



SYANIDI-IONIN IONIKROMATOGRAFISEN MÄÄRITYSMENETELMÄN VALIDOINTI

Jorma Sihvonen

Opinnäytetyö
Marraskuu 2014
Laboratorioalan
koulutusohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma

SIHVONEN, JORMA:

Syanidi-ionin ionikromatografisen määrittämenetelmän validointi

Opinnäytetyö 45 sivua, joista liitteitä 9 sivua
Marraskuu 2014

Työ tehtiin Suomen Puolustusvoimien tutkimuslaitokselle, Ylöjärvellä toimivassa räjähdde- ja suojelutekniikan osastossa. Opinnäytetyön tavoite oli kehittää sekä validoida ionikromatografinen menetelmä syanidi-ionin määrittämiseksi vedestä. Työssä käytettiin Dionex ICS-5000 ionikromatografilaitteistoa ja detektorina laitteen elektrokemiallista detektoria hopeaelektrodilla varustettuna. Mittaukset suoritettiin pulssiamperometrisella detektoinnilla (PAD). Työn tarkoituksena oli suorittaa validointiin tarvittavat mittaukset sekä menetelmän suunnittelu ja kirjallisuuteen tutustuminen.

Syanidille saatiin kehitettyä määrittämenetelmä ja validoinnissa määritettyä menetelmän lineaarisuusalueet, toteamis- ja määrittärajat, toistettavuus ja mittausepävarmuudet. Myös lämpötilan ja ajan vaikutusta syanidin säilyvyyteen tutkittiin. Työn aikana onnistuttiin pidentämään syanidi-ionin säilyvyyttä liuoksissa huomattavasti poistamalla erinäisiä kontaminaatiolähteitä. Merkittävimmät parannukset tulivat muuttamalla työssä käytettyjen astioiden pesukäytäntöjä paremmiksi, sekä perusteellisella puhdasvesijärjestelmän huollolla.

Menetelmällä saatiin vapaa syanidi stabiloitua ja määritettyä pienissä pitoisuuksissa. Menetelmää voitaisiin jatkossa kehittää tutkimalla matriisien vaikutusta syanidin määrittäyksissä sekä tutkia pulssiamperometrisella detektoinnilla suoritettujen mittausten uusittavuutta.

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Sciences

SIHVONEN, JORMA:

Validation of Ion Chromatographic Method for Cyanide-Ion Determination

Bachelor's thesis 45 pages, appendices 9 pages

November 2014

This study was done in the Finnish Defense Forces research institute in Ylöjärvi at the department of explosives and protection technologies. The aim of this study was to develop a method for determination of cyanide ion in water samples using ion chromatographic hardware and to also validate this method. Dionex ICS-5000 ion chromatographic hardware equipped with an electrochemical detector using silver electrode was used in this study. Measurements were performed using pulsed amperometric detection (PAD). The purpose was to perform the necessary measurements needed for the validation. Designing the method and orientation to the literature were also part of the work.

The study succeeded in developing an analytical method and the validation was able to specify linearity, detection and quantification limits, repeatability and measurement uncertainties of abovementioned method. The effects of temperature and time on cyanide stability were also examined. During the validation process the stability of cyanide ion solution was successfully increased significantly by removing a number of contamination sources. The most significant improvements came from improving the cleaning process for the equipment used and throughout maintenance of the pure water system.

The method succeeded in the stabilization of cyanide and it could also be used to determine cyanide in small quantities. For supplementing the method further studies for the effects of matrixes could be conducted for cyanide measurements. Furthermore, reproducibility of the measurements could be examined using pulsed amperometric detection.

Key words: Cyanide, ion chromatography, validation, pulse amperometry

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	SYANIDI.....	7
2.1	Myrkyllisyys	7
2.2	Käyttökohteet.....	8
2.3	Häiriötekijöitä ja näytteiden esikäsittely.....	8
3	IONIKROMATOGRAFIA	10
3.1	Ionikromatografialaitteiston periaate	10
3.2	Elektrokemialliset detektorit ja amperometria.....	12
3.3	Pulssiamperometria.....	14
4	VALIDOINTI.....	15
4.1	Validointisuunnitelma.....	15
4.2	Validoinnin parametrit	15
4.2.1	Lineaariset mittausalueet.....	16
4.2.2	Toteamis- ja määrittysraja	17
4.2.3	Spesifisyys ja selektiivisyys	18
4.2.4	Herkkyys	18
4.2.5	Toistettavuus	19
4.2.6	Mittausepävarmuus	20
4.2.7	Tarkkuus.....	20
5	TYÖN KOKEELLINEN OSA	22
5.1	Käytetyt kemikaalit ja astiat	23
5.2	Ajoasetuksien säätö.....	24
6	TYÖN SUORITUS JA TULOKSET	27
6.1	Lineaarisuus ja herkkyys	27
6.2	Määrittys- ja toteamisraja	29
6.3	Toistettavuus ja systemaattinen virhe	30
6.4	Laajennettu mittausepävarmuus.....	31
6.5	Ajan ja lämpötilan vaikutus säilyvyyteen	32
6.6	Yhteenvedo validoinnista	33
7	POHDINTA.....	34
	LÄHTEET	35
	LIITTEET	37
	LIITE 1. Toteamis- ja määrittysraja-arvot.....	37
	LIITE 2. Toteamisrajamittaus	38
	LIITE 3. Toistettavuus	39
	LIITE 4. Ajan ja lämpötilan vaikutus syanidin säilyvyyteen	41

LIITE 5. Syanidin säilyvyys.....	42
LIITE 6. Detektorin vasteet.....	44

1 JOHDANTO

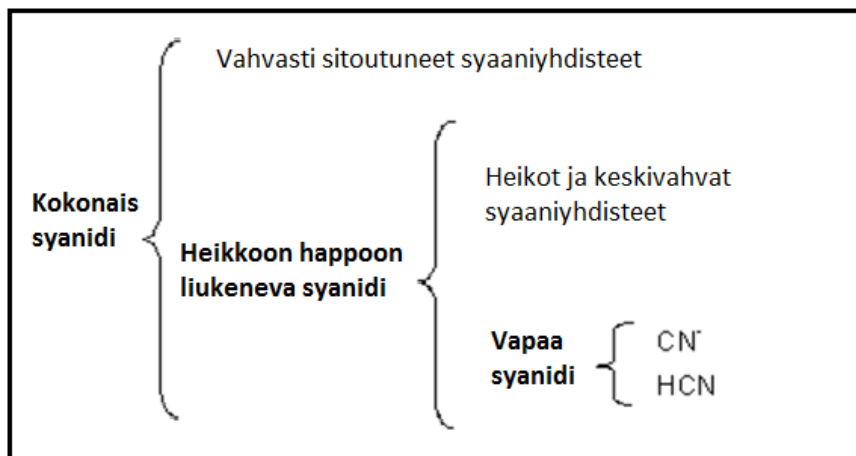
Tämä opinnäytetyö tehtiin Puolustusvoimien tutkimuslaitoksessa Ylöjärven yksikössä toimivassa Räjähde- ja suojelutekniikan osastoon kuuluvassa Keskuslaboratoriossa. Työn tarkoituksena oli saada validointiin vaadittavat mittaukset suoritettua sekä kehittää menetelmä kirjallisuuden pohjalta. Työn tavoitteena oli kehittää ja validoida ionikromatografinen menetelmä syanidi-ionin määrittämiseksi vedestä, koska kyseiselle anionille ei ollut vielä olemassa määrittämenetelmää Puolustusvoimien Tutkimuslaitoksessa.

Työssä käytettiin pohjana laitevalmistajan Dionex menetelmäohjetta ”Direct determination of cyanide in drinking water by ion chromatography with pulsed amperometric detection (PAD)” (Application note 173). Ionikromatografi, jolla validointi suoritettiin, oli menetelmäohjeiden mukainen, pieniä poikkeuksia lukuun ottamatta. Esimerkiksi kolonnien sisähalkaisija validoinnissa käytetyssä laitteistossa oli 4 mm (menetelmä ohjeissa 2 mm), eikä työelektrodi ollut kertakäyttöinen. Validointimittauksissa käytettiin itse valmistettuja standardi- ja kontrolliliuoksia. Menetelmän ajoparametrejä muutettiin validoinnin aikana ja validoinnissa esitetään tulokset kahdella erikokoisella näytesilmukalla, joiden tilavuudet olivat 10 ja 25 µl.

Opinnäytetyö koostui validoinnin teoreettisesta osuudesta, kokeellisista mittauksista, tulosten tilastollisesta käsittelystä sekä validointiraportin kirjoittamisesta. Validointiraporttia voi laboratorio käyttää apuna ja pohjana tulevissa syanidianalyysissä.

2 SYANIDI

Syanidista puhuttaessa tarkoitetaan yleisesti yhdisteitä, joissa esiintyy syanidi-ioni CN^- . Syanidi-ionin kemiallinen sitoutuminen yhdisteisiin voidaan jakaa kolmeen eri luokkaan kuvion 1 mukaisesti sitoutumisen vahvuuden perusteella. Vapaa syanidi on syanidin sekä syanidi-ionien summa ja voidaan mitata emäksisistä liuoksista ilman suurempia näytteenkäsittelyjä. Heikkoon happoon liukenevaa syanidia mitattaessa pH on heikosti happaman puolella, jolloin heikot syanidiyhdisteet hajoavat ja vapaan syanidin määrä kasvaa. Kokonaissyanidia mitattaessa käytetään yleensä vahvoja happoja sekä UV-valoa hajottamaan vahvatkin syanidiyhdisteet kokonaissyanidin määrittämiseksi. (Miessler & Tarr 2004, 474; Wallschlager 2001, 1.)



KUVIO 1. Syanidin luokitus (MEP Instruments 2014, 1, muokattu)

2.1 Myrkyllisyys

Sinihapon eli vetysyanidin hengittäminen on tappavaa ihmisille noin 1,1 mg/kg pitoisuudessa. Suonensisäinen tai nieltynä tappava annos kiinteää natrium- tai kaliumsyanidia on noin 0,1 – 0,2 mg/kg. Syanidillä on suuri taipumus muodostaa yhdisteitä rikin tai raudan kanssa, ja tähän perustuukin sen myrkyllisyys. Ihmisen altistuessa syanidille, sitoutuu syanidi-ioni solujen mitokondrioiden sytokromioksidaaseihin estäen näin soluhengityksen. Syanidiyhdisteitä esiintyy luonnossa yleisesti esimerkiksi hedelmissä ja siemenissä, kuten manteleissa ja persikoissa. Näitä syödessä voi mahalaukun happamissa oloissa muodostua vetysyanidiä. (United States Army: Medical Research Institute 1995.)

Ihminen metabolisoi syanidia noin $17 \text{ Fg/kg} \times \text{min}$, muuttaen syanidin vaarattomaksi tiosyanaatiksi, joka erittyy virtsan mukana pois. Mittaamalla virtsan tiosyanaattipitoisuutta voidaankin arvioida ihmisen altistumista syanidille. Koska ihminen pystyy käsittelemään syanidia pienissä pitoisuuksissa, on syanidin myrkyllisyys paljon vaarallisempaa suurena annoksena lyhyessä ajassa, kuin sama annos pitkällä aikavälillä. Tämä ei päde esimerkiksi taistelukaasuille, jotka aiheuttavat kuoleman tappavan annoksen ylittyessä, ajasta riippumatta. Syanidi vaikuttaa hitaasti. Esimerkiksi 15 sekunnin aikana hengitetty tappava annos syanidia tappaa noin 6 – 8 minuutin sisällä, joka mahdollistaa vasta-aineen antamisen henkilön pelastamiseksi. Vasta-aineena voidaan käyttää natriumnitriittiä tai natriumtiosulfaattia suonensisäisesti tai isoamyylinitriittiä hengitettynä. (United States Army: Medical Research Institute 1995.)

2.2 Käyttökohteet

Syanidin käyttö maailmanlaajuisesti on kasvanut vuosittain ja vuonna 2012 koko tuotanto oli noin 800 000 tonnia natriumsyanidia. Syanidin kulutus on kasvanut varsinkin Aasiassa Kiinan teollistuessa ja kaivostuotannon kasvaessa. Syanidia käytetään paljon kaivosteollisuudessa arvometallien rikastamisessa. Sitä käytetään myös metalli-, väriaine-, ja lääketieteellisyydessä sekä maatalouskemikaaleissa huomattavia määriä. (Merchant Research & Consulting 2013.)

2.3 Häiriötekijöitä ja näytteen esikäsittely

Syanidin määrittäminen on haasteellista, koska syanidi on hyvin reaktiivinen ja muodostaa yhdisteitä lukemattomien eri aineiden vaikutuksesta. Syanidi myös haihtuu vetysyanidiksi helposti mikäli pH on alle 12. Emäksisissä liuoksissakin syanidi reagoi hitaasti veden kanssa muodostaen ammoniakkia ja formiaattia (HCOO^-). Näin ollen varsinkin vapaan syanidin määrittäminen on erittäin vaikeaa, koska näytteenoton ja analyysin suorituksessa käytetyssä ajassa voi syanidi reagoida epäpuhtauksien kanssa pienentäen saantoa tai heikot syanidi yhdisteet voivat hajota ja kasvattaa vapaan syanidin määrää. (Adams 1990; Method 9016 2010, 3.)

Syanidin haihtumisen estämiseksi käsitellään näytteet yleensä natriumhydroksidilla heti näytteenoton yhteydessä. Natriumhydroksidia lisätään näytteeseen kunnes pH saavuttaa arvon 12, tämä voidaan tarkistaa tavallisella pH indikaattoripaperilla. (Method 9016 2010, 3; ASTM D7365 – 09a, 3.) Ennen näytteen emäskäsittelyä on kuitenkin hyvä testata näytteessä mahdollisesti esiintyvät rikkiyhdisteet, koska nämä voivat emäksisissä olosuhteissa reagoida syanidin kanssa muodostaen tiosyanaattia. Lyijy-asetaatti indikaattoripaperilla voidaan todeta rikkiyhdisteiden esiintyminen näytteessä. Rikkiyhdisteiden eliminoimiseksi voidaan näytteet käsitellä lyijyasetaatilla tai lyijykarbonaatilla. (Method 9016 2010, 9; ASTM D7365 – 09a, 3.)

Hapettavat yhdisteet, kuten kloori, voivat reagoida syanidin kanssa muodostaen syanaattia. Hapettavien yhdisteiden testaamiseen voidaan käyttää kaliumjodiditärkkelys indikaattoripaperia. Näytteet voidaan käsitellä natriumarseniitilla tai natriumtiosulfaatilla hapettavien yhdisteiden poistamiseksi. (Method 9016 2010, 9; ASTM D7365 – 09a, 7.) Syanidin käsittelyssä suositellaan käytettäväksi suuritiheyksisestä polyeteenimuovista valmistettuja astioita, koska kestäväinnissä käytetty natriumhydroksidi voi irroittaa lasiastioista epäpuhtauksia. (Method 9016 2010, 4; ASTM D7365 – 09a, 2.)

Kestäväinnissä käytetyn natriumhydroksidin on myös todettu vaikuttavan syanidimäärityksiin. Jätevesianalyseissä kestäväiityjen ja kestäväimättömien näytteiden pitoisuuksissa on ollut jopa kaksinkertainen ero toisiinsa nähden, vaikka analyysit on suoritettu 15 minuutin sisällä näytteenotosta. (Giudice ym. n.d, 3.)

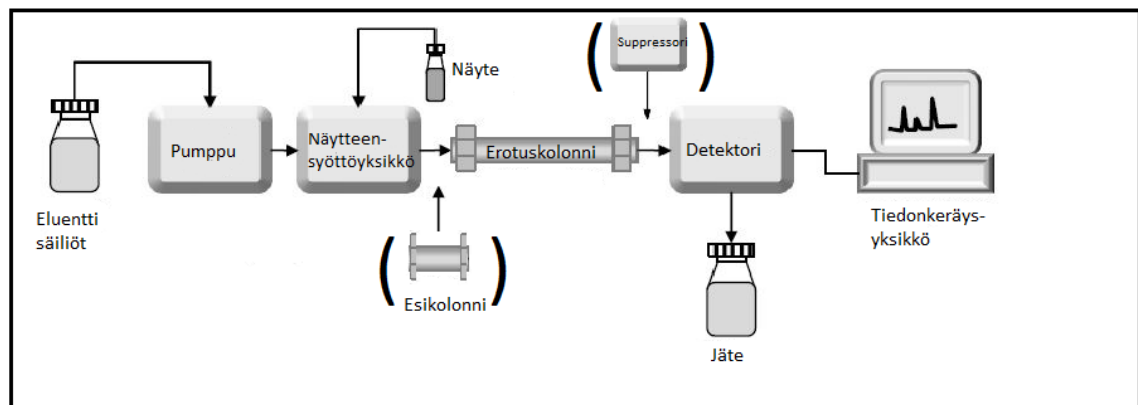
3 IONIKROMATOGRAFIA

Ionikromatografia termiä käytetään kaikissa metodeissa, joissa ioneja erotetaan toisistaan kromatografisesti. Ionikromatografialla voidaan erottaa anioneja tai kationeja monimutkaisista seoksista ja määrittää näiden pitoisuus tarkasti jopa miljoonasosissa. (Fritz & Gjerde 2009, 1.) Ionien erottuminen voidaan aikaansaada monella eri tekniikalla. Yleisimmät nykyisin käytössä olevat tekniikat ovat ioninvaihtokromatografia, ioniparikromatografia, ionieksklusiokromatografia ja käänteisfaasikromatografia. Ionien tunnistaminen ja pitoisuuksien määrittäminen tapahtuu detektoreilla, jotka voivat perustua ionien erilaisiin ominaisuuksiin, kuten esimerkiksi sähkönjohtokykyyn, elektrokemiallisiin reaktioihin, potentiometriaan tai spektroskopiaan. (Haddad & Jackson 1990, 7.)

Ionikromatografia on suosittu ja paljon käytetty analyysimenetelmä. Ionikromatografian etuja muihin analyysimenetelmiin ovat nopeat analyysiajat, kvantitatiiviset ja kvalitatiiviset mittaukset sekä näytteenkäsittelyn helppous. Näytteenkäsittelyyn riittää usein pelkkä suodatus sekä laimennos. (Fritz 2009, 1.)

3.1 Ionikromatografialaitteiston periaate

Ionikromatografialaitteiston tarkoituksena on liittää näyte eluenttivirtaukseen, joka kuljettaa näytteen erotuskolonniin läpi detektorille. Kuviossa 2 nähdään yksinkertainen kaavio elementeistä, joista ionikromatografiset laitteistot tyypillisesti koostuvat. Eluentti eli mobiilifaasi virtaa jatkuvana virtauksena laitteistossa analyysien aikana ja kuljettaa näytteen muiden yksiköiden lävitse detektorille. Eluenttiosio koostuu usein useista säiliöistä, jotka sisältävät analyysistä riippuen erilaisia mobiileja faaseja. (Fritz 2009, 24; Haddad 1990, 79.)



KUVIO 2. Ionikromatografian rakenne (Dionex. 2002, 5, muokattu)

Pumppuosion tarkoituksena on tuottaa tarkka ja tasainen eluentivirtaus halutulla nopeudella. Osista löytyy usein myös sekoitin, jolla voidaan useista eri eluenteista säätää halutunlainen mobiilifaasi. Mikäli analyysin aikana eluentin seossuhdetta muutetaan, on kyseessä gradientt ajo. Seossuhteen pysyessä vakiona on kyseessä isokraattinen ajo. (Fritz 2009, 26; Haddad 1990, 1.)

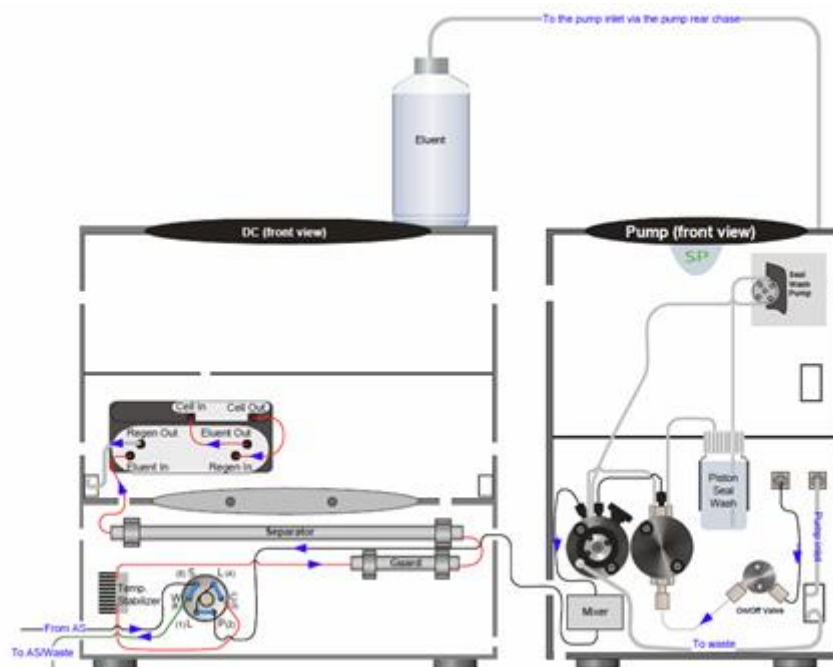
Näytteen-syöttöyksikön kautta injektoidaan näyte eluentivirtaukseen. Yksikköön kiinnitetään näytesilmukka, joka täytetään analysoitavalla nesteellä joko manuaalisesti tai automaattisesti niin sanotulla autosampler:lla. Näytesilmukan koko on yleensä 1 – 100 µl, joka samalla määrittää injektoidun näytteen tilavuuden. (Fritz 2009, 30; Haddad 1990, 1.)

Kolonniosio koostuu yleensä erotuskolonniasta ja esikolonniasta. Esikolonnin tarkoituksena on suojata erotuskolonnia sitomalla itseensä näytteen ja eluentin epäpuhtaudet parantaen näin mittaustarkkuutta. Tämä kasvattaa yleensä retentioaikoja noin 20 %. Erotuskolonniassa pääasiassa tapahtuu näytteen yhdisteiden erottuminen, johon eluentin koostumuksella ja virtausnopeudella on suurin vaikutus. (Fritz 2009, 31; Haddad 1990, 5.)

Suppressoria käytetään pienentämään suurta taustan kohinaa, joka voi olla hyvinkin suuri käytetystä eluentista riippuen. Suppressori vaimentaa taustan kohinaa muuttamalla käytetyn eluentin sisältämät H^+ - tai OH^- ionit vedeksi. (Fritz 2009, 33; Haddad 1990, 25.)

Detektorilla näytteestä mitataan erottuneiden yhdisteiden pitoisuudet. Detektoreita on monia erilaisia ja eri tekniikoihin perustuvia. Suosituin on johtokykydetektori, joka on tarkka ja toistettava detektori ja soveltuu hyvin monien eri yhdisteiden mittaamiseen. Suppressoria käyttämällä johtokykydetektorin herkkyyttä saadaan parannettua huomattavasti, lukuunottamatta heikosti emäksisiä anioneita, joiden johtokyky laskee suppressoria käytettäessä. (Fritz 2009, 34; Haddad 1990, 245.)

Tiedonkeräysyksikössä detektorin mitaamat signaalit kerätään ja prosessoidaan kromatogrammeiksi. Yksikkö koostuu tietokoneesta, johon on asennettu laitekohtaiset ohjelmat, joilla mitatut signaalit saadaan analysoitua. (Fritz 2009, 35.) Kuvio 3 näkyy poikkileikkauskuvana Dionexin valmistamasta ICS-5000 ionikromatografilaitteistosta.



KUVIO 3. Poikkileikkauskuvana ionikromatografilaitteistosta (Dionex 2010, 133, muokattu)

3.2 Elektrokemialliset detektorit ja amperometria

Elektrokemialliset detektorit luokitellaan kolmeen kategoriaan: jännite, virta ja resistiivisyys. Detektoreista puhuttaessa näistä käytetään nimityksiä potentiometrinen-, konduktometrinen- ja amperometrinen detektori. (Fritz 2009, 86.) Amperometrisella detektorilla mitataan yhdisteen ominaisuutta hapettua tai pelkistyä detektorin

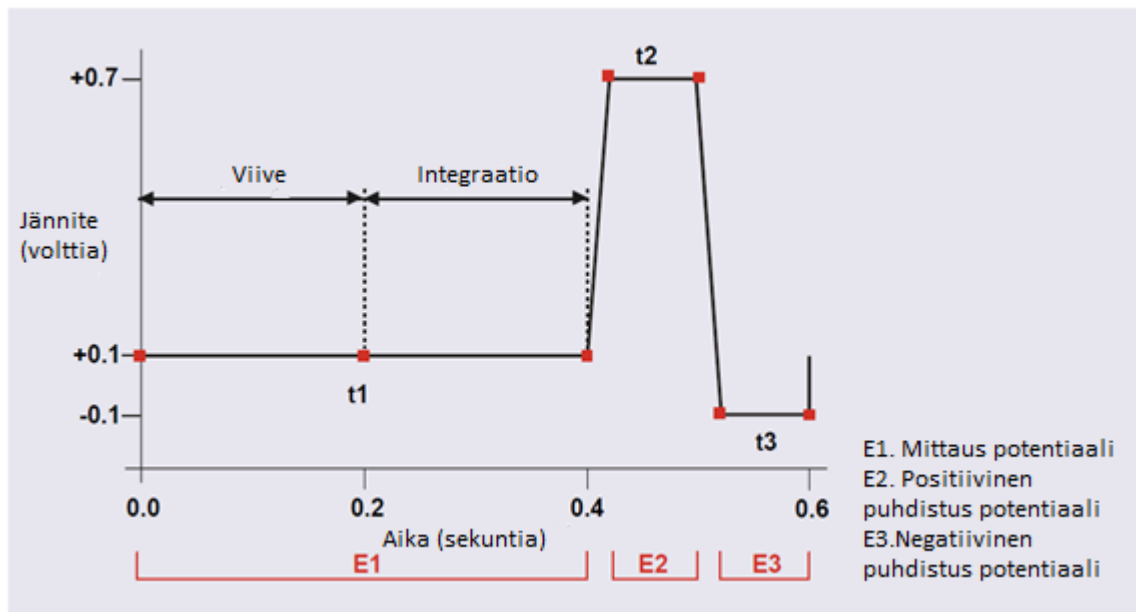
työelektrodilla. Näytteen hapettuminen tai pelkistyminen työelektrodilla aiheuttaa sähkövirran, joka kulkee vastaelektrodia pitkin mitattavaksi. Mitattua virtaa verrataan referenssielektrodin vakioituun potentiaaliin. Potentiaalien erotuksesta voidaan laskea mitatun näytteen pitoisuus. (Haddad 1990, 292.)

Yleensä amperometriassa työelektrodin pinta on hyvin pieni ja tästä johtuen vain pieni osa (yleensä alle 10 %) näytteestä saadaan reagoimaan. Mikäli työelektrodin pinta on suuri ja kaikki näyte saadaan reagoimaan, puhutaan tällöin coulometriasta. Coulometrisessä detektorissa voidaan saada parempi herkkyys amperometriaan verrattuna, mutta myös taustan vaikutus korostuu, jonka seurauksena saatu hyöty voi jäädä todella pieneksi. Coulometriset detektorit ovat myös kalliimpia ja monimutkaisempia. (Haddad 1990, 292 – 297; Fritz 2009, 87.)

Amperometriassa detektorin elektrodissa pidetään jännite vakiona. Tämä saa aikaan detektorin ohi virtaavien yhdisteiden hapettumisen tai pelkistymisen työelektrodille. Elektroodin jännite valitaan tutkittavan yhdisteen sekä työelektrodin materiaalin mukaan. Tietyt yhdisteet, kuten syanidi ja sulfidi, likaavat työelektrodin pinnan ja tästä seuraa asteittainen herkkyyden pienentyminen. Likaantumisessa työelektrodin pintaan kertyy näytteiden mittauksessa syntyviä reaktiotuotteita, jotka estävät tulevien näytteiden mittaukset. Tämän johdosta työelektrodit on jouduttu kunnostamaan usein. (Fritz 1990, 89; Dionex 2009, 25; Haddad 1990, 301.)

3.3 Pulssiamperometria

Työelektrodien likaantumista estämään on kehitetty pulssiamperometria. Pulssiamperometriassa työelektrodin jännite käy läpi ennalta määritetyn pulssin, jossa kuvion 4 mukaisesti jännitettä vaihdellaan pulssin sisällä. E1-vaiheessa elektrodissa vaikuttaa jännitepotentiaali, jonka aikana mitataan hapettuvat tai pelkistyvät yhdisteet. Mittauksen jälkeen elektrodiin johdetaan E2-vaiheessa mittausjännitettä suurempi jännitepotentiaali, jonka tarkoituksena on hapettaa epäpuhtaudet pois. E3-vaiheessa elektrodissa vaikuttaa mittauspotentiaalia vähäisempi jännite, mikä pelkistää epäpuhtaudet pois. E3-vaihe myös valmisteleo elektrodin seuraavaa mittausta varten, joko aktivoimalla elektrodin pinnan (pelkistää elektrodin) tai konsentroimalla näytettä valmiiksi elektrodin pintaan. Pulssit toistuvat koko mittausjakson ajan. (Haddad 1990, 302; Fritz 2009, 91; Dionex 2010, 100.)



KUVIO 4. Pulssiamperometrisen aaltomuodon esimerkki (Dionex 2010, 100, muokattu)

4 VALIDOINTI

Validointi on analyysimenetelmän luotettavuuden ja tulosten tarkkuuden testaamista halutulla tasolla. Yleensä asiakkailla on tarkat vaatimukset tulosten tarkkuuksille ja validoinnilla laboratoriot voivat todistaa asiakkaalle tulosten olevan tarpeita vastaavat. Validointi koostuu suunnitelmasta, kokeiden suorituksesta, tulosten tilastollisesta arvioinnista ja dokumentoinnista. Kemian analytiikassa validointi kohdistuu kaikkiin menetelmän vaiheisiin ja pätee vain testatuille matriiseille, pitoisuusalueille, laitteille sekä analyyyteille. Mikäli menetelmään tehdään muutoksia, on validointi suoritettava näiltä osin uudestaan tulosten luotettavuuden varmistamiseksi. (Mäkinen 1996, 6; Fritz 2009, 335.)

4.1 Validointisuunnitelma

Validointisuunnitelmassa määritetään validoinnin taso ja laajuus, minkä johdosta suunnitelma tehdään yleensä mahdollisimman aikaisessa vaiheessa. Validointisuunnitelmassa on hyvä olla validoinnin taso, tarkoitus ja tavoitteet sekä halutut ominaisuudet. Haluttuja ominaisuuksia ovat esimerkiksi lineaarisuus, tarkkuus, toistettavuus ja raja-arvot. Validointiin käytettävä laitteistokokonaisuus yksilöidään, jottei validoinnin aikana satu sekaantumisia samanlaisten laitteiden kanssa. Koesarjat ja näistä halutut parametrit selvitetään tarkasti, ettei validointi jäisi puutteelliseksi. Menetelmä ja itse validointisuunnitelma saattavat usein muuttua validoinnin edetessä. (Mäkinen 1996, 7.)

4.2 Validoinnin parametrit

Pitoisuuksia määrittäessä validoitavia parametrejä ovat yleensä selektiivisyys, lineaarisuus, säilyvyys, tarkkuus ja määrittämissä raja-arvo. Menetelmästä ja analysoiduista näytteistä riippuen voidaan tulosten luotettavuuden varmistamiseksi myös määrittää muita ominaisuuksia, kuten toteamisraja-arvo, toistettavuus, häiriöalttius, uusittavuus, mittausepävarmuus. (Bièvre 2005, 2; Mäkinen 1996, 6.)

4.2.1 Lineaariset mittausalueet

Kvantitatiivisille mittausmenetelmille on yleensä tarpeellista määrittää lineaariset mittausalueet, joissa tutkittavan yhdisteen pitoisuudella ja mittalaitteen antamalla vasteella on lineaarinen yhteys. Mittausalueen alapäänä pidetään yleensä määritysraja-arvoa ja loppupäänä mittalaitteen detektio-ominaisuuksia eli kykyä havainnoida analyytin pitoisuuden muutoksia. Mittausalue voi sisältää useita lineaarisuusalueita, joissa käytetään erilaista suoran sovitus. Käytetyimmät sovitukset ovat ensimmäisen asteen ja toisen asteen sovitukset. Suoran sovitukseen käytetään ensisijaisesti yhtälöä, joka soveltuu parhaiten tutkittavaan pistejoukkoon. (Mäkinen 1996, 16 – 17.)

Lineaarisuutta voidaan arvioida laskemalla regressioanalyysillä käytetylle suoralle korrelaatiokerroin r , joka kertoo kuinka paljon y :n muutoksesta x :n funktiona selittyy havaintomateriaalista lasketulla lineaarisella mallilla. Selitysaste r^2 arvo lähenee yhtä, jos muuttujien välillä on selvä yhteys. Lineaarisuuden arviointiin usein käytetty tapa on myös residuaalien tarkasteleminen. Residuaalit ovat regressiosuoran avulla laskettujen y :n arvojen erotuksia mitatuista y :n arvoista, joista piirretään kuvaaja x :n funktiona. Jos kalibrintisuora on lineaarinen, ovat pisteet jakaantuneet nollatason molemmiin puolin. Mikäli pisteet muodostavat selvän käyrän, tulisi suoran sovituksessa käyttää toisen asteen yhtälöä. (Mäkinen 1996, 16 – 18.)

4.2.2 Toteamis- ja määrittäysraja

Toteamisrajalla tarkoitetaan pienintä analyysin pitoisuutta, joka voidaan luotettavasti erottaa taustan kohinasta. Määrittäysraja taas kertoo analyysin pienimmän määritettävän pitoisuuden, joka voidaan mitata tarpeellisella tarkkuudella ja luotettavuudella. Näiden arvojen määrittämiseksi on monia eri menetelmiä ja tapoja. Yksi tapa on mitata useita rinnakkaismäärittäyksiä näytteistä, jotka eivät sisällä määritettävää yhdistettä tai sisältävät määritettävää yhdistettä hyvin vähän. Mitatuista näytteistä lasketaan keskihajonta (s), jota käytetään seuraavissa kaavoissa 1 ja 2 toteamis- ja määrittäysraja arvojen laskemiseksi. (Mäkinen 1996, 26; Bièvre 2005, 5 – 6.; Analytical Detection Limit Guidance 1996, 3 – 4.)

$$\text{LOD} = s * t\text{-arvo} \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = s * 10 \quad (2)$$

joissa s on näytteiden keskihajonta
 t -arvo löytyy Studentin t -arvo taulukosta näytemäärä $n-1$ kohdalta, halutulla todennäköisyydellä (yleensä 95 tai 99 %)
 LOD on toteamisraja
 LOQ on määrittäysraja.

Toteamis- ja määrittäysrajanäytteen pitoisuuden soveltuvuutta voidaan testata viiden pisteen testillä, jolla selvitetään, ettei näyte ole ollut liian pieni tai suuri. Kyseinen testi sisältää seuraavat vaiheet:

- 1. Ylittääkö näyte $10 * \text{määritetty toteamisraja}$?
- 2. Ylittääkö määritetty toteamisraja käytetyn näytteen pitoisuuden?
- 3. Osuuko määritetty toteamisraja asetettuihin tavoitteisiin?
- 4. Onko signaali-kohinasuhde sopivalla alueella?
- 5. Ovatko näytteen saantoprosentit sopivat?

Tärkeimmät näistä testeistä ovat 1 – 3. Mikäli menetelmälle ei ole asetettu tavoitetta toteamis- tai määrittäysrajoille, voidaan kolmas kohta unohtaa. Kohtia 4 – 5 voidaan käyttää arvioimaan tulosten laatua. (Analytical Detection Limit Guidance 1996, 11 – 12.)

4.2.3 Spesifisyys ja selektiivisyys

Spesifisyys- ja selektiivisyystesteillä on tarkoitus varmistua siitä, että menetelmällä mitataan tutkittavaa analyyttiä ja että mitattu signaali on peräisin ainoastaan tutkittavasta yhdisteestä. Spesifinen menetelmä tuottaa vasteen vain tutkittavalle analyyttille, vaikka näytteessä esiintyisi muita yhdisteitä tai epäpuhtauksia. Menetelmä voi olla spesifinen, vaikka tutkittavan analyytin seassa on muita aineita, kunhan nämä eivät vaikuta mitattuun vasteeseen. Epäpuhtauksien erottaminen analyytistä ei ole tällöin tarpeellista. (Bliesner 2006, 10; Mäkinen 1996, 9.)

Selektiivisyystermi sekoitetaan usein spesifisyyteen, vaikka näillä teknisesti ottaen on selvä ero. Selektiivisyydestä puhuttaessa tarkoitetaan laitteen tai menetelmän kykyä erottaa ja tunnistaa tutkittavan näytteen kaikki yhdisteet, myös epäpuhtaudet. (Bliesner 2006, 10; Bièvre 2005, 2.)

Analyysimenetelmän spesifisyyteen voivat vaikuttaa näytematriisissa esiintyvät yhdisteet, mikäli nämä häiritsevät mittalaitteen herkkyyttä analyytin suhteen (matriisihäiriö) tai vaikuttavat mittaavan ilmaisimen toimintaan (häirintä). Matriisihäiriöitä on liki mahdotonta aukottomasti testata validoinnin yhteydessä, joten spesifisyyttä ja selektiivisyyttä joudutaan usein testaamaan analysoitavien näytteiden mukaan. (Mäkinen 1996, 9; Bliesner 2006, 10.)

4.2.4 Herkkyys

Herkkyydellä tarkoitetaan menetelmän kykyä havaita näytepitoisuuksien pienet vaihtelut. Menetelmä on herkkä, mikäli pieni muutos pitoisuudessa aiheuttaa suuren muutoksen detektorin vasteessa. Herkkyys määritetään kalibrointisuoran kulmakertoimen avulla. Linearisessa kalibroinnissa herkkyys on vakio koko pitoisuusalueella ja tällöin herkkyys on sama kuin kalibrointisuoran $y = ax + b$ kulmakerroin (a). Epälinearisella kalibroinnilla herkkyys vaihtelee eri pitoisuuksilla ja se lasketaan toisen asteen yhtälön ensimmäisen derivaatan mukaan. (Mäkinen 1996, 28.)

4.2.5 Toistettavuus

Toistettavuudella tarkoitetaan mittaustulosten yhtäpitävyyttä, kun mittaukset tehdään lyhyen aikavälin sisällä samalla menetelmällä mukaanlukien kaikki näytteenkäsittelyn eri vaiheet. Toistettavuuteen vaikuttavat mittalaitteen ja näytteenkäsittelyssä tapahtuvat pienet variaatiot, joiden arviointiin käytetään mittausten keskihajontaa. Toistettavuudessa arvioidaan menetelmän, laitteen ja analyysoijan aiheuttamia variaatioita tuloksiin. (Mäkinen 1996, 40; Bliesner 2006, 10.)

Menetelmän toistettavuutta voidaan arvioida analysoimalla erityyppisiä näytteitä rinnakkaismäärittäyksin useana päivänä. Mittaustulokset toistettavuusanalyseissa käsitellään yleensä varianssianalyseilla. Varianssianalyseilla selvitetään tulosten hajonta määrityssarjojen sisällä, määrityssarjojen välillä sekä kokonaisvarianssi. Kokonaisvarianssi saadaan alla olevan kaavan 3 mukaan. Variansseille saadaan laskettua suhteellinen hajonta kaavalla 4. Sarjojen väliseen hajontaan vaikuttavat suuresti määritetyssä kalibroitaisuorassa tapahtuneet muutokset ja sarjan sisäiseen hajontaan voivat vaikuttaa näytteenkäsittelyssä tapahtuneet muutokset, esimerkiksi kontaminaatiot. (Mäkinen 1996, 41 - 45; Fritz 2009, 348.)

$$s_t^2 = s_w^2 + s_b^2 \quad (3)$$

$$s_x\text{-\%} = \frac{\sqrt{s_x^2}}{\bar{x}} * 100 \quad , \quad (4)$$

joissa s_t^2 on tulosten kokonaisvarianssi
 s_w^2 on sarjan sisäinen varianssi
 s_b^2 on sarjojen välinen varianssi
 $s_x\text{-\%}$ on suhteellinen hajonta
 \bar{x} on tulosten keskiarvo.

4.2.6 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus on arvio, millä ilmoitetaan rajat, joiden sisällä mitattu arvo halutulla todennäköisyydellä todellisuudessa on. Yleensä todennäköisyysrajoiksi valitaan 95 %. Mittausepävarmuus antaa käsityksen tulosten laadusta. Mitä tarkemmat rajat voidaan tulokselle antaa, sitä parempia tulokset ovat. Mittausepävarmuutta arvioitaessa tulisi ottaa huomioon kaikki mittaukseen vaikuttavat epävarmuustekijät. (Mäkinen 1996, 29, 53- 55.)

Mittausepävarmuus lasketaan yhdistämällä yksittäiset epävarmuustekijät yhteen, jolloin saadaan kokonaisepävarmuus eli yhdistetty mittausepävarmuus kaavan 5 mukaisesti. Kokonaisepävarmuudesta voidaan edelleen laskea laajennettu epävarmuus. Laajennettu epävarmuus 95 % luotettavuusvälillä saadaan kertomalla kokonaisepävarmuus luvulla 2. (Mäkinen 1996, 53 – 55.)

$$u_c = \sqrt{\sum u_i^2} \quad , \quad (5)$$

jossa u_c on yhdistetty mittausepävarmuus
 u_i on yksittäiset epävarmuustekijät.

4.2.7 Tarkkuus

Tarkkuus käsitettä käytetään silloin, kun menetelmällä pyritään saamaan todellisia pitoisuuksia näytteistä. Menetelmän tarkkuus on tulosten yhtäpitävyyttä todellisen tai hyväksytyyn arvon kanssa. Analyysitulokset halutaan saada mahdollisimman tarkoiksi ja todellisiksi. Tarkkuuteen vaikuttaa systemaattisten virheiden sekä satunnaisvirheiden summa, josta käytetään nimitystä kokonaisvirhe. Tarkkuus määritetään yleensä varmennetuilla vertailumateriaaleilla, joiden pitoisuus on tarkasti selvillä. Tarkkuus lasketaan mittauksen poikkeamana todellisesta vertailumateriaalin pitoisuudesta ja ilmoitetaan yleensä prosentteina. Tarkkuuden laskemiseen käytetään alla olevaa kaavaa 6. (Mäkinen 1996, 33.)

$$\text{Tarkkuus- \%} = \frac{|x - \mu|}{\mu} * 100 \quad , \quad (6)$$

jossa x on analyysitulosten keskiarvo
 μ on todellinen pitoisuus.

Systemaattisen virheen merkitsevyyttä voidaan testata käyttämällä t-arvotestiä seuraavan kaavan 7 mukaan.

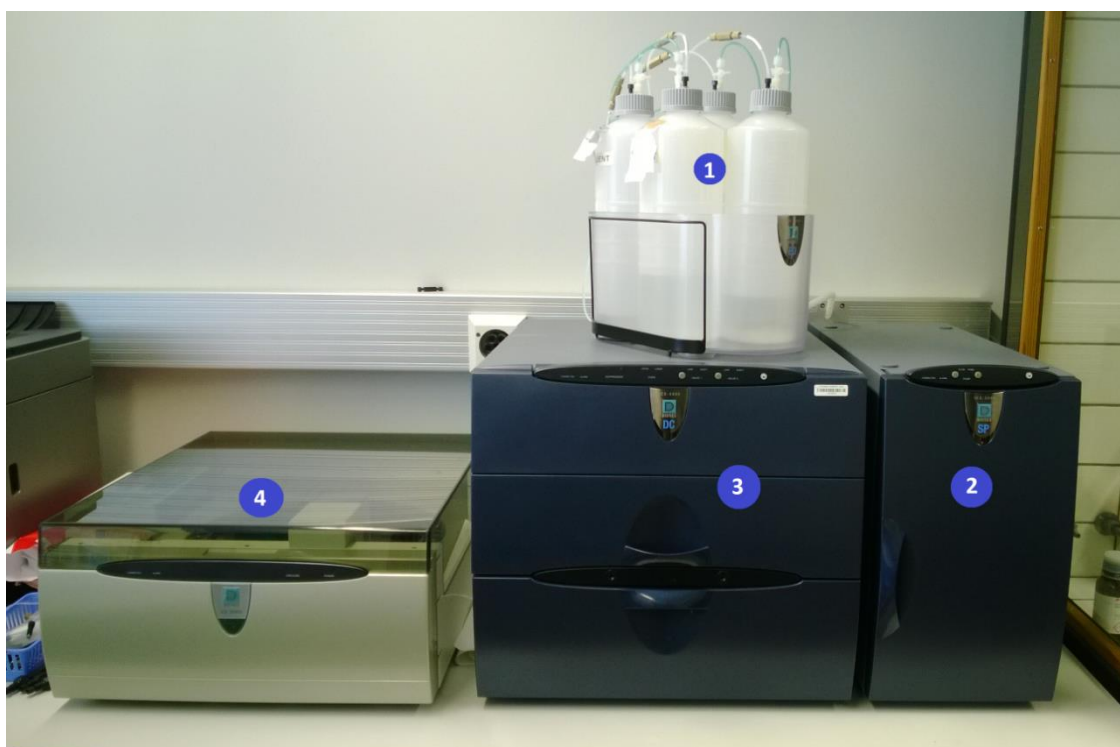
$$t = \frac{|\bar{x} - \mu|}{\frac{s}{\sqrt{n}}} \quad , \quad (7)$$

jossa \bar{x} on tulosten keskiarvo
 μ on todellinen arvo
 s on tulosten keskihajonta
 n on mittausten lukumäärä.

Systemaattisen virheen merkitsevyys saadaan vertaamalla laskettua t-arvoa Studentin t-jakauma taulukon arvoihin. T-arvo haetaan taulukosta 2-suuntaisen testauksen arvoista halutun todennäköisyyskertoimen mukaan ja käyttämällä vapausastetta $n-1$. Mikäli laskettu t-arvo on suurempi kuin taulukoitu t-arvo, voidaan systemaattista virhettä pitää merkitsevä. (Mäkinen 1996, 33 – 35.)

5 TYÖN KOKEELLINEN OSA

Opinnäytetyö tehtiin Puolustusvoimien tutkimuslaitoksen keskuslaboratorion Dionex ICS-5000 ionikromatografialaiteistolla. Laite on hankittu kyseisiin tiloihin vuoden 2011 alkupuolelta. Laitteella määritetään yleensä, työtilauksista riippuen, joko anioneita tai kationeita suppressoidusti. Laitteen mukana on myös ostettu pulssiamperometrinen detektori, jota käytetään silloin kuin johtokykymittaus ei sovellu määritettävälle ionille. Kyseisellä laitteella ei ennen opinnäytetyön tekemistä ollut käytetty pulssiamperometrinen detektoria ja opinnäytetyön yhtenä tarkoituksena olikin selvittää kyseisen detektorin toimintaa. Kuvassa 1 nähdään validoinnissa käytetty ionikromatografi. Kuvan kohdassa 1 ovat eluentisäiliöt ja kohdassa 2 pumppu sekä mikseri. Kohdan 3 lämpökontrollonin mahdollistavasta osasto sisältää kolonnit, näytteensyötin, suppressorit sekä detektorit. Viimeisessä kohdassa 4 on laitteeseen liitetty automaattinen näytteensyöttäjä, joka mahdollistaa 50 näytteen automaattisen syötön.



KUVA 1. Validoinnissa käytetty ICS-5000 laitteisto (Kuva: Jorma Sihvonen 2014)

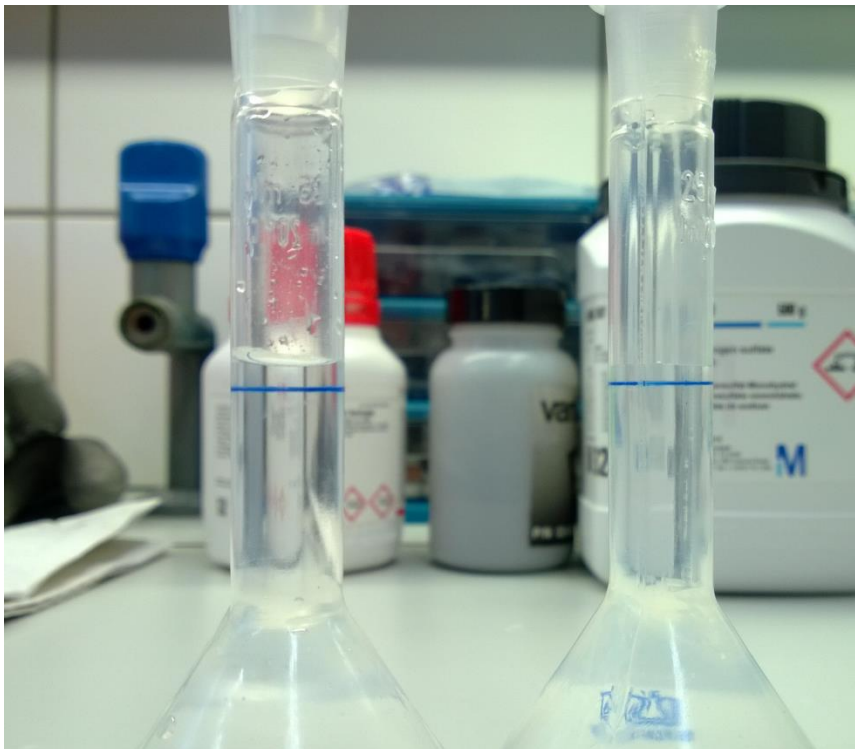
5.1 Käytetyt kemikaalit ja astiat

Työssä käytettiin Merck:n valmistamaa analyysilaatuista 50-prosenttista natriumhydroksidiliuosta, josta valmistettiin töihin tarvitut 0,1 M NaOH-liuokset päivittäin näytteiden laimennoksia varten. Laimennosliuoksesta poistettiin kaasut ennen käyttöä ultraäänikäsittelemällä liuosastiaa noin 15 minuutin ajan. Mobiilifaasiksi tarvittava 0,2 M NaOH-liuokset valmistettiin kulutuksesta riippuen joko kerran tai kahdesti viikossa. Myös tälle tehtiin ultraäänikäsitely. Töissä käytetty vesi otettiin Merck Millipore:n valmistamasta Milli-Q puhdasvesilaitteistosta, josta saatu vesi oli tyyppin 1 puhtausluokan täyttävää vettä (veden resistanssi 25 °C on noin 18,2 MΩ*cm). Puhdasvesijärjestelmän puolivuotishuolto oli töitä aloitettaessa viivystynyt jo kahdella kuukaudella ja saatiin huollettua vasta töiden ollessa loppuillaan. Veden laatu oli kuitenkin ehtinyt laskea jo tähän mennessä alle 18,0 MΩ*cm.

Syanidin kantaliuos 1 g/l valmistettiin Alfa Aesar:n valmistamasta ACS laadun granulaarisesta $\geq 95,0$ % natriumsyanidin kiinteistä paloista (CAS 143-33-9). Kantaliuos valmistettiin punnitsemalla 47,11 mg natriumsyanidia ja liuottamalla se 25 ml 0,1 M natriumhydroksidia. Matriisinäytemittauksia varten valmistettiin natriumbromidista, natriumjodidista, natriumsulfiitista, natriumtiosyanaatista sekä natriumtiosulfaatista 1g/l vahvuiset liuokset 25 ml mittapulloihin Milli-Q veteen.

Natriumtetraboraattidekahydraattia käytettiin 0,1 M vahvuisena kolonnien säilytysliuoksena. Kylläistä kaliumkloridia käytettiin Ag/AgCl-referenssielektrodin säilytysliuoksena. Astiat pestiin konepesulla käyttäen tehokasta laboratoriopesua, jossa yhdistyvät sekä emäs että happopesu. Pesuaineet olivat Deconexin valmistamia 22-LIQX (emäs) ja 25-ORGANACID (happo).

Mittapullot töiden alussa olivat uusia BRAND merkkiä A-laadun PMP-materiaalista valmistettuja muovipulloja. Mittapulloja oli kolmea eri kokoa 10, 25 ja 50 ml ja näiden toleranssit olivat 10 ja 25 ml pulloissa $\pm 0,04$ ml sekä 50 ml pulloissa $\pm 0,06$ ml. Validoinnin ollessa loppuillaan havaittiin käytettyjen mittapullojen sisäpintaan jäävän runsaasti nestepisaroita, josta voidaan päätellä PMP-astioiden kastumattoman pintakäsittelyn kärsineen. Tämä nähdään selkeästi alla olevasta kuvasta 2, jossa vasemmalla on paljon käytetty astia ja oikealla vähemmän käytetty. Syynä tähän voi olla liian tehokas konepesu, koska astioita ei pestä käsin hankaamalla.



KUVA 2. Mittapullojen sisäpinta (Kuva: Jorma Sihvonen 2014)

Töissä käytetyt pipetit olivat Thermo Scientificin valmistamia FinnpiPET digital pipettejä, joista käytettiin neljää eri kokoa 5 – 40, 40 – 200, 200 – 1000 ja 1000 – 5000 μ l. Pipetinkärjet olivat myös Thermo Scientificin valmistamia epästeriilejä kärkiä. Mittapullojen merkkiin tasauksissa ja näytepulloihin näytettä annosteltaessa käytettiin epästeriilejä 1 ja 3 ml pasteur-pipettejä. Näytepulloina käytettiin näytteistä riippuen joko 0,5 ml tai 5,0 ml Thermo Scientificin valmistamia PolyVial-pulloja normaaleilla korkeilla. Suodattimina käytettiin 0,2 μ m Whatmanin ruiskusuodattimen päitä 5 ml:n ruiskuilla.

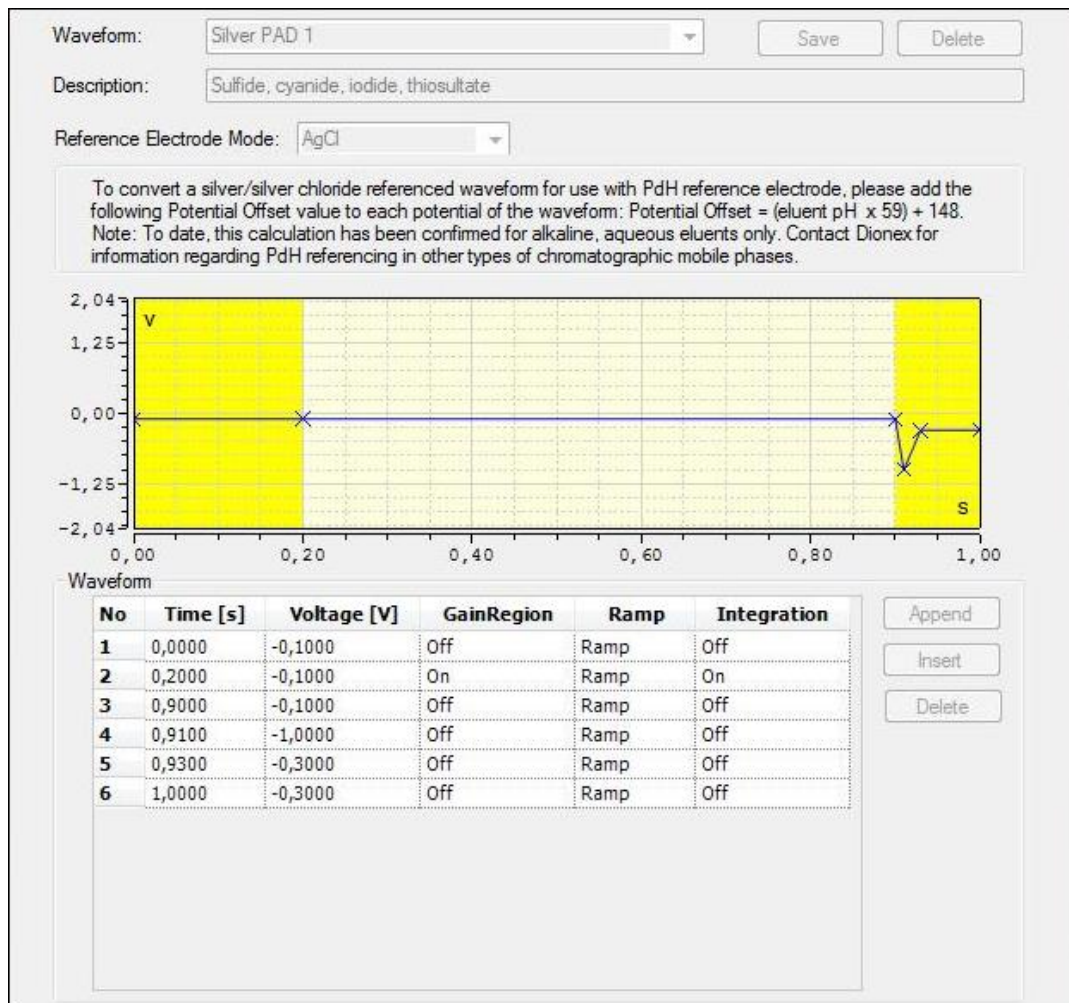
5.2 Ajoasetuksien säätö

Ajoasetuksia lähdettiin testaamaan Dionex Application note 173 ohjeiden mukaisesti ja muokattiin hieman sopimaan paremmin työn tarpeisiin. Dionex:n ohjeissa oli käytetty sisähalkaisijaltaan 2 mm kolonneja, jonka takia virtausnopeus 0,25 ml/min poikkesi työssä käytetystä 1 ml/min, kolonnien sisähalkaisijoiden ollessa 4 mm. Eluentin 63 mM NaOH koostumusta ei työssä muutettu. Lämpötila pidettiin kolonnin ja detektorin sisältävässä modulissa ohjeiden mukaisesti 30 °C asteessa. Tämä lämpötila on myös

suosituslämpötila käytetylle kolonnille näytteen yhdisteiden erottumisen kannalta. Työssä käytettiin AS-15 4×250 mm Ionpac-kolonnia sekä AG-15 4×50 mm Ionpack-esikolonnia. Näytteensyöttäjässä ei ollut mahdollisuutta lämpötilan säätöön, joten tämä oli huoneenlämpöinen, ohjeiden 10 °C sijaan. Näytteensyöttösilmukan kokona käytettiin 25 µl analysoitaessa lineaarisuutta sekä määritysrajoja parempien vasteiden saamiseksi. Silmukka vaihdettiin 10 µl toistettavuusnäytteissä terävämpien piikkien aikaansaamiseksi, koska havaittiin piikkien symmetrisyyden laskeneen tässä vaiheessa oletettavasti työelektrodin likaantumisen johtuen.

Ajoaika ohjeissa oli 25 minuuttia, koska 24 minuutin kohdalla näytteessä eluoituu negatiivinen piikki. Omissa testeissä parhaaksi ajoajaksi todettiin 12 minuuttia, jolloin saatiin negatiivinen piikki eluoitumaan näytteiden välissä häiritsemättä itse mittauksia. Injektionopeudeksi valittiin myös sama 4 ml/min, kuten ohjeissa. Nopeutta 1,6 ml/min testattiin, mutta tällä ei havaittu olevan mitään vaikutusta. Analyyseissä käytettiin suurimmaksi osaksi 0,5 ml näytepulloja 250 µl huuhtelulla, joka mahdollisti kahden näytteen injektoinnin. Toistettavuusnäytteissä käytettiin 5,0 ml pulloja suurempien injektointimäärien takia.

Mittauksissa käytettiin Dionex:n ohjeista poiketen kuvion 5. mukaisia asetuksia mittauspulssissa. Tämä poikkeaa ohjeista vain GainRegion-asetuksen osalta, joka ohjeissa on 0,91 sekuntiin asti päällä. Dionex:n ohjeiden asetuksia käyttämällä mittauksissa ei ollut muuta eroa kuin pohjaviivan kasvu 2.0 nC:lla, joten tarvetta tämän käyttämiseen ei ollut. Alla oleva aaltomuoto syanidin mittaukseen on hopeaelektrodin käyttöohjeen mukaan paras mitattaessa syanidia pienissä sulfidipitoisuuksissa (Product manual for disposable electrodes 2009, 23).



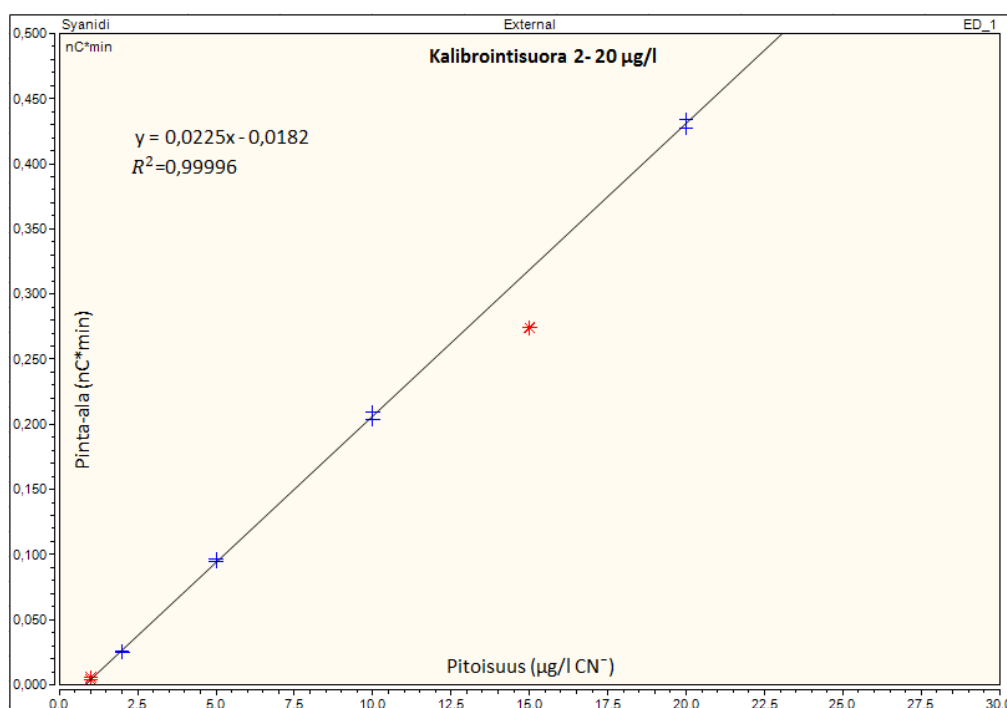
KUVIO 5. Syanidin mittauspulssi (Chromleon 7, 2014, muokattu)

6 TYÖN SUORITUS JA TULOKSET

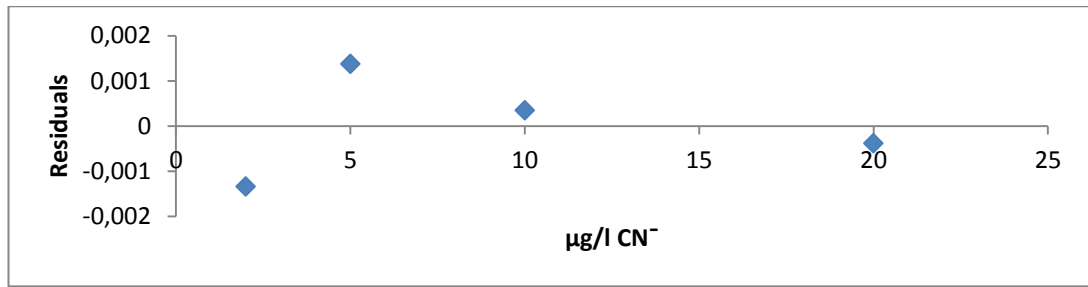
6.1 Lineaarisuus ja herkkyys

Menetelmäohjeessa lineaarisuusalueeksi oli määritetty 2 – 100 $\mu\text{g/l CN}^-$. Validoinnissa lineaarisuuden määrittämiseksi mitattiin kalibroitinnäytteitä alueelta 1 – 1000 $\mu\text{g/l CN}^-$. Kalibroitinnäytteiden pitoisuudet olivat 1, 2, 5, 10, 15, 20, 50, 100, 200, 400, 700 sekä 1000 $\mu\text{g/l CN}^-$. Kalibroitisuorat on piirretty kahden rinnakkaismittauksen tulosten keskiarvojen mukaan. Kalibroitimittauksista voitiin erottaa kaksi lineaarista aluetta, joissa mitatut vasteet saatiin vastaamaan pipetoituja määriä.

Kalibroitinnäytteistä 2 – 20 $\mu\text{g/l CN}^-$ voitiin piirtää suora, joka silmämääräisesti tarkasteltuna kulkee hyvin mittapisteiden kautta. Kalibroitisuora 2 – 20 $\mu\text{g/l CN}^-$ pitoisuusalueella on esitetty kuviossa 6. Kuviosta on jouduttu poistamaan 1 $\mu\text{g/l CN}^-$ kalibroitinnäyte, jonka mitattu vaste jäi liian pieneksi sekä 15 $\mu\text{g/l CN}^-$ kalibroitinnäyte, joka poikkesi suorasta merkittävästi. Kalibroitisuoran korrelaatiokerroin oli 0,99996, josta voidaan päätellä, ettei suoran laadussa ole vikaa. Kuviosta saadaan myös selville herkkyys, joka on kalibroitisuoran kulmakerroin, eli herkkyys $e = 0,0225 \frac{\text{nC}\cdot\text{min}}{\mu\text{g/l}}$.



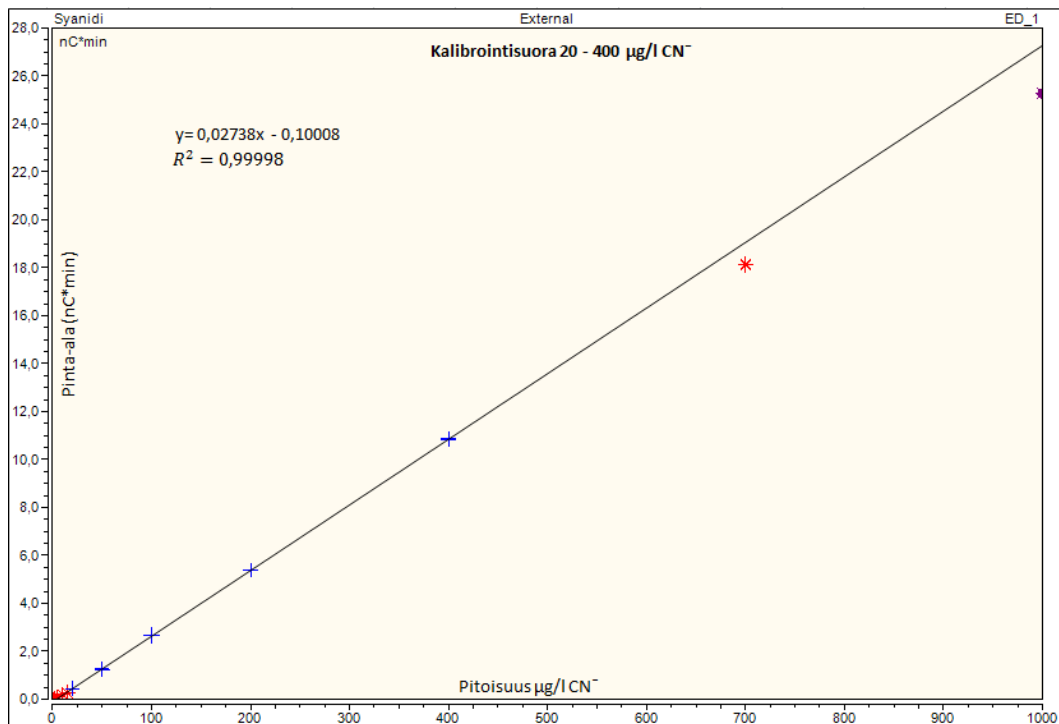
KUVIO 6. 2 – 20 $\mu\text{g/l CN}^-$ kalibroitisuora



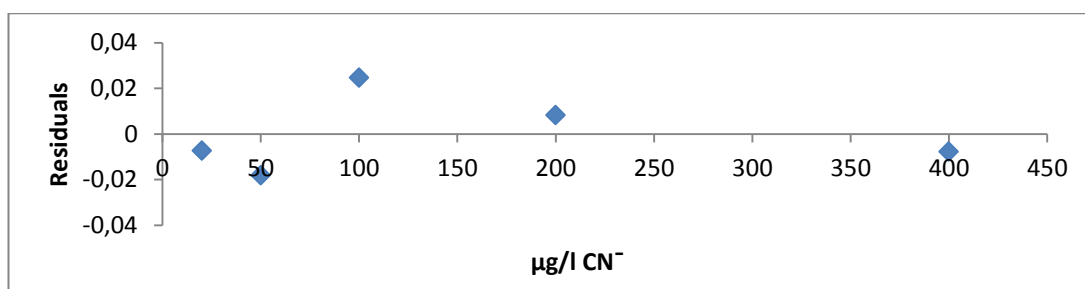
KUVIO 7. 2 – 20 µg/l CN⁻ kalibrintisuoran residuaalit

Kuviossa 7 on esitetty kalibrintisuoran residuaalit. Residuaaleista nähdään, etteivät ne ole jakaantuneet ideaalisesti nollassa molemmin puolin, mutta eivät myöskään muodosta selvää käyrää. Tästä syystä toisen asteen suoran sovitus ei ole tarpeen käyttää. Ensimmäisen asteen lineaarinen sovitus sopii pistejoukkoon parhaiten tässä tapauksessa.

Kalibrintinäytteistä 20 – 400 µg/l CN⁻ piirretty suora on esitetty kuviossa 8. Kuviossa on poistettu näytteet, joiden pitoisuus on suurempi kuin 400 µg/l, koska nämä levenivät liikaa luotettavan tuloksen saamiseksi. Näytteet, joiden pitoisuus oli alle 20 µg/l jäivät suoran ulkopuolelle, eivätkä antaneet luotettavia tuloksia. Kalibrintisuoran korrelaatiokerroin oli hyvä 0,99998 ja herkkyys $e = 0,0274 \frac{nC \cdot min}{\mu g/l}$.



KUVIO 8. 20 – 400 µg/l CN⁻ kalibrintisuora



KUVIO 9. 20 – 400 µg/l CN⁻ kalibrintisuoran residuaalit

Kuvion 9 residuaalien perusteella myös 20 – 400 µg/l CN⁻ kalibrintisuoraan käytetään lineaarista suoran sovitus.

6.2 Määrittys- ja toteamisraja

Toteamis- tai määrittysrajalle ei etuketään asetettu erityisiä tavoitteita. Menetelmäohjeissa toteamisrajalle oli määritetty pitoisuus 1 µg/l CN⁻ ja määrittysrajalle 2 µg/l CN⁻. Menetelmäohjeissa toteamisraja-arvo oli määritetty mittaamalla kohinan korkeus kymmenellä nollanäytteellä ja kerrottu näiden keskiarvo kolmella. Tätä korkeutta vastaavan standardin pitoisuus oli määritetty toteamisrajapitoisuudeksi. Määrittysraja-arvo oli ohjeissa kaksi kertaa toteamisraja-arvon pitoisuus.

Validoinnissa toteamis- sekä määrittysraja laskettiin 3 µg/l CN⁻ näytteiden perusteella. Raja-arvo määrittäisiin valmistettiin yksi 3 µg/l CN⁻ syanidiliuos ja tästä ajettiin peräkkäin 10 näytettä kahteen kertaan. Näytteistä käytettiin nimitystä MDL (method detection limit). Toteamisraja-arvo laskettiin sivun 17 kaavalla 1 ja määrittysraja-arvo kaavalla 2. Mittaustulokset ja laskut on esitetty liitteen 1 taulukossa 4.

Syanidille saatiin määritettyä toteamisrajaksi 0,4 µg/l ja määrittysrajaksi 1,2 µg/l, joka kuitenkin pyöristettiin 2,0 µg/l luotettavampien tulosten saamiseksi. Toteamisraja-arvoa testattiin 0,4 µg/l CN⁻ sisältävällä näytteellä, josta saatiin selvästi erottumaan piikki syanidin retentioajalla. Liitteessä 2 on kuviossa 11 kromatogrammi yhdestä tällaisesta analyysistä.

6.3 Toistettavuus ja systemaattinen virhe

Toistettavuus määritettiin mittaamalla kahta eripitoisuuksista syanidinäytesarjaa saman viikon aikana maanantaina, keskiviikkona sekä perjantaina. Toistettavuusnäytteinä käytettiin 25 ja 75 µg/l syanidin vesiliuoksia. Kummastakin pitoisuudesta valmistettiin jokaiselle päivälle kolme eri mittapulloa, joista jokaisesta pullosta mitattiin viisi rinnakkaisnäytettä. Tuloksista voidaan näin ollen laskea sivun 19 kaavoilla 3 ja 4 näytesarjoille päivien väliset ja sisäiset varianssit sekä kokonaisvarienssit. Tarkkuuden ja systemaattisen virheen arvioimiseksi tuloksista laskettiin sivun 20 kaavoilla 6 ja 7 t-arvot ja tarkkuus.

Toistettavuusmittauksissa käytettiin jokaiselle päivälle valmistettuja uusia kalibrointisuoria. Kalibrointisuorat valmistettiin syanidistandardiliuoksista, joiden pitoisuudet olivat 20, 30, 40, 60 ja 80 µg/l. Koska detektorin antama vaste samanhajuisille liuoksille vaihteli päivittäin merkittävästi, ei edellisiä kalibrointisuoria voitu käyttää, eikä mitattujen toistettavuusnäytteiden vasteita voitu verrata keskenään. Syanidistandardeja mitattiin myös toistettavuusnäytteiden välissä tason tarkkailuna.

Liitteen 3 taulukoista 5 ja 6 löytyvät toistettavuusmittauksien tulokset ja laskut, joista taulukkoon 1 on kirjattu tärkeimmät tiedot. Taulukosta 1 nähdään, ettei mitatuilla kahdella pitoisuudella ollut toisiinsa nähden eroa hajonnoissa. Kummallakin pitoisuusasteella sisäinen hajonta jäi alle prosenttiin ja näytteiden välinen hajonta alle kahteen prosenttiin. Hajonnat käyttäytyivät odotetusti, koska välisessä hajonnassa huomioidaan näytteiden valmistuksessa tapahtuvat vaihtelut, kuten pipetointitarkkuus. Kun taas sisäiseen hajontaan vaikuttavat lähinnä mittalaitteen mittauksissa tapahtuvat pienet vaihtelut. Kokonaishajonta mittauksissa on noin kaksi prosenttia ja tarkkuus yli 95 %.

TAULUKKO 1. Toistettavuusmittaukset

Näytesarja	25 µg/l	75 µg/l
Keskiarvo	25,8 µg/l	77,3 µg/l
Tarkkuus	3,3 %	3,1 %
Keskihajonta	1,9 %	1,9 %
t-arvo (laskettu)	5,182	4,719
Sisäinen hajonta	0,6 %	0,4 %
Välinen hajonta	1,8 %	1,9 %
Kokonaishajonta	1,9 %	2,0 %

Systemaattisen virheen testaamiseksi lasketut t-arvot 5,182 ja 4,719 ylittävät taulukkoarvon 2,306 (95 % todennäköisyys), eli systemaattinen virhe on merkitsevä. Systemaattisen virheen selittää mittauksissa havaittu tasojen nousu päivän kuluessa. Tämä havaittiin uudelleen ajetuista kalibrointistandardeista. Esimerkiksi 60 µg/l standardi illalla ajettuna antoi tuloksen 62 µg/l. Tasojen nousu on voinut johtua työelektrodin likaantumisesta tai virittymisestä.

6.4 Laajennettu mittausepävarmuus

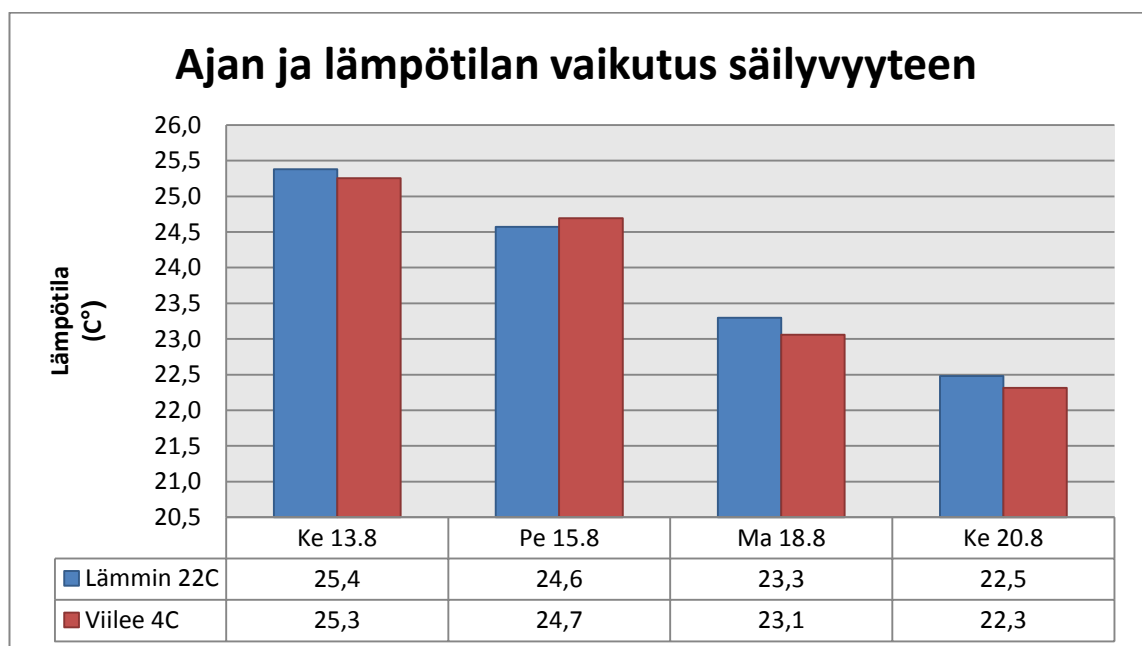
Mittausepävarmuus laskettiin edellisen kappaleen toistettavuusnäytteistä. Satunnaisvirheen arviointiin käytettiin suhteellista kokonaishajontaa ja systemaattisen virheen arviointiin käytettiin mittausten saantojen keskiarvoja. Käyttämällä näitä arvoja sivun 20 kaavassa 5 on taulukkoon 2 laskettu kummallekin pitoisuudelle mittausepävarmuus, sekä laajennettu mittausepävarmuus 95 % todennäköisyydellä.

TAULUKKO 2. Mittausepävarmuus

Pitoisuus CN	Mittausepävarmuus (u_c)	Laajennettu mittausepävarmuus (U)
25 µg/l	$\sqrt{(1,9)^2 + (3,3)^2} \approx 4 \%$	$2 * 4 \% = 8\%$
75 µg/l	$\sqrt{(2,0)^2 + (3,1)^2} \approx 4 \%$	$2 * 4 \% = 8\%$

6.5 Ajan ja lämpötilan vaikutus säilyvyyteen

Ajan ja lämpötilan vaikutusta syanidin säilyvyyteen tutkittiin valmistamalla yksi 25 µg/l vahvuinen syanidiliuos ja jakamalla tämä kahteen osaan, josta toinen osa säilytettiin jääkaapissa 4°C ja toinen vetokaapissa 22°C. Liuoksista otettiin näytteet neljänä eri päivänä viikon aikana ja mitattiin kolmena rinnakkaismäärityksenä. Liitteen 4 taulukosta 7 löytyvät näiden mittausten tulokset, joiden perusteella kuvio 10 on piirretty. Kuvio 10 nähdään, kuinka syanidipitoisuus laskee tasaisesti ajan mukaan. Viikossa laskua on tapahtunut ~10 %. Lämpötiloilla ei vaikuttanut olevan merkitystä säilyvyyteen.



KUVIO 10. Ajan ja lämpötilan vaikutus syanidin säilyvyyteen

Lämpötilan vaikutusta syanidin säilyvyyteen olisi hyvä testata huoneenlämpötilaa korkeammilla lukemilla, jotta voitaisiin paremmin arvioida esimerkiksi kesähelteiden vaikutusta syanidin säilyvyyteen.

6.6 Yhteenveto validoinnista

Validoitava menetelmä oli syanidi-ionin määrittäminen vedestä ionikromatografisesti. Syanidi-ionit erotellaan erotuskolonnissa eluentilla, jonka jälkeen näyte kulkee pulssiamperometrisen ilmaisimen läpi. Näyte reagoi ilmaisimen työelektrodilla synnyttäen virran, joka havaitaan vasteen kasvuna.

Validointi tehtiin kehitetyn menetelmän testaamiseksi. Validoinnissa määritettiin lineaarisuus, määrittämis- ja toteamisraja, tarkkuus, toistettavuus sekä mittausepävarmuus. Lisäksi tutkittiin lämpötilan ja ajan vaikutusta syanidi-ionin säilyvyyteen. Taulukkoon 3 on koottuna validoinnin tulokset.

TAULUKKO 3. Validoinnin tulokset

Lineaarisuusalue	2 – 20 µg/l (1.asteen yhtälö) 20 – 400 µg/l (1.asteen yhtälö)
Toteamisraja	0,4 µg/l
Määrittämisraja	2,0 µg/l
Tarkkuus	> 95 %
Sarjan sisäinen hajonta	0,6 % (25 µg/l) 0,4 % (75 µg/l)
Sarjan välinen hajonta	1,8 % (25 µg/l) 1,9 % (75 µg/l)
Kokonaishajonta	1,9 % (25 µg/l) 2,0 % (75 µg/l)
Laajennettu mittausepävarmuus	8 % (95 % todennäköisyys)

Kehitetty ionikromatografinen määrittämenetelmä sekä työssä käytetty laitteisto soveltuvat validoinnin tulosten perusteella syanidi-ionin määrittämiseen vedestä. Testattaessa lämpötilan vaikutusta syanidionin säilyvyyteen ei havaittu eroa jääkaapissa ja huoneenlämpötilassa säilytettyjen näytteiden välillä. Suurimmat tekijät syanidionin säilyvyyden kannalta, testien mukaan, olivat reagenssien ja astioiden epäpuhtaudet sekä näytteiden säilytysaika.

7 POHDINTA

Tavoite kehitettää menetelmä syanidi-ionin pitoisuuden määrittämiseksi vedestä onnistui. Menetelmällä voidaan nopeasti ja ilman näytteen monimutkaisia esikäsitteilyjä mitata syanidi pienissäkin pitoisuuksissa. Tavoitteeksi asetettu validointi onnistui myös ja menetelmällä saatiin toistettavia tuloksia hyvällä tarkkuudella.

Validoinnissa syanidin säilyvyys oli aluksi heikko, mikä havaitaan liitteessä 5 esitetyistä kuvioista 12 ja 13. Edellä mainituista kuvioista havaitaan, kuinka samojen näytteiden vasteet muuttuivat kuuden tunnin aikana. Vasteet pienenevät ja yhdestä näytteestä vaste hävisi täysin. Vasteiden pieneneminen ei kuitenkaan johtunut detektorista, koska näytteet uudelleen valmistettuina antoivat ensimmäisiä näytteitä vastaavat tulokset. Syanidin heikon säilyvyyden epäiltiin johtuvan kontaminoituneesta puhdasvedestä.

Työn aikana havaittiin detektorin antamien vasteiden muuttuneen mitattaessa samanvahvuisia syanidinäytteitä. Liitteen 6 kuvioista 14 ja 15 nähdään, kuinka saman päivän aikana ajettujen näytteiden vasteet muuttuvat vähän. Vasteet muuttuivat paljon verrattaessa eri päivinä mitattujen samanvahvuisten näytteiden vasteita toisiinsa. Tämä voidaan havaita vertaamalla kuvioiden 14 ja 15 vasteita keskenään.

Validointia voitaisiin jatkaa tutkimalla erilaisten matriisien vaikutusta syanidi-ionin säilyvyyteen sekä määrittämiseen. Myös laajempi tutkimus lämpötilojen vaikutuksesta syanidin säilyvyyteen olisi suositeltavaa. Pulssiamperometrisen ilmaisimen jatkokäytössä olisi hyvä tutkia ja seurata mitattujen vasteiden muuttumista, jotta voitaisiin arvioida sopiva aikaväli työelektrodin vaihtamiselle tai kiillottamiseen.

Vaikka syanidi osoittautui alussa vaikeasti määritettäväksi, muun muassa säilyvyysongelman vuoksi, saatiin ongelmat ratkaistua ja halutut parametrit pystyttiin määrittämään. Kehitettyä menetelmää voidaan jatkossa käyttää syanidin ionikromatografisissa määrityksissä.

LÄHTEET

Adams, M. D. 1990. The chemical behavior of cyanide in the extraction of gold. 1. Kinetics of cyanide loss in the presence and absence of activated carbon. Journal of the south African institute of mining and metallurgy Vol. 90, no 2. pp. 37-44.

<http://www.saimm.co.za/Journal/v090n02p037.pdf>

ASTM D7365 – 09a. Standard Practice for Sampling, Preservation and Mitigating Interferences in Water Samples for Analysis of Cyanide. ASTM International.

<http://www.astm.org/Standards/D7365.htm>

Analytical Detection Limit Guidance & Laboratory Guide for Determining Method Detection Limits. 1996. Wisconsin Department of Natural Resources Laboratory Certification Program. PUBL-TS-056-96.

<http://dnr.wi.gov/regulations/labcert/documents/guidance/-LODguide.pdf>

Bliesner, D. 2006. Validating Chromatographic Methods: a practical guide. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

Bièvre P. & Günzler H. 2005. Validation in Chemical Measurement. Berlin: Springer.

Dionex. 2010. ICS-5000 Ion Chromatography System Operator's Manual. Revision 02. Document No. 065342. Dionex Corporation

Dionex. 2009. Product manual for disposable electrodes. Revision 07. Document No. 065040

<http://www.dionex.com/en-us/webdocs/40542-Man-065040-07-DE-Electrodes-Jan09.pdf>

Dionex. 2006. Direct Determination of Cyanide in Drinking Water by Ion Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (PAD). Application note 173.

http://www.dionex.com/en-us/webdocs/40397-AN173_LPN1787-R2.pdf

Dionex. 2002. Principles and Troubleshooting Techniques in ION CHROMATOGRAPHY. Document No. 034461. Dionex Corporation

<http://www.iac.tuwien.ac.at/instprakt/ic4.pdf>

Fritz J. & Gjerde D. 2009. Ion Chromatography. Fourth, Completely Revised and Enlarged Edition. Weinheim: WILEY-VCH

Giudice, B. D., Jorgenson, B., Bryan, M. n.d. Problems with Using Current EPA Approved Total Cyanide Analytical Methods for Determining Municipal Wastewater Treatment Plant NPDES Permit Compliance. Robertson-Bryan inc. Elk Grove CA.

http://www.waterboards.ca.gov/rwqcb5/board_decisions/tentative_orders/1106/cyanide/3_cyanide_info_att_b.pdf

Haddad P. & Jackson P. 1990. ion chromatography principles and applications. Amsterdam: Elsevier Science Publishers

Irma Mäkinen, Anna-Mari Suortti, Riitta Saares, Ritva Niemi. 1996. Ohjeita ympäristönäytteiden kemiallisten analyysimenetelmien validointiin. Helsinki: SUOMEN YMPÄRISTÖKESKUS

MEP instruments. Luettu 22.9.2014

http://www.mep.net.au/processchemist/PC_5/PC5_WAD_CyanideMeasurementUsingPicricAcid.pdf

Merchant Research & Consulting ltd 2013. Global Sodium Cyanide Production Luettu 21.8.2014

<http://mcgroup.co.uk/news/20131011/global-sodium-cyanide-production-climbed-797000-tonnes.html>

Method 9016. 2010. FREE CYANIDE IN WATER, SOILS AND SOLID WASTES BY MICRODIFFUSION. Revision 0.

<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/pdfs/9016.pdf>

Miessler, G. L. & Tarr D. A. 2004. Inorganic Chemistry. 3rd Edition. New Jersey: Pearson Education, Inc. Prentice Hall.

United States Army: Medical Research Institute of Chemical Defence. 1995. Medical Management of Chemical Casualties Handbook. Second Edition.. Luettu 22.09.2014

<http://fas.org/nuke/guide/usa/doctrine/army/mmch/>

Wallschläger, D. 2001. Final Report: Low-level Speciation of Cyanide in Waters. EPA Contract Number: 68D01023.

LIITTEET

LIITE 1. Toteamis- ja määrittämissrajat

TAULUKKO 4. Toteamis- ja määrittämissrajamittaukset

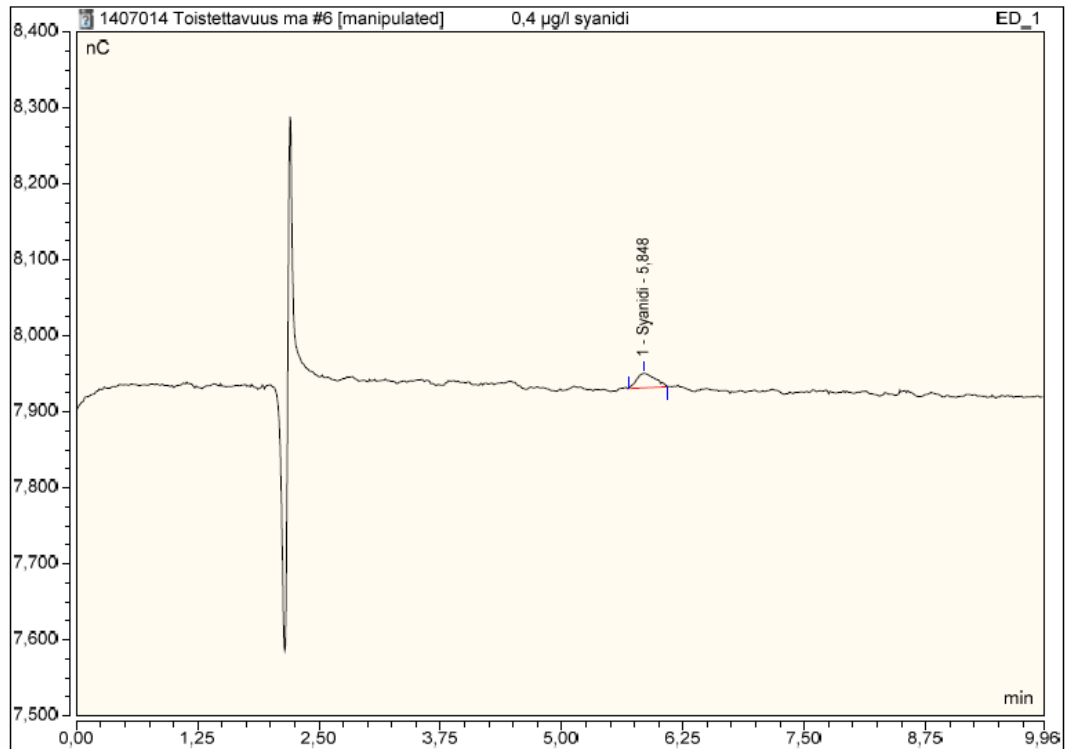
Inject Time	Name	Time min	Area nC*min	Height nC	Amount µg/l
Syanidi	Syanidi	Syanidi ED_1	Syanidi ED_1	Syanidi ED_1	Syanidi ED_1
10.07.14 17:12	3 µg/l MDL 1	5,864	0,041	0,16	2,88
10.07.14 17:23	3 µg/l MDL 1	5,867	0,046	0,17	3,08
10.07.14 17:33	3 µg/l MDL 2	5,864	0,048	0,17	3,20
10.07.14 17:44	3 µg/l MDL 2	5,874	0,049	0,17	3,25
10.07.14 17:54	3 µg/l MDL 3	5,874	0,051	0,17	3,34
10.07.14 18:05	3 µg/l MDL 3	5,864	0,045	0,17	3,08
10.07.14 18:16	3 µg/l MDL 4	5,864	0,043	0,17	2,98
10.07.14 18:26	3 µg/l MDL 4	5,871	0,042	0,17	2,93
10.07.14 18:37	3 µg/l MDL 5	5,868	0,046	0,18	3,10
10.07.14 18:47	3 µg/l MDL 5	5,864	0,047	0,17	3,13
10.07.14 18:58	3 µg/l MDL 6	5,871	0,042	0,17	2,92
10.07.14 19:09	3 µg/l MDL 6	5,868	0,046	0,17	3,10
10.07.14 19:19	3 µg/l MDL 7	5,868	0,046	0,17	3,11
10.07.14 19:30	3 µg/l MDL 7	5,861	0,049	0,17	3,24
10.07.14 19:40	3 µg/l MDL 8	5,861	0,047	0,17	3,17
10.07.14 19:51	3 µg/l MDL 8	5,861	0,045	0,17	3,07
10.07.14 20:01	3 µg/l MDL 9	5,867	0,046	0,17	3,10
10.07.14 20:12	3 µg/l MDL 9	5,858	0,049	0,18	3,23
10.07.14 20:22	3 µg/l MDL 10	5,861	0,046	0,17	3,11
10.07.14 20:33	3 µg/l MDL 10	5,874	0,047	0,16	3,14
Keskiarvo (ka)					3,11
Näytteitä (n)					10
t(n-1) 99 % 2-suunt.					2,821
Keskihajonta (s)					0,117
Toteamisraja (LOD)		2,821 * 0,117			0,33
Määrittämissraja (LOQ)		10 * 0,117			1,2
MDL-näytteen pitoisuus testi					
Spike level (10 * MDL > spike)			3,0 <	3,3	Ylitys
Spike level (MDL < Spike)			3,0 >	0,33	Ok
S/N Estimate (ka/s)				26	Korkea
Saanto- %				103,6 %	Ok

LIITE 2. Toteamisrajamittaus

Peak Integration Report

Sample Name:	0,4 µg/l syanidi	Inj. Vol.:	250,00
Injection Type:	Unknown	Dilution Factor:	1,0000
Program:	syandidin määrittys PAD 25 µl loop	Operator:	PvTT
Inj. Date / Time:	14-heinä-2014 / 11:03	Run Time:	9,96

No.	Time min	Peak Name	Peak Type	Area nC*min	Height nC	Amount
1	5,85	Syanidi	BMB*	0,004	0,019	1,6472
TOTAL:				0,00	0,02	1,65



KUVIO 11. 0,4 µg/l syanidimittaus

LIITE 3. Toistettavuus

1 (2)

TAULUKKO 5. 25 µg/l toistettavuusmittaukset

				Toistettavuus		CN- 25 µg/l		
		Mittaus	1	2	3	4	5	
sarja 1	Ma	Pullo 1	26,2	26,4	26,7	26,5	26,6	
sarja 2		Pullo 2	26,6	26,8	26,7	26,9	26,6	
sarja 3		Pullo 3	25,8	26,0	25,9	26,0	26,0	
sarja 4	Ke	Pullo 4	25,5	25,2	25,2	25,4	25,4	
sarja 5		Pullo 5	25,0	25,1	25,3	25,6	25,5	
sarja 6		Pullo 6	25,6	25,7	25,8	25,8	26,0	
sarja 7	Pe	Pullo 7	25,2	25,7	25,7	25,4	25,5	
sarja 8		Pullo 8	25,6	25,9	25,8	25,5	25,6	
sarja 9		Pullo 9	26,0	25,6	25,6	25,7	25,6	
		Keskiarvo (ka)				25,8	µg/l	
		Keskihajonta (s)				0,48		
		Suhteellinen hajonta (s-%)				1,9	%	
		Saanto				103,3	%	
		t-arvo				5,182		
		t-taulukko (n-1) (8)				2,306		
Anova: Single Factor								
SUMMARY								
	<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>			
	Row 1	5	132,2747648	26,45495	0,033941			
	Row 2	5	133,592298	26,71846	0,014142			
	Row 3	5	129,6550247	25,931	0,008949			
	Row 4	5	126,8200778	25,36402	0,016545			
	Row 5	5	126,6376251	25,32753	0,054862			
	Row 6	5	128,7534235	25,75068	0,021851			
	Row 7	5	127,5314159	25,50628	0,049454			
	Row 8	5	128,4256487	25,68513	0,018437			
	Row 9	5	128,4519602	25,69039	0,029541			
ANOVA								
	<i>Source of Variator</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>	
	Between Groups	9,055603442	8	1,13195	41,12513	7,73E-16	2,2085181	
	Within Groups	0,99088347	36	0,027525				
	Total	10,04648691	44					
	Näytteiden välinen hajonta sb =		0,46998	/ka*100	=	1,8	%	
	Näytteiden sisäinen hajonta sw=		0,006424114	*100	=	0,6	%	
	Kokonaisvariassi st=				=	1,9	%	

TAULUKKO 6. 75 µg/l toistettavuusmittaukset

				Toistettavuus		CN- 75 µg/l		
		Mittaus	1	2	3	4	5	
sarja 1	Ma	Pullo 1	76,1	76,6	77,3	76,7	76,6	
sarja 2		Pullo 2	79,5	79,9	79,5	79,7	79,5	
sarja 3		Pullo 3	79,6	79,6	80,1	80,1	80,1	
sarja 4	Ke	Pullo 4	75,2	76,0	75,9	76,1	76,0	
sarja 5		Pullo 5	76,9	76,5	76,1	76,1	76,6	
sarja 6		Pullo 6	77,7	76,8	76,7	76,8	76,3	
sarja 7	Pe	Pullo 7	75,5	76,1	75,6	75,7	76,2	
sarja 8		Pullo 8	77,3	77,5	77,3	76,7	77,0	
sarja 9		Pullo 9	77,5	77,2	77,4	77,2	77,1	
		Keskiarvo (ka)				77,3	µg/l	
		Keskihajonta (s)				1,5		
		Suhteellinen hajonta (s-%)				1,9	%	
		Saanto				103,1	%	
		t-arvo				4,719		
		t-tilaus (n-1) (8)				2,306		
Anova: Single Factor								
SUMMARY								
	<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>			
	Row 1	5	383,3779	76,67558	0,191987			
	Row 2	5	398,2528	79,65057	0,026055			
	Row 3	5	399,4156	79,88312	0,068112			
	Row 4	5	379,2087	75,84174	0,117731			
	Row 5	5	382,2423	76,44846	0,129969			
	Row 6	5	384,2872	76,85744	0,244153			
	Row 7	5	379,1006	75,82012	0,109418			
	Row 8	5	385,8786	77,17571	0,08525			
	Row 9	5	386,2693	77,25386	0,030273			
ANOVA								
	<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>	
	Between Groups	89,20871725	8	11,15109	100,0649	3,01E-22	2,208518	
	Within Groups	4,011788096	36	0,111439				
	Total	93,22050535	44					
	Näytteiden välinen hajonta sb =	1,48591	/ka*100	=	1,9	%		
	Näytteiden sisäinen hajonta sw=	0,229345	*100	=	0,4	%		
	Kokonaisvarianssi st=			=	2,0	%		

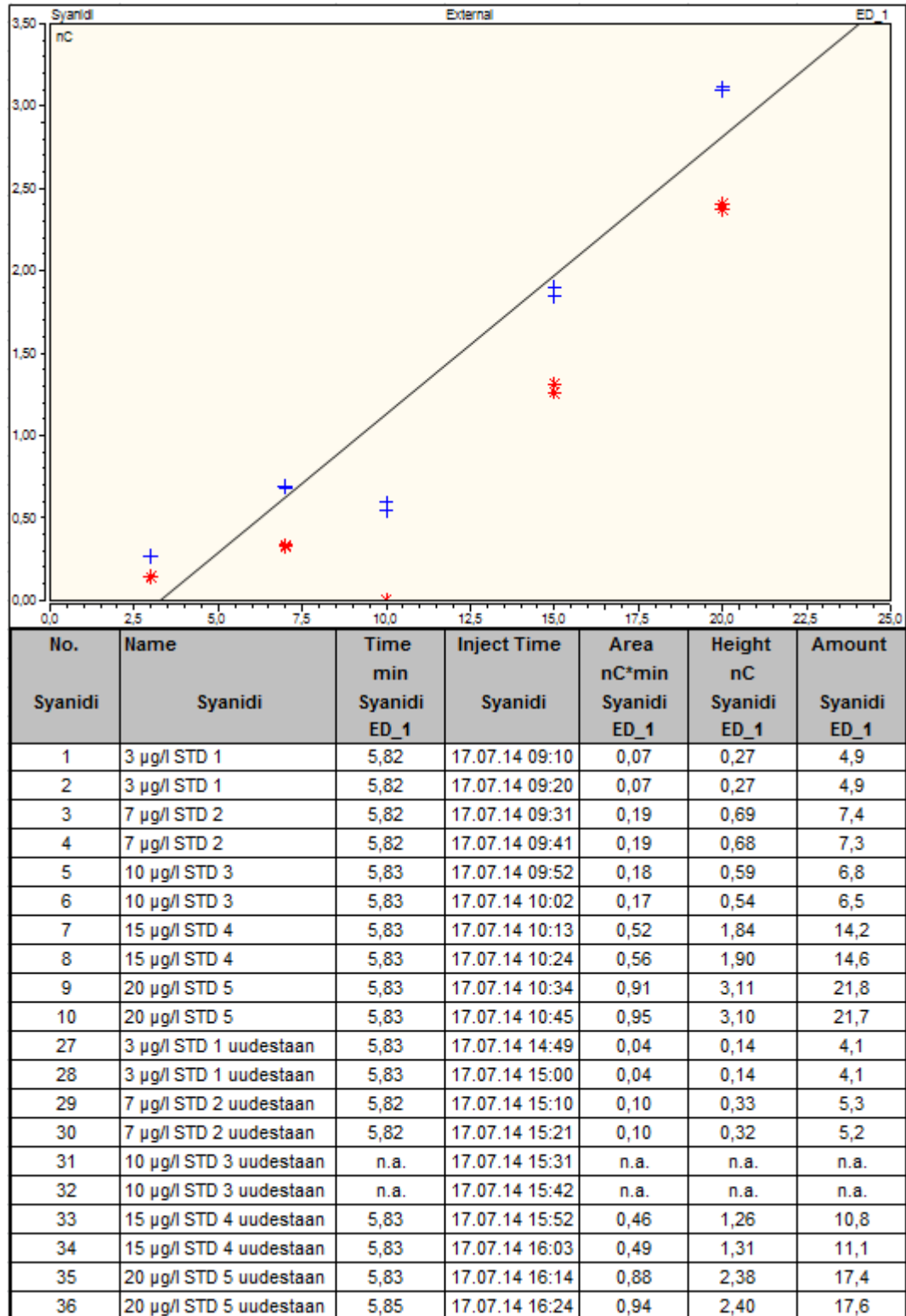
LIITE 4. Ajan ja lämpötilan vaikutus syanidin säilyvyyteen

TAULUKKO 7. Aika ja lämpötila mittaukset

No.	Name	Time min	Inject Time	Area nC*min	Height nC	Amount
Syanidi	Syanidi	Syanidi ED_1	Syanidi	Syanidi ED_1	Syanidi ED_1	Syanidi ED_1
Keskiviikko 13.8						
13	25 µg/l syanidi Viilee 1	5,884	13.08.14 12:24	0,132	0,289	25,35
14	25 µg/l syanidi Viilee 1	5,901	13.08.14 12:37	0,132	0,289	25,34
15	25 µg/l syanidi Viilee 1	5,884	13.08.14 12:50	0,129	0,285	25,07
16	25 µg/l syanidi Vetokaappi 1	5,884	13.08.14 13:02	0,132	0,290	25,35
17	25 µg/l syanidi Vetokaappi 1	5,901	13.08.14 13:15	0,133	0,287	25,47
18	25 µg/l syanidi Vetokaappi 1	5,901	13.08.14 13:28	0,131	0,287	25,31
Perjantai 15.8						
16	25 µg/l vetokaappi 2	5,884	15.08.14 13:00	0,137	0,31	24,62
17	25 µg/l vetokaappi 2	5,884	15.08.14 13:13	0,136	0,31	24,49
18	25 µg/l vetokaappi 2	5,884	15.08.14 13:25	0,137	0,31	24,61
19	25 µg/l viileessä 2	5,884	15.08.14 13:38	0,135	0,31	24,47
20	25 µg/l viileessä 2	5,884	15.08.14 13:51	0,138	0,31	24,69
21	25 µg/l viileessä 2	5,884	15.08.14 14:03	0,140	0,31	24,91
Maanantai 18.8						
16	25 µg/l Vetokaappi 3	5,868	18.08.14 13:16	0,145	0,33	23,63
17	25 µg/l Vetokaappi 3	5,884	18.08.14 13:29	0,140	0,33	23,14
18	25 µg/l Vetokaappi 3	5,884	18.08.14 13:41	0,140	0,33	23,11
19	25 µg/l Viilees 3	5,867	18.08.14 13:54	0,131	0,30	22,28
20	25 µg/l Viilees 3	5,867	18.08.14 14:07	0,146	0,33	23,74
21	25 µg/l Viilees 3	5,868	18.08.14 14:19	0,140	0,32	23,15
Keskiviikko 20.8						
21	25 µg/l Viilee 4	5,851	20.08.14 13:47	0,135	0,31	22,39
22	25 µg/l Viilee 4	5,868	20.08.14 14:00	0,134	0,31	22,29
23	25 µg/l Viilee 4	5,868	20.08.14 14:12	0,134	0,31	22,27
24	25 µg/l Vetokaappi 4	5,851	20.08.14 14:25	0,133	0,32	22,26
25	25 µg/l Vetokaappi 4	5,868	20.08.14 14:38	0,138	0,33	22,70
26	25 µg/l Vetokaappi 4	5,867	20.08.14 14:50	0,136	0,33	22,49
Maanantai 18.8 Lämpökaappi mittaus						
22	30 µg/l Vetokaappi	5,868	18.08.14 14:32	0,188	0,44	27,7
23	30 µg/l Vetokaappi	5,868	18.08.14 14:45	0,187	0,44	27,6
24	30 µg/l Vetokaappi	5,868	18.08.14 14:57	0,188	0,43	27,7
25	30 µg/l Lämpökaappi	5,884	18.08.14 15:10	0,187	0,43	27,7
26	30 µg/l Lämpökaappi	5,868	18.08.14 15:23	0,188	0,44	27,7
27	30 µg/l Lämpökaappi	5,884	18.08.14 15:35	0,190	0,45	27,9

LIITE 5. Syanidin säilyvyys

1 (2)



KUVIO 12. Syanidin standardisuora kahteen kertaan ajettuna

2 (2)

Anion Summary Report							
No.	Name	Time min	Inject Time	Area nC*min	Height nC	Amount	Comment
Syanidi	Syanidi	Syanidi ED_1	Syanidi	Syanidi ED_1	Syanidi ED_1	Syanidi ED_1	Syanidi
24	20 µg/l syanidi 2	5,82	30.07.14 12:31	0,050	0,144	13,3	25 ml mittapulloon -
25	20 µg/l syanidi 2	5,83	30.07.14 12:43	0,044	0,136	13,0	vasta valmistettu 20 µg/l syanidi liuos
26	20 µg/l syanidi 2	5,83	30.07.14 12:54	0,047	0,127	12,7	
27	20 µg/l syanidi 2	5,83	30.07.14 13:04	0,041	0,117	12,3	
28	20 µg/l syanidi 2	5,83	30.07.14 13:14	0,036	0,110	12,0	
29	20 µg/l syanidi 2	5,83	30.07.14 13:25	0,034	0,105	11,9	
30	20 µg/l syanidi 2	5,83	30.07.14 13:35	0,025	0,085	11,1	
31	20 µg/l syanidi 2	5,83	30.07.14 13:46	0,025	0,089	11,3	
32	20 µg/l syanidi 2	5,85	30.07.14 13:56	0,025	0,081	11,0	
33	20 µg/l syanidi 2	5,85	30.07.14 14:06	0,022	0,074	10,7	
34	20 µg/l syanidi 2	5,83	30.07.14 14:17	0,020	0,067	10,5	
35	20 µg/l syanidi 2	5,85	30.07.14 14:27	0,021	0,064	10,4	
36	Uusi 20 µg/l syanidi	5,83	30.07.14 14:38	0,054	0,155	13,7	uusi juuri valmistettu 20 µg/l -
37	Uusi 20 µg/l syanidi	5,83	30.07.14 14:50	0,052	0,148	13,4	syanidi, 25 ml pulloon

KUVIO 13. Syanidi piikin lasku rinnakkaismääritys mittauksissa

LIITE 6. Detektorin vasteet

1 (2)

No.	Name	Time min	Inject Time	Area nC*min	Height nC	Amount
Syanidi	Syanidi	Syanidi ED_1	Syanidi	Syanidi ED_1	Syanidi ED_1	Syanidi ED_1
6	STD 1 20 µg/	5,884	15.08.14 10:53	0,098	0,23	20,8968
7	STD 1 20 µg/	5,884	15.08.14 11:06	0,097	0,23	20,8365
8	STD 2 30 µg/	5,884	15.08.14 11:19	0,189	0,45	29,6081
9	STD 2 30 µg/	5,884	15.08.14 11:31	0,192	0,45	29,8697
10	STD 3 40 µg/	5,868	15.08.14 11:44	0,289	0,71	39,1554
11	STD 3 40 µg/	5,884	15.08.14 11:57	0,292	0,71	39,4251
12	STD 4 60 µg/	5,868	15.08.14 12:09	0,498	1,31	59,0638
13	STD 4 60 µg/	5,868	15.08.14 12:22	0,507	1,32	59,8809
14	STD 5 80 µg/	5,867	15.08.14 12:34	0,722	1,93	80,4178
15	STD 5 80 µg/	5,868	15.08.14 12:47	0,726	1,93	80,8459
16	25 µg/l vetok	5,884	15.08.14 13:00	0,137	0,31	24,6213
17	25 µg/l vetok	5,884	15.08.14 13:13	0,136	0,31	24,4902
18	25 µg/l vetok	5,884	15.08.14 13:25	0,137	0,31	24,6081
19	25 µg/l viilees	5,884	15.08.14 13:38	0,135	0,31	24,4695
20	25 µg/l viilees	5,884	15.08.14 13:51	0,138	0,31	24,6947
21	25 µg/l viilees	5,884	15.08.14 14:03	0,140	0,31	24,9140
22	25 µg/l Pullo	5,884	15.08.14 14:16	0,143	0,32	25,2079
23	25 µg/l Pullo	5,884	15.08.14 14:29	0,148	0,33	25,6829
24	25 µg/l Pullo	5,884	15.08.14 14:41	0,149	0,33	25,7473
25	25 µg/l Pullo	5,884	15.08.14 14:54	0,145	0,33	25,3678
26	25 µg/l Pullo	5,884	15.08.14 15:06	0,146	0,33	25,5254
27	25 µg/l Pullo	5,884	15.08.14 15:18	0,147	0,33	25,5973
28	25 µg/l Pullo	5,884	15.08.14 15:32	0,150	0,34	25,8771
29	25 µg/l Pullo	5,901	15.08.14 15:44	0,149	0,33	25,7721
30	25 µg/l Pullo	5,884	15.08.14 15:56	0,147	0,34	25,5487
31	25 µg/l Pullo	5,884	15.08.14 16:09	0,148	0,34	25,6304
32	25 µg/l Pullo	5,884	15.08.14 16:21	0,151	0,34	25,9779
33	25 µg/l Pullo	5,884	15.08.14 16:34	0,147	0,33	25,5782
34	25 µg/l Pullo	5,884	15.08.14 16:47	0,147	0,33	25,5710
35	25 µg/l Pullo	5,884	15.08.14 16:59	0,148	0,34	25,7220
36	25 µg/l Pullo	5,901	15.08.14 17:11	0,147	0,34	25,6029
37	STD 1 20 µg/	5,884	15.08.14 17:24	0,102	0,23	21,3193
38	STD 1 20 µg/	5,901	15.08.14 17:37	0,103	0,23	21,4123
39	75 µg/l Pullo	5,868	15.08.14 17:49	0,670	1,72	75,4711
40	75 µg/l Pullo	5,867	15.08.14 18:02	0,677	1,72	76,1174
41	75 µg/l Pullo	5,868	15.08.14 18:15	0,671	1,71	75,5835
42	75 µg/l Pullo	5,868	15.08.14 18:27	0,672	1,72	75,7093
43	75 µg/l Pullo	5,867	15.08.14 18:39	0,678	1,71	76,2192
44	75 µg/l Pullo	5,868	15.08.14 18:52	0,689	1,75	77,3277
45	75 µg/l Pullo	5,851	15.08.14 19:05	0,691	1,76	77,4578
46	75 µg/l Pullo	5,868	15.08.14 19:18	0,690	1,76	77,3332
47	75 µg/l Pullo	5,868	15.08.14 19:30	0,683	1,75	76,7411
48	75 µg/l Pullo	5,851	15.08.14 19:42	0,686	1,75	77,0188
49	75 µg/l Pullo	5,851	15.08.14 19:55	0,691	1,76	77,5017
50	75 µg/l Pullo	5,868	15.08.14 20:08	0,688	1,77	77,1862
51	75 µg/l Pullo	5,867	15.08.14 20:21	0,690	1,76	77,3534
52	75 µg/l Pullo	5,867	15.08.14 20:33	0,688	1,76	77,1692
53	75 µg/l Pullo	5,867	15.08.14 20:45	0,687	1,76	77,0589
54	STD 4 60 µg/	5,867	15.08.14 20:58	0,530	1,34	62,1083

KUVIO 14. Vasteiden seuranta 1

No.	Name	Time min	Inject Time	Area nC*min	Height nC	Amount
Syanidi	Syanidi	Syanidi ED_1	Syanidi	Syanidi ED_1	Syanidi ED_1	Syanidi ED_1
3	STD 1 20 µg/	5,918	11.08.14 11:07	0,052	0,120	21,53
4	STD 1 20 µg/	5,918	11.08.14 11:20	0,052	0,125	21,55
5	STD 2 30 µg/	5,901	11.08.14 11:32	0,118	0,282	28,88
6	STD 2 30 µg/	5,901	11.08.14 11:45	0,122	0,285	29,33
7	STD 3 40 µg/	5,901	11.08.14 11:57	0,206	0,508	38,77
8	STD 3 40 µg/	5,901	11.08.14 12:10	0,204	0,512	38,61
9	STD 4 60 µg/	5,884	11.08.14 12:22	0,392	0,985	59,74
10	STD 4 60 µg/	5,884	11.08.14 12:35	0,401	0,992	60,73
11	STD 5 80 µg/	5,884	11.08.14 12:47	0,575	1,438	80,34
12	STD 5 80 µg/	5,884	11.08.14 13:00	0,577	1,443	80,52
13	STD 1 20 µg/	5,917	11.08.14 13:12	0,060	0,139	22,46
14	STD 1 20 µg/	5,917	11.08.14 13:25	0,063	0,134	22,69
15	25 µg/l pullo	5,917	11.08.14 14:01	0,094	0,210	26,18
16	25 µg/l pullo	5,934	11.08.14 14:15	0,095	0,213	26,39
17	25 µg/l pullo	5,918	11.08.14 14:27	0,098	0,213	26,66
18	25 µg/l pullo	5,901	11.08.14 14:39	0,096	0,216	26,48
19	25 µg/l pullo	5,901	11.08.14 14:51	0,097	0,214	26,58
20	25 µg/l pullo	5,917	11.08.14 15:30	0,097	0,216	26,60
21	25 µg/l pullo	5,917	11.08.14 15:44	0,099	0,220	26,83
22	25 µg/l pullo	5,901	11.08.14 15:56	0,098	0,217	26,68
23	25 µg/l pullo	5,901	11.08.14 16:08	0,100	0,219	26,86
24	25 µg/l pullo	5,918	11.08.14 16:21	0,098	0,220	26,62
25	25 µg/l pullo	5,918	11.08.14 16:33	0,090	0,194	25,80
26	25 µg/l pullo	5,934	11.08.14 16:46	0,092	0,193	26,02
27	25 µg/l pullo	5,917	11.08.14 16:59	0,091	0,194	25,87
28	25 µg/l pullo	5,918	11.08.14 17:11	0,092	0,192	25,98
29	25 µg/l pullo	5,918	11.08.14 17:23	0,092	0,194	25,99
30	STD 4 60 µg/	5,884	11.08.14 17:36	0,403	0,975	61,01
31	STD 4 60 µg/	5,884	11.08.14 17:48	0,415	0,988	62,30
32	75 µg/l Pullo	5,884	11.08.14 18:01	0,537	1,327	76,08
33	75 µg/l Pullo	5,868	11.08.14 18:14	0,542	1,333	76,62
34	75 µg/l Pullo	5,884	11.08.14 18:26	0,548	1,334	77,31
35	75 µg/l Pullo	5,884	11.08.14 18:39	0,543	1,331	76,73
36	75 µg/l Pullo	5,868	11.08.14 18:51	0,542	1,337	76,64
37	75 µg/l Pullo	5,868	11.08.14 19:03	0,568	1,399	79,53
38	75 µg/l Pullo	5,868	11.08.14 19:17	0,571	1,403	79,90
39	75 µg/l Pullo	5,868	11.08.14 19:29	0,568	1,408	79,54
40	75 µg/l Pullo	5,867	11.08.14 19:41	0,570	1,408	79,73
41	75 µg/l Pullo	5,884	11.08.14 19:54	0,568	1,410	79,55
42	75 µg/l Pullo	5,868	11.08.14 20:06	0,568	1,405	79,58
43	75 µg/l Pullo	5,867	11.08.14 20:19	0,569	1,404	79,62
44	75 µg/l Pullo	5,868	11.08.14 20:32	0,573	1,407	80,07
45	75 µg/l Pullo	5,868	11.08.14 20:44	0,573	1,411	80,07
46	75 µg/l Pullo	5,884	11.08.14 20:56	0,573	1,415	80,07
47	STD 1 20 µg/	5,934	11.08.14 21:09	0,070	0,159	23,50

KUVIO 15. Vasteiden seuranta 2