



TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

KATIONIMENETELMÄN VALIDOINTI IONI- KROMATOGRAFILLE

Emilia Viljamaa

Opinnäytetyö
Toukokuu 2018
Energia- ja ympäristötekniikka
Laboratoriotekniikka



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Energia- ja ympäristötekniikka
Laboriotekniikka

VILJAMAA, EMILIA:

Kationimenetelmän validointi ionikromatografille

Opinnäytetyö 41 sivua, joista liitteitä 6 sivua
Toukokuu 2018

Opinnäytetyö tehtiin Tampereen teknilliselle yliopistolle kemian ja biotekniikan laboriolle. Laboratoriossa toimii tutkimusryhmiä, jotka ovat keskittyneet luonnonvarojen rajallisuuden tutkimiseen.

Opinnäytetyön tavoitteena oli validoida kationimenetelmä Dionex DX-120 ionikromatografille. Tarkoituksena työssä oli saada tietoa kationimenetelmän toimivuudesta ja pitkään käytössä olleen ionikromatografian toimintakunnosta. Menetelmän validoinnin parametreiksi valittiin lineaarisuus, toteamis- ja määrittämissrajat, tarkkuus, toistettavuus ja palautuminen.

Validoinnin perusteella menetelmää voidaan käyttää Na^+ -, K^+ -, Mg^{2+} - ja Ca^{2+} ionien määrittämiseen vesinäytteistä. Kaikille kationeille saatiin lineaariset standardisuorat, joiden korrelaatiokertoimet olivat vähintään 0,999. Tarkkuus, toistettavuus ja palautuminen olivat luotettavalla tasolla, poikkeuksena alhaisemmat pitoisuudet. Menetelmälle saatiin määritettyä toteamis- ja määrittämissrajat, jotka olivat suhteellisen korkeita, etenkin kalsium-ionilla.

Jatkossa referenssiluosten hankintaa voisi harkita alhaisten pitoisuuksien luotettavampaa määrittämistä varten. Mikäli menetelmällä halutaan päästä alhaisempiin määrittämissrajoihin olisi suositeltavaa suorittaa lisämittauksia referenssimateriaaleilla. Lisäksi menetelmälle voitaisiin määrittää uusittavuus.

ABSTRACT

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

VILJAMAA, EMILIA:
Validation of the Cation Method

Bachelor's thesis 41 pages, appendices 6 pages
May 2018

The objective of this thesis was to validate a method for the Dionex DX 120 ion chromatography equipment. The aim was to gather information and knowledge of the cation method and functionality of ion chromatography equipment. The method was validated for linearity, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), accuracy, repeatability and recovery.

In this study, water samples were examined to identify sodium-, potassium-, magnesium- and calcium cations. Based on the validation of the method, the laboratory of chemistry and biotechnology of Technical University of Tampere (TTY) can use the method for determination of cation concentrations from water samples.

Standard curves were gained for the foregoing cations with correlation factors at the least of 0,999. Accuracy, repeatability and recovery of the study were within acceptable limits, except for lower concentrations. For limit of quantitation and detection the study shows values higher than the equipment employed here is typically used for, especially with calcium-ion values which were significantly higher.

For future development of the cation method and the Dionex DX 120 ion chromatography equipment, usage of reference liquids and materials should be considered for a better coverage and liability of lower concentrations. Reproducibility of measurement could be also specified for the method.

Key words: ion chromatography, cation, validation

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	5
2	IONIKROMATOGRAFIA	6
2.1	Periaate.....	6
3	IONIKROMATOGRAFIALAITTEISTON TOIMINTA	8
3.1	Injektio	8
3.2	Pumppu	9
3.3	Eluentti.....	9
3.4	Kolonni	10
3.5	Supressori.....	11
3.6	Detektori	11
4	VALIDOINTI.....	13
4.1	Lineaarisuus- ja mittausalue	13
4.2	Toteamis- ja määrittäysraja.....	15
4.3	Tarkkuus	15
4.4	Toistettavuus	16
4.5	Palautuminen	17
5	KOKEELLINEN OSA	18
5.1	Dionex DX- 120 ionikromatografi	18
5.2	Menetelmä ja validointisuunnitelma.....	19
5.3	Liuosten valmistus	20
5.4	Mittausten suorittaminen	22
5.5	Validointiparametrit.....	23
6	TULOKSET	25
6.1	Mittausalue ja lineaarisuus.....	25
6.2	Toteamis- ja määrittäysraja.....	26
6.3	Tarkkuus	28
6.4	Toistettavuus	29
6.5	Palautuminen	30
7	POHDINTA.....	32
	LÄHTEET	34
	LIITTEET	36
	Liite 1. Validointisuunnitelma.....	36
	Liite 2. Kalibrointisuorat	38
	Liite 3. Residuaalien tarkastelu	39
	Liite 4. Toistettavuus	41

1 JOHDANTO

Opinnäytetyö tehtiin Tampereen teknilliselle yliopistolle kemian ja biotekniikan laboratoriolle. Laboratoriossa toimii tutkimusryhmiä, jotka tekevät tutkimusta kriittisistä luonnonvaroista vedestä, energiasta ja mineraaleista.

Opinnäytetyön tavoitteena oli validoida kationimenetelmä Dionex DX-120 ionikromatografille. Menetelmä pohjautuu standardiin SFS-EN ISO 14911, josta määritettävät kationit olivat Na^+ -, K^+ -, Mg^{2+} - ja Ca^{2+} ionit.

Tarkoituksena työssä oli saada tietoa menetelmän toimivuudesta ja ionikromatografian toimintakunnosta. Lisäksi kokeellisen osan yhteydessä laadittiin työohje laitteelle tehdyistä huoltotoimenpiteistä.

Ionikromatografia on analyysitekniikka, jota käytetään ionien, anionien ja kationien analysointiin erilaisista seoksista. Vesianalytiikassa ionikromatografiaa käytetään esimerkiksi veden laadun seurannassa. Tekniikka perustuu tutkittavien analyyttien erottamiseen ja niiden mittaamiseen johtokykytunnistimella.

2 IONIKROMATOGRAFIA

Kromatografia tarkoittaa erotusmenetelmää, jolla voidaan erottaa näytteessä olevat komponentit ja määrittää niiden pitoisuudet. Erottuminen perustuu tasapainoon stationäärifaasin ja liikkuvan faasin välillä. Kromatografia jaetaan kaasu- ja nestekromatografiaan riippuen liikkuvasta faasista. (Jaarinen & Niiranen 2005, 140 – 141.) Ionikromatografia on nestekromatografian menetelmä, jossa ionien erottuminen perustuu ioninvaihtoon, ionieksluusioon ja ionipareihin. (Weis 2004, 3 – 4.)

Ionikromatografia on analyysitekniikka, jota käytetään ionien tai ioniyhdisteiden erottamiseen ja määrittämiseen erilaisista seoksista. Sen etuja ovat helpot esikäsittelytavat, nopeat analyysiajat ja ionien yhtäaikainen analysointi. Lisäksi analysointiin riittää vähän näytettä. Ionikromatografia on selektiivinen eli valikoiva tekniikka ja mahdollistaa alhaisten pitoisuuksien määrittämisen, jopa miljardisosan tarkkuudella. (Fritz & Gjerde 2009,1; Michalski 2014.)

Erityisesti ionikromatografiaa käytetään vesianalytiikassa veden laadun seurannassa, sillä liuennet ionit vaikuttavat eri tavoin vedenlaatuun esimerkiksi makuun. Yleisimmin tutkittavia anioneja ovat sulfaatti- ja nitraatti ionit ja kationeista ammonium-, magnesium- ja kalsium ionit. (SFS-EN ISO 14911, 2000; AQVA 2016.)

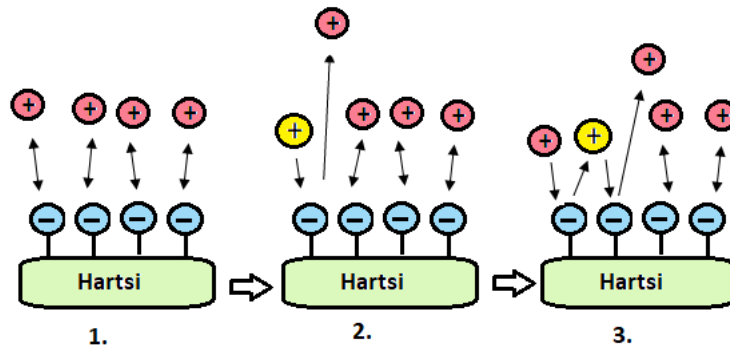
2.1 Periaate

Ionikromatografiassa erottuminen perustuu varautuneiden ionien vuorovaikutukseen stationäärifaasin ja liikkuvan faasin välillä. Stationäärifaasina käytetään ioninvaihtohartsia, joka on pakattu kolonniin. Näyte liitetään eluenttiin (liikkuva faasi), joka kulkee kolonnin läpi. Stationäärifaasin pinnalla on rajattu määrä sähköisesti varautuneita kohtia, joihin liikkuvassa faasissa olevat varautuneet ionit sitoutuvat. (Jaarinen & Niiranen 2005, 140– 141; Bruckner 2007.)

Ionit joilla on suurempi affiniteetti stationäärifaasin varattuun kohtaan kulkeutuvat kolonnista hitaammin kuin ne ionit, jotka sitoutuvat heikommin. Tällöin ionit kulkeutuvat kolonnista eri nopeuksilla. Erottumiseen kulunut aika eli retentioaika on spesifinen jokaiselle ionille. Eluentin ionien tunnistaminen tapahtuu detektorilla, joka mittaa eluentin sähkönjohtavuutta. Detektorilta saadusta datasta määritetään ionien

määrä ajan funktiona, joka esitetään tyypillisesti kromatogrammina. (Bruckner 2007; Materials in Evaluation and Engineering 2014.)

Kationien analysoinnissa hartsin varautuneet kohdat ovat positiivisesti varautuneita ja anionien vaihdossa päinvastoin, negatiivisesti. Kuviossa 1 on esitetty kationinvaihto hartsin ja liikkuvan faasin välillä, jossa keltaisella värillä on merkitty kationi näytteessä. (Shimadzu 2018.)

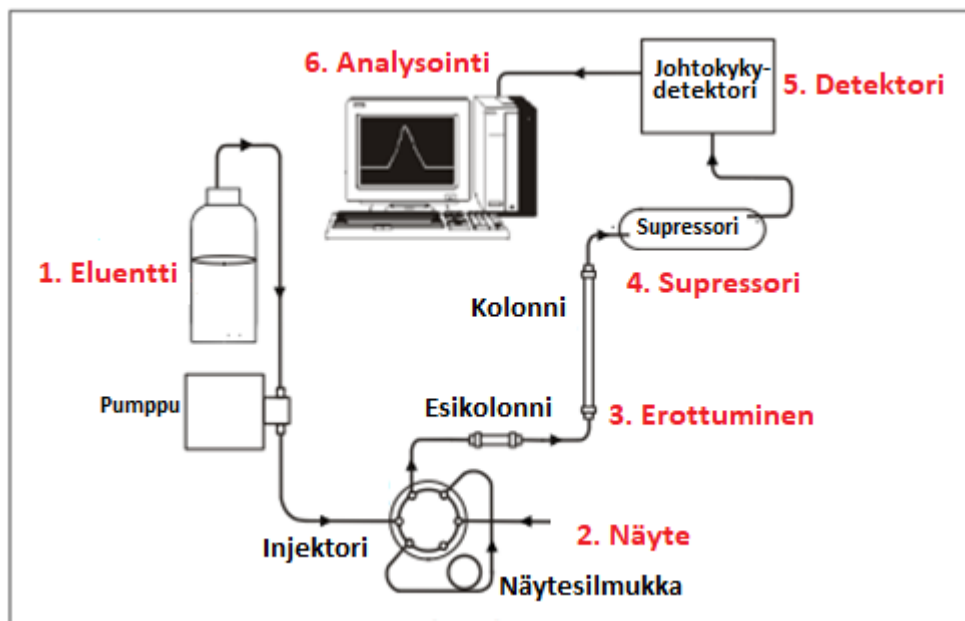


KUVIO 1. Kationinvaihdossa näyteionin sitoutuminen kolonnin hartsiin. (Shimadzu 2018, muokattu)

Kuvion kohdassa 1. hartsin ja liikkuvan faasin eli eluutin välillä on tasapaino. Kohdassa 2. näytteen positiivisesti varautunut kationi korvaa liikkuvan faasin kationin hartsista. Kohdassa 3. Liikkuvan faasin kationi korvaa näytteen kationin ja siirtyy seuraavaan sitoutumiskohtaan. Tämä sitoutuminen ja irtoaminen toistuu useita kertoja. (Shimadzu 2018.)

3 IONIKROMATOGRAFIALAITTEISTON TOIMINTA

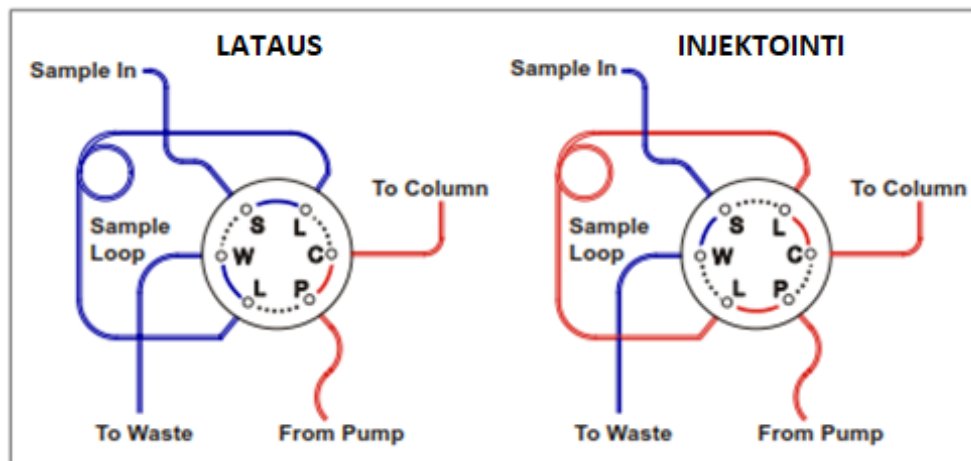
Ionikromatografialaitteisto koostuu komponenteista, joiden ominaisuudet vaihtelevat laitteistoista ja malleista riippuen. Ionikromatografian toimintaperiaate on havainnollistettu kuviossa 2. Eluenttia pumpataan järjestelmään, jonka jälkeen injektori sekoittaa näytteen eluenttivirtaukseen. Näyte virtaa esikolonniin läpi erotuskolonniin, jossa tapahtuu näyteionien erottuminen. Erottuneet ionit kulkeutuvat eluentti virtauksessa supressorin läpi detektorille, joka piirtää vasteen eli mittasignaalin. (Fritz & Gjerde 2009, 21–22.)



KUVIO 2. Ionikromatografian toimintaperiaate. (Thermo Scientific, 2005, muokattu.)

3.1 Injektio

Ionikromatografialaitteistossa on näytteensyöttäjä, johon näytteet ladataan erillisiin näyteputkiin tai astioihin riippuen näytteensyöttäjästä. Injektiossa neula siirtää näytteen eteenpäin systeemiin. Injektorilla on kaksi käyttöasentoa, lataus ja injektointi, jotka ovat havainnollistettu kuviossa 3. (SeQuant 2007; Thermo Scientific 1998, 11.)



KUVIO 3. Injektio. (Thermo Scientific, Dionex, muokattu)

Latausasennossa näyte kulkeutuu näytesilmukkaan. Samanaikaisesti eluentti virtaa pumpusta venttiilin läpi kolonniin ohittaen näytesilmukan. Ylimääräinen näyte virtaa jätteeksi. Injektioasennossa eluentti virtaa näytesilmukkaan ja silmukassa oleva näyte siirtyy kolonniin analysoitavaksi. Näytesilmukka on tyypillisesti 5-100 μl . (Thermo Scientific 1998, 11; Weis 2004, 5.)

3.2 Pumppu

Pumpun tehtävä on pumpata eluenttia järjestelmään. Ominaisuuksiltaan pumpun tulee olla inertti, kestävä ja tarkka, jotta se tuottaa halutun virtauksen. Pumppu voi olla yksimäntä- tai kaksimäntäpumppu. Yksimäntäpumppua käytetään isokraattisessa ajossa, jossa eluenttisuhteet pysyvät vakiona ajon ajan. Gradienttiasennossa käytetään kaksimäntäpumppua, jossa eluenttisuhteita voidaan muuttaa kesken ajon. (Fritz & Gjerde 2009, 26–27). Gradienttiasennossa käytetään esimerkiksi näytteen komponenttien ollessa poolisuudeltaan hyvin erilaisia, jolloin komponentit eivät eluoidu samalla eluenttisuhteella. Tällöin gradienttiasennolla mahdollistetaan kaikkien komponenttien eluotumisen kohtuullisessa retentioajassa. (Jaarinen & Niiranen 2005, 161).

3.3 Eluentti

Eluentti on liuosta, jota pumpataan laitteeseen koko analysoinnin ajan. Eluentti on ionikromatografiassa liikkuva faasi, joka osallistuu ionien erottamiseen kolonnissa olevan stationäärifaasin kanssa. Eluentin valinnassa on huomioitava konsentraatio, pH,

puskurikapasiteetti ja yhteensopivuus havaitsemismenetelmän eli detektorin kanssa. (Fritz & Gjerde 2009, 24; SeQuant 2007.)

Anionienvaihdossa käytetään esimerkiksi natriumkarbonaatti (Na_2CO_3) tai natriumhydroksidi (NaOH) eluenteja. (Michalski 2014). Hydroksidi eluentti muunnetaan vedeksi supressioreaktiolla, jolloin eluentin taustan johtokyky alenee. Jotta alhainen taustataso säilyy, eluentti tulee suojata ilmalta, sillä ilma voi muuttaa eluentin pH:ta. Tämän vuoksi eluenttia säilytetään paineistetussa eluenttisäiliössä, jossa ilmakuplat poistetaan käyttäen kaasua, esimerkiksi heliumia. Tarvittaessa eluentti tulee myös suodattaa, sillä kiintoainetta voi aiheuttaa tukoksia kolonniin. Hydroksidi-eluenteilla on tyypillisesti korkea pH, joka vaikuttaa eluotumisjärjestykseen. (SeQuant 2007.) Kationienvaihdossa eluuttina voidaan käyttää esimerkiksi mineraalihappoa tai vahvaa metaanisulfonihappoa. (Weiss 2004, 318).

3.4 Kolonni

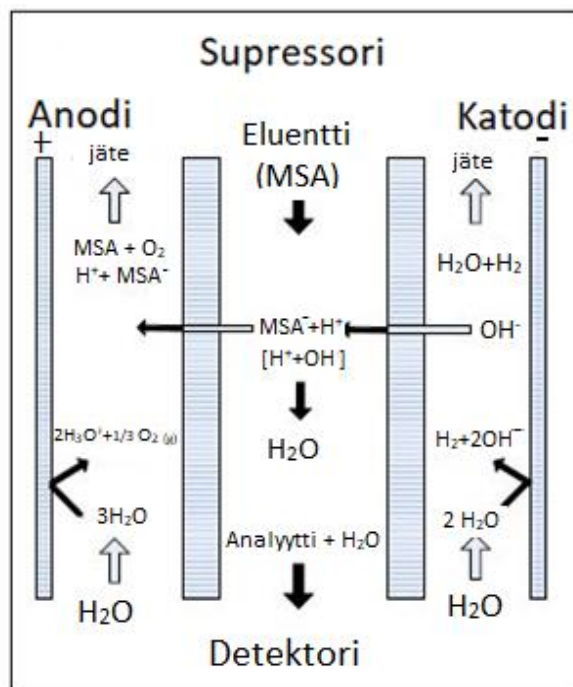
Seuraavaksi näyte kulkeutuu suojaavan esikolonnin kautta erotuskolonniin. Kolonnissa näyteionit erottuvat toisistaan. Kolonnit sisältävät varautuneita funktionaalisia ryhmiä, ioninvaihtoryhmiä. Anionien analysoinnissa ioninvaihtoryhmät ovat positiivisesti varautuneita ja kationienvaihdossa negatiivisesti. Positiivisesti varautuneet ryhmät sisältävät kvaternäärisen ammoniumyhdisteen, jossa yksi hiiliketju on kiinni pohjamateriaalissa kovalenttisella sidoksella. Kationien analysoinnissa negatiivisesti varautuneet ryhmät sisältävät heikon hapon esimerkiksi karboksyyli-, fosfoni- tai fosforihapon. Mitä pienempiä hartsin partikkelit ovat, sitä suurempi on hartsin pinta-ala, ja sitä nopeammin tapahtuu yhdisteiden erottuminen. (Fritz & Gjerde 2009, 176–177; SeQuant 2007; Paull & Nesterenko 2013, 157-191).

Kolonnin valintaan vaikuttavat tehokkuus, kapasiteetti ja selektiivisyys. Tehokkuus on riippuvainen pylväästä ja virtausnopeudesta. Tehokas kolonni tuottaa suuria ja kapeita piikkejä, jolloin saavutetaan hyvä herkkyys. Kapasiteetilla tarkoitetaan pylvään kykyä sitoa ioneja, jolla on vaikutus retentioaikaan. Selektiivisyys kertoo kyvystä erotella analyytit toisistaan ja se on riippuvainen kolonnin pylvään fysikaalisista ja kemiallisista ominaisuuksista. (SeQuant 2007.)

3.5 Supressori

Supressoria käytetään ainoastaan vaimennetun johtokyvyn havaitsemiseen, mutta sen käyttö ei ole laitteen toiminnankannalta välttämätöntä. Supressori vaimentaa eluutin taustakohinaa ja nostaa ionien havaitsemisherkkyttä. (SeQuant 2009).

Kationenvaihdossa voidaan käyttää happoeluenttia, metaanisulfonihappoa (MSA), jonka reaktio supressorilla on esitetty kuviossa 4. Hydroksidi-ioni (OH^-) neutralisoi eluutin vetyionin (H^+) regeneroinnissa ja kulkee anioninvaihtomembraanin läpi. Analyytin kationit ovat pariutuneet hydroksidi-ionilla, jolla on korkea sähkönjohtavuus. (Fritz & Gjerde 2009, 33–34)



KUVIO 4. MSA-eluutin reaktio supressorilla.

3.6 Detektori

Ionien tunnistaminen tapahtuu detektorilla, joka analysoi ionien määrää ajan funktiona. Detektorin saamasta vasteesta piirtyy kromatogrammi. (SeQuant 2009). Yleisimmin käytetään sähkönjohtavuuteen perustuvaa detektoria, koska sillä saadaan vaste kaikille ioneille. (Methrom 2018). Detektorissa on kaksi elektrodia, joiden välillä on sähkökenttä. Eluentti virtaa elektrodien välistä ja detektori mittaa ioneja

sähkönjohtavuuden perusteella. Jokaisella ionilla on spesifinen sähkönjohtokyky, joka on verrannollinen ionin konsentraatioon. (Jaarinen & Niiranen 2005, 168; Fritz & Gjerde 2009, 69–71; SeQuant 2007.)

Muita ionikromatografiaan soveltuvia detektoreita ovat UV/VIS- ja amperometrinen detektori. UV/VIS detektoria voidaan käyttää havaitsemaan ioneja, joilla on korkea absorbanssi tietyllä aallonpituudella. Amperometristä detektoria käytetään elektroaktiivisten yhdisteiden määrittämiseen ja se on suosittu sokerien, alkoholien ja anionien detektoinnissa. (Metrohm, 2018).

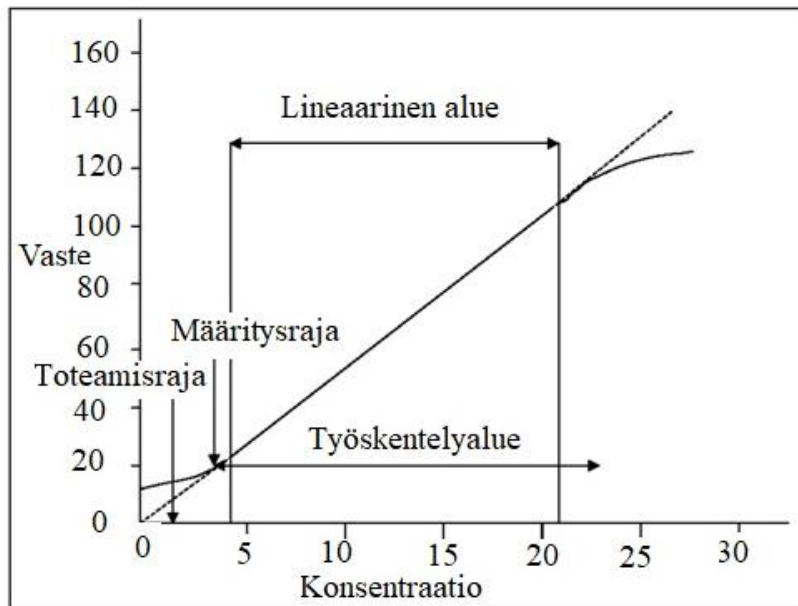
4 VALIDOINTI

Menetelmän validoinnilla tarkoitetaan prosessia, jolla voidaan kokeellisesti todeta, sopiiko menetelmä käyttötarkoitukseensa. Sen laajuus riippuu analyysimenetelmän käyttökohteesta ja tarkoituksesta. (MIKES 2005, 25-26.)

Validointi on ajankohtainen silloin kun menetelmän suorituskyky ja tai jokin ongelma halutaan selvittää. Tällaisia tapauksia voivat olla esimerkiksi uuden menetelmän kehittäminen, menetelmän siirto toiselle laitteelle, käytössä olevan menetelmän uudistaminen tietyillä parannuksilla tai menetelmien välinen vertailu. Validointiin kuuluu kokonaisuudessaan suunnitelman laatiminen, mittausten suoritus, tulosten analysointi tilastollisesti ja raportointi. (Jaarinen & Niiranen 2005, 30; MIKES 2005, 25-26.)

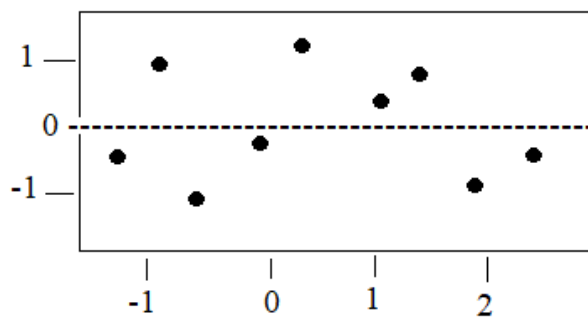
4.1 Lineaarisuus- ja mittausalue

Lineaarisuus tarkoittaa menetelmän kykyä antaa tulosten ja tutkittavan analyytin välille hyväksyttävä lineaarinen korrelaatio. Mitä lähempänä korrelaatiokerroin eli selitysaste on arvoa 1, sitä vähemmän mittauksissa esiintyy hajontaa ja mittaus on lineaarinen. Lineaarisuus määritetään mittaamalla nollanäyte ja vähintään viisi eripitoista liuosta. Jokaisella pitoisuudella tulee suorittaa useampia mittauksia. Tuloksista piirretään kalibroitisuusora, jolloin kuvaajasta nähdään vasteen suhde määritettyyn pitoisuuteen. Lineaarisuustutkimuksella määritetään myös menetelmän luotettava mittausalue, jolla voidaan saavuttaa hyväksyttävä tarkkuus ja täsmällisyys. Määrittämällä lineaarisuus saadaan määritettyä mittausalue, joka on laajempi kuin lineaarinen alue. Mittausalueella voidaan saavuttaa myös vielä hyväksyttävä tarkkuus ja täsmällisyys. Kuviossa 5 on esitetty lineaarisuus ja mittausalue. (Jaarinen & Niiranen 2005, 25-26; MIKES 2005, 28-29; Evira 2010).



KUVIO 5. Lineaarisuus (MIKES 2005, 29 muokattu.)

Kalibrointisuoran sopivuutta voidaan arvioida lisäksi residuaalien tarkastelulla, joista piirretään usein oma kuvaaja. Residuaali on mitattujen kalibrointipisteiden ja pienimmän neliösumman menetelmällä laskettu kalibrointisuoran pisteiden erotus. Residuaalit esitetään kalibrointiliuosten pitoisuuden funktiona ja niiden tulee olla satunnaisesti sijoittuneita nollatason molemmin puolin kuvio 6. (Jaarinen & Niiranen 2005, 25–26.)



KUVIO 6. Residuaalien tulee olla tasaisesti jakautuneita nollatason molemmin puolin. (Jaarinen & Niiranen 2005, 26, muokattu).

4.2 Toteamis- ja määrittäysraja

Toteamisrajalla LOD (Limit of Detection) tarkoitetaan määritettävän analyytin pienintä pitoisuutta, joka voidaan todeta luotettavasti ja joka eroaa nollanäytteen arvosta merkittävästi. Toteamisraja lasketaan regressioyhtälön kulmakertoimella ja leikkauskohdan keskihajonnalla yhtälöllä 1. (Jaarinen & Niiranen 2005, 13; MIKES 2005, 29–30.)

Määrittäysraja LOQ (Limit of Quantification) on pienin pitoisuus, joka voidaan määrittää matriisista ja, jolle voidaan esittää epävarmuusarvio. Määrittäysraja lasketaan toteamisrajan tapaan yhtälöllä 2, jossa kerroin 3 korvataan kertoimella 10. Jos tutkittavassa analyytissä pitoisuus on alle määrittäysrajan, mutta suurempi kuin toteamisraja, näytteen voidaan todeta sisältävän tutkittavaa analyyttiä. (Jaarinen & Niiranen 2005, 13; MIKES 2005, 29–30.)

$$c_{LOD} = \frac{3s_0}{b_1} \quad (.)$$

$$c_{LOQ} = \frac{10s_0}{b_1}, \quad (.)$$

jossa

b_1 = regressiosuoran kulmakerroin

s_0 = leikkauskohdan keskihajonta

4.3 Tarkkuus

Tarkkuus kertoo todellisen arvon ja mittaamalla saadun arvon yhteensopivuudesta ja mittalaitteen kyvystä antaa vasteita, jotka ovat lähellä tosi arvoa. Tarkkuutta tutkitaan mittauksen oikeellisuudella ja toistotarkkuudella, sillä tarkkuuteen vaikuttavat systemaattinen virhe ja satunnaisvirhe (Jaarinen & Niiranen 2005, 12; MIKES 2005, 35–36).

Tuloksen oikeellisuus eli poikkeamana kertoo mittauksen todellisten arvojen riippuvuutta määritetystä referenssiarvosta. Oikeellisuutta tutkitaan mittaamalla tunnettuja referenssimateriaaleja määrittämällä useampi rinnakkaismääritys. Referenssimateriaalin olisi hyvä olla sertifioitu materiaali ja samankaltainen kuin tutkittavat näytteet. Lisäksi laboratorio voi osallistua laboratorioden välisiin vertailumittauksiin, jolloin saadaan lisätietoa menetelmän tulosten oikeellisuudesta. Aina vertailumateriaaleja ei ole aina saatavilla, jolloin niitä voidaan valmistaa itse puhtaista sertifioiduista reagensseista. Kun tunnetaan vertailumateriaalin todellinen arvo, voidaan oikeellisuus laskea määrittämällä saadun konsentraation keskiarvosta yhtälöllä 3. (Jaarinen & Niiranen 2005, 12; MIKES 2005, 35–36.)

$$E = \frac{|\bar{x} - \mu|}{\mu} \cdot 100 \%, \quad (3)$$

jossa

E= mittaustuloksen oikeellisuus

\bar{x} = määrittämällä saatujen konsentraatioiden keskiarvo

μ = vertailumateriaalin todellinen arvo

Toistotarkkuus kertoo mittaustulosten keskinäisestä yhtäpitävyydestä, kun mittaukset on suoritettu tunnetuissa olosuhteissa. Toistotarkkuus, jota kuvastaa suhteellinen keskihajonta lasketaan yhtälön 4 mukaan. Jos mittauksien suhteellinen keskihajonta on alle 5 % tulos on erinomainen. (Jaarinen & Niiranen 2005, 12; MIKES 2005, 35.).

$$RSD = \frac{s}{x} * 100 \%, \quad (4)$$

jossa

s = näytteiden keskihajonta

x= näytteiden keskiarvo

4.4 Toistettavuus

Toistettavuus eli täsmällisyys kertoo mittaustulosten keskinäisestä paikkansapitävyydestä, joka saavutetaan, kun mittaukset on tehty toistettavissa olosuhteissa lyhyellä aikavälillä, samoilla tekijöillä, lämpötiloilla ja reagensseilla.

Toistettavuus määritetään tekemällä rinnakkaismäärittäisiä näytteistä eri pitoisuuksilla. Yleensä näytesarjojen sisäinen vaihtelu on pienempi kuin sarjojen välillä esiintyvä vaihtelu. Mikäli näytesarjojen välillä esiintyy huomattavaa vaihtelua, tulee syy pyrkiä selvittämään. Vaihtelu voi johtua analyysitekijöistä esimerkiksi lämpötilasta tai säilyvyydestä. Toistettavuus lasketaan yhtälöllä 5. (Jaarinen & Niiranen 2005, 12; MIKES 2005, 35.)

$$r = 2 \cdot \sqrt{2} \cdot s, \quad (5)$$

jossa s on näytteiden keskihajonta

4.5 Palautuminen

Menetelmästä voidaan laskea palautuminen (recovery). Määrittystä käytetään pääasiassa kromatografisissa analyysimenetelmissä. Palautuminen voidaan määrittää, kun tunnetaan analyytin todellinen pitoisuus, joka lasketaan kaavalla 6. Ihanteellinen arvo palautumiselle on 100 %. Arvo on mitattu keskiarvo toistettavissa olosuhteissa, jota verrataan todelliseen arvoon. Jos saatu tulos on lähellä tavoitearvoa 100 % voidaan todeta, että kyseinen konsentraatio on todennettu. (Weis 2004, 572.)

$$W = \frac{\bar{x}}{x_R} 100 \%, \quad (6)$$

jossa

\bar{x} = mitattu pitoisuus

x_R = todellinen pitoisuus

5 KOKEELLINEN OSA

5.1 Dionex DX- 120 ionikromatografi

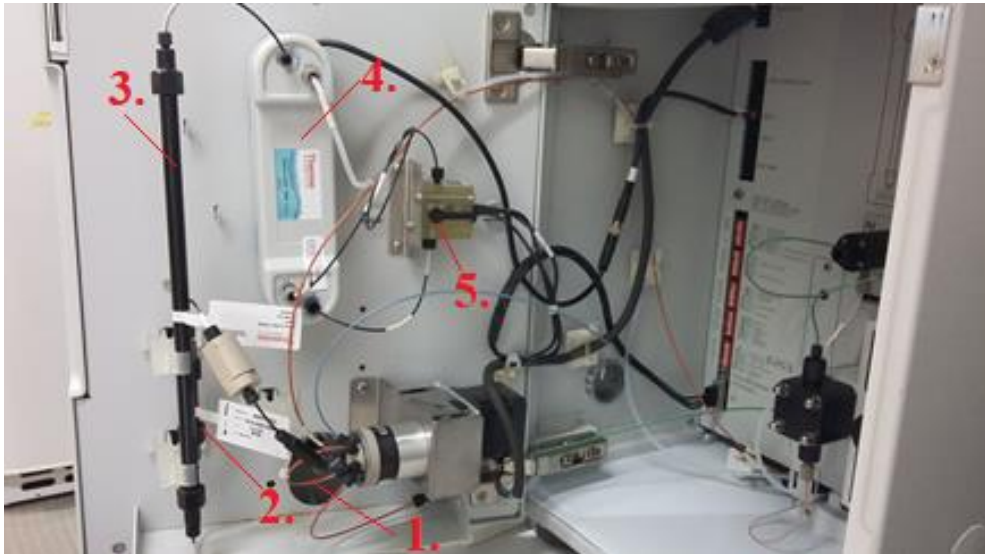
Työssä käytettiin Dionex DX- 120 ionikromatografia kuva 1. Laitteisto on isokraattinen sovellus, jolloin eluenttisuhdetta ei muuteta ajon aikana. Eluentille on käytössä muovinen säiliö, jossa se säilytetään heliumilla paineistettuna. Lisäksi säiliössä poistetaan eluentin ilmakuplat ennen sen pumppausta systeemiin. Laitteeseen on yhdistetty 50 paikkainen näytteensyöttäjä, joka on varustettu Rheodyne-injektioventtiilillä, jossa injektio tapahtuu lataus- ja injektointiasennoissa. Injektiossa näyte siirtyy näytesilmukkaan, jonka tilavuus on 25 µl.



KUVA 1. Validoinnissa käytetty laitteisto Dionex DX-120 ionikromatografi ja näytteensyöttäjä.

Komponentit ovat aseteltu laitteen oveen, kuva 2, ja taulukossa 1 on kerrottu komponenttien tiedot. Laitteen esikolonne ja kolonne ovat tarkoitettu kationien analysointiin. Kolonnin sisältämän materiaalin kanssa soveltuva eluentti on metaanisulfonihappo-tai rikkihappo-eluentti. Laitteessa on supressori asennettuna kolonnin ja detektorin väliin. Tällöin kolonnista kulkeutuva eluenttivirtaus saadaan supressoitua ennen detektorille pääsyä ja vähennettyä eluentin aiheuttamaa taustakohinaa. Supressori on tyypiltään itsestään regeneroituva. Detektorin on

johtokykydetektori, jonka sisällä kennossa on kaksi ruostumattomasta teräksestä valmistettua elektroodia.



KUVA 2. Laitteenkomponentit 1. näytesilmukka, 2. esikolonne, 3. erotuskolonne, 4. supressori ja 5. detektori.

Tulokset saadaan detektorin vasteesta, josta piiryy tietokoneelle kromatogrammi. Tietokoneella on käytössä Chromeleon-ohjelma, jonka avulla kromatogrammien tulkitseminen tapahtuu. Tulokset käsitellään vielä erikseen tietokoneella, sillä laite ei piirrä automaattisesti kalibrointisuoria.

TAULUKKO 1. Komponenttien tiedot.

Kolonne	Esikolonne	Supressori
Dionex IonPac CS12A	Dionex IonPac CG12A	Dionex CSRS 300
RFIC	RFIC	4 mm
4 x 250 mm	44 x50 mm	SP6951
Analytical	Guard	

5.2 Menetelmä ja validointisuunnitelma

Tarkoituksena työssä oli validoida menetelmä, jota käytetään vesissä, jätevesissä ja suolaliuoksissa olevien kationien Na^+ -, K^+ -, Mg^{2+} - ja Ca^{2+} määrittämiseen. Menetelmä pohjautuu standardiin SFS-EN ISO 14911 Veden laatu. Liuennon Li^+ -, Na^+ -, NH_4^+ -, K^+ -, Mn^{2+} -, Ca^{2+} -, Mg^{2+} -, Sr^{2+} - ja Ba^{2+} -ionien määrittäminen ionikromatografisesti vedestä ja jätevedestä.

Ensimmäiseksi menetelmästä laadittiin validointisuunnitelma (liite 1). Ennen validointimittauksia laitteelle suoritettiin huoltotoimenpiteitä, joista laadittiin työohje. Validointiparametreja suunniteltaessa täytyi ottaa huomioon, että menetelmän validoinnissa ei ollut mahdollisuutta käyttää referenssiluoksia tai varmennettuja vertailumateriaaleja. Useat validointiparametrit on myös mahdollista määrittää itse valmistetuista liuoksista, kun käytettyjen reagenssien laatu on riittävä. Tällöin mittaustuloksista voidaan laskea tarkat arvot ja verrata saatuja arvoja teoreettisiin arvoihin.

5.3 Liuosten valmistus

Kokeellinen suoritus aloitettiin valmistamalla validointiin tarvittavat liuokset. Taulukossa 2 on lueteltu kantaliuoksen valmistuksessa käytettyjen kemikaalien tiedot. Kemikaaleista valmistettiin itse spesifinen kantaliuos, jota käytettiin validointiparametrien määrittämiseen.

TAULUKKO 2. Kantaliuoksessa käytettyjen kemikaalien tiedot.

Kemikaali	Valmistaja	Tuotenumero	Eränumero
Natriumnitraatti NaNO ₃	VWR	107810010	
Kaliumnitraatti KNO ₃	MERCK	1.05063.0500	A686863 703
Kalsiumnitraatti tetrahydraatti Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	MERCK	1.02121.0500	A0303221 126
Magnesiumkloridiheksahydraatti MgCl ₂ · 6H ₂ O	MERCK	1.05833.1000	A0725033 646

Kantaliuos valmistettiin niin, että liuos sisälsi analysoitavat kationit, Na⁺ -, K⁺-, Mg²⁺- ja Ca²⁺ ionit. Ensimmäiseksi natriumnitraattia ja kaliumnitraattia kuivattiin lämpökaapissa kaksi tuntia lämpötilassa 105 °C kosteuden poistamiseksi.

Kalsiumnitraattitetrahydraattia ja magnesiumkloridiheksahydraattia kuivattiin kaksi tuntia eksikaattorissa, koska kidevedelliset reagenssit voivat rapautua. Kuivattuja reagensseja punnittiin taulukossa 3 esitetyt määrät samaan 200 ml:n mittapulloon ja lisättiin 2,0 ml 1 molaarista typpihappoa, jonka jälkeen pullo täytettiin ultrapuhtaalla

vedellä (UHP) merkkiin. Tällöin kantaliuos sisälsi taulukossa 3 kerrotut kationien pitoisuudet.

TAULUKKO 3. Kantaliuos

Kationi	Reagenssi	Kuivaus	Punnitus g	Pitoisuus mg/l
Na ⁺	NaNO ₃	2 h, 105 °C	1,1093	1500,17
K ⁺	KNO ₃	2 h, 105 °C	0,3882	750,6
Ca ²⁺	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	2h, eksikaattori	0,8837	757,6
Mg ²⁺	MgCl ₂ ·6H ₂ O	2h, eksikaattori	1,2672	749,9

Validointiin tarvittavat standardiliuokset valmistettiin kantaliuksesta laimentamalla. Standardiliuksista 2 ja 3 suoritettiin välilaimennos pipetoimalla 10 ml kantaliuosta 100 ml:n mittapulloon, joka täytettiin UHP-vedellä merkkiin. Liuoksesta pipetoitiin taulukon 4 mukaiset tilavuudet 100 ml:n mittapulloon ja lisättiin 1,0 ml 1 molaarista typpihappoa, jonka jälkeen mittapullo täytettiin UHP-vedellä merkkiin. Taulukossa 4 esitetty standardiliuos 1 pipetoitiin standardiliuos neljästä.

TAULUKKO 4. Standardiliuosten pipetointitilavuudet välilaimennoksesta.

Std 1 (std 4)	Std 2	Std 3
ml	ml	ml
1,0	1,3	6,7

Standardiliuokset 4, 5, 6, 7 ja 8 pipetoitiin suoraan kantaliuksesta taulukossa 5 esitettyjen tilavuuksien mukaan 100 ml:n mittapulloon ja lisättiin 1,0 ml 1 molaarista typpihappoa, jonka jälkeen mittapullo täytettiin UHP-vedellä merkkiin.

TAULUKKO 5. Standardiliuosten pipetointi tilavuudet kantaliuksesta.

Std 4	Std 5	Std 6	Std 7	Std 8
ml	ml	ml	ml	ml
1,3	2,0	2,7	4,0	5,3

Taulukossa 6 on kerrottu taulukoiden 3 ja 4 pipetointi määriä vastaavat pitoisuudet standardiliuksille.

TAULUKKO 6. Standardiliuosten pitoisuudet.

Kationi	0	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5	Std 6	Std 7	Std 8
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
Na ⁺	0	0,2	2,0	10,0	20,0	30,0	40,0	60,0	80,0
K ⁺	0	0,1	1,0	5,0	10,0	15,0	20,0	30,0	40,0
Mg ²⁺	0	0,1	1,0	5,0	10,0	15,0	20,0	30,0	40,0
Ca ²⁺	0	0,1	1,0	5,0	10,0	15,0	20,0	30,0	40,0

Kaikki kantaliuoksesta valmistetut liuokset täytyi laimentaa päivittäin uudestaan, sillä laimennetut liuokset eivät säily yli vuorokauden. Nollanäytteenä käytettiin UHP-vettä, jossa veteen lisättiin 100 µl 1 molaarista typpihappoa ja täytettiin UHP-vedellä merkkiin 100 ml mittapulloon.

5.4 Mittausten suorittaminen

Mittaukset suoritettiin DX Dionex 120- ionikromatorafilla, jota ennen kaikki näytteet suodatettiin 0,45 µm ruiskusuodattimen läpi näyteputkiin. Putkista poistettiin ilmakuplat ja suljettiin ne muovikorkilla. Ilmakuplien poiston jälkeen näyteputket asetettiin ionikromatografian näytteensyöttäjään.

Ennen ajon suorittamista laitteen jäteruuvia avattiin hieman, jotta letkuihin kertyneet ilmakuplat saatiin pois ja laitteen letkut puhdistuvat uudella eluentilla. Pumppu käynnistettiin ja odotettiin paineen nousevan 250 psi:tä, jonka jälkeen supressori laitettiin päälle. Seuraavaksi ionikromatografian annettiin tasaantua noin tunnin verran ennen mittausten suorittamista, jotta laite saavuttaa vaaditun paineen 1400 psi:tä. Tämän aikana laitteelle luotiin sekvenssi, jonka perusteella mittaukset suoritettiin. Tasaantumisen jälkeen laite oli käyttövalmiina ja näytteensyöttäjä kytkettiin päälle, jolloin laite alkoi injektoidaan näytettä. Virtausnopeus säädettiin 1 ml/min, mutta on mahdollista, että virtaus on vaihdellut ajon aikana 0,99-1 ml/min välillä. Kaikki validointiajot suoritettiin samoilla ajo-olosuhteilla, jotka on kuvattu taulukossa 7. Yhden näytteen analyysiaika oli 18 minuuttia, jossa kationit eluoiuivat seuraavassa järjestyksessä Na⁺ -, K⁺-, Mg²⁺- ja Ca²⁺. Pinta-alaltaan suurin piikki oli natriumionilla ja pienin kalsiumionilla.

TAULUKKO 7. Ajo-olosuhteet

Analyysi aika	18 min
Pumpun paine	1400-1450 psi
Johtavuus	0,505-0,658 μ S
Virtaus nopeus	1 ml/min
Eluentti	20 nM metaanisulfonihappo (MSA)

5.5 Validointiparametrit

Validointi aloitettiin määrittämällä menetelmälle mittausalue- ja lineaarisuus.

Määrittystä varten valmistettiin nollanäyte ja kahdeksan standardiliuosta, jotka olivat pitoisuudeltaan taulukon 6 mukaisia. Nollanäytteistä ja standardiliuoksista valmistettiin kolme rinnakkaismäärittystä. Menetelmän todettiin olevan lineaarinen kaikilla kationeilla koko mittausalueelta, jonka jälkeen nollanäytettä ja standardeja mitattiin kolmena päivänä lisämäärittysten vuoksi. Lineaarisuutta tutkittiin myös korrelaatiokertoimien avulla ja residuaalien tarkastelulla. Korrelaatiokertoimien rajaksi asetettiin 0,999.

Toteamis- ja määrittysrajat päätettiin aluksi määrittää mittaamalla nollanäytteitä useaan kertaan, mutta ensimmäisen mittauskerran tuloksista huomattiin, että kaikista nollanäytteistä ei tullut vastetta laitteella. Tämä saattoi johtua nollanäytteiden alhaisista pitoisuuksista, joista laite ei pysty mittaamaan vastetta ja muodostamaan piikkiä. Tällöin katsottiin luotettavammaksi vaihtoehdoksi määrittää toteamis- ja määrittysrajat lineaarisella regressiolla. Tällä menettelyllä standardiliuoksien tuloksista piirretään regressiosuora, joista toteamis- ja määrittysrajat lasketaan yhtälöillä 1 ja 2.

Tarkkuutta tutkittiin kolmena päivänä oikeellisuuden ja toistotarkkuuden avulla. Tarkkuusmittauksissa käytettiin kolmea eripitoista liuosta, joiden pitoisuudet ovat kerrottu taulukossa 8. Liuokset vastaavat standardiliuosten 2, 3 ja 4 pitoisuuksia, jolloin ne laimennettiin kantaliuoksesta taulukon 4 ja 5 mukaisesti. Jokaisesta liuospitoisuudesta valmistettiin kolme rinnakkaismäärittystä. Tuloksista laskettiin oikeellisuus ja toistotarkkuus kaavoilla 3 ja 4. Lisäksi menetelmän palautuminen laskettiin kaavalla 6.

TAULUKKO 8. Liuospitoisuudet tarkkuus määrityksiin.

Kationi	Liuos mg/l
Na ⁺	2,0
	10,0
	20,0
K ⁺ , Ca ²⁺ ja Mg ²⁺	1,0
	5,0
	10,0

Toistettavuutta tutkittiin mittaamalla neljää eripitoista liuosta, jotka ovat esitetty taulukossa 9. Toistettavuus kertoo menetelmän hajonnasta, joka voidaan laskea kaavalla 5, kun mittaukset on suoritettu toistettavissa olosuhteissa. Määritykseen käytetyt liuokset vastasivat pitoisuudeltaan standardiliuoksia 1, 3, 5 ja 7, jolloin ne laimennettiin kantaliuoksesta taulukon 4 ja 5 mukaisesti. Jokaisesta liuoksesta valmistettiin kymmen rinnakkaismääritystä. Tuloksista toistettavuus laskettiin kaavalla 5.

TAULUKKO 9. Liuospitoisuudet toistettavuus määrityksiin.

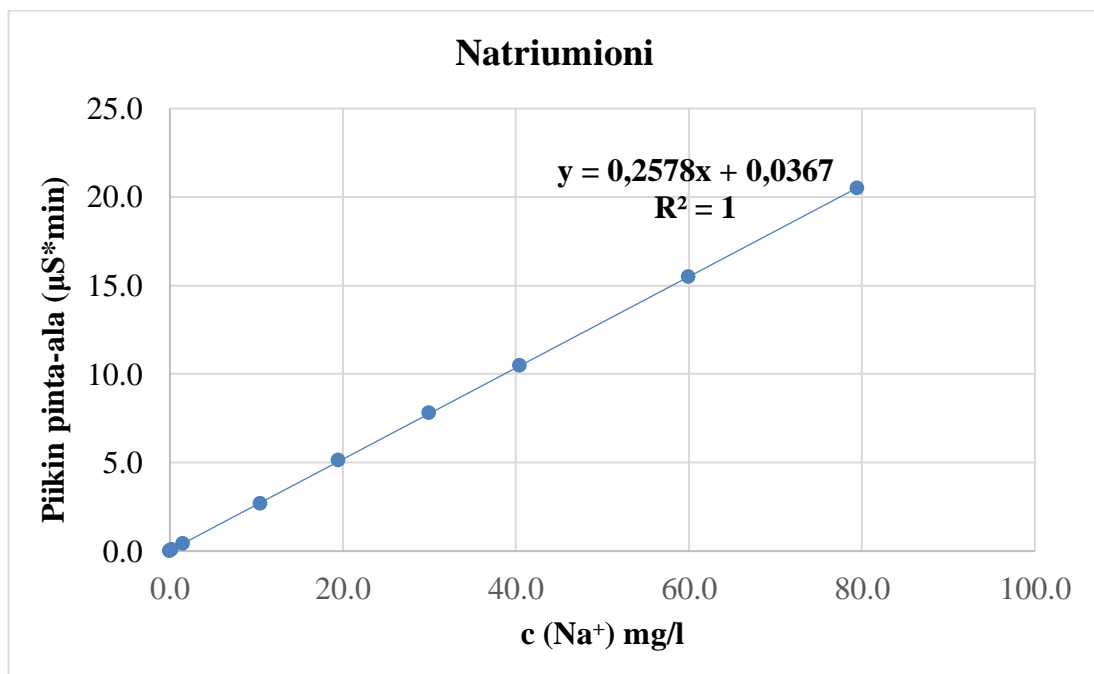
Kationi	Liuos mg/l
Na ⁺	0,2
	10,0
	30,0
	60,0
K ⁺ , Ca ²⁺ ja Mg ²⁺	0,1
	5,0
	15,0
	30,0

6 TULOKSET

6.1 Mittausalue ja lineaarisuus

Mittausalueen määrittämistä varten mitattiin nollanäyte ja kahdeksan standardiliuosta kolmella eri mittauskerralla. Natriumionin pitoisuusalue oli 0,2 mg/l - 80,0 mg/l ja kaliumille, magnesiumille sekä kalsiumionille pitoisuusalue oli puolet pienempi 0,1 mg/l - 40,0 mg/l. Mitatuista tuloksista piirrettiin standardisuorat kolmen mittauskerran keskiarvosta. Laitteelta saatu vaste ($\mu\text{S}\cdot\text{min}$) muutettiin standardisuoran sovituksen yhtälöä käyttämällä pitoisuudeksi (mg/l).

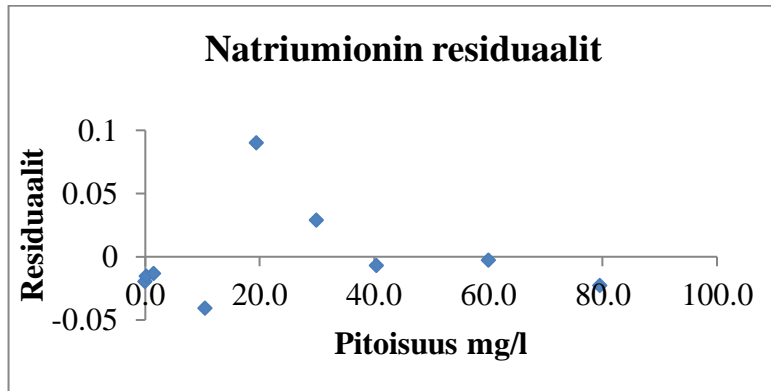
Kaikkien kationien kalibrointisuorat olivat lineaarisia koko tutkittavalta mittausalueelta. Lineaarisuuden tarkastelussa kiinnitettiin huomiota myös korrelaatiokertoimiin, joiden tuli olla vähintään 0,999 tai enemmän. Tämä vaatimus täyttyi jokaisella kationilla. Esimerkkinä natriumin kalibrointisuora kuviossa 7. Muiden määritettävien kationien kalibrointisuorat ovat esitetty liitteessä 2.



KUVIO 7. Natriumionin kalibrointisuora.

Residuaalien jakautuminen ei ollut kaikilla kationeilla ideaalista, tasaisesti nollassa molemmiin puoliin, mutta kuvioista ei myöskään havaittu pisteiden muodostavan selkeää

käyrää. Tästä pääteltiin, että toisen asteen yhtälön sovitusta tai muuta painotusta ei ole tarpeen kokeilla. Natriumionin residuaalit ovat kuviossa 7, jossa nähdään residuaalien jakautuneen nollassa molemmin puolin. Kaliumin, magnesiumin ja kalsiumin residuaalien tarkastelut ovat liitteessä 3.



KUVIO 8. Natriumionin residuaalit ovat jakautuneet nollassa molemmin puolin.

Kuviosta 8 voidaan arvioida residuaalien noudattavan karkeasti normaalijakaumaa. Kuviosta nähdään natriumionin residuaalien sijaitsevan todennäköisemmin lähellä regressiosuoraa kuin kaukana regressiosuorasta. Residuaalien keskimääräisen etäisyyden ollessa välillä $-0,05$ - $0,05$ voidaan yleistää kuvion 8 residuaalien muodostavan normaalijakautuneen tiheysfunktion, missä residuaalin etäisyyden odotusarvo on annetulla välillä.

6.2 Toteamis- ja määrittäysraja

Toteamis- ja määrittäysrajat laskettiin lineaarisella regressiolla. Rajojen laskemisessa huomioitiin mitta-alueelle sijoittuneet standardit, joita oli kahdeksan. Standardiliuoksien tuloksista suoritettiin regressioanalyysi, jossa huomioitiin kolmen päivän mittaustulokset ja niiden keskiarvot. Tällöin saatiin taulukko, josta luettiin leikkauskohdan keskihajonta ja regressiosuoran kulmakerroin, mistä toteamis- ja määrittäysrajat laskettiin yhtälöillä 1 ja 2. Esimerkkinä natriumionille saatu taulukko 10, jossa on esitetty tarvittavat arvot toteamis- ja määrittäysrajojen laskemiseen.

TAULUKKO 10. Natriumionin toteamis- ja määrittäysrajojen laskemiseen tarvittavat arvot, leikkauskohdan keskihajonta ja regressiosuoran kulmakerroin.

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>
Intercept	0,04217	0,02338
X Variable 1	0,25765	0,00058

Toteamisraja natriumionille:

$$c_{LOD} = \frac{3s_0}{b_1}$$

$$c_{LOD} = \frac{3 \cdot 0,02338}{0,25765}$$

$$c_{LOD} = 0,2722$$

$$c_{LOD} \approx 0,27 \text{ mg/l}$$

Määrittäysraja natriumionille:

$$c_{LOQ} = \frac{10s_0}{b_1}$$

$$c_{LOQ} = \frac{10 \cdot 0,02338}{0,25765}$$

$$c_{LOQ} = 0,9074$$

$$c_{LOQ} \approx 0,91 \text{ mg/l}$$

Taulukossa 11 on laskettuna kaikkien kationien toteamis- ja määrittäysrajat sekä liitteessä 4 on esitetty regressioanalyysistä saadut taulukot, joista arvot laskettiin. Tulokset ilmoitettiin standardin SFS-EN ISO 14911 mukaisesti kahdella merkitsevällä numerolla. Tuloksista voidaan havaita toteamis- ja määrittäysrajojen olevan korkeita. Tyypillisesti määrittäysrajan pitoisuus on ensimmäisen standardin lähellä. Natriumionille ensimmäisen standardiliuoksen pitoisuus oli 0,2 mg/l ja muille kationeille 0,1 mg/l, joten saadut tulokset ovat huomattavasti korkeampia.

TAULUKKO 11. Kationien toteamis- ja määritysrajat

Kationi	Toteamisraja mg/l	Määritysraja mg/l
Na ⁺	0,27	0,91
K ⁺	0,13	0,43
Mg ²⁺	0,20	0,67
Ca ²⁺	0,54	1,8

6.3 Tarkkuus

Tarkkuutta tutkittiin oikeellisuuden eli poikkeaman ja toistotarkkuuden avulla. Kolmea eripitoista liuosta mitattiin kolmella eri mittauskerralla, jolloin mittauskerroilla valmistettiin kolme rinnakkaismääritystä. Saaduista tuloksista laskettiin oikeellisuus ja suhteellinen keskihajonta yhtälöillä 3 ja 4. Taulukossa 12 on kerrottu oikeellisuuden ja suhteellisen keskihajonnan tulokset.

TAULUKKO 12. Oikeellisuus ja suhteellinen keskihajonta kolmesta eri pitoisuudesta.

Kationi	Liuos mg/l	Tulosten k.a mg/l	Teoreettinen mg/l	Keskihajonta <i>s</i>	Oikeellisuus %	RSD %
Na ⁺	2,0	1,29	1,5	0,045	14,1	3,5
	10,0	10,33	10,5	0,068	1,7	0,7
	20,0	20,20	19,5	0,254	3,6	1,3
K ⁺	1,0	0,75	0,75	0,031	0,6	4,1
	5,0	5,16	5,25	0,041	1,7	0,8
	10,0	9,90	9,76	0,162	1,4	1,7
Ca ²⁺	1,0	0,85	0,76	0,020	38,8	2,6
	5,0	5,14	5,30	0,027	1,9	0,5
	10,0	9,83	9,85	0,040	1,1	0,4
Mg ²⁺	1,0	1,04	0,75	0,063	11,8	8,4
	5,0	5,15	5,25	0,057	3,0	1,1
	10,0	9,64	9,75	0,089	0,2	0,9

Tuloksen oikeellisuus kuvaa mittauksen todellisten arvojen riippuvuutta määritetystä referenssiarvosta. Tuloksista huomataan oikeellisuuden heikkenevän alhaisemmillä pitoisuuksilla. Suhteellinen keskihajonta on kaikilla tuloksilla alle 5 %, poikkeuksena magnesiumionin liuos 1,0 mg/l, jossa tulokseksi saatiin 8,4 %.

6.4 Toistettavuus

Toistettavuutta tarkkailtiin yhden vuorokauden aikana, jolloin mitattiin neljää eripitoista liuosta. Jokaisesta liuoksista valmistettiin kymmenen rinnakkaismääritystä. Tuloksista laskettiin toistettavuus kaavalla 5. Taulukossa 13 on laskettu esimerkkinä natriumionin toistettavuus liuksesta 0,2 mg/l.

TAULUKKO 13. Natriumionin liuksesta 0,2 mg/l laskettu toistettavuus.

Liuos mg/l	Injektio	Pitoisuus mg/l
0,20	1	0,127
	2	0,092
	3	0,087
	4	0,085
	5	0,085
	6	0,092
	7	0,091
	8	0,088
	9	0,090
	10	0,088
Keskiarvo		0,093
Keskihajonta		0,012
Toistettavuus		0,03

Taulukkoon 14 on koottu kolmen eri pitoisuuden tulokset, jossa natriumionin liuos 30 mg/l jätettiin huomioimatta, sillä mittauksessa oli tapahtunut virhe. Taulukon 14 tuloksista voidaan havaita, että toistettavuudessa ei esiinny hajontaa. Kaliumin, magnesiumin ja kalsiumin toistettavuus tulokset ovat esitettyinä liitteessä 4, jossa liuos 15 mg/l jätettiin huomioimatta todennäköisen virheen vuoksi

TAULUKKO 14. Natriumionin toistettavuus tulokset.

	Liuos mg/l	Liuos mg/l	Liuos mg/l
	0,2	10,0	60,0
Keskiarvo	0,09	10,40	60,36
Keskihajonta	0,01	0,05	0,10
Toistettavuus	0,09	0,00	0,00

6.5 Palautuminen

Palautumisen arvo kuvastaa menetelmän kykyä todentaa mitattua konsentraatiota. Menetelmän palautumista tutkittiin kolmesta eri pitoisuudesta, joista palautuminen laskettiin yhtälöllä 7. Taulukossa 15 on laskettu esimerkkinä natriumionin liuksesta 20,0 mg/l palautuminen.

TAULUKKO 15. Natriumionin liuksesta 20,0 mg/l laskettu palautuminen.

Liuos mg/l	Injektio	Pitoisuus mg/l	Pitoisuus k.a mg/l	Teoreettinen mg/l	Palautuminen %
20,0	1	19,87	20,20	19,50	103,58
	2	19,88			
	3	19,85			
20,0	1	20,39			
	2	20,39			
	3	20,40			
20,0	1	20,41			
	2	20,31			
	3	20,29			

Taulukossa 16 on koottuna kaikkien kationien palautumistulokset. Palautumisessa päästiin korkeammilla pitoisuuksilla lähelle tavoitearvoa 100 %, jolloin voidaan todeta, että pitoisuus on todennettu. Alhaisemmilla pitoisuuksilla palautuminen oli alle tavoitearvon tai sen yli, johon voi olla syynä laitteiston tai liuoksen epäpuhtaudet.

TAULUKKO 16. Palautuminen.

Kationi	Liuos mg/l	Tulosten k.a mg/l	Teoreettinen mg/l	Palautuminen %
Na ⁺	2,0	1,29	1,5	85,9
	10,0	10,33	10,5	98,3
	20,0	20,2	19,5	103,6
K ⁺	1,0	0,75	0,75	99,4
	5,0	5,16	5,25	98,3
	10,0	9,9	9,76	101,4
Ca ²⁺	1,0	0,85	0,76	138,8
	5,0	5,14	5,3	98,1
	10,0	9,83	9,85	98,9
Mg ²⁺	1,0	1,04	0,75	111,8
	5,0	5,15	5,25	97
	10,0	9,64	9,75	99,8

7 POHDINTA

Tavoitteena opinnäytetyössä oli validoida kationimenetelmä Dionex DX-120 ionikromatografille. Tarkoituksena oli testata menetelmän toimivuus ja ionikromatografian toimintakunto. Validoinnissa tarkasteltiin lineaarisuutta, tarkkuutta, toistettavuutta ja palautumista sekä määritettiin menetelmälle toteamis- ja määritysrajat.

Mittausalue määritettiin mittaamalla nollanäyte ja kahdeksan standardiliuosta. Menetelmä oli lineaarinen kaikilla kationeilla koko tutkittavalta mittausalueelta. Kalibroitaisuurien korrelaatiokertoimet olivat vähintään 0,9995. Residuaalien tarkastelussa natrium- ja magnesiumionilla residuaalit olivat jakautuneet nollatason molemmin puolin. Kalium- ja kalsiumionilla residuaalit eivät olleet ihanteellisesti jakautuneet nollatason molemmin puolin, mutta eivät muodostaneet selvää käyrää. Residuaalien poikkeamat regressiosuorasta aiheutuivat alhaisten pitoisuuksien epätarkkuudesta.

Tarkkuus määritettiin oikeellisuuden eli poikkeaman ja suhteellisen toistotarkkuuden avulla. Poikkeama kertoo mittauksen todellisten arvojen riippuvuutta määritetystä arvosta. Tuloksista havaittiin, että alhaisemmilla pitoisuuksilla tulokset poikkesivat määritetystä arvosta, mutta korkeammilla pitoisuuksilla poikkeamaa ei juuri esiintynyt. Alhaisilla pitoisuuksilla laitteenkunto vaikuttaa todennäköisesti poikkeaman arvoon. Toistotarkkuutta tutkittiin suhteellisen toistotarkkuuden avulla, joka oli validoinnissa saatujen tulosten mukaan erinomainen, sillä tuloksissa päästiin suurilta osin alle 5 %.

Toistettavuudella tutkittiin menetelmään liittyvää hajontaa mittaamalla kolmea eripitoista liuosta. Toistettavuus vaihteli 0,01-0,28 välillä, jolloin voidaan todeta, että menetelmässä ei esiintynyt merkittävää hajontaa ja laite kykenee mittaamaan tuloksia toistettavasti lyhyellä aikavälillä ja samoilla mittausolosuhteilla.

Palautuminen kertoo kyvystä todentaa mitattua konsentraatiota, jota tutkittiin laskemalla palautuminen kolmesta eri pitoisuudesta. Tuloksista huomattiin alhaisten pitoisuuksien olevan alle tavoitearvon 100 % tai yli sen. Tähän syynä voi olla laitteen epätarkkuus ja pitoisuuden ollessa yli tavoitearvon tulokseen voivat vaikuttaa epäpuhtaudet liuoksessa.

Korkeammilla pitoisuuksilla päästiin lähelle tavoitearvoa, josta voidaan päätellä, että laite antaa tarkempia tuloksia korkeammilla pitoisuuksilla.

Toteamis- ja määrittämissrajat laskettiin regressiosuoranyhtälöstä kulmakertoimen ja keskihajonnan avulla, sillä nollanäytteistä ei saatu vastetta jokaisella mittauskerralla, joten tuloksia ei saatu riittävästi tai niitä ei voitu pitää luotettavana. Määrittämissrajoissa päästiin alle 0,91 mg/l rajaan, poikkeuksena kalsiumioni, jonka määrittämissraja oli 1,8 mg/l. Määrittämissrajojen todettiin olevan suhteellisen korkeita, sillä määrittämissraja on yleisesti ensimmäisen standardin pitoisuuden lähellä. Korkeat määrittämissrajat johtuivat residuaalien poikkeamista alhaisilla pitoisuuksilla. Poikkeamien aiheuttama epätarkkuus puolestaan nosti toteamis- ja määrittämissrajoja.

Kokonaisuudessaan kaikki ennalta määritellyt validoinnin parametrit saatiin todennettua. Menetelmää voidaan käyttää luotettavaan kationien analysointiin vesinäytteistä, kun huomioidaan saadut määrittämissrajat. Laitteella havaittiin nollanäytteitä mittaamalla, että kaikista tuloksista ei saatu vastetta. Lisäksi alhaisilla pitoisuuksilla esiintyi epätarkkuutta koko validoinnin ajan. Syitä nollanäytteiden ja alhaisten pitoisuuksien epätarkkuuteen voi olla laitteen komponenttien kunto, vuosihuollon puute ja laitteen käyttämättömyys, sillä laite ei ole rutiinikäytössä mikä voi heikentää laitteen suorituskykyä. Lisäksi virhettä validoinnin tuloksiin lisää liuosten päivittäisestä laimennoksesta aiheutuva virhe.

Jatkossa menetelmälle voitaisiin suorittaa lisämittauksia, mikäli määrittämissrajoista haluttaisiin alhaisempia. Määrittämissrajassa voisi käyttää mahdollisesti referenssimateriaalia, jolloin saataisiin enemmän luotettavuutta tuloksiin ja alhaisten pitoisuuksien määrittämiseen. Lisäksi menetelmälle voitaisiin määrittää uusittavuus, jotta saataisiin tietoa laitteen kyvystä antaa tuloksia pidemmällä aikavälillä.

LÄHTEET

- Aqva. 2016. Veden puhdistus. Mitä vedessäni on. Verkkosivu. Luettu 3.5.2018.
<https://www.aqva.fi/index.php> https://www.aqva.fi/Mit_vedess_ni_ono/ekauppa/g323/
- Bruckner, M. 2017. Ion Chromatography. Verkkosivu. Päivitetty 5/2018.
https://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/biogeochemical/ic.html
- Fritz, J. S. & Gjerde, D. T. 2009. Ion Chromatography. 4. painos. Weinheim: Wiley-VCH.
- Evira 2010. Luettu 27.5.2018. <http://docplayer.fi/786381-Kemiallisten-menetelmien-validointi-ja-mittausepavarmuus-leena-saari-kemian-ja-toksikologian-tutkimusyksikko.html>
- Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki: Edita Prima Oy
- B. Paull & P.N Nesterenko. 2013. Liquid Chromatography Fundamentals and Instrumentation. ACROSS.
- Materials evaluation and engineering, inc. 2014. Ion chromatography. Luettu 17.5.2018.
<https://www.mee-inc.com/hamm/ion-chromatography-ic/>
- Methrom. 2018. Ion chromatography. Detectors. Comprehensive options for detection. Luettu 17.5.2018.
https://www.metrohm.com/en/products/ion-chromatography/?gclid=EAIaIQobChMI4PjVptWU2wIVS4myCh1ehwHCEAAYASA AEgKUSvD_BwE
- Michalski R, 2014. Industrial applications of ion chromatography.
<http://www.chemikinternational.com/wp-content/uploads/2014/05/5.> [PDF]
- MIKES. 2005. Metrologian neuvottelukunta. Kemian ja mikrobiologian jaosto. Kemian metrologian opas. Luettu 4.3.2018.
- SeQuant. 2007. A Practical Guide to Ion Chromatography. An introduction and troubleshooting manual. SeQuant. Luettu 1.4.2018 [PDF]
https://www.nestgrp.com/pdf/Zp1/Sp1/ION_Manual.pdf
- Shimadzu. 2018. Inorganic Anion Detection. Verkkosivu. Päivitetty 2018.
<http://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/ictalk/64intro.html>
- Thermo Fisher Scientific. 1998. Dionex Corporation. Dionex -120 Ion Chromatography operator`s manual. Tulostettu 12.3.2018
<http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Man-031183-DX-120-IC-Man031183-EN.pdf>

Thermo Scientific. 2005. Dionex Corporation. ICS-1000 on Chromatography system operator`s manual. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/Man-031879-ICS-1000-Ion-Chromatography-Man031879-EN.pdf>

Weiss J. 2004. Handbook of Ion Chromatography. Third, completely revised and updated edition. Volume 1. Kääntänyt Tatjana Weiss. Weinheim: WILEY-VCH

Weiss J. 2004. Handbook of Ion Chromatography. Third, completely revised and updated edition. Volume 2. Kääntänyt Tatjana Weiss. Weinheim: WILEY-VCH

SFS-EN-ISO 14911. 2002. Helsinki: Suomen standarditoimistoliitto SFS. Luettu 25.2.2018. Vaatii käyttöoikeuden.
<https://sales.sfs.fi/fi/index/tuotteet/SFS/CENISO/ID2/1/12555.html.stx>

LIITTEET

Liite 1. Validointisuunnitelma

Tampereen teknillinen yliopisto, TTY	Validointisuunnitelma
Kemian- ja biotekniikan laboratorio	Suunnitelman laatija: Emilia Viljamaa Validoinnin suorittaja: Emilia Viljamaa Suunnitelma hyväksytty: 26.2.2018

<p>Validoitava menetelmä:</p> <p>Kationien määrittäminen Dionex DX-120 ionikromatografilla.</p> <p>Menetelmä pohjautuu standardiin SFS-EN ISO 14911 Veden laatu. Liuoksen Li^+-, Na^+-, NH_4^+-, K^+-, Mn^{2+}-, Ca^{2+}-, Mg^{2+}-, Sr^{2+}- ja Ba^{2+}-ionien määrittäminen ionikromatografisesti vedestä ja jätevedestä.</p>
<p>Validoinnissa huomioitavaa:</p> <p>Validointi suoritetaan itse valmistetuilla liuoksilla, joita käytetään validointi parametrien määrittämiseen. Liuosten säilyvyys 7 päivää, jonka aikana validointi täytyy suorittaa. Näytteensyöttäjään mahtuu 50 näytettä kerralla.</p> <p>Validointiin ei ole laboratorion puolesta määrätty parametreja tai ehtoja.</p>

Validoinnin parametrit:	Määrittystapa:
Mittausalue- ja lineaarisuus	Määritetään nollanäytteestä ja standardeista. Tuloksista tarkastellaan lineaarisuus ja residuaalit.
Toteamis- ja määrittämissrajat	Määritetään nollanäytteistä, jos ei mahdollista vaihtoehtoisesti lineaarisella regressiolla standardeista. Tulokset lasketaan nollanäytteistä tai vaihtoehtoisesti lineaarisella regressiolla.
Tarkkuus	Määritetään mittaamalla liuosta/liuoksia, joiden pitoisuus tunnetaan tarkasti. Tuloksista lasketaan tarkkuus eli oikeellisuus E % ja toistotarkkuus RSD %.
Toistettavuus	Määritetään mittaamalla liuosta/liuoksia joiden pitoisuus tunnetaan tarkasti. Tuloksista lasketaan toistettavuus.
Palautuminen	Määritetään mittaamalla liuosta, jonka pitoisuus tunnetaan tarkasti. Tuloksista lasketaan palautuminen.

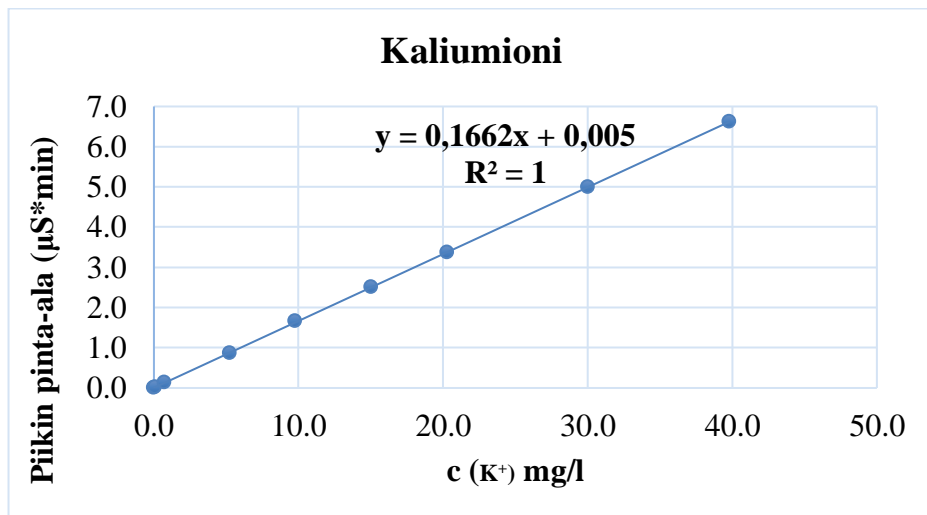
Välineet:
Pipetin kärjet 5 ml
Pipetin kärjet 1 ml
5 ml ruiskut
0,45µ suodattimet
Mittapullot 100 ml, 200 ml, 500 ml
Ionikromatografian näyteputket, korkit

Laitteet:	Huollettu / kalibroitu
Ionikromatografi Dionex DX-120	Dionex DX-120 ionikromatografi Vuosimalli:1998 Huollettu viimeksi: 3.10.2012
Vaaka, Mettler Toledo	17.1.2018
Pipetti 1-5 ml Pipetti100-1000 µl, Thermo Scientific Pipetti 20-200 µl , Thermo Scientific	12.3.2018
Lämpökaappi, Memmert	

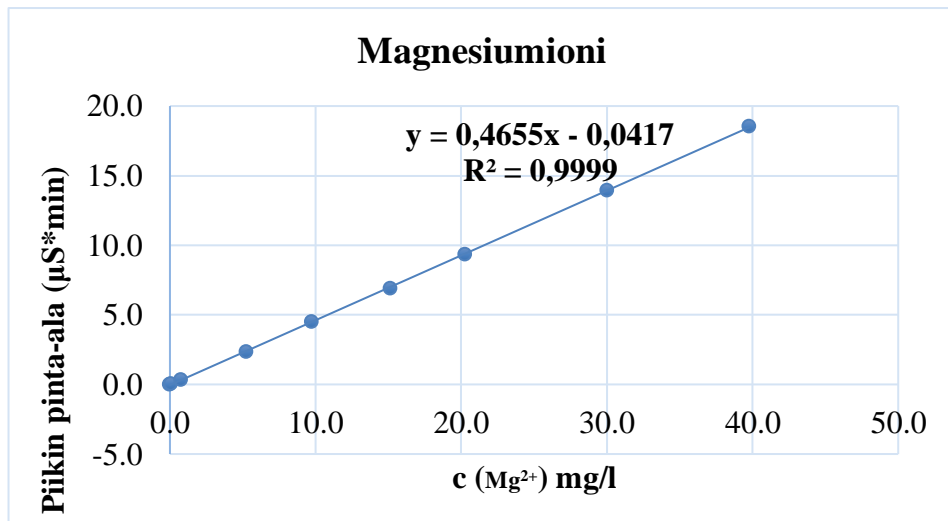
Reagenssit ja liuokset			
Kemikaali	Valmistaja	Tuotenumero	Eränumero
Natriumnitraatti NaNO ₃	VWR	107810010	
Kaliumnitraatti KNO ₃	MERCK	1.05063.0500	A686863 703
Kalsiumnitraatti tetrahydraatti Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	MERCK	1.02121.0500	A0303221 126
Magnesiumkloridiheksahydraatti MgCl ₂ · 6H ₂ O	MERCK	1.05833.1000	A0725033 646
Metaanisulfonihappo (MSA)			
Typpihappo			
UHP-vesi			

Validointi suoritetaan: 12.3.2018-18.3.2018
Tulokset: Lasketaan excelillä ja dokumentoidaan.

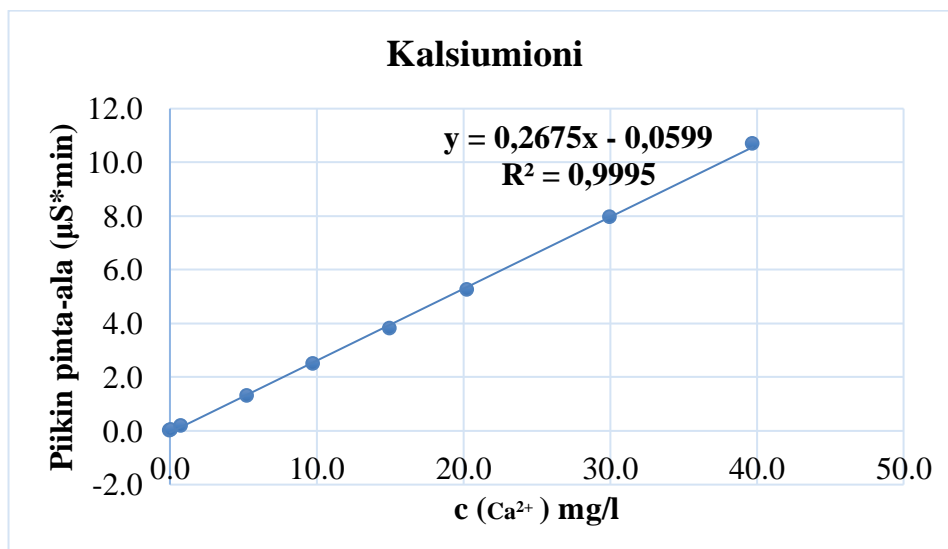
Liite 2. Kalibroitisuorat



KUVIO. Kaliumionin standardisuora

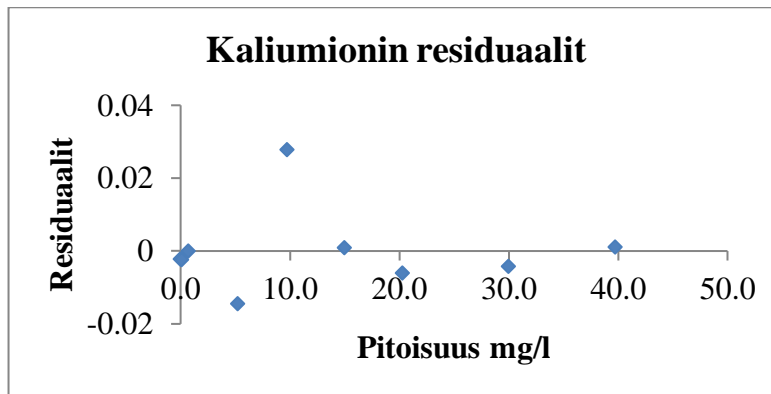


KUVIO. Magnesiumionin standardisuora.

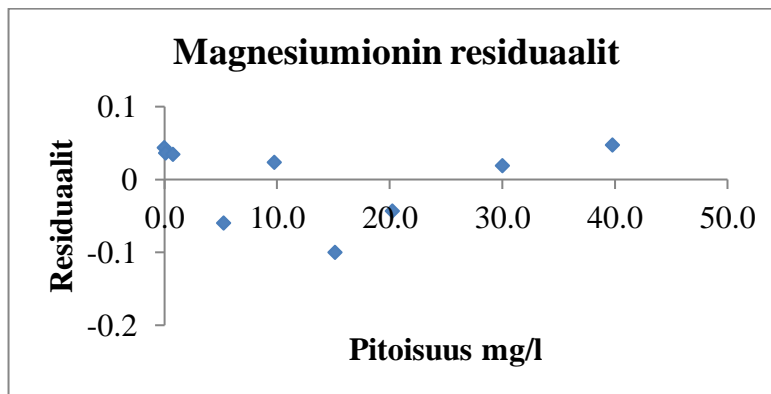


KUVIO. Kalsiumionin standardisuora

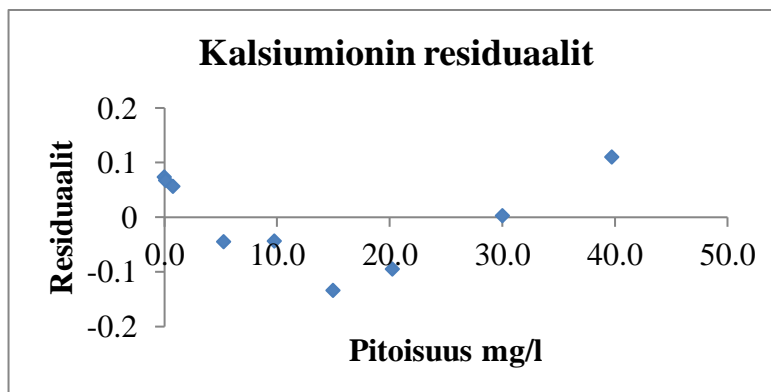
Liite 3. Residuaalien tarkastelu



KUVIO. Kaliumionin residuaalit eivät ole aivan ihanteellisesti normaalijakautuneita, mutta eivät muodosta käyrää.



KUVIO. Magnesiumionin residuaalit ovat normaalijakautuneita.



KUVIO. Kalsiumionin residuaalit eivät ole aivan ihanteellisesti normaalijakautuneita, mutta eivät muodosta käyrää.

Liite 4. Regressioanalyysin taulukot

TAULUKKO. Kaliumionin regressioanalyysi

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>
Intercept	0,005696	0,007074
X Variable 1	0,1661	0,0003513

TAULUKKO. Magnesiumionin regressioanalyysi

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>
Intercept	-0,05422	0,03133
X Variable 1	0,466	0,001555

TAULUKKO. Kalsiumionin regressioanalyysi

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>
Intercept	-0,08126	0,04845
X Variable 1	0,2682	0,002408

Liite 4. Toistettavuus

TAULUKKO. Kaliumionin toistettavuus standardiliuoksista

	Liuos mg/l 0,1	Liuos mg/l 5,0	Liuos mg/l 30,0
Keskiarvo	0,08	5,20	30,16
Keskihajonta	0,00	0,01	0,06
Toistettavuus	0,01	0,02	0,18

TAULUKKO. Magnesiumionin toistettavuus standardiliuoksista

	Liuos mg/l 0,1	Liuos mg/l 5,0	Liuos mg/l 30,0
Keskiarvo	0,18	5,13	30,15
Keskihajonta	0,00	0,01	0,03
Toistettavuus	0,01	0,03	0,09

TAULUKKO. Kalsiumionin toistettavuus standardiliuoksista

	Liuos mg/l 0,1	Liuos mg/l 5,0	Liuos mg/l 30,0
Keskiarvo	0,35	5,08	30,08
Keskihajonta	0,02	0,08	0,10
Toistettavuus	0,05	0,23	0,28