

Olli-Pekka Keituri

Polysyklisten aromaattisten hiilivetyjen (PAH) GC-MS-analysointimenetelmän validointi ja menetelmänkehitys

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

6.10.2017

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Olli-Pekka Keituri Polysyklisten aromaattisten hiilivetyjen (PAH) GC-MS-analysointimenetelmän validointi ja menetelmänkehitys 38 sivua + 7 liitettä 6.10.2017
Tutkinto	Laboratorioanalytiikka (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Ohjaaja(t)	Kemisti Juhani Kronholm, FT Kemisti Heidi Tiala, FL Lehtori Miika Kuivikko, FM
<p>Tässä opinnäytetyössä selostetaan Yhdysvaltain ympäristönsuojeluviraston priorisoimien polysyklisten aromaattisten hiilivety-yhdisteiden (EPA-PAH 16) määrittämiseen käytetyn analyysimenetelmän validointi. Opinnäytetyö toteutettiin sisäilman ja rakennusmateriaalien haitta-aineanalytiikkaan erikoistuvassa laboratorioalan yrityksessä Ositum Oy.</p> <p>Validoinnin kohde oli Ositum Oy:ssä käyttöön otettu kemiallinen analyysimenetelmä, jossa PAH-yhdisteet uutetaan sekoituksessa rakennusmateriaalipohjaisista näytteistä tolueniin ja määritetään kaasukromatografi-massaspektrometrillä (GC-MS). Menetelmä mukaillee standardeja ISO 18287 ja SFS-EN 15527, mutta on niitä suoraviivaisempi.</p> <p>Validoinnissa toluenuuttomenetelmän referenssimenetelmänä käytettiin standardin ISO 18287 menettelyä A, jossa näytteet uutetaan sekoituksessa kahteen liuottimeen, asetoniin ja petroleetteriin. Vesihuuhtelun myötä PAH-yhdisteet liukenevat petroleetteriin, josta ne määritetään GC-MS-laitteistolla. Kummankin menetelmän oikeellisuutta arvioitiin käyttäen hiekkaa ja bitumia näytematriiseina. Täsmällisyyden testaamisessa käytettiin yritykseen lähetettyjä koostumuksiltaan erilaisia asiakasnäytteitä. PAH-yhdistekohtaista spesifisyyttä, selektiivisyyttä, tarkkuutta, ja toteamis- ja määritysrajoja vertailtiin menetelmien välillä.</p> <p>Toluenuuttomenetelmän osoitettiin validoinnin myötä saavuttavan referenssimenetelmän asettamat tavoitteet. Rakennusmateriaalipohjaisten näytteiden sisältämät PAH-yhdisteet kyetään menetelmällä toteamaan ja määrittämään standardiin ISO 18287 verrannollisella tarkkuudella. Interferenssiä aiheuttavan bitumin havaittiin niin toluenuuttomenetelmässä kuin referenssimenetelmässä heikentävän määritysten oikeellisuutta ja nostavan varsinkin heikosti haihtuvien PAH-analyyttien toteamis- ja määritysrajoja.</p> <p>Bitumimatriisista aiheutuvan interferenssin vaikutuksia pyrittiin lievittämään vaihtoehtoisella esikäsitelymenetelmällä toluenuuttomenetelmän kehittämiseksi. Standardin ISO 18287 kaltaisessa vaihtoehtoisessa esikäsitelyssä näyte uutettiin kahteen liuottimeen, asetoniin ja tolueniin interferenssiä aiheuttavien komponenttien karsimiseksi. Tämän havaittiin olevan sinällään riittämätön toimenpide: PAH-määritykset bitumipohjaisista näytteistä edellyttävät toluenuuttomenetelmän laajempaa kehittämistä.</p>	
Avainsanat	Bitumi, GC-MS, Matriisivaikutus, PAH, Validointi

Author(s) Title Number of Pages Date	Olli-Pekka Keituri Validation and Method Development for GC-MS-Based Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) 38 pages + 7 appendices 6 October 2017
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructor(s)	Juhani Kronholm, Ph.D., Chemist Heidi Tiala, Ph.L., Chemist Miika Kuivikko, M.Sc., Senior Lecturer
<p>This thesis covers the validation process of an analytical method used to quantify polycyclic aromatic hydrocarbons prioritized by the United States Environmental Protection Agency (EPA-PAH 16). The work was carried out in Ositum Oy, a company providing analytical services concerning harmful substances in indoor air and building materials.</p> <p>Focus of the validation was a chemistry-based analytical method implemented by Ositum Oy, in which PAH compounds are extracted by means of shaking into toluene from building material samples and measured using a gas chromatograph–mass spectrometer (GC-MS). Despite being more straightforward, it resembles standards ISO 18287 and SFS-EN 15527.</p> <p>Method A of ISO 18287 was used in the validation as a comparative reference to the toluene extraction method. In Method A, PAH compounds are extracted by means of shaking into two solvents – acetone and petroleum ether. After rinsing the solution with water, PAHs dissolve into petroleum ether, from which they can be measured using GC-MS. Trueness of the methods were evaluated by utilizing sand and bitumen as sample matrices. Diverse samples sent prior by customers were used in further precision assessment. Specificity, selectivity, accuracy and limits of detection and quantification for each PAH compound were subject to comparison between methods.</p> <p>Validation results of the toluene extraction method were on par with the reference method. In the detection and quantification of PAHs present in building material samples, accuracy of the method was shown to be comparable to ISO 18287. As observed in both methods, interference caused by bitumen increased limits of detection and quantification most notably in nonvolatile PAH compounds and had an adverse effect on accuracy in general.</p> <p>As part of method development, mitigation of the effects of bitumen-related interference was attempted by using an alternative preparation method. Adhering to ISO 18287, the sample was dissolved into two solvents – acetone and toluene – and rinsed with water to remove interfering sample components. This procedure by itself was deemed insufficient. Analysis of PAH compounds in bitumen samples by toluene extraction requires more development.</p>	
Keywords	Bitumen, GC-MS, Matrix Effect, PAH, Validation

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Työn tausta	1
2.1	Polysykliset aromaattiset hiilivedyt	1
2.2	Polysyklisten yhdisteiden kemiallinen määrittäminen	3
2.3	Kaasukromatografi-massaspektrometri	4
2.3.1	Kaasukromatografia	4
2.3.2	Massaspektrometria	5
2.3.3	Sisäisen standardin käyttö kaasukromatografiassa	6
2.4	Analyttisen menetelmän validointi	6
2.4.1	Tarkkuus	7
2.4.2	Mittausepävarmuus	7
3	Laitteisto ja reagenssit	7
4	Työn toteutus	8
4.1	Analyysilaitteiston asennus ja ajo-ohjelmien luominen	8
4.2	Analyttien tunnistus ja kvantitointi	10
4.3	Validoinnin suunnittelu	11
4.4	Liuosten valmistus	12
4.5	Standardinmukaisen referenssimenetelmän vaiheet	13
4.6	Tolueeni-uuttomenetelmän vaiheet ja menetelmänkehitys	14
4.7	Esikäsittelykapasiteetit	14
5	Tulokset	15
5.1	Standardiliuoksiin valittu liuotin	15
5.2	Lineaarisuus, spesifisyys ja selektiivisyys	15
5.2.1	Mittausalueen lineaarisuus	15
5.2.2	Spesifisyys	17
5.2.3	Selektiivisyys	18
5.3	Oikeellisuus	20
5.3.1	Saantokokeet	20
5.3.2	Poikkeamien tarkastelu	24

5.4	Täsmällisyys	25
5.4.1	Kenttänytemääritykset	25
5.4.2	Määritysten uusittavuus	29
5.5	Tolueeniuttomenetelmän toistettavuus	29
5.6	Mittausepävarmuuden tarkastelu	30
5.7	Toteamisraja ja määritysraja	31
5.8	Menetelmänkehitys matriisivaikutuksen vähentämiseksi	32
6	Yhteenveto	34
6.1	Tolueeniuttomenetelmän suorituskyky	34
6.2	Bitumimatriisin vaikutus suorituskykyyn	35
6.3	Jatkotoimenpiteet	36
	Lähteet	37
	Liitteet	
	Liite 1. Menetelmillä luodut kalibrointikuvaajat	
	Liite 2. Taulukoidut saantokoetulokset	
	Liite 3. PAH-pitoisuudet täsmällisyyskokeissa	
	Liite 4. Täsmällisyyskokeiden tilastollinen tarkastelu	
	Liite 5. Tolueeniuton menetelmänkehitys	
	Liite 6. Kuvat täsmällisyyskokeiden kenttänytteistä	
	Liite 7. MUKit-mittausepävarmuustulosteet	

Lyhenteet

ACE	<i>Acetone</i> , asetoni.
CI	<i>Chemical Ionization</i> , kemiallinen ionisointi.
EI	<i>Electron Ionization</i> , elektroni-ionisointi.
EIC	<i>Extracted-Ion Chromatogram</i> , ionieroteltu kromatogrammi.
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> , Yhdysvaltain ympäristönsuojeluvirasto.
GC	<i>Gas Chromatograph</i> , kaasukromatografi.
GC-MS	<i>Gas Chromatograph – Mass Spectrometer</i> , kaasukromatografi-massaspektrometri.
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> , Kansainvälinen standardisoimisjärjestö.
ISTD	<i>Internal Standard</i> , sisäinen standardi.
LOD	<i>Limit of Detection</i> , toteamisraja.
LOQ	<i>Limit of Quantitation</i> , määritysraja.
m/z	<i>Mass-to-Charge Ratio</i> , massa-varaussuhde.
N.A.	<i>Not Applicable</i> , ei sovellettavissa.
PAH	<i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbon</i> , polysyklinen aromaattinen hiilivety.
P-E	<i>Petroleum Ether</i> , petrolieetteri.
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i> , suhteellinen keskihajonta.
S/N	<i>Signal-to-Noise Ratio</i> , signaali-kohinasuhde.
SD	<i>Standard Deviation</i> , keskihajonta.
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i> , valittujen ionien seuranta.
TIC	<i>Total Ion Current</i> , kokonaisonivirta.
TOL	<i>Toluene</i> , tolueeni.

1 Johdanto

Polysyklisten aromaattisten hiilivety-yhdisteiden levinneisyyden selvittämisestä on tullut keskeinen osa ympäristötutkimusta. PAH-yhdisteitä vapautuu jatkuvasti ympäristöömme epätäydellisen palamisen seurauksena, ja ne leviävät lähes kaikkialle sitoutuneina ilman pienhiukkasiin. Merkittävää altistumista tapahtuu tupakoinnin yhteydessä ja työpaikoilla kokaamoissa ja kreosoottikyllästämöissä. Voimakkaan altistumisen tiedetään lisäävän syöpäriskiä ihmisillä, joten lukuisia kemiallisia määritystapoja materiaaleissa piilevien PAH-yhdisteiden havaitsemiseksi on kehitetty.

Tämä opinnäytetyö toteutettiin haitta-aineanalytiikkaan erikoistuneessa Ositum Oy:n Vantaan toimipisteessä, joka on akkreditoitu testauslaboratorio. Ositum Oy on yksityinen puolueettomia rakennetun ympäristön analyysipalveluja tarjoava laboratorioalan yritys. Opinnäytetyön ensisijainen päämäärä oli validoida yrityksessä käytettävä polysyklisten aromaattisten hiilivety-yhdisteiden analysointimenetelmä, jossa pitoisuudet määritetään ympäristönäytteistä kaasukromatografi-massaspektrometrin avulla. Lisäksi menetelmän suorituskyvyn parantamista interferenssiä aiheuttavassa bitumissa testattiin.

2 Työn tausta

2.1 Polysykliset aromaattiset hiilivedyt

Polysyklinen aromaattinen hiilivety (engl. *polycyclic/polynuclear aromatic hydrocarbon*) on yläkäsite tasomaisille hiilivety-yhdisteille, jotka koostuvat kahdesta tai useammasta fuusioituneesta aromaattisesta renkaasta. PAH-yhdisteitä syntyy orgaanisen materiaalin epätäydellisessä palamisessa, ja niitä esiintyy merkittävinä pitoisuuksina muun muassa kreosootissa, kivihiilitervassa ja bitumissa.

Huoneenlämpötilassa PAH-yhdisteet ovat kiinteitä. Sulamispisteet asettuvat noin 80–440 °C:n välille ja kiehumispisteet noin 200–600 °C:n välille. Valtaosa haihtuu heikosti, mutta niiden on havaittu kulkeutuvan sitoutuneina ilmassa pölyihin ja muihin hiukkasiin. Ne ovat rasvaliukoisia, eivätkä liukene veteen. Ympäristötutkimuksessa on tavannut omaista, että analytiikassa huomioidaan vain 16 Yhdysvaltain ympäristönsuojeluviraston priorisoimaa PAH-yhdistettä (EPA-PAH 16), jotka ovat taulukossa 1. [1, s. 4.]

Taulukko 1. EPA-PAH 16 -yhdisteinä tunnetut polysykliset aromaattiset hiilivedyt, niiden CAS-numerot, molekyylikaavat ja haihtuvuus [1, s. 4–5].

Yhdiste	CAS-nro	Molekyylikaava	Haihtuvuus
Naftaleeni	91-20-3	C ₁₀ H ₈	Herkästi haihtuva
Asenaftyleeni	83-32-9	C ₁₂ H ₈	
Asenafteeni	208-96-8	C ₁₂ H ₁₀	
Fluoreeni	86-73-7	C ₁₃ H ₁₀	
Fenantreeni	85-01-8	C ₁₄ H ₁₀	Keskihaihtuva
Antraseeni	120-12-7	C ₁₄ H ₁₀	
Fluoranteeni	206-44-0	C ₁₆ H ₁₀	
Pyreeni	129-00-0	C ₁₆ H ₁₀	
Bentso[a]antraseeni	56-55-3	C ₁₈ H ₁₂	Heikosti haihtuva
Kryseeni	218-01-9	C ₁₈ H ₁₂	
Bentso[b]fluoranteeni	205-99-2	C ₂₀ H ₁₂	
Bentso[k]fluoranteeni	207-08-9	C ₂₀ H ₁₂	
Bentso[a]pyreeni	50-32-8	C ₂₀ H ₁₂	
Indeno[1,2,3-cd]pyreeni	193-39-5	C ₂₂ H ₁₂	
Dibentso[ah]antraseeni	53-70-3	C ₂₂ H ₁₄	
Bentso[ghi]peryleeni	191-24-2	C ₂₂ H ₁₂	

Tutkimuksissa voimakas altistuminen polysyklisille aromaattisille hiilivety-yhdisteille on liitetty lisääntyneeseen syöpäriskiin. PAH-yhdisteet kiihdyttävät solujen lisääntymistä ja kasvua sekä estävät soluviestintää. Altistumisesta syntyvien metaboliatuotteiden, kuten epoksidien, on tutkimuksissa todettu muodostavan sidoksia DNA- ja RNA-molekyylien sekä proteiinien kanssa. [1, s. 15] Kansainvälinen syöväntutkimuslaitos on todennut bentso(a)pyreenin ihmiselle syöpävaaralliseksi aineeksi ja valtaosan PAH-yhdisteistä mahdollisesti syöpävaaralliseksi aineiksi. Selvityksessään laitos luokittelee voimakkaasti PAH-yhdisteille altistavat prosessit, kuten nuohouksen, koksen tuotannon ja kivihiilitervan tislauksen, ihmiselle syöpävaaralliseksi toiminnaksi. [1, s. 20–21; 2, s. 771–773.]

Työterveyslaitos on selvityksessään todennut, että merkittävin työperäinen altistuminen polysyklisille aromaattisille hiilivety-yhdisteille liittyy yleensä kivihiilipohjaisten tuotteiden valmistukseen ja käsittelyyn [1, s. 2]. Esimerkiksi kivihiilipikeä sisältävien rakenteiden purkamistyö on tehtävä altistumisriskin takia henkilökohtaista suojavarustusta käyttäen. Purkujäte täytyy myös toimittaa ongelmajätelaitokselle, jos kivihiilipien sisältämien PAH-yhdisteiden yhteenlaskettu pitoisuus ylittää raja-arvon 200 mg/kg. [3.]

Maaperässä esiintyvien polysyklisen aromaattisten hiilivety-yhdisteiden pitoisuuksien raja-arvoista säädetään valtioneuvoston asetuksessa maaperän pilaantuneisuuden ja puhdistustarpeen arvioinnista, joka tunnetaan myös nimellä PIMA-asetus [4]. EPA-PAH 16 -yhdisteiden yhteenlasketun pitoisuuden kynnsarvo on 15 mg/kg, alempi ohjearvo 30 mg/kg ja ylempi ohjearvo 100 mg/kg. Siinä myös määritellään eräiden yksittäisten yhdisteiden, kuten naftaleenin ja antraseenin, raja-arvot. Kynnsarvo-arvon alittuessa maaperästä ei aiheudu terveysriskejä. Alemman ohjearvon alittuessa maaperä soveltuu tavalliseen maankäyttöön ja ylempään ohjearvon alittuessa teollisuus- ja varastoalueiden tapaiseen maankäyttöön. [5, s. 9.]

Rakennusalalla käytössä on yhä materiaaleja, joiden tiedetään sisältävän polysyklisiä aromaattisia hiilivetyjä, kuten terva-, kivihiiliterva- ja bitumipohjaiset maalit. Niillä voidaan yhä hoitaa vanhempien rakennusten maalattuja kattopintoja, ja kivihiilitervan käyttö on edelleen sallittua erikoiskohteisiin tarkoitetuissa pintakäsittelyaineissa. PAH-yhdisteitä sisältävien materiaalien käyttöä rakennuksissa on rajoitettu niistä aiheutuvien terveys-haittojen takia. Vanhojen rakennuksien ala- ja yläpohjan rakenteissa on saatettu käyttää kreosootilla kyllästettyä puuta. Vuosina 1890–1950 kivihiilipikeä hyödynnettiin yleisesti kosteuden ja veden eristeenä. Vastaavaan tarkoitukseen on käytetty kreosoottipitoisia bitumipahveja ja -sivelyjä. Nykyaikana kivihiilipikeä ja muut PAH-yhdistepitoiset materiaalit pyritään korjauksien yhteydessä poistamaan rakenteista kokonaan. [6, s. 99–103.]

2.2 Polysyklisen yhdisteiden kemiallinen määrittäminen

Toluenuuttomenetelmä pohjautuu poolittomien polysyklisen aromaattisten hiilivetyjen liuottamiseen poolittomaan tolueniliuottimeen. Yhdisteiden määrittäminen toteutetaan käyttäen deuteroituja PAH-yhdisteitä sisäisinä standardeina kaasukromatografi-massaspektrometrillä (GC-MS), jonka tiedetään soveltuvan PAH-analytiikkaan. Menetelmä muistuttaa Kansainvälisen standardisointijärjestön (ISO) standardia 18287 ja Suomen Standardisointiliiton (SFS ry) standardia 15527 [7; 8].

Standardissa ISO 18287 polysykliset aromaattiset hiilivedyt uutetaan petrolieetteriin ja konsentroidaan typpikuivausmenetelmällä tai vesihauteella ennen analysointia GC-MS-laitteistolla. SFS-EN 15527 mukailee edellä mainittua standardia. Siinä ohjeistettu esikäsittely ja analysointi ovat hyvin samanlaisia, mutta toisin kuin ISO 18287, se sisältää selvitykset menetelmään soveltuvista näytematriiseista ja liuottimista, ja siinä sallitaan suosituksista poikkeavien liuottimien harkinnanvarainen käyttö. Yleisellä tasolla SFS-EN 15527 on kuitenkin linjauksiltaan tiukempi kuin suurpiirteisempi ISO 18287.

2.3 Kaasukromatografi-massaspektrometri

2.3.1 Kaasukromatografia

Kaasukromatografia on analyttinen erottelumenetelmä, jossa liuotettu näyte hajotetaan komponenteikseen. Komponenttien erottelu toteutetaan käyttäen pitkää kolonna, jonka lämpötilaa nostetaan yhdisteiden höyrystämiseksi. Ne sitoutuvat vaihtelevasti kolonnin seinämällä olevaan stationäärifaasiin, minkä takia ne etenevät kolonnissa eri nopeuksilla. Erottelua, joka perustuu yhdisteiden ja stationäärifaasin vuorovaikutukseen, kutsutaan jakautumiskromatografiaksi. [9, s. 71; 10. s. 543.]

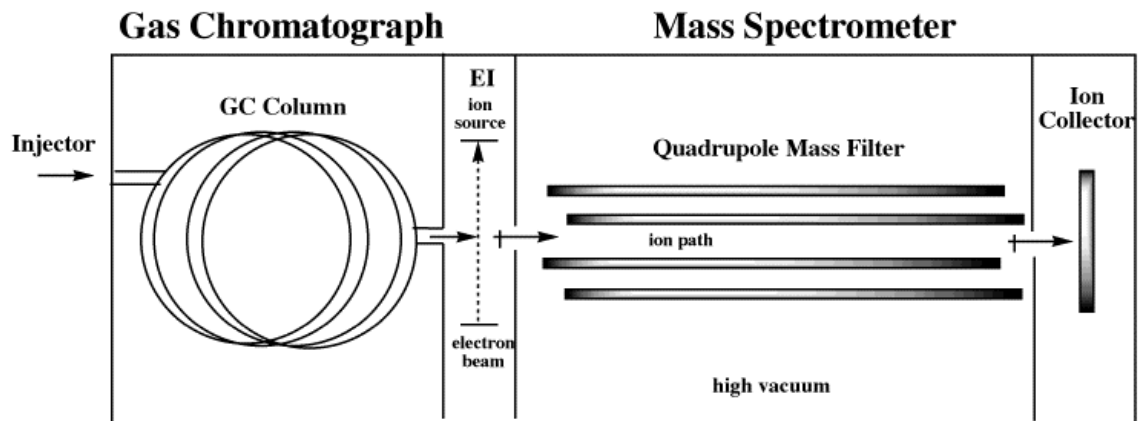
Nestemäinen näyte syötetään kaasukromatografian tuloaukkoon joko suoraan ruiskulla tai hyödyntäen automaattista näytteensyöttäjää. Näytteensyötön myötä näyte kulkeutuu GC-laitteiston uunissa sijaitsevaan kolonniin, jossa kromatografinen erottelu tapahtuu. Tuloaukon lämpötilan on oltava näytteen kiehumispisteen luokkaa, jotta näyte höyrystyisi ja etenisi nopeasti kolonniin [11, s. 76]. Kolonniin etenevän osuuden suuruuteen voidaan vaikuttaa: jakamattomassa näytteensyötössä koko ruiskun sisältö etenee kolonniin, mutta jakonäytteensyötössä vain murto-osa. Jälkimmäisellä tekniikalla voidaan hidastaa kolonnin likaantumista. [10, s. 577–578; 11, s. 17.]

Kolonnin lämpötila- ja paineolosuhteet voidaan mukauttaa uunia käyttämällä. Jotta näyte voidaan hajottaa yhdistekomponentteihinsa, uuniin säädetään sopiva lämpötilaohjelma, jonka aikana lämpötila nousee. Yleisesti GC-kolonneissa käytetään tasaisesti kohoavaa eli gradienttia lämpötilaohjelmaa. Nousun aikana näytteen herkästi haihtuvat yhdisteet saavuttavat kiehumispisteensä ensin ja kulkeutuvat kolonnin läpi heikommin haihtuvia yhdisteitä lyhyemmässä ajassa. Kromatografisessa erottelussa komponentit sitoutuvat liikkuvaan faasiin ja stationäärifaasiin kolonnin sisällä. Kaasukromatografiassa liikkuva faasi toteutetaan kolonnissa virtaavalla kantajakaasulla, joka on tyypillisesti puhdasta heliumia, kun taas paikallaan oleva stationäärifaasi koostuu kiinteästä tai nestemäisestä aineesta kolonnin seinämällä. [10, s. 542–543; 12, s. 183–184; 13, s. 4.]

Pienikokoiset molekyylit kulkeutuvat kolonnin läpi nopeasti ja pysyttelevät enimmäkseen liikkuvassa faasissa. Suurimmat molekyylit puolestaan kulkeutuvat hitaasti ja sitoutuvat enemmän stationäärifaasiin. [9, s. 71–72.] Komponentit erotellaan toisistaan retentioajan perusteella: yhdiste saavuttaa kolonnin jälkeen detektorin, joka mittaa siitä aiheutuvan vasteen. Intensiiteetti piikki tallentuu detektorin tuottamaan kromatogrammiin retentioajan funktiona. [10, s. 544–545.]

2.3.2 Massaspektrometria

Kaasukromatografiin voidaan yhdistää monenlaisia detektoreja, joista herkimpiä ovat massaspektrometridetektorit. Yleisin yhdistelmätekniikka on kaasukromatografiin liitetty kvadrupolimassa-analysaattori, jolloin laitteistoa kutsutaan nimellä kaasukromatografi-massaspektrometri tai lyhyesti GC-MS. Laitteiston rakenne havainnollistetaan kuvassa 1.



Kuva 1. Kaasukromatografi-massaspektrometrin rakenne [14].

Massaspektrometria on herkkä määrittelytekniikka, jolla kyetään mittaamaan atomien, molekyylien ja pirstoutuneiden molekyylien massat. Kromatografian kolonnista saapuvat kaasumaiset molekyylit ionisoituvat massaspektrometrin ionilähteessä. Voimakkuudesta riippuen molekyylit fragmentoituvat ionisoinnissa. Kun GC-MS-laitteistoon asennetaan elektroni-ionisointiin perustuva ionilähde eli EI (engl. *electron ionization*), molekyylejä pommitetaan ionilähteen filamentilla voimakkaalla ionisointienergialla. [10, s. 502–504.] Liuotin, johon näyte on valmistettu, kuormittaa filamenttia, joten se kytketään päälle vasta liuotinmolekyylien ionisoiduttua [12, s. 123–124].

Elektroni-ionisoinnin seurauksena molekyylit usein hajoavat, jolloin kyseessä on kovaksi ionisoinniksi kutsuttu tekniikka. Pehmeistä tekniikoista kemiallinen ionisointi eli CI (engl. *chemical ionization*) soveltuu myös GC-MS-analysointiin: ionilähde sisältää reaktiivista kaasua, kuten metaania, joka luovuttaa analyylille protonin hajottamatta sen rakennetta [10, s. 505]. Massaspektrometriassa ionit erotellaan toisistaan massa-varaussuhteiden (engl. *mass-to-charge ratio*) perusteella. Erotteluun voidaan käyttää lentoaika- (TOFMS) tai kvadrupolimassa-analysaattoria (QMS), joista jälkimmäinen on yleisempi.

Kvadrupolimassa-analyssaattorissa ionit ohjataan massa-varaussuhteidensa perusteella detektoriin neljän metallisauvan vaihtojännitteen taajuutta ja jännitteiden potentiaaleja muuttamalla [10, s. 513–514; 15, s. 48]. Detektorin mitaamat intensiteetit jokaiselle massa-varaussuhteelle tallentuvat laitteiston tuottamaan viivaspektriin, jota kutsutaan massaspektriksi. Spektrin perusteella yhdiste voidaan tunnistaa. [13, s. 13–14.]

Kaasukromatografiin yhdistettyä kvadrupolimassa-analyssaattoria voidaan kutsua myös massaselektiiviseksi detektoriksi, koska massa-analyssaattoriin saapuvasta ionivirrasta voidaan halutessa analysoida vain massa-varaussuhteiltaan tietyt ionit. Tällöin käytössä on valittujen ionien seuranta eli SIM (engl. *selected ion monitoring*), joka on herkempi kuin detektoriin saapuvaa kokonaisionivirtaa mittaava scan-tekniikka [16].

2.3.3 Sisäisen standardin käyttö kaasukromatografiassa

Kaasukromatografisesti analysoitavien näytteiden koostumusta ei voi suoraan määrittää toistettavasti. Kaasukromatografiassa muutaman prosentin suuruinen muutos kolonnin virtausnopeudessa voi vääristää analyytin vastetta merkittävästi. Näytteisiin on lisättävä sisäiseksi standardiksi (ISTD) kutsuttua analyytin tavoin käyttäytyvää yhdistettä. [10, s. 109.] Kaasukromatografia-massaspektrometrian yhteydessä tavallisesti käytetään deuteroituja yhdisteitä sisäisinä standardeina; yhdisteiden vetyatomit on korvattu vedyn isotoopilla deuteriumilla, joten niiden käyttäytyminen kromatografisessa erottelussa ei eroa analyytistä. Deuteriumin takia ne ovat kuitenkin analyyttiä raskaampia ja tuottavat pirstoutuessaan analyytistä poikkeavan massaspektrin. [13, s. 37.]

Sisäistä standardia lisätään tietty määrä kaikkiin kalibrintiliuoksiin. Mittauksen jälkeen analyytin tuottaman piikin pinta-ala jaetaan sitä vastaavan sisäisen standardin piikin pinta-alalla. Analyytin ja sisäisen standardin välisen suhteen oletetaan olevan suoraan verrannollinen konsentraatioon, joten kalibrintokuvaajissa pitoisuuksien mittauspisteinä käytetään näitä suhdearvoja. [12, s. 21–22; 13, s. 38.]

2.4 Analyyttisen menetelmän validointi

Validoinnilla tarkoitetaan varmentamista ja tavanomaisesti luonnontieteiden yhteydessä analyttisellä menetelmällä tehtävän määrittämisen varmentamista. Validointi toteutetaan laboratorioissa käyttämällä vakiintuneita kokeita, joilla menetelmän ja siinä käytettävän laitteiston soveltuvuutta käyttötarkoituksiinsa voidaan arvioida.

2.4.1 Tarkkuus

Analyttisen menetelmän tarkkuudella tarkoitetaan menetelmällä tehtyjen mittausten paikkansapitävyyttä. Riittävän tarkkuuden saavuttaminen on minkä tahansa analyttisen määrityksen ensisijainen tavoite. Tarkkuuden arvioimisessa validoitavalla menetelmällä tehdään lukuisia rinnakkaisia mittauksia eri pitoisuuksilla ja pitkällä aikavälillä. Tuloksia voidaan lisäksi verrata luotettavaksi osoitetulla menetelmällä eli referenssimenetelmällä mitattuihin arvoihin. [17, s. 2–3.] Analyttisen menetelmän tarkkuus perustuu oletukseen, ettei mittaustulos ole koskaan täysin oikein satunnaisvaihtelusta johtuen, joten tarkkuutta arvioidaan mittaustulosten ja odotusarvojen poikkeamaa ja satunnaisvaihtelun suuruutta tarkastelemalla [18, s. 19].

2.4.2 Mittausepävarmuus

Analyttisen menetelmän mittausepävarmuus on kvantitatiivinen arvio vaihtelusta, jonka sisälle mittaustuloksen oletetaan tietyllä todennäköisyydellä sijoittuvan. Epävarmuuden laskemisessa pyritään huomioimaan kaikki mittaustulosta vääristävät systemaattiset ja satunnaiset virheet. [17, s. 10.] Analyttisessä kemiassa lopulliseen mittaustulokseen liitettävä mittausepävarmuus ilmoitetaan yleisesti laajennettuna epävarmuutena, joka lasketaan kertomalla yhdistetty mittausepävarmuus peittävyyskertoimella k . Laajennettu epävarmuus peittävyyskertoimella $k=2$ vastaa 95 prosentin luottamusväliä. [19, s. 19.]

3 Laitteisto ja reagenssit

Validoinnissa käytetyt laitteet, mukaan lukien analyysilaitteisto, ovat taulukossa 2.

Taulukko 2. PAH-analyysimenetelmissä käytetty välineistö.

Väline	Valmistaja	Malli
Analyysivaaka	Sartorius	ED124S
Kaasukromatografi	Agilent	6890N
Kolonni		HP-5ms 19091S-433 30,0 m x 0,25 mm x 0,50 μ m
Massaspektrometri		5975B VL MSD
Näytteenotto		7683B
Sentrifugi		Eppendorf
Tasoravistelijä	Thermo Scientific	SHKA2000-1CE

Validoinnissa esikäsittelyissä ja kalibroinneissa käytetyt reagenssit ovat taulukossa 3.

Taulukko 3. PAH-analyysimenetelmissä käytettyjen reagenssien tiedot.

Triviaalinimi	Toimittaja	CAS-nro	Laatu	Varoitukset
Iso-oktaani	Merck Millipore Tuote: 1.15440	540-84-1	SupraSolv	
(EPA 16) PAH-standardisekoitus	Dr. Ehrenstorfer Tuote: PAH-Mix 63 YA06100300TO	-	>99 %	
Deuteroitu PAH-standardisekoitus	Dr. Ehrenstorfer Tuote: PAH-Mix 33 YA08273300TO	-	>99 %	
Petrolieetteri	VWR Chemicals Tuote: 83663	64742-49-0	Pestinorm	
Tolueeni	Merck Millipore Tuote: 1.08325	108-88-3	Emsure	
Ultrapuhdas vesi	Merck Millipore Tuote: 1.15333	7732-18-5	LiChrosolv	

4 Työn toteutus

4.1 Analyysilaitteiston asennus ja ajo-ohjelmien luominen

Validointi tehtiin kaasukromatografi-massaspektrometrillä, joka oli ollut käyttämättömänä useita vuosia ennen asennusta. GC-MS-laitteiston osat ovat taulukossa 2. Kokoamisen jälkeen sille tehtiin yleiset huoltotoimenpiteet:

- esikolonniin kiinnittäminen uuteen käyttämättömään analyttiseen kolonniin ja molempien asentaminen kaasukromatografian uuniin
- massaspektrometrin ionilähteen puhdistus
- kaasukromatografian näytteensyöttäjän lasisen linerin ja kumisen septumin korvaaminen uusilla, ja linerin huuhteleminen metanolilla
- heliumkaasulinjan kytkeminen kaasukromatografiin
- öljyn vaihtaminen massaspektrometrin esivakuumpumppuun.

Lopuksi GC-MS liitettiin tietokoneeseen, joka palautettiin tehdasasetuksiin, jotta siihen voitiin asentaa kokonaisuudessaan Agilentin ChemStation -hallinnointiohjelma (Revision E02.02 SP2).

GC-MS-laitteiston toimintakykyä arvioitiin analysoimalla aluksi puhtaita liuotinnäytteitä. Niiden jälkeen mitattiin EPA-PAH 16 -standardinäyte, jonka pitoisuudet analyyteille olivat 10 µg/ml. Kromatogrammin piikit ilmenivät poikkeavin retentioajoin, mutta ohjelmiston sisäistä kirjastotunnistusta hyödyntäen kaikki EPA-PAH 16 -yhdistettä voitiin tunnistaa. GC-MS osoitettiin toimivaksi, joten siihen ohjelmoitiin kaksi ajometodia validointia varten.

Validoinnin PAH-referenssimenetelmäksi valittu ISO 18287:2006 määräsi käyttämään pidempää mittausaikaa, joten erillinen ajo-ohjelma oli luotava. Ajo-ohjelmat erosivat myös siten, että standardinmukaisessa menettelyssä näytteensyötössä oli 1,8 minuutin pituinen viive, joka päätettiin toteuttaa paineistetun jakamattoman näytteensyötön (engl. *pulsed splitless injection*) avulla. Menettelyllä voidaan tehostaa analyyttien signaalia näytteissä, joissa näytematriisi aiheuttaa taustakohinaa. Häiriötä alentavan vaikutuksen uskotaan johtuvan siitä, että analyytit viipyvät lyhyemmän aikaa tuloaukon kammiossa ja etenevät kohotetun paineen vaikutuksesta nopeammin kolonniin [20, s. 395].

Taulukossa 4 ovat standardin ISO 18287 ohjeistusta mukailevat ajo-ohjelmparametrit.

Taulukko 4. Referenssimenetelmän GC-MS-parametrit.

Kaasukromatografi	
Injector Temperature	260 °C
Injection Mode	Pulsed Splitless, split closed 1,8 min
Injection Volume	1 µl
Oven Temperature Program	60 °C, 2 min 30 °C /min → 120 °C 5 °C/min → 300 °C, 5 min
Carrier Gas Flow	Helium 1 ml/min
Massaspektrometri	
MS Mode	Scan
Transfer Line Temperature	295 °C
MS Temperature	150 °C
Filament On	6,0 min
Scan Range	50–300 m/z
Scan Frequency	50 Hz

Taulukossa 5 ovat yrityksen oman PAH-analysointimenetelmän ajo-ohjelmparametrit.

Taulukko 5. Validoitavan analyysimenetelmän GC-MS-parametrit.

Kaasukromatografi	
Injector Temperature	260 °C
Injection Mode	Splitless
Injection Volume	1 µl
Oven Temperature Program	80 °C, 2 min 10 °C /min → 265 °C 5 °C/min → 290 °C 20 °C/min → 320 °C, 5 min
Carrier Gas Flow	Helium 1 ml/min
Massaspektrometri	
MS Mode	Scan
Transfer Line Temperature	295 °C
MS Temperature	150 °C
Filament On	5,0 min
Scan Range	50–300 m/z
Scan Frequency	50 Hz

4.2 Analyyttien tunnistus ja kvantitointi

PAH-analyyttien tavallinen eluutiojärjestys ilmoitettiin standardissa ISO 18287. Tämän varmentamiseksi yhdisteet tunnistettiin uniikkien massaspektriensä perusteella käyttäen Wiley 9th Edition/NIST 2008 -massaspektrikirjastoa. Tunnistuksien perusteella analyytit kulkeutuivat kolonnin läpi standardin kuvaamassa järjestyksessä. Analyyttien ja sisäisten standardien erottuvuutta kromatogrammeissa tehostettiin valitsemalla näkyviin vain oleelliset molekyyli­massat (taulukko 6), jolloin kromatogrammia kutsutaan ionierotelluksi (EIC).

PAH-analyyttien kvantitatiivinen määrittäminen tehtiin ulkoisella kalibroinnilla ja laskemalla kunkin PAH-analyytin suhde sisäiseen standardiin. Ulkoista kalibrointia varten kaksi eri PAH-standardisarjaa valmistettiin, jotta niiden liuotinsoveltuvuutta voitiin arvioida: toinen tolueenissa ja toinen petroleetterissä. Hyödyntäen ISO 18287:n suosituksia kaikille PAH-analyyteille määritettiin sopiva deuteroitu sisäinen standardi, joista suhde laskettiin. ISTD:n täytyi muistuttaa ominaisuuksiltaan mahdollisimman paljon analyyttiä. Natiivit analyytit ja niitä vastanneet deuteroidut yhdisteet ovat taulukossa 6.

Taulukko 6. Natiivit EPA-PAH 16 -analyytit, niitä vastanneet deuteroidut PAH-standardit sekä yhdisteiden molekyyli­massat.

Natiivi PAH	Molekyyli­massa (u)	Deuteroitu PAH	Molekyyli­massa (u)
Naftaleeni	128	Naftaleeni-d ₈	136
Asenaftyleeni	152	Asenafteeni-d ₁₀	164
Asenafteeni	154		
Fluoreeni	166		
Fenantreeni	178	Fenantreeni-d ₁₀	188
Antraseeni			
Fluoranteeni			
Pyreeni	202		
Bentso[a]antraseeni	228	Kryseeni-d ₁₂	240
Kryseeni			
Bentso[b]fluoranteeni	252	Peryleeni-d ₁₂	264
Bentso[k]fluoranteeni			
Bentso[a]pyreeni			
Indeno[1,2,3-cd]pyreeni	276		
Dibentso[ah]antraseeni	278		
Bentso[ghi]peryleeni	276		

4.3 Validoinnin suunnittelu

Validoinnin kohteena oli Ositum Oy:ssä kehitetty tolueeni­uuttomenetelmä. Ensisijaisesti validoinnissa arvioitiin menetelmän soveltuvuutta maaperän, kivihiilpien ja kivihiilitervan kaltaisten näytteiden analysoimiseen. Menetelmän mahdollisia rajoituksia näytteiden suhteen haluttiin myös tarkastella, joten määri­tyksiä tehtiin interferenssiä aiheuttavasta bitumista: sen tiedetään vaikeuttavan siinä esiintyvien PAH-yhdisteiden määrittystä [8, s. 5; 21, s. 1–2], joten sitä voitiin käyttää analysointimenetelmän yleisen sovellettavuuden selvittämiseen. Vertailu- eli referenssimenetelmäksi valittiin standardi ISO 18287.

Menetelmien soveltuvuutta päätettiin testata kahdesta näytematriisista. Tavanomaisia näytteitä edusti Fontainebleau-hiekka (VWR: tuote 27460.295), joka oli standardin ISO 18287 laadunvarmistusta käsittelevän ohjeistuksen mukainen. Interferenssiä aiheuttava näytteitä edusti kaupallinen bitumikate. Määri­tysten täsmällisyyden testaus toteutettiin oikeilla asiakasnäytteillä, eli kenttänäy­teillä, joiden koostumukset vaihtelivat. Tolueenia ja petroleetteriä kalibrointinäytteiden liuottimina verrattiin keskenään.

4.4 Liuosten valmistus

Sisäiset standardit valmistettiin kahteen liuottimeen, tolueeniin ja petrolieetteriin. Niissä käytettiin taulukkoon 3 merkittyä sekoitusta, joka sisälsi pitoisuuksiltaan 2000 µg/ml viisi eri deuteroitua polysyklisiä aromaattista hiilivetyä. Tämä kantaliuos laimennettiin ensin petrolieetterillä tai tolueenilla pitoisuuteen 1000 µg/ml, jotta käyttöliuoksen laimennuskerroin pysyisi alhaisena. Käyttöliuokset valmistettiin kaavan 1 mukaisesti:

$$V_{ISTD} = \frac{10 \text{ ppm} \times 50 \text{ ml}}{1000 \text{ ppm}} = 0,25 \text{ ml}, \quad (1)$$

missä

V_{ISTD} on ISTD-sekoituksen tilavuus yksikössä ml

10 ppm eli µg/ml on tavoitekonsentraatio

50 ml on tavoitetilavuus

1000 ppm eli µg/ml on lähtötilavuus.

Kalibrintiliuokset valmistettiin sisäisten standardien tavoin eri liuottimiin, eli tolueeniin ja petrolieetteriin. Liuokset pipetoitiin suoraan GC-lasipulloihin, joiden kokonaistilavuus oli 1,5 ml. Esimerkki yhden standardiliuoksen valmistamisesta on esitetty kaavassa 2:

$$V_{STD} = \frac{1,0 \text{ ppm} \times 1,5 \text{ ml}}{10 \text{ ppm}} = 0,15 \text{ ml}, \quad (2)$$

missä

V_{STD} on standardisekoituksen tilavuus yksikössä ml

1,0 ppm eli µg/ml on tavoitekonsentraatio

1,5 ml on tavoitetilavuus

10 ppm eli µg/ml on lähtötilavuus.

Kaikkiin kalibrintiliuoksiin lisättiin 150 µl sisäistä standardia, jonka pitoisuus oli 10 µg/ml. ISTD:n pitoisuus kaikissa liuoksissa oli 1,0 µg/ml. Epätarkkuuden estämiseksi liuoksia ei täytetty merkkiin, vaan liuottimet ja reagenssit lisättiin aina automaattipipetillä. Liuottimen tilavuus laskettiin kaavalla 3:

$$V_{\text{liuotin}} = 1500 \mu\text{l} - V_{\text{STD}} - 150 \mu\text{l}, \quad (3)$$

missä

1500 μl on liuoksen kokonaistilavuus

V_{STD} on standardisekoituksen tilavuus yksikössä μl

0,150 ml on sisäisen standardin osuus.

4.5 Standardinmukaisen referenssimenetelmän vaiheet

Standardissa ISO 18287 kuvattiin kaksi eri näyte-esikäsitelymenetelmää A ja B, joista ensimmäistä käytettiin referenssimenetelmänä. Käytännöllisyyteen vedoten näyte-esikäsitely tehtiin kymmenkertaisesti standardia pienemmässä mittakaavassa. Standardia mukailut esikäsitelyprotokolla oli seuraava:

- näyte jauhettiin, leikattiin ja punnittiin siten, että näyte oli liukenevassa muodossa ja painoi noin gramman
- näytteeseen lisättiin 1 ml sisäistä standardia, pitoisuuksiltaan 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ja 5 ml puhdasta asetonia
- näyte-asetoni-seosta sekoitettiin tunnin ajan tasosekoittimessa ~200 rpm teholla
- seokseen lisättiin 10 ml petrolieetteriä, seosta ravisteltiin, ja asettumisen jälkeen siihen lisättiin 40 ml ultrapuhdasta vettä
- veden lisäyksen myötä petrolieetteri muodosti poolittoman faasin ja asetoni siirtyi veden pooliseen faasiin, joten petrolieetteriuute voitiin siirtää pinnalta mittalasiin faasien erottamisen tehostamiseksi
- jos näytteelle tehtiin yrityksen oman menettelyn mukainen typpikuivauskonsentroidi, uute pipetoitiin koeputkeen, jossa siihen kohdistettiin kevyt kaasuvirtaus
- uutteeeseen lisättiin jauhemaista natriumsulfaattia kuivausaineeksi ja pieni määrä iso-oktaania säilöntäaineeksi
- näyte, jolle tehtiin typpikuivaus, siirrettiin 2 ml mittapulloon, ja se täytettiin merkkiin pitoisuuden täsmentämiseksi
- asettumisen jälkeen uutetta pipetoitiin eppendorf-putkeen, ja näyte sentrifugoitettiin teholla 11 300 rpm viiden minuutin ajan
- sentrifugoidun näytteen supernatantti pipetoitiin GC-lasipulloon ja säilöttiin GC-MS-analysointiin asti.

4.6 Tolueenuuttomenetelmän vaiheet ja menetelmänkehitys

Yrityksessä käyttöön otettu näyte-esikäsitely perustui PAH-yhdisteiden tolueenuuttoon petrolieetterin sijaan. Siinä ei muodostettu standardissa ISO 18287 kuvattua poolista faasia, jonka avulla ei-haluttujen yhdisteiden päätymistä uutteeseen voidaan vähentää.

Esikäsitelyprotokolla oli seuraava:

- näyte jauhettiin, leikattiin ja punnittiin siten, että näyte oli liukenevassa muodossa ja painoi noin gramman
- näytteeseen lisättiin 1 ml sisäistä standardia, pitoisuuksiltaan 10 µg/ml, ja 9 ml puhdasta tolueenia
- näyte-tolueeni-seosta sekoitettiin tunnin ajan tasosekoittimessa ~200 rpm teholla
- asettumisen jälkeen uutetta pipetoitiin eppendorf-putkeen, ja näyte sentrifugoitiin teholla 11 300 rpm viiden minuutin ajan
- sentrifugoidun näytteen supernatantti pipetoitiin GC-lasipulloon ja säilöttiin GC-MS-analysointiin asti.

Tolueenin liuotusteho huomioitiin validoinnissa: se liuotti petrolieetteriä tehokkaammin näytteen ei-haluttuja yhdisteitä, joten matriisivaikutuksen ennakoitiin olevan merkittävin analyttistä tarkkuutta vaarantava tekijä. Matriisivaikutuksen alentamisen mahdollisuus oli tästä syystä oleellisin menetelmänkehityksen väylä. Tämä toteutettiin käytännössä testaamalla tolueenuuttomenetelmää, jossa näytteessä esiintyviä häiritseviä yhdisteitä pyrittiin standardin ISO 18287 tavoin liuottamaan erilliseen pooliseen faasiin.

4.7 Esikäsitelykapasiteetit

Tolueenuuttoon perustunut esikäsitely oli arviolta kolme kertaa referenssimenetelmää nopeampi. Käytetty lasitavara oli myös huomattavasti helpompi puhdistaa, sillä tolueeni tehokkaampana liuottimena ehkäisi likaavien näytteiden pinttymistä pulloihin. Arvioitu standardinmukaisen esikäsitelykapasiteetti konsentroiduille näytteille oli 5–6 näytettä kolmessa tunnissa. Kapasiteettia voitiin kohottaa ohittamalla aikaa vievä konsentroidointi. Suoraviivaisuutensa ansiosta tolueenimenetelmällä oli mahdollista esikäsitellä useita kymmeniä näytteitä vastaavassa ajassa.

5 Tulokset

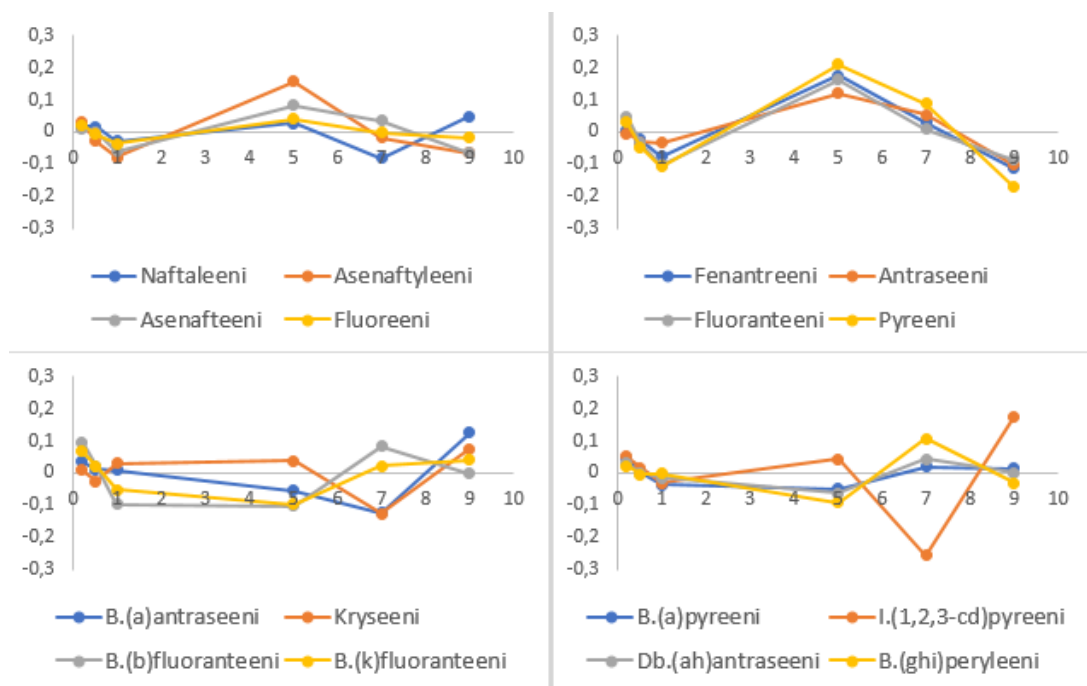
5.1 Standardiliuoksiin valittu liuotin

Tolueenin ja petroleetterin soveltuvuus standardiliuosten liuottimeksi tarkastettiin; niillä valmistettujen kalibrointikuvaajien korrelaatiota ja kolmen rinnakkaisen näytteensyötön keskihajontaa verrattiin keskenään. Tolueenin todettiin olevan kalibrointiin soveltuvampi liuotin, sillä näytteensyöttövirheen todennäköisyys oli alhaisempi ja kuvaajien korrelaatio oli parempi. Tulokset ovat taulukoissa liitteessä 1. Tolueeniin liuotettuja standardiliuoksia käytettiin tulosten laskemiseen.

5.2 Lineaarisuus, spesifisyys ja selektiivisyys

5.2.1 Mittausalueen lineaarisuus

Mittausalue molempien analyysimenetelmien osalta oli väliltä 0,2–9 µg/ml, joka mukaili standardia ISO 18287. Kalibrointisuorat piirrettiin kuudesta mittausalueelle sijoittuvasta pitoisuudesta kaikille analyyteille, ja kuvaajien lineaarisuutta tarkasteltiin tekemällä niille regressioanalyysit Microsoft Excelillä. Residuaalikuvaajat ovat kuvassa 2.

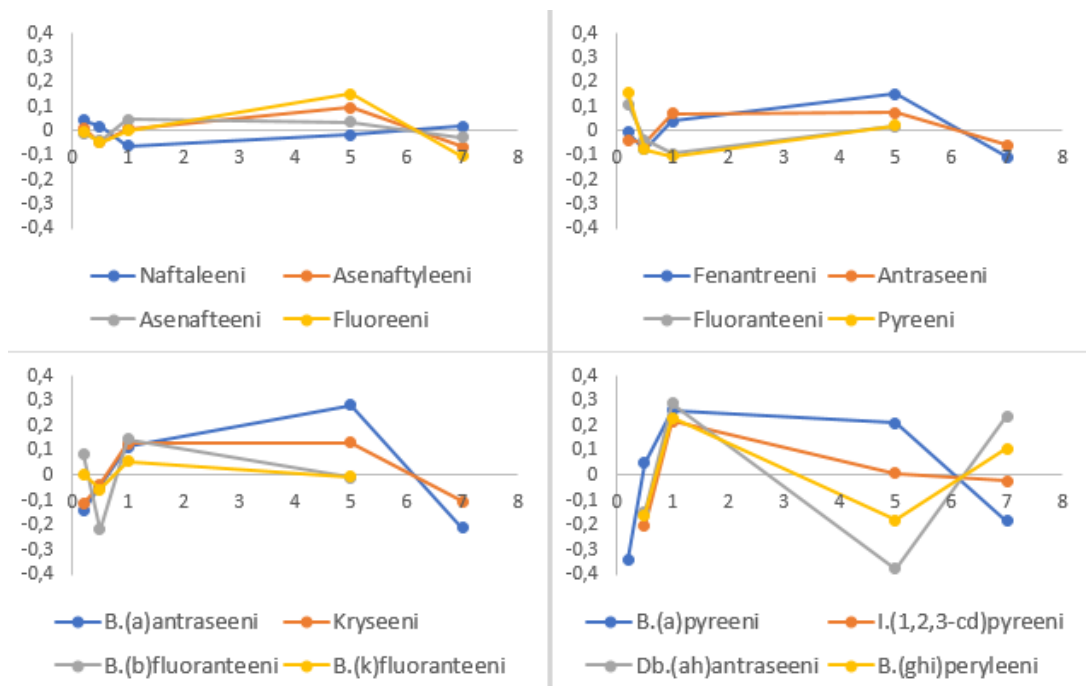


Kuva 2. PAH-analyyttien kalibrointikuvaajista tehdyt residuaalikuvaajat, joissa ovat yksittäisten pitoisuuksien poikkeamat yksikössä µg/ml (y-akseli) oletetuista pitoisuuksista mittausalueella 0,2–9 µg/ml (x-akseli).

Residuaalikuvaajilla arvioidaan kalibrointiliuoksista mitattujen pitoisuuksien asettumista kalibrointikuvaajalle. Mittausalueen lineaarisuutta pidetään hyvänä, kun mittauspisteet asettuvat residuaalikuvaajassa tasaisesti nollan ylä- ja alapuolelle. [17, s. 17.]

Useimpien kalibrointikuvaajien pitoisuusresiduaalit olivat jakautuneet tasaisesti nollan molemmiin puolin. Kuvaajissa ei myöskään ilmennyt trendejä, eli nousu- tai laskujohteisia linjautumisia. Kaikkien kalibrointikuvaajien korrelaatiokertoimet R^2 ylittivät arvon 0,998. Näiden havaintojen perusteella analyyttien pitoisuusvasteet käyttäytyivät lineaarisesti tarkastetulla mittausalueella.

Regressioanalyysit tehtiin bitumiin lisätyistä standardinlisäyskuvaajista. Residuaaleista mallinnetut kuvaajat ovat kuvassa 3.



Kuva 3. PAH-analyyttien bitumimatriisiin lisätyistä standardinlisäyskuvaajista piirretyt residuaalikuvaajat, joissa ovat yksittäisten pitoisuuksien poikkeamat yksikössä $\mu\text{g/ml}$ (y-akseli) oletetuista pitoisuuksista mittausalueella 0,2–9 $\mu\text{g/ml}$ (x-akseli).

Residuaalien hajonnassa kalibrointi- ja standardinlisäyskuvaajissa ei ollut suurta eroa haihtuvilla ja keskihaihtuvilla PAH-yhdisteillä. Standardinlisäyskuvaajissa suurikokoisten analyyttien jäännöshajonta oli suurta verrattuna kalibrointikuvaajiin. Kuvaajakorrelaatiot pysyivät useimmilla yhdisteillä hyvälaatuisina. Residuaalikuvaajissa ei ilmennyt trendejä, eli standardinlisäyskuvaajat olivat kalibrointikuvaajien tavoin lineaarisia.

5.2.2 Spesifisyys

Spesifisyys merkitsee menetelmän soveltuvuutta yksittäisen yhdisteen määrittämiseen [18, s. 15]. PAH-yhdisteiden spesifisyyttä tarkasteltiin vertaamalla kalibrointikuvaajien kulmakertoimia standardinlisäyssiin kulmakertoimiin. Näin voitiin arvioida analyttien määrittämisestä häiritsevien tekijöiden merkittävyyttä. Tavoite-eron maksimiarvoksi asetettiin 10 %. Kulmakertoimet ja niiden väliset erot on listattu taulukkoon 7. Liitteen 1 taulukoissa ovat yksityiskohtaisemmat tiedot kalibroinneista, eli piikkien pinta-alat eri pitoisuuksissa ja kuvaajien korrelaatiokertoimet sekä kulmakertoimet.

Taulukko 7. EPA-PAH 16 -yhdisteiden kalibrointi- ja standardinlisäyskuvaajien kulmakerrontien prosentuaaliset erot tolueeniutto- ja referenssimenetelmällä. Raja-arvon 10 % ylittävät arvot on korostettu tummanharmaalla.

Yhdiste	Tolueeniuttomenetelmä		Referenssimenetelmä	
	Kulmakerroin- ero hiekassa	Kulmakerroin- ero bitumissa	Kulmakerroin- ero hiekassa	Kulmakerroin- ero bitumissa
Naftaleeni	2,4 %	1,4 %	62,6 %	12,4 %
Asenaftyleeni	1,9 %	6,3 %	19,6 %	18,5 %
Asenafteeni	0,7 %	5,3 %	11,5 %	16,5 %
Fluoreeni	0,2 %	0,5 %	3,9 %	14,7 %
Fenantreeni	1,9 %	0,6 %	7,8 %	12,8 %
Antraseeni	6,5 %	11,2 %	6,7 %	25,0 %
Fluoranteeni	0,6 %	33,9 %	4,1 %	12,9 %
Pyreeni	2,5 %	40,8 %	5,9 %	12,7 %
Bentso[a]antraseeni	1,1 %	1,3 %	2,8 %	12,0 %
Kryseeni	5,4 %	8,7 %	2,1 %	21,7 %
Bentso[b]fluoranteeni	2,2 %	18,2 %	10,1 %	21,2 %
Bentso[k]fluoranteeni	1,4 %	4,8 %	6,9 %	30,3 %
Bentso[a]pyreeni	5,7 %	45,0 %	9,8 %	25,0 %
Indeno[1,2,3-cd]pyreeni	2,5 %	89,9 %	2,7 %	68,3 %
Dibentso[ah]antraseeni	5,2 %	57,5 %	3,0 %	45,0 %
Bentso[ghi]peryleeni	4,1 %	64,8 %	2,8 %	54,2 %

Standardinlisäyskuvaajien korrelaatio ei yleisesti heikentynyt matriisivaikutuksesta. Useimpien kuvaajien korrelaatiokertoimet olivat tolueeniuttomenetelmässä >0,998, mutta suurikokoisimmilla analyteilla ne laskivat bitumimatriisissa. Korrelaatiokertoimet referenssimenetelmässä olivat yleisesti tasoa >0,995 kaikilla analyteilla.

Bitumi tutkitusti vaikeuttaa siinä esiintyvien PAH-yhdisteiden määrittystä, koska bitumin monipuolinen koostumus sisältää lukuisia alifaattisia ja aromaattisia hiilivetyjä [8, s. 5; 21, s. 1–2]. Havaittiin, että näiden interferenssiä aiheuttavien komponenttien vaikutus analyyttien vasteisiin oli suuri, mutta yksinkertaisista hiekan edustamista matriiseista ei aiheutunut interferenssiä.

Bitumiin lisättyjen näytteiden standardinlisäyskuvaajat erosivat eniten painavimpien PAH-yhdisteiden osalta kalibrintokuvaajista. Referenssimenetelmässä haihtuvimpien analyyttien kuvaajat erosivat toisistaan merkittävästi, mutta tätä ei tapahtunut tolueeni-uuttomenetelmässä. Ero saattoi johtua hiekanäytteiden tyyppikuivauskonsentroinnista, jonka aikana pienikokoisimpia PAH-yhdisteitä väistämättömästi haihtui pois. Vaihetta ei tehty bitumiin lisätyissä standardinlisäysliuoksissa.

5.2.3 Selektiivisyys

Kromatografisen erottelun piirissä selektiivisyydellä tarkoitetaan analyyttien erottuvuutta toisistaan ja muista yhdisteistä [18, s. 15]. Validoinnin aikana tarkkailtiin, että analyyttien piikit erottuivat kromatogrammeissa selkeästi kaikista muista piikeistä. Lisäksi piikkien päällekkäisyyttä valvottiin nollanäytteillä: jos näytematriisi sisälsi analyyttien retentio-ajoilla ilmeneviä yhdisteitä, niistä aiheutuneen piikin pinta-ala vähennettiin analyyttipiikin pinta-alasta. Tällaista menettelyä noudatettiin esimerkiksi bitumikatteeseen lisättyjen näytteiden tapauksessa, sillä matriisissa itsessään esiintyi eräitä PAH-yhdisteitä.

Validoinnissa kahden menetelmän selektiivisyyttä verrattiin piikkien resoluution nojalla. Piikkien väliset resoluutiot laskettiin kaavalla 4:

$$R = \frac{2(t_{R1} - t_{R2})}{w_{b1} + w_{b2}}, \quad (4)$$

missä

R on piikkien resoluutio

t_{R1} on yhdisteen 1 retentioaika (min)

t_{R2} on yhdisteen 2 retentioaika (min)

w_{b1} on yhdisteen 1 piikin leveys pohjaviivalla

w_{b2} on yhdisteen 2 piikin leveys pohjaviivalla.

Resoluutiolaskut tehtiin vain yhdisteille, jotka olivat molekyyli­massoiltaan yhtä suuret, ja ilmenivät tästä syystä samoissa EIC-kromatogrammeissa. Resoluutiot laskettiin kromatogrammeista, joissa PAH-pitoisuudet olivat 5,0 µg/ml. Tulokset ovat taulukossa 8.

Taulukko 8. Samoissa ionierotelluissa kromatogrammeissa (EIC) esiintyvät PAH-analyytit ja piikkien väliset resoluutiot. Kalibrointi- ja tolueeni­uuttonäytteet analysoitiin samalla GC-lämpötilaohjelmalla. Referenssimenetelmä analysoitiin standardin­mukaisella lämpötilaohjelmalla, joka oli edellä mainittuja pidempi.

Yhdiste	Molekyyli­massa (u)	Resoluutio R		
		Kalibrointi-kuvaaja (5,0 µg/ml)	Bitumi, tolueeni­uutto (5,0 µg/ml)	Bitumi, referenssi (5,0 µg/ml)
Fenantreeni	178	1,5	1,4	1,6
Antraseeni				
Fluoranteeni	202	5,7	5,7	7,9
Pyreeni				
Bentso[a]antraseeni	228	1,6	1,6	1,4
Kryseeni				
Bentso[b]fluoranteeni	252	1,0	1,0	1,3
Bentso[k]fluoranteeni				
Bentso[k]fluoranteeni	252	10,2	10,2	12,1
Bentso[a]pyreeni				
Indeno[1,2,3-cd]pyreeni	276	3,7	3,7	7,0
Bentso[ghi]peryleeni				

GC-MS-analyseissä kromatogrammien resoluutiotavoitteeksi yleisesti asetetaan arvo väliltä 1,2–1,5. Resoluutiolla 1,5 ja sen ylittävillä arvoilla piikit erottuvat toisistaan pohjaviivaan asti. Taulukon 8 tulosten perusteella voitiin todeta, että bentso(b)fluoranteenin ja bentso(k)fluoranteenin piikkien välinen resoluutio tolueeni­uuttomenetelmässä oli huono, mutta resoluutiot muiden analyyttien osalta olivat hyvänlaatu­isia.

Referenssimenetelmässä – jossa lämpötilaohjelman pituus oli 55 minuuttia kalibrointi- ja tolueeni­uuttoliuosten 28 minuutin sijaan – analyyttipiikkien resoluutiot olivat korkeampia etenkin suurikokoisimmilla yhdisteillä. Pidempi lämpötilaohjelma vaikutti positiivisesti piikkien erottumiseen.

5.3 Oikeellisuus

5.3.1 Saantokokeet

Analyttisen menetelmän tarkkuutta voidaan arvioida saantokokeilla. Saantoprosentiksi kutsuttu tuloksen tavoite on mahdollisimman lähellä 100 prosenttia, ja saannolle voidaan asettaa tavoiteväli, kuten 95–105 prosenttia. Myös suurempi vaihtelu sallitaan. [17, s. 3; 18, s. 59.] Kaikki saantokokeiden tulokset, keskihajonnat ja suhteelliset keskihajonnat ovat liitteen 2 taulukoissa. Validoinnissa saantoprosentin tavoiteväliksi asetettiin 85–110 prosenttia, joten liitteessä 2 olevien saantokoetulosten keskiarvot korostettiin vaaleanharmaalla arvon 84,9 % alittuessa ja tummanharmaalla arvon 110,0 % ylittyessä.

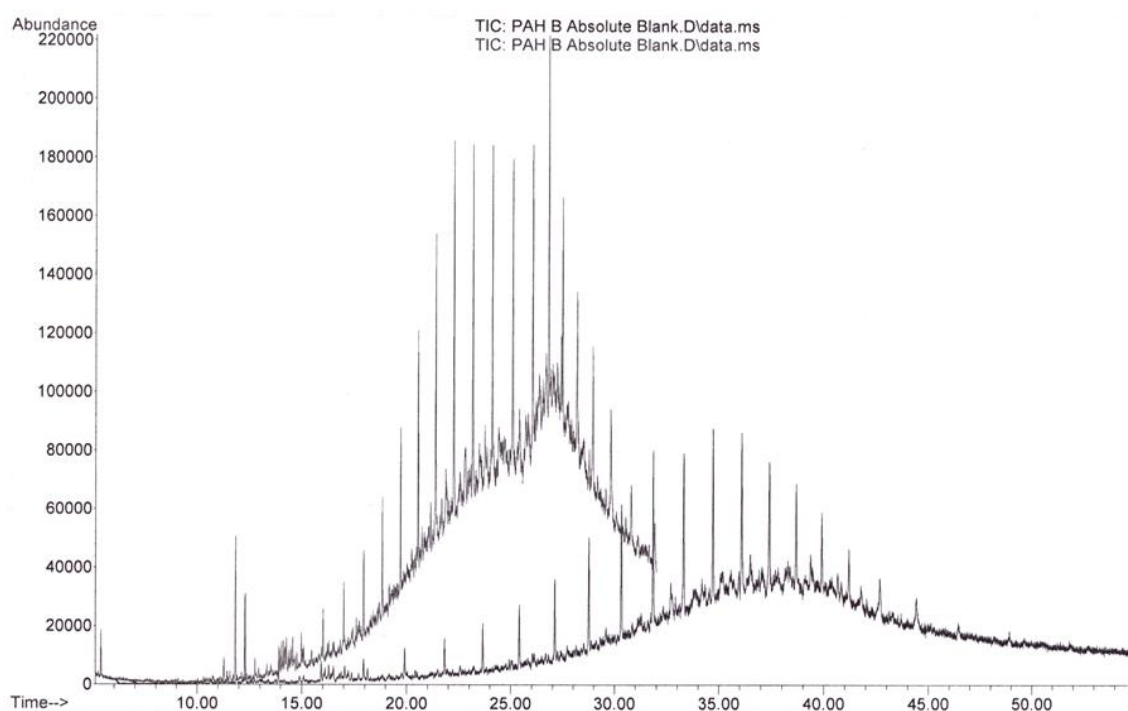
Tolueeniuttomenetelmällä saatujen saantokoetulosten keskiarvot ja hajonnat laskettiin 12 rinnakkaisnäytteestä. Referenssimenetelmän keskiarvot laskettiin 12 rinnakkaisesta hiekkasaantokokeesta ja 6 rinnakkaisesta bitumisaantokokeesta. Tarkkuutta arviointiin kahdella konsentraatitasolla, jotka olivat mitta-alueen pienin pitoisuus 0,2 µg/ml ja puoliväliin sijoittunut pitoisuus 5,0 µg/ml. Lisäksi referenssimenetelmässä ohjeistetun konsentrintimenettelyn vaikutusta tuloksiin selvitettiin tekemällä hiekkasaantokokeille tyypikuivauskonsentrinti. Tämän takia hiekkasaantokokeiden pitoisuudet 0,5 ja 7,5 µg/ml poikkesivat muista saantokokeista.

Bitumimatriisin aiheuttama matriisivaikutus, verrattuna vähemmän kohinaa aiheuttavaan hiekkään, oli huomattava. Hiekkamatriisiin lisättyjen analyttien saantoprosentit eivät poikenneet ihanteelliselta 85–110 prosentin väliltä, mutta bitumimatriisissa analyttien saantokoetulokset mitta-alueen pienimmillä pitoisuuksilla olivat epätavallisen suuria. Joidenkin analyttien antamat vasteet olivat odotusarvoon verrattuna jopa nelinkertaisia. Ilmiötä esiintyi molemmilla vertailtavilla menetelmillä, joten bitumimatriisista aiheutuneen kohinan havaittiin tehostavan analyttien vasteita. Voimistuminen rajoittui vain pieniin pitoisuuksiin, eli sitä ei tapahtunut pitoisuuksilla 5,0 ja 7,5 µg/ml.

Suhteelliset keskihajonnat (RSD) pysyivät kummankin menetelmän rinnakkaisnäytteissä enimmäkseen alle 10 prosentissa. Eniten hajontaa ilmeni painavimpien PAH-yhdisteiden rinnakkaisnäytteissä. Bitumikatematriisiin lisättyjen rinnakkaisnäytteiden väliset hajonnat olivat suurempia hiekkamatriisiin verrattuna.

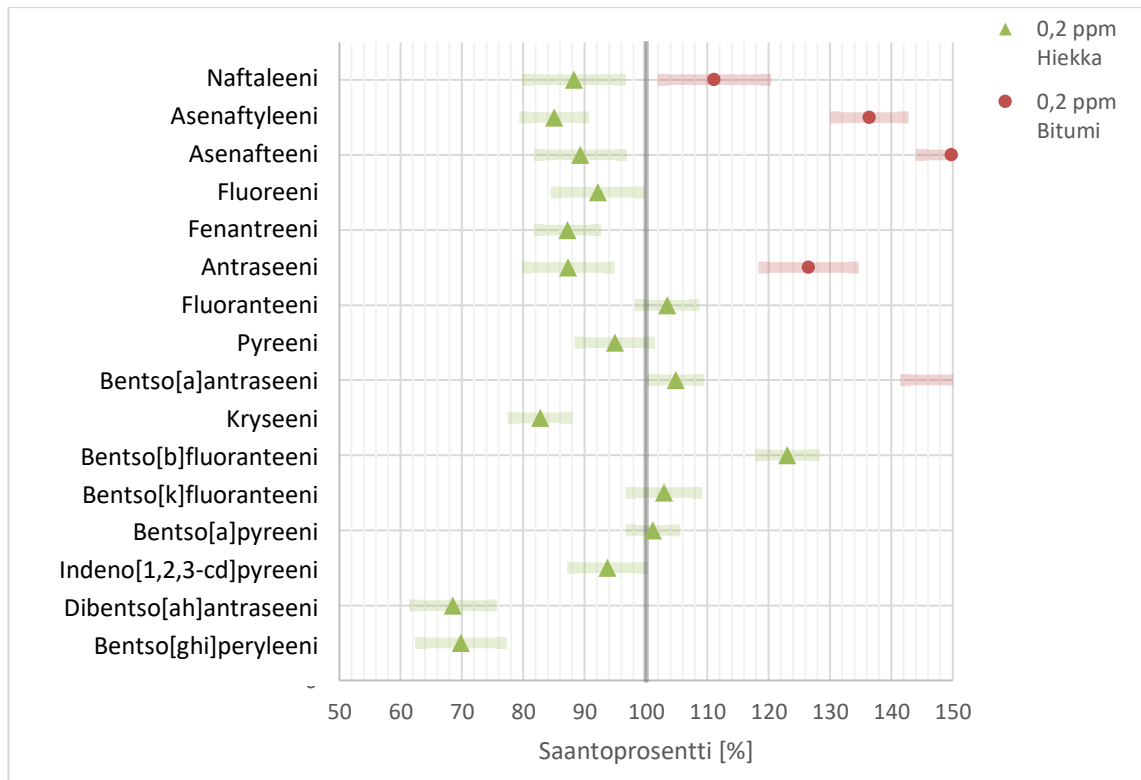
Molempien analyysimenetelmien tuloksia voitiin tulkita siten, että bitumikatteen vaikutus suurikokoisimpien PAH-yhdisteiden saantoprosentteihin oli suppressoiva. Tämä saattoi olla seurausta bitumin aiheuttamasta taustakohinasta, joka oli voimakkaimmillaan suurikokoisimpien PAH-yhdisteiden piikkien kohdalla. PAH-analyytit kulkeutuvat kolonnin läpi suuruusjärjestyksessä molekyylipainonsa perusteella, eli painavimpien PAH-analyyttien piikit olivat retentioajoiltaan myöhäisimpiä.

Kuvassa 4 ovat tavanomaiset bituminäytteiden kromatogrammit niin tolueenuutto- kuin referenssimenetelmällä mitattuina. Niissä matriisivaikutuksen aiheuttama taustakohina on selkeästi nähtävissä.

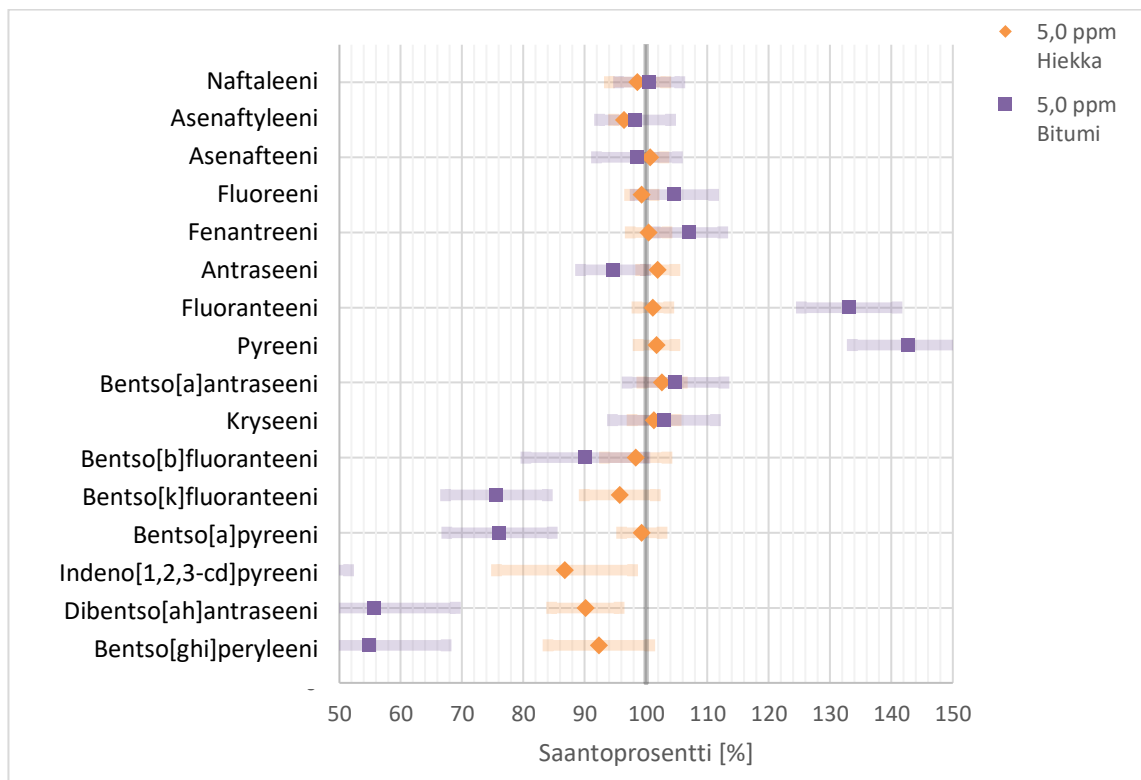


Kuva 4. Tolueenuuttomenetelmällä (lyhyempi mittausaika) ja referenssimenetelmällä (pidempi mittausaika) analysoidujen bituminäytteiden TIC-kromatogrammit, joiden loppupäissä esiintyy voimakasta taustakohinaa. Näytteisiin ei ole lisätty natiiveja tai deuteroituja PAH-yhdisteitä. Tasaisin retentioajoin ilmenevät piikit aiheutuvat matriisin sisältämistä alifaattisista hiilivedyistä.

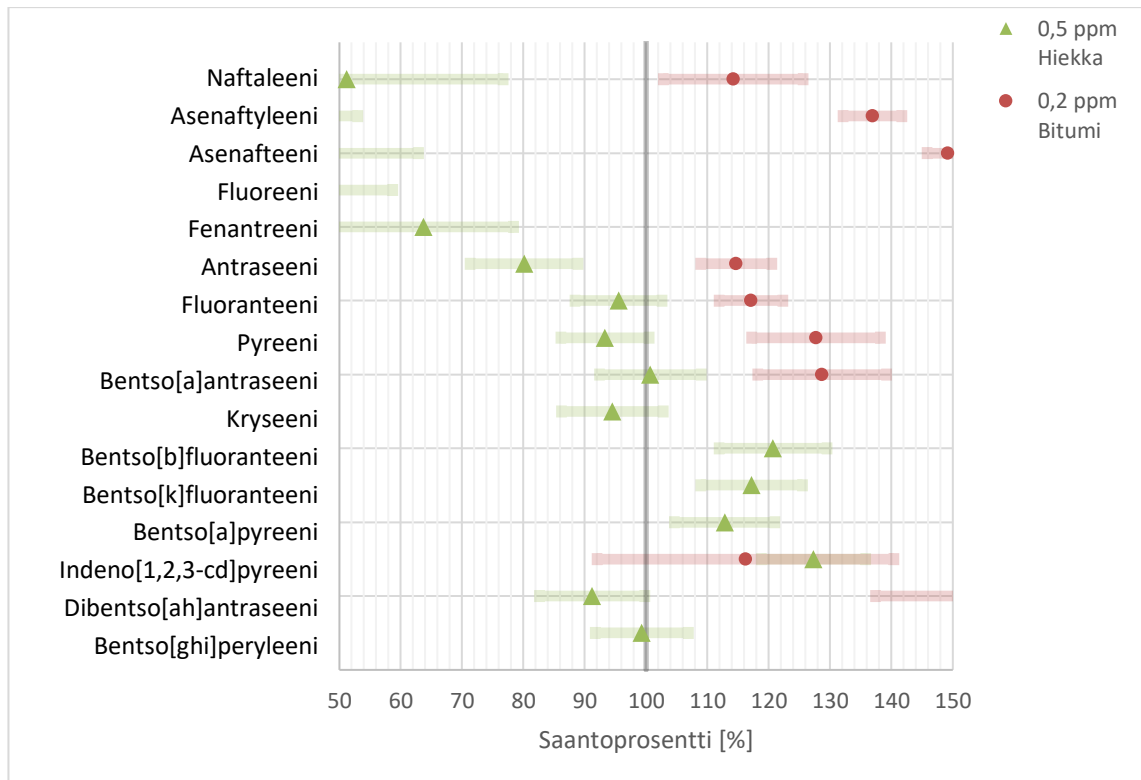
Tolueenimenetelmällä saatujen saantoprosenttien keskiarvot ja keskihajonnat EPA-PAH 16 -yhdisteille ovat kuvissa 5 ja 6. Referenssimenetelmällä saatujen saantoprosenttien keskiarvot ja keskihajonnat ovat kuvissa 7 ja 8.



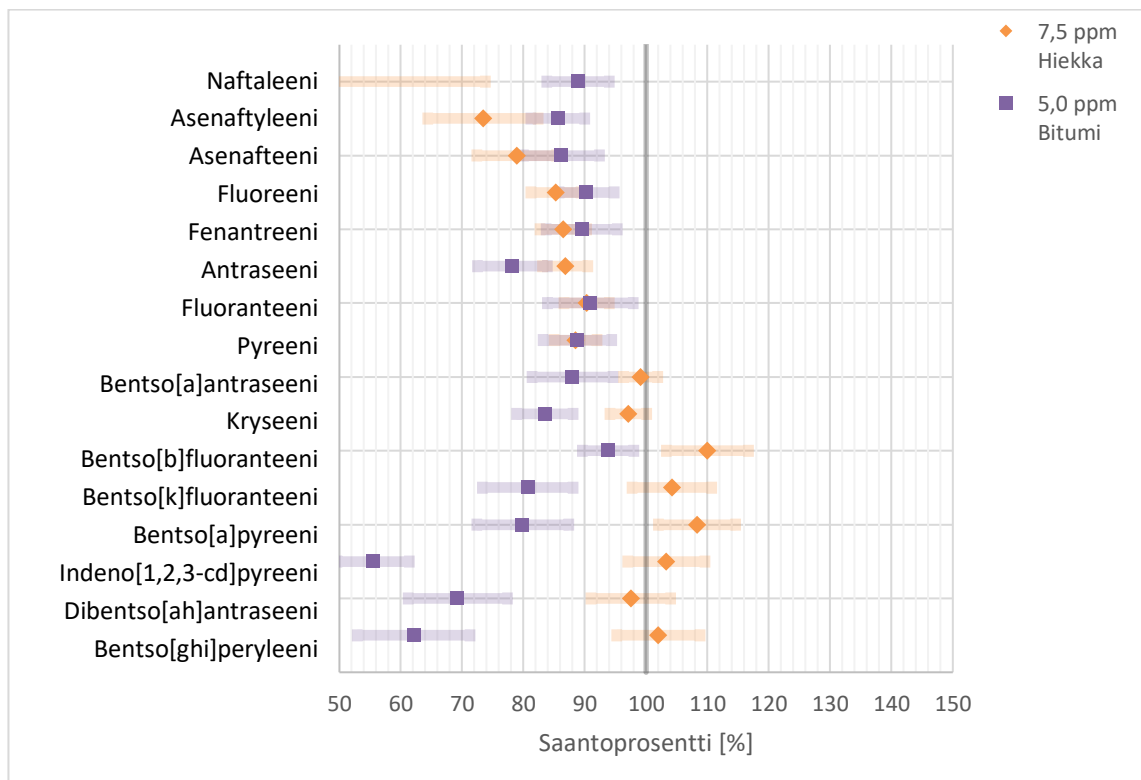
Kuva 5. Tolueeniutolla pitoisuuteen 0,2 µg/ml tehtyjen saantokokeiden (N=12) keskiarvot ja virhepalkit eri matriiseissa. Monet analyyteistä ylittävät asteikon. Arvot ovat liitteen 2 taulukoissa.



Kuva 6. Tolueeniutolla pitoisuuteen 5,0 µg/ml tehtyjen saantokokeiden (N=12) keskiarvot ja virhepalkit eri matriiseissa.



Kuva 7. Standardinmukaisesti pitoisuuksiin 0,2 ja 0,5 µg/ml tehtyjen saantokokeiden (N=12) keskiarvot ja virhepalkit eri matriiseissa. Monet analyteistä ylittävät asteikon. Arvot ovat liitteen 2 taulukoissa.



Kuva 8. Standardinmukaisesti pitoisuuksiin 5,0 ja 7,5 µg/ml tehtyjen saantokokeiden (hiekassa N=12, bitumissa N=6) keskiarvot ja virhepalkit eri matriiseissa.

Kohina vaikeutti painavimpien polysyklisen aromaattisten hiilivetyjen tunnistamista ja yhdessä saantokoesarjassa (kuva 5) teki sen mahdottomaksi; indeno[1,2,3-cd]pyreeniä, dibentso[ah]antraseeniä ja bentso[ghi]peryleeniä ei kyetty määrittämään tolueeni-uutolla esikäsitellyistä näytteistä lainkaan pienimmällä pitoisuustasolla. Suurikokoisimpien PAH-analyyttien erottuminen taustasta ei vaikeutunut referenssimenetelmän saantokokeissa.

Referenssimenetelmässä ohjeistetun konsentroidun vaikutus herkästi haihtuvien PAH-analyyttien saantoihin saattoi olla negatiivinen. Naftaleeni, asenaftyleeni, asenafteni ja fluoreeni luokitellaan erittäin herkästi haihtuviksi ja fenantreeni, antraseeni, fluoranteeni ja pyreeni keskihaihtuviksi [1, s. 4–5]. Saantoprosentit olivat konsentroiduissa näytteissä normaalia alhaisempia, mutta typpikuivauksen yhteyttä saantoihin ei voida varmuudella todeta, sillä näytteisiin lisätyt deuteroidut sisäiset standardit eivät haihtuneet samassa tahdissa. Bitumiin lisätyissä näytteissä – joita ei konsentroidu – haihtuvimpien analyyttien saannot eivät olleet poikkeavia kummallakaan pitoisuustasolla.

5.3.2 Poikkeamien tarkastelu

Saantokokeista tehtiin johtopäätös, että bitumimatriisilla on voimakas tehostava vaikutus PAH-analyyttien vasteisiin pienillä pitoisuuksilla. Vasteet olivat johdonmukaisesti liian suuria pitoisuuteen nähden kahdella vertailtavalla menetelmällä, joten vääristymisen voi luokitella systemaattiseksi virheeksi eli poikkeamaksi (engl. *bias*) Poikkeaman suuruus prosentteina voidaan laskea kaavalla 5:

$$Bias - \% = \frac{(X - \mu) \times 100\%}{\mu}, \quad (5)$$

missä

μ on odotusarvo

X on kokeellisesti määritetty arvo.

Tolueeniuttomenetelmällä valmisteltujen saantokokeiden tulospoikkeamat laskettiin. Tulokset ovat taulukossa 9. Bitumikatematriisiin lisätyt saantokokeet ovat poikkeamiltaan suurimpia erityisesti pienimmällä pitoisuudella. Hiekkamatriisiin lisätyt näytteet olivat poikkeamiltaan hyväksyttäviä.

Taulukko 9. Tolueeni-uuttomenetelmällä mitattujen saantokokeiden poikkeamat eri matriiseissa ja eri pitoisuuksilla. Poikkeamat laskettiin keskiarvoina useille PAH-yhdisteille, ja analyytit on jaoteltu haihtuvuusluokan perusteella.

PAH-analyytti	Poikkeama hiekkamatriisissa		Poikkeama bitumimatriisissa	
	0,2 ppm	5,0 ppm	0,2 ppm	5,0 ppm
Herkästi haihtuvat ¹⁾	-11,4 %	-1,3 %	43,6 %	0,5 %
Keskihaittavat ²⁾	-6,8 %	1,3 %	103,1 %	19,4 %
Heikosti haihtuvat ³⁾	-6,7 %	-4,2 %	70,0 %	-25,1 %

¹⁾ Naftaleeni – fluoreeni

²⁾ Fenantreeni – pyreeni

³⁾ Bentso[a]antraseeni – bentso[ghi]peryleeni

5.4 Täsmällisyys

5.4.1 Kenttänäyttemääritykset

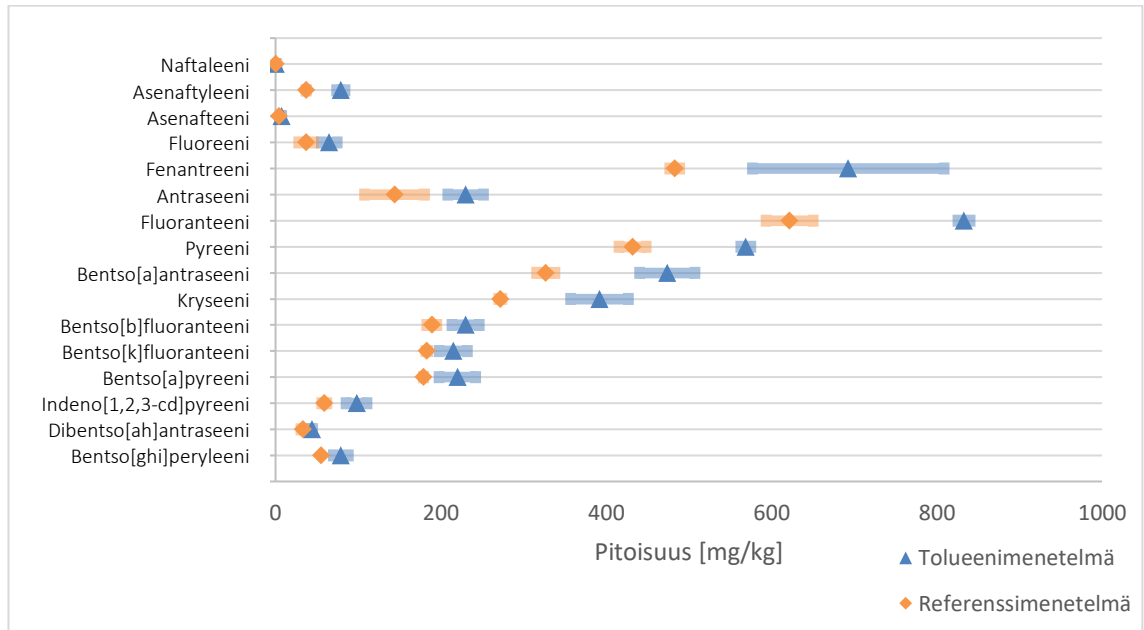
Verrattavilla menetelmillä analysoitujen näytteiden PAH-pitoisuuksia verrattiin toisiinsa. Tähän tarkoitukseen käytettiin oikeita asiakasnäytteitä, jotka oli lähetetty PAH-yhdiste-analyysiin Ositum Oy:lle vuoden 2017 aikana. Kaikista kenttänäytteistä tehtiin kolme rinnakkaismääritystä kummallakin menetelmällä. Näytteet oli aiemmin analysoitu Ositum Oy:n toimesta, joten sopivien näytematriisien ja PAH-pitoisuustasojen valintaan voitiin vaikuttaa.

Kenttänäytteiden tiedot merkittiin taulukkoon 10. Näytteistä otetut kuvat ovat liitteessä 6.

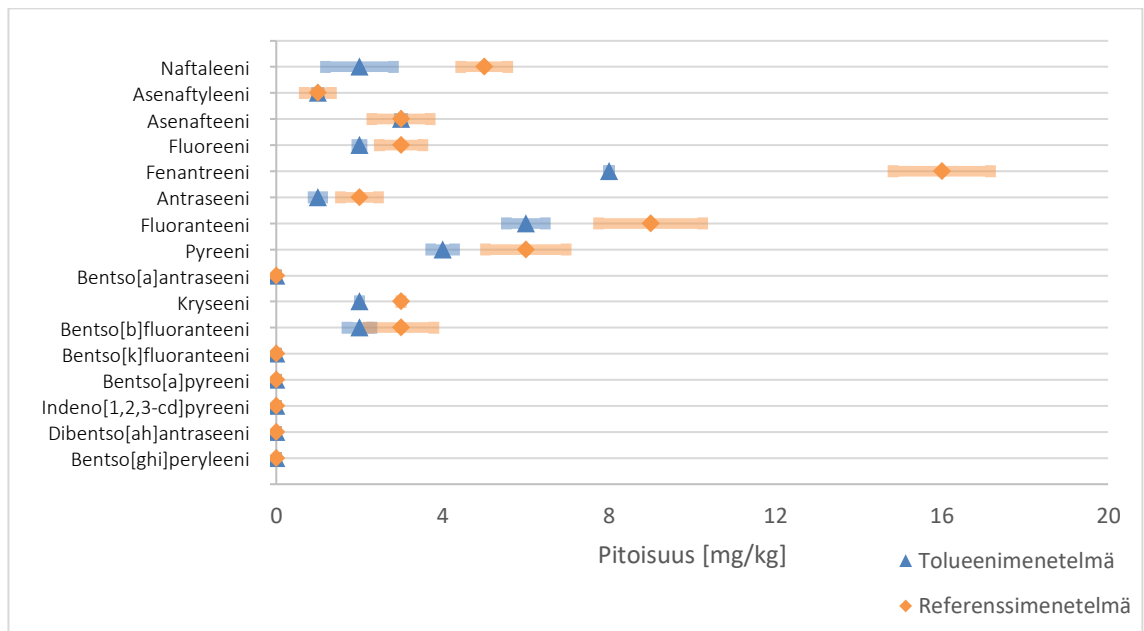
Taulukko 10. Täsmällisyyskokeisiin valittujen kenttänäytteiden tiedot.

Näyte	PAH-pitoisuus	Kuvaus	Preparointi
A	Keskisuuri	Vaaleaa kiviainesta, jossa oli pikikerros.	Sekakoosteista murskaa hienonnettiin vasaralla.
B	Matala	Puupalikka, jonka pinta oli käsitelty. Pinnointe mustaa, muuten vaaleaa puuta.	Puupalikan pintaa vuoltiin puukolla kohdista, jotka oli käsitelty pinnointeella.
C	Suuri	Mustaa tervapaperia.	Tasakoosteista paperia leikeltiin pieniksi paloiksi saksilla.

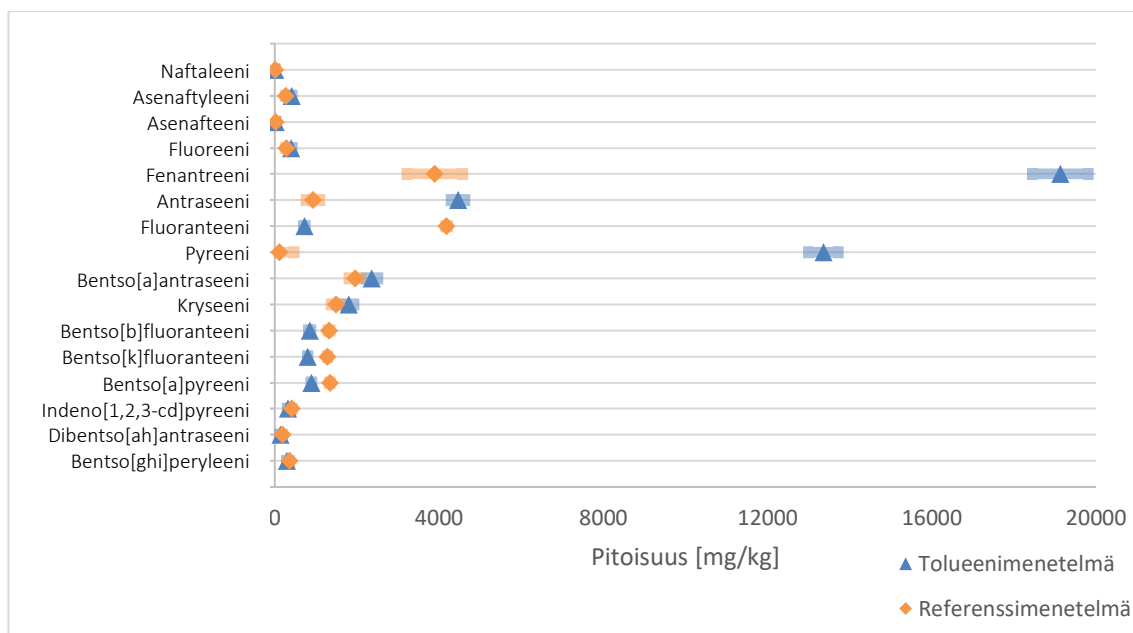
Kuvissa 9–11 ovat kenttänäytteistä analysoidut pitoisuudet ja keskihajonnat kahdesta parhaasta tuloksesta kullekin EPA-PAH 16 -yhdisteelle. Tulokset ja keskihajonnat ovat lisäksi liitteen 3 taulukossa.



Kuva 9. Näytteestä A määritettyjen PAH-analyyttien keskiarvot ja keskihajonnat molemmilla analyysimenetelmillä (N=2).



Kuva 10. Näytteestä B määritettyjen PAH-analyyttien keskiarvot ja keskihajonnat molemmilla analyysimenetelmillä (Tolueneimenetelmässä N=2 ja referenssimenetelmässä N=3).



Kuva 11. Näytteestä C määritettyjen PAH-analyyttien keskiarvot ja keskihajonnat molemmilla analyysimenetelmillä (N=2). Fenantreenin ja pyreenin pitoisuudet eroavat menetelmien välillä huomattavasti.

Täsmällisyyskokeissa näytteiden PAH-pitoisuudet yksikössä mg/kg laskettiin kaavalla 6:

$$\frac{(A_{Natiivi} - b) \times 10 \mu g}{s \times m}, \quad (6)$$

missä

$A_{Natiivi}$ on natiivin PAH-yhdisteen piikin pinta-ala

A_{ISTD} on deuteroidun PAH-yhdisteen piikin pinta-ala

b on analyytin kalibrintokuvaajan vakiotermi

10 μg on näytteeseen lisätyn sisäisen standardin massa

s on analyytin kalibrintokuvaajan kulmakerroin

m on näytteen massa yksikössä g.

Näytteiden hajonta rinnakkaisnäytteiden välillä oli suurta. Tämä saattoi johtua näytteiden heterogeenisistä matriiseista ja rinnakkaisten määritysten vähäisyydestä. Useimmissa rinnakkaismäärityksissä oli yksi selkeästi poikkeava arvo, joka jätettiin pois keskiarvon ja keskihajonnan laskuista.

Kahdella menetelmällä saatujen tulosten yhtäläisyyttä arvioitiin tekemällä vertailtaville pitoisuuksille kahden riippumattoman otoksen t-testi Microsoft Excelillä. Kummallakin esikäsittelymenettelyllä näytteistä tehtiin kolme rinnakkaista määrittystä. Vertailtaviksi otoksiksi valittiin niistä kaksi parasta tai vaihtoehtoisesti kaikki kolme. Testien p-arvot ovat liitteessä 4.

T-testeissä otosten väliset varianssit oletettiin erisuuriksi. Nollahypoteesina käytettiin väittämää, etteivät vertailtavat otokset eroa toisistaan luottamustasolla 95 %. Alfa-arvo oli 0,05. Nollahypoteesi hylättiin, jos p-arvo oli pienempi kuin alfa.

Tarkastelun perusteella eri menetelmillä analysoitujen näytteiden PAH-pitoisuudet eivät eronneet toisistaan tilastollisesti merkitsevästi luottamustasolla 95 %. Poikkeuksia olivat näytteessä B naftaleeni, fenantreeni, fluoranteeni ja pyreeni ja näytteessä C fenantreeni, antraseeni, fluoranteeni ja pyreeni. Yhdisteiden tilastolliset piirteet ovat taulukossa 11.

Taulukko 11. Tilastolliset piirteet yhdisteillä, joiden pitoisuudet erosivat toisistaan vertailtavien menetelmien välillä tilastollisesti merkitsevästi luottamustasolla 95 %. Tolueeni-uuttomenetelmä ja standardinmukainen referenssimenetelmä merkittiin tunnuksin TOL ja REF.

Näyte B							
Yhdiste	Keskiarvo [mg/kg]		Suht. keskihajonta		Otoskoko, lkm		P-arvo, 2-suuntainen
	TOL	REF	TOL	REF	TOL	REF	
Naftaleeni	2,3	5,4	35,6 %	10,5 %	2	3	0,043
Fenantreeni	8,5	16,0	0,2 %	7,3 %			0,008
Fluoranteeni	6,0	9,2	7,8 %	13,6 %			0,027
Pyreeni	3,6	5,8	8,0 %	16,6 %			0,030
Näyte C							
Yhdiste	Keskiarvot [mg/kg]		Suht. keskihajonta		Otoskoko, lkm		P-arvo, 2-suuntainen
	TOL	REF	TOL	REF	TOL	REF	
Fenantreeni	19132,0	3898,3	3,6 %	3,3 %	2	2	0,021
Antraseeni	4462,9	929,1	3,8 %	10,3 %			0,002
Fluoranteeni	720,4	4186,3	3,5 %	1,0 %			9,59E-05
Pyreeni	13361,4	109,7	2,7 %	5,7 %			0,012

5.4.2 Määrittysten uusittavuus

Tolueeniuttomenetelmän laboratorion sisäinen uusittavuus testattiin. Uusittavuudella tarkoitetaan tulosten yhdenmukaisuutta samalla menetelmällä mitattuina, eri henkilöiden toimesta ja eri laitteita käyttäen [17, s. 5; 19, s. 37]. Kenttänäytteiden PAH-määrittäjäsiä verrattiin määrittäjäsiintoihin, jotka oli tehnyt analytiikkaan pätevyitynyt Ositum Oy:n työntekijä. Lisäksi määrittäjäsi oli tehty eri GC-MS-laitteistoa käyttäen. Vertailu tehtiin kvalitatiivisella tasolla, eli tunnistettuja PAH-yhdisteitä verrattiin toisiinsa. Tällä tasolla tarkasteltuna tolueeniuttomenetelmän uusittavuus oli hyvä: identifioidut PAH-yhdisteet olivat tulkintojen välillä samat, joten väärin positiivisten tai negatiivisten tunnistusten todennäköisyys on matala.

5.5 Tolueeniuttomenetelmän toistettavuus

Toistettavuutta yleisesti arvioidaan laskemalla rinnakkaisnäytteiden suhteellinen keskihajonta RSD. Toistettavuudella tarkoitetaan saman mitattavan suureen peräkkäisten mittaustulosten paikkansapitävyyttä, kun mittaukset toteutetaan samoissa olosuhteissa [19, s. 37]. Saantokokeiden ja kenttänäytteiden rinnakkaismäärittäjäsiintien RSD-arvot ovat liitteiden 2 ja 3 taulukoissa.

Saantokokeissa toistettavuusväli kaikille EPA-PAH 16 -analyyteille oli 1,7–9,2 prosenttia (N=45). Suurimpien analyttien RSD oli järjestelmällisesti muita yhdisteitä korkeampi, väliltä 2,6–13,4 prosenttia. Kenttänäytteissä analyttien RSD-arvot olivat suurempia, sillä näytematriisin koostumuksen yhdenmukaisuutta oli vaikeampi hallita. Kenttänäytteiden toistettavuuskeskiarvot olivat näytteellä A 8,2 prosenttia, näytteellä B 9,2 prosenttia ja näytteellä C 4,5 prosenttia. Toistettavuuksien keskiarvo oli 6,8 prosenttia (N=102).

Jotta GC-näytteensyöttöjen välinen suhteellinen keskihajonta voitiin laskea, kalibrointi-näytteet analysoitiin laitteistolla kolmesti, ja mitattujen vasteiden välinen RSD laskettiin. Nämä RSD-arvot ovat liitteessä 1. Kalibrointiliuosten rinnakkaisista näyteesyöttöistä laskettu toistettavuuskeskiarvo oli 2,3 prosenttia ja vaihteluväli oli 0,2–8,3 prosenttia (N=96). Sarjojen sisäinen vaihtelu ei ollut sarjojen välistä vaihtelua suurempi.

Mittausten välinen aikaväli pyrittiin minimoimaan, jotta toistettavuusolosuhteet pysyisivät mahdollisimman muuttumattomina. Näyteesyöttöjen toistettavuusmittaukset ajoittuivat vuorokauden sisälle toisistaan. Saantokoe- sekä kenttänäytteiden mittaukset toteutettiin kahden viikon sisällä toisistaan.

5.6 Mittausepävarmuuden tarkastelu

Arviot mittaustulosten poikkeamista ja yhdistetystä sekä laajennetusta epävarmuudesta laskettiin Suomen ympäristökeskuksen lisensoimalla MUKit-ohjelmistolla. Laskutulokset ovat taulukossa 12. Muokkaamattomat ohjelmiston tulosteet ovat liitteessä 7.

Taulukko 12. Tolueeniuttomenetelmällä määritetyistä oikeellisuustuloksista MUKit-ohjelmalla lasketut arviot poikkeamista ja mittausepävarmuuksista EPA-PAH 16 -yhdisteille hiekkamatriisissa.

Yhdiste	Poikkeama		Mittausepävarmuus	
	Sisäinen uusittavuus $u(Rw)$	Systemaattinen virhe $u(bias)$	Yhdistetty epävarmuus u_c	Laajennettu epävarmuus $U, (k=2)$
Naftaleeni	4,9 %	8,4 %	9,7 %	20 %
Asenaftyleeni	3,1 %	10,9 %	11,4 %	23 %
Asenafteeni	3,2 %	7,6 %	8,2 %	17 %
Fluoreeni	3,7 %	5,6 %	6,7 %	14 %
Fenantreeni	3,7 %	9,1 %	9,8 %	20 %
Antraseeni	3,6 %	9,1 %	9,8 %	20 %
Fluoranteeni	3,9 %	2,5 %	4,7 %	10 %
Pyreeni	3,8 %	3,8 %	5,4 %	11 %
Bentso[a]antraseeni	4,2 %	3,9 %	5,7 %	12 %
Kryseeni	4,1 %	12,3 %	12,9 %	26 %
Bentso[b]fluoranteeni	5,6 %	16,3 %	17,2 %	35 %
Bentso[k]fluoranteeni	6,6 %	3,7 %	7,52 %	16 %
Bentso[a]pyreeni	4,1 %	0,9 %	4,2 %	9 %
Indeno[1,2,3-cd]pyreeni	11,9 %	10,5 %	15,8 %	32 %
Dibentso[ah]antraseeni	5,9 %	23,4 %	24,1 %	49 %
Bentso[ghi]peryleeni	8,9 %	22,0 %	23,7 %	48 %

Poikkeamat ja mittausepävarmuudet laskettiin vain hiekkaan valmistelluista oikeellisuusnäytteistä, koska hiekka oli edustavuudeltaan bitumia laaja-alaisempi. Laajennettujen mittausepävarmuuksien arviot olivat useimmilla analyteillä hyväksyttäviä: vaihteluväli herkästi haihtuvilla analyteillä oli 14–23 prosenttia, keskihaihtuvilla 10–20 prosenttia ja heikosti haihtuvilla 9–49 prosenttia.

5.7 Toteamisraja ja määrittäysraja

Signaalikohinasuhde, S/N, voitiin laskea vertaamalla useiden näytteiden analyyttipiikkien suhdetta taustakohinaan. Suhteen laskeminen tehtiin yleisen menettelytavan mukaisesti jakamalla analyyttipiikin korkeus taustakohinan keskimääräisellä korkeudella useista näytteistä.

Tarkastelemalla alhaisiin pitoisuuksiin valmistettujen analyyttien signaalikohinasuhteita, voitiin selvittää toteamisraja LOD, jonka S/N-suhteen suuruudeksi valittiin 3, ja määrittäysraja LOQ, jonka S/N-suhteen suuruudeksi valittiin 6. Määrittäysrajat laskettiin analyyteille matriisinäytteiden EIC-kromatogrammeista. Toteamisrajat laskettiin puhtaisiin liuottimiin valmistettujen kalibrointiliuosten EIC-kromatogrammeista. PAH-analyyttien toteamis- ja määrittäysrajat ovat taulukossa 13.

Taulukko 13. Signaalikohinasuhteiden perusteilla taulukoidut toteamisrajat (LOD, S/N=3) ja määrittäysrajat (LOQ, S/N=6) EPA-PAH 16 -analyyteille. Suhteiden laskemiseen käytettiin piikkien korkeuksia ionierotelluissa kromatogrammeissa. Tolueeniutto-menotelmä ja standardinmukainen referenssimenetelmä merkittiin tunnuksin TOL ja REF, ja niiden yhteyteen merkittiin laskuissa käytetty otoskoko N.

Yhdiste	LOD [mg/kg]		LOQ [mg/kg]			
	TOL (N=5)	REF (N=5)	TOL (N=5)		REF (N=3)	
			Hiekka	Bitumi	Hiekka	Bitumi
Naftaleeni	0,03	0,04	0,04	0,07	0,10	0,19
Asenaftyleeni	0,02	0,03	0,04	0,06	0,11	0,18
Asenaftteeni	0,04	0,05	0,06	0,10	0,25	0,28
Fluoreeni	0,03	0,04	0,10	0,15	0,21	0,23
Fenantreeni	0,03	0,04	0,08	0,08	0,08	0,16
Antraseeni	0,02	0,04	0,08	0,11	0,09	0,22
Fluoranteeni	0,03	0,04	0,09	0,19	0,08	0,28
Pyreeni	0,03	0,04	0,08	0,19	0,07	0,29
Bentso[a]antraseeni	0,05	0,04	0,09	0,34	0,08	0,59
Kryseeni	0,05	0,04	0,09	0,26	0,07	0,39
Bentso[b]fluoranteeni	0,11	0,04	0,15	0,58	0,08	0,66
Bentso[k]fluoranteeni	0,08	0,04	0,14	0,67	0,07	0,74
Bentso[a]pyreeni	0,10	0,04	0,16	0,75	0,09	0,83
Indeno[1,2,3-cd]pyreeni	0,10	0,05	0,24	1,64	0,11	1,11
Dibentso[ah]antraseeni	0,12	0,05	0,25	1,54	0,10	1,06
Bentso[ghi]peryleeni	0,14	0,05	0,24	1,18	0,12	1,10

Analyyttien toteamisrajat olivat molemmilla menetelmillä hyväksyttäviä. Vaihteluväli oli 20–140 ng/g. Referenssimenetelmän petroleetteriin liuotettujen standardiliuoksien EIC-kromatogrammeissa esiintyi vähemmän kohinaa kuin tolueeniin liuotetuissa liuoksissa, jonka ansiosta toteamisraja kyettiin asettamaan pienemmille pitoisuuksille.

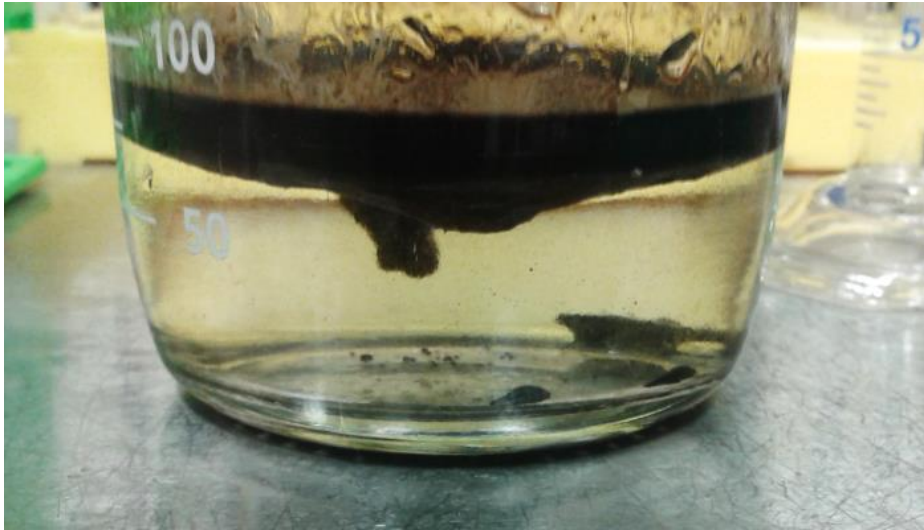
Bituminäytteistä lasketut määritysrajat painavimmille PAH-yhdisteille olivat laskettuihin toteamisrajoihin verraten korkeita. Standardissa ISO 18287 matriiseiltaan tavanomaisten PAH-näytteiden applikaatorajaksi (engl. *limit of application*) on merkitty kaikille EPA-PAH 16 -analyyteille yhteinen arvo 0,01 mg/kg. Vaikeiksi luokiteltavien matriisien, kuten bitumin, applikaatorajaa ei ilmoiteta standardissa. Edellä mainittua standardia mukaileva SFS-EN 15527 määrittelee applikaatorajaksi konsentraation 0,1 mg/kg ja selventää, ettei applikaatoraja yleisesti toteudu interferenssiä aiheuttavassa bitumimatriisissa [8, s. 5].

Määritysrajatulokset vastasivat standardeissa ISO 18287 ja SFS-EN 15527 ilmoitettuja suorituskykyseelvityksiä. Bitumimatriisiin valmistettujen näytteiden määritysrajat olivat suurempia, kuten jälkimmäisessä standardissa todettiin. Bituminäytteissä määritysrajan vaihteluväli oli 0,07–1,64 mg/kg ja hiekkamatriisissa 0,04–0,25 mg/kg. Arvot olivat hyvin samankaltaisia vertailumenetelmien välillä.

Painavimpien PAH-analyyttien tolueeniuuttoon perustuva määritysraja bitumissa nousi välille 1,18–1,64 mg/kg. Saantokokeissa alhaisilla pitoisuuksilla mitatut kromatogrammit, ja painavimpien yhdisteiden identifiointin vaikeus kromatogrammeista, osoittivat, että määritysrajan asettaminen korkeaksi oli aiheellista. Hiekkamatriisin määritysrajat olivat kohtuulliset ja olivat korkeimmillaan mittausalueen alimman pitoisuuden tasolla.

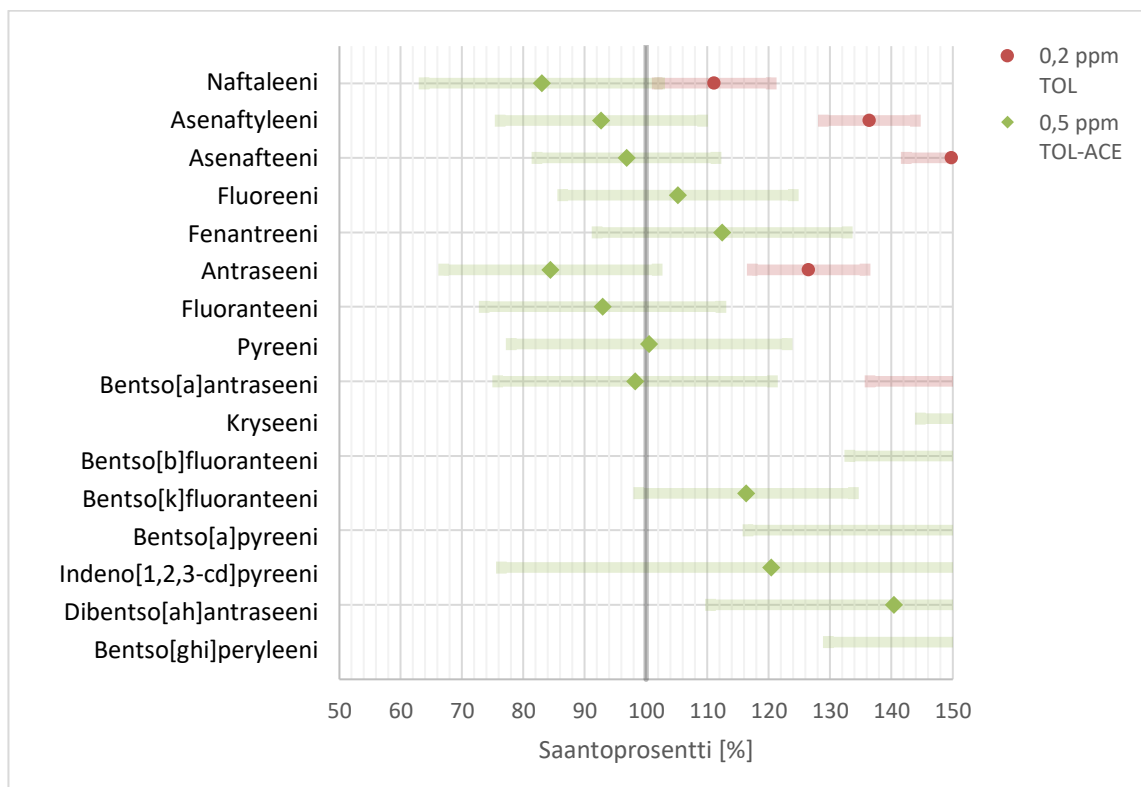
5.8 Menetelmänkehitys matriisivaikutuksen vähentämiseksi

Bitumimatriisista aiheutuvan interferenssin lieventämiseksi ja tolueeniuuttomenetelmän kehittämiseksi vaihtoehtoista esikäsittelytapaa testattiin. Siinä muodostettiin standardin ISO 18287 tavoin poolinen nestefaasi, johon ei-halutut yhdisteet sitoutuivat kiinteästä bitumikatenäytteestä. Faasit näkyvät kuvassa 12, jossa pohjalla oleva kirkas neste oli poolinen vesi-asetonifaasi ja pinnalle kertynyt musta neste oli tolueeniuutefaasi.



Kuva 12. Menetelmänkehityksen testaukseen käytetty näyte, jossa bituminäytteen PAH-analyytit on liuotettu pinnalla olevaan poolittomaan tolueeniin. Pohjalle muodostunut kirkas neste oli vesi-asetonifaasi, johon pyrittiin liuottamaan ei-halutut näytekomponentit.

Kuvassa 13 ovat tolueeniuutolla ja kokeellisella menettelyllä käsiteltyjen saantokokeiden keskiarvot ja keskihajonnat.



Kuva 13. Tolueeniuutolla pitoisuuteen 0,2 µg/ml ja modifioidulla tolueeniuutolla pitoisuuteen 0,5 µg/ml tehtyjen saantokokeiden keskiarvot ja virhepalkit bitumimatriisissa. Monet PAH-yhdisteet ylittävät asteikon. Arvot ovat liitteen 5 taulukossa.

Tolueeniasetoniuutto onnistuneesti vähensi bitumimatriisin interferenssiä. Modifioidun tolueeniuuton saantoprosentit pienillä pitoisuuksilla olivat tavanomaista tolueeniuuttoa parempia, ja kaikki PAH-analyytit kyettiin tunnistamaan taustakohinasta. Painavimpien PAH-yhdisteiden saantoprosentit olivat yhä liian suuria, ja niiden keskihajonnat olivat suurempia kuin tavanomaisella tolueeniuutolla käsitellyissä näytteissä. Toistettavuuskeskiarvo oli modifioidulla menettelyllä 21,9 prosenttia mitatulla pitoisuudella 0,5 µg/ml ja tavanomaisella menettelyllä 5,5 prosenttia pitoisuudella 0,2 µg/ml. Analyyttipiikkien signaalikohinasuhteissa ei havaittu muutoksia.

6 Yhteenveto

6.1 Tolueeniuuttomenetelmän suorituskyky

Tolueeniuuttomenetelmälle toteutettu täydellinen validointi osoitti, että sillä saavutetaan referenssimenetelmän asettamat tavoitteet analyttisen tarkkuuden osalta. Menetelmä on standardoitua petrolieetteriuuttoa nopeampi ja suoraviivaisempi ja täten soveltuvampi rutiininomaisesti tehtäviin polysyklisen aromaattisten hiilivetyjen analyysiin.

Validoinnissa tehtiin johtopäätös yleisten suorituskykyä ja virhelähteitä arvioivien testien perusteella, että tyypillisistä hiekkaan verrannollisista näytteistä PAH-analyytit kyetään tolueeniuuttomenetelmällä tunnistaa ja kvantitoida referenssimenetelmää vastaavalla tarkkuudella. Määritysten oikeellisuus kaikkien PAH-analyyttien osalta oli hyväksyttävä, ja mittausalueella ilmenevät poikkeamat olivat alhaisimpia pitoisuuksia lukuun ottamatta pieniä. Täsmällisyyttä arvioitiin kolmella kenttänäytteellä, jotka analysoitiin referenssi- ja tolueeniuuttomenetelmällä. 83 prosenttia vertailtavista määritystuloksista eivät eronneet toisistaan tilastollisesti merkitsevästi 95 prosentin luottamustasolla.

Polysyklisen aromaattisten hiilivetyjen analytiikassa selvitys tyypillisesti käsittelee PAH-yhdisteiden raja-arvon ylitystä. Esimerkiksi kivihiilipikijätteen yhteenlasketuksi pitoisuusraja-arvoksi on määritelty 200 mg/kg [3]. Useimmissa näyteanalyyseissä yhteenlasketun pitoisuuden on havaittu ylittävän tai alittavan raja-arvon selkeästi. MUKit-ohjelmistolla laskettujen yhdistettyjen mittausepävarmuuksien perusteella määritykset ovat riittävän tarkkoja myös tapauksissa, joissa analyttien yhteenlaskettu pitoisuus on raja-arvon luokkaa. Määritykset voidaan tulkita erityisen luotettaviksi näytematriiseista, joissa ei esiinny interferenssiä.

6.2 Bitumimatriisin vaikutus suorituskykyyn

Bitumi on tunnetusti hankala näytematriisi, sillä sen koostumus on monipuolinen sekoitus lukuisia alifaattisia ja aromaattisia hiilivetyjä. Yleisesti ennen varsinaista kromatografista analyysiä bituminäytteet puhdistetaan sopivalla kromatografisella preparointimetodilla, ennen kuin PAH-yhdisteet voidaan määrittää. [21, s 1–2.] Validoinnissa arvioitiin PAH-määritysten onnistumista bitumimatriisista ilman erillistä puhdistusvaihetta.

Bitumin vaikutus PAH-yhdisteiden määrittämiseen oli huonontava. Analyytin spesifisyys laski hiekkaan valmistettuihin näytteisiin verrattuna. Vaikutus kohdistui erityisesti suurikokoisiin heikosti haihtuviin analyytteihin sekä fluoranteeniin ja pyreeniin. Bitumimatriisi ei laskenut selektiivisyyttä toimenpiteitä vaativalle tasolle. Oikeellisuuden tarkastelussa tehtiin havainto, että bitumilla on ionisointia tehostava vaikutus alhaisilla pitoisuuksilla. Vaikutus toistui vertailtavien menetelmien välillä, ja oli liian johdonmukainen johtuakseen satunnaisvirheestä. Systemaattinen virhe laskettiin: bitumiin valmistetut saantoprosentit poikkesivat odotusarvosta herkästi haihtuvilla analyyteillä 44 prosenttia, keskihaihtuvilla 103 prosenttia ja heikosti haihtuvilla 70 prosenttia. Suurempaan pitoisuuteen 5,0 µg/ml valmistetut saantokokeet poikkesivat odotusarvosta herkästi haihtuvilla analyyteillä 0,5 prosenttia, keskihaihtuvilla 19 prosenttia ja heikosti haihtuvilla -25 prosenttia.

Tolueeniuttomenetelmän ja referenssimenetelmän toteamisrajat olivat samaa suuruusluokkaa. PAH-standardiliuoksista määritetyt toteamisrajat olivat väliltä 0,02–0,14 mg/kg (S/N=3). Määritysrajat, jotka laskettiin hiekka- ja bituminäytteiden kromatogrammeista, olivat vastaavasti samaa suuruusluokkaa vertailumenetelmien välillä. Hiekkänäytteiden määritysrajat olivat väliltä 0,04–0,25 mg/kg (S/N=6). Bituminäytteillä määritysrajat olivat systemaattisesti korkeampia: suurikokoisilla analyyteillä vaihteluväli oli 1,18–1,64 ja muilla analyyteillä 0,06–0,75 mg/kg (S/N=6).

Bitumin sisältämien komponenttien interferenssi on muihin näytematriiseihin verrattuna niin voimakasta, että PAH-yhdisteiden määrittäminen bitumista luotettavasti edellyttää tolueeniuttomenetelmän kehittämistä. Validoinnin yhteydessä testattiin menetelmää, jossa näytteisiin muodostettiin poolittoman tolueeniifaasin lisäksi poolinen vesi-asetoni-faasi, johon ei-haluttuja yhdisteitä pyrittiin liuottamaan. Menettely osoittautui lupaavaksi, mutta interferenssin vähentämisen kannalta yhä riittämättömäksi toimenpiteeksi. Bitumin ongelmallisuus PAH-analytiikassa on hyvin tunnettu, ja aiheutti matriisivaikutusta myös standardinmukaisella menetelmällä käsitellyissä näytteissä.

6.3 Jatkotoimenpiteet

Tolueeniuttomenetelmän soveltuvuuden parantaminen interferenssiä aiheuttavissa näytematriiseissa on vartenotettava kehityssuunta menetelmän yleisen suorituskyvyn laajentamiseksi. Käyttämällä massaspektrometrin Selected Ion Monitoring -toimintoa, analyttien vasteita voidaan kvantitoinnissa merkittävästi parantaa nopeampaan scan-ohjelmaan verrattuna. SIM-ohjelman käyttöön kannustetaan standardissa ISO 18287, mutta validointisuunnitelmaa tehdessä scan-ohjelman päätettiin olevan riittävä mittaus-tekniikka. SIM voi mahdollisesti parantaa PAH-analyttien erottumista taustasta, koska tekniikassa vain massa-varaussuhteiltaan oikeat ionit päätyvät detektoriin. Lievempi matriisivaikutusta alentava menettely on paineistetun jakamattoman näytteensyötön käyttöönotto. Tämän sisällyttäminen tolueeniuttomenetelmään on mahdollista, mikäli sen havaitaan laskevan taustakohinaa.

Tolueeniuttomenetelmän suorituskykyä muissa näytematriiseissa testataan. Soveltuvia matriiseja arviointiin ovat esimerkiksi erilaiset maaperänäytteet. Tulosten täsmällisyyttä matriiseissa voidaan tarkemmin arvioida laboratorioden välisillä virallisesti tunnistetuilla vertailukokeilla.

Lähteet

- 1 PAH-yhdisteiden tavoitetasoperustelumuistio. 2016. Työterveyslaitos. [Http://www.ttl.fi/wp-content/uploads/2016/12/pah-yhdisteet-tavoitetaso.pdf](http://www.ttl.fi/wp-content/uploads/2016/12/pah-yhdisteet-tavoitetaso.pdf). Luettu 31.8.2017.
- 2 IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 92. Some Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. 2010. Kansainvälinen syöväntutkimuslaitos. [Http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol92/mono92.pdf](http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol92/mono92.pdf). Luettu 1.9.2017.
- 3 Ratu-kortti 82-0381. Kivihiilipikeä sisältävien rakenteiden purku. 2011. Helsinki: Rakennustieto.
- 4 Valtioneuvoston asetus maaperän pilaantuneisuuden ja puhdistustarpeen arvioinnista. 2007. 214/1.6.2007.
- 5 Reinikainen, Jussi. 2007. Maaperän kynnys- ja ohjearvojen määrittämisperusteet. Suomen ympäristökeskus. [Http://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/38431/SY_23_2007.pdf](http://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/38431/SY_23_2007.pdf). Luettu 1.9.2017.
- 6 Komulainen, Jarmo, Huttunen, Jukka & Säntti, Jaakko. 2011. Haitalliset aineet rakennuksissa ja niiden hallinta. Vahanen Oy. Teoksessa Rakentajain kalenteri 2011. Helsinki: Rakennustieto.
- 7 SFS-ISO 18287. Soil quality. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) – Gas Chromatographic Method with Mass Spectrometric Detection (GC-MS). 2006. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto.
- 8 SFS-EN 15527. Characterization of Waste. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) in Waste Using Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS). 2008. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto.
- 9 Riekkola, Marja-Liisa & Hyötyläinen, Tuulia. 2002. Kolonnikromatografia ja kapillaarielektromigraatiotekniikat. 2. painos. Helsinki: Helsingin yliopisto.
- 10 Harris, Daniel C. 2010. Quantitative Chemical Analysis. 8. painos. New York: W. H. Freeman and Company.

- 11 GC Inlets – An Introduction. 2005. Verkkodokumentti. Agilent Technologies, Inc. 2. painos. [Http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/5958-9468_041007.pdf](http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/5958-9468_041007.pdf). Luettu 31.8.2017.
- 12 Jaarinen, Soili & Niiranen, Jukka. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. 5.– 6. painos. Helsinki: Edita Publishing.
- 13 Kitson, Fulton G., Larsen, Barbara S. & McEwen, Charles N. 1996. Gas Chromatography and Mass Spectrometry. 1. painos. Lontoo: Academic Press.
- 14 Instrumentation: The Inlet System. 2011. Verkkosivu. Coloradon yliopisto. [Http://www.orgchemboulder.com/Spectroscopy/MS/inletsys.shtml](http://www.orgchemboulder.com/Spectroscopy/MS/inletsys.shtml). Luettu 30.8.2017.
- 15 McMaster, Marvin C. 1998. GC/MS: A Practical User's Guide. New York: Wiley.
- 16 Introduction to MS Quantitation and Modes of LC/MS Monitoring. 2016. Verkkosivu. IonSource. [Http://www.ionsource.com/tutorial/msquan/intro.htm](http://www.ionsource.com/tutorial/msquan/intro.htm). Päivitetty 19.1.2016. Luettu 30.8.2017.
- 17 Kemiallisten analyysimenetelmien validointiohje. 1997. Helsinki: Elintarvikevirasto Evira.
- 18 Huber, Ludwig. 2010. Validation of Analytical Methods. Agilent Technologies, Inc. [Http://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990-5140EN.pdf](http://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990-5140EN.pdf). Luettu 31.8.2017.
- 19 Kemia metrologian opas. 2005. Helsinki: Mittatekniikan keskus.
- 20 Godula, Michal, Hajšlová, Jana & Alteřová Katerina. 1999. Pulsed Splitless Injection and the Extent of Matrix Effects in the Analysis of Pesticides. Teoksessa Journal of High Resolution Chromatography. Vol. 22, s. 395–402.
- 21 Huynh, Cong-Khanh. ym. 2007. Identification and Quantification of PAH in Bitumen by GC-Ion-Trap MS and HPLC-Fluorescent Detectors. Teoksessa Taylor & Francis. Vol. 27, s. 107–121.

PAH-kalibrointitaulukko		Kalibrointikuvaaja		Spezifisyys (Hiekka)		Spezifisyys (Bitumi)	
Referenssinäytteenä		Korrelaatio ¹⁾	ISTD	CAL Slope ²⁾	STDA Slope	CAL Slope ²⁾	STDA Slope
Yhdiste	RT =			Ero (%)	Ero (%)		
1	Naftaleeni RT = 6,94	0,9995	NFT-d8	1,022	0,535	1,065	0,941
2	Asenaftyleeni RT = 11,21	0,9978		1,923	1,579	1,899	1,578
3	Asenaftteeni RT = 11,87	0,9979	ASN-d10	1,071	0,955	1,105	0,937
4	Fluoreeni RT = 13,78	0,9979		1,302	1,252	1,278	1,103
5	Fenanitreeni RT = 17,70	0,9974		1,101	1,018	1,090	0,959
6	Antraseeni RT = 17,89	0,9972		1,126	1,053	1,262	0,982
7	Fluoranteeni RT = 23,04	0,9967	FEN-d10	1,267	1,216	0,783	0,688
8	Pyreeni RT = 23,99	0,9966		1,324	1,248	0,704	0,620
9	Bentsol(a)antraseeni RT = 29,63	0,9994		1,088	1,119	1,095	0,971
10	Kryseeni RT = 29,81	0,9989	KRY-d12	1,088	1,111	1,136	0,914
11	Bentsol(b)fluoranteeni RT = 34,34	0,9991		1,326	1,199	1,574	1,272
12	Bentsol(k)fluoranteeni RT = 34,44	0,9988		1,415	1,516	1,876	1,383
13	Bentsol(a)pyreeni RT = 35,57	0,9985	PER-d12	1,301	1,435	1,456	1,133
14	Indenol(1,2,3-cd)pyreeni RT = 39,71	0,9996		1,215	1,248	1,343	0,659
15	Dibentsol(a)antraseeni RT = 39,87	0,9996		1,236	1,199	1,167	0,738
16	Bentsol(ghi)peryleeni RT = 40,54	0,9999		1,282	1,318	1,206	0,692

¹⁾Alussa tehdystä kalibrointikuvaajasta laskettu korrelaatiokerroin.

²⁾Alussa tehdystä kalibrointikuvaajasta laskettu kulmakerroin.

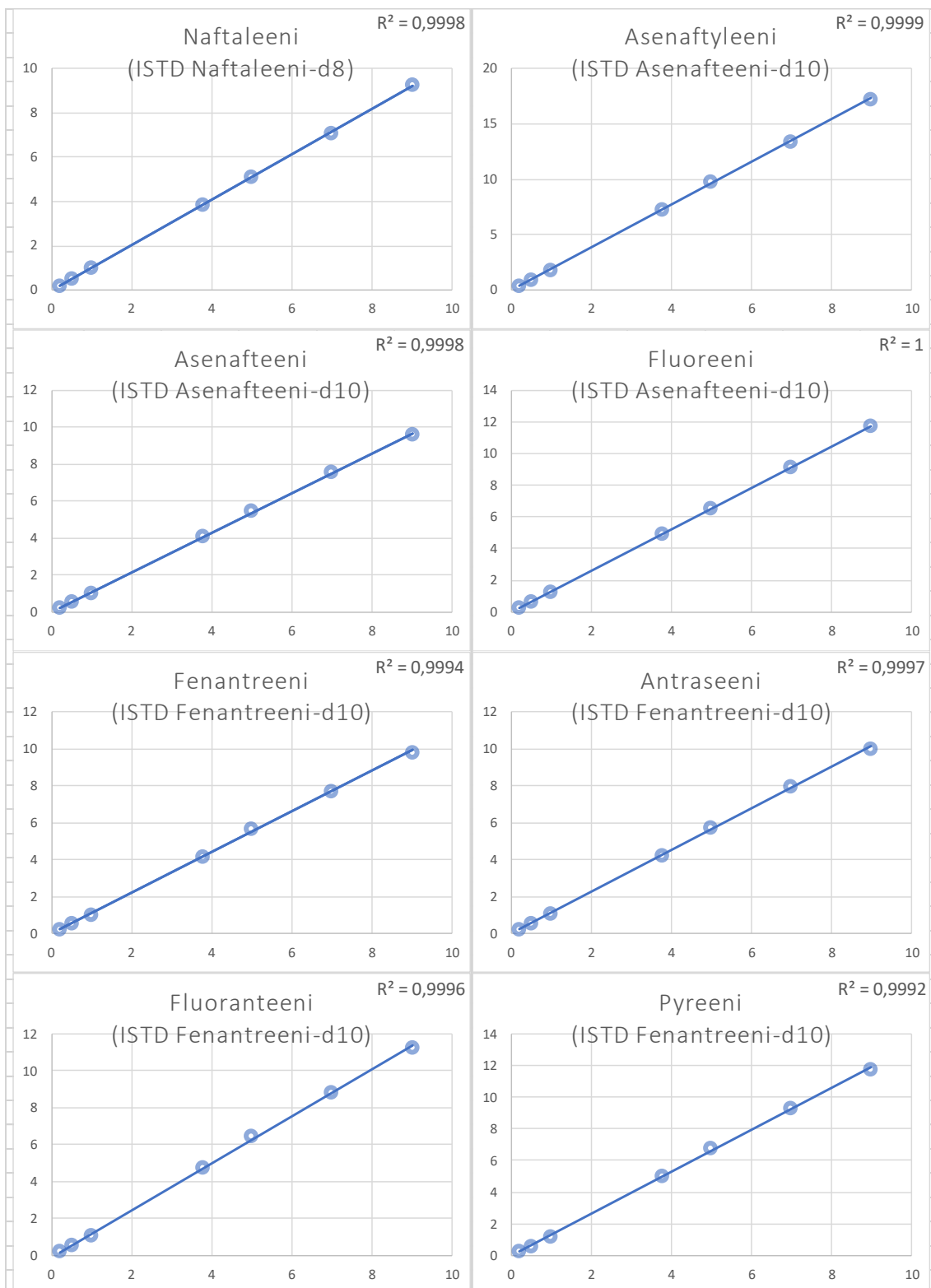
³⁾Myöhemmin tehdystä kalibrointikuvaajasta laskettu kulmakerroin.

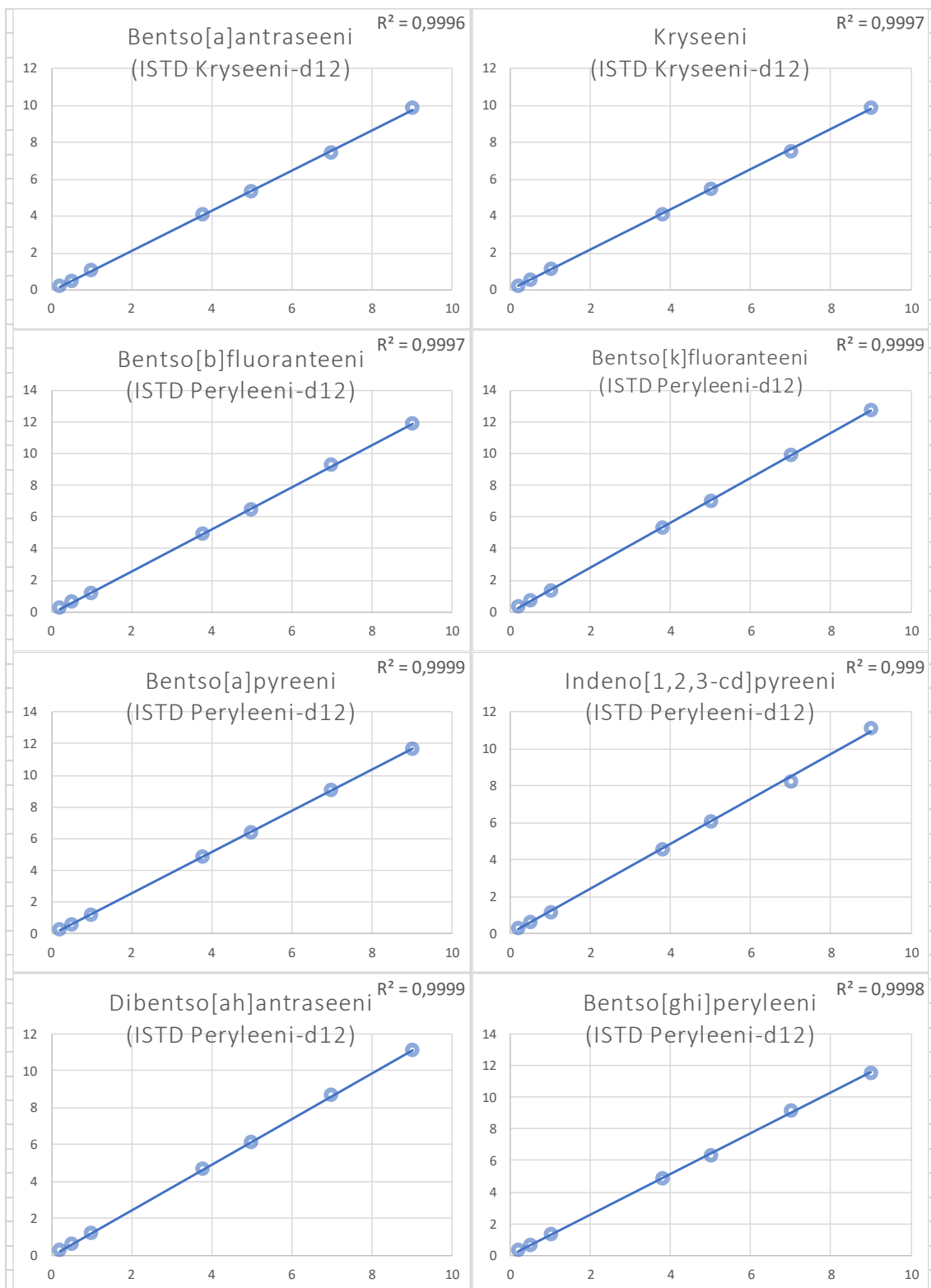
PAH-kalibrointitaulukko		Kalibrointikuvaaja		Spezifisyys (Hiekka)		Spezifisyys (Bitumi)	
Tolueni- ja toluenimetilä		Korrelaatio ¹⁾	ISTD	CAL Slope ²⁾	STDA Slope	CAL Slope ²⁾	STDA Slope
Yhdiste	RT =			Ero (%)	Ero (%)		
1	Naftaleeni RT = 7,57	0,9998	NFT-d ₈	1,022	0,998	1,065	1,050
2	Asenaftyleeni RT = 11,16	0,9999		1,923	1,887	1,899	1,783
3	Asenaftteeni RT = 11,60	0,9998	ASN-d ₁₀	1,071	1,078	1,105	1,048
4	Fluoreeni RT = 12,79	0,9999		1,302	1,305	1,278	1,272
5	Fenanitreeni RT = 15,04	0,9994		1,101	1,122	1,090	1,084
6	Antraseeni RT = 15,15	0,9997		1,126	1,202	1,262	1,128
7	Fluoranteeni RT = 17,09	0,9996	FEN-d ₁₀	1,267	1,275	0,783	1,103
8	Pyreeni RT = 18,40	0,9992		1,324	1,357	0,704	1,065
9	Bentsol(a)antraseeni RT = 21,32	0,9996		1,088	1,1	1,095	1,081
10	Kryseeni RT = 21,42	0,9997	KRY-d ₁₂	1,088	1,148	1,136	1,041
11	Bentsol(b)fluoranteeni RT = 24,23	0,9997		1,326	1,356	1,574	1,890
12	Bentsol(k)fluoranteeni RT = 24,30	0,9999		1,415	1,395	1,876	1,968
13	Bentsol(a)pyreeni RT = 25,11	0,9999	PER-d ₁₂	1,301	1,378	1,456	0,921
14	Indenol(1,2,3-cd)pyreeni RT = 27,65	0,9990		1,215	1,185	1,343	0,510
15	Dibentsol(a)antraseeni RT = 27,72	0,9999		1,236	1,173	1,167	0,646
16	Bentsol(ghi)peryleeni RT = 28,16	0,9998		1,282	1,231	1,206	0,616

¹⁾Alussa tehdystä kalibrointikuvaajasta laskettu korrelaatiokerroin.

²⁾Alussa tehdystä kalibrointikuvaajasta laskettu kulmakerroin.

³⁾Myöhemmin tehdystä kalibrointikuvaajasta laskettu kulmakerroin.





Liite 2. Taulukoidut saantokoetulokset

Tolueeniuttomenetelmä, 0,2 µg/ml						
Yhdiste	Saantoprosenttien keskiarvo (%)		Keskihajonta (%)		Suhteellinen keskihajonta (%)	
	Hiekka	Bitumi	Hiekka	Bitumi	Hiekka	Bitumi
Naftaleeni	88,2	111,1	6,7	9,3	7,6	8,4
Asenaftyleeni	85,0	136,4	4,1	7,5	4,8	5,5
Asenafteeni	89,3	149,8	5,9	7,4	6,7	5,0
Fluoreeni	92,1	177,1	6,2	11,2	6,8	6,3
Fenantreeni	87,2	218,0	4,0	20,2	4,6	9,2
Antraseeni	87,3	126,5	5,9	9,2	6,7	7,3
Fluoranteeni	103,4	188,8	4,5	19,6	4,4	10,4
Pyreeni	94,9	279,1	5,4	32,8	5,7	11,7
Bentso[a]antraseeni	104,8	153,2	4,0	16,7	3,8	10,9
Kryseeni	82,7	401,6	3,6	41,9	4,4	10,4
Bentso[b]fluoranteeni	123,0	277,4	5,4	20,2	4,4	7,3
Bentso[k]fluoranteeni	102,9	191,9	5,5	23,0	5,4	12,0
Bentso[a]pyreeni	101,1	335,9	3,6	45,0	3,6	13,4
Indeno[1,2,3-cd]pyreeni	93,7	N.A.	5,3	-	5,7	-
Dibentso[ah]antraseeni	68,5	N.A.	4,3	-	6,3	-
Bentso[ghi]peryleeni	69,8	N.A.	4,6	-	6,6	-
Tolueeniuttomenetelmä, 5,0 µg/ml						
Yhdiste	Saantoprosenttien keskiarvo (%)		Keskihajonta (%)		Suhteellinen keskihajonta (%)	
	Hiekka	Bitumi	Hiekka	Bitumi	Hiekka	Bitumi
Naftaleeni	98,6	100,5	4,5	5,0	4,6	5,0
Asenaftyleeni	96,4	98,2	1,6	5,7	1,7	5,8
Asenafteeni	100,7	98,5	2,2	6,5	2,2	6,6
Fluoreeni	99,3	104,6	2,0	6,7	2,0	6,4
Fenantreeni	100,4	107,0	3,0	5,9	3,0	5,5
Antraseeni	101,9	94,6	2,9	5,0	2,8	5,3
Fluoranteeni	101,1	133,1	2,6	10,4	2,6	7,8
Pyreeni	101,7	142,7	3,0	13,0	3,0	9,1
Bentso[a]antraseeni	102,6	104,8	3,4	8,3	3,3	7,9
Kryseeni	101,3	102,9	3,7	8,6	3,6	8,4
Bentso[b]fluoranteeni	98,3	90,1	5,0	8,7	5,1	9,7
Bentso[k]fluoranteeni	95,7	75,6	5,6	6,3	5,8	8,3
Bentso[a]pyreeni	99,3	76,1	3,3	6,6	3,3	8,6
Indeno[1,2,3-cd]pyreeni	86,7	39,0	9,6	4,9	11,1	12,5
Dibentso[ah]antraseeni	90,1	55,6	5,0	7,4	5,5	13,3
Bentso[ghi]peryleeni	92,3	54,9	7,6	6,9	8,3	12,5

Standardinmukainen uutto, hiekka 0,5 µg/ml ja bitumi 0,2 µg/ml						
Yhdiste	Saantoprosenttien keskiarvo (%)		Keskihajonta (%)		Suhteellinen keskihajonta (%)	
	Hiekka	Bitumi	Hiekka	Bitumi	Hiekka	Bitumi
Naftaleeni	51,2	114,2	13,1	13,0	25,5	11,4
Asenaftyleeni	23,7	136,9	6,9	6,5	29,3	4,8
Asenafteeni	23,0	149,2	9,2	5,1	39,9	3,4
Fluoreeni	30,6	161,6	8,6	13,5	28,1	8,3
Fenantreeni	63,7	181,5	9,3	15,3	14,7	8,4
Antraseeni	80,1	114,7	7,0	6,6	8,8	5,8
Fluoranteeni	95,5	117,1	6,8	6,1	7,1	5,2
Pyreeni	93,3	127,7	6,7	13,5	7,2	10,5
Bentso[a]antraseeni	100,7	128,7	8,3	13,6	8,3	10,5
Kryseeni	94,5	283,7	7,8	28,2	8,3	9,9
Bentso[b]fluoranteeni	120,7	309,1	10,6	38,9	8,8	12,6
Bentso[k]fluoranteeni	117,2	208,7	9,7	20,8	8,3	10,0
Bentso[a]pyreeni	112,8	268,5	9,3	48,1	8,2	17,9
Indeno[1,2,3-cd]pyreeni	127,3	116,2	10,8	28,1	8,5	24,2
Dibentso[ah]antraseeni	91,2	153,6	7,8	24,8	8,6	16,2
Bentso[ghi]peryleeni	99,3	237,8	7,6	38,5	7,6	16,2
Standardinmukainen uutto, hiekka 7,5 µg/ml ja bitumi 5,0 µg/ml						
Yhdiste	Saantoprosenttien keskiarvo (%)		Keskihajonta (%)		Suhteellinen keskihajonta (%)	
	Hiekka	Bitumi	Hiekka	Bitumi	Hiekka	Bitumi
Naftaleeni	39,1	88,9	13,6	4,5	34,7	5,1
Asenaftyleeni	73,4	85,6	6,6	3,8	9,0	4,4
Asenafteeni	78,9	86,2	5,2	5,3	6,5	6,2
Fluoreeni	85,3	90,3	3,5	4,0	4,1	4,5
Fenantreeni	86,5	89,5	3,3	5,2	3,8	5,8
Antraseeni	86,8	78,2	3,2	4,5	3,7	5,7
Fluoranteeni	90,3	90,9	3,3	6,3	3,7	7,0
Pyreeni	88,5	88,8	3,1	5,0	3,5	5,6
Bentso[a]antraseeni	99,1	88,0	2,7	5,8	2,8	6,6
Kryseeni	97,1	83,5	2,9	3,8	3,0	4,6
Bentso[b]fluoranteeni	110,0	93,8	7,4	4,0	6,7	4,2
Bentso[k]fluoranteeni	104,2	80,7	6,8	5,9	6,5	7,4
Bentso[a]pyreeni	108,3	79,9	6,8	6,0	6,3	7,5
Indeno[1,2,3-cd]pyreeni	103,3	55,5	6,5	3,3	6,3	5,9
Dibentso[ah]antraseeni	97,5	69,3	6,4	5,6	6,5	8,1
Bentso[ghi]peryleeni	102,0	62,1	6,9	5,7	6,8	9,2

Liite 3. PAH-pitoisuudet täsmällisyyskokeissa

Toluenuuttomenetelmällä tehdyt täsmällisyyskokeet						
Yhdiste	Näyte A		Näyte B		Näyte C	
	Tulos [mg/kg]	%RSD (N=3)	Tulos [mg/kg]	%RSD (N=2)	Tulos [mg/kg]	%RSD (N=2)
Naftaleeni	N.D.	-	2	35,6	5	7,8
Asenaftyleeni	79	6,5	1	2,6	413	2,8
Asenafteeni	7	5,6	3	1,6	26	7,5
Fluoreeni	65	14,9	2	3,2	405	5,2
Fenantreeni	693	16,8	8	0,2	19 132	3,6
Antraseeni	230	9,4	1	15,3	4 463	3,8
Fluoranteeni	833	0,9	6	7,8	720	3,5
Pyreeni	569	1,1	4	8,0	13 361	2,7
Bentso[a]antraseeni	474	7,1	N.D.	-	2 366	6,2
Kryseeni	392	8,9	2	17,2	1 807	6,8
Bentso[b]fluoranteeni	230	7,2	2	0,7	849	3,6
Bentso[k]fluoranteeni	215	8,0	N.D.	-	801	1,1
Bentso[a]pyreeni	220	10,1	N.D.	-	891	1,6
Indeno[1,2,3-cd]pyreeni	98	13,0	N.D.	-	327	7,7
Dibentso[ah]antraseeni	44	2,2	N.D.	-	133	3,0
Bentso[ghi]peryleeni	79	11,5	N.D.	-	295	1,0
Standardinmukaisella menetelmällä tehdyt täsmällisyyskokeet						
Yhdiste	Näyte A		Näyte B		Näyte C	
	Tulos [mg/kg]	%RSD (N=2)	Tulos [mg/kg]	%RSD (N=3)	Tulos [mg/kg]	%RSD (N=2)
Naftaleeni	N.D.	-	5	10,5	7	-
Asenaftyleeni	37	5,0	1	27,1	268	42,6
Asenafteeni	4	1,9	3	20,7	26	-
Fluoreeni	37	4,3	3	17,4	280	47,3
Fenantreeni	483	1,9	16	7,3	3 898	3,3
Antraseeni	144	4,2	2	28,9	929	10,3
Fluoranteeni	622	5,8	9	13,6	4 186	1,0
Pyreeni	432	6,6	6	16,6	110	5,7
Bentso[a]antraseeni	327	5,0	N.D.	-	1 952	9,4
Kryseeni	272	4,1	3	30,5	1 492	7,0
Bentso[b]fluoranteeni	189	1,0	3	32,5	1 322	52,5
Bentso[k]fluoranteeni	183	3,3	N.D.	-	1 286	53,0
Bentso[a]pyreeni	179	0,6	N.D.	-	1 343	54,3
Indeno[1,2,3-cd]pyreeni	59	0,4	N.D.	-	412	51,5
Dibentso[ah]antraseeni	33	9,3	N.D.	-	185	55,8
Bentso[ghi]peryleeni	55	4,3	N.D.	-	364	52,5

Liite 4. Täsmällisyyskokeiden tilastollinen tarkastelu

	Näyte A			Näyte B			Näyte C		
	TOL	P-E	P-arvo	TOL	P-E	P-arvo	TOL	P-E	P-arvo
					5,4				
Naftaleeni	0,0	0,0		1,7	4,8	0,043	4,5	0,0	0,743
	0,0	0,0		2,9	6,0		5,0	6,7	
Asenaftyleeni	82,8	38,2	0,058	1,3	1,1	0,720	404,4	187,3	0,326
	75,6	35,6		1,3	0,9		420,6	348,7	
Asenaftteeni	6,7	4,1	0,064	2,6	3,3	0,208	24,5	0,0	0,499
	7,2	4,2		2,7	2,7		27,3	25,8	
Fluoreeni	57,9	36,0	0,156	2,0	3,4	0,075	390,6	186,2	0,412
	71,6	38,3		1,9	2,4		420,3	373,5	
Fenantreeni	610,7	476,4	0,238	8,5	17,1	0,008	18650,1	3806,1	0,021
	774,8	489,1		8,5	14,7		19614,0	3990,5	
Antraseeni	214,2	140,2	0,117	0,8	2,1	0,095	4343,0	861,4	0,002
	244,8	148,8		0,7	1,2		4582,7	996,8	
Fluoranteeni	838,0	595,8	0,079	5,7	8,6	0,027	702,7	4157,3	9,59E-05
	827,6	647,2		6,3	8,4		738,0	4215,3	
Pyreeni	573,6	412,2	0,095	3,4	5,1	0,030	13103,8	105,3	0,012
	565,0	452,5		3,8	5,4		13619,0	114,1	
Bentso[a]antraseeni	497,4	315,7	0,114	0,0	0,0		2469,0	1822,5	0,131
	449,9	339,0		0,0	0,0		2262,2	2082,4	
Kryseeni	416,9	263,8	0,135	2,0	1,9	0,195	1894,7	1417,3	0,110
	367,4	279,5		1,5	2,4		1720,0	1565,7	
Bentso[b]fluoranteeni	241,4	188,0	0,181	1,8	2,1	0,136	870,5	831,6	0,512
	218,0	190,8		1,8	4,1		827,3	1812,5	
Bentso[k]fluoranteeni	227,1	178,6	0,244	0,0	0,0		807,5	804,2	0,484
	202,8	187,2		0,0	0,0		795,0	1767,6	
Bentso[a]pyreeni	235,8	178,7	0,235	0,0	0,0		901,4	827,5	0,542
	204,4	180,2		0,0	0,0		881,6	1859,0	
Indeno[1,2,3-cd]pyreeni	106,7	59,0	0,146	0,0	0,0		344,7	261,7	0,674
	88,7	59,4		0,0	0,0		308,9	561,8	
Dibentso[ah]antraseeni	44,9	31,0	0,131	0,0	0,0		130,0	111,9	0,606
	43,5	35,4		0,0	0,0		135,6	257,7	
Bentso[ghi]peryleeni	85,8	52,9	0,167	0,0	0,0		297,6	228,9	0,701
	72,9	56,2		0,0	0,0		293,3	499,4	

Liite 5. Tolueeni-uuton menetelmän kehitys

Tolueeni-menetelmä, ei asetonipesua 0,2 µg/ml ja asetonipesu 0,5 µg/ml						
Yhdiste	Saantoprosenttien keskiarvo (%)		Keskihajonta (%)		Suhteellinen keskihajonta (%)	
	TOL	TOL-ACE	TOL	TOL-ACE	TOL	TOL-ACE
Naftaleeni	111,1	83,0	9,3	19,2	8,4	23,1
Asenaftyleeni	136,4	92,7	7,5	16,5	5,5	17,8
Asenaftteeni	149,8	96,8	7,4	14,6	5,0	15,1
Fluoreeni	177,1	105,2	11,2	18,8	6,3	17,8
Fenantreeni	218,0	112,4	20,2	20,4	9,2	18,2
Antraseeni	126,5	84,4	9,2	17,4	7,3	20,6
Fluoranteeni	188,8	92,9	19,6	19,3	10,4	20,8
Pyreeni	279,1	100,5	32,8	22,5	11,7	22,4
Bentso[a]antraseeni	153,2	98,2	16,7	22,4	10,9	22,8
Kryseeni	401,6	164,6	41,9	19,9	10,4	12,1
Bentso[b]fluoranteeni	277,4	170,3	20,2	37,1	7,3	21,8
Bentso[k]fluoranteeni	191,9	116,3	23,0	17,5	12,0	15,1
Bentso[a]pyreeni	335,9	182,8	45,0	66,2	13,4	36,2
Indeno[1,2,3-cd]pyreeni	N.A.	120,4	-	44,0	-	36,5
Dibentso[ah]antraseeni	N.A.	140,4	-	29,9	-	21,3
Bentso[ghi]peryleeni	N.A.	183,9	-	54,2	-	29,5

Liite 6. Kuvat täsmällisyyskokeiden kenttänäytteistä



Liite 7. MUKIT-mittausepävarmuustulosteet

Fenantreeni

Concentration range ()	Reproducibility method	u (Rw) (%)	Bias method	u (bias) (%)	Combined uncertainty (%)	Expanded uncertainty (%)
0,2-9	Control sample and routine sample replicates	3,68	Certified reference material / Control Sample	9,08	9,80	20

Antraseeni

Concentration range ()	Reproducibility method	u (Rw) (%)	Bias method	u (bias) (%)	Combined uncertainty (%)	Expanded uncertainty (%)
0,2-9	Control sample and routine sample replicates	3,64	Certified reference material / Control Sample	9,09	9,79	20

Fluoranteeni

Concentration range ()	Reproducibility method	u (Rw) (%)	Bias method	u (bias) (%)	Combined uncertainty (%)	Expanded uncertainty (%)
0,2-9	Control sample and routine sample replicates	3,91	Certified reference material / Control Sample	2,53	4,65	10

Pyreeni

Concentration range ()	Reproducibility method	u (Rw) (%)	Bias method	u (bias) (%)	Combined uncertainty (%)	Expanded uncertainty (%)
0,2-9	Control sample and routine sample replicates	3,81	Certified reference material / Control Sample	3,81	5,39	11

Naftaleeni

Concentration range ()	Reproducibility method	u (Rw) (%)	Bias method	u (bias) (%)	Combined uncertainty (%)	Expanded uncertainty (%)
0,2-9	Control sample and routine sample replicates	4,87	Certified reference material / Control Sample	8,42	9,73	20

Asenaftyleeni

Concentration range ()	Reproducibility method	u (Rw) (%)	Bias method	u (bias) (%)	Combined uncertainty (%)	Expanded uncertainty (%)
0,2-9	Control sample and routine sample replicates	3,06	Certified reference material / Control Sample	10,94	11,36	23

Asenaftteeni

Concentration range ()	Reproducibility method	u (Rw) (%)	Bias method	u (bias) (%)	Combined uncertainty (%)	Expanded uncertainty (%)
0,2-9	Control sample and routine sample replicates	3,23	Certified reference material / Control Sample	7,56	8,22	17

Fluoreeni

Concentration range ()	Reproducibility method	u (Rw) (%)	Bias method	u (bias) (%)	Combined uncertainty (%)	Expanded uncertainty (%)
0,2-9	Control sample and routine sample replicates	3,66	Certified reference material / Control Sample	5,59	6,68	14

Bentso(a)antraseeni

Concentration range ()	Reproducibility method	u (Rw) (%)	Bias method	u (bias) (%)	Combined uncertainty (%)	Expanded uncertainty (%)
0,2-9	Control sample and routine sample replicates	4,24	Certified reference material / Control Sample	3,86	5,74	12

Kryseeni

Concentration range ()	Reproducibility method	u (Rw) (%)	Bias method	u (bias) (%)	Combined uncertainty (%)	Expanded uncertainty (%)
0,2-9	Control sample and routine sample replicates	4,05	Certified reference material / Control Sample	12,29	12,94	26

Bentso(b)fluoranteeni

Concentration range ()	Reproducibility method	u (Rw) (%)	Bias method	u (bias) (%)	Combined uncertainty (%)	Expanded uncertainty (%)
0,2-9	Control sample and routine sample replicates	5,56	Certified reference material / Control Sample	16,31	17,23	35

Bentso(k)fluoranteeni

Concentration range ()	Reproducibility method	u (Rw) (%)	Bias method	u (bias) (%)	Combined uncertainty (%)	Expanded uncertainty (%)
0,2-9	Control sample and routine sample replicates	6,57	Certified reference material / Control Sample	3,67	7,52	16

Bentso(a)pyreeni

Concentration range ()	Reproducibility method	u (Rw) (%)	Bias method	u (bias) (%)	Combined uncertainty (%)	Expanded uncertainty (%)
0,2-9	Control sample and routine sample replicates	4,07	Certified reference material / Control Sample	0,89	4,17	9

Indeno(1,2,3-cd)pyreeni

Concentration range ()	Reproducibility method	u (Rw) (%)	Bias method	u (bias) (%)	Combined uncertainty (%)	Expanded uncertainty (%)
0,2-9	Control sample and routine sample replicates	11,88	Certified reference material / Control Sample	10,45	15,82	32

Dibentso(h)antraseeni

Concentration range ()	Reproducibility method	u (Rw) (%)	Bias method	u (bias) (%)	Combined uncertainty (%)	Expanded uncertainty (%)
0,2-9	Control sample and routine sample replicates	5,86	Certified reference material / Control Sample	23,38	24,10	49

Bentso(ghi)perylenei

Concentration range ()	Reproducibility method	u (Rw) (%)	Bias method	u (bias) (%)	Combined uncertainty (%)	Expanded uncertainty (%)
0,2-9	Control sample and routine sample replicates	8,88	Certified reference material / Control Sample	22,02	23,74	48