



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2017 30 stp

Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM)

Validering av en gasskromatografi- massespektrometri-metode for kvantifisering av nitro- og oksy- polysykliske aromatiske hydrokarboner (N-/O-PAH) i jordprøver

Gas chromatography-Mass spectrometry method
validation for the quantitative determination of nitro-
and oxy- containing polycyclic aromatic
hydrocarbons (N-/O-PAHs) in soil samples

Johanne Bettina Garstad

Organisk kjemi

Validering av en gasskromatografi/massespektrometri-metode for kvantifisering av nitro-og oksy-polysykliske aromatiske hydrokarboner (N-/O-PAH) i jordprøver.

Gas chromatography/ Mass spectrometry method validation for the quantitative determination of nitro- and oxy containing polycyclic aromatic hydrocarbons (N-/O-PAHs) in soil samples.

Denne masteroppgaven i organisk kjemi ble skrevet ved institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM) ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) i Ås, Norge.

Nøkkelord: Nitro- og oksy- polysykliske aromatiske hydrokarboner (N-/O-PAH), metodevalidering, GC-MS, NICI, jordprøver



Norwegian University
of Life Sciences

Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Johanne B. Garstad
Ås, 11.05.2017

Takk

Jeg vil først og fremst takke min veileder, professor Roland Kallenborn for tildeling av en spennende, utfordrende, relevant og lærerik oppgave. Samtidig har det blitt vist forståelse, ekstrem tålmodighet og god hjelpelighet ved spørsmål og diskusjoner rundt oppgaven. Det har jeg satt veldig pris på. Du har også vist en stor grad av tilgjengelighet vedrørende oppgaven både kveld og helg, noe som har skapt en trygghet rundt arbeidet. I tillegg vil jeg takke PhD.-student Tatiana Drotikova ved Universitetscenteret i Svalbard (UNIS) og PhD.-student Montserrat Marques Bueno ved Universitat Rovira i Virgili (URV), Spania for opparbeiding av prøvemateriale.

Jeg vil også takke post. Doc. Pourya Shahpoury for drøftinger og felles vurderinger av påstander samt tilgjengelighet i ettertid i forbindelse med sammenligning og bruk av hans metode.

Det er viktig for meg å få takke PhD.-student Aasim M. M. Ali for fantastisk hjelp under bearbeidingen av resultatene ved bruk av dataprogram som ble benyttet. Det ble vist stor tålmodighet i denne perioden. Samtidig vil jeg takke for din tilstedeværelse under samtaler og drøfting rundt resultatene. Det ble en annen stemning på kontoret med deg tilstede!

Sist, men ikke minst, vil jeg takke familien min. Mamma og pappa har stilt opp, bidratt med enrom motivasjon når det har blitt som verst, vist både stolthet, støtte og forståelse. De perfekte barna mine har klart å få fokuset bort fra skole når det har trengtes og bragt glede og kjærighet inn i hverdagen. I tillegg har nære venner tilbudt seg å hjelpe, støttet og motivert meg i en ellers tøff hverdag.

Tusen takk alle sammen!

Sammendrag

Polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH) er en gruppe kjemiske forbindelser som er bygget opp av to eller flere benzenringer. PAH er reaktive forbindelser med en levetid i atmosfæren fra noen timer til flere dager. Ved oksidering av PAH dannes det hovedsakelig oksy- og nitro-derivater. Nitro- og oksy-polysykliske aromatiske hydrokarboner (N-/O-PAH) utgjør stor bekymring grunnet deres giftighet og noen har blitt klassifisert som kreftfremkallende, cytotoxiske og mutagene på mennesker av IARC (International Agency for Research on Cancer, groups 2A og 2B). De slippes ut i atmosfæren direkte ved ufullstendig forbrenning eller ved dannelse av homogene og heterogene fotooksideringsprosesser i atmosfæren ved at det skjer en endring av PAH.

Denne oppgaven går ut på å validere en gasskromatografi-massespektrometri-metode (GC-MS) basert på kvantifisering av N-/O-PAH i jordprøver utarbeidet ved NMBU/IKBM. Et utvalg jordprøver hentet ut og opparbeidet ved UNIS, ble sendt til Ås for videre tester og analyser for å kunne teste metoden under realistiske betingelser. Ulike standarder av nitro- og oksy-polysykliske aromatiske hydrokarboner ble analysert ved hjelp av internstandarder og gjenvinningsstandard. Alle analysene ble gjort med gasskromatografi og masseselektiv detektor (trippel kvadrupol) med negativ kjemisk ionisering (GC/QQQ-NICI).

Til slutt ble de samme standardene og et utvalg jordprøver analysert og sammenlignet med en annen GC-MS-metode utviklet for Max-Planck-instituttet for kjemi i Mainz, Tyskland (MPIC-metoden) på samme instrument.

Det ble utført en komplett metodevalidering og sammenligning av to metoder hvor flere valideringskriterier ble vurdert. For IKBM-metoden ble det med unntak av noen standarder estimert en tilfredsstillende linearitet med en regresjonskoeffisient, R , på 0,965-1,000. Deteksjons- og kvantifiseringsgrenser ble beregnet for begge metodene for å kunne vurdere om konsentrasjonene var egnet for miljøanalyser og ble liggende mellom 0,2-35500,4 pg/g. Denne spredningen i resultatene antas å oppstå grunnet utfordringer med de blanke prøvene benyttet på IKBM-metoden, hvor det ble detektert topper i kromatogrammet.

Presisjonen ble beregnet for begge metodene ved at standardavviket og relativt standardavvik ble beregnet. Det relative standardavviket for IKBM-metoden varierte fra 6-29 %, mens for MPIC-metoden varierte det fra 15-52 %. Beregnet standardavvik for IKBM-metoden lå mellom 3-15 pg, mens for MPIC-metoden lå den mellom 3-13 pg.

Gjenvinningsgraden og total mengde standard i bakgrunnsjordprøver ble kun beregnet for IKBM-metoden, da jordprøvene som ble analysert på MPIC-metoden ikke viste noen deteksjon av gjenvinningsstandard eller standarder. For IKBM-metoden ble gjenvinningen av internstandard i jordprøvene beregnet til å ligge mellom 10-83 %. For beregningene av total mengde standard i 10 g jordprøve, ble mengden standard estimert til å ligge mellom 1,9-2572,6 pg.

I tillegg ble det gjort vurderinger av selektiviteten og nøyaktigheten av metoden hvor instrumentparameterne og temperaturprogrammet benyttet i metoden ble tatt høyde for. Begge metodene ble vurdert som egnet for de forbindelsene de var laget for, men grunnet problemer med prøveoppbeholdelsen trengs det små justeringer til i senere undersøkelser.

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are a class of chemicals that contains two or more fused benzene rings. PAHs have a half-lifetime in the atmosphere from a few hours and up to several days. PAHs are transformed through environmental oxidation processes into nitro- and oxy-PAH (N-/O-PAH). Those major PAH transformation products are considered toxic for humans and the environment. Some of them are classified carcinogenic, cytotoxic and mutagenic on human beings by IARC (International Agency for Research on Cancer, groups 2A og 2B). They are released to the atmosphere through fossil fuel combustion (traffic, domestic sources and power plants), and produced from PAHs through homogeneous or heterogeneous photo oxidation in the atmosphere.

This thesis focused on the validation and comparison of two gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) based quantification methods developed for analysis of N-/O-PAHs in soil samples. A set of soil samples were prepared at UNIS and sent to Ås for testing and analysis. The method validation was performed on at GC-MS triple quadrupole instrument in negative ion Chemical Ionization selected ion mode (GC/QqQ-NICI-SIM). A GC/MS method was developed for the quantitative analysis of N-/O-PAHs in Svalbard soil and air (IKBM method). A second GC/MS method was developed for the N-/O-PAH analysis in a global survey of wet deposition and snow samples by the Max-Planck Institute for Chemistry (MPIC method, Mainz, Germany). Both methods were validated and compared on the same GC/MS instrument for the here conducted study.

A complete method validation for both methods was performed in the presented thesis. For both methods, the linearity was estimated with a regression coefficient, R , between 0,965-1,000. Limits of detection and limits of quantification were estimated for both methods. The estimated LOD and LOQ lied between 0,2-35500,4 pg/g. This huge variation in the results is believed to arise due to challenges with the blank samples used for IKBM method, where the curves were not flat, and it was detected peaks in the chromatogram.

The precision was estimated for both methods, where standard deviation and relative standard deviation was calculated and compared. Relative standard deviation for the complete GC-MS method was calculated to be 6-29 % for the IKBM-method and 15-52 % for the MPIC-method. The standard deviation was calculated to be 3-15 pg for the IKBM method and 3-13 pg for the MPIC method.

The recovery and the total amount of standards in soil samples was only estimated for IKBM method, because the soil samples used for MPIC method did not include any standards. The recovery was estimated to be between 10-83 % for the IKBM method. It was not possible to estimate the recovery of the soil samples analyzed on the MPIC method because of unexpected loss of recovery standard during the sample preparations at UNIS. The total amount of standards in soil samples were estimated to be 1,9-2472,6 pg/g.

The selectivity and accuracy of the methods were valued according to the instrumental parameters chosen as well as the GC temperature programs. Both methods are considered equally suitable for the trace analytical quantification of N-/O-PAHs. However, since the sample preparation method could not be validated, careful adjustments are required and should be given proper priority in future studies.

Innholdsfortegnelse

Takk	II
Sammendrag	III
Abstract	IV
Tabell over tabeller	VII
Tabell over formler	VIII
Tabell over figurer	VIII
Forkortelser	X
1. Bakgrunn	1
1.1. Polysykliske aromatiske hydrokarboner	1
1.2. Nitro- og oksy-polysykliske aromatiske hydrokarboner	2
1.3. Intern standard metode	5
1.4. Gasskromatografi-massespektrometri	5
1.5. Tidligere forskning	9
1.6. Om oppgaven	10
1.7. Metodevalidering	11
1.7.1. Linearitet	11
1.7.2. Sensitivitet	11
1.7.3. Nøyaktighet	12
1.7.4. Gjenvinning	12
1.7.5. Spesifisitet/selektivitet	13
1.7.6. Presisjon	14
1.7.7. Deteksjonsgrense	15
1.7.8. Kvantifiseringsgrense	16
1.7.9. Total mengde analytt i reelle prøver	16
1.7.10. Usikkerhet	17
2. Materialer og metode	18
2.1. Utstysrliste	18
2.2. Kjemikalieliste	18
2.3. Metode	20
2.3.1. Kalibreringsløsninger laget for analyse	21
2.3.2. IKBM-metoden	23
2.3.3. MPIC-metoden	24
3. Resultat	25
3.1. IKBM-metoden	25
3.1.1. Linearitet	25
3.1.2. Sensitivitet	28
3.1.3. Nøyaktighet	30
3.1.4. Gjenvinning	30
3.1.5. Spesifisitet/selektivitet	31
3.1.6. Presisjon	31
3.1.7. Deteksjons- og kvantifiseringsgrenser	33
3.1.8. Total mengde standarder i jordprøver	33
3.1.9. Usikkerhet	34
3.2. MPIC-metoden	35

3.2.1.	Linearitet	35
3.2.2.	Sensitivitet	36
3.2.3.	Nøyaktighet	37
3.2.4.	Gjenvinning	37
3.2.5.	Spesifisitet/selektivitet	37
3.2.6.	Presisjon	37
3.2.7.	Deteksjons- og kvantifiseringsgrenser	39
3.2.8.	Total mengde standarder i jordprøver	39
3.2.9.	Usikkerhet	40
4.	Diskusjon	41
4.1.	<i>IKBM -metoden</i>	41
4.2.	<i>MPIC-metoden</i>	43
4.3.	<i>Sammenligning av metodene</i>	44
5.	Konklusjon	47
6.	Videre arbeid	48
	Referanser	49
	Vedlegg	52
A.	<i>Kjemikalier og utstyr</i>	52
B.	<i>Tabeller og figurer tilknyttet kapittel 1.</i>	56
C.	<i>Resultater</i>	60
D.	<i>Kromatogram</i>	65

Tabell over tabeller

Tabell 2.2.1. Standardløsninger benyttet i fortyninger og videre analyser tilsendt fra Svalbard	18
Tabell 2.3.1: Valideringsplan for ulike metodevalideringskriterier.....	20
Tabell 2.3.2. Kalibreringsløsninger av nitro-og oksy-PAH og internstandarder	21
Tabell 2.3.3. Konsentrasjon av nitro- og oksy-PAH etter tilsetning av internstandard	22
Tabell 2.3.4. Konsentrasjon av internstandarder etter tilsetning av gjenvinningsstandard	22
Tabell 2.3.5. Temperaturprogram benyttet i IKBM-metoden.....	23
Tabell 2.3.6. Temperaturprogram benyttet i MPIC-metoden	24
Tabell 3.1.1. Oversikt over determinantkoeffisientene, R^2 hentet fra regresjonslikningen samt beregnet regresjonskoeffisient, R for N-/O-PAH-fortynningene.....	25
Tabell 3.1.2. Oversikt over determinantkoeffisienten, R^2 hentet fra regresjonslikningen samt beregnet regresjonskoeffisient, R for N-/O-PAH-fortynninger tilsatt 100 pg/ μ L ISTD .	26
Tabell 3.1.3. Oversikt over forbindelsene som ikke tilfredstilte linearitetskravet	27
Tabell 3.1.4. Oversikt over determinantkoeffisienten, R^2 hentet fra regresjonslikningen samt beregnede regresjonskoeffisienter, R for ISTD-fortynningene	27
Tabell 3.1.5. Oversikt over determinantkoeffisienter, R^2 hentet fra regresjonslikningen samt beregnede regresjonskoeffisienter, R for internstandardene tilsatt 100 pg/ μ L RSTD.....	27
Tabell 3.1.6. Oversikt over beregnet gjenvinning, R (%) for et utvalg jordprøver og internstandarder.....	31
Tabell 3.1.7. Beregnet deteksjons- og kvantifiseringsgrenser for et utvalg standarder (pg/g)	33
Tabell 3.1.8. Oversikt over beregnet total mengde standarder i et utvalg jordprøver målt i pg	34
Tabell 3.2.1. Oversikt over determinantkoeffisienter, R^2 hentet fra regresjonslikningen samt beregnede regresjonskoeffisienter, R for N-/O-PAH-fortynninger tilsatt 100 pg/ μ L ISTD	35
Tabell 3.2.2. Oversikt over determinantkoeffisienten, R^2 hentet fra regresjonslikningen samt beregnede regresjonskoeffisienter, R for ISTD-fortynninger tilsatt 100 pg/ μ L RSTD...	35
Tabell 3.2.3. Beregnet deteksjons-og kvantifiseringsgrenser for et utvalg standarder i pg/g..	39
Tabell 4.3.1. Oversikt over parameterinnstillinger som avviker på IKBM- og MPIC-metoden	44
Tabell A.1. Oversikt over instrumenter, utstyr og programvare benyttet i denne studien.....	52
Tabell A.2. Oversikt over kjemikalier benyttet i denne studien	53
Tabell A.3. Oversikt over forbindelser som opprinnelig er benyttet i MPIC-metoden	55
Tabell B.1. Nomenklatur, molekylformler, relativ molekylmasse og CAS-nummer av et utvalg N-PAH og deres oksygenderivater hentet fra Wahnschaffe, U. J., Kielhorn, J. og Mangelsdorf, I., Selected Nitro- and nitro.oxy-polycyclic aromatic hydrocarbons, 2003.[13].....	57
Tabell C.1. Oversikt over kvantifiserings- og kvalifiseringsioner samt retensjonstider til alle forbindelser benyttet i dette studiet.....	60
Tabell C.2. Beregnede deteksjons- og kvantifiseringsgrenser for standarder for IKBM-metoden i pg/g.....	61
Tabell C.3. Beregnet gjenvinning av internstandard i jordprøver gitt i prosent (%). Verdier under 20 % er markert med rødt, som ikke tilfredstilte kravet samt at den beste internstandard er markert med blått.	62
Tabell C.4. Total mengde standard beregnet i 10 g jordprøve målt i pg.	63
Tabell C.5. Beregnede deteksjons- og kvantifiseringsgrenser for standarder på MPIC-metoden målt i pg/g	64

Tabell over formler

Formel 1.1. Beregning av nøyaktighet i standardprøver.....	12
Formel 1.2. Beregning av responsfaktor til internstandard i forhold til gjenvinningsstandard	12
Formel 1.3. Beregning av gjenvinningsgrad.....	13
Formel 1.4. Beregnet standardavvik for et utvalg prøver	14
Formel 1.5. Beregnet relativt standardavvik (RSD) i prosent	14
Formel 1.6. Beregnet standardavvik for en gitt populasjon eller et antall prøver	15
Formel 1.7. Beregnet deteksjonsgrense når standardavviket for de blanke prøvene er beregnet	15
Formel 1.8. Beregnet kvantifiseringsgrense når standardavviket for de blanke prøvene er beregnet.....	16
Formel 1.9. Beregnet responsfaktor av analytt i forhold til internstandarden	16
Formel 1.10. Beregnet total mengde analytt i reelle prøver	16

Tabell over figurer

Figur 1.2.1. Strukturer på noen nitro- og oksy-PAH hentet fra Selected nitro and nitro-oxy-polycyclic aromatic hydrocarbons.[14]	4
Figur 1.4.1. Skjematisk beskrivelse av en gasskromatograf hentet fra BBC, Science Chromatography [25].....	6
Figur 1.4.2. Skjematisk beskrivelse av en kjemisk ionisasjon-ionekilde hentet fra University of Pittsburh, Mass Spectrometry Introduction[30]	8
Figur 1.4.3. Skjematisk beskrivelse av en gasskromatograf-massespektrometri hentet fra Organic Spectroscopy International.[31]	9
Figur 2.2.1. Kart over Longyearbyen, Svalbard hvor prøvene er høstet og opparbeidet. Bildet er hentet fra www.npolar.no	19
Figur 2.2.2. Flytskjema over prøveopparbeidingen gjort ved UNIS, Longyearbyen, Svalbard	19
Figur 3.1.1. Kalibreringskurven til 2-nitrofluorene	28
Figur 3.1.2. Kalibreringskurven til 2-nitroanthracene	29
Figur 3.1.3. Kalibreringskurven til 1,8-dinitropyrene.....	29
Figur 3.1.4. Kalibreringskurven til anthraquinone-D8	29
Figur 3.1.5. Kalibreringskurven til 9-fluorenone-D10.....	30
Figur 3.1.6. Fremstilling av relativt standardavvik av N-/O-PAH tilsatt 100 pg/μL ISTD i konsentrasjonsintervallene 450(1), 225(2), 56(3) og 28(4) pg/μL.	32
Figur 3.1.7. Fremstilling av beregnet standardavvik av N-/O-PAH tilsatt 100 pg/μL ISTD i konsentrasjonsintervallene 450(1), 225(2), 56(3) og 28(4) pg/μL.	33
Figur 3.2.1. Kalibreringskurven til 2-nitrofluorene	36
Figur 3.2.2. Kalibreringskurven til 1,6-dinitropyrene.....	36
Figur 3.2.3. Fremstilling av relativt standardavvik av alle N-/O-PAH tilsatt 100 pg/μL ISTD som ble analysert tilfredsstillende i konsentrasjonsintervallet 450(1), 125(2) og 56(3 og 4) pg/μL	38
Figur 3.2.4. Fremstilling av beregnet standardavvik av alle N-/O-PAH tilsatt 100 pg/μL ISTD som ble analysert tilfredsstillende i konsentrasjonsintervallet 450(1), 125(2) og 56(3 og 4) pg/μL	39
Figur 4.1.1. Beregnet gjenvinning av internstandard i jordprøver.....	42
Figur 4.3.1. Oversikt over fordeler og ulemper vurdert på IKBM- og MPIC-metoden.	45
Figur B.1. Navn og struktur på utvalgte PAH som overvåkes ut ifra anbefalinger gitt av EU Scientific Committee for Food (SCF), den Europeiske Union (EU) og US Environmental	

Protection Agency (EPA) hentet fra Lerda, D., Polycyclic aromatic hydrocarbons factsheet, 2010.[11].....	56
Figur D.1. Totalt ionekromatogram over standarder med konsentrasjon på 450 pg/ μ L tilsatt 100 pg/ μ L internstandard utført på IKBM-metoden.....	65
Figur D.2. Totalt ionekromatogram over standarder med konsentrasjon på 28 pg/ μ L tilsatt 100 pg/ μ L internstandard utført på IKBM-metoden.....	65
Figur D.3. Totalt ionekromatogram over internstandardene med konsentrasjon på 450 pg/ μ L tilsatt 100 pg/ μ L gjenvinningsstandard utført på IKBM-metoden	66
Figur D.4. Totalt ionekromatogram over internstandardene med konsentrasjon på 28 pg/ μ L tilsatt 100 pg/ μ L gjenvinningsstandard utført på IKBM-metoden	66
Figur D.5. Selektiv ionemodus-kromatogram som viser forbindelsene 1-nitronaphtalene og 2-nitronaphtalene ved en konsentrasjon på 28 pg/ μ L utført på IKBM-metoden.....	67
Figur D.6. Selektiv ionemodus-kromatogram som viser internstandarden 9-fluorenone-D8 ved en konsentrasjon på 28 pg/ μ L utført på IKBM-metoden.....	67
Figur D.7. Selektiv ionemodus-kromatogram som viser gjenvinningsstandarden fluoranthene-D10 ved en konsentrasjon på 100 pg/ μ L utført på IKBM-metoden.....	68
Figur D.8. Selektiv ionemodus-kromatogram for 5-nitroacenaphtene i prøve P6G utført på IKBM-metoden	68
Figur D.9. Selektiv ionemodus-kromatogram for tilhørende internstandard til 5-nitroacenaphtene, Anthraquinone-D8 i prøve P6G utført på IKBM-metoden.	68
Figur D.10. Selektiv ionemodus-kromatogram som viser internstandarden 9-fluorenone-D8 i prøve P8H utført på IKBM-metoden.	69
Figur D.11. Selektiv ionemodus -kromatogram som viser gjenvinningsstandarden fluoranthene-D10 i prøve P8H utført på IKBM-metoden.....	69
Figur D.12. Blank prøve på IKBM-metoden.....	69
Figur D.13. Totalt ionekromatogram over standarder med konsentrasjon på 450 pg/ μ L tilsatt internstandard med konsentrasjon på 100 pg/ μ L utført på MPIC-metoden.	70
Figur D.14. Totalt ionekromatogram over standarder med konsentrasjon på 28 pg/ μ L tilsatt internstandard med konsentrasjon på 100 pg/ μ L utført på MPIC-metoden.	70
Figur D.15. Totalt ionekromatogram over internstandarder med konsentrasjon på 450 pg/ μ L tilsatt gjenvinningsstandard med konsentrasjon på 100 pg/ μ L utført på MPIC-metoden.	71
Figur D.16. Totalt ionekromatogram over internstandarder med konsentrasjon på 56 pg/ μ L tilsatt gjenvinningsstandard med konsentrasjon på 100 pg/ μ L utført på MPIC-metoden.	71
Figur D.17. Selektiv ionemodus -kromatogram som viser de native standardene 1-nitronaphtalene og 2-nitronaphtalene ved en konsentrasjon på 28 pg/ μ L utført på MPIC-metoden.....	72
Figur D.18. Selektiv ionemodus -kromatogram som viser internstandarden 9-fluorenone-D8 ved en konsentrasjon på 56 pg/ μ L utført på MPIC-metoden.....	72
Figur D.19. Selektiv ionemodus -kromatogram som viser gjenvinningsstandarden fluoranthene-D10 med en konsentrasjon på 100 pg/ μ L utført på MPIC-metoden.	73
Figur D.20. Totalt ionekromatogram over en vanlig blank prøve utført på MPIC-metoden...	73
Figur D.21. Selektiv ionemodus -kromatogram over en reell prøve utført på MPIC-metoden	73

Forkortelser

AQ-D8:	Anthraquinone-D8
BF:	Benzo[a]fluoren-11-one
CAS:	Chemical Abstracts Service
CI:	Kjemisk ionisasjon (Chemical Ionization)
EI:	Elektronionisasjon (Electron Ionization)
EPA:	US Environmental Protection Agency
EU:	Den Europeiske Union
FA-D10:	Fluoranthene-D10
FE-D8:	Fluorenone-D8
GC:	Gasskromatografi
GC-MS:	Gasskromatografi-massespektrometri
HPLC:	Væskeskromatografi
IKBM:	Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap
ISTD:	Internstandard
IUPAC:	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC-MS:	Væskeskromatografi-massespektrometri (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)
LC-MS-MS:	Væskeskromatografi-tandem-massespektrometri (Liquid Chromatography-tandem-Mass Spectrometry)
LOD:	Deteksjonsgrense (limit of detection)
LOQ:	Kvantifiseringsgrense (limit of quantification)
MPIC:	Max Planck Institutt for Kjemi
MS:	Massespektrometri
m/z:	Masse/ladning-forhold
ng:	Nanogram
NICI/NCI:	Negativ kjemisk ionisasjon
NMBU:	Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
N-/O-PAH:	Nitro-/oksy-polysykliske aromatiske hydrokarboner
N-PAH:	Nitro-polysykliske aromatiske hydrokarboner
O-PAH:	Oksy-polysykliske aromatiske hydrokarboner
PAH:	Polysykliske aromatiske hydrokarboner
pg:	Pikogram
Ph.D.	Philosophiae doctor
Post.Doc	Postdoctoral
Qual:	Kvalitativt ion, m/z
Quant:	Kvantitativt ion, m/z
QuEChERS:	Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe
QqQ:	Trippelkvadrupol
Q1:	Kvantifiseringsmasse 1
Q2:	Kvantifiseringsmasse 2
RSD:	Relativt standardavvik
RSTD:	Gjenvinningsstandard
SCF:	EU Scientific Committee for Food
SIM:	Selektiv ionemodus
TIC:	Det totale ionekromatogrammet (total ion chromatogram)
UNIS:	Universitetssenteret på Svalbard (The University Centre in Svalbard)
URV:	Universitat Rovira i Virgili

uL:	Mikroliter
1-NN:	1-nitronaphthalene
1-NN-D7:	1-nitronaphthalene-D7
1-NP:	1-nitropyrene
2-NA:	2-nitroanthracene
2-NN:	2-nitronaphthalene
2-NP:	2-nitropyrene
2-NP-D9:	2-nitrophenyl-D9
3-NFA-D9:	3-nitrofluoranthene-D9
4-NBP:	4-nitrobiphenyl
5-NA:	5-nitroacenaphthene
6H-BP:	6H-benzo[cd]pyrene-6-one
9-FE-D8:	9-fluorenone-D8
9-FE:	9-fluorenone
1,2-BA:	1,2-dibenzo[a]anthraquinone
1,8-NP:	1,8-dinitropyrene
1,4-NQ-D8:	1,4-naphtaquinione-D8
2,7-NF:	2,7-dinitrofluorene

1. Bakgrunn

Metodevalidering er en systematisk prosess bestående av flere trinn som utføres for å kunne ta en vurdering på om en analytisk metode er akseptabel til de analysene den er tiltenkt. Det er en stor del av kvalitetssikringsarbeidet og det er derfor viktig at kravene er stilt i forkant av valideringen, slik at det er enklere å ta en vurdering senere om de er oppnådd. Det er en rekke ulike kriterier som inngår i metodevalidering ut ifra hvilken type metode som skal valideres. De vanligste kriteriene som inngår i en validering er linearitet, spesifisitet, nøyaktighet, presisjon og måleområdet. Resultatene av metodevalideringen anvendes for å bedømme kvalitet, pålitelighet og konsistens av analyseresultatene.

Denne oppgaven fokuserer kun på optimering og validering av en GC-MS-metode opparbeidet ved NMBU/IKBM. For dette ble det brukt en gasskromatograf koblet til en masseselektiv detektor (QQQ) i negativ kjemisk ionisering (NICI) og selektiv ionemodus (SIM). Den analytiske metoden som ble validert i denne studien, ble testet på nitro- og oksy-polysykliske aromatiske hydrokarboner (N-/O-PAH), som er to av flere derivater av PAH. Disse utgjør en stor bekymring grunnet deres giftighet og tilstedeværelse i miljøprøver.

Metoden benyttet i denne studien ble i tillegg til valideringen sammenlignet med en annen metode opparbeidet ved Max Planck Institutt for Kjemi (MPIC) i Mainz, Tyskland. Ulike standarder av N-/O-PAH ble analysert sammen med internstandarder og gjenvinningsstandard for å vurdere om metoden er egnet for sitt bruk. I tillegg ble det undersøkt et utvalg jordprøver opparbeidet ved Universitetssenteret på Svalbard (UNIS) for å teste metoden.

Det har blitt gjort en rekke tidligere forskning på PAH og deres derivater, men det er mindre forskning som omhandler studier av derivater i jordprøver. I en studie gjort av Albinet ble det opparbeidet en metode til å kvantifisere et utvalg N-/O-PAH med en Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS)-metode ble benyttet som referanse for etablering av IKBM-metoden. Denne metoden er også brukt for opparbeidelse av jordprøvene i Longyearbyen, Svalbard. Parametere på instrumentet ble tilpasset for å undersøke om deteksjonen av ønskelige forbindelser kunne tilfredsstille kvalitetskrav som stilles for slike analytiske metoder.

1.1. Polysykliske aromatiske hydrokarboner

Polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH) er en gruppe kjemiske forbindelser som er bygget opp av to eller flere sammenkoblede benzenringer, hvor hver ring deler to karbonatomer og forbindelsene kun inneholder karbon- og hydrogenatomer.[1-4] Størrelsen på molekylene varierer og de er delt inn i to grupper. Molekyler som inneholder fem ringer eller mindre betegnes som små molekyler og finnes ofte i gassfase.[1-3, 5] Består molekylene av mer enn fem ringer betegnes de som store og lagres i fast materiale.[1-3, 5] PAH er reaktive forbindelser med en levetid i atmosfæren fra noen timer til flere dager. Ved oksidering av PAH dannes det hovedsakelig oksy-derivater, typiske kinoner, og nitro-nedbrytningsprodukter av PAH, som er beskrevet nærmere i delkapittel 1.2.[1, 4, 6-8] PAH har mange ulike egenskaper som lavt damptrykk, høyt smelte- og kokepunkt, de er lysfølsomme, varmeresistente og har ledningsevne samt at de er lipofile og dermed godt løselige i organiske løsemidler.[1-3]

PAH dannes ved ufullstendig forbrenning av organisk materiale.[7, 9] Forbindelsene finnes naturlig i steinkulltjære, kreosot og forurenset sjøbunn, råolje, skog og gressbrann, utslipp fra vulkaner, planter med klorofyll, sopp og bakterier.[1-3, 6, 7, 10] Antropogene kilder er

petroleumsindustrien, elektrisk kraftproduksjon, oppvarming av boliger, produksjon av koks, sot, steinkulltjære og asfalt samt forbrenningsmotorer.[1-3] PAH kontamineres naturlig til omgivelsene ved vulkanutbrudd, skogbranner, trebrenning og kjøretøy, mens de vanligste formene for kontaminering er utslipp fra vedfyring og aluminiumsindustrien som røyk og aske.[1, 4, 7] PAH finnes både i luft, vann, jord, sedimenter og i organismer samt at det i tillegg slippes ut til overflatevann fra renseanlegg og industrianlegg og kan trenge ned i grunnvann.[1, 9]

PAH i jord kan brytes ned naturlig ved hjelp av mikroorganismer, noe som kan ta opptil flere måneder grunnet størrelsen på molekylene. PAH som er bygget opp av tre eller færre benzenringer brytes ned forttere enn andre.[2] Ved at det fraktes langt med luft, kan det avsettes i områder langt unna utslippsstedet ved nedbør.[6, 7] Ved at PAH fraktes i vann kan det underveis avsettes i jord og sedimenter grunnet deres dårlige oppløsning i vann. Ved at det fraktes i vannet, tas det opp i planter noe som også er en bidragsyter til at PAH lagres i jord.[1, 4, 7]

Giftigheten av PAH varierer fra forbindelse til forbindelse og det er mange faktorer som spiller inn på hvor helseskadelig en eventuell eksponering av PAH vil være.[1, 7] Både individuelle forskjeller som helsestatus, allergier, alder, fysisk form og inntak av medisiner samt hvilken forbindelse av PAH personen har blitt eksponert for er faktorer som vil påvirke graden av skade en kontaminering av PAH vil kunne gi.[1] Noen er giftige, arvestoffskadelige eller kreftfremkallende, mens andre ikke er dokumentert.[7, 9] Noen forbindelser omdannes til vannløselige forbindelser som kan være giftige og skadelige, men i levende organismer undergår de videre nedbrytning og hoper seg derfor sjelden opp i næringskjeden.[6, 7] I tillegg kan mennesker og dyr eksponeres for PAH ved å arbeide med eller være i kontakt med kontaminert jord. Dette er spesielt en fare for hagearbeidere, gartnere og små barn som leker mye i slike områder. Det er som oftest reaktive mellomprodukter av PAH som er den største faren for kreft.[6]

Det er mye forskning og kartlegging av PAH i verden. I vedlegg B, figur B.1. vises et utvalg av PAH-forbindelser og deres struktur som er kartlagt av EUs forskningskomite (SCF) for mat, den Europeiske Union (EU) og US Environmental Protection Agency (EPA) til å oppstå oftere enn andre og derfor overvåkes i større grad.[11]

Utslippene av PAH er redusert med over 60 % de siste 20 årene. Hovedgrunnen er modernisering av produksjonsprosessene i aluminiumsindustrien og rensing av utslipp fra fjernvarme og kraftverk.[7]

1.2. Nitro- og oksy-polysykliske aromatiske hydrokarboner

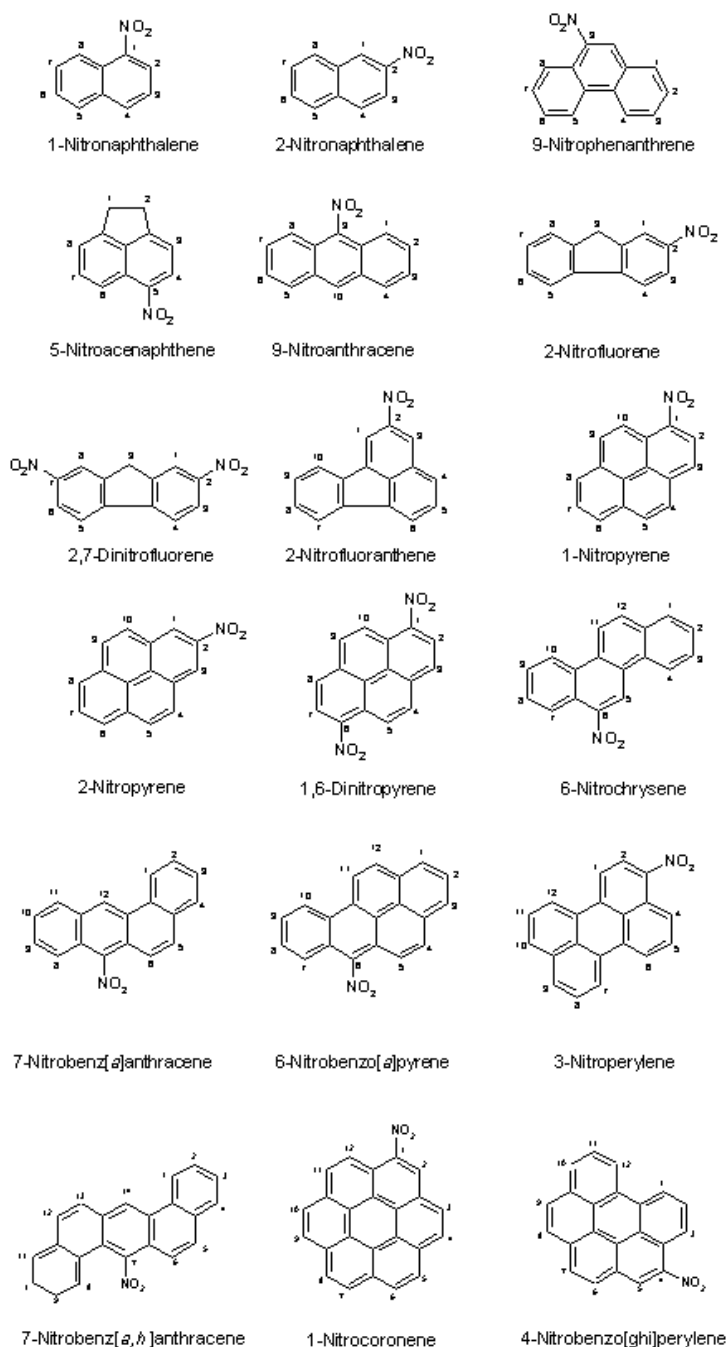
Nitro- og oksy-polysykliske aromatiske hydrokarboner (N-/O-PAH) er to av flere nedbrytningsprodukter av PAH. Disse type forbindelser er giftige for mennesker og dyr og noen har blitt klassifisert som kreftfremkallende, cytotoxiske og mutagene på mennesker av IARC (International Agency for Research on Cancer, groups 2A og 2B). Dette er en viktig motivasjon til videre forskning på effekter og egenskaper av disse og deres forurensninger i miljøet. [12-14] Det er begrenset kunnskap om den direkte kreftfremkallende effekten av PAH-derivatene, men kinonene er linket opp mot reaktive oksygengrupper og oksidativ stress, som er en direkte tilknytning opp mot sykdommer hos mennesker.[8] N-PAH inneholder minst to kondenserte aromatiske ringer som er bygget opp av karbon- og hydrogenatomer.[14] PAH som er substituert med ketoner eller kinoner danner O-PAH. De er vurdert til å være mer giftige og gjøre mer skade enn PAH.[15] Det er de funksjonelle

gruppene knyttet til N-/O-PAH som gjør de ekstra giftige, grunnet deres reaktive egenskaper.[16]

Nitro- og oksy-PAH slippes ut i atmosfæren direkte ved ufullstendig forbrenning eller ved dannelse av homogene og heterogene fotooksideringsprosesser i atmosfæren.[5, 9, 12, 14-16] Dette skjer enten ved en reaksjon med hydroksylradikaler som danner O-PAH eller med nitratradikal som danner N-PAH.[16] Andre forbindelser som PAH kan reagere med i atmosfære er ozon og nitrogenoksider.[13] O-PAH som inneholder kinoner kan også dannes ved videre degradering av fotolytisk metylert, nitret og andre oksygenerte PAH.[15] Det er kun noen få forbindelser som fremstilles industrielt.[5, 12, 14] I atmosfæren kan derivatene dannes fra PAH ved gassfasereaksjoner og de fremstår som direkte mutagene.[14, 17] På dagtid skjer det en fotolyse initiert av hydroksylradikaler som adderes til PAH. Samtidig kan N-PAH fjernes ved fotolyse på dagtid.[14, 18, 19] Andre muligheter er heterogene reaksjoner som inkluderer partikulært PAH og ozon og de ovennevnte forbindelsene som etterfølges av en reaksjon med nitrogendioksid og tap av vann.[14, 18] De atmosfæriske transformasjonene av PAH til N-/O-PAH er en viktig sekundær kilde til de observerte konsentrasjonene i atmosfæren. Allikevel er trafikk og eksosutslipp som følge av dette fortsatt den primære kilden til N-/O-PAH så godt som PAH i urbane områder.[13]

I miljøet oppstår N-/O-PAH ofte sammen med PAH og flere hundre andre organiske forbindelser. [14] De forekommer vanligvis i konsentrasjoner som er 10-100 ganger lavere enn PAH enten i gassfase eller adsorbent i fast materiale, men giftigheten av PAH-derivater er opp til 10^5 ganger større enn vanlig PAH. [14] Det forekommer gjerne noe høyere konsentrasjoner av O-PAH enn N-PAH.[5, 14, 20] Reaksjonsveiene på hvordan de dannes i atmosfæren er velstudert til tross for at kildene til O-PAH i atmosfæren er lite studert.[21] Noen av strukturene på utvalgte nitro- og oksy-PAH er vist i figur 1.2.1. I vedlegg B, tabell B1 vises det en oversikt over en rekke N-PAH. De er uløselige i vann, men som oftest godt løselig i organiske løsemidler. De kan fraktes langt i gassfase, men antas lite sannsynlig å bli transportert i vann. Da tas de isteden opp i jord og sediment. Det antas at N-PAH heller ikke lekker ut til grunnvann, men noen av forbindelsene kan være langsomt biologisk nedbrytbare under visse betingelser.

Bakgrunn



Figur 1.2.1. Strukturert på noen nitro- og oksy-PAH hentet fra *Selected nitro and nitro-oxy-polycyclic aromatic hydrocarbons*. [14]

Mange anaerobe og aerobe bakterier reduserer N-PAH til mutagene amino-PAH. Nitroreduksjon av mikrofloraen i tarmen spiller en viktig rolle i metabolismen av N-PAH hos pattedyr. Sopp, bakterier og alger har vist seg å bryte ned to-femringede PAH på en tilfredsstillende måte, men for N-PAH går denne nedbrytningen vesentlig saktere med kun enkelte mikroorganismer og kan derfor vedvare i jord og sedimenter. [14]

Kvantifisering av O-PAH og N-PAH gjøres ved GC-MS, LC-MS eller LC-MS-MS etter at løsemiddelestraksjon har blitt gjennomført. [9, 12, 20] Det kan være utfordrende å analysere individuelle N-PAH grunnet deres potensielle kjemiske aktivitet, at de finnes i svært lave konsentrasjoner i tillegg til at de befinner seg i komplekse blandinger. [12, 20] Ved bruk av

GC-MS med negativ kjemisk ionisering vil sterke elektronegative komponenter bli lett ionisert i tillegg til at metoden er kjent for å ha høy sensitivitet og selektivitet.[9]

1.3. Intern standard metode

Intern standard metode benyttes når det tilsettes en kjent mengde av en referansesubstans til den ukjente prøven. Denne type metode er ett av de viktigste kravene til et optimalt kvalitetskontrollsystem for organiske analyser. Komponentene som refereres til som internstandarder skal ikke finnes i prøven i utgangspunktet.[22]

Det stilles flere krav til en internstandard som skal benyttes i en prøve. Den skal være så lik som mulig analytten i kjemiske egenskaper eller den skal ha samme basestruktur som analytten med ulike funksjonelle grupper.[22]

Ved at en internstandard tilsettes i prøven i begynnelsen av prøveopparbeidelsen, kan det også bestemmes tap av internstandard underveis. Dette kan detekteres ved tilsetning av en gjenvinningsstandard, RSTD rett før GC-MS-analyse. På den måten kan tap av internstandard beregnes når gjenvinningsstandard tilsettes.[22]

Det skal være en kjent mengde og konsentrasjon av internstandard som tilsettes prøven. Dette skal senere benyttes til å bestemme responsfaktoren.[22]

1.4. Gasskromatografi-massespektrometri

Gasskromatografi

Gasskromatografi blir benyttet til å separere forbindelser i en blanding til individuelle komponenter.[23] Analytten blir fraktet gjennom kolonnen av en mobilfase, kalt en bæregass. Den vanligste bæregassen benyttet i gasskromatografi er helium, som er kompatibel med de fleste detektorer. Urenheter i bæregassen vil degradere stasjonærfasen og bæregass av høy kvalitet bør benyttes. Bæregassen burde også gjennomgå en renseprosess for å fjerne uønskede forbindelser.[24]

Det er mest vanlig å benytte kapillærkolonner bestående av silikarør som er dekket av polyamid. Ved bruk av kapillærkolonner oppnår man høyere oppløsning, kortere analysetid og bedre sensitivitet sammenlignet med pakkede kolonner. Kolonnene finnes i ulike tykkelser, hvor de tynne gir høyere oppløsning, men krever samtidig høyere trykk i tillegg til at de analyserer mindre prøvemateriale enn tykkere kolonner.[24]

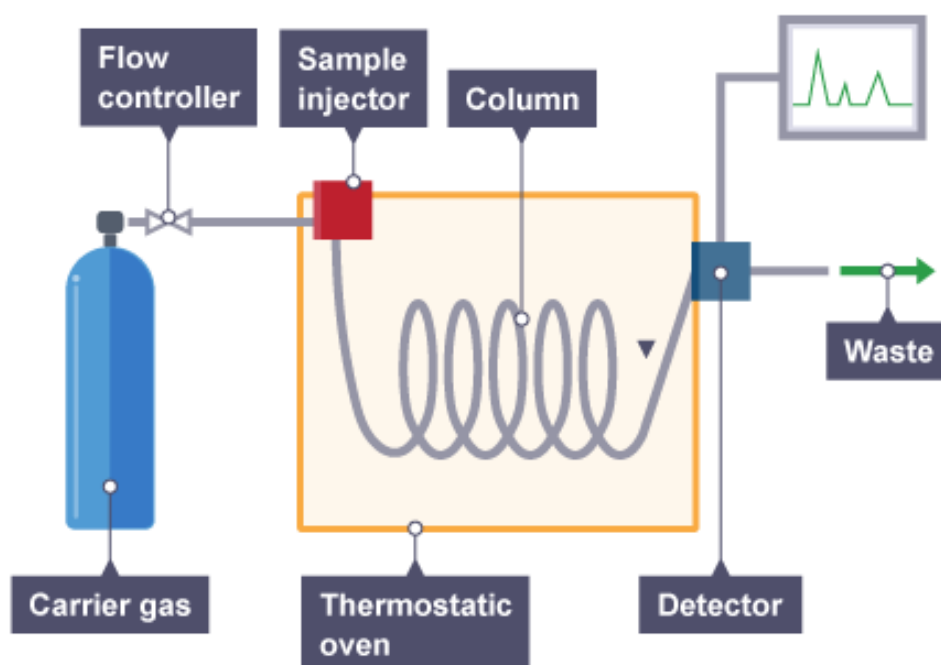
Initialtemperaturen til kolonnen settes til kokepunktet for løsemiddelet som blir benyttet, slik at den kondenserer i starten av kolonnen. Denne formen for prøvefangning gir tydeligere toppler i kromatogrammet. Analysen settes i gang ved at temperaturen i kolonnen økes for å fordampe prøven som da er fanget i starten av kolonnen.[24]

Det viktigste for instrumentet er å stille inn temperaturprogrammet, hvor temperaturen i kolonnen økes gradvis under separasjonen. Temperaturprogrammet settes opp ut fra hvilke forbindelser som skal detekteres, samt med utgangspunkt i hvilket løsemiddel som benyttes. Dette er for å øke hastigheten på analyttene for å få ned retensjonstidene på de sene analyttene. Kolonnen kan derimot ikke holdes oppe på en maksimumstemperatur som kolonnen tåler over tid, da dette kan føre til at stasjonærfasen dekomponerer og kolonnen begynner å blø. Maksimumstemperaturen til kolonnen varierer ofte mellom 250-400 °C. Endring på retensjonstider, tailing og brutte toppler i kromatogrammet kan være tegn på at kolonnen er skadet.[24]

Den ferdig opparbeidede prøven blir injisert inn i injeksjonskammeret av sprøyten og fraktet av mobilfasen som er en inert gass, f.eks. helium eller hydrogen. Mobilfasen fører prøven gjennom kolonnen. Temperaturen og interaksjonen med stasjonærfasen avhenger av hvor raskt komponentene elueres ut av kolonnen. Hvilken retensjonstid hver komponent får kan modifieres med ulike temperaturprogram. Temperaturen i ovnen hvor kapillærkolonnen er plassert øker gradvis i steg kalt ramper som bedrer separasjonen. Komponenter med lavt kokepunkt elueres raskere og får da lavere retensjonstid enn de med høyt.[23]

For sporanalyser hvor innholdet av analytt i prøven er mindre enn 0,01 % foretrekkes det å benytte splittløs injeksjon. Lineren for splittløs injeksjon er en rett, tom tube med rom for blanding. Et stort volum av en fortennet løsning blir injisert i lineren hvor splitventilen er stengt. Injektortemperaturen for splittløs injeksjon er lavere sammenlignet med splittinjeksjon.[24]

En skjematisk beskrivelse av en gasskromatograf er vist i figur 1.4.1.



Figur 1.4.1. Skjematisk beskrivelse av en gasskromatograf hentet fra BBC, Science Chromatography [25]

Etter at komponentene er separert igjennom kolonnen blir de isolerte komponentene sendt videre til en detektor som er koblet til en datamaskin. Det dannes en spenning mellom to elektroder som bearbeides av en egnet programvare. Her blir signalintensiteten (areal/høydeforhold) omregnet til konsentrasjon for hver komponent. Av signalene datamaskinen bearbeider dannes det et kromatogram hvor hver topp er en komponent. I kromatogrammet vises retensjonstiden på X-aksen og toppens intensitet på Y-aksen. Komponentene skal elueres ut til omtrent samme tid hver gang de blir kjørt under de samme betingelsene. [23]

Massespektrometri

Massespektrometri benyttes for å studere atommasse, molekylmasse eller fragmentmasser til molekyler. For å kunne danne et massespekter, blir gasspartikler ionisert. Ionene akselereres ved hjelp av et elektrisk felt for deretter å bli separert ved masse-ladning-forhold (m/z).[24]

Det er mulig å få ut strukturell informasjon om et molekyl ved å måle massene til fragmentene når molekylene deles opp i mindre biter.[26]

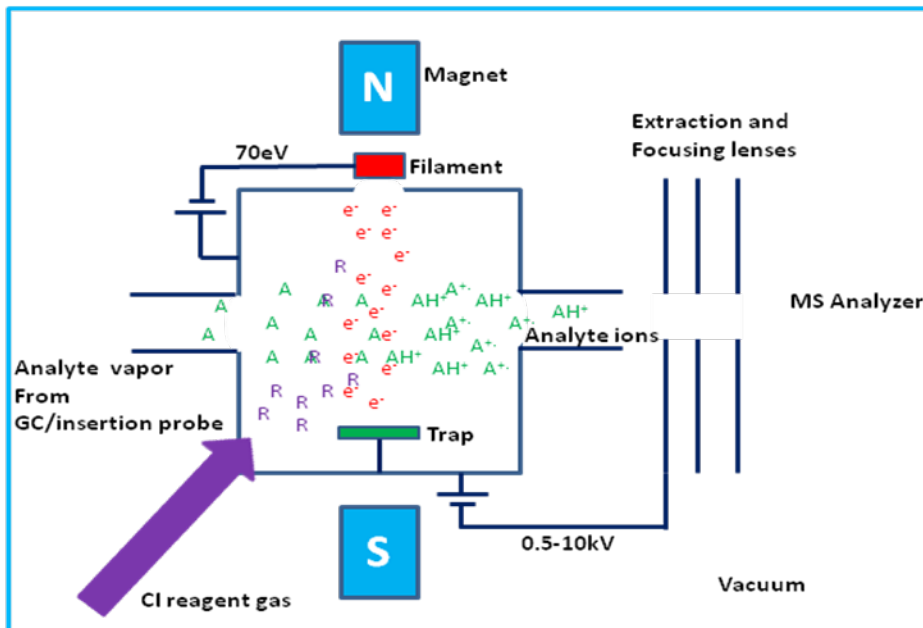
Et massespektrometer inneholder tre hoveddeler. Ionekilde hvor molekylene i prøven blir gitt en ladning, en masseanalysator hvor ionene blir separert ut ifra masse-ladning-forhold (m/z) og en detektor hvor de separerte ionene blir observert og telt.[26]

Prøven injiseres i massespektrometeret samtidig som pumpen holder trykket nede for at forbindelsene skal holdes stabile. Fra ionekilden fraktes prøven til masseanalysatoren (massefilteret) hvor separasjonen finner sted.[23, 27] Det finnes mange ulike massefiltere. En mye brukt masseanalysator er en kvadrupol, som blant annet er foretrukket grunnet sin robusthet.[24] En kvadrupol er bygget opp av fire staver som må være parallelle. Den benytter stabiliteten i banene i oscillerende elektriske felt for å separere ioner med hensyn på masse-ladning-forhold.[28]

Kjemisk ionisasjon (CI)

Kjemisk ionisering er en myk ionisasjonsteknikk, det gir mindre fragmentering og det kan oppnås høy sensitivitet. Grunnen til den lave fragmenteringen skyldes ioner med lite energi.[28] Det er spesielt nyttig når molekylvekten til en forbindelse skal bestemmes eller bekrefte.[29] Prosessen består i å produsere ioner ved at molekyler i prøven kolliderer med ioner i ionekilden. To hull på hver side muliggjør krysning av elektroner, mens et hull i bunnen tillater produksjonene til å passere igjennom.[28]

Ved bruk av CI som ionisasjonsteknikk, er det viktig med stabil temperatur og lave masser på analyttene som skal analyseres. Reaktantgassen får elektronstøt av høyenergiske elektroner i ionekilden som danner reaktantgassioner. Vanlige reaktantgasser som benyttes i CI er hydrogen, metan, isobutan og ammoniakk. Deretter gjennomgår reaktantgassionene reaksjoner med nøytrale reaktantmolekyler for å gi reaktantselektive ioner før prøven introduseres. Elektroner med lav energi slås ut og fanges senere opp av analytten ved at prøven reagerer med de selektive ionene. Avhengig om det benyttes positiv eller negativ kjemisk ionisasjonsteknikk, blir det dannet et positivt eller negativt ladet molekylion.[26] For å danne negative ioner kreves det en syregruppe eller et elektronegativt element. Dette fører til en selektivitet over deteksjonen i løsninger. Det skjer da en interaksjon mellom elektroner og molekyler som danner negativ ioneproduksjon.[28] Ionene som dannes separeres i massefilteret. En skjematisk beskrivelse av en CI ionekilde er vist i figur 1.4.2.[29]



Figur 1.4.2. Skjematisk beskrivelse av en kjemisk ionisasjon-ionekilde hentet fra University of Pittsburgh, *Mass Spectrometry Introduction*[30]

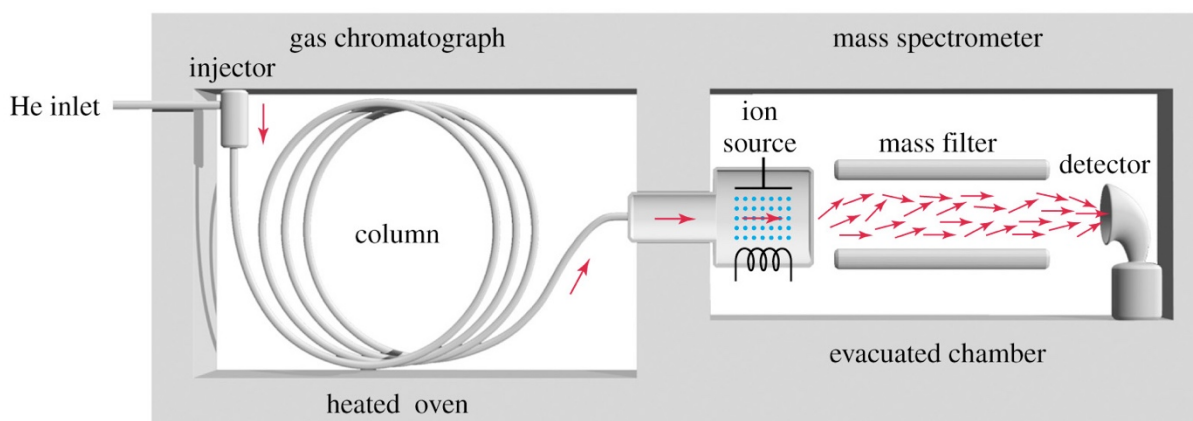
Det dannes nye ioner etterhvert som de interagerer med gasmolekyler. Kjemisk ionisering kan innebære overføring av et elektron, proton eller andre ladede partikler mellom reaktantene.[26] Negativ kjemisk ionisering inkluderer anioner i tillegg til reagentgassen og danner da et negativt ladet molekyllion.[24]

Reaktantene kan være den nøytrale analytten eller ioner fra en reaktantgass. For å oppnå høy kollisjon mellom ionene og reaktantgassen i løpet av tiden som er satt, kreves det at trykket økes gradvis. [29]

Gasskromatografi-massespektrometri (GC-MS)

Når gasskromatografi og massespektrometri kombineres gir det en høy selektivitet med deteksjon av strukturspesifikke ioner hvor alle analyttene har sin egen retensjonstid. Det er svært effektivt og nøyaktig og kan analysere prøver helt ned i pikogram. Når de kobles sammen, er det massespektrometeret som er detektoren til instrumentet. Dette gjør det godt egnet til å analysere flere ulike prøvetyper og kan identifisere og kvantifisere analytter både i luft, jord, vann, planter- og dyrevev.[22, 23] Figur 1.4.3. viser en skisse av GC-MS.

Gasskromatografen separerer komponentene mens massespektrometeret karakteriserer de. På denne måten blir komponentene både evaluert kvalitativt og kvantitativt. De ulike forbindelsene separeres ved at de elueres ut på ulikt tidspunkt. Hver forbindelse har da sin egen retensjonstid med tilhørende masse. Denne metoden er benyttet aktivt innen medisin, farmasi, miljø og politietterforskning med mer.[23]



Figur 1.4.3. Skjematisk beskrivelse av en gasskromatograf-massespektrometri hentet fra *Organic Spectroscopy International*. [31]

Et massespektrometer kan benyttes som detektor til en gasskromatograf. Kvantifiseringsionet er benyttet for kvantitativ analyse, mens bekreftelsesionet er benyttet for kvalitativ identifikasjon. En annen metode for å identifisere toppene i kromatogrammet er å sammenligne retensjonstidene med en ekte prøve av den ukjente komponenten. Dette gjøres gjerne ved å spike den ukjente prøven med den kjente forbindelsen. [24]

Massespektrometer er en sensitiv detektor som gir både kvalitativ og kvantitativ informasjon om prøven. Ved bruk av SIM kan en komponent i en kompleks løsning bestående av forbindelser med dårlig separasjon måles. SIM senker deteksjonsgrensen med en faktor på 10^2 - 10^3 sammenlignet med m/z-skanning, fordi SIM fokuserer i mye høyere grad på å detektere ioner av interesse. [24]

1.5. Tidligere forskning

Det har blitt gjort en rekke tidligere forskning på PAH, men det er ikke gjort så mye undersøkelser på PAH-substituent direkte i jordprøver. En studie utført av Markus Niederer tok utgangspunktet i PAH og deres substituent i jord og luft hvor deteksjonen foregikk på GC-MS med negativ kjemisk ionisering. Det ble utført en prøveopparbeidelse med ekstraksjon av metanol-aceton ved bruk av fastfaseekstraksjon og HPLC. Det ble benyttet 5 deutererte forbindelser som internstandarder med en gjenvinningsgrad på 80-90 %. Det ble benyttet ti N-PAH til kalibrering med en korrelasjonskoeffisient høyere enn 0,993 og en deteksjonsgrense på ca. 30 ng/kg for jordprøvene. Mengden N-PAH i jordprøvene tatt på overflaten i Basel, Sveits lå mellom 30-800 ng/kg tørrvekt for 1-nitropyrene. For O-PAH lå verdiene 10^2 - 10^4 ganger høyere. Det ble antatt at mengden N-PAH i jord var betraktelig mindre enn PAH, men de ble vurdert som like giftige. [20]

Til å utvikle metoden for denne studien, ble blant annet forskning gjort av Albinet med fler benyttet for å velge referansemasser, temperaturer og andre parametere vedrørende metoden. Den ble også brukt for prøveopparbeidelse av jordprøver fra UNIS (Longeyardbyen, Svalbard). Det ble gjort optimaliseringer på injeksjonstemperaturen på GC og deteksjonsinnstillinger på MS. Denne kvantifiseringsmetoden ble kalt Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) og er beregnet til å kunne kvantifisere 32 N-PAH, 32 O-PAH samt andre oksygenforbindelser. Det ble her benyttet to standarder til referanse, SRM 1649b (urban dust) og SRM 2787 (fint partikulært materiale, $<10\mu\text{m}$) for å bestemme nøyaktigheten og presisjonen til den optimaliserte metoden. Seks prøver av SRM 1649b og tre

prøver av SRM 2787 ble analysert. Tre av prøvene av SRM 1649b var på 20 mg og de siste tre var på 50 mg, mens alle tre prøvene av SRM 2787 var på 20 mg.[12]

De opparbeidede prøvene ble spiket med kjente mengder (5 eller 50 ng avhengig av eksperimentet som skulle gjøres) av N-PAH- og O-PAH-standarder. Det tilsvarte 5 µL eller 50 µL av en standardløsning som inneholdt 32 N-PAH og 32 O-PAH. [12] Deretter ble prøvene analysert på et GC-MS-instrument med negativ kjemisk ionisering. Komponentene ble separert av en Optima-5MS Accent-kolonne med dimensjoner 30 m*0,25 mm*0,25 µm filmtykkelse for deretter å bli identifisert ved sammenligning av retensjonstider med standardene. GC-instrumentet ble optimalisert hvor det ble sagt at pulserende splittløs injeksjon resulterte i den beste responsen og injeksjonstemperaturen ga maksimal respons på en temperatur mellom 140-200 °C. En temperatur på 140 °C ble valgt for å opprettholde høyest mulig sensitivitet på selv de mest utfordrende forbindelsene. De endelige instrumentparameterne ga mer eller mindre lik kvantifisering av N-/O-PAH. For MS-instrumentet ble det valgt en kjernetemperatur på 150 °C, fordi en høyere kjernetemperatur resulterte i utstrakt fragmentering som ble uegnet for å presentere pålitelige resultater. Evalueringen av metodens usikkerhet ble vurdert til å variere fra 22-586 % for en QuEChERS-metode. 90 % av den totale usikkerheten skyldtes analytiske prosedyrer. Til sammenligning ble den totale usikkerheten for benzo[a]pyren på ca. 40 %.[12]

1.6. Om oppgaven

Denne oppgaven går ut på å validere og optimere en GC-MS-metode utviklet ved NMBU/IKBM. Metoden ble validert med et utvalg av metodevalideringskriterier for å vurdere om metoden er egnet for kvantitative analyser av jordprøver. Alle valideringskriteriene er nærmere beskrevet i delkapittel 1.7. Standarder av N-/O-PAH ble benyttet for å gjøre de nødvendige testene på metoden slik at valideringskriteriene kunne vurderes. Temaet er relevant grunnet store forurensninger i miljøet samt at det har blitt gjort begrenset med forskning på N-/O-PAH i bakgrunnsmiljøprøver. Det er derfor viktig å studere et større omfang av PAH-derivater i miljøet for å undersøke mengden forurensning og deteksjon av standarder i miljøprøver.

Det ble analysert et utvalg allerede opparbeidede jordprøver i tillegg til standarder og internstandarder av N-/O-PAH og gjenvinningsstandard. Se vedlegg A, tabell A1 og A2 for full oversikt over standarder og utstyr som er benyttet i denne studien. Jordprøvene ble innhentet og opparbeidet ved Universitetssenteret på Svalbard (UNIS) av PhD-studentene Tatiana Drotikova ved UNIS og Montserrat Marques Bueno ved Universitat Rovira i Virgili (URV).

Det ble gjort tester på GC-MS for å detektere og kvantifisere komponenter over et stort konsentrasjonsområde. Dette ble gjort for å kunne ta en vurdering av om metoden er egnet til videre bruk til sporanalyser i bakgrunnsmiljøprøver, hvor lave konsentrasjoner av N-/O-PAH er tilgjengelig. Det er dermed viktig å undersøke i hvor små mengder metoden klarer å detektere standarder. Analysene av standardene, internstandardene, gjenvinningsstandard og til slutt jordprøvene ble benyttet til en komplett metodevalidering som beskrevet i delkapittel 1.7.

Til slutt ble de samme standardene og et utvalg jordprøver analysert med en annen metode utviklet ved Max-Planck Instituttet for kjemi i Mainz, Tyskland av post. Doc, Pourya Shahpoury til sammenligning, hvor de samme metodevalideringskriteriene beskrevet i delkapittel 1.7. ble benyttet.

Instrumentet som ble benyttet i oppgaven var Agilent Technologies 7890B GC som var koblet til Agilent Technologies 7000C trippel kvadrupol (QQQ) massespektrometer med negativ kjemisk ionisasjonsteknikk (NICI), som er beskrevet nærmere i delkapittel 1.4. Innstillinger og parametere benyttet på instrumentet for begge metodene er beskrevet i delkapittel 2.3.

1.7. Metodevalidering

Metodevalidering er en systematisk prosess bestående av flere trinn som utføres for å kunne ta en vurdering på om en analytisk metode er akseptabel til de analysene den er tiltenkt.[22, 24, 32] Det er en stor del av kvalitetssikringsarbeidet og det er derfor viktig at kravene er stilt i forkant av valideringen, slik at det er enklere å ta en vurdering senere om de er oppnådd. En metodevalidering er aktuelt ved innføring av en ny metode eller ved endring av en analysemetode.[22, 32, 33] Det er en rekke ulike kriterier som inngår i metodevalidering ut ifra hvilken metode som skal valideres.[22, 24, 34] Resultatene av metodevalideringen anvendes for å bedømme kvalitet, pålitelighet og konsistens av analyseresultatene.[35]

1.7.1. Linearitet

Linearitet vurderes ut ifra lineær regresjon, som sier noe om hvor godt kalibreringskurven følger en rett linje som viser responsen proporsjonalt med mengden analytt. [24, 32, 33] Dette gjøres for å undersøke proporsjonalitet i konsentrasjonene av analytt i prøven over hele området som er av interesse.[32, 36] Både regresjonskoeffisienten, R, skjæringspunktet med y-aksen og helningen på standardkurven vurderes for og kunne gi en total vurdering av lineariteten.[24] Det er ikke alltid at kalibreringskurven inkluderende determinantkoeffisienten, R^2 alene er tilstrekkelig for å vurdere metodens linearitet. Da skal flere forhold ligge til rette for det, blant annet at hele konsentrasjonsområdet må være dekket og det inkluderer de forventede analyttkonsentrasjonene i prøvene. Det er derfor viktig å studere kalibreringskurven opp mot signal og konsentrasjon. [36] Verdien for skjæringspunktet med y-aksen skal være så nært 0 som mulig.[24]

Det lages en kalibreringskurve av et utvalg av prøver, som skal danne en rett linje. Data direkte fra regresjonslinjen kan benyttes for å bestemme graden av linearitet. Det anbefales at minst fem konsentrasjoner benyttes for å kunne beregne en tilfredsstillende linearitet. Regresjonskoeffisienten, R skal ligge innenfor 0,95-1,05 for at lineariteten skal være tilfredsstillende. Avvik på 5 % anses som utmerket.[10, 22] Denne beregnes ved å ta kvadratroten av determinantkoeffisienten, R^2 hentet fra regresjonskurven. Determinantkoeffisienten viser hvor godt regresjonslinjen representerer de virkelige dataene og kan vise til et forhold mellom den viste variansen og total varians ved å vurdere regresjonskoeffisienten og determinantkoeffisienten opp mot hverandre.

1.7.2. Sensitivitet

Sensitivitet beskrives som metodens evne til å skille små forskjeller i konsentrasjon eller masse av analyttene i prøven og baserer seg på parametere fra kalibreringskurven.[35, 36] Den bestemmes ut fra helningen på standardkurven og studeres ved endringer i signalet med hensyn på endring av konsentrasjonen ved den minste forskjellen på analyttkonsentrasjonen.[10, 35, 36]

1.7.3. Nøyaktighet

Nøyaktigheten kan estimeres på ulike måter og gir en mulighet for vurdering av hvor nær resultatene er den sanne verdien. [24, 32, 37] Det forveksles ofte med riktighet, som er nærheten av overenstemmelse mellom gjennomsnittet av et uendelig antall gjentatte målinger og en referanseverdi. Nøyaktigheten bestemmes ofte med en kombinasjon av riktighet og presisjon. [36] Det kan analyseres et referansemateriale i en matriks likt til det som er ukjent slik at metoden skal kunne finne en tilfredsstillende verdi av analytten i referansematerialet. Da blir formel 1.1. benyttet. En annen mulighet er å sammenligne resultater fra to eller flere andre analytiske metoder. Da er en gjenvinningsstudie å foretrekke. [10, 24, 32, 37] Det er i tillegg en mulighet å analysere et sett av blanke prøver som er spiket med en kjent mengde analytt hvor matriksen må være lik den ukjente i prøven. Dette er det mest vanlige å utføre for å vurdere metodens nøyaktighet. Om ingen av alternativene over er mulig å gjennomføre, er en siste mulighet å tilsette en kjent mengde analytt til den ukjente prøven.[24] Om resultatene i en gitt metode er riktige og presise, er også nøyaktigheten av en enkelt måling høy.[36]

Formel 1.1. Beregning av nøyaktighet i standardprøver

$$\text{Nøyaktighet (\%)} = \frac{\text{Målt mengde}}{\text{Sertifisert (kjent) mengde}} \cdot 100$$

Kjent mengde analytt er tilsatt i standardprøven. Referansematerialet (internstandardene) bør være så lik analyttene som mulig. Nøyaktigheten kan vurderes når presisjonen, lineariteten og spesifisiteten er gitt. På den måten sammenlignes resultatene fra standardmaterialet. Det anbefales å benytte ni prøver, hvor tre ulike konsentrasjoner analyseres med tre replikater hver.[10, 37]

1.7.4. Gjenvinning

For å bestemme gjenvinningen må hele metoden testes med standarder og rene prøver. En kjent mengde analytt blir tilsatt prøven før de blir analysert av instrumentet. Gjenvinningsgraden av internstandard i prøven må beregnes for alle analytter og det trengs da en gjenvinningsstandard for å kunne gjøre det.[22]

Gjenvinningsgraden

Gjenvinningsgraden beregnes ved at en gjenvinningsstandard (RSTD) tilsettes direkte i prøven rett før analyse. Prøvene inneholder internstandard, som blir tilsatt under prøveoppbeiringen. Gjenvinningsgraden av ISTD ble da beregnet i forhold til RSTD ved først å beregne responsfaktoren og deretter gjenvinningsgraden i prosent ved bruk av resultatet på analysene av de reelle prøvene.[22]

Responsfaktoren til internstandard (ISTD) ble beregnet i forhold til gjenvinningsstandard (RSTD) ved bruk av formel 1.2.[22]

Formel 1.2. Beregning av responsfaktor til internstandard i forhold til gjenvinningsstandard

$$f_r = \frac{\text{Kons. ISTD} \cdot A_{S(\text{RSTD})}}{\text{Kons. RSTD} \cdot A_{S(\text{ISTD})}}$$

Hvor

f_r : Responsfaktor til internstandard, ISTD i forhold til gjenvinningsstandard, RSTD
 $A_{S(\text{RSTD})}$: Arealet av internstandard, ISTD

$A_{S(RSTD)}$: Arealet av gjenvinningsstandarden, RSTD

Gjenvinningsgraden (R) av den tilførte internstandard (ISTD) beregnes i forhold til gjenvinningsstandarden (RSTD) ved bruk av formel 2.3.[22]

Formel 1.3. Beregning av gjenvinningsgrad

$$R(\%) = \frac{\text{Tilført mengde RSTD} \cdot A_{p(ISTD)} \cdot f_r \cdot 100}{\text{Tilført mengde ISTD} \cdot A_{p(RSTD)}}$$

Hvor

f_r : Responsfaktor til internstandard, ISTD i forhold til gjenvinningsstandard, RSTD

$A_{p(ISTD)}$: Arealet til internstandard, ISTD i prøven

$A_{p(RSTD)}$: Arealet til gjenvinningsstandarden, RSTD i prøven

En gjenvinning mellom 40-120 % anses for å være akseptabel, mens en gjenvinning mellom 20-40 % er diskutabelt. Beregnet gjenvinning utover dette blir vurdert som ikke tilfredsstillende for metoden.[22]

1.7.5. Spesifisitet/selektivitet

Spesifisitet vurderes som evnen en analytisk metode har til å skille ut analytten fra alt annet som kan befinne seg i prøven.[24, 36] Det skal vises en tydelig separasjon fra eventuelle urenheter som kan befinne seg i prøven. Ofte benyttes grunnlinjeseparasjon av analytter, hvor analyttsignalet skal tilbake til grunnlinjen før andre signaler treffer detektoren.[24]

Analyttsignalet skal kun skyldes analytten. Det utføres tester for å validere om metoden er spesifikk for utvalgte analytter og i hvilken grad metoden klarer å bestemme en eller flere analytter i en blanding uten av de sammenfaller med hverandre. Disse testene er i for av identifiseringstester og analyse- og urenhetsstester i bestemmelsen av spesifisiteten.[10, 35]

Identifisering

Det gjøres valideringer av passende identifiseringstester for og kunne separere nært liggende strukturer. Det benyttes prøver både med og uten analytt hvor det kun skal oppstå positiv respons på analytten. Det kan også benyttes prøver som er strukturelt like eller nært lik analytten for å se at den positive responsen ikke inntreffer.[10] Om forbindelsene inneholder ulike kvantifiserings- og kvalifiseringsmasser vil de kunne skilles tilfredsstillende i kromatogrammet uavhengig av om retensjonstidene ligger nære hverandre.

Analyse- og urenhetsstester

For kromatografiske prosedyrer bør kromatogrammene brukes til å demonstrere spesifisiteten. Enkeltkomponentene skal da være merket. Ved separasjon i kromatografi, kan spesifisiteten bestemmes ved oppløsning av to forbindelser som elueres ut nærmest hverandre. Om en ikke-spesifikk metode benyttes, skal andre støttende analytiske metoder benyttes til å demonstrere spesifisiteten.[10]

Spikede prøver er tilgjengelig

Bestemmelsen skal inkludere tap av analytt ved å spike rene prøver for å bevise at analyseresultatet ikke påvirkes av forurensning. Dette gjøres ved å sammenligne resultatet av uspikete prøver.[10]

Spikede prøver er utilgjengelig

Om prøver som er spiket ikke er tilgjengelig, er det en mulighet å bestemme spesifisiteten ved å sammenligne analyser av prøver som inneholder urenheter utført på en annen validert metode. Det bør omfatte prøver som er lagret under relevante stressforhold som lys, varme, fuktighet eller ulike pH-forhold.[10]

Renhetstester kan være nyttige for å se at toppene i kromatogrammet kun tilhører en komponent.[10]

1.7.6. Presisjon

Presisjonen vurderes som hvor godt replikatmålinger samsvarer med hverandre ved hjelp av standardavvik.[24, 36] Ved dette estimeres de tilfeldige feilene i målingene, altså ut ifra spredningen i resultatene ved gjentatte målinger av samme størrelse. Dette bestemmes ved repeterbarhet, reproduserbarhet og variabilitet. Dette underligger beregninger av variansen, standardavviket og variasjonskoeffisienten av en serie av målinger og fremstilles i prosent.[10, 37] Presisjonen kan estimeres ved standardavviket ved bruk av formel 1.4. samt at variansen er standardavviket opphøyd i andre.[35] Det skal ikke være utslagsgivende på resultatene for små endringer av metodeparameterne.[10, 22]

Flere ulike typer presisjon skilles fra hverandre. En av de er instrumentpresisjonen, som også kalles injeksjonspresisjonen. Den mest generelle måten å vurdere presisjonen på er ved reproduserbarheten, som vurderes når delmengder av den samme prøven blir analysert av ulike personer i ulike laboratorier.[24, 36]

Formel 1.4. Beregnet standardavvik for et utvalg prøver

$$S = \sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

Hvor

S og σ : Beregnet standardavvik for et utvalg prøver

x: Antall prøver benyttet

\bar{x} : Gjennomsnittet av antall prøver

Det er mest vanlig å fremstille presisjonen som en prosent av relativt standardavvik ved bruk av formel 1.5. [35]

Formel 1.5. Beregnet relativt standardavvik (RSD) i prosent

$$\%RSD = \frac{S * 100}{x}$$

Hvor

RSD: Relativt standardavvik

S: Beregnet standardavvik

x: Totalt antall prøver benyttet

Repeterbarhet

Repeterbarheten er et mål for den spredningen som oppnås ved gjentatte målinger utført under like betingelser over et kort tidsrom og utgjør den minste forventede presisjonen til metoden. Det gir en idé for forventet variabilitet over et kort tidsrom.[8, 22, 35] Det kan utføres ved at et minimum av ni analyser som dekker det spesifiserte området av prosedyren (f.eks. tre ulike konsentrasjoner hvor det analyseres tre replikater av hver) eller ved at et minimum av seks prøver av 100 % av testkonsentrasjonen analyseres. [10, 37]

Reproduserbarhet

Reproduserbarheten skal bestemmes i forbindelse av standardisering av metoden.[22] Det er reproduserbarheten som observeres når den samme mengden prøve introduseres i instrumentet. Variabilitet i mengde injisert prøve og responsen i instrumentet kan oppstå.[24] Det blir ofte brukt som et mål på analytisk måleusikkerhet, og det er en forutsetning at det går over et lengre tidsrom slik at alle variable kommer med. [22]

Variabilitet

Ved å se på beregnet varians av prøveløsningene samt innstillinger av instrumentparameterne, kan metodens variabilitet vurderes. Stabiliteten av analytiske løsninger, ekstraksjonstiden, bruk av ulike kolonner i kromatografen, temperaturen og strømningshastigheten er noen eksempler som tas hensyn til. [10]

1.7.7. Deteksjonsgrense

Deteksjon- og kvantifiseringsgrensene bidrar til bestemmelse av selektiviteten og memoryeffekten til metoden ved brukt av blanke prøver. Det bidrar også til å fastslå eventuelle kontamineringsproblemer samt at det er egnet for å kunne måle mengden forbindelser i bakgrunnsmiljøprøver.[10, 22]

Deteksjonsgrensen beskrives som den laveste mengden analytt som detekteres tilfredsstillende fra den blanke prøven ved en gitt presisjon.[24, 36] Det er flere ulike alternativer som kan benyttes for å bestemme deteksjonsgrensen. Den kan bestemmes ved en visuell vurdering av bakgrunnsstøyen på kromatogrammet, ”peak-to-peak-noise” eller ved å beregne standardavviket av responsen og benytte helningen på kurven vist i formel 1.6.[10, 32] I likningen til regresjonen er a helningen og b skjæringspunktet med y-aksen. Formel 1.7 viser en mulig måte å beregne deteksjonsgrensen på.

Formel 1.6. Beregnet standardavvik for en gitt populasjon eller et antall prøver

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

Hvor

x: Gjennomsnittet av responsen til de blanke prøvene

n: Antall prøver som er benyttet

Formel 1.7. Beregnet deteksjonsgrense når standardavviket for de blanke prøvene er beregnet

$$DL = 3 \cdot \sigma$$

Hvor

σ: Standardavviket av responsen av de blanke prøvene

Det sies at signalet som er tre ganger større enn støyen som lages av de blanke prøvene vurderes som deteksjonsgrensen. Det kreves minimum 7 replikater av blanke prøver for å kunne gi en god nok vurdering av deteksjonsgrensene.[24, 36] Det må alltid vurderes om deteksjonsgrensen som er beregnet er realistisk.[10]

1.7.8. Kvantifiseringsgrense

Kvantifiseringsgrensen er den laveste beregnede konsentrasjonen hvor analytten kan kvantifiseres med et gitt nivå av sikkerhet. Dette gjøres ved å analysere prøvene med så lav konsentrasjon frem til presisjonen ikke lenger vurderes som tilfredsstillende. [32] Likt som for deteksjonsgrensen, kan kvantifiseringsgrensen bestemmes på samme måte. Formel 1.8 viser et alternativ å beregne kvantifiseringsgrensen på etter at formel 1.6. ble benyttet til å beregne standardavviket i forkant.[10]

Formel 1.8. Beregnet kvantifiseringsgrense når standardavviket for de blanke prøvene er beregnet

$$QL = 10 \cdot \sigma$$

Hvor

σ : Standardavviket av responsen av de blanke prøvene

Kvantifiseringsgrensen beskrives som et signal som er ti ganger større enn støyen som gis av de blanke prøvene. Det kreves minst 7 replikater for å kunne gi en god nok vurdering av kvantifiseringsgrensen.[24]

1.7.9. Total mengde analytt i reelle prøver

Den totale mengden analytt i reelle prøver beregnes ved at internstandard tilsettes med konstant konsentrasjon i standardene. Responsfaktoren til analytten blir beregnet i forhold til internstandard (ISTD) ved bruk av referanseløsningen gitt i formel 1.9.[22]

Formel 1.9. Beregnet responsfaktor av analytt i forhold til internstandard

$$f_i = \frac{\text{Kons. } P_i \cdot A_{S(\text{ISTD})}}{\text{Kons. ISTD} \cdot A_{S(i)}}$$

Hvor

f_i : Responsfaktor av analytten P_i i forhold til internstandard, ISTD

$A_{S(i)}$: Arealet av analytt, P_i

$A_{S(\text{ISTD})}$: Arealet av internstandard, ISTD

Den totale mengden av analytt i prøven er beregnet ved bruk av formel 1.10.[22]

Formel 1.10. Beregnet total mengde analytt i reelle prøver

$$M_i = \frac{\text{Mengde ISTD} \cdot A_{P(i)} \cdot f_i}{A_{P(\text{ISTD})}}$$

Hvor

f_i : Responsfaktor av analytten P_i i forhold til internstandard, ISTD

$A_{P(i)}$: Arealet av analytten P_i i prøven

$A_{P(\text{ISTD})}$: Arealet av internstandard, ISTD i prøven

1.7.10. Usikkerhet

Usikkerhet er ikke et eget valideringskriterie, men det er nødvendig å ta en vurdering av metodens totale usikkerhet for å bedømme egnetheten. Usikkerheten kan estimeres ut ifra deler av metodens utførelse eller ved en totalvurdering av hele metodens usikkerhet som inkluderer både parametere, instrumenter og komponenter. Ved at dette blir gjort kan både nytten av metoden og kvaliteten på resultatene bli vurdert tilstrekkelig.[36]

Det er en rekke hovedkilder knyttet opp til usikkerhet under analyser ved bruk av en analytisk metode. Det kan være unøyaktig presisering av målene til metoden, feil under prøveopparbeiding, personlige avvik av laborant ved å lese signaler feil eller å ikke gjenkjenne påvirkningene av alle eksterne faktorer på resultatet, usikkerhet tilknyttet kalibrering, utilstrekkelig oppløsning av prøvemateriale, usikkerhet tilknyttet standarder og/eller referansemateriell og usikkerhet knyttet opp mot tilnærminger som er gjort og forutsetninger som er tatt ved å benytte ett bestemt instrument. For å estimere en total usikkerhet er det vanlig å benytte et flytdiagram.[36]

Noe av det viktigste er å estimere usikkerheten rundt kalibreringen i en analytisk metode. Det kan gjøres ved å ta utgangspunktet i repeterbarheten, beregne usikkerheten tilknyttet referanseverdien for standardprøvene, påvirkningen av prøveopparbeidingen eller ukorrekt tilnærming av målepunktene for å lage kalibreringskurven.[36]

2. Materialer og metode

2.1. Utstyrliste

I denne oppgaven ble det utført analyser på Agilent Technologies 7890B gasskromatograf som var koblet til et Agilent Technologies, 7000C trippel kvadrupol (QQQ) massespektrometer med negativ kjemisk ionisering som detektor.

2.2. Kjemikalieliste

Det ble benyttet standardløsninger av N-/O-PAH, internstandarder og gjenvinningsstandard. Oversikt over alle standarder som ble benyttet er vedlagt i vedlegg A i tabell A.2. Standardløsningene er listet opp i tabell 2.2.1.

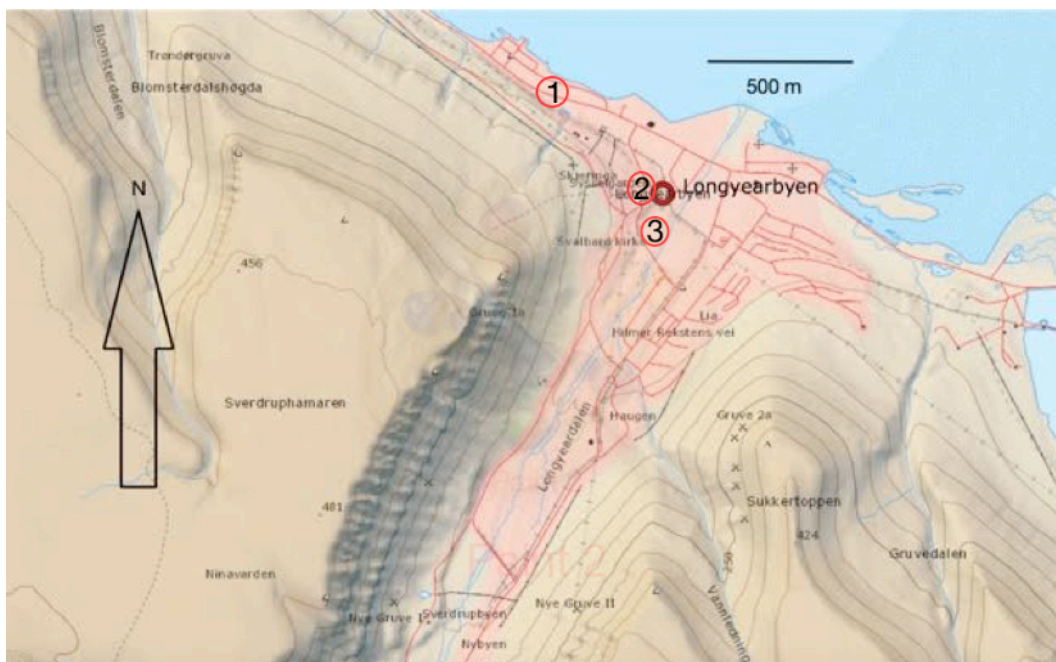
Tabell 2.2.1. Standardløsninger benyttet i fortyninger og videre analyser tilsendt fra Svalbard

Standardløsning	Konsentrasjon (ng/μL)
Nitro-Oksy-PAH	1
Internstandard	1
Gjenvinningsstandard	1

Bæregassen benyttet i instrumentet var helium (6,0 kvalitet AGA Porsgrunn) og metan (CH₄, 6,0 kvalitet AGA Porsgrunn) ble benyttet som reaktantgass i NICI.

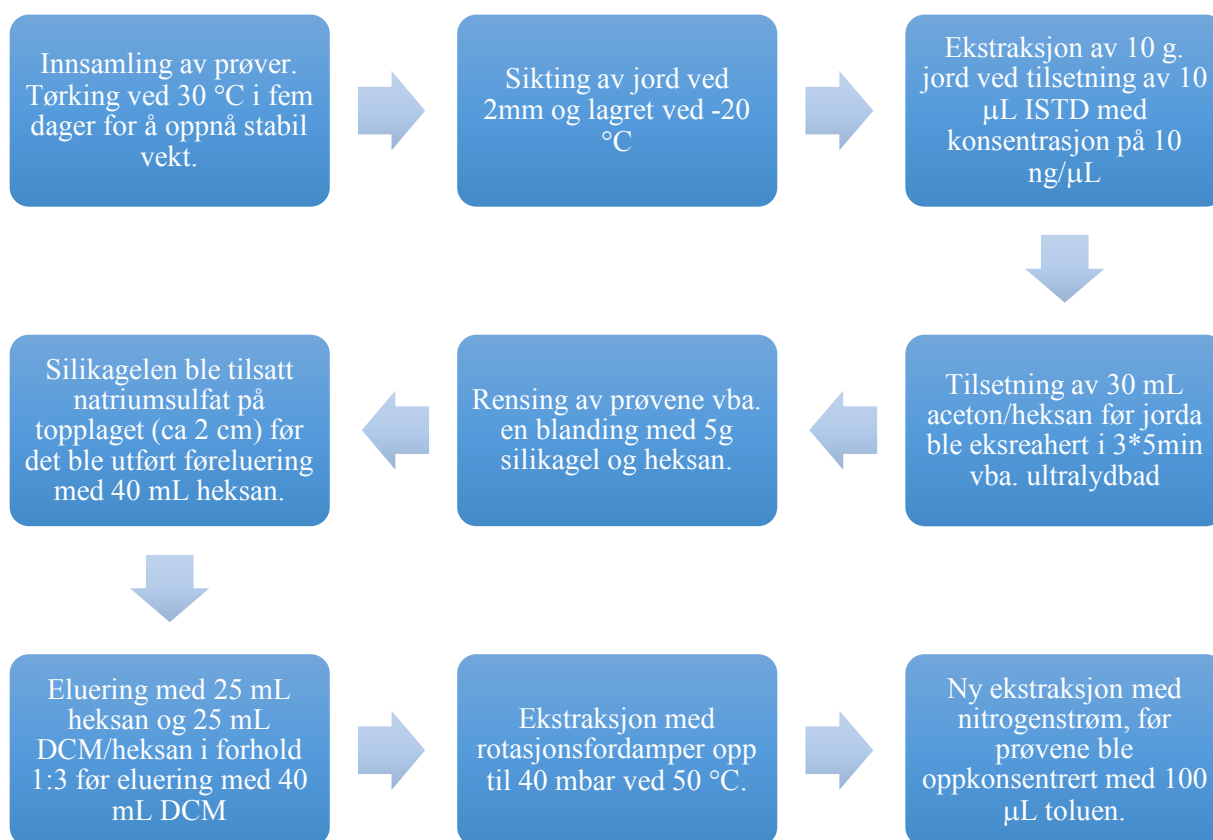
I tillegg ble det benyttet et utvalg jordprøver, som ble høstet og opparbeidet ved Universitetscenteret på Svalbard (UNIS). Det ble benyttet 14 ulike jordprøver for analyse på IKBM-metoden, mens 11 jordprøver ble benyttet for analyse på MPIC-metoden. Jordprøvene som ble analysert på MPIC-metoden inneholdt ikke internstandarder, da det hadde oppstått noe feil ved silikafraksjoneringen under prøveopparbeidningen utført av PhD-student Tatiana Drotikova ved UNIS. Derfor ble andre jordprøver benyttet for IKBM-metoden slik at en fullstendig metodevalidering kunne utføres. Disse jordprøvene hadde tidligere blitt analysert på metoden av PhD-student Montserrat Marques Bueno, Universitat Rovira i Virgili (URV).

Prøveopparbeidelsen ble gjort på Svalbard hvor prøvene P2, P5, P6 og P8 er jordprøver samlet ved butikkområde, foran bensinstasjon, ved havnen og en bakgrunnsprøve fra indre adventfjord. Figur 2.2.1. viser et kart over Longyearbyen, Svalbard hvor prøvene ble samlet og prøveopparbeidelsen ble gjort. Merke nummer en viser hvor prøven ved havnen ble tatt, merke nummer to viser hvor prøven ved butikkområde ble tatt og merke nummer tre viser hvor prøven ved bensinstasjon ble tatt. Bildet er hentet fra NPI og benyttet til redigering.



Figur 2.2.1. Kart over Longyearbyen, Svalbard hvor prøvene er høstet og opparbeidet. Bildet er hentet fra www.npolar.no

Longyearbyen ligger på Spitsbergen på Svalbard og har et innbyggertall på rundt 2100 innbyggere. Grunnet mye industri, gruvedrift og kullkraftverk er det forventet betydelige funn av N-/O-PAH i jordprøvene som ble kvantifisert fra bysentrum til tross for liten befolkningstetthet. Oversikt over prøveoppbeidelsen gjort på Svalbard er vist i figur 2.2.2.



Figur 2.2.2. Flytskjema over prøveoppbeidelsen gjort ved UNIS, Longyearbyen, Svalbard

Oversikt over hvilke internstandarder som ble tilsatt er listet opp i tabell 2.2.2. Internstandardene benyttet i denne oppgaven er deutererte (^2H)-forbindelser av N-/O-PAH.

Tabell 2.2.2. Oversikt over internstandarder tilsatt under prøveopparbeidingen

Navn
<i>PAH</i>
Biphenyl-D10
Phenanthrene-D10
Pyrene-D10
Benzo(a)anthracene-D12
Benzo(s)pyrene-D12
<i>N-PAH</i>
1-Nitronaphtalene-D7
9-Nitroanthracene-D9
3-Nitrofluoranthene-D9
6-Nitrochrysene-D11
2-Nitrobiphenyl-D9
<i>O-PAH</i>
1,4-Naphtaquinone-D6
Anthraquinone-D8
9-Fluorenone-D8

Gjenvinningsstandarden, fluoranthene-D10 ble tilsatt direkte i prøven like før analyse på GC-MS.

Det ble benyttet blanke prøver, hvor heksan ble analysert på begge metodene for bruk til beregning av deteksjons- og kvantifiseringsgrenser. Blant alle prøveanalysene som ble gjort, ble det også gjort blanke tester. Et utvalg av disse ble benyttet, hvor de beste resultatene på heksananalysene ble valgt for et best mulig resultat.

2.3. Metode

Det ble testet en allerede oppsatt metode, hvor metodevalidering var nødvendig for å kvalitetssikre den for videre arbeid. Metoden ble ledet igjennom flere ledd som inkluderte metodevalideringskriterier slik at det til slutt kunne bli tatt en vurdering av metoden i sin helhet. Metodevalideringskriterier er nærmere beskrevet i delkapittel 1.7. Det ble laget en valideringsplan for metoden, hvor forventede og akseptable grenser ble beskrevet. Dette er vist i tabell 2.3.1.

Tabell 2.3.1: Valideringsplan for ulike metodevalideringskriterier

Valideringskriterier	Akseptabel verdi
Linearitet	0,95-1,05
Kalibreringskurven	
Nøyaktighet	30-120 %
Gjenvinningstester	
Presisjon	30 %

Relativt standardavvik (%)	
Standardavvik	5 pg
Deteksjonsgrense	0,30 pg/ μ L
Kvantifiseringsgrense	0,30 pg/ μ L
Responsfaktor	10 %
Konsentrasjonsintervall	450-28 pg/ μ L
Usikkerhet	45 %

Informasjon om metodevalidering er beskrevet i delkapittel 1.7. Det ble tilsendt standarder av N-/O-PAH, internstandarder (ISTD) samt gjenvinningsstandard (RSTD) vedlagt i vedlegg A, tabell A2 fra Svalbard som ble benyttet til å utføre kvantifiseringen. I tillegg ble de samme standardene testet på en annen metode til sammenligning. Det ble også testet et antall bakgrunnsjordprøver opparbeidet av Tatiana Drotikova, PhD-student ved UNIS og Montserrat Marques Bueno, PhD-student ved URV på begge metodene for å kunne gjøre nødvendige valideringer og estimeringer senere.

Det ble gjort fire ulike tester for denne metoden i denne studien. Det ble benyttet intern standard metoden, som er nærmere beskrevet i delkapittel 1.3. og alle analyser foregikk på GC-MS med NICI, beskrevet nærmere i delkapittel 1.4. Først ble det laget kalibreringsløsninger av N-/O-PAH og internstandardløsningen, deretter ble det gjort analyser av fortyntinger av N-/O-PAH som ble tilsatt en mengde internstandard med konstant konsentrasjon på 100 pg/ μ L. Det ble også gjort en analyse med fortyntinger av internstandard som ble tilsatt en kjent mengde gjenvinningsstandard med konstant konsentrasjon på 100 pg/ μ L i tillegg til en test som inkluderte blanke prøver. Fortynningsrekkene ble ikke utført på MPIC-metoden, da dette ikke var nødvendig for sammenligningen. *n*-heksan ble benyttet til de blanke prøvene.

2.3.1. Kalibreringsløsninger laget for analyse

Med unntak av fortyntingsrekkene beskrevet under, ble de andre to kalibreringsløsningene og test av blanke prøver benyttet på begge metodene og tillaget på samme måte.

Fortynningsrekker

Først ble det laget en arbeidsløsning av de tilsendte prøvene ved at en mengde av prøvene ble overført i nye beholdere. Dette ble gjort for å unngå kontaminering i de tilsendte prøvene.

Det ble laget kalibreringsløsninger av den native standardløsningen som inneholdt N-/O-PAH og internstandardene med en konsentrasjon varierende fra 500 pg/ μ L og ned til 31 pg/ μ L. 250 μ L prøve med en konsentrasjon på 1 ng/ μ L ble tatt ut og overført til injeksjonsglass og tilsatt 250 μ L *n*-heksan. Fra denne løsningen ble det deretter tatt ut 250 μ L og tilsatt 250 μ L *n*-heksan. Dette ble gjort fem ganger. Oversikten over konsentrasjonene er gitt i tabell 2.3.2.

Tabell 2.3.2. Kalibreringsløsninger av nitro-og oksy-PAH og internstandarder

Fortynning	Konsentrasjon N-O-PAH (pg/ μ L)	Konsentrasjon ISTD (pg/ μ L)
1	500	500
2	250	250
3	125	125
4	63	63

5	31	31
---	----	----

Kalibreringsløsninger av nitro- og oksy-PAH tilsatt 100 pg/μL internstandard

Kalibreringsløsningene av N-/O-PAH ble benyttet til å lage nye prøver hvor konsentrasjonen av N-/O-PAH varierte i hver løsning fra 450 pg/μL- 28 pg/μL, hvor det ble tilsatt internstandard med konstant konsentrasjon på 100 pg/μL. Det ble tatt ut 90 μL av hver fortynning av N-/O-PAH og overført til nye injiseringsglass hvor det ble tilsatt 10 μL internstandard med en konsentrasjon på 1000 pg/μL. De nye konsentrasjonene av N-/O-PAH er vist i tabell 2.3.3.

Dette forsøket ble gjort for å beregne total mengde standarder i bakgrunnsjordprøvene som ble kvantifisert.

Tabell 2.3.3. Konsentrasjon av nitro- og oksy-PAH etter tilsetning av internstandard

Fortynning	Konsentrasjon av N-O-PAH (pg/μL)
1	450
2	225
3	112
4	56
5	28

Kalibreringsløsninger av internstandard tilsatt 100 pg/μL gjenvinningsstandard

Kalibreringsløsningene av internstandardene ble benyttet til å lage nye prøver hvor gjenvinningsstandard ble tilsatt fortynningene med en konstant konsentrasjon på 100 pg/μL. Dette forsøket ble gjort for å kunne beregne gjenvinningsgraden av internstandard i bakgrunnsjordprøvene. I tillegg ble det beregnet deteksjons- og kvantifiseringsgrenser for disse analysene. Sluttkonsentrasjonen på internstandardløsningen varierte fra 450 pg/μL -28 pg/μL. Gjenvinningsstandard som ble benyttet i denne oppgaven var fluoranthene-D10. Det ble pipettert ut 90 μL av hver kalibreringsløsning og tilsatt 10 μL gjenvinningsstandard med en konsentrasjon på 1000 pg/μL. De nye konsentrasjonene av internstandardløsningene er vist i tabell 2.3.4.

Tabell 2.3.4. Konsentrasjon av internstandarder etter tilsetning av gjenvinningsstandard

Fortynning	Konsentrasjon ISTD (pg/μL)
1	450
2	225
3	112
4	56
5	28

Blanke prøver

Det ble benyttet blanke prøver til beregning av deteksjons- og kvantifiseringsgrenser for begge metodene. *n*-heksan, ble benyttet som blank prøve på begge metodene. For MPIC-metoden ble det benyttet ni blanke prøver for alle forbindelser, mens det for IKBM-metoden varierte fra 4-11 blanke prøver per forbindelse grunnet problemer med heksanet. Det ble forsøkt å analysere rene paralleller av blanke prøver etter hverandre uten videre hell.

Kvantifisering av bakgrunnsjordprøver

For å kunne utføre en komplett metodevalidering, ble et utvalg jordprøver på begge metodene kvantifisert. Prøvene hadde tidligere blitt opparbeidet av PhD.-student Tatiana Drotikova ved UNIS og PhD.-student Montserrat Marques Bueno ved URV hvor det ble tilsatt internstandarder i prøvene før tilsending som beskrevet i delkapittel 2.2.

Gjenvinningsstandard ble tilsatt direkte i prøvene rett før analysene ble gjennomført. Dette ble senere benyttet til beregning av gjenvinningen av internstandard i jordprøvene samt beregning av total mengde nativ standard i jordprøvene.

Det ble benyttet ulike jordprøver på metodene, da jordprøvene som i utgangspunktet skulle benyttes på begge metodene ikke inneholdt noen standarder grunnet feil under prøveoppbeiringen. Det ble derfor benyttet andre jordprøver kvantifisert på IKBM-metoden ved et tidligere tidspunkt slik at en fullstendig metodevalidering kunne utføres på denne metoden.

2.3.2. IKBM-metoden

Metoden er utviklet ved NMBU/IKBM for å kvantifisere og kvalifisere et utvalg N-/O-PAH. Metoden som inkluderer GC-MS med splittløs injeksjon og negativ kjemisk ionisasjonsteknikk gjør den sensitiv.[38] Dette er nærmere beskrevet i delkapittel 1.4.

Instrumentinformasjon

I denne metoden ble analyser gjort på GC-MS hvor det ble benyttet negativ kjemisk ionisasjon (NICI) i selektiv ionemodus (SIM) med en kildetemperatur på 200 °C. Temperaturprogrammet er vist i tabell 2.3.5.

Tabell 2.3.5. Temperaturprogram benyttet i IKBM-metoden

	Rate (°C/min)	Temperatur (°C)	Holdtid (min)
Initial		70	2
Rampe 1	15	180	0
Rampe 2	5	280	5
Rampe 3	15	325	5

Temperaturprogrammet ble benyttet til alle analysene utført på denne metoden.

Instrumentet ble stilt inn med en rekke innstillinger for å få best mulig resultat ut fra analysene som ble gjort. For massespektrometeret ble det benyttet negativ kjemisk ionisering med en kildetemperatur på 200 °C.

Det ble benyttet splittløs injeksjon med et injeksjonsvolum på 2 µL. Temperaturen var 250 °C, trykket var 60,732 kPa og totale strømmingen var 54 mL/min.

Starttemperaturen på kolonnen var 70 °C med et trykk på 60,7 kPa og en strømming på 1 mL/min. Trykket utenfor kolonnen var 0 kPa. For injektoren var likevektstiden 0,25 min og maksimumstemperaturen 325 °C.

For gasskromatografen ble det benyttet splittløs injeksjon ved en temperatur (isoterm) på 250 °C.

2.3.3. MPIC-metoden

Denne metoden er utviklet fra Max-Planck Institutet for kjemi i Mainz (MPIC), Tyskland. Prøveløsningene av internstandardene og standardene av N-/O-PAH opparbeidet ved UNIS som ble benyttet for IKBM-metoden, ble også analysert på denne metoden for å få en best mulig sammenligning. De resterende massene som lå inne i denne metoden men ikke i IKBM-metoden ble ekskludert da dette ikke var relevant for sammenligningen som skulle utføres. Massene til gjenvinningsstandard (fluoranthene-D10) som ble benyttet i denne studien var ikke inkludert i metoden i utgangspunktet. Derfor ble det gjort en optimering av metoden hvor disse massene ble lagt inn slik at forbindelsen ble kvantifisert og kunne benyttes senere.

Instrumentinformasjon

I denne metoden ble alle prøvene analysert på GC-MS hvor det ble benyttet negativ kjemisk ionisasjon (NICI) i selektiv ionemodus (SIM) med en kildetemperatur på 200 °C. Temperaturprogrammet er vist i tabell 2.3.6.

Tabell 2.3.6. Temperaturprogram benyttet i MPIC-metoden

	Rate (°C/min)	Temperatur (°C)	Holdtid (min)
Initial		60	2
Rampe 1	15	180	0
Rampe 2	5	280	5
Rampe 3	15	325	15

Temperaturprogrammet ble benyttet til alle analysene utført på denne metoden.

For massespektrometeret ble det benyttet negativ kjemisk ionisering med en kildetemperatur på 200 °C.

Det ble benyttet splittløs injeksjon med et injeksjonsvolum på 1 µL. Temperaturen var 250 °C, trykket var 56,228 kPa og den totale strømmingen var 54 mL/min.

Starttemperaturen på kolonnen var 60 °C med et trykk på 56,2 kPa og en strømning på 1 mL/min. Trykket utenfor kolonnen var 0kPa. Under injeksjonen var likevektstiden 0,25 min og makstemperaturen 325 °C.

For gasskromatografen ble det benyttet pulserende splittløs injeksjon med en temperatur på 250 °C.

3. Resultat

I denne oppgaven ble det utført en komplett metodevalidering for en N-/O-PAH kvantifiseringsmetode tidligere utviklet ved NMBU/IKBM. Metoden ble deretter sammenlignet med en annen metode utviklet fra Max-Planck institutt for kjemi i Mainz, Tyskland, opparbeidet av Post. Doc. forsker Pourya Shahpoury. Det ble benyttet Microsoft Excel for Mac, versjon 15,26 (160910), Office 365 fra NMBU til å utføre videre beregninger hentet ut fra Mass Hunter Workstation Qualitative Analysis Software, versjon B.06.00 SP1 fra Agilent Technologies. Informasjon er vedlagt i vedlegg A, tabell A2. Deretter ble det tatt en vurdering av metodens kvalitet ved hjelp av kriteriene som inkluderes i metodevalideringen, som beskrevet i delkapittel 1.7.

3.1. IKBM-metoden

Metoden er opparbeidet for å kvantifisere og kvalifisere et utvalg N-/O-PAH som inneholder både kvantifiserings-og kvalifiseringsmasser over ladning (m/z). Oversikt over alle forbindelsene benyttet med tilhørende m/z og retensjonstider er vedlagt i vedlegg C i tabell C1.

Konsentrasjonene på kalibreringsløsningene varierte fra en konsentrasjon på 500 pg/μL- 28 pg/μL, som beskrevet i kapittel 2.

3.1.1. Linearitet

Lineariteten ble validert ved hjelp av lineær regresjon. Et linearitetsområde innenfor ±5 % (0,95-1,05) regnes som utmerket og er linearitetskravet som stilles, som er nærmere beskrevet i delkapittel 1.7.1.

Lineariteten til fortynningsrekkene av N-/O-PAH ble tilfredsstillende med unntak av noen forbindelser nevnt nedenfor. Oversikt over de ulike forbindelsene for N-/O-PAH-fortynningene med tilfredsstillende R-verdi er vist i tabell 3.1.1. Regresjonskoeffisienten, R ble beregnet ved å ta kvadratroten av determinantkoeffisienten, R^2 hentet fra regresjonslikningen.

Tabell 3.1.1. Oversikt over determinantkoeffisientene, R^2 hentet fra regresjonslikningen samt beregnet regresjonskoeffisient, R for N-/O-PAH-fortynningene

Navn	Determinantkoeffisient, R^2	Regresjonskoeffisient, R
9,10-anthraquinone	0,991	0,996
6H-benzo(CD)pyrene-6-one	0,999	1,000
1,2-dibenzo(A)anthraquinone	0,996	0,998
Benzo(A)fluorene-11-one	0,995	0,997
9-Fluorenone	0,990	0,995
1,4-naphtaquinone	0,999	0,999
2-nitrofluoranthene	0,921	0,960
3-Nitrofluoranthene	0,998	0,999
5-nitro-acenaphthene	0,993	0,997
2-nitrofluorene	0,994	0,997
9-nitroanthracene	0,990	0,995
1-nitronaphtalene	0,997	0,998
1-nitropyrene	0,997	0,999
4-nitropyrene	0,998	0,999

Resultat

7-nitro(a)-anthracene	0,997	0,998
9-nitrophenanthrene	0,997	0,999
2-nitropyrene	0,996	0,998
2-nitroanthracene	0,996	0,998
2-nitronaphthalene	0,996	0,998
4-nitrobiphenyl	0,993	0,997
1,3-dinitropyrene	0,990	0,995
1,8-dinitropyrene	0,984	0,992
6-nitrochrysene	0,998	0,999
2,7-dinitrofluorene	0,987	0,993
1,6-dinitropyrene	0,990	0,995

Lineariteten til N-/O-PAH tilsatt 100 pg/μL ISTD viser tilfredsstillende linearitet ut fra linearitetskravet som er stilt på de fleste forbindelsene. Oversikten over de forbindelsene med tilfredsstillende regresjonskoeffisient er vist i tabell 3.1.2., samt at oversikten over forbindelsene som ikke tilfredsstiller linearitetskravet er vist i tabell 3.1.3.

Tabell 3.1.2. Oversikt over determinantkoeffisienten, R^2 hentet fra regresjonslikningen samt beregnet regresjonskoeffisient, R for N-/O-PAH-fortynninger tilsatt 100 pg/μL ISTD

Navn	Determinantkoeffisient, R^2	Regresjonskoeffisient, R
9,10-Anthraquinone	0,991	0,996
6H-Benzo(CD)pyrene-6-one	0,997	0,999
1,2-dibenzo(A)anthraquinone	0,997	0,998
Benzo(A)fluorene-11-one	0,996	0,998
9-Fluorenone	0,986	0,993
1,4-naphtaquinone	0,997	0,998
Fluoranthene-D10	0,995	0,998
2-nitrofluoranthene	0,998	0,999
3-nitrofluoranthene	0,998	0,999
5-nitroacenaphthene	0,993	0,997
2-nitrofluorene	0,999	1,000
9-nitroanthracene	0,997	0,999
1-nitronaphtalene	0,995	0,998
1-nitropyrene	0,994	0,997
4-nitropyrene	0,999	0,999
7-nitro(a)-anthracene	0,997	0,999
9-nitrophenanthrene	0,998	0,999
2-nitropyrene	0,999	1,000
2-nitroanthracene	0,999	1,000
2-nitronaphthalene	0,989	0,994
4-nitrobiphenyl	0,989	0,994
1,3-dinitropyrene	0,999	1,000
1,8-dinitropyrene	1,000	1,000

Resultat

6-nitrochrysene	0,995	1,000
2,7-dinitrofluorene	1,000	1,000

Tabell 3.1.3. Oversikt over forbindelsene som ikke tilfredsstilte linearitetskravet

Navn	Determinantkoeffisient, R^2
1-indanone	0,002
9-methylcarbazole	0,039
9,10-phenanthrenequinone	0,716
1,6-dinitropyrene	0,993
6-nitrobenzo(A)pyrene	0,164

Disse forbindelsene ble ekskludert før videre beregninger ble utført grunnet utilfredsstillende linearitet, som er nærmere beskrevet i delkapittel 1.7. 1,6-dinitropyrene ble ekskludert fordi kalibreringskurven gikk motsatt vei av de andre med egnet linearitet.

Lineariteten til internstandardene ble tilfredsstillende hvor linearitetskravet beskrevet over ble tatt høyde for. Regresjonskoeffisienten, R ble beregnet på samme måte som for ovenstående fortyngninger. Oversikten over internstandardfortyngningene med god linearitet er vist i tabell 3.1.4.

Tabell 3.1.4. Oversikt over determinantkoeffisienten, R^2 hentet fra regresjonslikningen samt beregnede regresjonskoeffisienter, R for ISTD-fortyngningene

Navn	Determinantkoeffisienten, R^2	Regresjonskoeffisient, R
1,4-naphtaquinone-D8	0,993	0,996
1-nitronaphtalene-D7	0,993	0,997
2-nitrophenyl-D9	0,997	0,999
9-fluorenone-D10	0,999	1,000
Anthraquinone-D8	0,999	1,000
3-nitrofluoranthene-D9	0,992	0,996
6-nitrochrysene-D9	0,990	0,995

Etter utført analyse kom både 9-fluorenone-D10 og Anthraquinone-D8 perfekt ut.

Lineariteten til internstandardene tilsatt 100 pg/ μ L RSTD ble tilfredsstillende ut fra linearitetskravet som ble stilt tidligere og i delkapittel 1.7. Oversikten over determinantkoeffisientene, R^2 hentet fra regresjonslikningen samt de beregnede regresjonskoeffisientene, R er vist i tabell 3.1.5. Regresjonskoeffisientene ble beregnet på samme måte som for de andre fortynningsløsningene.

Tabell 3.1.5. Oversikt over determinantkoeffisienter, R^2 hentet fra regresjonslikningen samt beregnede regresjonskoeffisienter, R for internstandardene tilsatt 100 pg/ μ L RSTD.

Navn	Determinantkoeffisient, R^2	Regresjonskoeffisient, R
1,4-naphtaquinone-D8	0,988	0,994

Resultat

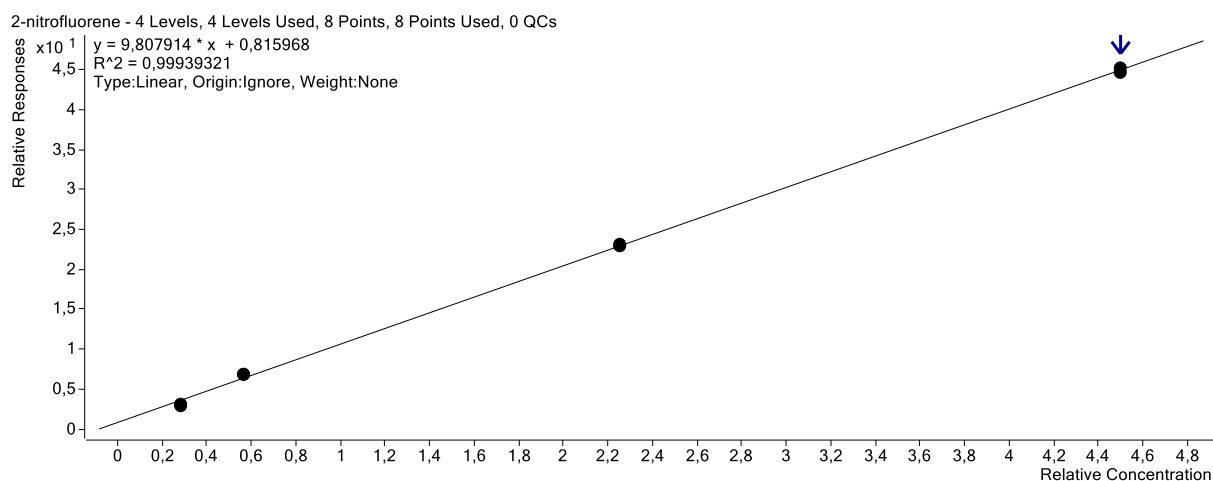
1-nitronaphtalene-D7	0,992	0,996
2-nitrophenyl-D9	0,997	0,999
9-fluorenone-D10	0,999	1,000
Anthraquinone-D8	0,999	1,000
3-nitrofluoranthene-D9	0,991	0,996

Etter utført analyse kom 9-fluorenone-D10 og anthraquinone-D8 best ut, men de resterende internstandardene ble også tilfredsstillende ut fra linearitetskravet som ble stilt.

3.1.2. Sensitivitet

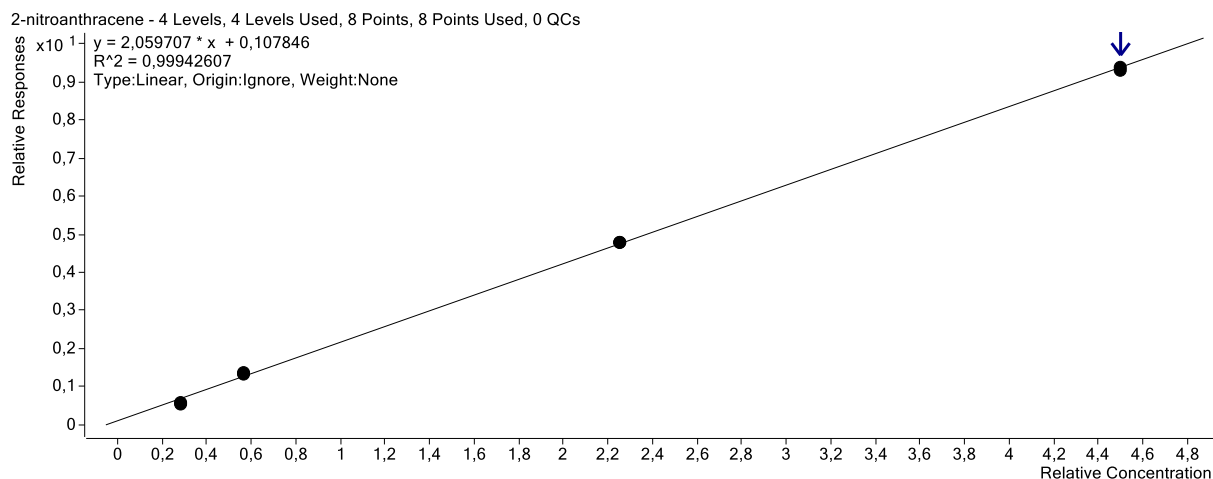
Sensitiviteten bestemmes ut fra helningen på standardkurven, som beskrevet i delkapittel 1.7. og gir et mål for metodens følsomhet. Ved bruk av GC-MS med negativ kjemisk ionisasjon skal det være mulig å oppnå høy sensitivitet. Det ble laget kalibreringskurver av alle forbindelsene som ble analysert og de fleste standarder og internstandarder kom ut med en tilfredsstillende determinantkoeffisient, R^2 og beregnet regresjonskoeffisient, R beskrevet ovenfor. Det var kun forbindelsene av N-/O-PAH som ikke tilfredsstilte linearitetskravet, som også viste en dårlig sensitivitet.

Figur 3.1.1., 3.1.2. og 3.1.3. viser kurvene til 2-nitrofluorene, 2-nitroanthracene og 1,8-dinitropyrene. Alle disse fikk en beregnet regresjonskoeffisient på 1, som vist i tabell 3.1.2.

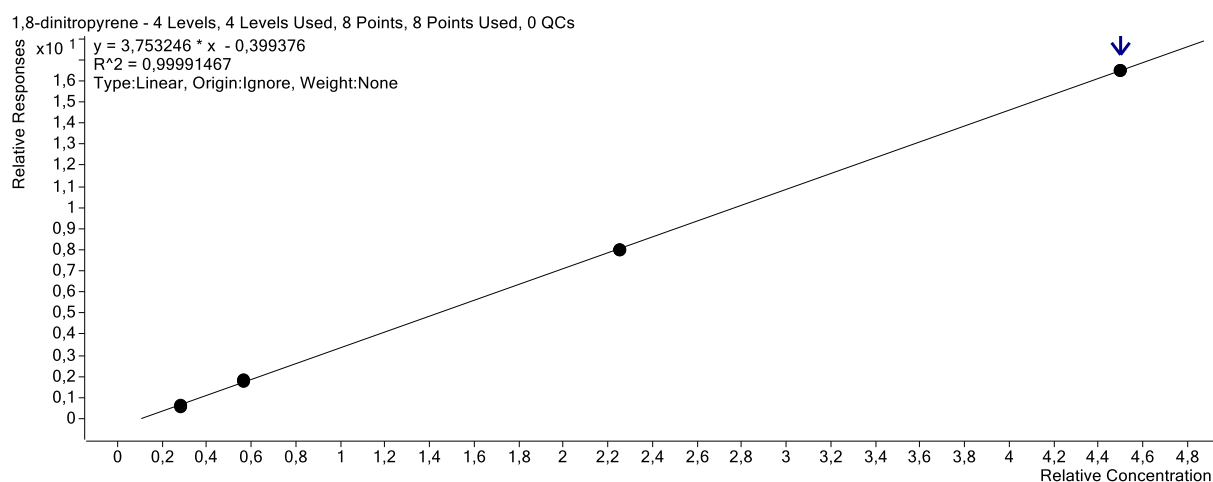


Figur 3.1.1. Kalibreringskurven til 2-nitrofluorene

Resultat

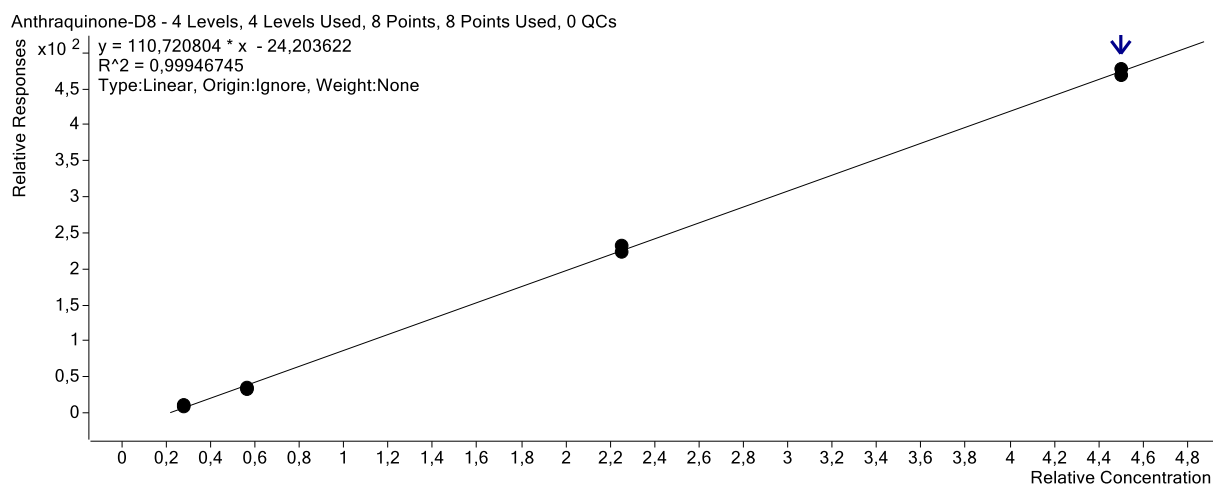


Figur 3.1.2. Kalibreringskurven til 2-nitroanthracene



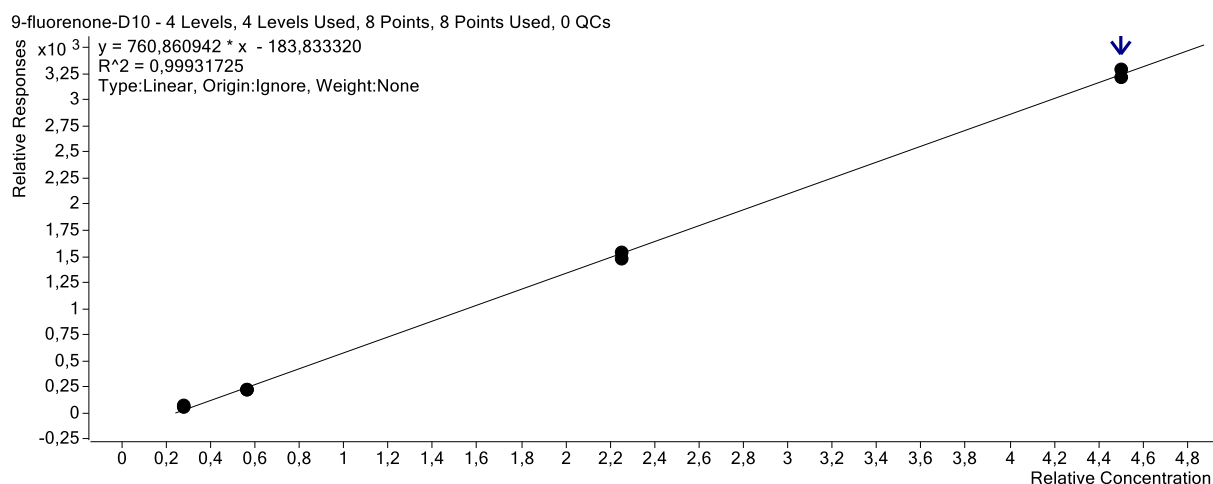
Figur 3.1.3. Kalibreringskurven til 1,8-dinitropyrene

I figur 3.1.4. og 3.1.5. vises kurvene til to internstandarder, anthraquinone-D8 og 9-fluorenone-D10. Begge disse fikk en beregnet R-verdi på 1, som vist i tabell 3.1.5.



Figur 3.1.4. Kalibreringskurven til anthraquinone-D8

Resultat



Figur 3.1.5. Kalibreringskurven til 9-fluorenone-D10

Den bratte helningen på kurvene samt den høye determinantkoeffisienten som ligger innenfor linearitetsområdet viser at metoden har god sensitivitet. På kurvene vist på ovenstående figurer, viser det et stigningstall mellom 0,8-2.

3.1.3. Nøyaktighet

Nøyaktigheten til metoden gir et mål for systematiske feil som forekommer i en analyse. Den beregnes ved bruk av formel 1.1. i delkapittel 1.7. og gir et tall på hvor stort tapet av analytt er i prøven. Den kan også estimeres ut fra stabiliteten til instrumentparameterne som er benyttet i metoden, beskrevet i delkapittel 2.3.2.

Parameterne som ble kalibrert for denne metoden er egnet for de aller fleste standarder den er testet på. Temperaturprogrammet vist i tabell 2.3.5. er satt opp slik at det inkluderer alle ønskelige retensjonstider samt at injeksjonsvolumet holder følsomheten på et høyt nivå. Instrumentet og ionisasjonsteknikken som ble valgt i denne oppgaven som beskrevet i delkapittel 1.4. og 1.6., skal i utgangspunktet gi grunnlag for en høy nøyaktighet. Responsen holder seg fra 10^4 samt at toppene i kromatogrammet blir godt fordelt selv på lave konsentrasjoner. Dette vises også ved de høye regresjonskoeffisientene.

3.1.4. Gjenvinning

Gjenvinningsgraden ble beregnet for å kunne gi en vurdering av gjenvinningen av internstandarder tilsatt i jordprøvene. Det ble totalt benyttet 14 jordprøver, som er nærmere beskrevet i delkapittel 2.2. Resultatene av kvantifiseringen av prøvene som ble valgt til beregning hadde blitt utført på et tidligere tidspunkt av PhD.-student Montserrat Marques Bueno ved URV.

Formel 1.2. ble benyttet for å beregne responsfaktoren til internstandarder i forhold til gjenvinningsstandarder hvor dette tallet ble brukt videre i formel 1.3. for å beregne gjenvinningsgraden i prosent. Dette er nærmere beskrevet i delkapittel 1.7. Gjenvinningsgraden (R) for et utvalg jordprøver er vist i tabell 3.1.6. I denne studien ble alle verdier over 30 % vurdert som kvantifiserbare. Se vedlegg D, figur D3 og D4 for TIC-kromatogram over ISTD tilsatt 100 pg/ μ L RSTD i høy og lav konsentrasjon og figur D10 og D11 for SIM-kromatogram av en utvalgt jordprøve samt ISTD og RSTD.

Tabell 3.1.6. Oversikt over beregnet gjenvinning, R (%) for et utvalg jordprøver og internstandarder

Internstandard Prøve	9-fluorenone-D8	Anthraquinone-D8	1-nitronaphtalene-D7
P8H	48	42	11
P8G	47	64	11
P2E	35	34	11

For mange av jordprøvene ble ikke internstandardene identifisert, slik at gjenvinningsgraden ikke kunne beregnes. Oversikt over hvilke jordprøver det ble beregnet gjenvinningsgrad for er vedlagt i vedlegg C i tabell C3. Av internstandardene som det ble beregnet gjenvinning for, er 9-fluorenone-D8 og anthraquinone-D8 foretrukket hvor begge har en beregnet gjenvinning på 30 % eller mer.

3.1.5. Spesifisitet/selektivitet

Metodens spesifisitet og selektivitet bestemmes ved hvilken grad forbindelsene skilles fra hverandre, som beskrevet nærmere i delkapittel 1.7. Med hensyn til dette tas det også en vurdering på i hvilken grad metoden er spesifikk for de forbindelsene den er laget for. For å vurdere spesifisiteten, ble fortyninger av standardløsningen benyttet.

Metoden regnes for å ha en høy komponentspesifisitet på standardene da forbindelsene viser god fordeling og kan skilles tilfredsstillende ved måling av selektiv ionemodus (SIM). Ved bruk av SIM kommer det tydelig frem at hvert enkelt signal i kromatogrammet tilhører en bestemt analytt selv i komplekse blandinger, ved at retensjonstidene holder seg konstant og tilhørende masse til retensjonstiden er den samme under hver analyse.

Kromatogrammene viser god fordeling med lite eller ingen tailing. Metoden klarer også å detektere forbindelsene ned til lave konsentrasjoner og de kan skilles ved massetall. Forbindelsene med dårlig linearitet oppgitt i tabell 4.1.3. hadde også dårlig selektivitet.

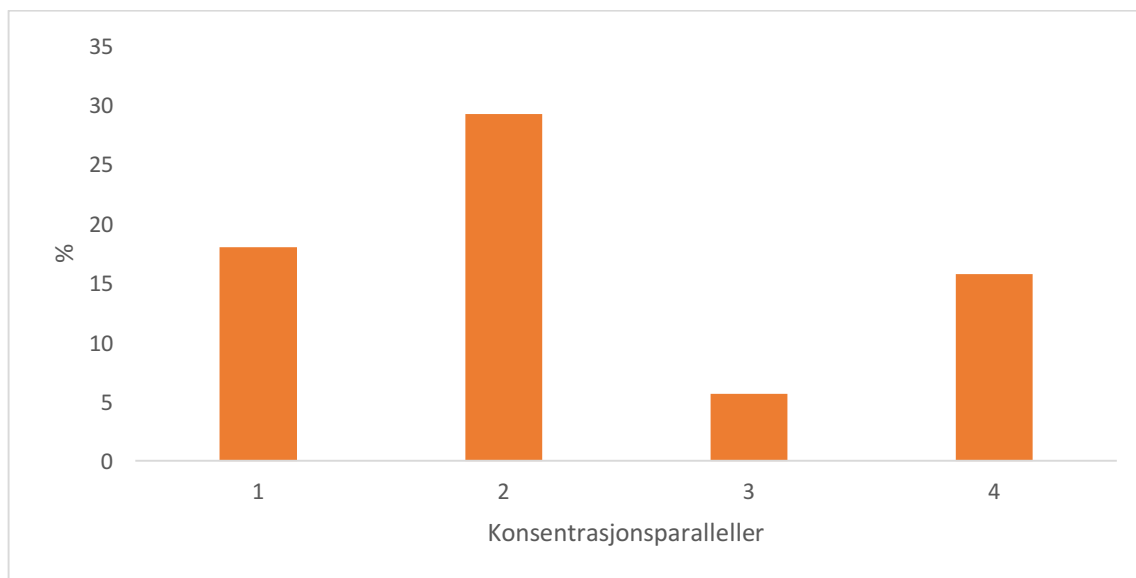
Ved lavere konsentrasjoner faller responsen fra 10^1 - 10^3 sammenlignet med analyser ved høyere konsentrasjoner, men for forbindelsene som opprettholder en respons på $>10^4$ vises det god fordeling ved ekstraksjon av massene. Det er derimot helt nødvendig å benytte SIM for å studere alle massene i blandingen. Ved å se på SIM- og TIC-kromatogrammene som er representert i vedlegg D, vises det et bilde over hvordan responsen endrer seg fra høy til lav konsentrasjon.

3.1.6. Presisjon

Presisjonen ble validert for og kunne ta en vurdering av de tilfeldige feilene i målingene. For en analytisk prosedyre kan presisjonen bestemmes ved variabiliteten med hensyn på variansen, standardavviket og variasjonskoeffisienten av en serie målinger. Dette er nærmere beskrevet i delkapittel 1.7.

Det ble gjort beregninger av det totale standardavviket, relativt standardavvik (%) og variansen av alle standarder tilsatt en konstant mengde internstandard som ble detektert tilfredsstillende i fortyningene vurdert ut fra linearitetskravet beskrevet i delkapittel 1.7.1. Formel 1.4. i delkapittel 1.7.6. ble benyttet til beregning av standardavviket for deretter å benytte formel 1.5. til beregning av det relative standardavviket. Det er det relative standardavviket og beregnet standardavvik som er representert i oppgaven.

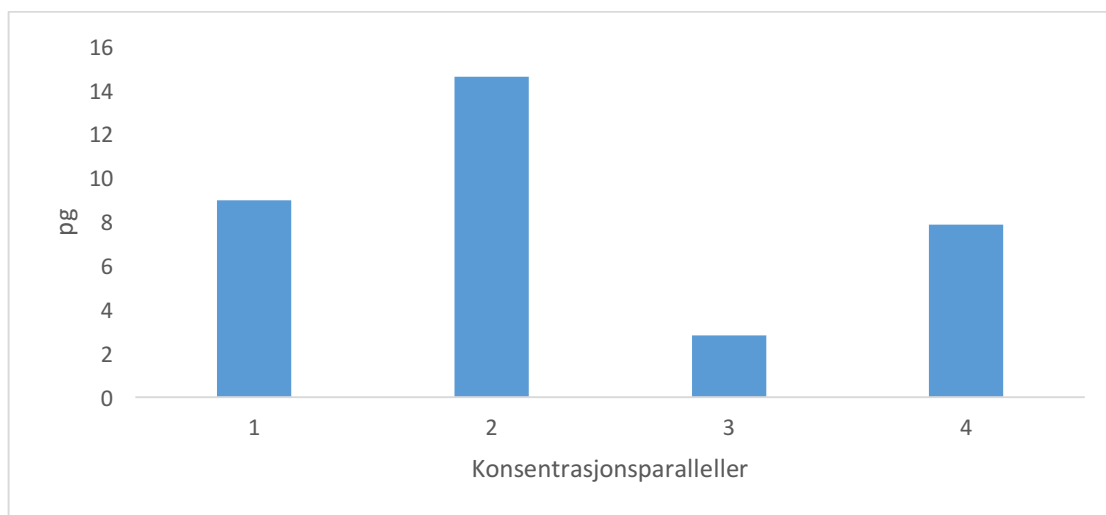
I figur 3.1.6. er beregnet relativt standardavvik i konsentrasjonsintervallene 450 pg/uL, 225 pg/uL 56 pg/uL og 28 pg/uL for de tillagede fortynningsløsningene av standardene. Relativt standardavvik av hvert konsentrasjonsintervall inkludert alle standardene ble beregnet. Det ble analysert dubletter av hver konsentrasjonsløsning, hvor det var fire kalibreringsløsninger av standardene i ulike konsentrasjoner.



Figur 3.1.6. Fremstilling av relativt standardavvik av N-/O-PAH tilsatt 100 pg/ μ L ISTD i konsentrasjonsintervallene 450(1), 225(2), 56(3) og 28(4) pg/ μ L.

Parallell nr. 2 skiller seg noe ut på relativt standardavvik som ble beregnet til å være 29 %. Parallell nr. 1 ligger noe under med beregnet relativt standardavvik på 18 %, mens parallell nr. 3 og nr. 4 kommer ut med lavest relativt standardavvik på 6 % og 16 %.

Metodens variabilitet ble vurdert ved beregning av standardavviket. Figur 3.1.7. viser standardavviket beregnet for alle standarder i hvert konsentrasjonsintervall som ble vurdert til å være tilfredsstillende ut fra linearitetskravet stilt i delkapittel 1.7. Totalt fire løsninger med dubletter av her kalibreringsløsning ble benyttet og standardavviket ble beregnet for alle standardene i hvert konsentrasjonsintervall.



Figur 3.1.7. Fremstilling av beregnet standardavvik av N-/O-PAH tilsatt 100 pg/ μ L ISTD i konsentrasjonsintervallene 450(1), 225(2), 56(3) og 28(4) pg/ μ L.

Det vises en variabilitet i standardavvikene, hvor konsentrasjonsparallell nr. 2 skilte seg mest ut med 15 pg, mens parallell nr. 1 hadde et standardavvik på 9 pg, parallell nr. 4 på 8 pg og parallell nr. 3 hadde det minste på 3 pg.

3.1.7. Deteksjons- og kvantifiseringsgrenser

For å bestemme deteksjons- og kvantifiseringsgrensen til de ulike forbindelsene ble det benyttet et utvalg av blanke prøver. For denne metoden ble 4-8 blanke prøver plukket ut for hver standard etter vurdering på hvor optimal hver blank prøve ble etter analyse. Deretter ble responsen benyttet til å beregne standardavviket ved bruk av formel 1.6. Ut fra dette ble konsentrasjonen til de blanke prøvene beregnet ved bruk av regresjonslikningen til hver standard før deteksjons- og kvantifiseringsgrensene ble beregnet ved å benytte formel 1.7. og 1.8. i delkapittel 1.7.

I tabell 3.1.7. er det vist et utvalg standarder hvor det er beregnet deteksjons- og kvantifiseringsgrense i pg/g.

Tabell 3.1.7. Beregnet deteksjons- og kvantifiseringsgrenser for et utvalg standarder (pg/g)

Navn	1-nitronaphtalene	2-nitronaphtalene	2-nitrofluorene	1,8-dinitropyrene
LOD	100,3	41,7	2,2	8,5
LOQ	334,2	139,1	7,4	28,5

Tabell over alle deteksjons- og kvantifiseringsgrensene er vedlagt i vedlegg C i tabell C2 og et TIC-kromatogram av en standard blank prøve er vedlagt i vedlegg D, figur D12.

3.1.8. Total mengde standarder i jordprøver

Den totale mengden standarder i jordprøvene ble beregnet ut fra beregnede konsentrasjoner av standardene ved hjelp av regresjonslikningen. Konsentrasjonene ble multiplisert med injeksjonsvolumet, som var 2 uL og dividert med 10 g, som var mengden jord som ble ekstrahert under prøveopparbeidelsen. Det ble benyttet andre jordprøver enn for MPIC-metoden grunnet problemer under silikafraksjoneringen for disse prøvene. Resultatene av

kvantifiseringen av prøvene som ble valgt til beregning hadde blitt utført på et tidligere tidspunkt av PhD.-student Montserrat Marques Bueno ved URV grunnet problemer under prøveopparbeidingen på de jordprøven som i utgangspunktet skulle benyttes. Dette er nærmere beskrevet i kapittel 2.

Ved bruk av likning 1.9. og 1.10. som beskrevet i delkapittel 1.7.9 ble den totale mengden standard beregnet. Det ble satt et krav til godt fordelte topper samt en respons på 10^4 før beregningene ble satt som signifikante for metoden.

Mengden standarder i et utvalg av jordprøvene er vist i tabell 3.1.8. Alle jordprøvene som ble benyttet til analyse er tatt i Longyearbyen, Svalbard og opparbeidet ved Universitetscenteret på Svalbard (UNIS).

Tabell 3.1.8. Oversikt over beregnet total mengde standarder i et utvalg jordprøver målt i pg

Navn Prøve	5-nitroacenaphtene	9-fluorenone	Benzo(A)fluorene-11-one
P8H	4,8	46,4	8,0
P8G	4,0	46,6	6,7
P2H	3,0	2572,6	10,1
P8F	5,6	96,5	17,2
P5E	3,0	2175,9	12,6
P8E	4,8	105,8	16,5
P5H	6,5	2467,6	18,7

Oversikt over resterende jordprøver hvor det ble beregnet total mengde standarder er vedlagt i vedlegg C, tabell C4. Mengden av standardene i jordprøvene varierte mye hvor de laveste og de høyeste konsentrasjonene ble liggende utenfor deteksjons- og kvantifiseringsområdet. De beregnede verdiene er vedlagt i vedlegg C i tabell C2. Et visuelt bilde av et SIM-kromatogram av en standard i en utvalgt jordprøve med tilhørende internstandard er vedlagt i vedlegg D i figur D8 og D9.

3.1.9. Usikkerhet

Ut fra en total vurdering som ble utført av metoden, ble det estimert en metodeusikkerhet på ca. 40 %. Den største delen av usikkerheten er knyttet til tillaging av kalibreringsløsningene, hvor metoden som ble valgt for tillaging bidro til økt usikkerhet da det ble benyttet små volum og flere pipetter etter hverandre for tillaging av samme løsninger.

Ved at *n*-heksanen som ble benyttet til blanke prøver i denne studien viste seg å være forurenset grunnet deteksjon av topper i kromatogrammet, ble det ikke beregnet tilfredsstillende deteksjons- og kvantifiseringsgrenser for metoden. Dette ble et bidrag til økt usikkerhet hvor beregnet total mengde analytt i jordprøvene ikke kunne vurderes opp mot en grense.

3.2. MPIC-metoden

MPIC-metoden er utviklet fra Max-Planck Institutt for kjemi i Mainz (MPIC), Tyskland (MPIC Post.Doc. forsker Pourya Shahpoury) og er en GC-MS-NICI-SIM- metode utviklet for O-PAH og N-PAH inkludert kvantifiserings- og kvalifiseringsioner. Valideringen av denne metoden ble gjort på samme måte som for IKBM-metoden. Optimaliseringer som ble gjort på denne metoden for å få ut all informasjonen om forbindelsene som var nødvendig er beskrevet i delkapittel 2.3.3.

3.2.1. Linearitet

Lineariteten ble vurdert ved hjelp av lineær regresjon og beregnet regresjonskoeffisient, R ved å ta kvadratrotten av determinantkoeffisienten, R^2 hentet fra regresjonslikningen. Det ble vurdert om regresjonskoeffisienten lå innenfor linearitetsområdet, som ble satt til å være mellom 0,95-1,05 eller ± 5 %. Lineariteten av N-/O-PAH tilsatt 100 pg/ μ L ISTD er vist i tabell 3.2.1.

Tabell 3.2.1. Oversikt over determinantkoeffisienter, R^2 hentet fra regresjonslikningen samt beregnede regresjonskoeffisienter, R for N-/O-PAH-fortynninger tilsatt 100 pg/ μ L ISTD

Navn	Determinantkoeffisient, R^2	Regresjonskoeffisient, R
1,4-naphtoquinone	0,997	0,998
1-nitronaphtalene	0,996	0,998
9-fluorenone	0,995	0,998
9,10-anthraquinone	0,993	0,997
5-nitroacenaphtene	0,995	0,997
2-nitrofluorene	0,995	0,997
9-nitrophenanthrene	0,990	0,995
Benz(A)-fluorenone	0,994	0,997
2-nitrofluoranthene	0,996	0,998
1,2-benzanthraquinone	0,992	0,996
6-nitrochrysene	0,997	0,998
1,6-dinitropyrene	0,992	0,996

6-nitrobenz(A)pyrene tilfredsstilte ikke linearitetskravet beskrevet ovenfor og ble ekskludert før videre validering av metoden.

Lineariteten til internstandardene (ISTD) tilsatt 100 pg/ μ L gjenvinningsstandard (RSTD) er vist i tabell 3.2.2.

Tabell 3.2.2. Oversikt over determinantkoeffisienten, R^2 hentet fra regresjonslikningen samt beregnede regresjonskoeffisienter, R for ISTD-fortynninger tilsatt 100 pg/ μ L RSTD

Navn	Determinantkoeffisient, R^2	Regresjonskoeffisient, R
1-nitronaphtalene-D7	0,951	0,975
9-fluorenone-D8	0,943	0,971
Anthraquinone-D8	0,936	0,967
9-nitroanthracene-D9	0,937	0,968
3-nitrofluoranthene-D9	0,931	0,965

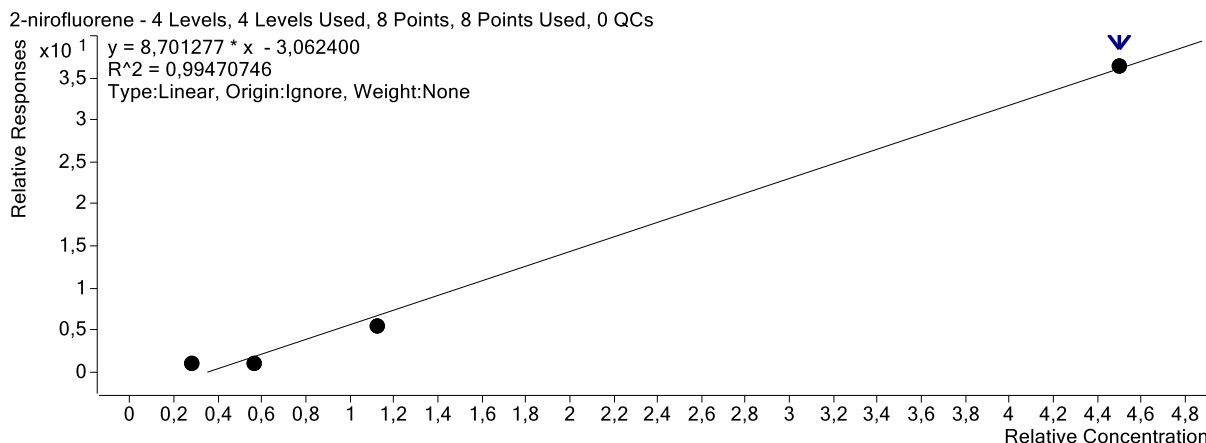
6-nitrochrysene-D11	0,935	0,967
---------------------	-------	-------

2-nitrofluorene-D9 tilfredsstilte ikke linearitetskravet beskrevet ovenfor med en beregnet regresjonskoeffisient på 0,6715 og ble ekskludert før videre beregninger.

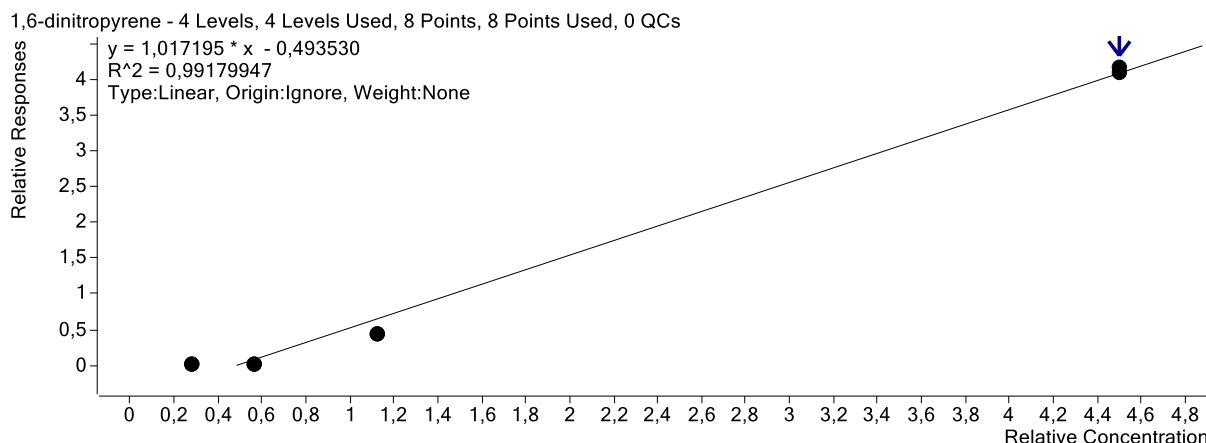
3.2.2. Sensitivitet

Sensitiviteten bestemmes ut fra helningen på standardkurven, som beskrevet i delkapittel 1.7.2. Ved bruk av GC-MS og negativ kjemisk ionisasjonsteknikk oppnås det høy sensitivitet på analysene.

Det ble laget kalibreringskurver av alle forbindelsene som ble analysert. De fleste standardene og internstandardene viste en god determinantkoeffisient med unntak av to forbindelser beskrevet ovenfor. Alle andre forbindelser med unntak av disse hadde en regresjonskoeffisient innenfor linearitetsområdet, som er beskrevet i delkapittel 1.7. Figur 3.2.1. og 3.2.2. viser kalibreringskurven til 2-nitrofluorene og 1,6-dinitropyrene.



Figur 3.2.1. Kalibreringskurven til 2-nitrofluorene



Figur 3.2.2. Kalibreringskurven til 1,6-dinitropyrene

Sett bort ifra fortynningsfeil under tillaging av løsninger, viser metoden en tilfredsstillende sensitivitet med høye determinantkoeffisienter med god helning på standardkurven, med et stigningstall på disse to kurvene på ca. 0,9.

3.2.3. Nøyaktighet

Nøyaktigheten gir et mål for den systematiske feilen som forekommer i en analyse. Nøyaktigheten kan beregnes ved bruk av formel 1.1. i delkapittel 1.7., som gir en prosentandel på mengden analytt som er igjen i standardprøven. Nøyaktigheten kan også estimeres ut fra instrumentet som er blitt benyttet, beskrevet i delkapittel 2.3.3.

Metoden virker egnet for de forbindelsene den er optimalisert for. De høye regresjonskoeffisientene til tross for fortynningsfeil som ble gjort tyder på god nøyaktighet av metoden. Analyseteknikken som er valgt for denne studien skal gi et grunnlag for å oppnå tilfredsstillende nøyaktighet samt at temperaturprogrammet vist i tabell 2.3.6 er optimalisert for forbindelsene som skal separeres og detekteres.

3.2.4. Gjenvinning

Gjenvinningen skulle ha blitt beregnet for å bestemme grad av gjenvinning av internstandarder tilsatt i jordprøvene ved bruk av gjenvinningsstandard.

Gjenvinningsgraden (R) for de utvalgte jordprøvene, totalt 11 prøver kunne ikke beregnes ut fra analysene, da ingen internstandarder eller gjenvinningsstandard ble kvantifisert.

I vedlegg D figur D18 og D19 er det også vedlagt kromatogram fra selektiv ionemodus (SIM) som viser gjenvinningsstandard og en internstandard.

3.2.5. Spesifisitet/selektivitet

Metodens spesifisitet og selektivitet bestemmes ved hvilken grad den er spesifikk for utvalgte analytter som metoden er bygget for, samt i hvilken grad den klarer å skille komponentene fra hverandre. Både SIM- og TIC-kromatogrammer for metoden er representert i vedlegg D. For å vurdere spesifisiteten, ble fortyninger av standardløsningen benyttet.

Metoden er spesifikk for de forbindelsene som den er utarbeidet for. Oversikt over standarder som i hovedsak er testet på denne metoden er vedlagt i vedlegg A i tabell A3.

Standardene inneholder både kvalifiserings- og kvantifiseringsioner og skilles på best måte ved å måle selektiv ionemodus (SIM). De kan tilsynelatende overlappe hverandre i det totale ionekromatogrammet (TIC), men ved å velge ut bestemte masser i selektiv ionemodus (SIM) blir hver standard detektert hver for seg og det blir tydelig at hver enkelt masse tilhører en bestemt standard. Det vises da at kun en forbindelse tilhører den enkelte masse ved den bestemte retensjonstiden.

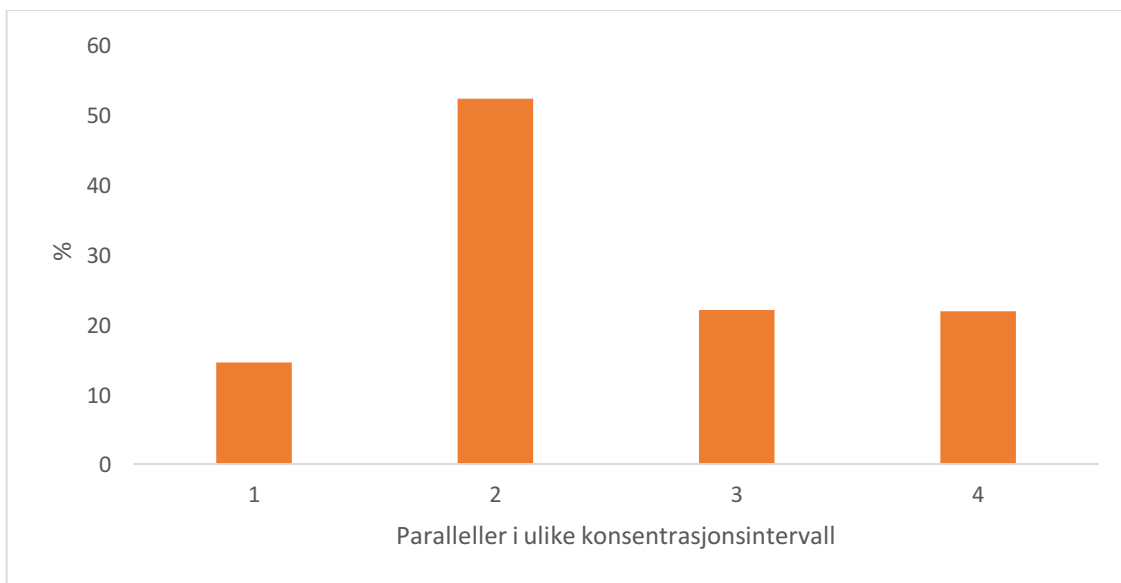
Kromatogrammene viser tilfredsstillende fordeling med adskilte topper og lite eller ingen tailing. Dette gir grunnlag for en tilfredsstillende selektivitet. Metoden detekterer også standarder ned til veldig lave konsentrasjoner selv om sensitiviteten går betraktelig ned grunnet lav respons på forbindelsene. Standardene som ble ekskludert under linearitetskravet hadde også dårlig selektivitet.

3.2.6. Presisjon

Presisjonen ble validert for og kunne ta en vurdering av de tilfeldige feilene i målingene. For en analytisk prosedyre kan presisjonen bestemmes ved variabiliteten med hensyn på standardavviket, relativt standardavvik og variasjonskoeffisienten av en serie målinger. Dette er nøyere beskrevet i delkapittel 1.7.

Det ble gjort beregninger av standardavviket, relativt standardavvik og variansen av alle fortyntinger av standarder tilsatt internstandard som ble detektert tilfredsstillende i fortyntingene vurdert ut fra linearitetskravet beskrevet i delkapittel 1.7.1. Formel 1.4. i delkapittel 1.7. ble benyttet til beregning av standardavviket for deretter å benytte formel 1.5. til beregning av det relative standardavviket. Det er kun det relative standardavviket og beregnet standardavvik for alle standarder i ulike konsentrasjonsnivå som er representert her.

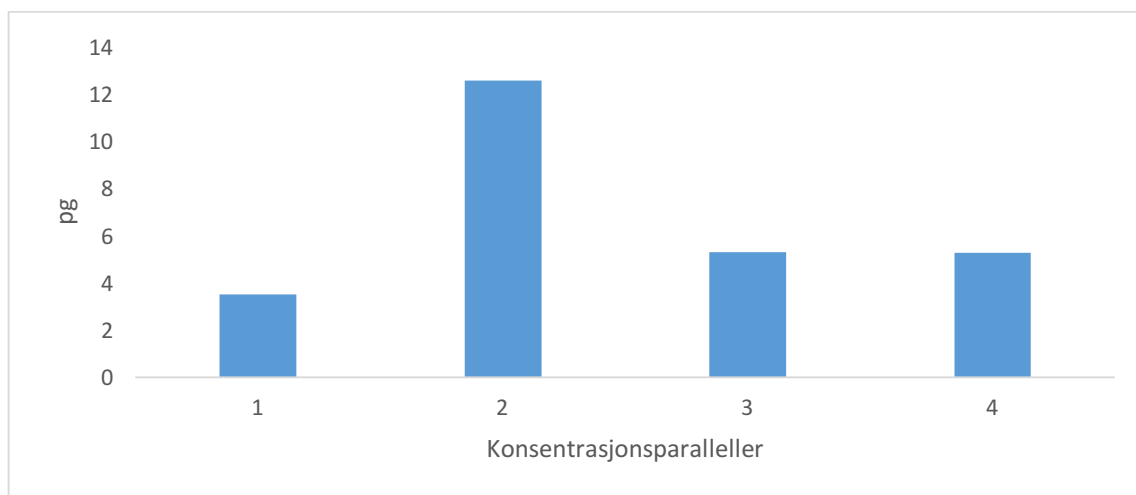
I figur 3.2.3. er beregnet relativt standardavvik i konsentrasjonsintervallene 450 pg/uL, 125 pg/uL og de to siste parallellene var begge på 56 pg/uL av de tillagede fortyntingsløsningene representert. Det ble analysert dubletter av hver konsentrasjon som inneholdt alle standarder, totalt fire fortyntinger. Beregningene er gjort av alle standarder i hvert konsentrasjonsintervall.



Figur 3.2.3. Fremstilling av relativt standardavvik av alle N-/O-PAH tilsatt 100 pg/ μ L ISTD som ble analysert tilfredsstillende i konsentrasjonsintervallet 450(1), 125(2) og 56(3 og 4) pg/ μ L

Parallell nr. 2 skilte seg noe mer ut enn de andre med et relativt standardavvik på 52 %. Parallell nr. 3 og nr. 4 ble beregnet til et relativt standardavvik på 22 %. Disse ble like grunnet fortyntingsfeilen gjort under tillaging av fortyntingsløsningene. Parallell nr. 1 med den høyeste beregnede konsentrasjonen fikk et lavt relativt standardavvik på 15 %.

Variabiliteten ble vurdert ved beregnet standardavvik. Figur 3.2.4. viser standardavviket beregnet for alle standarder i hvert konsentrasjonsintervall. Det ble analysert dubletter av hver prøve av totalt fire prøver.



Figur 3.2.4. Fremstilling av beregnet standardavvik av alle N-/O-PAH tilsatt 100 pg/ μ L ISTD som ble analysert tilfredsstillende i konsentrasjonsintervallet 450(1), 125(2) og 56(3 og 4) pg/ μ L

Standardavviket skilte seg mest ut for konsentrasjonsparallel 2, hvor det ble beregnet til å være 13 pg mot henholdsvis 3 pg og 5 pg for konsentrasjonsparallel 1, 3 og 4.

3.2.7. Deteksjons- og kvantifiseringsgrenser

Måleområdet bidrar til å fastslå eventuelle kontamineringsproblemer i metoden. Dette er nærmere beskrevet i delkapittel 1.7.

Totalt ni blanke prøver ble analysert for hver standard og benyttet på samme måte som for IKBM-metoden for å beregne deteksjons- og kvantifiseringsgrensene. Formel 1.6. i delkapittel 1.7.7. ble benyttet til å beregne standardavviket før resultatene fra det ble benyttet videre i formel 1.7. og 1.8. for å beregne deteksjons- og kvantifiseringsgrensene.

I tabell 3.2.3. er det vist et utvalg av standarder hvor det er beregnet deteksjons- og kvantifiseringsgrense.

Tabell 3.2.3. Beregnet deteksjons-og kvantifiseringsgrenser for et utvalg standarder i pg/g

Navn	1-nitronaphtalene	2-nitrofluorene	5-nitroacenaphtene	1,6-dinitropyrene
LOD	26,0	3,0	7,6	4,2
LOQ	86,8	10,2	25,2	14,0

Oversikt over alle beregnede deteksjons- og kvantifiseringsgrenser er vedlagt i vedlegg C tabell C5. Kromatogram av en standard blank prøve benyttet til beregningen er vedlagt i vedlegg D, figur D20.

3.2.8. Total mengde standarder i jordprøver

Den totale mengden standarder i bakgrunnsjordprøvene skulle blitt beregnet ut fra beregnede konsentrasjoner fra regresjonslikningene på samme måte som for IKBM-metoden. Resultatene ble ikke vurdert som kvantifiserbare da det ikke ble detektert noen internstandarder i noen av jordprøvene som ble analysert på denne metoden. Kromatogrammene av prøvene viste derfor kun støy. Se vedlegg D figur D21.

3.2.9. Usikkerhet

Ut fra en total vurdering av metodevalideringen utført på metoden, ble det estimert en metodeusikkerhet på ca. 50 %. Dette underligger en relativt høy usikkerhet ved tillaging av kalibreringsløsninger, da måten de ble laget på førte til at usikkerheten steg betraktelig. I tillegg ble det gjort en fortynningsfeil underveis, slik at antall kalibreringsløsninger i ulike konsentrasjonsintervall ikke ble optimal.

Grunnet feil under prøveopparbeidelsen av jordprøvene, ble det ikke beregnet noen gjenvinning eller total mengde analytt i reelle prøver. Ved at disse grunnleggende valideringspunktene ikke var mulig å gjennomføre, ble dette et bidrag til forhøyet usikkerhet.

Ved det lave injeksjonsvolumet som ble benyttet i denne metoden, bidrar det til en økt usikkerhet ved eventuelt tap av sensitive analytter under analysene. Deteksjonen kan bli dårlig samtidig som andre ikke fanges opp under analysen.

4. Diskusjon

4.1. IKBM -metoden

De fem forbindelsene som viste dårlig linearitet ut fra linearitetskravet som ble stilt i delkapittel 1.7. viste samtidig en dårlig sensitivitet fra tidligere kvantifiseringer utført på metoden. For at alle forbindelsene skulle bli sett i kromatogrammet, ble hver enkel masse valgt ut fra det totale ionekromatogrammet (TIC) og nærmere studert i selektiv ionemodus (SIM). Ved bruk av SIM viste toppene god fordeling med relativt høy respons. Ved de ulike kromatogrammene som er vedlagt i vedlegg D vises både SIM- og TIC-kromatogrammer ved ulike konsentrasjoner. Det ble gjort studier over et veldig stort konsentrasjonsområde, noe som kan bidra til en større usikkerhet i beregningene. Samtidig ble det undersøkt hvor sensitiv og presis metoden er til å detektere standarder i prøver ned til veldig lave konsentrasjoner. Det viste seg at metoden tapte seg noe i sensitivitet ved lavere konsentrasjoner, men at standardene med god linearitet ble detektert tilfredsstillende ved bruk av SIM. Det er allikevel diskutabelt om kalibreringskurven og tilhørende regresjonskoeffisient i seg selv gir en god indikasjon på hvor tilfredsstillende lineariteten er. Helningen på standardkurvene varierer noe fra en kurve til en annen, men tatt i betraktning at beregnet faktisk konsentrasjon i løsningene sammenlignet med forventet konsentrasjon ble relativt lik, er lineariteten vurdert til å være tilfredsstillende.

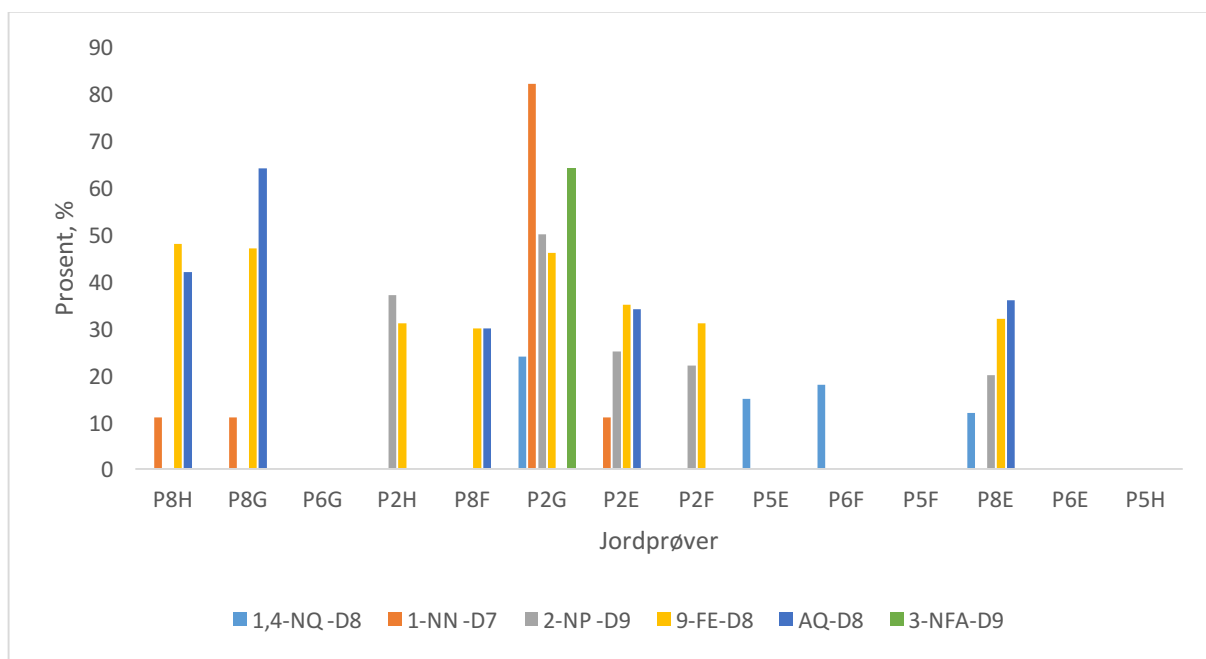
Ved tillaging av kalibreringsløsningene ble de samme pipettene benyttet i tillegg til at en fortykning ble laget fra den forestående. Det ble benyttet små volum for tillagingen grunnet begrenset tilgang av prøvemateriale, økte usikkerheten i tillagingen betraktelig. Dette kan ha gitt noe uttelling på de varierende resultatene for beregning av gjenvinning og total mengde standard i jordprøvene. Ved at en og en kalibreringsløsning hadde blitt laget hver for seg i andre konsentrasjonsforhold og i større volum ville en del av usikkerheten blitt eliminert i det praktiske arbeidet.

Ved at GC-MS ble benyttet som analysemetode sammen med negativ kjemisk ionisasjon, skal det være forutsetninger for å oppnå høy sensitivitet med deteksjoner ned til lave konsentrasjoner. Dette skal gjøre metoden følsom og nøyaktig for de forbindelsene den er utvalgt for. Samtidig er denne analysemetoden best egnet for lave massetall. Ved beregninger av metodens presisjon, vises det at variabiliteten på ca. 30 % gir størst utslag på de tilfeldige feilene under prøveoppbeiringen og tillaging av løsninger enn det gir på nøyaktigheten i instrumentet. Dette vises også ved at retensjonstidene til forbindelsene varierer lite og holder seg konstant på hver utvalgt masse som tilhører en bestemt standard. Presisjonen ble beregnet ved å ta utgangspunktet i beregnet konsentrasjon i kalibreringsløsningene av alle standardene tilsatt internstandard. Det ble derimot kun benyttet to paralleller av hvert konsentrasjonsintervall og ikke ni paralleller som er anbefalt. Dette vil derfor påvirke de beregnede resultatene ut fra tilgjengelig informasjon i dette studiet. De store variasjonene vil muligens kunne bli redusert ved å kvantifisere prøver med flere paralleller. Variabiliteten i instrumentet fra en tid til en annen viser ikke til å gi store utslag på deteksjonen av forbindelsene, noe som viser at parameterne som er valgt for metoden er tilfredsstillende for de forbindelsene den blir utført på.

Det ble beregnet deteksjons- og kvantifiseringsgrenser for å vurdere om den totale mengden standarder i jordprøvene var kvantifiserbare. Det ble store variasjoner i resultatene, hvor en faktor kan være forurensning av *n*-heksan som ble benyttet til de blanke prøvene. Det kan også ha oppstått en memoryeffekt eller interferens med matriks ved at rester fra forrige analyse ble overført til mellomkjøringen med *n*-heksan, da heksan ble analysert mellom hver

prøve. Dette er imidlertid usannsynlig, da det er de samme toppene som vises i kromatogrammene over de blanke prøvene, så det er rimelig å tro at hovedproblemet ligger i heksanløsningen. Det viste store variasjoner i responsen som ble benyttet til å beregne LOD og LOQ, noe som ikke gjorde verdiene kvantifiserbare til vurdering av total mengde standarder i jordprøvene. Se tabell C2 i vedlegg C for full oversikt over beregnede deteksjons- og kvantifiseringsgrenser for standarder og tabell C4 for beregnet total mengde standarder i jordprøvene. I en studie gjort av Markus Niederer (1998) ble LOD beregnet til å ligge på rundt 30 ng/kg for 1-nitropyrene i jordprøver til sammenligning. For IKBM-metoden ble LOD for samme forbindelse beregnet til å være 127,1 pg/g.

Det ble benyttet jordprøver hentet og opparbeidet ved UNIS, Longyearbyen på Svalbard til å beregne gjenvinningsgrad og total mengde standarder i bakgrunnsjordprøvene. Jordprøvene hadde tidligere blitt kvantifisert og analysert av PhD.- student Montserrat Marques Bueno på metoden benyttet i denne studien, da jordprøvene som i utgangspunktet skulle benyttes ikke inneholdt noen standarder. Gjenvinningen ble beregnet til å ligge mellom 10-83 %, hvor verdiene under 30 % ble vurdert som ikke tilfredsstillende. Dette er i utgangspunktet 10 % lavere enn hva som normalt vurderes som kvantifiserbart for beregnet gjenvinningsgrad i analytiske metoder. Det er anbefalt å benytte ni paralleller av hver prøve for å beregne en tilfredsstillende gjenvinning for metoden. I dette studiet ble det kun benyttet to paralleller for hver prøve, da dette var det som hadde blitt analysert på metoden tidligere. Dette skaper en større usikkerhet til resultatenes holdbarhet. Figur 4.1.1. viser beregnet gjenvinningsgrad av internstandarder i jordprøvene, hvor dataene i tabell C3 er benyttet.



Figur 4.1.1. Beregnet gjenvinning av internstandard i jordprøver

I en studie gjort av Markus Niederer (1998) ble gjenvinningsgraden beregnet til å ligge mellom 80-90 %. Dette er vesentlig høyere enn beregnet i dette studiet, noe som kan tyde på at det er nødvendig med ytterligere undersøkelser av beregnet gjenvinningsgrad. For total mengde standarder i jordprøvene, varierte verdiene fra 1,9-2572,6 pg/g i dette studiet. I den samme studien som nevnt ovenfor, ble mengden av 1-nitropyrene i jordprøver beregnet til å ligge mellom 30-800 ng/kg i tørket materiale. Ved å se i tabell C4 i vedlegg C for denne

forbindelsen, er beregnet mengde av samme forbindelse på 61,4 pg/g og 18,7 pg/g i de to prøvene den kunne kvantifiseres for. Det kan tyde på at verdiene som ligger i dette intervallet kan regnes som tilfredsstillende, mens de som ligger under deteksjonsgrensen på 30 pg/g ikke er godkjent for vurdering.

4.2. MPIC-metoden

Metoden måtte undergå mindre optimeringer for å inkludere massene til gjenvinningsstandard fluoranthene-D10 benyttet i denne studien. Det ga ikke videre resultater, da gjenvinningsstandard ikke ble tilfredsstillende detektert i fortynningene samt at bakgrunnsjordprøvene som ble kvantifisert på denne metoden ikke inneholdt noen standarder. Se vedlegg D figur D19 og D21 for kromatogram av gjenvinningsstandard og en jordprøve. Grunnen til at gjenvinningsstandard ikke ble kvantifisert i fortynningene kan skyldes det lave injiseringsvolumet benyttet i metoden.

Ved tillaging av kalibreringsløsninger, ble det benyttet små volum noe som resulterte i større usikkerhet i løsningene. Kalibreringsløsningene ble laget hver for seg, noe som resulterte i fortynningsfeil da volumforholdene var små. Dette la et grunnlag for en større usikkerhet enn det det hadde blitt om løsningene hadde blitt laget med større volum og i andre konsentrasjonsforhold.

Linearitetskravet beskrevet i delkapittel 1.7. ble oppfylt for alle forbindelser med unntak av de som ble ekskludert grunnet dårlig følsomhet. Det kunne vært interessant og eventuelt ha øket injeksjonsvolumet til samme nivå som for IKBM-metoden for og studert om lineariteten ble bedre og om disse forbindelsene hadde blitt kvantifisert på denne metoden. Samtidig kan fortynningsfeilene som ble gjort under tillaging av analyseprøvene også være en bidragsyter til noe lavere linearitet totalt selv om det ikke ga store variasjoner i resultatene da lineariteten allikevel ble vurdert som tilfredsstillende. Dette viser at metoden tåler tilfeldige feil ved ytre påvirkning i noe grad. Helningen på standardkurvene varierte noe, men tatt i betraktning at retensjonstidene varierte lite mellom hver analyse og tilhørte den samme forbindelsen, kan regresjonskoeffisienten representere lineariteten i større grad.

Ved analyse av jordprøvene benyttet på MPIC-metoden ble det ikke observert noen internstandarder på kromatogrammene. Grunnen til dette var at det hadde skjedd en feil med silikafraksjoneringen under prøveopparbeidingen ved UNIS, som har ført til at standardene falt ut. På bakgrunn av det ble det derfor ikke mulig å beregne verken gjenvinningsgrad eller total mengde standarder i bakgrunnsjordprøvene, da det ikke hadde blitt kvantifisert jordprøver på denne metoden tidligere som kunne benyttes til beregningene i denne studien. Grunnet tidsbegrensninger ble det derfor ikke mulighet for å analysere andre jordprøver på denne metoden.

Ved ionisasjonsteknikken som er benyttet på denne metoden, skal det være mulighet for høy nøyaktighet og sensitivitet. Presisjonen ble vurdert ved beregnet varians hvor tre av parallellene ble beregnet til relativt like verdier mens parallell to skilte seg veldig ut. Siden de samme vurderingen ble gjort for IKBM-metoden er det naturlig å anta at det har oppstått en feil under tillaging av kalibreringsløsningene i laboratoriet. Det kan også antas at den høye variabiliteten på over 50 % ble påvirket av denne feilen. Dette viser at instrumentparameterne valgt for metoden er tilfredsstillende for de prøvene den er opparbeidet for, men den er følsom for endringer og inkludering av nye forbindelser. Dette kan skyldes det lave injeksjonsvolumet, temperaturprogrammet som er valgt eller tuningen som er gjort for at metoden skal kunne detektere forbindelser med høyere masser.

Tidligere analyser gjort på denne metoden viser at forbindelser har blitt detektert helt ned i 1 pg/ μ L, men selektiviteten ble ikke like god som ved høyere konsentrasjoner. Det lave injiseringsvolumet på 1 μ L kan også være en grunn til at flere forbindelser ikke ble detektert på denne metoden grunnet dårlig følsomhet. Dette påvirker også nøyaktigheten av metoden hvor færre forbindelser kvantifiseres med lav respons. I tillegg ble det analysert 12 færre forbindelser på denne metoden enn på IKBM-metoden da kun forbindelser som var felles for begge ble valgt ut. Samtidig kan et lavt injiseringsvolum være positivt om det forekommer veldig lite prøvemateriale å benytte under analysene. Resultatet av dette viste i noen grad større variabilitet på prøvene som ble analysert på instrumentet i tillegg til at metoden er følsom for ytre påvirkning. Denne metoden er i utgangspunktet bygget for forbindelser som har høyere masser og har derfor også et annet tuningsprogram enn IKBM-metoden.

4.3. Sammenligning av metodene

Metodene ble opparbeidet for et utvalg standarder hvor noen av de samme standardene viste dårlig følsomhet på begge metodene. Dette påvirker derfor ikke egnetheten til metodene, men det er en utfordring å detektere disse standardene på metodene grunnet forbindelsenes lave følsomhet. Det kan derfor gjøres mindre optimeringer både i parameterinnstillingene eller i temperaturprogrammet for å forsøke å inkludere disse standardene i metoden uten at andre forbindelser faller ut. MPIC-metoden virker egnet for deteksjon av standardene som den i utgangspunktet er laget for, men den virker ikke optimal til å detektere nye forbindelser uten videre optimeringer. Denne metoden viser derfor til å være mindre fleksibel med hensyn til å utvide den til å inkludere og kvantifisere et større antall forbindelser på et senere tidspunkt.

Ved analyse av standardene og internstandardene viste det noen forskyvninger i retensjonstidene på de to metodene. Det kan skyldes variasjoner i instrumentet da det var mer stabilt da testene på IKBM-metoden ble utført sammenlignet med MPIC-metoden. En annen grunn til variasjonene i retensjonstidene kan også skyldes de ulike parameterinnstillingene på metodene, vist i tabell 4.3.1.

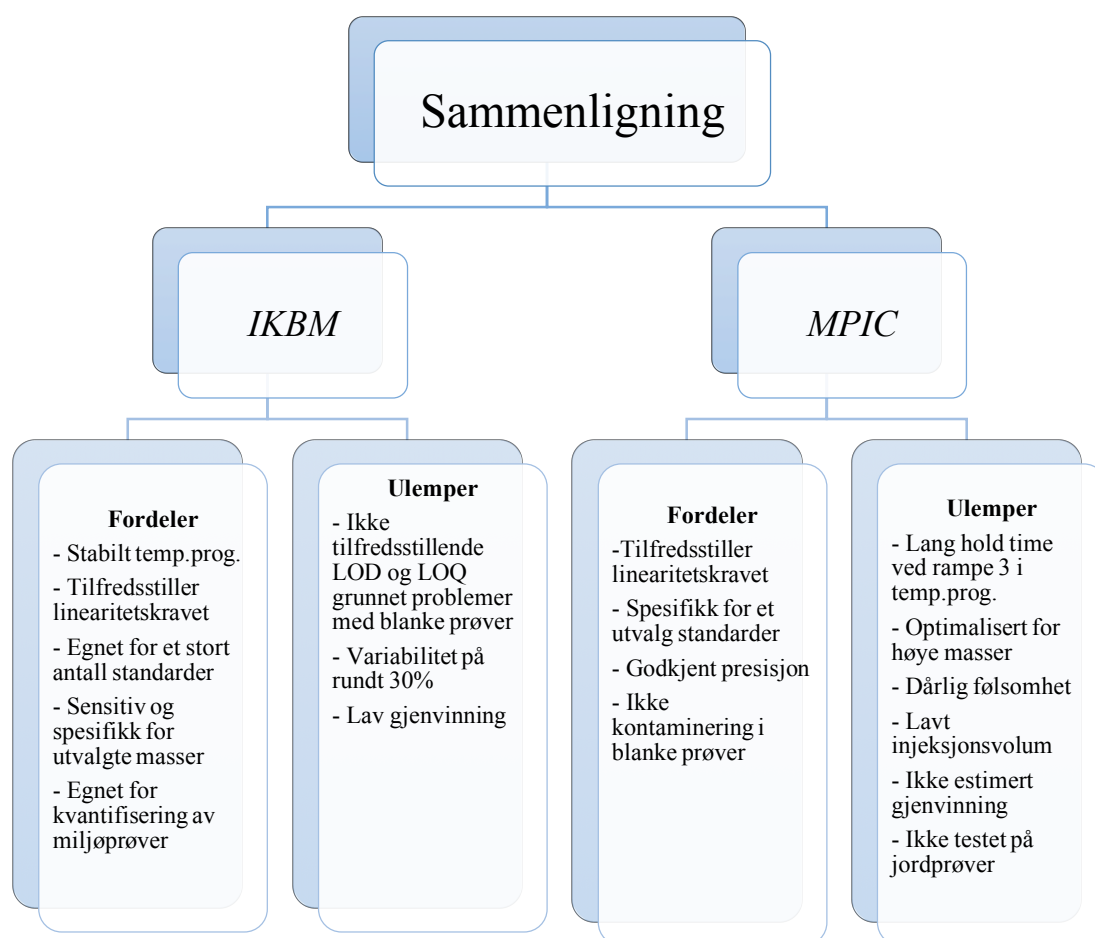
Tabell 4.3.1. Oversikt over parameterinnstillinger som avviker på IKBM- og MPIC-metoden

	IKBM	MPIC
Temperaturprogram		
Initial	70	60
Holdtid, rampe 3 (min)	5	15
MS-parametere		
Løsemiddelforsinkelse (min)	3,75	5
Injeksjonsparametere		
Injeksjonsvolum (μ L)	2	1
GC-parametere		
Modus	Splittløs	Pulsed splittløs
Trykk (kPa)	60	56

Forskjellene i temperaturprogrammet kan ha en påvirkning på forbindelsene som kvantifiseres i det tidsrommet. Det kan se ut som at temperaturprogrammet for IKBM-metoden er mer allsidig og fungerer bedre for et større antall forbindelser enn MPIC-metodens temperaturprogram, noe som kan gjøre det enklere å utvide metoden til å inkludere flere forbindelser på sikt. Generelt viste MPIC-metoden noe forsinkede retensjonstider

sammenlignet med IKBM-metoden. Dette kan ha en påvirkning av det lave injeksjonsvolumet eller ustabilitet i instrumentet på det tidspunktet analysene ble gjort.

Med et injeksjonsvolum på 2 µL har IKBM-metoden dobbelt så høy følsomhet sammenlignet med MPIC-metoden. Dette gjenspeiler seg i resultatene ved at deteksjonen og kvantifiseringen av flere forbindelser ble gjort tilfredsstillende på IKBM-metoden, samt at den generelle sensitiviteten, spesifisiteten og lineariteten ble vurdert som egnet i større grad. Det antas at det doble injeksjonsvolumet på IKBM-metoden er en faktor til at den viser en bedre selektivitet enn MPIC-metoden i tillegg til at metoden viser en større toleranse for ytre påvirkning. Dette kommer tydelig frem av responsen på kromatogrammene og spesielt ved lave konsentrasjoner hvor det for MPIC-metoden er flere tilfeller hvor forbindelsene ligger under deteksjonsgrensenivået. I figur 4.3.1. er det laget en oversikt over fordeler og ulemper vurdert for begge metodene.



Figur 4.3.1. Oversikt over fordeler og ulemper vurdert på IKBM- og MPIC-metoden.

Metodene er i seg selv satt opp til å detektere ulike forbindelser av N-/O-PAH hvor noen av de er felles for begge metodene. Ved å fokusere på forbindelsene som var felles, ble et færre antall forbindelser kvantifisert på MPIC-metoden, noe som begrenset utvalget av internstandarder som kunne knyttes opp mot standardene.

Ved at metodene er tunet for ulikt formål, kan dette også ha gitt utslag i resultatene på forbindelsene som ble benyttet. MPIC-metoden er laget med et fokus på høyere masser enn IKBM-metoden, og ved ionisasjonsteknikken som er valgt kan dette påvirke kvantifiseringen av forbindelsene da negativ kjemisk ionisasjonsteknikk er best egnet for lave masser.

MPIC-metoden ble estimert med en høyere total usikkerhet sammenlignet med IKBM-metoden. Dette ble påvirket av flere faktorer i tillegg til usikkerheten knyttet opp mot prøveopparbeidingen, blant annet usikkerhet knyttet til det lave injeksjonsvolumet som kan resultere i at forbindelser med lav følsomhet ikke detekteres under analysen samt at metoden er mindre robust for endringer i instrumentet og til å detektere andre forbindelser enn de den er tiltenkt for.

5. Konklusjon

En fullstendig metodevalidering ble utført på IKBM-metoden, som inkluderte totalt 38 standarder, internstandarder og gjenvinningsstandard. I tillegg ble resultatene sammenlignet med MPIC-metoden, hvor de samme valideringskriteriene ble testet på totalt 27 standarder, internstandarder og gjenvinningsstandard. Gjenvinningsstandard var ikke inkludert i metoden i utgangspunktet og ble lagt inn under optimaliseringen for denne studien.

Ut ifra metodevalideringskriteriene som ble vurdert i denne studien, vil IKBM-metoden være mest stabil og detektere et større antall forbindelser enn MPIC-metoden grunnet et dobbelt injeksjonsvolum og et mer allsidig temperaturprogram. Ved å sette resultatene opp imot verdiene som ble valgt i valideringsplanen vist i tabell 2.3.1. viste IKBM-metoden til å være mer tilfredsstillende enn MPIC-metoden til tross for at gjenvinningsgrad og total mengde standarder i jordprøvene ikke ble beregnet for MPIC-metoden. I tillegg viser IKBM-metoden større robusthet i forhold til ytre påvirkning og variasjoner enn MPIC-metoden, noe som også gjør at denne er mer foretrukket.

Ved sammenligningen av alle resultatene representert i denne studien, ble det tidlig i valideringen synlig at IKBM-metoden viste flere styrker enn MPIC-metoden. Sett bort ifra forbindelser som viste dårlig sensitivitet og dermed ble forkastet før videre validering ble utført, ble det vist en bedre linearitet for IKBM-metoden enn for MPIC-metoden ved presentasjon av kalibreringskurver og regresjonskoeffisienter. Ved å sammenligne retensjonstidene for de samme forbindelsene analysert på begge metodene, viste MPIC-metoden større variasjoner enn IKBM-metoden i tillegg til en lavere respons, noe som også tyder på at IKBM-metoden er foretrukket.

IKBM-metoden ble validert på bakgrunnsjordprøver, noe det for MPIC-metoden ikke ble gjort tilfredsstillende på. Dette var ikke grunnet svakheter på metoden, men feil på jordprøvene direkte. Allikevel ble ikke disse punktene av valideringen gjennomført for MPIC-metoden, slik at verken gjenvinning eller total mengde standard i jordprøvene kunne estimeres. Dette ble derimot gjort på IKBM-metoden, noe som styrket den totale valideringen av metoden. Resultatene på gjenvinning og total mengde standard i jordprøvene for IKBM-metoden ble ikke vurdert som tilfredsstillende for alle prøvene og standardene. De beregnede deteksjons- og kvantifiseringsgrenser ble ikke vurdert som egnet til bruk for å vurdere om den totale mengden lå innenfor ønsket område, slik at resultatene av disse valideringskriteriene ikke kan tas med i vurderingen om metodens egnethet.

Ut fra analysene som ble gjort på alle standardene, kom det frem at internstandardene 9-fluorenone-D8 og anthraquinone-D8 ble de beste alternativene, da gjenvinningsgraden på begge disse ble beregnet til å være på 30 % eller mer for IKBM-metoden. De viste også en tilfredsstillende linearitet og en høy respons og ble detektert ved stabile retensjonstider under hver analyse.

Ved vurdering av den totale usikkerheten ble det estimert at MPIC-metoden hadde en noe høyere usikkerhet knyttet opp mot metoden enn IKBM-metoden. Dette gjør også IKBM-metoden til et mer naturlig valg for videre arbeid med standardene. Ut fra metodevalideringen som ble gjort og vurderingen av resultatene samt sammenligning av metodene, ble IKBM-metoden til slutt vurdert som egnet til analyse av jordprøver.

6. Videre arbeid

Mindre metodeforberedelser kan gjøres på metoden for å få mer tilfredsstillende resultater på analysene. Dette kunne ha blitt gjort ved å utføre flere analyser av standardene enkeltvis samt forsøke å endre noen av parameterinnstillingene i metoden og optimalisert den for forbindelsene som viser dårlig følsomhet. Ved å endre hold time i temperaturprogrammet, injeksjonsvolumet eller dwell time, hadde det kanskje vært mulig og kvantifisert forbindelsene som viste dårlig følsomhet uten at det hadde gått på bekostning av forbindelsene som allerede viser god følsomhet og blir detektert tilfredsstillende. Ved å justere injeksjonsvolumet satt for IKBM-metoden ned eller justert det tilsvarende opp for MPIC-metoden kunne det ha blitt vurdert om dette ga noen endring i resultatene.

Deteksjons- og kvantifiseringsgrensene for IKBM-metoden må undersøkes videre og gjøres på nytt grunnet utfordringer med heksanløsningen som ble benyttet. Dette gjorde at resultatet på beregningene av LOD og LOQ ikke ble egnet for vurdering opp mot total mengde standarder som ble beregnet i bakgrunnsjordprøvene. Det hadde derfor vært nyttig og kvantifisert et større antall av blanke prøver etter hverandre i paralleller for deretter å benytte de videre i beregningen av LOD og LOQ slik som utført i denne oppgaven.

Det burde velges ut et mindre antall internstandarder for deretter å knytte de opp mot flere standarder, som for eksempel 9-fluorenone-D8 og anthraquinone-D8 som fikk en beregnet gjenvinningsgrad på 30 % eller mer. Deretter bør nye gjenvinningstester gjennomføres for å undersøke om graden av gjenvinning av internstandardene i jordprøvene økes.

For at metodevalideringen på MPIC-metoden skal kunne bli komplett for denne studien, må det gjøres analyser av jordprøver tilsatt standarder slik at gjenvinningsgraden og total mengde standarder i jordprøvene skal kunne beregnes. Ved vurdering av dette ville deteksjons- og kvantifiseringsgrensene blitt benyttet til vurdering om de beregnede resultatene er signifikante. Det er også en fordel at dette hadde blitt gjort for og kunne sammenligne de to metodene ytterligere for å se om også MPIC-metoden hadde blitt vurdert som egnet til analyse av jordprøver.

Referanser

1. (ATSDR), A.f.T.S.a.D.R. *Public health statement for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)*. 1995; Available from: <https://www.atsdr.cdc.gov/phs/phs.asp?id=120&tid=25>.
2. (ATSDR), A.f.T.S.a.D.R. *ToxFAQs for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)* 1996; Available from: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/tf.asp?id=121&tid=25>.
3. Humans, I.W.G.o.t.E.o.C.R.t., *Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures*. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans/World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 2010. **92**: p. 1.
4. Services, W.D.o.H. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*. 2015; Available from: <https://www.dhs.wisconsin.gov/chemical/pah.htm>.
5. Lee, B.-K., *Sources, distribution and toxicity of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) in particulate matter*. 2010: INTECH Open Access Publisher.
6. Folkehelseinstituttet, *Polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH)*. 2015.
7. Miljødirektoratet. *Polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH)*. 2016; Available from: <http://www.miljostatus.no/Tema/Kjemikalier/Noen-farlige-kjemikalier/PAH/>.
8. Harrison, R.M., et al., *Relationship of polycyclic aromatic hydrocarbons with oxy (quinone) and nitro derivatives during air mass transport*. *Science of The Total Environment*, 2016. **572**: p. 1175-1183.
9. Kamiya, Y., et al., *Determination of Particle-associated PAH Derivatives (CIPAHs, NPAHs, OPAHs) in Ambient Air and Automobile Exhaust by Gas Chromatography/Mass Spectrometry with Negative Chemical Ionization*. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 2016: p. 1-23.
10. Guideline, I.H.T., *Validation of analytical procedures: text and methodology*. Q2 (R1), 2005. **1**.
11. Lerda, D., *Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) factsheet*. JRC Technical Notes, 2010. **132**.
12. Albinet, A., et al., *A simple QuEChERS-like extraction approach for molecular chemical characterization of organic aerosols: application to nitrated and oxygenated PAH derivatives (NPAH and OPAH) quantified by GC-NICIMS*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2014. **406**(13): p. 3131-3148.
13. Keyte, I.J., A. Albinet, and R.M. Harrison, *On-road traffic emissions of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxy- and nitro-derivative compounds measured in road tunnel environments*. *Science of The Total Environment*, 2016. **566**: p. 1131-1142.
14. Kielhorn, J., et al., *Selected nitro and nitro-oxy-polycyclic aromatic hydrocarbons*. 2003: p. 480.
15. Layshock, J.A., G. Wilson, and K.A. Anderson, *Ketone and quinone-substituted polycyclic aromatic hydrocarbons in mussel tissue, sediment, urban dust, and diesel particulate matrices*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2010. **29**(11): p. 2450-2460.
16. Li, W., et al., *Concentrations and origins of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons and oxy-polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air in urban and rural areas in northern China*. *Environmental Pollution*, 2015. **197**: p. 156-164.

17. Ringuet, J., et al., *Reactivity of polycyclic aromatic compounds (PAHs, NPAHs and OPAHs) adsorbed on natural aerosol particles exposed to atmospheric oxidants*. Atmospheric environment, 2012. **61**: p. 15-22.
18. Nyiri, Z., et al., *Determination of particulate phase polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitrated and oxygenated derivatives using gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2016. **1472**: p. 88-98.
19. Souza, K.F., et al., *Diurnal and nocturnal measurements of PAH, nitro-PAH, and oxy-PAH compounds in atmospheric particulate matter of a sugar cane burning region*. Atmospheric Environment, 2014. **83**: p. 193-201.
20. Niederer, M., *Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and substitutes (nitro-, oxy-PAHs) in urban soil and airborne particulate by GC-MS and NCI-MS/MS*. Environmental Science and Pollution Research, 1998. **5**(4): p. 209-216.
21. Albinet, A., et al., *Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), nitrated PAHs and oxygenated PAHs in ambient air of the Marseilles area (South of France): concentrations and sources*. Science of the Total Environment, 2007. **384**(1): p. 280-292.
22. Oehme, M., *Quality control in organic trace analysis*. Necessary and useful test parameters-method validation-smart checks-establishment of working procedures-critical estimation of existing procedures-estimates of measuring uncertainty, 2007.
23. SRIF. *Gas Chromatography-Mass Spectroscopy Background*. 1998; Available from: <https://www.gmu.edu/depts/SRIF/tutorial/gcd/gc-ms2.htm>.
24. Harris, D.C., *Quantitative Chemical Analysis*. Vol. 8. 2010: Freeman.
25. BBC. *Science Chromatography*. 2014; Available from: http://www.bbc.co.uk/schools/gcsebitesize/science/triple_ocr_21c/further_chemistry/chromatography/revision/5/.
26. McMurry, J., *Organic Chemistry With Biological Applications*. Vol. 2. 2011.
27. Dawson, P.H., *Quadrupole mass spectrometry and its applications*. 2013: Elsevier.
28. Edmond de Hoffmann, V.S., *Mass Spectrometry, Principles and Applications*. Vol. 3. 2007: Wiley.
29. Harrison, A.G., *Chemical ionization mass spectrometry*. 1992: CRC press.
30. Pittsburgh, U.o. *Mass Spectrometry Introduction*. [cited 2016 11.10]; Available from: <http://www.chem.pitt.edu/facilities/mass-spectrometry/mass-spectrometry-introduction>.
31. International, O.S. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)*. 2014; Available from: <https://orgspectroscopyint.blogspot.no/2014/11/gas-chromatography-mass-spectrometry-gc.html?m=1>.
32. Chandran, S. and R. Singh, *Comparison of various international guidelines for analytical method validation*. Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007. **62**(1): p. 4-14.
33. Green, J.M., *Peer reviewed: a practical guide to analytical method validation*. Analytical Chemistry, 1996. **68**(9): p. 305A-309A.
34. Kvalitetskontroll, N.K.-K. *Validering/Verifisering av klinisk kjemiske analyser*. 2002; Available from: http://doc.noklus.no/handler.ashx?r=nkk&id=Val_NKK.pdf.
35. Kalra, K., *Method Development and Validation of Analytical Procedures*. QUALITY CONTROL OF HERBAL MEDICINES AND RELATED AREAS, 2011: p. 1.

36. Konieczka, P. and J. Namiesnik, *Quality assurance and quality control in the analytical chemical laboratory: a practical approach*. 2016: CRC Press.
37. Swartz, M.E. and I.S. Krull, *Analytical method development and validation*. 1997: CRC Press.
38. Cochran, R., et al., *Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxy-, nitro-, and hydroxy-oxidation products*. *Analytica chimica acta*, 2012. **740**: p. 93-103.

Vedlegg

A. Kjemikalier og utstyr

Tabell A.1. Oversikt over instrumenter, utstyr og programvare benyttet i denne studien

Type	Versjon	Produsent	Lokasjon
Massespektrometer	7000C Trippel kvadropol	Agilent Technologies	Santa Clara, CA, USA
Gasskromatograf	7890B GC-system	Agilent Technologies	Santa Clara, CA, USA
Kolonne	J%W GC Columns 30m, 0,250mm, 0,25µm film. 60-325°C (350°C) HP-5MS 5% Phenyl methyl silox	Agilent Technologies	Santa Clara, CA, USA
Autosampler	G4513A	Agilent Technologies	Santa Clara, CA, USA
Sprøyte	Standard Syringe, 10µL FN23/42/HP	Agilent Technologies	Santa Clara, CA, USA
Liner	900µL splittløs	Agilent Technologies	Santa Clara, CA, USA
Injiseringsglass	2mL, wide top crimp vial write-on CL scrw vial/insrt 300uL clr 9mm	Agilent Technologies	Santa Clara, CA, USA
Sprøytepipette	250µL 50µL 25µL 5µL	SGE Analytical Science	Melbourne, Australia
Mass Hunter Workstation Software: Quantitative Analysis for QqQ	B.07.00	Agilent Technologies	Santa Clara, CA, USA
MassHunter Workstation Software: Qualitative analysis for QqQ	B.06.00	Agilent Technologies	Santa Clara, CA, USA
Microsoft Excel for Mac	15,26 (160910) 2016 Microsoft	Microsoft	Redmond, Washington, USA
Microsoft Word for Mac	15,26 (160910) 2016 Microsoft	Microsoft	Redmond, Washington, USA

Vedlegg

Tabell A.2. Oversikt over kjemikalier benyttet i denne studien

Produktnr.	Navn	IUPAC-nomenklatur	Renhet	CASnr.	Produsent
C0013.16-100-T	1,3-dinitropyrene	1,3-dinitropyrene	100µg/mL i Toluen	75321-20-9	Chiron
C8107.10-K-IO	1,4-naphtoquinone	naphthalene-1,4-dione	1000µg/mL i Isooktan	130-15-4	Chiron
C0014.16-K-IO	1,6-dinitropyrene	1,6-dinitropyrene	100µg/mL i Toluen	42397-64-8	Chiron
C0015.16-100-T	1,8-dinitropyrene	1,8-dinitropyrene	100µg/mL i Toluen	42397-65-9	Chiron
A1-A11056.06	1-indanone	2,3-dihydroinden-1-one	99+%	83-33-0	Alfa Aesar
C007.10-100-T	1-nitronaphtalene	1-nitronaphtalene	100µg/mL i Toluen	86-57-7	Chiron
C0009.16-100-T	1-nitropyrene	1-nitropyrene	100µg/mL i Toluen	5522-43-0	Chiron
C1111.13-100-T	2,7-dinitrofluorene	2,7-dinitro-9H-fluorene	100µg/mL i Toluen	5405-53-8	Chiron
C1459.14-200-T	2-nitroanthracene	2-nitroanthracene	100µg/mL i Toluen	3586-69-4	Chiron
C1278.16-100-T	2-nitrofluoranthene	2-nitrofluoranthene	100µg/mL i Toluen	13177-29-2	Chiron
C1108.13-100-T	2-nitrofluorene	2-nitro-9H-fluorene	100µg/mL i Toluen	607-57-8	Chiron
C0008.10-100-T	2-nitronaphtalene	2-nitronaphtalene	100µg/mL i Toluen	581-89-5	Chiron
C1468.16-100-T	2-nitropyrene	2-nitropyrene	100µg/mL i Toluen	789-07-1	Chiron
C0025.16-100-T	3-nitrofluoranthene	3-nitrofluoranthene	100µg/mL i Toluen	892-21-7	Chiron
C1340.12-100-T	4-nitrobiphenyl	1-nitro-4-phenylbenzene	100µg/mL i Toluen	92-93-3	Chiron
C0048.16-100-T	4-nitropyrene	4-nitropyrene	100µg/mL i Toluen	57835-92-4	Chiron
C1113.12-100-T	5-nitroacenaphthene	5-nitro-1,2-dihydroacenaphthylene	100µg/mL i Toluen	602-87-9	Chiron
C0059.19-200-T	6H-Benzo[cd]pyrene-6-one	6H-Benzo[cd]pyrene-6-one	200 µg/mL Toluen	3074-00-8	Chiron
C0049.20-100-T	6-nitrobenzo[a]pyrene	6-nitrobenzo[a]pyrene	100µg/mL i Toluen	63041-90-7	Chiron
C0017.18-100-T	6-nitrochrysene	6-nitrochrysene	100µg/mL i Toluen	7496-02-8	Chiron
C1178.14-K-IO	9,10-anthraquinone	anthracene-9,10-dione	1000µg/mL i Isooktan	84-65-1	Chiron
A1-A11762.06	9,10-phenanthrenequinone	phenanthrene-9,10-dione	95 %	84-11-7	Alfa Aesar

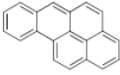
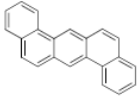

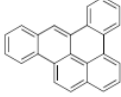

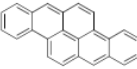
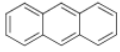
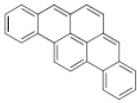
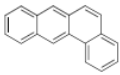
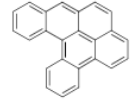
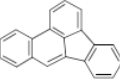
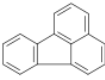
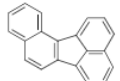
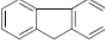
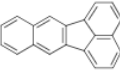
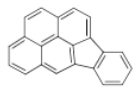
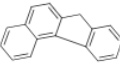
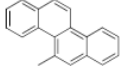
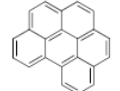

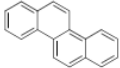
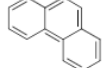


Vedlegg

C10718.14-K-T	9,10-phenanthrenequinone	phenanthrene-9,10-dione	1000µg/mL	84-11-7	Chiron
C2322.13-K-IO	9-fluorenone	fluoren-9-one	1000µg/mL i Isooktan	486-25-9	Chiron
C0379.13-K-T	9-methylcarbazole	9-methylcarbazole	1000µg/mL i Toluen	1484-12-4	Chiron
C1106.14-100-T	9-nitroanthracene	9-nitroanthracene	1000µg/mL i Toluen	602-60-8	Chiron
C2204.14-K-IO	9-nitrophenanthrene	9-nitrophenanthrene	1000µg/mL i Isooktan	954-46-1	Chiron
C0052.17-200-T	Benzo[a]fluoren-11-one	Benzo[a]fluoren-11-one	200µg/mL Toluen	479-79-8	Chiron
C3560.15-K-IO	2-methyl-9,10-anthraquinone	2-methylanthracene-9,10-dione	1000µg/mL i Isooktan	84-54-8	Chiron
C1733.18-K-T	Benz[a]anthracene-7,12-dione	benzo[a]anthracene-7,12-dione	1000µg/mL i Toluen	2498-66-0	Chiron
C1684.17-K-T	Benzanthrone	benzo[a]phenalen-7-one	1000µg/mL i Toluen	82-05-3	Chiron
C0043.18-100-T	7-nitrobenz[a]anthracene	7-nitrobenzo[a]anthracene	100µg/mL i Toluen	20268-51-3	Chiron
C0049.20-100-T	6-nitrobenzo[a]pyrene	6-nitrobenzo[a]pyrene	100µg/mL i Toluen	63041-90-7	Chiron
C0055.15-K-T	4H-cyclopenta[def]phenanthren-4-one	4H-cyclopenta[def]phenanthren-4-one	1000µg/mL i Toluen	5737-13-3	Chiron
D-5052-100	2-nitrobiphenyl-D9	1,2,3,4,5-pentadeuterio-6-(2,3,4,5-tetradeuterio-6-nitrophenyl)benzene	100mg	38537-53-0	CDN isotopes
C10720.12-K-T	2-nitrobiphenyl-D9	1,2,3,4,5-pentadeuterio-6-(2,3,4,5-tetradeuterio-6-nitrophenyl)benzene	1000µg/mL i Toluen	38537-53-0	Chiron
D-5442-50	9-fluorenone-D8	1,2,3,4,5,6,7,8-octadeuteriofluoren-9-one	50mg	137219-34-2	CDN isotopes
C10571.13-K-T	9-fluorenone-D8	1,2,3,4,5,6,7,8-octadeuteriofluoren-9-one	1000µg/mL i Toluen	137219-34-2	Chiron

Tabell A.3. Oversikt over forbindelser som opprinnelig er benyttet i MPIC-metoden

Navn	Retensjonstid, min	Q1 m/z	Q2 m/z
1,2-naphthoquinone	8,74	147,9	148,9
1,4-naphthoquinone	9,65	157,9	158,9
1-nitronaphthalene-D7	11,44	179,9	180,9
1-nitronaphthalene	11,47	172,9	173,9
Benzophenone	11,67	181,9	182,9
2-nitronaphthalene	11,88	172,9	173,9
2-nitrobiphenyl	12,37	198,9	199,9
9-fluorenone-d8	12,87	187,9	188,9
9-fluorenone	12,91	179,9	180,9
3-nitrobiphenyl	13,89	198,9	199,9
4-nitrobiphenyl	14,26	198,9	199,9
Anthraquinone-d8	15,79	215,9	216,9
9,10-anthraquinone	15,85	207,9	208,9
5-nitroacenaphthene	16,43	198,9	200
Acenaphthenquinone	16,73	197,9	198,8
2-nitrofluorene-D9	17,73	219,9	220,8
2-nitrofluorene	17,82	210,9	211,9
9-nitroanthracene-D9	18,24	231,9	232,9
9-nitroanthracene	18,3	222,9	223,9
2-nitro-9-Fluorenone	19,27	224,9	225,9
9-nitrophenanthrene	19,34	222,9	223,9
3-nitrophenanthrene	20,01	222,9	223,9
Benz(a)fluorenone	21,4	229,9	230,9
Benz(b)fluorenone	22,26	229,9	230,8
Benzanthrone	23,48	229,9	230,9
2-nitrofluoranthene	24,2	246,9	247,9
3-nitrofluoranthene-D9	24,21	255,9	254,8
3-nitrofluoranthene	24,28	246,9	247,9
1,2-benzanthraquinone	24,87	257,9	258,8
1-nitropyrene-D9	25,02	255,9	256,9
1-nitropyrene	25,07	246,9	247,9
2-nitropyrene	25,38	246,9	247,8
7-nitrobenz(a)anthracene	27,88	272,9	273,9
6-nitrochrysene-D11	28,96	283,9	284,9
6-nitrochrysene	29,06	272,9	273,9
1,3-dinitropyrene	30,14	291,9	292,9
1,6-dinitropyrene	30,94	291,9	290,9
1,8-dinitropyrene	31,49	291,9	292,9
6-nitrobenz(a)pyrene	34,06	296,9	297,9

B. Tabeller og figurer tilknyttet kapittel 1.

List	Common Name	Structure	List	Common Name	Structure
EPA, SCF, EU	Benzo[a]pyrene		EPA, SCF, EU	Dibenz[a,h]anthracene	
EPA	Acenaphthene		EU+SCF	Dibenzo[a,e]pyrene	
EPA	Acenaphthylene		EU+SCF	Dibenzo[a,h]pyrene	
EPA	Anthracene		EU+SCF	Dibenzo[a,i]pyrene	
EPA, SCF, EU	Benz[a]anthracene		EU+SCF	Dibenzo[a,l]pyrene	
EPA, SCF, EU	Benzo[b]fluoranthene		EPA	Fluoranthene	
SCF, EU	Benzo[j]fluoranthene		EPA	Fluorene	
EPA, SCF, EU	Benzo[k]fluoranthene		EPA, SCF, EU	Indeno[1,2,3-cd]pyrene	
EU	Benzo[c]fluorene		EU+SCF	5-Methylchrysene	
EPA, SCF, EU	Benzo[ghi]perylene		EPA	Naphthalene	
EPA, SCF, EU	Chrysene		EPA	Phenanthrene	
SCF, EU	Cyclopenta[cd]pyrene		EPA	Pyrene	

Figur B.1. Navn og struktur på utvalgte PAH som overvåkes ut ifra anbefalinger gitt av EU Scientific Committee for Food (SCF), den Europeiske Union (EU) og US Environmental Protection Agency (EPA) hentet fra Lerda, D., Polycyclic aromatic hydrocarbons factsheet, 2010.[11]

Tabell B.1. Nomenklatur, molekylformler, relativ molekylmasse og CAS-nummer av et utvalg N-PAH og deres oksygenderivater hentet fra Wahnschaffe, U. J., Kielhorn, J. og Mangelsdorf, I., *Selected Nitro- and nitro.oxy-polycyclic aromatic hydrocarbons*, 2003.[13]

Parent PAHs	Nitro derivative	Molecular formula	Relative molecular mass	CAS number
Two-ring PAHs				
Naphthalene	1-Nitronaphthalene	C ₁₀ H ₇ NO ₂	173.17	86-57-7
	2-Nitronaphthalene	"	"	581-89-5
	1,3-Dinitronaphthalene	C ₁₀ H ₆ N ₂ O ₄	218.17	606-37-1
	1,5-Dinitronaphthalene	"	"	605-71-0
	1,8-Dinitronaphthalene	"	"	602-38-0
	2,7-Dinitronaphthalene	"	"	24824-27-9
	2,3,5-Trinitronaphthalene	C ₁₀ H ₅ N ₃ O ₆	263.17	87185-24-8
	1,3,6,8-Tetranitronaphthalene	C ₁₀ H ₄ N ₄ O ₈	308.16	28995-89-3
Three-ring PAHs				
Acenaphthene	3-Nitroacenaphthene	C ₁₂ H ₉ NO ₂	199.21	3807-77-0
	5-Nitroacenaphthene	"	"	602-87-9
Fluorene	1-Nitrofluorene	C ₁₃ H ₉ NO ₂	211.22	22250-99-3
	2-Nitrofluorene	"	"	607-57-8
	3-Nitrofluorene	"	"	5397-37-5
	4-Nitrofluorene	"	"	24237-68-1
	2,7-Dinitrofluorene	C ₁₃ H ₈ N ₂ O ₄	256.22	5405-53-8
Anthracene	2-Nitroanthracene	C ₁₄ H ₉ NO ₂	223.23	3586-69-4
	9-Nitroanthracene	"	"	602-60-8
	9,10-Dinitroanthracene	C ₁₄ H ₈ N ₂ O ₄	268.23	33685-60-8
Phenanthrene	2-Nitrophenanthrene	C ₁₄ H ₉ NO ₂	223.23	17024-18-9
	9-Nitrophenanthrene	"	"	954-46-1
	2,6-Dinitrophenanthrene	C ₁₄ H ₈ N ₂ O ₄	268.23	
Four-ring PAHs				
Fluoranthene	1-Nitrofluoranthene	C ₁₆ H ₉ NO ₂	247.25	13177-28-1
	2-Nitrofluoranthene	"	"	13177-29-2
	3-Nitrofluoranthene	"	"	892-21-7
	7-Nitrofluoranthene	"	"	13177-31-6
	8-Nitrofluoranthene	"	"	13177-32-7

Vedlegg

	1,2-Dinitrofluoranthene	C ₁₆ H ₈ N ₂ O ₄	292.25	33611-88-0
	2,3-Dinitrofluoranthene	"	"	105735-66-8
	2,4-Dinitrofluoranthene	"	"	102493-19-6
	2,5-Dinitrofluoranthene	"	"	102493-21-0
	3,4-Dinitrofluoranthene	"	"	
	3,7-Dinitrofluoranthene	"	"	105735-71-5
	3,9-Dinitrofluoranthene	"	"	22506-53-2
	1,2,4-Trinitrofluoranthene	C ₁₆ H ₇ N ₃ O ₆	337.25	102493-20-9
	1,2,5-Trinitrofluoranthene	"	"	102493-22-1
	2,3,5-Trinitrofluoranthene	"	"	116331-54-5
Pyrene	1-Nitropyrene	C ₁₆ H ₉ NO ₂	247.25	5522-43-0
	2-Nitropyrene	"	"	789-07-1
	4-Nitropyrene	"	"	57835-92-4
	1,3-Dinitropyrene	C ₁₆ H ₈ N ₂ O ₄	292.25	75321-20-9
	1,6-Dinitropyrene	"	"	42397-64-8
	1,8-Dinitropyrene	"	"	42397-65-9
	1,3,6-Trinitropyrene	C ₁₆ H ₇ N ₃ O ₆	337.25	75321-19-6
	1,3,6,8-Tetranitropyrene	C ₁₆ H ₆ N ₄ O ₈	382.24	28767-61-5
Benz[<i>a</i>]anthracene	7-Nitrobenz[<i>a</i>]anthracene	C ₁₈ H ₁₁ NO ₂	273.29	20268-51-3
Chrysene	2-Nitrochrysene	C ₁₈ H ₁₁ NO ₂	273.29	3989-90-0
	5-Nitrochrysene	"	"	89455-17-4
	6-Nitrochrysene	"	"	7496-02-8
Five-ring PAHs				
Benzo[<i>e</i>]fluoranthene	3-Nitrobenzo[<i>e</i>]fluoranthene	C ₂₀ H ₁₁ NO ₂	297.31	
Benzo[<i>a</i>]pyrene	1-Nitrobenzo[<i>a</i>]pyrene	C ₂₀ H ₁₁ NO ₂	297.31	70021-997
	3-Nitrobenzo[<i>a</i>]pyrene	"	"	70021-98-6
	6-Nitrobenzo[<i>a</i>]pyrene	"	"	63041-90-7
	3,6-Dinitrobenzo[<i>a</i>]pyrene	C ₂₀ H ₁₀ N ₂ O ₄	342.31	128714-76-1
Benzo[<i>e</i>]pyrene	1-Nitrobenzo[<i>e</i>]pyrene	C ₂₀ H ₁₁ NO ₂	297.31	91259-16-4
	3-Nitrobenzo[<i>e</i>]pyrene	"	"	81340-58-1
Perylene	3-Nitroperylene	C ₂₀ H ₁₁ NO ₂	297.31	20589-63-3

Vedlegg

Dibenz[<i>a,h</i>]anthracene	7-Nitrodibenz[<i>a,h</i>]anthracene	$C_{22}H_{13}NO_2$	323.4	
Six-ring PAHs				
Benzo[<i>ghi</i>]perylene	4-Nitrobenzo[<i>ghi</i>]perylene	$C_{22}H_{11}NO_2$	321.34	
	7-Nitrobenzo[<i>ghi</i>]perylene	"	"	
Coronene	1-Nitrocoronene	$C_{24}H_{11}NO_2$	345.36	
Nitro-oxyPAHs				
	3-Nitrobenzanthrone	$C_{17}H_9NO_3$	275.26	1711-34-9
	2-Nitrobenzopyranone	$C_{13}H_7NO_4$	241.20	6623-66-1
	3-Nitrobenzopyranone	$C_{13}H_7NO_4$	241.20	6638-64-8
	4-Nitrobenzopyranone	$C_{13}H_7NO_4$	241.20	51640-90-5
	Nitropyrene lactones	$C_{15}H_7NO_4$	265.22	

C. Resultater

Tabell C.1. Oversikt over kvantifiserings- og kvalifiseringsioner samt retensjonstider til alle forbindelser benyttet i dette studiet

Navn	Quant	Qual	Retensjonstid (min)
<i>O-PAH</i>			
1,4-naphtaquinone-D8	164	160	9,048
1,4-naphtoquinone	158	159	9,197
9-fluorenone-D10	188	189	12,322
9-fluorenone	180	181	12,365
Anthraquinone-D8	216	217	15,268
9,10-anthraquinone	208	209	15,35
9,10-phenanthrenequinone	208	209	18,484
Benzo[A]fluorene-11-one	230	231	20,927
6H-Benzo[CD]pyrene-6-one	254	255	27,987
1,2-dibenzo(A)anthraquinone	258	259	24,408
<i>N-PAH</i>			
1-nitronaphtalene-D7	180	181	10,894
1-nitronaphtalene	173	174	10,908
2-nitronaphtalene	173	174	11,327
3-nitrofluoranthene-D9	256	157	23,756
2-nitrofluoranthene	247	248	23,736
3-nitrofluoranthene	247	248	24,061
1-nitropyrene	247	248	24,916
4-nitropyrene	247	248	24,611
1,6-dinitropyrene	292	293	30,565
6-nitrobenzo[A]pyrene	297	298	34,306
2-nitrophenyl-D9	208	209	11,788
4-nitrobiphenyl	199	200	13,735
9-fluorenone-D8	188	189	12,322
1-indanone	147	148	13,937
9-methylcarbazole	217	148	14,012
5-nitroacenaphthene	199	200	15,92
2-nitrofluorene	211	212	17,324
9-nitroanthracene	223	224	17,813
9-nitrophenanthrene	223	224	18,871
6-nitrochrysene-D11	284	285	28,53
2-nitroanthracene	223	224	20,215
2-nitropyrene	247	248	25,249
2,7-dinitrofluorene	256	257	25,493
7-nitro(a)-anthracene	273	274	27,427
1,3-dinitropyrene	292	203	29,734

Vedlegg

1,8-dinitropyrene	292	293	31,142
6-nitrochrysene	273	274	28,614
<i>Gjenvinningsstandard</i>			
Fluoranthene-D10	211	212	17,345

Tabell C.2. Beregnede deteksjons- og kvantifiseringsgrenser for standarder for IKBM-metoden i pg/g

Navn	Deteksjonsgrense (LOD)	Kvantifiseringsgrense (LOQ)
1,4-naphtaquinone	5727,7	19092,3
1-nitronaphtalene	100,3	334,2
2-nitronaphtalene	41,7	139,1
9-fluorenone	368,7	1228,9
4-nitrobiphenyl	319,6	1065,2
9,10-anthraquinone	126,7	422,3
5-nitroacenaphtene	12,5	41,8
2-nitrofluorene	2,2	7,4
Fluoranthene-D10	9,5	31,8
9-nitroanthracene	2617,7	8725,8
9-nitrophenantrene	2793,3	9311,1
2-nitroanthracene	10650,1	35500,4
Benzo(A)fluorene-11-one	93,0	310,1
2-nitrofluoroanthene	44,5	148,4
3-nitrofluoroanthene	43,6	145,5
4-nitropyrene	94,2	314,1
1,2-dibenzo(A)anthraquinone	76,1	253,7
1-nitropyrene	127,1	423,6
2-nitropyrene	205,7	685,8
1,8-dinitropyrene	9,3	30,9
2,7-dinitrofluorene	48,6	162,0
7-nitro-(A)-anthracene	118,3	394,3
6H-benzo(CD)pyrene-6-one	222,4	741,3
6-nitrochrysene	61,6	205,3
1,3-dinitropyrene	112,4	374,7

Vedlegg

Tabell C.3. Beregnet gjenvinning av internstandard i jordprøver gitt i prosent (%). Verdier under 20 % er markert med rødt, som ikke tilfredsstilte kravet samt at den beste internstandard er markert med blått.

Navn	1,4-NQ -D8	1-NN -D7	2-NP -D9	9-FE-D8	AQ-D8	3-NFA-D9
Prøvenavn						
P8H		11		48	42	
P8G		11		47	64	
P6G						
P2H			37	31		
P8F				30	30	
P2G	24	82	50	46		64
P2E		11	25	35	34	
P2F			22	31		
P5E	15					
P6F	18					
P5F						
P8E	12		20	32	36	
P6E						
P5H						

Tabell C.4. Total mengde standard beregnet i 10 g jordprøve målt i pg.

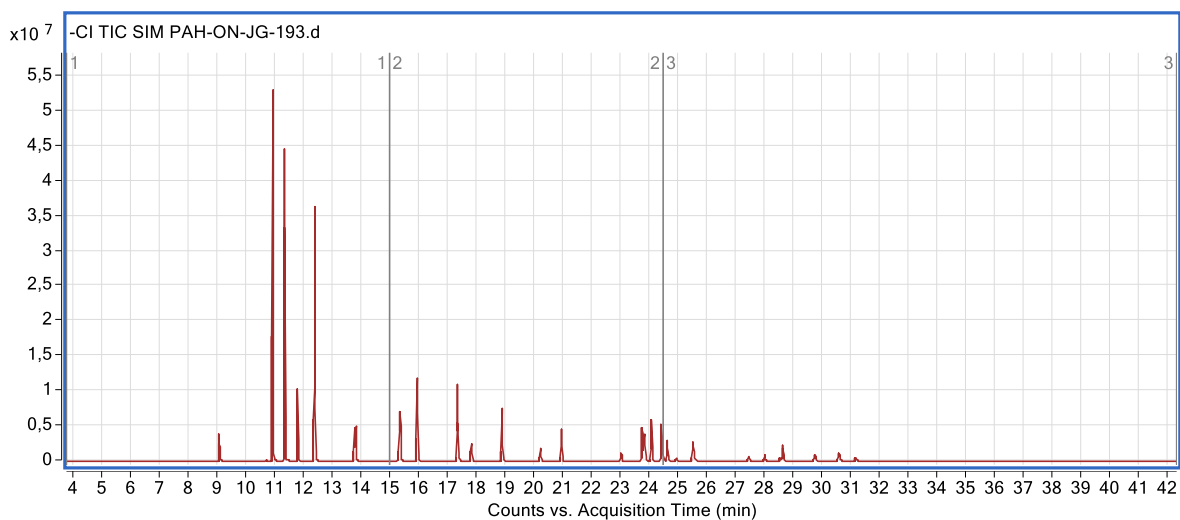
Navn Prøve- navn	1-NN	2-NN	9-FE	4-NBP	5-NA	2-NA	BF	1,2-BA	1-NP	2-NP	1,8-NP	2,7-NF	6H-BP
P8H	4,0	8,5	46,4		4,8		8,0						
P8G	3,6	5,2	46,6		4,0		6,7						
P6G		4,4			5,5	1,9	251,4	19,0	61,4	60,2	48,5		117,4
P2H			2573		3,0		10,1	3,5			3,4		6,1
P8F			96,5		5,6		17,2						
P2G				37,7	3,3	4,0	22,6	3,9				12,0	
P2E		7,7	292,3	9,3									
P2F				15,6									
P5E			2176	9,4	3,0	5,3	12,6	3,7	18,7		5,7		
P6F	4,5						624,9	52,4					
P5F	2,7	4,2	2398	9,4			12,1	4,5					
P8E		5,6	105,8	23,1	4,8		16,5						
P6E	3,9			33,2			677,8	47,3					
P5H		4,2	2468	15,4	6,5		18,7	5,6					

Tabell C.5. Beregnede deteksjons- og kvantifiseringsgrenser for standarder på MPIC-metoden målt i pg/g

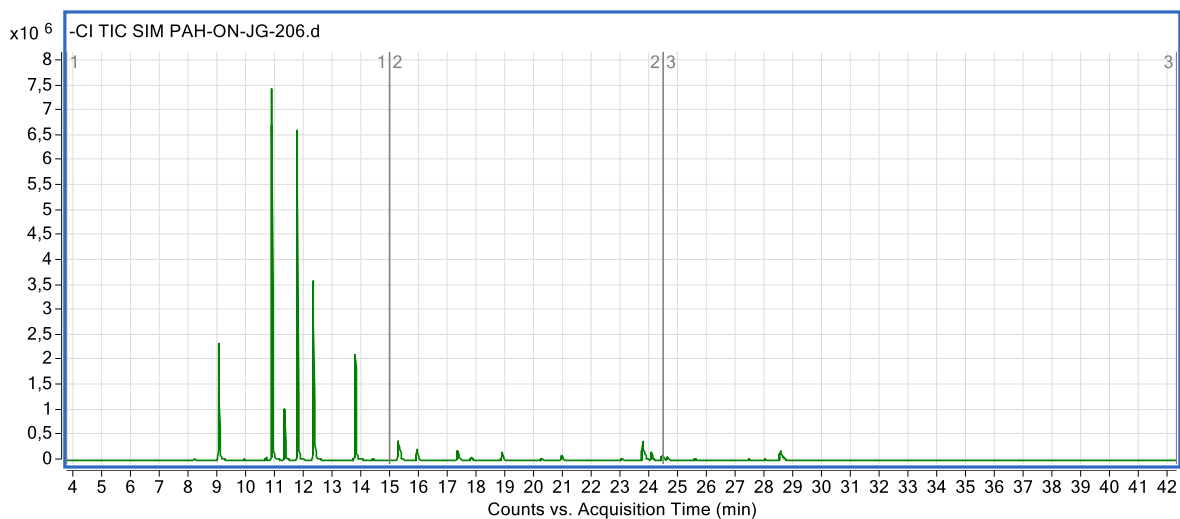
Navn	Deteksjonsgrense (LOD)	Kvantifiseringsgrense (LOQ)
1,4-naphtoquinone	53,0	176,7
1-nitronaphtalene	26,0	86,8
9-fluorenone	183,7	612,4
9,10-anthraquinone	13,3	44,4
5-nitroacenaphtene	7,8	25,2
2-nitrofluorene	3,1	10,2
9-nitrophenanthrene	0,2	0,5
Benz(A)fluorenone	20,1	67,1
2-nitrofluoranthene	0,2	0,5
1,2-benzanthraquinone	0,8	2,8
6-nitrochrysene	1,0	3,2
1,6-dinitropyrene	4,2	14,0

D. Kromatogram

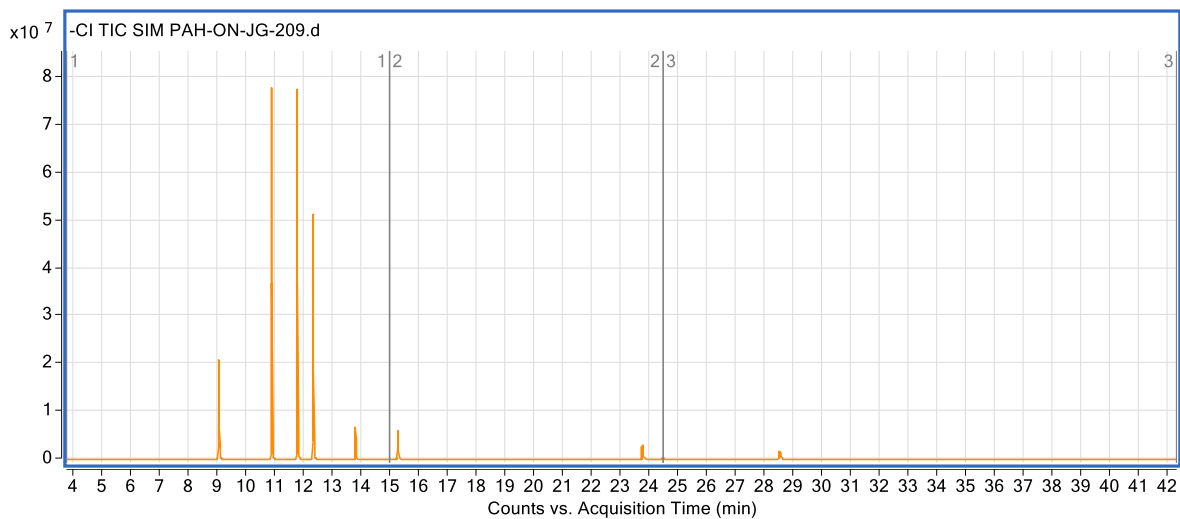
Kromatogrammene som er vist er hentet fra Agilent Mass Hunter QQQ Quantitative analyses, versjon B.07.00 og Qualitative analyses, versjon B.06.00.



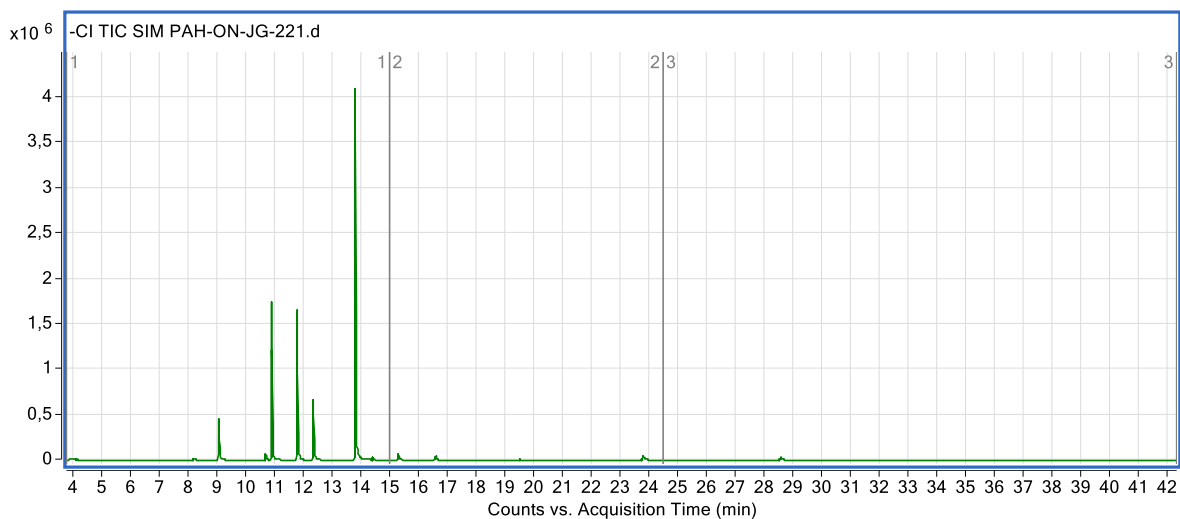
Figur D.1. Totalt ionekromatogram over standarder med konsentrasjon på 450 pg/ μ L tilsatt 100 pg/ μ L internstandard utført på IKBM-metoden.



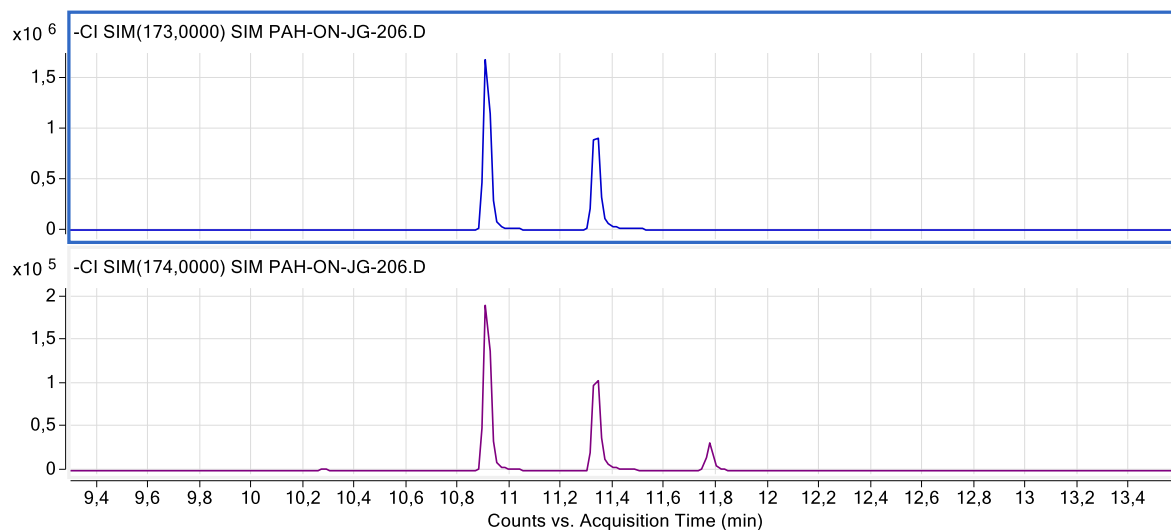
Figur D.2. Totalt ionekromatogram over standarder med konsentrasjon på 28 pg/ μ L tilsatt 100 pg/ μ L internstandard utført på IKBM-metoden.



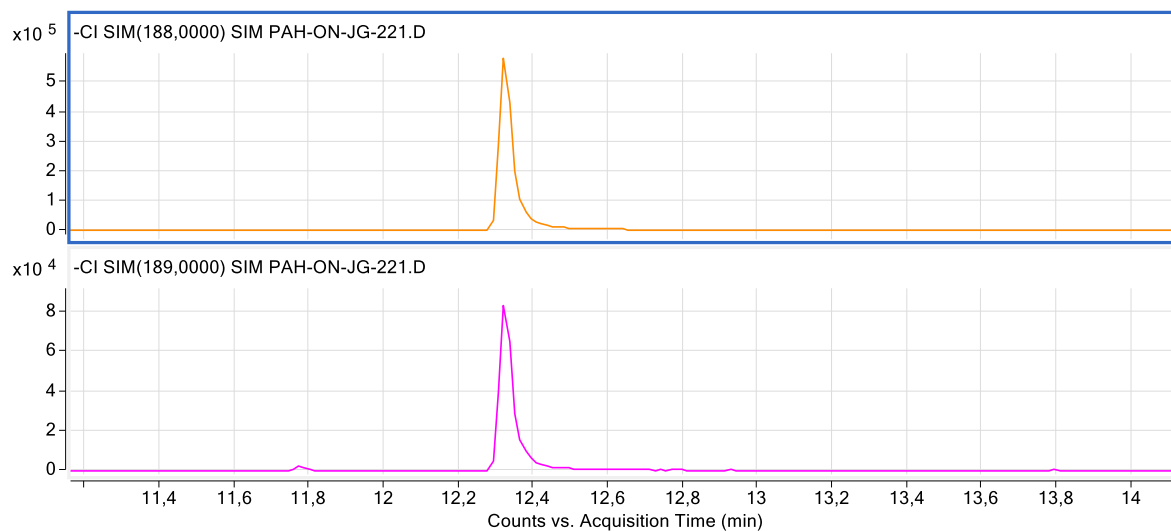
Figur D.3. Totalt ionekromatogram over internstandardene med konsentrasjon på 450 pg/μL tilsatt 100 pg/μL gjenvinningsstandard utført på IKBM-metoden



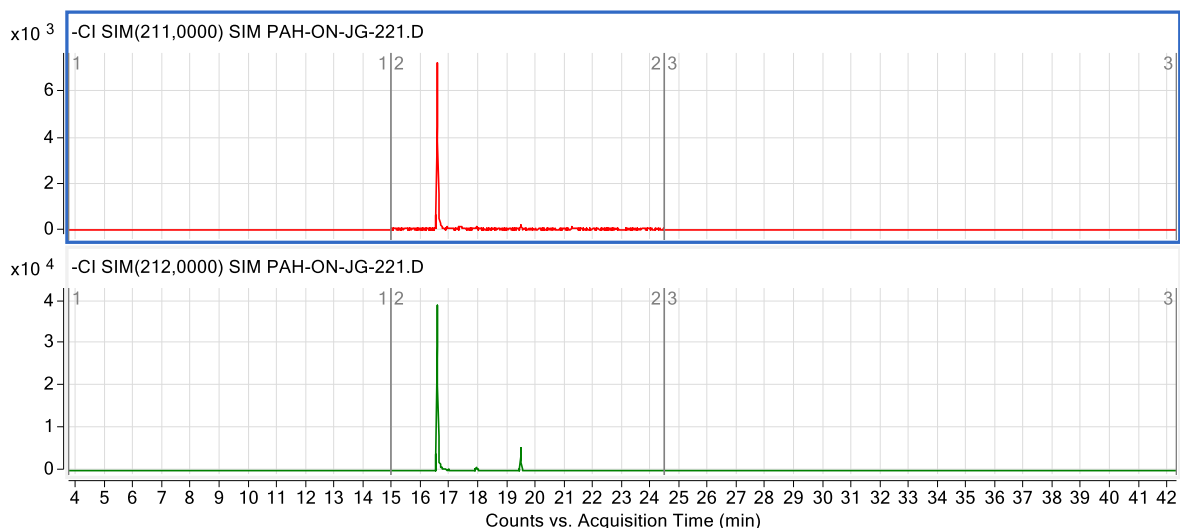
Figur D.4. Totalt ionekromatogram over internstandardene med konsentrasjon på 28 pg/μL tilsatt 100 pg/μL gjenvinningsstandard utført på IKBM-metoden



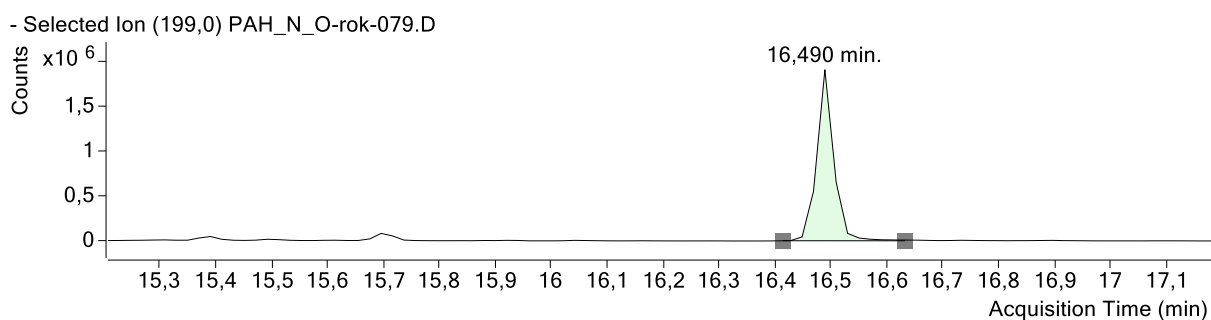
Figur D.5. Selektiv ionemodus-kromatogram som viser forbindelsene 1-nitronaphtalene og 2-nitronaphtalene ved en konsentrasjon på 28 pg/μL utført på IKBM-metoden.



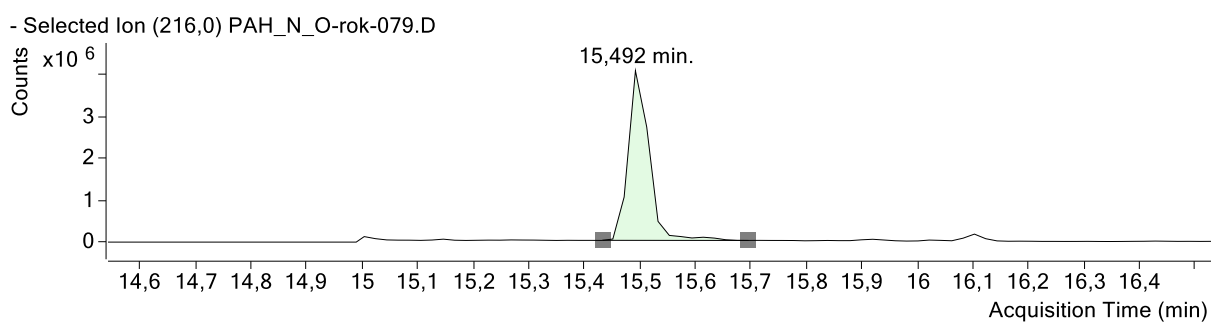
Figur D.6. Selektiv ionemodus-kromatogram som viser internstandarden 9-fluorenone-D8 ved en konsentrasjon på 28 pg/μL utført på IKBM-metoden.



Figur D.7. Selektiv ionemodus-kromatogram som viser gjenvinningsstandarden fluoranthene-D10 ved en konsentrasjon på 100 pg/μL utført på IKBM-metoden.

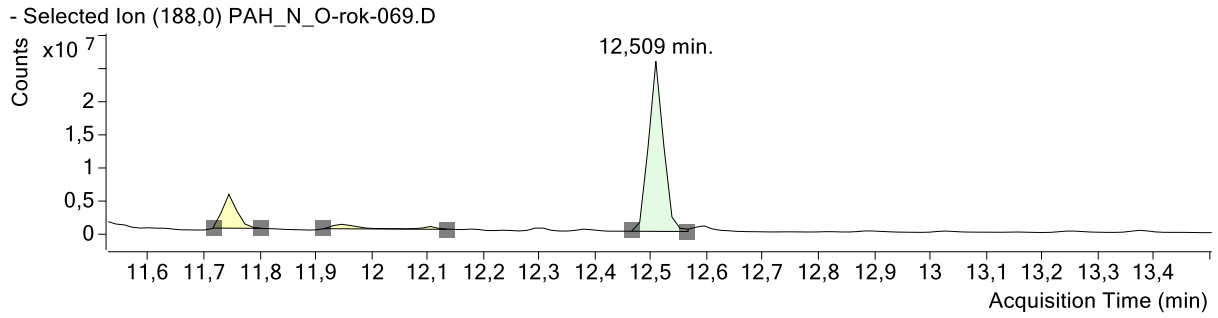


Figur D.8. Selektiv ionemodus-kromatogram for 5-nitroacenaphthene i prøve P6G utført på IKBM-metoden.

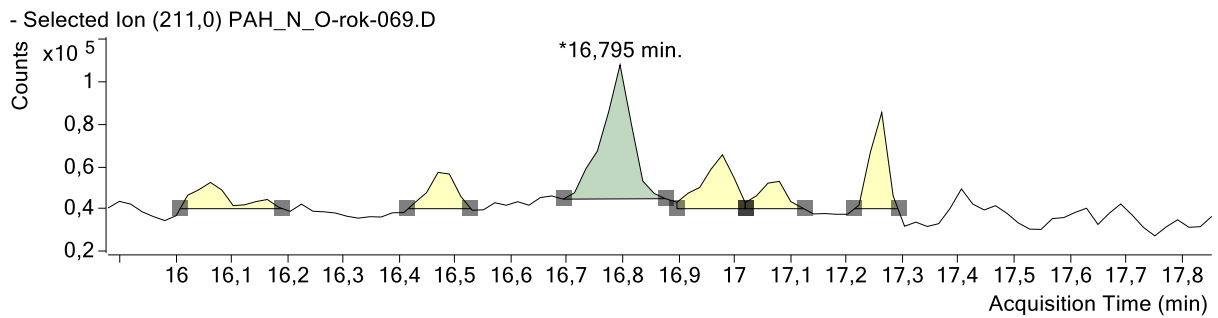


Figur D.9. Selektiv ionemodus-kromatogram for tilhørende internstandard til 5-nitroacenaphthene, Anthraquinone-D8 i prøve P6G utført på IKBM-metoden.

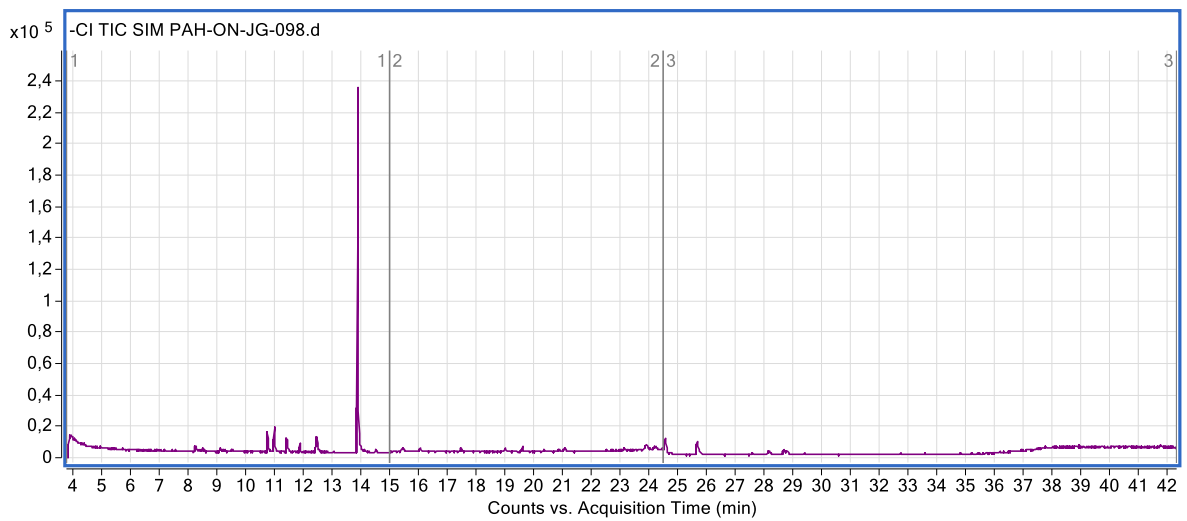
Vedlegg



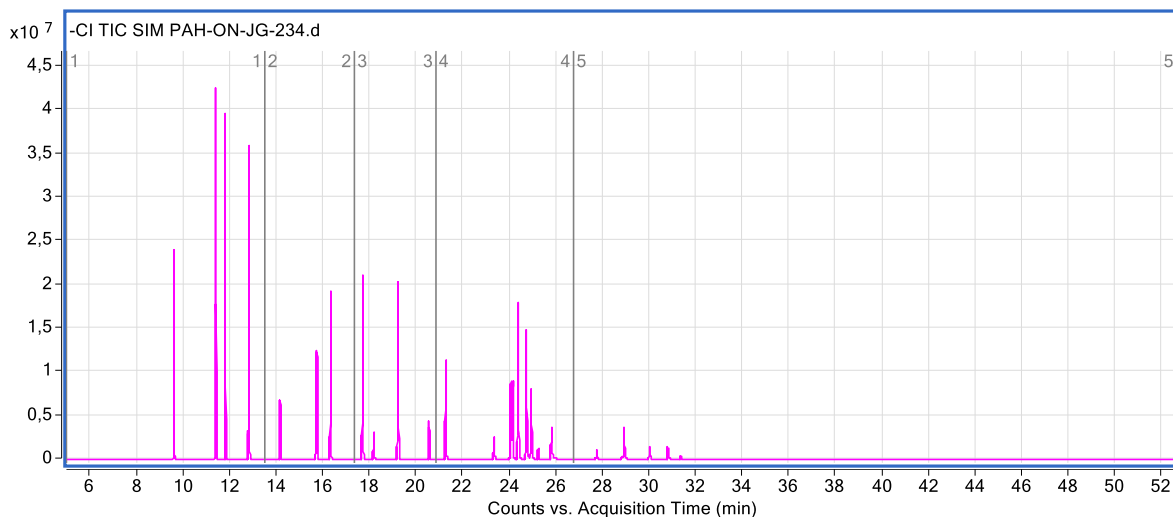
Figur D.10. Selektiv ionemodus-kromatogram som viser internstandarden 9-fluorenone-D8 i prøve P8H utført på IKBM-metoden.



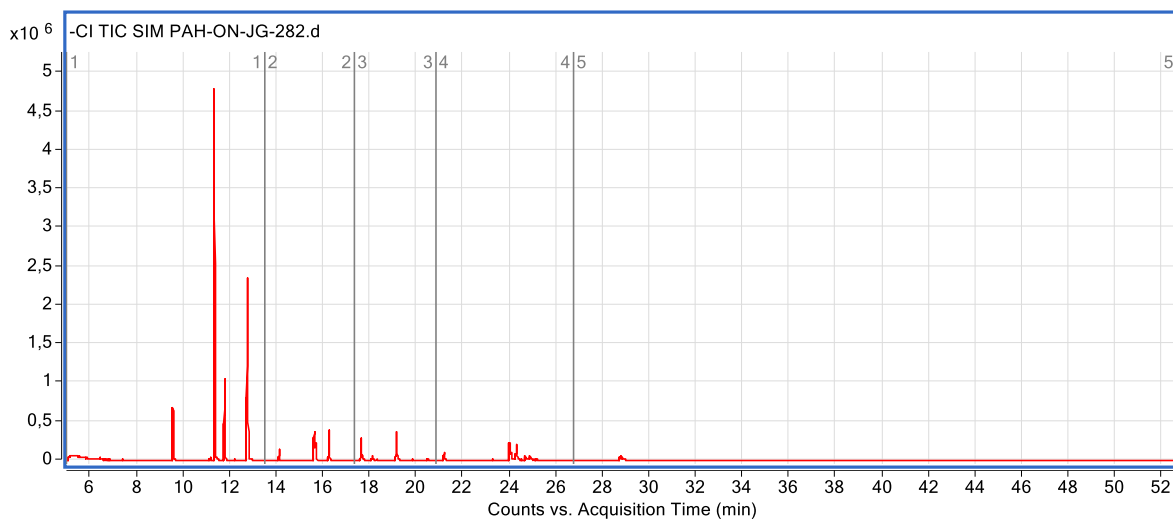
Figur D.11. Selektiv ionemodus-kromatogram som viser gjenvinningsstandarden fluoranthene-D10 i prøve P8H utført på IKBM-metoden.



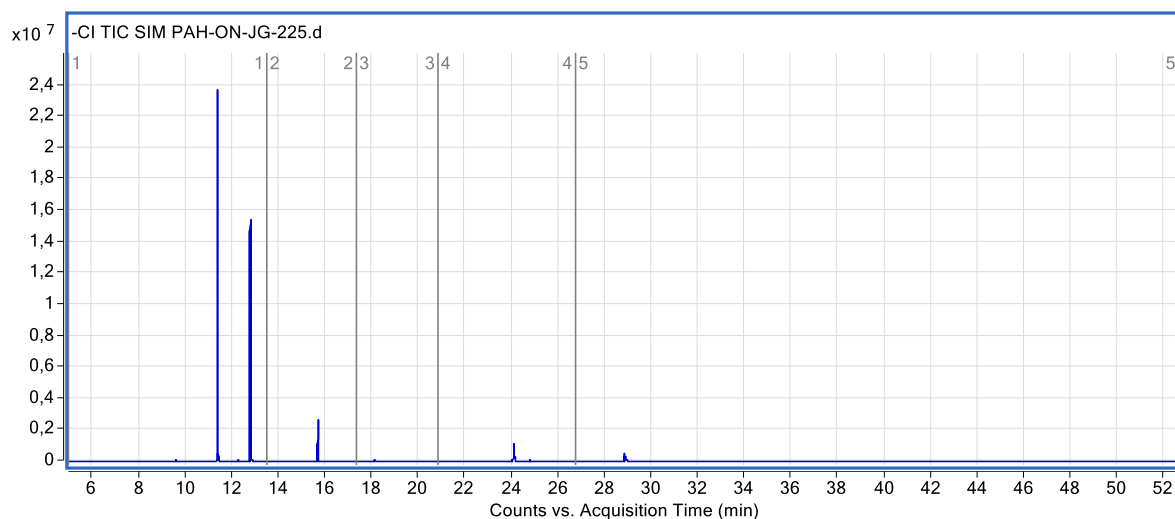
Figur D.12. Blank prøve på IKBM-metoden.



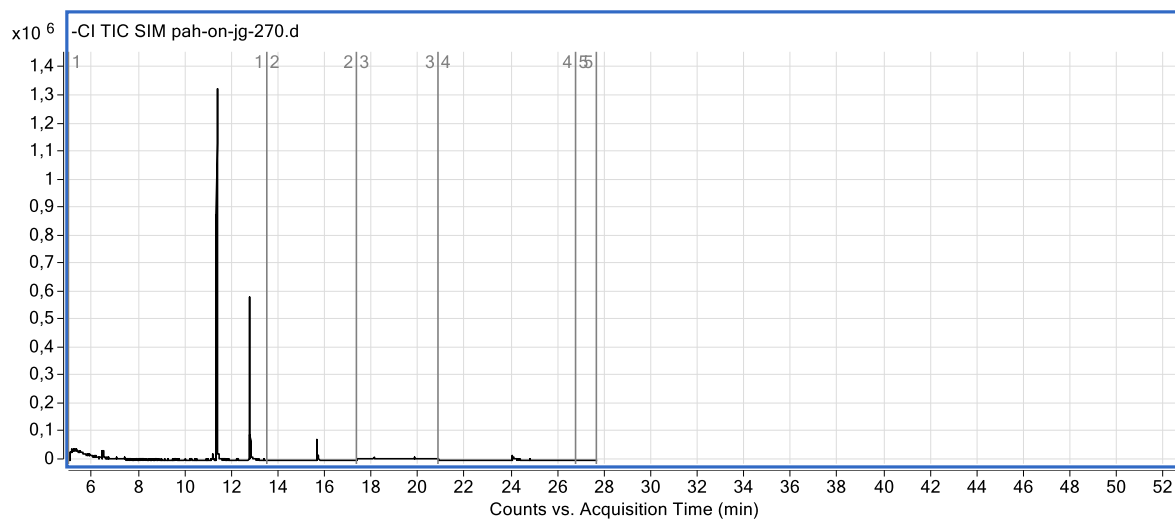
Figur D.13. Totalt ionekromatogram over standarder med konsentrasjon på 450 pg/μL tilsatt internstandard med konsentrasjon på 100 pg/μL utført på MPIC-metoden.



Figur D.14. Totalt ionekromatogram over standarder med konsentrasjon på 28 pg/μL tilsatt internstandard med konsentrasjon på 100 pg/μL utført på MPIC-metoden.

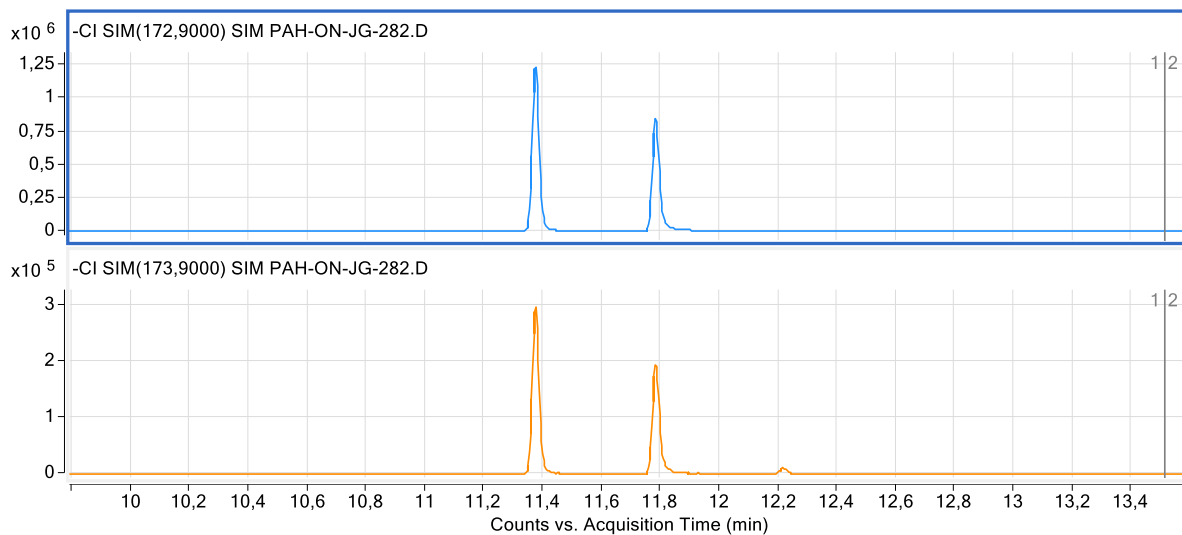


Figur D.15. Totalt ionekromatogram over internstandarder med konsentrasjon på 450 pg/ μ L tilsatt gjenvinningsstandard med konsentrasjon på 100 pg/ μ L utført på MPIC-metoden.

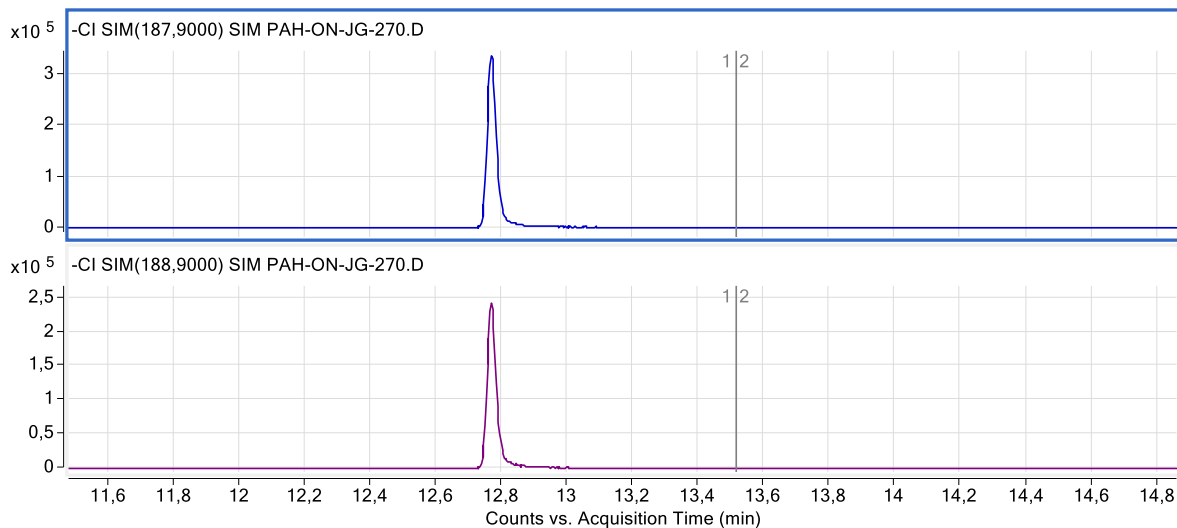


Figur D.16. Totalt ionekromatogram over internstandarder med konsentrasjon på 56 pg/ μ L tilsatt gjenvinningsstandard med konsentrasjon på 100 pg/ μ L utført på MPIC-metoden.

Vedlegg

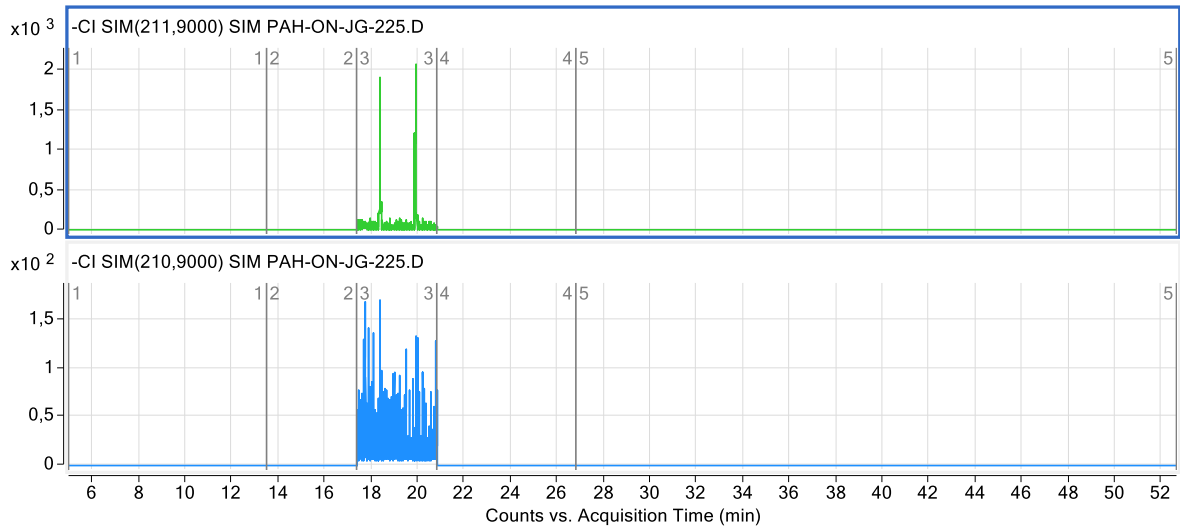


Figur D.17. Selektiv ionemodus -kromatogram som viser de native standardene 1-nitronaphthalene og 2-nitronaphthalene ved en konsentrasjon på 28 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ utført på MPIC-metoden.

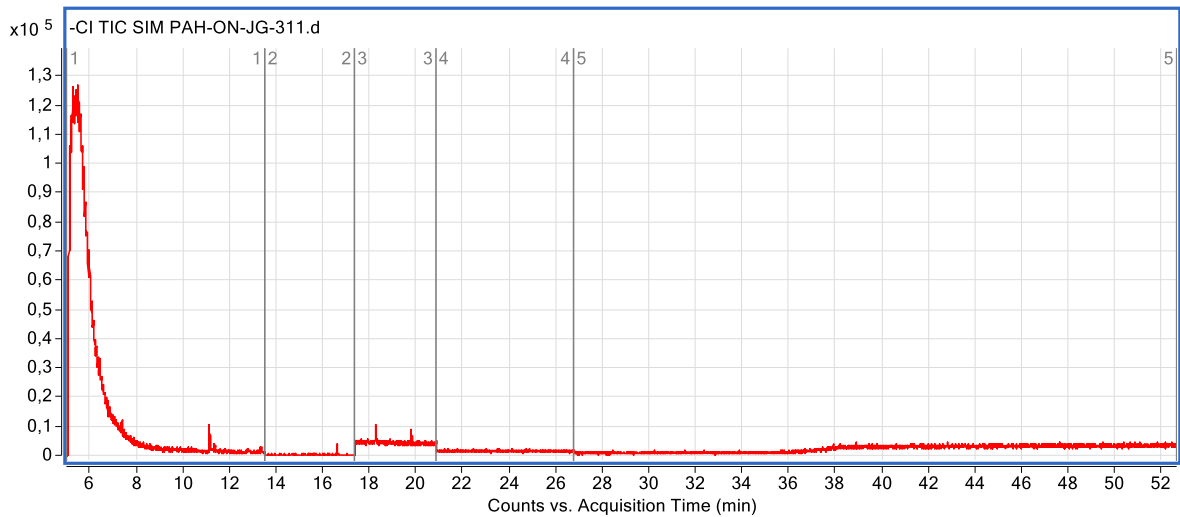


Figur D.18. Selektiv ionemodus -kromatogram som viser internstandarden 9-fluorenone-D8 ved en konsentrasjon på 56 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ utført på MPIC-metoden.

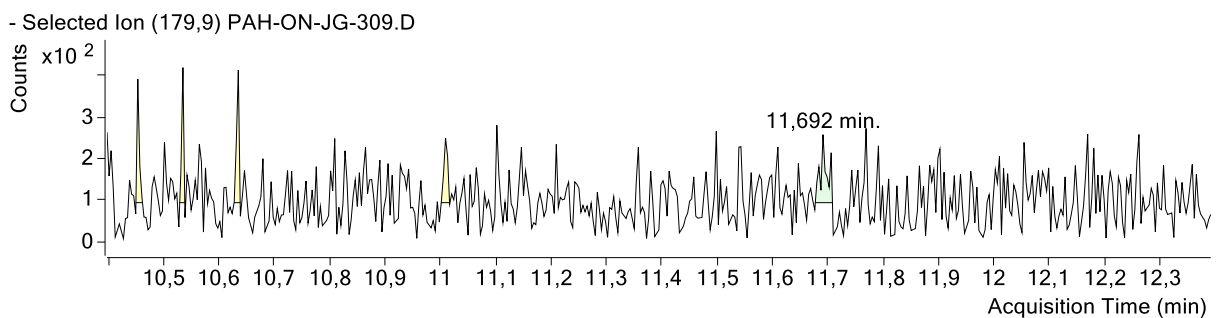
Vedlegg



Figur D.19. Selektiv ionemodus -kromatogram som viser gjenvinningsstandarden fluoranthene-D10 med en konsentrasjon på 100 pg/μL utført på MPIC-metoden.



Figur D.20. Totalt ionekromatogram over en vanlig blank prøve utført på MPIC-metoden.



Figur D.21. Selektiv ionemodus -kromatogram over en reell prøve utført på MPIC-metoden



Norges miljø- og biovitenskapelig universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway