



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Harri Kurki

Menetelmän kehitys ja validointi furaaninyhdisteiden kvantitointiin

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

30.11.2019

Tekijä Otsikko	Harri Kurki Menetelmän kehitys ja validointi furaaniyhdisteiden kvantitointiin
Sivumäärä Aika	35 sivua + 1 liite 30.11.2019
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat	Lehtori Mia Ruismäki Erikoistutkija Marja Raatikainen
<p>Tämä opinnäytetyö suoritettiin Eviralle tarkoituksena modernisoida furaaniyhdisteiden tutkimus nykyaikaiselle tasolle sekä nopeuttaa useiden peräkkäisten analyysien suoritusta. Furaaniyhdisteet sisältävät tässä yhteydessä furaanin itsensä lisäksi kaksi monometyylifuraania sekä kaksi dimetyylifuraania. Menetelmä on staattisen headspace-kaasukromatografiassa massaspektrometrian sovellus, näytteenkäsittelyn yksinkertaisuuden ja nopeuden vuoksi sekä itse analyysien korkean automaatioasteen takia. Työn puitteissa modulaarista laitteistoa muokattiin ja sen soveltuvuutta sekä tarvittavia ajoasetuksia testattiin ja säädettiin. Lisäksi työn validointiin tarvittavaa aineistoa hankittiin mm. saantokokeilla.</p> <p>Furaaniyhdisteiden tutkimus on herättänyt mielenkiintoa sitä myöten, kun sen pitoisuuksia eri ruokavalmisteissa on mitattu ja sen terveydelle haitallisia vaikutuksia on tutkittu. Furaaniyhdisteitä voi syntyä käytännössä kaikessa ruoka-aineiden kuumentamisessa, ja siksi furaaniyhdisteille altistumista on syytä kartoittaa kansanterveydellisin perustein. Tämän työn keskeiseksi tutkittavaksi matriisiksi valikoituivat sekä valmistettu suodatinkahvi että kahvijauhe itsessään. Aiempien tutkimusten mukaan kahvi aiheuttaa tilastollisesti jopa kaksinkertaisen furaaniyhdisteiden päivittäisen saannin kahvinjuojien osalta. Menetelmää on kuitenkin kehitetty laajalle mittausalueelle, sillä sitä on tarkoitus käyttää muidenkin ruoka-aineiden analysointiin.</p> <p>Menetelmän kehityksen katsotaan onnistuneen ja validointiin tarvittava aineisto saatiin kerättyä. Kahvijauheen pitoisuuden oikeellisuutta tutkittiin mm. vertaamalla mitattua furaanin pitoisuutta Fapasin ulkoiseen varmennettuun vertailumateriaaliin ja tulokseksi saatiin 100,84 %. Lisäksi määriteltiin menetelmän spesifisyys olevan Euroopan komission ohjeistuksen mukainen. Toistettavuus, uusittavuus, havaitsemis- ja määritysrajat sekä mittausalue ja lineaarisuus puolestaan määriteltiin Eviran ohjeistuksen mukaisesti. Kaikilla osa-alueilla saatiin tyydyttäviä tuloksia.</p> <p>Edellä mainittujen asioiden lisäksi analysoitiin kaupallisen valmistajan kolmen eri paahtoasteen kahveja ja verrattiin siten paahtoasteen merkitystä furaaniyhdisteiden määrään. Paahtoasteella näyttää työn tuloksien perusteella olevan merkittävää positiivista korrelaatiota jokaisen mitatun furaaniyhdisteen pitoisuuden kanssa.</p>	
Avainsanat	Furaanit, kaasukromatografia, massaspektrometria, kahvi, kvantitatiivinen analyysi

Author Title	Harri Kurki Development and Validation of a Method for Quantification of Furan Compounds
Number of Pages Date	35 pages + 1 appendix 30 November 2019
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Mia Ruismäki, Senior Lecturer, Metropolia University of Applied Sciences Marja Raatikainen, Specialist Researcher, Evira Finnish Food Safety Authority
<p>This thesis study was carried out in order to modernize analyzing methods for furan compounds used by Evira and to speed up the analysis time for consecutive analyses. Furan compounds in this research included furan itself, two monomethylfurans and two dimethylfurans. Method used was an application of static headspace-gas-chromatography-mass-spectrometry because of the simplicity and speed of sample preparation and for its high degree of automatization. In this work a modular sample handler was modified, its suitability and parameters were tested and adjusted. Furthermore, the data needed for the validation of the method was acquired, for example, via recovery tests.</p> <p>Research of furan compounds has become more relevant topic as the concentrations of those compounds have been measured from food products and adverse health effects have been discovered. Furan compounds can be formed whenever food ingredients are heated and therefore it is imperative to research how severely people are subjected to these compounds. Two matrices chosen for this work are filtered drip coffee and ground coffee. According to earlier research, statistically coffee users get twice the dosage of furan compounds compared to non-coffee drinkers. A method was developed using a large scale of concentrations, as it is meant to be used with other food substances later.</p> <p>Development of the method is considered a success and data needed for the validation was produced. Validity of ground coffee was examined, among other methods, by comparing analysis results with external certified reference material provided by Fapas, and result was 100,84 % validity. Furthermore, specificity of the method was defined to be in the range provided by European Commissions guidelines. Repeatability, reproducibility, limits of detection and quantification, area of measurement and linearity were calculated in accordance to Evira guidelines. All parts of the validation yielded satisfactory results.</p> <p>Additionally, three differently roasted ground coffees from the same label and manufacturer, were analyzed, and results were then compared with the degree of roasting. The said degree seems to have remarkably positive correlation with every measured concentrations of furan compounds.</p>	
Keywords	Furans, gas chromatography, headspace, mass spectrometry, coffee, quantitative analysis

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Tutkittavat analyytit	2
2.1	Furaani ja metyylifuraanit	2
2.2	Furaanin muodostuminen	4
2.3	Furaaniyhdisteiden esiintyminen elintarvikkeissa	5
2.4	Terveysvaikutukset	5
3	Headspace-GCMS-menetelmästä	6
4	Työn suoritus	8
4.1	Käyttö- ja standardiliuosten valmistus	10
4.2	Menetelmän kehitys	12
4.3	Validointi	14
4.3.1	Näytteiden käsittely	15
4.3.2	HS-GCMS-järjestelmässä käytetyt parametrit	16
4.4	Paahtoasteiden vertailu	18
5	Tulokset	18
5.1	Menetelmän kehitys	19
5.2	Validointi	23
5.2.1	Spesifisyys	24
5.2.2	Saantokokeet	24
5.2.3	Oikeellisuus	25
5.2.4	Toistettavuus	26
5.2.5	Uusittavuus	28
5.2.6	Havaitsemis- ja määrittäysraja	30
5.2.7	Mittausalue ja lineaarisuus	30
5.3	Kahvin paahtoasteiden vertailu	31
6	Yhteenveto	33
	Lähteet	35

Liite 1. Pipetointilomake

Lyhenteet

GCMS	Gas Chromatography Mass Spectrometry. Kaasukromatografia-massa-spektrometria.
HS	Headspace. Tarkoittaa tässä yhteydessä kaasufaasia näytepullossa.
MHE	Multiple Headspace Extraction. Headspace-menetelmän sovellus, jossa otetaan useita näytteitä kaasufaasista.
SPME	Solid Phase Micro Extraction. Kiinteäfaasimikrouutto.

1 Johdanto

Työ suoritettiin Eviran aloitteesta ja tarpeisiin, tavoitteena saada olemassa olevalle laitteistolle helppokäyttöinen ja toimiva menetelmä furaanin sekä sen määrättyjen johdannaisen kvantitatiiviseen analysointiin kahvinäytteistä. Menetelmä luotiin silmällä pitäen ajatusta siitä, että sama menetelmä olisi helposti muokattavissa tai käytettävissä sellaisenaan myös muille näytematriiseille.

Furaania on aiemmin analysoitu Eviralla kiinteäfaasimikrouuttomenetelmällä (SPME, Solid Phase Micro Extraction) manuaalisesti samalla kaasukromatografi-massaspektrometriadistelmällä, mutta se on etenkin nykystandardien mukaan työläs toteuttaa. Lisäksi kiinteäfaasimenetelmässä uuttokuidun ikä, kunto ja huolto voivat vaikuttaa tuloksiin. Näytteen-syöttäjään on myös sittemmin hankittu lisälaitteet automatisoituun kiinteäfaasiuuttoon, mutta tietävästi sitä ei ole otettu koskaan käyttöön.

Tässä työssä otettiin käyttöön modulaarisen näytteen-syöttäjän HS (Headspace) -laitteisto, jota käytettiin staattiseen HS-menetelmään. Käyttöönottoon sisältyi laitteistoon tutustuminen, komponenttien valinta ja asennus sekä muutamia huoltotoimenpiteitä, joista kerrotaan luvussa 4 Työn suoritus.

Menetelmän kehitys rakentui analyttien tunnistuksesta skannaavilla ajoilla, testiajoista tasapainotuksen optimoimiseksi ja laitteiston parametrien säätelystä. Menetelmän kehityksen tuloksissa käydään läpi muutamia helposti säädettäviä ajoparametreja sekä annetaan ehdotuksia menetelmän herkkyyden säätöön. Nämä voivat olla hyödyksi, kun menetelmää sovelletaan uusille näytematriiseille ja etenkin pienempiä pitoisuuksia tutkittaessa.

Validointiosuudessa tutkittiin menetelmän spesifisyyttä, oikeellisuutta (saantokokeilla), toistettavuutta, uusittavuutta, havaitsemis- sekä määritysrajoja. Stabiiliutta ei tutkittu, mutta siitä tehtiin joitakin havaintoja. Mittausaluetta sekä lineaarisuutta tarkastellaan regressioanalyysillä sekä residuaalikuvaajien avulla.

2 Tutkittavat analyytit

Menetelmään sisältyvien analyyttien ominaisuudet vaihtelevat suuresti huolimatta siitä, että kaikkien furaaniyhdisteiden ytimenä on aromaattinen furaanirengas, joka koostuu yhdestä hapestä ja neljästä hiilestä. Valittujen analyyttien kiehumispisteiden skaala on suuri, eikä pohjatietoja esim. kahvin dimetyylifuraanipitoisuuksista ei ollut saatavilla. Menetelmän tasapainotuslämpötila on korkeampi kuin monissa julkaisuissa, joissa on tutkittu vain furaania tai metyylifuraaneja, sillä dimetyylifuraaneilla on korkeampi kiehumispiste ja näin on pyritty varmistamaan kaikkien tutkittavien analyyttien riittävä esiintyminen näytteen kaasufaasissa.

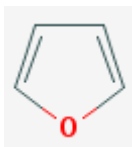
Näiden analyyttien lisäksi tutkittiin mahdollisuutta lisätä menetelmään asetaldehydin kvantitointi, mutta siitä luovuttiin, kun asetaldehydin retentioaika osoittautui olevan päällekkäinen liuottimena käytetyn metanolin kanssa. Massaspektrometri on syytä pitää poissa päältä liuottimen tullessa kolonnista, sillä liuottimen suuri määrä johtaa suureen määrään fragmentteja. Tämä puolestaan kuluttaa merkittävästi signaalinvahvistinta, joka jo kertaalleen jouduttiin tätä työtä varten vaihtamaan. Erottelu olisi vaatinut joko kolonnin vaihtoa, merkittävää uuniohjelman pidentämistä (ja siten analyysiajan pitkittymistä) tai liuottimen vaihtoa. Näistä ei mikään ollut työn tärkeimpien tavoitteiden kannalta järkevä vaihtoehto.

Työssä sisäisenä standardina (ISTD) käytettiin deuteroitua furaania. Deuteroinnissa yhdisteen vedyt on korvattu vedyn isotoopilla, jossa on siis vedyn yhden protonin lisäksi yksi neutroni. Tällöin saadaan hyvin lähelle alkuperäisen tavoin käyttäytyvä yhdiste, joka voidaan kuitenkin etenkin massaspektrometrillä erottaa käsittelemättömästä furaanista. Ihanteellisessa tilanteessa metyylifuraaneille ja dimetyylifuraaneille olisi ollut omat deuteroidut ISTD:t, mutta tällaisia ei valitettavasti ollut saatavilla.

2.1 Furaani ja metyylifuraanit

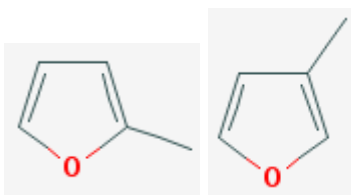
Tutkituista analyyteistä yksinkertaisin, furaani (kuva 1), koostuu vain itse furaanirengaasta, joka on bentseenin tapaan aromaattinen, eli sillä on delokaloitunut elektroni-pari. Furaani on veteen liukenematon, väritön, kirkas, helposti syttyvä sekä myrkyllinen.

Kaasumaisessa muodossa se on ilmaa raskaampi. Kiehumispiste on tutkituista analyyteistä alhaisin, $31,3^{\circ}\text{C}$, eli furaani haihtuu merkittävästi jo huoneenlämmössä. [1.]



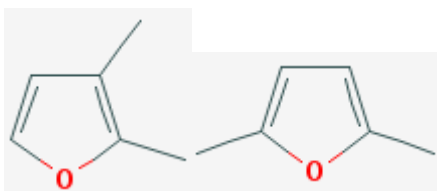
Kuva 1. Furaani. [1.]

Metyylifuraanit ovat furaanirenkaita, joissa yhteen hiileen on liittynyt metyyliryhmä (CH_3). Ryhmään kuuluu kaksi analyyttiä, 2-metyylifuraani sekä 3-metyylifuraani (kuva 2). 3-metyylifuraania on tutkittu melko vähän, mutta molemmat metyylifuraanit ovat värittömiä tai hailakan keltaisia sekä helposti syttyviä. Lähteissä on ristiriitaista tietoa 2-metyylifuraanin vesiliukoisuudesta, mutta tässä työssä vesiliuoksista saatujen korkeiden vasteiden perusteella yhdisteet eivät liene erityisen vesiliukoisia. NCBI:n (National Center for Biotechnology Information) mukaan 2-metyylifuraania käytetään myös aromina ja siinä on suklaamainen tuoksu. [2.]



Kuva 2. 2- sekä 3-metyylifuraanit. [2.]

Dimetyylifuraaneissa furaanirenkaan hiiliin on liittynyt kaksi metyyliryhmää (kuva 3). Kolmesta erilaisesta dimetyylifuraanista, tässä työssä tutkittiin kahta yhdistettä, 2,3-dimetyylifuraania sekä 2,5-dimetyylifuraania. 2,3-dimetyylifuraania on tutkittu hyvin vähän, samoin kuin edellisen ryhmän 3-metyylifuraania. Molemmat dimetyylifuraanit ovat voimakkaan tuoksuisia kellertäviä nesteitä. 2,5-dimetyylifuraania on mm. tupakansavussa ja sen pitoisuutta veressä voidaan käyttää biomarkerina indikoimaan tupakointia. 2,5-dimetyylifuraania pidetään myös hyvänä ehdokkaana tulevaisuuden biopolttoaineeksi sen bensiinin kaltaisten ominaisuuksiensa vuoksi. [3.]



Kuva 3. 2,3-dimetyylifuraani sekä 2,5-dimetyylifuraani. [3.]

Alla olevaan taulukko 1:een on koottu tietoja analyyteistä.

Taulukko 1. Tutkittavien furaaniyhdisteiden ominaisuuksia. [1; 2; 3.]

Analyytti	Molekyylipaino (g/mol)	Kiehumispiste (°C)	Tiheys (g/ml)
Furaani	68,07	31,3	0,94
Furaani-d ₄	72,1		0,99
2-metyylifuraani	82,1	63 - 66	0,93
3-metyylifuraani	82,1	63 - 66	0,92
2,3-dimetyylifuraani	96,13	n. 96	0,91
2,5-dimetyylifuraani	96,13	n. 96	0,89

2.2 Furaanin muodostuminen

Furaania (ja metyylijohdannaisia) syntyy askorbiinihaposta, aminohapoista, hiilihydraateista, tyydyttymättömistä rasvahapoista sekä karotenoideista kuumennettaessa. Teolliset ruuat (vauvan ruuat, säilykkeet, hillot jne.) pakataan usein bakteerikontaminaatiovaaran takia kuumina, jolloin prosessissa syntyneet furaaniyhdisteet eivät pääse haihtumaan. [4.]

Kahvijauheessa furaaneja syntyy kahvipapujen paahtamisen takia. Tässä työssä mitattiin (kahvijauheen lisäksi) valmistajan ohjeen mukaisesti valmistetun suodatinkahvin pitoisuuksia, mutta muissakin nesteimmersioon perustuvissa tavoissa uuttaa kahvia (esim. pressopannuissa, kahvipannuissa jne.) on havaittu suodatinkahvin kaltaisia pitoisuuksia. Poikkeuksena nesteimmersioutolla valmistetuista kahveista ovat ns. kapselikahvit, joissa on mitattu huomattavasti suurempia furaanipitoisuuksia. [5.]

2.3 Furaaniyhdisteiden esiintyminen elintarvikkeissa

Yksinkertaisen syntyvän (eli kuumentamisen) ja elintarvikkeissa yleisten furaanin prekursorien vuoksi furaania sekä sen metyyli johdannaisia löytyy useista purkitetuista tai muuten tiivistä pakatuista kaupallisista ruokavalmisteista. Yhdysvalloissa sekä Kanadassa on arvioitu ihmisten päivittäistä furaaniyhdisteiden saantia ainakin alustavasti ja arvioitu, että altistuminen jopa kaksinkertaistuu kahvinjuojien kohdalla [6]. Kahvissa aiempien mittausten mukaan furaaniyhdisteitä on verrattain paljon ja se herättääkin kiinnostusta nimenomaan kahvin furaaniyhdisteiden määrien tarkempaan tutkimukseen. Toinen kiinnostava tutkimuksen kohde on vauvanruuat, jotka valmistetaan säilykkeiksi ja kuuluvat täten valmistusprosessinsa takia furaaniyhdisteitä sisältäviin tuotteisiin. Pienen massansa takia vauvat ja pienet lapset saavat helposti suurempia annostuksia kokoonsa suhteutettuna. Lisäksi valmiit vauvanruuat voivat muodostaa suuren osan lapsen ruokavaliosta.

Samaisen tutkimuksen päivittäinen saanti (Kanada) pelkän furaanin osalta on 0,37 µg/kg. Lisäksi arvioitiin, että määrä nousee 0,71 µg/kg:aan kun lasketaan mukaan monometyylifuraanit, joiden terveydellisten vaikutusten on arveltu olevan vastaavia. Dimetyylifuraanien päivittäisiä saantimääriä ei tiedettävästi ole kattavasti tutkittu tätä työtä tehtäessä.

2.4 Terveysvaikutukset

Furaaniyhdisteet ovat pääsääntöisesti EFSA:n (European Food Safety Authority) mukaan todennäköisesti terveydelle haitallisia [4]. Näistä furaania on tutkittu eniten. Furaanille altistuminen aiheuttaa silmien ja ihon ärsytystä sekä keskushermoston lamautumista. Lisäksi sen metaboliatuotteilla (myös 2,5-dimetyylifuraanin) on havaittu eläinkokeissa olevan karsinogeenisiä vaikutuksia. On oletettavissa, että metyylifuraanien metaboliatuotteet käyttäytyvät samankaltaisesti kudoksissa. Tällä voi olla suurta merkitystä, etenkin kahvin suhteen, sillä se on suurin yksittäinen furaaniyhdisteiden lähde aikuisten ruokavaliossa ja etenkin 2-metyylifuraanin määrät ovat kahvissa paljon

furaania suuremmat [6]. Vaikka siis furaanin ja monometyylifuraaneiden määrän on todettu olevan pääsääntöisesti esim. kahvissa alle riskirajojen, on hyvin vähän tutkimusta kaikkien näiden furaaniyhdisteiden yhteisvaikutuksesta.

3 Headspace-GCMS-menetelmästä

HS-menetelmässä näyte laitetaan headspace-näytepulloon, joka on suljettu septumilla (kalvolla) varustetulla korkilla. Näyte siirretään ravistajaan, joka on pieni uuni, jossa lämpötila voidaan tarkasti pitää vakiona. Lisäksi ravistaja voidaan asettaa ravistamaan näytettä tasapainotusajan lyhentämiseksi. Näytettä pidetään tietyssä lämpötilassa vähintään sen ajan, että analyytit jakautuvat tasapainovakionsa mukaisesti kaasufaasin sekä varsinaisen näytteen välille.

Näyte voi siis olla kiinteä, neste tai periaatteessa kaasukin. Tässä menetelmässä näytteet ovat joko nesteitä tai veteen sekoitettuja kiinteitä aineita. Vesinäytteessä analyytin vesiliukoisuus ja tasapainotuslämpötila näyttelevät siis suurta osaa analyytin tasapainovakiossa. Lisäksi on huomattava, että näytteiden tilavuuden tulee olla keskenään sama, sillä myös kaasufaasin ja näytefaasin tilavuuksien suhde vaikuttaa tulokseen. Kaikissa headspace-menetelmissä (paitsi jos näyte on kauttaaltaan haihtuva ja sen annetaan kaasuuntua kokonaan) on joka matriisille selvitettävä erikseen analyyttien tasapainotusaika annetussa lämpötilassa, sillä mikäli analyytti ei ole ehtinyt jakautumaan vakionsa mukaisesti, ei välttämättä saada toistettavuudeltaan hyviä tuloksia.

Tasapainottumisen jälkeen näytepullosta otetaan näyte kaasutiiviillä ruiskulla korkin septumin läpi näytepullon kaasufaasista, josta tulee menetelmän nimikin (headspace). Septumi mahdollistaa näytteenoton pullosta korkkia avaamatta, jolloin analyyttien jakautuminen faasien välillä ei häiriinny. Tämä näyte siirretään lämmitetyssä ruiskussa injektorille. Ruiskun tulee olla lämmitettynä vähintään samaan lämpötilaan kuin agitaattorikin, jotta vältettäisiin näytteen/analyyttien tiivistyminen ruiskun pinnoille. Injektoitavan näytteen ollessa kaasu voivat tilavuudet olla verrattain suuriakin, sillä samanlaista paineiskua ei tapahdu injektorilasissa kuin injektoitaessa nestettä kuumaan injektoriin. Nesteinjektoinnissa tyypilliset tilavuudet ovat 1–10 µl ja Headspace-menetelmässä 100–5000 µl.

Headspace-menetelmät sopivat mainiosti helposti haihtuville yhdisteille, sillä tasapainotuslämpötilassa haihtumattomat matriisin komponentit eivät päädy kromatografille asti, toisin kuin nesteinjektiossa, jossa näytteen homogeenisyys on tärkeämpää ja kolonni likaantuu helpommin. HS ei myöskään sovi korkean kiehumispisteen analyyteille, sillä etenkin vesimatriiseissa käytettävää tasapainotuslämpötilaa rajoittaa näytepulloon kehittyvä paine [7, s. 26 - 27]. Syntyvää painetta voidaan toki alentaa pienentämällä näytetilavuutta näytepullossa.

Headspace-menetelmät ovat jaettavissa staattisiin sekä MHE-menetelmiin (Multiple Headspace Extraction). Staattisessa headspace-menetelmässä näytteen tasapainotuksen jälkeen otetaan näyte septumin läpi näytepullosta ja ruiskutetaan injektoriin, kuten edellä on kuvailtu. Pitoisuus lasketaan tästä yhdestä ajosta kalibrintisuoran ja mahdollisen sisäisen standardin avulla verraten analyytin piikin vastetta kalibrintisuoraan tai laskemalla kalibrintisuorasta johdetun yhtälön avulla. MHE-menetelmässä ensimmäisen näytteenoton jälkeen näyte tasapainotetaan uudelleen ja otetaan uusi näyte, kunnes näytteestä ei saada enää vasteita antavia analyyttihiikkejä. Kaikkien yhdestä näytepullosta otettujen saatujen piikkien vasteista lasketaan yksi yhteinen vaste, josta määritetään pitoisuus. Sama prosessi tehdään myös standardisuoran näytepulloille. Menetelmä on näin ollen paljon tarkempi (suurempien vasteiden takia) kuin staattinen menetelmä, mutta vie aikaa paljon enemmän.

Piikit kromatogrammissa muodostuvat tässä tapauksessa mitattavista ioneista. Jokaiselle analyytille on määritetty sekä kohdeioni (jota käytetään kvantitointiin) että referenssi-ioni tai useampi. Referenssi-ioneilla tarkistetaan, että kvantitoitava analyytti on oikea. Elektronisuihkuionisaatiomassaspektrometriassa jokainen yhdiste hajoaa elektronisuihkussa aina hyvin samalla tavalla fragmenteiksi, joilla on varaus, eli ne ovat ioneja. Näistä ioneista lukumäärältään suurinta käytetään kvantitointiin ja muiden analyyttistä fragmentoituneiden ioneiden määrän suhdetta kohdeioniin käytetään alkuperäisen yhdisteen tunnistukseen. Ionit erottautuvat toisistaan massa-varausomaisuutensa ansiosta (m/z). Käytännössä kaikilla näin syntyneillä ioneilla on sama varaus, eli 1, joten m/z -arvo on sama kuin ionin massa. [8.]

Retentioaika kromatografisissa menetelmissä tarkoittaa aikaa, joka analytyillä kestää kulkea kolonnin läpi, tarkemmin injektorilta detektorille. Tämä aika pysyy melko tarkkaan samana, mikäli ajo-olosuhteet pysyvät samoina.

4 Työn suoritus

Eviralla oli työtä varten varattuna kaasukromatografi-massaspektrometriyhdistelmä (kuva 4), jolle tätä menetelmää ryhdyttiin luomaan. Kaasukromatografi on Agilentin (silloisen HP:n) 6890-sarjasta ja massaspektrometri 5973 Network MSD (Mass Selective Detector), joista molemmat ovat tulleet markkinoille 90-luvun puolivälin jälkeen. Näytteensyöttäjä on myös Agilentin, modulaarinen G6509 – CTC-LHX PAL system, 120 cm leveä malli vuodelta 2010. Ensimmäiset sarjan laitteet ovat vuodelta 1999. Laitetekonaisuus kuvassa 4. Käyttöjärjestelmänä tietokoneen puolelta on hieman iäkkäämpi ChemStation.



Kuva 4. Työssä käytetty laitekombinaatio. Sisältää näytteensyöttäjän, kaasukromatografin sekä massaspektrometrin.

Saatavilla olevista kolonneista otettiin käyttöön 30-metrinen HP:n PLOT/Q 19091P-Q04, jonka materiaalina on polystyreeni-divinyylibetseeni. Samaa kolonnia oli käytetty Eviralla furaanin määrittämiseen myös kiinteäfaasimikrouuttomenetelmän kanssa. Kantokaasuna järjestelmässä on helium. Kolonnia lyhennettiin molemmista päistä, sitä paistettiin yön yli 200°C:n lämpötilassa heliumvirtauksessa käännettynä, jotta mahdolliset epäpuhtaudet kolonnin alkupäästä saataisiin puhallettua ulos. Tämän jälkeen kolonni asennettiin paikoilleen.

Jo ensimmäisissä laitteen sisäisissä diagnostiikka-ajoissa kävi ilmi, että elektronimonistaja, joka toimii massaspektrometreissä signaalinvahvistimena, alkoi olla tiensä päässä. Jännitteet virityksen aikana nousivat lähelle 3000 voltin maksimirajaa, ja ensimmäisissä skannaavissa ajoissa pohjaviiva nousi huomattavan korkealle eikä analyyttejä havaittu ollenkaan. Elektronimonistaja vaihdettiin uuden saavuttua ja vaihtotyöhön tehtiin ohjeet vastaisuuden varalta. Vaihdon jälkeen skannaavan ajon kromatogrammista oli havaittavissa kaikkien analyyttien retentiopiikit ja jännite pysyi verrattain matalana (1 300 V) diagnostiikan aikana.

Koeajojen alussa havaittiin, että ajot pysähtyivät ensimmäiseen näytteeseen. Syyksi paljastui HS-ruiskun huuhtelukaasulinjan puute, jota ei ollut asennettu näytteenkäsittelijään ollenkaan. Laitteessa on mahdollisuus omaan kaasunjakelujärjestelmäänsä, mutta sitä ei koskaan ollut asennettu. Ruiskun huuhtelu otettiin pois käytöstä metodista väliaikaisesti, mutta korjattiin myöhemmin. Typpikaasulinja kiinteäfaasikuidun puhdistuslaitteelle oli asennettu erillislinjasta, joten se siirrettiin suoraan tarpeettomalta puhdistuslaitteelta ruiskulle.

Ruiskunsiirtäjän ja ruiskun lämmitinkotelon välissä oleva liitos vuotaa, mutta laite tunnistaa virtauksen ja suostuu toimimaan. Vaikuttaa siltä, että vuoto on kuitenkin sen verran suuri, ettei ruisku puhdistu kunnolla ja tuloksissa havaitaan kautta linjan suurien pitoisuuksien jälkeen nollanäytteissä pieniä määriä analyyttejä. On epäselvää, miten tilanne tulisi korjata, sillä kyseisessä vuotokohdassa ei ole minkäänlaista tiivistyspintaa liittimien välissä ja toinen pinta on lisäksi kovaa mutta huokoista vaahtomuovia, joka toimii ruiskun lämmittimen eristeenä. Analyyttijäämien vaikutus tuloksiin poistettiin tässä työssä ajamalla suurien pitoisuuksien jälkeen lyhyt huuhteluohjelma millipore-vettä käyttäen.

Testiajojen alkupuolella ruiskunneula vääntyi toistuvasti kesken ajon. Laitteelta oli jo tarkistettu kohdistukset, joten automatiikka vei neulan oikeaan paikkaan, sekä tarjottimella, agitaattorilla että injektorilla. Kävi ilmi, että CTC PAL-näytteenyöttäjien ruiskun neulan ohjaimet pysyvät tarkasti paikoillaan kahden jännteen (tension cords) avulla, jotka pitäisi vaihtaa valmistajan ohjeiden mukaan kerran vuodessa, käytettiin näytteenyöttäjää tai ei. Näitä ei ollut vaihdettu tietävästi sitten koneen asennuksen vuonna 2010. Uudet jännitteet tilattiin ja vaihdettiin. Vaihtotoimenpiteen jälkeen neulat eivät enää vääntyneet.

4.1 Käyttö- ja standardiliuosten valmistus

Standardien valmistusta varten tehtiin väliajoin käyttöliuokset (numeroitu roomalaisin järjestysnumeroin I - IV), joista ensimmäiseen lisättiin kaikki analyytit, ja loput olivat laimennoksia. Näistä käyttöliuoksista pipetoitiin standardit näytepulloihin. Kaikki käyttöliuokset valmistettiin täyttämällä taarattu 50 ml:n mittapullo merkkiin metanolilla, mittapullo punnittiin ja paino merkittiin pipetointitaulukkoon. Tämän jälkeen pulloon lisättiin joko analyyttien kantaliuoksia (käyttöliuos I) tai sarjassa edellistä käyttöliuosta (käyttöliuokset II - IV). Sisäiselle standardille tehtiin omat käyttöliuokset (V ja VI), joista ensimmäiseen lisättiin furaani-d₄-kantaliuosta ja jälkimmäiseen edellistä käyttöliuosta.

Käyttöliuos I: Punnittuun metanoliin lisättiin vuoron perään 200 µl furaania, 2-metyylifuraania, 3-metyylifuraania, 2,3-dimetyylifuraania sekä 2,5-dimetyylifuraania ja merkittiin liuoksen paino muistiin joka lisäyksen jälkeen. Analyyttien pitoisuus laskettiin kaavalla:

$$\frac{\text{Lisätyn kantaliuoksen massa (mg)} \cdot \text{kantaliuoksen puhtaus}}{\text{Liuoksen massa kaikkien lisäysten jälkeen (mg)/1000}} = \text{Pitoisuus (mg/g)} \quad (1)$$

Käyttöliuos II: Punnittuun metanoliin lisättiin 200 µl käyttöliuos I:tä. Punnittiin liuos. Laskettiin pitoisuus kaavalla:

$$\left(\text{Käyttöliuos I pitoisuus} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) \cdot 1000 \right) \cdot \frac{\text{Lisätty käyttöliuos I massa (mg)}}{\text{Liuoksen massa lisäyksen jälkeen}} = \text{Pitoisuus (mg/g)} \quad (2)$$

Käyttöliuos III: Punnittuun metanoliin lisättiin 2 ml käyttöliuos II:ta. Laskettiin:

$$\left(\text{Käyttöliuos II pitoisuus} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) \cdot 1000 \right) \cdot \frac{\text{Lisätty käyttöliuos II massa (mg)}}{\text{Liuoksen massa lisäyksen jälkeen}} = \text{Pitoisuus (ng/g)} \quad (3)$$

Käyttöliuos IV: Punnittuun metanoliin lisättiin 2 ml käyttöliuos III:a. Laskettiin:

$$\left(\text{Käyttöliuos III pitoisuus} \left(\frac{\text{ng}}{\text{g}} \right) \right) * \frac{\text{Lisätty käyttöliuos III massa (mg)}}{\text{Liuoksen massa lisäyksen jälkeen}} = \text{Pitoisuus (ng/g)} \quad (4)$$

ISTD V: Punnittuun metanoliin lisättiin 50 µl furaani-d₄-kantaliuosta. Laskettiin:

$$\frac{\text{Lisätyn kantaliuoksen massa (mg)} * \text{kantaliuoksen puhtaus}}{\text{Liuoksen massa kaikkien lisäysten jälkeen (mg)/1000}} = \text{Pitoisuus (mg/g)} \quad (5)$$

ISTD VI: Punnittuun metanoliin lisättiin 50 µl ISTD V-liuosta. Laskettiin:

$$\left(\text{ISTD I pitoisuus} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) * 1000 \right) * \frac{\text{Lisätty ISTD I massa (mg)}}{\text{Liuoksen massa lisäyksen jälkeen}} = \text{Pitoisuus (µg/g)} \quad (6)$$

Käyttöliuokset säilöttiin 20 ml:n HS-näytepulloihin silikoni-teflonkorkeilla sekä 2 ml:n GC (Gas Chromatography) -näytepulloihin ja säilytettiin kylmiössä 4°C:n lämpötilassa.

Standardiliuokset valmistettiin suoraan näytepulloihin. Koska nollamatriisia ei ollut saatavilla keitetyle kahville, eikä kahvijauheelle, valmistettiin standardiliuokset veteen. Näihin, kuten myös näytteisiin vakioitiin sama määrä metanolia (jotta minimoitaisiin matriisin muutosta näytteiden ja standardiliuosten välillä), sillä lisättävät käyttöliuokset ja ISTD ovat metanoliliuoksia. Standardiliuoksiin laitettiin 5 ml millipore-vettä, käyttöliuos, ISTD sekä mahdollisesti metanolia niin, että kaikkien metanolipohjaisten lisäyksen tilavuus oli yhteensä 300 µl.

Tällä varmistetaan yhtäläinen vesi-metanolisuhde näytteessä. Ero vesi-metanolisuhdeessa voisi muuttaa analyyttien jakautumista eri faasien välillä. Kaikkien näytteiden ja standardien kokonaistilavuus oli näin ollen 5,3 ml. HS-menetelmän toimivuuden kannalta on tärkeää ylläpitää sama tilavuus kaikissa näytteissä tai neste- ja kaasufaasien suhde muuttuu. Tämä tarkoittaa sitä, että headspace-tilassa, josta näyte otetaan, on tällöin eri pitoisuus analyyttejä eivätkä tulokset ole vertailukelpoisia keskenään. Alla olevassa taulukossa 2 on merkittynä lisäykset seitsemän pisteen standardisuoran luomiseksi.

Taulukko 2. Standardiliuosten pipetointitaulukko. Lisäykset 5 ml:aan millipore-vettä standardiliuosten luomiseksi. Metanoliliuoksia yhteensä 300 µl jokaisessa näytepullossa.

Nimike	Metanolin lisäys (µl)	Furaaniliuoksen lisäys (µl)	Lisättävä furaaniliuos	ISTD-liuoksen lisäys, VI (µl)
STD 1	0	250	IV	50 VI
STD 2	200	50	III	50 VI
STD 3	100	150	III	50 VI
STD 4	0	250	III	50 VI
STD 5	225	25	II	50 VI
STD 6	200	50	II	50 VI
STD 7	50	200	II	50 VI

Standardiliuosten pitoisuus on laskettu kaavalla:

$$\frac{\text{Käyttöliuoksen lisäys (ml)} * 0,791425 \left(\frac{g}{ml}\right) * \text{Käyttöliuoksen pitoisuus} \left(\frac{ng}{g}\right)}{5,237428 g} = \text{Standardiliuoksen pitoisuus} \left(\frac{ng}{g}\right) \quad (7)$$

Käytetyistä seitsemästä standardista valittiin kalibrointisuoran muodostamiseen 5–6 pistettä vastaamaan mitattavan matriisin pitoisuusalueita. Käytetty suuri kalibrointipisteiden väli on seurausta siitä, että on pyritty kattamaan alusta pitäen suuri kirjo erilaisia näytteitä sekä siitä, ettei tiedetty minkälaisia pitoisuuksia kaikista analyyteistä olisi odotettavissa.

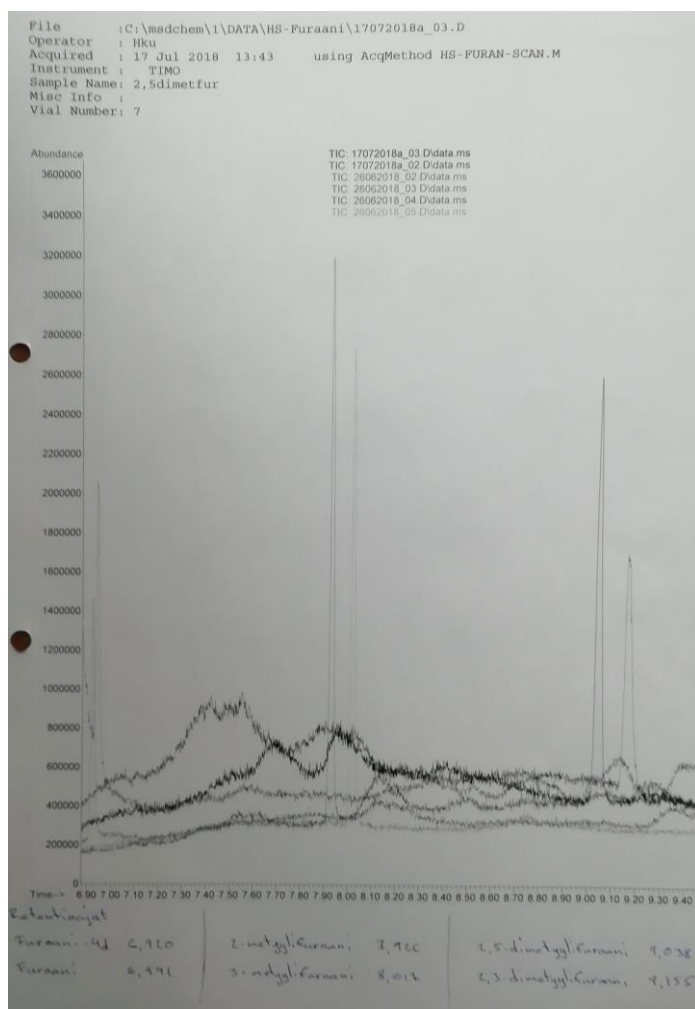
4.2 Menetelmän kehitys

Menetelmän kehityksen tarkoituksena on säätää laitteistoa niin, että lopputuloksena saadaan selkeät ja yksiselitteiset piikit analyyteistä kromatogrammiin sekä niistä kvantitoitavat tulokset.

Ruiskulle asetettiin lisäksi ruiskun täytön jälkeen 5 sekunnin viive, jotta kaasun paine ehtisi tasapainottua ruiskun ja headspacen välillä. Lisäksi ruiskulle asetettiin huuhtelu-aika, jossa ruiskua huuhdellaan typpivirtauksella, poiketen nesteinjektiossa käytetyistä huuhteluliuksista. Injektorille valittiin käyttöön täysin suora injektorilasi ilman villoja, mikä sopii kaasunäytteille kuumassa injektorissa yleensä hyvin.

Kaasukromatografian uuniohjelman pohjana käytettiin Eviran furaanille tarkoitetun SPME-menetelmän (Evira 8805/1) asetuksia. Tässä tehtiin kokeiluja uuniohjelman lyhentämiseksi, mutta päädyttiin lopuksi samaan ohjelmaan, ainoana muutoksena minuutin lisäämisen ohjelman 220°C:n lämpötilan keston.

Analyttien tunnistamiseksi ajettiin laitteella millipore-vesinäytteitä, joihin oli lisätty huomattavia pitoisuuksia (n. 1 mg/g) analyyttejä, skannaavalla ajolla. Skannaava ajo tarkoittaa, että massaspektrometri mittaa kaikkia ionikokoja asetetulta väliltä, esim. 1–100 m/z. Näin löydettiin analyttien piikit skannaavan ajon kromatogrammista (kuva 5) ja nähtiin, millaisista fragmenteista ne koostuivat. Näitä verrattiin kirjallisuudesta saatuihin arvoihin ja saatiin selville retentioajat kullekin analyylille.



Kuva 5. Kromatogrammi retentioaikojen hausta koeliuksen avulla.

Viipymisaika (Dwell time) määrää massaspektrometrissa ajan, jonka kone tarkkailee tiettyä massa-varausarvoa. Tällä säädettiin skannauksien määrää per piikki menetelmän kehittyessä jokaiselle analyyttiryhmälle niin, että jokaisen piikin kohdalla oli 10–20 skannausta.

Lähtökohtaisesti analyyttien kiehumispisteiden laaja kirjo (ks. taulukko 1) vaikeuttaa tasapainotuslämpötilan määrittämistä, sillä helpommin haihtuvat yhdisteet saattavat alkaa hajota jo ennen kuin muut yhdisteet merkittävästi edes haihtuvat. Lisäksi yhdisteiden vesiliukoisuus vaikuttaa niiden headspace-menetelmällä saataviin vasteisiin vesinäytteissä. Mikään analyyteistä ei ole ilmeisesti erityisen vesiliukoinen [4.], joskaan siitä ei ole yksiselitteistä, tarkkaa tietoa saatavilla. Liukoisuuden vaikutusta analyyttien välillä annetuissa olosuhteissa on vaikea ennalta arvioida, ja vakioimalla vesi-metanolisuhde näytteissä on pyritty minimoimaan sen vaikutus tuloksiin.

Tasapainotusajan selvittämiseksi ajettiin koesarjoja kummallekin eri näytematriisille. Näillä koesarjoilla pyritään varmistamaan, että analyytit ovat jakautuneet tasapainovakiinsa mukaisesti näyte- sekä kaasufaasin välille, jolloin saadaan korkeimmat mahdolliset vasteet ja pienin mahdollinen keskihajonta, kun olosuhteet ovat mahdollisimman vakioituja. Nämä koesarjat toteutettiin ChemStationissa luomalla oma metoditiedosto jokaiselle testattavalle aikaintervallille ja asetettiin ne tasapainotusaikansa mukaisesti pitenevään järjestykseen ajolistalle.

4.3 Validointi

Tässä validoinnissa mitattiin spesifisyyttä, saantoprosentteja, toistettavuutta, uusittavuutta, havaitsemis- ja määritysrajoja, mittausaluetta sekä lineaarisuutta ja menetelmän mittausepävarmuutta. Spesifisyyttä tarkasteltiin EU-asetusten mukaan, niistä tarkemmin spesifisyyden tuloksissa (luku 5.2.1). Saantokokeita varten tehtiin keitetulle kahville kolme väkevöitettyä sarjaa, joissa lisäystrasot olivat taulukon 3 mukaiset. Lisäykset tehtiin keitettyyn kahvimatriisiin, jonka pitoisuudet määriteltiin erikseen.

Taulukko 3. Väkevöitettyjen näytesarjojen lisätyt pitoisuudet.

Väkevöitetty sarja	Furaani (ng/ml)	2-metyylifuraani (ng/ml)	3-metyylifuraani (ng/ml)	2,5-dimetyylifuraani (ng/ml)	2,3-dimetyylifuraani (ng/ml)
Spiked A	344,59	360,70	349,63	367,49	347,38
Spiked B	57,43	60,12	58,27	57,90	61,25
Spiked C	4,36	4,57	4,43	4,40	4,65

Saanto-% lasketaan kaavalla:

$$Saanto = \frac{(\text{mitattu pitoisuus} - \text{mitattu kahvimatriisin pitoisuus})}{\text{lisätty pitoisuus}} * 100 \% \quad (8)$$

Kahvijauheelle tehtiin yksi väkevöitetty sarja, jossa lisättiin n. 130 ng/ml pitoisuus mitattavia analyyttejä kahvijauhe- sekä vesimatriisiin. Kahvijauhe- sekä vesimatriisin pitoisuus määriteltiin myös kuudella rinnakkaisella näytteellä, jotta ne voitaisiin vähentää myöhemmin lisäyksen saannon laskemiseksi.

Toistettavuutta ja uusittavuutta tarkkaillaan laskemalla Fapasin näytteen mitattuja pitoisuuksia sekä suodatinkahvin kohdalla saantokokeita varten väkevöityjen liuosten pitoisuuksien mittausten toistojen keskihajontoja, keskipitoisuuksia sekä variaatiokertoimia. Havaitsemis- ja määrittäysrajat on laskettu Eviran ohjeiden mukaisesti luvussa 5.2.6. Mitausaluetta ja lineaarisuutta tarkasteltiin Excelin regressioanalyysillä.

4.3.1 Näytteiden käsittely

Työssä käsiteltiin kahdenlaisia näytteitä, valmistettua suodatinkahvia sekä kahvijauhetta. Tässä luvussa kuvaillaan kummankin näytteen käsittely.

Valmistetun suodatinkahvin tutkimista varten keitettiin kahvia jokaiseen ajoin erikseen, Pauligin ohjeiden mukaisesti [9]. Valmistaminen tapahtui Eviran keittiölaboratorion kahvinkeitinillä. Suodattimeen mitattiin 26 g (0,4 * 65 g) kahvijauhetta ja vesisäiliöön 4 dl vettä. Heti valmistamisen jälkeen kahvi suljettiin tiiviiseen kierrekorkilliseen pulloon minimaalisella ilmatilalla ja pullo termostoitui vesihauteessa 22°C:n lämpötilaan. Näytteet pipetoitiin automaattipipetillä näytepulloihin (5 ml) vetokaapissa ja niihin lisättiin metanoli, ISTD sekä mahdolliset väkevöityksiin tarvittavat käyttöliuokset. Näytepullot pidettiin suljettuina lisäysten välillä. Kaikkiin tarvittaviin veden lisäyksiin käytettiin 22°C:n lämpötilaan termostoitua millipore-vettä.

Sekä näytteiden että käytetyn veden termostoinnilla pyritään minimoimaan tutkittavien analyyttien haihtuminen, kun pullot avataan, näytteitä tai vettä siirretään näytepulloihin tai näytepulloihin tehdään lisäyksiä standardiliuoksista. Lisäksi näytteiden ja veden siirtoon käytetyt pipetit on kalibroitu vedelle huoneen lämmössä.

Kahvijauheita punnittiin 0,5 g taaratulla punnitusalueella ja siirrettiin näytepulloon, joka suljettiin välittömästi korkilla. Näytepulloon lisättiin 4,5 g millipore-vettä sekä metanoli, ISTD ja käyttöliuokset väkevöityksissä. Tässäkin näytteenkäsittelyssä näytepullot pidettiin suljettuina lisäysten välillä.

4.3.2 HS-GCMS-järjestelmässä käytetyt parametrit

Osiassa on listattuna laitteiston parametrit, joihin menetelmänkehityksessä päädyttiin ja joita validoinneissa käytettiin.

Näytteenkäsittelijän asetukset

- tasapainotuslämpötila: 60°C
- tasapainotusaika: 10 min vesinäytteille, 35 min kahvijauhenäytteille.
- ravistajan nopeus: 500 rpm
- ruiskutustilavuus: 250 µl
- ruiskun lämpötila: 65°C
- ruiskun täyttönopeus: 100 µl/s
- ruiskun ulosvetoviive: 5000 ms
- viive ennen injektointia: 200 ms
- injektointinopeus: 500 µl/s

- viive injektoinnin jälkeen: 400 ms
- ruiskun huuhtelun kesto: 300 s.

Injektorin asetukset

- ei käytetä virtauksenjakojärjestelmää (splitless).
- lämpötila: 250°C
- paine: 180,2 kPa
- kantokaasu: Helium
- kaasun virtaus: 1,8 ml/min.

Uuniohjelma

- alkulämpötila 40°C, kesto 8 min.
- 40°C/min lämpötilan nosto 220°C:seen asti, jossa pidetään 2 min.
- jälkilämpötila 45°C, kesto 0,5 min
- kokonaiskesto: 14,5 min.

Massapektrometrin asetukset

- massaspektrometrin tulolämpötila: 230°C
- kvadrupolin lämpötila: 150°C
- viritys: Pienien massojen (<100 m/z) viritysohjelman luoma viritystiedosto

- liuotinvive: 8 min
- SIM-menetelmä.

Menetelmässä käytetyt SIM-ryhmät ja -asetukset on kerrottu taulukoissa 4 ja 5.

Taulukko 4. SIM-ryhmien asetukset. Tarkkuuden lisäämiseksi analyytit jaettiin ryhmiin, jotta spektrometrin ei tarvitsisi skannata kaikkia menetelmässä käytettäviä ioneja koko ajan.

SIM-ryhmät	Aloitusaika (min)	Ionit (m/z)				Dwell time (ms)
Furaanit	0,00	68,10	72,00	42,00	38,20	25
Met.furaanit	12,4	82,00	81,00	53,00	39,00	50
Dimet.furaanit	13,6	96,10	95,10	67,20		75

Taulukko 5. Analyyttikohtaiset kohde- ja referenssi-ionit.

Analyyttiryhmä	Kohdeioni (m/z)	Referenssi-ioni(t) (m/z)
Furaani	68,1	42
Furaani- _d 4	72	42
2-metyylifuraani	82	81,00 : 53,00
3-metyylifuraani	82	81,00 : 53,00
2,3-dimetyylifuraani	96,1	67,20 : 53,00
2,5-dimetyylifuraani	96,1	67,20 : 53,00

4.4 Paahtoasteiden vertailu

Työssä on mitattu menetelmän kehityksen ja validointiajojen jälkeen kolmen eri paahtoasteen Pauligin Juhlamokka-jauhetta, jotta nähtäisiin alustavasti, miten paahtoaste mahdollisesti vaikuttaa kahvin furaaniyhdisteiden pitoisuuksiin. Tähän ajoon tehtiin menetelmän mukainen seitsemän pisteen kalibroitaisuora ja mitattiin kolme rinnakkaista näytettä kustakin paahtoasteesta. Tulokset korjattiin kahvijauheen validoinnissa tuotetuilla saantoprosenteilla.

5 Tulokset

Tulokset ovat jaettavissa kahteen osioon, menetelmän kehitykseen ja validointiin. Pääsääntöisesti molemmista saadut tulokset katsotaan tämän työn puitteissa onnistuneiksi.

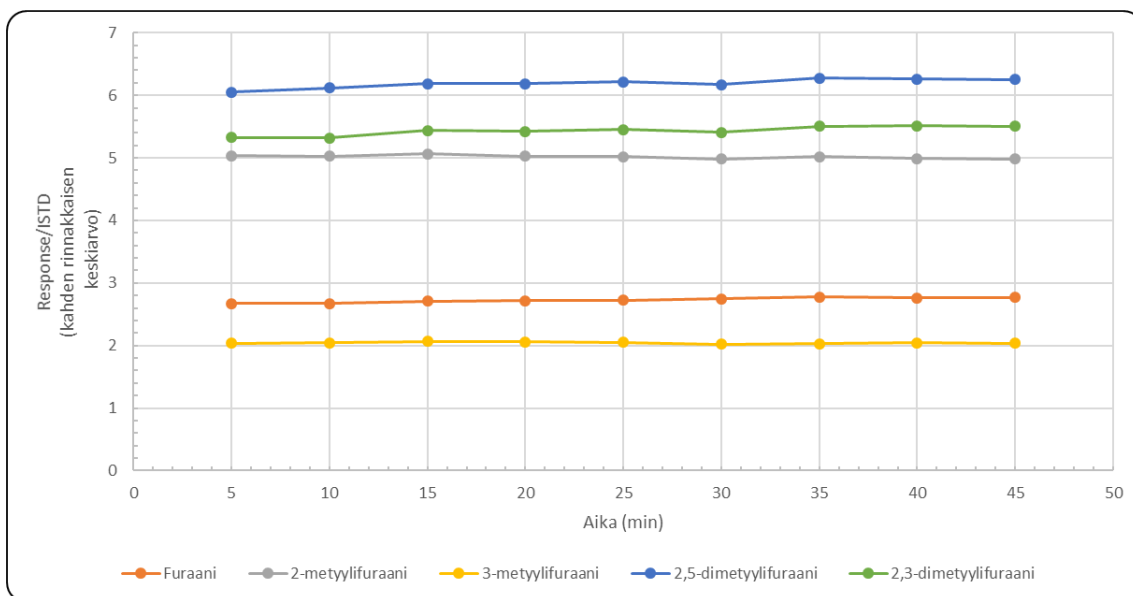
5.1 Menetelmän kehitys

Optimaalisen tasapainotuslämpötilan määrittämiseksi ajettiin koesarja 60, 70 ja 80°C:n lämpötiloissa ja jokaisessa lämpötilassa kaksi rinnakkaista näytettä. Tarkkojen johtopäätösten tekemiseen keskihajonta oli liian suuri, johtuen toki myös rinnakkaisten näytteiden vähyydestä. Hajonnoista kuitenkin voidaan epäillä, että tasapainotusaika on puutteellinen, sillä korkeammassa lämpötilassa analyytit usein tasapainottuvat faasien kesken nopeammin ja 80°C:n lämpötilassa keskihajonta on selvästi pienempi kuin alemmissa lämpötiloissa. Sen suurempia johtopäätöksiä tästä koeajosta ei kuitenkaan tehty, vaan todettiin vasteiden suuruuden olevan erottuva kaikissa lämpötiloissa ja kenties suurimmillaan 60°C:n lämpötilassa, jota päädyttiin käyttämään tasapainotusajan koeajoissa sekä sitä myöten kaikissa validointiajoissa. Lisäksi näytteiden lämmitys 60°C:n on huomattavasti nopeampaa kuin lämmitys korkeampiin lämpötiloihin ja näin lyhentää analyysiaikaa. Tasapainotuslämpötilan määrittämisajojen tulokset koottuina taulukossa 6.

Taulukko 6. Tasapainotuslämpötilan vaikutus vasteeseen sekä keskihajontaan.

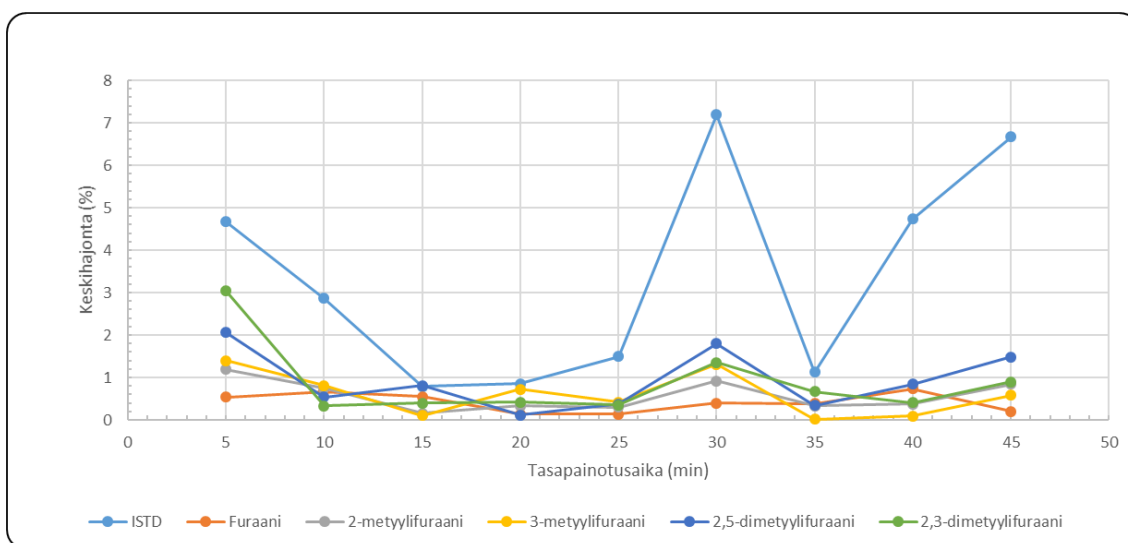
	60°C		70°C		80°C		Keskihajonnan keskiarvo analyyttille
Analyytti	Vaste	st.dev (%)	Vaste	st.dev (%)	Vaste	st.dev (%)	st.dev (%)
Furaani-d4	4,860	34,9	7,220	33,5	6,505	6,8	15,8
Furaani	2,527	21,7	1,677	36,7	1,748	10,2	13,3
2-metyylifuraani	4,517	23,8	2,904	50,3	3,163	10,0	20,5
3-metyylifuraani	2,010	14,5	1,329	84,5	1,693	2,6	44,2
2,5-dimetyylifuraani	5,276	23,5	3,422	50,2	3,654	9,4	20,7
2,3-dimetyylifuraani	4,539	23,1	2,409	91,2	3,096	9,0	44,0
Keskiarvo lämpötilassa	3,955	23,6	3,160	57,7	3,310	8,0	

Menetelmää kehitettiin, kuten aiemmin on mainittu, silmällä pitäen useampia tulevia matriiseja. Tästä syystä haettiin mieluummin yleistä tasapainotusaikaa vesiliuoksille, eikä vain keitetylle kahville. Standardisuoria kuitenkin kokeiltiin sekä veteen että kahviin tehtyinä, mutta merkittävää eroa ei havaittu. Keitetyssä kahvissa kahvista liuenneita yhdisteitä on vain 1,5–3 %, joten veteen tehdyn testin tulokset lienevät riittäviä keitetyn kahvin matriisillekin. Kuten alla olevasta kuvaajasta (kuva 6) nähdään, ei tasapainotusaikojen välillä, valitulla aikavälillä, ollut havaittavaa merkitystä vasteisiin.



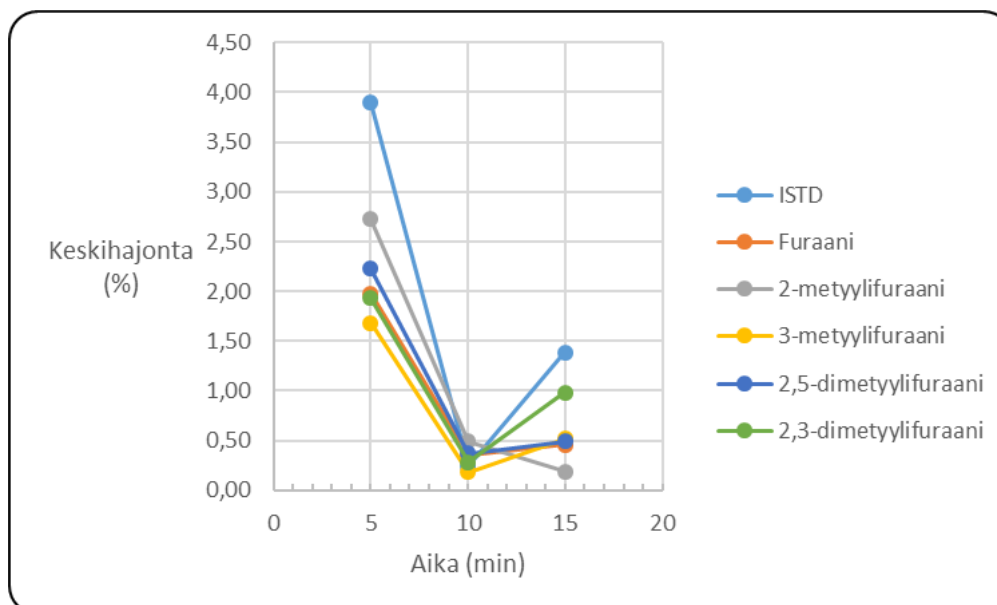
Kuva 6. Tasapainotusajan vaikutus vasteeseen suodatetulla kahvilla. Keskihajonnat huomioon ottaen tasapainotusaikojen välillä ei näytä olevan huomattavaa merkitystä vasteeseen annetulla aikavälillä.

Kun taas tarkastellaan keskihajontoja (kuva 7), nähdään, että keskihajonta on viiden minuutin kohdalla suurempi kuin pääsääntöisesti valitulla aikavälillä.



Kuva 7. Tasapainotusajan vaikutus vasteen keskihajontaan aikavälillä 5 – 45 min suodatetulla kahvilla. ISTD pois lukien, keskihajonta on suurimmillaan viiden minuutin kohdalla. ISTD:n heittely johtuu vielä tässä kohtaa sen kokeillusta annostelutavasta, josta sittemmin luovuttiin.

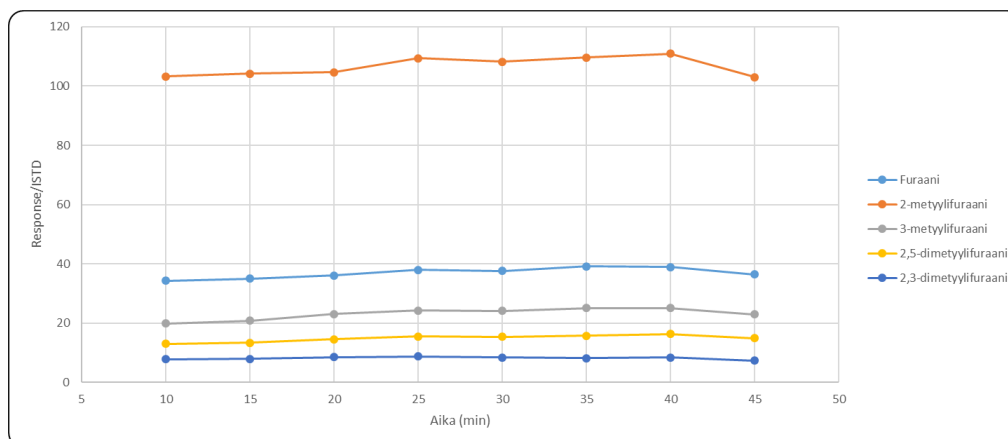
Koska edellinen ajo ei antanut vielä aivan yksiselitteisiä vastauksia optimaalisesta tasapainotusajasta, ajettiin uusi keskihajontaa tarkasteleva tarkentava ajo aikavälille 5 - 15 minuuttia useammalla rinnakkaisella näytteellä (kuva 8).



Kuva 8. Tasapainotusajan vaikutus vasteen keskihajontaan aikavälillä 5 – 15 min suodatetulla kahvilla. Tässä ajossa käytettiin kolmea rinnakkaista näytettä edellisen ajan kahden sijaan. Tämän sekä edellisen kuvaajan keskihajontojen perusteella päädyttiin ohjeelliseen 10 minuutin tasapainotusaikaan vesiliuoksissa.

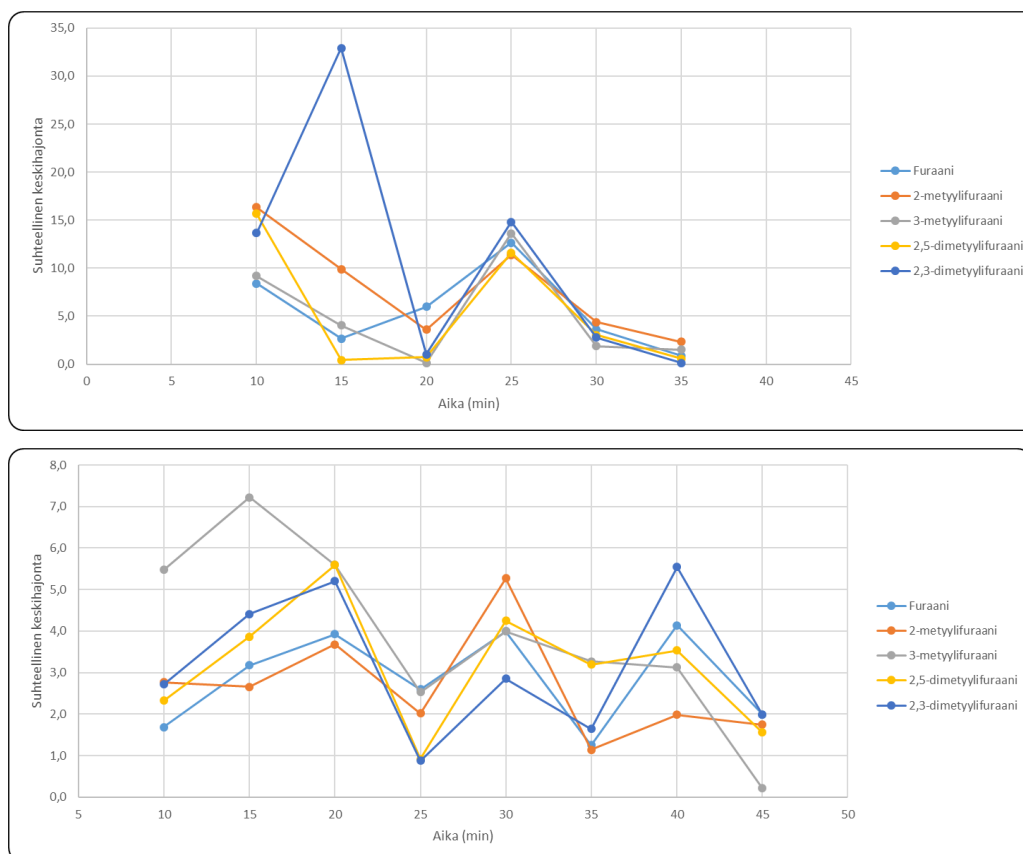
Näiden kahden keskihajontakuvaajan perusteella valittiin tasapainotusajaksi 10 minuuttia. Vaikka 10 ja 15 minuutin välillä ei voida sanoa olevan merkittävää eroa, näyttää siltä, että keskihajonta viiden minuutin kohdalla on kautta linjan suurempi kuin kymmenen minuutin kohdalla.

Kahvijauheen kohdalla näytteet punnittiin näytepulloihin ja lisättiin vesi, kuten luvussa 4.3.1 Näytteiden käsittely on kuvailtu. Näihin lisättiin 25 µl käyttöliuos II:ta, 225 µl metanolia sekä 50 µl ISTD:tä. Ensimmäisessä ajossa joka ajalle oli kaksi rinnakkaista näytettä mutta hajonta osoittautui hieman liian suureksi johtopäätösten tekemiseen ja seuraavaan ajoon laitettiin kolme rinnakkaista. Sarjan ensimmäinen tasapainotusaika oli kymmenen minuuttia ja siitä edettiin viiden minuutin askelluksilla 45 minuuttiin asti. Tulokset alla olevassa kuvaajassa (kuva 9).



Kuva 9. Tasapainotusajan vaikutus vasteeseen kahvijauheella. Vasteiden perusteella optimaalinen tasapainotusaika kahvijauheelle näyttää olevan 25 - 40 minuutin välillä.

Tässäkin tapauksessa tarkasteltiin myös keskihajontoja, alla (kuva 10) kahden eri ajon keskihajonnat viittaavat, yhdessä saatujen vasteiden kanssa, 35 minuutin tasapainotusajan olevan todennäköisesti luotettava.



Kuva 10. Tasapainotusajan vaikutus vasteen keskihajontaan kahvijauheella. Keskihajontojen kuvaajat kahvijauheen inkrementaalisista ajoista kahdelta eri päiväältä. Ylemmässä kaksi rinnakkaista näytettä, alemmassa kolme.

Tulevia matriiseja ajatellen on muutama helposti muokattava asia, joilla voidaan parantaa menetelmän herkkyyttä. Näistä ensimmäinen on ruiskun näytetilavuuden suurentaminen. Tällä hetkellä ruisku ottaa 250 µl näytettä näytepullon kaasufaasista. Tämä tilavuus on nykyisellä neulalla nostettavissa jopa kymmenkertaiseksi (2,5 ml). Suurempi näytemäärä tarkoittaa suurempia vasteita analyyteille ja parantaa näin menetelmän herkkyyttä. Saatavilla on tätäkin suurempia HS-ruiskuja, ainakin 5 ml:n tilavuuteen asti.

Veteen liukenemattomien näytteiden ollessa vesinäytteessä voidaan analyyttien suhteellista määrää kaasufaasissa kasvattaa nostamalla näytteen tilavuutta näytepullossa. On syytä pitää huoli, että neula mahtuu kuitenkin kaasufaasiin ja ettei se osu näytteen pintaan, jolloin olisi vaarana, että neula vetäisi nestettä sisäänsä. Tämä neste laajenisi räjähdysmäisesti injektorin korkeassa lämpötilassa ja voisi näin aiheuttaa paineiskun injektorilasissa. Injektorilasit on suunniteltu kestävänsä paineisku jopa 10 µl:n nestemäärästä, mutta ruiskulla siirrettävän näytetilavuuden ollessa 10 - 500 kertaa suurempia HS-menetelmässä voi näytepullon ylitäytöstä olla paljon vakavammat seuraukset. Neulan lävistyssyvyyttä voidaan muokata CTC-laitteella, mutta sen ei tulisi olla ainakaan pienempi kuin 5 mm, sillä HS-ruisku ei ota näytettä neulan päästä, vaan pienestä reiästä neulan varressa, neulan kärjen ollessa lähinnä septumin lävistämistä varten. Varsinaista minimiä lävistyssyvyyteen ei kuitenkaan ole mitattu.

Kuten luvussa 3 mainittiin, menetelmän herkkyyttä voidaan myös nostaa vaihtamalla se staattisesta MHE-menetelmäksi. Tämä kuitenkin lisäisi moninkertaisesti analyysiin kuluva-aikaa, ja lisäksi pienenevistä vasteista laskettava kokonaisvaste voi vaatia asiaan perehtymistä.

5.2 Validointi

Menetelmän validointia varten suunniteltiin saantokokeet sekä keitetylle kahville että kahvijauheelle. Vain kahvijauheelle oli saatavilla vertailumateriaali luotettavalla pitoisuudella (Fapasin toimittama). Saantokokeita suoritettiin kummallekin matriisille kolmena peräkkäisenä päivänä. Näiden kokeiden tuloksista tehtiin sitten päätelmät spesifisyydelle, oikeellisuudelle, toistettavuudelle, uusittavuudelle sekä lineaarisuudelle.

5.2.1 Spesifisyys

Spesifisyyttä tarkasteltiin ulkoisesta varmennetusta vertailunäytteestä saaduista referenssi/kohdeioniluvuista. Perustuen päätökseen 2002/657/EY: neuvoston direktiivin 96/23/EY täytäntöönpanosta määritysmenetelmien suorituskyvyn ja tulosten tulkinnan osalta verrattiin referenssi-ionien vaste/kohdeionin vastelukua pitoisuudeltaan lähimpien standardiliuosten vastaaviin.

Yhdisteiden osalta tulokset ovat keskiarvoista laskettuina raja-arvojen sisällä, mutta 2,3-dimetyylifuraanissa löytyi neljässä tarkasteltavassa ionisuhteessa (kaikkiaan 12 kpl) raja-arvot ylittäviä tuloksia. Tämä johtunee 2,3-dimetyylifuraanin pienistä pitoisuuksista Fapasin vertailumateriaalissa, jolloin matriisin taustaionit luovat suuren taustakohinan. Taulukossa 7 on esitetty suhteelliset raja-arvot mitattujen analyttien referenssi-ionien osalta, sekä keskimääräiset tulokset.

Taulukko 7. Ionien suhteellisen määrän raja-arvot sekä tulokset. Päätöksessä 2002/657/EY asetetut suhteelliset raja-arvot massaspektrometrille menetelmille spesifisyyden osalta on kuvattu vasemmalla ja oikealla on merkitty tulokset.

Sallittu vaihteluväli (%)			Keskimääräiset suhteelliset erot FAPAS-näytteistä standardeihin verrattuna (%)		
	Q1	Q2		Q1	Q2
Furaani	±15		Furaani	-5,1	
2-metyylifuraani	±10	±15	2-metyylifuraani	0,9	0,1
3-metyylifuraani	±10	±15	3-metyylifuraani	-1,4	-12,5
2,5-dimetyylifuraani	±10	±50	2,5-dimetyylifuraani	-4,2	7,4
2,3-dimetyylifuraani	±10	±15	2,3-dimetyylifuraani	-5,9	13,3

Validoinnin tässä kohdassa huomioitavaa on, että furaanissa ja ISTD:ssä oli määriteltynä vain yksi referenssi-ioni analyttiä kohden. Etenkin kvantitoitavalle furaanille voidaan lisätä myös toinen referenssi-ioni, mikäli se nähdään tarpeelliseksi.

5.2.2 Saantokokeet

Saannon määrittämistä varten keitetyle kahville tehtiin kolme väkevöitettyä sarjaa, joita mitattiin kolmena peräkkäisenä päivänä. Kahvijauheelle tehtiin vain yksi väkevöitetty sarja, sillä sen oikeellisuuden määrittämiseen oli käytettävissä myös varmennettu vertailumateriaali. Alla olevassa taulukossa 8 on listattu kahvijauheen saantokokeiden tulokset.

Taulukko 8. Kahvijauheen saantoprosentit validointiajoista. Taulukossa on merkittynä myös kolmen päivän saantoprosenttien yhdistetty hajonta sekä variaatiokerroin.

	Furaani	2-metyylifuraani	3-metyylifuraani	2,5-dimetyylifuraani	2,3-dimetyylifuraani
Keskiarvo (%)	72,93	53,65	86,55	53,83	40,43
Keskihajonta (prosenttiyksikköä)	2,39	3,65	15,24	10,05	7,39
Variaatiokerroin (%)	3,28	6,80	17,61	18,67	18,29

Näiden saantojen keskiarvoa on käytetty kahvijauhemittojen tuloksien korjaamiseen, Fapasin vertailumateriaalin pitoisuuksien määrittämisessä sekä paahtoasteiden välisen pitoisuuserojen mittaamisessa.

Keitetyn kahvin kohdalla käytettiin kolmea eri väkevöitettyä pitoisuutta. Tulokset esitetyinä taulukossa 9.

Taulukko 9. Valmistetun suodatinkahvin saantoprosenttien keskiarvo sekä saantoprosenttien yhdistetty keskihajonta ja variaatiokerroin.

Väkevöitetty sarja A	Furaani	2-metyylifuraani	3-metyylifuraani	2,5-dimetyylifuraani	2,3-dimetyylifuraani
Keskiarvo (%)	105,63	97,18	99,15	97,99	69,40
Keskihajonta (prosenttiyksikköä)	7,66	11,43	10,61	12,56	9,94
Variaatiokerroin (%)	7,25	11,76	10,70	12,82	14,32
Väkevöitetty sarja B	Furaani	2-metyylifuraani	3-metyylifuraani	2,5-dimetyylifuraani	2,3-dimetyylifuraani
Keskiarvo (%)	84,09	84,09	84,97	92,94	60,77
Keskihajonta (prosenttiyksikköä)	10,48	12,46	7,54	7,54	3,05
Variaatiokerroin (%)	12,47	14,82	8,87	8,11	5,01
Väkevöitetty sarja C	Furaani	2-metyylifuraani	3-metyylifuraani	2,5-dimetyylifuraani	2,3-dimetyylifuraani
Keskiarvo (%)	104,17	75,57	97,94	102,82	74,57
Keskihajonta (prosenttiyksikköä)	35,72	31,11	7,00	5,67	1,82
Variaatiokerroin (%)	34,29	41,16	7,15	5,51	2,45
Keskiarvo	Furaani	2-metyylifuraani	3-metyylifuraani	2,5-dimetyylifuraani	2,3-dimetyylifuraani
Keskiarvo (%)	97,96	85,61	94,02	97,91	68,25
Keskihajonta (prosenttiyksikköä)	15,06	10,18	3,42	2,70	1,91
Variaatiokerroin (%)	15,37	11,89	3,64	2,75	2,79

5.2.3 Oikeellisuus

Kahvijauheen furaanipitoisuuden osalta oikeellisuuden arviointiin käytettiin ulkoista vertailumateriaalia, jota analysoitiin kolmena päivänä, kuutena rinnakkaisena näytteenä kunkin päivänä. Tulokset on korjattu saantoprosenteilla sekä otettu laimennuskerroin huomioon. Kaikkien tuloksien keskiarvo jaettiin vertailumateriaalin pitoisuudella ja kerrottiin sadalla. Tulos alla taulukossa 10:

Taulukko 10. Laskettu menetelmän oikeellisuus käytetyn vertailumateriaalin avulla furaanille kahvijauhematriisissa.

Ulkoisen vertailunäytteen pitoisuus (ng/g)	Sallittu vaihteluväli (ng/g)	Mitattu pitoisuus (ng/g)	Keskihajonta (ng/g)	Variaatiokerroin (%)	Oikeellisuus (%)
2850	2070 - 3620	2874	143,7	5,00	100,84

Oikeellisuus näyttää kaikkien tulosten keskiarvoista laskettuna oikein hyvältä, mutta huomion arvoista on, että kahden ensimmäisen päivän keskiarvot ovat pitoisuusvälillä 2 640-2 680 ng/g, kun taas kolmannen päivän rinnakkaisten keskiarvo on n. 3 280 ng/g. Kaikki tulokset ovat Fapasin määrittelemän vaihteluvälin sisällä, mutta ero päivien välillä on silti merkittävä, mikä kuvastuukin keskihajonnassa.

Kahvijauheen muiden analyyttien osalta oikeellisuus määritettiin saantokokeiden perusteella, kuten tehtiin myös keitetyle kahville. Saantoprosenttijaon pitoisuuksia ei voida korjata saannoista itsellään saaduilla korjauskertoimilla. Varmennettujen vertailunäytteiden puuttuessa vaihtoehdot ovat vähissä ja oikeellisuuden korvaa näin ollen saantoprosentti muiden analyyttien kuin furaanin kohdalla. Nämä saantoprosenttien keskiarvot tutkituille analyyteille ovat esitettyinä edellisessä luvussa 5.2.2 Saantoprosentit taulukoissa 8 ja 9.

5.2.4 Toistettavuus

Toistettavuudella mitataan mittaustulosten luotettavuutta ja varianssia yhden näytesarjan sisällä, jolloin muuttujat mittaustilanteessa ovat minimoituja. Tämän osalta tarkasteltiin kulloisenkin päivän rinnakkaisten näytteiden mittausten keskihajontaa sekä variaatiokertoimia. Kahvijauheen osalta päädyttiin käyttämään väkevöitettyjen sarjojen sijasta Fapas-näytteiden mittauksia, jotta variaatiokertoimet, jotka ovat riippuvaisia näytteiden keskihajonnan suhteesta keskimääräiseen pitoisuuteen vastaisivat todellista tilannetta kahvijauheen osalta. Kahvijauheen toistettavuuden tulokset ovat esitetty taulukossa 11. 2,3-dimetyylifuraanin kohdalla toisen ajon tulos on pieni keskihajontaan nähden ja se jäikin alle määritysrajan. Luonnollisesti variaatiokerroin on tällöin suuri.

Taulukko 11. Toistettavuuden määrittämiseen lasketut eri päivien pitoisuudet, keskihajonnat sekä variaatiokerroin Fapas-kahvijauhenäytteen mittauksista.

Furaani	Pitoisuus KA (ng/g)	Keskihajonta (ng/g)	Variaatiokerroin (%)
Ajo 1	2680,24	123,42	4,60
Ajo 2	2645,90	138,64	5,24
Ajo 3	3296,09	150,73	4,57
2-metyylifuraani	Pitoisuus KA (ng/g)	Keskihajonta (ng/g)	Variaatiokerroin (%)
Ajo 1	8484,84	409,27	4,82
Ajo 2	8505,42	507,12	5,96
Ajo 3	10522,27	599,32	5,70
3-metyylifuraani	Pitoisuus KA (ng/g)	Keskihajonta (ng/g)	Variaatiokerroin (%)
Ajo 1	322,62	15,27	4,73
Ajo 2	385,89	21,12	5,47
Ajo 3	367,13	27,37	7,45
2,5-dimetyylifuraani	Pitoisuus KA (ng/g)	Keskihajonta (ng/g)	Variaatiokerroin (%)
Ajo 1	593,44	51,02	8,60
Ajo 2	746,44	59,77	8,01
Ajo 3	590,43	45,59	7,72
2,3-dimetyylifuraani	Pitoisuus (ng/g)	Keskihajonta (ng/g)	Variaatiokerroin (%)
Ajo 1	47,23	7,16	15,16
Ajo 2	16,78	8,47	50,47
Ajo 3	62,41	4,67	7,49

Valmistetulle suodatinkahville toistettavuuden arvojen määrittelyyn käytettiin väkevöitetyn sarjan B mittaustuloksia. Johtuen suodatinkahvin, jopa pitoisuuksiltaan maltillisesti väkevöitetyn, verrattain pienistä pitoisuuksista ovat variaatiokerroin suurempia kuin kahvijauheella. Oletettavasti toistettavuuden osalta tulokset olisivat huomattavasti parempia, mikäli kalibrointipisteet olisivat paremmin keskitettyjä suodatinkahvin pitoisuuksien ympärille. Suodatinkahvin osalta menetelmän toistettavuuden arvot ovat esitettyinä taulukossa 12.

Taulukko 12. Suodatinkahville lasketut päiväkohtaiset keskimääräiset pitoisuudet, keskihajonnat sekä variaatiokerroimet väkevöitetyn sarjan B mittauksista.

Furaani	Pitoisuus KA (ng/g)	Keskihajonta (ng/g)	Variaatiokerroin (%)
Ajo 1	89,04	7,96	8,94
Ajo 2	91,18	6,17	6,77
Ajo 3	72,05	7,59	10,53
2-metyylifuraani	Pitoisuus KA (ng/g)	Keskihajonta (ng/g)	Variaatiokerroin (%)
Ajo 1	91,51	8,33	9,10
Ajo 2	91,07	8,51	9,34
Ajo 3	69,70	9,07	13,02
3-metyylifuraani	Pitoisuus KA (ng/g)	Keskihajonta (ng/g)	Variaatiokerroin (%)
Ajo 1	91,96	7,76	8,44
Ajo 2	85,96	6,30	7,33
Ajo 3	76,98	6,55	8,50
2,5-dimetyylifuraani	Pitoisuus KA (ng/g)	Keskihajonta (ng/g)	Variaatiokerroin (%)
Ajo 1	99,96	7,85	7,85
Ajo 2	93,88	7,01	7,46
Ajo 3	84,97	7,30	8,59
2,3-dimetyylifuraani	Pitoisuus (ng/g)	Keskihajonta (ng/g)	Variaatiokerroin (%)
Ajo 1	63,01	5,16	8,18
Ajo 2	61,99	5,04	8,13
Ajo 3	57,30	4,69	8,19

5.2.5 Uusittavuus

Uusittavuutta on tarkasteltu Eviran ohjeen mukaisesti kolmena päivänä ajetuilla näytesarjoilla. Tässä kuten toistettavuudessaakin on käytetty Fapasin näytteen mittaustuloksia. Näistä lasketaan keskimääräinen pitoisuus, toistojen yhdistetty keskihajonta ja näiden suhteesta variaatiokerroimet. Näin saadaan kuva, kuinka paljon tuloksissa on variaatiota eri näytesarjojen välillä. Taulukossa 13 on listattuna tulokset kahvijauheen osalta ja taulukossa 14 valmistetun suodatinkahvin.

Taulukko 13. Kahvijauheen uusittavuuden arvot.

	Pitoisuus KA (ng/g)	Keskihajonta (ng/g)	Variaatiokerroin (%)
Furaani	2874,08	143,71	5,00
2-metyylifuraani	9170,84	571,43	6,23
3-metyylifuraani	358,55	26,10	7,28
2,5-dimetyylifuraani	643,44	43,46	6,75
2,3-dimetyylifuraani	42,14	4,46	10,58

Variaatiokertoimet kahvijauheen näytesarjojen välillä ovat siedettävissä rajoissa, mutta heikoimmillaan 2,3-dimetyylifuraanin kohdalla, johtuen taas luultavasti verrattain pienestä pitoisuudesta.

Valmistetussa suodatinkahvissa tulokset ovat myös siedettäviä keskihajonnan kannalta. Furaanin ja 2-metyylifuraanin keskihajonta tosin on jäänyt erityisen heikoksi väkevöityssä sarjassa C. Tämä johtuu siitä, että molempien analyyttien pitoisuudet valmistetun kahvin matriisissa ovat verrattain korkeita, jolloin vähiten väkevöitetyn sarjan lisäys jäi suhteellisesti pieneksi. Tällöin pienetkin satunnaisvaihtelut menetelmässä korostuvat tuloksissa.

Taulukko 14. Saantokokeiden väkevöitetyn sarjan B perusteella lasketut uusittavuuden arvot valmistetulle suodatinkahville.

	Pitoisuus KA (ng/g)	Keskihajonta (ng/g)	Variaatio kerroin (%)
Furaani	72,05	7,24	10,04
2-metyylifuraani	69,70	6,38	9,16
3-metyylifuraani	76,98	6,24	8,11
2,5-dimetyylifuraani	84,97	6,96	8,19
2,3-dimetyylifuraani	57,30	4,47	7,81

Mikäli variaatiokertoimet olisivat huomattavasti suurempia uusittavuudessa kuin toistettavuudessa, olisi syytä etsiä tuloksiin vaikuttavia muuttujia eri päivien mittausolosuhteissa. Nyt erot ovat verrattain pieniä, eikä syytä tarkempaan tarkasteluun tämän osalta nähdä.

5.2.6 Havaitsemis- ja määrittäysraja

Kahvijauheen osalta havaitsemisraja (Limit of Detection, LoD) laskettiin määrittämällä keskiarvot kaikkien kolmen päivän nollanäytteiden pitoisuuksista (korjaten tulokset saantoprosentilla sekä laimennuskertoimella) ja tähän keskiarvoon lisättiin 3*tulosten välinen keskihajonta Eviran sisäisten ohjeiden mukaisesti. Tulokset alla olevassa taulukossa 15. Määrittäysraja (Limit of Quantitation, LoQ) asetettiin kaksi kertaa suuremmaksi.

Taulukko 15. Havaitsemis- sekä määrittäysrajat.

Kahvijauhe	Furaani	2-metyylifuraani	3-metyylifuraani	2,5-dimetyylifuraani	2,3-dimetyylifuraani
Havaitsemisraja (ng/g)	13,8	29,4	14,1	25,4	26,2
Määrittäysraja (ng/g)	27,6	58,8	28,2	50,9	52,4
Suodatinkahvi	Furaani	2-metyylifuraani	3-metyylifuraani	2,5-dimetyylifuraani	2,3-dimetyylifuraani
Havaitsemisraja (ng/ml)	0,8	1,5	1,0	1,4	1,1
Määrittäysraja (ng/ml)	1,6	3,0	2,1	2,8	2,2

Keitetylle kahville rajat laskettiin samalla tavalla kuin jauheellekin, mutta tietenkin kertoimet jäivät pois. Nollanäytteiden pitoisuudet laskettiin päiväkohtaisten standardiliuosten 1–5 mitatuista pitoisuuksista koostuvilla kalibrointisuorilla, jotka pakotettiin origon kautta.

5.2.7 Mittausalue ja lineaarisuus

Käytännössä mittausalueen alarajaksi valitaan edellisessä luvussa määritelty määrittäysraja (LoQ). Yläraja tämän validoinnin osalta määrittyy suurimmaksi käytetyksi standardiksi. Tämä siksi, että kuten taulukosta 14 voidaan havaita, on viitteitä, että käytetyt standardisuorat ovat lineaarisuudeltaan riittäviä, sillä korrelaatiokertoimien keskiarvot ovat suuremmat kuin 0,995. Tämä itsessään ei riitä lineaarisuuden määrittämiseksi, ja lisäksi laskettiin myös residuaalit (eli poikkeamat mittauspisteiden ja kalibrointisuoran välillä) ja niiden olisi oltava Eviran ohjeen mukaan ± 20 %:n rajoissa. Tämä kuitenkin edellyttää seitsemästä standardipisteestä viiden mittausalueelle sopivimman valikoimista. Mikäli käytetään kaikkia seitsemää pistettä, nähdään suuria pudotuksia lineaarisuudessa (korrelaatiokertoimessa ja residuaaleissa), sillä käytetty skaala on liian suuri mittauspisteiden lukumäärään nähden. Tämä johtuu siitä, että työssä pyrittiin todistamaan sen soveltuvan laajalle alueelle, mutta rutiininomaisessa työskentelyssä kalibrointisuora tulisi tehdä paljon paremmin vastaamaan odotetun pitoisuuden tarpeita. Kalibrointisuoran tar-

kentamisesta odotettujen pitoisuuksien ympärille saataisiin tarkempia tuloksia ja päästäisiin vähemmällä työllä, mikäli kalibrointisuoran pisteitä ei tarvitsisi valikoida. Mittausalueen kalibrointisuorista suoritettiin regressioanalyysi Excelillä ja tulokset koottiin taulukkoon 16.

Taulukko 16. Tulokset regressioanalyysistä.

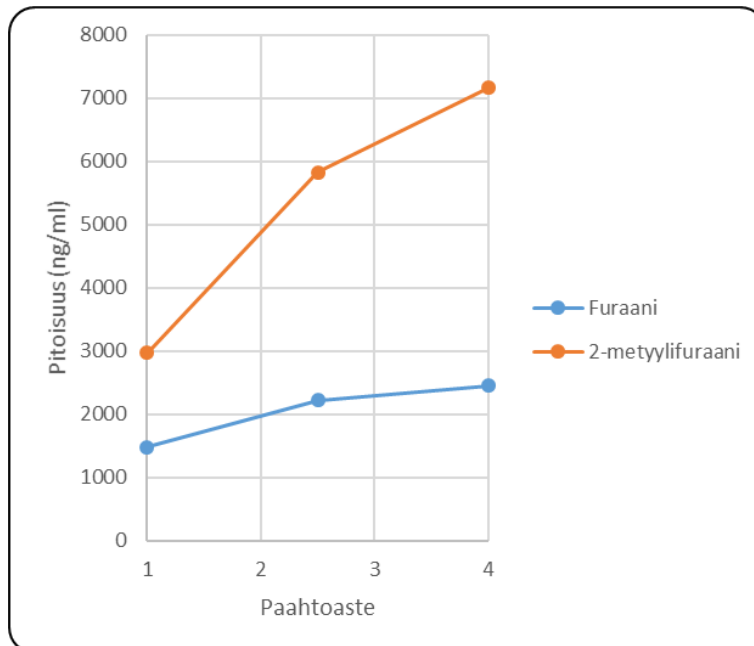
Valmistettu suodatinkahvi	Korrelaatiokerroin (r) (KA)	Residuaalien keskiarvo (%)	Residuaalien keskihajonta (%)	Kulmakerroin (KA)
Furaani	0,9997	1,7	12,5	0,233
2-metyylifuraani	0,9994	-2,6	12,7	0,420
3-metyylifuraani	0,9992	-7,9	9,2	0,448
2,5-dimetyylifuraani	0,9988	-12,1	9,8	0,547
2,3-dimetyylifuraani	0,9987	-14,2	10,0	0,500

Kahvijauhe	Korrelaatiokerroin (r) (KA)	Residuaalien keskiarvo (%)	Residuaalien keskihajonta (%)	Kulmakerroin (KA)
Furaani	0,9975	-12,7	13,3	0,124
2-metyylifuraani	0,9975	-13,1	13,4	0,228
3-metyylifuraani	0,9988	-0,4	11,1	0,185
2,5-dimetyylifuraani	0,9987	0,4	11,5	0,144
2,3-dimetyylifuraani	0,9998	1,2	11,6	0,143

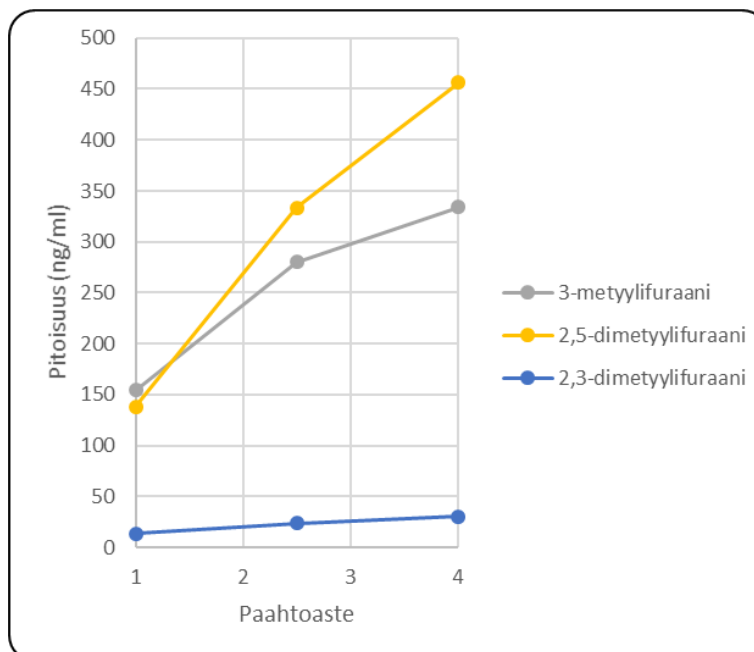
Kuten yllä on taulukoitu, havaittiin residuaalien pysyvän keskimäärin annetun ± 20 %:n rajoissa. Tämä yhdessä mainioiden korrelaatiokertoimien kanssa kertoo validoinnin onnistuneen lineaarisuuden osalta.

5.3 Kahvin paahtoasteiden vertailu

Kuten alla olevasta kuvista 11 sekä 12 voidaan havaita, paahtoasteella näyttää olevan selkeä korrelaatio testattujen furaaniyhdisteiden määrän kanssa. Tätä tutkimusta on tehty oletuksella, että Juhlamokan paahtoasteiden välinen ero on ainoastaan paahtamisessa, ei esimerkiksi kahvisekoituksessa. Tämän tutkimuksen perusteella ei voi siis määritellä, onko yhdisteiden määrän nousu suhteessa paahtamiseen lineaarista, sillä tarkkaa tietoa valmistajan eri paahtoasteiden välisistä eroista ei ole tähän työhön hankittu. Mahdollisia muuttujia ovat mm. paahtolämpötila, paahton kesto, kosteusprosentti sekä mahdolliset eroavaisuudet esikäsittelyissä.



Kuva 11. Paahtoasteen vaikutus furaaniin ja 2-metyylifuraaniin.



Kuva 12. Paahtoasteen vaikutus 3-metyyli- sekä 2,5-dimetyylifuraaniin. 2,3-dimetyylifuraanin nouseva trendi on myös merkitty kuvaajaan, vaikka sen pitoisuudet jäivätkin alle määrittämissä, eivätkä siksi ole luotettavia.

2-metyylifuraanin korkean lähtötason ja erityisen jyrkän nousun myötä kahdessa tummemmista paahtoasteissa pitoisuudet nousivat jopa suuremmiksi kuin väkevin standardi. Tulokset niiden osalta ovat siis ekstrapoloituja, ja niitä voidaan pitää vain suuntaa

antavina tuloksina. Taulukossa 17 on listattuna mitatut pitoisuudet kullekin paahtoasteelle.

Taulukko 17. Furaaniyhdisteiden pitoisuudet eri paahtoasteissa. Ekstrapoloidut tulokset ovat merkitty punaisella värillä.

Juhlamokka	Furaani (ng/g)	2-metyylifuraani (ng/g)	3-metyylifuraani (ng/g)	2,5-dimetyylifuraani (ng/g)	2,3-dimetyylifuraani (ng/g)
Vaalea (A)	1477	2970	154	138	na
Tumma (B)	2221	5825	280	334	na
Tosi tumma (C)	2453	7158	334	456	na

Kaikkien analyttien, paitsi 2,3-dimetyylifuraanin osalta rinnakkaisten hajonta pysyi 1–5 %:n välillä. 2,3-dimetyylifuraanin kohdalla hajonta ei myöskään ollut kuin 6–10 %:n välillä, mutta sen pitoisuudet jäivät alle aiemmin määritellyn määritysrajan. Siitä huolimatta siinäkin on havaittavissa samankaltainen nouseva trendi paahtoasteen myötä kuin muis-
sakin analyteissa.

6 Yhteenveto

Työn tarkoitus oli nopeuttaa furaaniyhdisteiden kvantitointia vaihtamalla laitteisto ja menetelmä automatisoidummaksi sekä todentaa uuden menetelmän toimivuus. Menetelmää luotiin myös silmällä pitäen mahdollisuutta käyttää sitä laajalle kirjolle erilaisia näyttematriiseja. Työn molemmat osiot, menetelmän kehitys (sisältäen laitteiston käyttöönoton) sekä validointi, voidaan katsoa onnistuneiksi. Menetelmä toimii odotetulla tavalla ja validoinnin saantoprosentit ovat korjauskertoimien käytön jälkeen hyviä. Menetelmän pääasiallinen käyttökohde tulee luultavasti olemaan nimenomaan kahvijauheen analysointi ja sen osalta tulokset, etenkin pienet variaatiokertoimet, ovat merkkejä menetelmän soveltuvuudesta. Paras osoitus lienee Fapasin ulkoisen vertailumateriaalin mittauksen tarkka pitoisuus furaanin osalta.

Uusi menetelmä on myös vanhaan manuaaliseen kiinteäfaasimikrouuttoon nähden huomattavasti nopeampi ja mahdollistaa 32:n näytepullon kokoisen sarjan automaattisen ajon, vapauttaen näin henkilötöyääkästä käytettäväksi toisaalla. Menetelmää testattiin kenties osittain kuriositeettina vertailemalla eri paahtoasteiden furaaniyhdistepitoisuuksia. Tämä johti mielenkiintoiseen havaintoon pitoisuuksien radikaalista noususta paahtoasteen kasvun myötä.

Menetelmää käytäntöön sovellettaessa on, kuten aiemmin mainittu, syytä tarkentaa kalibrintiliuosten vahvuudet tarkemmin odotettujen pitoisuuksien ympärille tutkittavan matriisin mukaan. Menetelmän kehityksessä käytettyä laajaa skaalaa ei realistisesti tulla tarvitsemaan minkään näytteen yhteydessä ja tulokset voivat vain tarkentua kalibrintisuoran vastatessa paremmin kulloistakin tarvetta. Laajan skaalan takia tässä työssä jätettiin suorittamatta myös laajennettu mittausepävarmuus, joka lienee parempi suoritettavaksi em. paremmin odotettua pitoisuutta vastaavilla kalibrintisuorilla ja jokaiselle näytematriisille erikseen. Luvussa 5.1 Menetelmän kehitys käydään läpi myös keinoja menetelmän hienosäätöön, mikäli tulevilla näytematriiseilla tarvitaan suurempia herkkyyksiä pienempien pitoisuuksien tai liukoisuuserojen takia.

Lähteet

- 1 Furan | C₄H₄O – PubChem. Verkkoaineisto. National Center for Biotechnology Information. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/furan#section=Top>> Luettu 24.5.2018
- 2 2-Methylfuran | C₅H₆O – PubChem. Verkkoaineisto. National Center for Biotechnology Information. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10797#section=Top>> Luettu 24.5.2018
- 3 Recent progress in the development of biofuel 2,5-dimethylfuran. 2014. Verkkoaineisto. Sciencedirect. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/>> Luettu 24.5.2018
- 4 Risks for public health related to the presence of furan and methylfurans in food. 2017. Verkkoaineisto. EFSA Journal. <<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2017.5005>> Päivitetty 25.10.2017. Luettu 18.7.2018.
- 5 Altaki, M.S. Santos, F.J. Galceran M.T. 2010. Occurrence of furan in coffee from Spanish market: Contribution of brewing and roasting. Verkkoaineisto. Food Chemistry. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610015530?via%3Dihub>>. Päivitetty 15.6.2011. Luettu 18.7.2018.
- 6 A. Becalski, S. Hayward, T. Krakalovich, L. Pelletier, V. Roscoe & E. Vavasour (2010) Development of an analytical method and survey of foods for furan, 2-methylfuran and 3-methylfuran with estimated exposure. Food Additives & Contaminants: Part A. Julkaistu 18.5.2010. Luettu 12.6.2018
- 7 Kolb, Bruno & Ettre, Leslie S. 2006. Static Headspace – Gas Chromatography: Theory and Practice. Yhdysvallat: John Wiley & Sons, Inc.
- 8 Mass-to-Charge Ratio – Chemistry LibreTexts. Verkkoaineisto. LibreTexts. <chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Reference/Organic_Chemistry_Glossary/Mass-to-Charge_Ratio> Päivitetty 5.6.2019. Viitattu 13.11.2019.
- 9 Kuinka paljon kahvia kuuluu mitata? | Paulig.fi. Verkkoaineisto. Oy Gustav Paulig Ab. <https://www.paulig.fi/kahvijutut/kuinka-paljon-kahvia-kuuluu-mitata?gclid=EAlaIQobChMI6L77sr-83AIVF-WaCh3ESw7wEAAYASAAEg-JUmPD_BwE>. Päivitetty 14.6.2016. Luettu 26.7.2018

Liitteet

Liite 1 Pipetointilomake

Punnitustulokset	
Käyttöliuos I	Punnitustulos (g)
Metanoli (50 ml)	
Furaani (200 µl)	
2-metyylifuraani (200 µl)	
3-metyylifuraani (200 µl)	
2,3-dimetyylifuraani (200 µl)	
2,5-dimetyylifuraani (200 µl)	
Käyttöliuos II	Punnitustulos (g)
Metanoli (50 ml)	
Käyttöliuos I (200 µl)	
Käyttöliuos III	Punnitustulos (g)
Metanoli (50 ml)	
Käyttöliuos II (2 ml)	
Käyttöliuos IV	Punnitustulos (g)
Metanoli (50 ml)	
Käyttöliuos III (2 ml)	
ISTD V	Punnitustulos (g)
Metanoli (50 ml)	
Furaani-d ₄ (50 µl)	
ISTD VI	Punnitustulos (g)
Metanoli (50 ml)	
ISTD V (50 µl)	