

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Biotekniikka

2017

Tuuli Ruponen

EPÄSPESIFISEN METALLI- IONIEN PITOISUUSMÄÄRITYS- MENETELMÄN KEHITTÄMINEN VESINÄYTTEILLE



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Tuuli Ruponen

EPÄSPESIFISEN METALLI-IONIEN PITOISUUSMÄÄRITYSMENETELMÄN KEHITTÄMINEN VESINÄYTTEILLE

Metallipitoisuuksien määrittäminen juomavedestä ja luonnon lähteistä on noussut mielenkiinnon kohteeksi viime aikoina. Tässä työssä kehitetään menetelmä, jossa terbium ja näytemetalli kilpailevat luminesoivaan ligandiin sitoutumisesta. Menetelmän on tarkoitus olla helppokäyttöinen, jotta sitä voidaan käyttää vähälläkin koulutuksella, ja epäspesifinen, jotta menetelmällä pystyttäisiin määrittämään mahdollisimman montaa eri tyyppistä metalli-ioniä. Tässä työssä tutkitaan Cu^{2+} - ja Fe^{2+} -ionien käyttäytymistä ja selvitetään näiden ionien määritysraja kehitettävällä menetelmällä. Tarkoituksena on löytää kummallekin tutkittavalle ionille modulaattori (usean reagenssin yhdistelmä), jolla saataisiin mahdollisimman pieni pitoisuus erottumaan taustasignaalista ja joka toimisi kummallakin näytemetallilla näissä pienissä pitoisuuksissa. Tuloksena Cu^{2+} -ionin määritysrajaksi saatiin $3 \mu\text{g/l}$ ja Fe^{2+} -ionin $30 \mu\text{g/l}$. Nämä tulokset saatiin käyttämällä eri modulaattoreita, joten menetelmässä on vielä kehittämistä. Yhden, kummallakin metallilla toimivan modulaattorin löytäminen ja käyttö myös yksinkertaistaisi mahdollisia kaupallisia sovelluksia. Jatkossa tulisi myös selvittää, voiko menetelmällä havaita yksittäisten metalli-ionien pitoisuuksia useita metalleja sisältävästä seoksesta.

ASIASANAT:

Fluoresenssi. Juomavesi. Talousvesi. Metallioni. Kupari. Rauta. Luminesenssi. Ligandi. Terbium.

Tuuli Ruponen

THE DEVELOPMENT OF A NON-SPECIFIC METHOD FOR DETECTION OF METAL ION CONCENTRATIONS IN WATER SAMPLES

The detection of metal concentrations in tap water and water from natural sources has become a source of interest lately. This study concentrates on developing a method in which terbium and the sample metal compete for binding with a luminescent ligand. The method is supposed to be easy to use so only a small amount of training is needed and non-specific so that the same method can be used to determine the amount of several different types of metal ions. In this study the ions Cu^{2+} and Fe^{2+} ions were used and the limit of detection for these ions was determined with this method. The purpose of this study was to find a modulator (a combination of multiple reagents) that would separate the smallest possible concentration of the metal ion from the background signal and that would work with both of the used metal ions at these small concentrations. As a result Cu^{2+} -ion's detection limit was found to be 3 $\mu\text{g/l}$ and Fe^{2+} -ion's 30 $\mu\text{g/l}$. These results were achieved by using different modulators, which means the method still needs development. Finding and using a modulator that works with both metals would also simplify possible commercial applications. In the future, the possibility of detecting particular metal ions from a mixture of several metals should be studied.

KEYWORDS:

Fluorescence. Tap water. Drinking water. Metal ion. Copper. Iron. Luminescence. Ligand. Terbium.

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET (TAI SANASTO)	6
1 JOHDANTO	7
2 PERIAATE	9
2.1 Terbiumin fluoresenssi	9
2.2 Spektrofotometrinen mittaus	10
2.3 Vesinäytteet	10
2.4 Metalli-ionien testit	11
3 KOKEELLINEN OSA	13
3.1 Reagenssit & laitteet	13
3.2 Välineet	14
3.3 Työturvallisuus	14
3.4 Työn suoritus	15
4 TULOKSET	32
5 LOPPUPÄÄTELMÄT	33
LÄHTEET	34

KUVAT

Kuva 1. Fluoresenssin synty.	10
Kuva 2. Havainnekuva kaivosta ennen kuivausta. (vaakaviiva: $TbCl_3$ -pisara, pystyviiva: ligandipisara)	17
Kuva 3. Esimerkkejä vesinäytteiden ja metallien välisistä signaaliroista sekä saman näytteen mittausten välisistä eroista ilman ruokasuolan tai hienosokerin lisäystä.	20
Kuva 4. Esimerkkejä metallien ja lisäaineiden (ruokasuola & hienosokeri) aiheuttamista eroista signaaliin aktiivihiliisuodatetussa vedessä. (vrt. Kuva 3 lisäaineettomien, aktiivihiliisuodatettujen näytteiden signaaliin)	21
Kuva 5. Kuparin mittaustulokset suurilla konsentraatioilla.	23
Kuva 6. Raudan mittaustulokset suurilla konsentraatioilla.	24
Kuva 7. Kuparin määritysrajamittauksen tulokset suhteellisella virheellä.	30
Kuva 8. Raudan määritysrajamittauksen tulokset suhteellisella virheellä.	31

TAULUKOT

Taulukko 1. Modulaattorien reagenssien välilaimennokset.	15
Taulukko 2. Välilaimennosten laimennukset modulaattorivahvuuksiin ja modulaattorien osien yhdistäminen.	16
Taulukko 3. Ensimmäisessä mittauksessa käytetyt modulaattorit.	17
Taulukko 4. Ensimmäisessä mittauksessa käytetyt vesinäytteet.	18
Taulukko 5. Ensimmäisen mittauksen laimennussarjat.	19
Taulukko 6. Kyllästetyillä suolaliuoksilla laimennetut reagenssit.	22
Taulukko 7. Kyllästetyn ruokasuolaliuoksen laimennus metallinäytteitä varten.	22
Taulukko 8. Toisessa mittauksessa käytetyt laimennokset.	23
Taulukko 9. Ruokasuola- ja natriumkloridiliuosten laimennus kyllästetyistä liuoksista.	25
Taulukko 10. Laimennukset modulaattorivahvuuksiin 200 g/l natriumkloridiliuoksella ja modulaattorien osien yhdistäminen.	26
Taulukko 11. Tutkimuksiin lisätyt modulaattorit.	27
Taulukko 12. Dequestin välilaimennos.	27
Taulukko 13. Uusien modulaattorien (5 & 6) reagenssien laimennokset ja yhdistäminen.	28
Taulukko 14. Määritysrajamäärityksessä käytetyt näytepitoisuudet.	29

KÄYTETYT LYHENTEET (TAI SANASTO)

FFF	Turun yliopiston funktionaalisten elintarvikkeiden kehittämis- keskus - Functional Foods Forum. (1)
Modulaattori	Yhdestä tai useammasta reagenssista koostuva fluore- soivaan tai luminesoivaan reagenssiin vaikuttava aine tai yh- diste.
AAS	Atomiabsorptiospektrometria
ICP	Induktiivinen plasmasppektrometria

1 JOHDANTO

Käyttökelpoisen juomaveden eräs kriteeri on tarpeeksi alhainen metallipitoisuus. Epäspesifisen menetelmän kehittäminen erilaisten metallien pitoisuuksien määrittämiseksi helpottaisi ja nopeuttaisi juomaveden kelpoisuuden tarkastamista. Menetelmää voitaisiin myös käyttää luonnonvesistöjen metallipitoisuuksien tarkastamiseen, mikä voisi auttaa mahdollisten saastumistilanteiden paikantamisessa ja luokittelussa.

Kehitysmaissa metallien päätyminen juomaveteen on suurempi ja yleisempi riski terveydelle kuin teollisuusmaissa, joissa tapaturmainen tai jopa tahallinen juomaveden saastuminen on kuitenkin mahdollista paremmasta vedenpuhdistusteknologiasta riippumatta. Juomaveden saastuminen saattaa myös aiheuttaa epämiellyttävää makua tai hajua, vaikka metallipitoisuus ei vielä olisikaan myrkyllinen aikuiselle ihmiselle. Metallien tahaton päätyminen veteen voi johtua esimerkiksi putkien korroosiosta tai vaarallisten jätteiden, kuten paristojen, päätymisestä luontoon, josta niiden sisältämät metallit saattavat imeytyä maaperään ja sen kautta pohjaveteen.

Täytyy myös huomioida joidenkin metallien tarpeellisuus ihmisille, mutta liian suuret määrät ovat vaarallisia terveydelle. Nämä metallit voivat myös olla vaarallisia luonnolle, jos niitä jätetään lojumaan ympäriinsä.

Yleisimmät metallienmääritysmenetelmät, atomiabsorptiospektrometria (AAS) ja induktiivinen plasmaspektrometria (ICP), vaativat investointeja kalliisiin laitteisiin, jotka vaativat erityiskoulutuksen omaavia asiantuntevia käyttäjiä. Menetelmät vaativat myös suuria näytetilavuuksia eivätkä ne pysty myöskään erottelemaan metallien hapetustiloja toisistaan.

Ioniselektiivisillä elektrodeilla on myös mahdollista määrittää metallipitoisuuksia. Niiden käyttö on halvempaa ja helpompaa kuin AAS:n tai ICP:n, mutta jokainen metalli-ioni tarvitsee erillisen elektrodin määrittämistä varten.

Näiden menetelmien lisäksi on myös kehitetty erilaisia kolorimetrisiä, spektrofotometrisiä ja fluorometrisiä menetelmiä metalli-ionien määrittämiseen. Näilläkin menetelmillä on ongelmansa, kuten jokaisen metalli-ionin tarve omalle erityiselle määritysprosessille. Fluorometriset menetelmät vaativat myös fluoroionoforeja, joiden syntetisointi vie pitkän ajan ja joita tarvitsee tehdä omanlaisensa jokaiselle tutkittavalle metallille.

Tutkimustyö tehtiin Turun yliopiston kemian laitokselle yhteistyössä Functional Food Forumsin (FFF) kanssa.

2 PERIAATE

2.1 Terbiumin fluoresenssi

Terbium on harvinainen maametalli, jonka kemiallinen merkki on Tb ja järjestysluku 65. Terbiumilla on luonnossa yksi vakaa isotooppi, Tb-159, eikä se lähes koskaan esiinny vapaana metallina vaan osana yhdisteitä tai muiden harvinaisten maametallien kanssa. (2)

Fluoresenssissa atomi tai molekyyli viritetään fotonilla eli atomin tai molekyylin elektroni siirtyy korkeammalle energiatasolle. Tämä viritystila purkautuu nopeasti virityksen jälkeen ja atomi tai molekyyli emittoi fotoneita, jotka voidaan havaita. (3)

Metalli-ionien määrittämiseen näytteistä voidaan käyttää terbiumtrikloridia (TbCl_3), joka nesteessä dissosioituu Tb^{3+} -ioniksi ja kloridi-ioniksi. Tb^{3+} on fluoresoiva ioni, josta saadaan signaali.

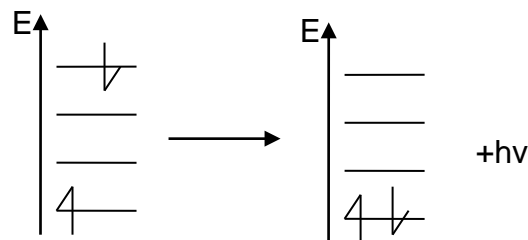
Menetelmässä analysoitava metalli ja terbium kilpailevat ligandiin sitoutumisesta. Näin ollen näytemetalli-ionien läsnäolo nostaa tai laskee luminesenssia riippuen ligandin tyypistä. Aktiivista luminesenssia muodostavan ligandin läsnä ollessa näytemetalli laskee mitattavaa signaalia sammuttamalla luminesenssia tai muodostamalla ei-luminesoivan kompleksin ligandin kanssa. Ei-luminesoivan ligandin ja aktiivista luminesenssia muodostavan ligandin läsnä ollessa ilman näytemetallia luminesoivan Tb^{3+} -kelaatin muodostuminen epäonnistuu ionin sitoutuessa ei-luminesoivaan ligandiin. (4)

Suurissa metalli-ionikonsentraatioissa (yli 0,5 mg/l) metalli sitoutuu myös terbiumiin, mikä johtaa signaalin sammumiseen, vaikka signaali olisikin alun perin ollut nousussa. Konsentraation kasvu vaikutti signaaliin varsinkin kuparinäytteillä ja sama ilmiö huomattiin myös rautanäytteillä. Tämä tarkoittaa sitä, ettei menetelmää voi käyttää suurien metalli-ionikonsentraatioiden määrittämiseen tällaisenaan. Toisaalta nämä metallikonsentraatiot ovat niin suuria, että suurin osa ihmisistä pystyy maistamaan ne juomavedessä. (4)

2.2 Spektrofotometrinen mittaus

Emissiopektrofotometriassa mitataan valoa, jota viritetyt molekyylit tai atomit emittoivat siirtyessään alemmalle energiatilalle. Tässä opinnäytetyössä emissiospektrometrinen määrittäminen perustui fluoresenssiin.

Fluoresenssi itsessään on nopea prosessi, jossa viritetyn elektronin spintila pysyy samana koko prosessin läpi.



Kuva 1. Fluoresenssin synty.

Fluoresenssispektrometriä käytettäessä laite virittää näytteen molekyylit ylemmälle energiatasolle ja detektoi virityksen purkautuessa syntyvän säteilyn intensiteettiä aallonpituuden funktiona.

Fluoresenssispektrometrian käyttäminen tutkimuksissa edellyttää, että tutkittava yhdiste fluoresoi tai siitä voi valmistaa fluoresoivan johdoksen. Tutkittavan yhdisteen on myös absorboitava viritysvaloa riittävä määrä fluoresenssin synnyttämiseksi. Jos yhdiste täyttää nämä ehdot, fluoresenssi on hyvin herkkä määrittämenetelmä.

Edellä mainittujen lisäksi näytteen lämpötila ja pH vaikuttavat voimakkaasti aineiden fluoresenssitehokkuuteen. (5)

2.3 Vesinäytteet

Työssä käytettiin pääasiassa kahta erityyppistä vesinäytettä. MilliQ-suodatettua vettä käytettiin näytteiden vertailussa.

Toinen vesinäyte oli normaalista Turun keskustan lähistöllä sijaitsevan asunnon keittiöhanasta ja toinen FFF:n aktiivihiihluuodatettua vesijohtovettä. Nämä kaksi vesilähdettä valittiin tutkimukseen liittyvän ihmispaneelin takia, joka suoritettaisiin FFF:n tiloissa.

Aistinvaraisissa tutkimuksissa käytetään aktiivihiihluuodatettua vesijohtovettä, koska suodatuksen tulisi poistaa kaikki ihmispaneelin tuloksia mahdollisesti vääristävät maut ja hajut vedestä.

Vesijohtovettä käytettiin, koska päätarkoituksena oli kehittää menetelmä, jolla voitaisiin määrittää pieniäkin metallipitoisuuksia talousvedestä, jossa saattaa olla läsnä muitakin metalli-ioneja ja epäpuhtauksia.

Työssä selvitettiin myös kemiallisen mittauksen tarkkuus testaamalla kahta eri vesinäytettä. Tavoitteena oli todistaa kemiallisen menetelmän parempi luotettavuus sen objektiivisuuden ja toistettavien tulosten takia verrattuna ihmispaneeliin.

Näytteenoton jälkeen vesinäytteet pakastettiin yliopiston pakastimessa, josta niitä otettiin sulamaan huonelämpötilaan tai jääkaappiin sen mukaan tehtiinkö analyysit seuraavana päivänä vai viikonlopun jälkeen.

2.4 Metallionien testit

Kemiallinen analyysimenetelmä kehitettiin erityisesti kupari- ja rautaionien määrittämiseen. Työssä päädyttiin näihin metalleihin, koska niitä voi olla suuriakin pitoisuuksia hanavedessä ja ne aiheuttavat veteen pahaa makua ja hajua. Testeissä käytettiin hapetusluvun +II omaavia ioneja, jotka saatiin kupari(II)sulfaatista ja rauta(II)sulfaatista. Työn kokeelliseen osaan kuuluivat kemiallinen testaus ja maistelutestaus.

Kemiallisessa menetelmässä vesinäytteisiin laimennettiin eri konsentraatioita kupari- ja rautaioneja. Metallionit reagoisivat kuoppalevyn kuoppiin kuivattujen reagenssien kanssa, mikä aiheuttaisi fluoresenssireaktion. Fluoresenssi voitai-

siin mitata ja näytteiden antamaa signaalia voitaisiin sitten verrata nollanäytteen, jossa oli pelkkää vettä.

Näitä ioneja sisältävää vettä voi myös maistella melko turvallisesti, sillä ei ole suurta riskiä, että ne aiheuttaisivat terveyshaittoja. Ioneja on myös tutkittu aiemmissa maistelukokeissa ja niille on olemassa tunnetut maistorajat. Kupari-ioneja sisältävälle juomavedelle raja on 0,61 mg/l ja rautaioneja sisältävälle juomavedelle raja on 0,031 mg/l. (6)

3 KOKEELLINEN OSA

Vesinäytteitä otettiin muovisiin säiliöihin. Mittauksissa ei aina käytetty samalla kerralla otettua näytettä. Vettä juoksutettiin hanasta noin viisi minuuttia ennen näytteenottoa. Näytteet pakastettiin kemian laitoksen pakastimessa näytteenoton jälkeen niin nopeasti kuin oli mahdollista, sillä näytteenottopisteiden ja kemian laitoksen välimatka on noin puoli kilometriä.

3.1 Reagenssit & laitteet

Lämpökaappi

Levysekoitin

Spektrofotometri (Labrox Plate Reader)

Aktiivihiiisuodatettu vesijohtovesi FFF:n tiloista

Suodattamaton hanavesi turkulaisesta kerrostaloasunnosta

Rauta(II)sulfaatti (FeSO_4 , Sigma-Aldrich, 31236-100G, SZBE310V, iron (II) sulfate hephhydrate)

MilliQ-vesi

Ruokasuola (Pirkka, Jodioitu ruokasuola, valmistuttaja: Ruokakesko Oy)

Hienosokeri

Natriumkloridi (NaCl , Sodium chloride for analysis, EMSURE, Merck KGaA, 1.06404.1000, K42436404 142)

Suolahappo (HCl , Hydrochloric acid, BDH Chemicals Limited)

Kupari(II)sulfaatti ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, copper (II) sulphate pentahydrate, Riedel-de Hään)

Rauta(III)kloridi (Iron (III) chloride hexahydrate, Acros organics, 423700050, A0332287)

DTPA (Diethylene triamine penta-acetic acid, Sigma-Aldrich)

CDA (Chelidamic acid, Sigma-Aldrich)

Tiron (4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulphonic acid disodium salt monohydrate, Acros Organics)

Dequest 2060 (Diethylene triamine pentakis (methylphosphonic acid), Sigma Aldrich)

3.2 Välineet

Musta OptiPlate 96-kuoppalevy (PerkinElmer)

Pipetti (Biohit Proline 1-5 ml, Biohit)

Pipetti (Biohit Proline 100-1000 µl, Biohit)

Pipetti (Biohit Proline 20-200 µl, Biohit)

Pipetti (Biohit Proline 0,5-10 µl, Biohit)

Monikanavapipetti (Biohit mLine 30-300 µl, Biohit)

Monikanavapipetti (Biohit mLine 0.5-10 µl, Biohit)

Levynpeittoteippi

3.3 Työturvallisuus

Suurimmaksi osaksi työssä käsitellyt metalli-ionipitoisuudet olivat niin pieniä, etteivät ne aiheuta vahinkoa ihmisille. Toisaalta kantaliuokset joista näytteet laimennettiin olivat niin vahvoja, että niitä käsitellessä oli pidettävä laborato-

riohanskoja. Liuokset oli myös pyyhittävä heti pois, jos niitä läikkyi pöydälle tai hanskoille, vaikka ne eivät aiheuttaneetkaan välitöntä vaaraa työntekijälle.

Näytteiden mittauksen jälkeen kuoppalevyt asetettiin vetokaappiin, jossa niistä haihdutettiin vesi. Kuivuneet levyt heitettiin polttokelpoiseen jätteeseen, sillä niissä olevat kemikaalijäämät olivat käytännössä olemattomia, ja joissain tapauksissa täysin vaarattomia.

Ennen näytteiden laimennosta valmisteltiin kuoppalevyt ja reagenssit lukuun ottamatta näyteliuoksia.

3.4 Työn suoritus

Ensimmäisissä mittauksissa modulaattorireagensseina toimivat $TbCl_3$, CDA, DTPA ja Tiron eri suhteissa modulaattorista riippuen. Tarvittavat konsentraatiot reagensseja laimennettiin aiemmin (1/2014) valmistetuista kantaliuoksista välilaimennoksella. (Taulukko 1)

Taulukko 1. Modulaattorien reagenssien välilaimennokset.

Reagenssit	Alkukonsentraatio (M)	Loppukonsentraatio (μM)	Laimennossuhteet (reagenssi / MQ- H_2O) (μl)	
$TbCl_3$	0,1	1000	1	99
CDA	0,25	1000	6	1590
Tiron	0,25	1000	1	249
DTPA	0,25	1000	2	598

Välilaimennokset tehtiin tarvittavien reagenssien alhaisten loppukonsentraatioiden takia. (Taulukko 2)

Taulukko 2. Välilaimennosten laimennukset modulaattorivahvuuksiin ja modulaattorien osien yhdistäminen.

Reagenssit	Alkukonsent-raatio (μM)	Loppukonsent-raatio (μM)	Laimennossuhteet (reagenssi(t) (μl) / MQ-H ₂ O (ml))
TbCl ₃	1000	5	25 μl + 4,98 ml
CDA	1000	20	80 μl + 80 μl + 3,84 ml
DTPA			
CDA	1000	250	1000 μl + 200 μl + 2,8 ml
DTPA		50	
CDA	1000	50	200 μl + 3,8 ml
Tiron	1000	50	200 μl + 3,8 ml

Testeissä käytetyt modulaattorit valittiin aiempien tutkimustulosten perusteella.

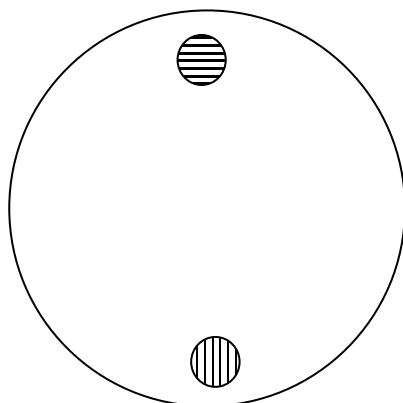
(4) Tutkimuksessa käytetyt kuoppalevyt olivat mustia OptiPlate 96-levyjä, jotka valittiin terbiumin luminesoivan luonteen takia.

Modulaattoreina käytettiin yhdistelmiä, joissa jokaisessa oli 5 μM TbCl₃:a ja modulaattorista riippuva konsentraatio yhtä tai useampaa ligandina toimivaa reagenssia. (Taulukko 3) Tämän lisäksi jokaiselle modulaattorille tehtiin kaksi levyä, joista toisessa mitattiin kupari- ja toisessa rautaionien antamaa signaalia.

Taulukko 3. Ensimmäisessä mittauksessa käytetyt modulaattorit.

Modulaattorinnumero	Reagenssien suhteet
1	5 μM TbCl_3 + (20 μM CDA + 20 μM DTPA)
2	5 μM TbCl_3 + (250 μM CDA + 50 μM DTPA)
3	5 μM TbCl_3 + (50 μM CDA)
4	5 μM TbCl_3 + (50 μM Tiron)

Levyille kuivattiin 3 μl :n pisara 5 μM TbCl_3 :a ja 3 μl :n pisara yhtä modulaattoria. Pisarat aseteltiin kuoppiin, niin etteivät ne koskisi toisiaan ja aloittaisi mittaukseen vaadittavaa reaktiota ennen aikojaan. (Kuva 2)



Kuva 2. Havainnekuva kaivosta ennen kuivausta. (vaakaviiva: TbCl_3 -pisara, pystyviiva: ligandipisara)

Kuivaus suoritettiin 76 °C:ssa lämpökaapissa ja kesti noin 30 minuuttia. Ennen levyjen asettamista kuivaukseen tarkistettiin, ettei levyjen liikuttaminen ollut yhdistänyt pisaroita. Jos yhdistyneitä pisaroita oli, yhdistyneet pisarat sisältävän kaivon kirjain ja numero kirjattiin muistiin, jotta sen mittausrvot voitaisiin poistaa vääristämästä lopullisia tuloksia.

Koska levyjä tehtiin usein useampia kuin niitä tarvittiin kerralla tai ne tehtiin päivän päätteeksi, kuivauksen jälkeen levyt peitettiin levynpeittoteipillä, joka esti mittausta häiritsevien pienhiukkasten pääsyn kuoppiin. Levyjä säilytettiin pimeässä ja huoneenlämmössä kuivauksen ja mittausten välissä.

Muidenkin prosessin osien aikana vältettiin pienhiukkasten ja muiden häiritsevien tekijöiden päätyminen näytteeseen tai kaivoon, muun muassa välttämällä pipetin kärjen koskemista muuhun kuin ilmaan tai reagensseihin. Toisaalta työskentelyyn ei kuitenkaan käytetty esimerkiksi vetokaappia, joka olisi lisännyt prosessin puhtautta.

Taulukko 4. Ensimmäisessä mittauksessa käytetyt vesinäytteet.

Vesinäyte	Lisätyt aineet
Aktiivihiihisiuodatettu vesi	-
Aktiivihiihisiuodatettu vesi	25 g/l ruokasuola
Aktiivihiihisiuodatettu vesi	25 g/l hienosokeri
Suodattamaton FFF:n vesi	-
Vanhempi aktiivihiihisiuodatettu vesi	-
Vanhempi suodattamaton vesi	-
Keittiön hanavesi	-
MQ-vesi	25 g/l suolaa

Vesinäytteistä (Taulukko 4) valmistettiin jatkonäytteitä, joihin laimennettiin useita eri konsentraatioita metalli-ioneja (Taulukko 5) vahvemmassa 20 g/l kantaliuoksesta. Cu^{2+} -liuos (tästä eteenpäin kupari) oli tehty aikaisemmin. Fe^{2+} -liuos (tästä eteenpäin rauta) tehtiin mittauspäivänä.

Rauta(II)sulfaatista jouduttiin tekemään uusi kantaliuos jokaista mittausta varten sen nopean hapettumisen vuoksi. Hapettuminen johti ionien aggregoitumiseen ja muutokseen liuoksen värissä, joka olisi vaikuttanut tuloksiin vääristävästi.

Näytteitä pipetoitiin 100 μl /kaivo kuoppalevyille laimennussarjoina siten, että jokaista näytettä tuli triprikaattina.

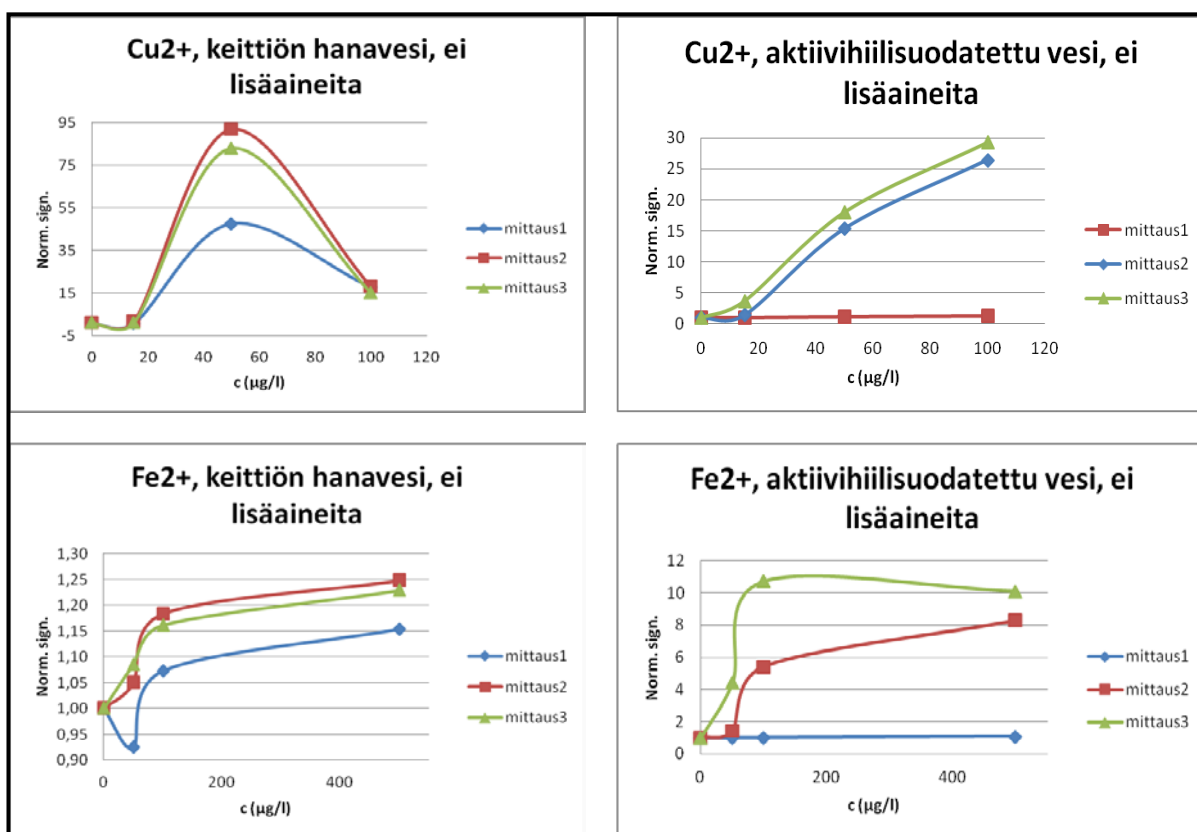
Taulukko 5. Ensimmäisen mittauksen laimennussarjat.

c (Cu²⁺) / (µg/l)	c (Fe²⁺) / (µg/l)
100	500
50	100
15	50
0	0

Levyjä sekoitettiin huoneenlämmössä levysekoittimella noin minuutti ennen mitausta.

Mittaus suoritettiin 330 nm eksitaatiolla ja 545 nm emissiolla, koska terbiiumille tyypillinen emissiospektrumien piikki on 544 nm:ssä (4) ja saatavilla olevista emissiofilttereistä 545 nm oli lähimpänä terbiiumin emissiospektrumien piikkiä. Jokainen levy mitattiin kolmesti, jotta saataisiin selville ajan ja inkubaation vaikutukset tuloksiin. Inkubaatiot suoritettiin mittausten välissä huoneenlämmössä ja jokainen niistä kesti tunnin.

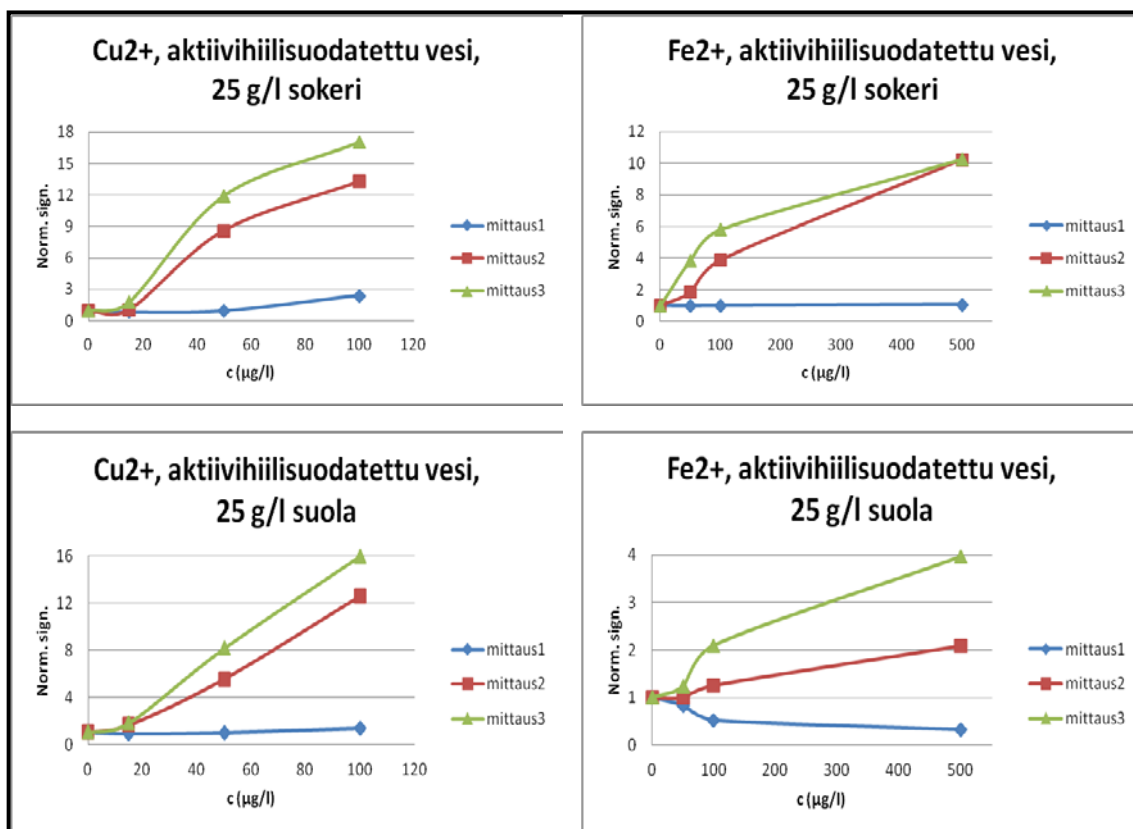
Ensimmäisistä määrityksistä alkaen oli selvää, että inkubointi lisäsi signaali/tausta-suhdetta, mutta pidempi inkubointi ei aina tuottanut suurempaa muutosta, joten jatkettiin mittauksia suunnitellusti. Huomattiin myös kuparin erottuvan rautaa herkemmin taustasignaalista. (Kuva 3)



Kuva 3. Esimerkkejä vesinäytteiden ja metallien välisistä signaaliroista sekä saman näytteen mittausten välisistä eroista ilman ruokasuolan tai hienosokerin lisäystä.

Koska projektin alussa suunniteltiin ruokasuolan ja hienosokerin käyttämistä metallien maun peittämiseen aistinvaraisessa tutkimuksessa, myös näiden yhdisteiden vaikutukset mittauksiin täytyi selvittää. (Kuva 4)

Myöhemmin kuitenkin aistinvaraisessa tutkimuksessa luovuttiin maun peittämis-ideaista, mutta kemiallisessa tutkimuksessa oli tässä vaiheessa jo havaittu ruokasuolan vaikuttavan tuloksiin positiivisesti ja ilmiötä haluttiin tutkia tarkemmin. Hienosokeri ei vaikuttanut tuloksiin luotettavasti.



Kuva 4. Esimerkkejä metallien ja lisäaineiden (ruokasuola & hienosokeri) aiheuttamista eroista signaaliin aktiivihiihiisuodatetussa vedessä. (vrt. Kuva 3 lisäaineettomien, aktiivihiihiisuodatettujen näytteiden signaaliin)

Ensimmäisten mittausten tulosten takia haluttiin selvittää aiheuttiko ruokasuolassa oleva lisäaine (esimerkiksi jodi) paremmat tulokset vai johtuiko vaikutus itse natriumkloridista.

Aloitettiin, tutkimalla vaikuttaako reagenssi, johon suola tai natriumkloridi lisätään lopullisiin tuloksiin. Reagensseina tässä tapauksessa olivat modulaattori 2:n eri osat (250 µM CDA + 50 µM DTPA), koska ruokasuola oli antanut suurimman signaalieron taustasignaaliin tällä modulaattorilla. Tämän modulaattorin kanssa terbium ja metalli-ioni kilpailevat ligandiin sitoutumisesta eli korkeammilla metallikonsentraatioilla saadaan korkeampi signaaliero.

Käytettiin kahta eri konsentraatiota ruokasuola- ja natriumkloridiliuoksista: 200 g/l liuosta ja kyllästettyä liuosta (ruokasuola: 338 g/l & NaCl: 336 g/l). Näitä liu-

oksia käytettiin myös reagenssien laimennuksessa, jotta voitaisiin selvittää vaikuttaako vaihe, jossa suolaliuos lisättiin saataviin tuloksiin.

MilliQ-vedellä ja 200 g/l liuoksella laimennetut reagenssit laimennettiin kuten Taulukossa 2. Kyllästetyillä liuoksilla laimennetut reagenssit laimennettiin kuten Taulukossa 6, paitsi terbium kuten Taulukossa 2.

Taulukko 6. Kyllästetyillä suolaliuoksilla laimennetut reagenssit.

Reagenssit	Alkukonsentraatio (µM)	Loppukonsentraatio (µM)	Laimennossuhteet (reagenssit (µl) + kyllästetty ruokasuola- tai NaCl-liuos (ml))
CDA	1000	250	500 µl + 100 µl + 3,4 ml
DTPA	1000	50	

Kyllästetyillä liuoksilla laimennettuja reagensseja pipetoitiin 7,1 µl/kuoppa 3 µl:n sijaan oikeiden reagenssisuhteiden saavuttamiseksi. Muuten levyt tehtiin samoin kuin aiemmin.

Kyllästetystä ruokasuolaliuoksesta tehtiin 25 g/l laimennokset, joita käytettiin metallinäytteiden laimennukseen. (Taulukko 7)

Taulukko 7. Kyllästetyn ruokasuolaliuoksen laimennus metallinäytteitä varten.

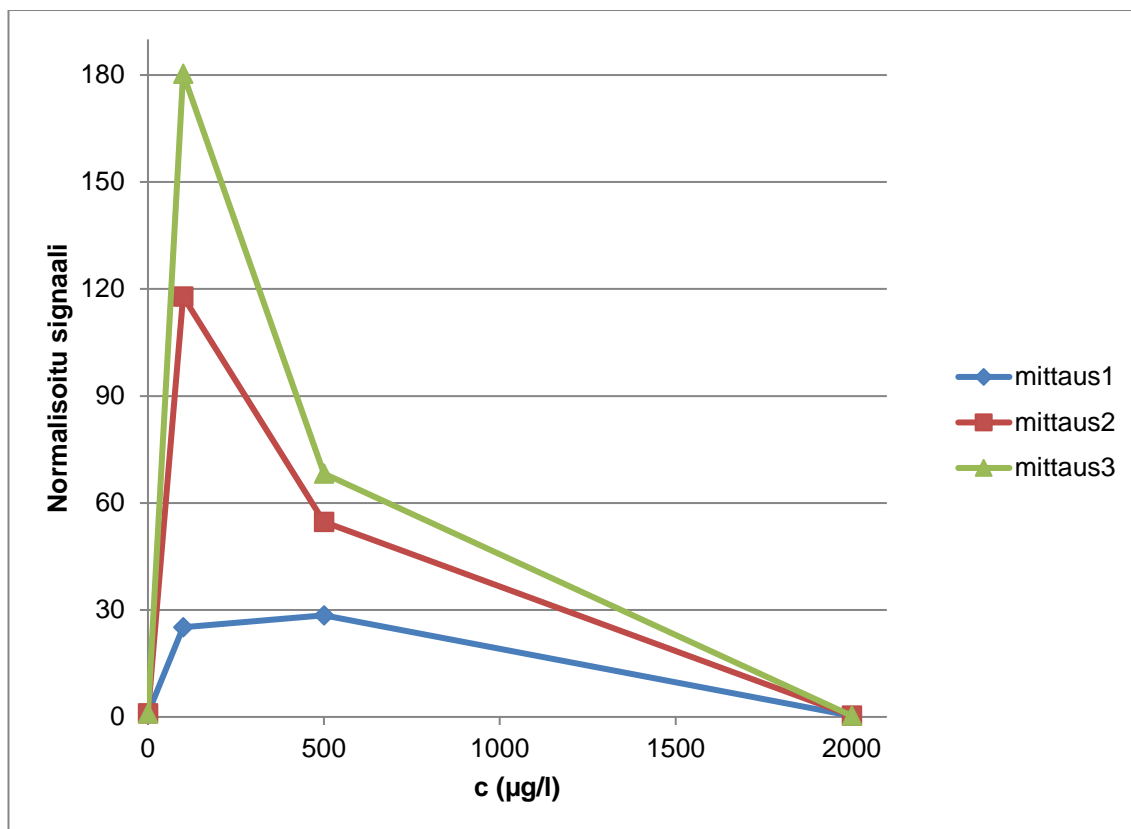
Reagenssi	Alkukonsentraatio (g/l)	Loppukonsentraatio (g/l)	Laimennossuhteet (reagenssi (µl) + MQ-H ₂ O tai hanavesi (ml))
Ruokasuolaliuos	338	25	296 µl + 3,70 ml

Tutkimuksessa haluttiin myös selvittää korkeampien konsentraatioiden vaikutusta, joten testilaimennokset olivat 100-2000 µg/l. (Taulukko 8)

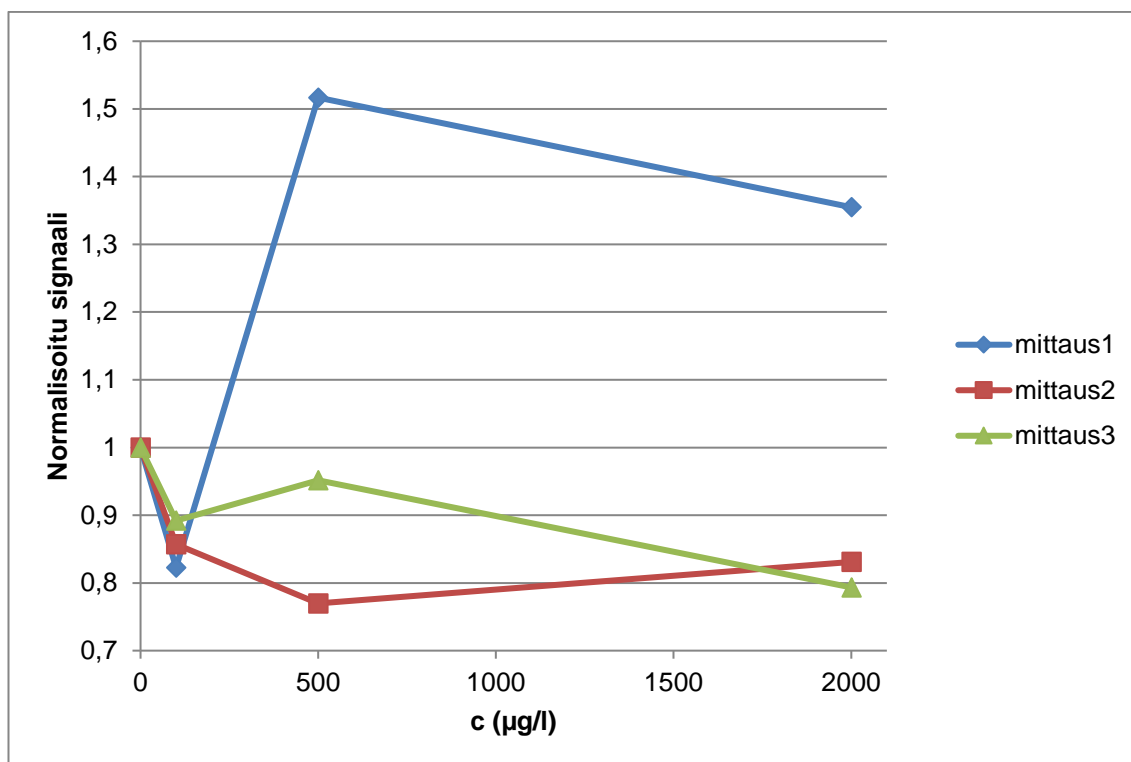
Taulukko 8. Toisessa mittauksessa käytetyt laimennokset.

$c(\text{Cu}^{2+}) / (\mu\text{g/l})$	$c(\text{Fe}^{2+}) / (\mu\text{g/l})$
2000	2000
500	500
100	100
0	0

Tuloksia (Kuva 5 ja 6) tarkastellessa kävi selväksi, että kupari aiheuttaa signaalin sammumista korkeammilla konsentraatioilla. Raudalla ei todettu olevan samanlaista vaikutusta.



Kuva 5. Kuparin mittaustulokset suurilla konsentraatioilla.



Kuva 6. Raudan mittaustulokset suurilla konsentraatioilla.

Tässä tapauksessa sammumista alkoi tapahtua 500 µg/l ja 2000 µg/l metalli-ionikonsentraatioiden välissä. Huomattiin myös, että reagenssilla tai prosessin-vaiheella, johon ruokasuola tai natriumkloridi lisättiin ei ollut huomattavaa vaikutusta tuloksiin ainakaan modulaattorilla 2. Prosessinvaiheella tarkoitetaan sitä, lisättiinkö lisäaine modulaattoreihin ennen välilaimennosta, välilaimennoksen jälkeen vai vasta näytteen laimennoksessa.

Näiden tulosten takia haluttiin tutkia vaikuttaako ruokasuolan lisäys myös muilla modulaattoreilla. Tämän lisäksi tutkittiin pH:n vaikutusta raudan määrittämiseen, sillä pH:n alentaminen saattaa parantaa raudan havaitsemista.

Raudan kantaliuoksen pH:ta alennettiin liuottamalla rauta(II)sulfaatti 10 mM suolahappoon. Vertailun vuoksi tehtiin kantaliuos raudasta myös MilliQ-veteen. Kupari(II)sulfaatti oli liuotettu MilliQ-veteen kantaliuosta tehtäessä.

Näytekonsentraatiot olivat 100-2000 µg/l eli samat kuin edellisessä mittaussarjassa.

Laimennettiin taas osa reagensseista suolaliuoksilla. Tällä kertaa käytettiin 25 g/l konsentraatioista ruokasuola- ja natriumkloridiliuosta, joka laimennettiin kylästetyistä liuoksista vesinäytteeseen ennen metalli-ionien liuottamista näytteeseen ja 200 g/l konsentraatioista natriumkloridiliuosta, joka laimennettiin kyllästetystä liuoksesta MilliQ-vedellä. (Taulukko 9) 200 g/l natriumkloridiliuosta käytettiin modulaattorien reagenssien laimentamiseen. (Taulukko 10) Laimennettiin modulaattoreita myös normaalisti puhtaalla MilliQ-vedellä.

Taulukko 9. Ruokasuola- ja natriumkloridiliuosten laimennus kylästetyistä liuoksista.

Reagenssit	Alkukonsentraatio (g/l)	Loppukonsentraatio (g/l)	Laimennossuhteet (reagenssi + H ₂ O)
Ruokasuola	338	25	511 µl + 5,889 ml
Natriumkloridi	336	25	515 µl + 5,885 ml
		200	7,74 ml + 5,26 ml

Taulukko 10. Laimennukset modulaattorivahvuuksiin 200 g/l natriumkloridiliuoksella ja modulaattorien osien yhdistäminen.

Reagenssit	Alkukonsentraatio (μM)	Loppukonsentraatio (μM)	Laimennossuhteet (reagenssi(t) (μl) / 200 g/l NaCl (ml))
TbCl ₃	1000	5	25 μl + 4,98 ml
CDA	1000	20	80 μl + 80 μl + 3,84 ml
DTPA			
CDA	1000	250	1000 μl + 200 μl + 2,8 ml
DTPA		50	
CDA	1000	50	200 μl + 3,8 ml
Tiron	1000	50	200 μl + 3,8 ml

Suolaliuoksella laimennettua kupari- tai rautanäytettä ja suolaliuoksella laimennettua modulaattoria ei käytetty samassa kaivossa, jotta voitaisiin erottaa suolaa sisältävien reagenssien vaikutukset ja niiden mahdollisesti antamat erot signaalissa.

Näiden mittausten perusteella päädyttiin johtopäätökseen, että ruokasuolan ja natriumkloridin antamat tulokset eivät eroa toisistaan huomattavasti, joten jatkettiin tutkimuksia puhtaalla natriumkloridilla. Tavoitteena oli päästä mahdollisimman hyvään toistettavuuteen.

Huomattiin myös, ettei suolahapon lisäys parantanut tuloksia tarpeeksi, jotta sen käyttöä raudan laimentamiseen kannattaisi jatkaa.

Seuraaviin mittauksiin otettiin mukaan kaksi modulaattoria lisää, jotka nimettiin modulaattoreiksi 5 ja 6. Näitä modulaattoreita oli käytetty aiemmissa tutkimuk-

sisä, joissa niiden oli huomattu toimivan hyvin samankaltaisissa metallien määrityksissä. (4)

Taulukko 11. Tutkimuksiin lisätyt modulaattorit.

Modulaattorinumero	Reagenssien suhteet
5	5 μM TbCl_3 + (500 μM CDA + 20 μM Dequest 2060)
6	5 μM TbCl_3 + (20 μM CDA + 10 μM Dequest 2060)

Reagensseille tehtiin välilaimennokset kuten Taulukossa 1. Dequest 2060 (tästä eteenpäin Dequest) oli aiemmista tutkimuksista valmiiksi laimennettuna (18.09.13) 0,0244 M vahvuiseksi, josta sitä laimennettiin MilliQ-vedellä 1 mM vahvuuteen. (Taulukko 12)

Taulukko 12. Dequestin välilaimennos.

Reagenssi	Alkukonsentraatio (mM)	Loppukonsentraatio (mM)	Laimennossuhteet (reagenssi (μl) + MQ- H_2O (μl))
Dequest	24,4	1	12,3 μl + 288 μl

Näistä välilaimennoksista laimennettiin modulaattorien vaatimat reagenssivahvuudet. Modulaattorit 1-4 kuten Taulukossa 2 ja modulaattorit 5-6 kuten Taulukossa 13.

Taulukko 13. Uusien modulaattorien (5 & 6) reagenssien laimennokset ja yhdistäminen.

Reagenssit	Alkukonsentraatio (µM)	Loppukonsentraatio (µM)	Laimennossuhteet (reagenssit (µl) + MQ-H ₂ O (ml))
CDA	1000	500	2000 µl + 80 µl + 1,92 ml
Dequest		20	
CDA	1000	20	80 µl + 40 µl + 3,88 ml
Dequest		10	

Vesinäytteenä toimi hanavesi. Näytepitoisuudet kuparilla olivat tällä kertaa 20 µg/l, 50 µg/l ja 100 µg/l ja raudalla 50 µg/l, 100 µg/l ja 500 µg/l. Osaan näytteistä laimennettiin myös 25 g/l natriumkloridi kyllästetystä liuoksesta. Tehtiin myös testit suolahappoon laimennetun raudan kanssa, jotta voitaisiin olla varmoja suolahapon vaikutuksesta raudan käyttäytymiseen kaikkien käytettyjen modulaattorien kanssa.

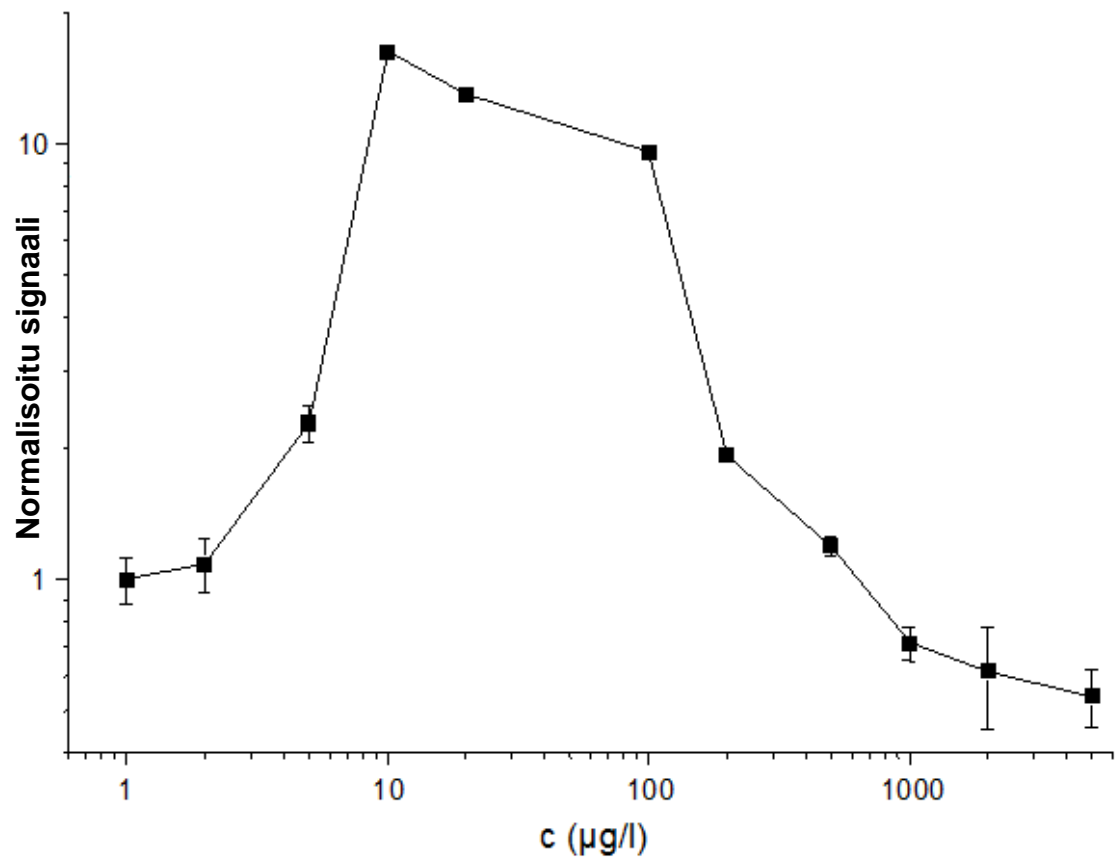
Suolahappo ei vaikuttanut huomattavasti tuloksiin uusienkaan modulaattorien kanssa, joten sen käytöstä mittauksissa luovuttiin kokonaan. Suolahappoa ei myöskään käytetty menetelmän määritysrajaa määritettäessä edellä mainituista syistä.

Menetelmän määritysraja määritettiin suorittamalla mittauksia FFF:n aktiivihiili-suodatetulla vedellä ja asunnosta saadulla hanavedellä. Käytettiin myös näytteitä, joissa oli 25 g/l natriumkloridi. Metallipitoisuudet kaikille vesinäytetyypeille olivat 0-5000 µg/l:ssa. (Taulukko 14) Tällä kertaa rinnakkaisnäytteitä oli neljä tarkemman herkkyyden saamiseksi.

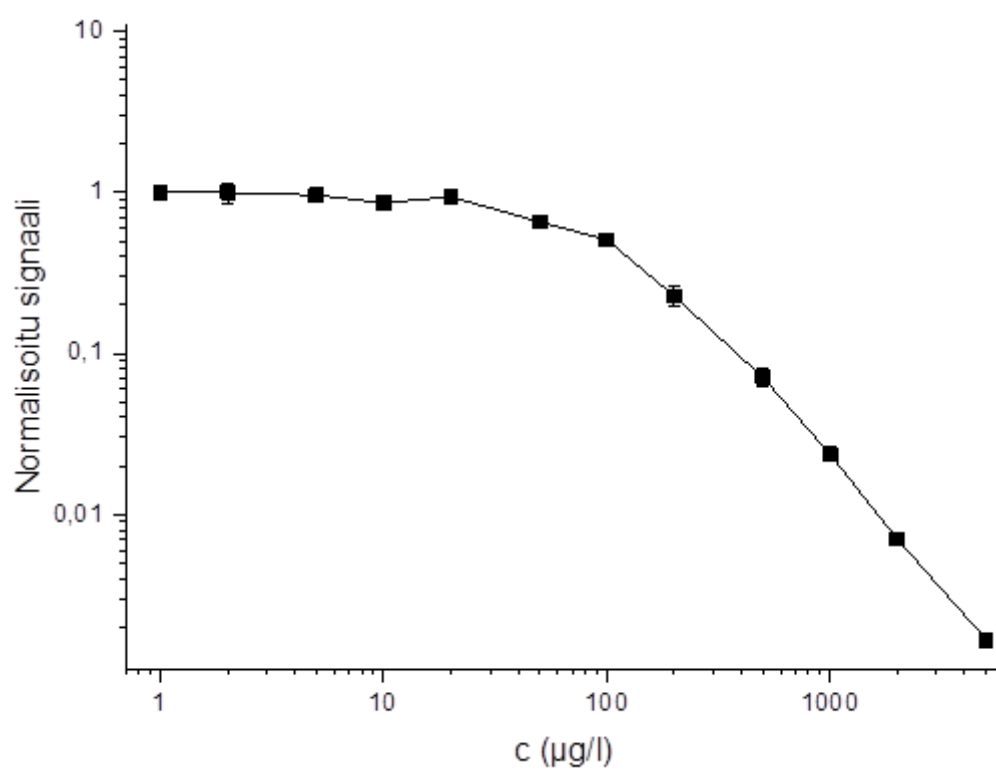
Taulukko 14. Määritysrajamäärityksessä käytetyt näytepitoisuudet.

Kuparin tai raudan pitoisuus näytteessä (µg/l)
0
2
5
10
20
50
100
200
500
1000
2000
5000

Näillä konsentraatioilla tehdyistä mittauksista saaduista tuloksista tehtiin kuvaajat suhteellisella virheellä. (Kuva 7 ja Kuva 8) Kuvaajien avulla selvitettiin alhaisin pitoisuus, jolla näyte- ja taustasignaali pystyttiin erottamaan toisistaan.



Kuva 7. Kuparin määritysrajamittauksen tulokset suhteellisella virheellä.



Kuva 8. Raudan määritysrajamittauksen tulokset suhteellisella virheellä.

4 TULOKSET

Kummallekin tutkitulle metalli-ionille suoritettiin määritysrajatutkimus, jolla selvitetiin kuinka pieniä arvoja menetelmällä pystytään luotettavasti määrittämään.

Cu^{2+} -ionilla määritysrajaksi saatiin 3 $\mu\text{g/l}$ ja Fe^{2+} -ionilla 30 $\mu\text{g/l}$. Valitettavasti nämä tulokset saatiin eri modulaattoreilla, joten menetelmässä on vielä kehittämistä.

Kuparin määityksessä tulokset saatiin lisäämällä 25 g/l natriumkloridia näytteeseen. Raudalla taas natriumkloridin lisäys ei vaikuttanut tuloksiin luotettavasti.

Kuparilla alhaisimmat pitoisuudet saatiin erotettua taustasignaalista modulaattorilla 6 (20 μM CDA + 10 μM Dequest2060) kun taas raudalla kyseessä oli modulaattori 4 (50 μM Tiron).

Aistinvaraiseen tutkimukseen osallistui 39 vapaaehtoista. Näistä osallistujista (36 %) maistoi raudan näytteessä kun pitoisuus oli vasta 5 $\mu\text{g/l}$, mikä on huomattavasti alhaisempi kuin kemiallisella menetelmällä. Kuparilla sama pitoisuus oli 10 $\mu\text{g/l}$, jonka maistoi 51 % osallistujista, mikä on selvästi korkeampi pitoisuus kuin kemiallisella menetelmällä. Toisaalta nämä pitoisuudet olivat alhaisimmat testissä käytetyt pitoisuudet, joten alhaisempien pitoisuuksien maistaminen on mahdollista.

Tutkimuksen aikana nousi myös kysymys rinnakkaisnäytteiden määrästä määrittämisluemittauksissa. Rinnakkaisten mittausten lisääminen kasvattaisi tulosten luotettavuutta.

5 LOPPUPÄÄTELMÄT

Kehitetty menetelmä on yksinkertainen tapa määrittää metalli-ionien pitoisuuksia vesinäytteistä. Menetelmän käyttö ei myöskään tarvitse erikoiskoulutusta tai erityisen kalliita laitteita. Epäspesifisyys tuo menetelmään myös monipuolisuutta, koska sitä voidaan käyttää monien eri metalli-ionien havaitsemiseen.

Menetelmän optimointi olisi tarpeellista, jotta saataisiin rautaionien määrittämisen määritysraja alle 30 µg/l. Olisi myös hyvä etsiä modulaattori, jolla saadaan kummankin tutkitun metallin pienimmätkin pitoisuudet näkyviin, ja mielellään ilman lisäaineita, menetelmän yksinkertaistamiseksi. Kummallakin metalli-ionilla toimivan ja alhaisen määritysrajan modulaattorin löytäminen myös mahdollistaisi metallien määrittämisen samalla levyllä, jos näytteitä on vain muutama.

Yhden, kummallakin metallilla toimivan modulaattorin löytäminen ja käyttö myös yksinkertaistaisi mahdollisia kaupallisia sovelluksia.

Tulevaisuudessa tulisi tutkia myös, miten eri metalleja seoksena sisältävät näytteet käyttäytyvät, sillä laboratorio-olotilojen ulkopuolella on erittäin harvinaista, että näytteessä olisi vain yhtä metalli-iona puhtaasti.

Työn aikana huomattiin aktiivihiihluodattettujen vesinäytteiden antavan erilaisia tuloksia riippuen näytteenottopäivästä. Tälle ilmiölle ei löydetty muuta selitystä kuin suodattimien vaihto näytteenottojen välissä, mutta FFF:n tutkijoiden mukaan vaihdolla ei olisi pitänyt olla minkäänlaista vaikutusta.

LÄHTEET

- (1) Turun yliopisto 2016. Funktionaalisten elintarvikkeiden kehittämiskeskus - Functional Foods Forum. Viitattu 28.1.2016. <http://www.utu.fi/fi/yksikot/fff/>
- (2) Krebs, R. E. 2006. The History and Use of Our Earth's Chemical Elements: A Reference Guide. 2. painos. Lontoo. Greenwood Press.
- (3) Paschotta, R. 2008. Encyclopedia of Laser Physics and Technology. 1. painos. Weinheim. Wiley-VCH.
- (4) Pihlasalo, S. ym. 2016. Luminometric Label Array for Quantification and Identification of Metal Ions. *Analytical Chemistry*. Vol. 88, No 10, 5271-5280.
- (5) Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. 5.-6. painos. Helsinki. Edita Prima Oy.
- (6) Omur-Ozbek, P. & Dietrich, A. M. 2010 "Retronasal perception and flavour thresholds of iron and copper in drinking water" *Journal of Water and Health* 09.1.

