

Massaspektrometriset menetelmät johtavat meressä piilevän uhan jäljille

Finntesting kevätseminaari

10.5.2022

Hanna Niemikoski

Suomen ympäristökeskus (SYKE)



S Y K E

Kemiallisen asean määritelmä

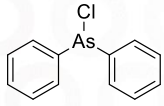
- Lamaannuttava, pysyviä vaurioita aiheuttava tai tappava aine
- Kemiallisia taisteluaineita:
 - hermomyrkyt
 - syövyttävät aineet
 - ärsyttävät aineet
 - tukahduttavat aineet
 - psykoaktiiviset aineet
- Kemiallisen asean kieltosopimus kieltää kemiallisten aseiden kehityksen, valmistuksen, varastoinnin sekä käytön
- Kemiallisten aseiden kieltojärjestys (OPCW) valvoo sopimuksen toteutumista
- Sopimus ei kata ennen vuotta 1985 upotettuja kemiallisia aseita



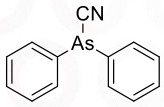
Kemiallisten aseiden käyttö

- Ensimmäisen kerran käytettiin sotilaallisessa tarkoituksessa v. 1915
- I ja II maailmansodan aikana erityyppisiä kemiallisia taisteluaineita kehitettiin ja valmistettiin suuria määriä

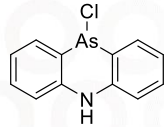
Kemiallisina taisteluväineinä käytetyt fenyyliarseeniyhdisteet



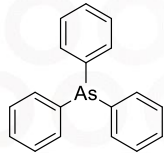
Clark I



Clark II



Adamsite



Triphenylarsine



- Fenyyliarseeniyhdisteet suunniteltiin mellakantorjunta-aineiksi
 - OPCW luokitellut liian myrkyllisiksi tähän käyttöön
- Vaikuttaa limakalvoihin aiheuttaen ärsytystä, kipua ja polttamisen tunnetta silmissä, nenässä, kurkussa ja ruuansulatuskanavassa
- Ilma-altistumisen oireita ovat aivastelu, yskä, lisääntynyt syljeneritys, nenän tukkoisuus, ja lopuksi tukehtuminen
- **Arsiiniöljy**
 - koostuu Clark I:stä, trifenyyliarsiinista, arseenitrikloridista, sekä Pfiffikuksesta (fenyylidiklooriarsiini)
 - Käytettiin taktisena seoksena sinappikaasu kanssa, ns. winter grade mustard
- Valmistettiin suuria määriä etenkin natsi-Saksassa
- Sodan loputtua liittoutuneet takavarikoivat ammusvarastot

Upotusoperaatiot hävityskeinona



Maailmanlaajuinen ongelma

Arvio upotettujen
ammusten
määrästä on
1,6 miljoonaa
tonnia



Hävitysalueet Itämeren alueella

- Bornholmin syväne 32,000 ja Gotlannin syväne 2,000 tonnia
- Skagerrak 170,000 tonnia



Kuva: J. Beldowski *et al.*, “Chemical Munitions Search & Assessment—An evaluation of the dumped munitions problem in the Baltic Sea,” *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.*, vol. 128, pp. 85–95, 2016.



Kansainväliset hankkeet mereenupotettujen aseiden tutkimuksessa

2006–2008



EU 6th Framework programme

2011–2014



2013–2015



2016–2019



2019–2021



Tutkimusta 15 vuoden vuoden ajan

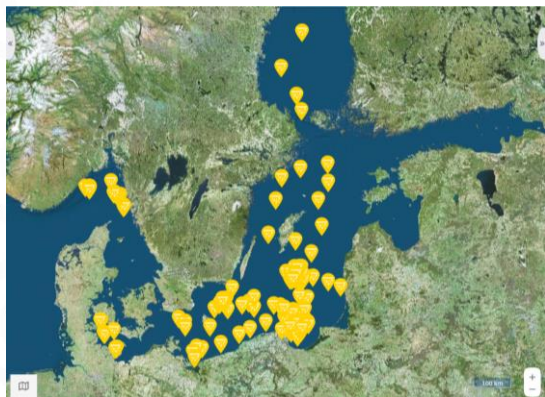
- Ammusten tunnistaminen
 - Visuaalinen tunnistus
 - Hydroakustinen tai magnetometrinen mittaus
- Sedimenttianalyysit
- Uusien upotusalueiden löytyminen



Kuvat: Shirshov Institute of Oceanology ja CHEMSEA project

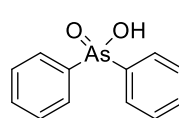


Sedimenttianalyysit paljastavat uusia upotuspaikkoja

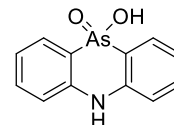


Kuva: AmuCad.org – Interreg DAIMON2 Decision Aid for Marine Munitions

- Sedimentinäytteistä on löytynyt korkeita pitoisuuksia kemiallisten taisteluaineiden hajoamistuotteita
- - Bornholm: 1300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (DPA)
210 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (DM[ox])

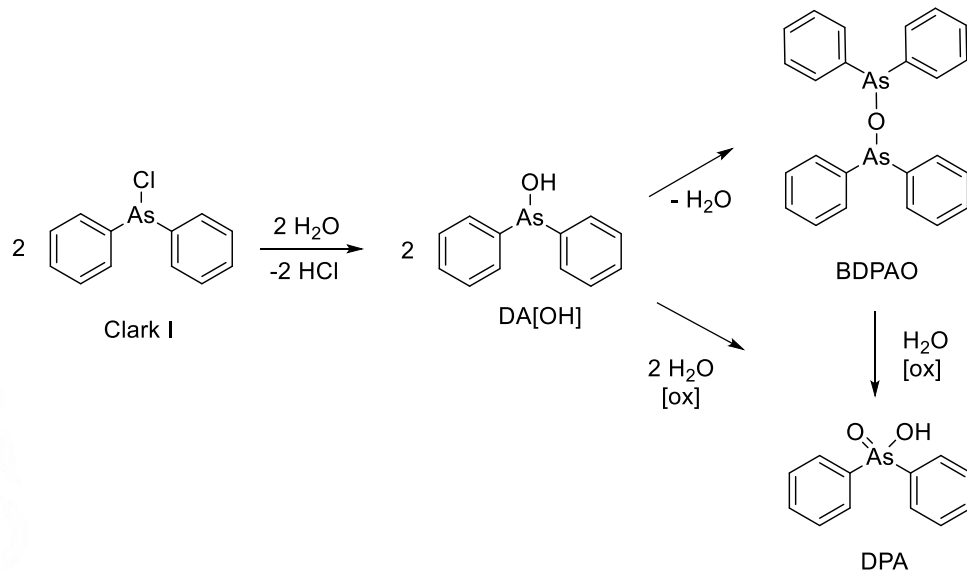


DPA



DM[ox]

Abioottinen hajoaminen meriympäristössä



Miten merieliöiden altistumista on tutkittu?

Yleinen kunto

- Kuntoindeksi
- Maksan somaattinen indeksi
- Pernan somaattinen indeksi
- Gonadosomaattinen indeksi
- Näkyvät sairaudet ja loiset

Molekyylitason vasteet

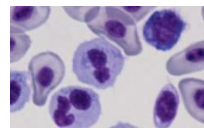
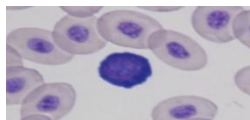
- Punasolujen muutokset ja DNA-vauriot
- Hermotoksisuus
- Antioksidanttivasteet



Kuva: SYKE

Solu- ja kudosaauriot

- Maksa
- Lysosomikalvon stabiilisuus -maksasolut
- Verisolujen määrä



Kuva: SYKE

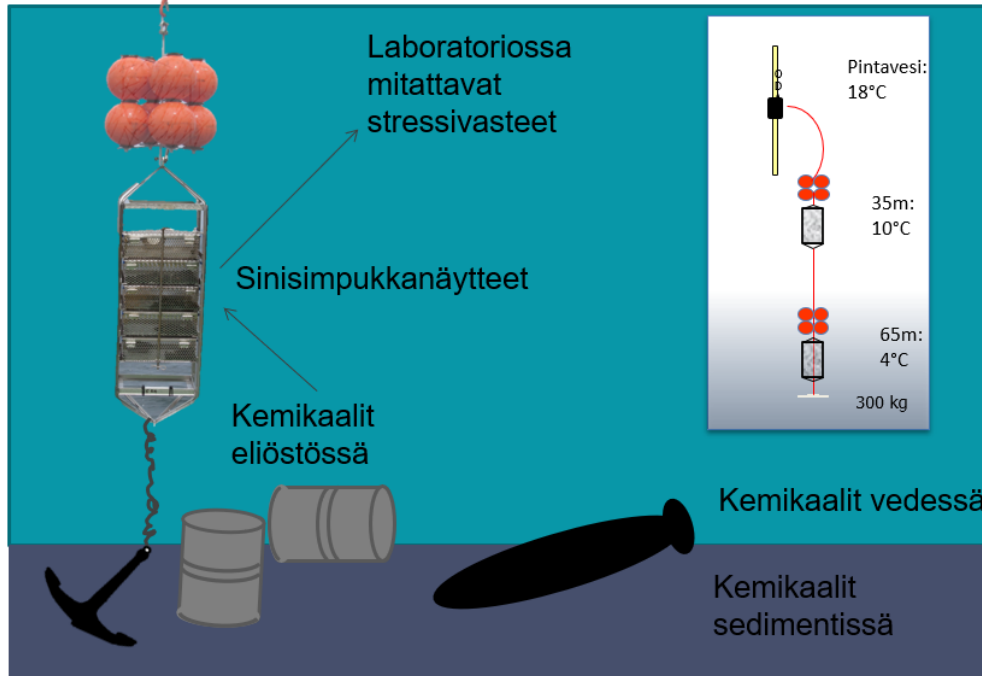


Kuva: SYKE/Kari Lehtonen



Miten merieliöiden altistumista on tutkittu?

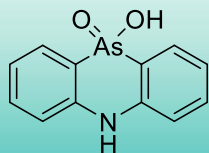
Häkityskoe Bornholmissa



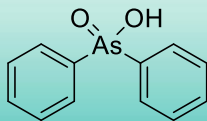
Kuva: SYKE

Väitöskirjatutkimuksen tavoitteet

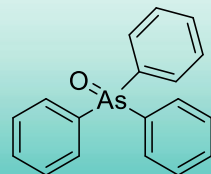
- Kehittää kemiallinen analyysimenetelmä valituille fenyyliarseeniyhdisteille kalan lihasnäytteistä ja arvioida menetelmän soveltuvuus käyttötarkoitukseensa
 - tutkittaviksi yhdisteiksi valittiin kolme primääristä hajoamistuotetta, joita on löytynyt sedimenttinäytteistä



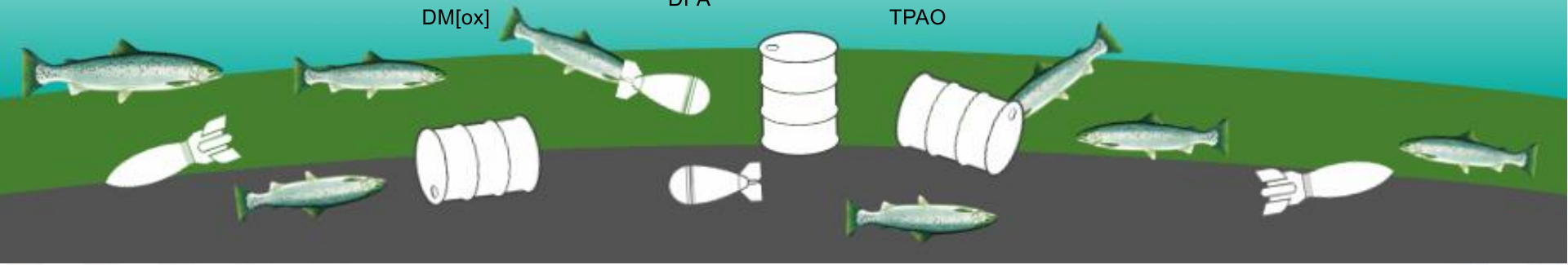
DM[ox]



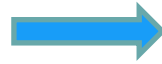
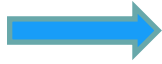
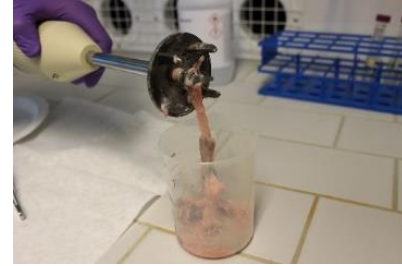
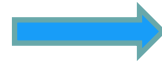
DPA



TPAO

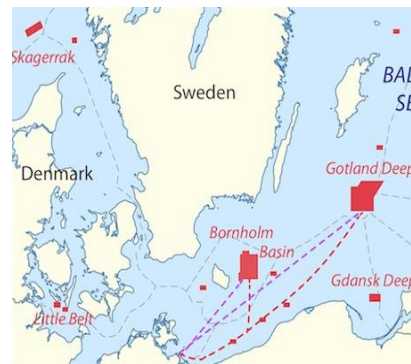


Menetelmäkehitys

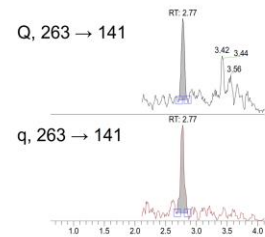
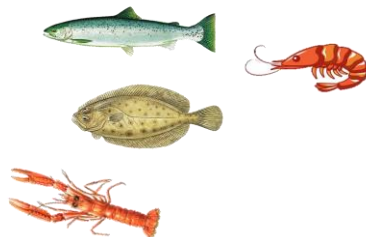
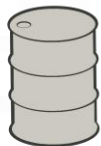
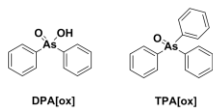


Kerääntyvätkö tutkittavat yhdisteet merieliöihin?

- Näytteitä analysoitu kolmelta eri upotusalueelta
 - Skagerrak
 - Måseskär
 - Bornholm



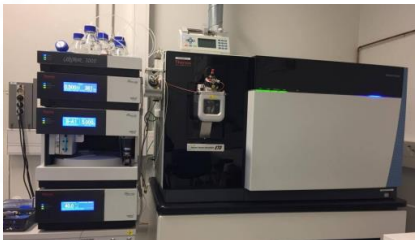
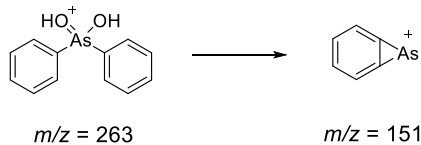
Kuva: J. Beldowski *et al.*, *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.*, 2016.



Massaspektrometriset tekniikat



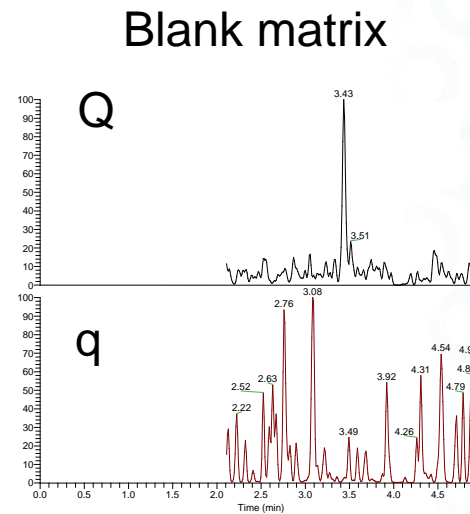
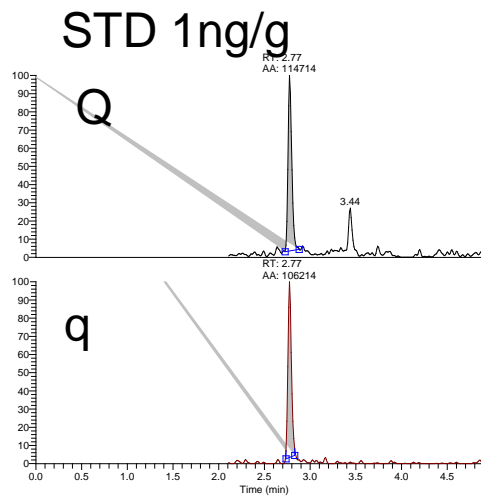
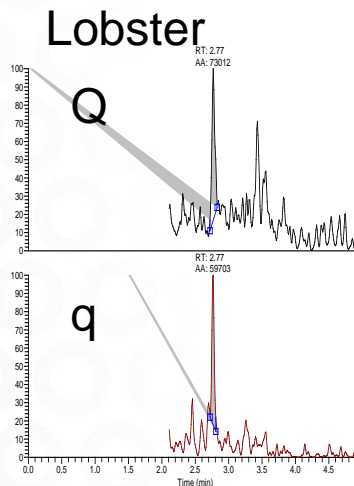
- Kolmoiskvadrupolimassaspektrometri (tandem massaspektrometria, MS)
- Tandem-massaspektrometria (MS/MS) soveltuu hyvin, kun tiedetään, mitä yhdisteitä halutaan mitata



- Korkean erotuskyvyn massaspektrometri
- Hankalista matriisista yhdisteiden tunnistaminen on mahdollista erinomaisen massatarkkuuden johdosta



Tunnistuskriteerit

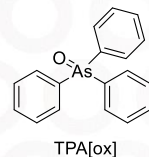
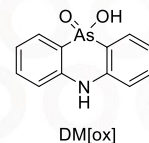
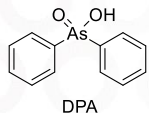


Q = Quantifier ion, q = qualifier ion

Transitions	STD 1ng/g $R_t = 2,77$ min		Lobster sample $R_t = 2,77$ min		Criteria
	Area	Ion ratio (%)	Area	Ion ratio (%)	
m/z 263 → 141 (Q)	114714	92.5 ± 18.5	73012	81.7	OK
m/z 263 → 152 (q)	106214		59703		

3. Siirtyvätkö ammuksista vapautuvat myrkylliset yhdisteet eliöihin?

- 14 % turskista ja 90 % viiksiympyräsuisista sisälsi fenyliarseeniyhdisteitä
- positiivisia löydöksiä myös hummerista, kampelasta sekä katkaravuista



Chemical	Dump site		
	Bornholm	Skagerrak	Måseskär
DPA	X	X	X
DM[ox]	N.F.	N.F.	N.F.
TPA[ox]	X	X	N.F.

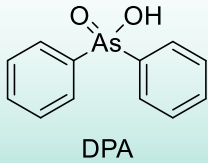
N.F. = not found (ei löydetty)



Kuva: J. Beldowski et al., *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.*, vol. 128, pp. 85–95, 2016

Väitöskirjatutkimuksen tavoitteet

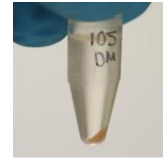
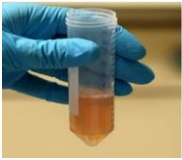
- Tutkia Itämeren kannalta oleellisten lajien *in vitro* malleilla, miten yhdisteet muuttuvat aineenvaihdunnan seurauksena



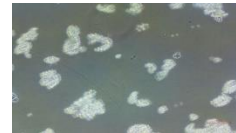
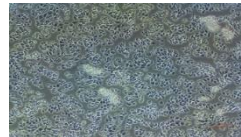
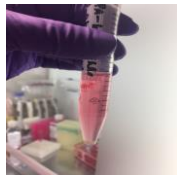
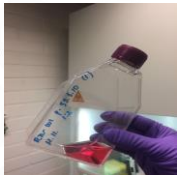
Metaboliatutkimukset

- Yhdisteiden muuttumista tutkittiin *in vitro* malleilla
 - turskan maksasta eristetty S9 fraktio
 - kirjoloihen maksasolulinja RTL-W1

S9:



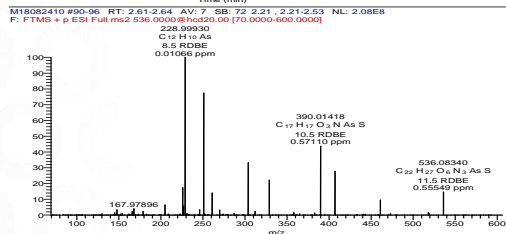
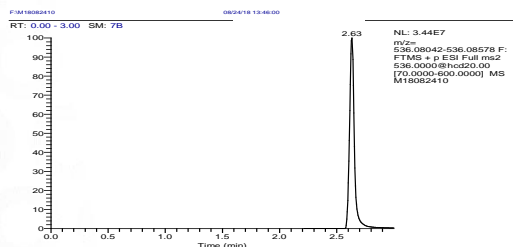
Maksasolulinja:



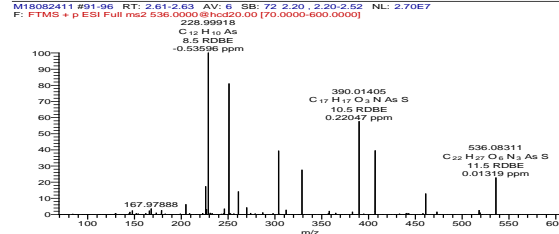
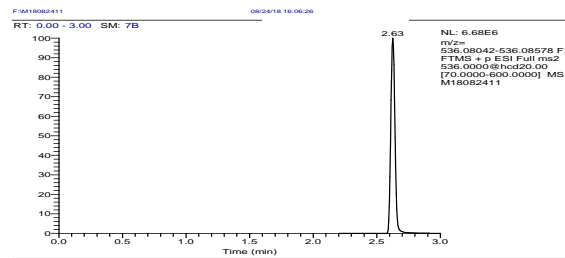
Metaboliatutkimukset

- The elemental composition ($C_{22}H_{27}N_3O_6AsS^+$) of the detected compound in *in vitro* samples was found to match the elemental composition of glutathione conjugate of Clark I in synthesized reference standard

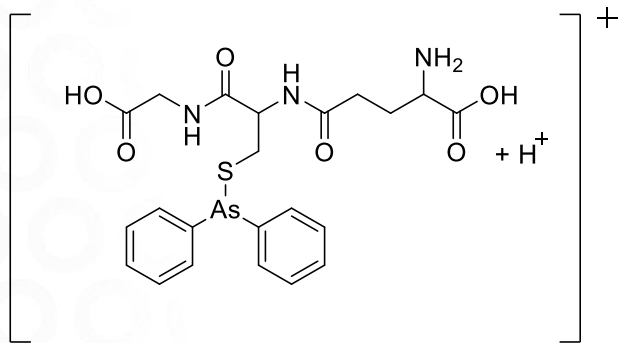
Standard



In vitro sample



Tunnistus

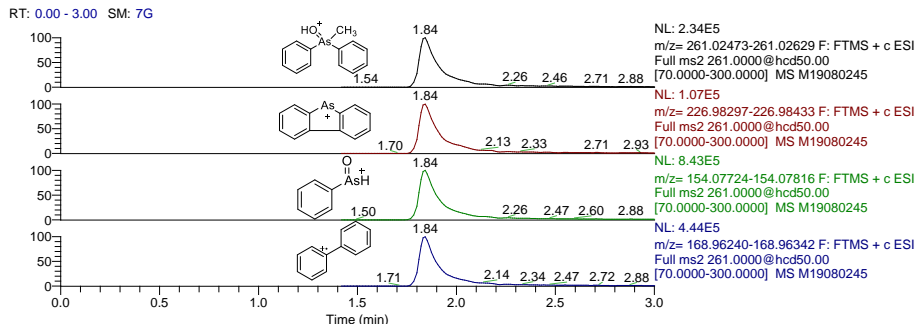


Proposed elemental composition	Neutral loss	Measured mass	Δ ppm (theoretical mass)
$[M+H]^+$	-	536.08311	0.01319
$C_{17}H_{20}O_3N_2AsS^+$	129.04259	407.04052	0.01379
$C_{17}H_{17}O_3NAsS^+$	146.06892	390.01418	0.57110
$C_{12}H_{10}AsS^+$	275.11188	260.97123	0.53139
$C_{12}H_{10}As^+$	307.08393	228.99918	0.53596

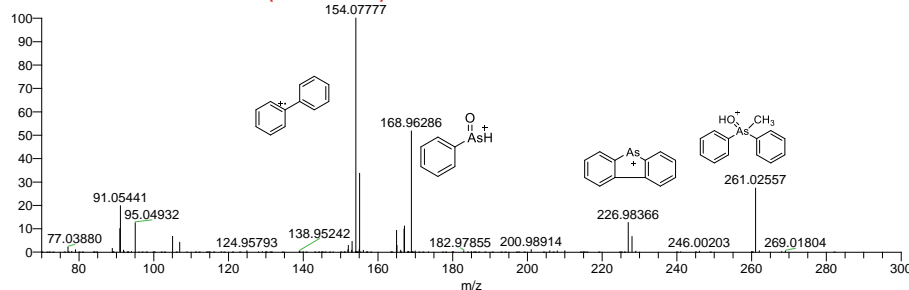
4. Mitä yhdisteille tapahtuu, kun ne joutuvat eliöön?

- Tunnistettuja metabolitteja löytynyt kentältä otetuista kalanäytteistä

Kalanäyte Skagerrakin upotusalueelta

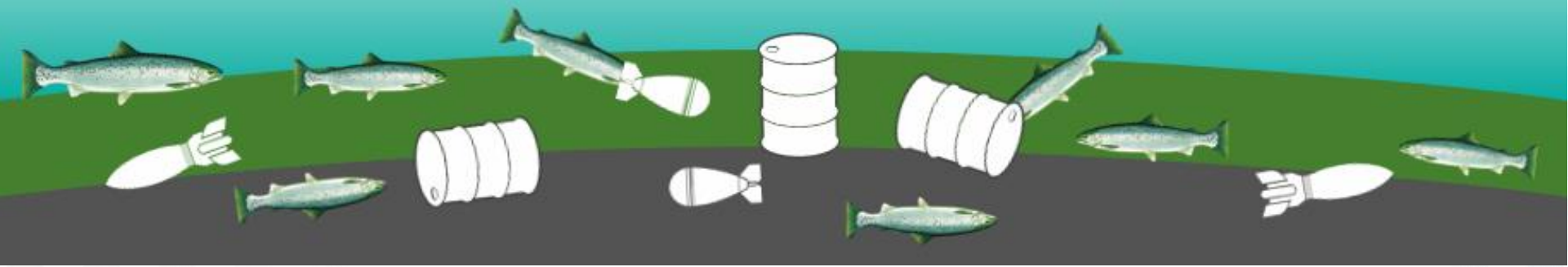


M19080245 #279 RT: 1.83 AV: 1 SB: 48 1.46-1.70, 2.12-2.42 NL: 9.20E5
F: FTMS + c ESI Full ms2 261.0000@hcd50.00 [70.0000-300.0000]

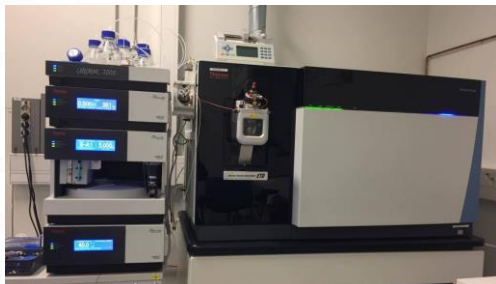


Väitöskirjatutkimuksen tavoitteet

Tutkia löytyykö Itämeren kemiallisten aseiden upotuspaikoilta kerätyistä sedimenteistä tuntemattomia hajoamistuotteita

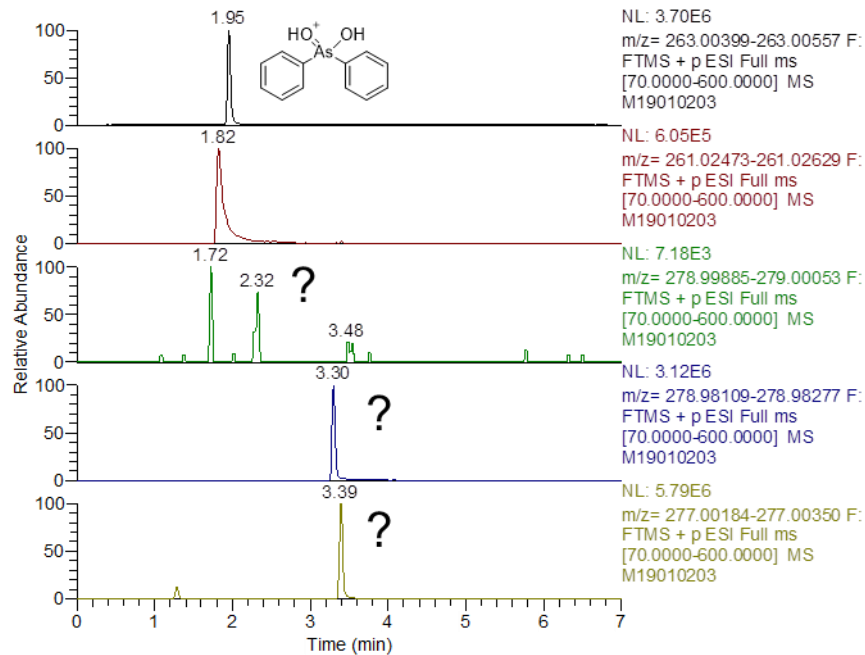


2. Muuttuvatko yhdisteet merisedimentissä?



Kuva: VERIFIN

- Korkean erotuskyvyn massaspektrometri (Orbitrap)
 - massatarkkuus 5 desimaalia
 - alkuainekoostumus

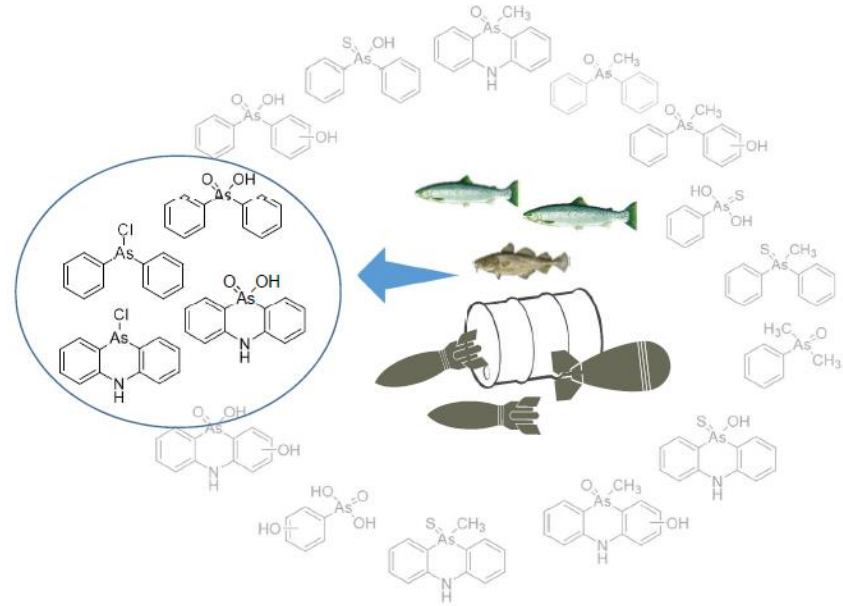


Uusia yhdisteitä sedimentistä

- 14 ennen tunnistamatonta arseenia sisältäviä hajoamistuotteita tunnistettiin

➔ fenyyliarseeniyhdisteiden pitoisuus sedimentissä suurempi kuin ollaan tiedetty

- Yhdisteet muodostuneet sedimenteissä mahdollisesti mikrobien vaikutuksesta



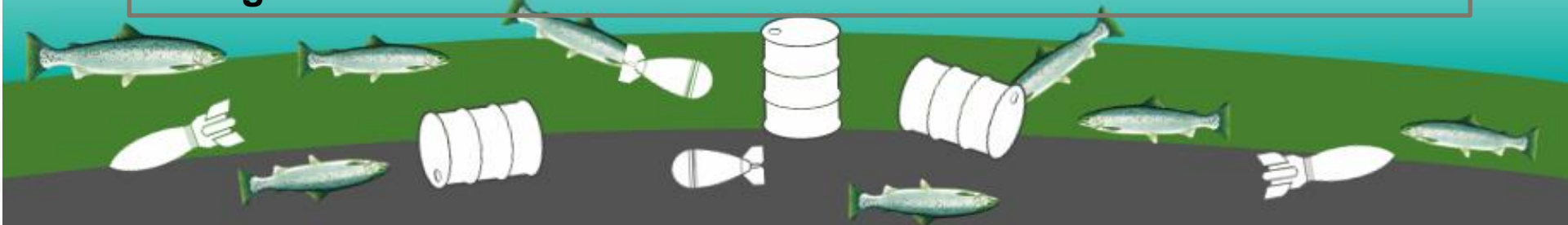
Mihin väitöskirjatutkimuksen tuloksia tarvitaan?

- Merenpohjassa vuotavien ammusten vaikutusten arviointiin merieliöissä
- Tietoa aineenvaihduntatuotteista tarvitaan, jotta niitä voidaan käyttää kohdeyhdisteinä, kun arvioidaan merieliöiden altistustasoa
- Aineenvaihdunta saattaa liittyä akuuttien toksisten vaikutusten ilmentymiseen
- Sedimenteistä löytyneet yhdisteet saattavat olla merkittävässä roolissa kemiallisten taisteluaineiden aiheuttamassa kokonaiskuormassa meriympäristössä



Tutkimustuloksista syntyy uusia kysymyksiä

- Ovat uudet yhdisteet myrkyllisiä?
 - Kerääntyvätkö uudet yhdisteet merieliöihin?
 - Mikä vaikutus löydetyillä yhdisteillä on kemiallisista taisteluaineista aiheutuvaan kokonaiskuormaan?
 - Tutkimus jatkuu parhaillaan SA:n rahoittamassa WARTOX-projektissa, jossa mukana VERIFIN & SYKE
- **Enemmän näytteitä tarvitaan upotusalueilta, jotta voidaan arvioida ongelman vakavuutta**



Kiitokset

VERIFIN (Prof. Paula Vanninen, Martin Söderström (nyk. KRP))

SYKE (Dos. Kari Lehtonen, Raisa Turja, Anu Lastumäki, Aino Ahvo)

Thünen Institute for Fisheries Ecology

Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research

Institute of Oceanology, Polish Academy of Sciences (IO PAN)

Norwegian Defence Research Establishment (FFI)

Swedish Defence Research Agency (FOI)



Kiitos yleisölle!



SYKE