



TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

POLYAROMAATTISTEN HIILIVETYJEN MÄÄRITYS VEDESTÄ KIINTEÄFAASIUUTOLLA JA KOLMOISKVADRUPOLI- MASSASPEKTROMETRILLA

Menetelmän kehitys ja testaus

Emma Pajunen

Opinnäytetyö
Huhtikuu 2016
Laboratorioalan koulutusohjelma



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma

PAJUNEN, EMMA:

Polyaromaattisten hiilivetyjen määrittäminen vedestä kiinteäfaasiuutolla ja kolmoiskvadrupolimassaspektrometrilla
Menetelmän kehitys ja testaus

Opinnäytetyö 54 sivua, joista liitteitä 5 sivua
Huhtikuu 2016

Polyaromaattiset hiilivedyt (PAH) ovat kahdesta tai useammasta aromaattisesta hiilivetyrenkaasta koostuvia orgaanisia yhdisteitä, joista monilla on todettu tai epäillään olevan karsinogeenisia ja mutageenisia vaikutuksia. PAH-yhdisteitä esiintyy luonnostaan öljy- ja hiilivarastoissa, mutta yleensä niitä syntyy ja vapautuu ympäristöön orgaanisten yhdisteiden epätäydellisissä palamisreaktioissa. Ne kontaminoivat tehokkaasti maaperää ja vesistöjä ja ovat haitallisia vesieläimille. EU:n vesipuitteidirektiivi ja Suomen lainsäädäntö asettavat PAH-yhdisteille tarkkailu- ja seurantavelvoitteita sekä luonnon- että talousvesistä.

Tämä opinnäytetyö tehtiin Nab Labs Oy:n Jyväskylän ympäristöanalytiikan toimipisteen orgaanisen analytiikan osastolle. Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää laboratoriossa kolmoiskvadrupolimassaspektrometrille (QQQ-GC/MS) uusi analyysimenetelmä PAH-yhdisteiden määrittämiseen vesinäytteistä kiinteäfaasiuutolla (SPE). Tavoitteena oli saavuttaa yhdisteille alhaiset määritysrajat ja yksinkertaistaa sekä nopeuttaa näytteenkäsittelyä. Työn tarkoituksena oli perustaa analyysimenetelmä, testata sen toimivuutta käytännössä ja kartoittaa keskeisiä validointiparametreja.

Opinnäytetyön aikana kehitettiin menetelmä 16 PAH-yhdisteen määrittämiseen vesinäytteistä kiinteäfaasiuuttopylväillä ja QQQ-GC/MS-laitteella standardia SFS-EN 16691 mukailleen. Menetelmää käyttämällä osallistuttiin kansainväliseen vertailukokeeseen PAH-yhdisteiden määrittämiseksi luonnonvesinäytteistä.

SPE-menetelmää verrattiin laboratorion sisäiseen heksaaniuuttomenetelmään saantokokeilla ja menetelmillä saatiin hyvin yhteneviä tuloksia. SPE-menetelmän määritysrajoja ja lineaarisuutta pienillä pitoisuuksilla kartoitettiin mittaamalla tunnettuja PAH-pitoisuuksia sisältäviä vesinäytteitä. Menetelmä oli lineaarinen tutkitulla pitoisuusalueella ja sen avulla havaittiin erittäin pieniä pitoisuuksia. Menetelmä vaatii kuitenkin uutta kalibrointia kevyillä PAH-yhdisteillä, jotta määritysrajat saadaan määritettyä luotettavasti.

Asiasanat: polyaromaattiset hiilivedyt, kiinteäfaasiuutto, kolmoiskvadrupolimassaspektrometri, vesianalyysi

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Sciences

PAJUNEN, EMMA:

Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Samples Using Solid Phase Extraction Combined with Triple Quadrupole Gas Chromatography Mass Spectrometry

Method Development and Testing

Bachelor's thesis 54 pages, appendices 5 pages

April 2016

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are organic compounds that consists of two or more fused aromatic hydrocarbon rings. Many of them have been proved to have or are suspected of having carcinogenic and mutagenic effects. PAHs occur naturally in oil and coal deposits but are usually produced and released into the environment as a result of incomplete combustion of organic compounds. They contaminate soil and water effectively and are toxic to aquatic organisms. The EU water framework directive and Finnish legislation both set obligations for monitoring their presence in natural freshwater resources and drinking water.

This thesis was written in Jyväskylä for the organic analytics department of Nab Labs Oy. The objective of the thesis was to develop a new analysis method for the determination of PAHs in water samples using solid phase extraction (SPE) combined with triple quadrupole gas chromatography mass spectrometry (QQQ-GC/MS) in order to combine low limits of quantification with simple and fast sample processing. The purpose of the study was to set up and test the analysis method and determine certain specified validation parameters.

A method was developed for the determination of 16 PAHs in water samples using SPE-tubes and QQQ-GC/MS detection modified from the standard SFS-EN 16691. The method was used to take part in an international proficiency test for detecting PAHs in surface waters with suspended solids.

The SPE method was compared to an internal hexane extraction method with recovery tests and the results from the two methods were very consistent with each other. The limits of quantification and linearity at small concentrations were studied using water samples spiked with known quantities of a certified PAH standard. The linearity of the method was excellent at the studied levels of concentration and the method was capable of detecting very small amounts of PAHs. However the method requires recalibration for some of the compounds studied here before the limits of quantification can be reliably determined.

Key words: polycyclic aromatic hydrocarbons, solid phase extraction, triple quadrupole mass spectrometer, water analysis

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	POLYAROMAATTISET HIILIVEDYT.....	7
	2.1 Kemialliset ominaisuudet ja toksisuus.....	7
	2.2 Polyaromaattisten hiilivetyjen lähteet.....	9
	2.3 Lainsäädäntö	10
3	KIINTEÄFAASIUUTTO.....	12
	3.1 Kiinteäfaasiuuttomenetelmän periaate ja edut.....	12
	3.2 Kiinteäfaasiuuttoon vaikuttavat tekijät	12
	3.3 Kiinteäfaasiuuton vaiheet	14
	3.4 Polyaromaattisten hiilivetyjen kiinteäfaasiuutto.....	15
4	KAASUKROMATOGRAFI- KOLMOISKVADRUPOLIMASSASPEKTROMETRI.....	16
	4.1 Kaasukromatografia.....	16
	4.2 Kolmoiskvadrupolimassaspektrometri	16
	4.3 Menetelmän kalibrointi ja responsivakiot	18
5	MENETELMÄN VALIDOINTIPARAMETRIT	20
	5.1 Validointi	20
	5.2 Keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta	20
	5.3 Saanto.....	21
	5.4 Lineaarisuus	21
	5.5 Toteamisraja ja määrittäysraja	22
	5.6 Vertailukokeet.....	22
6	MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....	24
	6.1 Analysoitavat PAH-yhdisteet ja reagenssit.....	24
	6.2 Kiinteäfaasiuutto	25
	6.3 Heksaaniuutto	27
	6.4 Laitteisto ja mittausmenetelmä	27
	6.5 Laitteen kalibrointi ja responsivakiot	29
	6.6 Saantokokeet	29
	6.7 Lineaarisuus pienillä pitoisuuksilla ja määrittäysrajan kartoitus.....	30
	6.8 Vertailukoenäytteet	31
7	TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU	33
	7.1 Menetelmän kalibrointi ja responsivakioiden määrittäys.....	33
	7.2 Saantokokeet	34
	7.3 Lineaarisuus pienillä pitoisuuksilla.....	36
	7.4 Määrittäysrajan kartoitus	40

7.5 Vertailukoetulokset	42
8 POHDINTA.....	44
LÄHTEET.....	48
LIITTEET	50
Liite 1. PAH-standardiliuokset.....	50
Liite 2. SPE-menetelmän kalibroinnin mittaustulokset.....	51
Liite 3. SPE-menetelmän kalibroinnin responsilaskenta	52
Liite 4. Saantokokeiden mittaustulokset	53
Liite 5. Määritysrajan kartoittamisen mittaustulokset	54

1 JOHDANTO

Polyaromaattiset hiilivedyt eli PAH-yhdisteet ovat kahdesta tai useammasta bentseenin kaltaisesta renkaasta koostuvia poolittomia orgaanisia yhdisteitä. Niitä esiintyy luonnostaan öljy- ja hiilivarastoissa. Niitä syntyy ja vapautuu ympäristöön epätäydellisen palamisen seurauksena muun muassa teollisuudessa, liikenteessä ja öljyntuotannon yhteydessä. Polyaromaattisten hiilivetyjen pitoisuuksia tutkitaan verkosto- ja luonnonvesinäytteistä, sillä useita PAH-yhdisteitä on todettu tai epäillään karsinogeenisiksi ja mutageenisiksi. Euroopan parlamentin ja neuvoston vesipuitteidirektiivissä on määritelty eräät PAH-yhdisteet erityisen haitallisiksi prioriteettiaineiksi, joiden pitoisuuksia tulee tarkkailla luonnonvesissä. Mittauslaitteiden ja analyysimenetelmien kehittyessä saavutetaan yhdisteille yhä alhaisempia määrittämissä, jolloin myös lainsäädännön kriteerit kiristyvät.

Opinnäytetyön tavoitteena on kehittää ja ottaa käyttöön kolmoiskvadrupolimassaspektrometrille uusi alhaisen määrittämissärajän menetelmä PAH-yhdisteiden määrittämiseen vesinäytteistä kiinteäfaasiuuttolla. Kolmoiskvadrupolimassaspektrometrilla saadaan mitattavan signaalin tausta alhaisemmaksi, jolloin päästään mittaamaan luotettavasti pienempiä pitoisuuksia. Kiinteäfaasiuuttomenetelmän etuna perinteiseen neste-nesteuuttoon verrattuna on nopeampi ja vähemmän työläs näytteenkäsittely, sekä mahdollisesti alhaisemmat saavutettavat määrittämissärajät.

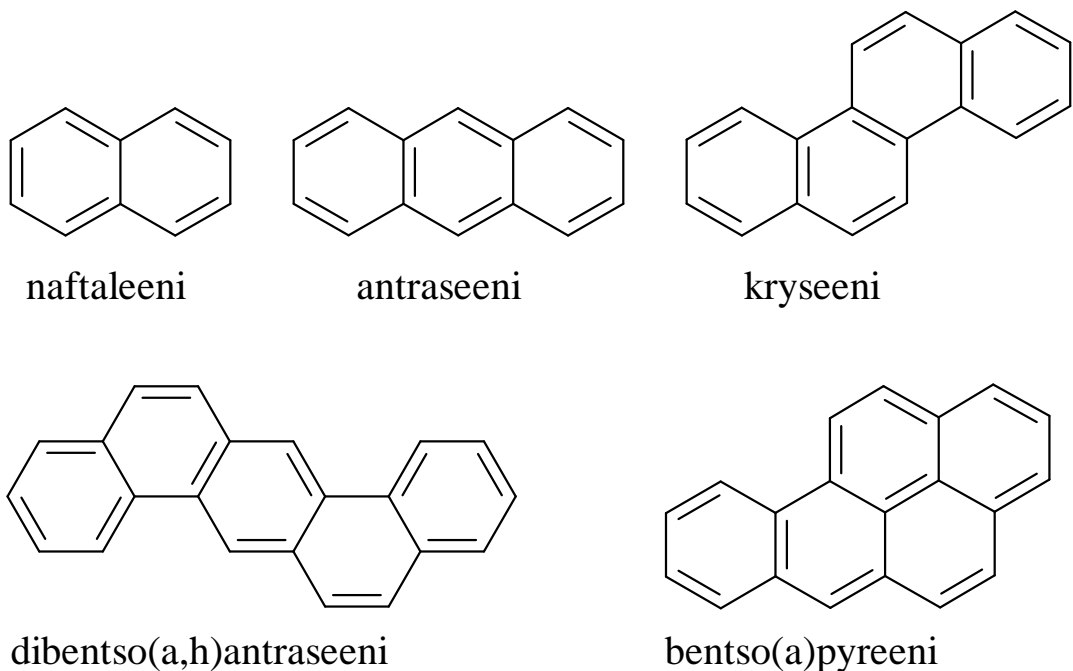
Työn tarkoituksena on uuden analyysimenetelmän perustaminen ja sen testaus käytännössä. Työssä verrataan kehitettävän kiinteäfaasiuuttomenetelmän tehokkuutta laboratorion sisäiseen neste-nesteuuttomenetelmään ja kartoitetaan alustavasti keskeisiä validointiparametreja. Menetelmän luotettavuutta testataan osallistumalla vertailukokeeseen. Mikäli uusi menetelmä todetaan käyttökelpoiseksi, se voidaan validoida laajemmin ja mahdollisesti akkreditoida, sekä ottaa käyttöön laboratorioissa.

Opinnäytetyö tehtiin Nab Labs Oy:n Jyväskylän ympäristöanalytiikan toimipisteen orgaanisen analytiikan osastolle. Opinnäytetyön ohjaajana toimi orgaanisen analytiikan vastuhenkilö ympäristötieteiden maisteri Pirjo Nurmela.

2 POLYAROMAATTISET HIILIVEDYT

2.1 Kemialliset ominaisuudet ja toksisuus

Hiilivedyt jaetaan rakenteen mukaan kahteen pääryhmään: alifaattisiin ja aromaattisiin. Aromaattiset hiilivedyt eroavat alifaattisista siten, että ne sisältävät bentseenin kaltaisia, tasomaisia kuuden hiilen renkaita, joiden piisidosten elektronit ovat delokalisoituneet koko renkaan ylle. Polyaromaattiset hiilivedyt (engl. *polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAH) sisältävät useita aromaattisia renkaita. (Walker 2009, 181; McMurry 2011, 155.) Kuvioon 1 on koottu esimerkkejä polyaromaattisista hiilivedyistä. Yksinkertaisin niistä on naftaleeni, joka koostuu kahdesta aromaattisesta renkaasta. PAH-yhdisteitä tutkitaan, sillä monilla niistä joko epäillään tai on osoitettu olevan karsinogeenisiä ja mutageenisia ominaisuuksia. Erityisen genotoksiset PAH-yhdisteet sisältävät yleensä 3–7 aromaattista rengasta. Näistä yhdisteistä bentso(a)pyreeni on tutkituin ja syöpävaarallisin (kuvio 1). (Walker 2009, 181–183.)



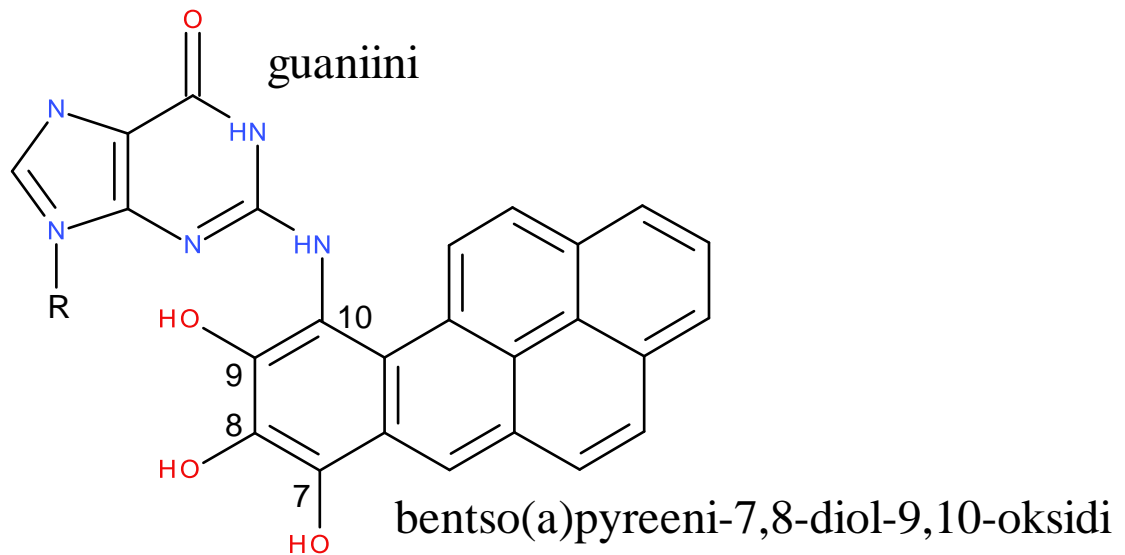
KUVIO 1. Esimerkkejä polyaromaattisista hiilivedyistä: naftaleeni, antraseeni, kryseeni, dibentso(a,h)antraseeni ja bentso(a)pyreeni

Koska PAH-yhdisteet koostuvat toisiinsa liittyneistä renkaista, ne ovat rakenteeltaan ta-somaisia ja melko jäykkiä. Ne ovat poolittomia ja lipofiilisiä eli rasvahakuisia yhdisteitä, jotka liukenevat huonosti veteen. PAH-yhdisteiden lipofiilisuus kasvaa molekyyli-massan kasvaessa. Myös PAH-yhdisteiden höyrynpaine riippuu molekyyli-massasta. Valtaosa PAH-yhdisteistä on heikosti haihtuvia, mutta kevyin naftaleeni on melko helposti haihtuva (engl. *semi-volatile*). (Walker 2009, 183.) Tämä tarkoittaa, että PAH-yhdisteitä ana-lysoitaessa on noudatettava erityistä varovaisuutta, jottei naftaleeni pääse haihtumaan näytteestä.

PAH-yhdisteissä ei ole funktionaalisia ryhmiä, joten ne eivät ole kemiallisesti erityisen reaktiivisia. Se tekee niistä melko pysyviä saastuttajia ympäristössä. Ne voivat kuitenkin hapettua joko biokemiallisesti tai foto-oksidaatiolla ilman ja valon vaikutuksesta. (Wal-ker 2009, 183.) PAH-yhdisteiden toksisuus sekä eläimille että ihmisille johtuu juuri siitä, että oksidaation seurauksena PAH-yhdisteet muuttuvat poolisiksi ja reaktiivisiksi. Foto-oksidaation seurauksena PAH-yhdisteet voivat muuntua esimerkiksi kinoneiksi (engl. *quinones*) tai endoperoksideiksi (engl. *endoperoxides*). Nämä hapettumistuotteet ovat erityisen toksisia kaloille. (Walker 2009, 183, 189, 191.)

PAH-yhdisteiden toksisuus ihmisille johtuu niiden metaboliittien mutageenisista ja kar-sinogeenisistä ominaisuuksista. Erityisen tutkittu PAH-yhdiste on karsinogeeniseksi luo-kiteltu bentso(a)pyreeni. Bentso(a)pyreeni hapettuu ensin 7,8-oksidiksi, jonka epoksidi-hydrolaasi muuttaa 7,8-*trans*-dioliksi. Tämä toimii substraattina sytokromi P4501A1-ent-syymille, joka hapettaa sen erittäin mutageeniseksi bentso(a)-pyreeni-7,8,-diol-9,10-ok-sidiksi. Bentso(a)pyreeni myös indusoi sytokromi P4501A1 -entsyymiä ja näin ollen kiih-dyttää omaa metaboliaansa. (Walker 2009, 184.)

Bentso(a)-pyreeni-7,8,-diol-9,10-oksidi kulkeutuu solussa tumaan ja sitoutuu DNA:n guaniinin vapaaseen aminoryhmään (kuvio 2). DNA:n korjausmekanismit poistavat mo-net sitoutuneista PAH-metaboliiteista nopeasti, mutta sidokset ja niiden genotoksiset vai-kutukset saattavat kestää monia viikkoja. (Walker 2009, 187–188.) Erilaisten steeristen esteiden ja DNA:n korjausmekanismien johdosta tietyt kohdat DNA:ssa ovat myös herk-kiä pysyvien sidosten muodostumiselle (Purchase 1994, 20).



KUVIO 2. Bentso(a)pyreeni-7,8,-diol-9,10-oksidin sitoutuminen DNA:n guaniiniin (Walker 2009, 188, muokattu)

2.2 Polyaromaattisten hiilivetyjen lähteet

Polyaromaattisia hiilivetyjä esiintyy luonnostaan öljy- ja hiilivarastoissa. Pääosin niitä syntyy orgaanisten yhdisteiden epätäydellisen palamisen seurauksena teollisuudessa ja muun ihmisten toiminnan seurauksena. Maailmanlaajuisesti tärkeimpiä PAH-yhdisteiden lähteitä ovat hiilen, raakaöljyn ja maakaasun polttaminen teollisuudessa tai kotitalouksissa, sekä näiden materiaalien käyttö teollisissa prosesseissa. Suuria määriä PAH-yhdisteitä vapautuu myös öljyntuotannon ja öljyonnettomuuksien yhteydessä. Luonnossa metsäpalot ja tulivuorenpurkaukset ovat paikallisesti merkittäviä, mutta ennalta arvaamattomia PAH-yhdisteiden lähteitä. Yleisesti ottaen PAH-yhdisteet vapautuvat ympäristöön useiden eri PAH-yhdisteiden monimutkaisina seoksina, eikä yksittäisinä yhdisteinä. (Walker 2009, 181–183.)

Teollisuudessa PAH-yhdisteet vapautuvat pääosin ilmakehään savukaasujen seassa monimutkaisina seoksina joko höyryn tai partikkelien mukana. Ilmakehässä PAH-yhdisteet adsorboituvat yleensä ilman partikkeleihin ja päätyvät niiden mukana pintavesiin sateiden tai diffuusion seurauksena. Vesistöön PAH-yhdisteitä päätyy myös paikallisten öljyonnettomuuksien tai öljyteollisuuden päästöjen seurauksena. Vesistöissä PAH-yhdisteillä

on taipumus adsorboitua orgaaniseen materiaaliin, joko sedimenttiin tai vesieliöihin. Vastaavasti maan pinnalle päätyvät PAH-yhdisteet adsorboituvat joko maaperän partikkeleihin tai eliöihin. (Walker 2009, 185–187.)

Suomalaisilla pääosa päivittäisestä PAH-yhdisteiden altistuksesta saadaan ruuan mukana (Valvira 2015, 17). Suomessa PAH-yhdisteiden saanti elintarvikkeista on huomattavasti suurempaa kuin muissa Euroopan maissa, minkä arvioidaan johtuvan savustetun ja grilattun ruuan suuresta kulutuksesta. Muita PAH-altistuksen lähteitä ovat tupakointi, liikenne ja työperäinen altistus, joka on pahimmillaan nuohoojilla ja teiden päällystystöitä tekevillä. (Evira 2009, 86, 89.) Ainoastaan noin 1 % päivittäisannoksesta tulee talousvedestä (Valvira 2015, 17).

2.3 Lainsäädäntö

PAH-yhdisteet ovat siis ihmisille karsinogeenisia ja mutageenisia ja toksisia vesieliöille, erityisesti kaloille (Walker 2009, 183–184). Niiden määriä valvotaan sekä talousvesissä että luonnonvesissä. PAH-yhdisteiden sallittuja enimmäismääriä talousvesissä säätelee sosiaali- ja terveysministeriön asetus 1352/2015 talousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista. Talousvesiasetuksessa määritelty enimmäispitoisuus PAH-yhdisteille on 0,10 µg/l. Pitoisuudella tarkoitetaan vertailuaineiksi valittujen yhdisteiden bentso(b)fluoranteenin, bentso(k)fluoranteenin, bentso(g,h,i)peryleenin ja indeno-(1,2,3-cd)pyreenin yhteismäärää. (Sosiaali- ja terveysministeriön asetus 1352/2015.) Vertailuaineet ovat isomolekyylisiä, karsinogeenisia PAH-yhdisteitä. Terveysriskin arvioinnissa PAH-yhdisteiden malliaineena pidetään bentso(a)pyreeniä, jonka enimmäisarvo talousvedessä on 0,01 µg/l. Pitoisuus 0,07 µg/l juomavedessä vastaa syöpäriskitasoa, jonka seurauksena esiintyy yksi ylimääräinen syöpätapaus sadantuhannen henkilön elinikäisessä altistumisessa. (Valvira 2015, 17.)

Euroopan Unionin yhteisellä lainsäädännöllä pyritään suojelemaan vesistöjä kemialliselta saastumiselta. Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2000/60/EY (2000) yhteisön vesipolitiikan puitteista määrittelee strategiat ja tarvittavat toimenpiteet sisämaan pinta-vesien, jokisuiden vaihdettumisalueiden sekä rannikko- ja pohjavesien suojelemiseksi. Direktiivissä määriteltiin prioriteettiaineet, joiden pitoisuuksia vesistöissä tulee seurata. Nämä prioriteettiaineet ja niiden ympäristölaatumormit määriteltiin tarkemmin Euroopan

parlamentin ja neuvoston direktiivissä 2008/105/EY (2008) ympäristölaatonormeista vesipolitiikan alalla ja päivitettiin direktiivissä 2013/39/EU (2013).

PAH-yhdisteiden osalta tarkkailtavaksi prioriteettiaineiksi määriteltiin antraseeni, fluoranteeni, naftaleeni, bentso(a)pyreeni, bentso(b)fluoranteeni, bentso(k)fluoranteeni, bentso(g,h,i)peryleeni ja indeno(1,2,3-cd)pyreeni (2008/105/EY 2008, 92–94). Näistä aineista kaikki paitsi naftaleeni ja fluoranteeni on vielä yksilöity vaarallisiksi prioriteettiaineiksi ja fluoranteeni on nimetty vaarallisempien polyaromaattisten hiilivetyjen osoittamiseksi (2008/105/EY 2008, 95–96). Luonnonvesille määritellyt sallitut enimmäispitoisuudet näillä PAH-yhdisteillä on koottu taulukkoon 1. Bentso(a)pyreeniä pidetään suurimolekyylisten, vaarallisten PAH-yhdisteiden indikaattorina, jolloin ainoastaan sen pitoisuuksia on tarpeen seurata vuosikeskiarvoa tarkkailtaessa. (2013/39/EU 2013, 14–17.)

TAULUKKO 1. PAH-yhdisteiden sallitut vuosikeskiarvot ja enimmäispitoisuudet pintavesissä (2013/39/EU 2013, 14–17)

Yhdiste	Vuosikeskiarvo µg/l	Sallittu enimmäispitoisuus µg/l
antraseeni	0,1	0,1
fluoranteeni	0,0063	0,12
naftaleeni	2	130
bentso(a)pyreeni	0,00017	0,27
bentso(b)fluoranteeni	–	0,17
bentso(k)fluoranteeni	–	0,17
bentso(g,h,i)peryleeni	–	0,00084
indeno(1,2,3-cd)pyreeni	–	ei sovelleta

Erilaisia tarkkailtavia luonnonvesityyppejä ovat pintavedet kuten joet, järvet ja valumavedet, pohjavedet, lähdevedet ja merivedet (2000/60/EY 2000, 6, 34–37). Tapauskohtaisesti PAH-yhdisteitä saatetaan määrittää myös erilaisista jätevesistä, kuten kaivosten poistovesistä, kaatopaikkojen suotovesistä ja teollisuuden jäte- tai prosessivesistä (Dean 2009, 13). Näillä näytetyypeillä on omat pitoisuusrajansa, jotka määritellään joko lainsäädännössä tai tapauskohtaisesti. Luonnonvesille ja talousvesille tarkoitettuja analyysimenetelmiä voi yleensä käyttää muokattuna myös muille vesinäytetyypeille (SFS-EN 16691, 5).

3 KIINTEÄFAASIUUTTO

3.1 Kiinteäfaasiuuttomenetelmän periaate ja edut

Kiinteäfaasiuutto eli SPE (engl. *solid phase extraction*) on paljon käytetty menetelmä näytteen puhdistamiseen sekä analyyttien eristämiseen ja rikastamiseen vesinäytteistä. Kiinteäfaasiuutossa nestemäinen näyte johdetaan kiinteän sorbentin läpi paineen tai vaakuumin avulla. Uuton aikana analyytit adsorboituvat selektiivisesti sorbenttiin, josta ne eluoidaan jatkokäsittelyä tai analyysiä varten. (Dean 2009, 49–50.)

Kiinteäfaasiuutolla katsotaan olevan monia etuja perinteiseen neste-nesteuuttoon verrattuna. Koska SPE on nopeampi tekniikka ja vaatii vähemmän näytekäsittelyä, sen käyttäminen lyhentää analyysiaikaa ja vähentää kuluja sekä työvoiman tarvetta. Kiinteäfaasiuutto on myös mahdollista automatisoida. SPE kuluttaa vähemmän liuottimia kuin perinteinen neste-nesteuutto. Näin ollen se pienentää liuottimien hankkimisesta ja liuotinjätteen hävittämisestä seuraavia kustannuksia, sekä vähentää työntekijöiden altistusta liuottimille ja emulsioiden muodostusta analyysin aikana. Kiinteäfaasiuutto voi parantaa uuttotehokkuutta ja antaa mahdollisuuden säilyttää analyyttejä sorbentissa. SPE:tä voidaan myös käyttää apuna analyyttien derivatisoinnissa. Koska SPE-uutto on monivaiheinen prosessi, se tarjoaa myös mahdollisuuden analyyttien selektiiviseen eristämiseen esimerkiksi fraktioimalla näyte eri analyytteihin tai analyyttiryhmiin. (Wells 2003, 79.)

3.2 Kiinteäfaasiuuttoon vaikuttavat tekijät

Uutta SPE-menetelmää suunniteltaessa tärkeimmät muuttujat ovat sorbentin tyyppi ja liuotinsysteemi. Valintaa suoritettaessa on otettava huomioon näytteen matriisi sekä tutkittavien yhdisteiden kemialliset ominaisuudet. (Dean 2009, 50.) Ideaalinen sorbenttimateriaali toimii siten, että tutkittavat yhdisteet kiinnittyvät siihen tehokkaasti ja toistettavasti, mutta ne pystytään myös eluoimaan pois kiinteästä faasista helposti ja täydellisesti. Prosessin täytyy siis olla reversiibeli. SPE-sorbentin tulee olla huokoista materiaalia, jossa on suuri pinta-ala sitoutumista varten. Siitä ei saa irrota epäpuhtauksia ja sen täytyy olla stabiili näytteen matriisiin ja käytettyjen liuottimien suhteen. (Wells 2003, 81.)

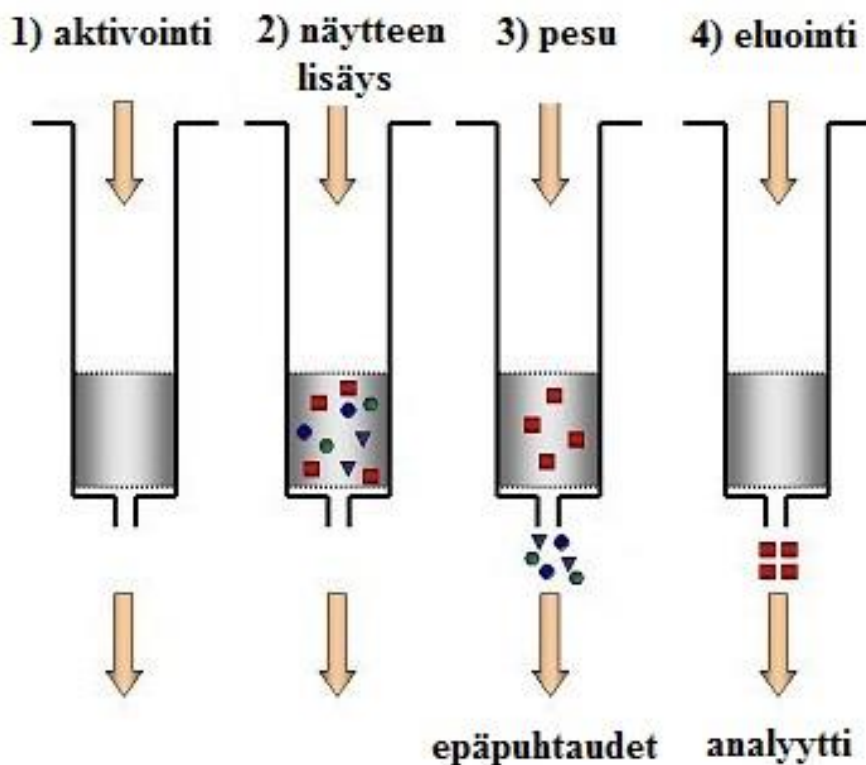
Yleisimmät SPE-sorbentit pohjautuvat silikapartikkeleihin ($(\text{SiO}_2)_x$), joihin on kemiallisesti sitoutettu funktionaalisia ryhmiä. Funktionaalisten ryhmien kemiallinen luonne määrää sorbenttien ominaisuudet ja käyttötarkoituksen. Tyypillisesti sorbentit jaetaan kolmeen luokkaan normaalifaasi-, käänteisfaasi- ja ioninvaihtosorbentteihin. Normaali-faasisorbenteissa on poolisia funktionaalisia ryhmiä kuten syano-, amino- tai dioliryhmiä, jotka sitovat muita poolisia yhdisteitä kuten fenoleita. Käänteisfaasisorbenttien poolittomat funktionaaliset ryhmät kuten C18 oktadekyyli-, C8 oktyyli- tai C1 metyyliiryhmät sitovat poolittomia yhdisteitä kuten polyaromaattisia hiilivetyjä. Ioninvaihtosorbenteissa funktionaaliset ryhmät ovat anionisia tai kationisia ryhmiä, jotka sitovat vastakkaisesti varautuneita yhdisteitä. (Wells 2003, 85–86; Dean 2009, 50.) Silikapohjaisten sorbenttien lisäksi on olemassa sorbentteja, jotka pohjautuvat florisiliin eli magnesiumsilikaattiin (MgSiO_3), aluminaan (Al_2O_3) ja polymeerihartseihin (XAD, PSDVB) (Wells 2003, 82, 84–85).

Sorbentin materiaalin lisäksi uuttoon vaikuttavat sorbentin määrä ja pakkaustapa. Sorbenttimateriaalin määrä voi vaihdella sovelluksesta ja käytetystä näytemäärästä riippuen 50 milligrammasta 10 grammaan. Perinteisesti SPE-sorbentit on pakattu lieriömäisiin, injektoruiskua muistuttaviin pylväisiin (engl. *tube*), lieriömäisiin kasetteihin (engl. *cartridge*) tai kiekkoihin (engl. *disc*). Pitkälle automatisoiduilla SPE-menetelmillä voidaan käyttää myös 96-kuoppalevyjä, jotka mahdollistavat lukuisten näytteiden tehokkaan, samanaikaisen käsittelyn. (Wells 2003, 108–111; Dean 2009, 53.) SPE-pylväät ovat monipuolisia ja helppoja käyttää sekä vakuumisysteemien kanssa että pienten näytemäärien tapauksessa ruiskun avulla. Kiekkojen etuna on, että iso pinta-ala mahdollistaa suurempien näytemäärien tehokkaan ja nopean virtauksen sorbentin läpi. Suuri virtausnopeus voi kuitenkin heikentää analyyttien vuorovaikutusta sorbentin kanssa ja huonontaa saantoa. (Dean 2009, 53–55, 252.)

Kiinteäfaasiuutossa käytetty liuotinsysteemi vaikuttaa sekä analyyttien retentioon sorbentissa että niiden eluointitehokkuuteen. Liuottimen valinta riippuu sorbenttimateriaalista ja analyytistä. Huomioon otettavia tekijöitä ovat liuottimen poolisuus ja pH. Esimerkiksi poolittomilla käänteisfaasisorbenteilla poolinen vesi on heikko liuotin ja pooliton heksaani on vahva liuotin. Ioninvaihtosorbenteilla taas liuottimen tehokkuuteen vaikuttavat erityisesti pH ja ionivahvuus. (Wells 2003, 104–105; Dean 2009, 58–59.)

3.3 Kiinteäfaasiuuton vaiheet

Käytännössä kiinteäfaasiuutto jaetaan neljään perusvaiheeseen: 1) sorbentin aktivointi, 2) näytteen lisäys, 3) sorbentin pesu ja 4) eluointi (kuvio 3). Aktivointivaiheen avulla varmistetaan, että sorbentti on valmis sitomaan tutkittavan yhdisteen toistettavalla tavalla. Käänteisfaasisorbenttien tapauksessa sorbentti kastellaan sopivalla orgaanisella liuottimella. Tällöin silikafaasin pintaan sitoutetut alkyyliketjut solvatoituvat, mikä saa ne levittymään auki ja maksimoimaan vuorovaikutuksen tutkittavien yhdisteiden kanssa. Sitteen sorbentti kastellaan näytteen matriisia muistuttavalla liuottimella tai puskurilla. Vesinäytteiden tapauksessa käytetään yleensä ionivaihdettua ja tislattua vettä. (Wells 2003, 108–109; Dean 2009, 57.)



KUVIO 3. Kiinteäfaasiuuton vaiheet (National Analytical Corporation 2016, muokattu)

Toisessa vaiheessa näyte pakotetaan sorbenttimateriaalin läpi paineen tai vakuumin avulla ja tutkittavat yhdisteet sitoutuvat sorbenttiin. Sorbenttiin saattaa sitoutua myös matriisiin sisältämiä, ei-toivottuja epäpuhtauksia. Kolmannessa vaiheessa nämä mahdolliset epäpuhtaudet pestään pois sorbentista käyttämällä liuotinta tai liuotinseosta, joka ei vaikuta tutkittaviin yhdisteisiin. Neljännessä vaiheessa tutkittavat yhdisteet eluoidaan pois sorbentista sopivalla liuottimella. Lopulliseen eluointiin käytetään mahdollisimman

pientä liuotinmäärää, jolla analyytti saadaan vapautumaan kvantitatiivisesti, jotta näyte saataisiin konsentroitua tehokkaasti. (Wells 2003, 108–109; Dean 2009, 57.)

Mikäli nestemäinen näyte sisältää paljon kiinteitä partikkeleita, ne saattavat tukkia huokoisen sorbenttimateriaalin kokonaan tai johtaa näytteen kulkemaan vain tiettyjä kanavia pitkin. Tämä heikentää uutotehokkuutta ja hidastaa analyysia. Tällöin saattaa olla tarpeen, että esimerkiksi maa-ainesta sisältävät vesinäytteet suodatetaan ennen SPE-uuttoa. Mikäli tutkittavat yhdisteet ovat taipuvaisia adsorboitumaan kiinteiden partikkeleiden pintaan, voi olla tarpeen uutaa sakka erikseen ja yhdistää uutokset ennen analyysiä. Tämän tarpeellisuus tulee arvioida ja testata tapauskohtaisesti. (Wells 2003, 80–81.)

3.4 Polyaromaattisten hiilivetyjen kiinteäfaasiuutto

Suomen standardoimisliiton standardi SFS-EN 16691 määrittelee menetelmän 7 PAH-yhdisteen määrittämiseksi kokonaisista vesinäytteistä. Kyseiset yhdisteet ovat antraseeni, fluoranteeni, bentso(a)pyreeni, bentso(b)fluoranteeni, bentso(k)fluoranteeni, bentso(g,h,i)peryleeni ja indeno(1,2,3-cd)pyreeni. Menetelmä sopii myös muiden PAH-yhdisteiden määrittämiseen, mikäli se validoidaan kaikille analysoitaville PAH-yhdisteille. (SFS-EN 16691 2015, 5.)

Standardin menetelmässä käytetään kiinteäfaasiuuttoa SPE-kiekoilla, jota seuraa kaasukromatografia-massaspektrometria. Menetelmä on tarkoitettu PAH-yhdisteiden määrittämiseen juomavedestä, pohjavedestä tai pintavesinäytteistä, jotka voivat sisältää suspensoituneita kiinteitä partikkeleita aina 500 mg/l asti. Menetelmä sopii modifioituna myös PAH-yhdisteiden määrittämiseen jätevesistä. (SFS-EN 16691 2015, 5.)

4 KAASUKROMATOGRAFI- KOLMOISKVADRUPOLIMASSASPEKTROMETRI

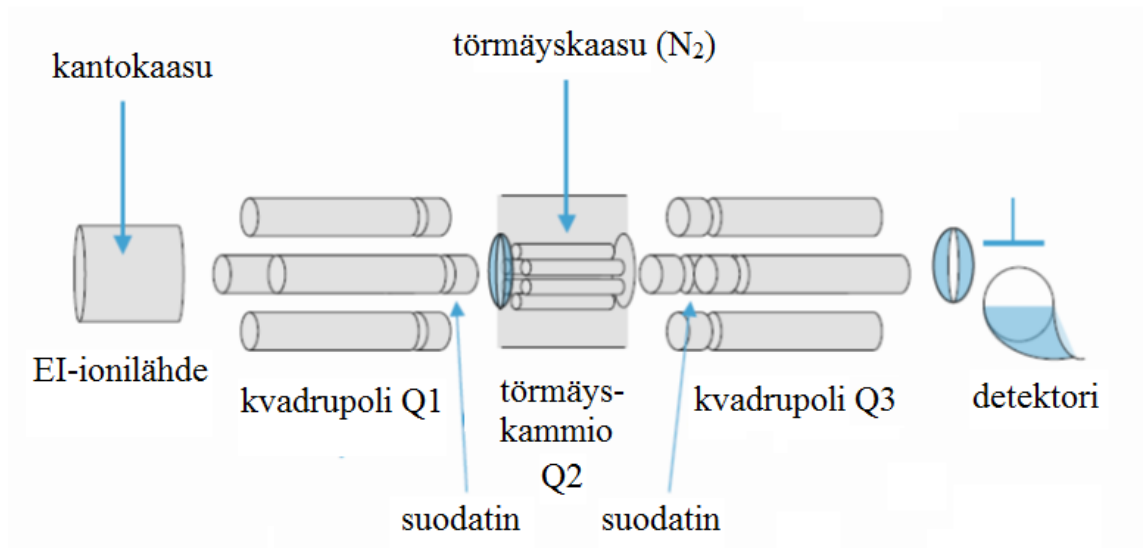
4.1 Kaasukromatografia

Kaasukromatografia (engl. *gas chromatography*, GC) on orgaanisen analytiikan perustekniikka, jolla tutkitaan erityisesti hajoamatta höyrystyviä orgaanisia yhdisteitä (Jaarinen & Niiranen 2008, 195). Kaasukromatografia sopii sekä kvalitatiiviseen että kvantitatiiviseen analytiikkaan. Kvantitatiivisessa analytiikassa sisäisten standardien (engl. *internal standard*, ISTD) käyttö on yleistä ja suositeltavaa virheiden minimoimiseksi. (Harris 2010, 580.)

Kaasukromatografiassa näyte injektoidaan ruiskulla septumin läpi kuumaan injektoriin. Injektorissa näyte höyrystyy ja kulkeutuu uunin sisällä sijaitsevaan kolonniin, jossa näytteen komponentit erottuvat toisistaan. Kaasumainen näyte kuljetetaan kolonnin läpi siten, että liikkuvana faasina toimii kantokaasuksi kutsuttu puhdas, inertti kaasu. Tyypillisesti kantokaasuna on helium, typpi tai vety. Kolonnit ovat pitkiä, kapeita silikakapillaareja, jotka on sisäpinnaltaan päällystetty ohuella stationäärifaasikerroksella. Stationäärifaasi on haihtumaton neste eli erottelumekanismina on jakaantumis- eli partitiokromatografia. (Harris 2010, 565–566, 574.) Yhdisteiden retentioaikaa voidaan säädellä muuttamalla uunin lämpötilaa ja kaasukromatografiassa käytetäänkin yleensä nousevaa lämpötilagradienttia hitaammin eluoituvien yhdisteiden erottumisen nopeuttamiseksi (Harris 2010, 573–574).

4.2 Kolmoiskvadrupolimassaspektrometri

Kaasukromatografi-kolmoiskvadrupolimassaspektrometrissa (QQQ-GC/MS) kromatografilla erotellut yhdisteet analysoidaan kolmoiskvadrupolimassaspektrometrilla. Kolmoiskvadrupolimassaspektrometri koostuu ionilähteestä, ioneja ohjaavasta optiikasta, kolmesta kvadrupolikennosta ja elektronimonistindetektorista (kuvio 4). Lisäksi massaspektrometriin kuulu pumppusysteemi, joka ylläpitää massaspektrometrin toiminnan vaatimaa tyhjiötä. (Agilent 2011, 21.)



KUVIO 4. Kolmoiskvadrupoli-massaspektrometri (Agilent Technologies 2011, muokattu)

Tutkittavat molekyylit ohjataan kolonnista kantokaasun mukana ionilähteelle. Elektronipommitukseen perustuvassa EI-ionisaattorissa (engl. *electron impact*) kuumalta filamentilta irtoaa elektroneja, jotka kiihdytetään korkeaan energiaan ionisaatiopotentiaalin avulla. Korkeaenergiset elektronit törmäävät molekyyleihin, jolloin ne ionisoituvat ja hajoavat kullekin yhdisteelle tyypillisiksi fragmenteiksi. Varaukselliset fragmentit kiihdytetään ja ohjataan magneettisen linssisysteemin avulla kvadrupoli-massa-analysaattoriin. (Harris 2010, 503–504; Agilent 2011, 39.)

Kvadrupoli erottelee ionit niiden massa-varaussuhteen m/z avulla. Kvadrupoli koostuu neljästä yhdensuuntaisesta sauvasta, joihin on yhdistetty sekä tasajännite että pareittain toisiinsa nähden kohtisuorassa oleva radiotaajuuksinen RF-jännite (engl. *radio frequency*). RF-jännitteen värähtely saa ionien lentoradan värähtelemään. Sitä säätelemällä voidaan varmistaa, että vain tietyn m/z -suhteen ionit läpäisevät kvadrupolin ja muut törmäävät sauvoihin. (Harris 2010, 513–514.) Tätä mittaustapaa kutsutaan SIM-moodiksi (engl. *selected ion monitoring*) (Harris 2010, 582).

Perinteisessä GC/MS-laitteessa on vain yksi kvadrupoli, jonka jälkeen ionit ohjataan detektorille. QQQ-GC/MS-laitteessa puolestaan on kolmoiskvadrupolisysteemi (kuvio 4), joka mahdollistaa herkemmän ja selektiivisemmän analytiikan ja madaltaa taustakohinaa. (Harris 2010, 524.) Kolmoiskvadrupolia voidaan käyttää MRM-moodissa (engl. *multiple reaction monitoring*). MRM-tekniikassa ionilähteeltä tulevat ionit ohjataan SIM-moodissa käytettävään ensimmäiseen kvadrupoliin Q1. Tällöin ainoastaan tietyn m/z -suhteen

prekursori-ionit (engl. *precursor*) läpäisevät Q1:n ja pääsevät törmäyskammioon. Törmäyskammio Q2 on itseasiassa heksapoli, jossa prekursori-ionit frangmentoituvat uudelleen tuoteioneiksi (engl. *product*) törmätessään typpi- ja heliumvirtaukseen. Ionit ohjataan SIM-moodissa käytettävään kolmanteen kvadrupoliin Q3, jolloin taas ainoastaan tietyn m/z -suhteen tuoteionit läpäisevät Q3:n ja ohjataan edelleen detektorille. (Agilent 2011, 30, 42–43.) MRM-tekniikassa laite voidaan ohjelmoida siten, että kolmoiskvadrupolisysteemi läpäisee tietyssä aikaikkunassa vain tietyn prekursori-tuote-ioniparin. Tällöin voidaan mitata erittäin selektiivisesti eri aikaan kaasukromatografilta eluoituvat yhdisteet. (Agilent 2011, 25.)

Massaspektrometrin detektorina toimii elektronimonistin, joka muuttaa viimeisen kvadrupolin läpäisseiden ionien energian sähköiseksi signaaliksi ja monistaa sen. Ionit ohjataan korkeaenergiseseen dynodiin. Dynodiin törmäävät ionit irrottavat sen pinnasta elektroneja valosähköisen ilmiön seurauksena. Elektronit kiihdytetään törmäämään elektronimonistinputken sisäpinnalta toiselle. Jokaisessa törmäyksessä irtoaa lisää elektroneja ja signaali vahvistuu. Elektronikaskadi johdetaan lopulta anodille, jossa monistunut signaali mitataan. (Harris 2010, 455, 514; Agilent 2011, 47.)

4.3 Menetelmän kalibrointi ja responssivakiot

Kvantitatiivinen analyysi perustuu analyytin kromatografisen piikin pinta-alaan. Menetelmän lineaarisella mittausalueella piikin pinta-ala on suoraan verrannollinen analyytin pitoisuuteen. Hyvin kapeiden piikkien tapauksessa piikin korkeus voi korvata pinta-alan. Kvantitatiivisessa analytiikassa käytetään lähes aina tunnettua määrää sisäistä standardia. Menetelmä kalibroidaan sisäisen standardin avulla ja tutkittaville yhdisteille määritetään responssivakiot, joiden avulla tuntematon pitoisuus voidaan mitata. (Harris 2010, 580.)

Responssivakio RF (engl. *response factor*) on kaasukromatografiassa menetelmän kalibroinnin yhteydessä määritettävä kerroin, jonka avulla analyytin tuottamasta signaalista saadaan oikea kvantitatiivinen tulos. Responssivakio määritellään yhtälön (1) mukaisena suhdelukuna. Yhtälössä A ja A_{ISTD} ovat analyytin ja sisäisen standardin piikkien pinta-alat ja C ja C_{ISTD} ovat analyytin ja sisäisen standardin konsentraatiot. (Harris 2010, 580; SFS-EN 16691 2015, 12–13.)

$$RF = \frac{A}{A_{ISTD}} \cdot \frac{C_{ISTD}}{C} \quad (1)$$

Responssivakiot määritetään mittaamalla pitoisuudeltaan tunnetut kalibrintistandardit C , joihin on lisätty sisäinen standardi C_{ISTD} . Responssivakiot määritetään erikseen jokaiselle kalibrintistandardin pitoisuudelle yhtälön (1) mukaan. Responssivakioiden suhteellinen keskihajonta saa olla korkeintaan 30 % kullekin yhdisteelle. Kalibroinnin lineaarisuus tarkistetaan laatimalla responssivakioiden suora suhteessa tunnettuihin konsentraatioihin lineaarisella regressiolla. Hyväksyttävä lineaarisuus on saavutettu, kun kullakin yhdisteellä standardisuoran kalibrintikerroin on suurempi kuin 0,99. Kun hyväksyttävä lineaarisuus on saavutettu, yhdisteen lopullinen responssivakio määritetään eri pitoisuuksien responssivakioiden keskiarvona. (SFS-EN 16691 2015, 12–13.)

5 MENETELMÄN VALIDOINTIPARAMETRIT

5.1 Validointi

Kemiallisen mittausmenetelmän validointi on menettely, jolla osoitetaan sen sopivuus aiottuun käyttötarkoitukseen. Validoinnin avulla todistetaan, että menetelmällä saadut tulokset ovat luotettavia ja päteviä määritellyissä rajoissa, kun analyysi tehdään menetelmäohjeen mukaan. Validointi on menetelmäkohtainen ja siinä huomioidaan haluttu toimintatarkkuus. Validoinnin laajuus ja vaatimusten tiukkuus riippuvat menetelmän käyttökohteesta ja mahdollisesti ulkopuolisista vaatimuksista, kuten viranomaisten asettamista määräyksistä. (Ehder 2005, 25; Hiltunen ym. 2011, 24.)

Validointi on tarpeen, kun halutaan osoittaa, että mittausmenetelmän suorituskyky on riittävä. Validointi suoritetaan esimerkiksi uutta menetelmää kehitettäessä, vanhan menetelmän muuttuessa tai kahta eri mittausmenetelmää vertailtaessa. Validoinnin yhteydessä yleisesti tutkittavia parametreja ovat muun muassa selektiivisyys ja spesifisyys, lineaarisuus, mittausalue, toteamisraja, määrittäysraja, poikkeama, saanto, häiriönkestävyys ja toimintavarmuus, tarkkuus, toistettavuus, uusittavuus sekä mittausepävarmuus. (Ehder 2005, 25–26; Hiltunen ym. 2011, 25–26.)

5.2 Keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta

Keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta ovat tulosten laskennassa tarvittavia matemaattisia parametreja. Keskiarvo \bar{x} lasketaan mitatuista suureista x_i , kun $i = [1, n]$. Keskiarvon määritelmä esitellään yhtälössä (2) (Dukkipati 2011, 10).

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (2)$$

Keskihajonta s (engl. *standard deviation*) kuvaa mitattujen arvojen hajaantumista keskiarvon ympärille. Se määritellään varianssin s^2 neliöjuurena yhtälön (3) mukaan (Dukkipati 2011, 12–13).

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

Suhteellinen keskihajonta *RSD* (engl. *relative standard deviation*) on prosenttiluku, joka kertoo mitattujen arvojen suhteellisesta vaihtelusta keskiarvoon verrattuna. Se lasketaan otoksen keskihajonnan s ja keskiarvon \bar{x} avulla yhtälön (4) mukaan. (Dukkipati 2011, 13.) Suhteellista keskihajontaa kutsutaan myös vaihtelu- tai variaatiokertoimeksi CV (Jaarinen & Niiranen 2008, 32).

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \% \quad (4)$$

5.3 Saanto

Saanto on analyysimenetelmän teho havaita tutkittavan analyytin kokonaismäärä. Saantoon voi vaikuttaa erityisesti näytteen kemiallinen esikäsittely. Saantoprosentti määritetään yleensä mittaamalla näytteistä analyytin pitoisuus tunnetuilla lisäyksillä ja ilman niitä. Saanto lasketaan yhtälön (5) mukaan, kun C_1 on keskiarvo tunnetuilla lisäyksillä tehdyistä mittauksista, C_2 on keskiarvo ilman lisäyksiä ja C_3 on tunnetun lisäyksen laskennallinen arvo. (Ehder 2005, 32–33; Hiltunen ym. 2011, 16.)

$$Saanto - \% = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \cdot 100 \% \quad (5)$$

5.4 Lineaarisuus

Mittausmenetelmän lineaarisuus tarkoittaa analyysimenetelmän kykyä antaa lineaarinen korrelaatio tutkittavan pitoisuuden ja mittaussignaalin välillä. Lineaarisuusalue määritetään mittaamalla analyytin pitoisuus vähintään viidestä mittausalueen kattavasta standardista useilla toistoilla. Tulosten avulla laaditaan regressiosuora pienimmän neliösumman menetelmällä ja graafisesta esityksestä arvioidaan menetelmän lineaarinen alue. (Ehder 2005, 28–29; Hiltunen ym. 2011, 11–12.)

Lineaarisuutta arvioidaan mittaustulosten ja lineaarisen mallin erotuksia eli residuaaleja tarkkailemalla. Residuaalien tulisi olla mahdollisimman pieniä ja esiintyä normaalijakautuneesti nollan molemmin puolin. (Jaarinen & Niiranen 2008, 25–26.) Varsinainen mittausalue on yleensä hieman laajempi kuin lineaarinen alue (Ehder 2005, 29; Hiltunen ym. 2011, 13).

5.5 Toteamisraja ja määrittäysraja

Toteamisraja tai havaitsemisraja C_{LOD} (engl. *limit of detection*) on pienin konsentraatio, joka voidaan luotettavasti havaita eli erottaa nollanäytteestä. Toteamisraja voidaan määrittää esimerkiksi nollanäytteiden avulla yhtälön (6) mukaan. Nollanäytteillä määritetty toteamisraja on yleensä nollanäytteiden keskiarvo \bar{x}_0 , johon on lisätty 3 kertaa nollanäytteiden keskihajonta s_0 . (Ehder 2005, 29–30; Jaarinen & Niiranen 2008, 13; Hiltunen ym. 2011, 13.)

$$C_{LOD} = \bar{x}_0 + 3s_0 \quad (6)$$

Määrittäysraja C_{LOQ} (engl. *limit of quantitation*) on pienin konsentraatio, jonka suuruus voidaan mitata luotettavasti. Määrittäysraja määritetään kuten toteamisraja, mutta käytetty kerroin on yleisesti 5, 6 tai 10 yhtälön (7) mukaan. (Ehder 2005, 30; Hiltunen ym. 2011, 13.)

$$C_{LOQ} = \bar{x}_0 + 10s_0 \quad (7)$$

5.6 Vertailukokeet

Laboratorioiden välisissä vertailukokeissa kaksi tai useampia laboratoriota suorittavat samasta näytteestä ennalta määrätyt mittaukset ja niiden arvioinnit. Yksittäisten laboratorioiden mittaustuloksia verrataan näytteelle määritettyyn referenssiarvoon. Vertailukokeisiin osallistumalla laboratorio voi arvioida omien analyysimenetelmiensä suorituskykyä ulkoisen mittarin avulla. Vertailukokeisiin osallistuminen on tarpeen uutta menetelmää validoitaessa, käytössä olevan menetelmän suorituskykyä kontrolloitaessa ja laboratorion

pätevyyttä arvioitaessa esimerkiksi akkreditoinnin yhteydessä. Tietyillä aloilla viranomaiset myös edellyttävät laboratorioden osallistuvan vertailukokeisiin. Säännölliset vertailukokeet ovat tyypillisiä muun muassa ympäristö- ja elintarvikealan sekä kliinisen alan laboratorioissa. (Ehder 2005, 45–47; Hiltunen ym. 2011, 67–69.)

Vertailukokeiden tuloksia vertaillaan z-arvon avulla yhtälön (8) mukaan. Siinä x_i on yksittäisen laboratorion saama mittaustulos, X on vertailuarvo ja s on raportoitujen mittaustulosten keskihajonta. (Ehder 2005, 48; Hiltunen ym. 2011, 71.)

$$z = \frac{x_i - X}{s} \quad (8)$$

Tavoitteena on mahdollisimman pieni z-arvo ja tuloksia arvioidaan yhtälöiden (9) avulla. Jos laboratorion saama mittaustulos eroaa vertailuarvosta enintään kahden keskihajonnan verran, vertailukokeen tulos on hyväksyttävä. (Ehder 2005, 49; Hiltunen ym. 2011, 72.)

$$\begin{aligned} |z| \leq 2 &= \textit{hyväksyttävä} \\ 2 < |z| \leq 3 &= \textit{kyseenalainen} \\ |z| \geq 3 &= \textit{huono} \end{aligned} \quad (9)$$

6 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

6.1 Analysoitavat PAH-yhdisteet ja reagenssit

Opinnäytetyössä kehitettiin menetelmä 16 PAH-yhdisteen määrittämiseen vesinäytteistä kiinteäfaasiuutolla. Taulukkoon 2 on koottu tutkittavat yhdisteet ja niiden kvantitoinnissa käytetyt sisäisen standardin deuteroidut PAH-yhdisteet. Taulukossa on vaakaviivoilla koottu ryhmiin ne yhdisteet, jotka kvantitoidaan kullakin sisäisen standardin komponentilla. Ensimmäisessä ryhmässä ISTD on D8-naftaleeni, toisessa D10-antraseeni, kolmannessa D12-kryseeni ja neljännessä D14-dibentso(a,h)antraseeni. Taulukkoon on myös merkitty luonnonvesistä tarkkailtavat EU:n prioriteettiaineet ja talousvesiasetuksen vertailuaineet (2008/105/EY 2008, 92–94; Sosiaali- ja terveysministeriön asetus 1352/2015).

TAULUKKO 2. Tutkittavat PAH-yhdisteet ja sisäisen standardin yhdisteet

Yhdiste	EU:n prioriteettiaineet luonnonvesistä	Talousvesiasetuksen vertailuaineet
D8-naftaleeni		
naftaleeni	x	
asenaftyleeni		
asenafteeni		
fluoreeni		
fenantreeni		
D10-antraseeni		
antraseeni	x	
fluoranteeni	x	
pyreeni		
bentso(a)antraseeni		
D12-kryseeni		
kryseeni		
bentso(b)fluoranteeni	x	x
bentso(k)fluoranteeni	x	x
bentso(a)pyreeni	x	x
D14-dibentso(a,h)antraseeni		
dibentso(a,h)antraseeni		
bentso(g,h,i)peryleeni	x	x
indeno(1,2,3-cd)pyreeni	x	x

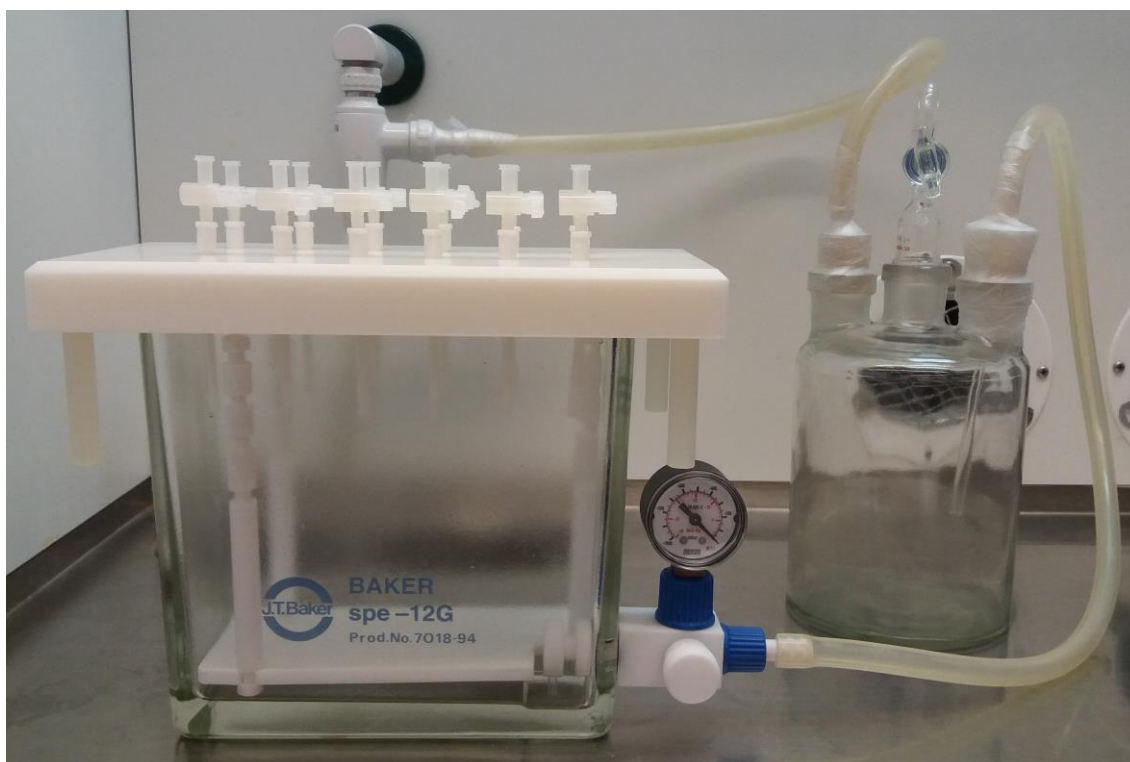
PAH-yhdisteiden uutossa käytetyt standardiliuokset ja muut reagenssit on kerätty taulukoon 3. Saantokokeita ja standardeja varten valmistettiin näytteitä pipetoimalla ultra-puhtaaseen veteen sertifioituja PAH-STD standardiliuoksia. Standardiliuosten sisältämät PAH-yhdisteet ja niiden pitoisuudet on koottu liitteeseen 1. PAH-STD tunnettua liuosta PAH Mix 39 (Dr. Ehrenstorfer) käytettiin saantokoenäytteisiin. PAH-STD perusliuoksesta PAH Mix Z-014G (AccuStandard) valmistettiin eri vahvuisia käyttöliuoslaimennoksia 1 ng/ml, 100 ng/ml ja 500 ng/ml asetoniin laimentamalla. Näytteet analysoitiin mahdollisimman pian valmistamisen jälkeen ja tarpeen tullen säilytettiin pimeässä 4 °C ruskeassa lasipullossa, sillä PAH-yhdisteet ovat alttiita foto-oksidaatiolle (Walker 2009, 183).

TAULUKKO 3. PAH-uuttomenetelmien reagenssit ja liuottimet

Reagenssi	Tiedot	Pitoisuus
PAH-ISTD perusliuos	D8-naftaleeni D10-antraseeni D12-kryseeni D14-dibentso(a,h)antraseeni	104 µg/ml asetonissa
PAH-ISTD käyttöliuos		1,04 µg/ml asetonissa
PAH-STD perusliuos	AccuStandard PAH Mix Z-014G	Liite 1
PAH-STD tunnettu liuos	Dr. Ehrenstorfer PAH Mix 39	Liite 1
Dikloorimetaani	VWR Chemicals 99,8 %	
Metanoli	VWR Chemicals 99,8 %	
Metanoli:vesi		50:50 (v/v)
Ultrapuhdas vesi	Milli-Q	
Heksaani	VWR Chemicals 95 %	
Na ₂ SO ₄	Merck EMSURE® 99,0 %	

6.2 Kiinteäfaasiutto

Kiinteäfaasiuutossa käytettiin Phenomenexin Strata® PAH-kiinteäfaasiuuttopylväitä, jotka olivat yhteensopivia kuvassa 1 esiteltävän J.T. Baker spe-12G vakuuimanimanifoldin kanssa. Vakuuimanimanifoldi yhdistettiin Wulffin pulloon ja vesi-imeun. Strata® PAH on patentoitu, silikapohjainen sorbenttimateriaali, joka eristää vesinäytteistä PAH-yhdisteet puhdistuen samalla pois luonnonvesien humushapot (Aqeel, Sadjadi & Pike 2010, 1). Käytettyjen pylväiden sorbenttimassa oli 750 mg, mikä sopii käytettäväksi 100–500 ml vesinäytteille (Phenomenex 2013, 8).



KUVA 1. Kiinteäfaasiuuttolaitteisto

Kiinteäfaasiuutossa näytteet käsiteltiin taulukossa 4 olevan Phenomenexin Strata® PAH-kiinteäfaasiuuttopylväille kehitetyn protokollan mukaisesti (Aqeel, Sadjadi & Pike 2010, 1). Ennen uuttoa vesinäytettä mitattiin pulloon 350 ml ja näytteeseen lisättiin sisäiseksi standardiksi 100 µl PAH-ISTD käyttöliuosta.

TAULUKKO 4. Kiinteäfaasiuuttoprotokolla

Vaihe	Strata® PAH-pylvään läpi
1) Pylvään aktivointi	20 ml dikloorimetaani 20 ml metanoli 20 ml ultrapuhdas vesi
2) Näytteen lisäys	350 ml näyte
3) Pylvään pesu	5 ml metanoli:vesi (50:50)
4) Pylvään kuivaus	60 sekuntia 10" Hg vakuuissa
5) Eluointi	6 ml dikloorimetaani

Pylväs aktivoitiin vetämällä sen läpi 20 ml dikloorimetaania, 20 ml metanolia ja 20 ml ultrapuhdasta vettä. Näytteen lisäysvaiheessa näyte vedettiin pylvään läpi kokonaisuudessaan. Näytepullo huuhdeltiin kahdesti 5–10 ml ultrapuhdasta vettä ja huuhteluedet vedettiin pylvään läpi. Pylväs pestiin 5 ml:lla metanoli-vesi seosta ja kuivattiin altistamalla se vakuuimanimanifoldissa 10" Hg paineelle noin 60 sekunnin ajan, kunnes pylvästä

ei enää tullut metanoli-vesi seosta. Näyte eluoiitiin 6 ml:lla dikloorimetaania. Dikloorimetaani lisättiin pylvääseen ja sen annettiin vaikuttaa noin minuutin ajan, minkä jälkeen se vedettiin pylvään läpi ja otettiin talteen Kimax-putkeen. Dikloorimetaaniin eluoiitu näyte kuivattiin natriumsulfaatilla ja siirrettiin puhtaaseen Kimax-putkeen. Dikloorimetaani haihdutettiin typpivirralla varovasti noin 200 µl:ksi ja siirrettiin GC-ajopulloon mikroinserttiin. Putkea huuhdeltiin kaksi kertaa noin 50 µl:lla dikloorimetaania ja näyte konsentroidtiin typpivirralla insertissä 100 µl tilavuuteen.

6.3 Heksaaniuutto

Alustavia PAH-yhdisteiden saantokokeita suoritettaessa sekä vertailukoenäytteitä analysoitaessa SPE-uuttomenetelmää verrattiin laboratorion sisäiseen heksaaniuuttomenetelmään O-Y-098 PAH-vesi (Tabell 2009). Heksaaniuuttomenetelmässä (HEX) mitattiin 350 ml vesinäytettä pulloon, johon lisättiin sisäiseksi standardiksi 100 µl PAH-ISTD käyttöliuosta. Näytettä uutettiin kaksi kertaa 3 ml:lla heksaania ja uutokset kerättiin yhteen. Näyte kuivattiin ja heksaani konsentroidtiin typpivirralla GC-ajopullon inserttiin 100 µl tilavuuteen kuten SPE-menetelmässä.

6.4 Laitteisto ja mittausmenetelmä

Mittaukset suoritettiin Agilent 7890A GC kaasukromatografilla, johon oli yhdistetty Agilent 7000 A GC/MS Triple Quadrupole GC/MS System kolmoiskvadrupolimassaspektrometri. Taulukkoon 5 on koottu injektio- ja ajoparametrit. Ruisku pestiin ennen ja jälkeen injektion heksaanilla ja etyyliasetaatilla.

TAULUKKO 5. Injektio- ja ajoparametrit

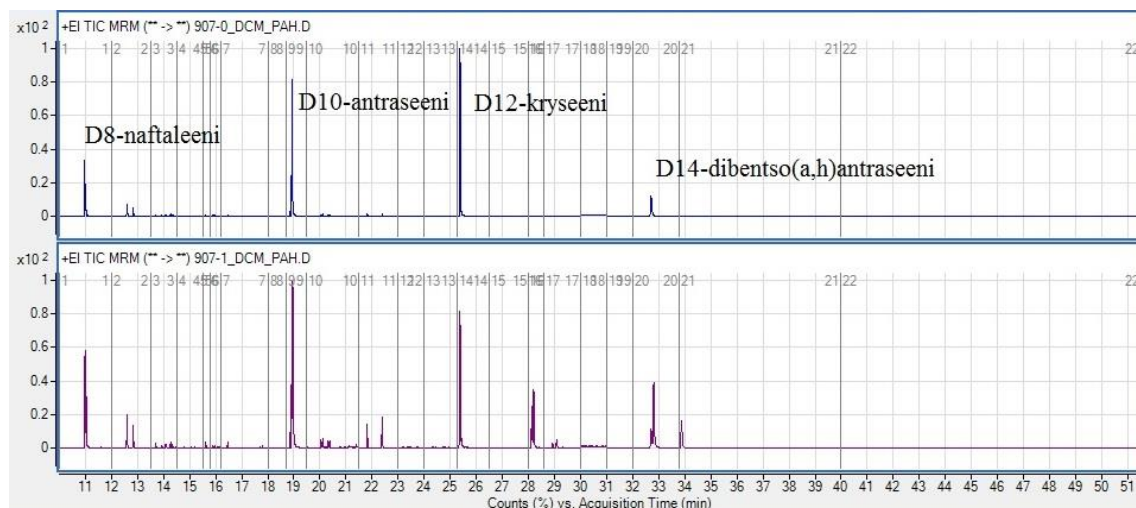
Injektio-tilavuus	1 µl
Jakosuhte	Splitless
Injektorin lämpötila	280 °C
Kantokaasu	Helium 1,632 ml/min
Kolonni	Agilent J&W DB-5ms: 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm
Backflush-kolonni	Agilent J&W HP-5: 15 m x 0,25 mm x 0,25 µm

Mittauksissa käytettiin laitteelle aiemmin optimoitua PAH-mittausmetodia, jonka lämpötilaohjelma on taulukossa 6. Ajo suoritettiin MRM-moodissa ja ajoaika 51,5 min oli jaettu 22 aikaikkunaan. Mitattaville PAH-yhdisteille ja deuteroiduille sisäisen standardin yhdisteille oli määritelty mitattavat prekursori- ja tuoteionit, dwell-ajat ja kiihdytyspotentiaalit.

TAULUKKO 6. PAH-metodin lämpötilaohjelma

Nopeus °C/min	Lämpötila °C	Pito min
	80	1
10	325	26
Post Run	310	3

Ajojen aikana tarkkailtiin, että injektoriputki oli puhdas, septa oli melko uusi ja kolonnin alkupää oli puhdas. Injektoripään likaisuus vaikutti erityisesti raskaampiin, ajon loppupäässä eluoituviin PAH-yhdisteisiin. Piikit liukuivat, madaltuivat ja levenivät ja piikkien resoluutio heikkeni. Kuviossa 5 on esitelty kaksi esimerkkikromatogrammia PAH-yhdisteiden ajosta MRM-moodissa. Ylemmässä kromatogrammissa on nollanäyte, johon on merkitty sisäisen standardin piikit D8-naftaleeni, D10-antraseeni, D12-kryseeni ja D14-dibentso(a,h)antraseeni. Alempana on PAH-yhdisteitä sisältävän näytteen kromatogrammi, jossa näkyvät samat ISTD-yhdisteet sekä näytteen sisältämät komponentit. Molemmissa kromatogrammeissa D14-dibentso(a,h)antraseenin piikki on hieman ideaalilannetta matalampi, mutta kuitenkin hyväksyttävä.



KUVIO 5. PAH-yhdisteiden MRM-ajon esimerkkikromatogrammit. Yllä nollanäyte, jossa sisäisen standardin yhdisteet, alla PAH-yhdisteitä sisältävä näyte.

6.5 Laitteen kalibrointi ja responsivakiot

Ajomenetelmä oli aiemmin kalibroitu vain näytteille, joissa on ajoliuottimena heksaani. Analysoitavat SPE-näytteet uutettiin dikloorimetaaniin, joten kalibrointi suoritettiin uudelleen dikloorimetaanipohjaisilla standardinäytteillä.

Kalibrointia varten valmistettiin PAH Mix Z-014G (AccuStandard) perusliuoksen laimennoksista standardiliuokset pitoisuuksilla 50, 100, 200, 500, 1000 ja 2000 ng/ml asetonissa. Standardiliuoksissa oli sisäisenä standardina 100 µl PAH-ISTD käyttöliuosta. Liuosten liuotin vaihdettiin asetonista dikloorimetaaniin. Asetonipohjaisiin liuoksiin lisättiin 10 µl glykolia estämään kevyiden PAH-yhdisteiden haihtumista näytteestä, asetoni haihdutettiin pois typpivirrassa ja ajopulloon lisättiin dikloorimetaania siten, että saavutettiin haluttu ajotilavuus. Kalibrointinäytteet ajettiin taulukoissa 5 ja 6 esiteltyllä PAH-ajometodilla ja tutkittaville PAH-yhdisteille määritettiin responsivakiot yhtälön (1) mukaan.

Kalibrointi verifioitiin käyttämällä sertifioitua vertailumateriaalia NIST 1649b Urban Dust (NIST 2015). Tunnettu määrä vertailumateriaalia uutettiin dikloorimetaaniin ultraääniuutolla. Näyte ajettiin PAH-ajometodilla ja vertailumateriaalinäytteen PAH-pitoisuudet määritettiin käyttämällä määritettyjä responsivakioita. Yhdisteiden saantoa verrattiin analyysisertifikaatissa annettuihin pitoisuuksiin

6.6 Saantokokeet

Alustavissa saantokokeissa verrattiin keskenään kiinteäfaasiuuttomenetelmää (SPE) ja heksaaniuuttomenetelmää (HEX). Molemmilla uuttomenetelmillä mitattiin nollanäytteet ja PAH Mix 39 (Dr. Ehrenstorfer) -standardista valmistettuja rinnakkaisnäytteitä. Taulukkoon 7 on koottu valmistetut saantokoenäytteet ja taulukkoon 8 on koottu niiden teoreettiset PAH-pitoisuudet. SPE-menetelmällä valmistettuja näytteitä mitattiin ennen ja jälkeen kalibroinnin, HEX-menetelmällä valmistettuja vain kalibroinnin jälkeen. Näin saatiin näkyville kalibroinnin vaikutus SPE-menetelmän saantoon ja varmistettiin sen toimivuus HEX-menetelmälle.

TAULUKKO 7. Saantokoenäytteet

SPE-uutto	Näytteet		V	PAH Mix 39
	Heksaaniuutto		ml	µl
SPE ₀	HEX ₀		500	0
SPE ₁	HEX ₁		500	100
SPE ₂	HEX ₂		500	200
SPE ₃			250	100
SPE ₄			250	200

TAULUKKO 8. Saantokoenäytteiden teoreettiset pitoisuudet

Yhdiste	SPE ₁ ja HEX ₁	SPE ₂ ja HEX ₂	SPE ₃	SPE ₄
	<i>C_{teor1}</i> ng/l	<i>C_{teor2}</i> ng/l	<i>C_{teor3}</i> ng/l	<i>C_{teor4}</i> ng/l
naftaleeni	100	200	200	400
asenaftyleeni	98	196	196	392
asenafteeni	50	100	100	200
fluoreeni	25	50	50	100
fenantreeni	48,8	97,6	97,6	195,2
antraseeni	10	20	20	40
fluoranteeni	50	100	100	200
pyreeni	50	100	100	200
bentso(a)antraseeni	25	50	50	100
kryseeni	25	50	50	100
bentso(b)fluoranteeni	25	50	50	100
bentso(k)fluoranteeni	10	20	20	40
bentso(a)pyreeni	25	50	50	100
dibentso(a,h)antraseeni	50	100	100	200
bentso(g,h,i)peryleeni	50	100	100	200
indeno(1,2,3-cd)pyreeni	100	200	200	400

6.7 Lineaarisuus pienillä pitoisuuksilla ja määrittämissuorituksen kartoitus

SPE-uuttomenetelmän määrittämissuorituksen kartoitus ja lineaarisuutta pienillä pitoisuuksilla testattiin mitaamalla nollanäyte sekä PAH Mix Z-014G (AccuStandard) -liuoksesta valmistettuja standardinäytteitä. Lineaarisuutta tutkittiin pitoisuusalueella 1–400 ng/l määrittämällä taulukkoon 9 kootut näytteet. Pitoisuuksilla 1 ng/l ja 10 ng/l valmistettiin kaksi rinnakkaisnäytettä, sillä pienet pitoisuudet ovat erityisen herkkiä kontaminaatiolle.

TAULUKKO 9. Linearisuustarkastelunäytteet

C_{PAH} ng/l	V ml
0	350
1	350
10	350
50	350
100	350
150	350
200	350
400	350

Määrittämissä kartoittamiseksi määritettiin nollanäytteitä ja näytteitä lähellä todennäköistä määrittämissä rajoja pitoisuusalueella 1–20 ng/l (taulukko 10). Osalla pitoisuuksista valmistettiin rinnakkaisnäytteet myös HEX-menetelmällä.

TAULUKKO 10. Määrittämissä rajojenäytteet

C_{PAH} ng/l	V ml	Menetelmä
0	350	SPE
1	350	SPE
2	305	SPE, HEX
10	350	SPE
20	350	SPE, HEX

6.8 Vertailukoenäytteet

Stuttgartin yliopiston instituutin Institute for Sanitary Engineering, Water Quality and Solid Waste Management osasto Analytische Qualitätssicherung Baden-Württemberg (AQS B-W) järjestää vertailukokeita vesianalyysin alalla. Kiinteäfaasiuuttomenetelmällä osallistuttiin AQS B-W:n järjestämään vertailukokeeseen ”9/15 WFD – PAH with suspended solids in surface water”. Vertailukokeessa analysoitiin kolme eri pintavesinäytettä eri PAH-yhdisteiden konsentraatioitasoilla (taulukko 11). Jokaisesta näytteestä toimitettiin kaksi 1000 ml rinnakkaisnäytettä. Näytteet tuli analysoida viimeistään vuorokauden kuluessa niiden saapumisesta vapaavalintaisella menetelmällä laboratorion omissa tiloissa ja oman henkilökunnan tekemänä. (Stuttgartin yliopisto 2015.) Rinnakkaisnäytteistä toinen analysoitiin SPE-menetelmällä ja toinen HEX-menetelmällä.

TAULUKKO 11. Vertailukoenäytteet ja niiden analyysimenetelmät

Näyte	Rinnakkaiset	Menetelmä
907-1	12-1	SPE
907-2	12-2	HEX
907-3	29-1	SPE
907-4	29-2	HEX
907-5	74-1	SPE
907-6	74-2	HEX

Vertailukokeen tarkoitus oli kontrolloida laboratorioden pätevyyttä analysoida EU:n vesipolitiikan puitedirektiivin määrittämiä prioriteettiaineita ja niille asetettuja enimmäispitoisuuksia vesistöissä (2008/105/EY 2008, 92–94; 2013/39/EU 2013, 12–17). Näytteistä määritettävät yhdisteet ja vertailukokeen tavoitemääritysrajat on koottu taulukkoon 12 (Stuttgartin yliopisto 2015).

TAULUKKO 12. Vertailukoenäytteistä analysoitavat yhdisteet ja niiden määritysrajat

Yhdisteet	Määritysrajatavoite ng/l
antraseeni	30
fluoranteeni	2
naftaleeni	30
bentso(b)fluoranteeni	0,3
bentso(k)fluoranteeni	5
bentso(a)pyreeni	5
bentso(g,h,i)peryleeni	2,5
indeno(1,2,3-cd)pyreeni	2,5

7 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELO

7.1 Menetelmän kalibrointi ja responsivakioiden määrittäminen

Menetelmän kalibroinnin standardiliuosten mittaustulokset on koottu liitteeseen 2. Mittaustuloksista laskettiin yhtälön (1) mukaan liitteen 3 responsivakiot eri PAH-yhdisteiden kaikille pitoisuuksille. Taulukkoon 13 on koottu liitteen 2 arvoista määritetyt korrelaatiokertoimet R^2 eri PAH-yhdisteiden kalibroitaisuurille. Taulukossa on myös liitteen 3 arvoista lasketut yhdisteiden responsivakiot RF , sekä responsilaskennan keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta.

TAULUKKO 13. SPE-menetelmän lineaarisuus ja responsivakiot RF

Yhdisteet	R^2	RF	s_{RF}	RSD_{RF} %
naftaleeni	0,9984	0,645	0,056	8,6
asenaftyleeni	0,9981	0,917	0,078	8,5
asenafteeni	0,9990	0,907	0,074	8,1
fluoreeni	0,9955	0,441	0,050	11,3
fenantreeni	0,9977	0,739	0,052	7,0
antraseeni	0,9980	0,566	0,057	10,0
fluoranteeni	0,9909	1,777	0,247	13,9
pyreeni	0,9940	1,543	0,170	11,0
bents(a)antraseeni	0,9950	0,753	0,091	12,1
kryseeni	0,9983	0,546	0,067	12,3
bentso(b)fluoranteeni	0,9895	1,272	0,206	16,2
bentso(k)fluoranteeni	0,9950	1,026	0,109	10,6
bentso(a)pyreeni	0,9886	1,431	0,296	20,7
dibentso(a,h)antraseeni	0,9941	0,646	0,058	8,9
bentso(g,h,i)peryleeni	0,9981	0,479	0,053	11,0
indeno(1,2,3-cd)pyreeni	0,9962	0,579	0,067	11,5

Standardissa SFS-EN 16691 (2015, 12–13) annettiin kriteerit PAH-yhdisteiden sisäisen standardin avulla tehtävän kalibroinnin onnistumiselle. Kalibroinnin lineaarisuus on riittävä, kun kaikkien yhdisteiden standardisuorien korrelaatiokertoimet ovat suurempia kuin 0,99 ja määritettyjen responsivakioiden RF suhteellinen keskihajonta on alle 30 %. Määritettyjen responsivakioiden suhteellinen keskihajonta vaihteli välillä 7,0–20,7 % kaikilla yhdisteillä. Lineaarisuusehto täyttyi kaikilla yhdisteillä paitsi bentso(b)fluoranteenilla ja bentso(a)pyreenillä, joiden korrelaatiokertoimet olivat 0,9895 ja 0,9886. Näillä

yhdisteillä oli myös responsivakioiden suhteellinen keskihajonta suurinta: 16,2 % ja 20,7 %. Kalibrointia ei kuitenkaan uusittu kokonaan, sillä poikkeamat lineaarisuusehdosta eivät olleet merkittäviä.

7.2 Saantokokeet

Alustavien saantokokeiden mittaustuloksista on laskettu liitteeseen 4 saantoprosentit yhtälön (5) mukaan. Liitteen arvoista on koottu taulukoihin 14–16 saantoprosenttien keskiarvot, keskihajonnat ja suhteelliset keskihajonnat. Taulukossa 14 ovat tulokset ennen laitteen kalibrointia mitatuille saantokokeille SPE_1 ja SPE_2 . Suurin saanto ennen kalibrointia oli fluoreenilla, jonka saantotestien keskiarvo oli 628 % ja rinnakkaisten suhteellinen keskihajonta oli jopa 35,7 %. Eri yhdisteiden saantoprosentit poikkesivat huomattavasti toisistaan ja mittaustulosten sisäinen keskihajonta vaihteli välillä 0,6–35,7 %.

TAULUKKO 14. SPE -saantokokeiden 1 ja 2 tulokset ennen menetelmän kalibrointia

Yhdiste	$Saanto_{SPE12}$ %	$SSPE12$ %	RSD_{SPE12} %
naftaleeni	119	2,8	2,4
asenaftyleeni	213	9,2	4,3
asenafteeni	206	6,4	3,1
fluoreeni	628	224,2	35,7
fenantreeni	303	33,9	11,2
antraseeni	118	0,7	0,6
fluoranteeni	347	46,0	13,3
pyreeni	304	17,0	5,6
bentso(a)antraseeni	117	14,1	12,1
kryseeni	135	1,4	1,0
bentso(b)fluoranteeni	103	2,8	2,7
bentso(k)fluoranteeni	108	7,8	7,2
bentso(a)pyreeni	64	15,6	24,3
dibentso(a,h)antraseeni	82	2,1	2,6
bentso(g,h,i)peryleeni	52	17,0	32,6
indeno(1,2,3-cd)pyreeni	67	5,7	8,4

Taulukossa 15 ovat tulokset kalibroinnin jälkeen mitatuille saantokokeille SPE_3 ja SPE_4 . Parhaat saantoprosentin tulokset 89–99 % saatiin dibentso(a,h)antraseenille, bentso(g,h,i)peryleenille asenaftyleenille ja indeno(1,2,3-cd)peryleenille. Pienin saanto

62 % oli bentso(a)pyreenillä, mutta kaikilla muilla yhdisteillä saanto oli yli 70 %. Tulosten suhteellinen keskihajonta vaihteli välillä 0,2–6,9 %.

TAULUKKO 15. SPE-saantokokeiden 3 ja 4 tulokset menetelmän kalibroinnin jälkeen

Yhdiste	<i>Saanto</i> _{SPE34} %	<i>SSPE</i> ₃₄ %	<i>RSD</i> _{SPE34} %
naftaleeni	84	0,2	0,3
asenaftyleeni	94	5,2	5,5
asenafteeni	89	5,7	6,4
fluoreeni	83	1,4	1,6
fenantreeni	74	1,2	1,7
antraseeni	73	2,2	3,0
fluoranteeni	69	3,7	5,4
pyreeni	70	4,9	6,9
bentso(a)antraseeni	88	1,2	1,3
kryseeni	70	0,3	0,4
bentso(b)fluoranteeni	75	3,6	4,8
bentso(k)fluoranteeni	70	0,5	0,7
bentso(a)pyreeni	62	1,5	2,3
dibentso(a,h)antraseeni	99	0,2	0,2
bentso(g,h,i)peryleeni	91	4,7	5,2
indeno(1,2,3-cd)pyreeni	89	4,5	5,1

Taulukossa 16 ovat tulokset kalibroinnin jälkeen mitatuille saantokokeille HEX₁ ja HEX₂. Kalibroinnin jälkeen HEX-uuutettujen näytteiden saantoprosentit olivat samaa suuruusluokkaa kuin SPE-uuutettujen näytteiden (taulukko 15). Heksaanilla uuutettujen mitaustulosten suhteellinen keskihajonta oli hieman suurempaa kuin SPE-uuutetuilla näytteillä ja vaihteli välillä 0,2–16,1 %.

TAULUKKO 16. HEX-saantokokeiden 1 ja 2 tulokset menetelmän kalibroinnin jälkeen

Yhdiste	$Saanto_{HEX12}$ %	S_{HEX12} %	RSD_{HEX12} %
naftaleeni	84	0,7	0,8
asenaftyleeni	91	9,3	10,2
asenafteeni	84	9,5	11,3
fluoreeni	80	9,0	11,3
fenantreeni	82	3,9	4,7
antraseeni	74	10,8	14,6
fluoranteeni	78	10,6	13,6
pyreeni	79	12,7	16,1
bentso(a)antraseeni	82	1,5	1,8
kryseeni	71	0,8	1,1
bentso(b)fluoranteeni	80	9,0	11,3
bentso(k)fluoranteeni	90	2,9	3,2
bentso(a)pyreeni	74	6,5	8,7
dibentso(a,h)antraseeni	86	0,2	0,2
bentso(g,h,i)peryleeni	95	10,9	11,4
indeno(1,2,3-cd)pyreeni	93	2,1	2,3

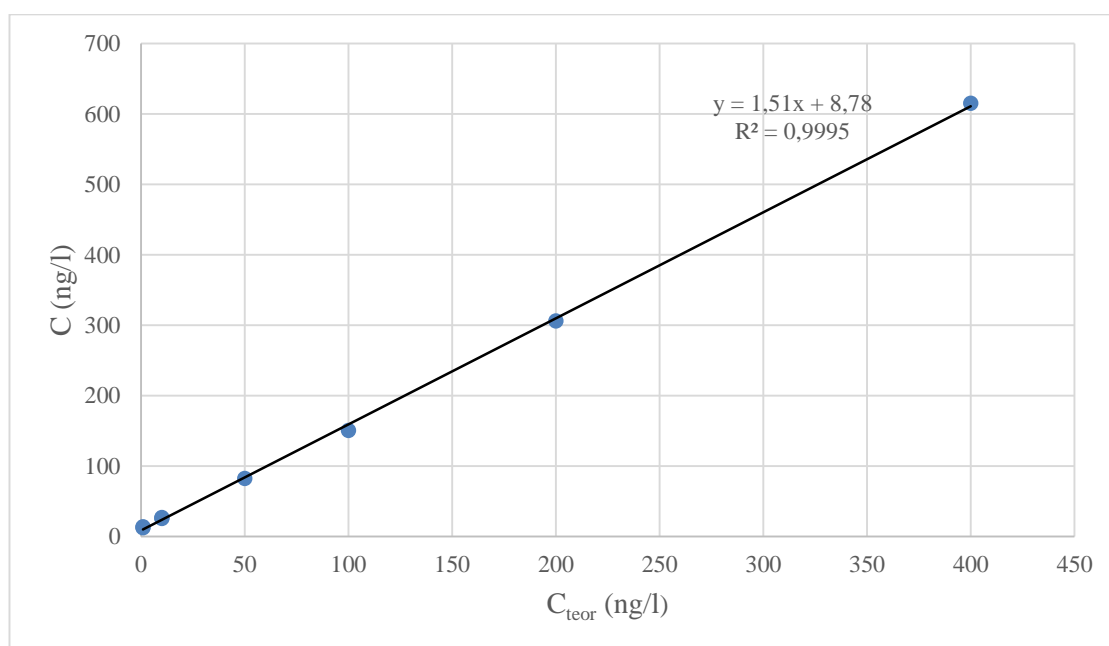
7.3 Lineaarisuus pienillä pitoisuuksilla

Kehitetyn SPE-menetelmän lineaarisuutta testattiin pienillä PAH-pitoisuuksilla 1–400 ng/l. Mittaustulokset on koottu taulukoihin 17–22. Kussakin taulukossa esitellään niiden PAH-yhdisteiden mittaustulokset, jotka on määritetty samaa sisäisen standardin komponenttia käyttämällä. Yhdisteille laadittiin lineaarisella regressiolla suorat, joissa mitattu pitoisuus esitettiin teoreettisen pitoisuuden funktiona. Taulukoihin 17–20 on lisätty kullekin yhdisteelle näiden suorien kulmakertoimet ja korrelaatiokertoimet R^2 . Jokaisesta taulukosta on valittu yksi esimerkkiyhdiste, jonka suora esitellään kuvioissa 6–9.

Taulukkoon 17 on koottu mittaustulokset $C_{mitattu}$ ja regressiosuoran kulmakerroin sekä korrelaatiokerroin R^2 yhdisteille, joiden pitoisuudet määritettiin ISTD:n komponentilla D8-naftaleeni. Suorien kulmakertoimet ovat kaikilla yhdisteillä yli 0,99, monilla jopa yli 0,999. Menetelmä antaa kuitenkin liian suuria pitoisuuksia kaikilla yhdisteillä. Esimerkiksi standardiliuoksen 400 g/l mitatut pitoisuudet vaihtelevat välillä 464,3–726,1 ng/l. Kuviossa 6 on naftaleenin regressiosuora pitoisuusalueella 1–400 ng/l.

TAULUKKO 17. Lineaarisuusmittaustulokset PAH-yhdisteille (D8-naftaleeni ISTD)

	naftaleeni	asenaftyleeni	asenafteeni	fluoreeni	fenantreeni
C_{teor} ng/l	$C_{mitattu}$ ng/l	$C_{mitattu}$ ng/l	$C_{mitattu}$ ng/l	$C_{mitattu}$ ng/l	$C_{mitattu}$ ng/l
0	10,2	0,8	0,9	4,2	4,2
1	12,5	2,1	3,0	5,3	6,5
1	13,7	1,5	2,3	5,3	5,8
10	26,8	18,4	20,6	16,3	22,7
10	25,4	18,9	20,9	16,0	21,5
50	82,3	80,2	84,3	58,8	80,0
100	150,4	180,3	188,4	107,6	150,3
200	306,1	378,0	400,6	228,5	299,6
400	615,0	726,1	724,9	464,3	537,8
R^2	0,9995	0,9993	0,9974	0,9993	0,9975
kulmak.	1,51	1,83	1,84	1,15	1,35

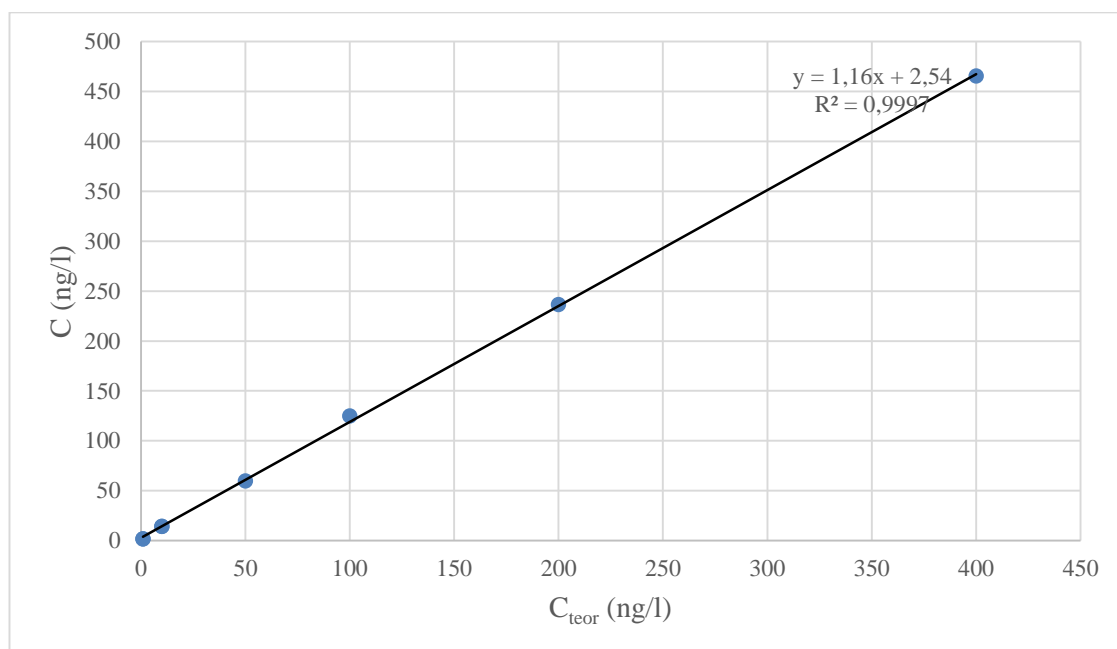


KUVIO 6. Naftaleenin lineaarisuus pitoisuusalueella 1–400 ng/l

Taulukkoon 18 on koottu mittaustulokset $C_{mitattu}$ ja regressiosuoran kulmakerroin sekä korrelaatiokerroin R^2 yhdisteille, joiden pitoisuudet määritettiin ISTD:n komponentilla D10-antraseeni. Kulmakertoimet ovat kaikilla yhdisteillä yli 0,99, mutta mitatut pitoisuudet ovat jälleen liian korkeita. Bentso(a)antraseenin pitoisuudet ovat melko lähellä teoreettisia arvoja, mutta muilla yhdisteillä esimerkiksi standardiliuoksen 400 g/l mitatut pitoisuudet vaihtelevat välillä 578,0–693,1 ng/l. Kuviossa 7 on bentso(a)antraseenin regressiosuora pitoisuusalueella 1–400 ng/l.

TAULUKKO 18. Linearisuusmittaustulokset PAH-yhdisteille (D10-antraseeni ISTD)

	antraseeni	fluoranteeni	pyreeni	bentso(a)antraseeni
C_{teor} ng/l	$C_{mitattu}$ ng/l	$C_{mitattu}$ ng/l	$C_{mitattu}$ ng/l	$C_{mitattu}$ ng/l
0	0,8	2,3	3,2	0,4
1	1,4	3,6	4,7	1,7
1	1,3	3,6	4,4	1,5
10	19,5	23,8	27,7	14,0
10	19,6	22,9	26,0	14,2
50	78,8	89,2	100,5	59,6
100	153,8	175,2	195,3	124,9
200	319,5	363,3	406,1	236,4
400	578,0	690,5	693,1	465,3
R^2	0,9977	0,9995	0,9941	0,9997
kulmakerroin	1,46	1,73	1,76	1,16

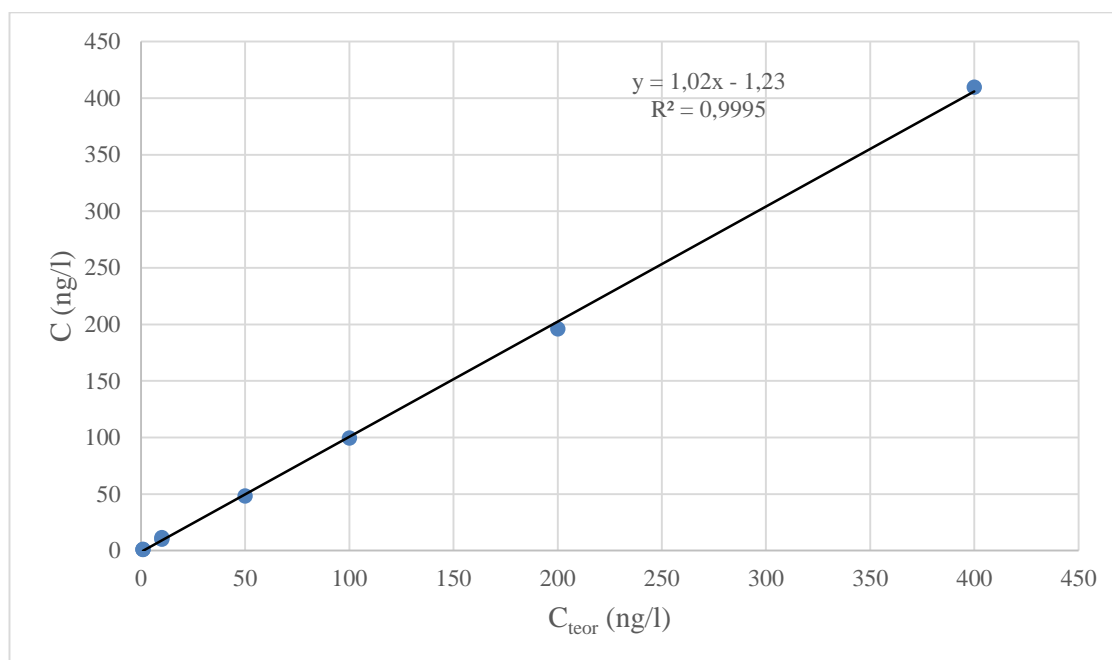


KUVIO 7. Bentso(a)antraseenin lineaarisuus pitoisuusalueella 1–400 ng/l

Taulukkoon 19 on koottu mittaustulokset $C_{mitattu}$ ja regressiosuoran kulmakerroin sekä korrelaatiokerroin R^2 yhdisteille, joiden pitoisuudet määritettiin ISTD:n komponentilla D12-kryseeni. Mitatut pitoisuudet ovat hyvin lähellä teoreettisia arvoja. Esimerkiksi standardiliuoksen 400 g/l mitatut pitoisuudet vaihtelevat välillä 402,0–464,4 ng/l. Standardisuorien korrelaatiokerroimet ovat myös yli 0,99 kaikilla paitsi bentso(a)pyreenillä, jolla korrelaatiokerroin oli 0,9894. Kuviossa 8 on bentso(k)fluoranteenin regressiosuora taulukon pitoisuusalueella 1–400 ng/l.

TAULUKKO 19. Lineaarisuusmittaustulokset PAH-yhdisteille (D12-kryseeni ISTD)

	kryseeni	bentso(b)fluoranteeni	bentso(k)fluoranteeni	bentso(a)pyreeni
C_{teor} ng/l	$C_{mitattu}$ ng/l	$C_{mitattu}$ ng/l	$C_{mitattu}$ ng/l	$C_{mitattu}$ ng/l
0	0,3	0,1	0,1	0,1
1	1,5	0,6	0,8	0,6
1	1,5	0,5	0,9	0,5
10	16,0	8,7	10,0	5,6
10	16,5	8,9	11,4	7,4
50	65,4	47,9	48,1	37,1
100	131,4	108,1	99,4	89,1
200	260,7	205,8	195,8	157,4
400	464,4	460,4	409,6	402,0
R^2	0,9966	0,9975	0,9995	0,9894
kulmak.	1,17	1,14	1,02	0,98

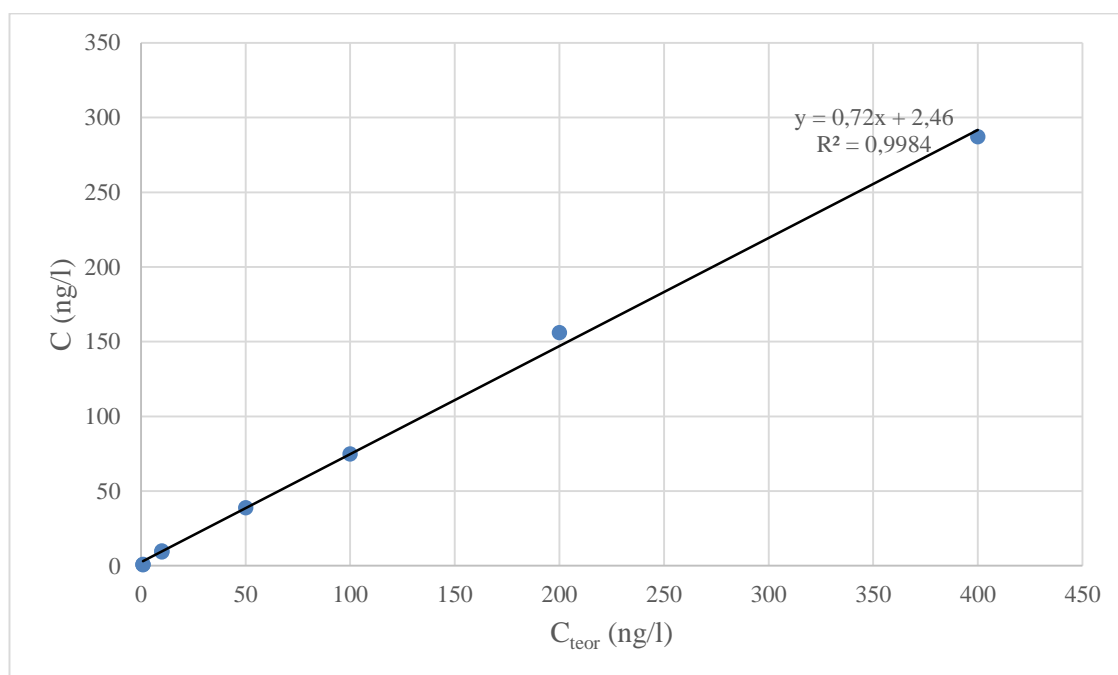


KUVIO 8. Bentso(k)fluoranteenin lineaarisuus pitoisuusalueella 1–400 ng/l

Taulukkoon 20 on koottu mittaustulokset $C_{mitattu}$ ja regressiosuoran kulmakerroin sekä korrelaatiokerroin R^2 yhdisteille, joiden pitoisuudet määritettiin käyttämällä sisäisen standardin komponenttia D14-bentso(a,h)antraseeni. Standardisuorien korrelaatiokerroimet ovat yli 0,99 kaikilla paitsi bentso(g,h,i)peryleenillä, jolla korrelaatiokerroin oli 0,9858. Mitatut pitoisuudet olivat hieman teoreettisia arvoja alhaisemmat. Esimerkiksi standardiliuoksen 400 g/l mitatut pitoisuudet vaihtelevat välillä 287,2–321,7 ng/l. Kuviossa 9 on dibentso(a,h)antraseenin regressiosuora pitoisuusalueella 1–400 ng/l.

TAULUKKO 20. Linearisuusmittaustulokset PAH-yhdisteille (D14-bentso(a,h)ant-raseeni ISTD)

	dibentso(a,h)antraseeni	bentso(g,h,i)peryleeni	indeno(1,2,3-cd)pyreeni
C_{teor} ng/l	$C_{mitattu}$ ng/l	$C_{mitattu}$ ng/l	$C_{mitattu}$ ng/l
0	0,2	0,2	0,1
1	0,9	0,9	0,8
1	0,9	0,9	0,9
10	10,0	8,6	8,0
10	9,3	9,2	9,3
50	38,8	43,0	38,8
100	75,0	83,6	78,2
200	156,1	203,4	180,5
400	287,2	321,7	315,3
R^2	0,9984	0,9858	0,9943
kulmak.	0,72	0,83	0,80



KUVIO 9. Dibentso(a,h)antraseenin lineaarisuus pitoisuusalueella 1 – 400 ng/l

7.4 Määrittärajän kartoitus

Määrittärajaa kartoitettiin mittaamalla nollanäyte ja standardinäytteitä pienillä pitoisuuksilla 1–20 ng/l. Määrittärajän kartoituksen mittaustulokset on koottu liitteeseen 5 ja sieltä taulukkoon 21 siten, että pitoisuudet 1 ng/l ja 10 ng/l on annettu rinnakkaisten mittausten keskiarvoina. Nollanäytteessä on alle 0,4 ng/l kahdeksaa raskainta PAH-yhdistettä ja 0,8

ng/l asenaftyleenia, asenafteenia sekä antraseenia. Fluoranteenin, pyreenin, fluoreenin ja fenantreenin pitoisuudet vaihtelevat välillä 2,3 – 4,2 ng/l ja naftaleenia on nollanäytteessä jopa 10,2 ng/l. Standardinäytteiden mitatut pitoisuudet ovat melko lähellä teoreettisia pitoisuuksia raskailla PAH-yhdisteillä. Kevyempien PAH-yhdisteiden mitatut pitoisuudet ovat odotettua korkeampia.

TAULUKKO 21. Määrittämissrajien kartoituksen mittaustulokset

Teoreettinen pitoisuus	0 ng/l	1 ng/l	2 ng/l	10 ng/l	20 ng/l
	C_0	C_1	C_2	C_{10}	C_{20}
Yhdisteet	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l
naftaleeni	10,2	13,1	15,1	26,1	42,5
asenaftyleeni	0,8	1,8	4,5	18,6	38,2
asenafteeni	0,8	2,6	2,0	20,8	42,7
fluoreeni	4,1	5,3	5,8	16,2	29,6
fenantreeni	4,2	6,1	8,8	22,1	39,6
antraseeni	0,8	1,4	2,7	19,5	37,2
fluoranteeni	2,3	3,6	6,7	23,4	42,9
pyreeni	3,2	4,6	8,0	26,8	48,7
bentso(a)antraseeni	0,4	1,6	2,8	14,1	28,3
kryseeni	0,3	1,5	2,9	16,2	30,6
bentso(b)fluoranteeni	0,1	0,5	1,6	8,8	23,6
bentso(k)fluoranteeni	0,1	0,9	2,2	10,7	25,7
bentso(a)pyreeni	0,1	0,5	1,5	6,5	18,6
dibentso(a,h)antraseeni	0,2	0,9	1,8	9,6	19,2
bentso(g,h,i)peryleeni	0,2	0,9	1,4	8,9	16,4
indeno(1,2,3-cd)pyreeni	0,1	0,8	1,5	8,6	17,0

Taulukkoon 22 on laskettu taulukon 21 arvoista saantoprosentit yhtälön (5) mukaan. Eri-tyisen korkeat saantoprosentit ovat naftaleenin pitoisuuksien 1–2 ng/l näytteillä. Korkeita saantoprosentteja saatiin kuitenkin kaikilla kevyillä PAH-yhdisteillä naftaleenista kryseeniin. Saantoprosentit ovat melko lähellä 100 % raskaimmilla PAH-yhdisteillä bentso(b)fluoranteenista indeno(1,2,3-cd)pyreeniin.

TAULUKKO 22. Määrittämissrajan kartoituksen saantoprosentit

Teoreettinen pitoisuus	1 ng/l	2 ng/l	10 ng/l	20 ng/l
	Saanto ₁	Saanto ₂	Saanto ₁₀	Saanto ₂₀
Yhdisteet	%	%	%	%
naftaleeni	1311	756	261	212
asenaftyleeni	178	227	186	191
asenaftteeni	261	100	208	213
fluoreeni	529	288	162	148
fenantreeni	615	438	221	198
antraseeni	137	137	195	186
fluoranteeni	359	337	234	214
pyreeni	458	401	268	243
bentso(a)antraseeni	159	141	141	141
kryseeni	151	145	162	153
bentso(b)fluoranteeni	53	82	88	118
bentso(k)fluoranteeni	87	110	107	128
bentso(a)pyreeni	52	77	65	93
dibentso(a,h)antraseeni	85	89	96	96
bentso(g,h,i)peryleeni	90	69	89	82
indeno(1,2,3-cd)pyreeni	81	74	86	85

7.5 Vertailukoetulokset

Taulukoihin 23–25 on koottu taulukossa 11 esiteltyjen vertailukoenäytteiden tulokset. Jokaisesta näytteestä oli kaksi rinnakkaista, joista toinen määritettiin SPE-utolla ja toinen HEX-utolla. Taulukoissa esitellään yksittäisten näytteiden mittaustulokset, sekä niiden keskiarvot, keskihajonnat ja suhteelliset keskihajonnat. Suhteellisten keskihajontojen avulla vertailtiin sitä, kuinka yhtenevät tulokset saatiin kahdella eri menetelmällä.

Taulukossa 23 on ensimmäisen vertailukoenäytteen, näytteen numero 907–1/2 tulokset. Mitatut PAH-pitoisuudet vaihtelivat välillä 24,0–189,0 ng/l ja tulosten suhteelliset keskihajonnat vaihtelivat välillä 0,02–18,7 %. Taulukossa 24 on toisen vertailukoenäytteen, näytteen numero 907–3/4 tulokset. Mitatut PAH-pitoisuudet vaihtelivat välillä 19,2–196,4 ng/l ja tulosten suhteelliset keskihajonnat vaihtelivat välillä 0,8–19,1 %. Taulukossa 25 on kolmannen vertailukoenäytteen, näytteen numero 907–5/6 tulokset. Mitatut PAH-pitoisuudet vaihtelivat välillä 9,9–280,9 ng/l ja tulosten suhteelliset keskihajonnat vaihtelivat välillä 0,7–15,5 %.

TAULUKKO 23. Vertailukoenäytteen 907-1/2 tulokset

907-1/2	907-1	907-2			
	SPE	HEX	$x_{1/2}$	$s_{1/2}$	$RSD_{1/2}$
Yhdisteet	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	%
antraseeni	150,9	151,1	151,0	0,10	0,07
fluoranteeni	24,0	24,0	24,0	0,01	0,02
naftaleeni	203,2	174,8	189,0	20,0	10,6
bentso(b)fluoranteeni	113,1	87,4	100,3	18,2	18,1
bentso(k)fluoranteeni	122,0	95,6	108,8	18,7	17,2
bentso(a)pyreeni	22,4	17,2	19,8	3,7	18,7
bentso(g,h,i)peryleeni	51,1	51,4	51,2	0,2	0,4
indeno(1,2,3-cd)pyreeni	105,7	105,8	105,8	0,05	0,04

TAULUKKO 24. Vertailukoenäytteen 907-3/4 tulokset

907-3/4	907-3	907-4			
	SPE	HEX	$x_{3/4}$	$s_{3/4}$	$RSD_{3/4}$
Yhdisteet	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	%
antraseeni	90,6	91,6	91,1	0,7	0,8
fluoranteeni	195,6	164,3	179,9	22,1	12,3
naftaleeni	99,6	82,9	91,2	11,8	12,9
bentso(b)fluoranteeni	222,9	169,8	196,4	37,6	19,1
bentso(k)fluoranteeni	71,2	58,5	64,8	8,9	13,8
bentso(a)pyreeni	130,0	102,3	116,2	19,9	16,9
bentso(g,h,i)peryleeni	20,4	18,0	19,2	1,7	8,9
indeno(1,2,3-cd)pyreeni	43,8	34,8	39,3	6,4	16,2

TAULUKKO 25. Vertailukoenäytteen 907-5/6 tulokset

907-5/6	907-5	907-6			
	SPE	HEX	$x_{5/6}$	$s_{5/6}$	$RSD_{5/6}$
Yhdisteet	ng/l	ng/l	ng/l	ng/l	%
antraseeni	60,6	60,0	60,3	0,4	0,7
fluoranteeni	279,5	282,3	280,9	2,0	0,7
naftaleeni	229,9	204,3	217,1	18,1	8,3
bentso(b)fluoranteeni	33,5	26,9	30,2	4,7	15,5
bentso(k)fluoranteeni	17,9	16,0	16,9	1,3	7,9
bentso(a)pyreeni	94,1	76,4	85,2	12,5	14,7
bentso(g,h,i)peryleeni	9,7	10,0	9,9	0,3	3,0
indeno(1,2,3-cd)pyreeni	11,6	10,3	10,9	0,9	8,1

8 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää Nab Labs Oy:n orgaanisen analytiikan osastolle uusi analyysimenetelmä polyaromaattisten hiilivetyjen määrittämiseen vesinäytteistä. Neste-nesteuuttomenetelmän rinnalle haluttiin kiinteäfaasiuuttomenetelmä yksinkertaistamaan ja nopeuttamaan näytteenkäsittelyä. Kolmoiskvadrupolimassaspektrometrilla mittaamalla haluttiin saavuttaa aikaisempaa alhaisemmat määritysrajat. Opinnäytetyön tarkoituksena oli perustaa analyysimenetelmä, testata sen toimintaa käytännössä ja verrata sitä laboratorion sisäiseen heksaanuuttomenetelmään. Tarkoituksena oli myös määrittää eräitä keskeisiä validointiparametreja ja osallistua menetelmää käyttämällä kansainväliseen vertailukokeeseen.

Kiinteäfaasiuuttomenetelmän pystyttäminen onnistui erinomaisesti ja menetelmä oli helppokäyttöinen. SPE-pylväiden käytön haittapuolena oli niiden pieni pinta-ala, mikä aiheutti melko matalan virtausnopeuden sorbentin läpi. Standardissa SFS-EN 16691 (2015, 11) suositeltiin näytteelle virtausnopeutta 25 ml/min. Pylväitä käsiteltäessä saatiin puhtaalle vedelle virtausnopeuden keskiarvoksi 21 ml/min ja suspensioituneita partikkeleita sisältävälle vedelle 11 ml/min. Kokonaisuudessaan yhden 350 ml näytteen uuttamiseen kului puhtaalla vedellä noin 30 minuuttia ja partikkeleita sisältävällä vedellä noin 45 – 50 minuuttia. Yhden työpäivän aikana sai käsiteltä enintään 8 näytettä. Tavoite näytteenkäsittelyn nopeutumisesta ei siis toteutunut opinnäytetyön aikana. Näytteenkäsittelyä nopeuttaisi useamman näytteen samanaikainen uuttaminen. Käytössä olevalla vakuutussysteemillä ja SPE-pylväillä se on mahdotonta 350 ml:n näyttemäärällä. Siirtyminen SPE-kiekkoihin ja monihaaraiseen suodatusyksikköön voisi nopeuttaa prosessia, mutta vaatisi laitehankintoja ja menetelmän uutta testausta ennen käyttöönottoa.

Menetelmän kalibrointi kolmoiskvadrupolimassaspektrometrille onnistui hyvin (taulukko 13). Eri yhdisteille määritettyjen responssivakioiden suhteellinen keskihajonta oli 7,0–20,7 % eli alle standardissa vaaditun 30 %. Kalibroinnin lineaarisuus oli myös riittävä, sillä lähes kaikkien yhdisteiden standardisuorien korrelaatiokertoimet ovat suurempia kuin 0,99. (SFS-EN 16691 2015, 12–13.) Poikkeuksina olivat bentso(b)fluoranteeni ja bentso(a)pyreeni, joiden korrelaatiokertoimet olivat 0,9895 ja 0,9886. Nämä arvot todettiin kuitenkin hyväksyttäviksi saantokokeiden tulosten perusteella.

Kalibroinnin jälkeisissä SPE-saantokokeissa (taulukko 15) parhaat tulokset 89,3–99,0 % saatiin dibentso(a,h)antraseenille, bentso(g,h,i)peryleenille asenaftyleenille ja indeno(1,2,3-cd)peryleenille. Pienin saanto 63 % oli bentso(a)pyreenillä, mutta kaikilla muilla yhdisteillä saanto oli yli 70 %. Kaikkien tulosten suhteellinen keskihajonta vaihteli välillä 0,2–6,9 %. Tämä oli huomattava parannus ennen kalibrointia saatujen mittaustulosten suhteelliseen keskihajontaan, mikä vaihteli välillä 0,6–35,7 % (taulukko 14). Kalibroinnin jälkeen HEX-uutettujen näytteiden saantoprosentit olivat samaa suuruusluokkaa SPE-uutettujen näytteiden kanssa (taulukko 16). Heksaanilla uutettujen mittaustulosten suhteellinen keskihajonta oli hieman suurempaa ja vaihteli välillä 0,2–16,1 %.

Myös muissa tutkimuksissa eri PAH-yhdisteiden saannot ovat olleet vaihtelevia. Robles-Molina, Gilbert-Lopez, Garcia-Reyes ja Molina-Diaz (2013, 386) ovat määrittäneet SPE-kasetteja käyttämällä PAH-yhdisteille saantotuloksia välillä 70–120 %. Duisburg-Essenin yliopistossa on tutkittu PAH-yhdisteiden määrittämistä SPE-kiekoilla. Werres, Balsaa ja Schmidt (2009, 2236) ovat saaneet opinnäytetyössä tutkituille PAH-yhdisteille saantotuloksia välillä 75–94 % naftaleenista kryseeniin. Myöhemmin Erger, Balsaa, Werres ja Schmidt (2012, 186) ovat määrittäneet saantotuloksia välillä 58–100 % bentso(a)pyreenistä fluoranteeniin. Näihin verrattuna kehitetty SPE-menetelmä vaikuttaa melko onnistuneelta.

Vertailukoenäytteet analysoitiin heti menetelmän kalibroinnin ja alustavien saantotestien jälkeen. Näytteet analysoitiin sekä kiinteäfaasi- että heksaaniuuttomenetelmällä. Mitatut pitoisuudet vaihtelivat yhdisteestä riippuen välillä 9,9–280,0 ng/l ja tulosten suhteelliset keskihajonnat vaihtelivat välillä 0,02–19,1 % (taulukot 23–24). SPE-menetelmällä saatiin useimmissa tapauksissa hieman suuremmat mittaustulokset, mutta rinnakkaisnäytteiden pitoisuudet olivat todella yhteneväiset. Tulokset olivat hyvin lupaavia, kun otetaan huomioon että kyseessä oli todella pienten pitoisuuksien määrittäminen kahdella eri uutto- menetelmällä ja liuottimella. Kun vertailukokeen loppuraportti julkaistaan, mittaustuloksia verrataan määritettyihin vertailuarvoihin ja z-arvoihin (Stuttgartin yliopisto 2016). Tällöin saadaan tietoa menetelmän todellisesta suorituskyvystä.

SPE-menetelmän lineaarisuutta arvioitiin pitoisuusalueella 1–400 ng/l, sillä pienten pitoisuuksien luotettava analysointi oli yksi menetelmäkehityksen päätavoitteista. Työssä haluttiin myös varmistua, että SPE-menetelmä on lineaarinen vertailukoenäytteiden tu-

losten kattamalla pitoisuusalueella 9,9–280 ng/l. Lineaarisuutta arvioitiin erikseen kaikilla yhdisteillä laatimalla taulukoiden 17–20 mittaustuloksista suorat lineaarisella regressiolla. Suorien korrelaatiokertoimet R^2 olivat yli 0,99 kaikilla yhdisteillä, paitsi bentso(a)pyreenillä ja bentso(g,h,i)peryleenillä, joiden korrelaatiokertoimet olivat 0,9894 ja 0,9858. Oli lupaavaa, että jopa 1 ng/l mittaustulokset olivat lineaarisia muihin nähden. Tämä pitoisuus on erittäin pieni ja todennäköisesti hyvin lähellä menetelmän määrittysrajaa tai sen alle. Menetelmä todettiin lineaariseksi tutkitulla pitoisuusalueella

Ideaalitapauksessa regressiosuoran kulmakerroin olisi 1,00 kaikille yhdisteille. Tällöin menetelmä antaisi standardiliuoksille täsmälleen teoreettiset pitoisuusarvot. Kulmakerroimet ja mittaustulosten arvot ovat kuitenkin jopa 1,3 – 1,8 kertaa ideaalitapausta suurempia erityisesti kevyillä PAH-yhdisteillä naftaleeni, asenaftyleeni, asenafteeni, fluoreeni, fenantreeni, antraseeni, fluoranteeni ja pyreeni (taulukot 17 ja 18). Raskaammilla PAH-yhdisteillä tätä ongelmaa ei ilmennyt (taulukot 19 ja 20). Kevyillä PAH-yhdisteillä esiintyi siis liian suuria mittaustuloksia, mutta virhe oli systemaattinen ja lineaarinen kulmakin yhdisteellä. Tämä viittaa siihen, että sisäisen standardin kevyempien komponenttien D8-naftaleeni ja D10-antraseeni pitoisuus näytteessä on pienentynyt, jolloin laskennalliset tulokset kasvavat. 2-renkainen naftaleeni ja 3-renkainen antraseeni ovat alttiita haihtumaan pois näytteestä esimerkiksi liian voimakkaan typpivirran seurauksena (Walker 2009, 183; SFS-EN 16691 2015, 11). Todennäköisesti D8-naftaleeni ja D10-antraseeni ovat päässeet haihtumaan näytteestä näytteenkäsittelyn aikana joko uuttoprosessin kuivausvaiheessa tai näytteitä ajotilavuuteen haihdutettaessa. On myös mahdollista, että komponentit ovat päässeet käytön aikana haihtumaan asetoniin laimennetusta sisäisen standardin PAH-ISTD käyttöliuoksesta.

Menetelmän kehitystä jatkettaessa täytyy paikallistaa ja korjata lineaarisuusmittauksissa havaittu ongelma kevyiden PAH-yhdisteiden pitoisuuksissa. Tätä varten tulee analysoida kahdet rinnakkaiset testinäytteet vanhasta ja uudesta sisäisen standardin laimennoksesta. Toiset näytteet viedään koko näytteenkäsittelyprosessin läpi ja toiset valmistetaan suoraan uuttoliuottimeen haihdutusvaiheeseen. Mikäli ongelma johtuu vanhasta PAH-ISTD-liuoksesta, hylätään vanha laimennos. Mikäli ongelma johtuu liian nopeasta ajotilavuuteen haihduttamisesta, noudatetaan jatkossa suurempaa varovaisuutta. Werres ym. (2009, 2237–2239) osoittivat, että PAH-yhdisteiden saanto on sitä heikompi, mitä enemmän näytettä joutuu konsentroimaan. Mikäli ongelma johtuu uuttoprosessin kuivausvaiheesta,

täytyy menetelmän kalibrointi suorittaa uudelleen siten, että kalibrointiliuokset valmistetaan veteen ja viedään koko uuttoprosessin läpi. Näin mahdolliset sisäisen standardin häviöt huomioidaan jo responssivakioita määritettäessä.

Määritysrajan suuruusluokkaa arvioitiin alustavasti mittaamalla nollanäyte ja pienten pitoisuuksien näytteitä välillä 1–20 ng/l (taulukko 21 ja 22). Mittaustuloksista voidaan todeta, että raskaat PAH-yhdisteet bentso(b)fluoranteenista indeno(1,2,3-cd)pyreeniin antavat erinomaisia tuloksia jopa 1 ng/l pitoisuudella, mikä viittaa alhaisiin määritysrajoihin. Kevyemmällä PAH-yhdisteillä tulokset ovat huomattavasti laskennallisia pitoisuuksia suurempia, eikä niistä voi vetää luotettavia johtopäätöksiä. Ennen määritysrajojen lopullista määrittämistä tulee selvittää lineaarisuusmittausten yhteydessä havaittu kevyiden PAH-yhdisteiden kalibrointiongelman. Naftaleenin tapauksessa täytyy myös selvittää kontaminaation mahdollisuus, sillä nollanäytteestä mitattiin jopa 10,2 ng/l naftaleenia. Laboratorion sisäisellä heksaaniuuttomenetelmällä määritysraja on 10 ng/l kaikille tutkituille PAH-yhdisteille (Tabell 2009).

Erilaisilla SPE-menetelmillä on muissa tutkimuksissa saatu melko vaihtelevia määritysrajoja. Erger ym (2012, 185) määrittivät SPE-kiekoilla PAH-yhdisteille määritysrajat välillä 7,2 – 25 ng/l bentso(g,h,i)peryleenistä naftaleeniin. Robles-Molina ym. (2013, 389) puolestaan saivat SPE-kaseteilla PAH-yhdisteiden määritysrajat jopa välille 0,03 – 5 ng/l. Stuttgartin yliopiston järjestämässä vertailukokeessa tavoitemääritysrajat asetettiin pienimmillään 0,3 ng/l bentso(b)fluoranteenille ja suurimmillaan 30 ng/l naftaleenille sekä antraseenille (taulukko 12). Muille vertailukokeen yhdisteille määritysrajoiksi edellytettiin 2 – 5 ng/l. Bentso(b)fluoranteenia lukuun ottamatta näitä voidaan pitää melko realistisina ja mahdollisina tavoitteina menetelmän jatkokehittämissä.

Opinnäytetyön aikana kehitettiin onnistuneesti kiinteäfaasiuuttomenetelmä 16 PAH-yhdisteen analysointiin vesinäytteistä kolmoiskvadrupolimassaspektrometrille. Kehitystyön aikana saatiin arvokasta pohjatietoa SPE-menetelmän käytännöllisyydestä ja suorituskyvystä jatkokehittelyä varten. Lisätietoa saatiin myös laboratorion sisäisen heksaaniuuttomenetelmän suorituskyvystä. SPE-menetelmän jatkokehittämissä tulee aluksi keskittyä kevyiden PAH-yhdisteiden kalibroinnin parantamiseen. Tämän jälkeen voidaan määrittää määritysrajat sekä mahdollisesti laajentaa lineaarista mittausaluetta. Ennen menetelmän käyttöönottoa tulee myös suorittaa laajempi validointi ja mahdollinen akkreditointi. Menetelmän suorituskyky vaikuttaa kuitenkin opinnäytetyön perusteella erittäin lupaavalta.

LÄHTEET

2000/60/EY. 2000. Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi yhteisön vesipolitiikan puitteista. Euroopan yhteisöjen virallinen lehti L327, 1–72.

2008/105/EY. 2008. Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi ympäristölaatuunormeista vesipolitiikan alalla. Euroopan unionin virallinen lehti L384, 84–97.

2013/39/EU. 2013. Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi direktiivien 2000/60/EY ja 2008/105/EY muuttamisesta vesipolitiikan alan prioriteettiaineiden osalta. Euroopan unionin virallinen lehti L261, 1–17.

Agilent Technologies. 2011. Agilent 7000 Series Triple Quadrupole GC/MS System. Concepts Guide. 2.painos. Agilent Technologies, Inc.

Aqeel, Z., Sadjadi, S. & Pike, E. 2010. Improved Recoveries of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) as Defined in EPA 550.1 and Simultaneous Removal of Humic Acids from Water Using Strata® PAH. [pdf]. Luettu 25.9.2015. http://phx.phenomenex.com/lib/tn82831010_1.pdf.

Dean, J. 2009. Extraction Techniques in Analytical Sciences. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.

Dukkipati, R. 2011. Probability and Statistics. Tunbridge Wells: New Academic Science Ltd.

Ehder, T. 2005. Kemian metrologian opas. J6/2006. Helsinki: Mittatekniikan keskus.

Erger, C., Balsaa, P., Werres, F. & Schmidt, T. 2012. Multi-component trace analysis of organic xenobiotics in surface water containing suspended particular matter by solid phase extraction/gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1249, 181–189.

Evira. 2009. Elintarvikkeiden ja talousveden kemialliset vaarat. Eviran julkaisuja 13/2009. [pdf]. Luettu 14.3.2016. http://www.evira.fi/attachments/elintarvikkeet/elintarvikkeiden_ja_talousveden_kemialliset_vaarat.pdf.

Harris, D. 2010. Quantitative Chemical Analysis. 8. painos. New York: W. H. Freeman and Company.

Hiltunen, E., Linko, L., Hemminki, S., Hägg, M., Järvenpää, E., Saarinen, P., Simonen, S. & Kärhä, P. 2011. Laadukkaan mittaamisen perusteet. J4/2011. Espoo: Mittatekniikan keskus.

Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. 6. painos. Helsinki: Edita.

McMurry, J. 2011. Fundamentals of Organic Chemistry. 7. painos. Belmont: Brooks/Cole/Cengage Learning.

National Analytical Corporation. 2016. POLYBOND C8-ne SPE CARTRIDGE. Luettu 12.2.2016. <http://www.nationalanalyticalcorp.com/polybond-c8-ne-spe-cartridge-1576387.html>.

NIST. 2015. Certificate of Analysis. Standard Reference Material® 1649b Urban Dust. [pdf]. Luettu 27.2.2016. <https://www-s.nist.gov/srmors/certificates/1649b.pdf>.

Phenomenex. 2013. Strata Silica-Based Solid Phase Extraction (SPE) Sorbents. [pdf]. Luettu 2.1.2016. <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/96ffdd27-9d9e-466d-800b-c5f70bed7166.pdf>.

Purchase, I. 1994. Current knowledge of mechanisms of carcinogenicity: genotoxic vs. non-genotoxic. *Human and Experimental Toxicology* 13, 17–28.

Robles-Molina, J., Gilbert-Lopez, B., Garcia-Reyes, J. & Molina-Diaz, A. 2013. Comparative evaluation of liquid-liquid extraction, solid-phase extraction and solid-phase microextraction for the gas chromatography-mass spectrometry determination of multiclass priority organic contaminants in wastewater. *Talanta* 117, 382–391.

SFS-EN 16691. 2015. Water quality. Determination of selected polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in whole water samples. Method using solid phase extraction (SPE) with SPE-disks combined with gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). Helsinki: Suomen Standardoimisliitto SFS ry.

Sosiaali- ja terveystieteiden ministeriön asetus 1352/2015 talousveden latuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista. 17.11.2015/1352.

Stuttgartin yliopisto. 2015. Proficiency test 9/15 – WFD. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) with suspended solids in surface water. [pdf]. Julkaistu 21.5.2015. Luettu 11.9.2015. http://www.ats.rs/sites/default/files/download/announcement_wfdpt_pah_2015.pdf.

Stuttgartin yliopisto. 2016. Proficiency tests. Luettu 4.4.2016. <http://www.iswa.uni-stuttgart.de/ch/aqs/rv/index.en.html>.

Tabell, M. 2009. O-Y-098 PAH-vesi. Versio 9. [Intranet]. Nab Labs Oy Quality Handbook.

Valvira. 2015. Talousvesiasetuksen soveltamisohje. Osa III: Enimmäisarvojen perusteet. [pdf]. Julkaistu 7.10.2015. Luettu 14.3.2016. http://www.valvira.fi/ymparistoterveys/terveydensuojelu/talousvesi/talousvesiasetuksen_soveltamisohje.

Walker, C. 2009. Organic Pollutants. An Ecotoxicological Perspective. 2. painos. Lontoo: Taylor & Francis Group.

Wells, M. 2003. Principles of Extraction and the Extraction of Semivolatile Organics from Liquids. Teoksessa Mitra, S. (ed.) *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 37–138.

Werres, F., Balsaa, P. & Schmidt, T. 2009. Total concentration analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples with high suspended particulate matter content. *Journal of Chromatography A* 1216 (12), 2235–2240.

LIITTEET

Liite 1. PAH-standardiliuokset

Yhdiste	CAS-numero	AccuStandard	Dr. Ehrenstorfer
		PAH Mix Z-014G	PAH Mix 39
		mg/ml	mg/l
asenafteeni	83-32-9	2,0	50,0
asenaftyleeni	208-96-8	2,0	100,0
antraseeni	120-12-7	2,0	10,0
bentso(a)antraseeni	56-55-3	2,0	25,0
bentso(a)pyreeni	50-32-8	2,0	25,0
bentso(b)fluoranteeni	205-99-2	2,0	25,0
bentso(g,h,i)peryleeni	191-24-2	2,0	50,0
bentso(k)fluoranteeni	207-08-9	2,0	10,0
kryseeni	218-01-9	2,0	25,0
dibentso(a,h)antraseeni	53-70-3	2,0	50,0
fluoranteeni	206-44-0	2,0	50,0
fluoreeni	86-73-7	2,0	25,0
indeno(1,2,3-cd)pyreeni	193-39-5	2,0	100,0
naftaleeni	91-20-3	2,0	100,0
fenantreeni	85-01-8	2,0	50,0
pyreeni	129-00-0	2,0	50,0

Liite 2. SPE-menetelmän kalibroinnin mittaustulokset

Teoreettiset pitoisuudet Yhdisteet	50 ng/ml	100 ng/ml	200 ng/ml	500 ng/ml	1000 ng/ml	2000 ng/ml	R ²
naftaleeni	72,3	182,6	287,3	764,5	1504,1	3241,1	0,9984
asenaftyleeni	50,8	128	205,9	521,1	1064,6	2305,4	0,9981
asenafteeni	54,8	130,9	208,9	524,5	1049,4	2211,6	0,999
fluoreeni	111,7	272,4	395,9	1210,1	2063,3	4670,2	0,9955
fenantreeni	67	151	247	674,9	1294,1	2849,8	0,9977
antraseeni	86,3	217,5	322,8	852,2	1669,8	3619	0,998
fluoranteeni	30,7	66,1	101,1	235,2	539,9	1280	0,9909
pyteeni	32,8	75,9	118,4	285,1	628,6	1443,9	0,994
bentso(a)antraseeni	58,1	145,5	237,6	637,8	1390,2	3191,1	0,995
kryseeni	98,3	233,3	334,1	884,8	1644,5	3519,9	0,9983
bentso(b)fluoranteeni	25,4	71,8	148,4	336,6	854,5	2072,8	0,9895
bentso(k)fluoranteeni	44	114,6	180	464,6	953,5	2194,5	0,995
bentso(a)pyreeni	26,9	72,7	125,1	332	803,4	1995,2	0,9886
dibentso(a,h)antraseeni	75,1	160,8	275,9	751,6	1546,2	3630,2	0,9941
bentso(g,h,i)peryleeni	92,5	205,7	370,8	1165,5	2174,9	4763,5	0,9981
indeno(1,2,3-cd)pyreeni	76,3	171	310	877	1845,6	4202,8	0,9962

Liite 3. SPE-menetelmän kalibroinnin responssilaskenta

Teoreettiset pitoisuudet	50 ng/ml	100 ng/ml	200 ng/ml	500 ng/ml	1000 ng/ml	2000 ng/ml
Yhdisteet	RF	RF	RF	RF	RF	RF
naftaleeni	0,692	0,548	0,696	0,654	0,665	0,617
asenaftyleeni	0,984	0,781	0,971	0,960	0,939	0,868
asenafteeni	0,912	0,764	0,957	0,953	0,953	0,904
fluoreeni	0,448	0,367	0,505	0,413	0,485	0,428
fenantreeni	0,746	0,662	0,810	0,741	0,773	0,702
antraseeni	0,579	0,460	0,620	0,587	0,599	0,553
fluoranteeni	1,629	1,513	1,978	2,126	1,852	1,563
pyreeni	1,524	1,318	1,689	1,754	1,591	1,385
bentso(a)antraseeni	0,861	0,687	0,842	0,784	0,719	0,627
kryseeni	0,509	0,429	0,599	0,565	0,608	0,568
bentso(b)fluoranteeni	1,969	1,393	1,348	1,485	1,170	0,965
bentso(k)fluoranteeni	1,136	0,873	1,111	1,076	1,049	0,911
bentso(a)pyreeni	1,859	1,376	1,599	1,506	1,245	1,002
dibentso(a,h)antraseeni	0,666	0,622	0,725	0,665	0,647	0,551
bentso(g,h,i)peryleeni	0,541	0,486	0,539	0,429	0,460	0,420
indeno(1,2,3-cd)pyreeni	0,655	0,585	0,645	0,570	0,542	0,476

Liite 4. Saantokokeiden mittaustulokset

Yhdiste	SPE ₁		SPE ₂		SPE ₃		SPE ₄		HEX ₁		HEX ₂	
	Saanto ₁ %	%	Saanto ₂ %	%	Saanto ₃ %	%	Saanto ₄ %	%	Saanto ₁ %	%	Saanto ₁ %	Saanto ₂ %
naftaleeni	121	117	84	83	84	83	84	85	84	84	85	85
asenaftyleeni	206	219	90	97	90	97	84	98	84	84	98	98
asenafteeni	201	210	85	93	85	93	78	91	78	78	91	91
fluoreeni	786	469	84	82	84	82	86	73	86	86	73	73
fenantreeni	327	279	73	75	73	75	85	79	85	85	79	79
antraseeni	117	118	71	75	71	75	82	66	82	82	66	66
fluoranteeni	379	314	66	72	66	72	70	85	70	70	85	85
pyreeni	316	292	67	74	67	74	70	88	70	70	88	88
bentso(a)antraseeni	127	107	87	89	87	89	81	83	81	81	83	83
kryseeni	136	134	70	71	70	71	71	70	71	71	70	70
bentso(b)fluoranteeni	105	101	73	78	73	78	73	86	73	73	86	86
bentso(k)fluoranteeni	102	113	70	70	70	70	92	88	92	92	88	88
bentso(a)pyreeni	75	53	61	63	61	63	70	79	70	70	79	79
dibentso(a,h)antraseeni	83	80	99	99	99	99	86	86	86	86	86	86
bentso(g,h,i)peryleeni	64	40	88	94	88	94	103	88	103	103	88	88
indeno(1,2,3-cd)pyreeni	71	63	86	92	86	92	94	91	94	94	91	91

Liite 5. Määrittämissuorituksen kartoittamisen mittaustulokset

Teoreettinen pitoisuus	0 ng/l	1 ng/l	1 ng/l	2 ng/l	10 ng/l	10 ng/l	10 ng/l	20 ng/l
Yhdisteet	C_0 ng/l	C_{1A} ng/l	C_{1B} ng/l	C_2 ng/l	C_{10A} ng/l	C_{10B} ng/l	C_{20} ng/l	
naftaleeni	10,2	12,5	13,7	15,1	26,8	25,4	42,5	
asenaftyleeni	0,8	2,1	1,5	4,5	18,4	18,9	38,2	
asenafteeni	0,8	3,0	2,3	2,0	20,6	20,9	42,7	
fluoreeni	4,1	5,3	5,3	5,8	16,3	16,0	29,6	
fenantreeni	4,2	6,5	5,8	8,8	22,7	21,5	39,6	
antraseeni	0,8	1,4	1,3	2,7	19,5	19,6	37,2	
fluoranteeni	2,3	3,6	3,6	6,7	23,8	22,9	42,9	
pyreeni	3,2	4,7	4,4	8,0	27,7	26,0	48,7	
bentso(a)antraseeni	0,4	1,7	1,5	2,8	14,0	14,2	28,3	
kryseeni	0,3	1,5	1,5	2,9	16,0	16,5	30,6	
bentso(b)fluoranteeni	0,1	0,6	0,5	1,6	8,7	8,9	23,6	
bentso(k)fluoranteeni	0,1	0,8	0,9	2,2	10,0	11,4	25,7	
bentso(a)pyreeni	0,1	0,5	0,5	1,5	5,6	7,4	18,6	
dibentso(a,h)antraseeni	0,2	0,8	0,9	1,8	10,0	9,3	19,2	
bentso(g,h,i)peryleeni	0,2	0,9	0,9	1,4	8,5	9,2	16,4	
indeno(1,2,3-cd)pyreeni	0,1	0,7	0,9	1,5	8,0	9,3	17,0	