

**Seleenin määrityksen virhelähteet ICP-MS-tekniikassa ja tulosten
oikeellisuuden varmentaminen rengastestillä**

Pro gradu -tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Kemian laitos

Uusiutuvat luonnonvarat
ja elinympäristön kemia

11.4.2018

Janne Järvinen

Tiivistelmä

Seleenin on ihmisille tärkeä hivenaine, mutta väli riittävän päivittäisannostuksen ja myrkyllisen annoksen välillä on suhteellisen kapea. Tämän vuoksi seleenin tarkka analytiikka on erittäin tärkeää. Tämän tutkielman kirjallisessa osassa kuvataan seleenin kemialliset ominaisuudet sekä terveysvaikutukset hivenaineena. Suomessa elintarvikkeiden riittävää ja turvallista seleenipitoisuutta säädellään seleenilannoituksin. Tutkielmassa tarkastellaan myös tämän lannoituksen vaikutusta elintarvikkeiden seleenipitoisuuksiin.

Elintarvikkeiden pienten seleenipitoisuuksien vuoksi ICP-MS-tekniikka (Induktiivisesti kytketty plasma -massaspektrometria) on käytetyin analyysimenetelmä seleenin mittaukseen. Sелеeni on kuitenkin suhteellisen haasteellinen alkuaine mitata ICP-MS-tekniikalla seleenin korkean ionisoitumisenergian ja useiden eri mittausta häiritsevien tekijöiden vuoksi. Tutkielman kirjallisessa osassa syvennyttään tarkemmin näiden mittaushäiriöiden teoriaan.

Tutkielman kokeellisessa osassa tarkastellaan seleenin mittausta häiritseviä tekijöitä. Mahdollista jäännöshiilen aiheuttamaa seleenin mittaushäiriötä tutkittiin lisäämällä mitattaviin liuoksiin metanolitausta. Taustan korjaaminen paransi seleenin mittaustuloksia, mutta muiden alkuaineiden mitattavuus samoista näyteliuoksista heikentyi. Sелеenin osalta saantoprosentit laskivat metanolia lisättäessä näytteestä riippuen 3–11 %-yksikköä. Myös gadoliniumin aiheuttamaa mittaushäiriötä tutkittiin, mutta elintarvikkeiden gadoliniumipitoisuuksien todettiin olevan liian pieniä aiheuttamaan häiriötä.

Tutkielman yhteydessä järjestettiin myös rengastesti, jossa laboratoriot mittasivat kuivatun lihanäytteen seleenipitoisuuden. Kaikkien laboratoriorien tulokset olivat z-arvoiltaan hyväksyttäviä. Tulosten yhteydessä laboratoriot ilmoittivat myös käytetyt mittausmenetelmät. Tuloksista voidaan havaita, että ICP-MS-tekniikassa käytetyllä törmäys- tai reaktiokaasulla ja sen virtausnopeudella on merkittävä vaikutus seleenin mittaustulokseen. Tutkielman aiheen kannalta on jatkossa mielekästä tutkia tarkemmin eri törmäys- ja reaktiokaasujen käyttöä sekä erisuuruisia kaasuvirtauksia seleenin mittauksen yhteydessä.

Esipuhe

Tämä pro gradu -tutkielma toteutettiin yhteistyössä Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran Kemian tutkimusyksikön sekä Jyväskylän yliopiston Kemian laitoksen kanssa. Työn aiheena oli seleenin määrittämiseen vaikuttavat virhelähteet ICP-MS-tekniikassa sekä rengastestin järjestäminen suomalaisille laboratorioille. Tutkielman kokeellinen osuus suoritettiin Eviran laboratoriossa syksyn 2017 aikana. Kirjallinen osuus työstä valmistui keväällä 2018. Työn ovat ohjanneet Eviralta tutkija Satu Mykkänen sekä erikoistutkija Eija-Riitta Venäläinen. Jyväskylän yliopistolta ohjaajana toimi dosentti Ari Väisänen.

Tutkielmassa käytetyt lähteet haettiin pääosin käyttäen Google Scholar-hakukonetta ja SciFinder-tietokantaa. Myös Evira toimitti osan käytetyistä lähteistä. Lähteitä haettiin esimerkiksi seuraavilla hakutermeillä: *ICP-MS interferences*, *Selenium determination by ICP-MS*, *effects of selenium fertilizers* ja *proficiency test sample preparation*.

Haluan kiittää tutkija Satu Mykkästä hyvistä ideoista ja ohjauksesta tämän työn aikana. Tutkielman aihe oli mielenkiintoinen ja mukaansatempaava. Tästä kiitos kuuluu erikoistutkija Eija-Riitta Venäläiselle sekä tutkimusyksikönjohtaja Janne Niemiselle. Haluan kiittää myös dosentti Ari Väisästä hyvistä kommentteista tutkielmaan liittyen sekä tutkijatohtori Siiri Perämäkeä tutkielmani tarkistamisesta. Lopuksi kiitos vielä koko Kemian tutkimusyksikön henkilökunnalle kaikesta avusta ja kannustuksesta, jota olen saanut tämän projektin aikana.

Helsingissä 11.4.2018

Janne Järvinen

Sisällys

Tiivistelmä.....	i
Esipuhe	ii
Sisällys	iii
Käytetyt lyhenteet ja vierasperäiset sanat	vi
I – Kirjallinen osa.....	1
1 Johdanto	2
2 Seleenin kemialliset ominaisuudet	3
3 Seleenin hivenaineena	6
4 Seleenin terveysvaikutukset	7
4.1 Seleenin puutostila.....	7
4.2 Seleenin toksisuus.....	8
4.3 Seleenin syöpää ehkäisevät vaikutukset.....	9
4.4 Seleenin raskasmetallien vastavaikuttajana.....	11
5 Seleenin saanti ruokavaliosta	12
5.1 Elintarvikkeiden sisältämä seleeni.....	14
5.2 Maaperän seleeni ja sen vaikutukset elintarvikkeiden seleenipitoisuuksiin.....	16
6 ICP-MS-tekniikka	21
6.1 Laitteiston toimintaperiaate	21
6.2 Näytteensyöttö.....	22
6.3 Induktiivisesti kytketty plasma.....	25
6.4 Väliosia ja ionioptiikka.....	28

6.5	Törmäys- ja reaktiokenno	30
6.6	Massa-analysaattorit	35
6.7	Detektorit	38
7	Seleenin mittausta häiritsevät tekijät ICP-MS:llä	39
7.1	Gadoliniumin aiheuttama häiriö	41
7.2	Jäännöshiilen vaikutus	44
II	Kokeellinen osa	47
8	Kokeellisen osan taustatiedot	48
9	Metanolin vaikutus seleenin mittaamisessa	49
9.1	Näytteiden esikäsittely	50
9.2	Näytteiden mittaus ja tulosten käsittely	50
9.3	Referenssinäytteiden tulosten tarkastelu	52
9.4	Rutiininäytteiden tulosten tarkastelu	59
9.5	Johtopäätökset	60
10	Gadoliniumin vaikutus seleenin määrittämiseen	61
11	Rengastutkimuksen järjestäminen	63
11.1	Johdanto	63
11.2	Näytteen valmistus	64
11.3	Rengastestin tavoitehajonnan σ_p määrittäminen	65
11.4	Homogeenisuuden määrittäminen	65
11.5	Stabiilisuuden määrittäminen	71
11.6	Konsensusarvon määrittäminen	74

11.7	Laboratorioiden z-arvojen arviointi	78
11.8	Laboratorioiden välisen varianssin määrittäminen	80
11.9	Tulosten tulkinta	82
12	Yhteenveto	85
13	Lähteet.....	87

Käytetyt lyhenteet ja vierasperäiset sanat

AAS	<i>Atomic absorption spectroscopy</i> – Atomiabsorptiospektrometria
AMC	<i>Analytical Methods Committee</i>
DCP	<i>Direct current plasma</i> – Tasavirtaplasma
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> – Euroopan elintarviketurvallisuusvirasto
GFAAS	<i>Graphite furnace atomic absorption spectroscopy</i> – Grafiittiuuni atomiabsorptiospektrometria
HG-ICP-OES	<i>Hydride generation ICP-OES</i> – Hydridin muodostus ICP-OES
ICP-OES	<i>Inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i> – Induktiivisesti kytketty plasma -optinen emissiospektrometria
ICP-MS	<i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i> – Induktiivisesti kytketty plasma -massaspektrometria
IE	<i>Ionization energy</i> – Ionisaatioenergia
KED	<i>Kinetic energy discrimination</i>
LA-ICP-MS	<i>Laser ablation ICP-MS</i> – Laser ablaatio ICP-MS
LOQ	<i>Limit of quantification</i> – Kvantitatiivinen määrittämiss raja
MAD	<i>Median absolute deviation</i> – Mediaanin absoluuttinen keskipoikkeama
MeOH	<i>Methanol</i> – Metanoli

MIP	<i>Microvawe-induced plasma</i> – Mikroaalloilla indusoitu plasma
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i> – Reaktiiviset typpiradikaalit
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> – Reaktiiviset happiradikaalit
RSD	<i>Releative standard deviation</i> – Suhteellinen standardipoikkeama
TOF	<i>Time-of-flight mass analyzer</i> – Lentoaika-analysaattori

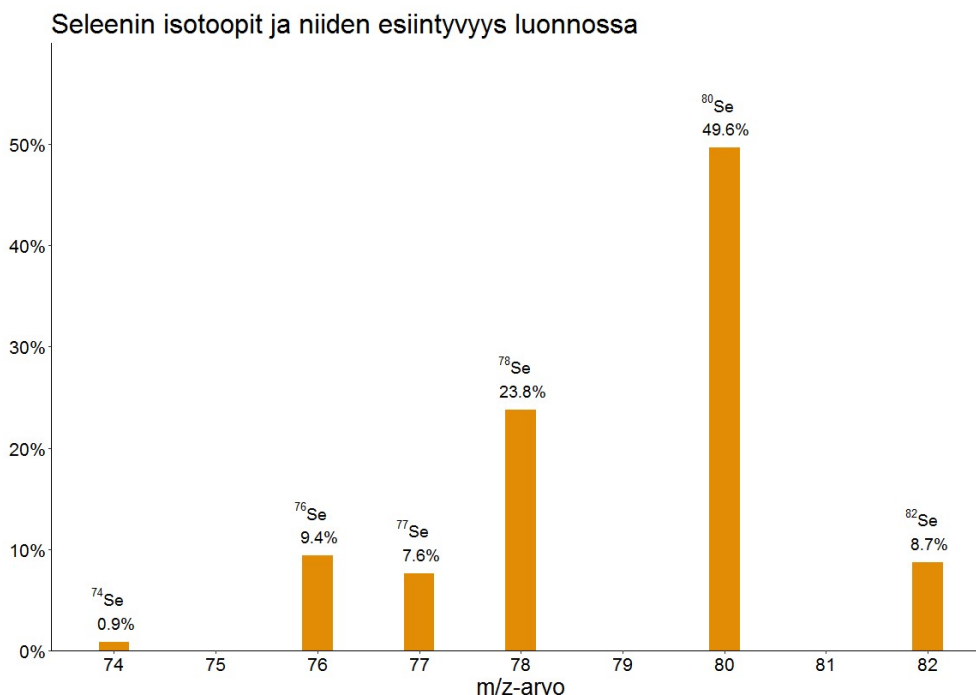
I – Kirjallinen osa

1 Johdanto

Seleeni on ihmisille ja eläimille erittäin tärkeä hivenaine. Seleeniä havaitaan elimistössä esimerkiksi selenokysteiniin muodossa, joka on seleeniä sisältävä aminohappo. Kyseinen aminohappo on merkittävässä roolissa useiden proteiinien toiminnassa. Näistä merkittävin on glutationiperoksidaasientsyymi, jolla on tärkeä rooli kehon hapetus-pelkistystilan säätelyssä. Myös kilpirauhashormonien säätelyyn vaikuttavissa entsyymeissä on selenokysteiniä. Vaikka seleeni on välttämätön hivenaine, se on kuitenkin suurina pitoisuuksina ihmiselle erittäin myrkyllinen. Muihin hivenaineisiin nähden riittävän päiväannostuksen ja liian suuren annostuksen välinen raja on seleenin kohdalla suhteellisen kapea. Liian suuri seleenin saanti voi johtaa sairauteen nimeltä selenoosi, joka voi oireilla esimerkiksi pahanhajuisena hengityksenä, ruuansulatuskanavan ongelmina sekä hiustenlähtönä. Vakavissa myrkytystapauksissa selenoosin oireet voivat johtaa esimerkiksi maksakirroosiin tai jopa kuolemaan.^{1,2}

Elintarviketurvallisuusvirasto Evira seuraa lannoitteiden, rehujen ja tiettyjen elintarvikkeiden seleenipitoisuuksia Suomessa. Turvallisen ja riittävän seleeninsaannin takaamiseksi seuranta on jatkuvatoimista. Vuotuista seleeniseurantaa on toteutettu Suomessa vuodesta 1984 lähtien.³ Koska seleenipitoisuudet ovat mitattavissa näytteissä erittäin pieniä, mittaukset suoritetaan tyypillisesti käyttäen ICP-MS-tekniikkaa (induktiivisesti kytketty plasma-massaspektroskopia).

Seleeni on kuitenkin suhteellisen haasteellinen alkuaine mitata ICP-MS-tekniikalla. Seleenillä on korkea ionisoitumisenergia, minkä vuoksi vain murto-osa plasmaan päätyneestä seleenistä ionisoituu ja päätyy lopulta detektorille. Tämän lisäksi luonnossa esiintyvä seleeni on jakautunut useaan stabiiliin isotooppiin. Seleenin isotoopit ja niiden esiintyvyys prosentteina on esitetty kuvassa 1. Koska ICP-MS-laitteistolla mitataan tyypillisesti vain yhtä isotooppia kerrallaan, herkkyys seleenin mittaukseen vähenee luonnossa esiintyvän seleenin jakaantuessa useaan isotooppiin. Näiden tekijöiden vuoksi seleenin määritysrajat voivat jäädä suhteellisen korkeiksi. Lisäksi seleenin isotooppeja häiritsevät useat spektraaliset häiriöt, joita tyypillisesti korjataan käyttämällä törmäys/reaktiokennoa ICP-MS-tekniikassa.²



Kuva 1. Selleenin stabiilit isotoopit ja niiden prosentuaaliset osuudet luonnossa.⁴

Finas-akkreditoituna laboratoriona Evira osallistuu säännöllisesti vertailututkimuksiin, joilla mitataan laboratorioden pätevyyttä. Kun tarkastellaan vertailututkimuksia, joissa mitattavana analyytinä on ollut seleeni, pätevyyttä kuvaavissa z-arvoissa on ollut havaittavissa positiivinen trendi. Kaikki z-arvot ovat olleet kuitenkin hyväksyttäviä. Tämän tutkielman tarkoituksena on perehtyä seleenin merkitykseen hivenaineena sekä sen mittaamiseen liittyviin virhelähteisiin ICP-MS-tekniikassa. Tarkastelun pohjalta voidaan päätellä, selittääkö jokin virhelähteistä positiivisen trendin vertailututkimuksissa.

2 Selleenin kemialliset ominaisuudet

Vuonna 1817 eli 200 vuotta sitten ruotsalainen kemisti Jöns Jacob Berzelius löysi uuden alkuaineen nimeltä seleeni. Uusi alkuaine muistutti ominaisuuksiltaan vastikään löydettyä telluuria, joka sai nimensä maan latinankielisen sanan *tellus* mukaan. Saman periaatteen mukaisesti nimettiin myös seleeni, joka sai nimensä kuuta tarkoittavan kreikkalaisen sanan *selene* mukaan.⁵

Seleeni on 66. yleisin alkuaine maankuoressa, joten voidaan sanoa seleenin olevan suhteellisen harvinainen alkuaine. Keskimääräinen maaperän seleenipitoisuus on 0,05 mg/kg. Samoilla pitoisuusalueilla ovat myös esimerkiksi hopea (Ag) ja elohopea (Hg), joita molempia on maankuoressa keskimäärin 0,08 mg/kg. Koska seleeni on alkuaineiden jaksollisessa

järjestelmässä samassa ryhmässä rikin (S) kanssa, se esiintyy tyypillisimmin maankuoren mineraaleissa, esimerkiksi sulfideissa, joissa seleeni on korvannut rikkiatomeja.⁵ Alkuainemuotoista seleeniä ei maankuoresta juuri löydy. Muita seleeniä sisältäviä mineraaleja ovat esimerkiksi hopeaa (Ag), kuparia (Cu), lyijyä (Pb) ja nikkeliä (Ni) sisältävät mineraalit. Myös seleenin oksideja havaitaan maankuoressa. Ne ovat tyypillisesti väriltään valkoisia tai kirkkaita.⁶

Lähes kaikki alkuainemuotoinen seleeni tuotetaan kuparituotannon sivutuotteena. Aiemmin seleeniä tuotettiin kuparisulfaattimalmin tuotannon ohella, mutta nykyään seleeniä tuotetaan kuparin elektrolyyttisen puhdistuksen yhteydessä muodostuvasta anodin pohjasakasta. Seleeni eristetään kuumentamalla sakkaa natriumkarbonaatin ja rikkihapon kanssa tai sulattamalla sakkaa yhdessä natriumkarbonaatin ja kaliumnitraatin kanssa.⁷

Seleenille tunnetaan useita kiderakenteeltaan erilaisia allotrooppisia muotoja. Karkeasti seleenin allotrooppiset muodot voidaan jakaa punaiseen, harmaaseen ja mustaan seleeniin. Punainen seleeni koostuu Se_8 -renkaista, harmaa seleeni omaa korkeamman kidejärjestelmän ja amorfinen musta seleeni koostuu epäsäännöllisenkokoisista valtavista seleenirenkaista.⁵

Rikin tavoin myös seleeni muodostaa kahdeksasta atomista koostuvia Se_8 -renkaita. Kyseiset renkaat voivat pakkautua kolmella eri tavalla (α , β ja γ) muodostaen punaista seleeniä, jonka kiderakenne on monokliininen. Erot eri muotojen välillä aiheutuvat ainoastaan Se_8 -molekyylien välisistä pakkautumiseroista. Tiivein pakkautuminen havaitaan α -rakenteisessa seleenissä ja löyhin γ -rakenteessa. Lisäksi muita seleenin rengasrakenteita on havaittu. Seleenirengas voi vaihtoehtoisesti koostua kuudesta tai seitsemästä seleeniatomista. On myös mahdollista, että rengasmolekyyli ei koostu pelkästään seleenistä, vaan rengasrakenne voi olla myös heterosyklinen, jolloin rengasrakenteessa on yksi tai kaksi rikkiatomia.⁵

Stabiilein seleenin muoto on kuitenkin metallinen harmaa seleeni. Sen kidejärjestelmä on heksagoninen, jossa seleeniatomit muodostavat haarautumattomia helikaalisia ketjuja. Nämä ketjut voivat myös esiintyä epäjärjestyneinä, jolloin kyseessä on väriltään punainen amorfinen seleeni (kuva 2). Harmaa seleeni on termodynaamisesti kaikkein vakain seleenin muoto. Sitä voidaan valmistaa hitaasti lämmittämällä muita seleenin allotrooppisia muotoja. Myös sulan seleenin hitaasti jäädyttäminen tuottaa harmaata seleeniä. Koska harmaalla seleenillä on säännöllinen kiderakenne, se myös johtaa hyvin sähköä. Harmaa seleeni on myös hyvä valonjohdin eli sen sähkönjohtavuus kasvaa, kun rakenteeseen kohdistetaan sähkömagneettista säteilyä. Tämän vuoksi harmaata seleeniä voidaan käyttää esimerkiksi valokennoissa.⁵

Musta seleeni (kuva 2) on seleenin kaupallinen muoto. Se on tyypiltään lasimaista ja koostuu epäsäännöllisen kokoisista seleenirenkaista. Renkaiden koko voi olla jopa 1000 seleeniatomia ja ne ovat järjestäytyneet täysin epäsäännöllisesti. Musta seleeni ei amorfisen luonteen vuoksi sula kokonaisuudessaan, mutta 50 °C lämpötilassa se pehmenee ja 180 °C lämpötilassa se muuttuu nopeasti kidehilalliseksi harmaaksi seleeniksi.⁵



Kuva 2. Seleenin allotropisia muotoja. Vasemmalla musta amorfisen seleeni rakeina. Oikealla punainen Se_8 -renkaista koostuva seleeni. Kuva on mukailtu lähteestä.⁸

Seleenillä esiintyy luonnossa kuusi stabiilia isotooppia. Näiden isotooppien tunteminen on alkuaineiden massaan perustuvan ICP-MS-analytiikan osalta kriittistä tietoa. Yleisin seleenin isotooppi on massaluvultaan 80. Noin puolet luonnossa esiintyvistä seleenistä on tätä isotooppia. Toiseksi yleisin seleenin stabiileista isotoopeista on massaluvultaan 78, jonka osuus luonnossa esiintyvistä seleenistä on noin neljännes. Muut stabiilit isotoopit kattavat lopun osuuden seleenin luonnossa esiintyvistä isotoopeista.⁴ Seleenillä esiintyy myös lukuisia radioaktiivisia isotooppeja. Näistä kuitenkin merkittävin on ^{79}Se , jonka tärkein käyttötarkoitus on ydinjätteen turvallisuuden arvioinnissa. Käytettävyys perustuu kyseisen isotoopin pitkään puoliintumisaikaan, joka on nykyisen tiedon mukaan yli 300 000 vuotta.^{9,10}

3 Seleeni hivenaineena

Seleeni on ihmiselle tärkeä hivenaine, sillä ihmisen elimistössä on kymmeniä eri proteiineja ja entsyymejä, jotka tarvitsevat seleeniä toimiakseen.¹¹ Esimerkiksi glutationiperoksidaasi on ihmisen metaboliassa esiintyvä entsyymi, jonka aktiivinen kohta perustuu seleeniatomiin. Sen tehtävä ihmisen elimistössä on pelkistää soluille haitallinen vetyperoksidi takaisin vedeksi. Glutationiperoksidaasista on olemassa useita eri rakenteita. Ihmisellä eri rakennemuotoja on havaittu seitsemän erilaista, joista viidessä seleeni on oleellinen osa rakennetta. Kyseisten entsyymien aktiivisessa keskuksessa on aminohappona seleeniä sisältävä selenokysteini, joka on rakenteeltaan kuten aminohappo kysteini, mutta kysteinin rikkiatomi on korvautunut seleeniatomilla.¹²

Glutationiperoksidaasin tavoin seleeni on tärkeässä roolissa myös muun muassa kilpirauhashormonien sekä C-vitamiinin hapetusasteen säätelyssä. Kilpirauhashormonien metabolia on erittäin riippuvainen selenoproteiinien läsnäolosta kilpirauhasessa. Glutationiperoksidaasi sekä tioredoksiinireduktaasi ylläpitävät metabolian kannalta oleelliset olosuhteet elimistössä eli ne hajottavat kilpirauhaselle haitalliset reaktiiviset happiradikaalit, joita muodostuu kilpirauhasrakkuloiden hormonisynteesin sivutuotteena.^{3,13}

Radikaalilla tarkoitetaan molekyyliä, jolla on vapaita elektroneita. Nämä tyypillisesti pienet molekyylit ovat erittäin reaktiivisia ja liian suurina pitoisuuksina saavat aikaan keholle haitallisia reaktioita. Radikaalit muodostuvat tyypillisesti happea, typpeä tai rikkiä sisältävistä molekyyleistä. Happea sisältävät radikaalit kuuluvat ryhmään ROS (*Reactive oxygen species*, reaktiiviset happiradikaalit) ja typpeä sisältävät radikaalit kuuluvat puolestaan ryhmään RNS (*Reactive nitrogen species*, reaktiiviset typpiradikaalit). Elimistössä muodostuvia happiradikaaleja ovat esimerkiksi superoksidianioni ($O_2^{\cdot-}$), perhydroksyyliiradikaali (HO_2^{\cdot}) sekä hydroksyyliiradikaali ($^{\cdot}OH$). RNS-yhdisteitä muodostuu puolestaan esimerkiksi typpioksidin ja superoksidianionin välisessä reaktiossa, jolloin muodostuu peroksinitraattia ($ONOO^{\cdot}$). ROS-ryhmään kuuluu happiradikaalien lisäksi myös muita elimistölle haitallisia happiyhdisteitä kuten esimerkiksi vetyperoksidi (H_2O_2) sekä hypokloorihapoke ($HClO$).¹⁴

Antioksidantilla tarkoitetaan yhdistettä, joka nimensä mukaisesti estää elimistössä toisia yhdisteitä hapettumasta. Antioksidanttien toiminta perustuu siihen, että ne toimivat pelkistiminä eli antioksidantit hapettuvat itse muiden yhdisteiden sijaan. Ihmisen normaaliin metaboliaan kuuluu vapaiden radikaalien muodostuminen, jotka liian suurina määrinä häiritsevät kehon toimintaa ja vahingoittavat soluja. Antioksidantit pelkistävät nämä radikaalit pysäyttäen ketjumaisen reaktion, jossa radikaalin vapaa elektroni siirtyy molekyyliltä toiselle.¹⁴

ROS- ja RNS- yhdisteillä on haitallisuudestaan huolimatta erittäin tärkeitä rooleja elimistössä. Ne säätelevät solujen välistä viestintää sekä kontrolloivat solujen apoptoosia eli hallittua solukuolemaa. Lisäksi ne vaikuttavat geenien luentaan ja ionien kuljetukseen soluissa. Liian korkeat radikaalipitoisuudet ovat kuitenkin haitaksi soluille, sillä vapaat radikaalit reagoivat myös proteiinien, DNA:n, RNA:n ja erilaisten rasvojen kanssa. Radikaalit reagoivat esimerkiksi proteiinien aminohappojen sivuketjujen, nukleiinihappojen emäsosien sekä tyydyttymättömien rasvahappojen kanssa pilkkoen hiiliatomien välisiä kaksoissidoksia yksöissidoksiksi.¹⁴

Oksidatiivisella stressillä tarkoitetaan tilaa kehossa, jossa tasapaino hapettavien olosuhteiden ja antioksidanttien välillä on kääntynyt hapettavien olosuhteiden puolelle. Tämä voi johtua kehon normaalia suuremmasta määrästä vapaita radikaaleja tai siitä, että kehon oma puolustus hapettavia tekijöitä vastaan, eli antioksidanttinen järjestelmä, on heikentynyt. Antioksidanttinen järjestelmä vähentää ROS- ja RSN-yhdisteiden hapettavaa vaikutusta. Sen toiminta perustuu entsyymaattisiin antioksidantteihin, joissa esimerkiksi seleeni on tärkeässä roolissa ja ei-entsyymaattisiin molekyyliin (esimerkiksi askorbiinihappo, C-vitamiini). Oksidatiivisen stressin on todettu vaikuttavan monen sairauden etenemiseen, kuten syövän, neurologisten häiriöiden, diabeteksen tai astman kehittymiseen.¹⁵

4 Seleenin terveysvaikutukset

4.1 Seleenin puutostila

Yleisin seleenin puutokseen yhdistettävä tauti on Keshanin tauti, joka on sydänlihaksen rappeumaa aiheuttava sairaus. Ensimmäiset havainnot taudista ovat peräisin 1930-luvun Kiinasta Keshanin alueelta, jonka mukaan tauti sai myös nimensä. Tuolloin tautia havaittiin erityisesti lapsilla ja nuorilla naisilla.¹⁶ Kyseisellä alueella maaperä on erittäin seleeniköyhä, mikä selittää taudin yleisyyden.¹⁷ Alueilla, joissa maaperässä oli riittävästi seleeniä, tautia ei puolestaan havaittu lainkaan. Kyseisen taudin puhkeaminen ei kuitenkaan aiheudu ainoastaan seleeninpuutoksesta vaan sen puhkeamiseen vaikuttaa myös virustartunta, jonka aiheuttaa coxsackievirus. Taudin puhkeamista ei voitu selittää ainoastaan seleenin puutostilalla, sillä sairastapausten määrä vaihteli vuodenaikojen mukaan. Tästä johtuen taudin syytä tutkittiin tarkemmin ja sairastuneiden veri- ja kudoksetilanteiden perusteella havaittiin taudin puhkeamiseen vaikuttavan myös coxsackievirus.¹⁶

Taudin aiheuttama sydänlihaksen rappeuma johtaa usein sydämen toimintahäiriöihin ja rytmihäiriöihin, jotka puolestaan voivat johtaa sydänkohtaukseen. Koska oireet olivat

tyypillisesti erittäin vakavia, ei tautiin menehtyminen ollut poikkeuksellista.^{16,18} Selenin saannin lisäravinteena havaittiin estävän taudin kehittymisen, joten 1970-luvun aikana Keshan taudin esiintymät Kiinassa laskivat huomattavasti.¹⁹

Selenin puutos voidaan yhdistää myös Kashin-Beck-tautiin sekä miesten hedelmättömyyteen. Kashin-Beck-tauti on nivelrustotauti, jossa ilmenee kasvulevyjen puutteellista kasvua, nivelten epämuodostumia ja nivelruston tuhoutumista. Kasvulevyjen puutteellisuus aiheuttaa tautia sairastaville lyhytkasvuisuutta.^{20,21} Seleninpuutoksen epäillään myös pahentavan jodinpuutoksen oireita. Jodinpuutoksen on todettu lisäävän vastasyntyneiden riskiä sairastua kretinismiin. Kyseinen sairaus aiheutuu jodin puutteen aiheuttamasta kilpirauhashormonin puutteesta, joka puolestaan aiheuttaa lyhytkasvuisuutta sekä älyllisiä kehityshäiriöitä.^{20,22} On myös arvioitu, että selenin puutostila olisi yhteydessä sydän- ja verisuonitauteihin. Esimerkiksi Yhdysvalloissa on havaittu sydän- ja verisuonitauteja seleniköyhillä alueilla enemmän kuin alueilla, joissa seleniä on maaperässä runsaasti.¹⁸ Myös Suomessa on tutkittu vastaavia ilmiöitä. Tutkittaessa kuolemaan johtaneiden sydänkohtausten ja seleninsaannin välistä yhteyttä, havaittiin alhaisella seleninsaannilla ja kuolemaan johtaneilla sydänkohtauksilla olevan yhteys.²³

4.2 Selenin toksisuus

Selenin toksisuus ihmisen elimistössä perustuu seleniitin (SeO_3^{2-}) ja selenidioksidin (SeO_2) reaktioon elimistössä olevan glutationiantioksidantin ja muiden vastaavien tiolien kanssa, jolloin reaktiotuotteena muodostuu selenotrisulfideja. Nämä yhdisteet edelleen reagoivat muodostaen superoksiedeita (O_2^-) ja vetyperoksidia (H_2O_2), jotka ovat elimistölle haitallisia. Selenotrisulfidit ovat suhteellisen stabiileja yhdisteitä, mutta voivat reagoida haitallisiksi yhdisteiksi esimerkiksi selenivedyn (H_2Se) aikaansaamana. Tämän lisäksi myös diselenidit, kuten selenokystiini ja selenokysteamiini, voivat pelkistyä glutationin ja tiolien vaikutuksesta selenoleiksi (RSeH), jotka katalysoivat superoksidien ja vetyperoksidin synteesiä.²⁴

Oireita selenin myrkyllisyydestä on havaittu jo kauan ennen selenin tunnistamista alkuaineeksi. 1200-luvun Kiinassa havaittiin myrkyllisiä kasveja, joiden kerrottiin aiheuttavan kyseisiä kasveja syöneille hevosille kavioiden irtoamista. Kasvin tarkkaa lajiketta ei koskaan tunnistettu, mutta 1930-luvulla saatiin varmuus siitä, että kyseisiin kasveihin oli luonnostaan kerääntynyt toksisia määriä seleniä.^{17,24,25} Samoihin aikoihin kirjallisuudessa raportoitiin taudista, jossa hevosilla havaittiin muun muassa irronneita ja nekroottisia kaviota, karvojen irtoamista sekä kasvuhäiriöitä. Taudin epäiltiin johtuvan myrkyllisistä kasveista, joita eläimet olivat syöneet. Kyseinen tauti luokiteltiin myöhemmin selenoosiksi eli akuutiksi

seleenimyrkytykseksi.^{25,26} Kasvien erittäin korkea seleenipitoisuus johtui kasveihin kertyneestä seleeniä sisältävistä aminohapoista kuten metyylliselenokysteiniinistä. Seleenipitoisuus kyseisissä kasveissa oli 20–50 mg/kg.²⁶

Nykyään seleenin myrkyllisyys on hyvin tiedossa ja seleenin liiallista saantia osataan välttää. Monipuolinen ruokavalio on riittävä turvaamaan ihmisille sopiva seleenin saanti, mutta esimerkiksi seleeniä sisältävien lisäravinteiden liiallinen käyttö saattaa aiheuttaa ihmisille myrkytysoireita. Seleenimyrkytys voi ilmetä sekä kroonisen että akuutin ylimääräisen seleenin saannin yhteydessä. Tyypillisimpiä oireita ovat esimerkiksi pahoinvointi, oksentelu, kynsien värimuutokset, kynsien hauraus ja irtoaminen, yleinen väsymys, ärtyisyys ja pahanhajuinen hengitys. Seleenimyrkytyksestä kärsivän henkilön hengitystä on usein kuvailtu voimakkaan valkosipulin tuoksuiseksi.²⁷

4.3 Seleenin syöpää ehkäisevät vaikutukset

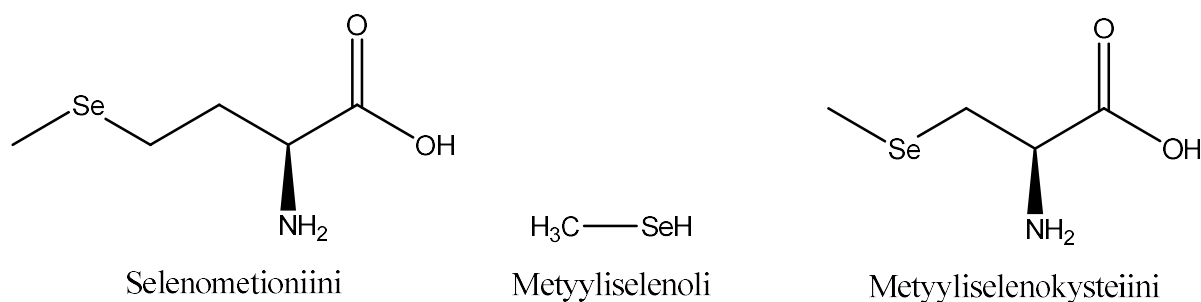
Seleenin vaikutuksesta syövän kehittymiseen on viime aikoina tehty lukuisia tutkimuksia. Monet tutkimuksista osoittavat sekä orgaanisella seleenillä että epäorgaanisella seleenillä olevan merkittävä vaikutus syövän kehittymisen estämiselle, sillä tietyt kehon tuottamat selenoproteiinit vaikuttavat voimakkaasti syövän etenemiseen. Seleeninsaannilla on todettu olevan vaikutusta esimerkiksi rinta-, eturauhas- ja paksusuolensyövän aiheuttamien etäpesäkkeiden kehittämisessä. Selenoproteiinien on havaittu vähentävän syöpäsolujen liikkuvuutta elimistössä, minkä ansiosta etäpesäkkeiden esiintyvyys vähenee.²⁸ Aihetta on tutkittu myös eläinkokeella, jossa eläimille syötettiin seleenipitoista ravintoa. Tutkittaessa eläimillä esiintyneiden syöpien levinneisyyttä havaittiin, että seleenipitoista ravintoa syöneillä eläimillä etäpesäkkeiden esiintyvyys oli alhaisempi verrattuna kontrolliryhmään.²⁹ Vaikka seleenin vaikutuksesta syövän syntyyn ja etenemiseen on paljon tutkimustietoa, tutkimustulokset ovat kuitenkin ristiriitaisia.²⁸

Seleenin ja syövän välistä yhteyttä on tutkittu suhteellisen vähän aikaa, vaikka tutkimuksia onkin tehty määrällisesti paljon. 1990-luvulla Clark *et al.*³⁰ tutkivat ravintolisäseleenin vaikutusta syöpien ilmentymisen määrään. Tutkimukseen osallistui noin 1300 ihmistä. Näistä ihmisistä osalle syötettiin 4,5 vuoden ajan plasebovalmistetta, kun taas osalle seleeniravintolisää, jossa päivittäinen seleeniannos oli 200 µg. Seleenia saaneiden henkilöiden syöpien esiintyvyydessä havaittiin 39 % lasku. Myös syöpään kuolleisuus oli seleeniä saaneessa ryhmässä 48 % alhaisempi. Esiintyvyyden ja kuolleisuuden alenema oli voimakkain juuri eturauhas- ja paksusuolen syövissä.³¹

Edellä mainitun tutkimuksen sekä monien muiden tehtyjen tutkimusten pohjalta Yhdysvaltojen kansallinen syöpäinstituutio (*National cancer institute*) käynnisti vuonna 2001 tutkimuksen³², jossa tutkittiin lisäravinneseleenin sekä E-vitamiinin vaikutusta eturauhassyövän esiintymiseen. Kuten edellä mainitussa tutkimuksessa, myös tässä potilaat saivat joko 200 µg seleeniä päivässä tai plasebovalmistetta. Lisäravinteena käytettiin L-selenometioniiniä. Vastaavasti E-vitamiinia saaneet saivat 400 mg α-tokoferolia.^{31,33} Suomen ravintosuositusten mukaan suurimmat turvalliset seleenin ja E-vitamiinin päivittäissaannit ovat 300 µg seleeniä sekä 300 mg E-vitamiinia vuorokaudessa.¹¹

Kyseinen tutkimus oli muihin vastaaviin tutkimuksiin verrattuna huomattavan laaja. Yli 100 miljoonaa dollaria maksaneessa tutkimuksessa oli mukana yli 32 000 miestä, jotka olivat kaikki yli 55 vuotiaita. Tutkimuksen oli määrä kestää 12 vuoden ajan.^{31,32} Tutkimus kuitenkin lopetettiin 3 vuotta ennen suunniteltua, sillä sen hetkisten tulosten perusteella todettiin, ettei lisäravinteena saadulla seleenillä ole vaikutusta eturauhassyövän ilmenemiseen. Lisäksi havaittiin, että lisäravinteena saatu E-vitamiini itseasiassa lisää riskiä sairastua eturauhassyöpään tietyillä potilailla. Riski oli suurin potilailla, joiden seleenitasot olivat matalalla, mutta E-vitamiinin saanti tutkimuksen myötä korkeammalla tasolla. Myös potilailla, joilla veren seleenipitoisuus oli korkealla ennen tutkimuksen alkua, havaittiin kohonnut riski sairastua eturauhassyöpään lisäravinneseleenin myötä.³³

Yksi tutkituimmista syöpää ehkäisevistä seleeniyhdisteistä on selenometioniini. Sen mahdollisen syöpää ehkäisevän vaikutuksen uskotaan perustuvan selenometionin hajoamistuotteeseen eli metyyლისelenoliin. Kyseinen yhdiste on kuitenkin suhteellisen reaktiivinen, minkä vuoksi yhdisteen suoranaista vaikutusta syövän kehittymiselle on vaikea tutkia. On kuitenkin esitetty, että metyyლისelenoli olisi kriittinen osa estämään syövän kehittymiseen liittyvää metaboliaa. Selenometioniinin lisäksi toinen seleeniä sisältävä aminohappo, metyyლისelenokysteiini, voidaan yhdistää syöpää ehkäiseväksi aineeksi. Metyyლისelokysteiinin on osoitettu muuntuvan nopeammin ja suuremmin metyyლისelenoliksi. Kuvassa 3 on esitetty näiden yhdisteiden rakennekaavat.³¹



Kuva 3. Selenometioniinin, metyyliselenolin ja metyyliselenokysteinin rakennekaavat. Kaikki kuvassa esiintyvät yhdisteet ovat keskeisiä seleeniyhdisteitä, kun tarkastellaan syövän kehittymistä ehkäisevää mekanismia.

4.4 Seleenin raskasmetallien vastavaikuttajana

Seleenillä on havaittu olevan myös vaikutusta raskasmetallien toksisuuden vähenemiseen. Reagoidessaan metalli-ionien kanssa seleeni muodostaa suhteellisen stabiileja yhdisteitä. Esimerkiksi hopean, kadmiumin ja elohopean toksisuuden on todettu olevan pienempi, kun seleeninsaanti on normaalilla tasolla verrattuna tilanteeseen, jossa seleeniä ei saada riittävästi tai ei ollenkaan. Raskasmetallit muodostavat seleenin kanssa stabiilin yhdisteen, joka voi sitoutua selektiivisesti tiettyihin veren proteiineihin. Sitoutuminen muuttaa raskasmetallien biologista kulkureittiä ja näin vähentää raskasmetallien toksisuutta. Hopean ja kadmiumin osalta reaktiomekanismi seleenin kanssa ei ole kuitenkaan täysin selvillä. Elohopean osalta mekanismi puolestaan tunnetaan paremmin.³¹

Seleeniyhdisteiden kulkiessa verenkierrossa ne sitoutuvat selektiivisesti veren punasoluihin ja pelkistyvät glutationiantioksidantin vaikutuksesta.³¹ Muodostunut seleeniyhdiste on yksinkertainen seleeniyhdiste eli seleenivety (H_2Se). Kyseinen yhdiste on erittäin reaktiivinen, jonka ansiosta se reagoi esimerkiksi elohopeaionien kanssa muodostaen stabiilia elohopeaselenidiä ($HgSe$)_n. Tämä yhdiste on metabolisesti inertti, minkä vuoksi elohopeaa ei pääse kertymään kudoksiin. Tyypillisesti raskasmetallit kertyvät maksaan ja munuaisiin. Muodostunut Hg-Se-kompleksi sitoutuu veri-plasmassa olevaan selenoproteiini P:hen. Tämä sitoutuminen muuttaa elohopean biologista kulkeutumista elimistössä vähentäen elohopean toksisia ominaisuuksia.^{34,35}

Edellä mainittu mekanismi ei ota kantaa siihen, että muodostuva seleenivety on suhteellisen reaktiivinen. Tästä johtuen onkin kyseenalaista, miksi seleenivety reagoisi vain raskasmetalli-ionien kanssa. Veriplasmassa on läsnä valtava määrä myös muita yhdisteitä, jotka nopeasti reagoivat seleenivedyn kanssa. Seleenin vaikutus raskasmetallien toksisuuden vähenemiseen

voidaan kuitenkin selvästi osoittaa. Nuttal ja Allen esittävät artikkelissaan³⁶ vaihtoehtoista reaktiomekanismia seleenin aiheuttamaan elohopean toksisuuden vähenemiseen. Veriplasma sisältää runsaasti albumiinia, joka on erilaisia yhdisteitä kuljettava proteiini. Albumiini sisältää yhteensä 17 disulfididosta, jotka sijaitsevat proteiinissa olevien rikkiptoisten aminohappojen välillä. Nämä disulfididokset voivat myös reagoida seleenivedyn kanssa, jolloin disulfididokset katkeaa ja proteiiniin muodostuu vapaa tiolirakenne. Tämä reaktiivinen tioliryhmä voi kelatoida raskasmetalli-ioneita kuten elohopeaa. Muodostunut kelaatti on myös suhteellisen stabiili rakenne, minkä vuoksi raskasmetallit eivät pääse kulkeutumaan elimiin.^{36,37}

Seleenin vaikutus elohopean kertymiseen havaitaan selvästi myös luonnossa. Chen *et al.* tutkivat artikkelissaan³⁸ luonnossa olevan seleenin määrän vaikutusta kalojen elohopeapitoisuuteen. Tutkitut kalat kuuluivat lajiltaan kuha- ja ahvenkaloihin. Kaloja tutkittiin yhteensä yhdeksästä eri järvestä ja niistä määritettiin seleeni- ja elohopeapitoisuus. Järvien läheisyydessä sijaitti suuri metallisulattamo. Tulosten perusteella havaittiin kalojen seleenipitoisuuden olevan suurempi mitä lähempää metallisulattamo kalanäytteet olivat otettu. Vastaavasti kalojen seleenipitoisuuden kasvaessa kalojen elohopeapitoisuuden havaittiin laskevan eksponentiaalisesti. Tulosten perusteella voidaan todistaa seleenin ehkäisevä vaikutus elohopean kertymisestä eliöihin.³⁸ Vastaavaa tutkimusta on tehty myös suolaisen veden kaloille. Burger ja Gochfeld tutkivat artikkelissaan³⁹ elohopean kertymistä merikaloihin. Seleenin ja elohopean korrelaation havaittiin olevan voimakkaan negatiivinen suurimmalle osalle otetuista näytteistä.

5 Seleenin saanti ruokavaliosta

Muihin ravintoaineisiin verrattuna seleeni on hieman poikkeuksellinen. Seleeni on ihmisille erittäin tärkeä ravintoaine, mutta liian suurina pitoisuuksina se on myrkyllinen. Väli välttämättömän päivittäisannoksen ja myrkyllisen annoksen välillä on erittäin kapea. Seleenillä suositeltava päiväannostus aikuisille on nykyisten suomalaisten ravitsemussuositusten mukaan miehille 60 µg/vrk ja naisille 50 µg/vrk. Suurin turvallinen päivittäisannos aikuisille on 300 µg/vrk. Kyseiset suositukset on päivitetty vuonna 2014. Tuolloin seleenin saantisuosituksia nostettiin 10 µg/vrk, sillä elimistön seleenitaseesta kertova merkkiaine vaihdettiin toiseen. Uuden merkkiaineen myötä oli tarpeellista nostaa suositeltua seleenin saantia.¹¹ Raskaana oleville ja imettäville naisille seleenin saantisuositukset ovat hieman korkeammat. Näin turvataan riittävä seleenin saanti äidille ja lapselle, sillä riittämätön seleenin saanti voi vaikuttaa negatiivisesti lapsen kehittymiseen.^{11,40} Suositeltava seleenin saanti raskauden ja imetyksen

aikaan on suomalaisten ravintosuositusten mukaan 60 µg/vrk. Nykyisen tiedon mukaan tämän hetkinen ihmisten seleenin saanti on riittävällä tasolla Suomessa.¹¹

Seleeninsaantisuositukset ovat vastaavia myös muualla maailmassa. Esimerkiksi Yhdysvalloissa aikuisille ihmisille suositeltu seleeninsaanti on 55 µg/vrk. Lisäksi raskaana oleville ihmisille suositellaan 60 µg/vrk ja imettäville 70 µg/vrk. Lapsille ja nuorille seleenin saantisuositukset muuttuvat iän mukaan taulukon 1 mukaisesti.²⁰

Taulukko 1. Amerikan terveystieteiden päivittäiset seleeninsaantisuositukset eri ikäryhmille. Taulukko mukailtu lähteestä.²⁰

Ikä	Miehet	Naiset	Raskaana olevat	Imettävät
0–6 kuukautta	15 µg/vrk*	15 µg/vrk *		
7–12 kuukautta	20 µg/vrk *	20 µg/vrk *		
1–3 vuotta	20 µg/vrk	20 µg/vrk		
4–8 vuotta	30 µg/vrk	30 µg/vrk		
9–13 vuotta	40 µg/vrk	40 µg/vrk		
14–18 vuotta	55 µg/vrk	55 µg/vrk	60 µg/vrk	70 µg/vrk
19–50 vuotta	55 µg/vrk	55 µg/vrk	60 µg/vrk	70 µg/vrk
yli 51 vuotta	55 µg/vrk	55 µg/vrk		

*Arvio riittävästä päivittäisannosta. Kyseisten ikäryhmien seleenitasesta ei ole riittävästi tietoa virallisen päivittäisannostuksen antamiselle. Annetut arvot vastaavat vauvan keskimääräistä rintaruokinnasta saatavaa seleenin määrää.

Myös Euroopan elintarviketurvallisuusvirasto EFSA on antanut omat suosituksensa päivittäiselle seleeninsaannille (taulukko 2). Verrattuna Yhdysvaltojen seleenin saantisuositukseen Euroopassa annetut suositukset ovat yleisellä tasolla hieman korkeammat. EFSA:n asettamat seleeninsaantisuositukset perustuvat mittauksiin, jossa seleenin riittävä saanti arvioitiin käyttämällä ihmisten veren selenoproteiini P:n konsentraatiota. Muihin suosituksiin nähden EFSA suosittelee imettäville naisille korkeampaa seleenin päivittäisannosta. EFSA:n arvion mukaan rintaruokinnassa seleeniä siirtyy rintamaitoon noin 12 µg/vrk. Verrattaessa normaaliin päivittäiseen saantisuositukseen 15 µg/vrk on riittävä lisä imettäville äideille korvaamaan rintamaitoon siirtynyt seleeni.⁴¹

Taulukko 2. Euroopan elintarviketurvallisuusviraston asettamat seleeninsaantisuositukset. Taulukko mukailtu lähteestä.⁴¹

Ikä	Seleenin saantisuositus
7–11 kuukautta	15 µg/vrk
1–3 vuotta	15 µg/vrk
4–6 vuotta	20 µg/vrk
7–10 vuotta	35 µg/vrk
11–14 vuotta	55 µg/vrk
15–17 vuotta	70 µg/vrk
yli 18 vuotta	70 µg/vrk
Raskaana olevat	70 µg/vrk
Imettävät	85 µg/vrk

5.1 Elintarvikkeiden sisältämä seleeni

Lukuisat elintarvikkeet sisältävät runsaasti seleeniä. Suomalaiset ravitsemussuositukset kehottavat syömään riittävän seleeninsaannin turvaamiseksi lihaa ja erilaisia lihavalmisteita. Suositusten mukaan myös maito ja erilaiset maitovalmisteet ovat hyviä seleenin lähteitä. Lisäksi täysjyvävilja on erinomainen seleenin lähde.¹¹ Koska seleeni sijaitsee samassa jaksollisen järjestelmän ryhmässä rikin kanssa, elintarvikkeet, jotka sisältävät paljon rikkiä, sisältävät usein myös suhteellisen paljon seleeniä. Tällaisia elintarvikkeita ovat esimerkiksi sipulit ja erilaiset kaalit.³

Vastaavasti Yhdysvaltojen terveystieteelliset suosittelevat seleenin saannin turvaamiseksi lisäämään ruokavalioon esimerkiksi mereneläviä ja eri eläinten sisäelimiä, sillä kyseisissä elintarvikkeissa seleenin pitoisuus on suurin. Myös suomalaisissa ravitsemussuosituksissa esitetyt liha-, maito- ja viljatuotteet mainitaan hyviksi seleenin lähteiksi. Suurin osa elintarvikkeista saadusta seleenistä onkin peräisin leivästä, viljatuotteista, punaisesta lihasta, siipikarjan lihasta, kaloista ja kananmunista.²⁰

Suomessa Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitos ylläpitää kansallista Fineli-tietokantaa yleisten elintarvikkeiden ravintosisällöstä. Taulukkoon 3 on poimittu korkean seleenipitoisuuden omaavia Suomessa myytäviä elintarvikkeita. Esimerkiksi parapähkinät sisältävät erittäin paljon seleeniä.⁴²

Taulukko 3. Joidenkin runsaasti seleeniä sisältävien elintarvikkeiden seleenipitoisuuksia. Taulukko mukailtu lähteestä.⁴²

Elintarvike	Seleenipitoisuus (µg/100g)
Parapähkinä	1917,0
Keltuaisjauhe	206,4
Keitetty munuainen	191,5
Naudan maksa	83,0
Säilyketonnikala	78,0
Anjovis	68,0
Keitetty rapu	62,5
Sinisimpukka	60,0
Sian maksa	56,0
Broilerin maksa	51,0
Korvasieni	50,6
Auringonkukansiemen	49,0
Seesaminsien	49,0

Kasviperäisten elintarvikkeiden seleenipitoisuuteen vaikuttaa merkittävästi maaperän seleenipitoisuus. Myös seleenin muodolla on merkitystä, kuinka suuri pitoisuus seleeniä elintarvikkeisiin kerääntyy. Kasvit pystyvät hyödyntämään parhaiten seleenin epäorgaanista muotoa, selenaatia, verrattuna seleenin orgaanisiin muotoihin. Lisäksi maaperän orgaanisen materiaalin määrä vaikuttaa kasvien seleenipitoisuuteen.^{20,43} Seleeniä pitoisuuteen vaikuttaa kuitenkin merkittävästi myös maan happamuus. Kasviperäisten elintarvikkeiden seleenipitoisuus on huomattavasti korkeampi, kun maaperän pH-arvo on korkea.⁴⁴ Suomessa maaperä on suhteellisen hapan, mikä vaikeuttaa seleenin siirtymistä maaperästä kasveihin.³

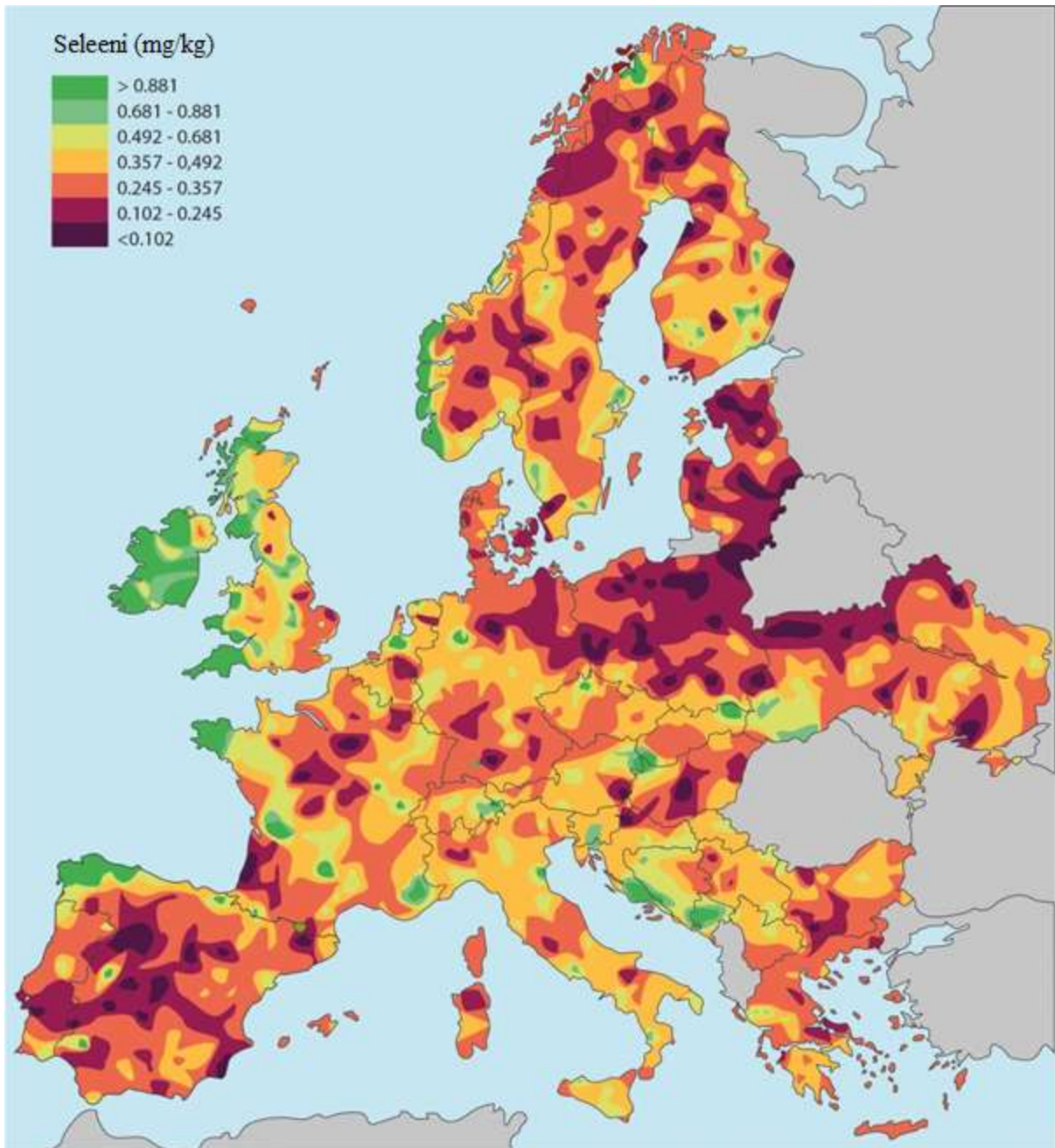
Myös eläinkunnantuotteissa havaitaan seleenipitoisuuden vaihtelua riippuen kasvien ja maaperän seleenipitoisuudesta. Eläinkunnan tuotteissa vaihtelu ei kuitenkaan ole maaperän seleenipitoisuudesta niin voimakkaasti riippuvaa kuin kasviperäisissä elintarvikkeissa, sillä eläimillä niiden homeostaattinen järjestelmä pyrkii ylläpitämään tasaista seleenipitoisuutta eri elimissä. Lisäksi tuotantoeläinten rehu on seleenin ja muiden hivenaineiden osalta tarkoin säädelty, mikä edelleen vähentää poikkeavia seleenin pitoisuuksia eläinkunnan tuotteissa.²⁰

Kasvit pystyvät hyödyntämään epäorgaanisen seleenin (seleniitti ja selenaatit) lisäksi myös orgaanista seleeniä. Kasvien metabolian ansiosta kasviin imeytynyt seleeni muuttuu lopulta kyseiseen orgaaniseen muotoon, joka on ihmisille ja eläimille tehokkaampi muoto seleeninsaannin kannalta. Epäorgaanisen seleenin imeytyminen ihmisillä ja eläimillä on parhaimmillaan vain 50 %.³ Epäorgaanisen ja orgaanisen seleenin käyttöä eläinten

ravitsemuksessa on tutkittu esimerkiksi lampailla. Steen *et al.* tutkivat⁴⁵, miten ravinnon mukana annettu epäorgaaninen ja orgaaninen seleeni vaikuttivat lampaiden ja näiden karitsojen veriplasman seleenipitoisuuteen. Tutkimuksessa tutkittiin teurastukseen menevien lampaiden lihan seleenipitoisuuden muutoksia, kun lampaat saivat ennen niiden teurastusta erimuotoista seleeniravintolisää. Osalle lampaista syötettiin epäorgaanista seleeniä natriumseleniitin muodossa, kun taas osalle lampaista syötettiin orgaanista seleeniä, joka oli elotonta seleenillä rikastettua hiivaa. Suurin osa seleenistä orgaanisessa seleenivalmisteessa oli seleenimetioniinin muodossa. Molempien ravintolisien pitoisuus oli 20 mg/kg. Koska lampaat kuluttivat ravintolisiä keskimäärin 20 g päivässä, niiden saama seleeniannos oli noin 400 µg/vrk. Erot eri valmisteiden välillä olivat selkeät. Uuhien, eli karitsoineiden lampaiden, veripiasman seleenipitoisuus oli hieman korkeampia lampailla, jotka söivät tutkimuksen ajan orgaanista seleenivalmistetta. Suurempi ero eri valmisteiden välillä nähtiin kuitenkin karitsojen veriplasmoissa, joissa havaittiin 30 % suuremmat pitoisuudet niillä, jotka saivat seleeniä orgaanisessa muodossa. Teurastettujen lampaiden lihan pitoisuudessa havaittiin vielä suuremmat eroavaisuudet. Lampailla, jotka saivat orgaanista seleeniravintolisää, havaittiin lihan seleenipitoisuudessa yli 50 % suuremmat tulokset verrattuna epäorgaanisella seleenillä ravittuihin lampaisiin. Tuloksista voidaan päätellä, että orgaanisessa muodossa oleva seleeni on eläinten metabolian kannalta huomattavasti suotuisampi muoto, jotta mahdollisimman suuri osa saadusta seleenistä voidaan hyödyntää.

5.2 Maaperän seleeni ja sen vaikutukset elintarvikkeiden seleenipitoisuuksiin

Lannoitus on merkittävä tekijä maanperän seleenipitoisuuteen ja sitä kautta se vaikuttaa myös elintarvikkeiden seleenipitoisuuksiin ja ihmisten terveyteen.³ Maaperässä luonnostaan oleva seleeni on Euroopassa ja myös muualla maailmalla erittäin epätasaisesti jakautunut. Seleenin jakautuminen maaperässä Euroopan eri alueilla on esitetty kuvassa 4.¹⁷



Kuva 4. Seleenin pitoisuus maaperässä Euroopassa. Karttakuva mukailtu lähteestä.⁴⁶

Kartasta havaitaan suhteellisen suurta seleenin määrän vaihtelua maaperässä myös maiden sisällä. Esimerkiksi Suomessa maaperän seleenipitoisuus voi olla paikoin jopa yli viisinkertainen verrattuna alueisiin, joissa maaperän seleenipitoisuus on pienimmillään.⁴⁶ Maaperää hallitsevat kivilajit määräävät suurimmilta osin maaperän seleenipitoisuuden. Piipitoisten kivilajien alueilla on tyypillisesti pienemmät seleenipitoisuudet, kun taas kivihiili- ja savikivisedimenttialueilla seleenipitoisuudet ovat hieman korkeammat. Suomessa seleenin imeytymisen kannalta merkittäviä tekijöitä ovat myös maaperän happamuus sekä haastavat

ilmastolliset olosuhteet. Happaman maaperän vuoksi seleeni pelkistyy maaperässä helposti, jolloin se ei ole enää kasvien saatavilla.³

Seleenin jakautuminen on epätasaista myös muualla maailmassa. Esimerkiksi Kiinassa on alueita, joissa seleenin määrä maaperässä on hälyttävän pieni. Toisaalta Kiinassa on myös alueita, joissa seleenin pitoisuus maaperässä on vaarallisen korkea. Näillä alueilla on havaittu oireita seleenimyrkytyksistä. Alueiden välinen etäisyys on vain 20 km.¹⁷

Suomi on poikkeuksellinen maa, kun tarkastellaan seleenilannoitusta. Ainoana maana Euroopasta lannoitteiden seleenipitoisuutta säädellään valtion tasolla. Suomessa peltoja on lannoitettu seleenillä vuodesta 1984 saakka. Vuonna 1983 perustettiin maa- ja metsätalousministeriön toimesta seleenityöryhmä, jonka ehdotuksesta seleenilannoitus aloitettiin seuraavana vuonna. Syinä olivat elintarvikkeiden ja rehujen erittäin alhaiset seleenipitoisuudet. Vuosina 1960–1980 tehdyissä tutkimuksissa selvisi, että ihmisten päivittäinen seleeninsaanti on vain noin 30 µg/vrk. Lisäksi tuotantoeläimillä todettiin tauteja, jotka olivat peräisin seleeninpuutoksesta. Näiden tautien hoitoon käytettiin seleenilisäravinteita sekä E-vitamiinia. Pienellä päivittäisellä seleeninsaannilla pelättiin myös olevan kansanterveydellisiä vaikutuksia, minkä vuoksi lannoitteiden seleenipitoisuutta alettiin säädellä kansallisesti.³

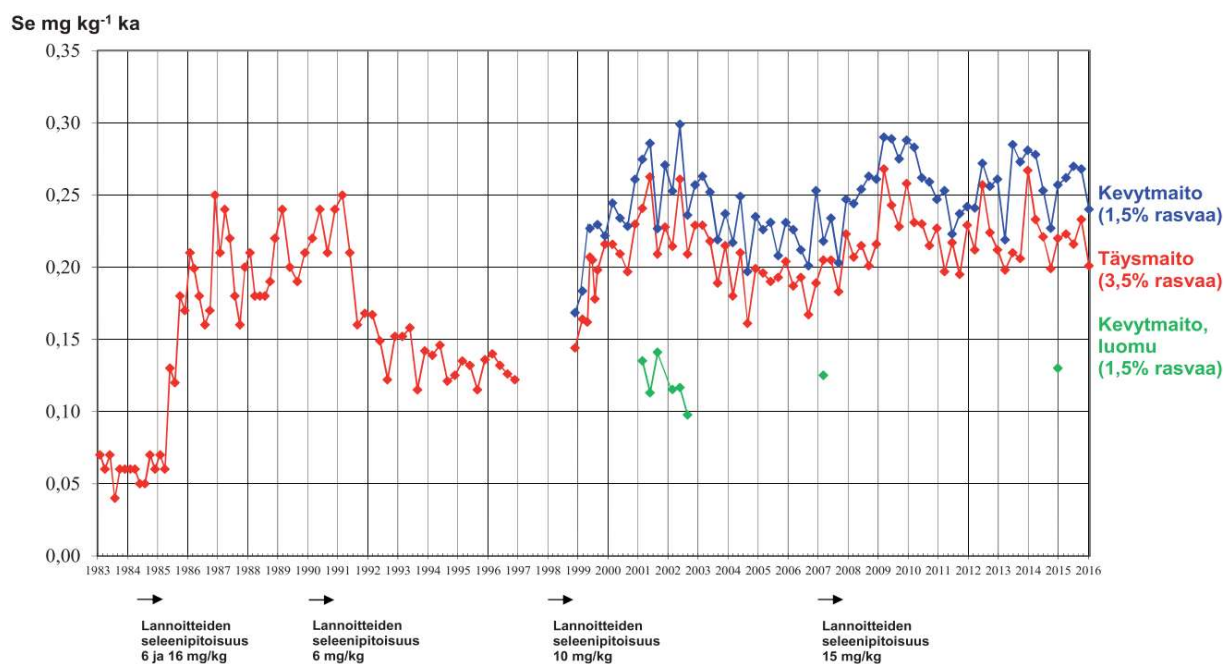
Seleenin lisäämistä maahan levitettäviin lannoitteisiin pidettiin turvallisena tapana varmistaa ihmisten riittävä ja turvallinen seleeninsaanti. Vaihtoehtoisena menetelmänä olisi voitu käyttää suoraan kasvien lehdille levitettävää seleenilannoitusta. Tällöin seleenin imeytyminen olisi ollut huomattavasti tehokkaampaa eikä lannoituksessa olisi tarvinnut huomioida maaperän monimuotoisuuden aiheuttamaa seleenin imeytymisen vaihtelua. Menetelmä olisi kuitenkin vaatinut kasvien käsittelyn liuoksilla, joissa seleenin pitoisuus on myrkyllisellä tasolla. Näin ollen menetelmää ei voitu pitää käytännöllisenä ja turvallisena, sillä nestemäisellä seleenilannoitteella käsitellyn viljan jyvät eivät olisi olleet turvallisia käyttää eläinten rehun raaka-aineena. Lisäksi menetelmä olisi ollut maataloudelle huomattavasti kalliimpi, sillä lannoitteen tasaiseen levitykseen olisi tarvittu erityislaitteistoa. Näin ollen seleenin lisääminen maahan levitettäviin lannoitteisiin koettiin olevan hallitumpi ja luotettavampi tapa nostaa kasvien seleenipitoisuutta.⁴⁷

Suomessa lannoitteisiin lisättävä seleeni on epäorgaanisessa muodossa eli selenaatteina. Käytetty seleeniyhdiste on natriumselenaatti. Näin mahdollisimman suuri osa lisätystä seleenistä on kasvien saatavilla. Lisättävästä seleenin määrästä päättää maa- ja metsätalousministeriö. Päätökset lisättävän seleenin määrästä pohjautuvat seleenityöryhmän

antamiin suosituksiin. Koska väli seleenin päivittäisen välttämättömän annoksen ja myrkyllisen annoksen välillä on suhteellisen kapea, on maaperään lisättävän seleenin vaikutuksia ehdottomasti seurattava hyvin tarkkaan. Seleenityöryhmän tarkoituksena onkin seurata maaperän, lannoitteiden, rehujen, elintarvikkeiden ja kuluttajien seleeninsaannin tasoa jatkuvasti. Kuluttajien seleeninsaantia tarkkaillaan analysoimalla ihmisten veri- ja seeruminäytteitä.³

Tutkimustulosten perusteella lannoitteisiin lisättävän seleenin määrää on muutettu kolmesti vuoden 1984 jälkeen. Lannoitus aloitettiin siten, että nurmilannoitteisiin lisättiin 6 mg/kg seleeniä ja viljan lannoitteisiin 16 mg/kg seleeniä. Tätä asetusta muutettiin ensimmäisen kerran vuonna 1990, jolloin kaikkien lannoitteiden seleenipitoisuudeksi säädettiin 6 mg/kg.³ Toimenpiteen taustalla oli eläinten viljassa ja rehuissa havaitut erittäin korkeat seleenipitoisuudet, joita havaittiin joissain yksittäistapauksissa. Rehun liian korkeiden seleenipitoisuuksien ehkäisemiseksi viljalannoitteiden seleenipitoisuus laskettiin samalle tasolle kuin nurmilannoitteiden eli 6 mg/kg.⁴⁸ Seleenin vaihtelevia tuloksia rehussa ja viljassa voidaan selittää myös nurmi- ja viljalannoitteiden yhtäaikaisella käytöllä, jossa kyseisten lannoitteiden käyttösuhde vaihteli maatilan mukaan. Tämän vuoksi päädyttiin ratkaisuun, jossa seleenipitoisuus olisi kaikissa lannoitteissa sama.⁴⁹ Vuonna 1998 kaikkien lannoitteiden seleenipitoisuutta muutettiin uudestaan ja seleenipitoisuus nostettiin arvoon 10 mg/kg. Viimeisin muutos lannoitteiden seleenipitoisuuteen tehtiin vuonna 2007, jolloin pitoisuutta jälleen nostettiin hieman. Nykyinen pitoisuus on 15 mg/kg. Tällöin sallittiin myös normaalista tasosta korkeammat (25 mg/kg) seleenipitoisuudet lannoitteille, joita käytetään täydennyslannoitteina nurmelle ja viljalle, kun pääasiallisena lannoitteena käytetään lantaa. Tarve lannoitteiden seleenipitoisuuden nostamiselle nähtiin, sillä elintarvikkeiden seleenipitoisuuksissa havaittiin laskeva trendi.³ Lisäksi lannan käytön yleistyessä kasvilannoitteena esimerkiksi karjataloilla, on epäorgaanisten lannoitteiden käyttö vähentynyt, mikä havaittiin seleenitasojen madaltumisena kasveissa. Lisäksi tuontilannoitteiden käyttö on lisääntynyt maataloilla, mikä voi myös selittää elintarvikkeiden seleenipitoisuuksien laskua. Ulkomaisten lannoitteiden seleenipitoisuus voi olla erittäin pieni, sillä vastaavaa aktiivista seleenilannoitusta ei juuri tehdä Suomen ulkopuolella.⁴⁹

Lannoitteiden sisältämän seleenin määrän muutokset näkyvät erittäin selvästi elintarvikkeiden seleenipitoisuuksissa. Juuri nämä muutokset seleenipitoisuuksissa ovat vaikuttaneet seleenilannoituksen määrän muutoksiin. Esimerkiksi eläinperäisistä elintarvikkeista maidossa havaitaan hyvin selvästi muutokset seleenilannoituksen määrässä (kuva 5).



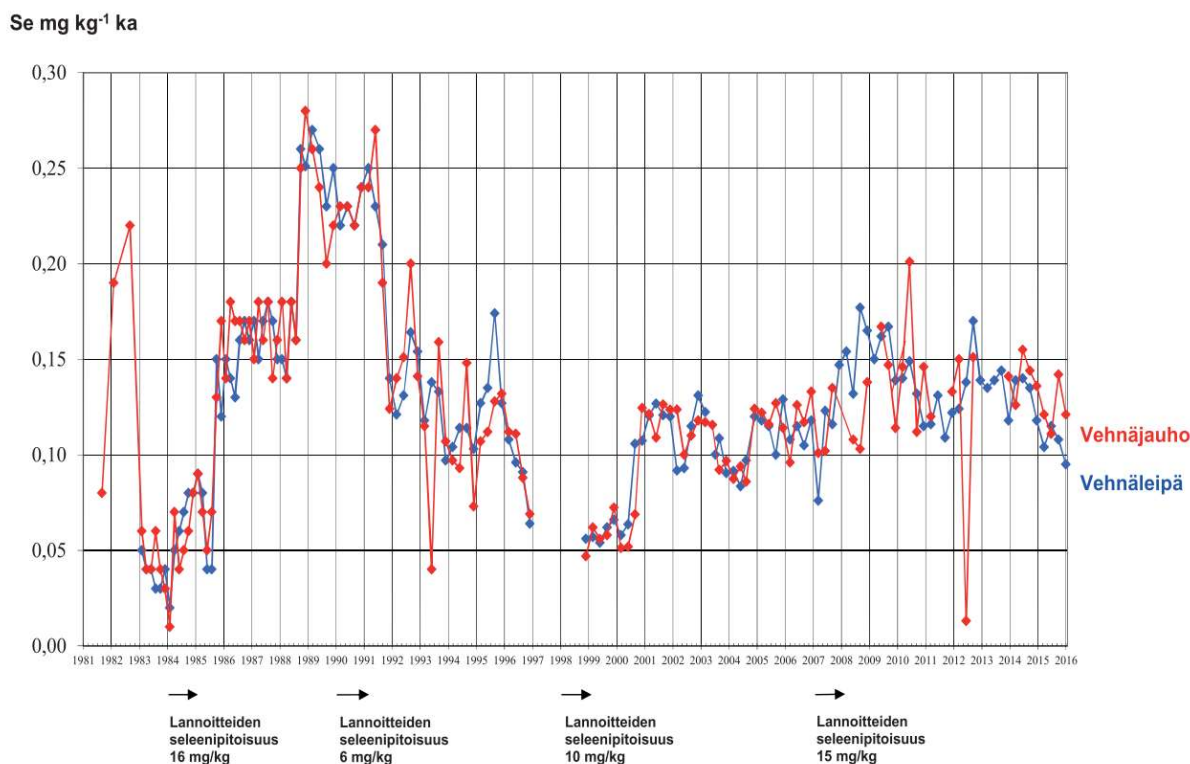
Kuva 5. Maidon seleenipitoisuus vuosina 1983-2016. Kuva mukailtu lähteestä.³

Kun seleenilannoitus aloitettiin vuonna 1984, maidon seleenipitoisuus lähes nelinkertaistui. Vuonna 1990, kun seleenin määrää vähennettiin huomattavasti lannoitteissa, myös maidon seleenipitoisuus alkoi laskea. Muutokset ovat selviä myös 1998 ja 2007 tehtyjen muutosten kohdalla.³

Kuvaajasta erottuu hyvin luomumaitojen muista poikkeavan pienet seleenipitoisuudet. Myös luomuelintarvikkeista löytyy siis seleeniä, vaikka pitoisuudet ovat tavanomaisesti tuotettuihin elintarvikkeisiin verrattuna huomattavasti pienemmät. Pitoisuudet ovat kuitenkin huomattavasti suuremmat kuin ennen kansallisen seleenilannoituksen aloittamista. Suomen rehulainsäädäntö sallii seleenin lisäämisen myös luomutuotantoon tarkoitettuun rehuun. Käytössä voi kuitenkin olla paikoin pelkästään erittäin vähän seleeniä sisältävää nurmirehua tai viljaa, mikä johtaa luomutuotteiden alhaisempaan seleenipitoisuuteen. Tämän vuoksi luomutuotteita käyttävillä voi olla suurempi riski altistua seleeninpuutosoireille.³

Suurempaa vuosittaista seleenipitoisuuden vaihtelua havaitaan ei-eläinperäisissä elintarvikkeissa, kuten vehnäleivässä ja vehnäjauhoissa (kuva 6). Lannoitteiden seleenipitoisuuden muutokset (vuosina 1984, 1990, 1998 ja 2007) näkyvät kuitenkin selvästi myös vehnän seleenipitoisuuden muutoksina. Vuosittainen voimakas vaihtelu seleenipitoisuudessa voidaan selittää sillä, että kotimaisen viljasadon laajuudesta riippuen jauhoissa käytetään myös muualta Euroopasta tuotua vehnää. Kotimaisen vehnän

seleenipitoisuus on huomattavasti korkeampi verrattuna muualta Euroopasta tuotuun vehnään. Huonon viljavuoden sattuessa suurempi osa Suomessa käytetystä vehnästä on ulkomaista, minkä vuoksi seleenin pitoisuus on pienempi.³



Kuva 6. Vehnäjauhon ja vehnäleivän seleenipitoisuus vuosina 1983-2016. Kuva mukailtu lähteestä.³

6 ICP-MS-tekniikka

6.1 Laitteiston toimintaperiaate

ICP-MS-tekniikalla voidaan määrittää nestemäisen näytteen alkuainekoostumus ionisoimalla näyte ja mittaamalla muodostuneiden ionien vaste. Näytteen syöttö laitteelle tapahtuu käyttäen peristalttista pumppua. Nestemäinen näyte johdetaan sumuttimelle, jossa näytteestä muodostuu argonkaasun avulla erittäin hienojakoista sumua. Muodostunut näytesumu johdetaan argonilla muodostettuun plasmaan sumutinkammion kautta, jossa suurimmat näytepisarat poistetaan. Plasmassa näytteen ionisoituminen tapahtuu analyttisellä alueella, jossa lämpötila on noin 6000–7000 K. Muodostuneet ionit kertovat näytteen alkuaineellisen koostumuksen. Ionit erotellaan massa-analyssaattorissa niiden m/z -arvon (massan suhde varaukseen) perusteella. Mitattaessa yksittäisen m/z -arvon aiheuttamia havaintoja detektorilla, saadaan kullekin m/z -

arvolle intensiteetti. Suhteuttamalla näyteliuosten intensiteettiarvoja kalibrointiliuosten intensiteettiin, voidaan näytteen alkuainepitoisuudet määrittää kvantitatiivisesti.⁵⁰

6.2 Näytteensyöttö

Suurin osa ICP-MS:llä analysoitavista näytteistä on nestemäisiä. Tämän vuoksi näytteensyöttö laitteeseen on erittäin kriittinen osa koko laitteen toimintaa. Nestemäiseen näytteensyöttöön voidaan käyttää useita erilaisia menetelmiä, mutta yksinkertaistettuna niiden toimintaperiaate ja tavoite ovat aina samat. Sumuttimen tarkoituksena on kehittää mahdollisimman hienojakoinen näyteargonsumu, joka johdetaan sumutinkammioon. Peristalttinen pumppu saattaa kuitenkin aiheuttaa vaihtelua sumuttimeen saapuvan näytteen määrään. Sumutinkammion yksi tehtävistä on vähentää tätä plasmaan päätyvän näytteen määrän vaihtelua. Näytteensyöttöä voidaan pitää ICP-MS-laitteen heikoimpana lenkinä, sillä vain erittäin pieni osa laitteeseen syötetystä näytteestä päätyy plasmaan aerosolin muodossa. Karkeasti arvioituna noin 1–2 % näytteestä päätyy plasmaan, kun loput syötetystä näytteestä johdetaan liuotinjätteeseen.⁵⁰

Peristalttinen pumppu koostuu roottorista, ja siinä kiinni olevista pienistä rullista, jotka puristavat näyte- ja jäteletkuja. Roottorin tasainen liike saa aikaan tasaisen näytteensyötön sumuttimeen. Tyypillisesti sumuttimeen pumpataan näytettä peristalttisella pumpulla noin 1 ml/min. Pumpun käyttö tasaa näyteliuosten ja synteettisten kalibrointiliuosten välisiä viskositeettieroja, jotka saattavat johtua esimerkiksi näytteiden sisältämästä erilaisesta matriisista. Nestemäinen näyte hajoaa pieniksi pisaroiksi sumuttimessa argonkaasun yhdistyessä näytevirtaan. Tyypillisesti argonia syötetään sumuttimeen noin 1 l/min. Kaikki sumuttimet eivät välttämättä tarvitse peristalttista pumppua toimiakseen, vaan argonkaasun virtaus sumuttimen läpi saa aikaan venturi-ilmiön, jossa kaasun aiheuttama alipaine imee näytettä näyteletkuun ja sitä kautta sumuttimeen.⁵⁰

Sumuttimesta näytesumu päätyy sumutinkammioon. Sen ensisijainen tehtävä on poistaa liian suuret näytepisarat pois näytevirrasta. Liian suuret pisarat jäädyttäisivät plasmaa, jolloin plasma ei olisi enää robusti. Tämä tarkoittaisi sitä, että plasma ei enää ionisoisi näytettä riittäväällä tehokkuudella. Sumutinkammio päästää läpi siis vain kaikkein hienojakoisimman ja pienipisaraisimman näytesumun. Tyypillisesti sumutinkammioista poistuvat pisarat ovat kooltaan noin 5–10 µm halkaisijaltaan.⁵⁰

Sumuttimia on saatavilla ICP-MS-laitteistolle erilaisiin käyttötarkoituksiin. Yleisimmin ICP-MS-analytiikassa käytetään pneumaattisia sumuttimia, joissa kaasun aiheuttaman paineen

mekaaninen voima pakottaa pisarat muodostumaan. Sumuttimien materiaali voi vaihdella valmistajan ja sumuttimen tyyppin mukaan. Tyypillisin materiaali on lasi, mutta myös erilaisista polymeereistä valmistetut sumuttimet ovat erittäin käytettyjä niiden hapon kestävyys vuoksi. On kuitenkin suositeltavaa, ettei ICP-MS-laitteistolla analysoida liuoksia, joissa kokonaissuolapitoisuus on yli 0,2 %. Suuremmat suolapitoisuudet saattavat muutoin tukkia plasmasoihdun jälkeen sijaitsevat kartiot, joita käytetään muodostuneiden ionien ohjaamiseen.^{50,51}

Pneumaattisista sumuttimista konsentroiva sumutin on yleisimmin käytetty sumutin ICP-MS-tekniikassa. Siinä näyte kulkee ohutta kapillaariputkea pitkin sumuttimen kärkeen, jossa se yhdistyy kapillaaria ympäröivään argonkaasuvirtaukseen. Ohi virtaava argonkaasu saa aikaan alipaineen kapillaarin päähän, jolloin paine-ero ja ohivirtaava kaasu saavat yhdessä aikaan aerosolin muodostumisen kapillaarin päässä. Näytteen virtaus konsentrisissa sumuttimissa voi vaihdella 0,01–3 ml/min. Pienempiä näytteen virtausnopeuksia (0,01–0,1 ml/min) voidaan käyttää konsentrisissa microflow-sumuttimissa, kun taas tavallisissa konsentrisissa sumuttimissa näytteen virtausnopeus on suurempi. Konsentrisen sumuttimen on kuitenkin suhteellisen herkkä tukkeutumaan, mikäli näytteen kokonaissuolapitoisuus on suuri. On myös tärkeää, että näytteen joukossa ei ole mitään kiinteitä partikkeleita, jotka voisivat tukkia sumuttimen. Esimerkiksi suodattamalla näytteen ennen analysointia, voidaan poistaa mahdolliset liukenemattomat kiinteät partikkelit. Konsentrisen sumuttimen käyttöikä oikein käytettynä voi olla jopa vuosia. Konsentrisen sumuttimen voidaan valmistaa joko lasista tai polymeeristä kuten PFA(perfluorialkoksi)-muovista. Lasisia sumuttimia ei voida käyttää vetyfluoridihapon kanssa eikä emäksisten liuosten kanssa.^{50,52}

Toinen yleisesti käytetty sumutintyyppi ICP-MS-tekniikassa on ristivirtaussumutin (*Cross flow nebulizer*). Ristivirtaussumutin sopii näytteille, joissa on voimakas matriisivaikutus tai pieniä määriä kiinteitä partikkeleita. Toisin kuin konsentrisessa sumuttimessa, ristivirtaussumuttimessa näyte ja argon kaasu kohtaavat kohtisuorassa linjassa. Tämän vuoksi näytteen kapillaariputkeen ei muodostu yhtä voimakasta alipainetta, joten ristivirtaussumuttimen kanssa käytetään useimmiten peristalttista pumppua näytteen syöttämiseksi sumuttimeen. Verrattuna konsentriseen sumuttimeen ristivirtaussumuttimet eivät kykene tuottamaan yhtä hienojakoista aerosolia. Näin ollen konsentrisen sumuttimen tarjoaa paremman herkkyyden mittaukselle kuin ristivirtaussumutin. Toisaalta ristivirtaussumutin on ainoa käytettävä vaihtoehto, mikäli näytematriisi on erittäin raskas eli näyteliuos sisältää paljon liuennetta suoloja. Konsentrisen- ja ristivirtaussumuttimen on esitetty kuvassa 7.^{50,52}



Kuva 7. Vasemmalla kuvassa lasista valmistettu konsentrisen Meinhard-sumutin ja oikealla Rytonista valmistettu ristivirtaussumutin. Kuva mukailtu lähteistä.^{53,54}

Mikäli analysoitava näytemäärä on erittäin rajallinen, on hyvä käyttää microflow-sumutinta. Siinä näytteen virtausnopeus on tyypillisesti vain alle 0,1 ml/min. Toimintaperiaate on käytännössä samanlainen kuin konsentrisilla sumuttimilla, mutta argonkaasun virtaus on suurempi, minkä ansiosta näytteen virtausta voidaan vähentää. Tämän lisäksi erittäin pieni näytteen kulutus vähentää muistivaikutuksen määrää laitteella. Microflow-sumuttimet valmistetaan useimmiten erilaisista polymeereistä.⁵⁰

ICP-MS-laitteistossa käytettäviä sumutinkammioita on käytännössä kahta eri tyyppiä: syklonisit sumutinkammiot sekä double pass-sumutinkammiot. Jotkut käytetyistä sumutinkammioista voidaan myös jäähdyttää ulkoisesti, jotta plasmaan päätyvän liuottimen määrä saataisiin minimoitua. Näin voidaan esimerkiksi minimoida oksidien muodostumista plasmassa.⁵⁰

Double pass-sumutinkammioista yleisin on Scott-mallinen double pass-sumutinkammio. Siinä näytesumu ohjataan keskusputkeen, jossa suurimmat pisarat painuvat putken pohjalle painovoiman vaikutuksesta. Pohjalle tiivistynyt näyte poistetaan sumutinkammioista poistoputken kautta, josta se kulkeutuu peristalttisen pumpun avustuksella jäteastiaan. Poistoputkessa vallitsee positiivinen paine, joka pakottaa kevyimmät pisarat keskusputken ja ulkokuoren väliseen tilaan, josta ne ohjataan edelleen plasmaan. Tyypillisesti double pass-sumutinkammiot valmistetaan polymeereistä ja niitä käytetään tyypillisesti ristivirtaussumuttimien kanssa.⁵⁰

Syklonisen sumutinkammion toiminta perustuu keskipakovoimaan. Näytesumu johdetaan pyöreään kammioon, jossa suurimmat pisarat päätyvät sumutinkammion seinämille keskipakovoiman johdosta näytesumun kiertäessä kammion sisällä. Sumutinkammion pohjalle valuneet suurimmat pisarat johdetaan liuotinjätteeseen. Sykloninen sumutinkammio

on tehokkaampi siirtämään näytettä plasmalle, mikä havaitaan korkeampana herkkyytinä. Toisaalta syklonisen sumutinkammion kohdalla havaitaan myös suurempaa vaihtelua näytesumun pisarakoossa verrattuna double pass-sumutinkammioon. Tämä voi aiheuttaa mittauksen tarkkuuden heikkenemistä.⁵⁰

Nestemäisten näytteiden lisäksi ICP-tekniikalla on myös mahdollista analysoida kiinteitä näytteitä. Tällöin näyte hajotetaan erittäin lyhytkestoisella laserpulsilla, jolloin laserpulsin energia siirtyy kiinteän näytteen pintaan hajottaen näytteen. Näytteestä ablatoitunut materiaali johdetaan ICP-MS-laitteelle, jonka avulla saadaan mitattua alkuainepitoisuudet näytteen pinnasta juuri siitä pisteestä, johon laserilla ammuttiin. Tekniikkaa kutsutaan LA-ICP-MS-tekniikaksi (*laser ablation inductively coupled mass spectroscopy*). Tekniikkaa käytettäessä näytteitä ei tarvitse esikäsitellä, esimerkiksi jauhaa tai liuottaa, vaan kiinteät näytteet voidaan mitata suoraan. Tekniikka mahdollistaa myös kaksiulotteisten alkuainekarttojen määrittämisen näytteiden pinnasta, kun mittaus toistetaan useita kertoja eri kohdista näytteen pintaa.⁵⁵

6.3 Induktiivisesti kytketty plasma

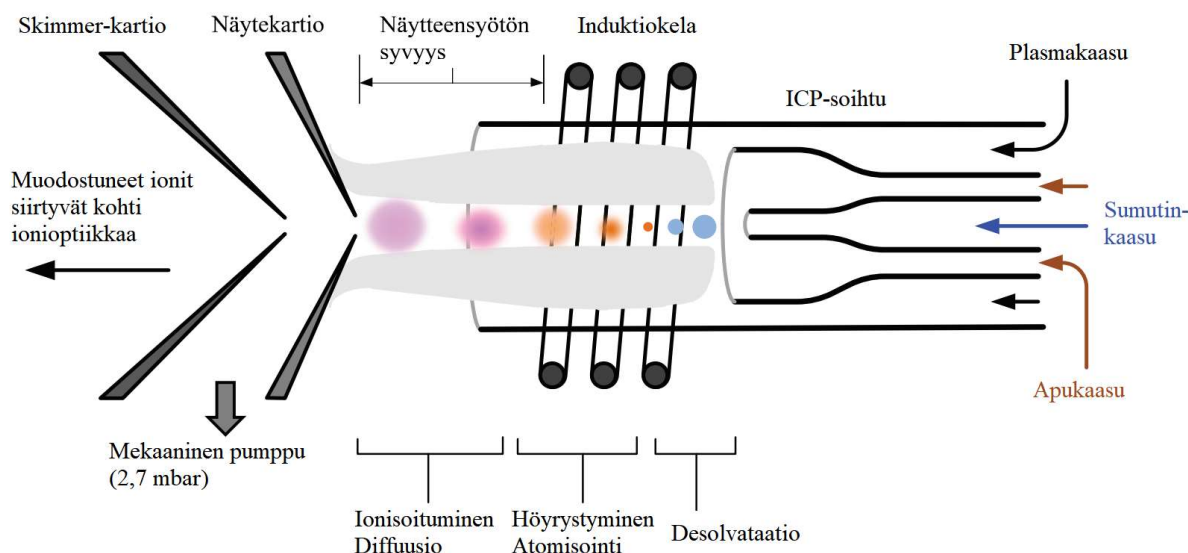
Puhuttaessa spektroskopiassa käytettävästä plasmasta termillä tarkoitetaan inertin kaasun muodostamaa joukkoa positiivisia ioneja, elektroneja sekä neutraaleja atomeja. Käytetyt inertit kaasut ovat tyypillisesti jalokaasuja kuten heliumia tai argonia. Näistä kahdesta argon on kuitenkin yleisin käytetty plasmakaasu. Plasmaa voidaan tuottaa keinotekoisesti monin eri tavoin, mutta tyypillisesti spektroskopiassa käytetty tekniikka on induktiivisesti kytketty plasma (ICP), jossa plasma muodostetaan hyödyntäen sähkömagneettista induktiota.^{50,56,57}

Spektroskopiassa yleisimmin käytetty plasman lähde on ICP, mutta myös muitakin plasman lähteitä voidaan käyttää. Plasma voidaan tuottaa esimerkiksi käyttämällä tasavirtaa (DCP, *Direct-current plasma*). Kyseinen tekniikka oli ensimmäisiä käytettyjä plasmatekniikoita ennen ICP:n yleistymistä. Tasavirtaplasmassa plasma muodostuu elektrodien väliin, joiden välillä vallitsee korkea jännite. Tyypillisesti anodeita on kaksi ja katodeita yksi, jolloin niiden väliin muodostuva plasma on muodoltaan Y-kirjaimen muotoinen. Näyte syötetään plasmaan anodien välistä. DCP-tekniikka on kuitenkin ICP-tekniikkaan verrattuna huomattavasti herkempi erilaisille häiriöille. Lisäksi DCP:n käytössä on ongelmia luotettavuuden ja käytettävyyden kanssa.^{50,56}

DCP-plasman heikkoudet johtivat elektrodittoman plasmatekniikan kehittymiseen. Yksinkertaisin elektroditon plasmalähde on mikroalloilla indusoitu plasma (MIP). Kyseisessä tekniikassa plasmakaasu johdetaan lasiseen tai kvartsista valmistettuun kaviteettiin, jonka

halkaisija on noin 1–2 mm. Plasmakaasuna voidaan käyttää argonia tai typpeä, mutta tyypillisimmin käytetään heliumia. Kaviteettiin kohdistetaan mikroaaltosäteilyä 50–200 W teholla ja 2,45 GHz taajuudella. Säteily ylläpitää kaviteettiin muodostettua plasmaa, joka käynnistetään voimakkaan sähkökipinän avulla. MIP-tekniikalla muodostetussa plasmassa on korkea virittymislämpötila (7000–9000 K), mutta kokonaisuudessaan plasman lämpötila on maksimissaan vain noin 2000–3000 K. Matalan lämpötilan vuoksi näytteiden asettamat matriisivaikutukset ovat hyvin merkittäviä käytettäessä MIP-tekniikkaa. Lisäksi mikroalloilla tuotettu plasma on herkkä sammumaan, mikäli plasmaan tuodaan vesiliuoksia. Tämän vuoksi MIP-tekniikka ei ole kovin yleistä alkuaineanalytiikassa, jossa näytteet tyypillisesti ovat vesiliuoksia. MIP-tekniikka soveltuu hyvin esimerkiksi kaasukromatografian ionisointilähteeksi.^{50,56}

Induktiivisesti kytketyn plasman toiminta perustuu kolmeen peruskomponenttiin: plasmasoihtuun, soihtua ympäröivään induktiokelaan eli radiotaajuusgeneraattoriin (*RF-coil*) sekä sen virtalähteeseen. Plasmasoihtu on kolmesta sisäkkäisestä putkesta valmistettu kappale, jonka sisälle plasma muodostetaan. Kunkin putken sisällä kulkee kaasuvirtaus, jonka virtausnopeus on erikseen säädettävissä. Ulommaisin putkista kuljettaa plasmakaasua, joka toimii ikään kuin plasman polttoaineena.⁵⁰ Nykyään plasmakaasuna käytetään lähes poikkeuksetta argonia, sillä argonin ionisaatioenergia (15,8 eV) on riittävän korkea ionisoimaan lähes kaikki alkuaineet lukuun ottamatta heliumia, neonia ja fluoria.⁵⁷ Plasmakaasua syötetään tyypillisesti noin 12–17 l/min. Keskimäinen plasmasoihdun putkista kuljettaa apukaasua, joka myös on lähes poikkeuksetta argonia. Virtausnopeus on kuitenkin plasmakaasuun verrattuna huomattavasti pienempi, noin 1 l/min. Apukaasun tehtävänä on muuttaa plasman muotoa sekä jäähdyttää soihtua. Ilman apukaasua plasman korkea lämpötila sulattaisi soihdun. Sisimmäisin plasmasoihdun putkista kuljettaa näytteen plasmaan. Sumutinkammioista saapuva näytesumu ohjataan muodostuvan plasman keskiosaan. Myös sumutinkaasun virtaus on yleensä noin 1 l/min. Putken kärkeä, josta näytesumu siirtyy plasmaan, kutsutaan näyteinjektoriksi. ICP-soihdun rakenne on esitetty kuvassa 8.^{50,56}



Kuva 8. Rakennokuva ICP-soihdun toiminnasta ICP-MS-tekniikan yhteydessä. Kuva mukailtu lähteestä.⁵⁸

Kaikissa ICP-tekniikalla tuotetuissa plasmassa on potentiaaliero plasman ja induktiokelan välillä. Tämä potentiaaliero on tyypillisesti satoja voltteja. Potentiaaliero aiheutuu kapasitiivisesta kytkennästä induktiokelan ja plasman välillä. ICP-MS-laitteistossa tämä aiheuttaa ongelmia, sillä varaus voisi purkautua plasman jälkeiseen metallisiin kartioihin haitaten laitteiston toimintaa. Tämän estämiseksi plasmasoihdun ympäröimä induktiokela on aina maadoitettu.⁵⁰

Mekanismi plasman muodostumisessa ICP-tekniikassa on molemmille laitetyppeille yhteinen. Plasmakaasun virratessa soihtuun sen ympärillä olevaan induktiokelaan johdetaan sähkövirta. Sähkövirran teho on tyypillisesti 750–1500 W ja sitä voidaan säädellä näytematriisiin sopivaksi. Sähkövirran suunta vaihtelee RF-generaattorin taajuuden mukaisesti. Tyypillisesti tämä taajuus on joko 27 tai 40 MHz.⁵⁰ Uusimmissa ICP-MS-laitteissa käytetään taajuutena 34 MHz, joka yhdistää näiden kahden edellä mainitun taajuuden parhaat puolet. Matalan taajuuden käyttäminen tuottaa kuumempaa plasmaa, kun taas korkean taajuuden käyttäminen parantaa plasman ja induktiokelan välistä kytkentää. Näin ollen muodostuva plasma on robustimpi, minkä vuoksi plasma kestää paremmin näytematriisia ja esimerkiksi näytteen seassa olevia orgaanisia liuottimia.⁵⁸

Plasmakaasun virtaaminen soihdussa ja sähkövirran kulku induktiokäämissä ei yksinään riitä käynnistämään plasmaa. Kun virtaavaan argonkaasuun annetaan korkeajännitteinen kipinä, osa argonatomeista menettää elektroninsa ja ionisoituu. Induktiokäämissä kulkeva muuttuva sähkövirta saa aikaan soihtuun oskilloivan magneettikentän. Tämä magneettikenttä kiihdyttää

muodostuneet argonionit nopeaan liikkeeseen. Argonionien nopean liikkeen ansiosta ne voivat kineettisellä liike-energiallaan ionisoida lisää neutraaleja argonatomeja. Törmäysten ansiosta syntyy itseään ylläpitävä ketjureaktio, jossa argonatomeista syntyy jatkuvasti lisää argonioneja ja irronneita elektroneja. Tätä neutraalien atomien, positiivisten ionien ja irronneiden elektronien muodostamaa kaasua kutsutaan induktiivisesti kytketyksi plasmaksi. Plasman ylläpitoon tarvittava ketjureaktio saa energiansa induktiokäämin sähkövirrasta, josta energia siirtyy induktiivisen kytkennän kautta jatkuvasti plasmaan.⁵⁰

Plasman lämpötila vaihtelee suuresti soihdun eri osissa. Näyte syötetään plasmaan aivan plasman keskikohdasta, jolloin näytesumun suuri nopeus puhkaisee reiän plasman keskikohtaan. Tämän vuoksi aivan näyteinjektorin kärkeen syntyy lämpötilaltaan alempi esilämmitysalue. Kulkiessaan plasman eri vyöhykkeiden läpi, näyte kokee useita fysikaalisia muutoksia. Esilämmitysalueella näytepisaroiden liuotin haihtuu pois ja näyte muodostaa kiinteitä partikkeleita. Esilämmitysalueen jälkeen näyte saapuu ensisäteilyn alueelle, jossa näyte höyrystyy ja atomisoituu. Näytteen ionisoituminen tapahtuu plasman analyttisellä alueella, jossa törmäykset korkeaenergisten argonionien kanssa saavat näytteen ionisoitumaan. Muodostuneet ionit siirtyvät eteenpäin kartioiden läpi kohti massa-analyysaattoria.⁵⁰

6.4 Väliosia ja ionioptiikka

ICP-MS-tekniikan kehittyessä ongelmallisimmaksi kohdaksi laitetta osoittautui plasmasoihdun ja massa-analyysaattorin välinen tila. Ennen massa-analyysaattoria ionit kulkevat kartioiden läpi, jotka ohjaavat plasmassa muodostuneet ionit eteenpäin. Ionioptiikalla puolestaan pyritään siirtämään ionit massa-analyysaattorille mahdollisimman tehokkaasti samalla poistaen häiritsevät tekijät, kuten näytematriisin komponentit.⁵⁰

Kartiot jakavat ICP-MS laitteiston kahteen painevyöhykkeeseen. Plasma muodostetaan soihdussa normaalissa ilmanpaineessa, kun taas ionioptiikka ja massa-analyysaattori toimivat lähes täydellisessä vakuuissa. Paine-eroista huolimatta kartioiden tehtävä on siirtää ionit tehokkaasti ja tasaisesti eteenpäin kohti massa-analyysaattoria. Kartioita on tyypillisesti kaksi, mutta tietyissä laitemalleissa kartioita voi olla myös kolme.^{50,59} Kartiot ovat tyypillisesti metallisia ja valmistettu nikkelistä, jolla on hyvä lämmönkestävyys. Myös platinasta valmistettuja kartioita voidaan käyttää, mikäli halutaan taata kartioiden korroosion kestävyys.^{50,56}

Ensimmäinen kartio, jolle analytti-ionit saapuvat on nimeltään näytekartio. Keskellä olevan reiän halkaisija on tyypillisesti 0,8–1,2 mm. Toinen kartioista on nimeltään skimmer-kartio,

jonka reiän halkaisija on puolestaan vain 0,4–0,8 mm. Mahdollista kolmatta kartiota kutsutaan hyper-skimmer-kartioksi. Kartioiden muodostamaan tilaan on kytketty mekaaninen pumppu, jonka tehtävä on muodostaa vakuumi kartioiden alueelle. Mekaanisen pumpun tuottama vakuumi ei kuitenkaan ole aivan täydellinen. Ilmanpaine kartioiden alueella on noin 2,7 mbar. Kartioihin ja niitä paikallaan pitävään koteloon kohdistuu erittäin suuri raskaus kuumen plasman kuumentamassa kartioita. Kotelo on tyypillisesti valmistettu hyvin lämpöä johtavasta materiaalista, kuten alumiinista tai kuparista. Jotta muodostunut lämpö saataisiin johdettua pois kartioista, niitä ympäröivää koteloa jäähdytetään aktiivisesti vesikierrolla.⁵⁰

Plasman ja kartioiden välille muodostuvaa potentiaaliero kutsutaan kapasitiiviseksi kytkennäksi. Mikäli tätä ongelmaa ei poisteta maadoittamalla induktiokelaa, kytkentä voidaan havaita valokaarena plasman ja kartioiden välillä. Kyseinen ilmiö voi aiheuttaa monia analyyttejä häiritsevien kahdesti varautuneiden ionien muodostumista, ionien kineettisen energian epätasaista jakautumista sekä kartioiden kulumista. Kartiosta voi myös ionisoitua materiaalia, jotka häiritsevät mittausta. Ionien kineettisen energian korkea vaihtelu aiheuttaa ongelmia myöhemmin ionioptiikassa. Ionien kineettisen energian tulisi olla mahdollisimman alhainen ennen massa-analysointia, jotta ionit voidaan fokusoida mahdollisimman tehokkaasti.⁵⁰

Kartioiden jälkeen ionit saapuvat ionioptiikkaan, jonka tarkoituksena on fokusoida ionit massa-analysointirille siten, että mahdollisimman suuri osa analyysi-ioneista päätyy lopulta massa-analysointirille. Tämän lisäksi ionioptiikan tehtävänä on poistaa ionivirrasta kaikki negatiiviset ionit elektronit ja neutraalit partikkelit. Ylimääräiset partikkelit aiheuttaisivat epästabiilin mittaussignaalin sekä nostaisivat taustakohinaa. Ionioptiikka toimii lähes täydellisessä vakuuissa, jota ylläpidetään tehokkaalla turbomolekyylipumpulla. Ionien siirtyminen optiikassa perustuu yhteen tai useampaan sähkövirralla ohjattavaan komponenttiin. Yksi tapa poistaa ionivirrasta ylimääräiset komponentit on asettaa maadoitettu metallilevy viimeisen kartion eteen. Positiiviset ionit voivat kiertää levyn, mutta neutraalit partikkelit ja fotonit törmäävät levyyn fyysisesti, minkä vuoksi ne eivät päädy eteenpäin massa-analysointirille. Toinen tapa suodattaa neutraalit partikkelit pois ionivirrasta on käyttää usean linssin muodostamaa yksikköä. Siinä useampi sähköllä ohjattu linssi ohjaa positiiviset ionit pois plasman suuntaiselta linjalta. Näin neutraalit partikkelit ohjautuvat pois ionivirrasta, mutta positiiviset ionit jatkavat kohti massa-analysointia.⁵⁰ Neutraalit partikkelit voidaan poistaa myös käyttämällä pienikokoista kvadrupolia ioniheijastimena. Tällöin tietyn varauksen omaavat positiiviset ionit kääntyvät 90 astetta ja neutraalit partikkelit ja fotonit jatkavat suoraan

eteenpäin. Ei-toivotut partikkelit poistetaan kvadrupolista poistoilman mukana, jotta ioniheijastin ei likaantuisi.⁵⁹

Paine-ero kartioiden ja ionioptiikan välillä saa ionivirran hajoamaan heti kartion jälkeen. Nopea paineen pudotus saa kevyet elektronit diffuntoitumaan pois raskaampien positiivisten ionien joukosta. Näin syntyy ionivirta, jossa on ainoastaan positiivisesti varautuneita partikkeleita. Koska kaikki ionivirran ionit ovat positiivisesti varautuneita, ne luonnollisesti hylkivät toisiaan. Ilman ulkoista sähkökenttää kevyimmät ioneista siirtyisivät kauemmaksi ionivirran keskikohdasta ja hajaantuisivat ympäri välisosaa. Ionien fokusointi tapahtuu siis kohdistamalla sähköisiin linssihin sopiva sähkövirta, jotta halutut ionit siirretään takaisin ionisäteen keskikohtaan, josta ne ohjautuvat eteenpäin massa-analysaattorille.⁵⁰

6.5 Törmäys- ja reaktiokenno

Tiettyjen alkuaineiden analytiikka voi olla erityisen hankalaa ICP-MS-laitteella, sillä plasmassa käytetty argonkaasu, hapot ja näytematriisissa olevat alkuaineet aiheuttavat aina tiettyjen ionien muodostumista. Plasman korkean lämpötilan vuoksi muutoin inertti argonkaasu muodostaa plasmassa ioniyhdisteitä esimerkiksi typen, rikin ja hapen kanssa. Argonin ja muiden alkuaineiden useiden isotooppien vuoksi nämä ionit voivat häiritä useita eri analyyttejä. Tyypillisiä häiriöitä ovat myös erilaiset ionisoituneet metallioksidit (MO^+). Esimerkkejä ICP-MS-laitteistolla esiintyvistä häiriöistä on koottu taulukkoon 4.^{50,60}

Taulukko 4. Esimerkkejä ICP-MS-laitteistolla esiintyvistä häiriöistä.⁵⁰

Analyytti	Häiriö
$^{56}\text{Fe}^+$	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$
$^{39}\text{K}^+$	$^{38}\text{ArH}^+$
$^{40}\text{Ca}^+$	$^{40}\text{Ar}^+$
$^{80}\text{Se}^+$	$^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$
$^{75}\text{As}^+$	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$
$^{52}\text{Cr}^+$	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$
$^{51}\text{V}^+$	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$

Häiriöitä voidaan kuitenkin poistaa käyttämällä törmäys- tai reaktiokennoa, joka sijaitsee laitteessa ennen massa-analysaattoria heti ionioptiikan jälkeen. Ionioptiikan ohjaamat ionit päätyvät siis ennen varsinaista massojen erottelua massa-analysaattorissa kennoon, johon ohjataan matala kaasuvirtaus. Tämän kaasuvirtauksen ansiosta mittausta häiritsevät ionit voidaan poistaa. Häiriöiden poistamiseen on käytännössä kaksi erilaista tapaa. Törmäys- tai reaktiokenno koostuu kaasukennosta sekä multipolista eli useasta varatusta sauvasta, jotka

muodostavat kennoon sähkökentän. Sauvoja on parillinen määrä ja törmäys- tai reaktiokennon tyypistä riippuen sauvoja on joko neljä, kuusi tai kahdeksan. Törmäyskennossa ionien erottelu perustuu niiden kineettisen energian eroihin. Tekniikasta käytetään nimitystä KED (*kinetic energy discrimination*). Törmäyskennoissa käytetään kaasua, joka ei ole reaktiivinen analyyttiläisten ionien kanssa. Reaktiokennolla puolestaan tarkoitetaan laitteistoa, jossa häiritsevien ionien sekä kennossa olevan reaktiokaasun välillä tapahtuu kemiallinen reaktio.⁵⁰

Törmäys- ja reaktiokennon perustoimintaperiaate perustuu kennon sisällä kulkevaan kaasuvirtaukseen sekä multipoliin eli massa-analyysaattoriin, jossa erottelu perustuu eri massaisten ionien lentoratojen vakauksien eroihin. Multipoli voi törmäys- tai reaktiokennossa olla esimerkiksi kvadrupoli, heksapoli tai oktapoli. Tyypillisesti multipolin taajuus rajataan vain RF-alueelle. Tämä tarkoittaa sitä, että törmäys- tai reaktiokennoissa käytetyt multipolit eroavat massa-analyysaattoreina käytetyistä kvadrupoleista siten, että ne fokusoivat ioneja, jonka jälkeen ionit törmäävät tai reagoivat kennossa virtaavan kaasun kanssa. Vasta massa-analyysaattorissa tapahtuu varsinainen ionien erottelu massan perusteella. Esimerkiksi ³⁹K-isotooppia häiritsevä ³⁸ArH⁺-ioni voidaan poistaa käyttämällä kennossa vetykaasua. Vety reagoi ³⁸ArH⁺:n kanssa muodostaen H₃⁺-ioneja sekä neutraaleja argonatomeja. Näin ollen kaliumin määrittystä häiritsevä ioni poistuu ja kalium voidaan mitata häiriöttä. Käytännössä kennossa tapahtuu kuitenkin myös sekundaarisia reaktioita ja törmäyksiä. Kennokaasun reagoiessa muodostuneet ionit reagoivat edelleen muiden ionien kanssa, jolloin ne saattavat muodostaa lisää häiritseviä ioneja. Mikäli näissä reaktioissa muodostuneita ioneja ei poisteta ionivirrasta, ne saattavat aiheuttaa lisää häiriöitä.⁵⁰

Törmäyskennoa käytettäessä häiriötä aiheuttavat moniatomiset ionit poistetaan ennen massa-analyysaattoria energiavallin avulla. Ionit törmäävät kennossa virtaavaan kaasuun, jolloin ionien kineettinen energia laskee. Moniatomiset ionit ovat pinta-alaltaan suurempia kuin yksiatomiset analyyttiläiset ionit. Tämän vuoksi törmäyksiä kohdistuu enemmän suurempikokoisiin moniatomisiin mittausta häiritseviin ioneihin. Törmäysten vuoksi moniatomisten ionien kineettinen energia on matalampi kuin analyyttiläisten ionien. Matalaenergiset häiritsevät ionit voidaan poistaa asettamalla törmäyskennon päähän hieman positiivisempi jännite kuin kennon multipolissa ioneja eteenpäin ohjaava jännite on. Näin analyyttiläiset ionit pääsevät jatkamaan törmäyskennosta kohti massa-analyysaattoria, kun taas häiritsevien moniatomisten ionien kineettinen energia ei riitä ylittämään energiavallia, jolloin ne jäävät törmäyskennoon.⁶¹

Kineettisen energian eroihin perustuvassa erottelussa käytetään usein heksapolia. Koska heksapolia käytetään vain kohdistamaan ionit törmäyksiä/reaktioita varten, se ei poista

tehokkaasti sekundaarisissa reaktioissa muodostuvien ioneja, jotka mahdollisesti voisivat aiheuttaa häiriöitä. Tämän vuoksi heksapoleissa ei voida käyttää reaktiivisia kaasuja, kuten metaania tai ammoniakkia poistamaan häiritseviä ioneja, sillä reaktioissa muodostuvien sekundaaristen ionien poistaminen ei olisi riittävän tehokasta. Törmäyskennoissa käytetäänkin tämän vuoksi tyypillisesti ei-reaktiivisia kaasuja, kuten helium- (He), vety- (H₂) ja ksenonkaasuja (Xe). Voimakkaammin reagoivia kaasuja voidaan käyttää kaasuseoksina esimerkiksi heliumin kanssa. ⁵²Cr-isotooppia häiritsevä ⁴⁰Ar¹²C voidaan esimerkiksi poistaa tehokkaasti käyttämällä törmäyskaasuna heliumia, jossa on pieni määrä ammoniakkia.⁵⁰ Teoreettisesti tarkasteltuna on myös todettu, että kevyiden kaasujen käyttäminen törmäyskennoissa on tehokkaampi tapa poistaa moniatomisten ionin aiheuttamat häiriöt verrattuna raskaampiin törmäyskaasuihin. Näin ollen esimerkiksi vetykaasun käyttö on erittäin suositeltavaa törmäyskaasuna.⁶¹

Törmäyskennoa käyttämällä ei kuitenkaan voida korjata yksiatomisten ionien aiheuttamia häiriöitä. Tällaisia ovat esimerkiksi ⁴⁰Ar-isotoopin häiriö mitattaessa ⁴⁰Ca-isotooppia ja kahdesti varautuneiden ionien aiheuttamat häiriöt. Näiden yksiatomisten ionien tapauksessa ionien pinta-alat ovat lähes yhtä suuret, jolloin kineettisen energian eroja ei pääse syntymään. Lisäksi kahdesti varautuneiden ionien tapauksessa ionit ovat analyyttiläisyyteen verrattuna myös huomattavasti raskaampia, minkä vuoksi törmäykset kaasun kanssa ei muuta ionien kineettistä energiaa yhtä paljon kuin analyyttiläisyyden.⁶¹

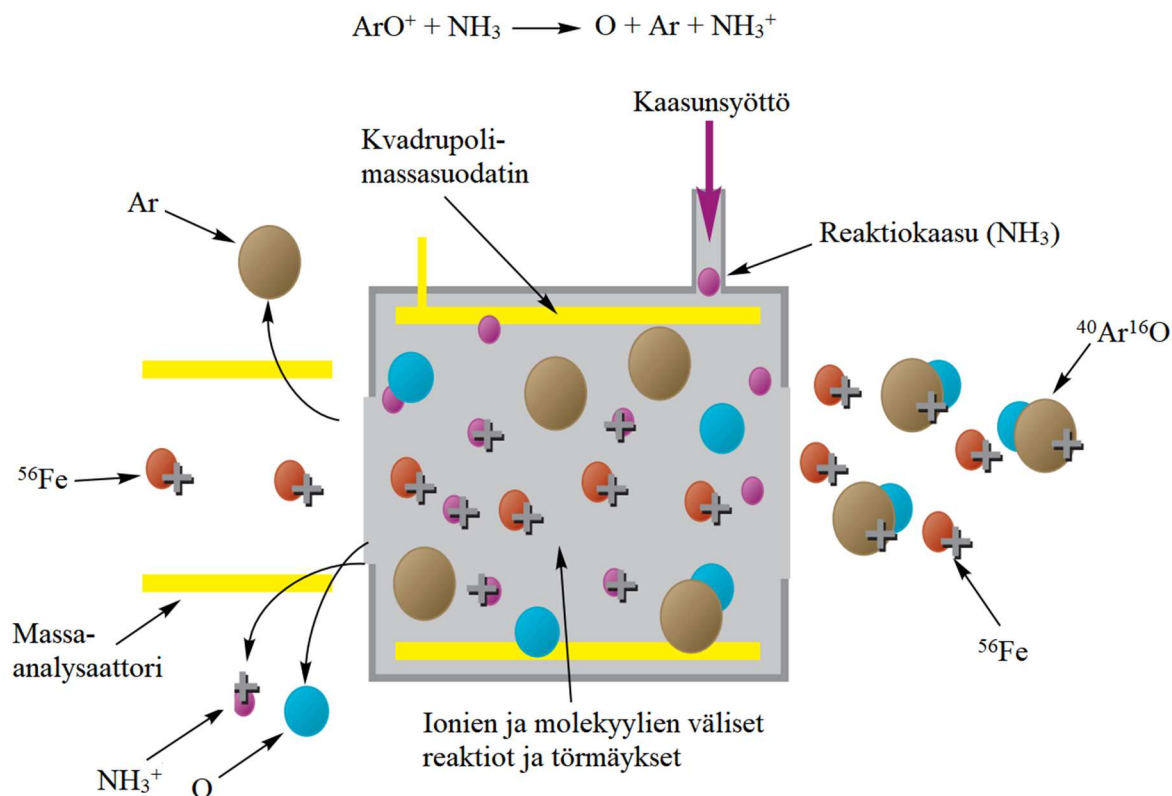
Kahdesti varautuneet ionit voivat häiritä mittausta, kun analyyttiläisyyteen nähden kaksinkertaisen massan omaava alkuaine ionisoituu plasmassa kahdesti muodostaen M²⁺-ioneja. Tällöin häiritsevä alkuaine saa saman *m/z*-arvon kuin analyyttiläisyyden-ioni. Häiriö voidaan havaita myös tilanteessa, jossa kahdesti varautuneen ionin *m/z*-arvo jää 0,5 yksikön päähän analyyttiläisyyden *m/z*-arvosta. Massa-analysaattorin resoluutio ei tyypillisesti ole riittävä erottamaan näitä kahta piikkiä toisistaan, jolloin kahdesti varautunut ioni vääristää analyyttiläisyyden mittaustulosta. Taulukkoon 5 on koottu esimerkkejä alkuaineista, joiden mittausta häiritsee jokin kahdesti varautunut ioni.^{50,62}

Taulukko 5. Kahdesti varautuneiden ionien aiheuttamia häiriöitä erälle alkuaineille. Taulukko mukailtu lähteestä.⁶²

Analyytti-ioni	M ²⁺ -ionin häiriö
²⁶ Na ⁺	⁴⁵ Sc ²⁺ , ⁴⁶ Ca ²⁺
²⁴ Mg ⁺	⁴⁸ Ca ²⁺
⁶⁵ Cu ⁺	¹³⁰ Ba ²⁺
⁶⁶ Zn ⁺	¹³² Ba ²⁺
⁶⁹ Ga ⁺	¹³⁷ Ba ²⁺ , ¹³⁸ Ba ²⁺ , ¹³⁸ Ce ²⁺ , ¹³⁸ La ²⁺ , ¹³⁹ La ²⁺
⁷⁵ As ⁺	¹⁴⁹ Sm ²⁺ , ¹⁵⁰ Sm ²⁺ , ¹⁵⁰ Nd ²⁺ , ¹⁵¹ Eu ²⁺
⁷⁹ Br ⁺	¹⁵⁷ Gd ²⁺ , ¹⁵⁸ Gd ²⁺ , ¹⁵⁸ Dy ²⁺ , ¹⁵⁹ Tb ²⁺
⁸⁰ Se ⁺	¹⁵⁹ Tb ²⁺ , ¹⁶⁰ Gd ²⁺ , ¹⁶⁰ Dy ²⁺ , ¹⁶¹ Dy ²⁺
⁸⁵ Rb ⁺	¹⁶⁹ Tm ²⁺ , ¹⁷⁰ Er ²⁺ , ¹⁷⁰ Yb ²⁺ , ¹⁷¹ Yb ²⁺
⁸⁸ Sr ⁺	¹⁷⁵ Lu ²⁺ , ¹⁷⁶ Lu ²⁺ , ¹⁷⁶ Yb ²⁺

Törmäyskennoissa voidaan heksapolin sijaan käyttää myös esimerkiksi oktapolia. Korkeamman asteen multipolin käyttö mahdollistaa tehokkaamman ionien siirtämisen kennossa varsinkin, kun tarkastellaan pienempimassaisia ioneja. Oktapolin toimintaperiaate on kuitenkin sama kuin heksapolin. Tyypillisesti oktopolin sisältävissä törmäyskennoissa käytetään kaasuna vetyä tai heliumia.⁵⁰

Tehokkaampi tapa poistaa häiritsevät ionit on käyttää reaktiokennoa, jossa erottelu perustuu ionien massaeroihin, kun häiritsevät ionit reagoivat reaktiokaasun kanssa. Tästä johtuen reaktiokennoissa ei voida käyttää törmäyskennon tavoin korkeamman asteen multipoleja, vaan reaktiokennoissa käytetään kvadrupolia. Tämän avulla häiritsevien ionien reagoidessa muodostuvat partikkelit voidaan tehokkaasti poistaa kennosta ennen kuin ne reagoivat eteenpäin mahdollisesti aiheuttaen lisää häiriöitä. Kvadrupoli toimii siis eräänlaisena suodattimena, jolloin vain analyytti-ionit jatkavat massa-analysaattorille. Koska reaktiossa muodostuvia ioneja poistetaan kennosta tehokkaasti, on reaktiokennoissa mahdollista käyttää myös reaktiivisia kaasuja, kuten ammoniakkia ja metaania. Ammoniakin avulla voidaan poistaa esimerkiksi ⁴⁰Ar¹⁶O aiheuttama häiriö mitattaessa ⁵⁶Fe-isotooppia (kuva 9).



Kuva 9. Havainnekuva reaktiokennon toiminnasta. Reaktiokennoon syötetään ammoniakkikaasua, joka reagoi $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$ -ionien kanssa muodostaen NH_3^+ -ioneja sekä atomaarista happi- ja argonkaasua. Kvadrupolimassasuodatin ohjaa ionit, joiden m/z arvo on 56, kohti massa-analysoitsaattoria. Reaktiossa muodostuneet ionit ja muut varaukselliset hiukkaset poistuvat reaktiokennosta massa-analysoitsaattorin ulkopuolelle.

Reaktiossa ammoniakki reagoi ArO^+ :n kanssa muodostaen atomaarista happea ja argonia sekä NH_3^+ -ioneja. Kvadrupolin ansiosta NH_3^+ -ionit poistetaan kennosta nopeasti ennen kuin ne reagoivat muiden kennossa olevien hiukkasten kanssa.⁵⁰

Reaktiokennoa käytettäessä voidaan hyödyntää myös eri reaktiokaasujen erilaista reaktiokinetiikkaa. Esimerkiksi ammoniakin avulla voidaan poistaa myös ^{40}Ar häiriö mitattaessa ^{40}Ca -isotooppia. Aikaisempiin esimerkkeihin verrattuna kyseessä on yksiatominen häiriö, jolloin sitä ei voida poistaa törmäyskennoa käyttämällä. Koska ammoniakin ionisoitumisenergia (10,2 eV) on matalampi kuin argonin (15,8 eV), varauksensiirtoreaktio on nopea ja eksoterminen näiden partikkeleiden välillä. Tällöin muodostuu NH_3^+ -ioneja sekä atomaarista argonkaasua. Vastaavasti kalsiumin ionisoitumisenergia on vain 6,1 eV, minkä vuoksi reaktio ammoniakin ja kalsiumionien välillä on endoterminen. Reaktiota ammoniakin ja kalsiumin välillä ei siis tapahdu reaktiokennossa. Näin ollen reaktiokennossa virtaava ammoniakkikaasu reagoi ainoastaan mittausta häiritsevien ionien kanssa, jolloin argonin

aiheuttama häiriö saadaan poistettua ja massa-analysaattorille päätyvät ainoastaan analyytti-ionit.⁵⁰

Uudempi näkökulma ICP-MS-laitteistolla esiintyvien häiriöiden korjaamiseen on käyttää ICP-QQQ-laitteistoa, joka perustuu tandemmassaspektroskopiaan. Siinä kolme kvadrupolia on kytketty peräkkäin. Näistä viimeinen toimii varsinaisena massa-analysaattorina, kun taas kaksi ensimmäistä poistavat häiriöt. Tekniikalla voidaan esimerkiksi määrittää proteiinien rikki- ja fosforipitoisuuksia. Tekniikan tarkoituksena on siirtää analyytin m/z -arvoa häiriövapaalle alueelle. Ensimmäinen kvadrupoleista toimii suodattimena, jonka läpi pääsevät vain analyytti-ionit ja massaltaan yhtä suuret mittausta häiritsevät ionit. Ensimmäisen kvadrupolin läpäisevät ionit ovat kaikki 1 amu (atomimassayksikköä) olevan massaikkunan sisällä. Toinen kvadrupoleista on tavallinen reaktiokenno, jossa voidaan käyttää kaasuna esimerkiksi happikaasua. Tällöin analyytti-ionit hapettuvat muotoon $^{47}\text{PO}^+$ ja $^{48}\text{SO}^+$, jolloin ne voidaan mitata häiriövapaasti. Koska ennen reaktiokennoa suurin osa näytematriisin tuomista ioneista poistetaan, ne eivät aiheuta häiriöitä mittaukseen. Myös taustakohinan määrä vähenee ensimmäisen kvadrupolin ansioista.^{61,63}

6.6 Massa-analysaattorit

ICP-MS-laitteiston oleellisin komponentti on massa-analysaattori, jonka tehtävänä on erottaa analyytti-ionit kaikista muista ioneista ja hiukkasista. Analyytti-ioneista eroteltavia hiukkaisia ovat esimerkiksi kaikki muut alkuaineet kuin analyytti, näytemariisi, liuotin ja plasman argonista muodostuneet ionit. Erottelu tapahtuu ionien m/z -suhteen perusteella. ICP-MS-tekniikassa käytetään suurimmaksi osaksi tekniikkana kvadrupolia, mutta myös muita tekniikoita on käytössä.⁵⁰

Kvadrupolin rajallinen erottelukyky voi aiheuttaa ongelmia, mikäli halutaan esimerkiksi erottaa analyytti-ionit ja niitä häiritsevät argonia sisältävät ionit. Tällöin kvadrupolin resoluutio ei ole riittävä piikkien erottamiseen. Ongelma voidaan ratkaista käyttämällä sektorimagneetti-massaspektrometria. Siinä ionien erottelu perustuu sähkömagneettiin, joka muuttaa eri massaisten ionien lentorataa. Ennen magneettia ionit kiihdytetään korkeaan nopeuteen korkean jännitteen avulla. Ionit fokusoidaan detektorille käyttäen elektrostaattista analysaattoria, joka ohjaa ioneja niiden energian perusteella. Toinen, hieman vähemmän ICP-MS-laitteistoissa käytetty massa-analysaattori on *time-of-flight*-analysaattori (TOF). Siinä ionit erotellaan niiden lentoajan perusteella. Ionit kiihdytetään jännitteen avulla siten, että ne saavat saman kineettisen energian. Koska ionien massa on eri, ne liikkuvat lentoputkessa eri nopeudella. Kun mitataan

detektorille saapuvia ioneja ajan funktiona, saadaan selville kunkin m/z -arvon suhteellinen intensiteetti.⁵⁰

Kvadrupoli on kuitenkin käytössä noin 90 % myydyistä ICP-laitteistoissa. Tekniikkana se on suhteellisen vanha, sillä se on ollut kaupallisesti saatavilla jo vuodesta 1983 alkaen. Rakenteeltaan kvadrupoli koostuu neljästä identtisestä sylinterimäisestä tai hyperbolisesta sauvasta. Sauvat ovat tyypillisesti valmistettu ruostumattomasta teräksestä tai molybdeenistä. Sauvoissa voi olla esimerkiksi keraaminen pinnoite estämään happaman näytetaustan mahdollisesti aiheuttama korrosio. ICP-MS-tekniikassa käytetyt sauvat ovat yleensä 15–20 cm pitkiä ja halkaisijaltaan noin 1 cm. Kvadrupoli, kuten muutkin massa-analysointilaitteet, sijaitsevat ionioptiikan ja mahdollisen törmäys- tai reaktiokennon sekä detektorin välissä. Turbomolekulaarinen pumppu pitää kvadrupolin ilmanpaineen mahdollisimman täydellisessä vakuuissa. Ionioptiikan ansiosta ionit saapuvat kvadrupolille siten, että niiden kineettinen energia on yhtä suuri. Tämän ansiosta ionit voidaan lajitella niiden m/z -suhteen perusteella. Pitkän historian ansiosta kvadrupoliin perustuvien ICP-MS-laitteiden voidaankin sanoa olevan erittäin hyvin soveltuvia rutiininomaiseen alkuaineiden analytiikkaan. Kvadrupoli mahdollistaa myös laitteen korkean suoritustehon, jonka ansiosta näytteistä voidaan määrittää suhteellisen nopeasti useita alkuaineita yhdellä mittauksella.⁵⁰

Kvadrupolien toimintaperiaate perustuu sauvoissa kulkeviin erilaisiin jännitteisiin. Toisessa sauvaparissa kulkee tasavirta ja toisessa sauvaparissa puolestaan radiotaajuinen vaihtovirta. Käytetty taajuus on tyypillisesti 2–3 MHz. Ionien saapuessa kvadrupoliin varaukseltaan positiiviset ionit alkavat kääntyä kohti negatiivisesti varattuja sauvoja. Kun toisen sauvaparin virran kulkusuunta muuttuu, myös ionin kulkusuunta vaihtuu päinvastaiseen suuntaan. Näin sopivan m/z -suhteen omaavat ionit joutuvat spiraalimaiseen liikkeeseen ja lopulta päätyvät ulos kvadrupolista. Näin vain tietyn m/z -arvon omaavat ionit pääsevät ulos kvadrupolista ja muut ionit poistuvat kvadrupolin väleistä ja eivätkä päädy detektorille. Jännitteitä muuttamalla, voidaan säädellä, mitkä ionit läpäisevät massa-analysointilaitteen. Kvadrupolilla ei siis voida määrittää kuin yksi alkuaine kerrallaan. Tämän vuoksi mittaus kestää sitä kauemmin, mitä enemmän alkuaineita mitataan.^{50,64}

Kvadrupolin toimintaa voidaan arvioida kahdella kriteerillä: sen erottelukyvillä (*resolving power*) sekä herkkyydellä (*abundance sensitivity*). Kvadrupolin erottelukyky voidaan määrittää analytti-ionin nominaalisen massan ja kahden erottuneen massapiikin välisen etäisyyden suhteella eli $R = m/\Delta m$, jossa R on erottelukyky, m on nominaalinen massa, ja Δm on erottuneiden piikkien välinen etäisyys. Kvadrupoleista puhuttaessa käytetään usein

erottelukyvyn sijasta termiä resoluutio. Määritelmän mukaan kvadrupolin resoluutio määritellään piikin leveytenä kohdasta, jossa piikin korkeus on 10 % piikin maksimikorkeudesta. Kvadrupolin herkkyydellä puolestaan voidaan kuvata sitä, kuinka paljon analyytin aiheuttama massapiikki vaikuttaa viereisiin piikkeihin. Yleensä tarkastellaan yhtä atomimassayksikköä suurempaa ja pienempää piikkiä verrattuna analyytin tuottamaan piikkiin. Näistä kahdesta ominaisuudessa tärkeämpi on juuri edellä mainittu herkkyys, sillä etenkin erittäin pienten pitoisuuden määrittämisessä on tärkeää, etteivät viereiset massat häiritse analyytin mittaamista. Kun pitoisuudet ovat pienet, viereisen piikin vaikutus saattaa muuttaa tulosta merkittävästi.⁵⁰

Kvadrupolin resoluutioon vaikuttavat useat tekijät. Esimerkiksi sauvojen muoto, halkaisija ja pituus ovat merkittäviä tekijöitä. Lisäksi käytetyt jännitteet ja taajuudet sekä vakuumin täydellisyys vaikuttavat ionien stabiilisuuteen. Ionien stabiilisuus niiden liikkuessa kvadrupolissa puolestaan mahdollistaa ionien paremman erottuvuuden. Teoriassa hyperboliset sauvat luovat erottelukyvyltään suotuisamman sähkökentän ioneille verrattuna sylinterimäisiin sauvoihin. Myös käytettävällä taajuudella on merkitystä. Korkeamman taajuuden käyttäminen aiheuttaa myös korkeamman ionien oskilloinnin, mikä puolestaan myös parantaa ionien erottuvuutta. Lisäksi vakuumin laatu vaikuttaa merkittävästi piikkien muodostumiseen. Mikäli vakuumi ei ole täydellinen, ilman aiheuttamat törmäykset kvadrupolissa aiheuttavat hajontaa ionien kineettiseen energiaan, mikä puolestaan havaitaan massaspektrissä piikkien leviämisenä. Tämä havaitaan erityisesti piikin vasemmalla puolella. Resoluutio ei kuitenkaan ole vakio kvadrupolissa, vaan sitä voidaan säätää. Tyypillisesti resoluutio voi vaihdella 0,3–3 atomimassayksikön välillä. Jotkin laitemallit voivat myös vaihtaa kvadrupolin resoluutiota jopa kesken mittauksen. On kuitenkin tärkeää ottaa huomioon, että korkeamman resoluution käyttö alentaa kvadrupolin herkkyyttä huomattavasti. Vastaavasti alemman resoluution käytöllä voidaan puolestaan kasvattaa mittausherkkyyttä.⁵⁰

Kvadrupolissa käytettyjen sauvojen fyysiset ominaisuudet vaikuttavat merkittävästi myös herkkyyteen. Eniten herkkyyteen ja sitä kautta piikkien muotoon vaikuttavat ionien liike ja kineettinen energia niiden saapuessa kvadrupoliin ja lähtiessä sieltä. Kvadrupolilla havaittujen ionien piikit muodostuvat aina siten, että piikin vasemmanpuoleinen puoli, eli matalamman massan puoli, on hieman loivemmin laskeva. Piikin oikea kylki on puolestaan vasempaan kylkeen verrattuna jyrkempi. Ilmiö johtuu siitä, että kvadrupoli hidastaa ionien liikettä, jolloin suurempi osa havaituista ioneista nähdään piikin vasemmalla puolella. Näin ollen kineettisen energian muutokset vaikuttavat dramaattisesti kvadrupolin herkkyyteen. Herkkyyden merkitys havaitaan selvästi, kun tarkastellaan esimerkiksi arseenin määrittystä. Europiumin kahdesti

varautunut ioni $^{151}\text{Eu}^{2+}$ häiritsee arseenin isotoopin ^{75}As määrittystä massalla 75,5. Mikäli kvadrupolin herkkyys on huono, europiumin piikin vasen puoli osuu päällekkäin arseenin piikin kanssa häiriten mittauksia. Ongelma voidaan usein kiertää käyttämällä jotain muuta analyytin isotooppia mittaukseen. Tämä ei kuitenkaan ole aina mahdollista. Esimerkiksi arseenin tapauksessa mitattavissa on vain yksi stabiili isotooppi. Näin ollen mitattavan isotoopin vaihtaminen ei ole mahdollista.⁵⁰

6.7 Detektorit

Viimeinen osa ICP-MS-laitteistoa on detektori, jolla erotellut ionit havainnoidaan. Detektorille saapuvat ionit muutetaan sähköpulsseiksi, jotka lasketaan detektoriin liitetyllä elektroniikalla. Muodostuneiden sähköpulsseiden määrä kuvastaa siis analyytin konsentraatiota näytteessä. Jotta näytteen konsentraatio voidaan laskea, pulssien lukumäärää verrataan kalibrointiliuoksista saatuihin arvoihin. ICP-MS-laitteiden kehityksen aikana käytössä on ollut useita erilaisia detektorityyppejä. Nykyisissä laitteissa yleisin detektorin tyyppi on dynodeihin perustuva elektronimonistin. Aiemmissa laitteissa käytettiin tyypillisesti matalilla ionin laskumäärillä yksinkertaisempia elektronimonistimia sekä Faradayn kuppia korkeammille ionimäärille.⁵⁰

Yksinkertaisempi malli elektronimonistimesta perustuu kanavaan, johon massa-analysaattorilta saapuvat ionit törmäävät. Kanava on päällystetty puolijohtavalla materiaalilla ja kanavan päiden välillä on potentiaaliero. Kanavan alkupää, johon ionit osuvat, on negatiivisessa potentiaalissa, kun taas kanavan loppupää on maadoitettu. Positiivisesti varautuneet ionit törmäävät alkupäässä kanavan pinnoitteeseen, jolloin pinnasta irtoaa yksi tai useampi elektroni. Potentiaalieron vuoksi nämä irronneet elektronit kulkeutuvat alaspäin kohti kanavan loppupäätä. Irronneiden elektronien osuessa kanavan seinämiin ne irrottavat lisää elektroneita, jotka puolestaan jatkavat reaktiota eteenpäin ketjureaktiomaisesti. Kanavan päässä on esivahvistin, joka vahvistaa elektroneista muodostuvan pulssin. Vahvistettu pulssi etenee digitaaliselle erottimelle, jonka tehtävä on laskea saapuneet pulssit. Tietyn raja-arvon tulee ylittyä, jotta digitaalinen erotin ottaa saapuneen pulssin mukaan laskuihin. Näin estetään, ettei pinnalta satunnaisesti emittoituneet sekä plasmasta emittoituneet fotonit aiheuta elektronista pulssia kanavassa. Mikäli ionien saapumisnopeus on korkea, ei elektronimonistin ehdi laskea kaikkia saapuneita ioneja. Pulssin lähtiessä elektronimonistimelta on noin 30–50 ns viive, jonka aikana detektori ei pysty laskemaan saapuneita ioneja. Tämän vuoksi suuremmille ionimäärille on käytettävä toisen tyyppistä detektointitekniikkaa.⁵⁰

Faradayn kuppi soveltuu hyvin käytettäväksi silloin, kun erittäin pienet määritysalarajat eivät ole tavoitteena ja detektorille saapuvien ionien määrä on erittäin korkea. Sopiva ionien

laskentanopeus Faradayn kupille on, kun ioneja saapuu detektorille vähintään noin 10 000 sekunnissa. Näin ollen Faradayn kuppi soveltuu huonosti ainoaksi käytettäväksi detektoriksi, sillä muuten laitteen herkkyys kärsii merkittävästi.⁵⁰ Faradayn kuppi on toiminnaltaan erittäin yksinkertainen. Massa-analysaattorilta saapuvat ionit osuvat kuppimaiseen virtapiiriin osaan, jolloin ionien varaus siirtyy kuppiin. Koska kuppi on osa detektorin virtapiiriä, muutos piirin jännitteessä pystytään mittaamaan erittäin tarkasti. Tämän vuoksi on myös tärkeää, että ioneja saapuu kuppiin riittävä määrä, jotta signaali saadaan muodostettua.⁶⁵

Uudemmissa laitteissa käytetään kuitenkin diskreettiä elektronien monistusputkea, jossa yksittäiset dynodit hoitavat elektronien monistumisen. Kyseistä detektorityyppiä voidaan kutsua myös aktiiviseksi filmiksi. Detektori asetetaan usein hieman sivuun kvadrupolin ulostuloakselista. Näin varmistetaan, etteivät mahdollisesti jäljelle jääneet neutraalit partikkelit ja plasmasta aiheutuva taustasäteily aiheuta ylimääräistä vastetta detektorissa. Ionien saapuessa detektorille ne kulkeutuvat kaarevaa rataa pitkin ensimmäiselle dynodille, jossa yksi tai useampi elektroni vapautuu dynodista. Nämä vapautuneet elektronit irrottavat elektroneita myös seuraavista dynodeista, kunnes lopulta irronneiden elektronien muodostama sähköpulsso mitataan anodilla. Dynodeja sisältävä detektori eroaa materiaaleiltaan hieman tavanomaisesta elektronimonistimesta. Tämän vuoksi elektronit irtoavat dynodeista hieman helpommin, minkä vuoksi detektorin herkkyys on hieman parempi verrattuna tavanomaiseen elektronimonistimeen.⁵⁰

7 Selenin mittausta häiritsevät tekijät ICP-MS:llä

Selenin määrittämiseen käytetään tyypillisesti GFAAS-, ICP-OES- tai ICP-MS-tekniikoita, sillä mitattavat pitoisuusalueet esimerkiksi elintarvikenäytteiden tapauksessa ovat tyypillisesti vain luokkaa mg/kg. Tyypillisin esikäsitteily elintarvikenäytteille, on liuottaa ne happoon, jolloin lopullisen laimennoksen myötä mitattava pitoisuus liuoksessa on enää vain luokkaa µg/l. Tämän vuoksi ICP-MS on selenin määrittämiseen soveltuvin laitteisto.¹

ICP-tekniikassa käytettävä plasma muodostetaan käyttäen argonkaasua. Tämän vuoksi argonin isotoopit saattavat aiheuttaa häiriöitä tietyille alkuaineille. Seleni on yksi näistä alkuaineista, joille argon aiheuttaa häiriöitä. Argonin yleisimmät isotoopit ovat 36, 38 ja 40 amu. Yksittäiset argonionit eivät kuitenkaan häiritse selenin mittaamista, jonka isotoopit ovat 74–80 amu alueella. Vaikka argon on reagoimaton jalokaasu, se kuitenkin muuttuu reaktiiviseksi erittäin korkeassa lämpötilassa. Plasman erittäin korkea lämpötila mahdollistaa siis argondimeerien syntymisen. Nämä argonin dimeerit ovat massaltaan samalla alueella selenin isotooppien kanssa. Selenin mitattavat isotoopit ja niitä häiritsevät Ar-dimeerin häiriöt on koottu alla

olevaan taulukkoon 6, jossa on myös esitetty seleenin isotooppien esiintyvyys luonnossa sekä argondimeerien laskennallinen esiintyvyys.¹

Taulukko 6. Seleenin isotoopit ja niiden esiintyvyys luonnossa, sekä isotooppien mittaamista vaikeuttavat Ar-häiriöt. Taulukko on mukailtu lähteestä.¹

Se isotooppi	Ar häiriö
⁷⁴ Se (0,9 %)	³⁶ Ar ³⁸ Ar (0,0004 %)
⁷⁶ Se (9,4 %)	³⁶ Ar ⁴⁰ Ar (0,67 %)
⁷⁷ Se (7,6 %)	-
⁷⁸ Se (23,8 %)	³⁸ Ar ⁴⁰ Ar (0,13 %)
⁸⁰ Se (49,6 %)	⁴⁰ Ar ⁴⁰ Ar (99,2 %)
⁸² Se (8,7 %)	-

Seleenin eri isotoopeista käytännössä kaikki muut paitsi ⁷⁴Se ovat esiintyvyytensä puolesta käytettäviä ICP-MS-mittauksessa. Suurin esiintyvyys on ⁸⁰Se isotoopilla, mutta kyseisellä isotoopilla on myös erittäin voimakas Ar-häiriö. Kyseisen seleenin isotoopin mittaaminen on siis käytännössä mahdotonta, sillä ⁴⁰Ar⁴⁰Ar-dimeerin aiheuttama intensiteetti detektorilla voi olla useita miljoonia cps (*counts per second*). Myös isotoopeille ⁷⁶Se ja ⁷⁸Se argonin häiriö on merkittävä, vaikka kyseisten argonin isotooppien esiintyvyys onkin huomattavasti pienempi. Kyseisten isotooppien kohdalla argonhäiriö voidaan poistaa käyttämällä mittauksessa törmäyskennoa.¹

Isotoopeilla ⁷⁷Se ja ⁸²Se argon dimeerin häiriötä ei havaita, mutta kyseisille isotoopeille on muita häiriötä. Erittäin korkeassa lämpötilassa argon reagoi myös muiden alkuaineiden kanssa. Argon muodostaa plasmassa esimerkiksi seuraavia yhdisteitä: ArN⁺, ArO⁺ ja ArCl⁺. Näistä yhdisteistä ⁴⁰Ar³⁷Cl häiritsee ⁷⁷Se-isotoopin mittaamista. ⁸²Se-isotoopin mittausta puolestaan häiritsevät ⁸²Kr sekä ⁸¹Br¹H. ArCl:n muodostuminen plasmassa on erittäin todennäköistä, sillä klooria on lähes jokaisessa näytematriisissa. Myös kryptonin häiriö on merkittävä, jonka vuoksi se estää isotoopin ⁸²Se käytön seleenin määrittämiseksi, sillä krypton on yleinen epäpuhtaus plasman muodostamiseen käytetyssä argonkaasussa. Sekä ⁷⁷Se että ⁸²Se soveltuvat seleenin mittaamiseen siis huonosti ellei häiriöitä poisteta.^{1,2}

Ongelmat argonhäiriön kanssa voidaan pääsääntöisesti korjata. Yksinkertaisin tapa korjata häiriötä on matemaattisesti poistaa häiriön aiheuttama vaikutus tuloksesta. Tätä käytetään usein esimerkiksi korjaamaan ⁴⁰Ar³⁷Cl-häiriö ⁷⁷Se-tuloksista. Jotta matemaattinen korjaus voidaan tehdä, on seleenin signaalin oltava häiriön aiheuttamaa signaalia korkeampi. Kun seleenin pitoisuus näytteissä pienenee, myös korjauksesta tulee vaikeampaa. Toinen tapa korjata häiriöitä on käyttää törmäyskennoa, jonka avulla suurempikokoiset argondimeerit ja

argonyhdisteet voidaan poistaa ennen detektointia. Luonnollisen esiintyvyytensä ansiosta parhaimmat vaihtoehdot seleenin mittaamiseen ovat ^{76}Se , ^{77}Se ja ^{78}Se . Näistä kuitenkin käytetyin on ^{78}Se , sillä sen esiintyvyys muihin verrattuna on lähes kolminkertainen.¹

Argonhäiriön lisäksi mainitsemisen arvoinen on myös nikkelin aiheuttama häiriö seleenin mittauksessa. NiO^+ sekä NiOH^+ häiritsevät seleenin isotooppien määrittämistä. Nikkelin kolme yleisintä stabiilia isotooppia ovat massaltaan 58, 60 ja 62 amu. Näin ollen oksidina nikkeli häiritsee seleenin isotooppeja ^{74}Se , ^{76}Se ja ^{78}Se . Pitoisuudet elintarvikkeissa on nikkelin osalta kuitenkin niin pieniä, että nikkelin mahdollisesti aiheuttama häiriö voidaan poistaa käyttäen törmäyskennoa.^{4,66}

7.1 Gadoliniumin aiheuttama häiriö

Argonin lisäksi seleenin määrittämistä häiritsee myös hieman yllättävä alkuaine. Gadolinium (Gd) on lantanoideihin kuuluva harvinainen maametalli. Gadoliniumia käytetään esimerkiksi magneettikuvauksessa varjoaineena. Gadolinium on hopeanhohtoinen metalli, mutta luonnossa se esiintyy vain epäorgaanisina suoloina mineraaleissa esimerkiksi gadoliniitissa.⁶⁷ Vaikka gadolinium kuuluu harvinaisiin maametalleihin, se ei nimestään huolimatta ole erityisen harvinainen maankuoressa. Se on yleisempi alkuaine maankuoressa kuin esimerkiksi tallium, antimoni, kadmium tai vismutti.⁶⁸

Harvinaisena maametallina gadoliniumin toinen ionisoitumisenergia (12,09 eV) on suhteellisen alhainen, joten kahdesti varautuneiden Gd^{2+} -ionien muodostuminen argonplasmassa on mahdollista.⁶⁹ Gadolinium esiintyy luonnossa massaluvuilla 152–160. Näin ollen muodostuvien kahdenarvoisten ionien m/z arvo on 76–80 eli juuri sillä alueella, jossa mitattavat seleenin isotoopit ovat. ICP-MS-laitteiston kvadrupoli erottelee ionit niiden massan ja varauksen suhteen perusteella ja näin näytteessä mahdollisesti oleva gadolinium häiritsee seleenin mittaamista aiheuttamalla virheellistä positiivista vastetta detektorilla.⁶⁶

Gadoliniumin stabiileista isotoopeista kaikki neljä häiritsevät seleenin mittausta (taulukko 7). Yleisimmät gadoliniumin isotoopeista häiritsevät seleenin isotooppeja ^{78}Se ja ^{80}Se . Näistä kahdesta ^{78}Se on käytetympi isotooppi seleenin mittaukseen, sillä ^{78}Se -isotoopin esiintyvyys on riittävällä tasolla mittauksen onnistumiseksi. Kyseisen isotoopin kohdalla on kuitenkin varmistuttava siitä, että näytteissä ei ole häiritsevää gadoliniumia tai vaihtoehtoisesti häiriö on jotenkin korjattava.⁶⁶

Taulukko 7. Seleenin ja gadoliniumin isotoopit sekä niiden esiintyvyydet luonnossa. Taulukko yhdistelty lähteistä.^{66,70}

Se isotooppi	Gd häiriö
⁷⁴ Se (0,9 %)	-
⁷⁶ Se (9,4 %)	¹⁵² Gd ²⁺ (0,20 %)
⁷⁷ Se (7,6 %)	¹⁵⁴ Gd ²⁺ (2,18 %)
⁷⁸ Se (23,8 %)	¹⁵⁶ Gd ²⁺ (20,47 %)
⁸⁰ Se (49,6 %)	¹⁶⁰ Gd ²⁺ (21,86 %)
⁸² Se (8,7 %)	-

Koska gadolinium on maaperässä suhteellisen yleinen alkuaine, ei ole mitenkään poikkeuksellista, että gadolinium kulkeutuu maaperän kautta myös esimerkiksi elintarvikenäytteisiin. Gadolinium voi olla ongelmana myös verinäytteiden seleenin määrittämisessä. Koska gadoliniumia käytetään magneettikuvauksissa varjoaineena, verenkiertoon jää pieniä määriä gadoliniumia, jolloin seleenin määrittäminen verestä magneettikuvauksen jälkeen saattaa aiheuttaa virheellisesti liian suuria tuloksia. Yleisesti käytetty gadoliniumia sisältävä lääkeaine on gadoteerihappo. Ongelman välttämiseksi on verinäyte otettava ennen mahdollista magneettikuvausta, mikäli verestä halutaan mitata seleenipitoisuus.⁶⁶

Esimerkiksi mitattaessa ⁷⁸Se-isotooppia ¹⁵⁶Gd²⁺ häiritsee mittausta, minkä vuoksi häiriö on korjattava, mikäli näytteissä on merkittäviä määriä gadoliniumia. Yksiatomista Gd²⁺-ionia ei kuitenkaan voida poistaa käyttämällä törmäyskennoa kuten argonin häiriön tapauksessa. Gadoliniumin häiriön poistamiseksi on siis käytettävä muita keinoja. Yleisesti käytetty tapa on matemaattisesti korjata seleenin mittaustulos siten, että gadoliniumin osuus aiheutuneesta vasteesta detektorilla poistetaan. Aluksi on kuitenkin mitattava puhtaasta Gd-liuoksesta Gd/Gd²⁺ suhde, jotta korjauskerroin voidaan laskea. Suhteen avulla laitteiston ohjelmistolla pystytään muodostamaan korjauskerroin seleenin tuloksen korjaamista varten.⁶⁶

Matemaattisen korjauksen lisäksi on myös mahdollista korjata häiriötä nostamalla laitteiston resoluutiota. Kun resoluutiona käytetään 0,4 amu, gadoliniumin isotoopit ¹⁵⁶Gd²⁺ ja ¹⁵⁵Gd²⁺ voidaan erottaa seleenin isotoopeista ⁷⁷Se ja ⁷⁸Se. Resoluution kasvattaminen laitteella alentaa kuitenkin merkittävästi laitteen herkkyyttä. Näin ollen erittäin pienten pitoisuuksien mittaaminen ei enää ole mahdollista, mikäli resoluutiota kasvatetaan.^{2,66}

Käytännöllisin menetelmä gadoliniumin häiriön poistamiseksi on käyttää törmäys- tai reaktiokaasua. Nelms artikkelissaan⁷¹ vertaili seleenin mittaamista korkeassa gadoliniumtaustassa sekä standardimoodissa että törmäys- ja reaktiokaasun kanssa. Standardimoodilla tarkoitetaan mittaustilaa, jossa ei käytetä törmäys- tai reaktiokennoa, vaan

näyte ohjataan sumutinkammiosta ionioptiikan läpi suoraan massa-analysointilaitteelle. Törmäys/reaktiokaasuna artikkelissa käytettiin puhdasta heliumia ja vetykaasua. Koeasetelmassa 5 µg/l Se-liuosta mitattiin 10 mg/l gadoliniumtaustassa. Määritys tehtiin käyttäen isotooppia ⁷⁷Se. Tuloksista käy ilmi, että paras menetelmä seleenin mittaamiseen gadoliniumin läsnä ollessa on käyttää reaktiokennossa vetyä reaktiokaasuna. Vedyn kanssa mitattuna liuoksen pitoisuus oli erittäin lähellä oikeaa arvoa 5 µg/l. Standardimoodilla mitattuna pitoisuus oli lähes 12-kertainen. Heliumin käytön törmäyskaasuna havaittiin puolestaan pahentavan gadoliniumin häiriötä. Tulokset heliumkaasulla mitattuna olivat oikeaan tulokseen nähden jopa 400-kertaisia. Reaktiokaasun käyttäminen rajoittaa kuitenkin muiden alkuaineiden määrittämistä samanaikaisesti, sillä joidenkin alkuaineiden kohdalla reaktiokennon käyttäminen heikentää analyysin intensiteettiä merkittävästi, jolloin myös herkkyys ja määrittämissalarajat laskevat. Mikäli näytteestä halutaan määrittää samanaikaisesti muita alkuaineita, ne tulee mitata eri mittaustilassa, mikä puolestaan pitkittää mittausta.^{66,71}

Vaikka heliumin käyttö törmäyskaasuna poistaakin tehokkaasti moniatomisten ionien aiheuttamia häiriöitä esimerkiksi argondimeerin aiheuttaman häiriön, se ei siis kuitenkaan poista gadoliniumin häiriötä vaan oikeastaan pahentaa sitä. Vertailtaessa eri kennokaasun virtausnopeuksia häiriö voimistui, kun He-kaasun virtausnopeutta kasvatettiin. Tämä aiheutuu siitä, että törmäyskennon käyttö vaikuttaa laskevasti intensiteetteihin suhteessa enemmän yhdesti varautuneisiin ioneihin verrattuna kahdesti varautuneisiin ioneihin. Ilmiö oletettavasti aiheutuu eri varaustilojen aiheuttamasta ionien kokoerosta.⁷²

Gadoliniumin häiriötä voidaan poistaa myös siirtymällä kokonaan pois seleenin häiriöalttiilta alueelta. Tämä tapahtuu käyttämällä reaktiokaasuna happea, jolloin seleeni hapettuu seleenioksidiksi (SeO). Tällöin muodostuvan ionin, esimerkiksi ⁷⁸Se¹⁶O⁺ massa on 16 amu suurempi kuin atomaarisen seleeni-ionin. Massalla 94 amu esiintyy kuitenkin myös eräs häiriö: molybdeenionilla on sama massa, joten molybdeenin läsnäolo näytteissä aiheuttaa virheellisen tuloksen mitattaessa seleenioksidia. Myös molybdeeni reagoi hapen kanssa muodostaen MoO⁺ ja MoO₂⁺ -ioneja. Näin seleeni voidaan mitata seleenioksidina ilman häiriöitä, kun vain kaikki näytteen molybdeeni saadaan myös hapetettua oksideiksi. Molybdeenioksidien muodostus riippuu kuitenkin käytetyn happikaasun virtauksesta. Riittämätön virtaus aiheuttaa sen, ettei kaikki näytteen molybdeeni hapetu oksideiksi, jolloin molybdeenionit häiritsevät seleenioksidin mittausta. Liian suuri virtaus puolestaan heikentää seleenin herkkyyttä, mikä vaikeuttaa mittausta.²

Seleenin mittaushäiriöihin liittyvässä artikkelissaan² Paul tutki eri mittaussuhteiden vaikutusta erilaisten seleeniliuosten mittauksessa. Käytettävänä mittaustekniikoina oli standardimittaustilan lisäksi mittaukset käyttäen törmäyskennoa sekä reaktiokennoa, jossa reaktiokaasuna oli 8 % H₂/He ja 10 % O₂/He. Näytematriisina oli neljä erilaista synteettistä seleeninäytettä, joissa kaikissa seleenin pitoisuus oli 1 µg/kg. Kahdessa näistä näytteistä oli gadoliniumtausta (10 µg/kg ja 100 µg/kg). Lisäksi tutkittiin näyte, jossa seleenin lisäksi oli myös molybdeenitausta (10 µg/kg) ja näyte, jossa oli sekä gadolinium- että molybdeenitausta (10 µg/kg). Parhaaksi menetelmäksi osoittautui 8 % H₂/He, jossa kaikkien näytteiden mittaustulos oli erittäin lähellä oikeaa arvoa. Standardimittaustilassa ja törmäyskennoa käytettäessä gadoliniumia sisältävät näytteet aiheuttivat voimakkaan vääristymän tuloksiin. Kun reaktiokaasuna käytettiin 10 % O₂/He-kaasuseosta, tulokset vääristyivät voimakkaasti, jos näytteissä oli molybdeenia.²

7.2 Jäännöshiilen vaikutus

Pian ICP-MS-tekniikan yleistymisen jälkeen hiilen vaikutusta mitattavien alkuaineiden intensiteetteihin alettiin tutkia. Allain *et al.* tutkivat artikkelissaan⁷³ eri alkuaineiden intensiteettimuutoksia, kun näytteiden joukkoon lisättiin hiiltä sisältäviä yhdisteitä. Lisättäessä glyserolia näytematriisiin seleenin (Se), elohopean (Hg), arseenin (As), kullan (Au) ja telluurin (Te) intensiteetit nousivat merkittävästi. Muilla mitatuilla alkuaineilla ei tapahtunut merkittäviä muutoksia intensiteeteissä. Sama intensiteettitasojen nousu havaittiin samoilla alkuaineilla myös, kun näytteiden joukkoon lisättiin glukoosia. Koska ilmiö toistui samoilla alkuaineilla ja osaan alkuaineista orgaanisen materiaalin lisääminen näytetaustaan ei vaikuttanut, pääteltiin, että intensiteettitasojen nousu ei aiheudu sumuttumisen muutoksista, vaan hiilen läsnäolo plasmassa aiheuttaa muutokset intensiteeteissä. Oletusta tutkittiin lisäämällä argonin sekaan 6 % (v/v) metaanitausta. Sama ilmiö toistui myös metaanilla, mikä varmisti hiilen aiheuttavan intensiteettien muutoksen. Lisäksi ilmiön todettiin olevan riippumaton lisätyn orgaanisen materiaalin konsentraatiosta, sillä kalibraatiosuorat olivat lineaarisia sekä vesiliuoksissa että kahdessa eri glyserolin konsentraatiossa.⁷³

Hiilen läsnäolo näytematriisissa nostaa siis myös seleenin intensiteettiä. Tämän vuoksi hiili saattaa aiheuttaa virhettä seleenin mittaukseen, mikäli hiilipitoisuus ei ole sama sekä kalibroitiliuoksissa että näyteliuoksissa. Näyteliuoksissa hiilipitoisuutta saattaa nostaa esimerkiksi liuennut hiilidioksidi tai erilaiset karbonaatit. Kun kalibroitiliuosten hiilipitoisuus säädetään mahdollisimman samaksi näytteiden kanssa, ongelma poistuu. Tämä voidaan toteuttaa lisäämällä näytteisiin, kalibrointi- ja blank-liuokseen esimerkiksi 2 % (v/v)

metanolitausta. Tällöin hiilen määrä on sekä näytteissä että kalibrointiliuoksissa likimain yhtä suuri ja riittävän korkea, että näytteissä alun perin olevat hieman korkeammat hiilipitoisuudet eivät merkittävästi vaikuta seleenin mittaustulokseen. Laboratorion rutiinianalytiikassa yksinkertaisin tapa lisätä metanoli kaikkiin liuoksiin on esimerkiksi lisätä sopiva metanolipitoisuus mahdollisesti käytetyn sisäisen standardin joukkoon.⁶⁶ Sisäistä standardia käytetään ICP-MS-analytiikassa tasaamaan eroja näytteiden ja standardien välillä. Erot saattavat johtua esimerkiksi näytteen erilaisesta käyttäytymisestä sumuttimessa. Sisäisenä standardina käytetään alkuainetta, jota näytteistä ei ole. Sama alkuainepitoisuus lisätään kaikkiin mitattaviin liuoksiin ja kyseisen alkuaineen intensiteetti mitataan jokaisesta liuoksesta. Näytteistä mitattavien analyyttien tulokset suhteutetaan blank-liuoksen sisäisen standardin ja näytteestä mitatun sisäisen standardin intensiteetin perusteella. Mikäli näytteestä mitattiin pienempi intensiteetti sisäiselle standardille kuin blank-liuoksesta, tulosta korjataan ylöspäin sisäisen standardin perusteella. Vastaavasti tulosta pienennetään, jos havaittu sisäisen standardin intensiteetti on suurempi kuin blank-liuoksessa.⁷⁴ Sisäistä standardia voidaan pipetoida kaikkiin liuoksiin sama tilavuus tai vaihtoehtoisesti lisätä sisäinen standardi T-kappaleen avulla ICP-MS-laitteen peristalttista pumppua käyttäen suoraan näytteensyöttölinjaan.⁶⁶

Tyypillisesti jäännöshiilen aiheuttaman seleenin ja myös arseenin mittaushäiriön korjaamiseen käytetään metanolia. Esimerkiksi seleenin ja arseenin intensiteetit nousevat noin 3-4 kertaisiksi, kun analysoitavissa liuoksissa on säädetty 3-4 % (v/v) metanolitausta.^{75,76} Metanolin lisäämistä analysoitaviin liuoksiin suositellaan myös ISO/TC 34 /SC 5 N-standardiluonnoksessa.⁷⁷ Kyseinen standardiluonnos sisältää menetelmän mineraalien ja hivenaineiden määrittämiselle erilaisista maitotuotteista. Suositeltu metanolipitoisuus analysoitaville liuoksille on 1 % (v/v) metanolia.

Larsen ja Stürup tutkivat⁷⁵ metanolin vaikutusta seleenin ja arseenin mittaukseen ICP-MS-tekniikassa. Tutkimuksessa vertailtiin eri metanolipitoisuuksien vaikutusta ja todettiin, että 3 % (v/v) metanolipitoisuus on sopiva kyseisten alkuaineiden mittauksessa. Tällöin seleenin ja arseenin intensiteetit kasvoivat noin 3,5–4,5-kertaisiksi verrattuna vesiliuoksista mitattuihin pitoisuuksiin. Samassa tutkimuksessa tutkittiin myös ammoniumkarbonaatin käyttöä hiilitaustan korjaamiseen, mutta sen käyttö aiheutti laitteen voimakkaan kontaminaation hiilellä. Metanolilla vastaavaa kontaminaatiota ei havaittu. Lähes vastaavaan tulokseen pääsivät myös Guo *et al.* tutkimuksessaan⁷⁶, jossa tutkittiin arseenin mittausta CH₄- ja O₂-reaktiokaasuilla käyttäen metanolia korjaamaan reaktiokaasun aiheuttamaa signaalin alenemista. Tutkimuksessa 4 % (v/v) metanolin todettiin aiheuttavan noin 3–4 kertaisen

intensiteetin nousun arseenille. Selenille ja arseenille on yhteistä niiden korkea ionisoitumisenergia, mikä tekee niistä huonosti ionisoituvia alkuaineita. Selenin ionisoitumisenergia on 9,75 eV ja arseenin 9,82 eV. Tästä johtuen selenistä vain noin 33 % ionisoituu ICP-MS-laitteiston plasmassa. Arseenille vastaava luku on 52 %.⁷⁵

Metanolin tai muun vastaavan pintajännitystä muuttavan yhdisteen lisääminen analysoitaviin liuoksiin osittain aiheuttaa signaalien intensiteettien nousua kaikilla alkuaineilla. Pienentynyt pintajännitys mahdollistaa pienempien pisaroiden syntymisen sumuttimessa, jolloin plasmaan päätyy enemmän näytettä. Pintajännityksen muutoksella ei kuitenkaan voida selittää, miksi juuri selenillä ja arseenilla havaitaan muista alkuaineista poikkeavasti erittäin suuri intensiteettitasojen nousu. Mekanismi intensiteettitasojen nousulle ei ole täysin selvillä, mutta sen arvellaan johtuvan plasmaan päätyvistä C^+ - ja CH^+ -ioneista. Kyseisten ionien ionisoitumisenergiat (IE) ovat C^+ :lle 11,26 eV ja CH^+ :lle 10,64 eV. Hiilen läsnäolo plasmassa ja korkeampi ionisaatioenergia mahdollistavat sen, että suurempi osa huonosti ionisoituvista alkuaineista, kuten seleeni tai arseeni, voivat ionisoitua. Analyyttien ionisoitumisasteen kasvu aiheutuu C^+ - ja CH^+ -ionien aiheuttamasta vapaiden elektronien lisääntymisestä plasmassa. Atomien välillä tapahtuu siis varauksensiirtoreaktio, jossa matalammalla ionisaatioenergialla oleva analyytti (esim. seleeni) luovuttaa elektroninsa hiilelle, jolloin seleeni ionisoituu. Metanolin aiheuttaman intensiteetin kasvun tietyillä alkuaineilla näyttäisi siis koskevan kaikkia niitä alkuaineita, joiden ionisaatioenergia on hieman hiilen ionisaatioenergian alapuolella eli noin 9–11 eV. Esimerkiksi bromilla (IE 11,81 eV) vastaavaa intensiteetin kasvua ei havaita metanolitaustasta huolimatta, sillä sen ionisaatioenergia on suurempi kuin hiilen. Hiilen aiheuttamaa intensiteetin nousua korkean ionisoitumisenergian omaavilla yhdisteillä ei kuitenkaan voida selittää vain hiilen ja analyytin välisellä varauksensiirtoreaktiolla, sillä kaikilla korkean ionisoitumisenergian omaavilla ei intensiteetin kasvua kuitenkaan havaita. Lisäksi on hyvä huomioida, että suurten hiilipitoisuuksien päättymisen plasmaan pitäisi aiheuttaa myös yleistä intensiteettitasojen laskemista, sillä suuret hiilipitoisuudet laskevat plasman lämpötilaa.^{75,78}

II – Kokeellinen osa

8 Kokeellisen osan taustatiedot

Kokeellisen osan tarkoituksena oli tarkastella seleenin mittaukseen liittyviä virhelähteitä. Jäännöshiilen mahdollista vaikutusta tutkittiin lisäämällä näytteisiin sekä standardiliuoksiin metanolia. Koska näytteen hajotuksesta näyteliuoksiin mahdollisesti jäävä hiili nostaa seleenin intensiteettiä, kaikkiin liuoksiin asetettiin metanolitausta, jotta hajotuksesta jäävän hiilen suhteellinen osuus ei olisi merkittävä. Näytteiden hajotusmenetelmä oli jo lähtökohtaisesti optimoitu siten, että mahdollisimman pieni osa hiiltä jää näyteliuoksiin. Gadoliniumin osalta tarkoituksena oli osoittaa gadoliniumhäiriön olemassaolo mittaamalla synteettisiä näytteitä, joissa gadoliniumpitoisuus oli tunnettu. Kyseisistä liuoksista mitattiin seleenin pitoisuus käyttäen isotooppia ^{78}Se . Osaan valmistetuista liuoksista ei lisätty lainkaan seleeniä, vaan liuokset sisälsivät ainoastaan gadoliniumia. Tulosten perusteella voitiin päätellä, kuinka suuri osa lisätystä gadoliniumista ionisoitui kahdenarvoiseksi ioniksi $^{156}\text{Gd}^{2+}$ häiriten seleenin mittausta. Myös Eviran rutiininäytteiden gadoliniumpitoisuudet mitattiin, jotta voitaisiin varmistua, ettei näytteissä ole seleenin mittausta häiritsevää gadoliniumia. Kaikki tutkimuksessa käytetyt laitteet on koottu taulukkoon 8 ja käytetyt reagenssit taulukkoon 9.

Taulukko 8. Tutkielmassa käytetyt laitteet, niiden valmistajat sekä laitemallit.

Laite	Valmistaja	Malli
Mikroaaltouuni	Milestone	Ethos Plus 2
ICP-MS	Perkin Elmer	NexION 300X
Automaattinen näytteensyöttäjä	Perkin Elmer	S10 Autosampler
Vaaka	Mettler Toledo	PG403-S
Puhdasvesilaitteisto	Millipore	Milli-Q
Homogenisaattori	Foss Tecator	2094 Homogenizer
Kylmäkuivuri	Labogene	Scanvac CoolSafe 100-9 Pro

Taulukko 9. Tutkielmassa käytetyt kemikaalit, niiden valmistajat sekä puhtausasteet.

Yhdiste	Valmistaja	Pitoisuus
Typpihappo (<i>normatom</i>)	VWR Chemicals	67–69 %
Vetyperoksidi (<i>normapur</i>)	VWR Chemicals	30 %
Metanoli (<i>chromanorm</i>)	VWR Chemicals	≥99,9 %
Rodium –perusliuos (<i>PrimAg</i>)	Romil	1000 ppm Rh, 5M HCl
Vismutti –perusliuos (<i>PrimAg</i>)	Romil	1000 ppm Bi, 0,5M HNO ₃
Germanium –perusliuos (<i>PrimAg</i>)	Romil	1000 ppm Ge, 0,1M HF
Gadolinium –perusliuos (<i>ICP standard</i>)	Accustandard	10 000 ppm Gd, 2–5 % HNO ₃
Seleeni –perusliuos (<i>Certipur</i>)	Merck	1000 ppm Se, 0,5M HNO ₃
ICP-kalibroinnin standardiliuos: ICP Calibration mix FS9 (<i>PrimAg</i>)	Romil	As: 1 ppm Cd, Cr, Mn, Ni, Pb, Se: 10 ppm Cu, Zn: 100 ppm
QC-näytteiden perusliuos: ICP-MS quality control sample 2 (25 alkuainetta)	Accustandard	10 ppm, 2–5 % HNO ₃

Lisäksi tutkielman yhteydessä järjestettiin rengastutkimus, jossa kymmenen laboratoriota määrittivät kuivatun lihanäytteen seleenipitoisuuden. Rengastutkimukseen osallistui suomalaisia laboratorioita, joiden toimintaan kuuluu metallianalytiikka elintarvikkeista, mutta kyseisten laboratorioiden vähyden vuoksi rengastutkimukseen pyydettiin mukaan myös laboratorioita muualta Euroopasta. Laboratorioiden pätevyyttä kuvattiin mittaustuloksista lasketuilla z-arvoilla. Tulosten ohessa laboratoriot ilmoittivat myös käyttämänsä mittaamenetelmät. Tätä tietoa hyödynnettiin tulosten tarkastelussa. Käytetyt mittaamenetelmät erosivat esimerkiksi ICP-MS-tekniikan osalta käytetyssä törmäys- tai reaktiokaasussa ja sen virtausnopeudessa.

9 Metanolin vaikutus seleenin mittaamisessa

Metanolin vaikutusta seleenin mittaukseen tutkittiin mittaamalla kolmea eri sertifioitua referenssimateriaalia ja rutiininäytteitä eri metanolipitoisuudessa (1 % ja 2 % v/v). Referenssimateriaaleja tarkasteltiin 1 % ja 2 % metanolitaustassa, mutta rutiininäytteitä tarkasteltiin käyttäen vain 1 % metanolitaustaa. Vertailun vuoksi samat referenssimateriaalit

mitattiin lisäksi ilman metanolia Eviran sisäisen menetelmän Evira8128 mukaisesti.⁷⁹ Näytteistä mitattiin seuraavat alkuaineet: arseeni (As), kadmium (Cd), kromi (Cr), kupari (Cu), mangaani (Mn), nikkeli (Ni), lyijy (Pb), seleeni (Se) ja sinkki (Zn).

Käytetyt referenssimateriaalit olivat: ERM-BD150 Skimmed Milk Powder (maitojauhe), BCR-185R Bovine Liver (kuivattu naudanmaks) ja NIES 27 – Typical Japanese Diet (tyypillinen japanilainen ruokavalio). Kaikki referenssimateriaalit vastaavat hyvin elintarvikematriisia ja niistä oli määritetty sertifioitu arvo seleenille. Lisäksi seleenipitoisuus oli kaikissa näytteissä suhteellisen alhainen. Kaikki näytteet hajotettiin menetelmän mukaisesti mikroaaltouuniavusteisesti ja näytteisiin säädettiin 2 % (v/v) typpihappopitoisuus. Jokaisesta referenssimateriaalista tehtiin kolme rinnakkaisnäytettä, joiden tuloksista laskettiin keskiarvot luottamusväleihin.

9.1 Näytteiden esikäsittely

Hajotukset tehtiin yhteensä kolmessa erässä siten, että yhdessä ajossa oli kutakin kolme referenssinäytettä kolme rinnakkaista sekä yksi sokeanäyte, joka sisälsi samat reagenssit kuin muut näytteet, mutta ei näytemateriaalia. Sokeanäyte käsiteltiin samalla tavalla kuin muut näytteet. Näytteitä punnittiin mikroaaltouuniastioihin noin 0,5 g, minkä jälkeen näytteiden joukkoon lisättiin 3 ml typpihappoa. Näytteiden annettiin seistä typpihapossa vähintään tunnin ajan. Tämän jälkeen näytteiden ja sokeanäytteen joukkoon lisättiin 2 ml vetyperoksidia sekä 3 ml milli-Q-vettä. Näytteet hajotettiin kuumentamalla mikroaaltouunilla. Hajotuksen aikana lämpötila nostettiin 1000 W teholla 200 °C:een. Hajotusohjelman pituus oli 22 minuuttia.

Näytteiden jäähtyttyä ne siirrettiin 100 ml mittapulloihin huuhdellen mikroaaltouuniastiat sekä niiden korkit milli-Q-vedellä. Ennen merkkiin täyttöä näytteisiin lisättiin sisäinen standardi. Sisäisenä standardina mittauksessa käytettiin germaniumia (Ge), rodiumia (Rh) ja vismuttia (Bi), joiden pitoisuus näytteissä oli rodiumin ja vismutin suhteen 10 µg/l sekä 100 µg/l germaniumin suhteen. Osaan näytteistä säädettiin metanolitausta ennen merkkiin täyttöä. Käytetty metanoli oli *Gradient-Grade*-laatuista ja sitä lisättiin 1 ml tai 2 ml riippuen halutusta pitoisuudesta 1 % tai 2 % (v/v).

9.2 Näytteiden mittaus ja tulosten käsittely

Mittausta varten valmistettiin myös yhteensä kahdeksan standardiliuosta sekä blank-liuos. Standardit valmistettiin käyttäen Romilin valmistamaa multialkuainekantaliuosta, joka sisälsi kaikki mitattavat alkuaineet. Kantaliuoksesta valmistettiin standardiliuosten valmistusta varten

kolme väilaimennosta, joista lopulliset standardiliuokset laimennettiin 100 ml muovisiin mittapulloihin. Mitattujen alkuaineiden kalibrointivälit on esitetty taulukossa 10. Ennen merkkiin täyttöä liuoksiin lisättiin sisäinen standardi ja mahdollinen metanoli.

Taulukko 10. Mitatut alkuaineet ja niiden kalibrointivälit.

Alkuaine	Pienin kalibrointiliuos	Suurin kalibrointiliuos
As	0,01 µg/l	20 µg/l
Cd	0,01 µg/l	200 µg/l
Cr	0,5 µg/l	200 µg/l
Cu	4 µg/l	2000 µg/l
Mn	0,1 µg/l	200 µg/l
Pb	0,1 µg/l	20 µg/l
Ni	0,2 µg/l	200 µg/l
Se	0,2 µg/l	20 µg/l
Zn	2 µg/l	2000 µg/l

Näytteet mitattiin Perkin Elmerin NexION 300X ICP-MS-spektrometrillä käyttäen lasista Meinhard-sumutinta sekä syklonista sumutinkammiota. Laitteen mittauseräparametrit on koottu taulukkoon 11.

Taulukko 11. Mittauksessa käytetyt laiteparametrit.

Plasman teho	1600 W
Plasmakaasun virtaus	18 l/min
Apukaasun virtaus	1,2 l/min
Törmäyskaasun virtaus (He)	3,8 ml/min
Pumpun nopeus	20 rpm
Pyyhkäisy	30
Replikaatit	3
Lukemat per replikaatti	1

Näytteistä mitattiin yhteensä yhdeksän alkuainetta, joiden massaluvut, käytetyt sisäiset standardit ja mittaustilat on listattu taulukossa 12.

Taulukko 12. Mitattujen alkuaineiden massaluvut, sisäiset standardit ja mittaustilat. KED (*kinetic energy discrimination*) on Perkin Elmerin ICP-MS-laitteistossa käytetty termi törmäyskennolle ja STD tarkoittaa mittausta standardimoodissa eli mittausta ilman törmäys- tai reaktiokennoa.

Alkuaine	Massaluku (amu)	Sisäinen standardi	Mittaustila
As	75	Ge	KED
Cd	111	Rh	KED
Cr	52	Ge	KED
Cu	65	Ge	STD
Mn	55	Ge	KED
Ni	60	Ge	KED
Pb	208	Bi	STD
Se	78	Ge	KED
Zn	68	Rh	STD

9.3 Referenssinäytteiden tulosten tarkastelu

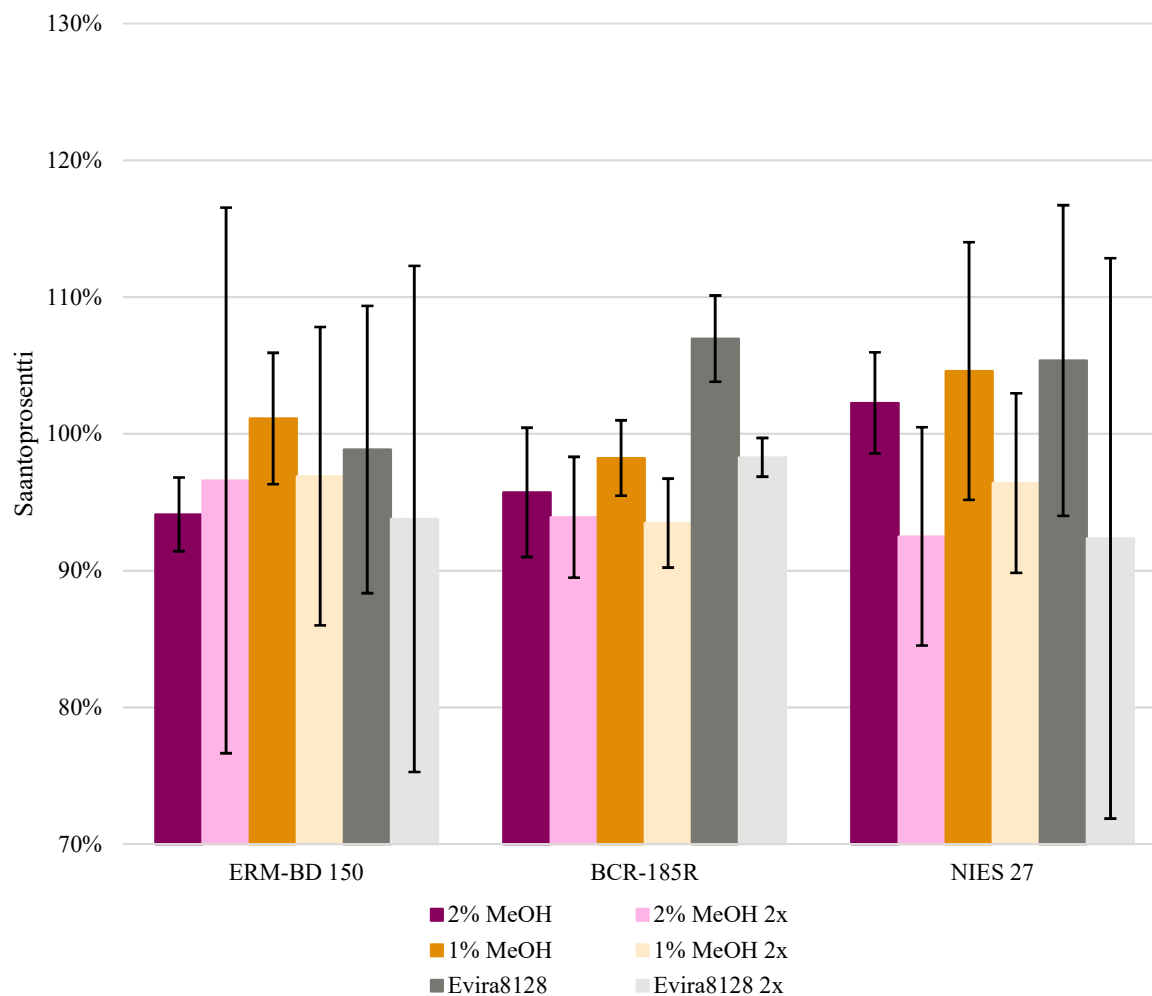
Tämän tutkimuksen kannalta oleellisin mitatuista alkuaineista on seleeni, jonka mittaustulokset on koottu taulukkoon 13 ja esitetty kuvassa 10. Tulosten saantoprosentit on laskettu kaavan (1) avulla:

$$\text{saanto}\% = \frac{\text{mitattu tulos}}{\text{sertifioitu arvo}} \cdot 100\% \quad (1)$$

Taulukko 13. Seleenin mittaustulokset ja 95 % luottamusrajat referenssimateriaaleissa sekä saantoprosentit.

Se (mg/kg)	ERM-BD150		BCR-185R		NIES 27	
Sertifioitu arvo	0,188 ± 0,014		1,68 ± 0,14		0,25 ± 0,02	
Laimennos	1x	2x	1x	2x	1x	2x
Evira8128	0,186 ± 0,020	0,176 ± 0,035	1,80 ± 0,06	1,65 ± 0,03	0,263 ± 0,028	0,231 ± 0,052
	99 %	94 %	107 %	98 %	105 %	92 %
1 % MeOH	0,190 ± 0,010	0,182 ± 0,021	1,65 ± 0,05	1,57 ± 0,06	0,262 ± 0,024	0,241 ± 0,017
	101 %	97 %	98 %	93 %	105 %	96 %
2 % MeOH	0,178 ± 0,006	0,182 ± 0,038	1,61 ± 0,08	1,58 ± 0,08	0,256 ± 0,010	0,231 ± 0,020
	94 %	97 %	96 %	94 %	102 %	93 %

Seleniumin saantoprosentti referenssinäytteissä



Kuva 10. Selenin saantoprosentit eri referenssinäytteissä, metanolipitoisuuksissa ja laimennoksissa. Kuvaajassa 2x tarkoittaa kaksinkertaista laimennosta. Tuloksille on esitetty myös saantoprosenttien 95 % luottamusvälit.

Taulukossa 13 on esitetty mittaustulokset ja saantoprosentit eri referenssimateriaaleille. Selenin osalta pitoisuus määritettiin myös kaksinkertaisista (2x) laimennoksista. Kaikki mittaustulokset on ilmoitettu kolmen rinnakkaismittauksen keskiarvona. Tuloksille on laskettu 95 % luottamusvälit kertoen rinnakkaisnäytteiden tulosten keskihajonta t-jakauman arvolla t_2 , joka kirjallisuuden⁸⁰ mukaan on kolmen rinnakkaisen tapauksessa on 4,30. Kyseinen tulo jaettiin rinnakkaismääritysten lukumäärän neliöjuurella. Kuvassa 10 samat tulokset ja 95 % luottamusvälit on esitetty graafisesti saantoprosenteille.

Lähtökohtaisesti nykyisellä menetelmällä, Evira8128, mitattuna selenin pitoisuus referenssimateriaaleissa on hieman suurempi kuin sertifioitu arvo. Voimakkaimmillaan tämä näkyy maksareferenssissä (BCR-185R). Toisaalta maitojauhereferenssin (ERM-BD150) kohdalla saantoprosentti näyttää olevan hyvä jo lähtötilanteessa. Metanolin lisääminen

näytteeseen näyttäisi pääsääntöisesti alentavan seleenin saantoa. Poikkeuksena tähän on kuitenkin maitojauhereferenssi, jossa paras seleenin saanto saavutetaan käyttämällä 1 % metanolia näyteliuoksessa.

Metanolin lisääminen näyttäisi myös alentavan rinnakkaismittausten keskihajontaa, mikä voidaan havaita pienentyvinä luottamusväleinä. Näytteiden laimentaminen näyttäisi puolestaan kasvattavan hajontaa huomattavasti. Tämä havaitaan erityisesti ERM-BD150- ja NIES 27-referenssinäytteiden kohdalla. Näissä näytteissä seleenipitoisuus on suhteellisen pieni. Kun näyte vielä laimennetaan kaksinkertaiseksi, pitoisuus liuoksessa on erittäin lähellä määritysalarajaa, mikä selittää suuren hajonnan mittausten välillä. Menetelmän määritysalaraja seleenille on 0,2 µg/l ja se on määritetty menetelmän validoinnin yhteydessä nollanäytteiden hajonnan perusteella.

Toisaalta havaitaan myös, että saantoprosentti on laimennetuilla näytteillä suhteellisen alhainen. Esimerkiksi laimennettujen NIES 27-näytteiden saantoprosentit ovat huomattavasti alhaisempia, kuin vastaavat arvot laimentamattomista näytteistä. Toisaalta myös hajonnat ovat laimennetuissa näytteissä huomattavasti korkeammat. BCR-referenssissä laimennetulla näytteellä saatu tulos on lähempänä 100 %:a ja näytteiden hajonta on erittäin pieni. On kuitenkin huomioitava, että hajonta perustuu ainoastaan kolmen rinnakkaisnäytteen määritykseen. Kun vain kolme rinnakkaistulosta mitataan ja tulokset ovat erittäin lähellä toisiaan, keskihajonnasta tulee suhteellisen pieni. Tämä puolestaan aiheuttaa kapean luottamusvälin.

Muiden alkuaineiden tulokset eri metanolipitoisuuksissa on koottu alla olevaan taulukkoon 14. Mittaustulosten yhteydessä on esitetty rinnakkaismääritysten hajonnasta lasketut 95 % luottamusrajat.

Taulukko 14. Muiden alkuaineiden tulokset ja saantoprosentit.

ERM BD150		Evira8128		1 % MeOH		2 % MeOH	
	Sert. arvo (mg/kg)	Tulos (mg/kg)	Saanto %	Tulos (mg/kg)	Saanto %	Tulos (mg/kg)	Saanto %
As		<LOQ		<LOQ		<LOQ	
Cd	0,0114 ± 0,0029	0,0107 ± 0,0007	94 %	0,0110 ± 0,0022	96 %	0,0112 ± 0,0028	98 %
Cr		0,14 ± 0,21		0,43 ± 0,21		0,17 ± 0,04	
Cu	1,08 ± 0,06	1,14 ± 0,50	106 %	1,44 ± 0,69	133 %	0,77 ± 0,07	72 %
Mn	0,298 ± 0,018	0,292 ± 0,023	101 %	0,282 ± 0,004	97 %	0,277 ± 0,012	96 %
Ni		0,05 ± 0,03		0,16 ± 0,06		0,08 ± 0,02	
Pb	0,019 ± 0,004	0,033 ± 0,026	175 %	0,032 ± 0,030	168 %	0,018 ± 0,018	94 %
Zn	44,8 ± 2,0	41,0 ± 3,8	92 %	41,4 ± 0,6	92 %	44,0 ± 0,8	98 %
BCR-185R		Evira8128		1 % MeOH		2 % MeOH	
	Sert. arvo (mg/kg)	Tulos (mg/kg)	Saanto %	Tulos (mg/kg)	Saanto %	Tulos (mg/kg)	Saanto %
As	0,0330 ± 0,0029	0,0320 ± 0,0025	97 %	0,0297 ± 0,0024	90 %	0,0300 ± 0,0027	91 %
Cd	0,544 ± 0,017	0,517 ± 0,012	95 %	0,547 ± 0,022	100 %	0,541 ± 0,017	99 %
Cr		0,08 ± 0,07		0,40 ± 0,15		0,16 ± 0,11	
Cu	277 ± 5	256 ± 2	92 %	266 ± 13	96 %	248 ± 6	89 %
Mn	11,07 ± 0,29	10,83 ± 0,24	98 %	10,51 ± 0,62	95 %	10,52 ± 0,20	95 %
Ni		0,05 ± 0,06		0,14 ± 0,07		0,07 ± 0,03	
Pb	0,172 ± 0,009	0,170 ± 0,006	99 %	0,170 ± 0,005	99 %	0,157 ± 0,018	91 %
Zn	138,6 ± 2,1	127,0 ± 3,2	92 %	139,2 ± 7,4	100 %	162,0 ± 4,0	117 %
NIES27		Evira8128		1 % MeOH		2 % MeOH	
	Sert. arvo (mg/kg)	Tulos (mg/kg)	Saanto %	Tulos (mg/kg)	Saanto %	Tulos (mg/kg)	Saanto %
As	0,60 ± 0,04	0,67 ± 0,04	112 %	0,61 ± 0,17	102 %	0,65 ± 0,02	108 %
Cd	0,069 ± 0,009	0,065 ± 0,004	94 %	0,064 ± 0,011	93 %	0,067 ± 0,003	97 %
Cr		0,11 ± 0,07		0,38 ± 0,21		0,23 ± 0,15	
Cu	2,8 ± 0,1	2,6 ± 0,2	94 %	2,6 ± 0,7	92 %	2,3 ± 0,2	80 %
Mn	8,9 ± 0,2	8,7 ± 0,4	98 %	8,3 ± 2,0	93 %	8,7 ± 0,1	98 %
Ni	0,39*	0,41 ± 0,03	105 %	0,47 ± 0,17	121 %	0,45 ± 0,09	116 %
Pb	0,62*	0,64 ± 0,07	103 %	0,60 ± 0,14	96 %	0,60 ± 0,01	97 %
Zn	20,9 ± 0,9	19,3 ± 1,8	92 %	20,0 ± 4,6	96 %	21,0 ± 0,2	100 %

* Referenssiarvo

Muiden alkuaineiden osalta tulokset olivat vaihtelevia. Ainoastaan kadmiumin kohdalla tulosten oikeellisuus parani metanolia lisättäessä kaikilla näytteillä. Kuparin ja mangaanin osalta tuloksen oikeellisuus näyttää kärsivän huomattavasti, kun näytetaustaan lisätään metanolia. Lisäksi kromin tulosten hajonta kasvoi, kun metanolia lisättiin näytetaustaan. Myös maitojauhereferenssin (ERM-BD150) lyijytuloksissa oli erittäin suurta hajontaa. Lyijyn mittaus jouduttiin uusimaan sekä maitojauhe- että maksareferenssin (BCR185R) kohdalla, sillä tulokset olivat erittäin poikkeavia normaaleista tuloksista. On hyvä ottaa huomioon, että mitattava lyijyn pitoisuus maitojauhereferenssissä on erittäin lähellä menetelmän määrittämälämpöarajaa (0,1 µg/l). Uusinnasta huolimatta maitojauhereferenssin kohdalla kolmen rinnakkaisen tulokset poikkesivat toisistaan erittäin paljon, mutta koska rinnakkaismäärittämiä oli vain kolme, ei yksittäisten tulosten poistaminen tilastollisesti ollut perusteltua. Tämä selittää erittäin suuret saantoprosentit lyijyn alkuperäisen menetelmän ja 1 % (v/v) MeOH-tuloksissa. Arseenin kohdalla kaikki mitatut tulokset olivat alle menetelmän määrittämälämpöarajan.

Maksareferenssin tuloksia tarkasteltaessa ei pääsääntöisesti havaittu saantoprosenttiltaan poikkeavia tuloksia. On kuitenkin huomattava, että arseenin kohdalla metanolin lisääminen aiheuttaa saantoprosentin laskua, jolloin saatu tulos on kauempana referenssiarvosta. Sama tulosten lasku havaitaan myös elintarvikereferenssin (NIES 27) tapauksessa. Myös sinkin tuloksissa havaitaan poikkeuksellinen tulos mitattaessa 2 % (v/v) metanolissa.

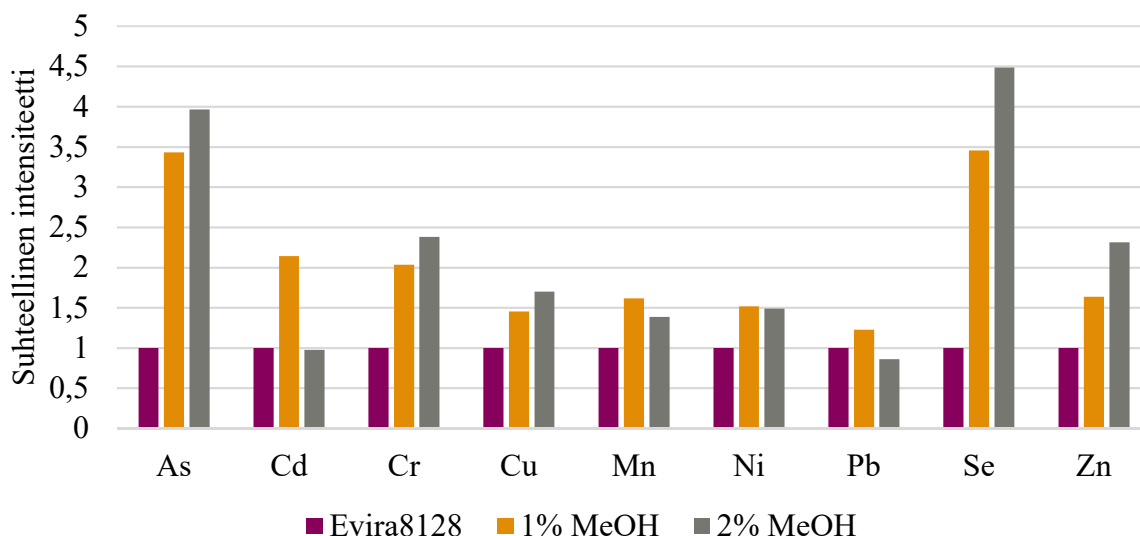
Elintarvikereferenssissä nykyisellä Evira8128-menetelmällä mitattuna arseenin tulos oli saantoprosenttiltaan hieman korkea. Metanolia lisättäessä arseenin tulokset laskivat, jolloin myös tuloksen oikeellisuus parani. Sama ilmiö tulosten pienenemisessä havaittiin myös kuparilla, mutta koska kuparin saantoprosentti oli lähtökohtaisesti alle 100 %:n, metanolin lisääminen näytteisiin heikensi kuparitulosten oikeellisuutta. 2 % metanolin tapauksessa kuparin saantoprosentti jää vain 80 %:iin, minkä vuoksi tulosta ei voida pitää enää luotettavana. Mittauksen oikeellisuus kuparin suhteen on voimakkaasti vääristynyt, sillä tulos on liian kaukana sertifioidusta arvosta. Myös nikkelillä havaitaan poikkeava tulos sekä 1 % että 2 % metanolin tapauksessa. Tulos on poikkeuksellisen korkea, mutta tässäkin tapauksessa rinnakkaistulosten hajonta on kohtuullisen suurta, mikä selittää hieman korkeamman tuloksen. Myös kromin osalta havaitaan poikkeavan suuri tulos 1 % MeOH-mittauksessa verrattuna mittaukseen, jossa ei ollut metanolitaustaa. Rinnakkaisten hajonta on tässäkin tapauksessa suhteellisen suuri, mikä vähentää tuloksen luotettavuutta.

Kaksinkertaisia laimennoksia ei tarkasteltu muiden alkuaineiden tapauksessa, sillä tuloksissa havaittiin erittäin suurta vaihtelua rinnakkaismittausten välillä. Lisäksi osalle alkuaineista

mitatut tulokset olivat pienempiä kuin pienin käytetty kalibrintistandardi, minkä vuoksi tulokset eivät olleet luotettavia. On myös pohdittava, ovatko muutokset saantoprosenteissa merkittäviä, sillä tuloksilla on suhteellisen suuri hajonta. Kaikki saadut tulokset ovat nimittäin erittäin lähellä 100 %:ia. Näyttäisi kuitenkin siltä, että metanolin lisääminen alentaa tuloksia ainakin seleenin ja arseenin kohdalla. Kromilla ei ollut yhdelläkään referenssimateriaaleista sertifioitua arvoa, mutta tuloksista havaitaan, että tulokset hieman nousevat, kun metanolipitoisuus kasvaa.

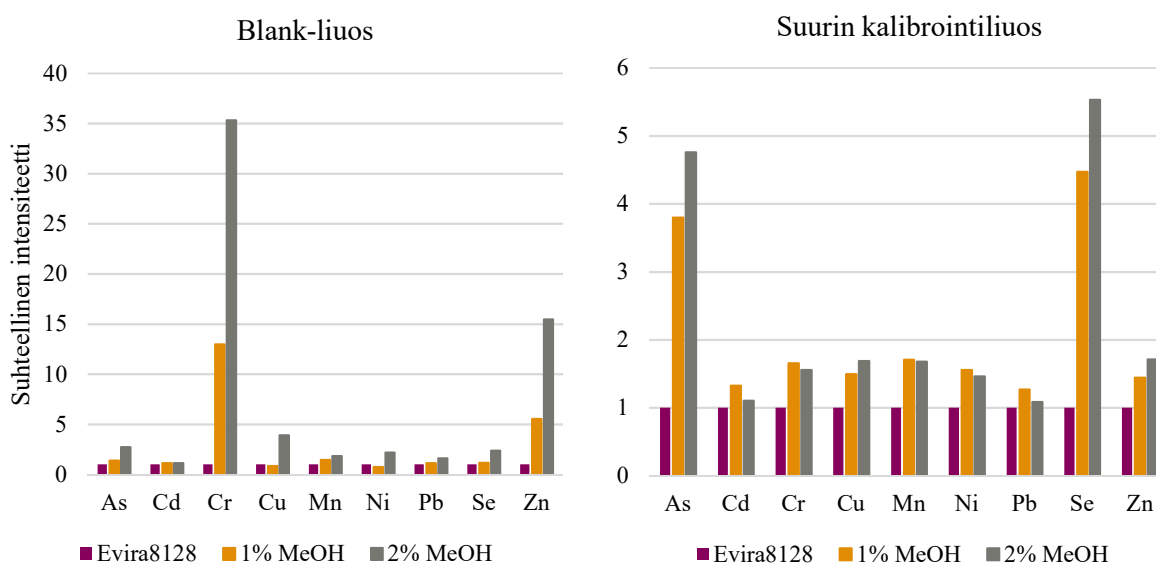
Eri alkuaineiden intensiteetit muuttuivat suhteellisen paljon lisättäessä metanolia näytteisiin (kuva 11). Kaavio on laskettu kalibrintiliuosten intensiteeteistä keskiarvoina. Jokaisen alkuaineen kalibrintipisteistä otettiin intensiteetit eri metanolipitoisuuksissa ja laskettiin intensiteettien keskiarvo kullekin metanolipitoisuudelle. Tämän jälkeen intensiteetit eri metanolipitoisuuksissa suhteutettiin toisiinsa siten, että tulos jaettiin alkuperäisen menetelmän intensiteettiä arvolla, jolloin alkuperäisen menetelmän intensiteetti saa arvon yksi ja eri metanolipitoisuuksien arvo kuvaa kuinka moninkertainen intensiteetti on verrattuna alkuperäiseen. On kuitenkin huomioitava, etteivät intensiteettierot eri alkuaineiden välillä ole suhteutuksen vuoksi vertailukelpoisia keskenään. Mittaukset eri metanolipitoisuuksissa suoritettiin eri päivinä. Tästä syystä kuvaaja on suuntaa antava, sillä alkuaineiden intensiteeteissä havaitaan pientä päivittäistä vaihtelua. Päivittäinen vaihtelu ei kuitenkaan voi selittää moninkertaisia intensiteettieroja eri metanolipitoisuuksissa mitattujen alkuaineiden välillä.

Intensiteettien muutos on voimakkaimmillaan arseenin ja seleenin kohdalla. Näillä jo 1 % metanolin lisäys yli kolminkertaistaa havaitun intensiteetin. Varsinkin seleenin kohdalla metanolin lisääminen 2 %:iin nostaa intensiteettitasoa vielä korkeammalle, jolloin intensiteetti suhteessa alkuperäiseen menetelmään on jopa 4,5-kertainen. Muihin alkuaineisiin verrattuna myös kadmiumilla, kromilla ja sinkillä havaittiin noin kaksinkertaista intensiteetin kasvua. Tosin kadmiumilla ja lyijyllä nousu havaittiin vain 1 % metanolin tapauksessa. Hieman poikkeavasti intensiteetit olivat 2 % metanolissa jopa hieman alhaisemmat kuin alkuperäisessä menetelmässä.



Kuva 11. Eri alkuaineiden intensiteetit suhteutettuna alkuperäisen menetelmän antamaan intensiteettiin.

Yleisellä tasolla voidaan sanoa, että metanolin lisääminen näytteisiin aiheuttaa kaikilla alkuaineilla intensiteettitason nousemista. Poikkeuksena kadmium ja lyijy, joissa 2 % metanoli aiheuttaa intensiteettitasojen laskun alemmaksi kuin alkuperäisessä menetelmässä. Tarkasteltaessa intensiteettien suhdetta yksittäisissä standardeissa havaittiin, että intensiteettien erot ovat voimakkaimmillaan standardeissa, joissa on korkea pitoisuus. Toisaalta taas kromin intensiteetit olivat poikkeus tähän, sillä voimakkaimmat erot intensiteeteissä havaittiin standardeissa, joissa kromin pitoisuus oli erittäin pieni sekä blank-liuoksessa. Esimerkiksi blank-liuoksissa 2 % metanolin intensiteetti verrattuna alkuperäiseen menetelmään intensiteettien ero oli jopa 35-kertainen (kuva 12).



Kuva 12. Metanolin vaikutus alkuaineiden intensiteetteihin blank-liuoksessa sekä suurimmassa kalibrintistandardissa.

9.4 Rutiininäytteiden tulosten tarkastelu

Referenssimateriaalien tarkastelun perusteella varsinaiset näytteet päätettiin mitata käyttäen ainoastaan 1 % metanolitaustaa sekä vertailun vuoksi alkuperäistä Eviran menetelmää ilman metanolia. Referenssimateriaalien tulokset 1 % metanolissa olivat verrattuna 2 % metanolin tuloksiin lähempänä 100 % saantoa, minkä vuoksi varsinaiset näytteet päätettiin mitata ainoastaan käyttäen 1 % metanolia. Esimerkiksi maitojauhereferenssin seleenin tuloksissa havaittiin metanolin lisäämisen pienentävän tuloksia, mutta 2 % metanolin lisäyksellä tulos kuitenkin laskee liian alhaiseksi.

Näytteinä käytettiin Evirassa aiemmin tutkittuja näytteitä. Näistä näytteistä valittiin kolme eri matriisia kuvaavat näytteet ja jokaisesta näytematriisista mitattiin kolme rinnakkaismäärittystä. Matriiseina olivat maitojauhe, poron lihas sekä poron maksa. Tulokset määritettiin laskemalla rinnakkaistulosten keskiarvo ja luottamusväli keskihajonnan perusteella 95 % luottamusvälillä. Saadut tulokset on koottu alla olevaan taulukkoon 15.

Taulukko 15. Rutiininäytteiden mittaustulokset (mg/kg).

	maitojauhe E17-0094263		poron lihas E17-0129665		poron maksa E17-0129683	
	Evira8128	1 % MeOH	Evira8128	1 % MeOH	Evira8128	1 % MeOH
As	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Cd	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,32 ± 0,01	0,33 ± 0,02
Cr	0,14 ± 0,14	0,16 ± 0,24	0,05 ± 0,04	< LOQ	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,04
Cu	4,88 ± 0,18	4,86 ± 0,13	1,38 ± 0,12	1,36 ± 0,04	279,0 ± 8,4	282,8 ± 4,3
Mn	1,10 ± 0,06	1,08 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	3,69 ± 0,05	3,67 ± 0,12
Ni	0,069 ± 0,059	0,074 ± 0,070	0,023 ± 0,012	0,013 ± 0,003	0,023 ± 0,004	0,031 ± 0,014
Pb	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,080 ± 0,004	0,082 ± 0,001
Se	0,25 ± 0,04	0,23 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,54 ± 0,01	0,51 ± 0,04
Zn	62,0 ± 2,9	62,5 ± 1,5	76,7 ± 11,3	77,6 ± 3,4	249,2 ± 4,3	240,3 ± 8,7

Tuloksissa havaitaan samankaltaisuuksia verrattuna referenssimateriaalien tuloksiin. Seleenin kohdalla saatiin kaikkien matriisien kohdalla hieman alkuperäistä tulosta pienempi tulos, kun näytteissä oli 1 % metanolitausta. Myös referenssimateriaalien tapauksessa havaittu tulosten hajonnan pieneminen havaittiin myös varsinaisten näytteiden tapauksessa. Esimerkiksi seleenin kohdalla myös hajonta on pienempää, kun näytteisiin on lisätty 1 % metanolitausta.

Maksanäytteen kohdalla hajonta oli kuitenkin suurempaa metanolia sisältävissä näytteissä. Myös nikkelin kohdalla havaittiin vaihtelua tuloksissa eri menetelmien välillä. Lihasnäytteen kohdalla havaittiin tuloksen pienenemistä, mutta maksanäytteen kohdalla puolestaan epäjohtomukaisesti tuloksen suurenemista. Muiden alkuaineiden kohdalla ei havaittu merkittävää muutosta näiden kahden eri mittauksen välillä. Osa mittaustuloksista jäi alle menetelmän määritysalarajan.

9.5 Johtopäätökset

Kaikkien tehtyjen mittausten perusteella näyttäisi siltä, että metanolin lisääminen näytteisiin vaikuttaa laskevasti seleenin tuloksiin. Ilmiö havaitaan voimakkaammin BCR-referenssimateriaalin tapauksessa. ERM- ja NIES-referenssimateriaalien tapauksessa seleenille saadaan tulosten hajonta huomioiden lähes samat tulokset kaikilla menetelmillä. Toisaalta BCR-referenssimateriaalissa seleenin pitoisuus on korkeampi verrattuna muihin käytettyihin referenssimateriaaleihin. Myös muiden alkuaineiden kohdalla havaitaan tulosten laskua, mutta kun otetaan huomioon tulosten luottamusväli, ei tulosten laskua voida pitää merkittävänä. Tuloksista havaitaan myös yleinen hajonnan väheneminen joidenkin alkuaineiden kohdalla, kun metanolipitoisuus näytteissä kasvaa. Osalla alkuaineista hajonta puolestaan kasvoi metanolia lisättäessä. Näyttäisi siltä, että metanolia lisäämällä voidaan parantaa menetelmän toistettavuutta seleenin osalta, mutta samalla muiden alkuaineiden mitattavuus kärsii.

Metanolin lisääminen havaitaan erittäin selvästi, kun tarkastellaan alkuaineiden intensiteettejä. Yleinen metanolin aiheuttama intensiteetin nousu nähdään jokaisella alkuaineella. Tämä johtuu metanolin vaikutuksesta liuosten pintajännitykseen. Myös hiilen vaikutus plasmassa havaitaan erittäin voimistuneena intensiteetteinä seleenillä ja arsenilla. Kyseiset alkuaineet ovat heikosti ionisoituvia, sillä niiden ensimmäinen ionisoitumisenergia on suhteellisen korkea.

Toisaalta intensiteeteistä havaitaan myös, että metanoli vaikuttaa kromin intensiteetteihin erittäin voimakkaasti. Ilmiö havaitaan erityisen voimakkaana, kun tarkastellaan kalibroitiliuoksia, joiden pitoisuus on erittäin pieni. Mahdollinen syy kromin voimakkaaseen intensiteetin nousuun on $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ -häiriössä. Hiilen määrän lisääminen näytteessä metanolilisäyksellä voi mahdollisesti lisätä plasmassa muodostuvan $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$:n määrää, jonka massa on 52, jolloin se häiritsee ^{52}Cr :n määrittystä. Ilmiötä puoltaa myös tuloksissa näkyvät huomattavasti suuremmat tulokset kromille näytteissä, joissa on lisätty metanolia. Mikäli ilmiö johtuu $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$:n häiriöstä, pitäisi sitä voida vähentää lisäämällä törmäyskaasun virtausta. Toisaalta myös sinkillä havaitaan matalissa pitoisuuksissa huomattavan korkeammat

intensiteetit liuksissa, joissa on metanolia. Sinkin intensiteettitasojen nousua ei kuitenkaan voida selittää millään hiilen muodostamalla moniatomisella häiriöllä. Mahdollinen sinkin intensiteettiä nostava tekijä voi kuitenkin olla käytetyn metanolin sisältämät pienet epäpuhtaudet.⁶⁰

10 Gadoliniumin vaikutus seleenin määrittämiseen

Gadolinium muodostaa suhteellisen helposti kahdesti varautuneita ioneja, minkä vuoksi se häiritsee useiden seleenin isotooppien määrittystä. Häiriö on merkittävä erityisesti ⁷⁸Se-isotoopin kohdalla, jota useimmin käytetään seleenin määrittämisessä. Jotta voidaan varmistua siitä, että mahdollinen systemaattinen virhe seleenin määrittämisessä ei aiheudu gadoliniumista, on varmistuttava siitä, ettei näytematriisi sisällä merkittävää määrää gadoliniumia.

Mahdollista gadoliniumin häiriötä seleenin mittauksessa tutkittiin aluksi määrittämällä kolmen tavanomaisen näytteen Gd-pitoisuudet ICP-MS-laitteella. Näytteet valittiin siten, että ne edustavat kolmea eri matriisia. Käytetyt näytematriisit olivat: maitojauhe, poron lihas sekä poron munuainen. Jokaisesta näytteestä valmistettiin kolme rinnakkaisnäytettä. Lisäksi valmistettiin yhteensä 13 sokeanäytettä määrittämissä varten.

Kalibrointia varten valmistettiin blank-liuos sekä kuusi standardiliuosta, joiden pitoisuudet olivat 0,01; 0,1; 0,2; 0,5; 2 ja 20 µg/l Gd. Blank-liuokseen, standardeihin sekä näytteisiin lisättiin kaikkiin sisäiseksi standardiksi rodiumia ja vismuttia 10 µg/l. Gadoliniumpitoisuudet mitattiin ICP-MS-laitteella käyttäen gadoliniumin isotoopeja ¹⁵⁷Gd ja ¹⁵⁸Gd. Koska mitattavia isotooppeja sekä sisäisiä standardeja oli molempia käytössä kaksi, mittauksessa saatiin yhteensä neljä eri tulosta kullekin näytteelle. Tuloksista valittiin laadunvalvontanäytteiden perusteella käytettävä kombinaatio. Parhaaksi kombinaatioksi valittiin isotooppi ¹⁵⁷Gd ja sisäiseksi standardiksi rodium.

Gadoliniumin määrittämissä laskettiin mittaamalla sokeanäytteiden pitoisuudet (taulukko 16). Määrittämissä määriteltiin siten, että tuloksista laskettiin keskiarvo ja siihen lisättiin tulosten keskihajonta kerrottuna kymmenellä. Mitattujen sokeanäytteiden perusteella määrittämissä saatiin 0,005 µg/l, joka 1 g / 100 ml punnituksella vastaa arvoa 0,0005 mg/kg.

Taulukko 16. Sokeanäytteiden Gd-pitoisuudet.

Näyte	Gd (µg/l)
Sokea 1	0,0010
Sokea 2	0,0008
Sokea 3	0,0005
Sokea 4	0,0005
Sokea 5	0,0008
Sokea 6	0,0003
Sokea 7	0,0007
Sokea 8	0,0004
Sokea 9	0,0003
Sokea 10	0,0002
Sokea 11	0,0003
Sokea 12	0,0014
Sokea 13	0,0001

Kaikkien näytteiden tulokset olivat reilusti alle määrittysalarajan. Hieman poikkeavasti lähes kaikkien sokeanäytteiden pitoisuus oli suurempi kuin varsinaisten näytteiden. Tästä johtuen voidaan todeta, että kaikki mitatut näytteet sisältävät gadoliniumia alle 0,0005 mg/kg. Pitoisuus on niin vähäinen, ettei sen voida katsoa merkitsevästi vaikuttavan seleenin määrittämiseen.

Vaikka näytteistä ei löytynyt gadoliniumia, ilmiötä tutkittiin vielä tarkemmin synteettisten näytteiden avulla. Perusliuoksista valmistettiin seleeniä ja gadoliniumia sisältävät liuokset, joiden avulla tutkittiin, miten gadoliniumin määrä liuoksissa vaikuttaa seleenin tuloksiin. Liuoksia valmistettiin neljässä eri gadoliniumipitoisuudessa siten, että osassa liuoksissa on 1 µg/l seleeniä ja toisissa ainoastaan gadolinium. Tulokset on koottu taulukkoon 17.

Taulukko 17. Seleenin mittaustulokset synteettisistä näytteistä, joihin oli lisätty eri määrä gadoliniumia.

Näyteliuos	Se µg/l	Näyteliuos	Se µg/l
		Se 1 µg/l	1,06
Gd 0,1 µg/l	<0,20	Se 1 µg/l + Gd 0,1 µg/l	1,02
Gd 2 µg/l	1,16	Se 1 µg/l + Gd 2 µg/l	2,28
Gd 20 µg/l	12,2	Se 1 µg/l + Gd 20 µg/l	12,7
Gd 200 µg/l	117	Se 1 µg/l + Gd 200 µg/l	120

Menetelmän määrittysalaraja seleenille on 0,20 µg/l. Näin ollen 0,1 µg/l Gd sisältävän liuoksen tulos jää alle määrittysalarajan. Suurin käytetty kalibrointiliuos puolestaan oli 20 µg/l, minkä vuoksi kumpaakaan 200 µg/l Gd sisältävien liuosten tuloksista ei voida pitää luotettavana. Yleisesti voidaan kuitenkin todeta, että gadolinium selvästi vaikuttaa seleenin määrittämiseen. 0,1 µg/l Gd-pitoisuuden vaikutus ei kuitenkaan ole merkittävä, kun tarkastellaan esimerkiksi liuosta, jossa seleeniä oli 1 µg/l ja gadoliniumia 0,1 µg/l. Verrattuna seleeniliuokseen, jossa

gadoliniumia ei ole, tulokset eivät merkitsevästi poikkea toisistaan. Seuraavassa gadoliniumpitoisuudessa vaikutus on jo merkittävä. Liouksessa, jossa seleeniä on 1 µg/l ja gadoliniumia 2 µg/l, seleenin tulos muuttuu yli kaksinkertaiseksi. Voidaan siis arvioida, että mitattaessa seleeniä gadoliniumliuoksesta, noin puolet lisätystä gadoliniumista havaitaan tuloksissa. Näin ollen gadoliniumin pitoisuuden on oltava suhteellisen korkea, jotta merkittävä muutos seleenin tuloksessa havaitaan. Varsinaisten näytteiden gadoliniumpitoisuuksien mittaustulosten perusteella voidaankin sanoa, että elintarvikenäytteiden gadoliniumpitoisuudet näyttäisivät olevan niin alhaisia, ettei mahdollista systemaattista virhettä seleenin määrittämisessä voida perustella gadoliniumhäiriöllä.

11 Rengastutkimuksen järjestäminen

11.1 Johdanto

Rengastutkimuksen tarkoituksena on parantaa laboratorioden analyysitulosten luotettavuutta sekä mitata laboratorioden pätevyyttä testattavaan analyysiin. Tässä rengaskokeessa määritettiin kuivatun lihanäytteen seleenipitoisuutta. Elintarviketurvallisuusvirasto Evira on Suomen kansallinen vertailulaboratorio, jonka tehtävänä on EU:n valvonta-asetuksen EC No 882/2004 mukaisesti koordinoita hyväksytyjen virallisten laboratorioden toimintaa. Tämän toteuttamiseksi Eviran tulee järjestää vertailututkimuksia, joilla laboratorioden pätevyys mitataan ja tulosten oikeellisuus varmennetaan. Rengaskokeen järjestelyt suoritettiin mukaillen IUPAC:n ohjetta *The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories*.⁸¹

Rengastutkimukseen osallistui yhteensä kymmenen laboratoriota. Suurin osa osallistuneista laboratorioista oli suomalaisia laboratorioita. Lisäksi rengastutkimukseen osallistui kolme laboratoriota muualta Euroopasta: Livmedelsverket Ruotsista, Veterinaar- ja Toidulaboratorium Virosta sekä Euroopan unionin referenssilaboratorio Italiasta. Rengastutkimukseen osallistuneet laboratoriot on koottu taulukkoon 18.

Taulukko 18. Rengastestiin osallistuneet laboratoriot.

Laboratorio	Maa, Paikkakunta
Elintarviketurvallisuusvirasto Evira	Suomi, Helsinki
Eurofins Scientific Finland Oy	Suomi, Lahti
European Union Reference Laboratory (EURL)	Italia, Rooma
KVVY Tutkimus Oy	Suomi, Tampere
Livsmedelsverket	Ruotsi, Uppsala
Luonnonvarakeskus (Luke)	Suomi, Jokioinen
MetropoliLab Oy	Suomi, Helsinki
Novalab Oy	Suomi, Karkkila
SeiLab Oy	Suomi, Seinäjoki
Veterinaar- ja Toidulaboratorium	Viro, Tartto

Laboratoriot ovat taulukossa aakkosjärjestyksessä, eikä järjestys vastaa myöhemmin tulosten yhteydessä esitettävien laboratorioskoodien järjestystä.

11.2 Näytteen valmistus

Näytteen valmistusta varten hankittiin yhteensä 2,6 kg suomalaista naudan lihaa. Näyte koostui kahdesta palasta, joiden painot olivat 1,5 ja 1,0 kg. Palat olivat samasta valmistuserästä. Esikäsitellyssä näytteestä poistettiin suurimmat jänteet sekä pakkauksessa oleva veri. Molemmat lihapalat pilkottiin noin 2 cm kokoisiksi paloiksi, minkä jälkeen palat sekoitettiin keskenään, jotta mahdolliset erot eri pakkauksissa olevien lihapalojen välillä tasaantuisivat. Esikäsitellyt lihanpalat homogenisoitiin kahdessa erässä Foss Tecator 2094 - homogenisaattorilla viiden minuutin ajan. Lopuksi molemmat erät yhdistettiin ja näytettä homogenisoitiin vielä viisi minuuttia, jotta kaksi erää sekoittuvat perusteellisesti keskenään. Homogenisoidun näytteen massaksi punnittiin 2,2 kg.

Homogenisoitu näyte siirrettiin 12 pakastusrasiaan ja jäädytettiin yön yli -20 °C lämpötilaan kylmäkuivausta varten. Seuraavana päivänä näytteet siirrettiin pakastimesta Labogene Scanvac CoolSafe 100-9 Pro -kylmäkuivuriin, jossa niitä kuivattiin yhteensä 117 tuntia eli noin 5 vuorokautta. Kuivauksen aikana lämpötila kylmäkuivurissa oli -100 °C ja paine 0,007 mbar.

Kuivauksen jälkeen näyte homogenisoitiin uudelleen. Kuivunut liha pilkottiin ensin veitsellä pieniksi paloiksi, jonka jälkeen paloja jauhettiin 10 minuutin ajan samalla homogenisaattorilla kuin aiemmin. Kuivattu näyte punnittiin ja massaksi saatiin 0,58 kg. Näin ollen lihan kosteusprosentti oli 74 %. Näyte jaettiin näytepurkkeihin siten, että laboratoriolle lähetettäviä näytepurkkeja valmistettiin 12 kappaletta, joissa jokaisessa oli näytettä noin 35 g. Lisäksi valmistettiin omat näytepurkit stabiilisuuden määrittystä varten. Näitä näytepurkkeja

valmistettiin 10 kappaletta, joihin jokaiseen punnittiin näytettä noin 15g. Kaikki näytepurkit siirrettiin säilytykseen eksikaattoreihin +4 °C lämpötilaan. Näytteet nimettiin siten, että varsinaiset 12 näytettä merkittiin kirjaimella "E" sekä juoksevilla numerolla 1-12 (E1-E12). Stabiilisuusnäytteet nimettiin puolestaan tunnuksin S1-S5 ja L1-L5.

11.3 Rengastestin tavoitehajonnan σ_p määrittäminen

Rengastestiä varten määritettiin tavoitteellinen hajonta σ_p IUPAC:n protokollan⁸¹ mukaisesti. Hyvänä arviona hajonnasta voidaan käyttää niin sanottua Horwitz'in trumpettia, joka kuvaa analyysimenetelmän RSD:n (suhteellinen standardipoikkeama) ja mitatun konsentraation välistä suhdetta. Horwitz'in trumpetti on matemaattinen yhtälö, jota kuvaa seuraava lauseke:⁸²

$$RSD(\%) = 2^{(1-0,5 \log(c))}, \quad (2)$$

jossa c kuvaa analyytin konsentraatiota massasuhteena, \log on 10-kantainen logaritmi ja RSD kuvaa suhteellista standardipoikkeamaa prosentteina. RSD puolestaan määritellään standardipoikkeaman s ja keskiarvon x avulla:⁸²

$$RSD(\%) = (s/x) \cdot 100 \quad (3)$$

Kaavoja (2) ja (3) yhdistämällä voidaan laskea tavoitteellinen hajonta σ_p , kun analyytin arvioitu pitoisuus on tiedossa. Homogeenisuusmittausten perusteella, jotka suoritettiin Evirassa, näytteen keskimääräinen pitoisuus oli 0,790 mg/kg, jolloin tavoitehajonnaksi saatiin:

$$RSD(\%) = 2^{(1-0,5 \log(0,7895 \cdot 10^{-6}))} = 16,579 \%$$

$$\sigma_p = \frac{16,579\%}{100} \cdot 0,7895 \text{ mg/kg} = 0,1309 \text{ mg/kg}$$

Horwitz'in trumpetti on erittäin käytännöllinen tavoitehajonnan kuvaamiseen, sillä se antaa hyvän kuvan analyysin ominaisuuksista laajalla konsentraatioalueella. Arvio hajonnasta on toimiva, vaikka funktio ei ota kantaa analyytin mittauksen vaikeuteen. Horwitz'in trumpetti on yleisesti käytetty menetelmä tavoitehajonnan arviointiin elintarvikkeiden analyysien alalla.^{81,83}

11.4 Homogeenisuuden määrittäminen

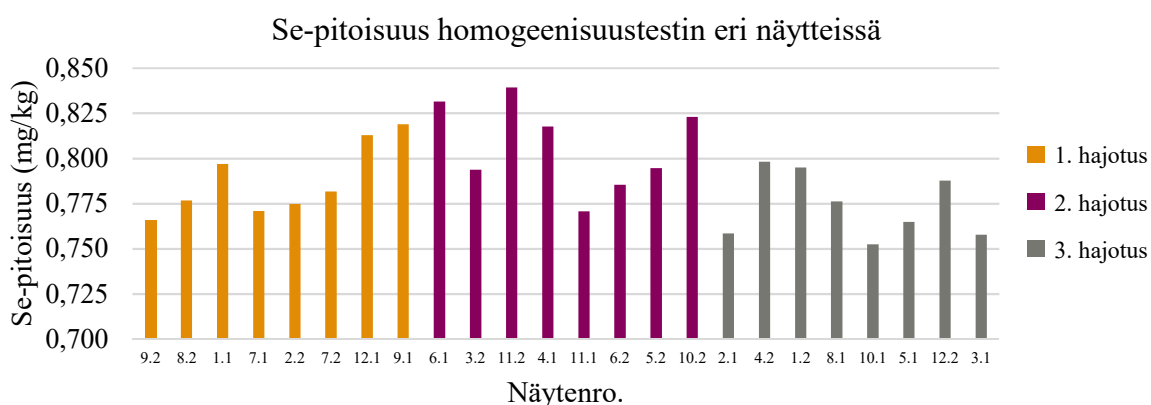
Homogeenisuuden määrittämiseksi kaikista 12 näytepurkista tehtiin kaksi rinnakkaismäärittystä IUPAC:n protokollan mukaisesti⁸¹. Koska näytteitä oli vain 12, päädyttiin homogeenisuus varmistamaan käyttäen kaikkia näytteitä. Vähimmäismäärä homogeenisuuden määrittämiseen

protokollan mukaan on 10 näytettä. Näytteet hajotettiin ja Se-pitoisuus mitattiin Eviran sisäisen menetelmän Evira8128 mukaisesti.

Näytteet hajotettiin ja mitattiin satunnaisessa järjestyksessä, joka perustuu Microsoft Excelillä generoituun satunnaislukusarjaan. Näin minimoitiin mittauksen ja hajotuksen vaikutus tuloksiin. Koska näytteitä oli yhteensä 24 kpl ja hajotuksessa käytettyyn mikroaaltouuniin mahtui kerralla vain 10 näytettä, homogeenisuuskokeen näytteet päätettiin hajottaa kolmessa erässä. Tulokset mittausjärjestyksessä on koottu taulukkoon 19 ja kuvaan 13.

Taulukko 19. Homogeenisuustestin mittaustulokset mittaus- ja hajotusjärjestyksessä kolmessa eri mikroaaltouunihajotuserässä.

	1. hajotus		2. hajotus		3. hajotus	
Paikkanro.	Näyte	Tulos (mg/kg)	Näyte	Tulos (mg/kg)	Näyte	Tulos (mg/kg)
1	9.2	0,766	6.1	0,831	2.1	0,759
2	8.2	0,777	3.2	0,794	4.2	0,798
3	1.1	0,797	11.2	0,839	1.2	0,795
4	7.1	0,771	4.1	0,818	8.1	0,776
5	2.2	0,775	11.1	0,771	10.1	0,753
6	7.2	0,782	6.2	0,786	5.1	0,765
7	12.1	0,813	5.2	0,795	12.2	0,788
8	9.1	0,819	10.2	0,823	3.1	0,758
Keskiarvo		0,787		0,807		0,774
Varianssi		0,000393		0,000587		0,000324



Kuva 13: Homogeenisuustestin näytteiden mittaustulokset eri hajotuskertoilla.

Koska eri hajotuskertojen välillä havaittiin eroja tulosten keskiarvoissa, päädyttiin tuloksille tekemään vielä varianssianalyysi (ANOVA). Näin saatiin selville, onko hajotuskertojen välillä mahdollisesti eroavaisuuksia. Anovan tulokset on koottu taulukkoon 20.

Taulukko 20. Varianssianalyysin (ANOVA, yksisuuntainen) tulokset homogeenisuusnäytteiden eri hajotuskertojen välisten erojen selvittämiseksi. Taulukossa *NS* on neliösumma, *va* on vapausasteet ja *KN* on keskineliö.

Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F	P-arvo	F-kriittinen
Hajotusten välissä	0,0044	2	0,0022	5,097	0,016	3,467
Hajotusten sisällä	0,0091	21	0,0004			
Yhteensä	0,0136	23				

Koska saatu F-arvo ylittää kriittisen F-arvon, on eri hajotuskertojen välillä eroa, jota ei voida selittää yksittäisten hajotuskertojen sisäisillä variansseilla. On kuitenkin huomioitavaa, että näytteet mitattiin täysin satunnaisessa järjestyksessä. Tästä johtuen keskiarvoltaan poikkeavien hajotuskertojen vaikutus jää vähäiseksi, sillä esimerkiksi 2. hajotuskerralla saadut keskimääräistä suuremmat pitoisuudet jakautuvat tasaisesti kaikkien näytteiden kesken.

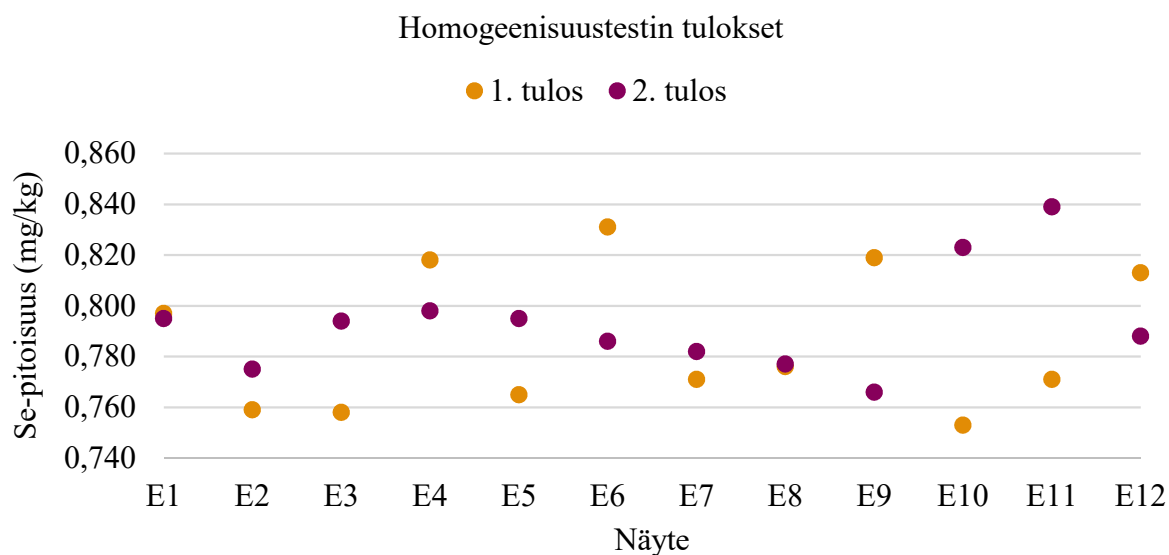
Toisaalta poikkeamaa hajotuskertojen välillä on vaikea selittää, sillä hajotukset suoritettiin täysin identtisesti. Näytettä punnittiin noin 500 mg, eivätkä punnitut massat eronneet erien välillä juurikaan. Näin ollen poikkeaman ei voida katsoa aiheutuvan matriisiin vaikutuksesta. Ennen hajotusta mikroaaltouunissa näytteiden annettiin seistä typpihapossa vähintään yksi tunti. Näistä kolmesta hajotuksesta toinen ja kolmas hajotus olivat hapossa yön yli ennen hajotusta ja ensimmäinen hajotus vain vaaditun tunnin ajan. Tämä ei kuitenkaan selitä toisen hajotuksen korkeampaa keskiarvoa, sillä kolmannessa hajotuksessa ei havaita merkittävästi korkeampaa pitoisuutta verrattuna ensimmäisen hajotuksen keskiarvoon. Vaikka varianssianalyysin mukaan hajotuksissa havaittiin merkittävä eroavaisuus, homogeenisuuden tarkastelua jatkettiin IUPAC:n ohjeen mukaan, sillä näytteiden satunnainen järjestys tasoittaa poikkeavan hajotuksen pitoisuudet kaikille näytteille tasaisesti.

Mittauksesta saadut tulokset järjestettiin taulukkoon ja kahden rinnakkaistuloksen perusteella laskettiin myös rinnakkaisten erotus, summa sekä erotuksen neliö. Lisäksi laskettiin summien varianssi sekä erotusten neliöiden summa, joita tarvittiin myöhemmin homogeenisuuden määrittämisessä. Tulokset on koottu taulukkoon 21.

Taulukko 21. Homogeenisuustestin tulokset sekä homogeenisuuden määrittämiseen tarvittavat arvot.

Näyte nro.	1. tulos	2. tulos	D (a-b)	S (a+b)	D ² (a-b) ²
1	0,797	0,795	0,002	1,592	0,00000
2	0,759	0,775	-0,016	1,534	0,00026
3	0,758	0,794	-0,036	1,552	0,00130
4	0,818	0,798	0,020	1,616	0,00040
5	0,765	0,795	-0,030	1,560	0,00090
6	0,831	0,786	0,045	1,617	0,00202
7	0,771	0,782	-0,011	1,553	0,00012
8	0,776	0,777	-0,001	1,553	0,00000
9	0,819	0,766	0,053	1,585	0,00281
10	0,753	0,823	-0,070	1,576	0,00490
11	0,771	0,839	-0,068	1,610	0,00462
12	0,813	0,788	0,025	1,601	0,00062
Summa					0,018
Varianssi				0,00081263	

Aluksi tuloksia tutkittiin silmämääräisesti tarkastelemalla, onko tuloksissa havaittavissa mitään poikkeamia (kuva 14). Poikkeavia trendejä ei havaittu kuvaajan perusteella. Mikään saaduista tuloksista ei myöskään vaikuttanut olevan ns. outlier-tulos, joten yksittäisten arvojen mahdollista poistoa outlier-tuloksena ei tarkasteltu tilastollisesti.



Kuva 14. Graafinen esitys homogeenisuustestin tuloksista.

Tulosjoukon perusteella arvioitiin IUPAC:n protokollan mukaisesti eri näytepurkkien välinen varianssi sekä käytetyn mittausmenetelmän sisäinen varianssi. Ensin kuitenkin tarkastettiin

vielä Cochranin testillä poikkeavatko jotkin yksittäisen näytteen rinnakkaismääritykset toisistaan merkitsevästi.

Cochranin testi määritellään seuraavasti:

$$C = \frac{D_{max}^2}{S_{DD}}, \quad (4)$$

jossa D_{max}^2 on suurin havaittu rinnakkaisten erotusten neliö ja S_{DD} on erotusten neliöiden summa. Näiden kahden suhteesta saadaan luku C , jota verrataan taulukoituihin kriittisiin arvoihin. Kriittiset arvot Cochranin testille on koottu taulukkoon 22.

Taulukko 22. Kriittiset C :n arvot 95 % ja 99 % luottamustasolla.⁸¹

Näytteiden lkm.	95 %	99 %
7	0,727	0,838
8	0,68	0,794
9	0,638	0,754
10	0,602	0,718
11	0,57	0,684
12	0,541	0,653
13	0,515	0,624
14	0,492	0,599
15	0,471	0,575
16	0,452	0,553
17	0,434	0,532
18	0,418	0,514
19	0,403	0,496
20	0,389	0,480

Suurin poikkeama rinnakkaisten välillä havaitaan näytteellä E10. Joten kaavan (4) perusteella C :n arvoksi saadaan:

$$C = \frac{0,00490}{0,018} = 0,2728.$$

Koska näytteiden lukumäärä on tässä tapauksessa 12, kriittinen arvo Cochranin testille 95 % luottamustasolla on 0,541. Kriittinen arvo ei siis ylity, joten myös tulos, jolla on poikkeavimmat rinnakkaistulokset, voidaan hyväksyä mukaan tulosjoukkoon. Tuloksen hylkäys olisi tarpeellinen vasta 99 % luottamustason ylittyessä. 95 % luottamustason ylittyessä on tarpeellista tarkastella tilannetta kriittisesti, mutta rajan ylittyminen ei automaattisesti johda tuloksen hylkäämiseen.

Mittausmenetelmän analyttinen varianssi (s_{an}) voidaan määrittellä seuraavan kaavan mukaisesti:

$$s_{an}^2 = \frac{\sum Di^2}{2m}, \quad (5)$$

jossa $\sum Di^2$ on rinnakkaistulosten erotuksien neliöiden summa ja m on mitattujen näytteiden lukumäärä. Näin ollen kaavan (5) mukaan analyttiseksi varianssiksi saadaan

$$s_{an}^2 = \frac{0,018}{2 \cdot 12} = 0,000748$$

Näytteiden välinen varianssi voidaan puolestaan määrittellä seuraavasti:

$$s_{sam}^2 = \frac{\frac{V_s}{2} - s_{an}}{2}, \quad (6)$$

jossa V_s on rinnakkaismääritysten summien varianssi, s_{an} on analyttinen varianssi. Kaavan (6) avulla saadaan näytteiden väliseksi varianssiksi:

$$s_{sam}^2 = \frac{\frac{0,00081263}{2} - 0,000748}{2} = -0,00017.$$

Koska näytteiden välinen varianssi on korkean analyttisen varianssin vuoksi negatiivinen, määritellään näytteiden väliseksi varianssiksi nolla ($s_{sam}^2 = 0$).

Seuraavaksi määriteltiin sallittu hajonta, joka IUPAC:in protokollan mukaan on 30 % tavoitehajonnasta σ_p . Näin ollen sallittu varianssi homogeenisuuden suhteen on

$$\sigma_{all}^2 = (0,3 \cdot 1,309)^2 = 0,001542$$

Näytettä ei voida pitää riittävän homogeenisena, mikäli hypoteesi $H: \sigma_{sam}^2 \leq \sigma_{all}^2$ ei toteudu. Hypoteesin oikeellisuutta voidaan tutkia määrittämällä yksisuuntainen luottamusväli todelliselle näytteiden väliselle varianssille σ_{sam}^2 seuraavasti:

$$s_{sam}^2 > F_1 \sigma_{all}^2 + F_2 s_{an}^2, \quad (7)$$

jossa F_1 ja F_2 ovat tilastollisia vakioita (taulukko 23), s_{sam}^2 on tuloksista laskettu näytteiden välinen varianssi ja s_{an}^2 on analyttinen varianssi. Mikäli kyseinen ehto toteutuu, hypoteesi

hylätään, jolloin näytettä ei voida pitää riittävän homogeenisena. Tällöin tulosten välinen vaihtelu ei pidä sisällään näytteiden välistä todellista varianssia σ_{sam}^2 .

Taulukko 23. Tilastolliset termit F_1 ja F_2 homogeenisuuden määrittämistä varten. Kokeessa olevien näytteiden määrää kuvataan termillä m .

m	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7
F₁	1.59	1.60	1.62	1.64	1.67	1.69	1.72	1.75	1.79	1.83	1.88	1.94	2.01	2.10
F₂	0.57	0.59	0.62	0.64	0.68	0.71	0.75	0.80	0.86	0.93	1.01	1.11	1.25	1.43

Kaavan (7) avulla voidaan laskea kriittinen arvo c , jota sitten verrataan näytteiden väliseen varianssiin.

$$c = F_1 \sigma_{all}^2 + F_2 s_{an}^2 = 1,79 \cdot 0,001542 + 0,86 \cdot 0,000748 = 0,003404$$

Koska näytteiden välinen varianssi on nolla, kaavan (7) mukainen ehto ei täyty. Näin ollen näyte on riittävän homogeeninen rengastutkimusta varten.

11.5 Stabiilisuuden määrittäminen

Ennen näytteen lähetystä näytteen stabiilisuus tarkastettiin mittaamalla erilaisissa olosuhteissa säilytettyjen näytteiden Se-pitoisuudet ja tutkimalla saatujen keskiarvojen poikkeavuutta toisistaan t-testillä. Stabiilisuuskokeen tarkoituksena oli osoittaa, että mahdolliset poikkeamat säilytysolosuhteissa eivät vaikuta näytteen Se-konsentraatioon. Stabiilisuuskoetta varten valmistettiin yhteensä kymmenen näytettä, joista viisi näytettä (S1-S5) säilytettiin koko rengaskokeen ajan jääkaappiin sijoitetussa eksikaattorissa ja loput näytteet (L1-L5) säilytettiin laboratorion vetokaapissa.

Säilytysolosuhteet valittiin siten, että toinen säilytystapa olisi mahdollisimman stabiili ja toinen kuvaisi mahdollisimman realistisesti näytteeseen kohdistuvia olosuhteellisia eroja. Laboratorion vetokaapissa säilytetyt näytteet altistuivat kokeen ajan normaalille lämpötilan ja kosteuden vaihtelulle, kun taas eksikaattorissa olevat näytteet olivat vakioitussa lämpötilassa jääkaapissa.

Näytteet mitattiin yhteensä kolme kertaa. Ensimmäinen mittaus suoritettiin näytteistä, joita ei vielä ollut säilytetty erilaisissa olosuhteissa. Näin voitiin tarkastaa, ettei eri näytesarjojen välillä ole jo lähtökohtaisesti eroavuuksia. Tulokset ensimmäisestä mittauksesta on koottu taulukkoon 24.

Taulukko 24. Stabiilisuuskokeen mittaustulokset ennen kokeen alkua.

Näyte nro.	Epästabiili (mg/kg)	Stabiili (mg/kg)
1	0,767	0,770
2	0,831	0,787
3	0,777	0,782
4	0,797	0,769
5	0,777	0,819

Ennen t-testin suorittamista tarkasteltiin tulosten varianssien yhtäsuuruutta kaksisuuntaisella F-testillä, jonka tulokset on esitetty taulukossa 25.

Taulukko 25. F-testin tulokset ennen kokeen alkua.

	Epästabiili	Stabiili
Keskiarvo (mg/kg)	0,790	0,785
Varianssi (mg/kg)	0,00066	0,00041
Havainnot	5	5
Vapausasteet	4	4
F-arvo	1,60	
F-kriittinen kaksisuuntainen	9,61	

Tuloksista nähdään, että varianssit eivät poikkea toisistaan merkitsevästi, koska laskettu F-arvo on pienempi kuin kriittinen F-arvo. Tästä johtuen näytteiden välistä eroavuutta tutkittaessa käytetään t-testiä, jossa varianssit oletetaan yhtä suuriksi. T-testin tuloksista (taulukko 26) voidaan päätellä, että näytteiden välillä ei ole merkittävää eroa, sillä kaksisuuntainen kriittinen t-arvo ei ylity.

Taulukko 26. T-testin tulokset (mg/kg) ennen kokeen alkua.

	Epästabiili	Stabiili
Keskiarvo	0,790	0,785
Varianssi	0,00066	0,00041
Havainnot	5	5
Yhdistetty varianssi	0,00054	
Vapausasteet	8	
T-arvo	0,289	
T-kriittinen kaksisuuntainen	2,31	

Näytteet hajotettiin ja mitattiin uudelleen 14 vuorokauden kuluttua. Tuloksille tehtiin samat tilastolliset tarkastelut kuin aiemmin. F-testin perusteella varianssien todettiin poikkeavan näytteiden välillä toisistaan merkitsevästi, joten t-testinä käytettiin versiota, jossa varianssit oletetaan erisuuriksi (taulukko 27).

Taulukko 27. Stabiilisuustestin tulokset (mg/kg), kun näytteitä oli säilytetty 14 vuorokautta erilaisissa olosuhteissa.

	Epästabiili	Stabiili
1	0,815	0,810
2	0,762	0,805
3	0,815	0,810
4	0,918	0,793
5	0,805	0,786
Keskiarvo	0,823	0,801
Varianssi	0,0033	0,00011
Havainnot	5	5
Vapausasteet	4	4
F-arvo	28,94011	
F-kriittinen kaksisuuntainen	9,605	
Yhdistetyt vapausasteet	4	
T-arvo	0,851	
T-kriittinen kaksisuuntainen	2,776	

Koska laskettu t-arvo ei ylitä kriittistä arvoa, voidaan osoittaa, ettei eri olosuhteissa säilytettyjen näytteiden välillä ole merkitsevää eroavaisuutta. Näytettä voidaan siis pitää riittävän stabiilina rengastutkimukseen.

Stabiilisuutta tarkasteltiin vielä rengastestin jälkeenkin, kun suurin osa laboratorioista olivat jo ilmoittaneet tuloksensa. 63 vuorokautta sen jälkeen, kun näytteet sijoitettiin eri säilytyspaikkoihin, näytteet hajotettiin vielä kolmannen kerran ja niiden pitoisuudet mitattiin. Tuloksille tehtiin F-testi varianssien eron selvittämiseksi samoin kuin edellä sekä F-testin tulosta vastaava t-testi (taulukko 28).

Taulukko 28. Stabiilisuustestin tulokset 63 vuorokauden jälkeen.

	Epästabiili	Stabiili
1	0,741	0,731
2	0,784	0,729
3	0,794	0,720
4	0,714	0,754
5	0,987	0,718
Keskiarvo	0,804	0,731
Varianssi	0,0115	0,00020
Havainnot	5	5
Vapausasteet	4	4
F	57,09807	
F-kriittinen kaksisuuntainen	9,605	
Yhdistetyt vapausasteet	4	
T-arvo	1,519898	
T-kriittinen kaksisuuntainen	2,776445	

F-testi tuottaa kriittisen arvon ylittävän tuloksen, joten t-testinä käytettiin varianssit erisuuriksi oletettavaa versiota. T:n arvo ei kuitenkaan ylitä kriittistä t:n arvoa, joten vielä 63 vuorokauden erilaisten säilytysolosuhteiden jälkeen seleenin pitoisuus näytteessä ei muutu.

Tuloksissa on yksi muista selvästi poikkeava tulos. Epästabiilien näytteiden näyte numero 5 tuotti poikkeavan korkean tuloksen. Tulosta tarkasteltiin mahdollisena outlier-tuloksena Grubbs'n testin avulla (ks. kohta 11.6). G :n arvoksi laskettiin 1,706. Kriittinen arvo taulukoiden⁸⁴ mukaan on $G_5=1,715$. Koska G :n laskennallinen arvo ei ylitä kriittistä arvoa, tulosta ei voida pitää outlier-tuloksena ja se on otettava mukaan tarkasteluun. Poikkeavasta tuloksesta huolimatta rinnakkaismittausten hajonta on riittävän suurta selittämään erot tulosten keskiarvojen välillä. Syitä yksittäiseen poikkeavaan tulokseen on vaikea arvioida, mutta laitteen satunnainen mittausvirhe on mahdollinen tai näyte on voinut kontaminoitua esikäsittelyvaiheessa.

11.6 Konsensusarvon määrittäminen

Rengaskokeeseen osallistui yhteensä kymmenen laboratoriota. Yksi laboratorioista osallistui rengaskokeeseen kahdella menetelmällä, minkä vuoksi laboratorioikoodeja on tulostaulukoissa yhteensä yksitoista. Tulokset rinnakkaismäärittämisistä ja tulosten keskiarvoista on koottu alla olevaan taulukkoon 29.

Taulukko 29. Laboratorioiden rinnakkaismääritysten tulokset sekä tulosten keskiarvot (mg/kg).

Laboratorio	1. tulos	2. tulos	Keskiarvo
LAB_001	0,685	0,691	0,688
LAB_002	0,713	0,755	0,734
LAB_003	0,737	0,698	0,718
LAB_004	0,899	0,823	0,861
LAB_005	0,661	0,650	0,656
LAB_006	0,642	0,646	0,644
LAB_007	0,676	0,653	0,665
LAB_008	0,689	0,731	0,710
LAB_009	0,684	0,698	0,691
LAB_010	0,710	0,720	0,715
LAB_011	0,857	0,820	0,839
Keskiarvo			0,720

Tulosjoukkoa käsiteltiin mukaillen IUPAC:n protokollaa. Lasketut keskiarvot muodostavat datajoukon, jonka avulla rengastestin konsensusarvo määritettiin. Ensin tarkasteltiin, onko tulosjoukossa erittäin poikkeavia tuloksia. Tällaisiksi tuloksiksi luokitellaan tulokset, jotka eivät mahdu välille: tulosten mediaani $\pm 50\%$. Tämä väli on tässä tapauksessa 0,355 – 1,065 mg/kg. Kyseisen välin ulkopuolisia tuloksia ei ollut yhtäkään.

Tämän lisäksi tarkasteltiin tulosten keskiarvosta eniten poikkeavaa tulosta (LAB_004). Kyseisen tuloksen ja keskiarvon välistä etäisyyttä suhteutettiin tulosten hajontaan, jonka avulla saatiin selville, onko tulos niin poikkeava, että tulos voitaisiin poistaa tulosjoukosta ns. outlier-tuloksena. Tilannetta tarkasteltiin ensin Grubbs'in testin avulla. Tuloksen avulla määritetään G-arvo, jota verrataan taulukoituihin kriittisiin arvoihin. Mikäli laskettu arvo ylittää kriittisen arvon, voidaan tulos poistaa outlier-tuloksena. G:n arvo määritettiin seuraavasti:

$$G = \frac{|q_s - \bar{x}|}{s} = \frac{|0,861 - 0,720|}{0,0701} = 2,013,$$

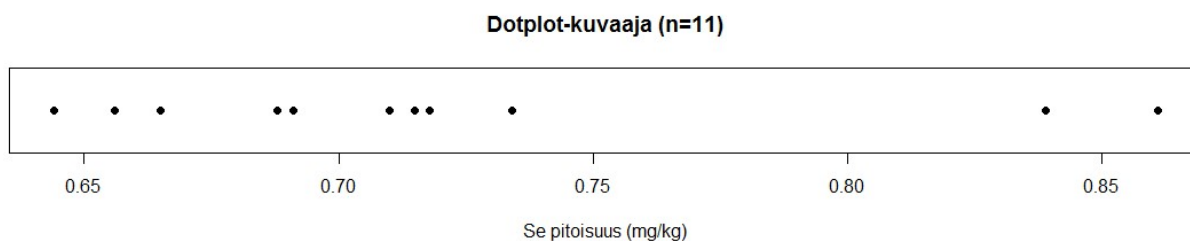
jossa q_s on outlier-arvoksi epäilty arvo, x on tulosten keskiarvo ja s tulosten keskihajonta.⁸⁰ Kriittinen kaksisuuntainen arvo G :lle taulukoiden⁸⁴ mukaan on: $G_{11} = 2,355$ ($p=0,05$). Koska kriittinen arvo ei ylity, tulosta ei voida poistaa outlier-tuloksena.

Grubbs'in testin lisäksi samaa tulosta tarkasteltiin myös Dixonin testin avulla. Dixonin testi ottaa kantaa myös siihen, kuinka lähellä on epäiltyä outlier-arvoa oleva seuraava tulos. Testissä lasketaan Q -arvo, jota verrataan taulukoituihin kriittisiin arvoihin. Q -arvo määritellään seuraavasti:

$$Q = \frac{|q_s - q_n|}{q_{max} - q_{min}} = \frac{|0,861 - 0,839|}{0,861 - 0,644} = 0,1037,$$

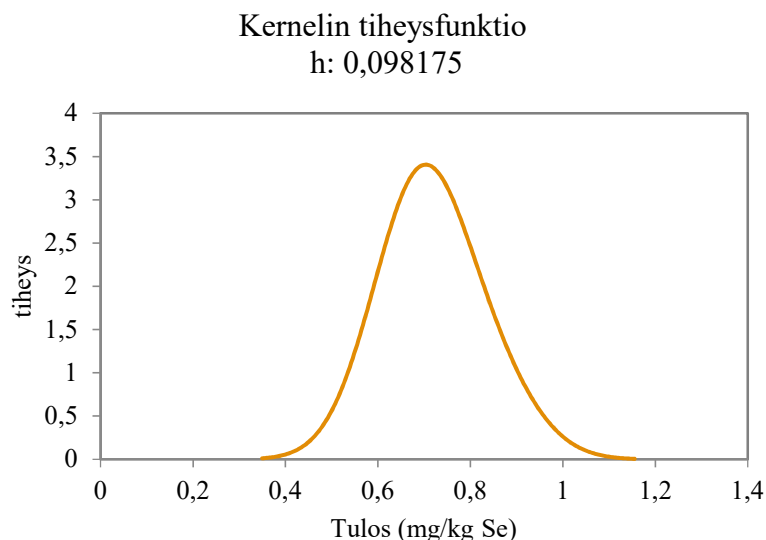
jossa q_s on epäily arvo, q_n on epäilyä arvoa lähin arvo, q_{max} on tulosjoukon suurin arvo ja q_{min} on pienin arvo.⁸⁰ Kriittinen arvo Q :lle taulukoiden⁸⁵ mukaan on $Q_{11}=0,3922$. Koska kriittinen arvo ei ylity, ei tulosta voida poistaa tulosjoukosta. Näistä kahdesta testistä standardointiorganisaatio ISO suosittelee käytettäväksi mieluummin Grubbs'in testiä.⁸⁰ Tässä tapauksessa molemmat testit antoivat kuitenkin saman tuloksen.

Tulosjoukossa ei siis havaittu tilastollisten menetelmien perusteella outlier-tuloksia, joten kaikista saaduista tuloksista piirrettiin dotplot-kuvaaja tulosten graafista tarkastelua varten (kuva 15).



Kuva 15. Dotplot-kuvaaja rengastutkimuksen tuloksista.

Kuvaajasta nähdään selvästi, että tulokset eivät muodosta täysin symmetristä jakaumaa. Kaksi tuloksista sijaitsevat muihin tuloksiin nähden huomattavasti oikealla. Toisaalta on myös huomioitava, että käytetty tulosjoukko on erittäin pieni. Koska kuvaaja ei ole symmetrinen, on hyvä tutkia tuloksia käyttäen Kernelin tiheysfunktioita (kuva 16). Kernelin tiheysfunktio on histogrammia vastaava esitys, jossa havainnollistetaan tulosten eri populaatioita.



Kuva 16. Kernelin tiheysfunktio rengastutkimuksen tuloksista.

Kuvaaja on piirretty käyttäen ytimen leveytenä eli h :n arvoa 0,098175, joka vastaa IUPAC:n protokollan mukaisesti arvoa $0,75\sigma_p$. Ydinfunktiona kuvaajan muodostuksessa on käytetty standardia normaalijakaumaa. Kaavio on piirretty käyttäen AMC:n tuottamaa Kernel-työkalua MS Excel-ohjelmistolle.⁸⁶ Kuvaajasta nähdään, että muodostuva funktio on yksihuippuinen ja karkeasti katsottuna myös symmetrinen. Näin ollen graafisen tarkastelun sekä edeltävien tilastollisten menetelmien perusteella ei ole syytä hylätä yhtään tulosjoukon tuloksista.

Rengastestin konsensusarvo määritettiin siis kaikkien saatujen tulosten perusteella. Konsensusarvon estimaattina käytettiin robustia keskiarvoa. Vertailun vuoksi tuloksista laskettiin myös keskiarvo ja keskihajonta. Lisäksi tuloksista laskettiin mediaani sekä keskihajontaa vastaava arvo sMAD eli mediaanin keskipoikkeama $\hat{\sigma}$. Jotta mediaanin keskipoikkeama kuvaisi todellista hajontaa, se kerrottiin arvolla 1,4826. Kyseinen luku on jakaumasta riippuva skaalauskerroin, joka tässä tapauksessa saadaan normaalijakaumasta, sillä tulosten voidaan olettaa olevan normaalisti jakautuneita. Mediaanin keskipoikkeama määritetään mittaamalla kaikkien tulosten absoluuttinen poikkeama mediaanista ja ottamalla saaduista luvuista mediaani.⁸⁷

Lopullinen konsensusarvo määriteltiin laskemalla robusti keskiarvo ja hajonta laboratorioiden tuloksista. Menetelmä on nimeltään Huberin menetelmä, jota AMC (*analytical methods committee*), ISO 5725-1:1994(en) -standardi (*Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results*) ja ISO 13528:2015(en) -standardi (*Statistical methods for*

use in proficiency testing by interlaboratory comparison) suosittelevat käytettävän rengastestien järjestämisessä⁸¹. Siinä tulosten robusti keskiarvo ja -hajonta määritetään iteroimalla lukuja useaan kertaan. Alkuoletuksena keskiarvon estimaattorina käytetään mediaania ja hajontana sMAD-arvoa. Olkoot nämä arvot μ ja σ . Tämän jälkeen tarkastetaan, onko kaikki tulosjoukon tulokset välillä $\mu \pm 1,5\sigma$. Mikäli tulos on suurempi kuin $\mu + 1,5\sigma$, muutetaan tulos kyseiseksi arvoksi. Samoin rajan alle jäävät tulokset muutetaan arvoksi $\mu - 1,5\sigma$. Muutetuista tuloksista lasketaan keskiarvo sekä keskihajonta, joka kerrotaan arvolla 1,135 (arvo johdettu normaalijakaumasta). Näitä toimenpiteitä toistetaan niin kauan, että luvut eivät enää muutu. Jäljelle jääneet luvut muodostavat robustin keskiarvon ja robustin keskihajonnan.⁸⁸ Huberin menetelmällä saadut arvot laskettiin käyttäen AMC:n tuottamaa MS Excel –laajennosta.

Lasketut tilastolliset estimaattorit on esitetty taulukossa 30.

Taulukko 30. Rengastestin tulosten tilastolliset parametrit.

Keskiarvo	\bar{x}	0,720 mg/kg	Keskihajonta	s	0,0701 mg/kg
Mediaani	$\hat{\mu}$	0,710 mg/kg	sMAD	$\hat{\sigma}$	0,0356 mg/kg
Robusti keskiarvo H15 Mean	$\hat{\mu}_{rob}$	0,707 mg/kg	Robusti keskihajonta H15 Std Dev	$\hat{\sigma}_{rob}$	0,0375 mg/kg

Konsensusarvon mittausepävarmuus voidaan määrittää seuraavasti robustin keskihajonnan avulla:

$$u = \frac{\hat{\sigma}_{rob}}{\sqrt{n}} = \frac{0,0375}{\sqrt{11}} = 0,0113.$$

Tulosjoukossa ei havaita liian suurta jakaumaa, sillä robustin keskihajonnan arvo on alle $1,2\sigma_p$. Lisäksi myös konsensusarvon mittausepävarmuus on pienempi kuin $0,3\sigma_p$. Näin ollen IUPAC:n protokollan asettamat kriteerit robustin keskiarvon käytöstä konsensusarvona täyttyvät. Virheen pyöristyssääntöjen mukaisesti konsensusarvo mittausepävarmuuksineen pyöristyy siis arvoon $0,707 \pm 0,012$ mg/kg.

11.7 Laboratorioiden z-arvojen arviointi

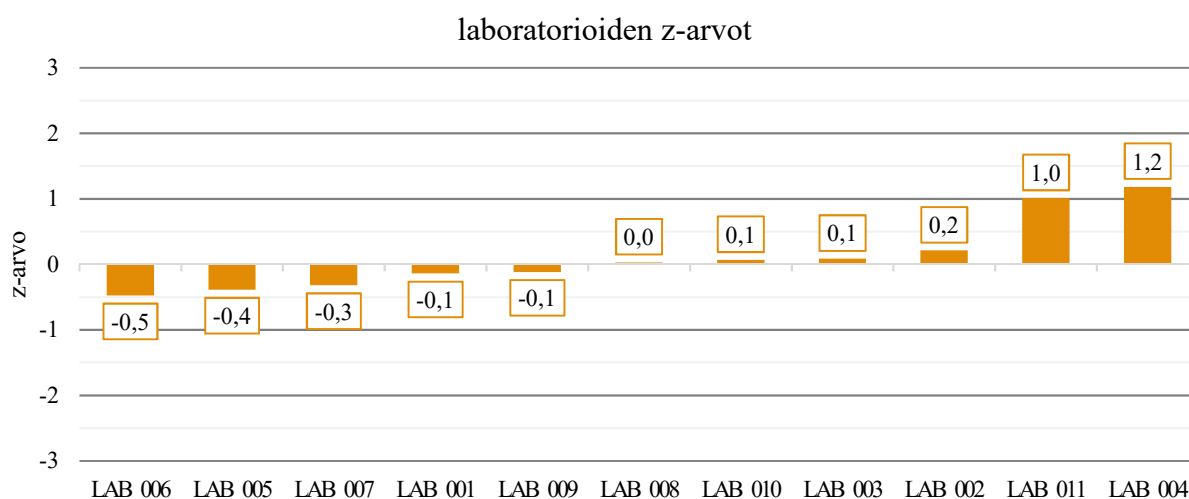
Laboratorioiden menestyksen vertailemiseksi rengastestissä tuloksista määritettiin kullekin laboratoriolle z-arvo, joka kuvaa poikkeamaa konsensusarvosta. Z-arvo määritellään seuraavan kaavan avulla:

$$z = \frac{x - x_a}{\sigma_p}, \quad (8)$$

jossa x on laboratorion saama tulos, x_a on rengastestin konsensusarvo ja σ_p on tavoitehajonta. Z-arvoja tulkitaan siten, että nolla on paras mahdollinen tulos. Tulokset, jotka ovat itseisarvoltaan alle kaksi, ovat hyväksyttäviä. Tulokset, jotka ovat itseisarvoltaan 2–3, ovat hyväksyttäviä, mutta kyseenalaisia. Tulokset itseisarvoltaan yli kolmen eivät ole hyväksyttäviä. Tilanteissa, joissa z-arvo ylittää arvon kolme, laboratorion tulisi tutkia, mikä heidän menetelmässään aiheuttaa virheellisiä tuloksia. Laboratorioiden z-arvot ja tulokset on laskettu kaavan (8) avulla taulukkoon 31. Z-arvot on myös järjestetty kuvaan 17 suuruusjärjestykseen.

Taulukko 31. Laboratorioiden tulokset ja z-arvot rengaskokeessa.

Laboratorio	Tulosten keskiarvo (mg/kg)	z-arvo
LAB_001	0,688	-0,1
LAB_002	0,734	0,2
LAB_003	0,718	0,1
LAB_004	0,861	1,2
LAB_005	0,656	-0,4
LAB_006	0,644	-0,5
LAB_007	0,665	-0,3
LAB_008	0,710	0,0
LAB_009	0,691	-0,1
LAB_010	0,715	0,1
LAB_011	0,839	1,0



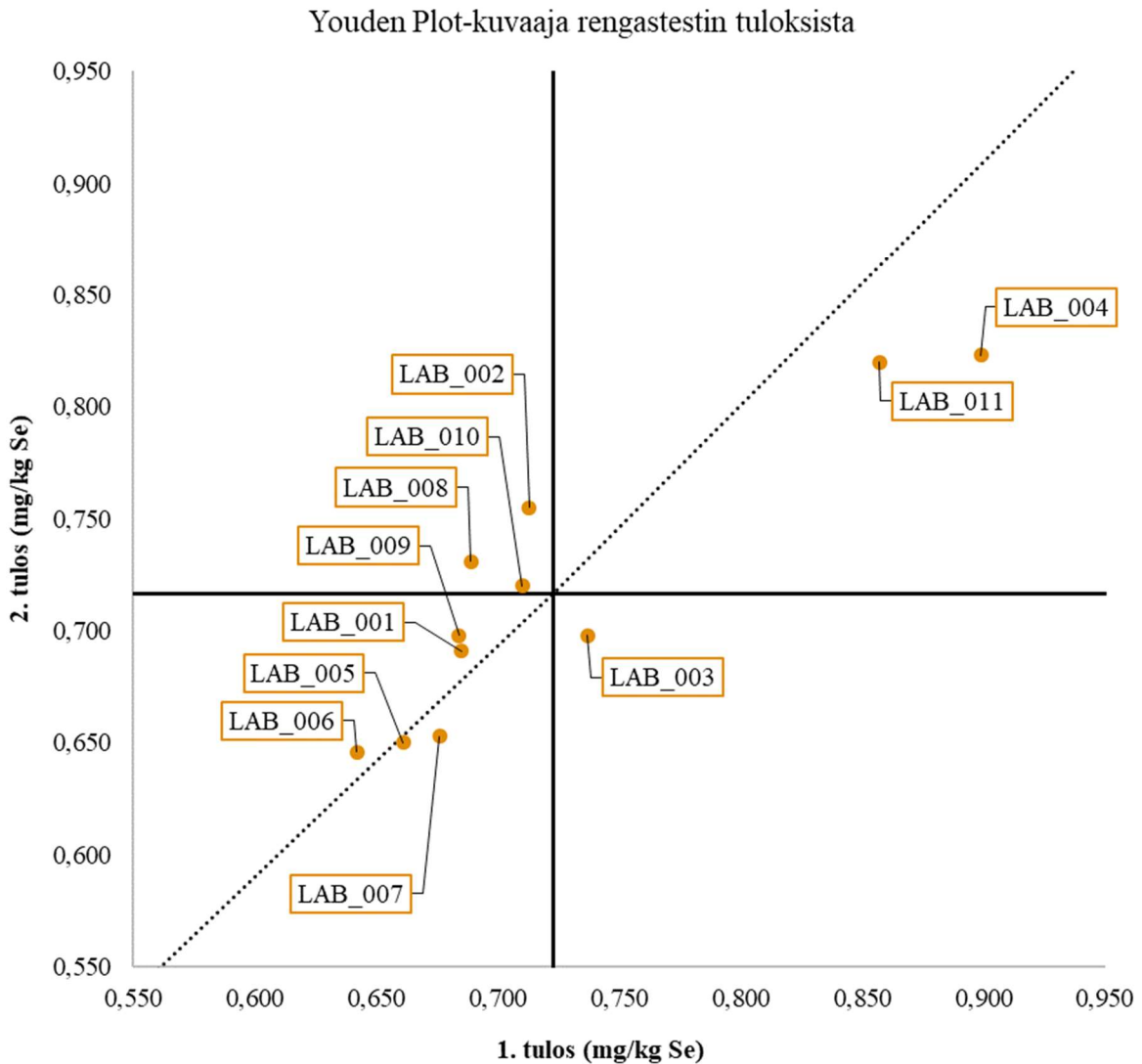
Kuva 17. Laboratorioiden z-arvot suuruusjärjestyksessä.

Kaikkien laboratorioiden z-arvot olivat itseisarvoltaan alle kaksi. Näin ollen voidaan sanoa, että kaikki laboratoriot menestyivät hyvin rengastestissä. Kaksi tuloksista (LAB_011 ja LAB_004)

olivat muita hieman korkeampia, mutta myös näiden tulosten z-arvot olivat hyväksyttävällä tasolla.

11.8 Laboratorioiden välisen varianssin määrittäminen

Z-arvojen lisäksi laboratorioiden tuloksia arvioitiin piirtämällä rinnakkaistuloksista Youden plot-kuvaaja (kuva 18).



Kuva 18. Youden-plot-kuvaaja rengastestin tuloksista.

Kuvaajassa on esitetty laboratorioiden tulokset siten, että yhden laboratorion kaksi rinnakkaistulosta muodostavat kuvaajan pisteen x- ja y-koordinaatit. Ensimmäisen rinnakkaisnäytteen tulos vastaa x-koordinaattia ja toinen tulos y-koordinaattia. Kuvaajaan on

piirretty suorat, jotka kuvaavat tulosten keskiarvoja. Pystysuora viiva kuvaa ensimmäisten rinnakkaismääritysten keskiarvoa ja vaakasuora viiva toisten rinnakkaistulosten keskiarvoa.

Akselit jakavat kuvaajan neljään osaan. Mikäli tuloksissa ei havaittaisi lainkaan systemaattista virhettä laboratorioden välillä, olisivat kaikki pisteet jakautuneet tasaisesti neljään osaan. Kuvaajaan on piirretty katkoviivalla myös 45 asteen suora. Pisteiden kohtisuora etäisyys tältä suoralta kuvaa laboratorion satunnaisen mittausvirheen suuruutta. Pisteiden 45 asteen suoran suuntainen etäisyys kuvaajan keskipisteestä kuvaa puolestaan laboratorioden systemaattista mittausvirhettä.

Systemaattisen ja satunnaisen virheen erottamiseksi toisistaan hyödynnetään varianssianalyysia (ANOVA). Mikäli laboratorion tuloksissa ilmenee systemaattista virhettä, sama virhe esiintyy molemmissa laboratorion tuloksissa. Tällöin erotus $D=X-Y$ poistaa systemaattisen virheen. D -arvojen jakautuman avulla voidaan arvioida satunnaista virhettä. Termeillä X tarkoitetaan tässä laboratorion ensimmäistä rinnakkaistulosta ja termillä Y toista rinnakkaistulosta. Kokonaisvariaatio voidaan puolestaan laskea rinnakkaistulosten summan $S=X+Y$ jakaumasta. Näiden kahden variaation avulla voidaan laskea arvio laboratorioden väliselle variaatiolle seuraavan kaavan mukaisesti:

$$s_R^2 = s_r^2 + 2s_L^2, \quad (9)$$

jossa s_R^2 on kokonaisvariassi, s_r^2 on satunnaisvirheen variassi ja s_L^2 on laboratorioden välinen variassi.⁸⁰ Kyseinen luku kerrotaan kaavassa kahdella, sillä tässä tapauksessa laboratoriot tekivät kaksi määrittystä samasta näytteestä. Laboratorioden tulokset ja niistä lasketut D - ja S -arvot on koottu taulukkoon 32:

Taulukko 32. Tilastolliset parametrit (mg/kg) varianssianalyysia varten.

Laboratorio	X	Y	S=X+Y	D=X-Y
LAB_001	0,685	0,691	1,376	-0,006
LAB_002	0,713	0,755	1,468	-0,042
LAB_003	0,737	0,698	1,435	0,039
LAB_004	0,899	0,823	1,722	0,076
LAB_005	0,661	0,650	1,311	0,011
LAB_006	0,642	0,646	1,288	-0,004
LAB_007	0,676	0,653	1,329	0,023
LAB_008	0,689	0,731	1,420	-0,042
LAB_009	0,684	0,698	1,382	-0,014
LAB_010	0,710	0,720	1,430	-0,010
LAB_011	0,857	0,820	1,677	0,037

Satunnaisvirheen varianssin homogeenisuus tarkistettiin ennen varianssianalyysia Cochranin testillä (ks. kohta 11.4). Eniten satunnaista virhettä sisältävä tulos oli laboratorion LAB_004, jonka C :n arvoksi saatiin 0,382. Kriittinen arvo (taulukko 22), kun $k=11$ ja $p=0,05$ on 0,57. Koska kriittinen arvo ei ylity, voidaan satunnaisvirheen varianssia pitää homogeenisena.

Satunnaisvirheen varianssi ja kokonaisvarianssi voidaan laskea seuraavilla kaavoilla:

$$s_r^2 = \frac{\sum_{j=1}^k (D_j - \bar{D})^2}{2(n-1)} \quad (10)$$

$$s_R^2 = \frac{\sum_{j=1}^k (S_j - \bar{S})^2}{2(n-1)}, \quad (11)$$

joissa \bar{D} ja \bar{S} ovat erotusten ja summien keskiarvot ja n on laboratorion lukumäärä. Vapausasteissa on luku 2, koska näytteistä analysoitiin kaksi rinnakkaista jokaisessa laboratoriossa. Kaavojen (10) ja (11) avulla satunnaisiksi varianssiksi saadaan: $s_r^2 = 0,000639$ ja kokonaisvarianssiksi $s_R^2 = 0,00983$. Näiden lukujen avulla ja kaavan (9) avulla voidaan laskea laboratorion välinen varianssi: $s_L^2 = 0,00459$.

Kun satunnaisvirhettä ja kokonaisvarianssia verrataan toisiinsa F -testillä, saadaan arvoksi $F=15,39$. Kriittinen kaksisuuntainen arvo kirjallisuuden⁸⁰ mukaan on $F_{10,10} = 2,98$ ($p=0,05$). Koska kriittinen arvo ylittyy, laboratorion välistä varianssia ei voida selittää satunnaisella virheellä, vaan laboratorion menetelmien välillä on systemaattista virhettä.

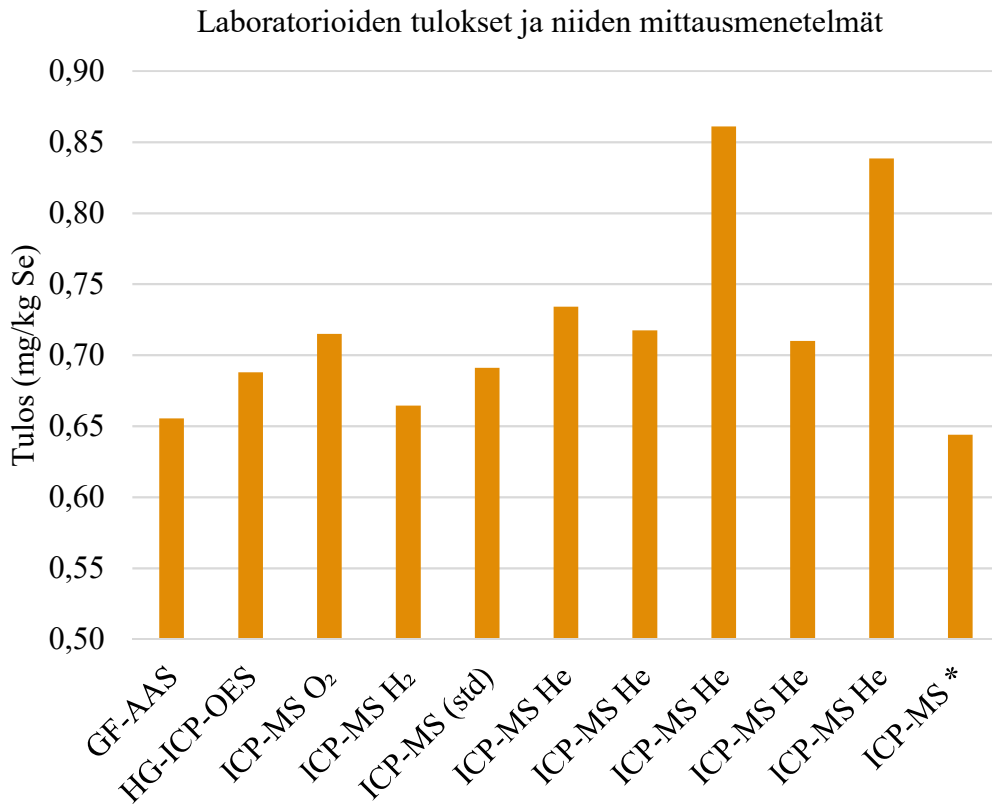
Kokonaisvarianssin perusteella voidaan määrittää vielä RSD-arvo laboratorion tuloksille. Kun kokonaisvarianssin neliöjuuri jaetaan kaikkien tulosten keskiarvolla, saadaan:

$$RSD = \frac{100\% \cdot \sqrt{0,00983}}{0,720} = 13,77\%$$

Rengastestin tavoitehajonta σ_p :lla määritettynä RSD:n arvo on tällä konsentraatioalueella 16,58 %. Tulosten kokonaishajonta oli siis pienempää kuin Horwitz'n trumpetti antoi olettaa.

11.9 Tulosten tulkinta

Tulosten perusteella voidaan sanoa, että mittausmenetelmällä on merkittävä vaikutus tuloksiin (kuva 19).

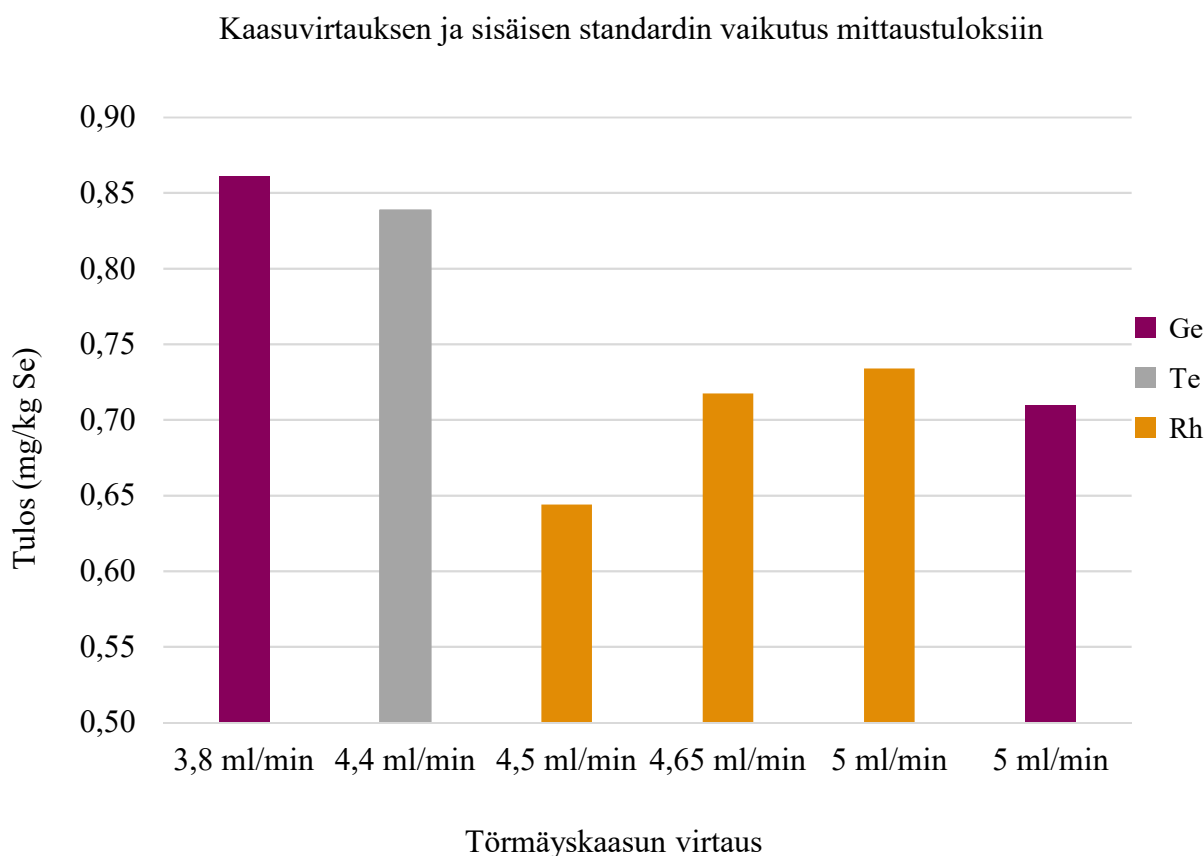


* Laboratorio ilmoitti käytössä olevan törmäyskaasu, mutta ei tarkentanut, mikä kaasu on kyseessä.

Kuva 19. Laboratorioiden tulokset ja niiden mittausmenetelmät.

Rengastestiin osallistuneista laboratorioista suurin osa käytti mittausmenetelmänä ICP-MS-tekniikkaa. Kaksi tuloksista oli määritetty muilla menetelmällä: toinen tuloksista oli määritetty ICP-OES-laitteella käyttäen hydridin muodostustekniikkaa ja toinen grafiittiuni-atomiaabsorptiota. ICP-MS-tulosten kohdalla on raportoitu myös käytetty törmäys- tai reaktiokaasu. Kaikissa muissa menetelmissä paitsi GFAAS-menetelmässä näytteen esikäsittelyssä käytössä oli mikroaaltouuniavusteinen suljettu märkäpoltto. GFAAS-menetelmässä käytössä oli avoin märkäpoltto. Liuotushappoina kaikissa ICP-MS-menetelmissä käytettiin typpihappoa ja yhtä laboratorioita lukuun ottamatta myös vetyperoksidia. HG-ICP-OES:ssä käytössä oli vetykloridihappo. Näytteen punnitusmäärät vaihtelivat 0,3–0,5 g välillä. Myös lopputilavuuksien ja laimennosten välillä oli laboratorioiden välisiä eroavuuksia, mutta punnitusmäärillä ja näyteliuosten pitoisuuksilla ei näyttänyt olevan merkitystä tuloksien suuruuteen. Menetelmien mittausepävarmuudet vaihtelivat 20–40 % välillä. Tuloksista havaitaan, että ICP-MS-menetelmät, joissa törmäyskaasuna käytettiin heliumia, näyttäisivät antavan muihin menetelmiin verrattuna hieman korkeampia tuloksia. Toisaalta vaihtelu tulosten välillä on kohtuullisen suurta.

Kun tarkastellaan ICP-MS-laitteen törmäysmittaustilassa mitattuja tuloksia (kuva 20) havaitaan myös, että kaasuvirtauksen suuruus näyttäisi vaikuttavan tulokseen.



Kuva 20. Käytetty törmäyskaasuvirtaus ja sisäinen standardi niille tuloksille, jotka mitattiin käyttäen ICP-MS-tekniikkaa ja törmäyskaasua.

Pienemmät kaasuvirtaukset (3,8 ja 4,4 ml/min) näyttäisivät tuottavan hieman korkeammat tulokset kuin suuremmat kaasuvirtaukset. Syynä tähän voi mahdollisesti olla korkeamman kaasuvirtauksen tehokkaampi Ar-häiriön poisto. Poikkeuksena voidaan pitää 4,5 ml/min kaasuvirtauksella saatua tulosta, joka on muihin nähden huomattavasti pienempi. Toisaalta juuri tuon tuloksen käytetty törmäyskaasu ei ole tiedossa.

Sisäisen standardin vaikutusta tuloksiin ei voida tehdä luotettavia johtopäätöksiä, sillä esimerkiksi käytettäessä germaniumia saadaan sekä suuri että pieni tulos seleenille. Yhden telluurilla tehdyn mittauksen korkeasta tuloksesta on myös mahdotonta tehdä päätelmiä, että telluuri toimisi huonosti sisäisenä standardina. Toisaalta voidaan kuitenkin todeta, että keskimääräisesti rodiumia käyttämällä tulokset olivat keskimääräisesti pienempiä, verrattuna telluurilla ja germaniumilla mitattuihin tuloksiin. On kuitenkin muistettava, että tarkasteltava

tulosjoukko on erittäin pieni. Tämän vuoksi tuloksista tehtyjen johtopäätösten luotettavuus on vähintäänkin kyseenalainen.

12 Yhteenveto

Jäännöshiilen vaikutusta tutkittiin lisäämällä näytteisiin ja standardeihin metanolitausta. Metanolin vaikutusta tutkittiin ensin referenssimateriaalien avulla, joihin lisättiin 1 % ja 2 % (v/v) metanolipitoisuus. Tulokset pienenevät seleenin osalta metanolipitoisuuden kasvaessa. Sama ilmiö havaittiin myös tarkasteltaessa tulosten hajontaa. Näyttäisi siis siltä, että metanolin lisääminen parantaa seleenitulosten oikeellisuutta sekä toistettavuutta. Muiden alkuaineiden kohdalla tulokset olivat vaihtelevia. Joidenkin alkuaineiden kohdalla tulosten hajonta pieneni metanolia lisättäessä ja joidenkin kohdalla hajonta puolestaan kasvoi. Esimerkiksi kromin kohdalla tulosten hajonta oli erittäin suurta metanolia sisältävissä liuksissa. Referenssimateriaalien tarkastelun perusteella parhaaksi metanolipitoisuudeksi valittiin 1 %, sillä 2 % metanolia käytettäessä osalla referenssimateriaaleista tulos oli liian alhainen, jolloin saanto jäi huomattavasti alle 100 %:n. Rutiininäytteet mitattiin käyttäen 1 % metanolia sekä ilman metanolia, jotta voitiin tutkia, toistuvatko samat ilmiöt myös rutiininäytteiden tapauksessa. Seleenin osalta tulos oli 1 % metanolitaustalla hieman pienempi verrattuna ilman metanolia mitattuun pitoisuuteen. Myös hajonnat olivat pienemmät metanolin tapauksessa kuin ilman metanolia. Tosin tuloksien väliset erot olivat suurempia referenssimateriaalien tarkastelussa verrattuna rutiininäytteisiin.

Eviran nykyisen menetelmän (Evira8128) mukaan elintarvikenäytteistä mitataan samanaikaisesti myös muita alkuaineita kuin seleeni. Jos metanolia lisättäisiin liuoksiin, häiritsisi se esimerkiksi kromin määrittystä huomattavasti. Seleenin mittauksen eriyttäminen omaksi menetelmäkseen ei myöskään ole kannattavaa, sillä erot metanolia sisältävien näytteiden ja nykyisellä menetelmällä mitattujen näytteiden välillä eivät ole merkittäviä, kun huomioidaan tulosten luottamusvälit. Näin ollen metanolin lisäystä näytetaustaan ei voida pitää tarpeellisena.

Gadoliniumin osalta häiriön merkittävyys pystyttiin todentamaan. Synteettisten näytteiden avulla havaittiin, että noin puolet lisäystä gadoliniumista havaitaan mitattaessa ⁷⁸Se-isotooppia. Pienissä pitoisuuksissa (0,1 µg/l) ei gadoliniumin vaikutusta seleenin tulokseen voida havaita. Gadoliniumipitoisuus mitattiin myös rutiininäytteistä, mutta kaikissa näytteissä gadoliniumin pitoisuus jäi alle määrittysalarajan. Tulosten perusteella voidaan siis päätellä, että ainakin mitattujen näytteiden osalta gadolinium ei aiheuta häiriötä seleenin mittaukseen, sillä gadoliniumipitoisuudet elintarvikkeissa ovat erittäin pienet.

Rengastestin tavoitteena oli perehtyä rengastestin järjestämiseen liittyviin toimintatapoihin ja järjestelyihin. Tämän tutkielman yhteydessä järjestetty rengastutkimus oli ensimmäinen Eviran Kemian tutkimusyksikön järjestämä rengastutkimus. Laboratorioiden tulokset olivat kaikki hyviä kaikkien z-arvojen ollessa itseisarvoltaan alle kaksi. Rengastestin yhteydessä saatiin arvokasta tietoa, miten ja millaisella menetelmällä tulokset on saatu. Näyttäisi siltä, että käytetyllä törmäys- tai reaktiokaasulla on merkittävä vaikutus seleenin tuloksiin. Rengastestiin osallistuneista laboratorioista kahden laboratorion tulos oli muihin nähden hieman korkeampi. Näissä molemmissa laboratorioissa tulos määritettiin käyttäen ICP-MS-tekniikkaa, jossa törmäyskaasuna oli helium. Lisäksi molempien laboratorioiden kohdalla käytetty törmäyskaasun virtausnopeus oli muihin laboratorioihin nähden hieman pienempi. Laboratoriot, jotka käyttivät korkeampaa kaasuvirtausta tai jotain muuta törmäys- tai reaktiokaasua, saivat z-arvoltaan parempia tuloksia. Näin ollen tutkimusta olisi hyvä jatkaa vielä testaamalla seleenin mittausta erilaisin kaasuvirtauksin ja mahdollisesti myös mitata käyttäen eri törmäys- tai reaktiokaasua.

13 Lähteet

1. Nelms, S., The Dark Side of the Moon: Selenium Analysis Using ICP-MS, Part 1, <http://analyteguru.com/the-dark-side-of-the-moon-selenium-analysis-using-icp-ms-part-1/> (24.12.2017).
2. Paul, M., *Analysis of Selenium in Difficult Samples*, 2016 Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, Tucson, Yhdysvallat, 10.-16.1.2016.
3. Euroola, M.; Alfthan, G.; Ekholm, P.; Erlund, I.; Korkalainen, K.; Luomanperä, S.; Mannio, J.; Salminen, P.; Suoniitty, T.; Venäläinen, E.-R.; Ylivainio, K. ja Hietaniemi, V., Seleenityöryhmän raportti 2016, *Luonnonvara- ja biotalouden Tutk.*, **2016**.
4. Chu, S. Y. F.; Ekström, L. P. ja Firestone, R. B., The Lund/LBNL nuclear data search, <http://nucleardata.nuclear.lu.se/toi/> (16.12.2017).
5. Aylett, B. J., Chemistry of the elements, *Polyhedron*, **1985**, 4, 1799–1800.
6. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, *Toxicological profile for selenium*, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, 2003.
7. Hammond, C., The Elements. Teoksessa: *Handbook of Chemistry and Physics*, 84. painos, CRC Press, 2003, ss. 4–26.
8. Science made alive, <http://woelen.homescience.net/science/chem/elem/elements/Se/index.html> (25.1.2018).
9. Jörg, G.; Bühnemann, R.; Hollas, S.; Kivel, N.; Kossert, K.; Van Winckel, S. ja Lierse v. Gostomski, C., Preparation of radiochemically pure ⁷⁹Se and highly precise determination of its half-life, *Appl. Radiat. Isot.*, **2010**, 68, 2339–2351.
10. Kim, S. S.; Min, J. H.; Baik, M. H.; Kim, G. N. ja Choi, J. W., Estimation of the behaviors of selenium in the near field of repository, *Nucl. Eng. Technol.*, **2012**, 44, 945–952.
11. Fogelholm, M.; Hakala, P.; Kara, R.; Kiuru, S.; Kurppa, S.; Kuusipalo, H.; Laitinen, J.; Marniemi, A.; Misikangas, M.; Roos, E.; Sarlio-Lähteenkorva, S.; Schwab, U. ja Virtanen, S., *Terveyttä ruoasta - Suomalaiset ravitsemussuositukset 2014*, 4. painos, Valtion Ravitsemusneuvottelukunta, 2014.

12. Masella, R. ja Mazza, G., *Glutathione and Sulfur Amino Acids in Human Health and Disease*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, Yhdysvallat, 2009.
13. Köhrle, J. ja Gärtner, R., Selenium and thyroid autoimmunity, *Biol. Targets Ther.*, **2008**, 2, 265–273.
14. Lü, J.-M.; Lin, P. H.; Yao, Q. ja Chen, C., Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems, *J. Cell. Mol. Med.*, **2010**, 14, 840–860.
15. Birben, E.; Murat, U.; Md, S.; Sackesen, C.; Erzurum, S. ja Kalayci, O., Oxidative Stress and Antioxidant Defense, *WAO J.*, **2012**, 5, 9–19.
16. Beck, M. A.; Levander, O. A. ja Handy, J., Selenium deficiency and viral infection., *J. Nutr.*, **2003**, 133, 1463–1467.
17. Oldfield, J. E., *Selenium World Atlas*, Selenium-Tellurium Development Association, Oregon State University, Corvallis, Yhdysvallat, 2002.
18. Koller, L. D. ja Exon, J. H., The two faces of selenium-deficiency and toxicity--are similar in animals and man., *Can. J. Vet. Res.*, **1986**, 50, 297–306.
19. Rayman, M. P., Food-chain selenium and human health: emphasis on intake, *Br. J. Nutr.*, **2008**, 100, 254–68.
20. Dietary Supplement Fact Sheet: Selenium — Health Professional Fact Sheet, <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Selenium-HealthProfessional/> (1.12.2017).
21. Jirong, Y.; Huiyun, P.; Zhongzhe, Y.; Birong, D.; Weimin, L.; Ming, Y. ja Yi, S., Sodium selenite for treatment of Kashin-Beck disease in children: a systematic review of randomised controlled trials, *Osteoarthr. Cartil.*, **2012**, 20, 605–613.
22. Chen, Z. P. ja Hetzel, B. S., Cretinism revisited, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2010**, 24, 39–50.
23. Salonen, J.; Alfthan, G.; Huttunen, J.; Pikkarainen, J. ja Puska, P., Association Between Cardiovascular Death and Myocardial Infarction and Serum Selenium in a Matched-Pair Longitudinal Study, *Lancet*, **1982**, 320, 175–179.

24. Spallholz, J. E., On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity, *Free Radic. Biol. Med.*, **1994**, *17*, 45–64.
25. Hartikainen, H., Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **2005**, *18*, 309–318.
26. Fan, A. M. ja Kizer, K. W., Selenium Nutritional, toxicologic, and clinical aspects, *West. J. Med.*, **1990**, *153*, 160–167.
27. MacFarquhar, J. K., Acute Selenium Toxicity Associated With a Dietary Supplement, *Arch. Intern. Med.*, **2010**, *170*, 256.
28. Chen, Y.-C.; Prabhu, K. S. ja Mastro, A. M., Is selenium a potential treatment for cancer metastasis?, *Nutrients*, **2013**, *5*, 1149–1168.
29. Jiang, C.; Jiang, W.; Ip, C.; Ganther, H. ja Lu, J., Selenium-induced inhibition of angiogenesis in mammary cancer at chemopreventive levels of intake, *Mol. Carcinog.*, **1999**, *26*, 213–225.
30. Clark, L. C.; Combs, G. F.; Turnbull, B. W.; Slate, E. H.; Chalker, D. K.; Chow, J.; Davis, L. S.; Glover, R. A.; Graham, G. F.; Gross, E. G.; Krongrad, A.; Leshner, J. L.; Park, H. K.; Sanders, B. B.; Smith, C. L. ja Taylor, J. R., Effects of Selenium Supplementation for Cancer Prevention in Patients With Carcinoma of the Skin, *JAMA*, **1996**, *276*, 1957.
31. DeNicola Cafferky, K.; Richardson, D. D. ja Caruso, J. A., ICP-MS Speciation Analysis: Three Roles of Selenium, *Spectroscopy*, **2006**, *21*, 18–22.
32. DeFrancesco, L., Prostate cancer prevention trial launched, *Nat. Med.*, **2001**, *7*, 1076–1076.
33. Kristal, A. R.; Darke, A. K.; Morris, J. S.; Tangen, C. M.; Goodman, P. J.; Thompson, I. M.; Meyskens, F. L.; Goodman, G. E.; Minasian, L. M.; Parnes, H. L.; Lippman, S. M. ja Klein, E. A., Baseline selenium status and effects of selenium and vitamin E supplementation on prostate cancer risk, *J. Natl. Cancer Inst.*, **2014**, *106*.
34. Watanabe, C., Modification of mercury toxicity by selenium: practical importance?, *Tohoku J. Exp. Med.*, **2002**, *196*, 71–77.

35. Yoneda, S. ja Suzuki, K. T., Detoxification of Mercury by Selenium by Binding of Equimolar Hg–Se Complex to a Specific Plasma Protein, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1997**, *143*, 274–280.
36. Nuttall, K. L. ja Allen, F. S., Selenium detoxification of heavy metals: a possible mechanism for the blood plasma, *Inorganica Chim. Acta*, **1984**, *92*, 187–189.
37. He, X. M. ja Carter, D. C., Atomic structure and chemistry of human serum albumin, *Nature*, **1992**, *358*, 209–215.
38. Chen, Y.-W.; Belzile, N. ja Gunn, J. M., Antagonistic effect of selenium on mercury assimilation by fish populations near Sudbury metal smelters?, *Limnol. Oceanogr.*, **2001**, *46*, 1814–1818.
39. Burger, J. ja Gochfeld, M., Mercury and selenium levels in 19 species of saltwater fish from New Jersey as a function of species, size, and season, *Sci. Total Environ.*, **2011**, *409*, 1418–1429.
40. Polanska, K.; Krol, A.; Sobala, W.; Gromadzinska, J.; Brodzka, R.; Calamandrei, G.; Chiarotti, F.; Wasowicz, W. ja Hanke, W., Selenium status during pregnancy and child psychomotor development—Polish Mother and Child Cohort study, *Pediatr. Res.*, **2016**, *79*, 863–869.
41. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for Selenium, *EFSA J.*, **2014**, *12*.
42. Fineli - Elintarvikkeiden kansallinen koostumustietopankki, <https://fineli.fi/fineli/fi/index> (28.1.2018).
43. Gupta, M. ja Gupta, S., An Overview of Selenium Uptake, Metabolism, and Toxicity in Plants, *Front. Plant Sci.*, **2016**, *7*, 2074.
44. Gissel-Nielsen, G., Influence of pH and Texture of the Soil on Plant Uptake of Added Selenium, *J. Agric. Food Chem.*, **1971**, *19*, 1165–1167.
45. Steen, A.; Strøm, T. ja Bernhoft, A., Organic selenium supplementation increased selenium concentrations in ewe and newborn lamb blood and in slaughter lamb meat compared to inorganic selenium supplementation, *Acta Vet. Scand.*, **2008**, *50*, 7.
46. Morrill, R., The History of Selenium Research, <https://www.pharmanord.com/history-of-selenium-research> (30.1.2018).

47. Ekholm, P., *Effects of Selenium Supplemented Commercial Fertilizers on Food Selenium Content and Selenium Intake in Finland*, väitöskirja, EKT-sarja, Helsingin Yliopisto, Elintarvikekemian ja -Teknologian laitos, 1997.
48. Ekholm, P.; Ylinen, M.; Koivistoinen, P. ja Varo, P., Selenium Concentration of Finnish Foods: Effects of Reducing the Amount of Selenate in Fertilizers, *Agric. Sci. Finl.*, **1994**, *4*, 377–384.
49. Alfthan, G.; Aspila, P.; Ekholm, P.; Euroola, M.; Hartikainen, H.; Hero, H.; Hietaniemi, V.; Root, T.; Salminen, P.; Venäläinen, E. R. ja Aro, A., Nationwide Supplementation of Sodium Selenate to Commercial Fertilizers: History and 25-year Results from the Finnish Selenium Monitoring Programme, *Combat. Micronutr. Defic. Food-based Approaches*, **2011**, 312–337.
50. Thomas, R., A beginner's guide to ICP-MS, Osat I-X, *Spectroscopy*, 16(4)-17(4), 2001-2002.
51. Houk, R. S., Mass spectrometry of inductively coupled plasmas, *Anal. Chem.*, **1986**, *58*, 97A–105A.
52. Gaines, P., Sample Introduction for ICP-MS and ICP-OES, *Spectroscopy*, **2005**, *20*, 20–23.
53. Concentric Quartz Nebulizer, MEINHARD® Type A3 | PerkinElmer, <http://www.perkinelmer.com/fi/product/nebulizer-quartz-concentric-we024371> (18.3.2018).
54. GemTip Cross-Flow II Ryton Nebulizer Assembly for ICP-MS and all ELAN instruments | PerkinElmer, <http://www.perkinelmer.com/fi/product/end-cap-assy-elan-nebulizer-n8120516> (18.3.2018).
55. Limbeck, A.; Galler, P.; Bonta, M.; Bauer, G.; Nischkauer, W. ja Vanhaecke, F., Recent advances in quantitative LA-ICP-MS analysis: challenges and solutions in the life sciences and environmental chemistry, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2015**, *407*, 6593–6617.
56. Dean, J. R., *Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectroscopy*, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, Yhdistynyt kuningaskunta, 2005, ss. 57-122.

57. Harris, D., *Quantative Chemical Analysis*, 8. painos, W.H Freeman and Company, 2010, ss. 486-487.
58. Cheung, T. S.; Wong, C. ja Badiei, H. R., *Advantages of a Novel Plasma Generator for the NexION 1000/2000 ICP-MS Systems*, PerkinElmer, Inc., Woodbridge, Ontario, Kanada, 2017.
59. Bass, D., *Determination of Trace Metals in Human Urine Using the NexION 300 ICP-MS*, PerkinElmer, Inc., Shelton, Yhdysvallat, 2010.
60. May, T. W. ja Wiedmeyer, R. H., A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS, *At. Spectrosc.*, **1998**, *19*, 150–155.
61. Yamada, N., Kinetic energy discrimination in collision/reaction cell ICP-MS: Theoretical review of principles and limitations, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, **2015**, *110*, 31–44.
62. Vaughan, M. A. ja Horlick, G., Oxide, Hydroxide, and Doubly Charged Analyte Species in Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry, *Appl. Spectrosc.*, **1986**, *40*, 434–445.
63. Fernández, S. D.; Sugishama, N.; Encinar, J. R. ja Sanz-Medel, A., Triple Quad ICPMS (ICPQQQ) as a New Tool for Absolute Quantitative Proteomics and Phosphoproteomics, *Anal. Chem.*, **2012**, *84*, 5851–5857.
64. de Hoffmann, E. ja Stroobant, V., *Mass spectrometry: principles and applications*, John Wiley & Sons, West Sussex, Yhdistynyt kuningaskunta, 2007.
65. Busch, K. L., Detecting ions in mass spectrometers with the faraday cup, *Spectroscopy*, **2011**, *26*.
66. Nelms, S., The Dark Side of the Moon: Selenium Analysis Using ICP-MS, Part 2, <http://analyteguru.com/the-dark-side-of-the-moon-selenium-analysis-using-icp-ms-part-2/> (28.12.2017).
67. National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Database, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23982> (28.12.2017).
68. Hedrick, J. B., Rare-Earth Metals, *U.S. Geol. Surv.*, **1998**, 61.1-61.12.

69. Handbook of Basic Atomic Spectroscopic Data | NIST, <https://www.nist.gov/pml/handbook-basic-atomic-spectroscopic-data> (28.12.2017).
70. Lide, D. R., *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 84th Edition, 2003-2004*, 84. painos, CRC Press, 2004.
71. Nelms, S., Removing the Gd²⁺ interference on Se, using the iCap Q ICP-MS, Sales Team Note, Thermo Fisher Scientific, Hemel Hempstead, Yhdistynyt kuningaskunta.
72. Jackson, B. P.; Liba, A. ja Nelson, J., Advantages of reaction cell ICP-MS on doubly charged interferences for arsenic and selenium analysis in foods, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2015**, *30*, 1179–1183.
73. Allain, P.; Jaunault, L.; Mauras, Y.; Mermet, J. M. ja Delaporte, T., Signal enhancement of elements due to the presence of carbon-containing compounds in inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **1991**, *63*, 1497–1498.
74. Vanhaecke, F.; Vanhoe, H.; Dams, R. ja Vandecasteele, C., The use of internal standards in ICP-MS, *Talanta*, **1992**, *39*, 737–742.
75. Larsen, E. H. ja Stürup, S., Carbon-enhanced inductively coupled plasma mass spectrometric detection of arsenic and selenium and its application to arsenic speciation, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1994**, *9*, 1099–1105.
76. Guo, W.; Hu, S.; Li, X.; Zhao, J.; Jin, S.; Liu, W. ja Zhang, H., Use of ion-molecule reactions and methanol addition to improve arsenic determination in high chlorine food samples by DRC-ICP-MS, *Talanta*, **2011**, *84*, 887–894.
77. ISO/TC 34/SC 5 - Milk, milk products, infant formula and adult nutritionals -- Determination of minerals and trace elements -- Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) method, 2013.
78. Bolea-Fernandez, E.; Balcaen, L.; Resano, M. ja Vanhaecke, F., Interference-free determination of ultra-trace concentrations of arsenic and selenium using methyl fluoride as a reaction gas in ICP-MS/MS, *Anal. Chem.*, **2014**, *86*, 7969–7977.
79. Evira8128 menetelmäohje: Alkuaineiden määrittäminen eläinperäisistä näytteistä, elintarvikkeista ja rehuvalmisteista ICP-MS- tekniikalla, Elintarviketurvallisuusvirasto Evira, 2017.

80. Miller, J. M. ja Miller, J. C., *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 6. painos, Pearson Education Limited, Essex, Yhdistynyt kuningaskunta, 2010.
81. Thompson, M.; Ellison, S. L. R. ja Wood, R., The International Harmonized Protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, **2006**, 78.
82. Workman, J. J. ja Howard, M., Limitations in Analytical Accuracy, Part I: Horwitz's Trumpet, *Spectroscopy*, **2006**, 21.
83. Thompson, M., A natural history of analytical methods, *Analyst*, **1999**, 124, 991.
84. Grubbs, F. E. ja Beck, G., Extension of Sample Sizes and Percentage Points for Significance Tests of Outlying Observations, *Technometrics*, **1972**, 14, 847–854.
85. Verma, S. P. ja Quiroz-Ruiz, A., Critical values for six Dixon tests for outliers Critical values for six Dixon tests for outliers in normal samples up to sizes 100, and applications in science and engineering, *Rev. Mex. Ciencias Geológicas*, **2006**, 23, 133–161.
86. Analytical Methods Committee, Representing data distributions with kernel density estimates, *AMC Tech. Br.*, **2006**, 4.
87. Rousseeuw, P. J. ja Croux, C., Alternatives to the Median Absolute Deviation, *J. Am. Stat. Assoc.*, **1993**, 88, 1273–1283.
88. Analytical Methods Committee, Robust statistics: a method of coping with outliers, *AMC Tech. Br.*, **2001**, 6, 2.