

CVG-ICP-OES –menetelmän käyttö elohopean  
analysointiin eläinkudoksesta

Pro gradu -tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Kemian laitos

Analyttisen kemian osasto

2015

Juho Ridanpää

## TIIVISTELMÄ

Tässä Pro gradu –tutkielmassa käsitellään elohopean määrittystä eläinkudoksesta kemiallinen höyryn muodostus induktiivisesti kytketty plasma optinen emissio spektrometria –menetelmällä (CVG-ICP-OES) ja siihen liittyvää näytteenkäsittelyä.

Tutkimuksen kirjallisessa osassa käydään läpi muun muassa eri näytteenliuotusmenetelmiä, analyysimenetelmiä, tutkittavien metallien pelkistämistä CVG-ICP-OES –analyysiä varten ja CVG-ICP-OES –analyysissä esiintyviä häiriöitä. Näytteenliuotusosassa keskitytään pääasiassa tutkimuksessa käytetyn ultraäänihajotuksen esittelyyn, tämän lisäksi myös muita yleisiä näytteenliuotusmenetelmiä esitetään. Analyysimenetelmä osiossa suurin huomio keskittyy ICP-OES –laitteistoon ja sen käyttöön osana CVG-ICP-OES määrittystä. Myös yleisesti käytetty atomiabsorptiospektrometria –laitteisto (AAS) esitellään, koska sitä voidaan käyttää myös elohopean määrittämiseen kylmähöyrynä CV-AAS –menetelmän avulla. Näytteen elohopean pelkistys sekä  $\text{NaBH}_4$  että  $\text{SnCl}_2$  avulla esitetään.

Tutkimuksen kokeellisessa osassa tutkitaan elohopean määrittystä referenssimateriaaleista DOLT-4 piikkikalan maksa ja TORT-2 hummerin haima CVG-ICP-OES –menetelmällä. Näytteet liuotettiin ultraäänessä hajotusliuoksella, joka sisälsi puolet kuningasvettä ja puolet vettä. Elohopean pelkistämiseen käytettiin 0,5 %:sta  $\text{NaBH}_4$ :ä 0,05 %:ssa  $\text{NaOH}$ :ssa. Menetelmän testauksen yhteydessä huomattiin, että näyte vaahtoutuu näytteenäytössä. Tämä ongelma poistettiin lisäämällä näytteisiin dekanolia ja optimoimalla näytteenäytöstä. Tällä menetelmällä saadut tulokset elohopean pitoisuuksista referenssimateriaaleista DOLT-4 ja TORT-2 olivat erittäin hyvät, tulokset olivat virherajojen puitteissa samat kuin sertifioidut pitoisuudet, saantoprosenttien ollessa 102 % ja 104 %.

Tämän lisäksi tutkittiin soveltuisiko käytetty liuotusmenetelmä myös metallien As, Cd, Cu, Ni, Zn ja Fe määrittämiseen referenssimateriaaleista ICP-OES:llä vain näytteenäytöstä vaihtamalla. Saatujen tulosten perusteella tämä näyttäisi olevan täysin mahdollista. Tutkimus antoi myös viitteitä mahdollisuudesta määrittää arseeni hydridinä yhdessä elohopean kylmähöyryn kanssa.

## **ESIPUHE**

Tämän pro gradu –tutkielman kokeellinen osa on tehty keväällä 2014 Jyväskylän yliopiston epäorgaanisen ja analyyttisen kemian osastolla, työn kirjallinen osa on kirjoitettu vuoden 2014 ja kevään 2015 aikana. Työn on ohjannut epäorgaanisen ja analyyttisen kemian dosentti Ari Väisänen.

Työssä on käytetty aineistona analyyttisen kemian tieteellisiä julkaisuja sekä kirjallisuutta. Käytetystä aineistosta suurin osa on hankittu internetin eri tietokannoista käyttäen tähän tarkoitettua SciFinder –hakukonetta. Painettua kirjallisuutta edustivat kemian oppikirjat ja yksityiskohtaisempi menetelmäkirjallisuus.

Haluan kiittää työn ohjauksesta, siihen liittyvistä hyvistä ideoista ja neuvoista ohjaajaani Ari Väisästä. Kiitos kuuluu myös hengessä mukana olleille ja gradustressiä lievittäneille ystäville ja läheisille.

# SISÄLLYSLUETTELO

<b>TIIVISTELMÄ</b> .....	<b>I</b>
<b>ESIPUHE</b> .....	<b>II</b>
<b>SISÄLLYSLUETTELO</b> .....	<b>III</b>
<b>LYHENTEET</b> .....	<b>VI</b>
<b>KIRJALLINEN OSA</b> .....	<b>1</b>
<b>1 JOHDANTO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 ELOHOPEASTA</b> .....	<b>2</b>
<b>3 NÄYTTEEN KÄSITTELY</b> .....	<b>4</b>
<b>4 NÄYTTEEN LIUOTUS</b> .....	<b>6</b>
4.1 Ultraäänihajotus.....	6
4.1.1 Teoriaa.....	6
4.1.2 Käyttö.....	8
4.1.3 Ultraäänihajotuksen etuja ja heikkouksia.....	10
4.2 Mikroaaltohajotus.....	10
4.3 Slurry -menetelmä .....	12
<b>5 ANALYYSIMENETELMÄT</b> .....	<b>14</b>
5.1 AAS –tekniikat .....	14
5.1.1 AAS-laitteen toimintaperiaate.....	14
5.1.2 Liekkitekniikat .....	16
5.1.3 Uuni- eli liekittömät tekniikat .....	17
5.1.4 Kylmähöyrytekniikka.....	18
5.2 ICP-OES .....	18
5.2.1 Näytteensyöttö.....	19
5.2.1.1 Sumuttimet .....	19
5.2.1.2 Sumutinkammiot .....	23
5.2.1.3 Pumppu.....	26
5.2.2 Plasma ja plasmasoihtu .....	26
5.2.3 Radiaalinen ja aksiaalinen mittaus .....	30
5.2.4 Spektrometrin optiikka ja detektori.....	31
5.2.5 Hydridin muodostus .....	33

<b>6</b>	<b>NÄYTTEIDEN ESIPELKISTYS</b> .....	<b>34</b>
<b>7</b>	<b>NÄYTTEIDEN PELKISTYS</b> .....	<b>36</b>
7.1	Natriumtetrahydroboraatti .....	36
7.2	Tina(II)kloridi.....	38
<b>8</b>	<b>CVG-ICP-OES</b> .....	<b>39</b>
8.1	Kemiallinen höyryn muodostus.....	39
8.2	FIAS-400 .....	40
8.3	Elohopean määrittäminen kemiallisen höyrymuodostuksen avulla .....	42
8.4	Arsenin määrittäminen hydridinä.....	44
<b>9</b>	<b>HÄIRIÖT ANALYYSEISSA</b> .....	<b>45</b>
9.1	Häiriöt hydriditeknikassa .....	45
9.1.1	Häiriöt elohopean kylmähöyry määrittämisessä .....	46
9.1.2	Häiriöt määrittäessä arsenia hydridin muodostus tekniikalla.....	47
9.2	Elohopean muistiefekti .....	49
	<b>KOKEELLINEN OSA</b> .....	<b>50</b>
<b>10</b>	<b>KÄYTETYT LAITTEET</b> .....	<b>50</b>
<b>11</b>	<b>REAGENSIT JA REFERENSSIMATERIAALIT</b> .....	<b>50</b>
<b>12</b>	<b>NÄYTTEET</b> .....	<b>51</b>
<b>13</b>	<b>NÄYTTEIDEN LIUOTUS JA PELKISTYS</b> .....	<b>51</b>
13.1	Liuotus.....	51
13.2	Pelkistys.....	51
<b>14</b>	<b>ICP-OES ASETUKSET, REAGENSIT JA NÄYTTEENSYÖTTÖ</b> .....	<b>52</b>
14.1	CVG-ICP-OES elohopea määrittäminen .....	52
14.2	Raskasmetallien määrittäminen .....	52
<b>15</b>	<b>MENETELMÄN OPTIMOINTI</b> .....	<b>54</b>
15.1	Erialaisten kombinaatioiden testaus .....	54
15.2	Näytteensyöttönopeuden optimointi.....	58
15.3	Sumuttimen kaasuvirtauksen optimointi .....	59

<b>16</b>	<b>TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU.....</b>	<b>60</b>
16.1	Elohopea.....	60
16.2	Raskasmetallit .....	61
<b>17</b>	<b>YHTEENVETO.....</b>	<b>63</b>
	<b>KIRJALLISUUSVIITTEET .....</b>	<b>64</b>
	<b>LIITTEET</b>	

**LYHENTEET**

AAS	Atomiabsorptiospektrometria (Atomic Absorption Spectrometry)
AFS	Atomifluoresenssispektrometria (Atomic Fluorescence Spectrometry)
CCD	Varauskytkentädetektori (Charge-Coupled Device)
CID	Varausinjektiodetektori (Charge Injection Device)
CRM	Sertifioitu referenssi materiaali (Certified Reference Material)
CV	Kylmähöyry (Cold Vapor)
CVG	Kemiallinen höyryn muodostus (Chemical Vapor Generation)
EDTA	Etyleenidiamiinitetraetikkahappo (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )
ETAAS	Elektroterminen Atomiabsorptiospektrometria (Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry)
FAO	Yhdistyneiden kansakuntien elintarvike- ja maatalousjärjestö (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
FI	Virtaus injektio (Flow-Injection)
HG	Hybridin muodostus (Hydride Generation)
ICP-OES	Induktiivisesti kytketty plasma-optinen emissiospektrometria (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry)
JECFA	FAO:n ja WHO:n yhteinen elintarvikelisiä aineita käsittelevä asiantuntijakomitea (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)
MIP	Mikroaalloilla kytketty plasma (Microwave Induced Plasma)
PDA	Valodiodirivi (Photodiode Array)

PTFE	Polytetrafluorieteeni, kaupp nimi teflon
TMAH	Tetrametyyliammoniumhydroksidi
US EPA	Yhdysvaltain ympäristönsuojeluvirasto (United States Environmental Protection Agency)
WHO	Maailman terveysjärjestö (World Health Organization)



## KIRJALLINEN OSA

### 1 JOHDANTO

Elohopean määrittäminen biologisista näytteistä on tärkeää, koska elohopea on erittäin myrkyllistä.<sup>1, 2</sup> Elohopean myrkyllisyys riippuu suuresti siitä millaisessa kemiallisessa muodossa se esiintyy. Yleisin ja myrkyllisin elohopeayhdiste on metyylielohopea. Suurimmat elohopean lähteet ihmisen ruokavaliosta ovat kalat, joihin elohopeaa on kertynyt sekä orgaanisessa että epäorgaanisessa muodossa. Elohopean määrittämiseen on kehitetty useita eri menetelmiä. Suosituin näistä menetelmistä on kylmähöyrymuodostus, jossa elohopea muutetaan muotoon  $\text{Hg}^{2+}$  happojen avulla ja pelkistetään kaasumaiseen alkuainemuotoonsa  $\text{Hg}^0$   $\text{NaBH}_4$ :llä tai  $\text{SnCl}_2$ :lla.

Yleisimmät analyysimenetelmät matalien elohopea pitoisuuksien määrittämiseen ovat kylmähöyry atomiabsorptiospektrometria (CV-AAS), kylmähöyry atomi fluoresenssispektrometria (CV-AFS), virtausinjektio induktiivisesti kytketty plasma optinen emissio spektrometria (FI-ICP-OES) höyrymuodostuksen kanssa tai ilman sitä ja induktiivisesti kytketty plasma massaspektrometria (ICP-MS).<sup>3</sup> Suurimmat höyrymuodostuksella saavutettavat edut spektroskooppisissa menetelmissä ovat analyytin erottuminen matriisista ja näytteen syötön suuri tehokkuus, jotka parantavat herkkyyttä ja selektiivisyyttä, mikä johtaa matalampiin havaintorajoihin.

Perinteisissä atomisaatio menetelmissä vain noin 10 %:a näyteaerosolista päätyy liekkiin tai plasmaan.<sup>3</sup> Kylmähöyrymenetelmissä kaasumaiseen alkuainemuotoonsa pelkistetty elohopea voidaan syöttää plasmaan tai liekkiin kaasufaasissa, jolloin menetelmän herkkyys kasvaa huomattavasti. Jotta kylmähöyrymenetelmällä voidaan saavuttaa paras mahdollinen herkkyys ja selektiivisyys, täytyy menetelmää varten optimoida useita parametreja. Virtausinjektio menetelmässä näitä parametreja ovat muun muassa pelkistimen konsentraatio ja virtausnopeus sekä näytteen ja kantajakaasun virtausnopeus näytteen syötössä.

## 2 ELOHOPEASTA

Ympäristössä elohopeaa (Hg) esiintyy monessa erilaisessa muodossa, kuten alkuaineena, ioneina ja useina erilaisina orgaanisina yhdisteinä joista esimerkkinä mainittakoon metyylielohopea ja etyylielohopea.<sup>4</sup> Elohopeaa päätyy ympäristöön tulivuorenpurkausten ja kiviaineksen rapautumisen yhteydessä. Ihmisen toiminnan seurauksena elohopeaa vapautuu luontoon teollisuudesta ja kivihiilivoimaloista. Elohopea voi kulkeutua ilmakehässä mantereelta toiselle. Ihmiselle haitallisimpia ovat elohopean orgaaniset yhdisteet, joista haitallisin on metyylielohopea (MeHg). Metyylielohopea syntyy, kun elohopea kulkeutuu ilmakehästä laskeuman kautta vesistöihin. Vedessä elohopea muuttuu bakteeritoiminnan seurauksena metyylielohopeaksi. Tätä prosessia kutsutaan metylaatioksi, siinä bakteerit muuttavat alkuaine- ja ionimuodossa olevan elohopean metyylielohopeaksi. Metyylielohopea on rasvaliukoinen, jonka ansiosta se kiinnittyy tiukasti elimistön rikkiä sisältäviin proteiineihin. Tästä syystä metyylielohopea rikastuu ravintoketjussa, minkä vuoksi metyylielohopealle altistutaan pääasiassa ravinnon kautta.

Ravintoketjun huipulla olevat suuret petokalal ovat merkittävin metyylielohopean lähde ihmiselle.<sup>4</sup> Kalojen elohopeapitoisuus kuitenkin vaihtelee paikallisesti paljon. Järvikaloissa pitoisuudet ovat suurempia kuin merikaloissa. Metyylielohopean kannalta ongelmallisimpia ovat tekojärvet, joissa veden alle jääneestä maaperästä vapautuu veteen runsaasti elohopeaa. EU:n komission asetuksen 1881/2006<sup>5</sup> mukaan elintarvikkeena käytettävän kalan elohopeapitoisuus ei saa ylittää 0,5 milligrammaa kilossa kalan tuorepainoa kohti laskettuna ( $\text{mg}/\text{kg}$  tp). Petokaloille pitoisuusrajaksi on asetettu  $1,0 \text{ mg}/\text{kg}$  tp.

FAO:n (Yhdistyneiden kansakuntien elintarvike- ja maatalousjärjestö) ja WHO:n (Maailman terveysjärjestö) yhteisen elintarvikelisiä aineita käsittelevän asiantuntijakomitea JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) mukaan ihminen voi ilman merkittäviä terveysriskejä altistua metyylielohopealle  $1,6 \mu\text{g}/\text{viikko}$  painokiloa kohden koko elämänsä ajan.<sup>4, 6</sup> Suomalaiset altistuvat elohopealle keskimäärin  $6,8 \mu\text{g}/\text{vrk}$ , joka 70-kiloiselle henkilölle tarkoittaa  $0,68 \mu\text{g}/\text{viikko}$  painokiloa kohti, mikä alittaa selvästi JECFA:n asettaman rajan metyylielohopean viikkosaannista.<sup>4</sup>

Höyrynä metallinen elohopea imeytyy helposti keuhkojen kautta, lisäksi jonkin verran elohopeaa imeytyy myös ruuansulatuselimistöstä ja vähän myös ihon lävitse.<sup>7 s. 7</sup> Hengitetystä metallisesta elohopeahöyrystä elimistöön jää noin 70–80 %. Keuhkoista elohopea liukenee vereen, jossa se sitoutuu pääosin punasolujen hemoglobiiniin ja plasman proteiinien SH-ryhmiin. Puoliintumisaika elohopealla veressä on noin 3-4 päivää. Osa elimistöön joutuneesta elohopeasta hapettuu 2-arvoiseksi elohopeaioneiksi ( $\text{Hg}^{2+}$ ), jotka sitoutuvat muun muassa valkuaisaineisiin. Muualta elimistöstä elohopea poistuu hitaammin kuin verestä, koko elimistön biologinen puoliintumisaika elohopealle on noin 60 päivää. Orgaaninen elohopea säilyy veressä pitkään, koska erityytään suolistoon se imeytyy osittain takaisin vereen.

Metallinen elohopea voi kulkeutua aivoihin, missä se vaikuttaa keskushermostoon, lisäksi elohopeaa kertyy munuaisiin ja maksaan.<sup>7 s. 7-8</sup> Ensimmäisinä merkkeinä elohopean vaikutuksista ilmaantuvat epäspesifiset hermostovaikutukset ja psykomotoriset oireet. Suurempaan altistumiseen liittyy tyypillisinä oireena käsien vapina, muistihäiriöt ja unettomuus. Tapaturmainen altistuminen korkealle elohopeahöyrypitoisuudelle saattaa aiheuttaa keuhkotulehduksen, jota seuraavat munuaisten ja keskushermoston oireet. Sikiön ja lapsen keskushermostolle metyylielohopea on erittäin haitallista.<sup>4</sup> Se saattaa aiheuttaa keskittymishäiriöitä, motorisia häiriöitä ja sanallisen muistin heikentymistä. Altistuminen metyylielohopealle on yhdistetty myös kohonneeseen sydän- ja verisuonitautien riskiin.

### 3 NÄYTTEEN KÄSITTELY

AAS- ja ICP-OES-tekniikoissa näyte syötetään laitteelle tavallisesti liuksena.<sup>8 s. 186</sup> Näytteen esikäsittelymenetelmät valitaan sen mukaan millainen näytetyyppi on kyseessä, mitkä alkuaineet halutaan määrittää, kuinka suurissa pitoisuuksissa ne ovat ja mikä määrittäminen valitaan. Mitään yleistä kaikille näytteille sopivaa menetelmää ei ole. Joskus näyte voidaan analysoida ilman esikäsittelyä, kun taas toisille näytteille tarvitaan useampi eri esikäsittelyvaihe.

Kemiallisen analyysiin vaiheet voidaan jakaa neljään vaiheeseen, näytteen ottoon ja säilytykseen, näytteen esikäsittelyyn ja valmistukseen, näytteen analyysiin ja tulosten käsittelyyn ja luotettavuuden arviointiin.<sup>8 s. 186</sup> Näytteen ottoon ja säilytykseen tulee kiinnittää erityistä huomiota, sillä niissä tehtyjä virheitä ei voi korjata jälkeenpäin. Kalibroinnissa tulee huomioida näytteen valmistusmenetelmä. Pieniä pitoisuuksia analysoidessa kontaminaation vaikutus tuloksiin kasvaa ja siihen on kiinnitettävä enemmän huomiota. Näytteenottomenetelmä valitaan näytetyypin ja näyttemäärän mukaan. Käytännössä näytteen otosta huolehti joku muu kuin analyytikko. Jotta voidaan varmistua, että eri laboratorioissa tehdyt määritykset olisivat vertailukelpoisia, tuloksista voitaisiin tehdä varmoja johtopäätöksiä ja että näyte on varmasti homogeeninen, täytyy näytteenotossa noudattaa eri näytetyypeille kehitettyjä näytteenottonormeja.

Rio-Segade ja Bendicho<sup>9</sup> esittävät simpukan kudoksenäytteille esikäsittelymenetelmän, jossa kudoksenäytteet käsiteltiin hajotusta varten seuraavasti. Simpukan kudoksen homogenoitiin jauhimella ja tehosekoittimella. Homogenoitu seos kuivattiin 40 °C:ssa 48 tuntia. Kuivattu näyte jauhettiin morttelilla ja seulottiin partikkelikokoon < 100 µm. Osterin kudoksenäytteet voidaan valmistaa seuraavasti.<sup>10</sup> Irrotetaan kudoksen osterinkuoresta, kuivataan uunissa 35 °C:ssa ja lopuksi kylmäkuivataan kahdeksan tuntia.

Referenssimateriaali TORT-2<sup>11</sup> hummerin haima on valmistettu seuraavasti. Lähtömateriaalina käytettiin syötäväksi tarkoitettua jäädytettyä hummerin haimaa, jota säilytettiin alle -30 °C:ssa, mikä estää proteiinien ja rasvojen hajoamisen. Näytteenvalmistus aloitettiin sulattamalla ja homogenoimalla haimat hienojakoiseksi slurryksi, joka spray kuivattiin. Tämän jälkeen suoritettiin asetoni uutto, jolla näytteestä poistettiin rasvat, minkä jälkeen näyte tyhjiökuivattiin. Kuivattu näyttemateriaali sekoitettiin, seulottiin, sekoitettiin uudelleen ja pulloitettiin. Lopuksi näytteet steriloitiin säteilyllä. Myös referenssimateriaali DOLT-4 piikkikalan maksa, on valmistettu hyvin samankaltaisella menetelmällä.<sup>12</sup>

## 4 NÄYTTEEN LIUOTUS

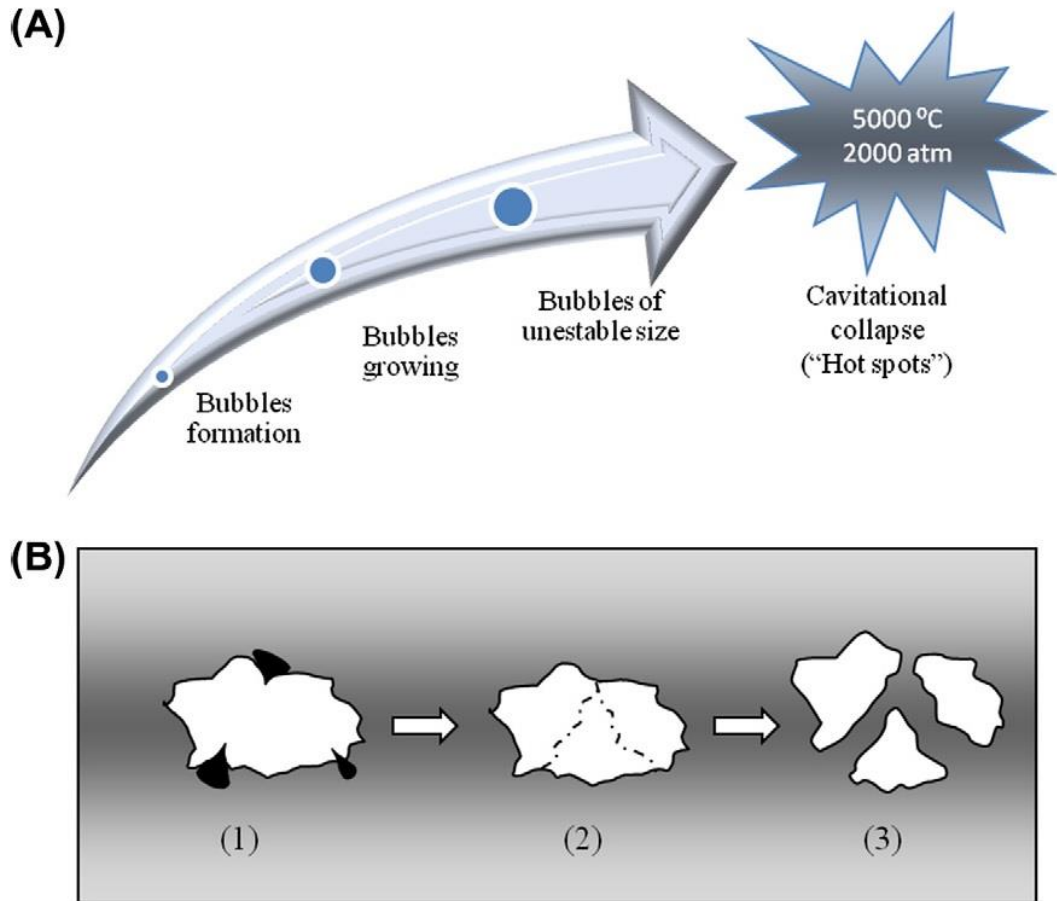
Biologiset näytteet koostuvat monimutkaisista seoksista hiilihydraatteja, proteiineja ja lipidejä eivätkä näin ollen liukene kokonaan veteen tai orgaanisiin liuottimiin.<sup>13</sup> Ennen analyysiä onkin tästä syystä suoritettava orgaanisen aineksen hajotus ja vapautettava metallit näytematriisista. Suuressa osassa näytteen liuotustekniikoista käytetään vahvoja hapettavia happoja kuten typpihappoa, jolla hajotetaan näytteen orgaaninen aines. Tällöin useita alkuaineita vapautuu liukoisina nitraattisuoloina. Lisäksi voidaan käyttää muita happoja hajottamaan näytettä edelleen, sen mukaan mitä alkuaineita halutaan analysoida ja millainen analyysitekniikka on valittu. Esimerkiksi vetykloridi on hyvä liuotin useille metallioksidoille. Vetyfluoridin käyttö on monesti tarpeellista silloin kun halutaan määrittää alkuaineita jotka ovat sitoutuneena kvartsimineraaleihin.

### 4.1 Ultraäänihajotus

#### 4.1.1 Teoriaa

Ultraäänien taajuus on korkeampi kuin ihmiskorvalla havaittava ääni.<sup>14</sup> Sen alarajana pidetään 20 kHz:ä. Ääniaallot ovat mekaanisia värähdyksiä joko kiinteässä, nestemäisessä tai kaasumaisessa aineessa, joten ne eivät etene tyhjiössä. Ääniaallon edetessä tapahtuu väliaineessa syklistä laajenemista ja puristumista. Laajeneminen vetää molekyyliä erilleen kun taas puristuminen puristaa niitä yhteen.

Nesteessä tapahtuva laajenemissykli tuottaa negatiivista painetta.<sup>14</sup> Ultraäänien ollessa riittävän voimakasta laajeneminen voi tuottaa nesteeseen kuplia. Näin tapahtuu silloin kun negatiivinen paine ylittää nesteen vetolujuuden, joka riippuu nesteestä ja sen puhtaudesta. Prosessia (kuva 1) jossa painekuplat muodostuvat, kasvavat ja kokevat imploosioromahduksen kutsutaan kavitaatioksi. Tämä koko prosessi tapahtuu noin 400 µs:ssa. Kavitaatio tapahtuu nesteessä olevissa heikoissa kohdissa, kuten kaasua sisältävissä koloissa suspensiona olevassa aineessa tai mikrokuplissa joita on jäljellä edellisestä kavitaatiosta. Useimmat nesteet ovat kontaminoituneet riittävällä määrällä pieniä partikkeleita, jotta kavitaatio tapahtuu melko alhaisissa negatiivisissa paineissa.



Kuva 1. Kavitaatio ilmiö. (A) kavitaatio kuplien muodostuminen ja romahdus. (B) Kavitaatioilmainen rohmahtaminen nesteen ja kiinteän rajapinnassa. Kuvat (1), (2) ja (3) kuvaavat partikkelin hajoamista/pilkkoutumista, mikä johtuu pinnan epätasaisuuksiin loukkuun jääneistä kaasukuplista. Tämä johtaa partikkelikoon pienenemiseen, joka myös kasvattaa näytteen pinta-alaa.<sup>15</sup>

Siinä vaiheessa kun kupla ei enää pysty tehokkaasti absorboimaan ultraäänen energiaa se kokee imploosion.<sup>14</sup> Kuplan romahtamisesta aiheutuu nopeaa adiabaattista kaasujen höyryjen puristumista kuplan sisällä. Tämä tuottaa erittäin korkeita lämpötiloja ja paineita. On arvioitu että lämpötila näissä kuumissa pisteissä voi olla jopa 5000 °C:ta ja paine noin 1000 atm. Näiden kuplien koko on erittäin pieni verrattuna koko liuoksen tilavuuteen, joten muodostunut lämpö hajaantuu hyvin nopeasti eikä ympäröivissä oloissa tapahdu merkittävää muutosta. Lisäksi kuplan romahdusta seuraava jäähtyminen on erittäin nopeaa.

Kavitaation tapahtuessa lähellä nesteen ja kiinteän aineen rajaa muuttuu kavitaatoromahdus merkittävästi siitä mitä se on puhtaassa nesteessä. Aineen ja nesteen rajapinnassa kavitaatiota ympäröivä aine ei ole yhdenmukaista, jolloin ei muodostu pallomaista kavitaatoromahdusta vaan romahdus on asymmetrinen. Tällöin romahduksen seurauksena muodostuu nopeita nestevirtauksia. Yhdessä nestevirtausten, korkean lämpötilan ja paineen kanssa kavitaatio aikaansaa näytteen pilkkoutumista, jolloin enemmän näytettä pääsee kontaktiin liuottimen kanssa.<sup>15</sup> Kavitaatio repii rikki myös soluja biologisista näytteistä, jolloin solun sisällä olevat analyytit vapautuvat.

#### 4.1.2 Käyttö

Näytteeseen ultraäänienergiaa voidaan tuoda, joko ultraäänihauteella (kuva 2) tai ultraäänisauvalla.<sup>14</sup> Ultraäänihauteet ovat selvästi yleisempiä. Niillä on kuitenkin kaksi suurta heikkoutta ultraäänisauvoihin verrattuna, jotka vaikuttavat kokeelliseen toistettavuuteen. Hauteessa ultraäänienergia jakautuu epätasaisesti suurelle alueelle, jolloin ultraäänilähteen lähellä vain pieni osa nesteestä kokee kavitaation. Myös ultraäänihauteen teho alenee ajan kuluessa. Ultraäänisauvoilla energia voidaan kohdistaa pienelle alueelle lähelle näytettä, tällöin kavitaatio on voimakkaampaa näytteen läheisyydessä. Kiinteä näyte voidaan ultraäänellä hajottaa tai siitä voidaan uuttaa halutut analyytit tai näyte voidaan liettää.<sup>16</sup>



Kuva 2. Ultraäänihautaus<sup>17</sup>



Kazi *et al.*<sup>18</sup> ovat tutkineet kuinka erilaiset muuttujat ultraäänihajotuksessa vaikuttavat ympäristö- ja biologisista CRM (sertifiotu referenssi materiaali) näytteistä saatuihin rakasmetallipitoisuus (Cd, Cr, Ni ja Pb) tuloksiin ETAAS:llä. Näitä tuloksia verrattiin myös tuloksiin joita saatiin keittolevyllä tehdyllä happohajotuksella. Tutkittuja muuttujia olivat hajotukseen käytetyt happoseokset, happojen kosketusaika näytteeseen ennen ultraääntä, ultraääniajan ja ultraäänihauteen lämpötilan vaikutus. Parhaat tulokset ympäristönäytteille saatiin happoseoksella HNO<sub>3</sub>-HCl (1:3), jonka annettiin olla kosketuksissa näytteeseen 15 minuuttia ennen ultraääntä. Ultraäänihauteessa näytettä pidettiin 25 minuuttia sen lämpötilan ollessa 80 °C:ta. Biologisille näytteille parhaat tulokset saatiin seoksella HNO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2:1), joka oli kosketuksissa näytteeseen 8 minuuttia ennen ultraääntä. Ultraäänessä näytteitä pidettiin 10 minuuttia ja ultraäänihauteen lämpötilana oli 70 °C:ta. Biologiset näytteet vaativat vahvan hapettimen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> käyttöä, koska sen avulla saadaan proteiineihin, hiilihyaatteihin ja monityydyttymättömiin rasvahappoihin sitoutuneet metallit irtoamaan liuokseen. Kaikki näillä menetelmillä saadut tulokset ovat vartoilukelpoisia perinteisen keittolevy happohajotuksen kanssa.

Matusiewicz ja Stanisz<sup>19</sup> ovat vertailleet erilaisia liuottimia biologisten näytteiden ultraääniliuotossa, epäorgaanisen elohopean pitoisuuksien määrittämiseksi, CV-AAS:llä. Vertailtavat liuottimet olivat 5 mol/l HCl, 6 % tetrametyyliammoniumhydroksidi (TMAH) ja n. 90 % HCOOH. Tutkimuksessa vertailtiin aikaa jonka näyte oli ultraäänessä, ultraäänien tehoa ja liuottimen määrää. Ultraäänilähteenä käytettiin ultraäänisauvaa, joka upotettiin näytteisiin. Liuotinta tarvittiin 250 mg:lle näytettä 5 ml HCl, 20 ml HCOOH ja 5 ml TMAH. Optimiteho ultraäänelle oli 35 W käytettäessä liuotukseen HCl ja 50 W kun käytettiin TMAH tai HCOOH. Näytettä tuli pitää ultraäänessä 5 minuuttia. Saadut tulokset epäorgaanisen elohopean pitoisuuksista olivat kaikilla liuottimilla kohtalaisen hyviä.

#### 4.1.3 Ultraäänihajotuksen etuja ja heikkouksia

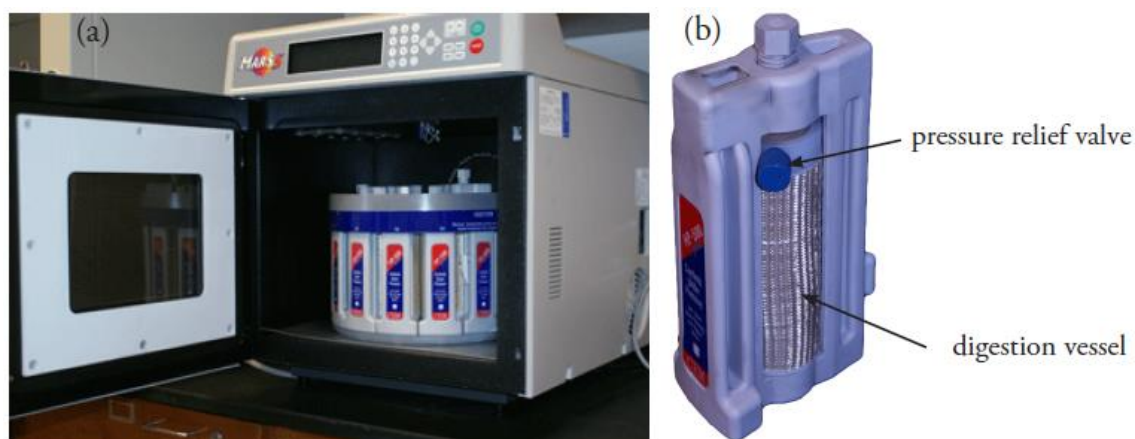
Ultraäänien käytössä on useita etuja esimerkiksi mikroaaltohajotukseen verrattuna.<sup>14, 15</sup> Ultraäänihajotus on monesti nopeampi kuin mikroaaltohajotus ja samalla se myös kuluttaa vähemmän energiaa. Se on myös turvallisempi, koska siinä ei tarvita korkeita paineita ja lämpötiloja. Monesti ultraäänihajotus on myös yksinkertaisempi, jolloin kontaminaatoriski on pienempi. Heikkoutena mikroaaltohajotukseen verrattuna voidaan pitää sitä, että ultraäänihajotus ei ole niin robusti menetelmä, koska ikääntynyt ultraäänilähde voi heikentää liuotuksen tehoa. Myös partikkelikoolle on suuri merkitys ultraäänihajotuksessa.

#### 4.2 Mikroaaltohajotus

Näytteen mikroaaltohajotus on nykypäivänä erittäin käytetty menetelmä analytiikassa.<sup>20</sup> Käytössä on monenlaisia mikroaaltohajotuslaitteita, kuten avoimessa astiassa suoritettava hajotus ja suljetussa astiassa korkeassa paineessa tehtävä hajotus. Mikroaaltohajotus tarjoaa useita etuja perinteisiin näytteenhajotusmenetelmiin nähden. Näitä etuja ovat muun muassa lyhyempi aika happoliuotukseen, oletetusti parempi saanto haihtuville yhdisteille ja alkuaineille, pienempi kontaminaatio, vähäisempi määrä reagensseja ja toistettavampi menetelmä. Mikroaaltohajotuksen avulla voidaan tavallinen ympäristönäyte hajottaa tai siitä voidaan liuottaa hivenaineet analyysiä varten. Koska kyseessä on nykyisin erittäin yleinen näytteenliuotusmenetelmä, on sen pohjalta luotu useita standardimenetelmiä. Biologisille näytteille käytetään yleisesti yhdysvaltain ympäristönsuojeluviraston standardimenetelmää US EPA 3052.<sup>21</sup>

Mikroaallot ovat elektromagneettista energiaa.<sup>22 s. 8</sup> Mikroaaltoenergia on ei ionisoivaa säteilyä, joka aiheuttaa molekyylien liikettä liikuttamalla ioneita ja pyörittämällä dipoleja mutta ei aiheuta muutosta molekyylin rakenteeseen. Mikroaaltojen taajuus vaihtelee välillä 300 – 300 000 MHz:ä. Mikroaallot lämmittävät vain nestefaasia, kun taas höyryt eivät absorboi mikroaaltoenergiaa.<sup>20</sup> Tästä johtuen kaasufaasin lämpötila on matalampi kuin nestefaasin lämpötila. Tämän vuoksi astian viileillä reunoilla tapahtuu höyryn tiivistymistä, jonka tuloksena todellinen kaasunpaine on matalampi kuin ennustettu kaasunpaine. Tämä onkin yksi mikroaaltohajotuksen tärkeimpiä etuja, sillä tästä johtuen sillä voidaan saavuttaa korkeita lämpötiloja matalissa paineissa. Korkea lämpötila tarkoittaa myös lyhyempää liuotusaikaa.

Suljetussa astiassa suoritettavassa mikroaltohajotuksessa näyte asetetaan putkeen, joka on usein valmistettu teflonista eli polytetrafluorietaanista (PTFE).<sup>13</sup> Sen jälkeen kun putkeen on lisätty myös hajotukseen käytettävät reagenssit, putki suljetaan tiiviisti ja asetetaan mikroaltohajotuslaitteeseen (kuva 3), missä se altistuu mikroaltohajotukselle ja lämpenee. Yksi suljetun mikroaltohajotuksen suurimmista eduista on siinä saavutettava suuri lämmitystehtävyys. Lämmitys aiheuttaa putken sisällä haihtumista mikä nostaa myös painetta putken sisällä. Paineen nousu nostaa myös käytettyjen reagenssien kiehumispistettä, mikä auttaa näytematriisin hajoamisessa. Putkissa käytetään ylipaineventtiiliä estämään putken räjähdys. Paineen nousua täytyy kuitenkin kontrolloida, sillä jos ylipaineventtiiliä tarvitaan tarkoittaa se myös, että putkesta karkaa paineen lisäksi myös näytettä.



Kuva 3. Mikroaltohajotuslaitteisto. (a) Mikroaltohajotusuuni, jonka sisällä on pyörivä hajotusputkeline. (b) Lähikuva hajotusputkesta, joka on kiinnitetty hajotusputkelineeseen.<sup>23</sup>

Avoimessa astiassa tehtävä mikroaltohajotus tehdään normaalissa ilmanpaineessa ja näin ollen paineen nousu ei aiheuta siinä ongelmia, kuitenkin tämä tekniikka vaatii tehokkaan laitteiston muodostuvien höyryjen poistoon.<sup>13</sup> Haihtuvien aineiden katoaminen näytteestä estetään tiivistämällä ne pystyjäähdyttimessä. Avoimella astialla on muutamia etuja suljettuun astiaan verrattuna. Kuten avoimella astialla voidaan hajottaa kerralla suurempia näytemääriä, jopa 15 grammaa kerralla, ja siihen voidaan lisätä hajotusreagensseja missä menetelmän vaiheessa tahansa. Heikkoutena menetelmällä on se, että normaalista ilmanpaineesta johtuen avoimessa menetelmässä pitää käyttää korkean kiehumispisteen omaavia happoja, kuten rikkihappoa, jotta näytteen orgaaninen materiaali saadaan hajotettua kokonaan.

Mikroaaltohajotusta voidaan käyttää monenlaisille näytetyypeille, kuten biologisille, geologisille ja vesinäytteille.<sup>13</sup> Käytettävä mikroaaltohajotusmenetelmä ja reagenssit tulee valita sen mukaan millainen näyte on kyseessä ja mitä alkuaineita siitä halutaan määrittää. Merieläinten kudospäätteistä elohopeaa on määritetty käyttäen typpihappoa ja suljettua mikroaaltohajotusta. Tämän lisäksi hajotus on suoritettu myös avoimessa sekä suljetussa mikroaaltohajotuksessa käyttäen reagensseina vahvoja hapettimia kuten rikkihappoa ja vetyperoksidia. Näytteen analysointi on suoritettu usein käyttäen CV-AAS –menetelmää.

### 4.3 Slurry -menetelmä

Määritettäessä hivenaineita orgaanisista matriiseista täytyy orgaaninen aines tuhota, jotta saadaan tarkkoja tuloksia.<sup>24</sup> Näytteen tulee myös olla kokonaan nestemäisessä muodossa, jolloin orgaaninen materiaali täytyy liuottaa kokonaan, sillä orgaaninen hiili häiritsee analyysiä joissain tekniikoissa. Käyttämällä näytteen esikäsittelyyn slurry –menetelmää voidaan välttyä happohajotuksen käytöltä. Hivenaineiden määrittäminen suoraan slurrystä poistaa tarpeen käyttää monimutkaisia ja aikaa kuluttavia näytteen käsittelyvaiheita, jotka voivat lisäksi aiheuttaa myös näytteen kontaminaatiota. Slurry –menetelmä onkin tehokas apuväline määrittäessä metalleja CVG-AAS:llä tai CVG-AES:llä. Slurry –menetelmän käyttö mahdollistaa myös näyteliuoksen konsentraation valinnan ja prosessin automatisoinnin.

Näytteen laimennokseen käytetään yleisesti mineraalihappoja, kuten typpihappoa ja vetykloridia.<sup>24</sup> Tämä lisää alkuaineiden irtoamisen tehokkuutta partikkeleista. Jotta voidaan valmistaa homogeenisenä pysyvä slurry –näyte, täytyy näyteliuos stabiloida, usein tähän käytetään Triton X-100:a tai 20 %:sta etanolia. Triton X-100 on tensidi, joka stabiloi esimerkiksi biologisia ja orgaanisia slurry –näytteitä. Tämän ansiosta liuoksen kiinteät partikkelit hajaantuvat tasaisesti liuoksen sisällä ja Triton X-100 estää partikkeleita nousemasta liuoksen pintaan. Haittana Triton X-100:n käytössä on se, että se aiheuttaa vaahtoamista, mutta se voidaan poistaa käyttämällä vaahtoamisenestoainetta. Yleensä slurry homogenisoidaan juuri ennen sen syöttämistä virityslähteeseen tai sitä voidaan myös sekoittaa kokoajan. Jatkuvaan sekoittamiseen käytetään muun muassa magneettisekoittajaa ja ultraääntä.

Huolimatta monista eduista slurry –menetelmässä on sillä myös muutamia heikkouksia, jotka voivat vaikuttaa analyysituloksiin.<sup>24</sup> Analyysin lopputulokseen vaikuttavat partikkelikoko näytteessä, kiinteän aineksen sisältämät alkuaineet, näytemäärä, partikkelimäärä ja -paino näytetilavuudessa, homogenoointiaika, aika homogoinnin lopettamisesta analyysiin, liuottimien kemiallinen luonne ja konsentraatio sekä se kuinka paljon partikkeleja näyteliuoksen mukana kulkeutuu atomisaattorille tai virityslähteeseen.

Hydridejä muodostavat As, Bi, Ge, Sb, Se ja Sn sekä alkuainemuotoinen Hg on määritetty onnistuneesti suoraan biologisista ja ympäristö slurry –näytteistä.<sup>25</sup> Nämä näytteet valmistettiin punnitsemalla reaktioastiaan noin 300 mg näytettä, lisäämällä sinne 9 ml 10 % HNO<sub>3</sub> ja 1 ml 10 % tioureaa, jolloin lopullinen slurry konsentraatio oli 3 %:a. Tämän jälkeen liuosta seisotettiin 30 minuuttia. Tiourea ja 30 minuutin säilytys pelkistävät tutkittavat metallit hydridin muodostuksen kannalta optimaaliselle hapetusasteelle. Seuraavaksi slurry –näytteet esikäsiteltiin ultraäänessä 40 W teholla 5 minuutin ajan. Ultraääni käsittelyn jälkeen näytteet siirrettiin mittausastiaan ja niihin lisättiin 100 µl dekanolia vaahtoamisenestoaineeksi. Slurry -näytteiden paakkuuntuminen ja laskeutuminen näyteastian pohjalle estettiin sekoittamalla näytettä voimakkaasti ennen analyysiä.

## 5 ANALYYSIMENETELMÄT

### 5.1 AAS –tekniikat

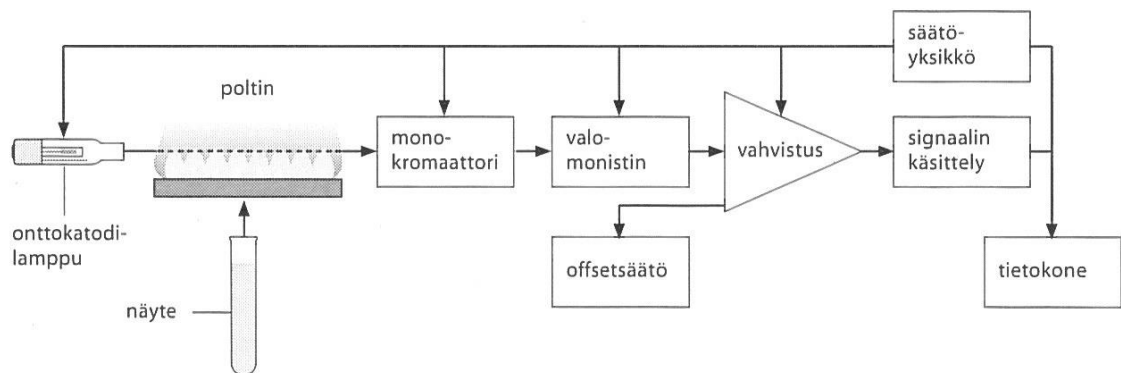
Atomiabsorptiospektrometriaa käytetään alkuaineiden määrittämiseen.<sup>26 s. 69</sup> Herkkyytensä ja selektiivisyytensä ansiosta se on käytetyin atomispektrometrian laji. AAS –tekniikoilla ei voida havaita yhdisteitä vaan ne hajotetaan analyysissä atomimuotoon. Tutkittavan alkuaineen on absorboitava aallonpituusalueella 190-900 nm atomaarisessa perustilassa. Lähes kaikki metallit ovat tällaisia. Vakuumiultravioletialueella absorboivia alkuaineita ei tavallisesti voida analysoida AAS:llä, tällaisia aineita ovat mm. halogeenit ja rikki.

Atomiabsorptiotekniikat jaetaan ryhmiin sen mukaan kuinka aine saatetaan atomimuotoon, yleisin atomisointitapa on liekkitekniikka.<sup>26 s. 70</sup> Tässä menetelmässä atomisaatio tapahtuu syöttämällä näyte kuumaan liekkiin. Liekissä näytteen sisältämät yhdisteet atomisoituvat. Liekittömistä atomisointitekniikoista grafiittiuunitekniikka on yleisin. Siinä näyte hajotetaan kuumentamalla sitä sähkövirran avulla pienessä grafiittiputkessa. Liekki- ja grafiittiuunitekniikat ovat yleismenetelmiä, joilla voidaan määrittää useimmat alkuaineet. Näiden atomisointitekniikoiden lisäksi käytössä on myös erikoismenetelmiä näytteiden atomisointiin kuten kylmähöyrytekniikka.

#### 5.1.1 AAS-laitteen toimintaperiaate

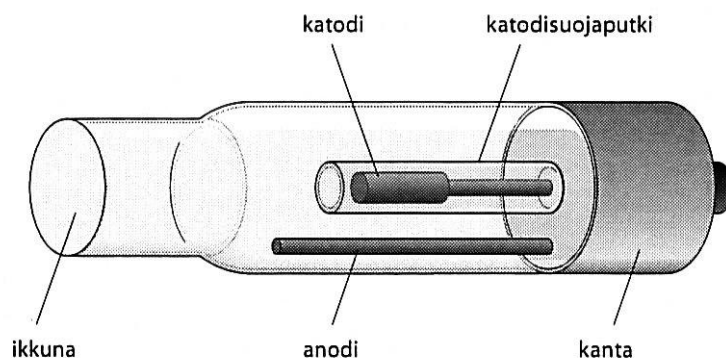
AAS-laitteilla tutkittava alkuaine määräytyy käytettävän lampun mukaan.<sup>26 s. 70</sup> Lamppu lähettää valoa kapealla aallonpituusalueella, jota tutkittava alkuaine absorboi. Alkuaineiden absorptiospektri on viivaspektri ja absorptioviivojen leveydet ovat luokkaa 0,001 nm. Nämä leveydet ovat huomattavasti pienempiä kuin parhaidenkaan monokromaattoreiden resoluutio. Lampun emissioviivat ovat niin kapeat ja kaukana toisistaan, että haluttu emissioviiva voidaan valita monokromaattorilla. Kun lampun lähettämä emissio on valittu tutkittavan alkuaineen mukaan, niin muut näytteen alkuaineet eivät absorboi lampun valoa. Tämä tekee tekniikasta alkuaine selektiivisen.

Lampun valo ohjataan liekissä, grafiittiunissa tai kyvetissä (hydridi tai kylmähöyry menetelmä) olevaan näytteeseen, jossa tapahtuu Beerin ja Lambertin lain mukainen intensiteetin pieneneminen.<sup>26 s. 70–71</sup> AAS-tekniikassa monokromaattori on vasta näytteen jälkeen. Tämä johtuu siitä, että atomisaattori lähettää kaikkia aallonpituuksia sisältävää valoa, joka on poistettava ennen valonmonistinta. Tämä tehdään monokromaattorilla, joka päästää lävitseen vain sen aallonpituuden jota käytetään analysissä. Lampusta tuleva mittausvalo on moduloitua eli pulssitettua tämä johtuu siitä, että näin saadaan erotettua lampun valo näytteen lähettämästä säteilystä. AAS-laitteen rakenne on esitetty kuvassa 4.



Kuva 4. Atomiabsorptiospektrometrilaitteiston rakenne<sup>27</sup>

AAS:ssa valonlähteenä käytetään onttokatodilamppuja (rakenne kuvassa 5).<sup>26 s. 72</sup> Onttokatodilamppu sisältää katodissaan tutkittavaa alkuainetta, tästä johtuen jokaisella alkuaineella on periaatteessa oma lamppunsa. Lampun täyttökaasuna on joko argonia tai neonia, joka ionisoidaan lampun läpi kulkevalla sähkövirralla. Tällöin syntyneet ionit siirtyvät katodille, jossa ne irrottavat katodilla olevan alkuaineen atomeja ja virittävät ne korkeammalle elektronitilalle. Näin virittyneet atomit emittoivat niille karakterista valoa. Kun emissio johtaa atomin perustilalle, saadaan valoa aallonpituudella, jota näytteen perustilaiset atomit voivat absorboida.



Kuva 5. Onttokatodilampun rakenne<sup>27</sup>

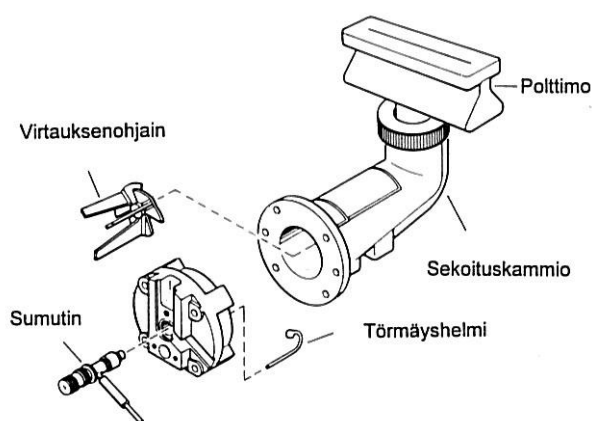
### 5.1.2 Liekkitekniikat

Liekkiatomiabsorptiossa käytettävät liekit voidaan jakaa kahteen ryhmään, palaviin ja diffuusioliekkeihin.<sup>8 s. 52</sup> Liekin lämpötila palavakaasu-kantajakaasuseoksissa on noin 2000–3000 K. Kantajakaasuna toimii yleisesti ilma tai dityppioksidi ja palavana kaasuna käytetään asetyleeniä, propaania tai vetyä. Liekin lämpötila määräytyy käytetyn kaasuseoksen mukaan. Diffuusioliekeissä palava kaasu toimii myös kantajakaasuna, joka palaa kun se joutuu kosketuksiin ulkoisen diffuusioilman kanssa. Lämpötila diffuusioliekeissä on alhaisempi kuin palavassa liekissä. Käytetyin diffuusioliekki on vety-diffuusioilmaliekki, koska se päästää signaalin hyvin läpi.

Palavassa liekissä lämpötilan lisäksi atomisointiin vaikuttaa liekin kemiallinen ympäristö eli se, mitä radikaaleja ja kemiallisia yhdisteitä liekki sisältää.<sup>8 s. 52–53</sup> Näin ollen kahdella erilaisella saman lämpötilan tuottavalla kaasuseoksella saattaa olla hyvin erilaiset analyttiset ominaisuudet. Puhdasta happea käytetään hyvin harvoin kantajakaasuna, koska silloin liekin palamisnopeus on hyvin suuri, mikä tekee liekestä vaikeasti hallittavan. Hapteen voidaankin sekoittaa argonia tai heliumia. Atomiabsorptiossa käytetyin liekki on ilma-asetyleeniliekki, koska siinä voidaan määrittää noin 30 metallia. Dityppioksidi-asetyleeniliekillä voidaan määrittää ne alkuaineet, jolle ilma-asetyleeniliekkiä ei voida käyttää. Dityppioksidi-asetyleeniliekkiin, jossa on pieni palavan kaasun ylimäärä, muodostuu noin 2–4 mm korkea sinivalkoinen primaarinen reaktiovyöhyke, sen yläpuolella noin 5–50 mm korkea punainen pelkistysvyöhyke ja tämän yläpuolella oleva sinivioletti sekundaarinen reaktiovyöhyke, jossa palava kaasu hapettuu. Atomeiksi näyte dissosioituu punaisessa pelkistysvyöhykkeessä.



Tärkein osa liekkiatomiabsorptiospektrometriä on sumutin-poltinjärjestelmä, jonka rakenne on kuvattuna kuvassa 6.<sup>8 s. 55–56</sup> Sumutin-poltinyksikön tehtävänä on muuttaa näyteliuos ensin aerosoliksi ja sen jälkeen atomihöyryksi, jonka absorptio mitataan. Näyteliuos imetään sumuttimeen kantajakaasun aiheuttaman alipaineen avulla. Sumutuksessa näyteliuos sekoitetaan kantajakaasuun, joka muutetaan aerosoliksi. Sumuttimesta näytepisarat kulkeutuvat sekoituskammioon kantajakaasun mukana. Näytepisaroiden homogenointi sopivan kokoisiksi tapahtuu sekoituskammiossa, missä ne myös sekoitetaan palavaan kaasuun. Suuret pisarat tiivistyvät sekoituskammion seinämille ja poistuvat viemäriin. Lopuksi näytesumu yhdessä kaasuseoksen kanssa johdetaan liekkiin, missä tapahtuu näytteen atomisoituminen. Edellä kuvattu epäsuora sumutus on eniten käytetty menetelmä atomihöyryn tuottamiseksi.



Kuva 6. Sumutin-poltinyksikön rakenne liekkitekniikassa<sup>26</sup>

### 5.1.3 Uuni- eli liekittömät tekniikat

Grafiittiuuni on herkempi kuin liekkitekniikat ja se vaatii vähemmän näytettä.<sup>28</sup> Vain 1-100 µl:aa näytettä tarvitsee syöttää grafiittiputkeen. Onttokatodilampun valo kulkee grafiittiputken läpi sen molemmissa päässä olevista ikkunoista. Grafiitin hapettumisen estämiseksi putken läpi kulkee jatkuva argon virtaus ja putkelle suositeltu maksimi lämpötila on 2550 °C, jossa se ei saa olla kuin korkeintaan 7 sekuntia. Liekkispektrofotometriassa analyytin viipymäaika optisella mittausalueella on alle yhden sekunnin. Kun taas grafiittiuuni rajaa atomisoidun näytteen optiselle mittausalueelle useaksi sekunniksi, mikä johtaa suurempaan herkkyyteen.

Manuaalisella näytteen syötöllä analyysin tarkkuus on harvoin parempi kuin 5-10 %.<sup>28</sup> Automaattisella näytteensyötöllä toistettavuus saadaan parannettu noin yhteen prosenttiin. Näyte tulee syöttää putkeen niin, että se jää pisaraksi pienelle alueelle. Jos näyte pisara syötetään liian korkealta saattaa se räiskähtää ja levitä pitkin putkea, mikä johtaa heikkoon tarkkuuteen.

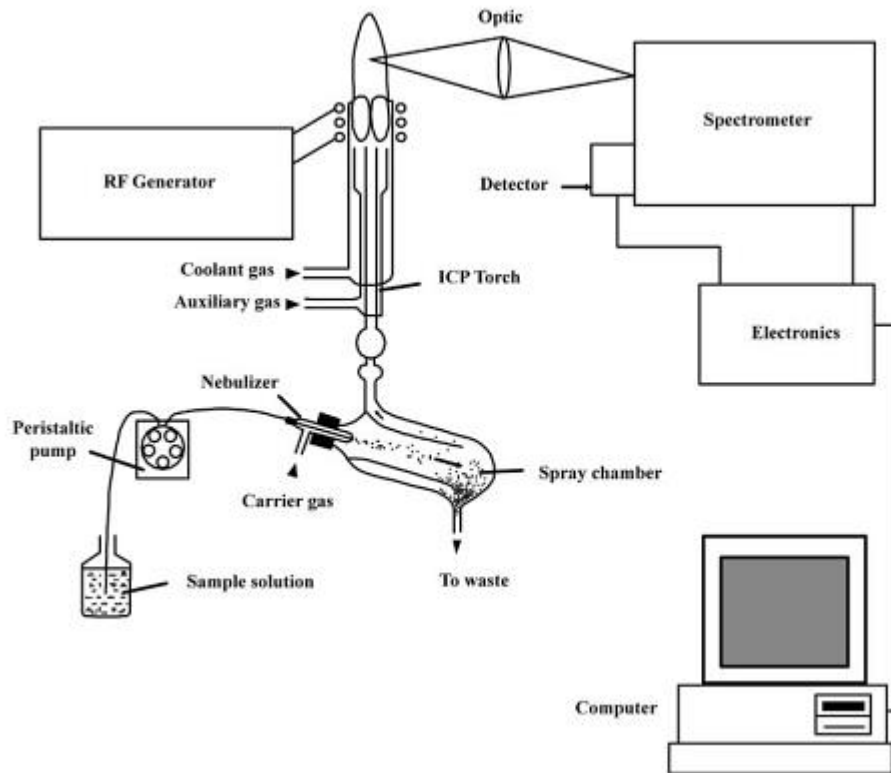
#### 5.1.4 Kylmähöyrytekniikka

Kylmähöyry (CV) tekniikassa analysoitava aine muutetaan höyrystyvään muotoon.<sup>24, 29</sup> Kylmähöyrymenetelmällä voidaan analysoida elohopea ja kadmium. Sitä käytetään yleisesti AAS:n yhteydessä. Elohopea on aine jonka atomit voivat esiintyä vapaassa tilassa huoneenlämmössä.<sup>24</sup> Koska elohopea syötetään detektorille alkuainemuodossaan, ei mittauslaitetta tarvitse lämmittää, tästä nimi kylmähöyry. Tekniikka perustuu elohopeahöyryn ominaisuuksiin, joista yksi on sen höyrynpaine joka on 20 °C:ssa 0,0016 bar. Näistä ominaisuuksista johtuen elohopea voidaan siirtää nestefaasista kaasufaasiin, sen jälkeen kun se on pelkistetty perustilaan eli alkuainemuotoon. Pelkistys tehdään usein joko tinakloridin ( $\text{SnCl}_2$ ) tai natriumboorihydridin ( $\text{NaBH}_4$ ) avulla. Lopuksi kaasumainen elohopea johdetaan analysaattorin viritys- tai atomisointi lähteeseen.

## 5.2 ICP-OES

Induktiivisesti kytketty plasma optinen emissio spektrometri (ICP-OES) on yksi tärkeimmistä laitteista alkuaineanalyseissä.<sup>30 s. 1,5</sup> Sen avulla voidaan analysoida noin 70 eri alkuainetta monista eri näytematriiseista. ICP-OES analyysijä tehdään näytteistä jotka tulevat muun muassa metallurgiasta, geologiasta, biologiasta, maataloudesta, teollisuudesta ja ympäristöstä.

ICP-OES koostuu näytteensyötöstä, plasmasta, optiikasta ja spektrometristä.<sup>30, 31</sup> Näytteensyötön tärkeimpiä osia ovat peristalttinen pumppu, sumutin (nebulizer) ja sumutinkammio (spray chamber). ICP-OES laitteen rakenne on esitetty kuvassa 7.



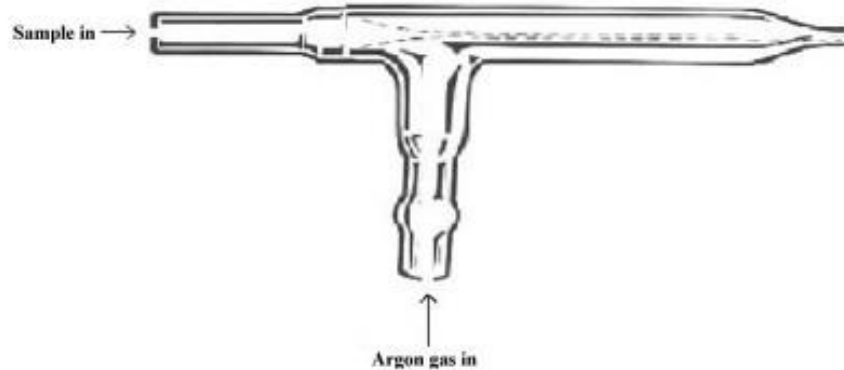
Kuva 7. ICP-OES laitteen rakenne ja tärkeimmät osat<sup>31 s.63</sup>

## 5.2.1 Näytteensyöttö

### 5.2.1.1 Sumuttimet

Normaalissa ICP-OES –analyysissä kaikki näytteet saatetaan nestemäiseen muotoon ennen kuin ne syötetään laitteeseen.<sup>31 s. 64</sup> Nestemäinen näyte kulkee sumuttimeen missä se muutetaan aerosoliksi. Näytteen sumuttuminen on yksi tärkeimmistä vaiheista ICP-OES –analyysissä. Näyte tulee syöttää plasmiaan niin, että se ei vaikuta plasman stabiilisuuteen eikä syntyvään emissiosignaaliin.<sup>30 s. 39–40</sup> Tämä on mahdollista vain erittäin pienillä partikkeleilla tai pisaroilla. Mitä pienempiä näytepisarot ovat sitä helpompaa niiden kuivaaminen ja virittäminen on plasmassa. Jos plasmiaan johdetaan liikaa aerosolia, se muuttuu epästabiiliksi ja lopulta sammuu. Epästabiili plasma johtaa heikkoon toistettavuuteen. Näytteensyöttö plasmiaan tulee optimoida niin, että näytettä menee plasmiaan riittävästi hyvän herkkyuden aikaansaamiseksi mutta ei liikaa, jotta plasma pysyy stabiilina.

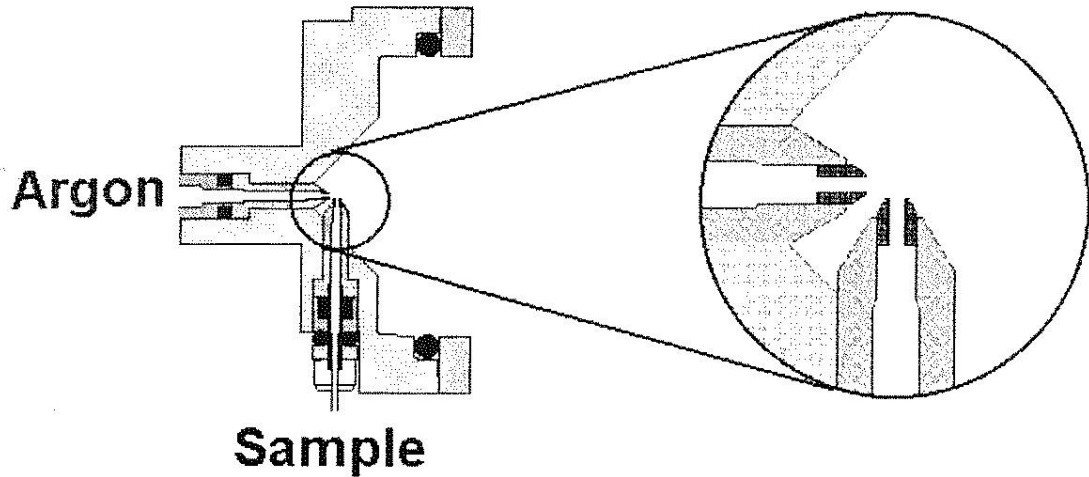
Käytössä on kahdenlaisia sumuttimia: pneumaattisia sumuttimia ja ultraääni sumuttimia.<sup>31 s. 64</sup> Suurin osa kaupallisesti saatavilla olevista sumuttimista on pneumaattisia sumuttimia. Niissä käytetään nopeaa kaasuvirtausta aerosolin muodostamiseen. Suosituin pneumaattinen sumutin on konsentroiva sumutin. Sen rakenne on kuvassa 8. Suurin osa näistä sumuttimista on valmistettu joko lasista tai kvartsista.



Kuva 8. Konsentroiva sumutin<sup>31 s. 64</sup>

Tämän tyyppisissä sumuttimissa näyteliuos imetään kapillaariputkeen alipaineen avulla, joka muodostuu argon kaasun virratessa nopeasti kapillaarin pään ohi.<sup>31 s. 64</sup> Nopeasti virtaava argon kaasu yhdistettynä alipaineeseen rikkoo nestemäisen näytteen aerosoliksi. Konsentroiva sumutin on tunnettu sen hyvästä herkkyydestä ja stabiilisuudesta. Heikkoutena sillä on ohut kapillaari, joka voi tukkeutua helposti. Tämä on yleistä liuoksilla jotka sisältävät niinkin vähän kuin 0,1 %:a liuennutta suoloja. Toki muutamat uudet versiot tästä sumuttimesta ovat vähentäneet tätä ongelmaa. Jotkin sumuttimet pystyvät käsittelemään myös näytteitä joissa on jopa 20 %:a liuennutta epäorgaanista ainesta.

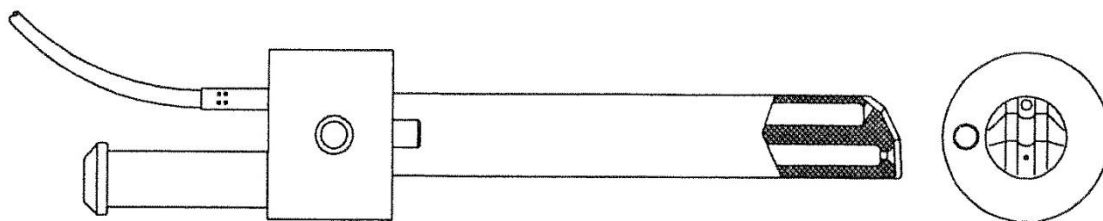
Toinen paljon käytetty pneumaattinen sumutin on cross-flow sumutin.<sup>31 s.64</sup> Tässä sumutin tyypissä nopeasti virtaava argon kaasuvirtaus ohjataan kohtisuorasti päin näytekapillaarin päätä, konsentroivassa sumuttimessa tämä tapahtui kohtisuorassa. Cross flow sumuttimen rakenne on esitetty kuvassa 9. Tässäkin sumuttimessa näyte syötetään sumuttimeen joko nopean kaasuvirtauksen muodostaman alipaineen avulla tai peristalttisen pumpun avulla.



Kuva 9. Cross flow sumutin<sup>30 s. 45</sup>

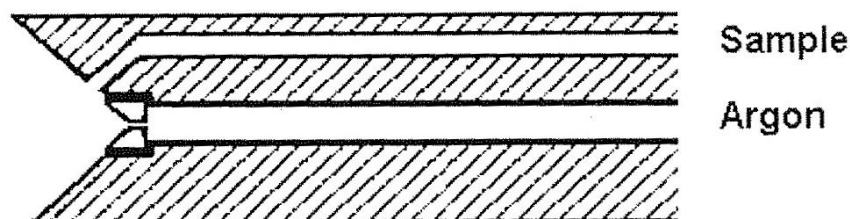
Yleisesti ottaen Cross flow sumuttimet eivät ole yhtä hyviä muodostamaan pieniä pisaroita kuin konsentroivat sumuttimet.<sup>31 s. 64</sup> Tämän tyyppiset sumuttimet eivät kuitenkaan tukkeudu niin helposti kuin konsentroivat sumuttimet, koska käytetty näytekapillaari on suurempi. Lisäksi cross flow sumuttimia voidaan valmistaa muistakin materiaaleista kuin lasista ja kvartsista, joten niistä voidaan valmistaa kestävämpiä.

Edellä mainituilla sumuttimilla on tapana tukkeutua väkevillä ja pieniä liukenemattomia partikkeleita sisältävillä liuoksilla.<sup>30 s. 45</sup> Tämän ongelman poistamiseksi on kehitetty sumuttimia, jotka toimivat pieniä partikkeleita sisältävillä väkevillä liuoksilla. Tärkeimmät näihin vaikeisiin analyysiin kehitetyt sumuttimet ovat V-groove – sumuttimet ja ConeSpray –sumuttimet. Molemmissa sumuttimissa on verrattain suuri aukko näytteen ulostulolle pienen suuttimen sijaan. Lisäksi sumutinkaasun ulostulo aukkoa huuhdellaan kokoajan näyteliuoksella. Nämä kaksi sumutinta eroavat toisistaan siinä kuinka näyteliuos syötetään sumutinkaasun ulostuloaukolle. V-groove – sumuttimessa (kuvassa 10) näyteliuos virtaa painovoiman vaikutuksesta alaspäin uraa pitkin, joka näyttää ylhäältäpäin katsottaessa V:n muotoiselta, kunnes se kohtaa sumutinkaasuvirtauksen.



Kuva 10. V-Groove –sumutin.<sup>30 s. 45</sup> Sumuttimien tarkat sijainnit on esitetty kuvassa oikealla. Näyteliuos tulee sumuttimelle ylemmästä reiästä ja sumutinkaasu alemmasta.

ConeSpray –sumuttimessa (kuvassa 11) laajenevasta sumutinkaasusta aiheutuva negatiivinen paine vetää näyteliuosta itseään kohti.<sup>30 s. 46</sup> Näyteliuoksen kohdatessa laajenevan kaasun näyteliuos murtuu pieniksi pisaroiksi.



Kuva 11. Poikkileikkaus ConeSpray -sumuttimesta<sup>30 s. 46</sup>

Tämän tyyppiset sumuttimet kuluttavat yleisesti suurempia määriä näytettä jopa 4 ml/minuutissa.<sup>30 s. 46</sup> Kuitenkaan ne eivät menetä merkityksellisesti analyttistä suorituskykyään nopeudella 1 ml/näytettä minuutissa, joten ne voivat toimia tällä näytteensyöttönopeudella kuin mikä tahansa muu sumutin samalla näytteensyöttönopeudella. Lopuksi on mainittava, että vaikka nämä sumuttimet toimivat pienistä partikkeleista huolimatta on syytä huomata että partikkelien kulkeutuminen plasmassa asti on epätodennäköistä. Tällöin näissä partikkeleissa olevia aineita ei välttämättä havaita.

### 5.2.1.2 Sumutinkammiot

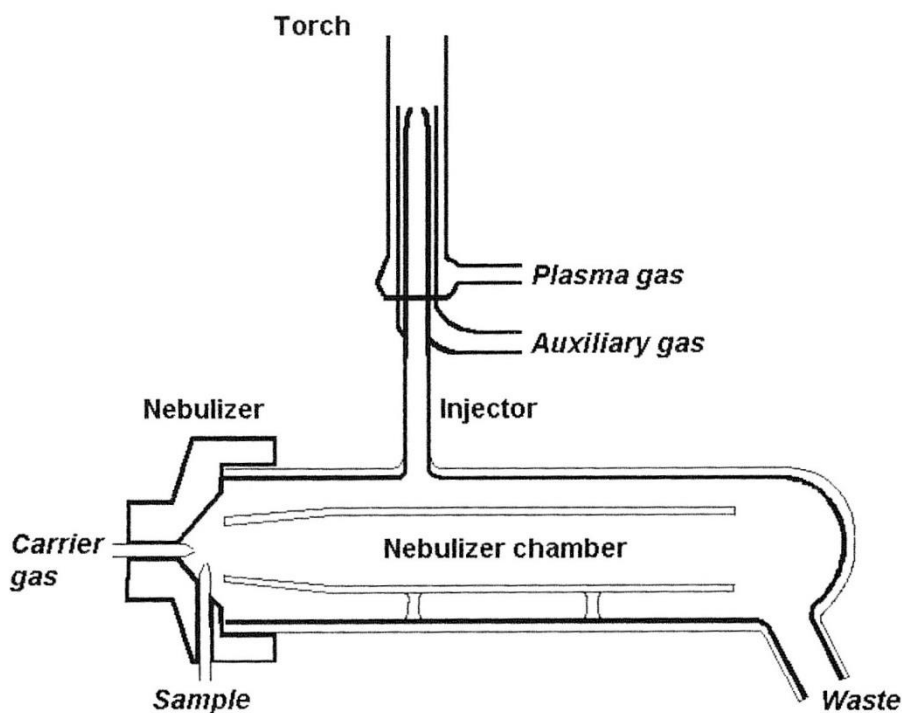
Sumuttimella muodostunut näyteaerosoli täytyy kuljettaa soihdulle, jotta se voidaan syöttää plasmaan.<sup>31 s. 65</sup> Kuitenkin vain aerosolin erittäin pienet pisarat voidaan tehokkaasti kuivata, höyrystää, atomisoida, ionisoida ja virittää plasmassa, joten suuret pisarat täytyy poistaa aerosolista. Tähän tarkoitukseen käytetään sumutinkammiota, joka sijaitsee sumuttimen ja soihdun välissä. Aerosolin sisältämät pisarat kulkevat sumutinkaasun mukana sumuttimesta sumutinkammioon.<sup>30 s. 49</sup> Jos tämä virtaus muuttaa suuntaansa pienimmät pisarat seuraavat kaasuvirtausta, mutta suuremmat pisarat lentävät suoraan ja päätyvät sumutinkammion seinälle. Seinämiltä pisarat valuvat sumutinkammion pohjalle, mistä ne poistetaan yleensä pumpun avulla jäteastiaan. Se minkä kokoisia pisaroita päätyy plasmalle asti, riippuu sumutinkammion muodosta ja kantajakaasun nopeudesta. Yleisesti voidaan ajatella, että sumutinkammio on suunniteltu niin, että se päästää plasmalle pisarat joiden halkaisija on 10 µm tai alle.<sup>31 s. 65</sup> Normaalilla sumuttimella ja sumutinkammiolla vain noin 1-5 %:a näytteestä päätyy plasmalle asti, loput näytteestä päätyy jätteeseen.

Sumutinkammion pääasiallinen tehtävä on siis poistaa aerosolista suuret pisarat, jotka heikentäisivät plasman stabiilisuutta.<sup>30 s. 49-50</sup> Lisäksi sumutinkammiolla vähennetään myös peristalttisesta pumpusta aiheutuvaa signaalin pulssittumista. Tämä pulssittumisen väheneminen on seurausta sumutinkammion suhteellisen suuresta tilavuudesta ja siitä, että juuri sumuttunut näyteaerosoli sekoittuu aikaisemmin muodostuneen aerosolin kanssa, joka kiertää sumutinkammiossa. Sillä kaikki aerosoli ei poistu sumutinkammiosta injektorille, vaan osa aerosolista pysyy sumutinkammiossa ja kiertää siellä. Tämän seurauksena uudet pisarat sekoittuvat vanhojen pisaroiden kanssa sumutinkammiossa. Tämä sekoittuminen aikaansaa paremman analyttisen signaalin toistettavuuden. Toisaalta se myös pidentää aikaa, joka tarvitaan signaalin stabiloitumiseen.

Sumutinkammio voidaan valmistaa erilaisista materiaaleista, kuten lasista, kvartsista ja erilaisista polymeereistä (esimerkiksi rytonista ja fluoratuista polymeereistä).<sup>30 s. 51</sup> Tärkeimmät ominaisuudet materiaalin valinnassa ovat materiaalin kestävyys liuottimille, hapoille ja muille liuotuksessa käytetyille reagensseille ja sumutinkammion sisäpinnan vettyvyys. Hyvin sileä sumutinkammion sisäpinta mahdollistaa hyvin suurten pisaroiden muodostumisen sumutinkammion sisäpintaan, mikä muuttaa sumutinkammion aerodynamiikkaa ja näin heikentää toistettavuutta.

Sumutinkammion suuri tilavuus tarkoittaa myös suurta pinta-alaa.<sup>30 s. 51–52</sup> Tämä voi olla ongelmallista, jos analyyttejä adsorboituu kammion pintaan. Tästä voi seurata, riippuen analyytin ja sumutinkammion valmistusmateriaalin adsorptio ominaisuuksista, pidentyneet huuhteluajat. Erityisesti alkuaineista elohopea ja boori ovat voimakkaasti adsorboivia. Pidentyneet huuhteluajat tarkoittavat myös pidempiä viiveitä peräkkäisten mittausten välillä. Tällaista adsorptiota ja siitä aiheutuvia pitkiä huuhteluajoja kutsutaan myös muistiefektiksi.

Scott double pass– (kuvassa 12) ja sykloninen (kuvassa 13) kammio ovat yleisimmin käytettyjä sumutinkammio tyyppejä.<sup>30 s. 53</sup> Scott double pass –kammio on ollut käytössä ICP-tekniikan alkuajoista saakka. Se koostuu kahdesta samansuuntaisesta putkesta, joista ulompi on vähän pidempi ja paksumpi kuin sisempi putki. Scott double pass –sumutinkammion kokonaispituus on tyypillisesti noin 15 cm:ä. Ulompaa putkea, jonka halkaisija on tyypillisesti 3 cm:ä, rajaa toisesta päästä kupera pääty ja toisessa päässä on sumutin. Sumuttimella muodostunut aerosoli johdetaan sisempään putkeen jossa se kulkee kantajakaasun mukana kohti ulomman putken kuperaa päätyä. Kuperalla päädyllä kaasuvirtaus kääntyy ja raskaimmat pisarat törmäävät kammion seinään ja poistuvat sumutinkammioista.



Kuva 12. Scott double pass –sumutinkammio ja Cross-Flow –sumutin muodostavat näytteenäytteen syötön vertikaaliseseen plasmaan<sup>30 s. 40</sup>



Sykloninen sumutinkammio hyödyntää syklonin muodostamaa keskipakoisvoimaa erikokoisten pisaroiden erotteluun.<sup>30</sup> s. 53–54 Sumutin liitetään sykloniseen sumutinkammioon niin, että aerosoli voidaan sumuttaa tangentialisesti kammioon. Kaikki sykloniset sumutinkammiot eivät kuitenkaan ole muotoilultaan ideaalisia, esimerkiksi baffle –tyyppiset sumutinkammiot sisältävät erotusputken jolla aerosoli ohjataan ulos sumutinkammiosta kohti plasmaa. Syklonisen sumutinkammion käyttö nostaa herkkyyttä noin 50 %:a ja laskee havaintorajoja kolminkertaisesti, kun käytetään vähän näytettä kuluttavaa sumutinta.



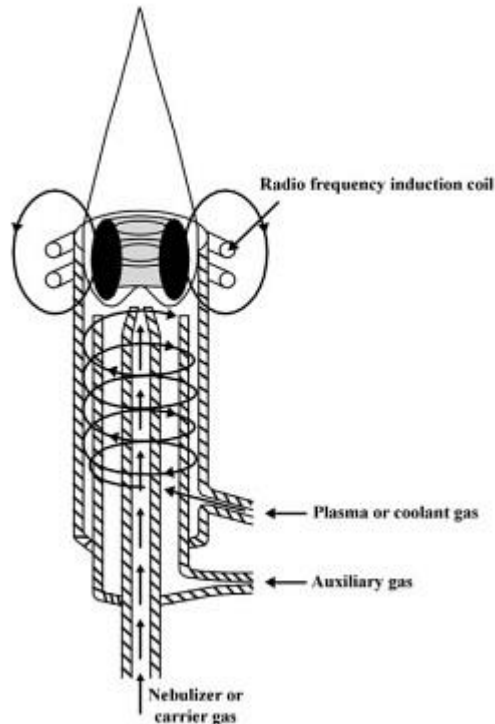
Kuva 13. Baffled –sykloninen sumutinkammio<sup>32</sup>

### 5.2.1.3 Pumppu

Tavallisesti pumppua pidetään osana näytteensyöttöä, yleisesti käytetään peristalttista pumppua.<sup>30 s. 55</sup> Pumpun tulisi siirtää nestemäistä näytettä eteenpäin osissa mahdollisimman tasaisesti. Mitä enemmän peristalttisessa pumpussa on rullia sitä korkeampi on pumpusta aiheutuva näytteen pulssittumistiheys. Tämä väistämättömästi pulssittumisesta aiheutuva häiriö voidaan minimoida käyttämällä lyhyttä mittausaikaa tai parantaa toistettavuutta käyttämällä yhtä pitkiä mittausaikoja. Myös paine jolla pumppu painaa putkea tulee optimoida, sillä liian suuri tai heikko putkeen kohdistuva paine voi aiheuttaa heikon toistettavuuden. Pumpun pyörimisnopeudella eli näytteensyöttönopeudella on merkityksensä, alhaisilla nopeuksilla pyörimisnopeuden kasvattaminen nostaa mitattuja intensiteettejä kunnes se alkaa tasaantua ja nopeutta edelleen nostettaessa intensiteetit alkavat laskea.

### 5.2.2 Plasma ja plasmasoihtu

Plasma on ionisoitua kaasua ja sitä kutsutaan joskus myös aineen neljänneksi olomuodoksi.<sup>30 s. 11</sup> Useimmiten ICP:lla käytetään argonkaasua. Argonkaasu kulkee plasmasoihtuun kolmea samansuuntaista putkea pitkin, jotka on usein valmistettu kvartsista (kuva 14).<sup>31 s. 61</sup> Kuparikela jota kutsutaan induktiokelaksi ympäröi soihdun yläosaa, kela on yhdistetty suurtaajuusgeneraattoriin. Kun argonkaasu virtaa tangentialisesti soihdun kolmen putken läpi, voidaan plasma sytyttää. Sytytys tapahtuu kipinällä, eli siemen elektronilla, joka alkaa ionisoida argonkaasua  $AR \rightarrow Ar^+ + e^-$ . Suurtaajuusgeneraattorin tehona käytetty, normaalisti, 0,5 - 2,0 kW:a ja 27 tai 40 MHz induktiokelassa aiheuttaa sähkö- ja magneettikentän muodostumisen, jotka yhdessä kiihdyttävät muodostuneita elektroneja. Tapaa syöttää energiaa kelan kautta elektroneille kutsutaan fysiikassa induktiiviseksi kytkennäksi. Muodostuneet korkea energiset elektronit vuorostaan ionisoivat lisää argonkaasua törmäämällä toisiin argon atomeihin. Tämä törmäyksistä aiheutuva argonkaasun ionisoituminen jatkuu ketjureaktiona, jonka seurauksena kaasu hajoaa plasmaksi, joka koostuu argon atomeista, elektroneista ja argon ioneista, muodostaen ICP purkauksen, jonka lämpötila on 6000 – 10000 Kelviniä.



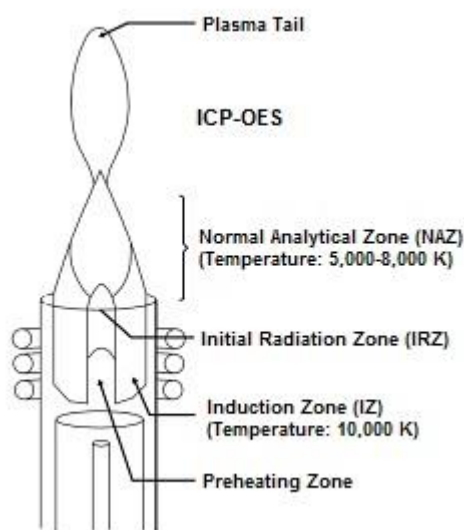
Kuva 14. Induktiivisesti kytketty plasma ja siinä käytetyt kaasuvirtaukset<sup>31 s. 61</sup>

Plasmasoihtua ja sen sisältämiä putkia tulee myös jäähdyttää, jotta ne eivät sula kuuman plasman vaikutuksesta.<sup>30 s. 14–15</sup> Jäähdytys suoritetaan argonkaasulla. Uloimman putken, tyypillisesti valmistettu kvartsista, jäähdytykseen käytettävää argonkaasua kutsutaan jäähdytin- tai plasmakaasuksi, sillä tämä kaasuvirtaus myös ylläpitää plasmaa. Plasmakaasun virtaus on tyypillisesti välillä 10 – 20 litraa minuutissa.

Aerosolimuodossa oleva näyte kuljetetaan injektoriputkella lähellä plasmaa.<sup>30 s. 15</sup> Injektoriputki on tyypillisesti valmistettu kvartsista tai alumiinioksidista. Injektoriputken sisällä virtaavaa kaasua kutsutaan sumutin- tai kantajakaasuksi. Sen virtausnopeus on tyypillisesti välillä 0,6 – 1,0 litraa minuutissa mutta voi olla myös jopa 0,3 – 2,0 litraa minuutissa. Kantajakaasun virtausnopeus vaikuttaa siihen kuinka kauan näyteaerosoli pysyy plasmassa. Mitä pidempää näyte pysyy plasmassa sitä enemmän se voi absorboida energiaa plasmasta, joka johtaa korkeampiin virityslämpötiloihin. Tästä syystä kantajakaasun virtaus pyritään pitämään niin pienenä kuin mahdollista. Liian pieni virtaus johtaa siihen, että näyte ei pääse plasmaan asti.

Uloimman putken ja injektoriputken välissä sijaitsee myös kolmas putki.<sup>30 s. 16</sup> Tällä putkella on kaksi tehtävää, ensimmäiseksi sillä ohjataan uloimman putken jäähdytyskaasuvirtausta, toiseksi sitä käytetään apukaasuvirtauksen syöttämiseen. Apukaasun tarkoitus on työntää plasma pois injektoriputken päästä. Tämä on tärkeää sillä jos injektoriputken pää kuumenee liikaa näyteliuos kuivuu jo injektoriputkessa ja näytteen sisältämät kiinteät partikkelit jäävät putken sisään, mikä johtaa lopulta injektoriputken tukkeutumiseen. Yleisesti apukaasun virtaus on välillä 0 – 2 litraa minuutissa.

Muodostuvan plasman eri alueiden nimet ovat kuvattuna kuvassa 15. Plasman alaosa on donitsin muotoinen johtuen kantajakaasuvirtauksesta joka työntyy reiäksi plasman alaosaan.<sup>31 s. 61</sup> Tätä aluetta kutsutaan induktioalueeksi (Induction Zone), sillä se on alue jossa suurtaajuusmuuntajan induktiivinen energia siirretään induktiokelalla plasmaan. Kohtaa, jossa näyte saapuu plasmaan kutsutaan esilämmitysalueeksi (Preheating Zone). Tällä alueella näytteestä haihdutetaan liuotin ja sen jälkeen kuivatut näytepartikkelit hajoavat kaasumaisiksi molekyyleiksi ja lopuksi molekyylit hajoavat yksittäisiksi atomeiksi eli näyte atomisoituu. Nyt näyte aerosoli on kuivattu, höyrystetty ja atomisoitu, joten plasman viimeinen tehtävä on vielä virittää ja ionisoida atomeita ja muodostuneita ioneita, jotta ne emittoisivat niille tyypillistä ominaissäteilyä. Nämä ionisoitumiset ja virittymiset tapahtuvat pääosin säteily- eli emissioalueella (Initial Radiation Zone) ja analyttisellä alueella (Normal Analytical Zone).



Kuva 15. Poikkileikkaus plasmasta ja sen eri alueista ICP:ssä<sup>31 s. 62</sup>

Säteily- ja emissionalueella tapahtuu enemmän atomien virittymistä ja viritysten purkautumisesta aiheutuvaa emissiota.<sup>30 s. 25</sup> Atomien kulkiessa eteenpäin plasman sisällä ne keräävät lisää energiaa plasmasta ja vapauttavat elektroneja muodostaen ioneja. Ioniset siirtymät ovat hallitsevia analyttisellä alueella, joka sijaitsee plasman ytimen ulkopuolella. Tälle alueelle ei syötetä mistään lisää energiaa, joten sen lämpötila laskee. Lopuksi ioneiden kulkiessa kauemmas plasman ytimestä ne reagoivat elektronien kanssa muodostaen atomeita, tämän jälkeen atomit reagoivat keskenään muodostaen molekyyliä. Tätä aluetta kutsutaan plasman hännäksi (Plasma Tail). Koko aluetta, jonka läpi näyteaerosoli plasmassa kulkee, kutsutaan analyttikanavaksi, se on plasman näkyvä kirkkaan värinen alue. Näytepartikkelit liikkuvat plasman läpi noin 20 m/s.

### 5.2.3 Radiaalinen ja aksiaalinen mittaus

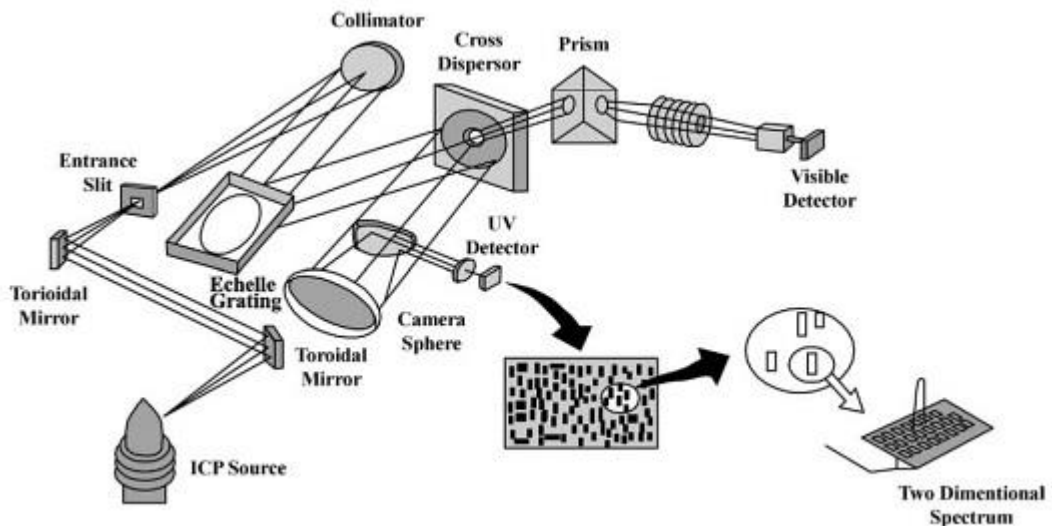
Plasmassa syntyvä emissiosäteily voidaan lukea kahdesta eri suunnasta, plasman sivusta eli radiaalisesti ja plasman suuntaisesti eli aksiaalisesti.<sup>30 s.32-33</sup> Vielä 1990-luvun keskivaiheille asti kaikki ICP –laitteet rakennettiin niin, että plasma on pystyssä ja plasmaa luettiin radiaalisesti. Tässä tapauksessa plasmasta pystytään lukemaan vain pieni osa siitä emittoituvasta säteilystä, eli se osa säteilystä, joka lähtee plasmasta nähden kohtisuorassa. Radiaalisessa mittauksessa mittauskorkeus plasmassa voidaan valita, jolloin voidaan valita se korkeus jossa tutkittava analyysi virittyy parhaiten.

Aksiaalisessa mittauksessa plasmasta lähtevä emissiosäteily luetaan samasta suunnasta plasman kanssa.<sup>30 s. 33</sup> Aksiaalista mittausta käyttävissä ICP –laitteissa plasman on yleensä sijoitettu horisontaalisesti ja emissiosäteilyn lukeminen tapahtuu plasman päästä tällöin säteilyä voidaan mitata koko plasman pituudelta. Aksiaalisen mittauksen etuja radiaaliseen verrattuna ovat suurempi herkkyys ja havaintorajojen pieneneminen. Aksiaalisessa mittauksessa pitkään ongelmia aiheutti plasman viileässä päässä tapahtuva emissiosäteilyn absorptio.<sup>31 s. 71</sup> Ongelma on kuitenkin saatu poistettua ottamalla käyttöön leikkauskaasu, joka on nopea kaasuvirtaus jolla plasman pää saadaan leikattua pois. Nykyään ICP -laitteista löytyy usein mahdollisuus sekä aksiaaliseen että radiaaliseen mittaukseen.

#### 5.2.4 Spektrometrin optiikka ja detektori

Kvantitatiivinen ja kvalitatiivinen informaatio näytteestä saadaan viritettyjen atomien ja ionien emittoimasta säteilystä.<sup>31 s. 62</sup> Virittyneet atomit ja ionit emittoivat säteilyä plasmassa usealla aallonpituudella, siksi plasmassa tapahtuva emissio on polykromaattista. Polykromaattinen säteily tulee erotella yksittäisiksi aallonpituuksiksi, jotta jokaisesta yksittäisestä atomista tai ionista lähtevä säteily voidaan tunnistaa ja määrittää ilman häiriötä tai päällekkäisyyttä muilta läheisiltä emissioaallonpituuksilta. Tämä aallonpituuksien erottelu tehdään tavallisesti monokromaattorin avulla, minkä avulla voidaan mitata yksi aallonpituus kerrallaan tai polykromaattorin avulla, jolla voidaan mitata useampaa aallonpituutta yhtäaikaisesti. Säteilyn erottelun jälkeen varsinainen detektointi tapahtuu valodiodirivin (PDA), varauskytkentädetektorin (CCD –kennon), Varausinjektiodetektorin (CID –ilmaisimen) tai vanhemmissa laitteissa valomonistinputken avulla. Kvalitatiivinen informaatio saadaan tunnistamalla näytteestä eri emissioaallonpituudet ja vertaamalla niitä alkuaineille tyypillisiin emissioaallonpituuksiin. Kvantitatiivinen informaatio näytteestä saadaan tutkimalla alkuaineelle ominaisen säteilyn intensiteettiä. Tämä tapahtuu vertaamalla mitattua intensiteettiä aiemmin tehdyn kalibrointisuoran arvoihin.

Emittoitunut säteily kerätään yleensä erilaisten optisten välineiden kuten linssien ja peilien avulla.<sup>31 s. 66, 68</sup> Seuraavaksi tämä yhteen kerätty plasmassa syntynyt säteily johdetaan optiikan avulla sisään spektrometriin. Laitteen kyky erotella ja käsitellä säteilyn eri aallonpituuksia on erittäin kriittinen vaihe analyysiä. Echelle –hilaan pohjautuvat ICP-OES –laitteet ovat täällä hetkellä suosituimpia, sen rakenne on esitetty kuvassa 16. Se hyödyntää kahta säteilyä hajottavaa laitetta, yhdistämällä sekä diffraktiohilan että prisman. Ne ovat sijoitettuna kohtisuorasti toisiinsa nähden. Yksi näistä hajottavista laitteista on echelle –hila, joka on ns. karkea hila, jonka viivamäärä vaihtelee välillä 8 – 300 viivaa/mm. Esimerkiksi diffraktiohilassa on 600 – 4200 viivaa/mm. Echelle –hilan tarkoituksena on erottaa ICP:ltä tuleva polykromaattinen säteily aallonpituuksien mukaan ja tuottaa useita päällekkäisiä aallonpituuksien monikertoja. Hilan tarkoituksena taas on lajitella tai hajottaa poikittain päällekkäiset aallonpituudet ja muodostaa kaksiulotteinen rivi aallonpituuksista spektrometrin polttotasolle. Tässä rivissä aallonpituudet ovat yhdessä suunnassa ja aallonpituuden monikerrat toisessa. Echelle –hilaan perustuvilla spektrometreilla on muutamia etuja verrattuna perinteisiin hila –spektrometreihin. Ne tuottavat erittäin suuren kvanttihyötysuhteen kaikilla spektrin monikerroilla kiinteän tilan detektoreissa (PDA, CCD ja CID), josta seuraa korkea herkkyys.

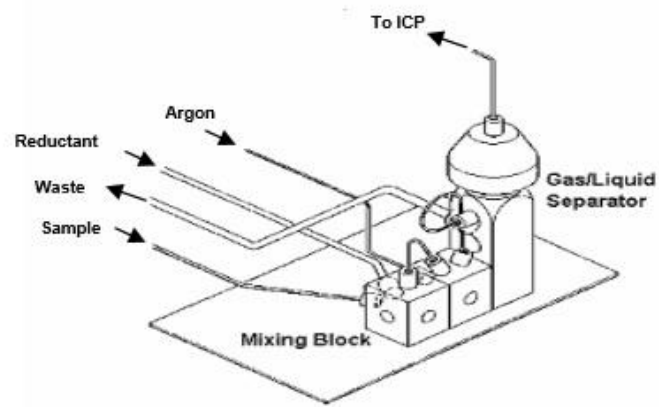


Kuva 16. Echelle -hilaan pohjautuvan ICP-OES spektrometrin rakenne<sup>31 s. 69</sup>



### 5.2.5 Hydridin muodostus

Normaalin näytteensyötön lisäksi ICP:lle on kehitetty vaihtoehtoisia näytteensyöttömenetelmiä, joilla voidaan korvata sumutin ja sumutinkammio.<sup>31 s.65–66</sup> Käytetyin näistä vaihtoehtoisista menetelmistä on hydridin muodostus (HG). Kaaviokuva hydridin muodostukseen käytettävästä laitteesta on esitetty kuvassa 17. Menetelmässä happoon liotettu näyte sekoitetaan pelkistimen kanssa, joka on usein natriumboorihydridi natriumhydroksidi liuoksessa. Näytteen ja natriumboorihydridin reaktiossa syntyy tietyistä alkuaineista kaasumaisia hydridejä. Näitä alkuaineita ovat esimerkiksi As, Se, Sb, Bi ja Sn. Kaasumaiset hydridit erotetaan muusta näytteestä ja kuljetetaan argonkaasun avulla plasmaan.



Kuva 17. Kaaviokuva hydridin muodostukseen käytettävästä Perkin Elmerin FIAS-400 laitteesta<sup>33</sup>

## 6 NÄYTTEIDEN ESIPELKISTYS

Haihtuvan hydrin muodostumisen tehokkuus riippuu vahvasti hydridiä muodostavan aineen hapetusasteesta. Tämä vaikutus on erittäin suuri varsinkin As, Sb, Se ja Te:n kohdalla.<sup>34</sup> Hydridin muodostuminen on vähäistä jos arseeni ja antimoni ovat hapetusasteella V. Seleenin ja telluuri ollessa hapetusasteella VI ne eivät pelkisty hydrideiksi ollenkaan. Tästä syystä nämä alkuaineet tulee esipelkistää ennen hydridin muodostusta. Hydrin muodostuksen kannalta parhaat hapetusasteet ovat As(III), Sb(III), Se(IV) ja Te(IV). Se millä hapetusasteella nämä aineet ovat näytteessä, riippuu siitä millainen näytteenhajotusmenetelmä on ollut käytössä. Tyypillisesti hapot HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ja HClO<sub>4</sub> hapettavat nämä aineet niiden korkeimmille hapetusasteille eli As(V), Sb(V), Se(VI) ja Te(VI). Käytettävän esipelkistimen valintaan vaikuttaa se mikä tai mitkä alkuaineet näytteestä halutaan määrittää.

Matusiewicz ja Ślachciński<sup>25</sup> ovat käyttäneet As(V):n, Sb(V):n, Se(VI):n ja Sn(IV):n yhtäaikaista pelkistykseen biologisista- sekä ympäristönäytteistä tioureaa. Näytteisiin lisättiin 1 % (m/v) tiourea tausta ja tiourea annettiin vaikuttaa näytteessä 30 minuuttia. Tämän jälkeen näytteen analyytit olivat pelkistyneet hapetusasteille As(III), Sb(III), Se(IV) ja Sn(II). Näiltä hapetusasteilta muodostettiin haihtuvat hydridit reaktiolla NaBH<sub>4</sub>:n kanssa näytteistä joissa oli 10 % HCl tausta.

Arseeni ja antimoni voidaan pelkistää hapetusasteille III myös käyttämällä L-kysteiniä, KI:ta tai KI:n ja askorbiinihapon seosta.<sup>35</sup> Eräässä tutkimuksessa on käytetty esipelkistimenä lentotuhkanäytteille 5 %:sen KI:n ja 5 %:sen askorbiinihapon seosta. Näytteisiin lisättiin tätä seosta 4 ml ja lisäksi 6 ml väkevää HCl:ää, jonka jälkeen näytteen annettiin seistä 30 minuuttia. Lopuksi näyte laimennettiin 50 ml:ksi. Tästä näytteestä muodostettiin As ja Sb hydridit NaBH<sub>4</sub>:n avulla.

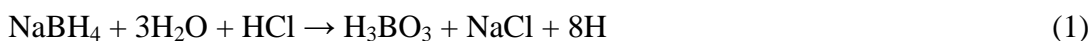
Seleenin taas voidaan pelkistää alimmalle hapetusasteelle IV käyttämällä näytteissä 6 mol/l HCl taustaa ja lämmittämällä näytteitä 90 °C:ssa tunnin ajan.<sup>10, 36</sup> Tässäkin tapauksessa seleeni hydridi on muodostettu reaktiolla NaBH<sub>4</sub>:n kanssa.

Tietyt esipelkistimet estävät toisten aineiden määrittämisen.<sup>34</sup> KI:n ja L-kysteiinin on havaittu pelkistävän Se(IV):n ja Te(IV) aina alkuaine muotoon asti, jolloin hydridin muodostus ei ole mahdollista. Myöskään lämmitys HCl:n kanssa ei pelkistä As(V):tä Sb(V):tä As(III):ksi ja Sb(III):ksi. Tiourealla on myös havaittu olevan negatiivinen vaikutus Se(IV) ja Te(IV) kanssa, sillä tiourea pelkistää osan Se:stä ja Te:stä alkuaine muotoon. Se kuinka paljon tätä pelkistymistä tapahtuu, riippuu tioureaan pitoisuudesta ja määrästä näytteessä.

## 7 NÄYTTEIDEN PELKISTYS

### 7.1 Natriumtetrahydroboraatti

Vain tietyt metallit voidaan pelkistää happamasta nestemäisestä näytteestä  $\text{NaBH}_4$ :n avulla kaasumaiseksi stabiiliksi hydridiksi.<sup>37</sup> Tällaisia metalleja ovat As, Bi, Ge, Pb, Sb, Se, Sn, Te, In ja Tl. Tämän lisäksi  $\text{NaBH}_4$ :llä voidaan pelkistää elohopea ja kadmium alkuainemuotoon.  $\text{NaBH}_4$ :n reaktio happaman näytteen kanssa on tunnetusti kiivas ja tapahtuu välittömästi.  $\text{NaBH}_4$ :n kiivas hajoaminen aikaansaa runsasta vedyn vapautumista faasierottimessa, jolloin muodostuu hienoa aerosolia, joka siirretään kantajakaasun avulla analysaattorille. Metallihydridin muodostusreaktio  $\text{NaBH}_4$  kanssa voidaan kuvata seuraavan reaktion avulla.<sup>34</sup>



missä  $\text{E}^{+m}$  on metalli-ioni ja  $\text{EH}_n$  on muodostunut metallihydridi

$\text{NaBH}_4$ :ä on käytetty pelkistimenä useissa tutkimuksissa<sup>3, 10, 25, 35, 36, 38-45</sup> useille eri metalleille useista eri näytematriiseista ja erilaisilla analysaattoreilla. Käytetyt  $\text{NaBH}_4$  pitoisuudet vaihtelevat eri tutkimusten välillä huomattavasti.<sup>37</sup> Tutkimuksissa saatuja tuloksia on hankala verrata keskenään, koska niissä on käytetty erilaisia  $\text{NaBH}_4$  ja  $\text{NaOH}$  konsentraatioita ja erilaisia näytteen ja pelkistimen virtausnopeuksia. Optimi konsentraatio  $\text{NaBH}_4$ :lle vaihtelee paljon.  $\text{NaBH}_4$ :n stabilisoimiseen käytetyn  $\text{NaOH}$ :n konsentraatio vaihtelee myös huomattavasti. On huomattu, että pelkistimen konsentraation kasvattaminen nostaa analyysin määrää detektorilla, mutta pelkistimen korkea konsentraatio myös lisää vedyn muodostumista mikä taas häiritsee analyysiä. Lisäksi myös näytteen käsittelyyn käytetyillä hapoilla on vaikutusta höyrymuodostukseen. On huomattu, että  $\text{HCl}$ :lla ja  $\text{HNO}_3$ :lla on positiivinen vaikutus höyrymuodostukseen ja tästä syystä niitä käytetäänkin usein näytteiden taustassa. Muiden mineraalihappojen ja orgaanisten happojen käytöstä ei ole havaittu olevan mitään hyötyä.

Taulukkoon 1 on koottu erilaisia  $\text{NaBH}_4$  konsentraatioita aiemmista tutkimuksista, joissa on määritetty elohopeaa kylmähöyrynä yksin tai muiden hydridejä muodostavien metallien kanssa. Yhdessä esitetyssä tutkimuksessa elohopea on määritetty onnistuneesti myös käyttämällä erittäin matalaa 0,05 %:n  $\text{NaBH}_4$  konsentraatiota.<sup>3</sup> Tämä tulos poikkeaa suuresti aiemmin kirjallisuudessa esitetyistä tuloksista.

Taulukko 1. Esimerkkejä erilaisista  $\text{NaBH}_4$  konsentraatioista määritettäessä eri metalleja kylmähöyrynä tai hydrideinä, eri matriiseista, eri menetelmillä

<b>Analysoidut alkuaineet</b>	<b>Näytematriisi</b>	<b>Pelkistin</b>	<b>Viite</b>
As, Sb, Se, Sn, Hg	Hummerin haima (LUTS-1) Piikkikalan maksa (DOLT-2) Merisedimentti (PACS-1)	1,5 % $\text{NaBH}_4$ 0,1 % NaOH:ssa	<sup>25</sup>
Hg, Se	Hummerin haima (TORT-2)	1,5 % $\text{NaBH}_4$ 0,4 % NaOH:ssa	<sup>10</sup>
Hg	Piikkikalan maksa (DOLT-2) Hummerin haima (TORT-2) Merisedimentti (PACS-2)	1,0 % $\text{NaBH}_4$ 0,4 % NaOH:ssa	<sup>39</sup>
As, Se, Hg	Riisijauho (SRM-1568a) Pinaatin lehti (SRM-1570a)	1,6 % $\text{NaBH}_4$ 0,5 % NaOH:ssa	<sup>36</sup>
Hg	Jokisedimentti (NIST 2704) Ihmisen hius (IAEA 085)	0,05 % $\text{NaBH}_4$ 0,1 mol/l NaOH:ssa	<sup>3</sup>

Kuitenkin on huomattava, että näissä taulukossa 1 esitetyissä tutkimuksissa on käytetty erilaisia näytteensyötön rakenteita ja erilaisia reagenssien, näytteiden ja kaasujen virtausnopeuksia. Lisäksi myös näytetaustat ovat erilaisia. Tämä tekee käytettyjen pelkistimien konsentraatioiden vertailusta erittäin haastavaa.

## 7.2 Tina(II)kloridi

Kuten  $\text{NaBH}_4$ :llä myös  $\text{SnCl}_2$ :lla voidaan pelkistää elohopea happamasta liuoksesta sen kaasumaiseen alkuainemuotoon.<sup>46</sup>  $\text{NaBH}_4$ :ä käytetään useammin elohopean kylmähöyrymäärytyksissä kuin  $\text{SnCl}_2$ :a, koska  $\text{NaBH}_4$ :llä voidaan pelkistää sekä orgaaninen että epäorgaaninen elohopea tehokkaammin ja nopeammin kuin  $\text{SnCl}_2$ :lla.  $\text{SnCl}_2$ :a käytettäessä ei kuitenkaan muodostu, kuten  $\text{NaBH}_4$ :llä, analyysiä häiritsevää vetykaasua.  $\text{SnCl}_2$  on myös heikompi pelkistin kuin  $\text{NaBH}_4$ , jonka vuoksi sen konsentraation tulee olla korkeampi kuin  $\text{NaBH}_4$ :n pelkistysreaktion aikaan saamiseksi.  $\text{SnCl}_2$  vesiliuos tulee happamoida, jotta voidaan estää  $\text{SnCl}_2$ :n hydrolyysi ja  $\text{Sn}(\text{OH})\text{Cl}$ :n muodostuminen, yleensä happamointi tehdään  $\text{HCl}$ :llä. Elohopean pelkistyminen tinakloridilla metalliseksi elohopeaksi tapahtuu seuraavan reaktion mukaisesti:<sup>8 s. 121</sup>



$\text{SnCl}_2$ :a voidaan käyttää myös epäorgaanisen ja kokonaiselohopean selektiiviseen määrittämiseen, sillä on yleisesti tiedossa että tinakloridilla voidaan pelkistää selektiivisesti näytteestä epäorgaaninen elohopea.<sup>42</sup> Rio-Segade ja Bendicho<sup>9</sup> ovat tutkineet epäorgaanisen ja kokonaiselohopean määrittystä simpukan kudoksesta FI-CV-AAS -tekniikalla. Tutkimuksessa epäorgaaninen elohopea määritettiin erillisestä näytteestä, joka hajotettiin vetykloridilla ultraäänessä. Epäorgaaninen elohopea pelkistettiin käyttäen 10 %:sta  $\text{SnCl}_2$  1 %  $\text{HCl}$ :ssä. Kokonaiselohopea määritettiin käyttäen pelkistimenä  $\text{NaBH}_4$ :ä. Lopputuloksena heillä oli, että epäorgaaninen elohopea voidaan pelkistää näytteestä selektiivisesti käyttäen tinakloridia, jolloin CV-AAS:llä ei havaita ollenkaan metyylielohopea signaalia. Tinakloridi tarjoaa parhaan selektiivisyyden, herkkyuden ja tarkkuuden kun sitä käytetään happotaustassa. He toteavat, että  $\text{SnCl}_2$ :a ja  $\text{NaBH}_4$ :ä voidaan käyttää kokonaiselohopean määrittämiseen, mutta kokonaiselohopean määrittämisessä näytteen hajotukseen käytetty typpihappo aiheutti suuren romahduksen elohopean absorbanssissa, kun käytössä oli  $\text{SnCl}_2$ . Tämä johtui siitä, että näytteessä olevat typen oksidit voivat hapettaa lisätyn  $\text{Sn}(\text{II})$  kokonaan, jolloin elohopean pelkistymistä ei tapahdu.

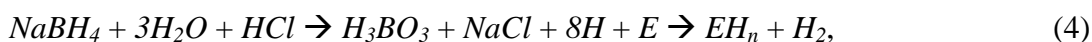
## 8 CVG-ICP-OES

Hivenaineiden määrittäminen monimutkaisista näytematriiseista on usein vaikeaa näytematriisin häiriöistä johtuen.<sup>24</sup> Monesti näytematriisi heikentää tuloksen tarkkuutta ja paikkansapitävyyttä. Tästä syystä on ollut tarve löytää menetelmä, joka mahdollistaa analyyttien erottamisen matriisista ja määrittämisen matalissa pitoisuuksissa. Tällaisia menetelmiä ovat hydridin muodostus- (HG) ja kylmähöyrymenetelmä (CV) ja tekniikat yhdistävä kemiallinen höyryn muodostus (CVG)

### 8.1 Kemiallinen höyryn muodostus

CVG –menetelmä yhdistää hydridin muodostus ja kylmähöyry menetelmät ja sillä voidaan analysoida elohopean ja kadmiumin lisäksi myös hydridejä muodostavia aineita kuten As, Bi, Ge, In, Pb, Sb, Se, Sn, Te, Tl.<sup>24, 29</sup> CVG:llä saavutetaan useita hyötyjä analyysihin, tehokas matriisin erotus mikä johtaa usein häiriöiden vähenemiseen, parempaan selektiivisyyteen ja parempiin havaintorajoihin. Lisäksi analyytin siirtyminen näytteestä detektorille kasvaa verrattuna sumutinkammioon.

Haihtuvien hydridien muodostumiseen nestefaasissa vaikuttaa usea tekijä: tutkittavan aineen hapetusaste liuoksessa, käytetty happo ja sen konsentraatio, käytettävä pelkistin ja sen konsentraatio, liuoksen pH, reaktioastian tyyppi ja materiaali, häiritsevien aineiden läsnäolo ja pitoisuus, hydridejä muodostavien aineiden laatu ja reaktiivisuus, matriisin vaikutus ja käytettävä hydridinmuodostustekniikka.<sup>24</sup> Pelkistimenä voidaan käyttää mm. NaBH<sub>4</sub>:ä tai SnCl<sub>2</sub>:a. Alkuaineiden pelkistyminen NaBH<sub>4</sub> –happoseoksella (usein HCl) on huomattavasti nopeampaa kuin metalli happoseoksella (SnCl<sub>2</sub>). NaBH<sub>4</sub>:n konsentraatio on yleisesti välillä 0,05 % - 10 %, lisäksi seos stabiloidaan 0,1 % - 2 % NaOH:lla. HCl:n konsentraatio on usein välillä 0,01 – 10<sup>mol/l</sup> ja sitä käytetään yleensä aineena joka hajottaa NaBH<sub>4</sub>:n. Kuitenkin myös sitruuna-, oksaali-, viini-, fosfori-, rikki- ja typpihappoa voidaan käyttää tähän tarkoitukseen. Esimerkki hydridin muodostusreaktiosta NaBH<sub>4</sub>:n kanssa on esitetty alla.<sup>33</sup>



missä E on analyytti.<sup>33</sup>

Suosituin tällä hetkellä käytetty reagenssi kemialliseen höyryn muodostukseen on  $\text{NaBH}_4$ , koska sillä voidaan muodostaa haihtuva hydridi hyvin useasta alkuaineesta.<sup>29</sup> Tämän lisäksi on esitetty myös useita CVG -menetelmiä joissa ei käytetä  $\text{NaBH}_4$ :ä, kuten esimerkiksi elektrokemiallinen höyryn muodostus, alkylointi reaktiot käyttäen Grignardin reagensseja ja fotokemiallinen höyryn muodostus UV -säteilyn avulla.

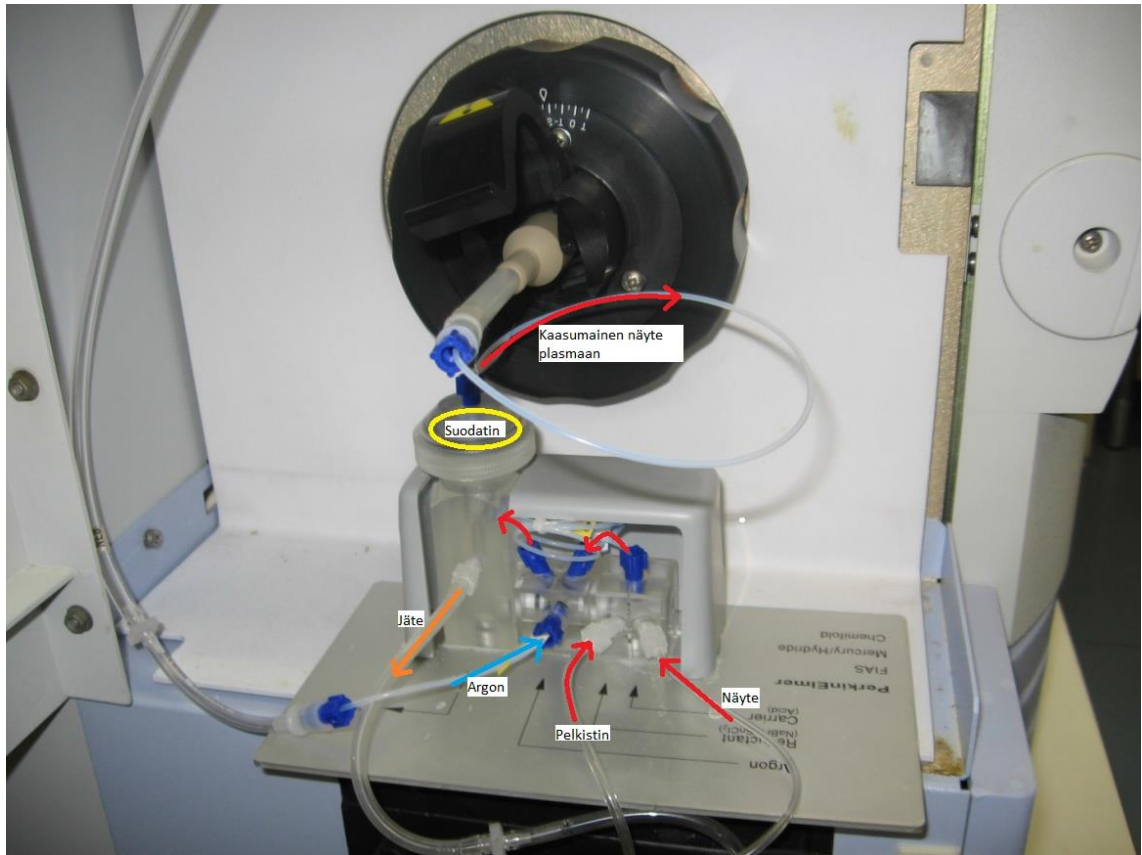
Käytetyn höyrynmuodostuslaitteen tyypistä riippumatta täytyy reaktiota varten optimoida useita parametreja.<sup>24</sup> Reaktio-olosuhteet tulee valita niin, että reaktio tapahtuu suurella teholla. Tätä varten tulee selvittää optimi konsentraatiot hapolle ja pelkistimelle, matriisin vaikutus konsentraatioihin ja kuinka paljon pelkistintä käytetään. Lisäksi täytyy myös varmistua, että kaasumaiset yhdisteet siirtyvät tehokkaasti plasmalle. Myös matriisissa olevat metallit voivat reagoida muodostuneiden hydridien kanssa tai aiheuttaa hydridien adsorptiota tai hajoamista.

## 8.2 FIAS-400

FIAS-400 on Perkin Elmerin valmistama metallien pelkistämiseen ja hydridien muodostukseen ICP-OES:llä käytettävä lisälaite.

Tässä laitteessa happamoitua näytettä ja käytettävää pelkistintä pumpataan jatkuvasti peristalttisen pumpun avulla samaan kammioon.<sup>33</sup> Tässä kammiossa tapahtuu reaktio, jossa muodostuvat kaasumaiset hydridit. Reaktion sivutuotteena muodostuu vetykaasua. Näytteseos siirtyy tästä kammioista seuraavaan, missä siihen kohdistuu argonkaasuvirtaus jolloin hydridit siirtyvät kaasufaasiin. Seuraavassa kammio toimii neste/kaasu erottimena. Sen yläosassa on suodatin, joka päästää vain kaasumaisen näytteen, jossa hydridit ovat, etenemään kohti plasmaa. Jäljelle jäävät nesteet pumpataan kammion alaosaan jäteastiaan. FIAS-400 laitteen rakenne yhdistettynä PerkinElmerin Optima 8300 ICP-OES:iin on esitetty kuvassa 18. Tällä laitteella hydridin muodostuksen avulla havaintorajoja voidaan yleisesti parantaa noin satakertaisiksi verrattuna perinteiseen määrittelyyn.





Kuva 18. FIAS-400 kytkettynä Optima 8300 ICP-OES -laitteeseen

Laitteella voidaan määrittää hydridejä muodostavista aineista muun muassa antimoni, arseeni, vismutti, seleeni ja telluuri.<sup>33</sup> Hydridejä muodostavat alkuaineet tulee kuitenkin pelkistää hydridin muodostuksen kannalta optimaalisimmalle hapetusasteelle ennen analyysiä. Ilander<sup>35</sup> on määrittänyt laitteen avulla arseenin ja antimonin lentotuhkasta ja Boutakhrif *et al.*<sup>38</sup> ovat määrittäneet sillä arsenia kaloista.

### 8.3 Elohopean määrittäminen kemiallisen höyrymuodostuksen avulla

Elohopean määrittäminen on tärkeää, koska se on myrkyllistä ja kerääntyy elimiin.<sup>39</sup> Aiemmin esitetty CV AAS –tekniikka ei kuitenkaan aina ole suoraan sovellettavissa kaikille näytteille, koska ne voivat sisältää niin matalia elohopea pitoisuuksia ja näin vaatisivat konsentroitua. ICP-OES –tekniikan kehitys on mahdollistanut myös sen käytön ympäristöanalyysiin.

Dos Santos *et al.*<sup>39</sup> ovat tutkineet elohopean määrittästä CV-ICP-OES menetelmällä useista erilaisista sertifioituista referenssimateriaaleista, kuten biologisista näytteistä, sedimenteistä, jätevesistä ja makean veden kalojen kudoksenäytteistä, mukana myös TORT-2 ja DOLT-2. Yhdessä ongelmaksi elohopean analysoinnissa he nostavat elohopean liikkuvuudesta ja haihtuvuudesta mahdollisesti aiheutuvan näytteen kontaminaation ja/tai analyysin häviämisen näytteestä silloin, kun näyte vaatii esikäsitteilyä kuten happohajotuksen kiinteän näytteen liuottamiseksi. Tästä syystä he ehdottavat käytettäväksi yksinkertaista näytteen liuotusta, jotta riskejä voitaisiin pienentää. He päätyvät käyttämään näytteen liuotukseen slurry –menetelmää. Liuotukseen he käyttivät 13–30 mg näytettä ja 1500 µl kuningasvettä. Tätä seosta pidettiin ultraäänihäuteessä 30 minuuttia ja tämän jälkeen näyte laimennettiin vedellä 15 ml:ksi, jolloin näytteessä oli kuningasvettä 10 %:a. Ennen analyysiä näytteisiin lisättiin vaahtoamisenestoaineeksi Sigma antifoaming A:ta ja näytettä sekoitettiin rajusti 30 sekunnin ajan. Elohopean pelkistämiseen valitut 1 % NaBH<sub>4</sub> 0,4 % NaOH:ssa ja 6 mol/l HCl yhdistettiin näytteeseen vasta laitteella. Näytteet analysoitiin sekä sellaisenaan, että suodatettuna käyttäen samaa kalibrointisuoraa. Suodattamattomista näytteistä saadut tulokset olivat yhtäpitäviä sertifioitujen arvojen kanssa, kun taas suodatetuista näytteistä saadut tulokset olivat usein tilastollisesti alhaisempia verrattuna suodattamattomaan. Tämä osoittaa, että osa elohopeasta on edelleen kiinni partikkeleissa eikä ole liennut nestefaasiin. Tämä slurry –menetelmä on esittäjiensä mukaan yksinkertainen, nopea, robusti ja tarkka.

Toisessa tutkimuksessa dos Santos *et al.*<sup>10</sup> analysoivat biologisista näytteistä elohopean ja seleenin samanaikaisesti CVG-ICP-OES menetelmällä. Tutkimuksessa selvitettiin seitsemän erityyppisen slurry –liuotuksen soveltuvuutta elohopean ja seleenin määrittämiseen. Näytteitä he eivät jauhaneet pienempään partikkelikokoon, vaan käyttivät niitä sellaisenaan, jolloin partikkelikoko oli  $\leq 120 \mu\text{m}$ . Kaikki seitsemän liuotusmenetelmää soveltuivat elohopean määrittämiseen. Yksi näistä oli jo yllä kuvattu liuotusmenetelmä kuningasvedellä ja ultraäänellä. Seleenin vuoksi he päätyivät kuitenkin käyttämään menetelmää, jossa organoseleeni yhdisteet hapetettiin  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  avulla ultraäänihauhteessa (60 min). Tämän jälkeen lisättiin HCl niin, että sen konsentraatio oli  $6 \text{ mol/l}$ . Ennen mittausta esipelkistettiin seleeni lämmittämällä näytteitä vielä  $90 \text{ }^\circ\text{C}$ :ssa 15 minuuttia ja lopuksi lisättiin vaahtoamisenestoaineeksi Sigma antifoaming A:ta. Pelkistimenä käytettiin 1,5 %  $\text{NaBH}_4$  0,4 %  $\text{NaOH}$ :ssa. Tämä konsentraatio valittiin, koska se oli korkein käyttökelpoinen konsentraatio. Tätä korkeammat konsentraatit tuottivat turbulenssia faasierottimella, mikä johtui suuresta määrästä vetyä, jota muodostuu pelkistysreaktiossa. Ylimäärästä vetyä seuraa myös epästabiili plasma tai sen sammuminen.

Elohopea on määritetty biologisista näytteistä onnistuneesti CVG-ICP-OES –menetelmällä myös pelkistämällä se alkuaineeksi korkeassa pH:ssa.<sup>29</sup> Tällöin toista pelkistintä kuten  $\text{NaBH}_4$  tai  $\text{SnCl}_2$  ei tarvitse käyttää. Tutkimuksessa biologinen näyte on ensin hajotettu käyttäen mikroaaltohajotusta, jonka jälkeen näytteen pH on nostettu kolmeentoista käyttäen  $\text{NaOH}$ :ta. Tämän jälkeen suljetun näyteastian annettiin seistä 90 minuuttia, jonka aikana  $\text{Hg}^{2+}$  -ionit pelkistyivät alkuainemuotoon ( $\text{Hg}^0$ ). Tämän jälkeen höyrystynyt elohopea ohjattiin plasmaan argonkaasun avulla. Kuitenkin elohopean ( $\text{Hg}^{2+}$ ) standardiliuoksen pelkistys  $\text{NaOH}$ :lla tuotti viisi kertaa alhaisemman intensiteetin verrattuna perinteisempään pelkistykseen  $\text{NaBH}_4$ :n ja  $\text{HCl}$ :n avulla. Tämä osoittaa sen, että erillisen pelkistimen käyttö nostaa huomattavasti pelkistymisen tehokkuutta ja nopeutta.

#### 8.4 Arseenin määrittäminen hydridinä

Boutakhrif *et al.*<sup>38</sup> ovat tutkineet arseenin määrittämistä kaloista ICP-OES:llä hydridin muodostusta apuna käyttäen. Laitteena heillä oli PerkinElmerin Optima 4300 DV ICP-OES argon plasmalla. Hydridien muodostukseen käytettiin PerkinElmerin FIAS-400 hydridigeneraattoria. Näytteet liuotettiin käyttäen märkätuhkistusta.

Ennen hydridin muodostusta As(V) esipelkistettiin As(III):ksi lisäämällä 2,5 ml:aan liuotettua näytettä 2,5 ml:aa 2,5 %:sta KI:ta, joka oli liuotettuna 2,5 %:seen askorbiinihappoon.<sup>38</sup> Tämän lisäksi seokseen lisättiin vielä 2,5 ml:aan 37 %:sta HCl:ää. Pelkistys todettiin tapahtuvan optimaalisesti 15 minuutin kuluessa ja liuoksen pysyvän mittauskelpoisena kolmen tunnin ajan. Tämän jälkeen näytteet valmistettiin niin, että ne sisälsivät 3 mol/l HCl:ää. Tämän jälkeen näyte ja pelkistimenä toiminut 0,2 % NaBH<sub>4</sub> (0,05 %:ssa NaOH:ssa) syötettiin peristalttisen pumpun avulla FIAS-400 laitteeseen. Näytteen syöttönopeus oli 3,0 ml/min ja NaBH<sub>4</sub> -liuoksen 2,6 ml/min.

## 9 HÄIRIÖT ANALYYSSEISSA

### 9.1 Häiriöt hydriditeknikassa

Hydridin muodostus tekniikalla tehtävässä analyysissä voi esiintyä monenlaisia ei-spektraalisia häiriöitä.<sup>47</sup> Häiriöt voivat aiheutua sekä neste- että kaasufaasissa. Syynä häiriöihin voivat olla liuoksessa olevat siirtymämetallit, muut hydridejä muodostavat aineet ja näytteen liuotukseen käytetyt hapot. Nestefaasin häiriöt ilmenevät hydridin muodostuksen tai hydridin nesteestä vapautumisen aikana. Nestefaasissa esiintyy yleisesti useita häiriöitä mutta ne voidaan jakaa yhdisteistä ja matriisista aiheutuviin ryhmiin. Yhdisteistä aiheutuvat häiriöt voivat johtua esimerkiksi siitä, että näytteessä ja standardeissa olevat analyytit ovat niissä eri hapetusasteella. Matriisihäiriöitä esiintyy silloin kun matriisi vaikuttaa hydridin muodostus- ja vapautumistehokkuuteen. Esimerkiksi ryhmien 8 - 12 alkuaineet ja näytteen hajottamiseen käytetyt hapot voivat aiheuttaa tällaisia häiriöitä. Kaasufaasin häiriöitä aiheuttavat siirtymämetallit ja toiset hydridit mutta niitä ei esiinny ICP –tekniikassa johtuen erittäin korkeasta plasman lämpötilasta atomisaation ja virittymisen aikana, mikä estää häiriöitä aiheuttavien pysyvien yhdisteiden muodostumisen plasmassa.

Häiriön vaikutusta voidaan myös yrittää minimoida.<sup>47</sup> Yleisesti käytetty menetelmä on näytteen laimentaminen mutta jos analyytin pitoisuus on pieni, se ei ole kovinkaan käyttökelpoinen menetelmä. Mahdollista on myös käyttää standardin lisäysmenetelmää mutta se on toimiva menetelmä vain jos häiriö on pientä. Käyttämällä hydridin muodostuksessa näytteensyötössä jatkuvaa virtausta voidaan häiriötä pienentää, sillä analyyttihydridien muodostuminen on nopeampaa kuin metallien pelkistyminen. Näyte viipyy tällaisessa näytteensyötössä vain lyhyen ajan, jolloin häiritseviä reaktiota ehtii tapahtua vähemmän. Lisäksi hydridit erottuvat näyteliuoksesta nopeasti. Näytteen lyhyt kontaktiaikaa pelkistimen kanssa ja hydridin nopea erottuminen näyteliuoksesta lisäävät hydridinmuodostuksen vastustuskykyä häiriöitä vastaan, korkeillakin häiritsevien aineiden pitoisuuksilla.

### 9.1.1 Häiriöt elohopean kylmähöyry määrityksessä

Wu *et al.*<sup>48</sup> ovat osoittaneet tutkimuksessaan, että alle 1000  $\mu\text{g}/\text{l}$  pitoisuudet ioneista  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ , ja  $\text{Pb}^{2+}$  eivät aiheuta häiriötä näytteessä, jossa on 1  $\mu\text{g}/\text{l}$  elohopeaa CVG-ICP-MS –tekniikalla analysoitaessa.

Määrittäessään elohopeaa biologisista näytteistä CV-AAS:llä Murphy *et al.*<sup>49</sup> tutkivat myös aiheuttavatko ionit  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{As}^{5+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Sb}^{5+}$  ja  $\text{Se}^{+6}$  häiriötä analyysissä. Mahdollisia häiriöitä tutkittiin lisäämällä elohopean 10  $\mu\text{g}/\text{l}$  standardiliuokseen tutkittavia ioneja. Tuloksista nähtiin, että hopealla ja seleenillä oli pieni elohopean signaalia vaimentava vaikutus, kun taas muut tutkitut ionit nostivat elohopean signaalia vähän. Kuitenkin hopeaa lukuun ottamatta pitoisuudet, joissa häiriötä huomattiin, olivat yli satakertaa suuremmat kuin elohopean. Tästä johtuen he toteavatkin, että nämä ionit eivät aiheuta merkittävää ongelmaa määrittäessä elohopeaa biologisista ja ympäristönäytteistä.

Pohl *et al.*<sup>46</sup> selvittivät aiheuttavatko metalli-ionit  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  ja  $\text{Zn}^{2+}$  tai haihtuvia hydridejä muodostavat metalli-ionit  $\text{As}^{5+}$ ,  $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Sb}^{3+}$  ja  $\text{Se}^{4+}$  häiriötä pitoisuuksilla 5, 10, 20, 50  $\text{mg}/\text{l}$  määrittäessä elohopean 0,2  $\text{mg}/\text{l}$  standardiliuosta CV-MIP-OES –menetelmällä. Mahdolliset häiriöt tutkittiin käyttäen pelkistimenä sekä  $\text{NaBH}_4$ :ä että  $\text{SnCl}_2$ :a.

Käytettäessä pelkistimenä  $\text{NaBH}_4$ :ä havaittiin, että  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{As}^{5+}$  ja  $\text{Bi}^{3+}$  ionit eivät aiheuttaneet häiriötä elohopean määrityksessä.<sup>46</sup>  $\text{Fe}^{3+}$  ja  $\text{Cd}^{2+}$  ionit vaimensivat elohopean signaalia kaikilla tutkituilla pitoisuuksilla,  $\text{Cd}^{2+}$  10 %:a ja  $\text{Fe}^{3+}$  20 %:a.  $\text{Cu}^{2+}$  –ionin vaikutus oli monimutkaisempi, sillä pitoisuudella 5  $\text{mg}/\text{l}$  elohopean signaali vaimenee todennäköisesti johtuen elohopean adsorptiosta pelkistyneeseen kupariin. Sen sijaan kuparin ollessa pitoisuudessa 10  $\text{mg}/\text{l}$  huomattiin elohopea signaalin nousua.  $\text{Se}^{4+}$  –ioni aiheutti erittäin suurta elohopea signaalin vaimenemista kaikilla tutkituilla pitoisuuksilla. Tämä saattoi johtua yhdisteen  $\text{HgSe}$  muodostumisesta. Toinen mahdollinen syy voi olla  $\text{NaBH}_4$ :stä kilpailevat reaktiot eli  $\text{Se}^{4+}$  hydrinmuodostus ja elohopean pelkistyminen kaasumaiseen alkuainemuotoon. Myös  $\text{Sb}^{3+}$  –ioni aiheutti määrityksissä taustahäiriöitä. Tämä häiriö johtui muodostuvasta  $\text{SbH}_3$  hydridistä, joka nosti Sb:n määrää detektorilla. Tästä johtuen detektorilla havaittiin voimakas viiva Sb I 252,8 nm, joka on lähellä Hg I 253,6 nm viivaa, tämä aiheutti ongelmia elohopea viivan intensiteetin määritykseen.

Vaihdettaessa pelkistimeksi  $\text{SnCl}_2$  eivät ionit  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  ja  $\text{Zn}^{2+}$  aiheuttaneet häiriötä elohopean määrittämisessä.<sup>46</sup> Pitoisuudessa 50 mg/l  $\text{Cu}^{2+}$  -ioni vaimensi elohopean signaalia 30 %:a  $\text{Ni}^{2+}$  -ioni 10 %:a.  $\text{As}^{5+}$ ,  $\text{Bi}^{3+}$  ja  $\text{Se}^{4+}$  -ionit vaimensivat elohopean signaalia maksimissaan 30 %:a, myös  $\text{Sb}^{3+}$  -ioni vaimensi signaalia 20 %:a. Näiden häiriöiden voidaan olettaa johtuvan erilaisista muodostuvista ei-kaasumaisista elohopean metalliyhdisteistä, kun elohopean pelkistämiseen käytetään  $\text{SnCl}_2$ :a.

Nunes *et al.*<sup>50</sup> taas ovat osoittaneet, että nitraatti-ioni ( $\text{NO}_3^-$ ) ei aiheuta häiriötä elohopean määrittämisessä biologisista näytteistä CV- tai HG-AAS määrittämisessä, kun taas nitriitti-ioni ( $\text{NO}_2^-$ ) aiheutti pientä häiriötä suuremmissa pitoisuuksissa.

Sulfidit aiheuttavat häiriötä analysoitaessa elohopeaa kylmähöyry –menetelmällä, kun pelkistimenä käytetään emäksisessä liuoksessa olevaa  $\text{SnCl}_2$ :a.<sup>51</sup> Tämä häiriö aiheutuu saostuvasta elohopeasulfidista. Kagaya *et al.*<sup>51</sup> ovat havainneet, että tämä häiriö voidaan poistaa lisäämällä näyteliuokseen natriumhypokloriittia ( $\text{NaClO}$ ), joka hapettaa sulfidit. Testatessaan kuinka paljon  $\text{NaClO}$ :ta voidaan näyteliuokseen lisätä, he huomasivat, että elohopean aiheuttama absorptanssi pysyi tasaisena kun lisäys oli 100 ml näytteeseen, joka sisälsi 1 mg sulfideja, välillä 0,02 – 1,5 ml. 100 ml jätevesinäytteisiin, jotka sisälsivät vähintään 10 mg sulfideja, he lisäsivät 1 ml  $\text{NaClO}$ :a. Tällöin he pystyivät määrittämään elohopean 100 ml näytteestä 10 % tarkkuudella.

### 9.1.2 Häiriöt määrittäessä arseenia hydridin muodostus tekniikalla

Siirtymämetallit voivat aiheuttaa häiriöitä määrittäessä arseenia hydridinä.<sup>47</sup> Nämä häiriöt voidaan poistaa käyttämällä maskausta. Esimerkiksi KI:n, HCl:än ja askorbiinihapon seos näytteessä poistaa siirtymämetallihäiriöt arseenin määrittämisestä. Lisäksi myös L-kysteiniä voidaan käyttää siirtymämetalleista aiheutuvien häiriöiden poistoon. KI:n HCl:n ja askorbiinihapon seoksella ja L-kysteiniinillä voidaan myös pelkistää arseeni hydridin muodostuksen kannalta parhaalle hapetusasteelle III.<sup>35</sup>

Usein häiriövapaan mittausalueen kokoa voidaan kasvattaa nostamalla happokonsentraatiota näytteessä.<sup>47</sup> Nostamalla näytteen happokonsentraatio välille 0,5 – 5,0 mol/l voidaan poistaa Ni, Cu, Co ja Fe aiheuttamat häiriöt. Samoin myös laskemalla pelkistimen (NaBH<sub>4</sub>) konsentraatiota voidaan poistaa siirtymämetalleista aiheutuvia häiriöitä. Joten yhdistämällä korkea happokonsentraatio matalan pelkistimen konsentraation kanssa voidaan laajentaa häiriövapaata aluetta, kun häiriö aiheutuu siirtymämetallin pelkistyneestä muodosta. Näin toimimalla voidaan siis poistaa Ni, Cu, Co ja Fe aiheuttamat häiriöt arseenin määrittämisestä. Myös käyttämällä HCl-HNO<sub>3</sub> happoseosta voidaan vähentää monesta siirtymämetallista aiheutuvia häiriöitä, sillä tämä seos lisää metalli-ioneiden liukoisuutta näytteessä.

Jos toinen hydridi aiheuttaa häiriötä, mikä on harvinaista ICP –tekniikassa, voidaan se yrittää sitoa muotoon josta ei muodostu hydridiä.<sup>47</sup> Esimerkiksi, jos seleeni aiheuttaa häiriötä arseenin määrittämisessä voidaan se poistaa lisäämällä näytteeseen kuparia, joka reagoi seleenin kanssa muodostaen liukenemattoman kupariselenidin (CuSe).

Pohl & Zyrnicki<sup>44</sup> ovat tutkineet kuinka voidaan poistaa siirtymämetallien aiheuttamia häiriöitä määrittäessä arseenia hydridinä ICP-AES –tekniikalla. He raportoivat, että tiourea avulla voidaan pienentää Cd(II), Co(II), Cu(II) ja Ni(II) aiheuttamia häiriöitä, jos ne esiintyvät kohtuullisissa pitoisuuksissa. Co(II) aiheuttamaa matriisihäiriötä voidaan pienentää käyttämällä EDTA:ta. Sen sijaan KCN ja KI eivät sovellu Cu(II) ja Ni(II) aiheuttamien häiriöiden poistoon, sen sijaan sitä voidaan käyttää pienentämään häiriötä, jotka aiheutuvat Co(II):sta ja Cd(II):sta.



## 9.2 Elohopean muistiefekti

Elohopealla esiintyy muistiefektiä ICP-AES<sup>52</sup>, ICP-MS<sup>53, 54</sup> ja ICP-OES<sup>55</sup> – määrittelyksissä. Muistiefekti aiheutuu elohopean adsorptiosta letkujen, sumutinkammion ja sumuttimen pinnalle.<sup>52</sup> Tämä aiheuttaa vähittäistä nousua elohopean signaalissa, josta seuraa epälineaarinen kalibraatio-suora ja pitkä pesuaika. Muistiefektiä aiheuttavat metallit voidaan poistaa laitteistosta käyttämällä pesuliuksena tioureaa ja HCl:n seosta tai kuningasvettä.<sup>24</sup> Elohopean muistiefekti voidaan poistaa käyttämällä kylmähöyrymenetelmää jossa kaikki elohopea pelkistetään alkuaineeksi eli Hg<sup>0</sup>:ksi käyttämällä SnCl<sub>2</sub>:a tai NaBH<sub>4</sub>:ä.<sup>52</sup> Tämän menetelmän haittana on se, että sitä varten täytyy hankkia erillinen laite.

Muistiefekti voidaan poistaa myös stabiloimalla elohopea liuokseen ja näin estää sen adsorptio laitteeseen.<sup>55</sup> Xiaoping *et al.* ehdottavat elohopeakompleksin muodostamiseen käytettäväksi Au(III)Cl<sub>3</sub>:a ICP-AES:lle.<sup>52</sup> Näin saadaan kaikki Hg(II) stabiloitua nestemäiseen näytteeseen ja estettyä elohopean haihtuminen.

Muistiefektin poistamiseksi biologisista näytteistä ICP-MS –laiteelta on käytetty L-kysteiniiniä<sup>53</sup> ja 2-merkaptoetanololia<sup>54</sup>. Tämän lisäksi myös pesuliukseen voidaan lisätä näitä elohopeaa sitovia aineita varmistamaan laitteen puhdistuminen<sup>53</sup>.

## KOKEELLINEN OSA

### 10 KÄYTETYT LAITTEET

Ultraäänihaude: Elma Transsonic 820/H

PerkinElmer ICP-OES Optima 8300

FIAS-400

### 11 REAGENSIT JA REFERENSSIMATERIAALIT

Elga PURELAB Ultra Analytic -laitteistolla puhdistettu ultrapuhdas vesi

Väk. 37 % HCl	Sigma-Aldrich	p.a.
Väk. 65 % HNO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich	p.a.
NaOH pelletti	Merck	p.a.
NaBH <sub>4</sub>	Aldrich	p.a.
Hg 10 mg/l	PerkinElmer	p.a.
As 1000 mg/l	PerkinElmer	p.a.
Cd 1000 mg/l	PerkinElmer	p.a.
Cu 1000 mg/l	PerkinElmer	p.a.
Ni 1000 mg/l	PerkinElmer	p.a.
Zn 1000 mg/l	PerkinElmer	p.a.
Fe 1000 mg/l	PerkinElmer	p.a.
1-Dekanoli	Fluka	97 %

DOLT-4	National Research Council Canada
TORT-2	National Research Council Canada

## 12 NÄYTTEET

Tutkimuksessa näytteinä käytettiin sertifioituja referenssimateriaaleja (CRM). CRM:t olivat National Research Council Canadan valmistamat DOLT-4<sup>12</sup> piikkikalan maksa ja TORT-2<sup>11</sup> hummerin haima.

## 13 NÄYTTEIDEN LIUOTUS JA PELKISTYS

### 13.1 Liuotus

250 mg CRM:ää liuotetaan 4 x 3 minuuttia ultraäänessä käyttäen hajotusliuosta, joka sisältää 3 ml kuningasvettä ja 3 ml vettä. Näyteputkia ravistellaan ja niistä päästetään painetta pois aina kolmen minuutin välein. Liuotuksen jälkeen näytteet suodatetaan. Tämän lisäksi näytteisiin lisätään väkevää HCl:ää 2 ml. Lopuksi näytteet laimennetaan ELGA vedellä 25 ml:ksi. Ennen analyysiä näytteisiin lisätään vaahtoamisenestoaineeksi dekanolia 100 µl per 10 ml näytettä.

### 13.2 Pelkistys

Elohopea voidaan pelkistää  $H^{2+}$ :sta  $H^0$ :ksi sekä natriumboorihydridillä ( $NaBH_4$ ) että tinakloridilla ( $SnCl_2$ ). Analyyseissä käytettiin laitevalmistajan suosittelemaa 0,5 %:sta  $NaBH_4$ :ä 0,05 %:sessa NaOH:ssa.<sup>33</sup>  $NaBH_4$  valittiin, koska  $SnCl_2$ :lla tulokset jäivät alhaisiksi.

## 14 ICP-OES ASETUKSET, REAGENSIT JA NÄYTTEENSYÖTTÖ

### 14.1 CVG-ICP-OES elohopea määrittäminen

Näytteistä analysoitiin elohopea CVG-ICP-OES –menetelmällä, käyttämällä aksiaalista mittausta aallonpituudella 253,652 nm. Analyysissä käytetyt reagenssit, näytteensyöttö ja kaasuvirtaukset ICP:llä on esitetty taulukossa 2. Pelkistin  $\text{NaBH}_4$  sekoitettiin näytteeseen yhdessä FIAS-400 laitteen kammiossa. Analyysien välissä suoritettiin laitteiston pesu, jossa käytettiin seosta josta yksi viidesosa oli kuningasvettä ja loput vettä. Elohopea kalibrointiin pitoisuusvälille 0-40  $\mu\text{g/l}$ , jolloin toteamisrajaksi muodostui 0,550  $\mu\text{g/l}$ , joten toteamisraja 250 mg:n näytteelle liuotettuna 25 ml:aan on 0,055  $\text{mg/kg}$ .

Taulukko 2. Elohopean määrittämiseen käytetyt parametrit, näytteensyötön rakenne ja reagenssit

Sumutin	GemCone High dissolved solids –sumutin
Sumutinkammio	Baffled -sykloninen sumutinkammio
Plasman teho	1500 W
Kaasuvirtaus plasmaan	17 l/min
Apukaasuvirtaus	0,2 l/min
Sumuttimen kaasuvirtaus	0,5 l/min
Näytteensyöttönopeus	1,8 ml/min
Pelkistin	0,5 % $\text{NaBH}_4$ 0,05 % $\text{NaOH}$ :ssa
Vaahoamisen estoaineita	Dekanoli 100 $\mu\text{l}$ /10ml näytettä
Pesuaika näytteiden välissä	60 Sekuntia

### 14.2 Raskasmetallien määrittäminen

Elohopea määrittämiseen liuotetuista näytteistä määritettiin testimielessä myös raskasmetalleja. Tällä pyrittiin selvittämään olisiko mahdollista määrittää näytteistä myös erilaisia raskasmetalleja käyttäen elohopea määrittämiseen luotua liuotustekniikkaa. Tällöin tarvitsisi tehdä vain yksi liuotus ja vaihtamalla näytteensyöttöä ICP:llä voitaisiin määrittää useita raskasmetalleja samasta näytteestä.

Referenssimateriaaleista määritettiin kuusi raskasmetallia käyttäen eri aallonpituuksia. Määritetyt metallit olivat arseeni, kadmium, kupari, nikkeli, sinkki ja rauta. Mittausaallonpituudet ja kalibrointivälit on esitetty taulukossa 3. Mittaus suoritettiin käyttäen aksiaalista mittausta.

Taulukko 3. Raskasmetallien analysoitiin käytetyt aallonpituudet ja kalibrointivälit

	Mittausaallonpituudet (nm)			Kalibrointiväli mg/l
Arseeni	193,696	188,979		0 - 0,5
Kadmium	228,802	214,440		0 - 0,5
Kupari	226,502	324,752		0 - 0,5
Nikkeli	231,604	221,648	232,003	0 - 0,25
Sinkki	206,200	213,857		0 - 1
Rauta	238,204	239,562	259,939	0 - 10

Raskasmetallien mittauksessa käytettiin aiemmin optimoituja mittausparametreja. Analyysieihin käytetty näytteensyöttö ja sen parametrit on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4. Raskasmetallien määrittämiseen käytetyt parametrit ja näytteensyötön rakenne

Sumutin	GemCone Low Flow –sumutin
Sumutinkammio	Sykloninen sumutinkammio
Plasman teho	1500 W
Kaasuvirtaus plasmaan	8 l/min
Apukaasuvirtaus	0,2 l/min
Sumuttimen kaasuvirtaus	0,5 l/min
Näytteensyöttönopeus	1,5 ml/min
Pesuaika näytteiden välissä	30 sekuntia

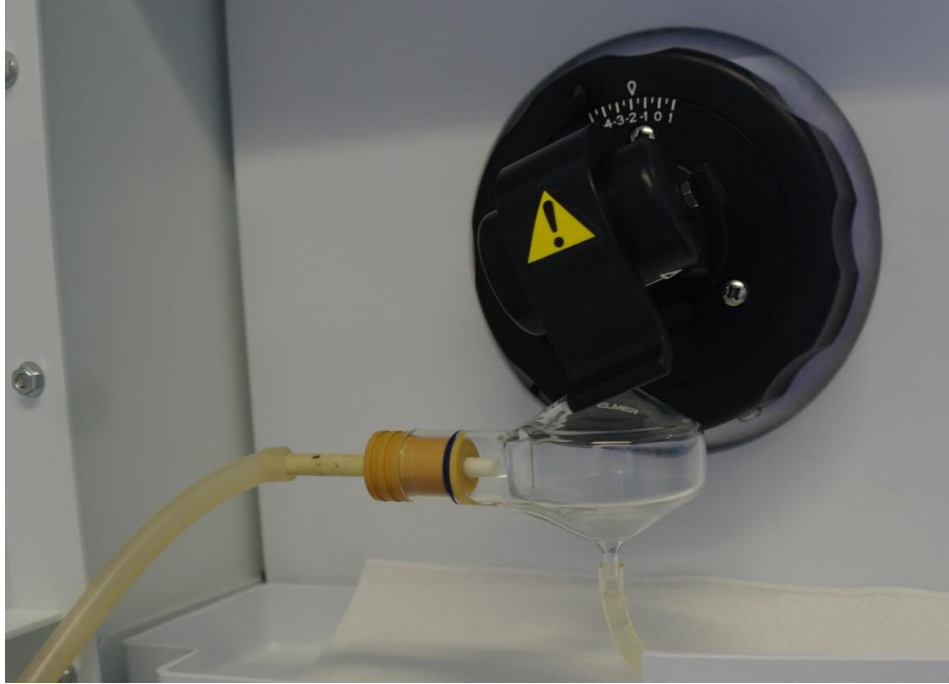
## 15 MENETELMÄN OPTIMOINTI

### 15.1 Erilaisten kombinaatioiden testaus

Menetelmän testaus aloitettiin PerkinElmerin omalla FIAS-400 hydridin muodostuslaitteella ja pelkistimenä käytettiin 0,5 % NaBH<sub>4</sub>:ä 0,05 %:ssa NaOH:ssa, tätä samaa liuosta käytettiin kaikissa testeissä joihin se sisältyi. Tämän menetelmän ongelmaksi muodostui näytteestä nestekaasu erottimella muodostuva vaahto, joka tukki siinä olevan suodattimen. Tästä aiheutui paineen muodostumista, jota laite ei kestänyt.

Paineen muodostumisesta aiheutuvan ongelman poistamiseksi siirryttiin käyttämään menetelmää, jossa näyte ja NaBH<sub>4</sub> sekoitettiin kammiossa, josta liuos johdettiin sumuttimelle ja sumutinkammioon. Sumuttimena käytettiin paljon liuennetta suoloja sisältävillä näytteillä tarkoitettua GemCone High Dissolved Solids –sumutinta ja sumutinkammiona orgaanisille näytteille tarkoitettua Baffled –syklonista sumutinkammiota. Tässäkin menetelmässä ongelmaksi ilmeni vaahto jota muodostui sumuttimessa.

Ongelma yritettiin ratkaista sillä, että sumuttimen tilalla käytettiin katkaistua injektoriputkea (Kuva 19). Injektoriputken suuaukon suuremmalla koolla perinteiseen sumuttimeen verrattuna pyrittiin estämään vaahtoaminen. Tässä menetelmässä kantajakaasu sekoitettiin näytteeseen jo ennen sen saapumista sumutin - injektoriputkelle. Tästäkin menetelmä ei poistanut vaahtoamisongelmaa. Tämän seurauksena yritettiin myös näytteisiin tehdä muutoksia mm. lämmittämällä niitä vesihautessa 30 tai 60 minuuttia noin 65 °C:ssa ja laimentamalla näytteitä suurimmillaan 50 %:a. Nämäkin toimenpiteet eivät poistaneet vaahtoamista ja epätarkkoja mittaustuloksia.



Kuva 19. Sumuttimen paikalle, sykloniseen sumutinkammioon, kiinnitetty katkaistu injektoriputki

Seuraavaksi päädyttiin käyttämään pelkistimenä 1 %  $\text{SnCl}_2$ :a noin 10 %:sessa  $\text{HCl}$ :ssä. Aiemman tiedon perusteella  $\text{SnCl}_2$ :n ei pitäisi aiheuttaa vaahtoamista.<sup>56</sup> Lisäksi  $\text{SnCl}_2$  ei muodosta hydridejä muiden metallien kanssa, jolloin plasmaan ei kulkeudu häiritseviä kaasumaisia metallihydridejä. Muuten menetelmä pidettiin samana kuin aiemmin eli injektoriputki –sumutin ja Baffled sykloninen sumutinkammio. Testeissä huomattiin, että vaahtoa ei syntynyt, mutta tulokset referenssimateriaaleista olivat alhaisia. Nyt kun vaahto oli saatu poistettua voitiin siirtyä käyttämään sumuttimena GemCone High Dissolved Solids –sumutinta. Kuitenkin tälläkin menetelmällä referenssimateriaaleista saadut tulokset olivat heikkoja. Seuraavaksi päätettiin vielä kokeilla perinteistä syklonista sumutinkammiota. Sekin tuotti huonoja tuloksia referenssimateriaalille. Ongelma ei myöskään poistunut vahvemalla 2 %:sella  $\text{SnCl}_2$ :lla 16 %:sessa  $\text{HCl}$ :ssä. Tästä pääteltiin, että  $\text{SnCl}_2$  ei sovi pelkistimeksi biologisille näytteille.

Aiempien tutkimusten<sup>10, 25, 39, 45</sup> perusteella todettiin, että yksi mahdollinen keino vaahtoamisen estämiseksi olisi käyttää vaahtoamisen estoaineita yhdessä  $\text{NaBH}_4$ :n kanssa. Näitä vaahtoamisenestoaineita olivat dekanoli<sup>25</sup>, Sigma antifoaming A<sup>10, 39, 45</sup> ja oktanoli<sup>25</sup>. Testiin päätettiin ottaa sekä oktanoli että dekanoli. Alkoholilla lisättiin näytteeseen  $100\mu\text{l}/10\text{ml}$  näytettä. Menetelmässä käytettiin GemCone High Dissolved Solids –sumutinta ja baffled -syklonista sumutinkammiota. Alkoholien todettiin estävän vaahtoamista. Silmämääräisesti ja tuloksista oli kuitenkin selvästi huomattavissa, että dekanoli vähensi vaahtoamista enemmän kuin oktanoli. Tästä syystä päädyttiinkin käyttämään dekanolia. Baffled –syklonisen sumutinkammion lisäksi testattiin myös Scott – sumutinkammiota. Tulokset referenssimateriaaleista molemmilla kammioilla olivat hyviä. Kuitenkin päädyttiin käyttämään baffled –syklonista sumutinkammiota, koska se on läpinäkyvä ja näin sumuttumista voidaan helposti seurata.

Taulukkoon 5 on koottu mitatut intensiteetit sekä elohopea standardiliuoksesta että referenssimateriaalista (DOLT-4), lisäksi siinä on myös esitetty analyysitulokset referenssimateriaalille. Taulukosta 5 on selvästi nähtävissä, että kaksi viimeistä menetelmää tuottavat korkeat intensiteetit ja hyvät analyysitulokset referenssimateriaalista ilman vaahdon aiheuttamaa häiriötä.



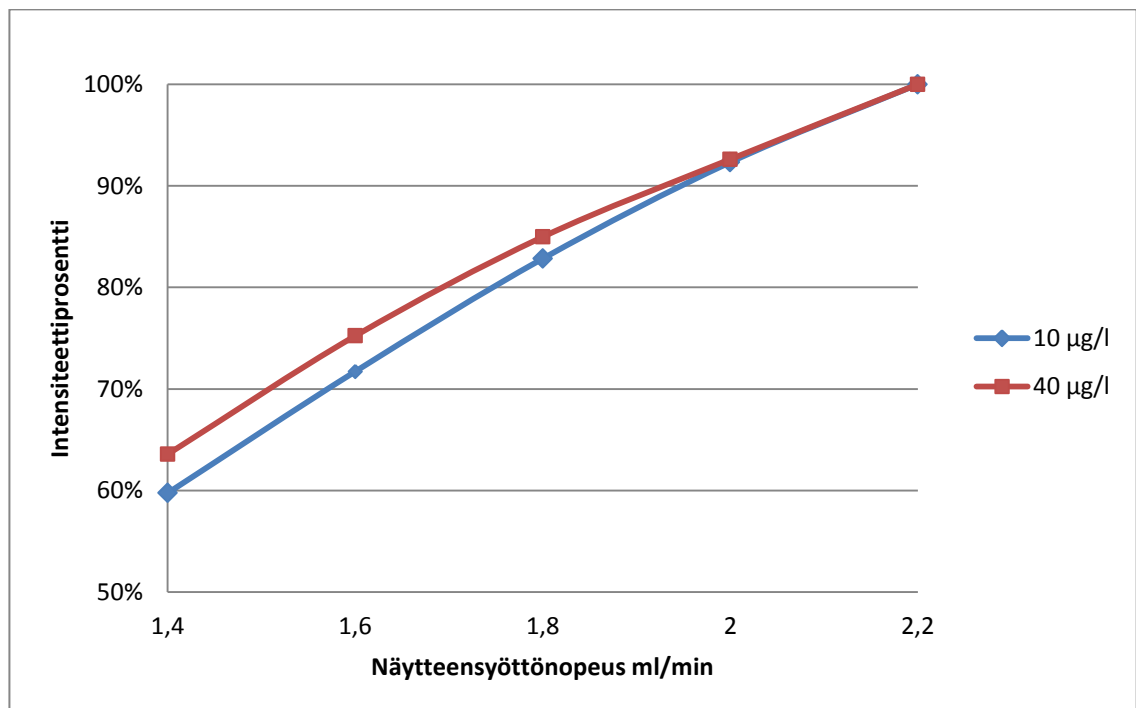
Taulukko 5. Eri menetelmillä saatuja elohopean intensiteettejä ja pitoisuuksia DOLT-4 referenssimateriaalista

Pelkistin	Sumutin	Sumutinkammio	Intensiteetit		Tulos* mg/kg	HUOM
			Std 25 µg/l	DOLT 50ml		
NaBH <sub>4</sub>	FIAS-400		26577	13136	<b>2,482</b>	Vaahto
NaBH <sub>4</sub>	GemCone High Dissolved Solids -sumutin	Baffled -sykloninen sumutinkammio	16094	4748	1,838	Vaahto
			Std 10 µg/l	DOLT 25ml	Tulos* mg/kg	
NaBH <sub>4</sub>	Injektoriputki	Baffled -sykloninen sumutinkammio	3301	24457	5,279	Vaahto
SnCl <sub>2</sub>	Injektoriputki	Baffled -sykloninen sumutinkammio	5318	7558	1,512	
SnCl <sub>2</sub>	GemCone High Dissolved Solids -sumutin	Baffled -sykloninen sumutinkammio	4313	2759	0,626	
SnCl <sub>2</sub>	GemCone High Dissolved Solids -sumutin	Sykloninen sumutinkammio	3794	5418	1,438	
NaBH <sub>4</sub>	<b>GemCone High Dissolved Solids -sumutin</b>	<b>SCOTT</b>	<b>9286</b>	<b>21982</b>	<b>2,38</b>	<b>Dekanoli</b>
NaBH <sub>4</sub>	<b>GemCone High Dissolved Solids -sumutin</b>	<b>Baffled -sykloninen sumutinkammio</b>	<b>7330</b>	<b>19558</b>	<b>2,63</b>	<b>Dekanoli</b>

\* Referenssiaineen sertifioitu Hg pitoisuus  $2,58 \pm 0,22 \text{ mg/kg}^{-1}$

## 15.2 Näytteensyöttönopeuden optimointi

Näytteensyöttönopeutta testattiin, jotta voitiin selvittää millä nopeudella saadaan suurimmat intensiteetit niin, että plasma pysyy stabiilina. Näytteensyöttönopeutta säädeltiin muuttamalla peristalttisen pumpun pyörimisnopeutta. Pumpun pyörimisnopeutta lukuun ottamatta muut parametrit pidettiin vakiona eli kaasuvirtaus plasmaan  $17 \text{ l/min}$ , apukaasuvirtaus  $0,2 \text{ l/min}$  ja sumuttimen kaasuvirtaus  $0,60 \text{ l/min}$ . Testissä saadut tulokset on esitetty kuvassa 20. Tulokset on esitetty prosentteina mitattuun maksimi intensiteettiin verrattuna. Intensiteetit mitattiin standardiliuoksista, joiden elohopeapitoisuudet olivat  $0 \text{ } \mu\text{g/l}$ ,  $10 \text{ } \mu\text{g/l}$  ja  $40 \text{ } \mu\text{g/l}$ .



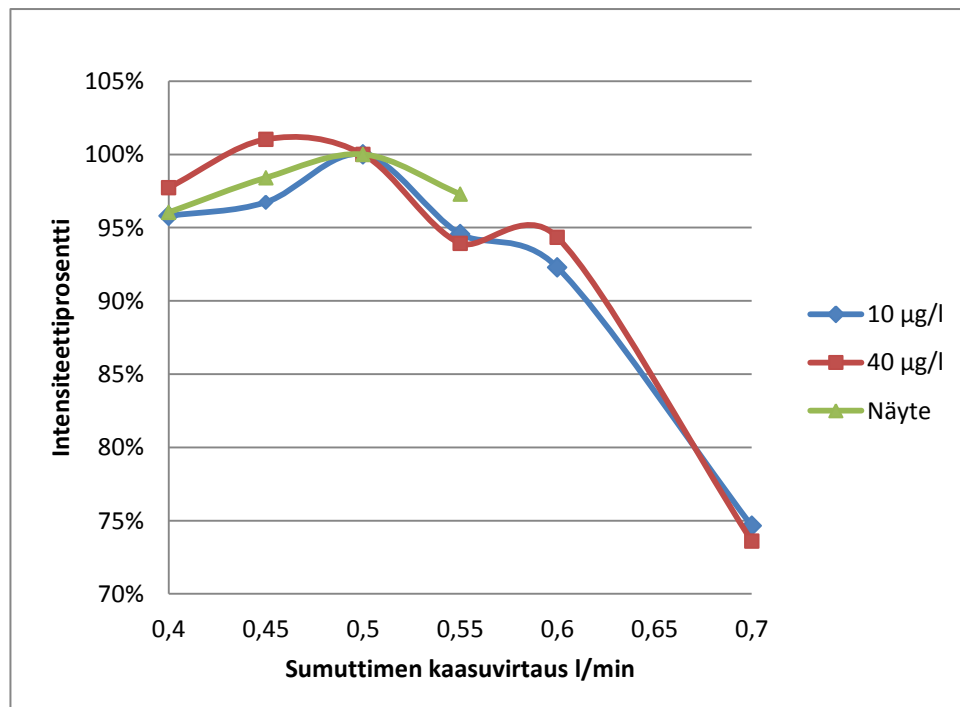
Kuva 20. Näytteensyöttönopeuden vaikutus intensiteetteihin, prosentteina suhteessa maksimiin

Tuloksista nähdään, että mitatut intensiteetit kasvavat, kun näytteensyöttönopeutta nostetaan. Näytteestä, joka ei sisältänyt elohopeaa, ei havaittu elohopea signaalia. Parhaat intensiteetit saadaan näytteensyöttönopeuden ollessa  $2,2 \text{ ml/min}$ . Tällä nopeudella plasma oli kuitenkin erittäin epästabiili. Näytteensyöttönopeuden ollessa  $2,4 \text{ ml/min}$  ei plasma enää pysynyt päällä. Käytettäväksi valittiin näytteensyöttönopeus, jossa plasma pysyi stabiilina. Korkein tällainen nopeus oli  $1,8 \text{ ml/min}$ , joka siis valittiin käyttöön.

### 15.3 Sumuttimen kaasuvirtauksen optimointi

Sumuttimen kaasuvirtauksen vaikutusta mitattuihin intensiteetteihin testattiin standardiliuoksista, joiden elohopeapitoisuudet olivat  $0 \mu\text{g/l}$ ,  $10 \mu\text{g/l}$  ja  $40 \mu\text{g/l}$ , lisäksi optimiolosuhteet tarkistettiin vielä näytteillä. Näytteen elohopea pitoisuus oli noin  $14 \mu\text{g/l}$ . Testeissä muut parametrit pidettiin vakiona, plasman kaasuvirtaus  $17 \text{ l/min}$ , apukaasun kaasuvirtaus  $0,2 \text{ l/min}$  ja pumpun pyörimisnopeus optimiarvossaan  $1,8 \text{ ml/min}$ . Intensiteetit mitattiin kuudella eri kaasuvirtauksella standardeille ja näytteille neljällä.

Intensiteetit kasvoivat näytteellä ja  $10 \mu\text{g/l}$  standardiliuoksella kun sumuttimen kaasuvirtausta nostettiin aina kaasuvirtaukseen  $0,5 \text{ l/min}$  asti, jonka jälkeen mitattu intensiteetti alkoi laskea.  $40 \mu\text{g/l}$  standardiliuoksella korkein intensiteetti mitattiin sumutinkaasu virtauksen ollessa  $0,45 \text{ l/min}$  tämän jälkeen intensiteetit pienenevät. Näytteestä, joka ei sisältänyt elohopeaa, ei havaittu elohopea signaalia. Saadut tulokset ovat kuvassa 21. Intensiteetit on esitetty prosentteina verrattuna korkeimpaan mitattuun intensiteettiin. Standardiliuosten perusteella paras kaasuvirtaus sumuttimelle oli  $0,5 \text{ l/min}$ . Tämä testattiin vielä näytteillä ja tulos oli sama.



Kuva 21. Sumuttimen kaasuvirtauksen vaikutus intensiteetteihin, prosentteina suhteessa maksimiin

## 16 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELO

Elohopea- ja raskasmetallipitoisuudet määritettiin referenssimateriaaleista DOLT-4 ja TORT-2 neljän rinnakkaisen näytteen keskiarvona.

### 16.1 Elohopea

Elohopea määritettiin onnistuneesti referenssimateriaaleista DOLT-4 ja TORT-2 edellä kuvatulla CVG-ICP-OES -menetelmällä. Taulukkoon 6 on koottu analyysitulosten keskiarvot virheineen, saantoprosentit ja t-testin arvo 95 % luottamustasolla.

Taulukko 6. Elohopean analyysitulokset neljän rinnakkaisnäytteen keskiarvona

	<b>Tulos mg/kg</b>	<b>Sertifioitu pitoisuus mg/kg</b>	<b>Saanto</b>	<b>t</b>	<b>t<sub>kriit.n=4</sub> (P = 0,05)</b>
<b>DOLT-4</b>	2,62 ± 0,04	2,58 ± 0,22	102 %	2,32	3,18
<b>TORT-2</b>	0,28 ± 0,03	0,27 ± 0,06	104 %	0,58	

Taulukossa 6 esitetyistä tuloksista huomataan, että elohopean määrittäminen onnistui erinomaisesti, minkä myös t-testi osoittaa. Määrittäessä elohopeaa tällä menetelmällä ei analyysissä huomattu elohopeasta aiheutuvaa muistiefektiä, mikä helpottaa analyysien välissä tapahtuvaa laitteiston pesua. Menetelmää testattaessa huomattiin, että dekanoli erottuu näytteestä, jos näytteet seisovat riittävän pitkään. Tällöin myös vaahtoamisenesto vaikutus heikkeni. Ongelman vaikutus minimoitiin ravistelemalla näytteitä uudelleen hieman ennen analyysiä. Elohopean määrittämisessä ei havaittu häiriöitä muista mahdollisesti NaBH<sub>4</sub> kanssa muodostuvista metallihydrideistä, joita myös päätyy plasmaan.

Menetelmällä analysoitiin kokeilumielessä myös arseenia hydridinä. Tuloksista huomattiin, että arseenin määrittäminen hydridinä yhdessä elohopean kanssa voisi olla mahdollinen, koska mitatut intensiteetit olivat huomattavasti korkeampia kuin perinteisessä mittauksessa. Arseni analysoitiin kuitenkin ilman esipelkistystä, jolloin vain osa arseenista oli optimaalisella hapetusasteella III. Tästä johtuen kaikista arseenista ei muodostunut hydridiä eikä se näin ollen päässyt plasmaan jolloin mitatut pitoisuudet olivat alhaisia. Koska arseenia ei pelkistetty, on tämän tutkimuksen perusteella mahdotonta sanoa vaikuttavatko arseenin pelkistämiseen tarvittavat reagenssit elohopean määritykseen.

## 16.2 Raskasmetallit

Kaikki raskasmetallien analyysitulokset DOLT-4:lle on esitetty liitteessä 1 ja TORT-2:lle liitteessä 2.

Seuraavaksi esitetään tulokset vain tutkituista aallonpituuksista parhaimman tuloksen antaneille aallonpituuksille. Paras aallonpituus valittiin sillä perusteella, että se antaa hyvän tuloksen kummallekin referenssimateriaalille. Tulokset referenssimateriaalille DOLT-4 on esitetty taulukossa 7 ja TORT-2 taulukossa 8. Taulukoissa 7 ja 8 sekä liitteissä 1 ja 2 esitetyt toteamisrajat on laskettu 250 mg näytteelle, joka on liuotettuna tilavuuteen 25 ml:aa.

Taulukko 7. Neljän rinnakkaisen analyysituloksen keskiarvo referenssimateriaalille DOLT-4

	Pitoisuudet (mg/kg) eri aallonpituuksilla					
	<b>As</b> <b>193,696</b>	<b>Cd</b> <b>228,802</b>	<b>Cu</b> <b>324,752</b>	<b>Ni</b> <b>232,003</b>	<b>Zn</b> <b>213,857</b>	<b>Fe</b> <b>239,562</b>
Tulos	8,8 ± 0,3	25 ± 1	37,2 ± 0,7	0,9 ± 0,4	139,4 ± 1,5	1790 ± 20
Sertifiotu-pitoisuus	9,66	24,3	31,2	0,97	116	1833
Saanto%	91 %	104 %	119 %	95 %	120 %	98 %
Toteamisraja	0,4	0,2	0,3	0,1	0,2	2
t	7,46	2,27	19,14	0,31	31,13	4,28
<b>t<sub>kriit. n=4</sub></b> <b>(P = 0,05)</b>	3,18					

Kuten taulukosta 7 nähdään, olivat raskasmetallien saantoprosentit DOLT-4 referenssimateriaalille välillä 91 % – 120 %. Kadmiumin ja nikkelin kohdalla myös t-testin tulos osoittaa tulosten olevan hyviä. Tosin nikkelin kohdalla se johtuu todennäköisesti korkeasta tulosten hajonnasta (RSD 36 %:a), mikä osoittaa toistettavuuden olevan huono.

Taulukko 8. Neljän rinnakkaisen analyysituloksen keskiarvo referenssimateriaalille TORT-2

	Pitoisuudet (mg/kg) eri aallonpituuksilla					
	<b>As</b> <b>193,696</b>	<b>Cd</b> <b>228,802</b>	<b>Cu</b> <b>324,752</b>	<b>Ni</b> <b>232,003</b>	<b>Zn</b> <b>213,857</b>	<b>Fe</b> <b>239,562</b>
Tulos	27,3 ± 0,8	29,7 ± 0,7	115 ± 1	5,2 ± 0,7	212 ± 3	124 ± 5
Sertifiotu- pitoisuus	21,6	26,7	106	2,5	180	105
Saanto%	126 %	111 %	108 %	209 %	118 %	118 %
Totemiraja	0,4	0,2	0,3	0,1	0,2	2
t	16,01	9,20	19,08	8,24	22,56	7,81
<b>t<sub>kriit. n=4</sub></b> <b>(P = 0,05)</b>	3,18					

Saantoprosentit mitatuille raskasmetalleille referenssimateriaalissa TORT-2 olivat välillä 108 % - 126 %, pois lukien nikkeli 209 % (taulukko 8). Kaikki mitatut raskasmetallipitoisuudet olivat suurempia kuin sertifioidut arvot ja tästä syystä t-testi ei mennyt yhdenkään näytteen kohdalla läpi. Kuten DOLT-4 kohdalla, myös TORT-2 nikkelin määrittäminen tuotti eniten hankaluuksia.

Saadut tulokset referenssimateriaaleista DOLT-4 ja TORT-2 raskasmetalleille olivat kuitenkin niin hyviä, että ne vahvistavat oletuksen siitä, että käytetty liuotusmenetelmä on sovellettavissa myös niiden määrittämiseen, kunhan vain mittausolosuhteet optimoidaan näytteille sopiviksi.

## 17 YHTEENVETO

Tutkimukselle asetut tavoitteet saavutettiin. Elohopea onnistuttiin määrittämään matalissa pitoisuuksissa kylmähöyrynä onnistuneesti biologisista referenssimateriaaleista DOLT-4 ja TORT-2 CVG-ICP-OES -menetelmällä. Lisäksi käytetty liuotusmenetelmä näyttäisi olevan sopiva myös muiden metallien määrittämiseen referenssimateriaaleista pelkästään ICP-OES -laitteen näytteensyötön rakennetta muuttamalla. Tutkimus antoi myös viitteitä mahdollisuudesta määrittää yhtäaikaaisesti elohopea kylmähöyrynä ja arseeni hydridinä.

Tutkimuksen tuloksena kehitettiin CVG-ICP-OES -menetelmä elohopean määrittämiseksi biologisista näytteistä kylmähöyrynä. Menetelmän luonnissa eniten ongelmia aiheutti näytteen vaahtoutuminen vedyn muodostumisen yhteydessä. Tämä ongelma onnistuttiin poistamaan lisäämällä näytteisiin dekanolia ja optimoimalla näytteensyöttöä. Happamoitu näyte ja pelkistin  $\text{NaBH}_4$  sekoitetaan erillisessä kammiossa, josta tämä seos johdettiin toiseen kammioon, missä siihen sekoitettiin kantajakaasuna toiminut argon. Tästä kammioista poistettiin jätteeseen myös suurin osa nestemäisestä näytteestä. Tämän jälkeen muodostunut näyte-kaasuseos johdettiin sumuttimelle ja sieltä sumutinkammioon. Sumutinkammioista kaasumainen elohopeahöyry johdettiin plasmaan.

Kehitetyllä CVG-ICP-OES menetelmällä saatiin elohopealle erittäin hyviä tuloksia molemmista referenssimateriaaleista. Menetelmä osoittautui tarkaksi ja sen toistettavuus on hyvä, eikä siinä havaittu elohopean muistiefektiä eikä muitakaan häiriöitä.

## KIRJALLISUUSVIITTEET

1. S. Rio-Segade and C. Bendicho, Ultrasound-assisted extraction for mercury speciation by the flow injection-cold vapor technique, *J. Anal. At. Spectrom.* **1999**, *14*, 263-268.
2. M.A. Vieira, A.S. Ribeiro, A.J. Curtius and R.E. Sturgeon, Determination of total mercury and methylmercury in biological samples by photochemical vapor generation, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *388*, 837-847.
3. V.C.G. dos Santos, M.T. Grassi, M.S. de Campos, P.G. Peralta-Zamora and G. Abate, Multivariate optimization of mercury determination by flow injection-cold vapor generation-inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Analyst.* **2012**, *137*, 4458-4463.
4. Metyylielohopea - Ympäristöterveys, <http://www.thl.fi/fi/web/ymparistoterveys/ymparistomyrkyt/tarkempaa-tietoa-ymparistomyrkyista/metyylielohopea>, Terveysten ja hyvinvoinnin laitos, (25.11.2014).
5. The Commission of the European Communities, Commission Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, **2006**.
6. Revised JECFA PTWI for methylmercury, <http://www.chem.unep.ch/mercury/Report/JECFA-PTWI.htm>, United Nations Environment Programme, (25.11.2014).
7. L. Pyy and A. Anttila, *Altisteet työssä 24. Elohopea*, Työsuojelurahasto, Helsinki, 1992.
8. L.H.J. Lajunen, *Atomispektrometria*, WSOY, Juva, 1986.
9. S. Rio-Segade and C. Bendicho, Selective Reduction Method for Separate Determination of Inorganic and Total Mercury in Mussel Tissue by Flow-Injection Cold Vapor Technique, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1999**, *42*, 245-252.
10. E.J. dos Santos, A.B. Herrmann, V.L.A. Frescura and A.J. Curtius, Evaluation of slurry preparation procedures for the simultaneous determination of Hg and Se in biological samples by axial view ICP OES using on-line chemical vapor generation, *Anal. Chim. Acta.* **2005**, *548*, 166-173.
11. Z. Mester, Certified Reference Material, TORT-2 Lobster Hepatopancreas Reference Material for Trace Metals, *National Research Council Canada*,. **1994**.
12. Z. Mester, Certificate of Analysis DOLT-4 Dogfish liver certified reference material for trace metals, *National Research Council Canada.* **2008**.
13. K.J. Lamble and S.J. Hill, Microwave digestion procedures for environmental matrices, Critical Review, *Analyst.* **1998**, *123*, 103R-133R.



14. J.L. Luque-García and M.D. Luque de Castro, Ultrasound: a powerful tool for leaching, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2003**, 22, 41-47.
15. C. Bendicho, I. De La Calle, F. Pena, M. Costas, N. Cabaleiro and I. Lavilla, Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2012**, 31, 50-60.
16. F. Priego Capote and d.C. Luque, Ultrasound in analytical chemistry, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 387, 249-257.
17. Ultraäänihäuteet laboratorioon,  
<http://www.labnet.fi/fin/tuotteet/laitteet/ultraaanipesurit/>, Labnet Oy, (7.4.2015).
18. T.G. Kazi, M.K. Jamali, M.B. Arain, H.I. Afridi, N. Jalbani, R.A. Sarfraz and R. Ansari, Evaluation of an ultrasonic acid digestion procedure for total heavy metals determination in environmental and biological samples, *J. Hazard. Mater.* **2009**, 161, 1391-1398.
19. H. Matusiewicz and E. Stanisz, Evaluation of various sample pre-treatment methods for total and inorganic mercury determination in biological certified reference materials by CVAAS technique, *Cent. Eur. J. Chem.* **2010**, 8, 594-601.
20. A. Agazzi and C. Pirola, Fundamentals, methods and future trends of environmental microwave sample preparation, *Microchem. J.* **2000**, 67, 337-341.
21. United States Environmental Protection Agency, Method 3052: Microwave Assisted Acid Digestion of Siliceous and Organically Based Matrices, **1996**.
22. H.M. Kingston and L.B. Jassie, *Introduction to Microwave Sample Preparation Theory and Practice*, American Chemical Society, Washington, DC, 1988.
23. 7C: Implementing The Sampling Plan,  
[http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical\\_Chemistry/Analytical\\_Chemistry\\_2.0/07%3A\\_Collecting\\_and\\_Preparing\\_Samples/7C%3A\\_Implementing\\_the\\_Sampling\\_Plan](http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Analytical_Chemistry_2.0/07%3A_Collecting_and_Preparing_Samples/7C%3A_Implementing_the_Sampling_Plan), UC Davis ChemWiki, (9.4.2015).
24. M. Ślachciński, Recent Achievements in Sample Introduction Systems for Use in Chemical Vapor Generation Plasma Optical Emission and Mass Spectrometry: From Macro- to Microanalytics, *Appl. Spectrosc. Rev.* **2014**, 49, 271-321.
25. H. Matusiewicz and M. Ślachciński, Simultaneous determination of hydride forming elements (As, Sb, Se, Sn) and Hg in sonicate slurries of biological and environmental reference materials by hydride generation microwave induced plasma optical emission spectrometry (SS-HG-MIP-OES), *Microchem. J.* **2006**, 82, 78-85.
26. S. Jaarinen and J. Niiranen, *Laboratorion analyysitekniikka*, 5. Painos, Edita Prima Oy, 2005.
27. P.O. Lehtonen and M. Sihvonen, *Laboratorioalan analyttinen kemia*, Edita Prima Oy, 2004.

28. D.C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, 8. Painos, W.H.Freeman and Company, New York, USA, 2010.
29. E.J. dos Santos, A.B. Herrmann, V.L.A. Frescura, R.E. Sturgeon and A.J. Curtius, A Novel Approach to Cold Vapor Generation for the Determination of Mercury in Biological Samples, *J. Brazil Chem. Soc.* **2008**, *19*, 929-934.
30. J. Nölte, *ICP Emission Spectrometry - A Practical Guide*, Wiley-VCH, Weinheim Germany, 2003.
31. J. Cazes and G.W. Ewing, *Ewing's analytical instrumentation handbook*, 3. Painos, Marcel Dekker, New York, 2004.
32. Baffled Cyclonic Spray Chamber - 50 mL,  
<http://www.perkinelmer.com/catalog/product/id/n0776053>, Perkin Elmer, (13.10.2014).
33. C.P. Bosnak and L. Davidowski, PerkinElmer field application report, ICP-optical emission, continuous flow hydride generation using optima ICP, **2004**.
34. P. Pohl, Hydride generation – recent advances in atomic emission spectrometry, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2004**, *23*, 87-101.
35. A. Ilander and A. Väisänen, The determination of antimony and arsenic concentrations in fly ash by hydride generation inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* **2011**, *689*, 178-183.
36. M. Grotti, C. Lagomarsino and E. Magi, Simultaneous Determination of Arsenic, Selenium and Mercury in Foodstuffs by Chemical Vapour Generation Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy, *Ann. Chim. (Rome, Italy).* **2006**, *96*, 751-764.
37. P. Pohl, Recent advances in chemical vapour generation via reaction with sodium tetrahydroborate, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2004**, *23*, 21-27.
38. K. Boutakhrit, R. Claus, F. Bolle, J.M. Degroodt and L. Goeyens, Open digestion under reflux for the determination of total arsenic in seafood by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with hydride generation, *Talanta.* **2005**, *66*, 1042-1047.
39. E.J. dos Santos, A.B. Herrmann, M.A. Vieira, V.L.A. Frescura and A.J. Curtius, Evaluation of slurry preparation procedures for the determination of mercury by axial view inductively coupled plasma optical emission spectrometry using on-line cold vapor generation, *Spectrochim. Acta, Part B.* **2005**, *60*, 659-665.
40. M. Grotti, C. Lagomarsino and R. Frache, Multivare study in chemical vapor generation for simultaneous determination of arseni, antimony, bismuth, germanium, tin, selenium, tellurium and mercury by inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* **2005**, *20*, 1365-1373.

41. D.P. Torres, V.L.A. Frescura and A.J. Curtius, Simple mercury fractionation in biological samples by CV AAS following microwave-assisted acid digestion or TMAH pre-treatment, *Microchem. J.* **2009**, *93*, 206-210.
42. I. Serafimovski, I. Karadjova, T. Stafilov and J. Cvetković, Determination of inorganic and methylmercury in fish by cold vapor atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Microchem. J.* **2008**, *89*, 42-47.
43. C.J. Park and H. Do, Determination of inorganic and total mercury in marine biological samples by cold vapor generation inductively coupled plasma mass spectrometry after tetramethylammonium hydroxide digestion, *J. Anal. At. Spectrom.* **2008**, *23*, 997-1002.
44. P. Pohl and W. Zyrnicki, Study of chemical and spectral interferences in the simultaneous determination of As, Bi, Sb, Se and Sn by hydride generation inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* **2002**, *468*, 71-79.
45. E.J. dos Santos, A.B. Herrmann, S.K. de Caires, V.L.A. Frescura and A.J. Curtius, Determination of Se in biological samples by axial view inductively coupled plasma optical emission spectrometry after digestion with aqua regia and on-line chemical vapor generation, *Spectrochim. Acta, Part B.* **2009**, *64*, 549-553.
46. P. Pohl, J.I. Zapata, E. Voges, N. Bings H. and J.A.C. Broekaert, Comparison of the cold vapor generation using NaBH<sub>4</sub> and SnCl<sub>2</sub> as reducing agents and atomic emission spectrometry for the determination of Hg with a microstrip microwave induced argon plasma exiting from the wafer, *Microchim. Acta.* **2008**, *161*, 175-184.
47. A.R. Kumar and P. Riyazuddin, Chemical interferences in hydride-generation atomic spectrometry, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2010**, *29*, 166-176.
48. L. Wu, C. Zheng, Q. Ma, C. Hu and X. Hou, Chemical Vapor Generation for Determination of Mercury by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Appl. Spectrosc. Rev.* **2007**, *42*, 79-102.
49. J. Murphy, P. Jones and S.J. Hill, Determination of total mercury in environmental and biological samples by flow injection cold vapour atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta, Part B.* **1996**, *51*, 1867-1873.
50. D.L. Nunes, E.P. dos Santos, J.S. Barin, S.R. Mortari, V.L. Dressler and ÉM. de Moraes Flores, Interference of nitrite and nitrogen dioxide on mercury and selenium determination by chemical vapor generation atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta, Part B.* **2005**, *60*, 731-736.
51. S. Kagaya, T. Nishimura and K. Hasegawa, Elimination of sulfide interference by sodium hypochlorite solution in the cold vapor atomic absorption spectrometric determination of mercury using tin(II) reduction in alkaline medium, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1999**, *363*, 112-113.

52. X. Zhu and S.D. Alexandratos, Determination of trace levels of mercury in aqueous solutions by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry: Elimination of the 'memory effect', *Microchem. J.* **2007**, *86*, 37-41.
53. Y. Li, C. Chen, B. Li, J. Sun, J. Wang, Y. Gao, Y. Zhao and Z. Chai, Elimination efficiency of different reagents for the memory effect of mercury using ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* **2006**, *21*, 94-96.
54. C.F. Harrington, S.A. Merson and T.M. D' Silva, Method to reduce the memory effect of mercury in the analysis of fish tissue using inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* **2004**, *505*, 247-254.
55. C. Støving, H. Jensen, B. Gammelgaard and S. Stürup, Development and validation of an ICP-OES method for quantitation of elemental impurities in tablets according to coming US pharmacopeia chapters, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *84*, 209-214.
56. E. Stanisiz, J. Werner and H. Matusiewicz, Mercury species determination by task specific ionic liquid-based ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction combined with cold vapour generation atomic absorption spectrometry, *Microchem. J.* **2013**, *110*, 28-35.

Analysoidut raskasmetallipitoisuudet referenssimateriaalista DOLT-4 neljän rinnakkaisen näytteen keskiarvona

	Pitoisuudet (mg/kg) eri aallonpituuksilla						
	As 193,696	As 188,979	Cd 228,802	Cd 214,440	Cd 226,502	Cu 327,393	Cu 324,752
1. DOLT-4	8,759	7,247	24,619	27,376	27,329	38,292	37,780
2. DOLT-4	9,143	7,980	26,713	29,772	29,519	37,851	37,302
3. DOLT-4	8,744	6,695	24,752	27,502	27,441	37,948	37,462
4. DOLT-4	8,621	7,682	25,471	28,329	28,278	37,002	36,322
Keskiarvo	8,817	7,401	25,389	28,245	28,142	37,773	37,216
Hajonta	0,226	0,559	0,959	1,103	1,011	0,548	0,629
RSD%	2,56 %	7,55 %	3,78 %	3,90 %	3,59 %	1,45 %	1,69 %
Tulos	8,8 ± 0,3	7,4 ± 0,6	25 ± 1	28,2 ± 1,2	28,1 ± 1,1	37,8 ± 0,6	37,2 ± 0,7
Sertifiotu-pitoisuus	9,66	9,66	24,3	24,3	24,3	31,2	31,2
Saanto%	91 %	77 %	104 %	116 %	116 %	121 %	119 %
Toteamisraja	0,4	0,3	0,2	0,1	0,5	0,4	0,3
t	7,462	8,084	2,271	7,156	7,601	23,991	19,141
$t_{\text{kriit. n=4}}$ (P = 0,05)	3,18						

	Pitoisuudet (mg/kg) eri aallonpituuksilla							
	Ni 231,604	Ni 221,648	Ni 232,003	Zn 206,200	Zn 213,857	Fe 238,204	Fe 239,562	Fe 259,939
1. DOLT-4	3,970	3,886	1,274	141,408	136,742	1761,168	1778,629	1754,267
2. DOLT-4	3,776	3,671	1,126	144,696	139,536	1802,026	1820,487	1794,669
3. DOLT-4	3,016	2,966	0,626	144,296	139,524	1766,586	1787,009	1761,749
4. DOLT-4	3,159	3,017	0,648	144,952	139,932	1765,555	1787,301	1761,600
Keskiarvo	3,480	3,385	0,919	143,838	138,933	1773,834	1793,356	1768,071
Hajonta	0,464	0,464	0,331	1,642	1,473	18,941	18,529	18,073
RSD%	13,33 %	13,69 %	36,02 %	1,14 %	1,06 %	1,07 %	1,03 %	1,02 %
Tulos	3,5 ± 0,5	3,4 ± 0,5	0,9 ± 0,4	144 ± 2	139,4 ± 1,5	1770 ± 20	1790 ± 20	1770 ± 20
Sertifiotu-pitoisuus	0,97	0,97	0,97	116	116	1833	1833	1833
Saanto%	359 %	349 %	95 %	124 %	120 %	97 %	98 %	96 %
Toteamisraja	0,1	0,2	0,1	1,3	0,2	2	2	1
t	10,823	10,420	0,311	33,906	31,130	6,247	4,279	7,185
$t_{\text{kriit. n=4}}$ (P = 0,05)	3,18							

Analysoidut raskasmetallipitoisuudet referenssimateriaalista TORT-2 neljän rinnakkaisen näytteen keskiarvona

	Pitoisuudet (mg/kg) eri aallonpituuksilla						
	As 193,696	As 188,979	Cd 228,802	Cd 214,440	Cd 226,502	Cu 327,393	Cu 324,752
1. TORT-2	27,878	22,240	29,822	31,358	32,962	115,104	114,137
2. TORT-2	26,535	22,329	30,540	32,092	33,820	116,134	114,930
3. TORT-2	27,877	22,221	29,028	30,581	32,002	115,009	113,931
4. TORT-2	26,793	21,447	29,387	31,459	32,504	117,405	115,950
Keskiarvo	27,271	22,059	29,694	31,373	32,822	115,913	114,737
Hajonta	0,708	0,411	0,651	0,620	0,772	1,117	0,916
RSD%	2,60 %	1,86 %	2,19 %	1,98 %	2,35 %	0,96 %	0,80 %
Tulos	27,3 ± 0,8	22,1 ± 0,5	29,7 ± 0,7	31,4 ± 0,7	33,8 ± 0,8	116,0 ± 1,2	115 ± 1
Sertifiotu- pitoisuus	21,6	21,6	26,7	26,7	26,7	106	106
Saanto%	126 %	102 %	111 %	118 %	123 %	109 %	108 %
Toteamisraja	0,4	0,3	0,2	0,1	0,5	0,4	0,3
t	16,013	2,236	9,203	15,081	15,860	17,745	19,075
<b>t<sub>kriit. n=4</sub></b> <b>(P = 0,05)</b>	3,18						

	Pitoisuudet (mg/kg) eri aallonpituuksilla							
	Ni 231,604	Ni 221,648	Ni 232,003	Zn 206,200	Zn 213,857	Fe 238,204	Fe 239,562	Fe 259,939
1. TORT-2	4,255	4,341	4,704	213,948	208,549	121,331	122,930	120,930
2. TORT-2	4,727	4,764	5,093	214,780	209,763	116,446	118,251	116,249
3. TORT-2	4,591	4,616	4,918	219,017	214,096	123,282	125,524	123,677
4. TORT-2	5,806	5,994	6,190	219,298	213,735	127,814	129,999	127,912
Keskiarvo	4,845	4,929	5,226	216,761	211,536	122,218	124,176	122,192
Hajonta	0,671	0,731	0,662	2,790	2,796	4,710	4,912	4,893
RSD%	13,85 %	14,84 %	12,66 %	1,29 %	1,32 %	3,85 %	3,96 %	4,00 %
Tulos	4,8 ± 0,7	4,9 ± 0,8	5,2 ± 0,7	217 ± 3	212 ± 3	122 ± 5	124 ± 5	122 ± 5
Sertifiotu- pitoisuus	2,50	2,50	2,50	180	180	105	105	105
Saanto%	194 %	197 %	209 %	120 %	118 %	116 %	118 %	116 %
Toteamisraja	0,1	0,2	0,1	1,3	0,2	2	2	1
t	6,990	6,642	8,239	26,348	22,557	7,311	7,807	7,027
<b>t<sub>kriit. n=4</sub></b> <b>(P = 0,05)</b>	3,18							