

**Seleeni- ja elohopeapitoisuuksien määrittäminen biologisista  
näytteistä CVG-ICP-OES -menetelmällä**

Pro gradu -tutkielma  
Jyväskylän yliopisto  
Kemian laitos  
Analyttisen kemian osasto  
2016  
Toni Louhenvirta

## Tiivistelmä

Tämän Pro gradu -tutkielman kirjallisessa osassa käsitellään monipuolisesti elohopeaa ja seleeniä käyden läpi muun muassa niiden ominaisuuksia ja käyttökohteita, niiden vaikutusta terveyteen, sekä määriä ravinnossa ja muissa lähteissä. Tämän lisäksi kirjoitelmassa käsitellään näytteenkäsittelymenetelmistä ultraääni- ja mikroaaltohajotukset, sekä kemialliseen höyryn muodostukseen mahdollisesti tarvittu esipelkistys. Analyysimenetelmänä läpi käydään kokeellisessa osassa käytetyn induktiivisesti kytketty plasma-optinen emissiospektrometri (ICP-OES) -laitteen tekniikkaa, sekä kemiallisen höyryn muodostuksen periaatteet ja siinä käytetty laitteisto. Myös mahdolliset mittauksissa esiintyvät häiriöt käydään tarvittavilta osin läpi.

Työn kokeellisessa osassa tutkittiin elohopean ja seleenin määrittämistä kemiallisen höyryn muodostus induktiivisesti kytketty plasma-optinen emissiospektrometri (CVG-ICP-OES) -laitteistolla käyttäen alussa referenssimateriaalia TORT-2 (hummerin haima), ja lopulliset tulokset saatiin referenssimateriaaleilla TORT-3 (hummerin haima), sekä DOLT-5 (kalan maksa). Näytteiden lopullisena liuotusmenetelmänä päädyttiin käyttämään mikroaaltouunihajotusta ja erilaisten liuosvaihtoehtojen jälkeen toimivammaksi todettiin yhteistilavuudeltaan 8 ml hajotusliuos, jossa oli 3 ml kuningasvettä, 2 ml vetyperoksidia ja 3 ml vettä. Näin happotausta säilyi maltillisena elohopean määrittämistä varten, minkä pitoisuus näytteessä oli pienin ja liiallista laimennosta haluttiin välttää. Pelkistimenä elohopealla päädyttiin käyttämään 1 %  $\text{SnCl}_2$ :ta, joka oli 2,5 % HCl taustassa. Seleenillä pelkistyksessä käytettiin 0,3 %  $\text{NaBH}_4$ :ä, joka oli 0,05 % NaOH:ssa. Kosteutta referenssimateriaaleilla oli TORT-3:lla ( $4,2 \pm 0,1$ ) % ja DOLT-5:llä ( $11,6 \pm 0,3$ ) %, joista jälkimmäinen on selkeästi suurempi kuin valmistajan arvioima kosteusprosentti. Referenssimateriaaleille saannoiksi saatiin kosteusprosentti huomioiden TORT-3:lla elohopealle 85,2 % ja seleenille 82,6 %. DOLT-5:llä saanto elohopealle oli 100,7 % ja seleenille 98,9 %.

## **Esipuhe**

Tämän Pro gradu -tutkielman kokeellinen osa tehtiin syksyn 2015 ja kevään 2016 aikana Jyväskylän epäorgaanisen ja analyttisen kemian osastolla. Kirjallinen osa on kirjoitettu samoin vuoden 2015 syksyn ja kevään 2016 aikana. Työn ohjaajana toimivat epäorgaanisen ja analyttisen kemian dosentti Ari Väisänen sekä tohtorikoulutettava Esa Lehtimäki.

Työssä on käytetty monipuolisesti analyttisen kemian kirjallisuutta ja julkaisuja. Käytettyjä hakukoneita olivat muun muassa Google Scholar ja SciFinder.

Haluan kiittää työn ohjaukseen liittyneistä neuvoista ja ideoista ohjaajiani Ari Väisästä ja Esa Lehtimäkeä. Kiitos kuuluu myös analyttisen kemian osastolla samaan aikaan työskennelleille tutkijatohtori Siiri Perämäelle ja tohtorikoulutettava Enni Nygrenille saamistani neuvoista varsinkin käytettyyn ICP-laitteistoon liittyen. Haluan kiittää myös perhettäni ja ystäviäni kaikista positiivisista kommentista ja tuesta tämän viimeisen prosessin aikana.

## Sisällys

1 Johdanto .....	1
2 Seleenin .....	2
2.1 Yleistietoa.....	2
2.2 Seleenin ja terveys .....	3
3 Elohopea.....	5
3.1 Yleistietoa.....	5
3.2 Elohopea ja terveys .....	6
3.3 Elohopea ympäristössä .....	9
3.4 Ihmisen altistuminen elohopealle .....	11
3.4.1 Ilma ja vesi.....	11
4 Seleenin ja elohopea ravinnossa.....	14
4.1 Elohopea eri ravintolähteissä.....	14
4.2 Seleenin eri ravintolähteissä .....	15
4.3 Elohopea ja seleeni vedenelävissä.....	17
5. Biologisten näytteiden käsittely .....	21
5.1 Liuotus.....	21
5.1.1 Ultraäänihajotus .....	22
5.1.2 Mikroaaltohajotus .....	24
5.2 Näytteiden esipelkistys .....	28
6 ICP-OES -laitteisto .....	29
6.1 Yleistä.....	29
6.2 Laitetekniikka .....	30
6.2.1 Plasma.....	30
6.2.2 Näytteensyöttö .....	33
6.2.3 Spektrometrit ja ilmaisimet.....	38
7 Kemiallinen höyryn muodostus .....	42
7.1 Hydridin muodostus ja kylmähöyrytekniikka .....	43
7.2 FIAS-400 .....	45
7.3 Pelkistimien käyttö .....	47
7.3.1. Pelkistimen valinta elohopean määrittämisessä.....	47
8 Ongelmat analyyseissä .....	50
8.1 Muiden alkuaineiden vaikutus saantoihin .....	51
<b>KOKEELLINEN OSUUS .....</b>	<b>53</b>
9 Laitteisto.....	54
10 Reagenssit .....	54
11 TORT-2 Hummerin haima.....	57

11.1	Liutusmenetelmän valinta .....	57
11.2	Menetelmän optimointi .....	60
11.2.1	Näytteen liutus .....	60
11.2.2	Häiriöt pelkistyksessä .....	61
11.3	Ensimmäiset CVG-ICP-OES mittaukset ja niiden kehittyminen .....	62
12	TORT-3 Hummerin haima .....	65
12.1	Lähtökohdat .....	65
12.2	Mikroaaltohajotusmenetelmän luominen ja optimointi .....	66
12.3	Mittaukset .....	68
12.3.1	Elohopea .....	68
12.3.2	Seleenit .....	71
13	DOLT-5 Kalan maksa .....	73
14	Kosteuden määrittäminen .....	73
15	Tulokset ja johtopäätökset .....	74
15.1	TORT-3 Hummerin haima .....	74
15.2	DOLT-5 Kalan maksa .....	76
16	Yhteenveto .....	78
17	Lähteet .....	81

## LYHENTEET

AAS	Atomiabsorptiospektrometria (Atomic Absorption Spectrometry)
CCD	Varauskytkentädetektori (Charge-Coupled Device)
CID	Varausinjektiodetektori (Charge Injection Device)
CTD	Varauksensiirtodetektori (Charge Transfer Device)
CV	Kylmähöyry (Cold Vapor)
CVG	Kemiallinen höyryn muodostus (Chemical Vapor Generation)
DTPA	Dietyleenitriamiinipentaetikkahappo
EDTA	Etyleenidiamiinitetraetikkahappo
EIE	Helposti ionisoituvat alkuaineet (Easily Ionizable Elements)
EPA	Yhdysvaltain ympäristönsuojeluvirasto (United States Environmental Protection Agency)
ETAAS	Elektrotermenäinen atomiabsorptiospektrometria eli Grafiittiuniteknikka (Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry)
ECG	Sähkökemiallinen hydridin muodostus (Electrochemical Hydride Generation)
FAAS	Liekkiatomiabsorptiospektrometria (Flame Atomic Absorption Spectrometry)
HG	Hydridin muodostus (Hydride Generation)
ICP-OES	Induktiivisesti kytketty plasma-optinen emissiospektrometria (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry)
IRZ	Esisäteilyalue (Initial Radiation Zone)
MIP	Mikroaalloilla indusoitu plasma (Microwave Induced Plasma)
MS	Massaspektrometria (Mass Spectrometry)
MSP	”Mikroliuska” plasma (Microstrip Plasma)
NAZ	Analyttinen alue (Normal Analytical Zone)
PHZ	Esilämmitysalue (Preheating Zone)

PVG	Fotokemiallinen höyryn muodostus (Photochemical Vapor Generation)
THB	Tetrahydroboraatti
WHO	Maailman terveysjärjestö (World Health Organization)

## 1 Johdanto

On yleisesti tiedossa, että erityisesti teollistumisen myötä ihmisen vaikutus ympäristöön on ollut hyvin negatiivista lisääntyneiden päästöjen myötä. Ongelmat ovat sekä paikallisia että maailmanlaajuisia vaihdellen otsonikadosta ja ilmastonmuutoksesta erilaisiin lähialueiden saastumisiin. Yleisesti ottaen ilmiöt voidaan jakaa helposti eri vakavuusasteisiin ja saastumisen kannalta varsinkin vesi ja ilma ovat hyvin riskialttiita ollessaan elämälle välttämättömiä, mutta ne voivat myös potentiaalisesti levittää saasteita laajalle alueelle toisin kuin maaperä. Kuitenkin kaikenlainen elinympäristön saastuminen voidaan nähdä potentiaalisena terveydellisinä uhkana; maaperästä saadaan ravintoa, samoin kuin vedestä juomisen lisäksi ja ilmaa tarvitsevat kasveja lukuun ottamatta lähes kaikki elävät eliöt. Erinäisten havaittujen ympäristöongelmien ja niiden aiheuttamien terveydellisten vaikutusten seurauksena varsinkin ravinnon ja juomaveden puhtauteen onkin alettu kiinnittää yhä enemmän huomiota.

Ravinnosta saatavat ravintoaineet voidaan jakaa makro- ja mikroravinteisiin sen mukaan, mikä niiden tarve on organismilla. Makroravinteisiin kuuluvat esimerkiksi hiili, typpi, fosfori, kalsium, kalium, rauta, natrium, magnesium ja rikki. Mikroravinteita eli hivenaineita tarvitaan elimistössä vähän ja niitä ovat esimerkiksi usein myös analyttisen tutkimuksen kohteena olevat koboltti, kromi, kupari, mangaani, nikkeli, sinkki ja tina.<sup>1,2</sup> Tämän gradun aiheena oleva seleeni kuuluu myös hivenaineisiin, joista poiketen sen erikoisuutena on hyvin kapea ikkuna tarvittavan ja toksisen määrän välillä. Saantisuositukset ja arviot suurimmasta turvallisen saannin rajasta vaihtelevat maiden ja organisaatioiden välillä, mutta saantisuosituksena Suomessa vuorokaudessa miehillä ja raskaana olevilla naisilla on 60 µg ja muutoin naisilla 50 µg<sup>3</sup>. Suurimmaksi turvallisen saannin rajaksi mainitaan esimerkiksi WHO:n vuoden 2011 tiedotteessa 400 µg<sup>4</sup>.

Makro- ja mikroravinteiden lisäksi ihmiset voivat saada ravinnosta myös haitallisia alkuaineita, kuten lyijyä, kadmiumia ja gradussa toisena tutkinnan kohteena olevaa alkuainetta, elohopeaa. Ravintoon näitä päätyy sekä luonnollisista lähteistä että ihmisen päästöistä. Kyseisille alkuaineille ei ole ainakaan vielä löydetty mitään fysiologista tarvetta, minkä takia niiden voidaan ajatella olevan puhtaasti toksisia. Elohopean haitallisuus on vahvasti sidoksissa siihen missä muodossa se on sille altistuttaessa. Esimerkiksi Eviran sivuilla on mainittu EU:n asettamat siedettävät päivittäisen saannin



rajat, jotka ovat metyylielohopealle 0,23 µg/kg (kehon paino) ja epäorgaaniselle elohopealle 0,57 µg/kg (kehon paino). Sallittu elohopean enimmäispitoisuus esimerkiksi ravintolisissä on 0,1 mg/kg. Kalanlihassa raja vaihtelee kalalajista riippuen ollen joko 0,5 tai korkeampi 1,0 mg/kg (mm. hauki, tonnikalat). Arvion mukaan metyylielohopeaa saadaan ravinnosta tällä hetkellä keskimäärin 0,11 µg/kg.<sup>5,6</sup>

## 2 Seleen

### 2.1 Yleistietoa

Seleen on jaksollisen järjestelmän ryhmään 16 kuuluva puolimetalli, jonka löysi ruotsalainen kemisti Jöns Jacob Berzelius vuonna 1817 rikkihapon valmistusprosessin aikana.<sup>7-9</sup> Tällöin hänen huomionsa kiinnittyi rikin poltossa saadun punaisen massan hajuun, mitä ensin luultiin jo vuonna 1783 löydettyksi telluuriksi<sup>10</sup>, mutta kun yhtään telluuria ei massasta löydetty, todettiin jatkotutkimusten perusteella kyseessä olevan uusi alkuaine. Happiryhmään kuuluva alkuaine on jaksollisessa järjestelmässä järjestysluvulla 34 rikin alapuolella, mitä Berzeliuskin totesi seleenin vahvasti muistuttavan.<sup>9,11,12</sup> Seleen esiintyy luonnossa neljällä hapetusasteella (VI, IV, 0, -II), joista tunnusomaiset molekyylit ovat<sup>13</sup>:

Se(VI)  $\text{SeO}_4^{2-}$  seleniatti

Se(IV)  $\text{SeO}_3^{2-}$  seleniitti

Se(0)  $\text{Se}^0$  alkuaine seleeni

Se(-II)  $\text{HSe}^-$  selenidi

Alkuaineella on kuusi pysyvää isotooppia: <sup>74</sup>Se, <sup>76</sup>Se, <sup>77</sup>Se, <sup>78</sup>Se, <sup>80</sup>Se ja <sup>82</sup>Se. Näiden suhteelliset osuudet luonnossa ovat 0,89 %; 9,37 %; 7,63 %; 23,77 %; 49,61 % ja 8,73 %.<sup>7</sup> Ulkonäöltään seleeni on olomuodosta riippuen joko hopeanhohtoinen metalli tai punainen jauhe, joka on myös amorfina.<sup>7,14</sup> Elektronikonfiguraatio seleenillä on  $[\text{Ar}]3d^{10}4s^24p^4$ , ja nimen seleeni Berzelius otti kreikankielen sanasta *selene*, joka tarkoittaa kuuta. Syynä tälle oli telluuria muistuttava ulkonäkö, jonka nimi puolestaan tulee latinankielen sanasta *tellus* eli maa.<sup>15,16</sup>

Seleen on yksi maankuoren harvinaisimmista alkuaineista ja arvioiden mukaan sen pitoisuus vaihtelee maankuoressa välillä 0,05 – 0,09 ppm. Seleenä tavataan varsinkin

rikkipitoisten sulfidimalmien, kuten rikki- ja kuparikiisun yhteydessä. Koska samoja malmeja tavataan vulkaanisilla alueilla, seleenin eräs yleisimmistä vapautumistavoista kallioperästä ympäristöön ovat tulivuorenpurkaukset ihmisen toiminnan ohella. Seleenin erottaminen malmeista puhtaasti seleenin saannin takia ei ole kannattavaa, sen sijaan seleeniä saadaan yleisimmin kuparin jalostuksen sivutuotteena. Tällöin sitä saadaan joko savukaasujen suodatuspölystä tai yleisimmin nykypäivänä anodilta elektrolyysiin pohjautuvassa kuparin erotuksessa<sup>17</sup>. Seleeniä saadaan myös rikkihapon valmistuksen yhteydessä. Suurimpia seleenin tuottajia ovat Japani, Kanada, Belgia, USA ja Saksa.<sup>13-15</sup> Kuten monien muiden alkuaineiden, myös seleenin määrä maaperässä vaihtelee hyvin paljon eri maiden ja alueiden mukaan. Suomessa seleeniä on pääpiirteisesti hyvin niukasti, minkä takia sitä lisätään lannoitteisiin. Ravinnosta seleeniä ihmiset saavat pääasiassa täysjyväviljasta, juustosta ja lihasta.<sup>16</sup>

Seleenillä on monta käyttötarkoitusta; sitä käytetään muun muassa lasituotteissa lisäaineena, jolloin se pieninä pitoisuuksina neutraloi usein rautayhdisteiden aiheuttamaa vihertävää väriä, mutta suurempina pitoisuuksina se tuo luonteenomaista punaista väriään lasiin. Sitä käytetään myös pigmenteissä keramiikkaan, maaliin ja muoveihin. Seleeni myös voi muuttaa valoa sähköksi ja sen sähkönvastustuskyky pienenee valovoiman kasvaessa; tämän takia seleeniä käytetään muun muassa valokennoissa, aurinkokennoissa ja valokopiokoneissa. Se voi muuttaa myös AC virtaa DC:ksi (vaihtovirta tasavirraksi), minkä takia sitä käytetään tasavirtaajissa. Näiden lisäksi seleeniä käytetään hilseshampoissa (seleenisulfidi) ja lisäaineena ruostumattoman teräksen valmistuksessa.<sup>7</sup> Seleeni on myös puolijohde, minkä takia sitä käytetään elektroniikkalaitteissa, kuten transistoreissa esimerkiksi tietokoneissa ja matkapuhelimissa.<sup>14</sup>

## 2.2 Seleeni ja terveys

Yleisesti ottaen seleenin vaikutus terveyteen on hyvin vahvasti sidoksissa siihen, missä muodossa se on. Monien muiden alkuaineiden tavoin seleenin yhdisteistä osa on vaarattomia ja osa, kuten vetyselenidi  $H_2Se$ , ovat myrkyllisiä<sup>15</sup>. Ravinnosta saatu seleeni on yleensä eläintuotteissa selenaatina, seleniittinä, selenometioniinina (SeMet) ja selenokysteiinina (SeCys). Kasveissa seleeni taas on yleisimmin muodoissa seleniitti, seleniitti ja (SeMet); myös muotoja SeCys, Se-metyyli-selenokysteiini (SeMCys), sekä GGSeMCys ( $\gamma$ -Glutamyyli-Se-metyyliselenokysteiini) esiintyy pienemmissä määrin.<sup>18,19</sup>

Nykyisen tietämyksen mukaan kasvit eivät tarvitse seleeniä, mutta sen sijaan rikki on runsaassa käytössä. Jos seleeniä on maaperässä, käyttävät kasvit sitä rikin tapaan toimintaansa. Jos rikkiä on maaperässä vähänlaisesti, voi seleenipitoisuus kasveissa nousta korkeaksikin, jolloin se voi kasvinsyöjien mukana kulkeutua ravintoketjussa eteenpäin.<sup>8</sup>

Hivenaineena seleeniä vaaditaan ravinnosta tarvittava määrä ja liian pieni määrä voi johtaa puutostiloihin. Seleenin tärkeys johtuu todennäköisesti sen tärkeästä roolista selenoproteiineissa, joista osa toimii entsyymeinä kehon toiminnoissa.<sup>20</sup> Selenoentsyymit ovat tärkeitä muun muassa hapetus-pelkitysreaktioiden kontrolloinnissa, sekä oksidatiivisten vaurioiden korjauksessa ja ehkäisyssä esimerkiksi aivoissa ja neuroendokriinisissä kudoksissa.<sup>21</sup> Koska varsinkin aivot käyttävät paljon happea ja samalla tuottavat reaktiivisia happiyhdisteitä, on selenoentsyymien toiminta äärimmäisen tärkeää aivojen toiminnan kannalta.<sup>22</sup> Seleenin alhaiseen saantiin on yleisesti yhdistetty korkeampi kuolleisuus, huonompi immuunitoiminta ja kognitiivisen prosessointikyvyn heikkeneminen. Suuremman seleenin saannin etuihin taas on liitetty muun muassa parempi vastustuskyky virustartuntoja vastaan, lisääntymiskyvyn paraneminen, sekä ehkäisevä vaikutus kilpirauhasen autoimmuunitulehdistusta vastaan. On myös olemassa viitteitä, että suurempi seleenin saanti voisi ehkäistä myös erilaisten syöpälajien syntyä, mutta tulokset ovat olleet ristiriitaisia. Tällöin seleenin saannin lisäämisestä voi olla hyötyä vain, jos sen saanti on ollut aiemmin puutteellista.<sup>23</sup> Eläinten ruokavaliossa seleenin puutoksen on todettu voivan johtaa kasvun hidastumiseen ja lisääntymiskyvyn heikkenemiseen.<sup>8</sup>

Kun seleeniä saadaan liian suuria pitoisuuksia, alkaa ilmetä myrkytysoireita. Altistuminen seleenille, kuten monille muillekin raskasmetalleille, voidaan jakaa akuuttiin eli äkilliseen ja krooniseen eli pitkänajan altistumiseen. Akuutissa altistumisessa, jossa seleeniä on saatu useita tuhansia kertoja verrattuna normaaliin päivittäiseen saantiin, oireina on esiintynyt pahoinvointia, oksentelua, sekä ripulia. Joillain yksilöillä on esiintynyt akuutissa altistumisessa myös kardiovaskulaarisia oireita, kuten takykardiaa. Laboratorioeläimillä hyvin runsas annostus (100 kertaa ihmisen normaali saanto) onkin aiheuttanut sydäninfarkteja. Kroonisella altistumisella pitoisuuden ollessa 10–20 kertainen normaaliin verrattuna voi ihmisillä kehittyä

selenoosi. Esimerkiksi kroonisissa altistumistapauksissa Kiinassa oireina ovat olleet iho-  
oireet, erilaiset kynsivauriot ja niiden irtoaminen, hiusten lähtö, hampaiden  
värjäytyminen ja heikentyminen, sekä erilaiset neurologiset oireet, kuten epätasainen  
askellus, turtuminen, halvautuminen ja joskus myös hemiplegiaa. Näissä tapauksissa  
seleenin määrä on ollut keskimäärin 1270 µg/päivä tai 10–20 kertaa normaalin  
keskimääräisen saannin.<sup>24</sup>

Myrkytystapauksia seleenille ilmenee varsinkin Kiinan seleenirikkailla alueilla, mutta  
myös muuallakin. Eräs esimerkki on vuonna 2008 ilmi tullut 201 ihmisen lievä akuutti  
myrkytystapaus 10 osavaltion alueella Yhdysvalloissa. Tällöin liiallinen altistuminen  
johtui nestemäisestä lisäravinteesta, joka sisälsi seleeniä 200-kertaisen määrän ilmoitettua  
ravintosisältöä enemmän.<sup>25</sup> Ainoat todistetusti karsinogeeniset seleeniyhdisteet ovat  
seleenisulfidi ja seleeni dietyyliditiokarbamaatti (ethyl selenac), jotka ovat aiheuttaneet  
jyrsijöille suunkautta nautittuna lisääntyntä syöpäriskiä. Ihmiset eivät kuitenkaan näille  
seleeniyhdisteille helposti altistu.<sup>24</sup>

### 3 Elohopea

#### 3.1 Yleistietoa

Elohopea on ryhmään 12 kuuluva siirtymämetalli, jonka järjestysluku on 80.<sup>26</sup>  
Alkuaineesta erityisen tekee se, että se on ainoa nestemäinen metalli  
huoneenlämpötilassa. Tämä huomioitiin myös sen kemiallisessa merkissä; Hg on lyhenne  
latinan termistä *hydrargyrum* tarkoittaen ”vetistä hopeaa”.<sup>27</sup> Englanninkielinen nimi  
Mercury on otettu roomalaisen jumalan nimestä, joka toimi viestinviejänä muiden  
jumalien välillä. Merkurius (Mercury) on myös aurinkoa lähinnä oleva planeetta.  
Elohopeasta on käytetty myös termiä ”quicksilver”, jolla viitattiin alkuaineen hyvään  
liikkuvuuteen.<sup>28</sup> Elohopean lisäksi ainoa nestemäinen alkuaine on epämetalliksi  
luokiteltu bromi. Elohopea on tunnettu jo tuhansia vuosia muun muassa kiinalaisten ja  
intialaisten toimesta, sekä vanhin löydetty näyte on peräisin noin 1500 eaa. aikaisesta  
Egyptiläisestä haudasta. Elohopea on ulkonäöltään raskas, sulaneen metallin näköinen  
hopeanhohtoinen metalli. Muihin metalleihin verrattuna sen lämmönjohtokyky on  
suhteellisen heikko, mutta sähkönjohtokyky on samaa luokkaa. Elohopea muodostaa  
helposti yhdisteitä muiden metallien, kuten kullan, hopean ja tinan kanssa.  
Muodostunutta seosta kutsutaan amalgaamiksi.<sup>26,29-31</sup>

Elohopeaa saadaan pääasiassa mineraali sinoperista, joka on käytännössä elohopeasulfidia (HgS).<sup>32,33</sup> Elohopeaa saadaan sinoperia lämmittämällä, jolloin kaasumainen elohopea saadaan kerättyä talteen. Elohopean myrkyllisyyden takia sen käytöstä on nykyisin joko luovuttu tai vaihtoehtoisia materiaalikokoonpanoja on pyritty etsimään sen aikaisemmille käyttökohteille, joita olivat muun muassa hammaspaikoissa olevat amalgaamit, lämpömittarit, barometrit, fluorisoivat lamput, elektroniset kytkimet ja patterit. Nykyisin elohopeaa käytetään yleisimmin katalyyttinä kemian teollisuudessa. Elohopean suurimpia tuottajamaita ovat Kiina ja Kirgisia, sen yleisimmät hapetusluvut ovat I ja II, sekä elektronikonfiguraatio on  $[\text{Xe}]4f^{14}5d^{10}6s^2$ .<sup>26,30,33,34</sup> Elohopeaa esiintyy luonnossa seitsemänä vakaana isotooppina, joita ovat <sup>196</sup>Hg, <sup>198</sup>Hg, <sup>199</sup>Hg, <sup>200</sup>Hg, <sup>201</sup>Hg, <sup>202</sup>Hg, ja <sup>204</sup>Hg. Näiden prosentuaaliset osuudet luonnossa ovat 0,15 %, 9,97 %, 16,87 %, 23,10 %, 13,18 %, 29,86 % ja 6,87 %.<sup>26,35</sup> Isotoopeista tärkeimmäksi katsotaan se yleisin eli elohopea-202.<sup>30</sup>

### 3.2 Elohopea ja terveys

Elohopeaa löytyy luonnossa monissa eri muodoissa ja se voi muuttua muotoaan biologisissa prosesseissa. Luonnossa esiintyvät elohopean esiintymismuodot voidaan jakaa epäorgaaniseen-, orgaaniseen ja alkuaine-elohopeaan.<sup>36</sup> Puhdasta alkuainetta voi saada helposti elimistöön hengityksen kautta, sekä pienissä määrin myös ihon läpi. Jo huoneenlämmössä ollessaan nestemäisestä elohopeasta voi haihtua niin paljon elohopeaa kaasumaiseksi, että potentiaalinen myrkytysraja ylittyy. Kun tilassa olevan nestemäisen ja kaasumaisen elohopean kesken vallitsee tasapainotila haihtuvuuden suhteen 20 °C lämpötilassa, on elohopeapitoisuus ilmassa 14 mg/m<sup>3</sup>. Kahdeksan tunnin HTP-arvo (Haitalliseksi Tunnettu Pitoisuus) elohopealle ja sen epäorgaanisille yhdisteille on 0,05 mg/m<sup>3</sup>. Elohopean alkyylilyhdisteillä tämä on 0,01 mg/m<sup>3</sup>.<sup>37-39</sup>

Elohopea kerääntyy sen esiintymismuodosta riippuen kehon eri osiin, mikä aiheuttaa myös erilaiset myrkytysoireet. Alkuaine-elohopea kerääntyy eniten munuaisiin (50–90%), sekä maksaan ja pernaan. Hengitetty kaasumainen elohopea voi vapaasti edetä keuhkoista, jolloin se hapettuu hapetusasteelle +II joko punasolussa tai kohdekudoksessa. Rasvaliuokoisena eli lipofiilisenä aineena elohopea kulkeutuu ennen hapettumistaan veren mukana helposti esimerkiksi aivoihin tai istukan kautta sikiöön, minne se myös hapettumisesta johtuen jää. Metyylielohopea menee alkuaine-elohopean tavoin veri-

aivoesteen ylitettyään aivoihin ja epäorgaaninen elohopea kerääntyy lähinnä munuaisiin, sillä se ei saa ylitettyä veri-aivoestettä. Eri lähteissä on ilmoitettu myös puoliintumisaikoja eri elohopealajeille, mutta nämä arvot ovat todennäköisesti parhaimmillaankin vain viitteellisiä. Munuaisissa ja lähes koko kehossa olevan elohopean puoliintumisajaksi on ilmoitettu Työterveysliiton verkkokirjassa noin 60 päivää, aivoissa 20–25 päivää. Principles of biochemical toxicology -kirjassa epäorgaanisille yhdisteille puoliintumisajaksi on ilmoitettu 40 päivää ja metyylielohopealle 70 päivää. Osalle kehossa olevasta elohopeasta puoliintumisaika on kuitenkin vuosia. Elohopea poistuu kehosta virtsan ja varsinkin ulosteen mukana. Elohopean esiintymismuotojen välillä on havaittu myös merkittäviä eroja ruuansulatuskanavasta imeytymisessä; metallisen alkuaine-elohopean on todettu imeytyvän hyvin huonosti, epäorgaanisesta elohopeasta noin 7 % imeytyy ja orgaanisesta elohopeasta noin 90–95 %. Toisaalta, hengitetyistä alkuaine-elohopeasta elimistöön imeytyy noin 80 %.<sup>39-42</sup>

Kuten jo todettua, myrkytysoireisiin vaikuttaa eniten elohopeayhdisteiden erilainen kertyminen eri kehon osiin. Akuutissa altistumisessa elohopeakloridi ja muut epäorgaaniset elohopeayhdisteet aiheuttavat heti oraalisesti nauttimisen jälkeen vaurioita ruuansulatuskanavassa, minkä oireita ovat verinen ripuli, haavaumat (vatsahaava), sekä mahdollisesti kuoliot. 24h sisällä nauttimisesta oireeksi tulee munuaisten vajaatoiminta, joka johtuu kuoliosta proksimaalisen tubuluksen epiteelisolujen *pars recta* alueella. Krooninen altistuminen pienille pitoisuuksille voi johtaa munuaisten hiussuonikerästen (glomerulus) vaurioitumiseen, sekä syljen erityksen ja ientulehdusten lisääntymiseen. Myös eretismiä esiintyy, mikä voi näkyä hermostuneisuutena ja ujoutena. Alkuaine-elohopea aiheuttaa vaurioita keskushermostolle, varsinkin kroonisessa altistumisessa. Oireina ovat muun muassa vapina, luonteen muutokset, aistiharhat, hourailu ja ientulehdukset. Hyvin myrkyllisenä pidetyt orgaaniset elohopeayhdisteet vaikuttavat lähinnä keskushermostoon, mutta jotkin yhdisteet kuten fenyyli- ja metoksietyylielohopea aiheuttavat samanlaisia oireita kuin epäorgaaniset elohopeayhdisteet. Patologisten tulosten perusteella metyylielohopea on aiheuttanut muun muassa rappiota ja kuolioita aivokuoren hermosoluissa, varsinkin näköaistiin keskittyvillä alueilla. Myös veri-aivoesteen toiminta on häiriintynyt. Oireina myrkytykselle onkin havaittu muun muassa muistiongelmia, parestesiaa, ataksiaa, näkökentän kapenemista ja edetessään oireiksi on tullut lisäksi lihaskoordinaation heikkenemistä, tunneperäistä epävakautta ja lopulta CP-vammoja. Raskaana olevien

naisten altistuminen on johtanut jälkeläisten kehitysvammaisuuteen ja CP-vammoihin, vaikkei äideillä olisi esiintynytäkään oireita.<sup>41,42</sup>

Elohopean myrkyllisyys perustuu ilmeisesti sen kykyyn reagoida metallisena tai ionina rikki- ja vetyatomien (-SH) sisältävän tioliryhmän (biokemiassa termi sulfhydryyliryhmä) kanssa. Tioliryhmiä on muun muassa proteiineissa, jotka voivat toimia entsyymeinä. Reagoidessaan tioliryhmien kanssa elohopea voi näin ollen estää joidenkin entsyymien toimintaa. Elohopea voi reagoida myös amino-, fosforyyli- ja karboksyyli-ryhmien kanssa. Elohopea tiettävästi inhiboi aivojen puryvaatti aineenvaihduntaa, sekä sen epäillään estävän oksidatiivista fosforylaatiota munuaisten mitokondrioissa.<sup>41,42</sup> Metyylielohopean on todettu inhiboivan myös hyvin voimakkaasti selenoentsyymejä ja tämän arvellaan olevan suurin syy sen toksisiin vaikutuksiin. Elohopea sitoutuu seleeniin yli miljoona kertaa tehokkaammin kuin rikkiin, joten varsinkin selenoentsyymien toiminta estyy altistumisessa. Elohopeaan sitoutunut seleeni on lopullisesti poissa seleeniä tarvitsevien entsyymien käytettävistä, joten turvaamalla tarvittava seleenin saanti voidaan metyylielohopean haitallisia vaikutuksia ainakin jossain määrin estää.<sup>21</sup> Elohopeamyrkytyksen hoidossa käytetään yleensä kelatoivia aineita, kuten dimerkaprolia tai penisillamiinia. Myös dialyysia voidaan käyttää tarvittaessa.<sup>41</sup>

Metyloidun elohopean aiheuttamia laajamittaisiakin myrkytystapauksia on todettu valittavan paljon historian aikana. Eräs esimerkki on Minamata Bayssä Japanissa 50–60-luvuilla ilmenneet myrkytystapaukset, joiden syyksi selvisi lopulta se, että alueella toimineen kemian yrityksen veteen vapauttama epäorgaaninen elohopea oli muuttunut anaerobisten bakteerien toiminnan myötävaikutuksella metyylielohopeaksi. Ravintoketjua pitkin kulkiessaan metyylielohopea konsentroitui ja päätyi lopulta ihmisten ravintona käyttämiin kaloihin, simpukoihin ja äyriäisiin. Uhrien määrä vaihtelee kirjallisuudessa hyvin paljon, todennäköisesti mukaan otetun ajanjakson perusteella, mutta esimerkiksi Mason toteaa kirjassaan ”Biology of freshwater pollution”, että vuoteen 1988 mennessä niin sanottu ”Minamatan tauti” oli virallisesti todettu 2209 ihmisellä, joista 730 oli kuollut.<sup>28,43</sup>

### 3.3 Elohopea ympäristössä

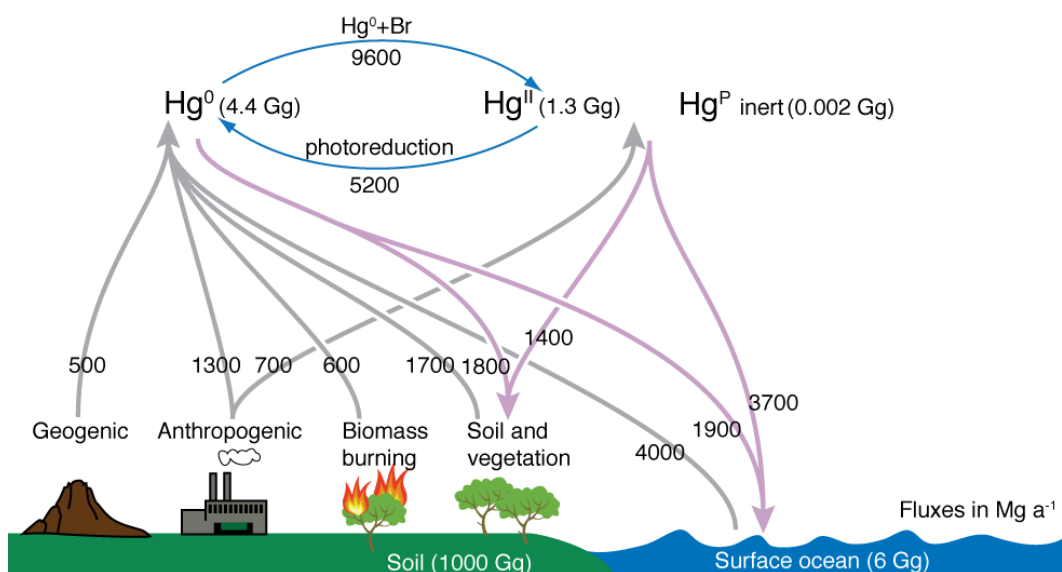
Elohopea on veden, typen ja hiilidioksidin tapaan aine, jolla on kiertokulku koko maailman mittakaavassa (kuva 1). Periaatteessa kiertokulku perustuu elohopean muuttumiseen muodosta toiseen; ilmakehässä ollessaan elohopea on yleensä kaasumaisena metallina  $\text{Hg}^0$ , jolloin se helposti leviää kaikkialle. Maaperään ja veteen päätyessään se yleensä vaihtelee muotoaan  $\text{Hg}^0$ :n,  $\text{Hg}^{2+}$ :n ja muiden muotojen välillä muodostaen myös erilaisia yhdisteitä. Takaisin  $\text{Hg}^0$ -muotoon palatessaan elohopea voi vapautua jälleen ilmakehään. Esimerkiksi metsät samanaikaisesti sekä sitovat elohopeaa orgaanisiin matriiseihin että vapauttavat sitä takaisin ilmakehään. Samoin merissä ollessaan elohopea voi potentiaalisesti muodostaa esimerkiksi metyylielohopeaa, mutta osa siitä myös auringonvalon vaikutuksesta pelkistyy takaisin alkuaineeksi ja vapautuu ilmakehään. Meriin elohopea päätyy sekä ilman että maaperän huuhtoutumisen kautta.<sup>44</sup>

Elohopeaa esiintyy luonnossa suurempina pitoisuuksina sinoperissä, jota yleensä tavataan vulkaanisilla alueilla. Tämän johdosta tulivuoret ovat luonnon elohopealähteistä suurimpia, sillä niiden purkautuessa alkuainemuotoista elohopeaa vapautuu huomattavia määriä ilmakehään. Varmasti tunnetuimpia esimerkkejä tästä on Euroopan suurin aktiivinen tulivuori Etna, joka vapauttaa vuodessa noin 27 Mg elohopeaa<sup>34</sup>. Elohopea voi vapautua ilmakehään joko luonnon omien prosessien (puiden ”hengitys”, metsäpalot, tulivuoren purkaukset, kivien rapautuminen) tai ihmisen toiminnan kautta. Ihminen on toiminnallaan aiheuttanut elohopeamäärän lisääntymistä kierrossa muun muassa vapauttamalla sitä maaperästä kaivuutoiminnan seurauksena, sekä vapauttamalla sitä ilmaan erilaisten polttoprosessien kautta, kuten polttamalla hiiltä, öljyä ja puuta energian tuottamiseksi. Myös viime vuosikymmenien aikana lisääntynyt jätteenpolto voi vapauttaa sitä ympäristöön jätelajista riippuen. Elohopeapitoista jätettä ovat muun muassa elektroniikkajäte, sekä jätteen sekaan päätyneet paristot. Myös kloorin valmistus voi vapauttaa elohopeaa ympäristöön, samoin teräksen tuotanto, sillä valmistuksessa käytetään rautamalmia, koksia, sekä kalkkikiveä.<sup>44,45</sup> Maaperään elohopeaa voi päästä myös maatalouden aiheuttamana, sillä sitä voi olla lannoitteessa, lietteessä, kalkissa ja lannassa. Metyloituja elohopeayhdisteitä käytettiin myös siemenien suojaamisessa sienitauteja vastaan.<sup>46</sup>



Maankuoressa ollessaan elohopea on vaaratonta ja sidoksissa ympärillään olevaan malmiin, mutta tästä vapautunut elohopea voi olla vaaraksi kasveille ja eliöille ilmansaasteena, maaperässä tai vesistöissä. Ilmaan vapautunut elohopea voi olosuhteista riippuen kulkeutua joko parin metrin päähän tai puoleen väliin maapalloa ennen laskeutumistaan maankamaralle. Tähän vaikuttavat muun muassa sääolosuhteet, miltä tasolta maaperään nähden elohopea vapautetaan, ympäröivä maasto, sekä missä muodossa elohopea on. Esimerkiksi ollessaan muodossa  $\text{Hg}^0$  voi elohopea pysyä ilmakehässä noin vuoden ajan, mutta  $\text{Hg}^{2+}$  vain noin kaksi viikkoa.<sup>44,45</sup>

Maaperässä ollessaan elohopea voi saastuttaa pohjavettä, huuhtoutua vesistöihin tai päätyä kasvien osiin. Kasveissa maaperästä saatu elohopea jää usein juuriin ja ei kulkeudu juurikaan muihin kasvinosiin. Sen sijaan maanpäällisiin osiin (esim. lehtiin) elohopea kerääntyy alkuainemuodossa ilmasta, johon se voi olla päätenyt esimerkiksi maaperästä uudelleen kaasuuntuessaan. Kasvien välillä on huomattavia eroja siinä, miten helposti elohopea niihin kerääntyy. Esimerkiksi kaura, vehnä ja ohra ottavat kaasumaista elohopeaa ilmasta viisikertaa tehokkaammin kuin maissi, durra ja verihirssi. Elohopean on todettu kerääntyvän myös lehtiin ja varsiin voimakkaammin silloin kuin se on orgaanisena yhdisteenä. Tutkimusten mukaan varsinkin vesikasveissa elohopeaa kerääntyy hyvin voimakkaasti.<sup>46</sup>



Kuva 1: Elohopean kiertokulku. Luvut kuvaavat elohopean määrää vuoden aikana ja yksikkö ilman erillistä mainintaa on  $\text{Mg}$ .<sup>47</sup>

### 3.4 Ihmisen altistuminen elohopealle

Ihminen voi altistua elohopealle sitä sisältävien tuotteiden käytön, ravinnon, sekä ilman kautta.<sup>36</sup> Kaikkiin näihin kolmeen altistumisen muotoon yritetään nykyisin puuttua korvaamalla aiemmin käytettyjä elohopeayhdisteitä vastaavilla turvallisemmilla yhdisteillä, sekä yrittämällä rajoittaa elohopeapäästöjen määrää. Yksilötasolla altistukseen voi vaikuttaa käytännössä välttelemällä riskiryhmään kuuluvia tuotteita ja elintarvikkeita. Ravintoa pidetään yleisesti ottaen suurimpana riskinä aiheuttaa altistumista raskasmetalleille ja muille haitallisille aineille. Nykyisin tutkimuksissa keskitytäänkin paljon vesien ja eri elintarvikkeiden raskasmetallipitoisuuksien määrittämiseen.

Elohopealle voidaan altistua myös työn kautta muun muassa kloorialkaliteollisuudessa ja jätteenhuollossa käsiteltäessä elohopeapitoista jätettä. Altistumista voi tapahtua myös erilaisten mittareiden käytön ja huollon seurauksena ja vähäisinä määrinä myös laboratorio- ja sairaalatyössä, sekä hammashuollossa. Varsinkin amalgaamipaikkojen käytön myötä hammaslääkärit altistuivat ennen hyvinkin suurille pitoisuuksille elohopeaa ja tätä ilmeisesti tapahtuu vieläkin maailmalla. Työperäisestä altistumisesta voi halutessaan lukea lisää Työterveyslaitoksen tiedotteesta ja nyt keväällä ilmestyneestä Kim *et al.* julkaisemasta monipuolisesti elohopeaa käsittelevästä artikkelista.<sup>40,48</sup>

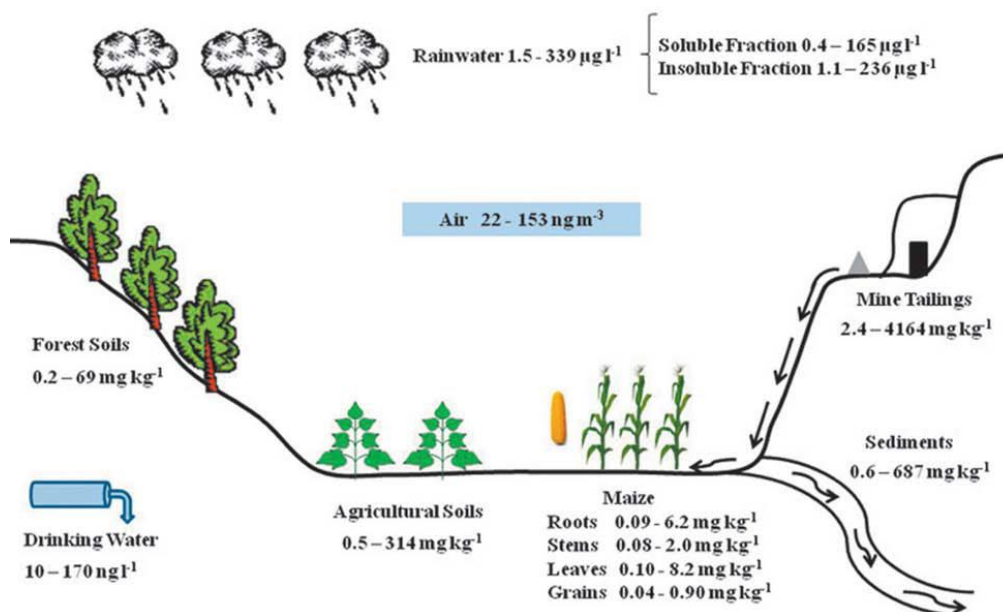
#### 3.4.1 Ilma ja vesi

Altistumisen riskiä ilmassa olevalle elohopealle pidettiin hyvin pienenä ainakin vielä vuonna 1972 julkaistussa WHO:n artikkelissa.<sup>49</sup> Ilmassa olevana elohopean perustasona, joka on mitattu syrjäisellä alueella merenpinnan tasolla, pidetään pohjoisella pallonpuoliskolla pitoisuusväliä 1,5–1,7 ng/m<sup>3</sup> ja eteläisellä pallonpuoliskolla väliä 1,1–1,3 ng/m<sup>3</sup>.<sup>50</sup> Näistä pitoisuuksista elohopeapitoisuudet ilmassa voivat potentiaalisesti kasvaa siirryttäessä asutuksen ja varsinkin teollisuuden läheisyyteen. Jos elohopeapitoisuuksista otetaan esimerkkejä, niin vuosina 2010–2013 Kanadan Fort McMurrayssa, Albertassa tehdyn tutkimusten elohopeapitoisuuden keskiarvo oli 1,45 ± 0,18 ng/m<sup>3</sup>.<sup>51</sup> Syrjäisellä Mt. Changbain alueella Koilis-Kiinassa saatiin kahden vuoden mittausajalla (lokakuu 2008-lokakuu 2010) keskiarvoksi 1,60 ± 0,51 ng/m<sup>3</sup>. Toisaalta toisella mittauspaikalla ajanjaksolla elokuu 2005-heinäkuu 2006 saatu keskiarvo oli 3,58

$\pm 1,78 \text{ ng/m}^3$ . Syyksi tälle arvioitiin jälkimmäisen mittauspaikan helpompaa altistumista paikallisille antropogeenisille elohopealähteille sekä pintatuulten vaihtelua alueella.<sup>52</sup>

Etelä-Kiinassa Mt. Leigongissa tehtyjen mittausten aikana välillä toukokuu 2008–toukokuu 2009 keskiarvoksi saatiin  $2,80 \pm 1,51 \text{ ng/m}^3$  ja vaihteluväliksi  $0,41\text{--}23,9 \text{ ng/m}^3$ . Artikkelin kirjoittajat toteavat tulokset korkeiksi verrattuna Euroopan tai Pohjois-Amerikan etäisten alueiden mittaustuloksiin, mutta tulokset ovat toisaalta suhteessa samansuuruisia tai alhaisempia kuin muualta Kiinasta tai muista Aasian maista saadut tulokset.<sup>53</sup> Elohopeapitoisuuksissa todettiin tapahtuvan muutoksia sekä vuoden- että vuorokaudenajan mukaan; esimerkiksi Albertassa elohopeapitoisuudet olivat korkeampia keväällä ja keskipäivällä, kun taas syksyllä ja aamuisin mitattiin pienempiä pitoisuuksia.<sup>51</sup> Ilmassa olevalle elohopealle ei ole asetettu kovinkaan paljon kriteerejä miltään järjestöiltä, mutta esimerkiksi WHO:n ohjeistuksessa rajana pidetään arvoa  $1 \mu\text{g/m}^3$ , joka on aiempia tuloksia selvästi korkeampi.<sup>54</sup>

Elohopeapitoisuuksia on määritetty myös erilaisista vesinäytteistä. Esimerkiksi Meksikon San Joaquínissa tehdyssä elohopeapitoisuuksia monipuolisesti mitanneessa tutkimuksessa juomaveden elohopeapitoisuudet olivat välillä  $10\text{--}170 \text{ ng/L}$  ja sadevedessä  $1,5\text{--}339 \mu\text{g/L}$ . Sadeveden elohopeasta vain  $0,4\text{--}165 \mu\text{g/L}$  oli liukenevassa muodossa ja  $1,1\text{--}236 \mu\text{g/L}$  liukenemattomassa muodossa, joka koostuu suspension kautta sadepisaran sisään jääneistä kiinteistä partikkeleista. Vuoden 2013 Martínez-Trinidad *et al.* julkaisu on loistava esimerkki elohopeapitoisuuksien tutkimuksesta sinoperikaivausten kontaminoimalla alueella, mistä on olemassa myös hyvin tilannetta havainnollistava kuva 2.<sup>55</sup> Jos esimerkiksi ilman elohopeapitoisuuksia vertaa aiemmin esitettyihin Kanadan ja Kiinan tuloksiin, on selvää että hyvin saastuneilla alueilla ympäristöongelmat voivat vaikuttaa jo selvästi alueella asuvien ihmisten hyvinvointiin.



Kuva 2: San Joaquínin elohopeatilanne Meksikossa.<sup>55</sup>

Yhdysvalloissa Idahossa ja Oregonissa olleella tutkimusalueella, joka on suosittu urheilukalastuskohde, mitattiin vuonna 2013 Boise ja Snake jokien vesien elohopeapitoisuuksiksi 0,73–1,21 ng/L viidellä mittauspaijalla ja Brownleen tekoaltaalla tulokseksi saatiin korkeampi 8,78 ng/L. Vaikka jälkimmäinen tulos oli huomattavasti korkeampi, ei se kuitenkaan ylittänyt EPAn asettamaa rajaa (12 ng/L) vesielämän hyvinvoinnille.<sup>56</sup> Puolan neljänneksi suurimmassa teollisuuden keskuksessa ja noin 570,000 asukkaan kaupungissa, Poznańissa, vuosina 2003 ja 2004 mitattujen pinta- ja pohjavesien pitoisuudet olivat korkeampia;  $20 \pm 8$  ng/L ja  $1,3 \pm 0,7$  ng/L.<sup>57</sup>

Puhtaasti juomavesien laatuun keskittyviä tutkimuksia ei kovinkaan paljon löydy, mutta jo edellä olleista esimerkeistä Poznańin pohjavesi on otettu kaivoista ja San Joaquínissa juomaveden elohopeapitoisuus oli välillä 10–170 ng/L, jotka molemmat jäävät selvästi WHO:n asettaman rajan 6  $\mu\text{g/L}$  alapuolelle<sup>58</sup>. WHO:n vuonna 1972 julkaiseman artikkelin mukaan elohopealla kontaminoituneen juomaveden riski on olemassa, mutta sitä kuitenkin pienentää se, että vedessä oleva elohopea on yleensä vaarattomampana epäorgaanisena muotona<sup>33</sup>. Myös Martínez-Trinidad *et al.* totesivat artikkelissaan elohopean olevan juomavedessä valtaosin hapetusasteella +II erilaisina yhdisteinä, jolloin vain osa nautitusta elohopeasta absorboituu elimistöön.<sup>55</sup>

## 4 Seleenin ja elohopean ravinnossa

### 4.1 Elohopea eri ravintolähteissä

Elohopeapitoisuuksista ravinnossa puhutaan erilaisia vedeneläviä lukuun ottamatta hyvin vähän. Tähän poikkeuksen tekevät lähinnä analyttisen kemian julkaisut. Tunnetusti saastuneita alueita lukuun ottamatta esimerkiksi kasvit eivät vaikutakaan sisältävän merkittäviä määriä elohopeaa. Esimerkiksi Tkachukin ja Kuzinan tekemässä laajassa tutkimuksessa ajanjakson 1875–1977 (yksi näyte myös 1200 eaa.) vehnänäytteistä vehnän luonnollisen elohopeapitoisuuden todettiin olevan välillä 2–12 µg/kg.<sup>59</sup> Tkachukin ja Kuzinan toisessa tutkimuksessa 1972 elohopeapitoisuudet vaihtelivat 80 vehnänäytteellä välillä 4–18 µg/kg ja vehnäjauhojen pitoisuudet olivat vastaavia.<sup>60</sup>

Vuonna 2002 julkaistussa Jędrzejczakin artikkelissa tutkittiin Puolassa vehnän ja rukiin lisäksi myös monien kasvien, hedelmien ja näistä valmistettujen tuotteiden elohopeapitoisuuksia. Vehnän elohopeapitoisuudet vaihtelivat välillä <0,1–13 µg/kg ja rukiilla <0,1–14 µg/kg. Keskiarvot näillä olivat  $2,8 \pm 2,5$  µg/kg ja  $2,0 \pm 2,0$  µg/kg. Vehnälle saadut tulokset olivat hyvin samassa linjassa Tkachukin ja Kuzinan tulosten kanssa. Kasviksista mukana olivat porkkana, tomaatti, kukkakaali, perunat, punajuuri, sellerinvarsi, persiljanvarsi, kaali ja kurkku, sekä hedelmistä mansikka, omena, mustikka, kirsikka, mustaherukka, aronia ja vadelma. Kasviksilla elohopeapitoisuudet vaihtelivat välillä <0,1–2,4 µg/kg keskiarvon ollessa  $0,5 \pm 0,4$  µg/kg. Hedelmillä elohopeapitoisuus vaihteli välillä <0,1–5,1 µg/kg keskiarvon ollessa  $1,1 \pm 0,9$  µg/kg. Hilloilla ja muroilla pitoisuudet vaihtelivat välillä <0,1–5,6 µg/kg, sekä mehuilla ja virvoitusjuomilla <0,1–3,0 µg/L.<sup>61</sup>

WHO:n raportin mukaan maito ja lihatuotteista voidaan myös löytää pieniä määriä elohopeaa, josta osa on myös metyloituneena. Syynä tälle on pidetty eläimille syötettyä kalasta valmistettua ravintoa tai metyylielohopeapitoisia viljan jyviä.<sup>49</sup> Viimeaikoina myös riisi on ollut tutkimuksen kohteena elohopeapitoisuuksien määrittämisessä, sillä sen on todettu olevan kalan lisäksi myös merkittävä metyylielohopean lähde varsinkin Aasiassa, jossa riisiä nautitaan paljon. Esimerkiksi Quizhoun saastuneella alueella arviolta noin 94–96 % ravinnosta saadusta metyylielohopeasta tuli riisistä, osittain senkin takia että sisämaa-alueella ihmiset eivät syö kalaa hyvinkään paljoa. Neljästä tutkinnan kohteena olleesta alueesta Wanshanista saatiin riisille kokonaiselohopeapitoisuuden

keskiarvoksi 78 µg/kg ja metyylielohopean pitoisuudeksi 9,3 µg/kg. Kohonneita kokonaiselohopeapitoisuuksia mitattiin myös muun muassa kasviksista ja lihasta, ja laskennallisesti noin 90 % päivittäisestä elohopealle altistumisesta (PDI = Probable Daily Intake) tuli näiltä kolmelta ravintolähteeltä. Altistumisessa näiden lähteiden osuudet olivat kokonaiselohopealle välillä 34–50 % riisille, 22–42 % kasviksille ja 15–33 % lihalle. Tutkimuksen perusteella arviolta 34 % ihmisistä Wanshanin alueella altistuu suuremmalle määrälle metyylielohopeaa kuin EPA:n asettama 0,1 µg/kg kehonpaino/päivä keskiarvon ollessa 0,096 µg/kg kehonpaino/päivä ja vaihteluvälin ollessa 0,015–0,45 µg/kg kehonpaino/päivä. Tulokset eivät sinällään yllätä, sillä alueella on artikkelinkin mukaan mitattu aiemmin hyvin korkeita elohopeapitoisuuksia niin ilmasta, pintavedestä kuin maastakin.<sup>62</sup>

## 4.2 Seleenin eri ravintolähteissä

Maaperässä seleenipitoisuuksiin ja sen biosaatavuuteen vaikuttaa kallioperän lisäksi muun muassa pH, ja pitoisuudet voivat vaihdella hyvin voimakkaasti eri alueiden välillä. Esimerkiksi Kiinassa seleenipitoisuudet vaihtelevat alueittain hyvin suurista pitoisuuksista todella niukkoihin, Pohjois-Amerikassa maan keskiosassa on yleisesti ottaen suuremmat seleenipitoisuudet kuin rannikkoalueilla ja Pohjois- ja Keski-Euroopan alueilla seleenipitoisuudet ovat keskimäärin pienempiä kuin Pohjois-Amerikassa. Seleenipitoisuudet vesistöissä ovat yleensä <1 µg/L ja merissä taustapitoisuus on luokkaa 0,02–0,04 µg/L. Jos ympäröivä maasto tai ihmisen toiminta aiheuttaa seleenimäärien kasvua, ovat seleenipitoisuudet vesissä yleensä luokkaa 1–10 µg/L, tai pahimmissa tapauksissa jopa 100 µg/L.<sup>63</sup> Koska seleeni ei ole elohopean tavoin määritelty samalla tavoin myrkylliseksi, ei sitä nähdä yhtä vakavana uhkana terveydelle. Kuitenkin päivittäiset saantorajat huomioiden WHO on asettanut juomaveden seleenipitoisuuden rajaksi 40 µg/L.<sup>4</sup>

Koska kasvien seleenipitoisuus vaihtelee maaperän mukaan ja eläinten liha korreloi niiden syömän ravinnon seleenipitoisuutta, voidaan suurella todennäköisyydellä todeta, että pääsääntöisesti suomalaiset kasvikset ja lihatuotteet eivät sisällä huolestuttavia määriä seleeniä.<sup>64,65</sup> Päinvastoin, vuonna 1984 lannoitteisiin alettiin lisätä natriumselenaattia kotieläinten ja väestön seleenin saannin turvaamiseksi. Suomalaisen elintarvikkeiden seleenimääriä on listattuna erittäin monipuolisesti Maa- ja

elintarviketalouden tutkimuskeskuksen Seleenityöryhmän raportissa vuodelta 2011. Viljoista esimerkiksi kaurassa ja ohrassa seleenipitoisuudet olivat vuonna 2009 keskiarvoltaan  $0,120 \pm 0,088$  ja  $0,120 \pm 0,094$  mg/kg vaihteluvälin ollessa  $<0,010$ – $0,360$  mg/kg. Vuonna 2010 puolestaan kevytmaidon seleenipitoisuus oli keskimäärin  $0,260 \pm 0,022$  mg/kg, edamjuuston  $0,390 \pm 0,028$  mg/kg ja kananmunien  $0,880 \pm 0,130$  mg/kg. Samana vuonna lihatuotteista naudan- ja sianlihan pitoisuudet olivat  $0,16$  mg/kg ja  $0,17$  mg/kg, kun taas maksalle tulokset olivat  $0,45$  mg/kg ja  $0,58$  mg/kg. Silakalle ja kirjolohelle pitoisuuksien keskiarvot olivat  $0,710 \pm 0,180$  mg/kg ja  $0,430 \pm 0,086$  mg/kg. Tilastojen mukaan suomalaisilla noin 70 % päivittäisestä seleenin saannista tulee maidosta ja lihasta.<sup>65</sup>

Eri ruokaryhmien seleenipitoisuuksia on tutkittu laajalti muuallakin maailmalla ja neljästä artikkelista on esitetty viitteellisiä arvoja taulukossa 1. Taulukkoa katsoessa kannattaa muistaa, että keskiarvot ja vaihteluvälit vaihtelevat hyvin paljon esimerkiksi eri kalalajien välillä ja riippuen siitä kuinka monta lajiketta edustaa kutakin ruokaryhmää. Pitoisuuksien esitystapa taulukossa on valittu alkuperäisen lähteen mukaan; välillä arvoja on esitetty niin yleistäen että on valittu ennemmin tarkka arvo täsmennetylle lajikkeelle yleisarvon sijaan. Tulosten perusteella voi kuitenkin todeta, että kalat ja merenelävät, lihatuotteet ja kananmunat sisältävät seleeniä paljon verrattuna esimerkiksi hedelmiin ja vihanneksiin.

Taulukko 1: Seleenipitoisuuksia ruokaryhmille neljästä eri artikkelista. Pitoisuuksien yksikkönä  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Maidot olivat täysmaitoa, Korean tutkimuksen maidon laadusta ei tietoa.

Alue	Kala ja muut merenelävät	Lihatuotteet ja siipikarja	Kananmunat	Maito	Vihannekset ja/tai hedelmät
<b>Thaimaa</b> <sup>66</sup>	450 ± 208	182 ± 58	327 ± 57	28 ± 6 täysmaito	12 ± 20 (v) 6 ± 5 (h)
<b>Kreikka</b> <sup>67</sup>	246	48,8 ± 8,6 (nauta) 94,1 ± 4,1 (sika)	172,8 ± 8,2 (häkki) 73,4 ± 17 (vapaa)	14,2 ± 0,9	6,5 (v) 3,4 (h)
<b>Korea</b> <sup>68</sup>	152–788	43–324	267*	60	≤ 52 (v) ≤ 28 (h)
<b>Englanti</b> <sup>64</sup>	280–1260 (rapu)	68–84 (nauta) 120–150 (sika)	-	15	7–28**

\* Puhutaan yleisesti munista, ei välttämättä vain kananmunista.

\*\* Peruna, ulkomainen.

### 4.3 Elohopea ja seleeni vedenelävissä

Aiemmin käytyjen asioiden ja esimerkiksi Minamata Bayn tragedian jälkeen on helppo ymmärtää miksi elohopeapitoisuuksia halutaan tarkistaa elintarvikkeista. Elohopean lisäksi myös seleenipitoisuuksiakin on tutkittu, mutta myös muut raskasmetallit ovat samalla tavoin seurannan alla. Erilaisia tutkimuksia tehdään hyvin paljon ympäri maailmaa niin luonnonvaraisille kuin viljellyille kaloille. Vedenelävien mahdollisten haitta-aineiden tutkiminen on tärkeää, sillä ne ovat tärkeä proteiinin lähde varsinkin kun otetaan huomioon, että yli puolet maailman ihmisistä asuu 100 km:n säteellä merestä<sup>69</sup>. Kalat tunnetusti sisältävät myös ihmisille välttämättömiä omega-3-rasvahappoja.

Eri vedenelävien elohopeapitoisuuksiin eniten vaikuttava tekijä on ehdottomasti elohopean saatavilla oleva määrä. Vedessä vesikasvit ja erilaiset pieneliöt, kuten selkärangattomat ja hyönteiset, kerryttävät helposti itseensä elohopeaa kalojen ohella. Vedessä oleva elohopea on pääosin epäorgaanisessa muodossa, mutta orgaanisen elohopean pitkä puoliintumisaika (kuukausista vuosiin) voi johtaa sen kertymiseen elimistössä vedenelävilläkin<sup>70</sup>. Kalalajeilla eräs suurimmista vaikuttavista tekijöistä



elohopean kertymisessä on sen asema ravintoketjussa; elohopeaa kertyy petokaloihin helpommin kuin kasveja ruokavaliiossaan suosivilla kalalajeilla, toisaalta pohjalta (sedimentiltä) sekä lihaa että kasveja syöville lajeilla pitoisuudet voivat myös nousta suhteellisen korkeiksi ainakin muilla raskasmetalleilla. Varsinkin suuret petokalat, kuten hait, miekkakalat ja tonnikalat, voivat tunnetusti kerryttää kehoonsa suuria määriä elohopeaa.<sup>69,71</sup>

Tulosten perusteella elohopeapitoisuuksien voidaan todeta nousevan kalan koon mukana (paino ja pituus), vaikkakin joissakin tilanteissa se ei kuitenkaan täysin korreloi mitattujen elohopeapitoisuuksien kanssa. Oikeastaan kalan iän on todettu korreloivan paremmin elohopeapitoisuuksien kanssa, mutta ongelmana on yleensä se, ettei kalan ikää tiedetä. Joillakin kalalajeilla on havaittu pitoisuuseroja myös sukupuolten välillä, muttei läheskään aina.<sup>72</sup> Esimerkiksi Olssonin julkaisemassa tutkimuksessa Ruotsissa 1976 uros hauilla mitattiin korkeampia elohopeapitoisuuksia kuin samanpituisilla naarailla. Syyksi tälle esitettiin sitä, että naaraat kasvavat uroksia nopeammin.<sup>73</sup> Vuonna 2015 Madenjian *et al.* julkaisemassa artikkelissa taas tilanne oli päinvastoin ja naaras mateilla oli keskimäärin 22 % korkeammat elohopeapitoisuudet kuin uros mateilla. Syyksi tälle taas arveltiin elohopean nopeaa poistumista urosten kehosta naaraisiin verrattuna, mikä voisi selittyä androgeenien eli mieshormonien positiivisella vaikutuksella elohopean eliminoinnissa.<sup>74</sup>

Muiden raskasmetallien tapaan myös elohopea ja seleeni kertyvät kalan kudoksiin eri tavoin. Visnjic-Jeftic *et al.* tekemässä tutkimuksessa Mustanmeren sillillä (Pontic shad, *Alosa immaculata*) selvitettiin alkuaineiden Al, As, Cd, Cu, B, Ba, Fe, Mg, Sr, Zn, Li, Co, Cr, Mn, Mo, Ni ja Pb kertymistä lihaksiin, maksaan ja kiduksiin. Tulosten perusteella alkuaineilla havaittiin selviä eroja pitoisuuksissa eri kudoksissa, ja kiduksiin kertyi eniten Al, Sr, Ba, Mg, ja Li, kun taas Cd, Cu, Zn, Fe ja B kertyivät maksaan. Lihaksiin oli kertynyt pääosin vähiten tutkittuja alkuaineita, mutta arseeni oli poikkeus; sitä kertyi eniten lihaksiin. Lihaksiin kertyneet As ja Cd ylittivät ravinnolle suositellut pitoisuudet.<sup>75</sup> Fallah *et al* tekemässä tutkimuksessa viljellyillä ja luonnon kirjolohilla saatiin todeta, että tutkituista alkuaineista (As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, **Hg**, Mn, Mo, Ni, Pb, **Se**, Sr ja Zn) bariumia ja strontiumia lukuun ottamatta muita raskasmetalleja ja hivenaineita löydettiin suurempia pitoisuuksia maksasta kuin lihaksista. Alkuaineiden kertymisen maksaan

arveltiin johtuvan siellä olevien proteiinien, metallotionien, kyvystä reagoida kyseisten alkuaineiden kanssa.<sup>76</sup>

Kaloja pidetään elohopean kannalta huolestuttavana ravintoryhmänä varsinkin sen takia, koska niissä valtaosa elohopeasta on metyylielohopeana; esimerkiksi Fang *et al.* tekemässä tutkimuksessa Taiwanissa tonnikalassa olleesta kokonaiselohopean määrästä ( $0,158 \pm 0,083 \mu\text{g/g}$ ) metyylielohopeaa oli  $89,3 \pm 15,0$  prosenttia. Tutkimuksessa muillakin kalalajeilla metyylielohopean prosentuaaliset määrät olivat samalla korkeustasolla; maitokalalle saatiin pienin tulos, mutta sekin oli silti 71,8 %. Prosentuaalisesti eniten metyylielohopeaa kokonaiselohopeasta oli valkokatkaravulla ( $102 \pm 2,9$  %), mutta toisaalta kokonaiselohopeapitoisuus oli vain  $0,013 \pm 0,006 \mu\text{g/g}$ .<sup>77</sup> Esimerkiksi Burger *et al.* kirjoitti vuonna 2012 julkaistussa artikkelissaan, että vaikka artikkelissa keskitytään vain kokonaiselohopea- ja seleenipitoisuuksiin, voidaan aiempien tutkimusten perusteella arvioida metyylielohopeaa olevan noin 90 % kokonaiselohopeasta.<sup>69</sup> Osa Fang *et al.* saamista tuloksista on esitettyä taulukossa 2.

Taulukko 2: Yleisesti Taiwanissa nautittujen merenelävien elohopea- ja seleenipitoisuuksia. Pitoisuuksien yksikkö  $\mu\text{g/kg}$ .<sup>77</sup>

Kalalaji	Latinalainen nimi	Kok. elohopea	MeHg:n osuus (%)	Seleeni	Se/Hg moolisuhde
<b>Hai</b>	Carcharhinus sp.	$305 \pm 256$	$82,8 \pm 33,1$	$457 \pm 340$	7,8
<b>Tonnikala</b>	Thunnus albacares	$158 \pm 83$	$89,3 \pm 15,0$	$959 \pm 913$	15,6
<b>Idänmarliini</b>	Mokaira mazara	$329 \pm 267$	$80,4 \pm 31,2$	$424 \pm 285$	4,2
<b>Japanilainen meribassi, suzuki</b>	Lateolabrax japonicus	$83 \pm 51$	$97,0 \pm 6,4$	$241 \pm 59$	11,8
<b>Valkokatkarapu</b>	Penaeus vannamei boone	$13 \pm 6$	$102 \pm 2,9$	$256 \pm 167$	64,2
<b>Isokatkarapu</b>	Macrobrachium rosenbergii	$10 \pm 11$	$80,8 \pm 21,6$	$261 \pm 52$	82,4
<b>Meriahven</b>	Epinephelus hexagonatus	$91 \pm 28$	$93,2 \pm 7,9$	$500 \pm 245$	13,9
<b>Maitokala</b>	Chanos chanos	$16 \pm 4$	$71,8 \pm 14,1$	$230 \pm 111$	37,0

Viimeaikaisissa tutkimuksissa on seleenin ja elohopean pitoisuuksia määritetty yhtä aikaa. Syynä tälle on seleenin ja elohopean aiemmin mainittu keskinäinen vuorovaikutus selenoentsyymeihin liittyen. Näissä tutkimuksissa kahden alkuaineen pitoisuuksien keskinäisiä suhteita on verrattu toisiinsa eri kalalajeilla. Burger *et al.* tutkimuksessa seleenille ja elohopealle laskettiin ainemäärien suhde (molar ratio), niin että seleenin ainemäärä jaettiin elohopean ainemäärällä näytteestä. Lopullisena tuloksena voitiin todeta, että 15 meressä elävällä kalalajilla tämä suhde vaihteli välillä 2,7–45,4 eli seleeniä oli kaikilla tutkituilla kalalajeilla ylimäärin elohopeaan nähden.<sup>21,69</sup> Myös Fang *et al.* tutkimuksessa seleeniä oli ylimäärin kaikilla merenelävillä; esimerkiksi hailla ja idänmarliinilla tulokset olivat kaikkein alhaisimmat 7,8 ja 4,2, kun taas isokatkaravulla tulos oli 82,4.<sup>77</sup> Vaikka tällaisia laskelmia tehdäänkin, ei tällä hetkellä voida varmuudella sanoa minkä verran seleeniä pitäisi olla estämään elohopean haitallista vaikutusta. Yleisesti uskotaankin, että mitä enemmän elohopean ja seleenin keskinäisten mooliosuuksien suhde on seleenille edullinen, sitä parempi se on sekä kalan että sitä syövän ihmisen terveydelle. Kuitenkin varminta olisi välttää tunnetusti suuria määriä elohopeaa sisältävien kalalajien nauttimista, sillä seleenipitoisuus voi vaihdella hyvinkin paljon elinalueen mukaan. Sivuhuomautuksena voitaneen vielä sanoa, että Calatayud *et al.* tekemässä tutkimuksessa elohopeapitoisuudet olivat keskimäärin korkeampia kaloissa kuin simpukoissa, seleenipitoisuuksien kohdalla tilanne taas oli päinvastoin.<sup>78</sup>

Sekä kalasta että muista vedenelävistä saadun elohopean biosaataavuutta on tutkittu paljon ja myös sitä onko kalan eri kypsennystavoilla vaikutusta tähän. Kuten monien muidenkin ravintoaineiden tavoin, keho ei saa käyttöönsä sata prosenttisesti kaikkea sitä mitä ruoka sisältää. Biosaataavuutta määritettäessä yritetään selvittää, kuinka suuri osa nautitun ravinnon aineksesta saadaan liukenemaan ruoansulatuskanavassa suoliston imeytettäväksi<sup>79</sup>. Useiden tutkimusten perusteella ruuan rakenteen muutos ja proteiinien tuhoutuminen kypsennyksen aikana vaikuttavat haitallisten aineiden biosaataavuuteen<sup>79</sup>. Osana Maulvault *et al.* tekemää tutkimusta mustahuotrakalalla tutkittiin elohopean biosaataavuuden muutoksia kokeellisessa ruoansulatusjärjestelmässä, kun raa'an tuotteen lisäksi kypsennysmenetelminä oli grillaus, paistaminen ja höyrytys. Saatujen tulosten mukaan raa'alla, höyrytetyllä ja grillatulla kalalla ei ollut tilastollisesti merkittävää eroa biosaataavuudessa, vaikkakin höyrytetyn kalan elohopean biosaataavuus olikin pienempi muihin verrattuna. Paistetun kalan elohopean biosaataavuus kuitenkin heikkeni. Paistamisella saatuja selvästi pienempiä biosaataavuus-arvoja perusteltiin paistossa

käytetyllä vehnäjäuholla olevien liukenemattomien kuitujen kykyä sitoa elohopeaa.<sup>80</sup> Myös Torres-Escribano *et al.* tekemässä tutkimuksessa harmaakoirahaila, tonnikalalla, miekkakalalla ja boniitilla elohopean biosaatavuuden todettiin merkittävästi pienentyvän tonni- ja miekkakalalla paistilevyllä paistamisen jälkeen. Tällöin biosaatavuus pieneni alkuperäisestä raa'an lihan vaihteluvälistä 13–19 % ja 59–87 % paistetun 6–10 % ja 38–49 %:iin.<sup>79</sup> Seleenille vastaavanlaisia tutkimuksia löytyy huomattavasti vähemmän, mutta esimerkiksi Cabañero *et al.* julkaisemassa artikkelissa kypsentämättömällä miekkakalalla ja sardiinilla saatiin biosaatavuus arvoiksi 76 % ja 83 %, kun tonnikalalla saatiin alhaisempi tulos 50 %.<sup>81</sup>

## 5. Biologisten näytteiden käsittely

### 5.1 Liuotus

Koska näytteenkäsittelyä pidetään yleisesti kaikkein suurimpana potentiaalisen virheen lähteenä, on siihen syytä kiinnittää erityistä huomiota. Myös ajallisesti näytteen käsittely vie valtaosan näytteen tutkimukseen käytetystä ajasta, kun taas varsinainen määrittäminen nykylaitteistolla on poikkeustapauksia lukuun ottamatta hyvin suoraviivaista ja vie tähän verrattuna vain hetken. Näytteen otossa ja sen käsittelyssä tapahtuneita virheitä ei myöskään pystytä enää korjaamaan myöhemmissä työvaiheissa, mutta mittaukset pystytään yleensä tarvittaessa uusimaan.<sup>82</sup>

Tutkittava näyte pystyy lähtökohtaisesti olemaan joko kaasumaisessa, nestemäisessä tai kiinteässä olomuodossa. Nykyisin yleisimpiin mittausten menetelmiin kuuluviin FAAS, GFAAS ja ICP tekniikoihin tutkittavan näytteen tulee lähes poikkeuksetta olla liuosmuodossa, jolloin kiinteästä näytteestä on saatava tarvittavilta osin liuotettua määritettävät alkuaineet. Tavoitteesta riippuen tämä tarkoittaa joko näytteen täydellistä hajotusta liuokseen tai vain halutun osan liuotusta eli uuttoa nestefaasin mukaan. Jälkimmäisessä tekniikassa hyvänä esimerkkinä ovat vaikkapa liuotusmenetelmät joissa pyritään jäljittelemään ihmisen ruoansulutusjärjestelmän eri osia ja tutkia eri alkuaineiden todellista biosaatavuutta.<sup>82</sup>

Käytetyn menetelmän määrittelee lopulta tutkimuksen tavoite ja määritettävät alkuaineet, sillä jotkin liuotusmenetelmät joko eivät sovellu haluttujen yhdisteiden täydelliseen

liuottamiseen tai voivat esimerkiksi olla korkeiden lämpötilojensa takia sopimattomia alkuaineiden määrittämiseen liian suuren haihtuvuuden vuoksi. Käyttämällä erilaisia liuotusreagensseja ja olosuhteita, erilaisille näytetyypeille voidaan löytää optimaalinen liuotusmenetelmä. Jos kokonaishajotuksen ja uuttamisen etuja vertaa toisiinsa, on uutto yleensä nopeampi suorittaa, mutta näytetyypistä riippuen se ei välttämättä tuhoa määrittämiä mahdollisesti häiritsevää matriisin osaa, kuten rasvaa. Toisaalta, jos määritettävä alkuaine saadaan verrattain helposti nestefaasiin, voi etuna menetelmässä olla mahdollisesti määrittämiä häiritsevien alkuaineiden pienempi määrä lopullisessa liuoksessa verrattuna täysin hajotettuun näytteeseen. Kokonaishajotuksella saadaan matriisin häiritsevät komponentit tuhottua samalla vapauttaen määritettävät alkuaineet matriisista. Hajotusmenetelmiä on olemassa lukuisia, ja varsinkin mikroaaltohajotus on ollut pitkään eräs käytetyimmistä menetelmistä. Myös ultraääniavusteinen hajotus/uutto on alkanut yleistyä sen lukuisten etujen vuoksi.<sup>82</sup>

### 5.1.1 Ultraäänihajotus

Ultraääni on taajuusalue, joka on ihmisen kuulemiskyvyn yläpuolella 20 kilohertsissä. Kuten muutkin äänet, on ultraääni aaltoliikettä, joka ei etene tyhjiössä lainkaan ja vaimenee kaasussa nopeasti. Ultraääni etenee sen sijaan hyvin kiinteän aineen sisällä ja nesteessä. Monille ultraäänitekniikka on tuttua lähinnä lääketieteen puolelta, jossa sitä sovelletaan verisuonten, sisäelinten ja pehmytkudosten tutkimiseen. Ultraääni soveltuu tähän hyvin, sillä osuessaan nesteeseen ääniaallot muodostavat kaiun, jolloin tutkitun kohteen rakenteesta ja muodoista saadaan tietoa. Eli kuvantaminen tapahtuu kaikuluotaimen tavoin. Lääketieteen puolella ultraääntä voidaan käyttää myös esimerkiksi munuaiskivien tuhoamiseen. Näiden sovellusten lisäksi ultraääntä käytetään muun muassa koirapilleissä, anemometreissä ja korunpuhdistimissa. Laboratoriossa ultraääntä käytetään lähinnä avustamaan hajotus- ja liuotusreaktioita, ja saatavilla on sekä ultraäänihauteita että -sauvoja.<sup>82-84</sup>

Ultraääni voi vaikuttaa hajotettavaan näytteeseen sekä mekaanisesti että kemiallisesti. Mekaaniset vaikutukset ilmenevät varsinkin matalammilla taajuuksilla, kun väliaineessa kulkiessaan ääniaallot aiheuttavat väliaineen laajenemista ja puristumista kasaan. Tällöin samalla molekyylit lähestyvät toisiaan ja taas loitotessaan aiheuttavat kuplia nesteessä ollessaan. Ennen pitkää syntynyt kupla ei enää kestä ultraäänien energiaa, jolloin se

romahtaa sisäänpäin. Kuplan sisällä olevien kaasujen puristuessa kasaan syntyy hyvin korkeita paikallisia lämpötiloja ja paineita. Kuitenkin, koska kuplien koko on hyvin minimaalinen verrattuna ympäröivän liuoksen tilavuuteen, ei itse liuoksen lämpötila muutu. Ilmiötä, jossa kuplat syntyvät, kasvavat ja romahtavat kutsutaan kavitaatioksi. Kavitaatio aiheuttaa partikkelien pinnalla kulumista pienentäen samalla niiden kokoa. Samalla ultraääni aiheuttaa muodostuneiden pienten partikkelien hajaantumista liuoksessa ja näin edistää liukenemista. Kemiallisena vaikutuksena ultraääni taas edistää joidenkin kemikaalien reaktiivisuutta ja aiheuttaa vapaiden radikaalien sekä muiden yhdisteiden muodostumista.<sup>47,82</sup>

Vaikka sekä kemialliset että mekaaniset vaikutukset ilmenevät käytännössä yhtä aikaa, voidaan ultraäänihajotus jakaa tekniikkana kahteen eri menetelmään, joiden erona on niiden painopisteen muutos jommankumman ilmiön suuntaan. USASD tekniikassa (Ultrasound-assisted soft digestion) ultraääni on ylimääräisen energian lähde suhteellisen matalien lämpötilojen ja paineiden olosuhteissa. Tällöin mekaaniset reaktiot ovat pääasiallinen hajotusta edistävä voima. USASTD tekniikassa (Ultrasound-assisted strong digestion) reaktio-olosuhteet ovat paljon rajummat ja yleensä tähän liittyy korkeammat lämpötilaolosuhteet ja reaktiiviset (hapettavat/pelkistävät) kemikaalit. Käytettyyn menetelmään vaikuttaa lopulta näytteen tyyppi ja varsinkin se millaisessa matriisissa analyytti on. Jos näyte on helposti liukeneva voi USASD käsittely olla riittävä, muutoin käännytään USASTD:n puoleen. Tärkeintä kuitenkin olisi, ettei käsittelyn aikana menetettäisi tutkittavaa alkuainetta.<sup>82</sup>

Ultraäänihajotuksen tehokkuuteen vaikuttaa moni asia. Eräs helposti unohdettava seikka on muun muassa käytetyn astian muoto, sillä energian siirron kannalta paras astia on tasapohjainen, kuten erlenmeyerkolvi. Näyteliuoksen ravistelu voi myös olla hyödyllistä, sillä se estää näytteen sedimentoitumisen ja voi myös lisätä liuoksen ja kiinteän aineksen vuorovaikutusta reaktion aikana. Ultraäänihäuteen lämpötilalla voi olla suuri merkitys reaktion kannalta; lämpötilan nosto voi edistää liuotusta tai se voi tehdä siitä liian kiivaan ja vaikeasti hallittavan. Jälkimmäinen voi tapahtua esimerkiksi jos käytetään vetyperoksidin kaltaista vahvaa hapetinta yhdessä happojen kanssa. Toisaalta, jotkin näytteet voivat olla myös termolabiileja eli herkkiä korkeille lämpötiloille, jolloin veden lämpötilaan on kiinnitettävä erityistä huomiota. Paineen vaikutusta ultraäänihajotukseen

on tutkittu hyvin vähän, mutta joissakin tutkimuksissa korkean paineen on havaittu katalysoivan reaktiota. Ultraäänihauteessa myös hajotusastian sijainnilla on väliä, sillä hauteessa muodostuvien seisovien aaltojen takia energia ei jakaudu tasaisesti. Ultraäänisauvaa käytettäessä taas sauvan tasolla tai sen yläpuolella ei tapahdu mitään reaktioita; sauvan ollessa liian ylhäällä nesteessä tapahtuu vaahtoamista ja ultraäänienergian siirto ei ole täydellistä. Liian syvällä nesteessä ollessaan taas sauvasta vapautuva energia ei jakaudu tasaisesti nesteeseen. Kuten arvata saattaa, myös kiinteän näytteen partikkelikoko ja käytetty liuotin vaikuttavat ultraäänihajotuksen tehokkuuteen.<sup>82</sup>

## 5.1.2 Mikroaaltohajotus

### YLEISTÄ

Mikroaaltohajotus on yksi käytetyimmistä näytteen käsittelymenetelmistä. Sen etuina ovat perinteisiin avonaisen astian menetelmiin verrattuna muun muassa kontaminaatoriskin pieneminen, mahdollisuus käyttää korkeita paineita ja lämpötiloja hajotuksessa, sekä lieventää riskiä helposti haihtuvien aineiden häviämiseen näytteen hajotuksen aikana. Moniin perinteisempiin hajotusmenetelmiin verrattuna mikroaaltohajotus on myös suhteellisen nopea ja se on myös monipuolinen soveltuen hyvin erilaisille näytetyypeille. Esimerkiksi eräs laajemmalti käytetyistä hajotusmenetelmistä, EPA Method 3052, soveltuu niin eri maalajien, lietteiden, sedimenttien kuin biologisten ja kasviperäisten näytteidenkin hajottamiseen. Näin laaja näytetyyppien skaala selittyy sillä, että menetelmän ohjeessa on paljon liikkumavaraa, kuten näytetyypin mukaan happoja ja niiden pitoisuuksia voi ja tuleekin vaihtaa hyvän tuloksen aikaansaamiseksi. Esimerkiksi biologisille näytteille suosituksena on käyttää 9 ml HNO<sub>3</sub>, 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ja 1 ml HCl, kun taas sedimenttinäytteille suositellaan liuokseksi 9 ml HNO<sub>3</sub>, 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2 ml HCl ja 3 ml HF silikaattiperäisten materiaalien täydelliseksi hajottamiseksi. Suositus näytteen määrästä vaihtelee sen tyyppin mukaan, mutta yleisesti ottaen liikutaan välillä 0,25–1,0 g. Jos näyte sisältää paljon orgaanista ainesta ja sen hajotessa on odotettavissa selkeä paineen nousu astian sisällä, suositellaan hajotuksessa pienempää näytemäärää.<sup>85,86</sup>

Mikroaaltotekniikat eivät keskity pelkästään hajotukseen, vaikka ne saattavatkin olla yleisimmin käytössä. Esimerkiksi EPA:n toinen menetelmä, 3015A, on tarkoitettu

mielenkiinnon kohteina olevien alkuaineiden uuttamiseen hajotuksen sijaan. Tällöin tuloksena ei ole välttämättä näytteen kokonaispitoisuus kyseisellä alkuaineella, mutta aina se ei olekaan tarpeen; joskus mielenkiinnon kohteena voi olla vain se helposti liukeneva osa, jos tutkitaan esimerkiksi jonkin raskasmetallin liikkuvuutta näytteestä.<sup>87</sup> Mikroaaltohajotuksen monipuolisuus ei selity pelkästään menetelmien laajuudella, vaan siihen on saatavilla myös valmistajilta monipuolisesti erilaisia osia ja astioita. Esimerkiksi mikroaaltohajotukseen soveltuvien mikroaaltouunien ja käyttöesineiden tunnetun valmistajan, CEM:in, valikoimiin kuuluu viisi erilaista mikroaaltohajotukseen perustuvaa laitetta ja niihin erilaisia varaosia, kuten MARS 6 mikroaaltouuniin hajotusastioiden materiaalivaihtoehtoina ovat PFA, Teflon, kvartsi ja lasi astiakoon vaihdellessa.<sup>88</sup>

## TOIMINTA

Mikroaaltouunin toiminta perustuu nimensäkin mukaisesti mikroaaltoihin, jotka ovat radioaaltojen ja ultraviolettivalon tavoin sähkömagneettista säteilyä. Tämän takia mikroaalloilla on samanlaiset fysikaaliset ominaisuudet tavallisen valon kanssa, vaikkamme niitä silmillämme pystykään havaitsemaan.<sup>89</sup> Mikroaaltouunissa käytettävien mikroaaltojen taajuus on yleensä noin 2,45 GHz ja ne saadaan aikaan magnetronin avulla.<sup>90,91</sup> Magnetroni käyttää toimiessaan sähkövirtaa, ja se muodostaa resonoidessaan sähkömagneettista säteilyä. Magnetronin keskellä on lämmitetty metalliputki, katodi, ja sen ympärillä on renkaanmuotoinen anodi, jossa on koloja tai lovia leikattuna siihen. Anodin alla on voimakas magneetti, joka synnyttää magneettikentän katodin suuntaisesti. Yrittäessään kulkea katodilta anodille elektronit joutuvat kulkemaan sekä sähkö- että magneettikentän läpi, minkä seurauksena ne kulkevat suoran linjan sijaan aivan anodin vierestä jolloin anodissa olevat kolot alkavat resonoida ja tämän seurauksena syntyy mikroaalloja. Syntyneet mikroaallot kerätään yhteen ja ohjataan niin sanotulla aallonjohtimella oikeaan mikron osaan, jossa ne voivat lämmittää ruokaa tai olla hajottamassa yhdessä typpihapon kanssa biologista näytettä.<sup>92</sup>

Mikroaaltouunin ruokaa lämmittävä vaikutus perustuu mikroaaltojen säteilyn vaikutukseen, jossa muuttuva sähkökenttä vaikuttaa ruuan sähköisesti varattujen molekyylien kanssa.<sup>90</sup> Molekyylien sähköinen varaus on seurausta elektronegatiivisuudesta, jolloin joillain alkuaineilla on toisia suurempi kyky vetää



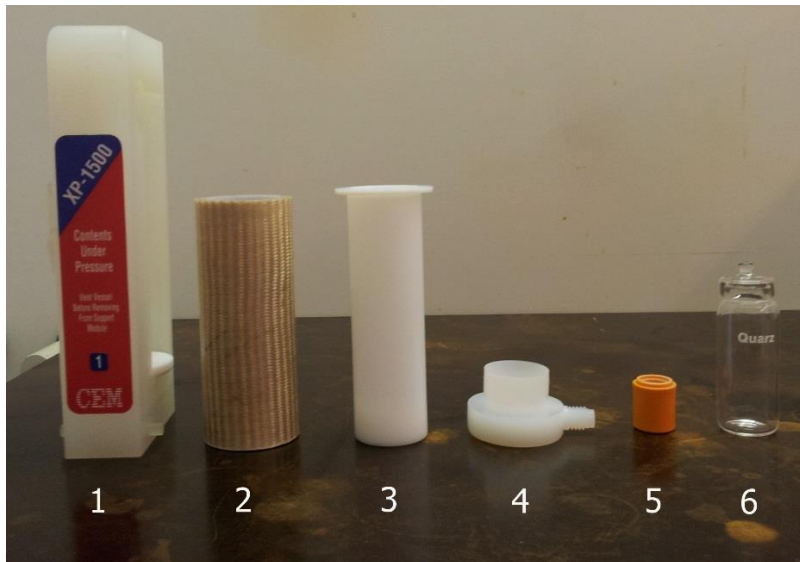
elektroneja puoleensa. Tästä johtuen elektronit eivät välttämättä ole molekyylissä jakautuneena tasaisesti, vaan elektronegatiivisemmän atomin ympärillä voi olla negatiivista osittaisvarausta johtuen sen ympärille keräytyneistä vapaista elektroneista. Vastaavasti taas pienemmän elektronitiheyden alueille syntyy positiivinen osittaisvaraus. Tällaista osittaisten sähkövarausten omaavaa molekyylä kutsutaan dipoliseksi ja siitä hyvänä esimerkkinä on esimerkiksi vesimolekyylä, jossa happimolekyylä on elektronegatiivisempi atomi ja vetyatomeille jää osittainen positiivinen varaus.<sup>34</sup> Muuttuvassa sähkökentässä positiivisen osittaisvarauksen omaava osa pyrkii suuntautumaan kentän suuntaisesti, kun taas negatiivisesti varautunut partikkeli suuntautuu kentän vastaisesti. Muuttavassa kentässä tämä aiheuttaa vesimolekyylin pyörimistä, mikä synnyttää lämpöä ja kitkan myötä lämmittää myös muita lähellä olevia molekyylejä.<sup>90</sup>

## **LAITTEISTO JA ASTIAT**

Pääsääntöisesti laboratorioden mikroaaltouunit ovat käyttötarkoitukseen suunniteltuja ja poikkeavat monilta osin ruoanlämmittämiseen tarkoitettusta uunista. Tästä huolimatta, joissakin tutkimuksissa on käytetty tavallista mikro-aaltouunia näytteenhajotuksissa tulosten ollessa vertailukelpoisia kaupallisesti saataviin mikro-aaltouuneihin. Yleisesti ottaen laboratorioympäristöön tarkoitetuissa laitteissa ja astioissa saavutetaan selkeästi parempi työturvallisuus niiden paremman hallittavuuden kautta; astiat ovat kunnollisesti kiinnitettynä kiinteän alustaan, ne ovat tiiviitä, kestävät kovia paineita, lämpötiloja ja happoja, sekä hajotusta voidaan tarkkailla lämpötila- ja/tai paineanturilla. Periaatteessa tavalliseenkin mikroaaltouuniin voidaan laittaa kunnolliset hajotusastiat, mutta laitteistosta jää joka tapauksessa puuttumaan käyttöä helpottavat anturit, jolloin hajotus suoritetaan vain kokeilun ja erehdyksen kautta. Hajotuksessa paineen selvä nousu astiassa on merkki hajoamisen alkamisesta ja lämpötila on ohjeistuksissa tehoa tarkempi mittari, sillä astiamäärän vaihdellessa myös tehon tarve muuttuu.

Hajotuksissa käytettävät mikroaaltouunit eroavat olennaisesti kodin mikroista siinä, että niissä on tehostettu ilmanpoisto mahdollisten happohöyryjen ja muun kaasumaisen hajoamistuotteen poistamiseksi, käytetty alusta mahdollistaa astioiden kiinnityksen siihen hajotuksen ajaksi, sekä ohjelmisto mahdollistaa monivaiheisen hajotusmenetelmän luomisen, mihin kuuluu yleensä lämpötilan nosto haluttuun

lämpötilaan halutussa ajassa (RAMP), lämpötilan pito kyseisessä lämpötilassa halutun ajan (HOLD) ja loppujäähdytys (COOLDOWN). Jos aivan uudenaikaisia hajotusastioita ei lasketa, ovat perinteisemmät astiat rakenteeltaan yleensä hyvin samankaltaisia. Näyte tulee yleensä sisäästiana olevan muoviastian (esim. polypropeeni) sisään, joka suljetaan kannella. Tämän sisäästian ympärille tulee tukikehikko, joka estää muovisen sisäästian laajenemisen mikroaaltohajotuksen aikana. Koko tämä systeemi tulee mikrokehikon sisään, minkä on tarkoitus kiinnittyä mikroaaltouunin sisällä pyörivään alustaan. Kehikoiden ulkonäkö vaihtelee paikoitellen astioiden tapaan, ja joissakin kehikoissa on myös mutterisysteemi, jonka tarkoitus on lukita hajotusastia ja sen kansi tiiviiksi hajotusta varten. Tarvittaessa sisäästian sisään voi laittaa myös vielä esimerkiksi kvartsiastian, jos näyte sitä vaatii. Esimerkiksi muovin hajotuksen on parempi tapahtua kvartsiastian kuin muoviastian sisällä. Erilaisista rakenneratkaisuista riippuen hajotusastiat ovat yleensä joko täysin suljettuja tai niissä on jonkinlainen tiiviste (murtokalvo), joka painerajan ylittyessä alkaa vuotaa ylimääräistä painetta pois suojellakseen astiaa. Kuvissa 3 ja 4 on esitettynä CEM:n XP-1500 astiat, jotka edustavat rakenteeltaan hyvin tyypillistä hajotusastiatyyliä<sup>93</sup>. Näissä astioissa murtokalvo löytyy kannen korkin sisältä.



Kuva 3: Hajotusastioiden osat. 1. Mikrokehikko, 2. Tukikehikko, 3. 4. 5. Polypropeeniastia + kansi + kannen korkki, 6. Kvartsiastia.<sup>93</sup>



Kuva 4: Koottu hajotusastia.<sup>93</sup>

## 5.2 Näytteiden esipelkistys

Näytteelle tehdyn liuotuksen jälkeen joidenkin alkuaineiden hapetusluku voi olla liian korkea kemialliseen höyryn muodostukseen vaadittuun pelkistykseen, joka tapahtuu esimerkiksi natriumborohydridillä. Tällöin näytteelle täytyy tehdä esipelkistys, jolla alkuaineen hapetusluku saadaan sopivaksi tekniikkaa varten.<sup>94</sup> Esipelkistyksen toteutus riippuu määritettävästä alkuaineesta. Esimerkiksi kylmähöyrytekniikan onnistumiseksi elohopealle on sen oltava hapetusasteella II, josta se pelkistetään kaasumaiseen alkuainemuotoon.<sup>95</sup> Usein elohopea ei kuitenkaan muiden alkuaineiden tavoin vaadi esipelkistystä. Esipelkistyksen takia joidenkin alkuaineiden yhtäaikainen määritys voi olla myös vaikeaa.

Seleenin ja telluurin esipelkistyksessä tarkoituksena on saada niiden hapetusluku putoamaan VI:sta IV:ään.<sup>94</sup> Tähän tarkoitukseen tehokas menetelmä on ollut laittaa näytteeseen 6 M vetykloriditausta ja pitää liuosta lämpölevyllä tietty aika, yleensä joko vain käyttäen sitä 90 asteessa, kuten PerkinElmerin ohjeessa<sup>94</sup>, tai pitäen sitä siinä 15 min kuten esimerkiksi Santos *et al.*<sup>96</sup> on tehnyt tutkimuksessaan. Toinen vaihtoehto seleenin esipelkistykseen on tiourealla käsittely, jossa sitä on lisätty näyteliuokseen ja annettu vaikuttaa jonkin aikaa, esimerkiksi 30–40 min.<sup>97,98</sup> Tioureaan käytössä ongelmallista on vain sen määrän optimointi; liian suuri määrä tioureaa yhdessä liian pitkän reaktioajan kanssa saattaa pelkistää liuoksen seleenin aina alkuainemuotoon saakka, mutta toisaalta liian vähäinen määrä sitä ei pelkistä kaikkea seleeniä hapetusasteelta VI. Liiallisen pelkistymisen riskin takia onkin kehitetty menetelmiä, joissa tiourea lisätään juuri ennen pelkistystä ja mittauslaitteelle menoa ns. ”on-line”. Näin on tehty muun muassa. Qiu *et al.* tekemässä tutkimuksessa, jossa tioureaa linjaan lisäämällä ja 30 sekunnin vaikutusajalla saatiin Se(VI) pelkistettyä tehokkaammin kuin pelkällä lämmittämällä vetykloridissa.<sup>99,100</sup> Tioureaa voi käyttää myös arseenin, antimoinin ja tinan esipelkistyksessä, sekä elohopean pelkistämisessä alkuainemuotoon. Tällöin arseeni, antimoni ja tina ovat alussa hapetusasteilla V, V sekä IV ja esipelkistyksen jälkeen III, III ja II.<sup>97</sup>

Arseenin, antimoinin ja vismutin esipelkistys voidaan suorittaa kaliumjodidin ja askorbiinihapon liuoksella. PerkinElmerin ohjeessa on tehty 5 % liuos liuottamalla 5 g kaliumjodidia ja askorbiinihappoa 100 ml polypropyleenipullossa ja täyttämällä

merkkiin. Esipelkistys tehtiin laittamalla 20 ml näyteliuosta 50 ml autosampler-astiaan, ja lisäämällä siihen 2 ml KI ja askorbiinihappoliuosta, sekä 6 ml vahvaa vetykloridia. Tämän jälkeen liuoksen annettiin olla vähintään 20 min, minkä jälkeen astia täytettiin merkkiin asti vedellä, ja liuos oli valmis mittauksia varten. Kaikki kolme alkuainetta pelkistyvät hapetusasteelta V hapetusasteelle III.<sup>94</sup> Kuten esimerkeistä ilmenee, voi eri alkuaineilla olla käytettävissä useampikin esipelkistystekniikka tilanteesta riippuen.

## **6 ICP-OES -laitteisto**

### **6.1 Yleistä**

ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy) -tekniikka on monipuolisuutensa ansiosta yleinen laite monessa analyttisiä määrittämiä tekevässä laboratoriossa. Menetelmä perustuu näyteliuoksen sumuttamiseen argon plasman ytimeen, jonka lämpötila voi olla niinkin korkealla kuin 10 000 K. Tällaisessa lämpötilassa näyte tuhoutuu täysin ja siinä olevat alkuaineet atomisoituvat, ionisoituvat ja termisesti virittyvät, jolloin ne viritystilalta palatessaan perustilalle emittoivat valosäteilyä, joka voidaan havaita optisella laitteistolla. Käytetty aallonpituusalue optisella laitteistolla on yleensä välillä 165–800 nm. Koska jokainen alkuaine lähettää omaa karakteristista aallonpituuttaan, voidaan kaikki näytteen sisältämät alkuaineet havaita samalla mittauskerralla. Optiselle laitteistolla havaittua aallonpituutta voidaan käyttää alkuaineen tunnistamiseen, kun taas säteilyn intensiteetti kertoo aineen määrästä näytteessä.<sup>101,102</sup>

ICP-OES -tekniikassa näytteen sisältämien alkuaineiden pitoisuudet määritetään samoin kuin muissakin spektrometrisissä menetelmissä eli kalibrointiin käytetään tunnetun pitoisuuden omaavia standardiliuoksia, joiden intensiteettien perusteella laite määrittää kalibrointisuoran ja näytteen pitoisuus saadaan sovittamalla tulos tälle suoralle. Korkea plasman lämpötila estää ainakin valtaosin matriisihäiriön synnyn. AAS-tekniikan tavoin ICP-tekniikassa näyte syötetään usein plasmalle nestemäisenä, mutta on olemassa myös näytteensyöttömenetelmiä, joissa näyte menee plasmalla kiinteänä tai kaasumaisena. Kiinteän näytteen syötöstä hyvänä esimerkkinä on nykyisin yleisesti käytössä oleva ”slurry”-menetelmä, jossa hienojakoinen näyte voidaan syöttää tasaisesti jakautuneena nesteen sisällä plasmaan. Kaasumaisesta näytteensyötöstä hyvänä esimerkkinä taas ovat kemialliset höyryn muodostus menetelmät, joissa ennen plasmalle menoa nestemäisestä

näyteliuoksesta muutetaan analyytit kaasumaiseen muotoon. Kemiallisia höyryn muodostus menetelmiä käydään läpi myöhemmin tässä kappaleessa.<sup>101,102,103</sup>

Eräs ICP-OES -tekniikan merkittävimmistä eduista on sen soveltuvuus noin 70 alkuaineen määrittämiseen erilaisista matriiseista, sekä sen kyky suorittaa mittaus usealle alkuaineelle samanaikaisesti verrattuna esimerkiksi perinteiseen FAAS-tekniikkaan, jossa kukin alkuaine määritetään omalla lampullaan erikseen. Verrattaessa OES-menetelmää toiseen nykyisin yleisesti käytössä olevaan ICP:n ja massaspektrometrin yhdistävään ICP-MS -tekniikkaan OES häviää herkkyydessä, mutta toisaalta sillä voidaan mitata helpommin kevyitä alkuaineita kuten S, Ca, Fe, K ja Se, joiden mittaus MS-tekniikalla voi olla haastavaa häiriöiden takia. Menetelmän keskeisimpiä etuja on myös mittauksissa käytössä oleva laaja pitoisuusalue; pitoisuudet voivat vaihdella ppm:stä (parts per million) painoprosentteihin, mikä vähentää tarvittavien laimennosten tekemistä näytteille. Käytännössä merkitystä on vain kalibrointiliuosten pitoisuuksilla, eli näytteelle mitatun pitoisuuden on osuttava kalibrointiliuosten muodostaman suoran alueelle ollakseen tarkka. Yleisenä sääntönä mittaustuloksen luotettavuudessa pidetään sitä, että RSD:n (relative standard deviation) on oltava alle 5 % näytteen mittauksen replikaateilla. Analyysin aikana vaikka näyte mitataankin vain näennäisesti kerran, sille otetaan samalla kertaa useampi tulos (replikaatti), joiden keskiarvon ja hajonnan laite ilmoittaa lopullisessa tuloksessa.<sup>101-103</sup>

## **6.2 Laitetekniikka**

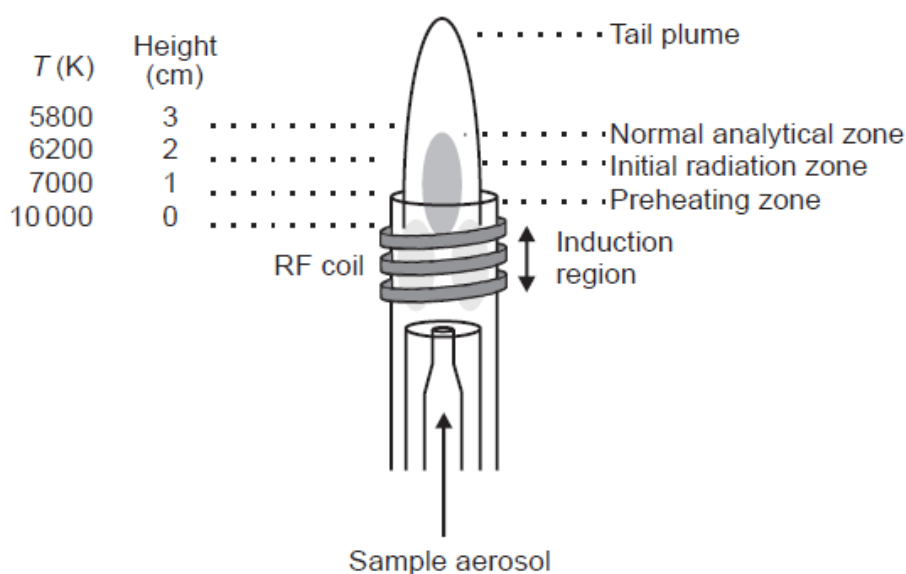
### **6.2.1 Plasma**

ICP-laite on perustekniikaltaan yksinkertainen, mutta komponentteja vaihtelemalla sitä saadaan muunneltua yllättävän monipuolisesti eri käyttötarkoituksia varten. Nimensä mukaisesti laitteen sydän on induktiivisesti kytketty plasma, joka syntyy voimakkaan magneettikentän ja konsentrisen kvartsisoihdun läpi tulevan argonin vuorovaikutuksesta. Kvartsisoihtu koostuu kolmesta sisäkkäisestä kvartsisista tai muusta soveltuvasta materiaalista valmistetusta konsentrisesta putkesta, sekä niiden yläosaa ympäröivästä kuparisesta induktiokäämistä, joka on kytketty radiotaajuuksia tuottavaan generaattoriin. Kun induktiokäämiin syötetään virtaa tässä muodossa, liikkuu se käämissä edestakaisin ja oskilloi generaattorin tuottaman taajuuden tahdilla. Tämä taajuus on yleensä 27 tai 40 MHz ja syötetyn virran seurauksena soihdun yläosaan syntyy sähkömagneettinen kenttä.

Kun soihtuun syötetään argonkaasua ja tälle tarjotaan kipinä, osa elektroneista karkaa argonkaasun atomeilta. Nämä elektronit jäävät induktiokäämillä tuotettuun magneettikenttään ja saavat sen vaikutuksesta lisää energiaa. Nämä korkeamman energian sisältävät elektronit voivat tämän jälkeen törmätä varauksettomiin argonkaasun atomeihin, jolloin myös niistä vapautuu elektroneja. Tästä argonkaasun ionisoitumesta tulee ketjureaktio, jolloin argonkaasu käytännössä hajoaa atomeja, ioneja ja elektroneja sisältäväksi plasmaksi. Syntynyt plasmasoihdu ylläpidetään tämän jälkeen syöttämällä soihdulle tarvittava määrä argonkaasua, sekä induktiokäämille virtaa.<sup>101,104,105</sup>

Soihdun sisältämällä kolmella konsentrisella putkella on omat tehtävänsä ja niihin liittyy vahvasti myös tekniikassa käytetty argonkaasu. Näistä putkista kaksi sisintä osallistuu plasman luontiin, kun taas uloin suojaa induktiokäämiä plasmalta. Uloimman putken halkaisija on yleensä noin 20 mm, mutta sen pituus vaihtelee mallista riippuen sen päättyen joskus heti induktiokelan jälkeen, mutta ulkoputki voi olla myös pidempi ja siihen on tehty yksi tai useampi lovi optiikan suuntaisesti. Tällöin ylimääräinen ilma ei pääse plasmalle ja mahdollisesti mittauksia häiritsevien komponenttien, kuten typenoksidien, syntyminen estyy. Uloimman putken sulamisen estämiseksi sen sisäosaan kohdistetaan voimakas argonkaasuvirtaus. Sama kaasuvirtaus myös ylläpitää plasmaa, minkä takia sitä kutsutaan plasmakaasuksi ja sen virtausnopeus on yleensä luokkaa 10–20 L/min. Sisimmän putken tarkoitus on kuljettaa näyteaerosoli plasmalle ja auttaa samalla myös sen muodon ylläpidossa. Sisimmäistä putkea kutsutaan injektoriputkeksi. Valmistusmateriaalina sillä on yleensä kvartsi tai alumiinioksidi ja siihen tulevaa kaasuvirtausta kutsutaan kantaja- tai sumutinkaasuksi. Virtausnopeudet voivat vaihdella välillä 0,3–2 L/min. Periaatteessa pienemmät virtausnopeudet näytteensyötössä ovat mittausten kannalta edulliset, sillä tällöin näyte on pidemmän aikaa plasmassa saaden enemmän energiaa. Virtausnopeuden on kuitenkin käytännössä oltava tarpeeksi suuri, jotta tämä kaasuvirtaus pääsee plasman sisään. Keskimmäisen putken tehtävänä on ohjata plasmakaasun virtausta ja sen kautta voidaan tarvittaessa ohjata niin sanottu apukaasu, joka nostaa plasmaa ehkäisten kiinteiden partikkelien kertymisen injektoriputken kärkeen sen kuumenemisen seurauksena. Apukaasun virtausnopeus on yleensä välillä 0–2 L/min. Soihdun rakennetta havainnollistaa myös kuva 5.<sup>101,106,107</sup>

Plasman sisällä lämpötila vaihtelee huomattavasti ja se voidaan jakaa eri alueisiin. Yleisesti ottaen plasman lämpötila vaihtelee aivan sydänsosan 10 000 Kelvinistä hännän alle 6000 Kelviniin. Plasma jaetaan näytteen kokemien vaiheiden mukaan kolmeen alueeseen ja näistä käytetään nimityksiä esilämmitysalue (Preheating Zone, PHZ), esisäteilyalue (Initial Radiation Zone, IRZ) ja analyttinen alue (Normal Analytical Zone, NAZ). Plasmaan syötetty näyte kokee kolme eri vaihetta, jotka ovat kaasuuntuminen, atomisoituminen ja ionisoituminen. Näistä kaasuuntuminen tapahtuu esilämmitysalueella, esisäteilyalueella tapahtuu atomisoituminen, sekä atomien virittyminen ja analyttisellä alueella ionisoituminen.<sup>101,105</sup>



Kuva 5: Plasmasoihtu sekä lämpötila-alueet eri korkeudella plasmaa.<sup>106</sup>

Koska ICP-tekniikka perustuu atomi- ja ionisiirtymien emittoimaan valoon, vaikuttaa menetelmässä käytetyn plasman käyttökaasu myös käytettävyyteen, sekä siihen mitä alkuaineita sillä voidaan määrittää. Yleisimmin käytössä olevan argon plasman ionin energia on 15,76 eV, mikä käytännössä tarkoittaa menetelmän soveltuvan virittämään tämän alle jäävät siirtymät. Tämä riittää helposti metallien ionienkin virittämiseen, sillä niillä ionisaatioenergia on yleisesti tasolla 7–8 eV. Alkalimetallien ionisaatioenergia on noin 4 eV, puolimetallien ionisaatioenergia on metalleja korkeampi ja epämetallien ionisaatio on jo argonplasmalla huomattavasti vaikeampaa niiden ionisaatioenergian ollessa noin 12eV. Myös tässä gradututkielmassa aiheena olevien elohopean ja seleenin ionisaatioenergiat ovat huomattavan korkeita; 10,44 eV ja 9,75 eV. Argonplasmalla syötetyistä elohopeasta ja seleenistä ionisoituu 38 % ja 33 % kokonaisuudesta. Muiden alkuaineiden hyödyntämistä käyttökaasuna rajoittaa yleensä kaasun korkeampi hinta ja/tai tarvittavan laitteiston kalliimpi hinta, joka tarvitaan plasmasoihdun

aikaansaamiseksi vaativammalla alkuaineella. Esimerkiksi helium olisi myös verrattain hyvä vaihtoehto käyttökaasuksi, mutta ionisaatioenergialla 24,59 eV se vaatii enemmän energiaa ja voimakkaamman generaattoriin. On syytä myös muistaa, että ICP:n lisäksi on olemassa muitakin plasmaan perustuvia tekniikoita, kuten tasavirta- (DCP) ja mikroaaltoplasma (MIP), josta jälkimmäisessä käyttökaasuna on helium. Tämän ansiosta mikroaaltoplasmalla saadaan korkeammat virityslämpötilat ja tutkittua paremmin epämetallejakin, mutta toisaalta tekniikka on altis matriisihäiriöille.<sup>101,108</sup>

Plasman käytössä olennaista on sen sijoitus käytettyyn optiseen laitteistoon nähden; tämä on voitu toteuttaa joko niin, että optinen laitteisto on plasmasoihtuun nähden sivussa (radiaalinen) tai sen häntäpäätä kohtisuoraan (akσιαalinen). Mittaustapojen välillä on laadullisia eroja. Radiaalisessa mittauksessa häiriön mahdollisuus on pienempi, jolloin se soveltuu aksiaalista mittaustapaa paremmin alkali- ja maa-alkalimetallien pitoisuuksien mittauksiin. Aksiaalinen mittaus taas on menetelmänä herkempi, mikä mahdollistaa alhaisemmat määritysrajat, mutta toisaalta niin sanottua EIE-efektiä (Easily Ionizable Elements) on vaikeampi kontrolloida ja matriisihäiriö on suurempi. EIE-efektiä esiintyy aiemmin mainituilla alkali- ja maa-alkalimetalleilla, jotka nimensä mukaisesti ionisoituvat helposti aiheuttaen matriisihäiriöitä. Yleisesti ottaen valittuun mittaustapaan vaikuttaa näyteliuoksen matriisi sekä määritettävät alkuaineet. Useissa nykyaikaisissa ICP-laitteissa mittauksia voidaan tehdä sekä aksiaalisesti että radiaalisesti, jolloin mittaustavan muuttuessa laitteiston optiikassa peili muuttaa sijaintiaan plasmaan nähden.<sup>101,108</sup>

## 6.2.2 Näytteenäyttö

### PERISTALTTINEN PUMPPU JA SUMUTTIMIT

Plasman lisäksi tärkeimmät laitteistoon kuuluvat osat ovat näytteenäyttöön osallistuvat peristalttinen pumppu, sumutin ja sumutinkammio, sekä mittauksiin osallistuvat spektrometri ja ilmaisimet. Peristalttisen pumpun toiminta on näistä oikeastaan yksinkertaisin selittää: tarvittavat näyte- ja jäteletkut lukitaan peristalttisen pumpun ympärille, jolloin letkut ovat tiiviisti painettuna pumpussa olevia rullia vasten. Nämä rullat ovat kiinni pumpun keskiössä, jolloin ne pyörivät pumpun mukana ja kuljettavat näytettä eteenpäin. Tavoitteena pumpun toiminnassa olisi, että liuosmuodossa oleva näyte kulkisi tasaisena virtana eteenpäin ja eri liuosten viskositeettierot eivät vaikuttaisi



mittauksen etenemiseen. Liuosmuodossa oleva näyte ohjataan sumuttimelle, jonka tehtävänä on muuttaa se pienipisaraiseksi aerosoliksi, mikä kantajakaasun avulla kulkee plasmalle. Pisaroiden tasalaatuisuus on tärkeää, jotta mitatuissa intensiteeteissä olisi mahdollisimman vähän hajontaa ja vain pienet pisarat ovat käyttökelpoisia tekniikassa. Sumuttimet voidaan jakaa kahteen päätyyppiin: pneumaattiset ja ultraäänisumuttimet. Periaatteessa pneumaattisilla sumuttimilla kantajakaasu tekee aerosolin aiheuttaen alipainealueen, joka hajottaa nesteen aerosoliksi. Ultraäänisumuttimissa näyteliuos menee ultraäänitaajuudella värähtelevälle levyille, josta liuos lähtee aerosolina plasman suuntaan.<sup>101,108</sup>

Erilaisia sumutintyyppiä on olemassa runsaasti soveltuen erilaisiin käyttötarkoituksiin. Pneumaattisista sumutintyypeistä yleisimmät ovat konsentriset lasisumuttimet, cross-flow sumuttimet sekä Babington sumuttimet. Konsentrisen sumuttimen toiminta perustuu sen keskellä olevan näytettä kuljettavan kapillaarin ja sen ympäriltä kulkevan kovan kaasuvirtauksen vuorovaikutukseen; kaasuvirtaus synnyttää kapillaariin päässä alipainealueen ja kun näyteliuos joutuu alipaineen ja kaasuvirtauksen risteyskohtaan hajoaa se aerosoliksi. Konsentrisia lasisumuttimia on olemassa monia, mutta näistä tunnetuin on Meinhard (kuva 6). Meinhard on sekä tuotemerkki että yrityksen nimi, minkä valmistama konsentrisen sumutin oli ensimmäisissä kaupallisissa ICP-laitteissa ja se valmistaa nykyäänkin muun muassa sumuttimia ICP-laitteisiin. Alkuperäisen sumuttimen haittapuolena oli sen helppo tukkeutuminen, mutta nykyään tuotekehityksen seurauksena saatavilla on Meinhardejakin eri malleja, sekä muita konsentrisia sumuttimia lähes joka käyttötarkoitukseen, esimerkiksi suuremmille suolapitoisuuksille, orgaanisille liuottimille ja pienemmille kaasuvirtauksille.<sup>101,104</sup>



Kuva 6: Meinhardin konsentrisen sumutin.<sup>109</sup>

Myös cross-flow on hyvin yleisesti käytössä oleva sumutintyyppi ja sen toiminnassa erona konsentrisiin sumuttimiin on oikeastaan se, että argonkaasuvirta tulee näytekapillaarille kohtisuoraan, minkä seurauksena näyteliuksesta syntyy aerosolia. Yleisesti ottaen cross-flow sumuttimet kestävät paremmin korkeampia suolapitoisuuksia (<5 %) laajemman näytekapillaarin ansiosta, mutta syntyvän aerosolin pisarat ovat suurempia kuin konsentrisilla sumuttimilla. Babington sumuttimien toiminta perustuu näyteliuksen kulkemiseen sumuttimessa olevalle reiälle, jonka läpi kulkee voimakas kaasuvirtaus ja tekee näytteestä aerosolia. Näiden sumuttimien etuna on niiden kyky sietää suurempia suolapitoisuuksia tukkeutumatta ja eräs variaatio tästä tekniikasta on niin sanottu conespray sumutin, jossa näyte ohjataan tehostetusti ylhäältäpäin kartionmuotoisen astian pohjassa olevaan reikään, jonka läpi ohjattu kaasuvirta tekee näytteestä aerosolin. Conespray tekniikkaan perustuva sumutin on esimerkiksi PerkinElmerin myymä GemCone sumutin, jota on saatavilla High Dissolved Solids malli korkeammille suolapitoisuuksille (<20 %) sekä Low-Flow malli pienemmille kaasuvirtauksille.<sup>101,108,110</sup>

Ultraäänisumuttimen tekniikka ei ole myöskään erityisen vaikeasti hahmotettava; periaatteessa näyte kuljetetaan näytelinjaa pitkin peristalttisella pumpulla tasolle (muuntajalle), joka värähtelee ultraäänitaajuudella. Tämä mekaaninen voima hajottaa näytteen hienoksi aerosoliksi ja se kuljetetaan kantajakaasun avulla plasmalle, mutta itsessään aerosolin muodostus ei vaadi kantajakaasua. Ultraäänisumuttimet ovat oikeastaan parhaimmillaan puhtaiden vesien kaltaisia näytteitä analysoitaessa. Näiden sumuttimien etuna on niiden parempi hyötysuhde verrattuna pneumaattisiin, minkä ansiosta enemmän näytettä menee plasmalle ja määritysrajat ovat alhaisemmat. Toisaalta, joskus ongelmana on ollut liian suuren liuotinmäärän virtaus plasmaan, jolloin plasma on sammunut. Tämän takia ultraäänisumuttimien kanssa toimii usein myös erotusyksikkö, jonka tehtävänä on estää liian liuottimen pääsy plasmaan.<sup>101,104,108</sup>

## **SUMUTINKAMMIOT**

Sumutinkammiot toimivat yleensä sumuttimiin kiinnittyneinä ja niiden tehtävänä on päästää vain hienojakoinen (pieni pisarainen) osa aerosolista plasmalle. Sumutinkammioiden toiminta perustuu siihen, että aerosolin kulkiessa kantajakaasun mukana kulkusuunnan muuttuessa vain pienimmät pisarat pysyvät kaasun mukana, mutta

suuremmat pisarat jatkavat alkuperäiseen suuntaan päätyen sumutinkammion seinämälle. Sumutinkammiot myös tasoittavat näyteaerosolin kulkua plasmalle, sillä muutoin pumpusta johtuen näyte ei välttämättä tulisi niin tasaisena virtana. Lopulta näyteliuoksesta vain 1–5 % päätyy plasmalle asti ylimääräisen nesteen valuessa hukkaputkeen. Ylimääräisen liuoksen poisto vaikuttaa varmasti hyvin yksinkertaiselta toimenpiteeltä, mutta huonosti toimiessaan sekin voi vaikuttaa merkittävästi saatuihin tuloksiin. Jäteliuoksen poiston toimiessa kunnolla ja tasaisesti on poistosysteemissä vastapaine, joka mahdollistaa näyteaerosolin kunnollisen kuljetuksen plasmalle. Jos jäteliuoksen poisto taas ei ole tasaista ja siinä kehittyy esimerkiksi kuplia, voi näyteaerosolin syötössä ilmetä häiriöitä, jotka näkyvät mittaustuloksissa piikkeinä.<sup>101,104</sup>

Sumutinkammioitakin on olemassa hyvin erilaisia ja valmistusmateriaaleina voivat olla muun muassa lasi, kvartsi ja erilaiset polymeerit. Sumutinkammion valintaan vaikuttavat sen sopivuus käytetyille liuoksille ja analyteille, sekä se miten kammion pinta kerää nestettä. Esimerkiksi hyvin sileäpintainen seinämä kerää suurempia pisaroita sumutinkammioon aiheuttaen vaihteluita kammion aerodynamiikkaan, mikä voi johtaa tulosten heittelyyn. Sumutinkammion materiaalivalinta on myös tärkeä, jotta se ensinnäkin kestäisi käytetyt liuottimet, mutta myös etteivät määritettävät alkuaineet, kuten elohopea ja boori, absorboituisi siihen. Absorptioon vaikuttaa myös sumutinkammion pinta-ala. Alkuaineiden absorboituminen voi johtaa niin sanotun muistiefektin syntyyn, jolloin pesuaikaa analyysin aikana joudutaan lisäämään linjaston kunnollisen puhdistamisen aikaansaamiseksi näytteiden välillä.<sup>101</sup>

Yleisimmät sumutinkammiotyypit ovat varmasti Scott ja sykloninen sumutinkammio (kuva 7), joista Scott on ollut mukana jo ensimmäisissä ICP-laitteissa. Scott sumutinkammio on muodoltaan putkimainen ja sen valmistusmateriaalina on usein jokin polymeeri, kuten Ryton (polyfenyleeni sulfidi), jonka etuna on hyvä kestävyys eri liuottimille, mukaan lukien vetyfluoridi. Kun Scott sumutinkammio kiinnitetään ICP-laitteeseen, on se yleensä kallellaan niin että takaosa on alempana kuin lähempänä plasmaa oleva etuosaa. Sumutinkammion takaosassa on jätteenpoisto ja etuosassa on mutka näyteaerosolin erotteluun. Sumutinkammion toiminta perustuu kahteen konsentriseen putkeen, joista sisempään ohjataan näyteaerosoli. Näyteaerosoli kohtaa

plasman suuntaan edetessään lievän mutkan, jossa suuremmat pisarat erottuvat hienompien seasta pois ja valuvat ulompaa putkea pitkin jätteenpoistoon.<sup>101,105</sup>



Kuva 7: Sykloninen sumutinkammio.

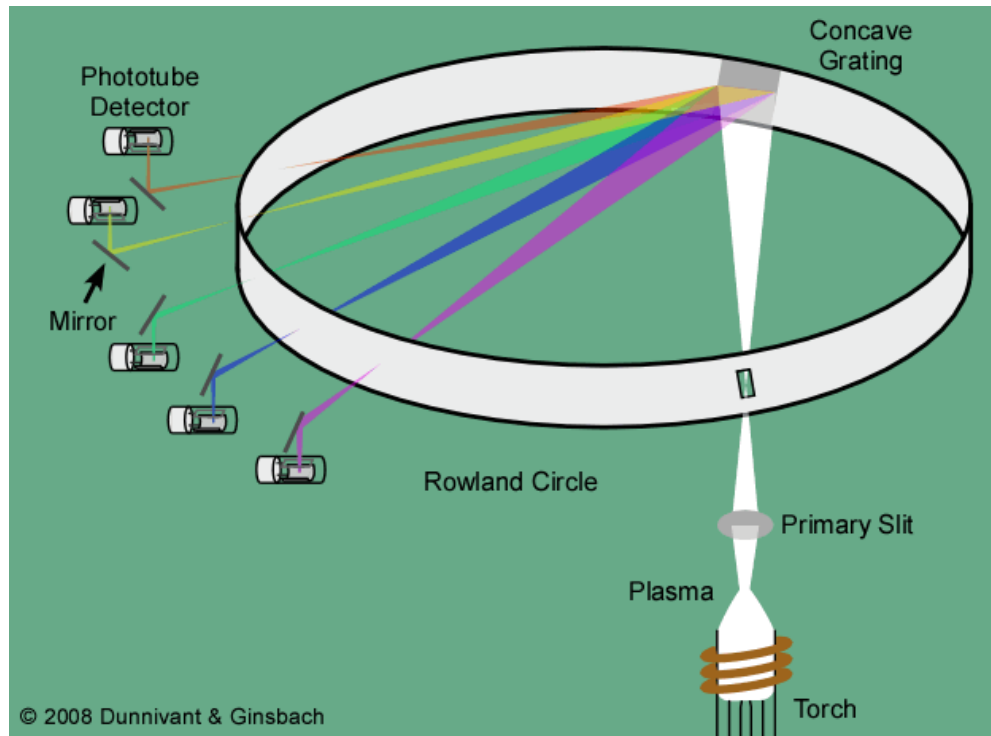
Sykloniset sumutinkammiot eroavat ulkonäöltään ja toimintaperiaatteeltaan selkeästi Scott sumutinkammioista. Syklonisten sumutinkammioiden valmistusmateriaaleina voivat olla muun muassa lasi, kvartsi ja erilaiset polymeerimateriaalit, kuten PTFE eli teflon, joka kestää myös vetyfluoridipitoisia liuoksia. Toiminnaltaan ne perustuvat keskipakovoiman käyttöön; näyteaerosoli ohjataan sumutinkammioon sen reunan suuntaisesti, jolloin hienojakoinen aines kulkee kantajakaasun mukana pyörteessä ja suuremmat pisarat törmäävät astian seinämille. Tämän sumutinkammiotyyppin etuna pidetään sen suurempaa tehokkuutta näytteenotossa, minkä ansiosta se on herkempi ja sillä saadaan alhaisemmat määritysrajat kuin Scott sumutinkammioilla. Toisaalta, pisarakoko plasmassa päätyvässä aerosolissa voi vaihdella enemmän varsinkin vaikeammilla näyteliuksilla, mikä voi johtaa pienempään tarkkuuteen. Merkittävin etu tällä sumutinkammiotyyppillä varmasti käyttäjän kannalta on kuitenkin se, että valikoima on laaja mahdollistaen sen soveltumisen erilaisiin käyttötarkoituksiin. Perinteisen syklonisen rakenteen lisäksi lukija törmää usein myös termiin ”baffled”; tämä on rakenneratkaisu, jossa sykloniseen kammioon on laitettu pystyyn lisäputki ohjaamaan näyteaerosoli plasmalle. Tämän tarkoituksena on tehostaa hienon aerosolin ja suurempien pisaroiden erotusta ennen näyteaerosolin syöttöä plasmalle.<sup>101,105</sup>

### 6.2.3 Spektrometrit ja ilmaisimet

#### SPEKTROMETRIT

Alkuaineiden ja ionien emittoiman säteily erotellaan eri aallonpituuksiin spektrometrissä olevaa optiikkaa käyttäen, minkä jälkeen ne ohjataan valoherkille ilmaisimille eli detektoreille. Tulevan valon erottelu eri aallonpituuksiin toteutetaan yleisimmin hiloilla, mutta se voidaan tehdä myös prismoilla, filtereillä, sekä interferometreillä. Hila on periaatteessa levy, jossa on hyvin tasaisesti ja tiheässä uurteita tai rakoja (ICP-OES-tekniikassa 600–4200 per/mm), jotka valon tullessa hajottavat sen eri aallonpituuksiin niiden erilaisen taittumisen eli diffraktion kautta. Hilat, tai muut valon eri aallonpituuksiin jakavat osat, ovat olennainen osa suurempaa kokonaisuutta, jota kutsutaan spektrometriksi. Spektrometrin tehtävänä on kerätä kaikkien alkuaineiden emittoima valo yhteen, erotella se eri aallonpituuksiin, ja kohdistaa tämä säteily rakoja käyttäen valoherkille ilmaisimille (detektoreille). Eli toisin sanoen, spektrometrin tehtävä on muuttaa mittauksissa saatu polykromaattinen valo monokromaattiseksi, eli yhden aallonpituuden sisältäväksi, valoksi.<sup>101,104,108</sup>

Optiset laitteistot voidaan jakaa simultaani- ja sekventiaaliin laitteistoihin niiden mittaustavan mukaan. Tällöin simultaanilaitteistolla kaikki aallonpituudet mitataan yhtäaikaisesti ja sekventiaalisella kukin aallonpituus erikseen. Spektrometrit taas voidaan tekniikkansa puolesta jakaa monokromaattoreihin ja polykromaattoreihin. Näistä kahdesta laitteesta molemmissa emissiossa syntynyt valo kootaan ensin yhteen joko kuperalla linssillä tai koveralla peilillä ja johdetaan sisääntuloraosta peilin kautta hilalle eroteltavaksi eri aallonpituuksiin, mistä ne voidaan edelleen heijastaa peilin kautta ulostuloraolle. Erona on se, että monokromaattoriksi kutsutaan laitetta, jossa on vain yksi ulostulorako ja ilmaisim, kun taas polykromaattorissa on useampi rako ja ilmaisim. Esimerkiksi Paschen-Runge on eräs sekä simultaani- että sekventiaalisessa mittauksessa käytetty polykromaattori, jossa käytetään ”Rowlandin kehää”, missä tarvittava optiikka on sijoitettu kehän muotoiselle alueelle (kuva 8). Perinteisiä valomonistinputkia (PMT, Photomultiplier Tube) ilmaisimina käyttäessä kyseinen sijoittelu kuitenkin aiheuttaa ongelmia, sillä laitteiston vaikean sijoittelun takia simultaanimittauksessa valinta joudutaan usein tekemään resoluution ja mittausalueen laajuuden välillä, sillä suuria ilmaisimia ei saada sijoitettua optimaalisiin kohtiin, koska ne menevät muutoin liian lähelle vieressä olevia emissioviivoja.<sup>101,104</sup>



Kuva 8: Rowlandin kehä.<sup>111</sup>

Perinteisellä simultaanilaitteistolla alkuaineet ja mittausaallonpituudet joudutaan valitsemaan ostohetkellä ja käytettävissä on noin 60 ulostulorakoa. Jälkeenpäin näiden muuttaminen on vaikeaa ja kallista, mutta toisaalta spektrometrin etuina ovat nopeus ja stabiilisuus niin lyhyellä kuin pitkälläkin aikavälillä. Sekventiaalisella laitteistolla vastaavanlaisia ongelmia ei yleisesti ottaen ole ja resoluutiokin on keskimäärin parempi. Esimerkkeinä tällaisista laitteista ovat muun muassa Czerny-Turner ja Ebert monokromaattorit, jotka eroavat toisistaan siinä, että Czerny-Turnerissa käytetään kahta erillistä peiliä tulevalle ja lähtevälle valolle, kun taas Ebert käyttää yhtä suurta peiliä molempien valojen heijastamiseen. Mittaukset molemmilla tehdään skannaamalla eli liikkumalla nopeasti yhdestä emissioviivasta toiseen hilaa kääntelemällä. Monokromaattorin suurin hyöty on sen juostavuus käytetyn aallonpituuden suhteen; periaatteessa mittauksia voi tehdä millä aallonpituudella tahansa, kunhan se on laitteistolla mahdollista. Monokromaattoreissa on yleensä myös suunnittelunsa puolesta parempi resoluutio.<sup>101,104</sup>

Aiemmin esitetty tieto on siitä ongelmallista, että se on syytä tietää, mutta joiltain osin esimerkiksi jako simultaani- ja sekventiaalilaitteistoihin on ainakin osittain jo turhaa, sillä nykyisin uusilla laitteilla pystytään mittaamaan sekä nopeasti että tarkasti laaja skaala

alkuaineita. Perinteisen yhden hilan käytön rinnalle on tullut Echelle hilaspektrometri, jossa käytetään toisiaan vastapäätä kahta hilaa tai hilaa ja prismaa, joista ensimmäisenä heijastavana hilana toimii Echelle. Echelle hilassa uria on tavanomaista harvemmassa (50–100/mm), mutta urien optimoidun suuntauksen avulla diffraktion kertaluvut saadaan korkeiksi ja valonmäärä suureksi. Toisen hilan tai prisman avulla kertaluvut saadaan paremmin erotettua toisistaan ja lopputuloksena on kaksikulotteinen spektri, jossa diffraktiokertaluvut ovat riveinä päällekkäin. Echelle spektrometrin etuna on erityisesti sillä saatu hyvä resoluutio ja tehokkuus eri kertaluvuilla.<sup>101,104</sup>

## ILMAISIMET

Ilmaisimien tehtävänä on muuttaa vastaanotettu valo hyödynnettäväksi signaaliksi. Ilmaisimiakin on olemassa hyvin erilaisia, kuten PMT (Photomultiplier Tube) ja CTD (Charge Transfer Device), joka voidaan vielä jakaa CCD (Charge Coupled Device) ja CID (Charge Injection Device) ilmaisimiin. PMT:n toiminta perustuu valoherkkään fotokatodiin (materiaalina esim. alkalimetallioksidi), joka valon osuessa siihen vapauttaa elektroneja. Nämä elektronit osuvat korkeamman potentiaalisen omaavaan elektrodiin nimeltä dynodi (dynode), joka tämän seurauksena vapauttaa 2–5 sekundääristä elektronia jokaista siihen osunutta elektronia kohti. Nämä sekundääriset elektronit osuvat toiseen, sitä korkeamman potentiaalisen omaavaan dynodiin ja ketjureaktio on valmis. PMT:ssä on yleensä 9–16 dynodia ja viimeisessä vaiheessa anodi kerää jälkimmäisen dynodin sekundääriset elektronit. Anodille tulevaa elektronivirtaa käytetään ilmaisemaan PMT:lle tulevan säteilyä intensiteettiä ja esimerkiksi jo yksi fotoni voi synnyttää yhdeksän dynodin systeemissä miljoona sekundääristä elektronia. PMT-ilmaisimen etuna pidetään sen tarkkuutta varsinkin tilanteissa, joissa ollaan lähellä määrittämissä rajoja. Ilmaisimien huonona puolena voidaan taas pitää niiden suurta kokoa, mikä takia esimerkiksi niiden käyttö simultaanilaitteistoissa on vaikeaa.<sup>101,104,106</sup>

CTD perustuu valoherkkiin piipohjaisiin puolijohdeilmaisimiin. Ilmaisimen toiminta perustuu varauksen siirtoon pii-hilan sisällä, missä piiatomit ovat toisiinsa sitoutuneina. Kun valokvantti osuu piiatomien väliseen sidokseen, irtoaa elektroni, jonka seurauksena muodostuu elektroni-reikä pari. Jos hilaan ohjataan jännite, pyrkivät elektronit siirtymään sähkökenttään nähden joko vastakkaiseen tai piidioksidin suuntaan, joka ympäröi positiivista varausta tuottavia elektrodeja, jotka taas ovat osa metallioksi-

puolijohdekondensaattoreita (pikseleitä). Positiivisen varauksen omaavat reiät taas siirtyvät elektroneihin verrattuna päinvastaiseen suuntaan eli sähkökentän suuntaisesti ja pois päin piidioksidista. Tämä hilassa tapahtuva erimerkkisten varausten liike synnyttää virran, joka on verrannollinen vastaanotettuihin fotoneihin. Käytännössä siis, mitä enemmän valoa ilmaisimissa saa, sitä enemmän elektroneja kertyy pii-piidioksidirajapinnalle. Kondensaattoreiden eli pikseleiden koko voi vaihdella välillä 5–50  $\mu\text{m}$  ja niistä voidaan muodostaa helposti kaksiulotteinen matriisi, jonka koko voi olla jopa 4096x4096 pikseliä. Tällöin kukin pikseli voi varastoida fotonien tuomaa energiaa. CTD:hen perustuvat tekniikat eroavat toisistaan siinä miten varaus saadaan aikaiseksi, miten sitä tutkitaan ja miten se varastoidaan.<sup>101,104,106</sup>

Olellainen ero CTD-tekniikkaan perustuvien CCD- ja CID-ilmaisimien välillä on niiden erilainen tapa lukea pikselin varaus; CID-ilmaisimissa kuhunkin pikseliin syntynyt varaus voidaan lukea yksittäin varausta tuhoamatta, kun taas CCD-ilmaisimissa pikseleiden varaukset luetaan rivistö kerrallaan muistaen kuitenkin otetun varauksen alkuperäinen sijainti. CCD-ilmaisimilla pikseleiden varaukset tuhoutuvat luettaessa, mutta toisaalta se on nopeampaa. Yleisesti ottaen voidaan todeta, että CCD:llä kvanttisuhde ja resoluutio ovat suurempia kuin CID:llä. Kuitenkin CID:llä varausta voidaan tutkia jo mittauksen aikana, mikä voi olla hyödyllistä. Ainakin CCD-ilmaisimia käytetään yleisesti muuallakin kuin vain spektroskopisissa sovelluksissa; ilmaisimia löytyy muun muassa videokameroista ja kopiokoneista. Nykyään on myös käytössä uudenlainen CCD-ilmaisintyyppi nimeltä SCD (Segmented-array Charge-coupled Device), jossa aiemmista ilmaisimista poiketen on suurten matriisien sijaan 20–80 pikselin alamatriiseja, joita on yhdessä ilmaisimissa satoja. Alamatriisi on rakenteeltaan jaettu eri alueisiin ja se koostuu valoherkästä alueesta, varastoalueesta ja varauksen siirtoon osallistuvasta alueesta. CCD-ilmaisimista poiketen SCD-ilmaisimissa kunkin alamatriisin varauksia voidaan tutkia erikseen käymättä välttämättä läpi koko ilmaisimen tietoja. SCD-ilmaisimien etuna on myös hyvä herkkyys alle 350 nm aallonpituuksilla, sillä toisin kuin CCD- ja CID-ilmaisimissa, SCD:ssä ei ole pikselin sisäisiä elektrodeja, jotka absorboivat fotoneja ja häiritsevät alhaisempien aallonpituuksien mittauksia. Tämän ansiosta SCD toimii hyvin 160–782 nm aallonpituusalueella ja alamatriisien tarkalla sijoittelulla, sekä työnjaolla näiden yksiköiden välillä tuhansia emissioviivoja voidaan lukea yhtä aikaisesti.<sup>106,108,112</sup>



## 7 Kemiallinen höyryn muodostus

Kemiallinen höyryn muodostus tarkoittaa käsitteenä liuosmuotoisen näyte-erän käsittelyä niin, että määritettävä alkuaine muutetaan tavalla tai toisella kaasumaiseen olomuotoon, jolloin se saadaan erotettua liuosfaasistaan ja tunnistettua esimerkiksi liekki- tai plasmatekniikan avulla. Termi on itsessään hyvin laaja, minkä takia sen sisään kuuluvat muun muassa yleisessä käytössä olevat kylmähöyry- ja hydridin muodostustekniikat, sekä vähemmän tunnetut ECG (electrochemical hydride generation) ja PVG (photochemical vapor generation). Koska kaksi jälkimmäistä tekniikkaa ovat selvästi harvinaisempia ja eivät juurikaan kuulu tämän tutkielman piiriin, voidaan ne käsitellä tässä lyhyesti.<sup>113</sup>

PVG on neljästä tekniikasta uusin, sillä sitä käytettiin ensimmäisen kerran vasta vuonna 2003 Guo *et al.* toimesta. Yksinkertaisesti ilmaistuna tekniikka perustuu kaasumaisten reaktiotuotteiden muodostumiseen näyteliuksesta kevyiden orgaanisten pelkistimien läsnä ollessa ja fotokemiallisen reaktion seurauksena, jonka tarkoituksena on tuottaa reagoivia radikaaleja. Esimerkiksi Guo *et al.* tekemässä tutkimuksessa näyteliuosten seleenipitoisuuksia tutkittiin muuttamalla ne kaasumaisiksi yhdisteiksi pienen moolimassan omaavilla orgaanisilla hapoilla ja UV-säteilyllä. Käytetyt hapot olivat muurahaishappo, etikkahappo ja propionihappo. Muodostuneet kaasumaiset molekyylit taas olivat haposta riippuen SeCO, CH<sub>3</sub>SeCH<sub>3</sub> ja CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>SeCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>. Tunnistus tapahtui käyttäen kaasukromatografiaa ja massaspektrometriä. PVG:tä on käytetty seleenin lisäksi myös ainakin elohopean, nikkelin, koboltin, raudan ja jodin määrityksessä. Menetelmän eduksi verrattuna normaaliin hydridin muodostukseen voidaan lukea se, että siinä käytetään vain orgaanisia happoja, jolloin vetykloridin ja kalliin NaBH<sub>4</sub>:n käyttö voidaan välttää. Natriumborohydridin käyttöä välttämällä myös sen kanssa yleisesti tunnettu siirtymämetallien aiheuttama häiriö määrityksessä vältetään, ainakin teoriassa.<sup>113,114</sup>

Elektrokemiallinen hydridin muodostus on neljästä läpikäytävästä menetelmästä vähiten käytetty yhdessä ICP:n kanssa ja sitä koskien onkin julkaistu hyvin vähän tutkimuksia. Menetelmä perustuu hydridin muodostukseen elektrolyyysiä käyttäen ja sillä on määritetty alkuaineista yhtäaikaaisesti muun muassa Bings *et al.* tutkimuksessa As, Bi, Ge, Hg, Sb ja Se, sekä Bolea *et al.* tutkimuksessa As, Sb, Se, Sn ja Ge. Koejärjestelyjen vaihdellessa ovat vaihdelleet tuloksetkin, mutta esimerkiksi Bings *et al.* tutkimuksessa kaikilla muilla

alkuaineilla paitsi seleenillä saadut tulokset olivat kohtuulliset käytetyllä referenssimateriaalilla. Syyksi seleenin huonompaan saantoon esitettiin muiden metallien tai anionien aiheuttamat häiriöt ja varsinkin sellaisten seleenimuotojen olemassa olo, mitkä eivät muodosta hydridiä. Kuten PVG:llä, voidaan tämänkin menetelmän eduksi lukea se, ettei  $\text{NaBH}_4$ :n käytölle ole tarvetta - reaktioliuoksenakin käytetään yleisimmin rikkihappoa eri vahvuuksina. Myöskään reaktio-olosuhteet eivät ole yhtä kriittiset kuin perinteisessä hydridimenetelmässä ja niihin on helppo tehdä muutoksia esimerkiksi anodin vaihdon kautta.<sup>113,115,116</sup>

## 7.1 Hydridin muodostus ja kylmähöyrytekniikka

Hydridin muodostuksesta voi helposti jäädä käsitys suhteellisen uudesta ja ainakin osittain keskeneräisestä tekniikasta, jota on käytetty pääasiassa AAS-tekniikan kanssa. Todellisuudessa menetelmää on kuitenkin käytetty yhdessä ICP-tekniikankin kanssa jo vuodesta 1978. Menetelmä perustuu kaikessa yksinkertaisuudessaan tutkittavien alkuaineiden muuttamiseen haihtuviksi hydrideiksi, jolloin ne saadaan helposti erotettua näytematriisista. Reaktiota, jossa halutut analyytit muutetaan näytteestä kaasumaisiksi tuotteiksi, kutsutaan pelkistämiseksi ja se toteutetaan yleensä tetrahydroboraatilla (THB), kuten natrium- tai kaliumborohydridillä. Kaikista THB vaihtoehtoista natriumborohydridi on selvästi vakiinnuttanut asemansa käytetyimpänä reagenssina. Tekniikkaa käytetään perinteisesti alkuaineille, jotka muodostavat kaasumaisia ja suhteellisen stabiileja hydridejä helposti, kuten antimoni, seleeni, arseeni, vismutti, lyijy, telluuri, tina ja germanium.<sup>94,113,117</sup>

Olellainen seikka hydridin muodostuksen onnistumiseen on yleensä liuoksessa olevien alkuaineiden hapetusasteet; usein alkuaineiden erotukseen näytematriisista käytetään vahvoja, hapettavia happoja, minkä seurauksena määritettävät alkuaineet ovat korkeammalla hapetusasteella. Näistä korkeamman hapetusasteen muodoista monetkaan alkuaineet eivät kykene hydridin muodostukseen. Tämän takia usein ennen tekniikan hyödyntämistä on analyytit esipelkistettävä, joka käytiinkin läpi aiemmin. Yleisesti ottaen kaikkien kemiallisten höyrymuodostustekniikoiden merkittävimpiä etuja on parantunut herkkyys tutkittaville alkuaineille, mikä auttaa alkuaineiden määrittämisessä varsinkin tilanteissa, joissa niiden pitoisuudet ovat pienet. Myös matriisin mahdollisesti häiritsevistä vaikutuksista päästään eroon. Menetelmien käyttäminen myös yhdessä ICP-

laitteen kanssa tuo joitakin etuja; esimerkiksi arseenin ja seleenin tärkeät spektriviivat ovat aallonpituudeltaan alle 200 nm, jonka alueella erilaiset radikaalit aiheuttavat vakavaa häiriötä mittauksissa perinteisellä FAAS-tekniikalla.<sup>94,117</sup>

Kylmähöyrytekniikka ja hydridin muodostus eroavat toisistaan siinä, että kylmähöyrytekniikkaa käytetään lähtökohtaisesti vain elohopean ja kadmiumin määrittämiseen ja muodostuvat kaasumaiset ainekset eivät ole hydridejä. Elohopean määrittäminen perustuu sen pelkistämiseen näyteliuoksesta kaasumaiseksi alkuaineeksi joko THB:n tai tinakloridin avulla ja kadmiumin muuntamiseen kaasumaisiksi yhdisteiksi vain THB:n avulla. Kylmähöyryn käyttö elohopean määrittämisessä on arkipäivää, mutta kadmiumin määrittämisestä on rajoittanut tekniikan osalta kaasumaisten reaktiotuotteiden epästabiilisuus ja vakavat kemialliset häiriöt esimerkiksi liuoksessa olevista kuparista, nikkelistä ja lyijystä. Kadmiumin höyrymuodostuksen mekanismi ei ole myöskään vielä täysin selvillä.<sup>113,118</sup>

Hydridin muodostus ja kylmähöyrytekniikka ovat hyvin lähellä toisiaan ja terminologisesti ajatellen jako näiden välillä voi tuntua välillä turhalta. Varsinkin kylmähöyry on puhtaasti terminä laaja, mutta käytännössä siihen kuuluu vain elohopean ja kadmiumin muuntaminen kaasumaisiksi tuotteiksi. Hydridin muodostus taas terminä kuvaa reaktiossa syntyviä lopputuotteita, mikä toimii rajoittavana tekijänä sen käytössä. Nykyisin hyvin monissa artikkeleissa puhutaankin molemmat tekniikat kattavasta kemiallisesta höyryn muodostuksesta, sillä esimerkiksi elohopeaa ja hydridin muodostajia tutkitaan usein yhtä aikaa ja laajempi termi mahdollistaa myös muiden kaasumaisten reaktiotuotteiden synnyn. Kun aletaan puhua kemiallisesta höyryn muodostuksesta, voidaan todeta, että aiempien alkuaineiden lisäksi CVG-tekniikalla on määritetty myös siirtymämetalleja vaihtelevalla menestyksellä. Suurimpina ongelmia ovat kuitenkin olleet syntyvien yhdisteiden epästabiilisuus, sekä niiden kyky muodostaa kolloideja tai saostumia keskenään. Tämän takia menetelmä ei ole ollut erityisen tehokas, kun analyyyteillä on verrattu syntyneiden kaasumaisten tuotteiden määrää ja liuokseen jäänyttä osuutta.<sup>119</sup> Hyvä esimerkki menetelmän laajennuksesta muidenkin alkuaineiden määrittämiseen on Matusiewiczin ja Ślachcińskin artikkeli vuodelta 2010, jossa MIP-OES-laitteella on määritetty siirtymämetalleista Au, Ag, Cd, Cu, Mn, Ni, Pb ja Zn, sekä jalometalleista Pd, Pt ja Rh alustavasti hyvin tuloksin.<sup>120</sup>

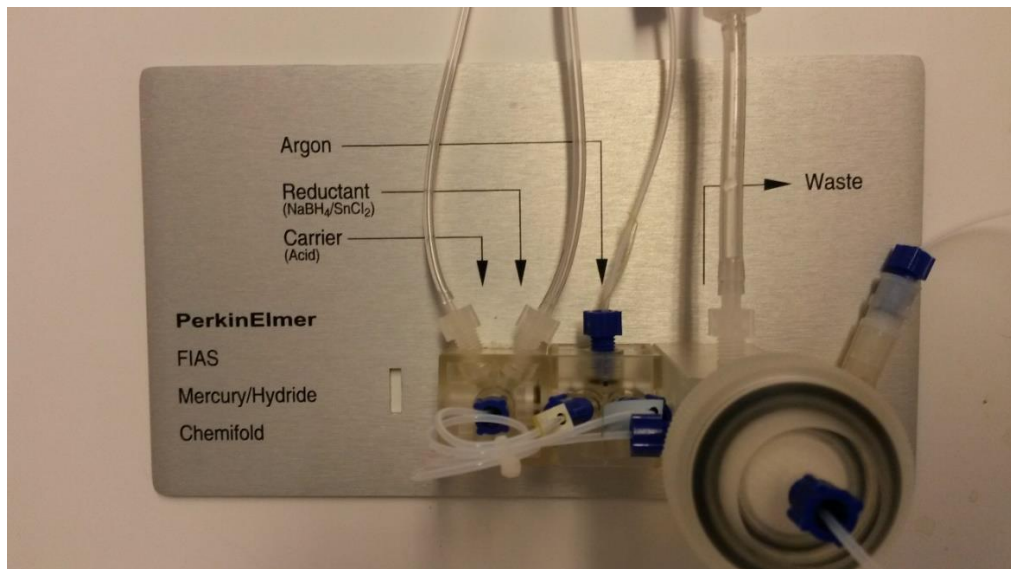
## 7.2 FIAS-400

Edellä mainittuja tekniikoita soveltaessaan omiin määrittäksiinsä tutkijat voivat käyttää niin omatekoisia ratkaisuja näytteenäytössä mittalaitteelle kuin laitevalmistajien kehittämiä valmiita kokonaisuuksia. Eräs valmiista kaupallisista laitteista on PerkinElmerin valmistama FIAS-400, joka soveltuu sekä elohopean että erilaisten hydridien määrittämiseen. Koska tätä laitetta tullaan käyttämään kokeellisessa osassa ja käytännön esimerkki oikeasta laitteesta on hyödyllinen aiemman teorian jälkeen, käydään FIAS-400:n toimintaperiaate seuraavaksi läpi.

Aiemman kaltaisen teorian muodossa selitetyt tekniikat saattavat vaikuttaa monimutkaisilta, mutta itsessään laitteiston toimintaperiaate on hyvin yksinkertainen. Koska kaasumaiset analyytit muodostetaan juuri ennen plasmalle syöttöä, korvaa FIAS-400 ja vastaavanlaiset näytteenäytösysteemit mittaustalaitteella perinteiset sumuttimet ja sumutinkammiot (kuva 9). Kuvassa 10 näkyy hyvin laitteelle menevät linjat: näyte ja pelkistin menevät erillisiä linjojaan pitkin sekoitettavaksi samaan kammioon, jonka jälkeen seuraavassa kammiossa seokseen lisätään argonkaasu. Argonkaasu toimii kantokaasuna ja se auttaa erottamaan muodostuneet kaasumaiset analyytit liuksesta. Viimeisessä suuremmassa kammiossa tapahtuu kaasun ja nesteen erotus niin, että kaasut menevät ylöspäin plasmalle ja nesteet menevät alas jätteenpoistoon. Kammion yläosassa tärkeässä osassa on neste-kaasuerotin, joka päästää vain kaasun menemään plasmalle. Käytännössä erotin on läpimitaltaan 25 mm suodatin, jonka huokoskoko on 1  $\mu\text{m}$ .<sup>94</sup>



Kuva 9: FIAS-400 osana PerkinElmerin Optima 8300-laitetta.

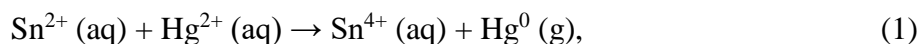


Kuva 10: FIAS-400 kuvattuna ylhäältä.

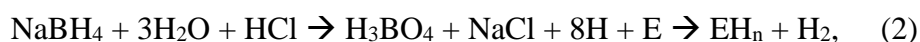
Näytteensyöttö on voitu toteuttaa tällaisissa laitteissa eri tavoilla, mutta FIAS-400 käyttää niin sanottua ”jatkuvan syötön” (continuous flow) menetelmää, jonka ideana on syöttää näyteliuosta tai standardia jatkuvana virtana ja sekoittaa se pelkistimen kanssa, jolloin muodostuu kaasumaisia analyyttejä. Toinen tapa olisi käyttää esimerkiksi ”pysäytetyn syötön”(stopped flow) tekniikkaa, jossa kaasumaiset lopputuotteet kuljetetaan reaktioastiasta muutaman sekunnin viiveellä, jolloin niiden muodostuminen on varmasti mennyt päätökseen. Menetelmän mahdollisena haittana voi kuitenkin olla epästabiliinien hydriiden tai muiden kaasumaisten tuotteiden hajoaminen tätä odotellessa.<sup>94,117</sup>

### 7.3 Pelkistimien käyttö

Kuten aiemmin todettua, perustuu elohopean ja seleenin pelkistäminen kaasumaisiksi tuotteiksi erilaisiin reaktioihin. Tämän takia CVG-tekniikassa elohopealle voidaan käyttää pelkistimenä sekä THB:ia että tinakloridia. Seleenin määrittämisessä on taas rajoitettu käyttämään THB:ia. Tinakloridin käyttö pelkistimenä perustuu reaktioon:



jossa tina pelkistää liuoksessa olevan elohopean alkuainemuotoon. Tämä johtuu niiden erilaisista redox-potentiaaleista, minkä takia tinalla on elohopeaa suurempi taipumus hapettua samalla pelkistäen sen.<sup>121</sup> PerkinElmerin ohjeessa<sup>94</sup> hydridin muodostus on kuvattuna natriumborohydridillä reaktiolla:



jossa E on analyytti. Booriyhdisteet myös yleisesti ottaen hapettuvat esimerkiksi elohopeaa helpommin, jolloin liuoksessa oleva elohopeakin pelkistyy alkuainemuotoon<sup>121</sup>. Koska molempia pelkistimiä voidaan käyttää elohopean määrittämisessä, on pelkistintä valitessa syytä olla tietoinen molempien ominaisuuksista hieman tarkemmin.

#### 7.3.1. Pelkistimen valinta elohopean määrittämisessä

CVG-tekniikassa voidaan pelkistimenä käyttää sekä natriumborohydridiä että tinakloridia. Käytännössä molemmilla pelkistimillä on omat hyvät ja huonot puolensa. Olennaisin kriteeri on se halutaanko elohopean lisäksi määrittää samanaikaisesti myös muita alkuaineita, sillä tinakloridista ei ole apua esimerkiksi hydridin muodostuksessa. Pelkistimenä natriumborohydridi on myös vahvempi kuin tinakloridi jolloin pelkistyminen on yleensä tehokkaampaa ja nopeampaa.<sup>113,122</sup> Tinakloridi ei myöskään kykene pelkistämään metyylielohopeaa, vaan ainoastaan epäorgaanisen elohopean.<sup>123</sup> Olennaista on siis myös se missä muodossa elohopea on tutkittavassa näytteessä. Tina(II):n on todettu myös joissakin tilanteissa absorboituvan reaktioastin seinämälle, mikä voi vaikuttaa valintaan<sup>124</sup>.

NaBH<sub>4</sub>:n käytössä ongelmina voivat olla siirtymämetallien aiheuttama häiriö mittauksissa, sekä pelkistyksessä sivutuotteena syntyvä vetykaasu, joka häiritsee helposti plasman toimintaa. Jälkimmäinen seikka on havaittavissa silloin kun analyysiolosuhteille

tehdään optimointia;  $\text{NaBH}_4$ :n konsentraation kasvaessa tiettyyn pisteeseen asti myös intensiteetti kasvaa, jonka jälkeen intensiteetti alkaa laskea plasmaan kulkeutuvan vedyn määrän kasvaessa. Pohl *et al.* vertaili vuonna 2007 julkaistussa artikkelissaan CV-MSP-OES -laitteella näiden kahden pelkistimen välisiä eroja käytännössä, johon kuului myös mittausolosuhteiden optimointi. Artikkelissa  $\text{NaBH}_4$  pitoisuuden vaikutusta intensiteettiin kokeiltiin välillä 0,05–0,6 % (m/v) päätyen lopulta käyttämään 0,1 % liuosta. Tinakloridilla taas kokeiltiin pitoisuuksia 1–6 % (m/v) ja intensiteetti kasvoi tasaisesti 4 % pitoisuuteen saakka, minkä jälkeen intensiteetti alkoi hieman laskea. Olennaista näissä tuloksissa oli se, että tinakloridilla intensiteetin muutos ei ole niin jyrkkä kuin  $\text{NaBH}_4$ :llä, jolloin reaktio-olosuhteet eivät ole niin tarkat. Myös taustaliuokset eroavat näillä kahdella pelkistimellä;  $\text{NaBH}_4$  on hyvin epästabili liuoksessa ollessaan ja sen hajoamisen estämiseksi se liuotetaan usein laimeaan NaOH-liuokseen. Tinakloridi taas on vesiliuoksessa altis hydrolyysille, joten se yleensä on vaihtelevan vahvuisissa HCl-liuoksissa. Pohl *et al.* mukaan myös pelkistinliuosten NaOH ja HCl pitoisuudet vaikuttavat merkittävästi intensiteetteihin, mikä on luonnollista, jos näiden aineiden stabiloivan vaikutuksen ansiosta pelkistimet säilyvät paremmin.  $\text{NaBH}_4$ :lle testattu NaOH konsentraatioväli oli 0,01–0,08 mol/L ja  $\text{SnCl}_2$ :n HCl:lle 0,1–1,0 mol/L. NaOH:lla paras tulos saatiin konsentraatiolla 0,04 mol/L ja tähän verrattuna 0,08 mol/L konsentraatiolla intensiteetti pieneni n. 10 %. Tinakloridilla taas paras tulos saatiin HCl konsentraatiolla 0,5 mol/L, vastaavasti 1,0 mol/L konsentraatiolla intensiteetti pieneni tästä 25 %. Suuremmilla HCl pitoisuuksilla intensiteetin laskun syyksi epäiltiin  $\text{SnCl}_2$ :n hapettumista  $\text{SnCl}_4$ :ksi, jolloin samalla mahdollistuisi myös  $\text{Sn}(\text{OH})\text{Cl}$ :n saostuminen liuoksesta.<sup>122</sup>

Koska pelkistimien teho on hyvin erilainen, tarvitaan niitä hyvin erilaiset määrät, mikä voi asettaa erilaiset vaatimukset reagenssien puhtauden suhteen varsinkin jos tutkittavien alkuaineiden pitoisuudet näytteissä ovat hyvin pienet. Varsinkin elohopeaa voi olla näytteissä hyvin pienet määrät ja sitä voi olla epäpuhtautena käytetyissä reagensseissa. Pohl *et al.* tutkimuksessa<sup>122</sup> optimipitoisuus  $\text{NaBH}_4$ :lle oli 0,1 % ja  $\text{SnCl}_2$ :lle 4 %, mikä tarkoittaa sitä että tinakloridia tulee olla 40-kertainen määrä verrattuna  $\text{NaBH}_4$ :iin. Eli jos tässä tilanteessa molempia liuoksia tehtäisiin 0,5 L, liuotettaisiin  $\text{NaBH}_4$ :iä 0,5 g ja  $\text{SnCl}_2$ :a 20 g. Jos molemmilla reagensseilla puhtausaste on esimerkiksi 99 %, voi valmistettu  $\text{SnCl}_2$ -liuos sisältää huomattavasti enemmän mahdollisia epäpuhtauksia.

Pohl *et al.* artikkelissa olennaisin ero kahdella pelkistimellä oli lähinnä määritysraja, joka natriumborohydridillä oli 9 ng/mL ja tinakloridilla huomattavasti alhaisempi 0,11 ng/mL. Myös muun muassa alkuaineiden Cd, Co, Cu, Fe, Ni ja Zn vaikutusta saantoihin verrattiin pelkistimien välillä elohopeapitoisuudella 0,2 µg/ml ja häiriömetallien pitoisuuksilla 5, 10, 20 ja 50 µg/mL. NaBH<sub>4</sub>:llä häiritseviä metalleja olivat kadmium, rauta ja kupari, joista kadmium ja rauta alensivat pitoisuusvälillä 5–50 µg/mL saantoa 10 % ja 20 %. Kuparin aiheuttama häiriö oli hieman mutkikkaampi aiheuttaen saannon laskemisen noin 70 %:iin 5 µg/mL pitoisuudella, minkä jälkeen tulos nousi 10 µg/mL:lla ja laski taas hiljalleen noin 80 % tuntumaan. Lähtökohtaisesti tinakloridin olettaisi sietävän paremmin siirtymämetallien läsnäoloa, mutta Pohl. *et al.* saamat tulokset antavat viitteitä myös sillä esiintyvistä ongelmista. Kupari ja nikkeli laskivat tinakloridilla 50 µg/mL pitoisuudella elohopean saantoa 30 ja 10 %, mitä voi teoriassa pitää aavistuksen natriumborohydridin tulosta parempana. Toisaalta, tutkittaessa hydridin muodostajien As(V), Bi(III), Sb(III), ja Se(IV) vaikutusta pitoisuuksilla 5, 10 ja 20 µg/mL vain Se(IV) alensi natriumborohydridillä elohopean saantoa. Tämä olikin merkittävää, sillä saanto oli enää 9 % seleenin 5 µg/mL pitoisuudessa. Tinakloridilla saanto laski yllättäen kaikilla hydridin muodostajilla ollen alimmillaan 68 % 20 µg/mL Se(IV) pitoisuudella. 20 µg/mL Sb(III) laski saantoa noin 20 %. Syynä saannon laskuun tinakloridilla pidettiin erilaisten amalgaamien syntyä hydridisoituvien metallien ja elohopean välillä.<sup>122</sup>

Pohl. *et al.* tutkimus<sup>122</sup> on hyvä esimerkki siitä, miten valinta pelkistimenkään suhteen ei ole välttämättä itsestään selvä ja lopulta valinta tullaan tekemään käytetyn laitteiston, elohopean esiintymismuodon ja läsnä olevien muiden alkuaineiden perusteella. Yleisesti ottaen siirtymämetallien vaikutus määritykseen on tinakloridilla pienempää ja sillä pystytään saavuttamaan alhaisemmat määritys- ja toteamisrajat. Toisaalta, natriumborohydridi on pelkistimenä hyvin yleispätevä soveltuen myös metyylielohopealle ja muille alkuaineille. Aikaisemman perusteella se myös sietää jotkin hydridin muodostajat tinakloridia paremmin, muttei seleeniä. Syytä on myös muistaa, että mittauksissa on käytetty hyvin erilaista CV-MSP-OES -laitteistoa, jolla saadut tulokset voivat erota perinteisemmistä ICP- ja AAS-laitteista.



## 8 Ongelmat analyyseissä

Vaikka kemiallisen höyryn muodostuksen eduksi voidaan lukea monta ominaisuutta, kuten parempi herkkyys, voi menetelmä olla myös hyvin virhealtis. Tämä johtuu ainakin osittain määritettävien alkuaineiden yleisesti tunnetusta haastavuudesta, minkä takia tekniikan käyttöön on voitu päätyä alun perinkin. Toisaalta, menetelmän käyttö tuo myös lisävaiheina pelkistyksen sekä mahdollisesti esipelkistyksen, mitkä voivat helposti epäonnistua tavalla tai toisella. Esimerkiksi epäonnistunut esipelkistys huomataan mittauksissa näytteiden alhaisina/korkeina tuloksina tai kalibrointisuoran huonona korrelaationa. Myös pelkistys-reaktion ollessa kaukana optimaalisesta voidaan tämä nähdä kalibrointisuoran alhaisena korrelaationa, tulosten heittelynä ja liian korkeana RSD:nä näytteelle mitatuilla replikaateilla. Tämä voi aiheutua esimerkiksi liian vahvasta tai liian heikosta THB-liuoksesta, jolloin liian vahva liuos aiheuttaa liian suuren vetymäärän pääsyn plasmalle ja häiritsee plasman toimintaa mahdollisesti jopa sammuttaen sen. Liian heikko liuos taas ei saa pelkistettyä kaikkia analyyttejä.

Oikeita näytteitä mitattaessa potentiaalinen ongelma on myös, että sen matriisi aiheuttaa jonkinlaisia eroja mittauksissa verrattuna kalibrointiliuoksiin tai synteettisiin näytteisiin. Liuosmatriisissa häiriöitä voivat aiheuttaa niin muut alkuaineet kuin esimerkiksi siihen jäänyt rasva tai muu materia, mikä tekee siitä erilaisen itse valmistettuihin synteettisiin tai kaupallisiin vertailunäytteisiin verrattuna. Synteettiset näytteet ovat erittäin hyvä keino saada selvitettyä esimerkiksi erilaisten alkuaineiden vaikutuksia määrityksiin, mutta tämä vaikutus voi erota synteettisillä näytteillä hieman todellisesta matriisin aiheuttamasta eroista johtuen. Pahimmassa tapauksessa saatuja tuloksia joudutaan korjaamaan mutkikkailta menetelmillä, kuten Väisänen *et al.* käyttämällä usean lineaarisen regression tekniikalla<sup>125</sup>.

Elohopeaa pidetään yleisesti ottaen haastavana alkuaineena niin käsittelyn kuin määritystenkin kannalta. Eräs ongelmista on muun muassa sen helppo haihtuvuus näytteen käsittelyn aikana, minkä takia esimerkiksi happohajotuksiin suositellaan suljettujen astioiden käyttöä. Elohopean on todettu myös säilyvän paremmin vetykloridissa kuin typpihapossa ja mittausten aikana muovisilla näytteensyöttöjärjestelmillä on havaittu tarvetta pidemmille pesuajoille näytteiden

välissä. Tämän takia mittauksissa suositeltaisiin käyttämään lasista näytteensyöttöjärjestelmää ja happotaustana vetykloridia.<sup>126</sup>

### 8.1 Muiden alkuaineiden vaikutus saantoihin

Seleenin mittauksessa hydridimenetelmällä on joidenkin siirtymämetallien havaittu aiheuttavan häiriöitä mittauksissa. Grotti *et al.* tekemässä tutkimuksessa<sup>95</sup> ICP-OES -laitteella tutkittiin alkuaineiden Hg, Se, As (III) ja As (V) määrittystä ja seuraavien ionien vaikutusta saantoihin: Zn (II), Fe (III), Cu (II), Mn (II) ja Ni (II). Saatujen tulosten mukaan seleenin ja arseenin mittausten kannalta haitallisia olivat varsinkin Cu (II), Co (II) ja Ni (II). Kupari häiritsi selkeästi eniten seleenin mittausta; kun seleeniliuoksen pitoisuus oli 100 µg/L ja kuparia oli liuoksessa saman verran, oli seleenin saanto enää vain 60 %. Samalla myös todettiin saannon huonontuvan entisestään kuparipitoisuuden kasvaessa. Kuparin määrän kasvaessa se alkoi vaikuttaa myös elohopean saantoihin. Myös korkeat rautapitoisuudet vaikuttivat elohopean ja seleenin saantoihin, sillä niiden pitoisuuden ollessa 100 µg/L laski 100 mg/L rautapitoisuus saannon noin 50 %:iin. Nikkelin vaikutus korostui vasta siinä vaiheessa kun pitoisuus ylitti 10 mg/L rajan, muutoin sen vaikutus oli vähäinen. Kuitenkin pitoisuudella 100 mg/L häiriö oli huomattava; tutkituista analyyteistä Hg saanto oli enää vain noin 28 %, kun Se, As (III) ja As (V) saannot olivat lähellä nollaa. Sinkin ja mangaanin vaikutus saantoihin oli vähäinen; sinkin kaikilla pitoisuuksilla saannot olivat luokkaa 90–100 %, As (V) ja Hg saantoon mangaanin vaikutus oli olematon, sen sijaan As (III) ja Se saannot pienenevät hieman mangaanipitoisuuden kasvaessa ja saanto 100 mg/L pitoisuudessa oli noin 85 % luokkaa.

Oikeastaan tärkein lähde seleenin mittauksissa aiheutuville häiriöille on Johanna Jukkalan Jyväskylän yliopistolle kesällä 2011 julkaistu tutkimusraportti<sup>127</sup>. Tärkeän tästä raportista tekee se, että tutkimus on tehty lähes samalla laitteistolla, jolla tämän Pro gradu -tutkielman kokeellinen osuuskin tullaan tekemään. Ainoa ero on vain se, että työssä tullaan käyttämään kuitenkin uudempaa PerkinElmerin Optima 8300 ICP-OES laitetta vanhemman Optima 4300:n sijaan. Tutkimusraportissaan Jukkalan pääasiallisena tavoitteena oli kehittää menetelmä seleenin määrittämiseen vesiliuoksista HG-ICP-OES menetelmällä ja tutkimuksen aikana havaittiin myös häiriönpoiston olevan olennainen ja välttämätön osa hyvien tulosten saamiseksi. Kirjallisuuden perusteella tutkittaviksi

häiriömetalleiksi oli valittu rauta, nikkeli ja kupari ja niiden vaikutusta seleenin saantoihin tutkittiin synteettisillä näytteillä, jolloin 50 µg/L pitoiseen seleeniliuokseen lisättiin haluttu pitoisuus mahdollisesti häiriötä aiheuttavaa metallia. Rautapitoisuutta nostettiin suhteessa seleeniin aina 400-kertaiseksi saakka, kun taas nikkeli- ja kuparipitoisuudet olivat korkeimmillaan 100-kertaisia. Aikaisempien tutkimusten tuloksista poiketen rautapitoisuuden kasvaessa seleenin saanto parani, ja nikkelikin vaikutti aiemmin raportoitua vaarattomammalta. Vaikka nikkelpitoisuus nousi satakertaiseksi, pysyi seleenin saanto hyväksyttävällä tasolla. Kuparin vaikutus seleenin saantoihin oli sen sijaan huomattava; seleenin saanto pieneni selkeästi kuparipitoisuuden kasvaessa kaksinkertaisesta ylöspäin. Tutkimuksessa havaittiin myös muistijäljen olemassaolo, eli ilmeisesti seleeniä jäi kiinni esimerkiksi letkuihin ja kaasukammioon, jolloin tulokset olivat välillä alhaisempia ja välillä korkeampia kuin pitäisi. Metallien ja muistijäljen aiheuttaman häiriön hallintaan työssä käytettiin 0,75 % 1,10-fenantroliinia, jonka avulla kuparin aiheuttama heikentynyt saanto saatiin eliminoitua aina 20-kertaisiin pitoisuuksiin saakka.

Krata *et al.* selvittivät osana tutkimustaan<sup>124</sup> elohopean määrittämisessä häiritseviä alkuaineita käyttämällä CV-AAS -laitteella. Tämä tehtiin elohopealiuoksella, jonka pitoisuus oli 10 µg/L. Tutkittavina mahdollisina häiriötä aiheuttavina alkuaineina olivat alkali- ja maa-alkalimetalleista Na, K, Ca ja Mg, mahdollisesti elohopean kanssa samanaikaisesti pelkistyvät ja yhdessä amalgaameja muodostavat Ni, Fe, Zn, Cd ja Cu, sekä hydridin muodostajat Se, Sb, As ja Pb. Tulosten perusteella vain kupari, rauta ja hapetusasteella IV oleva seleeni alensivat elohopeasaantoja. 10 mg/L pitoisuudella Cu ja Fe alensivat elohopean saantoa melkein 50 % ja 40 % tasolle alkuperäisestä. Se(IV) alensi elohopeasaantoa myös merkittävästi; syyksi tälle esitettiin teoriaa, jossa seleeni pelkistyisi aina alkuainemuotoon saakka jolloin se samalla sitoisi elohopeaa muodostaen kolloidin sen kanssa. Tämän todennäköisesti oletettiin johtuvan koejärjestelyissä olleesta tioureasta, minkä tiedetään voivan aiheuttaa seleenin liiallista pelkistymistä. Alkali- ja maa-alkalimetallit, sekä Ni, Zn ja Cd eivät vaikuttaneet elohopean saantoon edes niiden pitoisuuden ollessa 50 mg/L. Sama toistui myös hydridin muodostavilla alkuaineilla Se(VI), Sb(V), Sb(III), As(III) ja Pb(II). Artikkelissa Krata *et al.* huomautti, että eräässä Psonick *et al.* artikkelissa vuodelta 1994 rauta ei ollut aiheuttanut ongelmia vaikka pitoisuus oli ollut jopa 100 mg/L.

**KOKEELLINEN OSUUS**

## 9 Laitteisto

Sartorius PRACTUM224-1S laboratoriovaaka

Bandelin Sonorex ultraäänihaude

Milestone Ethos Touch Control mikroaaltouuni

Memmert UM400 lämpökaappi (kosteuden määrittäminen)

WTC Binder lämpökaappi (mikroastioiden elvytys)

PerkinElmer Optima 8300 ICP-OES

FIAS-400 hybridilaitteisto

## 10 Reagenssit

Taulukko 3: Kiinteät reagenssit

Reagenssi	Kaava	Valmistaja	Puhtausaste
Tinakloridi	$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck	p.a.
Kaliumperoksidisulfaatti	$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	Oy FF-Chemicals AB	p.a.
Natriumborohydridi	$\text{NaBH}_4$	Sigma-Aldrich	98 %
Kaliumdikromaatti	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Merck	p.a.
Natriumhydroksidi pelletit	$\text{NaOH}$	Baker Analyzed	>98 %
1,10-Fenantroliinimonohydraatti	$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich	p.a.
Tiourea	$\text{CH}_4\text{SN}_2$	Merck	p.a.
L-kysteini	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$	Merck	99 %
Titriplex V (DTPA)	$\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_{10}$	Merck	99 %

Taulukko 4: Liuokset

Ultrapuhdas vesi - puhdistettu Elga PURELAB Ultra Analytic -laitteistolla

Reagenssi	Kaava	Valmistaja	Puhtausaste
37 % Vetykloridi	HCl	Sigma-Aldrich	p.a.
65 % Typpihappo	HNO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich	p.a.
30 % Vetyperoksidi	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Analar Normapur	p.a.
ETAX Aa Absol. etanoli	CH <sub>3</sub> OH	Altia	99,5 % (paino- %)
1-Dekanoli	C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> OH	Fluka	97 %

Taulukko 5: Standardiliuokset

Standardi	Valmistaja	Puhtausaste
Se 1000 mg/L	Fluka Analytical	analytical standard
Hg 1000 mg/L	PerkinElmer	p.a.
Fe 1000 mg/L	PerkinElmer	p.a.
Cu 1000 mg/L	PerkinElmer	p.a.

### Kaupalliset referenssimateriaalit

TORT-2 hummerin haima National Research Council Canada

TORT-3 hummerin haima National Research Council Canada

DOLT-5 kalan maksa National Research Council Canada

Taulukko 6: TORT-2 Sertifioidut arvot

<b>Alkuaine</b>	<b>Pitoisuus (mg/kg)</b>
<b>Arseeni</b>	21,6 ± 1,8
<b>Kadmium</b>	26,7 ± 0,6
<b>Kromi</b>	0,77 ± 0,15
<b>Koboltti</b>	0,51 ± 0,09
<b>Kupari</b>	106 ± 10
<b>Rauta</b>	105 ± 13
<b>Lyijy</b>	0,35 ± 0,13
<b>Mangaani</b>	13,6 ± 1,2
<b>Elohopea</b>	0,27 ± 0,06
<b>Molybdeeni</b>	0,95 ± 0,10
<b>Nikkeli</b>	2,50 ± 0,19
<b>Seleeni</b>	5,63 ± 0,67
<b>Strontium</b>	45,2 ± 1,9
<b>Vanadiini</b>	1,64 ± 0,19
<b>Sinkki</b>	180 ± 6
<b>Metyylielohopea (elohopeasta)</b>	0,152 ± 0,013

Taulukko 7: TORT-3 sertifioidut arvot

<b>Alkuaine</b>	<b>Pitoisuus (mg/kg)</b>
<b>Arseeni</b>	59,5 ± 3,8
<b>Kadmium</b>	42,3 ± 1,8
<b>Kromi</b>	1,95 ± 0,24
<b>Kupari</b>	497 ± 22
<b>Rauta</b>	179 ± 8
<b>Lyijy</b>	0,225 ± 0,018
<b>Mangaani</b>	15,6 ± 1,0
<b>Elohopea</b>	0,292 ± 0,022
<b>Molybdeeni</b>	3,44 ± 0,12
<b>Nikkeli</b>	5,30 ± 0,24
<b>Seleeni</b>	10,9 ± 1,0
<b>Strontium</b>	36,5 ± 1,6
<b>Vanadiini</b>	9,1 ± 0,4
<b>Sinkki</b>	136 ± 6
<b>Arseenibetaiini (arsenista)</b>	54,9 ± 2,5
<b>Metyylielohopea (elohopeasta)</b>	0,137 ± 0,012

Taulukko 8: DOLT-5 sertifioidut arvot

Alkuaine	Pitoisuus (mg/kg)
Arseeni	34,6 ± 2,4
Kadmium	14,5 ± 0,6
Kalsium	550 ± 80
Koboltti	0,267 ± 0,026
Kupari	35,0 ± 2,4
Rauta	1070 ± 80
Lyijy	0,162 ± 0,032
Magnesium	940 ± 100
Elohopea	0,44 ± 0,18
Molybdeeni	1,41 ± 0,22
Kalium	14 400 ± 3000
Seleen	8,3 ± 1,8
Hopea	2,05 ± 0,08
Natrium	9 900 ± 1600
Strontium	3,73 ± 0,26
Tina	0,069 ± 0,036
Vanadiini	0,51 ± 0,06
Sinkki	105,3 ± 5,4

## 11 TORT-2 Hummerin haima

### 11.1 Liuotusmenetelmän valinta

Erikoistyön tekeminen aloitettiin lokakuun puolivälissä 2015 käyttäen laboratoriossa jo valmiiksi ollutta TORT-2 referenssimateriaalia. Lähtökohtana työlle oli Juho Ridanpään tuore Pro gradu -tutkielma<sup>128</sup>, jossa hän oli määrittänyt onnistuneesti elohopeapitoisuuksia TORT-2 ja DOLT-4 referenssimateriaaleista. Näytteiden liuottamiseksi Ridanpää käytti ultraäänihaudetta, jonka jälkeen näytteet analysoitiin kylmähöyry ICP-OES menetelmällä. Toinen lupaava lähtökohta tutkimukselle oli Santos *et al.* julkaisu<sup>96</sup>, jossa hyvin samanlaisella ultraäänihauteen käyttöön perustuvalla slurry-menetelmällä oli saatu elohopean lisäksi myös seleenille erittäin hyvät tulokset. Seleenin ja elohopean liuotuksen testaamiseen käytettiin kullekin menetelmälle aina kahta rinnakkaista näytettä. Alkuperäiset menetelmät ovat esitettyinä taulukossa 9.



Taulukko 9: Ridanpään<sup>128</sup> ja Santos *et al.*<sup>96</sup> alkuperäiset menetelmät

<b>Tekijä</b>	<b>Ridanpää</b>	<b>Santos et.al.</b>
<b>Näyttemäärä</b>	250 mg	15–30 mg
<b>Hajotusliuos</b>	3 ml kuningasvesi + 3 ml vesi	0,5 ml 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <b>tai</b> 1,5 ml 5 % (m/v) K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> 2,5 % (m/v) NaOH
<b>Tutkittavat alkuaineet</b>	Elohopea	Elohopea ja seleeni
<b>Menetelmä</b>	Ultraääni 4x3 min. Tämän jälkeen suodatus 25 ml mittapulloon ja 2 ml HCl lisäys. Täyttö merkkiin. Ennen mittausta vaahtoamisen estoon dekanolia 100 µL per 10 ml näytettä.	Ultraääni 60 min. Tämän jälkeen ensimmäiseen liuokseen 7,5 ml HCl ja toiseen 8,3 ml HCl. Nämä liuokset laimennettiin 15 ml tilavuuteen ja ennen mittausta liuoksia lämmitettiin 15 min 90 asteessa. Ennen mittausta vielä lisäyksenä 2 pisaraa Antifoaming A:ta ja manuaalinen sekoitus 30s.

Ridanpään liuotusmenetelmään pohjautuvassa kokeilussa pyrittiin alkuperäistä näytteenkäsittelytapaa muuttamaan mahdollisimman vähän, mutta koska seleeni vaatii esipelkistyksen hydridimenetelmää varten, oli se otettava osaksi näytteenkäsittelyä. Molempien tekijöiden muunnellut menetelmät löytyvät taulukosta 10. Nyt käytetyssä menetelmässä hajotusliuoksessa käytettiin 4 ml kuningasvettä 3 ml sijaan ja liuotus tapahtui hajotusputkissa 50 °C ultraäänihauteessa, sillä hauteen lämpötilaa ei mainittu alkuperäisessä Ridanpään työssä. Kunkin ultraäänikäsittelyn jälkeen hajotusputkia ravisteltiin näytteen sedimentoitumisen estämiseksi ja ylimääräinen paine päästettiin astiasta pois.

Taulukko 10: Ridanpään ja Santos *et al.* muunnellut menetelmät

<b>Tekijä</b>	<b>Ridanpää</b>	<b>Santos et al.</b>
<b>Näyttemäärä</b>	250 mg	200 mg
<b>Hajotusliuos</b>	4 ml kuningasvesi + 3 ml vesi	2,5 ml 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <b>tai</b> 5 ml 5 % (m/v) K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> 2,5 % (m/v) NaOH
<b>Tutkittavat alkuaineet</b>	Elohopea ja seleeni	Elohopea ja seleeni
<b>Menetelmä</b>	Ultraääni 50 °C 4x3 min. Tämän jälkeen siirto 50 ml dekantterilasiin esipelkistystä varten ja lisättiin 9,5 ml HCl ja 8,5 ml H <sub>2</sub> O. Lämmitys lämpölevyllä 90 asteessa 15 min. Jäähdytys ja suodatus siirtäen 25 ml mittapulloon. Ennen mittausta vaahtoamisen estoon dekanolia 100 µL per 10 ml näytettä.	Ultraääni 50 °C 60 min. Tämän jälkeen liuosten siirto 100 ml dekantterilasiin ja lisättiin 25 ml HCl. Ensimmäiseen liuokseen lisäksi 22,5 ml vettä ja toiseen 20 ml. Esipelkistys 15 min 90 asteessa. Tämän jälkeen jäähdytys ja siirto 50 ml mittapulloon samalla suodattaen ja täyttö merkkiin. Ennen mittausta vaahtoamisen estoon dekanolia 100 µL per 10 ml näytettä.

Santos *et al.* oli vertaillut artikkelissaan useita erilaisia liuotusmenetelmiä ja lopulta päätynyt suosittelemaan Ridanpään menetelmän kanssa hyvin samanlaista ultraääneen pohjautuvaa slurry-menetelmää. Artikkelista otettiin kokeiluun kaksi eri variaatiota, jotka perustuivat 5 % (m/v) kaliumperoksidisulfaatin (2,5 % NaOH tausta) ja vetyperoksidin käyttöön liuoksina menetelmien erotessa toisistaan vain näiden liuosten osalta. Näiden kahden menetelmän etu muihin kokeiltuihin tekniikoihin oli, että elohopean lisäksi myös seleenille oli saatu erittäin hyvät saannot. Artikkelin loppupäätelmänä oli, että seleenin kunnollinen erotus näytematriisista vaatii näiden kahden kaltaisen hapettimen onnistuakseen.

Alkuperäistä Santos *et al.* luomaa menetelmää jouduttiin muuttamaan paljon, sillä jo lähtökohtaisesti 15–30 mg näytemäärää ei suosittele referenssimateriaalin valmistajakaan todetessaan sertifioitujen arvojen pätevän näytemäärän ollessa vähintään 250 mg. Kompromissina menetelmän muunnelmassa käytettiin 200 mg näytemäärää. Näytemäärän kasvaessa myös liuosten määrää pyrittiin nostamaan suunnilleen samassa suhteessa. Vetyperoksidinäytteiden esipelkistyksessä ilmeni näyteliuoksen runsasta vaahtoamista vetykloridin lisäyksen yhteydessä, minkä laantumista joutui odottamaan huomattavan pitkään.

Ensimmäisten mittaustulosten perusteella Ridanpään menetelmään pohjautuvalla kuningasvesi käsittelyllä saatiin seleenille paras saanto, noin 64 %. Kahden muun menetelmän seleenitulokset olivat hyvin heikot, mitkä selittyvät sillä, ettei slurry-menetelmään perustuvassa hapottomassa liuotusmenetelmässä seleeni pääse liukenemaan näytematriisista, mikä tekee slurryyn pohjautuvista menetelmistä käyttökelvottomat ainakin tällä hetkellä sopivan laitteiston puuttuessa. Menetelmä vaatisi ainakin siihen soveltuvan sumuttimen, ja lähtökohtaisesti myös kiinteän aineen ja liuoksen muodostaman seoksen homogeenisyys pitäisi pystyä varmistamaan. Koska soveltuvaa laitteistoa ei tällä hetkellä slurry-menetelmään löydy, suodatettiin näytteet tämän sijaan ennen mittauksia, mikä ei toiminut.

## 11.2 Menetelmän optimointi

### 11.2.1 Näytteen liuotus

Koska alustavasti parhaat tulokset seleenille oli saatu Ridanpään menetelmän muunnoksella, päätettiin siihen tehdä erilaisia muutoksia menetelmän kehittämiseksi. Optimoinnissa muutettuja parametreja olivat muun muassa liuotuksessa käytettyjen happopitoisuuksien muuttaminen, hapettimien käyttö vetyperoksidin ja kaliumperoksidisulfaatin lisäysten muodossa, ultraäänikäsittelyn pituuden ja lämpötilan muuttaminen, esipelkistys tiourella, alustavasti 1,10-fenantroliinin lisäys, sekä esipelkistysajan vaikutusta tutkittiin mittauksissa vertaamalla intensiteettejä keskenään. Alla on esitetty lyhyesti tarvittavilta osin tehdyt muutokset alkuperäiseen menetelmään.

Happopitoisuuden vaikutusta liuotuksessa testattiin siten, että kahdella rinnakkaisella näytteellä alkuperäisen 4 ml kuningasvesi + 3 ml vesi liuoksen sijaan käytettiin yhdessä liuotuksessa 2 ml kuningasvettä ja 5 ml vettä, kun taas toisessa muunnelmassa käytettiin 5 ml kuningasvesi ja 2 ml vesi-yhdistelmää. Hapettimien vaikutusten testaus aloitettiin vetyperoksidilla siten, että 3,35 ml kuningasveden ja 3 ml veden sekaan lisättiin vielä 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Vetyperoksidin lisäys aiheutti runsasta vaahtoamista hajotusastiassa ultraäänihauteessa ollessaan ja 4x3 min käsittely piti tehdä alussa hitaasti vaahtoamisen ehdoilla. Toisena hapettimena olleen 5 % (m/v) kaliumperoksidisulfaattiliuoksen lisäyksen vaikutusta saantoihin kokeiltiin lisäämällä sitä 1 ml seokseen, joka sisälsi jo näytteen lisäksi 4 ml kuningasvettä ja 3 ml vettä. Millään edellä mainituista optimoinnista ei ollut vaikutusta seleenin saanto- %:iin.

Saantoa yritettiin parantaa myös lisäämällä ultraäänihaude-käsittelyn aikaa, niin että tavanomaisen 4x3 min lisäksi näytettä pidettiin ylimääräiset 15 min ultraäänihauteessa. Hauteen lämpötilan nostoa kokeiltiin myös korottamalla sitä alkuperäisestä 50 asteesta maksimiin eli 80 asteeseen ohjelman ollessa muuten 4x3 min + 15 min. Näidenkään toimenpiteiden ei havaittu nostavan seleenin saantoa alkuperäisestä.

### 11.2.2 Häiriöt pelkistyksessä

Seleenin määrittämisessä nousi esille myös kuparin mahdollisesti häiritsevä vaikutus seleenin mittauksissa. Johanna Jukkala oli tehnyt aiemmin tutkimuksia<sup>127</sup> seleenillä ja hän oli havainnut kuparin häiritsevän merkittävästi seleenin mittauksia. Kuparin häiritsevän vaikutuksen estämiseksi hän oli käyttänyt 0,75 % 1,10-fenantroliinia, joka koordinoituu  $\text{Cu}^{2+}$  ionien ympärille. Kirjallisuuden mukaan 1,10-fenantroliinia liukenee kuitenkin vain noin 0,25g 100 ml:n vettä ja Jukkala ei ollut raportissaan maininnut miten liuotus oli tehty suuremman pitoisuuden saavuttamiseksi. 1,10-fenantroliinille on ilmoitettu suurempia liukoisuusarvoja muihin liuoksiin, mutta ongelmaksi tulee näiden liuosten mahdollinen soveltumattomuus työssä tehtyihin määrittäksiin. Tämän takia esimerkiksi orgaaniseen liuottimeen, kuten asetoniin, tehty liuotus ei vaikuttanut houkuttevalta, sillä se mitä todennäköisimmin vaikeuttaisi nestefaasin rakennetta entisestään. Hapolla avustetulla liuotuksella haitaksi taas saattaisi muodostua 1,10-fenantroliinin hajoaminen tai avaruudellisen koordinoitumisen menetys. Parhaaksi vaihtoehdoksi jäi etanoliin liuotus, millä ei arveltu olevan haitallisia vaikutuksia määrittäysten kannalta. TORT-2 tutkimusten loppuvaiheella erilaisia kokeiluja tehtiin niin veteen tehdyllä 0,25 % (m/v) 1,10-fenantroliiniliuoksella kuin etanoliin tehdyllä 0,75 % (m/v) 1,10-fenantroliiniliuoksella. Alustavat tulokset eivät olleet rohkaisevia; 0,25 % liuoksen lisäyksillä ei havaittu eroa normaaleihin näytteisiin ja etanoliin tehdyn fenantroliiniliuoksen lisäys ei myöskään antanut sen parempaa tulosta - sen sijaan tämän liuoksen lisäys aiheutti aallonpituudella 203,985 nm jonkinlaisen häiriön myötä tulosten selvää laskua.

Eräs selitys seleenin saantoihin voisi olla myös sen huonolaatuinen esipelkistys. Myös artikkeleiden kesken esipelkistykseen käytetty aika vaihtelee huomattavasti. Jotkut ovat suosineet PerkinElmerin FIAS-400-ohjeessa<sup>94</sup> olevaa käyttöä 90 asteessa, mutta toiset ovat pitäneet liuoksia tässä lämpötilassa 15 min<sup>96</sup>, ja jotkut jopa 60 min<sup>95</sup>. Esipelkistysajan pituudella ei havaittu eroa kalibrintiliuoksilla, jotka olivat vain käytetty 90 asteessa ja liuoksilla jotka oli pidetty 90 asteen lämmössä 60 min. Näytteillä eroa ei havaittu 90 asteessa vain käytetyillä ja siinä 15 min pidetyillä rinnakkaisilla näyteliuoksilla, mutta 60 min pidetyt näyteliuokset antoivat muihin näytteisiin nähden puolta pienemmän saannon. Syynä tälle kuitenkin on todennäköisesti liuoksen liiallinen haihtuminen ja seleenin jämähtäminen läsnä olleeseen sakkaan. Näytteille kokeiltiin myös esipelkistys tekemistä 10 % (m/v) tiourealiuosta käyttäen lisäämällä 20 ml näytepulloihin ennen merkkiin täyttämistä 1, 2 ja 3 ml tioureaa, ja annettiin vaikuttaa 30

min. Saadut tulokset olivat paljon alhaisempia tavalliseen esipelkistykseen verrattuna. Tämän enemmän TORT-2:lle ei optimointia ehditty tehdä, sillä se loppui kesken ja tämän korvaajaksi samalta valmistajalta löytyi TORT-3. Paras tulos seleenille TORT-2:lla olikin Ridanpään alkuperäisen menetelmän muunnoksen 64 % saanto.

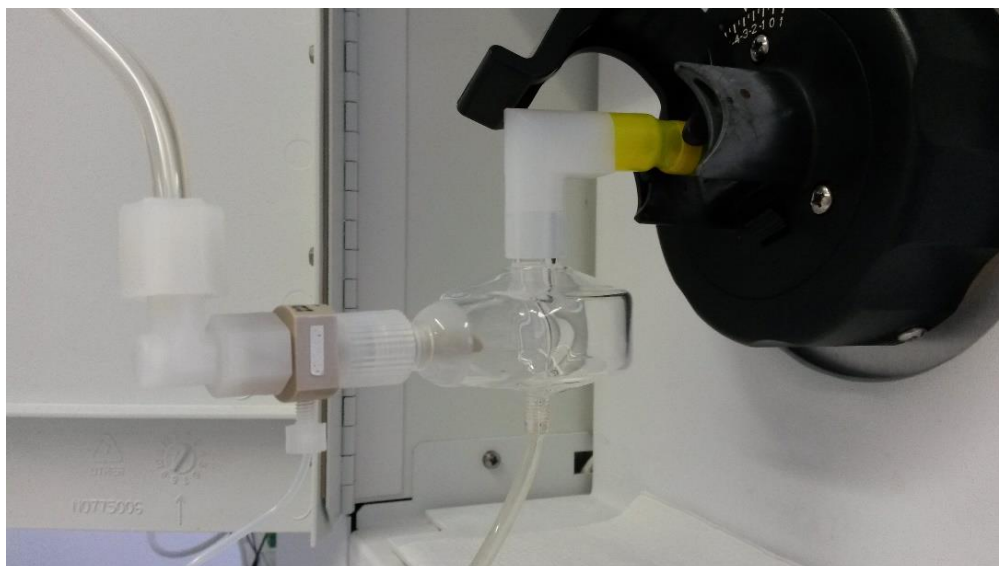
### **11.3 Ensimmäiset CVG-ICP-OES mittaukset ja niiden kehittyminen**

Koko työn ajan kalibrointiliuokset seleenille ja elohopealle tehtiin erikseen menetelmän helpomman muunneltavuuden ylläpitämiseksi. Näin tehtiin myös aivan tutkimuksen alussa vaikka kalibrointiliuosten pitoisuudet olivatkin vielä samat 5, 50 ja 100 µg/L taustan ollessa 6 M HCl:n suhteen. Mittaukset tehtiin aksiaalisesti molemmille alkuaineille kahdella eri aallonpituudella, jotka löytyvät myös taulukosta 11 muiden mittaustietojen kanssa. Käsiteltäessä tuloksia käytetään aallonpituuksista elohopealle aallonpituutta 253,652 nm ja seleenille 196,026 nm näiden ollessa yleisimmät muissakin raporteissa käytetyt aallonpituudet. TORT-2 referenssimateriaalilla mittaukset tehtiin FIAS-400:n sijaan siitä otetun näytteen ja pelkistimen sekoittavan muovikammion, GemCone High Solids -sumuttimen ja syklonisen sumutinkammion yhdistelmällä (kuva 11), minkä tarkoituksena oli estää jo Ridanpään erikoistyössä havaittu FIAS-400:n neste-kaasuerottimena toimivan suodattimen tukkeutuminen näytteen vaahtoamisen seurauksena. Pelkistimenä käytettiin Ridanpään käyttämää ja PerkinElmerinkin suosittelemaa 0,5 % NaBH<sub>4</sub>:ä, joka oli liotettu 0,05 % NaOH:iin. Vaahtoamisen estämiseksi käytettiin dekanolia 100 µl per 10 ml näytettä kohti. Pesuliuksena käytettiin TORT-2 mittauksissa vettä.

Taulukko 11: Mittaustekniset tiedot TORT-2

<b>Sumutin</b>	GemCone High Solids
<b>Sumutinkammio</b>	Baffled sykloninen
<b>Plasman teho</b>	1500 W
<b>Mitatut alkuaineet ja aallonpituudet</b>	Hg: 253,652 nm ja 194,168 nm Se: 196,026 nm ja 203,985 nm
<b>Mittaustapa</b>	Aksiaalinen
<b>Plasman kaasuvirtaus</b>	17 L/min
<b>Apukaasuvirtaus</b>	0,2 L/min
<b>Sumuttimen kaasuvirtaus</b>	0,5 L/min
<b>Pumpun pyörimisnopeus</b>	1,80 mL/min
<b>Pesuaika</b>	60s
<b>Näytteen lukuviive (Read Delay)</b>	60s

Koska seleenimittauksia ei ollut tehty hydridimenetelmää käyttäen laitoksella kovinkaan paljon ja aiempia tuloksia ei ollut referenssiksi, oli kalibroitiliuosten valmistamisessa aluksi epävarmaa se oliko myös ne esipelkistettävä näytteiden tavoin varmuuden vuoksi vai voitiinko niissä olettaa olevan oikea hapetusaste hydridin muodostusta varten. Ensimmäisillä mittauskerroilla seleenistandardina toimi myös laitoksella itse valmistettu standardi, jonka valmistusprosessista ei ollut varmoja tietoja. Ensimmäisillä mittauskerroilla seleenistandardeja ei lämmitetty, jolloin kalibroititulokset vaihtelivat ensimmäisten mittauksen suhteellisen hyvästä korrelaatiosta seuraavien kertojen huonompiin korrelaatioihin. Koska seleenistandardi ei vaikuttanut luotettavalta, päätettiin siitä tilata kaupallinen versio, josta valmistetuilla lämmittämättömillä standardeilla ensimmäisissä mittauksissa saatiin hyvä korrelaatio, muttei enää jatkossa. Tästä eteenpäin kalibroitiliuokset esipelkistettiin näytteiden tavoin.



Kuva 11: Alkuperäinen mittauksissa käytetty sumutin-sumutinkammiopari.

Elohopean kalibrointi onnistui hyvin, mutta näytteitä mitattaessa haasteena oli elohopean liian korkea pitoisuus saaduissa tuloksissa. Keskimääräisesti pitoisuudet olivat jopa 2–3 kertaa suurempia verrattuna sertifioidun materiaalin arvoihin. Syyksi mittaustuloksiin paljastuikin vanhentunut kaupallinen standardi. Koska laitoksella oli vastaavanlaisia avaamattomia kaupallisia standardiliuoksia varastossa, käytettiin niitä seuraavilla kerroilla. Tämän seurauksena ongelma lieveni, muttei poistunut. Lopulta laitokselle tilattiin uusi elohopean 1000 mg/L standardiliuos, josta tehtiin 8.12.2015 ensimmäinen 10 mg/L kantaliuos 5 % HNO<sub>3</sub>:ssa lasiseen 500 ml mittapulloon. Tämän jälkeen ongelmat elohopean mittauksissa katosivat näiltä osin, mutta TORT-2:sta ei hyvin paljon ehditty mitata elohopeapitoisuuksia ennen sen loppumista. Syynä tälle oli pääpainon tutkimuksessa keskittyen seleenin saannon parantamiseen, sillä elohopealle oli jo valmis Ridanpään luoma menetelmä olemassa.

TORT-2 referenssimateriaalille tehtyjen tutkimusten loppupuolella plasmalla havaittiin epästabiilisuus ongelmia. Yleisesti ottaen koko prosessin aikana 6 M HCl taustaa oli pidetty hyvin suurena, mutta tavoitteena ollessa seleenin ja elohopean yhtä aikainen määrittäminen, ja ottaen huomioon elohopean pieni pitoisuus näytteessä, ylimääräistä laimennosten tekoa haluttiin välttää. Toisaalta CVG-tekniikassa happoa ei pitäisi päätyä plasmalle, jolloin suurenkaan happopitoisuuden ei pitäisi olla ongelma. Koska seleenin kalibroinnissa oli ollut muutenkin haasteita, oli kalibrointiliuosten tekoa testattu jo aiemmin niin PerkinElmerin kuin Johanna Jukkalan ohjeiden mukaisesti 4,8 M ja 2,4 M

HCl taustoilla. Molemmille kalibroinneille saatiin hyvät korrelaatiot ja intensiteetit olivat eri vahvuisilla happotaustoilla verrannollisia keskenään. Plasmalla välillä nähtävien stabiilisuus-ongelmien myötä näytteiden HCl tausta laskettiin PerkinElmerin suosittelemalle 4,8 M tasolle ja TORT-3:lla lopulta 2,4 M tasolle.

## **12 TORT-3 Hummerin haima**

### **12.1 Lähtökohdat**

TORT-2 referenssimateriaalin loppuessa siirryimme käyttämään sen korvaajaa TORT-3:a, joka myös oli hummerin haimasta valmistettu referenssimateriaali. Ennakkoodotuksena oli, että kahdella materiaalilla ei olisi liuotuksen kannalta merkittävää eroa; sertifioiduista arvoista (taulukot 6 ja 7) voitiin todeta seleenipitoisuuden kaksinkertaistuvan, elohopean pysyvän kutakuinkin ennallaan ja mahdollisen haitta-aineen, kuparin pitoisuuden nelinkertaistuvan. Kuparin suurempaa pitoisuutta lukuun ottamatta työskentelyn voitiin katsoa jatkuvan suhteellisen normaalina. Tämä ei kuitenkaan osoittautunut todeksi ensimmäisissä mittauksissa, sillä TORT-3:n todettiin suodatuksesta huolimatta tukkivan näytteensyöttösystemin. Syynä vaikutti olevan mahdollisesti referenssimateriaalissa kasvanut rasvan osuus, mikä sai suodatetun näyteliuoksen näyttämään visuaalisesti raskaan oloiselta.

Näytteenkäsittelyn kannalta vaihtoehtoisiksi tulivat tällöin joko rasvan erottaminen orgaanisen liuottimen, kuten heksaanin, avulla näyteliuoksesta pois, tai näytteen täydellinen hajottaminen. Koska noin puolet referenssimateriaalissa olevasta elohopeasta on metyylielohopeaa, ei orgaanisen liuottimen käyttö rasvan erottamiseksi ole mahdollista, sillä myös metyylielohopea jäisi orgaanisen faasiin. Uttamista kuitenkin kokeiltiin heksaania käyttäen, jonka tuloksena olivat alhaiset elohopean saannot. Koska ultraäänellä ei onnistuttu saamaan toivottuja seleenisaantoja TORT-2:lla, oli EPA Method 3052 kaltaisen mikroaaltohajotuksen kokeilu ollut eräs harkinnan arvoinen vaihtoehto jo aikaisemminkin ja sitä päädyttiin kokeilemaan seuraavaksi.



## 12.2 Mikroaaltohajotusmenetelmän luominen ja optimointi

Mikroaaltohajotusta testattiin aluksi käyttäen valmistajan luomaa ohjelmaa ”Oyster Tissue”. Menetelmässä näytemäärä oli 250 mg ja hajotusliuksena käytettiin 7 ml HNO<sub>3</sub> ja 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Hajotusmenetelmä vaikutti toimivan erittäin hyvin kyseiselle näytetyypille ja tämän jälkeen näyteliuokset siirrettiin 20 ml mittapulloihin ja niistä näyteastioihin. Elohopean määrittämisen kannalta näytteet olivat jo valmiita, mutta seleeni vaati vielä esipelkistykseen. Tämän takia näyteliuos jaettiin kahteen osaan, jolloin osaa siitä käytettiin elohopean määrittämisessä ja osa meni vielä esipelkistettäväksi. Esipelkistys seleenin määrittämistä varten toteutettiin niin, että näyteliuosta pipetoitiin 10 ml 50 ml dekanterilasiin ja siihen lisättiin vetykloridia 10 ml, jotta saatiin 6 M HCl tausta. Liuosta lämmitettiin 15 min 90 asteessa, annettiin jäähtyä, ja siirrettiin 20 ml mittapulloon. Näytteiden happotausta oli tällöin 6 M HCl. Tästä väliliuksesta otettiin lopullista seleeninäytettä varten 4 ml näytettä 10 ml mittapulloon, jonka jälkeen lisättiin tarvittava määrä reagensseja ennen merkkiin täyttöä. Mitattavan seleeninäytteen taustaksi tuli 2,4 M. Hajotusmenetelmä, joka pysyi muuttumattomana koko työn ajan, on kuvattuna taulukossa 12. Hajotusta kontrolloitiin lämpötila-anturin avulla.

Taulukko 12: Mikroaaltohajotuksen ohjelma

Vaihe	Aika	Lämpötila	Teho	Vaihe
1	10 min	200° C	1000 W*	Lämpötilan nosto
2	20 min	200° C	1000 W*	Lämpötilan pito

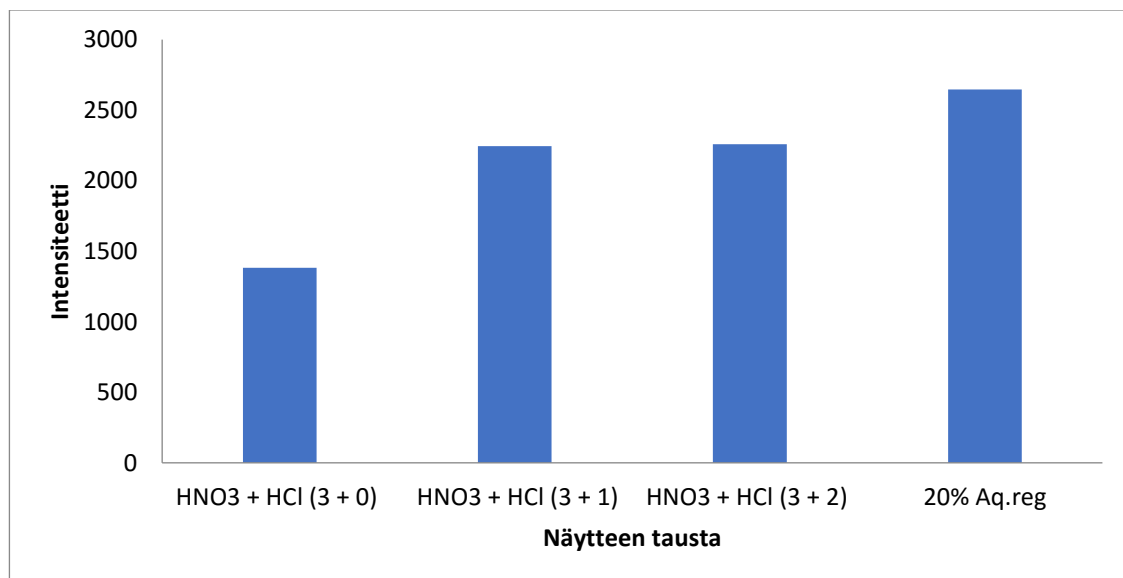
\*Jos astiamäärä oli vain kolme tai alle, käytettiin 500 W tehoa.

Ensimmäisten mittausten jälkeen mikroaaltohajotuksen todettiin olevan liuotusmenetelmänä hyvä vaihtoehto kyseiselle näytetyypille. Happotaustan todettiin olevan kuitenkin liian suuri, minkä seurauksena mikroaaltohajotuksessa kokeiltiin seuraavaksi käyttää hajotusliuksena ensin 3 ml HNO<sub>3</sub> + 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 3 ml H<sub>2</sub>O ja tämän jälkeen 3 ml Aq.reg. + 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 3 ml H<sub>2</sub>O. Hajotus ei mennyt kummallakaan liuksella niin täydellisesti kuin alkuperäisellä metodilla rasvaa jääden hieman liuoksen pintaan, mutta muunnellun metodin todettiin olevan kuitenkin tarpeeksi hyvä, sillä itse näyte oli hajonnut kokonaan.

Lopullinen hajotusliuos päätettiin mittausten perusteella, jossa testattiin happotaustan vaikutusta elohopean intensiteetteihin (kuva 12). Tällöin päädyttiin käyttämään hajotusliuoksena 3 ml HNO<sub>3</sub> + 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 3 ml H<sub>2</sub>O, johon lisättiin hajotuksen jälkeen 1 ml vetykloridia, mutta elohopean saannon ollessa neljällä rinnakkaisella näytteellä vain 72 %, kokeiltiin liuoksena myös 3 ml Aq.reg. + 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 3 ml H<sub>2</sub>O. Koska jälkimmäisellä kuningasvesitaustaisella hajotusliuoksella saatiin parempi saanto, 81,7 %, käytettiin sitä lopullisessa menetelmässä (taulukko 13). Syynä parempaan saantoon oli todennäköisesti kloridi-ionien elohopean absorptiota ehkäisevä vaikutus, mitä voi tapahtua niin hajotusastioissa kuin näytteensyötön aikanakin.

Taulukko 13: Lopullinen näytteenkäsittelymenetelmä

<b>Näytemäärä</b>	<b>250 mg</b>
<b>Hajotusliuos</b>	3 ml kuningasvesi 2 ml vetyperoksidi + 3 ml vesi
<b>Tutkittavat alkuaineet</b>	Elohopea ja seleeni
<b>Menetelmä</b>	Mikroaaltouunihajotus. Näytteen siirto suodattaen 20 ml mittapulloon. Näyteliuoksen jakaminen kahtia. Elohopea valmis mittauksiin. Seleeni: 10 ml näytettä 50 ml dekanterilasiin, lisätään 8,875 ml HCl + 1,125 H <sub>2</sub> O. Lämmitys lämpölevyllä 90 asteessa 15 min. Jäähdytys ja siirto 20 ml mittapulloon. Tästä väliliuoksesta lopulliseen näytteeseen 4 ml näyteliuosta 10 ml mittapulloon ja lisättiin tarvittaessa muita reagensseja.



Kuva 12: Taustan vaikutus elohopean intensiteetteihin. Näytteessä 4 µg /L elohopeapitoisuus ja taustat ovat milleinä 20 ml kokonaistilavuudessa.

## 12.3 Mittaukset

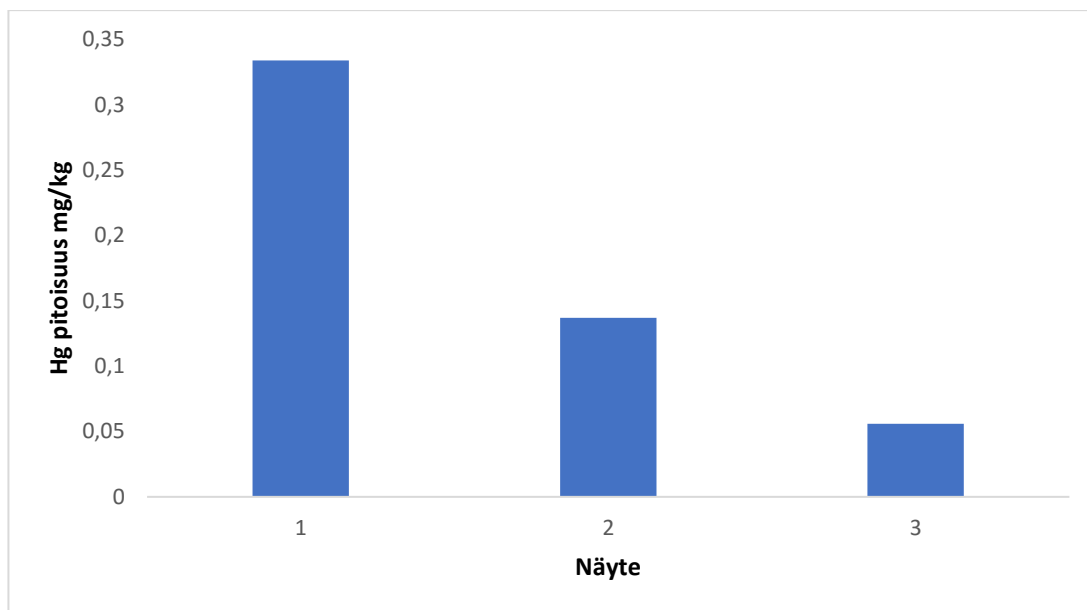
Mittausten aikana yksi merkittävä haaste oli plasman epästabiilisuus. Syyksi havaittiin lopulta uusi natriumborohydridi, joka osoittautui edeltäjänsä vahvemmaksi. Tästä syystä plasmaan kulkeutui enemmän vetykaasua aiheuttaen epästabiilisuusongelmia. Havainnon seurauksena natriumborohydridin konsentraatio laskettiin 0,5 %:sta 0,4 %:iin. Koska TORT-3 näytteet hajotettiin täysin mikroaaltouunissa, ei näytteen vaahtoaminen pelkistymisen aikana ollut enää ongelma. Tämä johti PerkinElmerin FIAS-400 -laitteen käyttöönottoon mittauksissa entisen sumutin ja sumutinkammio-systeemin sijaan. Mittausparametrit eivät pesuajan pidennystä lukuun ottamatta muuttuneet alkuperäisestä (taulukko 14).

Taulukko 14: Lopulliset mittaustekniset tiedot

<b>Hydridilaitteisto</b>	FIAS-400
<b>Plasman teho</b>	1500 W
<b>Mitatut alkuaineet ja aallonpituudet</b>	Hg: 253,652 nm ja 194,168 nm Se: 196,026 nm ja 203,985 nm
<b>Mittaustapa</b>	Aksiaalinen
<b>Plasman kaasuvirtaus</b>	17 L/min
<b>Apukaasuvirtaus</b>	0,2 L/min
<b>Sumuttimen kaasuvirtaus</b>	0,5 L/min
<b>Pumpun pyörimisnopeus</b>	1,80 mL/min
<b>Pesuaika</b>	80s
<b>Näytteen lukuviive (Read Delay)</b>	60s

### 12.3.1 Elohopea

Elohopean mittauksissa havaittiin merkittäviä haasteita, joista tärkeimpänä oli intensiteettien selvä lasku näytteiden välillä (kuva 13), mikä havaittiin myös kalibrintiliuoksilla näytteiden mittauksen jälkeen. ICP-laitteen Continuous Graphics -ohjelmalla voitiin tarkkailla laitteelle tulevaa signaalia myös mittausten ulkopuolella, millä havaittiin elohopean signaalin laskevan hyvin hitaasti perustasolle. Tässä kesti ajallisesti vähintään 2min30s eli pesuajan tulisi olla huomattavan pitkä. Myös heti kalibroinnin jälkeen suoritettussa tarkistuksessa standardiliuoksilla huomattiin tulosten paikoitellen poikkeavan yli 10 % sallitun rajan.

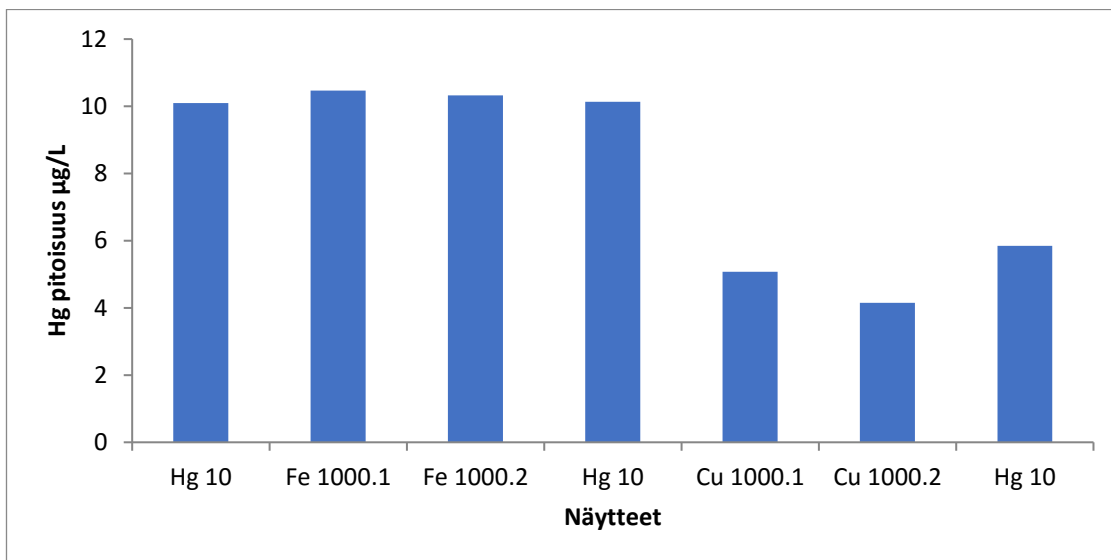


Kuva 13: Intensiteetin lasku elohopeamittauksissa TORT-3 näytteiden välillä. Pelkistimenä 0,4 % NaBH<sub>4</sub> 0,05 % NaOH:ssa. Tausta 3 ml HNO<sub>3</sub> + 1 ml HCl 20 ml mittapullossa. Elohopean sertifioitu arvo on 0,292 mg/kg.

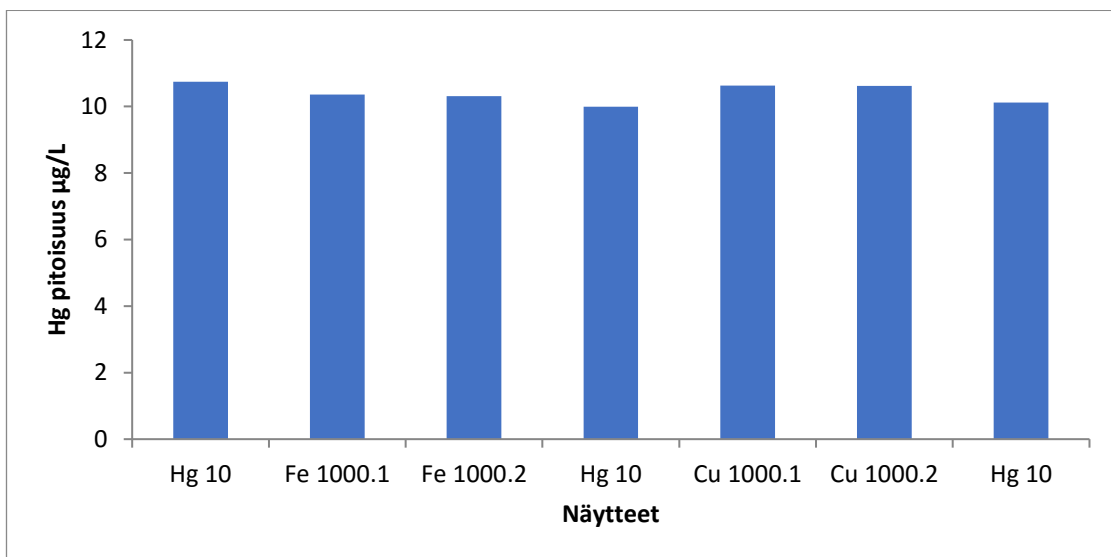
Ratkaisuksi testattiin erilaisia pesuliuoksia. Ajatuksena oli, että intensiteettiä laskee joko näytteenkäsittelystä mahdollisesti jäänyt rasva tai jokin häiritsevä alkuaine, joka jää linjastoon. Myös elohopean absorptio linjastoon oli eräs mahdollisuus. Pesuliuoksina kokeiltiin: 5 % HNO<sub>3</sub>, 5 % HCl ja 20 % kuningasvesi, sekä hieman erikoisemmat 0,05 % NaOH-liuos, sekä liuos, jossa oli 65,4 mg/L K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> ja taustana 2 % HCl. Näiden lisäksi kokeilussa sekä pesuliuoksena että standardeihin lisättynä oli 5/50 ml 0,18 % (m/v) L-kysteini, joka oli 2 % (v/v) HNO<sub>3</sub> taustassa. L-kysteiniä<sup>129</sup> ja kaliumdikromaattia<sup>130</sup> on molempia käytetty hyvin tuloksin aiemmin julkaistuissa artikkeleissa elohopean muistiefektin eliminointiin ICP-MS -laitteella. Molempien käyttö paransi kalibroinnin korrelaatiota hieman, muttei poistanut kuitenkaan edellä lueteltuja haasteita.

Pesuliuoksista kuningasvesi vaikutti yleispätevimmäältä tarkoitettuun käyttötarkoitukseen, joten sitä käytettiin jatkossa myös seleenin mittauksissa. Tämä ei kuitenkaan poistanut ongelmia intensiteettien laskemisen kanssa, vaan lopulliseksi ratkaisuksi osoittautui natriumborohydridin vaihto tinakloridiin pelkistimenä. Myöhemmin selvisi, että ainakin osasyynä intensiteettien laskuun oli ainakin näyteliuoksissa ollut kupari, jota semikvantitatiivisten mittausten perusteella oli elohopeaan nähden noin 1100-kertainen määrä. Tulosten perusteella kupari häiritse elohopean määrittystä natriumborohydridillä, muttei tinakloridilla (kuvat 14 ja 15).

Lopulliset tulokset neljälle rinnakkaiselle näytteelle saatiinkin käyttämällä 1 % SnCl<sub>2</sub> 2,5 % HCl:ssa.



Kuva 14: Häiriömetallianalyysi. Kaikissa näytteissä elohopeapitoisuus on 10 µg/L ja taustana 15 % kuningasvesi. Häiriömetalleista rauta ja kupari ovat elohopeaan nähden 1000-kertaisina ja häiriömetallinäytteitä tehtiin kaksi rinnakkaista. Pelkistimenä oli 0,3 % NaBH<sub>4</sub> 0,05 % NaOH:ssa.

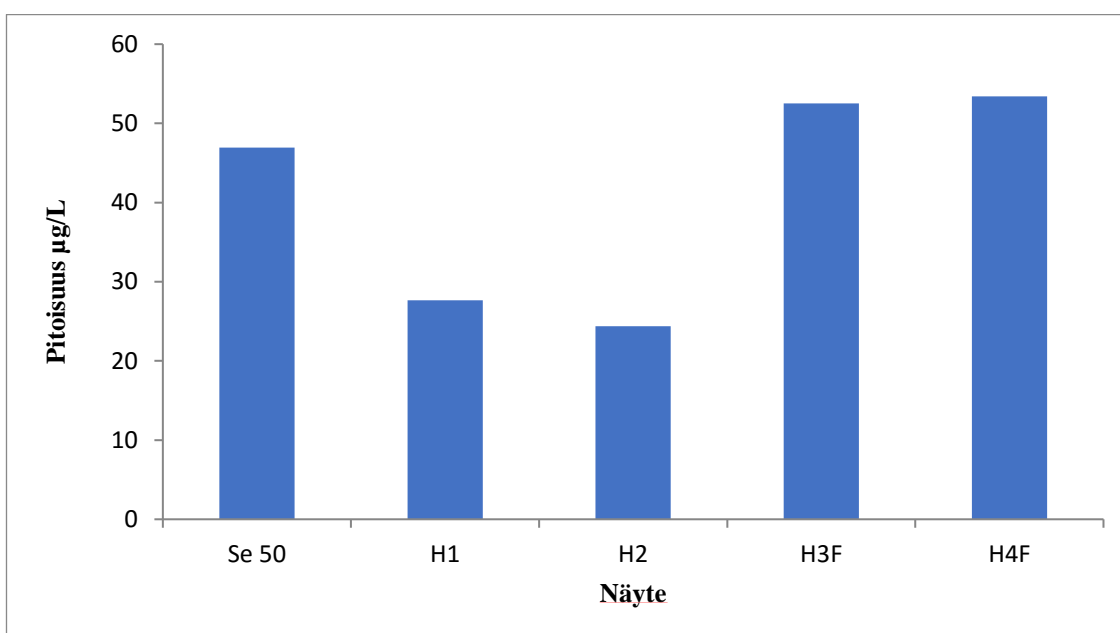


Kuva 15: Häiriömetallianalyysi. Kaikissa näytteissä elohopeapitoisuus on 10 µg/L ja taustana 15 % kuningasvesi. Häiriömetalleista rauta ja kupari ovat elohopeaan nähden 1000-kertaisina ja häiriömetallinäytteitä tehtiin kaksi rinnakkaista. Pelkistimenä oli 1 % SnCl<sub>2</sub> 2,5 % HCl:ssa.

### 12.3.2 Seleni

Seleenin mittauksissa käytettiin alun perin pelkistimenä 0,4 % natriumborohydridiä ja mittauksissa havaittiin samankaltaisia haasteita kuin elohopean määrittämisessä. Mittauksissa havaittiin muistiefektiä, standardiliuosten liian suurta poikkeamaa heti kalibroinnin jälkeen, sekä intensiteetin laskua standardiliuoksilla näytteiden jälkeen. Myös seleenin saanto- % oli heikko. Elohopean tilanteesta poiketen intensiteetin laskua ei tapahtunut näytteiden välillä, vaan se tapahtui standardiliuoksille näytteiden jälkeen.

Kiitos kirjallisuuden ja Johanna Jukkalan raportin, ongelmien syynä pidettiin edelleen liuoksessa olevaa kuparia, sillä nyt näyte oli täysin hajotettu poistaen seleenin huonon liukenemisen mahdollisuuden. Mittauksissa 0,25 % 1,10-fenantroliinin reilu lisäys osoittikin tämän toimivan kuparin aiheuttaman häiriön estämisessä. Lisätesteissä 5 ml 0,25 % 1,10-fenantroliinia 10 ml mittapullossa esti signaalin heikkenemisen synteettisissä häiriömetallinäytteissä, joissa oli lisättyä semikvantitatiivisten mittausten perusteella seleeniin nähden 30-kertainen määrä kuparia ja 10-kertainen määrä rautaa (kuva 16).



Kuva 16: Synteettiset häiriömetallinäytteet (H1 ja H2) ilman 5/10 ml 0,25 % 1,10-fenantroliinin lisäystä ja sen kanssa (H3F ja H4F). Näytteiden seleenipitoisuus 50 µg/L ja taustana 2,4 M HCl. F = Fenantroliini.

Jostain syystä 0,25 % 1,10-fenantroliinin vaikutus kuitenkin heikkeni ja se ei enää myöhemmissä mittauksissa saanutkaan estettyä kuparin vaikutusta määrittämisessä. Tälle on vaikea löytää selitystä, sillä mikään ei muuttunut mittauksissa ja reagenssikin säilyi

samana. Tämä johti muiden vastaavien kelatoivien aineiden testaamiseen, mutta EDTA ja DTPA eivät osoittaneet toimivan vesiliuoksissa fenantroliinia paremmin. DTPA-liuos valmistettiin liuottamalla sitä 0,2278 g 50 ml mittapulloon ja EDTA-liuos valmistettiin liuottamalla sitä 50 mg 100 ml mittapulloon. Punnittavat määrät selittyvät sillä, että aineiden liukoisuudet veteen kirjallisuuden mukaan ovat EDTA:lla sama kuin liuotettu määrä ja DTPA:lla 0,5 g / 100 ml. Lopullisiin näytteisiin näitä liuoksia lisättiin 5 ml 10 ml mittapulloon.

1 ml 1000 mg/L rautastandardin lisäys sen sijaan esti kuparin haitallista vaikutusta häiriömetallinäytteissä 10 ml lopullisessa tilavuudessa. Tämä kuitenkin toimi kokeissa vain kaksi kertaa, jonka jälkeen raudan lisäys ei enää toiminut. Raudan toiminta oli todennäköisesti jollain tapaa sidoksissa sen hapetuslukuun ja sen redox-potentiaaliin kupariin nähden. Rautaliuoksen kokeilu voisi olla kuitenkin tulevaisuudessa kannattavaa kuparin häiriön poistossa. Koska häiriönpoistossa edelleen parhaiten ja tasaisimmin oli toiminut fenantroliinin lisäys, oliärkevin vaihtoehto yrittää tehdä 0,25 %:n liuoksen rinnalle vahvempi liuos niin, että fenantroliini liuotettiin alkoholiin ja sitten alkoholipitoisuutta laskettiin veden avulla. Näin saatiin tehtyä 0,75 % 1,10-fenantroliiniliuos, joka oli 20 % etanolissa.

Etanolin läsnäolon ja siitä johtuvan epävarmuuden takia lähtökohtaisesti etanolin osuutta ei haluttu nostaa kovinkaan paljon yli 6 %:n lopullisissa näyteliuoksissa. Synteettisillä häiriömetallinäytteillä 3 ml 0,75 % 1,10-fenantroliiniliuosta 10 ml kokonaistilavuudessa osoitti olevan riittävä määrä kuparin häiriön poistoon. Mittauksissa kuitenkin huomattiin lisäyksen myötä aallonpituudella 196,026 nm intensiteetin kasvua ja aallonpituuden 203,985 nm ottavan mahdollisesti etanolista jonkinlaista häiriötä. Tämän takia myös kalibrointiliuoksiin oli tehtävä vastaavanlainen fenantroliinilisäys kuin näytteisiin, kun käytettiin 0,75 % -liuosta. Paras neljän rinnakkaisen näytteen saanto saatiinkin lopulta näytteillä, joiden lopullisessa laimennoksessa oli näytteelle alkuperäiseen mikrohajotukseen nähden 5x laimennos ja näyteliuokseen lisätty 3/10 ml 0,75 % 1,10-fenantroliinia. Saanto oli tällöin 82,6 %. Normaalilla kalibroinnilla ja 6/10 ml 0,25 % 1,10-fenantroliinilisäyksellä saanto jäi 62 %:iin.

### **13 DOLT-5 Kalan maksa**

Koska menetelmä oli jo käytännössä valmiiksi optimoitu, menetelmän soveltuvuutta arvioitiin määrittämällä sekä elohopea- että seleenipitoisuudet sertifioidusta kalan maksasta (DOLT 5). Kuparipitoisuus oli tässä referenssimateriaalissa selvästi pienempi (taulukko 8) ja oletuksena oli, että rasvapitoisuuskin olisi pienempi. Pienempää rasvapitoisuutta voitiin epäillä, koska ennen mikroaaltohajotusta niin sanotussa esihajotus-vaiheessa (predigestion) vaahdon muodostus ei ollut yhtä voimakasta kuin TORT-3 näytteissä vetyperoksidin lisäyksen jälkeen.

Mittaukset elohopealle meni ongelmitta tinakloridilla saannon ollessa 89 %. Seleenin määrityksessä kokeiltiin jälleen erilaisia fenantroliinin lisäyksiä ja parhaat saannot saatiin jo TORT-3:lla käytetyllä 3 ml 0,75 % 1,10-fenantroliinilla ja 6 ml 0,25 % 1,10-fenantroliinilla 10 ml kokonaistilavuudessa. Saanto olikin ensimmäisellä 96 % ja jälkimmäisellä 87 % aallonpituudella 196,026 nm.

### **14 Kosteuden määrittäminen**

Koska referenssimateriaalien valmistajan mukaan sertifioidut arvot koskevat kuivattuja näytteitä, piti niistä määrittää vielä kosteusprosentti. Toinen vaihtoehto yleensä olisi vain materiaalin kuivaus ennen näytteenkäsittelyä, mutta elohopean voimakkaan haihtuvuuden takia tämä ei ollut mahdollista. Sen sijaan kosteus määritettiin erillisistä näytteistä ja saadulla tuloksella voitiin tehdä korjaus mittauksissa käytettyjen näytteiden alkuperäiseen massaan. Kosteuden määritykseen molemmille referensseille punnittiin 500 mg kaksi rinnakkaista näytettä, jotka laitettiin valmiiksi taaratuille upokkaille.

Tämän jälkeen upokkaita käytettiin 1h uunissa, jonka lämpötila oli  $105 \pm 5$  °C ja annettiin jäähtyä eksikaattorissa 30 min ennen punnitusta. Tämä toistettiin niin pitkään, että painon lasku päättyi ja pysyi 0,2 mg tarkkuudella samana, mikä oli osoituksena kuivamisesta. Hieman vastoin odotuksia TORT-3 oli referenssimateriaaleista kuivempaa kosteutta ollen  $(4,2 \pm 0,1)$  % painosta. Hajonta kahden näytteen välillä oli olematon 0,06 %, mutta pyöristettiin kuitenkin 0,1:een menetelmän epävarmuuden vuoksi. DOLT-5 taas oli yllättävänkin kosteaa kahden näytteen keskiarvon ja keskihajonnan ollessa  $(11,6 \pm 0,3)$  %.



## 15 Tulokset ja johtopäätökset

### 15.1 TORT-3 Hummerin haima

Kalibroinnit onnistuivat työn loppupuolella todella hyvin ja korrelaatio oli aina vähintään 0,999 (taulukko 15). Elohopealla kalibrointi helpottui selvästi kun pelkistimeksi vaihdettiin 1 % SnCl<sub>2</sub> ja seleenilläkin tulokset paranivat siinä vaiheessa kun NaBH<sub>4</sub>:n pitoisuus laskettiin 0,4 %:sta 0,3 %:iin. Toteamis- ja määrittäysrajat (LOD- ja LOQ-arvot) laskettiin kullekin kalibroinnille suoritetun regressioanalyysin perusteella, jolloin suoran sovituksen y-akselin leikkauspisteen keskivirhe kerrottiin joko kolmella (LOD) tai kymmenellä (LOQ) ja jaettiin suoran kulmakertoimella. Saadut LOD- ja LOQ-arvot voisivat olla pienempiäkin, mutta ottaen huomioon näytteen sertifioidut pitoisuudet ovat tulokset kuitenkin hyvällä tasolla. Kalibrointiliuoksissa elohopealla oli 15 % kuningasvesitausta ja seleenillä taustana oli 2,4 M HCl, johon oli lisätty 3 ml 0,75 % 1,10-fenantroliinia 10 ml kokonaistilavuutta kohti. Kaikissa lopullisissa tuloksissa TORT-3:lla ja DOLT-5:llä on käytetty neljää rinnakkaista näytettä.

Taulukko 15: TORT-3 kalibroinnin tiedot

Alkuaine ja aallonpituus	Kalib.alue (µg/L)	Korrelaatio	LOD (µg/L)	LOD (mg/kg)	LOQ (µg/L)	LOQ (mg/kg)
Hg (253,652 nm)	4-20	0,9999	0,213	0,017	0,709	0,057
Se (196,026 nm)	20-100	0,9998	2,132	0,853	7,106	2,842

Tulokset TORT-3 referenssimateriaalille ovat taulukoissa 16 ja 17. Ottaen huomioon referenssimateriaalin haastavuuden, jotka aiheutuvat siinä olevasta rasvasta ja häiritsevistä alkuainesta, ovat tulokset hyviä. Molemmilla alkuaineilla tulokset kuitenkin jäävät sertifioidusta arvosta. Häiriömetalleista työssä tutkittiin vain kuparin ja raudan vaikutusta saantoihin, mitkä saatiin kutakuinkin kumottua käyttämällä elohopean määrittäyksessä tinakloridia ja seleenin määrittäyksessä 1,10-fenantroliinia.

Elohopean määrittäyksessä tinakloridilla häiriötä voivat aiheuttaa kuitenkin Pohl *et al.* artikkelin<sup>122</sup> mukaan varsinkin hydridin muodostajina tunnetut arseeni ja seleeni. Elohopeaan nähden näitä alkuaineita on sertifikaatin perusteella 203- ja 37-kertaiset määrät. Mikroaaltohajotus ei ole myöskään riskitön näytteenhajotusmenetelmä, sillä elohopea voi sekä potentiaalisesti haihtua astioiden raoista että absorboitua muovisten

hajotusastioiden seinämiin. Periaatteessa hajotus olisikin parasta tehdä ainakin kvartsiastioissa absorptio estämiseksi. Todennäköisesti elohopean säilymistä liuoksessa voisi myös yrittää varmistaa lisäämällä hajotusastiaan jonkinlaista reagenssia, kuten dikromaatti-liuosta.

Kuparin seleenin mittausta häiritsevä vaikutus saatiin eliminoitua suhteellisen hyvin 1,10-fenantroliinilla, mutta ei ole varmaa saatiinko se eliminoitua kokonaan. Referenssimateriaalissa on myös muitakin seleenin määrittystä mahdollisesti haittaavia alkuaineita, kuten toiset siirtymämetallit, sekä kadmium ja arseeni, joita on seleeniin nähden 5- ja 4-kertaiset määrät. Näistä sekä arseeni että kadmium voisivat potentiaalisesti kilpailla seleenin kanssa pelkistimestä, jolloin seleenin saanto alentuisi. Myös liuoksessa jäljellä ollut rasva on voinut potentiaalisesti häiritä mittaustapahtumaa.

Taulukko 16: Alkuperäiset tulokset elohopealle ja seleenille

Alkuaine ja aallonpituus	Tulos (mg/kg)	Sertifioitu arvo (mg/kg)	Saanto- %
Hg (253,652 nm)	0,239 ± 0,005	0,292 ± 0,022	81,7
Se (196,026 nm)	8,6 ± 0,3	10,9 ± 1,0	79,2

Taulukko 17: Lopulliset tulokset, joissa on huomioitu referenssimateriaalin kosteus

Alkuaine ja aallonpituus	Tulos (mg/kg)	Sertifioitu arvo (mg/kg)	Saanto- %
Hg (253,652 nm)	0,249 ± 0,005	0,292 ± 0,022	85,2
Se (196,026 nm)	9,0 ± 0,3	10,9 ± 1,0	82,6

## 15.2 DOLT-5 Kalan maksa

Myös DOLT-5:n kalibroinnit menivät hyvin ja korrelaatio oli vaadittu 0,999 (taulukko 18). Olosuhteissa mikään ei ollutkaan muuttunut TORT-3 mittauksiin nähden. Elohopealla pelkistimenä oli 1 % SnCl<sub>2</sub> ja seleenillä 0,3 % NaBH<sub>4</sub>. Saadut LOD- ja LOQ-arvot ovat edellä olevia TORT-3:n tuloksia selvästi korkeammat, mistä huomaa näiden laskennallisten arvojen olevan hyvin herkkiä korrelaation vaihteluille. Kalibroitiliuoksissa elohopealla oli 15 % kuningasvesitausta ja seleenillä taustana oli 2,4 M HCl, johon oli lisätty 3 ml 0,75 % 1,10-fenantroliinia 10 ml kokonaistilavuutta kohti. Taulukossa 19 on myös seleenin kalibroinnit pelkällä 2,4 M HCl taustalla, sillä tätä käytettiin näytteille, joihin tuli 0,25 % 1,10-fenantroliinin lisäys.

Taulukko 18: DOLT-5 kalibroinnin tiedot. Seleenillä taustana 2,4 M HCl, johon oli lisätty 3 ml 0,75 % 1,10-fenantroliinia 10 ml kokonaistilavuutta kohti.

Alkuaine ja aallonpituus	Kalib.alue (µg/L)	Korrelaatio	LOD (µg/L)	LOD (mg/kg)	LOQ (µg/L)	LOQ (mg/kg)
Hg (253,652 nm)	4-20	0,9997	0,496	0,040	1,652	0,132
Se (196,026 nm)	20-100	0,9994	4,031	1,612	13,436	5,374

Taulukko 19: DOLT-5 kalibroinnin tiedot. Seleenillä taustana 2,4 M HCl, ei fenantroliinin lisäystä.

Alkuaine ja aallonpituus	Kalib.alue (µg/L)	Korrelaatio	LOD (µg/L)	LOD (mg/kg)	LOQ (µg/L)	LOQ (mg/kg)
Se (196,026 nm)	20-100	0,9995	3,420	1,368	11,400	4,560

DOLT-5 referenssimateriaalilla saaduissa tuloksissa on havaittavissa kyseessä olevan TORT-3:a helpompi materiaali ja tulokset olivat sekä kosteus huomioiden että se huomiotta jättämällä sertifioitujen arvojen sisällä. Toisaalta, varsinkin elohopealla sertifioitujen arvon vaihteluväli sallii 40 % eroavuuden keskiarvona olevasta 0,44 mg/kg tuloksesta. Tulokset ovat erittäin hyvin linjassa sertifioituun arvoon, mutta referenssimateriaalille saatu kosteusprosentti (11,6 ± 0,3) % vaikuttaa epäilyttävän suurelta, sillä valmistajakin ilmoittaa sertifikaatissaan kosteuden yleensä olevan 4 %:n luokkaa. Kuivauksessa käytettiin TORT-3:n kanssa samaa uunia, jossa ei ainakaan ylimääräistä ilmavirtaa pitäisi olla liikaa. Kuitenkin epäselväksi jää, pystyikö hienojakoisempaa DOLT-5:ttä häviämään kosteuden määrittämisen aikana upokkaasta.

Taulukoissa 20 ja 21 on seleenin tulokset, kun on käytetty 3 ml 0,75 % 1,10-fenantroliinia 10 ml kokonaistilavuudessa. Parhaat tulokset seleenille saatiin kuitenkin käyttämällä häiriönpoistossa 6 ml 0,25 % 1,10-fenantroliinia 10 ml kokonaistilavuudessa (taulukko 22). Tämä selittyy oikeastaan referenssimateriaalin pienemmällä kuparipitoisuudella, jolloin 1,10-fenantroliinia ei tarvita niin paljoa ja 0,25 %:lla liuoksella kalibroinnin tarkistuksessa tulos standardiliuoksella oli lähempänä oikeaa arvoa. Kun näytteen kosteus huomioidaan tuloksissa, ovat ne erittäin vertailukelpoisia sertifioitujen pitoisuuksien kanssa.

Taulukko 20: Alkuperäiset tulokset elohopealle ja seleenille. Seleenillä taustana 2,4 M HCl, johon oli lisätty 3 ml 0,75 % 1,10-fenantroliinia 10 ml kokonaistilavuutta kohti.

Alkuaine ja aallonpituus	Tulos (mg/kg)	Sertifioitu arvo (mg/kg)	Saanto- %
Hg (253,652 nm)	0,392 ± 0,013	0,44 ± 0,18	89,0
Se (196,026 nm)	8,02 ± 0,15	8,3 ± 1,8	96,6

Taulukko 21: Lopulliset tulokset, joissa on huomioitu referenssimateriaalin kosteus. Seleenillä taustana 2,4 M HCl, johon oli lisätty 3 ml 0,75 % 1,10-fenantroliinia 10 ml kokonaistilavuutta kohti.

Alkuaine ja aallonpituus	Tulos (mg/kg)	Sertifioitu arvo (mg/kg)	Saanto- %
Hg (253,652 nm)	0,443 ± 0,014	0,44 ± 0,18	100,7
Se (196,026 nm)	9,07 ± 0,17	8,3 ± 1,8	109,2

Taulukko 22: Lopullinen tulos, jossa on huomioitu referenssimateriaalin kosteus ja seleenin määrityksessä on ollut 6/10 ml 0,25 % 1,10-fenantroliini.

Alkuaine ja aallonpituus	Tulos (mg/kg)	Sertifioitu arvo (mg/kg)	Saanto- %
Se (196,026 nm)	8,21 ± 0,49	8,3 ± 1,8	98,9

## 16 Yhteenveto

Erilaisten kokeilujen myötä lopullisena näytteenkäsittelymuotona TORT-3 ja DOLT-5 referenssimateriaaleilla päädyttiin käyttämään mikroaaltohajotusta, jossa näytemäärä oli 250 mg ja hajotusliuoksena 3 ml Aq.reg. + 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 3 ml H<sub>2</sub>O. Mikroaaltohajotusmenetelmä on kuvattu taulukossa 12. Hajotuksen jälkeen näyteliuokset siirrettiin 20 ml mittapulloihin ja niistä näyteastioihin. Seleenin vaatimaa esipelkistystä varten näytteet jaettiin tässä vaiheessa kahteen osaan, joista toinen oli jo valmis näyte elohopean määrittämiseen ja toinen meni esipelkistettäväksi.

Esipelkistys toteutettiin niin, että mikroaaltohajotuksen näyteliuosta pipetoitiin 10 ml 50 ml dekantterilasiin ja siihen lisättiin 8,875 ml HCl + 1,125 ml vettä. Liuosta lämmitettiin 15 min 90 asteessa, annettiin jäähtyä, ja siirrettiin 20 ml mittapulloon. Näytteiden happotausta oli tällöin 6 M HCl ja tästä väliliuoksesta otettiin lopullista seleeninäytettä varten 4 ml näytettä 10 ml mittapulloon jonka jälkeen lisättiin tarvittava määrä reagensseja ennen merkkiin täyttöä. Näin mitattavan seleeninäytteen taustaksi tuli 2,4 M HCl ja elohopeanäytteen tausta oli 15 % kuningasvesi. Lopullisissa määrittämissä käytettiin neljää rinnakkaista näytettä.

Kupari osoittautui vakavaksi häiriömetalliksi niin elohopean kuin seleeninkin mittauksissa. Rauta ei sen sijaan häirinnyt suurista pitoisuuksista huolimatta kummankaan analyysin määrittäystä. Kuparin aiheuttama häiriö oli vakavinta TORT-3 referenssimateriaalilla, sillä sen pitoisuus oli TORT-3:ssa huomattavasti korkeampi. Molemmille näytteille tehtiin myös semikvantitatiivinen mittaaminen, mistä raudan ja kuparin tulokset ovat esitettyinä taulukoissa 23 ja 24 kahden näytteen tuloksen keskiarvona. Saanto- % näillä kuvaa saatua tulosta verrattuna sertifioituun arvoon. Kuten tuloksista näkyy, on kuparin määrä seleeniin verrattuna TORT-3:lla 31-kertainen ja DOLT-5:llä vain 4-kertainen. Elohopeaan verrattuna kuparipitoisuus on TORT-3:lla yli 1100-kertainen ja DOLT-5:llä 83-kertainen. Kuparin häiriö eliminoidiin elohopean määrittämissä käyttämällä pelkistimenä natriumborohydridin sijaan 1 % tinakloridia, joka oli 2,5 % vetykloriditaustassa. Koska seleenin määrittämissä vastaavanlainen ei ollut mahdollista, päädyttiin mittauksissa käyttämään 0,3 % NaBH<sub>4</sub> 0,05 % NaOH:ssa ja häiriönpoistossa 1,10-fenantroliiniliuosta. TORT-3:lla paras tulos saatiin lisäämällä lopulliseen näyteliuokseen 3 ml 0,75 % 1,10-fenantroliiniliuosta 10 ml

kokonaistilavuuteen ja DOLT-5:llä 6 ml 0,25 % 1,10-fenantroliiniliuosta samaan kokonaistilavuuteen.

Taulukko 23: TORT-3 semikvantitatiivisen mittauksen tulokset raudalle ja kuparille

Alkuaineet	mg/L	mg/kg	Saanto- %
<b>Rauta (238,204 nm)</b>	1,542	122,7	68,5
<b>Kupari (327,393 nm)</b>	4,273	339,9	68,4

Taulukko 24: DOLT-5 semikvantitatiivisen mittauksen tulokset raudalle ja kuparille

Alkuaineet	mg/L	mg/kg	Saanto- %
<b>Rauta (238,204 nm)</b>	12,82	1016	95,0
<b>Kupari (327,393 nm)</b>	0,463	36,7	104,9

Referenssimateriaaleille tuli myös määrittää kosteus, sillä valmistaja on ilmoittanut sertifioitujen arvojen pätevän kuiville näytteille. Määritetyt kosteusprosentit olivat TORT-3:lle (4,2 ± 0,1) % ja DOLT-5:lle (11,6 ± 0,3) %. Lopulliset tulokset TORT-3:lle ovat esitettyinä taulukossa 17, ja saannot olivat elohopealle 85,2 % ja seleenille 82,6 %. DOLT-5:lle saadut parhaat tulokset elohopealle ja seleenille ovat esitettyinä taulukossa 25.

Taulukko 25: DOLT-5 tulokset, joissa on huomioitu referenssimateriaalin kosteus

Alkuaine ja aallonpituus	Tulos (mg/kg)	Sertifioitu arvo (mg/kg)	Saanto- %
<b>Hg (253,652 nm)</b>	0,443 ± 0,014	0,44 ± 0,18	100,7
<b>Se (196,026 nm)</b>	8,21 ± 0,49	8,3 ± 1,8	98,9

Saatuja tuloksia voidaan pitää hyvinä. TORT-3 osoittautui vaikeaksi materiaaliksi elohopean ja seleenin määrittämisessä varsinkin runsaan kuparipitoisuuden takia, mutta siinä on myös paljon muita potentiaalisia häiriön aiheuttajia läsnä. DOLT-5:n tulokset olivat erinomaisia, mikä on selitettävissä pääasiallisimman häiriömetallin, kuparin, pienellä pitoisuudella tässä referenssimateriaalissa. Kysymykseksi vielä jää olisiko TORT-3:n tuloksia voinut parantaa jollain tavalla ainakin elohopean osalta, mutta seleenin määrittämisessä kohdalla voi olla mahdollista että noin suuren kuparimäärän häiriön poistoon ainoa toimiva vaihtoehto olisi vaihtaa FIAS-400 toiseen laitteistoon, jossa

hydridin muodostus tapahtuisi juuri ennen plasmaa ja muodostuneet kaasumaiset tuotteet erotettaisiin heti liuoksesta. Joidenkin lähteiden mukaan hydridin muodostus on reaktiona erittäin nopea, toisin kuin reaktio, johon siirtymämetallien aiheuttama häiriö perustuu<sup>131</sup>.

Tulokset osoittavat työssä käytetyn kemiallisen höyryn muodostuksen olevan hyvä keino määrittää elohopean ja seleenin määriä näytteissä, joissa niitä on pieninäkin pitoisuuksina. Menetelmä vaatii kuitenkin käyttäjältä perehtymistä ja asiantuntemusta kyseisten alkuaineiden määrittämisessä, sillä menetelmä on edusta huolimatta hyvin herkkä siirtymämetallien ja mahdollisesti myös muiden hydridin muodostajien aiheuttamille häiriöille.

## 17 Lähteet

1. Ravinteet, [http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/ravinteet\\_1/3/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/ravinteet_1/3/), Solunetti (11.6.2016).
2. W. Nienstedt, O. Hänninen, A. Arstila ja S. Björkqvist, *Ihmisen fysiologia ja anatomia*, 18. Uudistettu painos, WSOY, Helsinki, 2009.
3. Valtion ravitsemusneuvottelukunta, *Suomalaiset ravitsemussuositukset 2014*, Juvenes Oy, Helsinki, 2014.
4. Selenium in Drinking-water (Background document), [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/chemicals/selenium.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/selenium.pdf), World Health Organization, 2011 (11.6.2016).
5. Vierasaineiden saantirajat, <https://www.evira.fi/yhteiset/vierasaineet/tietoa-vierasaineista/kalan-ymparistomyrkyt/vierasaineiden-saantirajat/>, Evira (11.6.2016).
6. Elintarviketurvallisuusvirasto Evira, *Elintarvikkeiden ja talousveden kemialliset vaarat*, Eviran julkaisuja 2/2013.
7. Periodic Table: Selenium, <http://www.rsc.org/periodic-table/element/34/selenium>, Royal Society of Chemistry (3.7.2015).
8. Selenium Element Facts, <http://www.chemicool.com/elements/selenium.html>, Chemicool (13.7.2015).
9. M.E. Weeks, The discovery of the elements. VI. Tellurium and selenium, *J. Chem. Educ.*, **1932**, 9(3), 474-485.
10. Periodic Table: Tellurium, <http://www.rsc.org/periodic-table/element/52/tellurium>, Royal Society of Chemistry (13.7.2015).
11. R. Seppänen, M. Kervinen, I. Parkkila, L. Karkela ja P. Meriläinen, *MAOL-taulukot*, 2. Painos, Otava, Helsinki, 2005.
12. J.E. Jorpes, *Jac. Berzelius: His Life and Work*, University of California Press, Berkeley ja Los Angeles, 1970.



13. N.V.C. Ralston, J. Unrine and D. Wallschläger, *Biogeochemistry and Analysis of Selenium and its Species*, North American Metals Council, 2008.
14. Selenium, <http://www.chemistryexplained.com/elements/P-T/Selenium.html>, Chemistry Explained (25.7.2015).
15. Selenium, <https://www.webelements.com/selenium>, WebElements (25.7.2015).
16. J. Mannila, Seleeni, hivenaine ja myrkky, *Helsingin Sanomat*, **2006**, <http://www2.hs.fi/extrat/teemasivut/tiedeluonto/alkuaineet/34.html>, (13.7.2015).
17. Periodic table of elements: Selenium, <http://periodic.lanl.gov/34.shtml>, Los Alamos National Laboratory (25.7.2015).
18. M. Roman, P. Jitaru and C. Barbante, Selenium biochemistry and its role for human health, *Metallomics*, **2014**, *6*, 25–54.
19. M.P. Rayman, H.G. Infante and M. Sargent, Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation, *Br. J. Nutr.*, **2008**, *100*, 238–253.
20. A. Sneddon, *Selenium nutrition and its impact on health*, Food & Health Innovation Service, **2012**.
21. N.V.C. Ralston and L.J. Raymond, Dietary selenium's protective effects against methylmercury toxicity, *Toxicology*, **2010**, *278*, 112–123.
22. L. J. Raymond, R.C. Deth and N.V.C. Ralston, Potential Role of Selenoenzymes and Antioxidant Metabolism in relation to Autism Etiology and Pathology, *Autism Res. Treat.*, **2014**.
23. M.P. Rayman, Selenium and human health, *The Lancet*, **2012**, *379*, 1256–1268.
24. J. Risher, *Toxicological Profile for Selenium (Update)*, DIANE Publishing, 2011.
25. J. K. MacFarquhar, D.L. Broussard, P. Melstrom, R. Hutchinson, A. Wolkin, C. Martin, R.F. Burk, J.R. Dunn, A.L. Green, R. Hammond, W. Schaffner and T.F. Jones, Acute Selenium Toxicity Associated With a Dietary Supplement, *Arch Intern Med*, **2010**, *170*(3), 256–261.

26. Mercury, <http://www.chemistryexplained.com/elements/L-P/Mercury.html>, Chemistry Explained (14.7.2015).
27. Mercury: historical information, <https://www.webelements.com/mercury/history.html>, WebElements (15.7.2015).
28. J. Sloane, Mercury: Element of the Ancients, <http://www.dartmouth.edu/~toxmetal/mercury/history.html>, Dartmouth Toxic Metals Superfund Research Program (17.7.2015).
29. The Element Mercury, <http://education.jlab.org/itselemental/ele080.html>, Jefferson Lab (15.7.2015).
30. Periodic Table: Mercury, <http://www.rsc.org/periodic-table/element/80/mercury>, Royal Society of Chemistry (15.7.2015).
31. Periodic table of elements: Mercury, <http://periodic.lanl.gov/80.shtml>, Los Alamos National Laboratory (18.7.2015).
32. Cinnabar Mineral Data, <http://webmineral.com/data/Cinnabar.shtml#.Vak7ufntlBc>, (17.7.2015).
33. Y. Bantor, Periodic Table: Mercury, <http://www.chemicalelements.com/elements/hg.html>, (17.7.2015).
34. C.E. Housecroft and A.G. Sharpe, *Inorganic Chemistry*, 3. Painos, Prentice Hall, Harlow, 2008.
35. Isotopes of the Element Mercury, <http://education.jlab.org/itselemental/iso080.html>, Jefferson Lab (22.7.2015).
36. K.M. Rice, E.M. Walker Jr, M. Wu, C. Gillette and E.R. Blough, Environmental Mercury and Its Toxic Effects, *J Prev Med Public Health*, **2014**, 47(2), 74–83.
37. Mercury, <http://periodic.lanl.gov/80.shtml>, Los Alamos National Laboratory (22.7.2015).

38. P. O'Neill, *Environmental chemistry*, Blackie Academic & Professional, Lontoo, 1998.
39. Työterveyslaitos ja kirjoittajat, *Kemikaalit ja työ: Selvitys työryhmän kemikaaliriskeistä*, Vammalan Kirjapaino Oy, Vammala, 2005.
40. Perustelumuistio virtsan ja veren elohopean toimenpiderajoiksi, <http://www.ttl.fi/fi/palvelut/turvallisempi-tyoymparisto/biomonitorointi/Documents/Elohopea.pdf>, Työterveyslaitos, (20.4.2016).
41. J.A. Timbrell, *Principles of biochemical toxicology*, 3. Painos, Taylor & Francis, Lontoo, 2000.
42. J. Timbrell, *Introduction to toxicology*, 3. Painos, Taylor & Francis, Lontoo, 2002.
43. C.F. Mason, *Biology of freshwater pollution*, 4. Painos, Prentice Hall, Harlow, 2002.
44. W.H. Schlesinger and E.S. Bernhardt, *Biogeochemistry: an analysis of global change*, 3. Painos, E-kirja, Elsevier, 2013.
45. Mercury in Your Environment, <https://www.epa.gov/mercury>, US EPA (16.3.2016).
46. M. Patra and A. Sharma, Mercury toxicity in plants, *Bot. Rev.*, **2000**, 66(3), 379–422.
47. C.D. Holmes, D.J. Jacob, E.S. Corbitt, J. Mao, X. Yang, R. Talbot and F. Slemr, Global atmospheric model for mercury including oxidation by bromine atoms, *Atmos. Chem. Phys.*, **2010**, 10, 12037-12057.
48. K.-H. Kim, E. Kabir and S.A. Jahan, A review on the distribution of Hg in the environment and its human health impacts, *J. Hazard. Mater.*, **2016**, 306, 376–385.
49. World Health Organization, *Evaluation of mercury, lead, cadmium and the food additives amaranth, diethylpyrocarbonate, and octyl gallate*, Wld Hlth Org. techn. Rep. Ser., No. 505, 1972.

50. S. Lindberg, R. Bullock, R. Ebinghaus, D. Engstrom, X. Feng, W. Fitzgerald, N. Pirrone, E. Prestbo and C. Seigneur, A Synthesis of Progress and Uncertainties in Attributing the Sources of Mercury in Deposition, *Ambio*, **2007**, 36(1), 19–32.
51. M.T. Parsons, D. McLennan, M. Lapalme, C. Mooney, C. Watt and R. Mintz, Total Gaseous Mercury Concentration Measurements at Fort McMurray, Alberta, Canada, *Atmosphere*, **2013**, 4, 472–493.
52. X.W. Fu, X. Feng, L.H. Shang, S.F. Wang and H. Zhang, Two years of measurements of atmospheric total gaseous mercury (TGM) at a remote site in Mt. Changbai area, Northeastern China, *Atmos. Chem. Phys.*, **2012**, 12, 4215–4226.
53. X.W. Fu, X. Feng, Z.Q. Dong, R.S. Yin, J.X. Wang, Z.R. Yang and H. Zhang, Atmospheric gaseous elemental mercury (GEM) concentrations and mercury depositions at a high-altitude mountain peak in south China, *Atmos. Chem. Phys.*, **2010**, 10, 2425–2437.
54. World Health Organization, *Air Quality Guidelines for Europe*, 2. Painos, WHO Regional Publications, European Series, No. 91, 2000.
55. S. Martínez-Trinidad, G.H. Silva, M.E.R. Islas, J.M. Reyes, G.S. Munguia, S.S. Valdes and R.C. Martinez, Total mercury in terrestrial systems (air-soil-plant-water) at the mining region of San Joaquín, Queretaro, Mexico, *Geofísica Int.*, **2013**, 52, 43–58.
56. D.E. MacCoy, Mercury Concentrations in Water, and Mercury and Selenium Concentrations in Fish from Brownlee Reservoir and Selected Sites in Boise and Snake Rivers, Idaho and Oregon, 2013, *US Geol. Surv. Open-File Rep.2014-1099*, **2014**, doi:<http://dx.doi.org/10.3133/ofr20141099>.
57. A. Kowalski, M. Siepak and L. Boszke, Mercury Contamination of Surface and Ground Waters of Poznan, Poland, *Polish J. of Environ. Stud.*, **2007**, 16(1), 67–74.

58. World Health Organization, *Mercury in Drinking-water*, Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality, 2005.
59. R. Tkachuk, and F.D. Kuzina, Natural Mercury Levels in Wheat, *Can. J. Plant Sci.*, **1983**, *63*, 1075–1081.
60. R. Tkachuk and F.D. Kuzina, Mercury levels in wheat and other cereals, oilseed and biological samples, *J. Sci. Fd Agric.*, **1972**, *23*, 1183–1195.
61. R. Jedrzejczak, Determination of total mercury in foods of plant origin in Poland by cold vapour atomic absorption spectrometry, *Food Addit. Contam.*, **2002**, *19*(10), 996–1002.
62. H. Zhang, X. Feng, T. Larssen, G. Qiu and R.D. Vogt, In Inland China, Rice, Rather than Fish, Is the Major Pathway for Methylmercury Exposure, *Environ. Health Perspect.*, **2010**, *118*(9), 1183–1188.
63. M. Navarro-Alarcon and C. Cabrera-Vique, Selenium in food and the human body: a review, *Sci. Total Environ.*, **2008**, *400*, 115–141.
64. M.N.I. Barclay, A. MacPherson and J. Dixon, Selenium Content of a Range of UK Foods, *J. Food Compos. Anal.*, **1995**, *8*(4), 307–318.
65. M. Eurola, G. Alfthan, P. Ekholm, T. Root, T. Suoniitty, E.-R. Venäläinen ja K. Ylivainio, *Seleenityöryhmän raportti 2011*, MTT Raportti 35, Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus, 2011.
66. P.P. Sirichakwal, P. Puwastien, J. Polngam and R. Kongkachuichai, Selenium content of Thai foods, *J. Food Compos. Anal.*, **2005**, *18*, 47–59.
67. E.C. Pappa, A.C. Pappas and P.F. Surai, Selenium content in selected foods from the Greek market and estimation of the daily intake, *Sci. Total Environ.*, **2006**, *372*, 100–108.
68. Y. Choi, J. Kim, H.-S. Lee, C. Kim, I.K. Hwang, H.K. Park and C.-H. Oh, Selenium content in representative Korean foods, *J. Food Compos. Anal.*, **2009**, *22*, 117–122.

69. J. Burger, M. Gochfeld, C. Jeitner, M. Donio and T. Pittfield, Interspecific and intraspecific variation in selenium:mercury molar ratios in saltwater fish from the Aleutians: Potential protection on mercury toxicity by selenium, *Sci. Total Environ.*, **2012**, *431*, 46–56.
70. World Health Organization, *Mercury - environmental aspects*, ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 86, 1989.
71. K.R. Campbell, Concentrations of heavy metals associated with urban runoff in fish living in stormwater treatment ponds, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **1994**, *27*, 352–356.
72. J. Burger and M. Gochfeld, Risk to consumers from mercury in Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) from the Aleutians: Fish age and size effects, *Environ. Res.*, **2007**, *105*, 276–284.
73. M. Olsson, Mercury level as a function of size and age in northern pike, one and five years after the mercury ban in Sweden, *Ambio*, **1976**, *5*, 73–76.
74. C. P. Madenjian, M.A. Stapanian, P.A. Cott, D.P. Krabbenhoft, W.H. Edwards, L.M. Ogilvie, J.G. Mychek-Londer and J.F. Dewild, Females Exceed Males in Mercury Concentrations of Burbot *Lota lota*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **2015**, *68*(4), 678–688.
75. Z. Visnjic-Jeftic, I. Jaric, L. Jovanovic, S. Skoric, M. Smederevac-Lalic, M. Nikcevic and M. Lenhardt, Heavy metal and trace element accumulation in muscle, liver and gills of the Pontic shad (*Alosa immaculata* Bennet 1835) from the Danube River (Serbia), *Microchem. J.*, **2010**, *95*, 341–344.
76. A.A Fallah, S.S. Saei-Dehkordi, A. Nematollahi and T. Jafari, Comparative study of heavy metal and trace element accumulation in edible tissues of farmed and wild rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using ICP-OES technique, *Microchem. J.*, **2011**, *98*, 275–279.

77. G.C. Fang, D.H. Nam and N. Basu, Mercury and selenium content of Taiwanese seafood, *Food Addit. Contam., Part B*, **2011**, 4(3), 212–217.
78. M. Calatayud, V. Devesa, J.R. Virseda, R. Barbera, R. Montoro and D. Vélez, Mercury and selenium in fish and shellfish: Occurrence, bioaccessibility and uptake by Caco-2 cells, *Food Chem. Toxicol.*, **2012**, 50, 2696–2702.
79. S. Torres-Escribano, A. Ruiz, L. Barrios, D. Vélez and R. Montoro, Influence of mercury bioaccessibility on exposure assessment associated with consumption of cooked predatory fish in Spain, *J. Sci. Food Agric.*, **2011**, 91, 981–986.
80. A.L. Maulvault, R. Machado, C. Afonso, H.M. Lourenço, M.L. Nunes, I. Coelho, T. Langerholc and A. Marquez, Bioaccessibility of Hg, Cd and As in cooked black scabbard fish and edible crab, *Food Chem. Toxicol.*, **2011**, 49, 2808–2815.
81. A.I. Cabañero, Y. Madrid and C. Cámara, Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: An in vitro digestion method, *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 526(1), 51–61.
82. F. Priego-Capote and M.D. Luque de Castro, Ultrasound-assisted digestion: A useful alternative in sample preparation, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2007**, 70, 299–310.
83. Ultraääni on mekaanista värähtelyenergiaa,  
[http://tieku.fi/laaketiede/laaketieteellinen-tekniikka/ultraaani-on-mekaanista-  
varahtelyenergiaa](http://tieku.fi/laaketiede/laaketieteellinen-tekniikka/ultraaani-on-mekaanista-varahtelyenergiaa), Tieteen Kuvalehti (11.10.2015).
84. M.D. Luque de Castro and F. Priego-Capote, Ultrasound-assisted preparation of liquid samples, *Talanta*, **2007**, 72, 321–334.
85. Method 3052: Microwave Assisted Acid Digestion of Siliceous and Organically Based Matrices, [https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-  
12/documents/3052.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3052.pdf), United States Environmental Protection Agency (2.3.2016).
86. Microwave Digestion - EPA Method 3052 on the Multiwave 3000,  
[https://www.perkinelmer.com/Content/ApplicationNotes/APP\\_MicrowaveDigestion  
Multiwave.pdf](https://www.perkinelmer.com/Content/ApplicationNotes/APP_MicrowaveDigestionMultiwave.pdf), PerkinElmer (2.3.2016).

87. Method 3015A: Microwave Assisted Acid Digestion of Aqueous Samples and Extracts, <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3015a.pdf>, United States Environmental Protection Agency (2.3.2016).
88. CEM-yhtiön kotisivut, <http://www.cem.com/> (5.5.2016).
89. R.D. Knight, *Physics for scientists and engineers: a strategic approach: with modern physics*, 2. Painos, Pearson/Addison Wesley, San Francisco, 2008.
90. How Do Microwaves Work, <http://www.universetoday.com/45527/how-do-microwaves-work/>, Universe Today (6.3.2016).
91. M. Fischetti, How the Microwave Works, *Scientific American*, <http://www.scientificamerican.com/article/how-the-microwave-works/> (9.3.2016).
92. Magnetrons, <http://www.explainthatstuff.com/how-magnetrons-work.html>, Explain That Stuff (9.3.2016).
93. T. Louhenvirta, *Metallit jätepolttolaitosten poltossa*, Kandidaatin tutkielma, Jyväskylän yliopisto, kemian laitos, soveltavan kemian osasto, Jyväskylä, 2014.
94. C.P. Bosnak and L. Dawidowski, *Continuous Flow Hydride Generation Using the Optima ICP*, Field application report, FIAS-400 käyttöohje, PerkinElmer.
95. M. Grotti, C. Lagomarsino and E. Magi, Simultaneous Determination of Arsenic, Selenium and Mercury in Foodstuffs by Chemical Vapour Generation Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy, *Ann. Chim.*, **2006**, *96*, 751–764.
96. E.J. dos Santos, A.B. Herrmann, V.L.A. Frescura and A.J. Curtius, Evaluation of slurry preparation procedures for the simultaneous determination of Hg and Se in biological samples by axial view ICP OES using on-line chemical vapor generation, *Anal. Chim. Acta*, **2005**, *548*, 166–173.
97. H. Matusiewicz and M. Ślachciński, Simultaneous determination of hydride forming elements (As, Sb, Se, Sn) and Hg in sonicate slurries of biological and environmental



- reference materials by hydride generation microwave induced plasma optical emission spectrometry (SS-HG-MIP-OES), *Microchem. J.*, **2006**, 82(1), 78–85.
98. H. Matusiewicz and M. Ślachciński, Method development for simultaneous multi-element determination of hydride forming elements (As, Bi, Ge, Sb, Se, Sn) and Hg by microwave induced plasma-optical emission spectrometry using integrated continuous-microflow ultrasonic nebulizer-hydride generator sample introduction system, *Microchem. J.*, **2010**, 95, 213–221.
99. J. Qiu, Q. Wang, Y. Ma, L. Yang and B. Huang, On-line pre-reduction of Se(VI) by thiourea for selenium speciation by hydride generation, *Spectrochim. Acta Part B*, **2006**, 61(7), 803–809.
100. J. Bowman, B. Fairman and T. Catterick, Development of a Multi-element Hydride Generation–Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Procedure for the Simultaneous Determination of Arsenic, Antimony and Selenium in Waters, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1997**, 12, 313–316.
101. J. Nölte, *ICP Emission Spectrometry - A Practical Guide*, Wiley-VCH, Weinheim, 2003.
102. Inductively Coupled Plasma (ICP),  
<http://www.elementalanalysis.com/services/inductively-coupled-plasma-icp/>,  
Elemental Analysis, Inc. (26.8.2015).
103. Inductively Coupled Plasma Spectroscopy (ICP-OES) Testing Services,  
<http://www.chemir.com/inductively-coupled-plasma-spectroscopy.html>,  
CHEMIR  
Evans Analytical Group (26.8.2015).
104. C.B. Boss and K.J. Fredeen, *Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*, 3. Painos, PerkinElmer, 2004.

105. R. Thomas, *Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners*, 3. Painos, CRC Press, 2013.
106. X. Hou and B.T. Jones, *Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry*, kirjasta *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000.
107. R.A. Thomas, Beginner's Guide to ICP-MS, Part III: The Plasma Source, *Spectroscopy*, **2001**, 16(6), 26-31.
108. R. Matilainen, KEMS302 Analyttisen kemian luentomuistiinpanot ja suullinen tiedonanto kurssin aikana, Jyväskylän yliopisto, Jyväskylä, kevätlukukausi 2015.
109. Meinhard TR+ Glass Nebulizer, <http://www.analyticalwest.com/manufacturers/icp-glassware/nebulizers/meinhard-nebulizers/meinhard-a-type-nebulizers/type-a-glass-nebulizers/meinhard-tr-glass-nebulizer.html>, Analytical West Inc. (14.6.2016).
110. H.E. Taylor, *Inductively Coupled Plasma-mass Spectrometry: Practices and Techniques*, Academic Press, Lontoo, 2000.
111. F.M. Dunnivant and J.W. Ginsbach, *Flame Atomic Absorbance and Emission Spectroscopy and Inductively Coupled Spectrometry - Mass Spectrometry*, E-Kirja, Whitman College, 2009.
112. Optima 8300 ICP-OES Optical System and SCD Detector, [http://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/TCH\\_Optima-8300-Optical-Sys-SCD\\_006270C\\_01.pdf](http://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/TCH_Optima-8300-Optical-Sys-SCD_006270C_01.pdf), Tekninen ohje, PerkinElmer (31.5.2016).
113. Y. Gao, R. Liu and L. Yang, Application of chemical vapor generation in ICP-MS: A review, *Chin. Sci. Bull.*, **2013**, 58(17), 1980–1991.
114. X. Guo, R.E. Sturgeon, Z. Mester and G.J. Gardner, UV Vapor Generation for Determination of Selenium by Heated Quartz Tube Atomic Absorption Spectrometry, *Anal. Chem.*, **2003**, 75(9), 2092–2099.

115. E. Bolea, F. Laborda, J.R. Castillo and R.E. Sturgeon, Electrochemical hydride generation for the simultaneous determination of hydride forming elements by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B*, **2004**, *59*, 505–513.
116. N.H. Bings, Z. Stefánka and S.R. Mallada, Flow injection electrochemical hydride generation inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry for the simultaneous determination of hydride forming elements and its application to the analysis of fresh water samples, *Anal. Chim. Acta*, **2003**, *479*, 203–214.
117. A.D. Campbell, A critical survey of hydride generation techniques in atomic spectroscopy (Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, **1992**, *64*(2), 227–244.
118. V. Yilmaz, L. Rose, Z. Arslan, and M.D. Little, On-line chemical vapour generation of cadmium in the presence of hexacyanochromate(III) for determination by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), *J. Anal. At. Spectrom.*, **2012**, *27*, 1895-1902.
119. P. Pohl, P. Jamroz, M. Welna, A. Szymczycha-Madeja and K. Greda, Chemical-vapor generation of transition metals through the reaction with tetrahydroborate in recent achievements in analytical atomic spectrometry, *TrAC Trends Anal. Chem.*, **2014**, *59*, 144–155.
120. H. Matusiewicz and M. Ślachciński, Method Development for Simultaneous Determination of Transition (Au, Ag, Cd, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn) and Noble (Pd, Pt, Rh) Metal Volatile Species by Microwave-Induced Plasma Spectrometry Using Ultrasonic Micronebulizer Dual Capillary Sample Introduction System, *Spectrosc. Lett.*, **2010**, *43*(3), 172–182.
121. D.C Harris, *Quantitative chemical analysis*, W.H. Freeman and Company, New York, 2010.

122. P. Pohl, I.J. Zapata, E. Voges, N.H. Bings and J.A.C. Broekaert, Comparison of the cold vapor generation using  $\text{NaBH}_4$  and  $\text{SnCl}_2$  as reducing agents and atomic emission spectrometry for the determination of Hg with a microstrip microwave induced argon plasma exiting from the wafer, *Microchim. Acta*, **2007**, *161*(1), 175–184.
123. G.A. Zachariadis, A.N. Anthemidis, E.I. Daftsis and J.A. Stratis, On-line speciation of mercury and methylmercury by cold vapour atomic absorption spectrometry using selective solid phase extraction, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2005**, *20*, 63–65.
124. A. Krata, K. Pyrzyńska and E. Bulska, Use of solid-phase extraction to eliminate interferences in the determination of mercury by flow-injection CV AAS, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2003**, *377*, 735–739.
125. A. Väisänen, R. Matilainen and J. Tummavuori, The determination of certain major and minor elements in geological samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. Some interference problems with the analysis of geological standard reference materials and nutrition supplements, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **2000**, *367*, 755–760.
126. Common Problems with Hg, Au, Si, Os and Na, ICP Operations Guide: Part 12, <https://www.inorganicventures.com/common-problems-hg-au-si-os-and-na>, Inorganic Ventures, P. Gaines (10.6.2016).
127. J. Jukkala, *Seleenin hydridianalyysi*, Tutkimusraportti, Jyväskylän yliopisto, kemian laitos, epäorgaanisen ja analyttisen kemian osasto, Jyväskylä, 2011.
128. J. Ridanpää, *CVG-ICP-OES -menetelmän käyttö elohopean analysointiin eläinkudoksesta*, Pro gradu -tutkielma, Jyväskylän yliopisto, kemian laitos, epäorgaanisen ja analyttisen kemian osasto, Jyväskylä, 2015.
129. Y. Li, C. Chen, B. Li, J. Sun, J. Wang, Y. Gao, Y. Zhao and Z. Chai, Elimination efficiency of different reagents for the memory effect of mercury using ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2006**, *21*, 94–96.

130. D.E. Nixon, M.F. Burritt and T.P. Moyer, The determination of mercury in whole blood and urine by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B*, **1999**, *54*(8), 1141–1153.
131. G.-H. Tao and R.E. Sturgeon, Sample nebulization for minimization of transition metal interferences with selenium hydride generation ICP-AES, *Spectrochim. Acta Part B*, **1999**, *54*, 481–489.