

Susanna Ruotsalainen

Entsyyntäisen menetelmän validointi urean määrittämiseen uima-allasvesistä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja kemiantekniikka

Insinöörityö

9.4.2018

Tekijä(t) Otsikko	Susanna Ruotsalainen Entsyyntymäntisen menetelmän validointi urean määrittymkseen uima-allasvesistä
Sivumäärä Aika	38 sivua + 4 liitettä 9.4.2018
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja kemianteekniikka
Suuntautumismvaihtoehto	Bio- ja elintarviketeekniikka
Ohjaaja(t)	Tutkintovastaava Carola Fortelius Kemisti Jarkko Nissinen
<p>Tämän insinööriityön tavoitteena oli selvittää työn toimeksiantajan käyttöön soveltuva entsymaattinen menetelmä ureapitoisuuksien analysoimiseen uima-allasvesinäytteistä ja suorittaa valitulle menetelmälle validointi. Työn toimeksiantajana oli Länsi-Uudenmaan vesi ja ympäristö ry eli LUVY ry. Tavoitteena oli validoida menetelmä, jolla pystyttäisiin mittaamaan tarkempia ja pienempiä ureapitoisuuksia kuin käytössä olevalla menetelmällä.</p> <p>Suomen Ympäristötutkimuskeskuksen eli SYKEN mukaan entsymaattisella analyysimenetelmällä pystytään mittaamaan tarkempia ureapitoisuuksia kuin laboratorion käytössä olevalla Koroleffin menetelmäksi kutsutulla menetelmällä. Entsyyntymäntisella menetelmällä saadut tulokset ovat SYKEN pätevyyskoeraporttien mukaan lähes kaksinkertaisia Koroleffin menetelmään verrattuna. Entsyyntymäntisiä menetelmiä urean määrittämiseksi on useita, ja näistä erityisesti uima-allasvesinäytteiden analysointiin on tarkoitettu fotometrinen menetelmä ja kolorimetrinen komparaattorimenetelmä. Tässä työssä validoitiin fotometrinen menetelmä, joka oli alun perin kehitetty sille tarkoitettulla analysaattorilla suoritettavaksi. Tämän johdosta menetelmää sovellettiin manuaaliseen käyttöön.</p> <p>Menetelmän kehittäminen manuaaliseksi sujui onnistuneesti ja validointi pystyttiin suorittamaan. Menetelmän määrittymraja jäi kuitenkin korkeaksi. Lisäksi tuloksista havaittiin, että menetelmä ei vastaa toivottuja tavoitteita tarkemmista pienistä ureapitoisuuksista. Pienillä ureapitoisuuksilla suhteellinen keskijajonta oli suurta isoihin pitoisuuksiin verrattuna. Menetelmän todettiin kuitenkin soveltuvan uima-allasvesien ureapitoisuuksien analysointiin hyvin tulosten saantoprosenttien perusteella.</p> <p>Menetelmän mittaasepävarmuus erityisesti pienemmillä ureapitoisuuksilla jäi niin suureksi, että menetelmä vaatii lisävalidointia ennen käyttöönottoa. Menetelmän määrittymrajaa ja pienten ureapitoisuuksien mittaustarkkuutta pystyttäisiin todennäköisesti parantamaan erilaisella kyvettivalinnalla. Ihanteellista analyysin manuaaliselle suorittamiselle olisi kyvetti, jossa näytteen pystyisi sekä inkuboimaan että mittaamaan spektrofotomerilla ilman siirtoa astiasta toiseen.</p>	
Avainsanat	urea, uima-allasvesi, validointi, entsymaattinen menetelmä, ureaasi

Author(s) Title	Susanna Ruotsalainen Validation of an Enzymatic Method for Analyzing Urea Concentration from Swimming Pool Water
Number of Pages Date	38 pages + 4 appendices 9 April 2018
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Chemical Engineering
Specialisation option	Biotechnology and Food Engineering
Instructor(s)	Carola Fortelius, Head of the Department Jarkko Nissinen, Chemist
<p>The aim of this thesis was to determine an enzymatic method which is suitable for the client for analyzing urea concentration from swimming pool water and to validate the selected method. The subscriber of this thesis was Länsi-Uudenmaan vesi ja ympäristö ry alias LUVVY ry. The aim was to validate a method that would be able to measure lower urea concentrations than the existing method.</p> <p>According to the Finnish Environment Institute alias SYKE, an enzymatic method can be used to measure more accurate urea concentrations than those received by the method of Koroleff which is used by LUVVY. According to the SYKE's Interlaboratory Proficiency test, the results of the enzymatic method are almost twice as high as the results of the method of Koroleff.</p> <p>There are many different enzymatic methods for analyzing urea concentration, and especially for analyzing swimming pool waters, there is a photometric method and a colorimetric method with a color-disk comparator. In this thesis, the validated method was a photometric method that was originally to be determined by an analyzer. Therefore, the method had to be modified for manual use.</p> <p>Developing the method for manual use and its validation were successful. However, the limit of determination remained high. The results also showed that the method does not meet the desired goals of more accurate results from lower urea concentrations. The relative standard deviation was higher with low urea concentrations than with high urea concentrations. However, on the basis of the yield percentage, the method was found to be suitable for the determination of urea in waters of swimming pools.</p> <p>The measurement uncertainty of the method remained so high, especially with the low urea concentrations, that the method requires more validation before deployment. The limit of determination and measurement accuracy could probably be improved by choosing a different cuvette. The ideal cuvette for manual analysis would be a cuvette where the sample could be both incubated and measured without transferring the sample from one cuvette to another.</p>	
Keywords	urea, swimming pool water, validation, enzymatic method, urease

Sisällys

Lyhenteet

KIRJALLINEN OSA	1
1 Johdanto	1
2 Urean määrittäminen uima-allasvesistä	1
2.1 Urea	2
2.2 Allasvesiasetus	3
2.3 Koroleffin menetelmä	3
2.4 Ureaasi	4
3 Validointi	4
3.1 Lineaarisuus ja mittausalue	5
3.2 Toteamis- ja määrittämissrajat	5
3.3 Tarkkuus	5
3.4 Toistettavuus ja toistotarkkuus	6
3.5 Menetelmävertailu	6
3.6 Mittausepävarmuus	7
KOKEELLINEN OSA	8
4 Validoitava menetelmä ja laitteet	8
4.1 Validoitavan entsyymattisen menetelmän toimintaperiaate	8
4.2 Validoitavan menetelmän valinta	8
4.3 Perkin Elmer UV/VIS spektrofotometri Lambda 35 ja mittauskyvetit	9
4.4 Hach Lange LT 200 -lämpöhaude ja inkubointikyvetit	10
4.5 Pipetit	10
5 Tulokset	11
5.1 Nykyisten laitteiden soveltuvuuden testaaminen valitulle menetelmälle	11
5.2 Lineaarisuus ja mittausalue	13
5.3 Määrittämissäytännön testaukset ennen validointia	15
5.3.1 Sokeanäytteen mittaamisen haasteet	15

5.3.2	Kokonaistilavuuden pienentäminen	16
5.4	Toteamis- ja määrittäysraja	17
5.5	Tarkkuus	18
5.6	Toistettavuus ja toistotarkkuus	19
5.7	Laadunvalvontanäytteiden rajat	20
5.7.1	Kontrollinäytteiden rajat	20
5.7.2	Rinnakkaisnäytteiden rajat	21
5.8	Menetelmävertailu	22
5.9	Mittausepävarmuus	23
6	Tulosten tarkastelu	24
6.1	Nykyisten laitteiden soveltuvuuden testaaminen valitulle menetelmälle	24
6.1.1	Perkin Elmer UV/VIS spektrofotometri 35 ja mittauskyvetit	24
6.1.2	Kustannusarvio	25
6.2	Lineaarisuus ja mittausalue	26
6.3	Määrittämissä käytännön kokeilut ennen validointia	27
6.3.1	Sokeanäytteen mittaamisen haasteet	27
6.3.2	Kokonaistilavuuden pienentäminen	28
6.4	Toteamis- ja määrittäysraja	29
6.5	Tarkkuus	31
6.6	Toistettavuus ja toistotarkkuus	31
6.7	Laadunvalvontanäytteiden rajat	32
6.7.1	Kontrollinäytteiden rajat	32
6.7.2	Rinnakkaisnäytteiden rajat	32
6.8	Menetelmävertailu	33
6.9	Mittausepävarmuus	35
7	Yhteenveto	35
	Lähteet	37
	Liitteet	
	Liite 1. Nollanäytteiden tulokset näytteenä mitattuna	
	Liite 2. Kontrollinäytteiden tulokset	
	Liite 3. Rinnakkaisnäytteiden tulokset (mg/l)	
	Liite 4. Mittaustulokset entsyymaattisella menetelmällä ja Koroleffin menetelmällä	

Lyhenteet

GLDH	Glutamaattidehydrogenaasi
NAD ⁺	Nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi, koenstyymi
NADH	Pelkistetty nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi
UV	Ultravioletti
SYKE	Suomen Ympäristökeskus
VIS	Näkyvän valon spektri

KIRJALLINEN OSA

1 Johdanto

Insinööriyön toimeksiantajana oli Länsi-Uudenmaan vesi ja ympäristö ry eli LUVY ry. LUVY ry käyttää uima-allavesien ureapitoisuuksien analysointiin Koroleffin menetelmänä tunnettua menetelmää. Laboratorio harkitsee entsyymaattisen analyysimenetelmän käyttöönottoa, sillä entsyymaattisella menetelmällä pystytään näytteistä selvittämään tarkempia pitoisuuksia kuin Koroleffin menetelmällä [1, s. 70]. Työn tarkoituksena on selvittää analyysille soveltuva entsyymaattinen menetelmä ja sen käyttöönoton kannattavuus laboratoriolle sekä toteuttaa valitulle menetelmälle validointi.

Validoitavaksi valittiin entsyymaattinen menetelmä, joka on alun perin suunniteltu analysointilaajalla suoritettavaksi. Tämän johdosta menetelmää tuli aluksi muokata manuaaliseen käyttöön soveltuvaksi ennen validoinnin varsinaista aloittamista.

2 Urean määrittäminen uima-allasvesistä

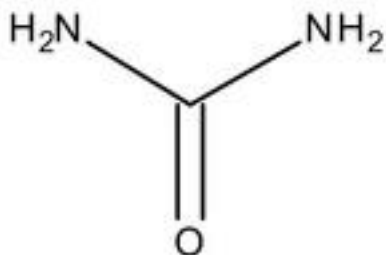
Ureaa päätyy allasvesiin altaissa uivien ihmisten hien ja virtsan mukana. Allasvesiin päätyneet urea reagoi altaan mikrobien torjunnassa käytettävän kloorin kanssa muodostaen klooriamiinia. Klooriamiinit ovat terveydelle haitallisia suurina pitoisuuksina ja altistavat muun muassa silmien ärsytykselle. [1, s. 32.]

Allasvesien ureapitoisuuksia tutkitaan ns. Koroleffin menetelmällä ja entsyymaattisella menetelmällä. Allasvesien ureapitoisuuksille on annettu sosiaali- ja terveysministeriön antamassa allasvesiasetuksessa (315/2002) laatuvaatimukset, jotka kertovat allasvesille sallitun ureapitoisuuden enimmäisarvon. Laatuvaatimus riippuu käytettävästä määrittämenetelmästä, sillä menetelmien vertailututkimuksissa on havaittu Koroleffin menetelmän saannon olevan noin 50 % vähemmän kuin entsyymaattisella menetelmällä. Koroleffin menetelmää käytettäessä laatuvaatimus on $\leq 0,8$ mg/l ja entsyymaattista menetelmää käytettäessä $\leq 1,6$ mg/l. Suuremmat ureapitoisuudet viittaavat allasveden puhdistuksen tai korvausveden määrän puutteisiin. [1, s. 32–33.]

2.1 Urea

Urea on herkästi veteen liukeneva tyypiyhdiste, joka esiintyy huoneenlämpötilassa kiinteässä muodossa väriltään valkeana jauheena tai värittöminä kiteinä [2]. Ureasta käytetään myös nimityksiä karbamidi tai karbonyylidiamiidi. Urean rakennekaava on esitetty kuvassa 1. Sen sulamislämpötila on 132,7 – 135 °C ja molekyyli­massa 60,06 g/mol. [3.]

Kuva 1. Urean rakennekaava [4].



Luonnossa ureaa esiintyy hyvin erityyppisissä yhteyksissä. Sitä syntyy syntetisoitumalla maksassa, minkä jälkeen elimistö poistaa sen kehosta virtsan ja hien mukana [1; 2, s. 32]. Tyypillisesti urea yhdistetään ihmisten mielissä lähinnä nisäkkäiden aineenvaihdunnan lopputuotteeksi, mutta sillä on myös merkittäviä käyttötarkoituksia teollisuudessa muun muassa lannoitteissa ja kosmetiikkatuotteissa [5]. Urea on ensimmäinen orgaaninen yhdiste jota onnistuttiin valmistamaan synteettisesti. Vuonna 1828 saksalainen kemisti Friedrich Wöhler onnistui valmistamaan ammoniumsulfaatista ja kaliumsyanaatista. [6.]

Ureapitoisuuksien määrittäminen on tärkeää lääketieteen, ympäristöanalytiikan ja maatalouden parissa. Määrittäminen taustalla on lääketieteen kannalta ihmisten terveydentilan tutkinta ja ympäristöanalytiikassa sekä laadunvalvonta ja ympäristön rehevöitymisen seuranta sekä ehkäiseminen [7]. Laadunvalvonnalla seurataan teollisten tuotteiden ja esimerkiksi uima-allasvesien ureapitoisuuksia, jotta niiden terveys- ja turvallisuusvaatimukset täyttyvät [1, s. 32].

2.2 Allasvesiasetus

Allasvesiasetus 315/2002 on sosiaali- ja terveysministeriön antama ja perustuu terveys- ja sosiaalilain (763/1994) pykälään 32. Asetuksessa säädetään allasvesien, kuten uimahallien ja kylpylöiden, terveydellisistä laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista. Asetuksessa on annettu myös määräykset toimenpiteille tilanteissa, joissa annettuja laatuvaatimuksia ei täytetä. [8.]

Allasvesiasetuksen soveltamiseksi Valvira on julkaissut vuonna 2017 asetuksen soveltamisohjeen, jossa annetaan selkeät ohjeistukset käytännön työtä varten. Soveltamisohje on tehty Suomen Uimaopetus- ja Hengenpelastusliiton vuonna 2008 julkaiseman uima-allasvesien laadun ja valvonnan soveltamisoppaan pohjalta. Soveltamisohjeen päätavoite on parantaa laitosten ja terveydenhuollon viranomaisten yhteistyötä ja korostaa laitosten omavalvonnan tärkeyttä. [1.]

2.3 Koroleffin menetelmä

Koroleffin menetelmänä tunnettu urean analyysimenetelmä on alun perin merivesien ureapitoisuuksien määrittämiseen kehitetty menetelmä, joka julkaistiin vuonna 1983 [9]. Suomessa suurin osa laboratorioista määrittää ureapitoisuuksia uima-allasvesistä Koroleffin menetelmällä [10]. Menetelmän laatuvaatimus on uima-allasvesiasetuksessa $\leq 0,8$ mg/l [8].

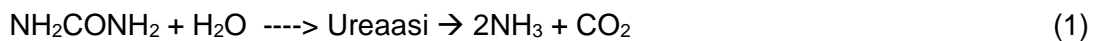
Menetelmä perustuu vahvan hapon ja heikon hapettimen reagoimiseen keskenään niin, että urea ja diasetyylimonoksiimi muodostavat yhdessä kondensaatioaineen. Kondensaatioaineesta syntyy semikarbatsidin ja manganionien kanssa helakanpunainen kompleks. Tämän seoksen pitoisuus määritetään fotometrisesti 520 nm:n aaltopituudella. [9, s.51.]

Koroleffin menetelmä soveltuu yhdisteille, joiden yleinen kaava $R1-NH-CO-NH-R2$. Yleisessä kaavassa R1 tulee olla vety tai yksinäinen alifaattinen radikaali ja R2 ei voi olla asyyliiradikaali [9, s.50].

2.4 Ureaasi

Ureaasi on selektiivinen entsyymi, jota hyödynnetään useissa urean määrittämissä. Selektiivinen entsyymi valikoi tarkasti molekyylin, johon se reagoi. Ureaasia käytetään määrittämissä joko lisättävänä reagenssina tai sidottuna veteen liukenemattomaan matriisiin, kuten esimerkiksi silica-helmiin. Sidottujen entsyymien käyttö on usein kannattavampaa kuin lisättävän reagenssin, sillä esimerkiksi määrittäksen kustannukset pienenevät ja entsyymien säilytysominaisuudet paranevat. [7.]

Ureaasi reagoi vain urean kanssa, katalysoiden sen entsymaattiseen hydrolyysireaktioon. Reaktiossa urea hydrolysoituu hiilidioksidiksi ja ammoniakiksi, jotka edelleen reagoivat veden kanssa ammoniumioneiksi ja vetykarbonaatti-ioneiksi. Ureapitoisuus määritetään ureaasia käytettäessä hydrolyysireaktiossa muodostuneiden ammoniakkin, ammoniumionien, vetykarbonaatti-ionien tai protoneiden mukaan. Kaavat 1, 2 ja 3 esittävät reaktion kulun. [11.]



Entsyymien käytössä on huomioitava entsyymien herkkyys pH:n ja lämpötilan muutoksille [12, s. 115]. Ureaasi-entsyymin ihanteellisin pH-arvo tuloksien kannalta on noin 7,4 [13].

3 Validointi

Validoinnin kulku ja siinä käytettävät parametrit suunniteltiin laboratoriossa aiemmin tehtyjen validointien mukaisiksi. Testattaviksi otettiin näin ollen mittausalue ja lineaarisuus, määrittäysraja, tarkkuus, toistettavuus ja toistotarkkuus, menetelmävertailu ja mittausepävarmuus. Kaikki testit suoritettiin 95:n % luottamustasolla.

3.1 Lineaarisuus ja mittausalue

Mittausalueella tarkoitetaan mittaussuureen tulosten aluetta, jolla mitattavan suureen tarkkuus ja toistotarkkuus pysyvät spesifien rajojen sisällä. Mittausalue voi olla analyysin lineaarista mittausaluetta suurempi. Lineaarilla mittausalueella mittaavan laitteen herkkyys eli mittaussignaalin arvomuutos suhteessa analyytin pitoisuudessa tapahtuvana muutokseen on vakio ja mittaussignaalin taso suhteessa analyytin pitoisuuteen on suoraan verrannollinen. Määritetyllä mittausalueella mittauslaitteen virhe pysyy tunnettujen rajojen sisäpuolella. [1, s. 13.]

3.2 Toteamis- ja määrittäysraja

Toteamisrajalla tarkoitetaan mitatun analyytin pienintä pitoisuutta, joka on mitattavissa 95:n % luotettavuustasolla ja joka eroaa nollanäytteen arvosta merkittävästi. Toteamisrajaksi määritetyn pitoisuuden tulee olla niin suuri, ettei sen voi katsoa olevan taustan satunnaisvaihtelusta aiheutuvaa. Toteamisraja lasketaan nollanäytteiden keskihajonnan avulla kaavalla 4, jossa μ on nollanäytteiden keskiarvo ja s niiden keskihajonta. [1, s.13.]

$$\textit{Toteamisraja} = \mu \pm 3 \times s, \quad (4)$$

Määrittäysraja tarkoittaa mitatun analyytin pienintä pitoisuutta, jolle voidaan suorittaa kvalitatiivisia mittauksia tietyllä luotettavuustasolla [1, s.13]. Määrittäysraja lasketaan nollanäytteiden keskihajonnan avulla kaavalla 5. Kaavassa μ on nollanäytteiden keskiarvo ja s niiden keskihajonta. [14, s.26.]

$$\textit{Määrittäysraja} = \mu \pm 6 \times s \quad (5)$$

3.3 Tarkkuus

Tarkkuudella tarkoitetaan mittaustuloksen ja todellisen arvon välistä yhteensopivuutta. Mitatun ja todellisen arvon yhteensopivuuteen vaikuttavat systemaattinen virhe ja satunnaisvirhe, jonka vuoksi on määritettävä myös mittauksen oikeellisuus ja toistotarkkuus. [15, s. 37.]

Oikeellisuus tarkoittaa mittaustulosten keskiarvon ja todellisen arvon yhtäpitävyyttä eli se kertoo menetelmän systemaattisen virheen osuuden. Oikeellisuus ilmaistaan tyypillisesti poikkeamana, joka määritetään vertailemalla validoitavalla menetelmällä saatuja tuloksia tiettyyn referenssiarvoon. Referenssiarvo saadaan tunnetusta vertailumateriaalista tai toisen tunnetun menetelmän avulla. Vertailumateriaaliksi ihanteellisin on sertifioitu matriisipohjainen näyte, joka muistuttaa mahdollisimman paljon validoinnissa tutkittavaa näytettä. [15, s. 35–36.]

3.4 Toistettavuus ja toistotarkkuus

Toistotarkkuus kertoo menetelmän toisistaan riippumattomien mittaustulosten keskinäisen paikkansapitävyyden tunnetuissa olosuhteissa, eli se kertoo menetelmän satunnaisvirheen osuuden. Toistotarkkuus ilmaistaan tulosten keskihajontana. [15, s.35.]

Laadunvalvontanäytteiden rajat

Laboratorion sisäisen laadunvalvonnan tarkoituksena on varmistaa, että menetelmälle määritetty mittausepävarmuus saavutetaan jokaisena päivänä menetelmää käytettäessä. Näin seurataan tulosten luotettavuutta. Tehokas sisäinen laadunvarmistus parantaa laboratorion menestystä laboratorioien välisissä vertailumittauksissa. [15, s. 51.]

LUVY ry käyttää päivittäisessä laadunvalvonnassa nollanäytteitä, kontrollinäytteitä ja rinnakkaisnäytteitä. Kaikki laadunvalvontanäytteet käsitellään samalla tavalla kuin varsinaiset näytteet. Laadunvalvontanäytteille määritetään validoinnin aikana hälytysrajat, joita tuloksen on noudatettava. Tarvittaessa määrittäessä olleista näytteistä otetaan erillisen ohjeistukseen perustuva määrä uusintamittaukseen, mikäli laadunvalvontanäytteiden tulokset eivät saavuta annettuja vaatimuksia.

3.5 Menetelmävertailu

Uutta menetelmää käyttöönotettaessa on hyvä suorittaa menetelmävertailua käytöstä poistuvaan menetelmään, mikäli uuden menetelmän validointiin ei ole olemassa sopivia referenssimateriaaleja [16, s. 61–62].

Tässä insinööriyössä menetelmävertailua suoritettiin mittaamalla näytesarjoja molemmilla menetelmillä saman päivän aikana. Menetelmien tulosten arviointiin käytettiin suhteellista eroprosenttia sekä tarkasteltiin kontrollinäytteistä laskettuja saantotuloksia SYKEn vuonna 2015 julkaiseman laboratorioden välisen pätevyyskokeen raportin esittämän ureamääritysten menetelmävertailun pohjalta.

3.6 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus kuvaa mitattavan suureen arvojen oletettua vaihtelua. Sen tarkoituksena on arvioida analyysituloksen tarkkuutta päätöksiä tehdessä ja vertailtaessa eri laboratorioden tuloksia toisiinsa. Se on kvantitatiivinen arvio rajoista, joiden sisäpuolella mittaustuloksen oletetaan olevan tietyllä todennäköisyydellä. Mittausepävarmuus lasketaan tilastollisten menetelmien avulla ja useimmiten käytetään 95:n % luotettavuusväliä. [15, s. 18.]

Mittausepävarmuutta arvioidaan menetelmän systemaattisen ja satunnaisen virheen määrittämisellä [14, s.22]. Systemaattinen virhe kertoo menetelmän poikkeaman, ja sitä voi aiheuttaa esimerkiksi mittaukseen käytetyn laitteen väärä kalibrointi tai muu epäkuntoisuus. Systemaattinen virhe pysyy mittauksista toistettaessa samana tai vaihtelee ennustettavasti. Poikkeaman merkittävyyttä arvioidaan suhteessa kokonaismittausepävarmuuteen. Mikäli poikkeama on näin arvioituna vähäinen, se voidaan jättää huomiotta. [15, s.30–32.]

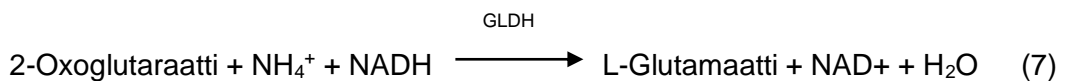
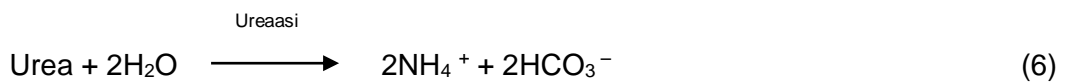
Satunnaisvirhe kertoo menetelmän sarjan sisäisen ja sarjojen välisen vaihtelun eli ennustamattoman virheen mittauksista toistettaessa. Sitä ei pystytä poistamaan mittauksesta kokonaan, vaan se on aina läsnä mittauksissa. Se aiheuttaa tuloksiin hajontaa sattumanvaraisesti tulosta pienentämällä ja suurentamalla. [17, s. 32.]

KOKEELLINEN OSA

4 Validoitava menetelmä ja laitteet

4.1 Validoitavan entsyymaattisen menetelmän toimintaperiaate

Tämän insinööriyön validoitava entsyymaattinen menetelmä perustuu ureaasin ja glutamaattidehydrogenaasin (GLDH) entsyymaattiseen reaktioon [18]. Reaktion kulku on esitetty tarkemmin seuraavasti:



Reaktiossa ureaasi hydrolysoi näytteessä olevan urean ammoniakiksi, jonka jälkeen ammoniakkipitoisuus määritetään spektrofotometrisesti aallonpituudella 340 nm. Näytteistä määritetään lisäksi sen alkuperäinen ammoniakkipitoisuus, jonka jälkeen saadaan kaavalla 8 laskettua näytteestä löytyvän urean määrä. Kaavassa *Urea (Ammonia)* tarkoittaa validoitavalla menetelmällä saatua mittaustulosta ja *Ammonia as N* tarkoittaa määritettyä alkuperäistä ammoniakkipitoisuutta. [18.]

$$\text{Urea (mg/l)} = \text{Urea (Ammonia) (mg/l)} - \left(\frac{\text{Ammonia as N}(\mu\text{g/l}) * 2,144}{1000} \right) \quad (8)$$

4.2 Validoitavan menetelmän valinta

Entsyymaattisia menetelmiä ureapitoisuuksien määrittämiseksi on useita, sillä ureaa määritetään uima-allasvesien ohella esimerkiksi verestä ja maidosta. Tässä insinööriyössä määrittämisen kohteena ovat uima-allasvedet, joten sopivinta menetelmää valittaessa huomionkohteena olivat lähinnä tähän tarkoitukseen suunnatut menetelmät. Menetelmää valittaessa käytiin lävitse myös esimerkiksi veren ja maidon ureapitoisuuksien analyysiin tarkoitettujen menetelmien soveltuvuutta uima-allasvesistöille, mutta niiden soveltaminen käytäntöön todettiin jo alkuvaiheessa kannattamattomaksi määrittämissä rajojen ja tarvittavien näytemäärien perusteella. [19;20.]

Uima-allasvesissä entsyymaattisella menetelmällä arvioitava ureapitoisuus saa uima-allasvesiasetuksen mukaan olla enintään 1,6 mg/l. Käytännössä uima-allasvesissä ihan-teellinen tilanne on, että ureaa ei analysoitavista näytteistä löydy tai pitoisuudet ovat erit-täin pieniä, sillä tämä kertoo allasvesien puhdistuksen toimivan hyvin. [1, s. 32- 33.] Näin ollen validoitavan menetelmän määritysrajan tulee olla varsin pieni, jotta allasvesinäyt-teiden pienimpiäkin ureapitoisuuksia pystytään luotettavasti määrittämään. Tällä kritee-rillä oli menetelmän valinnassa erityisen suuri merkitys, sillä laboratorion tavoitteena on löytää käytössä olevaa menetelmää tarkempia tuloksia antava menetelmä.

Menetelmää valittaessa määritysrajan lisäksi huomion kohteena oli näytemäärien tila-vuus ja tarvittavien reagenssien kulutus. Tarvittavan näytemäärän tilavuus tuli olla riittä-vän suuri, jotta näytepullosta pystytään pipetoimaan mahdollisimman edustava otos ana-lyysia varten.

Uima-allasvesille suunnattuja menetelmiä löytyi kolorimetrinen komparaattorimenetelmä ja fotometrinen menetelmä. Kolorimetrinen komparaattorimenetelmä karsiutui valintalis-talta pois suurpiirteisten tulosten vuoksi [21]. Värilevyjen avulla tulosten tulkinta kompa-raattorilla ei täytä laboratorion toivetta nykyistä menetelmää tarkemmista tuloksista. Fo-tometrinen menetelmä todettiin sopivimmaksi, kun menetelmän raaka-aineiden ja ana-lysaattorin valmistajalta saatiin menetelmästä tarkemmat tiedot. Valmistajan mukaan menetelmän määritysraja analysaattorilla on 0,064 mg/l [18]. Tämän perusteella arvioi-tiin, että sillä pystytään mittaamaan pienempiä ureapitoisuuksia kuin käytössä olevalla Koroleffin menetelmällä.

4.3 Perkin Elmer UV/VIS spektrofotometri Lambda 35 ja mittauskyvetit

Perkin Elmer UV/VIS spektrofotometri Lambda 35 on kaksisädeoptiikkaan perustuva spektrofotometri. Sillä pystytään suorittamaan määryksiä aallonpituusalueella 190–1100 nm. Sen aallonpituuden tarkkuus sekä toistettavuus ovat $\pm 0,1$ nm. Mittauksessa käytettävän kyvetin valotien tulee olla 1 cm. [22, s.45–46.]

Spektrofotometrillä mitataan näytteeseen ohjattavan valon ja sen läpi kulkeutuneen va-lon intensiteettien suhdetta aallonpituuden funktiona. Tutkittavan aineen absorptio selvi-tetään vähentämällä näytteen absorptiosta ns. taustan eli kyvetin pintojen heijastuksen

tuoma häiriö. Taustan vähentämisessä tällä spektrofotometrillä käytetään ns. säteenjakajaa, joka hajottaa säteilyn kahteen osaan. Nämä osat läpäisevät referenssikyvetin ja näytekyyvetin vuorotellen useita kertoja sekunnissa UV/VIS-spektrofotomerilla säteilyn lähteinä ovat UV-valon alueella (190–360 nm) deuteriumlamppu ja näkyvän valon (VIS) alueella (360–800 nm) volframi-halogeenilamppu. Mitattava näyte asetetaan kyvetissä paikoilleen valosäteen tielle. Toiminta perustuu Lambert-Beerin lakiin, eli kyvetin paksuuden tarkkuus on suoraan verrannollinen valotien tarkkuuteen. Näkyvän valon alueella, 310 nm:stä alkaen, kyvetiksi sopii lasikyvetti tai muovinen kertakäyttökyyvetti. UV-valon alueella tulee käyttää kvartsikyvettejä, jotka läpäisevät valoa jo 190 nm:stä alkaen. [17, s.55–60.]

4.4 Hach Lange LT 200 -lämpöhaude ja inkubointikyvetit

Hach Lange LT 200-lämpöhauteessa on kaksi 30 paikan lämmityslohkoa jotka voidaan lämmittää 37–150 °C asteeseen 0–480 minuutin ajaksi. Laitteessa on kolme standardiohjelmia ja mahdollisuus omien ohjelmien säätämiseen haluamansa lämpötilan ja ajastuksen mukaan. [23.] Validointia varten laitteeseen säädettiin oma ohjelma, jossa lämpötila on säädetty 37 °C asteeseen. Validoitavassa menetelmässä inkubointia suoritetaan kahdella eripituisella ajanjaksolla, joten laitteen ohjelmaan säädettiin lämmitysaika reilusti niiden yli. Näin laite ei sammuu huomaamatta kesken työskentelyn.

Perkin Elmer Lambda 35 -spektrofotometrissa käytettävät kyvetit eivät sovellu lämpölaitteeseen muotonsa vuoksi, joten inkubointivaihetta varten otettiin käyttöön laboratorioilta valmiiksi löytyviä 7 ml:n vetoisia kyvettejä. Nämä ovat malliltaan lieriöitä, joten ne soveltuvat laitteeseen hyvin.

4.5 Pipetit

Menetelmän vaatimat pipetit löytyvät laboratoriosta ennestään, joten lisäinvestointeja ei tarvita. Mikäli pipetoivia määriä muutetaan selvästi pienemmiksi luvussa 7.3. raportoidun alkukartoituksen arvion nähden, voivat lisäinvestoinnit erikokoisiin mikrolitrapipetteihin olla tarpeen.

5 Tulokset

5.1 Nykyisten laitteiden soveltuvuuden testaaminen valitulle menetelmälle

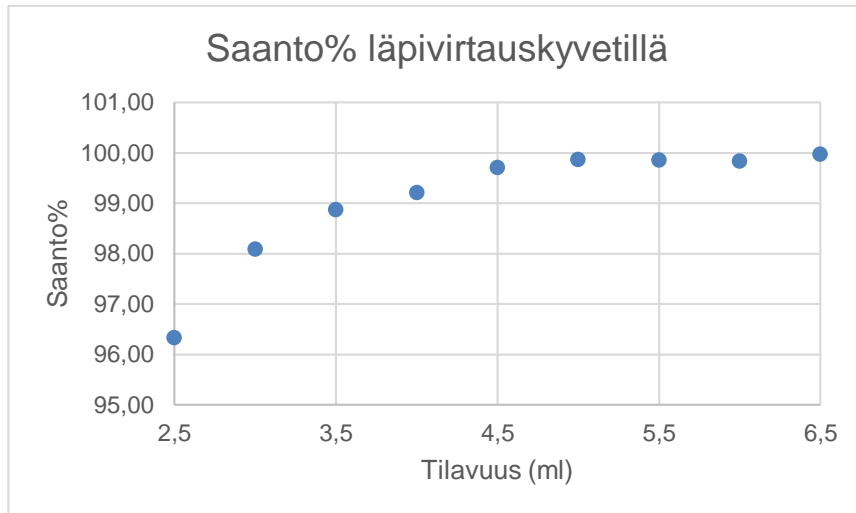
Perkin Elmer UV/VIS spectrometer Lamba 35 ja mittauskyvetit

Läpivirtauskyvetille suoritettiin useita mittaussarjoja eri tilavuuksilla, minkä tarkoituksena oli selvittää kyvetin vaatima minimi-tilavuus luotettavalle mittaustulokselle. Alla olevaan taulukkoon (taulukko 1) on kerätty mittaustulosten keskiarvot eri tilavuuksilla.

Taulukko 1. Läpivirtauskyvetin tulokset eri tilavuusmäärillä, mittaussarjojen keskiarvot. Läpivirtauskyvetille suoritettiin useita mittaussarjoja eri tilavuuksilla, jonka tarkoituksena oli selvittää läpivirtauskyvetin vaatima minimi-tilavuus luotettavalle mittaustulokselle.

ml	KA
0,5	0,0362
1	0,0938
1,5	0,1188
2	0,1281
2,5	0,1320
3	0,1344
3,5	0,1355
4	0,1359
4,5	0,1366
5	0,1368
5,5	0,1368
6	0,1368
6,5	0,1370

Tuloksista laskettiin saantoprosentit suhteessa jokaisen mittaussarjan suurimpaan mittaustulokseen. Saantoprosenttien tuloksista koostettiin kuvaaja (kuva 2). Saantoprosenttien perusteella läpivirtauskyvetin vaatima minimi-tilavuus luotettavalle mittaukselle on 5ml.



Kuva 2. Mittaustulosten saantoprosentit läpivirtauskyvetillä kokonaistilavuuksilla 2,5–6,5 ml. Läpivirtauskyvetille suoritettiin useita mittaussarjoja eri tilavuuksilla. Tuloksista laskettiin saantoprosentit suhteessa jokaisen mittaussarjan suurimpaan mittaustulokseen. Tämän tarkoituksena oli selvittää läpivirtauskyvetin vaatima minimi-tilavuus luotettavalle mittaustulokselle.

Läpivirtauskyvetin kokonaistilavuuden selvittämisen jälkeen suoritettiin vastaava testi 1 cm:n lasikyvetille. Testisarjoja eri tilavuuksilla suoritettiin kaksi ja laskettiin niistä keskiarvot (taulukko 2). Mittaustulokset kerättiin kuvaajaan (kuva 3). Näytetilavuuden vähimmäismäärän on oltava tällä kyvetillä vähintään 1,75 ml luotettavan mittaustuloksen saamiseksi.

Taulukko 2. 1 cm:n kyvetin tulokset eri tilavuuksilla. 1 cm:n lasikyvetille suoritettiin kaksi mittaussarjaa eri tilavuuksilla, jonka tarkoituksena oli selvittää kyvetin vaatima minimi-tilavuus luotettavalle mittaustulokselle.

ml	KA
0,25	0
0,5	0
0,75	0,0003
1	0,0781
1,25	0,1261
1,5	0,1403
1,75	0,0499
2	0,0462
2,25	0,0465
2,5	0,0461
2,75	0,0464

Kuvasta 3 nähdään, kuinka sentin kyvetiä käyttämällä tuloksissa tulee 1–1,5 millilitran kokonaistilavuuden kohdalla piikki. Piikki kertoo mittauksessa esiintyvistä häiriöistä. Häiriö häviää kokonaistilavuutta kasvattamalla, joka on havaittavissa tulosten tasaantumisesta.



Kuva 3. Kuvaaja 1 cm:n lasikyvetin mittaustulosten keskiarvoista. Kuvaajasta nähdään, kuinka sentin kyvetiä käyttämällä tuloksissa tulee 1–1,5 millilitran kokonaistilavuuden kohdalla piikki eli mittaushäiriö, jonka jälkeen tulokset tasaottuvat. Tulosten tasaottumisesta on nähtävissä kyvetin vaatima minimi-tilavuus luotettavalle mittaustulokselle.

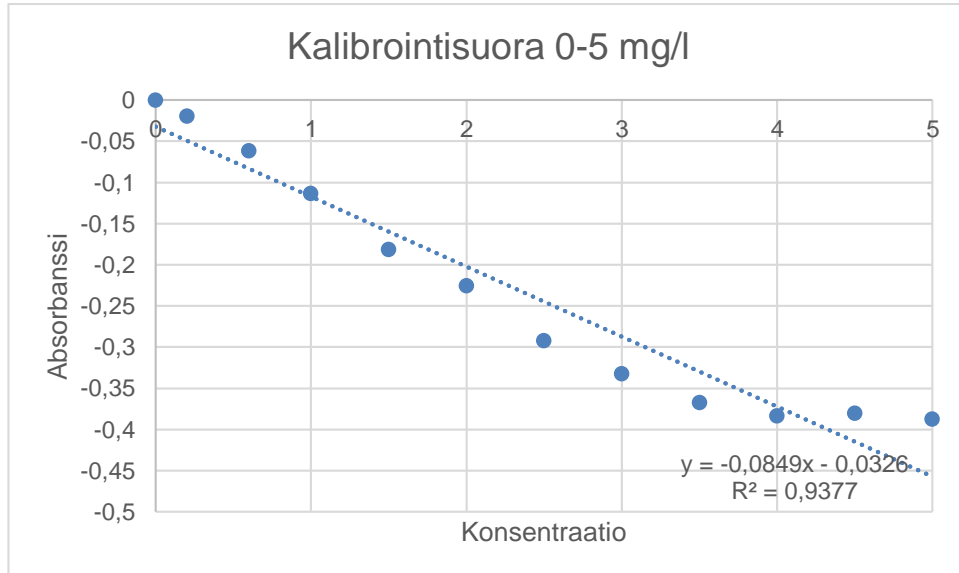
5.2 Lineaarisuus ja mittausalue

Menetelmälle luotiin spektrofotometrille kalibrintisuora urean standardiliuoksesta (1000 mg/l) tehtyjä laimennosliuoksia mittaamalla. Mitattavat liuokset olivat pitoisuudeltaan 0–5 mg/l.

Taulukko 3. Kalibrintisuoran pisteet. Taulukkoon on kerätty urean standardiliuoksen (1000 mg/l) eri laimennoksien mittaustulosten absorbanssit.

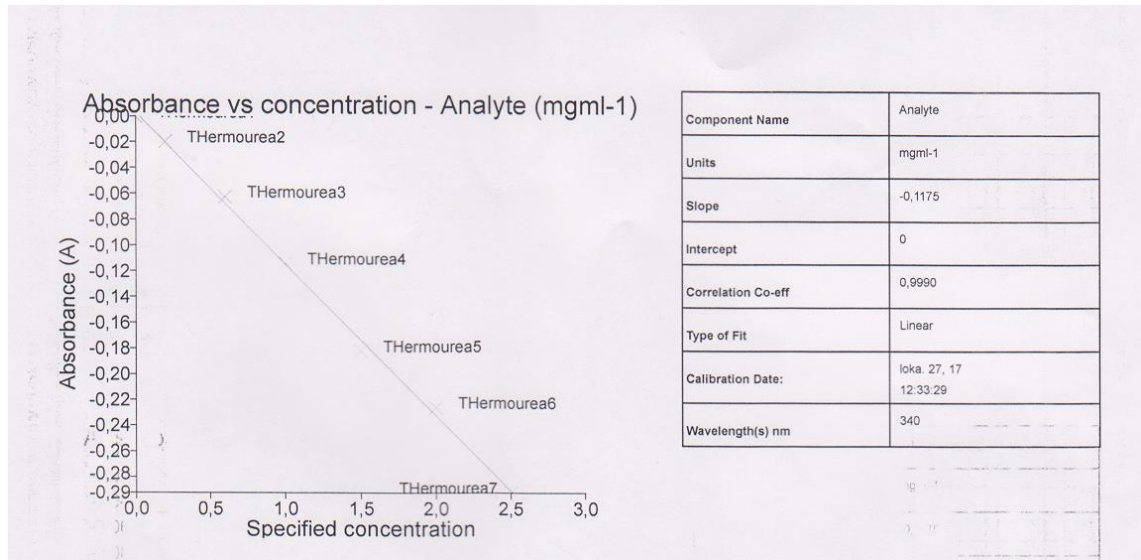
standardi mg/l	absorbanssi
0	-0,00041
0,2	-0,01962
0,6	-0,06228
1	-0,11387
1,5	-0,18204
2	-0,226
2,5	-0,2923
3	-0,33296
3,5	-0,36802
4	-0,38372
4,5	-0,38076
5	-0,38799

Kalibrintisuora kaikista mittaustuloksista (kuva 4) havainnollistaa menetelmän mittausalueen, eli alueen jolla tulokset asettuvat lineaarisesti suoralle. Suora on lineaarinen välillä 0–2,5 mg/l (kuva 5).



Kuva 4. Kalibrintisuora 0–5 mg/l. Kuvaaja havainnollistaa mittauspisteet jotka asettuvat lineaariselle suoralle. Tämä kertoo mittausalueen jolle menetelmä soveltuu.

Kuvassa 5 kalibrintisuora on siirretty spektrofotometrille. Suora lineaarinen ja sen korrelaatiokerroin on 0,999. Tulosten yksikkönä on virheellisesti mainittu mgml⁻¹, mutta sillä ei ole vaikutusta mittaustuloksiin tässä tapauksessa.



Kuva 5. Kalibroitisuora 0-2,5 mg/l spektrofotometrille siirrettyinä. Kuvaajan suora on laskeva ja korrelaatiokerroin 0,9990. Tulosten yksikkönä on virheellisesti mainittu mgml-1, mutta sillä ei ole vaikutusta mittaustuloksiin tässä tapauksessa.

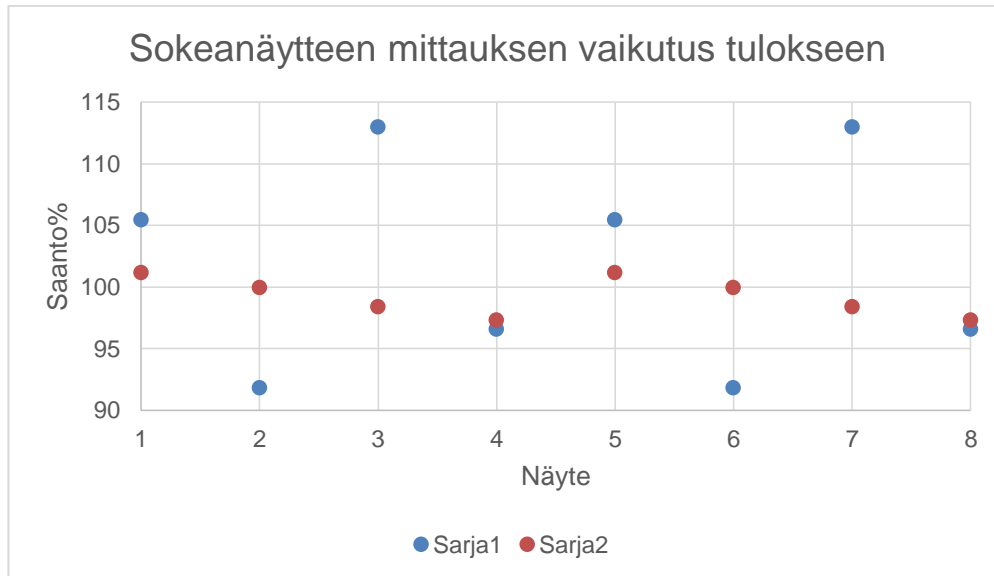
5.3 Määrityksen käytännön testaukset ennen validointia

Analyysin reagenssien kulutuksen pienentämiseksi selvitettiin sokeanäytteen mittaamisen välttämättömyyttä sekä mahdollisuutta pienentää määrittämisen kokonaistilavuutta.

5.3.1 Sokeanäytteen mittaamisen haasteet

Sokeanäytteen vaikutusta mittausten tuloksiin selvitettiin suorittamalla kaksi lyhyttä mittausarjaa kontrolli- ja standardinäytteille eri pitoisuusalueilla. Kuvassa 6 on havainnollistettu mittauksista saatuja tuloksia saantoprosenttien kautta käytetyn pitoisuustason teoreettiseen arvoon vertaamalla. Sarja 1 esittää tulokset, joissa on otettu huomioon sokeanäytteen vaikutus ja sarja 2 esittää tulokset ilman sokeanäytteen määrittämistä.

Saantoprosenttien perusteella sokeanäytteen mittaamisella on tuloksiin varsin vähäinen vaikutus kontrolli- ja standardinäytteillä. Varsinaisille uima-allasvesinäytteille ei suoritettu testejä ennen validointia. Niiden osalta sokeanäytteen mittaaminen on toistaiseksi välttämätöntä.



Kuva 6. Sokeanäytteen vaikutusta mittaustulokseen selvitettiin suorittamalla kaksi lyhyttä mittaussarjaa kontrolli- ja standardinäytteille eri pitoisuusalueilla. Kuvaajassa mittaustuloksia havainnollistetaan saantoprosenttien kautta käytetyn pitoisuustason teoreettiseen arvoon vertaamalla. Sarja 1 kertoo tulokset, joissa on otettu huomioon sokeanäytteen vaikutus lopputuloksessa ja sarja 2 saman näytteen tuloksen ilman sokeanäytteen määrittämistä. Kuvaajasta on havaittavissa, että sokeanäytteen vaikutus mittaustulokseen on hyvin pieni.

5.3.2 Kokonaistilavuuden pienentäminen

Reagenssien kulutuksen pienentämiseksi testattiin 0,7 ml:n kyvetin soveltumista menetelmälle. Suoritettiin kyvetille toistettavuutta mittaava testi mittaamalla kolme 18 mittauksen sarjaa pelkkää Synergy-vettä mittaamalla. Mittaus suoritettiin nostamalla kyvetti jokaisen mittauksen välissä pois ja asettamalla takaisin paikalleen, mikä mukaillee todellista käyttötilannetta validoitavalla menetelmällä. Lisäksi suoritettiin vertailuna yksi 18 mittauksen sarja liikuttamatta kyvetiä pois paikoiltaan mittausten välillä. Tuloksia havainnollistettiin kuvaajalla (kuva7).



Kuva 7. Kuvaaja ensimmäisen ja neljännen mittaussarjan tuloksista 0,7ml:n kyvetillä. Ensimmäinen mittaussarja on merkitty sinisellä värillä, neljäs sarja punaisella. Sininen sarja mukaillee todellista käyttötilannetta validoitavalla menetelmällä.

Kuvaajasta on havaittavissa, että 0,7 ml:n kyveti ei sovellu tälle menetelmälle käyttöön. Tuloksissa syntyy todellista käyttötilannetta mukaillessa huomattavaa vaihtelua, eikä mittauksia ole mahdollista suorittaa tällä menetelmällä poistamatta kyvetiä paikaltaan mittausten välillä

5.4 Toteamis- ja määritysraja

Valmistajan antama määritysraja menetelmälle on analysaattoria käytettäessä 0,064 mg/l. Määritysraja laskettiin validoitaessa suoritettujen näytesarjojen määrittämisen yhteydessä mitatuista nollanäytteistä (n=30) ja määritysrajaksi saatiin 0,29 mg/l. Toteamisraja laskettiin samojen nollanäytteiden mittausten pohjalta. Toteamisrajaksi saatiin noin 0,17 mg/l.

Taulukko 4. Nollanäytteiden tulosten yhteenveto. Nollanäytteitä mitattiin mittaussarjojen alussa aina kolme yhtä mittaussarjaa kohden. Nollanäytteitä kerättiin validoinnin aikana kaikkiaan 30 kappaletta, ja niiden keskiarvon ja keskihajonnan kautta laskettiin menetelmälle toteamisraja ja määrittäysraja.

Arvo	Tulos (mg/l)
Keskiarvo μ	0,038
Keskihajonta S	0,043
Toteamisraja $\mu + 3 S$	0,17
Määrittäysraja $\mu + 6 S$	0,29

Määrittäysraja osoittautui odotettua korkeammaksi, sillä noin kolmannes nollanäytteiden mittaustuloksista poikkeaa huomattavasti muista nollanäytteistä. Suoritettiin laskennallinen selvitys määrittäysrajalle ja toteamisrajalle, jossa nollanäytteiden poikkeavan suuret mittaustulokset jätettiin laskemien ulkopuolelle. Tällöin määrittäysraja on 0,16 mg/l ja toteamisraja 0,09 mg/l.

Taulukko 5. Nollanäytteiden rajat poikkeavan suurten tulosten pois jättämisen jälkeen. Menetelmän määrittäysrajan havaittiin olevan odotettua korkeampi, sillä kolmannes nollanäytteiden mittaustuloksista poikkeaa huomattavasti muista nollanäytteistä. Suoritettiin määrittäysrajalle ja toteamisrajalle laskennallinen selvitys, jossa poikkeavan suuret mittaustulokset jätettiin laskemien ulkopuolelle.

Arvo	Tulos (mg/l)
keskiarvo μ	0,013
keskihajonta S	0,025
toteamisraja $\mu + 3 S$	0,09
Määrittäysraja $\mu + 6 S$	0,16

5.5 Tarkkuus

Mittaustuloksista laskettiin eroprosentti suhteessa teoreettiseen arvoon. Tulokset ovat esitetty taulukossa 6. Taulukon tuloksiin käytetyt mittaustulokset löytyvät liitteestä 2. Tarkkuustulosten eroprosentit laskettiin kaavalla 9.

$$ero\% = \left(\frac{\text{mittaustulos}}{\text{teoreettinen arvo}} * 100\% \right) - 100 \quad (9)$$

Taulukko 6. Tarkkuustulosten yhteenveto. Menetelmän tarkkuus määritettiin mittaamalla kontrollinäytteiden pitoisuudet kahdelta eri pitoisuudelta kolmena eri päivänä. Tulosten perusteella laskettiin saantoprosentti ja eroprosentti kummallekin käytetylle pitoisuustasolle.

kontrollinäyte (n=30)	pitoisuus (mg/l)	saanto%
0,4 mg/l	0,433	108,14
2,0 mg/l	1,988	99,39

Menetelmän eroprosenteiksi saatiin 0,4 mg/l pitoisuusalueella 8,14 % ja 2 mg/l pitoisuusalueelle 0,61 %.

5.6 Toistettavuus ja toistotarkkuus

Toistettavuus ja toistotarkkuus määritettiin mittaamalla kontrollinäytteiden pitoisuudet kahdelta eri pitoisuudelta kolmena eri päivänä. Mittaustuloksista laskettiin kummallakin pitoisuustasolla keskiarvo, keskihajonta sekä suhteellinen keskihajonta (CV%). CV% laskettiin kaavalla 10. Menetelmän toistotarkkuus laskettiin ottamalla huomioon kaikki mittaustulokset eri päiviltä (taulukko 9).

$$CV\% = \frac{\text{keskihajonta}}{\text{keskiarvo}} * 100 \quad (10)$$

Taulukkoon 7 on kerätty yhteenveto eri mittauspäivinä pitoisuustasolla 0,4 mg/l saatujen mittaustulosten laskelmien tuloksista.

Taulukko 7. Tulosten yhteenveto pitoisuudella 0,4 mg/l. Kontrollinäytteitä mitattiin kolmena eri päivänä ja yksi mittaussarja sisälsi kolme nollanäytettä ja 10 kontrollinäytettä.

Päivä	Keskiarvo (mg/l)	ero% (keskiarvo)	keskihajonta	CV%
1	0,47	17,9	0,054	11,55
2	0,39	-1,32	0,046	11,75
3	0,43	7,82	0,073	17,03

Taulukkoon 8 on kerätty yhteenveto eri mittauspäivinä pitoisuustasolla 2,0 mg/l saatujen mittaustulosten laskelmien tuloksista.

Taulukko 8. Tulosten yhteenveto pitoisuudella 2,0 mg/l. Kontrollinäytteitä mitattiin kolmena eri päivänä ja yksi mittaussarja sisälsi kolme nollanäytettä ja 10 kontrollinäytettä

Päivä	Keskiarvo (mg/l)	ero% (keskiarvo)	keskihajonta	CV%
1	1,94	-3,1	0,048	2,46
2	2,01	0,5	0,063	3,06
3	2,02	0,8	0,076	3,76

Kontrollinäytteiden mittaustuloksista koostettiin päiväkohtaisten mittausten lisäksi yhteenveto. Tämän yhteenvedon mittaustuloksista laskettiin menetelmälle toistotarkkuus. Toistotarkkuuden tulokseksi saatiin 0,4 mg/l kontrollinäytteillä 15,14 % ja 2 mg/l kontrollinäytteillä 3,53 %.

Taulukko 9. Kontrollinäytteiden mittaustuloksista tehtiin lopuksi yhteenveto, jossa laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja CV% kummallekin pitoisuudelle.

Pitoisuus (mg/l)	keskiarvo (mg/l)	ero%	keskihajonta	CV%
0,4	0,43	8,14	0,065	15,14
2	1,988	-0,61	0,07	3,53

5.7 Laadunvalvontanäytteiden rajat

5.7.1 Kontrollinäytteiden rajat

Kontrollinäytteiden toiminta- ja hälytysrajat laskettiin kummallekin pitoisuusalueelle erikseen mittaustulosten keskihajontojen (s) ja teoreettisten arvojen kautta. YTR tarkoittaa toimintarajan ylintä arvoa, ATR toimintarajan alinta arvoa. YHR vastaavasti hälytysrajan ylintä ja AHR alinta arvoa. Laskut suoritettiin seuraavasti alla esitettyjen kaavojen mukaan:

$$YTR = \text{teoreettinen arvo} + 3 * s$$

$$ATR = \text{teoreettinen arvo} - 3 * s$$

$$YHR = \text{teoreettinen arvo} + 2 * s$$

$$AHR = \text{teoreettinen arvo} - 2 * s$$

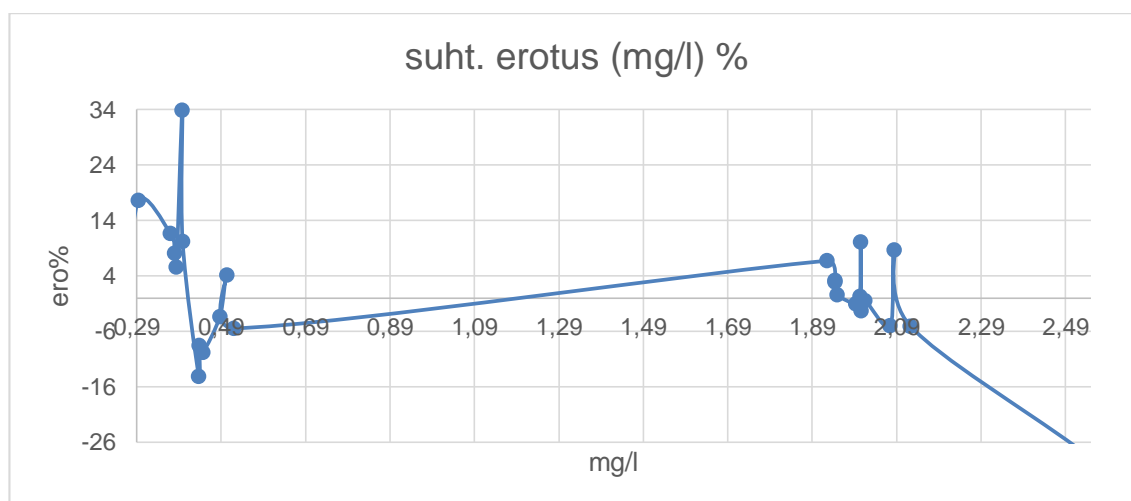
Taulukko 10. Kontrollinäytteiden toiminta- ja hälytysrajat. Taulukkoon on eritelty kontrollinäytteille (0,4 mg/l ja 2,0 mg/l) määritellyt raja-arvot sekä mittaustulosten keskiarvot ja keskihajonnat.

teor. pit. (mg/l)	n	ka (mg/l)	s	YTR	ATR	YHR	AHR
0,4	30	0,433	0,065	0,59	0,21	0,53	0,27
2,0	30	1,988	0,070	2,21	1,79	2,14	1,86

5.7.2 Rinnakkaisnäytteiden rajat

Rinnakkaismääritysten tuloksista laskettiin tulosten suhteelliset eroprosentit kaavalla 11. Suhteellisten eroprosenttien tuloksista koostettiin kuvaaja (kuva 8). Kuvaajasta jätettiin pois määritysrajan (0,29 mg/l) alle jääneet tulokset.

$$\text{suht. ero}\% = \frac{\text{mittaustulosten erotus}}{\text{mittaustulosten keskiarvo}} * 100\% \quad (11)$$



Kuva 8. Rinnakkaisnäytteiden hälytysrajojen laskentaa varten määritettiin ensin pitoisuusalueet rinnakkaisnäytteille koostamalla mitatuista rinnakkaisnäytteistä kuvaaja. Kuvaajan avulla tarkasteltiin silmämääräisesti, ovatko tulokset konsentraatiosta riippuvaisia. Kuvaajasta jätettiin pois määritysrajan (0,29 mg/l) alle jääneet tulokset.

Kuvasta 8 määritettiin silmämääräisesti rinnakkaisnäytteiden pitoisuusalueiksi 0,29–0,5 mg/l ja 0,5–2,5 mg/l. Näille pitoisuusalueille laskettiin hälytysrajojen laskennalliset arvot kertomalla pitoisuusalueen kontrollinäytteiden keskihajonta kahdella. Laskennallisen ar-

von pohjalta määritettiin menetelmän hälytysrajat vertaamalla laskennallisia arvoja kuvaajaan (kuva 8). Menetelmän hälytysrajaksi määritettiin pienelle pitoisuusalueelle 0,13 mg/l ja suurelle pitoisuusalueelle 11 % (taulukko 11).

Taulukko 11. Taulukkoon on koostettu yhteenveto menetelmälle määritetyistä hälytysrajoista rinnakkaisnäytteille eri pitoisuusalueilla. Hälytysrajojen laskennalliset arvot laskettiin kertomalla pitoisuusalueen kontrollinäytteiden keskihajonta kahdella.

Pitoisuusalue (mg/l)	s	Laskennallinen hälytysraja (mg/l)	Menetelmän hälytysraja
0,2 - 0,5	0,065	0,13	0,13 mg/l
0,5 - 2,5	0,070	0,14	11 %

5.8 Menetelmävertailu

Validoitavan ja käytössä olevan vanhan menetelmän vertailemiseksi mitattiin näytesarjoja oikeille uima-allasvesinäytteille (n=33) molemmilla menetelmillä saman päivän aikana. Mittaustuloksista laskettiin menetelmien suhteellinen eroprosentti kaavan 12 mukaisesti. Alle määritysrajan olevat mittaustulokset jätettiin laskemien ulkopuolelle, jolloin menetelmävertailuun osallistui 14 uima-allasvesinäytettä. Kaavassa A tarkoittaa validoitavan menetelmän mittaustulosta ja B käytössä olevan eli Koroleffin menetelmän mittaustulosta. Lasketuista eroprosenteista laskettiin keskiarvo.

$$\text{suht. ero\%} = \frac{(A-B)}{B} * 100\% \quad (12)$$

Menetelmävertailun tulokseksi saatiin 57,58 % (taulukko 12).

Taulukko 12. Menetelmävertailun tulos. Validoitavan ja käytössä olevan vanhan menetelmän vertailemiseksi mitattiin näytesarjoja oikeille uima-allasvesinäytteille molemmilla menetelmillä saman päivän aikana. Näytesarjat olivat kontrollinäytteiden pitoisuuksia lukuun ottamatta samanlaiset ja varsinaisia uima-allasvesinäytteitä mitattiin kaikkiaan 33. Alle määritysrajan olevat mittaustulokset jätettiin laskelmien ulkopuolelle, joten menetelmävertailun eroprosentin laskennassa mukana oli 14 näytettä.

	ero%
Keskiarvo (n=14)	57,58

5.9 Mittausepävarmuus

Menetelmän kokonaismittausepävarmuus ($u(\%)$) laskettiin kaavalla 13. Kaavassa $u_1(\%)$ tarkoittaa systemaattista virhettä ja $u_2(\%)$ satunnaisvirhettä. Tämän jälkeen laskettiin kummallekin pitoisuusalueelle laajennettu kokonaismittausepävarmuus ($U\%$) kaavalla 14. Pienelle pitoisuusalueelle laskettiin laajennettu kokonaismittausepävarmuus myös milligrammoina litrassa ($U \text{ mg/l}$). Tämä laskettiin kertomalla pitoisuusalueelle laskettu $U\%$ pienen pitoisuusalueen raja-arvojen (0,29 mg/l ja 0,5 mg/l) keskiarvolla.

$$u(\%) = \sqrt{\{(u_1(\%))^2 + (u_2(\%))^2\}} \quad (13)$$

$$U\% = u(\%) * 2 \quad (14)$$

Menetelmän mittausepävarmuudeksi laskettiin pienellä pitoisuudella 0,15 mg/l ja suurella pitoisuudella 12 % (taulukko 13).

Taulukko 13. Menetelmän mittausepävarmuus määritettiin kummallekin eri pitoisuusalueelle erikseen. Menetelmän systemaattisena virheenä käytettiin tarkkuusmäärityksissä kontrollinäytteille määritettyjen eroprocenttien keskiarvoja. Menetelmän satunnaisvirhe isoilla pitoisuuksilla laskettiin jakamalla rinnakkaisnäytteiden hälytysraja kahdella. Satunnaisvirhe pienillä pitoisuuksilla saatiin laskettua jakamalla kontrollinäytteiden (liite 2) keskihajonta kontrollinäytteiden teoreettisella pitoisuudella (0,4 mg/l).

Pitoisuusalue	0,29 - 0,5 mg/l	0,5 - 2,5 mg/l
Systemaattinen virhe $u_1(\%)$	8,14	0,61
Satunnaisvirhe $u_2(\%)$	16,25	5,5
Kokonaismittausepävarmuus $u(\%)$	18,17	5,53
Laajennettu kokonaismittausepävarmuus $U\%$	36,35	11,07
Laajennettu kokonaismittausepävarmuus U (mg/l)	0,14	
Ilmoitetaan jatkossa epävarmuus U	0,15 mg/l	12 %

6 Tulosten tarkastelu

Validointitestit suoritettiin aikavälillä 27.10.2017–20.1.2018. Aluksi validoitavalle menetelmälle tehtiin kalibrintisuora spektrofotometrille, jotta menetelmää voitiin kokeilla käytännössä. Ennen varsinaisten validointitestien aloittamista suoritettiin lyhyitä testisarjoja. Testisarjat olivat tarpeen, sillä validoitava menetelmä on suunniteltu analysaattorin käyttöön ja menetelmää oli kokeiltava manuaalisesti ensin käytännössä. Tämän tarkoituksena oli selvittää mahdolliset käytettävän välineistön muutostarpeet sekäärkevimmät käytännöt analyysin kulussa, jotta menetelmästä saataisiin mahdollisimman toimiva manuaalisesti suoritettavaksi. Varsinaiset validointitestit menetelmän validoimiseksi aloitettiin 14.12.2017.

6.1 Nykyisten laitteiden soveltuvuuden testaaminen valitulle menetelmälle

Menetelmää valittaessa oli selvítettävä laboratorion nykyisen laitteiston ja välineistön soveltuvuus kyseiselle menetelmälle. Selvityksen tarkoituksena oli kartoittaa lisäinvestointien tarvetta ja näin selvittää aloituskustannusten suuruutta.

6.1.1 Perkin Elmer UV/VIS spektrofotometri 35 ja mittauskyvetit

Välineistön alkukartoituksen aikana testattiin laboratorion valmiiksi löytyvien kyvettien soveltuvuutta validoitavalle menetelmälle. Aluksi selvitettiin, paljonko näytettä tarvitaan kun mittaus suoritetaan läpivirtauskyvetillä sekä mittauksen stabiilius. Mittaussarjassa mitattiin tulokset 0,5 millilitran välein välillä 0,5 -6,5 ml ja mittaussarjat suoritettiin seitsemän kertaa. Selvityksessä käytettiin elintarvikevärillä värjättyä laboratoriovettä ja aallonpituutta 630nm.

Kuvaajasta (kuva 2) on selkeästi havaittavissa piste, jossa tulokset eivät enää kasva eli minimitulavuus mittauksen onnistumiseksi on löytynyt. Voidaan todeta, että läpivirtauskyvetillä analysoitavan näytteen kokonaistilavuuden on oltava vähintään 5 ml, jotta tulokset olisivat luotettavia. Parhaat tulokset läpivirtauskyvetillä saatiin 6,5 millilitran kokonaistilavuutta käyttämällä.

Seuraavaksi suoritettiin kaksi mittaussarjaa myös 1 cm:n lasikyvetille, jotta saatiin selville vähimmäistilavuus mitattavalle näytteelle kyvetiä käytettäessä. Tällä kyvetillä tuloksia

arvioitiin suoraan mittaustuloksien perusteella laskemalla tuloksista keskiarvo ja havainnollistamalla niitä kuvaajan avulla (kuva 3). Sentin kyvetillä käytettiin pelkkää puhdasta laboratorio- eli Synergy-vettä, sillä mittaus suoritettiin pipetoimalla näytettä aina 0,25 ml lisää kyvetiin. Läpivirtauskyvetillä väriainetta tarvittiin helpottamaan mittauksia, sillä näytettä imettiin silmämääräisellä arviolla mittalasisista lisää jokaisen mittauksen välillä.

Kuvasta 3 nähdään, kuinka sentin kyvetiä käyttämällä tuloksissa tulee 1-1,5 millilitran kokonaistilavuuden kohdalla piikki, jonka jälkeen tulokset tasoittuvat lukemaan, joka on lopullinen mittaustulos. Piikin ilmeneminen kertoo mittauksessa ilmenevästä häiriöstä. Häiriön mahdolliseksi aiheuttajaksi arvioitiin nesteen korkeustaso, eli nesteen pinta osuu valotien eteen niin, että valosäde heijastuu pintaa vasten aiheuttaen näin tulosten vääristymistä. Näytetilavuuden vähimmäismäärän on oltava tällä kyvetillä vähintään 1,75 ml ylittääkseen tämän häiriöpisteen, jotta tuloksista saadaan luotettavia eikä mittaustulos enää muutu.

Selvityksen perusteella Perkin Elmer -spektrofotometri soveltuu validoitavalle menetelmälle, kun käytössä on tavallinen 1 cm:n kyveti. Läpivirtauskyvetin käyttö vaatisi tulosten perusteella kokonaistilavuuden kasvattamista valmistajan menetelmäohjeen mukaisesta määrästä vähintään viiteen millilitraan, jolloin reagenssien kulutus kasvaisi turhan suureksi. Myös 1 cm:n kyvetiä käytettäessä kokonaistilavuutta on kasvatettava, mutta tätä käyttämällä menetelmän käyttöönotto on vielä kannattavaa kustannusten osalta. Yksi mahdollisuus on myös hieman pienempään kyvetiin investoiminen, jolloin kustannuksia pystytään laskemaan entisestään. Tätä mahdollisuutta selvitettiin tarkemmin luvussa 6.3.2.

6.1.2 Kustannusarvio

Uusia laitteita ei validoitavaa menetelmää varten ole tarpeellista hankkia, sillä käytössä olevat ovat ominaisuuksiltaan sopivia. Kyvettien osalta on hyvä miettiä sopivinta mallia. Validoinnin aikana kokeiltiin kahta erikokoista kyvetiä mittauksen suorittamiseen, joista toinen osoittautui sopivammaksi spektrofotometrin vaatimuksiin. Ihanteellisina olisi löytää kyvetimalli, jossa soveltuisi sekä inkubointiin että mittauksen suorittamiseen. Näin näytettä ei tarvitsisi siirtää kyvetistä toiseen, jolloin kontaminaatiovaara pienenis. Lisäksi reagenssien kulutus vähenisi, sillä näytteiden sokeamittaukset pystyttäisiin todennäköisesti mittaamaan samasta näyteliuksesta kuin varsinainen mittaus. Tällainen kyveti voisi kuitenkin vaatia jo myös uusien laitteiden hankintaa.

Entsyaattisessa menetelmässä reagenssit ovat kalliimpia kuin Koroleffin menetelmän itse valmistettavat liuokset. Validoitavan menetelmän etuna Koroleffin menetelmän nähden on huomattava ajansäästö. Aktiivista työaikaa kuluu kummallakin menetelmällä suunnilleen yhtä paljon, mutta entsyaattisella menetelmällä tulokset valmistuvat puolet nopeammin huomattavasti lyhyemmän inkubaatioajan ansiosta. Tämä mahdollistaa suurempien näytemäärien analysoinnin nopeammin kuin käytössä oleva Koroleffin menetelmä.

Toisaalta validoitava menetelmä vaatii näytteiden analysoinnin kahden päivän sisällä niiden saapumisesta, sillä näytteitä ei kestävoidä. Käytännössä analyysit olisi näin ollen suoritettava kahdesti viikossa, kun käytössä olevalla menetelmällä analyysit pystytään näytteiden kestäväinnin ansiosta keskittämään pääsääntöisesti yhdelle kerralle.

6.2 Lineaarisuus ja mittausalue

Validoitava entsyaattinen menetelmä perustuu valmistajan antamaan ohjeistukseen menetelmästä. Valmistajan menetelmä sisältää valmiiksi kalibroitisuoran tulosten laskemista varten. Validoinnissa verrattiin valmistajan ohjeistuksen kalibroitisuoran esimerkkiä itse luotuun suoraan. Kalibroitisuoran luominen oli välttämätöntä, jotta menetelmä saatiin käyttöön spektrofotometrille.

Kalibroitisuora tehtiin validoitavalle menetelmälle käytössä olevan Koroleffin menetelmän ohjeistuksen mukaisesti, mutta ohjeistuksen kalibroitiliuosten pitoisuuksia kasvatettiin kaksinkertaisiksi. Kalibroitiliuokset valmistettiin Koroleffin menetelmässä käytetyllä standardin perusliuoksesta (1000 mg/l ureaa) laimentamalla. Kalibroitiohjeen liuosten pitoisuudet päädyttiin kasvattamaan kaksinkertaiseksi, sillä SYKE:n vuonna 2013 järjestämän laboratorioden välisen pätevyyskokeen raportin mukaan entsyaattisella menetelmällä saatavat tulokset ovat lähes kaksinkertaisia Koroleffin menetelmällä saattuihin tuloksiin verrattuna [10]. Lisäksi tehtiin muutama ylimääräinen näyte pitoisuuteen 5 mg/l asti. Tämän tarkoituksena oli katsoa, mihin pitoisuuteen asti tulokset ovat määritettävissä. Valmistajan ilmoittama suurin ilman laimentamista mitattavissa oleva pitoisuus on 2 mg/l.

Kalibrointi suoritettiin menetelmäohjeen mukaisesti muutoin, mutta nollausmittaukset väriin tuoman virheen poistamiseksi inkubointien välissä jätettiin pois, sillä kalibroinnissa käytettävät standardiliuokset ovat värittömiä eikä menetelmässä muodostu liuokseen väriä.

Taulukossa 3 on esitetty kalibroinnissa mitatut pisteet. Kalibrointisuoraa tarkasteltiin ensin koko skaalalla 0-5mg/l (kuva 4). Havaittiin, että suora lähtee kaartamaan ylöspäin noin 3 mg/l kohdalla, joka viittaa määritysrajan tulleen vastaan.

Tarkasteltiin suoraa välillä 0-2,5 mg/l kuvassa 5. Kuvaajan suora on laskeva ja korrelaatiokerroin 0,9990. Kuvan 5 kalibrointisuora on spektrofotometrin tekemä. Tulosten yksikönä on virheellisesti mainittu mgml-1, mutta sillä ei ole vaikutusta mittaustuloksiin tässä tapauksessa.

6.3 Määrittämisen käytännön kokeilut ennen validointia

Kalibrointisuoran määrittämisen jälkeen testattiin menetelmää käytännössä. Validoitava menetelmä on suunniteltu analysaattorilla suoritettavaksi, mutta LUVY ry:n laboratoriossa tarkoituksena on soveltaa menetelmä manuaaliseen määrittämiseen. Manuaalisessa määrittämisessä on huomioitava useita pieniä yksityiskohtia, jotta menetelmä soveltuisi manuaaliseen käyttöön mahdollisimman jouhevasti. Jo ensimmäisellä testikerralla havaittiin muutosvaatimuksia alkuperäisiin suunnitelmiin.

6.3.1 Sokeanäytteen mittaamisen haasteet

Käytännön kokeita varten tehtiin lyhyitä näytesarjoja, joissa on nollanäytteitä, standardinäytteitä, kontrollinäytteitä sekä varsinaisia testattavia allasvesinäytteitä. Ensimmäisessä kokeessa havaittiin ongelmalliseksi näytteen siirto lämpöhauteesta käytettävästä kyvetistä mittauskyvetiin ja tästä takaisin lämpöhauteen kyvetiin. Lämpöhauteen kyvetien kapea suu esti näytteen kaatamisen mittauskyvetistä takaisin niihin. Pipetillä siirtoa yrittäessä näytteen reagenssit vaahtosivat siinä määrin, että näyte valui yli reunojen. Menetelmäohjeen mukaan jokainen näyte on ensimmäisten reagenssien lisäämisen jälkeen mitattava näytteen omana sokeanäytteenä, jonka jälkeen lisätään viimeinen reagenssi ja inkuboidaan liuosta vielä hetki ennen varsinaisten mittaustulosten mittaamista [18].

Siirtämisen osoittauduttua haasteelliseksi koe toistettiin tekemällä jokaiselle näytteelle oma sokeanäytteensä. Tämä osoittautui sopivaksi käytännöksi, ja määritykset suoritettiin onnistuneesti. Menettelyllä on kuitenkin myös haittapuolensa. Sokeanäytteen tekeminen jokaiselle näytteelle kasvattaa kahden reagenssin kulutuksen kaksinkertaiseksi, jolloin analyysin kustannukset kasvavat. Kyseenalaista onkin, onko sokeanäyte tarpeellinen jokaisessa mittauksessa. Nollanäytteet ja laadunvalvontanäytteet ovat kirkkaita nesteitä, joiden koostumus tiedetään. Myös uima-allasvesille on asetettu uima-allasvesiasetuksessa tarkat rajoitukset esimerkiksi sameuden suhteen [8]. Valmistaja todennäköisesti suosittelee sokeanäytteen määritystä, sillä menetelmä on suunniteltu analyysaattorilla suoritettavaksi. Laitte on mitä ilmeisimmin ohjelmoitu toimimaan aina samalla kaavalla jokaisen näytteen kohdalla. Manuaalisessa menetelmässä näin toimiminen aiheuttaa lisätyötä ja kasvattaa kustannuksia, joten seuraavissa mittauksissa selvitettiin sokeanäytteen todellista vaikutusta tuloksiin.

Sokeanäytteen vaikutusta selvitettiin suorittamalla kaksi lyhyttä mittaussarjaa kontrolli- ja standardinäytteille eri pitoisuusalueilla. Kuvaajasta (kuva 6) on havaittavissa, sokeanäytteellä on varsin vähäinen vaikutus mittauksen tulokseen laadunvalvontanäytteissä. Suurimmat erot ovat havaittavissa pienimmissä näytteissä (nro 3 ja 7), joissa pitoisuudet olivat mittauksen pienimmät eli 0,4 mg/l. Alkuvaiheen testimittaukset ovat kuitenkin lyhyitä, joten otanta on pieni. Kokeen perusteella ei vielä voitu vetää selkeitä johtopäätöksiä varsinaisille uima-allasvesinäytteille sokeanäytteen mittaamisen tarpeellisuudesta. Pienen otannan vuoksi päätettiin varsinaisissa validointitesteissä mitata sokeanäytteet varsinaisille näytteille.

6.3.2 Kokonaistilavuuden pienentäminen

Koska sokeanäytteen määritys on vielä perusteltua ainakin varsinaisilla allasvesinäytteillä, kokeiltiin pienentää reagenssien kulutusta kokonaistilavuuteen vaikuttamalla. Otettiin käyttöön 0,7 ml:n mittauskyvetti. Kyvetiä testattiin käytännössä lyhyellä testisarjalla, mutta tuloksissa havaittiin huomattavaa vaihtelua, jota on havainnollistettu kuvassa 7.

Käytettävän 0,7 ml:n kyvetin valotien leveys on vain 2 mm, mikä on käytössä olevan spektrofotometrin vaatima minimi. Suoritettiin kyvetille toistettavuutta mittaava testi mittaamalla kolme 18 mittauksen sarjaa pelkkää Synergy-vettä mittaamalla. Mittaus suoritettiin nostamalla kyvetti jokaisen mittauksen välissä pois ja asettamalla takaisin paikal-

leen, mikä mukailee todellista käyttötilannetta validoitavalla menetelmällä. Kolmen ensimmäisen mittaussarjan tulokset olivat hyvin yhteneväisiä vaihtelultaan, eikä tuloksissa havaittu mittaustulosten vaihtelun vähenemistä. Lisäksi suoritettiin yksi 18 mittauksen sarja liikuttamatta kyvettä pois paikoiltaan mittausten välillä. Tämän tarkoituksena oli selvittää, voiko mittaustulosten vaihtelua selittää spektrofotometrin toiminnalla.

Mittausten perusteella havaittiin kuvan 7:n mukaista huomattavaa vaihtelua mittausten välillä kyvettä mittausten välillä pois nostettaessa. Ilmeisesti tämän aiheuttaa valotien leveys. Koska leveys on vain juuri ja juuri spektrofotometrin minimivaatimuksen täyttävä, on kyvetin käyttö hyvin herkkä pienellekin asentovirheelle. Tämä johtaa tulosten heikkoon toistettavuuteen, jolloin tulokset ovat epäluotettavia. Viimeisen mittaussarjan aikana havaittiin, että kyvetti soveltuisi käyttöön jos sitä ei tarvitsisi liikuttaa pois paikoiltaan mittausten välissä. Validoitavan menetelmän kohdalla näin ei kuitenkaan pysty toimimaan.

0,7 ml:n kyvetti osoittautui validoitavalle menetelmälle soveltumattomaksi, joten päätettiin siirtyä takaisin aiemmin käytettyyn kokonaistilavuuteen ja sentin kyvettiin ja aloitettiin varsinaisten validointitestien suorittaminen.

6.4 Toteamis- ja määrittämissrajat

Valmistajan antaman määrittämissrajan ja validoinnilla todetun määrittämissrajan eroon vaikuttaa todennäköisesti määrittämissajan kulun eroavaisuus. Valmistajan menetelmä on tehty analyysiaattorilla suoritettavaksi eli määrittämissajan vaikuttavia ulkopuolisia tekijöitä on oletusarvoisesti vähemmän kuin manuaalisesti analyysiä suoritettaessa.

Määrittämissrajaksi saatu 0,29 mg/l eroaa huomattavasti käytössä olevasta menetelmästä. Vaikka entsyymaattisten menetelmien tulosten taso on Suomen Ympäristökeskuksen vuoden 2015 laboratorioden välisen pätevyyskokeen raportin mukaan lähes kaksinkertainen suhteessa Koroleffin menetelmällä saatuihin tuloksiin, sen ei tulisi vaikuttaa määrittämissrajaan, sillä määrittämissraja määritetään nollanäytteistä. Nollanäytteissä ei ole ureaa eikä ammoniakkia, eli tulosten tulisi olla näin ollen selvästi lähempänä nollaa.

Validoinnissa haluttiin selvittää, mikä voisi olla syynä korkeahkoon määrittämissrajaan. Liitteessä 1 on eritelty tarkemmin nollanäytteiden tulokset näytteinä mitattuna. Tuloksista

on havaittavissa, että noin kolmannes tuloksista on huomattavasti muita suurempia. Noin kaksi kolmasosaa tuloksista on alle 0,03 mg/l, kun kolmannes mittauksista on lähellä arvoa 0,1 mg/l. Jos tuloksista poistetaan selvästi muista poikkeavan suuret mittaustulokset, ja lasketaan toteamisraja ja määrittäysraja jäljelle jäävien tulosten perusteella, määrittäysrajaksi saataisiin 0,16 mg/l, joka on jo hyvin lähellä Koroleffin menetelmälle määritettyä määrittäysrajaa (taulukko 5).

Todennäköisesti nykyinen tekniikka, jossa analysoitava liuos siirretään inkubointiin käytetystä kyvetistä mittauskyyvetiin, aiheuttaa mittausepävarmuutta tuloksissa. Tällä voi olla vaikutusta yhtenä tekijänä nollanäytteiden hajontaan. Validoinnissa havaittiin näyteliuoksen olevan myös herkästi vaahtoavaa, eli liuokseen jäi helposti pieniä kuplia. Kuplillakin saattaa olla vaikutusta tuloksiin, ja niiden määrää on viisainta yrittää minimoida antamalla näytteen siirron jälkeen ns. asettua kyvetissä heti.

Nollanäytteiden mittausepävarmuutta aiheuttavien tekijöiden kartoituksen ohella tehtiin lisäksi seuranta validoinnin ajan spektrofotometrillä. Seurannan tarkoituksena oli selvittää, voiko spektrofotometrin toiminnalla olla vaikutusta nollanäytteissä esiintyviin, valtaosaa selvästi suurempiin mittaustuloksiin. Seurannassa mitattiin ennen nollanäytteitä pelkkää puhdasta Synergy-vettä Synergy-vettä vastaan. Tällöin tulosten tulisi olla käytännössä nolla, sillä laite nollattiin Synergy-vettä käyttäen ja mitattiin vesi heti nollauksen jälkeen. Testin perusteella tulokset olivat keskimäärin luokkaa 0,024 mg/l, joka on sama kuin valtaosalla näytteenä mitatuista nollanäytteistä. Poikkeavan suurien nollanäytteiden ei seurannan perusteella voi spektrofotometrin toiminnalla selittää.

Mikäli mittausepävarmuutta tuovia tekijöitä saadaan vastaisuudessa poistettua parantamalla analyysin manuaalista suoristusta, on mahdollista että nyt määrittäysrajaksi asetettu 0,29 mg/l ja toteamisraja 0,17 mg/l laskevat tulevaisuudessa. Yksi keino tähän olisi esimerkiksi sellaisten kyvettien hankinta, joissa näytteet pystyttäisiin sekä mittaamaan että inkuboimaan ilman näyteliuoksen astiasta toiseen siirtoa.

6.5 Tarkkuus

Menetelmän tarkkuus määritettiin mittaamalla kontrollinäytteiden pitoisuudet kahdelta eri pitoisuudelta kolmena eri päivänä. Mitattavina pitoisuuksina olivat 0,4 mg/l ja 2 mg/l kontrollinäytteet. Näitä pitoisuuksia käytettiin kontrolleissa validoinnin aikana myös laadunvalvontanäytteinä varsinaisia uima-allasvesinäytteitä määritettäessä. Jokainen mittaus-sarja sisälsi kolme nollanäytettä ja 10 kontrollinäytettä valitulla pitoisuudella.

Menetelmän tarkkuus osoittautui pienellä pitoisuustasolla heikommaksi kuin suurella. Suurella pitoisuustasolla menetelmän tarkkuus on hyvä. Pienelle pitoisuustasolle laskettu tarkkuus ei ole validoinnin tavoitteiden mukainen, sillä menetelmän tulisi soveltua erityisesti pienten ureapitoisuuksien mittaamiseen. Tarkkuus on kuitenkin riittävä menetelmän käyttämiselle.

6.6 Toistettavuus ja toistotarkkuus

Toistettavuus ja toistotarkkuus määritettiin mittaamalla kontrollinäytteiden pitoisuudet kahdelta eri pitoisuudelta kolmena eri päivänä. Tässä hyödynnettiin luvussa 6.4. esitettyjä tarkkuusmäärittelyyn käytettyjä mittaustuloksia (liite 2).

Tuloksista laskettiin kummallakin pitoisuustasolla keskiarvo, keskihajonta sekä suhteellinen keskihajonta (CV%). CV% laskettiin kaavalla 10. Tuloksista tehtiin yhteenveto jokaiselta päivältä erikseen sekä kaikista päivistä yhteensä. Taulukossa 8 on esitetty tulosten yhteenveto päiväkohtaisesti 0,4 mg/l vahvuksilla kontrollinäytteillä ja taulukossa 7 on vastaavasti eriteltyä 2,0 mg/l vahvuisten kontrollinäytteiden tulokset.

Mittaustuloksista tehtiin lopuksi yhteenveto, jossa laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja CV% kaikkien mittaustulosten pohjalta kummallekin pitoisuudelle. Yhteenveto tuloksista on esitetty taulukossa 9. Mittaustulosten perusteella toistotarkkuus on tarkkuusmittausten tapaan hyvä suurilla pitoisuuksilla ja heikompi pienillä pitoisuuksilla.

6.7 Laadunvalvontanäytteiden rajat

Kontrollinäytteiden mittaustulosten perusteella laskettiin menetelmän laadunvalvontaa varten toiminta- ja hälytysrajat kontrollinäytteille ja rinnakkaisnäytteille.

6.7.1 Kontrollinäytteiden rajat

Kontrollinäytteiden toiminta- ja hälytysrajat laskettiin pitoisuusalueille 0,4 mg/l ja 2,0 mg/l erikseen mittaustulosten keskihajontojen (s) ja teoreettisten arvojen kautta. Yhteenveto tuloksista on esitetty taulukossa 10. [24, s. 19–21.] Tuloksien laskentaan käytetyt mittaustulokset ovat esitetty liitteessä 2.

6.7.2 Rinnakkaisnäytteiden rajat

Rinnakkaisnäytteiden hälytysrajojen laskentaa varten määritettiin ensin pitoisuusalueet rinnakkaisnäytteille. Tähän käytettiin varsinaisten näytesarjojen yhteydessä rinnakkaisnäytteinä mitattuja määrityksiä sekä kontrollinäytteitä soveltuvin osin. Kontrollinäytteissä rinnakkaisnäytteeksi tulkittiin samassa mittaussarjassa mitatut näytteet samalta pitoisuusalueelta, eli perättäiset saman pitoisuusalueen kontrollinäytteet samasta mittaussarjasta otettiin toistensa rinnakkaisnäytteiksi. Näin meneteltiin, sillä mittaussarjoja ehdittiin suorittamaan validoinnin aikana rajallinen määrä, eikä varsinaista näytteistä mitattuja rinnakkaisia kertynyt riittävän suurta otantaa. Rinnakkaisia saatiin näin koostettua tulosten käsittelyä varten 30 kappaletta.

Rinnakkaismääritysten tuloksista laskettiin tulosten suhteelliset eroprosentit kaavalla 10. Mittaustulokset (liite 3) järjestettiin suuruusjärjestykseen ensimmäisen mittaustuloksen perusteella ja niitä tarkasteltiin silmämääräisesti kuvaajaa (kuva 8) apuna käyttäen. Tämän tarkoituksena oli selvittää, ovatko tulokset konsentraatioista riippuvaisia. [24, s.14–15; 24,s.19–21.]

Kuvaajasta jätettiin pois määritysrajan (0,29 mg/l) alle jääneet tulokset. Kuvaajan avulla voitiin todeta tulokset konsentraatiosta riippuvaisiksi ja pitoisuusalueiksi määritettiin 0,29–0,5 mg/l ja 0,5–2,5 mg/l. Kuvaajassa on havaittavissa yksittäisen näytteen selvä poikkeama muista ison pitoisuusalueen arvoista. Yksittäisenä poikkeamana se jätettiin pois silmämääräisestä arviosta.

Rinnakkaisnäytteiden perusteella arvioituille pitoisuusalueille määritettiin hälytysrajat tarkkuuden määrittämiseen käytettyjen kontrollinäytteiden mittaustulosten avulla. Kontrollinäytteiden keskihajonnasta eli menetelmän satunnaisvirheestä (s) määritetään rinnakkaisnäytteiden laskennalliset hälytysrajat. [24, s. 20–21.] Hälytysrajojen laskennalliset arvot laskettiin kertomalla pitoisuusalueen kontrollinäytteiden keskihajonta kahdella. Laskennallisten hälytysrajojen kautta määritettiin menetelmän varsinaiset hälytysrajat. Hälytysrajat määritettiin pienelle pitoisuusalueelle absoluuttisena erotuksena (mg/l) ja suurelle pitoisuusalueelle suhteellisena eroprosenttina.

Laskennallisia hälytysrajoja verrattiin validoinnin yhteydessä saatuihin rinnakkaistuloksiin (kuva 8) ja määritettiin näin menetelmän hälytysraja kummallakin pitoisuusalueella. Pienen pitoisuusalueen laskennalliseksi hälytysrajaksi saatiin 0,13 mg/l. Kuvan 8 esittämät tulokset kyseisellä pitoisuusalueella mahtuvat laskennallisen hälytysrajan sisälle, joten menetelmän hälytysrajaksi asetettiin tällöin laskennallinen hälytysraja eli 0,13 mg/l. Ison pitoisuusalueen laskennalliseksi hälytysrajaksi saatiin keskihajonnan kautta 9,3 %. Kuvaajan tulokset isolla pitoisuusalueella eivät mene laskennallisen hälytysrajan antamiin rajoihin, joten rajaa nostettiin vastaamaan kuvaajan mittaustuloksia. Näin menetelmän hälytysrajaksi isolle pitoisuusalueelle määritettiin 11 %. Yhteenveto tuloksista on esitetty taulukossa 11.

6.8 Menetelmävertailu

Validoitavan ja käytössä olevan vanhan menetelmän vertailemiseksi mitattiin näytesarjoja oikeille uima-allasvesinäytteille molemmilla menetelmillä saman päivän aikana. Näytesarjat olivat kontrollinäytteiden pitoisuuksia lukuun ottamatta samanlaiset, sisältäen varsinaisten näytteiden lisäksi sarjan alussa kolme nollanäytettä, kaksi kontrollinäytettä ja sarjan lopussa kaksi kontrollinäytettä. Käytössä olevan menetelmän kontrollinäytteiden pitoisuudet ovat 0,2 mg/l ja 0,8 mg/l, kun validoitavalla menetelmällä käytettiin pitoisuuksia 0,4 mg/l ja 2 mg/l. Lisäksi jokaista sarjaa kohden mitattiin yksi näyte rinnakkaisena. Kaikkiaan menetelmävertailussa mitattiin 33 uima-allasvesinäytettä (liite 4), joista jätettiin laskelmien ulkopuolelle alle määritysrajan olleet mittaustulokset. Näin ollen menetelmävertailun laskennassa huomioitiin vain 14 näytettä.

Hypoteesina oli, että tulokset uima-allasvesinäytteistä olisivat validoitavalla menetelmällä lähes kaksinkertaisia käytössä olevan menetelmän tuloksiin nähden. Hypoteesin perustana käytettiin SYKEN laboratorioiden välisen uima-allasvesien pätevyyskokeen raporttia, jonka mukaan entsyymaattisella menetelmällä tulokset ovat lähes kaksinkertaisia Koroleffin menetelmään verrattuna [10].

Menetelmävertailun tulosta voidaan pitää hyväksyttävänä, sillä se on yli 50 %. Tuloksen olisi kuitenkin hyvä olla lähempänä sataa prosenttia, jotta se olisi hypoteesin mukainen. Liitteessä 4 on merkitty (*- merkillä huomattavan suuret negatiivisen arvot saaneet tulokset. Nämä jätettiin laskelmien ulkopuolelle kuten muutkin alle määritysrajan olleet tulokset. Todellisessa määristilanteessa näin negatiiviset tulokset tulisi uusia mittaustuloksen tarkastamiseksi. Tuloksista kaikkiaan viidellä 33:sta vertailumittauksesta tulokseksi saatiin huomattavan negatiivisia arvoja. Alle määritysrajan olevia vertailutuloksia oli kaikkiaan 57,6 prosenttia. Tämän myötä laskelmiin kelpollisia tuloksia kertyi validoinnin aikana niin pieni otos, että päätettiin vertailla arvoja Suomen Ympäristökeskuksen vuoden 2016 uima-allasvesimäärittelyn pätevyyskoeraportissa esitettyihin tuloksiin ureapitoisuuksista.

Raportissa eri menetelmiä on vertailtu laskemalla eri laboratorioiden tulosten keskiarvosta saantoprosentti suhteessa näytteen laskennalliseen arvoon. Tuloksiksi on saatu eri näytteillä entsyymaattisella fotometrisella menetelmällä 102–111 %. [25.] Koska validoinnin aikana ei menetelmävertailussa olleille näytteille ollut tiedossa varsinaista laskennallista arvoa, käytetään vertailussa SYKEN raporttiin liitteessä 2 esitettyjä kontrollinäytteiden tuloksia. Tuloksista laskettiin luvussa 6.5. saantoprosentit kahdelle eri pitoisuusalueelle. Pitoisuusalueella 0,4 mg/l saantoprosentiksi saatiin 108,14 % ja pitoisuusalueella 2,0 mg/l 99,39 %.

SYKEN raportissa tuloksia on tulkittu siten, että saantoprosentin ollessa näytteestä riippuen joko 80–120 % tai 90–110 %, menetelmä on todettu uima-allasvesien määrittelyyn soveltuvaksi ilman lisävalidointia. Tässä insinööriyössä saatujen kontrollinäytteiden saantoprosentit mukailevat SYKEN pätevyyskoeraportin tuloksia, joten menetelmää voi pitää uima-allasvesien määrittelyyn soveltuvana. On kuitenkin huomioitava että SYKEN raporttiin vertailuun käytettiin kontrollinäytteillä saatuja tuloksia eikä varsinaisia uima-allasvesinäytteitä kuten SYKEN pätevyyskokeessa.

6.9 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus määritettiin kummallekin pitoisuusalueelle erikseen. Mittausepävarmuutta arvioitaessa määritettiin ensimmäiseksi menetelmän systemaattinen virhe ja satunnaisvirhe. Menetelmän systemaattisena virheenä käytettiin tarkkuusmäärityksissä kontrollinäytteille määritettyjen eroprosenttien keskiarvoja. Menetelmän satunnaisvirhe isoilla pitoisuuksilla laskettiin jakamalla rinnakkaisnäytteiden hälytysraja kahdella. Satunnaisvirhe pienillä pitoisuuksilla saatiin laskettua jakamalla kontrollinäytteiden (liite 2) keskihajonta kontrollinäytteiden teoreettisella pitoisuudella (0,4 mg/l).

Laskelmien tarkat tulokset on esitetty taulukossa 13. Laskettujen mittausepävarmuusarvojen pohjalta luvut pyöristettiin ylöspäin.

Menetelmälle laskettu mittausepävarmuus on pienellä pitoisuustasolla melko suuri, mikä mukailee validoinnin aikana havaittua hajontaa pienten ureapitoisuuksien kohdalla. Satunnaisvirhe on pienillä pitoisuuksilla huomattavan suuri isoon pitoisuustasoon verrattuna, mikä vaikuttaa kokonaismittausepävarmuutta nostavasti. Tämän pienentäminen vaatisi todennäköisesti selkeitä muutoksia menetelmään esimerkiksi kyvetin valintaan huomiota kiinnittämällä. Pienellä pitoisuustasolla menetelmä on selvästi herkempi esimerkiksi näyteliuoksen inkubointikyvetistä mittauskyvetiin siirtämisen aiheuttaman vaahtoamisen tuomille häiriöille mittaustulokseen.

7 Yhteenveto

Työn tavoitteena oli validoida laboratoriolle entsyymaattinen määritysmenetelmä urean määrittämiseen uima-allasvesinäytteistä. Laboratorio on kiinnostunut vaihtamaan käytössä olevan menetelmän entsyymaattiseen, sillä entsyymaattisilla menetelmillä on raportoitu pystyttävän määrittämään tarkempia ureapitoisuuksia. Validointiin valittu menetelmä on suunnattu analysaattorikäyttöön ja sen määritysraja on valmistajan antamien tietojen mukaan käytössä olevaa Koroleffin menetelmää alhaisempi.

Ennen validoinnin alkua menetelmää muokattiin manuaalisesti määritettäväksi. Tavoitteena oli selvittää menetelmän sopivuus laboratorion nykyisillä laitteilla määritettäväksi. Menetelmä saatiin muokattua laboratorion laitteistoille soveltuvaksi, mutta tämän myötä määritysraja määritettiin suuremmaksi kuin käytössä olevan menetelmän. Menetelmän

tasoerosta on raportoitu kuitenkin jo SYKE:n pätevyyskokeiden tulosten myötä, joten jo validoinnin alussa oli ennakoitavissa tulosten tason muutos. Tämä ei ole este menetelmän käyttöönotolle. Määritysrajan kasvamisen myötä laboratorion tavoite saada tarkempia tuloksia myös pienille ureapitoisuuksille ei toteutunut validoinnin perusteella. Validoinnin aikana havaittiin menetelmän sopivan suurille pitoisuuksille pieniä paremmin. Pienillä ureapitoisuuksilla suhteellinen keskihajonta osoittautui selvästi suuremmaksi kuin isoilla pitoisuuksilla.

Menetelmävertailussa saatiin validoinnissa eroprosentiksi 57,58 %. Tulos mukaili hypoteesia, jonka mukaan menetelmällä saadaan lähes kaksinkertaisia tuloksia uudella menetelmällä vanhaan verrattuna. Menetelmävertailussa läpikäytyjen kontrollinäytteiden saantoprosentin perusteella menetelmä soveltuu uima-allasvesien määrittämiseen.

Validoinnissa aikana havaittiin menetelmän kyvettien tuovan haasteita määrittämisessä. Todennäköisesti menetelmän mittausepävarmuus laskisi, mikäli investoitaisiin kyvetiin jossa näyteliuksen voi sekä inkuboida että mitata siirtämättä liuosta kyvetistä toiseen. Ratkaisu vähentäisi myös reagenssien kulutusta.

Menetelmää saatiin validoinnin aikana kehitettyä lupaavaan suuntaan, mutta menetelmä ei vielä sovellu laboratorion käyttöön uima-allasvesien ureapitoisuuden määrittämiseksi. Menetelmä vaatii lisävalidointia, jotta määritysrajaa saataisiin alhaisemmaksi sekä parannettaisiin pienten ureapitoisuuksien määrittämisen tarkkuutta.

Lähteet

- 1 Allasvesiasetuksen soveltamisohje. 2017. Verkkoaineisto. Valvira. <https://www.valvira.fi/documents/14444/261239/Allasvesiasetuksen_soveltamisohje.pdf/f6bc9091-304e-49d3-a9ac-019bd7573db0>. 12.5.2017. Luettu 8.9.2017.
- 2 Urea. Verkkoaineisto. NCBI. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1176#section=Experimental-Properties>>. Luettu 19.2.2018.
- 3 Urea. 1997. Verkkoaineisto. Työterveyslaitos. <<http://kappa.ttl.fi/kemikaalikortit/khtml/nfin0595.htm>>. Luettu 1.12.2017.
- 4 Urea. 2018. Verkkoaineisto. Merck KGaA. <http://www.merckmillipore.com/FI/en/product/Urea,MDA_CHEM-818710?RefererURL=https%3A%2F%2Fwww.google.fi%2F>. Luettu 19.2.2018.
- 5 Puttonen, Mikko. 2011. Iho ei vaadi ihmeitä. Verkkoaineisto. Tiede-lehti. <https://www.tiede.fi/artikkeli/jutut/artikkelit/iho_ei_vaadi_ihmeita>. Luettu 26.2.2018.
- 6 Saltzman, Martin D. Friedrich Wöhler. Verkkoaineisto. Advameg, Inc. <<http://www.chemistryexplained.com/Va-Z/W-hler-Friedrich.html>>. Luettu 19.2.2018.
- 7 Algert, E.; del Valle, S.; Jurkiewicz, S.; Martinez-Fabregas, E. 1996. Automated analytical biosystem for urea monitoring. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 327, Issue 3, s. 243-251.
- 8 Sosiaali- ja terveysministeriön asetus uimahallien ja kylpylöiden allasvesien laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista. 2002. Helsinki. 315/2002.
- 9 Koroleff F. 1979. Meriveden yleisimmät kemialliset analyysimenetelmät. Verkkoaineisto. Merentutkimuslaitos. <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/157375/Meri_7_1979.pdf?sequence=1>. Luettu: 9.1.2018.
- 10 Laboratorioiden välinen pätevyyskoe 01/2015: Uima-allavesimääritykset. 2015. Suomen Ympäristökeskus. Verkkoaineisto. <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/154078/SYKEra_12_2015.pdf?sequence=1>. Luettu 1.12.2017.
- 11 Biebow Martin; Gujer Willi; Larsen Tove A. & Udert Kai M. 2003. Urea hydrolysis and precipitation dynamics in a urine-collecting system. *Water Research*. Vol. 37, s. 2571-2582.
- 12 Haajanen, Kari; Pärssinen, Raimo; Suominen, Ilari. 2012. Biogeeni – Ammatillista biokemiaa ja geenitekniikkaa. Helsinki: Opetushallitus.

- 13 Urease. 2018. Verkkoaineisto. Worthington Biochemical Corporation. <<http://www.worthington-biochem.com/urc/default.html>>. Luettu 19.2.2018.
- 14 Hägg Margareta. 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Verkkoaineisto. Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy. <<http://www.vtt.fi/inf/pdf/technology/2016/T276.pdf>>. Luettu 27.11.2017.
- 15 Kemian metrologian opas. 2005. Verkkoaineisto. MIKES. <<http://www.vtt.fi/inf/pdf/MIKES/2005-J6.pdf>>. Luettu 27.11.2017.
- 16 Mäkinen, Irma; Niemi, Ritva; Saares, Riitta & Suortti, Anne-Mari. 1996. Ohjeita ympäristönäytteiden kemiallisten analyysimenetelmien validointiin. Helsinki: Suomen Ympäristökeskus.
- 17 Jaarinen Soili; Niiranen Jukka. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki: Edita Prima Oy.
- 18 Enzymatic Analysis of Urea from Swimming Pool Waters. 2014. Verkkoaineisto. International Labmate Limited. <https://www.envirotech-online.com/article/water-wastewa-ter/9/kirsti_nikkola_marita_jokinen_tuula_jumppanen_mari_klemm_juhani_airo_annu_suoniemi-khr/enzymatic_analysis_of_urea_from_swimming_pool_waters/1657>. Luettu 19.2.2018.
- 19 Nousiainen, Juha. 2018. Verkkoaineisto.Valiojame. <<http://www.maitojame.fi/articles/mika-on-maidon-sopiva-ureapitoisuus/2379474>>. Luettu 28.2.2018.
- 20 Urea Assay Kit. 2017. Verkkoaineisto. Merck Grup. <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/mak006?lang=fi®ion=FI>>. Luettu 24.8.2017.
- 21 Urea Test for swimming pools. 2017. Verkkoaineisto. Merck Group. <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/114843?lang=fi®ion=FI>>. Luettu 24.8.2017.
- 22 Lambda 25, 35, 45 User's Guide. 2000. Laitteen käyttömanuaali. PerkinElmer, Inc.
- 23 Hach Lange LT 200 User Manual. 2013. Laitteen käyttömanuaali. Hach.
- 24 Nordtest raportti TR 569. 2006. Sisäinen laadunohjaus Internal Quality Control – Käsikirja kemian laboratorioille. Helsinki; Edita Prima Oy.
- 25 Interlaboratory Proficiency Test 01/2016: Swimming pool water analysis. 2016. Suomen Ympäristökeskus. Verkkoaineisto. <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/161208/SYKEre_16_2016.pdf?sequence=1>. Luettu 28.2.2018.

Liite 1**Nollanäytteiden tulokset näytteenä mitattuna**

Nollanäytteet mitattuina kunkin määrittäykerran nollauksessa käytettyä nollanäytettä vastaan. Nollaukseen käytetty nolla valittiin mittaamalla nollanäytteet ensin synergivettä vastaan ja näistä tuloksista valittiin arvoltaan keskimmäinen.

Näyte	Tulos mg/l
1	0,0026
2	0,0254
3	0,0229
4	0,0234
5	0,1194
6	0,0075
7	0,0226
8	0,094
9	0,0346
10	0,1051
11	0,0244
12	0,044
13	0,0773
14	0,0211
15	-0,0431
16	0,0827
17	0,0245
18	0,0289
19	-0,0283
20	0,0998
21	0,0247
22	-0,0473
23	0,0241
24	0,0633
25	0,0786
26	0,0605
27	0,0231
28	-0,0056
29	0,0985
30	0,0234

Liite 2

Kontrollinäytteiden tulokset

Kontrollinäytteiden tulokset: 0,4 mg/l

näyte	pitoisuus (mg/l)	ero%	teoreettinen arvo
1	0,5041	26,025	0,4
2	0,5256	31,4	0,4
3	0,5206	30,15	0,4
4	0,4929	23,225	0,4
5	0,4404	10,1	0,4
6	0,4742	18,55	0,4
7	0,5164	29,1	0,4
8	0,4808	20,2	0,4
9	0,3662	-8,45	0,4
10	0,396	-1	0,4
11	0,4387	9,675	0,4
12	0,4025	0,625	0,4
13	0,3805	-4,875	0,4
14	0,4124	3,1	0,4
15	0,2942	-26,45	0,4
16	0,3511	-12,225	0,4
17	0,437	9,25	0,4
18	0,3792	-5,2	0,4
19	0,4467	11,675	0,4
20	0,405	1,25	0,4
21	0,5482	37,05	0,4
22	0,3999	-0,025	0,4
23	0,2919	-27,025	0,4
24	0,4924	23,1	0,4
25	0,4073	1,825	0,4
26	0,379	-5,25	0,4
27	0,5129	28,225	0,4
28	0,4131	3,275	0,4
29	0,4488	12,2	0,4
30	0,4193	4,825	0,4

Liite 2**Kontrollinäytteiden tulokset****Kontrollinäytteiden tulokset: 2,0 mg/l**

näyte	pitoisuus (mg/l)	ero%	teoreettinen arvo
1	1,9441	-2,795	2
2	2,0061	0,305	2
3	1,9941	-0,295	2
4	1,9727	-1,365	2
5	1,9302	-3,49	2
6	1,9104	-4,48	2
7	1,9292	-3,54	2
8	1,8447	-7,765	2
9	1,9571	-2,145	2
10	1,899	-5,05	2
11	1,9491	-2,545	2
12	1,9611	-1,945	2
13	1,9258	-3,71	2
14	2,0595	2,975	2
15	2,0033	0,165	2
16	2,0083	0,415	2
17	2,0751	3,755	2
18	1,9734	-1,33	2
19	2,1229	6,145	2
20	2,0176	0,88	2
21	2,0065	0,325	2
22	1,9604	-1,98	2
23	2,0094	0,47	2
24	1,9273	-3,635	2
25	1,9523	-2,385	2
26	1,9668	-1,66	2
27	2,0756	3,78	2
28	2,0347	1,735	2
29	2,0298	1,49	2
30	2,1895	9,475	2

Liite 3

Rinnakkaisnäytteiden tulokset (mg/l)

Näytteet on lajiteltu ensimmäisen mittaustuloksen (= näyte (mg/l)) perusteella pienimmästä suurimpaan.

näyte nro	näyte (mg/l)	rinnakkainen (mg/l)	suht. ero%
4	0,00665	0,0112	50,98039216
1	0,0605	-0,1768	408,0825451
3	0,0824	-0,0554	-1020,740741
2	0,2348	0,1053	-76,15407233
6	0,2667	0,2635	-1,207091664
22	0,2942	0,3511	17,63520843
14	0,3696	0,4153	11,64479552
21	0,3805	0,4124	8,046411906
10	0,3841	0,406	5,543602076
5	0,3978	0,5604	33,93863494
12	0,3985	0,4414	10,21550185
23	0,437	0,3792	-14,1631953
20	0,4387	0,4025	-8,606752259
24	0,4467	0,405	-9,792180345
8	0,4869	0,4709	-3,340989768
18	0,5041	0,5256	4,175973585
19	0,5206	0,4929	-5,466206216
26	1,9258	2,0595	6,709657993
16	1,9441	2,0061	3,139081565
11	1,9446	2,0013	2,873869079
25	1,9491	1,9611	0,613779346
17	1,9941	1,9727	-1,078955329
27	2,0033	2,0083	0,249277096
13	2,0048	2,2185	10,1200483
30	2,0065	1,9604	-2,324233028
15	2,0149	2,0058	-0,452657497
28	2,0751	1,9734	-5,024082994
9	2,0845	2,2737	8,682483594
29	2,1229	2,0176	-5,086342229
7	2,5172	1,9187	-26,98437747

Liite 4

Mittaustulokset entsyymaattisella menetelmällä ja Koroleffin menetelmällä

Näyte	Uusi menetelmä	Vanha menetelmä	ero%
1	0,0605	0,1614	
2	-0,1768	0,1522	(*
3	-0,079	0,1015	
4	-0,2696	-0,0084	(*
5	-0,061	-0,0076	
6	0,2348	0,0534	
7	0,1053	0,0467	(*
8	0,0621	-0,0324	(*
9	0,4088	0,0359	
10	0,348	-0,0215	
11	0,0824	0,0189	(*
12	-0,0554	0,0411	
13	0,1219	0,1872	
14	0,4373	0,3456	26,53356
15	0,6381	0,4912	29,90635
16	0,4036	0,2631	53,40175
17	0,6122	0,4088	49,75538
18	0,0065	-0,0457	
19	0,0112	-0,0425	
20	0,034	0,0483	
21	0,3937	0,173	127,5723
22	0,4583	0,2912	57,38324
23	0,7478	0,4033	85,42028
24	0,252	0,1849	
25	0,7601	0,2665	185,2158
26	0,3978	0,368	8,097826
27	0,5604	0,3607	55,36457
28	0,6123	0,3704	65,30778
29	0,0406	-0,0038	
30	0,3002	0,3034	-1,05471
31	0,4868	0,4519	7,722948
32	0,2481	0,3065	
33	0,5011	0,3224	55,42804
keskiarvo			57,58