

**GEOSMIININ JA 2-METYyli-ISOBORNEOLIN MÄÄRITTÄMINEN  
KIERTOVIKESIPERIAATTEELLA TOIMIVAN KALANVILJELY-  
LAITOKSEN PROSESSIVEDESTÄ**

Jari Lappi

Pro gradu -tutkielma

Biotiede

Luonnontieteiden ja metsätieteiden tiedekunta

Itä-Suomen yliopisto

Elokuu 2012

## ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO

Luonnontieteiden ja metsätieteiden tiedekunta, Biotiede, Elintarvikebiotekniikan muuntokoulutus /  
Sotkamo

LAPPI JARI: Geosmiinin ja 2-metyyli-isoborneolin määrittäminen kiertovesiperiaatteella toimivan  
kalanviljelylaitoksen prosessivedestä

Pro gradu tutkielma, 38 sivua

Tutkielman ohjaajat: Dosentti Olavi Raatikainen  
FM Kaisa Raninen  
Professori Atte von Wright

Elokuu 2012

---

Avainsanat: Geosmiini, 2-metyyli-isoborneoli, kiertovesiviljely, sivumaku

Geosmiini ja 2-metyyli-isoborneoli ovat kaksi yleisintä ainetta, jotka aiheuttavat veteen epämiellyttävää hajua ja makua. Nämä aineet ovat ongelma erityisesti kiertovesiperiaatteella toimivassa kalankasvatuksessa. Maku siirtyy vedestä kaloihin ja niistä saataviin tuotteisiin. Tämän tutkimuksen tarkoituksena on perehtyä ongelmaan ja saada lisätietoa mahdollisille jatkotutkimuksille ongelman poistamiseksi.

Tämän opinnäytetyön päätarkoituksena oli määrittää 2-metyyli-isoborneoli- ja geosmiinipitoisuudet kiertovesiperiaatteella toimivan kalanviljelylaitoksen vedestä syksyisin esiintyvän hajuongelman aikana. Tätä ennen tuli kehittää analyysimenetelmä ko. aineiden määrittämiseksi alle ihmisen tunnistaman pitoisuuden soveltaen kirjallisuudessa kuvattuja menetelmiä.

Tutkimus on jatkoa vuonna 2010 tehdylle projektityölle, jossa kehitettiin menetelmä geosmiinin määrittämiseksi vedestä. Tässä työssä menetelmään lisättiin 2-metyyli-isoborneolin määrittäminen sekä kehitettiin menetelmää.

Tämän opinnäytetyön tuloksena saatiin analyysimenetelmä pitoisuusalueelle 0 - 6 ng/l. Suhteellinen keskihajonta 4 ng/l tasolla on 23,0 % 2-metyyli-isoborneolilla ja 42,6 % geosmiinilla. Ihmisen tunnistaa 2-metyyli-isoborneolin alimmillaan 0,6 ng/l tasolla ja geosmiinin 1 ng/l tasolla. Tutkimuksen aikana huomattiin näytteiden laimenevan muovisissa näytepulloissa. Tehtiin säilyvyyskokeet, joiden tuloksien perusteella määritettiin haihtumisen reaktiokineettinen yhtälö. Yhtälöstä ratkaistiin puoliintumisaika. Tämän ja säilytysajan perusteella määritettiin näytteen alkuperäinen pitoisuus.

Syksyn tutkimusjakson aikana 2-metyyli-isoborneolin pitoisuudet olivat korkeammat kuin geosmiinin sekä prosessiin tulevassa järvivedessä että itse prosessivedessä. Kummankin aineen pitoisuudet prosessivedessä olivat korkeammat kuin tulevassa vedessä, mikä viittaa näiden aineiden muodostumiseen prosessin aikana. Tuloveden lämpötilan laskettua alle 15 °C:n, sekä 2-metyyli-isoborneoli- että geosmiinipitoisuus laski lähes nolnaan. Tämän tutkimuksen johtopäätöksenä voidaan esittää tulovedessä tulevat ainesosat toimivat MIB:a ja GSM:a tuottavien mikrobien kasvualustana prosessivedessä. Tämä todettiin samanaikaisesti ja samansuuntaisesti vaihtuvista MIB- ja GSM-pitoisuuksista sekä tulo- että prosessivedessä.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND

Faculty of Science and Forestry, Bioscience, Master's Degree Programme in Food Biotechnology /  
Sotkamo

LAPPI JARI: Quantification of 2-methylisoborneol and geosmin from the process water of  
recirculating aquaculture systems

Master thesis, 38 pages

Supervisors: Adjunct professor Olavi Raatikainen  
M.Sc. Kaisa Raninen  
Professor Atte von Wright

August 2012

---

Key words: geosmin, 2-methylisoborneol, recirculating aquaculture systems (RAS), off-taste

Geosmin and 2-methylisoborneol are two of the most commonly occurring chemicals attributed to the unpleasant taste and odor of water. These substances cause trouble especially in recirculating aquaculture systems (RAS). The odor from water is transferred to fishes and the food products. The purpose of this research is to familiarize with the problem to gain more information for the decisions concerning further studies to eliminate the occasion.

The main purpose of this study was to quantify 2-methylisoborneol and geosmin concentrations in the water of fish farm using RAS during the autumn 2011. Prior to the quantification, a method had to be developed for concentrations below detection limit of human sense of smell by applying methods in the literature.

This study is a continuation of the project work where the method of geosmin quantification in the water was developed. The quantification of 2-methylisoborneol was attached to the method and the method was further developed.

As a result of this study a quantification method was gained with the measuring range from 0 – 6 ng/l. Relative standard deviation at 4 ng/l level, 23,0 % for 2-methylisoborneol and 42,6 % for geosmin. Human detection limit is 0,6 ng/l for 2-methylisoborneol and 1 ng/l for geosmin at the lowest. Dilution was noticed in the plastic sample vessel. Preservability tests were carried out. From the results of these tests, the reaction kinetics equation for both substances was defined. Half-life of both substances was calculated from the equation. By means of half-life and preservation time the original concentration of the sample was calculated.

During the research period the concentration of 2-methylisoborneol was higher than geosmin concentration in both process water and incoming lake water. The concentration of both agents was higher in process water than in incoming water, which indicates formation of these substances in the process. After the temperature of incoming water decreased below 15 °C, the concentration of both agents decreased close to zero. The most obvious conclusion from this study is that the ingredients of the incoming natural water are a source of growth medium for microbes producing these agents in the process water. This was evidenced by the simultaneous and parallel concentration changes in the incoming and in the process water.

## **Alkusanat**

Tämän pro gradu -tutkielman kokeellinen osuus on tehty Itä-Suomen yliopiston elintarvikkeiden terveysvaikutusten tutkimuskeskuksessa Kuopiossa 15.8.2011 - 19.12.2011.

Kiitän suuresti kalanviljelylaitosta, että sain tehdä tämän mielenkiintoisen ja monipuolisen työn. Kiitän kaikkia ohjaajiani Olavia, Kaisaa ja Attea hyvästä, innostavasta ja asiantuntevasta ohjauksesta. Kiitos henkisestä tuesta kuuluu etenkin kumppanilleni Kirstille ja myös äidilleni Anjalle, anopilleni Martalle sekä kaikille hyvälle ystäväilleni, sukulaisille ja opiskelukavereille. Kiitos kuuluu ihan kaikille mukana olleille.

Etukäteen minulla oli vain pieni aavistus, mitä kaikkea nyt päätökseen saamani opiskelu tulisi vaatimaan. Jos olisi pyydetty varautumaan noin 35000 km:n autolla ajamiseen, reilun 40000 euron rahallisiin kustannuksiin ansionmenetyksineen ja joskus raastavankin raskaaseen työtaakkaan, olisin erittäin todennäköisesti jättänyt tämän vaihtoehdon valitsematta. Taloudellisesti ajateltuna sijoitus ei välttämättä ollut paras mahdollinen mm. ikäni takia, mutta kaikki uhraukset todellakin kannattivat. Henkisen pääoman monella eri tasolla tapahtuneella kasvulla on ollut minulle mittaamattoman suuri arvo. Näillä sanoilla annan suurimmat kiitokseni ystävälleni Martti Kaskenmaalle, joka päättäväisesti kehotti ja kannusti minua kohti yliopisto-opintoja.

Tutkielma oli todellinen oppimisprosessi monella eri tavalla sekä minulle että ohjaajille. Laboratoriotekniseltä puolelta on mainittava massaspektrometri, joka oli minulle aivan uutta ja mielenkiintoista. Kaasukromatografia olen käyttänyt paljon, mutta tässä työssä käytetyt erittäin pienet pitoisuudet ja veteen liuenneiden kaasujen keräys olivat täysin uusi maailma. Sokerina pohjalla ovat ne useat onnistumisen ja ”keksimisen” tunteet.

Lopuksi lainaan hankkimaani graduopasta, joka teki monella tavalla minuun suuren vaikutuksen, mutta yksi lause siinä kiteytti oleellisen: ”Jokaisen graduntekijän matka on pieni tai suuri sankaritarina. Niin käy, vaikka jokaisen polkunsä kulkeneen sankarin nimeä ei lovetakaan kotikylän kansakoulun juhlasalin seinään pultattuun kivitauluun” (Hakala, 2009).

# SISÄLTÖ

<b>1. JOHDANTO .....</b>	<b>5</b>
<b>2. TEOREETTINEN TAUSTA.....</b>	<b>6</b>
2.1. VEDEN LAATUUN VAIKUTTAVIA TEKIJÖITÄ .....	6
2.1.1. 2-metyyli-isoborneoli, MIB.....	6
2.1.2. Geosmiini, GSM.....	7
2.1.3. MIB:a ja GSM:a tuottavia mikrobeja .....	8
2.2. KIERTOVIKESIMENETELMÄLLÄ TOIMIVA KALANVILJELYLAITOS.....	9
2.2.1. Kiertovesilaitosprosessi .....	10
2.2.2. MIB ja GSM kiertovesilaitoksella.....	11
2.2.3. Menetelmiä MIB:n ja GSM:n poistamiseksi .....	12
2.3 GC-MS- JA SPME -MENETELMIEN PERIAATTEET .....	13
2.3.1. Kaasukromatografia.....	13
2.3.2. Massaspektrometria .....	14
2.3.3. SPME-tekniikka .....	15
2.3.4. Muissa tutkimuksissa käytettyjä MIB:n ja GSM:n näytteenkäsittelymenetelmiä.....	16
<b>3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....</b>	<b>18</b>
3.1. STANDARDIAINEET .....	18
3.2. MITTAUSLAITTEISTO .....	18
3.3. MENETELMÄN KEHITTÄMINEN.....	18
3.4. ANALYYSIN SUORITTAMINEN .....	19
3.5. MENETELMÄN VALIDOINTI .....	20
3.6. VESINÄYTTEIDEN OTTO JA SÄILYTYS.....	22
3.7. SÄILYVYYSKOKEET .....	22
<b>4. TULOKSET .....</b>	<b>23</b>
4.1. MENETELMÄ.....	23
4.2. VESINÄYTTEET .....	24
4.2.1. Säilyvyyskoe.....	24
4.2.2. Pitoisuudet allas- ja tulovedessä.....	25
4.3. MIB- JA GSM-PITOISUUKSIEN KORRELAATIO JÄRVEN PINTAVEDEN LÄMPÖTILAAN.....	26
<b>5. POHDINTA.....</b>	<b>28</b>

## 1. JOHDANTO

Geosmiini (myöhemmin GSM) ja 2-metyyli-isoborneoli (myöhemmin MIB) ovat kaksi yleisintä pintavesistä saatujen juomavesien maku- ja hajuhaittojen aiheuttajaa (Srinivasan & Sorial, 2011). Nämä syntyvät erilaisten mikrobien metaboliitteina. Näitä aineita on löydetty myös muun muassa sisäilmasta, kalan kudoksista ja ruuista (Saito ym., 2008). Maku- ja hajuhaitoista koituu kalankasvattajille suuret kustannukset, kun joudutaan käyttämään suuria määriä puhdasta vettä kalojen saamiseksi myyntikelpoisiksi (Guttman & van Rijn, 2008). Maku/haju siirtyy myös kalasta saataviin tuotteisiin. Maku- ja hajuhaitat ovat ongelma erityisesti kiertovesiperiaatteella toimivissa kalanviljelylaitoksissa.

MIB:n ja GSM:n tiedetään aiheuttavan vain maku- ja hajuhaittoja. MIB:lla ja GSM:lla on osoitettu olevan mutageenisia ja hepatotoksisia ominaisuuksia, mutta ihmiselle vaarallisia pitoisuuksia ei ole havaittu (Saito ym., 2008). Aivan viimeaikaisessa tutkimuksessa on todettu geosmiinin biohajoavan saksitoksiineiksi, joilla voi olla vakaviakin terveysvaikutuksia ihmiseen (No ym., 2012). Australialaisen tutkimuksen mukaan hajoaminen edellyttää usean tietyn aineen ja mikrobin samanaikaista läsnäoloa. On epätodennäköistä, että nämä lämpimien vesien mikrobit olisivat Suomen kylmissä vesissä, mutta ilmaston lämpenemisen vaikutuksia tulevaisuudessa ei tiedetä.

Tämän opinnäytetyön lähtökohtana oli kiertovesiperiaatteella toimivalla laitoksella havaittu, elo-syyskuussa kaloissa esiintyvä, maku- ja hajuongelma. Laitos käyttää vetenä kiertovesijärjestelmässä luonnon vettä, joka otetaan paikallisesta järvestä. Oli selvitettävä, johtuuko maku- ja hajuhaittojen kasvu MIB:stä vai GSM:stä ja missä prosessin vaiheessa aineet mahdollisesti syntyvät vai tulevatko ne luonnon veden mukana. Paha haju ja maku on saatu pois siirtämällä myytäväksi tarkoitetut kalat joksikin aikaa puhtaaseen veteen, mutta tämä aiheuttaa kustannuksia.

Työn tarkoituksena oli antaa tietoa yritykselle aineiden esiintymisestä prosessissa ja lisätietoa mahdollisten jatkotutkimus- tai toimintapäätösten pohjaksi, jotta ongelma saataisiin poistettua. Suomessa tehtyjä MIB- tai GSM-tutkimuksia ei löytynyt. Muualla tehdyt tutkimukset eivät puolestaan ole suoraan vertailukelpoisia Suomessa tehtäviin tutkimuksiin, koska mm. lämpötila, mikrobikannat ja valon määrä poikkeavat toisistaan. Toisaalta vain yhteen järjestelmään kohdistuvia, yrityskohtaisia mittaustuloksia ei yleensä raportoida julkisesti, joten tietoa maku- ja hajuhaitoista ei ole helposti saatavilla.

Koska ihmisenä pystyy aistimaan hyvin pieniä ko. aineiden pitoisuuksia, alimmillaan 9 ppt MIB:lle ja 4 ppt GSM:lle (Saito ym., 2008) (ppt = parts per trillion = miljoonasosan miljoonasosa = ng/l), piti kehittää herkkä, mutta mahdollisimman yksinkertainen menetelmä aineiden luotettavaan määrittämiseen käytettävissä olevin laitteistoin. Työn tavoitteena oli saada validoitua menetelmä tehdyn validointisuunnitelman mukaisesti sekä käyttää sisäistä standardia menetelmän luotettavuuden varmistamiseksi. Tämän työn teon jälkeen on tullut uusi tutkimus, jossa ihmisenän detektorajaksi on määritetty 0,6 ppt MIB:lle ja 1 ppt GSM:lle (Braga ym., 2012).

## 2. TEOREETTINEN TAUSTA

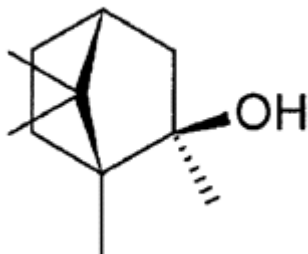
### 2.1. Veden laatuun vaikuttavia tekijöitä

Kiertovesilaitoksen veden laatuun vaikuttavat monet tekijät. Veden kiintoainepitoisuus on yksi tekijöistä. Osa kiintoaineesta on kalojen jätettä, osa kaloilta syömättä jäänyttä rehua. Kiintoainetta tulee myös tulovedestä. Kiintoaineiden nopealla poistolla parannetaan veden laatua. Rehun vaikutus on myös suuri. Sen sisältämällä ravinteilla on vaikutus mikrobistoon, mutta myös muiden yhdisteiden mm. fosforin ja muiden metallien mahdollisen kerääntymisen takia. Ammoniakin, nitriitin, nitraatin, hiilidioksidin ja hapen määrä sekä pH ovat merkittäviä veden laatuun vaikuttavia tekijöitä. Huonolla veden laadulla tai liian suurella kalatiheydellä tiedetään olevan yhteys erilaisiin kalasairauksiin, joten oikeat toimintaperiaatteet ovat tärkeitä menestyksellisessä kiertovesiviljelyssä (Noble & Summerfelt, 1996). MIB:n ja GSM:n lisäksi muita tunnettuja veteen hajua antavia aineita ovat 2,4,6-trikloroanisoli (TCA), 2-isopropyyli-3-metoksi-pyratsiini (IPMP), ja 2-isobutyryyli-3-metoksi-pyratsiini (IBMP), mutta näiden pitoisuudet ovat huomattavasti pienemmät kuin MIB:n ja GSM:n ja siksi näiden merkitys on vähäisempi (Sun ym., 2012).

#### 2.1.1. 2-metyyli-isoborneoli, MIB

MIB:n kemiallinen nimi on (1*R*-*exo*)-1,2,7,7-tetrametyylibisyklo[2.2.1]heptan-2-oli. Se on puolihaihtuva ja lipofiilinen (Robertson ym., 2005) tertiäärinen alkoholi. MIB:n kiehumispiste on 210 °C ja se on veteen liukenematon (Akron University, 2010a). MIB esiintyy kahtena enantiomeerinä (+) ja (-), joista (-) -enantiomeeri on noin 10 kertaa voimakkaampi hajultaan (Jüttner & Watson, 2007). Vain (-) -enantiomeeri esiintyy luonnossa.

MIB:n molekyylikaava on  $C_{11}H_{20}O$ , molekyylipaino on 168,28 g/mol ja rakennekaava on esitettyinä kuvassa 1.



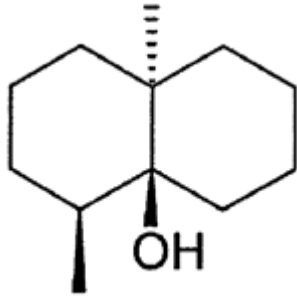
Kuva 1. (-)-MIB:n rakennekaava. (Jüttner & Watson, 2007)

MIB:n hajua kuvaillaan sanoilla ummehtunut, tunkkainen, homehtunut. Yhdysvalloissa 2008 julkaistussa tutkimuksessa tutkittiin MIB:n biosynteesiä aktinomykeettikannoilla (Komatsu ym., 2008). MIB:a muodostavan biosynteesin todettiin sisältävän kaksi vaihetta; metyyliiryhmän liittymisen geranylidifosfaattiin (GPP) GPP- metyyliitransferaasientsyymien katalysoimana ja rengasrakenteen muodostumisen monoterpeenisyklaasin katalysoimana.

### 2.1.2. Geosmiini, GSM

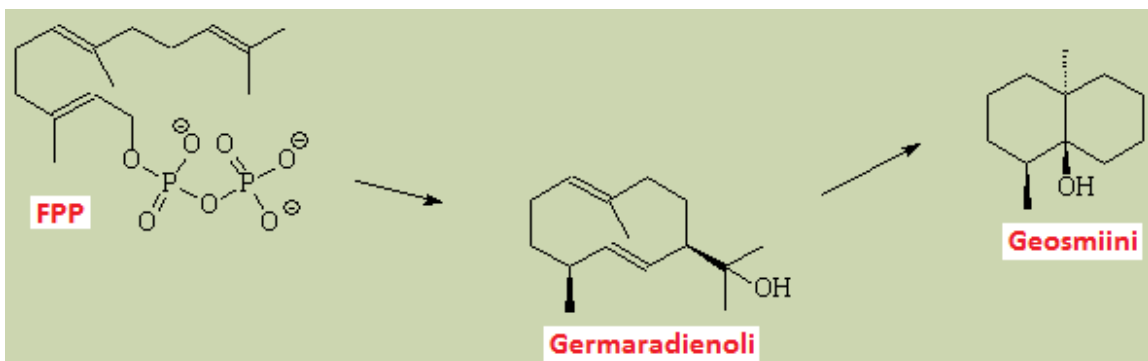
GSM:n kemiallinen nimi on trans-1,10-dimetyl-trans-9-decaloli. Se on puoli haihtuva ja lipofiilinen (Robertson ym., 2005) tertiäärinen alkoholi. Olomuodoltaan se on normaaliolosuhteissa väritön neste, jonka kiehumispiste on 270 °C (Cotton, 2009). Höyrynpaine 25 °C:ssa on 0,003 mmHg (Akron University, 2010b). Sen veteen liukenevuudesta on kirjallisuudessa erilaisia lukuja, 157 mg/l 25 °C:ssa (Ng ym., 2002) ja 550 mg/l 25 °C:ssa (Akron University, 2010b). GSM esiintyy kahtena enantiomeerinä (+) ja (-), joista (-) - enantiomeeri on noin 10 kertaa voimakkaampi hajultaan (Jüttner & Watson, 2007). Vain (-) -enantiomeeri esiintyy luonnossa (Cotton, 2009). (+) -enantiomeeriä voidaan valmistaa laboratoriossa. GSM:n molekyylikaava on  $C_{12}H_{22}O$ , molekyylipaino on 182,3 g/mol ja rakennekaava on esitettyinä kuvassa 2.





Kuva 2. (-)-GSM:n rakennekaava. (Jüttner & Watson, 2007)

GSM:n hajua kuvaillaan sanoilla multainen tai multakellarin hajuinen. Nimi tulee kreikan kielestä, jossa se tarkoittaa maan hajua (Cotton, 2009 mukaan). Se identifioitiin jo vuonna 1891, mutta molekyyli rakenne raportoitiin vasta vuonna 1965 ja biosynteesi vuonna 1968. Vasta viime aikoina on alettu ymmärtää sen biosynteesiä tarkemmin. Biosynteesi alkaa farnesyldifosfaatista (FPP), joka on steroli- ja seskviterpeenibiosynteesin rakennusosa. Germagradienoli-geosmiinisyntaasi-entsyymi (GGS) sisältää kaksi hyvin samanlaista katalyyttialuetta. Yksi alue muuttaa FPP:n germagradienoliksi, joka hajautuu toisella alueella GSM:ksi. Tämä prosessi on esitetty yksinkertaistettuna kuvassa 3. Aivan uusimpien, vielä julkaisemattomien tutkimusten mukaan kalojen on todettu metaboloivan vedessä olevaa GSM:a. (Schram ym., 2011).



Kuva 3. Geosmiinisynteesin päävaiheet. (Cotton, 2009).

### 2.1.3. MIB:a ja GSM:a tuottavia mikrobeja

GSM tunnetaan *Penicillium Vulpinum*- ja *Penicillium aethiopicum* -mikrobien metaboliittina sekä MIB *Aspergillus niger*-, *Penicillium urantiogriseum*- ja *Penicillium expansum* -kantojen kasvustoissa vahvoina hajulähteinä (Jelén ym., 2003). MIB löydettiin *Penicillium caseicolum* -kasvustoista. Haju yhdistetäänkin Brie ja Camembert juustoihin. Näiden juustojen valmistuksessa käytetään *Penicillium candium*, *Penicillium caseicolum* ja *Penicillium camemberti* -mikrobeja tuottamaan juuston kova pinta (Clark & Pazdernik, 2009).

Sekä GSM että MIB identifioitiin *Actinomyces* metaboliittina (Jelén ym, 2003). Nämä kaksi hajuainetta ovat tavallisesti vesissä *Streptomyces*-, *Nocardia*-, *Micromonospora*-, *Microbispora*-, *Oscillatoria*-ja *Phormidium*-kantojen tuottamia. Pintavesissä syanobakteerien tiedetään muodostavan geosmiinia (Song & O’Shea, 2007). Geosmiinituotantoa on varmistettu olevan myös useilla myxobakteerilajeilla kuten *Myxococcus fulvus*, *Stigmatella aurantiaca* ja *Chondromyces crocatus* (Schrader & Summerfelt, 2010). Vuonna 2008 eristettiin kaksi streptomykeettilajia, jotka ovat lähellä *Streptomyces roseoflavus*- ja *Streptomyces thermocarboxydus* -lajia ja näiden todettiin tuottavan sekä GSM:a että MIB:ia. Ainoat sienilajit, jotka tuottavat GSM:a, ovat löydetty maaperästä. Yhteenvetona voidaan todeta, että on mikrobeja, jotka tuottavat vain joko MIB:a tai GSM:a ja niitä mikrobeja, jotka tuottavat kumpaakin ainetta.

## 2.2. Kiertovesimenetelmällä toimiva kalanviljelylaitos

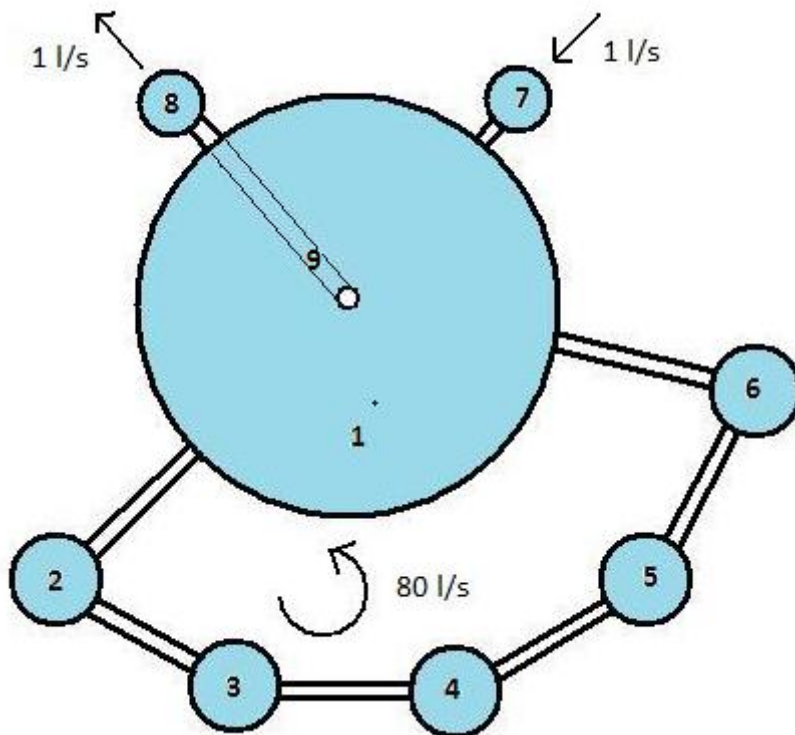
Allaskasvatuslaitoksia, jotka toimivat sisätiloissa ja käyttävät lämmintä vettä, on toiminnaltaan kahdenlaisia: läpivirtauslaitoksia ja kiertovesilaitoksia (Koskela ym., 2007). Läpivirtauslaitoksessa vesi virtaa jatkuvasti altaiden läpi, mutta lämpöä kierrätetään. Poistuvan veden lämpöä hyödynnetään tuloveden lämmityksessä. Kiertovesilaitoksessa puolestaan vettä kierrätetään ja puhdistetaan ja vesi vaihtuu hitaammin. Investointikustannuksiltaan kiertovesilaitos on läpivirtauslaitosta kalliimpi suuremman laitteiston vuoksi, mutta käyttökustannuksiltaan halvempi pienemmän veden lämmityksen ja pumppaamisen takia.

Kiertovesilaitoksen edut läpivirtauslaitokseen verrattuna ovat pienempi vedenkulutus ja kiintoaineiden helpompi käsiteltävyys. Ravinteiden kierrätys, hygienian ja tautien hallinta sekä biologisten jätteiden hallinta ovat myös helpommin toteutettavissa. Toisaalta vähäistä veden kierrätystä käyttävissä laitoksissa, joissa käytetään denitrifikaatioprosessia (sivu 10), mineraalit, lääkejäämät ja rehujen sisältämät kemikaalit voivat kerääntyä systeemiin ja vaikuttaa kalojen terveyteen sekä niistä valmistettavien elintarvikkeiden laatuun (Martins ym., 2010).

Kiertovesimenetelmällä toimivia kalanviljelylaitoksia on Itä-Suomessa kuusi (Tuomainen & Mölsä, 2011). Läpivirtausmenetelmällä toimivia laitoksia on 19, joiden lisäksi on seitsemän poikaslaitosta. Itä-Suomi on erittäin sovelias alue kalankasvatukseen puhtaiden vesiensä, kuormituksen sietokykynsä ja hyvän ekologisen tilansa ansiosta.

### 2.2.1. Kiertovesilaitosprosessi

Kuvassa 4 esitetään kiertovesiperiaatteella toimivan kalanviljelylaitoksen toimintaperiaate. Kaikki kiertovesilaitokset toimivat vastaavasti, laitteiden järjestys ja veden virtausmäärät voivat vaihdella laitoksittain (Tuotantopäällikkö, 2012). Ainoana poikkeuksena joissakin laitoksissa käytetään lisäksi denitrifikaatioprosessia (sivu 10). Laitoksen keskus on iso allas, jossa kalat uivat. Prosessissa on kaksi veden kiertoa: altaassa olevan luonnonveden tulo- ja menokierto sekä puhdistuskierto. Puhdistuskierrossa on pumpun lisäksi neljä vaihetta. Karkeasuodatuksella estetään isojen partikkeleiden pääsy pumpulle sen rikkoutumisen estämiseksi. Ilmastuksella poistetaan vedessä oleva kalojen ulos hengittämä hiilidioksidi. Biofiltterissä kalojen ulos hengittämä ammoniakki muutetaan mikrobien avulla nitraatiksi, joka poistuu lähtevän veden mukana. Hapetuksella turvataan kalojen elämä, koska biofiltterin mikrobit ovat aerobisia ja kuluttavat happea. Kiintoaineen poisto tapahtuu kartiomaisen altaan pohjalta ja se johdetaan lähtevän veden mukana jäteveden puhdistuslaitokseen.

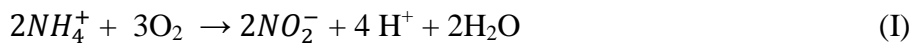


Kuva 4. Kiertovesilaitoksen prosessikaavio. 1 = kala-allas 2 = karkeasuodatin 3 = ilmastusallas, CO<sub>2</sub>:n poisto  
4 = pumppu 5= biofiltteri, ammoniakkin muuttaminen nitraatiksi 6 = hapetus 7 = luonnon vesi sisään  
8 = poistovesi ja liete ulos 9 = lietteen poisto altaasta. Virtausmäärät ovat tutkimuksessa olleelta laitokselta.

Tutkimuksen kohteena olleella laitoksella vettä otetaan systeemiin ulkopuolelta noin 1 litra/s ja saman verran poistetaan, mikä tarkoittaa kokonaisvesimäärän vaihtumista reilussa kahdessa vuorokaudessa. Toisessa kierrossa vettä kierrätetään noin 80 litraa/s, mikä tarkoittaa

kokonaisvesimäärän kulkeutumista puhdistuskierron läpi reilussa 40 minuutissa. Laitos koostuu useista vastaavista allasysteemeistä.

Nitrifikaatio on kiertovesilaitoksessa välttämätön prosessi, minkä saa aikaan biofiltterissä oleva mikrobikanta. Sen avulla kalojen ulos hengittämä ammoniakki muutetaan kaloille vähemmän haitalliseksi nitraatiksi. Nitrifikaatioprosessi on kaksivaiheinen, ensin ammoniakki muutetaan nitriitiksi (I) ja sitten nitraatiksi (II) (Li & Irvin, 2007).



Suolattomissa vesissä tiedetään (I)-reaktion tapahtuvan *Nitrosomonas*-kannan ja (II)-reaktion *Nitrospira*-kantojen vaikutuksesta (Schreier ym., 2010). Denitrifikaatioksi kutsutulla prosessilla nitraatti voidaan muuttaa kaasumaiseksi typeksi, joka poistuu prosessista haihtumalla (III) (Li & Irvin, 2007).



Denitrifikaatiomikrobit ovat joko *Pseudomonas*- tai *Comamonas*-kantoja (Schreier ym., 2010). Tutkimuksessa olevalla kalaviljelylaitoksella denitrifikaatiota ei käytetä.

Kalojen ruokinta tapahtuu usein (myös tutkimuksessa mukana olevalla laitoksella) automatisoidusti: altaiden päällä kiertää robottiohjattu ruokinta-automaatti, joka annostelee altaisiin rehun arvioimalla sen määrän kalojen koon mukaisesti. Kalan sukukypsyysjaksoja ja mädin tuotantoa säädellään valomäärän avulla. Kasvatusprosessia kontrolloidaan mittaamalla prosessista allasveden lämpötilaa, pH:ta ja liuenteen hapen pitoisuutta jatkuvatoimisesti sekä nitriitti-, nitraatti-, ammoniakki ja hiilidioksidipitoisuuksia säännöllisesti (Tuotantopäällikkö, 2011).

### 2.2.2. MIB ja GSM kiertovesilaitoksella

Sekä MIB:a että GSM:a on jatkuvasti kiertovesilaitoksen vedessä, mutta näiden pitoisuus nousee elo-syyskuussa (Tuotantopäällikkö 2, 2012). Kalojen pitämistä puhtaassa vedessä hajuaineiden poistamiseksi on tutkittu Yhdysvalloissa (Burr ym., 2012). Kyseisessä tutkimuksessa todettiin hajuaineiden poistuvan lohista 10 – 15 päivässä pidettäessä niitä

hajuttomassa vedessä. Lämpötilalla on oletettu olevan vaikutuksia MIB- ja GSM-pitoisuuksiin. Taiwanissa tehty tutkimus osoitti sekä ilman että veden lämpötilan vaikuttavan suuresti luonnosta vesivarastoon tulevan veden MIB- ja GSM-pitoisuuteen (Tung ym., 2008). Mitä korkeampi lämpötila oli, sitä suuremmat olivat MIB- ja GSM-pitoisuudet. Joulukuusta 2000 heinäkuuhun 2003 pitoisuus vaihteli MIB:llä 10 – 200 ng/l ja GSM:llä pitoisuus oli alle 10 ng/l. 23 tunnin jaksoilla mitattuna kummankin aineen pitoisuudet pysyivät lähes vakioina eli vuorokauden aikana vaihtelua ei ollut. MIB-pitoisuudelle löydettiin jopa matemaattinen yhteys ilman lämpötilaan. Tutkimuksen lopussa painotettiin matemaattisen mallin olevan paikkakohtainen. Viljeltäessä nieriää kiertovesilaitoksessa tutkijat arvelivat altaan seinämissä olleissa biofilmikerroksissa syntyvän makuhaittoja aiheuttavaa GSM:a (Houle ym., 2011). Taulukossa 1 on pitoisuusvertailu kalassa, vedessä ja biofilmikerroksessa olleista MIB- ja GSM-pitoisuuksista.

Taulukko 1. MIB- ja GSM-pitoisuuksien keskiarvot kalasta, vedestä ja biofilmistä neljästä altaasta (Houle ym., 2011). Altaista kaksi on kalojen kasvatusallasta ja kaksi kalojen puhdistusallasta, toinen kolmen päivän ja toinen seitsemän päivän puhdistuksen jälkeen. Pitoisuuden yksikkö on ng / kg.

Allas	Filee		Vesi		Biofilmi	
	MIB	GSM	MIB	GSM	MIB	GSM
Kasvatus	8 ± 8	703 ± 493	1 ± 0,2	37 ± 17	4 ± 4	381 ± 634
Puhdistus	2 ± 2	706 ± 619	2 ± 3	24 ± 17	3 ± 4	348 ± 393

### 2.2.3. Menetelmiä MIB:n ja GSM:n poistamiseksi

Veden otsonointia käytetään näiden aineiden poistamiseksi vedestä. Tutkimuksen valossa otsonikäsittelyllä (matala otsonipitoisuus) ei saada merkittäviä tuloksia MIB:n ja GSM:n osalta, vaikka otsonointi parantaakin veden muita ominaisuuksia, kuten väriä ja vähentää liuenneiden kiintoaineiden määrää (Schrader ym., 2010).

Seuraavista menetelmistä on saatu merkittäviä tuloksia laboratoriokeissa, mutta tuotantomittakaavassa näitä ei tiettävästi ole käytetty. Kun tutkittiin MIB:n ja GSM:n poistamista altaasta otetulla autoklavoidulla lietteellä *in vitro* -olosuhteissa, todettiin 79 % MIB:sta ja 93 % GSM:sta poistuneen 48 tunnin inkuboinnin aikana (Guttman & van Rijn, 2009). Tutkittaessa rakeisen aktivoidun hiilen kykyä poistaa MIB ja GSM joko ilman MIEX-käsittelyä (magnetic ion-exchange) tai ilman sitä, todettiin tämän poistavan nämä aineet hyvin pois (Drikas ym., 2009). Geosmiinin on tutkittu vähenevän vedestä myös epäsuoralla

sähkökemiallisella menetelmällä (Li ym., 2010). Tässä tutkimuksessa pitoisuus laski 600 ppt:stä 6 ppt:hen 60 minuutissa. Myös titaanioksidilla voidaan poistaa kumpaakin tutkittavaa ainetta (Lawton ym., 2003). Tässä tutkimuksessa kumpikin aine poistui 60 minuutissa, mutta menetelmä vaati jatkokehittelyä. Myös ultraäänellä voidaan näiden aineiden pitoisuutta vähentää vedestä (Song & O’Shea, 2007).

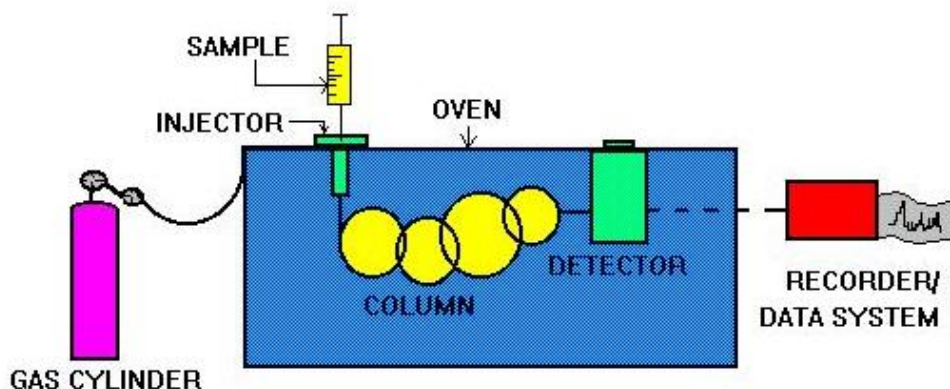
Yhdysvalloissa on myös eräs menetelmä patentoitu MIB:n ja GSM:n poistamiseksi vedestä (Perly ym., 2000). Patenti on nimeltään ”US Patent 6024879 – Water purification using cyclodextrins” eli veden puhdistaminen syklodekstriinien avulla.

### 2.3 GC-MS- ja SPME -menetelmien periaatteet

GC-MS (Gas Chromatography - Mass Spectrometry) on analyysitekniikka, jossa on yhdistettynä kaasukromatografia ja massaspektrometria. Aineet erotetaan toisistaan ja kvantitoidaan kaasukromatografisesti. Detektointi tehdään massaspektrometrisesti.

#### 2.3.1. Kaasukromatografia

Kaasukromatografiaa käyttivät ensimmäisenä itävaltalaiset Archer Martin ja Anthony T. James vuonna 1952 (De Lloyd, 2000). Näytteen komponentit ovat helpommat tunnistaa ja kvantitoida, kun ne ensin erotetaan toisistaan. Ollakseen sopiva kaasukromatografisesti analysoitavaksi, aineen tulee olla riittävästi haihtuva (kaasumaisena alle 450 °C:n lämpötilassa) ja kuitenkin kemiallisesti stabiili käytetyissä lämpötiloissa. Kuvassa 5 on esitetty kaasukromatografian toimintaperiaate.



Kuva 5. Kaasukromatografian periaatekuva. Näyte (sample) syötetään injektoriin (injector). Täältä näytteen kuljettaa uunissa (oven) olevaan kolonniin (column) kaasupullosta (gas cylinder) tuleva kaasu. Kolonnissa komponentit erotetaan ja sitten detektori (detector) tunnistaa komponentit ja lähettää tiedon tietokoneelle (recorder/data system). (Punrattasin, Spada, 1997).

Näyte syötetään injektoriin yleensä nesteeseen liuotettuna tai absorptiofaasiin sitoutettuna,. Korkean lämpötilan avulla (tyypillisesti 150-300 °C) saadaan yhdisteet kaasumaiseen muotoon. Liikkuva kaasufaasi kuljettaa näytteen injektorista lämpötilakontrolloidussa uunissa sijaitsevaan kolonniin, jossa aineiden erottuminen tapahtuu. Erottuminen perustuu kaasumaisen yhdisteen jakautumiseen liikkuvan kaasufaasin ja kiinteän faasin (kolonnin sisäpintamateriaalin) välillä. Erottumiseen vaikuttavat lämpötila, kolonnin kiinteän faasin kemialliset ominaisuudet, liikkuvan faasin virtausnopeus ja mitattavan aineen ominaisuudet. Aineilla on erilainen taipumus sitoutua kiinteään faasiin, jolloin yhdisteet kulkeutuvat kolonnin läpi erilaisilla nopeuksilla ja tulevat kolonnista ulos aina samaan aikaan samoissa olosuhteissa (retentioaika). Kolonnista aineet kulkeutuvat detektorille analysoitavaksi. Kun tunnetaan aineen retentioaika, sitä voidaan käyttää näytteessä olevan aineen tunnistamiseen. Mikäli mitattava aine tulee kolonnista ulos samaan aikaan toisen aineen kanssa, tällöin mittausta ei voida tehdä. Tällöin on muutettava joko ajo-olosuhteita (kantokaasu, sen nopeus, uunin lämpötila, mittausparametrit) tai on käytettävä erilaista kolonnia. Samaa tilanteeseen johtaa osittainkin mitattavien ja muiden aineiden päällekkäinen ulostuleminen kolonnista. Tärkein seikka kaasukromatografisessa analysoinnissa, kuten muussakin analysoinnissa, on kaikkien osatekijöiden vakiointi alkaen näytteenotosta ja -käsittelystä, jolloin tulokset ovat toistettavia ja luotettavia.

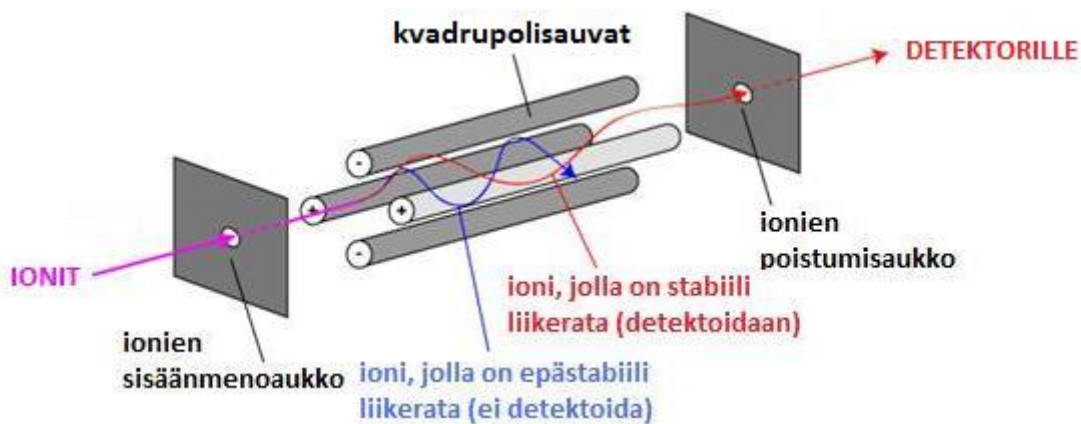
### **2.3.2. Massaspektrometria**

Alkutyön massaspektrometrian kehitykseen teki vuonna 1898 saksalainen fyysikko Wilhelm Wien (fysiikan Nobel 1911) tutkiessaan ionisoitujen kaasujen käyttäytymistä magneettikentässä (Beckmann ym., 2009). Massaspektrometrin esiasteen kehittivät 1900-luvun alussa Iso-Britanniassa Cambridgen yliopiston Cavendish-laboratoriossa Joseph John Thomson (kemian Nobel 1906) ja Francis William Aston (fysiikan Nobel 1922) (Gates, 2005). Thomson työkavereineen sai 1897 alkaneella työllä yhteensä seitsemän Nobelin kemian ja fysiikan palkintoa. Massaspektrometriaa ovat kehittäneet useat tiedemiehet eri vuosikymmenillä. Tässä työssä käytetty kvadrupoliteknikka sai alkunsa 1950-luvun alkupuolella, jolloin kolmas massaspektrometrian urauurtava tiedemies, Wolfgang Paul (fysiikan Nobel 1989) teki tämän keksinnön.

Massaspektrometrin toiminnassa voidaan erottaa kolme vaihetta (Reush, 2007). Aluksi näytteen molekyylit ionisoidaan jolloin molekyylit hajotetaan palasiksi, fragmenteiksi. Ionisoitumiseen tarvitaan myös korkeaenerginen elektronisäteilytys. Toiseksi tapahtuu ionien valikointi ja erotus massa-varaussuhteen mukaan. Kolmantena vaiheena tehdään erotettujen

ionien mittaaminen ja tulosten esittäminen. Ionien reaktiivisuudesta ja lyhytikäisyydestä johtuen niiden muodostaminen ja käsittely tehdään vakuuissa ( $10^{-5}$  -  $10^{-8}$  torr).

Kvadrupoliteknikka perustuu neljään yhdensuuntaiseen tankoon, joihin johdetaan kiinteää tasavirtaa ja vaihtuvia radiotaajuisia potentiaaleja niin, että kahden vastakkaisen, samanmerkkisen tangon potentiaalit vaihtuvat siniaaltomuotoisesti kaavalla  $\cos(\omega t)$ , missä  $\omega$  = taajuus ja  $t$  = aika (Gates, 2009). Tutkittavasta näytteestä muodostetut ionit johdetaan tankojen keskelle, missä niiden kulkeminen riippuu muodostettujen sähkökenttien voimakkuudesta niin, että tietyn massa-varausuhteen ( $m/z$ ) omaaville ioneille saadaan sauvojen keskelle vapaa alue ja vakaa liikerata poistua kohti detektoria (kuva 6. punainen liikerata). Erilaisten virtojen käyttöön perustuu SIM (Selected Ion Monitoring) -tekniikka, jolla voidaan ohjata halutut ionit detektorille. Muut ionit kiinnittyvät sauvoihin, eikä niitä detektoida (kuva 6. sininen liikerata). Tilassa on suuri, jatkuva alipaine ja tankoihin tarttuneet ionit poistuvat vakuumpumpun kautta. Laitteiston resoluutiota ja ionien massa- aluetta voidaan säätää sauvojen pituutta ja paksuutta muuntelemalla. Tekniikka on esitettyä yksinkertaistettuna kuvassa 6.



Kuva 6. Kvadrupoliteknikka yksinkertaistettuna. (Gates, 2009)

### 2.3.3. SPME-tekniikka

SPME-lyhenne tulee sanoista *solid phase microextraction*, joka suomennettuna on kiinteäfaasimikrouutto. Menetelmän kehittivät Arthur ja Pawliszyn vuonna 1995 (Morales-Valle ym., 2010). SPME on näytteenkäsittelymenetelmä, jossa ei tarvita liuottimia. Menetelmä perustuu polymeerillä pinnoitettuun kuituun, johon haihtuvat ja puolihaihtuvat orgaaniset yhdisteet konsentroituvat yhdessä vaiheessa (Mester & Sturgeon, 2005). SPME-



kuituja on olemassa erilaisia ja erilaisilla pinnoitteilla, jolloin ne keräävät erilaisia aineita (Dietz ym., 2005)

Tässä työssä käytetty kuitu on kehitetty juuri MIB:n ja GSM:n analyysiä varten (Sigma-Aldrich, 2002). Rakenteeltaan se on kolmikerroksinen. Ytimen muodostaa Carboxen<sup>TM</sup>-kuitu, joka on pinnoitettu PDMS:llä. Uloimpana kerroksena on divinyylibentseenin (DVB) ja polydimetyylisiloksaanin (PDMS) muodostama Stable Flex<sup>TM</sup>, -kerros. Näillä kummallakin adsorbentilla on suuri affiniteetti sekä MIB:lle että GSM:lle, mutta vapauttavat nämä helposti kuumennettaessa kuitua kaasukromatografian injektorissa. Tässä työssä näyte syötettiin kuidun avulla manuaalisesti injektoriin, mutta on olemassa myös automatisoituja näytteenotto- ja näytteenkäsittelymenetelmiä (Parinet ym., 2011).

Useissa tutkimuksissa on todettu, että analyyttien sitoutuminen kuituun ei välttämättä ole suoraan verrannollinen näytteen analyyttien pitoisuuteen (Urgeghe ym., 2011; Contini & Esti, 2006). Sitoutuminen riippuu mm. analyyttien molekyylimassasta ja polariteetista sekä tietenkin käytettävän kuidun ominaisuuksista. Jos näytteessä on paljon erilaisia analyyttejä, niiden sitoutumisessa kuituun tapahtuu kilpailua tai kuitu voi jopa kyllästyä. Tämä aiheuttaa mm. lineaarisuuden häipymistä ja näin kvantitatiivisen analyysin vaikeutumista. Tätä kilpailua voidaan välttää esimerkiksi optimoimalla analyyttien keräysaikaa ja -lämpötilaa tai laimentamalla näytettä. Tästä syystä standardisuora tulee tehdä kullekin mitattavalle aineelle, jotta tiedetään mittausalueen responssi pitoisuuden funktiona.

#### **2.3.4. Muissa tutkimuksissa käytettyjä MIB:n ja GSM:n näytteenkäsittelymenetelmiä**

MIB- ja GSM-tutkimuksissa käytettyjä näytteenkäsittelymenetelmiä on useita, vaikka ne kaikki detektoidaan GC-MS:lla.

CLSA-tekniikassa (*closed loop stripping analysis*) orgaaniset aineet ohjataan vedestä hermeettisesti suljettuun silmukkaan samalla poistaen vesi 40 °C:lla ilmalla tai inertillä kaasulla (Benanou ym., 2003). Aineet siirretään toiseen, erittäin pienen määrän puuhiiltä sisältävään suljettuun silmukkaan, josta ne eluoidaan pienellä määrällä liuotinta, esim. CS<sub>2</sub>. Tunnettu laimennos injektoidaan GC-MS:ään. Menetelmän haittana on riittämätön herkkyys alle 15 ppt:n MIB- ja GSM-pitoisuuksille sekä suuri ajan ja työvoiman tarve.

SBSE-tekniikassa (*stir bar sorptive extraction*) suljettuun, vesinäytettä sisältävään näyteastiaan laitetaan magneettisauva, joka on päällystetty 0,5 mm kerroksella

polydimetyylisiloksaania (PDMS), johon yhdisteet konsentroituvat (Benanou ym., 2003). Magneettisauvaa pyöritetään magneettisekoittimella 30 – 120 min, jonka jälkeen se siirretään desorptioputkeen. Lämmön avulla mitattava aine vapautetaan sauvasta ja johdetaan GC-MS:n injektoriin. Menetelmä on tarkka, toistettava ja herkkä, mutta yksi näytteen keräys kestää 120 min. Koska useita näytteitä voi kerätä samanaikaisesti, menetelmällä on mahdollisuus analysoida noin 20 näytettä päivässä.

Muita käytettyjä, menetelmiä ovat neste-neste-uutto LLE (*liquid-liquid extraction*) ja kiinteäfaasiuutto SPE (*solid phase extraction*), joiden haittoina ovat myrkyllisten ja kalliiden liuottimien käyttö, hitaus sekä mahdollisuus kontaminaatioihin (Cortada ym., 2011). Myös puhdistus ja loukku, PT-menetelmää (*purge and trap*) on käytetty MIB- ja GSM-analyysien yhteydessä (Deng ym., 2012). PT-menetelmässä inertillä kaasulla (helium, typpi) kuplitetaan vettä ja kupliva kaasu vie mennessään haihtuvat yhdisteet adsorbenttiin (Sigma-Aldrich, 1997). PT:hen yhdistetyllä mikroaaltouuniuutolla MAE (*microwave-assisted extraction*) saadaan nopea lämmitys ja siksi suuri mittaussnopeus. Sen etuina ovat myös liuottimettomuus ja helppokäyttöisyys sekä laaja näytematriisi. Yksi uusimmista menetelmistä on hajottava neste-nesteuutto DLLE (*dispersive liquid-liquid extraction*), jossa pieni pisara uutetta hajotetaan vielä pienemmiksi pisaroiksi dispensioluottimen avulla (Cortada ym., 2011). Tällöin haihtumispinta kasvaa ja analyyttien vaihto faasien välillä helpottuu ja nopeutuu. Dispensiota voidaan edistää ultraäänellä, jolloin orgaanisten liuottimien tarve pienenee. Tällöin puhutaan ultraääniavusteisesta hajottavasta neste-nesteuutosta USADLLE (*ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid extraction*). Menetelmässä oikean uuttoliuottimen merkitys todettiin tutkimuksessa suureksi. Samassa tutkimuksessa oli vertailtu eri näytteenkäsittelymenetelmien eroja MIB- ja GSM-analyyseissa. Alin lineaarinen alue oli SBSE:llä (0,5 - 100 ppt) ja seuraavana LLE (1 - 500 ppt) molemmille aineille. Seuraavan kolmen menetelmän lineaarisuusalue alkaa 10 ppt:stä, yläraja PT:llä on 200 ppt, USADLLE:llä 1000 ppt ja SPME:llä 30000 ppt. Vaikka tutkimus on vuodelta 2011, tieto SPME:stä oli vuodelta 1998. Nyt valmistaja lupaa lineaarisuuden 1 ppt:stä alkaen (Sigma-Aldrich, 2002).

Aivan uusimpana mittaussnopeutena on kehitetty ns. elektronista keinoonää (Braga ym., 2012). Se perustuu polymeeristen sensorien impedanssin mittaamiseen. Mittausalue ei kuitenkaan mene alle 25 ppt:n, mutta se soveltuu jatkuvatoimisena pitoisuuksien muutosten määrittämiseen.

### 3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Pro gradu -tutkielman kokeellinen osuus jakautui kahteen osa-alueeseen; menetelmän kehittämiseen ja validointiin sekä kiertovesilaitokselta otettujen näytteiden mittaamiseen.

#### 3.1. Standardiaineet

GSM-standardina käytettiin geosmiiniä (Sigma-Aldrich, Yhdysvallat), jossa geosmiiniä oli noin 2 mg/ml, liuottimena metanoli. MIB-standardina käytettiin 2-metyyli-isoborneolia (Sigma-Aldrich, Yhdysvallat), jossa 2-metyyli-isoborneolia oli noin 10 mg/ml, liuottimena metanoli. Tutkimuksen lopussa pitoisuudet tarkastettiin standardilla, joka sisälsi sekä MIB:a että GSM:a 100 mg/ml, liuottimena metanoli (Sigma-Aldrich, Yhdysvallat). Kahta ensimmäistä säilytettiin ohjeen mukaan -20 °C:ssa ja kolmatta huoneen lämmössä. Standardivetenä käytettiin suodatettua Milli-Q -vettä.

#### 3.2. Mittauslaitteisto

Analyysit suoritettiin GC-MS-laitteistolla 5890 series II Plus Gas Chromatograph - 5972 series Mass Selective Detector (Hewlett Packard Ltd, Yhdysvallat) käyttäen aineiden erottelussa Nukol™-kapillaarikolonnia, jonka pituus on 30 m, halkaisija 0,25 mm ja filmin paksuus 0,25 µm (Supelco, Yhdysvallat). Haihtuvat yhdisteet kerättiin ja injektointiin manuaalisesti käyttäen SPME-tekniikkaa (Sigma-Aldrich, 2011). Absorbenttikuituna käytettiin divinyylibentseeni-Carboxen™-polydimetyylisiloksaani-kuitua: SPME Fiber Assembly 2 cm - 50/30 µm DVB/Carboxen™/PDMS Stable Flex™, (Supelco, Yhdysvallat). Tarkempi laiteluettelo on liitteenä olevassa työohjeessa.

#### 3.3. Menetelmän kehittäminen

Projektityössä (Lappi, 2011) tehtyä menetelmää kehitettiin, että se soveltuisi myös MIB-analyysiin. Menetelmää optimoitiin myös muita osa-alueita kehittämällä luotettavien tulosten saamiseksi. Menetelmän kehityksessä testattiin muun muassa ulossuolaustekniikkaa, engl. *salting out*, (Nelson & Cox, 2008) ja sisäisenä standardina DHN:a, *cis*-dekahydro-1-naftoli (Zhu ym., 1999). Analyysiin etsittiin sopiva lämpötilaohjelma kaasukromatografille ja sopivimmat ionit detektoitaviksi SIM-tekniikkaa (Li ym., 2012) käyttäen massaspektrometrillä. Lisäksi selvitettiin taustassa esiintyvien häiriöpiikkien lähdettä, sekä näytteiden käsittelyn ja säilytyksen vaikutuksia.

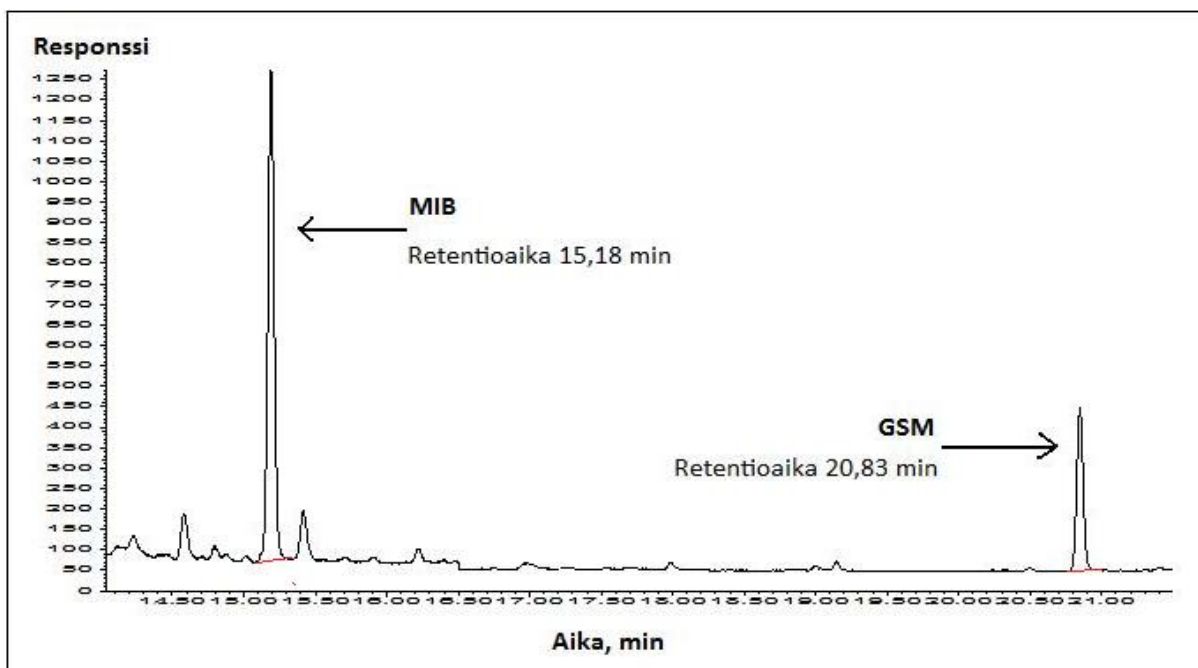
### 3.4. Analyysin suorittaminen

Pitoisuuksien määrittämiseksi tehtiin standardisuorat. Standardinäytteet laimennettiin haluttuun pitoisuuteen eri laboratoriossa kuin itse mittaus suoritettiin. Pitoisuuksiltaan vahvimmat näytteet laimennettiin eri vetokaapissa, etteivät ne kontaminoisi laimeampianäytteitä. Standardinäytteiden laimennukset tehtiin aina samana päivänä kuin niiden mittaukset, jotta aineet eivät ehtisi haihtua. Ennen analyysiä vesinäytteet siirrettiin säilytyspulloista näytepulloihin. Näytteet esirikastettiin SPME-tekniikan avulla näytepullojen ilmatilasta. Esirikastus tehtiin lämpökaapissa (60 °C) näytettä magneettisekoittimella sekoittaen. Esirikastusaika oli 20 min, jonka jälkeen näyte injektoidiin manuaalisesti kaasukromatografiin. Injektion jälkeen SPME-kuidun annettiin olla injektorissa (260 °C) noin 10 minuuttia, jotta kuitu olisi mahdollisimman puhdas seuraavaa näytteenottoa varten ja 2 minuuttia ennen seuraavaa näytteenottoa se puhdistettiin uudelleen injektorissa. Kaasukromatografissa käytettiin lämpötilaohjelmaa, joka on kuvattuna taulukossa 2.

Taulukko 2. Kaasukromatografian lämpötilaohjelma.

Vaihe	Lämpötila tai lämpötila-alue	Aika tai lämpötilan nousunopeus
1.	50 °C	1 min
2.	50 °C → 75 °C	30 °C / min
3.	75 °C → 165 °C	4,5 °C / min
4.	165 °C → 220 °C	30 °C / min
5.	220 °C	2 min

Ohjelman kokonaisaika oli noin 26 min. Detektio tapahtui SIM-tekniikalla seuraavasti: ajalla 14.00 min - 16.50 min detektoitiin ionia 95 (MIB) ja ajalla 16.50 min - 22.00 min ionia 112 (GSM). Heliumin virtausnopeus oli 1 ml/min. Kvantitatiivinen analyysi tehtiin integroimalla piikin pinta-ala manuaalisesti. Kuvassa 7 on esitettyä GC-MS -analyysistä saatu kuva, johon on merkitty eri komponenteista saadut piikit ja retentioajat sekä manuaali-integroinnin pohjaviiva.



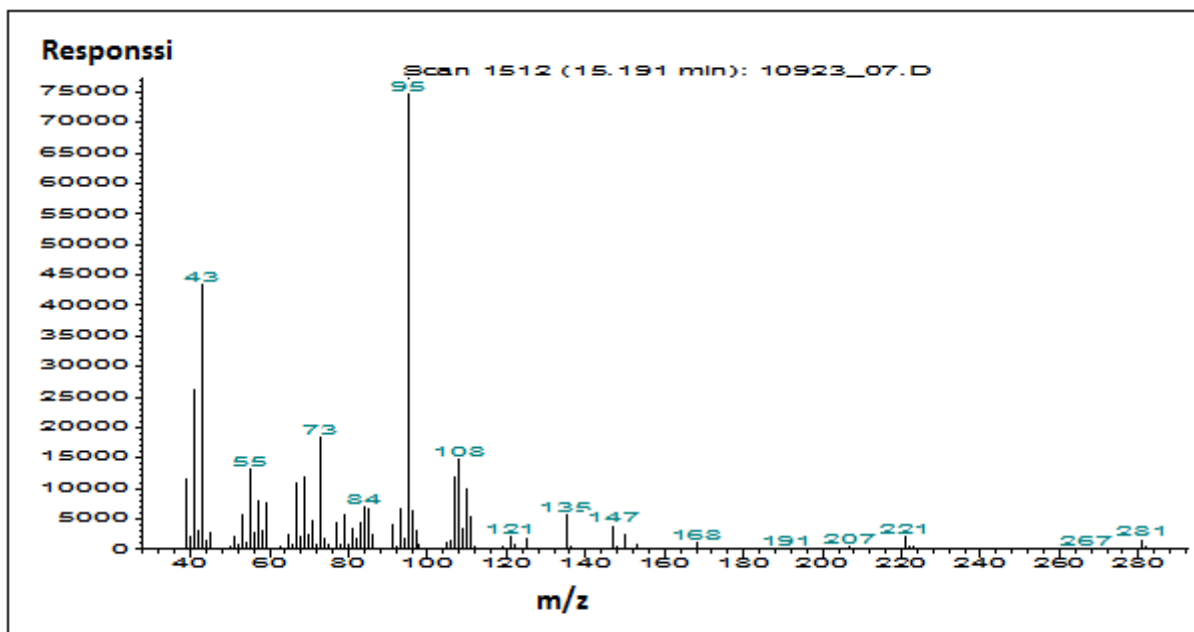
Kuva 7. Kromatogrammi mitatuista komponenteista. Punaisella viivalla on merkitty kvantitatiiviseen analyysiin manuaalisessa integroinnissa tarvittava pohjaviiva.

### 3.5. Menetelmän validointi

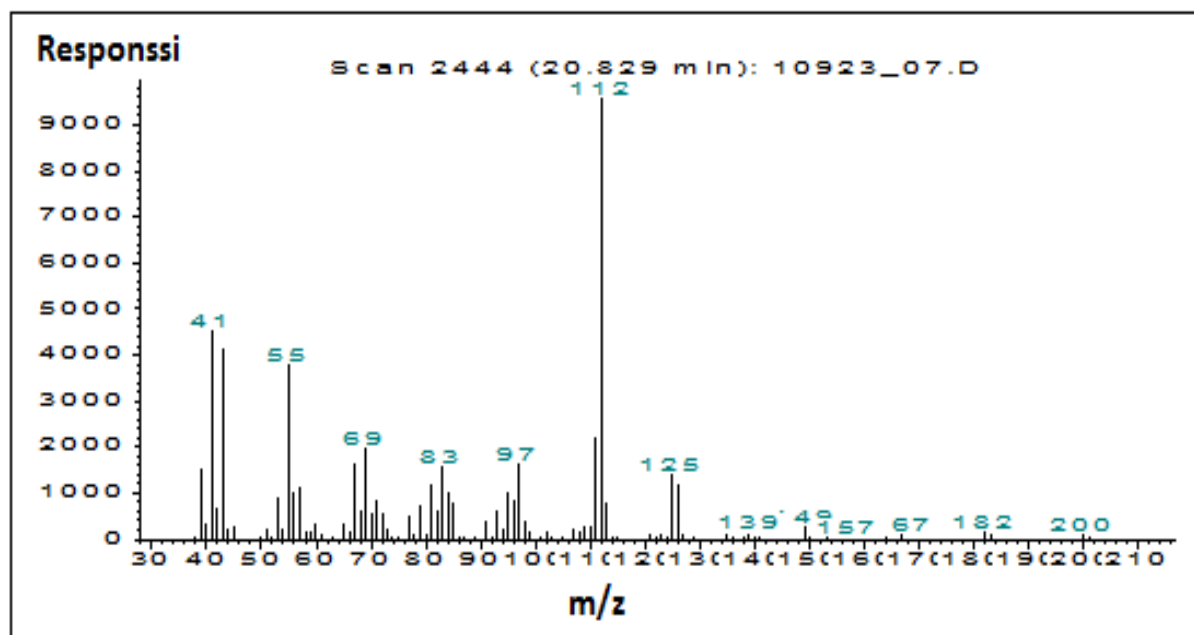
Standardien pitoisuuksina käytettiin 1, 2, 4, ja 6 ng/l sekä MIB:lle että GSM:lle, koska ihmisen detektoraja GSM:lle on alimmillaan mittauksen alkaessa olleen tiedon mukaan noin 4 ng/l ja MIB:n pitoisuudet olivat samalla pitoisuusalueella. Pitoisuudella 1 ng/l mittaukset tehtiin kolmena päivänä, muilla neljänä päivänä joko kahdella tai kolmella rinnakkaisnäytteellä. Määritetyistä piikkien pinta-aloista laskettiin menetelmälle sekä päivittäinen hajonta että kokonaishajonta kullakin pitoisuudella. Jakamalla hajonta keskiarvolla saatiin suhteellinen keskihajonta, joka prosentteina ilmoitettuna antaa kuvan menetelmän suhteellisesta hajonnasta. Nollanäyte mitattiin tutkimuksen alussa joka mittauspäivä taustapiikkien vuoksi. Taustapiikkien syyn löydyttyä (pesuainejäämät näytepulloissa) nollanäytteen päivittäinen mittaaminen päätettiin lopettaa ajan säästämiseksi, koska taustapiikit pystyttiin poistamaan puhdistamalla näytepullot keittämällä niitä Milli-Q -vedessä.

Jotta voitiin varmistua, että tutkitaan oikeita piikkejä, tuli verrata ionispekttriä aiemmin ko. komponenteista saatuihin ionispektreihin. Käytössä oli NIST:n (National Institute of Standards and Technology, Yhdysvallat) tekemä ionispektrikirjasto (Stein ym, 1995). Tässä kirjastossa ei ollut MIB:n ionispekttriä, mutta kaikissa kirjallisuudesta löytyneissä MIB-

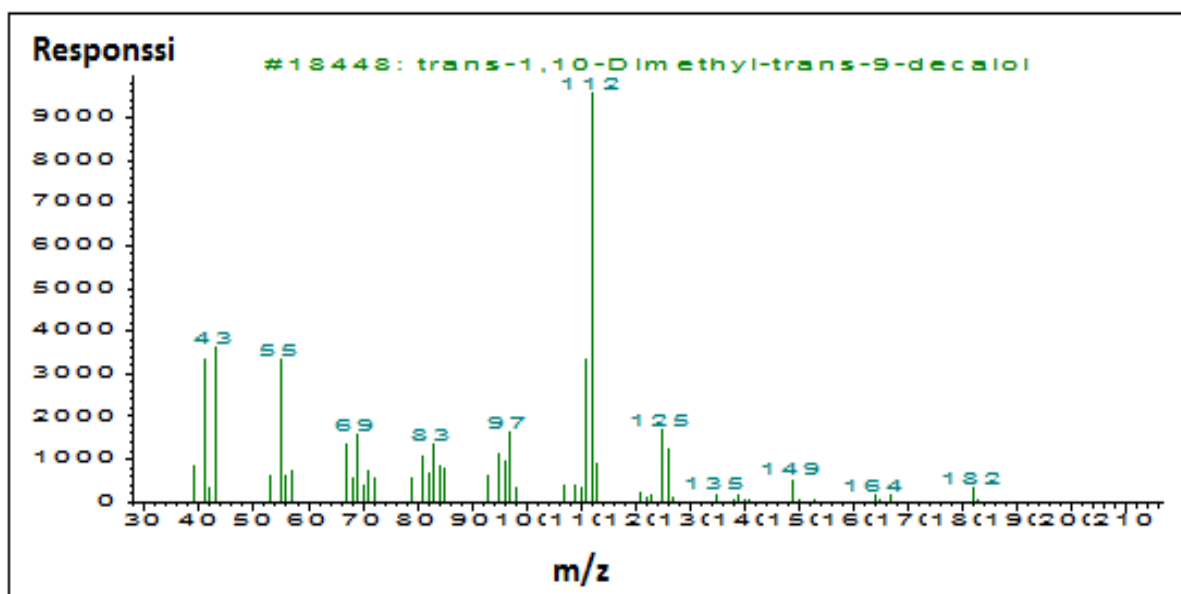
tutkimuksissa pääionin  $m/z$  oli 95. Kuvassa 8 on MIB-standardin ionispektri. Kuvassa 9 on GSM-standardin ionispektri. NIST:n kirjastosta otettu GSM:n ionispektri on kuvassa 10.



Kuva 8. MIB-standardin ionispektri. Tiedoston 10923\_07.D ionispektri skannattuna kohdalta 15,191 min.



Kuva 9. GSM-standardin ionispektri.



Kuva 10. GSM-ionispektri NIST:n ionispektrikirjastosta (Stein ym., 1995).

### 3.6. Vesinäytteiden otto ja säilytys

Allasvesinäytteet otettiin kerran viikossa kalanviljelylaitoksen henkilöstön toimesta ajalla 12.8 - 4.10 ja tutkijan toimesta 31.10., 1.11. ja 2.11., jolloin otettiin myös vesinäytteet ennen ja jälkeen biofilteriä. Tulovesinäytteet otettiin ajalla 12.8 - 22.9. kalanviljelylaitoksen henkilöstön toimesta viikoittain. Näyteastioina käytettiin tilavuudeltaan 1 litran suuruisia, vesinäytteille tarkoitettuja muovipulloja, jotka saatiin kalanviljelylaitokselta.

Kun analyysimetodi oli saatu käyttökelpoiseksi, analysoitiin vesinäytteet mahdollisimman pian. Vesinäytteitä säilytettiin kalanviljelylaitoksen jääkaapissa (+ 3 °C) 24 - 67 vrk.

### 3.7. Säilyvyyskokeet

Koska näytteitä jouduttiin säilyttämään ennen niiden analysointia, haluttiin tutkia, muuttuvatko mitattavien aineiden pitoisuudet säilytyksen aikana. Säilyvyyskoetta varten laitettiin viisi näytepulloa täyteen milliQ-vettä (Millipore, Yhdysvallat) ja lisättiin standardeja niin, että MIB-pitoisuudeksi tuli 9,7 ppt ja GSM-pitoisuudeksi 6,0 ppt. Vastaavasti tehtiin näytteet kalanviljelylaitoksen allasveteen niin, että lisätyt pitoisuudet olivat 3,7 ppt MIB ja 3,0 ppt GSM. Myös pelkkää allasvettä otettiin viiteen pulloon. Kaikkia näitä näytteitä säilytettiin kalanviljelylaitoksen jääkaapissa. Lisäksi otettiin neljä vajaata pulloa allasvettä, jotka säilytettiin kalanviljelylaitoksen pakastimessa. Kaikista edellä mainituista neljästä erästä mitattiin pitoisuus ennen säilytystä ja kaksi näytettä mitattiin viikon välein. Jotta saatiin arvio, miten haihtuminen vaikuttaa maksimissaan noin kymmenen viikon aikana, ekstrapoloitiin haihtumiskäyrät yhtälön  $[A] = [A_0] e^{-kt}$  ( $[A]$  = pitoisuus ajan hetkellä  $t$ ,  $[A_0]$  = pitoisuus ajan

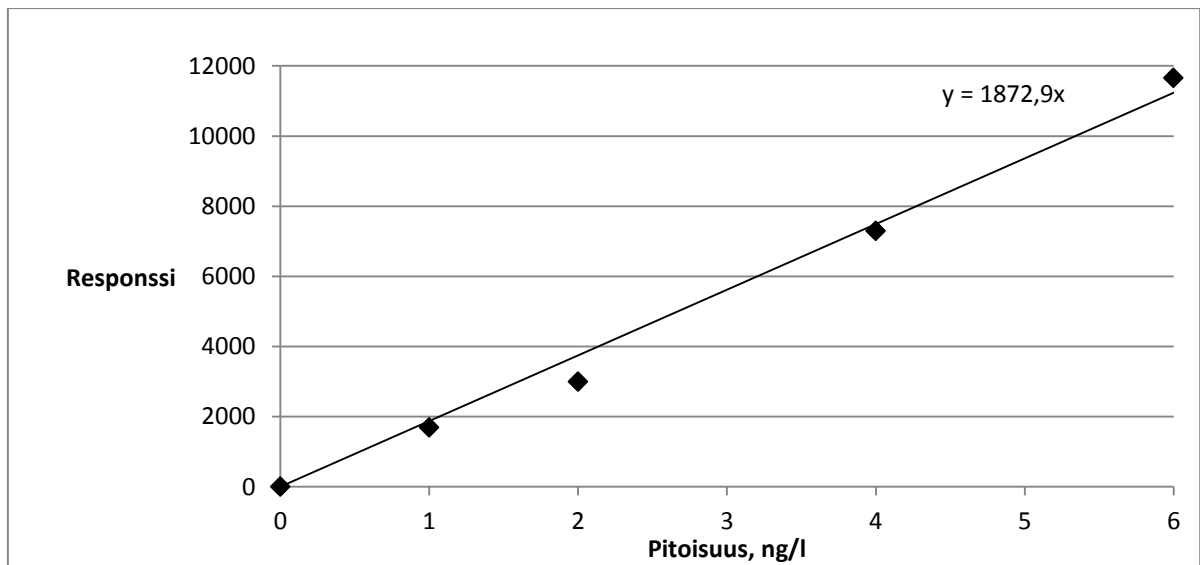
hetkellä 0,  $k$  = reaktionopeusvakio, ja  $t$  = säilytysaika) avulla, sillä haihtumisen todettiin noudattavan 1. kertaluvun kinetiikkaa (Kalliorinne ym., 1990). Käyrien  $k$ -arvojen keskiarvon avulla määritettiin puoliintumisaika  $t_{1/2}$ , kaavan  $t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$  avulla ja puoliintumisaikaa käyttäen laskettiin vesinäytteiden alkuperäiset pitoisuudet.

## 4. TULOKSET

Tulokset-osio on jaettu analyysimenetelmän tuloksiin, vesinäytteistä saatuihin tuloksiin sekä tilastollisiin tuloksiin.

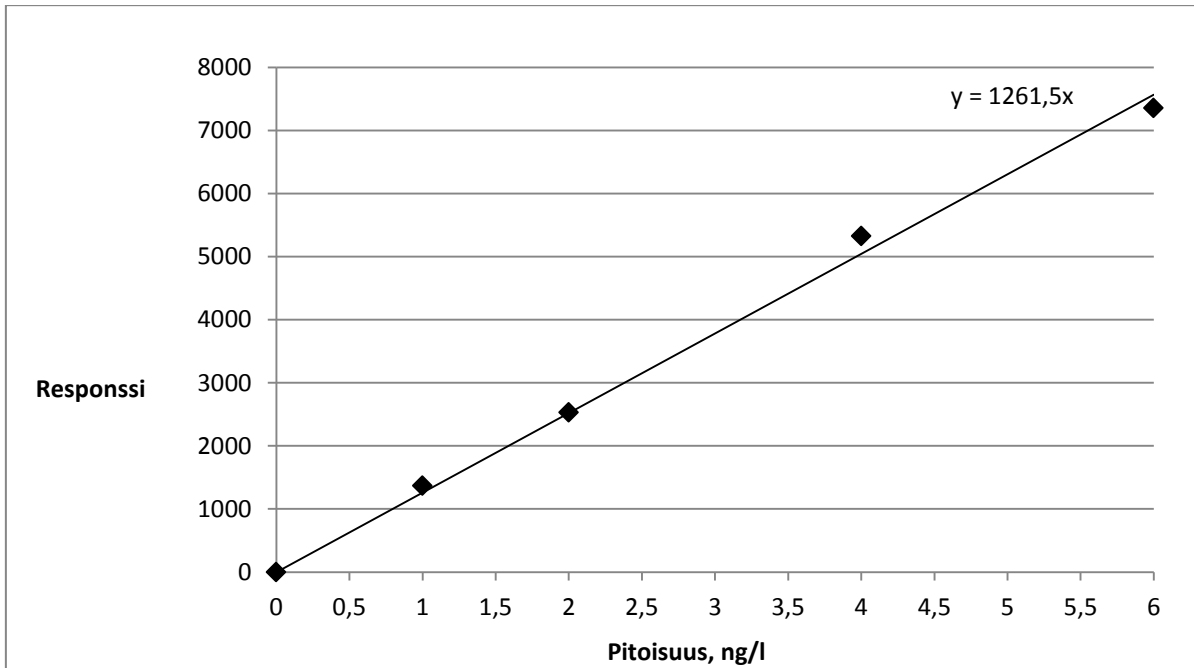
### 4.1. Menetelmä

Kuvassa 11 on MIB:n kalibrointisuora ja kuvassa 12 on GSM:n kalibrointisuora. Kutakin pitoisuutta vastaavan responssin arvo on kaikkien samaa pitoisuutta olleiden näytteiden responssien keskiarvo.



Kuva 11. MIB:n standardisuora. Kunkin pitoisuuden responssi on usean eri mittauksen keskiarvo. Ohut trendiviiva kertoo laskennallisen suoran ja sen yhtälö on merkitty suoran yläpuolelle.





Kuva 12. GSM:n standardisuora. Kunkin pitoisuuden responssi on usean eri mittauksen keskiarvo. Ohut trendiviiva kertoo laskennallisen suoran ja sen yhtälö on merkitty suoran yläpuolelle.

Standardisuoramittausten suhteellinen päivittäinen hajonta, rinnakkaisnäytteiden suhteellinen hajonta, mittauspäivien ja pitoisuuskohtaisten mittausten kokonaismäärät ovat taulukossa 3.

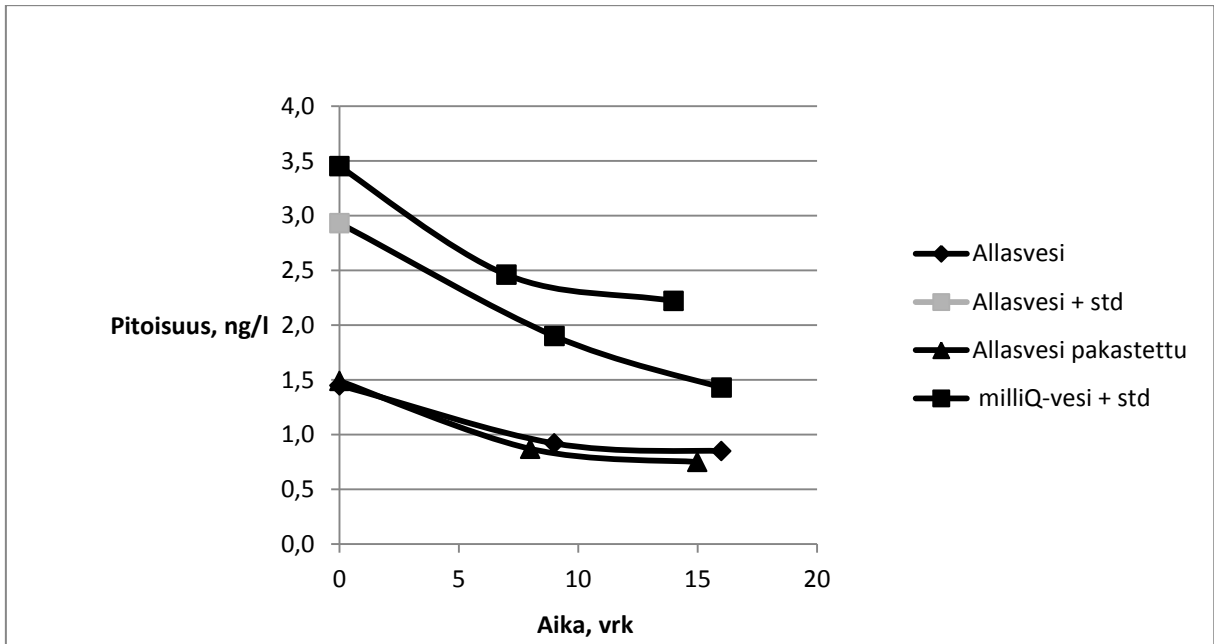
Taulukko 3. Analyysimenetelmän suhteelliset keskihajonnat.  $RSD_1$  = kaikkien rinnakkaisten mittausten suhteellinen keskihajonta,  $RSD_2$  = samana päivänä mitattujen rinnakkaisnäytteiden keskihajonta (keskiarvo useammalta päivältä),  $n_d$  = mittauspäivien määrä,  $n_a$  = mittausten kokonaismäärä

Pitoisuus (ng/l)	MIB		GSM		$n_d$	$n_a$
	$RSD_1$ (%)	$RSD_2$ (%)	$RSD_1$ (%)	$RSD_2$ (%)		
0	0	0	0	0	6	6
1	30,6	3,2	59,7	3,2	3	7
2	10,1	3,0	53,4	5,7	4	9
4	23	5,2	42,6	9,0	4	11
6	22	7,1	42,4	7,8	4	9

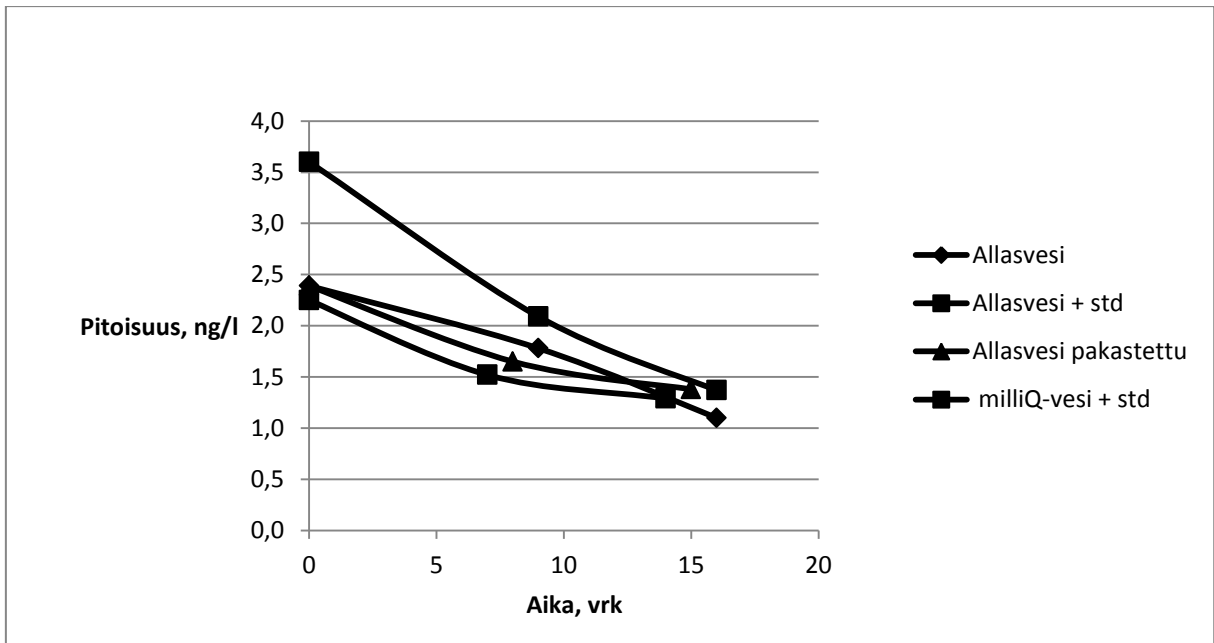
## 4.2. Vesinäytteet

### 4.2.1. Säilyvyyskoe

Kuvissa 13 ja 14 esitettyjen tulosten perusteella haihtumisen pääteltiin olevan lähinnä 1. kertaluokan mukaista haihtumista.



Kuva 13. MIB-säilyvyyskokeen tulokset.

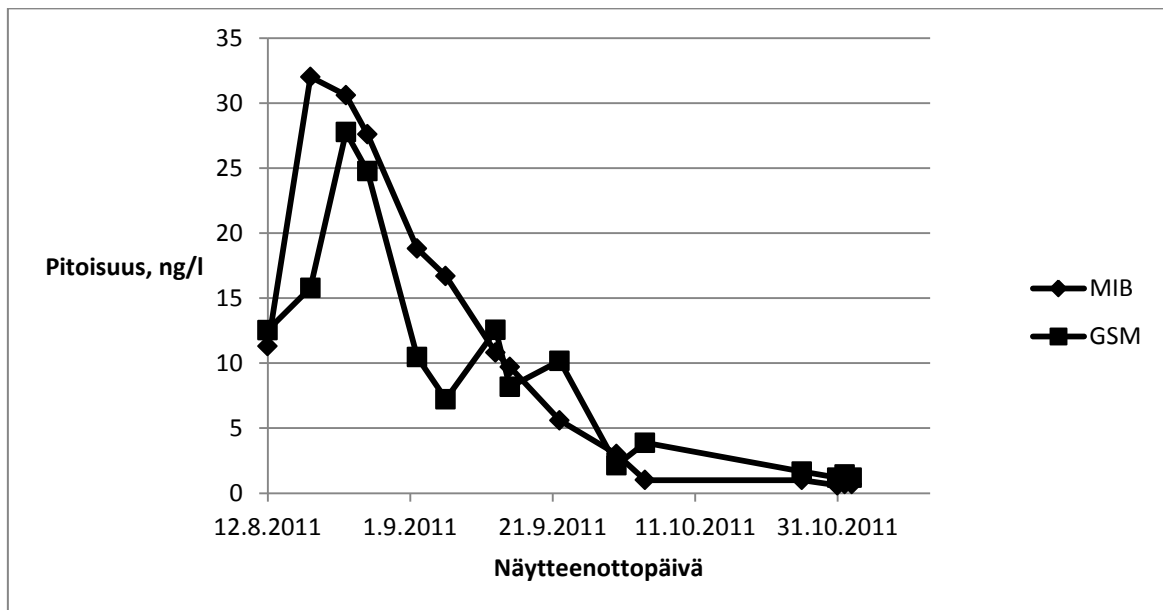


Kuva 14. GSM-säilyvyyskokeen tulokset.

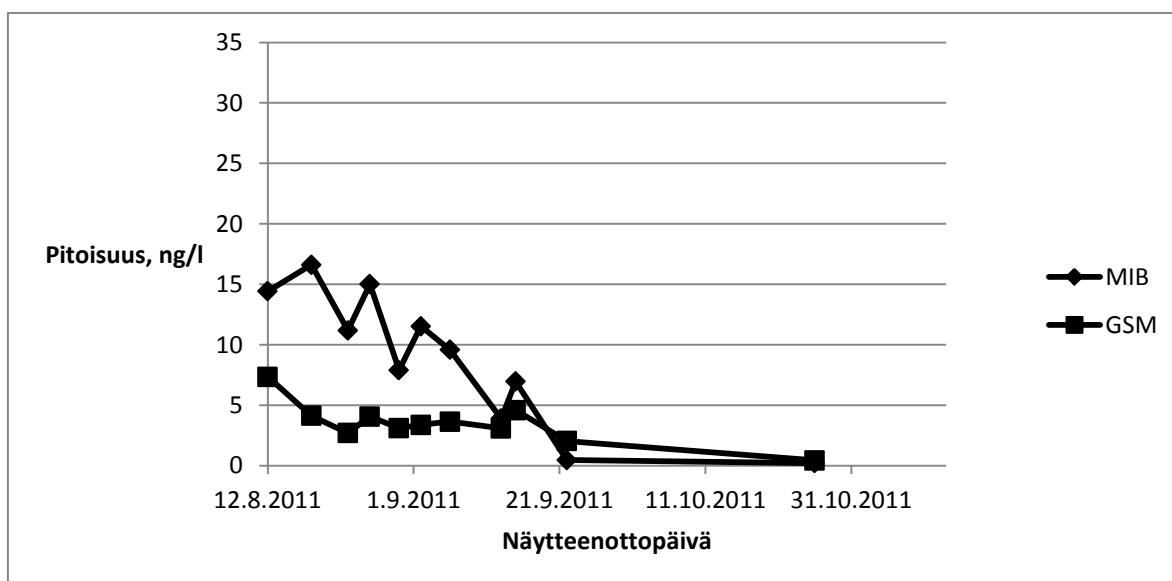
Puoliintumisajoiksi saatiin 17,8 vrk (MIB) ja 14,9 vrk (GSM), mikä tarkoittaa aineen haihtumista 50 % alkuperäisestä pitoisuudesta ko. ajassa.

#### 4.2.2. Pitoisuudet allas- ja tulovedessä

Kuvassa 7 on esitetty allasveden MIB- ja GSM-pitoisuudet käyttäen oletusta 1. kertaluvun mukaisesta haihtumisesta. Kuvissa 8 on vastaavasti tuloveden MIB- ja GSM-pitoisuudet.



Kuva 15. Allasveden MIB- ja GSM-pitoisuus. Mitatut tulokset on korjattu säilyvyydestin oletuksella, että haihtuvuus on ollut 1. kertaluvun mukaista.

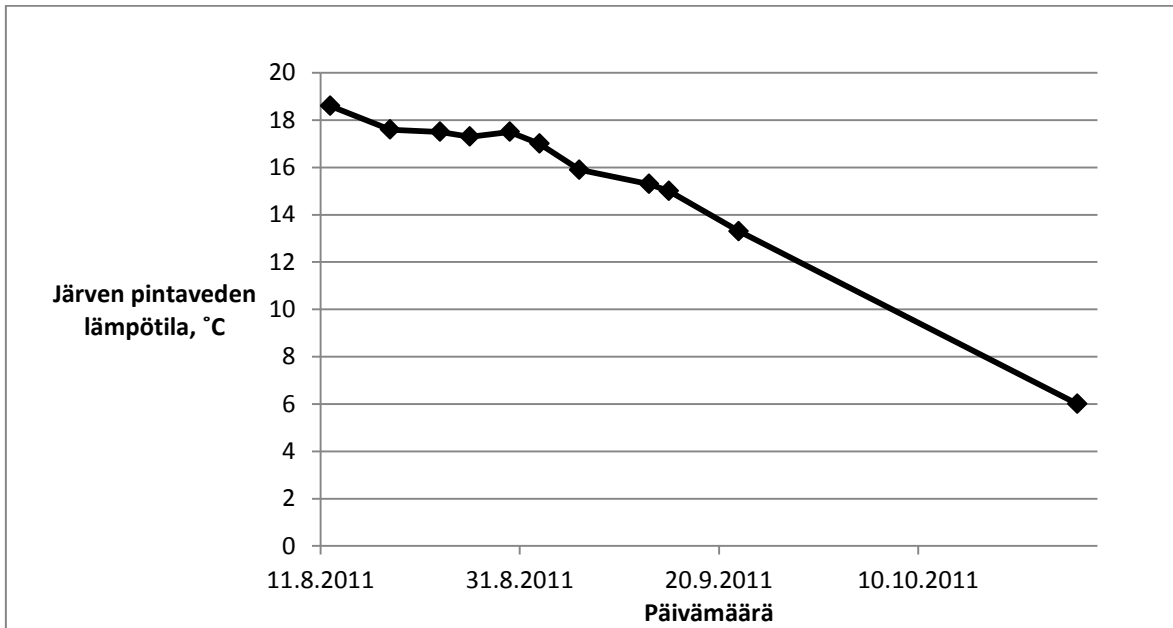


Kuva 16. Tuloveden MIB- ja GSM-pitoisuus. Mitatut tulokset on korjattu säilyvyydestin oletuksella, että haihtuvuus on ollut 1. kertaluvun mukaista.

Tutkimuksen tulos kertoo MIB:n pitoisuuden olleen suuremman sekä allas- että tulovedessä. Pitoisuuserot osoittavat MIB:a ja GSM:a syntyvän myös kierto-vesiprosessissa. Näiden aineiden muodostumispaikkaa prosessissa ei tiedetä tämän tutkimuksen perusteella.

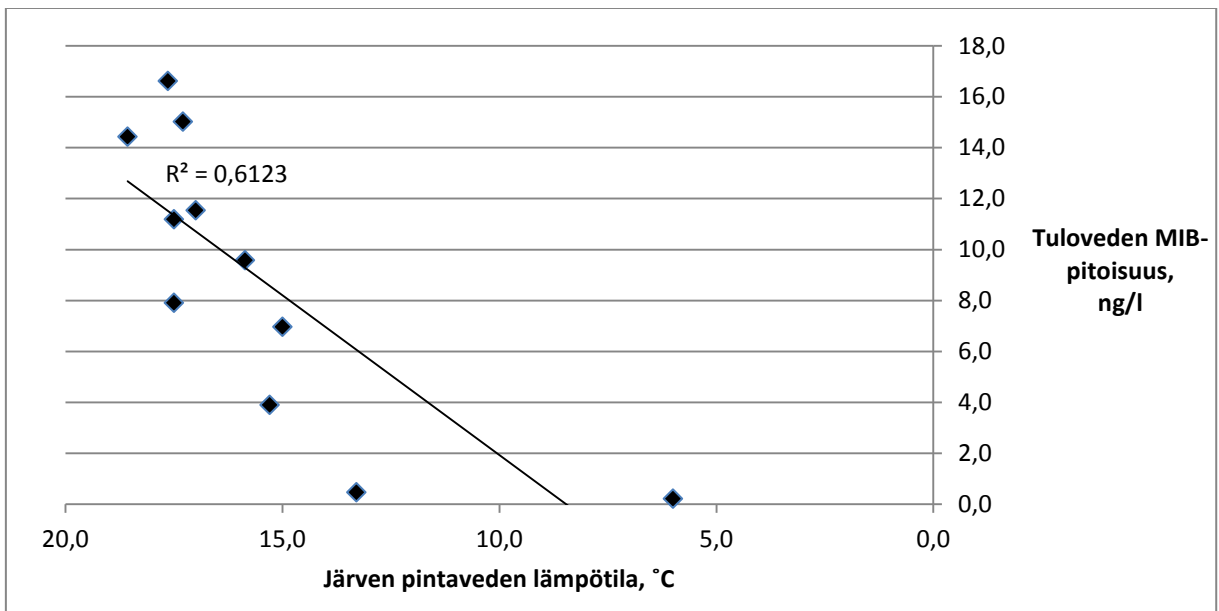
#### 4.3. MIB- ja GSM-pitoisuuksien korrelaatio järven pintaveden lämpötilaan

Laitokseen tuleva vesi otetaan paikallisesta järvestä, jonka pintaveden lämpötila-arvot ovat kuvassa 17.

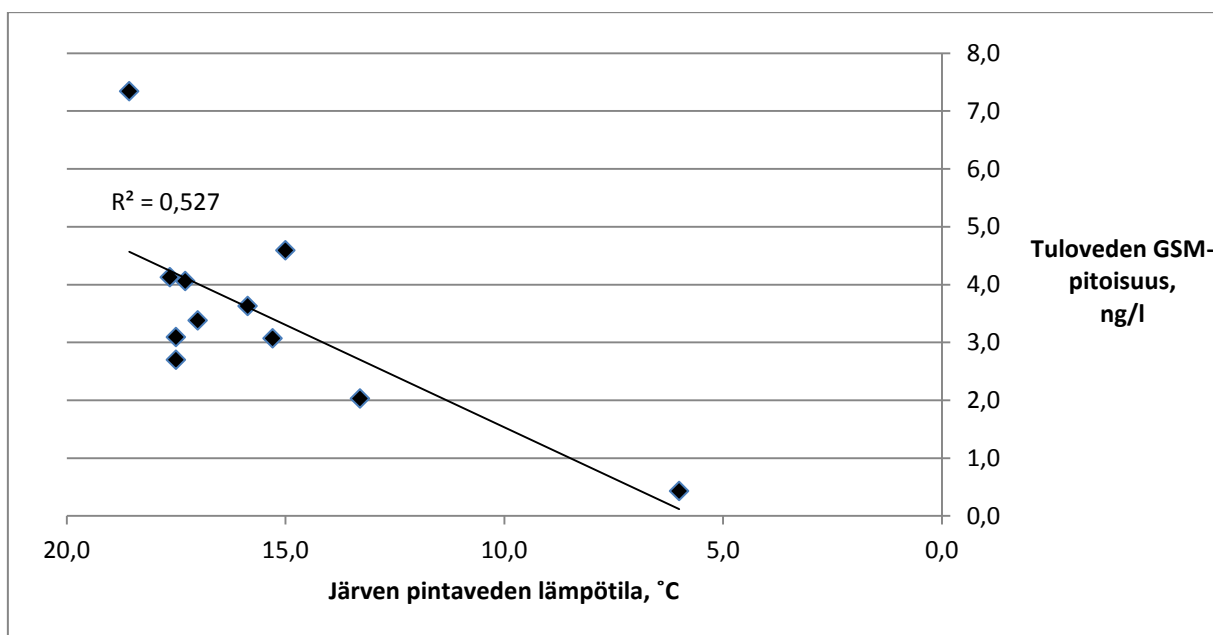


Kuva 17. Pintaveden lämpötila järvessä, josta tulovesi johdetaan laitokseen (Pohjois-Savon ympäristökeskus, 2011).

Tuloveden MIB- sekä GSM-pitoisuuksien riippuvuus järven pintaveden lämpötilasta on esitettyinä kuvissa 18 ja 19. Sekä R:n että p:n arvot määritettiin SPSS-ohjelmalla (IBM SPSS Statistics 19, International Business Machines Corporation, Yhdysvallat).



Kuva 18. Tuloveden MIB-pitoisuus järven pintaveden lämpötilan funktiona.  $R^2 = 0,612$ , lämpötila selittää noin 61 % MIB:n varianssista.  $R = 0,782$  - voimakas korrelaatio.  $p = 0,004$  - tilastollisesti merkittävä.



Kuva 19. Tuloveden GSM-pitoisuus järven pintaveden lämpötilan funktiona.  $R^2 = 0,527$ , lämpötila selittää noin 53 % GSM:n varianssista.  $R = 0,723$  - voimakas korrelaatio.  $p = 0,011$  - tilastollisesti merkittävä.

## 5. POHDINTA

Mittausjakson alussa 12.8. sekä MIB:n että GSM:n pitoisuus allasvedessä oli hieman yli 10 ppt. Tästä tasosta MIB-pitoisuus nousi 32 ppt:hen ja GSM-pitoisuus 27 ppt:hen 1-2 viikon aikana, jonka jälkeen kummankin aineen pitoisuudet pienenevät lähes tasaisesti ollen lokakuun alussa alle 5 ppt.

Saadun tuloksen perusteella syksyisin tapahtuvaan maku- ja hajuhaittojen kasvuun vaikuttaa MIB:n ja GSM:n pitoisuuden nousu selvästi yli ihmisen aistiman hajukynnyksen. Jo ennen tutkimusjakson alkamista kalanviljelylaitoksen henkilökunnan kanssa käydyissä keskusteluissa ilmeni, että kiertovesijärjestelmässä kasvatetuissa kaloissa on sekä voimakkaampi että erilainen haju kuin luonnon kaloissa. Tutkimuksen tulos tukee tätä käsitystä, koska standardeja haistelemalla MIB:n haju on selvästi terävämpi ja MIB:n pitoisuus allasvedessä on korkeampi kuin geosmiinin. Myös kummankin aineen pitoisuudet olivat suuremmat allasvedessä kuin luonnon vedessä.

Sekä MIB:n että GSM:n osalta tuloveden ja allasveden pitoisuusero osoittaa kumpaakin ainetta muodostuvan allasysteemissä. Myös tuloveden ja allasveden väliset MIB- ja GSM-pitoisuudet muuttuivat samanaikaisesti ja samansuuntaisesti. Olisi tarvittu erillinen tutkimus, jotta olisi voitu todistaa tuloveden ja allasveden välisten MIB- ja GSM-pitoisuuksien samanaikaisten ja samansuuntaisten muutoksien johtuneen tulovedessä olevien kiintoaineiden

ja mikrobien aiheuttamaksi. Tämä on kuitenkin erittäin todennäköistä, koska ravinne- ja lämpötilaolosuhteet ovat prosessivedessä otolliset aineiden syntymiselle. Tuloveden vaikutus voitaisiin todistaa käyttämällä MIB- ja GSM-vapaata vettä, esim. analysoitua pohjavettä tulovetenä, mutta se olisi iso projekti, sillä 1 litra / s tarkoittaa yli 5000 m<sup>3</sup> / 2 kk. Näin ollen luonnon vettä (= pintavesi) käytettäessä ainoaksi keinoksi jää elo-syyskuussa kalojen pitäminen puhtaassa vedessä, jos ko. aineet halutaan poistaa kaloista. Koska pintavesissä tiedetään kummankin aineen muodostuvan (Jüttner & Watson, 2007), pintaveden käyttöä tulisi lisäksi tutkia tarkemmin. Koska MIB:n ja GSM:n haju tunnistetaan ympäri vuoden kalanviljelylaitoksella (Tuotantopäällikkö, 2012), olisi tutkittava, tuleeko MIB:a ja GSM:a tuottavia aineita pintaveden mukana muulloinkin kuin syksyllä. Jos näin on, pohjaveden käyttö ratkaisisi todennäköisesti ongelman.

Mikäli halutaan tutkia muodostuuko MIB:a ja GSM:a biofiltterissä, pitää näytteet ottaa ennen ja jälkeen biofiltterin koko muutosprosessin ajan. Aineiden muodostuminen voidaan todennäköisesti havaita pitoisuuden ollessa allasvedessä suurimmillaan. Muutama koenäyte otettiin tässäkin tutkimuksessa, mutta näytteenottopaikka ei ollut sopiva. Haihtuvat yhdisteet karkaavat korkealla olevan putken päästä vapaasti ilmassa virtaavasta vedestä, ennen kuin näyte saatiin otettua. Myös mahdollisten biofilmikerrosten esiintymistä prosessilaitteiden seinämissä olisi syytä tutkia.

Verrattaessa tuloveden MIB- ja GSM-pitoisuutta järviveden pintalämpötilaan, saatiin näiden välille voimakas korrelaatio, kuten Tung ym. 2008 tekemässä tutkimuksessa. Aineiden pitoisuudet laskivat lämpötilan laskiessa. Kuvista 18 ja 19 voidaan nähdä sekä MIB:n että GSM:n muodostumisen pysähtyvän veden lämpötilan laskiessa 10 - 15 °C:een. Lämpötilan laskun ja valon vähenemisen vaikutuksesta myös mikrobien ravinteet vähenevät ja nämä kaikki yhdessä vaikuttavat MIB:n että GSM:n määrän pienenemiseen syksyn edetessä. Veden käyttö järvestä tulevassa runkoputkessa on suurta ja voidaan olettaa, että samana päivänä mitatut laitoksen tuloveden pitoisuudet ja järviveden pintalämpötilat vastaavat ajallisesti hyvin toisiaan. Vaikka tutkimusjaksolla tulovedessä aineiden pitoisuudet korreloi hyvin järviveden lämpötilan kanssa, kysymys ei ole pelkästään lämpötilasta. Heinäkuussa järviveden lämpötila on korkeimmillaan, siitä huolimatta suurta hajuongelmaa laitoksella ei tuolloin esiinny. Se, miksi elo-syyskuussa tapahtuu luonnonvedessä muutos, joka johtaa MIB:n ja GSM:n pitoisuuden lisääntymiseen allasvedessä, ei ole tiedossa. Muualla on saatu vastaavia tuloksia ja tutkimuksien perusteella epäilyt kohdistuvat leväkasvustoihin (Schram, 2012).

Menetelmän päivittäinen variaatio on yhtä poikkeusta (MIB, 2 ng/l) lukuun ottamatta johdonmukainen konsentraation suhteen, mitä pienempi pitoisuus sitä suurempi hajonta. Koska kyseessä ovat erittäin pienet pitoisuudet ja standardisuoran määrittämiseksi tehtyjen näytteiden määrä varsin vähäinen, eri päivinä mitattujen standardinäytteiden suhteelliset hajontaprosentit näyttävät suurilta, mutta ne ovat em. syistä hyväksyttävät. Menetelmää tulee kuitenkin tältä osin kehittää lisää. Toisaalta samana päivänä tehtyjen rinnakkaisnäytteiden suhteellinen hajontaprosentti oli erittäin hyvä.

Kaasukromatografissa oli jossain vaiheessa myös merkittävää päivittäistä retentioaikojen vaihtelua. Tässä tapauksessa vaihtelu ei vaikuttanut analyysituloksiin, sillä kaikkien aineiden piikkien retentioajat muuttuivat samalla tavalla ja niiden järjestys pysyi samana. Työssä käytetty GC-MS ei ollut elinkaarensa alkutaipaleella ja olisi ollut mielenkiintoista testata uudempaa laitetta ainakin eri päivinä saatujen tulosten vaihtelun osalta. Massaspektrometriassa tyypillisimpiä virhelähteitä ovat muista aineista muodostuvat samankokoiset ionifragmentit. Taustan vaihtelut, häiriöpiikit, vuodot yms. ovat virhelähteitä niin massaspektrometriassa kuin kaasukromatografiassakin. Mittausepävarmuutta lisäävät kaikki käytettävät laitteet, joiden toiminnan vaihtelut tulisi eliminoida mahdollisimman pieneksi, koska luotettavat tulokset perustuvat pitkälti hyvään toistettavuuteen. Virhelähteitä tarkasteltaessa tulee ottaa huomioon myös analysoijasta itsestään johtuvat virheet. Niitä voi olla satunnaisia, kuten häiritsevät puhelut, ympärillä olevien henkilöiden takia huomio siirtyminen pois analysoinnista, liiallisen kiireen aiheuttamat virheet ja monet muut asiat kuten vireystila. Systemaattisia henkilövirheitä itse on vaikea huomata, niiden toteamiseksi tulisi saman alan asiantuntijan tarkkailla jonkin aikaa työskentelyä. Punnitus- ja pipetointivirheet voivat olla joko henkilöstä tai laitteesta johtuvia.

Alkuperäisten standardien pitoisuudet oli ilmoitettu noin 10 mg / ml (MIB) ja noin 2 mg / ml (GSM). Laskennassa käytettiin 10 mg / ml ja vastaavasti 2 mg / ml. Noin-arvon ja laskennassa käytetyn arvon erotuksesta aiheutuvaa virhettä on vaikea määrittää.

Menetelmän validointi suoritettiin ennalta tehdyn validointisuunnitelman mukaisesti. Ainoastaan menetelmän detektioalarajan määrittäminen jäi ajan puutteen vuoksi tekemättä. Toisaalta, kun työn aikana tiedossa ollut nenän detektioraja alitettiin reilusti, ei määrittämiselle ollut tarvetta.

Jonkinlainen varmistus menetelmän toimivuudelle, kuten deuteroidun standardiaineen käyttö sisäisenä standardina, olisi ollut tarpeen. Rinnakkaisnäytteet osoittivat varsin suurta päivittäistä vaihtelua ja sisäisen standardin avulla responssit olisi voitu suhteuttaa sen pitoisuuksiin. Menetelmän kehityksessä testattiin, kuten tavoitteena oli, pikaisesti DHN sisäisenä standardina, mutta tämä ei näyttänyt soveltuvan sisäiseksi standardiksi, koska sen responssi kasvoi lähes vastaavalla tavalla kuin MIB:n ja GSM:n responssi, vaikka pitoisuus pysyi samana. Vaikutti siltä, että kysymyksessä olisi ollut kilpailu adsorbentin sitoutumispaikoista SPME-kuidussa, mutta asiaa ei tutkittu tarkemmin ajan puutteen vuoksi. Yksi mahdollinen syy on, että koe tehtiin työn alkuvaiheessa, jolloin menetelmäkehitys oli kesken. Todennäköisin syy on liian vähäinen näytteiden määrä, jolloin johtopäätöksien tekemiseen ei ole riittäviä perusteita.

Myös *salting out* -tekniikkaa kokeiltiin näytteen esirikastuksessa. Sitäkään ei kuitenkaan otettu lopulliseen menetelmään, sillä suolan lisäys lisäsi huomattavasti häiritsevien taustapiikkien määrää. Suolan käyttö näytteissä nosti responsseja MIB:llä lähes kolminkertaiseksi ja GSM:llä yli kaksinkertaiseksi, mutta analyysi oli riittävän herkkä ilman suolaakin.

Näytteiden käsittely on yksi analysoinnin tärkeimmistä vaiheista. Näyteastioiksi valitut pullot osoittautuivat soveltumattomiksi haihtuvien yhdisteiden säilytykseen ja tämän vuoksi oli tehtävä säilyvyyskoe lähtöpitoisuuksien arviointia varten. Tämän lisäksi eräs mahdollinen pitoisuuksien muuttumiseen vaikuttava tekijä pulloja säilytettäessä on mikrobitoiminta. Se voi vaikuttaa joko pienentävään tai suurentavaan suuntaan. Mahdollisen mikrobitoiminnan vaikutus jätettiin tutkimusta tehtäessä huomiotta. Pienentävään suuntaan vaikuttaa haihtuminen, joko itse pullomateriaalin, muovin (HDPE = high density polyethylene = korkeatiheksinen polyeteeni) läpi tai korkin tiivisteiden kautta. Säilyvyyskokeessa yksi epävarmuustekijöistä oli kalanviljelylaitoksen jääkaapin eri osissa ollut erilainen lämpötila. Osa näytteistä oli jäänyt. Jäätymisen vaikutusta ja sulatuksen aikana johdetun lämmön vaikutusta on vaikea arvioida. Vaikkei haihtuminen säilytettäessä olisi tapahtunutkaan aivan 1. kertaluvun mukaan, arviota voitaneen kuitenkin pitää varsin luotettavana. Myös säilyvyysvertailu tehtiin lasi- ja muovipullon välillä, mutta tämä epäonnistui teknisen kömmähdyksen vuoksi.

Näytteiden stabilointiin käytetyn lämpökaapin lämpötila vaihteli välillä 58 - 62 °C. Suurimmassa osassa rinnakkaisnäytteitä lämpötilan nousu näyttää vaikuttaneen pitoisuutta



nostavasti, mutta tätä ei erikseen tutkittu. Myöskään mittauksen aikaeron vaikutusta ensimmäisen ja kolmannen rinnakkaisnäytteen välillä ei tarkkaan tiedetä, viimeinen näytehän seisoi huoneenlämmössä pitempään kuin ensimmäiset.

Aika oli tämän tutkimuksen suurin rajoittava tekijä. Menetelmän kehitys osoittautui haasteelliseksi. Työn aikana ilmeni myös useita, tähän kirjoittamattomia vastoinkäymisiä ja kehittäminen jäi vaillinaiseksi. Menetelmän olisi ollut hyvä olla valmiina siinä vaiheessa, kun vesinäytteitä alettiin ottaa, jotta niitä ei olisi tarvinnut säilyttää. Toisaalta näytteiden häviämistä pulloista ei edes etukäteen osattu ajatella, mutta asia päätettiin tutkia varmuuden vuoksi, kun asiaa alettiin epäillä. Kalanviljelylaitos oli käyttänyt näitä näytepulloja vesinäytteiden tutkimiseen, mutta tähän asiaan liittyvää kirjallisuuden tutkimista olisi pitänyt tehdä ennen työn alkua. Kirjallisuudesta löytyy tietoa HDPE:n kaasunläpäisevyydestä (Plastics New Zealand Incorporated, 2012; Papiernik, 2002).

Ennen seuraavien tutkimusten aloittamista tulisi menetelmää kehittää siten, että eri päivien välinen tulosvaihtelu olisi pienempi. Näytteet tulee ottaa näyteastioihin suoraan kalanviljelylaitoksella ja analysoida mahdollisimman nopeasti luotettavimman tuloksen saamiseksi. Jos tarvitaan säilyttämistä, säilyvyyskoe tulee tehdä erimateriaalisten näyteastioiden välillä. Biofilterin jälkeinen näyte tulee ottaa jostakin muusta kohdasta kuin tässä tutkimuksessa.

Tässä tutkimuksessa saatua menetelmää voidaan käyttää myös juomavesien makuhaittojen tutkimisessa sekä soveltuvin osin rakennusten mahdollisten homevaurioiden tutkinnassa (Rantamäki ym., 2000).

## LÄHTEET

- Akron University, 2010a. 2-methylisoborneol. Verkkodokumentti. Kemian laitos, Akronin yliopisto, Ohio, Yhdysvallat. Saatavilla: <http://ull.chemistry.uakron.edu/erd/Chemicals/4000/298.html>. Viitattu 11.1.2012.
- Akron University, 2010b. Geosmin. Verkkodokumentti. Kemian laitos, Akronin yliopisto, Ohio, Yhdysvallat. Saatavilla: <http://ull.chemistry.uakron.edu/erd/Chemicals/26000/25632.html>. Viitattu 11.1.2012.
- Beckmann K, Messinger J, Badger M, Wydrzynski T, Hillier W, 2009. On-line mass spectrometry: membrane inlet sampling. Verkkodokumentti. Australian kansallinen yliopisto, Canberra. Viitattu 5.2.2012.
- Benanou D, Acobas F, Deroubin M R, David F, Sandra P, 2003. Analysis of off-flavors in the aquatic environment by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary GC/MS/olfactometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 376, no. 1, pp. 69-77.
- Braga G S, Paterno L G, Fonseca F J, 2012. Performance of an electronic tongue during monitoring 2-methylisoborneol and geosmin in water samples. *Sensors and Actuators, B: Chemical*.
- Burr G S, Wolters W R, Schrader K K, Summerfelt S T, 2012. Impact of depuration of earthy-musty off-flavors on fillet quality of Atlantic salmon, *Salmo salar*, cultured in a recirculating aquaculture system. *Aquacultural Engineering*.
- Clark D P, Pazdernik N J, 2009. *Biotechnology, Applying the genetic revolution*. 768 s. Elsevier Academic Press. Burlington, Massachusetts, Yhdysvallat.
- Contini M, Esti M, 2006. Effect of the matrix volatile composition in the headspace solid-phase microextraction analysis of extra virgin olive oil. *Food Chemistry* 94 (2006) 143–150.
- Cortada C, Vidal L, Canals A, 2011. Determination of geosmin and 2-methylisoborneol in water and wine samples by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, no. 1, pp. 17-22.
- Cotton S, 2009. Geosmin, the smell of countryside. Verkkodokumentti. School of Chemistry, University of Bristol, UK. Saatavilla: <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/geosmin/geosminh.htm>. Viitattu 5.2.2012.
- De Lloyd D, 2000. *Theory and practice of Capillary Column Gas Chromatography*. Verkkodokumentti. Chem. Dept, The University of The West Indies, St. Augustine campus, The Republic of Trinidad and Tobago. Saatavilla: <http://delloyd.50megs.com/moreinfo/gaschrom.html>. Viitattu 4.3.2012.
- Deng X, Xie P, Qi M, Liang G, Chen J, Ma Z, Jiang Y, 2012. Microwave-assisted purge-and-trap extraction device coupled with gas chromatography and mass spectrometry for the determination of five predominant odors in sediment, fish tissues, and algal cells. *Journal of Chromatography A*, vol. 1219, pp. 75-82.

- Dietz C, Sanz J, Cámara C, 2006. Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques. *Journal of Chromatography A*, vol. 1103, no. 2, pp. 183-192.
- Drikas M, Dixon M, Morran J, 2009. Removal of MIB and geosmin using granular activated carbon with and without MIEX pre-treatment. *Water research*, vol. 43, no. 20, pp. 5151-5159.
- Gates P, 2009. Quadruple & Triple Quadrupole (QQQ) Mass Analysis. Verkkodokumentti. Bristolin yliopisto, UK.Saatavilla: <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/quad-massspec.html>. Viitattu 11.1.2012.
- Gates P, 2005. The History of Mass Spectrometry. Verkkodokumentti. Bristolin yliopisto, UK.Saatavilla: <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/history.html>. Viitattu 11.1.2012.
- Guttman L, van Rijn J, 2008. Identification of conditions underlying production of geosmin and 2-methylisoborneol in a recirculating system. *Aquaculture*, vol. 279, no. 1-4, pp. 85-91.
- Guttman L, van Rijn J. 2009. 2-Methylisoborneol and geosmin uptake by organic sludge derived from a recirculating aquaculture system. *Water research*, vol. 43, no. 2, pp. 474-480.
- Hakala J T, 2009. Uusi graduopas. Toinen painos. 252 s. Gaudeamus, Helsinki.
- Ho L, Tang T, Monis PT, Hoefel D, 2012. Biodegradation of multiple cyanobacterial metabolites in drinking water supplies. *Chemosphere* 87 (2012) 1149–1154.
- Houle S, Schrader K K, Le Franccois N R, Comeau Y, Kharoune M, Summerfelt S T, Savoie A, Vandenberg G W, 2011. Geosmin causes off-flavour in arctic charr in recirculating aquaculture systems. *Aquaculture Research*, vol. 42, no. 3, pp. 360-365.
- Jelén H, Majcher M, Zawirska-Wojtasiak R, Wiewiórowska M, Wasowicz E, 2003. Determination of Geosmin, 2-Methylisoborneol, and a Musty-Earthy Odor in Wheat Grain by SPME-GC-MS, Profiling Volatiles, and Sensory Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, no. - 24, pp. 7079 -7085.
- Jüttner F, Watson S B, 2007. Biochemical and ecological control of geosmin and 2-methylisoborneol in source waters. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, no. 14, pp. 4395-4406.
- Kalliorinne K, Kankaanperä A, Kivinen A, Liukkonen S, 1990. Fysikaalinen kemia 3, Dynamiikka. 189 s, Kirjayhtymä, Helsinki.
- Komatsu M, Tsuda M, Omura S, Oikawa H, Ikeda H, 2008. Identification and functional analysis of genes controlling biosynthesis of 2-methylisoborneol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 21, pp.
- Koskela J, Kankainen M, Setälä J, Naukkarinen M, Vielma J, 2007. Kuhan ruokakalakasvatuksen kannattavuus verkkoallaskasvatuksessa ja lämminvesiviljelyssä. Verkkodokumentti. Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos, Helsinki. Saatavilla: <http://www.rktl.fi/www/uploads/pdf/raportti403.pdf>. Viitattu 19.1.2012.


- Lappi J, 2011. Geosmiinin määrittäminen vesinäytteistä SPME-GC-MS -menetelmällä. Projektityö. Itä-Suomen yliopisto.
- Lawton L A, Robertson P K J, Robertson R F, Bruce F G, 2003. The destruction of 2-methylisoborneol and geosmin using titanium dioxide photocatalysis. *Applied Catalysis B: Environmental*, vol. 44, no. 1, pp. 9-13.
- Li B, Irvin S, 2007. The comparison of alkalinity and ORP as indicators for nitrification and denitrification in a sequencing batch reactor (SBR). *Biochemical engineering journal*, vol. 34, no. 3, pp. 248-255.
- Li M, Xue Q, Zhang Z, Feng C, Chen N, Lei X, Shen Z, Sugiura N, 2010. Removal of geosmin (trans-1,10-dimethyl-trans-9-decalol) from aqueous solution using an indirect electrochemical method. *Electrochimica Acta*, vol. 55, no. 23, pp. 6979-6982.
- Li Y, Ruan Q, Li Y, Ye G, Lu X, Lin X, Xu G, 2012. A novel approach to transforming a non-targeted metabolic profiling method to a pseudo-targeted method using the retention time locking gas chromatography/mass spectrometry-selected ions monitoring. *Journal of Chromatography A*, , no. 0.
- Martins C I M, Eding E H, Verdegem M C J, Heinsbroek L T N, Schneider O, Blancheton J P, d'Orbcastel E R, Verreth J A J, 2010. New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. *Aquacultural Engineering*, vol. 43, no. 3, pp. 83-93.
- Mauranen K, Puntala E, 1995. *Biostatistiikka*. Kuopion yliopisto, Kuopio.
- Mester Z, Sturgeon R, 2005. Trace element speciation using solid phase microextraction. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, vol. 60, no. 9–10, pp. 1243-1269.
- Morales-Valle H, Silva L C, Paterson R R M, Oliveira J M, Venâncio A, Lima N, 2010. Microextraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry for improved analysis of geosmin and other fungal "off" volatiles in grape juice. *Journal of microbiological methods*, vol. 83, no. 1, pp. 48-52.
- Nelson D, Cox M. 2008. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 1158 s. pp. 85. Viides painos. W.H.Freeman and company, New York.
- Ng C, Losso J N, Marshall W E, Rao R M, 2002. Freundlich adsorption isotherms of agricultural by-product-based powdered activated carbons in a geosmin–water system. *Bioresource technology*, vol. 85, no. 2, pp. 131-135.
- Noble A C, Summerfelt S T, 1996. Diseases encountered in rainbow trout cultured in recirculating systems. *Annual Review of Fish Diseases*, vol. 6, pp. 65-92.
- Papiernik S K, Ernst F F, Yates S R, 2002. An apparatus for measuring the gas permeability of films. *Journal of Environmental Quality* 31 (1) , pp. 358-361
- Parinet J, Rodriguez M J, Serodes J, Proulx F, 2011. Automated analysis of geosmin, 2-methyl-isoborneol, 2-isopropyl-3-methoxypyrazine, 2-isobutyl-3-methoxypyrazine and 2,4,6-trichloroanisole in water by SPME-GC-ITDMS/MS. *International journal of environmental analytical chemistry*, vol. 91, no. 6, pp. 505-515.

- Perly P, Baudin C, Gosselin P, 2000. US Patent 6024879 – Water purification using cyclodextrins. Yhdysvallat.
- Plastics New Zealand Incorporated, 2012. HDPE Plastic Packaging. Verkkodokumentti. Plastics New Zealand Incorporated, Uusi Seelanti. Saatavilla: <http://www.plastics.org.nz/documents/ronz-hdpe-fact-sheet.pdf>. Viitattu 20.8.2012.
- Pohjois-Savon ympäristökeskus, 2012. Pintavesien lämpötilat Pohjois-Savossa 2011.
- Punrattanasin W, Spada C, 1997. Gas Chromatography. Verkkodokumentti. Virginia Tech, Blacksburg, Virginia, Yhdysvallat. Saatavilla: <http://www.cee.vt.edu/ewr/environmental/teach/smprimer/gc/gc.html>. Viitattu 11.1.2012.
- Rantamäki J, Kääriäinen H, Tulla K, Viitanen H, Kalliokoski P, Keskikuru T, Kokotti H, Pasanen A, 2000. Rakennusten ja rakennusmateriaalien homeet. Verkkodokumentti. Valtion teknillinen tutkimuskeskus, Rakennustekniikka / Kuopion yliopisto, Ympäristötieteiden laitos. Saatavilla: <http://www.vtt.fi/inf/pdf/tiedotteet/2000/T2030.pdf>. Viitattu 26.3.2012.
- Reush W, 2007. Mass Spectrometry. Verkkodokumentti. Michiganin yliopisto, Yhdysvallat. Saatavilla: <http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/MassSpec/masspec1.htm#ms1>. Viitattu 11.1.2012.
- Robertson R F, Jauncey K, Beveridge M C M, Lawton L A, 2005. Depuration rates and the sensory threshold concentration of geosmin responsible for earthy-musty taint in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, vol. 245, no. 1-4, pp. 89-99.
- Saito K, Okamura K, Kataoka H, 2008. Determination of musty odorants, 2-methylisoborneol and geosmin, in environmental water by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, vol. 1186, no. 1-2, pp. 434-437.
- Schrader K K, Summerfelt S T, 2010. Distribution of off-flavor compounds and isolation of geosmin-producing bacteria in a series of water recirculating systems for rainbow trout culture. *North American Journal of Aquaculture*, vol. 72, no. 1, pp. 1-9.
- Schrader K K, Davidson J W, Rimando A M, Summerfelt S T, 2010. Evaluation of ozonation on levels of the off-flavor compounds geosmin and 2-methylisoborneol in water and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* from recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* vol. 43, no. 2, pp. 46-50.
- Schram E., 2012. Sähköposti J Lapille 16.7.2012.
- Schram E, Swinkels W, van Eekert M, Schuman E, Kwadijk C, van de Heul J, Murk T, Schrama J, Verreth J, 2011. Off-flavour in farmed fish. Presentation at the Workshop on Recirculating Aquaculture Systems, Helsinki, Finland, 5-6<sup>th</sup> of October.
- Schreier H J, Mirzoyan N, Saito K, 2010. Microbial diversity of biological filters in recirculating aquaculture systems. *Current opinion in biotechnology*, vol. 21, no. 3, pp. 318-325.

- Sigma-Aldrich, 1997. Purge-and-Trap System Guide. Bulletin 916.
- Sigma-Aldrich, 2002. Solid Phase Micro Extraction of Odors in Drinking Water, for Analysis by GC/MS. Verkkodokumentti. Sigma-Aldrich, Yhdysvallat. Saatavilla: [http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Application\\_Notes/4685.Par.0001.File.tmp/4685.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Application_Notes/4685.Par.0001.File.tmp/4685.pdf). Viitattu 22.1.2012.
- Sigma-Aldrich, 2011. Introduction to SPME. Verkkodokumentti. Sigma-Aldrich, Yhdysvallat. Saatavilla: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/video/spme-video/introduction-video.html> [2012, 1/22].
- Song W, O'Shea K E, 2007. Ultrasonically induced degradation of 2-methylisoborneol and geosmin. *Water research*, vol. 41, no. 12, pp. 2672-2678.
- Srinivasan R, Sorial G A, 2011. Treatment of taste and odor causing compounds 2-methyl isoborneol and geosmin in drinking water: A critical review. *Journal of Environmental Sciences*, vol. 23, no. 1, pp. 1-13.
- Stein, Lewinsky, Fateen, 1995. MS Windows version of the NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectral library Standard Reference Database 1A. Version 1.1a. U.S. Secretary of Commerce on behalf of U.S.
- Sun W, Jia R, Gao B, 2012. Simultaneous analysis of five taste and odor compounds in surface water using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Frontiers of Environmental Science and Engineering in China*, vol. 6, no. 1, pp. 66-74.
- Tung S, Lin T, Yang F, Liu C, 2008. Seasonal change and correlation with environmental parameters for 2-MIB in Feng-Shen Reservoir, Taiwan, *Environmental monitoring and assessment*, vol. 145, no. 1-3, pp. 407-416.
- Tuomainen M, Mölsä H, 2011. Vesiviljelyn ohjaus Itä-Suomessa. Etelä-Savon ELY-keskus ja Itä-Suomen kalatalousryhmä. Verkkodokumentti. Saatavilla: [http://issuu.com/maakaista.fi/docs/vesiviljelyn\\_sijainnohjaus\\_it\\_\\_suomessa](http://issuu.com/maakaista.fi/docs/vesiviljelyn_sijainnohjaus_it__suomessa). Viitattu 23.1.2012.
- Tuotantopäällikkö, 2012. Suullinen tiedonanto 16.2.2012. Tämän tutkimuksen kiertovesilaitos.
- Urgeghe P P, Piga C, Addis M, Di Salvo R, Piredda G, Scintu M F, Wolf I V, Sanna G, 2011. SPME/GC-MS Characterization of the Volatile Fraction of an Italian PDO Sheep Cheese to Prevalent Lypolitic Ripening: the Case of Fiore Sardo. *Food Analytical Methods*, pp. 1-8.
- Zhu M, Aviles F J, Conte E D, Miller D W, Perschbacher P W, 1999. Microwave mediated distillation with solid-phase microextraction: determination of off-flavors, geosmin and methylisoborneol, in catfish tissue. *Journal of Chromatography A*, vol. 833, no. 2, pp. 223-230.

**LIITTEET**

1. Työohje, 2-metyyli-isoborneoli- ja geosmiinianalyysi.

 <p>UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND</p> <p>Department of Clinical Nutrition Food and Health Research Centre, ETTK</p>	Valid from: dd.mm.yy	Page 1/6	METHOD INSTRUCTION W:\LA\KRA\ravi\Laatujärjestelmä\Laboratorio\ Menetelmien työohjeet\Kliininen lab RAV
--	-------------------------	-------------	---

## 2-METYyli-ISOBORNEOLI- JA GEOSMIINIANALYYSI

### 1. Käyttökohde

2-metyyli-isoborneolin (MIB) ja geosmiinin (GSM) määrittäminen vesinäytteistä.

### 2. Periaate

Näyteastian headspace-tilasta aineet uutetaan SPME-tekniikkaa (Solid Phase Microextraction) käyttäen kuituun, jolla ne siirretään kaasukromatografiin (GC) ja sieltä detektorina käytettyyn massaspektrometriin (MS). Tuloksista tehdään standardisuora, johon verrataan vesinäytteistä saatuja tuloksia.

### 3. Esimerkkilaitteisto

Kaasukromatografi: Hewlett Packard 5890 series II Plus Gas Chromatograph

Kaasukromatografarin kolonni: Nukol™, pituus 30 m, halkaisija 0,25 mm ja filmin paksuus 0,25 µm, Supelco 24107

Massaspektrometri: Hewlett Packard 5972 series Mass Selective Detector

Tietokone

Kuitu: SPME Fiber Assembly 2 cm – 50/30 µm DVB/Carboxen™/PDMS Stable Flex™, Supelco 57348-U

Kuitupidin: Fibre Holder, Supelco 57330-U

Näyteastia: 40 ml vial, Supelco 27184

Näyteastian korkki: Polypropylene screw cap with hole 24 mm, Supelco 27057

Näyteastian korkin septumi: Blue Faced White Silicone Septa 22 mm, Supelco 2-7515

Lämpökaappi: Termaks, Norja

Magneettisekoitin: IKA, Saksa

Automaattipipettejä


Yleisiä laboratorioastioita

Höyrykattila ja keittolevy

Huom! Jos vesinäytettä joudutaan säilyttämään ennen analysointia, HDPE-pullojen (high density polyethylene = korkeatiheyksinen polyeteeni) käyttöä tulee välttää HDPE:n kaasunläpäisevyyden takia. Näytteet laimenevat ajan funktiona.

Compiled by: JL	Reviewed by: KR Approved by: OR	Replaces version:	Version: 12.08.20
--------------------	--	-------------------	----------------------



 <p>UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND</p> <p>Department of Clinical Nutrition Food and Health Research Centre, ETTK</p>	Valid from: dd.mm.yy	Page 2/6	METHOD INSTRUCTION W:\LA\KRA\ravi\Laatujärjestelmä\Laboratorio\ Menetelmien työohjeet\Kliininen lab RAV
--	-------------------------	-------------	---

#### 4. Reagenssit

GSM-standardi: Sigma-Aldrich G5908, ( $\pm$ )-Geosmin, GSM noin 2 mg/ml metanolissa.

MIB-standardi: Sigma-Aldrich M3933, MIB noin 10 mg/ml metanolissa.

Kumpaakin edellä olevaa ainetta on säilytettävä alle  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa.

Vesi: Millipore-vesi

Kaasukromatografian kantokaasu: Helium 4.6 (He > 99,996 %)

#### 5. Työvaiheet ennen varsinaista analysointia

##### 5.1 GC-MS

Varmista ensin, että GC-MS on käyttövalmiina ja että heliumia on riittävästi tutkimuksen suorittamiseen. Varmista myös injektorin septumin ja linerin kunto ja tarvittaessa vaihda ne.

Analysoijan täytyisi tuntea käytettävän laitteen toimintaan vaikuttavat asiat, ennen kuin aloittaa analysoinnin. Katso kohta 7. GC:n lämpötilaohjelma on taulukossa 1.

Taulukko 1. Kaasukromatografian lämpötilaohjelma.

Vaihe	Lämpötila tai lämpötila-alue	Aika tai lämpötilan nousunopeus
1.	$50\text{ }^{\circ}\text{C}$	1 min
2.	$50\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow 75\text{ }^{\circ}\text{C}$	$30\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min}$
3.	$75\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow 165\text{ }^{\circ}\text{C}$	$4,5\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min}$
4.	$165\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow 220\text{ }^{\circ}\text{C}$	$30\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min}$
5.	$220\text{ }^{\circ}\text{C}$	2 min

Kokonaisaika: 25,67 min.

Injektorin lämpötila:  $260\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Esimerkkilaitteistolla ja yllä olevalla ohjelmalla:


MIB detektoidaan ajalla 14.00 min - 16.50 min,  $m/z = 95$

GSM detektoidaan ajalla 16.50 min - 22.00 min,  $m/z = 112$

Heliumin virtausnopeus 1 ml /min.

Käytä esiohjelmoitua ohjelmaa, jos tiedät sellaisen olevan olemassa.

Compiled by: JL	Reviewed by: KR Approved by: OR	Replaces version:	Version: 12.08.20
--------------------	--	-------------------	----------------------

 <p>UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND</p> <p>Department of Clinical Nutrition Food and Health Research Centre, ETTK</p>	Valid from: dd.mm.yy	Page 3/6	METHOD INSTRUCTION W:\LA\KRA\ravi\Laatujärjestelmä\Laboratorio\ Menetelmien työohjeet\Kliininen lab RAV
--	-------------------------	-------------	---

## 5.2 Lämpökaappi ja magneettisekoitin

Aseta lämpökaappi lähelle kaasukromatografia työskentelyn helpottamiseksi ja aseta lämpötila 60 °C:ksi. Voit laittaa myös digitaalisen lämpömittarin kaapin ulkopuolelle ja ovitiivisteiden välistä anturijohdon kaappiin. Aseta myös magneettisekoitin kaappiin. Laita magneettisekoittimen viereen statiivi, johon liität kouran sopivalle korkeudelle kuitupidintä varten. Aseta magneettisekoittimen nopeuden säätöpyörä arvoon 6.

## 5.3 Kuitupidin

Varmista, että kuitupidinissä on oikea kuitu (harmaa yläosa). Aseta kuitu pidikkeeseen aina samalle korkeudelle, mustan osan yläreuna asteikon 2,1 kohdalle. Varmista, että kuidun pidikkeen alaosaan oleva ohjainosa on tiukasti kiinni. Tämä vaikuttaa saataviin tuloksiin jopa kaksinkertaisesti/puolittavasti. Siirron aikana kuidun tulee aina olla suojan sisällä – kuitu vaurioituu helposti. Vaikka kuitua käytetään ohjeiden mukaisesti, se suositellaan vaihdettavaksi 200 käyttökerran jälkeen ja enneminkin, jos kuitu jostain syystä vaurioituu. Uusi kuitu puhdistetaan pitämällä sitä 270 °C lämpötilassa, kaasukromatografian injektorissa tunnin.


## 5.4 Näyteastioiden puhdistus

Näyteastiat (= vialit), korkit ja septumit on puhdistettava edellisenä päivänä seuraavasti: Laita vialien pohjalle hieman vettä ja laita magneettisekoittimen sauva kuhunkin vialiin. Vialit laitetaan kattilaan, jossa vettä annetaan kiehua 3 min – älä anna veden kiehua pois vialista. Laita septumit korkin sisälle sininen puoli vialin oletettuun sisäosaan päin (oikea suunta jo ennen vialiin laittamista). Laita korkit septumeineen kattilan höyrytysosaan sinisen septumin jäädessä näkyviin. Lisää kattilaan hieman vettä, varo ettei roisku. Laita höyrytysosa ja kansi paikalleen. Anna kiehua 3 min. Vie vialit, korkit ja septumit kuivumaan yöksi lämpökaappiin, jonka lämpötila on 115 °C.

Huom! Älä laita korkkia ennen vialiin täysin kiinni, ennen ne ovat jäähtyneet huoneenlämpöiseksi. Tähän on kaksi syytä:

1. Vialiin jäähtymisen aikana muodostuva alipaine voi avattaessa imeä ennen näytteen laittoa vetokaapissa standardien käsittelystä johtuva taustailmaa vialin sisään.
2. Jos muodostuva alipaine on riittävän suuri se imaisee septumin vialin sisään.

Compiled by: JL	Reviewed by: KR Approved by: OR	Replaces version:	Version: 12.08.20
--------------------	--	-------------------	----------------------

 <p>UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND</p> <p>Department of Clinical Nutrition Food and Health Research Centre, ETTK</p>	Valid from: dd.mm.yy	Page 4/6	METHOD INSTRUCTION W:\LA\KRA\ravi\Laatujärjestelmä\Laboratorio\ Menetelmien työohjeet\Kliininen lab RAV
--	-------------------------	-------------	---

Laita korkit kiinni mahdollisimman pian, etteivät vialit pääsisi kontaminoitumaan. Jos mahdollista, pyri tekemään keitto ja kuivatus eri tilassa kuin standardien käsittely. Jos analysoit useampana päivänä, käytä samoja vialeita. On osoitettu, että välinehuollossa pesussa käyneissä vialeissa on pesuainejäämiä, jotka ovat aiheuttaneet häiriöpiikkejä ja siksi näyteastioiden puhdistus on tärkeä tehdä. Keiton aikana myös haihtuvat yhdisteet poistuvat vialista.

### 5.5 Standardien laimennukset

Laimenna käytettävät standardit haluttuun pitoisuuteen eri laboratoriossa kuin missä itse mittaus suoritetaan, jos mahdollista. Samoin vahvimmat pitoisuudet laimennetaan eri vetokaapissa kuin laimeammat. Laimennukset on tehtävä aina samana päivänä ettei komponentit ehtisi haihtua näytteistä. Tee laimennokset mittapulloihin. Tee sellainen laimennus, että voit lisätä standardin näyteastiaan yhdellä pipetoinnilla, esimerkiksi:

MIB A:  $(0,004 \text{ ml} \times 0,01 \text{ g/ml}) / 50 \text{ ml} = 800000 \text{ ng/l}$

MIB B:  $(0,02 \text{ ml} \times 800000 \text{ ng/l}) / 25 \text{ ml} = 640 \text{ ng/l}$

GSM A:  $(0,004 \text{ ml} \times 0,002 \text{ g/ml}) / 25 \text{ ml} = 320000 \text{ ng/l}$

GSM B:  $(0,05 \text{ ml} \times 320000 \text{ ng/l}) / 25 \text{ ml} = 640 \text{ ng/l}$

Kun vialissa olevaan 10 ml:aan vettä lisätään kumpaakin B-standardia sama määrä, saadaan kummankin komponentin pitoisuudeksi:

$(0,015 \text{ ml} \times 640 \text{ ng/l}) / 10,030 \text{ ml} = 1,0 \text{ ng/l}$


$(0,031 \text{ ml} \times 640 \text{ ng/l}) / 10,062 \text{ ml} = 2,0 \text{ ng/l}$

$(0,063 \text{ ml} \times 640 \text{ ng/l}) / 10,126 \text{ ml} = 4,0 \text{ ng/l}$

$(0,095 \text{ ml} \times 640 \text{ ng/l}) / 10,190 \text{ ml} = 6,0 \text{ ng/l}$

Tämä esimerkki on mittausalueelle 0 - 6,0 ng/l. Nollanäytteen teko on kappaleessa 6.

Compiled by: JL	Reviewed by: KR Approved by: OR	Replaces version:	Version: 12.08.20
--------------------	--	-------------------	----------------------

 <p>UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND</p> <p>Department of Clinical Nutrition Food and Health Research Centre, ETTK</p>	Valid from: dd.mm.yy	Page 5/6	METHOD INSTRUCTION W:\LA\KRA\ravi\Laatujärjestelmä\Laboratorio\ Menetelmien työohjeet\Kliininen lab RAV
--	-------------------------	-------------	---

## 6. Analyysin suorittaminen

Ennen varsinaista analysointia on varmistettava, että kuidusta tai GC:n kolonnista ei irtoa epäpuhtauksia. Tämä varmistetaan ajamalla ensin pelkkä kuitu injektorissa. Jos epäpuhtauksia on, kuitua tulee pitää korkeammassa lämpötilassa jonkin aikaa tai jos epäillään kolonnista tulevaa epäpuhtautta, uunia on pidettävä korkeammassa lämpötilassa. Tämän jälkeen ajetaan uudelleen pelkkä kuitu injektorissa. Jos epäpuhtauksia ei ole, voidaan aloittaa analysointi.

Tee 0-näyte laittamalla pelkkää vettä 10 ml puhdistettuun vialiin, jossa on magneettisekoittimen sauva ja analysoi se alla kuvatulla tavalla. Sen jälkeen vastaavasti pipetoi 10 ml näytettä tai standardia (katso 5.5). Vial laitetaan kahdeksaksi minuutiksi magneettisekoittimeen, joka on lämpökaapissa. Tämän jälkeen puhdistettu kuitu työnnetään septumin läpi mahdollisimman keskelle vialia. Työnnä kuitupidin septumin läpi niin pitkälle, että kuitupidin pohja koskettaa septumia (katso 5.3) ja työnnä kuitu ulos suojasta. Purista statiivissa oleva koura kuitupidin kiinni. Mitattavien komponenttien keräysaika on 20 minuuttia. Sen jälkeen näyte injektoidaan manuaalisesti kaasukromatografiin. Tee kuidun siirrot mahdollisimman nopeasti ja joka kerta samalla tavalla. Pidä kuitua näytteen syötön jälkeen injektorissa 10 min, että kuitu olisi mahdollisimman puhdas seuraavaa näytteenottoa varten ja laita se vielä 2 minuutiksi injektoriin seuraavaa näytteenottoa.

## 7. Tulosten tarkastelu

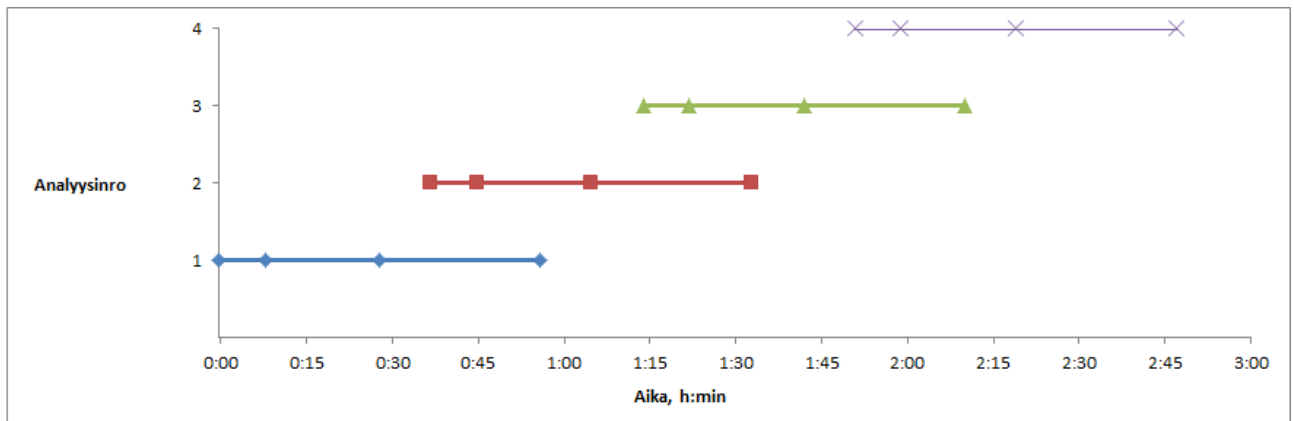
On varmistuttava, että mitataan oikeaa piikkiä. Ennen analyysijä on tehtävä ajoja suurilla pitoisuuksilla SCAN-moodissa ja verrattava saatua ionispekttriä mitattavan aineen tunnettuun ionispekttriin. Ionispektrejä on saatavana useasta eri lähteestä esim. NIST (National Institute of Standards and Technology, Yhdysvallat). Jos mitattavalle komponentille ei ionispekttriä löydy, tulee tässä tapauksessa tarkastella aiemmissä tutkimuksissa käytettyjä pääioneita, MIB = 95 ja GSM = 112. Ajoparametrit tulee olla sellaisia, etteivät muut aineet häiritsisi analyysiä.

Analyysi tehdään SIM-moodissa (Selected Ion Monitoring) ja kvantitatiivinen analysointi perustuu kunkin komponentin piikin pinta-alaan, jonka analysaattori muodostaa. Esimerkkilaitteistolla käytettiin manuaalista integrointia "Easy ID" -tilassa.

Compiled by: JL	Reviewed by: KR Approved by: OR	Replaces version:	Version: 12.08.20
--------------------	--	-------------------	----------------------

## 8. Ajan käytön suunnittelu

Jotta voidaan suunnitella analysointiin käytettävää aikaa käytettäessä esimerkkihjelmää, kuvassa 1 on esitettyä neljään analyysiin kuuluva minimiaika. Lisäksi on huomioitava näytteiden ja standardien valmistus. Tee korkeintaan kolme rinnakkaisnäytettä kerralla. Huomioi myös vialien puhdistus analyysien jälkeen.



Kuva 1. Neljän analyysin optimi ajankäyttö. Kunkin analyysin ensimmäinen jakso kuvaa näytteen stabilointiaikaa, toinen keräystä kuituun ja kolmas GC-MS -analyysiin kuluva aikaa.

## 9. Rajoitukset

Jos menetelmää käytetään hyvin pienien pitoisuuksien (alle 10 ng/l) mittaamiseen, tulosten suuri hajonta saattaa rajoittaa tulosten käsittelyä. Ohjeessa mainituilla pitoisuuksilla (kappale 5.5) suhteellinen keskihajonta eri päivinä tehdyissä analyyseissä vaihteli pitoisuuksista riippuen MIB:lla 30,6 - 22 % ja GSM:lla 59,7 - 42,4 %. Samana päivänä tehtyjen rinnakkaisnäytteiden keskihajonta (keskiarvo useammalta päivältä) oli kuitenkin alle 10 %.

## 10. Turvallisuusnäkökohtia

Käsittele reagenssejä aina vetokaapissa ja käsiin kädessä. Geosmiinillä ja 2-metyyliisoborneolilla on todettu joissakin tutkimuksissa olevan mutageenisia ominaisuuksia. Pyydä toimittajalta tai hanki netistä ajankohtaiset tiedot henkilökohtaisten suojainten käytöstä ja varotoimenpiteistä.

<p>Compiled by: JL</p>	<p>Reviewed by: KR Approved by: OR</p>	<p>Replaces version:</p>	<p>Version: 12.08.20</p>
----------------------------	--	--------------------------	------------------------------