

Osmo Rentola

PCSTestr™ 35-mittarin validointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

31.8.2018

| | |
|---|--|
| Tekijä(t) Otsikko | Osmo Rentola PCSTestr™ 35-mittarin validointi |
| Sivumäärä Päivämäärä | 27 sivua + 4 liitettä 31.8.2018 |
| Tutkinto | Laboratorioanalytiikka (AMK) |
| Koulutusohjelma | Laboratorioala |
| Ohjaaja(t) | Mia Ruismäki, Lehtori Matias Veikkolainen, Laboratorioteknikko |
| <p>Opinnäytetyön toimeksiantajana toimi Helsingin yliopiston elatusainekeittiö. Opinnäytetyötä alettiin tekemään, jotta laboratorioon saataisiin toimiva laadunvarmistusmenetelmä 1 x PBS-liuokselle. Mittaukset suoritettiin Viikissä. Laboratorioon oli hankittu PCSTestr™ 35-mittari, jolla pystytään mittaamaan mm. sähkönjohtavuutta, mutta se ei ollut vielä rutiinikäytössä.</p> <p>Validoinnin kohteena oli sähkönjohtokyvyn mittaus. Laadunvarmistusmenetelmälle nousi tarve huonon 1 x PBS-erän ja sen jäljittämisen hankaluuden johdosta. 1 x PBS-liuoksesta mitataan sähkönjohtokyky ja se ilmoitetaan yksikkönä mS/cm. Sähkönjohtokyky on normaalisti 13 - 15 mS/cm riippuen valmistuserästä.</p> <p>Validointi onnistui, ja saadut tulokset olivat tarkkoja ja toistettavia. Sähkönjohtokyvyn mittausepävarmuus laskettiin MUKit-ohjelmalla. Mittausepävarmuudeksi saatiin 8 % luottamustasolla 95 %. Tulosten perusteella kirjoitettiin käyttöohje laitteelle.</p> | |
| Avainsanat | sähkönjohtavuus, analyysimenetelmä, validointi, MUKit, mittausepävarmuus |

| | |
|--|---|
| Author(s) Title | Osmo Rentola The validation of PCSTestr™ 35 Meter |
| Number of pages Date | 27 pages + 4 appendices 31.8.2018 |
| Degree | Bachelor of Laboratory Services |
| Degree Programme | Laboratory Sciences |
| Instructor(s) | Mia Ruismäki, Senoir Lecturer Matias Veikkolainen, Laboratory Technician |
| <p>This study was done for Helsinki University's Media Kitchen at Viikki. The workj was commissioned because there was a need to get working quality assurance method for the 1 x PBS solution. The laboratory had acquired PCSTestr™ 35 Meter, which wasn't in routine use yet, for conductivity measurements earlier. The study was needed because of an incident that had happened earlier with the 1 x PBS solution batch.</p> <p>The target for validation was conductivity. The unit of conductivity is mS/cm. The conductivity of 1 x PBS solution is between 13 to 15 mS/cm depending on batch it was made from.</p> <p>The validation was successful, and results were accurate and repeatable. The MUKit program was used to calculate uncertainty for the conductivity. The measurement uncertainty was 8 % with 95 % confidence. Based on results, a manual for the Meter was written.</p> | |
| Keywords | conductivity, validation, method, MUKit, uncertainty |

Sisälllys

Lyhenteet

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Johdanto | 1 |
| 2 | Teoria | 2 |
| 2.1 | Sähkönjohtavuus | 2 |
| 2.1.1 | Lämpötilan vaikutus sähkönjohtokykyyn | 3 |
| 2.1.2 | TDS | 5 |
| 2.1.3 | Suolaisuuden määrittäminen sähkönjohtokykyymittarilla | 6 |
| 2.2 | PBS-liuos | 7 |
| 2.3 | Validointi | 7 |
| 2.4 | Validointiparametrit | 8 |
| 2.4.1 | Määrittämiss raja (LOQ) | 9 |
| 2.4.2 | Mittausalue | 10 |
| 2.4.3 | Uusittavuus | 10 |
| 2.4.4 | Mittausepävarmuus | 11 |
| 2.4.5 | Mittausepävarmuuden arviointi MUKit ohjelmalla | 13 |
| 2.4.6 | Oikeellisuus | 14 |
| 2.4.7 | Täsmällisyys | 16 |
| 3 | Laitteet ja materiaalit | 16 |
| 3.1 | Laitteet | 16 |
| 3.2 | Materiaalit | 17 |
| 4 | Työn suoritus | 18 |
| 4.1 | Liuosten valmistus | 18 |
| 4.2 | Mittaukset | 19 |
| 5 | Tulokset | 19 |
| 5.1 | Harha-arvot | 19 |
| 5.2 | Laajennettu mittausepävarmuus | 25 |
| 6 | Johtopäätökset | 26 |
| | Lähteet | 27 |

Liitteet

- Liite 1 Multi-parameter PCSTestr™ 35, Eutech Instruments spesifikaatiot
- Liite 2 Milli-Q^R, Advantage A10 Water Purification System spesifikaatiot
- Liite 3 MUKit-raportti
- Liite 4 Käyttöohje PCSTestr™ 35:lle

Lyhenteet

| | |
|----------|--|
| 1 x PBS | Phosphate Buffered Saline (Yksinkertainen fosfaattipuskuroitu suolaliuos) |
| 10 x PBS | Phosphate Buffered Saline (Kymmenkertainen fosfaattipuskuroitu suolaliuos) |
| EDTA | Etyleenidiamiinitetraetikkahappo |
| MAD | Median Absolute Deviation (Mediaanin absoluuttinen poikkeama) |
| TDS | Total Dissolved Solids |

1 Johdanto

Opinnäytetyön tavoitteena oli tehdä Helsingin yliopiston elatusainekeittiölle käyttöönotto, käyttöohje sekä validointi Eutech instrumentsin PCSTestr 35-mittarille (liite 1). Laite on monipuolinen ja sillä voi mitata viittä eri parametria (pH, sähkönjohtavuus, lämpötila, TDS, suolapitoisuus), mutta vakiokäytössä tulee olemaan vain sähkönjohtavuuden ja lämpötilan mittaus.

Sähkönjohtokyvyn mittaukselle tuli tarvetta laadunvalvonnallisista syistä. Laite on tarkoitettu käyttöön tehdessä 1 x PBS-liuosta (fosfaattipuskuroitu suolaliuos), joka tehdään laimentamalla 10 x PBS:stä. Aikaisemmin laboratoriossa tapahtui pieni virhe, joka johti mm. solujen kuolemaan asiakkailta. Elatusainekeittiön asiakaskuntaan kuuluu yliopiston sisällä eri tutkimusryhmiä sekä joitakin talon ulkopuolisia tahoja.

Tapahtunutta alettiin selvittämään ja pitkän selvittämisen jälkeen päätettiin mitata kyseisen 1 x PBS erän sähkönjohtavuus. Kävi ilmi, että kyseiseen erään ei ollut laitettu ollenkaan 10 x PBS:ää vaan liuos oli käytännössä pelkkää MilliQ-vettä. MilliQ veden pH:ta on vaikea mitata tarkasti sen sisältämien ionien vähyyden vuoksi, joten sähkönjohtokyvyn mittaaminen on varmempi tapa laadunvarmistukseen. Kun laite on validoitu, se tulee vakiokäyttöön ja jokaisen tehdyn erän sähkönjohtavuus merkitään työpäiväkirjaan.

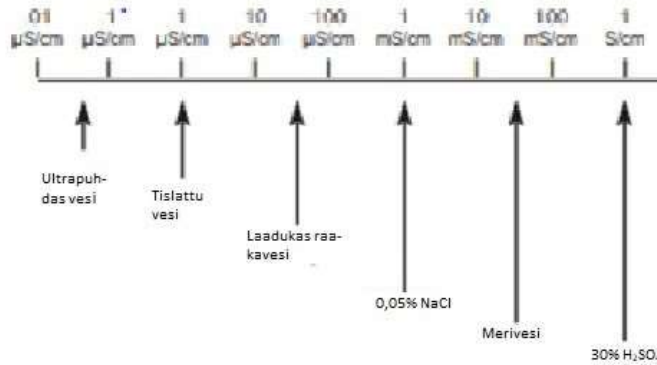
2 Teoria

2.1 Sähkönjohtavuus

”Sähkönjohtavuus, γ , on vesiliuoksen tietynsuuruisen yksikkökuution vastakkaisten pintojen välisen, tietyissä olosuhteissa mitatun vastuksen käänteisluku.” [1] Veden laatua tutkittaessa tämä ilmoitetaan yleensä sähkönjohtavuutena ja sitä saatetaan käyttää näytteessä olevien ionisoituvien liuenneiden aineiden konsentraation mittana. Se ilmoitetaan siemensinä metriä kohti, S/m [2, s. 3.] Johdetut yksiköt ovat $\mu\text{S}/\text{cm}$ ja mS/cm sekä S/cm , joka on sama kuin vanhempi yksikkö mho/cm (ohm toisinpäin, koska se kuvastaa käänteistä suhdetta johtokyvyn ja vastuksen välillä). Tietyt teollisuuden alat käyttävät yksikkönä resistiivisyyttä sähkönjohtavuuden sijaan, $\text{M}\Omega/\text{cm}$ [1].

Konduktiivisuudella tarkoitetaan liuoksen sähkönjohtokykyä. Jotta liuos johtaisi sähköä, sen täytyy sisältää ioneita tai varautuneita partikkeleita. Yleensä suurin osa sähköjohtokykymittauksista tehdään vesiliuoksista ja liuoksen sähkönjohtavuudesta vastaavat veteen liuenneet ionit, kuten suolat, hapot tai emäkset. Vesi itsessään ei ole kuitenkaan elektrolyytti, vaikka siinä onkin yleensä joitakin vety- ja hydroksidi-ioneita. Sähkönjohtokyky ei ole spesifinen, se määrittää ioneitten konsentraation liuoksessa, mutta ei pysty erottelemaan elektrolyyttejä toisistaan. [1]

Kuvasta 1. käy ilmi, että tislattun veden sähkönjohtavuus on korkeampi kuin ultrapuhtaan veden. Tämä johtuu siitä, että ilman hiilidioksidi kontaminoi veden ja liukenee siihen muodostaen heikon elektrolyytin, hiilihapon. [1]



Kuva 1. Puhtaan veden, tislattun veden ja tyypillisten elektrolyyttien sähkönjohtavuus 25° C:ssa. [3]

MilliQ-veden (ultrapuhdas) pH on 6,998. MilliQ on kuitenkin hyvin puhdasta ja se sisältää erittäin vähän ioneita ja sillä on matala puskurointikapasiteetti. Tästä johtuen veden pH voi muuttua hyvinkin nopeasti, kun se poistuu laitteen suljetusta systeemistä. Kaikki epäpuhtaudet säilöastian reunoilla liukenevat veteen ja muuttavat sen pH:ta, samoin ilman hiilidioksidi liukenee veteen laskien sen pH:ta. pH-mittareita joita on yleisesti laboratoriokäytössä, ei ole suunniteltu toimimaan liuksien kanssa, joissa on erittäin vähän ioneja ja niitä ei voi tämän takia käyttää luotettavasti pH:n mittaamiseen. [4]

2.1.1 Lämpötilan vaikutus sähkönjohtokykyyn

Lämpötilan nousu liuksessa laskee sen viskositeettiä ja nostaa sen sisältämien ionien liikkuvuutta. Lämpötilan nousu voi myös lisätä ionien määrää liuksessa johtuen molekyylien dissosiaatiosta. Koska liuksen sähkönjohtokyky on riippuvainen näistä parametreista, liuksen sähkönjohtokyky nousee lämpötilan noustessa. [5, s. 1]

Sähkönjohtavuuden lämpötilakerroin, $\alpha_{0,25}$, saadaan kaavasta

$$\alpha_{0,25} = \frac{1}{\gamma_{25}} \left(\frac{\gamma_{\theta} - \gamma_{25}}{\theta - 25} \right) * 100 \quad (1)$$

jossa 25 ja θ ovat lämpötiloja, joissa vastaavat sähkönjohtavuudet γ_{25} ja γ_{θ} on mitattu. [2, s. 4]

Lämpötilankorjauskertoimia käytetään korjaamaan sähkönjohtavuuden riippuvuutta lämpötilasta. Muunnokset sähkönjohtavuudeksi (γ_{25}) 25° C lämpötilassa voidaan tehdä käyttäen yhtälöä

$$\gamma_{25} = \frac{\gamma_{\theta}}{1 + \left(\frac{\alpha}{100}\right)(\theta - 25)} \quad (2)$$

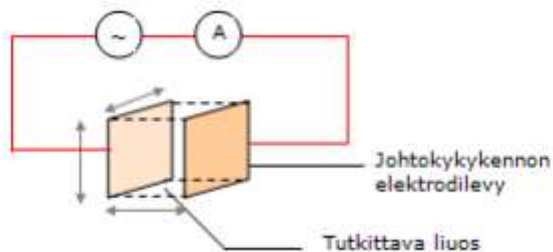
jossa

α on sähkönjohtavuuden lämpötilakerroin;

γ_{θ} on sähkönjohtavuus mitatussa lämpötilassa θ ;

θ on näytteen mittauslämpötila, celsiusasteina. [2, s. 4]

”Sähkönjohtavuuden lämpötilariippuvuus ei ole tarkkaanottaen lineaarinen, joten lineaarinen korjaus ei siksikään ole tarkka”. Kerroin tulisi määrittää mahdollisimman tarkoin samalta lämpötila-alueelta, jolla korjauskin tehdään. Mikäli mittausta tehdään laajalla lämpötila-alueella, kuten $T = 5-20$ °C, se ei ole mahdollista, vaan aiheuttaa lisää virhettä. [6, 7]



Kuva 2. Johtokykykennon periaate [7, s. 9]

Kuvan 2 perusteella voidaan todeta, että virta joka kulkee elektrodien välillä, ei riipu ainoastaan elektrolyytin johtokyvystä, vaan siihen vaikuttaa myös elektrodien välinen etäisyys ja niiden pinta-ala sekä geometria, eli kennovakio. Arvo kennovakiolle vaihtelee yleensä välillä $0,01-50 \text{ cm}^{-1}$ ja sen suuruus vaihtelee mitattavan johtokyvyn suuruuden mukaan: mitä suurempi johtokyky sitä suurempi kennovakio. Käytännön tasolla kennovakio määritetään standardielektrolyytillä, jolla on tunnettu resistiivisyys, minkä seurauksena kennosta ei tarvitse tietää tarkempia mittoja ja geometriaa. Näytteen

resistiivisyys voidaan laskea kennovakioista, jonka käänteisarvo on näytteen johtokyky eli konduktiivisuus. [7, s. 9]

Kennovakio, K , on suure, joka saadaan metrin käänteislukuna yhtälöstä:

$$K = \frac{l}{A} \quad (3)$$

jossa

l on sähkönjohtimen elektrodilevyjen välimatka toisistaan eli pituus, metreinä;

A on johtokykykennon elektrodilevyn pinta-ala, neliömetreinä.

Kennovakio johtuu kennon geometriasta. Se voidaan määrittää kokeellisesti. [2, s. 3]

2.1.2 TDS

TDS:llä (*Total Dissolved Solids*) tarkoitetaan kaikkien kationien, anionien ja dissosioitumattomien aineiden liuenneiden osien massaa litrassa vettä. TDS määritetään suodattamalla näyte membraanisudattimella. [8, s. 30]

Näyteastia kuivataan 105 ± 3 C asteisessa uunissa ja tämän jälkeen näyte jäähdytetään eksikaattorissa ympäristön lämpötilaan. Astia punnitaan ja saatu massa pyöristetään lähimpään milligrammaan (m_a). Tämän jälkeen astiaan lisätään haluttu määrä filtteröityä näytettä (V_{FB}), jolla saadaan lopputulokseksi 20-1000 mg (m_D) haihdutuksen jälkeen. Haihdutuksen jälkeen astia jäähdytetään eksikaattorissa ympäristön lämpötilaan, jonka jälkeen se punnitaan ja saatu massa pyöristetään lähimpään milligrammaan (m_b). Kuivan näytteen (m_D) massa on vakio mikäli, näytteen massa on edelleen 0,5 %:n tai 2 mg:n sisällä puolen tunnin lisäkuivatuksen jälkeen. Kuivatus jatkuu niin kauan, kunnes massa pysyy vaaditun rajan sisällä. [9, s. 6]

Tulokset lasketaan seuraavasti:

$$\rho_{TDS} = \frac{m_D}{V_{FB}} \quad (4)$$

$$m_D = m_b - m_a \quad (5)$$

ρ_{TDS} on haihdutusjäännös yksikössä mg/l

m_D on haihdutetun näytteen massa yksikössä mg

m_a on vakioidun tyhjän astian massa yksikössä mg

m_b on haihdutetun näytteen ja vakioidun astian massa yksikössä mg

V_{FB} on filtteroidyn näytteen määrä yksikössä l

Määrät pyöristetään lähimpään 1 mg/l. [9, s. 6]

Sähkönjohtokykyt mittarit tarjoavat nopeamman ja helpomman tavan mitata liuoksen TDS:ää seuraamalla sähkönjohtokykyä ja muuttamalla sen TDS-lukemaksi. TDS-kertoimen selvitys tapahtuu seuraavasti. Aluksi suoritetaan kalibrointi käyttämällä standardia, jolla on tunnettu TDS.

$$TDS_{kerroin} = \frac{TDS(STD)}{K_{18}(STD)} \quad (6)$$

$TDS(STD)$ yksikkö on mg/l.

$K_{18}(STD)$ on standardin sähkönjohtokyky korjattuna 18 °C:seen yksikössä $\mu\text{S}/\text{cm}$. [8, s. 30]

2.1.3 Suolaisuuden määrittäminen sähkönjohtokykyt mittarilla

Suolaisuus on veteen liuenneiden suolojen yhteismäärä, ja se ilmoitetaan saliniteettina S. Suolaisuus kertoo, kuinka monta grammaa yhteensä eri suoloja on liuennut yhteen kiloon vettä. Pääsääntöisesti merivesimittauksia tehdessä puhutaan saliniteetista. [10]

2.2 PBS-liuos

PBS on fosfaattipuskuroitu suolaliuos, jota käytetään biologisessa tutkimuksessa. Suolaliuos sisältää natriumkloridia, natriumfosfaattia ja joissakin resepteissä kaliumkloridia sekä kaliumfosfaattia. Puskuri auttaa pH:n vakiona pitämisessä. Liuoksen osmolaliteetti ja ionikonsentraatio vastaavat yleensä ihmiskehon pitoisuuksia. [11]

PBS-liuosta voidaan käyttää monessa eri tehtävässä, koska se ei ole myrkyllistä soluille. Sitä voidaan käyttää esimerkiksi eri aineiden laimentamiseen tai soluja sisältävien säiliöiden huuhtelemiseen, sekä laimennusaineena erilaisissa biomolekyylien kuivausmenetelmissä, koska sen sisältämät vesimolekyylit strukturoituvat aineiden, kuten proteiinien ympärille, jotta ne saadaan liikuntakyvyttömiksi ja voidaan kuivata. Ohut vesikalvo kiinnittyy aineeseen ja estää denaturoinnin tai muut rakennemuutokset. Karbonaattipuskureita voidaan käyttää samaan tarkoitukseen pienemmällä tehokkuudella. [1]

PBS-liuokseen voidaan lisätä esimerkiksi EDTA:a (etyleenidiamiinitetraetikkahappo) lisäämään tiettyjä toimintoja. EDTA:a sisältävää PBS-liuosta voidaan käyttää esimerkiksi irrottamaan kiinnittyneet ja yhdistetyt solut. Kahden arvoisia metalleja kuten esimerkiksi sinkkiä ei voida lisätä, koska se johtaa saostumiseen. [11]

2.3 Validointi

Validointi on prosessi, jolla osoitetaan analyysimenetelmän olevan oikea sen tarkoitettuun käyttöön. Validoinnin tuloksia voidaan käyttää laadun, luotettavuuden ja johdonmukaisuuden tarkastelemiseen. Se on olennainen osa hyvää analyttistä käytäntöä. [12]

Analyysimenetelmiä täytyy validoida tai uudelleenvalidoida

- ennen kuin ne otetaan vakiokäyttöön
- aina kun olosuhteisiin tulee muutoksia (esim. instrumentin vaihto tai muutos näytteissä)

- aina kun analyysimenetelmä vaihtuu tai muutos on nykyisen menetelmän alueen ulkopuolella. [12]

Tietyn menetelmän validisuus tulisi todistaa laboratoriokokeilla käyttäen näytteitä tai standardeja, jotka ovat tuntemattomia näytteitä vastaavia. Esikäsittelyn ja toteutuksen tulisi seurata validointiprotokollaa. Alla lista validointiprotokollasta. [12]

1. Validoinnin kohde, kuvataan validoinnin kohteena oleva menetelmä tai laite sen soveltamisala mukaan lukien käytettävät matriisit.
2. Validoinnin tavoite, arvioidaan mittausmenetelmän suorituskykyä sekä menetelmän soveltuvuutta tiettyyn tarkoitukseen.
3. Näyteaineisto, kuvataan käytettävät näytteet, niiden käsittely ja säilytys sekä mahdolliset häiriötä aiheuttavat tekijät.
4. Henkilöiden ja vastuiden nimeäminen, kirjataan vastuuhenkilöt.
5. Tavoiteaikataulu validoinneille.
6. Laitteet, kirjataan validoinneissa käytettävät laitteet ja varmistetaan, että laitteet ovat toimintakunnossa ja ne on jäljitettävästi kalibroitu.
7. Tilat, kuvataan käytettävät tilat ja niille mahdollisesti asetetut erityisvaatimukset.
8. Validoinnin laajuus ja määritettävät parametrit.
9. Vaatimusten asettaminen, mikäli mahdollista niin validointiparametreille annetaan tulosvaatimus, jonka tulee täytyä. [13, s. 10]

2.4 Validointiparametrit

Kuten taulukosta 1 käy ilmi, eri alojen validoinneissa keskitytään eri parametreihin. Esimerkiksi kvantitatiivisessa analytiikassa pyritään yhdistämään ainakin oikeellisuus, toistettavuus, uusittavuus, spesifisyys, määritysraja ja lineaarisuus. [13, s. 13]

Taulukko 1. Validoinnissa käytettävät parametrit [13, s. 13]

| | englanti (VIM) | suomi | Kemia, elintarvike, rehut, kliini- nen, ympäristö ym. | | Molekyyli- biologia | | Mikrobiologia ja virologia, kliininen | | Mikrobiologia elintarvike, rehut, ympäristö ym. | | Kliininen fysiologia |
|---------------------------|--------------------------|-------|---|-----------------|------------------------|-----------------|---|-----------------|--|-----------------|-------------------------|
| | | | semikvantitatiivinen kvantitatiivinen | kvalitatiivinen | kvantitatiivinen | kvalitatiivinen | kvantitatiivinen | kvalitatiivinen | kvantitatiivinen | kvalitatiivinen | |
| Limit of detection | Havaitsemisraja (LOD) | | x | x | x | x | x | x | | x | x |
| Sensitivity | Herkkyys | | x | x | x | x | x | x | | x | x |
| Robustness, ruggedness | Häiriöalttius | | x | x | x | x | | x | | | x |
| Linearity | Lineaarisuus | | x | | x | x* | x | | x | | x |
| Measurement range | Mittausalue | | x | | x | | x | | x | | x |
| Uncertainty | Mittaus- epävarmuus | | x | | x | | x | | x | | x |
| Limit of quantitation | Määritysraja (LOQ) | | x | | x | | x | | x | | x |
| Trueness | Oikeellisuus | | x | x | x | x | | | x | x | x |
| | Osoituskyky | | x | | | | | | | | x |
| Resolution | Resoluutio | | x | | | | | | | | x |
| Recovery | Saanto | | x | | | | x | | x | | x |
| Selectivity | Selektiivisyys | | x | x | | | x | x | x | x | x |
| Specificity | Spesifisyys | | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| Stability | Stabiilisuus | | x | | | | x | x | | | x |
| Performance | Suorituskyky | | x | | | | | | | | x |
| Repeatability | Toistettavuus | | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| Precision | Täsmällisyys | | x | | x | | | | | | x |
| Reproducibility | Uusittavuus | | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| | Virhelähteet | | | x | | x | | x | | x | x |

* multiplex –menetelmät

2.4.1 Määritysraja (LOQ)

”Kvantitatiivisen määrittelyn pitoisuusalaraja väliaineessa mitattuna, jolle voidaan esittää epävarmuusarvio”. [13, s. 26]

Alemmalla määrittämissrajalla (LLOQ) tarkoitetaan alhaisinta pitoisuutta, joka on mahdollista määrittää kvantitatiivisesti validoitavalle menetelmälle sen vaatimalla toistettavuudella ja todenmukaisuudella. Määrittämissraja määritetään samoin kuin havaitsemisraja, mutta oikeellisuuden ja toistettavuuden on pysyttävä halutuissa rajoissa. Useimmiten alempi määrittämissraja on 5,6 tai 10 kertaa nollanäytteen keskihajonta. [13, s. 26]

Ylemmällä määrittämissrajalla (ULOQ) tarkoitetaan korkeinta aineen pitoisuutta, joka voidaan määrittää hyväksyttävällä toistettavuudella sekä oikeellisuudella. Usein tämä on sama kuin korkein pitoisuus standardisuoralla. [13, s. 26]

2.4.2 Mittausalue

”Joukko saman lajin suureiden arvoja, jotka voidaan mitata tietyllä mittauslaitteella tai mittausjärjestelmällä, jolle on määritetty epävarmuus, määritellyin ehdoin.” Mittausalueesta puhuttaessa tarkoitetaan analyysin pitoisuusaluetta tai suureen vaihtelualuetta, jossa voidaan käyttää menetelmää käyttötarkoitukseensa soveltuvalla tarkkuudella. Kalibrointisuora on aina lineaarinen optimipitoisuusalueella. Lineaarinen alue kuvaa mittausaluetta, jolla vaste analysoitavasta yhdisteestä käyttäytyy lineaarisesti konsentraatioon nähden. Rajoittavina tekijöinä mittausalueen alkupäässä on menetelmän toteamis- tai määrittämissraja ja loppupäässä mittalaitteen kyky havainnoida analyysin pitoisuuden tai suureen muutoksia. [13, s. 23]

2.4.3 Uusittavuus

”Mittauksen täsmällisyys mittauksen uusittavuusehtojen täytyessä.” Kun määrittämisset tehdään samalla menetelmällä muuttaen yhtä tai useampaa seuraavista: mittauslaite, suorituspaikka, suorittaja tai muu oleellinen tekijä tai tehden mittaukset aikavälein, jotka ovat pitkät verrattuna yksittäisen mittauksen kestoajaan ja tulosten välillä on yhtäpitävyys niin saadaan uusittavuus. [13, s. 32]

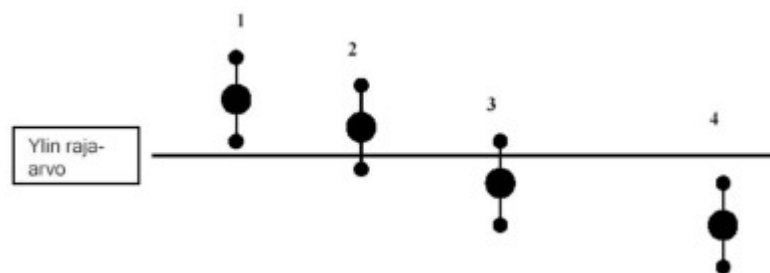
”Menetelmän uusittavuutta arvioidaan analysoimalla todellisia näytteitä tai vertailumateriaalia ja osallistumalla vertailumittauksiin. Kokonaishajonta kuvaa menetelmän uusittavuutta.” [13, s. 32]

2.4.4 Mittausepävarmuus

”Ei-negatiivinen parametri, joka käytettyjen tietojen perusteella kuvaa mittaussuurelle saatujen arvojen oletettua vaihtelua. Mittausepävarmuus kuvaa yleisluontoista mittaustulosten vaihtelua ja se on määritelty virherajojen avulla.” [13, s. 23]

Jokaiseen menetelmään liittyy tietty epävarmuus. Tämä voi johtua esimerkiksi virheistä tai epätarkkuuksista näytteenotossa, näytteen säilytyksessä, laitteissa ja analyysin eri vaiheissa. Mittausepävarmuus on tulokseen liittyvä arvio rajoista, joiden välissä ”oikea” arvo on tietyllä todennäköisyydellä. [13, s. 23]

Kuvasta 3 näemme, että kohdassa 1 mittaustulos ja epävarmuusarvio ovat raja-arvon yläpuolella. Kohdassa 2 mittaustulos on raja-arvon yläpuolella, mutta raja-arvo epävarmuusarvion sisällä. Kohdassa 3 mittaustulos on raja-arvon alapuolella ja raja-arvo epävarmuusarvion sisällä ja kohdassa 4 sekä mittaustulos että epävarmuusarvio raja-arvon alapuolella [13, s. 25]



Kuva 3. Mittaustulokset ja raja-arvot. [13, s. 25]

MUkit, eli *Measurement Uncertainty Kit*, on ohjelmisto jota käytetään mittausepävarmuuden arviointiin. Mittausepävarmuuden tunteminen analyysituloksesta on oleellista sen jäljitettävyyden vuoksi. Mittausepävarmuuden yhtenäinen arviointi vaikuttaa parantavasti analyysitulosten vertailukelpoisuuteen eri laboratorioiden välillä. Tämä prosessi helpottuu, sillä ohjelman avulla pystytään arvioimaan helposti mittausepävarmuuksia hyödyntämällä

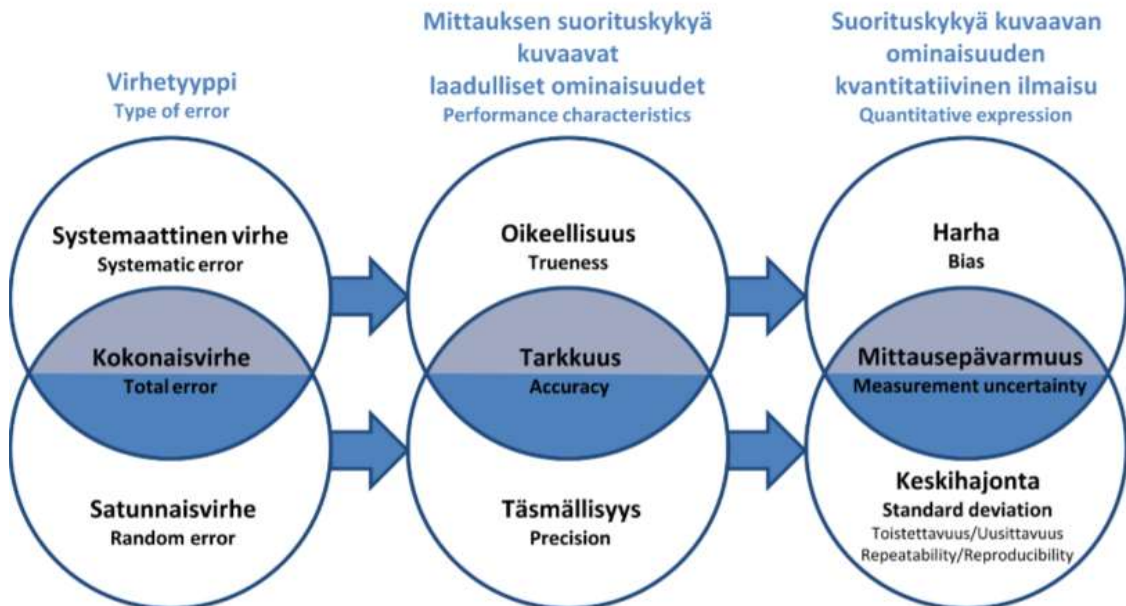
- kontrollinäytteiden tuloksia
- rutiininäytteiden rinnakkaistuloksia

- laboratorioiden välisiä vertailukoe/pätevyystuloksia
- saantokokeiden tuloksia. [14]

Mittausepävarmuus on numero merkin \pm jälkeen. Kaikkiin mittauksiin vaikuttaa tietty virhe. Mittausepävarmuus kertoo, minkä kokoluokan virhe voi olla kyseessä. Näin ollen mittausepävarmuus on tärkeä osa raportoitua tulosta. [15, s. 6]

Dataa käyttävän asiakkaan täytyy tietää mittausepävarmuus sekä tulokset, jotta niistä voidaan tehdä oikeat johtopäätökset. Tuloksen epävarmuus on tärkeä esimerkiksi kun seurataan lain määäämiä sallittuja mittausrajoja. ISO 17025 vaatii mittausepävarmuuden arviointia. [15, s. 6]

”Laajennettu mittausepävarmuus on mittauksen yhdistetyn standardiepävarmuuden ja lukua yksi suuremman kertoimen tulo. Pitoisuus ilmoitetaan määäryksen tuloksen luottamusvälinä, jonka voidaan olettaa pitävän sisällä suurimman osan testituloksista.” [13, s.25]



Kuva 4. Mistä mittausepävarmuus koostuu [16]

”Tarkkuus on systemaattisen mittausvirheen estimaatti. Menetelmän kokonaispoikkeama B on tuloksen ja teoreettisen arvon tai standardimenetelmälle

sovitun arvon välinen ero.” Kuvasta 4 nähdään, että se koostuu oikeellisuudesta ja täsmällisyydestä.

2.4.5 Mittausepävarmuuden arviointi MUKit ohjelmalla

Laajennetun mittausepävarmuuden selvittämiseksi, mittauksen yhdistetty standardiepävarmuus kerrotaan kattavuuskertoimella k . Laajennetun mittausepävarmuuden laskemisessa hyödynnetään saantokokeiden tuloksia sekä varsinaisten näytteiden toistomittausten tuloksia. Yleensä käytetään kattavuuskerrointa 2, mikä tarkoittaa 95 %:n luottamustasoa. [13, s. 25]

Tarkastelu MUKit ohjelmassa sisältää kuusi vaihetta:

1. mitattavan suureen määrittäminen
2. laboratorion sisäinen uusittavuus (R_w)
3. menetelmän ja laboratorion poikkeama (bias)
4. osatekijöiden muuttaminen standardiepävarmuuksiksi $u(R_w)$ ja $u(\text{bias})$

Lasketaan $u(R_w)$ ja $u(\text{bias})$.

$$u(R_w) = \sqrt{S_{Rw}^2 + s_r^2} \quad (7)$$

$$u(\text{bias}) = \sqrt{\text{bias}_1^2 + \left(\frac{s_{\text{bias}_1}}{\sqrt{n_1}}\right)^2 + u(c_{ref_1})^2} \quad (8)$$

Jossa

$u(R_w)$ on standardiepävarmuustekijä laboratorion sisäiselle uusittavuudelle

S_{Rw} on standardipoikkeama laboratoriossa uusittavissa olosuhteissa

s_r on standardipoikkeama toistettavissa olosuhteissa

$u(bias)$ on epävarmuustekijä, joka liittyy mahdolliseen menetelmään, ja laboratorion systemaattinen virhe

$u(Cref)$ on standardiepävarmuustekijä sertifioidulle tai osoitetulle arvolle – yksittäisten epävarmuustekijöiden keskiarvo

5. Yhdistetyn standardiepävarmuuden laskeminen

Tämän jälkeen lasketaan yhdistetty standardiepävarmuus u_c .

$$u_c = \sqrt{u(R_w)^2 + u(bias)^2} \quad (9)$$

Jossa

u_c on yhdistetty standardiepävarmuus

6. Laajennetun mittausepävarmuuden laskeminen

Lopuksi lasketaan laajennettu standardiepävarmuus U 95 %:n luottamustasolla.

$$U = 2 * u_c \quad (10)$$

Jossa

U on laajennettu mittausepävarmuus, normaalisti lähellä 95 %:n luottamustasoa

2.4.6 Oikeellisuus

”Oikeellisuus on hyvin monen, periaatteessa äärettömän monen toiston tuloksena saatujen suureen mitattujen arvojen keskiarvon ja suureen vertailuarvon yhtäpitävyys.” [13, s.27]

Jotta menetelmän antamien tulosten oikeellisuus voidaan tutkia tarvitaan tietoa määritettävän analyysin pitoisuudesta/ominaisuuksista. Oikeellisuus kuvaa tuntemattoman tosiarvon ja analyysituloksen läheisyyttä. Jotta saataisiin selville eri muuttujien mahdolliset vaikutukset oikeellisuuteen, niin mittaukset on suoritettava

pitkällä aikavälillä eri pitoisuusalueilla. Oikeellisuutta voidaan ilmaista suhteellisena poikkeamana (%). Käytännössä oikeellisuuden arviointi edellyttää varmennetun vertailumateriaalin käyttöä ja/tai osallistumista vertailumittauksiin. Oikeellisuuden arviointia voidaan arvioida myös vertaamalla validoitavaa menetelmää yleisesti hyväksytyyn referenssimateriaaliin. [13, s. 27]

Oikeellisuus määritetään sertifioidun vertailumateriaalin avulla seuraavasti:

1. Määritetään analyytin konsentraatio kussakin rinnakkaisnäytteessä
2. Lasketaan konsentraatioiden keskiarvo, keskihajonta ja vaihtelukerroin (%)
3. Lasketaan oikeellisuus jakamalla tulokseksi saatu keskimääräinen konsentraatio sertifioidulla arvolla ja kerrotaan tulos sadalla prosentuaalisen tuloksen saamiseksi.

[17, s. 36]

$$B = x - T \quad (11)$$

x on useampien mittaustuloksien keskiarvo

T on teoreettinen arvo tai standardimenetelmälle sovittu arvo. Poikkeama voidaan esittää myös prosentteina:

$$B (\%) = \frac{(x-T)}{T} * 100 \quad (12)$$

Poikkeama analyysimenetelmälle muodostuu menetelmää käyttävän laboratorion tekemistä omista systemaattisista virheistä sekä laboratoriosta riippumattomista menetelmään liittyvistä systemaattisista virheistä. [13, s. 23]

2.4.7 Täsmällisyys

”Täsmällisyys on sellaisten näyttämien tai suureen mitattujen arvojen yhtäpitävyys, jotka on saatu toistomittauksilla tutkittaessa samaa tai samankaltaisia kohteita hyvin määritellyissä olosuhteissa.” [13, s. 32]

Täsmällisyydellä tarkoitetaan mittauksissa saatujen arvojen vastaavuutta, jotka on saatu samankaltaiselle tai samalle kohteelle tietyissä olosuhteissa tehdyillä toistuvilla mittauksilla. Täsmällisyys menetelmälle ilmaistaan kvantitatiivisesti toistettavuudella ja uusittavuudella. Toistokokeiden suorittamistavasta riippuen hajonta mittaustuloksissa kuvaa menetelmän toistettavuutta tai uusittavuutta. [13, s. 32]

”Toistettavuus on mittauksen täsmällisyys tiettyjen toistettavuusehtojen täytyessä.” Toistettavuudella tarkoitetaan tulosten välistä yhtäpitävyyttä, kun määritykset tehdään samoissa olosuhteissa, samasta näytteestä, samalla menetelmällä, saman tekijän toimesta, samoilla laitteilla samassa laboratoriossa lyhyellä aikavälillä. Toistettavuutta testataan joko kvantitatiivisesti tai kvalitatiivisesti. [13, s. 31]

3 Laitteet ja materiaalit

3.1 Laitteet

Työssä käytetyt laitteet.

- Multi-parameter PCSTestr™ 35, Eutech Instruments (liite 1)
- Milli-Q^R, Advantage A10 Water Purification System (liite 2)
- Sauter Rc 2013, vaaka
- Mettler AT200, vaaka

Multi-parameter PCSTestr™ 35-laitteella, kuvassa 5, voidaan mitata viittä eri suuretta. Mitattavat suureet ovat sähkönjohtokyky, pH, liuenneet kiinteät aineet (TDS), lämpötila ja suolapitoisuus. Rutiinikäyttöön tulee vain sähkönjohtokykyä mittaava moodi.

Sähkönjotokykyä laite voi mitata kolmella eri alueella, 0-199,9 $\mu\text{S}/\text{cm}$, 200-1999 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ja 2,0-20.00 mS/cm . Resoluutio näille kolmelle alueelle on 0,1 $\mu\text{S}/\text{cm}$, 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ja 0,01 mS/cm . Laitevalmistajan ilmoittama tarkkuus on $\pm 1 \%$. Normalisointilämpötila on 25,0 $^{\circ}\text{C}$.



Kuva 5. Multi-parameter PCSTestr™ 35 [18]

3.2 Materiaalit

Työssä käytetyt materiaalit.

- KCl, J.T. Baker, Lot# 0622710101, CAS# 7447-40-7 (0,01 M KCl standardin tekoon)
KCl, Merck, Lot# A1073933 713, CAS# 7447-40-7 (10 x PBS tekoon)
- NaCl $\geq 99,5\%$, Sigma, Lot# BCBV5476, CAS# 7647-14-5

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \geq 99,5\%$, Merck, Lot# K48577680 702 , CAS# 10028-24-7
- KH_2PO_4 99,9%, VWR Chemicals, Lot# 17B134113, CAS# 7778-77-0
- MilliQ H_2O

4 Työn suoritus

4.1 Liuosten valmistus

Oikeellisuuden varmistamiseksi tehtiin 0,01 M kaliumkloridi-liuos (KCl). KCl:a kuivatettiin hetken aikaa ennen punnitsemista Mettler AT200-vaa'alla, jonka tarkkuus tarkastettiin 2 g f1-punnuksella (tulos 2,0000 g). KCl:a punnittiin 0,7455 g ja se liuotettiin ultrapuhtaaseen veteen litran mittapullossa. Tämän jälkeen se siirrettiin muovipulloon kuljetusta varten.

10 x PBS-liuos tehtiin liuottamalla 800 g NaCl:a, 20 g KCl:a, 144 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:a ja 24 g KH_2PO_4 :a 10 l:aan MilliQ-vettä. Liuos jaettiin litran pulloihin ja täytettiin tarkasti silmämääräisesti merkkiin asti. Tämän jälkeen liuokset steriloidtiin autoklaavissa minkä jälkeen ne siirrettiin säilytykseen huoneen lämpötilassa. Reagenssien punnitusten virhemarginaali oli $\pm 0,2$ g. Liuos tehtiin 10 litran kattilaan ja vesimäärä arvioitiin silmämääräisesti, mistä aiheutui pieniä eroja erien välillä. Laadunvarmistuksena käytettiin pH:n mittaamista 10 x PBS:stä.

1 x PBS tehtiin laimentamalla 10 x PBS MilliQ-veteen. 1 x PBS tehtiin myös 10 l:n kattilaan ja veden määrä arvioitiin silmämääräisesti mitattuna. Liuosten tekoon käytettiin yhdeksää eri 10 x PBS-erää. Myös 1 x PBS steriloidtiin autoklaavissa sähköjohtokyvyn mittaamisen jälkeen.

0,100 M, 0,200 M ja 0,137 M NaCl-liuokset valmistettiin MilliQ veteen ja ne tehtiin joka kerta uusiksi mittauksia varten samana päivänä kun 1 x PBS-liuos valmistettiin, jotta kaikissa liuksissa oli saman päivän vettä. Punnitusten virhemarginaali oli $\pm 0,002$ g. Näitä keinotekoisia näytteitä käytettiin satunnaisvirheen arviointiin ja oikeellisuuden. Nollanäytteenä käytettiin MilliQ-vettä.

4.2 Mittaukset

Mittaukset suoritettiin aikavälillä 26.7. - 28.12.2017. Kustakin liuksesta tehtiin rinnakkaismittaukset. Mittaussarjoja tehtiin 26 1 x PBS-liuksesta. 0,01 M KCl-liuksesta tehtiin 20 mittaussarjaa. 0,01 M KCl-liuos temperoitiin 25 °C:seen ennen mittauksia.

Ennen jokaista mittausta sähkönjohtokyky mittari huuhdeltiin MilliQ-vedelle, jonka sähkönjohtavuus oli noin 3 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

5 Tulokset

5.1 Harha-arvot

Tulokset näyttivät siltä, että ne saattaisivat sisältää harha-arvoja joten niiden selvittämiseksi käytettiin Hampelin testiä. Rinnakkaismittauksia suoritettiin 0,100 M, 0,137 M ja 0,200 M NaCl-liuksilla, MilliQ-vedellä ja 1 x PBS-liuksella. Ensin laskettiin kaikkien neljän liuksen mittaustulosten mediaanit. Seuraavaksi laskettiin d_i ja lukujen d_i MAD arvot.

”Hampelin testillä testataan harha-arvoja ja se perustuu mediaanin ja yksittäisten tulosten erotuksen itseisarvoon. Testissä lasketaan tulosten X_1, X_2, \dots, X_p mediaani X_{med} (arvo, jonka molemmin puolin on 50% tuloksista) sekä erotukset $d_i = |X_{\text{med}} - X_i|$. Lasketaan lukujen d_i mediaani eli ns. MAD (*Median Absolute Deviation*). Tulos X_i on harha-arvo, jos $d_i > 5,06 \text{ MAD}$.” [14, s.16]

Taulukko 2. Harha-arvojen testaus Hampelin testillä 0,100 M NaCl:n rinnakkaismittauksille

| 0,100 M NaCl | | |
|------------------|-------|------|
| Mittaus # | mS/cm | Di |
| 3 | 6,41 | 2,60 |
| 5 | 6,49 | 2,52 |
| 29 | 6,58 | 2,43 |
| 2 | 7,15 | 1,86 |
| 35 | 7,79 | 1,22 |
| 28 | 8,27 | 0,74 |
| 31 | 8,27 | 0,74 |
| 10 | 8,37 | 0,64 |
| 37 | 8,43 | 0,58 |
| 36 | 8,51 | 0,50 |
| 13 | 8,66 | 0,35 |
| 14 | 8,76 | 0,25 |
| 16 | 8,77 | 0,24 |
| 12 | 8,79 | 0,22 |
| 4 | 8,81 | 0,20 |
| 20 | 8,81 | 0,20 |
| 25 | 8,87 | 0,14 |
| 30 | 8,88 | 0,13 |
| 41 | 8,91 | 0,10 |
| 17 | 8,95 | 0,06 |
| 42 | 8,95 | 0,06 |
| 44 | 8,95 | 0,06 |
| 47 | 8,95 | 0,06 |
| 46 | 8,99 | 0,02 |
| 21 | 9,00 | 0,01 |
| 23 | 9,00 | 0,01 |
| 9 | 9,01 | 0,00 |
| 18 | 9,01 | 0,00 |
| 40 | 9,01 | 0,00 |
| 51 | 9,01 | 0,00 |
| 45 | 9,03 | 0,02 |
| 15 | 9,04 | 0,03 |
| 48 | 9,04 | 0,03 |
| 52 | 9,06 | 0,05 |
| 43 | 9,07 | 0,06 |
| 49 | 9,08 | 0,07 |
| 19 | 9,11 | 0,10 |
| 22 | 9,11 | 0,10 |
| 24 | 9,11 | 0,10 |
| 39 | 9,11 | 0,10 |
| 7 | 9,17 | 0,16 |
| 26 | 9,17 | 0,16 |
| 11 | 9,21 | 0,20 |
| 50 | 9,22 | 0,21 |
| 32 | 9,33 | 0,32 |
| 8 | 9,35 | 0,34 |
| 6 | 9,49 | 0,48 |
| 34 | 9,51 | 0,50 |
| 1 | 9,55 | 0,54 |
| 33 | 9,57 | 0,56 |
| 27 | 9,60 | 0,59 |
| 38 | 9,74 | 0,73 |
| MAD | | 0,41 |
| Harha-arvon raja | | 2,08 |

Taulukosta 2 käy ilmi, että 0,100 M NaCl-liuoksen mittaukset 3, 5 ja 29 eivät mahdu tarvittavan rajan sisälle ja ovat näin ollen harha-arvoja.

Taulukko 3. Harha-arvojen testaus Hampelin testillä 0,137 M NaCl:n rinnakkaismittauksille

| 0,137 M NaCl | | |
|------------------|-------|------|
| Mittaus # | mS/cm | Di |
| 6 | 11,85 | 0,98 |
| 7 | 11,98 | 0,85 |
| 5 | 12,00 | 0,83 |
| 8 | 12,03 | 0,80 |
| 2 | 12,15 | 0,68 |
| 12 | 12,27 | 0,56 |
| 1 | 12,33 | 0,50 |
| 33 | 12,33 | 0,50 |
| 27 | 12,34 | 0,49 |
| 28 | 12,41 | 0,42 |
| 11 | 12,46 | 0,37 |
| 34 | 12,49 | 0,34 |
| 35 | 12,53 | 0,30 |
| 37 | 12,55 | 0,28 |
| 9 | 12,57 | 0,26 |
| 32 | 12,57 | 0,26 |
| 31 | 12,64 | 0,19 |
| 16 | 12,66 | 0,17 |
| 14 | 12,67 | 0,16 |
| 40 | 12,75 | 0,08 |
| 52 | 12,75 | 0,08 |
| 17 | 12,77 | 0,06 |
| 18 | 12,77 | 0,06 |
| 26 | 12,77 | 0,06 |
| 21 | 12,79 | 0,04 |
| 3 | 12,81 | 0,02 |
| 42 | 12,81 | 0,02 |
| 23 | 12,83 | 0,00 |
| 13 | 12,85 | 0,02 |
| 46 | 12,85 | 0,02 |
| 47 | 12,86 | 0,03 |
| 15 | 12,88 | 0,05 |
| 20 | 12,88 | 0,05 |
| 44 | 12,88 | 0,05 |
| 38 | 12,89 | 0,06 |
| 25 | 12,91 | 0,08 |
| 36 | 12,92 | 0,09 |
| 22 | 12,95 | 0,12 |
| 50 | 12,97 | 0,14 |
| 39 | 12,99 | 0,16 |
| 49 | 12,99 | 0,16 |
| 51 | 12,99 | 0,16 |
| 10 | 13,01 | 0,18 |
| 43 | 13,01 | 0,18 |
| 45 | 13,02 | 0,19 |
| 48 | 13,02 | 0,19 |
| 24 | 13,03 | 0,20 |
| 29 | 13,05 | 0,22 |
| 41 | 13,07 | 0,24 |
| 19 | 13,08 | 0,25 |
| 4 | 13,11 | 0,28 |
| 30 | 13,37 | 0,54 |
| MAD | | 0,25 |
| Harha-arvon raja | | 1,27 |

Taulukosta 3 käy ilmi, että 0,137 M NaCl-liuoksen mittaukset mahtuvat kaikki harha-arvorajan sisälle.

Taulukko 4. Harha-arvojen testaus Hampelin testillä 0,200 M NaCl:n rinnakkaismittauksille

| 0,200 M NaCl | | |
|------------------|-------|------|
| Mittaus # | mS/cm | Di |
| 2 | 13,65 | 3,34 |
| 9 | 14,53 | 2,46 |
| 28 | 15,48 | 1,51 |
| 11 | 16,19 | 0,80 |
| 10 | 16,32 | 0,67 |
| 13 | 16,72 | 0,27 |
| 17 | 16,72 | 0,27 |
| 18 | 16,72 | 0,27 |
| 7 | 16,77 | 0,22 |
| 29 | 16,81 | 0,18 |
| 44 | 16,81 | 0,18 |
| 6 | 16,82 | 0,17 |
| 21 | 16,83 | 0,16 |
| 8 | 16,84 | 0,15 |
| 23 | 16,85 | 0,14 |
| 36 | 16,85 | 0,14 |
| 15 | 16,88 | 0,11 |
| 25 | 16,88 | 0,11 |
| 43 | 16,91 | 0,08 |
| 47 | 16,91 | 0,08 |
| 49 | 16,91 | 0,08 |
| 37 | 16,93 | 0,06 |
| 20 | 16,95 | 0,04 |
| 51 | 16,96 | 0,03 |
| 24 | 16,97 | 0,02 |
| 12 | 16,98 | 0,01 |
| 16 | 16,98 | 0,01 |
| 22 | 16,99 | 0,00 |
| 26 | 16,99 | 0,00 |
| 19 | 17,01 | 0,02 |
| 39 | 17,01 | 0,02 |
| 41 | 17,01 | 0,02 |
| 46 | 17,02 | 0,03 |
| 3 | 17,03 | 0,04 |
| 31 | 17,03 | 0,04 |
| 34 | 17,03 | 0,04 |
| 14 | 17,04 | 0,05 |
| 32 | 17,04 | 0,05 |
| 35 | 17,05 | 0,06 |
| 5 | 17,07 | 0,08 |
| 33 | 17,09 | 0,10 |
| 42 | 17,11 | 0,12 |
| 50 | 17,11 | 0,12 |
| 52 | 17,11 | 0,12 |
| 45 | 17,12 | 0,13 |
| 48 | 17,12 | 0,13 |
| 1 | 17,23 | 0,24 |
| 40 | 17,23 | 0,24 |
| 27 | 17,26 | 0,27 |
| 38 | 17,41 | 0,42 |
| 4 | 17,57 | 0,58 |
| 30 | 17,69 | 0,70 |
| MAD | | 0,29 |
| Harha-arvon raja | | 1,48 |

Taulukosta 4 käy ilmi, että 0,200 M NaCl-liuoksen mittaukset 2, 9 ja 28 eivät mahdu tarvittavan rajan sisälle ja ovat näin ollen harha-arvoja.

Taulukko 5. Harha-arvojen testaus Hampelin testillä MilliQ-veden rinnakkaismittauksille

| MilliQ | | |
|------------------|--------|--------|
| Mittaus # | mS/cm | Di |
| 9 | 0,0015 | 0,0022 |
| 10 | 0,0021 | 0,0016 |
| 11 | 0,0024 | 0,0013 |
| 1 | 0,0027 | 0,001 |
| 35 | 0,0027 | 0,001 |
| 36 | 0,0029 | 0,0008 |
| 23 | 0,0031 | 0,0006 |
| 3 | 0,0033 | 0,0004 |
| 13 | 0,0033 | 0,0004 |
| 18 | 0,0033 | 0,0004 |
| 21 | 0,0033 | 0,0004 |
| 49 | 0,0033 | 0,0004 |
| 15 | 0,0034 | 0,0003 |
| 16 | 0,0034 | 0,0003 |
| 20 | 0,0034 | 0,0003 |
| 24 | 0,0034 | 0,0003 |
| 37 | 0,0034 | 0,0003 |
| 47 | 0,0034 | 0,0003 |
| 17 | 0,0035 | 0,0002 |
| 19 | 0,0035 | 0,0002 |
| 22 | 0,0035 | 0,0002 |
| 26 | 0,0035 | 0,0002 |
| 44 | 0,0036 | 0,0001 |
| 27 | 0,0037 | 0 |
| 29 | 0,0037 | 0 |
| 46 | 0,0037 | 0 |
| 50 | 0,0037 | 0 |
| 51 | 0,0037 | 0 |
| 12 | 0,0038 | 1E-04 |
| 25 | 0,0038 | 1E-04 |
| 45 | 0,0038 | 1E-04 |
| 48 | 0,0038 | 1E-04 |
| 39 | 0,0039 | 0,0002 |
| 41 | 0,0039 | 0,0002 |
| 43 | 0,0039 | 0,0002 |
| 52 | 0,0039 | 0,0002 |
| 4 | 0,0041 | 0,0004 |
| 14 | 0,0041 | 0,0004 |
| 42 | 0,0041 | 0,0004 |
| 40 | 0,0044 | 0,0007 |
| 6 | 0,0046 | 0,0009 |
| 8 | 0,0047 | 0,001 |
| 30 | 0,0047 | 0,001 |
| 2 | 0,0049 | 0,0012 |
| 34 | 0,0049 | 0,0012 |
| 7 | 0,0050 | 0,0013 |
| 28 | 0,0053 | 0,0016 |
| 33 | 0,0055 | 0,0018 |
| 32 | 0,0058 | 0,0021 |
| 38 | 0,0063 | 0,0026 |
| 5 | 0,0074 | 0,0037 |
| 31 | 0,0075 | 0,0038 |
| MAD | | 0,0007 |
| Harha-arvon raja | | 0,0037 |

Taulukosta 5 käy ilmi, että MilliQ-veden mittaukset 5 ja 31 eivät mahdu tarvittavan rajan sisälle ja ovat näin ollen harha-arvoja.

Taulukko 6. Harha-arvojen testaus Hampelin testillä 1 x PBS:n rinnakkaismittauksille

| 1 x PBS | | |
|------------------|-------|------|
| Mittaus | mS/cm | Di |
| 2 | 12,16 | 1,67 |
| 7 | 13,15 | 0,68 |
| 5 | 13,23 | 0,60 |
| 31 | 13,29 | 0,54 |
| 34 | 13,52 | 0,31 |
| 39 | 13,53 | 0,30 |
| 45 | 13,60 | 0,23 |
| 18 | 13,61 | 0,22 |
| 32 | 13,62 | 0,21 |
| 3 | 13,63 | 0,20 |
| 6 | 13,66 | 0,17 |
| 33 | 13,67 | 0,16 |
| 19 | 13,68 | 0,15 |
| 11 | 13,71 | 0,12 |
| 12 | 13,71 | 0,12 |
| 29 | 13,71 | 0,12 |
| 13 | 13,73 | 0,10 |
| 10 | 13,75 | 0,08 |
| 14 | 13,77 | 0,06 |
| 15 | 13,77 | 0,06 |
| 27 | 13,78 | 0,05 |
| 8 | 13,79 | 0,04 |
| 9 | 13,79 | 0,04 |
| 38 | 13,79 | 0,04 |
| 41 | 13,79 | 0,04 |
| 1 | 13,83 | 0,00 |
| 36 | 13,83 | 0,00 |
| 35 | 13,84 | 0,01 |
| 44 | 13,84 | 0,01 |
| 37 | 13,87 | 0,04 |
| 40 | 13,87 | 0,04 |
| 28 | 13,89 | 0,06 |
| 20 | 13,91 | 0,08 |
| 23 | 13,91 | 0,08 |
| 16 | 13,92 | 0,09 |
| 49 | 13,92 | 0,09 |
| 46 | 13,94 | 0,11 |
| 42 | 13,95 | 0,12 |
| 47 | 13,95 | 0,12 |
| 21 | 13,96 | 0,13 |
| 17 | 14,05 | 0,22 |
| 43 | 14,07 | 0,24 |
| 25 | 14,11 | 0,28 |
| 51 | 14,13 | 0,30 |
| 4 | 14,15 | 0,32 |
| 30 | 14,17 | 0,34 |
| 22 | 14,24 | 0,41 |
| 26 | 14,28 | 0,45 |
| 48 | 14,29 | 0,46 |
| 52 | 14,35 | 0,52 |
| 50 | 14,40 | 0,57 |
| 24 | 14,44 | 0,61 |
| MAD | | 0,23 |
| Harha-arvon raja | | 1,17 |

Taulukosta 6 käy ilmi, että 1 x PBS-liuoksen mittaus 2 ei mahdu tarvittavan rajan sisälle ja on näin ollen harha-arvo.

Kuten taulukoista 2-6 huomataan, niin osa arvoista on harha-arvoja ja näitä mittaustuloksia ei käytetty laajennetun mittausepävarmuuden laskemiseen.

5.2 Laajennettu mittausepävarmuus

Laajennettu mittausepävarmuus laskettiin käyttämällä MUKit-ohjelmaa (liite 3), joka perustuu Nordtestin-oppaaseen ja on suunniteltu tähän tarkoitukseen. Kontrollinäytteenä toimi 0,01 M KCl-liuos, jota käytettiin oikeellisuuden määrittämiseen ja rinnakkaismittauksia tehtiin yhteensä 20 kappaletta. Konsentraation keskiarvo näytteillä oli 1,357 mS/m ja suhteellinen keskihajonta oli 0,23 %.

Taulukko 7. Kontrollinäyte 0,01 M KCl:n mittaukset 25 °C:n lämpötilassa ja oikeellisuuden laskeminen

| Mittaus | 0,01 M KCl mS/cm | | KA mS/cm |
|-------------------|------------------|-------|----------|
| 1 | 1,357 | 1,356 | 1,357 |
| 2 | 1,362 | 1,362 | 1,362 |
| 3 | 1,357 | 1,363 | 1,360 |
| 4 | 1,365 | 1,365 | 1,365 |
| 5 | 1,354 | 1,357 | 1,356 |
| 6 | 1,356 | 1,358 | 1,357 |
| 7 | 1,355 | 1,356 | 1,356 |
| 8 | 1,363 | 1,357 | 1,360 |
| 9 | 1,355 | 1,358 | 1,357 |
| 10 | 1,355 | 1,356 | 1,356 |
| 11 | 1,354 | 1,356 | 1,355 |
| 12 | 1,359 | 1,358 | 1,359 |
| 13 | 1,353 | 1,355 | 1,354 |
| 14 | 1,356 | 1,354 | 1,355 |
| 15 | 1,358 | 1,357 | 1,358 |
| 16 | 1,361 | 1,358 | 1,360 |
| 17 | 1,355 | 1,354 | 1,355 |
| 18 | 1,354 | 1,353 | 1,354 |
| 19 | 1,355 | 1,355 | 1,355 |
| 20 | 1,355 | 1,355 | 1,355 |
| KA kaikki | 1,3571 | | |
| RSD % | 0,0031 | | |
| Vaihtelukerroin % | 0,2312 | | |
| Oikeellisuus % | 96,24 | | |

Tiedetty johtokyky KCl-liukselle on 1,41 mS/cm ja liuoksen pitoisuuden epävarmuudeksi on arvioitu 0,50 %. Standardi mittausepävarmuus oli 3,9 % ja

laajennettu mittausepävarmuus 8 % luottamustasolla 95 %. Oikeellisuudeksi saatiin 96 %.

6 Johtopäätökset

Validointi onnistui ja PCSTestr 35™ tulee vakiokäyttöön laboratoriossa 1 x PBS:n sähkönjohtokyvyn seurantaan. Onnistuneen validoinnin ja mittausten seurauksena kirjoitettiin erillinen käyttöohje laitteelle (liite 4).

Lähteet

- 1 ADS 43-018/rev.D, Application Data Sheet, Tammikuu 2010, [Viitattu 21.4.2018], Saatavissa: http://www2.emersonprocess.com/siteadmincenter/PM%20Rosemount%20Analytical%20Documents/Liq_ADS_43-018.pdf
- 2 Suomen Standardisoimisliitto SFS, SFS-EN 27888, 1994 [Viitattu 21.4.2018]
- 3 ADS 43-018/rev.D, Application Data Sheet, Tammikuu 2010, Suomennettu (Rentola Osmo) [Viitattu 21.4.2018], Saatavissa: http://www2.emersonprocess.com/siteadmincenter/PM%20Rosemount%20Analytical%20Documents/Liq_ADS_43-018.pdf ADS 43-018/rev.D, Application Data
- 4 Merck, Water for pH measurement, 2018, [Viitattu 13.5.2018], Saatavissa: <https://www.merckmillipore.com/Fl/en/water-purification/learning-centers/applications/environment-water-analysis/ph-measurement/water-impact/7c2b.qB.xDkAAAFAdFsENFI2.nav?>
- 5 Barron J. John & Ashton Colin – Technical Services Department, Reagecon Diagnostics Ltd, Shannon Free Zone, County Clare, Ireland, The Effect of Temperature on Conductivity Measurement. [Viitattu 21.4.2018], Saatavissa: https://www.reagecon.com/pdf/technicalpapers/Effect_of_Temperature_TSP-07_Issue3.pdf
- 6 Heikkonen Jukka, Heikkinen Eero, Mäntynen Mia, POSIVA, Pohjaveden sähkönjohtavuuden lämpötilakorjauksen matemaattinen mallinnus synteettisten vesinäytteiden mittauksista, Lokakuu 2002, [Viitattu 1.5.2018], Saatavissa: http://www.posiva.fi/files/2131/POSIVA-2002-10_Tyoraportti_web.pdf
- 7 Koski Jouni, Fysikaalisen kemian laboratorioharjoitusten laatiminen prosessiolosuhteita simuloivalle vesikiertopiirille, Huhtikuu 2010, [Viitattu 14.5.2018], Saatavissa: <https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/14002/thesis.pdf?sequence=1>
- 8 Radiometer Analytical, Conductivity Theory and Practise, 2004, [Viitattu 1.5.2018], Saatavissa: http://www.analytical-chemistry.uoc.gr/files/items/6/618/agwgimometria_2.pdf
- 9 Suomen Standardoimisliitto SFS, SFS-EN 15216:2007, Characterization of waste — Determination of total dissolved solids (TDS) in water and eluates, Tammikuu 2008 [Viitattu 26.8.2018]
- 10 Vernier Suomi, Kemian opetuksen keskus, Helsingin yliopisto, Suolapitoisuuden määrittäminen, [Viitattu 14.5.2018], Saatavissa: https://www.helsinki.fi/sites/default/files/atoms/files/suolapitoisuus_verniersuomi_oppilas.pdf

- 11 Protocols Online, Phosphate Buffered Saline, Lokakuu 2016, (Viitattu 9.5.2018), Saatavissa: <https://www.protocolsonline.com/recipes/phosphate-buffered-saline-pbs/>
- 12 Dr. Huber Ludwig, Tutorial - Validation of Analytical Methods and Procedures, [Viitattu 22.4.2018], Saatavissa: <http://www.labcompliance.com/tutorial/methods/default.aspx>
- 13 Hägg Margareta, VTT, Validoinnin suunnittelun opas 2016, [Viitattu 22.4.2018], Saatavissa: <http://www.vtt.fi/inf/pdf/technology/2016/T276.pdf>
- 14 Suomen Ympäristökeskus, SYKE, Mittausepävarmuusohjelmisto MUKit 30.5.2013, päivitetty 20.1.2016, [Viitattu 27.4.2018], Saatavissa: [http://www.syke.fi/fi-FI/Palvelut/Laatu_ ja_laboratoriopalvelut/Kalibrointipalvelut_ ja_sopimuslaboratorio/MUKit_mittausepavarmuusohjelma/Mittausepavarmuusohjelmisto_MUKit\(2633\)](http://www.syke.fi/fi-FI/Palvelut/Laatu_ ja_laboratoriopalvelut/Kalibrointipalvelut_ ja_sopimuslaboratorio/MUKit_mittausepavarmuusohjelma/Mittausepavarmuusohjelmisto_MUKit(2633))
- 15 NT TR 537 edition 4, Nordtest, Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories, Marraskuu 2017, (Viitattu 29.4.2018), Saatavissa: http://www.nordtest.info/images/documents/nt-technical-reports/NT_TR_537_edition4_English_Handbook_for_calculation_of_measurement_uncertainty_in_environmental_laboratories.pdf
- 16 Menditta, Patriarca, Magnusson, Understanding the meaning of accuracy, trueness and precision, Accred Qual Assur, 2007 12: 45-47, Suomennettu (Teemu Näykki), [Viitattu 13.5.2018]
- 17 Ehder Tapio, Kemia metrologian opas, MIKES, 2005, [Viitattu 30.4.2018], Saatavissa: <http://www.vtt.fi/inf/pdf/MIKES/2005-J6.pdf>
- 18 Eutech PCSTestr35™, [Viitattu 15.5.2018], Saatavissa: <https://www.eutechinst.com/images/PCSTestr35.jpg>

Liite 1 **Multi-parameter PCSTestTM 35, Eutech Instruments spesifikaatiot**

| Product Specification | Description |
|---------------------------------|---|
| pH Range | 0.00 to 14.00 pH |
| Resolution | 0.01 pH |
| Accuracy | ±0.01 pH |
| pH Calibration Points | Up to 5 (Auto) |
| pH Buffer Options | USA, NIST |
| Conductivity Range | .. to 199.9 µS/cm 200 to 1999 µS/cm 2.00 to 20.00 mS/cm |
| Resolution | 0.1 µS/cm 1 µS/cm 0.01 mS/cm |
| Accuracy | ±1% Full Scale |
| Conductivity Calibration Points | 3 Auto 3 Manual |
| Normalization Temperature | 25.0 °C |
| Temperature Coefficient | 0.0 to 10.0%/°C |
| Auto-Ranging | Yes |
| TDS Range | 0.0 to 99.9 ppm 100 to 999 ppm 1.00 to 10.00 ppt |
| Resolution | 0.1 ppm / 1 ppm / 0.01 ppt |
| Accuracy | 1 % Full Scale |
| TDS Calibration Points | Up to 3 Points (Manual) |
| TDS Factor | 0.40 to 1.00 |
| Salinity Range | 0.0 to 99.9 ppm 100 to 999 ppm 1.00 to 10.00 ppt 0.0 to 1.00 ‰ |
| Resolution | 0.1 ppm / 1 ppm / 0.01 ppt / 0.01% |
| Accuracy | 1 % Full Scale |
| Salinity Calibration Points | Up to 3 (Manual) |
| Temperature Range | 0.0 to 50.0 °C / 32.0 to 120.0 °F |
| Resolution | 0.1 °C/°F |
| Accuracy | ±0.5°C/ ±0.9°F |
| Temperature Compensation | ATC / MTC |
| Non-Volatile Memory | Yes |
| Auto-Off | 8.5 mins after last key pressed (can be disabled) |
| LCD Display | Dual-display LCD (2.1 x 2.7cm) |
| Power | 4 X 1.5 V "A76" Micro alkaline batteries |
| Batter Life | > 150 hours |
| Dimensions; Weight | Boxed: 18.5 cm x 6.5 cm x 5 cm; 200 g |

Liite 2 Milli-Q^R, Advantage A10 Water Purification System spesifikaatiot

Specifications

Water Specifications

Milli-Q[®] Advantage A10 ultrapure water (Type 1)

| | |
|--|--------------------|
| Resistivity at 25 °C ¹ | 18.2 MΩ·cm |
| TOC ² | ≤ 5 ppb |
| Particulates (size > 0.22 µm) ³ | < 1 particulate/mL |
| Bacteria ^{3,4} | < 0.01 CFU/mL |
| Pyrogens (endotoxins) ⁴ | < 0.001 EU/mL |
| RNases ⁴ | < 1 pg/mL |
| DNases ⁴ | < 5 pg/mL |
| Flow Rate | Up to 2 L/min |

¹resistivity can also be displayed non-temperature-compensated as required by USP

²in the appropriate test conditions

³with Millipak[®] final filter

⁴with Biopak[®] polisher

These values (validated with Elix[®] feed water) are typical and may vary depending on the nature and concentration of contaminants in the feed water.

Feed water

| | |
|------------------------|--|
| Feed water quality | Elix [®] , RiOs™, distilled or DI water with conductivity |
| Feed water connection | ½" Gaz M |
| Feed water pressure* | 0 - 0.3 bar |
| Feed water temperature | 5 - 35 °C |

* For pressure above 0.3 bar, a pressure regulator needs to be installed upstream of the system; for pressures between 0 and -0.2 bar, the system will operate, but product flow rate may be lower.

System Specifications

Production unit

| | |
|---------------------------------|--|
| Dimensions (H x W x D) | 500 x 332 x 360 mm (19.5 x 13.0 x 14.2 in) |
| Operating weight | 19 kg (41.9 lb) |
| Electric power supply voltage | 100 - 230 V +/- 10% |
| Electric power supply frequency | 50 - 60 Hz |
| Main unit data connection | Ethernet (RJ45) |

Q-POD[®] dispenser

| | |
|---|------------------------------|
| Dimensions (H x D) | 579 x 230 mm (22.8 x 9.0 in) |
| Operating weight | 5.5 kg (12.1 lb) |
| Dispenser tubing length | 0.8 m (31.5 in) |
| Distance from production unit to Q-POD [®] | 2.9 m (9.5 ft) |
| Electric power cable length | 2.9 m (9.5 ft) |
| Q-POD [®] data connection | Parallel port (25-pin D-Sub) |

Liite 3 MUKit raportti

| Step | Action | Measurand | 30.4.2018 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|---|-----------|---|---|---------------------------------------|------------|--|--------|-------------------------------|---------------|--|--------|-------------------------------|----|--|---------|------------------------|---|--------|--|------------------------|--|
| 1 | Specify Measurand | Concentration range: 1 - 18 mS/cm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | Quantify within-laboratory reproducibility, $u(R_w)$ A: Control sample B: Possible steps not covered by control sample | <p>A: Control samples: Number of control samples: 40 Average concentration: 1,35705 mS/cm Standard deviation, S_{RW} : 0,23 %</p> <p>B: Routine replicate samples : Number of routine replicate samples: 89 Number of parallell measurements: 2 Concentration range: 6,495 - 17,630000 mS/cm Standard deviation estimate from range, S_r : 0,93 %</p> $u(R_w) = \sqrt{S_{RW}^2 + S_r^2} = 0,96 \%$ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | Quantify method and laboratory bias, $u(bias)$ | <p>Method and laboratory bias from certified reference material: Different certified reference materials count, N : 1</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>i</th> <th>1</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Certified concentration, $c_{ref\ i}$</td> <td>1,41 mS/cm</td> </tr> <tr> <td>Standard uncertainty of certified concentration, $u(c_{ref\ i})$</td> <td>0,50 %</td> </tr> <tr> <td>Measured concentration, c_i</td> <td>1,35705 mS/cm</td> </tr> <tr> <td>Standard deviation of measured concentration, s_{bias}</td> <td>0,23 %</td> </tr> <tr> <td>Number of Measurements, n_i</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>$bias_i = \frac{c_i - c_{ref\ i}}{c_{ref\ i}} \cdot 100\%$</td> <td>-3,76 %</td> </tr> <tr> <td>Period of measurements</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Matrix</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Additional information</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> $u(bias) = \sqrt{bias_1^2 + \left(\frac{s_{bias_1}}{\sqrt{n_1}}\right)^2 + u(c_{ref_1})^2} = 3,79 \%$ | | i | 1 | Certified concentration, $c_{ref\ i}$ | 1,41 mS/cm | Standard uncertainty of certified concentration, $u(c_{ref\ i})$ | 0,50 % | Measured concentration, c_i | 1,35705 mS/cm | Standard deviation of measured concentration, s_{bias} | 0,23 % | Number of Measurements, n_i | 40 | $bias_i = \frac{c_i - c_{ref\ i}}{c_{ref\ i}} \cdot 100\%$ | -3,76 % | Period of measurements | - | Matrix | | Additional information | |
| i | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Certified concentration, $c_{ref\ i}$ | 1,41 mS/cm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Standard uncertainty of certified concentration, $u(c_{ref\ i})$ | 0,50 % | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Measured concentration, c_i | 1,35705 mS/cm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Standard deviation of measured concentration, s_{bias} | 0,23 % | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Number of Measurements, n_i | 40 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| $bias_i = \frac{c_i - c_{ref\ i}}{c_{ref\ i}} \cdot 100\%$ | -3,76 % | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Period of measurements | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Matrix | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Additional information | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | Convert components to standard uncertainty | $u(R_w) = 0,96 \%$ $u(bias) = 3,79 \%$ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | Calculate combined standard uncertainty, u_c | $u_c = \sqrt{u(R_w)^2 + u(bias)^2} = 3,91 \%$ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | Calculate expanded uncertainty, U | $U = 2 \cdot u_c = 8 \%$ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Liite 4 Sähkönjohtavuuden mittaaminen PCSTestr 35:llä

1. Laita laite päälle on/off napista.
2. Varmista, että sähkönjohtokyky moodi on valittuna. Lämpötilan yläpuolella näkyy yksikkö μS kun oikea moodi on valittuna. Mikäli moodi on väärä voit vaihtaa sen mode/ent napista selaamalla, kunnes löydät oikean.
3. Huuhtelee kenno MilliQ-vedellä.
4. Tämän jälkeen voit mitata liuoksen sähkönjohtavuuden. Huljuttele laitetta liuoksessa, jotta koko kenno on varmasti liuoksen ympäröimä. 1 x PBS-liuoksen sähkönjohtavuus on yleensä 13,5 – 14,1. Jos tulos näyttää heittävän voit nostaa mittarin liuoksesta ja mitata uudestaan sähkönjohtavuuden muutamaan kertaan varmistaaksesi tuloksen.
5. Huuhtelee kenno uudestaan MilliQ-vedellä ja sulje mittari.