

Jesse Viksten

Diasetyylin ja 2,3-pentaanidionin määrittäminen sähkösavukenesteistä GC-FID- ja GC-MS-menetelmillä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinööryö

1.5.2016

Esipuhe

Aikuisopiskelu ja yli kahden vuosikymmenen työuran vaihtaminen uuteen ja epävarmaan on aina hyppy tuntemattomaan. Minulle tämän loikan ovat tuellaan ja kannustuksellaan mahdollistaneet rakas vaimoni Nina Viksten, sekä vanhempani Tuula ja Tero Viksten. Kiitos kaikesta. Olen velkaa ja omistan tämän insinöörin opinnäytetyön teille.

Opinnäytetyön ohjaajalleni lehtori Miika Kuivikolle myös lämmin kiitos, on ollut ilo seurata innostavaa ja asiantuntevaa opetustasi Onnentiellä. Haluan kiittää myös lehtori Mia Ruismäkeä validoinnin ohjaamisesta, sekä yliopettaja Jukka Niirasta kannustuksesta opinnäytetyöni kanssa. Lehtori Mikko Halsakselle ja koko Leiritien henkilökunnalle lämmin kiitos mielenkiintoisista bio- ja elintarviketekniikan vuosista. Opiskelukaverini Jussi Jämsén, Veera Lintola, Kristiina Liuska - kiitos yhteisistä kokemuksista.

Sitten asiaan. Nautintoaineita ja niiden valmistamista tai myytävänä pitoa koskevaa lainsäädäntöä valmistellaan Suomessa joskus objektiivisen arvioinnin, järjen ja arvioivan riskinhallinnan sijaan tunteella ja julkisuudessa osittain jopa kuvitteellisten riskien shokkiarvolla. Sähkösavukkeet sisällytetään Suomessa uuteen tupakkalakiin kesällä 2016. Sähkösavukelaitteiden sekä varsinkin makutiivisteiden saatavuutta käytännössä hankaloittavaa lakiesitystä ovat värittäneet tunnepitoiset argumentit sähkösavukenesiteiden tuntemattomista vaaroista. Huoli on varmasti aiheellista, mutta on perustunut myös suurelta osin tieteen sijasta tunteisiin ja tietämättömyyteen.

Tutkimustiedon puuttumiseen vetoaminen ei voi enää toimia perusteluna sähkösavukkeiden kieltolaille maassa, jossa tupakoinnin lopettamisen apukeinoksi tarjotaan nikotiinikorvaushoitoa tai jopa mielialalääkitystä. Toimikoon tämä insinöörin opinnäytetyö toivottavasti alkusysäyksenä kohti kattavaa, puolueetonta ja läpinäkyvää sähkösavuke-tutkimusta.

Lääke korvaa puuttuvan sielun,

lääke korvaa puuttuvan sielun,

ja outo maa, pitää hauskaa.

Outo maa. 1982. Terveet Kädet. Ääretön joulu 7" EP. Poko Records.

Tekijä(t) Otsikko	Jesse Viksten Diasetyyliin ja 2,3-pentaanidionin määrittäminen sähkösavu- kenesteistä GC-FID- ja GC-MS-menetelmillä
Sivumäärä Aika	52 sivua + 10 liitettä 1.5.2016
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	
Ohjaaja(t)	Lehtori Miika Kuivikko
<p>Opinnäytetyössä kehitettiin analyysimenetelmä sähkösavukenesteiden ja sähkösavu- kenesteissä käytettävien makutiivistenesteiden mahdollisesti sisältämien haitallisten haih- tuvien yhdisteiden kvalitatiiviseen ja kvantitatiiviseen määrittämiseen GC-FID- ja GC-MS- tekniikoilla. Määritettävät yhdisteet olivat 2,3-butaanidioni eli diasetyyli, 2,3-pentaanidioni eli asetyylipropionyyli sekä 3-hydroksi-2-butanoni eli asetoini.</p> <p>Tutkimuksen kohteeksi valitut kaksi diketonia ja asetoini ovat elintarvikekäyttöön hyväksyt- tyjä lisäaineita, joilla tavoitellaan tuotteissa yleensä voion, kerman tai paahtaisen karamelli- makuun. Elintarviketeollisuudessa näille aromeille on määritelty työskente- lyolosuhteissa altistukselle turvarajat, mutta vaikutukset hengitettynä ovat vielä epäselviä. Suomalaisista sähkösavukenesteistä ja makutiivisteistä tutkimusta ei ole vielä julkaistu.</p> <p>Työn tilaaja oli Vapers Finland ry. Opinnäytetyön tutkimukseen valittiin 36 eri kotimaista sähkösavukenesteiden makutiivistettä. Valintaa painotettiin makeiden ja kermaisten maku- tiivisteiden suuntaan, jotka oletettavasti voisivat sisältää tutkimuksen kohteena olevia yh- disteitä.</p> <p>Kaasukromatografisen GC-FID-menetelmän perusteella tutkimukseen osallistuneista ma- kutiivisteistä 19 % (7/36 kpl) sisälsi diasetyyliä. Määritetyt pitoisuudet olivat 6,5–177 µg/ml sähkösavukkeen käyttövalmiin liuoksen pitoisuutena ilmoitettuna.</p> <p>2,3-pentaanidionia sisälsi 39 % makutiivisteistä (14/36 kpl). 2,3-pentaanidionin pitoisuudet vaihtelivat diasetyyliä enemmän. Kymmenessä makutiivisteessä määritetty pitoisuus oli alle 100 µg/ml ja muissa neljässä reilusti korkeampia. Suurin määritetty pitoisuus 2,3- pentaanidionia sähkösavukkeen käyttöliuoksessa oli 1186 µg/ml.</p> <p>Asetoiinia menetelmällä määritettiin suurimmasta osasta eli 72 % makutiivisteistä (26/36 kpl). Määritetyn asetoinin pitoisuudet vaihtelivat matalista pitoisuuksista jopa 4000 µg/ml pitoisuuteen saakka. Neljä näytettä sisälsi asetoinia yli 1000 µg/ml käyttöliuoksen pitoisuu- tena ilmoitettuna.</p> <p>Tutkimuksen makutiivisteistä ei määrittämissä havaittu asetaldehydiä eikä formaldehydiä.</p>	
Avainsanat	Sähkösavuke, e-neste, diasetyyli, diketoni, höyryttely

Author(s) Title	Jesse Viksten Diacetyl and 2,3-pentanedione in electronic cigarette flavours
Number of Pages Date	52 pages + 10 appendices 1st May 2016
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	
Instructor(s)	Miika Kuivikko, Lecturer
<p>Diacetyl, 2,3-pentanedione and acetoin have been linked to respiratory symptoms and disorders among food industry workers. These flavour chemicals are commonly used and impart a rich, buttery flavour. These organic compounds are also likely to be present in sweet flavours and liquids used in electronic cigarettes. These diketones or flavour chemicals have been certified as safe for general use and ingestion. Nevertheless, they may not be safe to use in electronic cigarettes. Their presence in electronic cigarette liquids and flavours represents an avoidable risk.</p> <p>The objective of this thesis was to evaluate sweet-flavored electronic cigarette flavours for the presence of these compounds and to develop an analytical method for qualitative and quantitative analysis of these agents. Gas chromatography (GC) with mass spectrometry (MS) and flame ionization detectors (FID) was used to define the contents of the chosen 36 flavour samples. All of these flavours were developed and distributed in Finland. Sweet, buttery and creamy flavour profiles were emphasized in the selection of these samples.</p> <p>The client for this thesis was the Finnish vaping association, Vapers Finland ry. The study was conducted in Helsinki Metropolia University of Applied Sciences.</p> <p>Diacetyl or 2,3-butanedione was found in 19 % of the samples in concentrations ranging from 6,5 µg/ml to 177 µg/ml. Acetyl propionyl or 2,3-pentanedione was found in 39 % of the flavour samples in similar concentrations. Most of the samples contained acetoin as it was analysed in 72 % of the samples in concentrations up to 4000 µg/ml.</p> <p>The presence of carcinogenic aldehydes was also a point of interest in this thesis, but neither acetaldehyde nor formaldehyde was detected among the flavour samples.</p>	
Keywords	E-cigarette, e-liquid, diacetyl, diketone, vaping

Sisällys

Lyhenteet ja määritelmät

1	Johdanto	1
2	Sähkösavuke	4
2.1	Periaate ja laitteet	4
2.2	Sähkösavukenesteet	4
2.2.1	Valmisnesteet	5
2.2.2	Makutiivisteet	5
2.2.3	Pohjanesteet	6
3	Kotimaiset sähkösavukkeiden makutiivisteet	8
3.1	Kaasukromatografiasta yleisesti	8
3.1.1	Massaspektrometria	8
3.1.2	Liekki-ionisaatiodetektio	9
3.2	Menetelmät	9
3.3	Tutkimuksen makutiivisteet	10
4	Haihtuvat yhdisteet sähkösavukkeiden makutiivisteissä	11
4.1	Diasetyyli ja 2,3-pentaanidioni	11
4.2	Asetoiini eli 3-hydroksi-2-butanoni	14
4.3	Aldehydit	15
5	Kvalitatiivinen analyysi GC-MS-laitteistolla	16
5.1	Laitteisto	16
5.2	Käyttöönotto	16
5.3	Menetelmä	16
5.4	Alustavat tulokset	17
5.4.1	Glyserolin liuotinefekti	17
5.4.2	Triasetiini	18
5.5	Kvalitatiivinen analyysi	19
6	Kvalitatiivinen ja kvantitatiivinen analyysi GC-FID-laitteistolla	21

6.1	Laitteisto ja laitteiston käyttöönotto	21
6.2	Standardit ja liuottimet	24
6.3	Menetelmän kehittäminen	25
6.3.1	Kolonniuunin lämpötilaohjelma	26
6.3.2	Höyrystyskammio ja detektori	26
6.3.3	Näyteinjektio	26
6.3.4	Vanilliinien carry over	28
6.4	Menetelmä kvalitatiiviseen ja kvantitatiiviseen määrittämiseen	30
7	Kvantitatiivinen määrittäminen GC-FID-laitteistolla	32
7.1	Standardiliuosten valmistaminen	32
7.2	Kalibrointisuorat	33
7.3	Menetelmän toistettavuus ja selektiivisyys	36
7.4	Saantokokeet	37
7.5	Toteamis- ja määrittämissrajat	37
8	GC-FID-menetelmän analyysit ja tulokset	38
8.1	Analyysit	38
8.2	Tulokset	39
9	Kvantitatiivinen määrittäminen GC-MS-laitteistolla	42
9.1	GC-MS-menetelmän kalibrointi	42
9.2	Kvantitatiivisen määrittämisen tulokset GC-MS-menetelmällä	44
10	Yhteenveto	45
10.1	Kvantitatiivisten tulosten epävarmuus	45
10.2	Tutkimuksen merkitys kuluttajalle	46
10.3	Menetelmän kehitysehdotuksia	47
	Lähteet	49
	Liitteet	
	Liite 1. GC-MS-laitteiston menetelmä kvalitatiivisessa määrittämisessä	
	Liite 2. GC-FID-menetelmä kvalitatiivisessa ja kvantitatiivisessa määrittämisessä	
	Liite 3. Saantokokeiden tulokset	
	Liite 4. Esimerkkejä standardiliuosten analyysistä	
	Liite 5. Tulokset diasetyylin kvantitatiivisesta määrittämisestä	
	Liite 6. Tulokset 2,3-pentaanidionin kvantitatiivisesta määrittämisestä	

Liite 7. Tulokset asetoiinin kvantitatiivisesta määryksestä

Liite 8. GC-MS-menetelmä kvantitatiivisessa määryksessä

Liite 9. Tulokset kvantitatiivisesta määryksestä GC-MS-laitteistolla

Liite 10. GC-MS-analyysien pinta-alat ja retentioajat

Lyhenteet ja määritelmät

AC	Asetoiini eli 3-hydroksi-2-butanoni.
AP	2,3-pentaanidioni eli asetyylipropionyyli.
DA	Diasetyyli eli 2,3-butaanidioni.
ENDS	Electronic Nicotine Delivery System. Sähkösavuke.
FDA	Food and Drug Administration. Yhdysvaltojen elintarvike- ja lääkevirasto.
GC-FID	Gas Chromatography - Flame Ionization Detector. Kaasukromatografi, johon on yhdistetty liekki-ionisaatiotektori.
GC-MS	Gas Chromatography - Mass Spectrometry. Kaasukromatografi, johon on yhdistetty tektoniksi massaspektrometri.
GRAS	Generally Recognised As Safe. Yleisesti turvalliseksi luokiteltu.
PG	Propyleeniglykoli
REL	Recommended exposure limit. Suositeltu altistumisraja.
RT	Retention time. Retentioaika.
STEL	Short term exposure limit. Lyhytaikainen altistumisraja.
TWA	Time weighted average. Keskimääräinen altistumisraja.
VG	Kasvisglyseroli, glyseriini.

1 Johdanto

Sähkösavukkeet kehitettiin Kiinassa vuonna 2003. Sähkösavukkeet ovat viime vuosina yleistyneet ja osoittautuneet myös tutkitusti toimivaksi tavaksi vähentää tupakointia tai päästä tupakoinnista kokonaan eroon [1, s. 103]. Sähkösavukkeen fyysinen käyttökokemus vastaa läheisesti savukkeen polttamista ja tarjoaa tapariippuvaiselle tupakoitsijalle vähemmän haitallisen nikotiinin nauttimistavan ja vaihtoehdon pyrkiä savukkeista ja nikotiiniriippuvuudesta eroon [2]. Sähkösavuke ei sisällä tupakkaa, ja sen tuottamasta hengitettävästä höyrystä puuttuu oikein käytettynä tavallisen savukkeen palamisreaktioon liittyvät haitalliset ainesosat, kuten esimerkiksi formaldehydi, häkä, terva, nitrosoamiinit, asetoni, asetyleeni, DDT, lyijy, arsenikki ja kadmium [2, s. 7].

Sähkösavukkeen tuottama ”savu” on siis höyryä, pohjanesteen eli yleensä propyleeni-glykolin ja glyserolin sekä makuaineiden muodostama aerosoli. Sähkösavukkeissa ei tapahdu palamisreaktiota. Sähkösavukkeiden mahdolliset terveysriskit liittyvät nikotiinienesteiden sisältöön tai nesteiden kontaminantteihin sekä höyrymuodostuksen edellyttämän vastuksen kuumentamisen aiheuttamiin sivutuotteisiin.

Kesällä 2016 Suomessa voimaan tulevassa uudessa tupakkalaissa sähkösavuke rinnastetaan savukkeisiin ja muihin tupakkatuotteisiin ja siihen sovelletaan samoja rajoituksia. Sähkösavukkeissa ja niissä käytettävissä sähkösavukenesteissä saatetaan todennäköisesti voimaan tupakan tavoin rajoituksia koskien niissä käytettäviä makuaineita eli esimerkiksi mentholia sekä karamelli- ja hedelmämakeita. Makuainekielltoa on perusteltu lakiesitysvaiheessa sähkösavukkeiden houkuttelevuuden vähentämisellä nuorten keskuudessa, mutta myös makuaineiden tuntemattomien vaikutusten perusteella. Makuaineita on kansainvälisissä tutkimuksissa analysoitu, mutta tulokset ovat olleet osittain ristiriitaisia ja tutkimusten vertaisarviointi vähäistä.

Sähkösavukenesteiden makuaineet ovat eurobarometrin mukaan tärkein käyttäjäkokemukseen vaikuttavista ominaisuuksista [1, s. 89]. Perinteisen poltettavan tupakan maku ja käyttökokemus on aina lisätystä makuaineista huolimatta samankaltainen eli pohjimmiltaan palamistuotteiden hengittämistä. Sähkösavukkeen käytössä eli höyrytyksessä vastaavaa tunnusomaista makua ei varsinaisesti ole, sillä höyryä muodostavat

pohjanesteet ovat lähes mauttomia. Sähkösavukkeiden nesteitä ei sido savukkeiden makumaailma, ja niitä maustetaan hyvin monipuolisesti. Erilaisia makuja ja sekoituksia on myynnissä tuhansia. Kolmasosa käyttäjistä valitsee päivittäin tupakan kaltaisen tai tupakan makua jäljittelevän maun, mutta suurin osa käyttäjistä höyryttelee päivittäin hedelmä-, marja- ja jälkiruokamakuja tai näiden sekoituksia [3, s. 6].

Varsinkin hedelmä- ja marjamakuina käytetään sähkösavukenesteissä usein elintarvikemauista sovellettuja makutiivisteitä tai leivontaan tarkoitettuja propyleeniglykoliin uutettuja elintarvikemakuja sellaisenaan. Sähkösavukenesteissä käytettävät makutiivisteet ovat yleensä elintarvikekäyttöön hyväksytyjä sisäisesti nautittuna, mutta tutkimustietoa nesteiden vaikutuksista tai sisällöstä hengitettynä on vielä niukasti. Sähkösavukenesteet ovat vielä toistaiseksi tiukan viranomaisvalvonnan ulkopuolella ja luotettavan tiedon löytäminen vaikeaa ja kuluttajan omalla vastuulla.

Sähkösavukkeissa käytettävistä makuaineista diasetyyliin on epäilty liittyvän vakaviin hengityselinsairauksiin elintarviketeollisuudessa sille altistuvien työntekijöiden keskuudessa. Tulokset diasetyyliin yhteydestä esimerkiksi vakavaan keuhkorakkulatulehdukseen (bronchiolitis obliterans, niin sanottu "popcorn-keuhko") ovat ristiriitaisia, mutta asettavat joka tapauksessa diasetyyliin turvallisuuden ja tarpeellisuuden sähkösavukenesteiden makuaineena kyseenalaiseksi. [4.]

Diasetyyli on yleisesti käytetty makuaine elintarviketeollisuudessa ja sillä pyritään tuotteessa voin, kerman tai karamellimaisuuden makuun. Diasetyyliä esiintyy myös oluen ja viinin valmistuksessa sekä meijerituotteissa käymisprosessin sivutuotteena. Diasetyyli on voin ja hapanmaitotuotetuotteiden keskeinen aistittava aromiaine. Asetoiinia ja 2,3-pentaanidionia eli asetyyli propionyyliä käytetään aromiaineena diasetyyliin tavoin ja ne muistuttavat kemiallisilta ominaisuuksiltaan läheisesti diasetyyliä. Sähkösavukenesteissä edellä mainittuja makuaineita käytetään yleensä makeissa, kermäisissä tai karamellimaisissa sähkösavukkeiden makunesteissä. Paahteisen tai runsaan kermaisen maun aikaansaaminen ilman jotain näistä kolmesta yhdisteestä on sähkösavukenesteissä haastavaa. Tavallinen poltettava tupakka sisältää myös diasetyyliä ja 2,3-pentaanidionia. Määrät savukkeissa ovat kuitenkin monikymmenkertaiset sähkösavukenesteisiin verrattuna [4].

Opinnäytetyön tarkoituksena oli analysoida sähkösavukenesteiden ja erityisesti Suomessa valmistettavien ja myytävien sähkösavukenesteissä käytettävien makutiivistei-

den sisältöä. Opinnäytetyön tarkoituksena oli tuottaa tilaajalle tietoa, jonka perusteella tilaaja yhteistyössä nestevalmistajien kanssa kartoittaisi mahdollisuuksia vähentää tai poistaa haitallisina pidettynä yhdisteitä Suomessa valmistetuista ja myytävistä makutiivistenesteistä. Sähkösavukenesteitä ja niiden sisältämiä haitallisia haihtuvia yhdisteitä on jonkin verran jo tutkittu kansainvälisissä tutkimuksissa. [12; 13.] Kotimaisia sähkösavukkeiden valmisteita ja varsinkaan makutiivisteitä analysoivia tutkimuksia ei ole toistaiseksi julkaistu.

Opinnäytetyön tutkimuksessa päätettiin keskittyä kotimaisten makutiivistenesteiden kvalitatiiviseen sekä kvantitatiiviseen analyysiin kohdentaen huomio haitallisina pidettyihin diasetyyliin, 2,3-pentaanidioniin ja asetoiiniin. Tavoitteena oli myös tutkimuksen edetessä kiinnittää huomio muihin analyseissä mahdollisesti esiintyviin haitallisina tai vaarallisina pidettyihin yhdisteisiin, kuten esimerkiksi karsinogeenisiin aldehydeihin.

Opinnäytetyön tutkimus tehtiin Metropolian Onnentien toimipisteessä. Metropolian laboratoriolle ei ole akkreditointia, eikä laboratoriolle ollut valmiita validoituja menetelmiä valittujen yhdisteiden tutkimiseen. Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää yksinkertainen kaasukromatografinen määritysmenetelmä diketonien, kuten diasetyyliin ja 2,3-pentaanidionin, sekä asetoiinin määrittämiseksi sähkösavukenesteistä.

Opinnäytetyön tilaaja oli Vapers Finland ry. Yhdistys sopi hyvin opinnäytetyön tilaajaksi, sillä sen tavoitteena on vähentää tupakoinnista aiheutuvia haittoja tupakointia vähentämällä ja lisätä tietämystä sähkösavukkeista. Vapers Finland ry julkaisee ja kääntää tutkimustietoa, sekä pyrkii tiedottamaan ja vaikuttamaan sähkösavukkeita koskevaan lainsäädäntöön. Yhdistys on kaupallisesti riippumaton. [11.]

Opinnäytetyön tutkimukseen valittiin yhteensä 36 eri makutiivistettä. Opinnäytetyön analyysien tulokset julkaistiin makutiivisteitä nimeämättä. Analyysien tulokset toimitettiin tilaajalle ja makutiivisteiden toimittajille.

2 Sähkösavuke

2.1 Periaate ja laitteet

Sähkösavukkeet, jotka tunnetaan myös höyryttiminä, höyrykkeinä tai e-savukkeina, ovat vaihtoehto tavalliselle tupakoinnille. Arkikäytössä harvemmin esiintyvä tekninen määritelmä Electronic Nicotine Delivery System (ENDS) on kuvaava, sillä kyseessä on pohjimmiltaan sähköinen laite, jolla nautitaan makuaineilla maustettua nikotiinia. Sähkösavukkeet ovat siis akkukäyttöisiä laitteita, jotka kehittävät savun sijaan hengitettävää höyryä. Sähkösavukkeen ladattava akku lämmittää vastusta, jota kutsutaan atomisaattoriksi (kuva 1) tai höyrystimeksi. Vastukselle johdetaan nestesäiliöstä passiivisesti nestettä esimerkiksi pumpulista koostuvan väliaineen avulla.



Kuva 1. Freemax Starre atomisaattori [5].

Metallista tai keraamista vastusta kuumennetaan sähkösavuketta käyttäessä ja höyryä tuottaessa noin 200 - 250 asteen lämpötilaan. Höyrystyvä neste eli e-neste sisältää propyleeniglykolia (PG), kasvisglyserolia (VG), makuaineita sekä usein myös nikotiinia.

2.2 Sähkösavukenesteet

Sähkösavukenesteiden kulutuksen ja mahdollisten haitallisten haihtuvien yhdisteiden saannon kannalta on tarpeellista ymmärtää nesteiden sisällön ja kulutuksen monimuotoisuus. Nesteen kulutukseen vaikuttaa suurelta osin käytettävät laitteet, kuluttajan höyryttelytyyli sekä osin myös nikotiinipitoisuus. Käytettävistä laitteista ja käyttötottumuksista riippuen sähkösavukkeen käyttäjän eli höyryttelijän päivittäinen nestekulutus

voi vaihdella esimerkiksi välillä 1–20 ml. Höyryttelijän päivittäinen nesteen kulutus on hyvin yksilöllistä, ja se tulisi ottaa huomioon nesteiden riskejä arvioitaessa. Nesteiden makuainepitoisuus on myös makutiivisteistä valmistetuissa nesteissä käyttäjän itse määriteltävissä, joten lineaarinen riskien arviointi pelkkään nesteen sisältöön perustuen voi olla harhaanjohtavaa.

2.2.1 Valmisnesteet

Sähkösavukkeissa käytettävät valmisnesteet ovat sellaisenaan höyryttelyyn sopivia ja ne sisältävät yleensä myös nikotiinia. Valmisnesteitä on saatavilla tuhansia eri makuja, ja niitä on myynnissä eri nikotiinivahvuuksilla. Yleisimmät makuprofiilit ovat hedelmä- ja tupakkamaut sekä erilaiset makeat sekoitukset. Valmiiden sähkösavukenesteiden eli e-nesteiden tuoteselosteissa mainitaan ainesosista yleensä pohjanesteen PG/VG-pitoisuus ja nikotiinivahvuus, mutta harvoin mitään muuta.

Osa nestevalmistajista ja jälleenmyyjistä ilmoittaa tuotteiden mahdollisesti sisältämät haitallisena pidetyt ainesosat, kuten diketonit, väriaineet tai allergeenit kuten pähkinän. Valmisnesteistä on saatavilla jonkin verran tarkempaa tuotetietoa esimerkiksi diasetyyliin, 2,3-pentaanidionin ja asetoiinin osalta, sillä osa nestevalmistajista ja jälleenmyyjistä on julkaissut tuotteiden kaasukromatografisten analyysien tuloksia.

2.2.2 Makutiivisteet

Makutiivisteitä käytetään sähkösavukenesteitä itse valmistettaessa tai sekoitettaessa. Makutiivisteet myydään yleensä propyleeniglykoliin uutettuna. Käyttäjä sekoittaa itse haluamansa vahvuisen käyttöliuoksen makutiivisteestä ja erikseen hankkimastaan propyleeniglykolista ja/tai glyserolista sekä halutessaan nikotiinista. Makutiivisteiden etuna on yleensä lopullisen höyryttelyvalmiin nesteen edullisempi hinta kuluttajalle ja käyttäjän omien makumieltymysten mukainen tai yksilöllinen lopputuote makutiivisteitä yhdistelemällä.

Makutiivisteiden laimennossuhde pohjanesteeseen on yleensä 1–20 %, riippuen makutiivisteiden vahvuudesta ja mausta. Pohjanesteinä käytettävät PG ja VG ovat suurina myyntipakkauksina hankintahinnaltaan huokeita ja pienten esimerkiksi 10 ml makutiivistepakkausten ostaminen erikseen etämyynnistä on kuluttajalle helpompaa kuin

nikotiinipitoisten valmisteiden ostaminen ulkomailta, joten makutiivisteiden käyttö on suosittua etenkin edistyneempien käyttäjien keskuudessa. Sähkösavukkeiden käyttäjien keskuudessa makuaineiden ja nestesekeitusten valmistaminen ja vertailu on myös iso osa kokemusta tai jopa harrastusta ja siihen liittyy vahva yhteisöllisyys ja kokemusten jakaminen toisten käyttäjien kanssa.

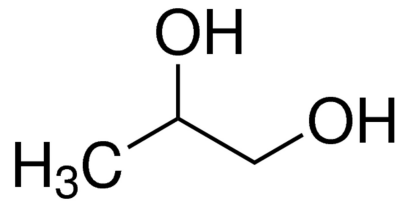


Kuva 2. Yhdysvaltalainen Capella Harvest Berry makutiiviste [6].

Makutiivisteitä (kuva 2) kuluttajat voivat ostaa koti- ja ulkomaisista höyryttelykaupoista. Makutiivistenesteiden tuoteselosteissa harvoin kerrotaan laimennossuhdesuosituksen ja oletetun makuprofiilin lisäksi mitään muuta tietoa tuotteesta.

2.2.3 Pohjanesteet

Sähkösavukenenesteissä höyryä tuottavana pohjanesteenä käytettävä propyleeniglykoli eli propaani-1,2-dioli (kuva 3) on synteettinen hygroskooppinen, eli vettä sitova, hajuton ja väritön olomuodoltaan siirappimainen neste. Propyleeniglykolia käytetään sähkösavukkeiden lisäksi kosteuden sitojana lääkevalmisteissa, kosmetiikassa ja elintarvikkeissa sekä esimerkiksi sikarihumidoreissa. [7.] Propyleeniglykolipohjaisia nesteitä käytetään myös jäänpoistossa ja lämmöntalteenottojärjestelmissä lämmönsiirtonesteenä. Propyleeniglykolia käytetään kosteuttajana myös nuuskan ja poltettavan tupakan lisäaineena.

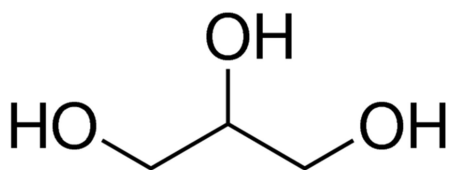


Kuva 3. Propyleeniglykolin rakenne [28].

Propyleeniglykolia käytetään elintarvikkeiden lisäaineena aromien ja lisäaineiden liuottimena sekä kantajana ja sen käytöstä ilmoitetaan Suomessa elintarvikelisiäinekoodilla E1520 [8]. Markkinoilla olevista makutiivistenesteistä suurin osa on PG-pohjaisia, sillä makuaineet ja aromit liukenevat hyvin propyleeniglykoliin ja liuos kestää hyvin säilytystä.

Propyleeniglykolin tavoin sähkösavukenesteissä höyryä tuottavana pohjanesteenä käytettävä glyseroli eli 1,2,3-propanitrioli on myös väritöntä hygroskooppista nestettä ja ominaismaultaan hieman makeaa. Glyseroli lukeutuu elintarvikekäytössä lisäaineena emulgointi-, stabilointi- ja sakeuttamisaineisiin ja sen elintarvikelisiäinekoodi Suomessa on E422 [9]. Glyserolia käytetään yleisesti liuottimena ja kosteuttajana kosmetiikassa ja elintarviketeollisuudessa [10].

Kasvisglyseroli eli VG (kuva 4) on huoneenlämmössä paksua viskoottista nestettä, ja siitä valmistettavan käyttövalmiin sähkösavukenesteen käsiteltävyyden helpottamiseksi siihen lisätään yleensä propyleeniglykolia tai joskus tislattua vettä.



Kuva 4. Kasvisglyserolin rakenne [29].

Valmisteiden ja makutiivistien myyntipakkauksissa on merkittynä yleensä tuotteen PG/VG-pitoisuus. Itse valmistettavan nesteen PG/VG-suhde on käyttäjän omien mieltymysten mukaan vapaasti valittavissa pohjanesteiden suhdetta muuttamalla.

3 Kotimaiset sähkösavukkeiden makutiivisteet

3.1 Kaasukromatografiasta yleisesti

Kromatografiassa tutkittava näyte jaetaan komponenteikseen tunnistamista ja pitoisuuksien määrittämistä varten. Komponenteiksi erottuminen tapahtuu kolonnissa, jossa on kaksi faasia, paikallaan pysyvä stationäärifaasi ja liikkuva faasi. Yhdisteiden erottuminen perustuu niiden kiinnittymiseen ja pidättymiseen stationäärifaasissa. Erilaiset yhdisteet kulkeutuvat liikkuvan faasin eli kaasukromatografiassa kantajakaasun mukana eri nopeudella stationäärifaasin läpi. [14, s. 140.]

Kaasukromatografiassa stationäärifaasi on yleisesti ohueen kapillaariputkeen ohueksi kerrokseksi sidottu nestefaasi. Mitä helpommin yhdisteet höyrystyvät, sitä nopeammin ne kulkevat kolonnin läpi. Eri nopeudella ja eri aikaan kolonnin läpi eluoituvat yhdisteet voidaan siten tunnistaa. Stationäärifaasin ominaisuudet, kuten esimerkiksi sen poolisuus, voivat vaikuttaa yhdisteiden eluoitusjärjestykseen. Kaasukromatografia sopii höyrystyvien yhdisteiden analytiikkaan. [14, s. 183.]



Kuva 5. Agilent 7890A -kaasukromatografi [15].

3.1.1 Massaspektrometria

Kaasukromatografian (GC, gas chromatography) erottelemat yhdisteet johdetaan kolonnissa viettämänsä ajan, retentioajan, mukaisessa järjestyksessä massaspektrometrin

(MS, mass spectrometry) ionisaattoriin, jossa ne ionisoidaan. Kaasuvirran ionit erotellaan ja tunnistetaan niiden massan ja varauksen suhteen. Ionisaatio tapahtuu vakuumpumpun ylläpitämässä tyhjiössä. Muodostuvasta massaspektristä nähdään ionien moolimassa ja yhdisteet voidaan sen perusteella tunnistaa tarkasti. [14, s. 207.]

3.1.2 Liekki-ionisaatiodektektio

Liekki-ionisaatiodektektiossa (FID, flame ionization detector) kolonnista läpi kulkeva kaasuvirta poltetaan vety-ilmaliekissä. Useimpien orgaanisten yhdisteiden palaessa syntyy ionisoituneita palamistuotteita. Kerääjäelektrodin ja polttimen välille muodostetun sähkökentän muutokset mitataan ja muodostuva signaali tulkitaan. Yhdisteiden tunnistamiseen tarvitaan vertailutietoa, sillä riittävän suuri pitoisuus jotain muuta yhdistettä voi antaa saman signaalin eli detektorivasteen. [16, s. 115; 17, s. 163.]

3.2 Menetelmät

Diasetyyliä esiintyy esimerkiksi oluen, viinin ja meijerituotteiden valmistuksessa käymistuotteena, joten diasetyylin määrittämiseen oli myös valmiita spektrofotometrisia menetelmiä [18]. Sähkösavukeneiteiden monimutkainen ja epähomogeeninen näytematriisi ei kuitenkaan sovellu järjestelmällisiin spektrofotometriin määrittäisiin, joten tutkimusmenetelmä kehitettiin kaasukromatografisia laitteistoja varten. Metropolian laboratoriossa oli valmiudet analysoida sähkösavukeneiteitä usealla eri kaasukromatografisella laitteistolla ja niissä erilaisilla detektio tavoilla. Tutkimukseen valittiin kaasukromatografi massaspektrometrillä (GC-MS) ja kaasukromatografi liekki-ionisaatiodektektorilla (GC-FID).

Farsalinoksen ym. [12] tutkimuksen mukaan sähkösavukeneiteiden sisältämät ainesosat ja yhdisteet esiintyvät vastaavasti myös sähkösavukkeen tuottamassa höyryssä. Opinnäytetyön tutkimus päätettiin tehdä makutiivisteistä kaasukromatografisesti suoraan nesteistä, eikä tehdä höyryn eli aerosolimuodon analyysistä koejärjestelyn haastavuuden takia. Automatisoidun höyryttelytilanteen koejärjestely olisi ollut mahdollinen, mutta sähkösavukkeen käyttäjän puuttuminen saattaisi johtaa virheellisiin tuloksiin. [19.]

Tutkimuksen tavoitteena oli analysoida makutiivisteet ensin kvalitatiivisesti GC-MS-laitteistolla ja kehittää sen jälkeen valituille yhdisteille kvantitatiivinen määritysmenetelmä GC-FID-laitteistolle. Massaspektrometrin etuna kvalitatiivisessa vaiheessa oli tarkka erotuskyky ja yhdisteiden tunnistus kirjastotietokannasta. GC-FID-laitteiston etuna kvantitatiivisessa vaiheessa oli menetelmän yksinkertaisuus ja kvantitoinnin selkeys, mikäli tutkittavat yhdisteet saataisiin erottumaan selkeästi toisistaan ja näytematriisista.

3.3 Tutkimuksen makutiivisteet

Opinnäytetyön tutkimukseen valittiin yhdessä tilaajan ja nestevalmistajien kanssa yhteensä 36 eri makutiivistettä. Makutiivisteitä tutkimukseen toimitti kahdeksan eri tuottajaa, kahdeltatoista eri kotimaiselta valmistajalta. Makutiivisteiden valinnassa keskityttiin pääosin makeisiin ja kermaisiin makuihin, jotka oletettavasti voisivat sisältää näitä aromeja tuottavia diasetyyliä, 2,3-pentaanidionia ja asetoiinia. Tutkimuksen tarkoituksena oli myös määrittää mahdolliset muut haitalliset yhdisteet, joita makutiivisteistä löytyisi. Tilaajan ja nestevalmistajien pyynnöstä opinnäytetyön tutkimus suoritettiin osittain salaisena. Tutkimuksen tulokset julkaistiin analysoituja nesteitä ja valmistajia nimeämättä. Makutiivisteiden täydelliset tulokset toimitettiin opinnäytetyön tilaajalle sekä kunkin makutiivisteiden toimittajalle.

Kaikki tutkimukseen valitut makutiivisteet olivat nikotiinittomia, kuten kaikki Suomessa myytävät sähkösavukkeiden valmisnesteet ja makutiivisteet. Tutkimukseen valituista makutiivisteistä ei ollut saatavilla suositellun laimennossuhteen ja makuprofiilin lisäksi muuta tietoa, eikä esimerkiksi luetteloa niiden sisältämistä ainesosista.

4 Haihtuvat yhdisteet sähkösavukkeiden makutiivisteissä

Massaspektrometriin yhdistetty kaasukromatografinen laitteisto (GC-MS) mahdollisti makutiivisteiden yksityiskohtaisen ja tarkan sisällön määrittämisen. Tarkasti tunnistettuja ainesosia makutiivisteissä oli analyyseissä kymmeniä. Kunkin makutiivisteiden lopullisen maku- ja tuoksuprofiilin määritteleviä aromiaineita, eteerisiä öljyjä ja estereitä tunnistettiin jokaisesta nesteestä useita. Määrät olivat yleensä pieniä.

Kaasukromatografisessa analyysissä havaittiin tutkimukseen valittujen makutiivisteiden koostuvan suurimmaksi osaksi

- kantoaineesta eli pohjanesteestä, yleensä propyleeniglykolista
- makeutusaineista, kuten maltolista ja etyylimaltolista
- vanilliinista ja etyylivanilliinista.

Pohjanesteen osuus makutiivisteestä oli yleensä noin 80 % ja maltolien sekä vanilliinien osuus usein noin 10 %. Makutiivisteistä havaittiin analyyseissä usein myös pieniä määriä alkoholeja, lähinnä etanolia sekä heikkoja orgaanisia happoja, kuten etikkahappoa ja bentsoehappoa. Liuottimena käytettävää etikkahapon etyyliesteriä eli etyyliasetaatia havaittiin myös useimmista tutkituista näytteistä. Orgaanisista aromiaineista nesteistä tunnistettiin esimerkiksi eukalyptolia, limoneenia ja eugenolia.

Opinnäytetyön tutkimuksen makutiivisteiden kaasukromatografisessa analyysissä huomio kiinnitettiin kuitenkin haitallisimpina pidettyihin diketoneihin eli diasetyyliin ja 2,3-pentaanidioniin sekä niitä muistuttavaan asetoiiniin. Yhtä tai useampaa näistä yhdisteistä löytyikin alustavissa kvalitatiivisissa analyyseissä yli puolesta tutkittavista makutiivisteistä.

4.1 Diasetyyli ja 2,3-pentaanidioni

Diasetyyli ja 2,3-pentaanidioni ovat kemialliselta rakenteeltaan visinaalisia diketoneja eli hiiliketjuja, joissa on kaksi ketoryhmää (C=O) vierekkäisissä hiiliatomeissa. Ne ovat pienimolekyylisiä ja herkästi haihtuvia yhdisteitä. Herkkä haihtuvuus tarkoittaa käytännössä myös sitä, että ne ovat tuotteesta tai elintarvikkeesta helposti aistittavissa.

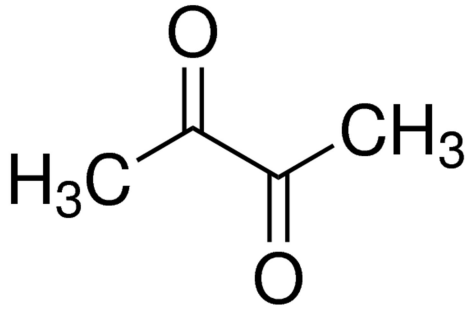
Vesiliuoksesta tai esimerkiksi oluesta diasetyylin aistittavuuden tai maistamisen kynnyksäraja on noin 50 ppb (50 µg/l) ja 2,3-pentaanidionin noin kymmenkertainen diasetyyliin nähden, eli noin 500 ppb (500 µg/l). [18.] Elintarvikkeissa ja myös esimerkiksi sähkösavukkeiden makutiivisteissä pitoisuuden aistimisraja voi vaihdella näytematriisin muiden komponenttien vuorovaikutusten myötä.

Kummallakin diketonilla on samankaltainen tunnusomainen maku. Ne aikaansaavat voin, kerman tai paahteisen karamellimaisuuden maun, josta sähkösavukeneesteissä käytetään yleisnimitystä "custard note", eli kermaisuus tai vanukasmaisuus (custard = maitokiisseli, vanukas). Makutiivisteet, joita kuvaillaan kermaisina, jäätelömäisinä tai pirttelömäisinä makeina jälkiruokamakuina, sisältävät usein näitä diketoneja tai asetooneja.

FDA (US Food and Drug Administration, Yhdysvaltojen elintarvikeviranomainen) on luokitellut nämä diketonit haitattomiksi (GRAS, generally recognised as safe, yleisesti luokiteltu turvalliseksi) elintarvikkeissa, mutta se ei ole toistaiseksi tehnyt näille luokitusta hengitettynä.

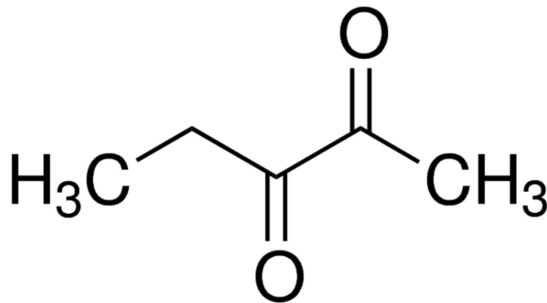
Diasetyylin ja 2,3-pentaanidionin hengittämisen on epäilty liittyvän vakaviin hengityselinsairauksiin elintarviketyöntekijöillä, jotka altistuvat työssään kyseisille aromiyhdisteille esimerkiksi popcornin valmistuksessa tai kahvipaahtimoissa. Popcornin diasetyyliä sisältävän voinmakuisen aromiaineen mukaan vakavaa keuhkosairautta bronchiolitis obliteransia kutsutaankin siihen sairastuneiden työntekijöiden mukaan popcorn-keuhkoksi. Diketoneille altistumisen on epäilty liittyvän myös muihin hengityselinsairauksiin, kuten keuhkojen tilavuuden ja hengitysvirtauksen muutoksiin. [20; 21.] Aromiaineiden tutkimuksissa ja rottakokeissa 300 ppm altistuksen diasetyyliä sisältäville aromiaineille havaittiin johtavan keuhkojen ja hengitysteiden epiteelikudoksen muutoksiin. [22; 23.]

Yhdysvaltojen työturvallisuusviranomainen NIOSH (The National Institute for Occupational Safety and Health) on määritellyt diasetyylille ja 2,3-pentaanidionille työperäisen altistuksen turvarajat.



Kuva 6. Diasetyyliin eli 2,3-butaanidionin rakenne [30].

Diasetyylille (kuva 6) suositeltu altistusraja (REL, recommended exposure limit) on 5 ppb ($18 \mu\text{g}/\text{m}^3$) kahdeksan tunnin työpäivän ja 40 tunnin työviikon keskiarvolle (TWA, time weighted average). Lisäksi hetkittäisen altistumisen kontrolloimiseksi NIOSH on määritellyt diasetyylille lyhytaikaisen altistumisen (STEL, short-term exposure limit) rajaksi 25 ppb ($88 \mu\text{g}/\text{m}^3$) keskiarvoksi viidentoista minuutin ajanjaksolle, jota ei saisi missään vaiheessa työpäivää ylittää. [24.]



Kuva 7. Asetyylipropionyylin eli 2,3-pentaanidionin rakenne [31].

2,3-pentaanidionille (kuva 7) suurin suositeltu suurin altistuminen (TWA) on 9,3 ppb ($38 \mu\text{g}/\text{m}^3$) 40 tunnin työviikolle ja lisäksi lyhytaikainen altistuminen (STEL) 31 ppb ($127 \mu\text{g}/\text{m}^3$) viidelletoista minuutille. 2,3-pentaanidionin suurempi pitoisuus altistusrajalla johtuu analyysimenetelmän ja yhdisteen määrittämisen rajoituksista eikä tarkoita, että se olisi diasetyyliä vaarattomampaa. [24.]

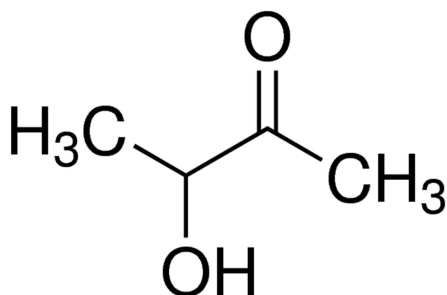
Kahdeksan tunnin altistumisajalle keskiarvotettuja turvarajoja (TWA) käytettiin opinnäytetyön tutkimuksen tulosten tulkitsemisessa ja potentiaalisesti hyväksytyjen raja-arvojen määrittämisessä. Ihmisen keskimääräiseksi hengitystiheydeksi oletettiin 15 kertaa minuutissa ja keskimääräiseksi hengitystilavuudeksi 0,5 litraa. Laskennallisesti 8

tunnin työpäivää vastaava hengitysmäärä on siis $3,6 \text{ m}^3$ ($[0,5 \text{ l} \times 15 \text{ kertaa minuutissa} \times 8 \text{ h} \times 60 \text{ min/h}] / 1000 \text{ l/m}^3$). Päivittäiset kynnyksarvot olisivat siis diasetyylille $65 \mu\text{g}$ ($18 \mu\text{g/m}^3 \times 3,6 \text{ m}^3$) ja 2,3-pentaanidionille $137 \mu\text{g}$ ($38 \mu\text{g/m}^3 \times 3,6 \text{ m}^3$). [12.]

Toisaalta tavallinen poltettava yksi savuke tuottaa diasetyyliä noin $285 \mu\text{g}$ ja 2,3-pentaanidionia noin $430 \mu\text{g}$. Päivittäisestä tupakoinnista saatavat diketonimäärät ylittäisivät jo siis reilusti työperäisen altistuksen turvarajat, joten diketoneille altistumisen ja keuhkosairauksien yhteys on osin epäselvä. Tupakoinnin seurauksena ei ole suoranaisesti diagnosoitu aromiaineiden diketoneihin yhdistettyä vakavaa keuhkosairautta, bronchiolitis obliteransia. Sähkösavukenesteiden sisältämän diasetyylin takia myös sähkösavukkeita on pidetty mahdollisena sairauden aiheuttajana, mutta yhtään tapausta ei ole virallisesti diagnosoitu. Diasetyyli, 2,3-pentaanidioni ja asetoiini ovat sähkösavukenesteisiin tarkoituksellisesti lisättyjä aromiaineita, ja näitä aineita sisältäviä nesteitä voi kuluttaja niin halutessaan välttää. Siten ne olivat tämänkin tutkimuksen mielenkiinnon kohteena ristiriitaisista tuloksista huolimatta. [20.]

4.2 Asetoiini eli 3-hydroksi-2-butanoni

Asetoiini (kuva 8) muistuttaa kemialliselta rakenteeltaan diasetyyliä, mutta toisen keto-ryhmän ($\text{C}=\text{O}$) tilalla on hydroksyyli-ryhmä (OH). Asetoiinille on myös ominaista voin tai kermaisuuden maku, ja sitä esiintyykin esimerkiksi hapanmaitotuotteissa.



Kuva 8. Asetoiinin eli 3-hydroksi-2-butanonin rakenne [32].

Asetoiinin aistimisen kynnyksraja vedestä on suurempi kuin esimerkiksi diasetyylin, noin $800 \mu\text{g/l}$ [18]. Makutiivisteisiin sovellettuna voidaan siten olettaa, että mikäli nesteessä on tavoiteltu kermaista makua diketonien eli diasetyylin tai 2,3-pentaanidionin sijasta asetoiinilla, on asetoiinin pitoisuus todennäköisesti suurempi kuin pelkkiä diketoneja

sisältävissä nesteissä. Asetoiinin haitallisuudesta diasetyyliin tai 2,3-pentaanidioniin verrattuna ei ole varmuutta. Edellä mainituista kolmesta yhdisteestä diasetyyliä pidetään tutkimustiedon perusteella haitallisimpana [25].

Asetoiinille ei ole määritelty työperäisen altistuksen turvarajoja, sillä tutkimustietoa asetoiinin vaikutuksista on vielä niukasti. Asetoiinia tavataan usein muun muassa diasetyyliin ja 2,3-pentaanidionin yhteydessä aromiaineissa, joten asetoiinin pitoisuus oli mielenkiinnon kohteena analyysissä. Diketonien ja asetoiinin välillä on myös suora yhteys, sillä asetoiini voi myös suotuisissa olosuhteissa esimerkiksi valon tai korkean lämpötilan vaikutuksesta pelkistyä hitaasti diasetyyliksi. [26.]

4.3 Aldehydit

Sähkösavukkeiden turvallisuudesta ovat herättäneet epäilyksiä myös niistä joissain tutkimuksissa havaitut karsinogeeniset aldehydit, kuten asetaldehydi, formaldehydi ja akroleiini. Farsalinoksen ym. [19, s. 276] tutkimustulokset osoittivat kuitenkin, että asetaldehydin ja formaldehydin kehittyminen sähkösavukkeissa vaatii tutkimusmenetelmälle ja testitapahtumalle epätavalliset tai peräti epäonnistuneet olosuhteet. Kyseessä oli sähkösavukkeen vastuksen kuivana palaminen eli niin sanottu "dry puff", jossa vastukselle nestettä kuljettava väliaine ei pysy nesteestä märkänä, vaan se kärehtää ja osin palaa vastusta kuumennettaessa. Palamistapahtuma on sähkösavukkeen käyttäjälle eli palokaasuja hengittävälle kivulias ja epämukava, eikä käyttöä pysty jatkamaan. Tutkimustilanteessa automatisoidun sähkösavukkeen käyttäminen kuivapolttotilanteessa monen sekunnin ajan vääristi koetilanteen todellisuuden vastaiseksi, eivätkä tulokset olleet vertailukelpoisia.

Edellä mainittujen karsinogeenisten aldehydien lisäksi hengitettynä mahdollisesti ärsyttävää kanelialdehydiä käytetään makuaineena makeisissa ja virvoitusjuomissa. Kanelialdehydiä tutkimuksen kohteena olevista makutiivisteistä löytyi GC-MS-analyysissä kahdesta nesteestä. Pienen alustavan löydösmäärän vuoksi kanelialdehydi ja karsinogeeniset aldehydit rajattiin tutkimuksen ulkopuolelle. Aldehydien kvalitatiivisessa ja kvantitatiivisessa määrittämisessä analyysit tulisi tehdä sähkösavukkeenesteiden aerosolimuodosta ja tuottaa analysoitava höyry varsinaisella sähkösavukelaitteistolla. Koejärjestelyn haastavuuden vuoksi tästä luovuttiin tämän opinnäytetyön tutkimuksessa.

5 Kvalitatiivinen analyysi GC-MS-laitteistolla

Opinnäytetyön tutkimuksessa makutiivisteet analysoitiin laimentamattomana ensin GC-MS-laitteistolla. Tavoitteena oli ensin hankkia tietoa makutiivisteiden sisällöstä ja testata tutkimusmenetelmän toimivuutta eri yhdisteiden erottamisessa. Kvalitatiivisten eli laadullisten analyysien pohjalta tutkimusmenetelmää muokattiin ja päätettiin jatko-toimenpiteistä kvantitatiivista eli määrällistä analyysiä varten GC-FID-laitteistolle.

5.1 Laitteisto

Tutkimukseen käytetty GC-MS-laitteisto koostui Agilent Technologies 7890A - kaasukromatografista (kuva 5), jossa detektorina oli Agilent Technologies MS 5975C - massaspektrometri. Näytteensyöttäjä oli Agilent Technologies 7693B Series -injektorin. Laitteiston ohjaamiseen käytetty ohjelmisto oli MSD ChemStationin versio E.02.00.493.

Kolonnina kaasukromatografissa oli matalapolaarinen Agilent Technologies HP-5ms (pituus 30 m x sisähalkaisija 0,250 mm x faasin paksuus 0,25 µm) ja kantokaasuna helium.

5.2 Käyttöönotto

Höyrystyskammion käyttökunto tarkastettiin ja injektoripään vaihdettiin uusi tiiviste eli septumi. Ensimmäisen viikon analyysien jälkeen tuloksissa ilmeni ongelmia ja epäjohtonmukaisuuksia ja niiden syyksi paljastui osittain injektoripäästä irronnut kapillaarikolonne. Kolonne irrotettiin, lyhennettiin kummastakin päästä noin 4 cm ja kiinnitettiin uudelleen ja uusi kolonnin pituus määritettiin laitteiston asetuksiin. Laitteistolle tehtiin sisäinen kalibrointi. Laitteiston erotuskyvystä sekä toimintavarmuudesta olivat osoituksena tasaiset ja hyvin erottuvat kromatogrammit.

5.3 Menetelmä

Menetelmässä (liite 1) oli kolonniuunin lämpötilan alkuasetuksena 40 °C ja sitä nostettiin 0,5 minuutin alkuvaiheen jälkeen 25 °C/min loppuarvoon 300 °C, jossa lämpötila

pidettiin vielä 5 min. Höyrystyskammion lämpötila oli 300 °C ja analyysit tehtiin split-suhteella 100:1. Septumihuuhtelun virtaus oli 2,0 ml/min ja kantokaasuna käytetyn heliumin virtaus kolonnissa oli 1,4 ml/min. Analyysin injektiomäärä oli 0,2 µl.

Pesuliuksena injektoiden välillä käytettiin tässä vaiheessa metanolia.

5.4 Alustavat tulokset

Kvalitatiivisen analyysin tarkoituksena oli erottaa ja tunnistaa makutiivisteissä esiintyvät yleisimmät yhdisteet. Analyysit onnistuivat aluksi hyvin, ja samankaltaisia tuloksia antaneet rinnakkaiset analyysit vahvistivat osaltaan menetelmän toimivuuden. Kolonnin erotuskyky ja näytteiden tunnistaminen kirjastotietokannasta (Agilent NIST05a) näyttivät riittävilä.

Makutiivisteiden sisältämä pohjaneste propyleeniglykoli näkyi kromatogrammeissa suurena vaihtelevana pylväänä 2,4–2,9 minuutin retentioajan välillä. Herkästi haihtuvat alkoholit, diketonit ja asetoiini näkyivät selkeästi retentioajan suhteen kuitenkin ennen propyleeniglykolia, ja ne erottuivat hyvin omiksi piikeiksi. Tuloksissa oli jonkun verran vaihtelua ja peräkkäisten rinnakkaisten analyysien välillä varsinkin pieninä määrinä esiintyvät yhdisteet tunnistettiin vaihtelevasti. Myöhemmin GC-FID-laitteistolla tämän havaittiin johtuvan propyleeniglykolipohjaisten makutiivisteiden viskoottisuudesta ja näyteinjektion ilmakuplittumisesta suurilla injektionopeuksilla. Analyyseissä oli havaittavissa ajoittain myös pesuliuksena käytetyn metanolin jäänteitä, ja pesuliuksen ristikontaminaatio otettiin huomioon tuloksia tulkittaessa.

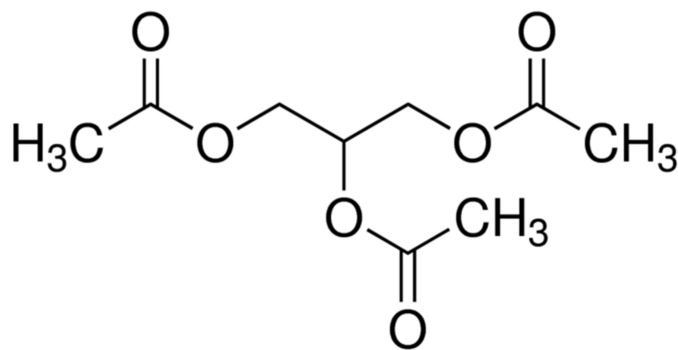
5.4.1 Glycerolin liuotinefekti

Analyyseissä havaittiin muutaman makutiivisteiden sisältävän pohjanesteenä propyleeniglykolin lisäksi myös kasvisglyserolia ja triasetiinia. Glyceroli vaikutti aiheuttavan kolonniin liuotinefektin eli muodostavan kolonnin erottelevan faasin päälle oman nestekalvonsa, sillä glyserolia sisältävien makutiivisteiden peräkkäisissä analyyseissä glyserolin määrä kasvoi ja levittäytyi kromatogrammiin laajemmalle alueelle retentioajan suhteen. Puhdasta glyserolia kokeeksi analysoitaessa havaittiin, ettei käytössä ollut menetelmä ja kolonni sopinut täysin glyserolipohjaisten näytteiden analysointiin. Kromatogrammit olivat epäselviä, ja glyseroli vaikutti pidättyvän kolonnissa. Myös näyt-

teen injektiossa vaikutti olevan ongelmia glyserolin suuresta viskoottisuudesta johtuen. Täysin glyserolipohjaisia nesteitä toimittaneelta nestevalmistajalta pyydettiin tutkimukseen tilalle propyleeniglykolipohjaiset makutiivisteet, joilla glyserolin ongelmia ei enää ilmennyt.

5.4.2 Triasetiini

Triasetiinipohjaisissa makutiivisteissä, joita tunnistettiin kaksi kappaletta, oli havaittavissa silmämääräisestikin selvää kerrostumista, eli makutiivisteiden osat erottuivat itsestään eri faaseihin. Kerroksiin erottuvan makutiivisteiden luotettava analyysi tulisi olemaan haastavaa, sillä tasalaatuisten injektien varmistamiseksi näytteet tulisi sekoittaa voimakkaasti juuri ennen injektiota tai injektoida manuaalisesti. Triasetiinipohjaisia makutiivisteitä käsiteltiin tämän johdosta tästä lähtien aina erikseen, eikä niitä liitetty pitkien analyysisekvenssien eli automatisoitujen ajojärjestelyjen osaksi.



Kuva 9. Triasetiinin rakenne [33].

Triasetiinia (kuva 9) käytetään elintarvikelisiä aineina esimerkiksi aromiaineiden liuottimena, purukumin pehmittimenä ja kosteuttajana ja sen käytöstä ilmoitetaan elintarvikkeissa lisäainekoodilla E1518. Triasetiinia valmistetaan glyserolista ja etikkahaposta. [27.] Yhdysvaltojen elintarvikeviranomaisen FDA (Food and Drug Administration) on luokitellut triasetiinin propyleeniglykolin ja glyserolin tavoin yleisesti turvallisiksi elintarvikekäyttöön (GRAS, generally recognised as safe) [26].

5.5 Kvalitatiivinen analyysi

Tunnistettujen diasetyylin (DA), 2,3-pentaanidionin (AP) ja asetoiinin (AC) osalta kromatogrammien pinta-alat kerättiin alustavaksi vertailukohteeksi (taulukko 1).

Taulukko 1. Kromatogrammien suhteelliset pinta-alat

	DA %	AP %	AC %
Makutiiviste 01			
Makutiiviste 02		0,76 %	0,18 %
Makutiiviste 03			0,01 %
Makutiiviste 04			
Makutiiviste 05			
Makutiiviste 06			
Makutiiviste 07			0,10 %
Makutiiviste 08		0,02 %	0,12 %
Makutiiviste 09		0,02 %	0,15 %
Makutiiviste 10		0,01 %	0,03 %
Makutiiviste 11			0,14 %
Makutiiviste 12			0,48 %
Makutiiviste 13			
Makutiiviste 14			1,12 %
Makutiiviste 15			
Makutiiviste 16			
Makutiiviste 17			
Makutiiviste 18			
Makutiiviste 19			0,08 %
Makutiiviste 20		0,24 %	0,48 %
Makutiiviste 21		0,33 %	0,44 %
Makutiiviste 22			
Makutiiviste 23		0,14 %	
Makutiiviste 24			
Makutiiviste 25			
Makutiiviste 26			
Makutiiviste 27			
Makutiiviste 28			
Makutiiviste 30	0,01 %		0,22 %
Makutiiviste 32			0,04 %
Makutiiviste 33			0,02 %
Makutiiviste 34	0,09 %		0,26 %
Makutiiviste 35			
Makutiiviste 36			

Taulukosta jätettiin injektio-ongelmien ja tulosten tulkinnanvaraisuuden vuoksi pois toistaiseksi kaksi triasetiinipohjaista makutiivistettä (makutiivisteet 29 ja 31). Suhteellisista pinta-aloista ei voitu päätellä makutiivisteiden mahdollisesti sisältämien diasetyyliin (DA), 2,3-pentaanidionin (AP) tai asetoiinin (AC) pitoisuuksia luotettavasti, mutta tunnistettuja yhdisteitä voitiin käyttää pohjana kvantitatiivisen menetelmän kehittämisessä. Myöhemmin suhteellisten pinta-alojen sijaan kromatogrammeista integroituja pinta-aloja käytettiin GC-FID-kvantitoinnin varmistamisessa hyödyksi.

6 Kvalitatiivinen ja kvantitatiivinen analyysi GC-FID-laitteistolla

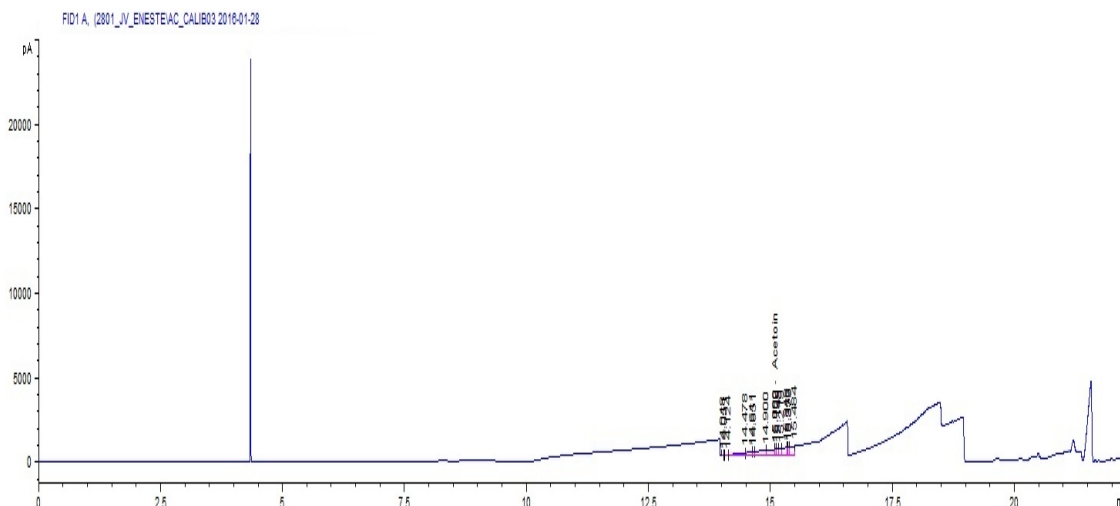
GC-MS-laitteistolla suoritettujen kvalitatiivisten eli laadullisten analyysien pohjalta kehitettiin menetelmä diasetyyliin, 2,3-pentaanidionin ja asetoiinin kvalitatiiviseen määrittämiseen GC-FID-laitteistolle eli kaasukromatografille, johon oli yhdistetty liekki-ionisaatiodektektori. Menetelmän etuna olisi sen yksinkertaisuus ja toistettavuus, mikäli tutkittavat yhdisteet saataisiin tunnistettua ja erottumaan riittävän selkeästi.

6.1 Laitteisto ja laitteiston käyttöönotto

Tutkimukseen ensimmäiseksi käytetty GC-FID-laitteisto koostui Agilent Technologies 6890N -kaasukromatografista, jossa detektorina oli sisäinen liekki-ionisaatiodektektori (FID, flame ionization detector). Näytteensyöttäjä oli Agilent Technologies 7693 Series -injektori. Laitteiston ohjaamiseen käytetty ohjelmisto oli Openlab CDS ChemStation-
ionin versio C.01.02.

Kolonnina kaasukromatografissa oli keskipolaarinen Agilent J&W Scientific DB-1701 (pituus 30 m x sisähalkaisija 0,250 mm x faasin paksuus 0,25 µm) ja kantokaasuna helium.

Jo ensimmäisissä analyyseissa havaittiin, ettei kolonnin (DB-1701) erotuskyky ja polarisuus sopinut tutkituille näytteille. Metanoliin liuotetut standardiaineet ja puhtasaineena metanoliliuoksessa testattu vanilliini kyllä erottuivat selkeinä piikkeinä kromatogrammissa, mutta varsinaisista makutiivistenäytteistä tarvittavan selkeää erottelua yhdisteiden välille ei enää tapahtunut ja yhdisteiden tunnistamisessa oli ongelmia.



Kuva 10. Propyleeniglykolin heikko erottuminen kromatogrammissa, josta osoituksena selkeiden yksilöllisten piikkien puuttuminen sekä korkea vaihteleva pohjasignaali.

Propyleeniglykoli näytti pidättävän kolonnissa ja vaikeuttavan muiden yhdisteiden määrittämistä. Menetelmää päätettiin kokeilla toisella GC-FID-laitteistolla, johon voitiin asentaa poolittomampi kolonni, jossa oli myös hieman suurempi kapillaariputken sisähalkaisija ja paksumpi stationäärifaasi.

Tutkimukseen lopulta pääosin käytetty GC-FID-laitteisto koostui Agilent Technologies 6890A -kaasukromatografista, jossa detektorina oli sisäinen liekki-ionisaatiodetektor (FID, flame ionization detector). Näytteensyöttäjä oli Agilent Technologies 7693 Series -injektor. Laitteiston ohjaamiseen käytetty ohjelmisto oli ChemStationin versio A.09.03.

Kaasukromatografi oli juuri hankittu Metropolian laboratorioon käytettynä. Laite asennettiin ensin kytkemällä kaasuliitännät (He, H₂ ja paineilma) ja tarkastamalla ne mahdollisten vuotojen varalta (kuva 11).



Kuva 11. Heliumin, vedyn ja paineilman liitännät Agilent 6890A –kaasukromatografissa.

Kolonniksi kaasukromatografiin asennettiin Sigma Aldrichin Supelco SLB-5ms (pituus 30 m x sisähalkaisija 0,32 mm x faasin paksuus 1,0 μm), joka soveltui matalan polaarisuutensa ja kolonnin ominaisuuksien mukaan hyvin liuottimien, alkoholien ja ketonien erottelamiseen.

Kolonnia (kuva 12) lyhennettiin huolto-ohjeiden mukaisesti noin 4 cm kummastakin päästä lasilevyllä leikaten. Kiinnityksen varmistavat ferrulit vaihdettiin kolonnia kiinnitettäessä uusiin ja injektoriin vaihdettiin uusi höyrystyskammio (Agilent Focus Liner SG092005) sekä siihen uusi septumi (Agilent 5181-3383-100).



Kuva 12. Supelco SLB-5ms kapillaarikolonne ennen asennusta.

Laitteiston kalibrointi suoritettiin Agilent FID MDL test sample -kalibroitiliuoksella (Agilent 5188-5372). Kalibroitiliuoksen yhdisteet erottuivat hyvin ja kromatogrammin piikit olivat selkeät sekä kalibroitiliuoksen mukana toimitettuihin kirja-arvoihin verrattuna täsmälliset.

Laitteistoa testattiin ennen menetelmän kehitystä vielä analysoimalla tutkimuksen standardiaineet ja vanilliini metanoliliuoksina sekä muutama makutiivistenäyte. Tulokset osoittivat laitteiston ja kolonnin sopivan hyvin tutkittavien yhdisteiden erottelamiseen ja tunnistamiseen.

6.2 Standardit ja liuottimet

Opinnäytetyön tutkimuksessa käytetyt standardit ja puhdasaineet olivat

- diasetyyli, puhtaus 99,2 %, Sigma Aldrich (erä BCBP6055V)
- 2,3-pentaanidioni, puhtaus 97 %, Sigma Aldrich (erä MKBB7504V)
- asetoiini, puhtaus 99,4 %, Sigma Aldrich (erä LC12545V)
- 2,3-heksaanidioni, puhtaus 98,0 %, Sigma Aldrich (erä MKBN5869V)
- asetoni, GC-laatu, puhtaus ≥ 99 %, Sigma Aldrich (erä STBF2122V)
- metanoli, HPLC-laatu, puhtaus $\geq 99,9$ %, Sigma Aldrich (erä STBF5832V).

Analyseissä pesuliuoksina ja kalibroitiliuoksia valmistettaessa käytettävät liuottimet olivat valmiina Metropolian laboratoriossa, ja analyysitason puhdasaineet diasetyyliä, 2,3-pentaanidionista, asetoinista ja 2,3-heksaanidionista tilattiin Sigma Aldrichilta tätä tutkimusta varten. Puhdasaineita säilytettiin kylmiössä valolta suojattuna, samoin kuin niistä valmistettuja kalibroitiliuoksiakin. Puhdasaineiden punnitsemiseen käytettiin laboratorion vaakaa (Mettler AT200) ja kalibroitiliuosten pipetoimiseen 1, 2 ja 5 ml:n mittapipettejä.

6.3 Menetelmän kehittäminen

Menetelmän oleellisten parametrien muutokset on esitetty taulukossa 2. Lopulliseen menetelmään sisältyneet parametrien muutokset on esitetty lihavoituina. Taulukossa on esitetty tärkeimmät muutokset ja varsinaisessa menetelmän kehityksessä ajoparametreista muutettiin aina vain yhtä kerrallaan erojen ja vaikutusten selvittämiseksi.

Taulukko 2. Menetelmän kehittyminen ja parametrien muutokset.

Höyrystyskammio						
Lämpötila (°C)	300	300	230	250	250	250
Paine (kPa)	46,6	46,6	46,6	46,6	46,6	46,6
Split-suhde	100:1	30:1	10:1	20:1	25:1	25:1
Kolonne						
Virtaus (ml/min)	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Paine (kPa)	46,6	46,6	46,6	46,6	46,6	46,6
Uuni						
Alkulämpötila (°C)	35	35	35	35	35	35
Isotermisen vaiheen kesto (min)	5	5	5	3	3	3
Lämpötilan muutos (°C/min)	30	10	10	10	10	10
Keskilämpötila (°C)		100	120	120	120	120
Lämpötilan muutos (°C/min)		30	30	30	30	30
Loppulämpötila (°C)	300	300	300	300	300	300
Kokonaisajoaika (min)	13,9	21,5	19,5	17,5	17,5	17,5
Detektori						
Lämpötila (°C)	300	300	250	250	230	250
Injektori						
Injektioilavuus (µl)	0,2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Ruiskun täyttönopeus (ml/min)	6000	6000	6000	500	200	200
Injektionopeus (ml/min)	6000	6000	6000	500	200	200

Menetelmän kehittämistä vaikeutti tutkimuksen kohteena olevien makutiivisteiden monipuolinen ja vaihteleva näytematriisi. Menetelmää rakennettiin aluksi pääosin neljän varsinaisen tutkimuksen ulkopuolisen makutiivisteiden analyysien avulla. Nämä ulkomaiset makutiivisteet sisälsivät valmistajien ilmoituksen mukaan yhtä tai useampaa tutkimuksen kohteena olevaa yhdistettä, joten ne sopivat hyvin menetelmän kehittämiseen ja laitteiston erottelukyvyn tarkkailemiseen.

6.3.1 Kolonniuunin lämpötilaohjelma

Tarkoitukseen sopivan kapillaarikolonnin valinnan lisäksi kolonniuunin lämpötilalla oli oletettavasti suuri merkitys tutkittavien yhdisteiden erottumiseen ja tunnistamiseen. GC-MS-menetelmässä hyvät tulokset tuottanut lämpötilan nopea ja tasaisen nostaminen ei toiminut samoin GC-FID-laitteistolla. Tutkittavat herkästi haihtuvat orgaaniset yhdisteet eivät erottuneet toisistaan tarpeeksi hyvin, jotta ne olisi voitu tunnistaa varmuudella. Lämpötilaohjelman jakaminen kahteen vaiheeseen ratkaisi haasteet tutkittavien yhdisteiden osalta. Maltillisesti nousevalla (10 °C/min) lämpötilaohjelmalla saatiin mielenkiintoisimmat yhdisteet erottumaan selkeästi omille retentioajoilleen selkeinä piikkeinä ennen propyleeniglykolin ja vanilliinien tuottamia tulkinnanvaraisia kromatogrammin piikkejä.

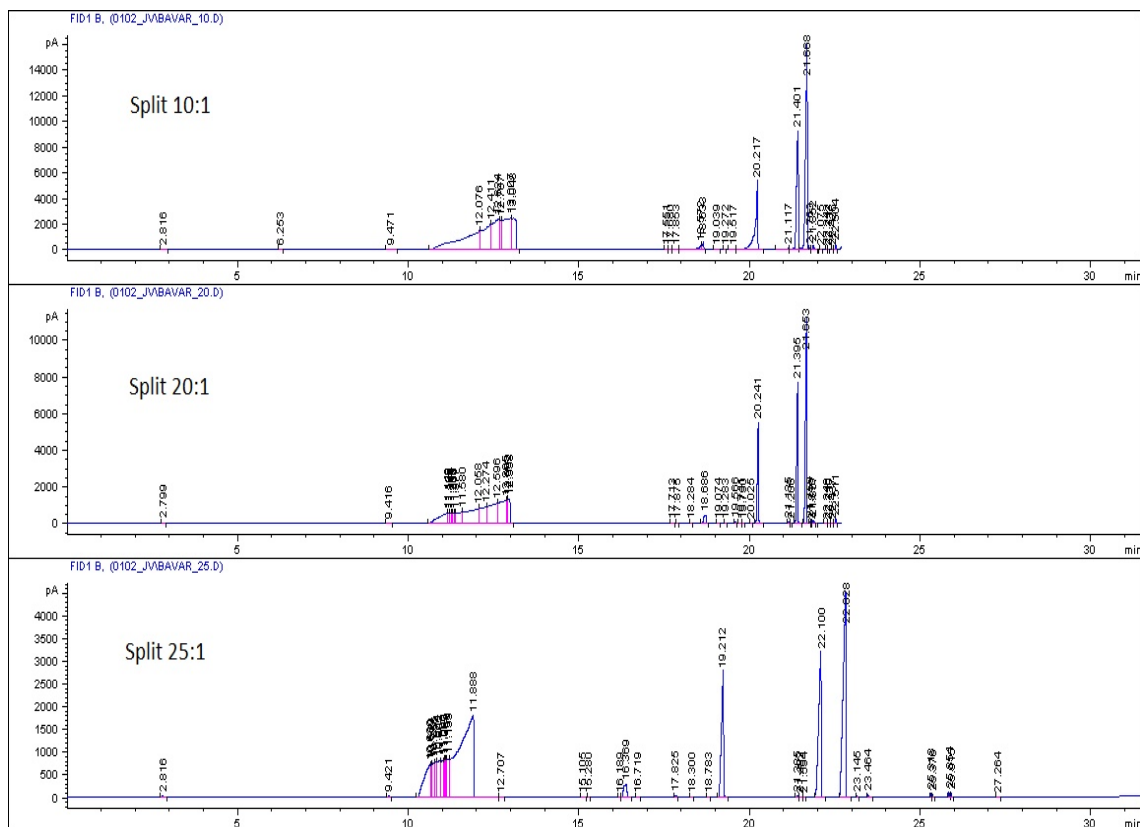
Huomionarvoista on silti, että todella hitaillakaan lämpötilaohjelmilla ei käytetyllä kolonnilla saatu retentioajan suhteen myöhään propyleeniglykolin jälkeen erottuvia vanilliineja ja maltoleja erottumaan johdonmukaisesti kaikista muista yhdisteistä, mikäli näistä olisi oltu erikseen kiinnostuneita. Näiden yhdisteiden kvantitointiin soveltuva menetelmä tulisi todennäköisesti kehittää GC-MS-laitteiston tai nestekromatografian puolelle.

6.3.2 Höyrystyskammio ja detektori

Höyrystyskammion ja detektorin lämpötilat olivat aluksi varsin korkeat eli kummallakin 300 °C. Varsinkin asetoiinin vaihtelevien tulosten perusteella oli syytä epäillä lämpötilojen vaikuttavan herkästi haihtuvien diasetyyliin ja asetoiinin tuloksiin ja mahdolliseen muuttumiseen toisiksi yhdisteiksi. Höyrystyskammion ja detektorin lämpötilan laskemisella ei ollut tuloksiin kuitenkaan merkittävää vaikutusta, ja ne vakiintuivat lopulta 250 °C:seen. Tämä lämpötila on myös lähempänä varsinaisen sähkösavukkeen vastukseen käytössä muodostuvaa lämpötilaa ja siten tutkimusmenetelmän kannalta realistinen.

6.3.3 Näyteinjektio

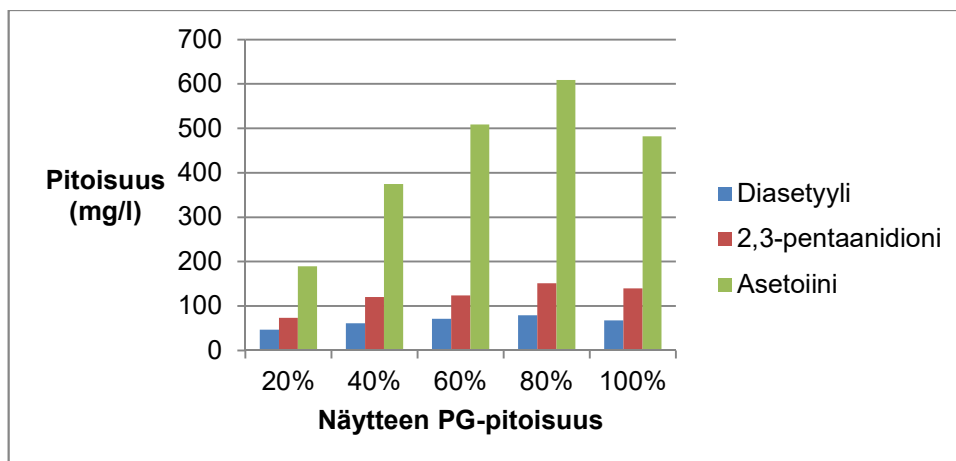
Haastavimmaksi ja tärkeimmäksi menetelmän ajoparametriksi osoittautui lopulta injektion asetukset. Split-suhdetta muuttamalla haettiin ensin 0,2 µl:n injektioilla tasapainoinen erotuskyky näytteiden eri yhdisteiden välille (kuva 13).



Kuva 13. Yhdisteiden erottuminen eri split-suhteilla. Ylempissä kromatogrammeissa piikkien päällekkäisyyksiä split-suhteilla 10:1 sekä 20:1. Alimpana split-suhteella 25:1 selkeästi näyttematriisista erottuvat ja tunnistettavat yhdisteet.

Split-suhteella 25:1 saatiin näytteen yhdisteet erottumaan toisistaan ja ne voitiin tunnistaa. Tämän jälkeen injektioilavuus kasvatettiin 1,0 mikrolitraan. Injektion oletusasetuksina laitteistossa oli nopea injektioruiskun täyttö ja injektio nopeudella 6000 ml/min. Tuloksia tarkemmin tarkasteltaessa huomattiin tutkittavien yhdisteiden retentioaikojen olevan täsmällisiä, mutta määritettyjen pitoisuuksien silti vaihtelevan rinnakkaisanalyysien kesken. Injektiotapahtumaa lähemmin tarkasteltaessa huomattiin propyleeniglykolipohjaisten makutiivisteiden ilmakuplittuvan injektioruiskuun täyttövaiheessa. Oletettavasti myös näyteinjektioita koskisi vastaavat ongelmat.

Propyleeniglykolin injektioitumista testattiin valmistamalla puhtasaineista testiliuos propyleeniglykoliin ja tekemällä liuoksesta laimennossarja. Liuottimena käytettiin asetonia. Mikäli propyleeniglykoliliuoksia injektioituisi analyysiin aina sama määrä, oletettiin yhdisteiden pitoisuuksien niissä kasvavan lähes lineaarisesti niiden sisältämien pitoisuuksien mukaisesti.



Kuva 14. Näytteen PG-pitoisuuden vaikutus analyyttien pitoisuuksiin.

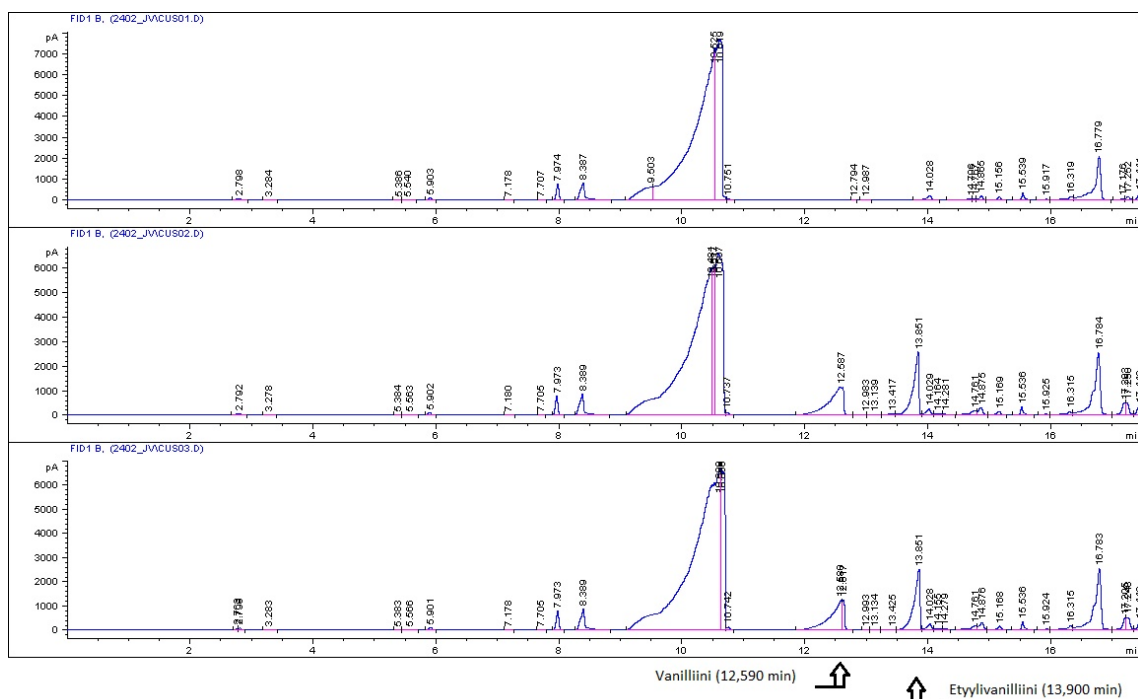
Neljän rinnakkaisen analyysisarjan tuloksista havaittiin, että keskiarvojen (kuva 14) kasvu suuremmilla propyleeniglykollin pitoisuuksilla ei ollut lineaarista. Suuremmilla propyleeniglykolin pitoisuuksilla yhdisteiden pitoisuudet olivat matalampia kuin liuosten sisältämien pitoisuuksien mukaan oletettiin. Tämän pääteltiin johtuvan injektion ongelmista. Korkeilla propyleeniglykolipitoisuuksilla ja nopeilla injektoriasetuksilla näytettä injektioiti vähemmän kuin asetonilla laimennetuilla liuoksilla.

Kaasukromatografian oletusasetusvaihtoehdoista hidas injektoriasetus oli liian hidas ja aiheutti yhdisteiden retentioaikoihin niiden tunnistamista vaikeuttavaa vaihtelua. Injektorin nopeutta muuttamalla löydettiin tasalaatuiset tulokset tuottavat asetukset ruiskun täyttö- ja tyhjennysnopeudella 200 ml/min. Lopulta viskoottisen propyleeniglykolin injektio-ongelmat ratkaistiin suorittamalla analyysit asetoniin 1:1 suhteella laimennettuna.

6.3.4 Vanilliinien carry over

Vanilliinin ja etyyliivanilliinin huomattiin aiheuttavan niin sanotun carry over –efektin peräkkäisten saman näytteen analyysien välille. Näytteet sisälsivät vanilliineja usein jopa yli 10 % (pinta-alojen suhteellisesta) kokonaismäärästä, ja niiden huomattiin siirtyvän ja kasautuvan analyysistä toiseen (kuva 15). Tähän pääteltiin olevan syynä vanilliinien pidentyminen kolonnissa. Vanilliinien erottumista ja kolonnin puhdistumista yritettiin parantaa kolonnin lämpötilaohjelmaa muuttamalla ja ajoaikaa pidentämällä, mutta vanilliinien siirtymisestä näytteestä toiseen ei päästy kuitenkaan eroon.

Vanilliinin retentioaika menetelmässä oli noin 12,590 minuuttia ja etyylivanilliinin noin 13,900 minuuttia. Koska vanilliinien retentioajat olivat kuitenkin järjestelmällisesti samat ja ne erosivat diasetyyliin (5,339 min), 2,3-pentaanidionin (7,926 min) ja asetoiinin (8,310 min) keskimääräisistä retentioajoista selkeästi, jätettiin vanilliinien siirtyminen näytteestä ja analyysistä toiseen huomioimatta. Tulosten kannalta menetelmäkontaminaatio eli mahdollinen muiden yhdisteiden siirtyminen näytteestä ja analyysistä toiseen otettiin kuitenkin vakavasti huomioon menetelmän kehittämisessä. Vanilliinien siirtymistä näytteestä ja analyysistä toiseen hallittiin ajamalla näytteiden välillä vuorotellen puhdasta propyleeniglykolia samalla menetelmällä riittävän monta kertaa ja tutkimalla välianalyysien puhtaus aina ennen seuraavien näytteiden analyysiä. Kerrannaisvaiikutuksena tästä oli analyysisekvenssien kokonaiskeston pitkittyminen ja analyysien määrän kasvaminen.



Kuva 15. Vanilliinien carry over –efekti kolmessa peräkkäisessä analyysissä 12–14 minuutin retentioaikojen välillä. Ensimmäisessä analyysissä yhdisteitä ei ole havaittavissa, mutta toisessa ja kolmannessa ne ovat tunnistettavissa.

Opinnäytetyön tutkimuksen keskeisten yhdisteiden osalta siirtymistä näytteestä toiseen ei havaittu, ja kontaminaatiota pyrittiin ehkäisemään ajamalla näytteiden analyysisarjojen välillä kontrollinäytteinä propyleeniglykolia ja myöhemmin korkeammilla lämpötila-asetuksilla liuottimena puhdasta asetonia.

6.4 Menetelmä kvalitatiiviseen ja kvantitatiiviseen määrittelykseen

Lopullisessa menetelmässä (liite 2) kolonniuunin lämpötilan alkuasetuksena oli 35 °C ja sitä nostettiin 3,0 minuutin alkuvaiheen jälkeen hitaasti 10 °C/min arvoon 120 °C, josta lämpötilaa nostettiin nopeammin 30 °C/min loppuarvoon 300 °C. Höyrystyskammion lämpötila oli 250 °C ja analyysit tehtiin split-suhteella 25:1. Kantokaasuna käytetyn heliumin virtaus kolonnissa oli 1,4 ml/min ja virtausnopeus 24 cm/s. Analyysin injektiomäärä oli 1,0 µl. Liekki-ionisaatiodetektorin lämpötila oli 250 °C.

Taulukko 3. GC-FID-menetelmän ajoparametrit.

Höyrystyskammio	
Lämpötila (°C)	250
Paine (kPa)	46,6
Kokonaisvirtaus (ml/min)	39,7
Split-suhde	25:1
Split-virtaus (ml/min)	35
Kolonne	
Virtaus (ml/min)	1,4
Paine (kPa)	46,6
Keskinopeus (cm/s)	24
Uuni	
Alkulämpötila (°C)	35
Isotermisen vaiheen kesto (min)	3
Lämpötilan muutos (°C/min)	10
Keskilämpötila (°C)	120
Isotermisen vaiheen kesto (min)	0
Lämpötilan muutos (°C/min)	30
Loppulämpötila (°C)	300
Isotermisen vaiheen kesto (min)	0
Kokonaisajoaika (min)	17,5
Detektori	
Lämpötila (°C)	250
Vetyvirtaus (ml/min)	40
Ilmavirtaus (ml/min)	450
Apukaasun (He) virtaus (ml/min)	30
Injektori	
Injektioilavuus (µl)	1,0
Ruiskun täyttönopeus (ml/min)	200
Injektionopeus (ml/min)	200

Injektion nopeudella oli propyleeniglykolipohjaisten näytteiden injektoinnissa tärkeä merkitys, joten täyttö- ja injektionopeudeksi valittiin lopulta hidas 200 ml/min. Pesuliuoksena injektioiden välillä käytettiin lopulta metanolin sijasta asetonia.

Analyysin kokonaisajoajaksi muodostui lopulta 17,5 minuuttia ja kolonniuunin jäähtyminen huomioon ottaen yhden näytteen analyysisykli kesti kerrallaan noin 30 minuuttia. Analyysijä GC-FID-laitteistolla suoritettiin menetelmän kehitysvaiheessa yli 600 kappaletta.

7 Kvantitatiivinen määrittely GC-FID-laitteistolla

Kvantitatiivista määrittelyä varten tutkittavista yhdisteistä valmistettiin analyysitason puhtasaineista standardiliuokset. Standardiliuokset valmistettiin ensin HPLC-laatuiseen metanoliin (Sigma Aldrich, tuotenumero 34860). Menetelmän kehitysvaiheessa havaittiin metanolin vaikuttavan diasetyyliin ja asetoiinin pitoisuuksiin ja aiheuttavan niiden välille muutoksia. Asetoiinin on todettu voivan muuntua diasetyyliksi metanolin ja valon vaikutuksesta [26]. Seisotuskokeissa eli samojen standardiliuosten eri aikoina tehdyissä analyysissä havaittiinkin tämän oletuksen vahvistavia pitoisuuksien muutoksia.

Standardiliuosten valmistamiseen käytettiin tämän jälkeen GC-laatuista asetonia (Sigma Aldrich, tuotenumero 24201). Asetoniin valmistetuissa standardiliuoksissa ei havaittu metanolin kaltaisia muutoksia. Lämpötilan, valon ja muiden mahdollisesti tuloksiin vaikuttavien olosuhteiden osuutta määrittelyyn ehkäistiin myös analysoimalla standardiliuokset välittömästi valmistamisen jälkeen. Standardiliuosten liuottimen vaihdon myötä myös GC-FID-laitteiston analyysien välinen pesuliuos vaihdettiin metanolista asetoniksi.

Standardiliuosten sisäiseksi standardiksi kokeiltiin 2,3-heksaanidionia (Sigma Aldrich), joka on yleisesti käytetty sisäinen standardi esimerkiksi oluen diasetyylianalyysissä. 2,3-heksaanidionin retentioaika oli noin 8,900 minuuttia, ja sen erottaminen kaikissa näytteissä olevasta propyleeniglykolista (retentio alkaen 9,000 min) oli vaikeaa.

Sisäisenä standardina kokeiltiin lisäksi etyylimetyyliketonia eli 2-butanonia, metyyliisobutyryliketonia eli isopropyleeniasetonia sekä 2-heptanonia. Mitään kokeilluista sisäisistä standardeista ei onnistuttu erottamaan tarpeeksi selvästi retentioajan suhteen propyleeniglykolista, vanilliineista tai maltoleista. Makutiivistenäytteiden monimutkaisen näytematriisin takia sisäisen standardin käytöstä luovuttiin.

7.1 Standardiliuosten valmistaminen

Diasetyyli, 2,3-pentaanidioni ja asetoini tunnistettiin ja kvantitoitiin standardiliuosten avulla. Valmistettujen standardiliuosten pitoisuudet on esitetty taulukossa 4. Standardiliuoksiin käytetyt puhtasaineet punnittiin 100 ml:n mittapulloihin ja täytettiin välittömästi

asetonilla merkkiin saakka. Standardiaineiden pitoisuuksissa on otettu laskennallisesti huomioon standardiaineiden puhtaus ensimmäisessä eli vahvimmassa pitoisuudessa. Punnitut määrät olivat diasetyylille 1008 mg, 2,3-pentaanidionille 1052 mg ja asetoiinille 1052 mg. Ensimmäisestä standardiliuoksesta valmistettiin laimennossarja eli standardiliuokset 2–6 pipetoimalla mittapipetillä ensimmäistä standardiliuosta tarvittava määrä 10 ml mittapulloihin ja laimentamalla asetonilla mittapullon merkkiin saakka.

Taulukko 4. Standardiliuosten (1–6) pitoisuudet (mg/l).

Standardiliuos	1	2	3	4	5	6
Diasetyyli	1000	500	400	300	200	100
2,3-pentaanidioni	1020	510	408	306	204	102
Asetoiini	1046	523	418,4	313,8	209,2	104,6

Standardiliuokset analysoitiin välittömästi GC-FID-laitteistolla sille kehitetyllä menetelmällä, sekä myös GC-MS-laitteistolla lopullista vahvistusta varten.

7.2 Kalibrointisuorat

Standardiliuoksia ja niistä määrittämisessä saatuja tuloksia (taulukko 5.) käytettiin diasetyyliin, 2,3-pentaanidionin ja asetoiinin kalibrointisuorin määrittämiseen ja GC-FID-menetelmän kalibrointiin. Kalibrointisuorat muodostettiin kuuden eri pitoisuuden standardiliuoksen avulla.

Yhdisteet erottuivat selkeästi retentioaikojen suhteen, eikä kromatogrammien piikkien integrointeja ollut tarpeen muokata manuaalisesti. Kromatogrammit olivat selkeitä ja yksiselitteisiä. Yhdisteiden erottuminen pitoisuudeltaan vahvimmissa standardiliuoksissa on esitetty liitteessä 3.

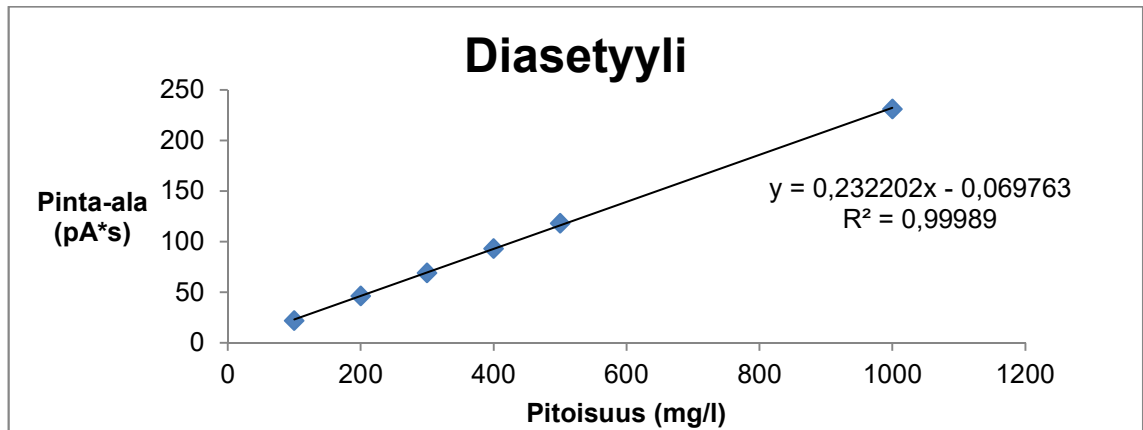
Diasetyyliin ja 2,3-pentaanidionin standardiliuosten tulokset oli valmistuskerrasta riippumatta luotettavia ja johdonmukaisia. Asetoiinin tuloksissa oli liuottimesta ja valmistuskerrasta riippumatta aina enemmän vaihtelua ja epämääräisyyttä. Kiinteää asetoiinia oli myös haastavaa saada liukenemaan joihinkin liuottimiin. Asetoiinin muutosherkkyyden ja epävakauden takia menetelmää ei enää priorisoitu asetoiinin tarkkaa kvantitatiivista määrittystä varten.

Taulukko 5. Standardiliuosten analyysien tulokset. Yhdisteiden retentioajat, standardiliuosten pitoisuudet ja piikkien pinta-alat.

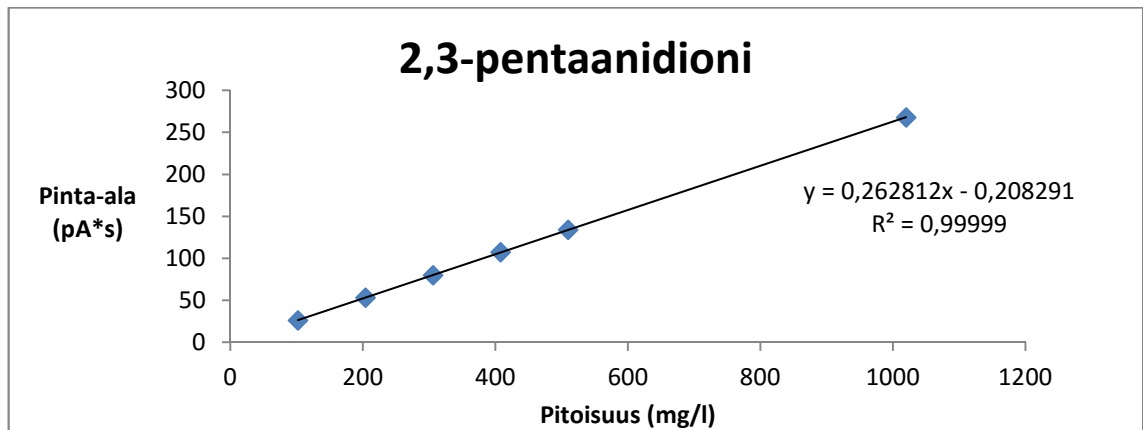
	Retentio-		Pitoisuus (mg/l)	Pinta-ala
	aika (min)	Taso		
Diasetyyli	5,338	6	100	22,05862
	5,338	5	200	46,28919
	5,338	4	300	69,16901
	5,338	3	400	93,05404
	5,337	2	500	118,28648
	5,337	1	1000	231,15962
2,3-pentaanidioni	7,928	6	102	26,27294
	7,926	5	204	53,38084
	7,926	4	306	79,85207
	7,926	3	408	107,44642
	7,926	2	510	134,02560
	7,927	1	1020	267,73444
Asetoiini	8,315	6	104,6	11,53693
	8,312	5	209,2	23,21523
	8,310	4	313,8	39,57626
	8,309	3	418,4	46,75734
	8,309	2	523	56,39730
	8,307	1	1046	148,13617

Diasetyylin, 2,3-pentaanidionin ja asetoiinin standardiliuosten analyysien tuloksista lasketut standardisuorat yhtälöineen on esitelty seuraavalla sivulla (kuvat 16–18).

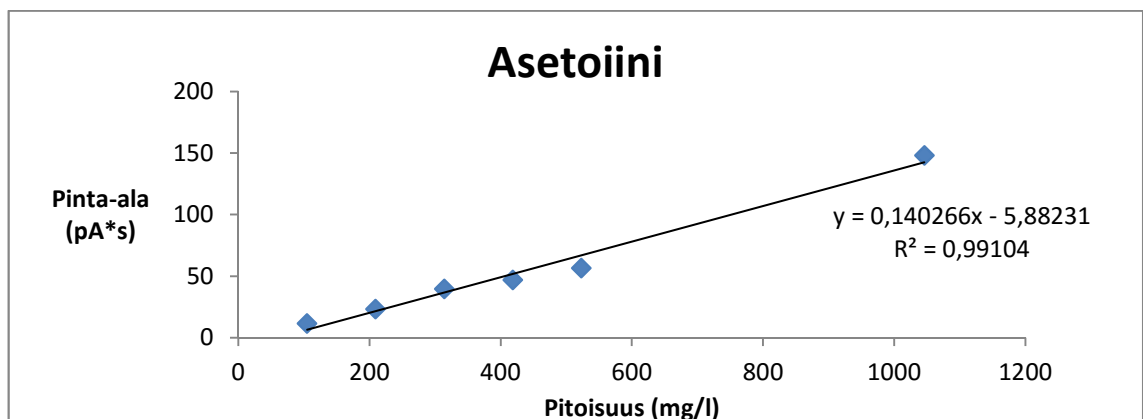
Standardisuorien kuvaajien selitysasteet (r^2) osoittivat kalibroinnin lineaarisuudesta eli diasetyyllillä ja 2,3-pentaanidionilla ne olivat lähellä arvoa 1. Asetoiinin standardisuoran kuvaajan selitysaste oli heikompi (0,991). Onnistuneita rinnakkaisia standardiliuosten analyysisekvenssejä ei laiteongelmien vuoksi onnistuttu suorittamaan välittömästi standardiliuosten valmistumisen jälkeen niin tarkasti, että residuaalien neliösumman tarkastelu olisi tuottanut relevanttia informaatiota standardisuorien lineaarisuudesta.



Kuva 16. Diaseetyylin standardisuora ja piikin pinta-ala pitoisuuden funktiona.



Kuva 17. 2,3-pentaanidionin standardisuora ja piikin pinta-ala pitoisuuden funktiona.



Kuva 18. Asetoiinin standardisuora ja piikin pinta-ala pitoisuuden funktiona.

Standardiliuosten tulosten pohjalta GC-FID-menetelmä kalibroitiin tunnistamaan tutkimuksen kohteena olevat yhdisteet ja määrittämään niiden pitoisuudet näytteistä. Makutiivisteiden tutkimuksessa menetelmän osittaista validointia vaikeutti sertifioidujen referenssimateriaalien puuttuminen, mutta validointimenettelyn tuloksia käytettiin menetelmän luotettavuuden toteamiseen.

7.3 Menetelmän toistettavuus ja selektiivisyys

Toistettavuudella tarkoitetaan samoissa olosuhteissa, samasta näytteestä ja samalla menetelmällä saatujen tulosten keskihajontaa tai suhteellista keskihajontaa. Toistettavuuskokeissa analysoitiin näytettä, joka sisälsi pienen pitoisuuden kaikkia kolmea tutkimuksen keskeistä analyyttiä.

Taulukko 6. Analyyttien eli diasetyylin, 2,3-pentaanidionin ja asetoiinin (DA, AP, AC) määritetyt pitoisuudet toistettavuuskokeessa sekä analyysisarjojen sisäinen keskiarvo ja keskihajonnat.

DA	(mg/l)	AP	(mg/l)	AC	(mg/l)
DA1	19,773	AP1	11,133	AC1	85,658
DA2	19,549	AP2	11,027	AC2	84,220
DA3	19,476	AP3	10,677	AC3	84,587
DA4	19,849	AP4	10,731	AC4	84,353
DA5	19,725	AP5	10,273	AC5	84,603
DA6	19,966	AP6	10,727	AC6	84,608
DA7	19,781	AP7	10,617	AC7	84,115
DA8	19,587	AP8	10,743	AC8	83,933
DA9	19,524	AP9	10,937	AC9	83,671
DA10	19,848	AP10	10,273	AC10	84,476
Keskiarvo (mg/l)	19,708		10,714		84,423
Keskihajonta (mg/l)	0,16		0,28		0,53
Suhteellinen keskihajonta (%)	0,8 %		2,6 %		0,6 %

Analyyttien tulosten pieni suhteellinen keskihajonta oli osoituksena menetelmän hyvästä toistettavuudesta. Menetelmä on selektiivinen, mikäli näytematriisista erotetaan analyytin vaste muista vasteista. Toistettavuuskokeiden analyyseissä kaikki kolme analyyttiä erotettiin selkeästi näytetaustasta ja toisistaan.

7.4 Saantokokeet

Takaisinsaantokokeet suoritettiin menetelmän oikeellisuuden arvioimiseksi. Saantokokeissa lisättiin analysoituihin näytteisiin pieni määrä standardiliuosta ja laskettiin tulosten keskiarvoista takaisinsaanto prosentteina. Saantokokeet suoritettiin kahdella eri standardiliuoksen pitoisuudella. Tulosten painoarvoa laskee referenssimateriaalien sijaan itse valmistettujen standardiliuosten käyttö saantokokeissa sekä vaihtelevien analyysitulosten keskiarvojen käyttö saantoprosentteja laskettaessa.

Saantokokeiden (liite 3) tuloksista laskettiin saantoprosentit. Standardinlisäyksen määrä oli 40 µl ja näytteen määrä 1000 µl. Määritetyistä pitoisuuksista laskettiin keskiarvot ja teoreettinen pitoisuus standardinlisäyksen jälkeen. Teoreettisen ja mitatun pitoisuuden suhteesta laskettiin saantoprosentit.

Saantoprosentit olivat diasetyylille 80,9 % (standardin D4 lisäykselle) ja 97,3 % (standardin D5 lisäykselle). 2,3-pentaanidionille saantoprosentit vastaaville standardinlisäyksille olivat 87,1 % ja 65,2 % ja asetoiinille 100,0 % ja 99,0 %.

Saantoprosentit olivat pieni otanta huomioon ottaen menetelmälle kohtuulliset. Tarpeeksi pitkiä rinnakkaisia analyysisekvenssejä ei pystytty kaikista näytteistä ajamaan. Analyysituloksissa oli myös jonkin verran vaihtelua.

7.5 Toteamis- ja määrittämisraja

Tutkimuksessa ei lopulta määritetty toteamisrajaa eikä määrittämisrajaa. Nollanäytteen tulosten keskiarvon perusteella arvioitava määrittämisraja ei tuonut vertailukelpoista tietoa, sillä se oli hyvin pieni. Käytännössä makutiivisteiden haastava näytematriisi määritteli lopulta määrittämisrajan ja tuloksissa ilmoitettiin kaikki varmasti rinnakkaisten analyysien avulla määritetyt pitoisuudet.

8 GC-FID-menetelmän analyysit ja tulokset

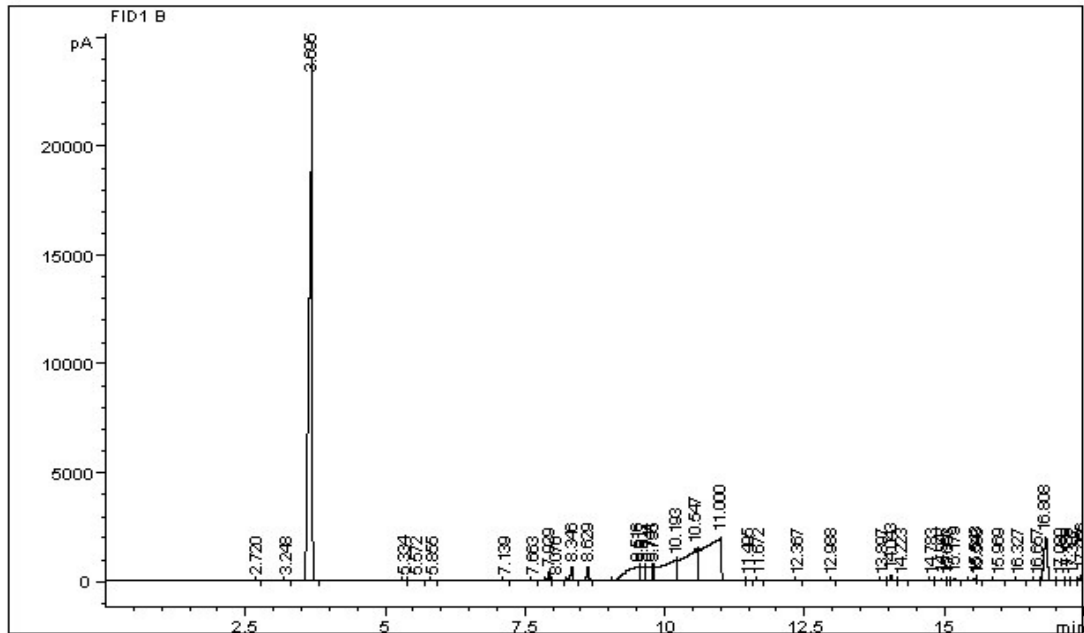
8.1 Analyysit

Tutkimukseen osallistuneet 36 makutiivistettä analysoitiin kolmeen kertaan eri päivinä. Makutiivisteet laimennettiin suhteessa 1:1 puhtaaseen asetoniin injektiovarmuuden parantamiseksi. Analyysiin sovellettiin kalibroitiliuosten avulla suoritettua menetelmän kalibrointia ja tulokset kerättiin taulukkoon. GC-FID-laitteiston ohjelmistolla oli mahdollisuus tuottaa erilaisia analyysijä sekä raportteja tuloksista (kuva 19).

```

=====
Injection Date : 3/15/2016 12:47:30 AM      Seq. Line : 30
Acq. Operator  : Jesse Viksten              Inj : 1
                                           Inj Volume : 1 µl
Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\DIKETONI.M
Last changed  : 3/14/2016 10:02:46 AM by Jesse Viksten
=====

```



```

=====
External Standard Report
=====

```

Signal 1: FID1 B,

RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [µg/l]	Grp	Name
5.334	BB	12.26414	4.33109	53.11710		DA
7.929	BV	1012.62854	3.80579	3853.84690		AP
8.346	BB	2075.78369	7.14952	1.48409e4		AC

Kuva 19. Esimerkkitulokset tutkimuksen ulkopuolisen makutiivisteiden analyysistä. Vaaka-akselilla retentioajan mukaan erottuneet yhdisteet ja alhaalla standardiliuosten kalibroinnin avulla tuotettu kvantitatiivinen määrittäminen tutkimuksen yhdisteille.

Analyysien kromatogrammin piikkejä ei muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta tarvinnut manuaalisesti erotella tai integroida. Kahta tutkimuksen triasetiinipohjaista makutiivistettä käsiteltiin muista näytteistä erillään. Ne sekoitettiin voimakkaasti ennen analyysin injektiota tasalaatuisen tuloksen varmistamiseksi.

8.2 Tulokset

Tuloksissa (liitteet 4–6) on ensimmäisessä sarakkeessa ilmoitettu GC-FID-menetelmällä määritetty pitoisuus kullekin yhdisteelle laskettuna teoreettisen sähkösavukkeen käyttöliuoksen laimennoksen mukaan. Laimennoksena on käytetty sähkösavukenesiteiden makutiivisteissä yleistä 20-prosenttista laimennosta. Käyttöliuos siis sisältäisi tämän pitoisuuden ($\mu\text{g/ml}$) kyseistä yhdistettä, mikäli käyttöliuos olisi valmistettu yhdistämällä 1 osa makutiivistettä ja 4 osaa pohjanestettä. Tulosten seuraavassa sarakkeessa on esitetty laskennallinen pitoisuus pelkälle makutiivisteelle (100 %), jota ei ole laimennettu.

Tulostaulukoissa on myös kolmen eri analyysisarjan tulokset ja tulosten keskiarvo. Analyysisarjojen 1–3 analyysien tulokset ovat makutiivistenäytteistä, jotka on laimennettu suhteella 1:1 asetonin kanssa, eli näytteiden makutiivisteipitoisuus on 50 %. Analyysien tuloksista on laskettu myös pitoisuuden keskihajonta ($\mu\text{g/ml}$) ja suhteellinen keskihajonta (%). Suhteellisten keskihajontojen avulla tulokset ja analyysisarjat tarkastettiin mahdollisten virheiden ja injektio-ongelmien varalta.

Liitteiden analyysisarjojen tuloksissa on tummemmalla (vihreällä) pohjavärillä eroteltu tulokset, jotka vahvistettiin myöhemmin kvantitatiivisesti vielä myös GC-MS-menetelmällä. Pieniä pitoisuuksia GC-FID-menetelmän mukaan sisältäneitä näytteitä ei pystytty aina GC-MS-menetelmällä vahvistamaan.

Pitoisuuksien yksikkö tulostaulukossa on vaihdettu kaasukromatografian ohjelmiston oletusasetuksesta (mg/l) paremmin sähkösavukenesiteiden käsittelymääriä vastaavaksi ($\mu\text{g/ml}$). Yksiköt vastaavat toisiaan eli 1 mg/l on yhtä kuin $1 \mu\text{g/ml}$. Seuraavalla sivulla tulokset on vielä koottuna esitelty 20 % vahvuisen käyttöliuoksen pitoisuuksina (taulukko 7).

Taulukko 7. Määritetyt pitoisuudet makutiivisteistä valmistetussa käyttövalmiissa 20-prosenttisessä käyttöliuoksessa.

	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)
	DA	AP	AC
Makutiiviste 01		8,9	62,3
Makutiiviste 02		1186,0	252,9
Makutiiviste 03			48,2
Makutiiviste 04			
Makutiiviste 05			
Makutiiviste 06			34,2
Makutiiviste 07			261,9
Makutiiviste 08		57,7	661,3
Makutiiviste 09		47,0	540,1
Makutiiviste 10		25,6	119,7
Makutiiviste 11			541,3
Makutiiviste 12			2216,8
Makutiiviste 13			
Makutiiviste 14	11,9		3733,9
Makutiiviste 15			
Makutiiviste 16			
Makutiiviste 17			
Makutiiviste 18			45,4
Makutiiviste 19			365,6
Makutiiviste 20	7,5	421,1	1822,3
Makutiiviste 21	6,5	407,6	1177,0
Makutiiviste 22			28,1
Makutiiviste 23		141,0	187,8
Makutiiviste 24			
Makutiiviste 25		9,0	31,6
Makutiiviste 26		36,5	260,8
Makutiiviste 27			463,1
Makutiiviste 28		70,8	
Makutiiviste 29	14,4		327,2
Makutiiviste 30	23,3		825,9
Makutiiviste 31	177,3		443,8
Makutiiviste 32			162,5
Makutiiviste 33			101,9
Makutiiviste 34	157,9	11,6	957,1
Makutiiviste 35		14,1	
Makutiiviste 36		8,8	

Kaasukromatografisen GC-FID-menetelmän perusteella tutkimukseen osallistuneista makutiivisteistä 7 kappaletta 36:sta (19 % makutiivisteistä) sisälsi diasetyyliä. Määritetyt pitoisuudet olivat melko pieniä eli 6,5–177,3 µg/ml 20-prosenttisen käyttöliuoksen pitoisuutena ilmoitettuna.

Toista diketonia eli 2,3-pentaanidionia sisälsi 14 makutiivistettä 36:sta (39 % makutiivisteistä). 2,3-pentaanidionin pitoisuudet vaihtelivat diasetyyliä enemmän. Kymmenessä makutiivisteessä määritetty pitoisuus oli alle 100 µg/ml. Neljässä muussa määritetyssä makutiivisteessä määrät olivat suurempia ja suurin määritetty pitoisuus 2,3-pentaanidionia 1:4 suhteella valmistetun käyttöliuoksen pitoisuutena ilmaistuna oli 1186 µg/ml.

Asetoiinia menetelmässä määritettiin suurimmasta osasta eli 26:sta tutkimuksen makutiivisteestä (72 % makutiivisteistä). Määritetyn asetoiinin pitoisuudet vaihtelivat pienistä pitoisuuksista aina lähes 4000 µg/ml pitoisuuteen saakka. Neljä näytettä sisälsi asetoiinia yli 1000 µg/ml käyttöliuoksen pitoisuutena ilmoitettuna.

Kaikki menetelmässä määritetyt diasetyyliä sisältäneet makutiivisteet sisälsivät myös asetoiinia suurina pitoisuuksina. Diasetyylin esiintymiseen näissä näytteissä voi olla siis syynä myös asetoiinin taipumus pelkistyä diasetyyliksi lämmön, valon tai metanolin vaikutuksesta.

9 Kvantitatiivinen määrittäminen GC-MS-laitteistolla

GC-FID-menettelmän tulosten vahvistamiseksi makutiivisteiden ja standardiliuosten vastaavat analyysit suoritettiin myös GC-MS-laitteistolla. Menettelmän ajoparametrit (liite 7) sovellettiin toimivaksi todetusta GC-FID-menettelmästä. Massaspektrometrin herkkyydestä johtuen injektioilavuus pidettiin silti edelleen 0,2 µl:ssa ja split-suhde oli GC-FID-menettelmästä poiketen 100:1.

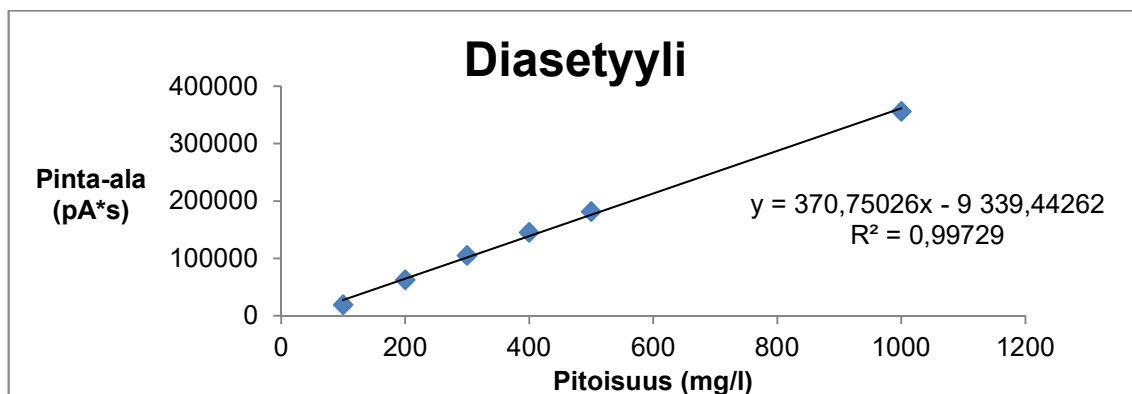
9.1 GC-MS-menettelmän kalibrointi

Kvantitatiivista määrittäystä varten GC-MS-laitteistolla suoritettiin samojen standardiliuosten (taulukko 4.) analyysit kuin GC-FID-menettelmässäkin. Standardiliuosten analyyseissa yhdisteet erottuivat hyvin ja yhdisteiden piikkien pinta-alat kerättiin integroinnin jälkeen kromatogrammeista (taulukko 8).

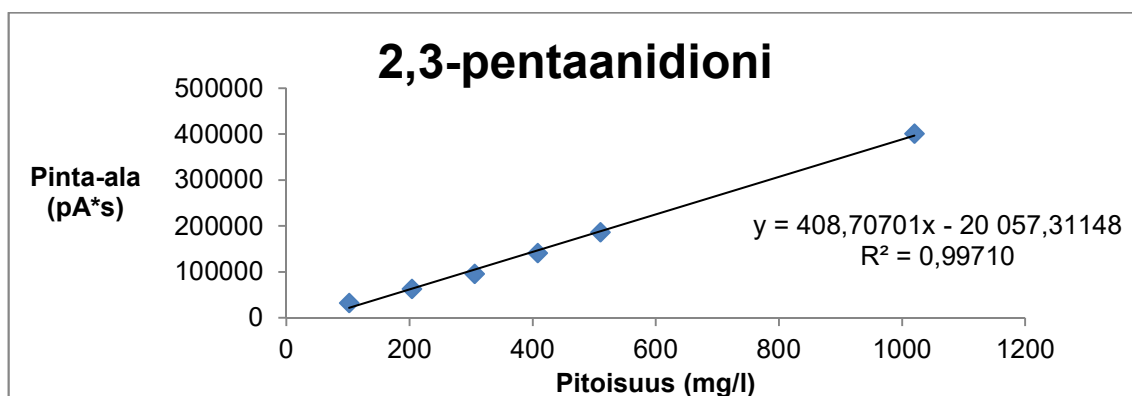
Taulukko 8. Yhdisteiden retentioajat, standardiliuosten pitoisuudet ja piikkien pinta-alat.

	Retentio- aika (min)	Taso	Pitoisuus (mg/l)	Pinta-ala
Diasetyyli	1,599	6	100	19328
	1,600	5	200	62768
	1,599	4	300	105318
	1,598	3	400	145580
	1,600	2	500	181689
	1,600	1	1000	356156
2,3-pentaanidioni	2,217	6	102	32781
	2,212	5	204	63683
	2,226	4	306	96025
	2,218	3	408	141322
	2,221	2	510	186753
	2,214	1	1020	401295
Asetoiini	2,415	6	104,6	7659
	2,391	5	209,2	18460
	2,384	4	313,8	59065
	2,382	3	418,4	91749
	2,371	2	523	113801
	2,357	1	1046	267798

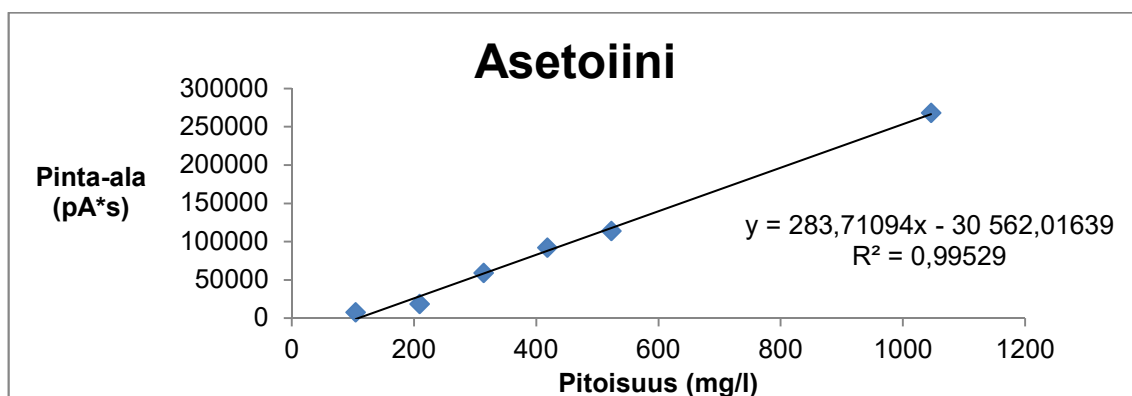
Tulosten perusteella laskettiin yhdisteiden standardisuorat (kuvat 20-22).



Kuva 20. Diasetyylin standardisuora ja piikin pinta-ala pitoisuuden funktiona.



Kuva 21. 2,3-pentaanidionin standardisuora ja piikin pinta-ala pitoisuuden funktiona..



Kuva 22. Asetoiinin standardisuora ja piikin pinta-ala pitoisuuden funktiona..

Standardisuurien pohjalta GC-MS-menetelmä kalibroitiin. Makutiivistenesteiden analyyseistä integroitiin tunnistettujen yhdisteiden kromatogrammien piikit retentioaiko-

jen mukaan ja niistä johdettiin tulokset standardisuorien yhtälöiden avulla (liite 8). Integroidut pinta-alat ja retentioajat ovat liitteessä 9. Tuloksia käytettiin ainoastaan GC-FID-menetelmän tulosten vahvistamiseen, eikä GC-MS-menetelmällä haettu varsinaista kvantitatiivista tarkkuutta. Tulokset on silti vertailun vuoksi esitetty.

9.2 Kvantitatiivisen määrittämisen tulokset GC-MS-menetelmällä

GC-MS-menetelmällä pystyttiin vahvistamaan GC-FID-menetelmällä määritetyt yhdisteet karkeasti lähinnä kvalitatiivisesti. Kvantitatiivisen määrittämisen pitoisuudet erosivat GC-FID-menetelmän vastaavista, mutta olivat pääpiirteittäin samaa luokkaa. GC-FID-menetelmässä havaittuja pieniä diasetyyliä, 2,3-pentaanidionin ja asetoinin pitoisuuksia ei GC-MS-menetelmällä ja näillä ajoparametreilla pystytty kuitenkaan vahvistamaan. Makutiivistenäytteissä ei tässäkään vaiheessa tunnistettu myöskään esimerkiksi asetaldehydiä eikä formaldehydiä.

GC-MS-menetelmällä määritettynä diasetyyliä sisälsi kaksi makutiivistenestettä 36:sta tutkitusta. 2,3-pentaanidionia vahvistettiin kahdeksasta ja asetoinia kahdestakymmenestä yhdestä makutiivisteestä. Pitoisuudet olivat kautta linjan hieman alemmalla tasolla kuin GC-FID-kvantitoinnissa, mutta menetelmää käytettiin lähinnä aikaisempien tulosten vahvistamiseen.

10 Yhteenveto

Opinnäytetyön tutkimukseen kehitetyllä kaasukromatografisella GC-FID-analyysimenetelmällä määritettiin tutkimuksen 36 kotimaisesta sähkösavukenesteiden valmistukseen käytettävästä makutiivisteestä niiden sisältämät diasetyyliin, 2,3-pentaanidionin ja asetoiinin pitoisuudet.

Makutiivisteistä 19 % sisälsi määrityksen mukaan diasetyyliä. Toista määritettyä diketonia eli 2,3-pentaanidionia sisälsi 39 % makutiivisteistä ja asetoiinia 72 % makutiivisteistä. Makutiivisteistä ei GC-MS-analyyseissä tunnistettu asetaldehydiä eikä formaldehydiä, eikä muitakaan yleisesti vaarallisena pidettyjä yhdisteitä.

10.1 Kvantitatiivisten tulosten epävarmuus

Menetelmän tuottamat tulokset (liitteet 4–6) olivat saatavilla olevaan sähkösavukenesteiden kansainväliseen vertailutietoon verrattuna realistisia. Tarkkoja kvantitatiivisia tuloksia tärkeämpänä voidaan silti pitää yhdisteiden kvalitatiivista eli laadullista määrittämistä näytteistä. Tutkittavien yhdisteiden herkkä haihtuvuus ja muutosalttius huomioon ottaen olisi myös tarkoituksenmukaisempaa havainnollistaa tulokset esimerkiksi suhteessa sähkösavukenesteiden päivittäiseen kulutukseen.

Aiemmin luvussa 4 esitetyt teoreettiset päivittäiset kynnsarvot olivat siis diasetyylille 65 µg ja 2,3-pentaanidionille 137 µg päivässä. Asetoiinille ei ole määritetty päivittäistä enimmäissaantosuositusta, jonka perusteella kynnsarvon voisi laskea.

Päivittäisestä 5 ml:n sähkösavukenestekulutuksesta teoreettinen esimerkkikäyttäjä ei vielä hengittäisi esimerkiksi diasetyyliin osalta saantosuosituksia ylittävää määrää kuin kahdesta suurimman pitoisuuden määrityksessä saaneesta makutiivisteestä. Laskelmaissa käyttöneste olisi valmistettu tutkimukseen osallistuneista makutiivistenesteistä yleisen 20-prosenttisen laimennossuhteen mukaan. Toisaalta nykyaikaisilla sähkösavukelaitteilla mahdollinen ja jopa tavallinen 20 ml:n päivittäinen nesteiden kulutus ylittäisi sekä diasetyyliin että 2,3-pentaanidionin osalta opinnäytetyöhön valitut

kynnysarvot reilusti. Toisaalta kynnysarvot itsessään ovat teoreettisia ja työsuojelua varten kehitettyjä. Lisäksi sähkösavukkeiden höyryn imeytymisessä, laitteissa sekä myös höyryttelijöissä on kenties liikaa muuttujia järjestelmällisen riskinarvioinnin perustaksi.

10.2 Tutkimuksen merkitys kuluttajalle

Tutkimuksen makutiivisteitä ei ole tarkoituksella nimetty, mutta lopputuloksena on, että osa kotimaisista makutiivistenesteistä sisältää vaihtelevia pitoisuuksia diasetyyliä, 2,3-pentaanidionia tai asetoinia. Tutkimukseen osallistuneiden makutiivistenesteiden yleinen makuprofiili eli osittain kermaisiin ja karamellimaisiin makuihin keskittyminen huomioon ottaen tulokset olivat odotetun kaltaisia. Yli puolet makutiivisteistä sisälsi määrityksessä yhtä tai useampaa tutkimuksen kohteena olevaa yhdistettä. Määritettyjä pitoisuuksia tärkeämpi seikka kuluttajalle on kuitenkin yhdisteen lähtökohtainen tunnistaminen makutiivisteestä. Nautintoaineekseen kermaisen tai jälkiruokamaisen sähkösavukenesteen valitseva kuluttaja asettaa mahdollisesti itsensä alltiiksi näille yhdisteille. Ei siis välttämättä, mutta tämä on mahdollista.

Diasetyylin, 2,3-pentaanidionin ja asetoiinin mahdollinen haitallisuus ja terveydelle vaarallinen taso on edelleen epäselvää. Sähkösavukkeen käytön avulla tupakointia vähentävä tai tupakoinnin lopettava kuluttaja voisi kuitenkin halutessaan välttää myös näitä yhdisteitä sisältäviä sähkösavukenesteitä ja makutiivisteitä, mikäli tietoa sähkösavukenesteistä olisi saatavilla.

Ennen kesällä 2016 voimaan tulevaa Suomen uutta tupakkalakia kuluttajat tekevät vielä toistaiseksi itse omat valintansa sähkösavukenesteiden makutiivisteisiin ja niiden sisältämiin aromiaineisiin liittyen. Makuaineekiellon myötä tuotetietoa ja tutkimusta valitettavasti tuskin lisätään. Tietoa sähkösavukkeiden valmisteistä ja makutiivisteistä on vielä niukasti saatavilla, joten tietoisuuden lisääntyessä tilausta tutkimukselle ja selvitykselle on, myös muita kuin tähän tutkimukseen valittuja yhdisteitä ja ainesosia kohtaan.

Todennäköinen lakiin sisältyvä sähkösavukkeiden makuaineita koskeva rajattu myyntikielto tulee todennäköisesti heikentämään kuluttajan asemaa, sillä kiellettävien hedelmä-, karamelli- ja jälkiruokamakujen käyttöä laki tuskin lopettaa. Makutiivisteitä

tullaan todennäköisesti edelleen myymään ja niitä tullaan markkinoimaan esimerkiksi muuhun käyttöön tarkoitettuina aromiaineina. Mikäli kieltolakia sovelletaan näin, niin leivontatarvikkeista tuskin tullaan näkemään tutkimustuloksia niiden sisältämien yhdisteiden vaikutuksesta hengitettynä. Omat riskinsä tulee aiheuttamaan myös kuluttajien sovellettu sähkösavukeneiteiden valmistus esimerkiksi alkoholipohjaisista tai kiinteistä maku- ja aromiaineista, mikäli laillisten makuaineiden saatavuutta rajoitetaan.

Osa tutkimuksen makutiivisteistä sisälsi selkeästi myös luonnollisia tai keinotekoisia väriaineita. Väriaineet jätettiin tämän tutkimuksen riskikartoituksesta pois, sillä nesteen värin muutokseen vaadittava määrä väriainetta voi olla hyvin pieni ja määrittäminen siten hankalaa. Toisaalta pelkäämistään esteettiseen mielikuvaan tai tuotteen markkinointiin liittyvästä hengitettävästä sähkösavukeneiteen värjämisestä voidaan olla monta mieltä.

Sähkösavukkeiden käyttö eli höyryttely on tuskin täysin vaaratonta, mutta varsinkin tavallista tupakointia niiden avulla vähentävä tai kokonaan lopettava kuluttaja voi tyytyä mielestään vähemmän haitalliseen vaihtoehtoon kyseenalaistamatta tuotteiden sisältöä. Vähemmän haitalliseen tuotteeseen vaihtaminen ja terveysriskien pieneneminen voi toimia hetken perusteluna tietämättömyydelle tai välinpitämättömyydelle, mutta kuluttajan kannattaa sisäistää ainakin perustiedot myös sähkösavukkeiden mahdollisista vaaroista ja riskeistä. Mikäli sähkösavukeneiteiden sisältämät haitalliset ainesosat liittyvät pelkäämistään tuotteen makuun tai väriin, on kuluttajalla toisaalta valinnoillaan mahdollisuus vähentää sähkösavukkeiden käytöstä itselleen aiheutuvia haittoja.

10.3 Menetelmän kehitysehdotuksia

Opinnäytetyön tutkimuksen analyyseissä ilmeni monia odottamattomia haasteita. Makutiivisteiden monimutkainen näytematriisi ja varsinkin propyleeniglykolin viskoottisuus vaikeuttivat menetelmän kehitystä. Suurimmat ongelmat onnistuttiin kuitenkin ratkaisemaan ja 36 makutiivisteiden analyyseistä saatiin hyväksyttävät tulokset. Menetelmää kehitettiin tietoisesti siten, että näytteenä olevaa makutiivistettä ei olisi tarvinnut käsitellä tai laimentaa. Lopullisessa menetelmässä analyysit tehtiin suhteella 1:1 asetoniin laimennetuista makutiivisteistä.

Kansainvälisissä tutkimuksissa analyysejä oli tehty jopa 40-kertaisilla laimennoksilla. Suuret laimennokset varmasti pienentävät vaikean näytematriisin vaikutusta, mutta saattavat toisaalta asettaa määritettyjen pitoisuuksien tarkkuuden kyseenalaiseksi.

Seuraavana loogisena askeleena menetelmän kehitystyössä olisi menetelmän validointi. Validoinnin avulla voitaisiin määrittää luotettavasti yhdisteiden tunnistamis- ja määrittämissuurekset. Validoinnin avulla voitaisiin karsia myös mahdolliset muut tuloksiin vaikuttavat ongelmat, joita tässä tutkimuksessa ei kenties edes ilmennyt tai havaittu.

Lähteet

- 1 Attitudes of europeans towards tobacco and electronic cigarettes. 2015. Verkko-dokumentti. European comission.
<http://ec.europa.eu/public_opinion/archives/ebs/ebs_429_en.pdf>. Luettu 19.4.2016.
- 2 Electronic cigarettes. 2014. Verkkodokumentti. UK Centre for Tobacco and Alcohol Studies.
<www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/311887/Ecigarettes_report.pdf>. Luettu 19.4.2016.
- 3 Use of electronic cigarettes (vapourisers) among adults in Great Britain. 2015. Verkkodokumentti. ASH. <http://www.ash.org.uk/files/documents/ASH_891.pdf>. Luettu 19.4.2016.
- 4 Pierce, J.S., Abelmann, A., Spicer, L.J., Adams, R.E. ja Finley, B.L. 2014. Diacetyl and 2,3-pentanedione exposures associated with cigarette smoking: implications for risk assessment of food and flavoring workers. Critical reviews in toxicology. Vol. 44, s. 420–435.
- 5 Starre Sub Ohm Tank by Freemax. 2016. Verkkodokumentti. Vaporleaf. <<http://www.vaporleaf.com/Starre-Sub-Ohm-Tank-by-Freemax-p/starre-sub-ohm.htm>>. Luettu 16.4.2016.
- 6 Harvest Berry flavor concentrate. 2016. Verkkodokumentti. Capella. <<http://www.capellaflavors.com/products/harvest-berry-flavor-concentrate-13ml.html>>. Luettu 20.4.2016.
- 7 1,2-propanediol. 2016. Verkkodokumentti. Pubchem. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1030#section=Top>>. Luettu 18.4.2016.
- 8 Elintarvikkeiden lisäaineet. 2016. Verkkodokumentti. Evira. <<http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/tietoa+elintarvikkeista/koostumus/elintarvikeparanteet/lisaaaineet/e-koodit/?a=showEcode&ecodId=1803&itemsPerPage=5000>>. Luettu 18.4.2016.
- 9 Elintarvikkeiden lisäaineet. 2016. Verkkodokumentti. Evira. <<http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/tietoa+elintarvikkeista/koostumus/elintarvikeparanteet/lisaaaineet/e-koodit/?a=showEcode&ecodId=1637&itemsPerPage=5000>>. Luettu 18.4.2016.
- 10 1,2,3-propanetriol. 2016. Verkkodokumentti. Pubchem. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/glycerol>>. Luettu 18.4.2016.

- 11 Vapers Finland ry. 2016. Verkkodokumentti. Vapers Finland ry. <<http://vapers.fi/yhdistys/>>. Luettu 21.4.2016.
- 12 Farsalinos, K.E., Kistler, K.A., Gillman, G. ja Voudris, V. 2015. Evaluation of electronic cigarette liquids and aerosol for the presence of selected inhalation toxins. *Nicotine and tobacco research*. Vol. 17, s. 168-174.
- 13 Tierney, P.A., Karpinski, C.D., Brown, J.E., Luo, W. ja Pankow, J.F. 2015. Flavour chemicals in electronic cigarette fluids. *Tobacco control*. Verkkodokumentti. <<http://tobaccocontrol.bmj.com/content/25/e1/e10.full>>. Luettu 24.1.2016.
- 14 Niiranen, J., Jaarinen, S. 2008. *Laboratorion analyysitekniikka*. 5.-6. painos. Helsinki: Edita Prima Oy.
- 15 Agilent 7890A. 2016. Verkkodokumentti. Agilent. <https://www.chem.agilent.com/cag/Pharmanews/Pharma18/images/DJ-fig-1_lg.jpg>. Luettu 28.4.2016.
- 16 Riekkola, M-L., Hyötyläinen, T. 2002. *Kolonnikromatografia ja kapillaarielektromi-graatiotekniikat*. 2. painos. Helsinki: Yliopistopaino.
- 17 Ketola, R., Kostiainen, R., Kotiaho, T. ja Vainiotalo, P. 2010. *Massaspektrometri-an perusteet*. Helsinki: Hakapaino.
- 18 Rintala, E. 2013. *Vapaan diasetyylin ja asetoinin määrittäminen kaasukromato-grafisesti piimästä*. Helsingin Yliopisto.
- 19 Farsalinos, K.E., Voudris, V. ja Poulas, K. 2015. E-cigarettes generate high levels of aldehydes only in 'dry puff' conditions. *Addiction*. Vol. 110, s. 1352-1356.
- 20 Pierce, J.S., Abelmann, A., Spicer, L.J., Adams, R.E. ja Finley, B.L. 2014. Diacetyl and 2,3-pentanedione exposures associated with cigarette smoking: implications for risk assessment of food and flavoring workers. *Critical reviews in toxicology*. Vol. 44, s. 420–435.
- 21 Fedan, J.S., Dowdy, J.A., Fedan, K.B. & Hubbs, A.F. 2006. Popcorn worker's lung: In vitro exposure to diacetyl, an ingredient in microwave popcorn butter flavoring, increases reactivity to methacholine. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Vol. 215, s. 17–22.
- 22 Hubbs, A.F., Battelli, L.A., Goldsmith, W.T., Porter, D.W., Frazer, D., Friend, S., Schwegler-Berry, D., Mercer, R.R., Reynolds, J.S., Grote, A., Castranova, V., Kullman, G., Fedan, J.S., Dowdy, J. & Jones, W.G. 2002. Necrosis of Nasal and Airway Epithelium in Rats Inhaling Vapors of Artificial Butter Flavoring. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Vol. 185, s. 128–135.

- 23 Hubbs, A.F., Cumpston, A.M., Goldsmith, W.T., Battelli, L.A., Kashon, M.L., Jackson, M.C., Frazer, D.G., Fedan, J.S., Goravanahally, M.P., Castranova, V., Kreiss, K., Willard, P.A., Friend, S., Schwegler-Berry, D., Fluharty, K.L. & Sriram, K. 2012. Respiratory and Olfactory Cytotoxicity of Inhaled 2,3-Pentanedione in Sprague-Dawley Rats. *The American Journal of Pathology*. Vol. 181, s. 829-844.
- 24 NIOSH Update. 2011. Verkkodokumentti. The National Institute for Occupational Safety and Health. <<http://www.cdc.gov/niosh/updates/upd-08-15-11.html>>. Luettu 16.4.2016.
- 25 Flavorings-related lung disease. 2016. Verkkodokumentti. The National Institute for Occupational Safety and Health. <<http://www.cdc.gov/niosh/topics/flavorings/exposure.html>>. Luettu 16.4.2016.
- 26 Pendergrass, S.M. 2004. Method development for the determination of diacetyl and acetoin at a microwave popcorn plant. *Environmental Science and Technology*. Vol 38, s. 858–861.
- 27 Triasetiini. 2016. E-koodit.fi. Verkkodokumentti. <<http://ekoodit.fi/E1518/glyserolitriasetiini/>>. Luettu 26.4.2016.
- 28 Propyleeniglykoli. 2016. Sigma Aldrich. Verkkodokumentti. <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure5/148/mfcd00064272.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00064272-medium.png>. Luettu 1.5.2016.
- 29 Glyseroli. 2016. Sigma Aldrich. Verkkodokumentti. <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure9/117/mfcd00004722.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00004722-large.png>. Luettu 1.5.2016.
- 30 Diasetyyli. 2016. Sigma Aldrich. Verkkodokumentti. <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure6/190/mfcd00008756.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00008756-large.png>. Luettu 1.5.2016.
- 31 2,3-pentaanidioni. 2016. Sigma Aldrich. Verkkodokumentti. <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure2/093/mfcd00009313.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00009313-large.png>. Luettu 1.5.2016.
- 32 Asetoiini. 2016. Sigma Aldrich. Verkkodokumentti. <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure0/044/mfcd00004521.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00004521-large.png>. Luettu 1.5.2016.

- 33 Triasetiini. 2016. Sigma Aldrich. Verkkodokumentti. <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure8/175/mfcd00008716.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00008716-large.png>. Luettu 1.5.2016.

GC-MS-laitteiston menetelmä kvalitatiivisessa määrittäksessä

INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS 5975

C:\MSDCHEM\1\5975\ENESTEET.M

Thu Jan 14 13:14:22 2016

Control Information

Sample Inlet	GC
Injection Source	GC ALS
Mass Spectrometer	Enabled

Oven

Equilibration Time	0,25 min
Oven Program	On
	40 °C for 0,5 min
	then 25 °C/min to 300 °C for 5 min
Run Time	15,9 min

Front Injector

Syringe Size	10 µL
Injection Volume	0,2 µL
Injection Repetitions	1
Solvent A Washes (PreInj)	15
Solvent A Washes (PostInj)	15
Solvent A Volume	8 µL
Solvent B Washes (PreInj)	5
Solvent B Washes (PostInj)	5
Solvent B Volume	8 µL
Sample Washes	10
Sample Wash Volume	8 µL
Sample Pumps	3
Dwell Time (PreInj)	0 min
Dwell Time (PostInj)	0 min
Solvent Wash Draw Speed	300 µL/min
Solvent Wash Dispense Speed	6000 µL/min
Sample Wash Draw Speed	300 µL/min
Sample Wash Dispense Speed	6000 µL/min
Injection Dispense Speed	6000 µL/min
Viscosity Delay	7 sec

Front SS Inlet He

Mode	Split	
Heater	On	300 °C
Pressure	On	11,041 psi
Total Flow	On	143,4 mL/min
Septum Purge Flow	On	2 mL/min
Gas Saver	On	15 mL/min After 2 min
Split Ratio	100:1	
Split Flow	140 mL/min	

Thermal Aux 2 {MSD Transfer Line}

Heater	On	
Temperature Program	On	
		300 °C for 0 min

Column #1

Column HP-5ms	450 °C: 30 m x 250 µm x 0,25 µm
	In: Front SS Inlet He
	Out: Vacuum

Column #1

(Initial)	40 °C
Pressure	11,041 psi
Flow	1,4 mL/min
Average Velocity	42,934 cm/sec
Holdup Time	1,1646 min
Flow Program	Off
	1,4 mL/min for 0 min
	Run Time15,9 min

MS ACQUISITION PARAMETERS

Tune File:	atune.u
Acquisition Mode	Scan

MS Information

Solvent Delay	0.00 min
EMV Mode	Relative
Relative Voltage	0
Resulting EM Voltage	2247

Scan Parameters

Low Mass	20.0
High Mass	300.0
Threshold	0

MSZones

MS Source	230 C, maximum 250 C
MS Quad	150 C, maximum 200 C

GC-FID-menetelmä kvalitatiivisessa ja kvantitatiivisessa määrittämisessä

=====

6890 GC-FID METHOD

=====

OVEN

Initial temp 35 'C (On)

Maximum temp 325 'C

Initial time 3.00 min

Equilibration time 0.50 min

Ramps:

#	Rate	Final temp	Final time
1	10.00	120	0.00
2	30.00	300	0.00
3	0.0	(Off)	

Post temp 35 'C

Post time 0.00 min

Run time 17.50 min

FRONT INLET

Mode	Split
Initial temp	250 'C (On)
Pressure	46.6 kPa (On)
Split ratio	25:1
Split flow	35.0 mL/min
Total flow	39.7 mL/min
Gas saver	On
Saver flow	15.0 mL/min
Saver time	1.20 min
Gas type	Helium

COLUMN 1

Model Number	sigma SLB-5MS
Max temperature	325 'C
Nominal length	30.0 m
Nominal diameter	320.00 um
Nominal film thickness	1.00 um
Mode	constant pressure
Pressure	46.6 kPa
Nominal initial flow	1.4 mL/min

Average velocity	24 cm/sec
Inlet	Front Inlet
Outlet	Back Detector
Outlet pressure	ambient

BACK DETECTOR (FID)

Temperature	250 'C (On)
Hydrogen flow	40.0 mL/min (On)
Air flow	450.0 mL/min (On)
Mode	Constant column+makeup flow
Combined flow	50.0 mL/min
Makeup flow	On
Makeup Gas Type	Helium
Flame	On
Electrometer	On

GC Injector

Front Injector	
Sample Washes	3
Sample Pumps	2
Injection Volume	1.0 microliters

Syringe Size	10.0 microliters
PostInj Solvent A Washes	0
PostInj Solvent B Washes	2
Viscosity Delay	0 seconds
Plunger Speed	Variable
Injection Speed	200.00 microliters/minutes
Draw Speed	200.00 microliters/minutes
Dispense Speed	500.00 microliters/minutes
PreInjection Dwell	0.00 minutes
PostInjection Dwell	0.00 minutes

Saantokokeiden tulokset

	RT DA	DA	RT AP	AP	RT AC	AC
D5 standardi		223,200		66,400		248,800
D5_1	5,348	227,363	7,928	66,479	8,318	246,847
D5_2	5,347	214,234	7,927	63,121	8,317	231,125
D5_3	5,348	236,114	7,927	68,874	8,317	254,397
D5_4	5,347	212,266	7,927	62,407	8,316	230,788
KA		222,494		65,220		240,789

	RT DA	DA	RT AP	AP	RT AC	AC
D4 standardi		334,800		99,600		373,200
D4_1	5,346	323,171	7,926	95,582	8,315	352,349
D4_2	5,346	324,199	7,927	95,819	8,315	353,634
D4_3	5,350	369,520	7,929	108,907	8,318	403,111
D4_4	5,349	342,708	7,928	101,274	8,317	374,684
KA		339,899		100,395		370,945

	RT DA	DA	RT AP	AP	RT AC	AC
SAMPLE_1	5,378	1355,453	7,978	52,554	8,341	2763,681
SAMPLE_2	5,380	1358,253	7,979	52,287	8,343	2767,997
SAMPLE_3	5,380	1348,355	7,977	52,526	8,341	2766,400
SAMPLE_4	5,380	1357,194	7,979	52,035	8,341	2603,123
KA		1354,814		52,350		2725,300

	RT DA	DA	RT AP	AP	RT AC	AC
D4_SAMPLE_1	5,346	272,180	7,928	77,471	8,315	421,519
D4_SAMPLE_2	5,353	332,775	7,930	92,004	8,319	487,195
D4_SAMPLE_3	5,349	284,024	7,928	80,924	8,316	446,433
D4_SAMPLE_4	5,352	336,977	7,929	93,036	8,318	490,631
KA		306,489		85,859		461,444

	RT DA	DA	RT AP	AP	RT AC	AC
D5_SAMPLE_1	5,352	223,977	7,930	60,242	8,318	359,325
D5_SAMPLE_2	5,348	200,862	7,928	55,090	8,315	348,365
D5_SAMPLE_3	5,347	195,345	7,928	53,538	8,314	333,692
D5_SAMPLE_4	5,347	196,392	7,927	54,144	8,314	339,576
KA		204,144		55,753		345,240

Esimerkkejä standardiliuosten analyyseistä

Diasetyylin standardiliuos 1

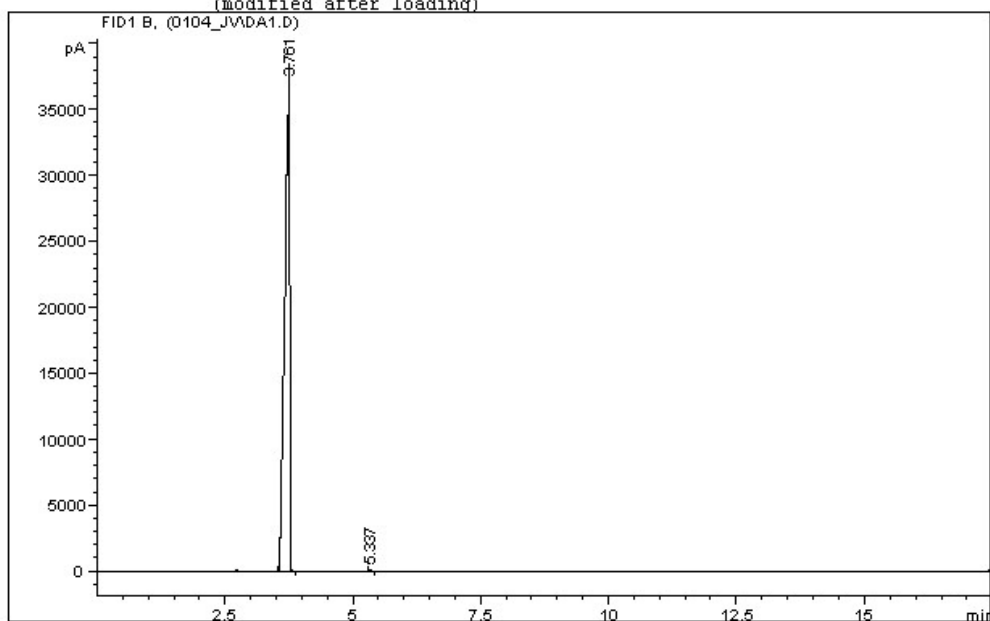
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\0104_JV\DAL.D

Sample Name: DAL

```

=====
Injection Date   : 3/31/2016 1:55:40 PM           Seq. Line :    6
Sample Name     : DAL                           Location  : Vial 63
Acq. Operator   : Jesse Viksten                 Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 1 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\DIKETONI.M
Last changed    : 3/31/2016 1:43:29 PM by Jesse Viksten
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DIKEACET.M
Last changed    : 4/28/2016 10:47:23 AM by HJPH
                  (modified after loading)
=====

```



External Standard Report

```

=====
Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : 4/1/2016 9:12:31 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====

```

Signal 1: FID1 B,

RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [ng/l]	Grp	Name
5.337	BB	231.15962	4.30789	995.81081	DA	
7.928	-	-	-	-	AP	
8.315	-	-	-	-	AC	

Totals : 995.81081

Results obtained with enhanced integrator!
 1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

```

=====
*** End of Report ***
=====

```

2,3-pentaanidionin standardiliuos 1

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\0104_JV\AP1.D

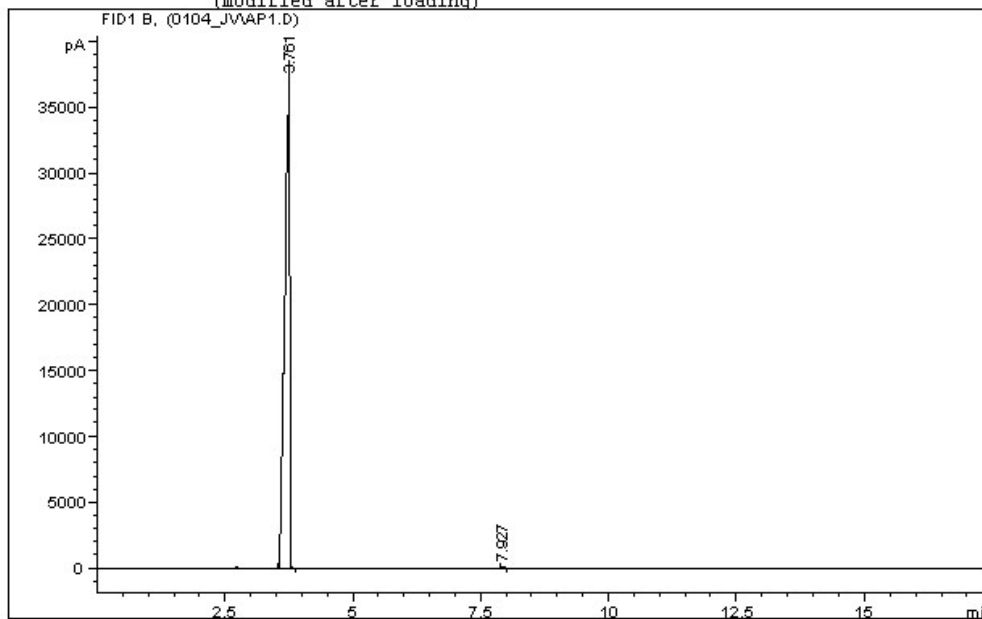
Sample Name: AP1

```

=====
Injection Date : 3/31/2016 4:53:42 PM      Seq. Line : 12
Sample Name    : AP1                        Location  : Vial 69
Acq. Operator  : Jesse Viksten              Inj      : 1
                                           Inj Volume: 1 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DIKETONI.M
Last changed   : 3/31/2016 4:41:44 PM by Jesse Viksten
                (modified after loading)
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\DIKEACET.M
Last changed   : 4/28/2016 10:46:37 AM by HJPH
                (modified after loading)
=====

```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 4/1/2016 9:12:31 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FID1 B,

RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [ng/l]	Grp	Name
5.338	-	-	-	-	-	DA
7.927	BB	267.73444	3.80796	1019.52281	AP	
8.315	-	-	-	-	-	AC

```
Totals :                               1019.52281
```

```
Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :
```

Warning : Calibrated compound(s) not found

```

=====
*** End of Report ***
=====

```


Asetoiinin standardiliuos 1

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\0104_JV\AC1.D

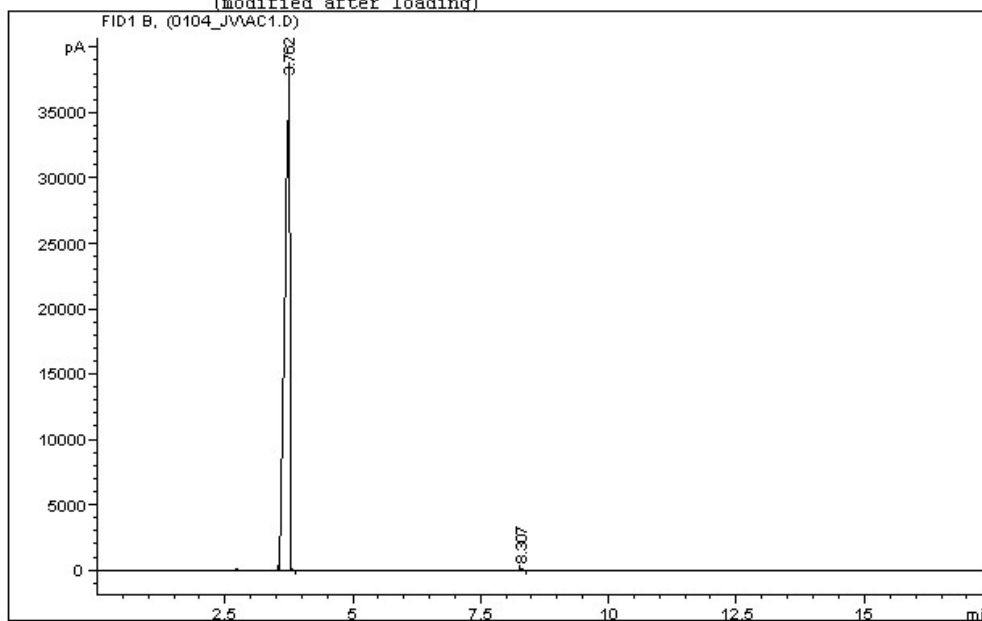
Sample Name: AC1

```

=====
Injection Date : 3/31/2016 7:51:24 PM      Seq. Line : 18
Sample Name    : AC1                        Location  : Vial 75
Acq. Operator  : Jesse Viksten              Inj      : 1
                                           Inj Volume: 1 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DIKETONI.M
Last changed   : 3/31/2016 7:39:26 PM by Jesse Viksten
                (modified after loading)
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\DIKEACET.M
Last changed   : 4/28/2016 10:46:01 AM by HJPH
                (modified after loading)
=====

```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified : 4/1/2016 9:12:31 AM
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FID1 B,

RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [ng/l]	Grp	Name
5.338	-	-	-	-	-	DA
7.928	-	-	-	-	-	AP
8.307	BB	148.13617	7.41241	1098.04628	-	AC

```
Totals :                               1098.04628
```

```
Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :
```

Warning : Calibrated compound(s) not found

```

=====
*** End of Report ***
=====

```


Tulokset 2,3-pentaanidionin kvantitatiivisesta määrittämisestä

	2,3-pentaanidioni								
	Pitoisuus		Näytteet 1:1 asetonissa			(µg/ml)	(mg/l)	Suht.	
	(µg/ml)	(µg/ml)	Analyysisarja						
20 %	100 %	1	2	3	KA	KH	KH		
Makutiiviste 01	8,9	44,5	23,0	22,6	21,3	22,3	0,9	3,9 %	
Makutiiviste 02	1186,0	5930,0	2960,2	2993,5	2941,4	2965,0	26,4	0,9 %	
Makutiiviste 03									
Makutiiviste 04									
Makutiiviste 05									
Makutiiviste 06									
Makutiiviste 07									
Makutiiviste 08	57,7	288,3	148,9	146,4	137,2	144,2	6,2	4,3 %	
Makutiiviste 09	47,0	234,8	115,2	118,8	118,1	117,4	1,9	1,6 %	
Makutiiviste 10	25,6	128,2	63,2	64,1	64,9	64,1	0,9	1,3 %	
Makutiiviste 11									
Makutiiviste 12									
Makutiiviste 13									
Makutiiviste 14									
Makutiiviste 15									
Makutiiviste 16									
Makutiiviste 17									
Makutiiviste 18									
Makutiiviste 19									
Makutiiviste 20	421,1	2105,4	1053,9	1066,8	1037,4	1052,7	14,7	1,4 %	
Makutiiviste 21	407,6	2037,9	1042,9	1003,0	1010,9	1018,9	21,1	2,1 %	
Makutiiviste 22									
Makutiiviste 23	141,0	705,0	355,1	352,0	350,4	352,5	2,4	0,7 %	
Makutiiviste 24									
Makutiiviste 25	9,0	45,0	23,2	22,6	21,8	22,5	0,7	3,1 %	
Makutiiviste 26	36,5	182,5	94,1	90,6	89,0	91,2	2,6	2,9 %	
Makutiiviste 27									
Makutiiviste 28	70,8	354,0	176,8	177,5	176,8	177,0	0,4	0,2 %	
Makutiiviste 29									
Makutiiviste 30									
Makutiiviste 31									
Makutiiviste 32									
Makutiiviste 33									
Makutiiviste 34	11,6	58,2	30,5	27,5	29,2	29,1	1,5	5,2 %	
Makutiiviste 35	14,1	70,6	36,2	35,1	34,6	35,3	0,8	2,4 %	
Makutiiviste 36	8,8	44,0	21,9	21,9	22,3	22,0	0,3	1,2 %	

GC-MS-menetelmä kvantitatiivisessa määityksessä

C:\MSDCHEM\1\5975\DIKETONI.M

Sample Inlet	GC
Injection Source	GC ALS
Mass Spectrometer	Enabled

Oven

Equilibration Time	0,5 min
Oven Program	On
	50 °C for 3 min
	then 10 °C/min to 100 °C for 0 min
	then 30 °C/min to 300 °C for 0 min
Run Time	14,667 min

Front Injector

Syringe Size	10 µL
Injection Volume	0,2 µL
Injection Repetitions	1
Solvent A Washes (PreInj)	2

Solvent A Washes (PostInj)	0
Solvent A Volume	8 µL
Solvent B Washes (PreInj)	0
Solvent B Washes (PostInj)	2
Solvent B Volume	8 µL
Sample Washes	2
Sample Wash Volume	8 µL
Sample Pumps	3
Dwell Time (PreInj)	0 min
Dwell Time (PostInj)	0 min
Solvent Wash Draw Speed	200 µL/min
Solvent Wash Dispense Speed	500 µL/min
Sample Wash Draw Speed	200 µL/min
Sample Wash Dispense Speed	200 µL/min
Injection Dispense Speed	200 µL/min
Viscosity Delay	2 sec
Sample Depth Disabled	

Front SS Inlet He

Mode	Split
Heater	On 230 °C
Pressure	On 11,729 psi
Total Flow	On 143,4 mL/min
Septum Purge Flow	On 2 mL/min
Gas Saver	On 15 mL/min After 2 min
Split Ratio	100 :1
Split Flow	140 mL/min

Thermal Aux 2 {MSD Transfer Line}

Heater	On
Run Time	14,667 min

Column #1

450 °C	30 m x 250 µm x 0,25 µm
In	Front SS Inlet He
Out	Vacuum
(Initial)	50 °C
Pressure	11,729 psi

Flow	1,4 mL/min
Average Velocity	43,151 cm/sec
Holdup Time	1,1587 min
Flow Program	On
	1,4 mL/min for 0 min
Run Time	14,667 min

MS ACQUISITION PARAMETERS

Tune File	atune.u
Acquisition Mode	Scan

MS Information

Solvent Delay	0.00 min
EMV Mode	Relative
Relative Voltage	0
Resulting EM Voltage	2247

[Scan Parameters]

Low Mass	20.0
High Mass	300.0
Threshold	0

Sample #	2
A/D Samples	4
Plot 2 low mass	271.8
Plot 2 high mass	272.1

[MSZones]

MS Source	230 C	maximum 250 C
MS Quad	150 C	maximum 200 C

Tulokset kvantitatiivisesta määryksestä GC-MS-laitteistolla

	Diasetyyli		2,3-pentaanidioni		Asetoiini	
	Pitoisuus		Pitoisuus		Pitoisuus	
	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)
Tiiviste (%)	20 %	100 %	20 %	100 %	20 %	100 %
Makutiiviste 01						
Makutiiviste 02			398,6	1993,0	73,0	364,8
Makutiiviste 03						
Makutiiviste 04						
Makutiiviste 05						
Makutiiviste 06						
Makutiiviste 07					278,8	1393,8
Makutiiviste 08					170,6	852,8
Makutiiviste 09			54,4	272,2	567,5	2837,4
Makutiiviste 10			49,8	248,9	144,8	723,8
Makutiiviste 11					456,2	2280,9
Makutiiviste 12					2109,8	10548,8
Makutiiviste 13						
Makutiiviste 14					2704,1	13520,6
Makutiiviste 15						
Makutiiviste 16						
Makutiiviste 17						
Makutiiviste 18						
Makutiiviste 19					207,9	1039,4
Makutiiviste 20			265,4	1327,2	1095,2	5476,2
Makutiiviste 21			371,0	1855,1	1230,9	6154,7
Makutiiviste 22						
Makutiiviste 23			209,4	1046,8	194,8	973,8
Makutiiviste 24						
Makutiiviste 25			61,4	306,9	59,3	296,5
Makutiiviste 26					289,8	1449,2
Makutiiviste 27					414,6	2073,2
Makutiiviste 28						
Makutiiviste 29					244,9	1224,4
Makutiiviste 30					178,2	891,2
Makutiiviste 31	198,2	991,0			290,1	1450,3
Makutiiviste 32					115,4	576,8
Makutiiviste 33					116,5	582,6
Makutiiviste 34	131,2	656,0	74,3	371,6	777,0	3884,9
Makutiiviste 35						
Makutiiviste 36						

GC-MS-analyysien pinta-alat ja retentioajat

	Diasetyyli		2,3-pentaanidioni		Asetoiini	
	Pinta- ala	(min) RT	Pinta- ala	(min) RT	Pinta- ala	(min) RT
Makutiiviste 01						
Makutiiviste 02			387221	2,217	21190	2,385
Makutiiviste 03						
Makutiiviste 04						
Makutiiviste 05						
Makutiiviste 06						
Makutiiviste 07					167160	2,378
Makutiiviste 08					90406	2,382
Makutiiviste 09			35577	2,217	371940	2,373
Makutiiviste 10			30797	2,217	72118	2,380
Makutiiviste 11					292998	2,353
Makutiiviste 12					1465846	2,362
Makutiiviste 13						
Makutiiviste 14					1887405	2,348
Makutiiviste 15						
Makutiiviste 16						
Makutiiviste 17						
Makutiiviste 18						
Makutiiviste 19					116889	2,374
Makutiiviste 20			251170	2,205	746273	2,351
Makutiiviste 21			359049	2,231	842514	2,374
Makutiiviste 22						
Makutiiviste 23			193862	2,214	107578	2,374
Makutiiviste 24						
Makutiiviste 25			42659	2,137	11493	2,374
Makutiiviste 26					175020	2,374
Makutiiviste 27					263538	2,374
Makutiiviste 28						
Makutiiviste 29					143127	2,372
Makutiiviste 30					95863	2,350
Makutiiviste 31	174365	1,618			175169	2,364
Makutiiviste 32					51255	2,379
Makutiiviste 33					52083	2,378
Makutiiviste 34	112260	1,620	55883	2,140	520537	2,358
Makutiiviste 35						
Makutiiviste 36						