Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Johanna Nieminen

Anionien määrittäminen ionikromatografisesti – menetelmän kehitys ja validointi Thermo Scientific™ Dionex™ ICS-5000 -ionikromatografille

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyytikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

11.9.2019

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Johanna Nieminen Anionien määrittäminen ionikromatografisesti – menetelmän kehitys ja validointi Thermo Scientific™ Dionex™ ICS-5000 -ionikromatografille 47 sivua 11.9.2019
Tutkinto	Laboratorioanalyytikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat	Kemisti Timo Lukkarinen Kemisti Leena Hedberg Lehtori Mia Ruismäki

Opinnäytetyö tehtiin MetropoliLab Oy:n Kemian tiimissä. Opinnäytetyö voidaan jakaa kahteen osuuteen: 1) analyysimenetelmän kehitys ja 2) analyysimenetelmän validointi. Työn tarkoituksena oli kehittää aikaisemmin luotua anionien analyysimenetelmää nopeammaksi ja validoida menetelmä. Menetelmä on luotu vuonna 2016, mutta ohjelman pitkä kesto on estänyt menetelmän analyysikäytön fluoridin, kloridin ja sulfaatin analysoinnissa.

Tutkittavina näytematriiseina työssä käytettiin järvi-, joki- ja vesijohtovesiä sekä jätevettä ja erilaisia vesiliuoksia. Validoinnissa määritettiin analyysimenetelmän lineaarisuus, toteamis- ja määritysrajat, oikeellisuus, toistettavuus, uusittavuus, mittausepävarmuus ja herkkyys.

Analyysimenetelmän kestoa saatiin pudotettua alkuperäisestä 48 minuutista 14,8 minuuttiin lisäämällä eluentin virtausnopeutta ja muuttamalla gradienttia. Kloridin ja sulfaatin kalibrointikäyrinä voidaan käyttää lineaarista suoraa, mutta fluoridin kalibrointikäyränä on toisen asteen yhtälö. Fluoridin määritysrajatavoitteena oli 0,02 mg/l. Tähän määritysrajaan ei päästy. Määritysrajaksi fluoridille saatiin 0,1 mg/l. Se on sama kuin vanhalla laitteella. Kloridille ja sulfaatille määritysrajaksi saatiin 0,3 mg/l, joka täyttää määritysrajatavoitteen 0,5 mg/l.

Fluoridin, kloridin ja sulfaatin analyysimenetelmän toistettavuus ja uusittavuus ovat hyviä. Mittausepävarmuus on kaikilla analyyteillä alle validoinnin mittausepävarmuusvaatimusten: fluoridilla 10 prosenttia, kloridilla 8 prosenttia ja sulfaatilla 11 prosenttia. Tulosten oikeellisuutta ja vertailukelpoisuutta tutkittiin t-testillä vertaamalla mittaustuloksia vanhalla ionikromatografilla saatuihin tuloksiin. Analyysien tulosten erot eivät poikkea merkittävästi toisistaan. Validoinnin tulosten perusteella päästään johtopäätökseen, että nopeutettu analyysimenetelmä fluoridille, kloridille ja sulfaatille voidaan ottaa käyttöön.

Avainsanat	validointi, IC, ionikromatografia, anioni

Author Title Number of Pages Date	Johanna Nieminen Determination of Anions by Ion Chromatography – Method Development and Validation for Thermo Scientific™ Dionex™ ICS-5000 Ion Chromatography 47 pages 11 September 2019
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Timo Lukkarinen, Chemist Leena Hedberg, Chemist Mia Ruismäki, Senior Lecturer

This thesis study was performed with MetropoliLab Oy's chemistry team and can be divided into two parts: 1) the development of analysis method and 2) validation of the analysis method. The purpose of this study was to increase the speed of the previously created anion analysis method and to validate the new method. The old method was initially created in 2016 but the use of it in the analysis of fluoride, chloride and sulphate has been prevented mainly because of its long duration.

Lake water, river and tap water, sewage water, and various aqueous solutions were studied as sample matrices. The validation determined the linearity of the analysis method, the limits of detection and determination, validity, repeatability, reproducibility, measurement uncertainty, and sensitivity.

The length of the assay process was decreased from 48 minutes to 14.8 minutes by increasing the eluent flow rate and by changing the gradient. The calibration curves for chloride and sulphate are linear and the calibration curve for fluoride is quadratic. The target of the determination limit for fluoride was 0.02 mg/l and the limit was not reached. The limit of determination was obtained 0.1 mg/l which is the same as the old device has. The limit of determination for chloride and sulphate was 0.3 mg/l meeting the assay target of 0.5 mg/l.

Repeatability and reproducibility of the analysis method of fluoride, chloride and sulphate are good. The measurement uncertainty is below the validation requirements in all analytes: fluoride 10 percent, chloride 8 percent and sulphate 11 percent. Validity and comparability of the results were investigated with t-test by comparing the new results with the results obtained with an old ion chromatography. There are no significant differences between the results of the analyses. Based on the results of the validation, it can be concluded that the new analysis method for fluoride, chloride and sulphate can be used.

Keywords	validation, IC, ionchromatography, anion

Sisällys

1 Johdanto 1

2 Veden laatu 2

2.1 Fluoridi 2
2.2 Kloridi 3
2.3 Sulfaatti 3

3 Ionikromatografia 4

3.1 Ionikromatografian toimintaperiaate 4
3.2 Thermo Scientific Dionex ICS-5000 -ionikromatografi 6
3.2.1 Eluentin valmistus EG-moduulissa 7
3.2.2 Automaattinen näytteensyöttö 10
3.2.3 Injektioventtiili 10
3.2.4 Kolonnit 11
3.2.5 Suppressori ja johtokykydetektori 12

4 Menetelmän kehitys ja validointi 15

4.1 Menetelmän kehitys 15
4.2 Menetelmän validointi 16
4.3 Käytetyt reagenssit, näytteiden esikäsittely ja ajoliuos 17
4.4 Standardiliuosten ja kontrollien valmistus 17
4.5 Validointi 20
4.5.1 Lineaarisuus 20
4.5.2 Toteamis- ja määritysraja 26
4.5.3 Oikeellisuus 27
4.5.4 Täsmällisyys 33
4.5.5 Mittausepävarmuus 36
4.5.6 Herkkyys 40
4.6 Johtopäätökset 41

5 Pohdinta 42

Lähteet 45

1 Johdanto

Tämän opinnäytetyön tavoitteena on kehittää MetropoliLab Oy:n Thermo Scientific™ Dionex™ ICS-5000 -ionikromatografille aiemmin luotua fluoridin, kloridin ja sulfaatin analysointimenetelmää nopeammaksi ja varmistaa menetelmän toimivuus validoimalla menetelmä. Validoinnissa määritettäviä parametreja ovat lineaarisuus, toteamis- ja määritysrajat, tarkkuus, toistettavuus ja uusittavuus, mittausepävarmuus ja herkkyys. Tutkittavina näytematriiseina työssä käytetään järvi-, joki- ja vesijohtovesiä sekä jätevettä ja erilaisia vesiliuoksia.

Lineaarisuutta tarkastellaan tutkimalla kalibrointikäyrien residuaaleja ja herkkyys määritetään kalibrointikäyrien derivaattoja tarkastelemalla. Toteamis- ja määritysrajat saadaan mittaamalla nollanäytteitä ja hyödyntämällä mittaustulosten keskiarvoa ja keskihajontaa rajojen määrittämisessä. Toistettavuus ja uusittavuus selvitetään analysoimalla rinnakkaisnäytteitä eri ajankohtina ja laskemalla niistä suhteellinen keskihajonta. Mittausepävarmuutta arvioidaan MetropoliLab Oy:n Excel-pohjaisella laskentatyökalulla.

Analyysimenetelmän tarkkuutta tutkitaan kahdella tavalla: 1) Tulosten oikeellisuutta tarkastellaan vertailemalla Thermo Scientific Dionex ICS-5000 -ionikromatografilla määritettäviä tuloksia Dionex DX-120 -ionikromatografilla saatuihin akkreditoituihin tuloksiin. Vertailu tehdään t-testillä. 2) Saantokokeilla arvioidaan menetelmän systemaattista virhettä.

MetropoliLab Oy tarjoaa laboratoriopalveluita yrityksille, laitoksille ja yhteisöille, kuntien ja valtion viranomaisille ja yksityisille henkilöille. MetropoliLab Oy on Helsingin kaupungin tytäryhtiö, jonka muita omistajia ovat Espoo, Vantaa ja Kauniainen. Vuonna 2008 Vantaan ja Helsingin ympäristölaboratoriot yhdistyivät ja MetropoliLab tuli osakeyhtiöksi vuonna 2010. [MetropoliLab – Yritys 2019.]

MetropoliLab Oy on FINAS-akkreditoitu laboratorio, ja se on saanut SFS-EN ISO/IEC 17025 -akkreditoinnin vuonna 1996. Akkreditoituun pätevyysalueeseen kuuluvat elintarvike-, vesi-, ympäristö-, asumisterveys- ja rehunäytteet ja lääkevalmisteet sekä elintarvike- ja pintapuhtausnäytteenotto. [MetropoliLab – Yritys 2019.]

2 Veden laatu

Vedestä analysoitavat ominaisuudet vaikuttavat laatuun eri tavoin: osa aiheuttaa haittaa terveydelle ja osa vaikuttaa vain ulkoisiin ominaisuuksiin tai makuun ja hajuun. Jotkut ominaisuudet voivat aiheuttaa vesiputkiin korroosiota tai saostumia. Esimerkiksi fluoridi voi korkeina pitoisuuksina aiheuttaa luuston ja hampaiden fluoroosia. Kloridi ja sulfaatti voivat vaikuttaa juomaveden hajuun, väriin ja muihin esteettisiin ominaisuuksiin. [Chiriac ym. 2016: 148; Pelia 2012.]

2.1 Fluoridi

Fluori esiintyy luonnossa vain ionimuodossa erilaisina fluorideina. Fluori on ihmiselle välttämätön hivenaine. Pienet fluoripitoisuudet vähentävät hampaiden reikiintymistä, koska se estää bakteerien aiheuttamaa hammaskiilteen mineraalien liukenemista ja ehkäisee hampaiden reikiintymistä aiheuttavien bakteerien aineenvaihduntaa ja happojen tuottoa. Lisäksi fluori auttaa bakteerien jo liuottaman kiilteen uudelleen mineralisoitumista. [Suunterveys – Fluori.]

Fluoridin liiallinen saanti aiheuttaa hammaskiilteen kehityshäiriöitä eli hammasfluoroosia, kun juomaveden fluoridipitoisuus ylittää 1,5 mg/l hampaiden muodostumisaikana. Fluoroosi aiheuttaa vaaleita läikkiä pysyviin hampaisiin vielä kehittymässä olevan hampaan mineralisaatiohäiriön seurauksena. [Suunterveys – Fluori; Talousvesi-asetuksen soveltamisohje III 2018: 14.] Runsas fluoridin saanti aiheuttaa muutoksia myös hohkaluun rakenteeseen lisäten luun murtumisherkkyyttä ja lonkkamurtumien riskiä vanhuksilla. [Talousvesiasetuksen soveltamisohje III 2018: 14.] Euroopan elintarviketurvallisuusvirasto EFSA:n suositusten mukainen fluoridin kokonaissaanti vuorokaudessa tulisi olla 0,05 mg/kg kehonpainoa kohti. Suositus koskee kaikkia ihmisiä lapset, raskaana olevat ja imettävät äidit mukaan lukien. Raskaana olevien ja imettävien äitien fluorin saanti lasketaan ennen raskautta olleesta normaalipainosta. [Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fluoride 2013: 3.]

2.2 Kloridi

Makeat pintavedet sisältävät yleensä alle 10 mg/l klorideja, ellei niissä ole kloridipitoisten jätevesien tai maantiesuolauksen vaikutusta. Pohjavesissä klorideja voi olla jopa satoja milligrammoja litrassa. Klorideja esiintyy pohjavesissä vanhoilla merenpohja-alueilla tai jätevesien ja tiesuolauksen vaikutusalueilla. Kloridilla ei tiedettävästi ole terveydelle haitallisia vaikutuksia, mutta se voi vaikuttaa korkeina pitoisuuksina veden makuun. Lisäksi kloridit lisäävät veden korroosiovaikutusta jo muutaman kymmenen milligramman pitoisuuksina litraa kohden. [Talousvesiasetuksen soveltamisohje III 2018: 24; Veden kemialliset ominaisuudet.]

Kloridilla ei ole tunnettuja haitallisia terveysvaikutuksia, mutta se aiheuttaa veteen makuvirheitä jo pitoisuudessa 100–200 mg/l [Miten tulkita yleisimpien vesitutkimusten tuloksia?]. Pohjaveden korkea kloridipitoisuus lisää vesijohtoverkostojen korroosiota. [Vaihtoehtoisten liukkaudentorjunta-aineiden kulkeutuminen pohjavedessä.] Kloridin metalleja syövyttävä vaikutus lisääntyy jo alle 50 mg/l pitoisuuksissa. Siksi pitoisuuden tulisikin olla mahdollisimman alhainen. Kloridia esiintyy pohjavesissä erityisesti rannikkoalueilla, mutta myös sisämaasta löytyy vanhoja merenpohjien suolataskuja. Maanteiden suolaus saattaa lisästä veden kloridipitoisuutta erityisesti suurten valtateiden läheisyydessä. [Miten tulkita yleisimpien vesitutkimusten tuloksia?]

2.3 Sulfaatti

Suomen vesien sulfaattipitoisuudet ovat alhaisia rannikkoseutuja lukuun ottamatta. Pintavesiä käsitellään alumiinisulfaatilla, ja se nostaa talousveden sulfaattipitoisuutta jonkin verran. Sulfaatti voi suurina määrinä (yli 500 mg/l) aiheuttaa laksatiivisia vaikutuksia. Yli 150 mg/l sulfaattia sisältävät vedet voivat aiheuttaa putkiston korroosiota. [Talousvesiasetuksen soveltamisohje III 2018: 14, 28–29.]

Pohjanmaalla entisillä merenpohjamailla maaperä on sulfaattipitoista. Näiltä happamilta sulfaattipitoisilta mailta huuhtoutuu jokiin suuria määriä metalleja. Lisäksi maankohoaminen ja ojitus aiheuttavat sulfidisaven joutumisen kosketuksiin ilman kanssa. Tällöin saven rikkipitoiset mineraalit hajoavat ja muodostavat rikkihappoa, joka

uuttaa maasta metalleja. Veden happamuus ja liukoiset metallit aiheuttavat kalakuolemia. [Karvonen ym. 2012: 36.]

Sulfaattia päätyy ympäristöön myös kaivosvesien ja sellutehtaiden jätevesien mukana. Monet kaivoksien käyttämät malmit ovat sulfidisia. Sulfidin reagoidessa ilman kassa syntyy sulfaattia. Sulfaatin reagoidessa edelleen veden kanssa muodostuu rikkihappoa. [Heinonen-Tanski 2018.] Sulfaattipäästöjen seurauksena järvi- ja jokivesien sulfaattipitoisuus nousee. Vesistöjen vedenlaatu aiheuttaa ekologisia ja ekotoksisia vaikutuksia vesistöissä. Esimerkkeinä tällaisista vaikutuksista ovat vesistöjen rehevöityminen ja levien esiintyminen. Sulfaatti vaikuttaa vesistöjen kemialliseen tasapainoon lisäämällä elohopean metyloitumista metyylielohopeaksi ja sen kertymisen kaloihin. [Sulfaatin terveysriskinarvion taustatiedot ja ohjeet.]

Sulfaatti aiheuttaa ihmisille pintavesissä lähinnä viihtyvyyshaittoja. Suuret sulfaattipitoisuudet heikentävät veden laatua ja vesi koetaan likaiseksi, jolloin sen hyödyntäminen peseytymiseen ja virkistyskäyttöön vähenee. [Sulfaatin terveysriskinarvion taustatiedot ja ohjeet.]

3 Ionikromatografia

3.1 Ionikromatografian toimintaperiaate

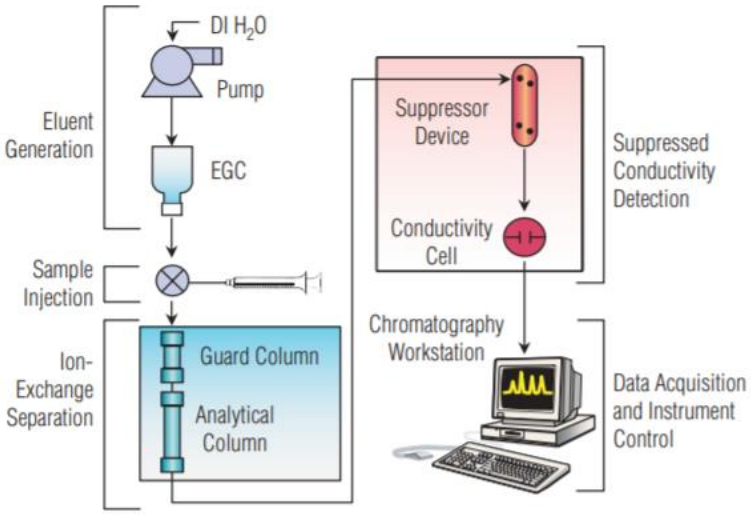
Kromatografia tarkoittaa aineiden erottelua kahden toisiinsa liukenemattoman faasin välillä. Erottuminen perustuu faasien väliseen tasapainoon. Liikkuva faasi kuljettaa näytteen stationäärifaasilla täytetyn kolonnin läpi. Nestekromatografiassa liikkuvana faasina on neste ja kaasukromatografiassa kaasu. Molemmissa kromatografialajeissa näytteen molekyylit tarttuvat kolonnin stationäärifaasiin, jolloin molekyylien kulku hidastuu. Kromatografiamenetelmä ja molekyylit vaikuttavat siihen, kuinka usein ja kuinka pitkään näytteen molekyylit ovat kiinnittyneinä stationäärifaasiin. Mitä useammin ja pidempään molekyylit ovat kiinnittyneinä stationäärifaasiin, sitä hitaammin ne kulkevat. Toisaalta molekyylit, jotka eivät juurikaan kiinnity stationäärifaasiin, kulkeutuvat kolonnin läpi nopeammin. Ionikromatografiassa nestemäisestä näytteestä erotetaan epäorgaanisia anioneja ja kationeja, jotta ne voidaan tunnistaa ja niiden pitoisuus

näytteessä määrittää. Ionikromatografia onkin nestekromatografian alalaji. [Jaarinen & Niiranen 2005: 140–141.]

Ionikromatografiassa kolonnin pinnalla olevassa stationäärifaasissa on sähköisesti varattuja kohtia, joihin vastakkaisen varauksen omaavat analyytit tarttuvat. Voimakkaasti varautuneet ionit sitoutuvat stationäärifaasiin pidemmäksi aikaa kuin heikosti varautuneet ionit. Näin ionit saadaan erotettua toisistaan niiden varauksen perusteella: heikosti varautuneet ionit kulkevat kolonnin läpi nopeimmin. [Jaarinen & Niiranen 2005: 141.]

Liikkuva faasi eli eluentti kuljettaa näytteen kiinteällä faasilla eli stationäärifaasilla täytettyyn kolonniin. Stationäärifaasi koostuu pienistä partikkelimaisista helmistä, jotka on valmistettu esimerkiksi silikaattijohdannaisista. Käytettävä eluentti ja kolonni valitaan tutkittavien ionien mukaan. Näytteen komponentit kulkevat kiinteän faasin läpi eri nopeuksilla. Kolonnin jälkeen näyte päätyy detektorille, jossa mitataan detektorin läpi virtaavan eluentin sähkönjohtavuutta. Kolonnissa erottuneet ionit aiheuttavat piikin sähkönjohtavuudessa, jolloin ne voidaan tunnistaa. Piikin pinta-ala ja korkeus muuttuvat kyseisen ionin pitoisuuden kasvaessa, joten menetelmällä voidaan määrittää ionin pitoisuutta näytteessä. [Jaarinen & Niiranen 2005: 141; Fritz & Gjerde 2009: 1–2.]

Käytettävä eluentti pumpataan korkeapainepumpulla ionikromatografialaitteistoon. Näyte kulkee eluentin mukana esikolonnin lävitse analyyttiseen kolonniin, jossa ionien erottelu tapahtuu. Tämän jälkeen eluentti ja näyte kulkevat suppressoriin. Suppressori vähentää eluentin ja lisää analyytin johtokykyä. Analyytit tunnistetaan ja mitataan johtokykydetektorilla. Tietokonetta ja tietokoneohjelmaa käytetään ionikromatografia-laitteiston ohjaamiseen ja tulosten käsittelyyn. (Kuva 1.) [Thermo Scientific Dionex Eluent Suppressors for Ion Chromatography 2013: 2.]



Kuva 1. Ionikromatografialaitteiston rakenne [Thermo Scientific Dionex Eluent Suppressros for Ion Chromatography 2013: 2].

Eluentin vahvuutta ja virtausnopeutta muuttamalla voidaan ionikromatografiassa vaikuttaa analyytin komponenttien eluoitumisnopeuteen. Nopeutta lisäämällä kuitenkin erottumisen resoluutio kärsii. Eluoitumisnopeuteen vaikuttavat myös kolonnin pituus ja stationäärifaasin partikkeleiden koko.

3.2 Thermo Scientific Dionex ICS-5000 -ionikromatografi

Thermo Scientific Dionex ICS-5000 Reagent-Free™ HPIC™ -ionikromatografissa on kaksi kanavaa, jotka voidaan asentaa joko rinnan tai peräkkäin. Rinnan asennettuna kanavilla voidaan analysoida samanaikaisesti erilaisia näytteitä, kuten näytteeseen liuenneet anionit ja kationit. [Thermo Scientific Dionex ICS-5000 Ion Chromatography System Operator's Manual 2011: 7.] MetropoliLab Oy:ssä anionikanavan lisäksi toisella kanavalla analysoidaan sokereita. Kumpikin kanavaa koostuu 1) pumpusta, 2) eluentti-patruunasta, 3) esikolonnista, 4) erotuskolonnista, 5) suppressorista ja 6) johtokyky-detektorista. Kanavilla on yhteinen näytteensyöttäjä. [Thermo Scientific Dionex ICS-5000 Ion Chromatography System Operator's Manual 2011: 7].

Thermo Scientific Dionex ICS-5000 -laitteistoon kuuluu neljä moduulia:

1) automaattinen näytteensyöttö eli AS-AP
2) pumppuyksikkö eli DP-moduuli
3) eluentin valmistusyksikkö- eli EG-moduuli
4) detektori- eli DC-moduuli.

Automaattinen AS-AP-näytteensyöttäjä injektoi analysoitavat näytteet laitteelle. [Thermo Scientific Dionex ICS-5000 Ion Chromatography System Operator's Manual 2011: 9]. DP-moduulissa on kaksi pumppua, jotka pumppaavat vettä laitteen päällä olevasta vesipullosta ylläpitäen virtausta laitteessa. Pumppuvaihtoehtoja on kolme ja niitä voidaan yhdistellä keskenään: 1. isokraattinen kapillaaripumppu, 2. isokraattinen analyyttinen pumppu ja 3. analyyttinen gradienttipumppu. [Thermo Scientific Dionex ICS-5000 Ion Chromatography System Operator's Manual 2011: 3.]

EG-moduuli valmistaa sähkökemiallisen reaktion avulla eluenttiliuosta ultrapuhtaasta vedestä ja eluenttipatruunoista. DC-moduulin sisällä oleva kolonniuuni mahdollistaa lämpötilasäädellyt olosuhteet erottelulle. Kolonniuunin lisäksi DC-moduulissa on injektio-venttiili, esi- ja erotuskolonnit, suppressorit ja detektorit. [Thermo Scientific Dionex ICS-5000 Ion Chromatography System Operator's Manual 2011: 5–7.]

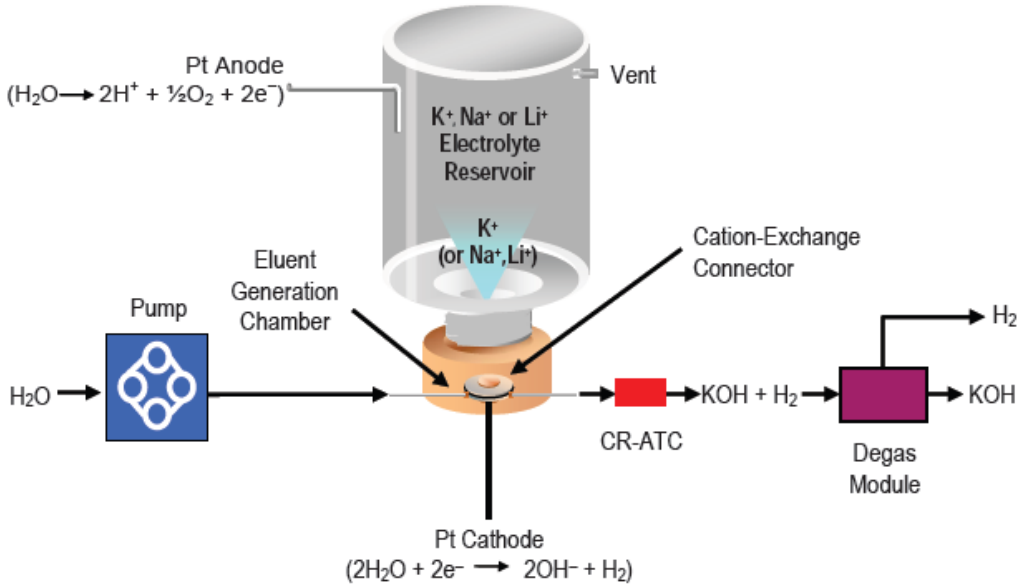
Tulokset analysoidaan ionikromatografiin kytkettyyn tietokoneeseen asennetulla Chromeleon-ohjelmalla. Ohjelmaversiona MetropoliLab Oy:n laitteessa on Chromeleon 7.2. Ohjelman on kehittänyt Dionex.

3.2.1 Eluentin valmistus EG-moduulissa

Thermo Scientific Dionex ICS-5000 -laitteistossa on RFIC-EG-järjestelmä (Reagent-Free Ion Chromatography System with Eluent Generation), joka valmistaa ultrapuhtaasta vedestä ja konsentroidusta KOH-eluenttipatruunasta halutun vahvuista kaliumhydroksidieluenttia. Eluenttina voidaan käyttää myös natrium- tai litium-hydroksidia.

KOH-eluenttipatruuna koostuu korkeasti paineistetusta eluentin valmistuskammiosta (EGC-kammio) ja matalapaineisesta elektrolyyttisäiliöstä. Eluentin valmistuskammiossa

on platinakatodi, jolla hydroksidi-ionit muodostuvat. Elektrolyyttisäiliö sisältää platina-anodin ja elektrolyyttiliuoksen. Kationinvaihtoliitin (Cation-Exchange Connector) yhdistää EGC-kammion elektrolyyttisäiliöön. Tämä mahdollistaa ionien läpikulun elektrolyyttisäiliöstä eluentin valmistuskammioon. Samalla anionien läpikulku elektrolyyttisäiliöön estyy. Kationinvaihtoliitin toimii myös seinämänä kammioiden välillä. (Kuva 2.) [Thermo Scientific Eluent Generator Catridges Product Manual 2012: 9.]



Kuva 2. Kaliumhydroksidieluentin valmistusprosessi. [Thermo Scientific Eluent Generator Cartridges Product Manual 2012: 9].

Kaliumhydroksidieluentin valmistukseen käytetty ionivaihdettu vesi pumpataan EGC-kammion läpi. Eluentin valmistuskammion anodin ja katodin välillä on tasavirta, jonka vaikutuksesta veden elektrolyysi tapahtuu. Anodilla tapahtuu veden hapettuminen ja katodilla vesi pelkistyy alla olevien reaktioyhtälöiden mukaisesti. (Kuva 2.) [Thermo Scientific Eluent Generator Catridges Product Manual 2012: 9–10.]

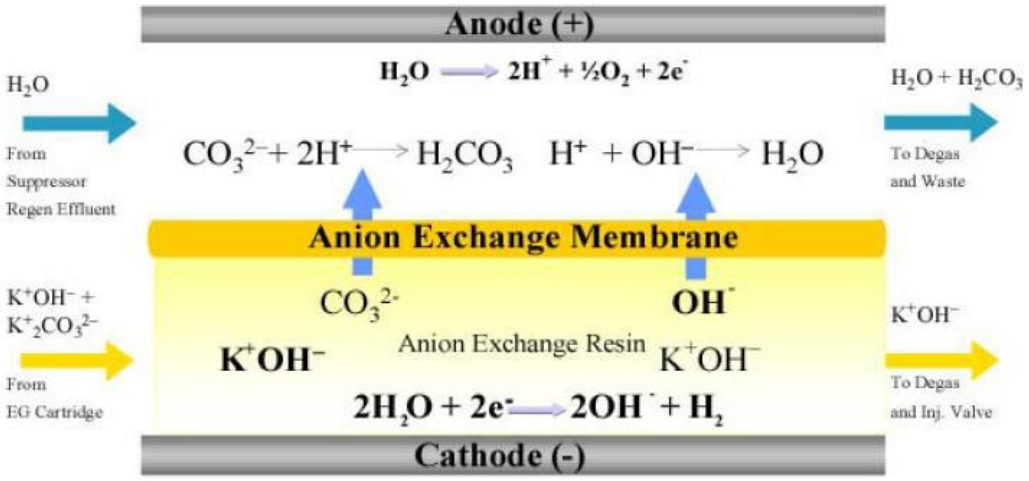
$$H_2O \rightarrow 2\ H^+ + ½\ O_2\uparrow + 2e^- \qquad \text{(anodi)}$$

$$2\ H_2O + 2e^- \rightarrow 2\ OH^- + H_2\uparrow \qquad \text{(katodi)}$$

Anodilla muodostuneet vetyionit syrjäyttävät kaliumionit elektrolyyttisäiliössä. Syrjäytyneet ionit reagoivat katodilla hydroksidi-ionien kanssa muodostaen ionikromatografiassa eluenttina käytettyä kaliumhydroksidiliuosta. Eluentin konsentraatiota voidaan

säädellä syötetyn virran ja eluenttiveden virtausnopeuden mukaan. [Thermo Scientific Eluent Generator Catridges Product Manual 2012: 9–10.]

EG-moduulin yhteydessä oleva CR-ATC- eli trap-kolonni poistaa eluentista ja vedestä kaikki anioniset ja kationiset epäpuhtaudet. Trap-kolonnin toimintaperiaate on esitetty kuvassa 3. Trap-kolonni koostuu anioninvaihtopedistä, jossa eluentti kulkee katodin ohitse tullessaan ulos kolonnista. Anioninvaihtokalvo eristää anodin niin, ettei eluentti pääse kulkeutumaan anodille. Anioninvaihtokalvo hidastaa eluentin anionisia epäpuhtauksia ja vetää niitä kohti anodia, jolloin epäpuhtaudet kulkeutuvat anionivaihtokalvon läpi. Katodilla muodostuvat hydroksidi-ionit uudistavat jatkuvasti anioninvaihtopetiä, kun taas anodilla syntyvät vetyionit reagoivat syntyneiden epäpuhtauksien kanssa muodostaen happoa. Emäksinen eluenttiliuos tulee ulos trap-kolonnista puhdistuneena anionisista epäpuhtauksista. [Thermo Scientific Continuously Regenerated Trap (CR-TC 500, Capillary) Column Product Manual 2012: 6.]



Kuva 3. Trap-kolonnin toimintaperiaate. Trap-kolonni poistaa eluentista ja vedestä anioniset ja kationiset epäpuhtaudet. [Thermo Scientific Continuously Regenerated Trap (CR-TC 500, Capillary) Column Product Manual 2012: 6].

CR-ATC-kolonnista eluentti jatkaa matkaansa kaasunpoistajalle (RFIC Eluent Degasser). Kaasunpoistaja poistaa elektrolyyttikaasun eluointiliuoksesta. Tämän jälkeen eluentti kulkeutuu esi- ja erotuskolonniin. [Thermo Scientific Dionex ICS-5000 Ion Chromatography System Operator's Manual 2011: 43.]

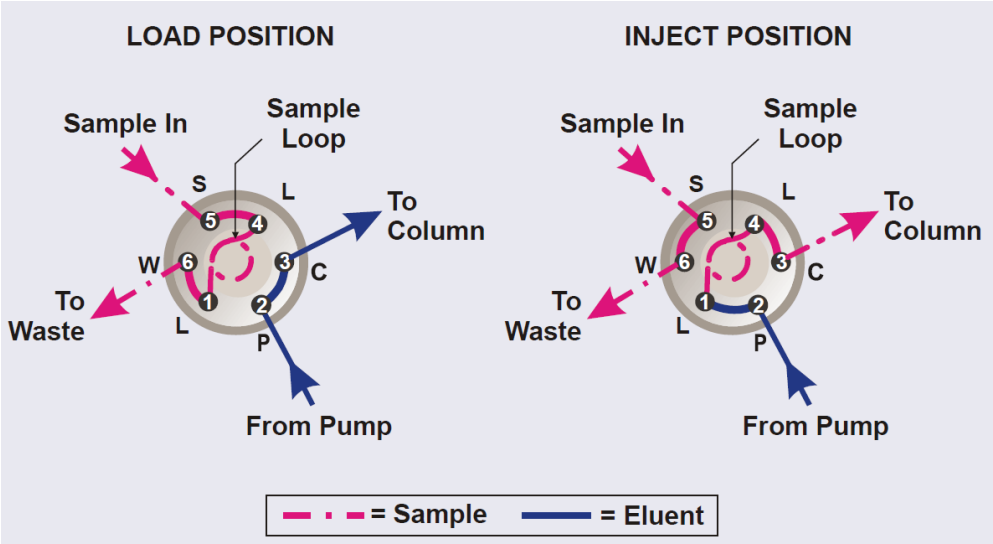
3.2.2 Automaattinen näytteensyöttö

Tutkittavat näytteet syötetään Thermo Scientific Dionex ICS-5000 -ionikromatografia-laitteistoon automaattisella AS-AP-näytteensyöttäjällä. Näytteen-syöttäjässä on lämpötilansäätö, jolla näytteiden lämpötila voidaan pitää 4–60 °C:ssa. AS-AP-näytteensyöttäjä sisältää ohjelmoitavan linjanvaihtoventtiilin. Tämä mahdollistaa näytteensyötön yhdellä näytteensyöttäjällä molemmille kanaville.

AS-AP -näytteensyöttäjässä on kolme 40-paikkaista näytetarjotinta 2 ml:n pulloille ja kolme 8-paikkaista tarjotinta 10 ml:n pulloille. Tällöin näytepullopaikkoja on yhteensä 144. Näytteensyöttäjässä on lisäksi mahdollisuus reagenssien lisäykseen, laimennukseen ja sekoitukseen, kuten standardiliuosten valmistukseen kantaliuoksista. Tämä toiminto oli epäkunnossa MetropoliLab Oy:n laitteessa.

3.2.3 Injektioventtiili

DC-moduulin alaosassa on 6-porttinen Rheodyne Titan HP™ -injektioventtiili, johon automaattiselta näytteensyöttäjältä näyte ohjautuu. Injektioventtiilillä on kaksi asentoa: 1) Load ja 2) Inject (kuva 4). [Thermo Scientific Dionex ICS-5000 Ion Chromatography System Operator's Manual 2011: 67].



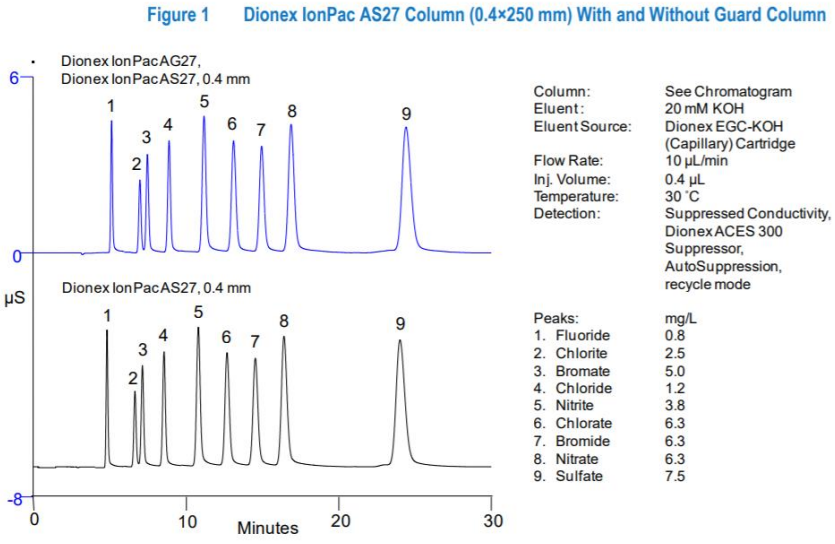
Kuva 4. 6-portaisen Rheodyne Titan HP -injektioventtiilin toimintaperiaate. [Thermo Scientific Dionex ICS-5000 Ion Chromatography System Operator's Manual 2011: 67].

Load-asennossa näyte virtaa näytelooppiin, jossa sitä pidetään injektointiin saakka. Ylimääräinen näyte virtaa jäteastiaan. Pumpulta eluentti virtaa venttiilin läpi kolonniin ohittaen näyteloopin. Inject-asennossa injektioventtiili pyörähtää niin, että eluentti pääsee virtaamaan näyteloopin läpi kolonniin kuljettaen näytteen analysoitavaksi. [Thermo Scientific Dionex ICS-5000 Ion Chromatography System Operator's Manual 2011: 67.]

3.2.4 Kolonnit

Esikolonnin tehtävänä on estää näytteen epäpuhtauksien pääsy erotuskolonniin. Esikolonnit ovat halvempia kuin erotuskolonnit, joten niiden vaihtaminen on järkevämpää ja edullisempaa kuin uusien erotuskolonnien vaihtaminen. Esikolonnin käyttö pidentää erotuskolonnin käyttöikää.

Tässä työssä käytössä oli Thermo Scientific Dionex IonPac™ AG27 Capillary Guard Column 0,4x50 mm -esikolonni (P/N 088442). Esikolonni valitaan käytettävän erotuskolonnin mukaan. Erotuskolonnina työssä oli Thermo Scientific Dionex IonPac AS27 Capillary Column 0,4x250 mm -kolonni (P/N 088441). Nämä kolonnit yhdessä on suunniteltu epäorgaanisten anionien, kuten fluoridin, kloriitin, bromaatin, kloridin, nitriitin, kloraatin, bromidin, nitraatin, sulfaatin ja fosfaatin määrittämiseen. Se on kuitenkin optimoitu erityisesti bromaatin analysointiin. (Kuva 5.) [Thermo Scientific Dionex IonPac AS27 Column Product Manual 2014: 7.]



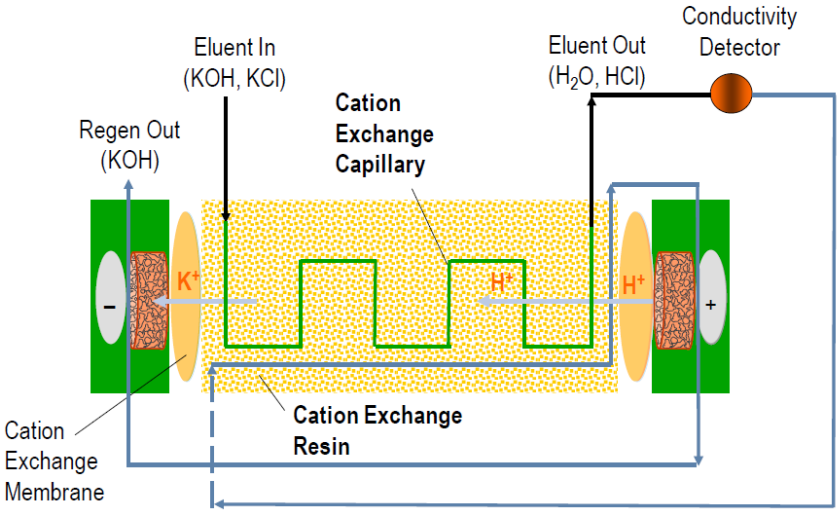
Kuva 5. Esikolonnin Thermo Scientific Dionex IonPac AG27 ja kolonnin Thermo Scientific Dionex IonPac AS27 valmistajan antamat esimerkkikromatogrammit. [Thermo Scientific Dionex IonPac AS27 Column Product Manual 2014: 19].

Eluenttina Thermo Scientific Dionex IonPac AS27 Capillary Column 0,4x250 mm -kolonnin kanssa voidaan käyttää erilaisia hydroksideja. Epäorgaanisia anioneita voidaan helposti erotella erilaisista näytematriiseista, kuten juomavedestä, pohjavedestä, jätevedestä, prosessivesistä ja pesuliuoksista. Eluentin pH voi olla välillä 0–14, ja eluentti voi sisältää orgaanista liuotinta 0–100 prosenttia. Suurin sallittu paine Thermo Scientific Dionex IonPac AS27 Capillary Column 0,4x250 mm -kolonnilla on 3 000 psi. Valmistaja ei kerro kolonnien stationäärifaasitietoja. [Thermo Scientific Dionex IonPac AS27 Column Product Manual 2014: 7.]

3.2.5 Suppressori ja johtokykydetektori

Ionikromatografiassa detektorina käytetään yleisimmin johtokykydetektoria. Käytetyt eluentit sisältävät ioneja, joiden johtokyky nostaa taustan johtokykyä ja vaikuttaa analysoitavien ionien erottumiseen taustasta. Analysoitavat ionit erottuvat paremmin taustasta. Siksi ionikromatografialaittessa, jossa detektorina on johtokykydetektori, käytetään suppressoria. Se sijaitsee analyysikolonnin ja detektorin välissä. Suppressorin tehtävänä on vähentää taustan johtokykyä ja vahvistaa analyytin johtokykyä. [Gjerde & Fritz 1987: 96.]

Thermo Scientific Dionex ACES™ 300 -suppressori muuntaa johtokykyiset hydroksidipohjaiset eluentit puhtaaksi vedeksi, jolloin niiden johtokyky laskee. Samalla suppressori muuntaa analyyttejä johtokykyisempään muotoon, jolloin niiden herkkyys johtokykydetektorilla kasvaa. Thermo Scientific Dionex ACES 300 -suppressori käyttää kolmen kammion tekniikkaa maksimoidakseen suppressiokapasiteettia ja vähentääkseen taustakohinaa. Eluenttikammio koostuu ioninvaihtokapillaarista, joka on upotettu kationinvaihtohartsikerrokseen. (Kuva 6.) [Thermo Scientific Dionex CES 300 Product Manual 2014: 7.]

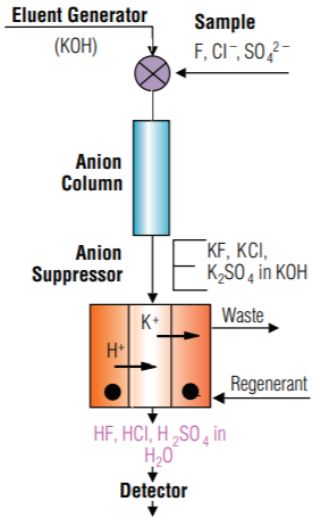


Kuva 6. Thermo Scientific Dionex ACES 300 -suppressori. [Thermo Scientific Dionex CES 300 Product Manual 2014: 7].

Thermo Scientific Dionex ACES 300 -suppressorissa on kaksi elektrodikammiota, jotka on erotettu eluenttikammiosta ioninvaihtokalvolla. Kun deionisoitu nestevirta on kulkenut eluointikammion ioninvaihtokerroksen läpi, kulkee se katodi- ja anodikammioiden läpi. Kun nestevirta on kulkenut ensimmäisen elektrodikammion läpi, muodostuu OH^-- ja H_3O^+-ioneita. Nämä ionit siirtyvät eluenttikammion sähkökentän läpi ylläpitäen ioninvaihtokerrosta. [Thermo Scientific Dionex Eluent Suppressros for Ion Chromatography 2013: 12.]

Thermo Scientific Dionex ACES 300 -suppressori poistaa natrium- tai kaliumhydroksi-ionit ja muut kationit eluentista ja korvaa ne hydroniumioneilla (H_3O^+), jotka muodostuvat veden elektrolyysin uudelleen generoinnissa. Nämä H_3O^+-ionit reagoivat eluentin hydroksidi-ionien (OH^-) tai karbonaatti-ionien (CO_3^{2-}) kanssa tuottaen vettä (H_2O) tai

hiilihappoa (H_2CO_3). Sekä vedellä että hiilihapolla on erittäin alhainen johtokyky verrattuna eluentin johtokykyyn. Analyytti-ionit reagoivat korkean johtokyvyn omaavien H_3O^+-ionien kanssa, jolloin analyytti-ionien johtokyky paranee. (Kuva 7.) [Thermo Scientific Dionex Eluent Suppressros for Ion Chromatography 2013: 2.]



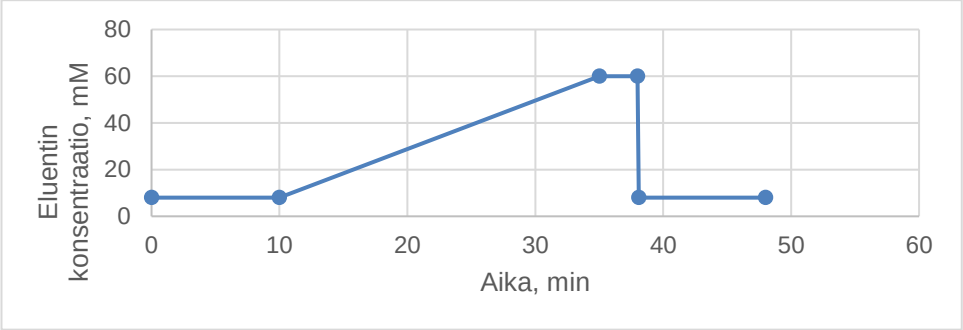
Kuva 7. Anionisuppressorin toimintaperiaate. [Muokattu lähteestä Thermo Scientific Dionex Eluent Suppressros for Ion Chromatography 2013: 2].

Suppressorista eluentti ja analyytit johdetaan johtokykydetektorille. Eluentti virtaa johtokykykennon läpi, joka mittaa analyytti-ionien sähkönjohtokyvyn [Thermo Scientific Dionex ICS-5000 Ion Chromatography System Operator's Manual 2011: 69.] Chromeleon-ohjelma piirtää kromatogrammin, jossa seurataan johtokyvyn muutosta ajan funktiona. Ionit havaitaan kromatogrammin piikkeinä.

4 Menetelmän kehitys ja validointi

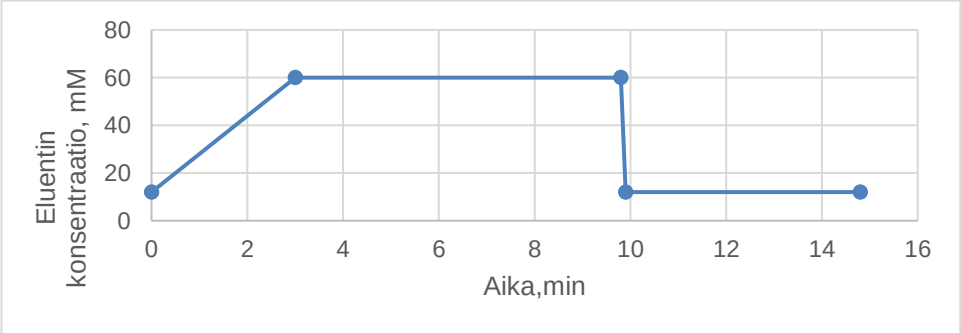
4.1 Menetelmän kehitys

Ionikromatografisen menetelmän kehitys ja validointi tehtiin MetropoliLab Oy:n Thermo Scientific Dionex ICS-5000 -laitteelle. Laitteella määritetään anioneja erilaisista vesinäytteistä ja laktoosia elintarvikkeista. Työn tarkoituksena ja tavoitteena oli kehittää jo aiemmin luotua fluoridin, kloridin ja sulfaatin Thermo Scientific Dionex ICS-5000 -ionikromatografin määritysohjelma nopeammaksi. Lähtötilanteessa ajo-ohjelman pituus oli 48 minuuttia (Kuva 8).



Kuva 8. Anionien määrittämiseen käytettävä vanha ohjelma. Ajoaika 48 minuuttia.

Menetelmää kehitettiin kokeilemalla erilaisia gradienttisia ja isokraattisia ajo-ohjelmia. Ohjelmia testattiin määrittämällä standardiliuoksia erilaisilla erotusohjelmilla. Ohjelmista valittiin yksi validointiin. Validoinnissa käytetty ohjelma on esitetty kuvassa 9.



Kuva 9. Validoitu ajo-ohjelma. Ajoaika 14,8 minuuttia.

Ajo-ohjelmaa saatiin lyhennettyä 48 minuutista 14,8 minuuttiin lyhentämällä tasaantumisaikaa ohjelman lopussa ja muuttamalla gradienttia. Taulukossa 1 on esitetty anionien retentioajat uudella ja vanhalla ohjelmalla.

Taulukko 1. Fluoridin, kloridin ja sulfaatin retentioajat sekä ohjelman pituus uudella ja vanhalla menetelmällä.

	FLUORIDI	KLORIDI	SULFAATTI	OHJELMAN PITUUS
VANHA	10,88 min	17,83 min	31,03 min	48 min
UUSI	6,37 min	7,85 min	9,05 min	14,8 min

4.2 Menetelmän validointi

Validoinnilla tarkoitetaan menettelyä, jolla osoitetaan analyysimenetelmän soveltuvuus ja toimivuus aiottuun käyttötarkoitukseen. Vertailumateriaalien avulla tarkastetaan menetelmän kyky tuottaa oikeita tuloksia ja toistomittausten avulla menetelmän toistettavuus. [Jaarinen & Niiranen 2005: 11, 30].

Ennen validointia tehdään validointisuunnitelma. Siinä kerrotaan validoinnin tavoite, kohde, aikataulu, validoinnin parametrit ja hyväksymiskriteerit. Validoinnista pidetään päiväkirjaa, johon kaikki vaiheet ja tulokset merkitään. Lopuksi validoinnista kirjoitetaan validointiraportti.

Validoitavat parametrit valittiin ja validointi tehtiin MetropoliLab Oy:n menetelmäohjeita noudattaen. Mittausepävarmuuden arviointi tehtiin MetropoliLab Oy:n omalla Excel-pohjaisella työkalulla. Tutkittaviksi näytematriiseiksi valittiin järvi-, joki- ja vesijohtovesi sekä jätevesi ja erilaisia vesiliuoksia. Näytteinä käytettiin asiakkailta tulleita näytteitä, jotka oli aiemmin analysoitu muilla menetelmillä.

4.3 Käytetyt reagenssit, näytteiden esikäsittely ja ajoliuos

Työssä käytettiin Merckin valmistamia 1 000 mg/l fluoridia, kloridia tai sulfaattia sisältäviä kantaliuoksia standardien ja kontrollien valmistamiseen sekä lisäysnäytteisiin. Taulukossa 2 on esitetty käytettyjen liuosten tuotenumerot, eränumerot ja voimassaolopäivämäärät. Kontrollit ja standardiliuokset tehtiin eri pulloista, vaikka ne olivatkin samaa erää. Lisäysnäytteet valmistettiin standardien kanssa samoista pulloista.

Taulukko 2. Standardi- ja kontrollikantaliuosten tuotetiedot.

ANALYYTTI	TUOTENUMERO	ERÄNUMERO (LOT)	VOIMASSAOLOPÄIVÄMÄÄRÄ (EXP.)	PUHTAUS-LUOKKA
FLUORIDI	1.19814.0500	HC87304014	30.9.2021	HPLC-LAATU
KLORIDI	1.19897.0500	HC74545197	30.11.2020	HPLC-LAATU
SULFAATTI	1.19813.0500	HC73214413	30.6.2020	HPLC-LAATU

Standardit ja kontrollit laimennettiin EasyPure-veteen. Laimennusteknisistä syistä kontrollissa 4 on fluoridia 10 mg/l. Tämä on kuitenkin mittausalueen ulkopuolella, joten sitä ei pidetä virallisena kontrollina fluoridille.

Näytteet esikäsiteltiin suodattamalla 0,45 µm:n membraanisuodattimen läpi. Fluoridin lisäysnäytteisiin lisättiin 5 ml:n näytteeseen 3 mg/l fluoridia ja kloridin ja sulfaatin lisäysnäytteisiin lisättiin 5 ml:n näytteeseen 5 mg/l kutakin analyyttiä.

Ajoliuoksena käytettiin laitevalmistajan omaa kaliumhydroksidiliuosta. Laite laimensi gradienttiajoon tarvittavat pitoisuudet automaattisesti.

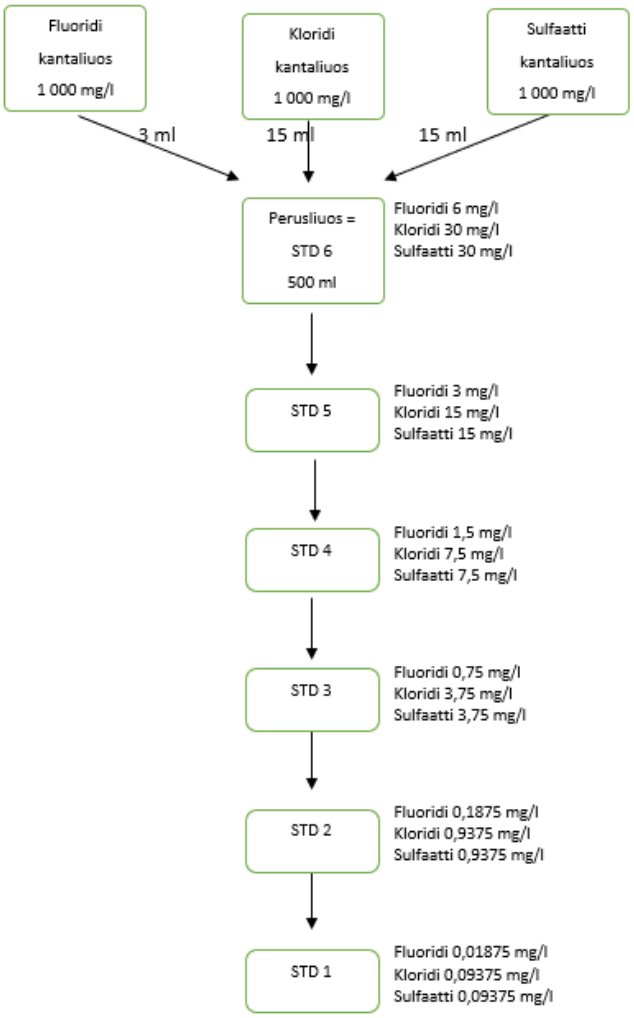
4.4 Standardiliuosten ja kontrollien valmistus

Kaikilla analyyteillä tehtiin kuuden pisteen kalibrointikäyrä. Fluoridilla oli neljä kontrollipistettä. Kloridilla ja sulfaatilla oli viisi kontrollipistettä. (Taulukko 3.)

Taulukko 3. Standardien ja kontrollien pitoisuudet.

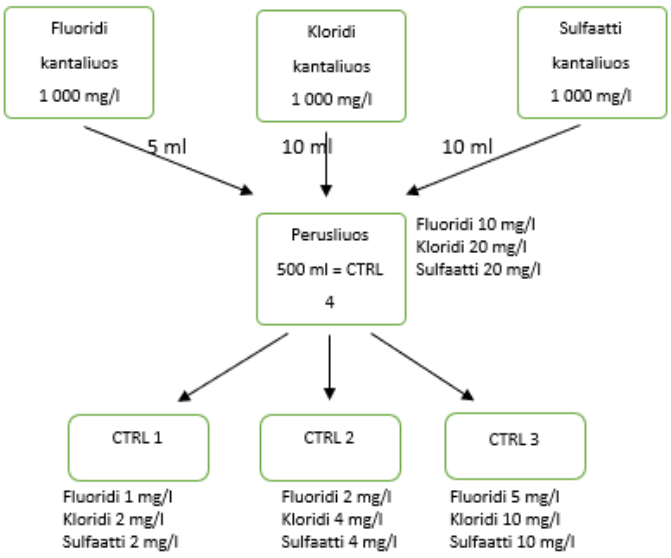
	FLUORIDI	KLORIDI	SULFAATTI
STD 1	0,01875 mg/l	0,09875 mg/l	0,09875 mg/l
STD 2	0,1875 mg/l	0,9875 mg/l	0,9875 mg/l
STD 3	0,75 mg/l	3,75 mg/l	3,75 mg/l
STD 4	1,5 mg/l	7,5 mg/l	7,5 mg/l
STD 5	3 mg/l	15 mg/l	15 mg/l
STD 6	6 mg/l	30 mg/l	30 mg/l
CTRL 1	1 mg/l	2 mg/l	2 mg/l
CTR 2	2 mg/l	4 mg/l	4 mg/l
CTRL 3	5 mg/l	10 mg/l	10 mg/l
CTRL 4	(10 mg/l)	20 mg/l	20 mg/l
CTRL 5	6 mg/l	30 mg/l	30 mg/l

Kalibrointikäyrien standardiliuokset valmistettiin kuvassa 10 olevan kaavion mukaisesti. Kaikille analyyteille tehtiin yhteiset standardiliuokset.



Kuva 10. Standardiliuosten valmistus.

Kontrolliliuokset valmistettiin kuvassa 11 olevan kaavion mukaisesti. Kaikille analyyteille tehtiin yhteiset kontrolliliuokset. Kontrolliliuos 5 valmistettiin kuten kuvassa 10 on valmistettu standardiliuos 6.



Kuva 11. Kontrolliliuosten valmistus.

4.5 Validointi

Validoinnissa tutkittiin seuraavat parametrit:

1. lineaarisuus
2. toteamis- ja määritysraja
3. tarkkuus:
   - oikeellisuus
   - täsmällisyys: toistettavuus ja uusittavuus
4. mittausepävarmuus
5. herkkyys.

4.5.1 Lineaarisuus

Lineaarisuuden arvioinnilla selvitetään mittausalueen pitoisuusalue, jolla kalibrointisuora täyttää lineaarisuuden ehdot. Ensisijaisesti pyritään käyttämään pienimmän neliösumman suoraa kalibrointikäyrän sovittamisessa. Mikäli ensimmäisen asteen yhtälö ei

sovellu tutkittavalle menetelmälle, voidaan käyttää myös muita funktioita kalibrointikäyränä: toisen asteen yhtälö ja korkeamman asteen yhtälö. Lineaarisuutta tutkitaan samalla tavalla, jos vaste on korvattu logaritmi- tai neliöjuuriarvolla. [Mäkinen ym. 1996: 17, 29.]

Lineaarinen alue kuvaa sitä mittausaluetta, jolla analyytin vaste käyttäytyy lineaarisesti suhteessa sen konsentraatioon. Lineaarinen alue määritetään mittaamalla vähintään viisi standardi- tai standardinlisäysnäytettä, joissa kaikissa on eri pitoisuus tutkittavaa analyyttiä. Luotettavuutta voidaan parantaa mittaamalla näytteistä useita toistoja. Tuloksista piirretään kalibrointisuora, joissa mittalaitteen antama vaste piirretään pitoisuuden funktiona. Kuvaajasta nähdään, kaartuuko käyrä. [Evira 1997: 5.]

Lineaarisen kalibroinnin pitoisuuden ja vasteen välistä riippuvuutta kuvataan regressiosuoralla y = a + bx. Muuttuja a on y-akselin leikkauspiste ja b on regressiosuoran kulmakerroin. Kulmakerroin kuvaa myös menetelmän herkkyyttä eli kykyä havaita analyytin pitoisuuden muutosta. [Mäkinen ym. 1996: 17, 28.]

Lineaarisuuden tutkimiseen voidaan käyttää mittaustuloksista saatavia residuaaleja. Residuaalit lasketaan kaavalla 1:

$$\varepsilon = y_i - v_i \tag{1}$$

ε on residuaali

y_i on mitattu y-arvo

v_i on regressiokäyrältä laskettu y-arvo. [Mäkinen ym. 1996: 18.]

Residuaaleista piirretään kuvaaja pitoisuuden funktiona. Kuvaajaa tarkastelemalla voidaan todeta lineaarisen mallin sopivuus. Lineaarisen suoran residuaalit jakautuvat vuorotellen nollan molemmin puolin. Mikäli residuaaleista muodostuu selkeä käyrä, tutkittavaa pitoisuusaluetta voidaan pienentää tai suoran sovitukseen voidaan käyttää korkeamman asteen yhtälöä. Jos ensimmäisen asteen yhtälö ei sovi aineistoon, voidaan kokeilla toisen asteen yhtälöä $y = a + bx + cx^2$. Toisen asteen yhtälön soveltuvuutta tutkitaan laskemalla residuaalit kaavan 1 mukaisesti ja piirtämällä niistä kuvaaja. [Mäkinen ym. 1996: 18, 22.]

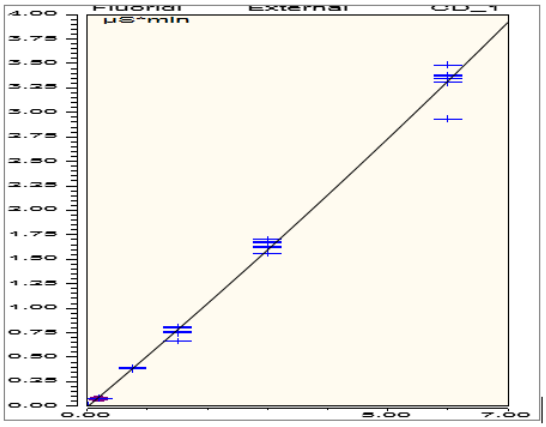
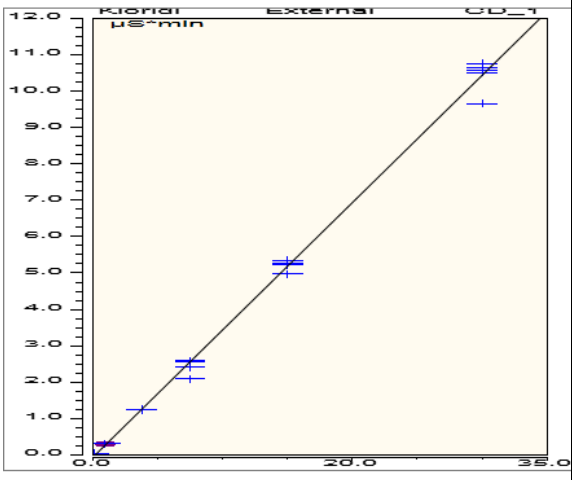
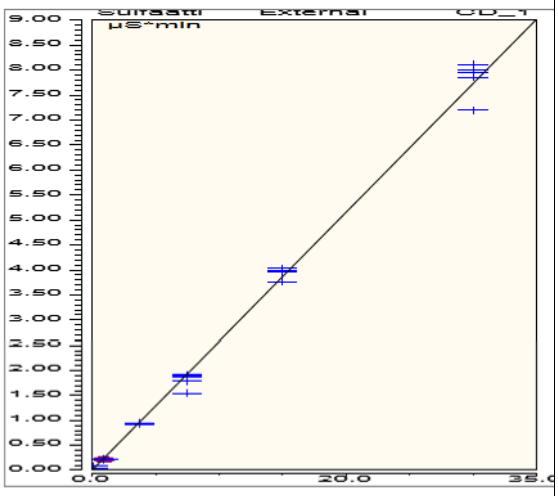
Toisen asteen yhtälön kuvaaja on paraabeli, jolla yhtä y-arvoa voi vastata kaksi pitoisuusarvoa eli x-arvoa. Käytettävällä mittausalueella ei saa olla maksimia eikä minimiä. Määrittämällä derivaatan nollakohta etsitään minimi- ja maksimikohta. [Mäkinen ym. 1996: 22–23.] Mäkisen ym. [1996: 22–23] mukaan derivaatan määritelmästä y' = b + 2cx_d saadaan x_d:n laskemiseen yhtälö:

$$x_d = \frac{-b}{2c} \tag{2}$$

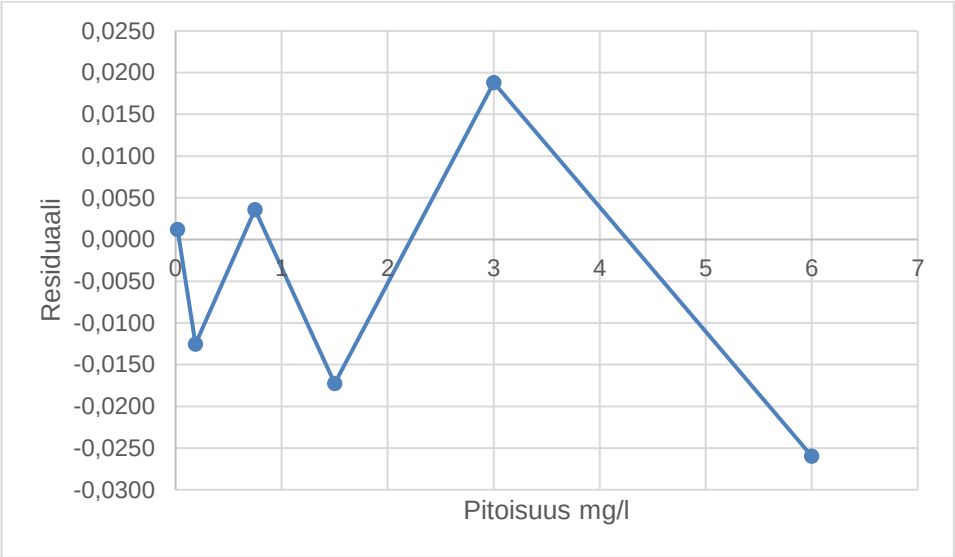
Kun x_d ei ole mittausalueen sisäpuolella, alueella ei ole minimiä eikä maksimia. Suoraa voidaan täten käyttää kalibrointiin. Mittausalue ei voi jatkua kovin lähelle tätä arvoa. [Mäkinen ym. 1996: 22–23.]

Chromeleon 7.2 -ohjelma antaa anionien kalibrointikäyrät. Fluoridin, kloridin ja sulfaatin selitysasteet, kalibrointikäyrät ja -kuvaajat on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4. Chromeleon 7.2 -ohjelman määrittämien kalibrointikäyrien yhtälöt.

	KALIBROINTIKÄYRÄ	R^2 (%)	KALIBROINTIKUVAAJA
FLUORIDI	$y = 0{,}007x^2 + 0{,}514x - 0{,}006$	99,7	
KLORIDI	$y = 0{,}35x - 0{,}055$	99,8	
SULFAATTI	$y = 0{,}258x + 0{,}008$	99,6	

Fluoridin, kloridin ja sulfaatin residuaaleista piirrettiin kuvaajat pitoisuuden funktiona. Kuvassa 12 olevasta fluoridin residuaalikuvaajasta nähdään, että kuvaajan pisteet jakautuvat tasaisesti nollatason molemmin puolin. Tästä tehtiin johtopäätös, että toisen asteen yhtälö sopii hyvin fluoridin kalibrointikäyräksi. Lisäksi Chromeleon 7.2 -ohjelmalla kokeiltiin kaikkia ohjelman mahdollistamia vaihtoehtoja kalibrointikäyrän malliksi. Todettiin, että toisen asteen yhtälö sopii hyvin kalibrointikäyräksi.



Kuva 12. Fluoridin residuaalikuvaaja.

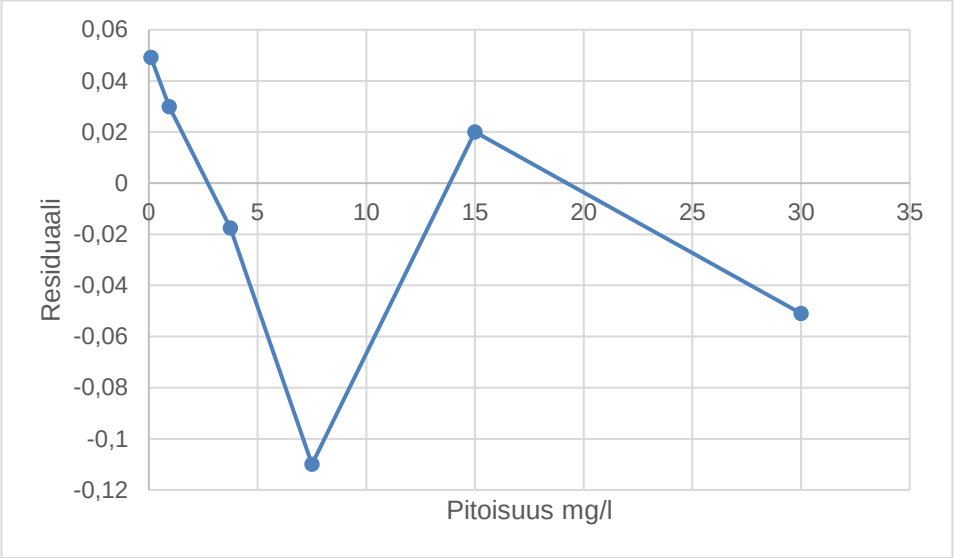
Fluoridin kalibrointikäyrän yhtälön $y = 0{,}007x^2 + 0{,}514x - 0{,}006$ derivaatta on $y' = 0{,}014x + 0{,}514$. Kaavalla 2 lasketaan x_d:n arvo:

$$x_d = \frac{-b}{2c} = \frac{-0{,}514}{2x0{,}007} = -36{,}7$$

Näin saatu arvo on fluoridin kalibrointikäyrän yhtälönä olevan toisen asteen yhtälön minimikohta. Näin ollen mittausalueelle ei osu minimiä tai maksimia.

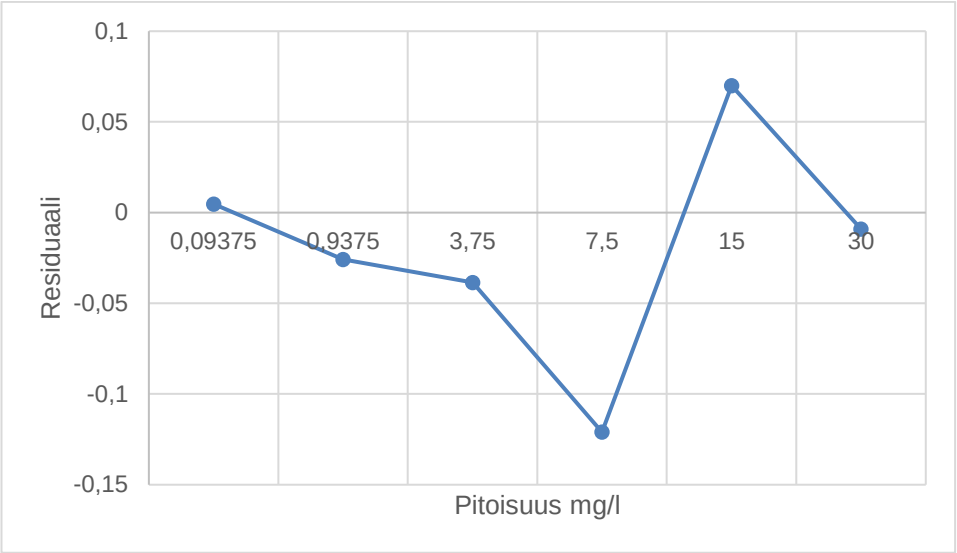
Jos kalibrointisuora on lineaarinen, residuaalit jakautuvat vuorotellen nollatason molemmin puolin [Mäkinen ym. 1996: 18]. Kloridin residuaalikuvaajan pisteet jakautuvat nollatason molemmin puolin, eikä selvää käyrää ole nähtävissä. Tästä voidaan todeta lineaarisen mallin soveltuvan hyvin kloridin kalibrointikäyräksi. (Kuva 13.) Lisäksi

Chromeleon 7.2 -ohjelmalla kokeiltiin kaikkia ohjelman mahdollistamia vaihtoehtoja kalibrointikäyrän malliksi. Todettiin, että ensimmäisen asteen yhtälö sopii hyvin kalibrointikäyräksi.



Kuva 13. Kloridin residuaalikuvaaja.

Sulfaatin residuaalikuvaajan pisteet jakautuvat nollatason molemmin puolin, eikä selvää käyrää ole nähtävissä. Tästä päästään johtopäätökseen, että lineaarinen malli soveltuu sulfaatin kalibrointikäyräksi. (Kuva 14.) Lisäksi Chromeleon 7.2 -ohjelmalla kokeiltiin kaikkia ohjelman mahdollistamia vaihtoehtoja kalibrointikäyrän malliksi. Todettiin, että ensimmäisen asteen yhtälö sopii hyvin kalibrointikäyräksi.



Kuva 14. Sulfaatin residuaalikuvaaja.

4.5.2 Toteamis- ja määritysraja

Toteamisraja (LOD, Limit of Detection) on pitoisuus, jolla voidaan todeta, onko näytteessä määritettävä yhdistettä. Arvo eroaa nollanäytteestä merkittävästi. Määritysraja (LOQ, Limit of Quantitation) on pitoisuus, joka voidaan määrittää hyväksyttävällä tarkkuudella ja täsmällisyydellä. Voidaan sanoa, että näytteessä oleva pitoisuus eroaa nollasta merkitsevästi tietyllä tilastollisella todennäköisyydellä. Toteamis- ja määritysrajoja arvioidaan yleensä 95 prosentin todennäköisyydellä. [Mäkinen ym. 1996: 29.]

Mäkisen ym. [1996: 30] ja MetropoliLab Oy:n Kemiallisten testauksien validointi – Menettelyohje M04 mukaan toteamisraja saadaan laskemalla kaavalla 3 ja määritysraja kaavalla 4:

$$\mathrm{LOD} = \bar{x} + 3s \tag{3}$$

$$\mathrm{LOQ} = \bar{x} + 6s \tag{4}$$

Kromatografisissa menetelmissä on mahdollista käyttää myös taustan signaali-kohinasuhdetta toteamis- ja määritysrajojen määrittämiseen. [Mäkinen ym. 1996: 30.] Tässä työssä toteamis- ja määritysrajat määritettiin tutkimalla taustan hajonta nollanäytteen toistomittauksilla ja laskemalla tulosten keskiarvo ja keskihajonta. Toteamis- ja määritysrajat laskettiin kaavoilla 3 ja 4.

Fluoridin määritysrajavaatimus 0,02 mg/l ei täyty. Toisaalta nykyisen laitteen, Dionex DX-120, määritysrajavaatimus on 0,1 mg/l ja tämä vaatimus täyttyy. Fluoridin määritysrajassa ei voida päästä pienempään pitoisuuteen, koska LOQ määritetään kaavalla 4 eikä käytetä nykyisin yleisemmin käytettävää kaavaa LOQ = 10s. Kloridin ja sulfaatin määritysrajavaatimukset täyttyvät. (Taulukko 5.)

Taulukko 5. Toteamis- ja määritysrajat fluoridille, kloridille ja sulfaatille. Tulokset mg/l.

	FLUORIDI	KLORIDI	SULFAATTI
KESKIARVO	0,10 mg/l	0,29 mg/l	0,29 mg/l
KESKIHAJONTA	0,0004 mg/l	0,004 mg/l	0,002 mg/l
TOTEAMISRAJA LOD	0,10 mg/l	0,30 mg/l	0,295 mg/l
MÄÄRITYSRAJA LOQ	0,10 mg/l	0,31 mg/l	0,30 mg/l
MÄÄRITYSRAJA-VAATIMUS	0,02 mg/l (VANHA MENETELMÄ 0,10 mg/l)	0,5 mg/l	0,5 mg/l

4.5.3 Oikeellisuus

Analyysimenetelmän tarkkuus tarkoittaa, että menetelmällä pyritään saamaan todellisia pitoisuuksia näytteistä. Tuloksia voidaan verrata myös muiden laboratorioiden tuloksiin. Systemaattinen virhe ja satunnaisvirhe vaikuttavat tarkkuuteen. Tarkkuudella tarkoitetaankin systemaattisen virheen ja satunnaisvirheen summaa. [Mäkinen ym. 1996: 33.]

Virheellinen kalibrointi ja nollanäytteen arviointi, kyvyttömyys määrittää kaikkia analyytin muotoja, määritysolosuhteet ja näytteen muuttuminen analysoinnin aina vaikuttavat systemaattiseen virheeseen. Menetelmän tarkkuus on tulosten keskiarvon yhtäpitävyys todellisen arvon kanssa. [Mäkinen ym. 1996: 33.]

Oikeellisuus voidaan määrittää, kun näytteen todellinen pitoisuus tiedetään esimerkiksi varmennetulla vertailumateriaalilla, vertailemalla tuloksia toisella menetelmällä saatuihin tuloksiin tai osallistumalla vertailukokeisiin. [Elintarvikevirasto EVIRA 1997: 3; Mäkinen ym. 1996: 33.] Tällöin arvioimiseen käytetään t-testiä. [Mäkinen ym. 1996: 33–34.] Mikäli edellä mainittuja ei ole käytettävissä, voidaan systemaattisen virheen arviointi tehdä saantokokeilla standardin lisäyksien avulla. Standardin lisäysmenettelyn tarkoituksena on osoittaa, onko näytteessä yhdisteitä, jotka voisivat häiritä määritystä. Näytteeseen lisätään tunnettu määrä määritettävää yhdistettä. Lisäysnäyte ja alkuperäinen näyte

analysoidaan. Saantoprosentin tavoiteväli on 100 ± 5 %. [Elintarvikevirasto EVIRA 1997: 3; Mäkinen ym. 1996: 34.] Saantoprosentti lasketaan Mäkisen ym. [1996: 34] kaavalla:

$$R = \frac{S-U}{C} x100\% \quad (5)$$

R on saantoprosentti
C on lisätyn standardiliuoksen tunnettu pitoisuus
U on näytteen alkuperäinen mitattu pitoisuus
S on lisäyksen sisältävän näytteen mitattu pitoisuus.

Keskiarvon keskivirhettä käytetään systemaattisen virheen arvioinnissa ja se lasketaan Mäkisen ym. [1996: 34] mukaan seuraavalla kaavalla:

$$s_R = \frac{s}{\sqrt{m}} \quad (6)$$

s_R on keskiarvon keskivirhe
s on keskihajonta
m on mitattujen sarjojen määrä.

Todellisen saannon arvon sijoittumisen arvioinnissa käytetään 2-suuntaista t-testiä ja 95 prosentin todennäköisyyttä. Tällöin kymmenelle näytteelle ja standardin lisäysnäytteelle vapausasteella 9 saadaan kaavaksi:

$$X \pm (1{,}833 x s_R) \quad (7)$$

X on tulosten keskiarvo
s_R on keskiarvon keskivirhe
1,833 on t-jakauman arvo. [Mäkinen ym. 1996: 34.]

Menetelmässä ei ole systemaattista virhettä, jos kaavalla 7 laskettu saanto ei ole merkitsevästi tavoitevälin ulkopuolella. [Mäkinen ym. 1996: 34.]

Systemaattisen virheen arviointi saantokokeilla

Fluoridin todellinen saannon arvo sijoittuu 95 prosentin todennäköisyydellä välille 98,7±1,2 % (t-jakauma, 2-suuntainen, 18 vapausastetta) eli välille 97,5–99,9 %. Todettu saanto ei ole merkitsevästi tavoitevälin 95–105 % ulkopuolella, eli menetelmässä ei ole systemaattista virhettä. (Taulukko 6.)

Taulukko 6. Fluoridin saantoprosentit.

FLUORIDI, LISÄYS 3 MG/L	FLUORIDIN RINNAKKAISNÄYTTEIDEN KESKIARVO (mg/l)	FLUORIDIN RINNAKKAISTEN LISÄYSNÄYTTEIDEN KESKIARVO (mg/l)	SAANTO-%, FLUORIDI
8732-1	0,0521	2,9665	97,1 %
8733-1	0,1464	3,0975	98,4 %
8722-1	0,1270	2,9291	93,4 %
8723-1	0,1010	3,0938	99,8 %
8721-1	0,0359	3,0036	98,9 %
8734-1	0,1880	3,0951	96,9 %
8731-1	0,0369	2,9033	95,5 %
8730-1	0,0466	2,9542	96,9 %
8707-1	0,0403	2,9821	98,1 %
5047-2	0,0623	3,0134	98,4 %
5046-2	0,0632	3,0471	99,5 %
5047-1	0,0541	3,0242	99,0 %
8968-1	0,0897	3,0353	98,2 %
8736-1	0,1330	3,0325	96,7 %
5046-1	0,0761	3,0225	98,2 %
8967-1	0,0923	3,2201	104,3 %
9348-1	0,2289	3,1655	97,9 %
9348-2	0,5808	3,7979	107,2 %
9348-3	0,5520	3,5958	101,5 %
KESKIARVO			**98,7 %**
KESKIHAJONTA			**0,03 %**
KESKIARVON KESKIVIRHE			**0,70 %**
TULOS (KAAVA 7)			**98,7±1,2%**

Kloridin todellinen saannon arvo sijoittuu 95 prosentin todennäköisyydellä välille 99,2±4,1 % (t-jakauma, 2-suuntainen, 10 vapausastetta) eli välille 95,1–103,3 %. Todettu saanto ei ole merkitsevästi tavoitevälin 95–105 % ulkopuolella, eli menetelmässä ei ole systemaattista virhettä. (Taulukko 7.)

Taulukko 7. Kloridin saantoprosentit.

KLORIDI, LISÄYS 5 MG/L	KLORIDIN RINNAKKAISNÄYTTEIDEN KESKI-ARVO (mg/l)	KLORIDIN RINNAKKAISTEN LISÄYSNÄYTTEIDEN KESKIARVO (mg/l)	SAANTO-%, KLORIDI
8732-1	6,3057	11,3341	100,6 %
8722-1	6,4401	11,1434	94,1 %
8734-1	3,7808	8,5543	95,5 %
8731-1	1,2631	6,3161	101,1 %
8730-1	16,1014	20,3443	84,9 %
8707-1	7,8737	12,7235	97,0 %
5047-2	2,0620	7,1869	102,5 %
5046-2	2,1865	7,4356	105,0 %
5047-1	2,1752	7,2684	101,9 %
8968-1	7,3394	12,0463	94,1 %
8967-1	6,3175	12,0295	114,2 %
KESKIARVO			**99,2 %**
KESKIHAJONTA			**0,075 %**
KESKIARVON KESKIVIRHE			**2,25 %**
TULOS (KAAVA 7)			**99,2±4,1%**

Sulfaatin todellinen saannon arvo sijoittuu 95 prosentin todennäköisyydellä välille 100±6 % (t-jakauma, 2-suuntainen, 7 vapausastetta) eli välille 94–106 %. Todettu saanto ei ole merkitsevästi tavoitevälin 95–105 % ulkopuolella, eli menetelmässä ei ole systemaattista virhettä. (Taulukko 8.)

Taulukko 8. Sulfaatin saantoprosentit.

SULFAATTI: LISÄYS 5 MG/L	SULFAATIN RINNAKKAISNÄYTTEIDEN KESKIARVO (mg/l)	SULFAATIN RINNAKKAISTEN LISÄYSNÄYTTEIDEN KESKIARVO (mg/l)	SAANTO-%, SULFAATTI
8723-1	13,9671	19,1664	104,0 %
8734-1	11,5207	16,1816	93,2 %
8731-1	4,1468	9,0706	98,5 %
5047-2	13,2169	18,5942	107,5 %
5046-2	5,7040	10,6475	98,9 %
8968-1	12,8857	17,3111	88,5 %
5046-1	5,9760	10,6196	92,9 %
8967-1	12,5224	18,3619	116,8 %
KESKIARVO			**100 %**
KESKIHAJONTA			**0,092 %**
KESKIARVON KESKIVIRHE			**3,2 %**
TULOS (KAAVA 7)			**100±6%**

Tulosten oikeellisuus ja vertailukelpoisuus

Tulosten oikeellisuutta ja vertailukelpoisuutta tutkittiin vertailemalla Thermo Scientific Dionex ICS-5000 -ionikromatografilla analysoitujen näytteiden tuloksia Dionex DX-120 -ionikromatografilla määritettyjen näytteiden tuloksiin. Vertailu tehtiin t-testillä.

Thermo Scientific Dionex ICS-5000 -ionikromatografilla määritettyjen fluoridinäytteiden tulokset eivät 95 prosentin luottamustasolla eroa parittaisen kahden otoksen t-testin perusteella tilastollisesti merkitsevästi Dionex DX-120 -ionikromatografilla analysoiduista tuloksista: $t(38) = 0{,}182$, $p = 0{,}857$, 2-suuntainen. (Taulukko 9.)

Taulukko 9. Fluoridin t-testin tulokset.

Parittainen kahden otoksen t-testi keskiarvoille
Fluoridi

	ICS-5000	*Vertailutulos*
Keskiarvo	0,744278632	0,778494872
Varianssi	1,622577727	4,573895624
Havainnot	39	39
Pearsonin korrelaatio	0,884434025	
Arvioitu keskiarvojen ero	0	
va	38	
t Tunnusluvut	-0,182052092	
P(T<=t) yksisuuntainen	0,428254777	
t-kriittinen yksisuuntainen	1,68595446	
P(T<=t) kaksisuuntainen	0,856509555	
t-kriittinen kaksisuuntainen	2,024394164	

Thermo Scientific Dionex ICS-5000 -ionikromatografilla määritettyjen kloridinäytteiden tulokset eivät 95 prosentin luottamustasolla eroa parittaisen kahden otoksen t-testin perusteella tilastollisesti merkitsevästi Dionex DX-120 -ionikromatografilla analysoiduista tuloksista: t(38) = 1,726, p = 0,093, 2-suuntainen. (Taulukko 10.)

Taulukko 10. Kloridin t-testin tulokset.

Parittainen kahden otoksen t-testi keskiarvoille
Kloridi

	ICS-5000	*Vertailutulos*
Keskiarvo	1,16041453	1,310412821
Varianssi	6,469575799	9,322683778
Havainnot	39	39
Pearsonin korrelaatio	0,997760019	
Arvioitu keskiarvojen ero	0	
va	38	
t Tunnusluvut	-1,725674964	
P(T<=t) yksisuuntainen	0,046265212	
t-kriittinen yksisuuntainen	1,68595446	
P(T<=t) kaksisuuntainen	0,092530423	
t-kriittinen kaksisuuntainen	2,024394164	

Thermo Scientific Dionex ICS-5000 -ionikromatografilla määritettyjen sulfaattinäytteiden tulokset eivät 95 prosentin luottamustasolla eroa parittaisen kahden otoksen t-testin perusteella tilastollisesti merkitsevästi Dionex DX-120 -ionikromatografilla analysoiduista tuloksista: t(38) = 1,585, p = 0,121, 2-suuntainen. (Taulukko 11.)

Taulukko 11. Sulfaatin t-testin tulokset.

Parittainen kahden otoksen t-testi keskiarvoille
Sulfaatti

	ICS-5000	*Vertailutulos*
Keskiarvo	9,208206838	9,575782051
Varianssi	161,3096229	194,4461412
Havainnot	39	39
Pearsonin korrelaatio	0,99844594	
Arvioitu keskiarvojen ero	0	
va	38	
t Tunnusluvut	-1,585160604	
P(T<=t) yksisuuntainen	0,060608858	
t-kriittinen yksisuuntainen	1,68595446	
P(T<=t) kaksisuuntainen	0,121217717	
t-kriittinen kaksisuuntainen	2,024394164	

4.5.4 Täsmällisyys

Tulosten yhtäpitävyyttä kutsutaan täsmällisyydeksi. Se saadaan määritettyä, kun määrityksiä toistetaan useita kertoja. Täsmällisyyttä arvioidaan keskihajonnan avulla. Täsmällisyydellä tarkoitetaan yleensä toistettavuutta ja uusittavuutta. Toistettavuudella tarkoitetaan rinnakkaismäärityksiin liittyvää hajontaa, kun määritykset tehdään toistettavissa olosuhteissa lyhyellä aikavälillä. Uusittavuus tutkitaan samalla tavalla kuin toistettavuus, mutta tekijänä voi olla joko sama tai eri henkilö ja näytteet tutkitaan eri aikoina. [Mäkinen ym. 1996: 40.]

Toistettavuus on riippuvainen pitoisuudesta. Siksi toistettavuusmäärityksiä tehdään useissa pitoisuuksissa. Käytettävien näytteiden tulee olla homogeenisiä. Testauksessa voidaan Mäkisen ym. [1996: 41] mukaan käyttää useanlaisia näytteitä:

- luonnonvesinäytteitä
- standardiliuoksia
- nollanäytteitä
- tunnetun pitoisuuden lisäysnäytteitä.

Tässä opinnäytetyössä toistettavuutta ja uusittavuutta arvioitiin tekemällä näytteistä rinnakkaismäärityksiä kolmena päivänä. Rinnakkaismäärityksistä laskettiin keskiarvo, keskihajonta, suhteellinen keskihajonta ja varianssi. Toistettavuus ja uusittavuus on suhteellinen keskihajonta muutettuna prosenteiksi.

Yleensä uusittavuus on suurempi kuin toistettavuus. Tässä validoinnissa nämä ovat kuitenkin toisin päin, koska validoitava laite antoi toistettavampia tuloksia validoinnin loppua kohden. Syynä tähän oli mitä ilmeisimmin laitteen vähäinen käyttö ennen validointia. Käytön myötä laite toimi paremmin.

Fluoridin päivän sisäinen toistettavuus vaihteli välillä 1,5–3,7 prosenttia. Uusittavuus oli 0,7 prosenttia. Mittaukset tehtiin kontrolli 1:llä eli pitoisuudella 1 mg/l. Ensimmäisenä päivänä tehtiin neljä rinnakkaismääritystä. Toisena ja kolmantena päivänä rinnakkais-määrityksiä tehtiin kolme. (Taulukko 12.)

Taulukko 12. Fluoridin toistettavuus ja uusittavuus.

TOISTETTAVUUS, FLUORIDI	PÄIVÄ 1	PÄIVÄ 2	PÄIVÄ 3
KESKIARVO, mg/l	1,00	0,99	0,99
KESKIHAJONTA, mg/l	0,04	0,02	0,03
SUHTEELLINEN KESKIHAJONTA, mg/l	0,037	0,015	0,032
VARIANSSI, mg/l	0,001	0,0002	0,010
PÄIVÄN SISÄINEN TOISTETTAVUUS, %	3,7	1,5	3,2

UUSITTAVUUS, FLUORIDI	
KESKIARVO, mg/l	0,99
KESKIHAJONTA, mg/l	0,01
SUHTEELLINEN KESKIHAJONTA, mg/l	0,007
VARIANSSI, mg/l	0,00004
PÄIVIEN VÄLINEN UUSITTAVUUS, %	0,7

Kloridin päivän sisäinen toistettavuus vaihteli välillä 0,2–1,9 prosenttia. Uusittavuus oli 1,1 prosenttia. Mittaukset tehtiin kontrolli 4:llä eli pitoisuudella 20 mg/l. Kaikkina päivinä tehtiin kolme rinnakkaismääritystä. (Taulukko 13.)

Taulukko 13. Kloridin toistettavuus ja uusittavuus.

TOISTETTAVUUS, KLORIDI	PÄIVÄ 1	PÄIVÄ 2	PÄIVÄ 3
KESKIARVO, mg/l	20,34	19,94	20,26
KESKIHAJONTA, mg/l	0,24	0,04	0,38
SUHTEELLINEN KESKIHAJONTA, mg/l	0,012	0,002	0,019
VARIANSSI, mg/l	0,058	0,002	0,144
PÄIVÄN SISÄINEN TOISTETTAVUUS, %	1,2	0,2	1,9

UUSITTAVUUS, KLORIDI	
KESKIARVO, mg/l	20,18
KESKIHAJONTA, mg/l	0,21
SUHTEELLINEN KESKIHAJONTA, mg/l	0,011
VARIANSSI, mg/l	0,044
PÄIVIEN VÄLINEN UUSITTAVUUS, %	1,1

Sulfaatin päivän sisäinen toistettavuus vaihteli välillä 0,3–1,8 prosenttia. Uusittavuus oli 1,2 prosenttia. Mittaukset tehtiin kontrolli 4:llä eli pitoisuudella 20 mg/l. Kaikkina päivinä tehtiin kolme rinnakkaismääritystä. (Taulukko 14.)

Taulukko 14. Sulfaatin toistettavuus ja uusittavuus.

TOISTETTAVUUS, SULFAATTI	PÄIVÄ 1	PÄIVÄ 2	PÄIVÄ 3
KESKIARVO, mg/l	20,63	20,18	20,60
KESKIHAJONTA, mg/l	0,36	0,06	0,30
SUHTEELLINEN KESKIHAJONTA, mg/l	0,017	0,003	0,015
VARIANSSI, mg/l	13	0,36	9
PÄIVÄN SISÄINEN TOISTETTAVUUS, %	1,8	0,30	1,5

UUSITTAVUUS, SULFAATTI	
KESKIARVO, mg/l	20,47
KESKIHAJONTA, mg/l	0,25
SUHTEELLINEN KESKIHAJONTA, mg/l	0,012
VARIANSSI, mg/l	6
PÄIVIEN VÄLINEN UUSITTAVUUS, %	1,2

4.5.5 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus on testaustulokseen liittyvä arvio, jolla ilmoitetaan rajat, joiden sisällä todellinen arvo on valitulla todennäköisyydellä eli kuinka luotettava mittaus on. Menetelmän mittausepävarmuus riippuu analysoitavasta matriisista ja pitoisuustasosta. [Mäkinen ym. 1996: 53.]

Kvantitatiivisten tulosten yhteydessä ilmoitetaan mittausepävarmuus. Se on tärkeää, sillä sitä tarvitaan arvioitaessa tulosten luotettavuutta, verrattaessa tuloksia keskenään, tehtäessä johtopäätöksiä tuloksista ja arvioitaessa tieteellistä työtä. Kaikki mittaukseen vaikuttavat epävarmuustekijät on otettava huomioon arvioitaessa mittausepävarmuutta. [Mäkinen ym. 1996: 53.]

Mittausepävarmuutta arvioitiin MetropoliLab Oy:n omalla Excel-pohjaisella työkalulla. Työkalu perustuu Nordtestin oppaaseen TR537. Työkalulla laskettavat suureet ovat taulukossa 15.

Taulukko 15. Mittausepävarmuuden mittaamisessa käytettyjen suureiden lyhenteiden selitteet.

Harha	*bias* (%)
Suhteellinen keskihajonta	*RSD %*
Laboratorion sisäinen uusittavuus, Satunnaisvirhe	$u(R_W)$
Harha (RMS = Root-Mean-Square)	$u(RMS_{bias})$
Saantokokeilla arvioitu epävarmuus	*u(Cref)*
Menetelmän harha, Systemaattinen virhe	*u(bias)*
Yhdistetty mittausepävarmuus eli kokonaisepävarmuus	u_c
Laajennettu mittausepävarmuus (95 %:n luottamustaso)	***U***

Mittaustuloksen harha lasketaan kaavalla 8:

$$bias\ (\%) = \frac{x_{ref} - x_i}{x_{ref}} * 100 \tag{8}$$

Suhteellinen keskihajonta lasketaan kaavalla 9:

$$RSD\ \% = \frac{s}{x} * 100 \tag{9}$$

Laboratorion sisäisen uusittavuuden satunnaisvirhe lasketaan kaavalla 10:

$$u(R_w) = \sqrt{s_{Rw}^2 + s_r^2} \tag{10}$$

Mittaustuloksen harha lasketaan kaavalla 11:

$$u(RMS_{bias}) = \sqrt{\frac{\sum bias_i^2}{n}} \tag{11}$$

Saantokokeilla arvioitu epävarmuus lasketaan kaavalla 12:

$$u(Cref) = \frac{s_R}{\sqrt{n}} \tag{12}$$

Menetelmän harha eli systemaattinen virhe lasketaan kaavalla 13:

$$u(bias) = \sqrt{RMS_{bias}^2 + u(Cref)^2} \tag{13}$$

Menetelmän yhdistetty mittausepävarmuus eli kokonaisepävarmuus lasketaan kaavalla 14:

$$u_c = \sqrt{u(R_w)^2 + (u(bias))^2} \tag{14}$$

Menetelmän laajennettu mittausepävarmuus 95 %:n todennäköisyydellä lasketaan kaavalla 15:

$$U = 2 * u_c \tag{15}$$

Mittausepävarmuuden määrittäminen tehtiin kontrolliliuosten rinnakkaismäärityksinä. Taulukoissa 16, 17 ja 18 on kerrottu kohdassa lukumäärä (*n*), kuinka monta analysointia kullekin kontrollitasolle on tehty.

Fluoridin laajennettu mittausepävarmuus 95 prosentin luottamustasolla on välillä 5–10 prosenttia, eli fluoridin mittausepävarmuus on 10 prosenttia. Validointisuunnitelmassa fluoridin mittausepä-varmuusvaatimus on 15 prosenttia. Fluoridin määritysmenetelmä täyttää mittausepä-varmuusvaatimuksen kaikissa kontrollipisteissä. (Taulukko 16.)

Taulukko 16. Fluoridin mittausepävarmuus usealle mittaustasolle.

FLUORIDIN MITTAUSEPÄVARMUUS			
	CTRL 1	**CTRL 2**	**CTRL 3**
KESKIARVO, mg/l	0,99	2,03	5,00
KESKIHAJONTA, mg/l	0,04	0,08	0,3
LUKUMÄÄRÄ	18	17	16
VAPAUSASTE	17	16	15
LUOTTAMUSTASO	0,95	0,95	0,95
KESKIVIRHE, mg/l	0,01	0,02	0,08
VAIHTELUVÄLI R, mg/l	0,13	0,26	1,36
STUDENT T	2,11	2,12	2,13
LUOTTAMUSVÄLI, mg/l	0,02	0,04	0,16
BIAS, %	1,4	1,3	0,1
RSD, %	3,9	3,7	5,9
U(R_W), %	0,05	0,11	0,42
U(RMS_{BIAS}), %	3,5	2,5	4,7
U(CREF), %	0,9	0,9	1,5
U(BIAS), %	3,6	2,6	4,9
$U_{C,\%}$	3,6	2,6	5
U, %	**7**	**5**	**10**

Kloridin laajennettu mittausepävarmuus 95 prosentin luottamustasolla vaihtelee välillä 4–8 prosenttia, eli kloridin mittausepävarmuus on 8 prosenttia. Validointisuunnitelmassa kloridin mittausepä-varmuusvaatimus on 10 prosenttia. Kloridin määritysmenetelmä täyttää vaatimuksen kaikissa kontrollipisteissä. (Taulukko 17.)

Taulukko 17. Kloridin mittausepävarmuus usealle mittaustasolle.

KLORIDIN MITTAUSEPÄVARMUUS (MULTI)					
	CTRL 1	**CTRL 2**	**CTRL 3**	**CTRL 4**	**CTRL 5**
KESKIARVO, mg/l	1,96	3,91	10,03	19,96	29,92
KESKIHAJONTA, mg/l	0,07	0,11	0,22	0,79	1,07
LUKUMÄÄRÄ	13	6	6	12	6
VAPAUSASTE	12	5	5	11	5
LUOTTAMUSTASO	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95
KESKIVIRHE, mg/l	0,02	0,03	0,06	0,22	0,3
VAIHTELUVÄLI R, mg/l	0,25	0,29	0,59	2,95	3,02
STUDENT T	2,18	2,57	2,57	2,2	2,57
LUOTTAMUSVÄLI, mg/l	0,04	0,11	0,23	0,5	1,12
BIAS (%)	1,9	2,4	0,3	0,2	0,3
RSD %	3,5	2,8	2,2	4	3,6
$U(R_W)$ %	0,1	0,15	0,31	1,1	1,5
$U(RMS_{BIAS})$ %	3,1	3,3	2	3,4	3,3
U(CREF) %	1	1,1	0,9	1,1	1,5
U(BIAS) %	3,2	3,5	2,2	3,6	3,6
U_C %	3,2	3,5	2,2	3,7	3,9
U %	**6**	**7**	**4**	**8**	**8**

Sulfaatin laajennettu mittausepävarmuus 95 prosentin luottamustasolla on välillä 4–11 prosenttia, eli sulfaatin mittausepävarmuus on 11 prosenttia. Validointisuunnitelmassa sulfaatin mittausepä-varmuusvaatimus on 10 prosenttia. Tämä täyttyy keskimääräisesti sulfaatin osalta, vaikka yhdessä mittauspisteessä tämä mittausepävarmuusvaatimus ylittyykin. Tämänkin mittauspisteen mittausepävarmuutta saataisiin pienennettyä näytemäärää lisäämällä, jolloin mittausepävarmuus jäisi 10 prosentin alapuolelle. (Taulukko 18.)

Taulukko 18. Sulfaatin mittausepävarmuus usealle mittaustasolle.

SULFAATIN MITTAUSEPÄVARMUUS (MULTI)					
	CTRL 1	CTRL 2	CTRL 3	CTRL 4	CTRL 5
KESKIARVO, mg/l	1,86	3,85	10	20,1	29,9
KESKIHAJONTA (S) , mg/l	0,05	0,14	0,2	0,77	0,96
LUKUMÄÄRÄ (N)	11	6	6	12	6
VAPAUSASTE	10	5	5	11	5
LUOTTAMUSTASO, mg/l	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95
KESKIVIRHE, mg/l	0,02	0,04	0,06	0,21	0,27
VAIHTELUVÄLI R, mg/l	0,21	0,4	0,59	2,66	2,55
STUDENT T	2,23	2,57	2,57	2,2	2,57
LUOTTAMUSVÄLI, mg/l	0,04	0,14	0,21	0,49	1
BIAS (%)	7	3,7	0,2	0,6	0,4
RSD %	2,9	3,6	2	3,8	3,2
$U(R_W)$ %	0,08	0,19	0,28	1,1	1,4
$U(RMS_{BIAS})$ %	5,3	4,9	1,9	3,3	2,9
U(CREF) %	0,9	1,5	0,8	1,1	1,3
U(BIAS) %	5,4	5,1	2	3,5	3,2
U_C %	5,4	5,1	2	3,7	3,5
U %	**11**	**10**	**4**	**7**	**7**

4.5.6 Herkkyys

Analyysimenetelmän herkkyys on kyky havaita pienet muutokset pitoisuudessa. Menetelmä on herkkä, kun pitoisuuden pieni muutos aiheuttaa suuren muutoksen vasteessa. [Mäkinen ym. 1996: 28.]

Herkkyys on kalibrointikäyrän derivaatta. Lineaarisessa kalibroinnissa herkkyys on vakio koko pitoisuusalueella. [Elintarvikevirasto EVIRA 1997: 7.] Herkkyys on suoran kulma-kerroin [Elintarvikevirasto EVIRA 1997: 7; Mäkinen ym. 1996: 28].

Korkeamman asteen yhtälöillä herkkyys on erilainen kalibrointikäyrän eri pisteissä. Tällöin herkkyys on kalibrointikäyrän pitoisuusalueen keskipisteen derivaatta. [Elintarvikevirasto EVIRA 1997: 7; Mäkinen ym. 1996: 28.] Toisen asteen yhtälölle $y = a + bx + cx^2$ saadaan Elintarvikevirasto EVIRA:n [1997: 8] ja Mäkisen ym. [1996: 28] mukaan:

$$Herkkyys = b + 2c\bar{x} \quad (16)$$

b ja c ovat kalibrointikäyrän ensimmäisen ja toisen asteen termien kertoimet

$\bar{x}$ on pitoisuusalueen keskipiste.

Fluoridin kalibrointikäyrän $y = 0{,}007x^2 + 0{,}514x - 0{,}006$ derivaatta on $y' = 0{,}014\bar{x} + 0{,}514$. Alin kalibrointipiste fluoridilla on 0,01875 mg/l ja ylin kalibrointipiste 6 mg/l. Näille saadaan keskiarvo $\bar{x} \approx 3$ ja herkkyydeksi saadaan:

$$Herkkyys = 0{,}014 * 3 + 0{,}514 = 0{,}556 \frac{1}{mg/l}.$$

Kloridilla ja sulfaatilla kalibrointikäyrät ovat lineaarisia suoria, jolloin niiden herkkyys on sama kuin suoran kulmakerroin. Kloridin kalibrointikäyrän yhtälöstä $y = 0{,}35x - 0{,}055$ nähdään, että kulmakerroin ja samalla kloridin määritysmenetelmän herkkyys on 0,35 $\frac{1}{mg/l}$. Vastaavasti sulfaatin kalibrointikäyrän yhtälöstä $y = 0{,}258 + 0{,}008$ saadaan kulma-kertoimeksi ja sulfaatin määritysmenetelmän herkkyydeksi 0,258 $\frac{1}{mg/l}$.

4.6 Johtopäätökset

Validointitulosten perusteella nopeutettu menetelmä voidaan ottaa käyttöön fluoridille, kloridille ja sulfaatille. Fluoridin määritysalueena voidaan käyttää 0,1–6 mg/l. Validoinnin tavoitteena oli saada fluoridin määritysrajaksi 0,02 mg/l. Tämä tavoite ei kuitenkaan täyttynyt. Toisaalta aikaisemmin käytössä olleella Dionex DX-120 -ionikromatografilla määritysraja oli 0,1 mg/l. Tällöin määritysraja pysyy samana Thermo Scientific Dionex ICS-5000 -ionikromatografilla kuin Dionex DX-120 -ionikromatografilla.

Kloridille ja sulfaatille tavoitteena oli, että määritysalueena voidaan käyttää 0,5–30 mg/l. Tämä tavoite täyttyi ja aluetta voidaan käyttää kloridin ja sulfaatin analysoinnissa.

5 Pohdinta

Opinnäytetyön kokeellisen osuuden tiukasta aikataulusta huolimatta menetelmän kehitys ja validointi onnistuivat hyvin. Analyysimenetelmää saatiin kehitettyä asetettujen tavoitteiden mukaisesti: tavoitteena oli saada sulfaatin retentioaika alle 10 minuutin; työssä saavutettiin sulfaatille n. 9 minuutin retentioaika. Validoinnin tavoitteet täyttyivät ja tulokset olivat todella hyviä. MetropoliLab Oy:ssä oltiin tyytyväisiä työhön ja tuloksiin.

Fluoridin kalibrointikäyrään olisi voinut lisätä vähintään yhden pisteen lisää alimman ja toiseksi alimman pisteen väliin. Tällöin toisen asteen yhtälön kaartuminen olisi näkynyt paremmin ja pienille pitoisuuksille olisi saatu lisää tarkkuutta sekä menetelmä olisi saatettu voida ottaa käyttöön myös välille 0,02–0,1 mg/l. Myös nollanäytteitä tulisi testata lisää määritysrajan laskemiseksi. Toisaalta, jos tyydytään määritysrajaan 0,1 mg/l, voisi kalibrointikäyrän alimmaksi pisteeksi vaihtaa 0,1 mg/l. Tällöin myös kalibrointikäyrä muuttuisi ja pystyttäisiin mahdollisesti käyttämään lineaarista kalibrointikäyrää.

Tulosten luotettavuus

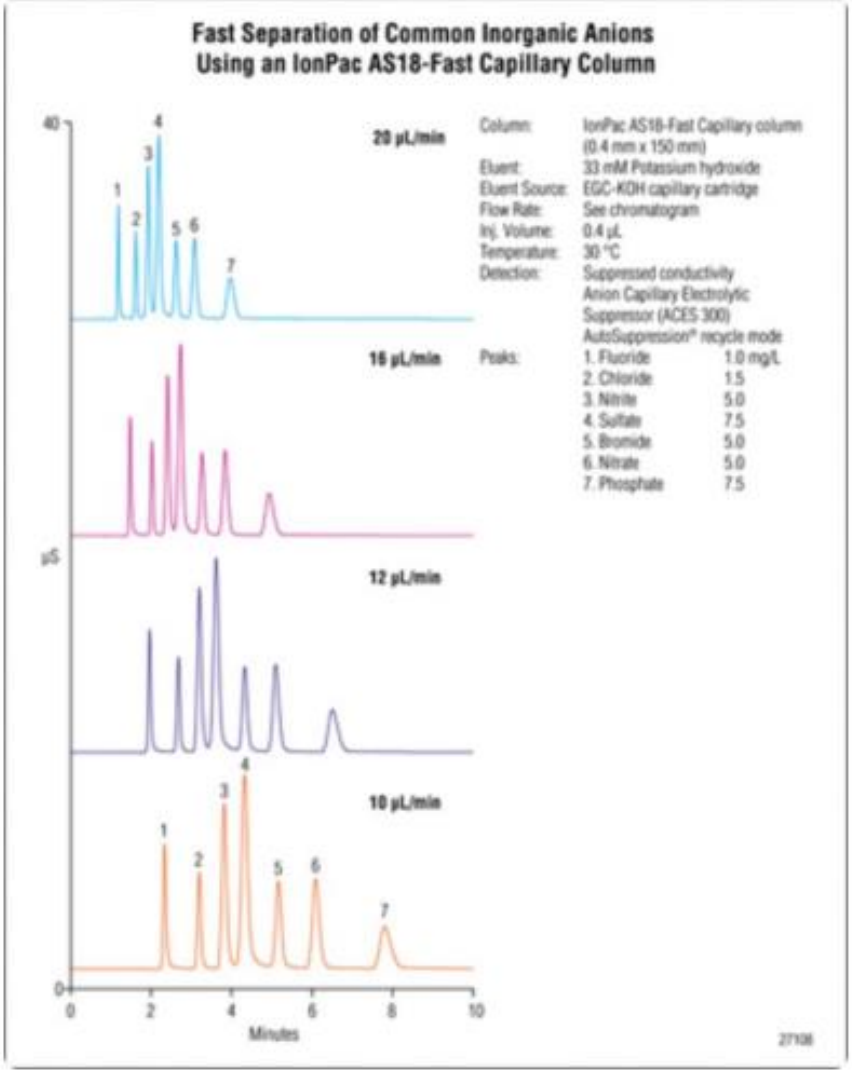
Validointiajojen jälkeen päätettiin vielä testata, kuinka hyvin menetelmä toimii, jos näytteessä olisi fluoridin, kloridin ja sulfaatin lisäksi myös bromidia, fosfaattia, nitraattia, asetaattia ja tiosulfaattia. Jo validoinnin aikana huomattiin, että fluoridipiikin vieressä on toinen piikki. Tällä testillä saatiin varmistettua, että yhdiste on asetaatti ja sen retentioaika on lähellä fluoridin retentioaikaa. Piikit erottuvat kuitenkin toisistaan, mutta siitä huolimatta integrointivaihe on kriittinen erityisesti pienissä pitoisuuksissa ja virheen mahdollisuus on olemassa. Integrointivaihe vaatiikin tekijältä erityistä huolellisuutta ja ammattitaitoa. Myös formiaatti ja propionaatti saattavat häiritä pienten fluoridi-pitoisuuksien analysointia [Pfaff 1993: 5]. Jos fluoridia on näytteessä yli 1,5 mg/l, häiritsevät analyytit eivät yleensä vaikuta tulokseen merkittävästi [Hautman 1997: 7]. Mikäli epäillään, että muut analyytit häiritsevät määritettävää analyyttiä, näytteeseen voidaan lisätä sopiva määrä standardiliuosta ja analysoida näyte uudelleen [Pfaff 1993: 14].

Sulfaattipiikin yhteydessä oli nähtävissä ”olkapää” jo validointiajoissa. Aiemmin mainitulla testillä saatiin selville, että tämä ”olkapää” on bromidin aiheuttama piikki. Sen retentioaika on lähes sama kuin sulfaatin. Sulfaatti- ja bromidipiikkien integrointi saattaa

olla haasteellista, ja virheen mahdollisuus on suuri. Sulfaatin todellisten saanto-prosenttien suurempi vaihteluväli kuin kloridilla tai fluoridilla saattaakin olla seurausta siitä, että bromidi häiritsee sulfaatin analysointia. Toisaalta sulfaatin saantoprosentteja määritettäessä näytteiksi valikoitui näytteitä, joilla sulfaattipitoisuus oli mittausalueen ulkopuolella. Aikaa näytteiden laimentamiselle ja uusintamääritykselle ei ollut, joten nämä näytteet jätettiin pois saantoprosenttilaskuista. Näytteiden pieni määrä lisäsi keskiarvon keskivirhettä. Lisäksi näytteiden vähäisen määrän seurauksena laskuissa jouduttiin käyttämään t-jakaumassa suurta kerrointa. Nämä yhdessä nostivat myös saantoprosentin raja-arvoja.

Ehdotus menetelmän kehittämiseksi tulevaisuudessa

Validoinnissa käytetty Thermo Scientific Dionex IonPac AS27 Capillary Column 0,4x250 mm -kolonni on optimoitu bromaatin määrittämiseen vesinäytteistä. Fluoridin, kloridin ja sulfaatin analysoimiseen löytyy parempiakin kolonneja. [Thermo Scientific Dionex IonPac IC column selection guide – Find the best IC column for your application.] Esimerkiksi Thermo Scientific Dionex IonPac AS18-Fast IC 0,4x150 mm -kolonneilla päästään valmistajan antamien tietojen mukaan fluoridilla ja kloridilla alle 2 minuutin ja sulfaatillakin alle 3 minuutin retentioaikoihin, kun eluentin virtausnopeutena on 20 µl/min [Thermo Scientific Dionex IonPac AS18-Fast IC Columns]. (Kuva 15.)



Kuva 15. Valmistajan tiedot Thermo Scientific Dionex IonPac AS18-Fast IC 0,4x150 mm -kolonnista. [Thermo Scientific Dionex IonPac AS18-Fast IC Columns].

Kuvan 15 esimerkissä on käytetty samaa suppressoria, ACES 300, ja samaa eluenttia, KOH, kuin MetropoliLab Oy:n Thermo Scientific Dionex ICS-5000 -ionikromatografissa on käytössä. Kolonni on 100 mm lyhyempi kuin käytössä ollut Thermo Scientific Dionex IonPac AS27 Capillary Column 0,4x250 mm -kolonni. Lisäksi kolonnia voidaan käyttää suuremmassa paineessa, jolloin eluentin virtausnopeutta voidaan nostaa. Nämä tekijät lyhentävät retentioaikoja huomattavasti. Valmistaja ei anna tietoja kolonnien stationäärifaaseista. Oletuksena on, että Thermo Scientific Dionex IonPac AS18-Fast IC 0,4x150 mm -kolonnin stationäärifaasi on optimoitu fluoridin, kloridin ja sulfaatin sekä muiden yleisesti määritettävien anionien nopeaan analysointiin.

Lähteet

Chiriac, Florentina Laura; Galaon, Toma & Cruceru, Liliana. 2016. Improved method for determination of anions present in aqueous samples by ion-chromatography. INCD ECOIND – International symposium – SIMI 2016. “The Environment and The Industry”, proceedings book. s. 147–151.

Elintarvikevirasto EVIRA.1997. Kemiallisten analyysimenetelmien validointiohje. Helsinki.

Fritz, James S. & Gjerde, Douglas T. 2009. Ion Chromatography. 4. painos. Weinheim: Wiley VCH.

Gjerde, Douglas T. & Fritz James S. 1987. Ion Chromatography. 2. painos. Heidelberg, Basel: Dr. Alfred Hüthig Verlag.

Hautman, Daniel P. 1997. Method 300.1 – Determination of inorganic anions in drinking water by ion chromatography. Verkkoaineisto. Yhdysvaltain ympäristönsuojeluvirasto U.S. EPA. <https://npis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P1008RPU.PDF?Dockey=P1008RPU.PDF>. Luettu 6.7.2019.

Heinonen-Tanski, Helvi. 2018. Sulfaattipäästöt vesiin aiheuttavat vaaroja. Verkkoaineisto. Suomen Luonnonsuojeluliitto. <https://www.sll.fi/2018/09/10/sulfaattipaastot-vesiin-aiheuttavat-vaaroja/>. 10.9.2018. Luettu 1.7.2019.

Jaarinen, Soili & Niiranen, JukkaKeinänen. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. 5., uudistettu painos. Helsinki: Edita Prima Oy.

MetropoliLab - Yritys. Verkkoaineisto. MetropoliLab Oy. <https://www.metropolilab.fi/fi/yritys>. Luettu 15.4.2019.

Karvonen, Airi; Taina, Tuire; Gustafsson, Juhani; Mannio, Jaakko; Mehtonen, Jukka; Nystén, Taina; Ruoppa, Marja; Sainio, Pirjo; Siimes, Katri; Silvo, Kimmo; Tuominen, Sirkku; Verta, Matti; Vuori, Kari-Matti & Äystö, Lauri. 2012. Vesiympäristölle vaarallisista ja haitallisista aineista annettujen säädösten soveltaminen – Kuvaus hyvistä menettelytavoista. Ympäristöministeriön raportteja 15/2012. Ympäristöministeriö. Helsinki. Verkkoaineisto. Luettu 1.7.2019.

Kemiallisten testauksien validointi – Menettelyohje M04. 2018. Yrityksen sisäinen dokumentti. MetropoliLab Oy.

Miten tulkita yleisimpiä vesitutkimusten tuloksia? Verkkoaineisto. WatMan Engineering Oy. <https://www.watman.fi/pdf/vedenlaatu.pdf>. Luettu 1.7.2019.

Mäkinen, Irma; Suortti, Anna-Mari; Saares, Riitta; Niemi, Ritva & Marjanen, Jari J. 1996. Ohjeita ympäristönäytteiden kemiallisten analyysimenetelmien validointiin. Helsinki: Suomen ympäristökeskus.

Pelia, Sonya. 2012. Capillary Ion Chromatography: Cations & Anions in Drinking Water. Verkkoaineisto. Analyte Guru. <http://analyteguru.com/capillary-ion-chromatography-cations-anions-in-drinking-water/>. 23.5.2012. Luettu 10.4.2019.

Pfaff, John D. 1993. Method 300.0 – Determination of Inorganic Anions by Ion Chromatography. Verkkoaineisto. Yhdysvaltain ympäristönsuojeluvirasto U.S. EPA. <https:// www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/method_300-0_rev_2-1_1993. pdf>. Luettu 6.7.2019.

Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fluoride. 2013. Verkkoaineisto. Euroopan elintarviketurvallisuusvirasto EFSA. <http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/3332.pdf>. Luettu 30.6.2019.

Sulfaatin terveysriskinarvion taustatiedot ja ohjeet. 2018. Verkkoaineisto. Opasnet. <http://fi.opasnet.org/fi/Sulfaatin_terveysriskinarvion_taustatiedot_ja_ohjeet> Päivitetty 1.2.2018. Luettu 1.7.2019.

Suunterveys - Fluori. Verkkoaineisto. Suomen Hammaslääkäriliitto. <https://www.hammaslaakariliitto.fi/fi/suunterveys/yleistietoa-suunterveydesta/hampaiden-ja-suun-puhdistus/fluori#.XRkMcegzY2w>. Luettu 30.6.2019.

Talousvesiasetuksen soveltamisohje. 2018. Enimmäisarvojen perusteet, osa 3. Sosiaali- ja terveysalan lupa- ja valvontavirasto. Helsinki.

Thermo Scientific Dionex CES 300 Product Manual. 2014. Thermo Fisher Scientific. Verkkoaineisto. <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/87169-Man-Suppressor-CES-300-065386-02-Aug12.pdf>. Luettu 15.4.2019.

Thermo Scientific Dionex ICS-5000 Ion Chromatography System Operator's Manual. 2011. Thermo Fisher Scientific. Verkkoaineisto. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/87164-Man-IC-ICS5000-Operators-Dec2011-DOC065342-06.pdf>. Luettu 9.5.2019.

Thermo Scientific Eluent Generator Cartridges Product Manual. 2012. Thermo Fisher Scientific. Verkkoaineisto. <https://conquerscientific.com/wp-content/ad_images/dionex-eg40-eluent-generator-manual.pdf>. Luettu 14.5.2019.

Thermo Scientific Continuously Regenerated Trap (CR-TC 500, Capillary) Column Product Manual. 2012. Verkkoaineisto. <http://dionex.su/en-us/webdocs/4394-Man-079684-01-CR-TC-500.pdf>. Luettu 14.5.2019.

Thermo Scientific Dionex Eluent Suppressros for Ion Chromatography. 2013. Verkkoaineisto. <http://www.cromlab.es/Articulos/Columnas/HPLC/Thermo/Dionex/Supresoras/ERS%20500/114797-PS__Eluent-Suppressors%20for%20IC-PS70690.pdf>. Luettu 12.6.2019.

Thermo Scientific Dionex IonPac AS27 Column Product Manual. 2014. Verkkoaineisto. Thermo Fisher Scientific. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/Man-065595-IonPac-AS27-Man065595-EN.pdf>. Luettu 13.6.2019.

Thermo Scientific Dionex IonPac AS18-Fast IC Columns. Verkkoaineisto. Thermo Fisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/072062>. Luettu 6.7.2019.

Thermo Scientific Dionex IonPac IC column selection guide – Find the best IC column for your application. Verkkoaineisto. Thermo Fischer Scientific. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/brochures/st-70588-ic-column-selection-guide-st70588-en.pdf>. Luettu 5.7.2019.

Vaihtoehtoisten liukkaudentorjunta-aineiden kulkeutuminen pohjavedessä (MIDAS). 2013. Verkkoaineisto. Suomen Ympäristökeskus (SYKE). <https://www.syke.fi/hankkeet/midas>. Päivitetty 7.12.2017. Luettu 1.7.2019.

Veden kemialliset ominaisuudet. Verkkoaineisto. BWT. <https://www.bwtwater.fi/fi/vesianalyysi/Sivut/veden-kemialliset-ominaisuudet.aspx>. Luettu 1.7.2019.