TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
Keemia instituut
Analüütilise keemia õppetool

Liina Tõnso

Poolpreparatiivse LC-MS metoodika arendamine fluoroühendite kvantitatiivseks ^{19}F-NMR analüüsiks

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Keemia

Juhendajad:
Koit Herodes, PhD
Lauri Toom, PhD

Tartu 2024

Infoleht

Poolpreparatiivse LC-MS metoodika arendamine fluoroühendite kvantitatiivseks ^{19}F-NMR analüüsiks

Käesolevas töös arendati poolpreparatiivse LC-MS eraldamise ja kvantitatiivse ^{19}F-NMR analüüsi metoodikat, mida saaks kasutada fluoroorgaaniliste ühendite, sealhulgas PFAS-de analüüsiks keskkonnaproovides. Metoodika arendamisel kasutati mudelsüsteemi, mis koosnes fluniksiinist ja ketoprofeenist, millest eraldada ja poolpreparatiivselt koguda fluniksiin. Saadud lahus kontsentreeriti ja viidi läbi qNMR analüüs.

Märksõnad: Vedelikkromatograafia, tuumamagnetresonantsspektromeetria

CERCS: P300 Analüütiline keemia

Development of Semi-preparative LC-MS Methodology for Quantitative ^{19}F-NMR Analysis of Fluorine Compounds

In this thesis, a methodology was developed for the semi-preparative LC-MS separation and quantitative ^{19}F-NMR analysis, which can be used for the analysis of fluoroorganic compounds, including PFAS, in environmental samples. A model system consisting of flunixin and ketoprofen was used with the aim of separating and semi-preparatively collecting flunixin. The collected solution was concentrated, and qNMR analysis was performed.

Key words: Liquid chromatography, nuclear magnetic resonance spectroscopy

CERCS: P300 Analytical chemistry

Sisukord

KASUTATUD LÜHENDID **4**

SISSEJUHATUS **5**

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE **6**

1.1. PFAS-id 6

1.2. Fluniksiin ja ketoprofeen 6

1.3. Avastusanalüüs ja selle meetodid 7

1.4. Poolpreparatiivne HPLC 10

1.5. Proovi kontsentreerimise meetodid 12

2. EKSPERIMENTAALNE OSA **14**

2.1. Kasutatud kemikaalid 14

2.2. Aparatuur 14

2.3. Jaoturi kalibreerimine 14

2.4. Fluniksiini kogumine mudelsüsteemist 14

2.5. Kogutud lahuse kontsentreerimine 15

2.6. NMR-analüüs 17

3. TULEMUSED JA ARUTELU **18**

3.1. Jaoturi režiimid ja vastavad jaotussuhted 18

3.2. Fluniksiini kogumine standardlahusest 19

3.3. Fluniksiini kogumine segust 22

3.4. qNMR 24

4. KOKKUVÕTE **29**

5. SUMMARY **30**

6. KASUTATUD KIRJANDUS **32**

7. LISAD **36**

Kasutatud lühendid

3-TFMA – 3-(trifluorometüül)aniliin

DMSO – dimetüülsulfoksiid

ESI – elektropihustus-ionisatsioon

FA – sipelghape

FLU – fluniksiin

GC – gaasikromatograafia

HPLC – kõrgefektiivne vedelikkromatograafia

LC – vedelikkromatograafia

MeOH – metanool

MS – massispektromeetria

MS/MS – tandem massispektromeeter

m/z – massi-laengu suhe

NMR – tuumamagnetresonants

PFAS-d – per- ja polüfluoritud alküülühendid

qNMR – kvantitatiivne tuumamagnetresonantsspektromeetria

SFC – superkriitilise fluidumi kromatograafia

SPE – tahke faasi ekstraktsioon

UHPLC – ultra-kõrgefektiivne vedelikkromatograafia

UV-Vis – ultravioletse ja nähtava spektriala kiirgus

Sissejuhatus

PFAS-id ehk per- ja polüflouroreeritud alküülühendid on grupp väga erinevaid sünteetilisi aineid, mida kasutatakse nende hüdrofoobsuse ja lipofoobsuse ning kõrge termilise stabiilsuse tõttu paljudes tehnilistes rakendustes. PFAS-id on tänu tugevale C-F sidemele stabiilsed ja keskkonnas väga püsivad ühendid, mis võivad kontsentreeruda pinnases ja veekogudes. Mõned PFAS-id võivad ka loomade ja taimede organismides bioakumuleeruda.[1] Kokkupuude ja PFAS-ide tarvitamine läbi toidu võib tekitada mitmeid terviseprobleeme, nt tavapärasest madalamat sünnikaalu, neeruvähki ja maksakahjustusi [2].

Kõikidest võimalikest keskkonna proovidest analüüsitakse rutiinselt ainult teatud osa ühendeid. Keeruline on kromatogrammilt leitud tundmatu ühendi struktuuri määramine juhul, kui massispektromeetria (MS) ja UV-Vis spektromeetria ei anna piisavat informatsiooni. Tuumamagnetresonantsspektromeetria (NMR-spektromeetria) sobib aine struktuuri tuvastamiseks, kuid selleks et NMR-spektromeetriaga rahuldavat signaali saada, peab aine kogus olema oluliselt suurem kui näiteks MS kasutades. Samuti on NMR- spektromeetriaga võimalik aine kogust kvantitatiivselt määrata vastava standardaineteta või täpset struktuuri teadmata.

Töö eesmärk on arendada poolpreparatiivse LC-MS (vedelikkromatograafia-massispektromeetria) eraldamise ja kvantitatiivse NMR metoodika, mida saaks tulevikus kasutada fluoroorgaananiliste ühendite, sealhulgas PFAS-ide analüüsil keskkonnaproovides. Metoodika arendamiseks kasutatakse mudelsüsteemi, mis koosneb kahe põletikuvastase ravimi fluniksiini ja ketoprofeeni segust, millest eraldatakse -CF_3 rühma sisaldav fluniksiin, mis „tuvastatakse“ NMR abil ja mille sisaldus määratakse kvantitatiivse NMR meetodil.

1. Kirjanduse ülevaade

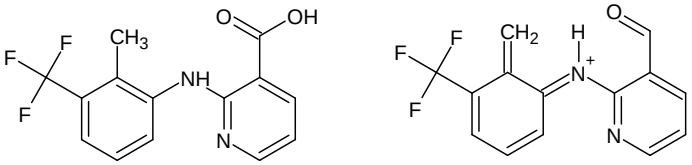
1.1. PFAS-id

PFAS-id ehk per- ja polüfluoritud alküülühendid on kemikaalid, mida kasutatakse paljudes erinevates valdkondades, näiteks pindaktiivsete ainetena vee ja rasva vastu [1]. Tänu tugevale C-F sidemele on PFAS-id temperatuurikindlad, mille tõttu kasutatakse neid ka tulekustutusvahendites. Samas see põhjustab nende püsivuse keskkonnas [3].

PFAS-id on potentsiaalselt ohtlikud inimeste tervisele ning võivad tekitada neeruvähki ja madalat sünnikaalu. On hinnatud, et kokkupuude PFAS-idega põhjustab Euroopa Majanduspiirkonnas tervisega seotuid kulusi 52–84 miljardit eurot aastas.[4]

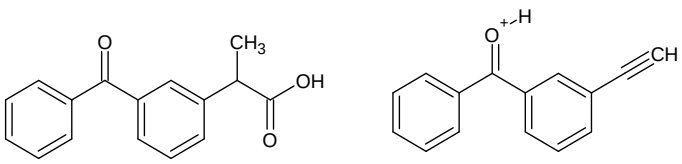
1.2. Fluniksiin ja ketoprofeen

Fluniksiin ja ketoprofeen on mitte-steroidsed põletikuvastased ravimid (ing k *non-steroidal anti-inflammatory drug* – NSAID). Fluniksiini manustatakse peamiselt kariloomadele, ketoprofeeni nii kariloomadele kui ka inimestele. [5,6] Artiklis Daeseleire *et al*. määrati fluniksiini toorpiimas, milleks kasutati LC-MS/MS (tandem massispektromeetria) süsteemi. Kasutatud MS-parameetrite ja positiivse režiimi juures detekteeriti fluniksiini ionisatsioonil molekulaariooni massi ja laengu suhtega (m/z) 297 ning fragmentioone m/z 279 ja m/z 264 (Joonis 1).[7] Ka Hu *et al*. artikkel, mille käigus töötati välja UHPLC-MS/MS (ultra-kõrgefektiivne vedelikkromatograafia) meetod 30 erineva põletikuvastase ravimi määramiseks, kinnitab, et flunksiini ionisatsioonil tekivad eelnevalt mainitud massi ja laengu suhtega ioonid.[8]



Joonis 1. Fluniksiini struktuurivalem ja võimalik fragmentiooni m/z 279 struktuur

Ketoprofeeni MS analüüsil registreeriti molekulaarioon m/z 255. Kõige intensiivsema signaaliga fragmentioon oli m/z-ga 209 [7]. Ketoprofeeni struktuur ja võimalik fragmentiooni struktuur on toodud joonisel (Joonis 2).



Joonis 2. Ketoprofeeni struktuurivalem ja võimalik fragmentiooni m/z 209 struktuur

1.3. Avastusanalüüs ja selle meetodid

1.3.1. Avastusanalüüs ehk *non-targeted analysis*

Avastusanalüüs (ing *k non-targeted analysis*) on analüütiline meetod, mille käigus määratakse tundmatu koostisega proovist võimalikult palju selles sisalduvaid ühendid. Ühendite tuvastamiseks võib olla eelnevalt määratud nimekiri potentsiaalsetest ainetest proovis.[9] Sellist meetodit kasutatakse laialdaselt tundmatute ühendite määramiseks nii reostunud keskkonnast (nt jõeveest) kui ka keskkonnaseire puhul [10]. Maailmaturul on saadaval üle 350000 erineva kemikaali, kuid tegemist on tagasihoidliku hinnanguga, sest paljud ühendid on registreeritud ainult ühe riigi või ühe piirkonna andmebaasides. Need ei ole avalikult saadaval ja samuti ei pruugi registrites olla reaktsioonide vahe- ja kõrvalprodukte.[11] Keskkonna reostuse tõttu sureb aastas ligikaudu 9 miljonit inimest, millest 6,7 miljonit põhjustab õhusaaste ja 1,4 miljonit veereostus [12]. Eurostati poolt tehtud uuringu andmetel toodeti Euroopa Liidus 2019. aastal 279 miljonit tonni kemikaale, millest 214 miljonit tonni olid inimese tervisele ohtlikud ja 85 miljonit tonni olid ohtlikud keskkonnale [13]. Selle tõttu on tähtis kiirelt tuvastada potentsiaalselt ohtlikke kemikaale.

LC-MS-i kasutades jagatakse ühendi struktuuri identifitseerimise kindlust viieks tasemeks. Taseme 1 saavutamiseks peab struktuur olema kinnitatud tunnusaine, MS-i spekter, MS/MS-i spektri ja retentsiooniaja abil. Taseme 2 saavutamiseks määratakse eeldatav struktuur võrreldes kirjandusest saadud MS-i ja MS/MS-i spektreid eksperimentaalsetega. Tase 3 on mõeldud orienteeruvatele struktuuridele, näiteks siis, kui on MS/MS-iga raske asendiisomeere eristada. Tase 4 näitab, et teada on molekuli täpne brutovalem, mis on leitud elementide erinevate isotoopsete koostiste kaudu. Kõige madalam tase 5 on saavutatud, kui on teada ühendi täpne molekulimass.[10]

1.3.2. Kromatograafia

Kromatograafia on erinevate meetodite kogum, mille abil saab lahuses sarnaste omadustega komponente üksteisest eraldada. Proov lahustatakse mobiilses faasis ja voolutatakse seejärel läbi statsionaarse faasi. Vastavalt aine omadustele jaotub see eelistatult kas mobiilsesse või statsionaarsesse faasi, mille tõttu elueeruvad ühendid erinevatel aegadel. Kromatograafilised meetodeid jagatakse kolmeks: gaasikromatograafia (GC), vedelikkromatograafia (LC) ja superkriitilise fluidumi kromatograafia (SFC). Samuti võib kromotograafilisi meetodeid jagada planaarseteks, kus statsionaarne faas on tasapinnal, ja kolonnkromatograafiaks, kus statsionaarne faas on paigutatud toru sisse. [14]

Gaasikromatograafias on mobiilseks faasiks kandegaas, mis on keemiliselt inertne, seega analüüt ei interakteeru sellega [14]. Proov peab kolonni läbimiseks lenduma [15].

HPLC puhul rakendatakse kolonnile kõrget rõhku, et suruda vedel mobiilne faas ehk eluent läbi statsionaarse faasi [16]. Kõige levinum HPLC meetod on jaotuskromatograafia, kus statsionaarne faas on vaadeldav vedelikuna. Statsionaarse ja mobiiilse faasi polaarsuse järgi klassifitseeritakse jaotuskromatograafia kaheks. Normaalfaaskromatograafia puhul statsionaarne faas on polaarne ja mobiilne faas mittepolaarne. Pöördfaaskromatograafias on statsionaarne faas mittepolaarne ja mobiilne faas polaarne. Pöördfaaskromatograafia on levinum, mille üheks põhjuseks on võimalus eluendina kasutada vett. Statsionaarse faasina kasutatakse silikageeli pinnale on kinnitatud alküülrühmade (kõige sagedamini C18 ja C8) „kiht“.[14] Paljudel keskkonna saasteainetel on C18 kolonnis piisav retentsioon ja sobiv piikide kuju [10]. Aktsepteeritav retentsioonifaktor on vahemikus 1 kuni 10 [14]. LC-MS on PFAS-ide määramisel keskkonna proovidest standardne analüüsivahend [3].

1.3.3. Massisipektromeetria

Massispektromeeter on järjest levinum kromatograafia detektor, mille abil on võimalik määrata ioonide m/z ja hulk kolonnist väjunud eluendivoos. Massispektromeeter koosneb kolmest osast: ionisatsiooniallikas, massianalüsaator ja detektor. Ionisatsiooniallikas ioniseeritakse molekulid otse lahusest või gaasifaasist. Massianalüsaator eraldab erineva massi-laengu suhtega ioonid ja detektor määrab ioonide hulga.[16]

Elektropihustusionisatsiooni (ESI) korral pihustatakse LC kolonnist väljuv vedelik pihustuskapillaari otsast, mille järel mitme kilovoldine pinge loob laenguga tilgad. Tilkades solvent aurustub, tilga läbimõõt väheneb ja laengutevahelised tõukejõud suurenevad, kuni pindpinevusjõud ei ole enam piisav laenguga tilga koos hoidmiseks. Tilgad lõhutakse veel väiksemateks, kuni alles jäävad ainult laenguga analüüdi ioonid.[14] Positiivsete ja negatiivsete ioonide režiimi muutmiseks tuleb elektrivälja polaarsust vahetada [16].

Kõige tavalisem massianalüsaator on kvadrupool. Võrreldes teiste massianalüsaatoritega, on see odavam ja töökindlam.[14] Kvadrupool koosneb neljast paralleelsest vardast, millele rakendatakse nii alalis- kui ka vaheldupotentsiaal. Ioone kiirendatakse 5–15 V potentsiaalide vahega enne seda, kui ioonid sisenevad ühest kvadrupooli otsast. Kvadrupoolide potentsiaal mõjutab ioonide trajektoori, nii et ainult soovitud laengu ja massi suhtega ioonid jõuavad kvadrupoolide teise otsa.[16] Pannes kaks massianalüsaatorid järjestikku, millest esimene valib välja eellasiooni, mis enne teise massianalüsaatorisse sisenemist fragmenteeritakse, saab koguda lisainformatsiooni antud iooni fragmenteerumise kohta. Antud meetodit nimetakse

tandem massispektromeetriaks ehk MS/MS-ks.[14] Karboksülaatidest ja sulfonaatidest PFAS-ide puhul kasutatske tihti MS/MS negatiivses ionisatsiooni režiimis, kus kõigepealt tekivad $[M-H]^-$ ioonid, mis fragmenteeruvad seejärel edasi [3].

1.3.4. Tuumamagnetresonantsspektromeetria

Peale massispektromeetrilise analüüsi on võimalik struktuuri määrata tuumamagnetresonants-spektromeetriaga (NMR-spektromeetria), mis on MS-iga võrreldes väiksema tundlikkusega, seega on analüüsiks vaja kõrgemat kontsentratsiooni.[10] Ühendi kontsentratsioon võiks ^{1}H-NMR-i korral olla vähemalt 10^{-1}–10^{-3} M, kuid on võimalik signaale saada ka 10^{-4}–10^{-5} M. Samas ESI-MS suudab detekteerida ühendeid kontsentratsiooniga 10^{-18} M.[17] Tänapäeval on põhimõtteliselt kasutusel ainult Fourier' teisendusega NMR-spektromeetrid, mille jaoks kiiratakse raadiosagedusega laineid impulssidega. NMR-ga on registreeritavad ainult aatomid, mille spinnkvantarv ei ole 0. Kõige rohkem kasutatakse ^{1}H, ^{13}C, ^{19}F ja ^{31}P.[14]

NMR-spektromeetria põhineb raadiolainete neeldumisel aatomite tuumades, milleks peab mõõtmine toimuma magnetväljas. Raadiolainete neeldumist tuumas mõjutavad antud tuuma ümbritsevad teised tuumad ja elektronid. Selle kaudu saab seega ka ühendi struktuuri kindlaks määrata.[14] Funktsionaalrühmadel on neile omased keemilise nihke ligikaudsed väärtused, mida saab mõõdetud spektriga kokku viia. Samuti võib aatomi signaal lõheneda mitmeks (dublettideks, triplettideks jne) spin-spin multipletsuse põhjal, mis annab informatsiooni aatomi teistest lähedalolevatest, kuid erineva keemilise nihkega aatomitest. Informatsiooni annab ka piigi pindala, mis ^{1}H ja ^{19}F puhul on vastavuses seda piiki andvate tuumade arvuga.[18]

Fluor-19 on ainus looduses esinev stabiilne fluori isotoop. Samuti on selle güromagnetiline suhe kõrge, ligikaudu 0,94 ^{1}H omast.[19] Tänu nendele omadustele on spektritel signaalide intensiivsus peaaegu samaväärne prootoni signaalidega [20]. Fluori spektri keemiline nihke ulatus (>350 ppm) on palju suurem võrreldes vesiniku spektri ulatusega, mille tõttu on ^{19}F spektri erinevate aatomite signaalid hea lahutuvusega [19]. ^{19}F-NMR on kasutatud koos HPLC-MS/MS-ga PFAS-de isomeeride sisalduse määramiseks [3].

Kvantitatiive tuumamagnetresonantsspektromeetria

Võrreldes teiste aine koguse hindamise meetodidega ei vaja kvantitatiivne tuumamagnet-resonantsspektromeetria (qNMR) täpselt sama aine olemasolu, mida soovitakse määrata. [21]. Aine kogust saab määrata järgmise arvutuskäiguga (1).

$$\frac{n_x}{n_y} = \frac{A_x}{A_y} \times \frac{N_x}{N_y} \quad (1)$$

kus n tähistab aine kogust, A signaali intensiivsust ja N vastavat signaali tekitavat aatomite arvu. x ja y tähistavad uuritava ainet ja standardit. Meetodi mõõtemääramatuseks on hinnatud erinevatel viisidel on alla 2%.[22] Meetodi puuduseks on analüüdi ja lisandite signaalide kattumine, mis teeb standardi valimise keeruliseks [21]. Kuigi ^{1}H-qNMR on palju rohkem levinud, on kvantitatiivset mõõtmist võimalik teostada ka ^{19}F-ga, ilma et tulemuse usaldusväärsus kannataks [23].

1.4. Poolpreparatiivne HPLC

Analüütilise vedelikkromatograafiaga teineteisest lahutatud ained kas hävinevad destruktiivses detektoris või suunatakse jääkide nõusse. Preparatiivse vedelikkromatograafia eesmärk on eraldada konkreetne aine proovist võimalikult puhtal kujul. Preparatiivset HPLCd võib läbi viia nii analüütilises mastaabis, näiteks mõne mikrogrammi aine saamiseks, kui ka aine tööstuslikuks puhastamiseks. Kehtib põhimõte, et mida suurem ainekogus on vaja puhastada, seda suuremat kolonni on vaja. Poolpreparatiivne HPLC jääb kolonni läbivate ainete koguste poolest analüütilise ja preparatiivse kromatograafia vahele.[24]

1.4.1. Preparatiivse ja poolpreparatiivse kolonni ja voolukiiruse valik

Preparatiivse kromatograafia meetodite arendamisel lähtutakse enamasti analüütilises mastaabis läbi viidud lahutamise tulemustest. Selle tõttu on oluline kolonni ja voolukiiruse valimine, et puhastatavaid ainekoguseid oleks võimalik suurenda, kuid samas jääks kromatograafiline lahutus samaväärseks.[25]

Kolonni valik ja voolukiirus põhineb peamiselt sellel, kui palju proovi ühe süstiga soovitakse kolonnist läbi lasta. Tüüpiliste analüütiliste kolonnide jaoks, näiteks läbimõõduga 4,6 mm ja 9,4 mm on soovituslikud aine kogused vastavalt 1–15 mg ja 7–70 mg. Eluendi voolukiirused on vastavalt 0,8–2,0 ml/min ja 4–10 ml/min. Koos kolonni läbimõõduga kasvab ka süstitav ainekogus ja voolukiirus. Näiteks poolpreparatiivsete läbimõõdutega (21,2 mm ja 30 mm) kolonnide jaoks on sobiv voolukiirus (18–42 ml/min ja 34–85 ml/min), ja proovi kogused on samuti suuremad (30–300 mg ja 64–640 mg).[24]

Eeldades, et kolonnide statsionaarsed faasid on sarnased, võib proovi komponentide eraldamise analüütilisest kolonnist preparatiivsesse (prep) kolonni ülekandmiseks ja rahuldavate kromatogrammi piikide saamiseks kasutada järgmist arvutuskäiku (2).

$$V_{prep} = V_{anal\ddot{u}\ddot{u}tiline} \times \frac{{D_{prep}}^2}{{D_{anal\ddot{u}\ddot{u}tiline}}^2} \times \frac{L_{prep}}{L_{anal\ddot{u}\ddot{u}tiline}} \quad (2)$$

milles *V* tähistab süsti ruumala (µl), *D* kolonni sisediameetrit (mm) ja *L* kolonni pikkust (mm).

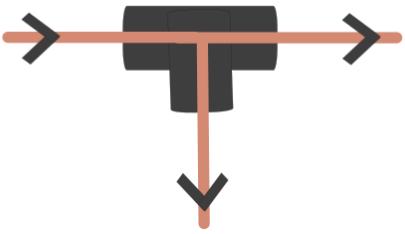
Piikide analüütilisega võrreldava kromatograafilise lahutuse saamiseks võib preparatiivse voolukiiruse valimisel kasutada järgmist arvutuskäiku (3).

$$F_{prep} = F_{analüütiline} \times \frac{D_{prep}^{2}}{D_{analüütiline}^{2}} \quad (3)$$

kus *F* tähistab eluendi voolukiirust (ml/min).[25]

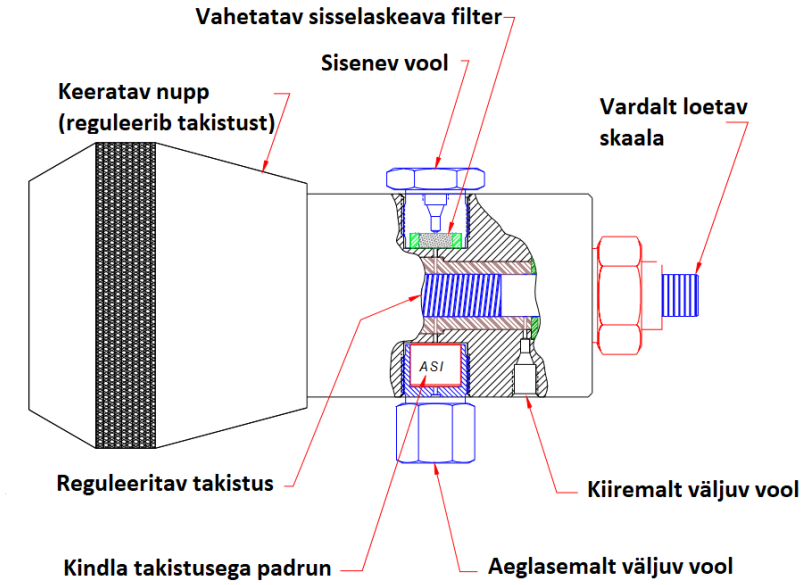
1.4.2. Eluendi voolu jaotamine

Fraktsioonide kogumisel on vajalik kindlaks määrata ainete elueerumise aeg. Seega peab destruktiivse detektori kasutamisel voolu jaotama kaheks osaks, väiksem osa suunatakse detektorisse ning ülejäänu kogutakse kokku. Pärast kolonnist väljumist tuleb kasutada eluendi voolu jaoturit (*splitter*). Neid on põhimõtteliselt kahte tüüpi. T-tükk, mis on odavam ja lihtsam, jaotab voolu kaheks, kuid kahe voolukiiruse suhet ei saa vabalt reguleerida, sest see sõltub kahe haru kapillaaride lisasurvest T-tüki järel. Jaotussuhet saab muuta kapillaaride pikkuse ja sisediameetriga.[24] Jaotussuhet mõjutab ka eluendi viskoossus, mis võib muuta kapillaaride lisarõhku. Primitiivne T-tüki visand on toodud all (Joonis 3).[26]



Joonis 3. T-tükk

Samuti on võimalik kasutada reguleeritavaid voolu jaotureid, milles vedeliku vool jaotatakse kahte harusse. Väiksema voolukiirusega harus on kindla takistusega padrun ja suurema voolukiirusega harus on vedeliku takisti, mille takistus on reguleeritav.[27] Näide reguleeritavast jaoturist on toodud all (Joonis 4).



Joonis 4. Antud töös kasutatud QuickSplit Series 600. (Joonis on tõlgitud eesti keelde seadme juhendist) [27]

1.5. Proovi kontsentreerimise meetodid

Lahustit saab kolonnist kogutud HPLC fraktsioonidest eemaldada mitmel erineval viisil [28]. Käesolevas töös kasutati HPLC eluendina metanooli ja sipelghappe (FA) vesilahust ja analüüdina fluniksiini, mille sulamistemperatuur 235 °C ja seega keemistemperatuur veelgi kõrgem [29]. Kui kogutud fraktsioonide lahustiks on orgaaniline solvent, siis saab kasutada rotaatoraurustit. Kui tegemist on orgaaniline solvendi ja vee lahusega ja rotaatoraurustiga ei olnud võimalik kogu vett eemaldada, siis on võimalik rotaatoraurustiga kuivatamisest järelejäänud vesi sublimeerida külmkuivatamisel. [28] Kohest külmkuivatamist ilma rotaatoraurustita takistab solvendi kõrge orgaanilise lahusti (käesoleval juhul MeOH) sisaldus, millel on külmkuivatamise efektiivseks läbiviimiseks liiga madal sulamistemperatuur. [30]
Kui eluendina kasutatakse mittelenduvaid puhvreid või vee osakaal lahuses on märkimisväärne, saab kasutada tahke faasi ekstraktsiooni, mille abil saab asendada vee orgaanilise solvendiga, mille aurustamine on lihtsam [28].

1.5.1. Tahke faasi ekstraktsioon

Tahke faasi ekstraktsioon (SPE) on kromatograafilise põhimõttega meetod, mida kasutatakse analüüdi kontsentreerimiseks, kuid ka näiteks HPLC-s segavate ühendite eemaldamiseks, lahuse solvendi vahetamiseks ja proovi hoiustamiseks ning transpordiks. SPE-s kasutatakse kas normaal- või pöördfaasi statsionaarseid faase sarnaselt HPLC meetodile. SPE koosneb

neljast järgnevast sammust: padruni konditsioneerimine, lahuse ülekandmine padrunisse, padruni pesemine, mille käigus segavad ained eemaldatakse, ja analüüdi väljapesemine.[31] Pöördfaasi padrun suudab eraldada mittepolaarseid ühendeid polaarsest lahusest, kui mittepolaarne analüüt jaotub eelistatult statsionaarsesse faasi. Pöördfaas-SPE täidisosakesed valmistatakse enamasti silikageelist, mille pind on modifitseeritud alküülrühmadega.[15]

1.5.2. Rotaatoraurusti

Rotaatoraurusti abil saab eemaldada madalal rõhul kergesti lenduva solvendi mitte-lenduvast ainest. Seda kasutatakse tihti, et eraldada ekstraktsiooniga või kromatograafiliselt puhastatud aine lahustist. Eelis tavalise vaakumdestillatsiooni ees on kolvi pöörlemine, mis tagab, et lahus kolvist agressiivselt välja ei kee. [32] Kuna korraga saab kuivatada ainult ühte proovi, siis on mõistlik rotaatoraurusti võtta appi, kui proove on vähe.[33]

1.5.3. Inertse gaasi voolu all kuivatamine

Inertse gaasi (näiteks lämmastiku) voolu all kuivatamisel tagab N_2 solvendi aururõhu languse solvendi kohal, mille tõttu solvent aurustub kiiremini kui muidu [30]. Aurustamisele aitab kaasa ka proovi vesivannis soojendamine. N_2 voolu all kuivatamine on mõistlik, kui soovitakse kuivatada palju väikese ruumalaga proove.[33] Samas kui lahustiks on kõrge keemistemperatuuriga lahusti, näiteks vesi, võib aurustamisprotsess pikale venida [30].

2. Eksperimentaalne osa

2.1. Kasutatud kemikaalid

Vedelikkromatograafias ja lahustitena kasutati eluendina järgmiseid kemikaale: metanool (tootja Honeywell, puhtus ≥99,9%), Milli-Q vesi (Milli-Q® IQ 7000 Merck Millipore, TOC 1,75 ppb, eritakistus 18 MΩ·cm 25 °C juures), sipelghapet (Honeywell, puhtus ≥98%).

Põletikuvastaste ravimite lahuse valmistamiseks kasutati ketoprofeeni (99,9%, Sigma-Aldrich), fluniksiini (puhtus 99,9%, Sigma-Aldrich).

NMR analüüsis kasutati deuteeriumoksiidi (Sigma-Aldrich, 99,9% D), metüülalkoholi-d_4 (Deutero, 99,80%) ja qNMR-i standardainena kasutati 3-(trifluorometüül)aniliini (Sigma-Aldrich, 99,5%).

2.2. Aparatuur

LC-MS analüüsiks ja fraktsioonide eraldamiseks kasutati kromatograafi Shimadzu Nexera XR ja massispektromeetrit Shimadzu LCMS-2020. Kromatograafia kolonniks oli Synergi Hydro-RP täidisosakeste suurusega 4 μm, läbimõõduga 4,6 mm ja pikkusega 250 mm. Kolonnist väljuva eluendivoolu jaotajana kasutati QuickSplit Series 600 (Lisa 1).

SPE padruniks valiti Zorbax SPE C18 (tootja Agilent). Lämmastiku voolu all aurustamiseks kasutati Pierce Reacti-Vap aurustit (mudel 18780) ja sama firma Reacti-Therm (mudel 18790) küttemoodulit. Rotaatoraurustina kasutati Heidolphi Laborata 4000.

NMR analüüsi tehti instrumendiga Bruker Avance-III 700, mille magnetvälja tugevus on 16,4 T (^{1}H sagedus 700,1 MHz, ^{19}F sagedus 658.7 MHz).

2.3. Jaoturi kalibreerimine

Kolonnist tuleva eluendi voolu jagamiseks kasutatavat jaoturit saab seadistada, keerates jaoturi käepidet. Kolonnist elueeruv lahus suunati jaoturisse ning 2 jaoturist väljuvat haru suunati läbi kapillaartorude eelnevalt kaalutud mõõtesilindritesse. Eluenti koguti paralleelselt mõlemasse silindrisse vähemalt 20 minuti jooksul ja kogumisaeg fikseeriti. Seejärel mõõtesilindrid kaaluti.

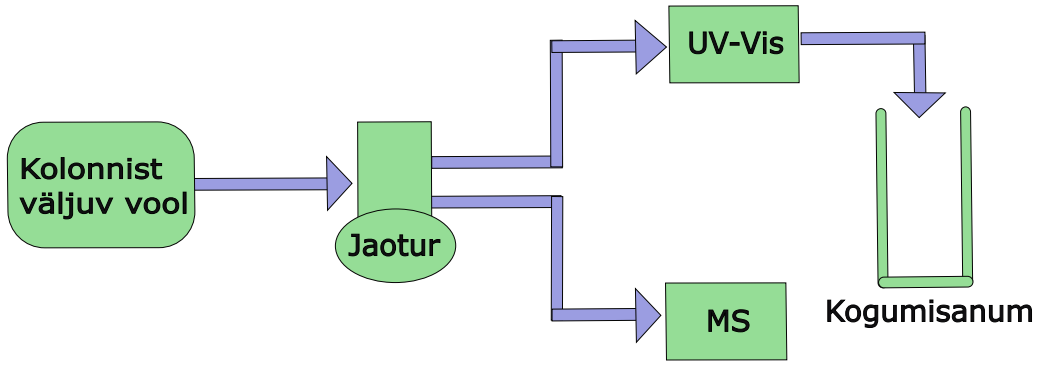
2.4. Fluniksiini kogumine mudelsüsteemist

Valmistati fluniksiini ja ketoprofeeni standardlahused kontsentratsiooniga ligikaudu 1 mg/ml. Fluniksiini lahustina kasutati MeOH-i, ketoprofeeni lahustina MeCN-MeOH-H_2O (1:1:2) lahust. Seejärel valmistati ravimainete lahuste segu suhtes 1:1. Lahuste kontsentratsioonid on ära toodud järgnevas tabelis (Tabel 1).

Tabel 1. Kasutatud ravimained, nende lahused ja registreeritavad m/z

Aine nimetus	Kaalutud aine, mg	Lahusti ruumala, ml	Kontsentratsioon lõpplahuses, mg/ml	Registreeritav m/z
Fluniksiin	10,008	10	0,50	297
Ketoprofeen	10,890	10	0,54	255

Fluniksiini eraldamiseks ketoprofeenist kasutati eluendi koostist 80% MeOH ja 20% 0,1%-list FA vesilahust. Fluniksiini fraktsioonide kogumiseks jaotati kolonnist väljuv eluendivool jaoturi abil kaheks. Kiirema voolukiirusega toru liikus UV-Vis detektorisse ja aeglasema voolukiirusega toru MS-i. UV-Vis spektromeetri järele paigutati kogumisanum. Kirjeldatud skeem on toodud all (Joonis 5). Jaoturi režiim seati 0,5 mm peale ja sarnaselt eelnevaga määrati ka selle eluendi koostisega antud režiimi jaotussuhe.



Joonis 5. Fluniksiini kogumiseks kasutatud aparatuuri skeem

Fluniksiini eraldamiseks registreeriti kromatogramm nii UV-Vis- kui MS-detektorit kasutades. Kuna MS-i ja UV-Vis spektromeetri retentsiooniajad erinesid teineteisest rohkem kui 5 s, siis, kasutati kogumisaja määramiseks ainult UV-Vis spektromeetrit. Erinevatel kogumistel fluniksiini retentsiooniaeg varieerus, nii et kogumisaeg määrati enne igat korda kahe proovisüstiga.

2.5. Kogutud lahuse kontsentreerimine

Järgnevalt on kirjeldatud kolme erinevat kolonnist kogutud fluniksiini lahuse kontsentreerimise viisi.

2.5.1. Tahke faasi ekstraktsioon

SPE padrun konditsioneeriti 20 ml Milli-Q H_2O-ga, mille järel voolutati fluniksiini standardlahusest kogutud lahus läbi padruni. Padrunit elueeriti kõigepealt 3 ml MeOH-ga, padrunit läbinud vedelik koguti. Sellele lahusele mõõdeti hiljem nii ^{1}H kui ka ^{19}F-NMR spekter. Seejärel elueeriti padrunit 3 ml lahusega koostisega 95% MeOH, 5% Milli-Q H_2O, mille järel padrunist väljunud lahus koguti. Elueerimist sama lahusega (seekord 4 ml) korrati ja padrunit läbinud fraktsioon koguti. Läbi SPE padruni elueerunud fraktsioonid ja ka proovi solvent, mis voolutati padrunist läbi, säilitati eraldi viaalides.

Kuna hiljem selgus nii ^{1}H-NMR kui ka ^{19}F-NMR-ga spektritest, et mõõdetud lahuses (elueeritud padrunist välja 3 ml MeOH-ga) oli fluniksiini sisaldus oodatust palju madalam, siis kõik padrunist kogutud fraktsioonid valati kokku ja kontsentreeriti meetodiga N_2 kuivatamine + SPE + N_2 kuivatamine, mida on kirjeldatud järgmises alampeatükis.

2.5.2. N_2-ga kuivatamine + SPE + N_2-ga kuivatamine

Lahus jaotati 2–3 viaali vahel ära, kuivatati N_2 voolu all kuniks lahuse taseme muutus viaalides aeglustus märgatavalt ehk MeOH oli lahusest ära aurustatud ja H_2O, millel on oluliselt kõrgem keemistemperatuur, jäi viaali. Aurustamise kiirendamiseks soojendati küttemooduli abil viaale vesivannis umbes 45 °C juures.

Saadud fluniksiini vesilahusele, millest oli MeOH ära aurustatud, viidi läbi SPE. Padrunit konditsioneeriti 3 ml H_2O-ga, fluniksiini lahus kanti viaalidest üle, pestes igat viaali 3 korda 0,5 ml H_2O-ga. Fluniksiin elueeriti padrunist välja 6 ml MeOH-ga.

Seejärel kuivatati lahus lämmastikuvoolu all, kuumutades viaali sarnaselt eelmise aurustamisega, kuni kogu MeOH oli aurustunud.

2.5.3. Rotaatoraurustiga kuivatamine

Fluniksiini ja ketoprofeeni segust kogutud lahus kanti üle 100 ml ümarkolbi ja kinnitati rotaatoraurusti külge. Ümarkolbi kuumutati kogu destillatsiooni vältel termostateeritud vesivannis 40 °C juures. Rõhku alandati esmalt 210 mbar-ni ning alandati veel vastavalt kuni 9 mbar, et lahusti tilguks jahutist kogumiskolbi pidevalt. Kui MeOH oli ära aurustatud, eemaldati kogumiskolvist MeOH, mille järel rõhku alandati sujuvalt 9 mbar-ni, kuniks ka H_2O oli ära aurustunud.

2.6. NMR-analüüs

Esimesed mõõtmised tehti solvendisignaale mahasuruvate parameetritega. Sellel juhul oli ^{1}H-NMR spektri kogumisajaks 1,3 s, relaksatsiooniajaks 1,5 (Lisa 2). Sama proovi puhul oli ^{19}F-NMR spektri mõõtmisel kogumisajaks 0,2 s ja relaksatsiooniajaks 0,1 s (Lisa 3).
Järgmised mõõtmised tehti ilma solvendisignaale mahasuruvate parameetrideta. Sellel juhul oli ^{1}H-NMR spektri kogumisajaks 2,9 s ja relaksatsiooniajaks 3 (Lisa 4).

2.6.1. qNMR

Kvantitatiivse NMR-i jaoks kasutati standardainena 3-(trifluorometüül)-aniliini (3-TFMA), mida kaaluti 6,161 mg ja lahustati 7,9711 g ehk 10 ml MeOH-s. Standardaine valiti fluniksiini stuktuurist lähtudes. Mõlemad sisaldavad nii aromaatseid vesinikke, mis on vajalikud ^{1}H-qNMR mõõtmiste jaoks, kui ka CF_3 rühma, mis on vajalik ^{19}F-qNMR-i jaoks. Kindel kogus saadud lahust lisati koos kontsentreeritud fluniksiini lahusega NMR tuubi. Lisatud standardaine ja fluniksiiini lahuse hulk igas mõõtmises on toodud all (Tabel 2). Samuti lisati MeOD-d.
I kogumise puhul lisati rotaatoraurustiga kuivatatud ümarkolbi 0,5 ml MeOH (0,3763 g), millest 0,2 ml MeOH (0,1594 g) kasutati esimeses qNMR mõõtmises. Järelejäänud fluniksiin kanti analüütiliselt üle järgmisesse mõõtmisesse. Sarnaselt kanti kuivatatud fluniksiin üle nii II kogumise kui meetodi N_2 + SPE + N_2 qNMR mõõtmise jaoks.

Tabel 2. Standardaine ja fluniksiini kogused qNMR mõõtmistes

Proovi nimi	V(3-TFMA lahus), µl	m(3-TFMA lahus), g	m(3-TFMA), mg	n(3-TFMA), µmol	m(FLU lahus), g
I kogumine	200	0,1614	0,1247	0,774	0,1594
I kogumise II lahustamine	200	0,1557	0,1240	0,746	Kanti üle kogu fluniksiin
II kogumine	200	0,1605	0,1240	0,769	Kanti üle kogu fluniksiin
N_2 + SPE + N_2 kontroll	250	0,1994	0,1540	0,956	Kanti üle kogu fluniksiin

Nii ^{1}H kui ka ^{19}F NMR spektri mõõtmisel koguti 1024 skaneeringut 90-kraadise pulsiprogrammiga. ^{1}H mõõtmised viidi läbi kogumisajaga 2,9 s ja relaksatsiooni ajaga 7 s. ^{19}F mõõtmised tehti kogumisajaga 1 s ja relaksatsiooniajaga 4 s.

3. Tulemused ja arutelu

3.1. Jaoturi režiimid ja vastavad jaotussuhted

Selleks, et leida, kui palju fluniksiini iga süstiga kogutakse ja kui palju läheb MS-s kaduma, jaotur kalibreeriti (Peatükk 2.3). See on oluline hiljem, kui leitakse qNMR-ga kogumise ja kontsentreerimise saagis. Kõigepealt uuriti, kuidas jaoturi režiimi muutmine muudab jaotussuhet kahe haru vahel. Eluendi voolukiirus oli 1,1 ml/min ja koostis 70% MeOH ja 30% H_2O-d. Saadud kalibreerimise tulemused on toodud all (Tabel 3).

Tabel 3. Jaotussuhte sõltuvus jaoturi seadistusest voolukiirusega 1,1 ml/min

Jaoturi režiim (mm)	v(kõrgem) (g/min)	v(madalam) (g/min)	Jaotussuhe - v(kõrgem)[1]/v(madalam)[2]
1	0,88	0,08	11
2	0,85	0,11	7,8
3	0,83	0,12	6,7
4	0,80	0,16	5,0

[1] Kiirema haru voolukiirus
[2] Aeglasema haru voolukiirus

Voolukiirus kummaski jaoturi harus arvutati jagades kogutud eluendi massi ajaga. Jaotussuhe on saadud, jagades jaoturist väljunud kiirema haru voolukiiruse madalama voolukiirusega. Näiteks, režiimi 1 mm (jaotussuhe 11) ja eluendi voolukiirusega 1,1 ml/min on ühest kapillaarist väljuva eluendi voolukiirus 0,1 ml/min ja teisest 1 ml/min. Mida suurem on jaotussuhe, seda väiksem on aeglasema haru voolukiirus. See põhimõte ühtib jaoturi tootja poolt ette antud andmetega, kuigi tootja poolt ette antud suhted vastavatele režiimidele ei ole võrreldavad. [34]

Järgmisena uuriti eluendi koostise mõju jaotussuhtele jaoturi režiimil 1 mm. Kuna vee-metanooli lahuse koostis ja selle viskoossus ei ole omavahel lineaarses seos, siis on raske ette arvata, kuidas mõjutab eluendi koostis kapillaaridest väljuva vedeliku voolukiirust.

Mõõtmistulemused on toodud järgnevas tabelis (Tabel 4).

.

Tabel 4. Jaotussuhte sõltuvus eluendi koostisest voolukiirusega 1,1 ml/min ja jaoturi režiimil 1 mm

Metanooli ruumala%	v(aeglasem) (g/min)	v(kiirem) (g/min)	Jaotussuhe v(kiirem)/v(aeglasem)
100	0,077	0,78	10
70	0,078	0,88	11
50	0,087	0,91	10
10	0,095	0,98	10

Tabelist selgub, et eluendi koostise muutudes jaotussuhe ei muutu märkimisväärselt.
Määrati ka jaotussuhe režiimile 0,5 mm eluendi koostisega 80% MeOH ja 20% 0,1%lise FA, mida kasutati hiljem fluniksiini kogumisel segust. Sellel saadi jaotussuhteks 12 ehk 13-st osast 12 koguti ja 1 registreeris MS. Režiim 0,5 mm valiti, sest see on kõige suurema jaotussuhtega režiim ehk võimalikult palju fluniksiini kogutakse ja võimalikult vähe fluniksiini läheb MS-s kaduma.

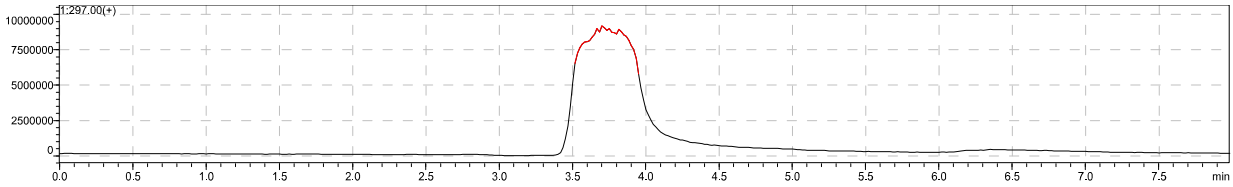
3.2. Fluniksiini kogumine standardlahusest

Selleks et kontrollida, kas fluniksinii kogumine ja kontsentreerimine on võimalik prooviti seda kõigepealt teha standardlahusega. Fluniksiini standardlahuse süstimisel kasutatud kogumisega seotud parameetrid on toodud all (Tabel 5).

Tabel 5. Fluniksiini standardlahusest kogutud süstid ja eeldatav kogutud fluniksiini mass

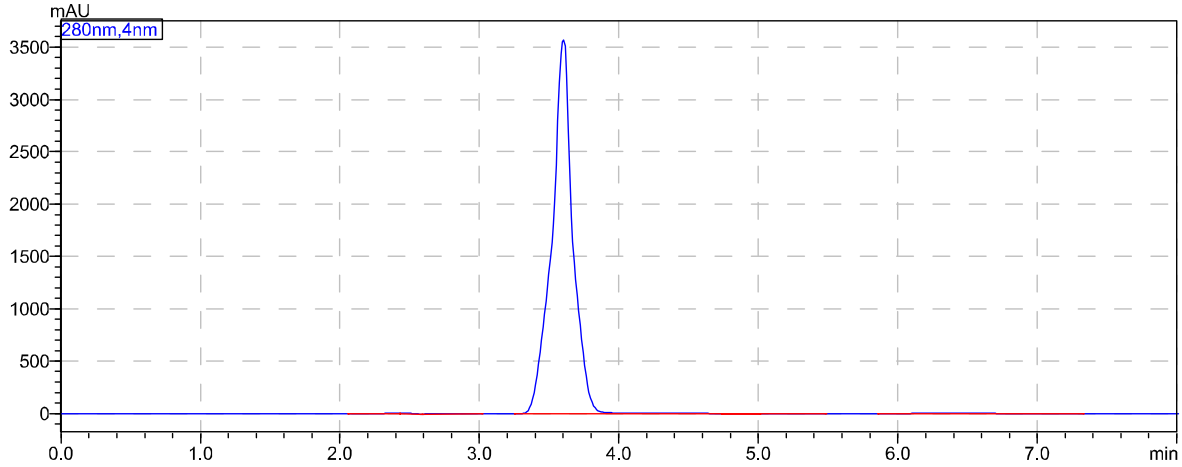
Süstitud lahus	c(FLU lahuses), mg/ml	V(süst), µl	Kogutud süstide arv	Jaoturi jaotussuhe	Eeldatav m(FLU), mg
Fluniksiini standardlahus	1.0	10	30	10	0,27

Fluniksiin koguti eluendi koostisega 80% MeOH ja 20% 0,1%list FA. Kasutati jaoturi režiimi 1 mm. UV-Vis detektorilt ja massispektromeetrilt saadud kromatogrammide võrdlemisel leiti, et fluniksiin väljub mõlemast torust samal ajal (Joonis 6, Joonis 7). Kogumisel lähtuti MS-i signaalist ja kogumist alustati kui fluniksiini molekulaariooni (m/z +297) signaal kerkis märkimisväärselt. Kogumine lõpetati, kui molekulaariooni piik oli möödunud ehk 4,20 min juures.



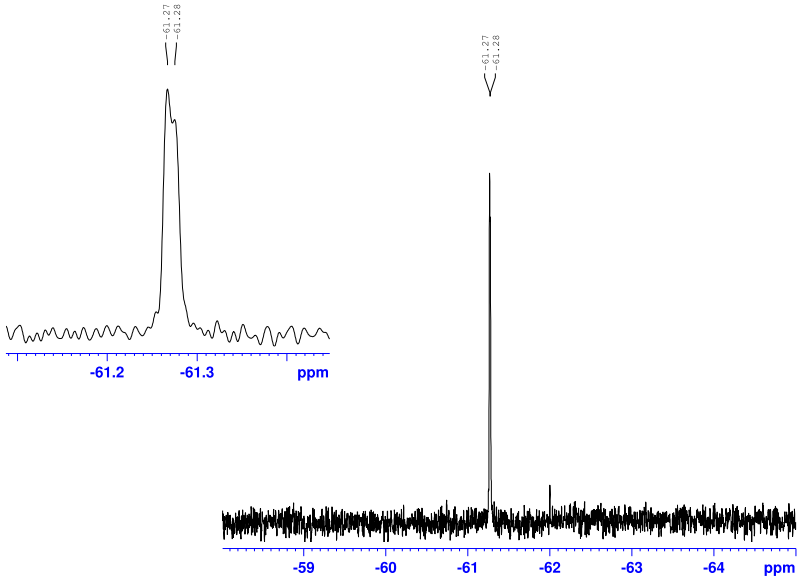
Joonis 6. Fluniksiini molekulaariooni m/z +297 kromatogramm eluendi koostisega 80% MeOH ja 20% 0,1%line FA, jaoturi režiimil 1 mm, süsti ruumala 10 µl, kogumisaeg 3,4–4,2 min.

Pikk piigi saba on tingitud MS-i ülekoormamisest ja UV-Visi kromatogrammi saba ei veni nii pikalt. Seega võib eeldada, et fluniksiin piik ei ole nii lai, kui MS-i kromatogrammilt tundub, ja põhimõtteliselt kogu fluniksiin saadi läbi kolonni kogumisel kätte. Kokku saadi lahust ligikaudu 24 ml, milles eeldatav fluniksiini sisaldus oli 0,01 mg/ml.



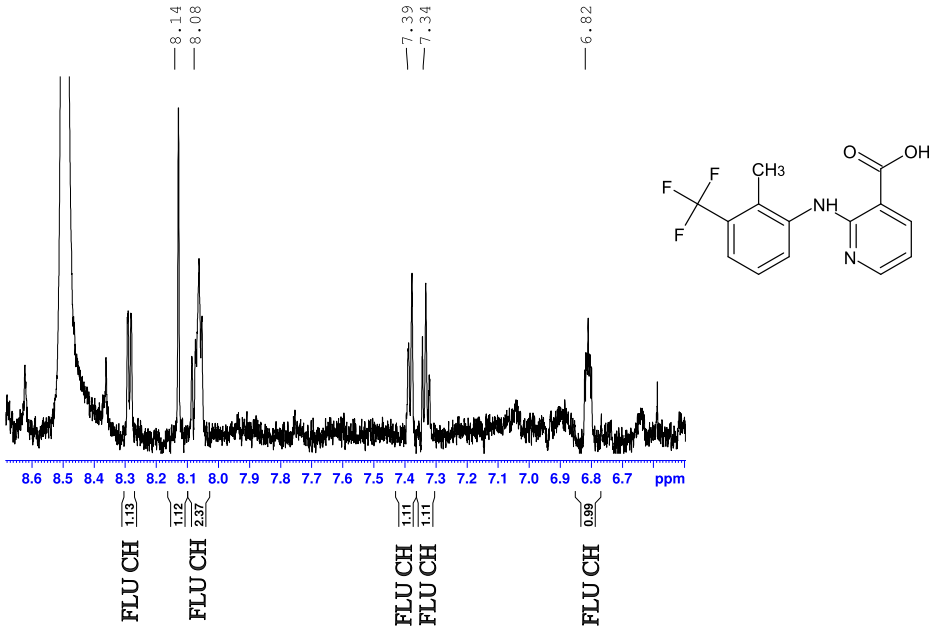
Joonis 7. UV-Vis kromatogramm (λ=280 nm) eluendi koostisega 80% MeOH ja 20% 0,1%line FA, jaoturi režiimil 1 mm, süsti ruumala 10 µl, kogumisaeg 3,4–4,2 min

Proovi kontsentreeriti SPE-ga (Peatükk 2.5.1). ^{19}F-NMR spektri mõõtmiseks lisati lahusele D_2O-d. Spektri jaoks koguti 120862 skaneeringut, kogumisajaga 0,2 s ja relaksatsiooniajaga 0,1 s (Joonis 8, Lisa 3) Fluniksiini CF_3-rühma signaal on 61,27 ppm-i juures.



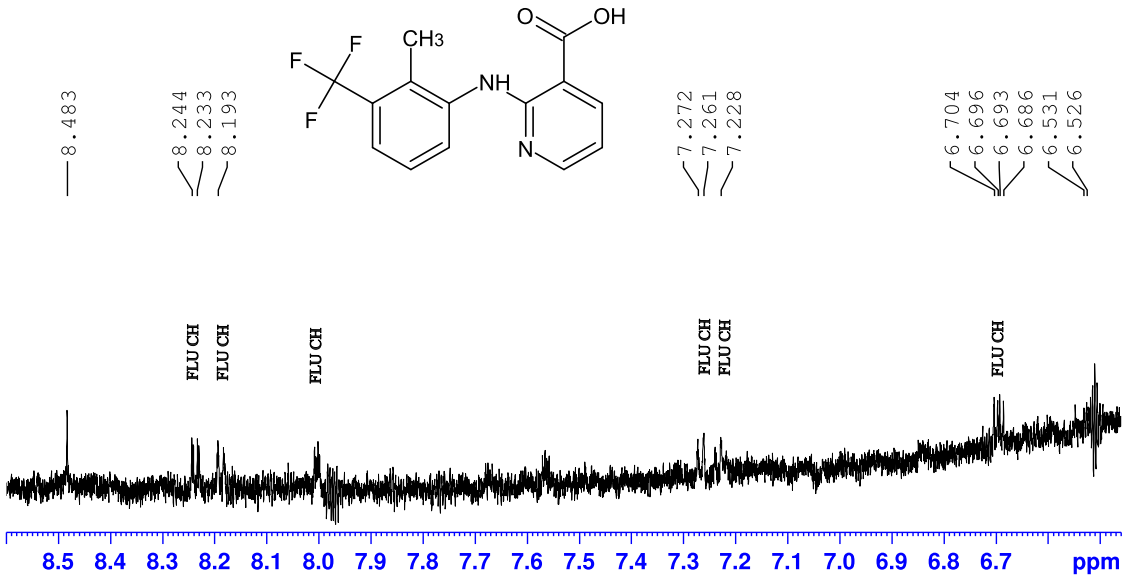
Joonis 8. SPE-ga kontsentreeritud fluniksiini lahuse ^{19}F-NMR-spekter

Kontsentreeritud lahusele registreeriti ka ^{1}H-NMR spekter (Joonis 9, Lisa 2), mille jaoks tehti 26800 skaneeringut ja kasutati solvendi signaali mahasuruvaid parameetreid. Yarhosseini *et al* artiklis mõõdetud fluniksiini ^{1}H-NMR spektriga võrdlemine kinnitab, et kogutud lahuses oli tõesti fluniksiin [35].



Joonis 9. ^{1}H-NMR spektri aromaatsete vesinike osa kolonnist kogutud fluniksiini standardlahusest, kontsentreeritud SPE-ga

Eeldades kadudeta kogumist ja kontsentreerimist oleks pidanud 3 ml MeOH-s olema 0,28 mg fluniksiini, kuid vaadates nii ^{1}H kui ^{19}F NMR mõõtmisel signaali saamiseks vajalikke skaneeringute arvu, siis saab järeldada, et tegelik lahuse kontsentratsioon oli palju madalam. Seega kontrolliti SPE kontsentreerimist. Eeldati, et fluniksiin oli kandunud MeOH-ga läbinud padruni. Ekstraktsioonist järele jäänud solvendid erinevates viaalides valati kokku ja kontsentreeriti meetodiga N_2 kuivatamine + SPE + N_2 kuivatamine. Kuivatatud fluniksiin lahustati mõnes ml-s MeOH-s ja registreeriti ^{1}H-NMR spekter (Joonis 10). Koguti 320 skaneeringut, kogumisajaga 2,9 s ja relaksatsiooniajaga 3 s (Lisa 4)



Joonis 10. ^{1}H-NMR spekter kogutud fluniksiini lahusest, mida kontsentreeriti uuesti (N_2+SPE+N_2)

Kuna uuesti kontsentreeritud lahuse signaalid saadi kätte kordades vähemate skaneeringute arvudega (320 vs 26800), siis järeldati, et meetodiga N_2 kuivatamine + SPE + N_2 kuivatamine läheb fluniksiini kordades vähem kaotsi kui lihtsalt SPE-ga. See on ka loogiline, ilma eelneva MeOH ära aurustamiseta kannab MeOH fluniksiini läbi padruni.

3.3. Fluniksiini kogumine segust

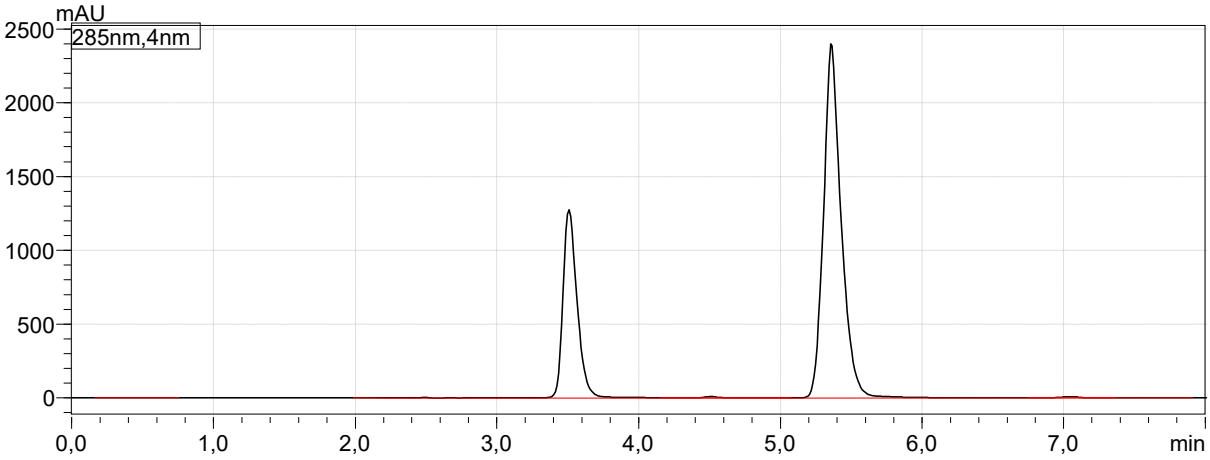
Kuna fluniksiini kogumine standardlahusest õnnestus ja oli olemas meetod saadud lahuse kontsentreerimiseks (N_2 + SPE + N_2), siis otsustati edasi liikuda fluniksiini eraldamise ja kogumise juurde segulahusest. Fluniksiini standardlahuse süstimisel kasutatud kogumisega seotud parameetrid on toodud all (Tabel 6). Kuna võrreldes standardlahusega oli fluniksiini

sisaldus kaks korda väiksem, siis suurendati süsti ruumala kaks korda 20 µl-ni. Fluniksiini koguti segust kahel korral samade parameetritega.

Tabel 6. Fluniksiini ja ketoprofeeni segust kogutud süstid ja eeldatud kogutud fluniksiini mass

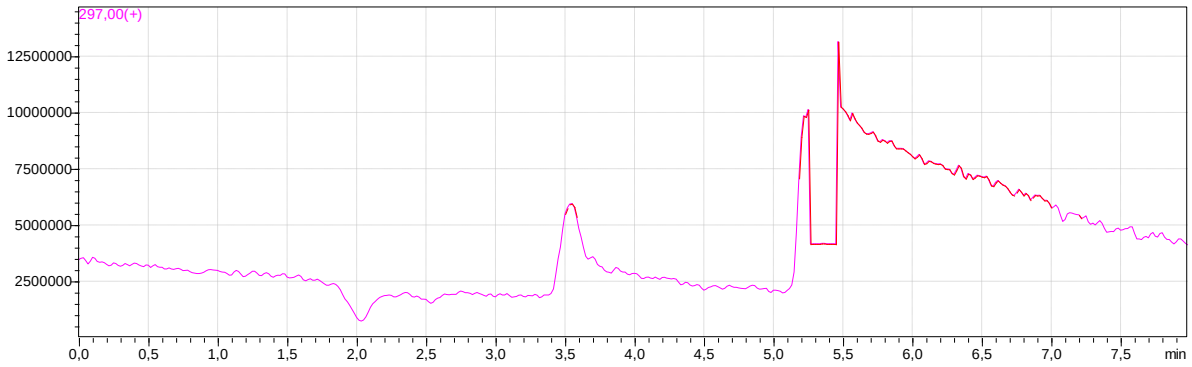
Süstitud lahus	c(FLU lahuses), mg/ml	V(süst), µl	Kogutud süstide arv	Jaoturi jaotussuhe	Eeldatav m(FLU), mg
Fluniksiini ja ketoprofeeni segu	0,5	20	30	12	0,28

Näide teisest kogumise UV-Vis kromatogrammist on toodud järgneval joonisel (Joonis 11) ja esimesest kogumisest lisades (Lisa 5).



Joonis 11. UV-Vis kromatogramm (λ=285 nm) eluendi koostisega 80% MeOH ja 20% 0,1%line FA, jaoturi režiimil 0,5 mm, süsti ruumala 20 µl, kogumisaeg 5,0–6,0 min.

Taas selgus, et ka veel suurem jaoturi jaotussuhe (12) ei ole piisav ja massispektromeetri detektor on ülekoormatatud. Fluniksiini elueerumisel (u 5,0–6,0 min) on näha, et piigi joon on punane (programm hoiatab, et y-teljelt ei saa enam intensiivsust korrektselt lugeda) ja piigis on katkestus (Joonis 12). UV-Vis kromatogrammil, sellist katkestust ei ole. MS kromatogrammist on ka näha, et piigil on pikk saba, mida põhjustab MS-i ülekoormamine.
UV-Vis kromatogrammi ja MS kromatogrammi võrdlemisel selgus, et MS-ni jõuab fluniksiini ligikaudu 5 s hiljem kui UV-Vis detektorisse, seega lähtuti kogumisaja määramisel UV-Vis kromatogrammist. Et aine elueeruks siiski ühel ajal ja oleks võimalik kasutada ka MS-i kromatogrammi, võib lisada MS-i haru pumba, mis kiirendab vastava haru voolukiirust.

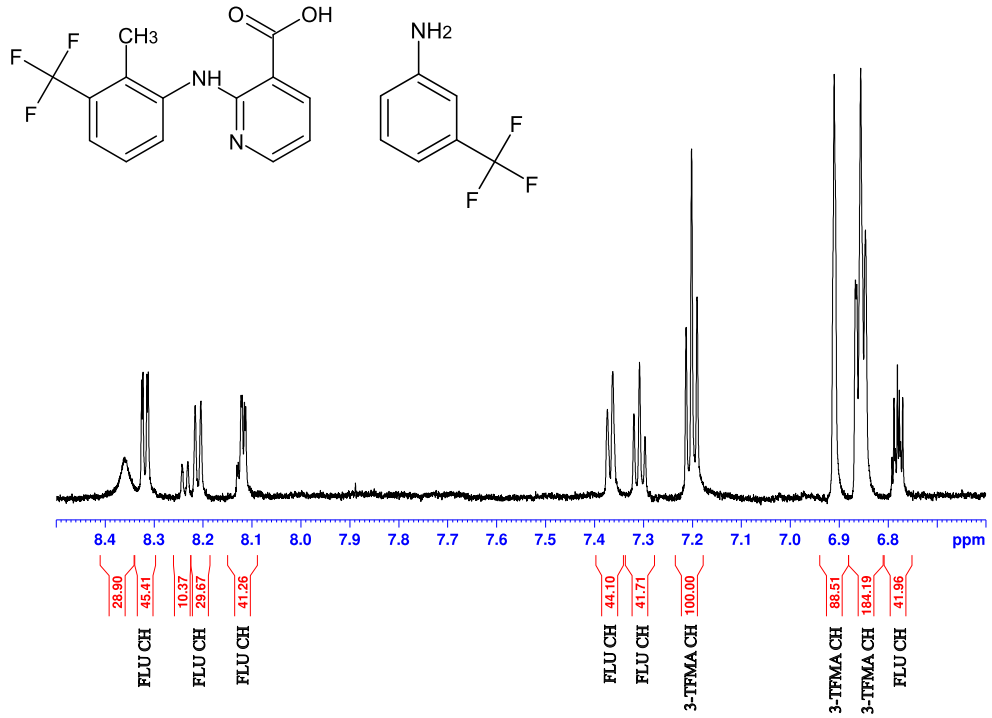


Joonis 12. MS kromatogramm eluendi koostisega 80% MeOH ja 20% 0,1%line FA, jaoturi režiimil 0,5 mm, süsti ruumala 20 µl, kogumisaeg 5,0–6,0 min.

Kokku saadi lahust 30 ml ja ideaalset kogumist eeldades oleks pidanud saama 0,28 mg fluniksiini, mille lahuse kontsentratsioon oli ligikaudu 0,01 mg/ml. Fluniksiini kogumist segust viidi läbi kaks korda ja mõlemal korral kuivatati lahus rotaatoraurustiga.

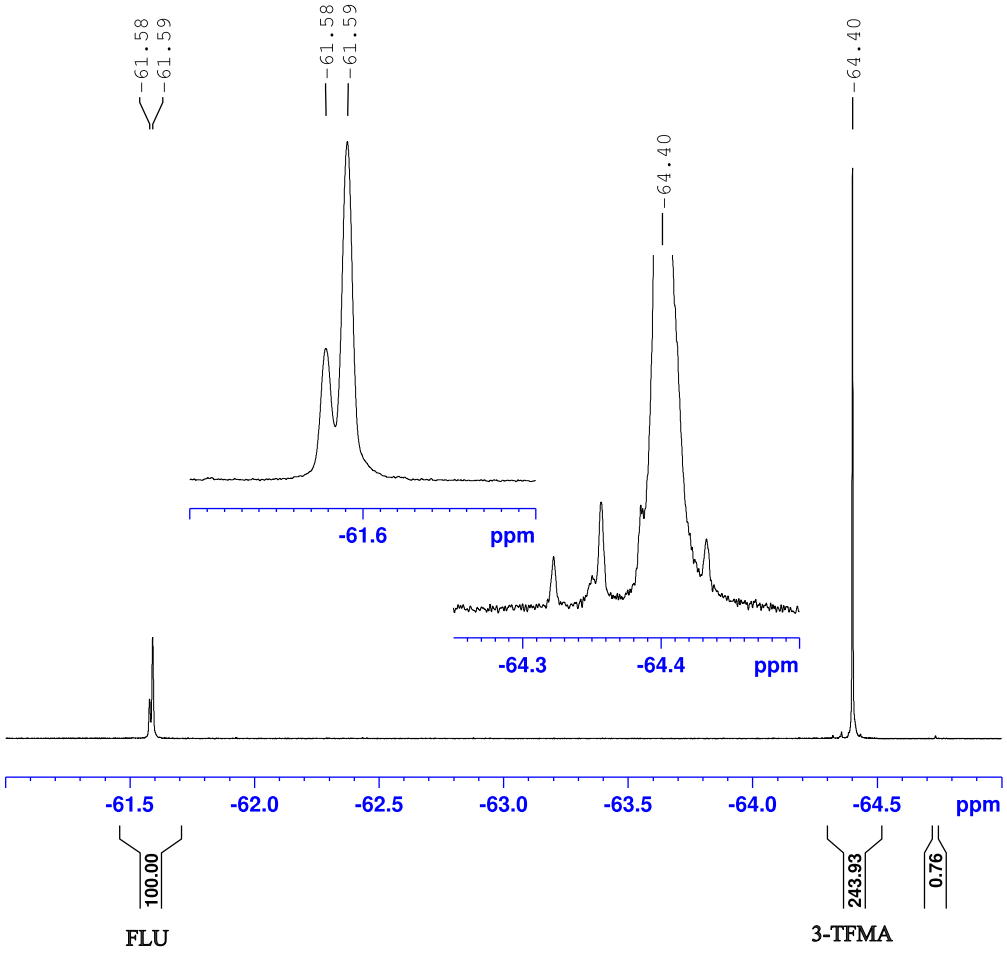
3.4. qNMR

Kogumise ja kontsentreerimise kadude hindamiseks registreeriti standardainega (3-TFMA) kontsentreeritud fluniksiini lahuse ^{1}H ja ^{19}F NMR spektrid. Esimese kogumise ^{1}H ja ^{19}F spektrid toodud all (Joonis 13, Joonis 14). Kvantitatiivse ^{1}H-NMR integreerimise jaoks kasutati piiki 7,2 ppm-i juurest (3-TFMA) ja piike 7,4 ning 7,3 ppm-i juures (FLU) (Lisa 6).



Joonis 13. FLU ja 3-TFMA ^{1}H-NMR spekter I kogumise I mõõtmine aromaatsete vesinike alas koos fluniksiini ja 3-TFMA struktuuridega

^{19}F spektris on näha lisapiike, mille puhul on tegemist ^{13}C satellitidega mis võeti samuti integreerimisel arvesse (Joonis 14, Lisa 7). Sarnaselt tehti ka kõik ülejäänud proovide mõõtmised.



Joonis 14. FLU ja 3-TFMA ^{19}F spekter, I kogumise I lahustamine

Saadud ^{1}H-spektrite integraalid ja nendest arvutatud fluniksiini kogused on toodud järgnevas tabelis (Tabel 7). Kõikide proovide puhul oli teoreetiline fluniksiini mass kogu lahuses 0,28 mg. ^{1}H-qNMR-ga saadi fluniksiini saagiseks esimesel kogumisel 83% ja ^{19}F-qNMR-ga 79%. Üks võimalus, miks fluniksiini sisaldus on väiksem kui teoreetiline on, et LC süsti ruumala ei ole tegelikult 20 µl, vaid on läbivalt väiksem. Et kontrollida, kas ümarkolvi seintelt õnnestus kogu fluniksiin lahustada, kanti ümarkolvi seintelt kogu fluniksiin analüütiliselt üle NMR-tuubi ehk sooritati teine lahustamine. Antud mõõtmise saagiseks saadi ^{1}H-qNMR-ga 49% ja ^{19}F-qNMR-ga 54% kui taas eeldada, et teoreetiline fluniksiini mass oli 0,28 mg (Lisa 8, Lisa 9). Esimesest lahustamisest palju madalam fluniksiini kontsentratsioon tähendab, et on võimalus, et ülekandmisel NMR-tuubi esinesid märgatavad kaod.

Tabel 7. ^{1}H spektrite qNMR mõõtmiste tulemused ja fluniksiini kogused

	I (^{1}H, 3-TFMA)	I (^{1}H, FLU)	m (FLU), mg	m (FLU kogu lahuses), mg	saagis, %
I kogumise I lahustamine	100	42,91	0,098	0,23	83
I kogumise II lahustamine	100	35,57	0,079	0,14	49
II kogumine	100	93,89	0,214	0,21	76

Teise kogumise saagised on sarnased esimesele kogumisele. ^{1}H-qNMR-ga saadi fluniksiini saagiseks 76% ja ^{19}F-qNMR-ga 62% (Lisa 10, Lisa 11). Erinevused kahe kogumise vahel võivad tuleneda sellest, et integreerimisel ei ole valituid signaale, mis ei sisaldaks mingi muu aine signaale.

Tabel 8. ^{19}F spektrite qNMR mõõtmiste tulemused ja fluniksiini kogused

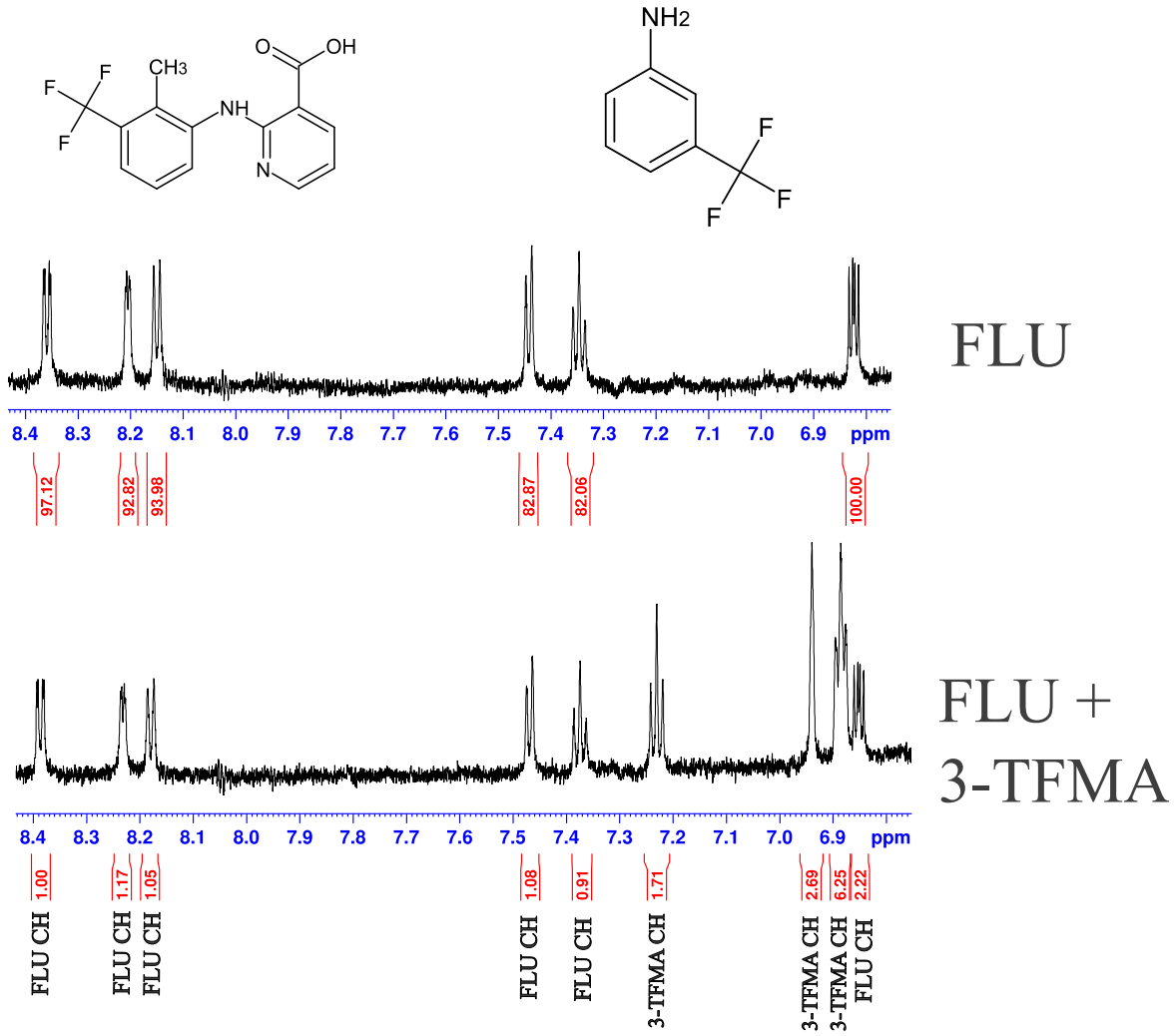
	I (^{19}F,3-TFMA)	I (^{19}F,FLU)	m(FLU tuubis), mg	m(FLU kogu lahuses), mg	saagis, %
I kogumise I lahustamine	243,9	100	0,094	0,22	79
I kogumise II lahustamine	252,7	100	0,088	0,15	54
II kogumine	131,2	100	0,174	0,17	62

Sarnaselt hinnati meetodi N_2 + SPE + N_2 kadusid (Lisa 12, Lisa 13). Valmistati fluniksiini lahus MeOH-s ja FA vesilahuses sama kontsentratsiooniga nagu peaks ideaalsel kogumisel kolonnist väljuma. Seega ka selle puhul pidi peale kuivatamist kätte saama 0,28 mg fluniksiini. ^{1}H ja ^{19}F qNMR-ga saadud tulemused näitavad, et kuivatamiseprotsessil saadi kätte vastavalt 80% ja 72% algsest fluniksiinist (Tabel 9). Kaod võivad tekkida näiteks SPE käigus, kogu fluniksiin ei jää proovi läbikandmisel padrunisse kinni või kogu fluniksiini ei pestud MeOH-ga välja. Fluniksiin võib ka teine kord N_2 voolu all kuivatamise ajal viaalist pulbri kujul välja lennata.

Tabel 9. N_2+SPE+N_2 meetodi kadude kontrolli mõõtmistulemused qNMR-i kasutades

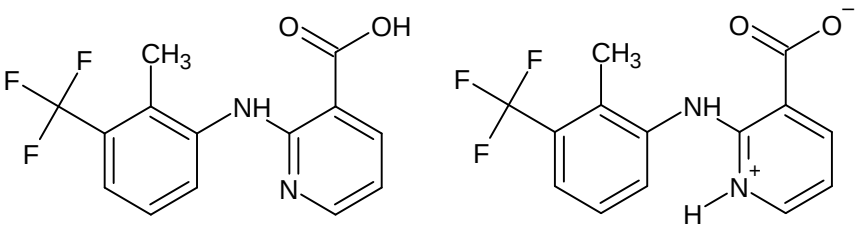
Mõõdetud isotoop	I (^{19}F, 3-TFMA)	I (^{19}F, FLU)	m(FLU tuubis), mg	m(FLU kogu lahuses), mg	saagis, %
^{19}F	139,7	100	0,203	0,20	72
^{1}H	100	78,69	0,223	0,22	80

Kuna qNMR spektrite analüüsi ajal leiti spektritest lisapiike (näiteks Joonis 13 8,23;8,14 ppm), mis ei olnud ei fluniksiini ega standardaine omad, kuid kattuvad mõlema aine piikidega, siis tehti täiendav mõõtmine. NMR-tuubi lisati fluniksiini ligikaudse kontsentratsiooniga 0,5 mg/ml ja teostati mõõtmine (Lisa 14). Seejärel lisati samasse tuubi sama kogus standardaine lahust, puhtas MeOH-s (Lisa 15).



Joonis 15. FLU vs FLU & 3-TFMA lahuste võrdlus MeOH-s samade parameetritega

Lisapiike antud spektritelt ei leia, nii et saab teha järelduse, et fluniksiin ja standardaine omavaheline interaktsioon ei põhjusta neid. Sarnaseid topeltsignaale on varemaselt raporteeritud ka näiteks nikotiinhappe (püridiin-3-karboksüülhape) puhul artiklis Soni *et al.*[36]. Antud piigid võivad tekkida fluniksiini ja mingi muu aine interaktsioonil või fluniksiin on erinevates lahustes, erineval kujul. Näiteks on võimalik, et fluniksiin esineb lahuses nii molekuli kui ka zwitterioonina, mille tasakaalu mõjutab lahuse pH (Joonis 16).



Joonis 16. Kaks fluniksiini võimalikku struktuuri molekulina ja zwitterioonina

4. Kokkuvõte

Käesolevas töös arendati poolpreparatiivse LC-MS eraldamise ja kvantitatiivse ^{19}F-NMR-i metoodikat, mida saaks kasutada fluoroorgaaniliste ühendite, sealhulgas PFAS-de analüüsiks keskkonna proovides. Selle jaoks kasutati mudelsüsteemi, mis koosnes fluniksiinist ja ketoprofeenist, kusjuures mõlema kontsentratsioon oli 0,5 mg/ml, eesmärgiga eraldada fluniksiin. Eesmärk õnnestus täita.

Poolpreparatiivse LC-MS jaoks kasutati jaoturit, mis jaotab pärast kromatograafilist kolonni eluendi voolu kaheks. Kõrgema voolukiirusega harust vedelik kogutakse, madalama voolukiirusega harust detekteerib MS. Kasutati reguleerivat jaoturit, mille erinevaid režiime eelnevalt iseloomustati ühe konkreetse eluendi koostisega ja samuti leiti, et eluendi koostisel ei ole märkimisväärset mõju kahe haru voolukiiruste erinevusele. Fluniksiin eraldati ketoprofeenist kasutades eluenti koostisega 80% MeOH ja 20% 0,1%-list FA vesilahust. Antud eluendi koostisele määrati ka jaoturi jaotussuhe. Fluniksiini kogumine viidi läbi kahel korral.

Prooviti kolme lahuse kontsentreerimise viisi. Ainult SPE ei andnud tulemusi, eluendi kõrge metanooli kontsentratsiooni tõttu voolutatati fluniksiin koos proovi solvendiga läbi padruni. Seega kõigepealt aurustati lahusest metanool välja, viidi läbi SPE, kus asendatakse järelejäänud vesi metanooliga, mille järel kuivatati fluniksiin metanoolist täielikult. Antud kontsentreerimise metoodika saagiseks saadi ^{1}H-qNMR-ga 80% ja ^{19}F-qNMR-ga 72%. Viimasena prooviti ka kogutud lahuse kontsentreerimist rotaatoraurustiga.

Kogutud fluniksiinile mõõdeti nii ^{19}F-qNMR kui ka ^{1}H-qNMR spektrid. Esimese kogumise saagiseks saadi vastavalt 79% ja 83%. Teise kogumise saagiseks vastavalt 62% ja 76%. Erinevused ^{19}F ja ^{1}H qNMR spektritest saadud tulemuste erinevused võivad tuleneda integreeritavate piikide halvast valikust ja on võimalus, et fluniksiin esineb proovis mitmel erineval kujul, mis tekitab lisapiike, mida pole integreerimisel arvesse võetud. ^{19}F-qNMR ja ^{1}H-qNMR tulemused suuremal määral kattuvad. Oodatavast väiksem fluniksiini kogus võib tuleneda sellest, et kromatograafi süsti ruumala on eeldatust väiksem. Järgmisena võib sooritada kindala kontsentratsiooniga ^{19}F-qNMR ja ^{1}H-qNMR lahuse mõõtmise, mille kaudu saaks valideerida fluniksiini ja kasutatud standardaine sobivust kvantitatiivse NMR-i jaoks.

Metoodika edasiarendusena saaks kasutada suuremat kolonni, et vähendada kogutavate süstide arvu; automatiseeritud kogumismehhanismi; pumpa, mis tagaks, et ühend jõuaks samaaegselt MS-detektorisse.

5. Summary

In this Bachelor's thesis a methodology was developed for semi-preparative LC-MS separation and quantitative ^{19}F-NMR, which can be used for the analysis of fluoroorganic compounds, including PFASs, in environmental samples. A model system was used, which consisted of flunixin and ketoprofen, both at a concentration of 0.5 mg/ml, with the aim of separating flunixin. This goal was successfully achieved.

For the semi-preparative LC-MS, an adjustable splitter was used to divide the eluent flow after the column into two streams. The stream of higher flow was collected, while the lower flow stream was directed to MS detector. A splitter was used, whose different modes were previously characterized with a specific eluent composition, and it was found that the eluent composition did not significantly affect the flow rate ratios of the two branches. Flunixin was separated from ketoprofen using an eluent composed of 80% MeOH and 20% 0.1% aqueous formic acid. The split ratio of the splitter for this eluent composition was determined beforehand. Flunixin collection was carried out twice.

Three methods for concentrating the solution were tested. SPE alone did not give acceptable results; due to the high methanol concentration in the eluent, flunixin was eluted along with the sample solvent through the cartridge. Therefore, methanol was first evaporated from the solution, secondly SPE was performed where the remaining water was replaced with methanol, and thirdly was flunixin completely dried from the methanol. The yield for this methodology was determined to be 80% with ^{1}H-qNMR and 72% with ^{19}F-qNMR. Thirdly, the collected solution was also concentrated with a rotary evaporator.

Both ^{19}F-qNMR and ^{1}H-qNMR spectra were measured to determine the yield of the collected flunixin. The yields for the first collection were 79% and 83%, respectively. For the second collection, the yields were 62% and 76%, respectively. Differences in the results obtained from the ^{19}F and ^{1}H qNMR spectra may stem from the poor selection of quantitative peaks, and it is possible that flunixin is present in multiple forms in the sample, creating additional peaks not accounted for in the integration. The ^{19}F-qNMR and ^{1}H-qNMR results largely overlap. The lower than expected amount of flunixin may be due to the injection volume being smaller than anticipated. Next, a solution with a known concentration of ^{19}F-qNMR and ^{1}H-qNMR could be measured to validate the suitability of flunixin and the standard used for quantitative NMR.

For further development of the methodology, a larger column could be used to reduce the number of injections needed; an automated collection mechanism could be implemented; and a pump could be used to ensure that the compound reaches MS-detector at the same time.

6. Kasutatud kirjandus

1. Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) - ECHA, https://echa.europa.eu/hot-topics/perfluoroalkyl-chemicals-pfas, viimati alla laetud 19.05.2024
2. Emerging chemical risks in Europe — 'PFAS' — European Environment Agency, https://www.eea.europa.eu/publications/emerging-chemical-risks-in-europe/emerging-chemical-risks-in-europe, viimati alla laetud 05.05.2024
3. D.M. Kempisty, Y. Xing, L. Racz, eds., Perfluoroalkyl Substances in the Environment, 1st edition, CRC Press, Boca Raton London New York, 2018, , pp 4, 40-41, 49
4. G. Goldenman, M. Fernandes, M. Holland, T. Tugran, A. Nordin, C. Schoumacher, A. McNeill, The cost of inaction : A socioeconomic analysis of environmental and health impacts linked to exposure to PFAS, Nordisk Ministerråd, 2019, p 127
5. T.G. Kantor, Ketoprofen: A Review of Its Pharmacologic and Clinical Properties, Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy. 6 (1986) 93–102.
6. A.V. Viscardi, E.J. Reppert, M.D. Kleinhenz, P. Wise, Z. Lin, S. Montgomery, H. Daniell, A. Curtis, M. Martin, J.F. Coetzee, Analgesic Comparison of Flunixin Meglumine or Meloxicam for Soft-Tissue Surgery in Sheep: A Pilot Study, Animals (Basel). 11 (2021) 423.
7. E. Daeseleire, L. Mortier, H. De Ruyck, N. Geerts, Determination of flunixin and ketoprofen in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, Analytica Chimica Acta. 488 (2003) 25–34.
8. T. Hu, T. Peng, X.-J. Li, D.-D. Chen, H.-H. Dai, X.-J. Deng, Z.-F. Yue, G.-M. Wang, J.-Z. Shen, X. Xia, S.-Y. Ding, Y.-N. Zhou, A.-L. Zhu, H.-Y. Jiang, Simultaneous determination of thirty non-steroidal anti-inflammatory drug residues in swine muscle by ultra-high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography A. 1219 (2012) 104–113.
9. B.J. Place, E.M. Ulrich, J.K. Challis, A. Chao, B. Du, K. Favela, Y.-L. Feng, C.M. Fisher, P. Gardinali, A. Hood, A.M. Knolhoff, A.D. McEachran, S.L. Nason, S.R. Newton, B. Ng, J. Nuñez, K.T. Peter, A.L. Phillips, N. Quinete, R. Renslow, J.R. Sobus, E.M. Sussman, B. Warth, S. Wickramasekara, A.J. Williams, An Introduction to the Benchmarking and Publications for Non-Targeted Analysis Working Group, Anal. Chem. 93 (2021) 16289–16296.
10. J. Hollender, E.L. Schymanski, L. Ahrens, N. Alygizakis, F. Béen, L. Bijlsma, A.M. Brunner, A. Celma, A. Fildier, Q. Fu, P. Gago-Ferrero, R. Gil-Solsona, P. Haglund, M. Hansen, S. Kaserzon, A. Kruve, M. Lamoree, C. Margoum, J. Meijer, S. Merel, C. Rauert, P.

Rostkowski, S. Samanipour, B. Schulze, T. Schulze, R.R. Singh, J. Slobodnik, T. Steininger-Mairinger, N.S. Thomaidis, A. Togola, K. Vorkamp, E. Vulliet, L. Zhu, M. Krauss, NORMAN guidance on suspect and non-target screening in environmental monitoring, Environmental Sciences Europe. 35 (2023) 75.

11. Z. Wang, G.W. Walker, D.C.G. Muir, K. Nagatani-Yoshida, Toward a Global Understanding of Chemical Pollution: A First Comprehensive Analysis of National and Regional Chemical Inventories, Environ. Sci. Technol. 54 (2020) 2575–2584.

12. R. Fuller, P.J. Landrigan, K. Balakrishnan, G. Bathan, S. Bose-O'Reilly, M. Brauer, J. Caravanos, T. Chiles, A. Cohen, L. Corra, M. Cropper, G. Ferraro, J. Hanna, D. Hanrahan, H. Hu, D. Hunter, G. Janata, R. Kupka, B. Lanphear, M. Lichtveld, K. Martin, A. Mustapha, E. Sanchez-Triana, K. Sandilya, L. Schaefli, J. Shaw, J. Seddon, W. Suk, M.M. Téllez-Rojo, C. Yan, Pollution and health: a progress update, The Lancet Planetary Health. 6 (2022) e535–e547.

13. Production and consumption of chemicals up in 2021 - Products Eurostat News - Eurostat, https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/DDN-20221216-3 , viimati alla laetud 11.26.2023

14. D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, Principles of Instrumental Analysis, Cengage Learning, 2017, pp 253, 259, 512, 524, 696-697, 701, 720, 746-747, 757

15. E. Lundanes, L. Reubsaet, T. Greibrokk, Chromatography: Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods, John Wiley & Sons, Singapur, 2013, pp 17, 168

16. D.C. Harris, Quantitative Chemical Analysis, 9th edition, W. H. Freeman, New York, 2015, 571-572, 579-581, 668, 671

17. A.M. Tsedilin, A.N. Fakhrutdinov, D.B. Eremin, S.S. Zalesskiy, A.O. Chizhov, N.G. Kolotyrkina, V.P. Ananikov, How sensitive and accurate are routine NMR and MS measurements?, Mendeleev Communications. 25 (2015) 454–456.

18. R. Gunawan, A.B.D. Nandiyanto, How to Read and Interpret 1H-NMR and 13C-NMR Spectrums, Indonesian Journal of Science and Technology. 6 (2021) 267–298.

19. W.R. Dolbier, Guide to Fluorine NMR for Organic Chemists, 1st edition, Wiley, Hoboken, N.J, 2009, p 5

20. B.C.T. Mitchell, B. Costisella, NMR - From Spectra to Structures: An Experimental Approach, 1st edition, Springer, Berlin Heidelberg, 2003, p 62

21. S.K. Bharti, R. Roy, Quantitative 1H NMR spectroscopy, TrAC Trends in Analytical Chemistry. 35 (2012) 5–26.

22. P. Soininen, Quantitative 1H NMR Spectroscopy - Chemical and Biological Applications, https://erepo.uef.fi/bitstream/handle/123456789/8989/urn_isbn_978-951-27-1093-5.pdf?sequence=1&isAllowed=y, viimati alla laetud 19.05.2024

23. Y. Liu, Z. Liu, H. Yang, L. He, Direct Comparison of 19F qNMR and 1H qNMR by Characterizing Atorvastatin Calcium Content, J Anal Methods Chem. 2016 (2016) 7627823.

24. A. Aubin, R. Cleary, Analytical HPLC to Preparative HPLC: Scale-Up Techniques using a Natural Product Extract, (2009).

25. H. Schulenberg-Schell, A. Tei, F. Rieck, R. Guilliet, Principles and Practical Aspects of Preparative Liquid Chromatography, (2019), pp 10,11,14,36,37,38.

26. J. Liigand, R. de Vries, F. Cuyckens, Optimization of flow splitting and make-up flow conditions in liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, Rapid Communications in Mass Spectrometry. 33 (2019) 314–322.

27. Flow Splitters - Adjustable Flow Splitters - ASI, https://www.hplc-asi.com/adjustable-flow-splitters/, viimati alla laetud 19.05.2024

28. Z. Latif, S.D. Sarker, Isolation of natural products by preparative high performance liquid chromatography (prep-HPLC), Methods Mol Biol. 864 (2012) 255–274.

29. H. Liu, X. Yang, S. Wu, M. Zhang, S. Parkin, S. Cao, T. Li, F. Yu, S. Long, An investigation of the polymorphism of a potent nonsteroidal anti-inflammatory drug flunixin, CrystEngComm. 22 (2020) 448–457.

30. I. Abeysna, R. Darrington, Understanding Concentration and Evaporation Technology: Part 1: Basic Principles of Commonly Used Evaporation Techniques, (2013).

31. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, Practical HPLC Method Development, Wiley, 1997, pp 120-121, 127

32. L.M. Harwood, C.J. Moody, J.M. Percy, Experimental Organic Chemistry: Standard and Microscale, 2nd edition, Wiley-Blackwell, Malden, MA, 1998, pp 47-48

33. Products, Types of Solvent Evaporators – An Overview, BioChromato, Types of Solvent Evaporators – An Overview, (2018) https://biochromato.com/types-of-solvent-evaporators-an-overview/, viimati alla laetud 20.05.2024

34. QuickSplit Series 600 Adjustable Flow Splitter and Make-Up Flow Splitter, https://peekescientific.com/wp-content/uploads/2017/10/AdjFlowSplitter_LowSplitMethods.pdf , viimati alla laetud 19.05.2024

35. M. Yarhosseini, S. Javanshir, Z. Dolatkhah, M.G. Dekamin, An improved solvent-free synthesis of flunixin and 2-(arylamino) nicotinic acid derivatives using boric acid as catalyst, Chem. Central Journal. 11 (2017) 124.
36. S. Soni, S. Koley, M.S. Singh, Dithioester-enabled chemodivergent synthesis of acids, amides and isothiazoles via CC bond cleavage and CO/CN/CS bond formations under metal- and catalyst-free conditions, Tetrahedron Letters. 58 (2017) 2512–2516.

7. Lisad

Lisa 1. Kolonni külge ühendatud QuickSplit Series 600 koos kahe väljuva haruga

Lisa 2. Standardlahusest kogutud, SPE-ga kontsentreeritud fluniksiini ^{1}H-NMR-spekter, milles kasutati solvendi signaale mahasuruvaid parameetreid

Lisa 3. SPE-ga kontsentreeritud fluniksiini lahuse ^{19}F-NMR spekterLisa 3. SPE-ga kontsentreeritud fluniksiini lahuse ^{19}F-NMR spekter

Lisa 4. Uuesti kontsentreeritud (N_2+SPE+N_2 meetodiga) kolonnist kogutud fluniksiini standardlahuse ^{1}H-NMR-spekter

Lisa 5. UV-Vis kromatogramm eluendi koostisega 80% MeOH ja 20% 0,1%line FA, jaoturi režiimil 0,5 mm, süsti ruumala 20 µl, kogumisaeg 5,0–6,0 min.

Lisa 6. ^{1}H-qNMR spekter esimesest segust kogumisest, rotaatoraurustiga kuivatatud, esimene lahustamine MeOH-s

Lisa 7. ^{19}F-qNMR spekter esimesest segust kogumisest, rotaatoraurustiga kuivatatud, esimene lahustamine MeOH-s

Lisa 8. ^{1}H-qNMR spekter esimesest segust kogumisest, rotaatoraurustiga kuivatatud, teine lahustamine MeOH-s

Lisa 9. ^{19}F-qNMR spekter esimesest segust kogumisest, rotaatoraurustiga kuivatatud, teine lahustamine MeOH-s

Lisa 10. ^{1}H-qNMR spekter teisest segust kogumisest, rotaatoraurustiga kuivatatud

Lisa 11. ^{19}F-qNMR spekter teisest segust kogumisest, rotaatoraurustiga kuivatatud

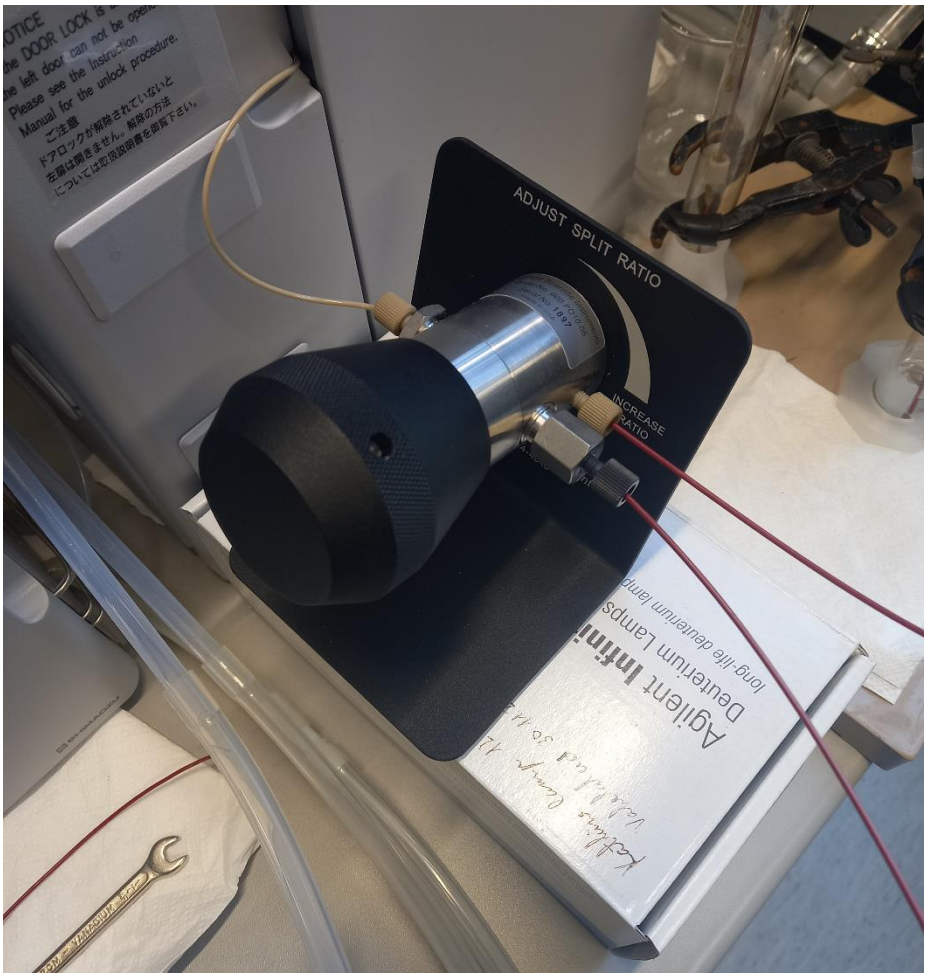
Lisa 12. ^{1}H-qNMR spekter, N_2 +SPE + N_2 meetodi kontroll

Lisa 13. ^{19}F-qNMR spekter, N_2 + SPE + N_2 meetodi kontroll

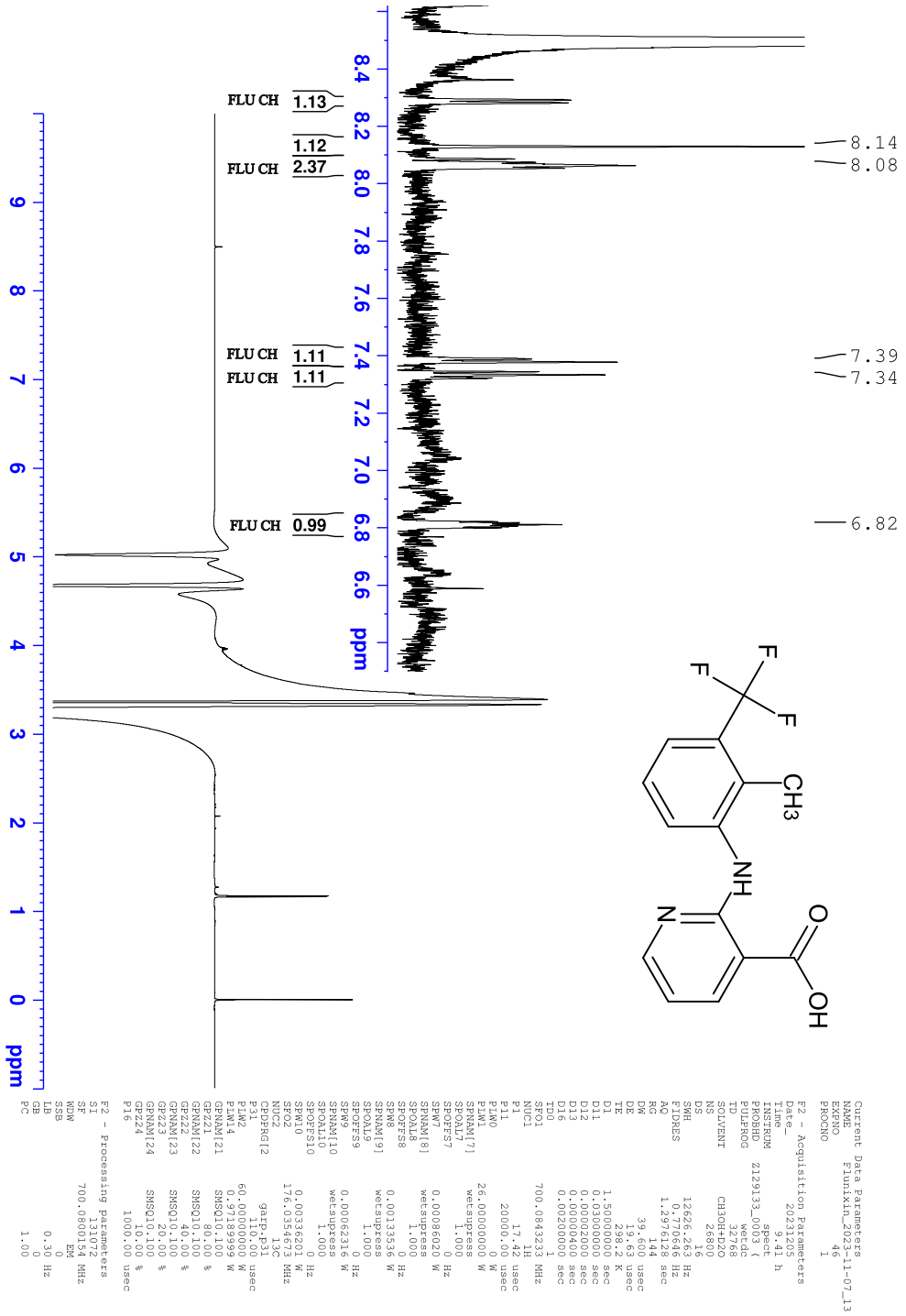
Lisa 14. ^{1}H-NMR spekter, fluniksiini lahus MeOH-s

Lisa 15. ^{1}H-NMR spekter, fluniksiini ja 3-TFMA lahus MeOH-s

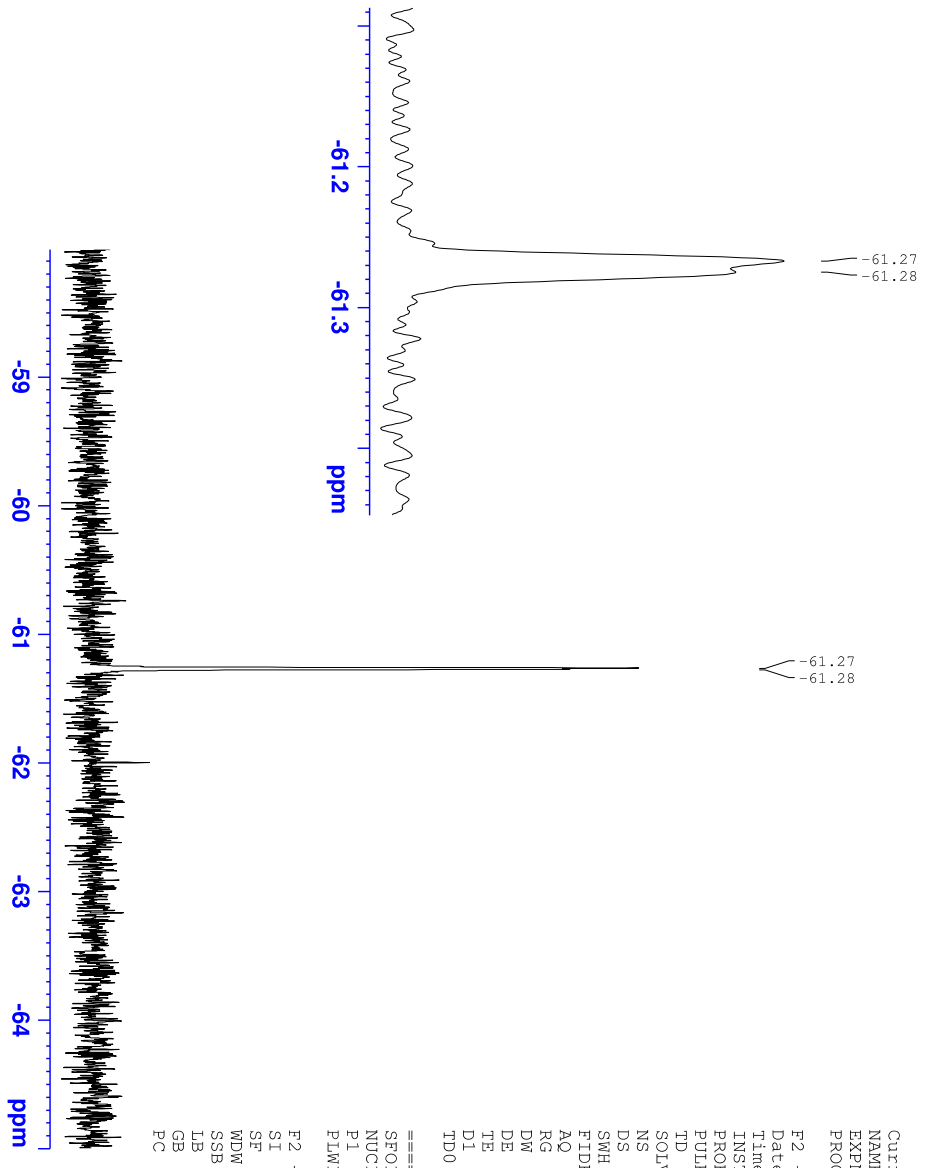
Lisa 1. Kolonni külge ühendatud QuickSplit Series 600 koos kahe väljuva haruga



Lisa 2. Standardlahusest kogutud, SPE-ga kontsentreeritud fluniksiini ^{1}H-NMR-spekter, milles kasutati solvendi signaale mahasuruvaid parameetreid

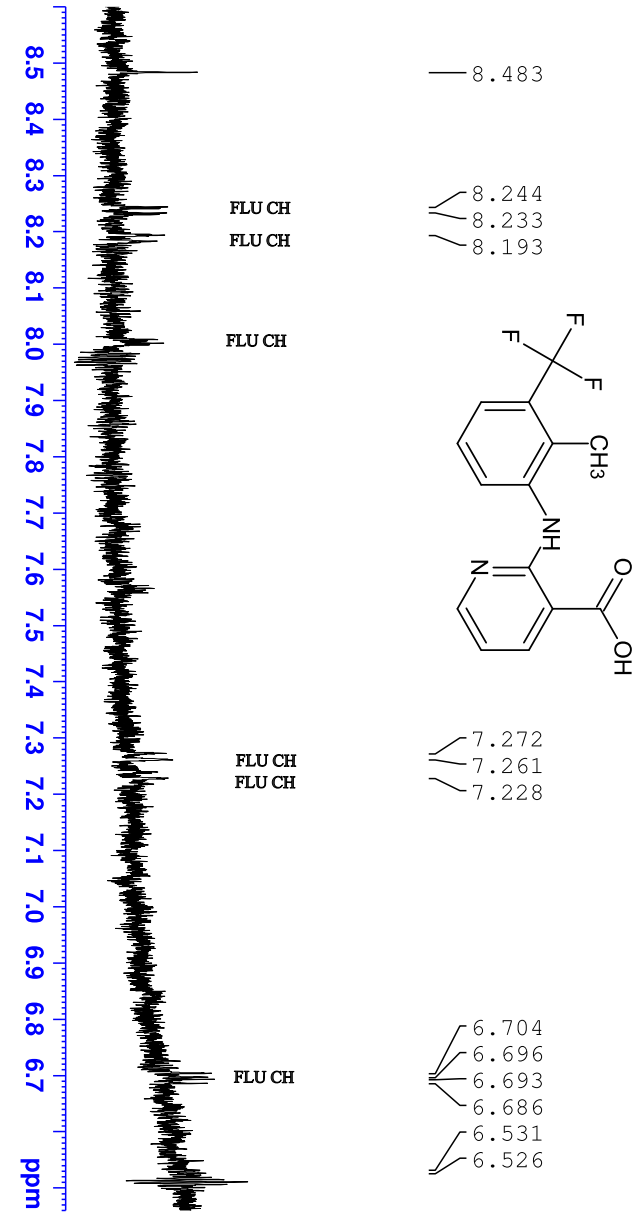


Lisa 3. SPE-ga kontsentreeritud fluniksiini lahuse ^{19}F-NMR spekter



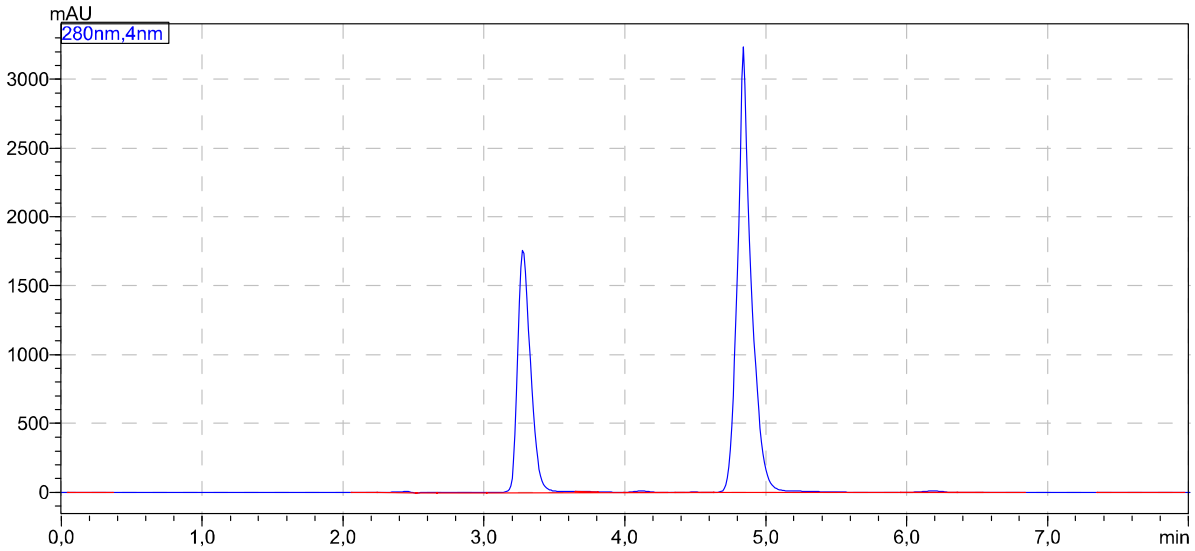

```
Current Data Parameters
NAME      Flunixin_2023-11-07_13
EXPNO                          9
PROCNO                         1

F2 - Acquisition Parameters
Date_                   20231107
Time                       22.32
INSTRUM                    spect
PROBHD     5 mm PABBO BB-
PULPROG                   zg30
TD                        3950
SOLVENT    D2O-capillary
NS                       120862
DS                            4
SWH                    9881.423 Hz
FIDRES                 2.501626 Hz
AQ                     0.1998700 sec
RG                           36
DW                        50.600 usec
DE                         6.50 usec
TE                       298.1 K
D1                     0.10000000 sec
TD0                           1

========== CHANNEL f1 ========
SFO1                 658.6925105 MHz
NUC1                         19F
P1                        15.00 usec
PLW1                  20.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI                        32768
SF                   658.7333520 MHz
WDW                          EM
SSB                           0
LB                         0.10 Hz
GB                            0
PC                         1.00
```

Lisa 4. Uuesti kontsentreeritud (N_2+SPE+N_2 meetodiga) kolonnist kogutud fluniksiini standardlahuse ^{1}H-NMR-spekter

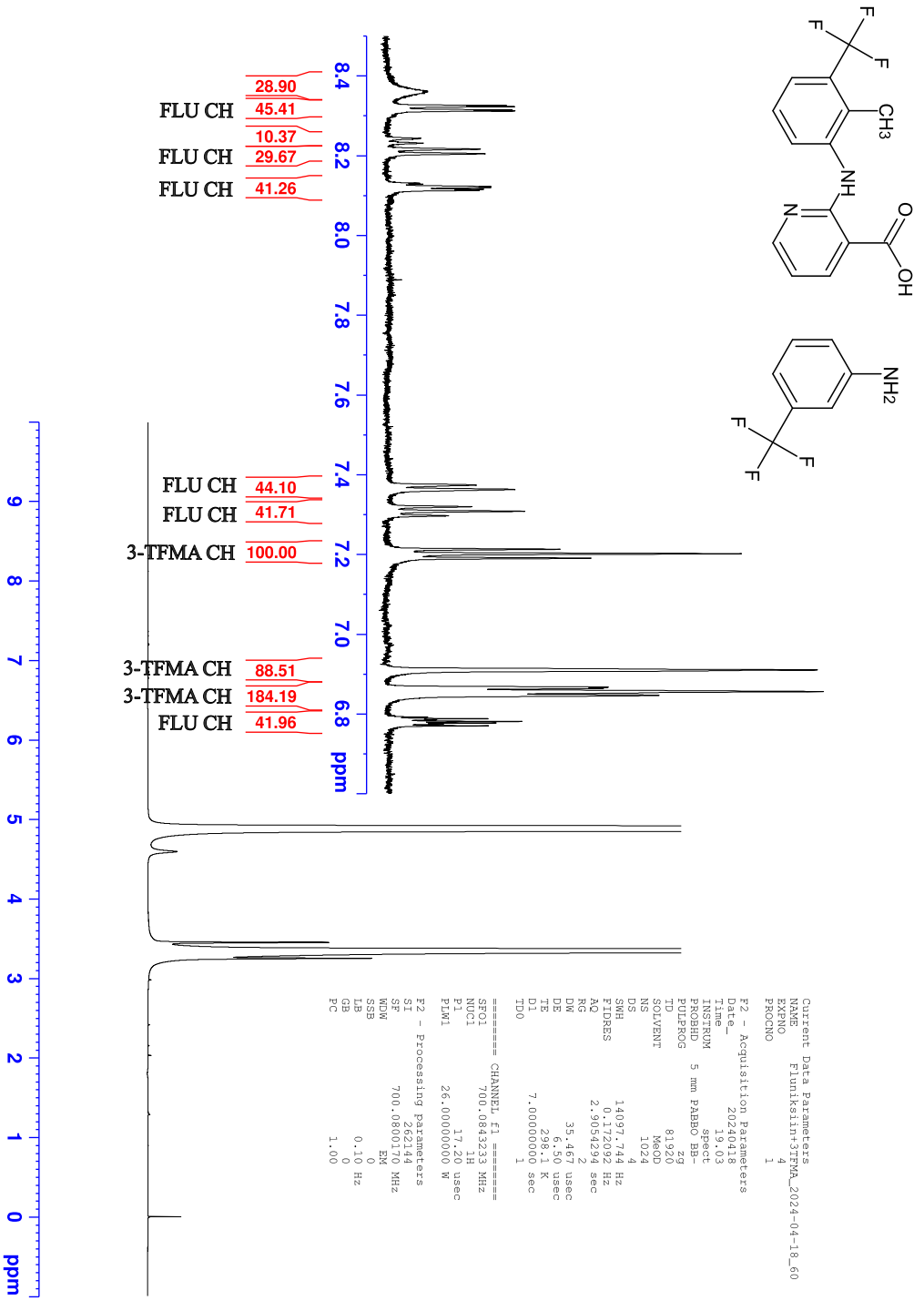



```
Current Data Parameters
NAME                   Fluniksiin_2024-04-03_13
EXPNO                           2
PROCNO                          1

F2 - Acquisition Parameters
Date_                 20240403
Time                      10.21
INSTRUM                   spect
PROBHD     5 mm PABBO BB-
PULPROG                 zg30
TD                      81920
SOLVENT                 None
NS                        320
DS                          4
SWH                 14097.744 Hz
FIDRES                0.172092 Hz
AQ                    2.9054294 sec
RG                          2.8
DW                     35.467 usec
DE                      6.50 usec
TE                     298.1 K
D1                     3.00000000 sec
TD0                         1

======== CHANNEL f1 ========
SFO1                700.0843233 MHz
NUC1                        1H
P1                     17.20 usec
PLW1                26.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI                         131072
SF                  700.0805507 MHz
WDW                            EM
SSB                             0
LB                           0.10 Hz
GB                              0
PC                           1.00
```

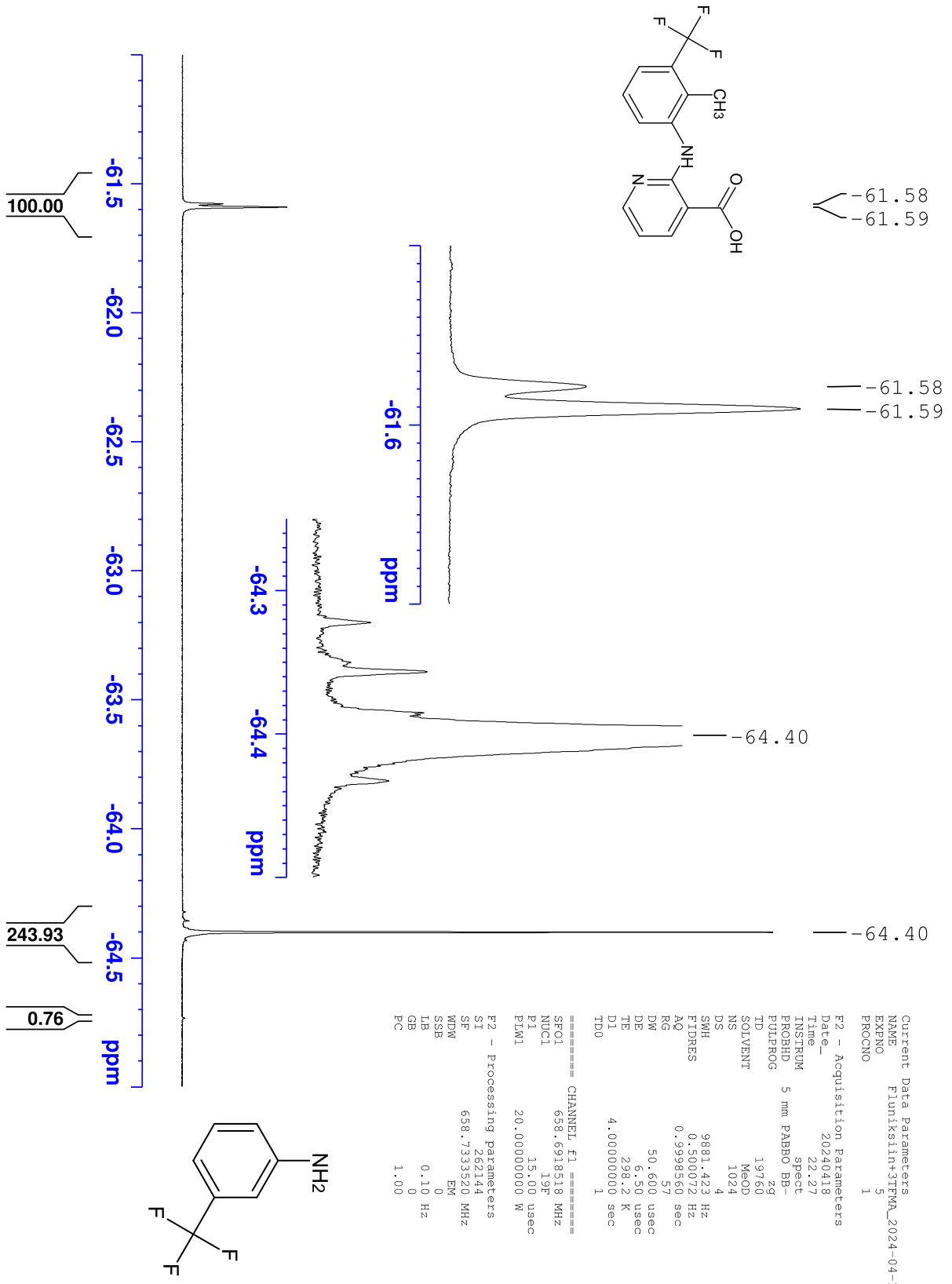
Lisa 5. UV-Vis kromatogramm eluendi koostisega 80% MeOH ja 20% 0,1%line FA, jaoturi režiimil 0,5 mm, süsti ruumala 20 µl, kogumisaeg 5,0–6,0 min.



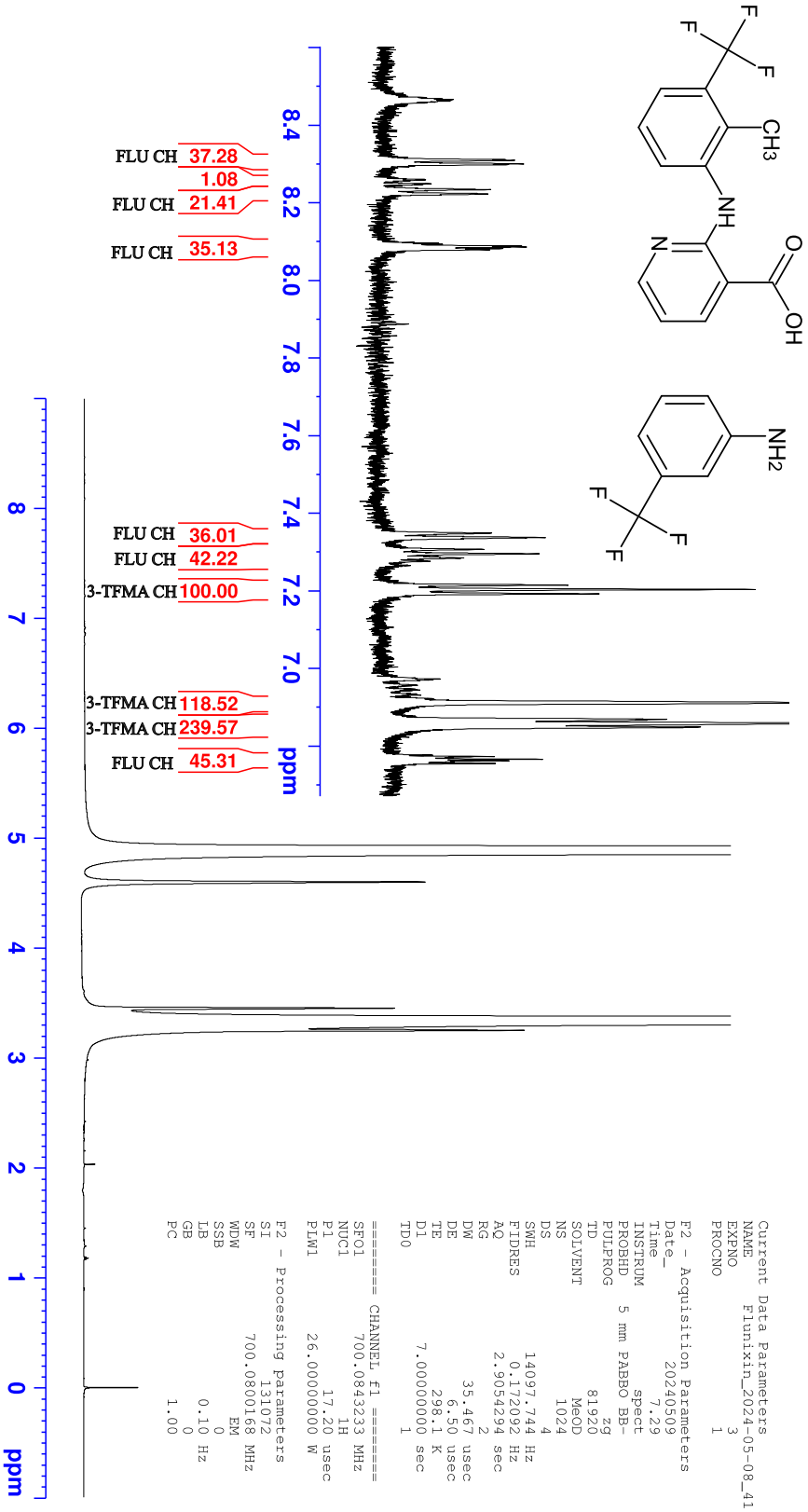
Lisa 6. [1]H-qNMR spekter esimesest segust kogumisest, rotaatoraurustiga kuivatatud, esimene lahustamine MeOH-s



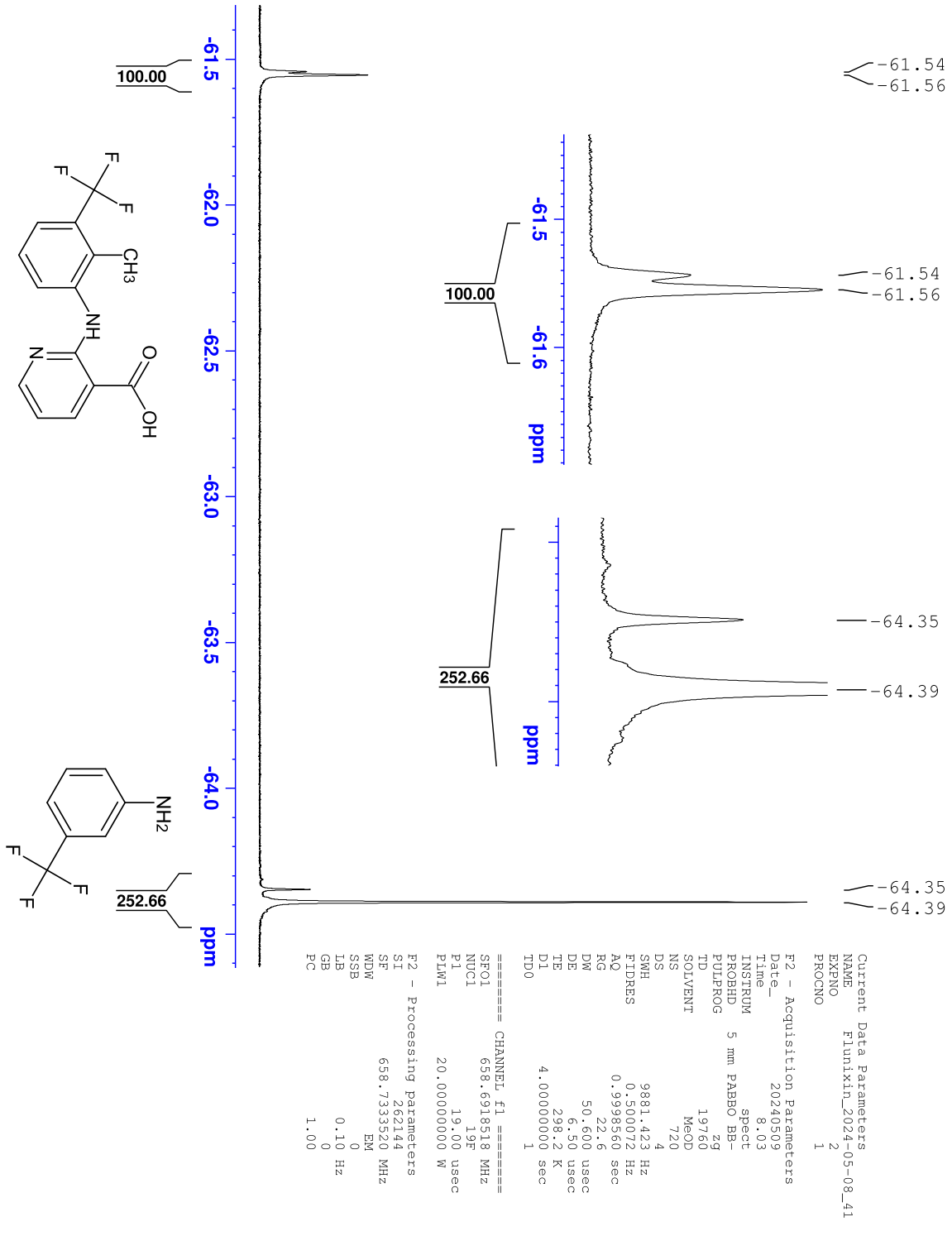
Lisa 7. ^{19}F-qNMR spekter esimesest segust kogumisest, rotaatoraurustiga kuivatatud, esimene lahustamine MeOH-s



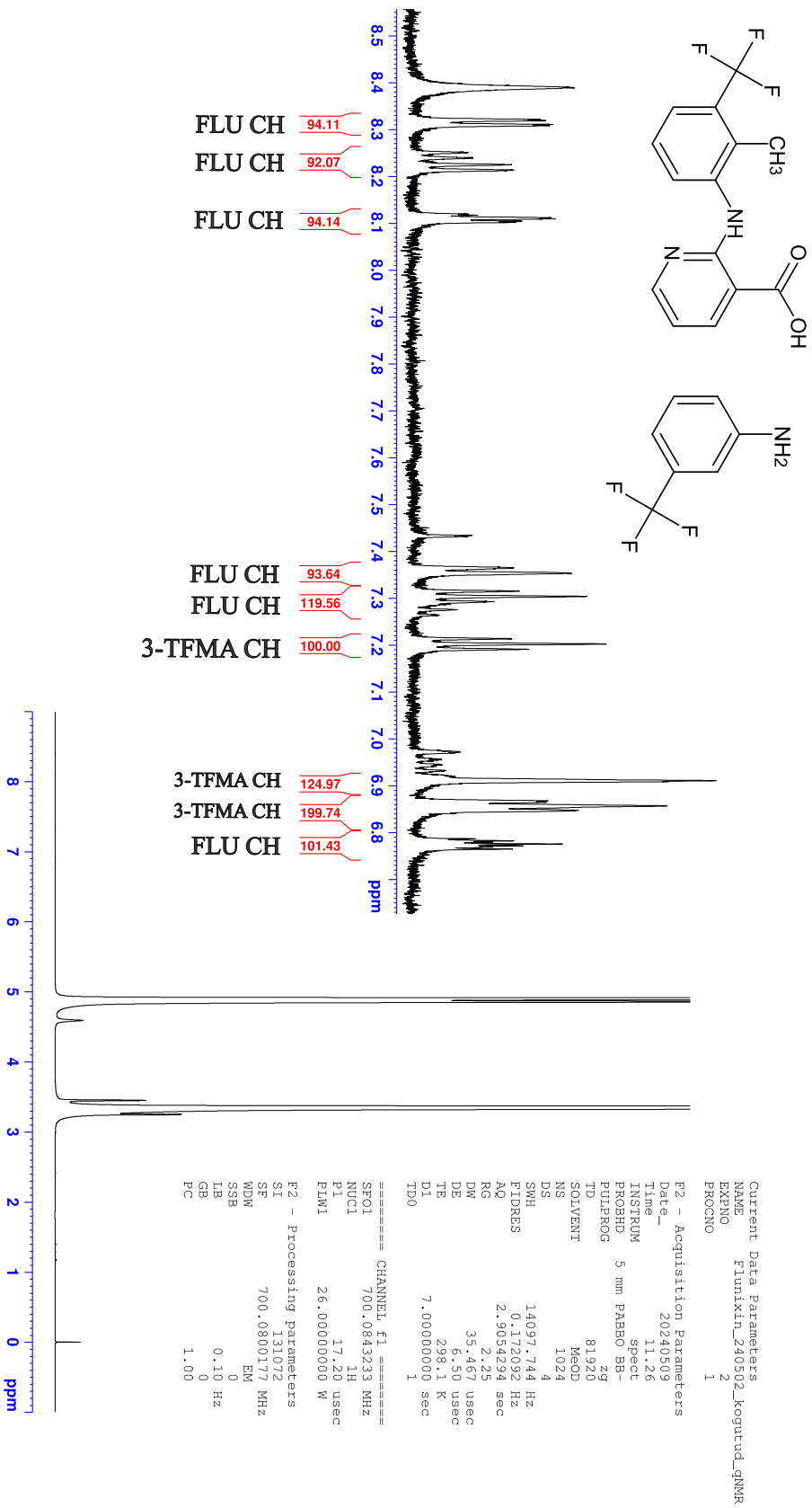
Lisa 8. ^{1}H-qNMR spekter esimesest segust kogumisest, rotaatoraurustiga kuivatatud, teine lahustamine MeOH-s



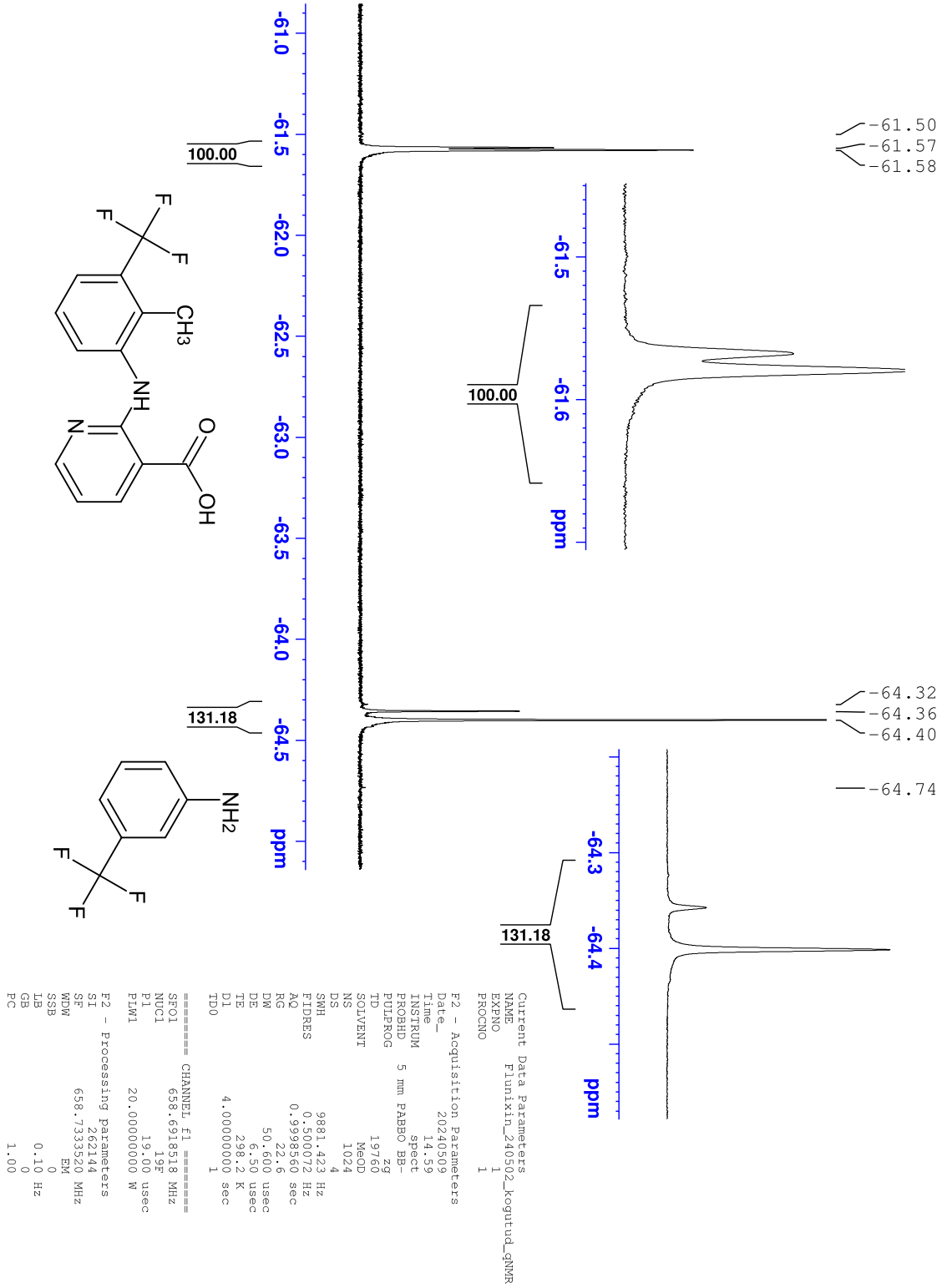
Lisa 9. ^{19}F-qNMR spekter esimesest segust kogumisest, rotaatoraurustiga kuivatatud, teine lahustamine MeOH-s



Lisa 10. ^{1}H-qNMR spekter teisest segust kogumisest, rotaatoraurustiga kuivatatud



Lisa 11. ^{19}F-qNMR spekter teisest segust kogumisest, rotaatoraurustiga kuivatatud



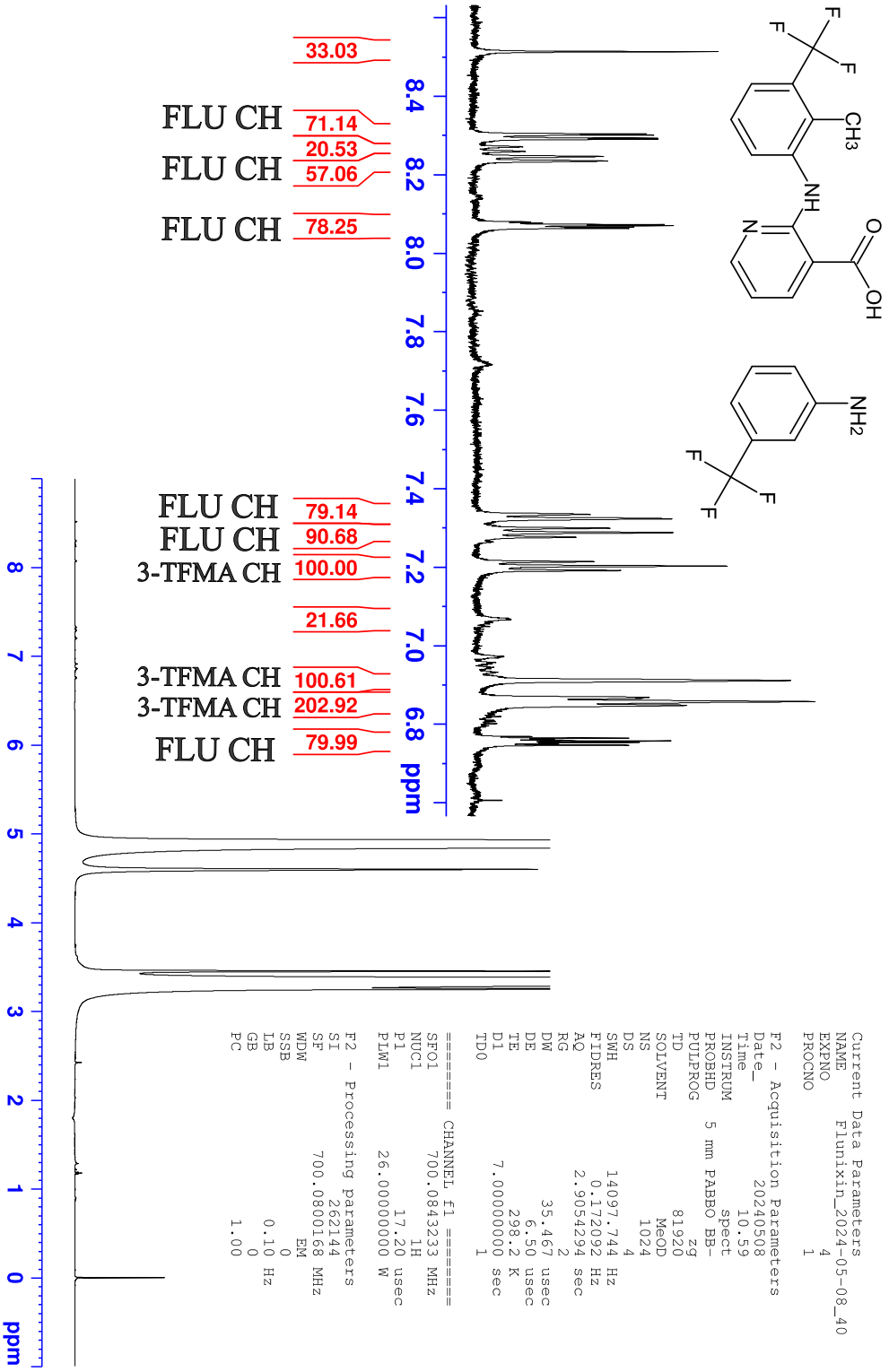
Current Data Parameters
NAME Flunixin_240502_kogutud_qNMR
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20240509
Time 14.59
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG zg
TD 19760
SOLVENT MeOD
NS 1024
DS 4
SWH 9881.423 Hz
FIDRES 0.500072 Hz
AQ 0.998560 sec
RG 22.6
DW 50.600 usec
DE 6.50 usec
TE 298.2 K
D1 4.00000000 sec
TD0 1

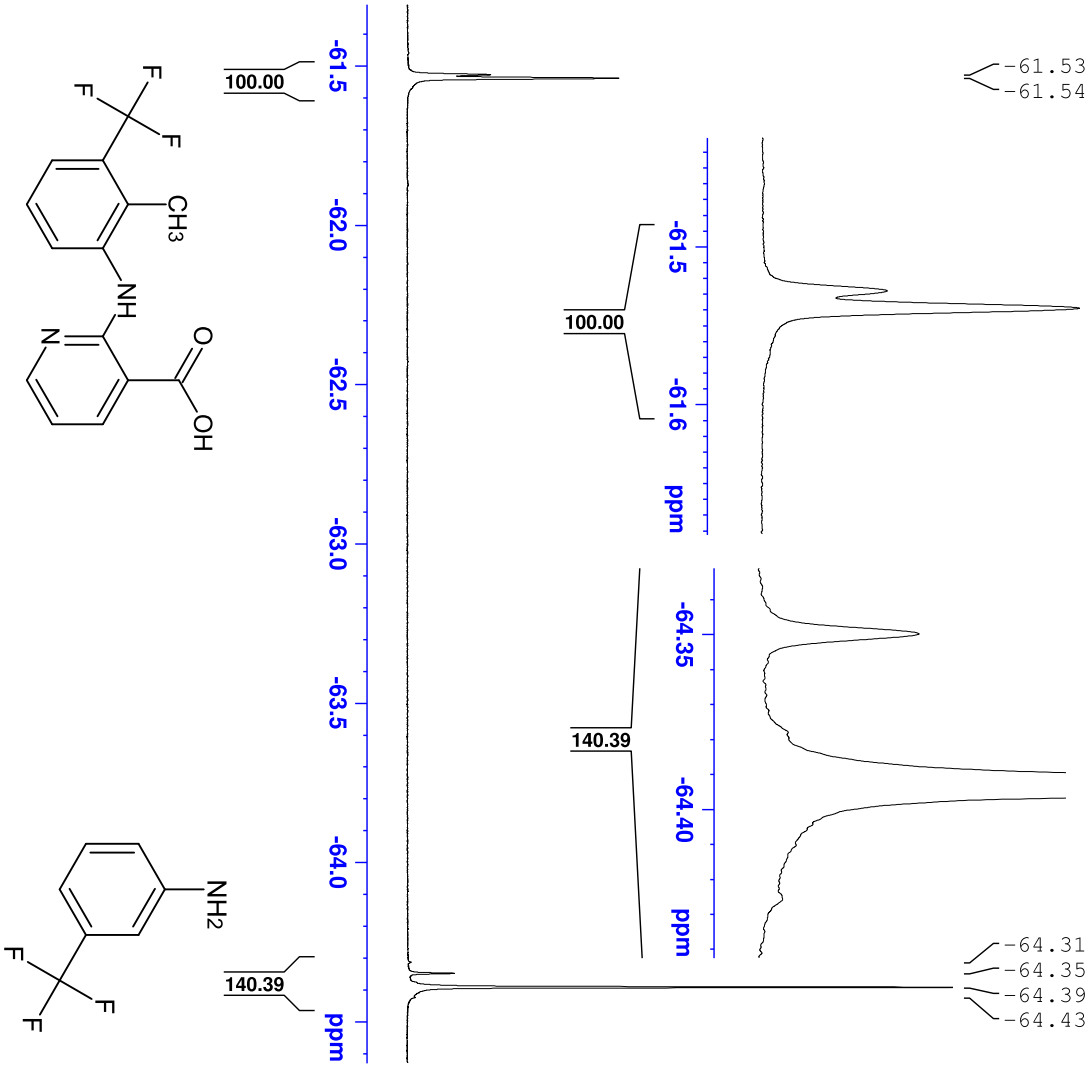
========== CHANNEL f1 ==========
SFO1 658.6918518 MHz
NUC1 19F
P1 19.00 usec
PLW1 20.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI 262144
SF 658.7333520 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.10 Hz
GB 0
PC 1.00

Lisa 12. ^{1}H-qNMR spekter, N_2 +SPE + N_2 meetodi kontroll

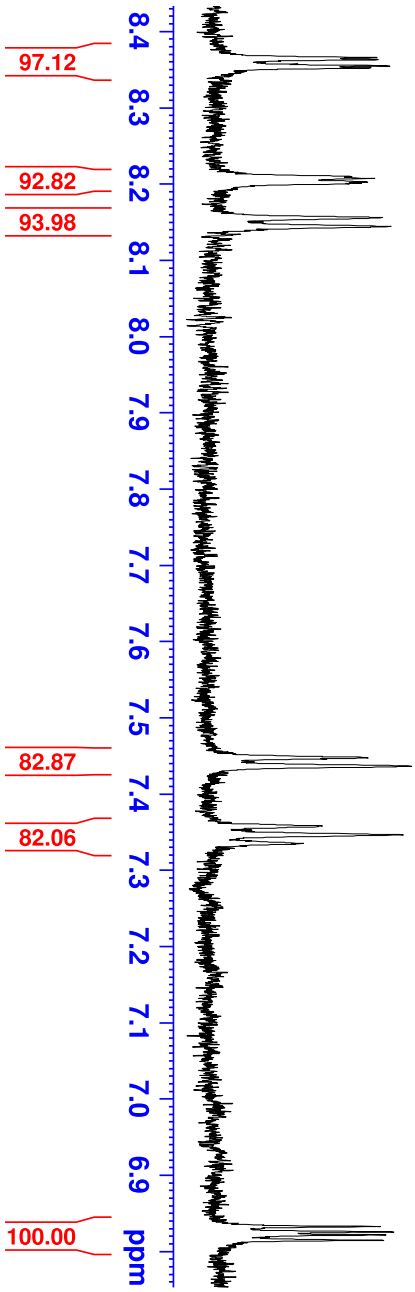


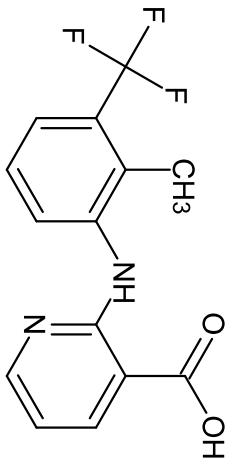
Lisa 13. ^{19}F-qNMR spekter, N_2 + SPE + N_2 meetodi kontroll




```
Current Data Parameters
NAME                  Flunixin_2024-05-08_40
EXPNO                                      3
PROCNO                                     1

F2 - Acquisition Parameters
Date_                              20240508
Time                                  14.45
INSTRUM                                spect
PROBHD                  5 mm PABBO BB-
PULPROG                                 zg
TD                                   19760
SOLVENT                               MeOD
NS                                    1024
DS                                       4
SWH                             9881.423 Hz
FIDRES                             0.500072 Hz
AQ                              0.9998560 sec
RG                                    22.6
DW                                50.600 usec
DE                                 6.50 usec
TE                                298.1 K
D1                           4.00000000 sec
TD0                                      1

======== CHANNEL f1 ========
SFO1                        658.6918518 MHz
NUC1                                   19F
P1                               19.00 usec
PLW1                     20.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI                                   262144
SF                          658.7333520 MHz
WDW                                    EM
SSB                                     0
LB                                   0.10 Hz
GB                                      0
PC                                   1.00
```

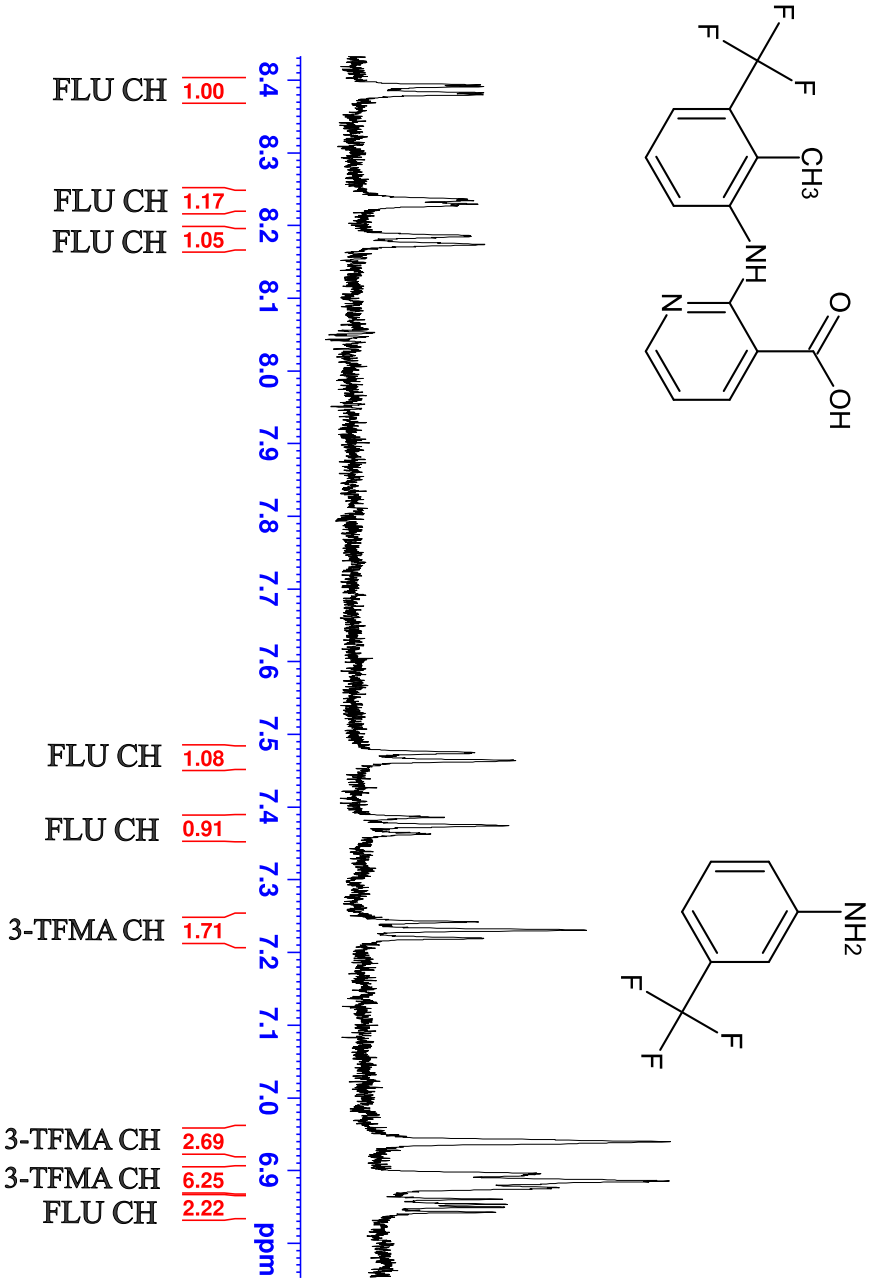
Lisa 14. [1]H-NMR spekter, fluniksiini lahus MeOH-s






```
Current Data Parameters
NAME                  Flunixin_2024-05-09_28
EXPNO                                      2
PROCNO                                     1

F2 - Acquisition Parameters
Date_                                20240509
Time                                   10.22
INSTRUM                                spect
PROBHD                5 mm PABBO BB-
PULPROG                                zg30
TD                                    56388
SOLVENT                                None
NS                                      128
DS                                        4
SWH                               14097.744 Hz
FIDRES                                0.250013 Hz
AQ                                1.9998944 sec
RG                                        2.8
DW                                   35.467 usec
DE                                    6.50 usec
TE                                   298.1 K
D1                                2.00000000 sec
TD0                                        1

======== CHANNEL f1 ========
SFO1                            700.0843233 MHz
NUC1                                       1H
P1                                    17.20 usec
PLW1                          26.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI                                       131072
SF                              700.0800000 MHz
WDW                                        EM
SSB                                         0
LB                                       0.10 Hz
GB                                          0
PC                                       1.00
```

Lisa 15. [1]H-NMR spekter, fluniksiini ja 3-TFMA lahus MeOH-s




```
Current Data Parameters
NAME          Fluniixin_2024-05-09_28
EXPNO                 11
PROCNO                 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_           20240509
Time              10.50
INSTRUM             spect
PROBHD   5 mm PABBO BB-
PULPROG             zg30
TD                 56388
SOLVENT             MeOD
NS                   128
DS                     4
SWH            14097.744 Hz
FIDRES             0.250013 Hz
AQ             1.9998944 sec
RG                   2.8
DW                35.467 usec
DE                 6.50 usec
TE                298.2 K
D1             2.00000000 sec
TD0                    1

======== CHANNEL f1 ========
SFO1          700.0843233 MHz
NUC1                     1H
P1                   17.20 usec
PLW1          26.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI                   131072
SF            700.0800000 MHz
WDW                      EM
SSB                       0
LB                     0.10 Hz
GB                        0
PC                     1.00
```

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Liina Tõnso,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Poolpreparatiivse LC-MS metoodika arendamine fluoroühendite kvantitatiivseks ^{19}F-NMR analüüsiks,

mille juhendajad on Koit Herodes ja Lauri Toom,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Liina Tõnso
28.05.2024