



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Esra-Maria Roue

Agilent Intuvo GC-MS -laitteen validointi PAH-yhdisteiden määrittämiseksi ilmanäytteistä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

27.10.2019

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Esra-Maria Roue Agilent Intuvo GC-MS -laitteen validointi PAH-yhdisteiden määrittämiseksi ilmanäytteistä 29 sivua + 1 liitettä 27.10.2019
Tutkinto	Laboratorioanalytiikka (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat	Yliopettaja Jukka Niiranen Asiantuntija Outi Kammonen Tuotepäällikkö Evgeny Parshintsev
<p>Opinnäytetyö tehtiin Työterveyslaitoksen Työympäristölaboratoriot-yksikössä. Työterveyslaitos on työhyvinvoinnin asiantuntijalaitos ja FINAS-akkreditoitu testauslaboratorio.</p> <p>Työn tarkoituksena oli tehdä käyttöönottovalidointi uudelle Agilent Intuvo GC-MS -laitteelle, joka on rakenteeltaan vanhempiin malleihin verrattuna täysin uudenlainen kaasukromatografi. Tarkoituksena oli myös siirtää polysyklisen aromaattisten hiilivetyjen (PAH) analysointi laitteelle. Työterveyslaitoksella Agilent Intuvo GC-MS -laitteella analysoidaan PAH-yhdisteitä ilmanäytteistä, jotka on kerätty XAD-keräimille sekä teflonsuodattimille. Tässä opinnäytetyössä laitteen validointi on kuitenkin tehty vain XAD-keräinten osalta.</p> <p>Työterveyslaitoksen menetelmällä <i>PAH-yhdisteiden määrittäminen ilmanäytteistä GC-MS-menetelmällä</i> määritettäviä yhdisteitä ovat EPA:n priorisoimat 16 PAH-yhdistettä ja niiden lisäksi 1- ja 2-metyyli-naftaleenit. Määritettäviä validoinnin suureita olivat toteamis- ja määrittämissuorat, lineaarisuus, tarkkuus, toistettavuus, vertailukelpoisuus Agilent 6890N GC-MS -laitteella saatuihin tuloksiin sekä mittausepävarmuus.</p> <p>Saatujen tulosten perusteella todettiin, että menetelmä soveltuu hyvin analyysiin ja validointi täyttää asetetut vaatimukset. Agilent Intuvo GC-MS -laitteen ja Työterveyslaitoksella aiemmin käytössä olleen Agilent 6890N GC-MS -laitteen vertailussa laitteet antoivat samankaltaisia tuloksia, joten laitteen ei katsota vaikuttavan merkittävästi tuloksiin. Agilent Intuvo GC-MS -laitteisto voidaan siis ottaa käyttöön XAD-näytteiden analysoinnin osalta. Validointi tulee suorittaa vielä teflonsuodattimien osalta.</p>	
Avainsanat	polysykliset aromaattiset hiilivedyt, PAH, kaasukromatografia-massaspektrometria, GC-MS, Agilent Intuvo GC-MS

Author Title	Esra-Maria Roue Validation of Agilent Intuvo GC-MS for Determination of PAH Compounds in Air Samples
Number of Pages Date	29 pages + 1 appendix 27 October 2019
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Jukka Niiranen, Senior Lecturer Outi Kammonen, Specialist Evgeny Parshintsev, Product manager
<p>This thesis study was done at the Working Environment Laboratories Unit of the Finnish Institute of Occupational Health. The Finnish Institute of Occupational Health is an expert institute of well-being at work and a FINAS accredited testing laboratory.</p> <p>The purpose of this thesis study was to carry out commissioning and validation for the new Agilent Intuvo GC-MS, which, compared to older models, is a completely new gas chromatograph. The purpose was also to transfer the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) to the Agilent Intuvo GC-MS. At the Occupational Health Institute the Agilent Intuvo GC-MS is used for analyzing PAH compounds in air samples collected on XAD collectors and teflon filters. In this thesis study, the device validation is, however, done only from XAD collectors.</p> <p>The compounds that were assayed by the analysis method by the Finnish Institute of Occupational Health are the 16 PAH compounds prioritized by the EPA, in addition to the 1- and 2-methylnaphthalenes. Validation parameters that were determined included detection and assay limits, linearity, accuracy, repeatability, comparability with results from the older Agilent 6890N GC-MS, and measurement uncertainty.</p> <p>Based on the results obtained, it was found that the method is well suited for analysis and validation meets the set requirements. A comparison between the Agilent Intuvo GC-MS and the Agilent 6890N, which was previously used by the Finnish Institute of Occupational Health, gave similar results and so the device itself is not considered to have a significant impact on the results. The Agilent Intuvo GC-MS can thus be deployed for XAD sample analysis. Validation is still required for teflon filters.</p>	
Keywords	polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH, gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS, Agilent Intuvo GC-MS

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Työn tausta	2
2.1	Polysykliset aromaattiset hiilivedyt, PAH	2
2.1.1	PAH-yhdisteet sisäilmassa	3
2.1.2	PAH-yhdisteiden vaikutus ihmisiin	4
2.2	Kaasukromatografia-massaspektrometria, GC-MS	5
2.2.1	Kaasukromatografia, GC	5
2.2.2	Massaspektrometria, MS	8
2.3	Agilent Intuvo 9000 GC	9
3	Validointi	12
4	Laitteet ja reagenssit	13
5	Työn suoritus	14
5.1	Menetelmän kuvaus ja tutkittavat yhdisteet	14
5.2	Näytteenotto ja näytteiden säilytys	15
5.3	Näytteiden esikäsittely ja kalibrointiliuosten valmistus	16
6	Validoinnin tulokset	17
6.1	Määrittämis- ja toteamisrajat	17
6.2	Lineaarisuus	19
6.3	Tarkkuus ja toistettavuus	21
6.3.1	Vertailukelpoisuus Agilent 6890N GC-MS –laitteella saatuihin tuloksiin	22
6.3.2	Oikeellisuus	24
6.3.3	Mittausepävarmuus	25
7	Yhteenveto	27
	Lähteet	28

Liite 1. Parittaiset kahden otoksen t-testit keskiarvoille

Lyhenteet

CI	Chemical ionization, kemiallinen ionisaatio
EI	Electron impact, elektroni-ionisaatio
EPA	Environmental Protection Agency, Yhdysvaltain ympäristösuojeluvirasto
FINAS	Finnish Accreditation Service, Suomen kansallinen akkreditointielin
GC	Kaasukromatografia
GC-MS	Kaasukromatografia-massaspektrometria
MS	Massaspektrometria
PAH	Polysykliset aromaattiset hiilivedyt
POP	Persistent Organic Pollutant, POP-yhdisteet eli pysyvät orgaaniset ympäristömyrkyt
SIM	Selected-ion monitoring, selektiivinen ionimonitorointi
TIC	Total ion chromatogram, totaali-ionikromatogrammi

1 Johdanto

Polysykliset aromaattiset hiilivedyt (PAH) ovat ryhmä orgaanisia yhdisteitä, jotka koostuvat kahdesta tai useammasta fuusioituneesta aromaattisesta renkaasta. PAH-yhdisteitä esiintyy ympäristössämme lähes kaikkialla sekä höyry- että hiukkasjakeessa. PAH-yhdisteet syntyvät orgaanisen materiaalin epätäydellisen palamisen seurauksena. Osa PAH-yhdisteistä on todettu karsinogeenisiksi. Suomessa ei ole kuitenkaan asetettu terveysperusteista raja-arvoa PAH-yhdisteiden kokonaispitoisuudelle sisäilmassa. Naftaleeni on ainoa PAH-yhdiste, jolle on asetettu sisäilman ohjearvoja. Työterveyslaitos on asettanut tavoitetasoksi $<2 \mu\text{g}/\text{m}^3$. [1; 2.]

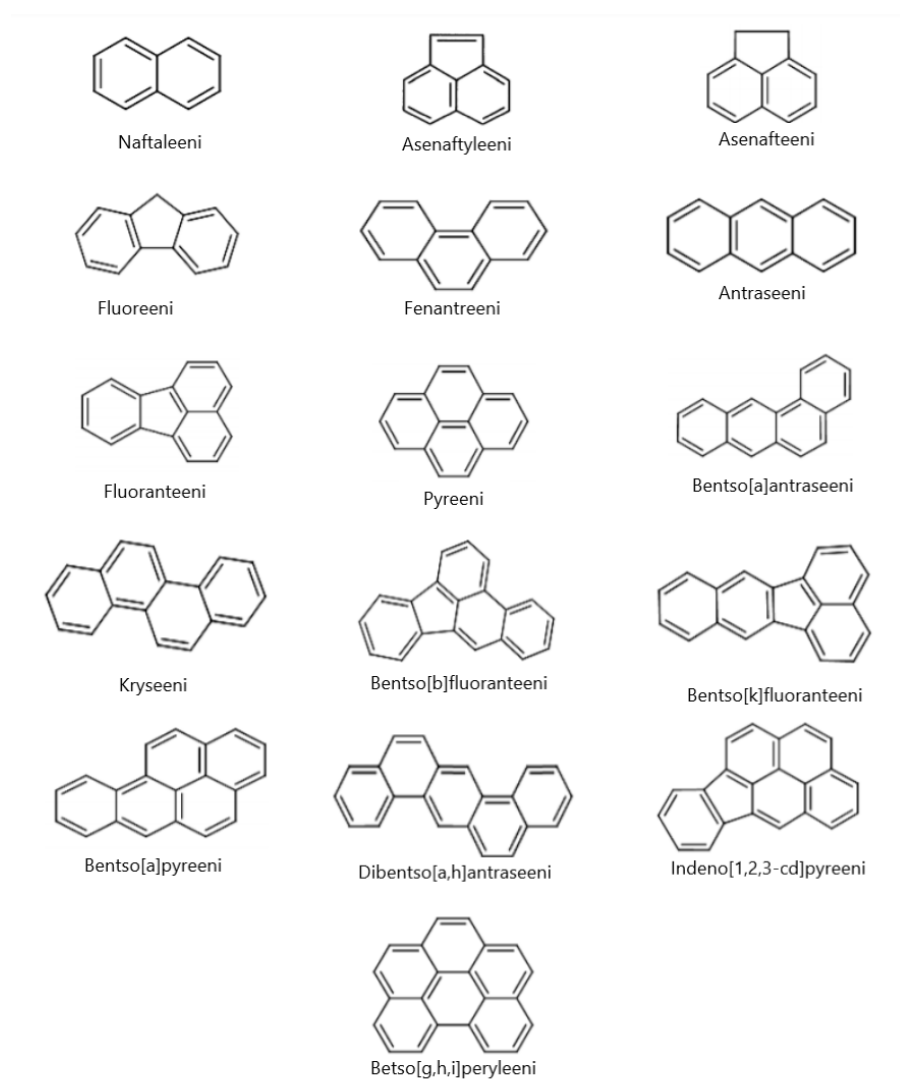
Opinnäytetyö tehtiin Työterveyslaitoksen Työympäristölaboratoriot-yksikössä. Työterveyslaitos on työhyvinvoinnin asiantuntijalaitos ja FINAS-akkreditoitu testauslaboratorio (T013, EN ISO/IEC 17025), jolla on Ruokaviraston hyväksyntä asumisterveyteen liittyvissä määrittämissä. Työterveyslaitoksella analysoitavia PAH-yhdisteitä ovat EPA:n (Yhdysvaltojen ympäristösuojeluvirasto) priorisoimat 16 PAH-yhdistettä sekä 1- ja 2-metyylinaftaleenit.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli validoida Työterveyslaitoksen uusi Agilent Intuvo GC-MS -laite soveltaen Työterveyslaitoksen menetelmää *PAH-yhdisteiden määrittäminen ilmanäytteistä GC-MS -menetelmällä*. Työn tavoitteena oli siirtää PAH-yhdisteiden analysointi ilmanäytteistä uudelle Agilent Intuvo GC-MS -laitteelle aikaisemmin käytössä olleelta Agilent 6890N-laitteelta. Työterveyslaitoksella ilmanäytteitä kerätään sekä adsorptioputkiin (XAD; Orto 43) että teflonsuodattimille. Tässä työssä on keskitytty XAD- ilmanäytteisiin. Määritettäviä validoinnin suureita ovat toteamis- ja määrittämissrajat, lineaarisuus, tarkkuus, toistettavuus, vertailukelpoisuus ja mittausepävarmuus.

2 Työn tausta

2.1 Polysykliset aromaattiset hiilivedyt, PAH

PAH-yhdisteet ovat useiden satojen orgaanisten yhdisteiden ryhmä, jotka sisältävät kaksi tai useamman aromaattisen renkaan ja esiintyvät yleensä monimutkaisina seoksina yksittäisten yhdisteiden sijaan. PAH-yhdisteet luokitellaan niiden sulamis- ja kiehumispisteen, höyrynpaineen sekä vesiliukoisuuden perusteella niiden rakenteesta riippuen. EPA:n priorisoiman 16 PAH-yhdisteen rakennekaavat ovat kuvassa 1. [2; 3.]



Kuva 1. EPA:n priorisoimien PAH-yhdisteiden rakennekaavat.

PAH-yhdisteiden kemiallisissa ja fysikaalisissa ominaisuuksissa on suuria vaihteluja. Yhdisteet ovat huoneenlämpötilassa kiinteitä ja väriykseltään yleensä joko värittömiä, valkoisia tai vaaleankeltaisia. PAH-yhdisteille ominaista on korkea sulamis- (noin 80–440 °C) ja kiehumispiste (noin 200–600 °C), alhaiset höyrynpaineet ja vesiliukoisuudet sekä korkeat n-oktanoli/vesi (log Kow) -jakokertoimet. PAH-yhdisteet liukenevat useisiin orgaanisiin liuottimiin, ja ne ovat erittäin lipofiilisiä. PAH-yhdisteet ovat ympäristössä pysyviä orgaanisia epäpuhtauksia (POP), joiden pysyvyys kasvaa renkaiden lukumäärän myötä. [2.] Taulukossa 1 on esitetty EPA:n priorisoimien 16 PAH-yhdisteen fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia.

Taulukko 1. Yleisimmin määritetyt PAH-yhdisteet eli ns. "EPA-PAH 16" -yhdisteet ja niiden fysikaalis-kemialliset ominaisuudet.

Yhdiste	Molekyylikaava	Moolimassa (g/mol)	Sulamispiste (°C)	Kiehumispiste (°C)	Höyrynpaine 25 °C (Pa)	logKow
Naftaleeni	C ₁₀ H ₈	128	81	218	10	3,4
Asenaftyleeni	C ₁₂ H ₈	152	92	280	0,89	4,0
Asenafteeni	C ₁₂ H ₁₀	154	95	279	0,29	3,9
Fluoreeni	C ₁₃ H ₁₀	166	115	295	0,08	4,2
Fenantreeni	C ₁₄ H ₁₀	178	101	340	0,016	4,6
Antraseeni	C ₁₄ H ₁₀	178	216	342	8,0 x 10 ⁻⁴	4,5
Fluoranteeni	C ₁₆ H ₁₀	202	109	375	1,3 x 10 ⁻³	5,2
Pyreeni	C ₁₆ H ₁₀	202	150	393	6,0 x 10 ⁻⁴	5,2
Bentso[a]antraseeni	C ₁₈ H ₁₂	228	161	400	2,8 x 10 ⁻⁵	5,6
Kryseeni	C ₁₈ H ₁₂	228	253	448	8,4 x 10 ⁻⁵	5,9
Bentso[b]fluoranteeni	C ₂₀ H ₁₂	252	168	481	7,6 x 10 ⁻⁵	6,1
Bentso[k]fluoranteeni	C ₂₀ H ₁₂	252	215	480	1,3 x 10 ⁻⁸	6,8
Betso[a]pyreeni	C ₂₀ H ₁₂	252	178	496	7,3 x 10 ⁻⁷	6,5
Indole[1,2,3-cd]pyreeni	C ₂₂ H ₁₂	276	164	536	1,3 x 10 ⁻⁸	6,9
Bentso[g,h,i]peryleeni	C ₂₂ H ₁₂	276	278	545	1,4 x 10 ⁻⁸	7,1
Dibentso[a,h]antraseeni	C ₂₂ H ₁₄	278	267	524	1,3 x 10 ⁻⁸	6,5

2.1.1 PAH-yhdisteet sisäilmassa

Orgaanisen aineen palamisen seurauksena ilmaan pääsee polysyklisiä aromaattisia hiilivetyjä. PAH-yhdisteitä syntyy sekä ihmisten toiminnasta että luonnollisista syistä. PAH-yhdisteitä pääsee luontoon kuitenkin eniten ihmisten toiminnasta, kuten puun poltosta, hiiliyhdisteistä koostuvien polttoaineiden käytöstä, teollisuudesta (esim. valimot) sekä tupakasta. Metsäpalot ja tulivuorenpurkaukset ovat esimerkkejä PAH-yhdisteiden luonnollisista lähteistä. [2; 3; 4.]

Ilmassa PAH-yhdisteitä esiintyy sekä höyry- että hiukkasjakeessa. Naftaleeni, joka on PAH-yhdisteistä haihtuvin, on yleensä höyryjakeen pääkomponentti. Ase-naftyleeni, ase-nafteeni, fluoreeni, fenantreeni ja antraseeni ovat myös höyryjakeen komponentteja. Sekä höyry- että hiukkasjakeessa esiintyy fluoranteenia ja pyreeniä. Hiukkasjakeeseen kuuluvat yhdisteet ovat raskaampia ja huoneenlämpötilassa vaikeasti haihtuvia. Bentso[a]antraseeni, kryseeni, bentso[b]fluoranteeni, bentso[k]fluoranteeni, bentso[a]pyreeni, indeno[1,2,3-cd]pyreeni, dibentso[a,h]antraseeni ja bentso[g,h,i]peryleeni ovat hiukkasjakeen komponentteja. [2.]

Suomessa ei ole asetettu terveysperusteista raja-arvoa PAH-yhdisteiden kokonaispitoisuudelle sisäilmassa. Naftaleeni on ainoa PAH-yhdiste, jolle on asetettu sisäilman ohjearvoja. Työterveyslaitos on asettanut sen tavoitetasoksi $<2 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Suomessa sisätilojen, kuten asuntojen, toimenpiderajaksi naftaleenille on asetettu WHO:n asettama raja-arvo $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$. [1.]

PAH-yhdisteistä tutkituin on bentso[a]pyreeni (BaP). Sen pitoisuutta käytetään PAH-yhdisteiden indikaattoriaineena PAH-seoksille, silloin kun kyseessä on terminen prosessi. Tavoitetasot ovat esimerkiksi kokaamoille $<0,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ja muille työpaikoille $<0,01 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Toinen indikaattoriyhdiste on naftaleeni, jota käytetään muun muassa kreosoottialtistumisissa. Tässä tapauksessa ehdotettu tavoitetaso on $<0,05 \text{mg}/\text{m}^3$. [1.]

2.1.2 PAH-yhdisteiden vaikutus ihmisiin

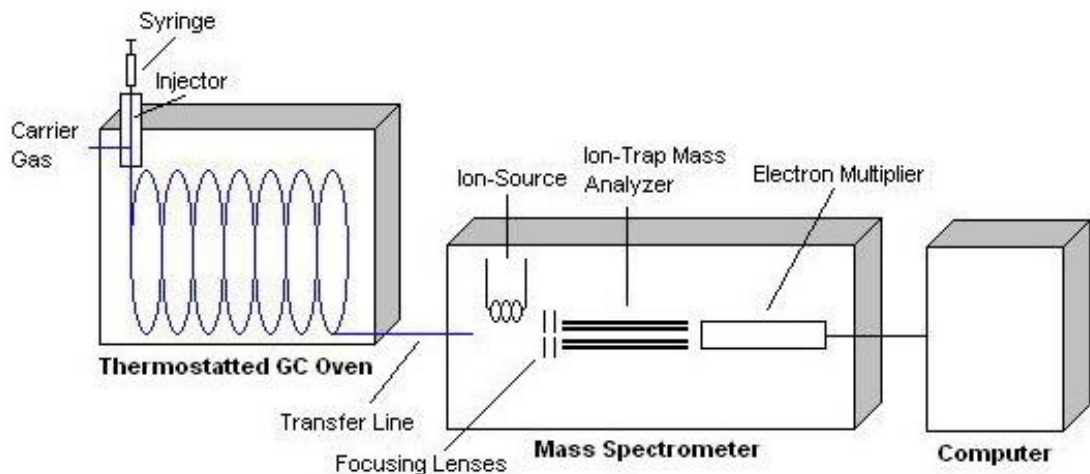
Kotiloissa ihminen altistuu yleisimmin PAH-yhdisteiden seokselle, jota päätyy sisäilmaan vanhoista kivihiilipikeä ja kivihiilitervoja sisältävistä eristeistä. Ihminen voi altistua PAH-yhdisteille myös työpaikallaan eri toimialoilla. Tällaisia töitä ovat esimerkiksi kokaamo- ja valimotyöt, nuohous sekä kreosoottikyllästettyjen materiaalien käyttöön liittyvät työt. [1, 2.]

Elimistöön PAH-yhdisteet voivat imeytyä ihon, hengitysteiden ja ruuansulatuskanavan kautta. Hengitysteitse tapahtuvassa altistumisessa altistutaan haihtuville PAH-yhdisteille. Jos altistuminen tapahtuu ihon kautta, altisteena on PAH-yhdisteiden seos. [2.]

Koska PAH-yhdisteet läpäisevät biologisia kalvoja helposti, ne kulkeutuvat elimistössä kaikkialle. Useat PAH-yhdisteet on todettu muta- ja karsinogeenisiksi yhdisteiksi. Niiden metaboliatuotteet, esim. epoksidi, muodostavat sidoksia DNA- ja RNA-molekyylien sekä proteiinien kanssa. Ne myös estävät soluviestintää ja lisäävät solujen kasvua ja lisääntymistä. [2.]

2.2 Kaasukromatografia-massaspektrometria, GC-MS

Kaasukromatografia-massaspektrometria, GC-MS, on analyysitekniikka, jolla voidaan tunnistaa kaasukromatografilla erotetut yhdisteet massaspektrien avulla. Näytteet, jotka pystytään analysoimaan kaasukromatografilla, voidaan analysoida myös massaspektrometrilla. Analysoitavien yhdisteiden tulee höyrystyä riittävästi, kuitenkin hajoamatta kaasukromatografian lämpötiloissa. Kuvassa 2 on kuvattu GC-MS-laitteisten rakenne. [5, s. 207.]



Kuva 2. GC-MS-laitteisto. [7.]

2.2.1 Kaasukromatografia, GC

Kaasukromatografia on tekniikka, jota käytetään orgaanisessa analytiikassa hajoamatta höyrystyvien yhdisteiden analysoinnissa. Tekniikassa näytteen komponentit liuotetaan

liuottimeen ja höyrystetään. Analyyttien erottuminen tapahtuu kahden faasin välillä. Liikkuvana faasina toimii kemiallisesti inertti kaasu, jonka tehtävänä on kuljettaa analyytin molekyylejä kuumennetun kolonnin läpi. Kiinteänä faasina eli stationäärifaasina toimii yleensä neste. [5, s. 183; 6, s. 634.]

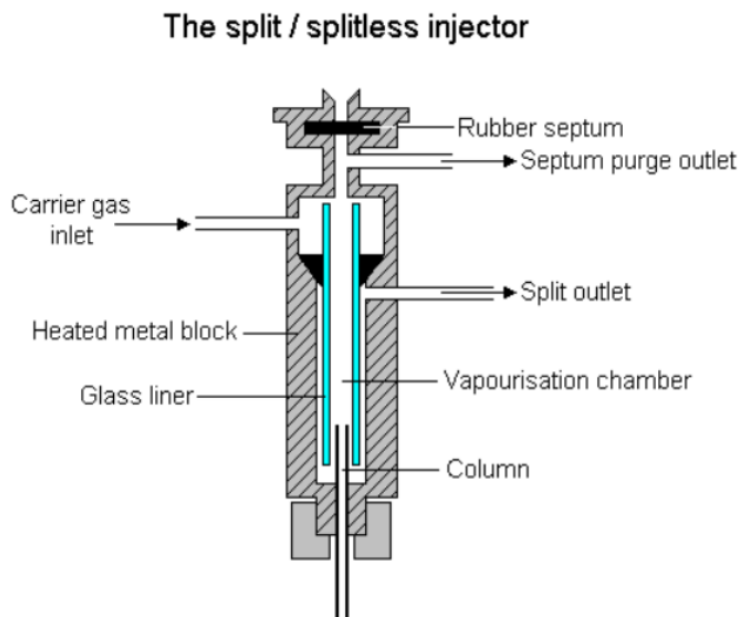
Kantajakaasuksi kutsutaan liikkuvaa faasia, joka kuljettaa näytteen injektorista kolonniin ja edelleen detektoriin. Liikkuvana faasina voidaan käyttää periaatteessa mitä tahansa tarpeeksi inerttiä ja puhdasta kaasua, mutta edellytyksenä on kuitenkin, että kantajakaasu on puhtaudeltaan vähintään 99,995 %. Kosteus, happi sekä kiinteät epäpuhtaudet voivat heikentää detektorin toimintaa sekä stationäärifaasin stabiilisuutta. Epäpuhtaudet voidaan kuitenkin poistaa kaasulinjoihin liitetyillä adsorbenttipatruunoilla. Yleisimpiä kantajakaasuja ovat vety, helium ja typpi. [5, s. 184; 6, s. 643.]

Kullakin kantajakaasulla on erilainen erottumisen kannalta optimaalinen virtausnopeus, joka riippuu käytettävästä kantajakaasusta ja kolonnista. Esimerkiksi kantajakaasuna yleisimmin käytetyn heliumin optimaalinen virtausnopeus on standardikokoisessa kolonnissa 22 cm/s. GC-MS-tekniikassa virtausnopeuteen vaikuttaa myös massaspektrometrin vakuumpumpun tehokkuus. GC-MS-laitteistoilla käytetään kantajakaasuna yleensä heliumia, koska esimerkiksi vetyä käytettäessä vakuumpumpun tulisi olla tehokkaampi. [5, s. 184; 6, s. 643.]

Injektiotekniikan valintaan vaikuttavat laitteisto, näyte ja tutkittavat analyytit. Injektion tarkoituksena on saada näyte, sen pitoisuus ja määrä huomioon ottaen, syötettyä kapeana vyöhykkeenä kapillaariin. Injektiotekniikoita on useita, joista keskeisimmät ovat jakoinjektio (split injection), suorainjektio (splitless injection) ja kolonniin injektio (on-column injection). [5, s. 186.]

Suorainjektiossa ja kolonniin injektiossa kolonniin ohjataan koko näytemäärä, kun taas jakoinjektiossa näytteestä vain pieni osa ohjataan kolonniin. Suorainjektio ja kolonniin injektio sopivat siis pieniä pitoisuuksia sisältäville näytteille ja jakoinjektio suurempia pitoisuuksia sisältäville. Kolonniin injektiota käytetään yleensä silloin, kun näyte höyrystyy liuotinta helpommin tai näyte voi hajota injektorissa. [5, s. 188.]

Koska tässä opinnäytetyössä tutkittavat näytteet sisältävät pieniä määriä PAH-yhdisteitä, käytetään suorainjektiota. Suorainjektiossa injektoinnin aikana jakoventtiili pidetään kiinni ja se avataan vasta noin minuutin päästä injektoinnista. Tällöin lähes koko näytemäärä saadaan kolonniin, jonka alkuosan sisäpintaan näytehöyry tiivistyy ohueksi nestekerrokseksi. Liuotinmolekyylien haihduttua kantajakaasun mukana, näyte kuivuu ja konsentroituu muodostaen kapean vyöhykkeen kolonniin. Tämän jälkeen kolonnin lämpötilaa nostetaan ja jakoventtiili avataan. [5, s. 189.] Injektorin rakenne on kuvattu kuvassa 3.



Kuva 3. Injektorin rakenne. [7.]

Yleisimmin käytettyjä kolonneja ovat kapillaarikolonnit, joiden pituudet vaihtelevat 20–30 metrin välillä. Sisähalkaisijaltaan kolonnit vaihtelevat 0,2–0,7 millimetrin välillä. Sekä kolonnin pituus että paksuus vaikuttavat resoluutioon. Kolonnin pituuden suurentaminen sekä kolonnin kaventaminen lisäävät resoluutiota. [5, s. 190.]

Kapillaarikolonne koostuu kolmesta kerroksesta, jotka ovat polyimidi, silika sekä stati-onäärifaasi. Polyimidi on kolonnin ulkopinnan päällyste, ja se tekee kolonnista mekaanisesti kestävä. Kolonnin kapillaari on taas valmistettu silikasta, joka on piioksidia. [5, s. 191.]

Stationäärifaasi on puolestaan kolonnin sisäpinnalla ohuena kerroksena. Stationäärifaasit ovat inerttejä nesteitä, joiden tulee kestää hajoamatta ja höyrystymättä kolonnin korkeissa lämpötiloissa. Stationäärifaasit ovat yleensä polymeerejä, joista yleisimmin käytössä on polysiloksaani. [5, s. 191.]

2.2.2 Massaspektrometria, MS

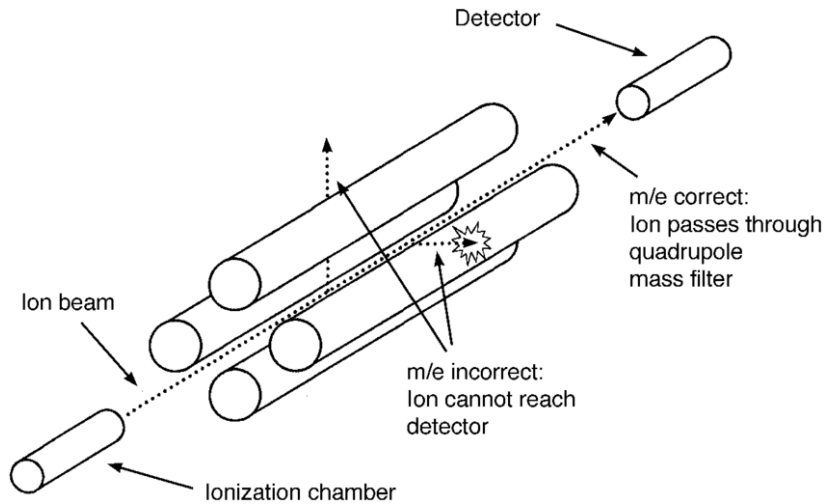
Massaspektrometrian käyttäminen detektorina mahdollistaa eluoituneiden yhdisteiden tunnistamisen sekä antaa tietoa niiden rakenteesta. Massaspektrometrialla ionit erotetaan niiden massa-varaussuhteen (m/z) perusteella. Massaspektrin mittauksessa voidaan käyttää kahta perusmenetelmää. TIC-menetelmässä mitataan ionisaattorissa muodostuneiden ionien kokonaismäärä. SIM-menetelmässä seurataan puolestaan massasignaalia yhdellä tai muutamalla massaluvulla. [5, s. 207.]

Tunnettujen yhdisteiden kvantitatiivisessa analytiikassa käytetään SIM-menetelmää, jolla saavutetaan suurempi herkkyys. Massaspektrometri seuraa analyysissä vain valittuja ioneja, joiden massafragmentit ovat tyypillisiä tutkittaville yhdisteille. [5, s. 207.]

Yksi massaspektrometriassa yleisimmin käytetyistä ionilähteistä on elektroni-ionisaatio (EI). Elektroni-ionisaatiossa näyte ionisoidaan elektroneja emissioivan filamentin avulla. GC-MS -tekniikan yhteydessä käytetään yleensä 70 eV:n energiaa, jolloin yhdisteet pilkkoutuvat voimakkaasti, muodostaen molekyyliin osuessaan positiivisesti varautuneita molekyyliä ja fragmentteja. Varautuneet molekyylit kulkeutuvat massa-analysaattoriin ohjauslinssien läpi. Ionilähteessä muodostuu sekä negatiivisesti että positiivisesti varautuneita ioneja. Elektroni-ionisaation lisäksi on olemassa muita yleisiä ionisaatiomenetelmiä, kuten kemiallinen ionisaatio (CI). [5, s. 207.]

Massa-analysaattorit eroavat toisistaan sen suhteen, miten ionit ja m/z -arvot erotetaan toisistaan. Analysaattorien toiminnan perustana on sähkö- ja magneettikentän vaikutus ionien lentorataan. Yleisimmin käytetty massa-analysaattori on kvadrupolianalysaattori, joka koostuu neljästä yhdensuuntaisesta pyöreästä sauvasta (kuva 4). Ionien etenemistä kvadrupolissa ohjaa sauvojen värähtelevä sähkökenttä, jonka pystyvät läpäisemään so-

pivalla tasa- ja vaihtojännitteellä tietyn m/z -suhteen ionit. GC-MS-yhdistelmässä käytetään pääasiassa kvadrupoli-instrumentteja, koska niiden massa-alue kattaa molekyyli-painot yhdisteille, joita voidaan käyttää GC:hen. [5, s. 125; 8, s. 164.]



Kuva 4. Kvadrupolianalysaattori. [9.]

2.3 Agilent Intuvo 9000 GC

Agilent Intuvo 9000 GC on rakenteeltaan aivan uusi kaasukromatografi, joka on tullut markkinoille syksyllä 2016. Rakenteensa erilaisuudesta huolimatta Intuvo on toimintaperiaatteeltaan edeltäjiensä kaltainen. Ulkonäöltään Intuvo on edeltäjiensä yli puolet pienempi, ja sitä voidaan ohjata isosta kosketusnäytöstä. Kosketusnäytössä näkyy kaikki käytön kannalta tarpeellinen tieto, ja se antaa myös vaihekohtaiset ja kuvalliset ohjeet osien vaihdossa. Kuvassa 5 on Agilent Intuvo GC-MS ja kuvassa 6 Agilent 6890N GC-MS. [10.]



Kuva 5. Agilen Intuvo GC-MS.



Kuva 6. Agilent 6890N GC-MS.

Rakenteensa ansiosta Agilent Intuvon analyysit ovat nopeampia ja tehokkaampia, ja sen uudet ominaisuudet nopeuttavat myös laitteen huoltoa. Merkittävimpiä muutoksia

Intuvossa edeltäjiinsä verrattuna ovat kolonnin suorälämmitys, lyhennysvapaa kolonni, siru-teknologia sekä klikkaa ja kytke-liitokset. [10.]

Agilent Intuvossa on myös suoraan lämmitettävä levykolonni, jonka lämmitys ja jäähdytys on aikaisempaa verrattuna paljon nopeampaa. Tämän ansiosta ajoaika lyhenee huomattavasti ja seuraava näyte on mahdollista syöttää aiemmin. Suoraan lämmitettävä levykolonni on myös pitkäikäisempi ja kooltaan paljon pienempi kuin vanhentyypiset kolonnit (kuva 7). [10.]



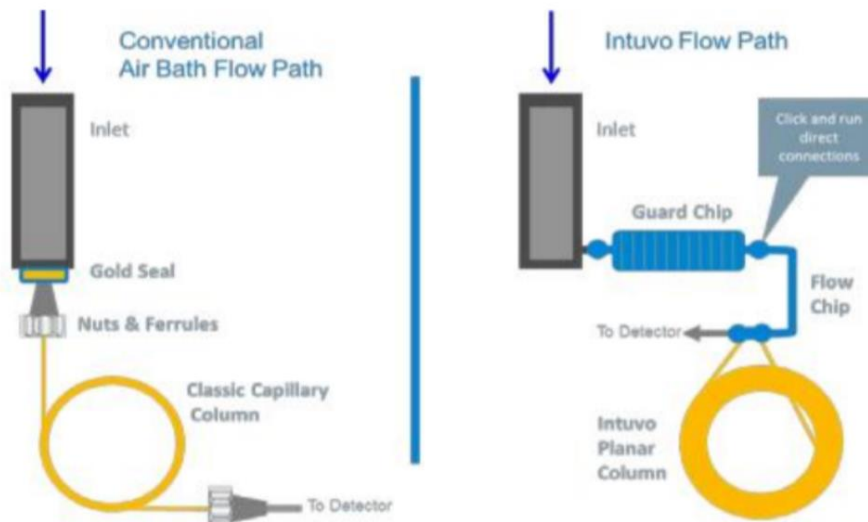
Kuva 7. Agilent Intuvo 9000. [10.]

Agilent Intuvossa mutterit ja holkit, joita käytetään tavallisissa kaasukromatografeissa, on poistettu käyttämällä suojaus- ja virtaussirua, joilla pystytään vähentämään muttereiden ja holkkien mahdollisesti aiheuttamia vuotoja. Tällöin sirujen käyttäminen on myös huomattavasti helpompaa. Sirujen asennus tehdään painamalla ne paikoilleen. Asennuksen onnistumisen voi varmistaa selkeästä napsahdusäänestä. Agilent Intuvossa esikolonnin tavoin toimii suojaussiru (kuva 8) ja kolonnia suojaa kaksi erilaista sirua. Edeltäjistään poiketen Agilent Intuvossa kolonnia ei sirujen takia tarvitse eikä myöskään pysty katkaisemaan. [10.]



Kuva 8. Agilent Intuvo suojasiru. [10.]

Kuvassa 9 on esitetty perinteisen GC:n ja Intuvo GC:n virtausreitit.



Kuva 9. Perinteisen ja Intuvo GC:n virtausreitit. [10.]

3 Validointi

Menettelyllä, jonka avulla analyysimenetelmän soveltuvuus käyttötarkoitukseen osoitetaan, tarkoitetaan validointia. Erilaisten suunniteltujen mittausjärjestelmien avulla saadaan selville analyysimenetelmän suorituskykyparametrit. Tällaisia mittausmenetelmän suorituskykyä kuvaavia käsitteitä ovat muun muassa määrittys- ja toteamisraja, lineaarisuus, tarkkuus, toistettavuus, vertailukelpoisuus, oikeellisuus sekä mittausepävarmuus. Nämä ovat myös tähän opinnäytetyöhön valittuja validointisuureita. [11; 12.]

Analyttiset menetelmät tulee validoida ennen rutiinikäyttöä tai tehtäessä muutoksia menetelmään. Menetelmän validoinnin tarkoituksena on pystyä osoittamaan menetelmän toiminta luotettavalla ja toistettavalla tasolla. Työterveyslaitoksen työohjeen *Laadunohjaus, menetelmien validointi ja laadussa pito* mukaan validoinnissa tulee käsitellä soveltuvin osin seuraavia asioita:

- syy uuden/muutetun menetelmän käyttöönotolle (käyttötarkoitus),
- epävarmuuslähteet (tunnetut)
- validointimenettely.

4 Laitteet ja reagenssit



Taulukossa 2 on esitetty validoinnissa käytetyt laitteistot ja niiden tarkemmat tiedot.

Taulukko 2. Validoinnissa käytetyt laitteistot.

Laite	Valmistaja	Malli
Näytteensyöttäjä	Agilent	7693
Kaasukromatografi		Intuvo 9000
Kolonni		HP-5MS UI 30 m x 0,25 mm x 0,25 mm
Massaspektrometri		5977B MSD
Näytteensyöttäjä	Agilent	7683B
Kaasukromatografi		6890N
Kolonni		HP-5MS UI 30 m x 0,25 mm x 0,25 mm
Massaspektrometri		5973 MSD

Taulukossa 3 on esitetty validoinnissa käytetyt reagenssit.

Taulukko 3. Validoinnissa käytetyt reagenssit.

Reagenssi	Toimittaja	CAS-nro	Lot	Varoitukset
PAH-Mix 14; 10 ng/μl; 18 yhdistettä	Dr Ehrenstorfer L20950014AL	-	G991633AL	
Dikloorimetaani	Merck Millipore 1.06044.1000	75-09-2	K50902344902	

5 Työn suoritus

5.1 Menetelmän kuvaus ja tutkittavat yhdisteet

Opinnäytetyössä mittauslaitteistona käytettiin Agilent Intuvo GC-MS-laitteistoa. Kaasukromatografina mittauksissa käytettiin Agilent Intuvo 9000-laitteistoa, johon on liitettyä Agilent 5977B MSD massaspektrometri. Mittauslaitteisto on esitetty luvun 2.3 kuvassa 5.

Agilent Intuvo GC -laitteessa kolonnina on HP-5MS UI 30 m x 0,25 mm x 0,25 mm. Kolonniuunin lämpötila oli ajon alussa 60 °C 1 minuutin ajan, jonka jälkeen lämpötila nostettiin nopeudella 60 °C/min 180 °C:seen. Lämpötilaa nostettiin vielä nopeudella 11 °C/min 350 °C 5 minuutin ajaksi. Analyysin kokonaisaika on noin 25 minuuttia. Kantaja-kaasuna käytettiin heliumia (virtaus 2,0 ml/min, paine 129,2 kPa ja nopeus 52 cm/s). Näytteensyöttäjänä käytettiin Agilen Autosampler 7693 -laitteistoa, jossa käytettiin yhtätoista pesupulloa. Injektio tehtiin suorainjektiolla 1 μl 300 °C:ssa.

Massaspektrometrissä käytettiin SIM-menetelmää, joka on esitetty tarkemmin taulukossa 4. Ionilähteen lämpötilana on 275 °C ja siirtolinjan 320 °C. Detektorin viiveaika on 2,9 minuuttia. SCAN-ajon ajo-olosuhteet ovat samat kuin SIM-menetelmällä ja yksittäisten ionien sijaan ajetaan välillä 1–25 minuuttia scan-alueella 35–300 m/z.

Taulukko 4. Tutkittavat yhdisteet ja niiden SIM-menetelmän retentioajat ja tunnistus- sekä kvantitointi-ionit.

Yhdiste	Retentioaika	Tunnistus- ioni (m/z)	Kvantitointi- ioni 1 (m/z)	Kvantitointi- ioni 2 (m/z)
Naftaleeni	3,595	128	102	
2-metyyli-naftaleeni	3,942	142	115	
1-metyyli-naftaleeni	4,001	142	115	
Asenaftyleeni	4,498	152	76	150
Asenaftteeni	4,629	154	153	76
Fluoreeni	5,034	166	165	139
Fenantreeni	6,043	178	176	152
Antraseeni	6,099	178	152	76
Fluoranteeni	7,781	202	101	200
Pyreeni	8,149	202	101	200
Bentso(a)antraseeni	10,43	228	114	226
Kryseeni	10,509	228	113	226
Bentso(b)fluoranteeni	12,539	252	126	250
Bentso(k)fluoranteeni	12,585	252	126	250
Bentso(a)pyreeni	13,115	252	126	250
Indeno(1,2,3,cd)pyreeni	15,024	276	138	274
Dibentso(a,h)antraseeni	15,086	278	139	276
Bentso(g,h,i)peryleeni	15,409	276	138	274

Analyysissä kalibrointinäytteet ajetaan sekä ajon alussa että lopussa. Jos ajosekvenssi on pitkä, ajetaan kalibrointinäytteet myös sekvenssin keskellä. Kalibrointisuorat näytteille ovat sekvenssin kahden vierekkäisen standardiryhmän keskiarvokuuvaajat. Näytteiden ja standardien välissä tehdään liuotininjektioita kontaminaation välttämiseksi.

5.2 Näytteenotto ja näytteiden säilytys

Koska PAH-yhdisteet jakautuvat ilmassa sekä kaasu- että hiukkasfaasiin, on se otettava huomioon näytteenotossa. Yhdisteiden jakaantumiseen kaasu- ja hiukkasfaasiin vaikuttavat muun muassa ympäristön lämpötila, yhdisteiden höyrynpaine sekä hiukkasten pinta-alakonsentraatio.

Ilmanäytteet kerätään XAD-keräimeen (Orbo 43, Supelco) tai teflonsuodattimille (esimerkiksi Zefluor™, Pall Corporation) pumpun avulla. Tässä opinnäytetyössä keskityttiin

XAD-keräimiin, joiden tilavuusvirta putkikeräimeen on 0,1-1 l/min ja ilmamäärä 10-100 l. Näytteet tulee uuttaa mahdollisimman pian keräyksen jälkeen. Jos näytettä ei pystytä käsittelemään heti, tulee se säilyttää kylmässä, esimerkiksi jääkaapissa, valolta suojatuna. Käsitellyt näytteet säilytetään pakastimessa.

5.3 Näytteiden esikäsittely ja kalibrintiliuosten valmistus

Näytteiden käsittelyssä XAD-näyteputket katkaistiin ja lasivilla sekä XAD-kerrokset siirrettiin koeputkiin, joihin lisättiin 2 ml dikloorimetaania. Näyteputkia uutettiin ultraäänihauuteessa 30 minuutin ajan. Hauteen lämpötila nousee tällöin noin 40 °C:seen. Uuton jälkeen näytteet siirrettiin GC-viaaleihin.

Toteamis- ja määrittämissä varten nollanäytteet valmistettiin käyttämättömistä XAD-putkista lisäämällä koeputkeen katkaistu XAD-putki ja uuttamalla se 2 ml dikloorimetaania. Koeputki laitettiin ultraäänihauuteeseen 30 minuutiksi.

Validoinnin tarkkuusmäärittämissä varten spikattiin 10 XAD-putkea haluttuun pitoisuuteen lisäämällä niihin 10 µl PAH-Mix 14 -seosta (10 ng/µl), jolloin pitoisuudeksi saatiin 100 ng/näyte. XAD-putket uutettiin heti 2 ml:aan dikloorimetaania ja laitettiin ultraäänihauuteeseen 30 minuutiksi.

Kalibrintiliuosten valmistamiseen käytettiin kaupallista PAH-Mix 14 -seosta (sisältää 10 ng/µl yksittäisiä yhdisteitä), joka laimennettiin dikloorimetaaniin. Kalibrintiliuokset valmistettiin Työterveyslaitoksen työohjeen *PAH-yhdisteiden määrittäminen ilmanäytteistä GC-MS-menetelmällä* mukaisesti pitoisuuksille 1,25; 2,5; 5; 10; 50; 100 ja 250 ng/ml. Määrittämissä ja lineaarisuutta varten valmistettiin uudet kalibrintiliuokset pitoisuuksille 0,5; 0,75; 1,0 ja 500 ng/ml.

Kalibrintiliuokset valmistettiin seuraavasti:

500 ng/ml: 1000 µl PAH-Mix 14 / 20 ml DCM

250 ng/ml: 500 µl PAH-Mix 14 / 20 ml DCM

100 ng/ml: 200 µl PAH-Mix 14 / 20 ml DCM

50 ng/ml: 100 µl PAH-Mix 14 / 20 ml DCM

10 ng/ml: 400 µl 500 ng/ml / 20 ml DCM

5 ng/ml: 200 µl 500 ng/ml / 20 ml DCM

2,5 ng/ml: 100 µl 500 ng/ml / 20 ml DCM

1,25 ng/ml: 50 µl 500 ng/ml / 20 ml DCM

1,0 ng/ml: 40 µl 500 ng/ml / 20 ml DCM

0,75 ng/ml: 30 µl 500 ng/ml / 20 ml DCM

0,50 ng/ml: 20 µl 500 ng/ml / 20 ml DCM.

6 Validoinnin tulokset

6.1 Määrittys- ja toteamisrajat

Määrittysraja on analysoitavan aineen pienin pitoisuus, joka voidaan ilmaista hyväksyttävällä tarkkuudella. Määrittysrajan laskemisessa voidaan käyttää tapauskohtaisesti erilaisia menetelmiä. Määrittysraja todetaan käyttämällä sopivaa näytettä tai standardia. [11; 12.] Alla olevalla kaavalla 1 määrittysraja voidaan määrittää käyttämällä samoja nollanäytteelle mitattuja keskiarvoja ja keskihajonnan arvoja kuin toteamisrajassa.

$$\text{Määrittysraja} = \mu B1 + k * sB1, \text{ jossa} \quad (1)$$

$\mu B1$ = nollanäytteen keskiarvo

$sB1$ = nollanäytteen keskihajonta

k = välillä 6–20.

Toteamisrajalla tarkoitetaan puolestaan pienintä pitoisuutta, jolla voidaan luotettavasti todeta sisältääkö näyte tutkittavaa yhdistettä vai ei. Mitatun vasteen tai määritetyn pitoisuuden tulee olla toteamisrajalla analyytillä niin suuri, ettei sen voi enää katsoa johtuvan taustan aiheuttamasta satunnaisvaihtelusta. [11; 12.] Toteamisraja lasketaan seuraavalla kaavalla 2:

$$\text{Toteamisraja} = \mu B1 + 3 * sB1, \text{ jossa} \quad (2)$$

$\mu B1$ = nollanäytteen keskiarvo

$sB1$ = nollanäytteen keskihajonta.

Määritys- ja toteamisrajat laskettiin kolmen nollanäytteen keskiarvon ja keskihajonnan avulla kaavojen 1 ja 2 mukaan. Aseftyleenille, kryseenille ja dibentso[a,h]antraseenille ei saatu tuloksia. Osa tuloksista on alle mittausalueen alimman pitoisuuden 0,5 ng/ml. Taulukossa 5 on esitetty PAH-16-yhdisteiden toteamis- ja määritysrajat.

Taulukko 5. PAH-16-yhdisteiden ja 1- ja 2-metyyli-naftaleenien toteamis- ja määrittämissrajat.

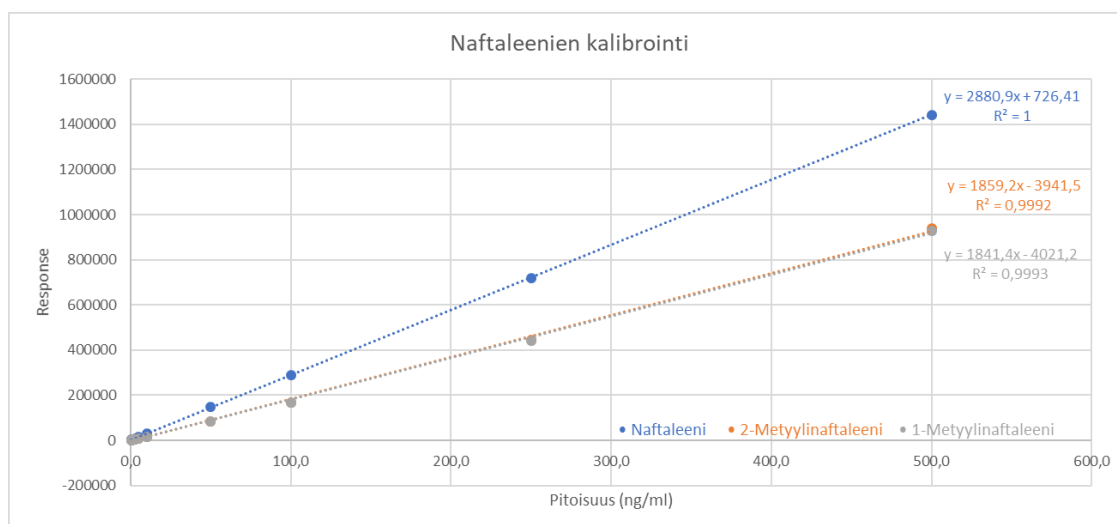
Yhdiste	Toteamisraja (ng/ml)	Määrittämissraja (ng/ml)
Naftaleeni	0,69	1,16
2-Metyyli-naftaleeni	0,37	0,48
1-Metyyli-naftaleeni	0,41	0,52
Asenaftyleeni	-	-
Asenafteeni	0,30	0,42
Fluoreeni	0,56	0,39
Fenantreeni	1,31	2,10
Antraseeni	0,30	0,44
Fluoranteeni	0,56	1,02
Pyreeni	0,23	0,52
Bentso[a]antraseeni	0,48	0,62
Kryseeni	-	-
Bentso[b]fluoranteeni	2,31	2,35
Bentso[k]fluoranteeni	0,76	0,80
Bentso[a]pyreeni	2,61	2,65
Indeno[1,2,3-cd]pyreeni	1,85	2,38
Dibentso[a,h]antraseeni	-	-
Bentso[g,h,i]peryleeni	1,62	1,87

6.2 Lineaarisuus

Lineaarinen alue kuvaa mittausaluetta, jolla analysoitavan yhdisteen vaste käyttäytyy suhteessa konsentraatioon lineaarisesti. Mittausalueeksi valitaan yleensä lineaarinen alue, joka on määritetty standardiliuosten avulla. Mittauksen pienimpänä pitoisuutena käytetään menetelmän määrittämissrajaa, ja mittauksia tulee suorittaa vähintään viidellä pitoisuudella. Tulosten perusteella saadaan suora, jossa käytetään pienimmän neliösumman menetelmää. Tuloksista piirretään graafinen kuvaaja, josta voidaan silmämääräisesti arvioida menetelmän lineaarinen alue. Luotettava mittausalue voi olla laajempi kuin lineaarinen alue. [11; 12.]

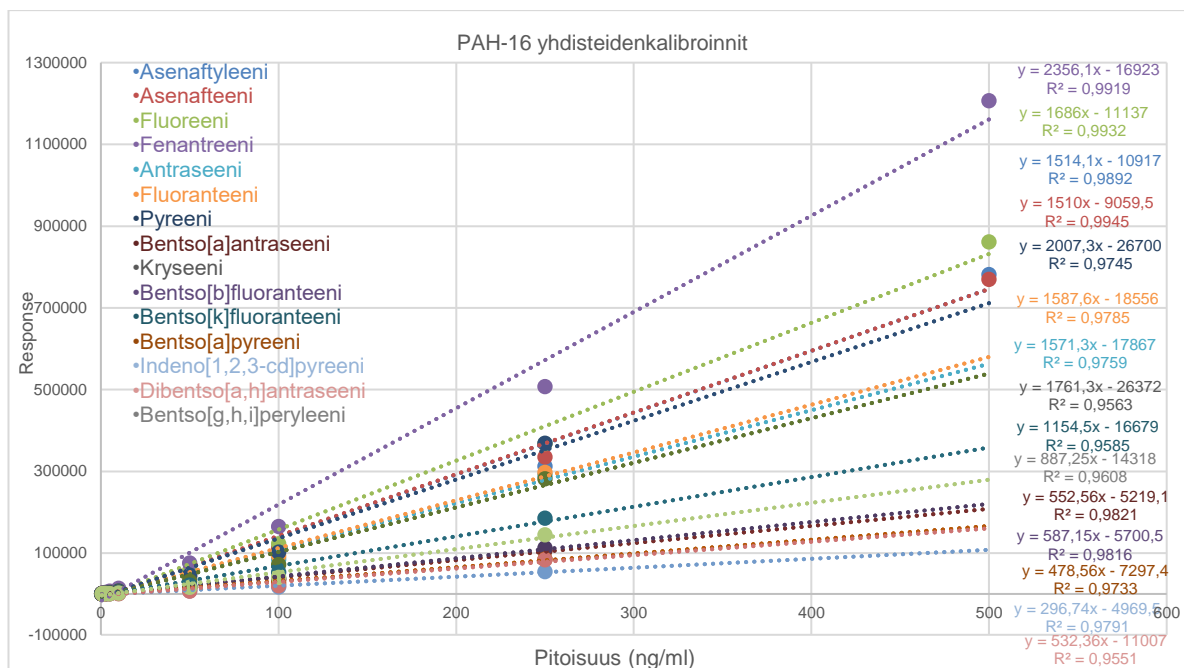
Lineaarisuuden määrittämistä varten tehtiin 11 pisteen kalibrointisuora PAH-Mix 14 -seoksesta kohdan 6.2 mukaisesti. Kuvassa 10 on esitetty naftaleenin sekä 1- ja 2-metyyli-naftaleenin kalibrointisuorat ja kuvassa 11 PAH-16-yhdisteiden kalibrointisuorat.

Naftaleenille sekä 1- ja 2-metyyli-naftaleeneille saatiin lineaariset kalibrointisuorat, joiden selitysasteet ylittävät arvon $R^2=0,998$.



Kuva 10. Naftaleenin, 1- ja 2-metyyli-naftaleenin kalibrointisuorat yhtälöineen ja selitysasteineen.

Antraseenin, fluoranteenin, pyreenin, bentso[a]antraseenin, kryseenin, bentso[b]fluoranteenin, bentso[k]fluoranteenin, bentso[a]pyreenin, indeno[1,2,3-cd]pyreenin, dibentso[a,h]antraseenin ja bentso[g,h,i]peryleenin kalibrointisuorista poistettiin pitoisuus 500 ng/ml. Silmämääräisesti PAH-16-yhdisteiden kalibrointisuorat ovat lineaarisia ja selitysasteiden katsotaan olevan riittävän korkeita.



Kuva 11. Muiden kuin naftaleenien ja metyyli-naftaleenien kalibrointisuorat yhtälöineen ja selitysteineen.

6.3 Tarkkuus ja toistettavuus

Toistettavuutta kuvataan tulosten suhteellisella keskihajonnalla ($S/\mu \cdot 100\%$) ja tarkkuutta määritysten keskiarvon suhteella tunnettuun pitoisuuteen. Toistettavuus ja tarkkuus määritetään tekemällä useita rinnakkaismääryksiä samoissa olosuhteissa sekä matalalla että korkealla pitoisuudella. [11; 12.]

Toistettavuus määritettiin 10 spiikatusta rinnakkaisnäytteestä, jotka ajettiin samassa ajosarjassa. Saaduista mittaustuloksista laskettiin keskiarvo sekä -hajonta, joiden avulla saatiin suhteellinen keskihajonta (RSD) kaavan 3 mukaan.

$$RSD = \frac{\text{keskihajonta}}{\text{keskiarvo}} * 100\% \quad (3)$$

Saaduista tuloksista tehtiin rinnakkaisnäytteille myös Outlie-testit, joiden perusteella todettiin, että ensimmäinen näyte poikkesi muista, ja se poistettiin tuloksista.

Taulukkoon 6 on koottu yhdeksän rinnakkaisnäytteen keskiarvot, keskihajonnat ja suhteelliset keskihajonnat jokaiselle yhdisteelle.

Taulukko 6. Yhdeksän rinnakkaisnäytteen keskiarvot, keskihajonnat ja suhteelliset keskihajonnat.

	Keskiarvo	Keskihajonta	% RSD
Naftaleeni	84,77	5,04	5,94
2-metyyli-naftaleeni	86,19	5,74	6,66
1-metyyli-naftaleeni	84,38	5,51	6,53
Asenaftyleeni	92,22	6,43	6,98
Asenaftteeni	90,69	6,86	7,56
Fluoreeni	91,19	6,48	7,11
Fenantreeni	96,50	6,04	6,26
Antraseeni	100,79	6,35	6,30
Fluoranteeni	120,13	4,93	4,10
Pyreeni	107,93	4,27	3,95
Bentso(a)antraseeni	114,35	7,91	6,92
Kryseeni	108,95	5,64	5,17
Bentso(b)fluoranteeni	105,32	6,72	6,38
Bentso(k)fluoranteeni	100,61	5,20	5,17
Bentso(a)pyreeni	106,08	5,95	5,61
Indeno(1,2,3,cd)pyreeni	110,92	9,14	8,24
Dibentso(a,h)antraseeni	110,23	6,80	6,17
Bentso(g,h,i)peryleeni	99,21	5,14	5,18

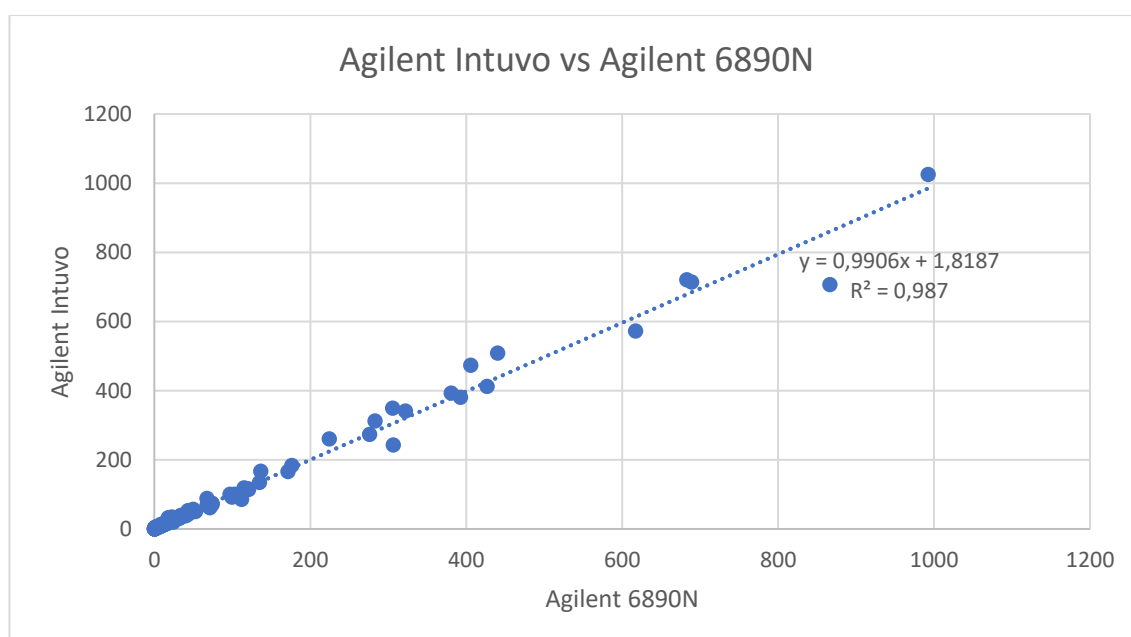
6.3.1 Vertailukelpoisuus Agilent 6890N GC-MS –laitteella saatuihin tuloksiin

Menetelmän tarkkuutta määritettiin myös vertailemalla Agilent Intuvo –laitteella saatuja tuloksia Agilent 6890N –laitteella saatuihin tuloksiin 20 asiakasnäytteen kohdalla.

Vertailu tehdään analysoimalla vähintään kymmenen näytettä sekä uudella että vanhalla laitteella. Näytteiden pitoisuuksien tulisi kattaa koko mittausalue. Tulosten vertailussa sovelletaan regressiosuoraa $y = a + bx$, joka piirretään siten, että vaaka-akselilla esitetään vanhalla laitteella saadut mittaustulokset ja pystyakselilla uudella laitteella saadut

tulokset. Suoran kulmakerroin on lähellä yhtä, jos kummallakin menetelmällä saadut tulokset ovat samat. Regressiosuoran lisäksi lähempää tarkastelua varten tehdään parillinen t-testi.

Kuvassa 12 on esitetty Agilent Intuvon ja 6890N:n vertailu. Tarkasteluun valittiin kaikkien 20 näytteen lasketut pitoisuudet, vaikka ne olisivat olleet alle määrittäysrajan. Määrittäyksessä tulokset saatiin yhdisteille naftaleeni, 1- ja 2-metyylinaftaleeni, asenaftyleeni, asenafteeni, fluoreeni, fenantreeni, antraseeni, fluoranteeni ja pyreeni. Kuten kuvasta nähdään, Agilent Intuvo antaa samankaltaiset tulokset kuin Agilent 6890 ja suoran kulmakerroin on lähellä yhtä.



Kuva 12. Agilent Intuvon ja Agilent 6890N:n vertailu.

Regressiosuoran lisäksi tuloksista tehtiin joka yhdisteelle parittainen kahden otoksen t-testi keskiarvolle tulosten tarkempaa tarkastelua varten (liite 1). T-testeissä nollahypoteesina käytettiin väittämää, etteivät tulokset eroa 95 %:n luottamustasolla. Nollahypoteesi hylättiin, jos saatu p-arvo oli alle alfa-arvon 0,05. T-testin p-arvot on koottu taulukkoon 7. Yhdisteitä, joiden tulokset erosivat tilastollisesti merkitsevästi luottamustasolla 95 %, olivat fenantreeni, antraseeni, fluoranteeni sekä pyreeni.

Taulukko 7. T-testin kaksisuuntaiset p-arvot

	P(T<=t) kaksisuuntainen
Naftaleeni	0,473
2-metyyli-naftaleeni	0,944
1-metyyli-naftaleeni	0,859
Asenaftyleeni	0,166
Asenaftteeni	0,121
Fluoreeni	0,096
Fenantreeni	0,039
Antraseeni	0,047
Fluoranteeni	0,027
Pyreeni	0,022
Bentso(a)antraseeni	-
Kryseeni	-
Bentso(b)fluoranteeni	-
Bentso(k)fluoranteeni	-
Bentso(a)pyreeni	-
Indeno(1,2,3,cd)pyreeni	-
Dibentso(a,h)antraseeni	-
Bentso(g,h,i)peryleeni	-

6.3.2 Oikeellisuus

Oikeellisuus todennetaan referenssinäytteiden ja luonnollisten näytteiden avulla. Tuloksia verrataan Agilent 6890N GC-MS -laitteella saatuihin tuloksiin. Tulosten tulisi olla $\pm 10\%$ oletusarvosta huomioon ottaen näytteen säilytysajasta johtuva haihtuminen.

Systemaattista virhettä arvioitiin samoilla yhdeksällä spiikatulla rinnakkaismäärityksellä, joita käytettiin toistettavuudessa. Systemaattinen virhe eli poikkeama laskettiin kaavalla 4.

$$\text{Bias} = \text{poikkeama} = X - \mu$$

$$\text{Bias} - \% = \frac{(X - \mu)100\%}{\mu} \quad (4)$$

Kaavassa 4 μ on todellinen arvo (odotusarvo) ja X määrittämällä saatu arvo.

Taulukossa 8 on koottu yhdeksän rinnakkaismäärittämissä keskiarvot ja poikkeamat jokaiselle yhdisteelle. Tulokset ovat lähellä haluttua ± 10 % oletusarvosta lukuun ottamatta muutamaa poikkeusta, kuten fluoranteeni, 1-metyyli-naftaleeni ja naftaleeni.

Taulukko 8. Rinnakkaismäärittämissä keskiarvot ja poikkeamat jokaiselle yhdisteelle.

	Bias-%
Naftaleeni	-15,23
2-metyyli-naftaleeni	-13,81
1-metyyli-naftaleeni	-15,62
Asenaftyleeni	-7,78
Asenaftteeni	-9,31
Fluoreeni	-8,81
Fenantreeni	-3,50
Antraseeni	0,79
Fluoranteeni	20,13
Pyreeni	7,93
Bentso(a)antraseeni	14,35
Kryseeni	8,95
Bentso(b)fluoranteeni	5,32
Bentso(k)fluoranteeni	0,61
Bentso(a)pyreeni	6,08
Indeno(1,2,3,cd)pyreeni	10,92
Dibentso(a,h)antraseeni	10,23
Bentso(g,h,i)peryleeni	-0,79

6.3.3 Mittausepävarmuus

Mittaustulokset sisältävät aina tuntemattoman määrän epävarmuutta, jota pyritään arvioimaan laajennetun mittausepävarmuuden avulla. Arvio ottaa huomioon mittauksissa tapahtuneen satunnaisvirheen sekä systemaattiset virhelähteet. Mittausepävarmuus tulee ottaa huomioon tulosten luotettavuuden arvioinnissa. Tämä on paras arvio rajoista, joiden sisällä näytteen pitoisuuden tulisi olla 95 %:n luottamustasolla. [11; 12.]

Mittausepävarmuudet laskettiin Työterveyslaitoksen laatuohjeen mukaan. PAH-yhdisteiden kokonaismittausepävarmuus u_c laskettiin kaavalla 5:

$$u_c = \sqrt{(u_{RW})^2 + (u_{bias})^2}, \quad (5)$$

jossa u_{RW} on satunnaisvirhe (sarjojen välinen hajonta) ja u_{bias} systemaattinen virhe.

Laajennettu kokonaismittausepävarmuus laskettiin kaavalla 6:

$$U = 2u_c. \quad (6)$$

Taulukkoon 9 on koottu PAH-yhdisteille saadut keskiarvot, keskihajonnat, satunnaisvirheet, systemaattiset virheet sekä kokonaismittausepävarmuudet.

Taulukko 9. PAH-yhdisteiden mittausepävarmuus.

	Keskiarvo	Keskihajonta	% RSD	Bias-%	u %	U
Naftaleeni	84,77	5,04	5,94	-15,23	16,04	32,08
2-metyyli-naftaleeni	86,19	5,74	6,66	-13,81	14,96	29,92
1-metyyli-naftaleeni	84,38	5,51	6,53	-15,62	16,56	33,12
Asenaftyleeni	92,22	6,43	6,98	-7,78	10,10	20,19
Asenaftteeni	90,69	6,86	7,56	-9,31	11,56	23,13
Fluoreeni	91,19	6,48	7,11	-8,81	10,94	21,88
Fenantreeni	96,50	6,04	6,26	-3,50	6,98	13,96
Antraseeni	100,79	6,35	6,30	0,79	6,40	12,79
Fluoranteeni	120,13	4,93	4,10	20,13	20,72	41,45
Pyreeni	107,93	4,27	3,95	7,93	9,00	18,01
Bentso(a)antraseeni	114,35	7,91	6,92	14,35	16,38	32,76
Kryseeni	108,95	5,64	5,17	8,95	10,57	21,15
Bentso(b)fluoranteeni	105,32	6,72	6,38	5,32	8,57	17,14
Bentso(k)fluoranteeni	100,61	5,20	5,17	0,61	5,24	10,48
Bentso(a)pyreeni	106,08	5,95	5,61	6,08	8,51	17,02
Indeno(1,2,3,cd)pyreeni	110,92	9,14	8,24	10,92	14,24	28,48
Dibentso(a,h)antraseeni	110,23	6,80	6,17	10,23	12,29	24,57
Bentso(g,h,i)peryleeni	99,21	5,14	5,18	-0,79	5,20	10,40

7 Yhteenveto

Validoinnissa selvitettiin uuden Agilent Intuvo GC-MS -laitteen toimivuutta ja tarkoituksenmukaisuutta EPA:n priorisoimien 16 PAH-yhdisteen ja 1- ja 2-metyyli-naftaleenin määrittämiseksi ilmanäytteistä.

Työterveyslaitoksen menetelmän määritysraja on ollut standardisuoran pienin konsentraatio eli 1,25 ng/ml. Määritysraja pidetään samana, vaikka saadut tulokset olivatkin välillä 0,39-2,65 ng/ml. Lineaarisuudessa suorien on katsottu olevan silmämääräisesti lineaarisia ja selitysasteiden on katsottu olevan riittävän korkeita. Näin ollen menetelmän voidaan katsoa olevan lineaarinen kalibrointialueella. Näytteet joiden pitoisuudet ylittävät suurimman kalibrointipitoisuuden tulee laimentaa.

Tarkkuuden ja toistettavuuden kannalta tuloksiin on voinut vaikuttaa PAH-yhdisteiden herkkä haihtuvuus. Rinnakkaismääryksiä tehtäessä on aikaisemmin tehdyistä näytteistä voinut haihtua yhdisteitä. Tuloksissa tämä näkyy selkeänä pitoisuuden laskuna viimeisen ja ensimmäisen näytteen välillä.

Agilent Intuvo GC-MS-laitteen ja Agilent 6890N -laitteen vertailussa laitteet antoivat samankaltaisia tuloksia, joten laitteen ei katsota vaikuttavan merkittävästi tuloksiin. Mitäusepävarmuuden on katsottu olevan samalla tasolla kuin Työterveyslaitoksen menetelmäohjeessa *PAH-yhdisteiden määrittäminen ilmanäytteistä GC-MS-menetelmällä*.

Saatujen tuloksien perusteella voitiin todeta, että menetelmä soveltuu hyvin analyysiin ja validointi täyttää asetetut vaatimukset. Agilent Intuvo GC-MS-laitteisto voidaan siis ottaa käyttöön XAD-näytteiden analysoinnin osalta. Validointi tulee suorittaa vielä teflon-suodattimien osalta.

Lähteet

- 1 Kooste epäpuhtaustasoista, joiden ylittyminen voi viitata sisäilma-ongelmiin toimistotyyppisillä työpaikoilla. Työterveyslaitos. Verkkoaineisto. <<https://www.ttl.fi/wp-content/uploads/2016/09/sisaympariston-viitearvoja.pdf>> . Luettu 12.10.2019.
- 2 PAH-yhdisteiden tavoitetasoperustelumuihistio. 2016. Työterveyslaitos. Verkkoaineisto. <<https://www.ttl.fi/wp-content/uploads/2016/12/pah-yhdisteet-tavoitetaso.pdf>>. Luettu 15.10.2019.
- 3 PAH-yhdisteitä sisältävät rakennusmateriaalit huomioitava purkukohteissa. 11.4.2019. Työsuojelu. Verkkoaineisto. <<https://www.tyosuojelu.fi/-/pah-yhdisteita-sisaltavat-rakennusmateriaalit-huomioitava-purkukohteissa>>. Luettu 15.10.2019.
- 4 PAH-yhdisteet. 14.10.2019. Helsingin seudun ympäristöpalvelut. Verkkoaineisto. <<https://www.hsy.fi/fi/asiantuntijalle/ilmansuojelu/mittaustulokset/Sivut/PAH-yhdisteet.aspx>>. Luettu 16.10.2019.
- 5 Jaarinen Soili & Niiranen Jukka, Laboratorion analyysitekniikka. 5. – 6. painos, Edita Prima Oy, Helsinki 2008.
- 6 Harris, Daniel C, Quantitative Chemical Analysis. 9th edition. W.H. Freeman & Co Ltd, 2015.
- 7 Gas chromatography. Sheffield Hallam University. Verkkoaineisto. <<https://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/gaschrm.htm>>. Luettu 2.10.2019.
- 8 Ketola Raimo, Kostianen Risto, Kotiaho Tapio & Vainiotalo Pirjo, Massaspektrometrian perusteet. Suomen Massaspektrometrian Seura ry. Hakapaino, Helsinki 2010.

- 9 Quadrupole mass spectrometry. ResearchGate. Verkkoaineisto. <https://www.researchgate.net/figure/Quadrupole-mass-spectrometry_fig3_8997538>. Luettu 2.10.2019.
- 10 Intuvo 9000 GC System. Agilent. Verkkoaineisto.<<https://www.agilent.com/en/products/gas-chromatography/gc-systems/intuvo-9000-gc-system#howitworks>>. Luettu 3.10.2019.
- 11 The Fitness for Purpose of Analytical Methods. 2014. Eurachem. Verkkoaineisto. <https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf>. Luettu 6.10.2019.
- 12 Internal Quality Control – Handbook for Chemical Laboratories. 2005. Nordtest. Verkkoaineisto. <https://www.nordtest.info/images/documents/nt-technical-reports/nt%20tr%20569_ed4_en%20internal%20quality%20control%20%20handbook%20for%20chemical%20laboratories.pdf>. Luettu 6.10.2019.

Parittaiset kahden otoksen t-testit keskiarvoille

Parittainen kahden otoksen t-testi keskiarvoille		
Naftaleeni		
	Muuttuja 1	Muuttuja 2
Keskiarvo	393,0785	358,049
Varianssi	587413,0086	337612,9869
Havainnot	20	20
Pearsonin korrelaatio	0,987265089	
Arvioitu keskiarvojen ero	0	
va	19	
t Tunnusluvut	0,73273141	
P(T<=t) yksisuuntainen	0,23633293	
t-kriittinen yksisuuntainen	1,729132812	
P(T<=t) kaksisuuntainen	0,47266586	
t-kriittinen kaksisuuntainen	2,093024054	

Parittainen kahden otoksen t-testi keskiarvoille		
2-metyylinaftaleeni		
	Muuttuja 1	Muuttuja 2
Keskiarvo	96,43	96,71
Varianssi	28618,80134	27020,65436
Havainnot	20	20
Pearsonin korrelaatio	0,994820577	
Arvioitu keskiarvojen ero	0	
va	19	
t Tunnusluvut	-0,071003571	
P(T<=t) yksisuuntainen	0,472068482	
t-kriittinen yksisuuntainen	1,729132812	
P(T<=t) kaksisuuntainen	0,944136965	
t-kriittinen kaksisuuntainen	2,093024054	

Parittainen kahden otoksen t-testi keskiarvoille		
1-metyylinaftaleeni		
	Muuttuja 1	Muuttuja 2
Keskiarvo	47,168	47,4465
Varianssi	8276,09288	7899,920119
Havainnot	20	20
Pearsonin korrelaatio	0,997320101	
Arvioitu keskiarvojen ero	0	
va	19	
t Tunnusluvut	-0,180311033	
P(T<=t) yksisuuntainen	0,429408836	
t-kriittinen yksisuuntainen	1,729132812	
P(T<=t) kaksisuuntainen	0,858817672	
t-kriittinen kaksisuuntainen	2,093024054	

Parittainen kahden otoksen t-testi keskiarvoille		
Asenaftyleeni		
	Muuttuja 1	Muuttuja 2
Keskiarvo	3,913684211	2,942631579
Varianssi	77,41919123	36,13524269
Havainnot	19	19
Pearsonin korrelaatio	0,992317281	
Arvioitu keskiarvojen ero	0	
va	18	
t Tunnusluvut	1,444758521	
P(T<=t) yksisuuntainen	0,082854679	
t-kriittinen yksisuuntainen	1,734063607	
P(T<=t) kaksisuuntainen	0,165709359	
t-kriittinen kaksisuuntainen	2,10092204	

Parittainen kahden otoksen t-testi keskiarvoille		
Asenaftteeni		
	Muuttuja 1	Muuttuja 2
Keskiarvo	61,2015	58,1735
Varianssi	28188,06066	25829,42994
Havainnot	20	20
Pearsonin korrelaatio	0,999662739	
Arvioitu keskiarvojen ero	0	
va	19	
t Tunnusluvut	1,621792205	
P(T<=t) yksisuuntainen	0,060662385	
t-kriittinen yksisuuntainen	1,729132812	
P(T<=t) kaksisuuntainen	0,12132477	
t-kriittinen kaksisuuntainen	2,093024054	

Parittainen kahden otoksen t-testi keskiarvoille		
Fluoreeni		
	Muuttuja 1	Muuttuja 2
Keskiarvo	33,1645	28,804
Varianssi	6789,442205	5110,086615
Havainnot	20	20
Pearsonin korrelaatio	0,999590048	
Arvioitu keskiarvojen ero	0	
va	19	
t Tunnusluvut	1,751731936	
P(T<=t) yksisuuntainen	0,047972904	
t-kriittinen yksisuuntainen	1,729132812	
P(T<=t) kaksisuuntainen	0,095945807	
t-kriittinen kaksisuuntainen	2,093024054	

Parittainen kahden otoksen t-testi keskiarvoille		
Fenantreeni		
	Muuttuja 1	Muuttuja 2
Keskiarvo	87,103	76,589
Varianssi	21976,21631	16293,40334
Havainnot	20	20
Pearsonin korrelaatio	0,999284208	
Arvioitu keskiarvojen ero	0	
va	19	
t Tunnusluvut	2,213170956	
P(T<=t) yksisuuntainen	0,019660869	
t-kriittinen yksisuuntainen	1,729132812	
P(T<=t) kaksisuuntainen	0,039321738	
t-kriittinen kaksisuuntainen	2,093024054	

Parittainen kahden otoksen t-testi keskiarvoille		
Antraseeni		
	Muuttuja 1	Muuttuja 2
Keskiarvo	5,733333333	3,138
Varianssi	115,444881	37,93620286
Havainnot	15	15
Pearsonin korrelaatio	0,997992595	
Arvioitu keskiarvojen ero	0	
va	14	
t Tunnusluvut	2,178436921	
P(T<=t) yksisuuntainen	0,023478986	
t-kriittinen yksisuuntainen	1,761310136	
P(T<=t) kaksisuuntainen	0,046957971	
t-kriittinen kaksisuuntainen	2,144786688	

Parittainen kahden otoksen t-testi keskiarvoille		
Fluoranteeni		
	Muuttuja 1	Muuttuja 2
Keskiarvo	11,60315789	8,935789474
Varianssi	444,2381006	264,8655702
Havainnot	19	19
Pearsonin korrelaatio	0,999684115	
Arvioitu keskiarvojen ero	0	
va	18	
t Tunnusluvut	2,409809083	
P(T<=t) yksisuuntainen	0,013439924	
t-kriittinen yksisuuntainen	1,734063607	
P(T<=t) kaksisuuntainen	0,026879848	
t-kriittinen kaksisuuntainen	2,10092204	

Parittainen kahden otoksen t-testi keskiarvoille		
Pyreeni		
	Muuttuja 1	Muuttuja 2
Keskiarvo	4,226	3,710666667
Varianssi	31,38915429	24,32652095
Havainnot	15	15
Pearsonin korrelaatio	0,997292745	
Arvioitu keskiarvojen ero	0	
va	14	
t Tunnusluvut	2,578666933	
P(T<=t) yksisuuntainen	0,010932984	
t-kriittinen yksisuuntainen	1,761310136	
P(T<=t) kaksisuuntainen	0,021865968	
t-kriittinen kaksisuuntainen	2,144786688	