

Markus Kukkohovi

**SPE-MENETELMÄN KÄYTTÖÖNOTTO PAH-YHDISTEIDEN  
ERISTÄMISEEN VESINÄYTTEISTÄ JA MÄÄRITTÄMISEEN GC-  
MS-LAITTEELLA**

**SPE-MENETELMÄN KÄYTTÖÖNOTTO PAH-YHDISTEIDEN  
ERISTÄMISEEN VESINÄYTTEISTÄ JA MÄÄRITTÄMISEEN GC-  
MS-LAITTEELLA**

Markus Kukkohovi  
Opinnäytetyö  
Kevät 2015  
Laboratorioalan koulutusohjelma  
Oulun ammattikorkeakoulu

# TIIVISTELMÄ

Oulun ammattikorkeakoulu  
Laboratorioalan koulutusohjelma, bioteknologian sv.

---

Tekijä: Markus Kukkohovi  
Opinnäytetyön nimi: SPE-menetelmän käyttöönotto PAH-yhdisteiden eristämiseen vesinäytteistä ja määrittämiseen GC-MS-laitteella

Työn ohjaajat: Marjatta Lehesvaara, Matti Nieminen  
Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Kevät 2015 Sivumäärä: 34 + 2 liitettä

---

Työn tarkoituksena oli ottaa käyttöön SPE-menetelmä polysyklisen aromaattisten hiilivetyjen eristämiseksi vesinäytteistä sekä tuottaa siitä työohje Mikkelin ammattikorkeakoulun ympäristölaboratorion tarpeisiin. Laboratoriossa oli valmiina uuttamiseen käytettävä laitteisto ja työhön sopivat välineistöt. Opinnäytetyö tehtiin yhteistyössä Mikkelin ammattikorkeakoulun ympäristötekniikan laboratorion kanssa.

Työssä käytettiin standardeina EPA-PAH 16 -yhdisteitä ja sisäisinä standardeina oli viisi erilaista deuteroitua PAH-yhdistettä. Keskeisenä tavoitteena oli saada hyviä standardisuoria kaikille yhdisteille ja ratkaista uuttomenetelmän käyttöönotossa ilmenevät ongelmat. Tarkoituksena oli myös kehittää ratkaisu suurien vesinäytteiden uuttamiseen. Menetelmän toimivuutta testattiin omilla tunnetuilla näytteillä.

PAH-yhdisteiden uuttojen analyyseihin käytettiin Agilent Technologiesin 5975C GC-MS -laitteistoa. Kaikille käytössä olleille yhdisteille saatiin standardisuorat, joilla pystyttiin analysoimaan tunnettujen näytteiden pitoisuuksia. Työssä ratkaistiin myös suurien vesinäytteiden näytteenotto-ongelma tilaamalla laitevalmistajalta sopivat osat. Suurille vesinäytteille käytettävää imulaitteistoa testattiin omilla tunnetuilla näytteillä, jotka antoivat luotettavia tuloksia.

---

Asiasanat: SPE-uutto, PAH-yhdiste, GC-MS

# SISÄLLYS

TIIVISTELMÄ	3
SISÄLLYS	4
SANASTO	6
1 JOHDANTO	7
2 PAH-YHDISTEET	8
2.1 Käyttäytyminen ympäristössä	9
2.2 Tutkittavat yhdisteet	10
2.3 Altistuminen ja haittavaikutukset	11
2.4 Elintarvikkeet	13
3 KIIENTEÄFAASIUUTTO	14
3.1 SPE vs. LLE	14
3.2 Materiaalit	15
3.3 Käänteisfaasi SPE	15
3.4 Käytännön toteutus	16
4 GC-MS	18
4.1 Kaasukromatografia	18
4.2 Suora höyrystävä injektointi	19
4.3 Massaspektrometria	20
4.4 Deuteroidut yhdisteet	20
5 SPE-MENETELMÄN TYÖOSUUS	22
5.1 Käytetyt laitteet, tarvikkeet ja reagenssit	22
5.2 Eristysmenetelmän käyttöönotto	23
5.3 Standardiliuosten valmistus	25
5.4 Standardiliuosten ongelmat	25
5.5 SPE-laitteen käyttö standardeilla ja näytteillä	26
5.6 GC:n ja massaspektrometrin parametrit	26
6 GC-MS-TULOKSET	29
6.1 Standardit	30
6.2 Testinäytteet	31
7 YHTEENVETO	34
LÄHTEET	36

Liite 1 5 µg näytepitoisuudet

Liite 2 0,5 µg näytepitoisuudet

## SANASTO

in vitro	tutkimusmenetelmä, jossa koe suoritetaan elävän solun tai organismin ulkopuolella
ISTD	sisäinen standardi
karsinogeeni	syöpää aiheuttava
mutageeninen	kemiallinen tai fysikaalinen vaikuttaja, joka muuttamalla DNA:n rakennetta lisää solujen mutaatioita
PAH	polysyklinen aromaattinen hiilivety
SPE	kiinteäfaasiuutto
STD	standardi

# 1 JOHDANTO

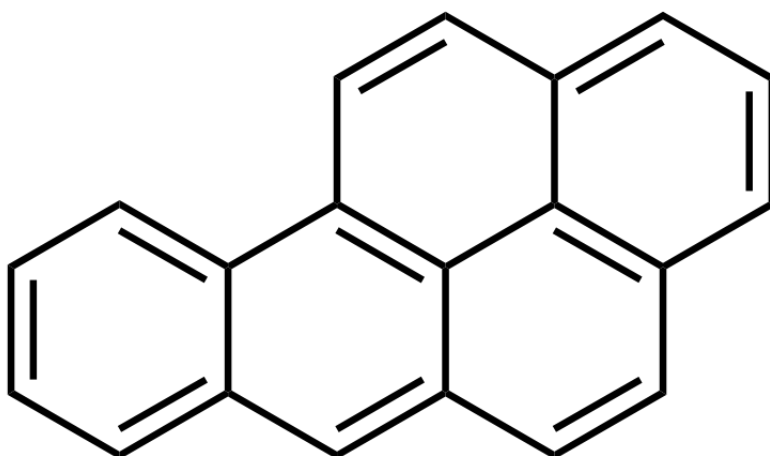
PAH-yhdisteet ovat jokapäiväisessä elämässä niistä tietämättämme. Niitä kulkeutuu elimistöihimme ilman välityksellä, ympäristöstä ja ruoasta mitä syömme. Teoriaosuudessa käsitellään aihetta lyhyesti – mitä ovat polysykliset aromaattiset hiilivedyt, missä niitä esiintyy ja syntyy. Ympäristön- ja terveydensuojelun näkökulmasta työssä tutustuttiin pintavesien ympäristölaatonormeihin sekä elintarvikkeista saatavien PAH-yhdisteiden määrään Suomessa.

SPE-uuttomenetelmä on ollut olemassa jo 1970-luvun lopulta lähtien, ja sen käyttö on koko ajan lisääntynyt. Menetelmän automatiikka ja materiaalit ovat myös kehittyneet, ja markkinoilla on paljon vaihtoehtoja eri tarkoituksiin. Menetelmää käytetään näytteen eristämiseen, puhdistamiseen ja konsentrointiin. Tässä käytetty puhdistusmenetelmä perustuu analyysin ja SPE-sorbenttimateriaalin hydrofobiseen kanssakäymiseen.

Työn tavoitteena oli ottaa käyttöön Mikkelin ammattikorkeakoulun ympäristölaboriolle SPE-menetelmä PAH-yhdisteiden eristämiseksi. Kiinteäfaasiuuttoa ei ollut testattu laboratoriossa entuudestaan, joten opinnäytetyöllä oli käytännön arvoa laboratorion toiminnalle. Työ toteutettiin kokonaan ympäristölaboratorion laitteilla ja tiloissa. Työstä tehtiin myös kirjallinen ohjeistus menetelmän käyttämiseen näille yhdisteille.

## 2 PAH-YHDISTEET

PAH-yhdisteet eli polysykliset aromaattiset hiilivedyt (engl. polycyclic aromatic hydrocarbons) ovat ryhmä orgaanisia yhdisteitä, jotka koostuvat pääasiassa kahdesta tai useammasta yhteen kiinnittyneestä bentseenirenkaasta, joilla on yhteisiä hiiliatomeja (kuva 1). PAH-yhdisteitä muodostuu epätäydellisessä palamisessa ja niitä esiintyy melkein kaikkialla ympäristössämme. (PAH-yhdisteet ja niiden esiintyminen. 2010.)



*KUVA 1 Yksi tutkituimmista PAH-yhdisteistä, bentso[a]pyreeni (Wikimedia Commons. 2007)*

PAH-yhdisteitä sisältäviä aineita ovat mm. kivihiilipiki ja kivihiiliterva, terva, kreesoottijäätke ja muut kivihiiliperäiset öljyt, dieselöljyt, käytetyt moottoriöljyt, noki, asfaltti, bitumi ja pakokaasut. PAH-yhdisteitä sisältäviä tuotteita on myös käytetty vesieristeenä rakenteissa, jotka ovat kivihiilitervaan perustuvia tuotteita, öljypohjaisia bitumeja tai näiden seoksia. Kreesoottieristeet sisältävät kuitenkin paljon enemmän PAH-yhdisteitä, kuin bitumipohjaiset eristeet. (PAH-yhdisteet ja niiden esiintyminen. 2010.)

Vaikka yhdisteitä tunnetaan kymmeniä erilaisia, tutkituin ja vaarallisin niistä on bentso[a]pyreeni tai lyhennettynä BaP. Vuoteen 2012 saakka oli asetettu lainsäädännöllinen enimmäismäärä vain bentso[a]pyreenin pitoisuudelle elintarvikkeissa



PAH-indikaattoreina komission asetuksessa (EY) N:o 1881/2006. EU:n asetusta N:o 835/2011 kiristettiin alkaen vuodesta 2012, jolloin otettiin käyttöön BaP:n lisäksi enimmäismäärät PAH4-yhdisteiden summalle, joihin kuuluvat bentso[a]pyreenin lisäksi kryseeni, bentso[a]antraseeni ja bentso[b]fluoranteeni. 2012 voimaan tullutta lakia kiristettiin entisestään vuonna 2014, jolloin yhdisteiden enimmäismäärät pienenevät alle puoleen aikaisemmasta. (PAH-yhdisteet savusteissa kalatuotteissa ja lihavalmisteissa. 2012, 2.) Indikaattoriaine tässä tapauksessa nimensä mukaisesti ilmaisee PAH-yhdisteiden läsnäolon näytteessä, jolloin siinä voi olla muitakin haitallisia PAH-yhdisteitä eri pitoisuuksilla.

## 2.1 Käyttäytyminen ympäristössä

PAH-yhdisteiden liikkeisiin ympäristössä vaikuttaa se, ovatko ne ilman partikkeleihin liittyneinä vai kaasufaasissa. Niiden jakautumiseen vaikuttavat atmosfäärisen aerosolien ainesekset ja runsaus sekä lämpötila ja kosteus. Kaasu-hiukkasjakautumisessa on havaittu varianssia maantieteellisesti ja ajallisesti. Yhdisteet sitoutuvat vedessä orgaaniseen ainekseen, veteen ne ovat niukkaliukoisia. Yhdisteet, jotka sisältävät kaksi tai kolme rengasta, esiintyvät lähes ainoastaan kaasufaasissa. Hiukkasissa esiintyy pääasiallisesti vain yhdisteitä, joissa on viisi rengasta tai enemmän. Havaitut varianssit liittyvät pääasiassa neljä rengasta sisältäviin yhdisteisiin kaasu-hiukkasjakautumisessa. Näistä esimerkkejä ovat fluoranteeni, pyreeni, bentso(a)antraseeni ja kryseeni. Suomessa PAH-4-yhdisteiden kokonaispäästöistä 65 % aiheutui pienpoltosta vuonna 2000. (Vesiympäristölle haitallisten teollisuus- ja kuluttaja-aineiden kartoitus. 2011, 34.)

Valtioneuvoston asetuksessa 1022/2006 on kerrottu vesiympäristölle vaarallisista ja haitallisista aineista. PAH-yhdisteille on mainittuna ympäristölaatumit, jotka on määrätty antraseenille 0,1 µg/l, naftaleenille 2,4 µg/l, fluoranteenille 0,1 µg/l, bentso[a]pyreenille 0,05 µg/l, bentso[b]- ja bentso[k]fluoranteenille yhteensä 0,03 µg/l, bentso[g,h,i]peryleenille ja indeno[1,2,3-cd]pyreenille yhteensä 0,002 µg/l. Aineiden pitoisuus pintavedessä tai kalassa ei saa ylittää esitettyjä ympäristölaatumormeja. (Valtioneuvoston asetus vesiympäristölle vaarallisista ja haitallisista aineista 1022/2006 § 6, § 13.)

Pitoisuuksia seurataan luonnossa, koska jotkut yhdisteistä ovat erittäin pysyviä eli niillä on pitkä puoliintumisaika. Esimerkiksi kivihiilitervan tisle, kreosootti, sisältää PAH-yhdisteitä 60–85 %. Ilmaston joutuessaan kreosootin helposti haihtuvat PAH-yhdisteet esim. naftaleeni, fluoreeni ja fenantreeni hajoavat hydroksyy-liradikaalien vaikutuksesta, ja niiden on arvioitu puoliintuvan yhdestä seitsemään tuntiin. Maaperässä hajoaminen vaihtelee alle yhdestä viikosta yli vuoteen, kun taas hapettomissa olosuhteissa hajoamista ei ole havaittu. (OVA-ohje: Kreosootti-tiivistelmä. 2011.)

Vesistöissä puoliintumisen on arvioitu tapahtuvat noin kuukaudessa. Vedestä ne voivat poistua haihtumalla, kertymällä eliöstöön, fotolyysin ja biologisen hajoamisen myötä tai adsorboitumalla. Osan yhdisteistä on todettu kertyvän ravintoverkkoon. (OVA-ohje: Kreosootti-tiivistelmä. 2011.)

## 2.2 Tutkittavat yhdisteet

Tässä työssä käytettiin ns. EPA-PAH 16 -yhdisteitä, jotka ovat 16 eniten määritettyä PAH-yhdistettä (taulukko 1). Näiden lisäksi käytettiin sisäisenä standardina viittä erilaista deuteroitua yhdistettä, jotka ovat suurimmalta osalta samoja kuin tutkittavien aineiden ryhmässä olevat. Deuteroituja yhdisteitä olivat naftaleeni-D8, asenaftteeni-D10, antraseeni-D10, peryleeni-D12 ja kryseeni-D12.

*TAULUKKO 1 Työssä käytetyt PAH-yhdisteet ja niiden kemiallisia ominaisuuksia (PAH-yhdisteiden tavoitetasoperustelumuistio. 2010, 4)*

Yhdiste	Molekyyli- kaava	Mooli- massa (g/mol)	Sulamis- piste (°C)	Kiehumis- piste (°C)
Naftaleeni	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>	128	81	218
Asenaftyleeni	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub>	152	92	-
Asenaftteeni	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub>	154	95	279
Fluoreeni	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub>	166	115	295
Fenantreeni	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	178	101	340
Antraseeni	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	178	216	342

Fluoranteeni	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	202	109	375
Pyreeni	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	202	150	393
Bentso[a]antraseeni	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	228	161	400
Kryseeni	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	228	253	448
Bentso[b]fluoranteeni	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252	168	480
Bentso[k]fluoranteeni	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252	215	481
Bentso[a]pyreeni	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252	178	496
Indeno[1,2,3-cd]pyreeni	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	276	164	536
Benzo[g,h,i]peryleeni	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	276	278	545
Dibentso[a,h]ant-raseeni	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub>	278	267	524

### 2.3 Altistuminen ja haittavaikutukset

Tavallisessa elämässä korkein altistuminen PAH-yhdisteille tapahtuu tupakatuotteiden käyttämisestä. Korkein altistumisepitoisuus työssä liittyy yleensä kivihiilipohjaisten tuotteiden valmistamiseen tai käyttöön. Suomessa altistutaan eniten koksaamoissa ja puutavaran kreosoottikyllästyksessä sekä asennuksessa. Altistumista tapahtuu myös teiden päällystyksessä ja vesieristyksissä, kun käytetään bitumia. (PAH-yhdisteiden tavoitetasoperustelumuistio. 2010, 2, 10.)

Arkielämässäkin siis altistutaan näille yhdisteille, kotona, työpaikoilla tai ulkoilmassa. Ympäristössä altistutaan PAH-yhdisteille mm. tupakasta, kotitalouspäästöistä, pakokaasuista, ongelmajätteen keräyspaikoista ja metsäpaloista. Kotona näille on mahdollista altistua tupakan savusta, puunpoltosta ja jopa elintarvikkeista kuten mm. muroista, jauhoista, leivästä, hedelmistä ja vihanneksista. (Toxicological profile for polycyclic hydrocarbons. 1995, 3–4.)

Helsingin kaupungin ympäristökeskuksen teettämässä tutkimuksessa seurattiin raakaveden lähteen vaikutusta talousveden laatuun. Veden laatua seurattiin noin

vuoden ajan 15 näytteellä. Tutkimuksessa tehtiin kaikki yleisimmät laadusta ker-  
tovat analyysit. Tuolloin oli jo asetettu enimmäispitoisuusvaatimukset BaP:lle. Li-  
säksi tutkittiin bentso[b]fluoranteenin, bentso[k]fluoranteenin, indeno[1,2,3-cd]py-  
reenin ja bentso[g,h,i]peryleenin pitoisuuksia. Mitään näistä PAH-yhdisteitä ei to-  
dettu olevan talousvedessä tuona aikana. (Raakaveden vaikutus Helsingissä  
käytettävän talousveden laatuun. 2011, 8.)

Monet PAH-yhdisteistä ovat vain vähän tai eivät lainkaan mutageenisia in vitro -  
tutkimuksissa. Niiden metaboliitit ja johdannaiset kuitenkin voivat olla potentiaali-  
sia mutageeneja elimistössämme. Karsinogeenisyyttä on tutkittu paljon koe-eläi-  
millä. Tutkijat ovat raportoineet iho-, keuhko-, maksa-, virtsarakko- ja mahalaukun  
syövän sekä pistoskohtien tukikudossyöpien kasvaneesta esiintyvyydestä eläi-  
missä. Koe-eläintutkimukset osoittavat, että tietyt PAH-yhdisteet vaikuttavat  
myös ihmisen hematopoieettiseen ja immuunijärjestelmään. Ne voivat aiheuttaa  
myös neurologisia häiriöitä sekä lisääntymis- ja kehityshäiriöitä. Tutkijat ovat ha-  
vainneet, että on vaikeaa havaita yksittäisten PAH-yhdisteiden terveysvaikutuk-  
sia epidemiologisissa tutkimuksissa, koska altistuminen tapahtuu useimmiten  
PAH-seoksille. Yhdisteet metabolisoituvat useissa elimissä ja erittyvät sappeen  
ja virtsaan, esimerkiksi pyreenin metaboliitti 1-pyrenolia virtsassa on pidetty indi-  
kaattorina PAH-yhdisteille altistumisesta. Ne myös erittyvät äidinmaitoon ja va-  
rastoituvat rajoitetusti rasvakudokseen. (Case Studies in Environmental Medicine  
– Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). 2009, 27, 34.)

PAH-yhdisteiden indikaattoriaineena ihmisen altistumiselle pidetään siis 1-py-  
renolia, jota käytetään tunnistamaan vaikeammin haihtuvat yhdisteet ja 1-naftoli  
on indikaattori helpommin haihtuville yhdisteille. Tupakoitsijoille 1-naftolin viite-  
raja on 300 nmol/l ja tupakoitsemattomille 30 nmol/l. 1-pyrenolille viiterajana on  
3,0 nmol/l. Toimenpiderajoja ei kuitenkaan ole asetettu, mutta työterveyslaitos  
suosittelee näitä indikaattoreita biologisille näytteille. (PAH-yhdisteiden tavoiteta-  
soperustelumuuisto. 2010, 6.)

## 2.4 Elintarvikkeet

Elintarvikkeiden, kuten lihan liiallinen kuumentaminen ja hiiltyminen lisäävät PAH-yhdisteiden pitoisuutta. Yhdysvalloissa tyypillisen ruokavalion PAH-pitoisuudet ovat olleet alle 2 mikrogrammaa kilogrammassa ruokaa ja juomavesien pitoisuuksissa on havaittu vaihtelua 4–24 nanogrammaa litrassa. (Toxicological profile for polycyclic hydrocarbons. 1995, 4).

Suomessa elintarvikkeista saatavat PAH-pitoisuudet ovat arvioituja suurempia verrattuna moneen Euroopan maahan. Tämä johtuu pääosin grillatun lihan ja savustetun kalan suuresta kulutuksesta. Yhdisteiden esiintymistä on tutkittu kotimaisissa elintarvikkeissa 1980-luvulta lähtien. Suomalaiset altistuvat bentso[a]pyreenille keskimäärin 232 ng/henkilö/vrk ja EU:ssa saanti vaihtelee 186–258 ng:n välillä. Suomessa ja EU:ssa on kuitenkin kiristetty koko ajan syöpää aiheuttavien PAH-yhdisteiden tarkkailua. (Elintarvikkeiden ja talousveden kemialliset vaarat 2009, 86, 89; PAH-yhdisteet savustetuissa kalastustuotteissa ja lihavalmisteissa. 2012, 2.)

Suomessa merkittävin osa ruoasta saatavista PAH-yhdisteistä saadaan siis lihasta ja lihavalmisteista, joiden vuosittainen osuus on 81 %, viljavalmisteista 7 % ja kalatuotteista 3 %. Korkeita PAH-pitoisuuksia sisältävät elintarvikkeet ovat mm. hiilillä grillatut tai nuotiossa kääritetyt elintarvikkeet, talkkunajauho, riihiruisjauho, tuoreet nilviäiset, saunapalvikinkku ja kahvi. (Elintarvikkeiden ja talousveden kemialliset vaarat 2009, 87–88.)

### 3 KIINTEÄFAASIUUTTO

Kiinteäfaasiuutto eli SPE (engl. solid phase extraction) on nopeasti suosiota kasvattanut näytteiden eristys-, puhdistus- ja konsentroitimenetelmä, joka kilpailee LLE-tekniikan eli neste-neste-uuttomenetelmän (engl. liquid-liquid extraction) kanssa. SPE-menetelmä keksittiin vuonna 1978 ja sitä on kehitetty siitä saakka eteenpäin mm. materiaalien ja automatiikan osalta. (Laiho – Perämäki – Sirén 2009, 271.)

Pääperiaatteena uutossa on kiinnittää näyte sorbenttimateriaaliin sopivassa liuotimessa ja poistaa epäpuhtaudet tai pidättää ne kolonnissa ja eluoida puhtas näyte ulos kolonnista eri liuottimella (Jaarinen – Niiranen 2002, 160). Menetelmä soveltuu kaiken tyyppisten yhdisteiden eristämiseen nestemäisistä näytteistä, ympäristö-, vesi-, maaperä- ja ilmastonäytteistä. Maaperänäytteet kuitenkin vaativat tutkittavien yhdisteiden liuottamisen sopivalla liuottimella ennen SPE-käsittelyä. (Laiho ym. 2009, 271.)

#### 3.1 SPE vs. LLE

LLE eli neste-nesteuutto (engl. liquid-liquid extraction) on yleisin esikäsittelymenetelmä, jossa uuttoliuotin valitaan sen selektiivisyyden perusteella sekä tutkittavien yhdisteiden poolisuuksien perusteella. Tarkoituksena on saada mahdollisimman suuri saantoprosentti. Tärkeimpänä kriteerinä pidetään uuttoliuottimen ja näytematriisiliuottimen erottumista hyvin toisistaan. (Laiho ym. 2009, 258.)

LLE on yksivaiheinen uuttomenetelmä, kun taas SPE on kromatografinen menetelmä, joka muistuttaa HPLC:tä. Lisäksi sillä on monia etuja verrattuna neste-nesteuuttoon. SPE:llä saadaan mm. tehokkaampi häiritsevien yhdisteiden poistaminen, täydellisempi analyytin uuttuminen, parempi selektiivisyys. SPE-uutto on myös helpommin automatisoitavissa ja siinä käytettävät liuotinmäärät ovat paljon pienemmät. SPE:ssä huonona puolena on kuitenkin sen monimutkaisempi menetelmänkehitys. Joidenkin analyyttien peruuttamaton adsorptio uuttopatruunaan. Myös käyttäjän sekaannuksesta johtuvia mekanismien sekoittumista keskenään voi esiintyä. (Sample preparation fundamentals for chromatography. 2013, 94–95.)

### 3.2 Materiaalit

Eristysmenetelmää kehitettäessä on tärkeää valita tutkittavalle yhdisteelle sopiva kiintoainemateriaali eli sorbentti. Kaupallisissa SPE-tuotteissa on laaja kirjo eri tarkoituksiin sopivia tuotteita, jotka ovat valmiiksi pakattuja ja käyttövalmiita. Sorbentit ovat yleensä syntetisoitua silikaa, polymeeria tai piioksidia, joihin on kemiallisesti sidottu orgaanisia rakenneryhmiä. Rakenneryhmät ja käytettävä liuotin, jossa näyte lisätään, määräävät SPE-kolonnin mekanismin. Kolonnit voivat olla käyttötarkoituksesta riippuen poolittomia, poolisia, kationin- tai anioninvaihtimia. (Laiho ym. 2009, 272.)

Tutkittavat näytemäärät on otettava huomioon sorbentin määrässä, koska sitä on putkessa yleensä melko pieni määrä. Tässä työssä käytetyt putket sisälsivät sorbenttimateriaalia 500 mg. Sääntönä voidaan pitää, että adsorptiokyky on 1–5 % sorbentin massasta. Omassa tapauksessani siis 500 mg voi maksimissaan adsorboida 25 mg tutkittavia yhdisteitä ja näytematriisia. (Laiho ym. 2009, 273.)

### 3.3 Käänteisfaasi SPE

Työssä käytetyt Supelclean ENVI-18-uuttopatruunat olivat käänteisfaasiin perustuvia eli nk. RP-SPE-patruunoita. Niiden toiminta perustuu hydrofobiseen kanssakäymiseen, jossa vaikuttavia voimia ovat dispersiovoimat ja polaarisen nesteen ja poolittoman kiinteän faasin vuorovaikutukset tai Van der Waalsin voimat. SPE-patruunoissa käytetään myös normaalifaasia ja ioninvaihtotekniikkaa. (Guide to Solid Phase Extraction. 1998, 3.)

Käänteisfaasieristykseen kuuluu polaarinen, yleensä vesiliuos tai muuten kohtalaisen polaarinen näytematriisi ja pooliton stationäärifaasi eli sorbenttimateriaali. Tutkittava yhdiste on yleensä asteikolla keskipoolisesta poolittomaan. Tarkastellaan esimerkkinä ENVI-18:aa, jossa piioksidirakeiden pinnalla oleviin silanoliryhmiin on kemiallisesti liitetty pitkä hiilivetyketju, oktadekyyli  $C_{18}H_{37}$ . (Guide to Solid Phase Extraction 1998, 3.)

### 3.4 Käytännön toteutus

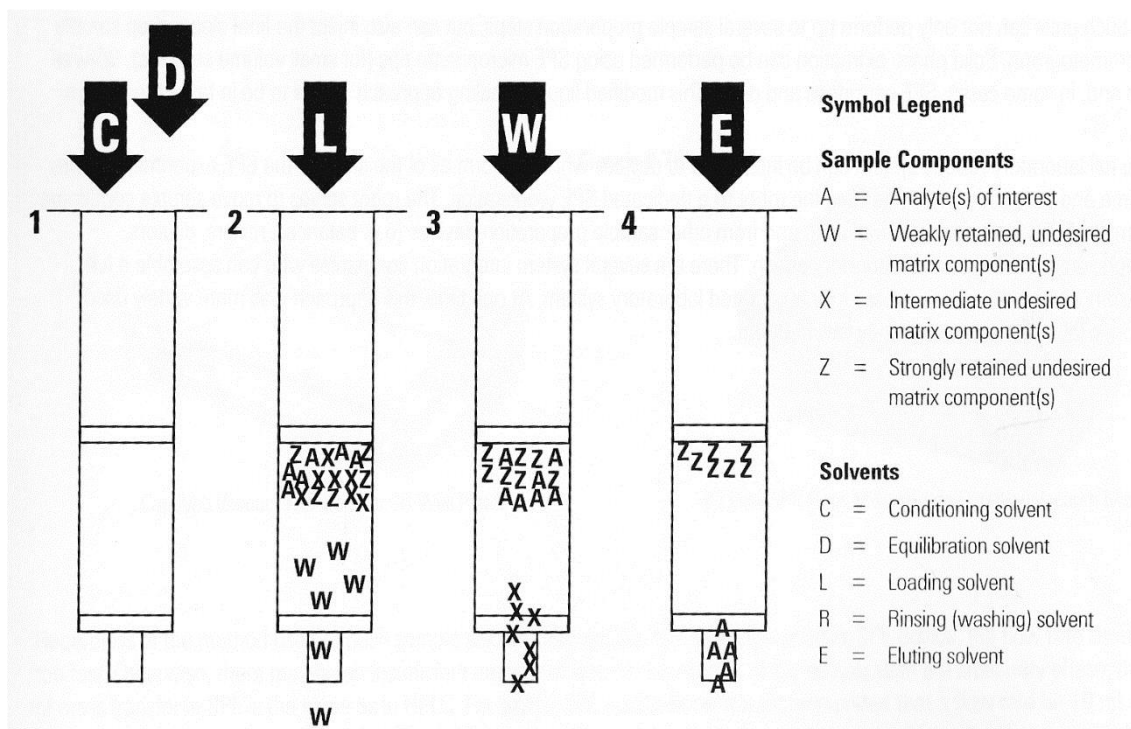
Kiinteäfaasiuutto on melko helppo tehdä käytännössä. Uuttopatruunoita kunnostettaessa ja standardeja patruunoihin pipetoitaessa kannattaa käyttää tilavuuteen sopivaa mäntäpipettiä. Esimerkiksi 3 ml:n patruunalle voi käyttää 1–5 ml:n pipettiä kunnostamisessa ja standardeille 100–1000 µl:n pipettiä. Jos uutossa käytetään liuottimia, työskentely kannattaa suorittaa vetokaapissa.

Ennen kuin sorbenttimateriaali on kunnostettu eli kykeneväinen pidättämään halutut yhdisteet, tulee se esikäsitellä. Esikäsitelyssä materiaali turvotetaan kostuttamalla se ennen näytettä. Sorbenttimateriaali- ja laitevalmistajat vaikuttavat siihen, millaisella ohjeistuksella patruuna kunnostetaan, koska eri valmistajilla voi olla käytössään itse kehitetyt materiaalit ja menetelmät. Uuttopatruunoiden valmistajien internetsivuilta voi myös löytyä omia ohjeita sorbenttimateriaalille riippuen mitä eristetään ja mistä. (Laiho ym. 2009, 277.)

Käytännössä on kuitenkin kolme erilaista lähestymistapaa tai strategiaa näytteen uuttamiseen SPE-menetelmällä. Ensimmäinen tapa, joka on myös yleisimmin käytetty. Siinä kaikki yhdisteet kiinnitetään ja lopulta pelkästään analyytti eluoidaan. Haluttu yhdiste kiinnitetään sorbenttimateriaaliin ja matriisi huuhdotaan pois sopivalla pesuliuksella. Eluotaessa poistetaan vain tutkittavat yhdisteet sorbentista. Toinen tapa on kiinnittää kaikki häiritsevä matriisi sorbenttiin ja päästää analyytti ja sisäinen standardi suoraan läpi näytteenlisäysvaiheessa. Tämä toimii kemiallisena suodattimena ja yleensä näytettä joudutaan lopuksi evaporoimaan pienempään tilavuuteen. Kolmas tapa on fraktioittainen eluoiminen. Tässä on tarkoituksena sekventaalisesti eluoida erityyppisiä yhdisteitä modifioimalla eluenttia tai lisäämällä orgaanisen liuottimen osuutta. (Michel, 2010, 16–19.)

Tässä työssä käytetty SPE-prosessi eteni kuten ensimmäisenä mainitussa tavassa, mutta siinä ei ollut laisinkaan matriisin huuhtomista pois. Häiritsevät tekijät kiinnitetään sorbenttiin, joka kuivattiin imussa ja näyte eluoiitiin ulos. Kuvassa 2 on esimerkki ensimmäisenä mainitusta tavasta.





KUVA 2 Esimerkki SPE-prosessista käytännössä. C ja D ovat kunnostus ja tasapainotusliuoksia. L on näytteen latausvaihe. W on pesuvaihe ja E on eluointi (Sample preparation fundamentals for chromatography. 2013, 110.)

Jos SPE-ohjetta ei ole saatavilla, on yleisiä ohjeita sen suorittamiseen. Näytteen virtauksen tulee olla 1–2 ml/min, kun se viedään sorbenttimateriaaliin ja näyttemäärä suhteutetaan materiaalin määrään. Matriisin huuhteluvaiheessa on tärkeää käyttää 1 ml pesuliuosta 100 mg:aa sorbenttimateriaalia kohden. Eluoinnissakin suhteutetaan käytettävä eluaatin määrä sorbenttimateriaaliin ja käytettävän liuottimen imeytymiselle annetaan 30–60 sekuntia aikaa. Virtaus tulisi olla 1–2 ml/min ja eluointiin käytettävä tilavuus kannattaa olla pieni. Jos eluointi suoritetaan esimerkiksi 1 ml:lla liuotinta, se kannattaa laittaa patruunaan kahdessa 0,5 ml:n erässä. (Laiho ym. 2009, 278.)

## 4 GC-MS

PAH-yhdisteiden tutkimiseen käytettiin hyvin tavanomaista yhdistelmälaitetta, jossa on kapillaarikaasukromatografi yhdistettynä massaspektrometriin eli GC-MS. MAMK:ssa on käytössä Agilent Technologiesin laitteisto. Laitteisto koostuu kaasujärjestelmästä, näytteen syöttäjästä, injektorista, kolonnista, kolonniuunista ja detektorista, joka tässä tapauksessa oli MS-detektori. Laite on kytkettynä tietokoneeseen, jolla tulokset voidaan analysoida.

### 4.1 Kaasukromatografia

Tätä kromatografian muotoa käytetään paljon perustekniikkana orgaanisten aineiden analytiikassa ja se soveltuu hajoamatta höyrystyvien yhdisteiden analytiikkaan. Nimensä mukaisesti liikkuvana faasina käytetään kaasua ja stationääri-faasina on yleensä neste, joka on sidottu kolonniin. Yhdisteiden erilaiset höyrönpaineet ja erilaiset liukoisuudet stationäärifaasin kanssa vaikuttavat erottumiseen. Tällöin kyseessä on jakaantumis- eli partitiokromatografia. Yhdisteet eluotuvat yleensä kiehumispistejärjestyksessä, koska mitä alhaisemmassa lämpötilassa yhdisteet höyrystyvät, sitä nopeammin ne kulkeutuvat kolonnissa. Stationäärifaasin kemialliset ominaisuudet, kuten poolisuus, voivat vaikuttaa eluotumisjärjestykseen. (Jaarinen – Niiranen 2002, 167.)

Kaasukromatografian toimintaperiaate on melko yksinkertainen. Näyte syötetään tiiviin kumisen septumin läpi injektoriin, jossa näyte höyrystyy. Kantajakaasu kuljettaa näytteen kolonniin ja sieltä edelleen detektorille, joka vaihtelee käyttötarkoituksen mukaan, mutta etuna esimerkiksi nestekromatografiaan on herkät ja selektiiviset yleisdetektorit. Kolonneina käytetään nykyään lähes poikkeuksetta silikakapillaareja, joiden pituudet voivat vaihdella viidestä jopa yli sataan metriin. Stationäärifaasi on ohuena kerroksena silikakapillaariputken sisäpinnalla. Ominaisuuksiensa ansiosta silikakapillaarit ovat syrjäyttäneet melkein kokonaan tavalliset pakatut kolonnit. (Jaarinen – Niiranen 2002, 167.)

Helium on kantajakaasuna yleisin ja turvallisin typpikaasun lisäksi, koska se on myrkytön ja palamaton eikä muodosta räjähtäviä seoksia ilman kanssa. Se so-

veltuu myös kaikkien detektoreiden kanssa käytettäväksi. Heliumin etuna tyyppien on sen optimi virtausnopeus. Tyypellä optimi virtaus on 12 cm/s, kun taas heliumilla 27 cm/s, jolloin päästään yli kaksi kertaa nopeampiin analyysiaikoihin. Van Deemterin käyrästä voidaan nähdä, että heliumin keskimääräinen lineaarinen virtausnopeus on tasaisempi laajalla virtausnopeusalueella. Tätä ominaisuutta voidaan käyttää hyödyksi käyttämällä optimia suurempaa virtausnopeutta resoluution merkittävästi huonontumatta, jolloin voidaan vaikuttaa analyysin nopeuteen. (Hyötyläinen – Riekkola 2002, 74–75.)

Tässä työssä käytettiin avoputkikolonnia. Se on kaasukromatografiassa yleisimmin käytetty kolonnityyppi, joka on valmistettu synteettisestä piioksidista ja päällystetty polyimidillä. Avoputkikolonniin erotuskyky on paljon parempi kuin pakatuilla kolonneilla. Pakatut kolonnit soveltuvat analyysiin, joissa tarvitsee erottaa vain muutama yhdiste toisistaan. Avoputkikolonniin ominaisuuden määrittelee siinä oleva nestemäinen stationäärifaasi. Stationäärinestefaaseina käytetään viskooseja polymeerejä, joilla kapillaarin sisäpuoli on pinnoitettu. Ominaisuuksiltaan faasin täytyy olla homogeeninen sekä termisesti että kemiallisesti stabiili. Kolonniin valinnassa pätee periaatteena, että stationäärifaasin tulee olla kemialliselta luonteeltaan samankaltainen kuin analyytti eli pooliton poolittomille ja polaarinen polaarille analyyteille. Laittevalmistajat määrittelevät omien kolonniensa lämpötilojen ylä- ja alarajat. (Hyötyläinen – Riekkola 2002, 76–77.)

## **4.2 Suora höyrystävä injektointi**

Analyyseissa käytettiin pienille pitoisuuksille sopivaa injektointimetodia eli suoraa höyrystävää injektointia, englanniksi splitless injection, jota käytetään paljon myös suomalaisessa ammattikielessä. Tässä näytteensyöttömetodissa injektorissa oleva jakuventtiili pidetään suljettuna injektoinnin ajan, jolloin suurin osa näytteestä kulkeutuu kolonniin. (Hyötyläinen – Riekkola 2002, 96.)

Toisena vaihtoehtona yleensä käytetään jakoinjektiota eli split injection, jossa suurin osa näytteestä kulkeutuu jakuventtiilin kautta pois ja vain pieni osa näytteestä kulkeutuu kantajakaasun virtauksessa kolonniin (Hyötyläinen – Riekkola 2002, 93). Tässä työssä tutkittiin luonnossa hyvin pieninä pitoisuuksina esiintyviä aineita, joten suoran höyrystävän injektoinnin käyttö oli siten perusteltua.

### 4.3 Massaspektrometria

Kaasukromatografilta näytteet tulevat massaspektrometrille. Periaatteena massaspektrometrissa on tutkittavan yhdisteen ionisoiminen positiiviseksi ioniksi. Ylimäärin energiaa sisältävä molekyyli pilkkoutuu pienemmiksi fragmenteiksi. Nämä massafragmentit voivat olla neutraaleja tai ionimuodossa. Laite havaitsee ainoastaan ionifragmentit, jotka se erottelee niiden massan ja varauksen suhteen  $m/z$ , eli kyse on massajakaumasta. Näytepiikin massaspektrissä oleva suurin piikki on peruspiikki, joka voi kuulua myös molekyyli-ionille. Peruspiikki saa arvokseen 100 % ja muista ioneista tulevat piikit suhteutetaan siihen. (Jaarinen – Niiranen 2002, 116, 123.)

Tavallisesti yhdisteen tunnistamiseen käytetään laitteessa olevaa spektrikirjastoa vertaamalla oman yhdisteen massaspektriin. Spektrikirjastoa käytetään datan analysointiin tarkoitetussa ohjelmassa, josta oman tuntemattoman näytepiikkien massajakaumalla voidaan suorittaa haku kirjastosta, joka näyttää eniten yhtäläisyyksiä omaavien yhdisteiden nimiä ja niiden ominaisuuksia. Jos halutaan varmuus kirjaston oikeellisuudesta, on mitattava puhdas vertailuaineen spektri, josta tiedetään varmasti, mitä yhdiste on. (Jaarinen – Niiranen 2002, 116.)

### 4.4 Deuteroidut yhdisteet

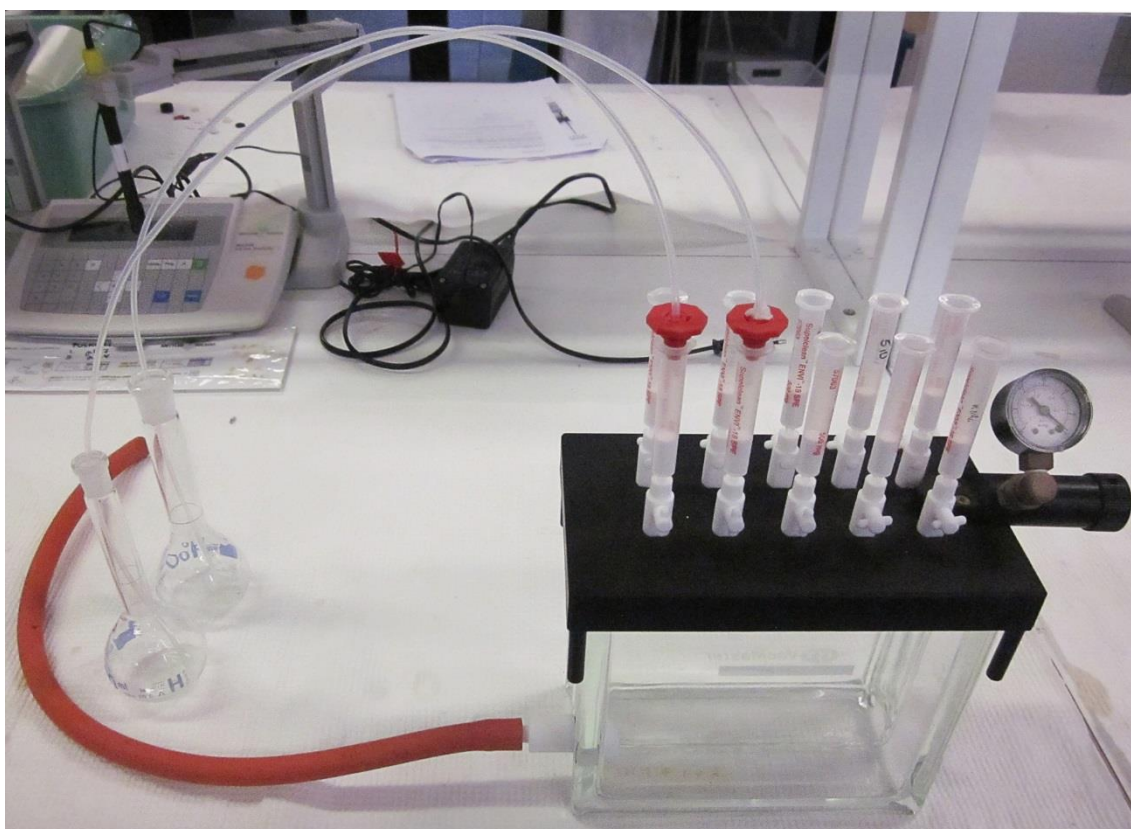
Työssä käytettiin deuteroituja PAH-yhdisteitä, jotka jakoivat analyysin kaikki 16 yhdistettä omiin ryhmiinsä ja toimivat samalla sisäisenä standardina (internal standard) näytteissä sekä standardeissa. Työssä käytetyt kaupalliset deuteroidut yhdisteet ovat periaatteessa samanlaisia kuin analysoitavat yhdisteet, mutta aromaattisten renkaiden vetyatomit ovat korvattu kemiallisesti deuteriumilla, joka on vedyn toinen isotooppi.

Hyvän sisäisen standardin täytyy olla analysoitavan yhdisteen kaltainen. Sitä lisätään standardiliuoksiin ja näytteisiin samat määrät, koska määritettävän yhdisteen piikin intensiteettiä verrataan aina oman ryhmänsä sisäisestä standardista saatuun intensiteettiin. Tätä saatua suhdetta taas pystytään vertaamaan standardeilla saatuihin suhteisiin. (Hyötyläinen – Riekkola 2002, 34.)

ISTD:n lisäys on hyvä tehdä jo näytteenkäsittelyn alussa, koska se kompensoi käsittelyssä, pipetoinnissa tai injektoinnissa tapahtuneita virheitä. Hyötyläinen – Riekkola (2002, 34) kertovat ISTD:n hyvistä ominaisuuksista, joita ovat mm. analyysin lähellä eluoituminen ja erottuvuus tutkittavasta yhdisteestä. Työssä käytetyt sisäiset standardit noudattavat hyvin kirjassa lueteltuja ominaisuuksia.

## 5 SPE-MENETELMÄN TYÖOSUUS

Työosuuden aloittaminen alkoi olemassa olevan välineistön kartoittamisella ja laboratorioon tutustumisella. Mikkelin ammattikorkeakoulun ympäristötekniikan laboratoriossa oli valmiina SPE-uuttoon käytettävä laitteisto, johon kuuluu vakuumpumppu ja vakuumityhjiö kannella, jossa on SPE-patruunoille kymmenen paikkaa (kuva 3). Kartoittamisen yhteydessä löytyi PAH-yhdisteiden eristämiseen käytettäviä SPE-patruunoita, joihin myös valmistajan sivuilta löytyi ohjeet. Myöhemmin jouduttiin tilaamaan lisäosia näytteensyöttöä varten.



*KUVA 3 Työssä käytetty SPE-laitteisto sekä imuletkut ja adapterit*

### 5.1 Käytetyt laitteet, tarvikkeet ja reagenssit

Taulukossa 2 ovat työosuudessa käytetyt tärkeimmät laitteistot ja reagenssit. Niiden lisäksi käytettiin erilaisia mäntäpipettejä, mittapulloja, liuottimia, sentrifugia ja

kuivausaineita veden poistoon lopullisesta kaasukromatografilla ajettavasta näytteestä.

*TAULUKKO 2 Käytetyt laitteet ja tarvikkeet ominaisuuksineen*

Laite/ tarvike/ reagenssi	Ominaisuudet
Agilent Technologies 5975C VL MSD with Triple-Axis Detector	
Agilent Technologies 7890A GC System	
Zebron Capillary GC Column ZB-35HT Inferno	Length: 30 meters, I.D. 0.25 mm, film thickness 0.25 µm  Temperature limits: minimum 40 °C, maximum: 360/400 °C (Isothermal/Program)
Sigma-Aldrich Supelclean™ ENVI™-18 SPE Tube	Reversed phase, bed weight 500 mg, volume 3 ml, active group: octadecyl bonding C18
Restek SV Calibration Mix #5	16 PAH's in methylene chloride, 2000 µg/ml, Expiration date June 2006
Restek SV Internal Standard Mix	6 ISTD's in methylene chloride, 4000 µg/ml, Expiration date October 2005

## 5.2 Eristysmenetelmän käyttöönotto

Kokonaista menetelmää tässä työssä ei ollut tarvetta luoda. Koululla oli valmiina työhön sopivaksi katsottuja SPE-uuttopatruunoita. Patruunoiden valmistajan sivuilta löytyi PAH-yhdisteiden SPE-eristysmenetelmä, joka oli tarkoitettu vesinäytteille. Menetelmä oli tehty 6 ml:n uuttopatruunoille. Käytössä oli 3 ml:n patruunoita, mutta molemmat koot sisälsivät silti saman määrän sorbenttimateriaalia. Tästä syystä päädyttiin käyttämään samoja nestemääriä kuin 6 ml:n patruunoille oli valmistajan sivuilla ohjeistettu, vaikka jouduttiinkin pipetoimaan kaksinkertaisesti puolta pienempiin patruunoihin.

*TAULUKKO 3 PAH-yhdisteiden eristäminen vesimatriisista vaiheittain (GC Analysis of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Water on a 5 % Phenyl Column after SPE using Supelclean™ ENVI-18. 2014)*

Patruunan sorbentin kunnostaminen	2*6 ml tolueeni:metanoli (10:1)
	1*6 ml metanoli
	1*6 ml DI-vesi
Näytteen lisäys	250 ml vesinäyte 10 ml/ minuutissa
Kuivaus	10 minuuttia vakuumi päällä, kun näyte mennyt läpi
PAH-yhdisteiden eluointi	2*1 ml tolueeni:metanoli (10:1)

Työssä oli tarkoitus myös luoda sopiva menettelytapa standardien käsittelylle edellä mainitulla menetelmällä. Tekemällä sama käsittely STD-liuoksille saadaan totuudenmukaisempia tuloksia mahdollisista oikeista näytteistä.

SPE-eristysmenetelmän testaus aloitettiin kahdella PAH-yhdisteellä, naftaleenilla ja peryleenillä. Yhdisteet olivat kiinteässä muodossa, joten liuokset valmistettiin punnitsemalla ja liuottamalla sopivalla liuottimella. Yhdisteet olivat erittäin niukkaliukoisia, joten kokeiltiin monia eri liuottimia. Naftaleeni liukeni hyvin eri liuottimiin, mutta peryleeni oli ongelmallisempi ja se jäi osaksi liukenematta monessa eri liuottimessa.

Liuottamiseen sopivaksi todettiin 1:1 bentseeni:dikloorimetaani. Liuottimina testattiin myös metanolia, dikloorimetaania, 1:1 asetoni:dikloorimetaani, mutta näillä ei saatu täydellisesti näitä kahta yhdistettä liukenemaan. Tällä kahden yhdisteen liuoksella oli tarkoituksena vain yksinkertaisesti testata SPE-kolonneja ja muuta työhön tarvittavaa laitteistoa. SPE-kolonnit todettiin toimiviksi analysoimalla eluoidut näytteet GC-MS-laitteella, josta saatiin halutut näytepiikit peryleenistä ja naftaleenista. Testauksessa ei kiinnitetty huomiota virtausnopeuksiin tai sorbenttimateriaalin kuivumiseen kunnostuksen aikana kiinteäfaasiuttoa tehdessä.

Myöhemmässä vaiheessa SPE-kolonneja testattiin standardeilla sekä arvioitiin suoran luotettavuutta itse tehdyillä liuoksilla, joiden pitoisuudet tiedettiin. Tässä



vaiheessa virtausnopeuksiin kiinnitettiin enemmän huomiota. Sorbenttimateriaalien kunnostamisvaiheessa virtausnopeus oli noin 2 tippaa sekunnissa. Vakuumi oli säädettyä n. 65 mmHg:iin. SPE-laitteen kannen hanat olivat imuvaiheessa täysin auki, koska vakuumilla oli helpompi säädellä virtausnopeutta. Virtausnopeus hidastui erittäin paljon standardien ja näytteiden lisäämisen jälkeen. Tästä johtuen vakuumin alipaine säädettiin n. 380 ...510 mmHg:n välille. Kolonnien annettiin kuivua n. 10 minuuttia imussa, minkä jälkeen näytteet eluoiitiin 2 ml:lla 1 ml:n erissä lasisiin koeputkiin. Koeputkiin lisättiin spaattelilla natriumsulfaattia veden poistamiseksi. Kuivauksen jälkeen putket sentrifugoitiin 4000 rpm nopeudella kahden minuutin ajan. Orgaaninen faasi kaadettiin kaasukromatografian näytepulloon ja suljettiin korkilla ajoa varten.

### **5.3 Standardiliuosten valmistus**

Standardiliuokset ja sisäiset standardit valmistettiin käyttämällä kaupallisia liuoksia. Kaupallisen standardin vahvuus oli 2000 µg/ml ja sisäisen standardin vahvuus oli 4000 µg/ml. Näistä laimennettiin ensin dikloorimetaanilla käyttöliuokset, jotka olivat 20 µg/ml. Standardien vahvuudet olivat 0,5, 1, 2, 5 ja 10 µg/ml ja sisäisen standardin vahvuus 5 µg/ml. Alussa ISTD oli 10 µg/ml, mutta koettiin alhaisemman pitoisuuden olevan parempi. Standardit laimennettiin merkkiin aluksi dikloorimetaanilla ja myöhemmin vain metanolilla pidättäytyvyysongelmien takia.

### **5.4 Standardiliuosten ongelmat**

SPE-kolonneja ei ole suoranaisesti tarkoitettu käytettäväksi standardeille, jotka lisätään kolonniin muussa liuottimessa kuin vedessä. Veteen standardit eivät kuitenkaan liuenneet, ja olisi ollut todella epävarmaa toimia standardeilla, jotka eivät liukene liuottimeen asianmukaisesti.

Työskentelyn alussa standardeissa käytettiin liuottimena pelkästään dikloorimeetaania, koska kaupalliset kantaliuokset olivat siihen liuotettuina. Ongelmia liuottimessa huomattiin vahvemmissa 5 ja 10 mikrogramman standardeissa, joissa ta-

pahtui liuosten valumista lävitse SPE-kolonnista. Ongelmaa yritettiin korjata hiitaammalla imulla, mutta se ei auttanut. Seuraavaksi testattiin standardien liuottamista heikompaan liuottimeen, joka tässä tapauksessa oli metanoli. Metanolin käyttö standardeissa paransi huomattavasti tilannetta vahvemmissä standardeissa eikä sitä tullut enää yhtä paljon lävitse. Sisäinen standardi kuitenkin korjasi tuloksia, koska sitä pääsi samassa suhteessa läpi SPE-kolonnista.

### **5.5 SPE-laitteen käyttö standardeilla ja näytteillä**

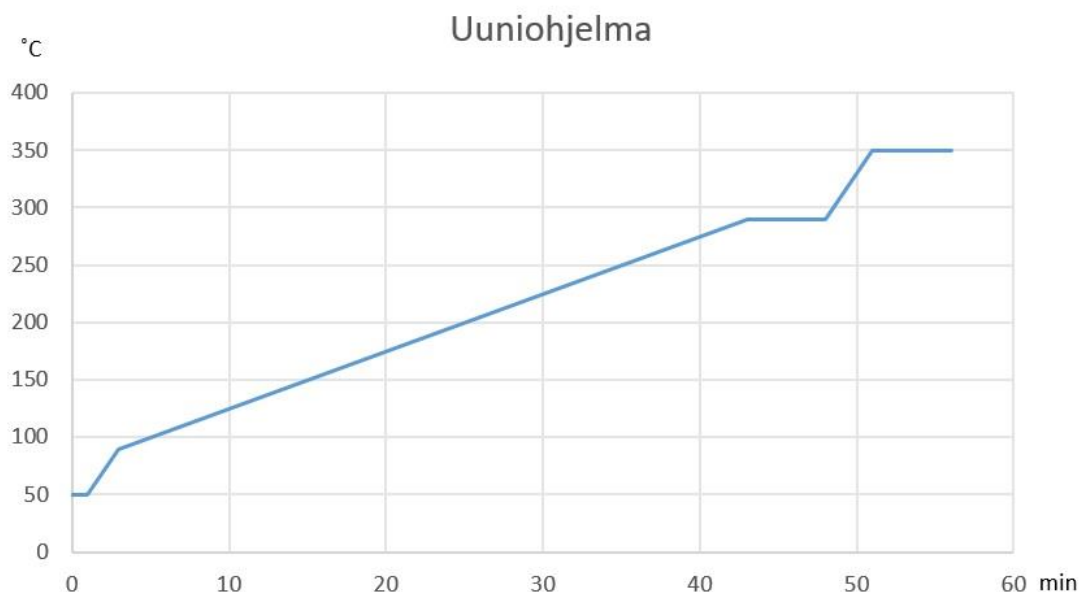
Standardien ja testinäytteiden uuttaminen tehtiin, kuten aiemmin on kuvattu (taulukko 3). Sorbenttimateriaali kunnostettiin ensin 1:10 tolueeni:metanoliliuoksella. Työssä käytettiin lasisia väliastioita ja pipetoinnissa 5 ml:n pipetinkärkiä. Liuosta pipetoitiin 3 ml kerrallaan ja yhteensä 12 ml. Hanoja avattiin välissä ja vakuumin annettiin imeä liuosta hitaasti SPE-patruunan läpi noin 2 tippaa sekunnissa. Tämän jälkeen sama toistettiin 6 ml:lla metanolia ja ultrapuhtaalla vedellä.

Eristyksessä käytettäville oikeille näytteille kehitettiin imulaitteisto. Siinä näytettä imevä ohut putki on asetettuna suoraan näytettä sisältävään astiaan. Tässä työssä käytettiin lasista mittapulloa. Vakuumpumpulla toimiva alipaine imee näytettä letkun kautta SPE-patruunaan, johon letku on yhdistetty liitinkappaleella. Muoviletkun pään annettiin tulla hieman näkyviin liittimen alaosaan, jolloin pystyttiin tarkkailemaan näytteensyötön toimivuutta. Näytteensyötössä käytettiin nestekromatografian laitteessa ollutta muoviletkua. Ennen varsinaisia testinäytteitä näytteensyöttöä testattiin deionisoidulla vedellä. Tällä haluttiin selvittää, kuinka suurella alipaineella saadaan tarpeeksi nopea näytteensyöttö aikaiseksi. Aikaisemmin on mainittu, että vesinäytteille kaupallisen ohjeen mukaan hyvä syöttönopeus olisi 10 ml minuutissa (taulukko 3). Kun näytteensyöttöön on liitettyä yksi vesinäyte, saadaan n. 380 mmHg:n eli n. 0,5 baarin alipaineella imettyä noin 11 ml minuutissa.

### **5.6 GC:n ja massaspektrometrin parametrit**

Analyysissä käytetty kaasukromatografian uuniohjelma on havainnollistettuna kuvassa 3. Lämpötilaa nostettiin lineaarisesti 20 °C minuutissa 90 °C:seen ja siitä

lineaarisesti 5 °C minuutissa 290 °C:seen, jossa lämpötilaa pidettiin viisi minuuttia.



*KUVA 4 Kaasukromatografian uuniohjelman lämpötilakaavio PAH-yhdisteille*

Ensin massaspektrometrillä ajettiin SCAN-ajolla tutkitut PAH-yhdisteet, jotta saatiin kaikki halutut näytepiikit ja retentioajat esille. SCAN-ajossa pienimmissä 0,5 ja 1,0 µg:n standardeissa ei näkynyt kolmea viimeistä piikkiä eli indeno[1,2,3-cd]pyreenin, benzo[g,h,i]peryleenin ja dibentso[a,h]antraseenin piikkejä. Vahvemmissa standardeissa ne näkyivät, jolloin niistä sekä kaikista muista yhdisteistä saatiin poimittua halutut ionit, joita seurattiin SIM-ajossa. Ionien valinta perustui omiin ajettuihin piikkeihin, joista valittiin massaspektrin primääriset ionit. Osalle yhdisteitä valittiin sekundäärinen ioni. Monella yhdisteellä oli samat ionit valittuna SIM-ajoon johtuen yhdisteiden samankaltaisuuksista. Ionien valinnassa verrattiin olemassa oleviin taulukkoarvoihin, jossa oli lueteltuina tyypillisiä massaioneja näille yhdisteille. (Taulukko 4.; Method 8270C - Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). 1996, s. 25 – 29.)

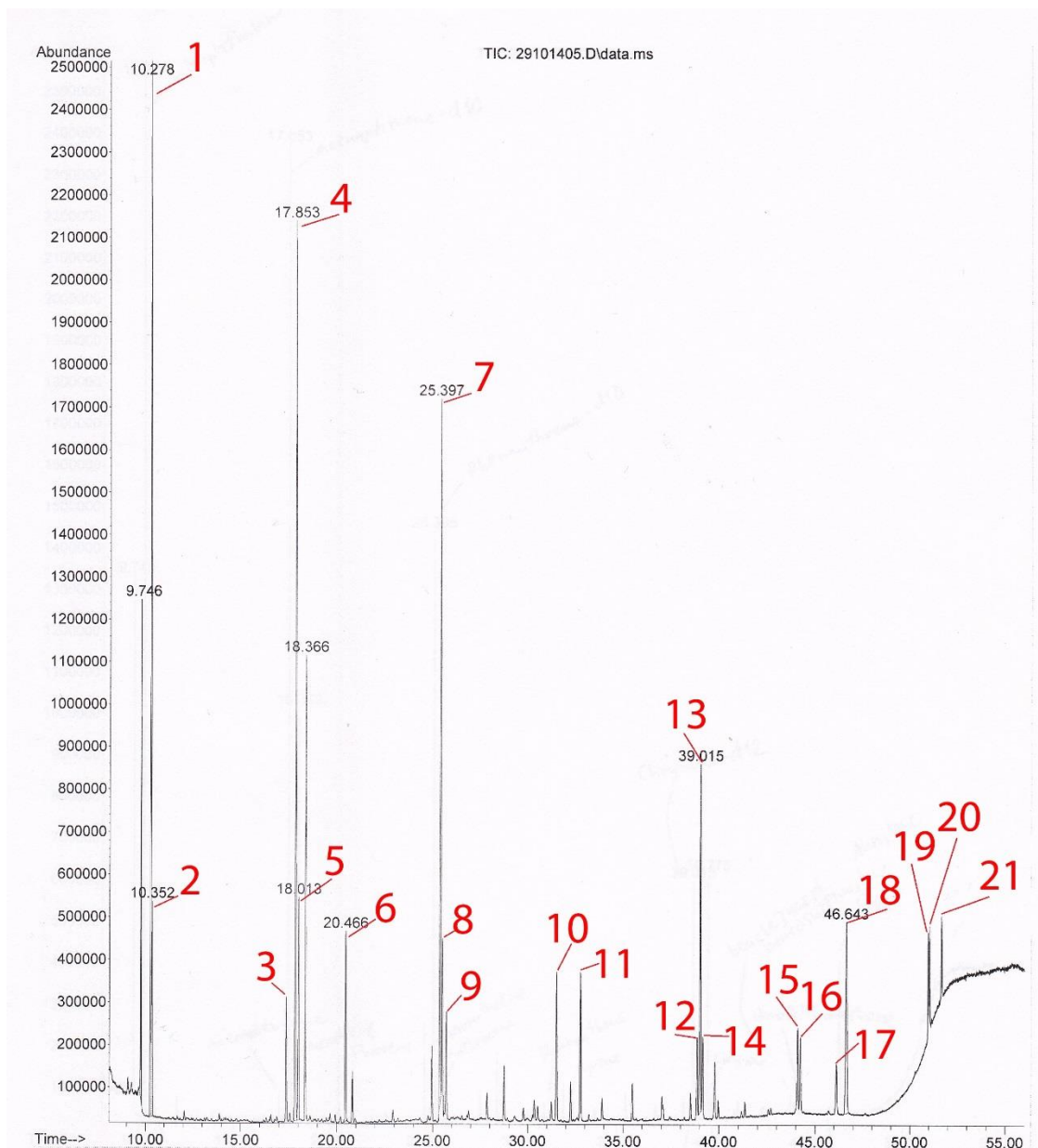
TAULUKKO 4 SIM-ajossa käytetyt ionit ja yhdisteiden retentioajat

Yhdiste	Retentioaika (RT)	Primääri/ sekundäärinen ioni (m/z)
Naftaleeni-D8 Ryhmä 1	10.22	136
Naftaleeni	10.30	128
Asenaftyleeni	17.32	152
Asenafteeni-D10 Ryhmä 2	17.79	164
Asenafteeni	17.95	153
Fluoreeni	20.40	166
Fenantreeni-D10 Ryhmä 3	25.33	188
Fenantreeni	25.45	178
Antraseeni	25.65	178
Fluoranteeni	31.44	202
Pyreeni	32.71	202
Bentso[a]antraseeni	38.80	228
Kryseeni-D12 Ryhmä 4	38.94	240
Kryseeni	39.08	228
Bentso[b]fluoranteeni	44.01	252/ 125
Bentso[k]fluoranteeni	44.15	252/ 125
Bentso[a]pyreeni	46.04	252/ 125
Peryleeni-D12 Ryhmä 5	46.54	264
Indeno[1,2,3-cd]pyreeni	50.93	276/ 138
Dibentso[a,h]antraseeni	51.01	276/ 138
Benzo[g,h,i]peryleeni	51.63	278/ 139

## 6 GC-MS-TULOKSET

Kaasukromatografilla saatiin erotettua kaikki halutut yhdisteet (kuva 4). Työn alussa saadut standardisuorat eivät olleet kovin hyviä, mutta työskentelyn edetessä ne ja testinäytteiden tulokset paranivat. Alussa standardit ja sisäiset standardit olivat vain yhdessä pitoisuudessa omissa erillisissä mittapulloissa, joista sitten pipetoitiin haluttu määrä kunkin standardin SPE-patruunaan. Seuraavaksi standardit olivat omissa mittapulloissaan ilman sisäistä standardia, jolloin ne pipetoitiin erikseen SPE-patruunaan. Näistä saatujen standardisuorien jälkeen jokaiselle standardipitoisuudelle valmistettiin oma liuos mittapulloon, johon sisällytettiin sisäinen standardi, joista pipetoitiin 1 ml kunkin standardin SPE-patruunaa kohden. Tällä toimenpiteellä parannettiin huomattavasti standardisuoria.

Työssä aluksi käytetty 10 µg:n sisäinen standardi ei näyttänyt vaikuttavan paljon standardisuorien tai testinäytteiden tuloksiin. Työssä kuitenkin haluttiin noudattaa sisäisen standardin käytännön neuvoja, joista yksi on, että ISTD-piikin intensiteetti olisi lähellä keskimmäisen käytettävän standardin piikin intensiteettiä (Hyötyläinen – Riekkola 2002, 34). Tässä tapauksessa siis käytettiin 5 µg:n sisäisiä standardeja.



KUVA 5 SCAN-ajossa erotetut PAH-yhdisteet 2 µg standardissa, 10 µg ISTD:llä

## 6.1 Standardit

Standardisuorien kuvaajat näyttivät hyviltä. Yhteensä 14:ssä eri PAH-yhdisteen suoran korrelaatiokertoimessa oli kaksi yhdeksikköä. Kahdessa yhdisteessä, pyreenissä ja bentso[a]pyreenissä, suoran hyvyttä kuvaava korrelaatiokerroin jäi alle kahden yhdeksikön. Ihanteellinen tulos suoralle olisi tasan 1.000, josta moni suora ei ollut kovin kaukana. Taulukossa 5 on esitettyä työn viimeisen standar-

disuorien analyysien tulokset, jossa sisäisen standardin pitoisuus oli muutettu oikeaksi. Tulospäätteellä laitteen ohjelmisto antaa suorien korrelaatiokertoimen kolmen desimaalin tarkkuudella.

*TAULUKKO 5 Standardisuorien korrelaatiokertoimet 16 PAH-yhdisteelle*

Yhdiste	Korrelaatiokerroin $r^2$
Naftaleeni	0.996
Asenaftyleeni	0.999
Asenafteeni	0.996
Fluoreeni	0.998
Fenantreeni	0.995
Antraseeni	0.996
Fluoranteeni	0.990
Pyreeni	0.989
Bentso[a]antraseeni	0.997
Kryseeni	0.995
Bentso[b]fluoranteeni	0.998
Bentso[k]fluoranteeni	0.996
Bentso[a]pyreeni	0.984
Indeno[1,2,3-cd]pyreeni	0.998
Benzo[g,h,i]peryleeni	0.999
Dibentso[a,h]antraseeni	0.997

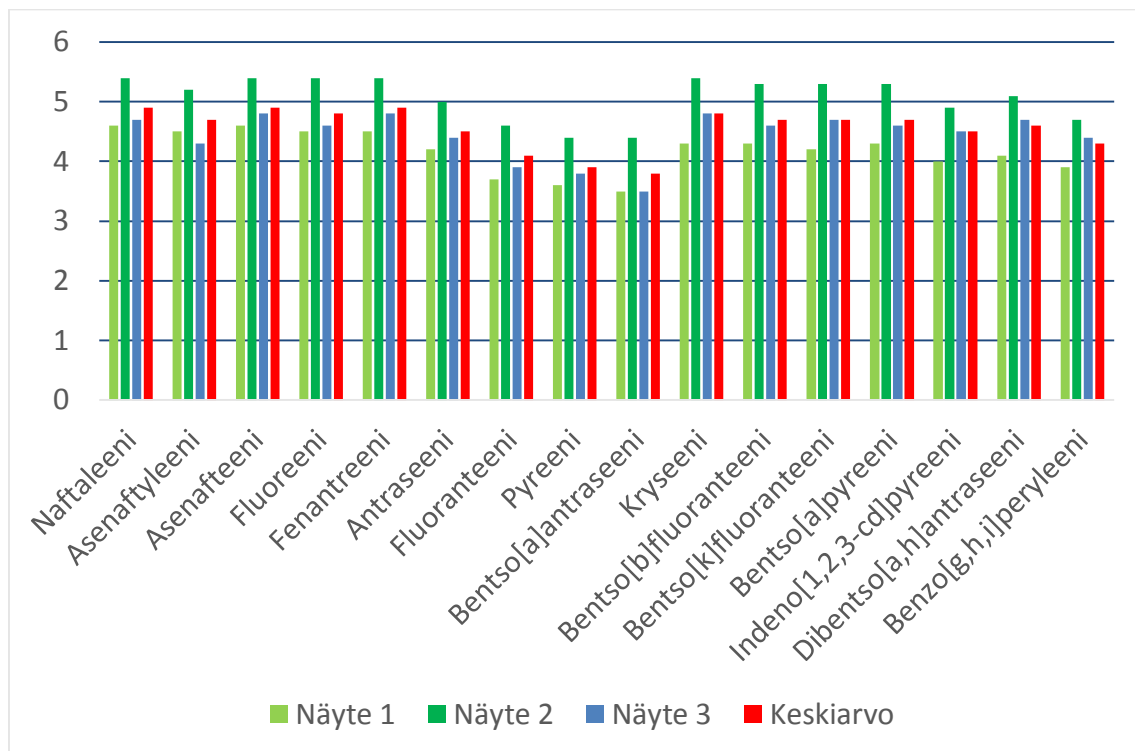
## 6.2 Testinäytteet

Tässä esitettyjen omien tunnettujen näytteiden tulokset ovat kolmen rinnakkaisen näytteen tulos keskiarvona. Mittauspitoisuuksina käytettiin 5 µg:n ja 0,5 µg:n

näytteitä. Näissä analyyseissä käytettiin suurille vesinäytteille kehitettyä imulaitteistoa.

5 µg:n testinäytteet antoivat melko tasaisia tuloksia. Saman aineen eri näytteissä on pieniä poikkeamia yli tai ali oikean pitoisuuden. Keskiarvot ovat kuitenkin monessa yhdisteessä lähellä oikeaa 5 µg:n rajaa. Osassa yhdisteitä on selvästi havaittavissa pitoisuuksien alenemista. Diagrammista tämän huomaa selkeästi ainakin fluoranteenin, pyreenin ja bentso[a]antraseenin kohdalla, joiden keskiarvot ovat lähempänä 4 µg. Näissä yhdisteissä on yhteistä niiden rakenne, jossa on 4 hiilivetyrengasta. (Taulukko 6.)

**TAULUKKO 6** Standardisuurilla analysoidut pitoisuudet 5 µg:n testinäytteiden tiedetyistä pitoisuuksista

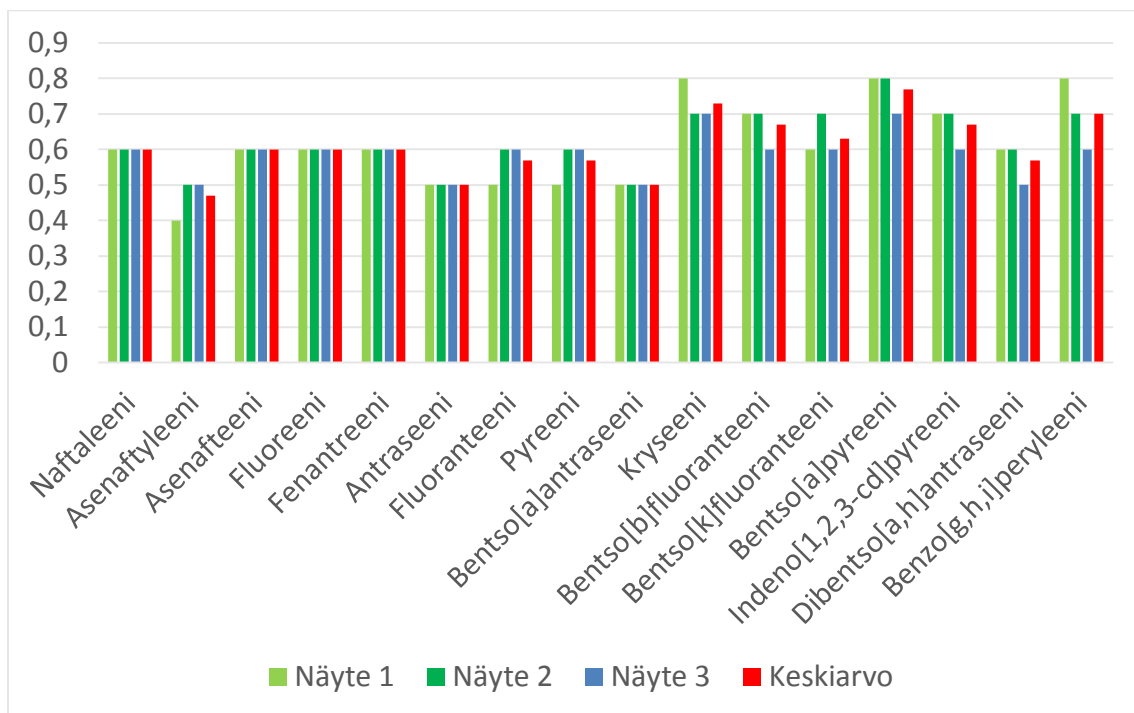


Kymmenen kertaa pienemmillä 0,5 µg:n pitoisuuksilla saatiin myös tasaisia ja toistettavia tuloksia eri näytteillä samoista yhdisteistä. Alkupään yhdisteillä saatiin hyviä tuloksia, mutta loppupään yhdisteissä on havaittavissa näytteiden kasvanut



pitoisuus. Diagrammista voi huomata tämän ainakin kryseenin, bentso(b)fluoranteenin, bentso(k)fluoranteenin, bentso(a)pyreenin, indeno(1,2,3-cd)pyreenin, dibentso(a,h)antraseenin ja benzo(g,h,i)peryleenin kohdalla. Näillä yhdisteillä on 4–6 hiilivetyrengasta rakenteessaan. Pienemmissä pitoisuuksissa loppupään yhdisteiden pitoisuuksien nousu voi johtua kaasukromatogrammista, jonka kolonniin on voinut jäädä korkealla kiehuvien PAH-yhdisteiden jäämiä ja nämä sitten näkyvät seuraavissa ajoissa. Näytteiden välillä kuitenkin injektoitiin pelkkää liuotinta kolonniin, jonka ajateltiin puhdistavan kolonnia epäpuhtauksista. (Taulukko 7.)

**TAULUKKO 7** Standardisuorilla analysoidut pitoisuudet 0,5 µg:n testinäytteiden tiedetyistä pitoisuuksista



## 7 YHTEENVETO

Työn tavoitteena oli ottaa käyttöön SPE-menetelmä PAH-yhdisteille, jossa mielestäni onnistuttiin hyvin. Työn tilaaja rajasi opinnäytetyön vain menetelmän toiminnan testaukseen, koska validoinnille ei ympäristölaboratoriolla ollut tarvetta tässä vaiheessa. Lopputuotoksena kirjoitettiin kirjallinen ohje SPE-menetelmän käytöstä. Laboratoriolla on oikeudet ohjeen tarvittaviin muutoksiin, jos niitä ilmenee. Jos työssä olisi tehty menetelmän kehittämistä, se olisi vaatinut paljon enemmän aikaa. Menetelmän kehittäminen olisi tietysti vielä suotavaa, koska uskon, että esimerkiksi kaikki eristyksessä käytettävät nestemäärät eivät ole täysin optimaalisia.

Optimaalisiin olosuhteisiin ja nestemääriin päästäisiin määrällisesti monella näyteajolla. Tällaisen testaamisen etu olisi yhden muuttujan eristäminen muista ja sen muuttujien arviointi koko analyysin saantoihin. Laittevalmistajilta esimerkiksi Sigma-Aldrichilta saatavat 96-kaivoiset SPE-levyt olisivat hyvä vaihtoehto menetelmäkehittämiseen.

Työn suurimmat ongelmat olivat standardien liuottaminen ja standardien kanssa yleisesti toimiminen sekä näytteensyötön kehittäminen suuremmille vesinäytteille. Myös esimerkiksi kaupallisten tunnettujen vesinäytteiden käyttö olisi ollut mielestäni työn tulosten luotettavuutta lisäävä tekijä. Standardeille löydettiin sopivampi liuotin – metanoli. Työosuudessakin mainittu standardien ennenaikainen läpivaluminen patruunasta oli ongelmallista, koska liuosta menee hukkaan sen läpi mennessä ennen kuivaus- ja eluointivaihetta. Sisäinen standardi kuitenkin toimi erittäin hyvin, joten läpivaluminen näkyy standardisuorissa hyvin vähän tai ei ollenkaan.

Työssä käytettiin näytteinä itse valmistettuja, tunnetun PAH-pitoisuuden sisältäviä näytteitä, joilla haluttiin testata standardien toimivuutta. Tulostaulukoissa olevat näytteet edustavat viimeisimpiä näytteitä, joihin käytettiin onnistuneesti työn aikana kehitettyä imulaitteistoa. Laitteiston osat tilattiin Sigma-Aldrichilta. Sitä testattiin standardin pienimmällä pitoisuudella eli 0,5 µg:n näytteellä ja siitä kym-

menen kertaa suuremmalla pitoisuudella eli 5 µg:n näytteillä. Molemmilla pitoisuuksilla testinäytteistä saatiin kohtalaisen hyviä tuloksia, erityisesti pienemmällä pitoisuudella.

Suuremmille vesinäytteille työn aikana kehitettyä imulaitteistoa voisi vielä jatkossa kehittää. Patruunoihin asetettavat adapterit ovat toimivia ja tiiviitä. Niihin laitettavat nykyiset letkut eivät välttämättä istu adapteriin kovin hyvin vaan saattavat jäädä väljäksi. Imuletukujen väljyys adapterissa aiheutti omassa työssä epäsäännöllisyyttä näytteensyötössä näytteiden välillä. Epäsäännöllisyys näkyi kolmen näytteen yhtäaikaisessa syötössä, kun kaksi muuta näytettä saattoi valua samaa tahtia SPE-patruunoihin, mutta kolmannessa syöttö katkesi välillä eikä näyte valunut samalla tahdilla. Näytteiden läpiviemistä patruunasta voisi mielestäni vielä nopeuttaa, mutta se vaatisi paksumpaa syöttöletkua.

Omien kokemuksieni perusteella SPE-patruunat toimivat hyvin PAH-yhdisteiden eristämiseen. Työn aikana otin myös yhteyttä Sigma-Aldrichin tuoteneuvontaan standardien käytöstä uuttopatruunoille, mutta heiltä ei tullut uusia tai parempia neuvoja asiaan, kun mainitsin standardien liian aikaisen läpivalumisen. SPE-patruunoita ei suositella käytettäväksi useammin kuin kerran, ja omien kokemusten perusteella näytteille ja etenkin standardeille käytettyjen patruunoiden käytettävyyden huononi käytön myötä. Jatkoa ajatellen kannattaisi tehdä selvitystä, onko PAH-yhdisteille käytettyjä SPE-patruunoita mahdollista elvyttää käyttökuntoon.

## LÄHTEET

Case Studies in Environmental Medicine – Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). 2009. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Saatavissa: <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/pah/docs/pah.pdf>. Hakupäivä 29.11.2014.

Elintarvikkeiden ja talousveden kemialliset vaarat. 2009. Evira. Saatavissa: <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/16159/Elintarvikkeiden.pdf>. Hakupäivä 3.12.2014.

GC Analysis of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Water on a 5% Phenyl Column after SPE using Supelclean™ ENVI-18. Sigma-Aldrich. Saatavissa: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/80207?lang=fi&region=FI>. Hakupäivä 11.12.2014.

Guide to Solid Phase Extraction. 1998. Sigma-Aldrich. Saatavissa: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Bulletin/t197910.pdf>. Hakupäivä 15.12.2014.

Hyötyläinen, Tuulia – Riekkola, Marja-Liisa 2002. Kolonnikromatografia ja kapillaarielektromigraatiotekniikat. 2. painos Helsinki: Yliopistopaino.

Jaarinen, Soili – Niiranen, Jukka 2002. Laboratorion analyysitekniikka – laatu, spektrometria, kromatografia. 3-4. painos. Helsinki: Edita Publishing Oy.

Laiho, Jussi – Perämäki, Paavo – Sirén, Heli 2009. Esikäsittelyn käsikirja – Ohjeita vesi-, ympäristö- ja prosessitekniikan sekä teollisuuden laboratorioille. Ylöjärvi: Kemian Kustannus Oy.

Method 8270C - Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). 1996. Saatavissa: <http://www.caslab.com/EPA-Methods/PDF/8270c.pdf>. Hakupäivä 2.3.2015.

Michel, Frank 2010. Basics of SPE Technology & Mechanisms – Sigma Aldrich. Saatavissa: [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/promo\\_NOT\\_INDEXED/General\\_Information/1/envi-01-spe-basics.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/promo_NOT_INDEXED/General_Information/1/envi-01-spe-basics.pdf). Hakupäivä 29.11.2014.

OVA-ohje – Kreosoottitiivistelmä. 2011. Työterveyslaitos. Saatavissa: <http://www.ttl.fi/ova/tkreosootti.html>. Hakupäivä 1.12.2014.

Overview of SPE Technology/Method Development & New Trends in Sample Preparation. Sigma Aldrich. Saatavissa: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Posters/1/t407048h.pdf>. Hakupäivä 29.11.2014.

PAH-yhdisteet ja niiden esiintyminen. 2010. Työterveyslaitos. Saatavissa: [http://www.ttl.fi/fi/kemikaaliturvallisuus/ainekohtaista\\_kemikaalitietoa/pah-yhdisteet\\_ja\\_niiden\\_esiintyminen/](http://www.ttl.fi/fi/kemikaaliturvallisuus/ainekohtaista_kemikaalitietoa/pah-yhdisteet_ja_niiden_esiintyminen/). Hakupäivä 1.12.2014.

PAH-yhdisteet savustetuissa kalastustuotteissa ja lihavalmisteissa. 2012. Evira. Saatavissa: [http://www.evira.fi/files/attachments/fi/elintarvikkeet/valmistus\\_ja\\_myynti/tutkimukset\\_projektit/evo2012\\_pah\\_loppuraportti.pdf](http://www.evira.fi/files/attachments/fi/elintarvikkeet/valmistus_ja_myynti/tutkimukset_projektit/evo2012_pah_loppuraportti.pdf). Hakupäivä 2.12.2014.

PAH-yhdisteiden tavoitetasoperustelumuistio. 2010. Työterveyslaitos. Saatavissa: [http://www.ttl.fi/fi/tyoturvallisuus\\_ja\\_riskien\\_hallinta/riskien\\_hallinta/ohjearvot\\_tavoitetasot\\_haittatekij%C3%B6ille/tavoitetasot/sivut/default.aspx](http://www.ttl.fi/fi/tyoturvallisuus_ja_riskien_hallinta/riskien_hallinta/ohjearvot_tavoitetasot_haittatekij%C3%B6ille/tavoitetasot/sivut/default.aspx) -> Tavoitetasodokumentit ->PAH yhdisteet. Hakupäivä 29.11.2014.

Raakaveden vaikutus Helsingissä käytettävän talousveden laatuun. 2011. Helsingin kaupungin ympäristökeskus. Saatavissa: [http://www.hel.fi/hel2/ymk/julkaisut/2011/Julkaistu\\_04\\_11\\_net.pdf](http://www.hel.fi/hel2/ymk/julkaisut/2011/Julkaistu_04_11_net.pdf). Hakupäivä 9.12.2014.

Sample preparation fundamentals for chromatography. 2013. Agilent Technologies.

Toxicological profile for polycyclic hydrocarbons. 1995. U.S Department of Health and Human Services – Agency for Toxic Substances and Diseases Registry. Saatavissa: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69.pdf>. Hakupäivä 2.12.2014.

Valtioneuvoston asetus vesiympäristölle vaarallisista ja haitallisista aineista 1022/2006. Finlex. Saatavissa: <https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2006/20061022>. Hakupäivä 18.3.2015.

Vesiympäristölle haitallisten teollisuus- ja kuluttaja-aineiden kartoitus. 2011. Suomen ympäristökeskus. Saatavissa: [https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/37046/SY3\\_2011.pdf](https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/37046/SY3_2011.pdf). Hakupäivä 17.3.2015.

Wikimedia Commons. 2007. Saatavissa: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Benzo-a-pyrene.svg>. Hakupäivä 18.3.2015.

## LIITE 1

Yhdiste	#1 5 µg näyte	#2 5 µg näyte	#3 5 µg näyte	Keskiarvo
Naftaleeni	4,6	5,4	4,7	4,9
Asenaftyleeni	4,5	5,2	4,3	4,7
Asenafteeni	4,6	5,4	4,8	4,9
Fluoreeni	4,5	5,4	4,6	4,8
Fenantreeni	4,5	5,4	4,8	4,9
Antraseeni	4,2	5,0	4,4	4,5
Fluoranteeni	3,7	4,6	3,9	4,1
Pyreeni	3,6	4,4	3,8	3,9
Bentso[a]antraseeni	3,5	4,4	3,5	3,8
Kryseeni	4,3	5,4	4,8	4,8
Bentso[b]fluoranteeni	4,3	5,3	4,6	4,7
Bentso[k]fluoranteeni	4,2	5,3	4,7	4,7
Bentso[a]pyreeni	4,3	5,3	4,6	4,7
Indeno[1,2,3-cd]pyreeni	4,0	4,9	4,5	4,5
Dibentso[a,h]antraseeni	4,1	5,1	4,7	4,6
Benzo[g,h,i]peryleeni	3,9	4,7	4,4	4,3

## LIITE 2

Yhdiste	#1 0,5 µg näyte	#2 0,5 µg näyte	#3 0,5 µg näyte	Keskiarvo
Naftaleeni	0,6	0,6	0,6	0,6
Asenaftyleeni	0,4	0,5	0,5	0,47
Asenafteeni	0,6	0,6	0,6	0,6
Fluoreeni	0,6	0,6	0,6	0,6
Fenantreeni	0,6	0,6	0,6	0,6
Antraseeni	0,5	0,5	0,5	0,5
Fluoranteeni	0,5	0,6	0,6	0,57
Pyreeni	0,5	0,6	0,6	0,57
Bentso[a]antraseeni	0,5	0,5	0,5	0,5
Kryseeni	0,8	0,7	0,7	0,73
Bentso[b]fluoranteeni	0,7	0,7	0,6	0,67
Bentso[k]fluoranteeni	0,6	0,7	0,6	0,63
Bentso[a]pyreeni	0,8	0,8	0,7	0,77
Indeno[1,2,3-cd]pyreeni	0,7	0,7	0,6	0,67
Dibentso[a,h]antraseeni	0,6	0,6	0,5	0,57
Benzo[g,h,i]peryleeni	0,8	0,7	0,6	0,70