

Räjähdysaineita sisältävien maanäytteen esikäsittelymenetelmien vertailu

Pro Gradu -tutkielma ja erikoistyö

Jyväskylän yliopisto

Kemian laitos

Epäorgaanisen ja

analyttisen kemian osasto

03.04.2012

Tiina Runsas

Tiivistelmä

Räjähdysaineiden kulkeutuminen maaperään ja vesistöihin aiheuttaa merkittävän ympäristöriskin, sillä toksikologisissa tutkimuksissa räjähdysaineiden on havaittu aiheuttavan monia terveydellisiä haittoja ja ne ovat myrkyllisiä eläville organismeille. Tämän johdosta räjähdysaineita sisältävien ympäristönäytteiden analysointiin on kehitetty monia menetelmiä, jotta koko ekosysteemiä kohtaavat vahingot voitaisiin tunnistaa ja suorittaa kunnostustoimenpiteitä kontaminoituneilla alueilla.

Tässä Pro gradu-tutkielmassa tarkastellaan räjähdysaineita, niiden ympäristö- ja terveysvaikutuksia sekä räjähdysaineita sisältävien maanäytteiden uuttamista ja analysointia. Tutkielmassa selvitetään nestekromatografisen systeemin toimintaperiaate sekä käydään läpi analyysimenetelmien validointiin ja laadunvarmistukseen liittyviä asioita.

Erikoistyössä verrattiin räjähdysaineita sisältävien maanäytteiden uuttamiseen käytettyjä kolmea näytteen esikäsittelymenetelmää. Näytteiden uuttaminen suoritettiin mekaanisella ravistelulla, nopeutetulla liuotinuutolla ja mikroaaltoavusteisella uutolla. Analyyttien pitoisuudet analysoitiin nestekromatografisesti ja yhdisteiden detektointi suoritettiin UV-detektorilla. Menetelmän validointi suoritettiin viiden validointiparametrin (selektiivisyys, spesifisyys, lineaarisuus, toistotarkkuus, oikeellisuus) avulla ja se soveltui hyvin maanäytteistä uutettujen analyyttien pitoisuusmäärittäisiin.

Esikäsittelymenetelmien välisessä vertailussa mekaaninen ravistelu todettiin suhteellisen tarkaksi ja toistettavaksi menetelmäksi, jolla on kohtalainen uutotehokkuus. Nopeutetussa liuotinuutossa uuttolaitteisto oli tekniseltä toimintavarmuudeltaan huono, mutta se oli uutotehokkuudeltaan paras. Mikroaaltoavusteinen uutto oli suhteellisen tarkka ja toistettava esikäsittelymenetelmä, mutta sen uutotehokkuus oli huono, joten menetelmän optimointia on jatkettava tulevaisuudessa.

Esipuhe

Tämä Pro gradu ja erikoistyö on tehty Ylöjärvellä Puolustusvoimien Teknillisen Tutkimuslaitoksen (PVTT) räjähdde- ja suojelutekniikkaosastolla, kemian analytiikan laboratoriossa. Kokeellinen osa tehtiin 2011 kesä-marraskuussa ja kirjallinen osa kirjoitettiin vuoden 2011 marraskuun ja 2012 huhtikuun välisenä aikana. Työn ohjaajina toimivat FM Timo Kröger PVTT:sta ja dosentti Rose Matilainen Jyväskylän yliopistosta.

Kirjallisuustutkimuksessa käytettiin hyödyksi räjähdysaineisiin ja niiden analytiikkaan sekä uuttomenetelmiin liittyviä artikkeleita, luentomateriaaleja ja aiheista kirjoitettuja kirjoja. Tiedonhaussa käytettiin Sci Finder -viitetietokantaa, Elsevier ScienceDirect -artikkelitietokantaa sekä PVTT:n kirjastopalveluja. Hakuksina käytettiin mm. seuraavia sanoja ja niiden yhdistelmiä: HPLC, validation, TNT, RDX, HMX, soil, environmental analysis, explosives, extraction, microwave ja accelerated solid extraction.

Haluan esittää lämpimät kiitokseni työnohjaajalle tutkija Timo Krögerille mielenkiintoisesta ja haastavasta aiheesta, hyvistä neuvoista ja opastuksesta erikoistyöni aikana. Kiitokset kuuluvat myös koko kemian analytiikan henkilökunnalle, jotka opastivat ja auttoivat pyyteettömästi kohdatessani ongelmia työn tekemisessä. Unohtaa ei myös voi läheisiä työkavereitani räjähdetekniikan laboratoriossa, jotka ovat tukeneet ja innostaneet minua koko opintojen ajan. Haluan myös kiittää työnohjaaja dosentti Rose Matilaista hyvistä neuvoista ja korjaus ehdotuksista, jotta työ saatiin lopulliseen julkaisuasuunsa.

Kiitokset myös vanhemmilleni ja läheisilleni kaikesta tuesta ja avusta. Ilman teitä työn valmistuminen ei olisi ollut mahdollista.

Ylöjärvellä 03.04.2012

Tiina Runsas

Sisällysluettelo

Tiivistelmä	i
Esipuhe	ii
Sisällysluettelo	iii
Käytetyt lyhenteet	vi
KIRJALLINEN OSA	
1 Johdanto	1
2 Räjähdyksaineet ja niiden ympäristö- ja terveysvaikutukset	2
2.1 TNT	2
2.2 RDX.....	3
2.3 HMX	4
2.4 Räjähdeiden muuntuminen ja kulkeutuminen ympäristöön	5
2.5 Räjähdyksaineiden myrkyllisyys ja terveysvaikutukset.....	6
3 Räjähdyksaineita sisältävien maanäytteiden analysointi	7
3.1 Näytteenotto	8
3.2 Näytteen esikäsittelymenetelmät.....	9
3.2.1 Mekaaninen ravistelu	9
3.2.2 ASE -uutto	10
3.2.2.1 Uuttoprosessi	10
3.2.2.2 Uutossa käytetyt liuottimet	11
3.2.3 MAE -uutto.....	12
3.2.3.1 Uuttoprosessi	13
3.2.3.2 Uutossa käytetyt liuottimet	14
3.3 Yhteenveto käytetyistä esikäsittelymenetelmistä.....	14
3.4 Tutkimuksia eri uutomenetelmillä	15
4 Räjähdyksaineita sisältävien maanäytteiden kromatografisen analysointi.....	18
4.1 Yleistä kromatografiasta	18
4.2 Nestekromatografia laitteisto ja sen toiminta	19

4.2.1 Pumput	19
4.2.2 Näytteiden injektointi.....	20
4.2.3 Kolonnit ja stationäärifaasit	20
4.2.4 Detektorit	21
4.2.5 Nestekromatografiset liuotinsysteemit	22
5 Analyysimenetelmän validointi ja laadunvarmistus	23
5.1 Validointi.....	23
5.1.1 Selektiivisyys ja spesifisyys	24
5.1.2 Kalibrointi	24
5.1.2.1 Lineaarisuus	25
5.1.2.2 Kalibrointi sisäisen standardin menetelmällä.....	26
5.1.2.3 Toteamis- ja määrittämissrajat; menetelmän herkkyys	27
5.1.3 Menetelmän toistotarkkuus, täsmällisyys.....	28
5.1.4 Menetelmän oikeellisuus.....	28
5.2 Laadunvarmistus	29
6 Yhteenveto.....	29
KOKEELLINEN OSA	
7 Räjähdyksineiteistä sisältävien maanäytteiden analysointi HPLC -laitteistolla	32
7.1 Työn tarkoitus.....	32
7.2 Laitteisto	32
7.3 Vertailumateriaalit.....	33
7.4 Näytteen esikäsittelymenetelmät.....	34
7.4.1 Mekaaninen ravistelu	34
7.4.2 ASE -uutto	35
7.4.3 MAE -uutto.....	36
8 Työn tulokset.....	38
8.1 Kalibrointi.....	38
8.1.1 Lineaarisuus	39
8.1.2 Toteamis- ja määrittämissrajat; menetelmän herkkyys.....	40

8.2 HPLC -menetelmän selektiivisyys ja spesifisyys	41
8.3 HPLC -menetelmän toistotarkkuus.....	43
8.3.1 Injektionin toistettavuus.....	43
8.3.2 Määritysten sisäinen toistettavuus	44
8.4 HPLC -menetelmän oikeellisuus	45
9 Esikäsittelymenetelmien vertailu	48
10 Yhteenveto.....	58
11 Kirjallisuusviitteet	61
Liitteet	65

Käytetyt lyhenteet

A-DNT	Aminodinitrotolueeni
ASE	Accelerated solvent extraction/pressurized fluid extraction
(=PFE)	Nopeutettu liuotin uutto/paineistettu liuotin uutto
1,2-DNB	1,2-dinitrobentseeni
1,3-DNB	1,3-dinitrobentseeni
DNT	Dinitrotolueeni
DNX	heksahydro-1,3-dinitroso-5-nitro-1,3,5-triatsiini
ECD	Electron capture detector Elektronisieppausdetektori
FID	Flame ionization detector Liekki- ionisaatiodetektori
GC	Gas Chromatography Kaasukromatografia
HMX	1,3,5,7-tetrametyyleeni-1,3,5,7-tetranitramiini Oktogeeni
HPLC	High Performance Liquid Chromatography Nestekromatografia
LOD	Limit of detection Toteamisraja
LOQ	Limit of quantification Määrittäysraja
MAE	Microwave assisted extraction Mikroaaltoavusteinen uutto
MNT	Mononitrotolueeni
MNX	heksahydro-1-nitroso-3,5-dinitro-1,3,5-triatsiini
MS	Mass Spectrometer Massaspektrometri
4-NT	4-nitrotolueeni
PBDE	polybromattu difenyylieetteri
PCB	polykloorattu bifenyylä
RDX	1,3,5-trimetyyleeni-2,4,6-trinitramiini Heksogeeni

RSD	Relative standard deviation Suhteellinen keskihajonta
SD	Standard deviation Keskihajonta
TNT	2,4,6-trinitrotolueeni Trotyyli
TNX	heksahydro-1,3,5-trinitroso-1,3,5-triatsiini
US EPA	United States Environmental Protection Agency

KIRJALLINEN OSA

1 Johdanto

Nitroaromaattisia räjähteitä ja sykliisiä nitramiineja on valmistettu sotilaalliseen käyttöön jo yli sadan vuoden ajan hyvin laajassa mittakaavassa.¹⁻³ Räjähdeiden valmistus ja käyttö sekä sotilaallisilla harjoitus- ja hävitysalueilla että sotilaskonflikteissa aiheuttavat ympäristöriskejä, jos räjähteet pääsevät kulkeutumaan maaperään ja vesistöihin. Räjähdeitä on joutunut ympäristöön myös niiden hävitystoiminnan kautta, sillä yleisesti käytetty hävitystapa on ollut kaivaa hävitettävät räjähteet maahan tai upottaa ne vesistöihin.^{1 ss. 77-82,4}

Toksikologisissa tutkimuksissa räjähdysaineiden ja niiden hajoamistuotteiden on havaittu aiheuttavan terveydellisiä haittoja ja olevan myrkyllisiä eläville organismeille ja siten vahingollisia koko ekosysteemille.^{5,6} Tämän johdosta räjähdysaineiden uuttaminen ja analysointi maaperä- ja vesinäytteistä on ollut viranomaisten kiinnostuksen kohteena jo pitkään.

Markkinoilta löytyy uutto- ja analysointilaitteistoja, joiden avulla voidaan määrittää pieniäkin räjähdysainepitoisuuksia erilaisista näytteistä. Maanäytteiden uuttamisessa on käytetty perinteisesti Soxhlet -uuttoa, jonka liuottimenkulutus on suuri (100-500 ml) ja uuttoaika pitkä (24-48 tuntia).^{7,8} Vaihtoehtoisia menetelmiä, joissa liuottimen kulutusta on saatu pienennettyä ja uuttoaikaa lyhennettyä, ovat mm. mikroaaltoavusteinen uutto (MAE) ja nopeutettu/paineistettu liuottinuutto (ASE/PFE). Räjähdeaineiden pitoisuusmäärittämisessä käytetään useimmiten kromatografisia menetelmiä; kaasukromatografi/liekki-ionisaatio-, elektronisieppaus- tai massadetektori (GC/FID, GC/ECD tai GC/MS) tai neste-kromatografi/UV-Vis - tai massadetektori (HPLC/UV-Vis tai HPLC/MS).

Tässä työssä tarkastellaan räjähdysaineita, niiden ympäristö- ja terveysvaikutuksia sekä räjähdysaineita sisältävien maanäytteiden analysointia. Maanäytteiden uuttomenetelmistä esitellään kolme menetelmää (mekaaninen ravistelu, MAE- ja ASE -uutto), joiden vertailu suoritettiin tämän tutkielman kokeellisessa osassa. Analysointimenetelmistä tutustutaan kromatografisiin menetelmiin ja

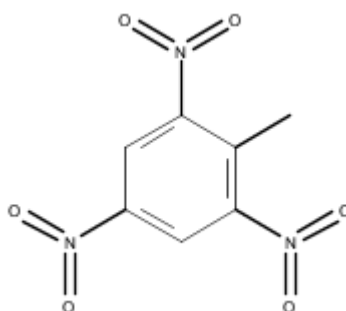
niistä tarkemmin nestekromatografisiin systeemeihin. Kirjallisen osion lopussa selvitetään analyysimenetelmien validointia ja laadunvarmistusta.

2 Räjähdyksaineet ja niiden ympäristö- ja terveysvaikutukset

Räjähdyksaineilla kontaminoitunut maaperä ja vesistöt ovat ongelmana ekosysteemille ja eläville organismeille (ihmisille, eläimille ja kasveille).^{1 ss. 36-37,2} Ihmisten altistuminen räjähdysaineille tapahtuu tyypillisesti hengitysteiden, ihokosketuksen tai ravinnonoton välityksellä. Pääasiällisin suora altistumisreitti ihmisillä on altistuminen saastuneen juomaveden välityksellä. Epäsuora altistuminen tapahtuu kontaminoituneilla mailla kasvaneiden tai saastuneella vedellä kastelujen kasvien kautta. Yleisimmin käytettyjä ja myös maaperästä eniten analysoituja räjähdysaineita ovat nitroaromaattinen 2,4,6-trinitrotolueeni (TNT) hajomistuotteineen ja sykkliset nitramiinit 1,3,5-trimetyyleeni-2,4,6-trinitramiini (RDX) sekä 1,3,5,7-tetrametyyleeni-1,3,5,7-tetranitramiini (HMX).

2.1 TNT

TNT on vaalean keltainen, hajuton ja kiinteä yhdiste.^{9,10} TNT tunnetaan myös nimillä trotyyli ja toliitti. TNT:n rakennekaava on kuvassa 1.



Kuva 1. TNT:n rakennekaava.¹¹

TNT:tä ei esiinny luontaisesti ympäristössämme vaan sitä valmistetaan nitraamalla tolueenia happoseoksella sotilaallista käyttöä varten. TNT liukenee or-

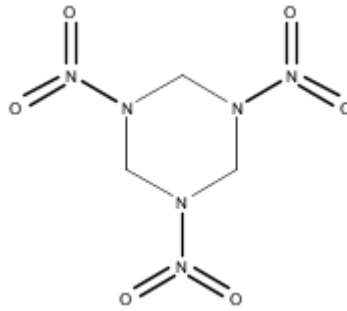
gaanisiin liuottimiin kuten asetoniin, tolueeniin, bentseeniin ja eetteriin sekä jonkin verran myös alkoholiin. Veteen TNT:tä liukenee 130 mg/l.

TNT:tä valmistetaan nitraamalla tolueenia typpi- ja rikkihapposeoksella korotussa lämpötilassa kolmivaiheisessa prosessissa, jolloin muodostuu mononitrotolueenia (MNT), dinitrotolueenia (DNT) ja TNT:a.^{4 ss. 1-3,9,10} Nitrauksessa muodostuu sivutuotteena useita muitakin yhdisteitä, kuten 2,4,6-TNT:n epäsymmetrisiä isomeerejä (esim. 2,3,4-, 2,4,5- ja 3,4,5-TNT), hapettumistuotteita (tetranirometaani, nitrobentsoehappo ja nitrokresoli) ja osittain nitrautuneita tolueeneja. Sotilaallisessa käytössä tarvitaan vain puhdasta 2,4,6-TNT -isomeeriä, jonka johdosta valmistettu TNT pitää uudelleen kiteyttää orgaanisella liuottimella (alkoholi tai bentseeni) tai typpihapolla (62%). Epäsymmetriset isomeerit poistetaan pesemällä tuotetta natriumsulfiittiliuoksella, jolloin syntyy suuria määriä jätevettä kuormittamaan ympäristöä.

TNT on yksi tärkeimmistä ja käytetyimmistä sotilasräjähteistä, sillä epäherkkyytensä vuoksi sitä voidaan käyttää monenlaisissa ampumatarvikkeissa.^{9,10} TNT on erittäin stabiili ja neutraali räjähdde, joka ei reagoi metallien kanssa. TNT:a käytetään sekä puhtaana, että sekoitettuna muiden räjähteiden (RDX/TNT eli heksotoli ja HMX/TNT eli oktoli) kanssa, jolloin puhutaan binäärisistä räjähteistä. Muita tunnettuja binäärisiä räjähteitä ovat amatoli (ammonium nitraatti/TNT) ja tritonaali (alumiinijauhe/TNT).

2.2 RDX

RDX eli heksogeeni on toiseksi yleisin sotilasräjähdysaine.^{4 ss. 3-5,9 ss. 174-177} RDX:n rakennekaava on kuvassa 2. RDX on tehokkaampi räjähdysaine kuin TNT, mutta sitä ei voida käyttää seostamattomana ampumatarvikkeissa, sillä sen korkean sulamispisteen vuoksi sitä ei voida sulattaa ja valaa. Räjähdysaineiden tehokkuuteen vaikuttaa sen tiheys, koostumus ja energiasisältö. Nämä räjähdysaineen perusominaisuudet määräävät aineen räjähdysnopeuden, joka kertoo räjähdysaineen tehokkuudesta. RDX:a käytetään esim. nalleissa, räjäytimissä, kranaattien ja ontelohanostien täytteenä TNT:n kanssa valettavissa räjähdysaineseoksissa (heksotoli). RDX:n liukenevuus veteen on 42 mg/l.

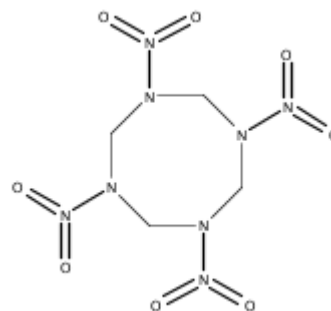


Kuva 2. RDX:n rakennekaava.¹¹

RDX:a voidaan valmistaa kahdella eri tavalla; joko nitraamalla heksamiinia ns. Woolwichin prosessissa tai Bachmannin prosessissa, jossa heksamiinia nitraataan ammoniumnitraatilla ja typpihapolla etikkahapponanhydridin toimiessa liuottimeksi. Molemmissa prosesseissa syntyy epäpuhtautena HMX:a.

2.3 HMX

HMX eli oktogeeni on tehokas sotilasräjähdysaine, joka esiintyy kemialliselta rakenteeltaan neljässä eri kidemuodossa (α , β , δ ja γ).^{9 ss. 237-239,12} HMX:n rakennekaava on kuvassa 3. Yleisimmin näistä käytetään β -muotoa, koska sillä on korkea tiheys ja siten myös suuri räjähdysnopeus ja –paine ampumatarvikesovellusten kannalta. HMX:a käytetään ampumatarvikkeissa, joilta vaaditaan suurta tehoa esim. ontelokranaateissa. Sitä ei voida yksinään valaa, vaan sitä käytetään seostettuna TNT:n kanssa (oktoli) tai muovisidosteisena. HMX:n liukenevuus veteen on huono, vain 5 mg/l.



Kuva 3. HMX:n rakennekaava.¹¹

HMX:a syntyy sivutuotteena valmistettaessa heksogeenia Bachmannin prosessilla.^{4 s. 5,9 s. 239} Prosessissa, jossa 1,5-metyleni-3,7-dinitro-1,3,5,7-tetrasyklooktaania käsitellään etikkahappoanhydridillä, ammoniumnitraatilla ja typpihapolla, syntyy päätuotteena HMX:a. Prosessin lähtöainetta saadaan valmistettua, kun etikkahappoanhydridin annetaan reagoida heksametyleenitetramiininidinitraatin kanssa.

2.4 Räjähdeiden muuntuminen ja kulkeutuminen ympäristöön

TNT molekyyli on reaktiivinen, joka biomuuntuu helposti sekä aerobisissa että anaerobisissa olosuhteissa aminodinitrotolueeneiksi (2A-DNT, 4A-DNT).¹³ Muodostuvien amiinien biomuuntumistuotteita ovat atso-, atsoksi-, asetyyli- ja fenolijohdokset. TNT:n mineralisoituminen maaperässä on lähes olematonta, sillä entsyymaattiset ja abioottiset hyökkäykset vaikuttavat ensisijaisesti TNT:n aromaattiseen renkaaseen kiinnittyneisiin funktionaalisiin ryhmiin ja rengas jää stabiiliksi. Vähäistä mineralisoitumista on aikaansaatu laboratorio-olosuhteissa bakteerien ja sienien avulla. TNT:n muuntumiseen vaikuttavia ympäristötekijöitä ovat mm. redox -olosuhteet, pH, orgaanisen hiilen määrä, kationinvaihtokapasiteetti, laajenemiskykyisen saven ja pelkistävien tekijöiden olemassaolo.¹⁴

Sykliset nitramiinit (RDX ja HMX) eivät omaa TNT:n kaltaista aromaattisesta renkaasta johtuvaa elektronista stabiiliutta, jolloin tietyissä entsyymaattisissa muutoksissa N-NO₂- tai C-H -sidokset voivat katketa, molekyyli muuttuu epästabiiliksi ja hajoaa muodostaen typpioksidia ja hiilidioksidia.¹³

RDX:n hajoaminen tapahtuu vaiheittain heksahydro-1-nitroso-3,5-dinitro-1,3,5-triatsiiniksi (MNX), heksahydro-1,3-dinitroso-5-nitro-1,3,5-triatsiiniksi (DNX) ja heksahydro-1,3,5-trinitroso-1,3,5-triatsiiniksi (TNX).^{13,14} Nämä nitroso-yhdisteet muuntuvat hydroksyyliamiini-RDX -johdannaisiksi, joista muodostuu mm. hydridiä (NH₂NH₂), formaldehydiä (HCHO) ja metanolia (CH₃OH). RDX kiinnittyy maaperän orgaaniseen ainekseen heikommin kuin TNT ja sen on havaittu olevan liikkuvampi kuin TNT:n.

HMX:n on todettu olevan melko stabiili laajalla redox- ja pH -alueella. HMX:n hajoamistuotteita on havaittu maaperänäytteissä hyvin harvoin ja niistä ei ole paljonkaan tutkimustietoa.¹⁴ HMX hajoamista tapahtuu vain anaerobisissa olosuhteissa, jolloin muodostuu mono- ja dinitroso-yhdisteitä. RDX:n tavoin HMX:n on todettu kiinnittyvän heikemmin maaperään kuin TNT:n.

Räjähteiden hajoaminen voi tapahtua myös fotolyttisesti, alkaalisissa olosuhteissa ja pelkistymällä tiettyjen katalyyttien läsnäollessa.^{5,13} TNT:n fotolyttisen eli valon vaikutuksesta tapahtuvan hajoamisen johdosta syntyy uusia yhdisteitä kuten nitrobenseenejä, betsaldehydejä, atsoksidikarboksyylihappoja ja nitrofenoleja. Myös RDX:n ja HMX:n on havaittu hajoavan fotolyttisesti, jolloin muodostuu esim. atsoksi-yhdisteitä, ammoniakkaa, formaldehydiä, nitraatteja ja nitriittejä. TNT:n on havaittu olevan epästabiili kohonneissa pH -olosuhteissa. Alkaliseen hydrolyysiin perustuva TNT:n hajoaminen tapahtuu, kun pH on 11. Reaktio tapahtuu, kun hydroksidi -ioni aikaansaa nitro- ja metyyliiryhmien nukleofiilisen substituution ja muodostuu ns. punaisia Maisenheimerin komplekseja. RDX:n ja HMX:n hajoaminen voi tapahtua pH:n kohotessa yli 10, jolloin muodostuu esim. nitriittejä, formaldehydiä, ammoniakkaa ja typpioksidia. Kun räjähdysaineet hajoavat pelkistymällä, nitroruuhmit pelkistyvät aminoryhmiksi. Tällaiset reaktiot riippuvat pH:sta, redox -potentiaalista ja vaativat katalyyttien (esim. rauta, savimineraalit tai makromolekyylit) läsnäolon. Reaktioissa muodostuvat yhdisteet (mm. polyamiinit, MNX, DNX ja TNX) voivat jatkossa metabolisoitua bioottisissa prosesseissa tai absorboitua maaperään.

2.5 Räjähdysaineiden myrkyllisyys ja terveysvaikutukset

Ihmisten ja muiden selkärankaisten altistuminen räjähdysaineille voi tapahtua hengitysteitse, nieltynä tai ihon kautta.⁵ Ihmisten räjähdysainealtistumisista saatu informaatio on kerätty pääasiassa ampumatarviketyöntekijöille tapahtuneiden altistumisien perusteella. Toksikologisia tutkimuksia on eniten tehty TNT:lle, joten informaatiota syklisten nitramiinien (RDX ja HMX) myrkyllisyydestä löytyy niukasti.⁶ s. 4 Välitöntä myrkyllisyyttä kuvaava LD₅₀ -arvo (suun kautta rotille) TNT:illä on 795 mg/kg, RDX:illä 153 mg/kg ja HMX:illä 6490 mg/kg. Juomaveden

sallittu TNT-pitoisuus on U.S Environmental Protection Agency:n (U.S. EPA) mukaan 2 µg/l.²

Eläinkokeissa TNT:n on havaittu aiheuttavan terveydellisiä haittoja ja sitä pidetään genotoksisena, mutageenisena ja karsinogeenisenä yhdisteenä.^{5,6} ss. 3-23 Ihmisillä havaittuja oireita ovat olleet esim. ihotulehdukset, maksa- ja munuaisvauriot, pahoivointi, mahakatarri ja anemia. Epidemiologisissa tutkimuksissa RDX on aiheuttanut neurologisia kohtauksia, kouristuksia ja pahoivointia. Yleisesti syklonitramiinit ovat myrkyllisiä eläville organismeille ja siten vahingollisia koko ekosysteemille. HMX:n myrkyllisyydestä ihmisille on vain vähän tietoa. Eläimillä HMX vaikuttaa ruoansulatuskanavaan, munuasiin ja aiheuttaa maksavaurioita.

Tutkimuksissa, joissa tarkasteltiin bakteerien, levien ja mikro-organismien altistumista räjähdysaineille TNT:n havaittiin olevan myrkyllisempää kuin sen hajoamistuotteiden 2,4-DNT:n ja 2,6-DNT:n.⁵ Hajoamistuotteista vähiten myrkyllisiä olivat aminonitroyhdisteet (2A-DNT ja 4A-DNT). RDX todettiin olevan vähemmän myrkyllistä kuin TNT:n ja HMX ei ollut myrkyllistä bakteereille, leville ja mikro-organismeille, johtuen luultavasti sen huonosta liukenevuudesta veteen.

Räjähdysaineiden fytotoksisuudesta eli kasvien kasvua haittaavasta tekijästä¹⁵ on saatavilla tietoa hyvin rajoitetusti.^{5,14} DNT:n on havaittu olevan kasveille fytotoksisempi kuin TNT:n. RDX:llä ja HMX:llä ei ole havaittu olevan merkittäviä fytotoksisia vaikutuksia kasveihin. Räjähdysaineet vaikuttavat eri kasvilajeihin hyvin eritavalla ja myös maaperän fysikaalisilla ja kemiallisilla ominaisuuksilla on merkitystä, sillä ne vaikuttavat räjähdysaineiden adsorptioon ja siten myös haitallisuuteen kasveille.

3 Räjähdysaineita sisältävien maanäytteiden analysointi

Kemiallinen tai fysikaalinen tutkimus jakautuu kolmeen vaiheeseen: näytteenottoon, näytteen esikäsittelyyn ja niiden analysointiin.¹⁶ Laadukkaalla näytteenotolla taataan näytteen edustavan alkuperäistä kohdetta ja se onkin eniten analyysituloksen luotettavuuteen vaikuttava tekijä. Näytteen esikäsittelyn tavoit-

teena on eristää tutkittavat yhdisteet matriisista ja analyysiä häiritsevistä yhdisteistä, ollen myös usein haasteellisin vaihe tutkimuksessa. Näytteiden esikäsittely ja varsinainen mittaus ovat erillisiä prosesseja, joten esikäsittelymenetelmää valittaessa on huomioitava sen käyttökelpoisuus varsinaiseen analyysitekniikkaan.

3.1 Näytteenotto

Näytteenotolla on huomattava merkitys tutkimuksen onnistumisen kannalta.¹⁶ Monissa tapauksissa näytteenottoa ohjeistetaan tarkkoilla standardeilla. Onnistuneen näytteenoton johdosta tutkittavasta alueesta tai kokonaisjoukosta saadaan edustava näyte, jonka ominaisuudet ovat keskimäärin kokonaisjoukon kaltaiset. Jotta saavutetaan tutkimukselle asetetut tavoitteet näytteenvalmistuksen ja analysoinnin tarkkuustasolla, on näytteenotto suunniteltava hyvin. Näytteenottosuunnitelmassa päätetään näytteenottopaikka ja aika, miten näyte otetaan ja minkälaisella näytteenottimella se suoritetaan. Näytteenottajan tulisi tuntea tutkittavien aineiden ominaisuudet ja niille tehtävät esikäsittelymenetelmät sekä tutkimukseen vaadittava laatutaso.

Näytteenotossa pyritään siihen, että osanäytteen (primäärinäytteen) koostumus olisi mahdollisimman samankaltainen kuin koko tutkittavalla kohteella.¹⁶ Osanäytteen koostumus on kuitenkin eri syistä johtuen aina erilainen kuin alkupe räisnäytteen ja tämä aiheuttaa perusvirheen näytteenottoon. Kun näyte jauheetaan pienempään hiukkaskokoon, perusvirhettä saadaan pienemmäksi. Hiukkaskoolla on merkittävä vaikutus näytteenotossa; mitä heterogeenisempi materiaali on kyseessä, sitä suurempi on vaadittava näytemäärä, jotta analyysituloksen epävarmuus saadaan pysymään pienenä. Osanäytteiden partikkelikokoa voidaan pienentää (murskaaminen, jauhaminen) erilaisten apuvälineiden esim. kuulamylyn ja morttelin avulla, jonka jälkeen partikkelit seulotaan, jotta ne saadaan yhdenmukaiseen minimikokoon. Hienojakoisella näytteellä on suuri reaktiivinen pinta-ala, jolloin varsinaisessa näytteenkäsittelyssä näytteen uutto ja liuotus tapahtuu tehokkaammin. Kun näyte on saatu sopivaan hiukkaskokoon, pitää näytemäärä pienentää sopivan kokoiseksi.

Tämä voidaan suorittaa käyttämällä näytteenjakajaa, joka jakaa näytteen useaan täsmälleen yhtä suureen osaan, jolloin jokaisessa osiossa on suhteessa sama määrä näytteen eri fraktioita.

3.2 Näytteen esikäsittelymenetelmät

Analyttinen kemia jaetaan epäorgaaniseen ja orgaaniseen analytiikkaan ja kummassakin tapauksessa löytyy useita tekniikoita näytteiden esikäsittelyä varten. Orgaanisessa analytiikassa kiinteiden maanäytteiden esikäsittelyyn käytettyjä menetelmiä ovat esim. Soxhlet -uutto (EPA 3540), automatisoitu Soxhlet -uutto (EPA 3541), ASE/PFE -uutto (EPA 3545)¹⁷, MAE -uutto (EPA 3546)¹⁸ ja ultraääniavusteinen uutto (EPA 3550), jotka kaikki ovat EPA 3500C standardin¹⁹ (orgaaninen uutto ja näytteenvalmistus) mukaisia esikäsittelymenetelmiä. Tässä kirjallisuustyössä tarkastellaan lähemmin kolmea (mekaaninen ravistelu, ASE- ja MAE -uutto) orgaaniseen analytiikkaan liittyvää esikäsittelymenetelmää, joiden tehokkuutta verrattiin räjähdysaineita sisältävien maanäytteiden analysoinnissa tämän työn kokeellisessa osiossa.

3.2.1 Mekaaninen ravistelu

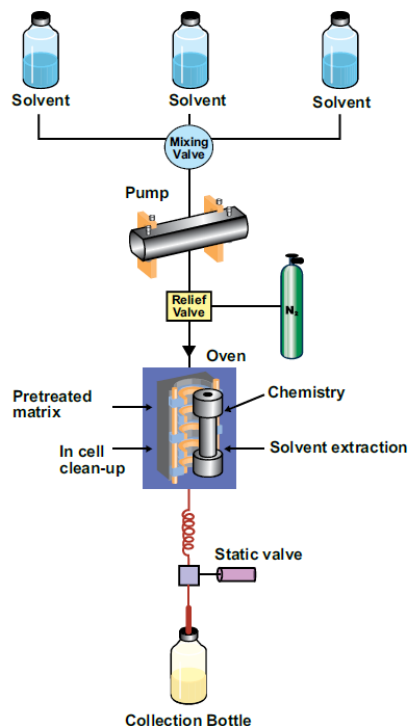
Mekaaninen ravistelu kuuluu perinteisiin, jo pitkään käytössä olleisiin näytteen esikäsittelymenetelmiin, joiden tehokkuus perustuu sellaisten liuottimien käyttöön, jotka liuottavat tehokkaasti määritettäviä analyytteja, ja joihin näytematriisi on niukkaliukoinen.^{3 s. 207,20} Jos näytematriisi on hyvin hienojakoista tai huokoista, saavutetaan analyyttien ja liuottimen välillä hyvä vuorovaikutus, jolloin uutomenetelmä toimii tehokkaammin. Mekaaninen ravistelu on hyvin yksinkertainen suorittaa, sillä kyseessä on näytteen ravistelu useita tunteja suljetussa astiassa (esim. erlenmayer) uuttoliuottimen kanssa. Mekaanista ravistelua voidaan tehostaa lämmittämällä uuttoliuotinta, sillä yhdisteet ovat usein helppoliukoisempia kuumaan kuin huoneenlämpöiseen liuottimeen.

3.2.2 ASE -uutto

ASE -uuttoa (Accelerated Solvent Extraction) käytetään orgaanisten yhdisteiden uuttamiseen kiinteistä ja puolikiinteistä näytteistä.^{3 ss. 216-217, 7 ss. 146-150,17,20-22} Uuton aikana näyteastia on paineenalainen, jolloin kuumennettu liuotin pysyy nestemuodossa. Tällaisissa olosuhteissa yhdisteiden liukoisuusominaisuudet paranevat, sillä liuotin tunkeutuu näytematriisiin hyvin. ASE -uutto suoritetaan 40-200°C lämpötilassa, jolloin yhdisteiden desorptio matriisista nopeutuu ja liukoisuus uuttoliuottimeen kasvaa. Korotetussa paineessa (500-3000 psi) ja lämpötilassa uuttoaika saadaan lyhennettyä ja liuottimen kulutusta vähennettyä huomattavasti verrattuna perinteisiin uuttomenetelmiin (esim. Soxhlet- ja ultraäänivusteinen uutto). ASE -uutossa liuottimen kulutus on tyypillisesti 15-50 ml, näytettä punnitaan näyteastioihin 1-30 g ja yhteen uuttoon kuluu aikaa 15-20 minuuttia.

3.2.2.1 Uuttoprosessi

ASE -uutossa (kuva 4) näyte suljetaan teräksiseen näyteastiaan ja se siirretään kuumennusuuniin, jossa se alipaineistetaan.^{3 ss. 216-217, 7 ss. 148-150,17,20,23} Ennen näyteastian täyttöä sen pohjalle sijoitetaan kertakäyttöinen selluloosasuodatin estämään näyteastian pohjakannen ruostumattoman terässintterin tukkeutumista. Näytteen joukkoon voidaan tarvittaessa lisätä kuivaus- ja dispergointiainetta. Kuivausaineena käytetään joko vedetöntä natriumsulfaattia (Na_2SO_4) tai polaaristen liuottimien (esim. asetoni tai metanoli) kanssa rakeista piimaata.



Kuva 4. Uuttoprosessin kulku ASE-utossa.²⁴

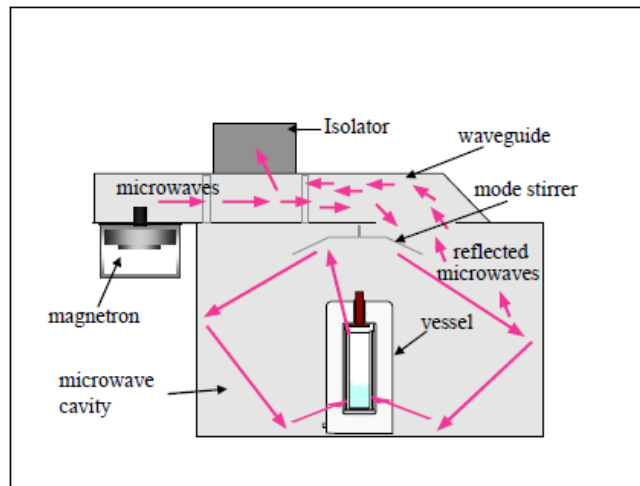
Näyteastia täytetään liuottimella ja sitä kuumennetaan uunissa lämpötasapainon saavuttamiseksi. Näytettä uutetaan staattisesti (noin 5-10 min), jonka jälkeen liuotin huuhdotaan typpivirtauksen avulla lasiseen keruuampulliin. Näytteestä uutetut, analysoitavat yhdisteet ovat uuttoliuottimessa keruuampullissa näytteen esikäsittelyn seuraavaa vaihetta varten.

3.2.2.2 Uutossa käytetyt liuottimet

Uuttoliuottimina voidaan käyttää puhtaita (HPLC- tai pestisidi -puhtausaste) orgaanisia tai vesipohjaisia liuottimia.²³ Uuttoliuotin voi koostua yhdestä liuottimesta tai olla useamman liuottimen seos. Liuottimina ei voi käyttää rikkihiiltä (CS_2), dietyylieetteriä ($(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$) eikä 1,4-dioksaania ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$), sillä näiden yhdisteiden itsesyttymispiste on 40-200°C välillä. Myöskään vahvoja happo- ja emäsluoksia ei voida käyttää ASE -uutossa. Uuttoliuottimeksi tulisi valita liuotin tai liuotinseos, joka liottaa hyvin analysoitavia yhdisteitä, mutta jonka liuot ominaisuudet näytematriisin suhteen ovat alhaiset.

3.2.3 MAE -uutto

MAE -uutosta (microwave assisted extraction) on viime vuosien aikana tullut yksi käytetyimmistä esikäsittelymenetelmistä sekä epäorgaanisessa että orgaanisessa analytiikassa.^{3 ss. 214-216, 7 s. 166,8,18,25,26} Laboratorioissa käytettävissä mikroaaltouuneissa on magnetroni, isolaattori, aallonohjain, mikroaaltokentän tasaaja ja uuni (kuva 5).²⁵ Magnetronilla aikaansaatu mikroaaltoenergia kulkeutuu aallonohjaimen avulla uuniin ja energian levittymistä edistetään mikroaaltokentän tasaajan avulla. Isolaattorin tehtävänä on suojella magnetronia heijastuvilta mikroaalloilta, jotka ovat sen toiminnalle haitallisia.



Kuva 5. Mikroaaltouunin kaaviokuva.²⁵

MAE -uutossa näytettä lämmitetään mikroaaltouunissa tehokkaasti erilaisten liuottimien avulla mikroaalloista saatavalla energialla.^{3 ss. 214-216,7 ss. 166-167} Mikroaaltosäteily on sähkömagneettista säteilyä, jonka aallonpituusalue on 1 mm-1 m (taajuus 0,3-300 GHz). Kaupallisissa laboratoriomikroaaltouuneissa käytetään yleensä aallonpituutta 12,2 cm, mikä vastaa 2,45 GHz (2450 MHz) taajuutta.

Sähkömagneettinen säteily, ja siten myös mikroaaltosäteily muodostuu nopeasti värähtelevistä sähkö- ja maneettikentistä.^{7 ss. 167-172,26,27} Kun aine absorboi mikroaaltosäteilyä, se lämpenee, mikä aiheutuu ionikonduktion ja etenkin dielektrisen polarisaation vaikutuksesta. Ionikonduktio aiheutuu näyteliuoksessa olevien ionien pyrkimyksestä liikkeeseen, kun niihin kohdistetaan mikroaaltosäteilyä. Kun liuoksissa ovat muut aineet vastustavat ionien liikkumista, aiheutuu kitkaa

ja näyteliuos lämpenee. Näytteen kuumenemiseen vaikuttava, ionikonduktiota tärkeämpi tekijä on dielektrinen polarisaatio (käytetään myös nimitystä dielektrinen kuumeneminen), joka aiheutuu aineiden polaroitumisesta eri mekanismien seurauksena, kun ne ovat mikroaaltosäteilyn aiheuttamassa sähkökentässä. Koska monilla aineilla on pysyvä dipolimomentti (esim. vesi, mineraalihapot ja jotkut orgaaniset liuottimet), ne voivat olla vuorovaikutuksessa sähkökentän kanssa. Molekyylit värähtelevät suurella taajuudella mikroaaltokentässä, kun sähköiset dipolit pyrkivät suuntautumaan mikroaaltosäteilyn aiheuttaman sähkökentän suuntaisesti. Tällainen molekyylien liike aiheuttaa kitkaa ja näyte lämpenee.

3.2.3.1 Uuttoprosessi

MAE -uutto voidaan suorittaa joko normaalipaineessa (avoin astia) tai alipaineessa (suljettu astia).^{7 ss.168-172,25,26,27} Uutossa käytettyjen astiamateriaalien tulee olla sekä kemiallisesti kestäviä ja puhtaita, että niillä tulee olla hyvä lämpötilankesto ja niiden tulee läpäistä mikroaaltosäteilyä. Astioita valmistetaan esim. lasista, fluoripolymeeristä ja kvartsista (sisäästia) ja niillä on erillinen komposiittinen ulkokuori. MAE -uutto suoritetaan uunissa, johon mahtuu kerralla 12-14 näyteastiaa. Uutossa käytetty näytemäärä on tyypillisesti 5-20 g ja uuttoliuotimen kulutus 20-50 ml. Uuttoa voidaan tehostaa nostamalla lämpötilaa (20-200°C) ja painetta (maksimi 200 psi). Lämpötilaa ja painetta seurataan yhteen hajotusastiaan (kontrolliastia) sijoitetun lämpötila- ja paineanturin avulla. Räjähdyksen välttämiseksi suljetut astiat on varmistettu ylipainesuojalla (esim. murtokalvo tai jousikuormitteinen kansi). Myös helposti syttyvien ja myrkyllisten orgaanisten liuotinhöyryjen tarkkailua suoritetaan mikroaaltouuniin sijoitetun anturin avulla. Näytteiden tasainen kuumeneminen on varmistettu pyörivän näytekarusellin avulla. Uunin sisällä tapahtuvaa paikallista ylikuumenemista estetään uuneissa olevalla pyörivällä mikroaaltokentän tasaajalla, joka poistaa seisovat aallot.

3.2.3.2 Uutossa käytetyt liuottimet

MAE -uutossa liuottimen valinnalla on suuri merkitys uutotehokkuuteen.^{7 s. 168, 8}

MAE -uutossa tulisi valita liuotin, jolla on suuri dipolmomentti eli jolla on korkea dielektrinen vakio, joka aiheuttaa vuorovaikutuksen mikroaaltojen kanssa. Kun mikroaallot aiheuttavat molekyylien värähtelyä, syntyy kitkaa ja näyte lämpenee.

MAE -uutossa voidaan käyttää:

- 1) Yhtä liuotinta, jolla on korkea mikroaaltoadsorptio (esim. asetoni, metanoli, vesi tai asetonitrili).
- 2) Liuotinseosta, jossa toisella on matala mikroaaltoadsorptio (esim. heksaani tai tolueeni) ja toisella on korkea mikroaaltoadsorptio (kohdan 1 liuottimet).
- 3) Liuotinta, jolla on matala mikroaaltoadsorptio, jolloin mikroaallot ovat vuorovaikutuksessa näytematriisiin ja analysoitavat yhdisteet vapautuvat ns. kylmään liuottimeen.

3.3 Yhteenveto käytetyistä esikäsitelymenetelmistä

Edellä käsitellyistä kolmesta näytteen esikäsitelymenetelmästä EPA 8330B standardin²⁸ mukainen mekaaninen ravistelu on helpoin suorittaa ja siihen tarvittava välineistö/laitteisto on yksinkertaisin ja hinnaltaan halvin. Mekaanisessa ravistelussa uuttoliuottimen kulutus (20-40 ml) näytettä kohden on samaa luokkaa kuin ASE- ja MAE -uutossa ja siten hyvin paljon alhaisempi kuin esimerkiksi paljon laboratorioissa käytetyssä Soxhlet -uutossa (100-500 ml/näyte). Mekaanisessa ravistelussa uuttoaika on kuitenkin huomattavasti pidempi (ravistelun kesto 18 tuntia) ja esikäsitelymenetelmän tehokkuus riittää vain analyteille, joille löytyy liuotin, johon analysoitavien yhdisteiden liukoisuus on hyvä.

ASE -uutossa uuttoaikat saadaan lyhennettyä 15-20 minuuttiin/näyte ja uuttoliuoksen kulutus (15-50 ml) sekä orgaanisen jäteliuoksen määrä on pienempi. Uutotehokkuutta pystytään parantamaan korotetun paineen (500-3000 psi) ja lämpötilan (40-200°C) avulla. MAE -uutossa saavutetaan samat edut kuin ASE -uutossa ja uuttoihiin kuluva kokonaisaika on vielä lyhyempi, sillä MAE -uutossa

voidaan suorittaa 12-14 uuttoa samanaikaisesti, ja tämä usean näytteen yhtäaikainen uuttoprosessi kestää 30-50 minuuttia. ASE -uuton etuna verrattuna MAE -uuttoon on uuttoliuksen siirtyminen automaattisesti uuton lopuksi keruuampuliin, kun taas MAE -uutossa uuttoliuos ja näytematriisi ovat samassa näyteastiassa. MAE -uutossa liuottimen ja siten myös analysoitavien yhdisteiden siirto aiheuttaa yhden virhelähteen enemmän, kun tarkastellaan menetelmien uutto-
tehokkuutta.

3.4 Tutkimuksia eri uuttomenetelmillä

Zuluoga *et al.* ovat tutkineet kloorattujen bifenyyliden (CB) uuttamista maaperänäytteistä.²⁹ Tutkimuksessa verrattiin eri uuttomenetelmien (ASE-, MAE- ja Soxhlet -uutot) tehokkuutta, sekä optimoitiin menetelmä ASE -uuttolaitteistolle. Optimoinnissa muutettiin painetta, uuttoaikaa ja lämpötilaa uuttoliuottimen koostumuksen pysyessä vakiona (asetoni 75%/heksaani 25%, v/v). Optimaalisimmat tulokset saavutettiin 1800 psi:n paineessa, 100 °C:n lämpötilassa ja 10 minuutin uuttoajalla. MAE -uutossa uuttoliuottimena oli 15 ml asetoni 74%/heksaani 26% (v/v), mikroaaltojen teho oli 57%, paine 21 psi ja uuttoaika 40 minuuttia. Soxhlet -uutossa uuttoliuottimena oli 200 ml asetoni 75%/heksaani 25% (v/v) ja refluksointi kesti 24 tuntia. Taulukosta 1 löytyy vertailussa olleiden uuttomenetelmien tulokset sekä vertailumateriaalin (CRM 481) sertifioidut arvot, joista voidaan havaita, että ASE- ja MAE -uutoilla tulokset ovat hyvin samanlaisia ja hiukan parempia kuin Soxhlet -uutolla. Uuttotehokkuuden lisäksi ASE- ja MAE -uuttojen etuna verrattuna Soxhlet -uuttoon olivat lyhyemmät uuttoajat ja pienempi liuottimen kulutus.

Taulukko 1. Vertailumateriaalin CRM 481 pitoisuudet ASE-, MAE- ja Soxhlet-uutoilla sekä vertailumateriaalin sertifioidut arvot²⁹

Compound	ASE		MAE		Soxhlet		Certified value	
	C (µg/g)	RSD %	C (µg/g)	RSD %	C (µg/g)	RSD %	C (µg/g)	RSD %
CB-101	33±2	6.06	37±1	2.70	32±7	21.87	37±3	8.11
CB-118	12±2	16.66	10±1	10.00	9±0.4	4.44	9±0.7	7.77
CB-153	128±12	9.36	129±9	6.98	111±10	9.01	137±7	5.11
CB-180	130±7	5.38	121±6	4.96	114±14	12.28	124±6	4.84

Lopez-Avila *et al.* ovat arvioineet MAE -uuton käyttökelpoisuutta ja tehokkuutta orgaanisten yhdisteiden uuttamiseksi maanäytteistä.³⁰ Tutkimus kuului EPA:n tutkimusohjelmaan, jossa oli tarkoituksena arvioida uuttomenetelmiä, joilla pysyttäisiin pienentämään laboratorioissa syntyvän liuotinjätteen määrää, parantamaan analyyttien uuttotehokkuutta ja vähentämään näytteenkäsittelyn kustannuksia. Tutkimuksessa tarkasteltiin 95 osittain haihtuvan yhdisteen uuttamista MAE -uutolla. Tutkittavat analyytit lisättiin pintamaanäytteisiin metyylikloridiin liuotettuna seoksena ruiskun avulla. Maanäytteille tehtiin MAE -uutto käyttäen uuttoliuottimena heksaani-asetonia (1:1) 115°C:n lämpötilassa ja 10 minuutin uuttoajalla mikroaaltouunin tehon ollessa 100%. 95 analyytistä 79:n saannot olivat 80-120%. 14 yhdisteen saannot olivat alle 80%, joista viidellä saannot jäivät alle 20%. Yhden yhdisteen saanto oli yli 120%. Lopez-Avila *et al.* ovat tutkineet myös torjunta-aineina käytettävien orgaanisten klooriyhdisteiden uuttamista maanäytteistä Soxhlet-, MAE- ja ultraääniavusteisella uutolla. Näissä tutkimuksissa MAE -uuton saannot (72-116%) olivat vähintään 7% suurempia kuin Soxhlet- (22-128%) ja ultraääniavusteisella (45-108%) uutolla. Tutkimustulosten perusteella MAE -uutto todettiin käyttökelpoiseksi ja tehokkaaksi uuttomenetelmäksi orgaanisille yhdisteille maaperänäytteistä. MAE -uuton etuina perinteisiin uuttomenetelmiin nähden oli liuottimien kulutuksen pieneneminen sekä uuttoajan lyheneminen.

Pastor *et al.* ovat tutkineet polysyklisen aromattisten hiilivetyjen (PAH), polykloorattujen bifenyyliden (PCB) ja diklooridifenyylitrikloorietaanin (DDT) uuttamista MAE -uutolla merisedimentistä.³¹ MAE -uutossa uuttoliuottimena käytettiin 10-30 ml tolueenia/vettä (10:1), asetoni/heksaania (1:1), asetoni/heksaania (1:1)+10% vettä tai heksaania/vettä (10:1). Uuttoaika oli 6 minuuttia ja mikroaaltosäteilyn teho 660 W. Yhdisteiden pitoisuusanalyysit suoritettiin kaasukromatografisesti käyttäen detektoreina FID-, ECD- ja MS -detektoreita. MAE -uutolla saatuja tuloksia verrattiin Soxhlet -uutolla saatuihin tuloksiin. Soxhlet -uutossa liuottimena käytettiin 60 ml asetoni/heksaania (1:1). MAE -uutolla saatujen tulosten saannot vaihtelivat 97-107% verrattaessa niitä Soxhlet -uutolla saatuihin saantoihin (MAE/Soxhlet*100) eli yhdisteiden uuttaminen onnistui MAE -uutolla yhtä hyvin kuin perinteisellä Soxhlet -menetelmällä. Uuttoliuottimella ei ollut vaikutusta MAE -uutolla saatuihin saantoihin. Tutkimuksessa arvioitiin myös mikroaaltosäteilyn tehon (23-100% 1100 W:sta) ja uuttoajan (3-12 min) vaikutusta

saantoihin. Soxhlet -uuttoa vastaavat saannot saavuteettiin, kun mikroaalto-
säteilyn teho oli vähintään 66-100% 1100 W:sta ja uuttoaika 6-12 minuuttia.
Näytemäärän (2-10 g) ja uuttoluottimen (10-30 ml) suhteen vaikutusta arvioita-
essa parhaat saannot saavutettiin, kun näytteen/liuottimen -suhde oli vähintään
1:3 tai suurempi.

Wang *et al.* ovat tutkineet PCB:n ja polybromattujen difenyylietterien (PBDE)
uuttamista ”oikeista” (kontaminoituneista) maanäytteistä Soxhlet-, ASE- ja MAE
-uutoilla.³² Soxhlet -uutossa 3 g maanäyte uutettiin 150 ml *n*-heksaani/asetonilla
(1:1, v/v) 24 tunnin ajan. ASE -uutossa 3 g maanäyte uutettiin 100 ml *n*-
heksaani/asetonilla (1:1, v/v) 150°C lämpötilassa ja 1500 psi:n paineessa. MAE
-uutossa 3 g maanäyte uutettiin 30 ml *n*-heksaani/asetonilla (1:1, v/v) 115°C
lämpötilassa ja mikroaaltojen tehojen ollessa 1200 W. Uutettujen yhdisteiden
pitoisuudet määritettiin korkean erotuskyvyn HRGC/HRMS -laitteistolla. Uutto-
menetelmien vertailu tehtiin normalisoimalla MAE- ja ASE -uutoilla saadut tu-
lokset Soxhlet -uutolla saatuihin tuloksiin nähden, sillä Soxhlet -uutto on perin-
teinen menetelmä ja siten sitä käytettiin vertailumenetelmänä. ASE -uuttojen
normalisoidut saannot PCB:lle olivat 87-160% ja MAE -uuttojen normalisoidut
saannot olivat 94-176% eli lähes kaikkien PCB -yhdisteiden kohdalla ASE- ja
MAE -uutot antoivat korkeampia tuloksia kuin Soxhlet -uutto. PBDE -yhdisteiden
normalisoidut saannot ASE -uutolla olivat 79-118% ja MAE -uutolla normalisoi-
dut saannot PBDE:lle olivat alhaisempia (50-96%) kuin Soxhlet -uutolla.

Sporring *et al.* ovat tutkineet PCB -yhdisteiden uuttamista maaperästä. Perintei-
sellä Soxhlet -uutolla saatuja tuloksia verrattiin ASE- ja MAE -uutolla saatuihin
tuloksiin.³³ Uuttomenetelmiä ei optimoitu tässä tutkimuksessa, vaan käytettiin
muiden tutkimusryhmien julkaisemia optimointiparametreja PCB:n määrittämi-
seksi maaperästä. Soxhlet -uutossa 1-2 g maanäyte uutettiin 100 ml *n*-
heksaani/asetonilla (1:1, v/v) 18 tunnin ajan. ASE -uutossa 1-2 g maanäyte uu-
tettiin noin 30 ml *n*-heksaani/asetonilla (1:1, v/v) tai tolueenilla 100°C lämpöti-
lassa ja 2000 psi:n paineessa. MAE -uutossa 1-2 g maanäyte uutettiin 25 ml *n*-
heksaani/asetonilla (1:1, v/v) +1 ml vettä 110°C lämpötilassa ja mikroaaltojen
tehojen ollessa 1200 W. Uutettujen yhdisteiden pitoisuudet määritettiin GC/ECD
-laitteistolla. ASE -uutolla saadut tulokset olivat 95-130% Soxhlet -uutolla saa-
duista tuloksista ($ASE/Soxhlet \cdot 100$), kun uuttoluottimena käytettiin *n*-

heksaani/asetonia (1:1, v/v) ja 95-155%, kun uuttoluottimena oli tolueeni. MAE -uutolla saadut tulokset olivat 105-135% Soxhlet -uutolla saaduista tuloksista (MAE/ Soxhlet*100). Tutkimus osoitti ASE- ja MAE -uutoilla saatujen tulosten olevan samankaltaisia ja useimpien PCB -yhdisteiden kohdalla jopa korkeampia, kuin Soxhlet -uutolla saadut tulokset.

4 Räjähdyksineitä sisältävien maanäytteiden kromatografisen analysointi

4.1 Yleistä kromatografiasta

Kromatografia on erotusmenetelmä, joka perustuu näytekomponenttien erilaiseen jakautumiseen kahden eri faasin välillä.³⁴⁻³⁷ Paikallaan pysyvää, joko nestemäistä tai kiinteää faasia kutsutaan stationäärifaasiksi. Toinen faaseista on liikkuva faasi eli eluentti, joka virtaa kromatografisen systeemin läpi. Näytekomponentit omaavat erilaiset vuorovaikutukset stationäärifaasin ja eluentin välillä, josta aiheutuu niiden erottuminen. Näyte injektoidaan liikkuvan faasin virtaan ja se kulkee stationäärifaasia sisältävän kolonnin läpi detektorille, jossa erottuneet näytekomponentit voidaan havaita.

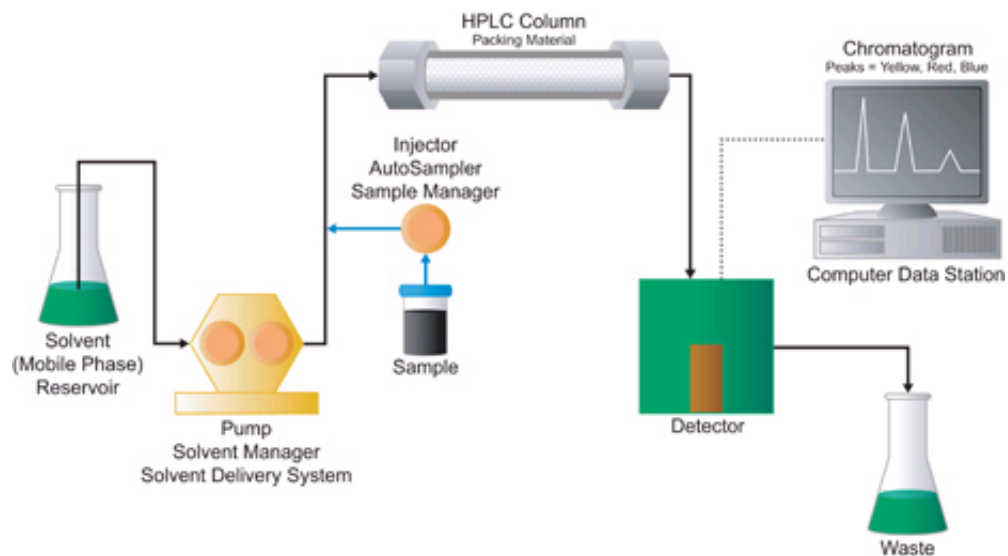
Kromatografiset menetelmät jaetaan kolmeen pääkategoriaan analyysimenetelmän liikkuvan faasin mukaan ja ne ovat neste- kaasu- ja ylikriittinen kromatografia.^{34 ss. 36-37,36} Kaasukromatografiassa liikkuvana faasina on kaasu ja nestekromatografiassa neste. Ylikriittisessä kromatografiassa (SFC) liikkuvana faasina on ns. ylikriittinen fluidi, joka on ominaisuuksiltaan kaasun ja nesteen välimuoto.³⁸

Nestekromatografiassa näytekomponentit ovat aktiivisessa vuorovaikutuksessa stationäärifaasin ja liikkuvan faasin kanssa.^{34 ss.36-37,37} Näytteiden nestekromatografisen analyysin on mahdollista, jos näyte saadaan liukenemaan johonkin sopivaan liuottimeen ja sen tulee liueta myös eluenttiin. Nestekromatografia jaetaan alalajeihin stationäärifaasin ja sen erotusmekanismin mukaisesti.

Nestekromatografian eri alalajeja ovat normaalifaasinestekromatografia, käänteisfaasinestekromatografia, ioninvaihtokromatografia, ioniparikromatografia, eksklusiokromatografia ja affiniteetikromatografia.

4.2 Nestekromatografia laitteisto ja sen toiminta

Nestekromatografialaitteisto koostuu pumpusta, injektorista, kolonnista, detektorista ja tietokoneesta, jolla ohjataan nestekromatografista systeemiä ja analysoidaan tuloksia (kuva 6).^{37 s. 7,38 s. 608,39} Usein laitteistoissa on kolonniuuni, jonka avulla kolonnin lämpötilaa voidaan säädellä ja näin parantaa analyysien toistettavuutta ja lyhentää analyysiaikoja.



Kuva 6. Nestekromatografialaitteiston kaaviokuva.⁴⁰

4.2.1 Pumput

Pumpulla on merkittävä rooli nestekromatografisessa analysoinnissa ja sitä voidaan pitää nestekromatografisen systeemin ”sydämenä”. Sen avulla liikkuva faasi eli eluentti saadaan laitteistossa liikkumaan.^{34 ss. 97-100} Pumpulla on pystyttävä tuottamaan toistettava ja vakaa eluentin virtausnopeus pulssittomasti erilaisilla nopeuksilla (0,01-10 ml/min) ja painella (2000-7000 psi). Nestekromatografiseen systeemiin muodostuva paine aiheutuu käytettävästä kolonnista (pi-

tuus, sisähalkaisija ja stationäärifaasin partikkelikoko) sekä eluentin virtausnopeudesta ja viskositeetista.

Pumpun tulee olla kemiallisesti kestävä, sillä nestekromatografisen systeemin eluenttikoostumus vaihtelee orgaanisista liuotinseoksista epäorgaanisiin puskuriliuoksiin.^{34 ss. 99-100} Pumpumateriaalit eivät saa reagoida käytettyjen eluenttien kanssa. Usein pumpuissa käytetään materiaaleina ruostumatonta terästä, safiiria, rubiinia ja fluoria sisältäviä polymeerejä. Myös titaania käytetään sovelluksissa, missä pumpulta vaaditaan suurta inerttiyttä, joskin se on hinnaltaan erittäin kallis materiaali.

Nestekromatografisina pumppuina käytetään mekaanisia pumppuja (resiprookki- ja ruiskupumppu) tai pneumaattisia pumppuja.^{34 ss. 100-105,39 ss. 12-13} Yleisin nestekromatografeissa käytettävistä pumpuista on resiprookkipumppu, jonka toiminta perustuu moottorin avulla toimivan männän liikkumiseen edestakaisin hydraulisessa kammiossa.

4.2.2 Näytteiden injektointi

Nestekromatografisessa systeemissä näytteensyöttö tapahtuu useimmiten monitieventtiilien avulla.^{34 ss. 107-109, 37 s. 109,38 s. 621} Monitieventtiilissä on näytesilmukka (loop), jonka koko voi vaihdella 2 µl:sta jopa 1000 µl:aan. Näyte injektoidaan näytesilmukkaan ruiskun avulla. Näytesilmukan täyttövaiheen aikana pumppu pumppaa eluenttia kolonniin ja näytesilmukka täytetään näytteellä. Kun venttiili käännetään inject- asentoon, näyte siirtyy eluenttivirrassa kolonniin. Nykyisin näytteiden injektointi suoritetaan useimmiten automaattisen näytteensyöttäjän avulla, jolloin useita näytteitä voidaan injektoida peräkkäin tietokoneohjatusti.

4.2.3 Kolonnit ja stationäärifaasit

Nestekromatografiakolonnit valmistetaan yleensä ruostumattomaan teräsputkeen ja ne pakataan käyttösovellukseen sopivalla stationäärifaasilla.^{34 ss. 109-113, 38 s. 610,41} Sovelluksissa, joissa ruostumaton teräs on sopimaton, käytetään ko-

lonneja, joissa teräsputkeen on asennettu lasiputki tai kolonni valmistetaan polyeteerietteriketonista (PEEK). Analyyttisiin tarkoituksiin valmistetut kolonnit ovat pituudeltaan 3-30 cm mittaisia ja niiden sisähalkaisija on 1-5 mm. Kolonnin mitat (pituus ja sisähalkaisija) ja stationäärifaasin partikkelikoko vaikuttavat analysointi-aikaan, näytekomponenttien resoluutioon ja muodostuvaan vastapaineeseen. Nestekromatografisessa systeemissä tulisi pyrkiä mahdollisimman pienen 'tyhjään tilavuuteen', joten kolonnien kiinnitysosien ja kapillaariputkien kokoon ja rakenteeseen pitää kiinnittää erityistä huomiota. Ennen analyttistä kolonnia voidaan käyttää esikolonnia, joka on täytetty samalla stationäärifaasilla kuin analyttinen kolonni. Esikolonnin tarkoituksena on kerätä näytteiden sisältämät liukenemattomat partikkelit ja näin suojata analyttistä kolonnia pidentäen sen käyttöikä.

Kolonnit pakataan kiinteillä stationäärifaasipartikkeleilla, joiden ominaisuudet vaihtelevat käyttösovellusten mukaan.^{38 ss. 610-612,39 s. 46,41 ss. 175-186} Stationäärifaasien perusmateriaali, rakenne, muoto, koko ja partikkelien kokojakauma vaikuttavat kolonnin soveltavuuteen ja tehokkuuteen käyttötarkoitusta ajatellen. Analyttisesti tärkeimpiä stationäärifaaseja ovat perinteiset adsorptiofaasit ja kemiallisesti sidotut faasit. Yleisimmin nestekromatografisissa sovelluksissa stationäärifaasina käytetään silikapartikkeleita, joihin on kemiallisesti sidottu haluttu yhdisteryhmä. Tavallisimmin käytetty sitoutuva ryhmä on oktadekyyli-ryhmä, jolloin vastaava faasi on oktadekyyilisilaani (ODS). Silikan käytön ongelmana on sen rajoitettu pH-kestävyys; silika on stabiili pH-alueella 2-8. Muodoltaan pyöreät partikkelit ovat parhaita, sillä ne voidaan pakata kolonniin tiiviisti. Stationäärifaasien partikkelikoko vaihtelee 2-15 µm:iin ja sen muutoksilla voidaan vaikuttaa kolonnin erotustehokkuuteen. Pienemmät partikkelit lisäävät erotustehokkuutta, mutta samalla nostavat myös vastapainetta.

4.2.4 Detektorit

Nestekromatografiassa voidaan käyttää useita erilaisia detektoreita esim. spektroskopisia detektoreita, (UV/Vis- ja fluoresenssidetektorit, massaspektrometri)

sähkökemiallisia detektoreita (johtokykydetektori, konduktometrinen ja amperometrinen detektori) tai taitekerroindetektoria (RI -detektori).^{34 ss. 114-115,37 ss. 109-115,39 ss. 18-22,41 ss. 80-89} Näytekomponenttien detektointi perustuu yhdisteiden kemiallisiin tai fysikaalisiin ominaisuuksiin. Detektoreita voidaan kytkeä myös peräkkäin, mikäli näytekomponentit ovat hyvin erilaisia ja niiden kaikkien toteaminen halutaan varmistaa. Nestekromatografiassa käytettävältä detektorilta vaaditaan herkkyyttä, toistettavuutta, laajaa lineaarista mittausaluetta ja toimintavarmuutta.

Yleisin nestekromatografiassa käytetty detektori on UV/Vis -detektori, jonka toiminta perustuu ultraviolettisäteilyn ja näkyvän valon absorbanssimittauksiin aallonpituusalueella 190-800 nm. Absorbanssimittaus perustuu yhtälön 1^{34 s. 120} mukaiseen Lambert -Beerin lakiin.

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C , \quad (1)$$

missä ε = molaarinen absorptiokerroin, l = näytekyyvetin paksuus ja C = näyteliuoksen konsentraatio.

UV/Vis -detektori voi olla yhden aallonpituuden laite, muutettavan aallonpituuden laite tai diodirividetektori, jolla voidaan mitata kahta tai useampaa eri aallonpituutta samanaikaisesti.^{34 ss. 120-122,41 ss. 59-60} UV/Vis -detektori antaa vasteen yhdisteille, jotka pystyvät absorboimaan valoa UV- tai näkyvän valon aallonpituuksilla tai ne voidaan tehdä absorboivaksi johdoksenmuodostuksen avulla.

4.2.5 Nestekromatografiset liuotinsysteemit

Nestekromatografiassa eluentin valintaan vaikuttaa eniten käytetty stationääri-faasi ja näytteen koostumus, sillä nestekromatografisessa erotuksessa näytekomponenteilla on aktiivinen vuorovaikutus sekä liikkuvan että stationääri-faasin kanssa.^{34 ss. 15-16,39 s. 57} Kun tehdään näytteen kannalta oikeita valintoja, näytekomponentit saadaan jakaantumaan omiksi vyöhykkeikseen ja kulkeutumaan liikkuvan faasin mukana.

Eluentti koostuu tyypillisesti vähintään kahdesta komponentista, joiden välistä suhdetta muuttamalla etsitään analysointiolosuhteet, joissa näytekomponenttien erottuminen on mahdollista.^{34 ss. 91-96,41 ss. 234-240} Yleisimmät nestekromatografiassa käytetyt orgaaniset liuottimet ovat asetonitrili ja metanoli, joita käytetään yhdessä veden ja sopivien lisäaineiden (puskurisuolat, hapot ja emäkset) kanssa. Orgaaniselta liuottimelta vaadittavia ominaisuuksia ovat esim. saatavuus erittäin puhtaana (HPLC -laatu), liuottimen myrkyllisyys pitää olla hyväksyttävällä tasolla, sen viskositeetti pitää olla melko alhainen (suuri viskositeetti aiheuttaa korkean vastapaineen) ja liuottimen pitää olla soveltuva käytettävän detektointimenetelmän kanssa. Nestekromatografisissa systeemeissä käytetään useimmin UV -detektoria, jolloin eluentti ei saa absorboida valoa ultraviolettilon aallonpituuksilla (190-400 nm).

Nestekromatografinen liuotinsysteemi on joko isokraattinen tai gradientti. Isokraattisessa liuotinsysteemissä eluenttikoostumus pysyy muuttumattomana koko analysoinnin ajan, kun taas gradienttisysteemissä eluentin koostumusta muutetaan joko jatkuvasti tai portaittain ajon aikana.^{38 s. 614,41 ss. 351-353} Gradienttisysteemi asettaa suuremmat vaatimukset laitteistolle, kuin isokraattinen systeemi, mutta sen avulla voidaan analysoida myös monikomponenttisia näytteitä tehokkaasti ja eluutioajat saadaan lyhyemmiksi kuin isokraattisissa ajoissa.

5 Analyysimenetelmän validointi ja laadunvarmistus

5.1 Validointi

Kemiallisen mittausmenetelmän validoinnilla voidaan osoittaa analyttisen menetelmän sopivan aiottuun käytötarkoitukseen.^{41 s. 686,42-45} Validoinnissa arvioidaan mittausmenetelmän suorituskykyä ja soveltuvuutta tiettyyn tarkoitukseen ja joissakin tapauksissa validoinnissa tulee huomioida myös viranomaisvaatimukset. Asiakkaat odottavat laboratorion analyysituloksien olevan luotettavia, joten analyttisen menetelmän validoinnin avulla analyttikot voivat vastata asiakkaiden tarpeisiin.

Validointi kohdistuu menetelmän kaikkiin eri vaiheisiin ja se pätee vain testatulle matriisille, pitoisuusalueelle ja laitteelle.^{41 ss. 686-687,42-44} Validointi koostuu suunnitelmasta, kokeiden suorittamisesta, tulosten tilastollisesta tarkastelusta ja niiden dokumentoinnista. Menetelmän uudelleenvalidointitarve arvioidaan saatujen tulosten perusteella, sillä menetelmän pätevyyttä pitää seurata koko ajan käytön yhteydessä. Menetelmän validoinnissa tutkittavia asioita ovat esim. selektiivisyys, spesifisyys, lineaarisuus, toteamis- ja määrittämisrajat, menetelmän herkkyys, toistotarkkuus ja oikeellisuus.

5.1.1 Selektiivisyys ja spesifisyys

Menetelmän selektiivisyydellä tarkoitetaan menetelmän kykyä määrittää tarkasti ja spesifisesti haluttu analyytti näytematriisista, joka sisältää muitakin komponentteja määrättyissä testiolosuhteissa.^{41 ss. 695-697,42,43 s. 199,44 ss. 134-136} Menetelmän spesifisyydellä tarkoitetaan menetelmän kykyä mitata vain haluttua analyyttiä. Spesifinen menetelmä tuottaa vasteen vain yhdelle analyyttille ja selektiivinen menetelmä voi tuottaa vasteen useille yhdisteille, mutta erottaa halutun analyytin vasteen muista vasteista. Analysoitaville yhdisteille täysin selektiivinen menetelmä on myös spesifinen menetelmä.

Analyytin mittausta voivat häiritä matriisi tai muut yhdisteet, jotka muuttavat mittalaitteen herkkyyttä analyytin suhteen tai vaikuttavat suoraan mittalaitteen vasteeseen.^{41 ss. 695-697,42,43 s. 60,44 ss. 134-136} Analyysitekniikka- ja menetelmä sekä näytteenkäsittelymenetelmä vaikuttavat spesifisyyteen ja selektiivisyyteen. Koska jokaisella näytteellä on omanlaisensa häiriötekijät, on häiriötekijöiden vaikutusta mahdoton testata aukottomasti validoinnin yhteydessä. Spesifisyyttä ja selektiivisyyttä on täten seurattava jatkuvasti analysointiin tulevien näytteiden yhteydessä.

5.1.2 Kalibrointi

Näytteessä olevien analyyttien pitoisuuden määrittäminen perustuu useimmiten suhteellisen mittauksen periaatteeseen.^{41 s. 653-654,43 s. 15} Mittalaite tai detektor ei

yleensä mittaa suoraan analyytin pitoisuutta, vaan jotakin detektointiin sopivaa fysikaalista ominaisuutta. Analyysilaitteen kalibroinnilla pyritään löytämään mitattujen fysikaalisten ominaisuuksien ja tutkittavien yhdisteiden pitoisuuksien välille yhteys, jotta mittasignaali vastaisi konsentraatiota.

5.1.2.1 Lineaarisuus

Kun käytetään pitoisuusaluetta, jossa analyyttien pitoisuuden ja laitteen mittasignaalin välillä vallitsee lineaarinen riippuvuus, pystytään analyyttien pitoisuus määrittämään kvantitatiivisesti.^{42,43 s. 24,44 ss. 136-138,46} Kalibrointifunktion soveltamisessa käytetään usein pienimmän neliösumman menetelmää, jonka avulla lasketaan kalibrointisuoran kulmakerroin ja leikkauspiste.

Kalibrointisuoran yhtälö (2)^{44 s. 36} on:

$$y = bx + a, \tag{2}$$

missä x on analyytin pitoisuus, y on mittalaitteen signaali, b on regressiosuoran kulmakerroin ja a on y -akselin leikkauspiste.

Kalibrointisuoran korrelaatiokerroin (r) kertoo, kuinka paljon mittalaitteen signaalin y :n muutoksesta analyytin pitoisuuden x funktiona selittyy lineaarisella mallilla.^{36 s. 134} Menetelmän lineaarisuutta voidaan arvioida esimerkiksi tarkastelemalla yhtälön 3^{43 s. 24} mukaisesti residuaaleja (d_i), jotka ovat mitattujen ja kalibrointisuoralta laskettujen arvojen erotuksia.

$$d_i = y_i - Y_i, \tag{3}$$

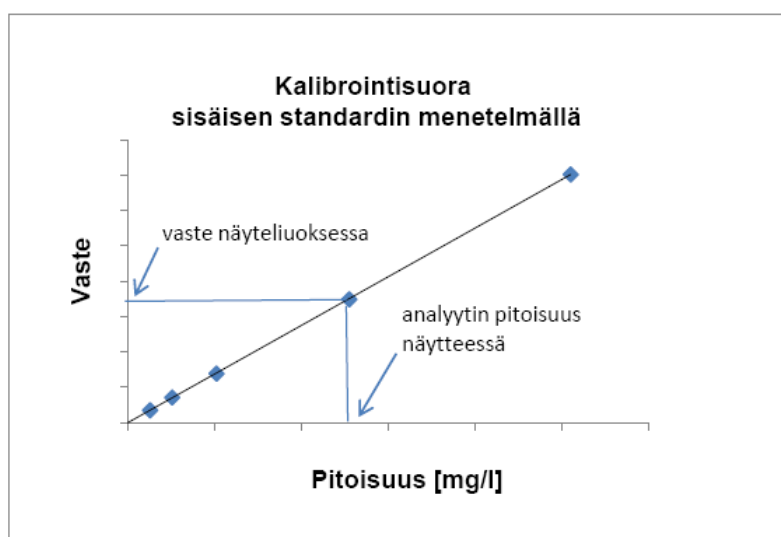
missä y_i on mitattu y :n arvo ja Y_i on kalibrointisuoralta laskettu y :n arvo. Residuaaleista piirretään kuvaaja x :n funktiona.^{41 ss. 693-694} Jos kalibrointisuora on lineaarinen, residuaalit jakautuvat vuorotellen nollassa molemmin puolin.

5.1.2.2 Kalibrointi sisäisen standardin menetelmällä

Sisäisen standardin menetelmässä kalibroitiliuoksiin lisätään tutkittavien yhdisteiden lisäksi toista, näiden kanssa mahdollisimman samankaltaista yhdistettä ns. sisäistä standardia.^{41 ss. 657-660,43 s. 46-48,47} Sisäistä standardia lisätään kaikkiin kalibroitiliuoksiin sama määrä, kun taas kalibroitiliuksissa tutkittavien yhdisteiden pitoisuudet kattavat koko kalibrointialueen. Kalibroinnissa määritetään tutkittavan yhdisteen mittasignaalin suhdetta sisäisen standardin signaaliin. Signaalien suhde kerrottuna sisäisen standardin pitoisuudella (eli vaste, $\frac{A_S C_{IS}}{A_{IS}}$) esitetään analysoitavan aineen pitoisuuden funktiona yhtälön 4⁴⁸ mukaisesti (kuva 7). Sisäisen standardin kalibroinnissa oletetaan, että molemmat signaalit ovat suoraan verrannollisia konsentraatioihin. Sisäisen standardin menetelmää käytetään tilanteissa, joissa analysointiin liittyy monivaiheinen näytteenkäsittely. Sen avulla huomioidaan näytteenkäsittelyssä mahdollisesti tapahtuneet hävikit.

$$\frac{A_S C_{IS}}{A_{IS}} = a C_S + b, \quad (4)$$

missä A_S on näytteessä olevan analyytin signaalin pinta-ala/ korkeus, A_{IS} on sisäisen standardin signaalin pinta-ala/korkeus, C_S on kalibroitiliuksessa olevan analyytin pitoisuus, C_{IS} on sisäisen standardin konsentraatio, a on kalibrointisuoran kulmakerroin ja b on kalibrointisuoran y -akselin leikkauspiste.



Kuva 7. Sisäisen standardin menetelmän kalibrointisuora.

Analyytin pitoisuus näytteessä (C_s) lasketaan yhtälön 5 mukaisesti ratkaisemalla C_s yhtälöstä 4 seuraavasti:

$$C_s = \frac{\left[\frac{A_s C_{is}}{A_{is}} - b \right]}{a} \quad (5)$$

5.1.2.3 Toteamis- ja määrittysrajat; menetelmän herkkyys

Toteamisraja (limit of detection, LOD) on pienin analyytin pitoisuus, joka voidaan havaita luotettavasti testiolosuhteissa ja joka eroaa riittävästi nollanäytteen arvosta.^{42,43 s. 200,44 ss. 143-150,49} Määrittysraja (limit of quantitation, LOQ) on pienin analyytin pitoisuus, joka voidaan määrittää kvantitatiivisesti hyväksyttävällä tarkkuudella ja täsmällisyydellä käytetyllä analyysimenetelmällä. Toteamis- ja määrittysrajojen arvioimisessa tutkitaan nollanäytteen ja taustan (signaali/kohina, S/N) hajontoja tai ne voidaan määrittää signaalin hajonnan (y -akselin leikkauspisteen virhe) ja kalibroitisuoran kulmakertoimen avulla yhtälöiden 6⁴⁹ ja 7⁴⁹ mukaisesti.

Tyypillisesti toteamisraja määritetään kertomalla nollanäytteen tai taustan keskihajonta (SD) 3,3 ja määrittysraja kertomalla SD kymmenellä.

$$LOD = \frac{3,3 \times SD_a}{b} \quad (6)$$

$$LOQ = \frac{10 \times SD_a}{b}, \quad (7)$$

missä SD_a on y-akselin leikkauspisteen virheen SD ja b kalibroitisuoran kulmakertoimen.

Menetelmän herkkyys tarkoittaa menetelmän kykyä havaita näytepitoisuuksissa tapahtuvat pienet vaihtelut ja se määritetään regressiosuoran kulmakertoimen (b) avulla.^{42,43 s. 199,44 s. 164} Kun pieni pitoisuuden muutos aiheuttaa suuren muu-

toksen detektorin vasteessa, on kysymyksessä herkkä menetelmä. Herkkyys on tärkeä parametri etenkin menetelmän kehitysvaiheessa.

5.1.3 Menetelmän toistotarkkuus, täsmällisyys

Menetelmän toistotarkkuudella tarkoitetaan tulosten läheisyyttä, kun mittaus tehdään useita kertoja peräkkäin määrättyissä olosuhteissa.^{41 ss. 687-688,42,43 s.202}

Toistotarkkuus voidaan ilmoittaa usean määrittelyn SD :na yhtälön 8^{44 s. 5} mukaisesti tai suhteellisena keskihajontana ($RSD\%$) yhtälön 9^{44 s. 7} mukaisesti.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}, \quad (8)$$

missä x_i on yksittäinen mittaustulos ja \bar{x} mittaustulosten keskiarvo.

$$RSD(\%) = \frac{100 \times SD}{\bar{x}} \quad (9)$$

Validoinnissa tutkitaan usein injektoinnin toistettavuutta, määrittelyn sisäistä toistettavuutta (saman päivän aikana suoritettavat analyysit) ja määrittelyjen välistä toistettavuutta (eri päivien välillä tapahtuva vaihtelu).

5.1.4 Menetelmän oikeellisuus

Menetelmän oikeellisuudella tarkoitetaan sitä, kuinka lähellä mittaustulokset ovat todellista arvoa.^{42,43 s. 203,44 s. 173} Menetelmän oikeellisuutta voidaan testata saantotesteillä, jolloin näytematriisiin lisätään tunnettu määrä analysoitavaa yhdistettä ja sen pitoisuus määritetään. Menetelmän oikeellisuutta voidaan tarkistaa myös menetelmävertailuilla ja referenssimateriaalien analysoinnilla.

5.2 Laadunvarmistus

Analyysimenetelmien laadunvarmistuksella (Quality Assurance, QA) pyritään takaamaan analyysitulosten luotettavuus ja laadukkuus.^{38 ss. 721-722,42,43 ss. 115-117,44 ss. 41-46} Laaduntarkkailu (Quality Control, QC) pitää sisällään kaikki ne toiminnot ja menetelmät, millä laadunvarmistus suoritetaan. Standardimenetelmien, vertailumateriaalien, rinnakkaismääritysten ja sokeakokeiden käyttö, sekä osallistuminen menetelmävertailuihin laboratorion sisällä ja laboratorioden välillä ovat hyviä keinoja analyysimenetelmän laadun varmistamiseksi.

6 Yhteenveto

Räjähteiden valmistuksesta, käytöstä ja hävitystoiminnasta aiheutuvat ympäristöriskit ovat olleet viranomaisten huolenaiheena useiden vuosien ajan ympäri maailmaa. Yleisimmin käytettyjä ja myös maaperästä eniten analysoituja räjähdysaineita ovat nitroaromaattinen TNT hajoamistuotteineen ja sykliset nitramiinit RDX sekä HMX. Toksikologisissa tutkimuksissa räjähdysaineiden ja niiden hajoamistuotteiden on havaittu aiheuttavan terveydellisiä haittoja ja olevan myrkyllisiä eläville organismeille ja siten vahingollisia koko ekosysteemille.

Räjähdysaineita sisältävien ympäristönäytteiden tutkimus jakautuu kolmeen vaiheeseen: näytteenottoon, näytteen esikäsittelyyn ja niiden analysointiin. Hyvin suoritettu näytteenotto mahdollistaa luotettavien analyysitulosten saamisen ja se takaa näytteen edustavan alkuperäistä kohdetta. Jotta tutkittavat yhdisteet voidaan eristää matriisista, pitää löytää sopiva näytteenesikäsittelymenetelmä, joka on myös käyttökelpoinen varsinaiseen analyysitekniikkaan. Tässä tutkielmassa tarkasteltiin kolmea (mekaaninen ravistelu, ASE- ja MAE -uutto) orgaaniseen analytiikkaan liittyvää esikäsittelymenetelmää.

Mekaaninen ravistelu on perinteinen esikäsittelymenetelmä, jonka tehokkuus perustuu sellaisten liuottimien käyttöön, jotka liuottavat tehokkaasti määritettäviä analyytteja, ja joihin näytematriisi on niukkaliukoinen. Mekaanisessa ravistelussa näytettä ravistellaan useita tunteja suljetussa astiassa (esim. erlenmayer)

uuttoliuottimen kanssa. ASE -uutto suoritetaan korotetussa paineessa (500-3000 psi) ja lämpötilassa (40-200°C). ASE -uuttossa näyte suljetaan teräksiseen näyteastiaan ja se siirretään kuumennusuuniin jossa se alipaineistetaan. Näytettä uutetaan staattisesti (noin 5-10 min), jonka jälkeen liuotin huuhdotaan typpivirtauksen avulla lasiseen keruuampulliin. MAE -uutossa näytettä lämmitetään mikroaaltouunissa tehokkaasti erilaisten liuottimien avulla mikroaalloista saatavalla energialla. MAE -uutto voidaan suorittaa joko normaalipaineessa (avoin astia) tai alipaineessa (suljettu astia). Astioita valmistetaan esim. lasista, fluoripolymeeristä ja kvartsista (sisäästia) ja niillä on erillinen komposiittinen ulkokuori. MAE -uutto suoritetaan uunissa, johon mahtuu kerralla 12-14 näyteastiaa. Uuttoa voidaan tehostaa nostamalla lämpötilaa (20-200°C) ja painetta (maksimi 200 psi). Kaikissa kolmessa esikäsitelymenetelmässä uuttoliuotinta kuluu 15-50 ml, joka on huomattavasti pienempi määrä kuin paljon käytetyssä Soxhlet-uutossa (100-500 ml). Mekaanisessa ravistelussa uuttoaika on pitkä (18 tuntia), kun ASE -uutossa se on 15-20 minuuttia/ näyte. MAE -uutossa voidaan suorittaa 12-14 uuttoa samanaikaisesti, ja tämä usean näytteen yhtäaikainen uuttoprosessi kestää 30-50 minuuttia.

Monet kansainväliset tutkijaryhmät ovat vertailleet eri uuttoprosessien tehokkuuksia, sillä tavoitteena on löytää useille eri yhdisteille sopiva menetelmä, jonka uuttoaika olisi lyhyt ja liuottimenkulutus pieni. Näin saataisiin nopeutettua näytteen esikäsitelyä ja vähennettyä liuottimenkulutusta sekä siten myös liuotinjätteen määrää. Tämä kaikki pienentäisi laboratorioden kustannuksia ja näytteet pystyttäisiin analysoimaan edullisemmin.

Räjähdyksaineiden pitoisuusmäärityksissä käytetään useimmiten kromatografisia menetelmiä; GC/FID, GC/ECD, GC/MS, HPLC/ UV-Vis tai HPLC/MS. Kromatografia on erotusmenetelmä, joka perustuu näytekemponenttien erilaiseen jakautumiseen kahden eri (paikallaan pysyvä eli stationäärifaasi ja liikkuva faasi eli eluentti) faasin välillä. Kromatografisessa analysoinnissa näyte injektoidaan liikkuvan faasin virtaan ja se kulkee stationäärifaasia sisältävän kolonnin läpi detektorille, jossa erottuneet näytekemponentit voidaan havaita. Tässä tutkielmassa esiteltiin tarkemmin nestekromatografinen menetelmä, jota käytettiin räjähdysaineiden analysointiin työn kokeellisessa osassa. Näytteiden nestekromatografinen analyysi on mahdollista, jos näyte saadaan liukenemaan johonkin so-

pivaan liuottimeen ja sen tulee liueta myös eluenttiin. Yleisimmät nestekromatografiassa käytetyt orgaaniset liuottimet ovat asetonitrili ja metanoli, joita käytetään yhdessä veden ja sopivien lisäaineiden (puskurisuolat, hapot ja emäkset) kanssa. Liuottimen pitää olla soveltuva myös käytettävän detektointimenetelmän kanssa. Nestekromatografiassa voidaan käyttää useita erilaisia detektoreita esim. spektroskopisia detektoreita, sähkökemiallisia detektoreita tai RI -detektoria. Yleisin nestekromatografiassa käytetty detektorina on spektroskopinen UV/Vis -detektorina, jolloin eluentti ei saa absorboida valoa ultraviolettivalon aallonpituuksilla (190-400 nm).

Kun tutkimuksen kolme vaihetta (näytteenotto, näytteen esikäsittely ja analysointi) on suoritettu, saadaan analyysitulokset, jonka luotettavuus halutaan selvittää tutkimuksen tilanteelle asiakkaalle. Analyttisen menetelmän kyvykkyyttä ja soveltuvuutta aiottuun käyttötarkoitukseen voidaan osoittaa menetelmän validoinnilla. Validointi koostuu suunnitelmasta, kokeiden suorittamisesta, tulosten tilastollisesta tarkastelusta ja niiden dokumentoinnista. Menetelmän validoinnissa tutkittavia asioita ovat esim. selektiivisyys, spesifisyys, lineaarisuus, toteamis- ja määritysrajat, menetelmän herkkyys, toistotarkkuus ja oikeellisuus. Analyysimenetelmien laadunvarmistuksella pyritään takaamaan analyysitulosten luotettavuus ja laadukkuus. Analyysimenetelmän laadukkuutta voidaan varmistaa esimerkiksi käyttämällä standardimenetelmiä, tekemällä analyysieja vertailumateriaaleille, analysoimalla riittävä määrä rinnakkaismäärittäyksiä ja osallistamalla laboratorioiden välisiin menetelmävertailuihin.

KOKEELLINEN OSA

7 Räjähdyksaineita sisältävien maanäytteiden analysointi HPLC -laitteistolla

7.1 Työn tarkoitus

Työn tarkoituksena oli verrata kolmea eri näytteenesikäsittelymenetelmää räjähdysaineita sisältävien maanäytteiden analysointia varten. Maanäytteiden uutaminen suoritettiin mekaanisella ravistelulla, ASE- ja MAE -uutolla. Esikäsittelymenetelmien vertailu suoritettiin viiden analyytin (TNT, RDX, HMX, 1,3-dinitrobensoeni (1,3-DNB) ja 2,4-DNT) avulla, joiden pitoisuudet analysoitiin nestekromatografisesti HPLC -laitteistolla. Yhdisteiden detektointi suoritettiin UV-detektorilla. HPLC -menetelmän validointi suoritettiin viiden validointiparametrin avulla (selektiivisyys, spesifisyys, lineaarisuus, toistotarkkuus, oikeellisuus).

7.2 Laitteisto

Mittaukset suoritettiin Waters Alliance 2695 nestekromatografilla, detektorina Waters 2487 UV -detektori (kuva 8) ja datankäsittely suoritettiin Empower -ohjelmistolla. Kolonni oli 250 x 4,6 mm RP-18 ODS 2, jonka partikkelikoko oli 5 µm. Kolonniuunin lämpötila oli 30°C ja eluenttina 47 % metanoli/53 % vesi virtausnopeudella 1,2 ml/min. Näytteiden analysointi suoritettiin aallonpituudella 240 nm.



Kuva 8. Työssä käytetty Waters Alliance 2695 nestekromatografi ja 2487 UV -detektori.

7.3 Vertailumateriaalit

Työssä käytettiin vertailumateriaaleina kahta itse valmistettua maanäytettä; slurry 1 (analyyttien pitoisuus n.0,5 mg/kg) ja slurry 2 (analyyttien pitoisuus n.1,0 mg/kg). Slurrit valmistettiin pipetoimalla tarkasti (slurry1: 500 μ l ja slurry2: 1000 μ l) 1 kg:aan 0- maata (1mm seulalla seulottu, kuivattu ylöjärveläinen hiekkamooreeni) seosstandardia, jonka pitoisuus oli 1 mg/ml (1000 ppm). Slurryn päälle kaadettiin asetonia (p.a laatu) niin paljon, että hiekka peittyi sen alle. Slurryä sekoitettiin hyvin, jotta analyytit saatiin leviämään koko näytteeseen. Tämän jälkeen asetonin annettiin haihtua pois. Seosstandardin analyytit olivat TNT, RDX, HMX, 1,3-DNB ja 2,4-DNT. Seosstandardissa oli mukana myös kuudes analyytti 1,3,5-trinitrobentseeni (1,3,5-TNB), mutta sen pitoisuus ei ollut slurryissa pysyvä koko työn keston ajan, joten 1,3,5-TNB:n pitoisuustarkastelu jätettiin tämän työn ulkopuolelle. Slurryihin pipetoitiin myös sisäistä standardia 1,2-dinitrobentseeniä (1,2-DNB), sillä analyyttien pitoisuus määritettiin nestekromatografisesti sisäisen standardin menetelmällä.

7.4 Näytteen esikäsittelymenetelmät

Analyyttien uuttaminen maanäytteistä suoritettiin kolmella eri menetelmällä ja tarkoituksena oli verrata esikäsittelymenetelmien tehokkuutta toisiinsa nähden. Jokaisessa menetelmässä uuttoliuottimena oli asetonitrili (p.a laatu) ja kuhunkin uuttoon punnittiin näytettä 16 g.

7.4.1 Mekaaninen ravistelu

Mekaaninen ravistelu on nitroaromaattisten yhdisteiden ja nitramiinien uuttamiseen tarkoitettu EPA standardin²⁸ mukainen uuttomenetelmä, jossa näytettä punnittiin erlenmayeriin noin 16 g ja sitä uutettiin asetonitrilillä (32 ml) ravistelemalla 18 tunnin ajan (kuva 9). Näytteille tehtiin kuusi rinnakkaismäärittystä.



Kuva 9. Näytteiden esikäsittely mekaanisella ravistelulla.

Tämän jälkeen näyte suodatettiin (suodatinpaperi Whatman 41) dekantterilasiin (kuva 10) typpivirrassa suoritettavaa konsentrointia varten.



Kuva 10. Näytteiden suodatus mekaanisen ravistelun jälkeen.

Liuos siirrettiin kvantitatiivisesti 20 ml mittapulloon, johon pipetoitiin toinen sisäinen standardi 4-nitrotolueeni (4-NT) analyyttien saantoprosenttien (recovery) määrittämiseksi. Lopulliseen laimennukseen, josta HPLC -ajo suoritettiin, pipetoitiin 2,5 ml näytettä ja 2,5 ml ionivaihdettua vettä.

Analyyttien saantoprosentit laskettiin määrittämällä kullekin analyylille vastekerroin (analyytin signaalin korkeus/4-NT:n signaalin korkeus) sekä liuottamalla yhdisteet suoraan puhtaaseen liuottimeen että uuttamalla ne maanäytteestä ja lisäämällä 4-NT:a näyteliuokseen uuton jälkeen. Uuton läpikäyneiden analyyttien vastekerroin jaettiin liuottimessa olevien analyyttien vastekertoimella yhtälön 10^{48} mukaisesti, jolloin saatiin määritettyä uuton läpikäyneiden analyyttien uutto-
tehoisuus (recovery).

$$\frac{\text{vastekerroin } 1}{\text{vastekerroin } 2} \times 100 = \text{analyytin uuttotehokkuus (\%)}, \quad (10)$$

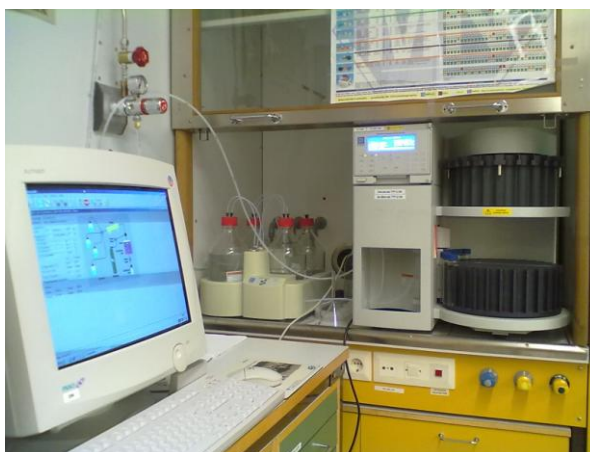
missä

$$\text{vastekerroin } 1 = \left(\frac{\text{uutetun analyytin signaalin korkeus}}{\text{4-NT:n signaalin korkeus}} \right) \text{ ja}$$

$$\text{vastekerroin } 2 = \left(\frac{\text{liuottimeen liuotet. anal. signaalin korkeus}}{\text{4-NT:n signaalin korkeus}} \right).$$

7.4.2 ASE -uutto

ASE -uutot suoritettiin Dionexin ASE 200 (Accelerated Solvent Extractor) pikauuttolaitteistolla (kuva 11). Laitteisto koostuu Dionex ASE 200 pikauuttolaitteesta ja liuottimen ohjausyksiköstä sekä AutoASE -ohjelmistosta. Pikauuttolaitteisto on tarkoitettu orgaanisten yhdisteiden uuttamiseen kiinteistä näytteistä. Uuton aikana näyteastia on paineenalainen ja prosessia nopeutetaan käyttämällä liuotinta kohotetussa lämpötilassa. Tilavuudeltaan 33 ml teräksiseen näyteastiaan punnittiin noin 16 g näytettä ja näytteen joukkoon laitettiin rakeista piimaata (Dionex ASE Prep DE), joka toimii kuivausaineena.



Kuva 11. Työssä käytetty Dionexin ASE 200 pikauuttolaitteisto.

Kuumennuksen jälkeen uutoliuos (asetonitriili) huuhdeltiin 60 ml:n vakiomalliseen lasiampulliin. Näytteille tehtiin kuusi rinnakkaismäärittystä. Näytteitä konsentroidiin lasiampulleissa typpivirrassa, jonka jälkeen ne siirrettiin kvantitatiivisesti 20 ml mittapulloihin. Tämän jälkeen näytteelle suoritettiin samat toimenpiteet, mitä aikaisemmin esitetystä kohdassa 7.4.1 (mekaaninen ravistelu) on jo kerrottu. Uutot suoritettiin taulukossa 2 olevien asetusten mukaisesti.

Taulukko 2. Nopeutetussa liuotinuutossa käytetyt asetukset

Asetus	Arvo
Lämpötila (°C)	100
Paine (psi)	1500
Kesto aika (min)	15
Huuhtelukaasu	typpi

7.4.3 MAE -uutto

MAE -uutot suoritettiin CEM Corporationin MARS 5 (Microwave Accelerated Reaction System) mikroaaltouunissa (kuva 12). Kun MARS 5 toimii täydellä teholla se tuottaa mikroaalloja 1600 W teholla ja 2450 MHz taajuudella. MARS 5 laitteistoa voidaan käyttää laboratoriossa monissa sovelluksissa esim. liuottamaan, sulattamaan ja kuivattamaan monia erilaisia materiaaleja.²⁵



Kuva 12. Työssä käytetty CEM Corporationin MARS 5 mikroaaltouuni.

MAE -uutossa käytettiin uuttoluottimena asetonitriliä. Uutto suoritettiin Green-Chem astioissa ja MARS 5 -laitteistoon oli asennettu liuotindetektorit uuttojen ajaksi liuotinhöyryjen tarkkailuun. Uutot suoritettiin taulukossa 3 olevien asetusten mukaisesti.

Taulukko 3. Mikroaaltoavusteisessa uutossa käytetyt asetukset

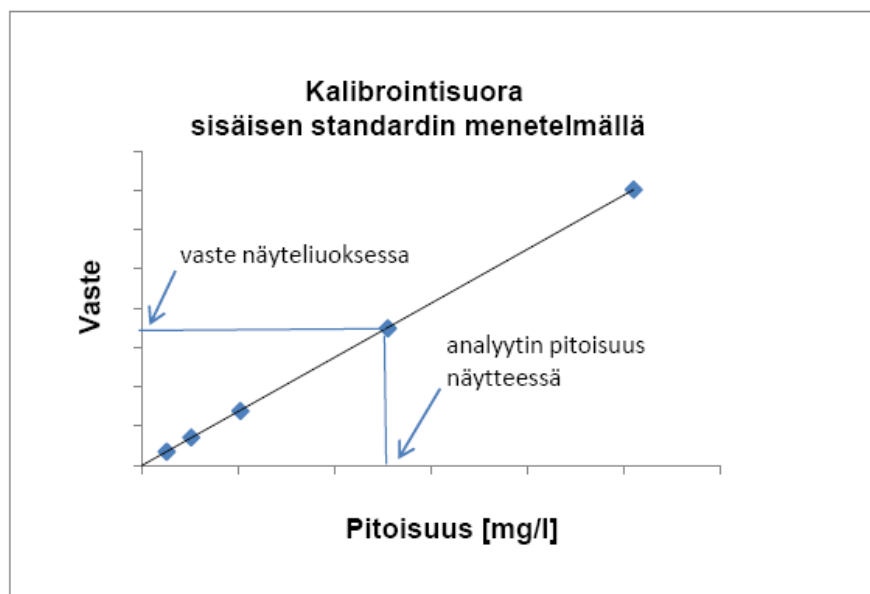
Asetus	Arvo
Teho (W)	1600
Lämmitysaika (min)	15
Pitoaika (min)	30
Tavoitelämpötila (°C)	130
Jäähdytysaika (min)	20

MAE -uutossa käytettiin samaa näyte- ja liuotinmäärää (16 g/32 ml), kuin mekaanisessa ravistelussa ja näytteille tehtiin myös kuusi rinnakkaismäärittystä. Uuton jälkeen näyte siirrettiin kvantitatiivisesti dekantterilasiin pasteur-pipetin avulla typpivirrassa suoritettavaa konsentrointia varten. Konsentroidin jälkeen näytteelle suoritettiin myös samat toimenpiteet, mitä aikaisemmin aikaisemmin esitetystä kohdassa 7.4.1 (mekaaninen ravistelu) on jo kerrottu.

8 Työn tulokset

8.1 Kalibrointi

HPLC -menetelmän kalibrointi suoritettiin viiden kalibrintiliuoksen avulla (pitoisuudet: 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 ja 5,0 mg/l) Kalibrintiliuokset valmistettiin punnitsemalla yhdisteet tarkasti (50 mg) 50 ml mittapulloon ja liuottamalla ne asetoniin. Tästä 1000 ppm perusliuksesta valmistettiin 100 ppm seosstandardi, joka sisälsi kaikki analyytit ja toimi työliuksena, josta eri pitoisuuksien kalibrintiliuokset valmistettiin. Analyyttien pitoisuudet määritettiin sisäisen standardin menetelmällä. Sisäisenä standardina oli 1,2-DNB, jota lisättiin kaikkiin kalibrintiliuoksiin sama määrä (2,04 mg/l). Kalibroinnissa määritettiin tutkittavan yhdisteen signaalin suhdetta sisäisen standardin signaaliin. Signaalien suhde kerrottuna sisäisen standardin pitoisuudella (eli vaste, $\frac{A_s C_{is}}{A_{is}}$) esitettiin analysoitavan aineen pitoisuuden funktiona yhtälön 4 mukaisesti (kuva 7) jokaiselle analyyttille. Kuvassa 13 on esimerkkinä TNT:n kalibrointisuora. Taulukossa 4 on esimerkkinä TNT:n ja sisäisen standardin 1,2-DNB:n signaalien arvot, joiden perusteella TNT:n kalibrointisuora määritettiin.



Kuva 13. TNT:n kalibrointisuora sisäisen standardin menetelmällä.

Taulukko 4. TNT:n ja sisäisen standardin 1,2-DNB:n signaalien arvot

STD	Pitoisuus TNT [mg/l]	Korkeus TNT	Korkeus 1,2-DNB	Pitoisuus 1,2-DNB [mg/l]	Vaste
1	0,26	2738	15801	2,04	0,35
2	0,51	5630	16032	2,04	0,72
3	1,02	11146	16357	2,04	1,39
4	2,55	28137	16436	2,04	3,49
5	5,10	56140	16304	2,04	7,02

Kalibroitifunktion sovittamisessa käytettiin pienimmän neliösumman menetelmää, jolla laskettiin kalibroitisuoran kulmakerroin ja leikkauspiste yhtälön 2 mukaisesti. Kalibroitisuoran korrelaatiokerroin r kertoo, kuinka paljon mittalaitteen signaalin y :n muutoksesta analyytin pitoisuuden x funktiona selittyy lineaarisella mallilla. Kalibroitisuorien korrelaatiokertoimet löytyvät taulukosta 5 ja suorien graafiset kuvaajat suorien yhtälöineen liitteestä 1a-c.

Taulukko 5. Kalibroitisuorien korrelaatiokertoimet (r)

Yhdiste	Korrelaatiokerroin (r)
TNT	0,99998
RDX	0,99998
HMX	0,99999
1,3-DNB	0,99995
2,4-DNT	0,99995

Jokaisen yhdisteen kalibrointi onnistui erinomaisesti, sillä korrelaatiokertoimet ovat hyvin lähellä ideaalista korrelaatiokerrointa $r=1,0000$.^{36 s. 134}

8.1.1 Lineaarisuus

Menetelmän lineaarisuutta arvioitiin yhtälön 3 mukaisesti tarkastelemalla residuaaleja (d_i), jotka ovat mitattujen ja kalibroitisuoralta laskettujen y -arvojen

erotuksia. Residuaaleista piirrettiin kuvaaja analyytin pitoisuuden funktiona (liite 2a-b). Koska residuaalit jakautuivat jokaisella analyytillä vuorotellen nollassa molemmin puolin, kalibroitisuorat olivat lineaarisia.

8.1.2 Toteamis- ja määrittämissrajat; menetelmän herkkyys

Menetelmän toteamis- ja määrittämissrajat laskettiin y-akselin leikkauspisteen virheen *SD*:n ja kalibroitisuoran kulmakertoimen (*b*) avulla yhtälöiden 6 ja 7 mukaisesti. Menetelmän herkkyyttä arvioitiin kalibroitisuoran kulmakertoimen (*b*) avulla. Yhdisteiden kalibroitisuorien kulmakertoimet ja y-akselin leikkauspisteen virheen *SD*:t löytyvät taulukosta 6 ja toteamis- ja määrittämissrajat löytyvät taulukosta 7.

Taulukko 6. Yhdisteiden kalibroitisuorien kulmakertoimet ja y-akselin leikkauspisteen virheen *SD*:t

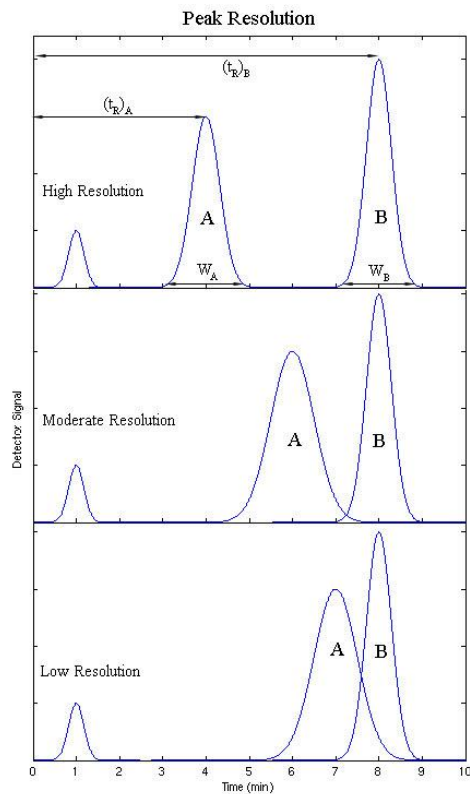
Yhdiste	Kulmakerroin (<i>b</i>)	y-akselin leikkauspisteen virheen <i>SD</i> :t
TNT	1,3759	0,0100
RDX	1,2244	0,0086
HMX	2,0607	0,0101
1,3-DNB	2,1850	0,0238
2,4-DNT	1,1130	0,0121

Taulukko 7. Yhdisteiden toteamis- ja määrittämissrajat

Yhdiste	Toteamisraja (LOD) [mg/l]	Määrittämissraja (LOQ) [mg/l]
TNT	0,02	0,07
RDX	0,02	0,07
HMX	0,02	0,05
1,3-DNB	0,04	0,11
2,4-DNT	0,04	0,11

8.2 HPLC -menetelmän selektiivisyys ja spesifisyys

Selektiivisellä menetelmällä tutkittavat analyytit pystytään erottamaan toisistaan ja muista näytteissä olevista yhdisteistä ja niiden pitoisuudet voidaan määrittää luotettavasti. Testatulla isokraattisella HPLC -menetelmällä (eluentti: 47% metanoli/53% vesi, virtaunopeus 1,2 ml/min) analyyteille saatiin riittävä erottuminen (Analyyttien resoluutio, $R_s > 1$) ja niille voitiin tehdä kvantitatiiviset analyysit luotettavasti. Kun resoluutio (R_s) on 1,5 analyytit ovat erottuneet täysin toisistaan (high resolution) eli analyyttien välinen laaksokohta sivuaa pohjaviivaa, jolloin resoluutio on analyyttiseen määrittämiseen erinomainen^{41 s. 25} (kuva 14).



Kuva 14. Esimerkkejä erilaisista resoluutioista (high resolution $R_s > 1,5$, moderate resolution $R_s = 1$ ja low resolution $R_s < 0,8$).^{41 s. 25,50}

Resoluutio laskettiin yhtälön 11^{36 s.20} mukaisesti.

$$R_{(s)} = \frac{2 \cdot (t_2 - t_1)}{(w_2 - w_1)}, \quad (11)$$

missä t_1 = aikaisemmin eluoituvan analyytin retentioaika, t_2 = myöhemmin eluoituvan analyytin retentioaika, w_1 = aikaisemmin eluoituvan analyytin signaalin leveys, w_2 = myöhemmin eluoituvan analyytin signaalin leveys

Yhdisteiden retentioajat ja resoluutiot löytyvät taulukosta 8. Yhdistettä 1,2-DNB käytettiin menetelmän sisäisenä standardina ja se pipetoitiin näytteisiin heti analysoinnin alkuvaiheessa. Toinen sisäinen standardi 4-NT pipetoitiin näytteisiin vasta uuttojen jälkeen ja sen avulla määritettiin analyyttien uuttotehokkuus (recovery) yhtälön 10 mukaisesti.

Taulukko 8. Yhdisteiden retentioajat ja resoluutio

Yhdiste	Retentioaika (min.)	Resoluutio (R_s)
HMX	3,4	3,4
RDX	5,0	1,5
1,2-DNB	6,6	1,1
1,3-DNB	7,3	3,8
TNT	9,6	2,9
2,4-DNT	11,4	4,1
4-NT	14,1	41,4

Menetelmän selektiivisyyttä tutkittiin vertaamalla puhtaiden referenssianalyyttien kalibrointisuorien kulmakertoimia matriisia sisältävien analyyttien kalibrointisuorien kulmakertoimiin. Matriisia sisältävien analyyttien kalibrointisuorien kulmakertoimet määritettiin pipetoimalla kolmeen 0 -maanäytteeseen analyytit (pitoisuudet: 0,5; 1,0 ja 5,0 mg/l) sekä sisäinen standardi (pitoisuus kaikissa 2,04 mg/l) ja uuton jälkeen suoritetuista HPLC -ajoista määritettiin kalibrointisuora kullekin analyytille sisäisen standardin menetelmällä yhtälön 4 mukaisesti. Kalibrointisuorien kulmakertoimien vertailu löytyy taulukosta 9. Koska yh-

disteiden kalibroitaisuurien kulmakertoimet poikkeavat toisistaan vähemmän kuin $\pm 5\%$, menetelmä on selektiivinen.

Taulukko 9. Puhtaiden referenssianalyyttien ja matriisia sisältävien analyyttien kalibroitaisuurien kulmakertoimet sekä poikkeamat

Yhdiste	Puhtaiden referenssianalyyttien kalibroitaisuurien kulmakerroin	Matriisia sisältävien analyyttien kalibroitaisuurien kulmakerroin	Poikkeama (%)
TNT	1,3759	1,3520	-1,74
RDX	1,2244	1,2650	3,32
HMX	2,0607	2,1081	2,30
1,3-DNB	2,1850	2,2285	1,99
2,4-DNT	1,1130	1,1228	0,88

8.3 HPLC -menetelmän toistotarkkuus

8.3.1 Injektion toistettavuus

Injektion toistettavuutta tutkittiin kolmella eri pitoisuudella (0,25; 1,0 ja 5,0 mg/l). Jokaisella pitoisuustasolla tehtiin kuusi injektioita ja kunkin analyytin pitoisuuksista laskettiin *SD* kaavalla 8 ja *RSD%* kaavalla 9. Injektion *RSD%* löytyvät taulukosta 10. Koska kaikilla analyyteillä injektion *RSD%* <2%, injektion toistettavuus oli hyväksyttävällä tasolla. Vain HMX:llä injektion toistettavuus suurimmalla pitoisuudella (5,0 mg/l) oli hyväksyttävän tason rajalla, muiden analyyttien kohdalla injektion toistettavuutta voidaan pitää jopa erinomaisena.

Taulukko 10. Injektionin toistettavuus kolmella eri pitoisuustasolla (0,25; 1,0 ja 5,0 mg/l)

Yhdiste	RSD % (0,25 mg/l)	RSD % (1,0 mg/l)	RSD % (5,0 mg/l)
TNT	1,0	1,1	0,5
RDX	0,3	0,6	0,9
HMX	0,8	0,4	2,0
1,3-DNB	0,5	0,5	0,2
2,4-DNT	0,9	0,8	0,4

8.3.2 Määritysten sisäinen toistettavuus

Määritysten sisäistä toistettavuutta tutkittiin kahdella eri pitoisuustasolla 0,5 mg/kg (slurry1) ja 1,0 mg/kg (slurry2). Kumpikin vertailunäyte esikäsiteltiin kolmella eri uuttomenetelmällä (mekaaninen ravistelu, ASE- ja MAE -uutto), jonka jälkeen analyttien pitoisuudet määritettiin nestekromatografisesti. Näytteille tehtiin kuusi rinnakkaismäärittystä kullakin uuttomenetelmällä. Rinnakkaismäärittäyksille laskettiin *SD* kaavalla 8 ja *RSD%* kaavalla 9. Kolmen eri uuttomenetelmän rinnakkaismääritysten *RSD%*:t pitoisuustasolla 1,0 mg/kg löytyvät taulukosta 11 ja pitoisuustasolla 0,5 mg/kg taulukosta 12.

Taulukko 11. Määritysten sisäinen toistettavuus pitoisuustasolla 1,0 mg/kg (slurry 2) kolmella eri uuttomenetelmällä

Yhdiste	RSD% Ravistelu 1,0 mg/kg	RSD% ASE 1,0 mg/kg	RSD% MAE 1,0 mg/kg
TNT	2,0	4,2	1,2
RDX	3,1	3,9	5,3
HMX	3,5	4,5	4,9
1,3-DNB	0,5	1,5	0,9
2,4-DNT	1,5	4,3	1,4

Pitoisuustasolla 1,0 mg/kg (slurry 2) rinnakkaismääritysten *RSD%*:t vaihtelivat välillä 0,5-5,3% analyytistä ja uuttotavasta riippuen. Toistettavin menetelmä oli, kun näytteet uutettiin mekaanisella ravistelulla. Myös ASE- ja MAE -uutolla

päästiin lähes samoihin toistettavuuksiin. Kun analyttisen menetelmän rinnakkaismääritysten *RSD%*:t ovat >2%, toistettavuus ei ole enää hyväksyttävällä tasolla. Täten jokaisen uuttomenetelmän kohdalla toistettavuudessa olisi parantamisen varaa, mutta kun ottaa huomioon kuinka monta eri vaihetta näytteen esikäsittelyssä on, *RSD%* <2% on melko haasteellista saavuttaa.

Taulukko 12. Määritysten sisäinen toistettavuus pitoisuustasolla 0,50 mg/kg (slurry 1) kolmella eri uuttomenetelmällä

Yhdiste	<i>RSD%</i> Ravistelu 0,50 mg/kg	<i>RSD%</i> ASE 0,50 mg/kg	<i>RSD%</i> MAE 0,50 mg/kg
TNT	7,8	4,2	2,0
RDX	7,7	21,9	3,1
HMX	7,4	9,4	5,4
1,3- DNB	1,7	3,8	0,9
2,4- DNT	0,9	1,5	2,0

Pitoisuustasolla 0,5 mg/kg menetelmän toistettavuus huononi mekaanisen ravistelun kohdalla TNT:n, RDX:n ja HMX:n osalta. ASE -uuttomenetelmällä RDX:n ja HMX:n tuloksissa *RSD%*:t kasvoivat vielä dramaattisemmin. Suoritettaessa nopeutettuja liuotinuuttoja ASE -uuttolaitteiston toiminnassa oli teknisiä ongelmia, joten tuloksia tämän uuttotekniikan osalta (pitoisuustasolla 0,5 mg/kg) ei voida pitää luotettavina. Paras toistettavuus (kaikkien analyttien kohdalla vaihtelu 0,9-5,4%) saavutettiin MAE -uutolla.

8.4 HPLC -menetelmän oikeellisuus

HPLC -menetelmän oikeellisuutta testattiin saantotestien avulla. Saantotesteissä näytematriisiin (0 -maahan) lisättiin tunnettu määrä (0,25; 0,5; 1,0 ja 5,0 mg/l) analysoitavia yhdisteitä. Jokaiselle pitoisuudelle tehtiin yksi määrittäminen. Analytit uutettiin näytematriisista kaikilla käytetyillä esikäsittelymenetelmillä (ravistelu, ASE- ja MAE -uutto) ja niiden pitoisuudet määritettiin nestekromatografisesti sisäisen standardin menetelmällä yhtälön 5 mukaisesti.

Saantotestien tulokset sisäisen standardin menetelmällä neljällä eri pitoisuudella (yksi määrittys/pitoisuus) jokaiselle esikäsittelymenetelmälle löytyvät taulukoista 13 (mekaaninen ravistelu), 14 (ASE -uutto) ja 15 (MAE -uutto). Analyyttien saantoprosentit laskettiin kaavalla 12^{43 s. 199}.

$$Saanto - \% = \frac{\text{Analyytin mitattu pitoisuus}}{\text{Analyytin tunnettu pitoisuus}} \times 100\% \quad (12)$$

Taulukko 13. Analyyttien saannot neljällä pitoisuustasolla, esikäsittelymenetelmänä mekaaninen ravistelu

Yhdiste	0,25 mg/l saanto-%	0,5 mg/l saanto-%	1,0 mg/l saanto-%	5,0 mg/l saanto-%
TNT	99,6	99,0	105,0	97,8
RDX	98,4	97,6	105,6	103,0
HMX	98,2	99,0	104,6	103,4
1,3- DNB	99,6	99,0	96,1	101,7
2,4- DNT	99,2	98,4	98,2	100,9

Taulukko 14. Analyyttien saannot neljällä pitoisuustasolla, esikäsittelymenetelmänä ASE-uutto

Yhdiste	0,25 mg/l saanto-%	0,5 mg/l saanto-%	1,0 mg/l saanto-%	5,0 mg/l saanto-%
TNT	98,4	106,9	98,0	108,5
RDX	106,4	106,4	96,3	109,9
HMX	105,0	107,5	98,9	109,9
1,3- DNB	93,3	99,0	93,2	94,4
2,4- DNT	91,3	99,4	92,7	97,9

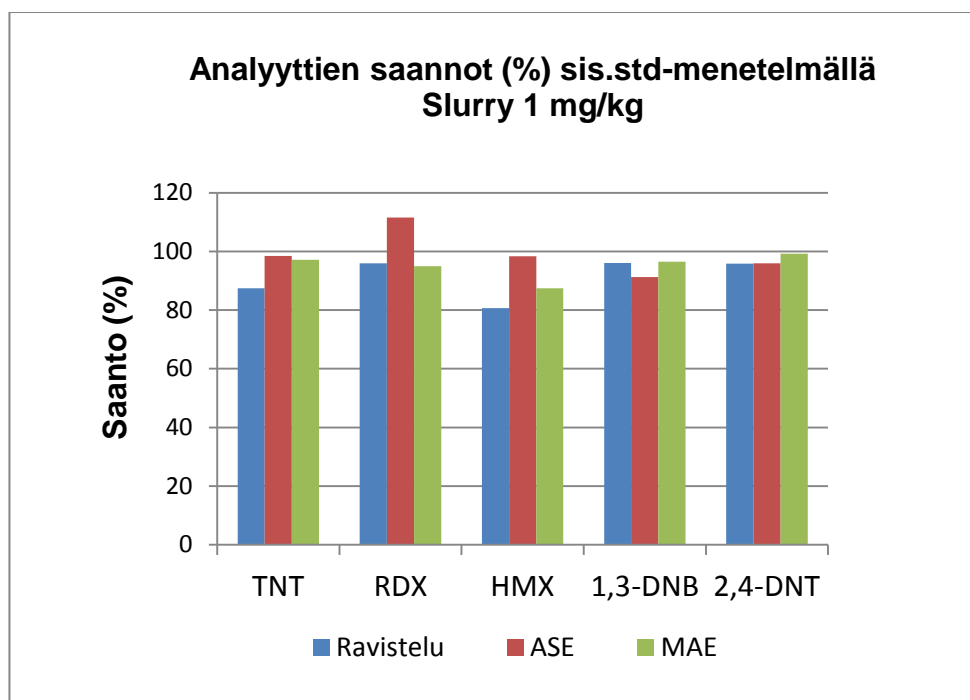
Taulukko 15. Analyyttien saannot neljällä pitoisuustasolla, esikäsitelymenetelmänä MAE-uutto

Yhdiste	0,25 mg/l saanto-%	0,5 mg/l saanto-%	1,0 mg/l saanto-%	5,0 mg/l saanto-%
TNT	96,5	101,6	96,9	107,1
RDX	114,8	104,8	100,1	102,6
HMX	104,2	103,2	97,9	101,0
1,3- DNB	103,5	97,6	98,4	98,7
2,4- DNT	97,6	99,2	99,7	101,1

Jos analyyttien saannot ovat välillä 95-105 %, menetelmä tuottaa oikeita tuloksia. Tällaisessa tapauksessa analyysituloksissa on vain vähän systemaattista ja satunnaisvirhettä. Tarkimpia ja oikeellisimpia tuloksia saatiin määritettyä uuttamalla analyytit mekaanisella ravistelulla. Myös MAE -uutto tuotti oikeita tuloksia, pois lukien pienintä pitoisuutta (0,25 mg/l) RDX:llä ja suurinta pitoisuutta (5,0 mg/l) TNT:llä. ASE -uutossa saannot olivat useimmin kriittisten arvojen ulkopuolella ja poikkeamia havaittiin kaikkien analyyttien kohdalla. Kuitenkin ASE -uutollakin päästiin (analyyttien saannot 91-110%) hyvin lähelle hyväksyttäviä arvoja.

9 Esikäsitelymenetelmien vertailu

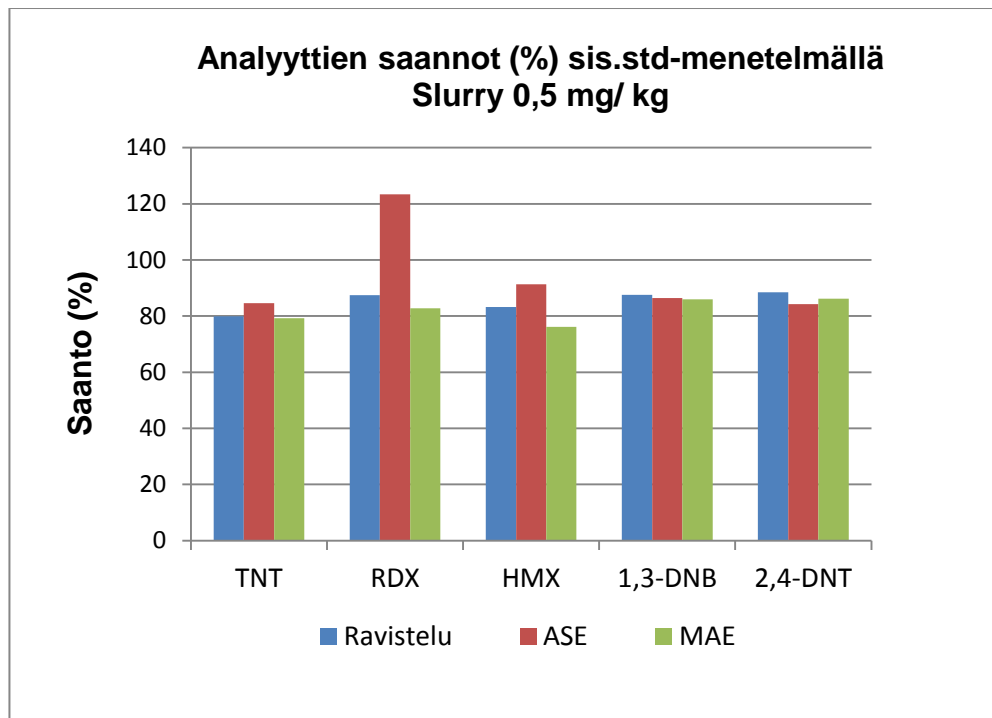
Esikäsitelymenetelmien vertailu suoritettiin kahdella eri pitoisuustasolla 0,5 mg/kg (slurry 1) ja 1,0 mg/kg (slurry 2). Kumpikin vertailunäyte esikäsiteltiin kolmella eri uuttomenetelmällä (mekaaninen ravistelu, ASE- ja MAE -uutto), jonka jälkeen vertailunäytteissä olleiden analyyttien (TNT, RDX, HMX; 1,3-DNB ja 2,4-DNT) pitoisuudet määritettiin nestekromatografisesti sisäisen standardin menetelmällä yhtälön 5 mukaisesti. Näytteille tehtiin kuusi rinnakkaismäärittystä kullakin uuttomenetelmällä. Esikäsitelymenetelmiä verrattiin sekä analyyttien saannon (määritettiin yhtälön 12 mukaisesti) että menetelmien uuttotehokkuuden (määritettiin yhtälön 10 mukaisesti) perusteella. Mekaaninen ravistelu on EPA standardin mukainen menetelmä²⁸ nitroaromaattisille yhdisteille ja nitramiineille, joten ASE- ja MAE -uuttoa verrattiin ensisijaisesti siihen. Lopuksi vertailu suoritettiin myös ASE- ja MAE -uuton välillä. Analyyttien saantojen keskiarvot ja *SD*:t molemmilla pitoisuustasoilla ja kolmella eri esikäsitelymenetelmällä löytyvät taulukoista 16, 17, 18 ja 19 sekä tuloksia havainnollistavat kuvat kuvista 15, 16, 17 ja 18.



Kuva 15. Analyyttien saannot sisäisen standardin menetelmällä pitoisuustasolla 1,0 mg/kg eri uuttomenetelmillä.

Taulukko 16. Analyyttien saantojen keskiarvot ja *SD*:t sisäisen standardin menetelmällä pitoisuustasolla 1,0 mg/kg eri uuttomenetelmillä

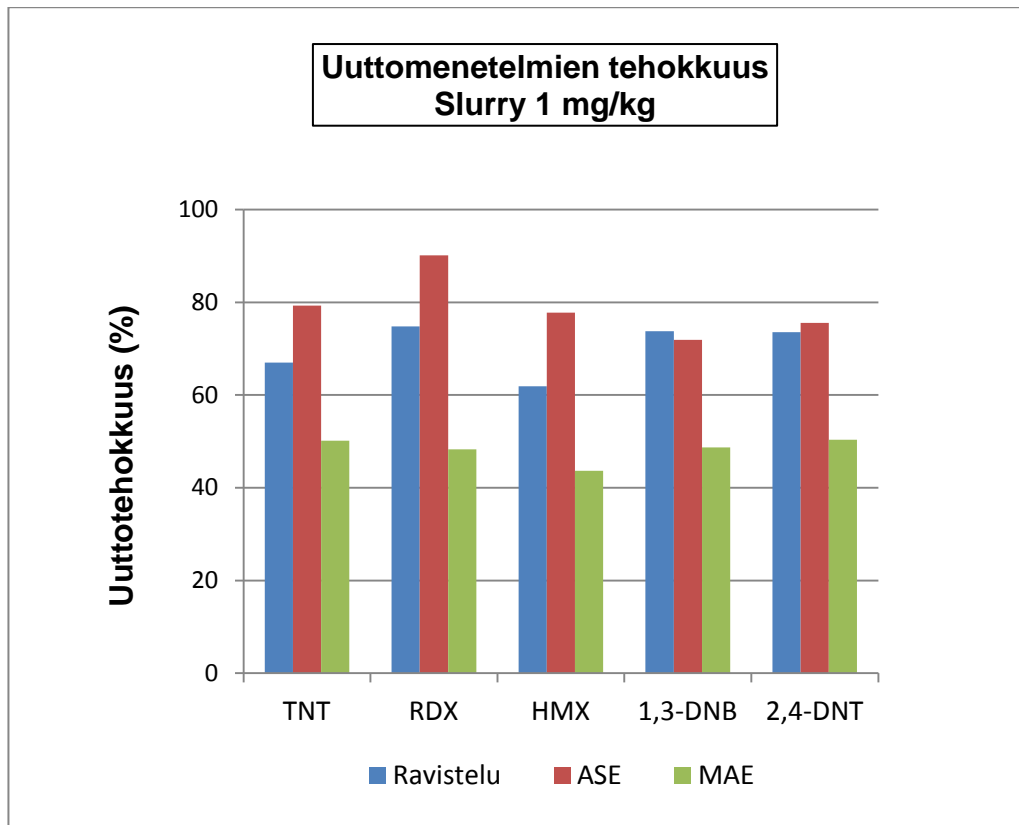
Yhdiste		Mekaaninen ravistelu	ASE -uutto	MAE -uutto
TNT	keskiarvo	87,4	98,5	97,2
	hajonta	1,33	4,14	1,24
RDX	keskiarvo	95,9	111,6	95,0
	hajonta	2,58	4,37	5,06
HMX	keskiarvo	80,7	98,4	87,4
	hajonta	2,40	4,42	4,26
1,3-DNB	keskiarvo	96,1	91,3	96,5
	hajonta	0,74	1,38	0,76
2,4-DNT	keskiarvo	95,9	96,0	99,3
	hajonta	0,78	1,41	1,37



Kuva 16. Analyyttien saannot sisäisen standardin menetelmällä pitoisuustasolla 0,5 mg/kg eri uuttomenetelmillä.

Taulukko 17. Analyyttien saantojen keskiarvot ja *SD*:t sisäisen standardin menetelmällä pitoisuustasolla 0,5 mg/kg eri uuttomenetelmillä

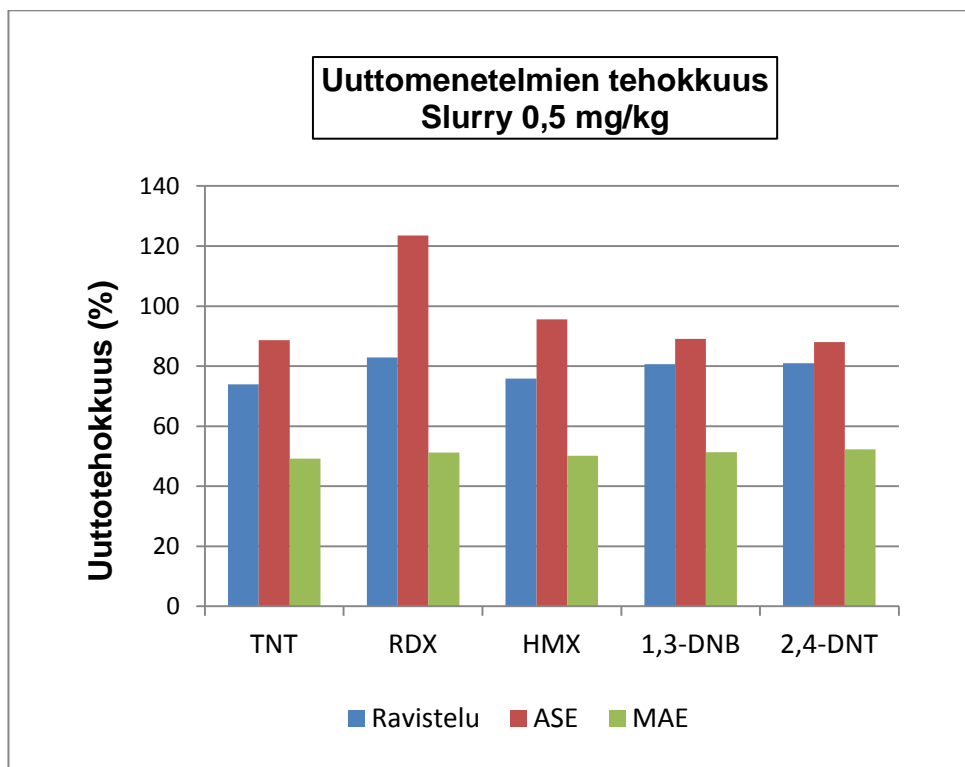
Yhdiste		Mekaaninen ravistelu	ASE- uutto	MAE- uutto
TNT	keskiarvo	80,0	84,6	79,3
	hajonta	6,49	3,82	1,48
RDX	keskiarvo	87,5	123,4	82,7
	hajonta	7,00	27,12	2,39
HMX	keskiarvo	83,3	91,4	76,2
	hajonta	6,43	8,87	4,08
1,3-DNB	keskiarvo	87,6	86,4	86,0
	hajonta	1,24	2,87	1,00
2,4-DNT	keskiarvo	88,5	84,3	86,2
	hajonta	1,15	1,17	1,95



Kuva 17. Uuttomenetelmien tehokkuus (recovery) pitoisuustasolla 1,0 mg/kg

Taulukko 18. Uuttomenetelmien tehokkuuksien (recovery) keskiarvot ja *SD*:t pitoisuustasolla 1,0 mg/kg.

Yhdiste		Mekaaninen ravistelu	ASE -uutto	MAE -uutto
TNT	keskiarvo	67,0	79,3	50,2
	hajonta	2,98	2,14	14,14
RDX	keskiarvo	74,8	90,1	48,3
	hajonta	3,46	2,30	14,68
HMX	keskiarvo	61,9	77,8	43,6
	hajonta	2,87	1,89	13,03
1,3-DNB	keskiarvo	73,7	71,9	48,7
	hajonta	4,08	3,41	13,08
2,4-DNT	keskiarvo	73,6	75,6	50,3
	hajonta	3,91	2,60	13,67



Kuva 18. Uuttomenetelmien tehokkuus (recovery) pitoisuustasolla 0,5 mg/kg

Taulukko 19. Uuttomenetelmien tehokkuuksien (recovery) keskiarvot ja *SD*:t pitoisuustasolla 0,5 mg/kg.

Yhdiste		Mekaaninen ravistelu	ASE -uutto	MAE -uutto
TNT	keskiarvo	73,9	88,6	49,2
	hajonta	1,90	2,80	13,94
RDX	keskiarvo	82,9	123,5	51,2
	hajonta	2,41	24,54	15,26
HMX	keskiarvo	75,9	95,5	50,2
	hajonta	2,18	5,95	15,30
1,3-DNB	keskiarvo	80,7	89,0	51,3
	hajonta	6,76	5,71	14,11
2,4-DNT	keskiarvo	81,0	88,0	52,3
	hajonta	4,99	3,27	13,33

Esikäsitelymenetelmien analyyttien saantoja verrattaessa käytettiin apuna tilastollisia testejä. Ensin testattiin menetelmien tarkkuutta F -testin avulla satunnaisen virheen arvioimiseksi kaavan 13⁴⁴ s. 17^{avulla}. Jos menetelmien standardipoikkeamat olivat yhtä suuret (F -testi ”meni läpi”), voitiin t -testissä käyttää yhdistettyä standardipoikkeamaa kaavan 14⁵¹ mukaisesti. Jos standardipoikkeamat eivät olleet yhtä suuret, suoritettiin t -testi kaavan 15⁵¹ mukaisesti. Tällaisessa tapauksessa, jossa standardipoikkeamat eivät olleet yhtä suuret, t :n vapausaste (v) laskettiin kaavalla 16⁵¹, jolloin t -kriittinen arvo oli erilainen, vaikka havaintoja kaikissa testeissä oli sama määrä eli kuusi. Kun kahta menetelmää verrataan t -testin avulla, testataan poikkeako määritystulosten keskiarvojen erotus keskihajonnallaan mitattuna merkitsevästi nolasta. t -testin avulla voidaan arvioida menetelmien systemaattista virhettä.

F -testi:

$$F = \frac{SD_1^2}{SD_2^2}, \quad (13)$$

missä SD_1 on suuremman standardipoikkeaman omaavan lukujoukon arvo ja SD_2 on pienemmän standardipoikkeaman omaavan lukujoukon arvo.

t -testi käyttäen yhdistettyä standardipoikkeamaa:

$$t = \frac{|\bar{x}_A - \bar{x}_B|}{s\sqrt{[(1/n_A) + (1/n_B)]}}, \quad (14)$$

t -testi, kun standardipoikkeamat eivät ole yhtä suuret:

$$t = \frac{|\bar{x}_A - \bar{x}_B|}{\sqrt{[(s_A^2/n_A) + (s_B^2/n_B)]}}, \quad (15)$$

joissa \bar{x}_A ja \bar{x}_B ovat menetelmien A ja B määritystulosten keskiarvot ja s_A ja s_B niitä vastaavat standardipoikkeamat sekä n_A ja n_B menetelmien A ja B mittaus tulosten lukumäärä.

t :n vapausasteen (ν) laskeminen:

$$\nu = \frac{\left[\frac{s_A^2}{n_A} + \frac{s_B^2}{n_B} \right]^2}{\frac{s_A^4}{n_A^2(n_A-1)} + \frac{s_B^4}{n_B^2(n_B-1)}}, \quad (16)$$

Kaavasta saatava luku (ν) katkaistaan kokonaisluvuksi.

Esikäsitelymenetelmien vertailut F - ja t -testien avulla analyyttien saannon perusteella vertailunäytteelle 1,0 mg/kg löytyvät taulukosta 20 (mekaaninen ravistelu/ASE -uutto), taulukosta 21 (mekaaninen ravistelu/MAE -uutto) ja taulukosta 22 (ASE-/MAE -uutto). Kun F - ja t -testien lasketut arvot ovat pienempiä kuin kriittiset arvot, menetelmien välillä ei ole eroa 5% merkitsevyystasolla. Kun F - ja t -testien lasketut arvot ovat suurempia kuin kriittiset arvot, eroa 5% merkitsevyystasolla löytyy.

Taulukko 20. Menetelmien välinen vertailu F - ja t -testien avulla: mekaaninen ravistelu/ASE -uutto; 1,0 mg/kg

Yhdiste	F - kriittinen	F - laskettu	Arvio	t - kriittinen	t -laskettu	Arvio
TNT	5,05	9,69	varianssit erisuuret	2,45	6,25	menetelmien välillä on eroa
RDX	5,05	2,86	varianssit samat	2,23	7,54	menetelmien välillä on eroa
HMX	5,05	3,39	varianssit samat	2,23	8,62	menetelmien välillä on eroa
1,3-DNB	5,05	3,49	varianssit samat	2,23	7,53	menetelmien välillä on eroa
2,4-DNT	5,05	3,26	varianssit samat	2,23	0,11	menetelmien välillä ei ole eroa

Verrattaessa mekaanista ravistelua ja ASE -uuttoa vertailunäytteellä 1,0 mg/kg, vain 2,4-DNT saatiin määritettyä niin, että menetelmien välillä ei ollut tilastollista eroa 5% merkitsevyystasolla.

Taulukko 21. Menetelmien välinen vertailu *F*- ja *t*-testien avulla: mekaaninen ravistelu/MAE -uutto; 1,0 mg/kg

Yhdiste	<i>F</i> - kriittinen	<i>F</i> - laskettu	Arvio	<i>t</i> - kriittinen	<i>t</i> -laskettu	Arvio
TNT	5,05	1,15	variانسsit samat	2,23	13,10	menetelmien välillä on eroa
RDX	5,05	3,84	variانسsit samat	2,23	0,41	menetelmien välillä ei ole eroa
HMX	5,05	3,14	variانسsit samat	2,23	3,36	menetelmien välillä on eroa
1,3-DNB	5,05	1,07	variانسsit samat	2,23	0,90	menetelmien välillä ei ole eroa
2,4-DNT	5,05	3,06	variانسsit samat	2,23	5,23	menetelmien välillä on eroa

Verrattaessa mekaanista ravistelua ja MAE -uuttoa vertailunäytteellä 1,0 mg/kg, RDX ja 1,3-DNB saatiin määritettyä niin, että menetelmien välillä ei ollut tilastollista eroa 5% merkitsevyystasolla.

Taulukko 22. Menetelmien välinen vertailu *F*- ja *t*-testien avulla: ASE-/MAE -uutto; 1,0 mg/ kg

Yhdiste	<i>F</i> - kriittinen	<i>F</i> - laskettu	Arvio	<i>t</i> - kriittinen	<i>t</i> -laskettu	Arvio
TNT	5,05	11,09	variانسsit erisuuret	2,45	0,77	menetelmien välillä ei ole eroa
RDX	5,05	1,34	variانسsit samat	2,23	6,08	menetelmien välillä on eroa
HMX	5,05	1,08	variانسsit samat	2,23	4,39	menetelmien välillä on eroa
1,3-DNB	5,05	3,27	variانسsit samat	2,23	8,08	menetelmien välillä on eroa
2,4-DNT	5,05	1,06	variانسsit samat	2,23	4,10	menetelmien välillä on eroa

Verrattaessa ASE- ja MAE -uuttoa vertailunäytteellä 1,0 mg/kg, vain TNT saatiin määritettyä niin, että menetelmien välillä ei ollut tilastollista eroa 5% merkitsevyystasolla.

Esikäsitellymenetelmien vertailut F - ja t -testien avulla analyyttien saannon perusteella vertailunäytteelle 0,5 mg/kg löytyvät taulukosta 23 (mekaaninen ravistelu/ASE -uutto), taulukosta 24 (mekaaninen ravistelu/MAE -uutto) ja taulukosta 25 (ASE-/MAE -uutto).

Taulukko 23. Menetelmien välinen vertailu F - ja t -testien avulla: mekaaninen ravistelu/ASE-uutto, 0,5 mg/kg

Yhdiste	F kriittinen	F laskettu	Arvio	t kriittinen	t -laskettu	Arvio
TNT	5,05	2,89	variانسsit samat	2,23	1,51	menetelmien välillä ei eroa
RDX	5,05	15,03	variانسsit erisuuret	2,45	3,14	menetelmien välillä on eroa
HMX	5,05	1,90	variانسsit samat	2,23	1,81	menetelmien välillä ei eroa
1,3-DNB	5,05	5,36	variانسsit erisuuret	2,36	0,93	menetelmien välillä ei eroa
2,4-DNT	5,05	1,04	variانسsit samat	2,23	6,37	menetelmien välillä on eroa

Verrattaessa mekaanista ravistelua ja ASE -uuttoa vertailunäytteellä 0,5 mg/kg, TNT, HMX ja 1,3-DNB saatiin määritettyä niin, että menetelmien välillä ei ollut tilastollista eroa 5% merkitsevyystasolla.

Taulukko 24. Menetelmien välinen vertailu F - ja t -testien avulla: mekaaninen ravistelu/MAE -uutto, 0,5 mg/kg

Yhdiste	F - kriittinen	F - laskettu	Arvio	t - kriittinen	t -laskettu	Arvio
TNT	5,05	19,31	variانسsit erisuuret	2,45	0,26	menetelmien välillä ei eroa
RDX	5,05	8,60	variانسsit erisuuret	2,45	1,57	menetelmien välillä ei eroa
HMX	5,05	2,48	variانسsit samat	2,23	2,28	menetelmien välillä on eroa
1,3-DNB	5,05	1,55	variانسsit samat	2,23	2,50	menetelmien välillä on eroa
2,4-DNT	5,05	2,88	variانسsit samat	2,23	2,57	menetelmien välillä on eroa

Verrattaessa mekaanista ravistelua ja MAE -uuttoa vertailunäytteellä 0,5 mg/kg, TNT ja RDX saatiin määritettyä niin, että menetelmien välillä ei ollut tilastollista eroa 5% merkitsevyystasolla.

Taulukko 25. Menetelmien välinen vertailu F - ja t -testien avulla: ASE-/MAE -uutto, 0,5 mg/kg

Yhdiste	F - kriittinen	F - laskettu	Arvio	t - kriittinen	t -laskettu	Arvio
TNT	5,05	6,69	variانسsit erisuuret	2,45	3,20	menetelmien välillä on eroa
RDX	5,05	129,25	variانسsit erisuuret	2,57	3,66	menetelmien välillä on eroa
HMX	5,05	4,72	variانسsit samat	2,23	3,81	menetelmien välillä on eroa
1,3-DNB	5,05	8,33	variانسsit erisuuret	2,45	0,36	menetelmien välillä ei eroa
2,4-DNT	5,05	2,77	variانسsit samat	2,23	2,04	menetelmien välillä ei eroa

Verrattaessa ASE- ja MAE -uuttoa vertailunäytteellä 0,5 mg/kg, 1,3-DNB ja 2,4-DNT saatiin määritettyä niin, että menetelmien välillä ei ollut tilastollista eroa 5% merkitsevyystasolla.

10 Yhteenveto

Työn kokeellisessa osassa verrattiin kolmea eri näytteen esikäsittelymenetelmää, joita käytetään räjähdysaineita sisältävien maanäytteiden analysoinnissa. Esikäsittelymenetelmien vertailu suoritettiin viiden analyytin (TNT, RDX, HMX, 1,3-DNB ja 2,4-DNT) avulla, joiden pitoisuudet analysoitiin nestekromatografisesti HPLC -laitteistolla sisäisen standardin menetelmällä.

Yhdisteiden pitoisuusmäärittämisessä käytetyn HPLC -menetelmän validointi suoritettiin viiden (lineaarisuus, spesifisyys ja selektiivisyys, menetelmän toistotarkkuus ja oikeellisuus) validointiparametrin avulla. Yhdisteille määritettiin lineaarinen mittausalue välillä 0,05-5,0 mg/l. Analyyttien toteamisrajat (LOD) olivat 0,02-0,04 mg/l ja määrittämisrajat 0,05-0,11 mg/l. Menetelmä oli spesifinen ja selektiivinen kullekin analyyttille. Menetelmän toistotarkkuus (*RSD%* 0,5-5) oli samaa suuruusluokkaa kaikilla esikäsittelymenetelmillä, kun mittaukset suoritettiin vertailunäytteellä, jonka pitoisuus oli 1 mg/kg. Menetelmän toistettavuus huononi (*RSD%* 1-10%), kun mittaukset suoritettiin vertailunäytteelle 0,5 mg/kg. HPLC -menetelmän oikeellisuus testattiin saantotestien avulla. Tarkimpia ja oikeellisimpia tuloksia saatiin määritettyä uuttamalla näytteet mekaanisella ravistelulla (saannot 96-106%). Myös MAE -uutolla päästiin lähes samanlaisiin tuloksiin (saannot 97-107%, poikkeavana analyytinä RDX saannolla 115%). Tulosten oikeellisuus oli huonoimmillaan (saannot 91-110%), kun näytteet uutettiin ASE -uutolla.

Esikäsittelymenetelmien vertailu suoritettiin kahdella eri pitoisuustasolla; 0,5 mg/kg (slurry 1) ja 1,0 mg/kg (slurry 2) vertaamalla sisäisen standardin menetelmällä mitattuja analyyttien saantoja ja uuttomenetelmien tehokkuutta (recovery). Esikäsittelymenetelmien vertailu suoritettiin mittaustuloksista laskettujen keskiarvojen, *SD*:jen sekä tilastollisten testien (*F*- ja *t*-testit) avulla. *F*-testin avulla arvioitiin menetelmien satunnaisvirhettä ja *t*-testin avulla niiden systemaattista virhettä. Menetelmien välistä eroa tarkasteltiin 5% merkitsevyystasolla.

Esikäsittelymenetelmien välillä oli jonkin verran (ei kuitenkaan huomattavia) eroja, kun analyyttien pitoisuudet mitattiin sisäisen standardin menetelmällä (Ver-

tailunäyte 1,0 mg/kg saannot 90-98%, vertailunäyte 0,5 mg/kg saannot 80-89%.) Myös menetelmien välisissä hajonnoissa olleet erot olivat melko pieniä. Kun tuloksia tarkasteltiin tilastollisesti, esikäsitteilymenetelmien välillä havaittiin eroja 5% merkitsevyytasolla riippuen määritetystä analyytistä. Vertailunäytteelle 1,0 mg/kg lasketuissa t -testeissä eroja havaittiin useimmille analyyteille, kun vertailunäytteen 0,5 mg/kg kohdalla. Vertailunäytteelle 1,0 mg/kg lasketut F -testit osoittivat menetelmien satunnaisvirheiden olevan samanlaiset (varianssit samat) riippumatta määritetystä analyytistä, mutta vertailunäytteelle 0,5 mg/kg lasketuissa F -testeissä havaittiin satunnaisvirheiden eroavaisuuksia (varianssit erisuuret) useampien analyyttien kohdalla.

Kun HPLC -menetelmän validoinnin yhteydessä tarkasteltiin menetelmän oikeellisuutta, analyyttien saannot (0,5 mg/l; 98-108% ja 1,0 mg/l; 93-106%) olivat jonkin verran parempia kuin esikäsitteilymenetelmien vertailussa saadut saannot (0,5 mg/kg; 80-89% ja 1,0 mg/kg; 90-98%). HPLC-menetelmän validoinnissa näytteet valmistettiin pipetoimalla tietty määrä (0,25; 0,5; 1,0 ja 5,0 mg/l) seosstandardia näytematriisiin eli 0 -maahan (yksi näyte/pitoisuus) ja uuttamalla analyytit kaikilla kolmella uuttomenetelmällä, kun taas esikäsitteilymenetelmien vertailussa näytteenä oli itse valmistettu slurry -tekniikalla tehty vertailunäyte (1 kg:aan 0 -maata pipetoitiin tietty määrä seosstandardia ja se "levitettiin" hiekkään asetonin avulla, joka lopuksi haihdutettiin pois), jonka osanäytteille (näytemäärä 16 g) tehtiin kuusi rinnakkaismäärittystä. Erot saattavat johtua siitä, että validoinnin yhteydessä analyytit pipetoitiin 0 -maahan juuri ennen uuttoa, kun taas esikäsitteilymenetelmien vertailussa slurryt valmistettiin jopa viikkoja ennen uuttoja eli validoinnissa käytetyt näytteet olivat "tuoreempia" kuin vertailunäytteet (slurryt). Myös Lopez-Avila *et al.* ovat havainneet tutkimuksissaan vanhenettujen näytteiden antavan huonompia saantoja kuin juuri ennen uuttoa valmistetut näytteet, kun he arvioivat MAE -uuton käyttökelpoisuutta ja tehokkuutta orgaanisten yhdisteiden uuttamiseksi maanäytteistä.³⁰

Verrattaessa esikäsitteilymenetelmien uuttotehokkuutta (recovery) ASE -uutolla saavutettiin parhaimmat tulokset (uuttotehokkuus 75-95%). Mekaanisella ravistelulla päästiin 75-85% uuttotehokkuuteen. MAE -uuton tehokkuus jäi hyvin alhaisiksi (40-50%), mikä on askarruttavaa, sillä kirjallisuudesta löytyneet arviot²⁹⁻³³ MAE -uuton sopivuudesta maanäytteiden uuttamiseen ovat olleet todella lu-

paavia. MAE -uutto oli PVTT:ssa ensimmäistä kertaa käytössä orgaanisessa liuotinuutossa, joten uuttomenetelmän optimointia (uuttoaika, lämpötila, liuotin ja näytemäärä) pitää tulevaisuudessa jatkaa, jotta päästäisiin saantoihin, joita tutkimusryhmät muualla maailmassa ovat saavuttaneet.

Kaiken kaikkiaan verrattaessa esikäsitteilymenetelmiä keskenään, mekaaninen ravistelu havaittiin olevan suhteellisen tarkka ja toistettava menetelmä, jolla on kohtalainen uuttotehokkuus. ASE -uuttolaitteisto oli tekniseltä toimintavarmuudeltaan huono (uutot keskeytyivät usein liuotinhöyrysensorin vikailmoituksen takia), mutta se oli uuttotehokkuudeltaan paras. MAE -uutto oli suhteellisen tarkka ja toistettava menetelmä, mutta sen uuttotehokkuus oli huono, joten menetelmän kehitystyötä jatkettava tulevaisuudessa.

11 Kirjallisuusviitteet

1. R. D. Albright, *Cleanup of Chemical and Explosive Munitions*, William Andrew Inc., New York, USA, 2008, ss. 38-39.
2. K. Ayoub, E. D. van Hullebusch, M. Cassir and A. Bermond, Application of advanced oxidation processes for TNT removal: A review, *J. Hazard. Mater.*, **2010**, *178*, 10-28.
3. T. J. Janssen, *Explosive Materials Classification, Composition and Properties*. Kirjassa: T. J. Janssen (toim.), *Materials Science and Technologies*, Nova Science Publishers, Inc., New York, 2011, ss. 203-205.
4. J. Yinon, *Forensic and Environmental Detection of Explosives*, John Wiley & Sons Ltd, England, 1999, s. 187.
5. Soils contaminated with explosives: Environmental fate and evaluation of state-of-the-art remediation processes (IUPAC Technical Report), <http://www.iupac.org/publications/pac/pdf/2011/pdf/8307x1407.pdf>, IUPAC (02.12.2011).
6. J. Yinon, *Toxicity and Metabolism of Explosives*, CRC Press, Inc., Boca Raton, USA, 1990, ss. 3-23.
7. A. J. Handley, *Extraction Methods in Organic Analysis*. Kirjassa: R. N. Ibbett (toim.), *Sheffield Analytical Chemistry*, Sheffield Academic Press Ltd, England, 1999, s. 155.
8. C. Sparr Eskilsson and E. Björklund, Analytical-scale microwave-assisted extraction, *J. Chromatogr. A*, **2000**, *902*, 227-250.
9. R. Meyer, J. Köhler and A. Homburg, *Explosives*, Sixth Completely Revised Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2007, ss. 336-339.
10. Toxicological profile for 2,4,6-trinitrotoluene, <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp81.pdf>, U.S. Department of health and human services Public Health Service (02.12.2011).
11. Sci Finder: Explore substances, <https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>, American Chemical Society (26.02.2012).
12. Toxicological profile of HMX, <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp98.pdf>, U.S. Department of health and human services Public Health Service (16.2.2012).
13. J. Hawari, S. Beaudet, A. Halasz, S. Thiboutot and G. Ampleman, Microbial degradation of explosives: biotransformation versus mineralization, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2000**, *54*, 605-618.

14. J. C. Pennington and J. M. Brannon, Environmental fate of explosives, *Thermochim. Acta*, **2002**, 384, 163-172.
15. Phytotoxicity (Plant tolerance), http://www.ecn.nl/docs/society/horizontal/hor8_phytotoxicity.pdf (16.2.2012).
16. H. Sirén, P. Perämäki and J. Laiho, *Esikäsittelyn käsikirja*, Kemian kustannus Oy, Helsinki, 2009, ss. 13-20.
17. U.S EPA Method 3545A, Pressurised fluid extraction, <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3545a.pdf>, U.S Environmental Protection Agency (06.01.2012).
18. U.S EPA method 3546, Microwave extraction, <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3546.pdf>, U.S Environmental Protection Agency (02.12.2011).
19. U.S EPA method 3500C, Organic extraction and sample preparation, <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3500c.pdf>, U.S Environmental Protection Agency (07.01.2012).
20. R. E. Majors, An overview of sample preparation methods for solids, *LCGC North Am.*, **1999**, 17, S8-S8.
21. B. E. Richter, The extraction of analytes from solid samples using accelerated solvent extraction, *LCGC North Am.*, **1999**, 17, S22-S22.
22. E. Björklund, T. Nilsson and S. Bøwadt, Pressurised liquid extraction of persistent organic pollutants in environmental analysis, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **2000**, 19, 434-445.
23. ASE 200 Accelerated solvent extractor operator's manual, <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/57733-31149-04.pdf>, Dionex Corporation (28.02.2012).
24. Dionex ASE 150 and 350 systems, <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/4035-Bro-ASE-Systems-25Oct2010-LPN2012-04.pdf>, Dionex (06.02.2012).
25. California Environmental Protection Agency Department of Toxic Substances Control, *Evaluation report Technology: Microwave-Accelerated Reaction System, Model MARS-X, for the Extraction of Organic Pollutants from Solid Matrices*, California Environmental Protection Agency Department of Toxic Substances Control, California, USA, 2000.
26. G. LeBlanc, Microwave-accelerated techniques for solid sample extraction, *LCGC North Am.*, **1999**, 17, S30-S30.
27. P. Lidström, J. Tierney, B. Wathey and J. Westman, Microwave assisted organic synthesis—a review, *Tetrahedron*, **2001**, 57, 9225-9283.

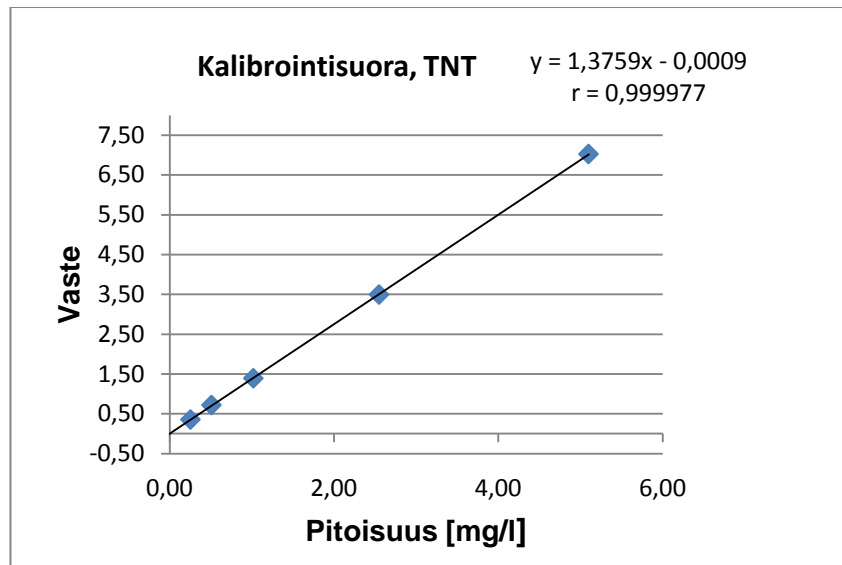
28. U.S EPA Method 8330 B: Nitroaromatics, nitramines and nitrate esters by HPLC, <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/pdfs/8330b.pdf>, U. S. Environmental Protection Agency (02.12.2011).
29. O. Zuloaga, N. Etxebarria, L. A. Fernández and J. M. Madariaga, Comparison of accelerated solvent extraction with microwave-assisted extraction and Soxhlet for the extraction of chlorinated biphenyls in soil samples, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **1998**, *17*, 642-647.
30. V. Lopez-Avila, R. Young, J. Benedicto, P. Ho and R. Kim, Extraction of organic pollutants from solid samples using microwave energy, *Anal. Chem.*, **1995**, *67*, 2096-2102.
31. A. Pastor, E. Vázquez, R. Ciscar and M. de la Guardia, Efficiency of the microwave-assisted extraction of hydrocarbons and pesticides from sediments, *Anal. Chim. Acta*, **1997**, *344*, 241-249.
32. P. Wang, Q. Zhang, Y. Wang, T. Wang, X. Li, L. Ding and G. Jiang, Evaluation of Soxhlet extraction, accelerated solvent extraction and microwave-assisted extraction for the determination of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in soil and fish samples, *Anal. Chim. Acta*, **2010**, *663*, 43-48.
33. S. Sporning, S. Bøwadt, B. Svensmark and E. Björklund, Comprehensive comparison of classic Soxhlet extraction with Soxtec extraction, ultrasonication extraction, supercritical fluid extraction, microwave assisted extraction and accelerated solvent extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil, *J. Chromatogr. A*, **2005**, *1090*, 1-9.
34. W. J. Lough and I. W. Wainer, *High Performance Liquid Chromatography : Fundamental Principles and Practice*, Chapman & Hall, London, cop., 1996, s. 15.
35. Introduction to chromatography, http://anchem.univie.ac.at/fileadmin/user_upload/anchem/Introduction_to_Chromatography.pdf, Institute for Analytical Chemistry, University of Vienna (27.12.2011).
36. V. R. Meyer, *Pitfalls and Errors of HPLC in Pictures*. Kirjassa: W. Dünges (toim.), *Desk Library of Chemistry*, Hüthig GmbH, Heidelberg, 1997, s. 16.
37. M. C. McMaster, *HPLC, a Practical User's Guide*, VCH Publishers, Inc., New York, USA, 1994, ss. 4-13.
38. D. C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, Sixth Edition, W.H. Freeman and Company, New York, USA, 2003, s. 618.
39. T. Hanai, *HPLC A Practical Guide*. Kirjassa: R. M. Smith (toim.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1999, ss. 11-25.

40. Waters, High Performance Liquid Chromatography, http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10049055&locale=en_FI, Waters (06.02.2012).
41. L. R. Snyder, J. J. Kirkland and J. L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, Second Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, 1997, ss. 186-187.
42. EURACHEM Guide, <http://www.eurachem.org/guides/pdf/valid.pdf>, Eurachem (02.12.2011).
43. W. Funk, V. Dammann and G. Donnevert, *Quality Assurance in Analytical Chemistry*, Second Completely Revised and Enlarged Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim, Germany, 2007, ss. 1-7.
44. P. Konieczka and J. Namiesnik, *Quality Assurance and Quality Control in Analytical Chemical Laboratory*, Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, FL, 2009, ss. 131-134.
45. M. Swartz and I. Krull, Analytical method validation: back to basics, part I. *LCGC North Am.*, **2009**, 27, 989-990, 992-995.
46. P. C. Meier and R. E. Zünd, *Statistical Methods in Analytical Chemistry*. Kirjassa: J. D. Winefordner and I. M. Kolthoff. (toim.), *Analytical Chemistry and Its Applications*, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, 1993, ss. 84-85.
47. Ph Quevauviller, E. A. Maier and B. Griepink, *Quality Assurance for Environmental Analysis*. Kirjassa: Ph Quevauviller, E. A. Maier and B. Griepink. (toim.), *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands, 1995, s. 19.
48. U.S EPA method 8000 B, Determinative chromatographic separations, <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8000b.pdf>, U.S Environmental Protection Agency (02.12.2011).
49. J. W. Dolan, Calibration Curves, Part II: What are the Limits? *LCGC North Am.*, **2009**, 27, 306-306,308,310,312.
50. UC Davis chemwiki:HPLC, http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/High_performance_liquid_chromatography, University of California (28.02.2012).
51. A. Väisänen, *Kemiallisten tulosten tarkastelu tilastollisin menetelmin*, Jyväskylä, 2010.

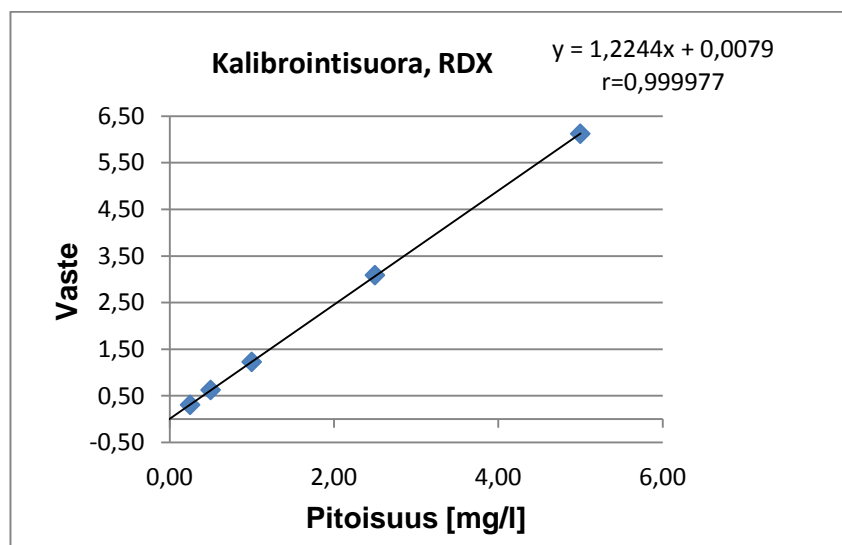
Liitteet

LIITE 1 a-c Määritettyjen analyyttien kalibrintisuorat (kuvat 19-23)

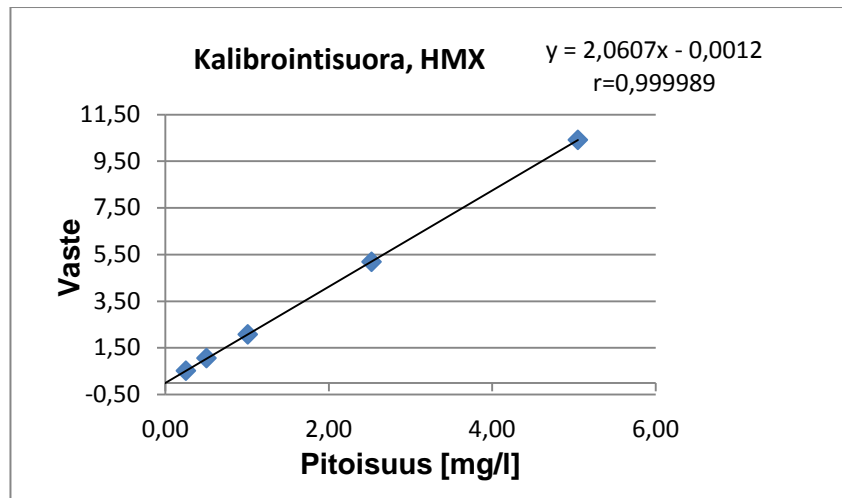
LIITE 2 a-b Määritettyjen analyyttien residuaalikuvaajat (kuvat 24-28)



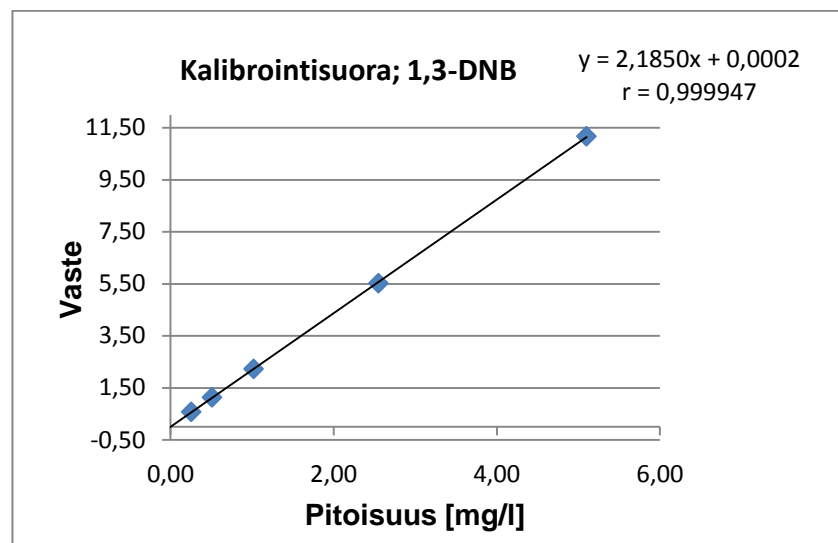
Kuva 19. TNT:n kalibrintisuora.



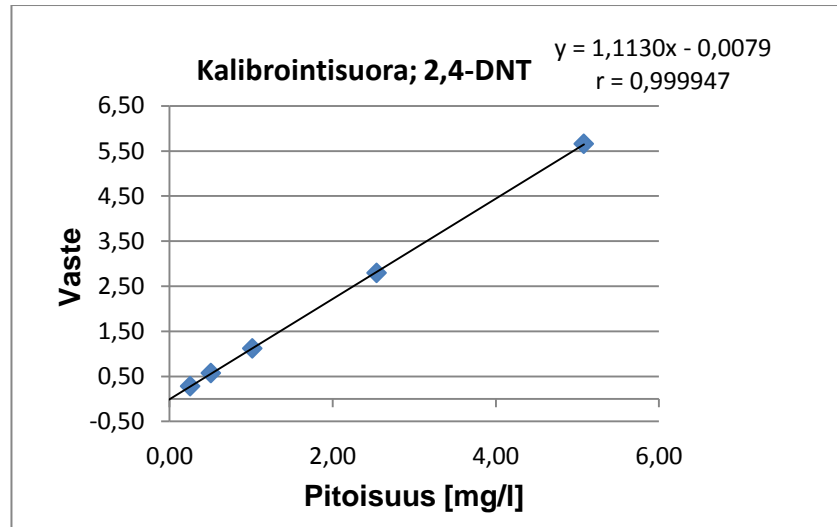
Kuva 20. RDX:n kalibrintisuora.



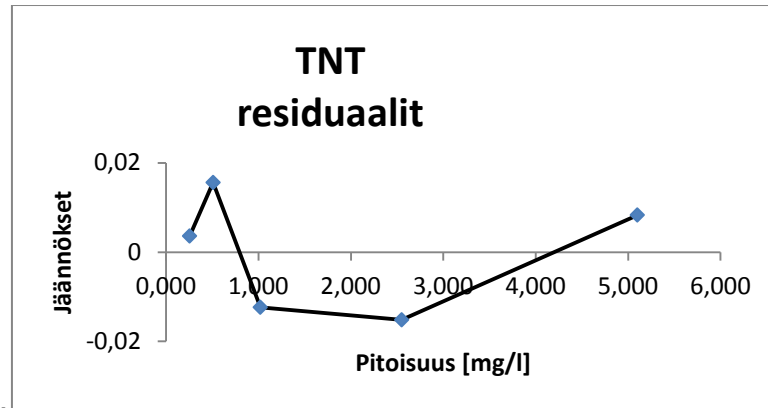
Kuva 21. HMX:n kalibrointisuora.



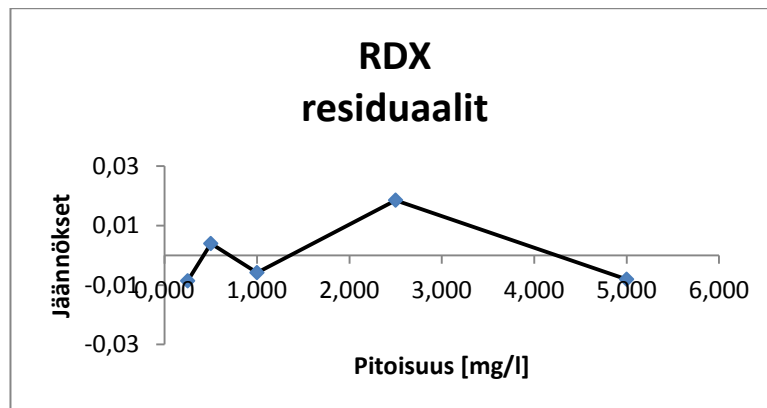
Kuva 22. 1,3-DNB:n kalibrointisuora.



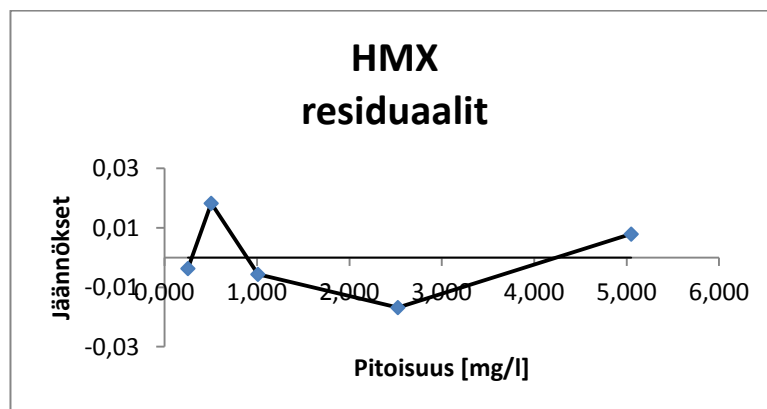
Kuva 23. 2,4-DNT:n kalibrointisuora.



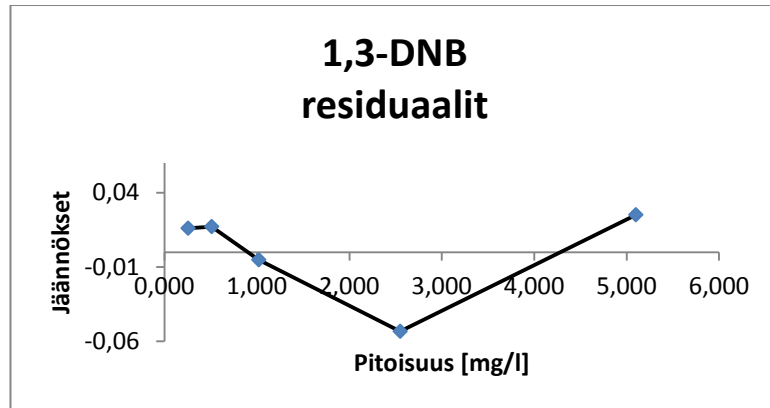
Kuva 24. TNT:n residuaalit.



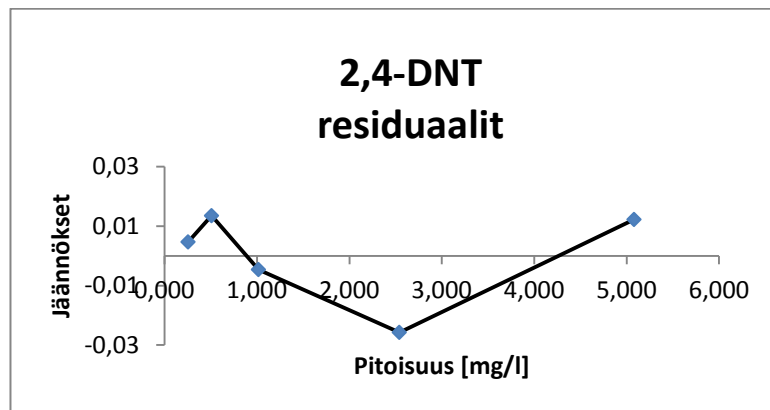
Kuva 25. RDX:n residuaalit.



Kuva 26. HMX:n residuaalit.



Kuva 27. 1,3-DNB:n residuaalit.



Kuva 28. 2,4-DNT:n residuaalit.