

Opinnäytetyö AMK

Prosessi- ja materiaaliteknikan koulutus, insinööri

2022

Alexi Olkkola

TRITON X-100 NÄYTTEIDEN KÄSITTELY JA ANALYYTTISET MENETELMÄT JÄTEVEDESTÄ HAVAINNOINTIIN

OPINNÄYTETYÖ AMK | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Prosessi- ja materiaalitekniikan koulutus, insinööri

2022 | 47 sivua, 8 liitesivua

Tekijä Aleksi Olkkola

TRITON X-100 NÄYTTEIDEN KÄSITTELY JA ANALYYTTISET MENETELMÄT JÄTEVEDESTÄ HAVAINNOINTIIN

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää analyysimenetelmä Triton X-100:n havaitsemiseen jätevedestä ja selvittää sopiva näytteiden käsittelymenetelmä. Analyysimenetelmän tarkoituksena on osoittaa, ettei tuotannossa käytettyä pinta-aktiivista kemikaalia pääse jäteveden mukana ympäristöön, koska sen hajoamistuotteet ovat ympäristölle haitallisia ja hormonitoimintaa häiritseviä.

Työssä perehdyttiin aluksi kirjallisuuskatsauksena Triton X-100:n analyyttisiin menetelmiin, fysikaaliskemiallisiin ominaisuuksiin, teollisiin käyttötarkoituksiin sekä lainsäädäntöön. Analyysimenetelmä kehitettiin korkean erotuskyvyn nestekromatografilla ja työssä tutkittiin kahden erilaisen kromatografisen erotusmenetelmän sopivuutta.

Työn lopputuloksena kehitetyllä analyysimenetelmällä voidaan mitata jäteliuoksista ja tuotantoprosesseista oktyylifenolien määrät toistettavasti, mutta toimeksiantajan tavoitetarkkuutta ei saavutettu menetelmällä.

ASIASANAT:

Nestekromatografia, Triton X-100, oktyylifenoli, pinta-aktiivinen aine, analyysimenetelmä

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Chemical and Material Engineering

2022 | 47 pages, 8 pages in appendices

Author Aleksi Olkkola

TRITON X-100 SAMPLE PREPARATION AND ANALYTICAL METHODS FOR DETECTION IN WASTE WATER

The objective of this bachelor's thesis was to develop an analysis method for the detection of Triton X-100 in wastewater, and to find out an appropriate method for sample preparation. The analytical method would be used for ensuring zero emissions of the surfactant chemical from the production processes, as the degradation products of the chemical are hazardous for the environment and disruptive to hormonal activity.

Research articles were used for studying suitable Triton X-100 analytical methods, its physiochemical properties, as well as its industrial uses and legal status. An analytical method was developed with high-performance liquid chromatography and two different chromatographic separation methods were studied.

The result of the thesis can be used as an analytical method for quantifying octylphenols from chemical waste or manufacturing processes. However, the detection limit of the method did not reach the client's goal.

KEYWORDS:

liquid chromatography, Triton X-100, octyl phenol, surfactant, analytical method

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO	7
1 JOHDANTO	8
2 TRITON X-100	9
2.1 Triton X-100:n fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet	9
2.1.1 Misellit	10
2.1.2 Sameutumispiste	11
2.1.3 Triton X-100:n hajoamistuotteet ja -mekanismit	12
2.2 Lainsäädäntö	13
2.3 Teolliset käyttötarkoitukset	14
3 ANALYYSIMENETELMÄT	15
3.1 Kromatografiset analyysimenetelmät	15
3.1.1 HPLC	16
3.1.2 Spektrofotometriset detektorit	17
3.1.3 Kaasukromatografia	19
3.2 Massaspektrometria	20
3.3 Analyysimenetelmän valinta	21
4 ANALYYSIMENETELMÄN KEHITYS	23
4.1 Työturvallisuus ja käytetyt reagenssit	23
4.2 Välineet ja laitteet	25
4.3 Menetelmien testaus	26
4.4 Menetelmän optimointi	31
4.4.1 Triton X-100:n tunnistaminen	34
4.5 Näytteenkäsittely	34
4.5.1 Standardinäytteet	36
4.5.2 Näytteet	38
5 TULOKSET	39
5.1 Kromatogrammien integrointi	39
5.2 Tulosten laskeminen	40
5.3 Tulosten tarkastelu	43

6 LOPUKSI	45
------------------	-----------

LÄHTEET	46
----------------	-----------

LIITTEET

Liite 1. Standardisuorien kuvaajat.

Liite 2. Testatut parametrit ja havainnot HILIC-menetelmällä.

KUVAT

Kuva 1. Triton X-100:n rakennekaava (MPBio 2021).	9
Kuva 2. Misellien rakenne. Alkuperäisen kuvan teksti on käännetty suomeksi (Rusnano 2021).	10
Kuva 3. Ionittomien detergenttien faasidiagrammi, jossa esitetään lämpötilan ja pitoisuuden vaikutus. Alkuperäisen kuvan teksti on käännetty suomeksi. (Thomas & Dirk, 2007).	12
Kuva 4. Nestekromatografian rakenne.	16
Kuva 5. Triton X-100:n absorbanssispektri (Joshua L 2011).	18
Kuva 6. Kaasukromatografian rakenne. Alkuperäisen kuvan teksti on käännetty suomeksi (Wikipedia Commons 2021).	19
Kuva 7. Massaspektrometrin rakenne. Alkuperäisen kuvan teksti on käännetty suomeksi. (Chemguide 2021).	20
Kuva 8. Kromatogrammi Phenomenexin RP-menetelmällä analysoidusta Triton X-100:sta. (Phenomenex 2021).	21
Kuva 9. Kromatogrammi HILIC-menetelmällä analysoidusta Triton X-100:sta (Farsang 2019).	22
Kuva 10. Kaavio oktyylifenolijätteiden käsittelyyn.	24
Kuva 11. Triton X-100:n vaste UV-detektorilla eri aallonpituuksilla.	28
Kuva 12. Menetelmän kehityksen alussa käytetty gradienttiprofiili.	29
Kuva 13. Kromatogrammi 10 µg/mL näytteestä.	30
Kuva 14. Kromatogrammi 1 µg/mL Triton X-100 näytteestä.	33
Kuva 15. Kromatogrammi näytteestä, joka sisälsi 12,5 µg/mL Triton X-100 ja 1,25 µg/mL 4-teOp.	33
Kuva 16. Triton X-100:sta mitattu absorbanssispektri.	34
Kuva 17. Triton X-100 nestekristallina vesirajapinnassa.	35
Kuva 18. Triton X-100:n piikkien manuaalinen integrointi.	39
Kuva 19. Kromatogrammi pullotusprosessin lopussa otetusta näytteestä.	44

TAULUKOT

Taulukko 1. Työssä käytetyt kemikaalit.	23
Taulukko 2. Käytetyt laboratoriolaitteet ja -tarvikkeet.	25
Taulukko 3. Käänteisfaasimenetelmän aloitusparametrit.	26
Taulukko 4. Testatut parametrit ja havainnot käänteisfaasimenetelmässä.	27
Taulukko 5. HILIC menetelmän aloitusparametrit.	29
Taulukko 6. Optimoidun menetelmän ajoparametrit.	32
Taulukko 7. Analysoidut näytteet.	36
Taulukko 8. 4-tert-oktyylifenoli ja Triton X-100 standardien laimennokset.	37
Taulukko 9. Mitatut näytteet ja niiden laimennokset.	38
Taulukko 10. Triton X-100:n OPEO 9 standardisuora, suoran yhtälö sekä korrelaatiokerroin.	40
Taulukko 11. Näytteiden Triton X-100 pitoisuudet OPEO 9:llä laskettuna.	41
Taulukko 12. Triton X-100:n eri oligomeerien retentioaikojen keskiarvot ja sovitusten korrelaatiokertoimet.	42
Taulukko 13. 4-teOp standardien retentioajat ja pinta-alat.	43
Taulukko 14. Toistettavuusmittaukset 25 µg/mL Triton X-100 standardilla.	43
Taulukko 15. Näytteiden pitoisuuksien keskiarvo ja -hajonta laskettuna OPEO 8, 9 ja 10 oligomeereillä.	44

KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO

Lyhenne	Lyhenteen selitys
4-teOp	4-tert-Octylphenol (4-tert-oktyylifenoli)
DAD	Diode Array Detector (Diodirividetektor)
ECHA	European Chemicals Agency (Euroopan kemikaalivirasto)
GC	Gas Chromatography (Kaasukromatografia)
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (Hydrofiilisen vuorovaikutuksen nestekromatografia)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Korkean erotuskyvyn nestekromatografia)
LC	Liquid Chromatography (Nestekromatografia)
MS	Mass Spectrometry (Massaspektrometria)
OPEO	Octylphenoxyethoxyate (Oktyylifenolietoksyylaatti)
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (Kemikaalien rekisteröinti, arviointi, lupamenettely ja rajoitukset)
RP	Reverse Phase (Käänteisfaasi)
SVHC	Substance of Very High Concern (Erityistä huolta aiheuttava kemikaali)
USP	United States Pharmacopeia (Yhdysvaltojen farmakopea)
UV/vis	Ultravioletti- ja näkyvän valon aallonpituudet

1 JOHDANTO

Opinnäytetyön toimeksiantaja PerkinElmer Wallac Oy on *in vitro*-diagnostiikan reagensseja, laitteita sekä ohjelmistoja tuottava yritys Turussa ja se kuuluu kansainväliseen PerkinElmer terveysteknologiakonserniin. Wallac Oy käyttää reagensseissaan raaka-aineena Triton X-100:aa joka on kauppanimi on opinnäytetyössä tutkittavalle ionittomalle pinta-aktiiviselle aineelle. Käyttökohteita Triton X-100:lla on teollisuudessa ja tutkimuksissa, sekä erityisesti laboratoriokemikaalina.

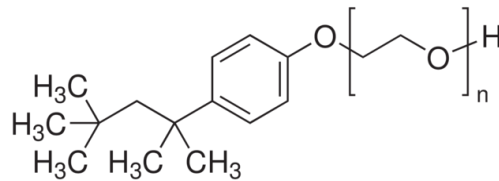
Oktyylifenolietoksylaatit, kuten Triton X-100 ja nonyyylifenolietoksylaatit luokiteltiin erityistä huolta aiheuttaviksi aineiksi (SVHC) REACH-asetuksen liitteessä XIV. Kyseisten yhdisteiden hajoamistuotteet ovat ympäristölle haitallisia, sillä niillä on hormonitoimintaa häiritseviä ominaisuuksia. Lääke- ja muussa teollisuudessa käytetty Triton X-100 muuttui luvanvaraiseksi 04.01.2021 jälkeen. Yrityksillä on mahdollisuus hakea käyttö lupa Euroopan kemikaaliviraston (ECHA) välityksellä.

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää Wallac Oy:n sisäiseen käyttöön analyysimenetelmä, jolla pystytään mittaamaan Triton X-100:n pitoisuudet jätevesiliuoksista. Opinnäytetyössä perehdyttiin kirjallisuuskatsauksena Triton X-100:n fysikaaliskemiallisiin ominaisuuksiin, teollisiin käyttötarkoituksiin, lainsäädäntöön sekä potentiaaliin analyysimenetelmiin. Analyysimenetelmälle asetettiin tavoitteeksi < 10 µg/L pitoisuuksien mittaaminen.

Työn kokeellinen osuus suoritettiin Wallac Oy:n Orgaaniset synteetit ja analyysit -osaston laboratoriossa. Analyysimenetelmä kehitettiin HPLC-laitteistolla ja työssä tutkittiin sekä optimoitiin kahteen erilaiseen erotustapaan perustuvia HPLC-menetelmiä. Analyysimenetelmän kehityksessä selvitettiin optimaaliset laiteparametrit sekä näytematriisit. Opinnäytetyössä tarkastellaan myös analyysimenetelmän ja tulosten luotettavuutta.

2 TRITON X-100

4-(1,1,3,3,-tetrametyyli)butyyli)fenoli-polyetyleeniglykoli, jota myydään kauppanimellä Triton X-100 on ioniton, pinta-aktiivinen aine. Se koostuu aromaattisesta hiilivetyryhmästä, joka on hydrofobinen ja lipofiilinen, sekä siihen kiinnittyneestä hydrofiilisesta polyetylenioksidiketjusta, jonka ketjunpituus on keskimäärin 9,5 yksikköä. Kuvassa 1 havainnoillistetaan Triton X-100:n rakennekaava, jossa n-kirjaimella ilmaistaan ketjuun kiinnittyneiden etyleenioksidiyksikköjen lukumäärää. (MPBio 2021).



Kuva 1. Triton X-100:n rakennekaava (MPBio 2021).

Euroopan kemikaaliviraston määritelmän mukaisesti polymeeri koostuu vähintään kolmen monomeeriyksikön pituisesta jaksosta, joka on kiinnittynyt kovalenttisella sidoksella lähtöaineeseen. Triton X-100 on oligomeeri, eli polymeeri jossa yksikköjä on kiinnittynyt jonoon pieni määrä (ECHA 2017). Hydrofofiilisten etyleenioksidiyksikköjen määrä vaikuttaa yhdisteen pinta-aktiivisiin ominaisuuksiin, ja tämän vuoksi oktyylifenolietoksylaatteja tuotetaan sekä kaupallistetaan eri etyleenioksidiyksikköjen määrillä (Farsang 2019, 7).

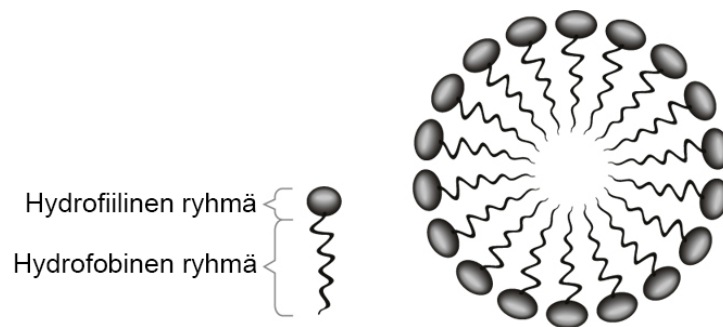
2.1 Triton X-100:n fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet

Pinta-aktiiviset aineet ryhmitellään niiden hydrofiilisen pään varauksen mukaisesti. Anioniset detergentit ovat yleisimmin käytettyjä, esimerkiksi yleispuhdistusaineina, pesuaineina ja saippuina. Muita pinta-aktiivisia aineryhmiä ovat ionittomat, kationiset ja amfoteeriset detergentit. Ionittomilla detergenteilla ei ole sähköistä varausta käyttöliuoksissa, jolloin niitä voidaan käyttää laajalla pH-alueella (Dharaiya 2017, 7).

2.1.1 Misellit

Pinta-aktiivisten aineiden ominaisuudet ovat peräisin niiden kyvystä muodostaa misellejä eli amfofiilisiä kolloidisia rakenteita, jotka ovat 5 nm ja 200 nm väliltä partikkelikooltaan. Pinta-aktiiviset aineet ovat yleensä vesiliuoksissa monomeereinä tai miselleinä. (Patel 2015.)

Vesiliuoksissa detergentin hydrofiilinen pää on misellien rakenteessa ulkona ja lipofiilinen häntä sisäpuolella. Tällöin yhdiste hakeutuu öljypartikkelin ympärille lipofiilisen häntän vetovoimien takia. Ulkopuolella oleva hydrofiilinen puoli pitää misellin ja sen sisältämän öljyn liuenneena vesiliuokseen, samalla mahdollistaen sitoutumisen poolisiin molekyyliin. Miselleillä voidaan esimerkiksi kuljettaa lipofiilisiä lääkemolekyyliä vesiliuoksissa sekä hallita nanopartikkelien itserakentumista.



Kuva 2. Misellien rakenne. Alkuperäisen kuvan teksti on käännetty suomeksi (Rusnano 2021).

Ionittomilla detergenteilla lämpötila vaikuttaa kriittiseen misellienmuodostumiskonsentraatioon (CMC). Lämpötilalla on myös vaikutusta misellien muotoon ja kokoon. Korkeammassa lämpötilassa Triton X-100:n ellipsin muotoiset misellit muuttuvat pidemmiksi sekä kasvavat kooltaan kohtalaisesti. Lisäaineilla, kuten polymeerillä tai suolalla, voidaan hallita muodostuvien misellien kokoa ja muotoa huomattavasti. (Patel 2015, 6).

Lisäaineet vaikuttavat ionittomien detergenttien miselleihin hydrofobisten ja hydrofiilisten vuorovaikutusten kautta. Suolat kuten natriumkloridi ja natriumjodidi vaikuttavat misellien kokoon. NaCl:n läsnäolo muodostaa suurempia ja NaI:n pienempiä misellejä (Dharaiya 2015, 6). Triton X-100:n CMC on 0,22 mM, mutta lisäaineilla tai lämpötilaa muuttamalla CMC voi olla 0,17–0,3 mM (Thomas, A. & Dirk, L. 2007, 429).

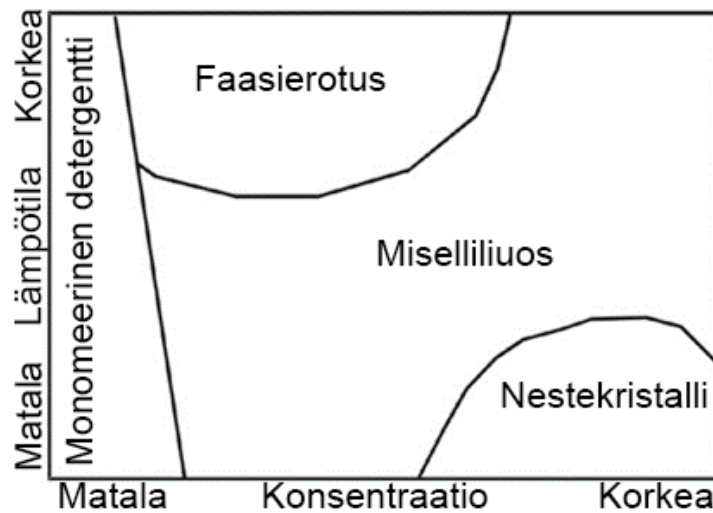
2.1.2 Sameutumispiste

Sameutumispisteellä tarkoitetaan lämpötilaa, jossa pinta-aktiivisten aineiden hydrofiilisen pään liukoisuus vähenee niin paljon liuoksessa, että yhdiste saostuu ja on havaittavissa silmin liuoksen sameutumisena.

Lyhyemmät polyetylenioksidiketjut laskevat sameutumispistettä, koska niiden liukoisuus vähenee vedessä. Sameutumispiste on myös riippuvainen surfaktantin pitoisuudesta (Dharaiya 2015, 3). 1 m-% pitoisuudessa Triton X-100:n sameutumispiste vesiliuoksessa on 66°C. (Halide 2010, 675).

Sameutumispistettä hyödynnetään solukalvojen proteiinien eristämisessä ja puhdistamisessa, erottamalla detergentin misellien kantamat proteiinit eri faasiin. Triton X-100:lla on kohtalaisen korkea sameutumispiste proteiinien faasierotukseen sellaisenaan, mutta lisäämällä 9–23 % ammoniumsulfaattia tai 16–25 % natriumkloridia, sameutumispiste laskee huoneenlämpöön. Korkeissa konsentraatioissa ionittomien detergenttien sameutumispiste nousee voimakkaasti ja matalissa lämpötiloissa tapahtuu faasimuutos nestekristalliksi. Tyypillisissä käyttöliuoksissa olevat konsentraatiot ovat niin matalia, ettei nestekristallien muodostumista tai sameutumispisteen nousua tarvitse huomioida (Thomas & Dirk, 2007, 2).

Kuvassa 3 havaittavat ionittaman detergentin faasimuutokset ja ominaisuudet vaikuttivat sopivan analyysimenetelmän valintaan sekä näytteiden käsittelyyn. Ionittomien detergenttien liukenevuus vähenee vedessä, kunnes lämpötila saavuttaa sameutumispisteen ja yhdiste saostuu vesifaasista silminhavaittavana sameutena.



Kuva 3. Ionittomien detergenttien faasidiagrammi, jossa esitetään lämpötilan ja pitoisuuden vaikutus. Alkuperäisen kuvan teksti on käännetty suomeksi. (Thomas & Dirk, 2007).

Triton X-100 muodostaa matalassa pitoisuudessa misellejä, joiden muotoon ja kokoon vaikuttavat lämpötila sekä mahdolliset vesiliuoksessa olevat lisäaineet, esimerkiksi suolat. Kyseiset ominaisuudet ovat hyödyllisiä Triton X-100:n teollisuus- ja tutkimuskäyttötarkoituksissa, joissa yhdisteen käyttäytymistä hallitaan, mutta analyysimenetelmässä se on kehitysparametri tai jopa rajoite.

2.1.3 Triton X-100:n hajoamistuotteet ja -mekanismit

Triton X-100:n hajoamistuotteena syntyvät oktyylifenolit ovat endokriinisesti häiritseviä, sillä ne toimivat estrogeenianalogeina vesieläimille ja eläimille. Oktyylifenolietoksylaatit eivät hajoa merkittävästi abioottisissa vesiolosuhteissa, vaan niiden pääasialliseksi hajoamismekanismit on havaittu mikrobien metabolia. Oktyylifenolin ja etoksylaatin välinen sidos on vahva, jolloin hydrolyyttistä hajoamismekanismia pidetään epätodennäköisenä. Fotolyysin kautta tapahtuvaa hajoamista esiintyy vesiympäristössä vain parin ensimmäisen senttimetrin syvyydelle, ja ilmassa fotolyysia voisi tapahtua vain lyhytketjuisille, matalan höyrynpaineen omaaville oktyylifenolietoksylaateille. (REACH 2011, 21, 10-13.)

Pseudomonas sp. TX1 voi käyttää ainoana hiilen lähteenä oktyylifenolietoksylaatteja, lyhentäen etyleenioksidiketjujen pituutta ja tuottaen metaboliittina oktyylifenoleja sekä oktyylifenolin karboksylaatteja. Etyleenioksidiketjun pilkkomiseen on oksidatiivinen ja ei-

oksidatiivinen biohajoamismekanismi. Oksidatiivisessa biohajoamisessa yhdisteen päässä olevat etoksylaatit hapettuvat ja muuttuvat karboksylaateiksi, jotka pilkkoutumisen ohessa tuottavat glyoksyylihappoa. Ei-oksidatiivisessa biohajoavuudessa yhdisteen päässä oleva hydroksyyli-ryhmä siirtyy viimeiseksi hiileksi, johtaen epävakaiseen kemialliseen rakenteeseen. Etoksylaattien lyhenemisen ohella kyseisessä mekanismissa vapautuu asetaldehydiä. Kyseisten mikrobien on havaittu hyödyntävän myös oktyylifenolia hiililähteenä. (Yi-Wen 2010, 1.)

4-tert-oktyylifenoli on itsessään vakaana pysyvä yhdiste, joka imeytyy voimakkaasti maaperään, lietteeseen ja sedimenttiin. Lietteessä ja anaerobisessa olosuhteessa yhdisteellä on hidaskatoamisprosessi, puoliintumisajan ollessa 49-285 päivää. Maaperässä pääasiallinen hajoaminen on vielä hitaampaa kuin lietteessä. Oktyylifenolietoksylaatit aiheuttavat maaperässä tai lietteessä jatkuvan ja mahdollisesti pitkäaikaisen lähteen 4-tert-oktyylifenolille ympäristöön (REACH 2011, 22).

2.2 Lainsäädäntö

Kemikaalien aiheuttamia ympäristöhaittoja ennaltaehkäistään jätelainsäädännöllä ja kemikaalilainsäädännöllä, josta merkittävä osa on EU:n yhteisötason asetuksia. Suomessa kansallinen lainsäädäntö täydentää ja toteuttaa EU:n säädöksiä. (Ympäristöministeriö 2021).

ECHA eli Euroopan kemikaalivirasto toimeenpanee ja valvoo EU:n kemikaaliasetuksia, joiden tavoitteena on suojella ihmisten terveyttä ja luontoa, sekä edistää innovaatiota ja kilpailukykyä. ECHA auttaa yrityksiä toimimaan EU:n kemikaaliasetusten mukaisesti, tarjoaa tietoa kemikaaleista ja käyttöturvallisuudesta, kannustaa innovaatiota kemianteollisuudessa huolestuttavien aineiden korvaamisessa sekä toimii yhdessä EU:n komission ja hallintoelimien kanssa huolestuttavien kemikaalien tunnistamisessa ja tarpeellisissa jatkotoimissa.

REACH

REACH eli kemikaalien rekisteröinti, arviointi, lupamenettely ja rajoitukset on EU:n asetus, joka vaikuttaa kaikkiin Euroopassa käytettäviin tai valmistettaviin kemikaaleihin. REACH asettaa vaatimustenmukaisuuden täyttymisen todistustaakan yrityksille, jolloin yritysten täytyy tunnistaa ja hallita kemikaalin tuotannossa sekä käytössä olevia riskejä (ECHA 2021).

Oktyylifenolietoksylaatit, kuten Triton X-100 ja nonyylifenolietoksylaatit luokiteltiin REACH-asetuksen liitteessä XIV erityistä huolta aiheuttaviksi aineiksi (Substance of Very High Concern). Lääke- ja muussa teollisuudessa käytetty Triton X-100 on velvoitettu korvattavaksi siirtymäaikaan 04.01.2021 mennessä, mutta yrityksillä oli mahdollisuus hakea käyttöön lisää aikaa ECHA:n lupamenettelyn välityksellä tietyin ehdoin. Käyttöluvan myöntämistä varten on osoitettava tarpeellinen riskienhallinta aineen käytössä tai on osoitettava, että sosioekonomiset hyödyt ylittävät aineen käytöstä johtuvan riskin. Vaatimuksena on myös, ettei aineelle löydy soveltavaa vaihtoehtoa. (ECHA 2021.)

2.3 Teolliset käyttötarkoitukset

Triton X-100 on yleisesti käytetty detergentti laboratorioissa sekä lääketeollisuudessa. Kemikaalin tavaramerkin nykyinen omistaja on The Dow Chemical Company, joka esittää käyttöalueiksi myös maali-, pinnoite-, paperi-, agrokemikaali-, muovi- ja kuituteollisuuden. Se soveltuu erityisesti steriiliin jäädytysten ja sulatusten stabilointiin sekä dispersioimaan pigmenttejä ja hiiltä (Dow Inc 2021). Triton X-100 kykenee sitoutumaan proteiineihin ilman niiden denaturoimista, jonka takia sitä on käytetty erottelemaan tai poistamaan biomolekyyliä, kuten aminohappoja, proteiineja ja nukleinihappoja. (Dharaiya 2015, 2). Nanoteknologiassa pinta-aktiivisia aineita käytetään materiaalien hallitsemisessa nanometrien mittakaavassa. Triton X-100:n on tutkittu kiinnittyvän hiilinanoputken hydrofobiseen pintaan erityisen hyvin, nostaan samalla kolloidista dispersiota vesiluokassa. (Keinänen 2018.)

3 ANALYYSIMENETELMÄT

Sopivia analyysimenetelmiä Triton X-100:n mittaamiseen kartoitettiin tieteellisistä artikkeleista sekä laboratoriolaitevalmistajien julkaisuista. Kromatografiset analyysimenetelmät olivat soveltuvimmat mitattavien pitoisuuksien ja näytteenkäsittelyn puolesta. Massaspektrometri olisi tarpeellinen pienempiin mittauspitoisuuksiin ja oligomeerien tunnistamiseen.

3.1 Kromatografiset analyysimenetelmät

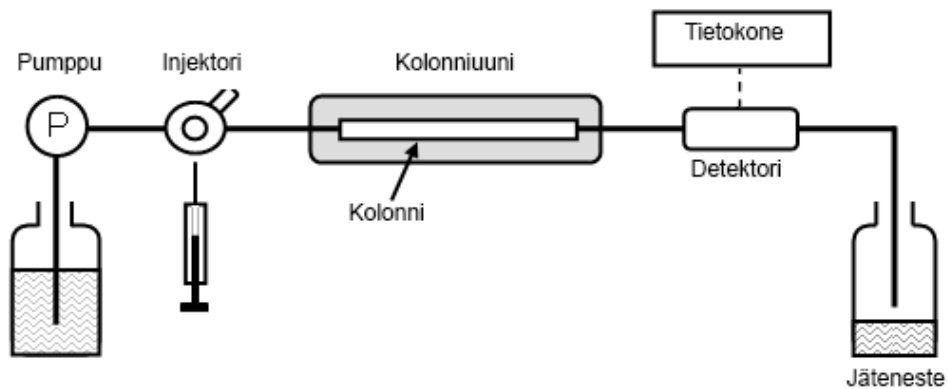
Kromatografiassa erotetaan näytteen sisältämät komponentit kahden eri faasin, liikkuvan- ja stationaarifaasin välillä. Liikkuvan faasin komponenteilla on erilainen vuorovaikutus stationaarifaasin kanssa, jolloin liikkuvassa faasissa olevat näyteaineet voidaan erottaa etenemisnopeuden perusteella niiden kulkeutuessa stationaarifaasin läpi. Liikkuva faasi on neste tai kaasu. Stationaarifaasi on viskoosinen neste tai kiinteä aine, joka on pakattu kapillaariputkeen tai pylvääseen eli kolonniin. Kolonniin sisään kulkeutuvaa liikkuvaa faasia kutsutaan eluentiksi, ja kolonnista poistuvaa eluaatiksi. Koko prosessia kutsutaan eluutioksi (Harris 2009, 542).

Kromatografia voidaan jaotella erotusmekanismien perusteella. Erityyppisiä kromatografisia erotusmenetelmiä ovat adsorptio-, partitio-, ioninvaihto-, kokoekskluusio- ja affiniteetikromatografia. (Harris 2009, 543).

Kolonnista eluoituneet komponentit havaitaan detektorin avulla. Detektorin antamasta signaalista piirretään graafi, eli kromatogrammi, jossa toisena funktiona on eluutioaika. Retentioaika ilmaisee näytteen injektioimisen ja detektorin havaitseman näytekomponentin signaalin välistä aikaa. Näytekomponentilla, jolla on pidempi retentioaika, on voimakkaampi retentio eli vuorovaikutus stationaarifaasin kanssa kolonnissa (Harris 2009, 9, 544).

3.1.1 HPLC

Korkean erotuskyvyn nestekromatografiassa liikkuva nestefaasi pakotetaan kolonnin läpi. Kuvassa 4 havainnollistetaan HPLC laitteistoa, joka koostuu tyypillisesti pumppuyksiköstä, näytteensyöttäjästä, kolonniuunista, kolonnista, detektorista ja tietokoneesta, jolla ohjataan laitteistoa sekä käsitellään tuloksia. HPLC nestefaasi eli ajoliuos, koostuu liuottimien sekoituksista ja lisäaineista, kuten puskureista, hapoista tai ioniparireagensseista.



Kuva 4. Nestekromatografian rakenne.

Pumput tuottavat tasaisen virtauksen ajoliuokselle jopa 400 bariin asti ja jopa 10 mL/min virtausnopeuksille. Riippuen laitteesta, ajoliuoksia voi olla neljä samanaikaisesti gradienttiaoja varten ja ne sekoitetaan 4-suuntaisen venttiilin kautta tyypillisesti matalassa paineessa, ennen päätymistä korkeapainepumpuille. (Harris 2009, 611). Yleensä HPLC-analyysissä paineet ovat 40–300 barin välillä ja virtausnopeudet 0,5–5 mL/min. (Harris 2009, 598).

Näyte injektoidaan näytesilmukkaan ilmanpaineessa. Venttiilit ohjaavat korkean paineen ajoliuoksen silmukkaan ja näyte kulkeutuu ulostuloverteilla kolonniin. [Harris s.611] Tyypillisesti injektoidavat näyteliuoksen tilavuudet ovat 2–10 μL välillä, mutta suurempia tilavuuksia on mahdollista injektoida. Injektiotilavuuksia rajoittava tekijä on yleisesti kolonnin kapasiteetti sekä laitteen kapillaariputkien tilavuudet.

HPLC kolonnit ovat tyypillisesti metalliputkia, jotka on pakattu tyypillisesti hienojakoisella silikalla ja ne voivat sisältää erilaisia funktionaalisia ryhmiä. Kolonnin tilavuudesta silikapartikkelit täyttävät noin 40 % ja liuotin 60 %. HPLC kolonnit ovat tyypillisesti pituudeltaan 5–30 cm ja sisähalkaisijaltaan 1–5 mm. Kolonnien suorituskykyyn kuten resoluutioon ja

eluutioaikaan vaikuttaa muunmuuassa stationaarifaasiin pakatun partikkelien halkaisija, joka on tyypillisesti 3 μm ja 5 μm välillä. Pieni partikkelikoko nostaa kolonnin pohjalukua koska stationaarifaasin pinta-ala kasvaa. Pienellä partikkelikoolla tulee tasaisempi virtaus kolonnin läpi ja se pienentää etäisyyttä, jota liuenneet näyteaineet kulkevat neste-faasin ja stationaarifaasin välisessä diffuusiassa. Nopea näyteaineen vuorovaikutus faasien välillä tuottaa kapeamman näytepiikin ja nostaa havaitsemisrajaa. Pieni partikkelikoko aiheuttaa vastusta liikkuvan faasin virtaukselle ja vaatii korkeamman paineen kulkeutuakseen kolonnin läpi. (Harris 2009, 596-598).

Kolonnin edessä on yleensä suojana esikolonne, joka sisältää saman stationaarifaasin kuin pääkolonne. Pienet partikkelit sekä voimakkaasti absorboituneet liuenneet aineet jäävät kiinni esikolonnein. (Harris 2009, 598).

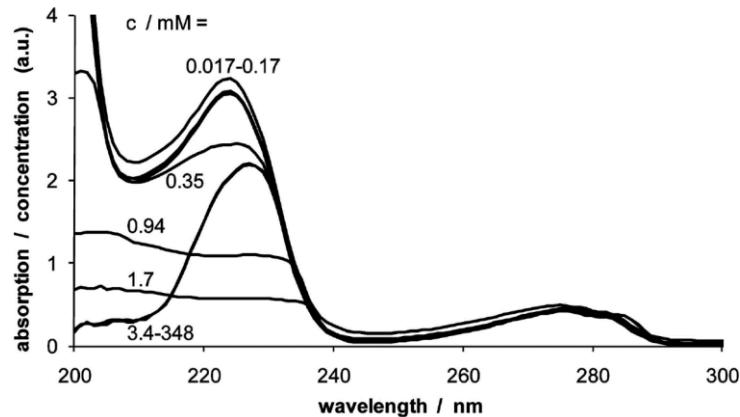
Yleisimpiä detektoreita HPLC-laitteissa ovat spektrofotometriset detektorit, kuten UV/vis-detektori, diodirividetektori ja fluoresenssidetektori. Muita detektoreja ovat esimerkiksi massaspektrometri, refraktiivinen indeksidetektori, elektrokemiallinen detektori sekä varauksellinen aerosolidetektori. (Harris 2009, 612–617).

3.1.2 Spektrofotometriset detektorit

Spektrofotometriassa käytetään valoa mittaamaan kemikaalien pitoisuuksia liuksissa. Aineita pystytään tunnistamaan niille ominaisten aallonpituuksien mukaan, joissa tapahtuu absorbanssia. Absorbanssi on tietyllä pitoisuusalueella lineaarinen, jolloin kvantitatiivinen analyysi on mahdollinen spektrofotometrillä (Harris 2009, 394–397). Spektrofotometri voi olla detektorina toisessa analyysilaitteessa tai täysin itsenäinen laite.

UV/vis detektorilla voidaan mitata näytteitä ultravioletin ja näkyvän valon aallonpituusalueella. Se on yleisin nestekromatografissa käytetty detektori, koska sillä voidaan mitata monipuolisesti erilaisia näytekomponentteja sekä se kykenee kohtuulliseen tarkkuuteen. Diodirividetektorilla voidaan mitata laajoja absorbanssispektrejä, joita voidaan hyödyntää kromatografisesti eroteltujen näytekomponenttien tunnistamisessa.

Triton X-100 esiintyy vesiliuoksessa kirkkaana nesteenä, joka absorboi UV-aallonpituuksia. Kuvassa 5 on esitettyä Triton X-100:n spektri suhteutettuna eri pitoisuuksiin. Yhdisteellä on selkeitä absorbanssihuippuja 200, 225 ja 275 nm aallonpituuksissa.



Kuva 5. Triton X-100:n absorbanssispektri (Joshua L 2011).

Spektrofotometrisessä analyysissä näytematriisi voi sisältää häiritseviä komponentteja, jotka vääristävät kvantitatiivisia analyyskejä. Häiriötekijät voidaan poistaa näytteenkäsittelymenetelmillä tai erottelemalla näytekomponentit kromatografisesti.

Käänteisfaasikromatografia

Käänteisfaasikromatografia (Reversed phase chromatography) on erotusmenetelmä, jossa stationaarifaasi on pooliton tai heikosti poolinen ja liikkuva faasi poolinen. Vähemmän poolisella liuottimella on suurempi eluutiovoima. Käänteisfaasissa ei tapahdu piikkien häntimistä neutraaleilla yhdisteillä, sillä stationaarifaasissa on vähemmän alueita joihin yhdisteet voi kiinnittyä voimakkaasti. Normaalifaasikromatografia on herkkä pienelle määrälle vettä liikkuvassa faasissa, jolloin käänteisfaasikromatografia on soveltuvampi vettä sisältävien Triton X-100 näytteiden takia. (Harris 2009, 602-603.)

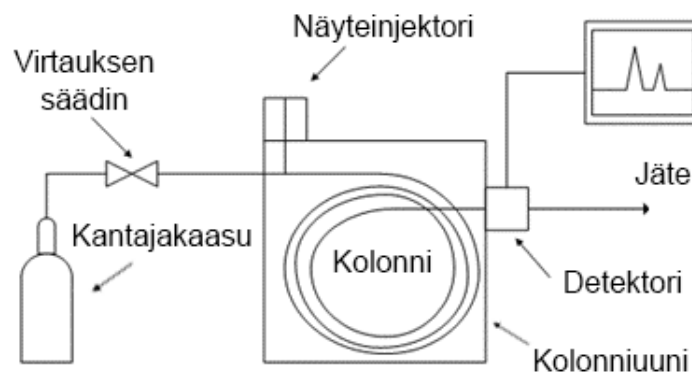
Ajoliuoksen veden osuutta orgaanisista liuottimista voi säätää käänteisfaasimenetelmässä hyvin laajalla alueella, jolloin pinta-aktiivisen aineen käyttäytyminen olisi ennustettavissa.

Hydrofiilinen vuorovaikutuskromatografia

Hydrofiilinen vuorovaikutuskromatografia (Hydrophilic interaction chromatography, HILIC) perustuu voimakkaasti pooliseen stationaarifaasiin ja pooliseen liikkuvaan faasiin, joka on tyypillisesti 25–97 V-% asetonitriliä tai muuta liuotinta sekoitettuna vesipohjaiseen puskuriliuokseen. Liuenneet yhdisteet tasapainottuvat liikkuvan faasin ja stationaarifaasin pinnalla olevan vesifaasin välillä. HILIC:ssa eluutiovoima kasvaa mitä enemmän liikkuva faasi sisältää vettä. Gradientteluutio toteutetaan nostamalla veden osuutta liikkuvassa faasissa. (Harris 2009, 606).

3.1.3 Kaasukromatografia

Kaasukromatografiassa näytteet sekä liikkuva faasi kulkeutuvat kolonnin läpi kaasuna. Liikkuvaa faasia kutsutaan kantajakaasuksi ja se on tyypillisesti heliumia, typpeä tai vetyä. Stationäärifaasina kaasukromatografiassa on joko haihtumaton neste sidottuna kolonnin sisäpintaan, jolloin näytekomponenttien erottuminen perustuu komponenttien jakautumiseen, tai kiinteitä parikkeleita, jolloin vuorovaikutus perustuu absorptioon. Kuvassa 6 havainnollistetaan kaasukromatografia, joka koostuu injektorista, kolonniuunista, kolonnista, detektorista sekä ohjauslaitteesta.



Kuva 6. Kaasukromatografian rakenne. Alkuperäisen kuvan teksti on käännetty suomeksi (Wikipedia Commons 2021).

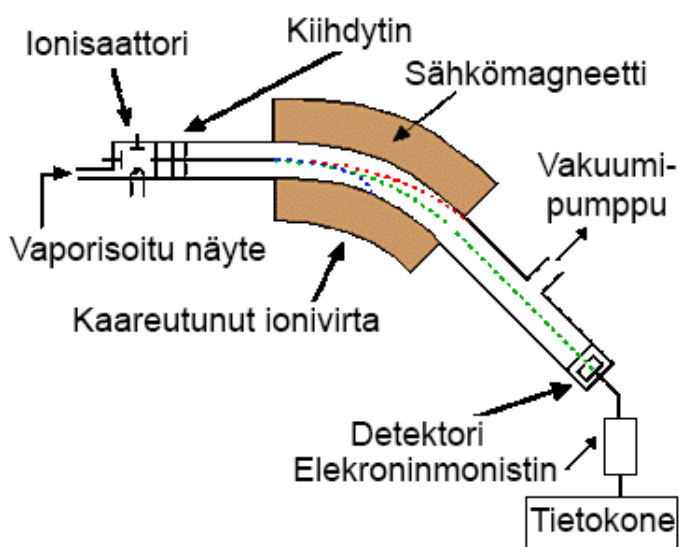
Kaasukromatografissa haihtuva neste- tai kaasunäyte injektoidaan septumin läpi lämmitettyyn injektiopesään, jossa näyte haihtuu nopeasti. Virtaava kantajakaasu kuljettaa höyrystyneen näytteen kolonnin läpi ja erottuneet komponentit tunnistetaan detektorin

antamalla signaalilla. Kolonna lämmitetään, jotta eluoituminen tapahtuu käytännöllisessä ajassa (Harris 2009, 565–566).

Kaasukromatografi soveltuu helposti haihtuville yhdisteille. Triton X-100 hajoamistuotteena tulevaa 4-tert-oktyylifenolia voidaan analysoida kaasukromatografilla, yhdisteen matalan molekyylimassan takia.

3.2 Massaspektrometria

Massaspektrometri mittaa atomien, molekyylien tai molekyylien osien massaa ja sen toiminta perustuu varauksellisten partikkelien käyttäytymiseen sähkömagneettisessa kentässä. Kuvassa 7 havainnollistetaan massaspektrometria, joka koostuu ionilähteestä, massa-analysaattorista ja detektorista.



Kuva 7. Massaspektrometrin rakenne. Alkuperäisen kuvan teksti on käännetty suomeksi. (Chemguide 2021).

Massaspektrometrissä ionisoitu näyte kiihdytetään sähkökentän avulla, jonka jälkeen jokainen ionisoitunut komponentti erottuu niiden massan ja varaussuhteen mukaisesti kulkeutuessaan magneettikentän läpi detektorille. Saman massan ja varauksen omaavat ionit kulkevat samaan pisteeseen, kun kevyemmät tai raskaammat ionit kaareutuvat ja osuvat eri kohtiin detektorissa. Kunkin ionin lukumäärä ja massa mitataan detektorin elektronimonistajassa, jonka antamasta signaalista luodaan massaspektri.

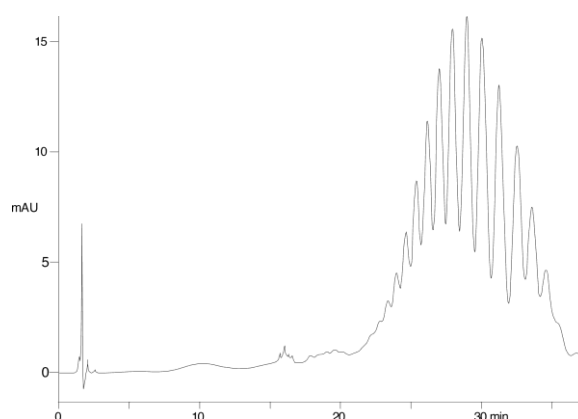
Massaspektristä ilmenee näytteen muodostaneiden ionien massa x-akselilla ja niiden suhteellinen määrä y-akselilla. (Opintohallitus 2021.)

Harris esittää massaspektrometrin olevan tehokkain detektori kromatografiassa, koska sillä voidaan saavuttaa erittäin matala havainnointiraja ja se soveltuu sekä kvalitatiiviseen että kvantitatiiviseen analyysiin sekä kykenee erottamaan saman retentioajan omaavat yhdisteet. Massaspektrometri voi olla selektiivinen tutkittavan näytteen suhteen, helpottaa näytteen käsittelyä tai kromatografista erottamista. Nestekromatografiassa yleisiä puskureja tai muita ajoliuoksen haihtumattomia lisäaineita pitää välttää, kun havainnointimenetelmänä käytetään massaspektrometriä. (Harris 2009, 502.)

3.3 Analyysimenetelmän valinta

Triton X-100:lle sopivia nestekromatografisia analyysimenetelmiä oli kirjallisuudessa käänteisfaasi- ja HILIC-kolonneille. Näillä pystytään erottelemaan kromatografisesti oligomeerit. Farsangin analyysimenetelmä (Farsang 2019) hyödynsi massaspektrometriä nestekromatografia laitteiston detektorina. Sen avulla pystyttiin tunnistamaan eri oligomeerien ketjunpituus mitattujen massojen perusteella.

Kuvassa 8 Phenomenexin (Phenomenex 2021) kehittämässä käänteisfaasimenetelmässä Triton X-100 erottuu ominaislaatuisena piikkiryppäänä.

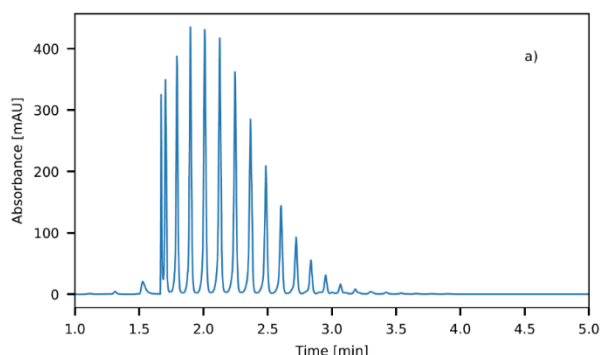


Kuva 8. Kromatogrammi Phenomenexin RP-menetelmällä analysoidusta Triton X-100:sta. (Phenomenex 2021).

Menetelmässä oli Phenomenex Synergi 4 μm Max-RP 80Å 4,6 mm · 150 mm kolonni, ajoliuoksena asetonitriili-vesiseos suhteessa 55:45, isokraattinen eluointi, virtausnopeutena 1 mL/min sekä UV/vis-detektorin aallonpituutena 254 nm. Kyseinen

käänteisfaasiin perustuva HPLC-menetelmä valittiin opinnäytetyössä testattavaksi analyysimenetelmäksi. Menetelmälle ei ollut esitettyä suorituskykyparametrejä tai kromatogrammille näytepitoisuuksia.

Kuvassa 9 on kromatogrammi HILIC-menetelmällä analysoidusta Triton X-100:sta. Piikit erottuvat toisistaan paremmin kuin käänteisfaasimenetelmällä ja olisivat erikseen kvantitavissa.



Kuva 9. Kromatogrammi HILIC-menetelmällä analysoidusta Triton X-100:sta (Farsang 2019).

Farsangin analyysimenetelmässä käytettiin ajoliuoksina asetonitriliä ja vettä, gradientteliuutiota, virtausnopeutena 1 mL/min, kolonnin lämpötilana 20°C, injektioilavuutena 2 µL ja diodirividetektorin mittausaallonpituutena 200, 223 ja 275 nm. Triton X-100 näytteet laimennettiin asetonitriliin 1:100 suhteessa. Tutkimuksessa havaittiin optimaaliseksi gradientin ajaksi neljä minuuttia Triton X-100 yhdisteiden erottamisessa. Isokraattinen eluutio ei ollut sopiva kaikkien oligomeerien tunnistamiseen järkevässä ajassa ja resoluutiossa.

Massaspektrometriä varten eluenteihin oli lisätty muurahaishappoa 100 µL/L pitoisuuteen, parantamaan kromatografisesti erottuvien piikkien muotoa. Kvadrupolianalyssaattorissa näytteet ionisoitiin sähkösumutus-ionisaatiolla, joka oli positiivisella varauksella ja +20 V sumuttimen jännitteellä. Farsangin HILIC erotuksella ja massaspektrometrillä tunnistettiin Triton X-100:n 28 eri oligomeeriä. HILIC valittiin vaihtoehtoiseksi testattavaksi analyysimenetelmäksi opinnäytetyöhön.

4 ANALYYSIMENETELMÄN KEHITYS

Opinnäytetyön kokeellinen osuus suoritettiin Orgaaniset synteesit ja analyysit-osastolla, joka palvelee tuotannon, loppulaadunvalvonnan ja tuotekehityksen tukena Wallac Oy:ssä.

4.1 Työturvallisuus ja käytetyt reagenssit

Opinnäytetyössä käytettäviin kemikaaleihin ja työssä syntyvän jätteen käsittelyyn perehdyttiin ennen laboratoriotyön aloittamista. Työssä käytetyt reagenssit ja niihin liittyvät tiedot ovat koottu Taulukkoon 1.

Taulukko 1. Työssä käytetyt kemikaalit.

Kemikaali	Luokitus	Valmistaja	Työturvallisuus
Asetonitrili	≥99,9 % HPLC	Supelco	Helposti syttyvä, haitallinen
Etanoli	96,5 %	Altia	Helposti syttyvä
Metanoli	≥99,9 % HPLC	Merck	Helposti syttyvä, välitön myrkyllisyys, krooninen terveyshaitta
Muura-haishappo	98 % ≥95 %	Fluka Analytical Honeywell	Syövyttävä
Octoxynol 9	97,8 m-% sertifioitu referenssistandardi	United States Pharmacopea	Syövyttävä, haitallinen, vesiympäristölle vaarallinen
4-tert-Oktyylifenoli	99,2 m-% sertifioitu referenssistandardi	Sigma-Aldrich	Syövyttävä, vesiympäristölle vaarallinen
Triton X-100	100 % laboratorioreagenssi	Sigma-Aldrich	Syövyttävä, haitallinen, vesiympäristölle vaarallinen

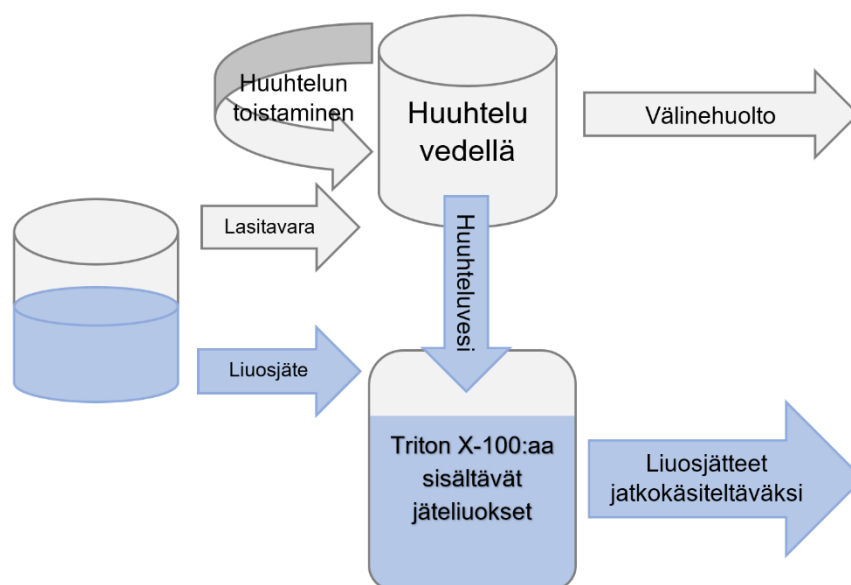
Ympäristölle vaarallisia kemikaaleja kuten Triton X-100:aa ja 4-tert-oktyylifenolia käsiteltiin erityisellä huolella. Suurin ympäristövaikutus kyseisillä yhdisteillä on päästessään

viemäristöön. Vetokaappiin sijoitettiin erillinen muoviastia, johon Triton X-100:aa sisältävät liuokset eristettiin. Menettelyn tavoite oli vähentää riskiä yhdisteiden päätyemisestä viemäriin, esimerkiksi liuosastian kaatuessa.

Jätteiden käsittely

Työssä syntyi liuotinjätettä sekä ympäristölle vaarallista liuosjätettä. HPLC-laitteiston tuottama liuotinjäte kerättiin jäteliuoskanistereihin, jotka olivat merkittyjä syntyvälle jäte-tyypille. Triton X-100:aa sisältävä liuosjäte otettiin talteen ympäristölle vaarallisena jätteenä ja sen käsittelyprosessissa noudatettiin kuvan 10 toimintaperiaatteita.

Puhdas liuotinjäte hävitettiin niille tarkoitettuun jäteastiaan sekä käytetyistä lasiastioista haihdutettiin ylimääräinen liuotin pois ennen pesua tai siirtoa roskiin. Triton X-100:n ja 4-tert-oktyylifenolin käsittelyssä käytetyt lasiastiat puhdistettiin. Astioiden puhtaus varmistettiin vielä erillisellä toimintaperiaatteella, joka on esitetty kuvassa 10.



Kuva 10. Kaavio oktyylifenolijätteiden käsittelyyn.

Ympäristölle vaaralliset pinta-aktiiviset aineet ohjattiin kyseisille jätteille tarkoitettuun jäteastiaan ja kosketuksissa olleiden astioiden puhtaus tarkastettiin. Astiaan lisättiin vettä ja sekoitettiin heiluttamalla tai ultraäänihauteessa. Mikäli vesi vaahtosi, ei lasiastia ollut puhdas ja se otettiin tällöin talteen. Astian huuhtelu toistettiin, kunnes vedessä ei havaittu vaahtoa. Lasitavarat siirretään sen jälkeen välinehuoltoon perusteellisempaa puhdistamista varten.

Kiinteä jäte lajiteltiin asianmukaisesti jätteastioihin, kuten lasijätteet, metallijätteet sekä muut poltettavat jätteet. Koska sekajätteet menevät poltettavaksi, Triton X-100:n ja 4-tert-oktyylifenolin kanssa käytettyjä tarvikkeita ei lajiteltu erikseen.

4.2 Välineet ja laitteet

Taulukossa 2 on esitetty työssä käytetyt laitteet ja tarvikkeet sekä niihin liittyviä oleellisia tietoja. HPLC-laitteistossa käytettiin vain puhtaita, HPLC-laatusia liuottimia ja reagensseja.

Taulukko 2. Käytetyt laboratoriolaitteet ja -tarvikkeet.

Laite tai tarvike	Valmistaja ja malli
Analyysivaaka	Mettler Toledo AT261 ± 0,02 mg
Automaattipipetti	10–100 µL Gibson Microman 100–1000 µL Gibson Microman 1–5 mL Finnpiipette
Ruiskusuodatin	Millex GV PVDF 0,22 µM
pH-mittari	Radiometer PHM240 Meter Lab
HPLC	Shimadzu HPLC
Pumppu	LC10AT
Matalan paineen gradienttiventtiili	FCV-10AL
Vakuumikaasunpoisto	DGU-14A CBM-20A
Fraktionkerääjä	FRC-10A
Automaatti-injektori	SIL-20AC
Kolonniuuni	CTO-20AC
Diodirividetektor	SPD-M10A
UV/Vis-detektor	SPD-20A
Tietokone	Windows PC Labsense ohjelmisto

Ajoliuoksiin tulevien liuosten tilavuudet mitattiin mittalasilla, kanta- ja näyteliuokset valmistettiin aina mittapulloihin. Asetonitriliä ja vettä sekoitettaessa huomioitiin

endoterminen reaktio, jonka takia ajoliuoksia tai näyteliuoksia valmistettaessa niiden annettiin lämmentä huoneenlämpöiseksi.

Epäpuhtaudet voivat aiheuttaa HPLC-laitteistossa esimerkiksi tukoksia esikolonnissa tai varsinaisessa kolonnissa. Tämän vuoksi työssä käytettiin ajoliuoksien valmistuksessa tuoretta MilliQ-vettä ja erityisen puhtaita, HPLC-käyttöön tarkoitettuja liuottimia. Analyysitasoa epäpuhtaammat reagenssit ja näyteliuokset suodatettiin 0,22 µm ruiskusuodattimen läpi.

4.3 Menetelmien testaus

Opinnäytetyössä testattiin kahden eri HPLC-menetelmän sopivuutta Triton X-100:n analysoimiseksi. Ne olivat käänteisfaasikromatografia ja hydrofiilinen vuorovaikutus kromatografia.

Käänteisfaasi

Triton X-100 analyysimenetelmän kehitys aloitettiin Phenomenexin menetelmällä, josta kerrottiin kappaleessa [3.3](#). Taulukossa 3 ilmaistaan oleelliset tiedot menetelmän kehityksen lähtökohdasta.

Taulukko 3. Käänteisfaasimenetelmän aloitusparametrit.

Kolonne	Phenomenex Synergi Max-RP 80Å 4 µm (4,6 · 150 mm)
Kolonniuunin lämpötila	25 °C
Ajoliuos	Asetonitriili-vesi 1:1
Eluointi	Isokraattinen
Virtausnopeus	1 mL/min
Ajoaika	50 min
Injektio-tilavuus	20 µL
Autosampler lämpötila	25 °C
Detektori	UV 254 nm

Testit aloitettiin 1000 µg/mL Triton X-100 pitoisuuden omaavista näytteistä ja ne tuottivat tunnusomaisen piikkiryppään kromatogrammille (Kuva 8. Kromatogrammi Phenomenexin RP-menetelmällä analysoidusta Triton X-100:sta).

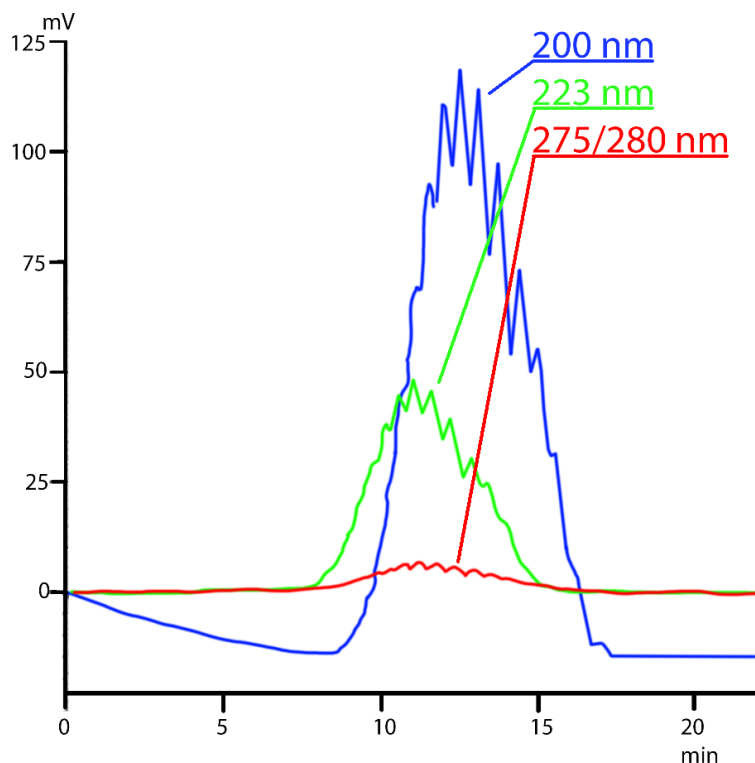
Menetelmällä ei saatu kuitenkaan toistettavia tuloksia pienillä pitoisuuksilla. Ongelmia selvitettiin kartoittamalla eri laiteparametrejä sekä näytteenkäsittelytapoja. Taulukossa 4 on koottu testiparametrit ja niiden vaikutus, kun lähtökohtana on ollut taulukon 3 parametrit. Testattujen detektoriparametrien vaikutus on esitetty kuvassa 11.

Taulukko 4. Testatut parametrit ja havainnot käänteisfaasimenetelmässä.

Parametri	Testattu parametri	Havainnot mittauksesta
UV-detektorin mitausaallonpituus	275 nm	Suurempi vaste detektorilla.
	280 nm	
	223 nm	Huomattavasti suurempi vaste detektorilla, piikit kiinni toisissaan.
	200 nm	Suurin havaittu vaste detektorilla, piikkien signaali päällekkäistä.
Autosampler, lämpötila	15 °C	Lyhyempi retentioaika.
	20 °C	Hieman lyhyempi retentioaika.
Näyte	Suodattamaton	Ei vaikutusta.
	Liuotettu 100 % asetonitrili.	Huonompi oligomeerien erottuminen, näytepiikit kapeampia.

Huonoa toistettavuutta pohdittiin myös näytteenkäsittelyn osalta. Triton X-100:n säilyvyys, reaktiot lasin kanssa, ruiskusuodattimien soveltuvuus sekä lämpötilan vaikutus nousivat tärkeiksi kysymyksiksi. Suodatetulla ja suodattamattomalla näytteellä ei havaittu olevan eroa, joten käytetty ruiskusuodatin oli soveltuva näytteenkäsittelyyn. Uusia kantaliuoksia ja laimennoksia valmistettiin säännöllisesti epävarmuustekijän poistamiseksi, sillä Triton X-100:n säilyvyydestä ei ollut tarkkaa tietoa.

Kuvassa 11 on eri mittausaallonpituuksien tuottama vaste, kun detektorin signaalit ovat suhteutettuna toisiinsa. Näytteiden pitoisuus oli kaikissa 500 µg/mL.



Kuva 11. Triton X-100:n vaste UV-detektorilla eri aallonpituuksilla.

Triton X-100:lla on voimakas absorbanssi matalilla UV-aallonpituuksilla, mutta kyseisillä aallonpituuksilla häiriötekijöitä on myös enemmän (Kuva11).

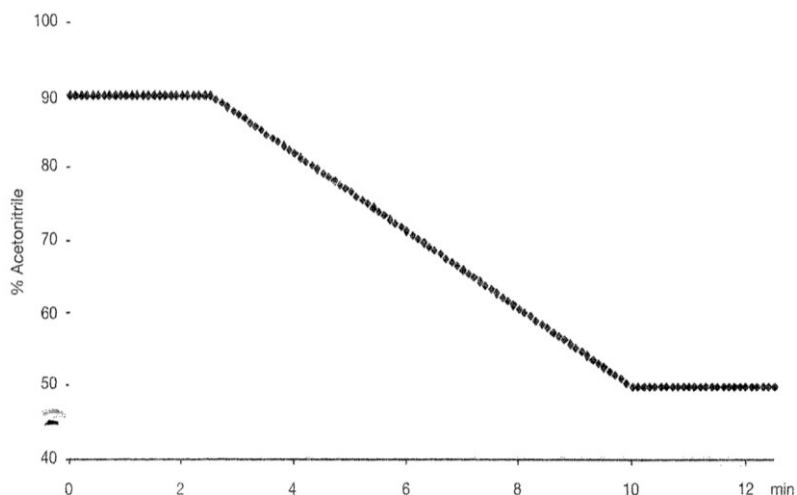
HILIC

Opinnäytetyötä varten oli käytettävissä Phenomenex Kinetex 2,6 µm HILIC 100Å (4,6 · 100 mm) kolonni ja menetelmää lähdettiin kehittämään Phenomenexin kolonnin HILIC-ohjeistuksen (Kuva 12.) sekä Farsangin UHPLC-MS menetelmään pohjautuen (Farsang 2019). Eluointi suoritettiin menetelmässä gradientin avulla. HILIC menetelmällä tavoiteltiin erikseen kvantitaitavissa olevia Triton X-100 oligomeerejä, kun käänteisfaasimenetelmällä oli havaittavissa piikkien sulautumista yhteen. Taulukossa 5 kerrotaan menetelmän aloitusparametrit ja Liitteessä 2 on kasattuna testatut parametrit ja havainnot.

Taulukko 5. HILIC menetelmän aloitusparametrit.

Kolonne	Phenomenex Kinetex 2,6 µm HILIC 100Å (4,6 mm · 150 mm)
Kolonniunin lämpötilä	30 °C
Ajoliuos	A. Asetonitrili/H ₂ O 98:2 B. H ₂ O
Eluointi	Gradientti
Virtausnopeus	1 mL/min
Ajoaika	25 min
Injektio-tilavuus	20 µL
Autosampler lämpötilä	15 °C
Detektori	UV 254 nm
	DAD 220-350 nm

Ajoliuksena oli HPLC-laitteiston A-linjassa asetonitrili ja B-linjassa vesi-asetonitriliiliuos 98:2 tilavuussuhteella. HILIC-kolonne toimii kuin normaalifaasikolonne ja veden osuus ajoliuksessa vaikuttaa voimakkaasti analyytin retentioon. Kuvassa 12 esitetään menetelmässä aloituspisteinä käytettyä Phenomenexin suosittelemaa gradienttiprofiilia.



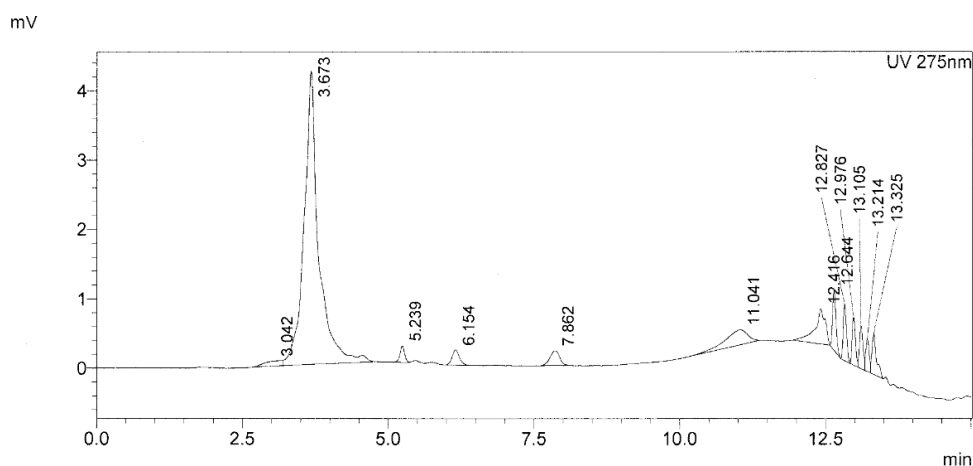
Kuva 12. Menetelmän kehityksen alussa käytetty gradienttiprofiili.

Ensimmäisten näyteajojen jälkeen havaittiin, etteivät Triton X-100 oligomeerit erottuneet tunnistettavasti, jolloin kokeiltiin puskurin lisäämistä ajoliukseen. Ammoniumformiaatin pitoisuus oli 5 mM uusissa ajoliuksissa. Puskurin lisäyksestä saavutettiin parempi

erottuminen, mutta uutena ongelmana havaittiin ajon alussa tulevan piikin peittävän mahdollisesti Triton X-100:n oligomeerejä.

Ajoliuosta valmistettaessa havaittiin, että käytössä oleva 0,5 M ammoniumformiaattiliuos saostuu puhtaaseen asetonitriiliin. Tämän havainnon myötä päätettiin vaihtaa ajoliuoksen lisäainetta. Muurahaishapon lisäämisellä ajoliuokseen oli positiivisia vaikutuksia, sillä aiemmin havaittu signaali oli nyt tunnistettavissa selkeämmin Triton X-100:ksi.

UV-detektorin aallonpituudella havaittiin olevan merkittävä vaikutus Triton X-100:n tunnistamiseen gradienttijaossa, sillä 275 nm oli huomattavasti parempi havaitsemaan Triton X-100:aa. Kuvassa 13 on kromatogrammista havaittavissa HILIC-menetelmällä erotuneet oligomeerit 10 µg/mL näytteestä. Alussa 3,67 minuutin kohdalla tuleva piikki ei ollut tunnistettavissa absorbanssispektrin perusteella Triton X-100:ksi.



Kuva 13. Kromatogrammi 10 µg/mL näytteestä.

Alussa tulevan piikin mahdollisesti peittämät Triton X-100:n oligomeerit oli merkittävin epävarmuustekijä menetelmässä, eikä gradientin myöhempi aloittaminen muuttanut kuin 3,7 minuutin jälkeen retentoituvia piikkejä myöhemmäksi. Myös gradientin aiheuttama pohjasignaalin muutos vaikeutti analyysiä.

HILIC-menetelmällä saavutettiin parempi toistettavuus 10 µg/mL pitoisuuksilla kuin käänteisfaasilla, mutta yhdisteen retentio-ongelmat vaativat selvityksen ennen kuin menetelmää jatkettaisiin.

4.4 Menetelmän optimointi

Käänteisfaasimenetelmää lähdettiin optimoimaan aiemmin toimiviksi havaittujen parametrien pohjalta sekä lisäämällä HILIC menetelmässä tärkeäksi havaittu muura-haishappo ajoliuokseen. Menetelmässä testattiin ensiksi ajoliuosta, joka sisälsi vettä ja asetonitriiliä 1:1 suhteessa sekä muurahaishappoa 100 µL/L. Näytteenä oli 10 µg/mL Triton X-100, joka oli valmistettu 1:1 vesi-asetonitriililiuokseen. Triton X-100:ksi tunnistettavat oligomeerit erottuivat 25–35 minuutin välillä aiempaa selkeämmin.

Lämpötila

Lämpötilavaikutukset havaittiin + 5 °C kylmiöstä otetulla näytepullolla. Triton X-100:lla ei ollut havaittavissa yksittäisiä oligomeerejä, vaan yhdiste tuli yhtenäisenä, isona piikkinä kromatogrammille. Retentioaika väheni 12,8 minuuttiin. Tämän havainnon jälkeen näytepulloa lämmitettiin hanaveden alla ja kyseinen näyte analysoitiin uusiksi. Nyt oligomeerit erottuivat selkeästi 25 ja 39 minuutin välillä. Tästä voitiin päätellä, että Triton X-100:n kromatografiseen erottumiseen vaikuttaa lämpötila.

Näytteen lämpötilan vaikutuksen takia Triton X-100:n retentioon, testattiin myös korkeaa kolonniuunin lämpötilaa. Nostamalla kolonniuunin lämpötila 25°C:ta 50°C:een, havaittiin lähinnä voimakasta pohjasignaalin heittelyä analyyseissä. Hyötyä korkeasta kolonniuunin lämpötilasta ei ollut. Kolonniuunin lämpötilaa laskettiin 40 °C, näytepiikki erottui isona yhtenäisenä piikkinä 26–32 minuutin kohdalla. Ja lisäksi oli havaittavissa vielä yksittäinen terävä piikki 31,7 minuutin kohdalla.

Lämpötilatestien jälkeen asetettiin lämpötiloiksi kolonniuuniin 25 °C ja automaattiseen näytteensyöttäjään 15 °C. Automaattisen näytteensyöttäjän ja täten näytteiden matalampi lämpötila nopeutti yhdisteen retentiota hieman, eikä vaikuttanut piikkien erottamiseen toisistaan.

Ajoliuos

Ajoliuoksen orgaanisen liuottimen osuus vaikutti voimakkaasti retentioaikaan. Nostamalla asetonitriilin määrä 80 V-%:iin, erottuivat Triton X-100:n oligomeerit 3,6–4,75 minuutin välillä.

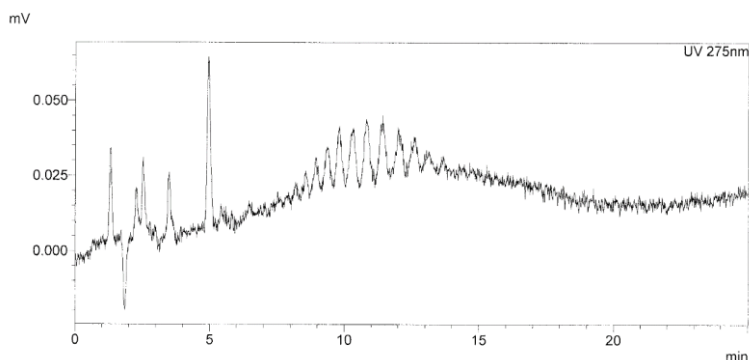
Eri ajoliuoskonsentraatioiden testaamisen tavoitteena oli saada oligomeereille tarpeeksi terävät piikit, jotka erottuvat tarpeeksi toisistaan kvantifiointia varten. Asetonitriilipitoisuus nostettiin 50 %:stä 60 %:iin, koska se nopeutti retentioaikaa sekä tuotti riittävän erotuskyvyn. Muurahaishappoa lisättiin ajoliuokseen 50 µL/L pitoisuuteen. Myös näytematriisi muutettiin vastaamaan ajoliuosta, eli näytteet valmistettiin 60:40 suhteessa asetonitriili-vesiseokseen.

Optimoidun käänteisfaasimenetelmän parametrit, jolla saavutettiin toistettavia ja hyvin erottuvia piikkejä 10 µg/mL näytepitoisuudella on koottu taulukkoon 6.

Taulukko 6. Optimoidun menetelmän ajoparametrit.

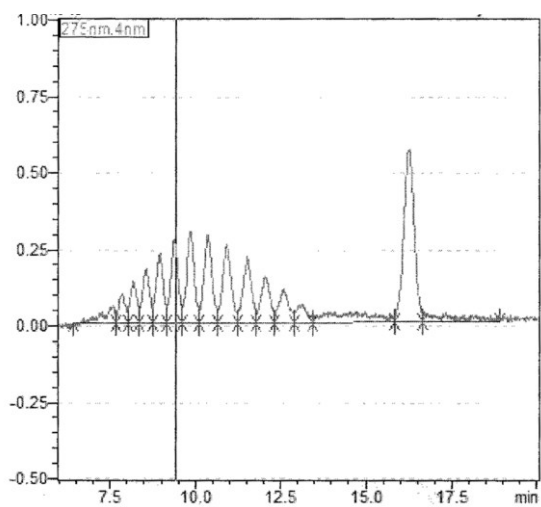
Kolonni	Phenomenex Synergi 2,6 µm Max-RP 80Å (4,6 · 150 mm)
Kolonniuunin lämpötila	25 °C
Ajoliuos	Asetonitriili/H ₂ O 60:40 + muurahaishappo 50 µl/L, pH = 4,2
Eluointi	Isokraattinen
Virtausnopeus	1 mL/min
Ajoaika	25 min
Injektioilavuus	20 µL
Autosampler lämpötila	15 °C
Detektori	UV 275 nm
	DAD 200-350 nm

Triton X-100:n oligomeerien retentioaika on 8–13 minuuttia (Kuva 14). Kromatogrammissa 1,5–5 minuutin välillä tulevat tuntemattomat piikit eivät vastaa absorbanssispekt-riltään Triton X-100:aa. Kyseisten piikkien koko pysyi samana, vaikka analysoidun näytteen pitoisuus muuttui.



Kuva 14. Kromatogrammi 1 µg/mL Triton X-100 näytteestä.

Menetelmää testattiin sertifioiduilla näytteillä. Triton X-100 referenssinäytteestä valmistettiin standardit 5 µg/mL – 125 µg/mL pitoisuusvälille. Menetelmällä testattiin myös Triton X-100:n hajoamistuotteen, 4-tert-oktyylifenolin erottuminen. Kuvassa 15 hajoamistuote oli havaittavissa 16,5 minuutin kohdalla ja Triton X-100:n oligomeerit 7–14 minuutin välillä.

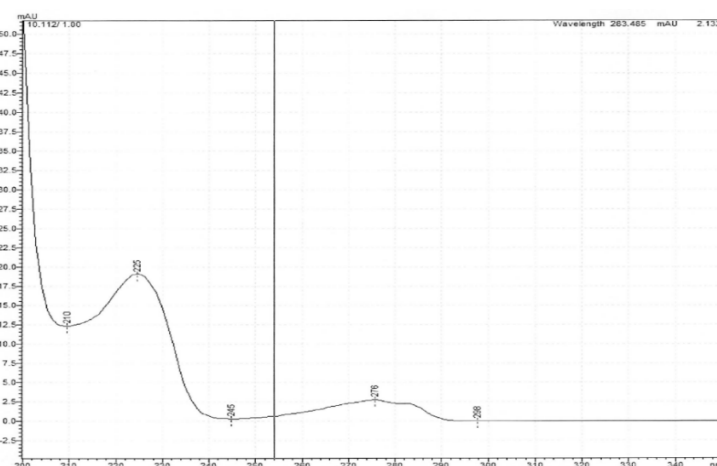


Kuva 15. Kromatogrammi näytteestä, joka sisälsi 12,5 µg/mL Triton X-100 ja 1,25 µg/mL 4-teOp.

Koska 4-teOp on homogeeninen, sitä voitiin analysoida huomattavasti pienempiä pitoisuuksia kuin Triton X-100:aa. 4-teOp standardit valmistettiin 0,25 µg/mL – 5 µg/mL pitoisuusvälille.

4.4.1 Triton X-100:n tunnistaminen

Diodirividetektorilla varmistettiin, että havaitut piikit olivat Triton X-100:n oligomeerejä. Spektrit tallennettiin 200–300 nm aallonpituuden alueelta ja yksittäisen oligomeerin piikkiä tarkasteltiin Labsense-ohjelmiston kautta sekä verrattiin kirjallisuudesta löytyviin spektreihin. Yksittäisen Triton X-100:n oligomeerin absorbanssissa on havaittavissa absorptiomaksimeja 225 nm ja 276 nm aallonpituuden alueilla (Kuva 16.)



Kuva 16. Triton X-100:sta mitattu absorbanssispektri.

Mitatun spektrin muoto on vastaava kuin kirjallisuudessa esitetyllä spektrillä (Kuva 5). Optimoidussa menetelmässä havaitut ylimääräiset piikit tarkistettiin diodirividetektorin keräämästä datasta, eivätkä ne vastanneet Triton X-100:n absorbanssispektriä.

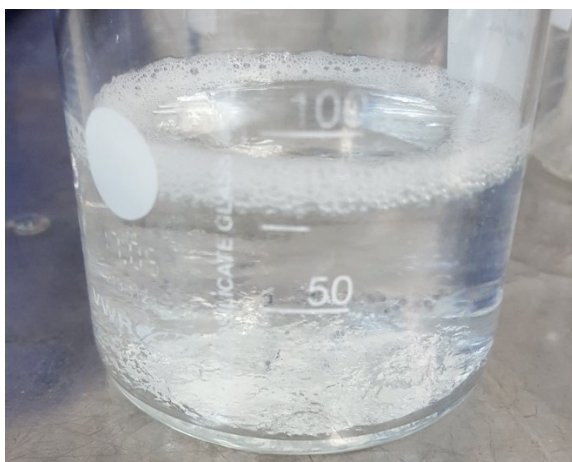
4.5 Näytteenkäsittely

Näytteiden sopivuus analyysilaitteelle on tärkeä menetelmän toimivuuden kannalta. HPLC-laitteistossa näytteen on oltava nestemäisessä olomuodossa sekä pysyvästi stabiilina analyysissä.

Menetelmän kehityksessä vastaan tulleita ongelmia, kuten huonoa toistettavuutta ja ylimääräisiä piikkejä, selvitettiin myös näytteenkäsittelyn puolelta. Työn loppupuolelta lukuun ottamatta Triton X-100 näytteenä käytettiin Sigma-Aldrichin tuotantoreagenssia, joka oli nestemäistä ja viskoosista. Säilytyksessä näytteissä ei havaittu muutosta

uudelleenanalysoitaessa, jolloin voitiin todeta, etteivät näytteet hajonneet tai muuttuneet 1–2 kuukauden aikavälillä.

Puhdas Triton X-100 laimennettiin asetonitriiliin, sillä sen havaittiin veteen laimennettaessa muuttuvan nestekristalliksi (Kuva 17.) Kantaliuoksista laimennettiin tämän jälkeen käyttöliuokset, joilla menetelmän suorituskykyä ja kehitystä tutkittiin. Liitteessä 2 on listattu kaikki HILIC-menetelmässä testatut näytematriisit, joiden perusteella havaittiin ajo-
liuosta vastaavien näytematriisien olevan parhaimmat.



Kuva 17. Triton X-100 nestekristallina vesirajapinnassa.

Triton X-100:aa sisältävät jäteliuosnäytteet eivät sisältäneet analyysiä häiritseviä komponentteja, joten kyseiset näytteet käsiteltiin ruiskusuodattamalla ja laimentamalla standardinäytteiden pitoisuusrajojen sisälle. Taulukkoon 7 on listattu näytteet, jotka mitattiin menetelmällä. Näytteet 1–3 olivat peräisin Wallac Oy:n loppulaadunvalvonnasta, näyte 4 reagenssituotannon prosessista, näyte 5 tuotantoprosessin mittalaitteesta sekä näyte 6 tuotantoreagenssista, jonka Triton X-100 pitoisuus on tiedossa.

Taulukko 7. Analysoidut näytteet.

Näytteet	Näytteen kuvaus	Näyte otettu	Huomioita
1.	Triton X-100 jätekanisteri	06.11.2020	
2.	Delfia-laitteiston jäteliuos	06.11.2020	Tuore näyte laitteesta.
3.	Autodelfia-laitteiston jäteliuos	06.11.2020	
4.a 4.b	Delfia Inducer pullotusprosessi, annosteluletkujen huuhtominen	11.12.2020	Huuhtomisen alusta ja lopusta.
5.	GSP-laitteiston jäteliuos	11.12.2020	Näyte ei ole edustava.
6.	Enhancement Solution-reagenssi	08.12.2020	Sisältää 0,1 % Triton X-100

GSP-jäteliuksesta otettu näyte ei ollut edustava, sillä näytettä saatiin otettua talteen vain pinnalta. Jäteliuosastian pohjalla oli havaittavissa myös saostumaa, joka olisi mahdollisesti vaikuttanut analyysitulokseen.

Inducer pullotusprosessissa annosteluletkut huuhdellaan aina työn päätteeksi. Näytteeksi otettiin 500 mL vettä huuhtelun alusta (Näyte 4.a) sekä lopusta (Näyte 4.b).

4.5.1 Standardinäytteet

Analyysilaitteen kalibrointia varten valmistettiin referenssinäytteistä kantaliuos ja näytelaimennokset. USP Octoxynol 9 referenssistä laimennettiin 1000 µg/mL Triton X-100 kantaliuos. Kantaliuos valmistettiin 100 mL:n mittapulloon, johon lisättiin noin 20 mL asetonitriiliä ja siihen pipetoitiin 102,73 mg Octoxynol 9 referenssinäytettä. Pipetoitu massa punnittiin analyysivaa'alla. Reagenssin mukana toimitetussa sertifikaatissa ilmoitetaan 1 mg:n sisältävän 0,978 mg Octoxynol 9:ää. Kvantitatiivista analyysia varten standardia punnittiin todellisuudessa 100,47 mg.

$$102,73 \text{ mg} \cdot 0,978 = 100,47 \text{ mg}$$

Mittapullo täytettiin 100 mL:n kokonaistilavuuteen asetonitriilillä. 1000 µg/mL kantaliuksesta laimennettiin kalibrointistandardit taulukon 8 mukaisesti. Standardeja varten mittapulloihin lisättiin taulukossa osoitetut tilavuudet MilliQ-vettä, jotka mitattiin 250 mL:n tai

50 mL:n mittalaseilla. 1000 µg/mL kantaliuosta pipetoitiin 2,5 mL:aa jokaiseen mittapulloon mahdollisimman tarkasti.

Referenssitason 4-tert-oktyylifenolista valmistettiin 500 µg/mL kantaliuos. Kiinteää reagenssia siirrettiin spaattelilla lasiseen punnituslaivaan 50,14 mg. Reagenssin sähköisyys teki punnitsemisesta ja käsittelystä haastavaa, sillä sitä siirtyi spaattelista punnitusalustan pintaan lähietäisyydellä. Osa reagenssista jäi punnituslaitteessa alustan ulkopuolelle, ja tämä pyrittiin siirtämään sisäpuolelle spaattelilla. Punnituslaivaa huuhdottiin asetonitriilillä 100 mL:n mittapulloon, jonka jälkeen upotettiin asetonitriilillä täytettyyn 50 mL:n dekantterilasiin. Dekantterilasin sisältö siirrettiin mittapulloon, tavoitteena saada kaikki punnittu 4-tert-oktyylifenoli kvantitatiivisesti siirretyksi. Mittapullo täytettiin 100 mL:n kokonaistilavuuteen asetonitriilillä.

Standardeja varten mittapulloihin lisättiin taulukossa 8 kerrotut tilavuusmäärät MilliQ-vettä sekä 500 mg/mL kantaliuosta pipetoitiin 250 µL:aa jokaiseen mittapulloon mahdollisimman tarkasti.

Taulukko 8. 4-tert-oktyylifenoli ja Triton X-100 standardien laimennokset.

Standardi 4-teOp	Pitoisuus µg/mL	V (kantaliuos) mL	V (H ₂ O) mL	V (kokonaistilavuus) mL
1.	0,25	0,25	200	500
2.	0,5	0,25	100	250
3.	1,25	0,25	40	100
4.	2,5	0,25	20	50
5.	5	0,25	10	25
Standardi Triton X-100	Pitoisuus µg/mL	V (kantaliuos) mL	V (H ₂ O) mL	V (kokonaistilavuus) mL
1.	5	2,5	200	500
2.	10	2,5	100	250
3.	25	2,5	40	100
4.	50	2,5	20	50
5.	100	2,5	10	25
6.	125	2,5	8	20

4.5.2 Näytteet

Mitatut näytteet ja niiden laimennossuhteet ovat taulukossa 9. Mittaus-alueen pitoisuuden ylittävät näytteet oli laimennettu mittausalueelle sopiviksi.

Taulukko 9. Mitatut näytteet ja niiden laimennokset.

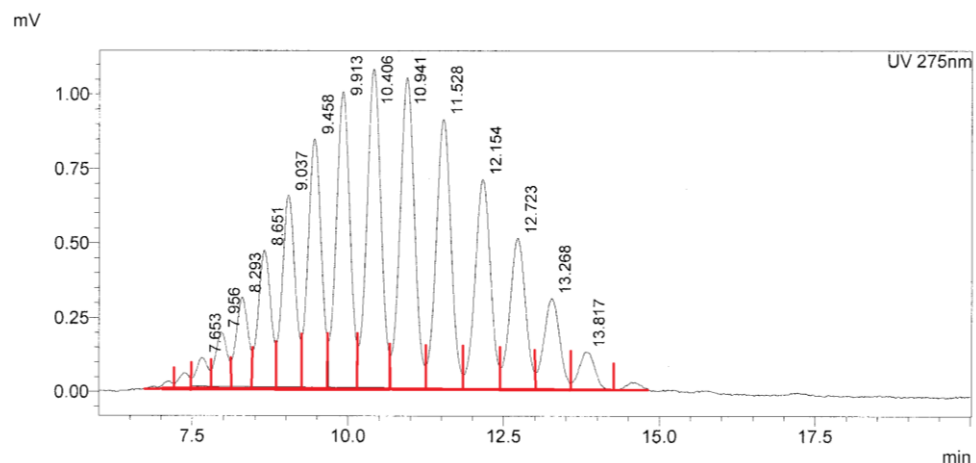
Näyte	Laimennossuhde
1. Triton X-100 jätekanisteri	1:10
2. Delfia-laitteiston jäteliuos	1:1
3. Autodelfia-laitteiston jäteliuos	1:1
4.a Pullotusprosessi, huuhtomisen aloitus	1:10
4.b Pullotusprosessi, huuhtomisen lopetus	1:1
5. GSP-laitteiston jäteliuos	1:10
6. Enhancement Solution-reagenssi	1:10

Näytettä pipetoitiin 25 mL:n mittapulloon. 1:1 laimennetuissa näytteissä käytettiin vain asetonitriliä laimentamisessa. 1:10 laimennoksia varten mittapulloon pipetoitiin 9 mL:aa MilliQ-vettä, ennen kuin ne täytettiin tilavuuteen asetonitrilillä. Näytteet 1-3 ja 4-6 olivat analysoitu eri kertoina.

5 TULOKSET

5.1 Kromatogrammien integrointi

Triton X-100:n piikkien pinta-alat integroitiin manuaalisesti, sillä automaattinen integrointi LabSense ohjelmistossa ei osannut määrittää signaalin pohjaa toistettavasti. Kuvassa 18 näytetään punaisella yliviivauksella piikkien integrointi. Oligomeereille asetettiin pohjaviiva, joka vastaisi detektorin signaalia ilman yhdistettä. Piikit erotettiin toisistaan signaalin kuopan matalimmasta kohdasta, vaikka yhdisteen piikeillä oli päällekkäisyyttä. Koska päällekkäiset signaalit olivat samasta yhdisteestä, voitiin integroituja pinta-aloja käyttää yksittäisten oligomeerien kvantitoinnissa.



Kuva 18. Triton X-100:n piikkien manuaalinen integrointi.

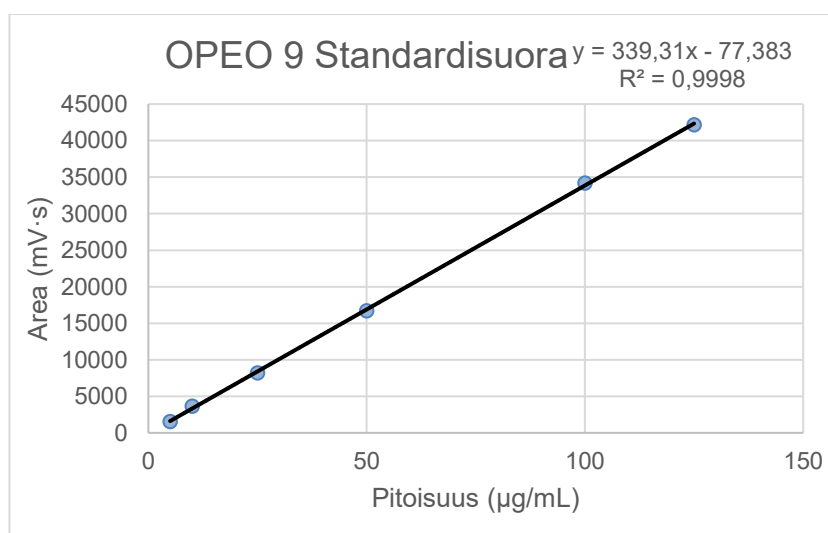
Triton X-100:n oligomeerien ketjunpituus pääteltiin suurimpien piikkien perusteella sekä havaitulla eluutiojärjestyksellä. 4-tert-oktyylifenolilla oli pidempi retentioaika kuin Triton X-100:n oligomeereillä, jolloin pääteltiin pidempiketjuisten oligomeerien eluittuvan käänteisfaasissa ensiksi. Oligomeerin pystyisi tunnistamaan varmasti

massaspektrometrillä, jolla mitattaisiin kunkin kromatografisesti erotetun oligomeerin atomimassa.

5.2 Tulosten laskeminen

Referenssinäytteistä tehtiin Microsoft Excel taulukkolaskentaohjelmistolla standardisuora, jossa akselien arvoina olivat pitoisuudet ja mitatut piikkien pinta-alat. Suoralle tehtiin pienimmän neliösumman menetelmällä lineaarinen sovitus. Triton X-100:lla suurin oligomeerin piikki oli OPEO 9 ja tämän vuoksi sitä käytettiin standardisuoran laskemiseen aluksi (Taulukko 10.)

Taulukko 10. Triton X-100:n OPEO 9 standardisuora, suoran yhtälö sekä korrelaatiokerroin.



Standardisuoran yhtälön avulla voitiin laskea näytteiden pitoisuudet.

$$y = ax + b \rightarrow x = \frac{y - b}{a}$$

$y =$ Piikin pinta – ala ($mV \cdot s$)

$x =$ Pitoisuus ($\mu g/mL$)

$a =$ Suoran kulmakerroin

$b =$ Suoran leikkauspiste

Esimerkiksi näytteen OPEO 9 piikin pinta-alaksi mitattiin 34081 mV·s. Arvo sijoitettiin standardisuoran yhtälöön sekä ratkaistiin.

$$x = \frac{34081 + 77,383}{339,31} = 100,6701$$

Laimennetuissa näytteissä oli huomioitava loppupitoisuutta laskiessa niiden laimennoskerroin, joka esimerkin näytteessä oli 1:10.

$$100,67 \cdot 10 = 1006,7 \mu\text{g/mL}$$

Mitatun näytteen Triton X-100 pitoisuudeksi saatiin 1006,7 $\mu\text{g/mL}$. Standardisuoran pitoisuuden ja pinta-alan yksiköt olivat samat kuin lasketun tuloksen, jolloin yksikön muunnoksia ei tarvinnut tehdä.

Taulukko 11. Näytteiden Triton X-100 pitoisuudet OPEO 9:llä laskettuna.

Näyte	OPEO 9 retentioaika (min)	OPEO 9 pinta-ala (mV·s)	Pitoisuus ($\mu\text{g/mL}$)
1.	10,078	8269	241,8
2.	10,076	3433	18,7
3.	10,087	2725	14,3
4.a	10,350	8712	259,0
5.	10,346	1706	10,5
6.	10,328	34081	1006,7

Referenssinäytteistä saatiin laskettua 13 yksittäisen eri oligomeerin standardisuora. Oligomeerien etyleeniyksikköjen määrä oli 3:n ja 16:sta välillä. OPEO 1-18 tarkoittaa koko piikkialueen pinta-alaa (Taulukko 12).

Taulukko 12. Triton X-100:n eri oligomeerien retentioaikojen keskiarvot ja sovitusten korrelaatiokerroimet.

Triton X-100 OPEOn	Retentioaika (min)	Kalibrointipisteitä	Korrelaatiokerroin R ²
OPEO 1-18	10,3	6	0,9996
OPEO 16	7,3	4	0,9961
OPEO 15	7,5	5	0,9974
OPEO 14	8,2	6	0,9981
OPEO 13	8,6	6	0,9990
OPEO 12	9,0	6	0,9991
OPEO 11	9,4	6	0,9992
OPEO 10	9,8	6	0,9999
OPEO 9	10,3	6	0,9998
OPEO 8	10,9	6	0,9998
OPEO 7	11,4	6	0,9998
OPEO 6	12,1	6	0,9998
OPEO 5	12,6	6	0,9989
OPEO 4	13,2	5	0,9996
OPEO 3	13,7	4	0,9942

Etyleeniyksiköt 3 ja 16 oli laskettu neljällä standardilla, sillä kyseisten piikkien koko oli liian pieni laimeimmissa standardeissa. Yksittäin integroitujen oligomeerien korrelaatiokerroin on hyvä, yli 0,999. Tätä voidaan hyödyntää näytteiden pitoisuuksien laskemisessa, kun näytteestä integroidaan ja lasketaan myös useampi oligomeeri.

Koko Triton X-100:n piikkialueen integroinnissa saatiin myös hyvä korrelaatiokerroin, sillä R² oli 0,9996. Yksittäin integroituna OPEO 10-6 piikit tuottivat paremman korrelaatiokerroimen verrattuna koko piikkialueen integroimiseen.

Hajoamistuotteen eli 4-tert-oktyylifenolin standardinäytteiden pitoisuudet olivat 0,25–5 µg/mL välillä. Taulukossa 13 on ilmaistuna standardien pitoisuudet sekä piikin retentioajat ja pinta-alat.

Taulukko 13. 4-teOp standardien retentioajat ja pinta-alat.

Näyte	Pitoisuus ($\mu\text{g/mL}$)	Retentioaika (min)	Pinta-ala ($\text{mV}\cdot\text{s}$)
1.	0,25	17,1	2334
2.	0,5	17,1	4679
3.	1,25	17,1	11308
4.	2,5	17,1	22266
5.	5	17,1	43263

Hajoamistuotetta ei havaittu analysoiduissa näytteissä. Korrelaatiokerroin 4-teOp standardeilla oli 0,9998 (Liite 1, 7).

5.3 Tulosten tarkastelu

Menetelmän toistettavuutta tarkastettiin injektoimalla 5 kertaa peräkkäin standardia 3. ja tulokset laskettiin OPEO 9 oligomeeristä. Keskihajonta mittausten välillä oli 0,67 % (Taulukko 14).

Taulukko 14. Toistettavuusmittaukset 25 $\mu\text{g/mL}$ Triton X-100 standardilla.

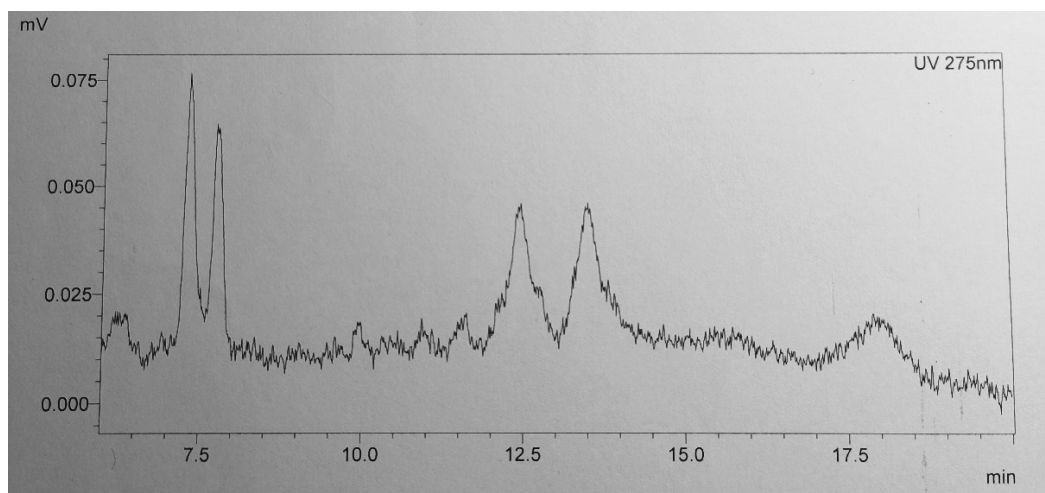
Mittaus	Pinta-ala ($\text{mV}\cdot\text{s}$)
1	7852
2	7939
3	7958
4	7868
5	7990
Keskihajonta	53,0
Keskihajonta %	0,67 %

Menetelmällä pystyttiin määrittämään Triton X-100:n pitoisuudet kaikista näytteistä, lukuun ottamatta pullotusprosessin huuhtomisen lopussa otettua näytettä. Tulokset laskettiin kolmen suurimman piikin keskiarvosta (Taulukko 15.)

Taulukko 15. Näytteiden pitoisuuksien keskiarvo ja -hajonta laskettuna OPEO 8, 9 ja 10 oligomeereillä.

Näyte	Keskiarvo ($\mu\text{g/mL}$)	Keskihajonta ($\mu\text{g/mL}$)
1. Triton X-100 jätekanisteri	241,8	1,45
2. Delfia-laitteiston jäteliuos	18,4	0,91
3. Autodelfia-laitteiston jäteliuos	13,8	1,17
4.a Pullotusprosessin huuhtominen, aloitus	261,7	20,65
5. GSP-laitteiston jäteliuos	11,5	0,76
6. Enhancement Solution-rea-genssi	1008,6	3,74

Näytteen 6 tiedettiin sisältävän Triton X-100:aa noin 0,1 m/V-%. Analyysimenetelmällä mitattiin näytteen pitoisuudeksi 1006,7 $\mu\text{g/mL}$ OPEO 9 oligomeerillä ja 1008,6 $\mu\text{g/mL}$ OPEO 8-10 oligomeereillä laskettuna.



Kuva 19. Kromatogrammi pullotusprosessin lopussa otetusta näytteestä.

Ympäristön vaikutus detergentin käyttäytymisessä havaittiin muutoksena oligomeerien piikkien pinta-alojen suhteessa. Pullotusprosessin huuhtomisen alussa otetussa näytteessä OPEO 8-10 oligomeerien välinen keskihajonta oli 21 $\mu\text{g/mL}$, joka oli suurempi kuin muissa näytteissä (Taulukko 15). Huuhtelun lopussa otetussa näytteessä havaittiin vain muutama epäilty Triton X-100:n oligomeeri (Kuva 19). Vertaamalla taulukon 12 retentioaikoihin, näytteessä olisi mahdollisesti OPEO16, OPEO15, OPEO5 ja OPEO4 oligomeerejä.

6 LOPUKSI

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää analyysimenetelmä Triton X-100:n tunnistamiseen jätevedestä. Menetelmän kehitys suoritettiin HPLC-laitteistolla ja siinä tutkittiin kahden eri kromatografisen erotusmenetelmän soveltuvuutta analyysiin. Analyysimenetelmän ohella tutkittiin näytteiden käsittelymenetelmiä Triton X-100:lle.

Kehitetyllä käänteisfaasimenetelmällä pystyttiin tunnistamaan Triton X-100:n 13 eri oligomeeriä ja määrittämään toistettavasti yhdisteen kokonaispitoisuudet liuosnäytteistä. Analyysimenetelmällä voidaan myös mitata Triton X-100:n hajoamistuotetta, 4-tert-oktyylifenolia. Lineaarinen mittausalue oli Triton X-100:lla 5–125 µg/mL ja 4-tert-oktyylifenolilla 0,25–5 µg/mL. Toimeksiantajan tavoitteeksi asettamaa <10 µg/L määrittämissuutta ei saavutettu. Triton X-100:n koostumus tuotti haasteita piikkien integroinnissa ja näytteiden pitoisuuksien laskemisessa. Yhdisteelle löydettiin integrointimenetelmä, joka tuottaisi luotettavia tuloksia.

Menetelmässä rajoittavana tekijänä oli HPLC-laitteiston UV-detektori ja siinä käytetty korkea mittausaallonpituus, joka ei ollut tarpeeksi herkkä yhdisteelle. Toisaalta matalampi mittausaallonpituus olisi herkempi detektiota häiritseville komponenteille. Massaspektrometri olisi jatkokehityksessä oleellinen, kun tavoitteena olisi matalampi määrittämissuutta yhdisteelle. Ajoliuos sisältää lisäaineena vain muurahaishappoa, jolloin se soveltuisi erityisen hyvin massaspektrometrille. Menetelmää voisi hyödyntää tuotantoprosesseissa syntyvän liuosjätteen Triton X-100 pitoisuuksien määrittämiseen.

Ympäristön havaittiin vaikuttavan Triton X-100:n eri oligomeerien suhteeseen, johtuen eripituisten ketjujen erilaisista pinta-aktiivisista ominaisuuksista. Tämä tekisi yhdisteen pitoisuuden määrittämisen haastavaksi viemäriverdestä tai valumavesistä, mutta samalla omalaatuinen piikkiryppäs olisi helppo tunnistaa laadullisesti.

LÄHTEET

Biasutti, M. A. et al. 2018. Kinetics of reactions catalyzed by enzymes in solutions of surfactants. *Advances in Colloid and Interface Science*. 136, 1–24.

Chemguide 2021. The mass spectrometer. Viitattu 02.03.2021. <https://www.chem-guide.co.uk/analysis/masspec/howitworks.html>

Dow Inc 2021. Triton X-100 Surfactant. Viitattu 04.03.2021. <https://www.dow.com/en-us/pdp.triton-x-100-surfactant.85735z.html>

Dharaiya, N. et.al. 2013. Light scattering and NMR studies of Triton X-100 micelles in the presence of short chain alcohols and ethoxylates *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 436, 252–259.

Dharaiya, N. et.al. 2015. Characterization of Triton X-100 and its oligomer (Tyloxapol) micelles vis-à-vis solubilization of bisphenol A by spectral and scattering techniques. *Colloids and Surfaces A. Physicochem. Eng. Aspects* 470, 230–239.

ECHA 2021. Understanding REACH. Viitattu 29.03.2021.

ECHA 2021. Authorisation list. 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol, ethoxylated. Viitattu 02.03.2021. <https://echa.europa.eu/authorisation-list/-/dislist/details/0b0236e1807df80d>

ECHA 2021. Substance Infocard. 2-[4-(2,4,4-trimethylpentan-2-yl)phenoxy]ethanol. Viitattu 02.03.2021. https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.123.919#REGULATORY_NAMEScontainer

ECHA 2017. Miten määrittää onko aine polymeeri vai ei ja asiaankuuluvan rekisteröinnin aloittaminen. Helsinki.

Farsang, E. & Gaál, V. 2019. Analysis of Non-Ionic Surfactant Triton X-100 Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *Molecules* 24, 1223-1236.

Halide, A. et.al. 2010. Study on cloud points of Triton X-100-cationic gemini surfactants mixtures: A spectroscopic approach. *Spectrochimica Acta Part A* 75, 671–677.

Harris, D.C. 2008. *Quantitative Chemical Analysis*, 8th edition. W.H. Freeman and Company.

Jozua L, et.al. 2011. The Partitioning of Octyl Phenol Ethoxylate Surfactant between Water and Sunflower Oil. *The Open Colloid Science Journal* 4, 37–41.

Hitachi 2021. Configuration of an HPLC system. Viitattu 12.03.2021. <https://www.hitachi-high-tech.com/global/products/science/tech/ana/lc/basic/course3.html>

Jumhawan, U., Xing, J. & Zha, Z. 2017. An Ultrafast LC/MS/MS Method for Characterization and Quantitation of Triton X-100 Extracted From Palm Oil. Shimadzu Corporation.

Keinänen, P. et.al. 2018. Optimized dispersion quality of aqueous carbon nanotube colloids as a function of sonochemical yield and surfactant/CNT ratio. *Heliyon* 4.

Lab-training 2021. What are the differences between GC and HPLC? Viitattu 18.03.2021. <https://lab-training.com/2014/04/02/what-are-the-differences-between-gc-and-hplc/>

Lab-training 2021. What are the benefits of UHPLC over normal analytical HPLC? Viitattu 18.03.2021. <https://lab-training.com/2014/04/17/what-are-the-benefits-of-uhplc-over-normal-analytical-hplc/>

McNaught, A.D. & Wilkinson, A. 1997. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997.

MPBio 2021. Triton X-100. Viitattu 13.08.2021. <https://www.mpbio.com/au/tritonr-x-100>

Opetushallitus 2021. Laboratorioanalyysit, Kromatografia. Viitattu 18.03.2021. http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_2-6_nestekromatografia.html

Opetushallitus 2021. Laboratorioanalyysit, Massaspektrometria. Viitattu 18.03.2021. http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_5-5_massaspektrometria.html

Poša, M. & Pilipovic, A. 2019. Micellisation of the binary mixture of surfactants Triton X100. J. Chem. Thermodynamics 138, 167–178.

Patel, U. et al. 2012. Effect of amphiphilic and non-amphiphilic polymers on micellar behaviour of nonionic surfactant Triton X-100. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 481, 100–107.

Patel, U. et.al. 2015. Preservative solubilization induces microstructural change of Triton X-100 micelles. Journal of Molecular Liquids: 216, 156–163.

Phenomenex 2021. Surfactants on Synergi-Max RP. Viitattu 10.11.2020 <https://www.phenomenex.com/Application/Detail/14738>

PubChem 2021. Substance Info. Octoxinol. Viitattu 02.03.2021 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5590>

REACH Liite 15 asiakirja-aineisto 2011. Proposal for identification of a substance as a CMR cat 1A or 1B, PBT, vpBv, or a substance of an equivalent level of concern. BAuA. Saksa.

Rusnano 2021. Micelle. 03.06.2021. <https://eng.thesaurus.rusnano.com/wiki/article1199>

Thomas, A. & Dirk, L. 2007. Phase separation in the isolation and purification of membrane proteins. BioTechniques 43, 427-440.

Yi-Wen L. et. al. 2010. Growth of Pseudomonas sp. TX1 on a wide range of octylphenol polyethoxylate concentrations and the formation of dicarboxylated metabolites. Bioresource Technology 101, 2853–2859.

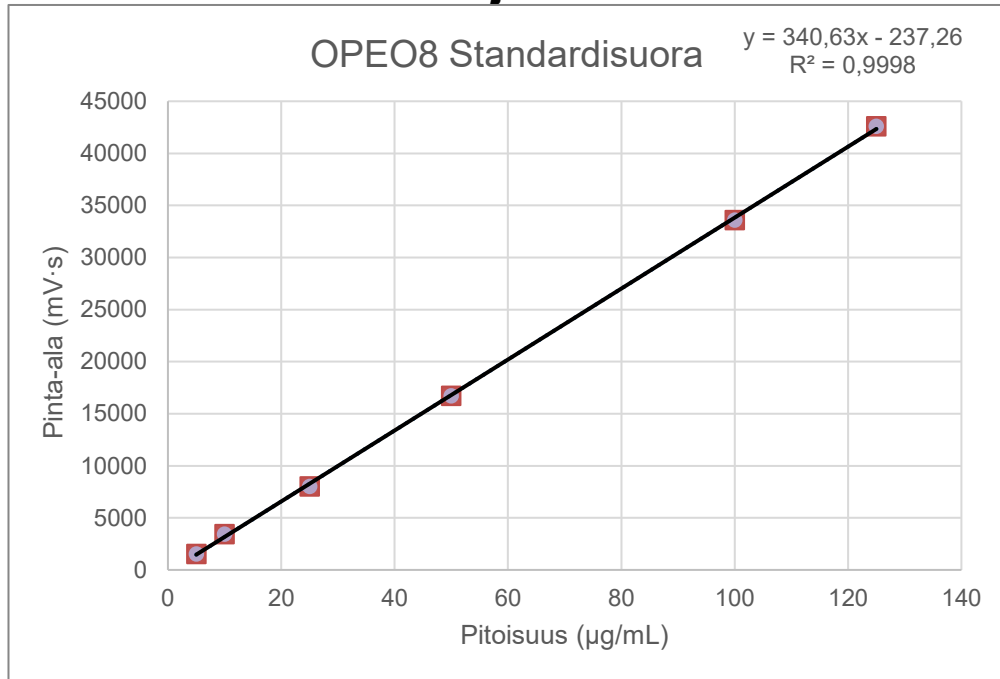
Yu, Z. et.al. 2012. Effect of Triton X-100 on the removal of aqueous phenol by laccase analyzed with a combined approach of experiments and molecular docking. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 97, 7– 12.

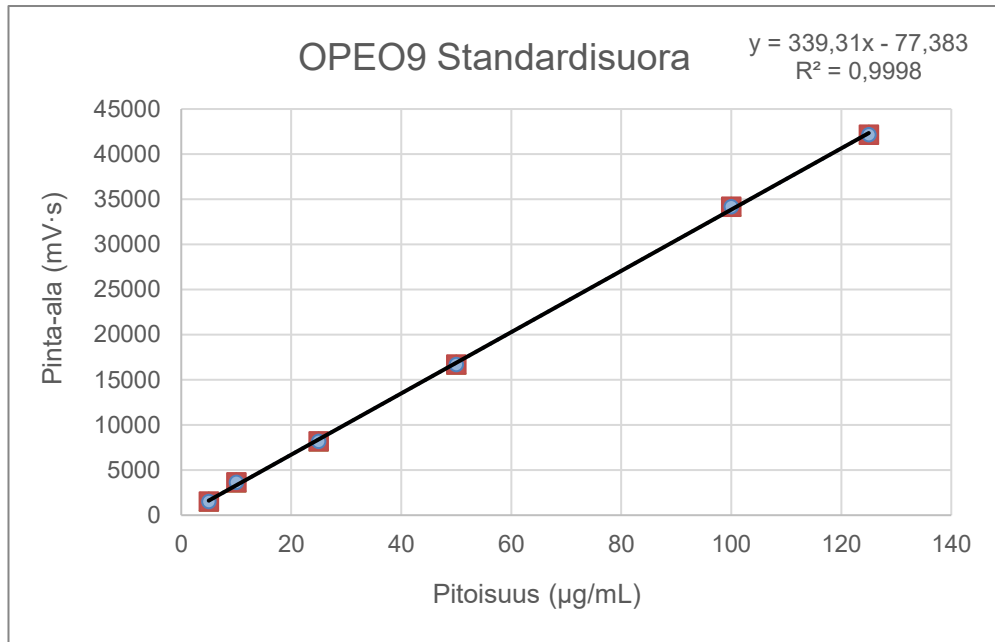
Ympäristöministeriö 2021. Kemikaalilainsäädäntö. Viitattu 29.03.2021. <https://ym.fi/kemikaalilainsaadanto>

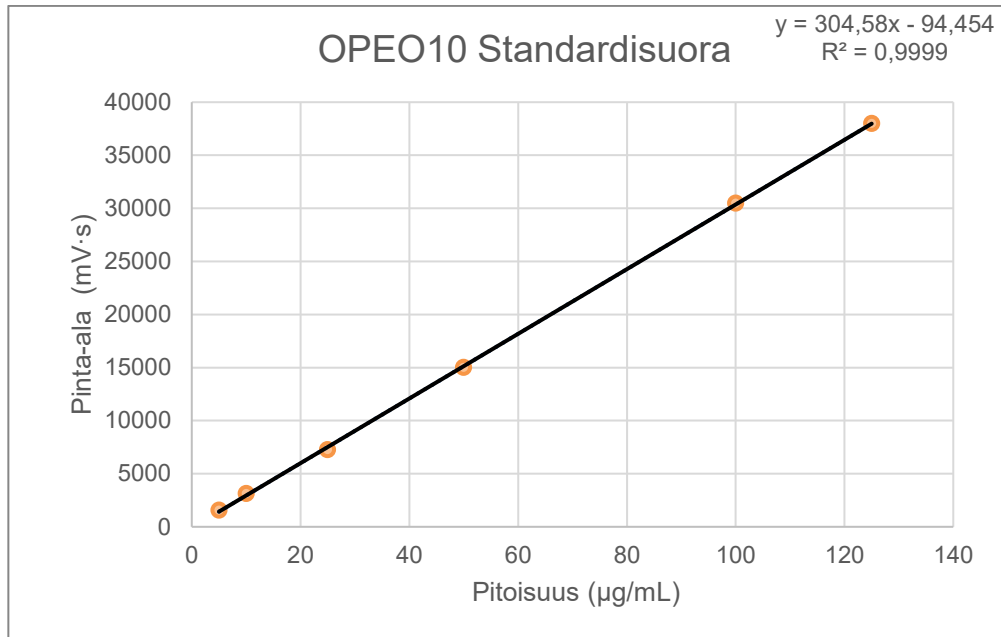
Zhang, Y. et al. 2012. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 97, 7– 12.

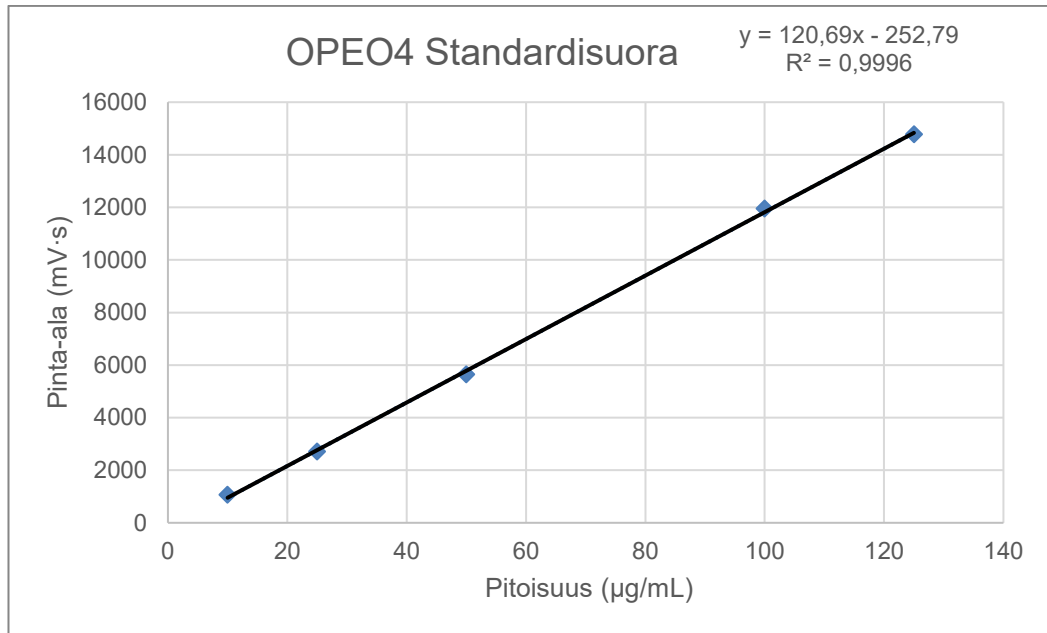
Wikipedia Commons. 2021. Gas chromatograph. Viitattu 18.03.2021. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gas_chromatograph.png

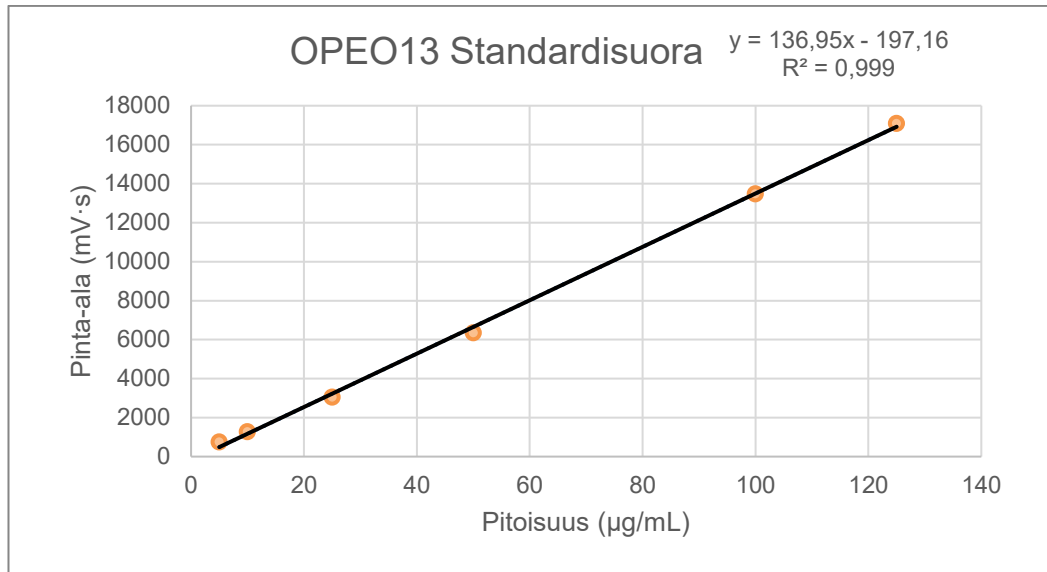
Standardisuorien kuvaajat

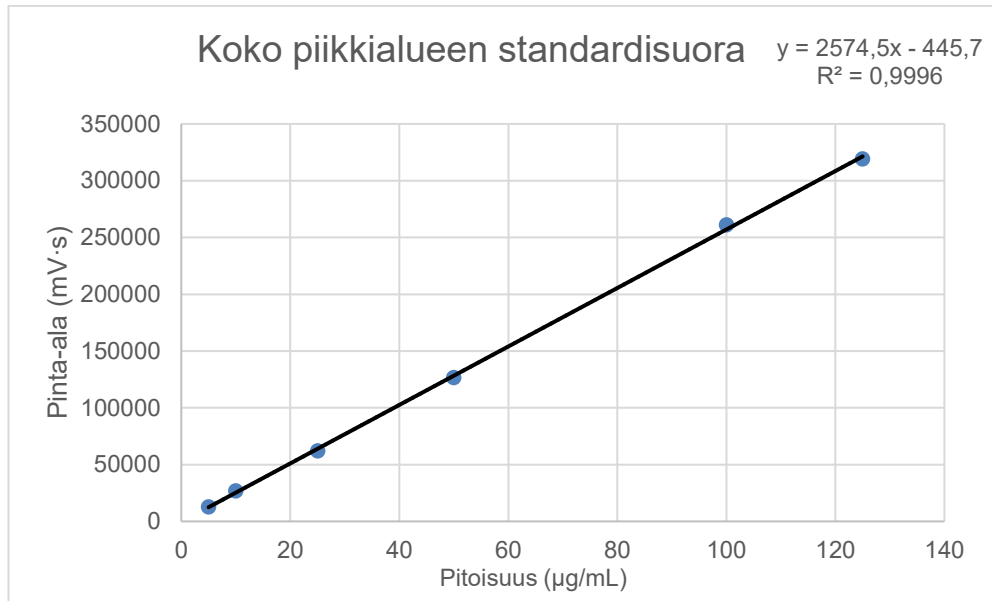


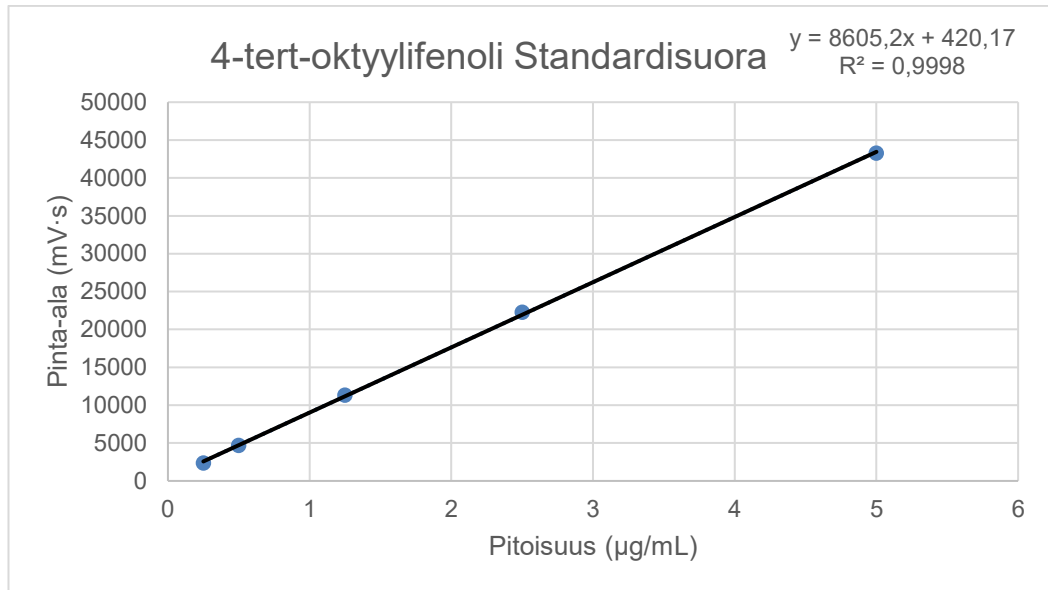












Testatut parametrit ja havainnot HILIC menetelmällä

Parametri	Testattu parametri	Havainnot
Ajoliuoksen lisäaineet	Ammoniumformiaatti 5 mM	Saavutettu kromatografinen erottuminen.
	Muurahaishappo 100 µL/L	Parempi erottuminen kuin ammoniumformiaatilla.
Gradientin aloitus	0 min	Triton X-100:lla erottumista 10,5 minuutin jälkeen, tunnistamaton piikki alussa.
	2 min	Triton X-100:lla erottumista 12,5 minuutin jälkeen, oligomeerien piikkiryppäessä parempi erottuminen.
	3,5 min	Erottumista 14 minuutin jälkeen, piikkiryppäessä parempi erottuminen.
	5 min	Erottumista 15,5 minuutin jälkeen, piikkiryppäessä parempi erottuminen.
Isokraattinen eluointi	B0 %	Heikkoa erottumista liuotinpiikin jälkeen
	B50 %	Havaittavissa vain tunnistamaton piikki alussa.
Näytematriisi	Asetonitrili	Iso liuotinpiikki, Triton X-100:n erottuminen 9 minuutin kohdalla.
	Asetonitrili + 100 µL/L muurahaishappo	Triton X-100:lla erottumista 8.8 minuutin kohdalla.
	Asetonitrili-vesiseos 1:1	Pieni piikki alussa. Heikkoa erottumista.
	Asetonitrili-vesiseos 1:1 + 100 µL/L muurahaishappo	Pieni piikki alussa. Triton X-100:lla erottumista.
	Metanoli	Triton X-100:lla heikkoa erottumista havaittavissa. Ylimääräinen vaste detektorissa 9,3 minuutin kohdalla.
	Metanoli-vesiseos 1:1	Ei havaittavissa erottumista. Ylimääräinen vaste 9 minuutin kohdalla.
	Metanoli-asetonitrili-vesiseos 1:1:2	Huono erottuminen.
	Etanoli-vesiseos 2:1	Etanolista iso liuotinpiikki, huono piikkien erottuminen.
Kolonne	Waters Atlantis HILIC Silica 5 µm (4,6 mm · 250 mm)	Oligomeereillä parempi erottuminen, mutta venyneet piikit.