



Osaamista  
ja oivallusta  
tulevaisuuden  
tekemiseen

Henna Hyvärinen

# MCPD- ja glysidyyliestereiden kaasukromatografinen määrittäminen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja kemiantekniikka

Insinöörityö

8.9.2019

Tekijä Otsikko	Henna Hyvärinen MCPD- ja glysidyyliesterien kaasukromatografinen määrittäminen
Sivumäärä Aika	41 sivua + 1 liite 8.9.2019
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bio- ja kemiantekniikka
Ammatillinen pääaine	Kemiantekniikka
Ohjaajat	Kemisti Carola Ranta Insinööri Jouni Lipasti Lehtori Esa Toukoniitty
<p>Insinööriyössä oli tavoitteena validoida 2-MCPD-, 3-MCPD- ja glysidyyliesterien ISO-standardimenetelmä Tullilaboratorion käytettäväksi sekä tunnistaa menetelmässä kriittisten työvaiheiden vaikutusta määrittämisen onnistumiseen. Pystytetyllä menetelmällä voidaan määrittää haitallisten kontaminanttien pitoisuutta Tullilaboratorioon tuotavista öljy- ja rasvänäytteistä.</p> <p>Työssä käytettiin kaasukromatografi-massaspektrometrillä analyysia haitallisten kontaminanttien menetelmän pystytykseen ja määrittämiseen. Menetelmän pystytykseen sovellettiin ISO-standardia 18363-3:2017. Työn aikana analyysimenetelmä osoittautui niin kriittiseksi, ettei validointia pystytty aloittamaan kyseisellä standardimenetelmällä. Insinööriyössä keskityttiin erityisesti näiden kriittisten analyysivaiheiden tunnistamiseen ja analyysissä havaittujen häiriöiden poistamiseen.</p> <p>Analyysimenetelmässä keskeisimmät työvaiheet olivat vaihtoesteröinti, ulossuolaus sekä derivatisointi. Menetelmässä käytettiin pentadeuteroituja standardiaineita sekä sisäisiä standardeja. Insinööriyössä toteutettiin erilaisia koesarjoja näihin kyseisiin analyysivaiheisiin ja etsittiin mahdollista häiriön aiheuttajaa. Työssä sovellettiin erilaisia standardiaineita, jolloin analyysimenetelmästä voitiin jättää pois vaihtoesteröinti sekä ulossuolaus. Menetelmä saatiin pystytettyä ja vertailunäyte määritettyä käyttämällä standardiaineita, jotka poistivat analyysimenetelmästä kriittiset, häiriötä aiheuttavat työvaiheet eli vaihtoesteröinti sekä ulossuolaus. Määritettävät analyytit mitattiin kaikki PBA-johdannaisina, joten standardinäytteen näytteenkäsittelyvaiheiden tapa ei vaikuttanut kyseisten yhdisteiden tunnistamiseen kaasukromatografi-massaspektrometrisessä analyysissä. Näin ollen mitattavat PBA-johdannaiset pystyttiin määrittämään GC-MS/MS-laitteistolle sekä varmistamaan piikkien oikeellisuus vertailumatriisin avulla. Menetelmään tehtiin kalibrointisuora, jolla todennettiin pitoisuuksien määrittämisen oikeellisuus.</p>	
Avainsanat	MCPD, glysidyyliesterit, GC, PBA-johdannainen, sisäinen

Author Title	Henna Hyvärinen Gas Chromatographic Determination of MCPD and Glycidyl esters
Number of Pages Date	41 pages + 1 appendix 8 September 2019
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Chemical Engineering
Professional Major	Chemical Engineering
Instructors	Carola Ranta, Customs Chemist Jouni Lipasti, Engineer Esa Toukoniitty, Senior Lecturer
<p>The aim of this thesis was to validate the ISO standard method for 2-MCPD, 3-MCPD and glycidyl esters for use by the Customs Laboratory and to identify the impact of critical work steps on the success of the assay. The erected method will be used to determine the concentration of harmful contaminants in the oil and fat samples in the Customs Laboratory.</p> <p>Gas chromatographic mass spectrometric analysis was used in this work to erect and determine set up of the method of harmful contaminants. The ISO standard 18363-3: 2017 was applied to the method. During the work, the analytical method proved to be so critical that validation could not be started with this standard method. The thesis focused in particular on the identification of these critical analysis steps and the elimination of interferences observed in the analysis.</p> <p>The main steps in the analytical method were transesterification, salting-out and derivatization. The method used pentadeuterated standard materials as well as internal standards. In the thesis, different series of experiments were carried out for these particular stages of analysis and the possible cause of the disturbance was investigated. Different standard substances were applied in the thesis so that transesterification and salting-out could be omitted from the analytical method.</p> <p>The method was erected and the reference sample determined using standard substances which removed critical interfering work steps, transesterification and salting-out, from the assay method. The analytes to be determined were all measured as PBA derivatives; thus, the identification of the compounds in question by gas chromatographic mass spectrometry was not affected by the standard sample preparation steps. As a result, measurable PBA derivatives could be determined for GC-MS/MS equipment and confirmed by the reference matrix. A calibration line was performed to verify the accuracy of the concentration determinations.</p>	
Keywords	MCPD, glycidyl esters, GC, PBA-derivative, ISTD

## Sisällys

### Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Kirjallisuuskatsaus	2
2.1	2- ja 3-MCPD- sekä glysidyyliirasvahappoesterit	2
2.1.1	Esiintyvyys elintarvikkeissa	4
2.1.2	Muodostuminen	5
2.1.3	Haitallisuus	8
2.2	Kaasukromatografia	9
2.2.1	Kaasukromatografi-massaspektrometri	9
2.2.2	Massaspektrometriset menetelmät	10
3	Menetelmä ja materiaalit	14
3.1	Analyysimenetelmä	14
3.2	ISO 18363-3:2017 -standardi	14
3.2.1	Glysidyyliestereiden muuntaminen sekä uutto	16
3.2.2	Vaihtoesteröinti	17
3.2.3	Ulossuolaus	17
3.2.4	Derivatisointi	18
3.3	Kaasukromatografi-massaspektrometrinen analyysi	19
3.3.1	GC-MS	20
3.3.2	GC-MS/MS	22
3.4	Reagenssit ja laitteisto	25
4	Tulokset	28
4.1	Menetelmän toimivuus	28
4.2	Muutokset standardimenetelmään	32
4.2.1	Pakastaminen ja viilentäminen	32
4.2.2	SPE-puhdistus	34
4.2.3	Ulossuolaus	35
4.2.4	Derivatisointi	35

4.3	Menetelmän pystytys	36
5	Johtopäätökset	40
	Lähteet	42
	Liitteet	
	Liite 1. Vertailunäytteen pitoisuuden määrittäminen	

## Lyhenteet

2-MCPD	2-monokloori-1,3-propaanidioli.
3-MCPD	3-monokloori-1,2-propaanidioli.
CONTAM	The Panel on Contaminants in the Food Chain. Elintarvikeketjun vierasaineita käsittelevä tiedelautakunta.
DAG	Diaglyseroli.
EFSA	European Food Safety Authority. Euroopan elintarviketurvallisuusvirasto.
EI	Elektroni-ionisaatio.
FAME	Fatty acid methyl esters. Rasvahappometyyliesterit.
GC-MS	Kaasukromatografi-massaspektrometri.
ISO	International Organisation for Standardization. Kansainvälinen standardisointijärjestö.
LOD	Limit of Detection. Toteamisraja.
LOQ	Limit of Quantitation. Määrittämisraja.
MBPD	Monobromipropaaniesteri
PBA	Phenylboronic acid. Fenyyliboronihappo.
TDI	Tolerable daily intake Siedettävä päiväsaanti.

## 1 Johdanto

Palmuöljyn käyttö on aiheuttanut keskustelua sen terveyshaitoista johtuen. Media on uutisoinut lähivuosien aikana aiheesta ja aiheuttanut keskustelua palmuöljyn käytöstä. Kaupoissa on saatavana tuotteita, joissa palmuöljyn puuttumista käytetään mainoslauseena, jota ilmeisesti pidetään parempana vaihtoehtona. Palmuöljyssä tiedetään olevan epäpuhtauksia, joita voidaan luokitella mahdollisesti karsinogeenisiksi yhdisteiksi, kuten 3-kloori-1,2-propaanidioli-, 2-kloori-1,3-propaanidioli- sekä glysidyyliesterit. Yhdisteitä muodostuu öljyihin niiden puhdistusvaiheessa sekä ruuanvalmistuksen ohessa. Euroopan komissio on määrännyt asetuksen (EU) 2018/290, jossa kyseisten vierasaineiden enimmäismäärät elintarvikkeissa on määritettävä. [1].

Tämän insinööriyön pääasiallisena tavoitteena oli validoida sitoutuneiden 2- ja 3-MCPD- sekä glysidyyliirasvahappoestereiden määrittämiseen tarkoitettua ISO 18363-3:2017 -standardimenetelmää Tullilaboratorion käyttöön. Lisäksi tavoitteena oli tutustua kyseisten rasvahappoestereiden ominaisuuksiin ja vähentää kriittisten esikäsittelyvaiheiden aiheuttamaa virhettä.

Insinööriyö tehtiin Tullilaboratorioon. Tullilaboratorio on FINAS-akkreditointipalvelun akkreditoima testauslaboratorio (T006, akkreditointivaatimus SFS-EN ISO/IEC 17025). Tullilaboratorion toimintaa arvioi FINAS-akkreditointipalvelun lisäksi myös EU, sillä Tullilaboratorio toimii kansallisena vertailulaboratoriona elintarvike- ja elintarvikekontaktimateriaalitutkimuksissa EU:n valvonta-asetuksen mukaisesti. Tullilaboratorio tutkii maahan tuotavien elintarvikkeiden ja yhdistelmäelintarvikkeiden lisäksi myös kulutustavaroiden turvallisuutta. Elintarvike- ja kulutustavaravalvonnan keskusvirastot Evira ja Tukes ovat mukana Tullilaboratorion toiminnassa. Tullilaboratorio on tiiviissä yhteistyössä myös Keskusrikospoliisin ja Fimean kanssa laittoman maahantuonnin valvomisessa. [2.]

Tullilaboratoriossa on käytössä menetelmä 3-monoklooripropaani-1,2-diolin (3-MCPD) määrittämiselle, mutta menetelmä soveltuu ainoastaan vapaan muodon määrittämiseen. 2- ja 3-MCPD-yhdisteitä esiintyy huomattavia määriä myös rasvahappoihin sitoutuneina. Kasviöljyihin kontaminoituneet 2- ja 3-MCPD- sekä glysidyyliirasvahappoestereitä on tutkittu sekä niiden oletetaan olevan terveydelle haitallisia yhdisteitä.

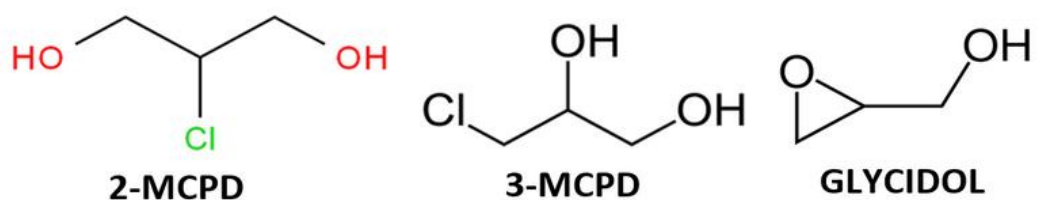
## 2 Kirjallisuuskatsaus

### 2.1 2- ja 3-MCPD- sekä glysidyyliirasvahappoesterit

3-kloori-1,2-propaanidioli tunnetaan yleisemmin nimellä 3-MCPD. 3-MCPD-yhdisteellä esiintyy isomeeri 2-kloori-1,3-propaanidioli eli 2-MCPD. Kuvassa 1 on esitetty 3-MCPD- ja 2-MCPD-rasvahappoesterit ovat glysidolin (2,3-epoksi-1,propanoli) tapaan glyseroli-johdannaisia. 2-MCPD sekä 3-MCPD esiintyvät vapaina tai rasvahappoihin esteröityneinä. 3-MCPD on yleisin esiintyvä klooripropanoli-yhdiste, jota esiintyy elintarvikkeissa. [3, s.11, 4–5.]

2- ja 3-MCPD ja niiden rasvahappoesterit löydettiin 1970-luvun lopulla hydrolysoidun kasviproteiinin (HVP, hydrolyzed vegetable protein) koostumuksesta. MCPD-yhdisteet muodostuvat HVP:n valmistusprosessissa hydrolyysivaiheen aikana. Elintarviketeollisuudessa MCPD-yhdisteiden muodostumismekanismia ei ole tarkkaan määritetty, mutta niiden uskotaan syntyvän kloorin reaktiosta glyserolin tai asyyliglyserolien kanssa. [3, s. 3.]

Euroopan Komission asetuksen (EU) 2018/290 mukaan glysidyyliestereiden pitoisuus mitataan glysidolina. Kuvassa 1 on 2- ja 3-MCPD:n sekä glysidolin rakennekaavat. 2- ja 3-MCPD:n keskinäinen ero on ainoastaan kloorin sijainnilla yhdisteessä.



Kuva 1. 2- ja 3-MCPD:n sekä glysidolin rakennekaavat [4].

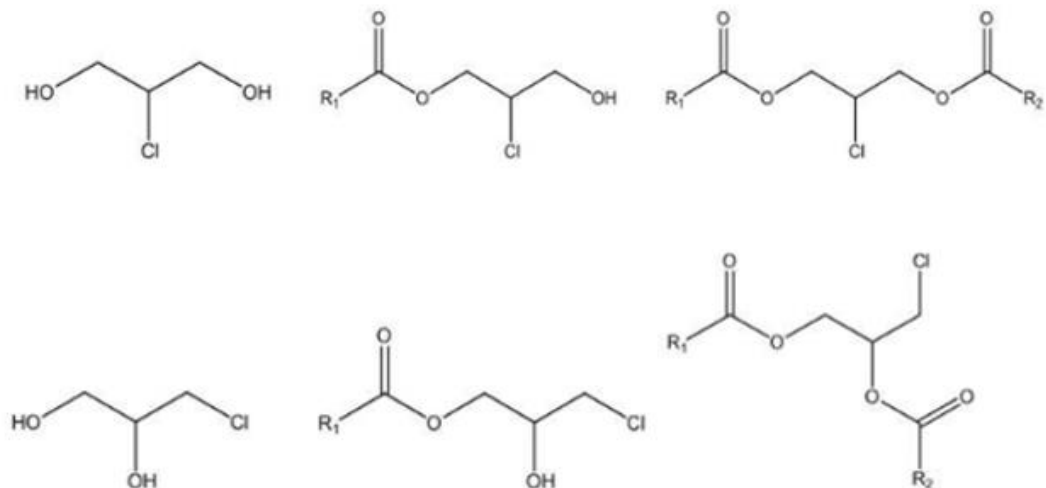
3-MCPD on väritön tai hieman kellertävä öljyinen neste, jonka tiheys huonelämpötilassa on  $1,32 \text{ g/cm}^3$ . Sulamispiste on  $-40 \text{ }^\circ\text{C}$  sekä kiehumispiste  $213 \text{ }^\circ\text{C}$ , paineen ollessa  $760 \text{ mmHg}$ . 2-MCPD vastaa 3-MCPD:n fysikaalisia ominaisuuksia, sillä yhdisteet ovat isomeerejä toisilleen. Glysidoli on väritön neste, joka huonelämpötilassa liukenee veteen



ja useisiin polaarisiin liuottimiin. 2- ja 3-MCPD- sekä glysidyyli-rasvahappoestereillä on samanlaiset ominaisuudet polariteetin ja liukoisuuden kannalta, mutta sulamispisteet sitoutuneilla muodoilla ovat alhaisemmat. [3, s. 12–13.]

2-MCPD:n kemialliset ominaisuudet vastaavat lähes täysin 3-MCPD:n ominaisuuksia. 3-MCPD on kiraalinen molekyyli. 3-MCPD reagoi helposti happojen, alkoholien, aldehydien, ammoniakkin, aminoyhdisteiden, ketonien ja tiolien kanssa. [3, s. 12–13.]

MCPD yhdisteet sekä glysidoli voivat muodostaa estereitä rasvahappojen kanssa (kuva 2). Kuvassa 2. ensimmäisellä rivillä on esitetty 2-MCPD:n esiintyvät muodot ja toisella rivillä 3-MCPD:n muodot. Reaktio tapahtuu herkemmin korkeassa lämpötilassa. 2- ja 3-MCPD pystyvät kumpikin muodostamaan monoestereiden lisäksi myös esimerkiksi diestereitä. Diestereillä esiintyy isomeerejä, joissa kaksi hydroksyyli-ryhmää on esteröity eri rasvahappojen kanssa. [3 s. 13.]



Kuva 2. 2- ja 3-MCPD:n mono- ja diesterit [5].

Yhdisteiden rasvahappoesterit eivät liukene polaarisiin liuottimiin, ja niillä on huono vesiliukoisuus. Rasvahappoketjun pituus vaikuttaa liukoisuuteen mono- ja diestereissä, jolloin pidemmän rasvahappoketjun omaavalla yhdisteellä on pienempi liukoisuus polaarisiin liuottimiin ja lisää liukoisuutta ei-polaarisin liuottimiin. [3, s. 13–14.]

### 2.1.1 Esiintyvyys elintarvikkeissa

MCPD- sekä glysidyyliesterit esiintyvät elintarvikkeissa vierasaineina, erityisesti kasvirasvoissa sekä erilaisissa öljyalosteissa, kuten margariineissa ja kasviöljyissä. Kasviöljyjä käytetään monien leivonnaisten raaka-aineena, joten kontaminanteja tavataan myös elintarvikkeissa. Eteenkin palmuöljyn käyttö on herättänyt keskustelua sen terveyshaitoista. Palmuöljyä käytetään paljon leivonnassa sen hyvien ominaisuuksiensa vuoksi. Palmuöljyn tapaan myös muissa ruokaöljyissä voidaan havaita samanlaisia pitoisuuksia MCPD- sekä glysidyyliestereistä. Kuitenkin palmuöljyn tiedetään sisältävän erityisen korkeita pitoisuuksia kyseisistä kontaminanteista. [6.]

Euroopan komission asetuksen 2018/290 mukaan 3-MCPD sekä glysidyyliirasvahappoestereiden pitoisuuksia elintarvikkeissa on valvottava asetettujen enimmäismäärien mukaisesti. Elintarvikkeita on luokiteltu matriisien mukaan ja esimerkiksi äidinmaidonkorvikkeiden sekä imeväisten, ja pikkulasten ruokavaliovalmisteiden enimmäismääriä tullaan laskemaan 1.7.2019 alkaen. Taulukossa 1 on määritelty 3-MCPD:lle sekä glysidyyliirasvahappoestereille enimmäispitoisuudet erilaisissa elintarvikkeissa. 2-MCPD:lle ei vielä ole määritelty enimmäismäärää elintarvikkeissa. [7.]

Taulukko 1. Taulukossa on esitetty EU:n komission mukaiset enimmäismäärät 3-MCPD:lle sekä glysidyyliirasvahappoestereille. [7]

Elintarvikkeet <sup>(1)</sup>		Enimmäismäärät (µg/kg)
4.1	<b>3-monoklooripropaani-dioli (3-MCPD)</b>	
4.1.1	Hydrolysoitu kasviproteiini <sup>(30)</sup>	20
4.1.2	Soijakastike <sup>(30)</sup>	20
4.2	<b>Glysidyyliirasvahappoesterit glysidolina ilmaistuna</b>	
4.2.1	Kasvirasvat ja -öljyt, jotka on saatettu markkinoille loppukuluttajaa varten tai elintarvikkeiden ainesosaksi, lukuun ottamatta 4.2.2 kohdassa tarkoitettuja elintarvikkeita	1 000
4.2.2	Kasvirasvat ja -öljyt, jotka on tarkoitettu lastenruokien sekä imeväisten ja pikkulasten viljapohjaisten valmisruokien valmistukseen <sup>(3)</sup>	500
4.2.3	Äidinmaidonkorvikkeet, vieroitusvalmisteet ja imeväisten ja pikkulasten erityisruokavaliovalmisteet lääkinnällisiin tarkoituksiin (jauheena) <sup>(3)</sup> <sup>(29)</sup>	30.6.2019 saakka 75 1.7.2019 lähtien 50
4.2.4	Äidinmaidonkorvikkeet, vieroitusvalmisteet ja imeväisten ja pikkulasten erityisruokavaliovalmisteet lääkinnällisiin tarkoituksiin (nesteinä) <sup>(3)</sup> <sup>(29)</sup>	30.6.2019 saakka 10,0 1.7.2019 lähtien 6,0*

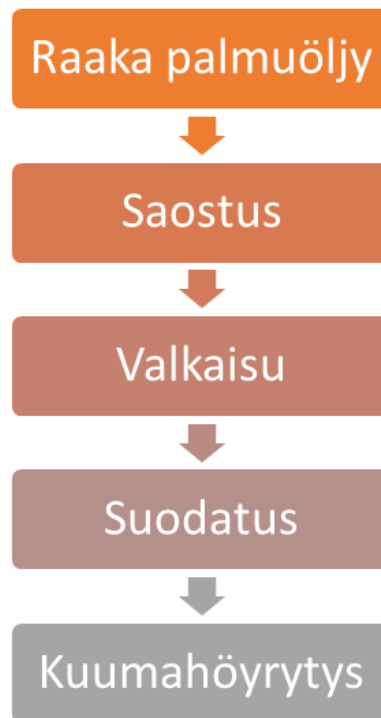
Elintarviketurvallisuusviranomaisen alainen elintarvikeketjun vierasaineita käsittelevä tiedelautakunta (CONTAM-lautakunta) antoi toukokuussa 2016 lausunnon 2- ja 3-MCPD- rasvahappoestereiden sekä glysidyyliirasvahappoestereiden terveydellisistä haitoista ja terveysriskeistä elintarvikkeissa. Euroopan unionin suosituksen 2014/661 mukaan 3-MCPD-yhdisteelle on määriteltä TDI (tolerable daily intake), joka kertoo siedettävän päiväsaannin. TDI 3-MCPD-yhdisteelle on määriteltä 2 µg painokiloa kohti [9]. Vuoden 2016 Euroopan elintarviketurvallisuusviraston (EFSA) julkaisussa TDI päivitettiin 0,8 µg:aan. CONTAM- lautakunta muutti TDI-arvoa pitkäaikaistutkimuksien perusteella MCPD-yhdisteiden haitallisuudesta ja yhdisteen terveyshaitoista johtuen. [3, s. 5–8.]

### 2.1.2 Muodostuminen

Korkeiden lämpötilojen tiedetään lisäävän kemiallisten reaktioiden syntyä kasviöljyissä. Ruokaa uppoaistetaan ja kuumennetaan erilaisilla menetelmillä ruuanlaitossa, jolloin ruokaan syntyy terveydelle haitallisia kontaminantteja. Vain pieni osa näistä kontaminanteista on ruuanlaiton yhteydessä muodostunutta, sillä öljyjen jalostusprosessissa muodostuu suurin osa 2- ja 3- MCPD- sekä glysidyyliestereistä.

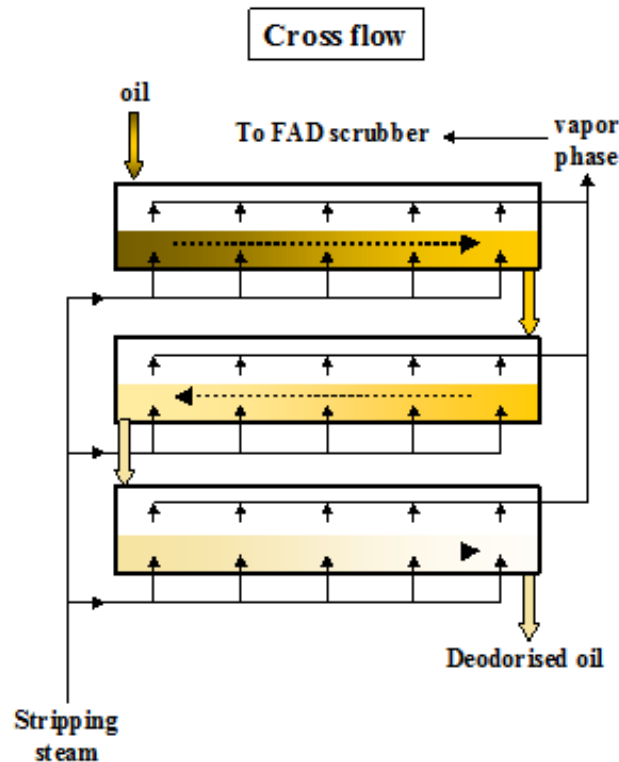
Glysidyyliesterit muodostuvat pääasiassa kasviöljyjen diaglyseroleista (DAG), kun kasviöljyjä kuumennetaan yli 200 °C:ssa. Glysidyyliestereitä syntyy myös deodorisointivaiheen aikana fysikaalisesti tai kemiallisesti. Palmuöljy sisältää huomattavan DAG-pitoisuuden, joten siksi palmuöljyllä havaitaan korkeita glysidyyliestereiden pitoisuuksia. [3, s. 16.]

Öljyjen esikäsittelyvaihe lisää haitallisten prosessikontaminanttien muodostumista. Öljyjen prosessointi ja puhdistus lisääntyivät Euroopan margariiniteollisuuden kasvun jälkeen, jolloin ruokaöljyistä haluttiin poistaa väriä ja hajua aiheuttavia komponentteja. Kasviöljyjen jalostus koostuu saostuksesta, valkaisuista, suodatuksesta ja deodorisaatiosta eli kuumahöyrytyksestä (kuva 3). Deodorisaatio on kasviöljyjen puhdistuksessa herkin vaihe, jolloin epähaluttuja prosessikontaminantteja muodostuu öljyyn. Kuumahöyrytyksen tarkoituksena on poistaa öljystä epämiellyttäviä hajupigmenttejä. [8.]



Kuva 3. Yksinkertaistettu palmuöljyn jalostusprosessi.

*Deodorisaatio* on kasviöljyjen puhdistuksessa kriittisin vaihe, jolloin epähaluttuja prosessikontaminanteja muodostuu öljyyn. Deodorisaatio on prosessitekniikassa strippausprosessi, joka tunnetaan myös absorption käänteisprosessina. Siinä yksi tai useampi komponentti poistetaan nestefaasista kaasuvirran tai höyryn avulla. Prosessille on ominaista korkea lämpötila, sillä prosessin toimivuus riippuu Henryn vakiosta, Henryn lain mukaisesti. Korkeat lämpötilat kasvattavat Henryn vakiota, jolloin prosessin energiatehokkuus lisääntyy. Deodoroinnissa tietty määrä höyryä johdetaan tietyn ajanjakson ajan kuumaan höyryyn käyttäen matalaa painetta. Kuvassa 4 on havainnollistettu deodorisointiprosessi. Prosessissa raakaöljyyn johdetaan höyryä, jonka tarkoituksena on puhdistaa raakaöljyä siirtämällä epäpuhtaudet nestefaasista höyryfaasiin. Raakaöljy on alussa sameaa, mutta vähitellen kirkastuu prosessin edetessä, kun epäpuhtaudet siirtyvät pois nestefaasista. Prosessissa käytetään matalaa painetta. Kuvasta 4 voidaan havaita, että viimeisessä vaiheessa öljy on jo lähes puhdasta. Korkean lämpötilan seurauksena kemiallisten reaktioiden määrä lisääntyy prosessin aikana, jolloin myös prosessikontaminantit 2- ja 3-MCPD- sekä glysidyyliesterit muodostuvat öljyihin. [8.]



Kuva 4. Deodorointiprosessi. Vaiheittain öljyn puhdistuminen. [8.]

Öljyjen esikäsittelyvaiheissa pyritään vähentämään öljylle ominaisia väripigmenttejä sekä epähaluttuja aromeja. Prosessiin käytetään yleensä noin 200 °C:n lämpötilaa, joka vie huomattavan ajan öljynpuhdistuksesta. Prosessia voidaan kuitenkin nopeuttaa nostamalla lämpötila 260 °C:seen. Lämpötilan nostamista prosessin nopeuttamiseksi sovelletaan esimerkiksi palmuöljyille, sillä palmuöljy vaatii pitkän kuumennuksen ja palmuöljyerät ovat yleensä suuria. Jotkut öljyt ja rasvat eivät vaadi korkeaa lämpötilaa puhdistukseen, jonka vuoksi niille voidaan käyttää alle 200 °C:n lämpötilaa, jolloin kemiallisten reaktioiden riski pienenee. Prosessin nopeuttamisesta ja korkean prosessilämpötilan seurauksena havaittiin prosessoiduissa öljyissä transrasvahappojen sekä glysidyyliesterien korkeita pitoisuuksia. Lämpökuormaa oli alennettava, jotta prosessoituihin öljyihin ei kontaminoituisi haitallisia yhdisteitä ja aiheuttaisi terveyshaittoja. [8.]

Ruuanvalmistus mahdollistaa MCPD-yhdisteiden muodostumista, jos reaktiossa on mukana vettä, natriumkloridia ja glyserolia tai lipidiprekursoreita. 3-MCPD:n määrä lisääntyy aina, kun lämpötila saavuttaa yli 160 °C:n lämpötilan. Lämpötilalla on kaikista suurin

merkitys MCPD-yhdisteiden syntyyn, kun öljyjä puhdistetaan tai hyödynnetään ruuanlaitossa. On esimerkiksi osoitettu, että grillaaminen voi lisätä 3-MCPD:n pitoisuutta huomattavasti, jos verrataan mikroaaltouunilla valmistettua rasvapitoista ruokaa. [3, s. 14–16.]

Viljoihin, esimerkiksi ohraan, muodostuu oluen valmistuksessa 3-MCPD-yhdisteitä, kun maltaita paahdetaan yli 170 °C:n lämpötilassa. Uuttamisen ja laimentamisen seurauksena MCPD-yhdisteet eivät kuitenkaan siirry valmistusprosessin loppuun saakka, joten MCPD-yhdisteiden kontaminaatiota ei havaita tuotannossa valmistuneissa juomissa. [3, s. 15–16.]

Kontaminantteja muodostuu ruuan valmistuksen lisäksi myös leivonnassa yhteydessä. Leivonnassa hiivan entsyymien avulla muodostunut vapaa glyseroli on tärkein reagenssi 2- ja 3-MCPD:n muodostumiselle. MCPD-yhdisteiden kontaminoituminen on suurinta lämpötilan ollessa 220 °C sekä kosteuden ollessa alhainen, noin 1–15 %. Siksi myös leivonnaisissa tavataan kyseisiä kontaminantteja, koska monet leivonnaiset kypsennetään uunissa. [3, s. 15.]

### 2.1.3 Haitallisuus

Euroopan Komission pyynnöstä epäpuhtauksia käsittelevää paneelia (CONTAM) pyydettiin antamaan tieteellinen lausunto mahdollisesti ihmiselle aiheutuvista terveyshaitoista, joita 2- ja 3-monoklooripropaanidioli sekä glysidyyliirasvahappoesterit ihmiselle aiheuttavat. IARC luokitteli glysidolin ryhmään 2A eli todennäköisesti ihmiselle karsinogeeninen ja 3-MCPD:n ryhmään 2B eli mahdollisesti karsinogeeninen ihmiselle. Vaikka 3- ja 2-MCPD ovat toistensa isomeerejä, niiden terveyshaittoja ei kuitenkaan voida pitää samana. [3, s. 1;4–6.]

Pitkäaikaisissa eläinkokeissa rotilla aiheutui surkastumaa, joka Leydigin soluissa häiritsee testosteronin normaalia tuotantoa, kun rottia altistettiin 3-MCPD:lle. Rottien munuaisissa aiheutui myös havaittavaa surkastumaa. CONTAM-lautakunnan mukaan eläinkokeiden tuloksia ei kuitenkaan voida suoraan verrata ihmisille mahdollisesti aiheutuville oireille. [3, s. 1;4–6.]

## 2.2 Kaasukromatografia

Kaasukromatografia (GC, gas chromatography) soveltuu haihtuvien yhdisteiden tunnistamiseen ja määrittämiseen. Kaasukromatografiassa, kuten myös muissa kromatografiatekniikoissa, voidaan erottaa kaksi faasia, joista toinen on liikkuva ja toinen paikallaan pysyvä stationaarifaasi. Liikkuvana faasina kolonnin läpi virtaa inertti kaasu eli kantajakaasu, jonka mukana haihtuvat yhdisteet kulkeutuvat. Kantajakaasuna käytetään tavallisesti typpeä, argonia, vetyä tai heliumia. Kaasukromatografian avulla näytteestä voidaan erottaa satoja erilaisia orgaanisia yhdisteitä sekä kvantitatiiviseen että kvalitatiiviseen analyysiin. [9.]

### 2.2.1 Kaasukromatografi-massaspektrometri

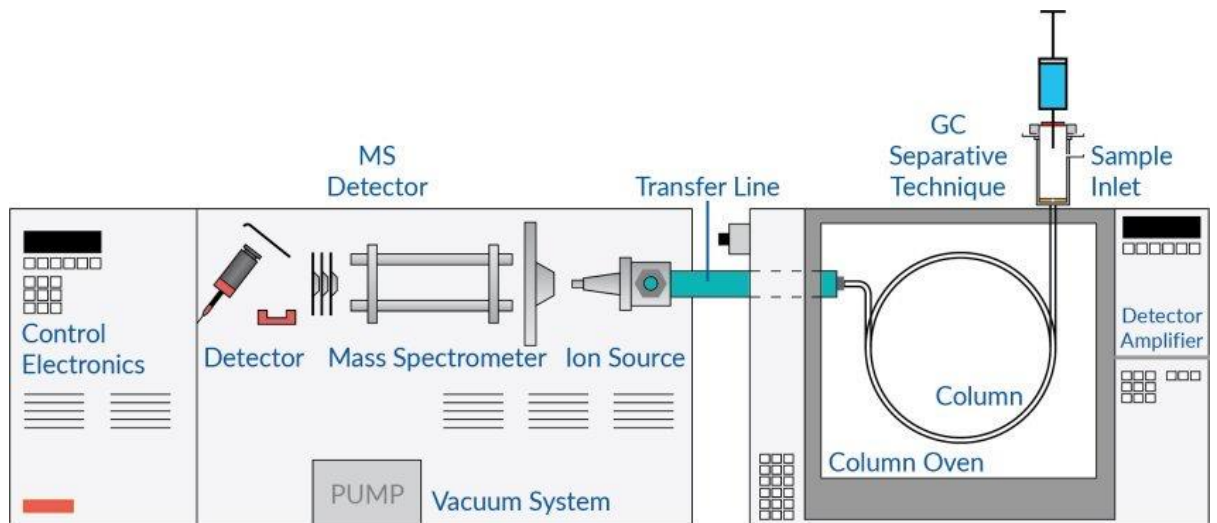
Massaspektrometrin tärkeimmät osat ovat ionilähde, massa-analysaattori ja detektori. Laitteistoon on liitetty myös pumppujärjestelmä, sillä menetelmä tarvitsee alhaisen paineen toimiakseen.

Näyte syötetään injektorikammioon, jossa se höyrystyy noin 200-300 °C:n lämpötilassa. Höyrystyneet yhdisteet kulkeutuvat liikkuvan faasin mukana kolonniin, josta ne kulkeutuvat eteenpäin yhdisteille ominaisilla nopeuksilla. Nopeuteen vaikuttaa yhdisteiden haihtuvuus ja vuorovaikutus kolonnin sisäpinnalla olevan paikallaan pysyvän nestefaasisikerroksen kanssa. [9.]

Näytteen komponentit kulkeutuvat niille ominaisilla retentioajoilla ionisaattoriin, jossa tutkittavan näytteen komponentit ionisoituvat ja fragmentoituvat. Positiivisesti varautuneet fragmentti-ionit kulkeutuvat kvadrupolimassasuodattimeen, jossa vain tietyt ionit niiden massavaraussuhteesta riippuen päätyvät ilmaisimelle. Detektorin signaalin suuruus muodostuu ilmaisimeen osuvien ionien määrästä. Kromatogrammissa tämä ilmenee piikkeinä. Itse tunnistaminen perustuu analyysimenetelmän retentioaikaan, joka on jokaiselle yhdisteelle ominainen. [9.]

Kuvassa 5 on havainnollistettu GC-MS-laitteiston rakenne. Näyte injektoidaan (sample inlet) ja kulkeutuu uunin (column oven) sisälle kolonniin. Näyte kulkeutuu ionilähteen (ion

source) kautta massaspektrometrille (mass spectrometer). Lopuksi näyte vietään de-  
tektorille (detector), joka on yhteydessä tietokoneeseen.



Kuva 5. GC-MS-laitteiston rakenne [10].

### 2.2.2 Massaspektrometriset menetelmät

*SIM*-menetelmä eli valittujen ionien seurantamenetelmä (selected ion monitoring) mittaa ainoastaan valitut ionit analysoitavasta näytteestä. *SIM*-menetelmä on erittäin herkkä, sillä se pystyy määrittämään spesifisesti tietyn analyytin muista häiritsevistä yhdisteistä. Massaspektrometri kerää mittaustuloksia ainoastaan valituilta ioneilta, jonka vuoksi massaspektrometri keskittyy ainoastaan vain muutamaani ioniin. Tähän perustuu *SIM*-menetelmän herkkyys. *SIM*-menetelmän herkkyyttä voidaan parantaa vähentämällä samasta aikaikkunasta ionien määrää, jolloin laite kykenee mittaamaan herkemmin valittuja ioneita. Jos näytteestä analysoidaan useampia analyyttejä, on tärkeää ryhmitellä ne erilleen ja määrittellä jokaiselle analyyttille mitattavat ionit. [11.]

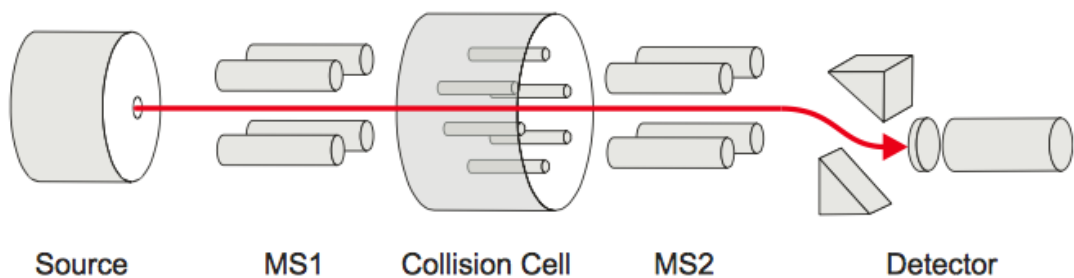
Menetelmässä määritetään kvantitointi-ioni eli target ion. Kvantitointi-ionin avulla näytteestä voidaan erottaa haluttu analyytti muista häiritsevistä yhdisteistä, vaikka ne esiintyisivät samalla retentioajalla. Konfirmaatioioni eli qualifier ion voidaan määrittää ajatusta massaspektristä. Kvantitointi- ja konfirmaatioionien avulla voidaan varmistaa oikean



analyytin löytyminen. Yleisesti seurataan kolmea ionia yhdistettä kohti. Yhtä ionisignaalia käytetään kvantitointi-ionina ja kahta muuta kvalitatiiviseen tarkasteluun. [11.]

Ionien valinta vaikuttaa huomattavasti yhdisteiden tunnistamiseen, joten ne kannattaa valita huolellisesti. Ioniksi kannattaa valita spesifinen ioni, joka ei esiinny yleisesti monilla muilla yhdisteillä. Lisäksi kannattaa suosia suurimassaista ionia, sillä pienen massan omaavilla ioneilla tavataan enemmän häiriöitä herkkyudessa ja tunnistamisessa. Koska mitataan pieniä pitoisuuksia, kannattaa valita kuitenkin sellainen ioni, jota ilmenee runsaasti yhdisteessä. Jos yhdisteessä on vain pieni määrä suurimassaista ionia, niin pienissä pitoisuuksissa ionia ei välttämättä kyetä tunnistamaan.

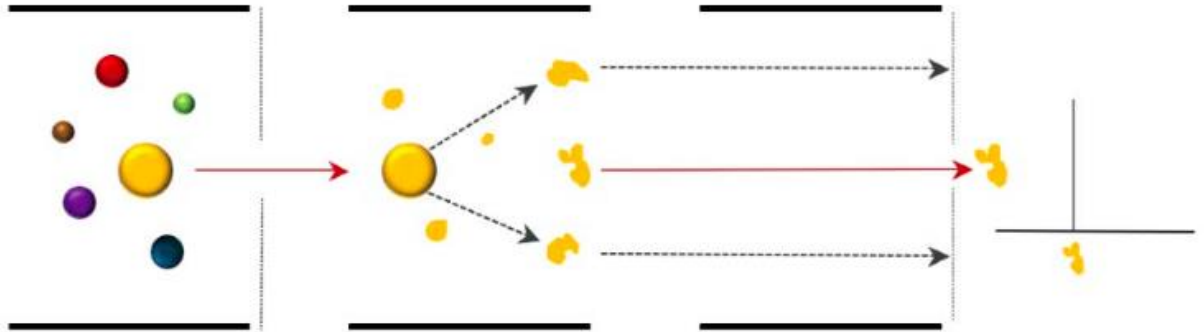
*MRM*-menetelmä eli useiden reaktioiden seuranta (multiple reaction monitoring) on erityisen herkkä menetelmä, jolla pystytään tunnistamaan monia analyyttejä pienistäkin pitoisuuksista. *MRM*-menetelmässä määritetään prekursori-ioni sekä tytär-ioni, jonka vuoksi menetelmä poikkeaa *SIM*-menetelmästä. Tandem-kvadrupoli-massaspektrometrissä ensimmäinen kvadrupoli (*MS1*) päästää lävitseen ainoastaan tietyn massasuhteen ionin (prekursori-ionin), minkä jälkeen kvadrupolien välissä olevassa heksapoli-törmäytyskammiossa ioni frakmentoituu. Frakmentoituneet ionit kulkeutuvat toiseen kvadrupoliin, jossa kvadrupoli päästää lävitseen ainoastaan tietyn massasuhteen frakmentoituneen ionin (tytär-ioni). Kuvassa 6 on havainnollistettu *MRM*-menetelmä. [12; 13.]



Kuva 6. *MRM*-menetelmän periaate [12, s.10]

Kuvassa 6 merkitty *MS1* ja *MS2* ovat kvadrupoleja, joissa mitataan tiettyjen ionien massat. Ensimmäisessä kvadrupolissa (*MS1*) mitataan prekursori-ioni ja toisessa kvadrupolissa (*MS2*) mitataan tytärioni. Törmäytyskammiossa ensimmäisessä kvadrupolin läpi

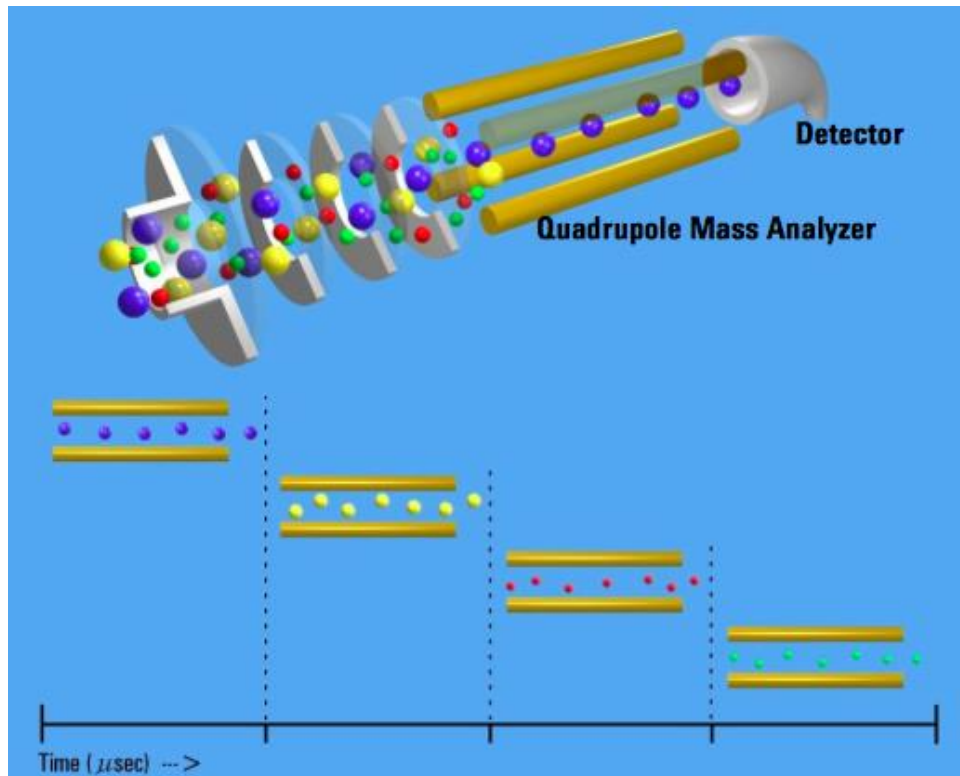
menneet ionit fragmentoidaan eli ”pilkotaan”. Fragmentoituminen on havainnollistettu kuvassa 7.



Kuva 7. Kuvassa MRM-menetelmä, jossa keskimmaisessä törmäytyskammiossa tapahtuu fragmentoituminen. [13, s. 2.]

Menetelmä sopii hyvin monimutkaisille yhdisteille sekä pienen pitoisuuden omaaville näytteille, sillä käytettäessä kahta kvadrupolia massasuhteen ionien valintaan, menetelmästä tulee erittäin spesifinen ja herkkä. MRM-menetelmää käytetään paljon kvantitatiivisille analyyseille määrittämään pieniä pitoisuuksia. Menetelmässä voidaan poistaa taustan tai näytematriisin aiheuttamaa häiriötä analyysin retentioajalla.

SCAN-menetelmä poikkeaa muista massaspektrometrisistä menetelmistä, sillä se mittaa kaikki  $m/z$ -suhteen ionit asetetulta väliltä. SCAN-mittauksessa määritetään massasuhteen ionit, jotka halutaan mitata. Esimerkiksi 50-500  $m/z$ . Näin ollen laitteisto mittaa 50-500 massasuhteen ionien määrät. Skannausmenetelmässä kvadrupoli toimii  $m/z$ -suhteen suodattajana ajan kuluessa (kuva 8). Kuvassa 8 huomataan, että tietyssä ajanjaksona mitataan vain yhtä  $m/z$ -suhteen ionia kerrallaan. SCAN-menetelmää ei voida pitää erityisen herkkänä, sillä kunkin massasuhteen arvojen havaitsemisjakso on huomattavasti alle 100 %.



Kuva 8. SCAN–menetelmä, jossa kvadrupoli toimii suodattajana ajan suhteen kaikille määrätuille  $m/z$ -arvoille [13, s.17].

SCAN-menetelmää (full scan) käytetään erityisesti kvantitatiivisen menetelmän kehittämiseen, sillä sen avulla voidaan määrittää kaikkien ionien määrät asetetulla massasuhteen välillä. Sen avulla voidaan muodostaa spektri, josta löytyvät kaikki massasuhteen ionit näytteessä. Tässä insinööriyössä SCAN-menetelmän käyttö oli välttämätöntä, sillä menetelmällä pystyttiin varmistamaan analyysin onnistuminen.

### 3 Menetelmä ja materiaalit

Tässä luvussa kuvataan insinööriyössä käytettävä standardimenetelmä sekä menetelmässä havaittujen kriittisten työvaiheiden käsittely. Työssä käytetyt materiaalit ja laitteet on esitelty luvun 3 lopussa.

#### 3.1 Analyysimenetelmä

Analyysimenetelmässä määritetään sitoutuneiden 2- ja 3-MCPD- sekä glysidyyliirasvahappoestereiden pitoisuuksia rasvoissa ja öljyissä. Sitoutuneille 2- ja 3-MCPD- sekä glysidyyliestereille on kehitelty erilaisia esikäsittelyvaiheen omaavia menetelmiä.

Analyysimenetelmä perustuu happokatalysoituun esterin katkaisuun ja pilkottujen vapaiden analyyttien derivointiin fenyyliboronihapolla. Näytteet analysoidaan käyttäen kaasukromatografi-massaspektrometristä GCMSMS-analyysiä. Menetelmää voidaan validoida jälkeen soveltaa sekä kiinteisiin että nestemäisiin rasvoihin ja öljyihin.

#### 3.2 ISO 18363-3:2017 -standardi

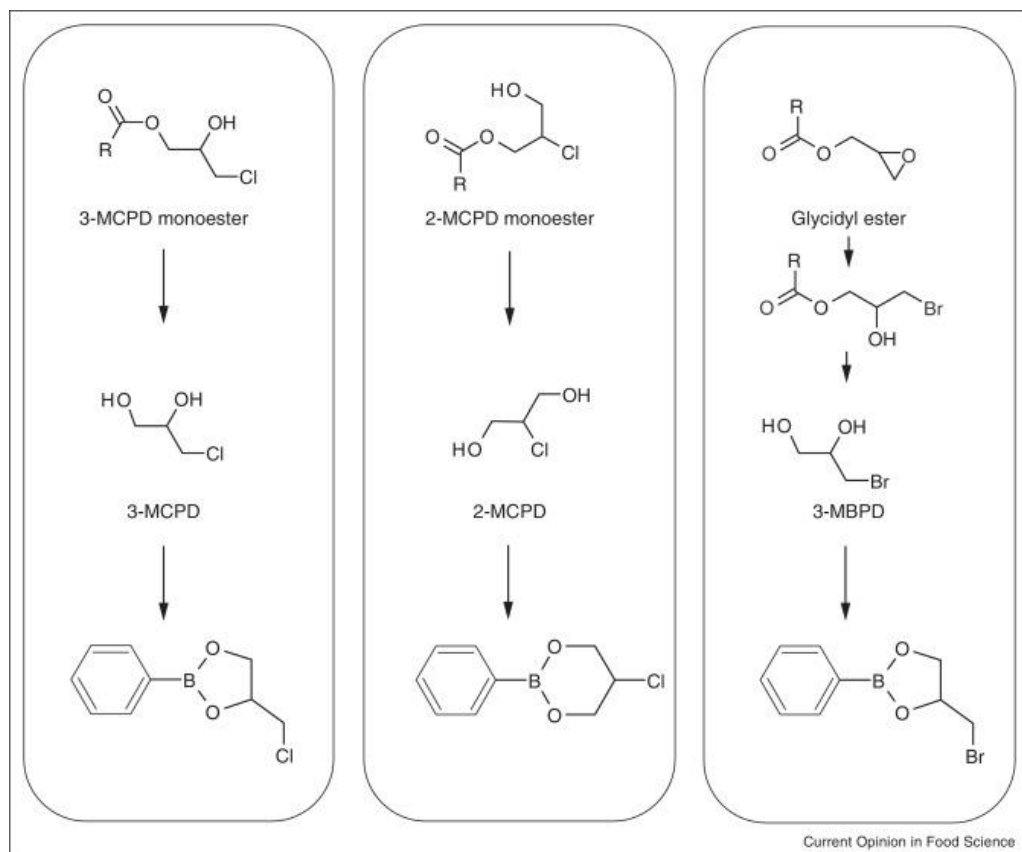
Työssä käytetty menetelmä perustuu sitoutuneiden 2- ja 3-MCPD estereiden ja glysidyyliesterien samanaikaiseen määrittämiseen. Käytettävä menetelmä on kansainvälinen ISO (International Organization for Standardization) 18363-3 -standardi, jossa kaikki kyseiset yhdisteet voidaan määrittää yhdellä määrittäyksellä.

Näyte esikäsitellään varovaisella lämpökäsittelyllä, jos näyte on kiinteää tai hyvin sameaa. Nestemäisille näytteille ei tarvita erillistä esikäsittelyä. Näytteeseen lisätään sisäiset standardit (2-MCPD-d5, 3-MCPD-d5 ja Gly-d5). Sisäisinä standardeina käytetään pentadeuteroituja 3- ja 2-MCPD sekä glysidyyliestereitä, sillä ne käyttäytyvät samalla tavalla, kuin varsinaiset yhdisteet. Sisäisillä standardeilla voidaan tarkkailla varsinaisten

yhdisteiden hajoamista tai häviämistä, sillä sisäisten standardien pitoisuuksien muutos on verrattavissa varsinaisten yhdisteiden muutokseen näytteessä. [11.]

Glysidyyliesterit muunnetaan 3-MBPD-monoestereiksi lisäämällä natriumbromidin happanta liuosta. Kuvassa 9 on havainnollistettu esikäsitteilyn välivaiheet. Orgaaninen faasi erotetaan vesifaasista ja haihdutetaan kuivaksi. Orgaaninen faasi sisältää 2- ja 3-MCPD-estereitä ja 3-MBPD-estereitä. Seuraavaksi jäännös liuotetaan tetrahydrofuraaniin ja lisätään happoalkoholiliuosta, jolloin saadaan aikaiseksi vaihtoesteröinti. [11.]

Vaihtoesteröinnissä sitoutuneet esterit pilkotaan vapaiksi muodoiksi. 16 tunnin inkuboinnin jälkeen 40 °C:ssa näyte neutraloidaan ja vaihtoesteröinnin aikana muodostuneet rasvahappometyyliesterit (FAME) poistetaan näytteestä. Lopuksi näytteestä muodostetaan PBA-johdannainen ennen GCMS-analyysiä, jotta saadaan mitattavista yhdisteistä haihtuvampia. Johdoksen muodostus eli derivatisointi on menetelmän yksi kriittisimmistä vaiheista. [11; 12.]



Kuva 9. Kuvassa on esitetty 2- ja 3-MCPD- sekä jot glysidyyliesterin pilkkoutuminen vapaiksi muodoikseen ja niistä edelleen muodostetut fenyyliboronihappojohdannaiset. [13.]

### 3.2.1 Glysidyyliestereiden muuntaminen sekä uutto

Glysidyyliesterit muunnetaan samanlaiseen muotoon, kun 2- ja 3-MCPD-esterit. Kuvasta 9 nähdään, että glysidyyliestereitä käsitellään yhden välivaiheen verran enemmän, jotta glysidyyliesteri saadaan muunnettua vakaammaksi monobromipropaaniestereiksi (3-MBPD).

Näytteeseen lisätään sisäisten standardien jälkeen vedetön tetrahydrofuraani ja sekoitetaan voimakkaasti käyttäen vortexia. Huolellisen sekoituksen jälkeen näytteeseen lisätään natriumbromidin hapanta vesiliuosta ja annetaan näytteen inkuboitua 50 °C:ssa 15 minuuttia. Natriumbromidin hapan vesiliuos valmistetaan lisäämällä natriumbromidia analyysilaatuiseen veteen. Seokseen lisätään vielä rikkihappoa sekä analyysilaatuista vettä. [11; 12, s.12–18.]

Menetelmässä käytetty tetrahydrofuraani on oltava täysin kuivattua, tai se voidaan kuivattaa esimerkiksi natriumsulfaatilla. Veden läsnäolo vaikeuttaa glysidyyliestereiden muuntamista 3-MBPD-esteriksi, tai se voi aiheuttaa myös mahdollisia sivureaktioita, jonka seurauksena syntyy epähaluttuja yhdisteitä. Glysidyyliesterin muuntaminen 3-MBPD:ksi on menetelmän yksi kriittisimpiä vaiheita, mutta silti välttämätöntä. Glysidyyliesteristä vapautuva glysidoli reagoi helposti kloorin kanssa muodostaen 2- tai 3-MCPD-estereitä, jolloin MCPD- estereiden määrää näytteessä lisääntyisi virheellisesti. [11;14.]

Inkuboitumisen jälkeen reaktio pysäytetään lisäämällä näytteeseen natriumvetykarbonaatin vesiliuosta (0,6 %). Näytteestä uutetaan pois vesi lisäämällä heptaania. Näyte sekoitetaan huolellisesti käyttäen vortexia sekä sentrifugia. Näytteestä poistetaan uutossa vesifaasi, jolloin orgaaninen faasi kerätään talteen. [11.]

### 3.2.2 Vaihtoesteröinti

Vaihtoesteröinnin tarkoituksena on katkaista MCPD- ja MBPD-esterit vapaiksi muodoikseen, jolloin reaktio suoritetaan happamassa metanoliliuoksessa. Vaihtoesteröinti on myös yksi kriittisimmistä vaihteista, koska ainoastaan vaihtoesteröinnistä saadut vapaat MCPD sekä MBPD-yhdisteet voidaan derivatisoinnin jälkeen määrittää. Vaihtoesteröinnin epäonnistuessa MCPD sekä MBPD-yhdisteet jäävät sitoutuneeseen muotoon, joita ei voida myöhemmin derivatisoida. Kuvassa 1 on esimerkit vapaista 2- ja 3-MCPD-yhdisteistä. Vaihtoesteröinti tehdään siis vain sitoutuneille MCPD-estereille. Määrittäessä vapaita MCPD-yhdisteitä vaihtoesteröinti jätetään pois.

Uuton jälkeen näytteestä haihdutetaan pois erotukseen tarvittu heptaanii. Haihdutuksen jälkeen jäännökseen lisätään tetrahydrofuraania ja sekoitetaan käyttäen vortexia. Vaihtoesteröiminen happamissa olosuhteissa on todettu olevan tehokkain menetelmä esterien katkaisuun. Näytteeseen lisätään rikkihapon ja metanolin seosta. Näyte inkuboituu 16 tuntia vesihauteessa 40 °C:ssa. Vaihtoesteröinnin tuloksena analyytit on katkaistu sekä rasvahappoketjuista on muodostunut FAME-yhdisteitä (Fatty acid methyl esters). [11;12;14.]

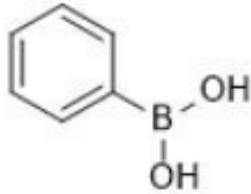
### 3.2.3 Ulossuolaus

Ennen ulossuolausta näyte neutraloidaan natriumvetykarbonaatilla ja haihdutetaan näytteestä pois metanoli. Näytteeseen lisätään natriumsulfaattiliuosta (20 %) sekä heptaanii. Näyte sekoitetaan käyttämällä vortexia sekä sentrifugia. Näytteeseen muodostuu kaksi faasia, joista alempi kerätään talteen. Päällimmäinen faasi koostuu vaihtoesteröinnissä muodostuneista FAME-yhdisteistä, joka erotetaan näytteestä. Ulossuolauksessa analyyttien häviäminen on yleistä, mutta sisäiset standardit kompensoivat analyysivaiheessa pitoisuutta. [11.]

Ulossuolauksen jälkeen näyte koostuu vapaista MBPD- sekä MCPD-yhdisteistä. Vaihtoesteröinti ja ulossuolaus ovat kriittisiä työvaiheita näyteenkäsittelyssä, sillä johdoksen muodostus riippuu vaihtoesteröinnin sekä ulossuolauksen onnistumisesta.

### 3.2.4 Derivatisointi

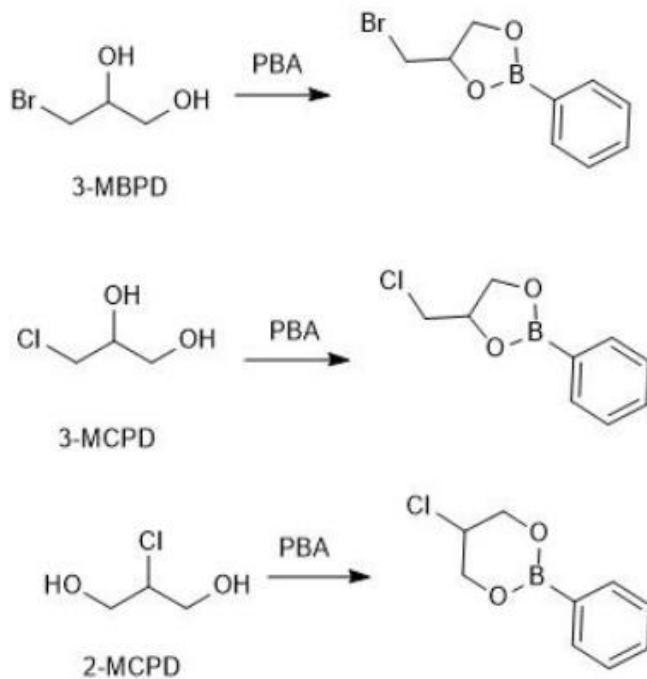
Derivatisointi eli johdoksen muodostus on näytteen käsittelyn tärkein vaihe, sillä vain derivatisoituneet analyytit voidaan määrittää. Johdoksen muodostamiseen käytetään fenyyliboronihappoa, joka on esitetty kuvassa 10.



Kuva 10. Fenyyliboronihappo, jota käytetään johdoksen muodostukseen. [14, s. 40]

Fenyyliboronihappo sekoitetaan asetonin ja veden seokseen. PBA-seosta lisätään näytteeseen ja inkuboidaan ultraäänessä viisi minuuttia. Inkuboinnin aikana vapaat analyytit muodostavat fenyyliboronihapon kanssa johdoksen. Kuvassa 11 on esitetty MCPD ja MBPD-yhdisteistä muodostetut johdokset, jotka ovat analyysin mitattavia analyyttejä.





Kuva 11. Johdoksen muodostus fenyyliboronihapolla. [14, s. 40.]

Johdos pystytään muodostamaan ainoastaan vapaisiin MCPD sekä MBPD-yhdisteisiin, joten derivatisointi ei onnistu, jos vaihtoesteröinnissä estereitä ei ole saatu pilkottua. PBA-johdos on hyvin haihtuva yhdiste, joka sopii erityisesti kaasukromatografiseen määrittelykseen.

Näytteessä oleva vesi uutetaan heptaanilla, jonka jälkeen orgaaninen faasi kerätään talteen ja haihdutetaan kuivaksi. Haihdutus on tehtävä varovasti, sillä PBA-johdannaiset ovat herkästi haihtuvia. Jäännös liuotetaan heptaaniiin ja sekoitetaan käyttäen vortexia. Päälimmäisestä faasista otetaan näyte analysoitavaksi.

### 3.3 Kaasukromatogafi-massaspektrometrinen analyysi

Insinöörityössä analyyttien pitoisuudet määritettiin kaasukromatografia-massaspektrometrisesti (GC-MS) käyttäen elektroni-ionisaatiota (EI). Käytävissä oli GC-MS-laitteisto sekä GC-MS/MS-laitteisto. GC-MS-laitteistolla käytettiin SIM-menetelmää ja GC-

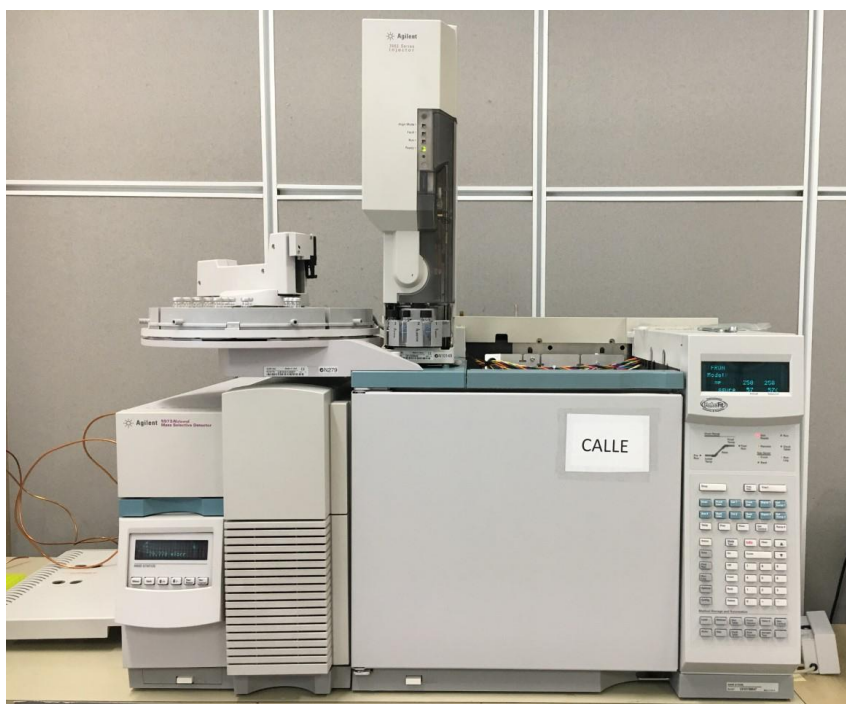
MS/MS-laitteistolla MRM-menetelmää. Analyysilaitteiston valinta ei vaikuttanut näytteen valmistukseen, jolloin samaa näytettä analysoitiin molemmilla laitteistolla.

Mittaustuloksia käsiteltiin ChemStation-ohjelmistolla, joka suoritettiin tietokoneelta. Tietokone oli liitetty GC-MS-laitteiston.

### 3.3.1 GC-MS

ISO 18363-3:2017 -standardin mukaan määrittäminen tehdään käyttäen GC-MS-laitteistoa. Mitattavat yhdisteet määritetään standardin mukaan SIM-menetelmällä, jossa laitteisto mittaa ainoastaan määriteltyjä SIM ioneja.

Mittauksen suoritettiin Agilent Technologies 8683 -sarjan injektorilla sekä Agilent Technologies 5973 -sarjan kaasukromatografilla. Kolonnina käytettiin HP-5MS UI:ta, jonka pituus 15 m ja halkaisija 0,250 mm, 0,25 µm. Kuvassa 12 on työssä käytetty GC-MS-laitteisto.



Kuva 12. Työssä käytetty GC-MS-laitteisto.

Työ aloitettiin GC-MS-laitteistolla käyttäen SIM-analyysimenetelmää. Työssä käytettiin standardimenetelmän antamia SIM-ioneja. Taulukkoon 2 on jaoteltu ionit yhdisteen mukaan. Mitattava yhdiste on fenyyliboronihappojohdannainen.

Taulukko 2. SIM-menetelmän ionit PBA-johdannaisille.

Yhdiste	m/z
3-MCPD-PBA	147
	196
	198
3-MCPD-d5-PBA	150
	201
	203
2-MCPD-PBA	196
	198
2-MCPD-d5-PBA	201
	203
3-MBPD-PBA	147
	240
3-MBPD-d5-PBA	150
	245

Menetelmässä käytettävä injektioilavuus on 1,0 µl. Injektiossa on käytössä pulsed splitless-menetelmä. Lämpötila injektiossa on 250 °C. Heliumin virtausnopeus on 0,8 ml/min. Uunin lämpötilaohjelma on esitetty kuvassa 13. Lämpötilaohjelma poikkeaa hieman standardimenetelmän uuniohjelmasta, koska kuvan 13 mukaisesta lämpötilaohjelmasta saatiin tuloksia näkymään paremmin. Työssä käytettävässä uunin lämpötilaohjelmassa mittaus aloitetaan alemmasta lämpötilasta kuin standardimenetelmässä, sillä sen avulla pyritään estämään mitattavan yhdisteen mahdollinen enneaikainen haihtuminen. Mitattavat yhdisteet ovat helposti hajoavia, joten lämpötilan säätelyllä varmistetaan mittauksen onnistuminen.

Oven	Rate °C/min	Value °C	Hold Time min	Run Time min
▶ (Initial)		60	1	1
Ramp 1	6	150	2	18
Ramp 2	10	300	10	43
*				

Kuva 13. Työssä käytössä oleva uunin lämpötilaohjelma, joka poikkeaa standardiohjeen lämpötilaohjelmasta.

Uunin lämpötila nostetaan aluksi 60 °C ja pidetään lämpötilassa yhden minuutin ajan. Seuraavaksi lämpötilaa nostetaan 6 °C/min 150 °C:seen, jossa lämpötilaa pidetään kaksi minuuttia. Lopuksi lämpötilaa nostetaan 10 °C/min 300 °C:seen, jossa lämpötilaa pidetään 10 minuuttia. Kokonaisajoaika on 43 minuuttia. Korkean lämpötilan on tarkoitus puhdistaa myös kolonnin näytteestä ja pidentää sen käyttöikää.

### 3.3.2 GC-MS/MS

Tullilaboratoriossa on käytössä myös GC-MS/MS-laitteisto, joten menetelmää pystytettiin molemmille laitteistoille. Laitteistossa oli Agilent Technologiesin injektorin sekä 7010B Triple Quad -kaasukromatografi (kuva 14). Kolonni on sama kuin GC-MS-laitteistossa eli HP-5MS UI. Laitteistossa on kaksi kolonnin toinen esi- ja toinen pääkolonni.



Kuva 14. Käytettävissä oleva GC-MS/MS-laitteisto.

GC-MS/MS-laitteistolla käytettiin MRM- menetelmää, joka on herkempi kuin SIM-menetelmä. MRM-menetelmän uunin lämpötilaohjelmassa (kuva 15) lämpötila nostetaan aluksi 60 °C:seen ja pidetään lämpötilassa yhden minuutin ajan. Seuraavaksi lämpötilaa nostetaan 10 °C/min 200°C:seen ja nostetaan lämpötila välittömästi 250 °C:seen nopeudella 25°C/min. Kokonaisuudessaan ajoaika on 17 minuuttia sekä ajon lopuksi ajetaan kolmen minuutin lopetusajo (post run).

	Rate °C/min	Value °C	Hold Time min	Run Time min
► (Initial)		60	1	1
Ramp 1	10	200	0	15
Ramp 2	25	250	0	17
*				

Kuva 15. Kuvassa MRM-menetelmän uunin lämpötilaohjelma.

Inletin lämpötilaohjelma on esitetty kuvassa 16. Inletin lämpötila nostetaan ensin 80 °C:seen ja pidetään lämpötilaa 0,02 minuuttia, jonka jälkeen lämpötilaa nostetaan 500 °C/min 300 °C:seen ja pidetään 1,5 minuuttia. Lopuksi lämpötila nostetaan 325 °C:seen ja pidetään lämpötilaa kolmen minuutin ajan vakiona. Näytettä injektoidaan 1 µl pulsed splitless-ohjelmalla.

Rate (°C/Min)	Temperature (°C)	Hold time (min)
0	80	0.02
500	300	1.5
Post Run	325	3

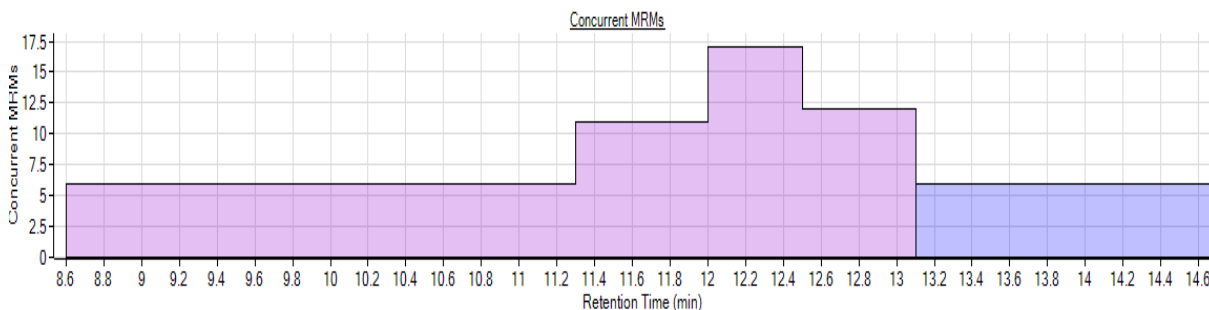
Kuva 16. MRM–menetelmän lämpötilaohjelma inletille.

MRM–menetelmässä määritellään prekursori- ja tytäri-ionit sekä törmäytysenergiat (collision energy). Kuvassa 17 on käytetyn MRM-menetelmän tiedot mitatuista kvantitointi- ja konformaatioionesta. Transiitioita eli kvantitointi- ja konformaatioionipareja on luokiteltu jokaiselle yhdisteelle erikseen.

	Enable	Compound Name	CAS#	ISTD	Precursor Ion	MS1 Resolution	Product Ion	MS2 Resolution	RT (min)	Left RT Delta (min)	Right RT Delta (min)	Average Dwell (ms)	CE (eV)
1	<input checked="" type="checkbox"/>	3-MCPD		<input type="checkbox"/>	198	Wide	147.2	Wide	11.6	3	1.5	39.1	15
2	<input checked="" type="checkbox"/>	3-MCPD		<input type="checkbox"/>	196	Wide	147.1	Wide	11.6	3	1.5	39.1	5
3	<input checked="" type="checkbox"/>	3-MCPD		<input type="checkbox"/>	147	Wide	91	Wide	11.6	3	1.5	39.1	20
4	<input checked="" type="checkbox"/>	3-MCPD-IS		<input type="checkbox"/>	201	Wide	149.2	Wide	11.6	3	1.5	39.1	5
5	<input checked="" type="checkbox"/>	3-MCPD-IS		<input type="checkbox"/>	201	Wide	92.1	Wide	11.6	3	1.5	39.1	25
6	<input checked="" type="checkbox"/>	3-MCPD-IS		<input type="checkbox"/>	150	Wide	93	Wide	11.6	3	1.5	39.1	20
7	<input checked="" type="checkbox"/>	2-MCPD		<input type="checkbox"/>	198	Wide	104	Wide	11.9	.6	.6	29.1	15
8	<input checked="" type="checkbox"/>	2-MCPD		<input type="checkbox"/>	196	Wide	104	Wide	11.9	.6	.6	29.1	15
9	<input checked="" type="checkbox"/>	2-MCPD		<input type="checkbox"/>	196	Wide	91	Wide	11.9	.6	.6	29.1	10
10	<input checked="" type="checkbox"/>	2-MCPD-IS		<input type="checkbox"/>	201	Wide	106	Wide	11.9	.6	.6	29.1	10
11	<input checked="" type="checkbox"/>	2-MCPD-IS		<input type="checkbox"/>	201	Wide	104.1	Wide	11.9	.6	.6	29.1	30
12	<input checked="" type="checkbox"/>	GLY		<input type="checkbox"/>	240	Wide	147.1	Wide	12.7	.7	2	40.3	5
13	<input checked="" type="checkbox"/>	GLY		<input type="checkbox"/>	240	Wide	91.1	Wide	12.7	.7	2	40.3	30
14	<input checked="" type="checkbox"/>	GLY		<input type="checkbox"/>	147	Wide	91	Wide	12.7	.7	2	40.3	15
15	<input checked="" type="checkbox"/>	GLY-IS		<input type="checkbox"/>	245	Wide	149.1	Wide	12.7	.7	2	40.3	15
16	<input checked="" type="checkbox"/>	GLY-IS		<input type="checkbox"/>	245	Wide	92.1	Wide	12.7	.7	2	40.3	35
17	<input checked="" type="checkbox"/>	GLY-IS		<input type="checkbox"/>	150	Wide	93	Wide	12.7	.7	2	40.3	15

Kuva 17. Käytetyn MRM-menetelmän mitattavat ioniparit ja törmäytysenergiat (eV)

Kuvasta 17 nähdään, että yhdisteelle on määritelty oletettu retentioaika. Herkkyyttä on pyritty parantamaan vähentämällä mitattavia yhdisteitä samaan aikaan. Kuvassa 18 on havainnollistettu mitattavien ionien jakautuminen ajoikaan.



Kuva 18. MRM–menetelmässä mitattavien ionien jakautuminen retentioaikaan

Kuvasta 18 huomataan, että 12-13 minuutin kohdalla mitattavia ioneja on kaikista eniten. Herkkyys vähenee, mitä enemmän on mitattavaa. Kyseinen laitteisto on todella herkkä, joten mitattavien ionien määrä ei huononna merkittävästi laitteiston herkkyyttä.

### 3.4 Reagenssit ja laitteisto

Taulukossa 3 on esitetty työhön tarvittavat liuottimet sekä muut reagenssit. Tetrahydrofuraanin on oltava vedetöntä tai on kuivattava liuotin ennen käyttöä.

Taulukko 3. Menetelmässä käytetyt liuottimet sekä reagenssit

<b>Liuottimet</b>				
<b>Yhdiste</b>	<b>Valmistaja</b>	<b>CAS-numero</b>	<b>Puhtaus</b>	<b>Huomioitavaa</b>
Tetrahydrofuraani (THF)	VWR	109-99-9	100,0%	Vedetön, kuivattu
Metanoli (MeOH)	VWR	67-56-1	99,9%	
Heptaani	Rathburn Chemicals	142-82-5	≥99,7%	
Asetoni	VWR	67-64-1	99,7%	
Tolueeni	VWR	108-88-3	100,0%	
<b>Reagenssit</b>				
<b>Yhdiste</b>	<b>Valmistaja</b>	<b>CAS-numero</b>	<b>Puhtaus</b>	<b>Huomioitavaa</b>
Rikkihappo	Sigma Aldrich	7664-93-9	95-97%	
Natriumvetykarbonaatti	Merck	144-55-8	≥99,7%	
Natriumsulfaatti	J.T.Baker	7757-82-6	100,3%	Vedetön
Fenyyliboorihappo (PBA)	Sigma Aldrich	98-80-6	≥97,0%	
Natriumbromidi (NaBr)	Sigma Aldrich	7647-15-6	≥99,5%	

Standardiaineet säilytetään pakkasessa ja niistä valmistetaan työohjeen mukaiset laimennukset ja seokset. Standardiaineita käsiteltäessä on työskenneltävä vetokaapissa. Taulukossa 5 on lueteltuina työssä käytetyt standardiaineet. Sisäisinä standardeina on käytetty pentadeuteroituja 3- ja 2-MCPD- sekä glysidyyliestereitä, sillä niiden käyttäytyminen on verrattavissa varsinaisiin yhdisteisiin. Esimerkiksi näytteenkäsittelyssä yhdisteiden häviämistä voidaan korjata sisäisillä standardeilla.

Taulukko 4. Taulukossa on esitetty standardiaineet.

<b>Yhdiste</b>	<b>Puhtaus (%)</b>	<b>CAS#</b>
PP-3-MCPD	99,9	51930-97-3
PP-3-MCPD-d5	98,7	1185057-55-9
PP-2-MCPD	98	169471-41-4
PP-2-MCPD-d5	98	1426395-62-1
GLY-P	99,9	7501-44-2
GLY-P-d5	99,9	1794941-80-2

Taulukossa 5 on esitetty työssä käytetyt laitteistot ja välineet. Mittalaitteiston tarkemmat tiedot kerrotaan luvussa 3.3.



Taulukko 5. Analyysiin tarvittavat laitteet ja välineet.

Laitteisto ja välineet		
Laitteisto	Nimi	Tarkennus
Vaaka	Precisa XT 20M	
Vortexsekoitin	Scientific Industries, Vortex Genie 2	
Ultraäänihaude	FinnSonic 303	
Haihdutuslaitteisto	Pierce, Reacti-Therm	Typpi
Kromatografi	Agilent GC-MS, GC-MS/MS	
Pipetti	Thermo Labsystems	1-5ml
Pipetti	Thermo Electron Corporation	100-1000 µl
Automaattipipetti	Biohitelite	1000 µl
Sentrifugi		

## 4 Tulokset

### 4.1 Menetelmän toimivuus

Työ aloitettiin työohjeen mukaisesti valmistamalla analyysiin tarvittavat liuokset ja standardiaineiden laimennukset. Analyysin helpottamiseksi voidaan yleensä analysoida pelkästään standardiaine sekä sisäinen standardi ajamalla standardiaineista SCAN-ajot ja varmistaa samalla retentioajat. Ongelman aiheuttaa kuitenkin se, että standardit eivät ole siinä muodossa, jota mitataan lopputuotteena. Analyysissa mitataan yhdisteiden PBA-johdannaisia, jolloin standardiaineiden retentioajat poikkeavat mitattavien yhdisteiden retentioajoista. Näin ollen standardiaineesta ei voida ajaa SCAN-ajoja, sillä retentioaikojen lisäksi myös massasuhteen ionit eivät vastaisi työohjeen lopputuotetta.

Menetelmän testaus aloitettiin valmistamalla testisarja, jossa käytettiin puhdasta oliiviöljyä, jonka ei pitäisi sisältää kyseisiä estereitä. Näytteiden valmistaminen aloitettiin lisäämällä oliiviöljyyn suuri pitoisuus standardiainetta sekä sisäistä standardia, jolloin yhdisteen tunnistaminen helpottuisi selkeän piikin ansiosta. Näytteen valmistus tehtiin työohjeen mukaisesti ja näyte analysoitiin käyttäen GC-MS-laitteistoa.

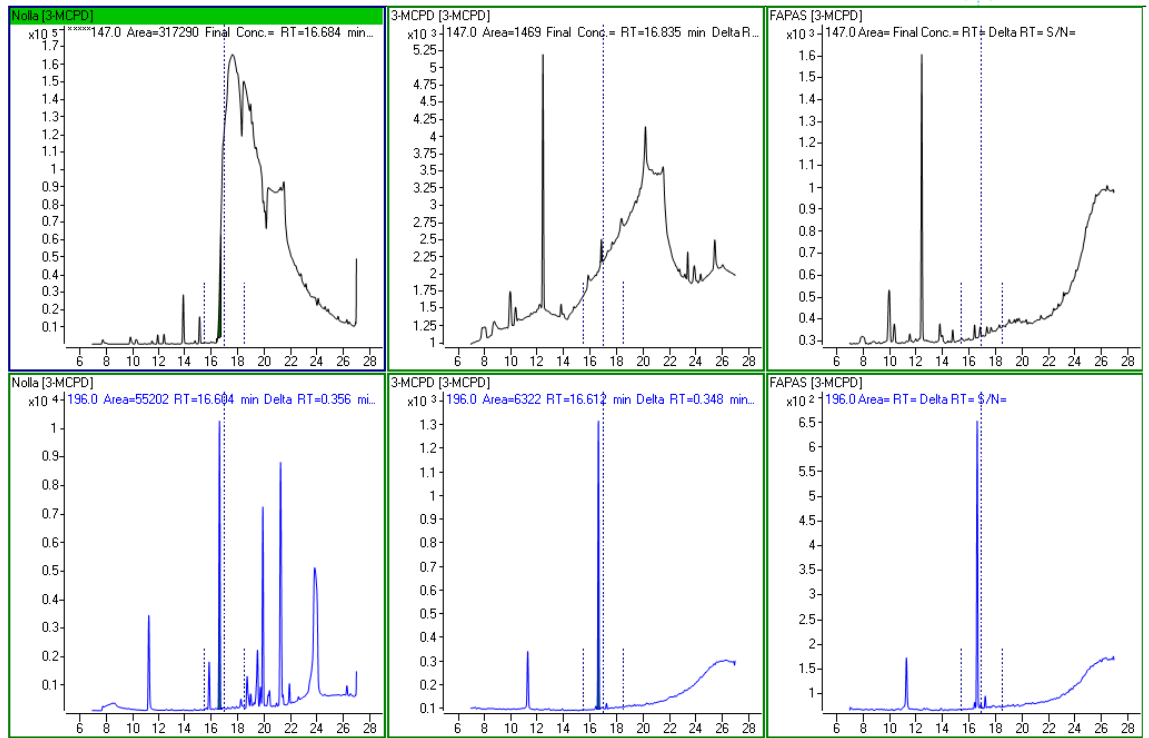
Ensimmäisessä koesarjassa näytteinä oli nollanäyte, 3-MCPD sekä Fapas näyte. Fapas näyte on nimitys työssä käytettävästä vertailunäytteestä. Fapas tarjoaa laajan valikoiman erilaisia matriiseja ja analyytteja, joiden avulla voidaan suorittaa laadunvarmistusta. Vertailunäytteen avulla voidaan siis arvioida menetelmän toimivuutta, sillä analyyteista on saatavilla yksityiskohtaiset tiedot sen sisällöstä. Menetelmän pystytyksessä on hyödynnetty Fapaksen kasviöljymatriisia. Työssä käytetty Fapas-näytteen tiedetään sisältävän 2- ja 3-MCPD- sekä glysidyyliestereitä ja tuloksissa näytettä kutsutaan nimellä Fapas.

Kuvassa 19 vasemmalla on nollanäyte, keskellä 3-MCPD-PBA ja viimeisenä Fapas-näytteestä tarkastelussa 3-MCPD-PBA:n tulokset. Yläpuolella on yhdisteen kvantitointi-ioni ja alapuolella konfirmaatio-ioni. Nollanäytteeseen ei ole lisätty standardeja, joten sen

tuloksia voidaan vertailla lisäysnäytteiden saatuihin piikkeihin. Voidaan olettaa, että nollanäytteestä poikkeava piikki olisi kyseisen yhdisteen piikki. Standardiohjeen mukaan yhdisteiden retentioajat SIM-menetelmällä olisivat 16-19 minuutin välillä. Ajomenetelmä on tehty standardiohjeen mukaisesti, joten yhdisteillä pitäisi olla samat retentioajat kuin standardiohjeessa. MRM-menetelmässä retentioaika on 12-13 minuutin kohdalla.

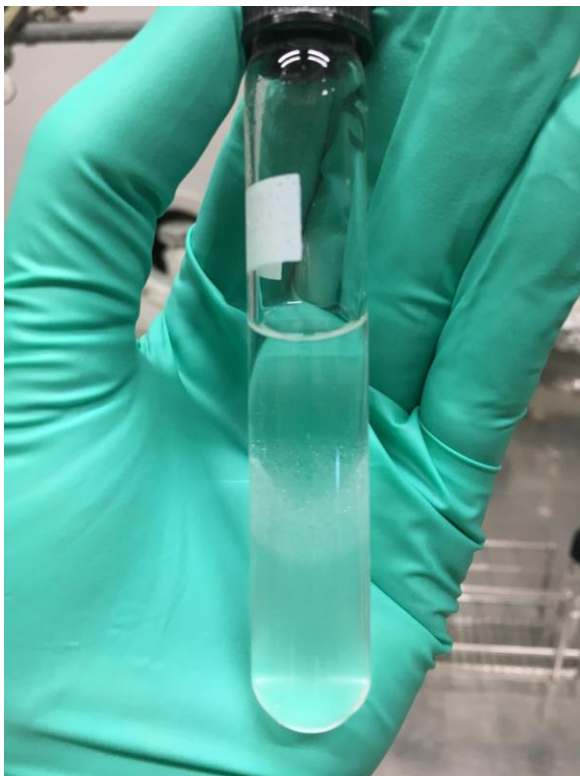
Nollanäytteessä ei siis pitäisi näkyä piikkiä, mutta 16-19 minuutin kohdalla esiintyy iso epämääräinen pohjan nousu. Näin ollen ei voida vertailla nollanäytettä ja 3-MCPD-näytettä keskenään, sillä nollanäyte ei ole tarpeeksi siisti. Esimerkiksi nollanäytteessä voisi olla pohjan nousun sisällä sama piikki, jota oletettaisiin 3-MCPD-PBA:n piikiksi.

Pohjan nousu aiheuttaa ongelmia muiden analyttien tunnistamisessa. 3-MCPD-näytteessä havaitaan myös pohjan nousua, mutta 16,8 minuutin kohdalla nähdään mahdollinen piikki. Retentioaika täsmää standardiohjeen retentioaikaan, mutta ainoastaan retentioajalla ei voida varmistaa piikin oikeellisuutta, koska sama piikki voisi löytyä nollanäytteestä pohjan nousun ”sisältä”. Myös 3-MCPD-näytteen piikin pinta-ala jää todella pieneksi, vaikka näytteeseen on lisätty suuri määrä standardiainetta. Fapas-näytteestä ei voida määrittää oikea piikkiä, sillä kvantitointi- sekä konfirmaatio-ioni antaa monia mahdollisia piikkejä.



Kuva 19. Ensimmäisiä ajoja näytteestä, johon on lisätty 3-MCPD:n standardia.

Pohjan nousu voi olla aiheutunut näytteessä olevasta emulsiosta, joka muodostuu näytteeseen kahden liukenemattoman faasin välille, kun näytettä ravistetaan voimakkaasti. Kuvassa 20 havaitaan emulsiota kahden faasin välillä. Työvaiheessa näytteeseen lisättiin heptania, jotta näytteen sisältämä vesi pystyttiin uuttamaan pois. Näytettä sekoitettiin vortexilla, jonka jälkeen faasien välille muodostui kuohuva faasiraja. Myöhemmin tunnistettiin sen olevan emulsio, joka aiheutti pohjan nousua kaasukromatografisessa analyysissä.



Kuva 20. Kahden faasin välille on muodostunut emulsio.

Standardimenetelmässä suurin ongelma oli se, ettei saatujen piikkien intensiteetti ollut tarpeeksi hyvä. Piikkien pinta-ala oli todella pieni verrattuna standardilisäyksien määrään näytteessä. Myös mahdollisesti emulsiosta aiheutuva pohjan nousu häiritsi analyysiä. Näytesarjoja tehtiin useita samalla standardimenetelmällä, mutta lopputulos oli samanlainen jokaisella näytesarjalla. Näytteitä analysoitiin myös GC-MS/MS-laitteistolla käyttäen MRM-menetelmää, mutta samat ongelmat ilmenivät myös siinä.

Näytesarjoja tehtiin useina eri päivinä ja analysoitiin ne kummallakin laitteistolla. Kaikissa näytesarjoissa havaittiin samat ongelmat pohjan nousun sekä hyvin olemattomien piikkien suhteen. Näytteistä ajettiin GC-MS-laitteistolla SCAN-ajoja, mutta saaduista kromatogrammeista ei kyetty löytämään selkeästi yhdisteille ominaisia massasuhteen ioneja. Menetelmä ei jostain syystä toiminut, vaikka näytteisiin oli lisätty todella suuria pitoisuuksia lisäysliuosta. Samaa GC-MS/MS-laitteistoa käytetään Tullilaboratoriossa torjunta-ainejäämien analysoimiseen, joten laitteiston herkkyydestä analyysin epäonnistuminen ei voinut johtua. Todettiin, että ongelman täytyy olla näytteen valmistuksessa, joten itse näytteen valmistukseen liittyviin vaiheisiin aloitettiin tutkimustyö. Tutkimustyön edetessä

standardimenetelmään tehtiin muutoksia, joiden avulla pyrittiin kartoittamaan ongelmakohdat näytteen valmistuksessa.

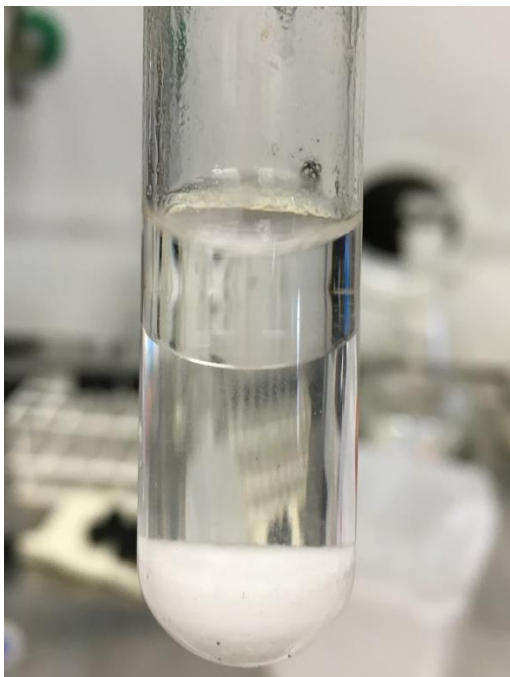
## 4.2 Muutokset standardimenetelmään

ISO 18363-3:2017 -standardiohje ei kuitenkaan soveltunut yhdisteiden määrittämiseen kyseisissä olosuhteissa, vaikka työohje ja kaikki työhön tarvittavat reagenssit oli tarkastettu ja valmistettu uudelleen. Aluksi kartoitettiin mahdollisia työvaiheita, joissa voisi mahdollisesti syntyä virhettä. Kriittisiin työvaiheisiin kiinnitettiin huomiota ja suoritettiin samassa koesarjassa erilaisia kokeiluja työvaiheen suorittamiseksi.

### 4.2.1 Pakastaminen ja viilentäminen

Aikaisemmin todettiin, että analyysiä hankaloitti näytteeseen muodostunut emulsio. Kuvassa 19 havaittiin, että ajoissa pohjan nousun vuoksi ajot olivat epäonnistuneet. Ensimmäiseksi kartoitettiin emulsiota aiheuttavat työvaiheet. Emulsiota ilmeni kaikissa työvaiheissa, jossa kaksi toisiinsa liukenematonta faasia sekoitettiin vortexilla. Standardiohje ei neuvonut käytettäväksi sentrifugia työvaiheissa. Ainoastaan ensimmäisessä uutossa standardiohjeessa oli maininta, että sentrifugia voidaan käyttää, jos sekoittaminen vortexilla ei tuota siistiä faasirajaa. Ensimmäiseksi kokeiltiin sentrifugin käyttöönottoa jokaiseen faasien välisiin erotuksiin, jotta faasirajat olisivat siistimpiä. Sentrifugin käyttöönotto ei vähentänyt emulsion muodostumista eli pelkästä sentrifugin käytön lisäämisestä ei ollut vaikutusta. Testiajoissa ei havaittu käyttöönotosta huolimatta muutoksia.

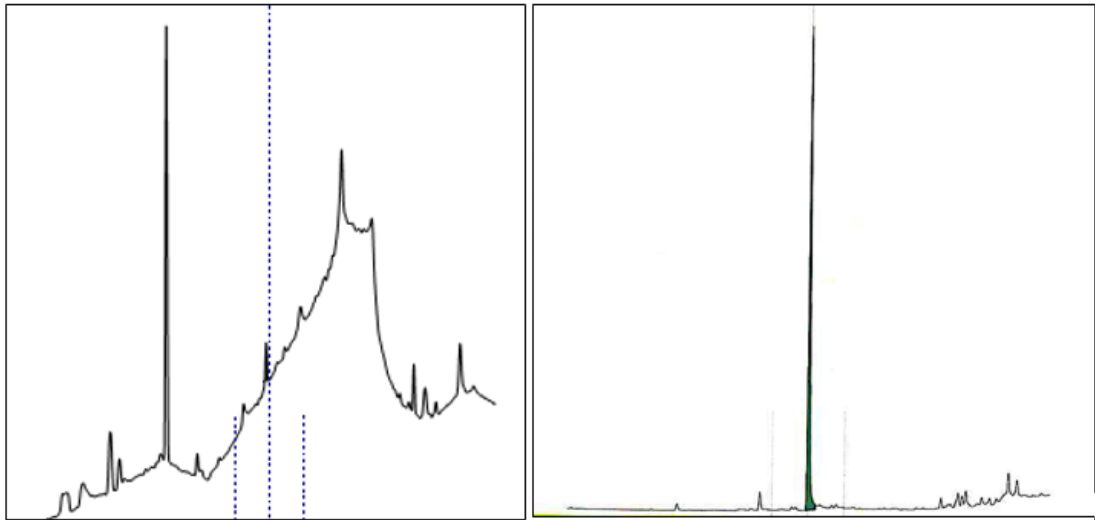
Seuraavaksi kokeiltiin lämpötilan vaikutusta emulsion muodostumiseen. Sentrifugia käytettiin edelleen jokaisessa erotuksessa, mutta sentrifugin lämpötila säädettiin +4 °C:seen. Ennen erotusta näyte sekoitettiin käyttämällä vortexia, jolloin faasien rajalle muodostui emulsiota. Näytteen annettiin viilentyä pakastimessa 15 minuutin ajan, minkä jälkeen näyte käytettiin sentrifugissa +4 °C:ssa. Ennen erotusta havaittiin, että emulsio oli hävinnyt näytteestä, minkä vuoksi myös näyte näytti siistimmältä ja erotus oli helppo suorittaa. Kuvat 20 ja 21 ovat samasta työvaiheesta, mutta työvaihe kuvassa 21 on toteutettu käyttämällä matalampaa lämpötilaa.



Kuva 21. Pakastamisen sekä sentrifugin lämpötilan alentamisen vaikutus aikaisempaan (kuva 20).

Lämpötilan alentaminen helpotti erotusta, jolloin uuton onnistuminen varmistettiin. Muutos ja sen hyödyt varmistettiin tekemällä useita koesarjoja, joissa jokaisessa viileässä sentrifugoiminen poisti emulsion näytteestä.

Pakastaminen ei ollut välttämätöntä, eikä sen pois jättäminen vaikuttanut emulsion muodostumiseen. Kyseistä työvaihetta testattiin erilaisilla koesarjoilla tarkastellen silmämääräisesti näytteen koostumusta ja analysoimalla niitä GC-MS-laitteistolla. Koesarjoissa kokeiltiin pakastamisen sekä sentrifugin aiheuttamaa muutosta näytteen laatuun. Pakastamisen ja sentrifugin yhteisvaikutusta kokeiltiin myös valmistamalla näyte käyttäen molempia menetelmiä havaitsemalla niiden yhteisvaikutusta. Koesarjojen perusteella voitiin todeta, että +4 °C:ssa sentrifugin käyttö poisti emulsion näytteestä eikä pakastamista tarvittu. Muutos paransi selvästi menetelmää, sillä mahdollisesti emulsion aiheuttamaa pohjan nousua ei havaittu muutoksen myötä laitepuolen ajoissa (kuva 22).



Kuva 22. Emulsion poistamisen vaikutus pohjan nousuun.

Kuvassa 22 huomataan, että oikean puoleisessa kuvassa pohja on todella siisti. Emulsion poistaminen näytteestä selkeästi paransi näyteajoja. Jokaisella mitattavalla yhdisteellä oli ongelmana pohjan nousu, joka saatiin muutoksen avulla poistettua. Pinta-ala on kuitenkin vain noin 36 000, joten näytteestä häviää huomattava määrä yhdisteitä. Lämpötilan muutoksella saatiin kuitenkin pohjaa siistittyä. Näytteeseen on lisätty hyvin suuri pitoisuus standardia, joten saatavat pinta-alat olisivat lähempänä miljoonaa kuin kymmentä tuhatta.

#### 4.2.2 SPE-puhdistus

SPE-puhdistus eli kiinteäfaasiuutto on näytteenvalmistusmenetelmä, jonka tarkoituksena on poistaa näytteestä epäpuhtauksia ennen varsinaisen näytteen valmistusta. Puhdistuksella voidaan poistaa häiritseviä komponentteja. Puhdistuksessa näyte kiinnitetään SPE-patruunaan, jossa näyte puhdistetaan ja lopuksi eluoidaan puhdas näyte pois patruunasta koeputkeen.

Kiinteäfaasiuuttoa kokeiltiin, jotta voidaan poissulkea matriisissa olevien epäpuhtauksien vaikutus piikkien esiintyvyyteen. SPE-puhdistuksessa käytettiin Supelclean LC-NH<sub>2</sub>



SPE-patruunoita. Valmistettiin näytesarja, jossa osa näytteistä käsiteltiin SPE-puhdistuksella ja osa jätettiin käsittelemättä. SPE-puhdistus ei parantanut menetelmää, sillä saman sarjan rinnakkaiset eivät poikenneet puhdistetuista näytteistä. SPE-puhdistus ei myöskään pienentänyt piikkien intensiteettiä. SPE-puhdistusta kokeiltiin oliiviöljyyn sekä rypsiöljyyn, eikä matriisi vaikuttanut lopputulokseen.

#### 4.2.3 Ulossuolaus

Ulossuolauksessa on todennäköistä, että mitattavia analyyttejä häviää näytteestä FAME-yhdisteiden mukana. Ulossuolausta testattiin erilaisilla menetelmillä, mutta yksinään ulossuolauksella ei todettu olevan merkitystä analyyttien katoamiseen. Ulossuolausta yritettiin parantaa käyttämällä sentrifugia ulossuolauksen yhteydessä sekä vaihtelemalla heptaanin ja natriumsulfaatin lisäysjärjestystä. Ulossuolauksessa testattiin myös ajan vaikutusta. Natriumsulfaatti ulossuolaa FAME-yhdisteet pois näytteestä ja yhdessä näytesarassa testattiin, tarvitseeko natriumsulfaatti enemmän aikaa "liueta" näytteeseen, jotta ulossuolaus varmasti poistaa FAME-yhdisteet.

Sentrifugin käyttö ulossuolauksen välissä ei vaikuttanut näytteen onnistumiseen, sillä muutoksella ei saatu piikkejä näkymään ajoissa yhtään sen paremmin. Muutoksesta ei myöskään havaittu näytteen ulkonäöllisiä muutoksia. Ulossuolauksessa käytetty natriumsulfaatin ja heptaanin lisäysjärjestys ei myöskään vaikuttanut onnistumiseen. Ajalla ei myöskään ollut vaikutusta näytteen valmistukseen, vaikka natriumsulfaatin annettiin liueta ja vaikuttaa näytteeseen ennen uuttoa.

#### 4.2.4 Derivatisointi

Derivatisointi on todettu näytteenkäsittelyssä yhdeksi kriittisimmäksi vaiheeksi (16). Derivatisointi on viimeinen vaihe ennen GC-MS-analyysiä, jolloin sen onnistumista on erittäin hankala testata. Käytössä oli kuitenkin 3-MCPD- ja 3-MCPD-d5-yhdisteiden vapaita standardeja eli standardit eivät ole esteröityneitä. 3-MCPD ja sen sisäinen standardi vastaavat kuvan 1. mukaista rakennetta. Näiden vapaiden standardien käyttäminen jättäisi pois näytteenkäsittelyssä vaihtoesteröinnin sekä ulossuolauksen, sillä yhdisteet ovat jo näytteessä niin sanotuissa vapaisissa muodoissa. Tämä lyhentäisi itse näytteenkäsittelyn

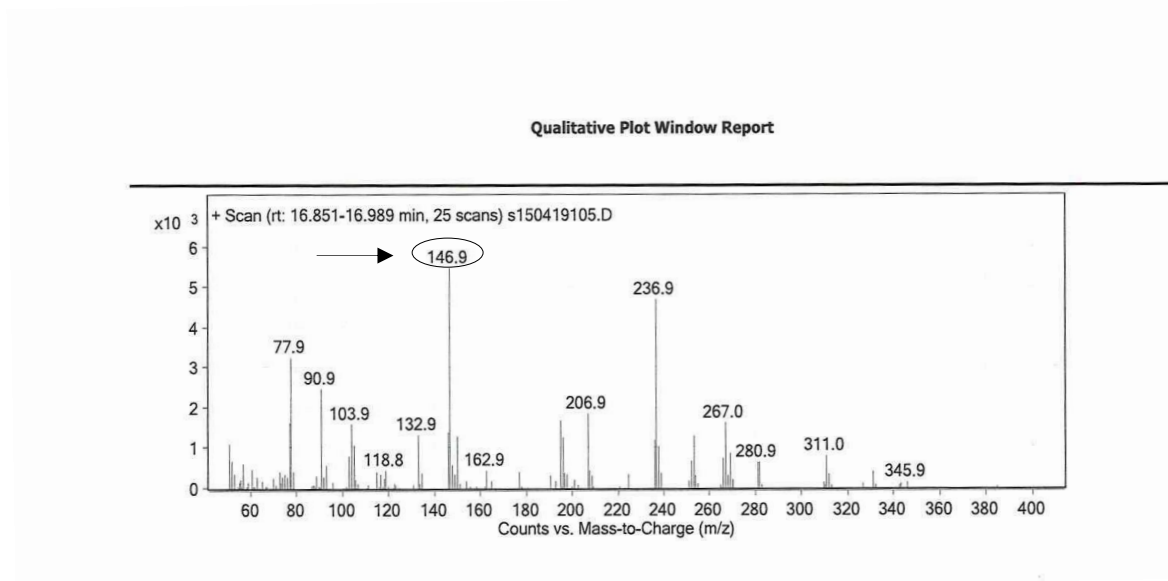
pituutta ennen derivatisointia, jolloin derivatisoinnin onnistumista voisi luotettavammin testata.

Derivatisoinnin onnistumista testattiin siis 3-MCPD ja sen sisäisellä standardilla, jotka olivat vapaissa muodoissa. Käytännössä öljynäytteeseen lisättiin standardit ja vain puhdistettiin näyte ennen derivatisointia. Derivatisoinnissa käytettiin samaa fenylboronihappoliuosta, jolloin mitattava yhdiste on täsmälleen sama, kuin käytettäisiin aiempia standardeja. Tuloksena standardien vaihtamisesta ja menetelmän lyhentämisestä saatiin GC-MS/MS-laitteistolle PBA-johdannaisille ominaiset 3-MCPD ja sen sisäisen standardien piikit. Testauksesta voidaan päätellä, että derivatisointi ei ole ollut ongelma näytteenkäsittelyssä. Derivatisointi siis onnistuu, jolloin epäonnistuminen on tapahtunut ennen derivatisointia. Testattaessa vapailla standardeilla vaihtoesteröinti ja ulossuolus jäivät näytteenkäsittelystä pois. Voidaan siis olettaa, että vaihtoesteröinnissä tai ulossuolauksessa tapahtuu jotain, joka estää näytteenkäsittelyn onnistumisen. Derivatisoinnin onnistumisen varmistuksessa saatiin myös siis rajattua näytteenkäsittelyn epäonnistumisen syy. Syynä epäonnistumiseen on vaihtoesteröinnin ja ulossuolauksen työvaiheista aiheutunut analyttien häviäminen. Tämän vuoksi nykyisellä menetelmällä ei voida aloittaa menetelmän pystytystä.

#### 4.3 Menetelmän pystytys

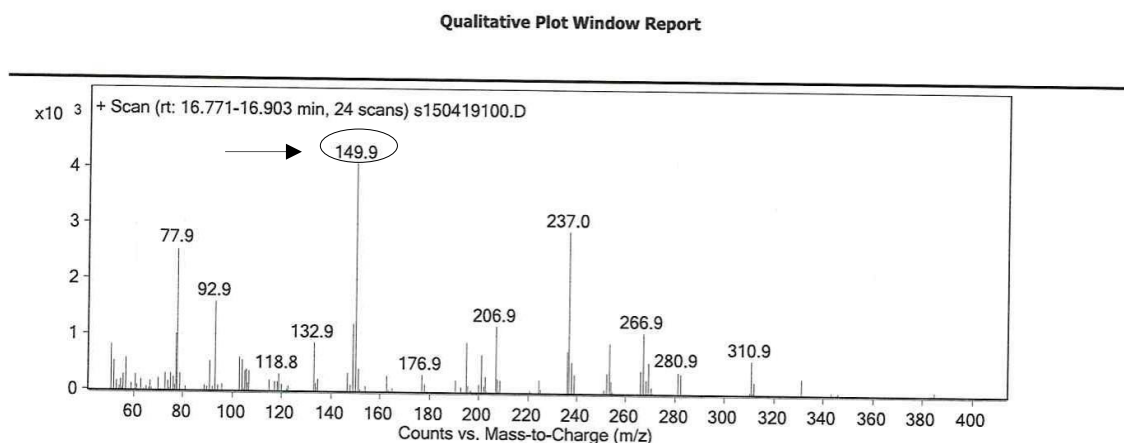
Vaihtoesteröinti ja ulossuolus aiheuttaa analyttien häviämistä näytteestä, jolloin menetelmää ei voida onnistuneesti pystyttää laitteistoille. Menetelmää lähdettiin pystyttämään kuitenkin laitteistolla käyttämällä yhdisteiden standardeja, jotka eivät ole esteröityneitä. Näin ollen voidaan ohittaa vaihtoesteröinti ja ulossuolus, jolloin yhdisteet saadaan mitattua laitteistolla.

Ensiksi valmistettu näyte ajettiin SCAN-menetelmällä, jotta voidaan varmistaa halutun yhdisteen löytyminen näytteestä. 3-MCPD-PBA:n tunnistettava ioni on 147 ja 3-MCPD-d5-PBA on 150. Kuvassa 23 on 3-MCPD-PBA-yhdisteen SCAN-jo, josta voidaan löytää ioni 147 (146.9).



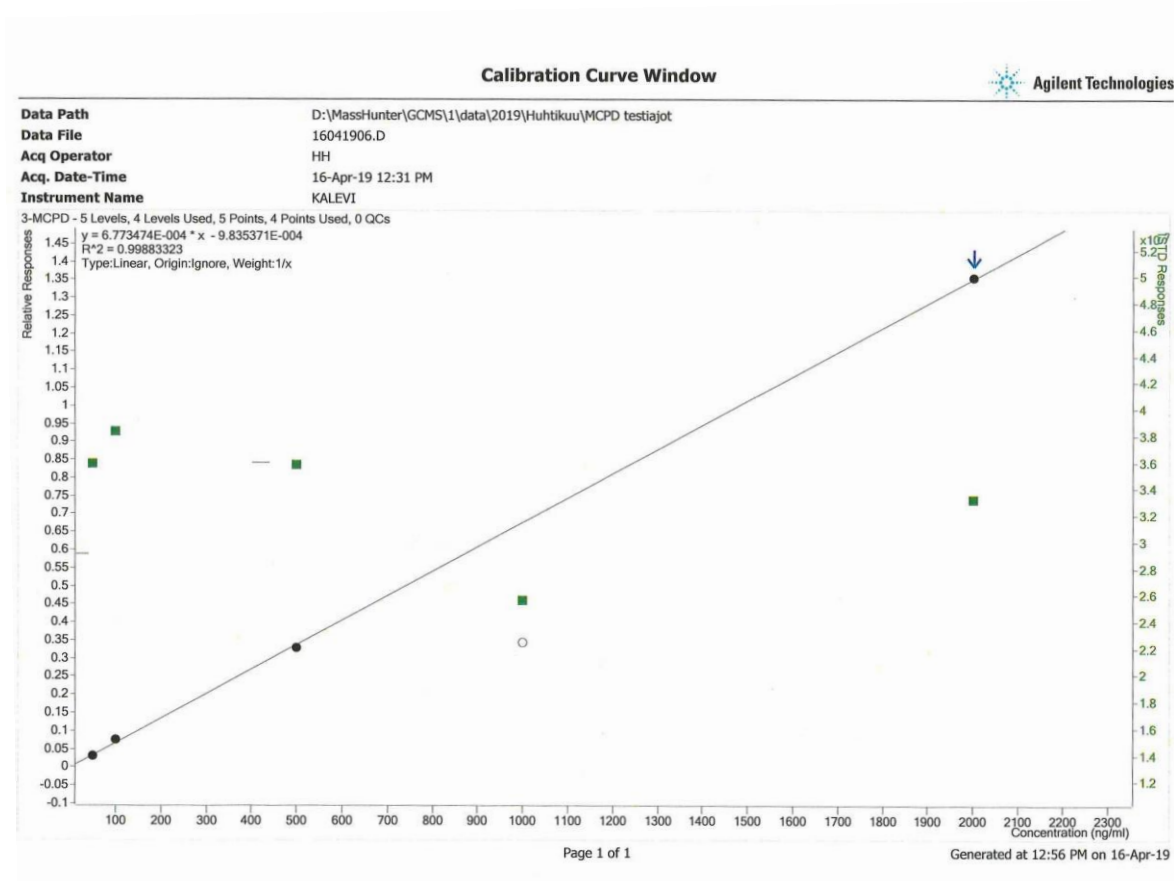
Kuva 23. 3-MCPD-PBA:n SCAN-ajo. Ioni 147 pystytään tunnistamaan.

Kuvasta 24 voidaan löytää ioni 150 (149,9). Ioni on 3-MCPD-d5-PBA:lle ominainen. SCAN-ajoilla voidaan siis todeta, että 3-MCPD-PBA sekä 3-MCPD-d5-PBA on onnistuneesti analysoitu näytteestä. GC-MS/MS-laitteisto kykenee löytämään kyseiset yhdisteet, jolloin voidaan menetelmä rakentaa laitepuolelle.



Kuva 24. 3-MCPD-d5-PBA:lle ajettu SCAN-ajo, jossa yhdisteelle ominainen ioni 150 on löydetty.

Standardisuoran avulla voidaan piirtää suora, jonka avulla voidaan näytteistä määrittää pitoisuuksia. Standardisuoran valmistus ja vertailunäytteen analysoiminen suoran avulla varmistavat vielä menetelmän onnistumisen. Standardisuora valmistettiin standardeilla, jotka sisälsivät vapaita 3-MCPD-yhdisteitä. Kuvasta 25 huomataan, että kalibrintisuora on onnistunut, sillä  $R^2 = 0,9988$ . Se kertoo piirretyn suoran sopivuuden mitattuihin (mustiin) pisteisiin. Vihreät pisteet ovat sisäisten standardien pisteitä, jotka korjaavat analyysin aiheuttamaa virhettä. Kalibrintisuoran avulla voidaan määrittää näytteiden pitoisuus ja varmistaa vertailunäytteellä kalibrintisuoran paikkansapitävyys. Liitteessä 1 on las-kettu kalibrintisuoran avulla Fapaksen vertailunäytteen pitoisuus, jolla voidaan todeta menetelmän oikeellisuutta.

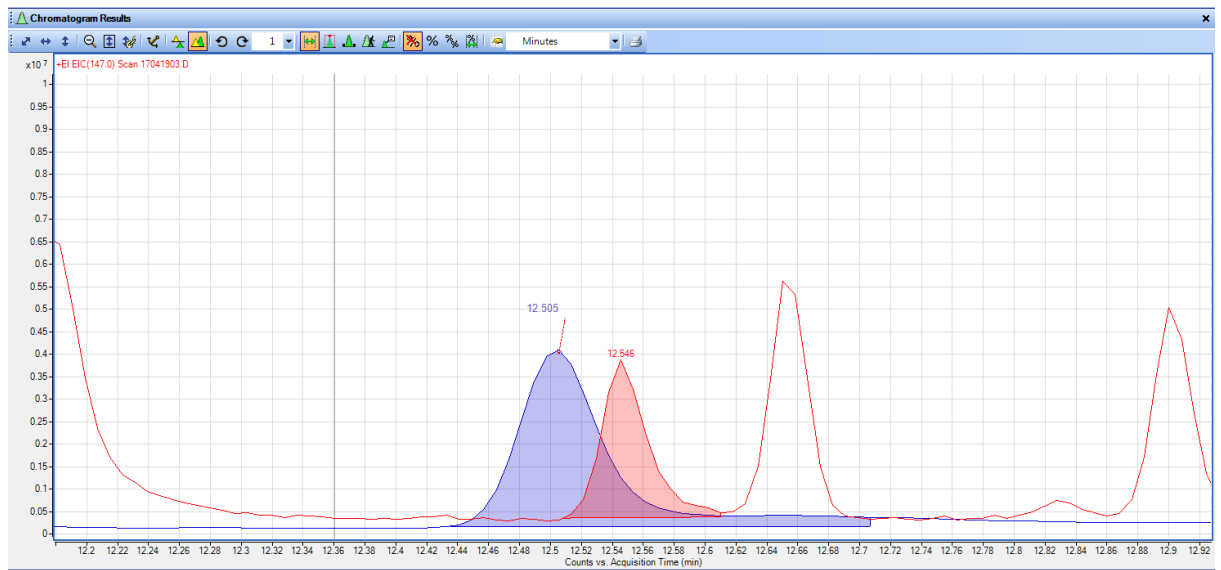


Kuva 25. GC-MS/MS-laitteistolla saatu kalibrintisuora 3-MCPD-PBA yhdisteelle.

Seuraavaksi valmistettiin näyte FAPAS–vertailunäytteestä, jonka tarkka pitoisuus tiedettiin. Fapas–vertailunäytteessä 3-MCPD:n pitoisuus on 39,5 µl. Näyte analysoitiin GC-

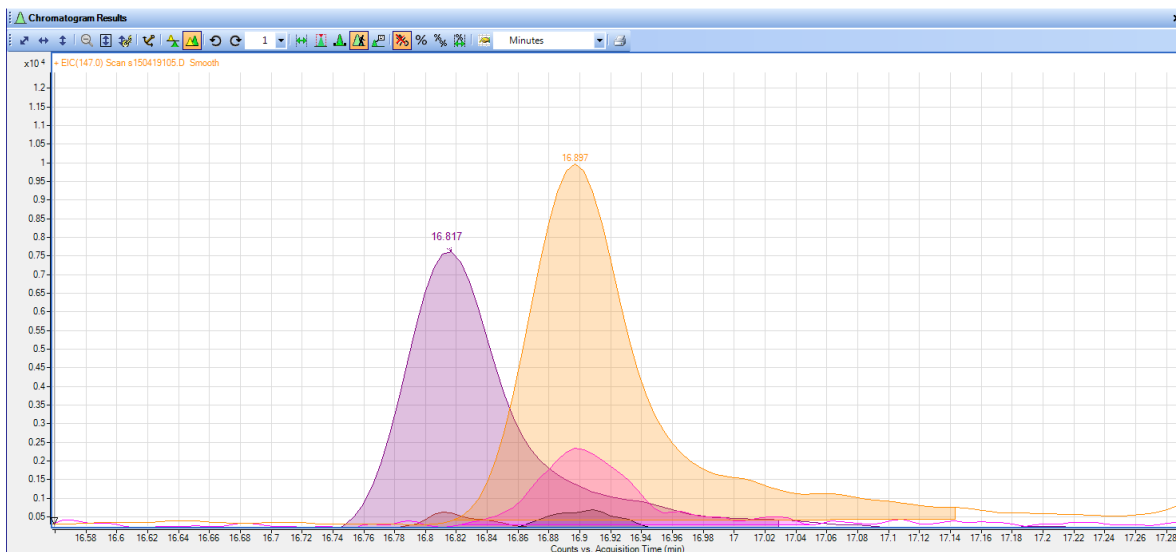
MS/MS-laitteistolla ja saatiin näytteen pitoisuudeksi 31,6 µl. Pitoisuuden määrittäminen on esitetty tarkemmin liitteessä 1.

Työn lopuksi määritettiin 3-MCPD-PBA sekä 3-MCPD-d5-PBA:lle tarkat retentioajat käyttäen laitteiston kvalitatiivista tarkastelua. Koska mitattavat PBA-johdannaiset ovat täsmälleen samat tehtynä näytteenkäsittely vapaille standardeilla, kuin esteröityneillä standardeilla, niin retentioajat eivät myöskään muutu. 3-MCPD-d5-PBA:n retentioaika on GC-MS/MS-laitteistolla 12,505 min ja 3-MCPD-PBA:n 12,546 min.



Kuva 26. Kvalitatiivisella tarkastelulla GC-MS/MS-laitteiston retentioajat 3-MCPD-PBA sekä 3-MCPD-d5-PBA-yhdisteille.

Näytteet analysoitiin myös GC-MS-laitteistolla ja saatiin selvitettyä retentioajat tulevaa validointia varten. Kuvassa 27 on retentioajat GC-MS-laitteistolle.



Kuva 27. GC-MS-laitteiston kvalitatiivinen tarkastelu määrittämään retentioajat.

3-MCPD-PBA:n retentioaika GC-MS-laitteistolla on 16,817 min sekä 3-MCPD-d5-PBA:n 16,897 min. Käytössä ei ollut glysidolin eikä 2-MCPD:n vapaita standardeja, jolloin retentioaikoja ei voitu määrittää, mutta oletettavasti ne olisivat olleet yhtä helposti määritettävissä.

## 5 Johtopäätökset

Työssä pystyttiin onnistuneesti laitteistolle menetelmä, jolla pystytään määrittämään 3-MCPD:n fenyliboronihappojohdannainen. GC-MS/MS-laitteistolle pystytetyn menetelmän avulla voidaan jatkaa 2- ja 3-MCPD- sekä glysidyyliestereiden kvantitatiivisen menetelmän validointia. 3-MCPD:n ja 3-MCPD-d5:n fenyliboronihappojohdannaisten retentioajat pystyttiin varmistamaan soveltamalla kaasukromatografi-massaspektrometrin ajomenetelmiä. Laitteiston SCAN-menetelmän avulla yhdisteistä saatiin spektrit, joiden avulla yhdisteiden oikeellisuus kyettiin varmistamaan.

Työssä onnistuttiin rajaamaan analyysimenetelmässä toistuvat kriittiset työvaiheet. Standardimenetelmän työohjeisiin jouduttiin tekemään muutoksia erilaisten testauksien

myötä, sillä muutosten todettiin parantavan menetelmää. Varsinaista analyysimenetelmää ei onnistuttu pystyttämään, jolla näytteen sisältämät 2- ja 3-MCPD- sekä glysidyyliesterit pystyttäisiin määrittämään. Menetelmä ei ollut toistettava, jolloin menetelmän laatuvaatimukset eivät olisi toteutuneet validoinnissa. Työssä kuitenkin onnistuttiin rajaamaan eniten virhettä aiheuttavat työvaiheet, joiden uskotaan olevan syy varsinaisen menetelmän epäonnistumiselle. Vaihtoesteröinnin ja ulossuolauksen aikana todennäköisesti 2-MCPD-, 3-MCPD- ja glysidyyliesterit eivät hydrolysoitu vapaiksi muodoikseen, minkä vuoksi näytettä ei voida derivatisoida.

Työssä käytettiin matriisina erilaisia kasviöljyjä, joista myös lopuksi onnistuttiin muodostamaan vapaiden standardien ja fenyyliboronihapon kanssa mitattava yhdiste. Tästä voidaan todeta, että öljymatriisi soveltuu menetelmään.

Työ aloitettiin käyttämällä SIM-menetelmää käytössä olevalla GC-MS-laitteistolla, mutta työ saatettiin loppuun GC-MS/MS-laitteistolla käyttäen MRM-menetelmää. Näytteitä analysoitiin molemmilla laitteistoilla, mutta ainoastaan GC-MS/MS-laitteistolle onnistuttiin pystyttämään toimiva ajomenetelmä. GC-MS/MS-laitteisto todettiin erittäin herkäksi määrittäessä johdannaisten pieniä pitoisuuksia näytteestä. Vertailunäytteen analysointi todisti laitteiston ja ajomenetelmän toimivan.

Laitteistolle pystytetyn menetelmän sekä kriittisten työvaiheiden rajaamisen avulla standardimenetelmää on helpompi lähteä kehittämään kohti validointia. Insinööriyössä onnistuttiin pystyttämään laitteistolle menetelmä, jolla voidaan määrittää 2-MCPD-, 3-MCPD- ja glysidyyliestereiden pitoisuudet näytteessä. Kuitenkin näytteenvalmistusta on vielä parannettava ennen validoinnin aloittamista.

## Lähteet

- 1 Komission asetus (EU) 2018/209. 27.2.2018. Euroopan unionin virallinen lehti.
- 2 Tullilaboratorion tehtävät. Verkkoaineisto. Tullilaboratorio. <<https://tulli.fi/web/tulli-laboratorio/tutustu-toimintaamme>>. Luettu 13.11.2018.
- 3 EFSA Journal. 2016. Risks for human health related to the presence of 3- and 2-monochloropropanediol (MCPD), and their fatty acid esters, and glycidyl fatty acid esters in food. PDF- tiedosto. < <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2016.4426>> Luettu 29.4.2019.
- 4 AOAC International. 2018. 2- and 3-MCPD esters & Glycidyl esters (GE) Working Group. Verkkoaineisto. <<http://stakeholder.aoc.org/SPIFAN/mcpd.html>>. Luettu 29.4.2019
- 5 Gerstel. 3-MCPD in Vegetable Oils. Power Point. <[http://www.grifa.org/Presentazioni/session\\_ANALYTICS/automated%20determination%20of%203-MCPD%20&%20glycidol%20in%20edible%20oils%20CARRETTA.pdf](http://www.grifa.org/Presentazioni/session_ANALYTICS/automated%20determination%20of%203-MCPD%20&%20glycidol%20in%20edible%20oils%20CARRETTA.pdf)>. Luettu 29.4.2019
- 6 Niittymaa, Veikko. 2017. Palmuöljy voi aiheuttaa syöpää – EU rajoittaa käyttöä syksyllä. Verkkoaineisto. Maaseudun tulevaisuus. < <https://www.maaseuduntulevaisuus.fi/ruoka/palmuöljy-voi-aiheuttaa-syöpää-eu-rajoittaa-käyttöä-syksyllä-1.183258>>. Päivitetty 23.3.2017. Luettu 13.11.2018
- 7 Euroopan komissio. 2018. Komission asetus (EU) 2018/290. Euroopan unionin virallinen lehti. Luettu 11.12.2018
- 8 AOCS Lipid Library, 2018, Deodorization, Verkkoaineisto, < <http://lipid-library.aocs.org/OilsFats/content.cfm?ItemNumber=40326>>. Luettu 5.2.2019
- 9 Massaspektrometria. Verkkoaineisto. Opetushallitus. <[http://www03.edu.fi/oppi-materiaalit/laboratorio/analyysimenetelmat\\_5-5\\_massaspektrometria.html](http://www03.edu.fi/oppi-materiaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_5-5_massaspektrometria.html)>. Luettu 2.5.2019
- 10 Cayman Chemical. 2017. Advice from Lipid Experts. Verkkoaineisto <<https://www.caymanchem.com/news/advice-from-lipid-experts>>. Luettu 11.5.2019
- 11 Agilent Technologies. Setting up a SIM Acquisition Method. PDF-tiedosto. <<https://www.agilent.com/cs/library/support/documents/a05042.pdf>>. Luettu 11.5.2019



- 12 Waters. Waters Quattro micro API Mass Spectrometer Operator's Guide.PDF-tiedosto. <<https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/71500058602rd.pdf>>. Luettu 12.5.2019
- 13 Agilent Technologies. New Dynamic MRM Mode Improves Data Quality and Triple Quad Quantification in Complex Analyses. PDF-tiedosto. <[https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/Public/5990-3595en\\_lo%20CMS.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/Public/5990-3595en_lo%20CMS.pdf)>. Luettu 12.5.2019
- 14 Agilent Technologies.2013. Agilent 5977 Series MSD System. PDF-tiedosto.<<https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G3870-90104.pdf>>. Luettu 13.5.2019
- 15 ISO, International Standard, 2017. Animal and vegetable fats and oils – Determination of fatty-acid-bound chloropropanediols (MCPDs) and glycidol by GC/MS, Part 3: Metod using acid transesterification and measurement for 2-MCPD, 3-MCPD and glycidol.
- 16 Giri, Anupam; Wenzl, Thomas & Zelinkova, Zuzana. 31.1.2017. Assesment of critical steps of a GC/MS based indirect analytical method for the determination of fatty acid esters of monochloropropanediols (MCPDEs) and of glycidol (Ges). Food control- kirja. Ladattu 12.12.2018
- 17 Stadler, H Richard. Current Opinion in Food Science. 2015. E-kirja. Luettu 2.3.2019
- 18 Rämänen, Petri. 2017. 2-kloori-1,2-propaanidiolin,3-kloori-1,2-propaanidiolin ja 2,3-epoksi-1-propanolin rasvahappoestereiden kaasukromatografia-massaspektrometrinen kvantitatiivinen analytiikka epäsuoralla menetelmällä. Pro gradu. Helsingin yliopisto. Helka-tietokanta.

## Vertailunäytteen pitoisuuden määrittäminen

$$((C4/C6)-(C9))*C5*(1/C7)*(1/C8)*1000$$

Aa 2893199  
 IS 0,00016  
 Ais 10854247  
 a 6,77E-04  
 W 2  
 b -9,84E-04

c 31,5977872 ug/kg

GC (antama pitoisuus)	315,9 ng/ml
	0,3159 ppm
SAATU (kerroin huomioitu)	0,03159 ppm

IS	1,6 ppm
	0,0000016 ug/ul
	0,00016 100 ul

Näytteelle lisätään kerroin 0,1  
 jolloin saadaan laskentakaavan mukainen oikea tulos

Saatu konsentraatio 31,60 ug/kg  
 Fapas konsentraatio 39,50 ug/kg