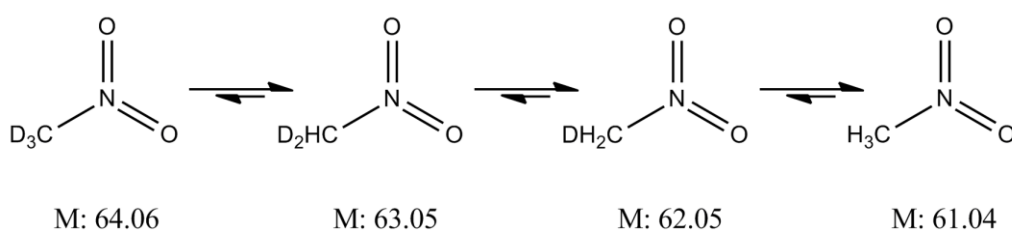
Kuva 9. Deuteroidun nitrometaanin n. 20 tuntia huoneenlämmössä säilytetyn liuoksen SIM-kromatogrammi.

Ionisuhteiden muuttuminen vedessä vaikutti tapahtuvan nopeammin ja fosfaattipuskuriin tehty kaasutilanäytteen sisäisen standardin vaste oli kadonnut täysin (kuva 10).



Kuva 10. D₃-nitrometaani ja nitrometaani 3 µg/ml fosfaattipuskurissa (kaasutilänäyte).

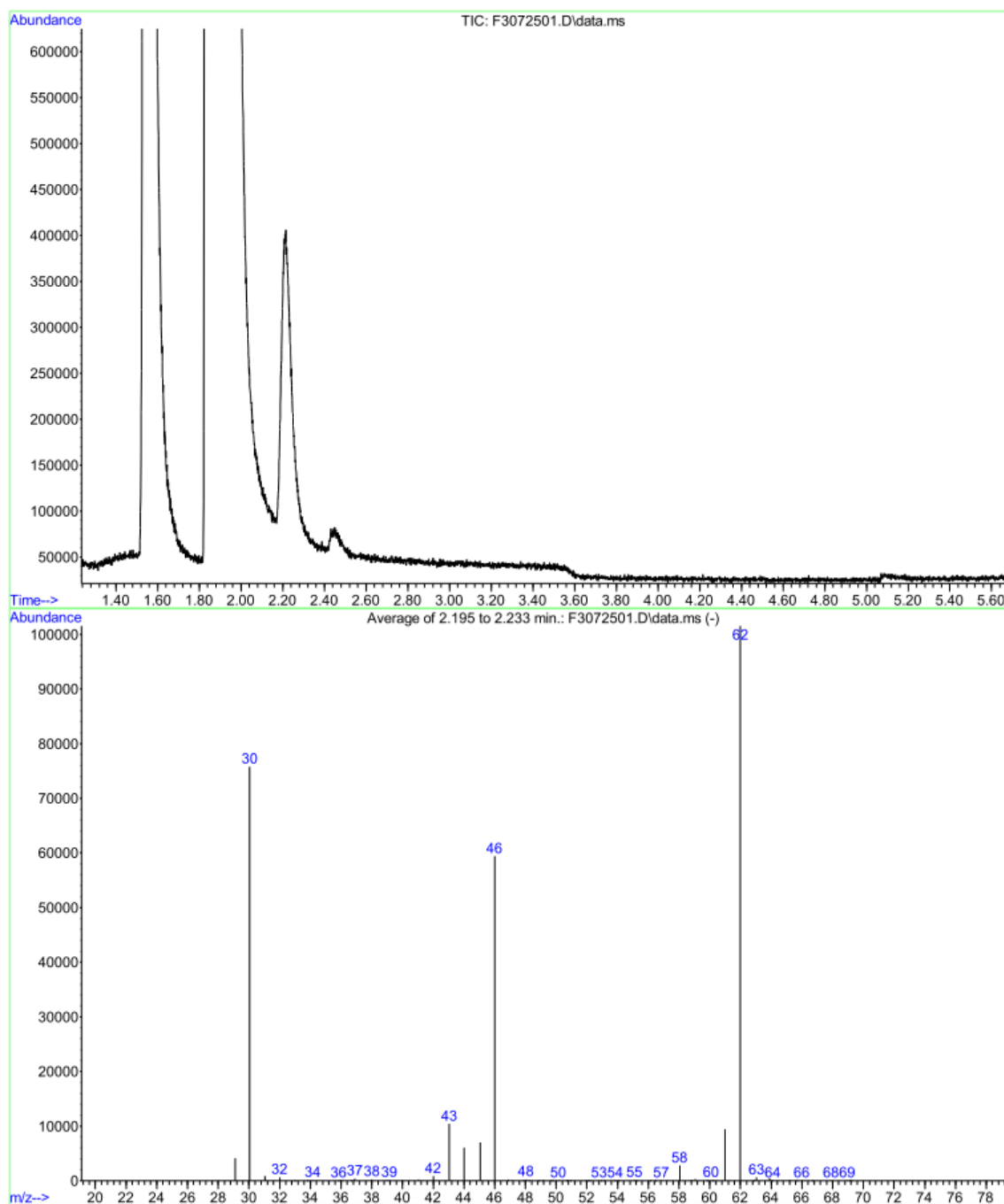
Mittaustuloksista voitiin päätellä, ettei deuteroitu nitrometaani ollut stabiili DMSO:ssa, vedessä eikä fosfaattipuskurissa. Tämä johtuu ilmeisesti siitä, että nitrometaani on lievästi hapan nitroryhmänsä vuoksi [24], jolloin pieni osa siitä on deprotonoituneessa muodossa. Tasapainotilan mukaisesti nitrometaani ottaa todennäköisimmin protonin vastaan, koska liuotuksessa olevan protiumin määrä on hyvin paljon suurempi verrattuna liuoksen sisältämään deuteriumin määrään. Kuvassa 11 on havainnollistettu deuteroidun nitrometaanin molekyyllisissä tapahtuvaa muutosta reaktion edetessä.



Kuva 11. Deuteriumin luovutus ja protiumin vastaanotto.

Havaitun kaltaista protiumin ja deuteriumin vaihtumista kutsutaan englannin kielellä nimellä deuterium-protium exchange [41].

Deuteroidun yhdisteen ongelmien vuoksi alettiin käyttämään ^{13}C -leimattua nitrometaania. Kuvassa 12 on ^{13}C -nitrometaanin 1 mg/ml:ssa DMSO-liuoksen TIC-kromatogrammi ja massaspektri.



Kuva 12. ^{13}C -nitrometaanin (RT 2,20 min) TIC-kromatogrammi ja massaspektri.

Käytetyn reagenssin puhtaus oli 99 atomi-%, joten n. 1 % sisäisestä standardista oli ^{12}C -nitrometaania. Yhdisteen yksinkertaisuudesta johtuen sisäisen standardin signaali erottuu vain yhden atomimassayksikön verran nitrometaanin signaalista. Tilanne johti

siihen, että alemmilla standardien pitoisuuksilla alkuperäinen ^{12}C -nitrometaanin signaali hukkuu sisäisestä standardista peräisin olevaan ^{12}C -nitrometaanin signaaliin. Tämä osaltaan nosti menetelmän määrittäjärajaa.

Termostointiajan ja -lämpötilan optimoimiseksi mitatuista tuloksista (liite 2) nähdään, että osassa mittaussarjoista on suurtakin vaihtelua, mikä osittain voi selittyä huonoilla lämpötila- ja aika-asetuksilla, mutta toisaalta myös injektoinnissa (ei sisäistä standardia) ja näytteen valmistuksessa tapahtuneista virheistä. Suurimmat vasteet saatiin, kun lämpötila oli asetettu $80\text{ }^{\circ}\text{C}$:seen eron ollessa $70\text{ }^{\circ}\text{C}$:n vasteisiin n. kaksinkertainen.

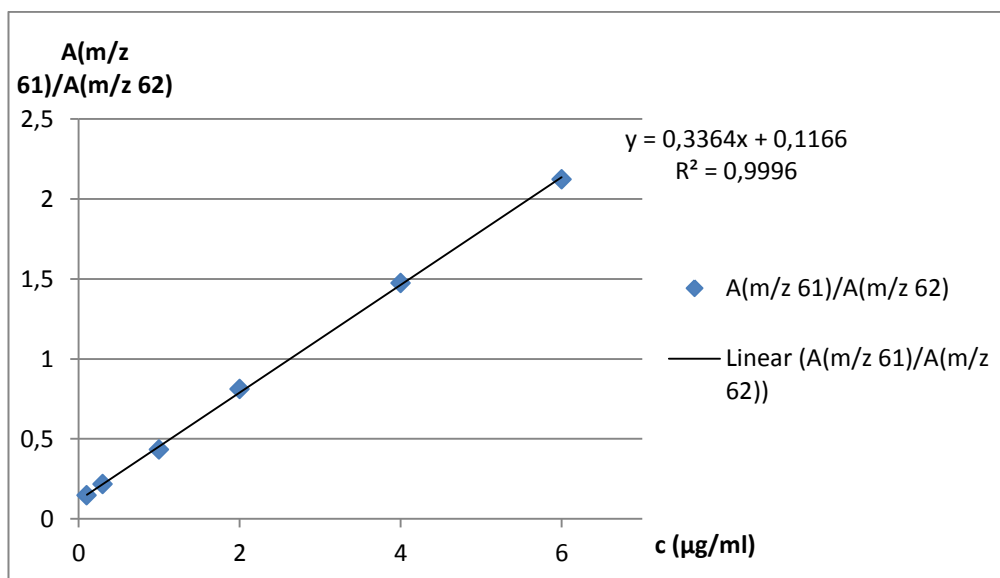
Huonoimman korrelaatiokertoimen saivat alle 20 min termostoituneet suorat, mikä voisi viitata siihen, että kunnollista tasapainotilaa ei ole ehtinyt syntyä neste- ja kaasufaasin välille.

DMSO:n ja asetoniin välisestä erosta spiikkauksen liuottimena voidaan sanoa, että DMSO:lla spiikkattujen vasteet ovat selkeästi suurempia. Eri termostointiaikoja ja lämpötiloja olisi voitu kokeilla DMSO-pohjaisillakin näytteillä, mutta tässä vaiheessa oltiin todettu, että korkeampi lämpötila haihdutti vettä liian nopeasti näytekaivoista ja 20 min oli riittävä termostoitumisaika.

7.2 Validoinnin tulokset

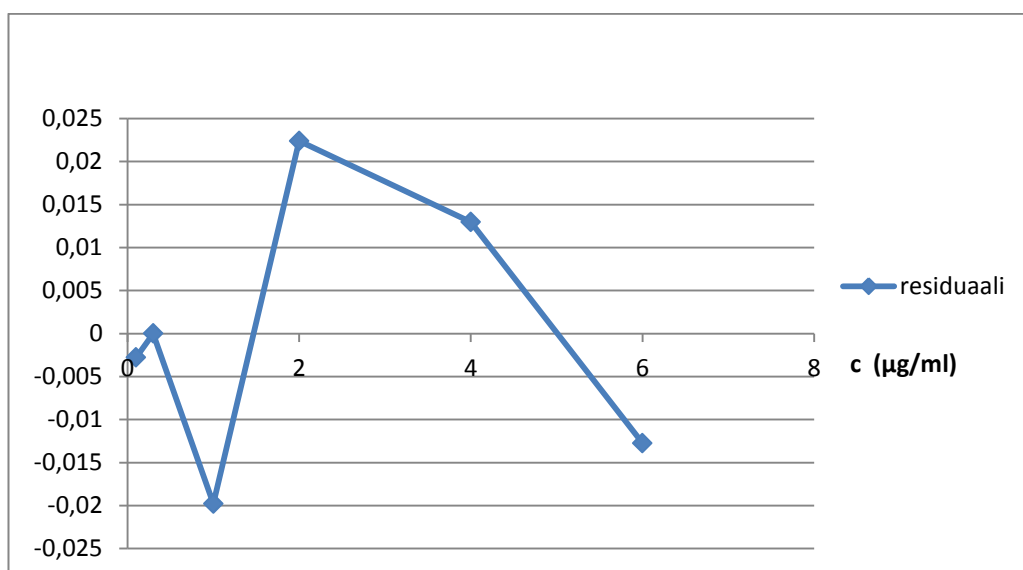
Validointimittaukset tehtiin kolmen päivän aikana ja jokaisena päivänä mitattiin kolme kalibroitamisuoraa. Manuaalinen injektointi ja näytteiden termostointi sekä analyysin pituus muodostivat tarkan aikataulun, jonka omaksumisen jälkeen mittaukset etenivät sujuvasti.

Kuvassa 13 on esitetty kolmena päivänä mitattujen yhdeksän standardisuoran tuloksista laskettujen keskiarvojen mukainen kuvaaja.



Kuva 13. Validointimittaustulosten keskiarvojen (n = 9) mukainen kalibrointisuora.

Kuvassa 14 on esitettyä kuvan 13 suoran residuaalikuvaaja.



Kuva 14. Keskiarvoisen standardisuoran residuaalien kuvaaja.

Residuaalikuvaajasta voidaan päätellä, että suorat ovat lineaarisia koko mittausalueella. Residuaaleissa on selkeää toistuvuutta (vaikkakin pientä) kaikilla mittaussarjoilla, mikä viittaa systemaattiseen virheeseen. Liitteessä 3 sivulla 2 on esitetty kaikkien mittaussarjojen residuaaliarvot.

Menetelmän toteamisraja (LOD) laskettiin kaavalla 1 käyttäen Microsoft Excel -ohjelman linest-komennolla saatujen y-akselin leikkauspisteiden keskihajontaa.

Vastaavasti määrittäysraja (LOQ) laskettiin kaavalla 2. LOD ja LOQ laskettiin erikseen jokaiselle suoralle ja niistä otettiin keskiarvo. Laskuissa käytetyt arvot ovat taulukoituna sivulla 3 liitteessä 3.

Näin laskettuna toteamisrajaksi ja määrittäysrajaksi saatiin:

LOD = 10 ng/ml

LOQ = 33 ng/ml

Liitteessä 3 sivulla 1 esitetyistä mittaustuloksista laskettiin pitoisuudet ja niiden hajonnat ja luottamusväli 95 %:n todennäköisyydellä. Varianssit on laskettu liitteessä 5 esitetyistä ANOVA-taulukoiden arvoista, joiden mukaan sarjojen välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa ja vaihtelu johtuu mittausepävarmuudesta. Yhteenveto käsitellyistä tuloksista taulukossa 6.

Taulukko 6. Validointimittaustulosten keskihajonta, suhteellinen keskihajonta ja 95 %:n luottamusväli sekä sarjojen sisäiset, väliset ja kokonaisvarienssit pitoisuuskohtaisesti.

std c(µg/ml)	Laskettu			Laajennettu mittausepävarmuus		Sarjojen välinen varienssi	Sarjojen sisäinen varienssi	Kokonais- varienssi
	c (ka) (ng/ml)	SD	RSD (%)	(ng/ml)	%			
0,1	92	2,4	2,6	97	106,0	0,3 %	2,6 %	2,6 %
0,3	300	3,2	1,1	94	31,3	0,4 %	0,9 %	1,0 %
1	941	3,7	0,4	85	9,0	0,0 %	0,5 %	0,5 %
2	2067	7,9	0,4	77	3,7	0,1 %	0,4 %	0,4 %
4	4039	8,8	0,2	92	2,3	0,1 %	0,2 %	0,2 %
6	5962	6,2	0,1	129	2,2	0,0 %	0,1 %	0,1 %
testi 0,3	308	6,3	2,0	94	30,5	0,0 %	2,1 %	2,1 %

Luottamusväli on laskettu kaavalla 7.

7.3 *In vitro* -näytteiden tulokset

Varsinaiset *in vitro* -näytteet mitattiin kahden standardiliuossarjan perään. Standardiliuosten vahvimman ja laimeimman liuoksen välillä sekä ennen näytteitä mitattiin pelkkää liuotinta sekä pelkkää sisäistä standardia sisältävät nollanäytteet.

Taulukossa 8 on esitetty näytteiden ja nollanäytteiden vasteet, sekä lasketut pitoisuudet.

Taulukko 7. Näytteiden mittaustulokset ja lasketut pitoisuudet sekä nollanäytteiden vasteet ja lasketut pitoisuudet.

Näyte	Laskettu c (ng/ml)	Pinta-alojen suhde (<i>m/z</i> 61)/(<i>m/z</i> 62)
1	114	0,158
2	118	0,159
3	109	0,156
4	107	0,156
5	1043	0,470
0_9G	111	0,157
0_S	106	0,155
Blank 1	111	0,157
Blank 2	114	0,158

Taulukossa 8 luetelluista arvoista nähdään, että kaikkien paitsi näytteen 5 vasteet eivät eroa nollanäytteiden (pelkkä ISTD) antamasta vasteesta. Samoin taulukon 9 suhteellisen mittaasepävarmuuden perusteella voidaan päätellä, että pitoisuudet jäävät nolnaan muiden kuin näytteen 5 kohdalla.

Taulukko 8. *In vitro* -näytteiden ja nollanäytteiden laajennettu epävarmuus. ts_x tulee kaavasta 7.

näyte	c (ng/ml)	ts_x (ng/ml)	%
1	109	148	135
2	114	148	130
3	105	148	141
4	103	148	143
5	1040	138	13
0_9G	107	148	138
0_S	102	148	146

In vitro -näytteiden ja niiden kalibroitaisuorien mittaustulokset löytyvät liitteestä 6.

In vitro -näyte 5 oli ainoa, johon oli lisätty GSH:ta ja se erosi näytteestä 2 ainoastaan lisätyn GSH:n osalta. (Ks. taulukko 5 s. 21.) Näytteisiin 2, 4 ja 5 oli lisätty suurempi pitoisuus klooripikriiniä, kuin näytteisiin 1 ja 3. Näytteet 0_9G ja 0_S olivat kokeen nollanäytteitä ja niihin ei oltu lisätty klooripikriiniä, vaan ainoastaan klooripikriinin liuottimena käytettyä DMSO:a.

8 Päätelmät

Validointimittaustulosten vaihtelu oli sisäisen standardin ansiosta hyvin pientä. Lisäksi sisäinen standardi vähensi matriisin vaikutuksesta johtuvaa virhettä. Esimerkiksi mitatuissa *in vitro* -näytteissä käytetty fosfaattipuskurin suolapitoisuus erosi n. kolminkertaisesti validointinäytteiden matriisin suolapitoisuudesta. Höyrytilanäytteen nestefaasin suolapitoisuus on yksi analyytin faasien väliseen jakautumiseen eniten vaikuttavista tekijöistä.

Valitettavasti kaikista validointimittaussarjoista jäivät puuttumaan nollanäytteet, joiden avulla olisi voitu arvioida esimerkiksi toteamisrajan ja määritysrajan sopivuutta. Sisäisen standardin sisältämä ^{12}C -nitrometaani nostaa nollanäytteen vastetta niin paljon, että *in vitro* -näytteiden lasketut pitoisuudet eivät voi täysin pitää paikkaansa muiden kuin näytteen 5 kohdalla.

Taulukkoa 5 tarkastelemalla nähdään, että näyte 5 on ainoa *in vitro* -näyte, johon on lisätty GSH:a. Lisäksi näyte 5 ja näyte 2 eivät eroa toisistaan muuten, kuin

näytteeseen 5 lisätyn GSH:n osalta. Tuloksen perusteella looginen johtopäätös on, että ilman glutationia klooripikriini ei metaboloitu maksan entsyymeillä nitrometaaniksi.

Voidaan todeta, että nollanäytteille mitattu nitrometaanin vaste ei eroa kalibroitisuorien alimman pisteen vasteesta, ja siten menetelmän toteamisraja näytteen alkuperäiselle nitrometaanin pitoisuudelle täytyy olla alimman kalibroitipisteen yläpuolella. Testinäyte (0,3 µg/ml) saatiin mitattua luotettavasti ja siksi määritysrajana voidaan pitää kyseistä pitoisuutta. Luotettavaksi mittausalueeksi tälle menetelmälle saatiin siis 0,3–6 µg/ml.

Menetelmällä saatiin mitattua luotettavalla mittausalueella yhdelle *in vitro* -näytteelle pitoisuus. Tuloksesta on hyötyä nitrometaanin ja klooripikriinin metaboliatutkimukselle.

Injektorin lämpötilana käytetty 250 °C on tarpeettoman korkea höyrytilänäytteille ja sitä kannattaa laskea. Korkea injektorin lämpötila aiheuttaa myös jonkin verran klooripikriinin termistä hajoamista [21], mikä tulisi ottaa huomioon mahdollisen kvantitointimenetelmän kehityksessä.

Menetelmän jatkokäytön kannalta olisi hyödyllistä selvittää rinnakkaismittausten luotettava määrä, jolloin tiedetään kuinka monesti sama näyte voidaan analysoida, ilman että tuloksen luotettavuus kärsii huomattavasti. Tässä työssä toistomittauksia ei tehty. Myöskään näytteiden termostoimisessa lämmön siirtoon käytetyn veden lisäämisen tarpeellisuutta ei tutkittu. Jos veden lisäämisestä ei ole huomattavaa hyötyä, kannattaisi se poistaa turhana vaiheena.

Lähteet

- 1 Guidelines for Schedules of Chemicals. 2005. Verkkosivu. <<http://www.opcw.org/chemical-weapons-convention/annex-on-chemicals/a-guidelines-for-schedules-of-chemicals/>>. Luettu 22.10.2013.
- 2 Roark, R. C. 1934. A bibliography of chloropicrin, 1848-1932. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture.
- 3 Oriol, M. Edmiston, S., Beauvais, S., Barry, T. & O'Malley, M. Illnesses Associated with Chloropicrin Use in California Agriculture, 1992-2003. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Vol. 200.
- 4 Citac / Eurachem – Guide to Quality in Analytical Chemistry. Verkkodokumentti. <<http://www.european-accreditation.org/publication/citac-eurachem-ta>>. 2002. Luettu 9.10.2013.
- 5 Selectivity in Analytical Chemistry – Recommendations for its Use. IUPAC. Verkkodokumentti. <<http://old.iupac.org/projects/posters01/vessman01.pdf>>. Julkaistu 30.9.2001. Luettu 30.10.2013.
- 6 Shrivastava, A., Gupta, V. B. 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. Chron Young Sci. Vol. 2, s. 21 - 25.
- 7 Armbruster, D. A., Tillman, M. D. & Hubbs, L. M. 1994. Limit of detection (LOD)/limit of quantitation (LOQ): comparison of the empirical and the statistical methods exemplified with GC-MS assays of abused drugs. Clinical Chemistry. Vol. 40, s. 1233 - 1238.
- 8 Eurachem – The Fitness for Purpose of Analytical Methods; A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Verkkodokumentti. <<http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>>. 1998. Luettu 20.10.2013.
- 9 Repeatability. IUPAC. Verkkodokumentti. <<http://goldbook.iupac.org/R05293.html>>. Päivitetty 19.8.2012. Luettu 30.10.2013.
- 10 Harris, D. C. 2010. Quantitative chemical analysis. 8th, international ed. New York: W.H. Freeman.
- 11 Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. EURACHEM/CITAC. 2nd ed. 1999.

- 12 Public health response to biological and chemical weapons – WHO Guidance. Annex1, Chemical agents. Verkkodokumentti. <<http://www.who.int/csr/delibepidemics/biochemguide/en/>>. 2004. Luettu 29.10.2013.
- 13 The Emergency Response Safety and Health Database. Verkkodokumentti. <http://www.cdc.gov/niosh/ershdb/EmergencyResponseCard_29750034.html>. Päivitetty 18.6.2013. Luettu 14.8.2013.
- 14 Marks, C. A., Gigliotti, F. & Busana, F. 2009. Fumigation Of Rabbit Warrens With Chloropicrin Produces Poor Welfare Outcomes. *Wildlife Research*. Vol. 36, s. 342 - 352.
- 15 Gianessi, L. P. & Marcelli, M. B. 2000. *Pesticide Use In U.S. Crop Production: 1997*. Washington, DC: National Center for Food and Agricultural Policy.
- 16 Nelson, S. D., Simpson, C. R., Ajwa, H. A. & Williams, C. F. 2012. Evaluating Surface Seals In Soil Columns To Mitigate Methyl Isothiocyanate Volatilization. *Integrated Pest Management and Pest Control*, s. 567 - 580.
- 17 Products to be withdrawn from the market following the non-approval of chloropicrin. Health and Safety Executive. Verkkosivu. <<http://www.pesticides.gov.uk/guidance/industries/pesticides/News/Collected-Updates/Regulatory-Updates-2012/February/Withdrawal-of-chloropicrin-products-from-the-market>>. Julkaistu 9.2.2012. Luettu 14.8.2013.
- 18 Specialty Gas Fumigant – Vikane. Dow AgroSciences LLC. Käyttöturvallisuustiedote. <<http://www.cardinalproproducts.com/SiteAssets/msds/Vikane%20Label%207-29-13.pdf>>. Päivitetty 29.7.2013. Luettu 26.9.2013.
- 19 Nikolaou, A. D., Lekkas, T. D., Golfopoulos, S. K. & Kostopoulou, M. N. 2001. Application of different analytical methods for determination of volatile chlorination by-products in drinking water. *Talanta*. Vol. 56, s. 717 - 726.
- 20 Disinfectants and Disinfection By-Products. WHO Seminar Pack For Drinking-Water Quality. Verkkodokumentti. <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/S04.pdf>.
- 21 Battin-Leclerc, F., Baronnet, F., Paternotte, G., Leclerc, J.P. & Gourhan, R. 1999. Thermal Decomposition Of Chloropicrin, Diphosgene And Phosgene Between 100 And 530°C. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. Vol. 53, s. 95 - 105.
- 22 Carter, W. P. L., Dongmin, L. & Malkina, I. L. 1996. Investigation of the Atmospheric Reactions of Chloropicrin. *Atmospheric Environment*. Vol 31, s.1425 - 1439.

- 23 Nitromethane. ANGUS Chemical Company. Käyttöturvallisuustiedote. <http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh_07c8/0901b803807c8ae8.pdf?filepath=angus/pdfs/noreg/319-00012.pdf&fromPage=GetDoc>. Luettu 9.10.2013.
- 24 Coetzee, J. F. & Chang T.-H. 1986 Recommended Methods For The Purification Of Solvents And Tests For Impurities: Nitromethane. Pure and Applied Chemistry. Vol. 58, s. 1541 - 1545.
- 25 Pesonen, M., Vähäkangas, K., Halme, M., Vanninen, P., Seulanto, H., Hemmilä, M., Pasanen, M. & Kuitunen, T. 2010. Capsaicinoids, chloropicrin and sulfur mustard: possibilities for exposure biomarkers. Frontiers in Pharmacology. Vol. 1, Article 140.
- 26 Riekkola, M. & Hyötyläinen, T. 2002. Kolonnikromatografia ja kapillaarielektromigraatiotekniikat. 2. painos. Helsinki: Helsingin yliopisto, analyttisen kemian laboratorio.
- 27 De Bievre, P. & Taylor, P.D.P. Recommended isotopic abundances, IUPAC. Verkkodokumentti. <<http://ie.lbl.gov/atom/ab.pdf>>. 1993. Luettu 10.10.2013.
- 28 Spielmann, H. & Goldberg, A. M. In Vitro Methods in Toxicology. Verkkodokumentti. <http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/In%20Vitro%20Methods%20in%20Toxicology/invitro_methods_tox.html>. Luettu 19.10.2013.
- 29 Groneberg, D. A., Grosse-Siestrup, C. & Fischer, A. 2002. In Vitro Models to Study Hepatotoxicity. Toxicologic Pathology. Vol 30, s. 394 - 399.
- 30 Komulainen, H. Toksisuuden tutkiminen ja arviointi. Farmakologia ja toksikologia. Verkkodokumentti. <http://www.medicina.fi/index.php?option=com_content&view=article&id=78&Itemid=78>. 2007. Luettu 22.10.2013.
- 31 Smith, C. M., Allan D. & Lieberman, M. 2005. Basic Medical Biochemistry. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- 32 Kolb, B. & Ettre, L. S. 1997. Theory and Practice of Static Headspace Gas Chromatography. New York: Wiley-VCH.
- 33 Kvadrupoli. Verkkosivu. <<http://www.chromatography-online.org/GC-Tandem/Quadrupole-Mass-Spectrometer/rs37.html>>. Luettu 4.11.2013.
- 34 McMaster, M. C. & McMaster, C. 1998. GC/MS: a practical user's guide. New York: Wiley.

- 35 Sadek, P. C. 2004. Illustrated pocket dictionary of chromatography. Hoboken, New Jersey: Wiley-Interscience.
- 36 Three-Dimensional Nature of GC/MS. Verkkoartikkeli. <http://svmsl.chem.cmu.edu/vmsl/Caffeine/caffeine_scanrate.htm>. Luettu 27.10.2013.
- 37 Introduction to MS Quantitation and Modes of LC/MS Monitoring. Verkkodokumentti. <<http://www.ionsource.com/tutorial/msquan/intro.htm>>. Päivitetty 18.10.2012. Luettu 27.10.2013.
- 38 Thermionic Emission. Verkkodokumentti. <<http://www.physics.csbsju.edu/370/thermionic.pdf>>. Päivitetty 18.8.2009. Luettu 26.9.2013.
- 39 Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. 5.- 6. p. Helsinki: Edita.
- 40 EI -ionilähde. Verkkosivu. <<http://www.chromatography-online.org/GC-Tandem/GC-MS/Ion-Generation/Electron-Impact-Ionization/rs65.html>>. Luettu 4.11.2013.
- 41 Kinglerley, R. W. & LaMer, V. K. 1941. Exchange And Transfer Equilibria Of Acids, Bases, And Salts In Deuterium-Protium Oxide Mixtures. Journal of the American Chemical Society. Vol. 63, s. 3256 - 3262.

INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS: 6890N-5975B

D:\METHODS\J121_TG_Split.M
Wed Aug 07 16:49:15 2013

Control Information

Sample Inlet : GC
Injection Source : Manual
Mass Spectrometer : Enabled

No Sample Prep method has been assigned to this method.

=====

6890 GC METHOD

OVEN

Initial temp: 35 'C (On) Maximum temp: 330 'C
Initial time: 4.00 min Equilibration time: 0.50 min
Ramps:
Rate Final temp Final time
1 15.00 70 0.00
2 0.0(Off)
Post temp: 200 'C
Post time: 1.00 min
Run time: 6.33 min

FRONT INLET (SPLIT/SPLITLESS) BACK INLET (COOL ON COLUMN)

Mode: Split Mode: Oven track
Initial temp: 250 'C (On) Pressure: 0.000 bar (Off)
Pressure: 0.459 bar (On) Gas type: Helium
Split ratio: 10:1
Split flow: 9.9 mL/min
Total flow: 13.7 mL/min
Gas saver: On
Saver flow: 20.0 mL/min
Saver time: 2.00 min
Gas type: Helium

COLUMN 1 COLUMN 2

Capillary Column (not installed)
Model Number: J&W 122-5532
DB-5ms
Max temperature: 325 'C
Nominal length: 30.0 m
Nominal diameter: 250.00 um
Nominal film thickness: 0.25 um
Mode: constant flow
Initial flow: 1.0 mL/min
Nominal init pressure: 0.460 bar
Average velocity: 36 cm/sec
Inlet: Front Inlet
Outlet: MSD
Outlet pressure: vacuum

FRONT DETECTOR (NO DET) BACK DETECTOR (NO DET)

SIGNAL 1 SIGNAL 2
Data rate: 20 Hz Data rate: 20 Hz
Type: test plot Type: test plot

Save Data: Off	Save Data: Off
Zero: 0.0 (Off)	Zero: 0.0 (Off)
Range: 0	Range: 0
Fast Peaks: Off	Fast Peaks: Off
Attenuation: 0	Attenuation: 0

COLUMN COMP 1 (No Detectors Installed)	COLUMN COMP 2 (No Detectors Installed)
---	---

THERMAL AUX 2

Use: MSD Transfer Line Heater
 Description: MSD interface
 Initial temp: 280 °C (On)
 Initial time: 0.00 min
 # Rate Final temp Final time
 1 0.0(Off)

POST RUN

Post Time: 1.00 min
 Oven Temperature: 200 °C
 Column 1 Flow: 1.0 mL/min

TIME TABLE

Time	Specifier	Parameter & Setpoint
------	-----------	----------------------

GC Injector

Front Injector:

Sample Washes	0
Sample Pumps	3
Injection Volume	1.00 microliters
Syringe Size	10.0 microliters
PreInj Solvent A Washes	10
PreInj Solvent B Washes	0
PostInj Solvent A Washes	0
PostInj Solvent B Washes	10
Viscosity Delay	0 seconds
Plunger Speed	Fast
PreInjection Dwell	0.00 minutes
PostInjection Dwell	0.00 minutes
Sampling Depth	0.0 mm

Back Injector:

No parameters specified

Column 1 Inventory Number : AB001

Column 2 Inventory Number :

MS ACQUISITION PARAMETERS

General Information

Tune File : atune.u
 Acquisition Mode : SIM

MS Information

--

Solvent Delay : 1.80 min

EMV Mode : Gain Factor
Gain Factor : 3.00
Resulting EM Voltage : 1741

[Sim Parameters]

GROUP 1

Group ID : Nitrometaani
Resolution : Low
Plot 1 Ion : 61.00
Ions/Dwell In Group (Mass, Dwell) (Mass, Dwell) (Mass, Dwell)
(30.00, 30) (46.00, 30) (61.00, 30)
(62.00, 30)

GROUP 2

Group ID : Klooripikriini
Resolution : Low
Group Start Time : 3.00
Plot 1 Ion : 82.00
Ions/Dwell In Group (Mass, Dwell) (Mass, Dwell) (Mass, Dwell)
(82.00, 30) (117.00, 30) (121.00, 30)

[MSZones]

MS Source : 230 C maximum 250 C
MS Quad : 150 C maximum 200 C

END OF MS ACQUISITION PARAMETERS

TUNE PARAMETERS for SN: US63244805

Trace Ion Detection is OFF.

EMISSION : 34.610
ENERGY : 69.922
REPELLER : 24.259
IONFOCUS : 90.157
ENTRANCE_LE : 35.000
EMVOLTS : 1388.235
Actual EMV : 1741.18
GAIN FACTOR : 2.91
AMUGAIN : 1595.000
AMUOFFSET : 122.563
FILAMENT : 1.000
DCPOLARITY : 0.000
ENTLENSOFFS : 18.322
MASSGAIN : -714.000
MASSOFFSET : -37.000

END OF TUNE PARAMETERS

END OF INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS

Nitrometaani vedessä, spiikkausliuottimena ACN

c (µg/ml)	T (°C)	t (min)	Area				
0			0				
2	70	10	16914	kulmakerroin	8277,686	390,4571	leikauspiste
3	70	10	26849		492,4205	1325,883	
4	70	10	32298		0,992972	1456,599	
0			0				
2	70	15	33645	kulmakerroin	8377,229	6585,486	leikauspiste
3	70	15	37449		3940,599	10610,39	
4	70	15	30643		0,693221	11656,45	
0			0				
2	70	20	17550	kulmakerroin	7291	1320	leikauspiste
3	70	20	25177		886,0798	2385,843	
4	70	20	28172		0,971308	2621,059	
0			0				
2	75	15	13680	kulmakerroin	8923,257	-1510,83	leikauspiste
3	75	15	24527		874,8351	2355,566	
4	75	15	36059		0,981139	2587,797	
0			0				
2	75	20	16662	kulmakerroin	7306,629	574,0857	leikauspiste
3	75	30	21841		413,4776	1113,323	
4	75	20	29553		0,993636	1223,083	
0			0				
2	80	20	74255	kulmakerroin	17773,29	13654,86	leikauspiste
3	80	20	71487		7883,644	21227,36	
4	80	20	68837		0,717616	23320,13	
0			0				
2	80	20	16865	kulmakerroin	10352,63	-1643,91	leikauspiste
3	80	20	27231		1062,992	2862,193	
4	80	20	42502		0,97935	3144,372	

Nitrometaain vaste vedessä, spiikkausliuottimena DMSO (kolmen sarjan pitoisuuksien vasteiden keskiarvot)

c (µg/ml)	T (°C)	t (min)	Area				
0			0				
2	70	20	568235	kulmakerroin	267752	11575	leikkauspiste
3	70	20	818824		6683	17995	
4	70	20	1069014		0,9988	19769	

Validointimittausten tulokset ja niistä lasketut arvot

Liite 3

1 (3)

Vasteet										ka	SD	RSD (%)	
std c (µg/ml)	pvä 1 pinta-alojen m/z 61 ja m/z 62 suhde			pvä 2 pinta-alojen m/z 61 ja m/z 62 suhde			pvä 3 pinta-alojen m/z 61 ja m/z 62 suhde						
0,1	0,1479	0,1460	0,1478	0,1474	0,1467	0,1481	0,1468	0,1482	0,1480	0,147	0,0008	0,5	
0,3	0,2177	0,2180	0,2179	0,2182	0,2153	0,2177	0,2172	0,2187	0,2169	0,217	0,0010	0,5	
1	0,4327	0,4341	0,4318	0,4336	0,4328	0,4328	0,4318	0,4347	0,4343	0,433	0,0011	0,2	
2	0,8147	0,8080	0,8094	0,8111	0,8132	0,8158	0,8140	0,8113	0,8080	0,812	0,0029	0,4	
4	1,4747	1,4679	1,4745	1,4733	1,4748	1,4772	1,4744	1,4837	1,4752	1,475	0,0041	0,3	
6	2,1193	2,1253	2,1261	2,1131	2,1246	2,1194	2,1244	2,1285	2,1184	2,122	0,0048	0,2	
testi	0,2221	0,2184	0,2197	0,2201	0,2206	0,2170	0,2228	0,2195	0,2205	0,220	0,0017	0,8	
m	0,33593	0,33643	0,33691	0,33496	0,33693	0,33606	0,33677	0,33761	0,33585	kulmakerroin leikkaus- piste			
b	0,11760	0,11522	0,11550	0,11803	0,11543	0,11793	0,11597	0,11686	0,11673				
std c (ng/ml)	Lasketut pitoisuudet (ng/ml)										ka (ng/ml)	SD (ng/ml)	RSD (%)
100	90	92	96	88	93	90	92	93	93	92	2	2,6	
300	298	306	304	299	296	297	300	302	298	300	3	1,1	
1000	938	948	939	942	942	937	938	941	946	941	4	0,4	
2000	2075	2059	2060	2069	2071	2076	2073	2057	2058	2067	8	0,4	
4000	4040	4021	4034	4046	4035	4045	4034	4049	4045	4039	9	0,2	
6000	5959	5975	5968	5956	5963	5956	5964	5958	5960	5962	6	0,1	
testi	311	307	309	305	312	295	317	304	309	308	6	2,0	

Validointimittausten tulokset ja niistä lasketut arvot

Residuaalit

std c (µg/ml)	päivä 1			päivä 2			päivä 3			Average	SD
	suora 1	suora 2	suora 3	suora 4	suora 5	suora 6	suora 7	suora 8	suora 9		
0,1	-0,002	-0,004	-0,002	-0,003	-0,004	-0,002	-0,003	-0,002	-0,002	-0,003	0,001
0,3	0,000	0,001	0,000	0,001	-0,002	0,000	0,000	0,001	-0,001	0,000	0,001
1	-0,020	-0,019	-0,021	-0,019	-0,020	-0,020	-0,021	-0,018	-0,019	-0,020	0,001
2	0,025	0,019	0,020	0,022	0,024	0,026	0,025	0,022	0,019	0,022	0,003
4	0,013	0,006	0,012	0,011	0,013	0,015	0,012	0,022	0,013	0,013	0,004
6	-0,016	-0,010	-0,009	-0,022	-0,010	-0,016	-0,010	-0,006	-0,016	-0,013	0,005

Varianssit**

std c (µg/ml)	s_b^2	s_b	s_w	s_{tot}	\bar{x}_{total} µg/ml	$s_{totsuht}$ %	s_b suht %	s_w suht %
0,1	6,1E-08	0,0002	0,0024	0,0024	0,09	2,63	0,27	2,62
0,3	1,4E-06	0,0012	0,0027	0,0029	0,30	0,98	0,39	0,90
1	1,8E-06	0,0014	0,0043	0,0045	0,94	0,48	0,14	0,45
2	1,8E-06	0,0013	0,0076	0,0077	2,07	0,37	0,06	0,37
4	5,3E-06	0,0023	0,0080	0,0084	4,04	0,21	0,06	0,20
6	3,6E-06	0,0019	0,0055	0,0058	5,96	0,10	0,03	0,09
testi 0,3	1,0E-06	0,0010	0,0064	0,0065	0,31	2,12	0,33	2,09

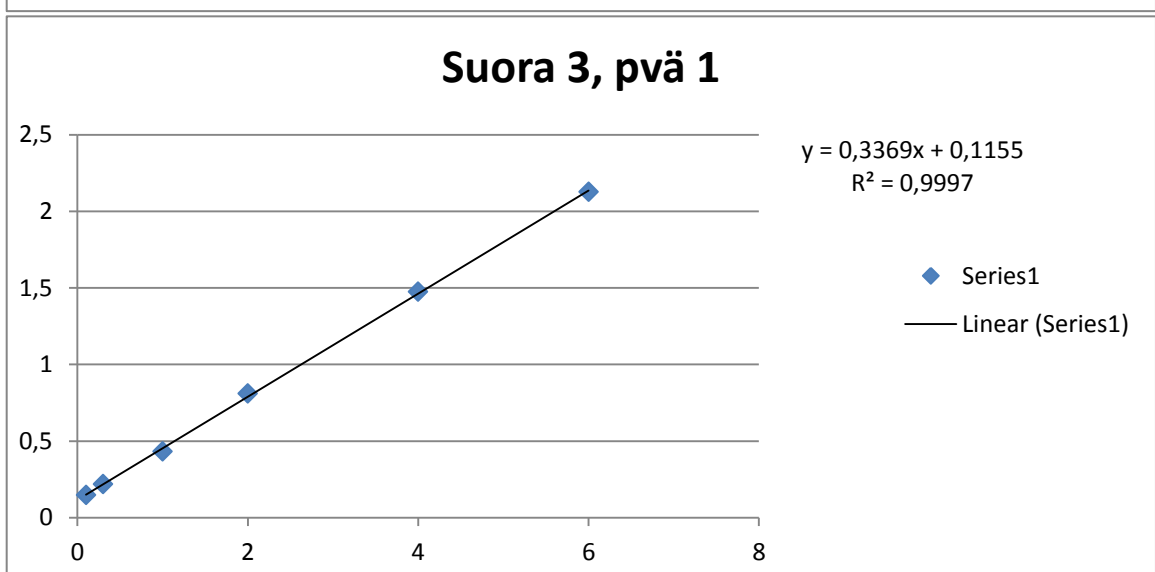
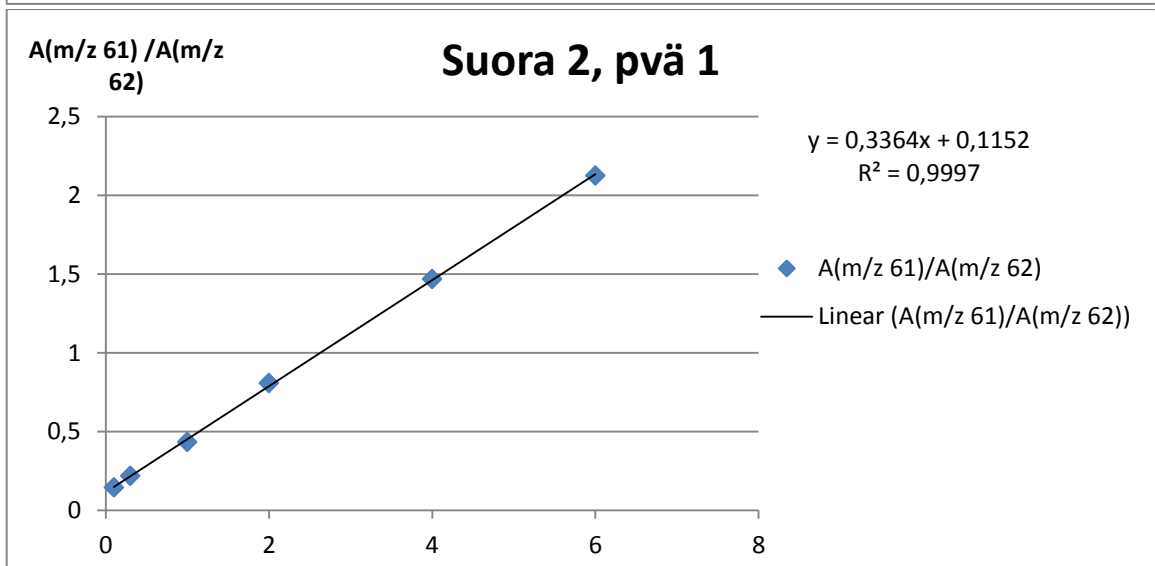
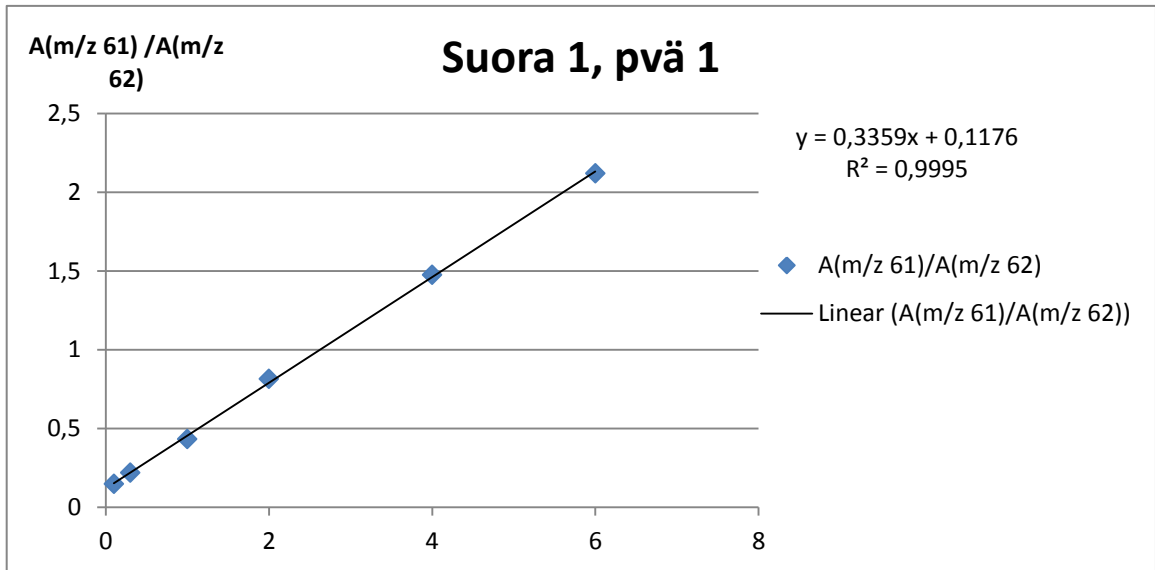
** Selitykset löytyvät liitteen 5 sivulta 4.

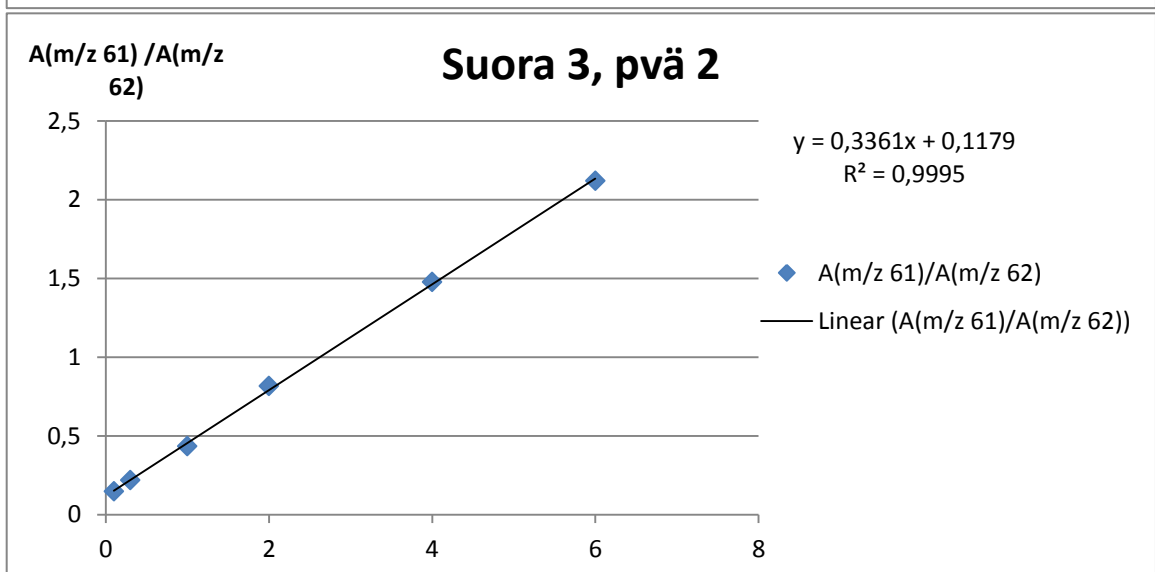
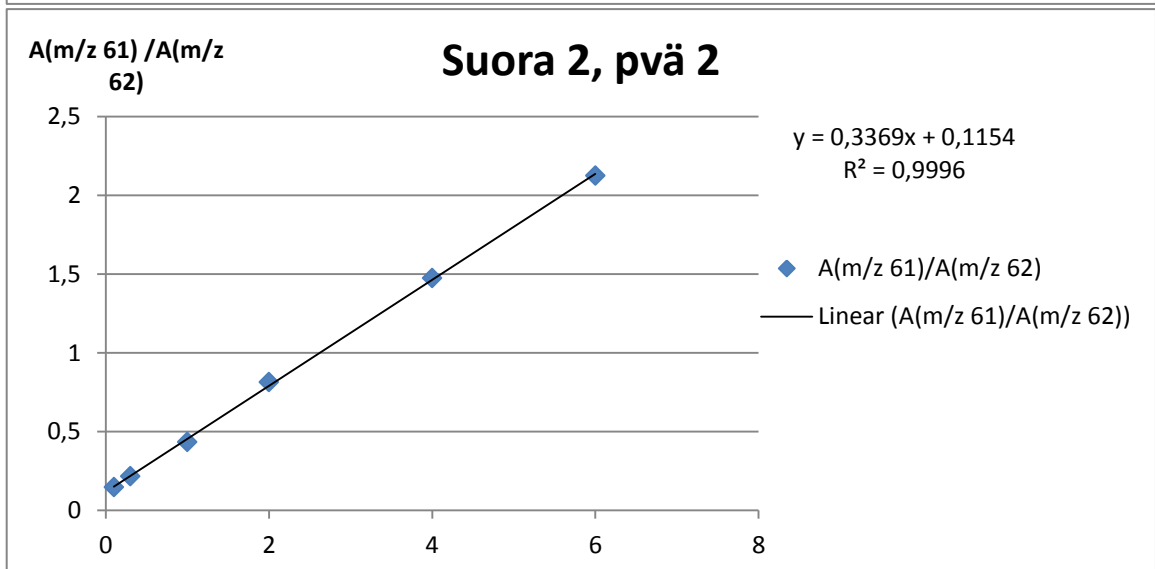
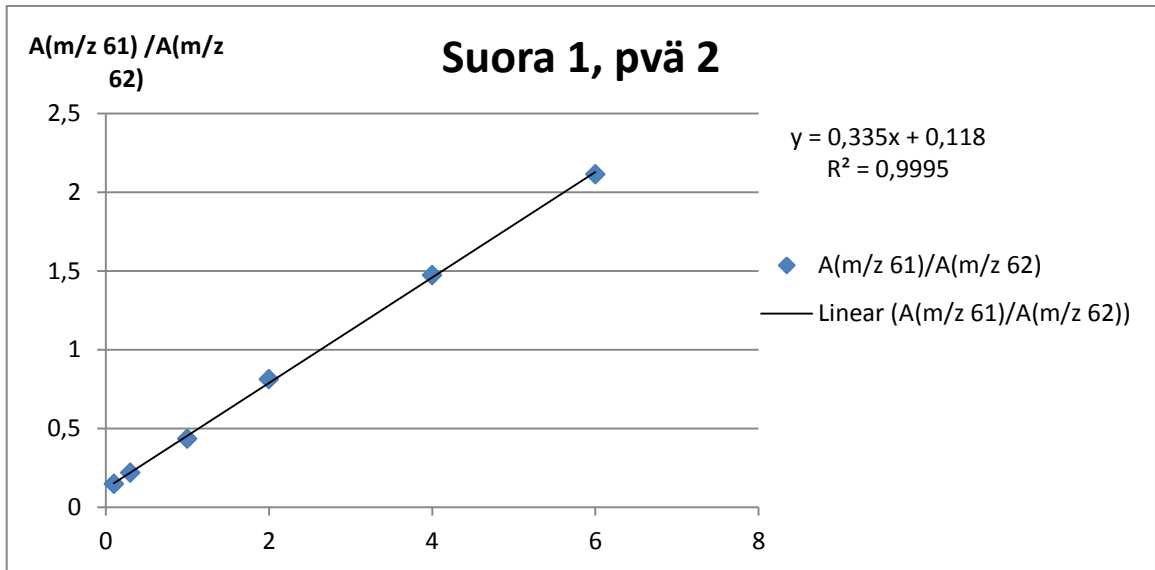
Validointimittausten tulokset ja niistä lasketut arvot

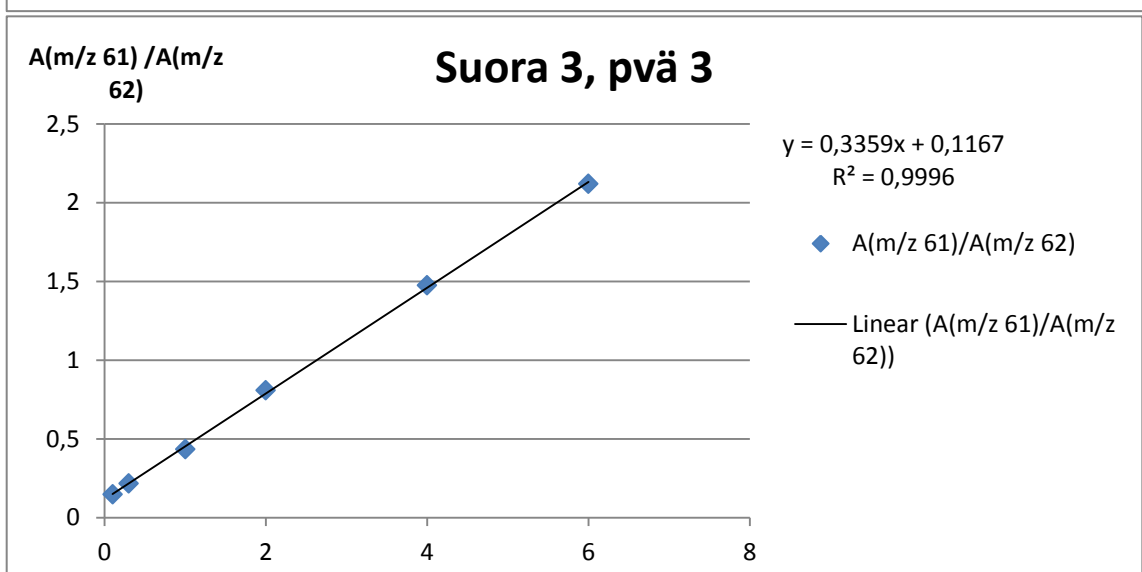
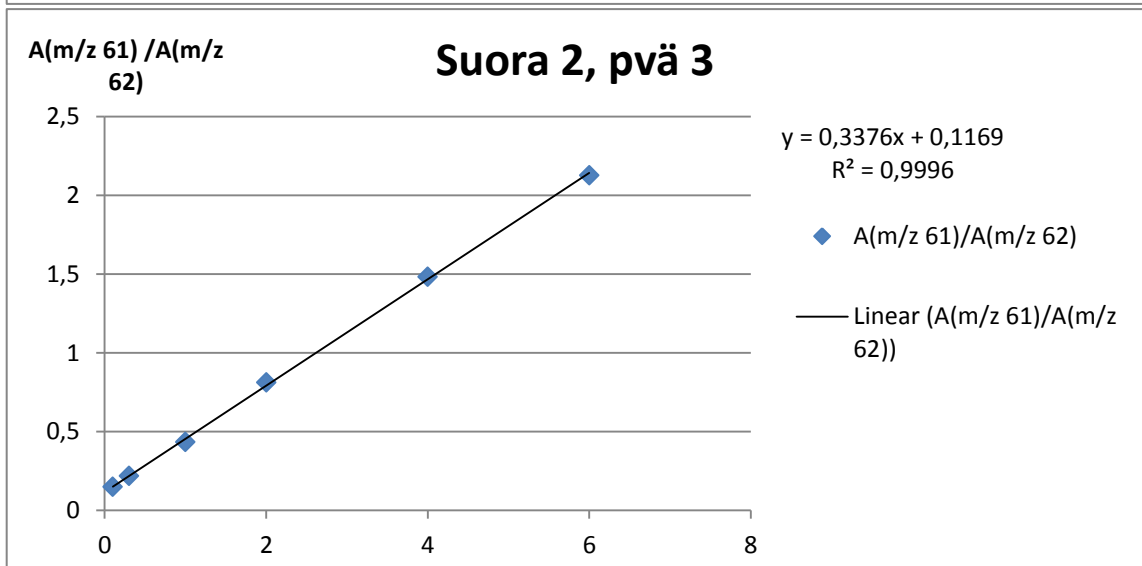
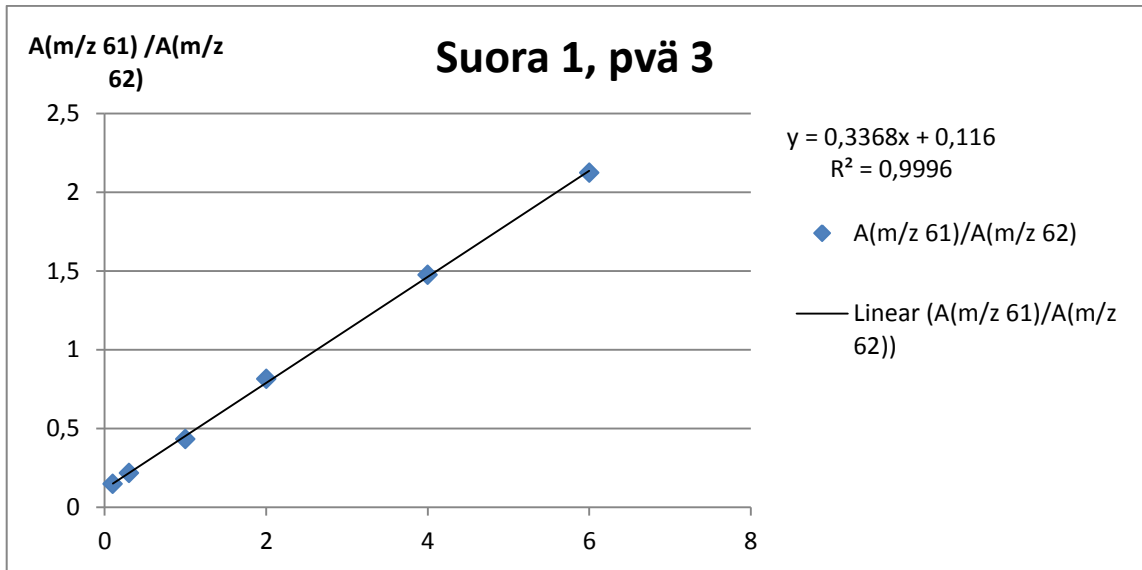
LOD ja LOQ laskuihin käytetyt arvot. m on suoran kulmakerroin, b on suoran y-akselin leikkauspiste ja SD(b) on leikkauspisteiden keskihajonta.

	m	b	SD(b)	LOD	LOQ
suora 1	0,3359	0,1176	0,0011	0,0099	0,0329
suora 2	0,3364	0,1152		0,0099	0,0329
päivä 1 suora 3	0,3369	0,1155		0,0099	0,0328
suora 4	0,3350	0,1180		0,0099	0,0330
suora 5	0,3369	0,1154		0,0099	0,0328
päivä 2 suora 6	0,3361	0,1179		0,0099	0,0329
suora 7	0,3368	0,1160		0,0099	0,0329
suora 8	0,3376	0,1169		0,0098	0,0328
päivä 3 suora 9	0,3359	0,1167		0,0099	0,0329

0,0099	0,0329	µg/ml
9,9	32,9	ng/ml







Anova: Single Factor 0,1 µg/ml

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
Column 1	3	0,277645	0,092548443	9,51E-06
Column 2	3	0,27013	0,090043231	7,05E-06
Column 3	3	0,277685	0,092561689	7,36E-07

KA	0,091717788
SD	0,001184103
RSD (%)	1,291028506

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	1,26189E-05	2	6,30945E-06	1,094605	0,393304	5,143253
Within Groups	3,45848E-05	6	5,76413E-06			
Total	4,72037E-05	8				

Variance between groups	6,06E-08	S_b^2
Variance within groups	2,40E-03	S_w
Variance between groups	2,46E-04	S_b
Chance variation	2,41E-03	S_{tot}
Chance var (%)	2,6	$S_{totsuht}$

Keltaisella pohjalla olevat luvut on laskettu itse. Käytetyt kaavat löytyvät tämän liitteen lopusta.

Anova: Single Factor 0,3 µg/ml

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
Column 1	3	0,907577	0,302525647	1,67E-05
Column 2	3	0,892136	0,297378799	2,07E-06
Column 3	3	0,900146	0,300048832	3,09E-06

KA	0,299984426
SD	0,002101686
RSD (%)	0,70059821

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	3,97537E-05	2	1,98769E-05	2,72975	0,143535	5,143253
Within Groups	4,36894E-05	6	7,28157E-06			
Total	8,34432E-05	8				

Variance between groups	1,40E-06	S_b^2
Variance within groups	2,70E-03	S_w
Variance between groups	1,18E-03	S_b
Chance variation	2,95E-03	S_{tot}
Chance var (%)	1,0	$S_{totsuht}$

Anova: Single Factor

1 µg/ml

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
Column 1	3	2,824621	0,941540478	2,95E-05
Column 2	3	2,820928	0,940309396	9,23E-06
Column 3	3	2,824867	0,941622364	1,59E-05

KA	0,941157413
SD	0,00060057
RSD (%)	0,063811805

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	3,24615E-06	2	1,62308E-06	0,089178	0,915872	5,143253
Within Groups	0,000109202	6	1,82003E-05			
Total	0,000112448	8				

Variance between groups*

0,00E+00 S_b^2

* Negatiivinen varianssi -> 0

Variance within

4,27E-03 S_w

Variance between

0,00E+00 S_b

Chance variation

4,27E-03 S_{tot}

Chance var (%)

0,5 $S_{totsuht}$

Anova: Single Factor

2 µg/ml

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
Column 1	3	6,194212	2,064737226	8,27E-05
Column 2	3	6,216453	2,072150885	1,5E-05
Column 3	3	6,188102	2,062700797	7,66E-05

KA	2,066529636
SD	0,004060837
RSD (%)	0,196505136

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0,000148414	2	7,42068E-05	1,277239	0,345043	5,143253
Within Groups	0,000348596	6	5,80994E-05			
Total	0,00049701	8				

Variance between groups

1,79E-06 S_b^2

Variance within

7,62E-03 S_w

Variance between

1,34E-03 S_b

Chance variation

7,74E-03 S_{tot}

Chance var (%)

0,4 $S_{totsuht}$

Anova: Single Factor

4 µg/ml

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
Column 1	3	12,094375	4,031458351	9,59E-05
Column 2	3	12,125303	4,041767632	3,83E-05
Column 3	3	12,127039	4,042346345	6,02E-05

KA	4,038524109
SD	0,005001829
RSD (%)	0,123852883

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0,000225165	2	0,000112582	1,737981	0,253854	5,143253
Within Groups	0,000388666	6	6,47776E-05			
Total	0,00061383	8				

Variance between groups	5,31E-06	S_b^2
Variance within	8,05E-03	S_w
Variance between	2,30E-03	S_b
Chance variation	8,37E-03	S_{tot}
Chance var (%)	0,2	$S_{totsuht}$

Anova: Single Factor

6 µg/ml

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
Column 1	3	17,90157	5,967189855	6,48E-05
Column 2	3	17,87505	5,958350057	1,79E-05
Column 3	3	17,88216	5,960719974	7,73E-06

KA	5,962086629
SD	0,00373598
RSD (%)	0,062662281

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0,000125618	2	6,28089E-05	2,084763	0,205377	5,143253
Within Groups	0,000180766	6	3,01276E-05			
Total	0,000306384	8				

Variance between groups	3,63E-06	S_b^2
Variance within	5,49E-03	S_w
Variance between	1,91E-03	S_b
Chance variation	5,81E-03	S_{tot}
Chance var (%)	0,1	$S_{totsuht}$

Anova: Single Factor testinäyte 0,3
µg/ml

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
Column 1	3	0,927176	0,30905854	4,62E-06
Column 2	3	0,911844	0,303947972	7,64E-05
Column 3	3	0,93019	0,31006344	4,3E-05

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	6,45267E-05	2	3,22633E-05	0,780226	0,499816	5,143253
Within Groups	0,000248108	6	4,13513E-05			
Total	0,000312634	8				

Variance between groups*	0,00E+00	s_b^2	* Negatiivinen varianssi -> 0
Variance within	6,43E-03	s_w	
Variance between	0,00E+00	s_b	
Chance variation	6,43E-03	s_{tot}	
Chance var (%)	2,1	$s_{totsuht}$	

KA ja \bar{x}_{total} on kaikkien ryhmien keskiarvojen keskiarvo.

$$s_b^2 = \frac{(MS_b - MS_w)}{n}$$

s_b^2 on ryhmien välinen varianssi.

MS_b on Mean Squares Between Groups.

MS_w on Mean Squares Within Groups.

$$s_w = \sqrt{MS_w}$$

s_w on sarjojen sisäinen varianssi.

$$s_b = \sqrt{s_b^2}$$

s_b on sarjojen välinen varianssi.

$$s_{tot} = \sqrt{(s_b)^2 + (s_w)^2}$$

s_{tot} on satunnaisvaihtelu.

$$s_{totsuht} = \frac{s_{tot}}{\bar{x}_{total}}$$

$s_{totsuht}$ on keskiarvoon suhteutettu satunnaisvaihtelu.

In vitro -näytteiden mittaustulokset ja niistä lasketut arvot

In vitro -näytteiden kalibrintisuorien sekä nollakokeiden mittaustulokset ja suorien Linest -tulosteet.

	Suora1	Suora2
	A	A
c (µg/ml)	m/z(61/62)	m/z(61/62)
0,1	0,15126567	0,14862326
0,3	0,22357419	0,22161582
1	0,43486457	0,43535784
2	0,81814878	0,81689903
4	1,4784052	1,47468256
6	2,11524188	2,12324458
nollakoe ** 0	0,15724958	0,15755224

Suora1	Linest		
Kulmakerroin	0,33478	0,122575	Leikkauspiste
	0,004003	0,012348	
	0,999429	0,020865	
Suora2	Linest		
Kulmakerroin	0,335982	0,11971	Leikkauspiste
	0,003521	0,010863	
	0,999561	0,018355	

**tämä oli 250 µl fosfaattipuskuria ja 10 µl:a ISTD

Testi

0,3 0,22049934 0,22663742

LOD ja LOQ. m on suoran kulmakerroin, b on y-akselin leikkauspiste. SD(b) on leikkauspisteiden keskihajonta.

	m	b	SD(b)	LOD	LOQ
suora 1	0,33477977	0,12257522	0,002026	0,018153	0,060511
suora 2	0,33598218	0,11971031		0,018088	0,060295

0,018121	0,060403	µg/ml
18	60	ng/ml

In vitro -näytteiden mittaustulokset ja niistä lasketut arvot

Liite 6

2 (2)

In vitro -näytteiden vasteet ja lasketut pitoisuudet.

Näytteiden vasteet		Näytteiden lasketut pitoisuudet		
Näyte	A m/z(61/62)	Suoralla 1	Suoralla 2	KA
		c (µg/ml)		
1	0,1579	0,105	0,114	0,109
2	0,1594	0,110	0,118	0,114
3	0,1563	0,101	0,109	0,105
4	0,1558	0,099	0,107	0,103
5	0,4700	1,038	1,043	1,040
0_9G	0,1571	0,103	0,111	0,107
0_S	0,1552	0,098	0,106	0,102