



Huong Ly

Seerumin PCB-analyysimenetelmän kehitys ja optimoiminen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

31.5.2023

Tiivistelmä

Tekijä:	Huong Ly
Otsikko:	Seerumin PCB-analyysimenetelmän kehitys ja optimoiminen
Sivumäärä:	42 sivua + 5 liitettä
Aika:	31.5.2023
Tutkinto:	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Laboratorioanalytiikka
Ammatillinen pääaine:	
Ohjaajat:	Lehtori Miika Kuivikko Johtava asiantuntija Tiina Rantio

Tämä opinnäytetyö valmistui Työterveyslaitoksen Biomonitointi-yksikössä. Työterveyslaitos on testauslaboratorio ja työhyvinvoinnin asiantuntijalaitos, joka täyttää kansainväliset laatuvaatimukset ja -standardit. Työn tavoitteena oli korvata sisäinen standardi PCB 116, käyttämällä leimattuja sisäisiä standardeja, jotka ovat PCB 153, 138 ja 180:n isotyyppejä, ja samalla kehittää ja optimoida analyysimenetelmää. Työssä keskityttiin pääasiassa soveltamiseen ja ongelmanratkaisuun analyysimenetelmän kehittämiseksi ja optimoimiseksi.

Työ aloitettiin soveltamalla leimattuja sisäisiä standardeja nykyiseen menetelmään DB-1701P-kolonnilla. Tämän jälkeen nykyinen menetelmä optimoitiin tarkistamalla eri SIM-tilan massa-varausarvoja. Uusi kolonni, DB-XLB, otettiin käyttöön ja sen testauksessa tarkistettiin PCB-yhdisteiden retentioaika sekä ajettiin nykyinen menetelmä uudella kolonnilla. SIM-tilan m/z-arvot pidettiin samana. Uunin lämpötilan ohjelmia testattiin ja suoritettiin useiden kontrollinäytteiden toistettava ajaminen. Haasteina ilmeni nollanäytteiden kontaminaatiota, retentioaika eroja ja epäonnistuneita analyysien suorituksia laitteen takia.

Tulosten perusteella analyysimenetelmän optimointi on onnistunut, sillä suurin osa kontrollinäytteistä on asettunut hyväksyttävän rajan sisälle. Työn tavoite on siis saavutettu. Testattiin sisäisen standardin PCB 116:n korvausta leimatuilla sisäisillä standardeilla. Uusi ajometodi on lyhyempi kuin aikaisempi menetelmä vanhalla kolonnilla DB-1701P, mikä tuo etuja Työterveyslaitokselle. Ajometodi on optimoitu sekä uutta kolonnia on perusteellisesti testattu ja se toimii hyvin.

Avainsanat: PCB, sisäinen standardi, GC-MS, optimointi

Tämän opinnäytetyön alkuperä on tarkastettu Turnitin Originality Check -ohjelmalla.

Abstract

Author: Huong Ly
Title: Development and Optimization of Serum PCB Analysis Method
Number of Pages: 42 pages + 5 appendices
Date: 31 May 2023

Degree: Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme: Laboratory Sciences
Professional Major:
Supervisors: Miika Kuivikko, Senior Lecturer
Tiina Rantio, Leading Expert

This thesis study was completed in the Biomonitoring unit of the Finnish Institute of Occupational Health (FIOH). FIOH is a testing laboratory and an expert organization in occupational health, fulfilling international quality requirements and standards. The aim of the work was to replace the internal standard PCB 116 by using labeled internal standards, which are isotopes of PCB 153, 138, and 180. In addition, a further aim was to develop and optimize the analysis method. To develop and optimize the analysis method, the work focused on application and problem-solving.

DB-1701P was used to apply labeled internal standards to the current method. The current method was then optimized by checking the different SIM-mode mass-to-charge ratios. The updated column, DB-XLB, was introduced, and the retention times of PCB compounds were checked, and the current method was run with the DB-XLB column. The SIM-mode m/z values were kept the same. Oven temperature programs were tested, and control samples were repeated. Challenges arose due to contamination of blank samples, retention time differences, and failed analysis runs due to the instrument.

Based on the results, the optimization of the analysis method has been successful, as most control samples are within acceptable limits. The work replaced internal standard PCB 116 with labeled standards. The new method has a shorter run time than the previous method with the old DB-1701P column. This provides benefits for the Finnish Institute of Occupational Health. The run method has been optimized, and the newly added column has been thoroughly tested and performs well.

Keywords: PCB, internal standard, GC-MS, optimize

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Yleistä	3
2.1	Polyklooratut bifenyylit	3
2.2	Työterveyslaitoksen PCB-analyysit	4
2.3	Analyysimenetelmän eri osien teorit	4
2.3.1	Kaasukromatografian periaate	4
2.3.2	Massaspektrometrian periaate	6
2.3.3	Sisäinen standardin periaate	8
2.3.4	Kaasukromatografiset parametrit	9
2.3.5	Näytteenkäsittely	9
3	Laitetiedot ja kolonnit	10
3.1	Kaasukromatografi-massaspektrometrian laitetiedot	10
3.2	Vertailussa olevat kolonnit	11
4	Reagenssit	12
5	Työn suoritus	16
5.1	Esitestit	16
5.2	Vanhan kolonnin (DB-1701P) testit	18
5.3	Uuden kolonnin (DB-XLB) testit	19
5.4	Nollanäytteen ongelmat	23
5.5	Retentioaikaan liittyvät ongelmat	27
6	Tuloksien tarkastelu	33
7	Yhteenveto ja pohdinta	38
	Lähteet	40

Liitteet

Liite 1: Määrittämissä käytetyt nollanäytteiden arvot

Liite 2: Tulokset ja nollanäytteiden arvot, yksikkönä µg/l

Liite 3: Kontrollinäyte 68A:n ja B:n kuvaajat

Liite 4: Pylväiden esipesun kromatogrammit

Liite 5: Tulokset, jos on vain yksi sisäinenä standardina

Lyhenteet

CI	Chemical Ionization, kemiallinen ionisaatio
EI	Electron Ionization, elektroni-ionisaatio
GC-MS	Gas Chromatography Mass Spectrometer. Kaasukromatografia-massaspektrometri
GC-EDC	Gas Chromatography Electron Capture Detector kaasukromatografia-elektroninsieppausilmaisin
ISTD	Yhdiste, joka muistuttaa määritettävää yhdistettä, mutta erottuu kromatogrammissa selvästi eri piikkinä
LCL	Lower Control Limit, alaraja
LOD	Limit of Detection, toteamisraja
LOQ	Limit of Quantitation, määrittäysraja
m/z	Ionin massa suhteessa varaukseen, jota voidaan mitata massaspektrometrillä.
PCB	Polyklooratut bifenyylit
POP	Persistent Organic Pollutants, pysyvä orgaaninen yhdiste
SIM	Selektiivinen ionimonitorointi, valittujen ionien monitorointi
TEF	Toxic Equivalency Factor, toksisuus-ekvivalenssitekijä

TIC Total Ion Count, ionien kokonaismäärä

UCL Upper Control Limit, yläraja

1 Johdanto

Työterveyslaitos (TTL) on sosiaali- ja terveysministeriön alainen, itsenäinen julkisoikeudellinen yhteisö, joka toimii työsuojelun, työhyvinvoinnin, työterveyden, työympäristön ja terveellisen elämän edistämisen parissa. Laitoksen tavoitteena on edistää ihmisten hyvinvointia ja terveyttä työssä. TTL:n toimintaan kuuluu tutkimus, asiantuntijapalvelut, koulutus ja neuvonta. [1.]

TTL tarjoaa monipuolisia asiantuntijapalveluita eri alojen työpaikoille ja työntekijöille. Palveluihin kuuluvat esimerkiksi työpaikkaselvitykset, työterveysneuvonta, työpaikkakoulutus ja työterveysmittaukset. Laitos tekee myös laajaa tutkimustyötä eri alojen työterveyskysymysten parissa ja tuottaa tietoa ja raportteja alan kehityksestä. [1.]

TTL:n tavoitteena on olla alan johtava asiantuntijaorganisaatio, joka edistää työterveyttä ja työturvallisuutta sekä kehittää uusia menetelmiä ja työkaluja työpaikkojen käyttöön. Laitos panostaa vahvasti myös kansainväliseen yhteistyöhön ja verkostoitumiseen alan muiden toimijoiden kanssa. [1.]

PCB-yhdisteet eli polyklooratut bifenyylit ovat orgaanisia yhdisteitä. PCB-yhdisteen eri ominaisuuksista määrää klooriatomien lukumäärä sekä niiden sijainti [2]. PCB-yhdisteillä on 209 kongeneeria eli yhdiste on johdettu samasta kantaineesta. Kaupallisessa käytössä on hieman yli 100 eri PCB-kongeneeria [4].

TTL:n PCB-analyysissä sisäisenä standardina (ISTD) käytetään PCB-kongeneeria 116. PCB-analyysissä analysoidaan PCB 153, 138 ja 180:n määrää seeruminäytteestä. Sisäinen standardi PCB 116 on eri yhdiste, joten se ei käytäydy aina samalla tavalla kuin analyytit. TTL toivoo, että nykyinen standardi PCB 116 voidaan korvata testeissä käytetyillä leimatuilla sisäisillä standardeilla PCB 153, 138 ja 180:n isotyypeillä. Samalla kun analyysimenetelmää optimoidaan, voidaan testata eri kaasukromatografian kolonnia sekä ajo-olosuhteita, jotta saavutettaisiin paras mahdollinen tulos.

Opinnäytetyössä kehiteltiin seerumin Polykloorattu bifenyylä (PCB) -analyysimenetelmää. Päätaoaitteena oli menetelmän kehitystä ja optimoimista analyysin laadun parantamiseksi. Taaoitteen saavuttamiseksi testataan sisäisien standardien käyttöä, sekä testataan uuden kolonnin herkkyyttä. Lopuksi vielä testataan kaasukromatografia-ajometodin parantamista, muuttamalla ajomenetelmän eri parametrejä. Tämä opinnäytetyö tehtiin TTL:n toimeksiantona.

2 Yleistä

2.1 Polyklooratut bifenyylit

PCB-yhdisteet ovat keinotekoisia, hyvin karsinogeenisiä orgaanisia yhdisteitä, jotka kuuluvat pysyviin orgaanisiin yhdisteisiin (POP). POP-yhdisteet ovat erittäin pysyviä ja voivat jäädä pitkäksi aikaa ympäristöön eli biokertyä. Niiden ominaisuuksien vuoksi ne voivat myös kertyä eläinten ja ihmisten kudoksiin. [4; 5.] PCB-yhdisteillä voi olla erilaisia vaikutuksia ihmisiin riippuen siitä, kuinka usein ja kuinka paljon niihin altistutaan. Lyhytaikainen altistuminen voi aiheuttaa oireita, kuten pahoinvointia, oksentelua, ihoärsytystä, päänsärkyä ja huimausta. Pitkäaikainen altistuminen voi johtaa terveysongelmiin, kuten immuunijärjestelmän ongelmiin, maksa- ja kilpirauhasongelmiin, neurologisiin ongelmiin, hedelmällisyysongelmiin ja lisääntyneeseen syöpäriskiin. [6, s. 155–156.]

PCB-seokset ovat olleet teollisessa käytössä vuodesta 1929 lähtien. Niitä on käytetty muun muassa sähkö-, lämpö- sekä hydraulisissa laitteissa. Seokset ovat olleet myös maaleissa, muoveissa, kumituotteissa pehmittimenä, väriaineena, pigmenteissä sekä muussa teollisissa käytössä. [2.] Vuonna 1979 PCB-yhdisteiden käyttö kiellettiin Yhdysvalloissa ja 2001 kiellettiin kansainvälisesti Tukholman sopimuksen mukaan [3]. Tukholman sopimus on kansainvälinen ympäristösopimus, joka allekirjoitettiin 2001 keväällä ja tuli voimaan 17. toukokuuta 2004. Sopimuksen tavoitteena on rajoittaa tai poistaa pysyvien orgaanisten yhdisteiden käyttöä ja tuotantoa. [7.]

Yksi tapa arvioida altistumista PCB-yhdisteille on mitata tiettyjen PCB-kongeneerien määrä. Yleisimmin ihmisen verestä ja rasvakudoksesta löytyvät kongeneerit ovat PCB 138, 153 ja 180. Näitä kolmea kongeneeria käytetään usein kokonaisaltistuksen mittareina, sillä ne muodostavat suuren osan ihmisen kehossa esiintyvistä PCB-yhdisteistä. [6.]

2.2 Työterveyslaitoksen PCB-analyysit

TTL on yksi Suomen johtavista laboratorioista, joka tarjoaa PCB-yhdisteiden pitoisuuksien analysointipalveluita [1]. PCB-yhdisteiden pitoisuus voidaan mitata erilaisista näytteistä, kuten seerumista, ilmasta, ja erilaisista materiaaleista [8; 9; 10]. TTL:n Seerumin PCB-analyysimenetelmä on akkreditoitu, mikä tarkoittaa, että menetelmä täyttää kansainväliset laatuvaatimukset ja -standardit [11].

TTL:n käyttämät PCB-analyysimenetelmät perustuvat kaasukromatografia-massaspektrometriaan (GC-MS) [8; 9; 10]. Näiden menetelmien avulla voidaan määrittää useita eri PCB-yhdisteitä ja niiden pitoisuuksia.

Seerumin PCB-analyysissä näytteenotto tapahtuu hankkimalla TTL:stä näytteenottoastioita kuten kaksi 10 ml:n alipaineputkea, jossa ei ole antikoagulanttia. Näytteenottoastiat täytetään verellä ja annetaan hyytyä. Sitten seerumi erotetaan erikoispestyyn lähetysputkeen, jota voi saada myös TTL:ltä. Näytteenotto- ja lähetysastiat kuuluvat analyysin hintaan. [10.]

TTL tarjoaa PCB-analyysejä kaikille mutta niitä käyttävät erityisesti julkishallinnon organisaatiot, teollisuusyritykset, tutkimuslaitokset ja myös yksityishenkilöt [12].

2.3 Analyysimenetelmän eri osien teoriat

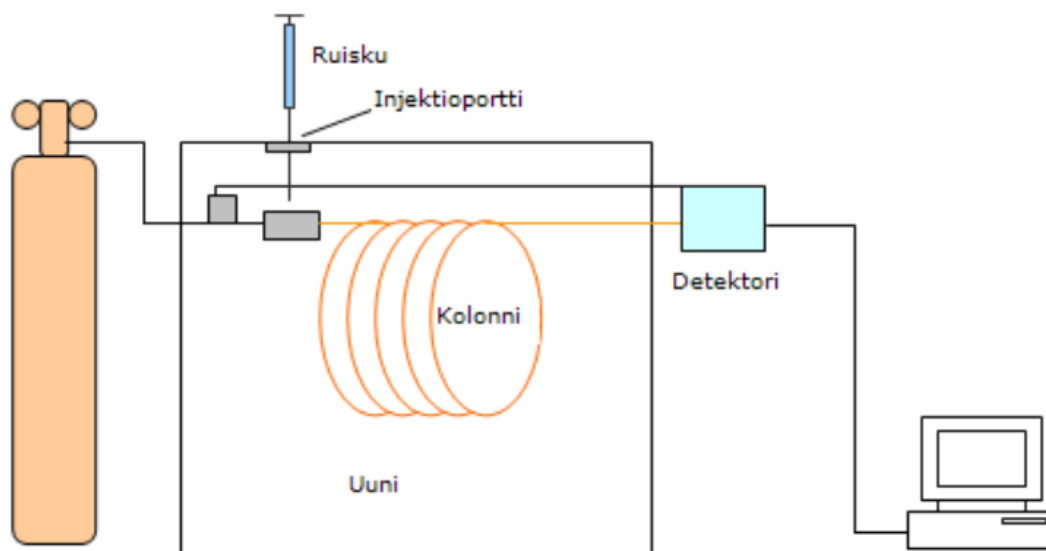
2.3.1 Kaasukromatografian periaate

Kaasukromatografia (GC) on yksi kromatografian analyysimenetelmistä, joka soveltuu haihtuvien aineiden erotteluun, tunnistamiseen ja pitoisuuden määrittämiseen [13.] Kaasukromatografia on herkkä analyysitekniikka, joka voi analysoida pieniäkin määriä näytteitä, ja se voidaan automatisoida. Tekniikka perustuu dynaamiseen tasapainoon, jossa liikkuvana faasina toimii inertti kaasu ja stationääri faasina neste. Näyte höyrystetään kuumen lämpötilan avulla, ja erotuksen aikana näytteen pitää pysyä höyrynä. [14, s. 184.]

Kantokaasuna käytetään usein heliumia, typpeä, vetyä, tai argonia, ja kaasun on oltava reagoimaton näytteen ja stationäärifaasin suhteen. Näyte syötetään injektiokammioon sopivasti laimennettuna ja liuotettuna oikeaan liuottimeen, jossa aine höyrystyy 200–300 °C:ssa. Höyrystyneet komponentit kulkevat kantokaasun mukana kolonniin, jossa erottuminen tapahtuu siten, että helpommin höyrystyvät aineet näytteessä höyrystyvät eri aikaan. Yhdisteet, joilla on matalampi kiehumispiste, höyrystyvät nopeammin ja ovat enemmän liikkuvassa faasissa, joten ne saapuvat detektoriin aikaisemmin eli niillä on lyhyempi retentioaika kuin korkeamman kiehumispisteen yhdisteillä. Yhdisteet erottuvat usein kiehumispistejärjestyksessä, mikä tarkoittaa, että matalamman kiehumispisteen yhdisteet erottuvat ensin ja korkeamman kiehumispisteen yhdisteet myöhemmin. [13; 14, s. 184; 15 s. 103.]

Kaasukromatografiamenetelmän avulla voitiin selvittää seerumin PCB-yhdisteiden retentioajat ja eri testien tulokset. Tämä mahdollisti tarkemman ja luotettavamman seerumin PCB-analyysimenetelmän kehittämisen opinnäytetyössä.

Kuvassa 1 on kaavakuva, jonka kaasukromatografian detektorina toimii massaspektrometri.



Kuva 1 Kaasukromatografian kaavakuva [13].

2.3.2 Massaspektrometrian periaate

Massaspektrometri on analyttinen työkalu, jota käytetään kemiallisten yhdisteiden rakenteen ja koostumuksen määrittämiseen. Sen periaate perustuu ionisointiin, jossa yhdisteiden molekyylit muunnetaan ionisoituneiksi hiukkasiksi, jotka voidaan erottaa sähkö- ja magneettikenttien vaikutuksesta niiden massan ja varauksen perusteella (m/z). Massaspektrometriä voidaan käyttää tarkan molekyylipainon määrittämiseen. Tyypillisesti massaspektrometriä voidaan käyttää tuntemattomien yhdisteiden tunnistamiseen niiden massaspektrien avulla, tunnettujen yhdisteiden kvantifointiin eli tunnettujen yhdisteiden määrälliseen analysointiin. [16.]

Massaspektrometrin toimintaperiaate voidaan jakaa neljään vaiheeseen: näytteen ionisointi, ionien erottelu, detektointi ja signaalien käsittely. Ensimmäisessä vaiheessa näyte ionisoidaan esimerkiksi elektronisesti (EI) tai kemiallisesti (CI). Ionisointi tapahtuu yleensä positiivisiksi ioneiksi, mutta negatiivisia ioneja voidaan myös muodostaa ainoastaan CI:llä. Toisessa vaiheessa ionit erotellaan toisistaan niiden massan ja varauksen perusteella käyttämällä sähkö- ja magneettikenttiä. Erottelun jälkeen ionit ohjataan detektoriin, joka rekisteröi niiden saapumisajan ja määrän. Kolmannessa vaiheessa detektorista saatua signaalia käsitellään ja muutetaan dataksi. Tämä data merkitsee ionien määrää ja saapumisajan intensiteettiä. Neljännessä vaiheessa data analysointiin käytetään erilaisia menetelmiä, kuten spektrin vertailua tunnettuihin yhdisteisiin tai tietokoneohjelmia, jotka voivat tunnistaa yhdisteitä massaspektrometrin tuottaman datan perusteella. [16.]

Total Ion Count (TIC) -menetelmä on yksi massaspektrometrian menetelmä, joka mahdollistaa kemiallisten yhdisteiden tunnistamisen. TIC-menetelmässä kaikki näytteestä saatavat ionit detektoidaan ja lasketaan yhteen, mikä tuottaa kokonaisionispektrin. Tämän jälkeen yhdisteet erotellaan niiden mukaan, missä retentioajassa ne näytteessä esiintyvät. [17, s.1–11.] TIC-kromatogrammi käsitellään kvantitatiivisesti, ja yksittäisten yhdisteiden pitoisuudet lasketaan vertaamalla niiden intensiteettiä standardien intensiteettiin [18, s. 583].

Electron Ionization (EI) on yksi yleisimmistä ionisaatiomenetelmistä massaspektrometriassa. Se on menetelmä, jota käytetään kaasumolekyylien ionisoimiseen massaspektrometrin inletissä, jossa kaasua pommitetaan korkean energian elektroneilla. Tämän seurauksena näytteeseen siirtyy energiaa, joka vapauttaa elektroneja ja aiheuttaa molekyylien rikkoutumisen ja ionisaation. Näitä fragmentteja analysoidaan massaspektrillä. [18, s. 561–562.]

Valittujen ionien monitorointi (SIM) on massaspektrometrin käyttämä menetelmä, joka mahdollistaa tiettyjen määrättyjen ionien massaspektrissä [18, s. 862]. SIM-menetelmä soveltuu erityisesti silloin, kun yhdisteiden pitoisuudet ovat matalia. SIM-menetelmässä massaspektrometrin detektori tallentaa vain tietyt asetetut ionit massaspektristä, jolloin se mahdollistaa yhdisteen tarkan kvantitoinnin. [19.]

SIM-tilassa massaspektrometri valitsee tietyn m/z -arvon, joka vastaa tietyn yhdisteen kvantitointi-ionin m/z -arvoa. Tässä työssä yhdiste on PCB-yhdiste, ja rekisteröi vain kyseisen ionin ilmenemisen. Tämä mahdollistaa herkemmän ja selektiivisemmän havainnoinnin, sillä muiden ionien esiintyminen ei vaikuta havaittavan yhdisteen ionin intensiteettiin. [18, s. 583.]

SIM-menetelmä on hyödyllinen PCB-yhdisteiden määrittämisessä seerumista, sillä PCB-pitoisuudet ovat yleensä hyvin alhaisia esimerkiksi, jos tarkoituksena on kehittää ja optimoida analyysimenetelmää opinnäytetyössä ja testata sen herkkyyttä.

SCAN-tilassa massaspektrometri mittaa kaikkien ionien esiintymistä tietyssä m/z -alueessa ja tallentaa niiden intensiteetit spektriin. Tämä mahdollistaa useiden yhdisteiden tunnistamisen yhdellä mittauksella, mutta spektri voi olla monimutkainen, ja tiettyjen yhdisteiden havaitseminen voi olla haastavaa, koska muiden ionien esiintyminen voi peittää ne. [20.]

2.3.3 Sisäinen standardin periaate

PCB määritetään kvantitatiivisesti tunnettujen standardiliuosten avulla. Käytetään ISTD-menetelmää, jolla voidaan vähentää laitteen injektoinnista johtuvaa virhettä. ISTD on yhdiste, joka muistuttaa määritettävää yhdistettä, mutta erotuu kromatogrammissa selvästi eri piikkinä. ISTD:tä lisätään näytteeseen tunnettu määrä ennen analyysia. Sen avulla voidaan tarkistaa, että näytteen käsittely, analyysi ja mittaus ovat onnistuneet oikein, ja korjata mahdollisia mittausvirheitä. [18, s. 109.]

ISTD:tä käytetään sen takia, että sitä voidaan lisätä näytteeseen ennen näytteen käsittelyä. Se on samantapainen yhdiste kuin tutkittava analyytti. Tällöin sisäisestä standardista voidaan arvioida uuttumisen tehokkuutta eri uuttovaiheissa myös analysoitavan yhdisteen kohdalla. Jos injektointimäärä vaihtelee, sisäinen standardi ottaa sen huomioon: sisäisen standardin ja analyytin suhde säilyy samana, vaikka näytettä injektoidaisiin eri määrää. [15, s. 141.]

PCB-standardit ja standardiseokset voidaan jakaa kahteen ryhmään. Yksi ryhmästä on WHO Dioxin-Like PCBs -ryhmä, joka osoittaa dioksiinin kaltaisia aktiivisuutta ja WHO on antanut myrkyllisyyttä vastaavat tekijät (TEF). Toinen ryhmä on WHO Non-Dioxin-Like (Marker/Indicator) PCBs -ryhmä, jota yhdisteet löytyvät suurella pitoisuudella teknisissä tuotteissa sekä ympäristöissä. Jälkimmäistä ryhmää voidaan käyttää sisäisenä standardina. Leimatut sisäiset standardit PCB 153, 138 ja 180 kuuluvat WHO Non-Dioxin-Like (Marker/Indicator) PCBs -ryhmään. [21.]

Tässä työssä sisäisenä standardina käytetään PCB 153, 138 sekä 180:n isotyyppejä.

2.3.4 Kaasukromatografiset parametrit

Analyysimenetelmän kehittämisessä yleisesti keskitytään eri parametrien muutokseen, mutta tämän työn tapauksessa tämä ei ole ensisijaista, sillä tarkoituksena on käyttää testattuja optimoituja menetelmiä asiakasnäytteissä. Syväällisempää tarkastelua varten menetelmä tulee validoida, mikä on oma työnsä. Tärkeintä on, että muutosten, kuten kolonnin vaihdon, jälkeen tulokset vastaavat mahdollisimman hyvin PCB 116:ta, minkä jälkeen menetelmää ja ajon optimointia voidaan edelleen kehittää.

Kaasukromatografian parametrit ovat esimerkiksi retentioaika, todellinen retentioaika, retentiotekijä, resoluutio sekä piikkien epäsymmetrisyys [22]. Tässä opinnäytetyössä keskitytään retentioaikaan sekä resoluutioon. Seerumin PCB-analyysissä retentioaika saadaan määritettyä vertaamalla tutkittavaa näytettä standardinäytteisiin, joissa tiedetään aineiden retentioajat. Resoluutio tarkoittaa kykyä erottaa kaksi lähellä toisiaan olevaa komponenttia, jotka ovat läsnä näytteessä [22].

2.3.5 Näytteenkäsittely

PCB uutetaan seerumista dietyylieetteri-heksaaniseokseen. PCB liukenee seokseen, ja sekoitetaan kunnolla, jonka jälkeen seos sentrifugoidaan, jotta seerumin ja dietyylieetteri-heksaanikerrokset erottuvat toisistaan. PCB:tä sisältävä dietyylieetteri-heksaanifaasi siirretään pipetillä toiseen astiaan. Tämän jälkeen näyte konsentroidaan typpihaihdutuksella ja puhdistetaan väkevällä rikkihappokäsittelyllä ja pylväskromatografisesti. Lopuksi näyte konsentroidaan vielä jälleen kerran. Konsentroitunut näyte analysoidaan kaasukromatografia-massaspektrometrialla. [23.]

PCB-analyysissä voidaan myös käyttää kaasukromatografia-elektronisieppausilmaisinta eli GC-ECD:tä. GC-MS-analyysissä PCB:iden erottelu ja tunnistus tapahtuu niiden massaspektrometrian avulla, kun taas ECD tarjoaa herkin havainnoinin halogenoitujen yhdisteiden esiintymisestä. [24.]

3 Laitetiedot ja kolonnit

3.1 Kaasukromatografi-massaspektrometrian laitetiedot

Laitteistona on Agilent Technologies GC/MSD 5977B, joka on varustettu massaselektiivisellä ilmaisimella sekä automaattisella näytteensyöttäjällä. Laitteistoon kuuluu OpenLab-ohjelmisto (Agilent Technologies. Laiterekisterinumero on 652379.

3.2 Vertailussa olevat kolonnit

Alla olevassa taulukossa 1 on koottu vertailussa olevat kolonnit.

Taulukko 1. Vertailussa olevat kolonnit

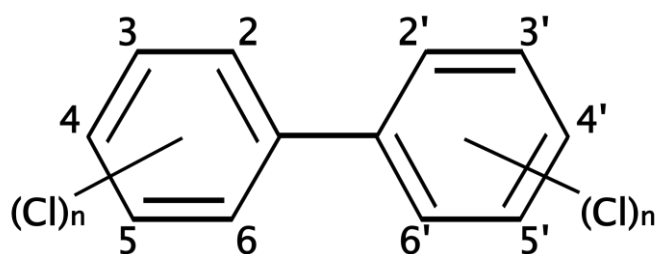
Kaasukromatografia		
Alkuperäinen kolonni Agilent J&W DB-1701P	Tyyppi	Silikakapillaari
	Pituus	30 m
	Halkaisija	0,25 mm
	Paksuus	0,25 µm
Kantokaasu	Kaasutyyppi	Helium 4,6
	Virtausnopeus	1,4 ml/min
Lämpötila-alue	-20 °C -> 280 °C (300 °C)	
Hankittu kolonni Agilent J&W DB-XLB	Tyyppi	Silikakapillaari
	Pituus	30 m
	Halkaisija	0,18 mm
	Paksuus	0,18 µm
Kantokaasu	Kaasutyyppi	Helium 4,6
	Virtausnopeus	1,0 ml/min
Lämpötila-alue	30 °C -> 340 °C (360 °C)	

Valittiin kolonni DB-XLB sen helpon saatavuuden takia, ja sitä suositeltiin erityisesti seerumin PCB-analyysia varten.

4 Reagenssit

Leimatut $^{13}\text{C}_{12}$ PCB-standardit olivat pitoisuudeltaan $40 \pm 2 \mu\text{g/ml}$ ja liuotettuna nonaaniin. Leimatut reagenssit olivat sitä varten, kun halutaan korvata sisäinen standardi PCB 116, uusilla sisäisillä standardeilla eli leimatuilla. Työssä uudet sisäiset standardit mainitaan tekstissä leimatuilla sisäisillä standardeilla PCB 153, 138 ja 180:lla, jotka ovat samoja isomeerejä, joita tutkitaan asiakasanalyysissä.

Kuvassa 2 on kemiallinen kaava polyklooratusta bifenyylistä.



Kuva 2. Polyklooratut bifenyylien kemiallinen kaava [3].

Taulukossa 2 on koottu leimattujen standardien kemikaalitiedot.

Taulukko 2. Leimattujen standardinäytteiden kemikaalitiedot

Leimatut ¹³C₁₂ PCB standardit		
PCB 153	Valmistaja	Cambridge Isotope Laboratories Inc.
	Erä	SDHL-004
	Osa	CIL-EG-1406-3
	Isomeeri	2,2',4,4',5,5'
	CAS	35065-27-1
PCB 138	Valmistaja	Cambridge Isotope Laboratories Inc.
	Erä	SDGD-017
	Osa	CIL-EG-1436-3
	Isomeeri	2,2',3,4,4',5'
	CAS	35065-28-2
PCB 180	Valmistaja	Cambridge Isotope Laboratories Inc.
	Erä	SDHC-022
	Osa	CIL-EG-1407-3
	Isomeeri	2,2',3,4,4',5,5'
	CAS	35065-29-3

Leimatut PCB standardit liuotettiin asetoniin ja laimennukset tehtiin heksaaniin:

- Asetoni Lot No. 21I234004, VWR CAS: 67-64-1, Puhtaus: LiChrosolv
- Heksaani Lot No. K52984391103, VWR/Merck CAS: 110-54-3.

Alla olevassa taulukossa 3 on standardien sekä sisäisten standardien pitoisuudet. Standardinäytteiden kemikaalitiedot on koottu taulukkoon 4.

Taulukko 3. Standardinäytteiden pitoisuudet, yksikkönä ($\mu\text{g/l}$)

	STL1	STL2	STL3	STL4	STL5
PCB 116	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209
PCB 153	0,0188	0,0655	0,196	0,522	1,958
PCB 138	0,0204	0,0635	0,191	0,5095	1,911
PCB 180	0,0204	0,064	0,1925	0,5135	1,925
Leimatut	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

Taulukko 4. Standardinäytteiden kemikaalitiedot

Standardit		
PCB 153	Valmistaja	LGC Dr. Ehrenstorfer
	Erä	G1199553
	Isomeeri	2,2',4,4',5,5'
	CAS	35065-27-1
PCB 138	Valmistaja	LGC Dr. Ehrenstorfer
	Erä	G1152971
	Isomeeri	2,2',3,4,4',5'
	CAS	35065-28-2
PCB 180	Valmistaja	LGC Dr. Ehrenstorfer
	Erä	G1290868
	Isomeeri	2,2',3,4,4',5,5'
	CAS	35065-29-3
PCB 116	Valmistaja	LGC Dr. Ehrenstorfer
	Erä	1251779
	Isomeeri	2,3,4,5,6
	CAS	18259-05-07

5 Työn suoritus

5.1 Esitestit

Esitesteissä testattiin kvantitointia TIC-menetelmällä, jota on selitetty tarkemmin osiossa 2.3.2. Työn aiheena on korvata sisäinen standardi PCB 116, leimatuilla standardeilla. Tämä tarkoittaa, että näytteessä voi olla samanlaisia PCB-yhdisteitä kuin ISTD:ssä. Näytteessä voi olla PCB 153, 138 ja 180 yhdisteitä sekä näytteenkäsittelyn jälkeen leimattuja isotyyppisiä, kuten $^{13}\text{C}_{12}$ PCB 153, 138 ja 180. Käyttäessä TIC-menetelmää kokonaisspektri sisältää nämä samat yhdisteet ja TIC-menetelmä erottaa vain retentioajalla. Tämän takia pitää vaihtaa kvantitointi-menetelmää SIM-menetelmään SCAN-menetelmän jälkeen.

Esikokeissa testattiin EI-ionisointitekniikkaa, vaikka oletamus oli jo alussa, että CI-ionisointitekniikka on herkempi. Tämän analyysin avulla saatiin varmennus olettamukselle, että ionisointitekniikka CI on herkempi kuin EI. Tämän seurauksena tehtiin tulevat muutostestaukset CI-ioniin.

Ennen menetelmän optimoimista testattiin ajo leimatuilla standardeilla, jonka jälkeen sovellettiin leimatut sisäiset standardit ajomenetelmään. Sovelletun menetelmän myötä kvantitointi tehtiin yhden ionin avulla (kvantitointi-ioni), joilla oli 2 muuta varmistusionia.

Kvantitointi-ioni on kvantifioivaa ja vahvaa signaalia antava ioni, jota käytetään analyysin määrälliseen analysointiin, kun taas varmistusioneja käytetään analyysin identifioimiseen. Sillä varmistetaan analysoidun piikin olevan analyysi eikä matriisi tai jotain muuta. Varmistusioni antaa heikomman signaalin kuin kvantitointi-ioni. [25, s. 56.]

Alussa ajettiin leimatut standardit SCAN-tilassa, minkä jälkeen tulevat testit ajettiin SIM-tilassa.

Ennen lopullisten arvojen saamista suoritettiin useita testejä ajamalla eri SIM-arvoja ja tarkastelemalla, mikä arvo tuotti parhaimmat tulokset. Parhaimmat tulokset ovat taulukossa 5.

Taulukko 5. PCB-yhdisteiden kvantitointi- ja varmistusionit

	Kvantitointi-ioni (m/z)	Varmistusionit (m/z)
PCB 116	326	323.9
		327.9
PCB 153/138	359.9	357.9
		361.9
PCB 180	393.9	395.9
		397.9
Leimattu PCB 153/138	372	374
Leimattu PCB 180	406	407.9

5.2 Vanhan kolonnin (DB-1701P) testit

TTL:ssä on ollut käytössä DB-1701P-kolonne. Kokeiltiin optimoida ja esitestien jälkeen tuloksena oli alla oleva taulukko 6:n mukainen ajo-ohjelma.

Taulukko 6. Vanhan kolonnin DB-1701P optimoitu ajo-ohjelma

Kaasukroma- tografia	Kolonne DB- 1701P	Tyyppi	Silikakapillaari
		Pituus	30 m
		Halkaisija	0,25 mm
		Paksuus	0,25 µm
	Kantokaasu	Kaasutyyppi	Helium 4,6
		Virtausnopeus	1,4 ml/min
	Injektori	Injektio tilavuus	2,5 µl
		Injektio tila	Pulsed Splitless
	Uunin lämpötila- ohjelma	Lämpötila alussa	120 °C
		Lämpötila	Nousu 5 °C per/min 280 °C:seen
Lämpötila lopus		280 °C	
Massaspektro- metria	Instrumentti	Agilent 5977B	
	Ionisointi	Kemiallinen ionisointi (CI)	
	Analyyttinen tila	SIM	

5.3 Uuden kolonnin (DB-XLB) testit

Toteamisraja (LOD) on pienin pitoisuus, minkä voidaan luotettavasti todeta, sisältääkö näyte tutkittavaa yhdistettä vai ei [26].

Toteamisrajaa selvitettiin käyttämällä alla olevaa yhtälöä

$$\text{Toteamisraja} = \mu_{B1} + 3 * s_{B1} \quad (1)$$

μ_{B1} on nollanäytteen keskiarvo

s_{B1} on nollanäytteen keskihajonta

Esimerkkilasku PCB 153:n toteamisrajasta on esitetty alempana.

$$0,0177 + 3 * 0,0080 = 0,042 \mu g/l$$

Määrittäysraja (LOQ) on pienin analysoitavan aineen pitoisuus, joka voidaan ilmaista hyväksyttävällä tarkkuudella [26].

Määrittäysrajaa selvitettiin käyttämällä yhtälöä

$$\text{Määrittäysraja} = \mu_{B1} + k * s_{B1} \quad (2)$$

μ_{B1} on nollanäytteen keskiarvo

s_{B1} on nollanäytteen keskihajonta

k on välillä 6–20

Esimerkkilasku PCB 153:n määrittäysrajasta on esitetty alempana.

$$0,0177 + 6 * 0,0080 = 0,066 \mu g/l$$

Edellä kuvatulla tavalla lasketut PCB 153, 138 ja 180:n toteamis- ja määrittäysraajat on koottu alla olevaan taulukkoon 7. Liitteessä 1 on nollanäytteiden arvot, joita on käytetty toteamis- sekä määrittäysrajalaskuissa.

Taulukko 7. Toteamisraja ja määrittäysraja kolonnille DB-XLB, injektioilavuus 4 µl

	Keskiarvo µB1 (µg/l)	Keskihajonta sB1 (µg/l)	Toteamisraja LOD (µg/l)	Määrittäys- raja LOQ (µg/l)
PCB 153	0,018	0,008	0,042	0,066
PCB 138	0,023	0,011	0,055	0,088
PCB 180	0,011	0,005	0,025	0,039

Taulukossa 8 on koottu uuden kolonnin DB-XLB:n ajo-ohjelma, jota on käytetty testeissä.

Taulukko 8. Uuden kolonnin DB-XLB:n ajo-ohjelma

Kaasukroma- tografia	Kolonnei <u>DB- XLB</u>	Tyyppi	Silikakapillaari
		Pituus	30 m
		Halkaisija	<u>0,18 mm</u>
		Paksuus	<u>0,18 µm</u>
	Kantokaasu	Kaasutyyppi	Helium 4,6
		Virtausnopeus	<u>1,0 ml/min</u>
	Injektori	Injektio tilavuus	<u>4 µl</u>
		Injektio tila	<u>Jakamaton</u>
	Uunin lämpötila-ohjelma	Lämpötila alussa	<u>110 °C</u>
		Lämpötila	<u>Nousu 15 °C per/min 320 °C:seen - Pitäytymisaika 5 min</u>
Lämpötila lopussa		<u>320 °C</u>	
Massaspektrometria	Instrumentti	Agilent 5977B	
	Ionisointi	Kemiallinen ionisointi (CI)	
	Analyyttinen tila	SIM	

Uuden kolonnin tilavuus-virtausnopeudeksi valittiin 1,0 ml/min, sillä nopeampi virtausnopeus voi heikentää erotuskykyä ja vaikeuttaa optimaalisen alueen löytämistä Van Deemterin käyrällä. Tämä käyrä kuvaa kolonnin erottelukyvyn ja ajoajan riippuvuutta virtausnopeudesta [18, s. 622–623]. Hitaammalla virtausnopeudella PCB-yhdisteet eivät erotu sen paremmin ja se pidentää ajoaikaa. Injektiomäärällä tavoiteltiin mahdollisimman suurta arvoa, jotta määritysrajan herkkyys olisi korkea. Otettiin injektion sisäputki ja liuotin huomioon, ettei liika injektiomäärä ylikuormittaisi kolonnia.

Taulukossa 9 on koottu PCB-yhdisteiden retentioajat taulukon 8 ajo-ohjelmaa noudattaen.

Taulukko 9. PCB-yhdisteiden retentioajat (min), kolonnilla DB-XLB

Yhdiste	Aika (min)
PCB 116	11,80
PCB 153	12,54
PCB 138	12,92
PCB 180	13,77

5.4 Nollanäytteen ongelmat

Nollanäyte oli ionivaihdettua vettä, jota käsiteltiin ja analysoitiin samalla tavalla kuin varsinaisia näytteitä, jotta varmistettiin ettei kontaminaatiota tapahdu [27]. Teoriassa, nollanäytteessä ei ole mitään ylimääräisiä aineita. Tämän työn tapauksessa nollanäytteeseen on lisätty PCB 116:ta, sekä leimattuja sisäisiä standardeja kuten varsinaisissa näytteissä. Tutkittavissa kromatogrammeissa on käytetty SIM (359,9) Cl:ta, jossa leimatut sisäiset standardit eivät näy. Eli teoriassa ei pitäisi ilmetä mitään piikkejä.

Seerumin PCB-analyysin näytteenkäsittelyssä käytettiin kahta nollanäytettä. Huomattiin, että nollanäytteessä esiintyy aina jonkin verran epäpuhtauksia, ja sen huomioon ottaminen tulosten laskennassa johtaa hyväksyttävän alueen alittumiseen. Aloitettiin ongelman ratkaiseminen testaamalla jokaisen näytteenkäsittelyvaihetta. Eri vaiheita olivat

- sentrifugin jälkeen, eli uuton jälkeen, jossa näyte on uuttunut dietyylieetteri-heksaanissa
- ensimmäisen haihdutuksen jälkeen, eli dietyylieetteri-heksaanikerroksen erotuksen jälkeen
- rikkihappokäsittelyn jälkeen, jossa erotettiin dietyylieetteri-heksaanikerros väkevästä rikkihaposta ennen Na_2SO_4 kuivausta
- Na_2SO_4 kuivauksen jälkeen, joka tapahtui ennen pylväspuhdistusta.
- pylväspuhdistuksen jälkeen, ennen loppuhaihdutusta
- kontrolli, jossa näytteenkäsittely on suoritettu normaalisti.

Jokaisesta vaiheesta otettiin osa nollanäytteestä talteen, minkä jälkeen tehtiin analyysi. Kuvassa 3 analyysin tuloksista nähdään, että pylväspuhdistuksessa epäpuhtaus ei vähene. Pylväspuhdistuksen jälkeisen loppuhaihdutuksen seurauksena on, että epäpuhtauden konsentraatio nousee.



Kuva 3. Nollanäytteen vertailu eri näytteenkäsittelyvaiheissa

Todettiin, että kyseinen ongelma ilmenee pylväspuhdistusvaiheessa. Näytteenkäsittelyohjeessa pylväiden esipesussa käytetään 2 ml heksaania, annetaan heksaanin mennä pylväiden läpi ilman imua jäteastiaan. Jonka jälkeen vaihdetaan näyteastiaan, lisätään näyte ja lopuksi 2 ml heksaania annetaan valua pylvään läpi. Lopussa imettiin pylväät tyhjäksi. Lopputulos on kuin kuvassa 3 nollanäytteen loppuhaihdutuksen jälkeen.

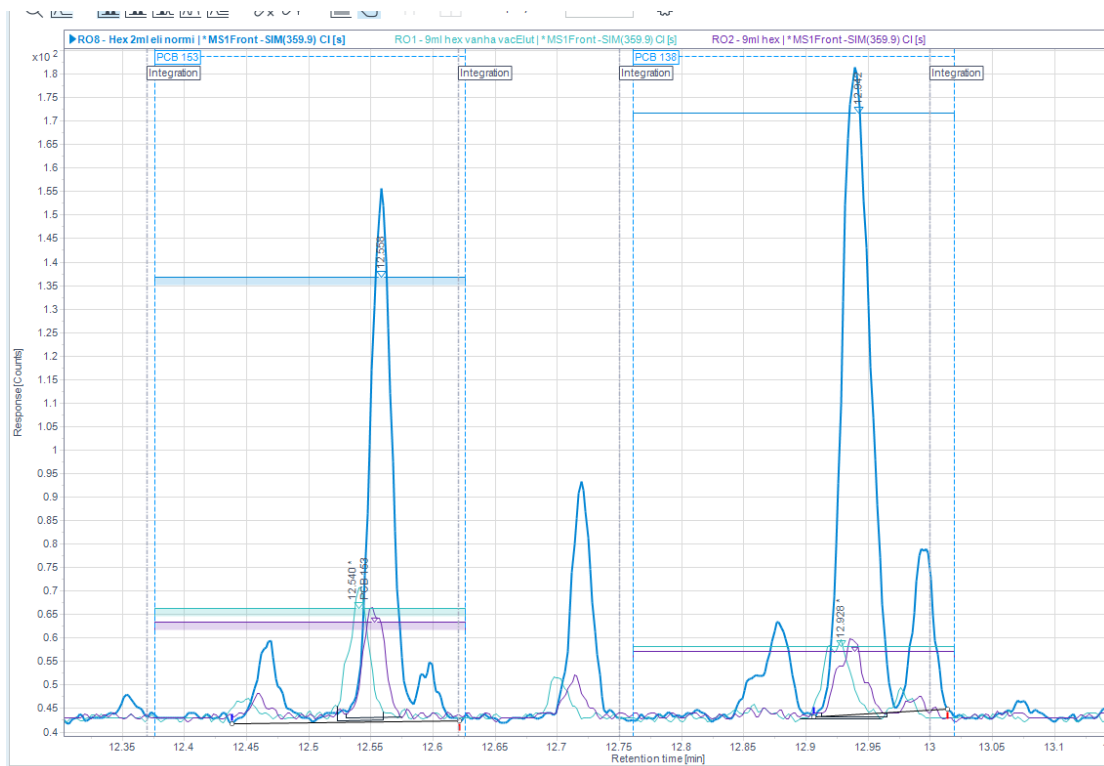
Ongelman ratkaisemiseksi testattiin pylväiden esipesua suuremmalla määrällä heksaanilla, ja testattiin esipesua sekä tolueenilla, että asetonilla. Muilla liuottimella esipeseminen tapahtui näin: esipestiin aluksi heksaanilla, jonka jälkeen pestiin 2–4 ml:lla asetonia tai tolueenilla. Lopussa esipestään vielä 4 ml:lla heksaanilla, pylväiden kylläistämistä varten, jotta esipesussa käytettyjen eri liuottimet eivät vaikuttaisi näytteen pylväspuhdistukseen negatiivisesti. Lopputuloksena eri liuottimen käytöstä vain tolueeni puhdisti näytteen saman verran kuin liitteen 4 kuvassa 1, 9 ml heksaanilla esipuhdistettu pylväs. Todettiin, että esipesussa on hyvä käyttää vain yhtä liuotinta.

Testattiin 10 ml:lla heksaanin esipesua, tulos havaitaan liitteessä 4 kuvassa 3, jossa suuremmalla määrällä on tullut enemmän epäpuhtauksia. Tulos oli yllättävä, mutta vähempi heksaanin käyttö on taloudellisesti edullisempaa. Esipesu 9 ml:lla heksaania ei ole sen käytännöllisempää. Jos on suurempia määriä näytteitä, tämä voi tuottaa ongelmia. Näytteet voivat jäädä esipesun takia pitempään rikkihappokäsittelyyn, näytteenkäsittelyssä näytteitä ei käsitellä samalla tavalla koska pitää ottaa huomioon käynnissä oleva pylväiden esipesu ja virheitä tapahtuu helpommin, kun keskittyminen on jaettu kahdelle tehtävälle.

Testattiin myös heksaaniliuotinta sekä jäteheksaania, jota on käytetty esipesussa, ennen uuttoja dietyylieetteri-heksaania. Näitä oli otettu noin 4 ml ja loppuhaihdutettu noin 300 µl analysoitavaksi. Lopputulos oli, että heksaani ei ole kontaminoitunut PCB:llä, eikä dietyylieetteri-heksaani ole kontaminoitunut. Liitteen 4 kuvassa 4 nähdään, että esipesu 9 ml:lla heksaania ja esipesu 2 ml:lla heksaania ei ole eroa. Tämä tulos tuotti hämmennystä. Hypoteesi oli, että pylväissä on epäpuhtauksia, jotka esipesulla jäävät jäteheksaaniin, ja näin pylväs on puhtas käytettäväksi.

Hankittiin uusi erä silika-ylväitä ja testattiin niitä. Tuloksena saatiin huomattavasti pienempi arvo, mutta nolla-arvoa ei vielä saavutettu kuten nollanäytteissä odotetaan. Kuvassa 4 on esitetty uuden ja vanhan erän vertailu. Kun tilattiin lisää pylväitä ja testattiin niitä, huomattiin, että vanha erä tuotti ongelmia

tuntemattomasta syystä. Päätettiin, että jos seuraavat erät ovat kunnossa, vanhoja eriä ei enää käytetä.



Kuva 4 Esipestyjen pylväiden vertailu, tumman sininen kromatogrammi kuvaa vanhaa pylväsmateriaalia

Kuvan 4 tumman sinisellä oleva piikki oli vanhalla pylväällä ja kun on käytetty ohjeen mukaan 2 ml heksaania esipuhdistuksessa. Violetilla oleva piikki on, kun vanhalla pylväällä on esipesty 9 ml:lla heksaania. Vaalean sininen piikki on testistä, jossa on tilattu uusi erä pylväitä ja esipesty 4 ml:lla heksaania. Kuvasta 4 käy ilmi, että vanhan erän 9 ml:n esipesulla ja uuden erän 4 ml:n esipesulla ei ole merkittävää eroa. Tämän perusteella voidaan todeta, että uuden erän käyttö 4 ml esipesulla on huomattavasti parempi käytännöllisyyden ja taloudellisuuden näkökulmasta.

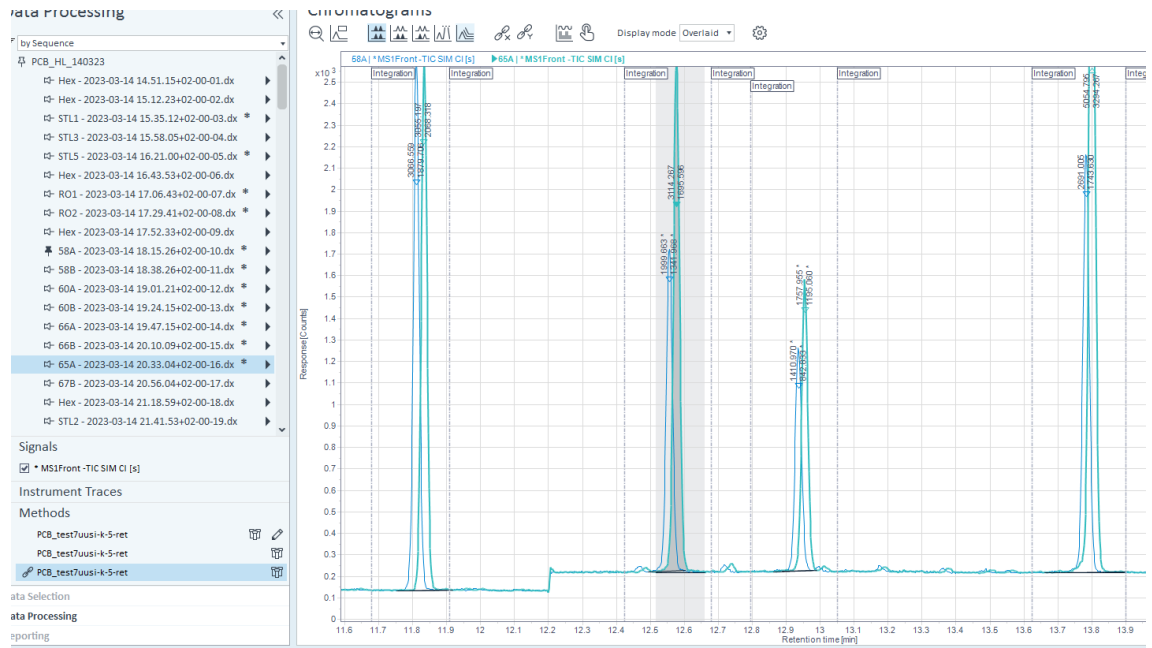
5.5 Retentioaikaan liittyvät ongelmat

Nollanäytteen ongelmien jälkeen havaittiin, että näytteiden retentioaika kasvaa myöhemmin, mitä enemmän näytteitä ajetaan. Väliaikainen ratkaisu löydettiin ajamalla liuotinta eli heksaania 2–3 kertaa ennen näytteen ajamista, mikä vähentää retentioaikaeron kasvua.

Tätä menetelmää verrattiin vanhan kolonnin ajoihin, joissa piikkien retentioajat olivat kasvaneet hieman, mutta eivät yhtä paljon kuin uudella kolonnilla. Huomattiin, että leimatut sisäiset standardit käyttäytyvät samalla tavalla kuin näyte. Jos ratkaisua tai syytä ei löydetä, niin voidaan tarkistaa leimattujen sisäisien standardien retentioajasta oikean piikin paikka.

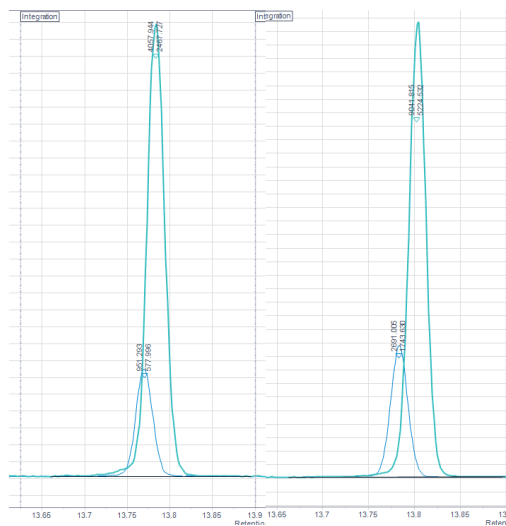
Jos retentioaika menee myöhemmäksi mitä enemmän näytteitä analysoidaan tarkoittaa, että näytteessä on vielä aineita, jonka takia se vaikuttaa seuraaviin ajoihin. Ratkaisuksi muutettiin uunin lämpötilaa korkeammaksi ja pidettiin uuni kuumana pidempään.

Toinen vaihtoehto oli vähentää injektioilavuutta. Tuloksista saatiin selville, että injektiomäärän vähentäminen parantaa retentioaikojen muutosta ajon aikana. Injektioilavuuden muuttamisen seurauksena pitää määrittää uusi määritysraja, joka on todennäköisesti pienempi kuin nykyinen määritysraja. Määritysrajan pieneminen vähentää ajomenetelmän herkkyyttä, mikä ei ole toivottavaa. Todettiin, että on parempi muuttaa uunin lämpötila-asetuksia. Jos muuttaminen ei korjaa retentioaikaeroja, niin pienennetään injektioilavuutta.



Kuva 5 Normaalialajo, jossa on verrattu näytettä 58A ja 65A. Näytteiden välissä on 5 muuta näytettä. Kromatogrammissa on retentioaikaeroja.

Kuvassa 5 on vertailtu kahta näytettä 58A sekä 65A, joiden välissä on ollut 5 muuta näytettä. Huomataan kromatogrammissa ilmenevän retentioaikaeroja, joiden retentioajat eroavat toisistaan. Näin ei pitäisi tapahtua, sillä näytteet sisältävät samoja PCB-yhdisteitä. Näytteet ovat kontrollinäytteitä, joten tiedetään niiden sisältävän juuri tiettyjä PCB-yhdisteitä.



Kuva 7 7 minuutin pitämisaika (vasen) verrattuna 5 min pitämisaikaan (oikea)

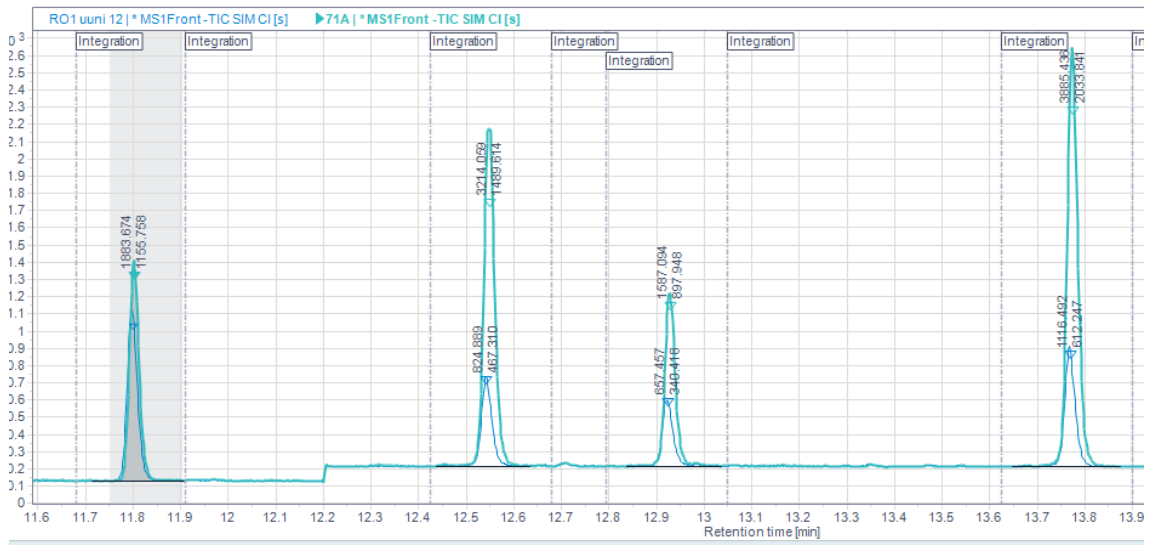
Taulukossa 10 on lopullinen ajo-ohjelma retentioaika ongelmien korjauksien jälkeen.

Taulukko 10. Retentioajan korjauksen jälkeinen ajo-ohjelma

Kaasukro- matografia	Kolonne DB-XLB	Tyyppi	Silikakapillaari
		Pituus	30 m
		Halkaisija	0,18 mm
		Paksuus	0,18 µm
	Kanto- kaasu	Kaasutyyppi	Helium 4,6
		Virtausno- peus	1,0 ml/min
	Injektori	Injektio tila- vuus	4 µl
		Injektio tila	Jakamaton
	Uunin läm- pötila- oh- jelma	Lämpötila alussa	110 °C - <u>Pitäytymis- aika 0,5 min</u>
		Lämpötila	Nousu 15 °C per/min <u>340 °C:seen</u> - <u>Pitäytymisaika 12 min</u>
Lämpötila lo- pussa		340 °C	
Massaspekt- rometria	Instru- mentti	Agilent 5977B	
	Ionisointi tila	Kemiallinen ionisointi (CI)	
	Analyytti- nen tila	SIM	

Jatkettiin testauksia muilla pitämisaajalla kuten 15 minuutin pitämisaikaa ja saavuttiin siihen lopputulokseen, että 12 minuutin pitämisaika on riittävä. Normaali ajo vanhalla kolonnilla kesti noin 30 minuuttia, ja sen pidempi kesto ei ole taloudellisesti kannattavaa TTL:lle. Alla olevassa kuvassa 8 on kromatogrammi

lopullisesta ajo-ohjelmasta. Kyseisellä ajo-ohjelmalla yksi ajo kestää 27,8 minuuttia.



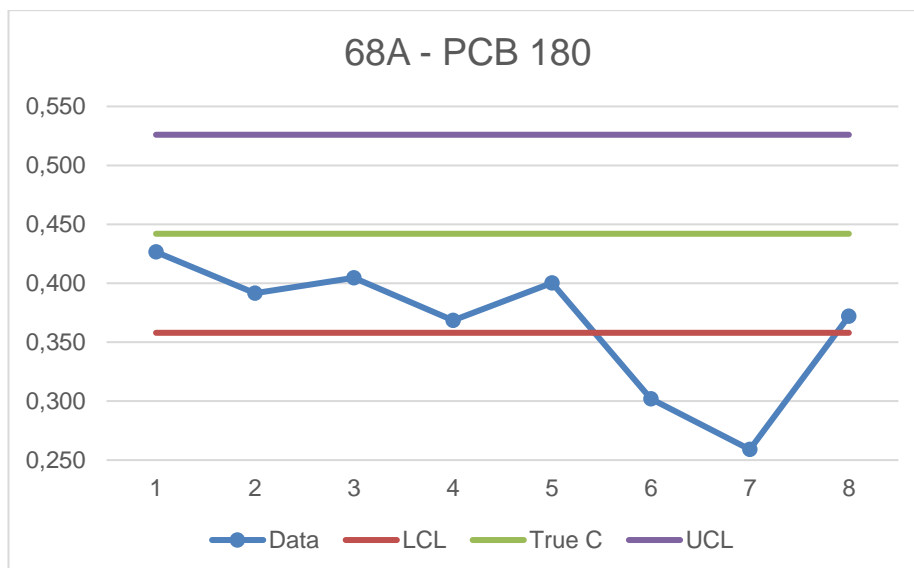
Kuva 8 Kromatogrammi, jossa uunin lämpötila ohjelmaa on muutettu taulukon 10:n mukaan.

Kuvan 8 kromatogrammista havaitaan, että riittää, jos muutetaan lämpötila-ohjelmaa, joten injektioilavuuden pienentäminen ei ole tarpeen.

6 Tuloksien tarkastelu

Testeissä käytettiin kontrollinäytteitä saksalaislaatukierroksilta (German Society of Occupational and Environmental Medicine) A- ja B-tasoa, kuten 58A, 58B, 60A, 60B, 61A, 61B, 65A, 66A, 66B, 67A, 67B, 68A, 68B, 69A, 69B, 70A ja 70B, joista 68A ja 68B olivat eniten käytettyjä. Kuvassa 9 näkyy kontrollin 68A:n PCB 180 -testattujen pitoisuuksien kuvaaja verrattuna todelliseen arvoon. Y-akselin yksikkö on $\mu\text{g/l}$. Kuvaajassa näkyy kontrollin yläraja (UCL), todellinen pitoisuus (True C) sekä alaraja (LCL). X-akselin arvot 1 ja 2 viittaavat ajokertoihin, joissa käytettiin vanhaa kolonnia DB-1701P eli ajokerta D-260123 sekä D310123. Kuvassa 9 ajokertoina 3–8 käytettiin uutta kolonnia DB-XLB. Ajokerta 6 D-020323 ja erityisesti ajokerta 7 eli D-070323 johtivat standardien liialliseen haihtumiseen, joten standardien teoreettinen arvo oli pienempi kuin todellisuudessa, jolloin kontrollinäytteiden arvot olivat myös vähentyneet. Tämän seurauksena kontrollit alittivat hyväksytyn rajan.

Liitteessä 3 nähdään kuvaajat kontrollinäytteille 68A ja 68B. PCB 138:n kuvaajista havaitaan, että 1, 2, 3 ja 4 ylittivät huomattavasti hyväksytyn rajan, mutta koska PCB 138 on aiheuttanut paljon ongelmia aiemmin asiakasnäytteissä, sitä ei otettu paljon huomioon. Ongelma ei ole ilmennyt yhtä usein uuden kolonnin käyttöönoton jälkeen.

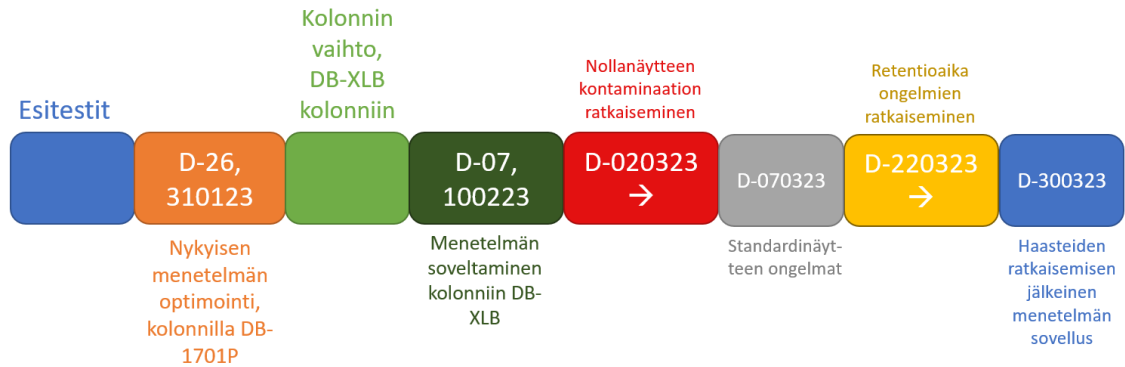


Kuva 9 Kontrollinäytteen 68A:n PCB 180-kontrollikuvaaja

Ajokerran 7 jälkeen tehtiin uudet standardit, jonka jälkeen alettiin käyttää standardeja vain yhden ajon verran, jotta sama ongelma ei ilmenisi. Ajokertana 7 oli ajettu näytteet 68, 69 ja 70 jonka jälkeen oli havaittu ongelma standardissa. Tästä seurasi uusien standardien teko, jonka jälkeen näytteet 69 ja 70 ajettiin uudelleen. Näytettä 68 ei ajettu uudelleen, koska sitä oli jo käsitelty monta kertaa ja ajokerta 8:ssä käytettiin samoja näytteitä uudelleen, joten se todettiin tarpeettomaksi. Näytteen 68 viides ajokerta vastaa näytteen 69 ajokertaa. Kuvassa 9 nähdään, miten ajokerran 7:n standardit ovat vaikuttaneet tuloksiin.

Alla olevassa taulukossa 11 on yksinkertaistettu tuloksien arvot ja siitä nähdään, että ajokertoina D-260123 ja D-310123 on onnistuttu soveltamaan leimatuja sisäisiä standardeja vanhaan menetelmään. Tulokset ovat suurimmaksi osaksi menneet läpi. Valitettavasti PCB 138:n tulokset ylittivät hyväksyttävän rajan. Seuraavilla ajokerroilla on vaihdettu uuteen kolonniin DB-XLB. Kontrollinäytteistä vain pieni osa alitti hyväksyttävän alueen. D-140123-ajokerran jälkeen nollanäytteen kontaminaatio oli selvitetty ja tulevien ajojen näytteenkäsittelyssä on käytetty 9 ml:n heksaanin esipesua ja sen myötä 4 ml:n heksaanin esipesua toisilla silika-pylväserillä. Tuloksista nähdään edellä mainitun ajokerran

7:n eli D-070323:n tarkat arvot.



Kuva 10 Analyysimenetelmän kehityksen aikajana

Kuvassa 10 on esitetty aikajana, joka auttaa hahmottamaan miten työ on edennyt.

D-100323-ajokerta onnistui hyvin ja kaikki kontrollinäytteet asettuivat hyväksyttävän rajan sisälle. Seuraavalla ajokerralla D-140323 ajettiin uusia näytteitä, osa näytteistä poikkesi hyväksytystä tasosta kuten näyte 60A. D-160323-ajokerralla suurin osa näytteistä asettui hyväksytylle rajalle, pieni osa näytteistä oli hyväksytyt alueen rajoilla. Ajokertana D-220323 ajettiin 61B ja 60A analysoitiin uudelleen, jotta voitaisiin tarkistaa, esiintyikö ongelma edelleen. Näyte 61B meni selkeästi läpi, kun taas 60A-näytteellä oli samat ongelmat. Tulosten perusteella vaikuttaa siltä, että näyte 60A saattaa olla trendi, jossa näyte alittaa hyväksyttävän rajan PCB 138:n pitoisuudelle. Muut näytteet ovat olleet hyväksyttäviä, joten syytä ei tunneta. Lisätestaaminen on tarpeen, jotta voitaisiin selvittää syy. Näytteen 60A:n tulokset ovat kuitenkin rajoilla, joten hyväksyttävän alueen alittaminen saattaa johtua mittausepävarmuudesta.

	D-160323						D-220323		D-300323	
	58A	61A	61B	60A	66A	67B	60A	61B	60A1	60A2
PCB 153	H	H	H	<u>A</u>	H	H	<u>A</u>	H	H	H
PCB 138	H	H	H	<u>A</u>	H	H	<u>A</u>	H	H	H
PCB 180	H	H	<u>A</u>	H	H	H	H	H	H	H

Seuraavassa ajossa D-300323 on ajokerta, jolloin on korjattu ja sovellettu retentioajan ratkaisu. Ajossa on analysoitu näyte 60A ja sen rinnakkaisnäyte. Näytteet olivat hyväksyttävällä alueella. Edellisten ajojen syynä saattaa olla epävarmuus.

Seuraavaksi testataan, riittääkö, jos on vain yksi sisäinen standardi joko PCB 116, 153, 138 tai 180. Liitteessä 5 on taulukko vertailusta. Sieltä havaitaan, että jos on leimattuja sisäisiä standardeja näytteitä jokaiselle PCB-yhdisteelle niin näytteet ovat hyväksyttävällä alueella.

Liitteessä 5 nähdään, että kun näytteitä verrataan siihen, jos on pelkästään PCB 116, 153, 138 tai 180 sisäisenä standardina, tulos ei ole sama kuin jos jokaisella yhdisteellä on oma sisäinen standardi. Tästä voidaan todeta, että pitää käyttää kaikkia kolmea yhdistettä sisäisenä standardina.

Liitteessä 2 taulukossa 1 on tarkemmat arvot kontrollinäytteen tuloksille.

7 Yhteenveto ja pohdinta

Opinnäytetyön tavoitteena oli analyysimenetelmän kehitys ja optimointi, käyttäen leimattuja sisäisiä standardeja sekä ajomenetelmän optimointia. Analyysimenetelmänä käytettiin kaasukromatografia-massaspektrometria-menetelmää. Työssä sovellettiin uusia leimattuja standardeja PCB 153, 138 ja 180, jotka korvaisivat nykyisen sisäisen standardin PCB 116. Koska leimatut sisäiset standardit ovat samoja yhdisteitä kuin tutkittavat analyytit, tulokset ovat luotettavimpia kuin nykyinen menetelmä. Leimatut standardit sovellettiin hyvin nykyiseen menetelmään, jolloin vaihdettiin DB-XLB-kolonneihin. Menetelmää sovellettiin uuteen kolonneihin, jonka jälkeen optimoitiin ajometodia.

Ajometodin optimoinnin aikana ilmeni haasteita, joista suuremmat haasteet olivat nollanäytteen kontaminaatio sekä retentioaika ongelma. Selvitettiin nollanäytteen kontaminaation lähde, joka oli puhdistuspylväät. Ratkaistiin esipesemällä nykyistä menetelmää suurempi määrä heksaanilla. Pienennettiin kontaminaation määrää, todettiin liiallisen esipesun olevan TTL:lle taloudellisesti sekä PCB-analyysin käytännön työskentelylle epäedullista ja työlästä.

DB-XLB-kolonnin vaihdon jälkeen retentioaika vaihtelu oli merkittävämpi. Todettiin todennäköisenä syynä siihen, että jokaisen näytteen jälkeen jää ylimääräistä ainetta. Ratkaisuksi uunin pitämisaikaa pidennettiin, jotta ylimääräinen materiaali haihtuisi pois. Lopuksi sovellettiin ratkaistut haasteet lopulliseen menetelmään.

Päästiin haluttuun tulokseen, eli sisäinen standardi PCB 116 voidaan korvata leimatuilla sisäisillä PCB 153, 138 ja 180:lla. Todennäköisesti TTL käyttää molempia sisäisiä standardeja, kun PCB 116:ta on vielä jäljellä. Tämä toisi lisää varmennusta tuleviin analyysihin. Luotettavimman tuloksen saamiseksi voi vielä yrittää selvittää, miksi puhdistuspylväissä on kontaminaatiota.

Tämän työn merkitys oli suuri. Nollanäytteiden kontaminaation selvittäminen, retentioaikaeron selvitys sekä PCB 116:n sisäisen standardin korvaaminen

leimatuilla sisäisillä standardeilla parantaa analyysiaikaa, analyysin tarkkuutta ja luotettavuutta sekä helpottaa tulosten tarkastelua.

Lähteet

- 1 Työterveyslaitoksen Verkkosivusto. Verkkoaineisto. Työterveyslaitos. <<https://www.ttl.fi/>>. Luettu 7.10.2022.
- 2 Learn About Polychlorinated Biphenyls. United States Environmental Protection Agency. Verkkoaineisto. <<https://www.epa.gov/pcbs/learn-about-polychlorinated-biphenyls-pcbs>>. Luettu 17.9.2022.
- 3 PCB-yhdisteen yleistiedot. Verkkoaineisto. <https://en.wikipedia.org/wiki/Polychlorinated_biphenyl>. Luettu 18.9.2022.
- 4 Pysyvät Orgaaniset Yhdisteet. Verkkoaineisto. Ympäristö. <<https://www.ymparisto.fi/pop>>. Luettu 23.9.2022.
- 5 Biomonitoring. 2017. Verkkoaineisto. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/biomonitoring/NDL-PCBs_Biomonitoring-Summary.html>. Luettu 25.4.2023.
- 6 Elvers B, Hawkins S, Schulz K, Russey W, Schaumann E (Eds.). 2006. Chlorinated Biphenyls. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 6th Edition. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- 7 Tukholman Sopimus. Verkkoaineisto. <https://en.wikipedia.org/wiki/Stockholm_Convention_on_Persistent_Organic_Pollutants>. Luettu 10.10.2022.
- 8 PCB- ja lyijymääritys vanhojen elementtirakennusten saumaussmassasta. Verkkoaineisto. Työterveyslaitos. <<https://www.ttl.fi/palvelut/laboratoriopalvelut/naytteenotto-ohjeet/pcb-ja-lyijymaaritys-vanhojen-elementtirakennusten-saumaussmassasta>>. Luettu 4.4.2023.
- 9 PCB ilmassa, rakennusmateriaaleissa ja pinnoilla. Verkkoaineisto. Työterveyslaitos. <<https://www.ttl.fi/palvelut/laboratoriopalvelut/naytteenotto-ohjeet/pcb-ilmassa-rakennusmateriaaleissa-ja-pinnoilla>>. Luettu 4.4.2023.
- 10 Polyklooratut bifenyylit (PCB), paastoseerumi, fS-PCB. Verkkoaineisto. Työterveyslaitos. <<https://www.ttl.fi/palvelut/laboratoriopalvelut/naytteenotto-ohjeet/polyklooratut-bifenyylit-pcb-paastoseerumi-fs-pcb>>. Luettu 4.4.2023.
- 11 Akkreditoidut Toimijat t013. Verkkoaineisto. Finas. <<https://www.finas.fi/toimijat/Sivut/default.aspx#k=t013>>. Luettu 4.4.2023.
- 12 Tietoa Meistä. Verkkoaineisto. Työterveyslaitos. <<https://www.ttl.fi/tietoa-meista>>. Luettu 4.4.2023.

- 13 Kaasukromatografia. Verkkoaineisto. Opetushallitus. <http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_2-5_kaasukromatografia.html>. Luettu 17.11.2022.
- 14 Jaarinen, Soili & Niiranen, Jukka. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. 5., uudistettu painos. Helsinki: Edita Prima Oy.
- 15 Niiranen, Jukka. 2020. Kromatografian perusteet, nestekromatografia ja Kaasukromatografia Luentomateriaali. Metropolia Ammattikorkeakoulu.
- 16 What is Mass Spectrometry. Verkkoaineisto. Broadinstitute. <<https://www.broadinstitute.org/technology-areas/what-mass-spectrometry>>. Luettu 4.4.2023.
- 17 Williams, C. M. 2006. Total Ion Chromatograms. In Encyclopedia of Analytical Chemistry.
- 18 Harris, Daniel C. 2016. Quantitative Chemical Analysis 9th edition. New York: W.H. Freeman and Company.
- 19 Selected Ion Monitoring. Verkkoaineisto. <https://en.wikipedia.org/wiki/Selected_ion_monitoring>. Luettu 13.4.2023.
- 20 Dr. Deepak. 2016. What is the difference between GC – MS Full Scan and Selected Ion Monitoring. Verkkoaineisto. <<https://lab-training.com/what-is-the-difference-between-gc-ms-full-scan-and-selected-ion-monitoring/>>. Luettu 15.4.2023.
- 21 Dspsystems.eu. 2018. PCB Standards and Standard Mixtures. Verkkoaineisto. <<https://www.dspsystems.eu/wp-content/uploads/2018/03/PCB-Standards-and-Standard-Mixtures.pdf>>. Luettu 25.4.2023.
- 22 Kyynäräinen, Tanja. 2012. Kromatografiset Parametrit. Luentomateriaali. Metropolia Ammattikorkeakoulu.
- 23 Seerumin PCB:n määrittäminen (fS-PCB). 2020. Työterveyslaitoksen Työohje.
- 24 SFS-EN 17322:2020. Environmental Solid Matrices. Determination of polychlorinated biphenyls (PCB) by gas chromatography. mass selective detection (GC-MS) or electron-capture detection (GC-ECD). 2020. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto.
- 25 Caprioli RM, Yates AJ, McLafferty FW. 1997. Tandem Mass Spectrometry. New York: John Wiley & Sons, Inc.

- 26 Laadunohjaus: menetelmien validointi ja laadussapito. 2022. Työterveyslaitoksen Työohje.
- 27 Laaduntarkkailunäytteet. Verkkoaineisto. Syke. <[https://www.syke.fi/fi-FI/Tutkimus__kehittaminen/Vesi/Mallit_ja_tyokalut/Pohjaveden_naytteenotto/Laaduntarkkailunaytteet\(41646\)](https://www.syke.fi/fi-FI/Tutkimus__kehittaminen/Vesi/Mallit_ja_tyokalut/Pohjaveden_naytteenotto/Laaduntarkkailunaytteet(41646))>. Luettu 13.4.2023

Liite 1 Määritysrajalaskuissa käytetyt nollanäytteiden arvot

Taulukko 1. Nollanäytteiden arvot, jota on käytetty määritysrajalaskuissa (D-160323 ja D-220323)

	RO1	RO2	RO3	RO4	RO5	RO6
PCB 153	0,029	0,011	0,010	0,022	0,023	0,011
PCB 138	0,037	0,015	0,012	0,028	0,032	0,013
PCB 180	0,015	0,008	0,006	0,014	0,017	0,008

Liite 2 Tulokset ja nollanäytteiden arvot, yksikkönä µg/l

Taulukko 1. Tulokset

BOLDilla tulokset = hyväksyttävien rajoilla, Alleviivatut tulokset = alle hyväksytyyn rajan,

Vihreällä alueella tulokset = hyväksyttävän alueen sisällä. Oranssilla alueella tulokset = hyväksyttävän alueen ulkopuolella

	D-260123		D-310123		D-070223		D-100223		D-140223			
	68A	68B	68A	68B	68A	68B	68A	68B	68A	68B	69A	69B
PCB 153	0,420	1,336	0,420	1,134	0,419	1,113	0,429	1,093	0,476	1,148	0,656	1,465
PCB 138	0,538	1,080	0,432	0,742	0,263	0,480	0,312	0,541	0,334	0,557	0,323	0,904
PCB 180	0,427	1,381	0,392	1,089	0,405	1,046	0,369	0,998	0,400	1,072	0,511	1,415

Uusi kolonni ->

	D-020323				D-070323		D-070323 - uudet standardit					
	68A	68B	69A	69B	70A	70B	68A	68B	69A	69B	70A	70B
PCB 153	0,326	1,236	0,549	1,238	0,390	0,788	0,283	0,875	0,620	1,373	0,454	0,844
PCB 138	0,208	0,607	0,258	0,720	0,206	0,455	0,195	0,427	0,297	0,829	0,250	0,492
PCB 180	0,302	1,117	0,432	1,131	0,284	0,632	0,259	0,753	0,526	1,250	0,346	0,684

Sama näytteenkäsittely kerta, 69 ja 70 ajettu samana päivänä kuin D-100323

	D-100323 - Uudet standardit						D-140323					
	67A	68A	68B	69A	69B	70A	70B	58B	60A	60B	66B	65A
PCB 153	0,235	0,395	1,097	0,613	1,418	0,464	0,821	0,982	0,153	1,103	0,486	0,203
PCB 138	0,216	0,250	0,541	0,310	0,831	0,249	0,474	0,119	0,097	0,822	0,347	0,109
PCB 180	0,220	0,372	1,020	0,516	1,272	0,359	0,661	0,800	0,065	0,562	0,527	0,253

	D-160323					D-220323		D-300323		
	58A	61A	61B	60A	66A	67B	60A	61B	60A 1	60A 2
PCB 153	0,059	0,385	0,680	0,149	0,245	0,619	0,150	0,733	0,153	0,158
PCB 138	0,046	0,197	0,419	0,096	0,094	0,484	0,090	0,461	0,118	0,098
PCB 180	0,030	0,154	0,275	0,061	0,256	0,552	0,056	0,286	0,063	0,069

Rinnakaisnäytteet

Taulukko 2. Hyväksyttävä raja, todellinen pitoisuus ($\mu\text{g/l}$) näytteille

Tolerable range - Hyväksyttävä raja									
	58A	58B	60A	60B	61A	61B	65A	66A	66B
PCB 153	0.060–0.102	0.988–1.522	0.152–0.224	1.043–1.469	0.326–0.572	0.605–1.001	0.176–0.320	0.221–0.353	0.442–0.700
PCB 138	0.045–0.099	0.115–0.235	0.098–0.152	0.759–1.113	0.185–0.341	0.411–0.675	0.101–0.197	0.084–0.162	0.344–0.530
PCB 180	0.027–0.057	0.733–1.327	0.054–0.108	0.512–0.770	0.145–0.271	0.278–0.446	0.230–0.416	0.220–0.418	0.489–0.807
	67A	67B	68A	68B	69A	69B	70A	70B	
PCB 153	0.186–0.300	0.550–0.850	0.314–0.512	0.956–1.472	0,526–0,838	1,245–1,929	0.385–0.601	0.746–1.148	
PCB 138	0.178–0.310	0.474–0.744	0.221–0.347	0.502–0.724	0,272–0,422	0,599–1,295	0.189–0.333	0.424–0.670	
PCB 180	0.181–0.319	0.491–0.851	0.358–0.526	1.026–1.464	0,443–0,731	1,266–1,998	0.299–0.485	0.627–0.981	

Todellinen pitoisuus									
	58A	58B	60A	60B	61A	61B	65A	66A	66B
PCB 153	0,081	1,255	0,188	1,256	0,449	0,803	0,248	0,287	0,571
PCB 138	0,072	0,175	0,125	0,936	0,263	0,543	0,149	0,123	0,437
PCB 180	0,042	1,030	0,081	0,641	0,208	0,362	0,323	0,319	0,648
	67A	67B	68A	68B	69A	69B	70A	70B	
PCB 153	0,243	0,700	0,413	1,214	0,682	1,587	0,493	0,947	
PCB 138	0,244	0,609	0,284	0,613	0,347	0,947	0,261	0,547	
PCB 180	0,25	0,671	0,442	1,245	0,587	1,632	0,392	0,804	

Taulukko 3. Nollanäytteiden arvot ($\mu\text{g/l}$)

Pylväiden esipesu 2 ml heksaanilla

	D-260123			D-310123			D-070223			
	RO1	RO2	KESKIARVO	RO1	RO2	KESKIARVO	RO1	RO2	KESKIARVO	
PCB 153	0,039	0,061	0,05	0,075	0,064	0,0695	0,076	0,051	0,0635	
PCB 138	0,117	0,142	0,1295	0,191	0,198	0,1945	0,128	0,119	0,1235	
PCB 180	0,022	0,027	0,0245	0,041	0,038	0,0395	0,033	0,024	0,0285	
	D-100223			D-140223						
	RO1	RO2	KESKIARVO	RO1	RO2	RO3	RO4	RO5	RO6	KESKIARVO
PCB 153	0,059	0,062	0,0605	0,067	0,083	0,077	0,046	0,094	0,064	0,0718
PCB 138	0,102	0,134	0,118	0,089	0,100	0,105	0,061	0,125	0,094	0,0957
PCB 180	0,033	0,034	0,0335	0,031	0,042	0,037	0,021	0,045	0,033	0,0348

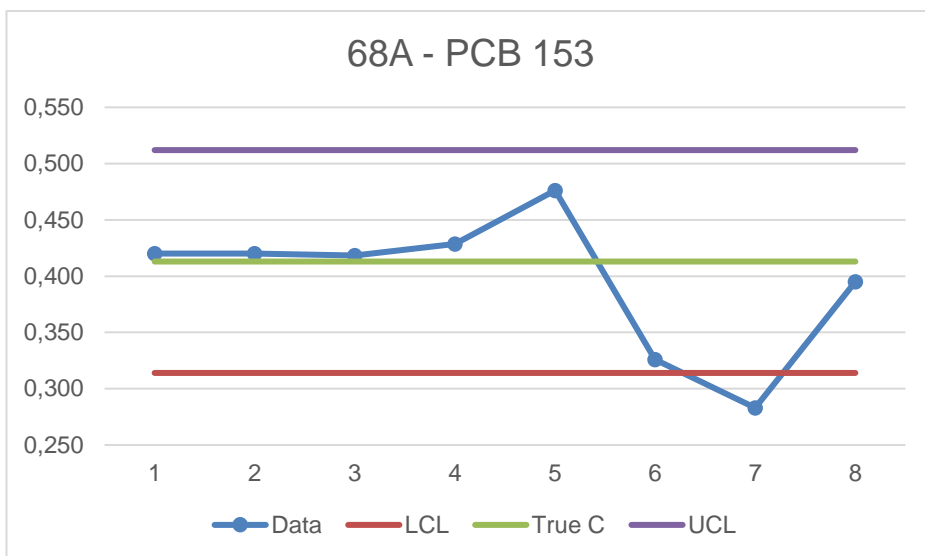
Pylväiden esipesu nyt 9 ml heksaanilla

	D-240223				D-280223			
	RO1	RO2	RO3	KESKIARVO	RO1	RO2	RO3	KESKIARVO
PCB 153	0,014	0,014	0,02	0,0160	0,015	0,013	0,02	0,0160
PCB 138	0,017	0,017	0,021	0,0183	0,017	0,016	0,02	0,0177
PCB 180	0,008	0,006	0,011	0,0083	0,008	0,007	0,01	0,0083
	D-020323							
	RO1	RO2	RO3	KESKIARVO				
PCB 153	0,010	0,015	0,017	0,0140				
PCB 138	0,012	0,017	0,018	0,0157				
PCB 180	0,006	0,007	0,008	0,0070				

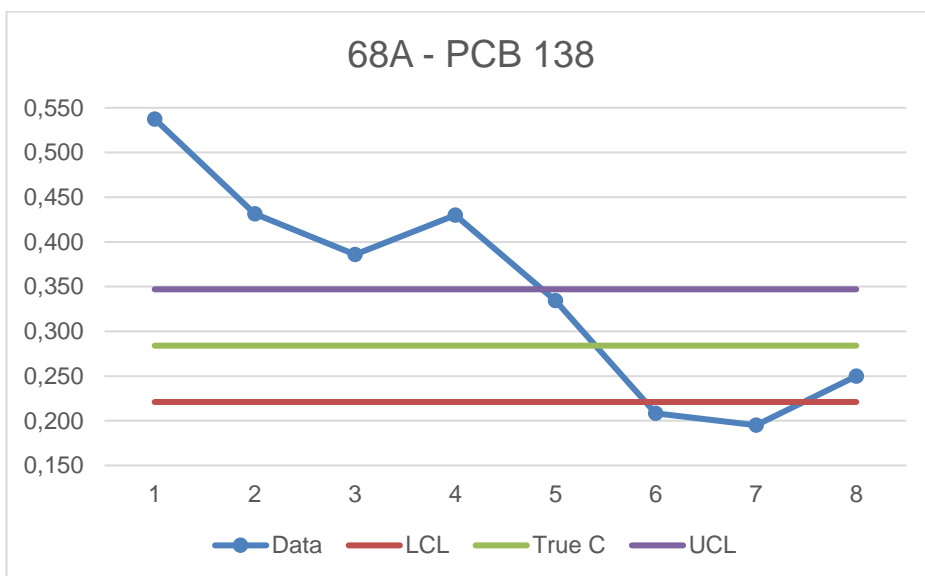
Uusi erä parempi 4 ml esipesu heksaani

	D-070323				D-090323			D-100323		
	RO1	RO2	RO3	KESKIARVO	RO1	RO2	KESKIARVO	RO1	RO2	KESKIARVO
PCB 153	0,021	0,014	0,004	0,0130	0,014	0,01	0,012	0,021	0,013	0,017
PCB 138	0,027	0,022	0,005	0,0180	0,018	0,014	0,016	0,026	0,016	0,021
PCB 180	0,012	0,009	0,002	0,0077	0,007	0,005	0,006	0,013	0,007	0,01
	D-140323			D-160323						
	RO1	RO2	KESKIARVO	RO1	RO2	RO3	KESKIARVO			
PCB 153	0,017	0,038	0,028	0,029	0,011	0,010	0,017			
PCB 138	0,02	0,048	0,034	0,037	0,015	0,012	0,021			
PCB 180	0,009	0,019	0,014	0,015	0,008	0,006	0,010			
	D-220323				D-300323					
	RO1	RO2	RO3	KESKIARVO	RO1	RO2	KESKIARVO			
PCB 153	0,022	0,023	0,011	0,019	0,029	0,018	0,024			
PCB 138	0,028	0,032	0,013	0,024	0,03	0,022	0,026			
PCB 180	0,014	0,017	0,008	0,013	0,012	0,011	0,012			

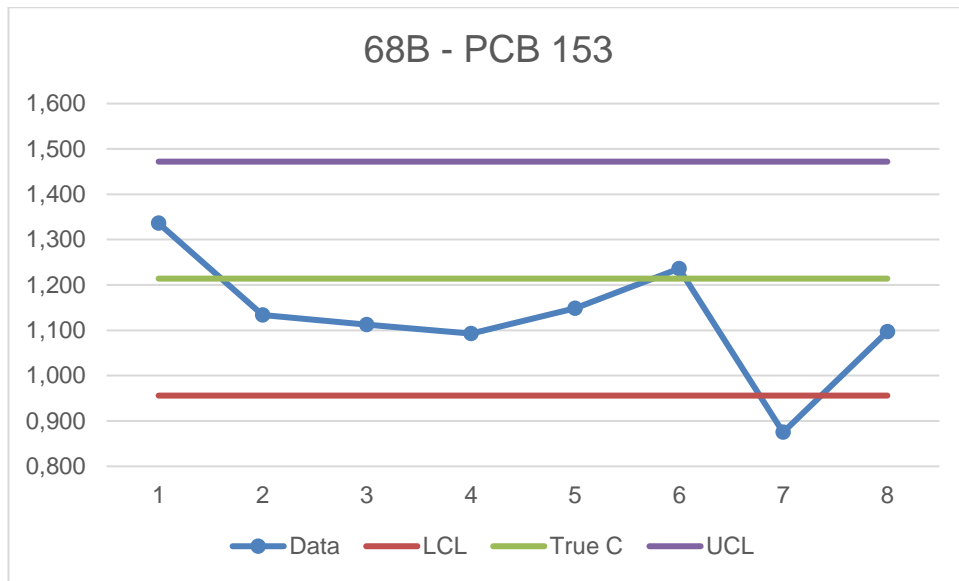
Liite 3 Kontrollinäyte 68A ja -B:n kuvaajat



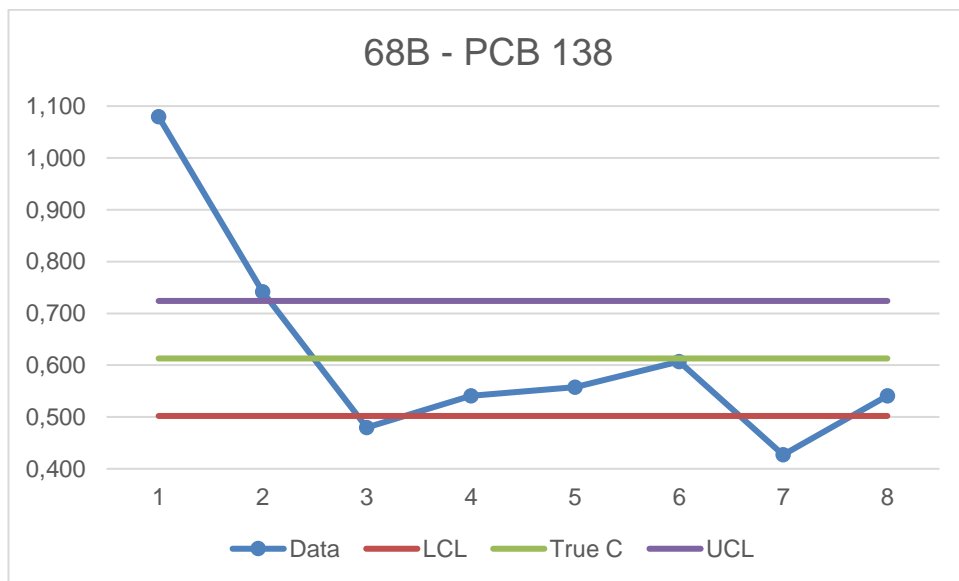
Kuva 1 Kontrollinäyte 68A - PCB 153 kontrollikuvaaja



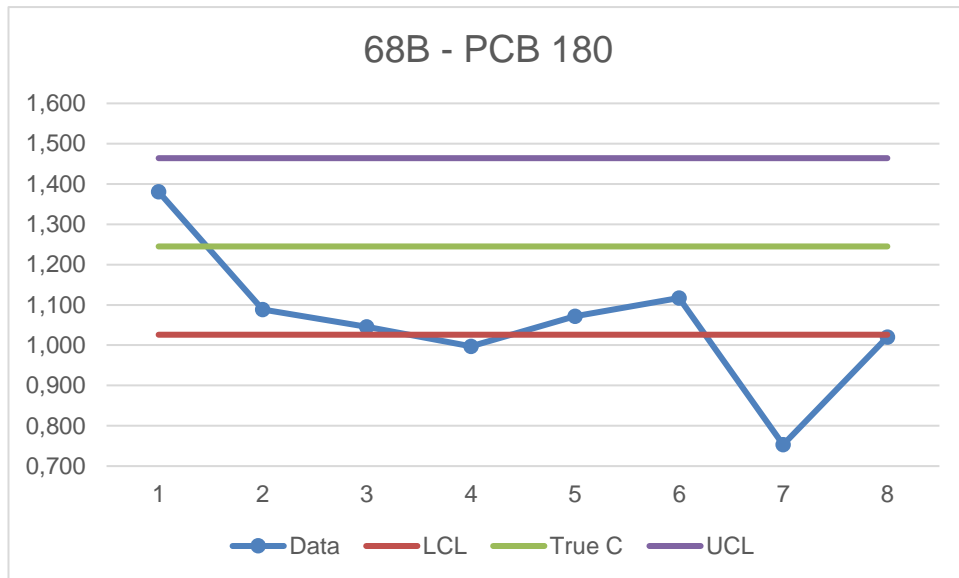
Kuva 2 Kontrollinäyte 68A - PCB 138 kontrollikuvaaja



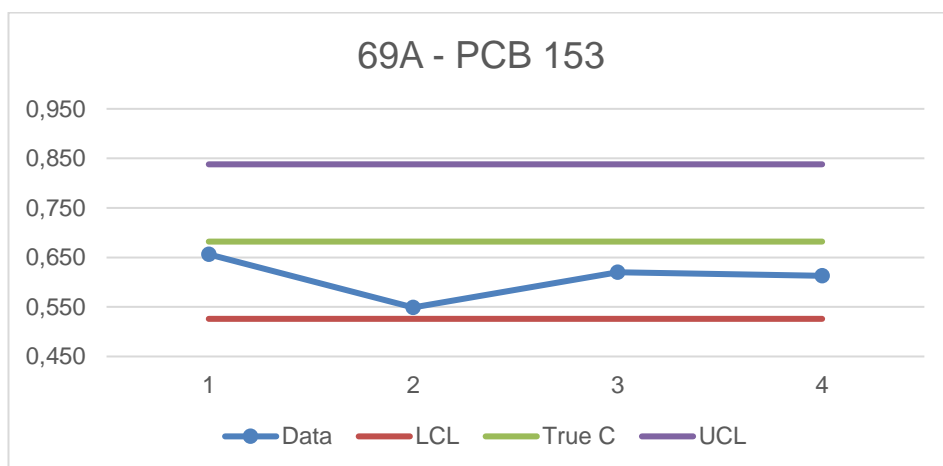
Kuva 3 Kontrollinäyte 68B - PCB 153 kontrollikuvaaja



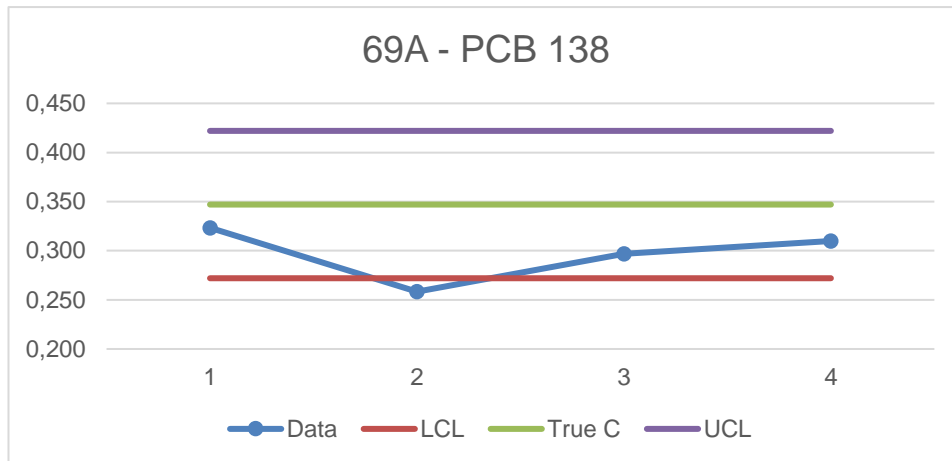
Kuva 4 Kontrollinäyte 68B - PCB 138 kontrollikuvaaja



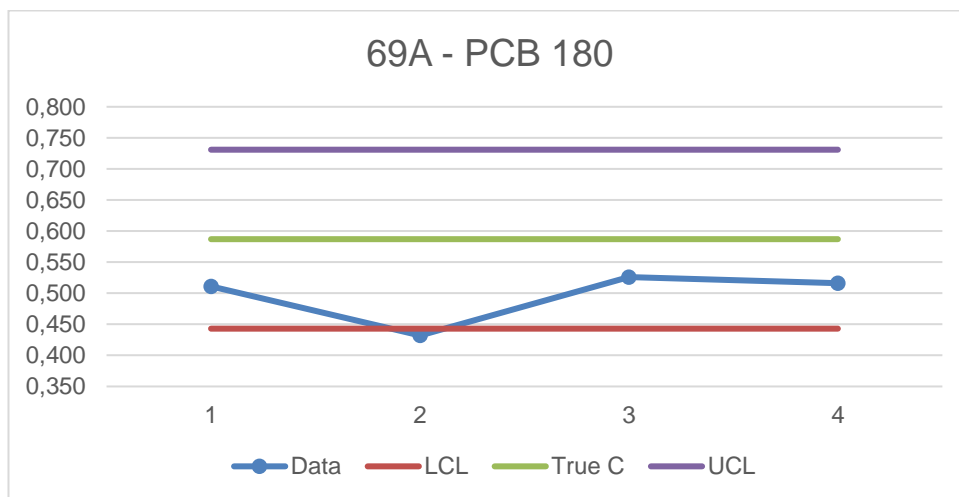
Kuva 5 Kontrollinäyte 68B - PCB 180 kontrollikuvaaja



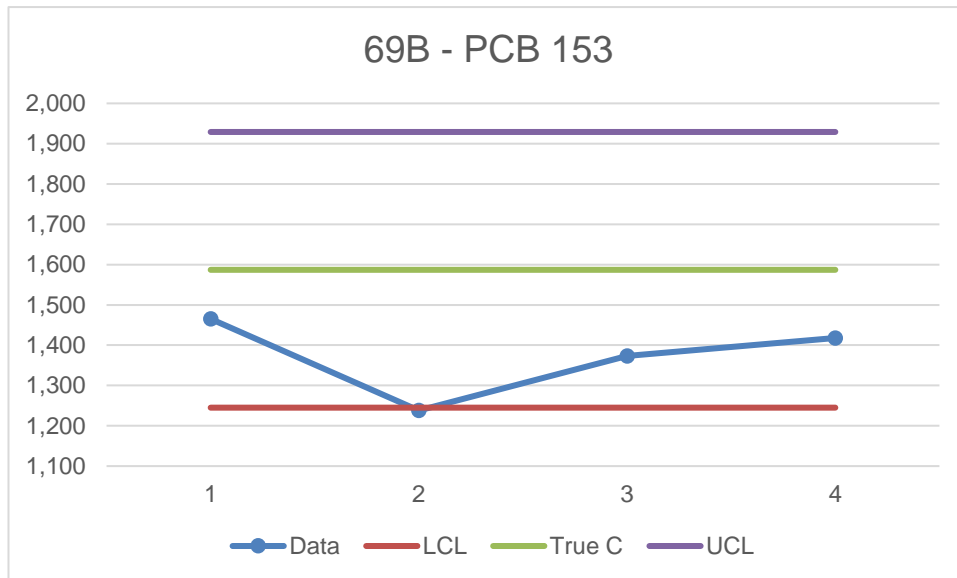
Kuva 6 Kontrollinäyte 69A - PCB 153 kontrollikuvaaja



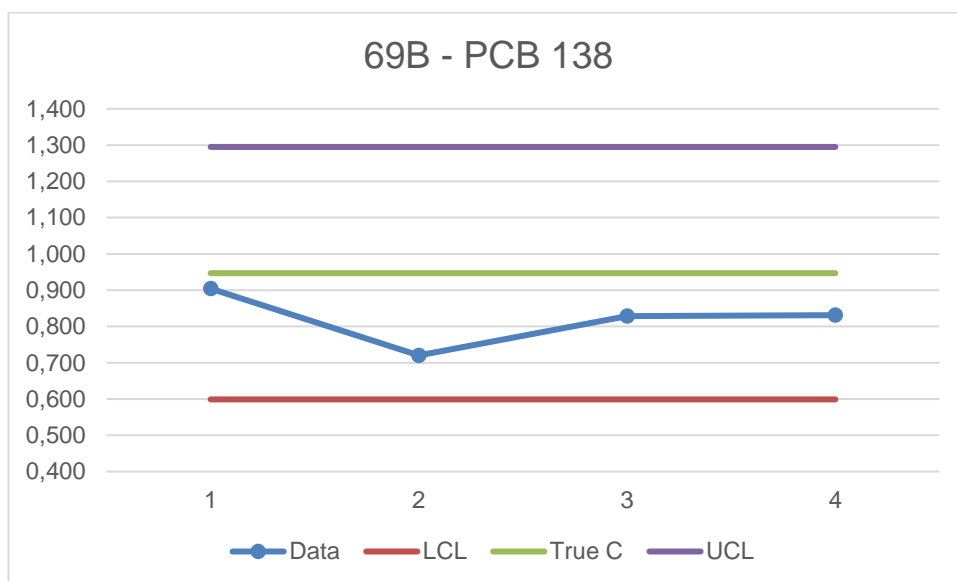
Kuva 7 Kontrollinäyte 69A - PCB 138 kontrollikuvaaja



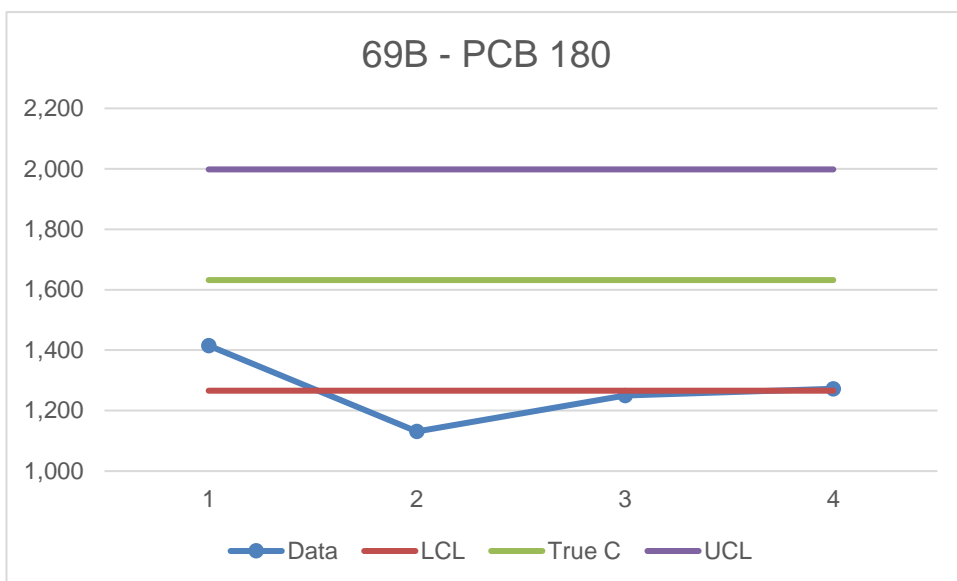
Kuva 8 Kontrollinäyte 69A - PCB 180 kontrollikuvaaja



Kuva 9 Kontrollinäyte 69B - PCB 153 kontrollikuvaaja

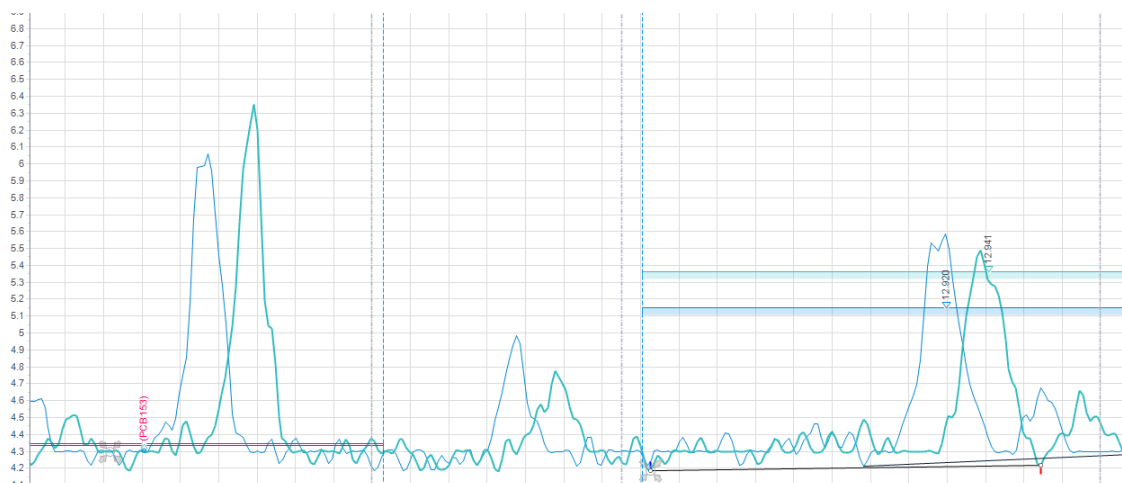


Kuva 10 Kontrollinäyte 69B - PCB 138 kontrollikuvaaja

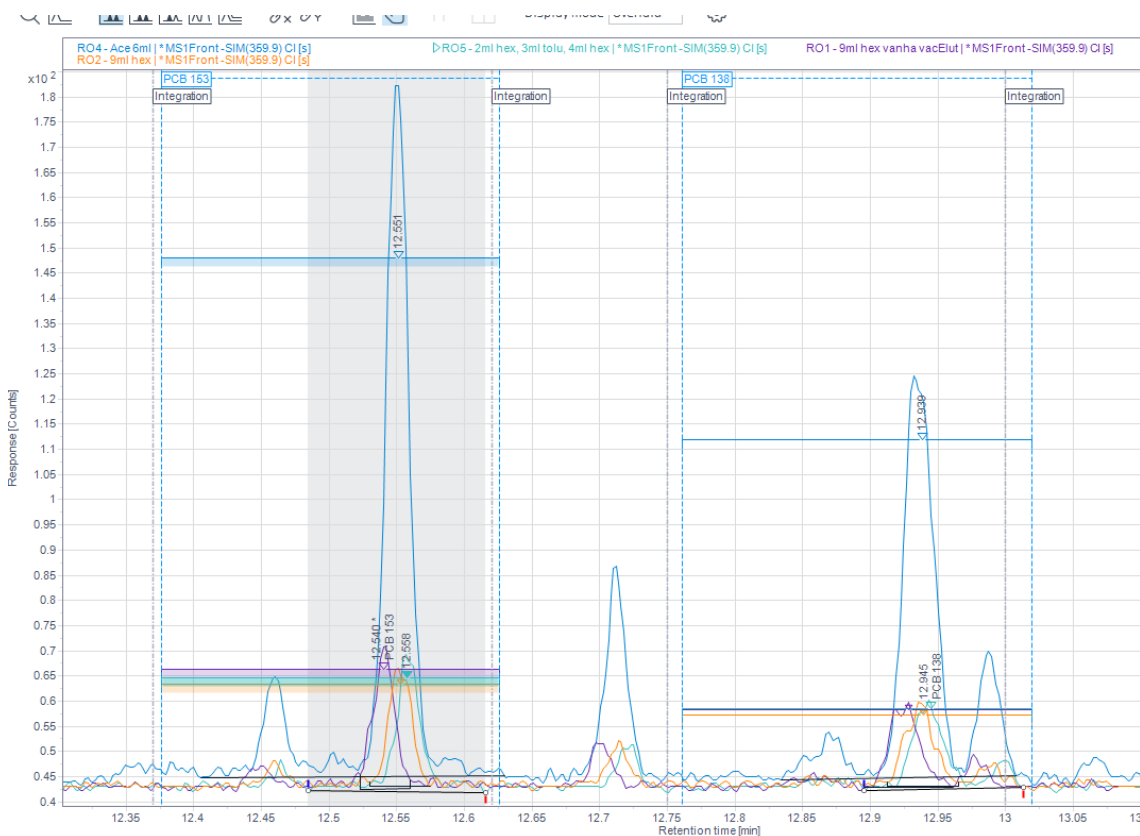


Kuva 11 Kontrollinäyte 69B - PCB 180 kontrollikuvaaja

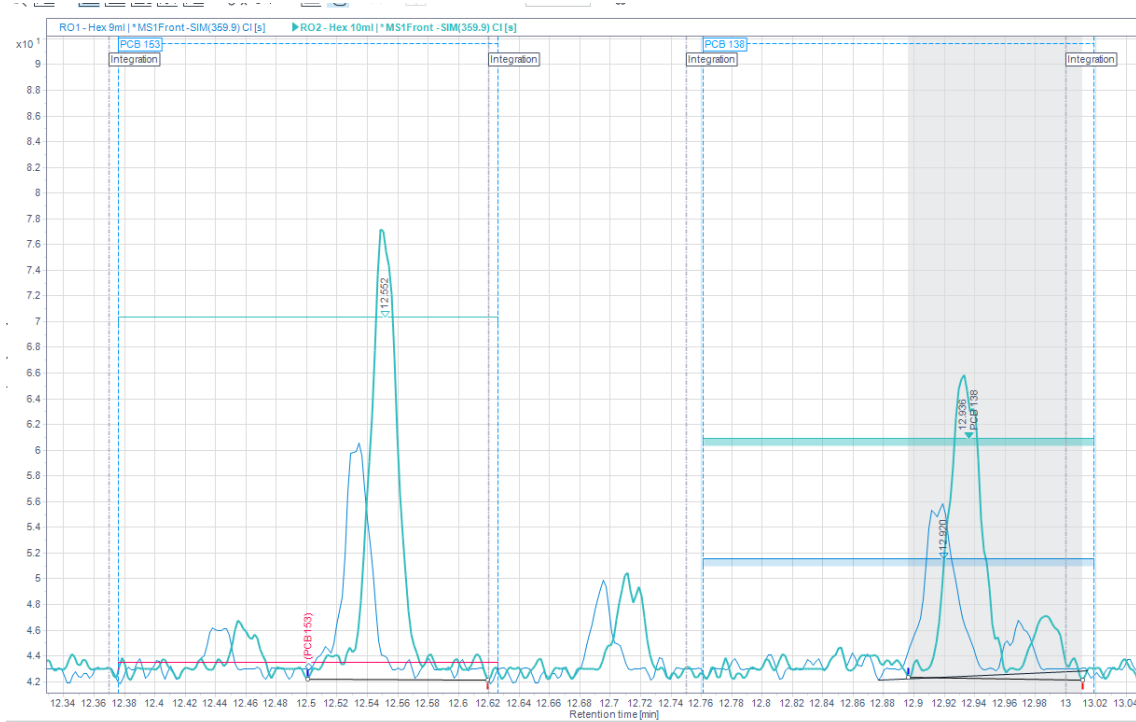
Liite 4 Pylväiden esipesun kromatogrammit



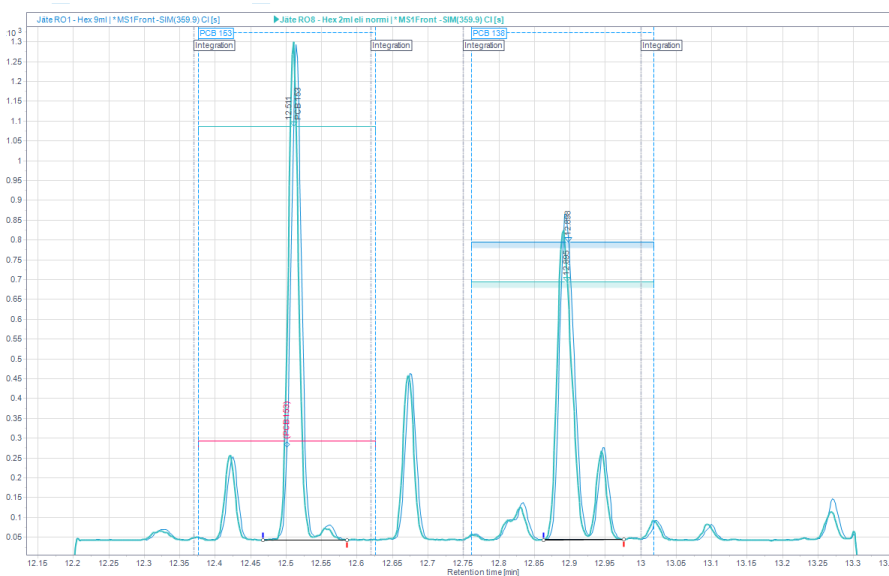
Kuva 1 Esipesu 9 ml heksaanilla (sininen) verrattuna toluenilla (turkoosi) ei ole eroa



Kuva 2. Esipesu asetonilla (tumman sininen), toluenilla (turkoosi), 9 ml heksaanilla (violetti ja oranssi).



Kuva 3. Esipesu 9 ml (tumman sininen) heksaanilla verrattuna 10 ml (turkoosi), 10 ml tuottaa enemmän epäpuhtauksia



Kuva 11. Esipesun jälkeinen oleva heksaanit, joista tumman sininen kromatogrammi kuvaa 9 ml heksaanin esipesua, ja turkoosi kuvaa 2 ml esipesua

Liite 5 Tulokset, jos on vain yksi sisäinen standardina

	58A	58B	60A	60B	61A	61B	65A	66A	66B	67A	67B	68A	68B	69A	69B	70A	70B
PCB 153	0,059	0,982	0,149	1,103	0,385	0,733	0,203	0,245	0,486	0,235	0,619	0,395	1,097	0,613	1,418	0,464	0,821
PCB 138	0,046	0,119	0,096	0,822	0,197	0,461	0,109	0,094	0,347	0,216	0,484	0,250	0,541	0,310	0,831	0,249	0,474
PCB 180	0,030	0,800	0,061	0,562	0,154	0,286	0,253	0,256	0,527	0,220	0,552	0,372	1,020	0,516	1,272	0,359	0,661
Verrattuna PCB 116																	
	58A	58B	60A	60B	61A	61B	65A	66A	66B	67A	67B	68A	68B	69A	69B	70A	70B
PCB 153	0,036	0,740	0,073	0,788	0,212	0,705	0,148	0,036	0,169	0,197	0,291	0,365	1,073	0,595	1,284	0,417	0,789
PCB 138	0,024	0,077	0,039	0,477	0,093	0,453	0,067	0,007	0,099	0,177	0,188	0,232	0,508	0,294	0,725	0,219	0,446
PCB 180	0,025	0,682	0,043	0,459	0,123	0,280	0,210	0,058	0,218	0,180	0,377	0,325	0,971	0,493	1,098	0,325	0,611
Verrattuna Leimattuun PCB 153																	
	58A	58B	60A	60B	61A	61B	65A	66A	66B	67A	67B	68A	68B	69A	69B	70A	70B
PCB 153	0,059	0,982	0,149	1,103	0,385	0,733	0,203	0,245	0,486	0,235	0,619	0,395	1,097	0,613	1,418	0,464	0,821
PCB 138	0,037	0,098	0,077	0,674	0,169	0,467	0,090	0,078	0,295	0,215	0,407	0,254	0,523	0,306	0,807	0,248	0,428
PCB 180	0,043	0,894	0,090	0,633	0,228	0,304	0,290	0,388	0,605	0,213	0,822	0,349	0,988	0,506	1,207	0,360	0,633
Verrattuna Leimattuun PCB 138																	
	58A	58B	60A	60B	61A	61B	65A	66A	66B	67A	67B	68A	68B	69A	69B	70A	70B
PCB 153	0,082	1,156	0,205	1,301	0,513	0,723	0,236	0,329	0,553	0,236	0,809	0,388	1,129	0,620	1,456	0,466	0,830
PCB 138	0,046	0,119	0,096	0,822	0,197	0,461	0,109	0,094	0,347	0,216	0,484	0,250	0,541	0,310	0,831	0,249	0,474
PCB 180	0,059	1,018	0,122	0,723	0,299	0,288	0,326	0,510	0,667	0,210	1,049	0,338	0,999	0,504	1,218	0,356	0,629
Verrattuna Leimattuun PCB 180																	
	58A	58B	60A	60B	61A	61B	65A	66A	66B	67A	67B	68A	68B	69A	69B	70A	70B
PCB 153	0,043	0,864	0,105	0,962	0,268	0,682	0,175	0,167	0,415	0,248	0,429	0,428	1,154	0,637	1,523	0,470	0,873
PCB 138	0,029	0,085	0,056	0,579	0,138	0,439	0,077	0,055	0,249	0,230	0,278	0,281	0,562	0,324	0,884	0,255	0,507
PCB 180	0,030	0,800	0,061	0,562	0,154	0,286	0,253	0,256	0,527	0,220	0,552	0,372	1,020	0,516	1,272	0,359	0,661
Todellinen pitoisuus																	
	58A	58B	60A	60B	61A	61B	65A	66A	66B	67A	67B	68A	68B	69A	69B	70A	70B
PCB 153	0,081	1,255	0,188	1,256	0,449	0,803	0,248	0,287	0,571	0,243	0,700	0,413	1,214	0,682	1,587	0,493	0,947
PCB 138	0,072	0,175	0,125	0,936	0,263	0,543	0,149	0,123	0,437	0,244	0,609	0,284	0,613	0,347	0,947	0,261	0,547
PCB 180	0,042	1,030	0,081	0,641	0,208	0,362	0,323	0,319	0,648	0,25	0,671	0,442	1,245	0,587	1,632	0,392	0,804