

**LuK-tutkielma**

**Synkronoidun fluoresenssispektroskopian  
optimointi vesi-etanolitaustaisille fluoranteeni- ja  
bentso(k)fluoranteeninäytteille**

**Harri Asikainen**



**Jyväskylän yliopisto**

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Ympäristötiede ja -teknologia

7.9.2020

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta  
Bio- ja ympäristötieteiden laitos  
Ympäristötiede ja -teknologia

Asikainen Harri: Synkronoidun fluoresenssispektroskopian optimointi  
vesi-etanolitaustaisille fluoranteeni- ja bentso(k)fluoranteeninäytteille  
Kandidaatin tutkielma: 26 s.  
Tutkielman ohjaaja: Akatemiattutkija, FT Eeva-Riikka Vehniäinen  
Syyskuu 2020

---

Hakusanat: Etyylialkoholi, fluoresenssi, fluorometria, PAH, PNA, polynukleaarinen aromaattinen hiilivety, polysyklinen aromaattinen hiilivety, SFS, spektrofluorometria

Perinteisesti polysyklisiä aromaattisia hiilivetyjä (PAH) on määritetty kromatografisilla menetelmillä. Niiden huonoina puolina ovat muun muassa näytteiden vaatima runsas esikäsitely, analyysiajojen hitaus, operaattoreilta vaadittava korkea tietotaito, laitteistojen korkea hinta ja tarvittavien orgaanisten liuottimien suuri määrä. Synkronoitu fluoresenssispektroskopia (SFS) on nopea, helposti operoitava ja vähän näytteiden esikäsitelyä vaativa menetelmä, joka lisäksi tarjoaa perinteistä fluoresenssispektroskopiaa yksinkertaisemmat spektrit. Tässä tutkielmassa selvitettiin synkronoidun fluoresenssispektroskopian soveltuvuutta fluoranteenin ja bentso(k)fluoranteenin määrittämiseen vesi-etanolitaustaisista näytteistä käyttämällä niille kirjallisuudesta löytyneitä mittauseräparametrejä. Seoksena vesi ja etanoli muodostavat fluoresoivan klusterin, vaikka yksin ne eivät ole fluoresoivia yhdisteitä. Vesi-etanolin klusteri emittoi osittain samalla aallonpituudella fluoranteenin kanssa ja nostaa taustaemission niin korkeaksi, että fluoranteenin osalta ei pystytä määrittämään niin alhaisia pitoisuuksia kuin SFS muuten mahdollistaisi. Bentso(k)fluoranteenin kohdalla taustaemissio jäi pieneksi ja vaikutus bentso(k)fluoranteenin määrittävyyteen jäi vähäiseksi. SFS soveltuu hyvin bentso(k)fluoranteenin määrittämiseen vesi-etanolitaustaisista näytteistä, mutta fluoranteenin kohdalla vesi-etanolin voimakas taustaemissio aiheuttaa ongelmia.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science  
Department of Biological and Environmental Science  
Environmental Science and Technology

Asikainen Harri: Optimization of Synchronous Fluorescence Spectroscopy for Fluoranthene and Benzo(k)-fluoranthene Samples with Water-Ethanol Background

Bachelor of Science Thesis: 26 p.

Supervisor: Academy Research Fellow, PhD Eeva-Riikka Vehniäinen

September 2020

---

Keywords: Ethyl Alcohol, Fluorescence, Fluorometry, PAH, PNA, Polynuclear Aromatic Hydrocarbon, Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, SFS, Spectrofluorometry

Traditionally, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are determined by chromatographic methods. Their disadvantages include the extensive pre-treatment required by the samples, the slowness of the analysis runs, the high level of know-how required of operators, the high cost of equipment and the large amounts of organic solvents required. Synchronous fluorescence spectroscopy (SFS) is a fast, easy-to-operate and low-sample-pre-treatment method, which also provides simpler spectra than traditional fluorescence spectroscopy. This thesis examined the applicability of synchronous fluorescence spectroscopy for the determination of fluoranthene and benzo(k)fluoranthene in samples with water-ethanol backgrounds by using measurement parameters found in the literature. As a mixture, water and ethanol form a fluorescent cluster, although alone they are not fluorescent compounds. The water-ethanol cluster partially emits at the same wavelength as fluoranthene and raises the background emission to such a high level that the fluoranthene cannot be determined at concentrations as low as SFS would otherwise allow. For benzo(k)fluoranthene, background emission was low and the effect on the determinability of benzo(k)fluoranthene was limited. SFS is well suited for the determination of benzo(k)fluoranthene from samples with a water-ethanol background, but in the case of fluoranthene, a strong background emission of water-ethanol causes problems.

# SISÄLLYSLUETTELO

<b>1 JOHDANTO .....</b>	<b>5</b>
<b>2 AINEISTO JA MENETELMÄT .....</b>	<b>9</b>
2.1 Aineisto .....	9
2.2 Menetelmät .....	11
<b>3 TULOKSET .....</b>	<b>15</b>
3.1 Fluoranteeni.....	15
3.2 Bentso(k)fluoranteeni.....	17
<b>4 TULOSTEN TARKASTELU .....</b>	<b>20</b>
<b>KIITOKSET.....</b>	<b>24</b>
<b>KIRJALLISUUS.....</b>	<b>24</b>

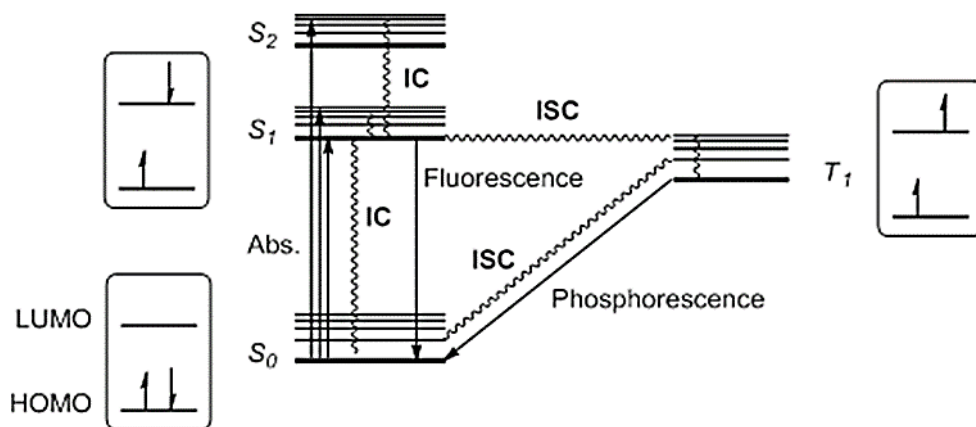
## 1 JOHDANTO

Polysykliset aromaattiset hiilivedyt (PAH) ovat orgaanisia yhdisteitä, jotka koostuvat kahdesta tai useammasta aromaattisesta renkaasta. Yleisimmin PAH:t esiintyvät kahdesta (naftaleeni) seitsemään (koroneeni) renkaisina (Boehm 1964). Useimmat PAH-yhdisteet ovat mutageenisia ja karsinogeenisia (Andrade Eiroa ym. 1998, Patra & Mishra 2001, Lage-Yusty ym. 2005). PAHeja muodostuu epätäydellisen palamisen seurauksena sekä luonnollisista että antropogeenisistä lähteistä. Luonnollisista lähteistä PAH-yhdisteitä muodostuu esimerkiksi metsä- ja ruohikkopalojen seurauksena (Andrade Eiroa ym. 1998). Antropogeenisiä lähteitä ovat esimerkiksi fossiilisten ja biopolttoaineiden polttaminen. Lisäksi PAHeja vapautuu ympäristöön esimerkiksi kasvien tuottamina synteetitöineinä (Andrade Eiroa ym. 1998) ja öljyn sekä petrokemian tuotteiden joutuessa ympäristöön (Boehm 1964). Ympäristöstä PAH-yhdisteitä löytyy käytännössä kaikkialta. Niitä on muun muassa vesistöissä, maaperässä, ilmassa, kuten myös eliöissä (Andrade Eiroa ym. 1998).

Polysyklisiä aromaattisia hiilivetyjä voidaan määrittää monilla eri tavoilla. Perinteisesti on käytetty kromatografisia menetelmiä (Andrade Eiroa ym. 1998). Pääasialliset menetelmät ovat olleet kaasukromatografia (GC) ja korkean erotuskyvyn neste-kromatografia (HPLC) yhdistettynä esimerkiksi massadetektoriin (massaspektrometri, MS) (Andrade Eiroa ym. 2000, Saitoh ym. 2009). Näiden menetelmien huonoina puolina ovat näytteiden vaatima runsas esikäsitely, analyysiajojen hitaus, operaattoreilta vaadittava korkea tietotaito, laitteistojen korkea hinta ja tarvittavien orgaanisten liuottimien suuri määrä (Patra & Mishra 2001, Patra & Mishra 2002, Saitoh ym. 2009). Myös perinteisessä PAH-analytiikassa on hyödynnetty PAH-yhdisteiden kykyä virittyä ja emittoida viritysenenergia fluoresenssisäteilynä, joka on mitattu fluoresenssidetektorilla (FLD) (Das & Thomas 1978, Patra & Mishra 2001).

Fluoroforit ovat yhdisteitä, jotka pystyvät emittoimaan absorboimansa sähkömagneettisen säteilyn fluoresenssisäteilynä. Sähkömagneettisella säteilyllä, kuten va-

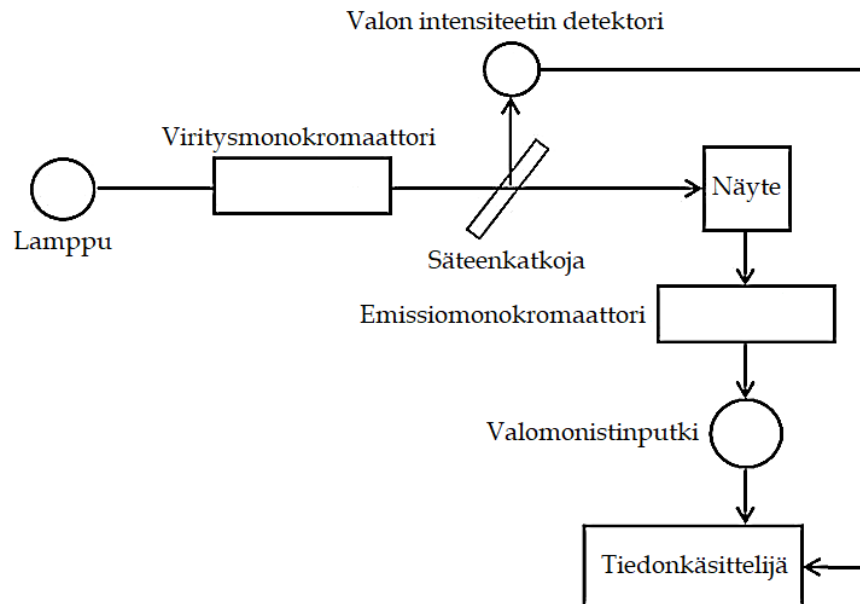
lolla, on kyky virittää kemiallisia yhdisteitä. Yhdisteen absorboidessa sopivan kokoisien säteilykvantin (energiapaketin) se virittyy. Säteilykvantin täytyy olla sen verran suuri, että sen energia riittää virittämään yhdisteen, mutta se ei saa olla niin suuri, että se esimerkiksi tuhoaa yhdisteen rakenteen sidosten katkeamisella. Virityksessä yhdiste siirtyy energiansa perustilalta ( $S_0$ ) virittyneelle energiatilalle ( $S_n$ ,  $n \geq 1$ , Kuva 1) (Albani 2007). Singlettisiirtymässä yhdisteen elektronitilassa tapahtuvassa muutoksessa elektronin pyörimissuunta (spin) ei muutu (Kuva 1, vasen reuna). Fluoroforin emittoidessa viritysen energiansa alimmalta singlettiviritystilalta ( $S_1$ ) sähkömagneettisena säteilynä palaten takaisin perustilalleen, ilmiö havaitaan fluoresenssisäteilynä. Fluoresenssi on kvanttimekaanisesti niin sanottu sallittu siirtymä, joten se on nopea. Fluoresenssin kesto on luokkaa  $10^{-12}$ – $10^{-4}$  s (Albani 2007, Harris & Lucy 2016).



Kuva 1. Jablonskin kaavio (Kiddle Encyclopedia 2020). Kaavio kuvaa kemiallisen yhdisteen virittymisen (Abs. = absorptio) ja viritystilan erilaiset purkautumisreitit sekä elektronien spinien erot singletti (S) ja tripletti (T) -tiloissa. Yhdisteen viritystilasta voi purkautua joko lämpönä (aaltoviiva) tai säteilynä, valona (Fluorescence = fluoresenssi, Phosphorescence = fosforesenssi). HOMO = korkein varattu molekyyliorbitaali, LUMO = alin vapaa molekyyliorbitaali, IC = sisäinen muuntuma, ISC = sisäinen risteymä.

Perinteisessä fluoresenssispektroskopiassa (FLS) viritysaallonpituudet ( $\lambda_{ex}$ ) ja emissioaallonpituudet ( $\lambda_{em}$ ) skannataan erikseen tai pidetään jompikumpi vakiona ja skannataan toinen (Lage-Yusty ym. 2005). Näin saadaan joko viritysspektri, emissiospektri tai molemmat. Viritys- ja emissioaallonpituuksien erillistä skannaamista

varten fluoresenssispektrometreissa on kaksi monokromaattoria (Kuva 2). Monokromaattorilla erotetaan valonlähteestä tai näytteestä tulevasta sähkömagneettisen säteilyn kimpusta halutun kokoinen aallonpituusväli.



Kuva 2. Fluoresenssispektrometrin yksinkertaistettu rakenne (Akaoglu 2017).

Fluoresenssispektroskopia on erittäin tehokas analyysimenetelmä. Se soveltuu fluoresoiville yhdisteille, eli melko rajalliselle joukolle yhdisteitä. Fluoresoimattomasta yhdisteestä voidaan kuitenkin derivatisoimalla (liittämällä siihen fluoresoiva osa) tehdä fluorofori, joka laajentaa FLS:n käyttömahdollisuutta. Jokaisella yhdisteellä on yksilöllinen rakenne, mistä johtuu, että niillä on myös yksilöllinen absorptio- ja emissiospektri. Fluoresenssispektroskopia perustuu fluoroforien yksilöllisiin absorptio- (viritys) ja emissiospektreihin, joita voidaan käyttää hyväksi niiden tunnistamisessa ja pitoisuuden määrittämisessä. Fluorometrian herkkyys on omaa luokkaansa moniin muihin spektroskooppisiin menetelmiin verrattuna. Sillä pystytään havaitsemaan jopa yksittäinen molekyyli (Harris & Lucy 2016). Erittäin selektiivisen siitä tekee mahdollisuus määrittää joko yhdisteiden viritysspektri tai emissiospektri (Lage-Yusty ym. 2005). Fluoresenssispektroskopian muita etuja ovat muun muassa nopeus ja näytteiden vähäinen esikäsittelyn tarve (Andrade Eiroa ym. 2000). Parhaiten perinteinen fluoresenssispektroskopia soveltuu yksittäisten

yhdisteiden analysointiin tai jonkin erotusmenetelmän, kuten esimerkiksi HPLC:n, yhteyteen (Patra & Mishra 2002, Saitoh ym. 2009).

Useita analyyttejä sisältävien näytteen analysointiin perinteinen fluoresenssispektroskopia soveltuu huonosti, sillä eri fluoroforien spektrit ovat hyvin samankaltaisia ja signaalipiikit leveitä (Andrade Eiroa ym. 1998, Andrade Eiroa ym. 2000). Sen takia spektrit menevät päällekkäin. Useita analyyttejä sisältävien näytteen spektrit ovat monimutkaisia ja yksittäisten analyyttien tunnistaminen niistä on vaikeaa tai jopa mahdotonta ilman spektrien jälkikäsitelyä (Patra & Mishra 2002). Muita fluoresenssispektroskopian huonoja puolia ovat muun muassa itseabsorptio (autoabsorptio) (Albani 2007, Harris & Lucy 2016), jossa liuotin absorboi osan viritys- tai emissioenergiasta, ja "quenching" (Harris & Lucy 2016), jossa osa tai koko fluoroforin viritystilä siirtyy toiselle yhdisteelle. Molemmat ilmiöt vaikuttavat vääristävästi havaittuun fluoresenssiin.

Perinteistä fluorometriaa paremmin useita analyyttejä sisältävien näytteen analysointiin soveltuu synkronoitu fluoresenssispektroskopia (SFS). Sen etuina perinteiseen fluorometriaan verrattuna ovat kapeammat spektrien piikit, yksinkertaisemmat emissiospektrit ja kapeampi tarvittava spektraalinen alue (Patra & Mishra 2002). Näiden seikkojen vuoksi SFS-menetelmällä mitatuista spektreistä on helpompi tunnistaa eri analyytit ja niiden erottuvuus on parempi kvantitatiivista määrittystä varten.

Synkronoitu fluoresenssispektroskopia voidaan jakaa kolmeen eri tekniikkaan. Aallonpituusvakioidussa SFS:ssä pidetään viritys- ja emissioaallonpituuksien väli vakiona ( $\Delta\lambda$  on vakio). Tämä on helpoin ja käytetyin SFS-tekniikka. Tätä tekniikkaa käytettiin myös tässä tutkielmassa. Energiavakioidussa SFS:ssä pidetään viritys- ja emissioaallonpituuksien välinen energia vakiona (viritys- ja emissioaallonpituuksien välinen frekvenssiero,  $\Delta\nu$ , on vakio). Muuttuvan kulman SFS:ssä viritys- ja emissioaallonpituuksia muutetaan samanaikaisesti, mutta eri nopeudella. Tämä mahdollistaa spektrin x-akselin suuntaisen tarkastelun 45–90 asteen kulmasta, jol-



loin spektristä saa kokonaisvaltaisemman kuvan (Patra & Mishra 2002). Energiavaikioitu ja muuttuvan kulman SFS-tekniikat ovat vähemmän käytettyjä SFS-menettelmiä.

Tässä LuK-tutkielmassa selvitettiin synkronoidun fluoresenssispektroskopian käyttömahdollisuutta vesi-etanolitaustaisten PAH-yhdisteiden analytiikassa. Tutkielma liittyi laajempaan kokonaisuuteen, ja sen tuloksia oli tarkoitus käyttää biotesteissä käytettyjen altistusvesien PAH-pitoisuuksien määrittämisessä. Etanolia käytettiin altistusvesinäytteen kestävöintiin. Malliyhdisteinä tässä tutkielmassa käytettiin fluoranteenia ja bentso(k)fluoranteenia, joille SFS optimoitiin käyttäen kirjallisuudesta löytyviä mittausparametreja ja kokeilemalla niiden soveltuvuutta vesi-etanolitaustaisille liuoksille. Tämän LuK-tutkielman tutkimuskysymys oli siis, että soveltuuko synkronoitu fluoresenssispektroskopia fluoranteenin ja bentso(k)fluoranteenin määrittämiseen vesi-etanolitaustaisista näytteistä. Kirjallisuudesta ei löytynyt tietoa, että vesi-etanolia olisi käytetty PAH-yhdisteiden liuottimena ainakaan tässä tutkielmassa käytetyille yhdisteille. Vesi ja etanoli (etyylialkoholi) eivät kumpikaan ole fluoresoivia yhdisteitä, joten niiden pitäisi soveltua hyvin PAH-yhdisteiden fluoresenssimittauksiin. Oletuksena oli siis, että fluoranteenin ja bentso(k)fluoranteenin määrittäminen onnistuu vesi-etanolitaustaisista näytteistä.

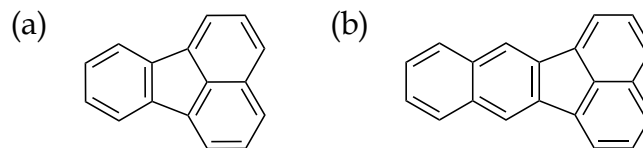
## 2 AINEISTO JA MENETELMÄT

### 2.1 Aineisto

Fluoranteeni on kellertävä, kiteinen yhdiste, joka koostuu kolmesta bentseenirenkaasta ja yhdestä viiden hiilen renkaasta (Kuva 3) (NCBI 2020a). Se on hydrofobinen yhdiste, joten se liukenee huonosti veteen (Taulukko 1). Parhaiten fluoranteeni liukenee orgaanisiin liuottimiin. Fluoranteeni on ärsyttävä ja ympäristölle vaarallinen yhdiste. Hydrofobisena se sitoutuu orgaaniseen ainekseen, kuten humukseen. Se muodostaa addukteja biologisen materiaalin, kuten DNA:n, kanssa. Aikaisemmin

fluoranteenia ei pidetty karsinogeenisenä, mutta vuonna 2019 ECHA (Euroopan kemikaalivirasto) lisäsi sen mahdollisesti syöpää aiheuttavien yhdisteiden listalle (ECHA 2019).

Bentso(k)fluoranteeni on keltainen, kiteinen yhdiste, joka koostuu neljästä bentseenirenkaasta ja yhdestä viiden hiilen renkaasta (Kuva 3) (NCBI 2020b). Bentso(k)fluoranteeni on fluoranteeniakin hydrofobisempi, joten se liukenee erittäin huonosti veteen (Taulukko 1). Parhaiten bentso(k)fluoranteeni liukenee orgaanisiin liuottimiin. Bentso(k)fluoranteeni on terveydelle ja ympäristölle erittäin vaarallinen yhdiste. Se on erittäin todennäköisesti karsinogeeninen. Hydrofobisena se sitoutuu orgaaniseen ainekseen, kuten humukseen. Fluoranteenin tapaan bentso(k)fluoranteenikin muodostaa addukteja biologisen materiaalin, kuten DNA:n, kanssa.



Kuva 3. (a) Fluoranteenin ja (b) bentso(k)fluoranteenin rakennekaavat.

Taulukko 1. Fluoranteenin ja bentso(k)fluoranteenin identifioimiseen ja liukoisuuteen vaikuttavia fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia. NA = tietoa ei löytynyt.

Ominaisuus	Fluoranteeni <sup>a</sup>	Bentso(k)fluoranteeni <sup>d</sup>
Molekyylikaava	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>
CAS-numero	206-44-0	207-08-9
EC-numero	205-912-4	205-916-6
Molekyyli massa (g/mol)	202,25	252,31
Log K <sub>ow</sub>	5,16	6,11
Dipolimomentti (D)	0,34	NA
Liukoisuus (mg/ml)		
Veteen	< 1	< 1
Etanoliin	Liukenee	< 1 <sup>e</sup>
DMSO:hon	≥ 8 <sup>b</sup>	< 1 <sup>e</sup>
Asetoniin	NA	1-10 <sup>e</sup>
Tolueeniin	> 100 <sup>c</sup>	5-10 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> (NCBI 2020a)

<sup>b</sup> (Dwyer ym. 1997)

<sup>c</sup> (Berlman ym. 1968)

<sup>d</sup> (NCBI 2020b)

<sup>e</sup> (Merck KGaA 2020)

Molemmat työssä käytetyt PAH-yhdisteet oli valmistanut Aldrich Chemistry (Sigma-Aldrich). Fluoranteeni oli puhtaudeltaan 98 % ja bentso(k)fluoranteeni fluoresenssimittauksiin soveltuvaa, vähintään 99 %. PAH-yhdisteiden kantaliuosten valmistukseen käytetty vedetön DMSO (dimetyylisulfoksidi) oli Sigma-Aldrichin valmistamaa ja puhtaudeltaan vähintään 99,9 %. PAH-liuosten laimennoksiin ja taustana käytetyn vesi-etanoliseoksen etanoli oli Altia Oyj:n Etax Aa:ta puhtaudeltaan vähintään 99,5 % ja vesi ultrapuhdasta vettä.

## 2.2 Menetelmät

Työssä käytettyjen PAH-yhdisteiden kantaliuokset valmistettiin liuottamalla 24,046 mg fluoranteenia 3 ml:aan vedetöntä DMSO:ta. Bentso(k)fluoranteenia liuotettiin 0,995 mg 1 ml:aan vedetöntä DMSO:ta. Fluoranteenin kantaliuoksesta valmistettiin mittausliuokset, joiden pitoisuudet olivat noin 0,08–200 µg/l, sopivilla laimennoksilla ja välilaimennoksilla (Taulukko 2). Laimennoksiin käytettiin 1:1 (v/v) vesi-etanoliseosta. Bentso(k)fluoranteenin mittausliuosten pitoisuus vaihteli

välillä 1–10 µg/l (Taulukko 3) ja myös ne valmistettiin käyttäen sopivia välilaimennoksia ja vesi-etanoliseosta.

Taulukko 2. Fluoranteenin välilaimennosten ja mittausliuosten valmistus. Liuokset numero 4–10 (0,08–200 µg/l) mitattiin.

Liuoksen numero	Liuoksen pitoisuus (µg/l)	Lähtöliuos	Vesi-etanoli (ml)
1	$8 \times 10^6$	–	–
2	$8 \times 10^4$	40 µl liuosta 1	4
3	800	40 µl liuosta 2	4
4	200	1 ml liuosta 3	3
5	140	0,5 ml liuosta 6 + 0,5 ml liuosta 4	0
6	80	300 µl liuosta 3	3
7	40	1 ml liuosta 6	1
8	8	40 µl liuosta 3	4
9	0,8	200 µl liuosta 8	2
10	0,08	40 µl liuosta 8	4

Taulukko 3. Bentso(k)fluoranteenin välilaimennosten ja mittausliuosten valmistus. Liuokset numero 4–6 (1–10 µg/l) mitattiin.

Liuoksen numero	Liuoksen pitoisuus (µg/l)	Lähtöliuos	Vesi-etanoli (ml)
1	$1 \times 10^6$	–	–
2	$1 \times 10^4$	10 µl liuosta 1	1
3	100	10 µl liuosta 2	1
4	10	100 µl liuosta 3	0,9
5	5	50 µl liuosta 3	0,95
6	1	100 µl liuosta 4	0,9

Fluoresenssimittaukset tehtiin Perkin Elmerin LS 55 Luminescence -spektrometrillä käyttäen ksenonlamppua ja muovisia, kertakäyttöisiä 1 x 1 cm mikrokyvettejä. Ohjelmistona laitteistossa oli Perkin Elmerin FL WinLab (versio 4.00.02). Aallonpituudet skannattiin 0,5 nm:n välein.

Fluoranteenin mittausparametrien optimointiin käytettiin mittausliuoksen pitoisuutta 8 µg/l, jolle kokeiltiin eri mittausparametrien arvoja (Taulukko 4) ja niistä

valittiin parhaan herkkyuden ja erottuvuuden tarjoamat parametrit. Bentso(k)fluoranteenin mittausparametrit optimoitiin samaan tapaan kuin fluoranteenille käyttäen mittausliuosta 1 µg/l (Taulukko 5).

Taulukko 4. Fluoranteenin mittausliuoksen pitoisuudelle 8 µg/l kokeillut mittausparametrit.  $\Delta\lambda$  = monokromaattorien aallonpituusväli,  $\lambda_{ex}$  = viritysmonokromaattorin aukon koko,  $\lambda_{em}$  = emissiomonokromaattorin aukon koko.

Aloitusaallonpituus (nm)	Lopetusaallonpituus (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	$\lambda_{ex}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)	Mittausnopeus (nm/min)	Lähde
200	500	200	2,5	5,0	240	a
250	600	200	2,5	5,0	240	b
200	500	155	2,5	5,0	240	c
200	400	155	2,5	5,0	240	-
200	400	200	2,5	5,0	240	-
200	400	150	2,5	5,0	240	-
200	400	145	2,5	5,0	240	-
200	400	160	2,5	5,0	240	-
200	400	165	2,5	5,0	240	-

<sup>a</sup> (Andrade Eiroa ym. 1998)

<sup>b</sup> (Patra & Mishra 2001)

<sup>c</sup> (Lage-Yusty ym. 2005)

Taulukko 5. Bentso(k)fluoranteenin mittausliuoksen pitoisuudelle 1 µg/l kokeillut mittausparametrit.  $\Delta\lambda$  = monokromaattorien aallonpituusväli,  $\lambda_{ex}$  = viritysmonokromaattorin aukon koko,  $\lambda_{em}$  = emissiomonokromaattorin aukon koko.

Aloitusaallonpituus (nm)	Lopetusaallonpituus (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	$\lambda_{ex}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)	Mittausnopeus (nm/min)	Lähde
200	500	95	2,5	5,0	240	a
250	600	100	2,5	5,0	240	b
202	502	95	2,5	5,0	240	c
200	500	25	2,5	5,0	240	d
250	400	98	2,5	5,0	240	e
200	500	98	2,5	5,0	240	-
200	500	100	2,5	5,0	240	-

<sup>a</sup> (Andrade Eiroa ym. 1998)

<sup>b</sup> (Patra & Mishra 2001)

<sup>c</sup> (Andrade Eiroa ym. 2000)

<sup>d</sup> (Lage-Yusty ym. 2005)

<sup>e</sup> (Saitoh ym. 2009)

Mittausparametrien optimoinnin jälkeen parhailla parametreilla mitattiin kaikki mittausliuokset ja nollanäyte (vesi-etanoliseos) menetelmän kalibroimiseksi. Menetelmä kalibroidiin molemmilla tutkittavilla yhdisteillä käyttäen sekä piikkien pinta-aloja että korkeuksia. Mittaustuloksille tehtiin regressioanalyysi Microsoft Excelin (versio 2002) analyysityökaluilla. Regressioanalyysistä saatujen kalibrintisuoran leikkauspisteen keskivirheen ( $S_b$ ) ja suoran kulmakertoimen ( $a$ ) avulla menetelmälle laskettiin toteamis- (LOD,  $\mu\text{g/l}$ ) ja määrittäysraja (LOQ,  $\mu\text{g/l}$ ) kaavoilla 1 ja 2.

$$\text{LOD} = \frac{3S_b}{a} \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10S_b}{a} \quad (2)$$

Toteamis- ja määrittäysrajojen sekä kalibrintisuorien selitysasteiden ( $R^2$ ) perusteella tutkittaville yhdisteille valittiin parempi kalibrintitapa (alhaisemmat LOD ja LOQ, parempi kalibrintisuoran selitysaste). Valittujen kalibrintitapojen kalibrintisuorien yhtälöiden ja kalibroinnissa saatujen mittausliuosten eri pitoisuuksien intensiteettien avulla mittausliuoksille laskettiin pitoisuudet ikään kuin ne olisivat olleet näytteitä (Kaava 3). Mittausliuoksista laskemalla saatuja fluoranteenin ja bentso(k)fluoranteenin pitoisuuksia verrattiin alkuperäisiin pitoisuuksiin laske-  
malla niille tarkkuudet kaavalla 4. Tarkkuusprosenttien perusteella arvioitiin menetelmän soveltuvuutta tutkittaville yhdisteille.

$$y = ax + b \Rightarrow x = \frac{y - b}{a}, \quad (3)$$

jossa  $y$  = liuoksen fluoresenssin intensiteetti,  $a$  = kalibrintisuoran kulmakerroin,  $x$  = liuoksen pitoisuus ( $\mu\text{g/l}$ ) ja  $b$  = kalibrintisuoran y-akselin leikkauspiste.

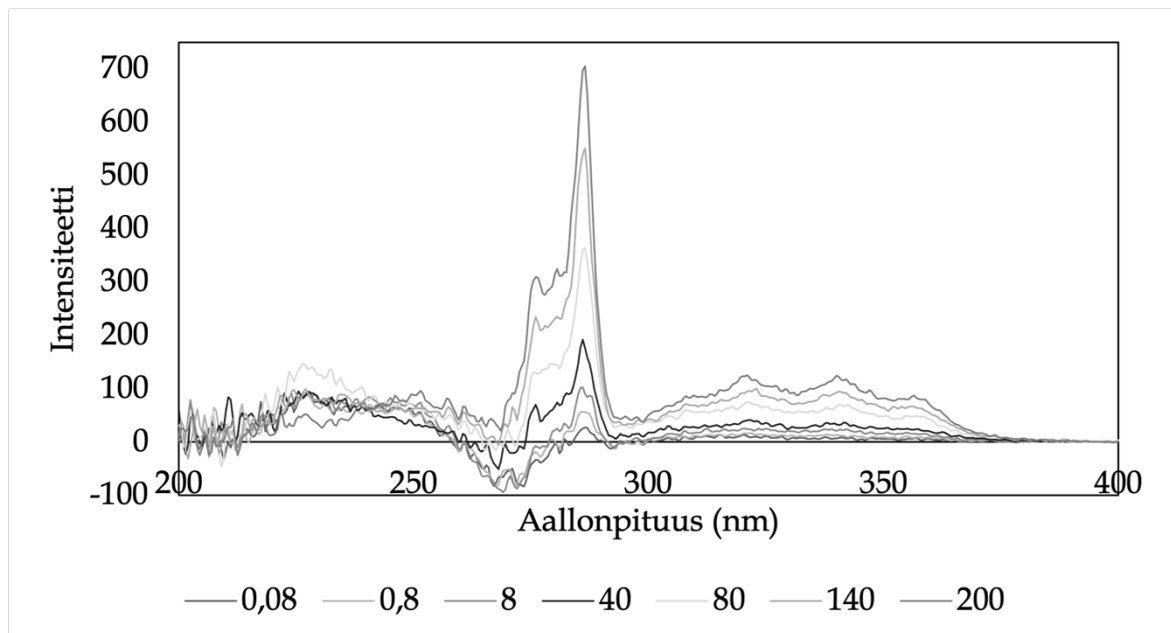
$$\text{Tarkkuus} = \frac{c_{\text{mitattu}}}{c_{\text{odotettu}}} \cdot 100 \%, \quad (4)$$

jossa tarkkuus = tarkkuusprosentti (%),  $c_{\text{mitattu}}$  = liuoksen laskettu pitoisuus ( $\mu\text{g/l}$ ) ja  $c_{\text{odotettu}}$  = liuoksen alkuperäinen pitoisuus ( $\mu\text{g/l}$ ).

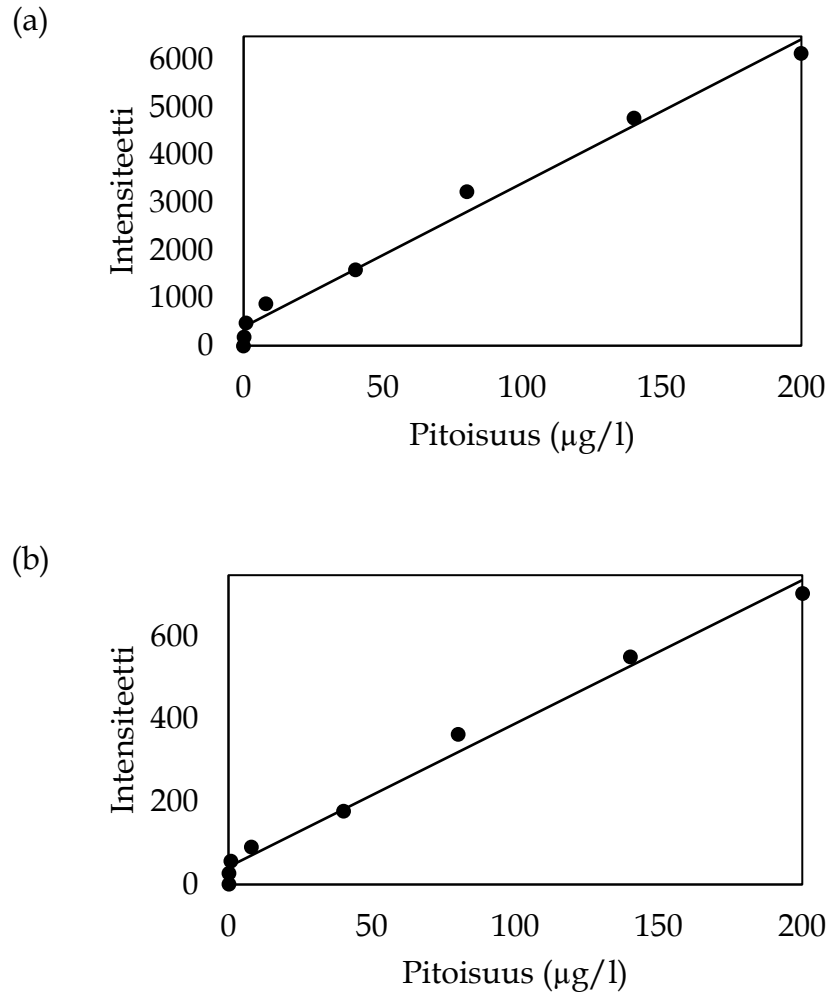
## 3 TULOKSET

### 3.1 Fluoranteeni

Fluoranteenille parhaiksi mittausparametreiksi osoittautui parametriryhmä, jossa mittausalue oli 200–400 nm ja  $\Delta\lambda$  155 nm (Taulukko 4). Fluoranteenin karakteristinen piikki osui kohdalle 284,0–289,5 nm, jolta myös piikin pinta-ala laskettiin, ja piikin huippu kohtaan 286,5 nm, josta saatiin piikin korkeus (Kuva 4). Kalibroinnissa piikkien pinta-aloilla tehdyn kalibroinnin selitysaste oli 0,985 ja piikkien korkeuksilla tehdyn 0,988, joten hieman parempi kalibrointi saatiin käyttäen kalibroinnissa piikkien korkeuksia (Kuva 5).



Kuva 4. Fluoranteenin eri pitoisuuksien fluoresenssikuvaajat. Selitteessä olevat pitoisuudet ovat yksikössä  $\mu\text{g/l}$ .



Kuva 5. Fluoranteenin kalibrointisuorat. (a) Kalibroinnissa on käytetty piikkien pinta-aloja ( $R^2 = 0,985$ ) ja (b) kalibroinnissa on käytetty piikkien korkeuksia ( $R^2 = 0,988$ ).

Menetelmän toteamis- ja määrittäysrajat fluoranteenille olivat piikkien pinta-aloilla laskettuna  $14,0 \mu\text{g/l}$  ja  $46,5 \mu\text{g/l}$  ja piikkien korkeuksilla laskettuna  $12,6 \mu\text{g/l}$  ja  $42,0 \mu\text{g/l}$ . Parempi kalibrointi saavutettiin piikkien korkeuksia käyttäen, joten mitausluoksille laskettiin sen perusteella pitoisuudet ja tarkkuusprosentit (Taulukko 6).



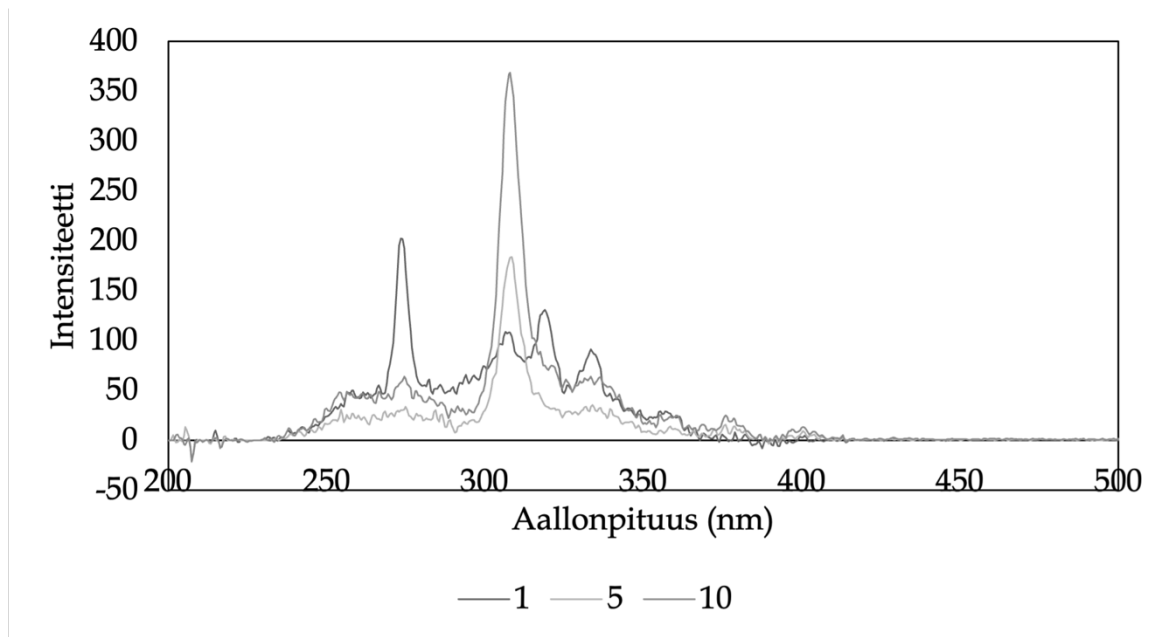
Taulukko 6. Piikkien korkeuksien perusteella tehdystä kalibroinnista lasketut fluo-  
ranteenin mittausliuosten pitoisuudet ja tarkkuusprosentit liuosten alkuperäisiin  
pitoisuuksiin verrattuna.

Liuoksen alkuperäinen pitoi- suus ( $\mu\text{g/l}$ )	Liuoksen laskettu pitoisuus ( $\mu\text{g/l}$ )	Tarkkuuspro- sentti (%)
0,08	-4	-5000
0,8	4	500
8	14	175
40	39	98
80	92	115
140	146	104
200	191	96

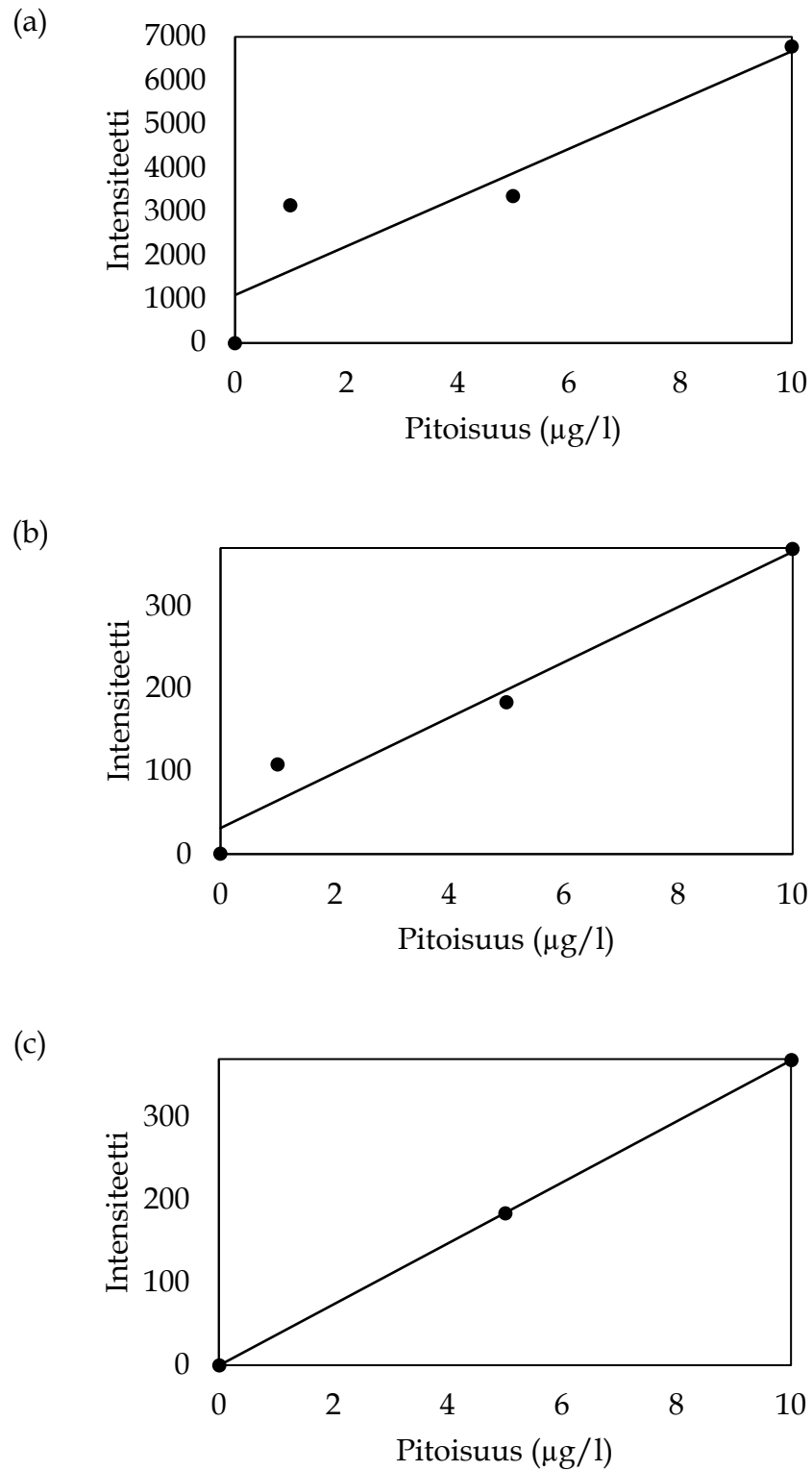
### 3.2 Bentso(k)fluoranteeni

Bentso(k)fluoranteenille parhaiksi mittausparametreiksi osoittautui parametri-ryhmä, jossa mittausalue oli 200–500 nm ja  $\Delta\lambda$  95 nm (Taulukko 5). Bentso(k)fluoranteenin karakteristinen piikki osui kohdalle 297,5–315,5 nm, jolta myös piikin pinta-ala laskettiin, ja piikin huippu kohtaan 308,5 nm, josta saatiin piikin korkeus (Kuva 6). Kalibroinnissa piikkien pinta-aloilla tehdyn kalibroinnin selitysaste oli 0,838 ja piikkien korkeuksilla tehdyn 0,957, joten parempi kalibrointi saatiin käyttäen kalibroinnissa piikkien korkeuksia (Kuva 7).

Bentso(k)fluoranteenin liuos 1  $\mu\text{g/l}$  oli kontaminoitunut (Kuva 6). Kontaminaatio vaikutti bentso(k)fluoranteenin kalibraatioon (Kuva 7). Mikäli kontaminoituneen liuoksen jättää kalibroinnissa huomioimatta, niin kalibrointisuoran selitysasteeksi tulee yksi ( $R^2 = 1$ ), joka osoittaa bentso(k)fluoranteenin pitoisuuden ja fluoresenssin intensiteetin riippuvan täysin lineaarisesti toisistaan (Kuva 7 c).



Kuva 6. Bentso(k)fluoranteenin eri pitoisuuksien fluoresenssikuvaajat. Selitteessä olevat pitoisuudet ovat yksikössä  $\mu\text{g/l}$ .



Kuva 7. Bentso(k)fluoranteenin kalibrointisuorat. (a) Kalibroinnissa on käytetty piikkien pinta-aloja ( $R^2 = 0,838$ ) ja (b) kalibroinnissa on käytetty piikkien korkeuksia ( $R^2 = 0,957$ ). (c) Piikkien korkeuksilla tehdystä kalibroinnista on poistettu kontaminoitunut  $1 \mu\text{g/l}$  liuos ( $R^2 = 1$ ).

Menetelmän toteamis- ja määrittysrajat bentso(k)fluoranteenille olivat piikkien pinta-aloilla laskettuna 5,2 µg/l ja 17,5 µg/l ja piikkien korkeuksilla laskettuna 2,5 µg/l ja 8,4 µg/l. Parempi kalibrointi saavutettiin piikkien korkeuksia käyttäen, joten mittausliuoksille laskettiin sen perusteella pitoisuudet ja tarkkuusprosentit (Taulukko 7). Kontaminoituneen liuoksen poistamisen jälkeen piikkien korkeuksilla laskettu LOD oli 0,08 ja LOQ 0,3 µg/l. Jäljelle jääneisiin tarkkuusprosentteihin kontaminoituneen liuoksen poistaminen ei vaikuttanut.

Taulukko 7. Piikkien korkeuksien perusteella tehdystä kalibroinnista lasketut bentso(k)fluoranteenin mittausliuosten pitoisuudet ja tarkkuusprosentit liuosten alkuperäisiin pitoisuuksiin verrattuna.

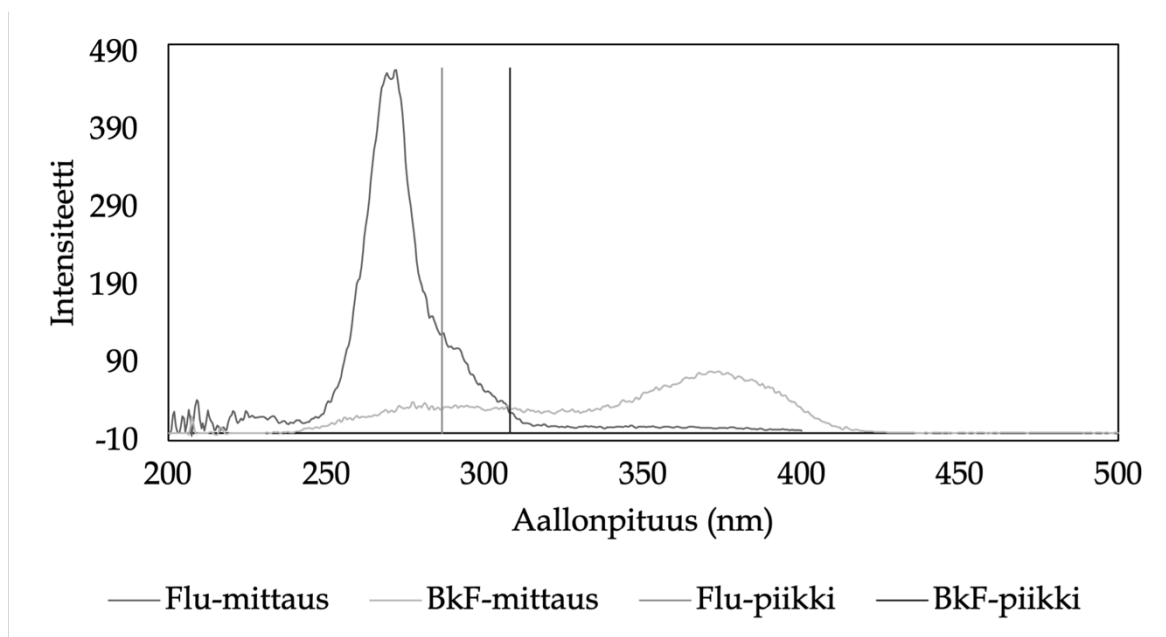
Liuoksen alkuperäinen pitoisuus (µg/l)	Liuoksen laskettu pitoisuus (µg/l)	Tarkkuusprosentti (%)
1	2	200
5	5	100
10	10	100

#### 4 TULOSTEN TARKASTELO

Tässä tutkielmassa selvitettiin synkronoidun fluoresenssispektroskopian soveltuvuutta kahden PAH-yhdisteen, fluoranteenin ja bentso(k)fluoranteenin, määrittämiseen vesi-etanolitaustaisista näytteistä. Varsinaista menetelmän validointia tai SFS:n yleistä soveltuvuutta PAHeille ei tutkittu.

Fluoranteenin mittauksissa tausta nousi yllättävän korkealle. Lisäksi fluoranteenin spektri painuu negatiiviseksi noin 270 nm:n kohdalla (Kuva 4). Taustan nousu näkyy myös bentso(k)fluoranteenin spektrissä, mutta ei niin voimakkaana kuin fluoranteenilla (Kuva 6). Yksin vesi ja etanoli eivät ole fluoresoivia yhdisteitä, mutta kirjallisuudesta selvisi, että seoksena ne muodostavat fluoresoivan klusterin (Liu ym. 2006). Fluoranteenille käytetyillä mittausparametreilla vesi-etanoli muodostaa hieman häntävän emissiopiikin noin 270 nm:n kohdalle (Kuva 8). Terävänä piikkinä

vesi-etanolin emissio ei vaikuttaisi fluoranteenin määrittävyyteen, mutta piikin "häntä" menee päällekkäin fluoranteenin piikin kanssa, joka heikentää fluoranteenin määrittävyyttä. Korkea tausta nostaa pienintä mahdollista määrittävissä olevaa fluoranteenin pitoisuutta. Bentso(k)fluoranteenin mittaustilanteilla vesi-etanolin emissio emittoi huomattavasti vähemmän bentso(k)fluoranteenin karakteristisen piikin kohdalla ja näin vaikuttaa bentso(k)fluoranteenin määrittävyyteen huomattavasti vähemmän (Kuva 8).



Kuva 8. Vesi-etanolin emissiospektrit fluoranteenin (Flu-mittaus) ja bentso(k)fluoranteenin (BkF-mittaus) mittaustilanteissa. Pystyviivat kuvaavat fluoranteenin (Flu-piikki) ja bentso(k)fluoranteenin (BkF-piikki) piikkien paikat suhteessa vesi-etanolin spektriin.

Fluoranteenin kalibrointi ei ollut täysin lineaarinen. Kalibrointisuora pyörityi alapaästä, mikä huonontaa kalibroinnin selitysastetta ( $R^2$ -arvoa) ja aiheuttaa merkittävää virhettä fluoranteenin alhaisten pitoisuuksien määrittämiseen (Kuva 5 ja Taulukko 6). Pitoisuudesta 40  $\mu\text{g}/\text{l}$  alkaen kalibrointi oli erittäin lähellä lineaarista ja fluoranteenin tarkkuusprosentit lähellä 100 prosenttia (Kuva 5 ja Taulukko 6). Kalibrointisuoran pyöritymisen saattoi aiheuttaa virhe fluoranteeniliuosten pienim-

missä pitoisuuksissa. Liuokset näyttäisivät olevan vahvempia kuin niiden oli tarkoitus olla. Ensimmäinen liian vahvalta vaikuttava liuos oli liuos 8 µg/l, josta myös valmistettiin liuokset 0,8 µg/l ja 0,08 µg/l (Taulukko 2).

Bentso(k)fluoranteenin pitoisuus 1 µg/l oli kontaminoitunut. Liuoksen kalibroinnista poistamisen jälkeen bentso(k)fluoranteenin pitoisuus ja fluoresenssin intensiteetti riippuivat täysin lineaarisesti toisistaan ( $R^2 = 1$ ). Täydellisen lineaarisen riippuvuuden varmistamiseksi kalibrointiin olisi kuitenkin tarvittu enemmän liuoksia. Nyt kalibrointiin jäi ainoastaan kaksi liuosta (5 ja 10 µg/l). Sopiva määrä olisi ollut noin viisi liuosta.

Yleisesti ottaen synkronoidulla fluoresenssispektroskopialla päästään tutkittujen PAH-yhdisteiden osalta pitoisuustasolle µg/l, kun perinteisillä, kromatografisilla menetelmillä saavutetaan taso ng/l (Taulukot 8 ja 9).

Taulukko 8. Fluoranteenille eri menetelmillä saatuja toteamis- ja määrittämissärajoja. SFS = synkronoitu fluoresenssispektroskopia, LOD = toteamisraja, LOQ = määrittämissäraja, HPLC = korkean erotuskyvyn nestekromatografia, UV = ultraviolettidetektor, FLD = fluoresenssidetektor, GC = kaasukromatografia, MS = massaspektrometri.

Menetelmä	Liuotin	LOD (µg/l)	LOQ (µg/l)	Lähde
Aallonpituusvakioitu SFS	Vesi-etanoli	12,6	42,0	a
Aallonpituusvakioitu SFS	Vesi	6,5	-	b
Aallonpituusvakioitu SFS	Heksaani	0,65	1,95	c
Aallonpituusvakioitu SFS	Heksaani	0,20	1,20	d
HPLC-UV	Asetonitriili- vesi	0,010	-	e
HPLC-FLD	Asetonitriili- vesi	0,010	-	e
GC-MS	-	0,00023	0,00036	f

<sup>a</sup> Tämä tutkielma

<sup>b</sup> (Patra & Mishra 2001)

<sup>c</sup> (Lage-Yusty ym. 2005)

<sup>d</sup> (Andrade Eiroa ym. 1998)

<sup>e</sup> (Maureen 2003)

<sup>f</sup> (Fernández-González ym. 2007)

Taulukko 9. Bentso(k)fluoranteenille eri menetelmillä saatuja toteamis- ja määrittämissrajoja. SFS = synkronoitu fluoresenssispektroskopia, LOD = toteamisraja, LOQ = määrittämissraja, HPLC = korkean erotuskyvyn nestekromatografia, UV = ultraviolettidetektor, FLD = fluoresenssidetektor, GC = kaasukromatografia, MS = massaspektrometri.

Menetelmä	Liuos	LOD (µg/l)	LOQ (µg/l)	Lähde
Aallonpituusvakioitu SFS	Vesi-etanoli	2,5	8,4	a
Aallonpituusvakioitu SFS	Vesi-etanoli	0,08*	0,3*	a
Aallonpituusvakioitu SFS	Vesi	1,65	-	b
Energiavakioitu SFS	Heksaani	0,02	0,07	c
Aallonpituusvakioitu SFS	Heksaani	0,14	0,33	d
Aallonpituusvakioitu SFS	Heksaani	0,01	0,05	e
HPLC-UV	Asetonitriili- vesi	0,0056	-	f
HPLC-FLD	Asetonitriili- vesi	0,00012	-	f
GC-MS	-	0,00044	0,00072	g

\* Kontaminoituneen liuoksen 1 µg/l poistamisen jälkeen saatu arvo

a Tämä tutkielma

b (Patra & Mishra 2001)

c (Andrade Eiroa ym. 2000)

d (Lage-Yusty ym. 2005)

e (Andrade Eiroa ym. 1998)

f (Maureen 2003)

g (Fernández-González ym. 2007)

Vesi-etanolin voimakkaan taustaemission takia fluoranteenin kohdalla ei päästy niin pieniin pitoisuuksiin kuin täysin fluoresoimatonta liuotinta (heksaani) käyttämällä (Taulukko 8), mutta tämän tutkimuksen perusteella sitä ei voida täydellä varmuudella sanoa, vaan ensin pitäisi sulkea pois mahdolliset virheet liuosten 0,08–8 µg/l pitoisuuksissa. Bentso(k)fluoranteenin kohdalla vesi-etanolin taustaemissio on niin vähäistä, että se ei juurikaan vaikuta bentso(k)fluoranteenin määrittävyyteen, vaan vesi-etanolin kanssa saavutettavat toteamis- ja määrittämissraja ovat samaa suuruusluokkaa kuin täysin fluoresoimattoman heksaanin kanssa (Taulukko 9).

Synkronoitu fluoresenssispektroskopia soveltuu hyvin bentso(k)fluoranteenin analysoimiseen vesi-etanolitaustaisista näytteistä, mutta fluoranteenin määrittämissraja vesi-etanolin muodostaman klusterin emissio häiritsee merkittävästi ja tekee SFS:stä käyttökelvottoman fluoranteenin kaikkein pienimpien pitoisuuksien määrittämiseen

tutkitulla liuotintaustalla. Fluoranteenin kohdalla mahdollisen virheen mahdollisuus liuosten pitoisuuksissa täytyy kuitenkin ensin poissulkea ennen kuin lopullista johtopäätöstä voi varmuudella tehdä. Menetelmänä SFS on nopea ja helppo operoida ja soveltuu hyvin PAH-analytiikkaan sopivalla liuottimella, vaikka sillä ei päästäkään ihan niin pieniin pitoisuuksiin kuin perinteisillä, kromatografisilla menetelmillä.

## KIITOKSET

Haluan kiittää tutkielmani ohjaajaa Eeva-Riikka Vehniäistä asiantuntevasta avusta tutkielman kokeellisen osion suorittamisessa sekä kehittävästä palautteesta kirjoitusprosessin aikana. Lisäksi haluan kiittää vanhempiani tuesta ja kannustuksesta erityisesti tutkielman kirjoitusvaiheen aikana.

## KIRJALLISUUS

- Akaoğlu C. 2017. *Investigation of film forming, optical and electrical properties of AgNPs doped PS/AgNPs composites*. Istanbul Technical University, Istanbul, Turkey.
- Albani J.R. 2007. *Principles and applications of fluorescence spectroscopy*. Blackwell Science, Oxford; Ames, Iowa, USA.
- Andrade Eiroa A., Vázquez Blanco E., López Mahía P., Muniategui Lorenzo S. & Prada Rodríguez D. 1998. Simultaneous determination of 11 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by second-derivative synchronous spectrofluorimetry considering the possibility of quenching by some PAHs in the mixture. *Analyst* 123: 2113-2117, doi:10.1039/a804281k.
- Andrade Eiroa A., Vázquez Blanco E., López Mahía P., Muniategui Lorenzo S., Prada Rodríguez D. & Fernández Fernández E. 2000. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a complex mixture by second-derivative constant-energy synchronous spectrofluorimetry. *Talanta* 51: 677-684, doi:10.1016/S0039-9140(99)00328-8.



- Berlman I.B., Wirth H.O. & Steingraber O.J. 1968. Anomalous fluorescence characteristics of fluoranthene and some of its derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* 90: 566-569, doi:10.1021/ja01005a003.
- Boehm P.D. 1964. 15 - Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Teoksessa: Morrison R.D. & Murphy B.L. (toim.), *Environmental Forensics*, Academic Press, Burlington, s. 313-337.
- Das B.S. & Thomas G.H. 1978. Fluorescence detection in high performance liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Anal. Chem.* 50: 967-973, doi:10.1021/ac50029a036.
- Dwyer F.J., Doane T.R. & Hinman M.L. 1997. *Environmental toxicology and risk assessment: Modeling and risk assessment (sixth volume)*. American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, USA.
- ECHA 2019. *Six new substances added to the Candidate List*. <https://echa.europa.eu/-/six-new-substances-added-to-the-candidate-list> (luettu 2.5.2020).
- Fernández-González V., Concha-Graña E., Muniategui-Lorenzo S., López-Mahía P. & Prada-Rodríguez D. 2007. Solid-phase microextraction-gas chromatographic-tandem mass spectrometric analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons: Towards the European Union water directive 2006/0129 EC. *J. Chromatogr. A* 1176: 48-56, doi:<https://doi-org.ezproxy.jyu.fi/10.1016/j.chroma.2007.11.006>.
- Harris D.C. & Lucy C.A. 2016. *Quantitative chemical analysis*. 9. painos. W. H. Freeman and Company, New York, USA.
- Kiddle Encyclopedia 2020. *Photochemistry Facts for Kids*. <https://kids.kiddle.co/Photochemistry> (luettu 28.4.2020).
- Lage-Yusty M.A., López-González J. & Simal-Lozano J. 2005. Resolution of 13 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Constant-wavelength Synchronous Spectrofluorometry. *Anal. Sci.* 21: 1203-1206, doi:10.2116/analsci.21.1203.
- Liu Y., Luo X., Shen Z., Lu J. & Ni X. 2006. Studies on Molecular Structure of Ethanol-Water Clusters by Fluorescence Spectroscopy. *Opt. Rev.* 13: 303-307, doi:10.1007/s10043-006-0303-3.
- Maureen J. 2003. HPLC Detector Options for the Determination of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. *Varian Application Note 7*, LC7:1291, saatavissa <https://www.agilent.com/cs/library/applications/lc07.pdf>.
- Merck KGaA 2020. *Benzo[k]fluoranthene*. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/392251?lang=fi&region=FI> (luettu 2.5.2020).

- NCBI 2020a. *PubChem Database. Fluoranthene, CID=9154*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fluoranthene> (luettu 2.5.2020).
- NCBI 2020b. *PubChem Database. Benzo[k]fluoranthene, CID=9158*. [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzo\\_k\\_fluoranthene](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzo_k_fluoranthene) (luettu 2.5.2020).
- Patra D. & Mishra A.K. 2002. Recent developments in multi-component synchronous fluorescence scan analysis. *Trends Anal. Chem.* 21: 787-798, doi:10.1016/S0165-9936(02)01201-3.
- Patra D. & Mishra A.K. 2001. Investigation on simultaneous analysis of multicomponent polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in water samples: a simple synchronous fluorimetric method. *Talanta* 55: 143-153, doi:10.1016/S0039-9140(01)00404-0.
- Saitoh T., Itoh H. & Hiraide M. 2009. Admicelle-enhanced synchronous fluorescence spectrometry for the selective determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Talanta* 79: 177-182, doi:10.1016/j.talanta.2009.03.022.