

PAH-yhdisteiden määrittäminen GC-MS/MS menetelmällä savukalasta

Petri Olkkola

Opinnäytetyö
Huhtikuu 2013

Laboratorioalan koulutusohjelma
Tekniikan ja liikenteen ala





Tekijä(t) OLKKOLA, Petri	Julkaisun laji Opinnäytetyö	Päivämäärä 6.4.2013
	Sivumäärä 35	Julkaisun kieli Suomi
	Luottamuksellisuus () saakka	Verkojulkaisulupa myönnetty (X)
Työn nimi PAH-YHDISTEIDEN MÄÄRITTÄMINEN GC-MS/MS-MENETELMÄLLÄ SAVUKALASTA		
Koulutusohjelma Laboratorioalan koulutusohjelma		
Työn ohjaaja(t) LEPPÄ-AHO, Jaakko, lehtori		
Toimeksiantaja(t) Elintarviturvallisuusvirasto Evira, Helsinki. HOKKANEN, Mirja, tutkija.		
Tiivistelmä <p>Tutkimuksen päämääränä oli tutkia eroja PAH-yhdisteiden määrässä eri tavoin valmistettujen savukalojen välillä. Tutkittavia kohteita olivat erot lämmin- ja kylmäsavumenetelmien välillä sekä perinteisen savustuksen ja nestesavun käytön välillä. Sekä tutkittiin miten nahan PAH-yhdisteiden määrä erosi itse lihan PAH-yhdiste määrästä.</p> <p>Tutkimus suoritettiin Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran Helsingin toimipisteessä tutkimuksen ja analytiikan osastossa, kemian ja toksikologian tutkimusyksikössä sekä toksikologian jaostossa.</p> <p>Aluksi savukalanäytteet kylmäkuivattiin. Tämän jälkeen näytteille suoritettiin nopeutettu liuotinuutto, jonka aikana näytteisiin lisättiin myös sisäistä standardia menetelmän luotettavuuden parantamiseksi. Sitten saaduille näyteliuksille suoritettiin kiinteäfaasiuutto, jonka jälkeen näytteet olivat valmiina GS-MS/MS-ajoa varten, ajon jälkeen saatiin tulokset näytteen sisältämästä PAH-yhdisteiden määrästä.</p> <p>Tutkimuksessa oli tarkoitus määrittää kuudentoista eri PAH-yhdisteen määrä eri tavoin valmistetuissa savukaloissa, mutta tutkimuksen edetessä päädyttiin tutkimaan pelkästään savustetuja lohia ja osassa näytteistä tarkasteltiin vain neljää tärkeintä PAH-yhdistettä ajanpuutteen vuoksi.</p> <p>Tuloksiksi saatiin että kylmä ja lämminsavu menetelmien välillä ei ollut merkittävää vaihtelua tutkittujen PAH-yhdisteiden määrässä, mutta perinteisen savun menetelmällä valmistetussa kalassa oli enemmän PAH-yhdisteitä kuin nestesavu menetelmällä valmistetussa. Merkittävänä muuna löydöksenä tuli esille, että kalan nahassa oli paljon enemmän PAH-yhdisteitä kuin lihassa.</p>		
Avainsanat (asiasanat) PAH eli polysyklinen aromaattinen hiilivety, savukala, GC-MS/MS-menetelmä		
Muut tiedot		



Author(s) OLKKOLA, Petri	Type of publication Bachelor's Thesis	Date 6.4.2013
	Pages 35	Language Finnish
	Confidential <input type="checkbox"/> Until	Permission for web publication <input checked="" type="checkbox"/>
Title Detecting polyaromatic hydrocarbons with GC-MS/MS method from smoked fishes.		
Degree Programme Laboratory sciences		
Tutor(s) LEPPÄ-AHO, Jaakko		
Assigned by Finnish Food Safety Authority, Evira. HOKKANEN, Mirja, Research Scientist.		
Abstract <p>The goal of the research was to find out the differences in the polycyclic aromatic hydrocarbon levels in different way prepared smoked fishes. The research was about differences between hot and cold smoked fishes, between original smoking style and liquid smoking and differences in PAH compounds in the skin and the meat.</p> <p>Research was done at Finnish Food Safety Authority Evira's office in Helsinki, at Research and laboratory Department, Chemistry and Toxicology research unit and in the toxicology section.</p> <p>The smoked fish samples were first freeze-dried, after that to the samples were performed accelerated solvent extraction, during which was added some internal standard to increase the accuracy. Then to the received solutions were performed solid-phase extraction, and after that the samples were ready for GS-MS/MS analysis, which then gives the results about the amount of polyaromatic hydrocarbons the sample had.</p> <p>In the research the aim was to detect 16 different PAH compounds in the smoked fishes, but during the project we ended up checking only 4 most important ones in some of the samples and in the end only smoked salmon analyses were included to thesis.</p> <p>For results we got that there wasn't significant changes between the PAH levels of the hot and cold smoked fishes. The amount of PAH was higher on the original smoking style compared to liquid smoking. It was also noted that the skin of the fish contained far more PAH compounds compared to the meat.</p>		
Keywords PAH, smoked fish, GC-MS/MS		
Miscellaneous		

Sisältö

Käsitteet	3
1 JOHDANTO	4
2 PAH-YHDISTEET	5
2.1 Ominaisuudet	5
2.2 Rajat ja vaarallisuus	7
2.3 Metabolia	8
2.4 Altistuminen	9
2.5 Elintarvikkeet	11
2.5.1 Ruoka	11
2.5.2 Tupakka	12
2.6 Luonto	12
3 SAVUSTUSTEKNIIKAT JA MENETELMÄT	13
3.1 Perinteinen savu	13
3.1.1 Lämminsavumenetelmä	14
3.1.2 Kylmäsavumenetelmä	14
3.2 Nestesavu	15
4. ESIKÄSITTELYMENETELMÄT	15
4.1 Kylmäkuivaus	15
4.2 Paineistettu liuotinuutto	16
4.3 Kiinteäfaasiuutto	16
5 ANALYYSITEKNIIKAT	17
5.1 Kaasukromatografia	17
5.2 Massaspektrometria	20
5.3 Sisäisen standardin menetelmä	21
6 TUTKIMUSMENETELMÄ	22
6.1 Tehtävän rajausta ja tavoitteet	22
6.2 Näytteen käsittely	23
6.3 Kylmäkuivaus	23
6.4 Nopeutettu liuotinuutto	24
6.5 Kiinteäfaasiuutto	24
6.6 Näytteen ajaminen	25
7 TULOKSET	25
7.1 Lämminsavukirjoloheet	26
7.1.1 Kirjolahifilee	26
7.1.2 Nahallinen kirjolohi	26
7.2 Kylmäsavu kirjoloheet	27
7.2.1 Nestesavumenetelmällä valmistetut kylmäsavukirjoloheet	27
7.2.2 Perinteisen savun menetelmällä valmistetut kylmäsavukirjoloheet	28
8 Tulosten tarkastelua ja vertailua	29

8.1 Nestesavun ja perinteisen savun vertailua	29
8.2 Lihan ja nahan erot	30
8.3 Kylmä- ja lämminsavumenetelmien ero	31
8.4 Koonti	32
LÄHTEET	33

TAULUKOT

Taulukko 1 . EFSA:n mukaan syöpävaarallisiksi määritetyt PAH-yhdisteet.....	6
Taulukko 2 Bentso(a)pyreenille säädetyt rajat joillekin elintarvikkeille EU:ssa	7
Taulukko 3 Keskimääräinen päiväsaanti aikuiselle ei tupakoivalle henkilölle EU komission mukaan	10
Taulukko 4. Nestesavun ja perinteisen savun PAH-yhdisteiden määrien vertailua	30
Taulukko 5. Lihan ja nahan sisältämien PAH-yhdisteiden määrien vertailua	31
Taulukko 6. Kylmä- ja lämminsavumentelmien tuottamien PAH-yhdisteiden vertailua	32

KUVIOT

Kuvio 1. Bentso(a)pyreenin metaboloituminen Bentso(a)pyreenidoliepoksidiiksi	9
Kuvio 2. Kaasukromatografian rakenne.	18
Kuvio 3. Kvadrupolimassaspektrometri	21
Kuvio 4. Nahallisten kirjolohien sisältämien PAH-yhdisteiden keskiarvo	27
Kuvio 5. Nestesavun sisältämien PAH-yhdisteiden määrien keskiarvo	28
Kuvio 6. Perinteisen savun menetelmällä valmistettujen savukalojen PAH-yhdisteiden määrä	29

Käsitteet

B(a)P = bentso(a)pyreeni

Biotransformaatiokyky= kemikaallisten muunnosten teko kyky elimistössä eri kemikaaleille, kuten ravintoaineille, aminohapoille, toksineille ja lääkkeille

CYP-entsyymi= suureen sytokromi P450-ryhmään kuuluva entsyymi, joka toimii ihmisen sekä useiden eläinten vierasainemetaboliassa aineen hapettavana tekijänä

HTP-arvo = Haitalliseksi todettu pitoisuus. Pienin määrä kemikaalia ilmassa, minkä on arvioitu aiheuttavan haittaa tai vaaraa henkilölle.

HTP_{8h}= haitalliseksi todettu pitoisuus kahdeksan tunnin aikana

Karsinogeeninen = syöpää aiheuttava

M/Z suhde= massan ja varauksen suhde

Metabolia= aineenvaihdunta, biologinen prosessi, jossa ravintoaineita muokataan

Mutageeninen = aiheuttaa mutaatioita eliön geneeissä

NOAEL= No observed adverse effect level. Altistumisen määrä, jolla ei ole todettu kemikaalisia muunnoksia kehossa.

PAH4-yhdisteet= PAH-yhdisteistä bentso(a)antraseeni, kryseeni, bentso(b)fluoranteeni, bentso(a)pyreeni kuuluvat tähän.

PAH= PAH-yhdisteet ovat aromaattisista renkaista koostuvia hiilivetyjä, jotka syntyvät epätäydellisessä palamisessa.

Sublimoituminen= Olomuodon muutos kiinteästä suoraan kaasuksi ilman nestemäistä olotilaa

1 JOHDANTO

PAH-yhdisteiden eli polysyklisen aromaattisten hiilivetyjen määrä savustetuissa kaloissa on tiedetty olevan huomattava ja niiden määrää on aloitettu kontrolloida niiden syöpää aiheuttavien ominaisuuksien vuoksi. EU on asettanut tiettyjä raja-arvoja bentso(a)pyreenille, joka on yksi PAH-yhdisteistä. Tulevaisuudessa myös muita yhdisteitä ollaan aloittamassa tarkkailla.

Eviralla sain mahdollisuuden ottaa osaa projektiin, jossa tarkemmin tutkittiin PAH-yhdisteiden määrän eroja eri tavoin savustetuissa savukaloissa. Projektin tarkoituksena oli tutkia eroja lämmin- ja kylmäsavustetun kirjolohen välillä sekä perinteisen- ja nestesavutekniikan välillä. Projektissa myös haettiin tuntumaa, kuinka paljon näytteitä oli mahdollista määrittää tulevaisuudessa, kun PAH-määrittämisen määrän olisi tarkoitus kasvaa ja määrittämiä olisi tarkoitus ottaa myös muista matriiseista kuin kalasta.

Elintarviketurvallisuusvirasto Eviralla on kaksi päätoiminta-aluetta: ensimmäinen on elintarvikkeiden laadun varmistus tutkimalla sekä valvomalla niitä, toinen on eläinten ja kasvien terveyden hallinta. Näitä kahta uhkaaviin riskeihin varautuminen on myös tärkeä asia yhtiön toimintaa. Eviran toimipaikat ovat jakautuneet ympäri Suomea, ylivoimaisesti suurin toimipaikka on kuitenkin Helsingin toimipiste, jossa työskentelee noin 500 henkilöä. Muita toimipaikkoja on yhdeksällä paikkakunnalla ja näissä työskentelee yhteensä noin 100 ihmistä, myös teurastamoilla ympäri Suomea työskentelee noin 100 henkilöä.

2 PAH-YHDISTEET

Polysyklisen aromaattisten hiilivetyjen (PAH) ryhmä on yleinen nykyisessä elinympäristössä. Ryhmään kuuluu satoja eri yhdisteitä, jotka yleisimmin syntyvät orgaanisten yhdisteiden, kuten puun, öljyn tai hiilen epätäydellisen palamisen seurauksena. (Liguori, Heggstad, Hove & Julshamn. 2006) PAH-yhdisteet esiintyvät yleensä seoksena. Suurin osa ihmisen aikaansaamista PAH-yhdisteistä on peräisin joko pakokaasuista tai teollisuuden päästöistä. PAH-yhdisteitä voi syntyä myös luonnollisesti metsäpaloissa ja tulivuodenpurkauksissa, mutta näiden määrä on pieni verrattuna ihmisen aikaansaamaan. (Case Studies in Environmental Medicine Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). 2009)

2.1 Ominaisuudet

PAH-yhdisteet ovat aromaattisia hiilivetyjä, joiden rakenteessa on vähintään kaksi yhteen liittyntä bentseenirengasta. PAH-yhdisteet ovat yleensä kiinteitä rasvaliukoisia aineita, jotka ovat myös erittäin pysyviä. Suurenpi moolimassaiset yhdisteet ovat usein vähemmän vesiliukoisia kuin pienen moolimassan yhdisteet. Monet PAH-yhdisteistä on luokiteltu ihmisille vaarallisiksi, haitallisimmissa hiilivedyissä renkaita yleensä on 4 - 6 kappaletta.

Euroopan elintarviketurvallisuusvirasto (EFSA) on määrittänyt 16 yhdistettä erityisen karsinogeenisiksi ihmiselle. Nämä yhdisteet on listattu taulukossa 1. Nämä on valittu yhdisteiden yleisyyden, tunnetun vaarallisuuden ja näiden yhdisteiden ollessa potentiaalinen uhka ihmisille. Näistä yhdisteistä on valittu EU:n toimesta yksi erityisesti tutkittavaksi merkkiyhdisteeksi ruuan ja ilman sisältämistä PAH-määristä. Täksi aineeksi valittiin bentso(a)pyreeni, joka on PAH-yhdisteistä eniten tutkittu ja yleinen tutkittavissa näytteissä. EFSA:n tutkimusten mukaan kuitenkin 30 % :ssa näytteistä,

joissa ei todettu bentso(a)pyreeniä, todettiin kuitenkin muita karsinogeenisiä PAH-yhdisteitä. Tämän vuoksi nykyisin ollaankin siirtymässä neljän PAH-yhdisteen tutkimiseen näytteistä pelkän bentso(a)pyreenin sijaan. (Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food. 2002.) Nämä neljä yhdistettä ovat bentso(a)pyreeni, bentso(a)antraseeni, bentso(b)fluoranteeni ja kryseeni.

Monet PAH-yhdisteistä on myös luokiteltu karsino- tai mutageenisiksi yhdisteiksi. Tutkijat ovat raportoineet kasvanutta todennäköisyyttä iho-, keuhko-, virtsarakko-, maksa ja vatsasyöpään (Case Studies in Environmental Medicine Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). 2009). PAH-yhdisteillä ei ole todettu suurta vastetta akuutille altistumiselle.

Taulukko 1 . EFSA:n mukaan syöpävaarallisiksi määritetyt PAH-yhdisteet

Bentso(a)antraseeni
Bentso(a)pyreeni
Bentso(b)fluoranteeni
Bentso(c)fluoreeni
Bentso(g,h,i)peryleeni
Bentso(j)fluoranteeni
Bentso(k)fluoranteeni
Dibentso(a,i)pyreeni
Dibentso(a,h)antraseeni
Dibentso(a,e)pyreeni
Dibentso(a,h)pyreeni
Dibentso(a,l)pyreeni
Indeno(1,2,3-cd)pyreeni
5-Metyylikryseeni
Kryseeni
Syklopenta(c,d)pyreeni

2.2 Rajat ja vaarallisuus

PAH-yhdisteille altistumisen vaarallisuus ja terveysvaikutus riippuu monista eri tekijöistä. Näitä tekijöitä ovat annosmäärä, altistuksen kesto, altistuksen tyyppi (syöminen, juominen, hengitys vai ihon läpi), muut kemikaalit, joille on altistuttu, ja yksilökohtaiset erot (sukupuoli, ikä, elämäntyyli ja terveystilanne). (Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons.1995)

PAH-yhdisteiden enimmäismäärästä on tällä hetkellä EU-lainsäädännössä asetettu rajat vain yhdelle PAH-yhdisteelle, bentso(a)pyreenille. Lainsäädäntöön on kuitenkin tulossa uudistus, jonka tarkoituksena olisi lisätä raja myös neljän PAH-yhdisteen summalle.

Bentso(a)pyreenin määrälle on asetettu EU:n toimesta rajoja joissain ruoka-aineissa. Taulukossa 2 on esitetty yleisimmin käytössä olevien elintarvikkeiden bentso(a)pyreenin maksimipitoisuuksia mikrogrammoina kiloa märkää painoa kohden.

Taulukko 2 Bentso(a)pyreenille säädetyt rajat joillekin elintarvikkeille EU:ssa. ((EC) NO 1881/2006.)

Bentso(a)pyreeni	
Ruoka-aine	Maksimi arvo µg/kg (märkää painosta)
Öljyt sekä rasvat, käyttöön tarkoitetut sekä ruokien valmistusaineina	2,0
Savustettu liha ja savustetun lihan tuotteet	5,0
Savustettu kala ja savustetun kala tuotteet	5,0
Muu kuin savustettu kala	2,0
Viljapohjaiset elintarvikkeet ja pienille lapsille tarkoitettu ruoka	1,0

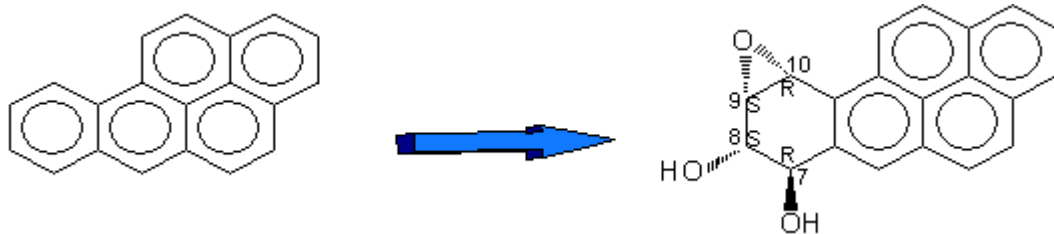
Muutamien PAH-yhdisteiden ei-karsinogeenisille vasteille on asetettu NAOEL-arvoja. Nämä arvot ovat kuitenkin tuhatkertaisia ruuasta saatavalle päiväannokselle, joten niitä ei perustilanteessa ole mahdollista saada. Useiden yhdisteiden ollessa karsino- tai mutageenisia ei turvallisia rajoja PAH-yhdisteiden saantiin ole asetettu vaan suositeltavaa on pitää altistuminen niin pienenä kuin on kohtuudella mahdollista.

Kahdelle PAH-yhdisteelle on asetettu HTP-rajat (haitalliseksi todettu pitoisuus) työpaikalle. Näitä ovat naftaleeni, jonka HTP_{8h} on $5\ 000\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ sekä bentso(a)pyreenille, jonka HTP_{8h} on $10\ \mu\text{g}/\text{m}^3$. (PAH-yhdisteiden viitearvot Suomessa. 2011)

Saksassa ja Itävallassa bentso(a)pyreenin pitoisuudelle savustetussa lihassa on asetettu huomattavasti tiukempi raja kuin EU edellyttää, $1\ \mu\text{g}/\text{kg}$. (D'Mello. 2003)

2.3 Metabolia

Rasvaliukoisten ominaisuuksien vuoksi PAH-yhdisteet voivat rajallisissa määrin varastoitua rasvakudokseen. Elimistö pyrkii poistamaan PAH-yhdisteet muuntamalla ne vesiliukoisiksi yhdisteiksi muutamien välivaiheiden jälkeen, jolloin ne voivat poistua virtsan mukana ulos elimistöstä. Yleisesti ottaen vaiheet on jaoteltu kahteen osaan. Ensimmäisen osan reaktioissa funktionaalinen ryhmä liitetään yhdisteeseen hapettavien, pelkistävien tai hydrolyyttisten reaktioiden avulla. Toisessa osassa tapahtuu lähinnä konjugatiivisia reaktioita. (Kuljukka-Rabb. 2002) Pääasiassa PAH-yhdisteiden metabolia tapahtuu CYP-entsyymien toimesta maksassa ja osittain munuaisissa. Pieniä määriä metabuloituu myös useissa muissa osissa kehoa. Eniten on tutkittu CYP1A1 geenin vaikutusta PAH-metaboliassa. Tämän geenin tuottamat proteiinit hajottavat yhdisteitä syöpävaaralliseen muotoon. Aktiivisen CYP1A1-geenin omistavilla henkilöillä on suurempi riski saada syöpä PAH-yhdisteistä. (Case Studies in Environmental Medicine Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). 2009)



Kuvio 1. Bentso(a)pyreenin metaboloituminen Bentso(a)pyreenidoliepoksidiksi (NYU, 2005)

PAH-yhdisteiden vaarallisuus perustuu suureksi osaksi niiden aineenvaihduntatuotteisiin. Pieni osa elimistöön joutuneista yhdisteistä muuntuu metabolian seurauksena karsinogeeniseen tai mutageeniseen muotoon, jolloin ne saattavat aiheuttaa mutaatiota. Erityisen vaaralliseksi on todettu PAH-yhdisteiden yksi väliahjoamismuoto nimeltään Dioli epoksiitti, jonka yksi muoto on näkyvä kuviossa 1. Tässä muodossa yhdiste on erittäin reaktiivinen ja kykenee reagoimaan kemiallisesti DNA-juosteen guaniinin ja adeniinin kanssa. Tämä muodostaa mutaation reagoimassaan kohdassa, jollei solun korjausmekanismi toimi. (Case Studies in Environmental Medicine Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). 2009)

2.4 Altistuminen

Työympäristössä PAH-yhdisteet voivat kulkeutua kehoon hengitysilman kautta tai ihon läpi. Muita altistumistapoja ovat ruuan tai juoman mukana tuleva altistuminen ja tupakointi. Ruoista etenkin savustetussa, paahdetussa tai käristetyssä lihassa tai kalassa voi olla suuriakin pitoisuuksia. Yleisesti tupakka aiheuttaa selvästi enemmän

altistumista PAH-yhdisteille kuin ruoka. Pieniä altistumisia saattaa tulla myös juomavedestä sekä PAH-kontaminoituneiden tuotteiden käsittelystä.

Suurimmassa vaarassa työympäristöstä tulevalle altistumiselle ovat hiilen tai hiilituotteiden kanssa työskentelevät ihmiset. Erityisesti kivihiilitervan ja siitä valmistettujen tuotteiden on todettu sisältävän paljon PAH-yhdisteitä. Myös noessa ja tuhkassa oletetaan olevan suuria määriä PAH:a, jotka ovat aiheuttaneet nuohoojille syöpää.

Kaupunkialueilla ilmassa B(a)P pitoisuus on yleisesti 0,15 – 19,3 ng/m³, kun kaupunkien ulkopuolisilla alueilla määrä on 0,02 - 1,2 ng/m³. (Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons. 1995) Arvo kuitenkin vaihtelee vuodenajan mukaan, ja onkin tutkittu että talvella PAH-yhdisteitä on ilmassa moninkertainen määrä. (De Nicola. 2004) Taulukkoon 3 on merkitty keskimääräiset päiväsaannit myös muille PAH-yhdisteille ilmasta, ruuasta sekä juomavedestä.

Taulukko 3 Keskimääräinen päiväsaanti aikuiselle ei tupakoivalle henkilölle EU komission mukaan. (Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food. 2002.)

PAH	ng/henkilö		
	Ruoka	Juomavesi	Ilma
Antraseeni	<30-640	-	20
Fluoranteeni	600-1660	2.0-20	100
Pyreeni	600-1090	0.2-20	100
Benz(a)antraseeni	<20-410	0.2-20	20
Kryseeni	200.153	0.2-20	20
Bentso(b)fluoranteeni	5-360	0.1-2	20
Bentso(j)fluoranteeni	<30	0.02-0.2	-
Bentso(k)fluoranteeni	40-140	0.02-2	20
Bentso(a)pyreeni	50-290	0.2-2	20
Bentso(g,h,i)peryleeni	120-360	0.2-2	20
Indeno(1,2,3-cd)peryleeni	<20-460	0.2-2	20
Dibentso(a,h)antraseeni	<10-80	-	2
Juomavedessä oletettu 2l/päivä			
Ilmassa oletettu 20m ³ /päivä			

2.5 Elintarvikkeet

2.5.1 Ruoka

Raa'assa lihassa PAH-määrät ovat yleensä 0,01 - 1 µg/kg luonnosta saatujen PAH-kontaminaatioiden vuoksi, kun taas savustetusta lihasta ja kalasta on mitattu jopa 200 µg/kg PAH:ä. Grillatusta lihasta on raportoitu mitattavan 130 µg/kg PAH:ä. Savustetun lihan tapauksessa vaikuttavia tekijöitä PAH-yhdisteiden määrään on useita: uunin laatu, hapen saatavuus tässä ja savustustyyli. Puuta poltettaessa myös puun laatu vaikuttaa. Esimerkiksi jalopuut tuottavat yleisesti vähemmän PAH-yhdisteitä ruokaan kuin havupuut ja kuiva puu tuottaa enemmän PAH:ä korkeamman savulämpötilan vuoksi. Lihaa paistettaessa on useita keinoja vähentää PAH-yhdisteiden siirtymistä ruokaan. Hyvinä keinoina pidetään pienempää lämpötilaa ja pidempää kypsytysaikaa tai ruuan pitämistä kauempana tulesta. Ruuan sijoittaminen tulen alle PAH-yhdisteiden siirtymistä ruokaan verrattuna ruuan kypsyttämistä tulen päällä. Savustuksessa käytettävää nestesavua pidetään vähemmän PAH:ä sisältävänä kuin perinteistä savustusta.

Elintarvikeöljyssä PAH-pitoisuudet saattavat myös olla suhteellisen korkealla kuivausprosessin vuoksi. Määrät öljyissä vaihtelevat kuitenkin paljon riippuen tuotantoprosessista.

Hedelmien ja vihannesten sisältämä PAH on yleensä niiden pinnalla, johon se on siirtynyt pintaabsorption seurauksena. Huolellinen pesu yleensä vähentää PAH-määrät näissä puoleen. Pesu poistaa varsinkin pinnoilla olevat korkea moolimassaiset PAH yhdisteet, kun taas pienimassaiset yhdisteet ovat todennäköisemmin hedelmän ja vihanneksen sisäosissa, joten pesu ei juuri auta poistamaan näitä. Teollisuusalueilla ja vilkasliikenteisten teiden vierellä vihanneksissa on todennäköisesti suurempi määrä

PAH-yhdisteitä tämän vuoksi. (Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food. 2002.)

2.5.2 Tupakka

Yhdestä tupakasta on mitattu saatavan 20 - 40ng bentso(a)pyreeniä. Passiivisen tupakoinnin katsotaan olevan paljon vaarallisempaa PAH-saannin suhteen: saatu PAH-altistus on keskimäärin kolminkertainen. (Phillips. 1996; Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer. 1999) Tupakoijien kanssa samoissa tiloissa elävät saavat myös lisänä hengitysilmaasta PAH-yhdisteitä, tällaisissa tiloissa PAH-pitoisuudet ovat kasvaneet 1 - 100 ng/m³.

2.6 Luonto

PAH-yhdisteet eivät oikeastaan liukene veteen, joten suuri osa niiden liikkumisesta tapahtuu ilmassa. Ilmassa PAH-yhdisteet ovat tiukasti kiinni pienten kiinteiden partikkelien pinnalla tai höyrystyneinä. PAH-yhdisteistä kaksi- ja kolmerenkaiset ovat suureksi osaksi ilmassa höyrystyneessä muodossa, kun 5 renkaan tai suuremmat yhdisteet löytyvät ilmasta pääasiassa pienten partikkeleiden, kuten tuhkan tai noen pinnoilta. Nelirenkaiset yhdisteet liikkuvat melko tasaisesti kummallakin tavalla. Nämä partikkelit voivat liikkua ilmassa pitkiäkin matkoja, kunnes ne tulevat sateen mukana alas. (Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons. 1995)

PAH-yhdisteet ovat luonnossa melko pysyviä, mutta ilmakehässä ne saattavat hajota auringonvalon sekä ilmakehän muiden kemikaalien vaikutuksesta muutamasta tunnista

muutamaan viikkoon kestävässä aikana. Maaperässä hajoamisessa menee viikoista kuukausiin, ja hajoaminen tapahtuu pääasiassa mikro-organismien avittamana. Joissakin tapauksissa yhdisteet säilyvät maaperässä jopa vuosia. Bentso(a)pyreenille on todettu 229 - 309 päivän puoliintumisaika maaperässä. (Public Health Goal for Benzo(a)pyrene in Drinking Water. 2010)

Veteen PAH-yhdisteet päätyvät usein ilmasta, joskus myös päästöjen tai onnettomuuksien mukana. Vedessä PAH-yhdisteet useimmiten päätyvät kiinni sedimentteihin, joista niitä voi löytää suurenkin määrän. Öljynjalostamoiden läheisyydessä on dokumentoitu maaperässä olevan jopa 200 000 µg/kg. Kun kaupunkien läheisyydessä ja suuriliikenteisten alueiden viereltä otetuista maaperänäytteistä on saatu yleisesti alle 2000 µg/kg:n arvoja. (Certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds. Monograph on the evaluation of carcinogenic risks of the chemical to man. 1973) Ruokaketjuun sedimenttien PAH-yhdistemäärästä päätyy lopulta vain pieni osa, sillä sedimentissä elävien ja sitä syöville eliöillä on hyvä biotransformaatiokyky PAH-yhdisteille. Joillain eläimillä tätä kykyä ei ole, joten niissä saattaa olla paljon yhdisteitä suuriakin määriä. (Case Studies in Environmental Medicine Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). 2009)

3 SAVUSTUSTEKNIIKAT JA MENETELMÄT

3.1 Perinteinen savu

Perinteisen savun menetelmässä savustus suoritetaan polttamalla puuta tai haketta ja pitämällä savustettavaa kalaa savussa. Teollisuudessa poltettavana aineena on yleensä hake. Puusta tuleva savu sisältää muun muassa tervaa, hartsia, fenoleja, etikkahappoa, muurahaishappoa, metyylialkoholia ja muitakin alkoholeja sekä aldehydejä, vettä ja PAH-yhdisteitä. Perinteisen savun tapauksessa on kaksi pääasiassa käytössä olevaa

menetelmää, lämminsavu ja kylmäsavu. Perinteisen savun menetelmissä käytetään teollisuudessa yleensä savustuspönttöjä, joissa kalat ripustetaan roikkumaan yläosiin, ja savu johdetaan pönttöön vierellä olevasta savunkehittimestä. (Koistinen. 1995)

3.1.1 Lämminsavumenetelmä

Lämminsavustuksen pääajatuksena on, että kalan lihan lämpötila nousee niin korkeaksi että lihan valkuaisaine saostuu eli liha kypsyy. Lämminsavustuksen tehtävänä on antaa kalalle savustuksesta tuleva tyypillinen maku ja ulkonäkö sekä lisätä kalan säilyvyyttä. Lämminsavussa tapahtuva savustus myös tappaa yleensä kaikki bakteerit kalan pinnalta. (Koistinen. 1995)

3.1.2 Kylmäsavumenetelmä

Kylmäsavumenetelmässä savun ja savustettavan kalan lämpötila pyritään pitämään savustuksen aikana 17 – 22 asteessa ja joka tapauksessa alle 30 asteessa. Savustustekniikkana kylmäsavustus on lämminsavua hitaampi ja kotona savustus kestää useita päiviä, mutta teollisuudessa kylmäsavustus voidaan suorittaa jo muutamassa tunnissa. (Koistinen. 1995)

3.2 Nestesavu

Nestesavumenetelmä perustuu valmistettuun savunesteeseen, jota suihkutetaan kalan päälle. Nesteen mukana kalaan siirtyvät savun sisältämiä aineista vain ne, jotka vastaavat lopputuotteen savunväristä ja -mausta. Savunesteestä on siis pyritty poistamaan terva, kiinteät hiukkaset ja ym. savustuksen haitallisista aineista, kuten PAH-yhdisteistä. Nestesavun käytössä on kaksi yleistä menetelmää, sumutus- ja suihkutusmenetelmät. Sumutusmenetelmän käytössä tarvitaan kuitenkin omat laitteensa. Menetelmässä käytetään savustusuunia, johon on lisätty sumutusmenetelmälle erityinen laite nestesavun muuntamiseksi höyrymäiseen muotoon. Laitteessa nestesavu ja paineilma johdetaan samanaikaisesti pienireikäisen suuttimen läpi, jolloin nestesavu höyrystyy. Sumutusmenetelmä on ajankäytön osalta yhtä nopea kuin lämminsavu, ja prosessi yleisesti on samankaltainen. Suihkutusmenetelmässä laimennettu nestesavu valutetaan tai suihkutetaan suoraan kalan päälle, minkä jälkeen kala kuivataan ja keitetään. Suihkutusmenetelmä on todella paljon nopeampi ja sopii parhaiten tuotantoon, jossa valmistetaan pitkiä sarjoja samankaltaisia tuotteita. Nykyisin eri menetelmille on olemassa monia erivahvuisia ja eri aromisia nestesavu vaihtoehtoja. (Koistinen. 1995, Leiponen. 2006)

4. ESIKÄSITTELYMENETELMÄT

4.1 Kylmäkuivaus

Kylmäkuivausta käytetään usein lämpötilalle herkkien aineiden kuivauksessa. Vettä sisältävä näyte saadaan vedettömään muotoon. Tällöin näyte saa säilyvyyttä ja sitä on mahdollista käyttää analyyseissä, jotka eivät siedä vettä. Kylmäkuivauksessa pyritään

kuivattamaan näyte sublimaatiolla. Kuivauksessa materiaali jäädytetään ja ilmanpainetta lasketaan. Kylmäkuivausprosessi on jaettu yleisesti kolmeen eri vaiheeseen. Ensimmäisessä vaiheessa näyte jäädytetään, jolloin mukana oleva vesi jäätyy samalla. Toisessa vaiheessa jäätynyt vesi sublimoituu eli siirtyy jäädästä kaasuksi. Kolmannessa vaiheessa tiukasti näytteeseen sitoutunut vesi haihtuu pois. Veden sublimaatio suoritetaan prosessissa laskemalla ilmanpainetta, jolloin ilmiö on mahdollinen alemmissa lämpötiloissa. (Flink & Knudsen. 1983. 6 – 19.)

4.2 Paineistettu liotinuutto

Nopeutettu liotinuutto on uuttomenetelmä, joka perustuu uuttamiseen kohotetun lämpötilan ja paineen kanssa. Menetelmässä uutto suoritetaan jollain orgaanisella liuottimella, joka on valittu analyysin mukaan sopivaksi.

Ennen ajon aloittamista on valmisteltava uuttokennot tulevaan uuttoon. Uuttokennojen valmistelun jälkeen niihin voidaan syöttää näyte ja suorittaa uutto. Uutossa laite siirtää kennon säädeltävään uuniin. Tämän jälkeen lisätään liuotin ja uutto käynnistyy. Paineen ja lämpötilan voi säädellä analyysiin sopivaksi. Laite suorittaa paineistuksen ja lämmityksen, minkä jälkeen olosuhteet pidetään samanlaisina tasapainon saamisen vuoksi. Uuton loputtua näyte huuhdellaan liuottimella talteen linjastoilta, jotta kaikki analyytit saadaan kerättyä talteen keräysputkeen. (Settle. 1997. 33.)

4.3 Kiinteäfaasiuutto

Kiinteäfaasiuutto (SPE) on laajalti käytetty selektiivinen näytteen esikäsittely menetelmä. Menetelmällä voidaan erottaa aineita toisistaan tai haluttu aine

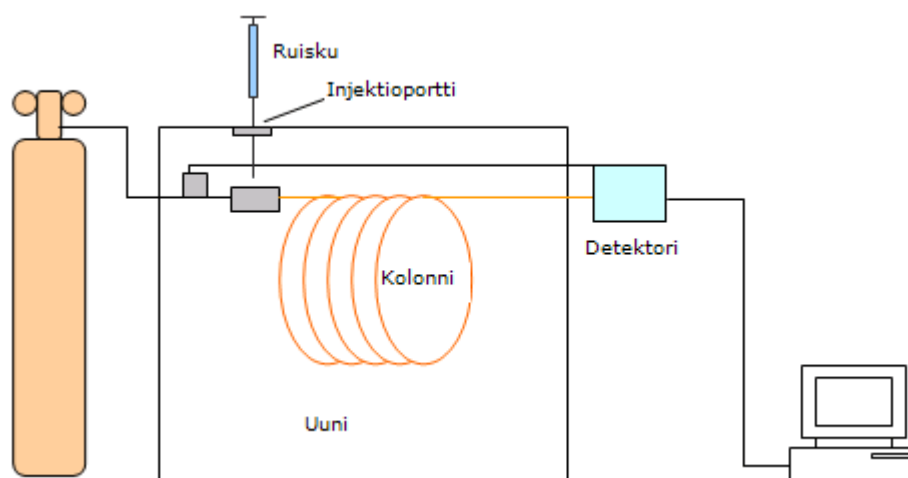
epäpuhtauksista tai konsentroida analyytti. SPE:ssä stationäärifaasina toimii kiinteä aine ja näyte on nestemäinen. Stationäärifaasi on yleensä pakattu putkeen, josta läpi neste sitten valutetaan uuttoa suorittaessa.

Kiinteäfaasiuutto suoritetaan useassa eri vaiheessa. Ensin valitaan analyysiin sopiva stationäärifaasi ja sen jälkeen päästään aloittamaan peseminen. Ensimmäinen vaihe on stationäärifaasina toimivan putken aktivointi, jolloin siitä päästetään liuotinta läpi. Seuraavassa vaiheessa päästetään läpi näyte, joka jää stationäärifaasiin kiinni. Seuraavaksi ajetaan pesuliuos, joka on valittu näytteelle sopivaksi. Liuokseen olisi tarkoitus tarttua näytteen epäpuhtaudet, ja sen ei saisi reagoida näytteen kanssa millään tavalla. Viimeisenä vaiheena on eluentin ajo putken läpi. Eluentiksi on valittu liuotin tai seos, johon analyytit liukenevat hyvin. Analyytit tulevat eluentin mukana pois stationäärifaasista. (Settle. 1997. 37 – 42.)

5 ANALYYSITEKNIIKAT

5.1 Kaasukromatografia

Kaasukromatografi toimii haihtuvien ja termisesti stabiilien yhdisteiden erottamisessa. Monet yhdisteet voidaan esikäsittelyn avulla myös muuntaa tähän muotoon. Kaasukromatografian pää rakenne on esitelty kuvioissa 2.



Kuvio 2. Kaasukromatografian rakenne. (Kaasukromatografia.2010)

Kaasukromatografiassa liikkuvana faasina toimii kaasu ja stationäärifaasina kiinteä aine tai nestefaasi. Näytteiden erottuminen kaasukromatografiassa perustuu yhdisteiden liikkeeseen kaasufaasissa, diffuusioon nestefaasiin sekä irrottautumiseen stationäärifaasin pinnalta. Stationäärifaasissaoloajan määrää yleensä faasin paksuus, molekyylin koko ja sen diffuusiovakio. Erottumisen kannalta tärkeää on suuri kontaktien määrä yhdisteen ja stationäärifaasin välillä. Tämän vuoksi halkaisijaltaan pienemmissä kolonneissa on yleensä parempi erotuskyky. Erotuskykyä voi myös parantaa hankkimalla pitemmän kolonnin. Näytteen ajonopeuteen taas vaikuttaa kantokaasu, ajon lämpötila, näytteen moolimassa ja kolonnin pituus. (Riekkola. & Hyötyläinen. 2002. 71–72)

Kantajakaasuna voidaan käyttää puhtaita ja inertejä kaasuja. Puhtauden tulisi olla ainakin 99,995 %. Epäpuhtauksista erityisesti vesi ja happi voivat heikentää tulosten laatua. Yleisimmät kantajakaasut ovat vety, helium ja typpi. Kantajakaasut vaikuttavat paljon kolonnin tehokkuuteen, resoluutioon, analyysiaikaan ja herkkyuteen. (Riekkola. & Hyötyläinen. 2002. 72 – 73.)

Stationäärifaaseina käytetään yleensä hyvin viskooseja polymeerejä, yleisimmin polysiloksaaneja, polyfenolieettereitä tai polyetyleeniglykoleja. Sisäseinämällä oleva

faasi on siis nestemäinen, mutta korkean kiehumispisteen ja viskositeetin vuoksi se pysyy kolonnin seinillä. Stationäärifaasin valintaan vaikuttaa yleensä näytteen tyyppi, yleisesti valitaan poolinen faasi poolisille yhdisteille ja pooliton faasi poolittomille. Kolonnin pituus vaikuttaa suoranaisesti analyysiaikaan sekä resoluutioon. Pitempi kolonni yleisesti kasvattaa näitä molempia. Kolonnin sisähalkaisija vaikuttaa yleisesti resoluutioon, pienempi halkaisija lisää kantajakaasun kontakteja stationäärifaasin kanssa, jolloin resoluutio on parempi. (Riekkola. & Hyötyläinen. 2002. 76–87)

Injektioinnissa on mahdollista käyttää erilaisia tekniikoita määrittävän aineen mukaan, päätyypit ovat höyrystävät näytteensyöttötekniikat ja suoraan kolonniin injektointi. Höyrystettävissä tekniikoissa käytetään yleisesti kahta tekniikkaa, split ja splitless. Jakoinjektiossa (split) näyte höyrystetään linerissä, minkä jälkeen valittu osa näytteestä jatkaa kolonniin kantajakaasu mukana ja suuri osa poistuu jakoventtiilin kautta pois. Menetelmä on nopea ja yksinkertainen, vaihteleva jakosuhte voi kuitenkin aiheuttaa virheitä kvantitatiivisessa tutkimuksessa. Tekniikka myös käyttää suuren määrän näytettä, joten ei ole kannattava kaikissa sovelluksissa tämän vuoksi. Suoraan höyrystävä injektointi eli splitless injektioinnissa menetelmä on melkein sama kuin jakoinjektiossa. Erona on näytteen täydellinen höyrystäminen ja mahdollisimman paljon näytteestä pyritään saamaan kolonniin, jakoventtiili pidetään injektioinnin ajan kiinni. Menetelmän etuina on tässä on hyvä luotettavuus sekä kvantitatiivisessä että kvantitatiivisessä määrityksessä. (Riekkola. & Hyötyläinen. 2002. 93–100)

Suoraan kolonniin injektointissa näyte injektoidaan suoraan kolonnin sisälle, jossa se höyrystyy kantajakaasuvirtauksen mukana. Menetelmä antaa hyvän tarkkuuden, sekä toistettavuuden kvantitatiivisissä määrityksissä, menetelmän heikkoutena ovat epäpuhtaudet. Haihtumattomat epäpuhtaudet menevät suoraan kolonniin ja kerääntyvät kolonnin alkupäähän ja epäpuhtauksien kertyminen vähentää kolonnin elinikää. (Riekkola. & Hyötyläinen. 2002. 100 – 102.)

5.2 Massaspektrometria

Massaspektrometri on yksi monipuolisimmista analyttisen kemian välineistä, koska sillä saa yhdisteen tunnistamisen kannalta paljon olennaista informaatiota.

Massaspektrometri voidaan liittää esimerkiksi kaasu- tai nestekromatografiin, jolloin voidaan hyvin tunnistaa yhdisteitä myös monimutkaisista seoksista.

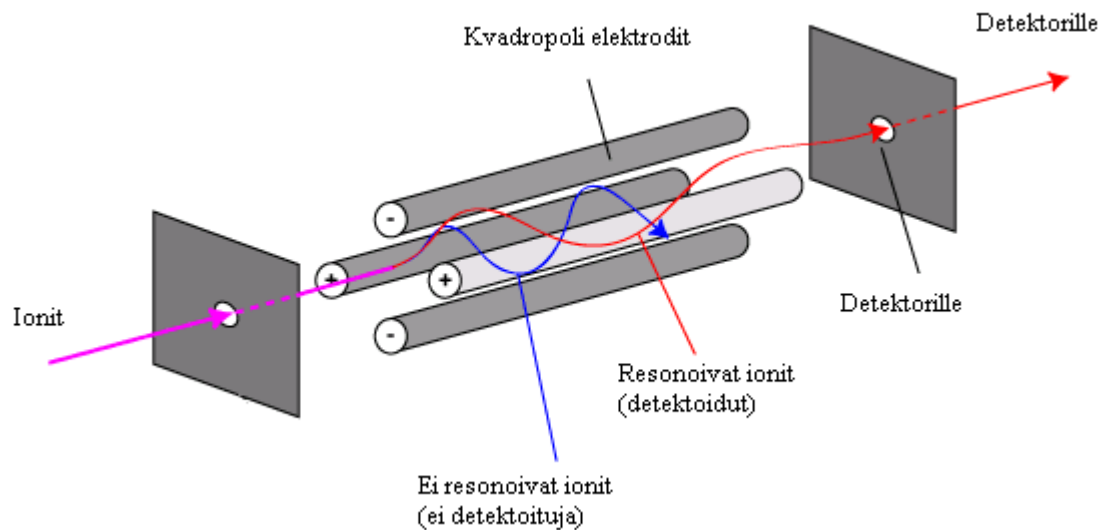
Laitteen toiminta perustuu kolmeen päävaiheeseen. Ensiksi tutkittavat näyte siirretään kaasufaasiin ja sitten ionisoidaan. Ionisoinnissa on käytössä kaksi yleistä tekniikkaa elektroninen ionisaatio (EI) ja kemikaalinen ionisaatio (CI). Seuraavaksi muodostuneet ionit erotellaan toisistaan m/z -suhteen perusteella ja viimeisenä kohtana on ionien detektointi. (Riekkola. & Hyötyläinen. 2002. 38 – 40.)

Ionisoinnissa käytetyistä tekniikoista EI on erityisesti käytössä, kun kyseessä on GC-MS-suoraliitäntä. EI:ssä näytenäytekaasua pommitetaan elektroneilla, joiden tuottamiseen käytetään filamenttia. Tuotetut elektronit kiihdytetään sähkökentän avulla matkalla anodille, jossa ne törmäävät näytemolekyyleihin. Menetelmän etuna on hyvä pilkkoutuminen. CI:ssä reagenssikaasun molekyylit ionisoidaan elektronipommituksen avulla jolloin pommitus aiheuttaa näytteen atomien ionisoitumisen törmäyksessä reagenssikaasun kanssa. CI:tä voidaan käyttää sekä kaasumaisten että nestemäisten aineiden suorasyötössä. CI on yleisesti heikompi pilkkomaan yhdisteitä, mutta pehmeämpi ionisoitumismenetelmä. (Riekkola. & Hyötyläinen. 2002. 40 – 43.)

Ionien erotuksen osalta on olemassa useita erilaisia massaspektrometrejä. Yleisimmin käytössä on kvadrupolimassaspektrometri, jonka rakenteen näkee tarkemmin kuviosta 3. Tämä laite muodostuu neljästä samansuuntaisesta metallisauvasta, joihin kytketään jännite. Kaksi vastakkaista elektrodia kytketään positiiviseen ja toiset kaksi negatiiviseen potentiaaliin. Lisäksi molempiin pareihin kytketään radiotaajuinen vastakkaisessa vaiheessa oleva vaihtojännite. Spektriä mitattaessa läpi kvadrupoli-laitteesta pääsevät tietyillä AC/DC-arvoilla vain tietyn m/z -suhteen omaavat ionit.

Tämän jälkeen ionit siirtyvät detektorille, jossa niiden pitoisuus sitten mitataan. (Riekkola. & Hyötyläinen. 2002. 49 – 56.)

Tandemmassaspektrometrillä eli MS/MS-laitteella toiminta muuntuu hieman edellisestä. Laite on kahden massaspektrometrin yhdistelmä, jossa näyte törmäytetään, jolloin saatu yhdiste on pilkkoontunut paremmin kuin yksinkertaisella laitteella. Yleisesti MS/MS-laitteiden erotus tapahtuu kolmoiskvadrupolilaitteistolla. Kyseinen tekniikka on suositeltava suurille molekyyileille sekä seoksille. (Riekkola. & Hyötyläinen. 2002. 54–55)



Kuvio 3. Kvadrupolimassaspektrometri (Quadruple & Triple Quadrupole (QQQ) Mass Analysis. 2005)

5.3 Sisäisen standardin menetelmä

Sisäisen standardin menetelmän pääperiaatteena on, että näytteeseen lisätään tunnettu määrä sopivaa yhdistettä sisäiseksi standardiksi. Määritettävän yhdisteen piikkiä verrataan sitten standardisuoran piikkiin ja standardisuoran sisäisen standardin piikkien

suhdetta verrataan tutkittavien näytteiden vastaaviin ja piikkien perusteella lasketaan näiden pitoisuus. Oikean sisäisen standardin valinta on kuitenkin tärkeää toistettavuuden kannalta. Oikea sisäinen standardi on yhdiste, joka on määritettävän aineen kaltainen joka kuitenkin erottuu tutkittavista yhdisteistä. Sisäisen standardin menetelmää käytetään etenkin silloin, kun näytteenkäsittelymenetelmä on monivaiheinen. Tämän avulla voidaan sitten ottaa huomioon näytteen käsittelyssä syntyvät hävikit. Sisäinen standardi lisätään edellisessä tapauksessa ennen näytteen käsittelyä, sisäinen standardi voidaan myös lisätä juuri ennen ajoa, jolloin sen avulla saadaan otettua huomioon pelkästään injektoinnissa syntyneet hävikit. (Riekkola. & Hyötyläinen. 2002. 34 – 35.)

Sisäisen standardin menetelmässä voidaan esimerkiksi käyttää hiili 13-atomeja. Piikin massa on suurempi hiili 13-isotoopin mukana olon vuoksi, ja yhden hiilen läsnäolo tekee sisäisen standardin piikin yhden massayksikön suuremmaksi. Piikin koon oletetaan olevan 1.1 % alkuperäisestä yhdisteen sisältäessä yhden hiiliatomin ja 2.2 % kahden ollessa kyseessä, sillä mahdollisuus että yhdiste sisältää hiili 13-atomin on kaksinkertainen tässä tapauksessa.

6 TUTKIMUSMENETELMÄ

6.1 Tehtävän rajaus ja tavoitteet

Tutkimuksen tavoitteena oli verrata savukalojen PAH-pitoisuuksia ja verrata näitä keskenään. Tavoitteena oli verrata kylmä- sekä lämminsavustettuja kirjolohia, sekä nestesavustettujen ja perinteisen savun menetelmällä valmistettujen kirjolohien PAH-eroja. Alkuperäisestä suunnitelmasta karsittiin pois eri kalalajien välinen vertailu, pitkän analyysiprosessin vuoksi.

Toinen tärkeä tavoite oli kehittää analyysin varmuutta ja kokeilla, kuinka paljon kapasiteettiä on suuremman analyysimäärän suorittamiselle.

6.2 Näytteen käsittely

Näytteet tulivat Eviralle samoissa paketeissa, joissa niitä myydään kaupoissa. Näytteen käsittely alkoi siis ottamalla näytettä eripuolilta kaloista punnituille petrimaljoille. Yhdestä kalasta otettiin aina neljä rinnakkaista noin 10:n gramman näytettä. Näytteet pyrittiin ottamaan tasaisesti eri puolilta kalaa, jotta lopulta saataisiin hyvä peruskuva kalan sisällöstä. Nahallisista kaloista otettiin erikseen vielä ylimääräinen nahkanäyte, jota työstettiin muiden näytteiden rinnalla. Suorituksen jälkeen petrimaljat vielä punnittiin ja laitettiin pakastimeen odottamaan seuraavaa vaihetta.

6.3 Kylmäkuivaus

Näytteenoton jälkeen petrimaljat siirrettiin punnituina kylmäkuivaimeen, jossa näitä alettiin kuivata alhaisen lämpötilan ja alipaineen avulla. Kuivaus kestää erälle noin 2 - 3 päivää. Kuivausta seurataan punnitsemalla maljat kaksi kertaa päivässä. Kun näytteiden painon muutos alkoi olla alle 50 mg, todettiin näytteet kuiviksi. Tämän jälkeen jokaisesta kalasta otetut neljä näytettä yhdistettiin ja homogenisoitiin. Tämän jälkeen homogenisoidut näytteet säilöttiin pakastimeen seuraavaa vaihetta odottamaan. Nahka näytteille tehtiin samat vaiheet, ja ne pidettiin erillään muusta kalasta.

6.4 Nopeutettu liotinuutto

Käytössä olevana laitteistona oli ASE (Accelerated solvent extraction). Ennen liotinuuton aloittamista oli ASE-näyteastiat valmisteltava ja esikäsiteltävä. ASE-astia koottiin täyttämällä se pohjalta lähtien, ensiksi asettamalla suodatin, minkä jälkeen 0,5 g Celiteä ja 7,5 g Florisiliä. Näiden jälkeen tyhjäksi jäänyt tilavuus täytettiin lasihelmillä liuottimen säästämiseksi. Sitten valmistetuille näyteastialle suoritettiin dikloorimetaanipesu ASE laitteistolla, jotta apuaineiden sisältämistä PAH-jäämistä päästiin eroon. Kun dikloorimetaani pesu saatiin loppuun, oli putket valmiina näytettä varten. Ensiksi poistetaan lasihelmet, sitten 0,5 g näytettä asetettiin putkeen Florisil kerroksen päälle ja lisättiin takaisin lasihelmet. Näytteeseen lisättiin tässä vaiheessa myös sisäinen standardi. Tämän jälkeen suoritettiin ASE-uutto heksaanin ja asetonin seoksella, ja uute saatiin uuttamisen jälkeen omaan astiaansa liuottimen kanssa. Näytteen valmistamista määritettävään muotoon jatkettiin nopeutetulla liotinuutolla saadusta uutteesta. Ensiksi saatu uute haihdutettiin typpihaihduttimella 1 ml asti ja sitten saatuun liuokseen lisätään noin 3ml sykloheksaania.

6.5 Kiinteäfaasiuutto

Kiinteäfaasiuutto aloitettiin ensin kasaamalla laitteisto tulevaa uuttoa varten. Ensimmäisen vaiheena uutossa aktivoitiin erotuspylvään stationäärifaasi tiputtamalla siitä läpi ensin 15 ml etyyliasetaattia ja 10 ml sykloheksaania. Aktivoinnin jälkeen tiputettiin näyte ja näyteastian huuhtomiseen käytetty sykloheksaani läpi erotuspylvästä. Tämän seurauksena näyte siirtyy stationäärifaasiin. Seuraavaksi kolonnia pestiin 6 ml:lla sykloheksaanin ja etanolin seosta, jonka mukana näytteestä lähti pois epäpuhtauksia. Viimeiseksi suoritettiin eluointi sykloheksaanin ja etyyliasetaatin seoksella. Ennen eluoinnin aloitusta jokaiselle näytteelle laitettiin omat putket, joihin eluoinnin seurauksena analyytit ja eluointi liuos tulvat ulos.

6.6 Näytteen ajaminen

Kiinteäfaasiuuton jälkeen analyytit olivat vielä eluointiliuoksen mukana, joten oli siis tehtävä typpihaihdutus. Eluaatti haihdutettiin kuiviin ja haihdutus lopetettiin välittömästi liuottimen haihduttua, jotta vältetään turhalta hävikiltä. Tämän jälkeen näyte liuotetaan 100 µl:aan toluenia ja siirretään ajopulloon sekä siirretään GC-MS/MS-laitteistoon ajettaviksi.

7 TULOKSET

Opinnäytetyön aikana tehdyssä projektissa oli tarkoitus ensin vertailla nestesavulla ja perinteisellä savulla valmistettujen lämmin- sekä kylmäsavustettujen kirjolohien PAH-yhdisteiden määrien eroavaisuuksia. Tässä vaiheessa mukana oli 20 nahallista sekä 20 nahatonta kirjolohea. Molemmista sekä nahallisista että nahattamista kirjolohista oli 10 eri tavoin savustettuja. Toisessa erässä oli 20 kylmäsavustettua kirjolohta, joista 10 oli nestesavulla ja 10 perinteisellä savulla valmistettua. Jokaisesta kalasta otettiin 4 rinnakkaista näytettä, joiden keskiarvo lopulta laskettiin tulosten tarkkuuden parantamiseksi. Kolmantena näyte-eränä oli tarkoitus olla lämminsavulla valmistettu savusiika, jotta eroja eri kalalajien välillä olisi hieman saatu verrattua, mutta tähän aika ei enää riittänyt.

7.1 Lämminsavukirjoloheet

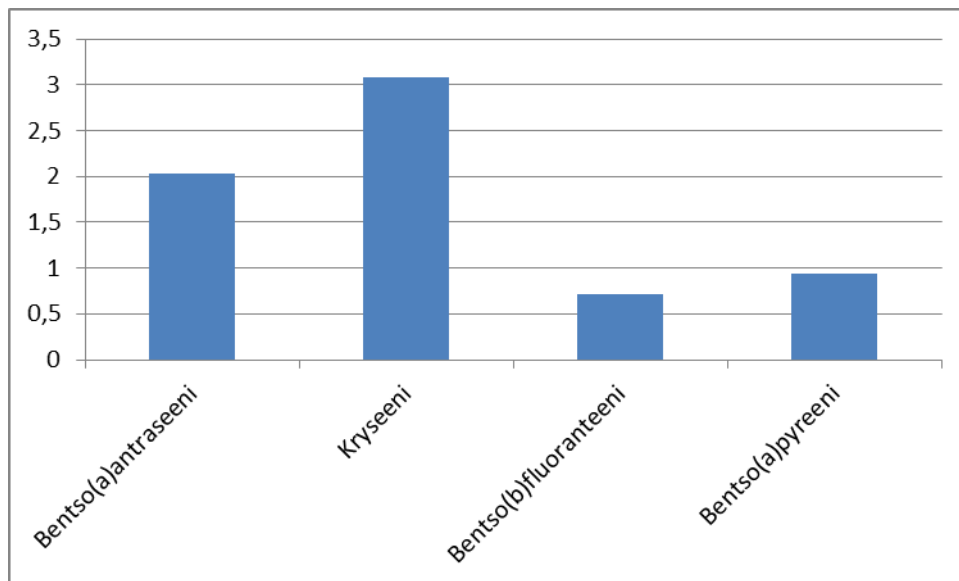
Lämminsavukirjolohien tapauksessa näytteinä oli 20 kirjolohifileettä ja 20 nahallista kirjolohta. Kirjoloheet toimitettiin kahdessa eri erässä, 10 fileettä ja 10 nahallista kerrallaan.

7.1.1 Kirjolohifilee

Kirjolohifileistä 10 oli valmistettu nestesavulla ja 10 perinteisellä savulla. Kummassakaan näistä tapauksista ei ylitetty EU:n asettamien enimmäisrajoja, joten arvot olivat suhteellisen matalia. Kun verrattiin nestesavua perinteiseen savuun havaittiin, että perinteisen savun menetelmässä useita PAH-yhdisteitä oli selvästi nestesavumenetelmää suurempia määriä. Erityisesti bentso(c)fluoreenin, bentso(a)antraseenin, kryseenin, syklopenta(c,d)pyreenin sekä bentso(a)pyreenin tapauksissa. Määrällisesti perinteisen savun menetelmän näytteissä oli noin kaksinkertainen pitoisuus näitä yhdisteitä.

7.1.2 Nahallinen kirjolohi

Lämminsavustettujen nahallisten kirjolohien tapauksessa huomattiin suuria pitoisuuksia kolmessa perinteisen savun nahkanäytteessä, myös yleisesti pitoisuudet olivat korkeammat kuin muissa, kuten kuviosta 4 näkee. Näissä kolmessa näytteessä bentso(c)fluoreenin määrä ylitti niukasti 5 µg/kg. Myös muissa nahkanäytteissä bentso(c)fluoreenin määrä oli korkea. Nahkanäytteissä oli korkeita pitoisuuksia myös bentso(a)antraseeniä, kryseeniä, syklopenta(c,d)pyreeniä sekä bentso(g,h,i)peryleeniä. Myös bentso(a)pyreenin määrät olivat hieman muita korkeammat, keskiarvoltaan kuitenkin myös nahkanäytteiden sisältämät PAH-arvot jäivät rajojen sisäpuolelle.



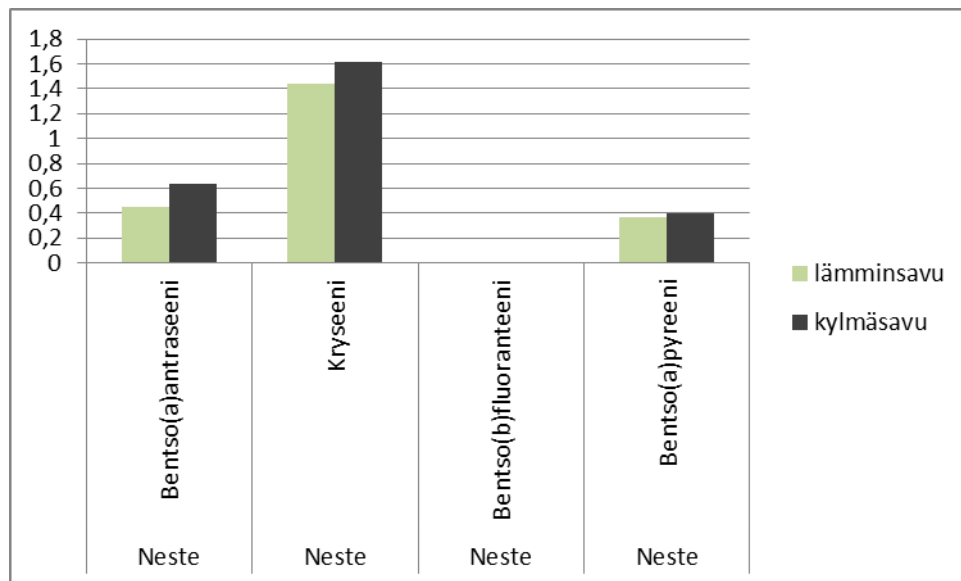
Kuvio 4. Nahallisten kirjolohien sisältämien PAH-yhdisteiden keskiarvo

7.2 Kylmäsavu kirjolohet

Kylmäsavukirjolohien tapauksessa näytteinä oli 10 kappaletta nestesavulla valmistettuja savukirjolohifileitä sekä 10 kappaletta perinteisen savun menetelmällä valmistettuja savukirjolohifileitä. Kylmäsavukirjolohien tapauksessa nahalliset vaihtoehdot oli jätetty pois. Kylmäsavukirjolohien tapauksessa tutkin pelkästään PAH4-yhdisteitä ajanpuutteen vuoksi.

7.2.1 Nestesavumenetelmällä valmistetut kylmäsavukirjoloheet

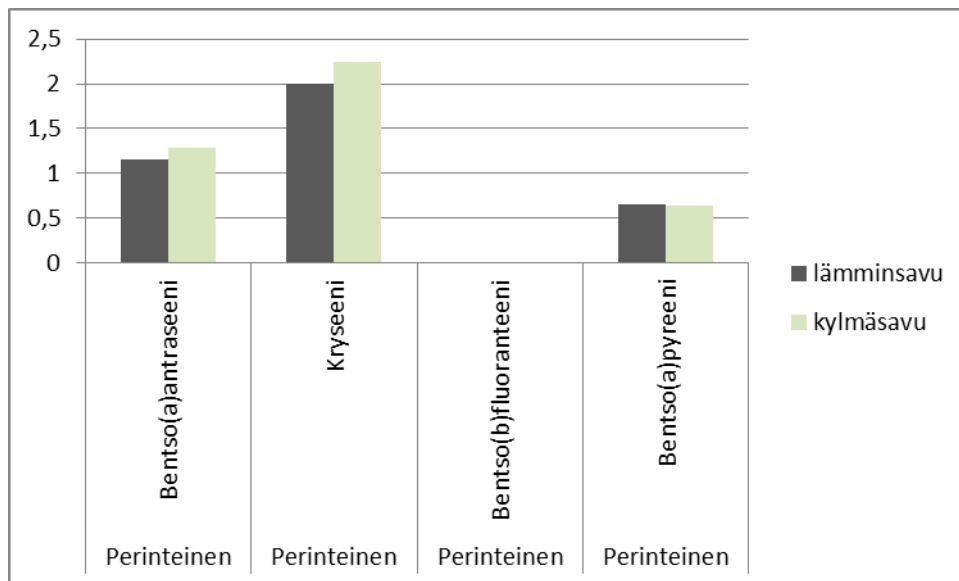
Kaikissa nestesavulla valmistetuissa kylmäsavulohissa PAH4-pitoisuudet olivat todella matalat, kuten kuviossa 5 näkyy. Kuvioon on laskettu keskiarvo saaduista nestesavumenelmällä valmistetuista kylmäsavukirjolohista, joita oli yhteensä 20 kappaletta. Kirjolohista oli tehty yhteensä 80 rinnakkaista näytettä tarkkuuden parantamiseksi.



Kuvio 5. Nestesavun sisältämien PAH-yhdisteiden määrien keskiarvo

7.2.2 Perinteisen savun menetelmällä valmistetut kylmäsavukirjoloheet

Myös perinteisen savun menetelmässä saadut tulokset olivat matalia rajoihin nähden. Ainoastaan bentso(a)antraseenin tapauksessa arvot olivat hieman koholla. Kahdessa näytteessä todettiin pitoisuuksia 3,5 µg/kg - 4 µg/kg, jotka ovat suhteellisesti korkeampia muihin verrattuna. Keskiarvoltaan saadut tulokset jäivät kuitenkin reilusti alle EU:n bentso(a)pyreenille säätämien rajojen, kuten kuviossa 6 näkyy. Kuviossa 6 mukana on 20 perinteisen savun menetelmällä valmistettua kirjolohta, joista 10 oli kylmäsavukirjolahifileitä. Lopuista 10:stä lämminsavustetuista viisi oli nahallisia kirjolohtia ja viisi nahattomia.



Kuvio 6. Perinteisen savun menetelmällä valmistettujen savukalojen PAH-yhdisteiden määrä

8 Tulosten tarkastelua ja vertailua

8.1 Nestesavun ja perinteisen savun vertailua

Tutkimuksissa saatiin suhteellisen selvästi esille perinteisen savun menetelmän sisältämä suurempi PAH-pitoisuus verrattuna nestesavumenetelmällä valmistettuihin savukaloihin. Nestesavun keskiarvoksi tuli 2,46 ja perinteisen savun 3,985 (PAH-4 yhdistettä), joten ero perinteisen savun menetelmällä valmistetuissa kaloissa oli 62% enemmän PAH-4 yhdisteitä.

Nestesavumenetelmän sisältämän PAH-pitoisuuden pienempi määrä ei ole mikään yllätys, kun menetelmässä pyritään jo itsessään suihkuttamaan kalaan vain ne osat

savustuksessa tulevista aineista, jotka vaikuttavat kalan makuun ja ulkonäköön. Eli poistamaan myös ylimääräiset PAH-yhdisteet, jotka eivät kuulu näihin. Perinteisen savun menetelmässä ei PAH-yhdisteiden kannalta vähentäviä muutoksia juurikaan voida tehdä.

Taulukko 4. Nestesavun ja perinteisen savun PAH-yhdisteiden määrien vertailua

		Neste	Perinteinen
Lämminsavu	Bentso(a)antraseeni	0,45	1,15
Kylmäsavu	Bentso(a)antraseeni	0,64	1,28
Lämminsavu	Kryseeni	1,44	2
Kylmäsavu	Kryseeni	1,62	2,24
Lämminsavu	Bentso(b)fluoranteeni	0	0
Kylmäsavu	Bentso(b)fluoranteeni	0	0
Lämminsavu	Bentso(a)pyreeni	0,37	0,66
Kylmäsavu	Bentso(a)pyreeni	0,4	0,64

8.2 Lihan ja nahan erot

Nahassa PAH-yhdisteiden määrä on suurempi sen suuremman rasvaosuuden vuoksi, sekä sen sijainnin vuoksi, eli on ensimmäinen pinta. Sijainnin vuoksi savustettaessa syntyneet PAH-yhdisteet pääsevät helpommin siihen, sekä ne imeytyvät rasvaan, kuten taulukossa 5 näkyy. Ero on huomattava kaikkien neljän PAH-yhdisteen kohdalla. Nahan ja lihan eroa vertaamisessa käytettiin näytteinä viittä lämminsavustettua kirjolohta ja 5 kylmäsavustettua lohta, jotka sisälsivät nahan. Ero näitten kohdalla laskettiin kummastakin kerroksesta saadusta PAH4-määrästä. Keskiarvoisesti näistä 10 näytteestä nahkaosan todettiin sisältävän 123 % enemmän PAH4-yhdisteitä kuin lihaosan.

Taulukko 5. Lihan ja nahan sisältämien PAH-yhdisteiden määrien vertailua

		Lämminsavu	Lämminsavu, nahka
Neste	Bentso(a)antraseeni	0,45	1,45
Perinteinen	Bentso(a)antraseeni	1,15	2,6
Neste	Kryseeni	1,44	2,47
Perinteinen	Kryseeni	2	3,68
Neste	Bentso(b)fluoranteeni	0	0,7
Perinteinen	Bentso(b)fluoranteeni	0	0,73
Neste	Bentso(a)pyreeni	0,37	0,58
Perinteinen	Bentso(a)pyreeni	0,66	1,3

8.3 Kylmä- ja lämminsavumenetelmien ero

Tuloksien mukaan kylmäsavumenetelmällä valmistetuissa savukaloissa on kutakuinkin saman verran PAH-yhdisteitä kuin lämminsavumenetelmällä valmistetuissa. Näitä vertailtaessa tarkastelin kuitenkin vain neljää tärkeintä PAH-yhdistettä, mutta nämä näyttävät tilanteen luotettavasti aikaisempien tuloksien perusteella. Taulukossa 6 näemme tarkasteltujen kylmä ja lämminsavumenetelmien PAH-yhdisteiden määrät, jotka ovat lähellä toisiaan.

Taulukko 6. Kylmä- ja lämminsavumentelmien tuottamien PAH-yhdisteiden vertailua

		Lämminsavu	Kylmäsavu
Neste	Bentso(a)antraseeni	0,45	0,64
Perinteinen	Bentso(a)antraseeni	1,15	1,28
Neste	Kryseeni	1,44	1,62
Perinteinen	Kryseeni	2	2,24
Neste	Bentso(b)fluoranteeni	0	0
Perinteinen	Bentso(b)fluoranteeni	0	0
Neste	Bentso(a)pyreeni	0,37	0,4
Perinteinen	Bentso(a)pyreeni	0,66	0,64

8.4 Koonti

Lähdettäessä tarkastelemaan eri savustustekniikoiden välisiä PAH-yhdisteiden pitoisuuksien eroja. Saatiin tässä tutkimuksessa selkeä kuva nestesavun ja perinteisen savun tekniikoiden erosta kyseisessä savustamossa. Tilanteen pitäisi olla sama myös yleisellä tasolla. Mahdollinen lämminsavustuslaitteen laatu ja tila tämän kalasavustamon voi tuoda kuitenkin vaihtelua tuloksiin.

Eron lämmin- ja kylmäsavukirjolojien kanssa olisi voinut saada tarkemmin suuremmalla määrällä näytteitä eri lähteistä, mutta tähän aika ei kuitenkaan riittänyt. PAH-yhdisteiden määrän erosta nahassa ja lihakerroksessa saatiin selkeä tulos. Tutkimuksessa käytettyjen kalojen määrä oli suhteellisen pieni, mutta saatujen tulosten perusteella jo tällä määrällä erot olivat melko merkittävät. Suuri rinnakkaisten näytteiden määrä lisäsi luotettavuutta yksittäisille tuloksille. Tutkittavat pitoisuudet olivat todella pieniä ja käytetyt laitteet herkkiä. Jolloin useiden rinnakkaisten näytteiden analyysin jälkeen tulokset olivat tarkkoja. Tutkimuksen tarkoituksena oli myös lisätä kyseisen analyysin tuntemusta Eviralla ja tarkastella kuinka nopeaa näytteitä oli mahdollista käydä läpi näillä resursseilla.

LÄHTEET

Case Studies in Environmental Medicine Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). 2009. Agency for Toxic Substances & Disease Registry (ATSDR). Viitattu 15.1.2011. <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/pah/docs/pah.pdf>.

Certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds. 1973. Monograph on the evaluation of carcinogenic risks of the chemical to man. International Agency for Research on Cancer (IARC). Vol. 3. Lyon, France: World Health Organization.

(EC) NO 1881/2006. Commission regulations (EC) NO 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. EU komissio. Viitattu 24.1.2011. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:EN:PDF>.

(EC) NO 1881/2006. Commission regulations (EC) NO 333/2007 of 28 March 2007. EU komissio. Viitattu 18.1.2011. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:088:0029:0038:EN:PDF>.

De Nicola, F., Maisto, G., Prati, M., & Alfani, A. 2004. Temporal variations in PAH concentrations in *Quercus ilex* L. (holm oak) leaves in an urban area. *Chemosphere*. Volume 61. Issue 3.

D'Mello, J. 2003. Food safety: contaminants and toxins. UK Trowbridge: Cromwell press.

DNA chemistry and photophysics. New Yorkin yliopisto (NYU). Viitattu 1.2.2011 http://www.nyu.edu/projects/geacintov/WEB_Txt_PAH.htm

Flink, J & Knudsen, H. 1983. An introduction to freeze drying. Kööpenhamina: Department for the Technology of plant Food Products Royal Veterinary and Agricultural University Copenhagen, Denmark.

IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: International Agency for Research on Cancer. 1986. International Agency for Research on Cancer (IARC). Viitattu 26.1.2011. <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/stat/sp79/SP79.pdf>.

Kaasukromatografia. Opetushallitus. Viitattu 1.2.2011. http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_2-5_kaasukromatografia.html

Koistinen, R. 1995. Kalan savustus Kalatalouden keskusliitto n:o 112. Helsinki: Kalatalouden keskusliitto

Kuljukka-Rabb, T. 2002. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in complex mixtures – metabolic activation and DNA adduct formation.

Leiponen, M. 2006. Lihateollisuusopiston internetsivut. Viitattu 17.2.2011
http://www.lihakeskusliitto.fi/lihalehti/lihatieto/li0309_55-56.pdf

Liguori, L., Heggstad, K., Hove, H. & Julshamn, K. 2006. An automated extraction approach for isolation of 24 polyaromatic hydrocarbons (PAHs) from various marine matrixes. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 573–574, p.181 – 188.

Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food. 2002. EU komissio. Viitattu 20.1.2011.
http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out153_en.pdf.

PAH-yhdisteiden viitearvot Suomessa. 2011. Työterveyslaitoksen internet sivut. Viitattu 31.1.2011. http://www.ttl.fi/fi/kemikaaliturvallisuus/ainekohtaista_kemikaalitietoa/pah-yhdisteet_ja_niiden_esiintyminen/pah-yhdisteiden_viitearvot_suomessa/sivut/default.aspx

Phillips, D. 1996. DNA adducts in human tissues: Biomarkers of exposure to carcinogens in tobacco smoke. *Environ Health Perspect*. 104(Suppl 3): 453–458.

Public Health Goal for Benzo(a)pyrene in Drinking Water. 2010. Pesticide and Environmental Toxicology Branch Office of Environmental Health Hazard Assessment California Environmental Protection Agency (OEHHA). Viitattu 20.1.2011.
<http://oehha.ca.gov/water/phg/pdf/091610Benzopyrene.pdf>.

Quadruple & Triple Quadrupole (QQQ) Mass Analysis. 2005. Bristolin yliopisto. Viitattu 1.2.2011 <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/newversion/quad-ms.htm>

Riekkola, M. & Hyötyläinen, T. 2002. Kolonnikromatografia ja kapillaarielektromigraatiotekniikat. Helsinki: Helsingin yliopisto

Settle, F. 1997. Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. New Jersey: Prentise Hall PTR

Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer. 1999. JNCI Journal of the National Cancer Institute. Vol. 91, Issue 14, p.1194 – 1210.

Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons.1995. Agency for Toxic Substances and Disease Registry(ATSDR). Viitattu 22.1.2011.

<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69.pdf>.