

Patrik Luoto

# Väriaineiden määrittäminen elintarvikkeista LC-MS/MS-tekniikalla

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

05.12.2014

Tekijä	Patrik Luoto
Otsikko	Väriaineiden määrittäminen elintarvikkeista LC-MS/MS-tekniikalla
Sivumäärä	24 sivua + 7 liitettä
Aika	05.12.2014
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioala
Ohjaajat	FM Mia Ruismäki FT Suvi Ojanperä
<p>Opinnäytetyö tehtiin Tullilaboratorion Yleinen kemia 1 -osastolla Espoossa. Työn tarkoituksena oli kehittää eteenpäin uutta LC-MS/MS-menetelmää väriaineiden analysoimiseksi elintarvikkeista. Työssä validoitiin menetelmää virvoitusjuomamatriisille sekä kehitettiin näytteenkäsittelyä erityisesti vesiliukoisille värianalyteille maustematriisista. Analyyttejä menetelmässä oli yhteensä 37, joista osa oli elintarvikeväriä ja osa elintarvikekäytössä kiellettyjä väriaineita.</p> <p>Virvoitusjuomamatriisin näytteenkäsittelyyn käytettiin SPE-uttoa ja maustematriisille käytettiin sekä asetonitrili- että vesiuuttoa. Vesiuutossa oli DNA:n puhdistamisessa käytettäviä mikrosentrifugisuodattimia, jotta mausteainesta saataisiin poistettua liuoksesta. Analysointiin käytettiin Watersin UPLC-MS/MS-laitetta. Kolonnina oli Watersin UPLC C-18-kolonnina. Massaspektrometrillä käytettiin sähkösumutusionisaatiota (ESI+/ESI-) sekä usean reaktion seuranta (MRM).</p> <p>“Heikkoja” eli pienen vasteen antavia analyyttejä olivat lähinnä vesiliukoiset yhdisteet. “Vahvoja” eli suuren vasteen antavia analyyttejä olivat rasvaliukoiset. “Heikkojen” analyttien mittaustulos oli suurimmalle osalle 0,05 - 2 mg/kg ja “vahvojen” analyttien 0,01 - 0,2 mg/kg. Virvoitusjuomamatriisissa todettiin vaikuttavan joidenkin analyttien lineaarisuuteen heikentävästi. Virvoitusjuomamatriisissa määrittämisrajaksi saatiin analyttistä riippuen 0,05 - 1 mg/kg. Saannot määrittämisrajatesteissä olivat välillä 20 - 116 %. Tarkkuustesteillä suhteellinen keskihajonta näytteiden välillä oli 1 - 89 % ja saannot olivat välillä 8 - 166 %. Analyysin onnistuminen vaihteli paljon eri analyteilla.</p> <p>Menetelmä saatiin toimimaan lähes kaikkien analyttien osalta, mutta vaatii vielä kehittämistä. Maustematriisin uutteen yhdistelmällä saatiin analysoitua kaikki analytit lukuun ottamatta kahta elintarvikeväriä. Virvoitusjuomamatriisilla saatiin pääsääntöisesti kaikki vesiliukoiset väriaineet analysoitua.</p>	
Avainsanat	LC-MS/MS, synteettiset väriaineet, elintarvikevärit, validointi

Author	Patrik Luoto
Title	Analysis of colorants in foodstuff by LC-MS/MS
Number of Pages	24 pages + 7 appendices
Date	Friday 5 <sup>th</sup> December, 2014
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Mia Ruismäki, M.Sc. Suvi Ojanperä, Ph.D.
<p>This thesis was made in the Department of Common Chemistry 1 in the Finnish Customs Laboratory in Espoo. The purpose of this thesis was to develop a new LC-MS/MS method for determining colorants from foodstuffs. The method was validated for a soft drink matrix, and the sample preparation of the spice matrix was developed especially for water-soluble colorants. There were 37 different colorants included in the method; some of them were food colorants, while others were colorants which are illegal to use in foodstuffs.</p> <p>Soft drink samples were prepared with SPE, and spice samples were prepared with acetonitrile and water extraction. Microcentrifuge filters, which are normally used for DNA purification, were used to filter spice samples to remove spice matter from the solution. For analyzing the samples a Waters UPLC-MS/MS and a Waters UPLC C-18 column were used. Mass spectrometry was used with electrospray ionization (ESI+/ESI-) and multiple reaction monitoring (MRM).</p> <p>“Weak” colorants, i.e. analytes with a low response, were primarily water-soluble compounds. “Strong” colorants, i.e. analytes with a high response, were fat-soluble compounds. For the majority of weak colorants, the measuring range was 0.05 - 2 mg/kg, while that of strong colorants was 0.01 - 0.2 mg/kg. The soft drink matrix affected linearity negatively. For soft drink matrix, the limit of quantification was between 0.05 mg/kg and 1 mg/kg. Yields for LOQ tests were between 20 - 116 %. Relative standard deviation for accuracy was between 1 - 89 %, and yields were between 8 - 166 %. Success of the analysis varied according to different analytes.</p> <p>The method was successfully functional with almost all of the analytes, but still needs further development. All of the analytes could be analyzed by combining the extracts of the spice matrix, except for two food colorants. Primarily, all the water-soluble colorants could be analyzed from soft drink matrix.</p>	
Keywords	LC-MS/MS, synthetic colorants, food colorants, validation

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Väriaineet	1
2.1	Väriaineita koskeva lainsäädäntö	1
2.2	Tutkitut väriaineet	3
2.2.1	Elintarvikevärit	3
2.2.2	Kielletyt väriaineet	4
3	Analyysitekniikat	5
3.1	LC-MS/MS-tekniikka	5
3.2	Kiinteäfaasiuutto	7
4	Materiaalit ja menetelmät	8
4.1	Reagenssit	8
4.2	Materiaalit	8
4.3	Laitteet	8
4.4	Näytteenkäsittely	9
4.4.1	Virvoitusjuoma	9
4.4.2	Mauste	10
4.5	LC-MS/MS-parametrit	11
5	Tulokset	12
5.1	Mittausalue ja lineaarisuus	12
5.2	Matriisin vaikutus	13
5.3	Määrittäysraja	13
5.4	Standardien säilyvyys	15
5.5	Tarkkuus	15
5.6	Mitattuja maustenäytteitä	16
6	Pohdinta	17
7	Päätelmät	21
	Lähteet	23

## Liitteet

- Liite 1 Kromatogrammi kaikista analyyteistä
- Liite 2 Väriaineanalyytit
- Liite 3 Analyyttien MS-parametrit
- Liite 4 Standardisuorat
- Liite 5 Standardien säilyvyyslaskelmat
- Liite 6 Tarkkuus- ja täsmällisyyslaskelmat
- Liite 7 Havaintoja analyyttien käyttäytymisestä

## Lyhenteet

ACN	Asetonitrili
ADI	<i>Acceptable Daily Intake</i> , päivittäinen saanti
API	<i>Atmospheric pressure ionization</i> , ilmanpaineinen ionisointi
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> , Euroopan elintarviketurvallisuusvirasto
ESI	<i>Electrospray ionization</i> , sähkösumutus-ionisaatio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
LC-MS	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> , nestekromatografia-massaspektrometria
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i> , usean reaktion seuranta
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i> , tandemmassaspektrometria
%RSD	<i>Relative standard deviation</i> , suhteellinen keskihajonta
SPE	<i>Solid-phase extraction</i> , kiinteäfaasiuutto
$t_R$	<i>Retention time</i> , retentioaika
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> , korkean erotuskyvyn nestekromatografiatekniikka

## 1 Johdanto

Tullilaboratoriolla on rutiinikäytössä menetelmä elintarvikevärien määrittämiseksi kvalitatiivisesti ohutlevykromatografialla sekä toinen menetelmä synteettisten elintarvikevärien määrittämiseksi kvantitatiivisesti nestekromatografialla. Kvantitatiivinen menetelmä soveltuu vain muutamalle elintarvikevärille. Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää näiden menetelmien rinnalle LC-MS/MS-menetelmä, jolla saataisiin yhtäaikaisesti määritettyä useita eri väriaineita. Elintarvikevärien lisäksi tutkittiin myös elintarvikkeissa kiellettyjä väriaineita. Menetelmässä on mukana yhteensä 37 väriainetta. Tavoitteena on validoida menetelmä virvoitusjuomamatriisille. Menetelmän pohjatyö ja maustematriisin validointi on jo tehty Eeva Hietalan ja Suvi Ojanperän toimesta. Maustematriisin osalta tavoitteena kehittää ja validoida analytiikkaa erityisesti vesiliukoisille väriaineille.

## 2 Väriaineet

Teollisuusmaissa peräti 75 % ruoasta prosessoidaan ennen kuin se tavoittaa kuluttajan. Ruoan prosessoinnissa saatetaan menettää elintarvikkeen alkuperäinen väri, joten teollisuudessa voidaan korvata hävinnyt väri synteettisillä tai luonnollisilla väriaineilla. Väriaineita voidaan myös käyttää voimistamaan elintarvikkeen luonnollista väriä, kuten esimerkiksi virvoitusjuomissa. Tämän lisäksi väriaineita voidaan käyttää värjäämään värittömiä elintarvikkeita, jotta ne olisivat houkuttelevampia kuluttajalle. [1, s. 225 - 226.]

### 2.1 Väriaineita koskeva lainsäädäntö

Atsovärien käyttö elintarvikkeissa kiellettiin Suomessa jo 80-luvulla, mutta EU:hun liittymisen jälkeen ne ovat jälleen sallittuja. Euroopan elintarviketurvallisuusviranomainen EFSA aloitti vuonna 2008 projektin, jonka tarkoituksena on arvioida kaikki EU:ssa käytössä

olevat lisäaineet uudelleen. Projekti lähti liikkeelle elintarvikeväreistä, ja niiden ADI-arvot tullaan arvioimaan uudelleen. Tähän mennessä *kinoliinikeltaisen, paraoranssin, uuskokkiinin, tartratsiinin, karmosiinin* sekä *alluranpunaisen* ADI-arvoja on laskettu alaspäin [2]. *Paraoranssille* annettiin vuonna 2009 väliaikainen ADI-arvo 1 mg/kg/vrk, joka nostettiin arvoon 4 mg/kg/vrk heinäkuussa 2014 [3]. Vuodesta 2008 lähtien on elintarvikkeen pakkausmerkintöihin lisättävä ”voi vaikuttaa haitallisesti lasten aktiivisuustasoon ja heikentää tarkkaavaisuutta”, jos elintarvikkeessa on käytetty *paraoranssia, kinoliinikeltaista, karmosiinia, alluranpunaista, tartratsiinia* tai *uuskokkiinia* [4]. *Red 2g* -elintarvikeväri poistettiin sallittujen värien joukosta vuonna 2007, koska se metaboloituu nopeasti karsinogeeniseksi aniliiniksi [5].

Yhdysvalloissa ei ollut ennen 1900-lukua minkäänlaisia säädöksiä värien käyttöön elintarvikkeissa. Useat tuolloin käytetyistä aineista olivat myrkyllisiä ja johtivat ruokamyrkytykseen. 1900-luvun kuluessa väriaineita tutkittiin tarkemmin ja erinäisiä säädöksiä niiden rajoittamiseen tai kieltämiseen syntyi. [1, s. 226 - 228.] Yhdysvalloissa sallittuja synteettisiä elintarvikevärejä on tällä hetkellä vain seitsemän [6]. Sallittuja ovat myös luonnolliset väriaineet, joista tässä menetelmässä ovat mukana *karmiinihappo* ja *kurkumiini* [7]. *Amarantti*, joka on sallittu EU:ssa, on kielletty Yhdysvalloissa elintarvikekäytössä ja sallittu ainoastaan ulkoisesti lääke- ja meikkiteollisuudessa [8]. Toisin kuin EU:ssa *fast green fcf* on sallittu elintarvikekäytössä Yhdysvalloissa. FDA:n lausunto suositeltavasta synteettisen elintarvikevärin määrästä on seuraavanlainen:

...may be safely used for coloring foods (including dietary supplements) generally in amounts consistent with good manufacturing practice...[6]

FDA ei siis varsinaisesti anna ylärajaa elintarvikevärien käytölle.



















## 2.2 Tutkitut väriaineet

Tutkituista 37:stä väriaineesta 16 on elintarvikekäyttöön sallittuja EU:ssa ja 21 kiellettyjä. Kielletyt väriaineet sisältävät muussa teollisuudessa käytettyjä väriaineita.

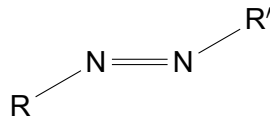
### 2.2.1 Elintarvikevärit

Taulukossa 1 on listattuna työssä tutkitut elintarvikevärit ja niiden E-koodi, väri-indeksi-numero (*Colour Index*), Yhdysvaltojen FDA:n nimitys ja ADI-arvo. Suluissa oleva FDA:n nimitys on käytöstä poistettu väriaine ja sen kieltovuosi. ADI-arvolla tarkoitetaan lisäainemäärää, jonka ihminen voi syödä päivässä ilman terveydellistä haittavaikutusta elämän aikana. ADI-arvo ilmoitetaan milligrammoina painokiloa kohti per vuorokausi [9].

Taulukko 1: Sallitut elintarvikevärit [1, 6, 10, 11, 12]

Väri	Nimi	E-koodi	CI	FDA	ADI-arvo (mg/kg/vrk)
	Alluranpunainen	E129	16035	FD&C Red No. 40	7
	Amarantti	E123	16185	(FD&C Red No. 2, 1976)	0,15
	Briljanttimusta	E151	28440	-	5
	Briljanttisininen	E133	42090	FD&C Blue No. 1	6
	Erytrosiini	E127	45430	FD&C Red No. 3	0,1
	Indigokarmiini	E132	73015	FD&C Blue No. 2	5
	Karmiinihappo	E120	75470	Carmine	5
	Karmosiini	E122	14720	-	4
	Kinoliinikeltainen	E104	47005	-	0,5
	Kurkumiini	E100	75300	Turmeric	3
	Paraoranssi	E110	15985	FD&C Yellow No. 6	4
	Patenttisininen	E131	42051	-	15
	Ruskea HT	E155	20285	-	1,5
	Tartratsiini	E102	19140	FD&C Yellow No. 5	7,5
	Uuskokkiini	E124	16255	-	0,7
	Vihreä S	E142	44090	-	5

Atsovärejä näistä ovat *alluranpunainen*, *amarantti*, *briljanttimusta*, *karmosiini*, *paraoranssi*, *ruskea ht*, *tartratsiini* sekä *uuskokkiini*. Atsovärit saavat nimensä atsoryhmästä (kuva 1), joka myös aiheuttaa atsovärien haitallisuuden. Atsovärien haitallisuus vaihtelee atsovärin rakenteen mukaan. Atsovärit voivat hajota elimistössä atsoryhmän kohdalta muodostaen ihmiselle haitallisia aromaattisia amiineja. [13, s. 75.]
























Kuva 1: Atsoryhmä

## 2.2.2 Kielletyt väriaineet

Taulukossa 2 on listattuna työssä tutkitut väriaineet, joiden käyttö on kielletty elintarvikkeissa EU:ssa. Suluissa oleva FDA:n nimitys on käytöstä poistettu väriaine ja sen kieltovuosi. 2000-luvun alkupuolella Isossa-Britanniassa löydettiin jäämiä kielletystä *sudan I* -väriaineesta. Tämän johdosta EU:n ulkopuolelta tulevilta chili-tuotteilta alettiin vaatia analyysitodistuksia, etteivät ne sisällä kyseistä väriainetta. Vuonna 2005 satunnaisia *sudan I* testejä tehtiin myös palmuöljyä ja kurkumaa sisältäville elintarvikkeille. Ennen kyseisten elintarvikkeiden tuontia EU:n alueelle, täytyi nämä todeta turvallisiksi väriaineiden *sudan I*, *II*, *III* ja *IV* kohdalta. Näihin aikoihin alettiin löytämään myös muita kiellettyjä väriaineita, kuten *para red*, *rhodamine b* ja *orange II*. [14, s. 220 - 225.]

Taulukko 2: Kielletyt väriaineet [1, 6, 10, 15]

Väri	Nimi	E-koodi	CI	FDA
	Acid yellow 36	-	13065	-
	Auramine	-	41000B	-
	Chrysoidine G	-	11270	-
	Fast garnet GBC	-	11160B	-
	Fast green FCF	E143	42053	FD&C Green No. 3
	Oil orange SS	-	12100	(FD&C Orange No. 2, 1956)
	Orange II	-	15510	-
	Para red	-	12070	-
	Red 2 G	E128	18050	-
	Rhodamine B	-	45170	-
	Sudan I	-	12055	-(1918)
	Sudan II	-	12140	(FD&C Red No. 32, 1956)
	Sudan III	-	26100	-
	Sudan IV	-	26105	-
	Sudan orange G	-	11920	-
	Sudan red 7B	-	26050	-
	Sudan red B	-	26110	-
	Sudan red G	-	12150	-
	Sudan yellow	-	11020	-
	Toluidine red	-	12120	-
	Yellow 2 G	-	18965	-

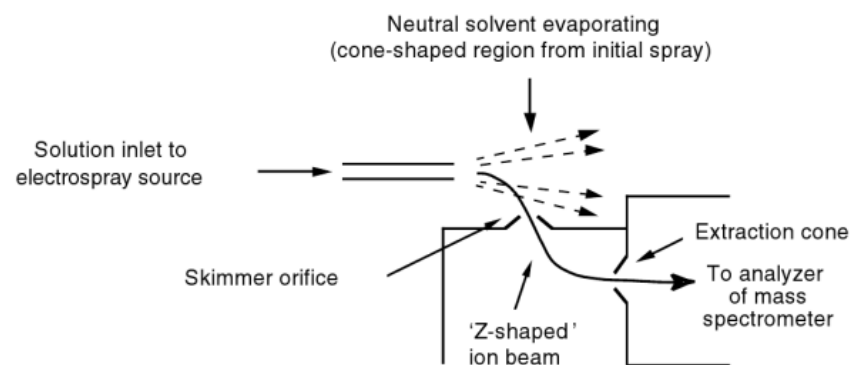
### 3 Analyysitekniikat

Tässä osiossa käydään läpi työssä käytetyt analyysitekniikat.

#### 3.1 LC-MS/MS-tekniikka

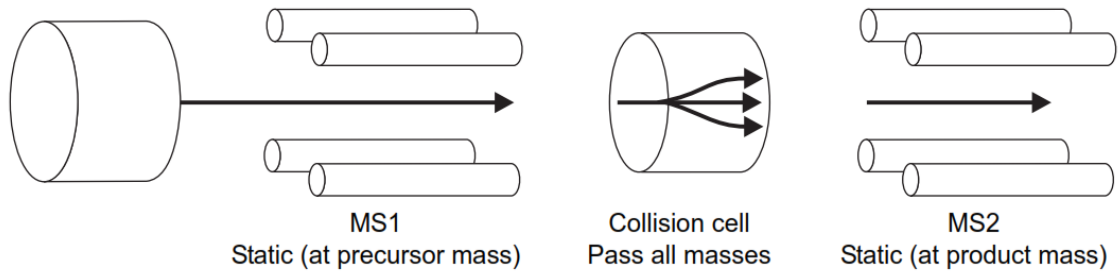
UHPLC-laitteisto parantaa erotuskykyä sekä herkkyyttä verrattuna HPLC-laitteistoon. Tämän takia UHPLC:tä käytetään yleensä massaspektrometrin kanssa ja tällöin usean kvadrupolin kera. UHPLC myös lyhentää menetelmien ajoaikoja huomattavasti. UHPLC rajoittaa kuitenkin käytettävissä olevia eluenteja, koska UHPLC:n erittäin korkea paine voi vaikuttaa niiden käyttäytymiseen liikkuvana faasina. [16, s. 737.]

Sähkösumutusionisaatio (*electrospray ionization*, ESI) on yksi nestekromatografian kanssa käytettävistä ilmanpaineessa tapahtuvista ionisaatiokeinoista (*atmospheric pressure ionization*, API). Sähkösumutusionisaatiossa päästään eroon nestekromatografilta tulevasta liuksesta kuljettamalla se lyhyen teräksisen kapillaarin läpi, jonka päässä on korkea positiivinen tai negatiivinen jännite. Voimakas sähkökenttä kapillaarin päässä aiheuttaa melkein välittömän haihtumisen kapillaarin läpi tulevalle liukselle. Liuksesta muodostuu aerosoli, jonka pisarat pienenevät pienenemistään, kunnes jäljelle jää varautuneita ioneja ja neutraaleja molekyylejä. Varautuneet ionit kulkeutuvat varauksellisen kartion (*skimmer*) läpi massaspektrometrille. Watersin käyttämässä *Z-spray*-tekniikassa ionisuhku muodostaa "Z-muotoisen" kulkureitin, koska normaalista poiketen *skimmer*-kartio ei ole kapillaarin kanssa samansuuntainen, vaan 90 asteen kulmassa kapillaariin nähden. Kuvassa 2 on esitettyä *Z-spray*-ionisaatio. *Z-spray* vähentää neutraalien molekyylien joutumista massaspektrometriin. Sähkösumutusionisaatio tuottaa usein monivarautuneita ioneja, jotka mahdollistavat isojen molekyylien mittaamisen tarkasti. [17, s. 55 - 66.]



Kuva 2: *Z-spray*-ionisaatio [17, s. 66]

Usean reaktion seuranta (*Multiple reaction monitoring*, MRM) on yksi kolmoiskvadrupoliteknikoista (QqQ). MRM:ää käytetään kvantitointiin sekä varmistamiseen. Kuvassa 3 nähdään MRM-tekniikan toimintatapa. Ensimmäinen kvadrupoli (MS1) päästää valitun molekyyli-ionin läpi törmäytyskammioon (*Collision cell*). Törmäytyskammiossa molekyyli-ionista saadaan törmäyttämällä apukaasun kanssa fragmentoitua tuote-ioneja. Saadut tuote-ionit jatkavat matkaa kolmannelle kvadrupolille (MS2), jolla valitaan tuote-ioneista merkittävimmät. Lopulta valitut tuote-ionit päättävät matkansa detektorille. Suurimman vasteen antavaa tuote-ioni käytetään yhdisteen kvantitointiin ja muita saatuja tuote-ioneja varmistamiseen. [18, s. 206 - 207.]



Kuva 3: Usean reaktion seuranta eli MRM

Menetelmän kokonaiskromatogrammi löytyy liitteestä 1. Kromatogrammi ei ole skaalassa eli heikon vasteen antavia analyyttejä on vahvistettu, jotta ne näkyisivät kromatogrammissa. Vesiliukoiset analyytit eluotuvat nopeimmin käytetyllä menetelmällä, koska gradientti alkaa vesipitoisena. Rasvaliukoiset analyytit eluotuvat ajon loppuvaiheilla, kuten kromatogrammista nähdään.

### 3.2 Kiinteäfaasiuutto

Kiinteäfaasiuutto (*solid phase extraction, SPE*) on näytteenkäsittelymenetelmä, jolla saadaan näyte puhdistettua ei-halutuista aineista, analyysiä haittaavista aineista tai matriisiperäisistä epäpuhtauksista. Tämä tapahtuu esimerkiksi uuttopatruunoilla, joiden sorbenttimateriaali pidättää halutut yhdisteet tai päästää ne suoraan läpi patruunasta. [19, s. 99.] Tässä menetelmässä käytettiin Watersin Oasis WAX -uuttopatruunoita, jotka ovat käänteisfaasi/heikko anioninvaihto -patruunoita. Kyseiset patruunat soveltuvat vahvojen happojen pidättämiseen. Uuttomenetelmä perustuu artikkeliin [20], jota käytettiin virvoitusjuomamenetelmän pohjana. Artikkelin uuttomenetelmä on suoraan Watersin kyseisille uuttopatruunoille ohjeistama "Oasis 2x4" -menetelmä [21]. Uuttomenetelmää kuitenkin muutettiin Watersin kaavion mukaisesti, koska osa analyyteistä eluotui liian aikaisin.

## 4 Materiaalit ja menetelmät

Tässä osiossa esitetään käytetyt reagenssit, materiaalit sekä laitteet.

### 4.1 Reagenssit

Menetelmässä käytetyt reagenssit:

- Asetonitrili, VWR Hipersolv 20048.320, lot 13A002845, HPLC-laatu
- Metanoli, Sigma-Aldrich Chromasolv  $\geq 99,9\%$ , lot SZBD011MV, HPLC-laatu
- 25 % Ammoniakki, Merck 1054321000, lot K41851032
- 98-100 % Muurahaishappo, Merck, lot K25132664
- Ammoniumasetaatti, Sigma-Aldrich, 14267-25G
- Väriaineanalyytit (liite 2)

### 4.2 Materiaalit

Menetelmässä käytetyt materiaalit:

- Käänteisfaasi SPE-uuttopatruunoita, Waters Oasis WAX 3 cc Cartridge 60 mg 30  $\mu\text{m}$ , Part 186002490, Lot 014533155A, Sorbent batch 0145
- Sentrifugisuodatinputkia, Millipore Centrifugal Filter Units, Amicon Ultra 0,5 ml, Ultracel – 30K membrane, Lot R1EA80161

### 4.3 Laitteet

Menetelmässä käytetyt laitteet:

- Waters ACQUITY UPLC<sup>®</sup>, nestekromatografi

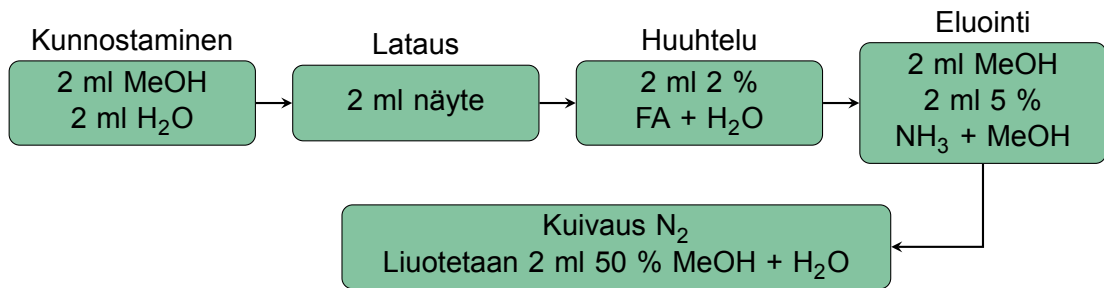
- Kolonni: Waters ACQUITY UPLC<sup>®</sup> HSS T3 1,8 µm, C-18, (2,1 x 100 mm), part 186003539, lot 0144330081
- Esikolonni: Waters ACQUITY UPLC<sup>®</sup> HSS T3 1,8 µm, VanGuard Pre-Column (2,1 x 5 mm), part 186003976, lot 0146331692
- Waters XEVO TQ MS, massadetektor
- Ultraäänihaude
- Supelco Visiprep DL, SPE-kammio
- Pierce Reacti-Vap, typpihaihdutin
- Eppendorf 5810R, sentrifugi
- Eppendorf 5417C, mikrosentrifugi

#### 4.4 Näytteenkäsittely

Näytteenkäsittelyosiossa käsitellään sekä virvoitusjuomamatriisin että maustematriisin näytteenkäsittely. Virvoitusjuomamatriisi esikäsiteltiin SPE-uutolla ja maustematriisi vesi- ja ACN-uutoilla. Asetonitriliuutto on kehitetty ja validoitu Eeva Hietalan toimesta.

##### 4.4.1 Virvoitusjuoma

Virvoitusjuomanäytteistä poistettiin hiilihappo ultraäänihauhteella. SPE-patruunat kunnostettiin 2 ml:lla metanolia sekä 2 ml:lla vettä. Tämän jälkeen patruunaan lisättiin 2 ml näytettä. Näytteen lisäyksen jälkeen patruuna huuhdeltiin 2 ml:lla 2 % muurahaishappoa. Lopulta näyte eluoiitiin patruunasta 2 ml:lla metanolia sekä 2 ml:lla 5 % ammoniakkia metanolissa. Virtaus oli koko kiinteäfaasiuuton ajan alle 1 ml/min. Eluoinnin jälkeen suoritettiin liuottimenvaihto kuivaamalla näyte ensin typpihaihduttimella ja sen jälkeen liuottamalla kuivattu näyte 2 ml:aan 50 % metanoli-vesiseokseen. Kuvassa 4 on esitetty virvoitusjuoman SPE-käsittely.

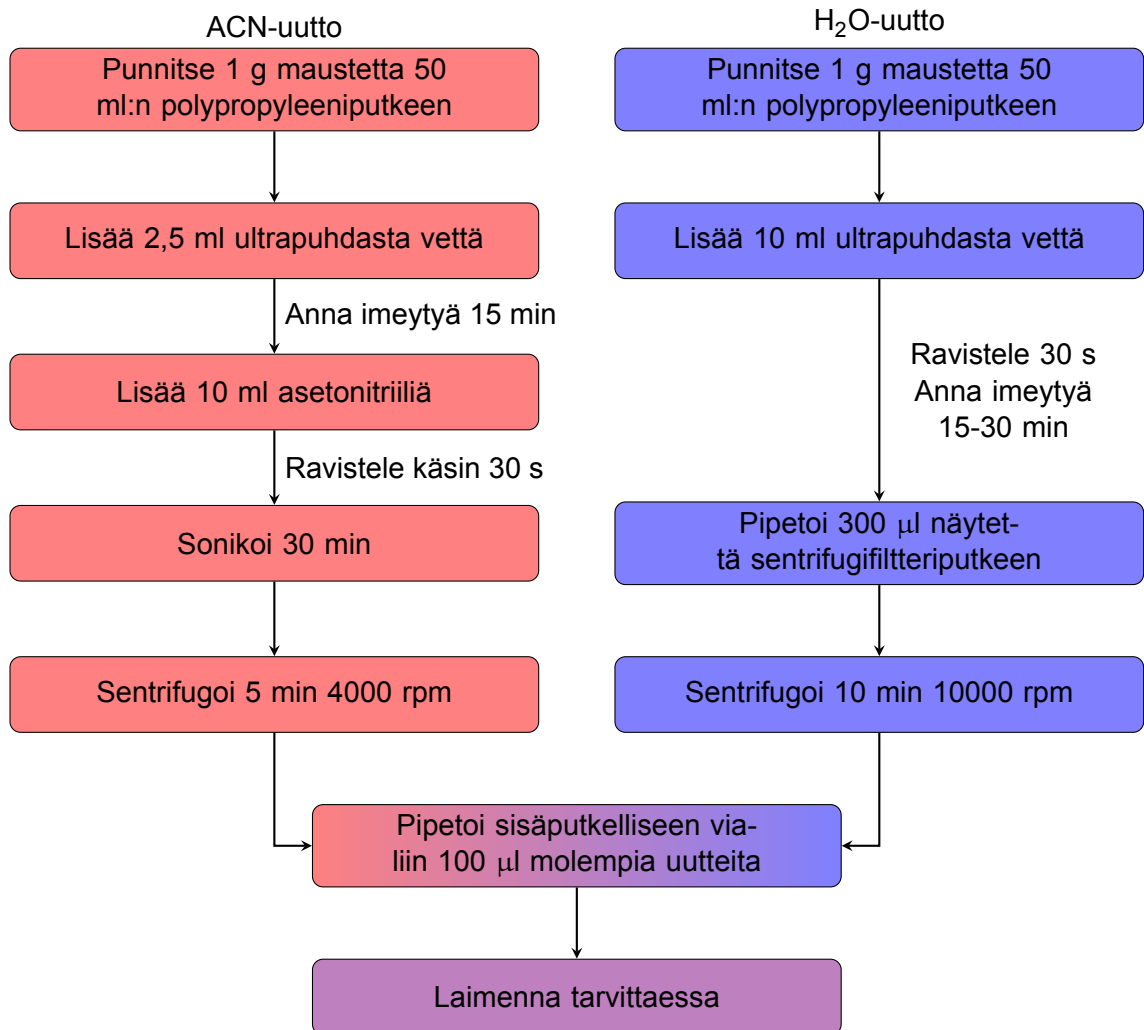


Kuva 4: Käytetty SPE-menetelmä virvoitusjuomamatriisille

#### 4.4.2 Mauste

Maustenäytteelle käytettiin asetonitrili- ja vesiuttoa, jotta saataisiin sekä vesiliukoiset että rasvaliukoiset väriaineet uutettua näytteestä. Asetonitriliuutossa maustetta punnittiin 1 g polypropyleeniputkeen ja putkeen lisättiin 2,5 ml ultrapuhdasta vettä. Mausteen annettiin imeytyä 15 min. Imeytymisen jälkeen lisättiin 10 ml asetonitriliä ja putkea ravistettiin käsin 30 s. Ravistelun jälkeen putkea sonikoitiin 30 min, jotta mahdollisimman paljon väriainetta liukenisi maustematriisista. Sonikoinnin jälkeen putkea sentrifugoitiin 5 min nopeudella 4000 rpm. Vesiutossa punnittiin myös 1 g näytettä polypropyleeniputkeen ja lisättiin 10 ml ultrapuhdasta vettä ja annettiin imeytyä 15 - 30 min. Imeytymisen jälkeen näytettä pipetoitiin sentrifugisuodatinputkeen 300  $\mu$ l ja putkea sentrifugoitiin mikrosentrifugilla 10 min nopeudella 10 000 rpm. Lopulta näytteet yhdistettiin pipetoimalla 100  $\mu$ l uutetta suoraan sisäputkelliseen UHPLC-vialiin. Näytettä laimennettiin, jos näyte oli väriltään todella vahva. Kuvassa 5 on kuvattu sekä asetonitriliuutto että vesiutto maustenäytteille.





Kuva 5: Asetonitrili- sekä vesiuutto maustematriisille

#### 4.5 LC-MS/MS-parametrit

Menetelmässä käytetyt massaparametrit:

- Sisäänmenokartion (*Cone*) ja törmäyskammion (*Collision*) jännite analyysin mukaan (liite 3, punaisella merkitty kvantitointi-ioni)
- Ionilähteen lämpötila 150°C
- Desolvaatio lämpötila 500°C
- Desolvaatiokaasun virtaus 1000 l/h (N<sub>2</sub>)
- Sisäänmenokartion kaasun virtaus 30 l/h (N<sub>2</sub>)
- Törmäyskaasun virtaus 0,15 ml/min (Argon)
- Kolonniuunin lämpötila 45°C
- Näytteesyöttäjä huoneenlämpötilassa

Eluenteina käytettiin 5 mM ammoniumasetaattipuskurin sekä asetonitriilin sekoituksia. Ammoniumasetaattipuskuri sisälsi myös 0,1 % muurahaishappoa. A-eluentti koostui 10 % ACN ja 90 % puskurista ja B-eluentti koostui 90 % ACN ja 10 % puskurista. Eluenteja säilytettiin jääkaapissa ja uusittiin kahden viikon välein tai tarvittaessa. Taulukossa 3 on listattu käytetty gradientti ajon aikana.

Taulukko 3: LC-MS/MS-laitteen gradientti

Aika (min)	Virtaus (ml/min)	A (%)	B (%)
0	0,3	95	5
2	0,3	95	5
10	0,3	50	50
18	0,3	0	100
26	0,3	0	100
28	0,3	90	10
33	0,3	90	10

## 5 Tulokset

Tulokset-osiossa lasketaan ja kootaan yhteen saadut mittaustulokset. Virvoitusjuomamatriisin kohdalla käytössä ei ollut näytteitä, joten kaikki mittaukset tehtiin itsetehdyillä ”spii-  
katuilla” kontrollinäytteillä.

### 5.1 Mittausalue ja lineaarisuus

Mittausaluetta tutkittiin tekemällä väriainestandardit, joista piirrettiin standardisuorat. Standardisuorat löytyvät liitteestä 4. Virvoitusjuomamatriisin kohdalla mitattiin myös matriisiin tehdyt standardit, joiden avulla tutkittiin matriisin vaikutusta lineaarisuuteen. Analyyttien mittausaluetta testattiin välillä 0,005-2 mg/kg. ”Heikkoja” eli pienen vasteen antavia analyyttejä olivat lähinnä vesiliukoiset yhdisteet. ”Vahvoja” eli suuren vasteen antavia analyyttejä olivat rasvaliukoiset. ”Heikkojen” analyyttien mittausalue oli 0,05 - 2 mg/kg ja ”vahvoille” analyyteille mittausalue oli 0,01 - 0,2 mg/kg. Osalle ”heikoista” analyyteistä mittausalue oli 1 - 2 mg/kg määrittämisrajasta johtuen.

## 5.2 Matriisin vaikutus

Matriisin vaikutusta virvoitusjuomamatriisilla tutkittiin tekemällä standardisuorat virvoitusjuomaan ja saatuja standardisuoria verrattiin liuotinsuoriin suorien kulmakertoimia vertaamalla. Suorien kuuluksi olla yhdensuuntaisia, jotta voitaisiin todeta, ettei matriisi vaikuta mittaustuloksiin. Standardisuorat analyysiteille metanolissa, matriisissa ja suodatettuna matriisissa löytyvät liitteestä 4. Laskettiin metanolisuoran ja matriisisuorien kulmakertoimien eroavaisuus, jotka ovat esitettyinä taulukossa 4. Kaikkia väriaineita ei löydy taulukosta, koska niille ei saatu tehtyä virvoitusjuomassa standardisuoria.

Taulukko 4: Virvoitusjuomamatriisin ja metanoliin tehtyjen standardisuorien kulmakertoimien prosentuaalinen ero

Analyytti	Kulmakertoimien ero (%)	
	Matriisi	Matriisi, suodatettu
Acid Yellow 36	19	3
Alluranpunainen	8	1
Briljanttisininen	4	5
Erytrosiini	41	36
Kurkumiini	96	95
Orange II	10	4
Paraoranssi	28	18
Patenttisininen	8	1
Red 2 G	7	2
Tartratsiini	50	25

Mitattiin myös useita rinnakkaisia nollanäytteitä ja tutkittiin, antaako pelkkä matriisi min-käänlaista vastetta millekään analyysille. Nollanäytteinä käytettiin 7UP-virvoitusjuomaa, joka käsiteltiin SPE-utolla samalla tavoin kuin muutkin näytteet. Nollanäytteet eivät antaneet merkittävää vastetta yhdenkään analyysin kohdalla.

## 5.3 Määrittäjäraja

Määrittäjäraja määritettiin mittaamalla viisi rinnakkaista lisäysnäytettä, kunnes saatiin suhteellinen keskihajonta (%RSD) pienemmäksi kuin 30 %. Suhteellinen keskihajonta laskettiin kaavalla (1), jossa  $s$  on näytteiden pinta-alojen keskihajonta ja  $\bar{x}$  on näytteiden

pinta-alojen keskiarvo. Saantoprosentti laskettiin vertaamalla rinnakkaisnäytteen pinta-alaa standardiliuoksen pinta-alaan kaavan (2) mukaisesti. Mukana mittauksissa olivat vain vesiliukoiset väriaineet, koska rasvaliukoiset väriaineet eivät lienneet virvoitusjuomamatriisiin. Taulukossa 5 ovat listattuna lasketut %RSD:t sekä saannot. Saantoprosentti on merkitty viiden rinnakkaisnäytteen keskiarvona.

$$\%RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (1)$$

$$\text{Saanto-\%} = \frac{A_{\text{näyte}}}{A_{\text{std}}} \cdot 100\% \quad (2)$$

Taulukko 5: Vesiliukoisten väriaineiden lisäsnäytteiden %RSD sekä Saanto-%

Analyytti	Pitoisuus (mg/kg)	%RSD	Saanto-%
Acid Yellow 36	0,05	26,0	108,2
Alluranpunainen, ESI+	0,05	10,5	74,6
Amarantti, ESI+	0,5	18,4	84,9
Briljanttisininen	0,05	6,8	99,9
Erytrosiini	0,05	13,2	41,1
Fast garnet GBC	0,05	7,6	81,6
Fast green FCF	1	39,2	105,1
Indigokarmiini	0,5	16,6	89,1
Karmiinihappo	0,5	17,9	115,8
Karmosiini, ESI-	1	38,3	48,2
Kinoliinikeltainen, ESI+	1	54,5	-
Kurkumiini	0,05	16,7	213,4
Orange II	0,05	4,9	95,3
Paraoranssi, ESI-	0,5	20,7	54,1
Patenttisininen, ESI+	0,05	1,1	91,8
Red 2G, ESI+	0,05	6,8	90,0
Rhodamine B	0,05	1,4	96,0
Sudan orange G	0,5	18,8	20,1
Tartratsiini, ESI+	0,05	11,2	79,3
Uuskokkiini, ESI+	0,5	16,7	53,4
Vihreä S	1	28,0	82,0
Yellow 2 G	1	72,6	42,8

#### 5.4 Standardien säilyvyys

Standardien säilyvyyttä tutkittiin mittaamalla jokaisella mittauskerralla sama standardiliuos ja mittauksen tuloksia taulukoitiin ja laskettiin eri muuttujille suhteellinen keskihajonta. Mittauksia on ajalta 28.08.2013 - 23.10.2013 ja mittauksia on yhteensä 14 kpl. Taulukko tuloksista löytyy liitteestä 5. Samalla tutkittiin eri analyyttien retentioaikojen vaihtelua.

#### 5.5 Tarkkuus

Tarkkuus jakautuu oikeellisuuteen ja täsmällisyyteen. Oikeellisuutta kuvaa, kuinka lähellä mittaustulokset ovat oikeaa pitoisuutta ja täsmällisyys kuvaa, kuinka paljon hajontaa on mittaustulosten välillä. Tarkkuutta tutkittiin mittaamalla itse tehtyjä kontrollinäytteitä kolmella eri pitoisuustasolla. Varmennettuja vertailumateriaaleja ei ollut käytettävissä. Kontrollinäytteet tehtiin näytematriisiin ja toistoja tehtiin neljä jokaisella pitoisuudella. Laskettiin toistojen välinen keskihajonta sekä keskiarvo, joiden avulla määritettiin suhteellinen keskihajonta. Analyytit jaettiin kolmeen eri ryhmään, koska osalle analyyteistä tarvittiin suurempi pitoisuus kuin toiselle. Ryhmät olivat "matala" (0,05 - 0,2 mg/kg), "keski" (0,5 - 1 mg/kg) ja "korkea" (1 - 2 mg/kg). Taulukossa 6 on havainnollistettu eri pitoisuusryhmät ja varsinaiset tulokset ovat taulukoituina liitteessä 6. Taulukossa 7 on tarkkuutta kuvaavat saantoprosentit.

Taulukko 6: Pitoisuustasot sekä analyyttiryhmät

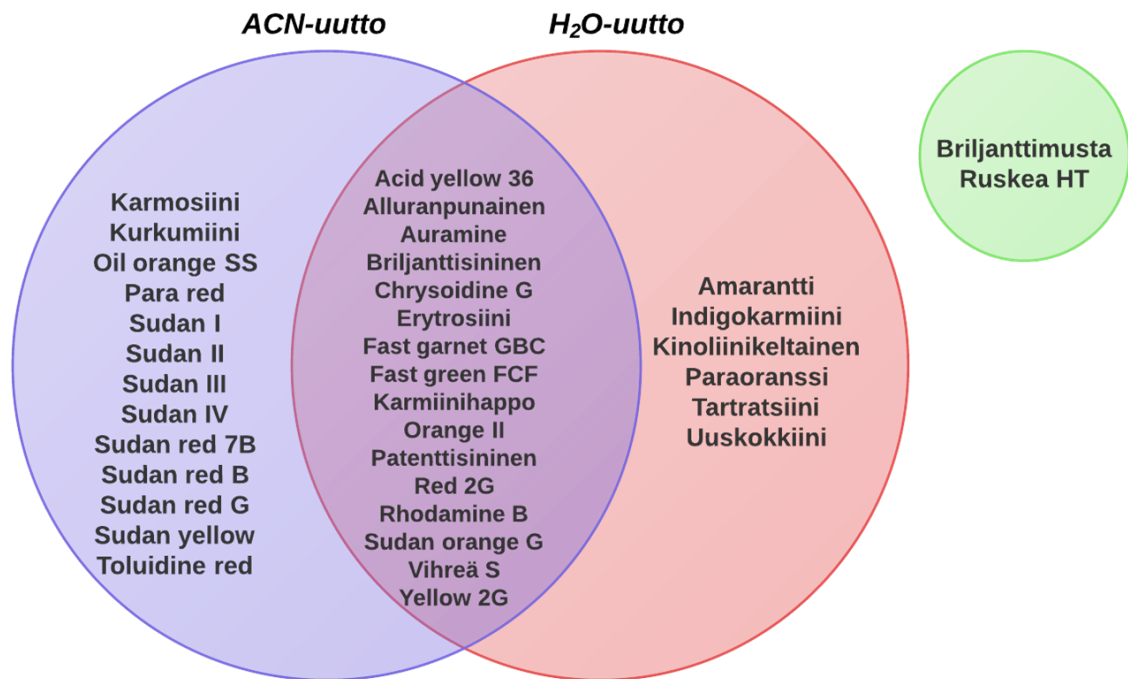
Taso	Pitoisuus (mg/kg)		
	"Matala"	"Keski"	"Korkea"
1	0,05	0,5	1
2	0,1	0,75	1,5
3	0,2	1	2

Taulukko 7: Tarkkuutta kuvaavat saantoprosentit

Analyytti	Saanto-%		
	Taso 1	Taso 2	Taso 3
Acid yellow 36	76,8	73,2	80,4
Alluranpunainen , ESI+	62,7	77,8	104,4
Alluranpunainen, ESI-	96,2	171,8	76,8
Amarantti, ESI+	77,9	71,0	91,3
Amarantti, ESI-	358,8	136,9	168,8
Auramine	107,0	98,8	104,4
Briljanttisininen FCF	57,2	65,2	87,8
Chrysoidine G	11,0	8,0	16,6
Erytrosiini	32,0	33,6	51,8
Fast garnet GBC	50,4	63,3	84,6
Fast green FCF	84,9	78,1	85,1
Indigokarmiini	43,1	36,1	45,6
Karmiinihappo	86,0	81,3	38,3
Karmosiini, ESI+	2169,6	902,1	1100,5
Karmosiini, ESI-	38,6	65,0	68,7
Kinoliinikeltainen, ESI+	66,2	26,8	8,0
Kurkumiini	102,2	65,6	57,1
Orange II	101,6	82,3	87,4
Paraoranssi, ESI-	96,3	86,1	94,6
Patenttisininen, ESI+	92,3	82,3	90,0
Patenttisininen, ESI-	82,0	93,7	91,0
Red 2G, ESI+	91,3	80,8	94,8
Red 2G, ESI-	72,9	68,1	85,7
Rhodamine B	92,6	84,8	94,0
Sudan orange G	8,1	9,7	11,5
Tartratsiini, ESI+	68,7	62,2	84,1
Tartratsiini, ESI-	821,0	1650,0	6082,7
Uuskokkiini, ESI+	82,0	89,4	102,5
Vihreä S	85,6	73,7	75,1
Yellow 2G	68,1	165,7	154,7

## 5.6 Mitattuja maustenäytteitä

Maustemenetelmää jatkokehitettiin vesiliukoisten väriaineiden osalta. Useasta maustenäytteestä löydettiin väriaineita, jotka löytyivät myös jo olemassa olevilla menetelmillä. Tehtiin myös spiikattu maustenäyte valvontanäytteestä, josta ei ollut havaittu yhtään väriainetta. Spiikatun maustenäytteen avulla saatiin todettua toimiiko uusi vesiuuttomenetelmä maustenäytteille. Kuvassa 6 on esitettyinä kaikki mausteautoilla tunnistetut väriaineet. Ulkopuolisessa vihreässä ympyrässä ovat väriaineet, joille ei ole luotettavasti toimivia MS-parametrejä eli niiden uuttumisesta ei ole varmuutta.



Kuva 6: Väriaineiden uuttuminen maustematriisissa

## 6 Pohdinta

Menetelmälle saatu mittausalue on suurimmalle osalle analyteistä sopiva. Muutamalle analyyttille tarvittaisiin huomattavasti vahvempia standardeja. Lineaarinen regressio sopii suorien perusteella analyteille. *Fast green fcf:n* kohdalla suoran kulmakerroin vaihtelee huomattavasti riippuen päivästä. *Kinoliinikeltaisen* suorat ovat todella huonoja johtuen analyytin useasta eri muodosta ja tästä johtuvasta haastavasta integroinnista. *Kinoliinikeltaisen* pitoisuuden olisi pitänyt olla huomattavasti suurempi. *Kurkumiinillä* on erikoisesti ensimmäinen standardisuora lineaarisen sijaan polynominen. Tämän voi olettaa johtuvan *kurkumiinin* hajoamisesta, koska tämän jälkeen valmistettiin uudet standardiliuokset. *Sudan III:n* viimeiset suorat ovat huonoja, koska kyseinen analyytti hävisi työn loppumetreillä kokonaan omalta retentioajaltaan eikä tälle keksitty minkäänlaista syytä. *Yellow 2g:n* suorat eivät ole kovinkaan yhdensuuntaisia johtuen analyytin pinta-alan suuresta vaihtelevuudesta mittausten välillä.

Matriisi vaikuttaa huomattavasti suurimpaan osaan analyyteistä virvoitusjuomamatriisissa. Kulmakertoimien prosentuaaliseksi eroksi haluttiin alle 5 %, jotta voitaisiin todeta että matriisi ei vaikuta mittauksiin. Suodattamattomista analyyteistä ainoastaan *briljanttisininen* saavutti tämän. Suodatettuna tämän saavuttivat *acid yellow 36*, *alluranpunainen*, *briljanttisininen*, *orange II*, *patenttisininen* ja *red 2g*. Suodattamisen huonona puolena on kuitenkin joidenkin analyyttien jääminen suodattimeen. Tulokset ovat vain yhdeltä päivältä ja näiden mittausten jälkeen menetelmässä muutettiin useaa parametriä ja jopa näytteenkäsittelyä.

Suurimmalla osalla analyyteistä saatiin suhteellinen keskihajonta (%RSD) alle 30 % ja tämä pitoisuus otettiin määritysrajaksi. Parhaimmillaan %RSD oli 1,1 % *patenttisinisellä*. Määritysrajaa ei saatu määritettyä *fast green fcf:lle*, *karmosiinille*, *kinoliinikeltaiselle* eikä *yellow 2g:lle*. Kyseisille analyyteille tarvittaisiin todennäköisesti vielä suurempaa pitoisuutta. Saannot määritysrajatesteissä olivat väliltä 20,1 - 115,8 %. Saantokokeiden vertailussa käytettiin metanoliin tehtyjä standardeja, joka voi selittää hunoimmat saannot. Parempia saanto-% varten standardiliuokset pitäisi tehdä virvoitusjuomamatriisiin. Kurkumiinin saantoprosentti oli yli 200 %, joka johtuu käytetystä vanhasta standardivälilaimennoksesta, koska *kurkumiinin* on todettu hajoavan ajan kuluessa.

Standardien säilyvyytulosten perusteella suurimmat vaihtelut analyyttien vasteessa olivat muutenkin ongelmallisilla analyyteillä tai negatiivisella (ESI-) puolella, joita käytettiin lähinnä analyyttien tunnistamiseen, muutamaa poikkeusta lukuunottamatta. Retentioaikojen vaihtelu analyyteillä oli yllättävän pientä, suurimmillaan 7,3 % ja sekin *amarantilla* (ESI-). Suurta vaihtelua pinta-aloissa oli *fast green fcf:llä*, *vihreä s:llä* ja *Yellow 2g:llä*, jotka viimeisimmissä mittauksissa saivat huomattavasti suurempia vasteita kuin ensimmäisissä. Tunnetusti hajoava yhdiste *indigokarmiini* ei tulosten perusteella ehtinyt tällä aikavälillä huomattavasti hajoamaan vaikka vasteen vaihtelu olikin suurehkoa. Indigokarmiinille jouduttiin työn aikana kuitenkin tekemään uusi kantaliuos. *Kinoliinikeltaisen* osalta vaihtelu oli merkittävää, eikä jokaiselle päivälle saatu edes tulosta. *Kurkumiinin* on epäilty hajoavan ajan myötä ja tulokset tukevat tätä päätelmää. *Kurkumiinin* pinta-ala on pudonnut n. 100 000:sta n. 30 000:een ja korkeus suunnilleen saman verran.



Tarkkuusmääritykset saatiin tehtyä vain yhtenä päivänä ajanpuutteen vuoksi, joten voidaan vertailla vain samana päivänä (*intra-day*) mitattujen rinnakkaisten näytteiden tuloksia. Suhteellinen keskihajonta näytteiden välillä oli 1,2 - 88,8 %. Suhteellinen keskihajonta oli huomattavasti suurempi pienillä pitoisuuksilla kuin suurilla. Keskimäärin suhteellinen keskihajonta oli n. 20 %. Saannot näille testeille olivat välillä 8,0 - 165,7 %. Saannot olivat kuitenkin keskimäärin n. 70 %. Saantojen vaihtelu johtuu todennäköisimmin käytetyistä standardiliuoksista, koska niitä ei oltu tehty matriisiin. Matriisilla on todettu olevan vasteeseen vähentävä vaikutus. Erityisesti matriisiefekti vaikuttaa *chrysoidine g-* ja *sudan orange g -*väriaineisiin.

Taulukosta 8 nähdään tiivistelmä saaduista tuloksista. Liitteestä 7 löytyy työn aikana löydettyjä havaintoja analyttien käyttäytymisestä.

Taulukko 8: Tiivistelmä virvoitusjuomamatriisin tuloksista

Analyytti	Lineaarisuus, liuotin	Lineaarisuus, matriisi	Määrittys- raja	Tarkkuus
Acid Yellow 36	✓	✓	✓	✓
Alluranpunainen	✓	✓	✓	✓
Amarantti	✓	✗	✓	✓
Auramine	✓	✗	✗	✓
Briljanttimusta	✗	✗	✗	✗
Briljanttisininen	✓	✓	✓	✓
Chrysoidine G	✓	✗	✗	✗
Erytrosiini	✓	✓	✓	✚
Fast garnet GBC	✓	✗	✓	✓
Fast green FCF	✓	✗	✚	✚
Indigokarmiini	✓	✗	✓	✚
Karmiinihappo	✓	✗	✓	✗
Karmosiini	✓	✗	✚	✚
Kinoliinikeltainen	✗	✗	✗	✗
Kurkumiini	✓	✓	✓	✓
Oil orange SS	✓	✗	✗	✗
Orange II	✓	✓	✓	✓
Paraoranssi	✓	✓	✓	✓
Para Red	✓	✗	✗	✗
Patenttisininen	✓	✓	✓	✓
Red 2G	✓	✓	✓	✓
Rhodamine B	✓	✗	✓	✓
Ruskea HT	✚	✗	✗	✗
Sudan I	✓	✗	✗	✗
Sudan II	✓	✗	✗	✗
Sudan III	✓	✗	✗	✗
Sudan IV	✓	✗	✗	✗
Sudan orange G	✓	✗	✓	✗
Sudan red 7B	✓	✗	✗	✗
Sudan red B	✓	✗	✗	✗
Sudan red G	✓	✗	✗	✗
Sudan yellow	✓	✗	✗	✗
Tartratsiini	✓	✓	✓	✓
Toluidine red	✓	✗	✗	✗
Uuskokkiini	✓	✗	✓	✓
Vihreä S	✓	✗	✓	✚
Yellow 2 G	✚	✗	✚	✚

✓: tulos ok, ✗: ei tulosta, ✚: kohtalainen tulos

## 7 Päätelmät

Tässä opinnäytetyössä oli tarkoitus kehittää uutta analyysimenetelmää väriaineiden tunnistamiseen elintarvikkeista. Tavoitteena oli validoida menetelmä virvoitusjuomamatriisille sekä kehittää analytiikkaa vesiliukoisille väriaineille maustematriisista. Virvoitusjuomamatriisin validointi jäi hieman vajaaksi ajanpuutteen vuoksi, mutta huomattavaa edistystä menetelmän parissa tehtiin. Maustematriisin osalta ehdittiin kehittää luotettavalta vaikuttava esikäsittelymenetelmä vesiliukoisille väriaineille.

Virvoitusjuomien osalta menetelmällä saatiin määritettyä vesiliukoisia väriaineita luotettavasti. Matriisi vaikuttaa suunnattoman paljon eri analyytteihin, joten kvantitatiivisia tuloksia varten menetelmässä on pakko käyttää standardiliuoksia, jotka on tehty matriisiin. Haittapuolena tässä on näytteenkäsittelyn ajankulutus. Näytteenkäsittelyyn jouduttiin vauraamaan yllättävän paljon aikaa. SPE-utto itsessään on nopea suorittaa, varsinkin kun näytteille ei tarvinnut käyttää alipainetta virtauksen saamiseksi. Hidasteeksi osoittautui uuton jälkeinen liuottimen vaihtaminen typpikuivauksella. Kuivaukseen kului vähintään kaksi tuntia aikaa ja vielä kauemmin, jos näytteitä oli enemmän kuin kuivauslaitteen kapasiteetti. Virvoitusjuoman matriisiefektiä tulisi tutkia vielä tarkemmin, koska tässä työssä ehdittiin tehdä matriisipohjaiset standardit analyyteille vain työn alkuvaiheilla ja tämän jälkeen menetelmää muutettiin.

Virvoitusjuomamatriisin tulokset eroavat huomattavasti menetelmän pohjana käytetyn artikkelin tuloksista. Artikkelissa analyyteille saatiin pienemmät määritysrajat. Tämä kuitenkin selittyy artikkelin menetelmässä käytetystä *Orbitrap*-massaspektrometrillä, joka on kolmoiskvadrupolia herkempi. Artikkelissa oli mukana vain 11 vesiliukoista väriainetta, joista tässä menetelmässä olivat mukana *yellow 2g*, *karmosiini*, *orange II* ja *acid yellow 36*. [20]

Maustematriisille saatiin kehitettyä erittäin helppo ja nopea uutto vesiliukoisille analyyteille, mikä täydentää asetonitriiliuuttoa. Jatkoa varten pitäisi vielä pohtia, miten saadaan yhdistelmäuute kvantitoitua ja kuinka hyvin kyseiset uutot toimivat keskenään, vai joudutaanko ne kuitenkin ajamaan erikseen.

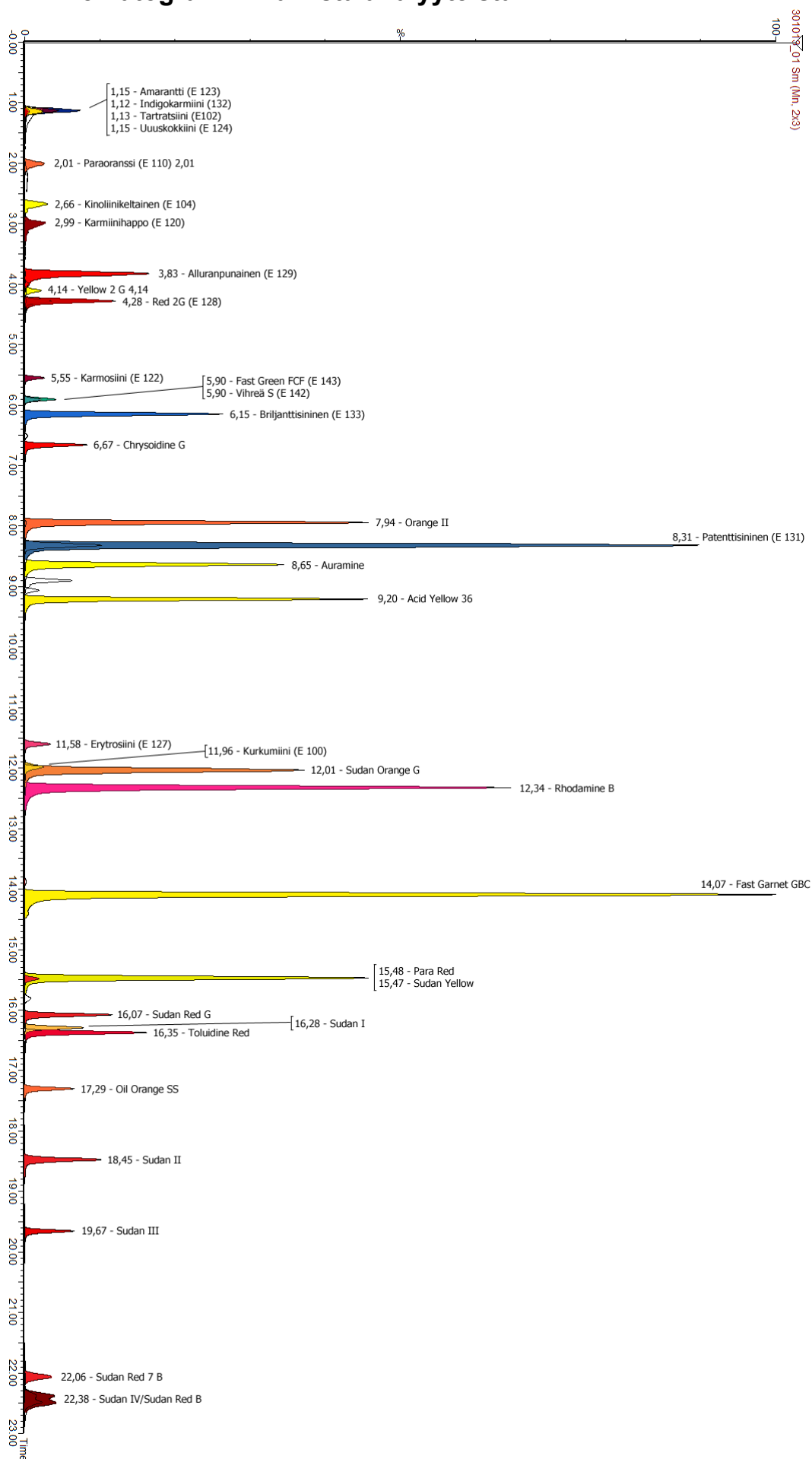
Menetelmän suurimmat ongelmat analyyttien kohdalla on vesiliukoisimpien ja rasvaliukoisimpien kanssa, kuten liitteestä 7 nähdään. *Uuskokkiinia* ja *amaranttia* ei pystytty erottamaan toisistaan, johtuen analyyttien samankaltaisesta rakenteesta. *Sudan IV-* ja *sudan red b* -väriaineiden kohdalla ongelmaksi ilmeni kaksoispiikki ajon loppupäässä, mistä ei tiedetä kumpi piikeistä on kumpi väriaine. Ongelman pystyisi todennäköisesti ratkaisemaan ajamalla kummallekin väriaineelle oma standardi ja tutkimaan näiden retentioajat. Ongelmaksi jäisi silti kaksoispiikin kvantitoiminen luotettavasti. *Briljanttimustan* ja *ruskea ht:n* ongelmiksi jäi puuttuvat toimivat massaparametrit, mutta työn loppumetreillä *ruskea ht:lle* saatiin löydettyä jonkinlaiset uudet parametrit, jotka tarvitsevat lisää tutkimista.

## Lähteet

- 1 Deshpande SS. Handbook of Food Toxicology. Food Science and Technology. Taylor & Francis; 2002. Saatavilla:  
<http://books.google.fi/books?id=Ex5QNL0-UkMC> [viitattu 29.11.2014].
- 2 Food Colours. European Food Safety Authority; 2008. Saatavilla:  
<http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/foodcolours.htm> [päivitetty 15.7.2014; viitattu 28.11.2014].
- 3 Reconsideration of the temporary ADI and refined exposure assessment for Sunset Yellow FCF (E 110). European Food Safety Authority; 2014. Saatavilla:  
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3765.pdf> [viitattu 28.11.2014].
- 4 Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1333/2008, elintarvikelisiä aineista. Euroopan yhteisöjen virallinen lehti; 2008. Saatavilla:  
<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FI/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R1333> [viitattu 28.11.2014].
- 5 Komission asetus (EY) N:o 884/2007, kiireellisistä toimenpiteistä elintarvikväriaineen E 128 Punainen 2G käytön keskeyttämiseksi. European Food Safety Authority; 2007. Saatavilla: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FI/TXT/PDF/?uri=CELEX:32007R0884> [viitattu 28.11.2014].
- 6 Listing of color additives subject to certification. Food and Drug Administration; 2014. Saatavilla: <http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=1f7565fb34de47823c4a2b4f411815cb&node=pt21.1.74&rgn=div5> [viitattu 28.11.2014].
- 7 Listing of color additives exempt from certification. Food and Drug Administration; 2014. Saatavilla: <http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=fe844db17ab752a0eacd8c794c0eff95&node=pt21.1.73&rgn=div5> [viitattu 28.11.2014].
- 8 Listing of certified provisionally listed colors and specifications. Food and Drug Administration; 2014. Saatavilla: [http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=1f7565fb34de47823c4a2b4f411815cb&node=pt21.1.82&rgn=div5#se21.1.82\\_1304](http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=1f7565fb34de47823c4a2b4f411815cb&node=pt21.1.82&rgn=div5#se21.1.82_1304) [viitattu 28.11.2014].
- 9 Principles for the safety assessment of food additives and contaminants in food. World Health Organization; 1987. Saatavilla:  
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc70.htm> [viitattu 01.12.2014].
- 10 Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 94/36/EY, elintarvikkeissa käytettäväksi tarkoitetuista väriaineista. Euroopan yhteisöjen virallinen lehti;

1994. Saatavilla: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FI/TXT/PDF/?uri=CELEX:31994L0036> [viitattu 28.11.2014].
- 11 Register of Questions, Mandate M-2008-0019. European Food Safety Authority; 2008. Saatavilla: <http://registerofquestions.efsa.europa.eu/raw-war/mandateLoader?mandate=M-2008-0019> [viitattu 28.11.2014].
- 12 Long-term dietary exposure to different food colours in young children living in different European countries. European Food Safety Authority; 2010. Saatavilla: <http://www.efsa.europa.eu/en/search/doc/53e.pdf> [viitattu 28.11.2014].
- 13 Hutzinger O. The Handbook of Environmental Chemistry. No. nid. 9 in The Handbook of Environmental Chemistry. Springer-Verlag; 1980. Saatavilla: <https://books.google.fi/books?id=d6tRMXS-cqoC> [viitattu 29.11.2014].
- 14 Doeg C. Crisis Management in the Food and Drinks Industry: A Practical Approach. Practical Approaches to Food Control and Food Quality Series. Springer; 2006. Saatavilla: <https://books.google.fi/books?id=XYlpwF4TPt0C> [viitattu 29.11.2014].
- 15 Colour Index Database. Zhejiang NetSun Co., Ltd.; Saatavilla: <http://www.chemnet.com/resource/colour/> [viitattu 28.11.2014].
- 16 Nollet LML, Toldra F. Food Analysis by HPLC, Third Edition. Food science and technology. Taylor & Francis; 2012. Saatavilla: <https://books.google.fi/books?id=yBEeEqzGCnsC> [viitattu 28.11.2014].
- 17 Herbert CG, Johnstone RAW. Mass Spectrometry Basics; 2002. Saatavilla: <https://books.google.fi/books?id=983ZkPwXXNYC> [viitattu 29.11.2014].
- 18 Wang J, MacNeil JD, Kay JF. Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food. Wiley Series on Mass Spectrometry; 2011. Saatavilla: <https://books.google.fi/books?id=a-nC7Eg06UAC> [viitattu 01.12.2014].
- 19 Suomi J. Kemiällisen näytteen esikäsittely. Otava; 2009.
- 20 Liu X, Yang JL, Li JH, Li XL, Li J, Lu XY, et al. Analysis of water-soluble azo dyes in soft drinks by high resolution UPLC–MS. Food Additives & Contaminants: Part A. 2011;28(10):1315–1323. PMID: 22007886. Saatavilla: <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2011.604795> [viitattu 01.12.2014].
- 21 Oasis Sample Extraction Products. Waters Corporation; 2014. Saatavilla: [http://www.waters.com/waters/en\\_US/Oasis-Sample-Extraction-Products/nav.htm?cid=513209](http://www.waters.com/waters/en_US/Oasis-Sample-Extraction-Products/nav.htm?cid=513209) [viitattu 01.12.2014].

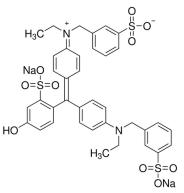
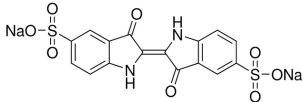
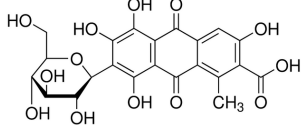
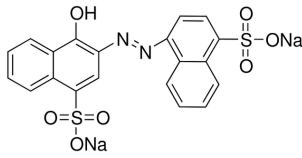
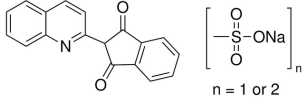
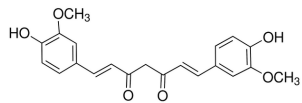
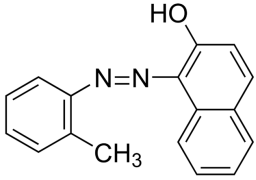
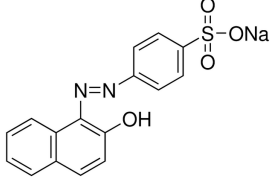
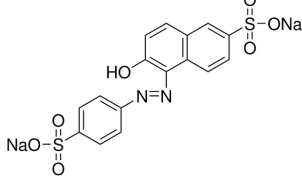
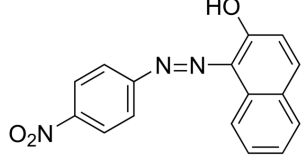
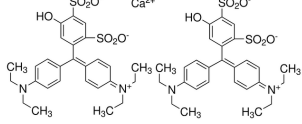
# 1 Kromatogrammi kaikista analyyteistä



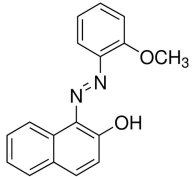
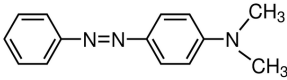
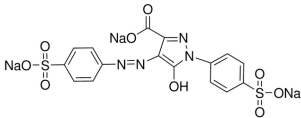
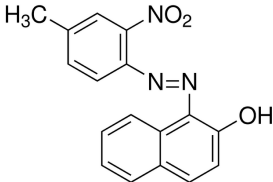
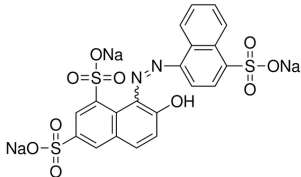
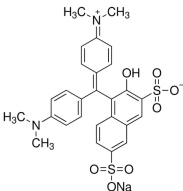
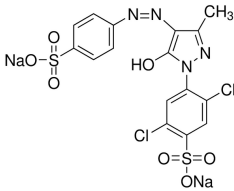
## 2 Väriaineanalyytit

CAS	Nimi	Kaava	Valmistaja	Erä#	Puhtaus (%)
587-98-4	Acid Yellow 36		Dr. Ehrenstorfer GmbH	81203	99
25956-17-6	Alluranpunainen		Dr. Ehrenstorfer GmbH	80917	83
915-67-3	Amarantti		Dr. Ehrenstorfer GmbH	20306	99
492-80-8	Auramine		Sigma-Aldrich	1399697V	97,2
2519-30-4	Briljanttimusta		Dr. Ehrenstorfer GmbH	70830	99
3844-45-9	Briljanttisininen		Dr. Ehrenstorfer GmbH	20118	85
532-82-1	Chrysoidine G		Cunnersdorf	771194	98,1
16423-68-0	Erytrosiini		Dr. Ehrenstorfer GmbH	91209	88
97-56-3	Fast garnet GBC		Sigma-Aldrich	MKBJ7135V	97



CAS	Nimi	Kaava	Valmistaja	Erä#	Puhtaus (%)
2353-45-9	Fast green FCF		Dr. Ehrenstorfer GmbH	90406	96
860-22-0	Indigokarmiini		Dr. Ehrenstorfer GmbH	10825	92
1260-17-9	Karmiinihappo		Dr. Ehrenstorfer GmbH	90717	98,5
3567-69-9	Karmosiini		Dr. Ehrenstorfer GmbH	10504	99
8004-92-0	Kinoliinikeltainen		Dr. Ehrenstorfer GmbH	01124	97,1
458-37-7	Kurkumiini		Dr. Ehrenstorfer GmbH	11128	95
2646-17-5	Oil orange SS		Sigma-Aldrich	1405477V	98,7
633-96-5	Orange II		Dr. Ehrenstorfer GmbH	00312	96,2
2783-94-0	Paraoranssi		Dr. Ehrenstorfer GmbH	91001	87
6410-10-2	Para Red		Dr. Ehrenstorfer GmbH	01119	98
3536-49-0	Patenttisinen		Sigma-Aldrich	BCBD1139V	97,6

CAS	Nimi	Kaava	Valmistaja	Erä#	Puhtaus (%)
3734-67-6	Red 2G		Dr. Ehrenstorfer GmbH	70830	90,0
81-88-9	Rhodamine B		Dr. Ehrenstorfer GmbH	10221	99
4553-89-3	Ruskea HT		Dr. Ehrenstorfer GmbH	91120	100
842-07-9	Sudan I		Dr. Ehrenstorfer GmbH	90827	91
3118-97-6	Sudan II		Dr. Ehrenstorfer GmbH	10615	87
85-86-9	Sudan III		Dr. Ehrenstorfer GmbH	00421	96
85-83-6	Sudan IV		Dr. Ehrenstorfer GmbH	91102	87
2051-85-6	Sudan orange G		Dr. Ehrenstorfer GmbH	20124	98,6
6368-72-5	Sudan red 7B		Dr. Ehrenstorfer GmbH	00118	89
3176-79-2	Sudan red B		Dr. Ehrenstorfer GmbH	00208	90

CAS	Nimi	Kaava	Valmistaja	Erä#	Puhtaus (%)
1229-55-6	Sudan red G		Dr. Ehrenstorfer GmbH	00118	93,5
60-11-7	Sudan yellow		Dr. Ehrenstorfer GmbH	00629	98,5
1934-21-0	Tartratsiini		Dr. Ehrenstorfer GmbH	90813	90
2425-85-6	Toluidine red		Dr. Ehrenstorfer GmbH	10127	68
2611-82-7	Uuskokkiini		Dr. Ehrenstorfer GmbH	91120	70
3087-16-9	Vihreä S		Sigma-Aldrich	BCBG0492V	98,5
6359-98-4	Yellow 2G		Sigma-Aldrich	BCBF5073V	98,2

## 3 Analyyttien MS-parametrit

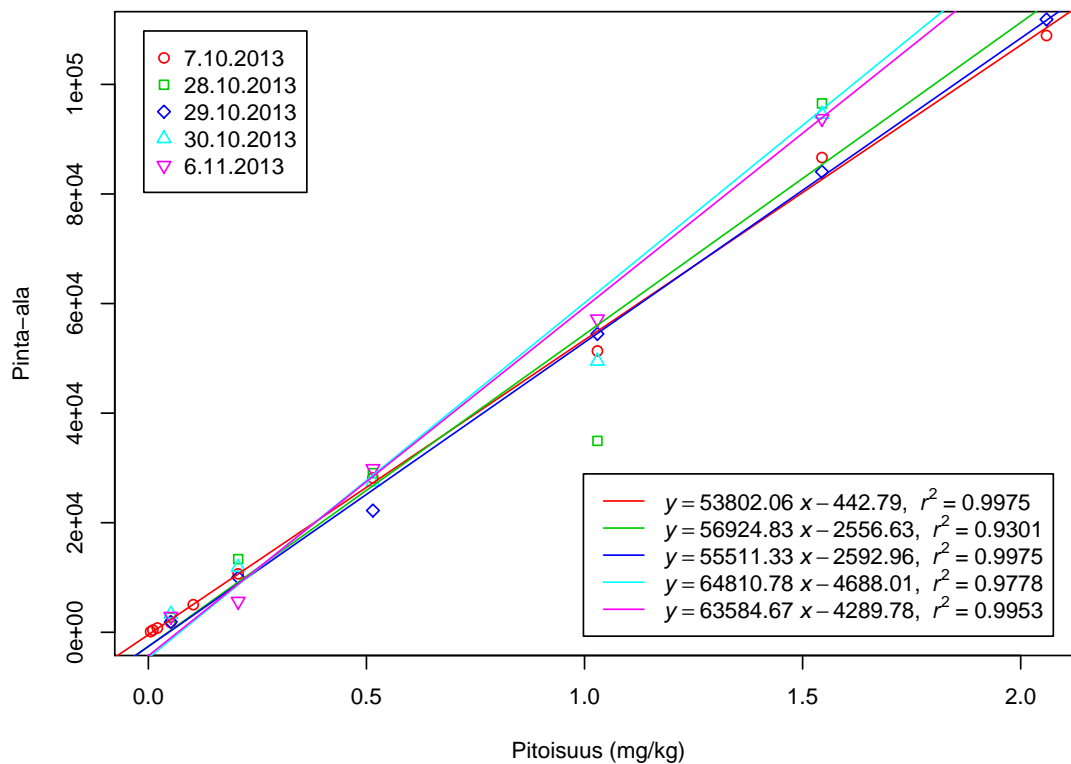
Nimi	Molekyyli- ioni (m/z)	Tuote- ioni (m/z)	Cone (V)	Törmäytys- energia (eV)	Ioni- saatio	$t_R$ (min)	
Acid yellow 36	353,80	109,00	42	28	ESI+	9,21	
		156,91		24	ESI+		
		168,81		28	ESI+		
Alluranpunainen	453,16	217,09	28	28	ESI+	3,88	
		451,2		50	33		ESI-
		371,1		25	ESI-		
Amarantti/ Uuskokkiini	539,03	223,07	34	24	ESI+	1,15	
		348,04		36	ESI+		
		(537,2)		50	28		ESI-
Auramine	268,16	(317,00)	48	27	ESI-	8,67	
		(457,10)		26	ESI+		
		122,04		46	ESI+		
Briljanttimusta	410,70	131,09	34	28	ESI+		
		147,06		30	ESI-		
		156,00		40	ESI-		
Briljanttisininen	749,22	185,00	74	54	ESI+	6,17	
		171,00		74	ESI+		
		284,23		74	ESI+		
Chrysoidine G	212,9	77,0	27	19	ESI+	6,70	
		121,0		21	ESI+		
		200,88		66	70		ESI+
Erytrosiini	836,67	329,11	66	58	ESI+	11,60	
		582,96		50	ESI+		
		91,01		34	22		ESI+
Fast garnet GBC	226,10	91,33	34	38	ESI+	14,11	
		106,98		20	ESI+		
		169,71		64	70		ESI+
Fast green FCF	764,71	170,89	70	58	ESI+	5,92	
		287,84		70	56		ESI-
		205,02		54	56		ESI+
Indigokarmiini	422,90	249,04	54	40	ESI+	1,12	
		341,98		30	ESI+		
		298,25		36	38		ESI-
Karmiinihappo	490,78	326,71	36	26	ESI-	3,08	
		356,69		24	ESI-		
		133,06		38	20		ESI+
Karmosiini	459,22	171,00	30	47	ESI-	5,57	
		457,1		30	47		ESI-
		377,20		21	ESI-		

Nimi	Molekyyli- ioni (m/z)	Tuote- ioni (m/z)	Cone (V)	Törmäytys- energia (eV)	Ioni- saatio	$t_R$ (min)	
Kinoliinikeltainen	433,67	351,77	46	20	ESI+	2,73	
	431,73	287,71	58	30	ESI-		
	431,73	351,66	58	35	ESI-		
Kurkumiini	368,84	117,00	22	42	ESI+	11,99	
		144,90		32	ESI+		
		176,94		20	ESI+		
Oil orange SS	262,90	107,00	22	18	ESI+	17,31	
		127,97		24	ESI+		
		155,90		18	ESI+		
Orange II	329,10	127,98	28	32	ESI+	7,95	
		156,02		20	ESI+		
		173,03		20	ESI+		
Paraoranssi	(409,22)	(89,06)	34	16	ESI+	2,04	
		(171,09)		16	ESI+		
		(228,05)		16	ESI+		
		407,03		25	ESI-		
Para red	294,16	327,0	24	26	ESI-	15,49	
		128,00		34	ESI+		
		143,00		26	ESI+		
Patenttisininen	561,14	156,04	60	16	ESI+	8,33	
		164,06		40	ESI+		
		479,27		36	ESI+		
Red 2 G	559,2	435,3	56	44	ESI-	4,31	
		479,5		45	ESI-		
		92,36		24	32		ESI+
Rhodamine B	466,10	424,11	24	16	ESI+	12,36	
		464,10		42	24		ESI-
		443,29		68	64		ESI+
Ruskea HT	222,00	355,20	45	60	ESI+	1,11	
		399,26		42	ESI+		
		158		21	ESI-		
Sudan I	249,10	79,8	45	28	ESI-	16,31	
		93,04		22	22		ESI+
		128,06		28	ESI+		
Sudan II	277,16	156,03	22	16	ESI+	18,48	
		106,01		42	ESI+		
		120,95		20	ESI+		
Sudan III	353,22	156,02	34	16	ESI+	19,67	
		76,99		32	ESI+		
		156,02		22	ESI+		
Sudan IV/ Sudan red B	381,22	196,95	36	18	ESI+	22,38	
		91,01		26	ESI+		
		128,05		48	ESI+		
		224,43		20	ESI+		

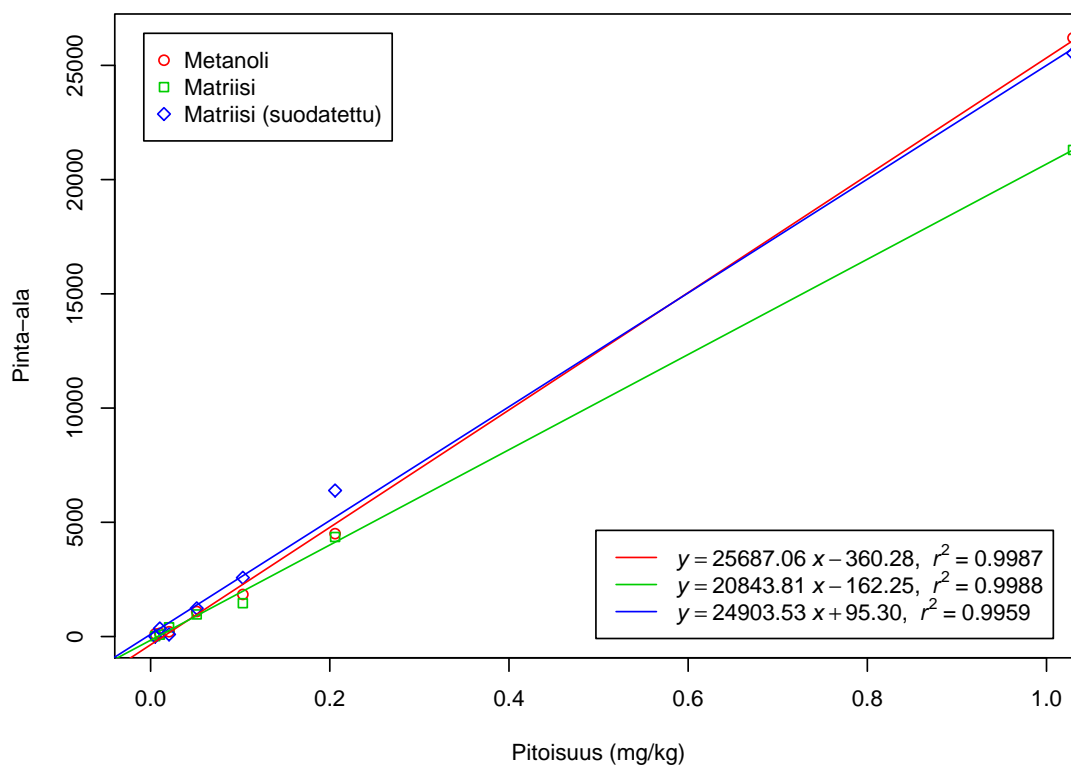
Nimi	Molekyyli- ioni (m/z)	Tuote- ioni (m/z)	Cone (V)	Törmäytys- energia (eV)	Ioni- saatio	$t_R$ (min)
Sudan orange G	215,03	92,38	26	24	ESI+	12,05
		93,09		18	ESI+	
		121,97		16	ESI+	
Sudan red 7 B	379,84	114,99	24	46	ESI+	22,06
		168,95		26	ESI+	
		183,00		14	ESI+	
Sudan red B/ Sudan IV	380,84	91,00	32	26	ESI+	22,36
		106,08		34	ESI+	
		224,85		18	ESI+	
Sudan Red G	278,84	107,98	22	34	ESI+	16,09
		122,94		18	ESI+	
		155,90		16	ESI+	
Sudan yellow	225,90	77,03	32	22	ESI+	15,48
		120,92		20	ESI+	
		133,07		30	ESI+	
Tartratsiini	469,16 (467,2)	199,92	28	28	ESI+	1,13
		(198,1)	50	43	ESI-	
		(423,1)		22	ESI-	
Toluidine red	307,84	128,01	26	32	ESI+	16,39
		151,93		22	ESI+	
		155,90		18	ESI+	
Uuskokkiini/ Amarantti	539,03 (537,2)	130,07	30	58	ESI+	1,14
		158,03		36	ESI+	
		222,81	24	ESI+		
Vihreä S	554,71	(302,0)	80	34	ESI-	5,93
		(429,2)		28	ESI-	
		376,82		62	44	
Yellow 2 G	506,61	391,90	52	38	ESI+	4,15
		472,89		30	ESI+	
		108,04		44	ESI+	
		172,85		36	ESI+	
		265,95		30	ESI+	

## 4 Standardisuorat

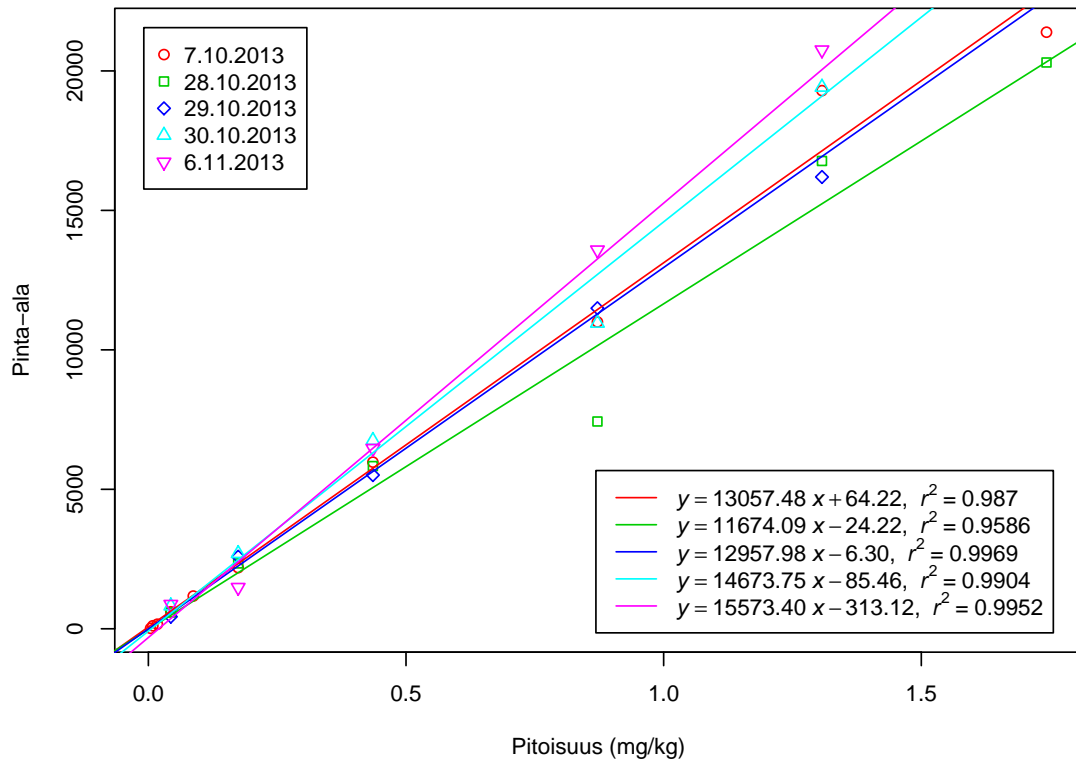
Acid yellow 36



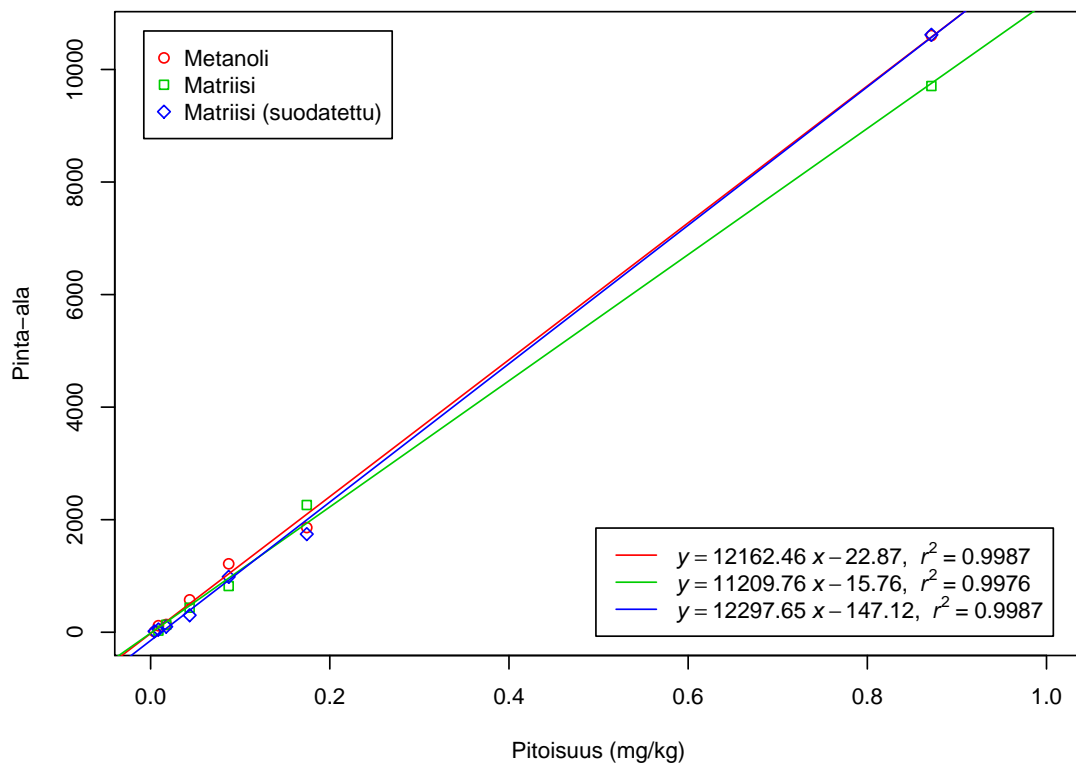
Acid yellow 36



### Alluranpunainen

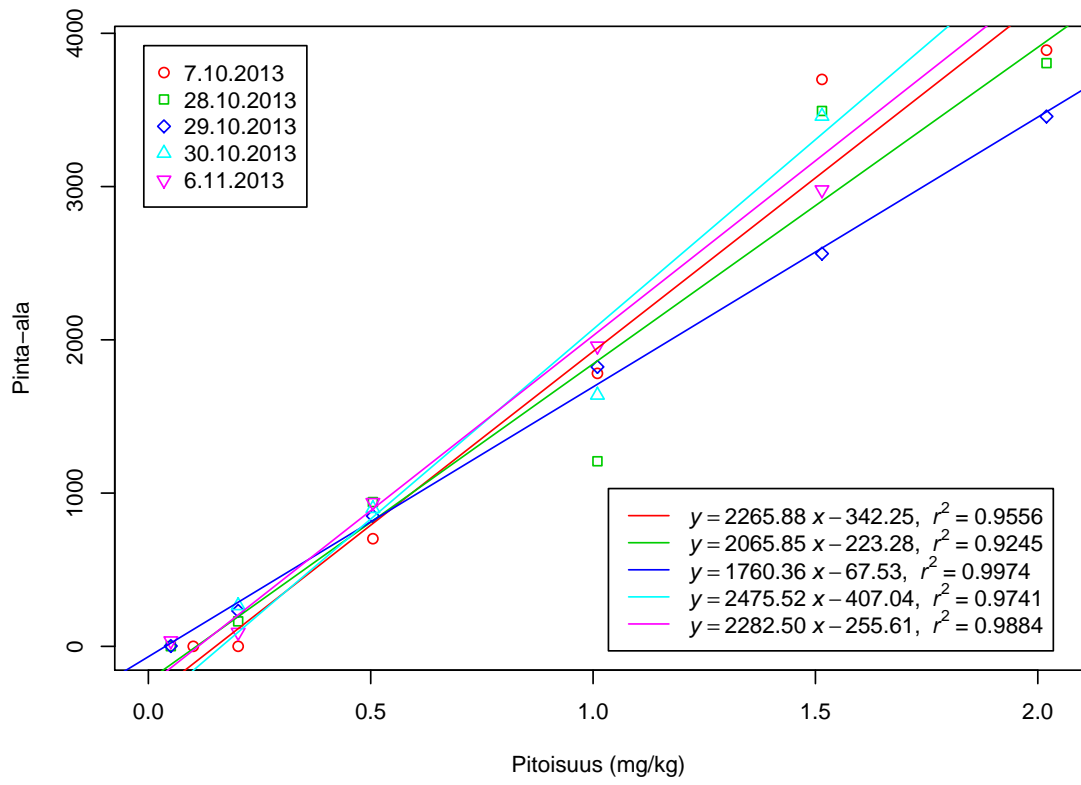


### Alluranpunainen

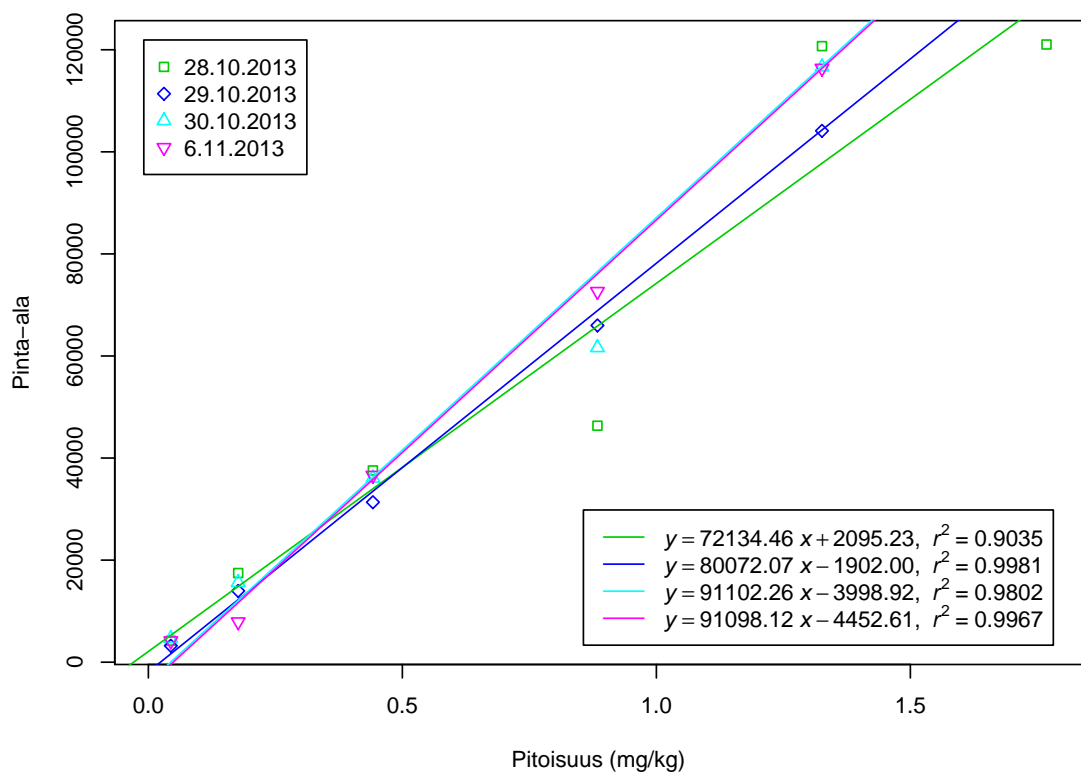




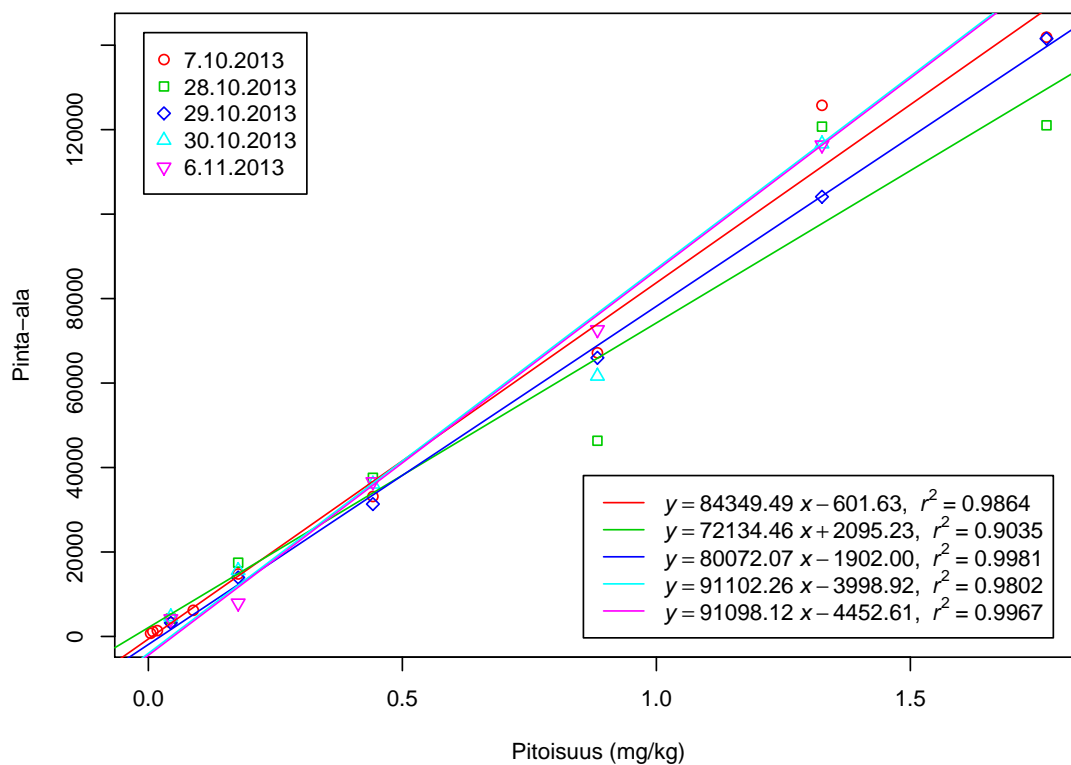
### Amarantti



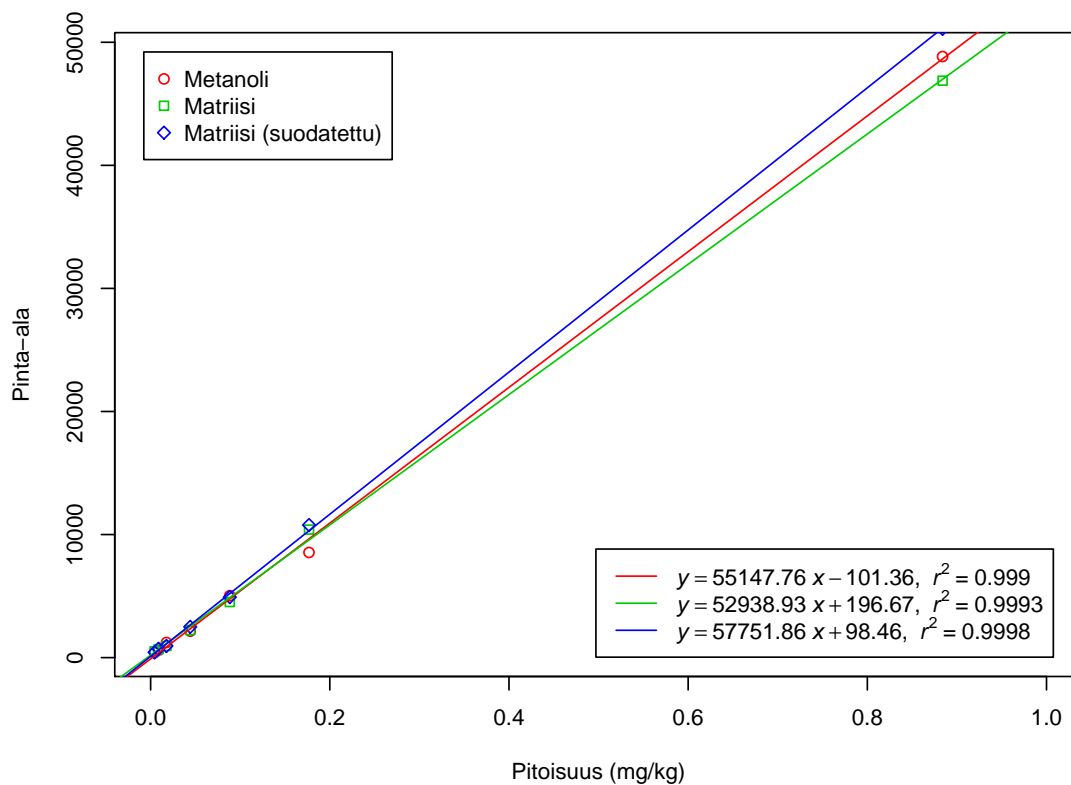
### Auramine



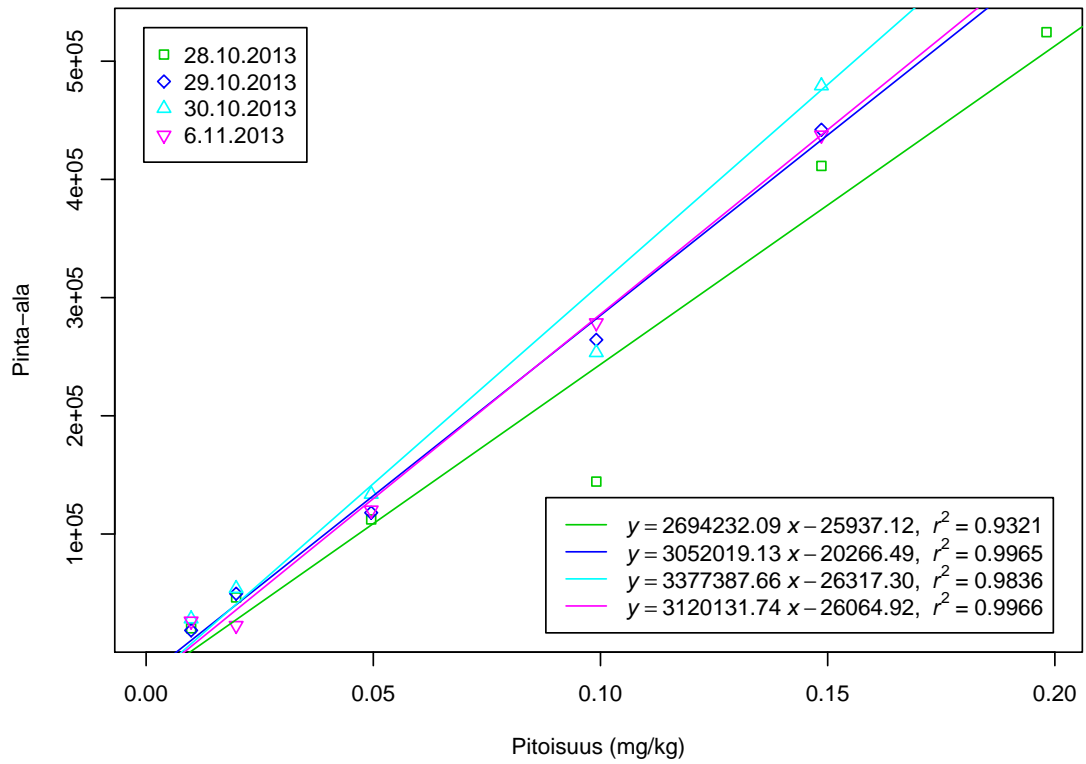
### Briljanttisinen FCF



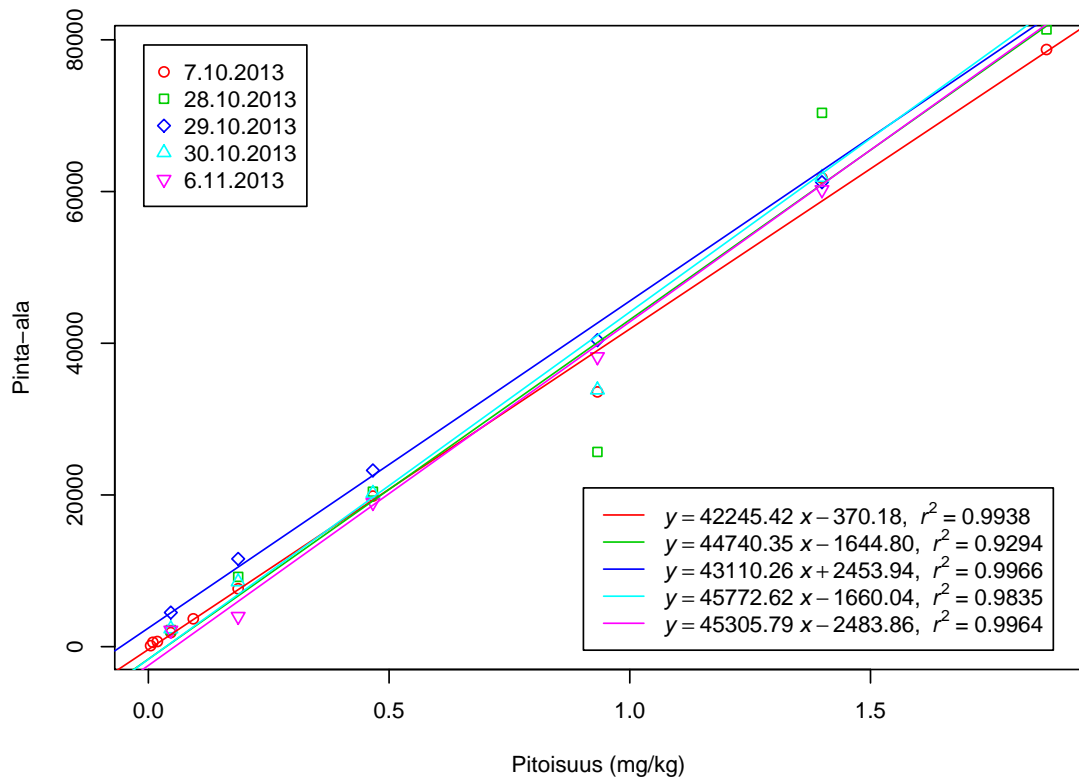
### Briljanttisinen FCF



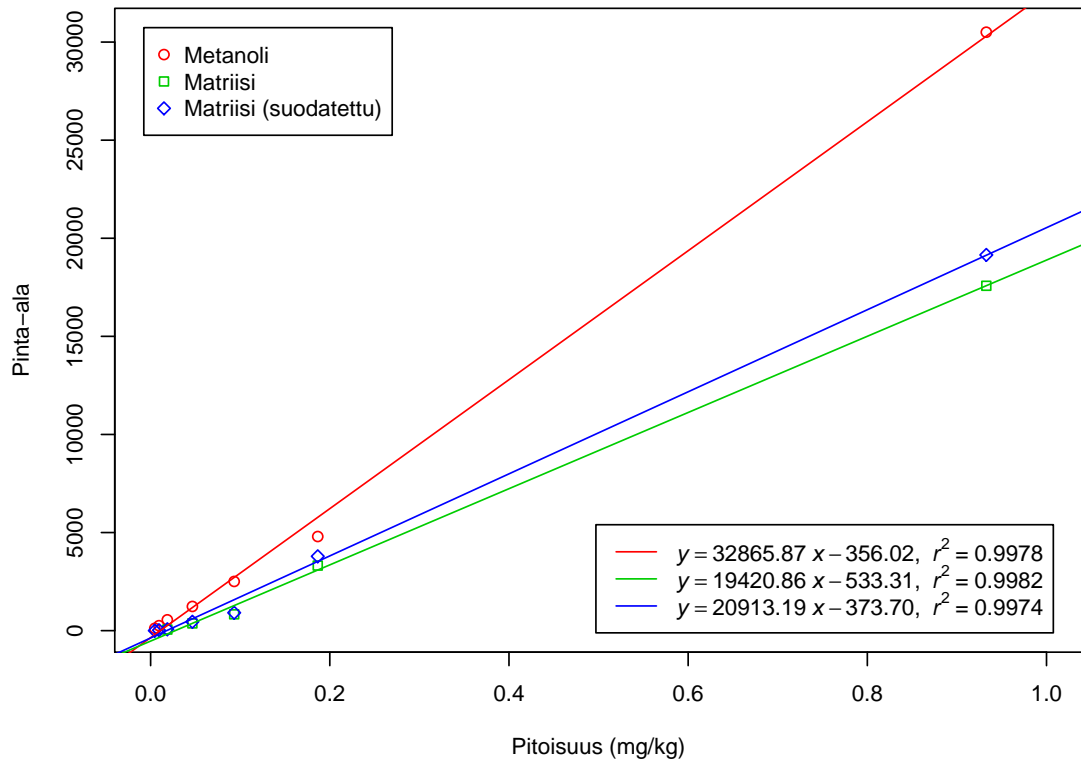
### Chrysoidine G



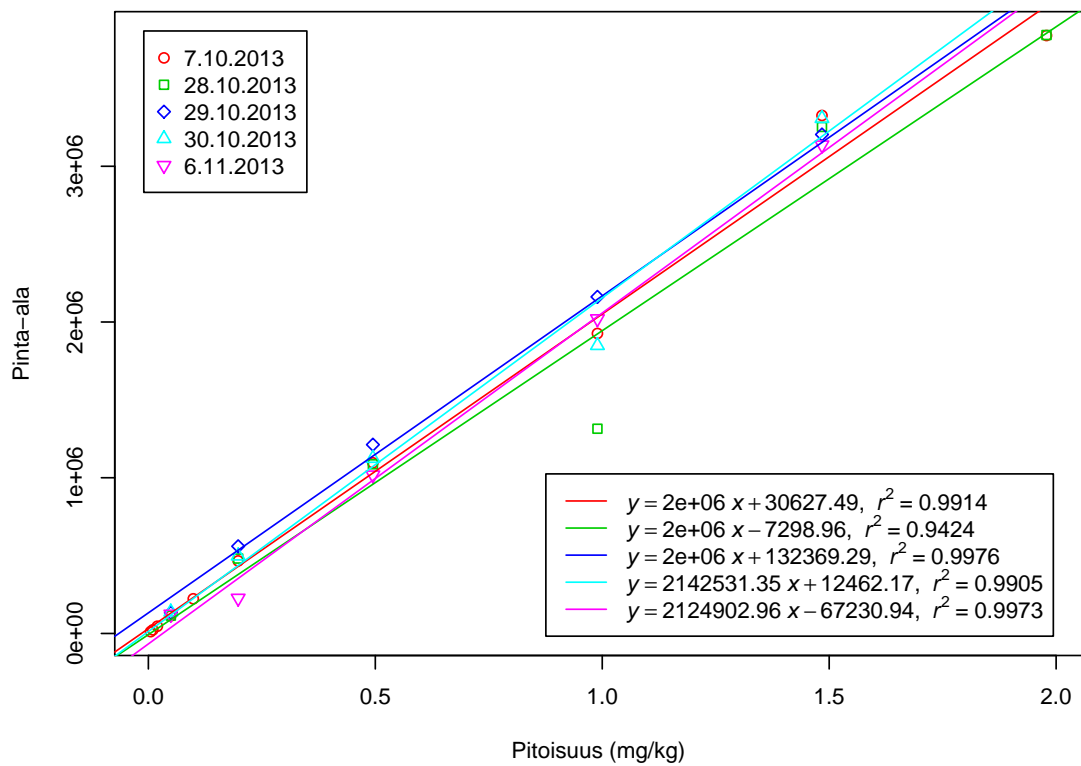
### Erytrosiini



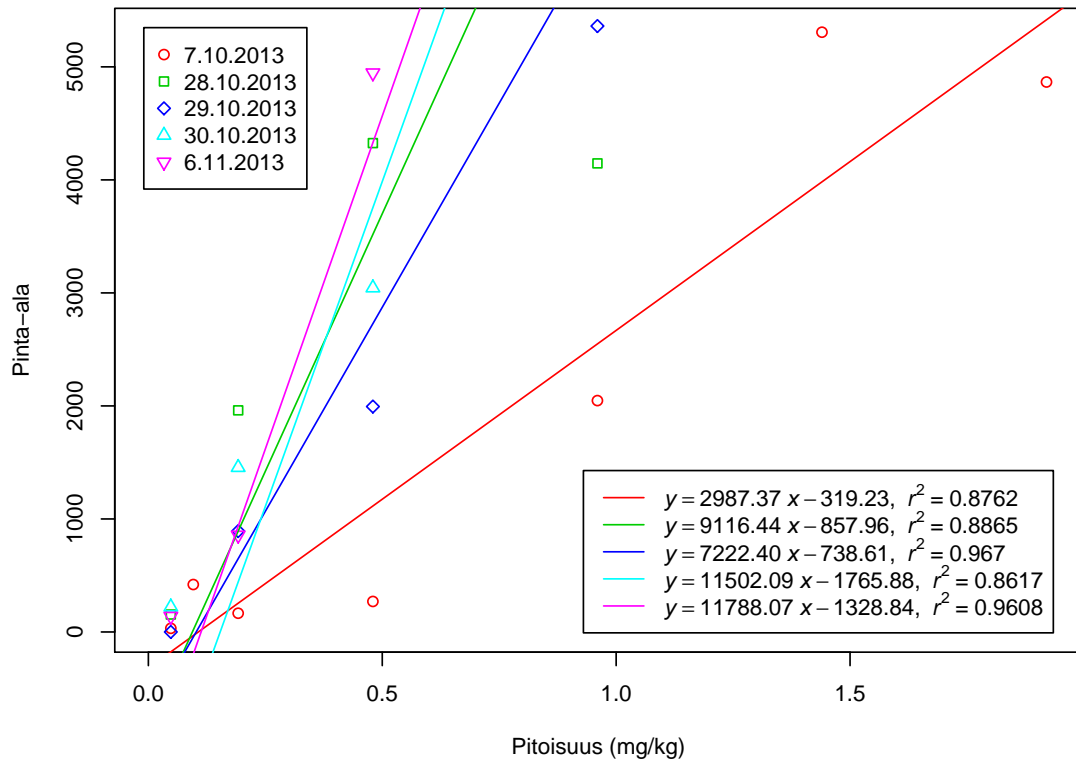
### Erytrosiini



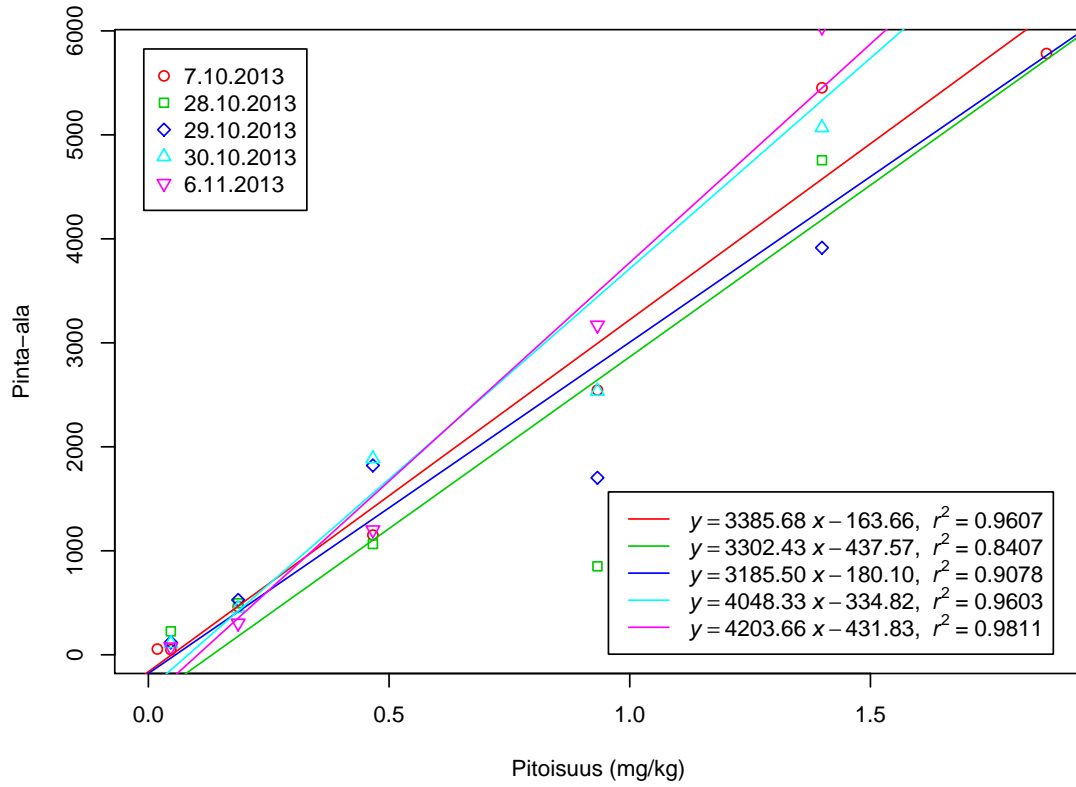
### Fast garnet GBC



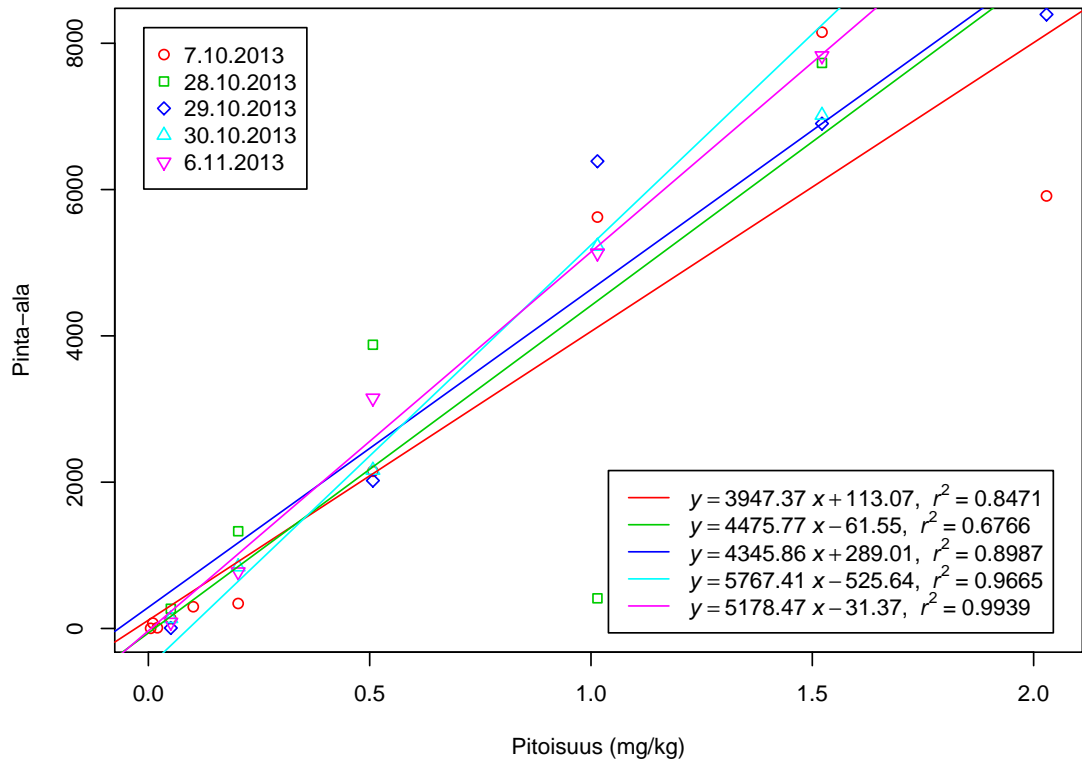
### Fast green FCF



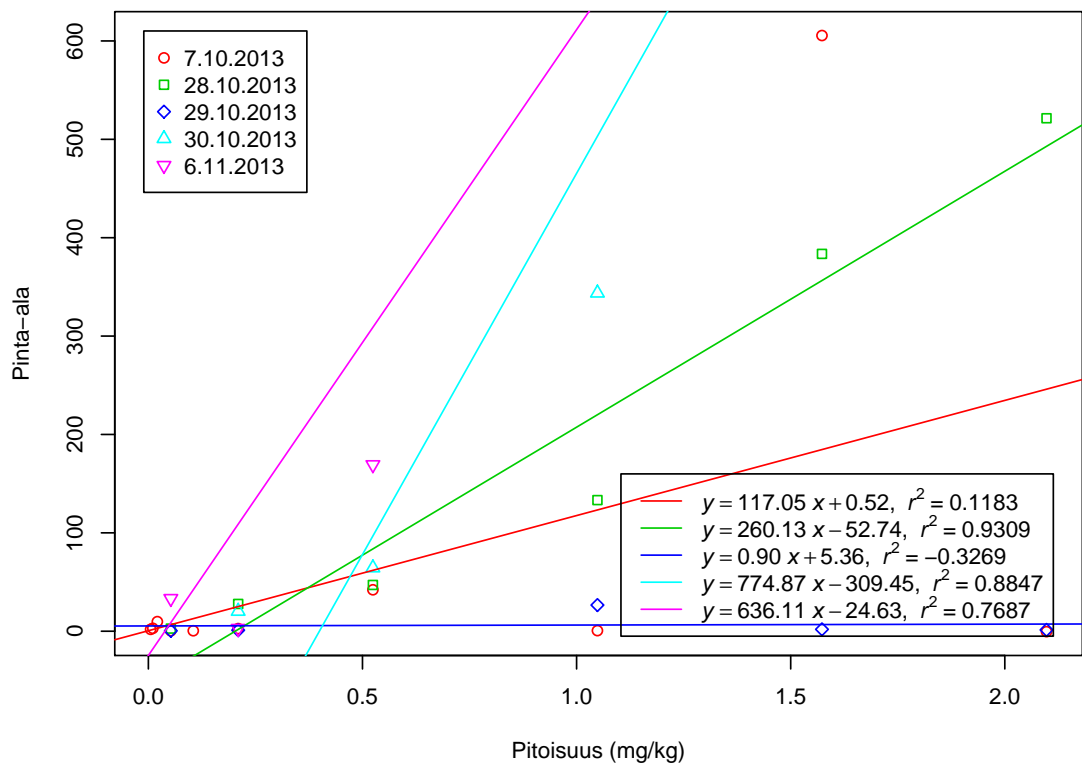
### Indigokarmiini



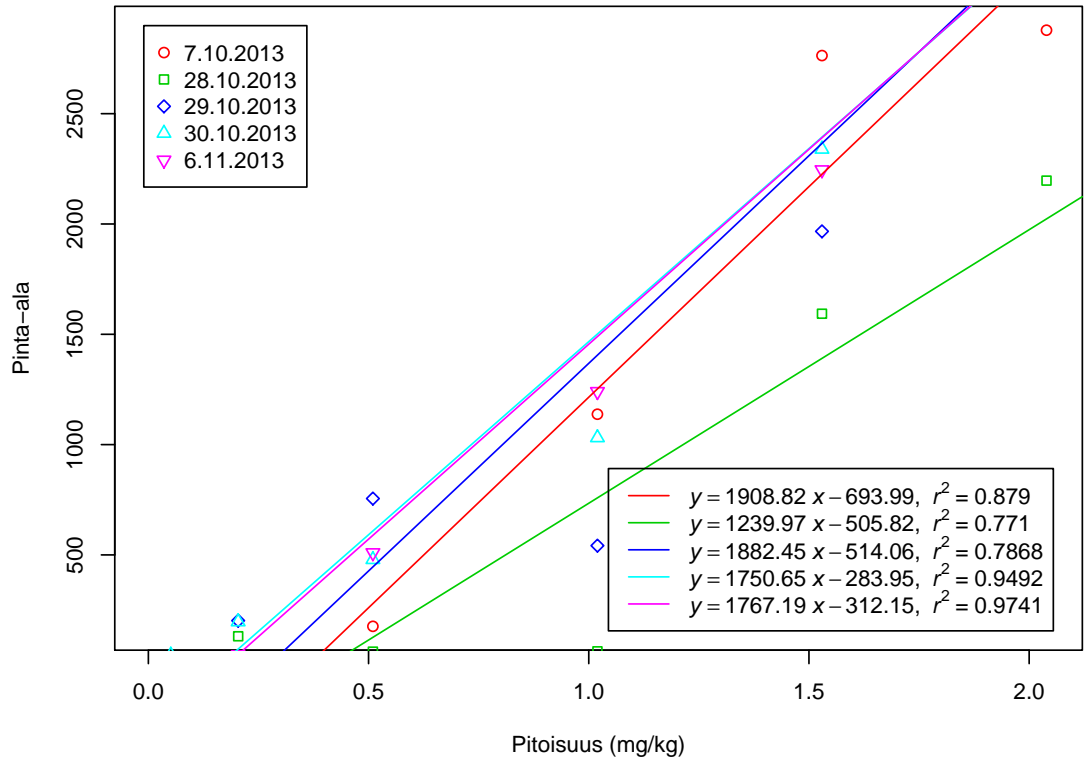
### Karmiinihappo



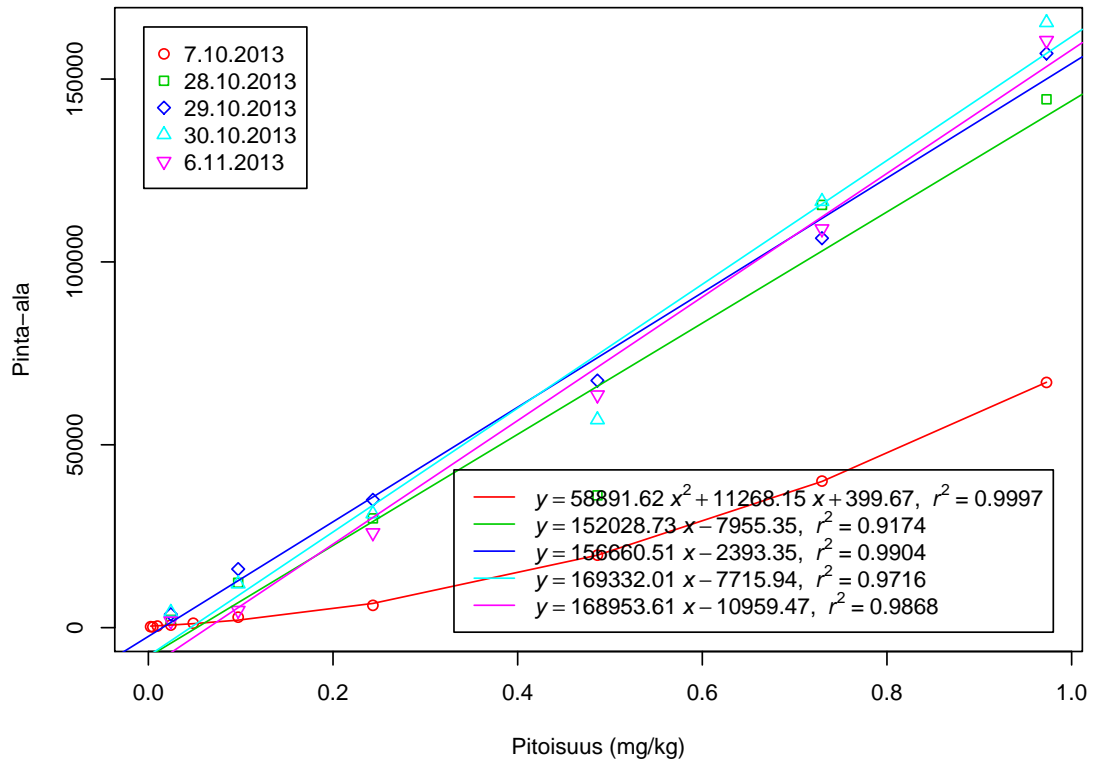
### Kinoliininkeltainen



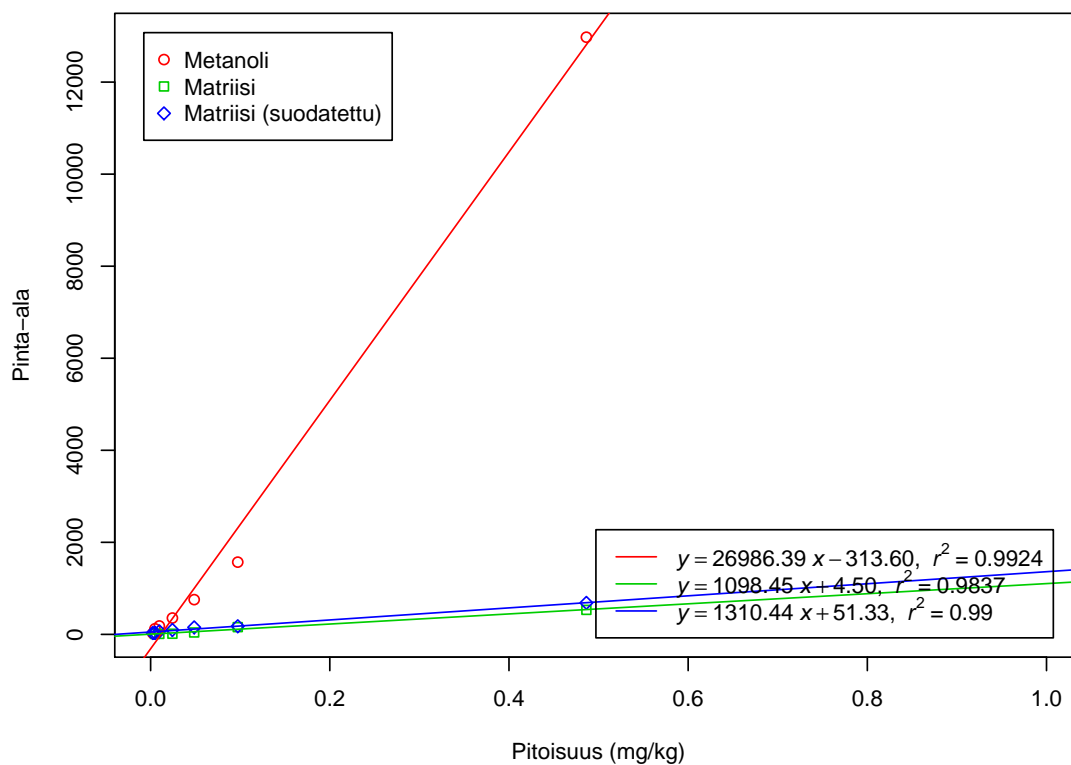
### Karmosiini



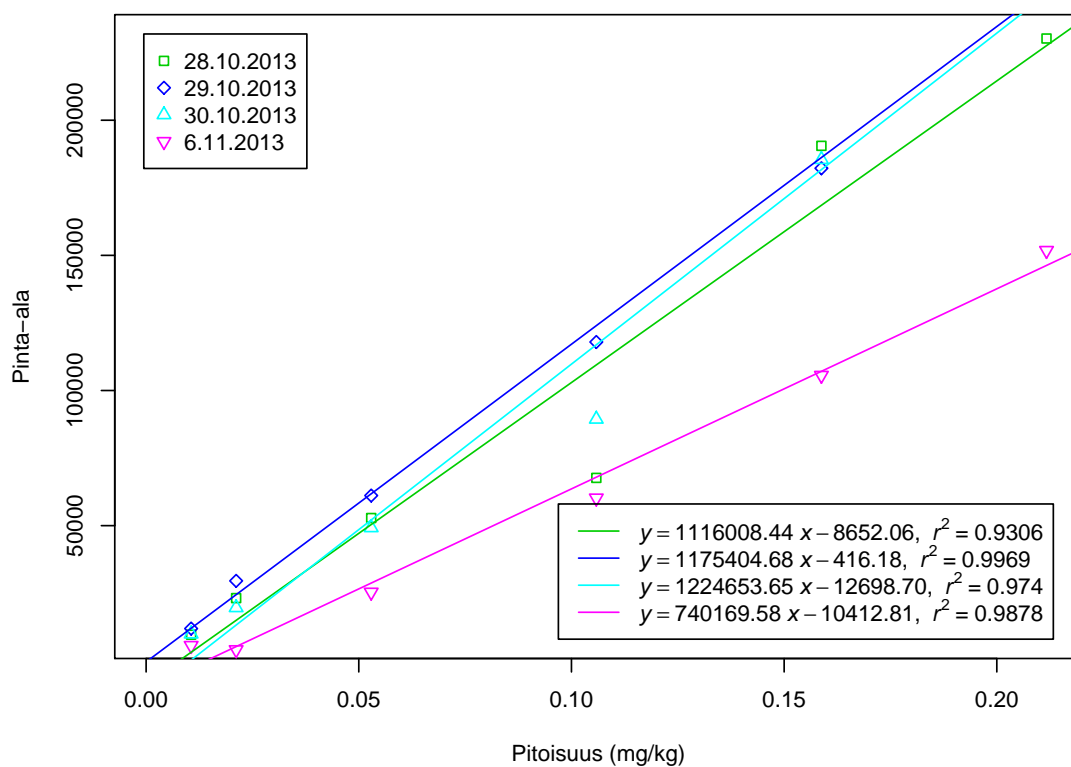
### Kurkumiini



### Kurkumiini

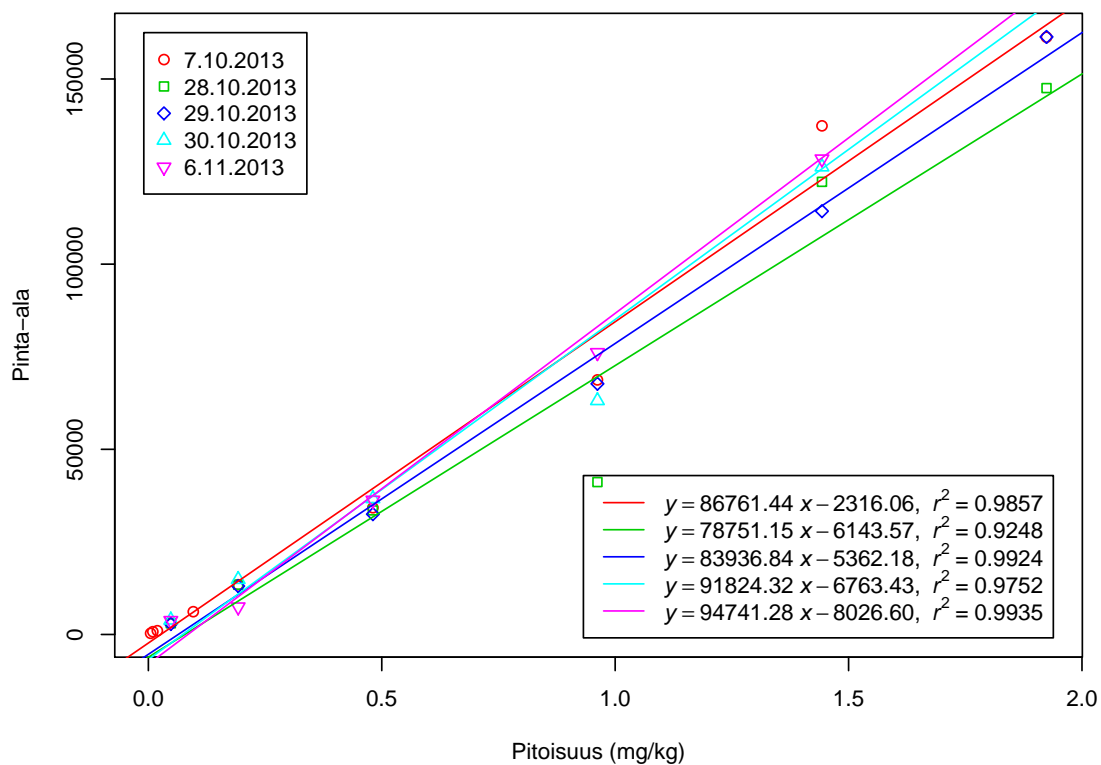


### Oil orange SS

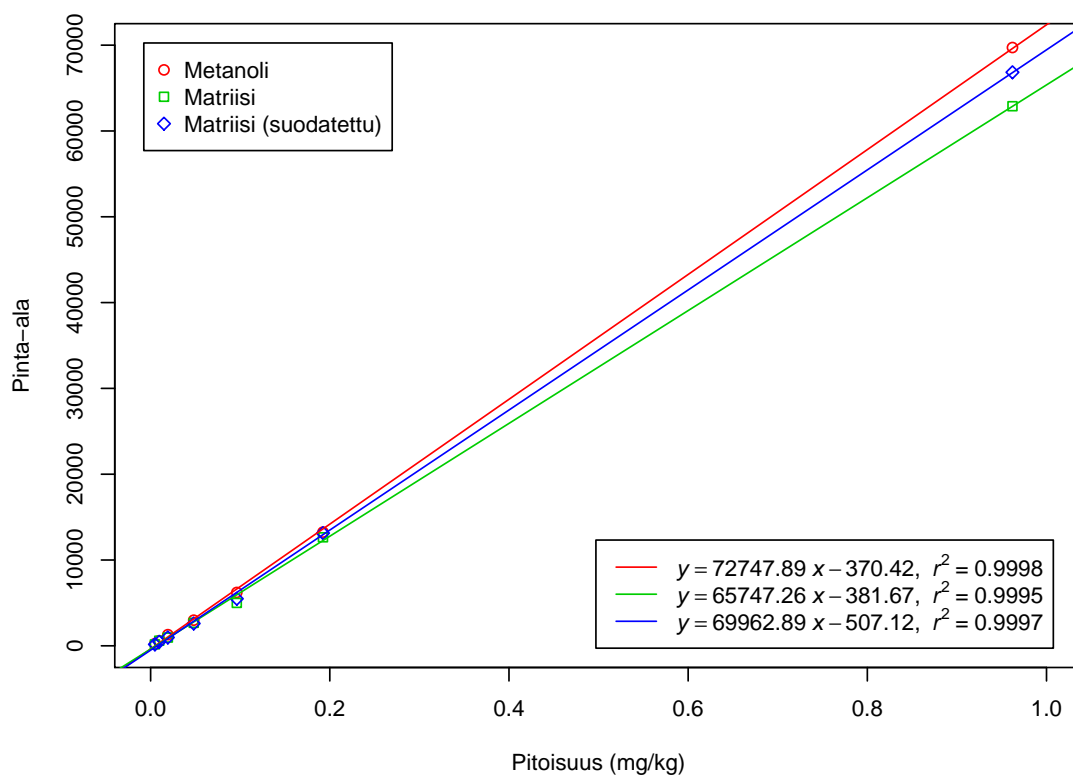




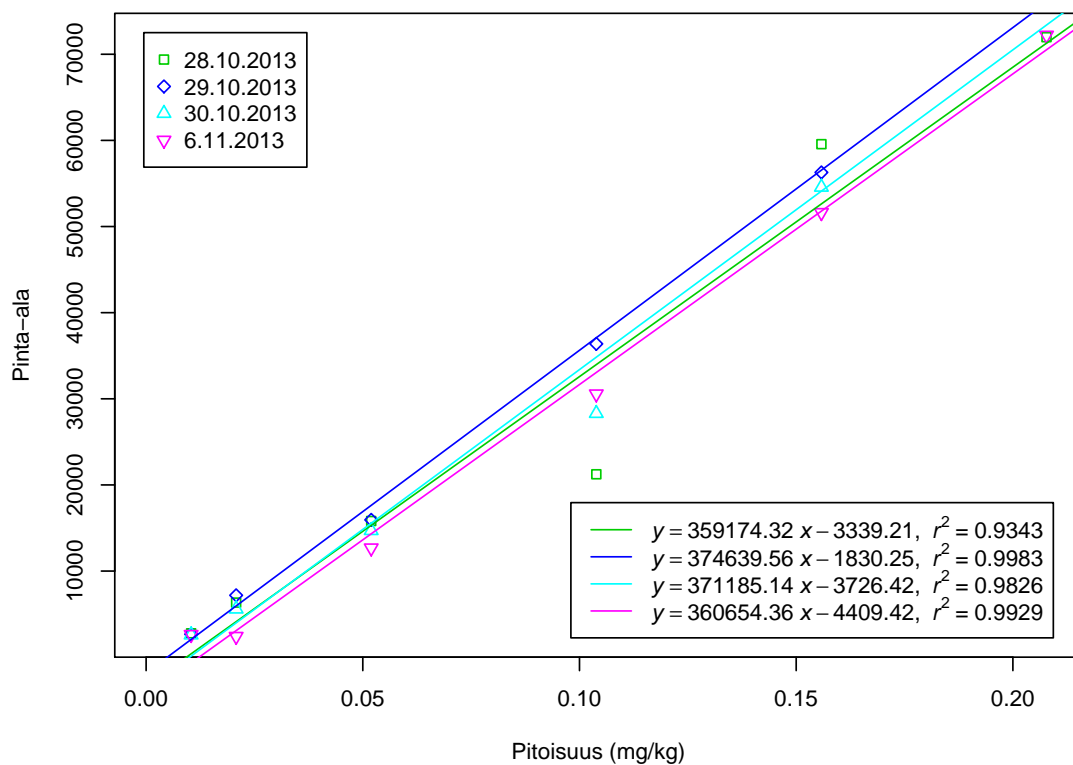
### Orange II



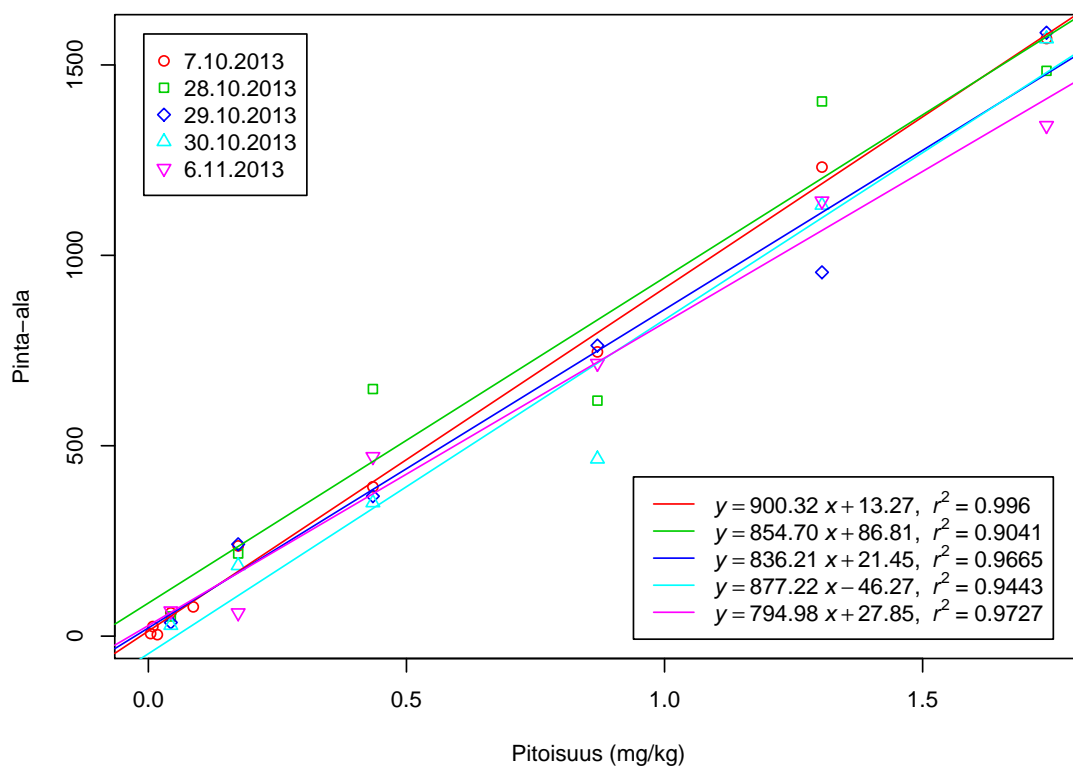
### Orange II



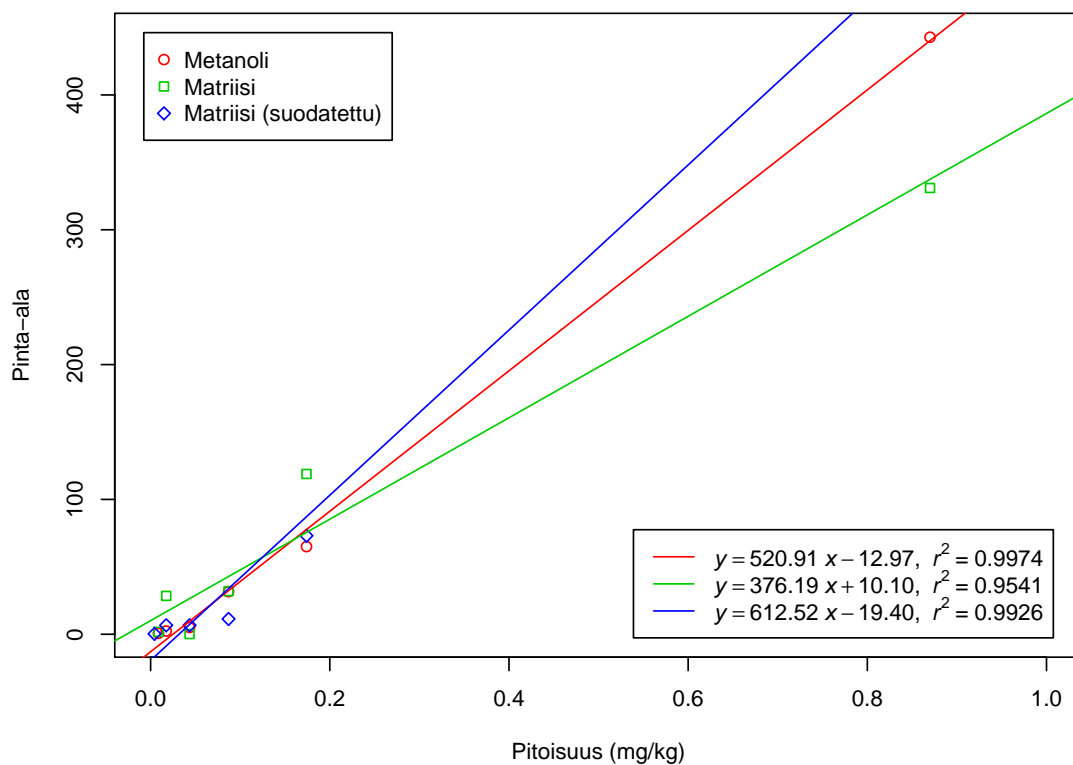
### Para Red



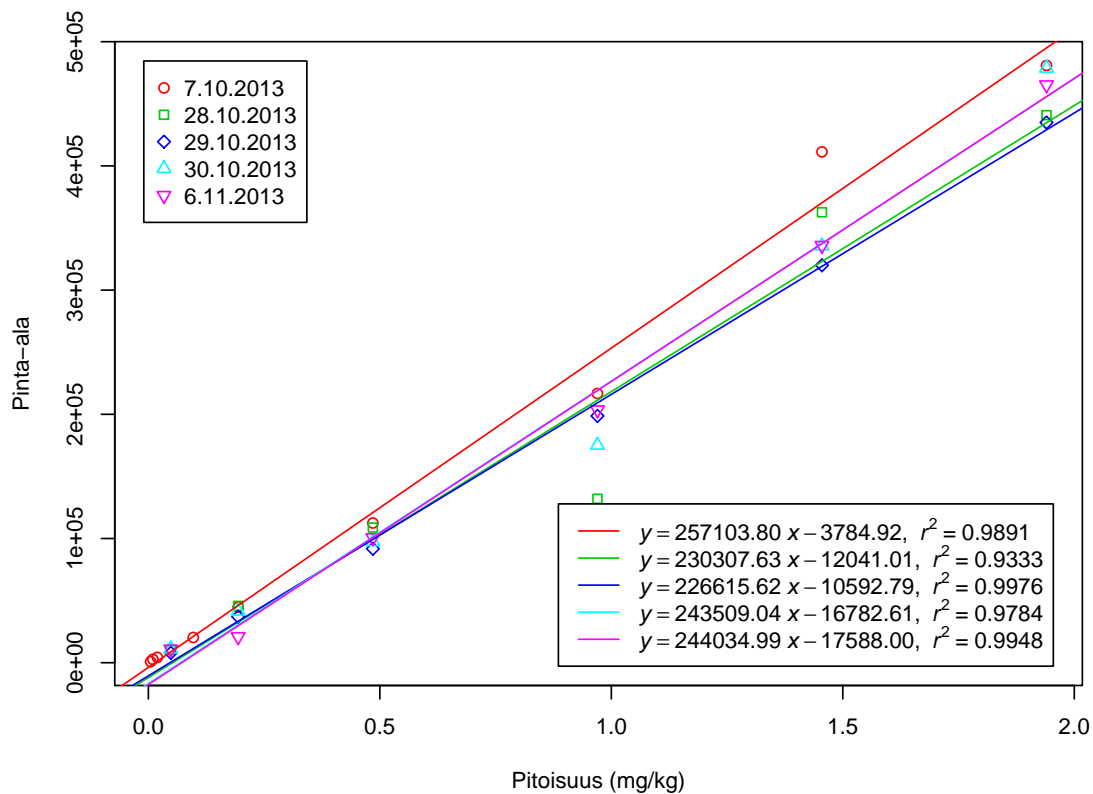
### Paraoranssi



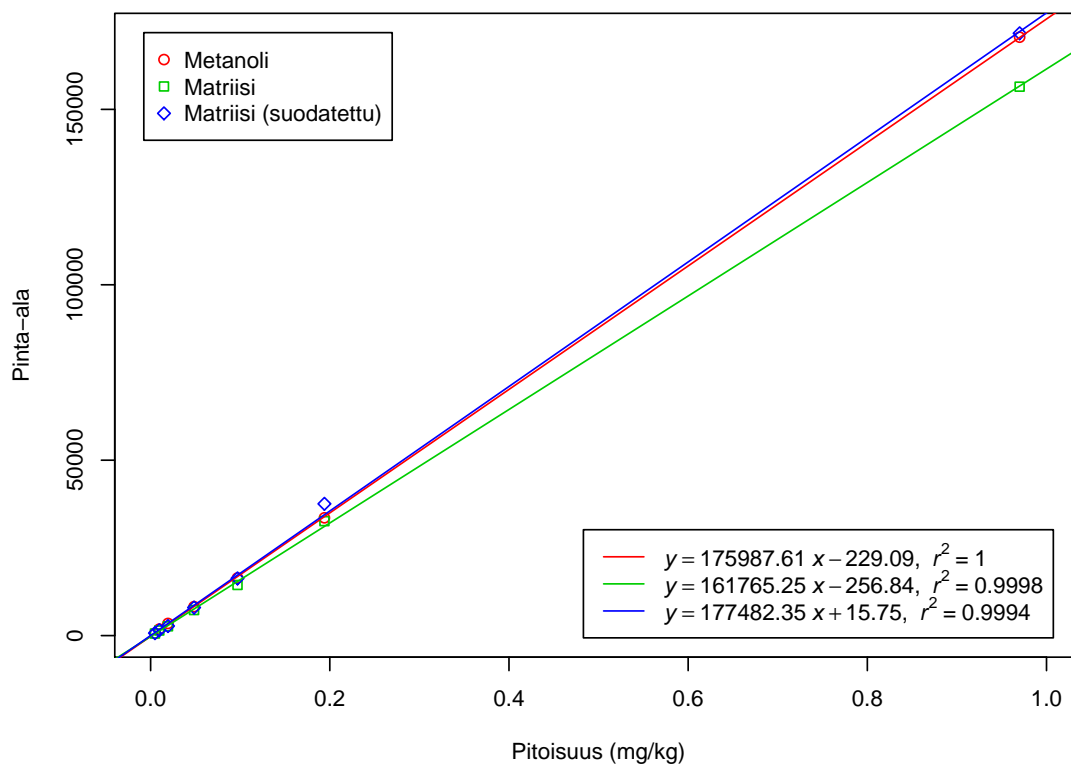
### Paraoranssi



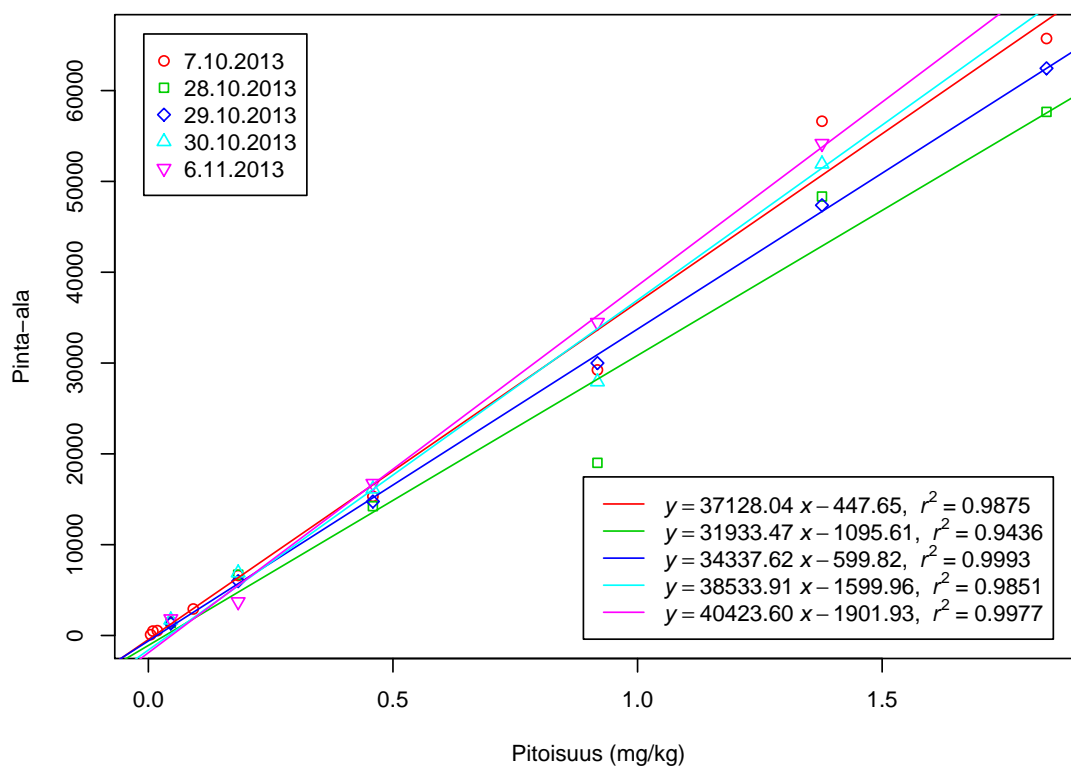
### Patenttisinen



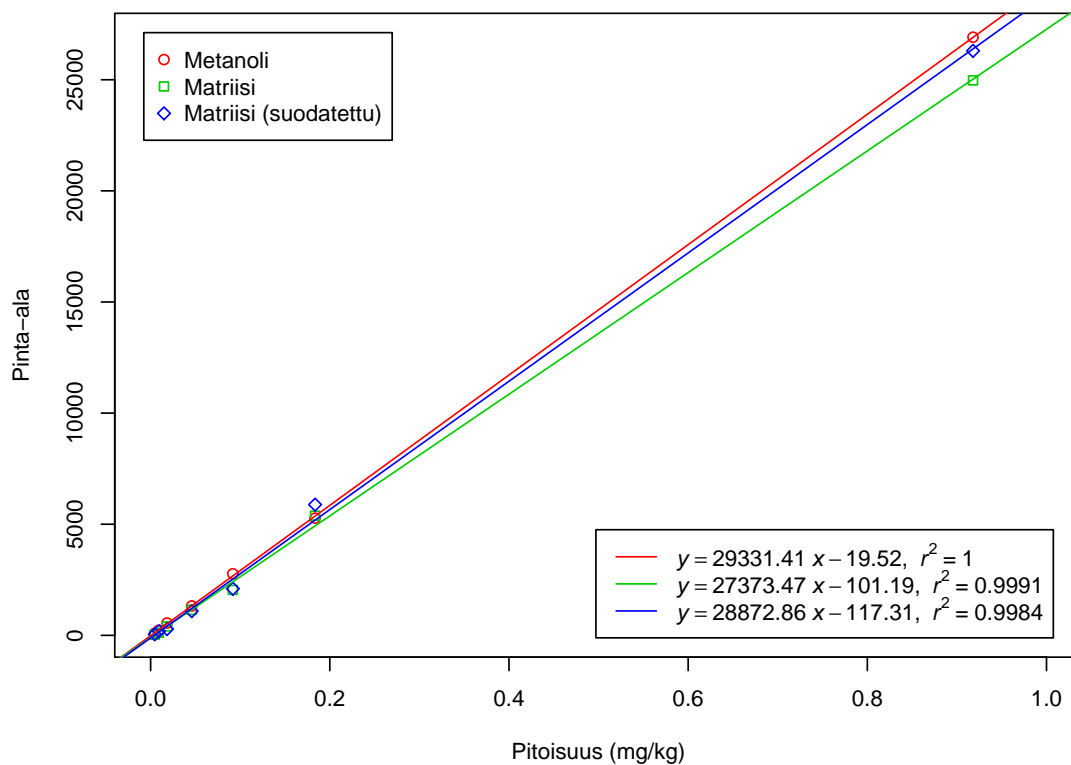
### Patenttisinen



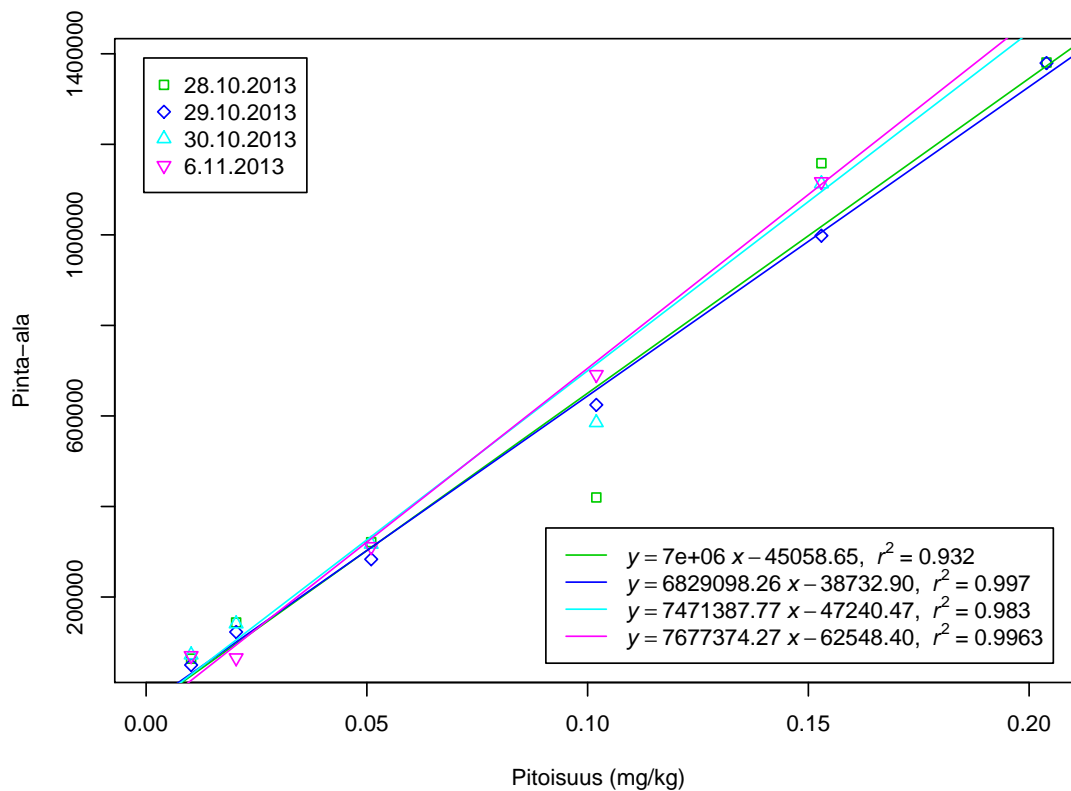
### Red 2 G



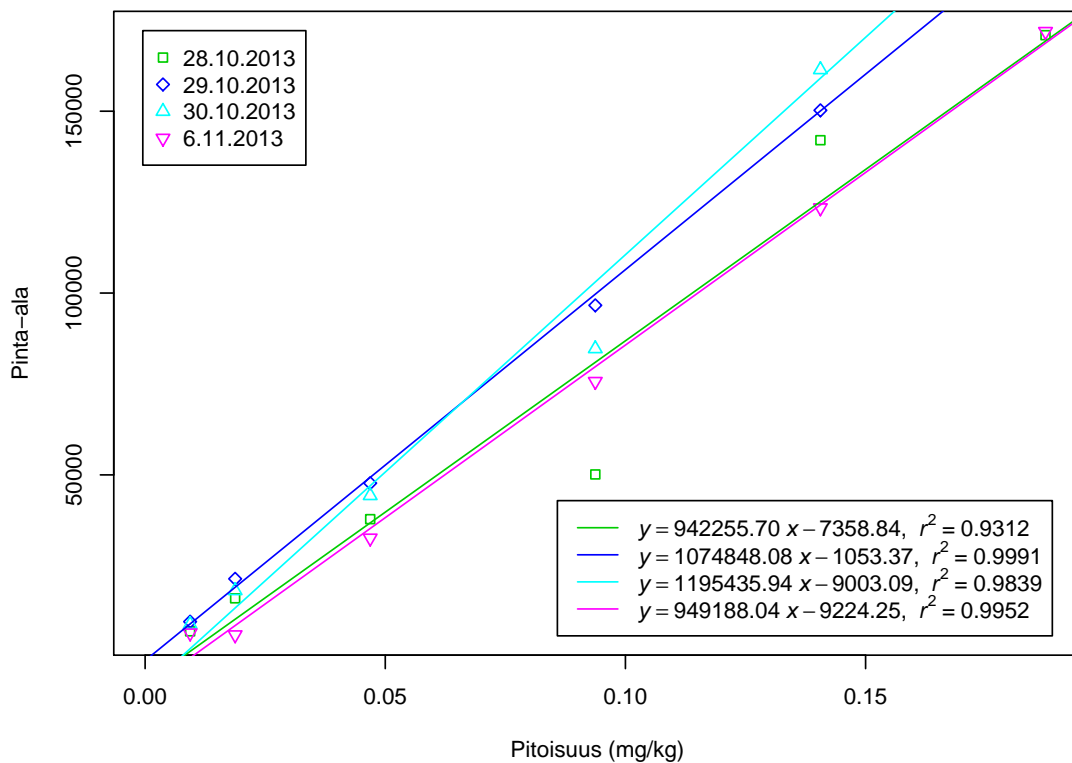
Red 2 G



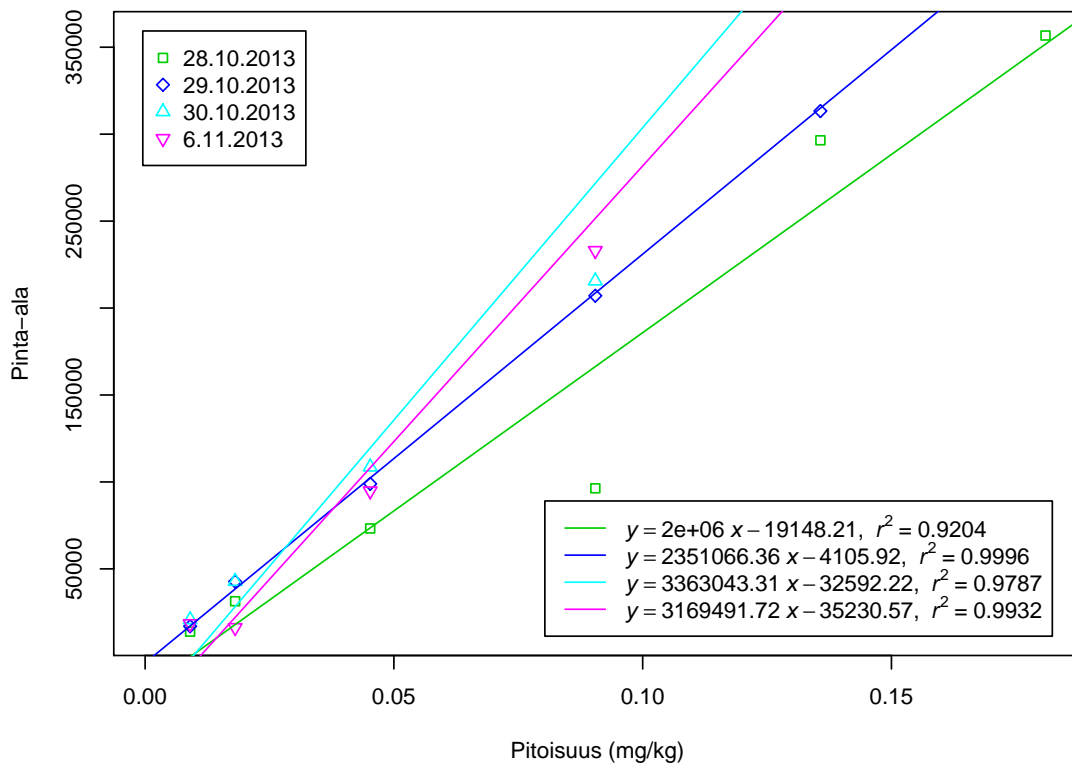
Rhodamine B



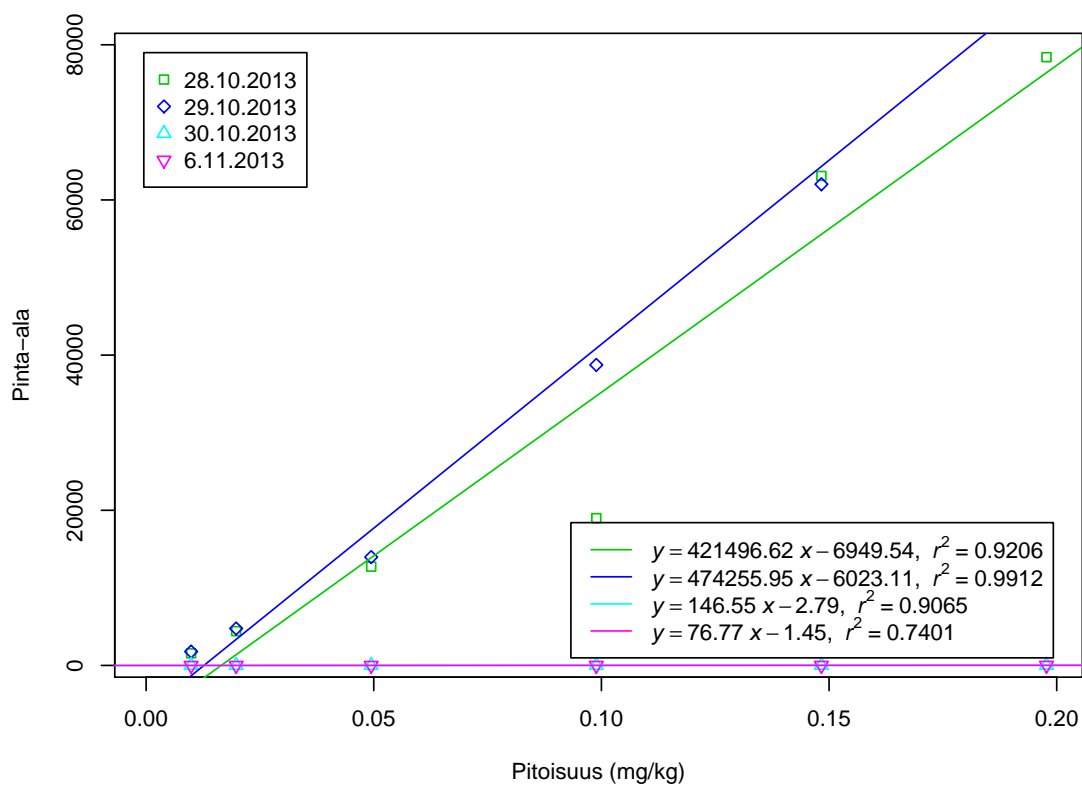
**Sudan I**



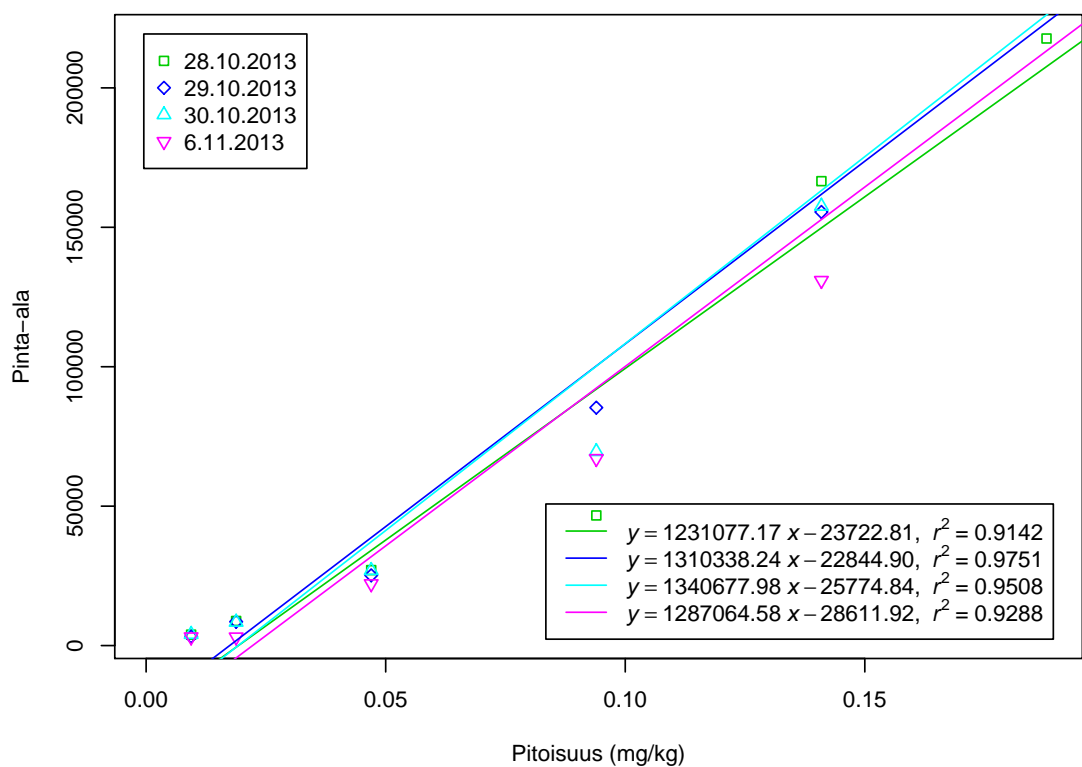
**Sudan II**



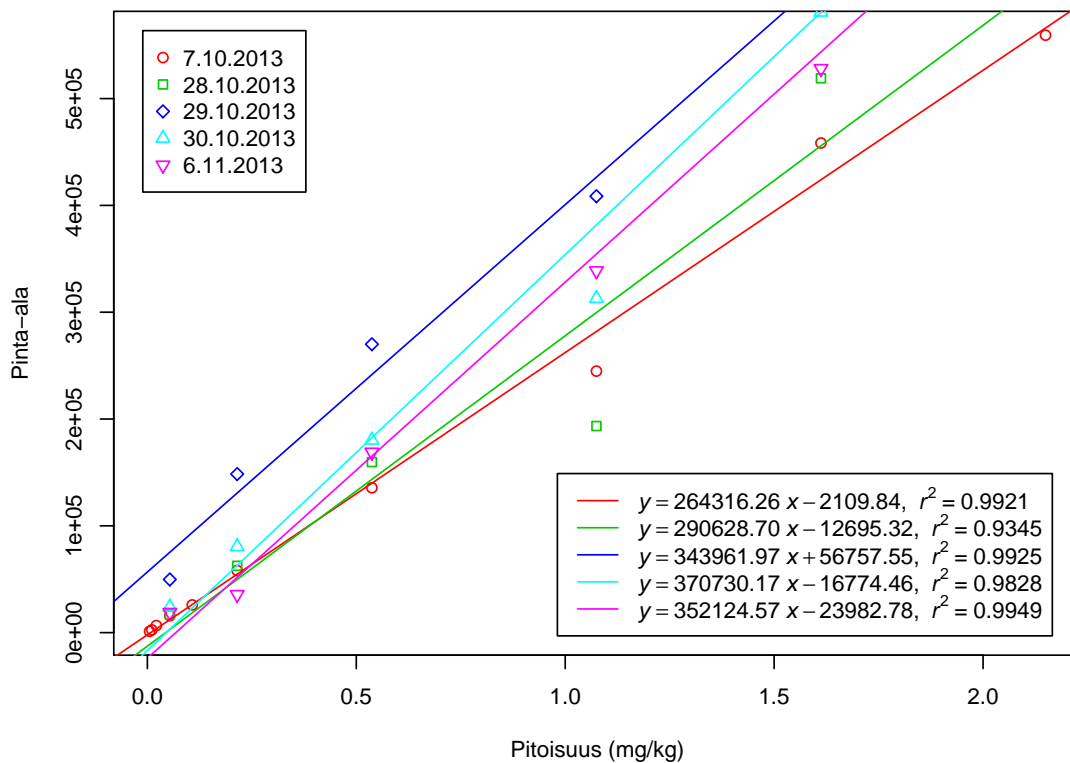
### Sudan III



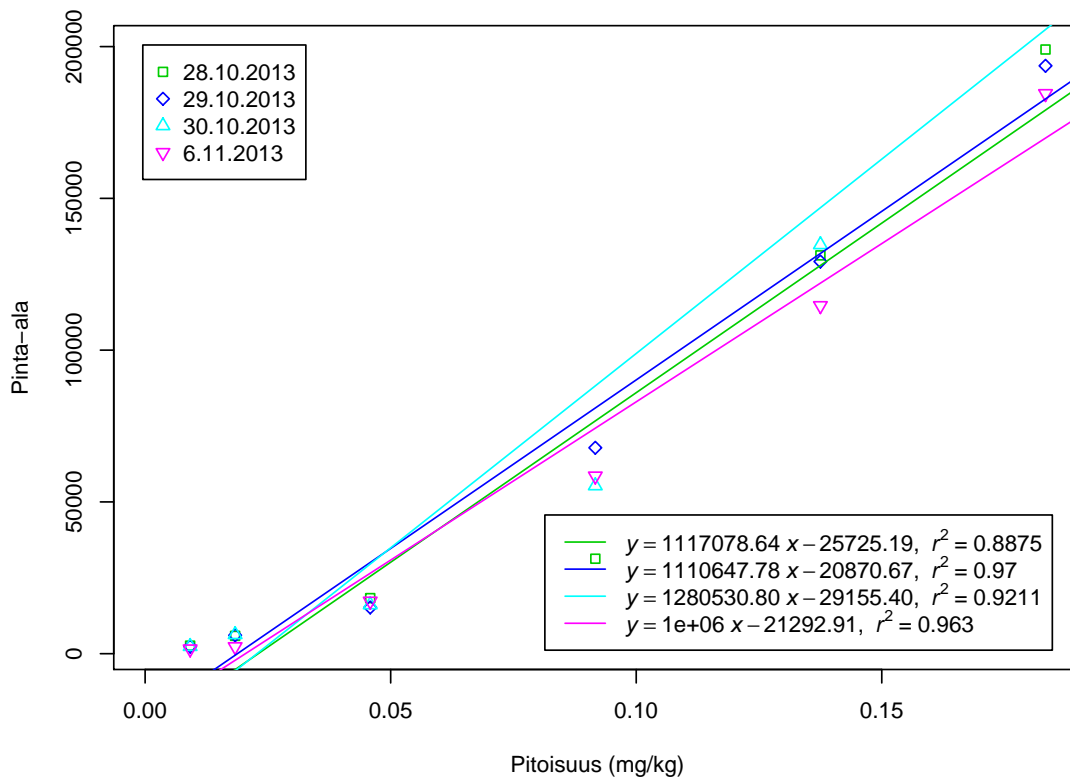
### Sudan IV



### Sudan orange G

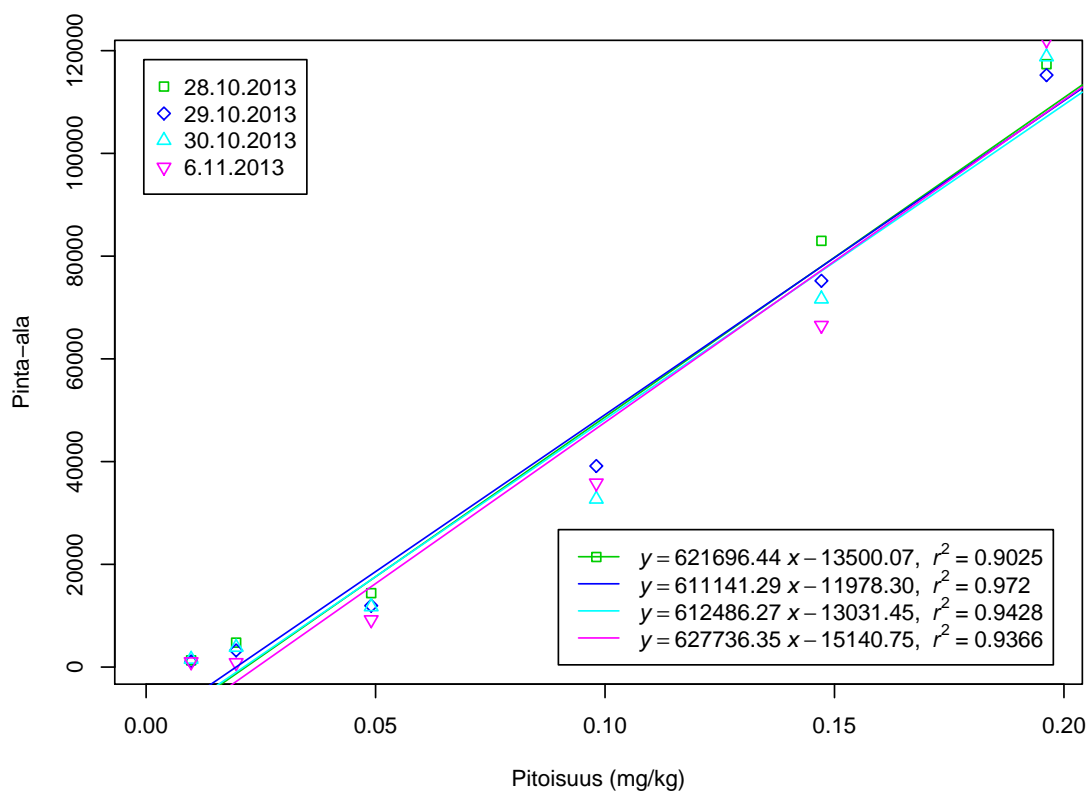


### Sudan red 7B

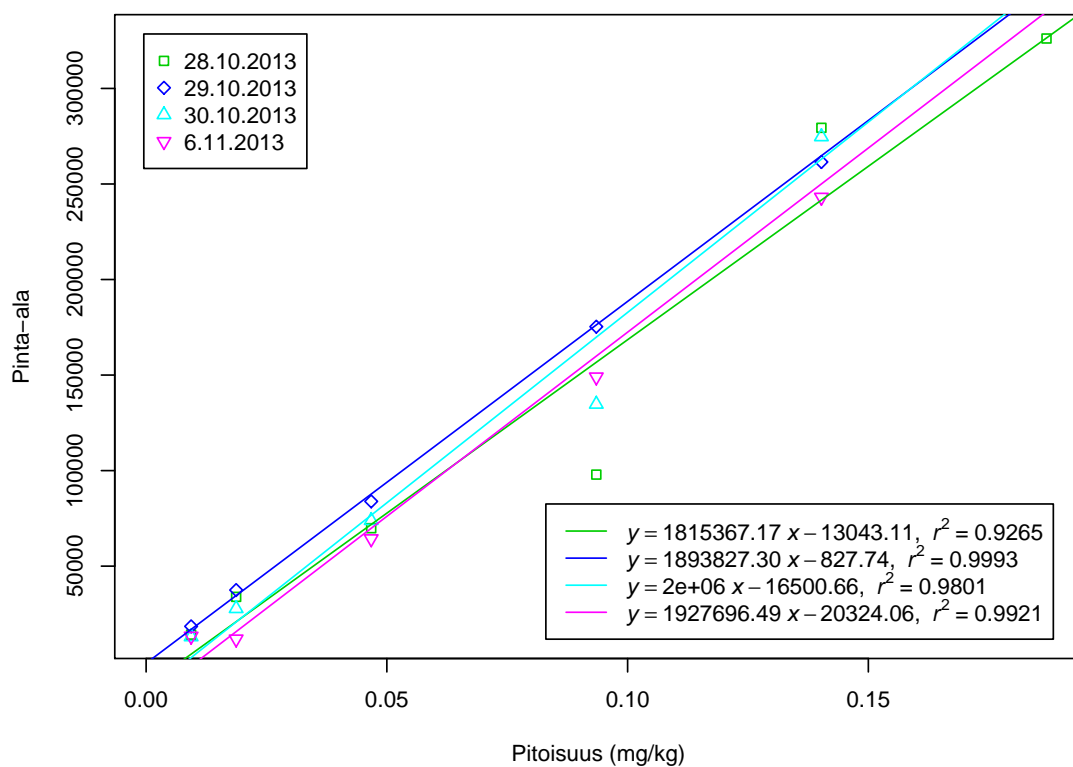




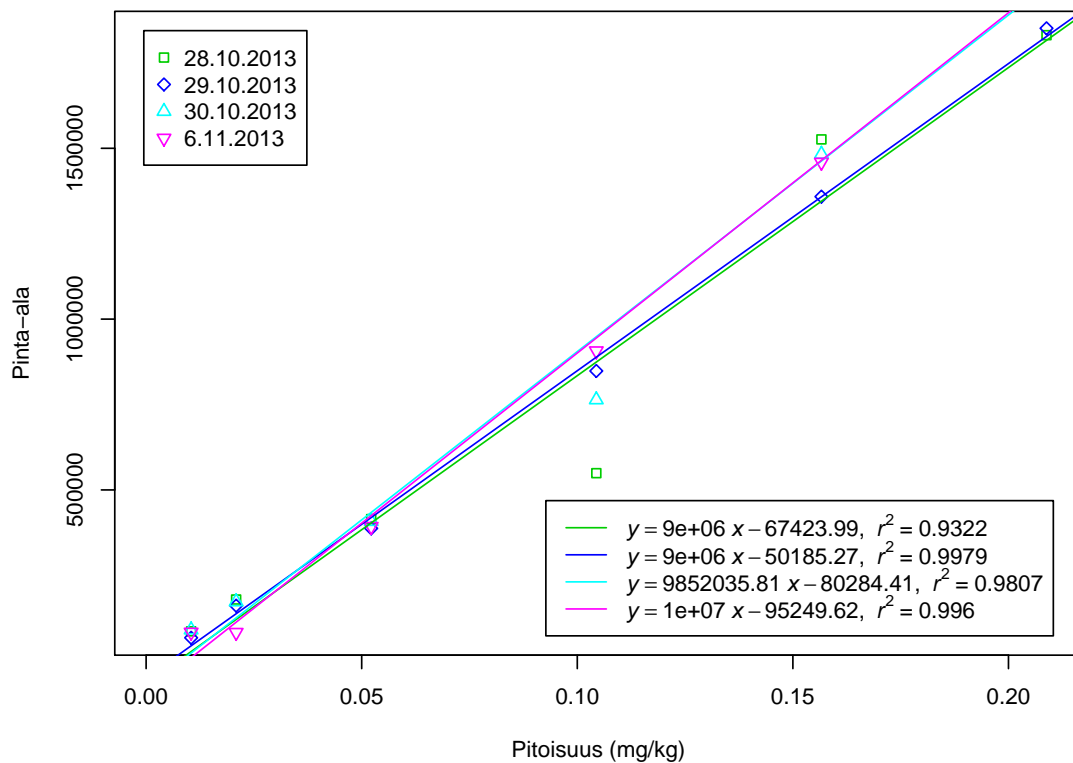
### Sudan red B



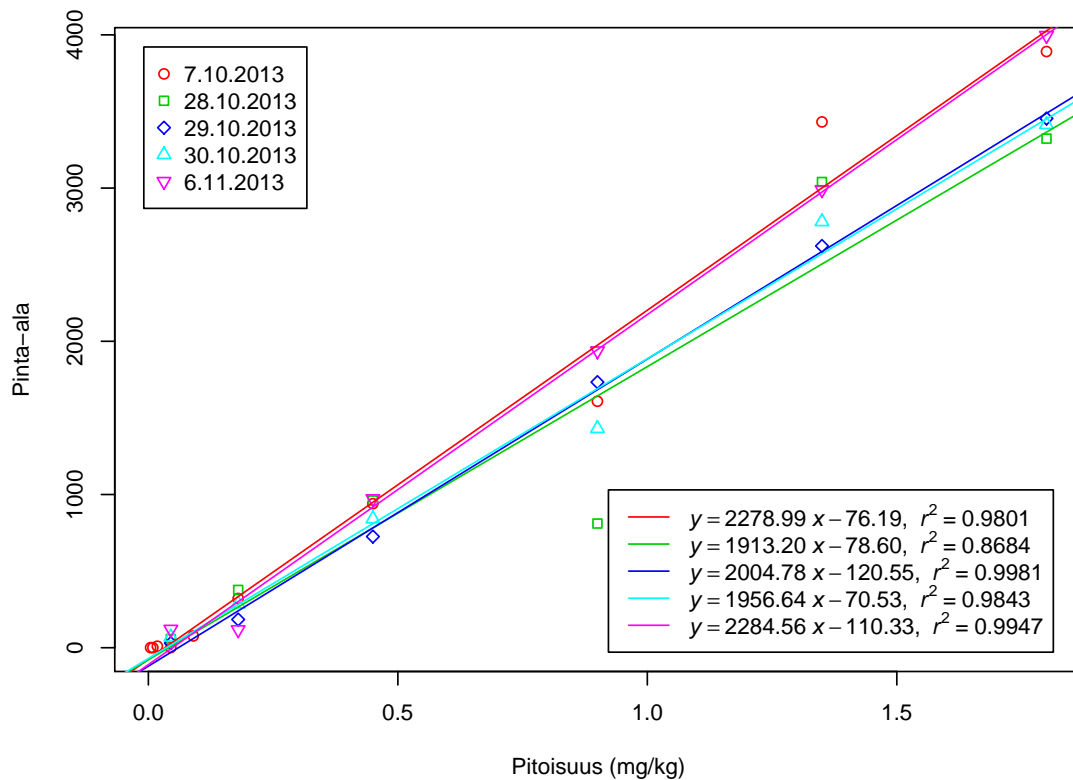
### Sudan red G



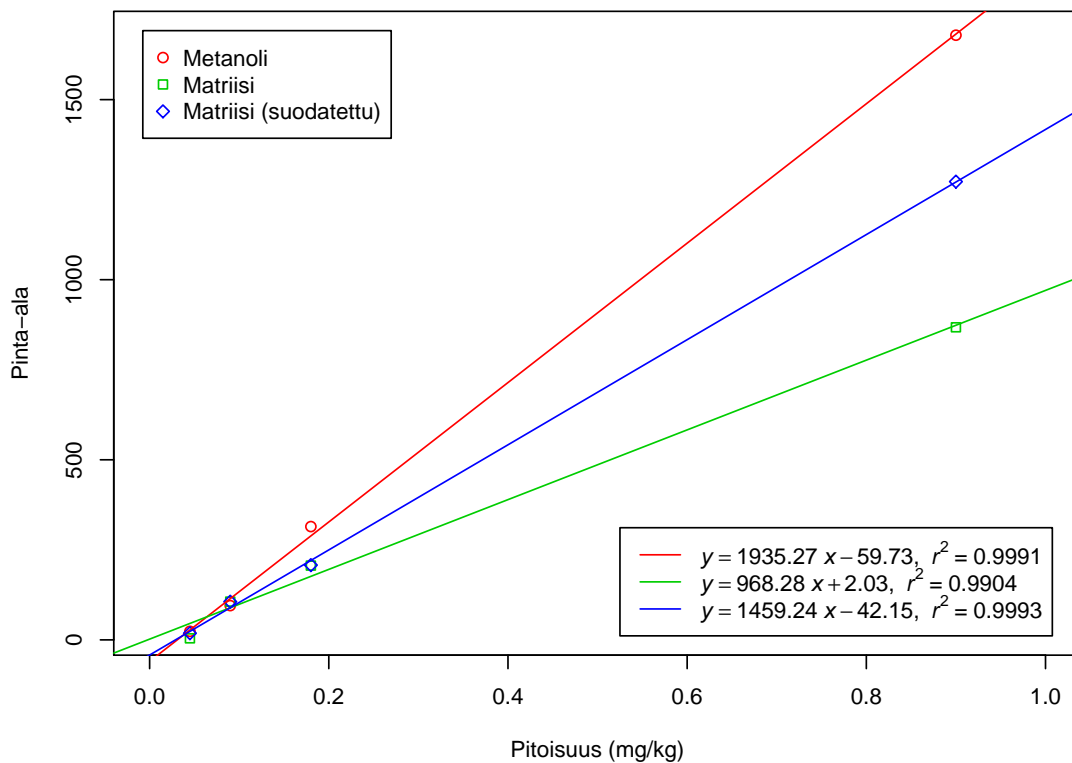
### Sudan yellow



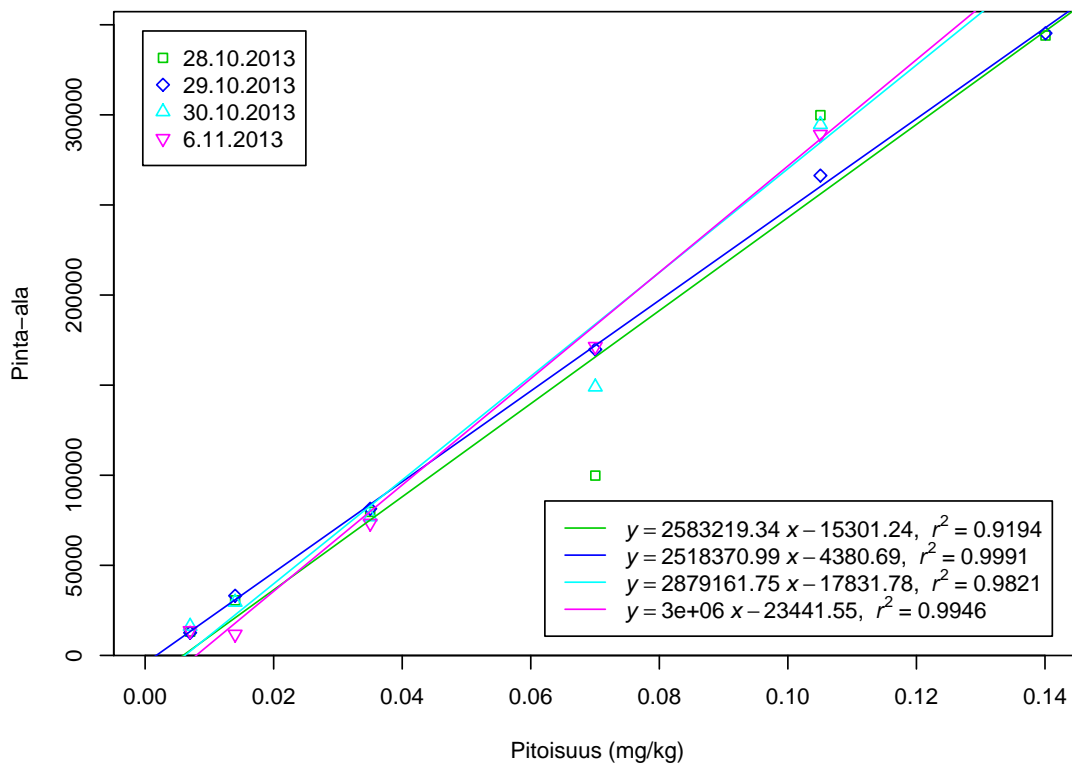
### Tartratsiini



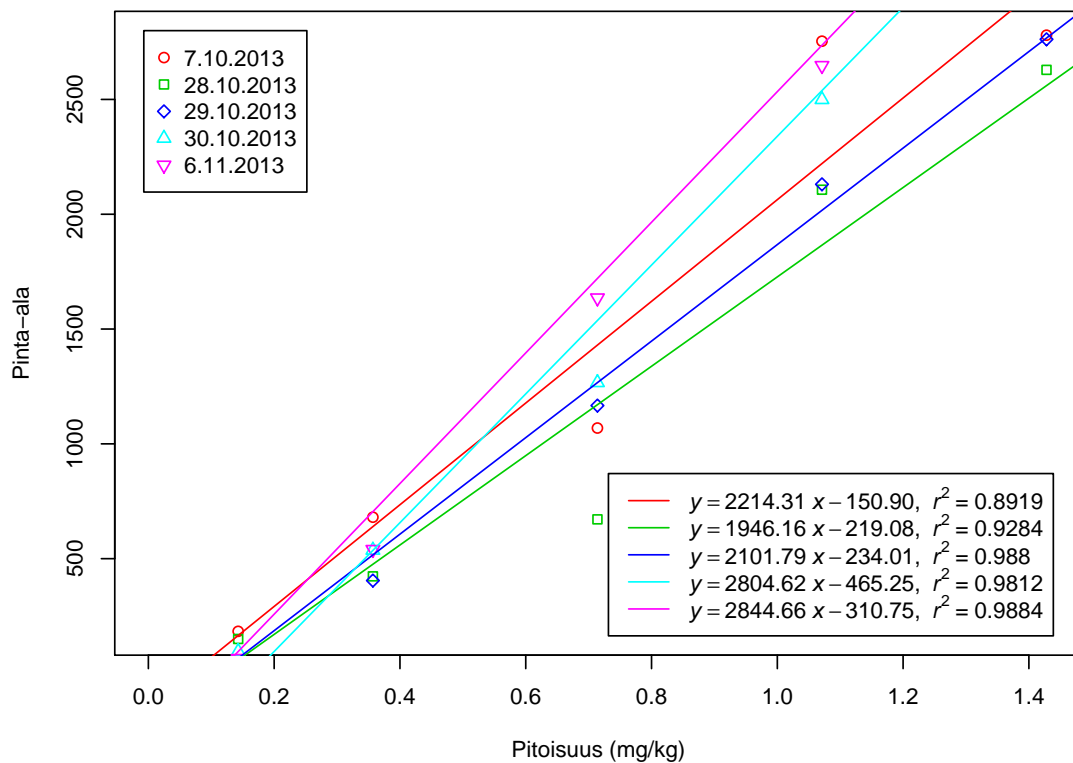
### Tartratsiini



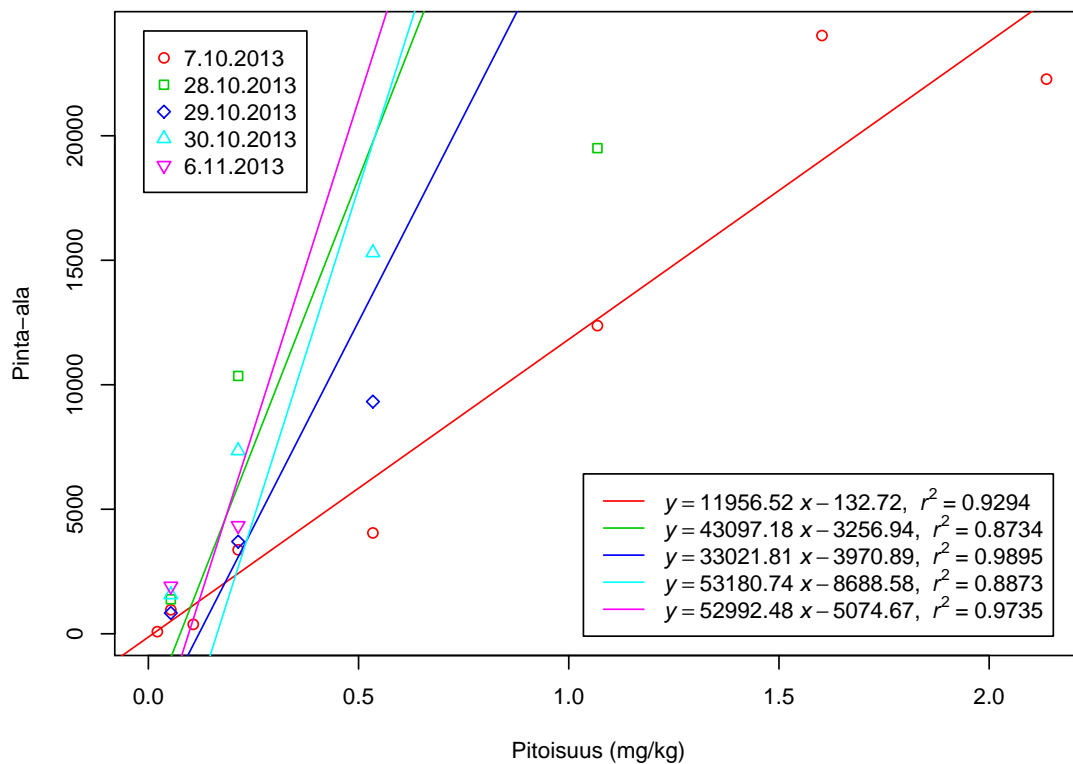
### Toluidine red



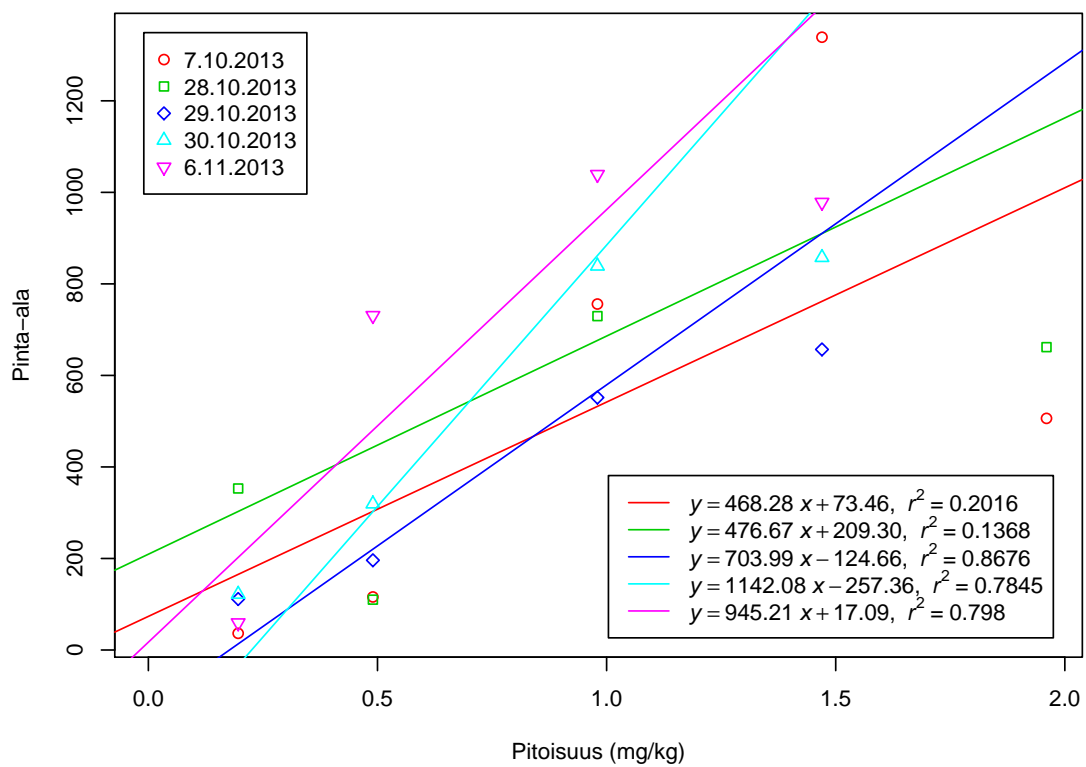
### Uuskokkiini



### Vihrea S



### Yellow 2G



## 5 Standardien säilyvyytlaskelmat

Analyytti	%RSD								
	Kvantitointi-ioni			Q1			Q2		
	$t_R$	Pinta-ala	Korkeus	$t_R$	Pinta-ala	Korkeus	$t_R$	Pinta-ala	Korkeus
Acid yellow 36	0,1	46,3	46,2	0,1	45,4	45,0	0,1	54,4	53,6
Alluranpunainen, ESI+	0,6	11,7	12,4						
Alluranpunainen, ESI-	0,6	28,0	26,4	0,6	37,7	37,5			
Amarantti, ESI+	4,5	14,2	29,8	4,1	16,6	34,8			
Amarantti, ESI-	7,3	77,1	87,1	6,3	68,3	68,6			
Auramine	0,1	4,4	4,7	0,1	3,9	4,4	0,1	5,0	4,3
Briljanttisininen FCF	0,2	24,3	23,5	0,2	25,8	25,0			
Chrysoidine G	0,9	16,9	17,8	0,9	14,8	15,7			
Erytrosiini	0,7	26,4	27,4	0,7	22,4	22,9	0,7	26,2	27,4
Fast garnet GBC	0,1	9,5	9,8	0,1	7,4	7,1	0,1	6,6	6,3
Fast green FCF	2,0	220,7	220,4	2,1	226,2	226,2	1,1	37,2	37,7
Indigokarmiini	0,4	17,9	19,8	0,4	15,6	14,3	0,5	27,2	33,1
Karmiinihappo	3,6	40,1	42,0	3,4	120,1	121,3	3,5	92,1	98,7
Karmosiini, ESI+	0,5	46,7	34,7						
Karmosiini, ESI-	0,2	37,2	39,6	0,3	25,8	26,1			
Kinoliinikeltainen, ESI+	1,7	136,4	135,8						
Kinoliinikeltainen, ESI-	2,0	97,7	89,2	1,4	132,7	103,9			
Kurkumiini	0,1	46,1	45,8	0,1	41,5	41,0	0,1	36,4	36,4
Oil orange SS	0,1	16,5	16,6	0,1	14,8	15,1	0,1	16,9	17,5
Orange II	0,1	10,1	10,0	0,1	11,3	11,1	0,1	11,4	11,3
Para Red	0,1	6,3	6,6	0,1	6,9	6,9	0,1	9,5	9,5
Paraoranssi, ESI-	0,9	18,6	16,8	1,0	20,9	19,8			
Patenttisininen, ESI+	0,1	17,7	17,0	0,1	23,8	23,0			
Patenttisininen, ESI-	0,1	22,4	22,0	0,2	29,7	29,8			
Red 2G, ESI+	0,4	14,3	14,5	0,4	7,5	8,1			
Red 2G, ESI-	0,4	15,5	15,8						
Rhodamine B	0,1	12,4	13,5	0,1	12,7	13,6	0,1	13,3	14,7
Sudan I	0,1	8,0	8,1	0,1	8,0	8,2	0,1	7,4	7,8
Sudan II	0,1	11,3	11,5	0,1	12,4	12,0	0,1	13,4	13,3
Sudan III	0,1	24,9	24,6	0,1	24,1	24,9	0,1	25,3	24,8
Sudan IV	0,2	36,5	43,3	0,1	40,0	36,0	0,1	31,5	29,4
Sudan orange G	0,1	15,8	15,8	0,1	12,3	12,6	0,1	11,1	11,5
Sudan red 7 B	0,1	97,8	98,9	0,1	75,0	72,9	0,1	90,8	90,1
Sudan red B	0,4	85,9	86,7	0,4	113,5	105,0	0,2	81,7	75,3
Sudan red G	0,1	16,9	17,7	0,1	18,4	19,5	0,1	19,2	20,8
Sudan yellow	0,1	12,7	13,2	0,1	14,0	14,8	0,1	12,9	14,3
Tartratsiini, ESI+	0,3	16,6	17,2						
Tartratsiini, ESI-	1,4	121,3	122,5						
Toluidine red	0,1	22,1	22,5	0,1	21,0	21,7	0,1	20,4	20,5
Uuskokkiini, ESI+	4,0	19,1	36,8	4,1	19,5	29,9	5,2	18,6	36,2
Uuskokkiini, ESI-	1,0	68,0	68,5						
Vihreä S	0,3	244,3	244,4	1,4	246,5	246,6	0,4	247,7	247,7
Yellow 2G	0,5	102,1	99,5	0,5	131,9	132,2	0,8	116,1	115,0

## 6 Tarkkuus- ja täsmällisyyslaskelmat

Taulukko 1: Tason 1 tulokset

Analyyyti	Pitoisuus (µg/kg)	Keskiarvo	Keskihajonta	%RSD	Abs.virhe
Acid yellow 36	50	38,4	10,0	26,0	-11,6
Alluranpunainen, ESI+	50	31,4	6,3	20,1	-18,6
Alluranpunainen, ESI-	50	48,1	0,0	0,0	-1,9
Amarantti, ESI+	500	389,5	57,3	14,7	-110,5
Amarantti, ESI-	500	1793,8	2751,4	153,4	1293,8
Auramine	50	53,5	4,1	7,7	-3,5
Briljanttisininen FCF	50	28,6	8,1	28,3	-21,4
Chrysoidine G	50	5,5	1,3	22,9	44,5
Erytrosiini	50	16,0	4,6	28,5	-34,0
Fast garnet GBC	50	25,2	4,2	16,8	-24,8
Fast green FCF	1000	848,9	181,2	21,3	-151,1
Indigokarmiini	500	215,4	15,6	7,3	-284,6
Karmiinihappo	500	430,1	82,9	19,3	-69,9
Karmosiini, ESI+	1000	21696,4	7550,3	34,8	20696,4
Karmosiini, ESI-	1000	386,0	202,1	52,4	-614,0
Kinoliinikeltainen, ESI+	1000	662,0	292,0	44,1	-338,0
Kurkumiini	50	51,1	5,0	9,8	1,1
Orange II	50	50,8	4,8	9,5	0,8
Paraoranssi, ESI-	500	481,5	108,9	22,6	-18,5
Patenttisininen, ESI+	50	46,2	3,1	6,7	-3,8
Patenttisininen, ESI-	50	41,0	6,8	16,5	-9,0
Red 2G, ESI+	50	45,6	2,6	5,7	-4,4
Red 2G, ESI-	50	36,4	8,2	22,5	-13,6
Rhodamine B	50	46,3	5,1	11,1	3,7
Sudan orange G	500	40,4	17,0	42,1	-459,6
Tartratsiini, ESI+	1000	686,6	138,8	20,2	-313,4
Tartratsiini, ESI-	1000	8210,1	8122,8	98,9	7210,1
Uuskokkiini, ESI+	500	410,0	101,1	24,7	-90,0
Vihreä S	1000	856,2	106,6	12,4	-143,8
Yellow 2G	1000	680,8	598,5	87,9	-319,2

Taulukko 2: Tason 2 tulokset

Analyytti	Pitoisuus (µg/kg)	Keskiarvo	Keskihajonta	%RSD	Abs.virhe
Acid yellow 36	100	73,2	13,6	18,5	-26,8
Alluranpunainen, ESI+	100	77,8	16,6	21,4	-22,2
Alluranpunainen, ESI-	100	171,8	0,0	0,0	71,8
Amarantti, ESI+	750	532,3	57,2	10,7	-217,7
Amarantti, ESI-	750	1026,8	2,4	0,2	276,8
Auramine	100	98,8	16,1	16,3	1,2
Briljanttisininen FCF	100	65,2	21,0	32,2	-34,8
Chrysoidine G	100	8,0	0,5	6,5	92,0
Erytrosiini	100	33,6	5,2	15,4	-66,4
Fast garnet GBC	100	63,3	12,6	20,0	-36,7
Fast green FCF	1500	1171,7	533,6	45,5	-328,3
Indigokarmiini	750	271,1	95,1	35,1	-478,9
Karmiinihappo	750	610,1	273,2	44,8	-139,9
Karmosiini, ESI+	1500	13531,0	2350,2	17,4	12031,0
Karmosiini, ESI-	1500	975,4	226,2	23,2	-524,6
Kinoliinikeltainen, ESI+	1500	401,4	124,3	31,0	-1098,6
Kurkumiini	100	65,6	7,0	10,7	-34,4
Orange II	100	82,3	13,3	16,2	-17,7
Paraoranssi, ESI-	750	646,0	234,5	36,3	-104,0
Patenttisininen, ESI+	100	82,3	12,6	15,3	-17,7
Patenttisininen, ESI-	100	93,7	16,9	18,1	-6,3
Red 2G, ESI+	100	80,8	14,9	18,4	-19,2
Red 2G, ESI-	100	68,1	16,9	24,8	-31,9
Rhodamine B	100	84,8	14,4	17,0	15,2
Sudan orange G	750	72,4	22,5	31,1	-677,6
Tartratsiini, ESI+	1500	933,7	181,3	19,4	-566,3
Tartratsiini, ESI-	1500	24750,0	20927,6	84,6	23250,0
Uuskokkiini, ESI+	750	670,9	51,0	7,6	-79,1
Vihreä S	1500	1105,7	461,9	41,8	-394,3
Yellow 2G	1500	2485,4	884,6	35,6	985,4



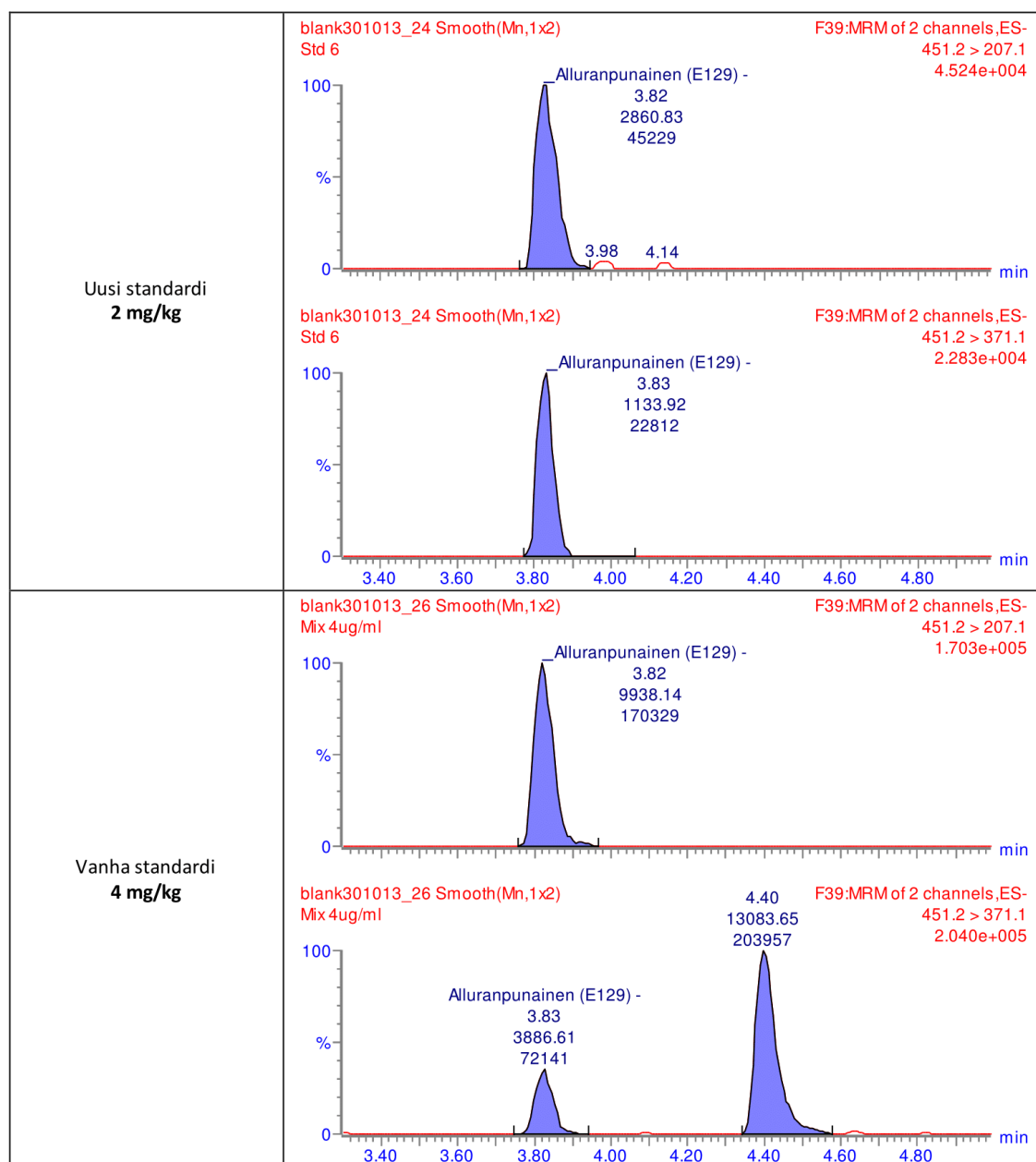
Taulukko 3: Tason 3 tulokset

Analyytti	Pitoisuus (µg/kg)	Keskiarvo	Keskihajonta	%RSD	Abs.virhe
Acid yellow 36	200	160,8	14,9	9,3	-39,2
Alluranpunainen, ESI+	200	208,9	6,3	3,0	8,9
Alluranpunainen, ESI-	200	153,7	112,0	72,9	-46,3
Amarantti, ESI+	1000	913,0	44,7	4,9	-87,0
Amarantti, ESI-	1000	1688,2	1385,7	82,1	688,2
Auramine	200	208,8	5,7	2,7	-8,8
Briljanttisininen FCF	200	175,6	2,1	1,2	-24,4
Chrysoidine G	200	33,2	9,8	29,7	166,8
Erytrosiini	200	103,6	11,9	11,5	-96,4
Fast garnet GBC	200	169,2	2,0	1,2	-30,8
Fast green FCF	2000	1701,8	134,9	7,9	-298,2
Indigokarmiini	1000	456,2	76,1	16,7	-543,8
Karmiinihappo	1000	383,1	340,2	88,8	-616,9
Karmosiini, ESI+	2000	22010,1	10659,8	48,4	20010,1
Karmosiini, ESI-	2000	1375,0	342,1	24,9	-625,0
Kinoliinikeltainen, ESI+	2000	159,5	0,0	0,0	-1840,5
Kurkumiini	200	114,3	17,2	15,0	-85,7
Orange II	200	174,8	3,8	2,2	-25,2
Paraoranssi, ESI-	1000	945,5	134,5	14,2	-54,5
Patenttisininen, ESI+	200	180,0	2,9	1,6	-20,0
Patenttisininen, ESI-	200	181,9	31,0	17,1	-18,1
Red 2G, ESI+	200	189,5	4,3	2,3	-10,5
Red 2G, ESI-	200	171,4	10,6	6,2	-28,6
Rhodamine B	200	188,0	5,0	2,6	12,0
Sudan orange G	1000	115,1	34,7	30,2	-884,9
Tartratsiini, ESI+	2000	1681,2	151,2	9,0	-318,8
Tartratsiini, ESI-	2000	121654,0	84457,6	69,4	119654,0
Uuskokkiini, ESI+	1000	1025,5	114,2	11,1	25,5
Vihreä S	2000	1502,3	308,6	20,5	-497,7
Yellow 2G	2000	3093,9	737,8	23,8	1093,9

## 7 Havaintoja analyttien käyttäytymisestä

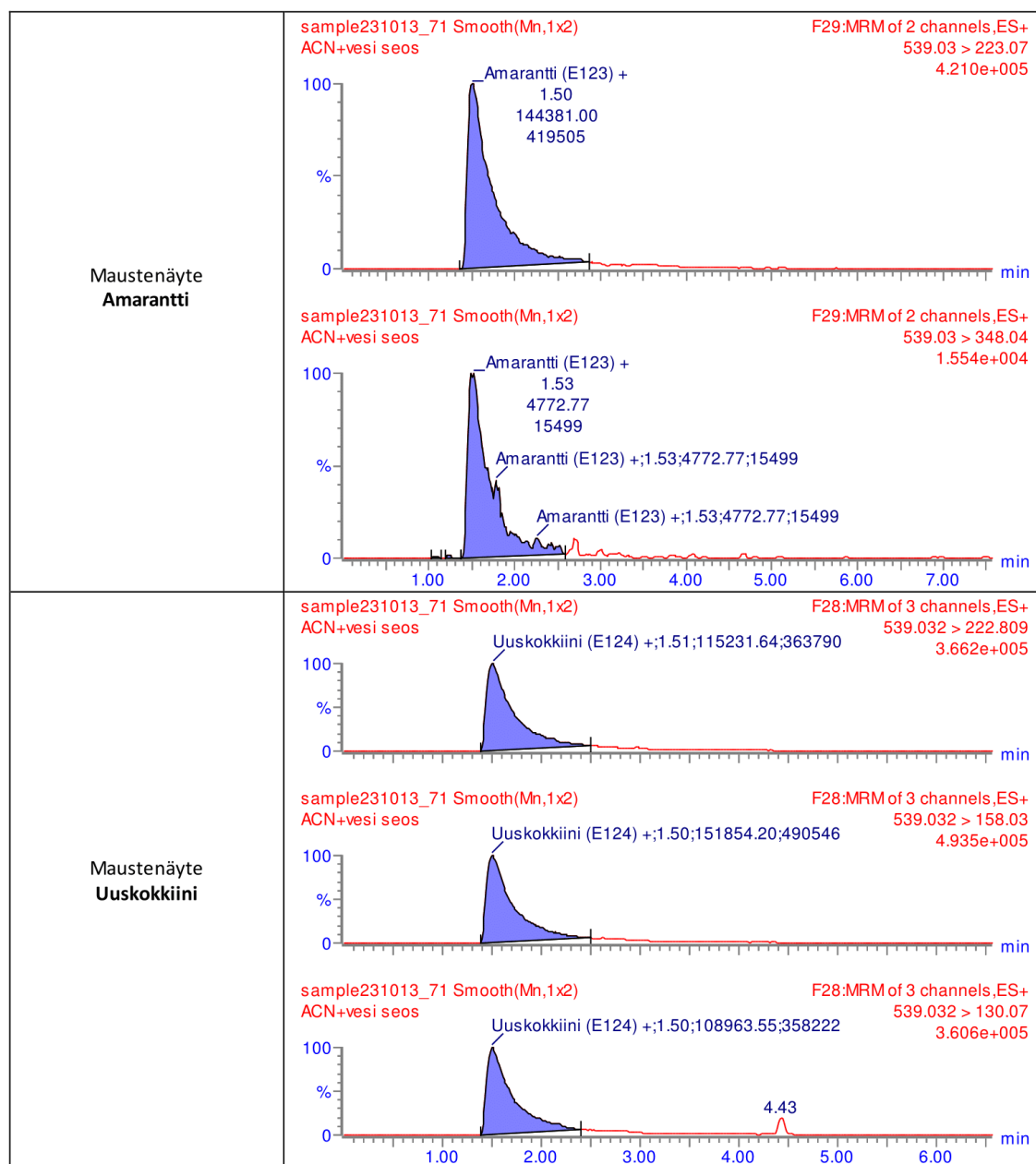
### 7.1 Alluranpunainen

ESI- puolella *alluranpunaisen* Q1 (451,2 > 371,1) viereen ilmestyy ajan myötä toinen piikki retentiolla 4,40. *Alluranpunaisen* hajoamistuote tämä ei voi olla, koska alkuperäinen piikki ( $t_R$  3,83) sijoittuu kalibrintisuoralle mainiosti. Kyseessä on luultavasti jonkin toisen analyttin hajoamistuote.



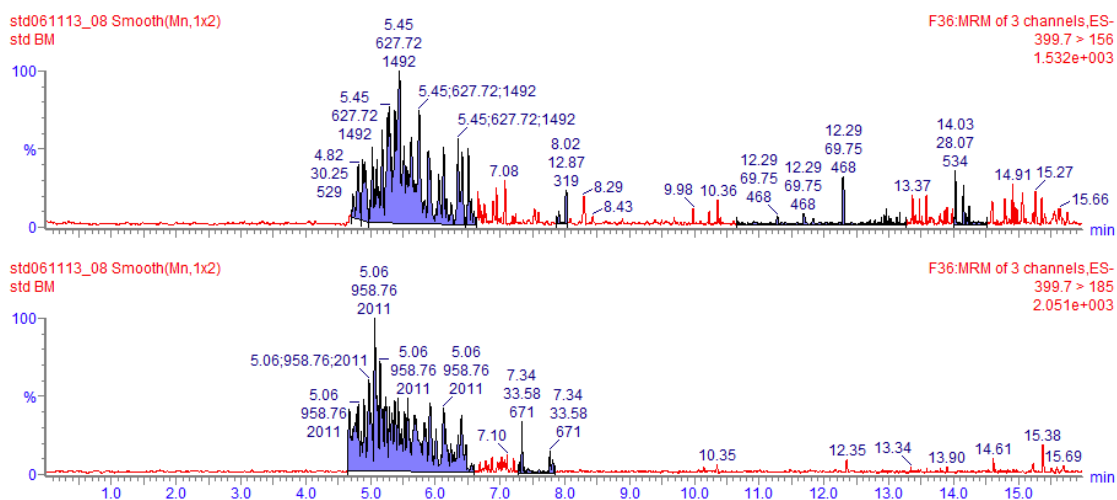
7.2 Amarantti ja Uuskokkiini

Identtinen retentioaika sekä pilkkoutuminen eli näitä kahta väriainetta ei pystytä erottamaan tällä menetelmällä. Esimerkkinä näyte, josta löydettiin TLC-menetelmällä vain *uus-*kokkiini.



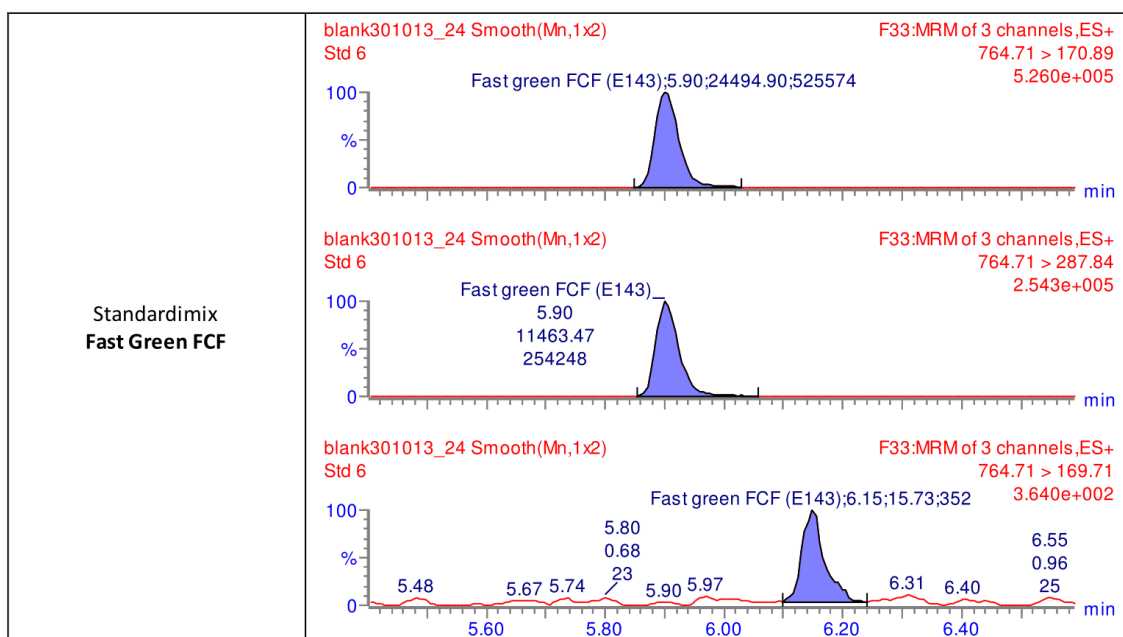
### 7.3 Briljanttimusta

*Briljanttimustan* alkuperäiset MS-parametrit eivät olleet toimivat. *Briljanttimustalle* yritettiin etsiä manuaalisesti syöttämällä puhdasta standardia suoraan massaspektrometrille. *Briljanttimustalle* löydettiin uudet parametrit negatiiviselta (ESI-) puolelta, joita kokeiltiin ajamalla puhtas standardi. Kuvassa on kyseisen ajon kromatogrammi, josta nähdään etteivät löydetty parametrit ole kovin optimaaliset.



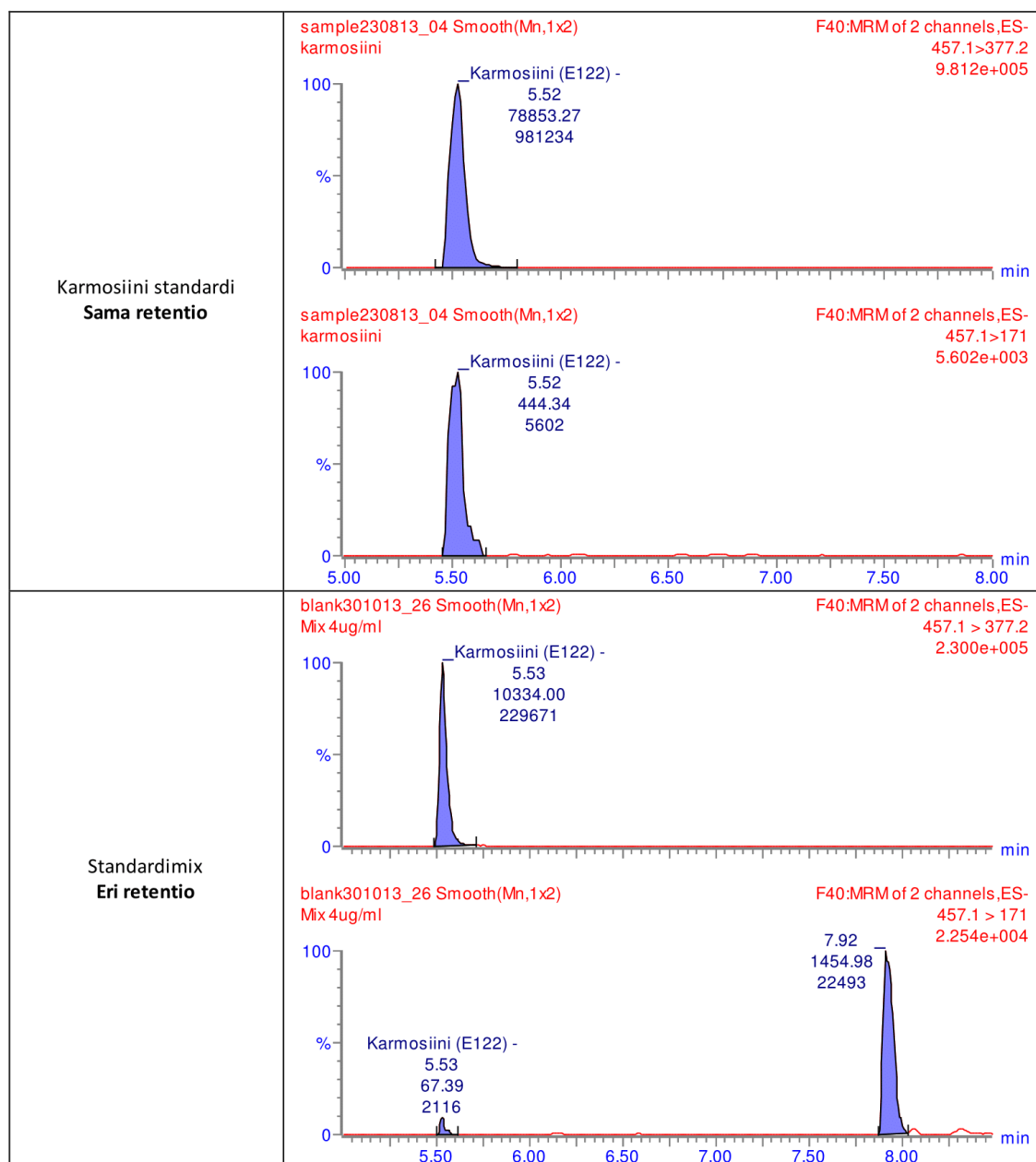
7.4 Fast Green FCF

*Fast green fcf:n* Q2:lla (764,71 > 169,71) on eri retentioaika verrattuna targettiin ja Q1:een. Tämä mahdollisesti johtuu standardin sisältämästä useasta eri analyytistä. Puhdasainee-  
na Q2:n retentioaika olisi todennäköisesti sama.



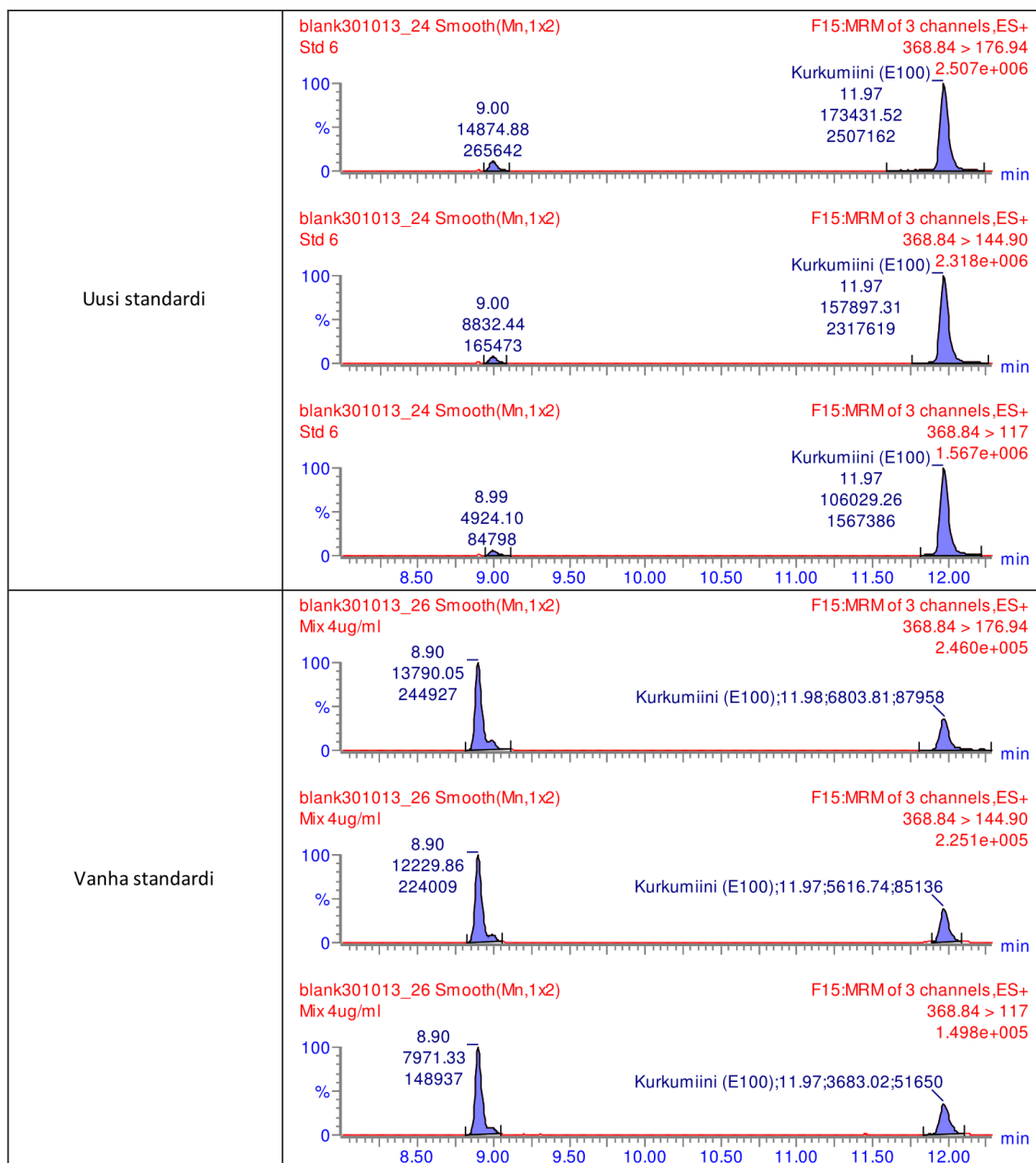
7.5 Karmosiini

*Karmosiinin* Q1:llä eri retentioaika negatiivisella puolella standardimixissä kuin puhtaana aineena tai Q1:n vaste on todella pieni.



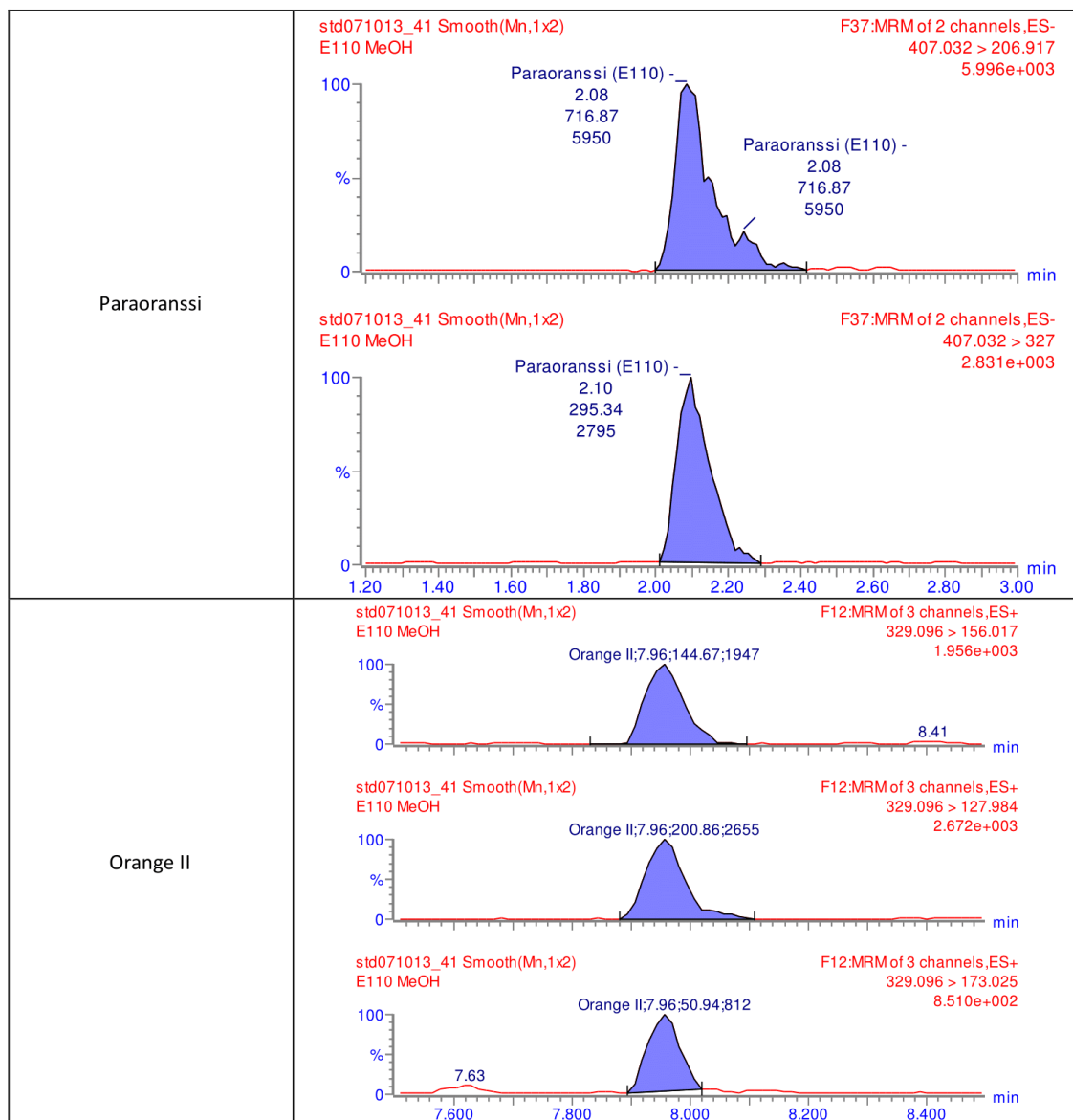
7.6 Kurkumiini

*Kurkumiini* hajoaa ajan myötä. Uusi piikki on mahdollisesti *kurkumiinin* isomeeri.



7.7 Paraoranssi

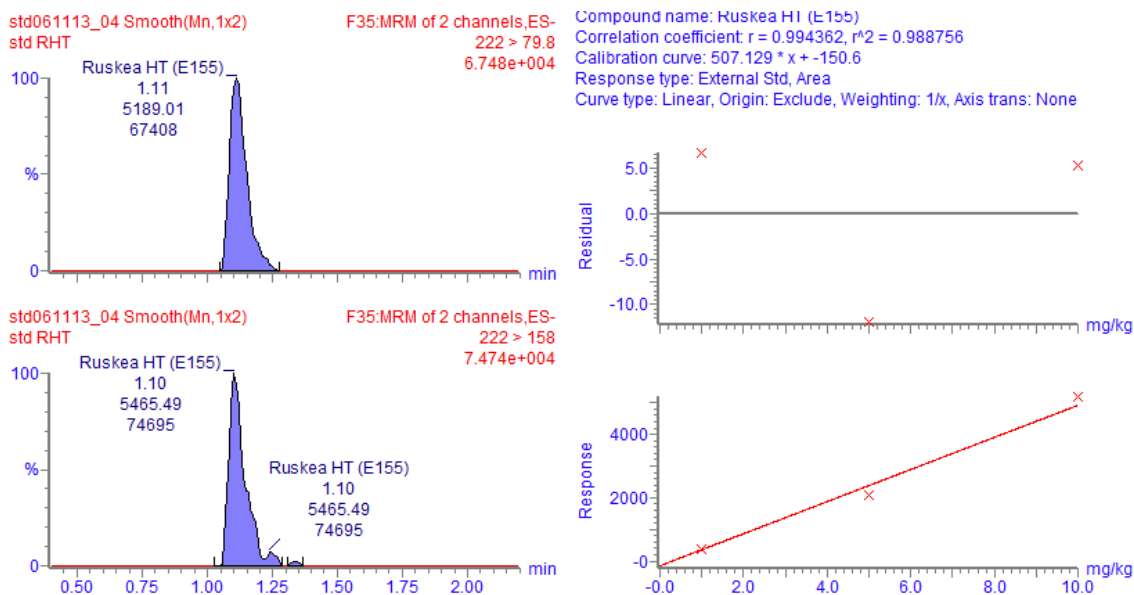
Tarkemmalla tutkinnalla *paraoranssi* standardi sisältää kiellettyä *orange II* väriainetta. Tämä todettiin yksittäisellä *paraoranssi* standardilla, jonka pitoisuus oli 1 mg/kg.





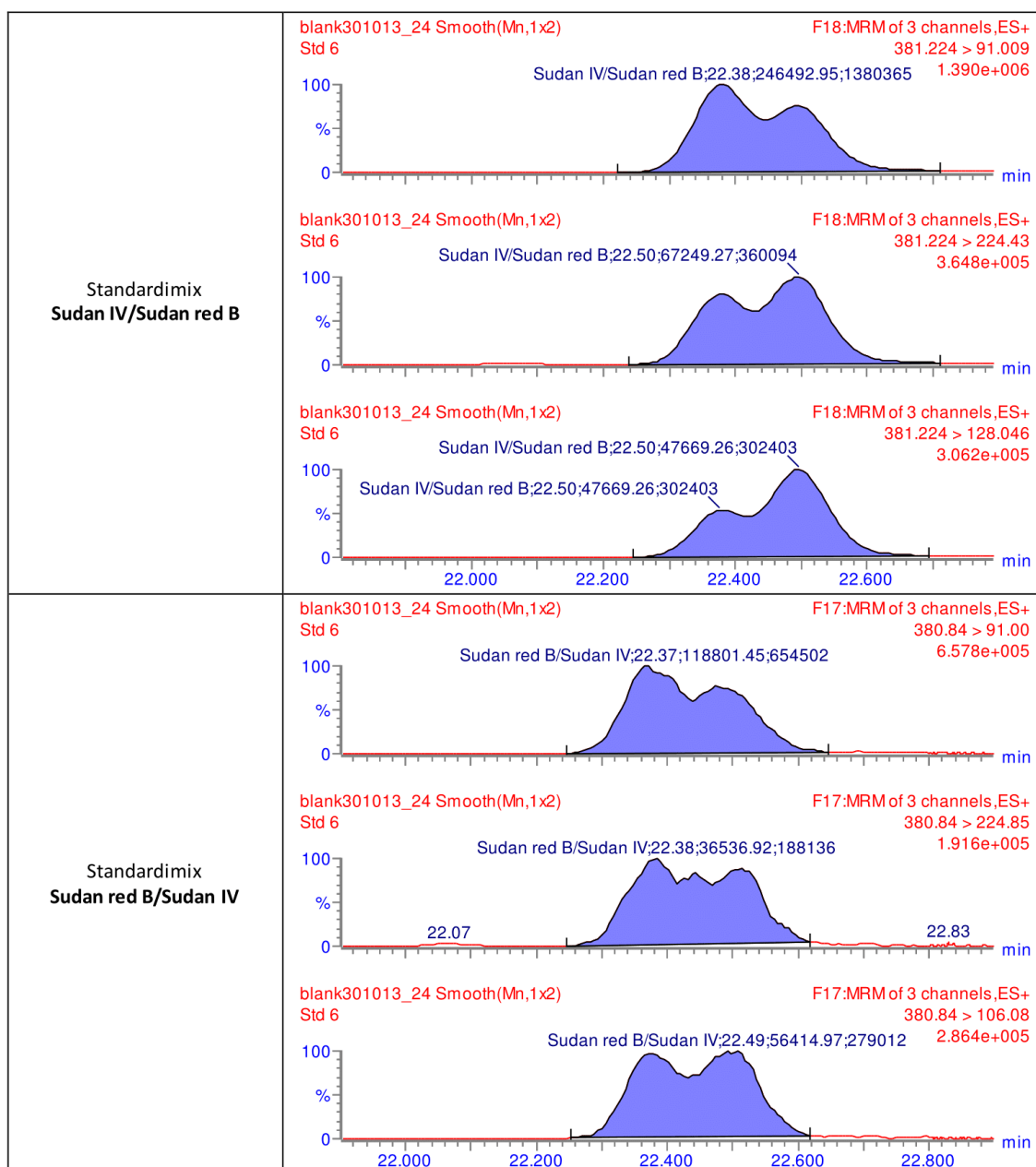
## 7.8 Ruskea HT

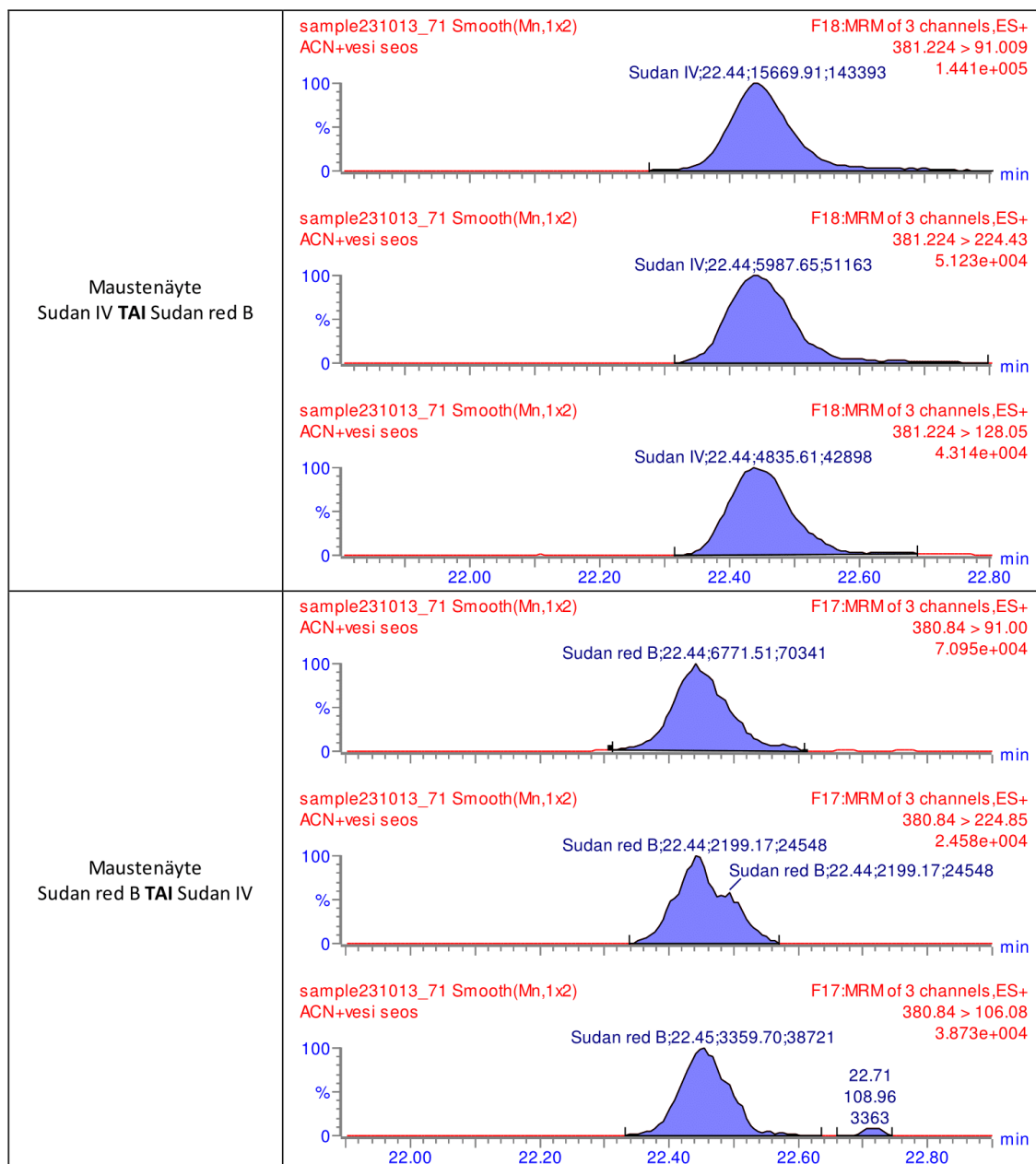
*Ruskea ht:n* kohdalla tehtiin samoin kuin *briljanttimustalle*. *Ruskea ht:lle* saatiin uudet lu-  
paavat MS-parametrit, joiden avulla saatiin tehtyä standardisuora. Tätä kokeilua pidem-  
mälle ei ehditty päästä.



7.9 Sudan IV ja Sudan red B

Analyttien erottuminen huono, lähes sama retentioaika. Ilmenee tuplapiikkinä standardimixissä. Puhdasaineina saattaisi erottua toisistaan.





7.10 Todella suuren vasteen analytyt

Suuren vasteen antava analytytti saattaa näkyä toisen analytytin kromatogrammissa ylimääräisenä piikkinä. Esimerkkinä *kurkumiini* ( $t_R$  11,96) näkyy suuressa pitoisuudessa sekä *erytrosiinin* ( $t_R$  11,58) sekä *rhodamine b:n* ( $t_R$  12,34) kromatogrammeissa suurena piikkinä.

Taulukko 1: Häiritseviä analytyttejä ja niiden  $t_R$

Analytytti	Retentioaika (min)
Patenttisininen	8,31
Kurkumiini	11,96
Rhodamine B	12,34
Fast Garnet GBC	14,07

