

Hanna Aho

PAH-yhdisteiden määrittäminen lihamatriisista
GC-MS/MS-menetelmällä
Menetelmän kehitys ja osittainen validointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Laboratorioanalyttikko (AMK)
Laboratorioala
Opinnäytetyö
3.6.2012

Alkusanat

Tein tämän opinnäytetyön elintarviketurvallisuusvirasto Eviran päätoimipisteessä Viikissä, tutkimus- ja laboratorio-osaston kemian ja toksikologian tutkimusyksikön toksikologiaosastossa. Haluaisin kiittää työni ohjaajia, tutkija Mirja Hokkasta perusteellisesta perehdytyksestä ja hyvästä työohjauksesta ja lehtori Mia Ruismäkeä opinnäytetyön kirjoittamisen ohjauksesta. Kiitos myös kaikille mukaville työkavereille KETO:ssa, jotka auttoivat monissa käytännön ja teorian asioissa.

Helsingissä 3.6.2012

Hanna Aho

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Hanna Aho PAH-yhdisteiden määrittäminen lihamatriisista GC-MS/MS- menetelmällä 49 sivua + 2 liitettä 3.6.2012
Tutkinto	Laboratorioanalyytikko
Koulutusohjelma	Laboratorioala
Suuntautumisvaihtoehto	
Ohjaajat	Tutkija Mirja Hokkanen Lehtori Mia Ruismäki
<p>Tämä opinnäytetyö tehtiin elintarviketurvallisuusvirasto Eviralle. Työn tarkoituksena oli kehittää menetelmä polysyklisen aromaattisten hiilivetyjen (PAH-yhdisteet) määrittämiseksi lihatuotteista. Nykyään seurataan bentso(a)pyreenin määrää elintarvikkeissa, mutta lainsäädäntö PAH-yhdisteiden suhteen on kiristymässä vuoden 2012 syksyllä ja jatkossa aletaan seurata myös niin sanottujen PAH4-yhdisteiden (bentso(a)pyreeni, kryseeni, bentso(a)antraseeni ja bentso(b)fluoranteeni) kokonaismäärää.</p> <p>Tässä menetelmässä näytteet kylmäkuivataan ja PAH-yhdisteet uutetaan nopeutetulla liuotinuutolla (ASE®). Uuton jälkeen näyte puhdistetaan kiinteäfaasiuuttopylväessä (SPE) ja yhdisteet analysoidaan kaasukromatografi-tandemmassaspektrometrillä (GC-MS/MS).</p> <p>Menetelmän kehitykseen kuului erilaisten kiinteäfaasiuuttopylväiden vertailu ja sentrifugaalihakiduttimen käyttöönotto. SPE-pylväiden vertailussa havaittiin jo käytössä oleva Supelcon ENVI-ChromP-pylväs sopivimmaksi. Sentrifugaalihakiduttimeen hankittiin konsentroidut adapterit. Adapterit estävät näytteen haihtumisen kuiviin eikä näytteitä tarvitse vaihtaa niin usein.</p> <p>Kehitetyn analyysimenetelmän validoinnissa määritettiin spesifisyys, selektiivisyys, lineaarisuus, toistettavuus, sisäinen uusittavuus, takaisinsaanto, havaitsemis- ja määrittämissrajat sekä mittausepävarmuus. Kaikki parametrit täyttivät asetetut kriteerit. Takaisinsaantoprosentiksi 2,5 µg/kg:n pitoisuudella saatiin 99 - 115 % ja keskihajonnaksi 6 - 13 %, 5,0 µg/kg:n pitoisuudella 101 - 113 % ja keskihajonnaksi 5 - 10 % ja 7,5 µg/kg:n pitoisuudella 96 - 112 % ja keskihajonnaksi 7 - 11 %.</p>	
Avainsanat	PAH-yhdisteet, GC-MS/MS, SPE, sentrifugaalihakidutus

Author Title	Hanna Aho Quantification of PAH Compounds from Meat with GC-MS/MS
Number of Pages Date	49 pages + 2 appendices 3 June 2012
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Programme	Laboratory Science
Specialisation option	
Instructors	Mirja Hokkanen, Researcher Mia Ruismäki, Senior Lecturer
<p>This thesis was made for the Finnish Food Safety Authority Evira. The purpose of the work was to develop an application for quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH compounds) in meat products. Now only benzo(a)pyrene is monitored in food stuffs, but legislation will tighten on PAH compounds and the whole amount of the so called PAH4 compounds (benzo(a)pyrene, chrysene, benzo(a)anthracene and benzo(b)fluoranthene) will be monitored from fall 2012.</p> <p>In this application the sample is lyophilized and the PAH compounds are extracted with accelerated solvent extraction (ASE®). After the extraction the sample is cleaned in solid phase extraction column (SPE) and the compounds are analyzed with gas chromatograph-tandem mass spectrometer (GC-MS/MS).</p> <p>Part of the development was comparing different solid phase extraction columns and the commissioning of a centrifugal evaporator. In comparison of the SPE columns, Supelcos ENVI-ChromP which was already in use, was found the most suitable. Concentrating adapters were acquired to the centrifugal evaporator. The adapters prevent the sample from evaporating and drying, and thus the samples need not be watched that often.</p> <p>In validation of the developed method the following parameters were determined: specificity, selectivity, linearity, repeatability, inner reproducibility, recovery, limit of detection and limit of quantification and contingency of determination. All the parameters met the set criteria. The recovery percentages for the concentration of 2,5 µg/kg were 99 - 115 % and the standard deviation was between 6 - 13 %, the recovery percentages for the concentration of 5,0 µg/kg were 101 - 113 % and the standard deviation was between 5 - 10 % and the recovery percentages for the concentration of 7,5 µg/kg were 96 - 112 % and the standard deviation was between 7 - 11 %.</p>	
Keywords	PAH compounds, GC-MS/MS, SPE, centrifugal evaporation

Sisälllys

Alkusanat

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Työn teoria	1
2.1	PAH-yhdisteet	1
2.1.1	Esiintyminen ympäristössä ja elintarvikkeissa	1
2.1.2	PAH-yhdisteiden ominaisuudet	2
2.1.3	Vaikutukset ihmiseen	4
2.1.4	Lainsäädäntö	5
2.2	PAH-yhdisteiden näytteenkäsittely	6
2.2.1	Lihanäytteiden puhdistaminen	6
2.2.2	Kylmäkuivaus	7
2.2.3	Nopeutettu liotinuutto ASE®	7
2.2.4	Sentrifugaalihakudutus	7
2.2.5	Kiinteäfaasiuutto SPE	9
2.3	Analysointi GC-MS/MS:llä	9
3	Työn toteutus	12
3.1	Näytteenkäsittely	12
3.1.1	Kylmäkuivaus	12
3.1.2	Nopeutettu liotinuutto ASE	14
3.1.3	Sentrifugaalihakuduttimen käyttöönnotto	15
3.1.4	Kiinteäfaasiuutto ja SPE-pylväiden vertailu	20
3.2	Näytteiden analysointi GC-MS/MS-laitteella	27
3.3	Analyysimenetelmän validointi	29
4	Validointisarjojen tulokset ja tulosten tarkastelu	30
4.1	Spesifisyys ja selektiivisyys	30
4.2	Lineaarisuus	32
4.3	Toistettavuus ja sisäinen uusittavuus	37
4.4	Takaisinsaanto	39
4.5	Tarkkuus	41

4.6	Havaitsemis- ja määritysrajat	42
4.7	Mittausepävarmuus	43
5	Päätelmät	44
	Lähteet	45
	Liitteet	
	Liite 1. Käytetyt laitteet ja materiaalit	
	Liite 2. Validointiin käytettävän matriisisuoran pipetointitaulukko ja validointisarja	

Lyhenteet

ASE®	<i>Accelerated solvent extraction</i> , nopeutettu liotinuutto
DCM	Dikloorimetaani
GC-MS/MS	Kaasukromatografia-tandemmassaspektrometria
ISTD	<i>Internal standard</i> , sisäinen standardi
MRL	<i>Maximum residue limit</i> , suurin sallittu pitoisuus
PAH	<i>Polycyclic aromatic hydrocarbon</i> , polisyklinen aromaattinen hiilivety
SPE	Kiinteäfaasiuutto, <i>Solid Phase Extraction</i>

1 Johdanto

Tämä työ käsittelee PAH-yhdisteiden (polysykliset aromaattiset hiilivedyt) määrittämistä lihamatriisista. Elintarviketurvallisuusvirasto Evirassa on käytössä menetelmä PAH-yhdisteiden määrittämiseksi savustetuista kaloista ja öljyistä. Menetelmää on haluttu laajentaa kattamaan myös savustetut lihatuotteet. PAH-yhdisteistä vain bentso(a)pyreeniä on tähän asti valvottu lainsäädännöllä (komission asetus N:o 333/2007) [1]. Vuoden 2012 syyskuun alusta lähtien kuitenkin aletaan seurata myös bentso(a)pyreenin, bentso(a)antraseenin, kryseenin ja bentso(b)fluoranteenin (PAH4-yhdisteet) kokonaispitoisuutta [2].

2 Työn teoria

2.1 PAH-yhdisteet

2.1.1 Esiintyminen ympäristössä ja elintarvikkeissa

PAH-yhdisteitä on löydettävissä kaikkialta ympäristöstä, jopa vedestä. Niitä syntyy ihmisen vaikutuksesta erilaisissa palamis- ja pyrolyysiprosesseissa ja myös luonnonmukaisesti. PAH-yhdisteitä pääsee ympäristöön hiilen käsittelystä, orgaanisten aineiden epätäydellisestä palamisesta, pakokaasuista ja tupakoinnista [3; 4]. Luonnonmukaisia PAH-yhdisteiden lähteitä ovat metsäpalot, tulivuoret ja hydrotermaaliset prosessit. Useat PAH-yhdisteet ovat genotoksisia ja syöpää aiheuttavia ja myös mutageenisia ja biologisia vaikutuksia on havaittu [5]. PAH-yhdisteet, jotka eivät ole suoraan karsinogeenisiä, voivat toimia synergisteinä [4].

Ruoka on yksi suuri PAH-yhdisteiden lähde tupakoimattomille ihmisille. Tupakoijat voivat saada niitä saman verran tupakasta kuin ruoasta. Ruoka voi saastua ympäristön

PAH-yhdisteistä. Ne voivat kerääntyä hedelmien ja vihannesten vahamaiseen pintaan [6]. Myös siemenissä ja jyvässä on havaittu PAH-yhdisteitä [7]. Ne kerrostuvat lähinnä ilmasta [4], eivätkä saastuneesta maaperästä. On myös tutkimuksia, joiden mukaan vihannekset ottavat PAH-yhdisteitä maaperästä ja vedestä ja metaboloivat ne [8]. Ruoka voi saastua niistä myös liikenteen takia. Kaupunkiteiden varrelta PAH-yhdisteitä tai nitro-PAH-yhdisteitä voi siirtyä viljaan ja karjaan [7].

Merenelevät ja kala voivat saastua veden ja sedimentin välityksellä. Merenelevistä PAH-yhdisteet kerääntyvät tehokkaammin simpukoihin, jotka eivät pysty metaboloimaan niitä, toisin kuin kalat. PAH-yhdisteitä löytyy ruoasta myös teollisten prosessointien johdosta, kuten savustamisen, grillaamisen, paahtamisen ja kuivaamisen takia, jolloin ruoka on suorassa kontaktissa palamistuotteiden kanssa. Tämä on tärkeä syy siihen, miksi siemenissä, ruokaöljyissä, lihassa ja maitotuotteissa on PAH-yhdisteitä. [6]

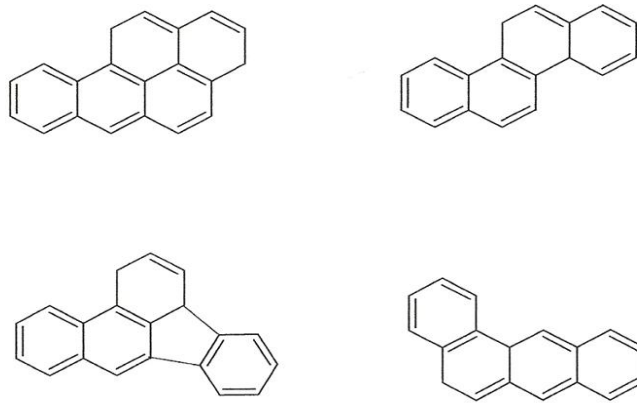
Elintarvikkeissa käytetään myös savuaromeja, jotka on tehty savukondensaateista, jotka sisältävät PAH-yhdisteitä. Elintarviketeollisuudessa käytetään polyetyyleeniä, joka vähentää PAH-yhdisteitä elintarvikkeista, mutta kierrätetyn polyetyleenin käyttäminen öljypakkauksissa voi taas lisätä niitä uudelleendiffuusion takia. [9]

Bentso(a)pyreeni on tutkituin PAH-yhdiste. *The International Agency for Research on Cancer* (IARC) kuvasi bentso(a)pyreenin mahdollisesti ihmiselle syöpää aiheuttavana vuonna 1987 [10]. Sitä onkin käytetty ympäristöanalyysissä mittarina koko PAH-yhdisteiden määrälle. EU:lla on raja-arvo bentso(a)pyreenille [14] ja se on myös vakiinnuttanut näytteenotto- ja analyysimenetelmiä virallisille kontrollinäytteille [1]. Bentso(a)pyreeniä on kuitenkin vain 1 - 20 % kokonais-PAH-määrästä ja muitakin aromaattisia yhdisteitä voi olla mukana [3].

2.1.2 PAH-yhdisteiden ominaisuudet

Polysykliset aromaattiset hiilivedyt koostuvat vedystä ja hiilestä, jotka muodostuvat kahdesta tai useammasta toisiinsa liittyneestä aromaattisesta renkaasta. PAH-yhdisteissä ei ole heteroatomeja tai substituentteja. PAH-yhdisteet, joissa on viisi tai useampi aromaattista rengasta, ovat "raskaita" ja ne, joissa on vähemmän kuin viisi

rengasta, ovat "kevyitä". Raskaat PAH-yhdisteet ovat myrkyllisempiä ja pysyvämpiä kuin kevyet. PAH-yhdisteet ovat poolittomia ja lipofiilisiä. [13] PAH4-yhdisteiden rakennekaavat on esitetty kuviossa 1.



Kuvio 1. PAH4-yhdisteet. Ylhäällä vasemmalla bentso(a)pyreeni, ylhäällä oikealla kryseeni, alhaalla vasemmalla bentso(b)fluoranteeni ja oikealla bentso(a)antraseeni.

PAH4-yhdisteiden kemiallisia ja fysikaalisia ominaisuuksia löytyy taulukosta 1.

Taulukko 1. PAH4-yhdisteiden kemiallisia ja fysikaalisia ominaisuuksia [11]

	Bentso(a)pyreeni	Bentso(a)antraseeni	Kryseeni	Bentso(b)-fluoranteeni
Molekyylikaava	$C_{20}H_{12}$	$C_{18}H_{12}$	$C_{18}H_{12}$	$C_{20}H_{12}$
Molekyyli massa (g/mol)	252,3	228,29	228,3	252,3
Olomuoto, ulkonäkö	Vaalean keltainen, kiinteä, levymäinen tai neulamainen	Kelta-sininen fluoresenssi, kiinteä, levymäinen	Väritön sinisellä/puna-sinisellä fluoresenssilla, kiinteä, levymäinen	Väritön, kiinteä, neulamainen
CAS numero	50-32-8	56-55-3	218-01-9	205-99-2

	Bentso(a)pyreeni	Bentso(a)antraseeni	Kryseeni	Bentso(b)-fluoranteeni
Sulamispiste (°C)	179 - 179,3	158 - 159; 162	255 - 256	168,3
Kiehumispiste (°C)	495	400, 435 °C:ssa sublimoituu	448	?
Liukoisuus veteen (mg/l)	0,0023	0,010	0,0028	0,0012
Liukoisuus orgaaniseen liuottimeen	Niukkaliukonen etanoliin ja metanoliin, liukenee bentseeniin, tolueeniin, ksyleeniin ja eetteriin	Liukenee vähän etikkahappoon ja kuumaan etanoliin, liukenee asetoniin, dietylieetteriin, liukenee hyvin bentseeniin	Liukenee vähän asetoniin, hiilidisulfidiin, dietylieetteriin, etanoliin, jäätikkahappoon, tolueeniin, kuumaan ksyleeniin, liukenee bentseeniin	Liukenee vähän bentseeniin ja asetoniin
Tiheys (g/cm ³)	1,351	1,274 20 °C:ssa	?	?

2.1.3 Vaikutukset ihmiseen

PAH-yhdisteet pääsevät ihmisen kehoon monen eri reitin kautta. Ne voivat siirtyä hengityksen mukana keuhkoihin, esim. tupakansavun kautta. Juomavesi ja ruuan, maaperän tai pölyn, joka sisältää PAH-yhdisteitä, nieleminen on yksi reitti kehoon, vaikka absorptio on yleisesti ottaen hidasta tällä tavoin. Ne voivat myös siirtyä ihon läpi esim. saastuneen maaperän tai kreosootin kautta.

PAH-yhdisteet pääsevät kudoksiin, jotka sisältävät rasvaa. Ne kerääntyvät enimmäkseen munuaisiin, maksaan ja rasvakudokseen. Pienempiä määriä voi löytyä pernasta, lisämunuaisista ja munasarjoista. Jokainen kudos metaboloii PAH-yhdisteitä moniksi eri aineiksi. Jotkut näistä ovat haitallisempia ja jotkut vähemmän haitallisia kuin alkuperäiset PAH-yhdisteet. Eläinkokeista päätellen PAH-yhdisteet eivät varastoidu kehoon pitkäksi aikaa ja useimmat niistä lähtevät kehosta muutaman päivän kuluessa.

PAH-yhdisteiden rasvaliukoisuus auttaa niitä pääsemään solukalvojen läpi ja pysymään kudoksessa ikuisesti. Metaboloituessaan ne kuitenkin muuttuvat vesiliukoisimmiksi ja eritettävämmiksi. PAH-yhdisteiden aineenvaihduntaa tapahtuu kaikissa kudoksissa. Aineenvaihduntareittejä on useita mahdollisia ja valittava reitti riippuu entsyymien aktiivisuudesta ja affiniteetista kussakin kudoksessa. PAH-yhdisteiden aineenvaihduntaa on tutkittu paljon *in vitro* ja *in vivo*. Ne metaboloituvat samantapaisesti samankaltaisen rakenteen takia. Monissa mikrosomaalisissa-, solu- ja viljellyissä kudospreparaateissa on kvalitatiivisesti samankaltaiset metaboliat. Erojakin on tiettyjen metaboliittien suhteellisissa tasoissa ja muodostumisnopeudessa, kun on vertailtu eri kudoksia ja solupreparaatteja eri eläinlajeista ja -kannoista. [11]

2.1.4 Lainsäädäntö

Koska PAH-yhdisteet ovat karsinogeneenejä, niiden sallittuja pitoisuuksia säädellään lainsäädännöllä. Lainsäädäntö myös säätelee menetelmän suoritusarvovaatimuksia. EU:n komission asetuksessa 333/2007 määritetään bentso(a)pyreenille sovellettavuus, toteamisraja, määritysraja, täsmällisyys, saanto ja spesifisyys. Sovellettavuus tarkoittaa asetuksessa EY 1881/2006 mainittuja elintarvikkeita ja siinä mainitaan savustettu liha ja savustetut lihavalmisteet [14]. Spesifisyyden kriteerit täytyvät, kun ei ole väliaineesta aiheutuvia tai spektrihäiriöitä ja pystytään tekemään positiivisen toteamisen varmentaminen. Takaisinsaanto bentso(a)pyreenille pitää olla välillä 50 - 120 %. Havaitsemisraja bentso(a)pyreenille pitää olla alle 0,3 µg/kg ja määritysraja bentso(a)pyreenille alle 0,9 µg/kg. Täsmällisyys esitetään HORRAT-arvona (*Horwitz ratio*), jonka pitäisi olla <2. [1]

Lainsäädäntö muuttuu uusien asetusten 835/2011 ja 836/2011 myötä. Suurin muutos koskee bentso(a)antraseenin, bentso(b)fluoranteenin ja kryseenin sisällyttämistä määriteltäviin yhdisteisiin bentso(a)pyreenin kanssa (PAH4). Niille otetaan käyttöön yhteiskiintiö, joka on 1.9.2012 - 31.8.2014 välisellä ajalla 30,0 µg/kg ja 1.9.2014 lähtien 12,0 µg/kg. Bentso(a)pyreeniä määritetään yhä myös erikseen. Etuna tällä on se, että tulokset ovat vertailukelpoisia vanhempien tuloksien kanssa. Korkein sallittu pitoisuus bentso(a)pyreenille on 5,0 µg/kg ja se alenee 2,0 µg/kg:ksi 1.9.2014 alkaen. [2; 15]

2.2 PAH-yhdisteiden näytteenkäsittely

PAH-yhdisteiden uuttaminen elintarvikkeista on perinteisesti tehty saponifikaatiolla, neste-neste-uutolla (LLE= *liquid-liquid extraction*) ja puhdistus pylväskromatografialla, mutta nykyisin entistä useammin kiinteäfaasiuutolla (SPE= *solid phase extraction*) [12].

2.2.1 Lihanäytteiden puhdistaminen

Wang et al. [13] kuvasi ensimmäisenä paineistetun liotinuuton (PLE= *pressurized liquid extraction*) käytön PAH-yhdisteiden määrittämiseksi lihasta. Liuottimena uuttoaasiaan käytettiin dikloorimetaani/asetonitrili-seosta ja sorbenttina C₁₈ tai C₈ ja natriumsulfaattia. Muissa menetelmissä, jossa PLE:tä on käytetty, on puhdistusvaiheessa käytetty geelipermeaatiokromatografiaa (GPC) ja pylväskromatografiaa [16] tai GPC:tä ja SPE:tä [17]. Näissä käytettiin n-heksaania liuottimena ja polymeeripohjaisia pylväitä (styreeni divinyylibentseeni) geelipermeaatiokromatografiassa (GPC= *gel permeation chromatography*) (normaali faasi). Tässä vaiheessa poistettiin paljon lipidejä näytteestä. Tämäkään ei kuitenkaan riittänyt, vaan tarvittiin myös geelipermeaatiokromatografiaa tai kiinteäfaasiuuttoa. Jira et al. [16] totesi geelipermeaatiokromatografian olevan tehokas tapa poistaa rasvaa saponifikaation sijasta. Jäljelle jääneet rasvat ja polaariset yhdisteet poistettiin pylväskromatografialla käyttäen silikageeliä.

Saantoprosentit yleisesti ottaen LLE- ja PLE-pohjaisilla menetelmillä ovat samankaltaiset, vaikka PLE:llä on jotain etuja, kuten prosessin automatisointi ja ajan ja liuottimen säästäminen.

Vaikka SPME:tä (*solid-phase microextraction*) käytetään normaalisti nestemäisillä näytteillä, Martin et al. [18] on käyttänyt tätä tekniikkaa kiinteän näytteen kanssa (SPME-DED, DED= *direct extraction device*). SPME-kuidulla on tällöin gelatiinista valmistettu tuki, joka mahdollistaa kuidun ja näytteen vuorovaikutuksen.

2.2.2 Kylmäkuivaus

Kylmäkuivauksessa on kolme vaihetta; jäädytys, ensimmäinen kuivausvaihe (sublimaatio) ja toinen kuivausvaihe (desorptio). Jäädytyksen tarkoituksena on saada muodostumaan riittävästi kideistä rakennetta, että sublimoituva aine pääsee pois kuivattavasta aineesta. Mitä isompi kide on, sitä parempi. Hitaampi jäätyminen tuottaa isompia kiteitä. Jäädytys voi kestää 1 - 24 tuntia.

Ensimmäisessä kuivausvaiheessa sitoutumaton kosteus poistuu. Sublimaatio tapahtuu vakuumissa, kun aineen lämpötila on alempi kuin sen kriittinen lämpötila. Tämän vaiheen jälkeen aineen kosteusprosentti on 3 - 5 %. Jos aineen kosteusprosenttia pitää vielä laskea, suoritetaan toinen kuivausvaihe.

Toisessa kuivausvaiheessa poistuu ionisesti sitoutunut vesi. Tämän vaiheen jälkeen kosteusprosentti voi olla 0,5 %. [19]

2.2.3 Nopeutettu liuotinuutto ASE®

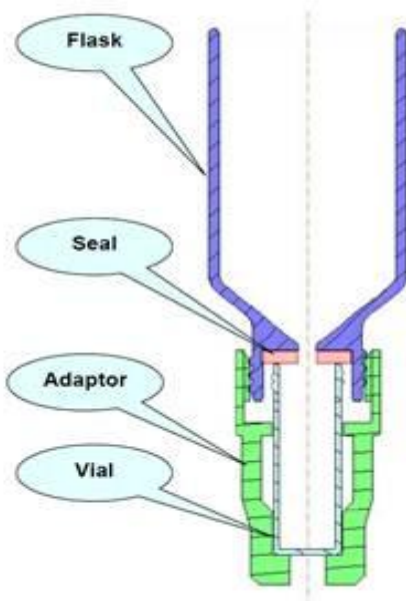
Nopeutettu liuotinuutto eli *accelerated solvent extraction* (ASE®) käyttää korkeaa painetta ja korkeaa lämpötilaa näytteen uuttamisen nopeuttamiseen. ASE on pitkälle automatisoitu ja käyttää vähemmän liuotinta, kuin muut uuttometodit. Näyte laitetaan teräksiseen näyteastiaan, joka täytetään liuottimella, kuumennetaan ja paineistetaan. Näytettä uutetaan yleensä 5 - 10 minuuttia ja liuotin menee näyteastiasta keräysastiaan. Sen jälkeen näyteastia vielä puhdistetaan typpikaasulla. Liuottimet uuttavat paremmin analyyttejä kiehumispistettä korkeammassa lämpötilassa, sen takia liuotinta ei tarvita niin paljon. Lämpötilan kohotessa myös desorptio paranee. Paine pitää liuottimen nestemäisessä muodossa ja helpottaa analyytin siirtymistä kiinteään näytteen mikrorakenteesta. [20]

2.2.4 Sentrifugaalihaihdutus

Sentrifugaalihaihduttimessa painetta alennetaan käyttäen vakuumpumppua ja samalla nesteiden kiehumispiste alenee. Haihduttimen sentrifuugi estää ristikontaminaatioita ja

näytteiden karkaamisen. Kun näytteet alkavat kiehua, liuotin helposti ryöpsähtelee. Tässä työssä käytetyssä haihduttimessa oli ominaisuus (DriPure), joka hillitsee näytteen ryöpsähtelyä kontrolloimalla vakuumia ja roottorin nopeutta haihdutuksen ensimmäisessä vaiheessa, kun painetta lasketaan. [21; 22]

Koska PAH-yhdisteet ovat helposti haihtuvia, näytettä ei haluttu haihduttaa kuiviin. Tässä työssä testattiin sentrifugaalihaihduttimeen sopivia konsentroivia adaptereita. Adapterien läpileikkaus on esitetty kuviossa 2.

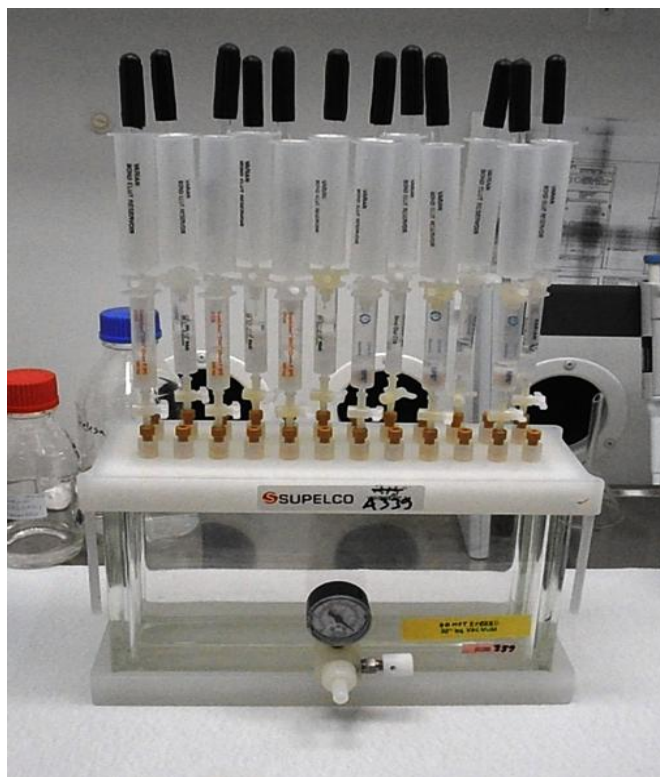


Kuvio 2. SampleGenie-adapterin läpileikkaus

Haihdutin toimittaa lämpöä haihduttaakseen liuottimen ja kondensaattori tiivistää liuottinhöyryn takasin nestemäiseksi jäteastiaan. Lämpö siirtyy näytteisiin näyteastian seinämän läpi. Näyteastia saa lämmön blokista (esim. alumiinia) johon näytteet asetetaan. Blokki saa lämmön laitteesta olevasta infrapunalamppusta. Lämpimästä blokista lämpö siirtyy liuottimeen, joka on kylmä, koska vakuumin takia liuottimen kiehumispiste on alentunut. Tämän lämpötilaeron takia lämpö virtaa kohti näytettä. [23]

2.2.5 Kiinteäfaasiuutto SPE

Polystyreeni-divinyylibentseeniä on käytetty PAH-näytteiden puhdistamiseen kiinteäfaasiuutolla sedimentistä tai steroideista erilaisista biologisista nesteistä ja kudoksista. Se on erittäin selektiivinen PAH-yhdisteille ja riittävä sellaisenaan ennen GC-MS/MS ajoa useimmissa menetelmissä [24]. PAH-yhdisteiden aromaattiset renkaat muodostavat polystyreeni-divinyylibentseenifaasin kanssa π - π -sidoksia. Faasi mahdollistaa elektronin luovutuksen yhdisteen piisidoksille. Tämä lisää faasin ja analyytin vuorovai-
kutusta [25]. Kiinteäfaasiuuttokammio on esitetty kuviossa 3.



Kuvio 3. Kiinteäfaasiuuttokammio

2.3 Analysointi GC-MS/MS:llä

Kolonnit:

GC-MS:aa käytetään kaikenlaisten elintarvikkeiden analyyseissä. Erotusvaiheessa kolonnifaasit, jotka perustuvat 5 % fenyyli/95 % metyyliipolysiloksaani substituutioon, on

käytetty paljon. Näillä kolonneilla tarpeeksi hyvän resoluution kanssa voi olla ongelmia, koska tutkittavien yhdisteiden kanssa voi eluotua muita PAH-yhdisteitä. Samaan aikaan eluotuvia yhdisteitä ovat mm. kryseeni ja trifenyleeni; syklopenta(c,d)pyreeni, bentso(a)antraseeni ja kryseeni; bentso(b)fluoranteeni, bentso(j)fluoranteeni ja bentso(k)fluoranteeni; dibentso(a,c)antraseeni ja dibentso(a,h)antraseeni; sekä dibentso(a,h)antraseeni ja indeno(1,2,3-c,d)pyreeni. [12]

Gómez-Ruiz et al. [26] vertaili erilaisia stationäärifaaseja mukaan lukien 5 % faasi, 50 % fenyyli/50%-metyylipolysiloksaanifaasi (esim. DB-17 ms), joka on keskipolaarinen, ja myös keskipolaarisesta polaariseen (Optima® δ-6). 50 % fenyyli/50%-metyylipolysiloksaanifaasi ratkaise kolmen eri PAH-ryhmän samaan aikaan eluotumisen; dibentso(a,h)antraseeni ja indeno(1,2,3-c,d)pyreeni; bentso(b)fluoranteeni, bentso(j)fluoranteeni ja bentso(k)fluoranteeni; sekä syklopenta(c,d)pyreeni, bentso(a)antraseeni ja kryseeni. Tilaustyönä tehty DB-17ms kolonni antoi parhaat tulokset EU-listassa olevien neljän dibentsopyreenin (dibentso(a,e)pyreeni, dibentso(a,h)pyreeni, dibentso(a,i)pyreeni ja dibentso(a,l)pyreeni) määrittämiseen. Tavallisella 5 ms-kolonnilla näillä yhdisteillä on herkkyysongelmia ja piikit leviävät voimakkaan analyytin ja faasin vuorovaikutuksen takia.

On myös kehitetty menetelmiä, joissa on käytetty nopeaa erottelua esim. lyhyemmillä kolonneilla (esim. 10 m x 0,1 mm) [17; 27] tai yhdistämällä kaksi kromatografia (GC x GC) [28]. Jälkimmäisessä esimerkissä ensimmäinen erottelu suoritetaan 5 %-fenyyli polysilfenyleeni-siloksaanikolonnilla (kolonni 30 m, tavallinen erottelu) ja toinen polaarisella kolonnilla (esim. 50 % fenyleeni polysilfenyleeni-siloksaani, kolonnin pituus 1 m, erottelu perustuu polaarisuuteen). Resoluutio paranee, mutta raakadata ja kromatogrammit ovat monimutkaisempia, joten aineistoa käsittelevän ohjelmiston pitää olla hyvä. Myös yli 30-metrisiä kolonneja on käytetty ja niillä saa paremman resoluution tietyille isomeereille ja metyylijohdannaisille [29].

Injektointi:

PAH-yhdisteiden määrittämisessä on kokeiltu myös erilaisia näytteen injektointitapoja. Sillä on merkitystä ns. "raskaampien" PAH-yhdisteiden kohdalla, koska niillä on suuret kiehumispisteet. Monet käyttävät *splitless*-injektiota (suora höyrystävä injektio) [30; 31; 32]. Myös lämpötilaohjelmoitua höyrystämistä (PTV=*programmed-temperature*

vaporization) (esim. [31; 33]) on käytetty, samoin kuin kylmänä suoraan kolonniin (*on-column*) injektoimista, joka parantaa pienempien PAH-yhdisteiden piikkien muotoa [5]. On myös kokeiltu suurten määrien injektoimista (LVI=*large volume injection*), mikä ei ole kuitenkaan yleistä, vaikka se voi parantaa herkkyyttä [24; 34; 35].

Detektorit:

Useissa tutkimuksissa käytetään yksittäistä kvadrupolianalysointia ja SIMiä (SIM=*single ion monitoring*), kun taas ioniloukkua (IT=*ion trap*) [30; 31; 37; 38; 39] ja kolmoiskvadrupolia [39; 40] käytetään harvemmin. Korkean resoluution massaspektrometrian analysointia (esim. lentoaika, *time of flight*) [32; 28; 40] ja magneettisektoreita [16; 17; 27] on myös käytetty, mutta korkean hinnan takia ei paljoa. Tandemmassaa ja muita kehittyneitä analysointia käytettäessä selektiivisyys paranee. Ilmeisesti kuitenkin PAH-yhdisteiden pysyvyyden takia enimmäkseen käytetään yksittäistä kvadrupolianalysointia ja massaspektrometriaa.

Suurin osa havaitsemisrajoista (LOD) on alle tai ppb-tasolla. Merkittäviä eroja yksittäisen kvadrupolin ja muiden analysointimenetelmien välillä ei ole. Tutkimuksissa, joissa käytettiin yksittäistä kvadrupolia tai kolmoiskvadrupolia ja IT-analysointia, LOD-arvot olivat alle ppb-tason (esim. [24; 31; 40]). Samanlaisia tuloksia on saatu myös käytettäessä LC-FLD:a (nestekromatografi-fluoresenssidetektorit) ja GC-MS(/MS):a.

Tandemmassaspektrometria:

Tandemmassaspektrometriassa (MS/MS, MSⁿ) käytetään kahta tai useampaa massa-analysointia. Ensimmäisellä analysointimenetelmällä valitaan ioni, jolle tehdään haluttu reaktio. Reaktiotuote analysoidaan seuraavassa analysointimenetelmässä. Tandemmassaspektrometrian avulla voidaan tutkia esim. metastabiileja tai eri tavalla aktivoituja ioneja, ioni- tai molekyylireaktioita ionilähteessä ja reaktiokammioissa ja ionien sisäisiä energioita. Menetelmällä on hyvä signaali-kohinasuhde (S/N), joten näytteen pitoisuus voi olla pieni (yleensä ng/ml-pg/ml). Kaikki MS/MS-mittaukset ovat muunnelmia samasta ideasta. Ensimmäisessä tuotetaan tutkittava ioni, joka sen jälkeen eristetään ja sille tehdään valittu reaktio ja reaktiotuotteet analysoidaan.

Tässä työssä käytettiin törmäyksen aiheuttamaa reaktiota (CID = *collision-induced dissociation*) (kaava 1):



Törmäyksen aiheuttamassa reaktiossa osa ionin kineettisestä energiasta muutetaan sen sisäiseksi energiaksi ja ioni virittyy korkeammalle energiatasolle. [41]

Tässä työssä käytettiin myös kolmoiskvadrupolilaitteistoa, jossa ensimmäisessä kvadrupolissa valittu ns. äiti-ioni törmäytettiin argonin kanssa toisessa kvadrupolissa ja syntyneet tytäri-ionit analysoidaan kolmannessa kvadrupolissa [42].

3 Työn toteutus

Tässä opinnäytetyössä käytetty menetelmä perustuu soveltavasti Bruno Veyrandin et al. artikkeliin *Innovative method for determination of 19 polycyclic aromatic hydrocarbons in food and oil samples using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry based on an isotope dilution approach* vuodelta 2007 [24]. Menetelmässä näyte ensin kylmäkuivataan vakuuissa, sen jälkeen lisätään sisäinen standardi, uuteaan nopeutetulla liuotinuutolla, puhdistetaan SPE-pylväällä ja analysoidaan kaasukromatografi-tandemmassaspektrometrillä. Työssä käytetyt laitteet ja materiaalit on lueteltu liitteessä 1.

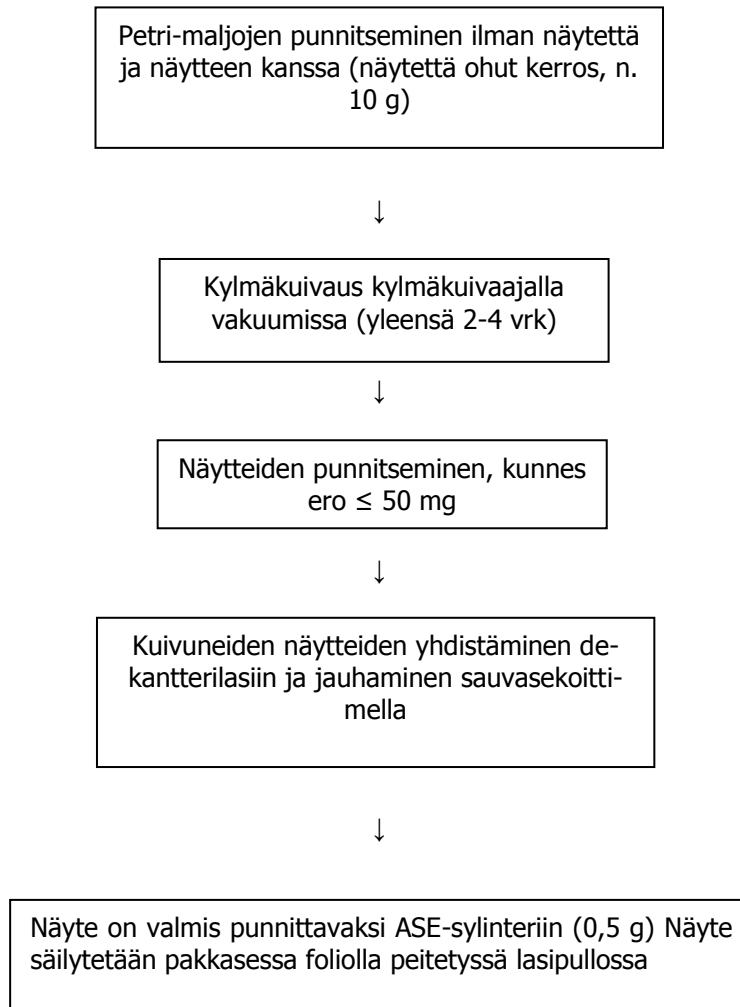
3.1 Näytteenkäsittely

3.1.1 Kylmäkuivaus

Validointisarjoihin käytetty jauheliha oli nauta-sikajauhelihaa (50:50). Jauhelihaa punnittiin lasisille petri-maljoille ja kylmäkuivattiin noin neljä vuorokautta, kunnes sen paino ei eronnut mittausten välillä 50 mg:aa enempää. Sen jälkeen jauhelihat hienonnettiin sauvasekoittimella ja säilöttiin foliolla peitettyssä lasipullossa pakastimeen (kaavio

1). Jauhelihalle laskettiin kuiva-aineprosentiksi 38,94 %. Kylmäkuivain on esitetty kuviossa 4.

Kaavio 1. Näytteen kylmäkuivaus





Kuvio 4. Kylmäkuivain Edwards Modulyo 4K

3.1.2 Nopeutettu liuotinuutto ASE

ASE-sylinteriin laitettiin ensin selluloosasuodatin, sitten 0,5 g Celiteä ja 7,5 g Florisilia. Sylinteri täytettiin lasihelmillä ja suoritettiin ASE-uutto DCM:lla mahdollisten PAH-jäämien poistamiseksi. DCM-pesun jälkeen kylmäkuivattua jauhelihaa punnittiin 0,5 g ASE-sylinteriin. Jokaisen näytteen tarkka massa kirjattiin ylös tulosten laskemista varten. Jauhelihaan lisättiin 170 μ l sisäistä standardia (0,01 μ g/ml) ja PAH mix 183 standardia MRL-tasosta (*Maximum Residue Limit* = suurin sallittu pitoisuus) riippuen (ks. liite 2) ja sylinteri täytettiin taas lasihelmillä. Pesuohjelma ja uutto-ohjelma olivat samat lukuun ottamatta käytettyä liuotinta, joka oli uutossa heksaani-asetoni (50/50 tilavuusprosentteina). Uutto-ohjelma näkyy taulukossa 2.

Taulukko 2. ASE uutto-ohjelma

<i>Static</i>	5 min
<i>Flush</i>	40 %
<i>Purge</i>	60 sec
<i>Cycle</i>	2
<i>Oven temperature (°C)</i>	100 °C
<i>Pressure</i>	1500 psi
<i>Extraction solvent</i>	Heksaani/asetoni 50/50 (v/v)
<i>Extraction time</i>	~ 20 min

3.1.3 Sentrifugaalihaihduttimen käyttöönotto

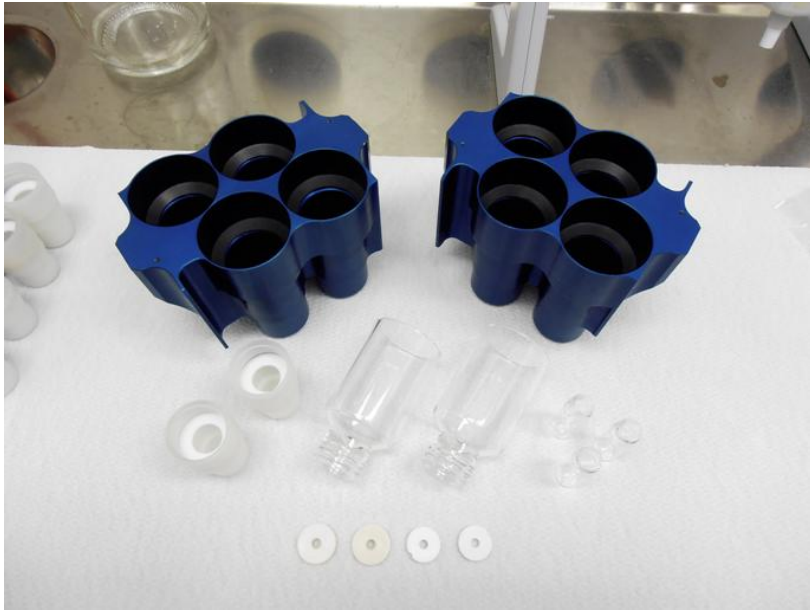
Selvitettiin sentrifugaalihaihduttimen käyttöä haihdutuksessa ennen SPE-uuttoa typpihaihduttimen sijasta. Haihdutuksen jälkeen näytettä pitäisi jäädä vähintään 1 ml. Sentrifugaalihaihduttimeen saatavilla adaptereilla voidaan konsentroida näyte, jolloin näytteitä ei tarvitse vaihtaa niin usein kuin käytettäessä typpihaihdutinta. Haihdutin oli Genevacin EZ-2 Plus HCl compatible ja se on esitetty kuviossa 5. Haihduttimeen sopivat konsentroivat SampleGenie-adapterit on esitetty kuviossa 6.

Toinen mahdollisuus näytteen konsentroidamiseen on käyttää *keeper*-liuotinta, jolla on huomattavasti korkeampi kiehumispiste kuin muulla liuottimella. Tällöin *keeper* jää jäljelle muun liuottimen haihduttua. Yksi mahdollinen *keeper*-liuotin oli tolueeni. Kokeiltiin miten tolueeni käyttäytyy SPE-pylväessä ja vaikuttaa analyttien määrittämiseen. Tehtiin kolme rinnakkaista liuotinnäytettä liuottimena tolueeni ja kolme rinnakkaista liuotinnäytettä liuottimena heksaani-asetoni (50/50, v/v), jotka spiikattiin konsentraatioon 0,064 µg/ml.



Kuvio 5. Sentrifugaalihaihdutin EZ-2 Plus

Koekäyttöön tilatuilla SampleGenie-adaptoreilla tehtiin 4 koesarjaa, joilla selvitettiin haihdutusajan vaikutus jäännösluottimen määrään. Ensimmäisessä sarjassa SampleGenie-adaptoreihin laitettiin heksaani-asetonia noin puoleen väliin, mittalasilla mitattuna 30 ml. Näytteitä oli 8. Toinen koesarja oli sama, mutta muutettiin *final stage timeä* 6 minuutista 1 minuuttiin. Kolmas koesarja oli sama testi, mutta liuottimeen lisättiin ISTD 170 μl ja standardia pitoisuudella 0,064 $\mu\text{g/ml}$. Näyte, jossa on analyyttiä ja/tai matriisia voi haihtua eri tavalla kuin pelkkä liuotin. Näytteitä ei laitettu SPE-kolonnin läpi. Konsentraatin tilavuudet tarkistettiin. Näytteet haihdutettiin typpihaihduttimella kuiviin ja liuotettiin 100 μl :an tolueenia ja siirrettiin ajopulloon. Näytteet ajettiin GC-MS/MS:lla. Neljännessä koesarjassa haihduttimeen laitettiin ensin 30 ml heksaani-asetoni-liuosta, haihdutettiin, kunnes silmämääräisesti oli haihtunut vähintään 2/3 ja pysäytettiin ohjelma. Laitettiin putkiin loput 20 ml ja haihdutettiin uudestaan. Mitattiin konsentraatti. Tämä testi tehtiin sen takia, että ASE:n jälkeen näytettä on noin 50 ml.



Kuvio 6. SampleGenie-adapterit

Ensimmäisessä koesarjassa useimmissa putkissa konsentraattia oli jäljellä alle 1 ml. Tehtiin sama testi uudelleen, mutta *final stage timea* lyhennettiin kuudesta minuutista yhteen minuuttiin. Tilavuudet olivat paremmat, yli 1 ml (n. 1100 - 1350 μ l). Kolmannen sarjan, johon oli spiikattu analyyttejä, tilavuudet olivat noin 1000 - 1500 μ l. Saannot olivat hyvät. Neljännen sarjan saannot olivat 1000 μ l - 1650 μ l, eli konsentroidi SampleGenie-adapttereilla toimi hyvin.

Validoinnin koesarjaa tehtäessä huomattiin, että matriisilla on paljon vaikutusta jäännöstilavuuteen. Tilavuudet kasvoivat huomattavasti sen vaikutuksesta. Saantoprosentteihin sillä ei näyttänyt olevan vaikutusta.

Tolueenin ja heksaani-asetonin välillä nähtiin eroa liuottimissa sekä kromatogrammeissa, että saantoprosenteissa. Tolueenin kromatogrammi oli epäselvempi ja varmistusionia oli vaikea erottaa. Kuviossa 7 on bentso(a)pyreenin kromatogrammi tolueeniliuottimissa ja kuviossa 8 heksaani-asetonissa. PAH4-yhdisteiden saantoprosenttien keskiarvot (\bar{k}), keskihajonnat (s_d) ja suhteelliset keskihajonnat (CV%) tolueenissa ovat taulukossa 3 ja heksaani/asetonissa taulukossa 4.

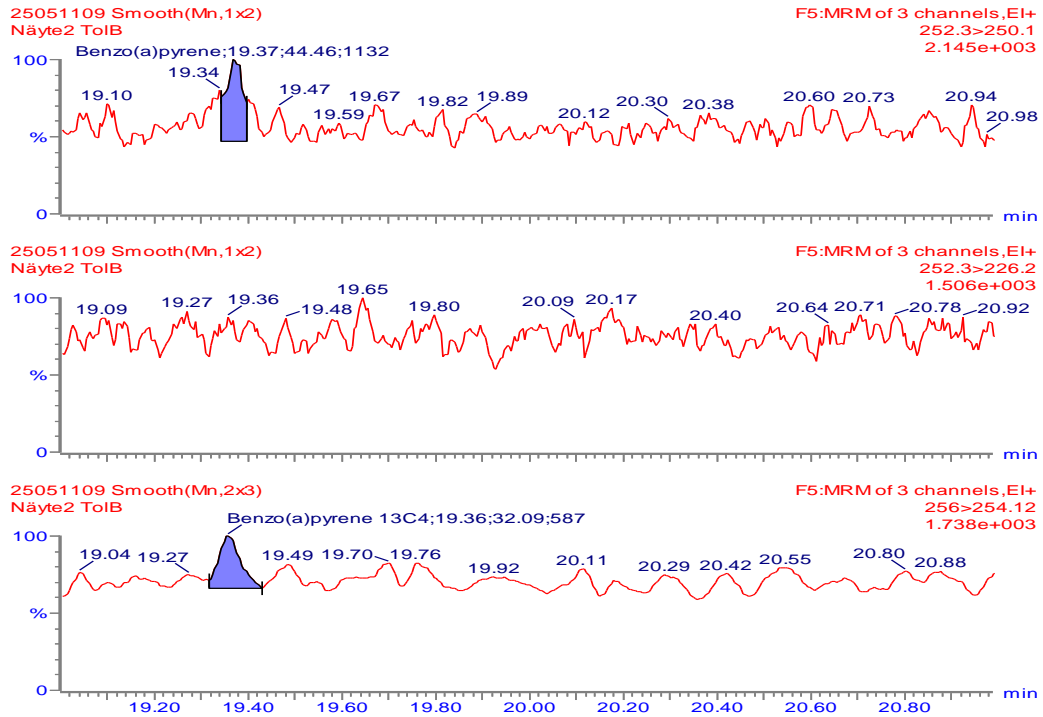
Taulukko 3. Näyte tolueenissa

Yhdiste	ka %	sd %	CV %
Bentso(a)antraseeni	124,11	10,27	8,27
Kryseeni	168,39	26,69	15,85
Bentso(b)fluoranteeni	146,41	19,90	13,59
Bentso(a)pyreeni	125,05	31,21	24,95

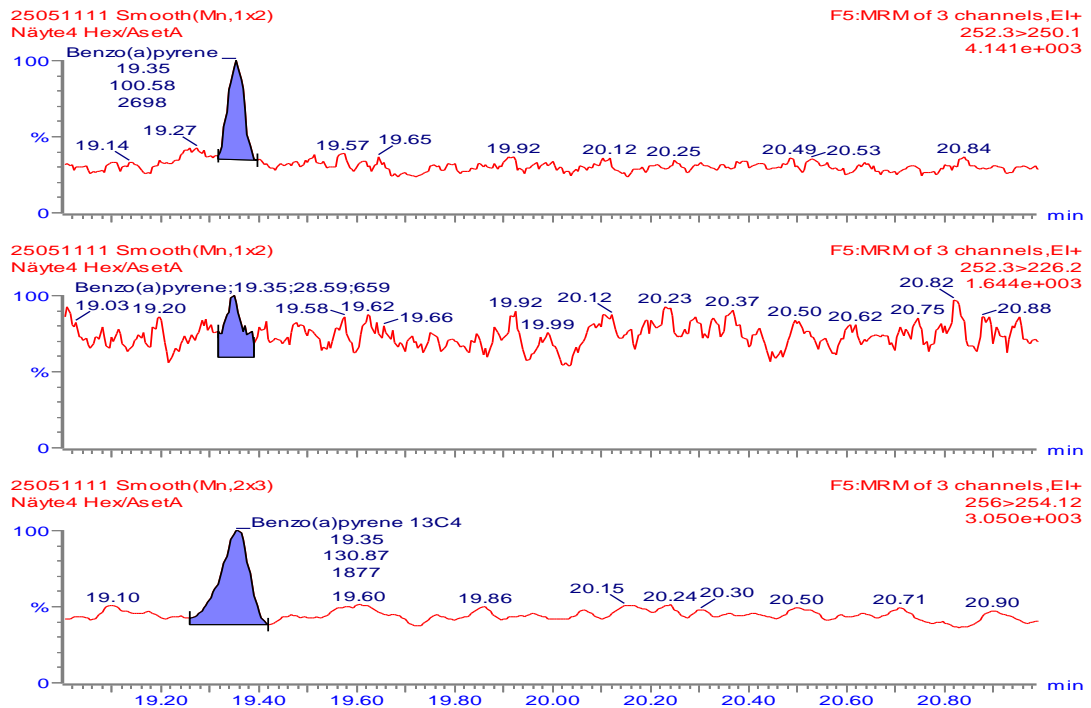
Taulukko 4. Näyte heksaani/asetonissa

Yhdiste	ka %	sd %	CV %
Bentso(a)antraseeni	135,00	37,86	28,04
Kryseeni	142,76	25,54	17,89
Bentso(b)fluoranteeni	134,01	19,44	14,50
Bentso(a)pyreeni	112,66	15,40	13,67

Kolmen rinnakkaisnäytteen saantoprosentit olivat lähempänä lainsäädännön vaatimuksia heksaani-asetonissa muissa yhdisteissä paitsi bentso(a)antraseenissa. CV%:t olivat vähän paremmat tolueenissa, mutta ei paljon. Korkeampien saantojen ja epäselvemmän kromatogrammin takia päätettiin luopua ajatuksesta tolueenista hyvänä *keeper*-liuottimena.



Kuvio 7. Bentso(a)pyreenin kromatogrammi tolueeniliuottimessa



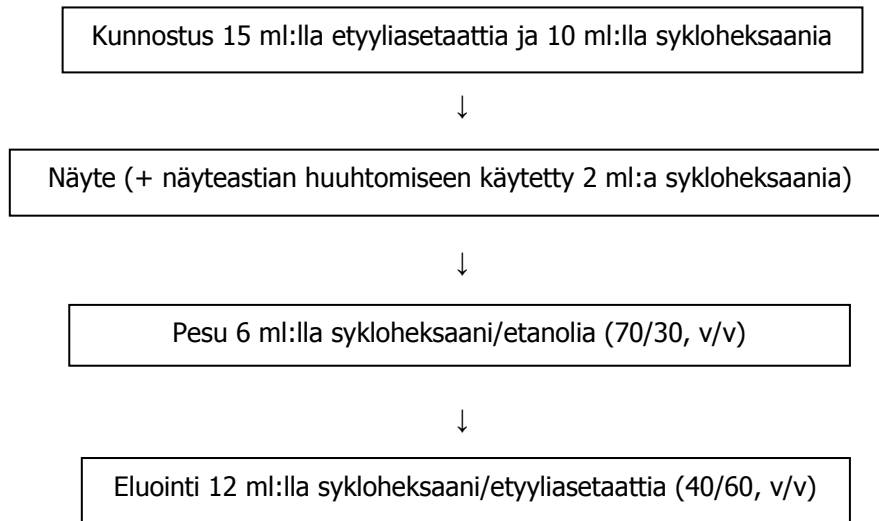
Kuvio 8. Bentso(a)pyreenin kromatogrammi heksaani-asetoniliuottimessa

3.1.4 Kiinteäfaasiuutto ja SPE-pylväiden vertailu

Ensimmäinen SPE-testi:

PAH-menetelmässä oli käytössä Supelcon Supelclean Envi-ChromP SPE-pylväät. Pylväiden epäiltiin sisältävän PAH-yhdisteitä ja näin suurentavan saantoprosentteja. Päätettiin kokeilla muita SPE-pylväitä ja verrata tulosten saantoprosentteja keskenään. Ensimmäiseen vertailuun valittiin Envi-ChromP:n lisäksi Phenomenexin Strata PAH, joka on erityisesti kehitetty PAH-analytiikkaan, Varianin Bond Elut C18 ja J.T. Bakerin Bakerbond SPE Alumina. Rinnakkaisnäytteitä tehtiin kolme. Kaikkiin pylväisiin käytettiin samaa SPE-protokollaa. Pylväiden SPE-protokolla on kaaviossa 2. Heksaaniasetoniliuokseen (1,3 ml) spikattiin kiinteiden näytteiden spikkausnäyte sp1, pitoisuus 0,064 µg/ml ja näyte suodatettiin SPE-pylvään läpi. Suodos haihdutettiin typpihaihduttimella, näytteet liuotettiin 100 µl:an toluenia.

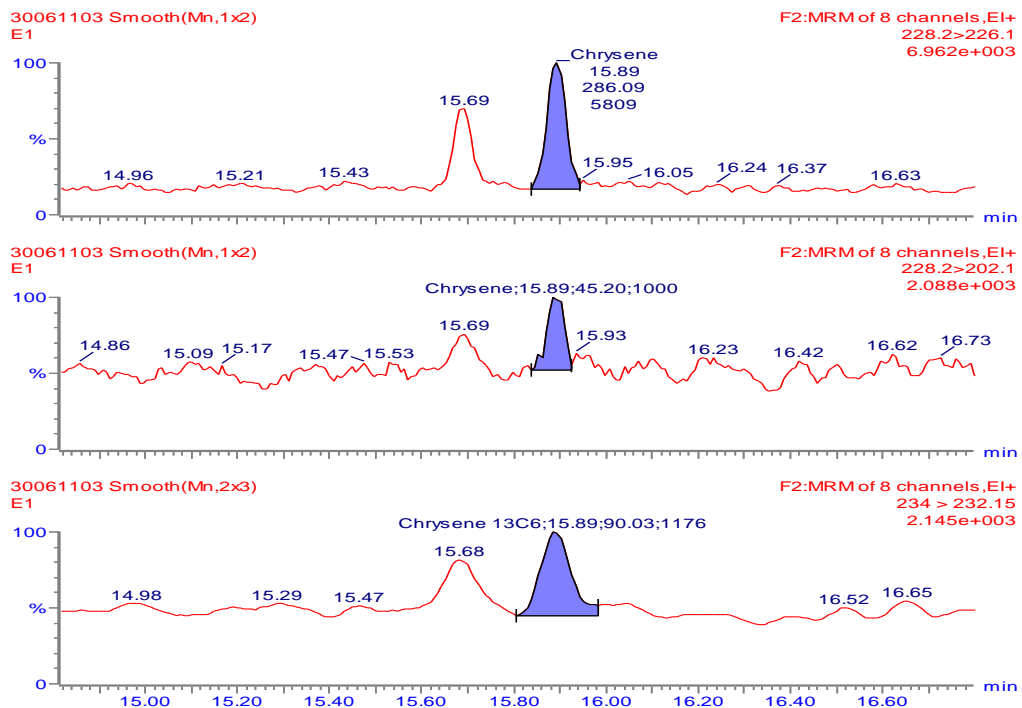
Kaavio 2. Envi-ChromP-pylvään SPE-protokolla



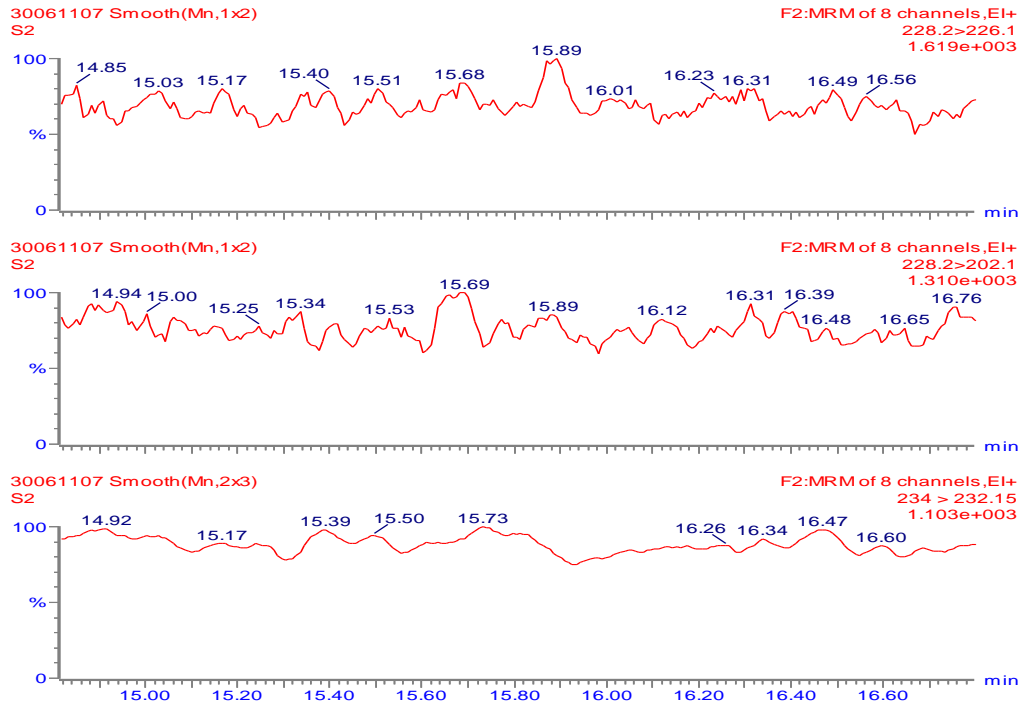
Ensimmäisen SPE-kokeen tulokset ovat taulukossa 5. Kuvioissa 9 - 12 näkyvät kryseenin kromatogrammit eri pylväillä puhdistettuna. Kuvista näkee, että ENVI-ChromP-pylväällä piikit erottuvat parhaiten.

Taulukko 5. Ensimmäisen SPE-kokeen ENVI-ChromP:n takaisinsäantoprosenttien keskiarvot, keskihajonnat ja CV %:t

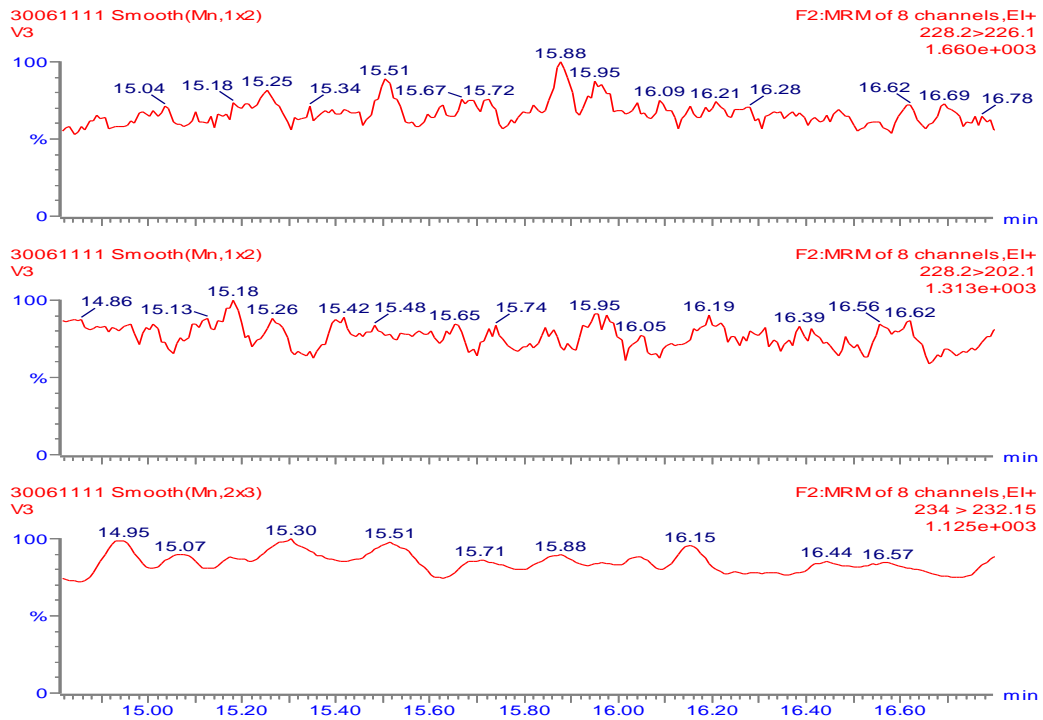
Yhdiste	ka %	sd %	CV%
Bentso(a)antraseeni	98,75	1,89	1,92
Kryseeni	133,96	28,28	21,11
Bentso(b)fluoranteeni	-	-	-
Bentso(a)pyreeni	106,93	29,52	27,61



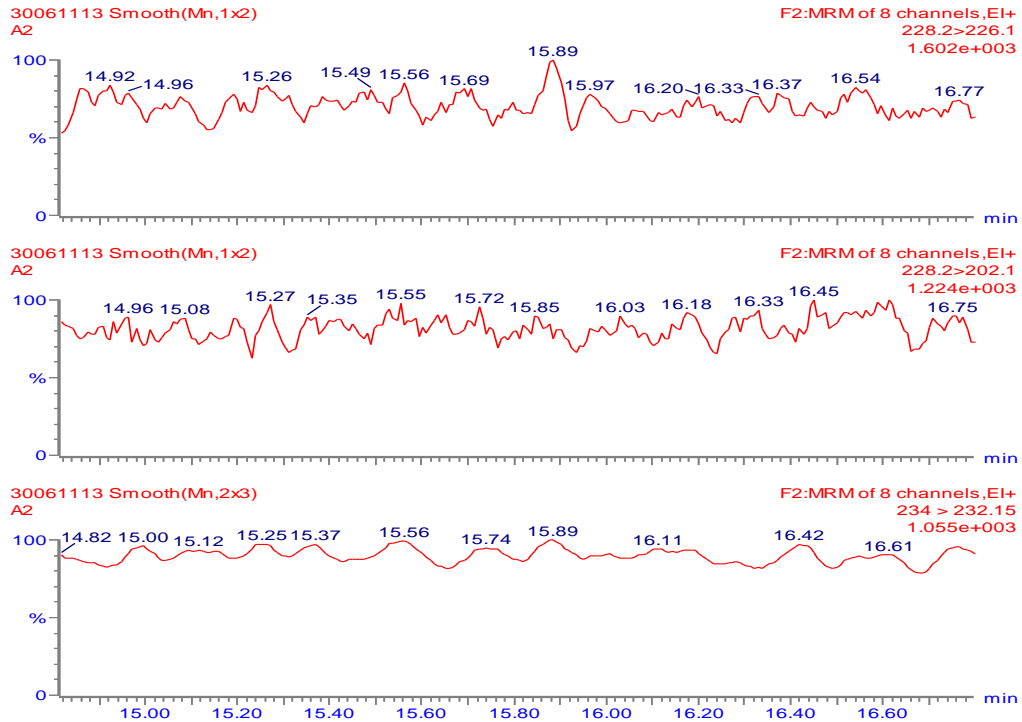
Kuvio 9. Kryseenin kromatogrammi, näyte puhdistettu ENVI-ChromP-pylväällä



Kuvio 10. Kryseenin kromatogrammi, näyte puhdistettu Strata PAH-pylväällä



Kuvio 11. Kryseenin kromatogrammi, näyte puhdistettu C18-pylväällä



Kuvio 12. Kryseenin kromatogrammi, näyte puhdistettu Alumina-pylvällä

Toinen SPE-testi:

Tulosten perusteella jatkettiin Envi-ChromP-pylvällä, johon tehtiin tavallinen SPE-protokolla ja pidennetty SPE-protokolla, jossa aluksi tehtiin kunnostus ja eluointi ja sen jälkeen normaali protokolla, Aluminalla ja kokeiltiin lisäksi Varianin SI silika-pylvästä. Aluminaan käytettävät liuottimet vaihdettiin ja kunnostukseen käytettiin 10 ml heksaania ja eluutioon 15 ml heksaani-dikloorimetaania suhteessa 1:2. Silika-pylvään liuottimena käytettiin vain sykloheksaania. Kunnostukseen käytettiin liuotinta 10 ml ja pesu/eluutioon 12 ml. Jokaisesta tehtiin kaksi rinnakkaista näytettä. Tulokset on esitetty taulukoissa 6 - 9.

Taulukko 6. Toisen SPE-kokeen bentso(a)antraseenin takaisinsaantoprosenttien keskiarvot, keskihajonnat ja CV %:t

	ka %	sd %	CV %
SI	107,19	10,83	10,10
Envi1	114,92	5,86	5,10
Envi2	125,16	2,65	2,12
Alumina	100,63	15,69	15,59

Taulukko 7. Toisen SPE-kokeen kryseenin takaisinsaantoprosenttien keskiarvot, keskihajonnat ja CV %:t

	ka %	sd %	CV %
SI	122,03	1,10	0,91
Envi1	121,80	0,77	0,63
Envi2	131,09	7,29	5,56
Alumina	137,73	15,14	10,99

Taulukko 8. Toisen SPE-kokeen bentso(b)fluoranteenin takaisinsaantoprosenttien keskiarvot, keskihajonnat ja CV %:t

	ka %	sd %	CV %
SI	106,88	10,61	9,92
Envi1	102,03	5,08	4,98
Envi2	106,33	13,37	12,57
Alumina	105,16	24,31	23,11

Taulukko 9. Toisen SPE-kokeen bentso(a)pyreenin takaisinsaantoprosenttien keskiarvot, keskihajonnat ja CV %:t

	ka %	sd %	CV %
SI	98,36	7,84	7,98
Envi1	90,86	12,48	13,74
Envi2	97,66	11,27	11,54
Alumina	101,02	3,65	3,61

Validoinnin testisarja

Seuraavaksi käytettiin spiikattua näytettä matriisissa. SPE-pylväinä käytettiin Varianin silika-pylvästä ja EnviChromP:tä, jolle oli tehty ylimääräinen alkukunnostus ja eluointi. Ne spiikattiin MRL-tasoilla 0,5, 1,0 ja 1,5 suoraan jauhelihaan ja jokaisesta MRL-tasosta tehtiin kaksi rinnakkaisnäytettä (*Maximum Residue Limit* = suurin sallittu pitoisuus). Lisäksi tehtiin kaksi nollanäytettä, joissa oli vain sisäinen standardi. Kuviossa 13 ovat kaikki testatut pylväät.



Kuvio 13. Testatut SPE-pylväät

Testisarjan näytteet, joissa oli käytetty silika-pylvästä, olivat liian rasvaisia laitettavaksi kaasukromatografiin. Niinpä tulokset saatiin vain ENVI-ChromP-pylväiden näytteistä. Testisarjan kaikkien näytteiden keskiarvot (saanto-%), keskihajonnat ja CV %:t löytyvät taulukosta 10. Keskiarvot ovat hyvät. Kryseenin saanto on koholla, niin kuin yleensä.

Taulukko 10. Testisarjan keskiarvot, hajonnat ja CV %:t (ENVI-ChromP-pylväs, 6 näytettä)

Yhdiste	Saanto-%	sd %	CV %
Bentso(a)antraseeni	104,97	14,54	13,85
Kryseeni	117,27	21,24	18,12
Bentso(b)fluoranteeni	101,05	15,23	15,07
Bentso(a)pyreeni	91,21	25,25	27,68

3.2 Näytteiden analysointi GC-MS/MS-laitteella

Näytteet ajettiin kaasukromatografi-tandemmassaspektrometrillä (Agilent 6890N, Waters Quattro Micro GC, kuviossa 14), jonka aikaikkunat ja analysoidut prekursori- ja tuoteionit ovat taulukossa 11. Olosuhteet ovat taulukossa 12. Massaspektrometrissä käytettiin positiivista elektroni-ionisaatiota ja yhdisteet detektoitiin MRM:llä (*multiple reaction monitoring*). Tulokset analysoitiin Watersin MassLynx-ohjelmalla. PAH4-yhdisteiden kromatogrammi on esitetty kuviossa 15.

Taulukko 11. Aikaikkunat

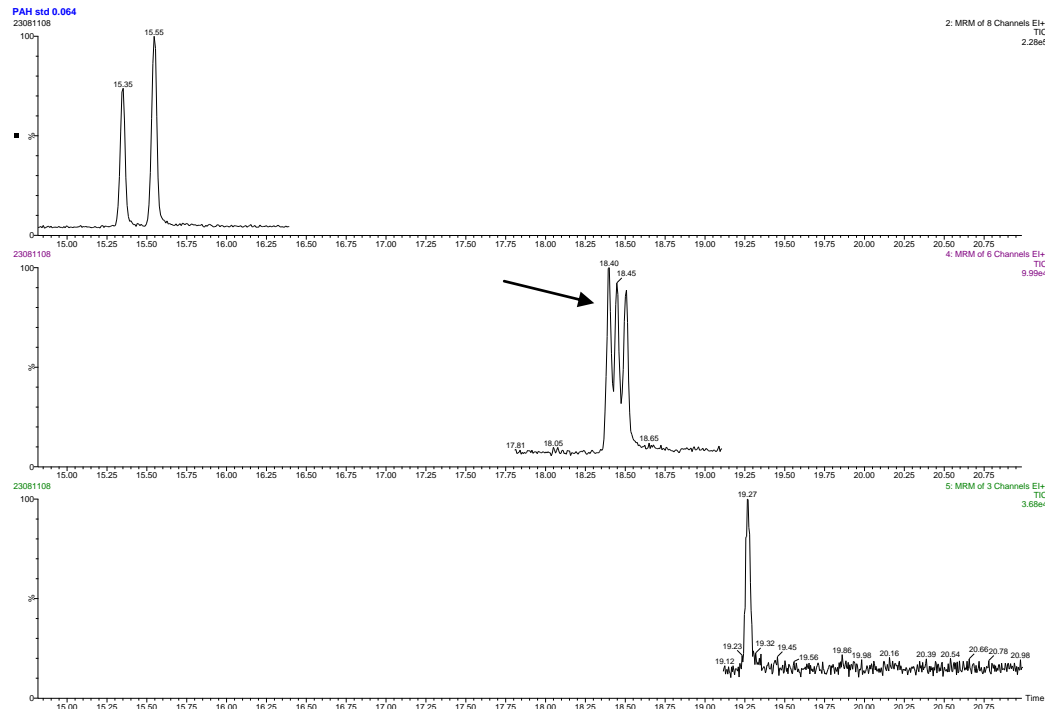
Aikaikkuna (min.)	Yhdiste m/z	Tuoteionit m/z
~ 15 - 16,8	Bentso(a)antraseeni 228.2	202.2, 226.2
	ISTD Bentso(a)antraseeni ¹³ C ₆ 234.0	232.2
	Kryseeni 228.2	202.1, 226.1
	ISTD Kryseeni ¹³ C ₆ 234.0	232.2
~ 16,9 - 18,2	Bentso(b)fluoranteeni 252.3	226.0, 250.1
	ISTD Bentso(b)fluoranteeni ¹³ C ₆ 258.0	256.2
~ 18,3 - 19,5	Bentso(a)pyreeni 252.3	226.2, 250.1
	ISTD Bentso(a)pyreeni ¹³ C ₄ 256.0	254.1

Taulukko 12. Kaasukromatografian olosuhteet

Injektioilavuus	1 μ l
Kantokaasu	Helium
Injektorin lämpötila	320 °C
<i>Interfacen</i> lämpötila	250 °C
Lämpötilaohjelma	80 °C
	15 °C /min -> 265 °C
	5 °C /min -> 290 °C
	20 °C /min -> 320 °C, 20 min
Ajoaika	38,83 min



Kuvio 14. Kaasukromatografi Agilent 6890N ja tandemmassaspektrometri Waters Micromass Quattro Micro GC.



Kuvio 15. Kromatogrammi PAH4-yhdisteistä (vasemmalta oikealle). Ylimpänä bentso(a)antraseeni ja kryseeni, keskellä bentso(b)fluoranteeni (ensimmäinen piikki), bentso(k)fluoranteeni ja bentso(j)fluoranteeni ja alimpana bentso(a)pyreeni.

3.3 Analyysimenetelmän validointi

Validointisarjoja tehtiin kaksi eri päivinä. Yhteen sarjaan kuului kuusi tai seitsemän nollanäytettä, matriisikalibrointisuora, jossa seitsemän pistettä, liuotinkalibrointisuora, jossa samat pisteet kuin matriisikalibrointisuorassa, sekä MRL-tasoilla 0,5, 1,0 ja 1,5 olevia näytteitä kuusi kappaletta kutakin. Matriisisuora väkevöitiin SPE:n jälkeen ennen viimeistä haihdutusta koko protokollan läpikäyneeseen liuottimeen. Kalibrointisuoran pitoisuudet validointisarjoissa olivat 0,0, 0,8, 2,5, 5,0, 7,5, 15 ja 30 µg/kg.

Validointi tehtiin soveltaen Eviran menetelmäohjetta 8806/3. Ensin punnittiin 0,5 g kylmäkuivattua jauhelihaa DCM:lla pestyihin ASE-sylintereihin, minkä jälkeen suoritettiin ASE-uutto heksaani-asetoni-liuottimella. Tämän jälkeen näytteet haihdutettiin sentrifugaalihaihduttimella yli 1 ml tilavuuteen ja uutettiin SPE:lla (Supelcon Supelclean ENVI-ChromP). SPE:n jälkeen näytteet haihdutettiin kuiviin ja liuotettiin 100 µl:an tolueneen.

4 Validointisarjojen tulokset ja tulosten tarkastelu

Menetelmän validoinnissa seurattiin seuraavia parametreja; spesifisyys, selektiivisyys, lineaarisuus, toistettavuus, sisäinen uusittavuus, takaisinsaanto, havaitsemis- ja määritysraja sekä mittausepävarmuus.

4.1 Spesifisyys ja selektiivisyys

Spesifisyys määritettiin nollanäytteistä, joihin oli pipetoitu vain sisäinen standardi. Nollanäytteitä oli 12 kpl. Bentso(a)antraseenilta ja kryseeniltä löytyi varmistusioni nollanäytteissä. Bentso(a)antraseenin nollanäytteissä löytyi varmistusioni 8/12 tapauksessa ja kryseenin nollanäytteissä löytyi varmistusioni 10/12 tapauksessa. Nollanäytteiden konsentraatioksi saatiin bentso(a)antraseenille 0,31 - 1,01 µg/kg ja kryseenille 0,91 - 1,85 µg/kg. Koska kryseeniä näytti olevan paljon ylimääräistä, sille tehtiin nollanäyttehennys, eli vähennettiin nollanäytteiden konsentraation keskiarvo väkevöityjen näytteiden konsentraatiosta. Koska PAH-yhdisteet ovat ympäristökontaminantteja, niitä voi löytyä nollanäytteestäkin. Lisäksi kryseenin korkeaan saantoon voi vaikuttaa se, että trifenyleenillä on sama retentioaika kuin kryseenillä. Koska lainsäädäntö edellyttää myös kryseenin määrän mittausta, on nykyään kehitetty erikoiskolonne, joka erottaa kryseenin ja trifenyleenin toisistaan [43].

Lainsäädännön mukaan menetelmän spesifisyyttä arvioidaan kahden tuoteionin detektiolla oikeassa suhteessa. Liutinsuorien jokaisesta pisteestä laskettiin kvantitointi-ionin ja varmennusionin välinen ionisuhde, kvantitointi-ionin toimiessa pääpiikkinä. Ionien suhteellisten intensiteettien toleranssit on laskettu myös lainsäädäntöön perustuen. Taulukossa 13 on kahden päivän väkevöityjen näytteiden ionisuhdeiden keskiarvo ja laskettu toleranssiväli. Kaikki keskiarvot osuvat toleranssin rajoihin. [44]

Taulukko 13. PAH4-yhdisteiden ionisuhteiden toleranssirajat ja kahden päivän keskiarvo

Yhdiste	Ionisuhteen ka	Sallittu ionisuhteen
		toleranssi
Bentso(a)antraseeni	5,48	4,21 - 7,83
Kryseeni	5,12	3,94 - 7,31
Bentso(b)fluoranteeni	6,49	5,00 - 9,28
Bentso(a)pyreeni	5,94	4,57 - 8,48

Selektiivisyyttä määritettiin SSE-prosentilla (*signal suppression enhancement*), joka lasketaan seuraavasti (kaava 2):

$$\frac{K_M}{K_S} * 100 = SSE\% , \quad (2)$$

jossa K_M on matriisisuoran kulmakerroin ja K_S liuotinsuoran kulmakerroin. SSE-prosentille ei ole varsinaisesti ole raja-arvoja, mutta mitä lähempänä arvo on sataa, sitä yhteneväisemmät liuotinsuora ja matriisisuora ovat ja matriisivaikutus on pieni. Liuotin- ja matriisisuorien kulmakertoimia vertaamalla saattoi myös päätellä, että tuloksia laskettaessa voi käyttää liuotinsuoran tuloksia ja tulevaisuudessa tehtäessä PAH-analyysjä lihasta voidaan valmistaa liuotinsuora matriisisuoran sijasta. Taulukossa 14 näkyy ensimmäisen ja toisen validointipäivän SSE-prosentit.

Taulukko 14. Selektiivisyys

Yhdiste	SSE %	
	1. päivä	2. päivä
Bentso(a)antraseeni	104,1	110,8
Kryseeni	101,3	109,2
Bentso(b)fluoranteeni	115,3	109,1
Bentso(a)pyreeni	112,3	102,5

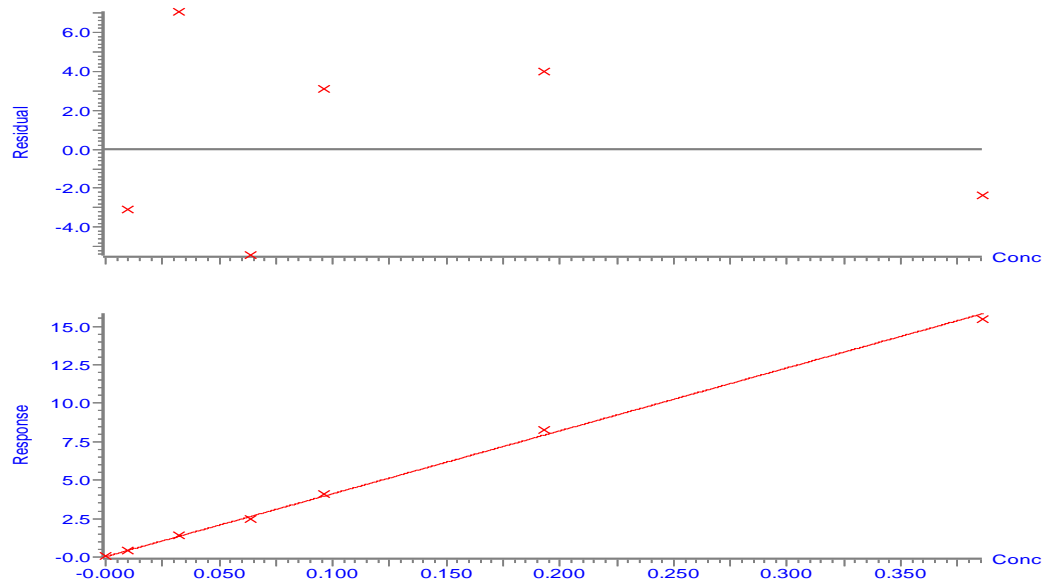
4.2 Lineaarisuus

Lineaarisuus määritettiin liuotinsuoran pisteiden residuaaliarvojen perusteella. Mass-Lynx-ohjelma laskee residuaaliarvot. Residuaaliarvot jakautuvat suoran molemmille puolille tasaisesti, jos menetelmä on lineaarinen. Lineaarisuus on erinomainen jos residuaalit poikkeavat suorasta $\pm 10\%$. Jos yksi piste poikkeaa enemmän kuin $\pm 10\%$ lineaarisuus on hyvä ja jos kaksi pistettä poikkeaa enemmän kuin $\pm 10\%$ on lineaarisuus tyydyttävä. Taulukossa 15 on kahden päivän liuotinsuorien lineaarisuudet. Kuvioiden 16 - 23 näkyvät ensimmäisen ja toisen validointisarjan liuotinsuorat ja residuaalit PAH4-yhdisteille.

Taulukko 15. Lineaarisuus (liuotinsuora)

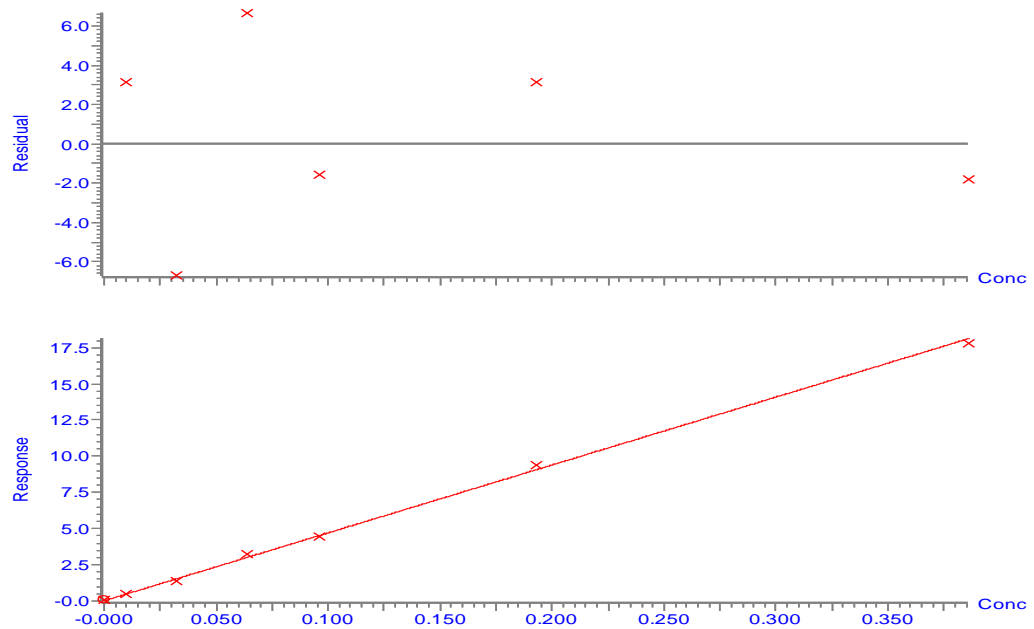
Yhdiste	Lineaarisuus	
	1. päivä	2. päivä
Bentso(a)antraseeni	erinomainen	erinomainen
Kryseeni	erinomainen	erinomainen
Bentso(b)fluoranteeni	hyvä	hyvä
Bentso(a)pyreeni	erinomainen	tyydyttävä

Compound name: Benz(a)anthracene
 Correlation coefficient: $r = 0.999246$, $r^2 = 0.998493$
 Calibration curve: $40.8978 * x + 0.0259477$
 Response type: Internal Std (Ref 1), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None



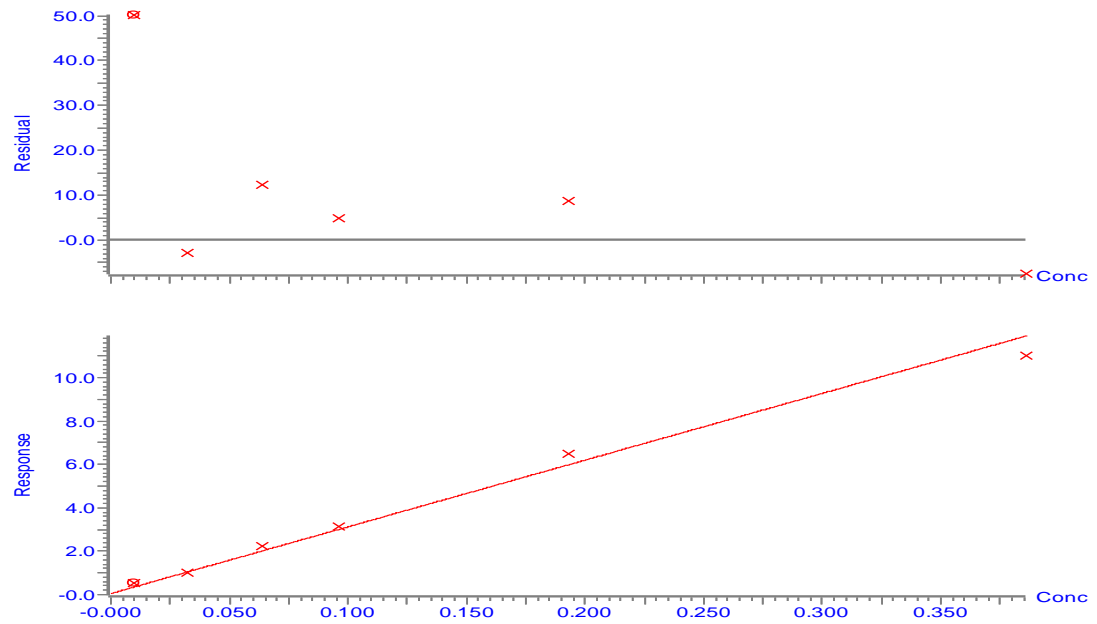
Kuvio 16. 1. validointisarjan bentso(a)antraseenin residuaaliarvot ja liuotinsuora.

Compound name: Chrysene
 Correlation coefficient: $r = 0.999397$, $r^2 = 0.998794$
 Calibration curve: $46.9154 * x + 0.0133301$
 Response type: Internal Std (Ref 2), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None



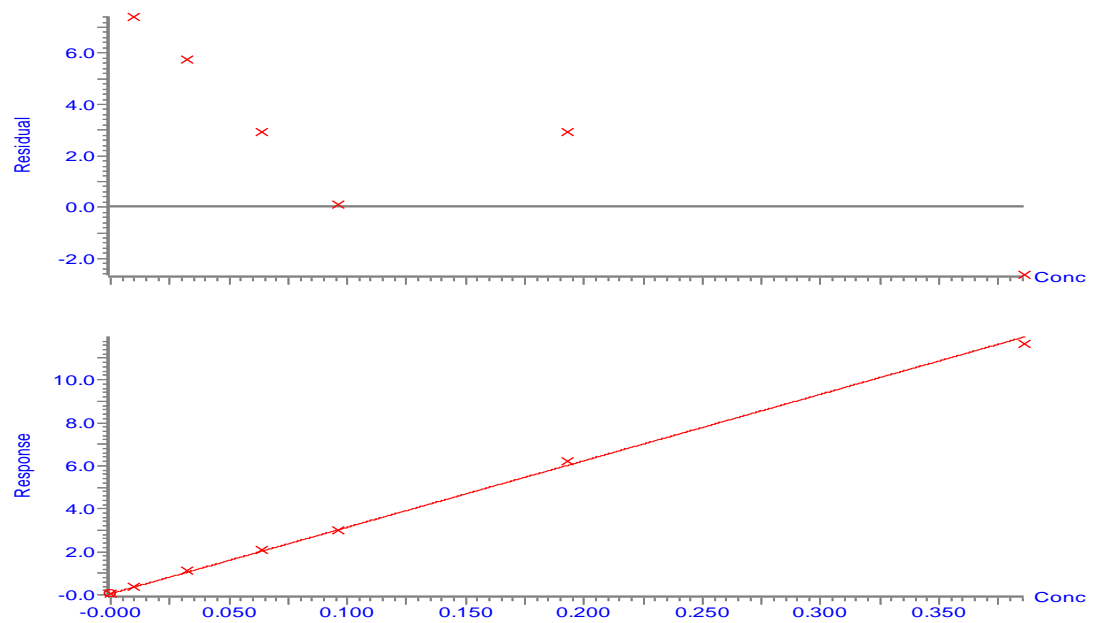
Kuvio 17. 1. validointisarjan kryseenin residuaaliarvot ja liuotinsuora.

Compound name: Benzo(b)fluoranthene
 Correlation coefficient: $r = 0.995892$, $r^2 = 0.991800$
 Calibration curve: $30.7462 * x + 0.0484703$
 Response type: Internal Std (Ref 3), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None



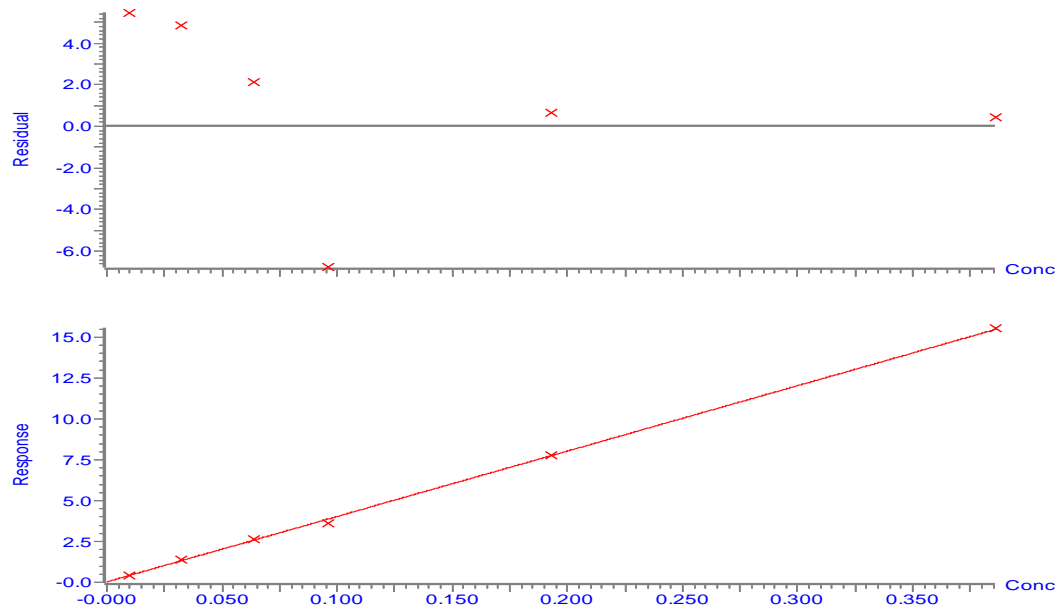
Kuvio 18. 1. validointisarjan bentso(b)fluoranteenin residuaaliarvot ja liuotinsuora.

Compound name: Benzo(a)pyrene
 Correlation coefficient: $r = 0.999291$, $r^2 = 0.998582$
 Calibration curve: $30.9284 * x + 0.0508521$
 Response type: Internal Std (Ref 4), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None



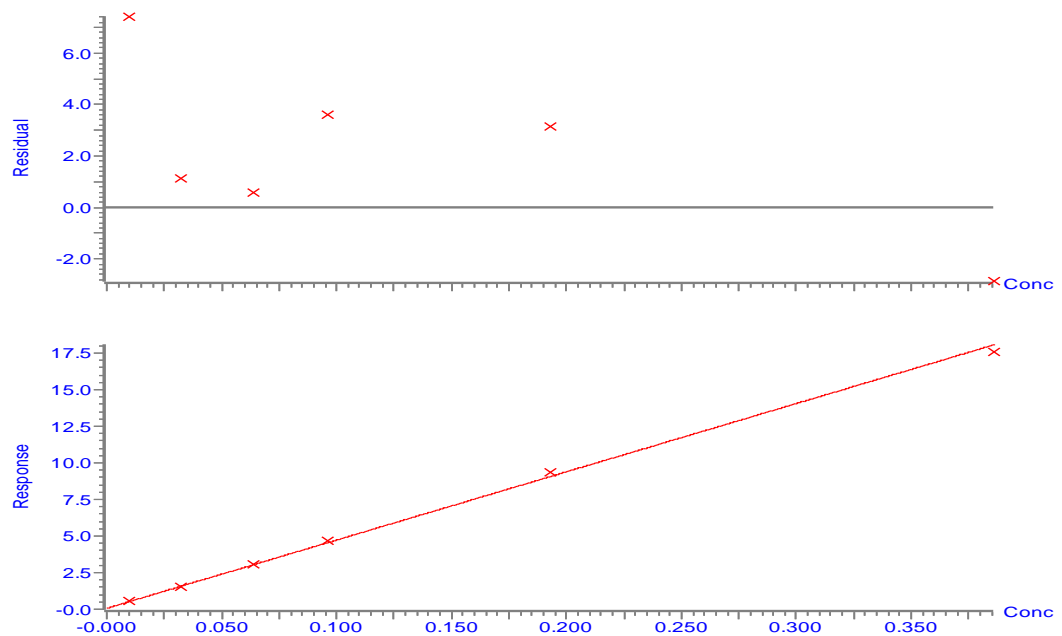
Kuvio 19. 1. validointisarjan bentso(a)pyreenin residuaaliarvot ja liuotinsuora.

Compound name: Benz(a)anthracene
 Correlation coefficient: $r = 0.999508$, $r^2 = 0.999017$
 Calibration curve: $40.0224 * x + 0.0272186$
 Response type: Internal Std (Ref 1), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None



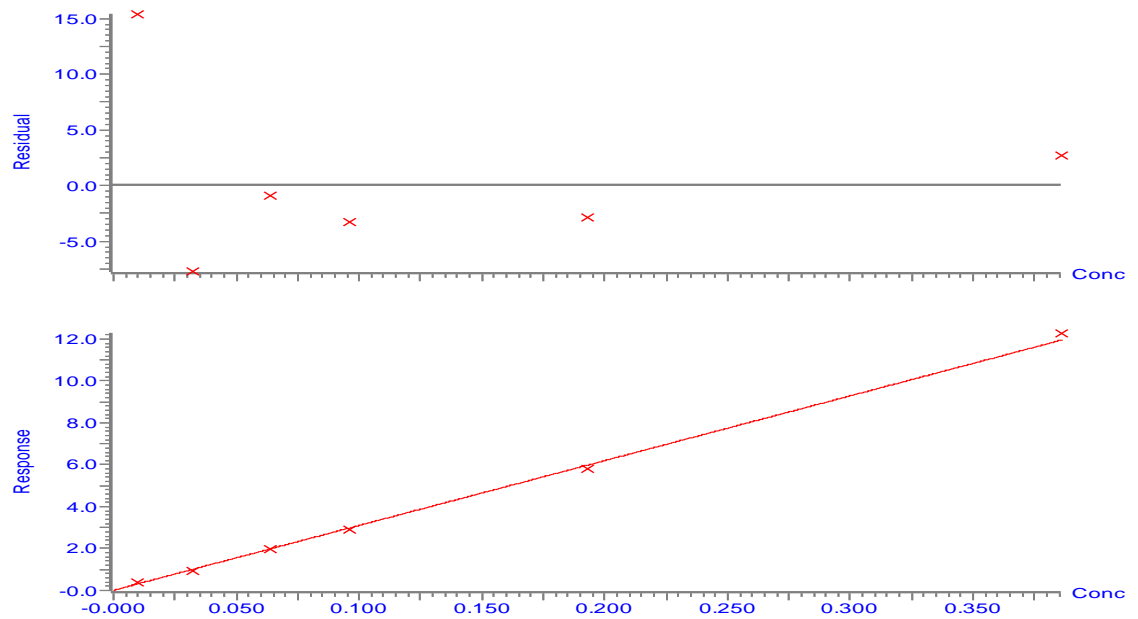
Kuvio 20. 2. validointisarjan bentso(a)antraseenin residuaaliarvot ja liuotinsuora.

Compound name: Chrysene
 Correlation coefficient: $r = 0.999329$, $r^2 = 0.998659$
 Calibration curve: $46.6356 * x + 0.0607882$
 Response type: Internal Std (Ref 2), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None



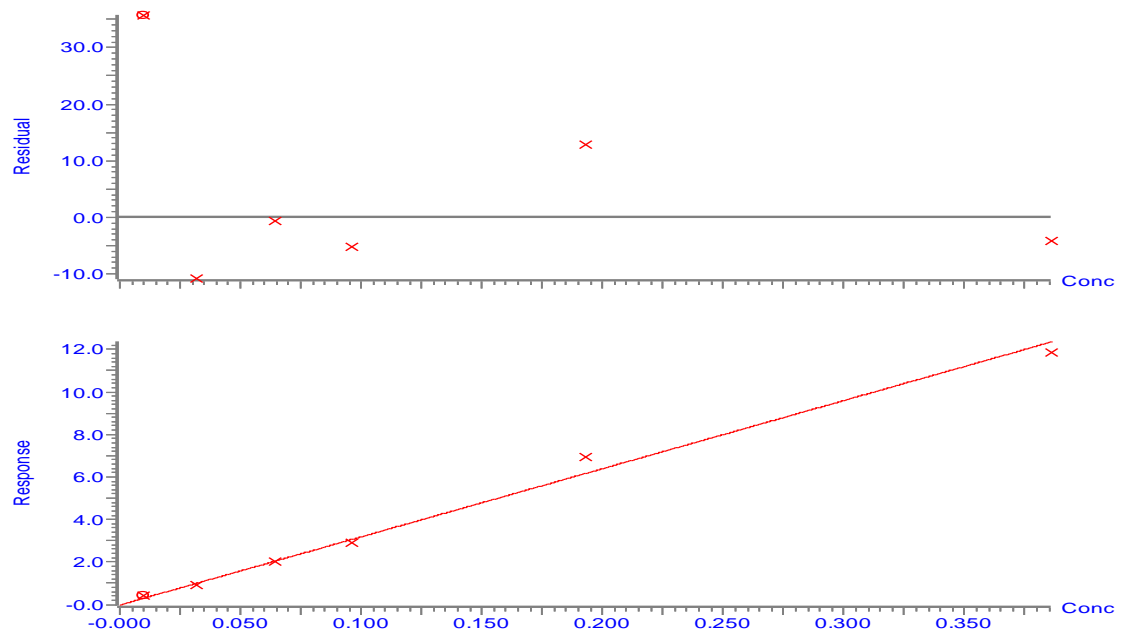
Kuvio 21. 2. validointisarjan kryseenin residuaaliarvot ja liuotinsuora.

Compound name: Benzo(b)fluoranthene
 Correlation coefficient: $r = 0.999239$, $r^2 = 0.998478$
 Calibration curve: $30.9375 * x + 0.00989982$
 Response type: Internal Std (Ref 3), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Kuvio 22. 2. validointisarjan bentso(b)fluoranteenin residuaaliarvot ja liuotinsuora.

Compound name: Benzo(a)pyrene
 Correlation coefficient: $r = 0.996386$, $r^2 = 0.992786$
 Calibration curve: $32.0596 * x + -0.0253482$
 Response type: Internal Std (Ref 4), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Kuvio 23. 2. validointisarjan bentso(a)pyreenin residuaaliarvot ja liuotinsuora.

4.3 Toistettavuus ja sisäinen uusittavuus

Menetelmän toistettavuus määritettiin spiikatuilla rinnakkaisnäytteillä, joita oli kolme pitoisuustasoa; 2,5 µg/kg, 5,0 µg/kg ja 7,5 µg/kg. Määrittelyssä vertailtiin kahden eri päivän tuloksia. Toistettavuudessa tarkastellaan toistotarkkuutta saman päivän sisällä. Toistettavuudet PAH4-yhdisteille löytyvät taulukoista 16 - 18.

Taulukko 16. Toistettavuus
2,5 µg/kg

Yhdiste	1. päivä			2. päivä		
	ka. (µg/kg)	sd. (µg/kg)	CV %	ka. (µg/kg)	sd. (µg/kg)	CV %
Bentso(a)antraseeni	2,69	0,26	9,81	2,83	0,16	5,66
Kryseeni	2,29	0,33	14,45	2,62	0,21	7,94
Bentso(b)fluoranteeni	2,71	0,25	9,26	2,84	0,13	4,52
Bentso(a)pyreeni	2,77	0,17	6,30	2,95	0,02	0,84

Taulukko 17. Toistettavuus
5,0 µg/kg

Yhdiste	1. päivä			2. päivä		
	ka. (µg/kg)	sd. (µg/kg)	CV %	ka. (µg/kg)	sd. (µg/kg)	CV %
Bentso(a)antraseeni	5,32	0,57	10,69	5,21	0,46	8,92
Kryseeni	4,66	0,21	4,42	5,30	0,43	8,02
Bentso(b)fluoranteeni	5,61	0,27	4,77	5,40	0,47	8,69
Bentso(a)pyreeni	5,60	0,26	4,61	5,62	0,20	3,62

Taulukko 18. Toistettavuus
7,5 µg/kg

Yhdiste	1. päivä			2. päivä		
	ka. (µg/kg)	sd. (µg/kg)	CV %	ka. (µg/kg)	sd. (µg/kg)	CV %
Bentso(a)antraseeni	7,59	0,75	9,94	8,09	0,83	10,22
Kryseeni	7,22	0,41	5,65	7,08	0,58	8,22
Bentso(b)fluoranteeni	7,69	0,49	6,32	8,53	0,57	6,71
Bentso(a)pyreeni	8,11	0,64	7,95	8,58	0,41	4,79

Sisäinen uusittavuus tarkoittaa sillä tavoin saavutettua täsmällisyyttä, että määritykset tehdään samassa laboratoriossa useana eri päivänä. Menetelmän sisäisen uusittavuuden arvioimisen käytettiin samoja näytteitä kuin toistettavuuden arvioimiseen. Tulokset ovat taulukoissa 19 - 21.

Taulukko 19. Sisäinen uusittavuus pitoisuudella
2,5 µg/kg

Yhdiste	ka (µg/kg)	sd (µg/kg)	CV %
Bentso(a)antraseeni	2,76	0,21	7,74
Kryseeni	2,45	0,31	12,83
Bentso(b)fluoranteeni	2,78	0,19	6,89
Bentso(a)pyreeni	2,86	0,10	3,57

Taulukko 20. Sisäinen uusittavuus pitoisuudella
5,0 µg/kg

Yhdiste	ka (µg/kg)	sd (µg/kg)	CV %
Bentso(a)antraseeni	5,27	0,52	9,80
Kryseeni	5,01	0,47	9,37
Bentso(b)fluoranteeni	5,50	0,37	6,73
Bentso(a)pyreeni	5,61	0,23	4,11

Taulukko 21. Sisäinen uusittavuus pitoisuudella
7,5 µg/kg

Yhdiste	ka (µg/kg)	sd (µg/kg)	CV %
Bentso(a)antraseeni	7,84	0,79	10,08
Kryseeni	7,15	0,48	6,78
Bentso(b)fluoranteeni	8,11	0,53	6,51
Bentso(a)pyreeni	8,35	0,53	6,37

4.4 Takaisinsaanto

Takaisinsaanto lasketaan prosentteina määritetystä pitoisuudesta verrattuna alkuperäiseen väkevöityyn konsentraatioon. Tässä validoinnissa ei käytetty sertifioitua vertailumateriaalia, joten takaisinsaanto laskettiin sisäisellä standardilla spiikatuilla nollamatriisinäytteillä kolmella eri pitoisuustasolla. Lainsäädännön mukaan takaisinsaantoprosentin pitäisi olla 50 - 120 %, joten tulokset menevät rajoihin hyvin. Takaisinsaannot ovat taulukoissa 22 - 24.

Taulukko 22. Takaisinsaanto 2,5 µg/kg

Yhdiste	1. päivä	2. päivä	1.-2. päivä		
	rec-% ka.	rec-% ka.	rec-% ka.	rec-% sd.	rec-% CV %
Bentso(a)antraseeni	108,1	113,8	110,9	9,0	8,1
Kryseeni	91,9	99,6	98,5	12,6	12,8
Bentso(b)fluoranteeni	108,9	114,1	111,5	8,1	7,3
Bentso(a)pyreeni	111,3	118,6	115,0	6,0	5,3

Taulukko 23. Takaisinsaanto 5,0 µg/kg

Yhdiste	1. päivä	2. päivä	1.-2. päivä		
	rec-% ka.	rec-% ka.	rec-% ka.	rec-% sd.	rec-% CV%
Bentso(a)antraseeni	107,0	104,5	105,7	9,8	9,3
Kryseeni	93,7	103,0	100,6	9,4	9,3
Bentso(b)fluoranteeni	112,8	108,2	110,5	7,8	7,1
Bentso(a)pyreeni	112,5	112,7	112,6	4,5	4,0

Taulukko 24. Takaisinsaan-
to 7,5 µg/kg

Yhdiste	1. päivä	2. päivä	1.-2. päivä		
	rec-% ka.	rec-% ka.	rec-% ka.	rec-% sd.	rec-% CV%
Bentso(a)antraseeni	101,7	108,2	104,9	10,7	10,2
Kryseeni	96,7	91,2	95,7	6,5	6,8
Bentso(b)fluoranteeni	102,9	114,0	108,5	8,9	8,2
Bentso(a)pyreeni	108,6	114,8	111,7	7,6	6,8

4.5 Tarkkuus

Analyysimenetelmän tarkkuutta tutkittiin HORRAT-arvolla. Horwitzin yhtälö ei suoraan sovellu pitoisuuksille, jotka ovat alle 100 µg/kg (direktiivi 2002/657/EY). PAH-yhdisteille raja-arvot ovat niin pienet, että pitoisuuksien tarkasteluun käytetään HORRATia. HORRAT_r-arvo kertoo, miten tosiasiallinen määritetty tarkkuus vertautuu Horwitzin kaavalle. Virallisesti HORRAT_r-arvo on RSD_r jaettuna RSD_r arvolla, joka on estimoitu muutetusta Horwitzin yhtälöstä käyttäen oletusta $r = 0,66 R$ (EU 836/2011). HORRAT perustuu Horwitzin yhtälöllä laskettujen ja omien toistettavuustuloksien suhteellisten keskihajontojen vertailuun. [45] HORRAT_r-arvo lasketaan toistettavuustuloksista. HORRAT_r -arvot ovat taulukossa 25. HORRAT_r -arvon pitäisi olla alle 2, joten ne menevät rajoihin.

Taulukko 25. PAH4-yhdisteiden HORRAT(r)-arvot (laskettuna takaisinsaanto-arvoista) eri lisäystasoilla

Yhdiste	HORRAT (r) (2,5 ppb)	HORRAT (r) (5,0 ppb)	HORRAT (r) (7,5 ppb)
Bentso(a)antraseeni	0,310	0,397	0,460
Kryseeni	0,487	0,396	0,302
Bentso(b)fluoranteeni	0,281	0,303	0,376
Bentso(a)pyreeni	0,207	0,167	0,313

4.6 Havaitsemis- ja määrittämissrajat

EU asettaa havaitsemis- ja määrittämissrajojen (LOD ja LOQ) arvoiksi $\leq 0,3 \mu\text{g}/\text{kg}$ ja $\leq 0,9 \mu\text{g}/\text{kg}$. Laskennallinen havaitsemisraja (LOD) määritettiin laskemalla nollanäytteiden taustakohinan (pinta-ala) keskiarvo ja lisäämällä siihen 3 x nollanäytteiden keskihajonta. Verrantoon käytettiin matriisivalidointisuoran pienintä pistettä, jonka avulla lasketaan nollanäytteiden keskiarvon konsentraatio.

Määrittämissraja eli LOQ-arvo määritettiin laskemalla nollanäytteiden taustakohinan (pinta-ala) keskiarvo ja lisäämällä siihen 10 x nollanäytteiden keskihajonta. Verrantoon käytettiin taas matriisivalidointisuoran pienintä pistettä, jonka avulla laskettiin nollanäytteiden keskiarvon konsentraatio. Laskennalliset LOD- ja LOQ-arvot ovat taulukossa 26. Taulukosta nähdään, että laskennalliset rajat eivät täytä kriteerejä. Selektiivisyyttä arvioidessa havaittiin, ettei matriisikalibrointisuorassa ja liuotinkalibrointisuorassa ole havaittavissa matriisivaikutusta, joten liuotinkalibrointisuoraa voi käyttää määrittäessä LOD- ja LOQ-arvoja. Jos käytetään liuotinkalibrointisuoraa LOD- ja LOQ-arvojen määrittämisessä, voidaan todeta, että LOQ-arvoksi saadaan vähintään $0,80 \mu\text{g}/\text{kg}$ ja LOD-arvoksi on sovittu $1/3$ LOQ:sta, joten LOD-arvoksi saadaan vähintään $0,27 \mu\text{g}/\text{kg}$, joten molemmat menevät lainsäädännön rajoihin.

Taulukko 26. Laskennalliset havaitsemis- ja määritysrajat laskettuna matriisikalibrointisuorasta

Yhdiste	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Bentso(a)antraseeni	0,48	1,19
Kryseeni	1,39	3,48
Bentso(b)fluoranteeni	0,55	1,36
Bentso(a)pyreeni	0,33	0,80

4.7 Mittausepävarmuus

Laajennetut mittausepävarmuudet 95 %:n luottamustasolla on ilmoitettu prosentteina ja ne on laskettu NMKL Procedure No. 5:n mukaan. Tulokset ovat taulukossa 27.

Taulukko 27. Laajennetut mittausepävarmuudet

Yhdiste	Laajennettu mittausepävarmuus (%)		
	2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	5,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	7,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Bentso(a)antraseeni	15,5	19,6	20,2
Kryseeni	25,7	18,7	13,6
Bentso(b)fluoranteeni	13,8	13,5	13,0
Bentso(a)pyreeni	7,1	8,2	12,7

Kaiken kaikkiaan kahden validointisarjan tulokset täyttivät lainsäädännön kriteerit, joten sarjat olivat siltä osin onnistuneita.

5 Päätelmät

Tämän työn tarkoituksena oli kehittää menetelmä PAH4-yhdisteiden määrittämiseksi lihamatriisista. Työhön kuului erilaisten SPE-pylväiden testaamista ja sentrifugaalihaihduttimen käyttöönotto.

Sentrifugaalihaihduttimen kohdalla todettiin, että sitä voi käyttää myös tässä menetelmässä. Adaptereilla saatiin konsentroitua näyte tarpeeksi pieneen tilavuuteen ennen SPE-uuttoa.

Kiinteäfaasiuuttopylväistä todettiin nykyisten pylväiden olevan soveliaimpia tähän menetelmään kaikista testatuista pylväistä.

Validointisarjoja ehdittiin tekemään kaksi. Sarjojen tulokset täyttivät lainsäädännön kriteerit, joten ne olivat siltä osin onnistuneita. Myöhemmin on tehty myös kolmas sarja ja kehitetyllä menetelmällä on osallistuttu syksyllä 2011 FAPAKSEN järjestämään laboratorioiden väliseen vertailututkimukseen, jossa näytteenä oli savustettua lihaa. Menestyminen siinä oli erinomainen.

Lähteet

- 1 Euroopan komissio. 2007. Komission asetus (EY) N:o 333/2007. Verkkodokumentti. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:088:0029:0038:FI:PDF>. 29.3.2007. Viitattu 26.2.2012.
- 2 Euroopan komissio. 2011. Komission asetus (EY) N:o 835/2011. Verkkodokumentti. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:215:0004:0008:FI:PDF>. 20.8.2011. Viitattu 26.2.2012.
- 3 Simon, Rupert, Gomez Ruiz, José Angel, von Holst, Christoph, Wenzl, Thomas & Anklam, Elke. 2008. *Results of a European inter-laboratory comparison study on the determination of EU priority PAHs. Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Volume 391, s. 1397-1408.
- 4 Wenzl, Thomas, Simon, Rupert, Anklam, Elke & Kleiner Juliane. 2006. *Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union. Trends in Analytical Chemistry*. Volume 25. Issue 7, s. 716-725.
- 5 Poster, Dianne L. Schantz, Michele M. Sander, Lane C. & Wise, Stephen A. 2006. *Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples: a critical review of gas chromatographic (GC) methods. Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Volume 386, s. 859-881.
- 6 Euroopan elintarviketurvallisuusvirasto. 2007. *Findings of the EFSA Data Collection on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food*. Verkkodokumentti. <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/33r.pdf>. Viitattu 5/2010.
- 7 Phillips, David H. 1999. *Polycyclic aromatic hydrocarbons in food. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. Volume 443, s. 139-147.
- 8 Simon, Rupert, de la Calle, Beatriz, Palme, Sonja, Meier, Dietrich & Anklam, Elke. 2005. *Composition and analysis of liquid smoke flavouring primary products. Journal of Separation Science*. Volume 28, s. 871-882.
- 9 Moret, Sabrina & Conte, Lanfranco S. 2000. *Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical methods. Journal of chromatography A*. Volume 882, s. 245-253.

- 10 *International Agency of Research on Cancer. Overall evaluation of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs*, vol. 1-42, *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Suppl. 7*, IARC, Lyon 1987.
- 11 *U.S. Department of Health and Human Services. 1995. Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons*. Verkkodokumentti. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69.pdf>. 8/1995. Viitattu 17.8.2011.
- 12 Plaza-Bolaños, Patricia, Garrido Frenich, Antonia & Martínez Vidal, José Luis. 2010. *Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. Analytical methods and trends*. *Journal of chromatography A*, 1217, s. 6303-6326.
- 13 Wang, Guangdi, Lee, Arthur S. Lewis, Monique, Kamath, Burde & Archer, Renita K. 1999. *Accelerated Solvent Extraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry for Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Smoked Food Samples*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry. Volume 47*, s. 1062-1066.
- 14 Euroopan komissio. 2006. Komission asetus (EY) N:o 1881/2006. Verkkodokumentti. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:FI:PDF>. 20.12.2006. Viitattu 26.2.2012.
- 15 Euroopan komissio. 2011. Komission asetus (EY) N:o 836/2011. Verkkodokumentti. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:215:0009:0016:FI:PDF>. 20.8.2011. Viitattu 26.2.2012.
- 16 Jira, Wolfgang. 2004. *A GC/MS method for the determination of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in smoked meat products and liquid smokes*. *European Food Research and Technology. Volume 218*, s. 208-212.
- 17 DjinoVIC, Jasna, Popovic, Aleksandar & Jira, Wolfgang. 2008. *Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in traditional and industrial smoked beef and pork ham from Serbia*. *European Food Research and Technology. Volume 227*, s. 1191-1198.
- 18 Martin, Diana & Ruiz, Jorge. 2007. *Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in solid matrixes by solid-phase microextraction coupled to a direct extraction device*. *Talanta. Volume 71*, s. 751-757.
- 19 Millrock Technology. Inc. *Freeze Drying/Lyophilization Info Online/Process – Freeze Drying*. Verkkodokumentti. <http://www.freezedryinginfo.com/Process.html>. 2009. Viitattu 9.4.2012.

- 20 Pawliszyn, Janusz. 2005. *Sampling and sample preparation for field and laboratory*. Verkkodokumentti. http://books.google.fi/books?id=N3Es-WvRoZcC&pg=PA945&lpq=PA945&dq=basis+accelerated+solvent+extraction&source=bl&ots=rShWLIaZnM&sig=zZBqki-PJ_8P2sDB1Xp8ZACRv-Y&hl=fi&sa=X&ei=BwFjT8aFMMj64QTj9dn8Bw&ved=0CFsQ6AEwBw#v=onepage&q=basis%20accelerated%20solvent%20extraction&f=false. Viitattu 16.3.2012.
- 21 PLD Finland/Genevac. 2011. Verkkodokumentti. <http://www.pld.fi/supp/Sampleprep/genevac.htm>. Viitattu 25.3.2012.
- 22 PLD Finland/Genevac. 2011. Verkkodokumentti. http://www.pld.fi/supp/Sampleprep/genevac_dripure.htm. Viitattu 25.3.2012.
- 23 Genevacin uutiskirje 2.6, syyskuu 2008. Lainattu 9.4. 2012
- 24 Veyrand, Bruno, Brosseau, Aline, Sarcher, Ludovic, Varlet, Vincent, Monteau, Fabrice, Marchand, Philippe, Andre, François & le Bizec, Bruno. 2007. *Innovative method for determination of 19 polycyclic aromatic hydrocarbons in food and oil samples using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry*. *Journal of chromatography A*, 1149, s. 333-344.
- 25 Marcé, R.M. & Borrull, F. 2000. *Solid-phase extraction of polycyclic aromatic compounds*. *Journal of chromatography A*, 885, s. 273-290.
- 26 Gómez-Ruiz, José Ángel & Wenzl, Thomas. 2009. *Evaluation of gas chromatography columns for the analysis of the 15+1 EU-priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Volume 393, s. 1697-1707.
- 27 DjinoVIC, Jasna, Popovic, Aleksandar & Jira, Wolfgang. 2008. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in different types of smoked meat products in Serbia*. *Meat Science*. Volume 80, s. 449-456
- 28 Purcaro, Giorgia, Morrison, Paul, Moret, Sabrina, Conte, Lanfranco S. & Marriott, Philip J. 2007. *Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils using solid phase microextraction-comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry*. *Journal of chromatography A*. Volume 1161, s. 284-291.
- 29 Šimko, Peter. 2002. *Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives*. *Journal of chromatography B*. Volume 770, s. 3-18.

- 30 Diletti, Gianfranco, Scortichini, Giampiero, Scarpone, Rossana, Gatti, Giuseppe, Torreti, Luigi & Migliorati, Giacomo. 2005. *Isotope dilution determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in olive pomace oil by gas chromatography-mass spectrometry. Journal of chromatography A. Volume 1062, s. 247-254.*
- 31 Ballesteros, E. García Sánchez A. & Ramos Martos N. 2006. *Simultaneous multidetermination of residues of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in olive and olive-pomace oils by gas chromatography/tandem mass spectrometry. Journal of chromatography A. Volume 1111, s. 89-96.*
- 32 Purcaro, Giorgia, Moret, Sabrina & Conte, Lanfranco S. 2007. *Rapid validated method for the analysis of benzo[a]pyrene in vegetable oils by using solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. Journal of chromatography A. Volume 1176, s. 231-235.*
- 33 Houessou, Justin Koffi, Delteil, Corine & Camel, Valérie. 2006. *Investigation of Sample Treatment Steps for the Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Ground Coffee. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Volume 54, s. 7413-7421.*
- 34 Gomes Zuin, Vânia, Montero, Larisse, Bauer, Coretta & Popp, Peter. 2005. *Stir bar sorptive extraction and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Mate teas. Journal of chromatography A. Volume 1091, s. 2-10.*
- 35 Rodil, Rosario, Schellin, Manuela & Popp, Peter. 2007. *Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and beverages using membrane-assisted solvent extraction in combination with large volume injection-gas chromatography-mass spectrometric detection. Journal of chromatography A. Volume 1163, s. 288-297.*
- 36 Jie, Fang & Kai-Xiong, Wang. 2007. *Multiresidual Analysis of Organochlorine Pesticides, Polychlorinated Biphenyls and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Marine Shellfishes by Gas Chromatography-Ion Trap Mass Spectrometry. Chinese Journal of Analytical Chemistry. Volume 35, s. 1607-1613.*
- 37 Anyakora, Chimezie, Ogbeche, Anthony, Palmer, Pete & Coker, Herbert. 2005. *Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in marine samples of Siokolo Fishing Settlement. Journal of chromatography A. Volume 1073, s. 323-330.*
- 38 Al-Omair, A. & Helalah, M.I.H. 2004. *Selected-Ion Storage GC-MS Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Palm Dates and Tuna Fish. Chromatographia. Volume 59, s. 715-719.*

- 39 Arrebola, Francisco J. Garrido Frenich A. González Rodríguez, Manuel J. Plaza Bolaños, Patricia & Martínez Vidal, José Luis. 2006. *Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in olive oil by a completely automated headspace technique coupled to gas chromatography-mass spectrometry. Journal of mass spectrometry. Volume 41, s. 822-829.*
- 40 Nácher-Mestre, Jaime, Serrano, Roque, Portolés-Nicolau, Tania, Hernández, Félix, Benedito-Palos, Laura & Pérez-Sánchez Jaume. 2009. *A reliable analytical approach based on gas chromatography coupled to triple quadrupole and time-of-flight mass analyzers for the determination and confirmation of polycyclic aromatic hydrocarbons in complex matrices from aquaculture activities. Rapid Communications in Mass Spectrometry. Volume 23, s. 2075-2086.*
- 41 Ketola, Raimo, Kostianen, Risto, Kotiaho, Tapio & Vainiotalo, Pirjo. 2010. *Massaspektrometrian perusteet.* Helsinki: Hakapaino.
- 42 Jaarinen, Soili & Niiranen, Jukka. 2005. *Laboratorion analyysitekniikka.* 5. painos. Helsinki: Edita.
- 43 Hokkanen, Mirja/Evira. 2011. PAH-kuulumisia EU-vertailulaboratoriokokouksesta. Verkkodokumentti. http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/lomakkeet_ja_ohjeet/elintarvikkeet/elintarvike_ja_rehututkimus/mibi/pah_eu-rl_nrl_kokouksen_2011_raportti.pdf. Luettu 22.1.2012.
- 44 Euroopan komissio. 2002. Komission päätös (2002/657/EY). Verkkodokumentti. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:FI:PDF>. 17.8.2002. Viitattu 3.2.2012.
- 45 Hokkanen, Mirja. 2012. Tutkija, elintarviketurvallisuusvirasto Evira, Helsinki. Sähköpostiviesti 9.5.2012.

Käytetyt laitteet ja materiaalit

Lihamyly Tecator 1094 Homogenizer

Kylmäkuivain Edwards Modulyo 4K, vakuumpumppu Edwards

Sentrifugaalihakututin GeneVac EZ-2 Plus, Genevac Ltd., Ipswich, England, kytketty 5,0 tyypeen N₂, AGA

GC-MS/MS, kaasukromatografi Agilent 6890N, Autosampler Agilent 7683, U.S.A, massaspektrometri Waters Quattro Micro GC, U.S.A.

GC-kolonne Zebron ZB-50 30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Phenomenex, U.S.A.

Typpihakututin Turbovap

Typpihakututin PIERCE model 18780 Reacti-Vap, Rockford, Illinois, U.S.

Accelerated solvent extractor 200, DIONEX corporation, Sunnyvale, CA, U.S.A.

SPE-kammio, Supelco visiprep, Bellefonte, PA, U.S.A. Sigma-Aldrich

SPE-pylväät:

Supelco Supelclean ENVI-ChromP SPE-pylväs, 500 mg/6 ml, 57226, Bellefonte, PA, U.S.A.

Varian Bond Elut C18 SPE-pylväs, 500 mg/3 ml, U.S.

Varian Bond Elut-SI SPE-pylväs, 500 mg/3 ml, U.S.

Phenomenex Strata PAH SPE-pylväs, 1,5 g/ 6 ml, U.S.

J.T. Baker Bakerbond SPE Alumina SPE-pylväs 1g/6 ml, Deventer, Holland, Phillipsburg, NJ

Liuottimet:

Dikloorimetaani, J.T. Baker, HPLC analyzed/Baker analyzed

n-heksaani, J.T. Baker, HPLC analyzed

Asetoni, J.T. Baker, HPLC analyzed

Sykloheksaani, J.T. Baker, Baker analyzed

Etyyliasetatti HPLC, LAB-SCAN tai vastaava

Metanoli, J.T. Baker, HPLC analyzed/Baker analyzed

Etanoli Aa 99,5 %, Altia

Tolueeni, J.T. Baker, Ultra resi-analyzed

Celite 545, Merck

Florisil, 100-200 mesh, Sigma-Aldrich

Standardit:

Standardi PAH-mix 183 10 µg/ml sykloheksaanissa, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany

ISTD Bentso(a)antraseeni $^{13}\text{C}_6$ 100 µg/ml n-nonaanissa, LGC Standards tai vastaava

ISTD Kryseeni $^{13}\text{C}_6$ 100 µg/ml n-nonaanissa, LGC Standards tai vastaava

ISTD Bentso(b)fluoranteeni $^{13}\text{C}_6$ 100 µg/ml n-nonaanissa, LGC Standards tai vastaava

ISTD Bentso(k)fluoranteeni $^{13}\text{C}_6$ 100 $\mu\text{g/ml}$ n-nonaanissa, LGC Standards tai vastaava

ISTD Bentso(a)pyreeni $^{13}\text{C}_4$ 100 $\mu\text{g/ml}$ n-nonaanissa, LGC Standards tai vastaava

ISTD Dibentso(a,h)antraseeni $^{13}\text{C}_6$ 100 $\mu\text{g/ml}$ n-nonaanissa, LGC Standards tai vastaava

ISTD Indeno(1,2,3-c,d)pyreeni $^{13}\text{C}_6$ 100 $\mu\text{g/ml}$ n-nonaanissa, LGC Standards tai vastaava

ISTD Bentso(g,h,i)peryleeni $^{13}\text{C}_{12}$ 100 $\mu\text{g/ml}$ n-nonaanissa, LGC Standards tai vastaava

ISTD Dibentso(a,e)pyreeni $^{13}\text{C}_6$ 100 $\mu\text{g/ml}$ n-nonaanissa, LGC Standards tai vastaava

ISTD Dibentso(a,i)pyreeni $^{13}\text{C}_{12}$ 50 $\mu\text{g/ml}$ n-nonaanissa, LGC Standards tai vastaava

Validointiin käytettävän matriisisuoran pipetointitaulukko ja validointisarja

Validointiin käytettävän matriisisuoran pipetointitaulukko

	Teoreettinen pitoisuus (µg/kg)	ISTD KII (0,01 µg/ml) lisäys	ISTD KII loppupitoisuus (µg/ml)	PAH mix 183 lisäys (µl)	PAH mix 183 loppupitoisuus (µg/ml)	PAH mix 183 laskettu loppupitoisuus (µg/kg)
std 1	0,0	170 µl	0,017	-	0	0
std 2	0,8	170 µl	0,017	K VI 100 µl (0,01 µg/ml)	0,010	0,779
std 3	2,5	170 µl	0,017	K V 128 µl (0,025 µg/ml)	0,032	2,492
std 4	5,0	170 µl	0,017	K IV 64 µl (0,1 µg/ml)	0,064	4,984
std 5	7,5	170 µl	0,017	K IV 96 µl (0,1 µg/ml)	0,096	7,476
std 6	15	170 µl	0,017	K IV 193 µl (0,1 µg/ml)	0,193	15,031
std 7	30	170 µl	0,017	K 3,5 193 µl (0,2 µg/ml)	0,386	30,062

Validointisarja

Näyte	ISTD KII (0,01 µg/ml) lisäys	ISTD KII loppupitoisuus (µg/ml)	PAH mix 183 lisäys (µl)	PAH mix 183 loppupitoisuus (µg/ml)
Blank (6+7+7 kpl)	170 µl	0,017	-	-
Matriisisuora (7 pistettä)	170 µl	0,017	ks. edellinen taulukko	ks. edellinen taulukko
Liuotinsuora (7 pistettä, sama kuin matriisisuora)	170 µl	0,017	ks. edellinen taulukko	ks. edellinen taulukko
MRL 0,5 (6 kpl)	170 µl	0,017	K V (0,025 µg/ml) 128 µl	0,032
MRL 1,0 (6 kpl)	170 µl	0,017	K IV (0,1 µg/ml) 64 µl	0,064
MRL 1,5 (6 kpl)	170 µl	0,017	K IV (0,1 µg/ml) 96 µl	0,096
Kontrollistandardi liuottimeen 0,064	170 µl	0,017	K IV (0,1 µg/ml) 64 µl	0,064
Kontrollistandardi liuottimeen 0,011	170 µl	0,017	K V (0,025 µg/ml) 45 µl	0,011