



Kokonaissyänidin määrittäminen SFA-analysaattorilla: menetelmän validointi

Anni-Rosa Apilainen

OPINNÄYTETYÖ
Toukokuu 2022

Laboratoriotekniikka

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratoriotekniikan tutkinto-ohjelma

APILAINEN, ANNI-ROSA:

Kokonaissyänidin määrittäminen SFA-analysaattorilla: menetelmän validointi

Opinnäytetyö 57 sivua, joista liitteitä 9 sivua
Toukokuu 2022

Opinnäytetyö tehtiin KVVY Tutkimus Oy:n puhtasvesiosastolla. Aiemmin syänidin määrittämiseen käytössä ollut FIA-analysaattori haluttiin korvata uudella tehokkaammalla laitteistolla kasvavien näytemäärien vuoksi sekä analysoinnin helpottamiseksi. Opinnäytetyön tavoitteena oli Skalar SFA -analysaattorin käyttöönotto sekä laitevalmistajan vapaan- ja kokonaissyänidin määrittämiseen tarkoitettujen menetelmien validointi erilaisille vesimatriiseille. Menetelmä pohjautuu standardiin SFS-EN ISO 14403-2:2012. Uuden menetelmän määrittämissärajat olivat laajemmalla kuin vanhassa menetelmässä, joten se sopi KVVY Tutkimus Oy:n tarpeisiin paremmin. Tuloksia verrattiin aiemmin syänidin määrittämisessä käytetyn Lachat Instruments QuikChem 8000 -laitteistolla saatuihin tuloksiin.

Laboratoriossa on aiemmin analysoitu FIA-laitteistolla syänidinäytteistä vain kokonaissyänidi, joten sen validointia pidettiin tärkeimpänä. Suunnitelmasta poiketen validointi saatiin määrittämällä ainoastaan kokonaissyänidin osalta, sillä mittauksien alussa ilmenneet laiteongelmat ja laitehuolto viivästyttivät mittauksien etenemistä. Validoinnissa saatiin määrittämällä hyväksytysti menetelmän lineaarisuus, toteutamis- ja määrittämissärajat, sisäinen uusittavuus ja systemaattinen virhe, luotettavuus ja oikeellisuus sekä laajennettu mittausepävarmuus. Laitevalmistajan lupaama määrittämissäraja 1 µg/l ei kuitenkaan ollut käytännössä mahdollinen, sillä epävarmuus lasketulla määrittämissärajalla oli >60 %. Määrittämissärajaksi oli mittausepävarmuuden vuoksi otettava 2 µg/l, mikä oli kuitenkin KVVY Tutkimus Oy:n tarpeisiin riittävä. Luonnollisista näytteistä varsinkin jäte- ja prosessivedet voitiin todeta hankaliksi analysoida. Matriisin vaikutusta oli vaikea ennustaa, eikä syytä rinnakkaisuusvaihteluudelle löydetty.

Validoitu menetelmä voidaan ottaa käyttöön KVVY Tutkimus Oy:n puhtasvesilaboratoriossa kokonaissyänidin osalta. Menetelmää voitaisiin kehittää lisäämällä näytteenkäsittelyyn vaihe ketonien, aldehydien, nitrilien ja sulfiittien ilmaisemiselle näytteistä. Näiden tiedetään tiettyinä pitoisuuksina aiheuttavan häiriötä, mutta häiriöiden testaamiseen ei laitevalmistajan ohjeissa ole määritelty mitään menetelmää. Jatkossa menetelmä voidaan validoida myös vapaalle syänidille samoja validointimenettelyjä käyttäen.

Asiasanat: syanidi, SFA, segmentoitu virtausanalyysi, kokonaissyänidi, validointi

ABSTRACT

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

APILAINEN ANNI-ROSA:

Implementation and Method Validation for Determination of Total Cyanide

Bachelor's thesis 57 pages, appendices 9 pages

May 2022

The purpose of this thesis was to implement and validate a new method for the determination of total and free cyanide in various types of water. The thesis was carried out in the water department of KVVY Tutkimus Oy, and the aim was to use segmented flow analysis (SFA) to determine cyanide from samples of drinking water, surface water, leachate, and wastewater. The department had a method for the determination of total cyanide using flow injection analysis (FIA), but this method was considered laborious and time-consuming with an older analyzer. The new method using an SFA analyzer was intended to shorten the analysis time as well as increase occupational safety. The new method is based on the standard SFS-EN ISO 14403-2:2012.

The method could only be validated for total cyanide due to technical problems with the SFA analyzer. The validation was carried out successfully for the determination of the linearity, the limits of detection and quantification, internal reproducibility, systematic error, reliability, accuracy, and the expanded measurement of uncertainty. The limit of quantification promised by the manufacturer was not met, due to the uncertainty of the measurements. However, the limit of quantification accepted in the validation measurements was sufficient for the needs of KVVY Tutkimus Oy. The effect of the matrix especially from waste and process waters was difficult to predict and reason for the variability of parallel results was not always found.

The validated method can be used for the determination of total cyanide at KVVY Tutkimus Oy. Furthermore, pre-treatment for wastewater and process water samples could be developed to indicate uncommon interferences. It is known that sulfide, sulfite, nitrite, and carbonyl compounds can cause some interference, but the effect of these were not tested during the validation. In the future, the method could be validated for free cyanide according to the manufacturer's instructions using the same validation procedures.

Key words: cyanide, SFA, Segmented flow analysis, total cyanide, validation

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	7
2	SYANIDI	8
	2.1 Syanidiyhdisteet.....	9
	2.2 Ominaisuudet ja myrkyllisyys.....	9
3	SFA-ANALYSAATTORI.....	11
	3.1 Laitteisto ja periaate.....	11
	3.1.1 Näytteen syöttäjä.....	12
	3.1.2 Kemian moduuli.....	13
	3.1.3 Detektori.....	13
	3.2 Ominaisuuksia	14
	3.3 Kokonaissyänidin määrittäminen	15
	3.4 Näytematriisit ja matriisihäiriöt	16
4	VALIDOINTI.....	18
	4.1 Validointisuunnitelma	19
	4.2 Käsitteet ja määritelmät	19
	4.2.1 Spesifisyys ja selektiivisyys.....	20
	4.2.2 Mittausalue ja lineaarisuus.....	20
	4.2.3 Toteamis- ja määrittämissrajat.....	22
	4.2.4 Täsmällisyys.....	23
	4.2.5 Todenmukaisuus.....	24
	4.2.6 Mittausepävarmuus.....	25
	4.2.7 Saanto.....	27
5	KOKEELLINEN OSA	28
	5.1 SFA-analyysilaitteisto.....	28
	5.2 Menetelmä	29
	5.2.1 Näytteet.....	30
	5.2.2 Reagenssit	30
	5.2.3 Työturvallisuus	32
	5.3 Validointimittaukset.....	33
	5.3.1 Lineaarisuuden ja mittausalueen määrittäminen	33
	5.3.2 Toteamis- ja määrittämissrajan määrittäminen	33
	5.3.3 Sisäinen uusittavuus ja systemaattinen virhe.....	34
	5.3.4 Luotettavuus ja oikeellisuus	34
	5.3.5 Laajennettu mittausepävarmuus.....	34
6	TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU.....	36
	6.1 Menetelmän lineaarisuus.....	36

6.2 Menetelmän toteamis- ja määrittäysraja	38
6.3 Menetelmän sisäinen uusittavuus ja systemaattinen virhe	39
6.4 Menetelmän luotettavuus ja oikeellisuus	40
6.5 Menetelmän mittausepävarmuus.....	41
6.6 Laitteiden välinen vertailu	41
7 JOHTOPÄÄTÖKSET	43
LÄHTEET.....	46
LIITTEET.....	48
Liite 1. Reagenssit	48
Liite 2. Kontrolliliuosten valmistus.....	50
Liite 3. Lineaarisuuden tulokset	51
Liite 4. Määrittäys- ja toteamisrajan laskennan tulokset	52
Liite 5. Saantokokeiden tulokset.....	53
Liite 6. Kontrollinäytteiden mittaustulokset.....	54
Liite 7. Vertailunäytteen mittaustulokset	55
Liite 8. Mukit-ohjelman tulokset	56
Liite 9. SFA- ja FIA-laitteistolla mitatut tulokset.	57

LYHENTEET JA TERMIT

ASMD	Automaattinen näytteen sekoittaja / <i>Automatic sample mixing device</i>
CFA	Jatkuvan virtauksen analyysi / <i>Continuous flow analysis</i>
LOD	Toteamisraja / <i>Limit of Detection</i>
LOQ	Määrittysraja / <i>Limit of Quantitation</i>
Matriisi	Näytetausta, jossa ei ole analysoitavaa ainetta
Pohjaviiva	Lukema, jossa järjestelmän läpi virtaa vain reagenssia ja pesuliuosta
Reagenssi	Aine tai seos, jonka avulla toinen aine voidaan osoittaa, eristää tai määrittää
RSD	Suhteellinen keskihajonta / <i>Relative standard deviation</i>
SFA	Segmentoitu virtausanalyysi / <i>Segmented flow analysis</i>
Suotovesi	Neste, joka ottaa aineita materiaalista, jonka lävitse se kulkee
WAD	heikkoihin happoihin liukeneva / <i>weak acid dissociable</i>

1 JOHDANTO

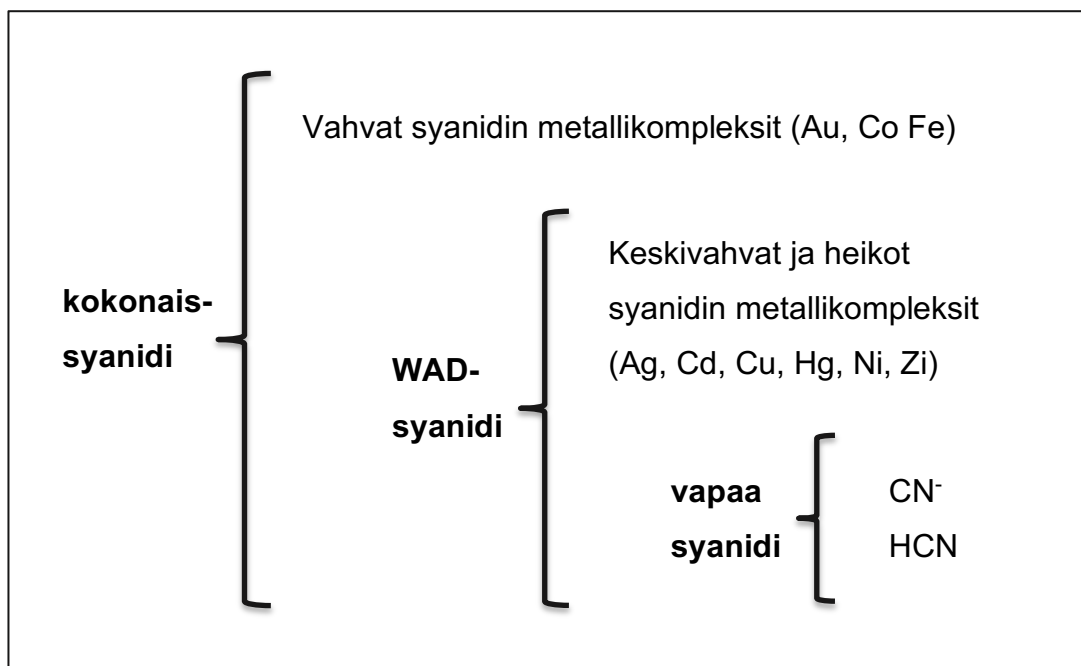
Opinnäytetyö tehtiin KVVY Tutkimus Oy:n puhdasvesianalytiikan osastolla. Työn tavoitteena oli ottaa käyttöön ja validoida kokonais- ja vapaan syanidin määrittämiseen tarkoitettu menetelmä erilaisille näytematriiseille. Uuden menetelmän oli määrä korvata käytössä oleva työläämpi ja epätarkempi menetelmä tarkemmalla, nopeammalla ja työturvallisemmalla menetelmällä.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli käyttää Skalar SFA-analysointilaitetta ja laitevalmistajan omaa menetelmäohjetta syanidin määrittämiseen pohja-, pinta-, talous-, suoto- ja jätevesistä. Laitevalmistajan menetelmä pohjautuu standardiin SFS-EN ISO 14403-2:2012 Tuloksia verrattiin aiemmin kokonaissyänidin määrittämisessä käytetyn Lachat Instruments QuikChem 8000 -laitteistolla saatuihin tuloksiin.

Talousvesiasetuksen (1352/2015) mukaan kokonaissyänidin hyväksyttävä enimmäismäärä on 50 µg/l. Asetuksen mukaan syanidi tulee tutkia talousvedestä vähintään viiden vuoden välein, mikäli pitoisuudet ovat alle 50 % enimmäisarvosta, eikä ilmeistä syytä niiden nousemiselle ole. KVVY Tutkimus Oy analysoi kokonaissyänidia myös luonnonvesistä, jätevesistä sekä erilaisista teollisuuden prosessivesistä mutta enemmistö näytteistä koostuu talousvesistä. Vapaan syanidin menetelmä on laboratoriolle uusi, eikä sitä ole vanhemmalla laitteella analysoitu.

2 SYANIDI

Puhuttaessa syanidista, viitataan yleensä yhteen kolmesta syanidin luokituksesta. Syanidit voidaan kuvio 1 mukaan jakaa kokonaissyanideihin, WAD-syanideihin (eng. weak acid dissociable), eli heikkoihin happoihin liukeneviin syanideihin, sekä vapaisiin syanideihin. Jokaisella näistä luokista on omat kemialliset ominaisuutensa ja myös niiden on omat analyysimenetelmänsä. On myös tärkeää ymmärtää näiden luokkien välistä suhdetta kun analysoidaan syanidiliuoksia. Kuvan 1 mukaan liuoksen kokonaissyanidipitoisuus on aina suurempi tai yhtä suuri kuin WAD-syanidin ja WAD-syanidin pitoisuus on aina suurempi tai yhtäsuuri kuin vapaan syanidin pitoisuus. (Akcil, Botz & Mudder. 2005, 6.)



KUVIO 1. Syanidiyhdisteiden yleiset luokitukset (Akcil, A. ym. 2005, muokattu.)

Vapaa syanidi, CN^- radikaali on pseudo-halogeneeni, eli sen kemia muistuttaa suuresti halogeeniatomin X kemiaa. Syanidia voi olla vesiliuoksissa vapaana syanidina (CN^-), sitoutuneen vetesyaniidina (HCN), ja anionisina syanidikomplekseina useiden metallien kanssa.

Vetysyanidin arvellaan olevan yksi pienistä molekyyleistä maapallon varhaisessa ilmakehässä, ja sillä oli tärkeä rooli monien biologisesti tärkeiden yhdisteiden muodostumisessa. Vetysyanidin vanhempi nimitys on preussihappo. (Housecroft & Sharpe. 2012 ,477; Baird, Eaton & Rice. 2017, 4500(1).)

2.1 Syanidiyhdisteet

Yleisesti syanidi esiintyy C_2N_2 -, HCN- ja CN- yhdisteinä. Vaikka C_2N_2 ja HCN ovat termodynaamisesti epästabiileja ovat ne ja CN kuitenkin analytiikassa vakiintuneita, sekä paljon tutkittuja. Syanidi esiintyy vedessä yleensä heikkona happona (HCN), jonka pKa on 9,2. Vesiliuoksissa, joiden pH on lähellä neutraalia, HCN on hallitsevampi muoto enemmän kuin vapaa CN^- . (Housecroft & Sharpe. 2012 ,477; Baird ym. 2017, 4500(1).)

Yksinkertaiset syanidisuolat (NaCN ja KCN) hajoavat kokonaan vedessä muodostaen anionisia syanidikomplekseja, ellei muita metallisia kationeja ole. Näiden kompleksien stabiilisuus vaihtelee suuresti ja termodynaamiset muodostumisvakiot vaihtelevat välillä $10^{41,5}$ ($Hg(CN)_4^{2-}$) ja $10^{16,7}$ ($Zn(CN)_4^{2-}$). Metallikompleksien stabiilisuus riippuu pääasiassa liuoksen pH:sta, sillä useimmat kompleksit hajoavat happoliuoksissa. Anionisin syanidikompleksi on raudan kanssa muodostuvat ferrosyanidi $[Fe(CN)_6^{4-}]$ - sekä ferrisyaniidikompleksiin $[Fe(CN)_6^{3-}]$ jotka muodostuvat kun vesiliuos sisältää ylimääräistä syanidia ja kaikki käytettävissä oleva rauta sitoutuu. (Manahan. 2010, 166; Baird ym. 2017, 4500(1).)

2.2 Ominaisuudet ja myrkyllisyys

Vetysyanidi (HCN) on väritön sekä helposti syttyvä neste ja sillä on tyypillinen tuoksu katkerista manteleista. Puhdas vetysyanidi neste polymeroituu huoneenlämmössä ilman stabilointiainetta (kuten H_3PO_4) ja voi tällöin räjähtää. Vetysyanidi valmistetaan pienessä mittakaavassa lisäämällä happoa natriumsyanidiin (NaCN). Monissa orgaanisissa synteeseissä on mukana vetysyanidia, ja sillä on-

kin suuri teollinen merkitys. Suuri osa vetysyanidista käytetään 1,4-disyanobutaanin (putreskiini) tuotantoon nailonin valmistuksessa syanoetyleenin eli akryylikuitujen tuotantoon. (Housecroft & Sharpe. 2012 ,477; Baird ym. 2017, 4500(1).)

Vetysyanidi on helposti haihtuva ja erittäin myrkyllinen ja sitä näiden ominaisuuksiensa vuoksi käytetty muun muassa kaasukammio teloituksissa Yhdysvalloissa. Syanidia on yleisesti käytetty teollisuudessa myös metallien puhdistuksessa sekä galvanoinnissa. Kaasutöissä ja koksiumunissa käytettynä se on myös yksi yleisimmistä kaasu- ja koksipasureiden jätevesien epäpuhtauksista. Syanidia käytetään myös tiettyjen mineraalien käsittelyssä ja useiden kalakuolemien tiedetään olevan seurausta näiden prosessivesien päästämisestä vesistöihin. (Manahan. 2010, 166.)

Vetysyanidi HCN on erittäin myrkyllinen vesiliöille; se muodostuu syanidipitoisissa liuoksissa, kun CN⁻-ioni reagoi veden kanssa hydrolyysireaktiossa. CN⁻-ioni on vähemmän myrkyllinen kuin HCN. Sillä ei yleensä ole merkitystä, koska suurin osa vapaasta syanidista esiintyy luonnonvesissä vetysyanidina. Tämä johtuu siitä, että useimpien luonnollisten vesien pH on huomattavasti alhaisempi kuin vetysyanidin pKa. Useimpien testattujen syanidikompleksien myrkyllisyys kaloille johtuu pääasiassa kompleksien hajoamisesta vetysyanidiksi. (Baird ym. 2017, 4500(2).)

Vetysyanidit sekä syanidisuolat, ovat molemmat nopeasti toimivia myrkkijä ja jo 60–90 mg annos riittää tappamaan ihmisen. Metabolisesti syanidi sitoutuu rauta (III)-ioniin rautaa sisältävään sytokromioksidaasiin, estäen entsyymissä raudan pelkistymistä rauta (II)-ioniksi oksidatiivisessa fosforylaatiossa. Tämä estää hapen käytön soluissa, minkä seurauksena metaboliset prosessit lakkaavat. (Manahan. 2010, 652; Jaszczak, Polkowska, Narkowicz & Namieśnik. 2017, 10.)

3 SFA-ANALYSAATTORI

Segmentoitu virtausanalyysi (SFA) on menetelmä, joka automatisoi suuren määrän märkäkemiallisia analyysyjä. SFA-analysaattoria voidaan pitää niin sanottuna liukuhihnajärjestelmänä, jossa reagenssit lisätään suoraa tuotantolinjalla. Analyysaattorin erilaiset sovellukset on kehitetty kopioimaan manuaalisia menettelyjä mahdollisimman tarkasti. SFA:ta sovellettiin ensin natriumin ja kaliumin analysointiin ihmisen veriseerumista. Detektorina käytettiin liekkifotometriä ja häiritsevät proteiinit poistettiin selektiivisesti huokoisen kalvon (dialyzer) avulla. (Baird ym. 2017, 4120(1).)

3.1 Laitteisto ja periaate

Yksinkertainen järjestelmä sisältää neljä peruskomponenttia: näytteensyöttäjän, nesteenkuljetuslaitteen, kuten peristaattisen pumpun, analyysiyksikön, jossa ke-mia tapahtuu, ja detektorin analyysin kvantifioimiseksi. Yleensä järjestelmässä käytetään automaattista näytteensyöttäjää. Näytteensyöttäjän varsi liikuttaa näyteneulaa näytekupin ja pesuastian välillä, joka sisältää näytematriisia mahdollisimman hyvin vastaavan ja tutkittavaa ainetta sisältävän liuoksen. Pesuliuos pumpataan jatkuvasti säiliön läpi ristikontaminaation poistamiseksi. Näyte pumpataan analyysiyksikköön erillisenä segmenttinä, joka on erotettu pesuliuoksesta ilmakuplilla. Ilmakupla syntyy näytteenottajan käsivarren matkan aikana pesualtaasta näytekuppiin ja takaisin. (Baird ym. 2017, 4120: 2.)

Analyysiyksikössä järjestelmä lisää näytteen reagenssiin ja tuo oikeassa suhteessa identtiset ilmakuplat reagenssi- ja näytevirtaan. Vaihtoehtoisesti ilma voidaan korvata jollain toisella kaasulla tai höyrystymättömällä nesteellä. Tämän jälkeen analysaattori suhteuttaa tutkittavan näytteen useisiin analyysisegmentteihin näytteenottoajan, pesuajan ja segmentointitiheyden mukaan. Sekoituskäämi tehostaa sekoittamista pyörittämällä liuosta painovoimaa hyödyntäen.

Kemialliset reaktiot, liuottimien erottelu, katalyyttinen reaktio, laimennus, tislauksen sekä kuumennus tapahtuvat analyysiyksikön asianmukaisissa osissa segmentoidun virran virratessa detektorin kohti. (Gomesa, Barretob, Carvalhoa, Pinheiroa, de Limaa, Silvaa, Filhoc & Fernandes. 2015. 902–903; Baird ym. 2017, 4120: 2.)

Koska kaasukuplat ovat kokoonpuristuvia, erittäin heijastavia ja johtavat huonosti sähköä, ne vääristävät voimakkaasti detektorin signaalia, joten monet järjestelmät poistavat kuplat ennen optista valopolkua. Jos järjestelmä kuitenkin poistaa kuplat missä tahansa järjestelmän vaiheessa, voivat eriytetyt nesteet olla vuorovaikutuksessa ja yhdistyä. Tämä voi aiheuttaa ristiin kontaminoitumista sekä hidastaa vauhtia, jolla näytteet analysoidaan. Reaaliaikaiset analogiset tai digitaaliset tietojen rekonstruktio-tekniikat, joita kutsutaan käyrän regeneraatioksi, voivat poistaa virtaussolujen kuplanpoistolaitteiden vaikutuksen muihin järjestelmän jaokkeettomiin osiin. (Baird ym. 2017, 4120: 2.)

On olemassa myös vaihtoehtoinen tekniikka, joka ei poista kuplia, vaan käyttää analogista tai digitaalista käsittelyä kuplien aiheuttaman vääristymän poistamiseksi. Kyseinen tekniikka vaatii kuitenkin riittävän nopean detektorin vasteajan ja edellyttää, että läpivirtauskyvetin tilavuus on pienempi kuin yksittäisen neste-segmentin tilavuus. (Baird ym. 2017, 4120: 2.)

3.1.1 Näytteensyöttäjä

Automaattisen näytteensyöttäjän avulla voidaan analysoida suuria näytemääriä ilman käyttäjän valvontaa. Näytteensyöttäjä voidaan ohjelmoida analyysistä ja asiakkaan tarpeista riippuen suorittamaan automaattisesti esimerkiksi käynnistyksen ja sammutuksen, standardien valmistuksen kantaliuoksesta sekä esi- ja jälkilaimennosajoja näytteistä. Näytteensyöttäjään kuuluu sisäänrakennettu huuhtelupumppu, näyteneula ja jopa 140 näytepaikkaa. (Skalar. 2008, 4; Skalar Analytical B.V. 2022.)

Näytteensyöttäjään voidaan yhdistää automaattinen näytteen sekoittaja (ASMD). ASMD on suunniteltu erityisesti sameiden näytteiden tai automaattisesti laimennettujen näytteiden nopeaan ja jatkuvaan sekoittamiseen näytteenoton aikana. ASMD:n ilmansyöttöyksikkö kehittää ilmanpainetaajuuden, joka johdetaan erityiseen kaksoisnäyteneulaan. Tämä taajuus mahdollistaa nestevirran nopean edestakaisen liikkeen sekoitusneulan päässä, kun taas näyteneula ottaa näytteen samanaikaisesti. Ilmansyöttöyksikön painetta voidaan säätää potentiometrillä. (Skalar. n.d. Automatic sample mixing device, 1:1.)

3.1.2 Kemian moduuli

Analysaattorin suoritusteho riippuu sovelluksesta ja voi vaihdella 25:stä 120 analyysiin tunnissa. Nopeussäädettävä pumppu vetää näytteenottimesta tulevat näytteet ja säiliöiden reagenssit kemian yksikköön. Sisäänrakennettu ilmainjektori säätää näytteiden ilmasegmentoinnin. Synkronoitu 10-kanavainen ilmainjektio ja erillinen sisäänrakennettu kompressori takaavat stabiilin virtauksen sekä nopean käynnistyksen. Kemian moduulissa tarvittavat reagenssit sekoittuvat näytteisiin, josta ne kulkeutuvat sisäänrakennetulle detektorille. (Skalar 2021, 1:3–4; Skalar Analytical B.V. 2022.)

Kemian moduuliin voidaan sisällyttää erilaisia reaktioseoksen automaattisia käsittelyjä, kuten UV-hajotus, hydrolyysi, tislauk, ioninvaihto, lämmitys ja jäähditys. Tislausyksikkö on integroitu erilliseen takapaneeliin ja erilaiset reaktorit sijaitsevat kansilevyn alla. Kemianmoduulista löytyvät myös vuotoilmaisimet, jotka on sijoitettu moduulin pohjalle. Kun vuoto havaitaan, koko järjestelmä sammuu automaattisesti. (Skalar 2021, 1:3–4.)

3.1.3 Detektori

Tyypillinen SFA-detektori on spektrofotometri, joka mittaa näytteen värikehitystä tietyllä aallonpituudella. Korkean resoluution digitaaliset fotometriset detektorit on integroitu kemian yksikköön helppopääsyiseen erilliseen osioon. Jokainen detek-

tori koostuu optisesta tunnistuspäästä, jossa on enintään kaksi suodatinta ja virtaussolua. Detektori pystyy tällöin käsittelemään sekä segmentoitua, että segmentoimatonta näytevirtaa. Korkean resoluution detektori johtaa optimaaliseen signaalin ja melun väliseen suhteeseen, joka takaa alemmat havaitsemisrajat ja laajemman dynaamisen alueen. (Skalar. 2008, 5; Baird ym. 2017, 4120: 2.)

3.2 Ominaisuuksia

Segmentoidun virtauksen etuja manuaaliseen menetelmään verrattuna ovat näytteen ja reagenssin kulutuksen vähentäminen, toistettavuuden parantaminen sekä käyttäjän kemikaaliturvallisempi työskentely. Tyypillinen SFA-järjestelmä voi analysoida 30–120 näytettä tunnissa. Uusittavuutta parantavat järjestelmän tarkka ajoitus ja toistettavuus. Tällöin kemiallisten reaktioiden ei tarvitse tapahtua täydellisesti loppuun saakka. (Baird ym. 2017, 4120(1).)

Manuaalisten näyte- ja liuosmanipulaatioiden pienempi määrän vähentää työvoimakustannuksia, parantaa työturvallisuutta ja analyttistä tarkkuutta. Monimutkaisia kemiallisia reaktioita, joissa käytetään vaarallisia kemikaaleja, voidaan SFA:n avulla suorittaa suljetussa järjestelmässä ja epävakaat reagenssit voidaan valmistaa analyysin aikana. SFA-analysointori käyttää pienempiä määriä reagenssia ja näytteitä kuin manuaaliset menetelmät, mikä tuottaa vähemmän kemikaalijätettä ja tällöin vähentää myös jättekustannuksia. (Baird ym. 2017, 4120(1).)

SFA ei rajoitu vain yksivaiheisiin kolorimetrisiin määrittämiin. Segmentoituihin virtaustekniikoihin kuuluvat usein myös liuosten sekoittaminen, laimentaminen, tislauksen, dialyysin, liuottimen uuttaminen ja/tai katalyyttinen muuntaminen. Ammoniakkin, fluoridin, syanidin, fenolien ja muiden haihtuvien yhdisteiden määrittämisessä voidaan käyttää linjalla tapahtuvia tislauksimenetelmiä. Dialyysikalvoja käytetään poistamaan häiriöitä, kuten näytematriisissa esiintyviä proteiineja ja väriä. SFA soveltuu hyvin myös automatisoituihin neste/neste uuttoihin, kuten MBAS:n eli pinta-aktiivisen aineen määrittämiseen. Pakattuja ioninvaihtopylväitä voidaan käyttää häiriöiden poistamiseen ja havaitsemisen herkkyyden ja selektiivisyyden parantamiseen. (Baird ym. 2017, 4120(1).)

3.3 Kokonaissyänidin määrittäminen

Automatisoitu SFA menetelmä kokonaissyänidin määrittämiseksi perustuu seuraavaan reaktioon; kompleksiset syanidiyhdisteet hajotetaan UV-säteilyllä 3,8 pH:ssa. UV-yksikön sisällä oleva borosilikaattikierre suodattaa alle 290nm:n aallonpituudet, mikä estää tiosyanaatin hajoamisen syanidiksi. Vapautunut syanidi erotellaan tislauksyksikössä 125°C pH:n ollessa 3,8. Tislattu syanidi reagoi kloramiini-T:n kanssa muodostaen syanogeenikloridia, joka reagoi edelleen pyridiini-4-karboksyylihapon ja 1,3-dimetyylibarbituurihapon kanssa muodostaen violetin värin. Värillisen yhdisteen absorbanssi mitataan detektorilla 600 nm:ssä. (SFS-EN ISO 14403-2. 2012, 3.)

Kokonaissyänidin määrittäminen SFA-laitteistolla on tarkemmin havainnointi kuviossa 2, jossa näkyvät näytteen ja reagenssien kulku laitteistossa aina näytteensyöttäjältä detektorille ja sieltä jäteastiaan. Kuviossa näytteiden ja reagenssien kulkusuunta on merkattu nuolella. Kuvasta löytyvät myös eri liuosten virtausnopeudet ml/min.

VIRTAUS DIAGRAMMI

kokonaissyanidi

1–100 µg CN/l

värjäysreagenssi

kloramiini-T liuos

ilma

puskuriliuos

näyte

NaOH (0,1M)

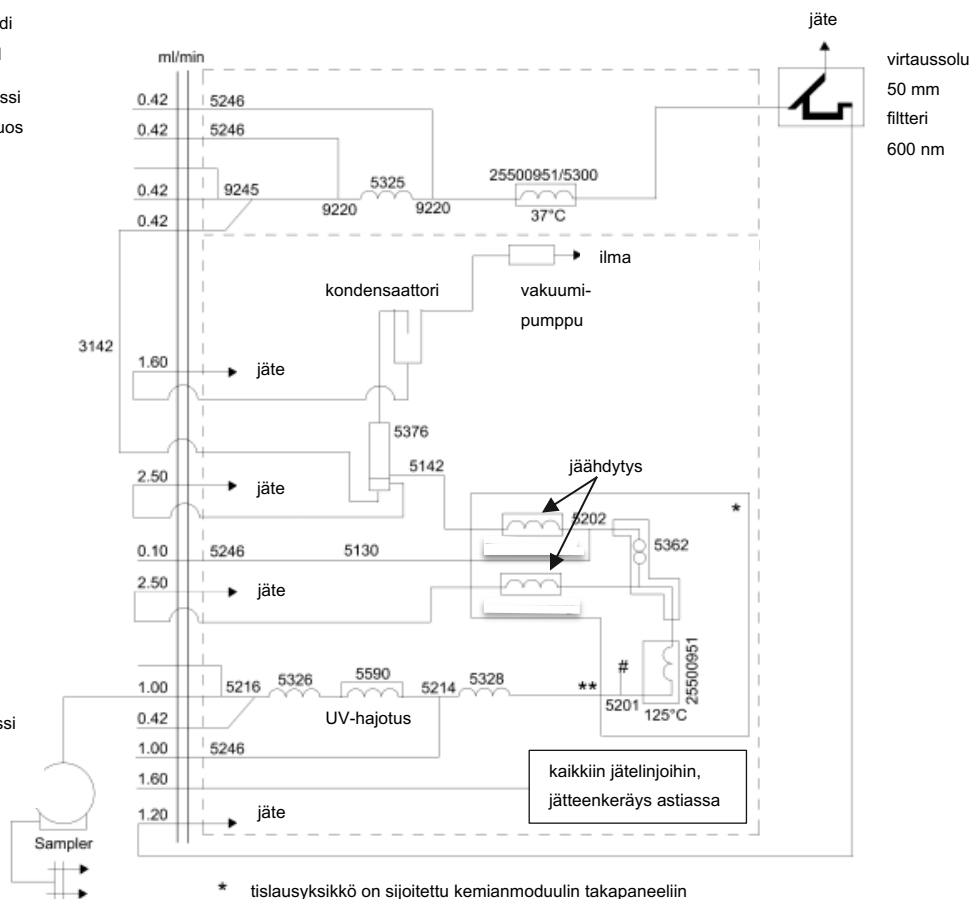
ilma

näyte

tislusreagenssi

tislattu vesi

NaOH (1M)



KUVIO 2. SFA-laitteiston virtauskaavio kokonaissyanidin määrittämiselle (Skalar methods. n.d.,12, muokattu.).

3.4 Näytematriisit ja matriisihäiriöt

Syanidi voidaan määrittää erityyppisistä vesissä, kuten pohjavedestä, juomavedestä, pintavedestä, suotovedestä ja jätevedestä. Näiden näytetyyppien syanidipitoisuus on yleensä 2 µg/l–500 µg/l ilmaistuna syanidi-ioneina laimentamattomassa näytteessä. Käyttöaluetta voidaan muokata esimerkiksi laimentamalla alkuperäistä näytettä tai muuttamalla virtaussolun reitin pituutta. Merivesi voidaan analysoida muuttamalla laitteen herkkyyttä muutoksilla sekä muuntamalla reagenssit ja kalibrointiliuokset vastaamaan näytteiden suolapitoisuutta. (SFS-EN ISO 14403-2. 2012, 1.)

Kiintoainetta sisältävien näytteiden hiukkaset voivat näytevirrassa tukkia letkun, jolloin näyte ei pääse kokonaan kulkemaan UV-yksikköön. Tämä voidaan välttää

homogenisoimalla, eli sekoittamalla näyte mahdollisimman hyvin ennen analysointia. Hiukkaset, joiden halkaisija on suurempi kuin 0,1 mm on kuitenkin poistettava suodattamalla. Näytteessä mahdollisesti olevat suolat voivat aiheuttaa tislauksierukan tukkeutumisen, joten matriisihäiriöiden välttämiseksi enemmän kuin 10 g/l suolaa sisältävät näytteet tulee laimentaa. (SFS-EN ISO 14403-2. 2012, 2–3.)

Hapettavat aineet kuten kloridi häiritsevät määrittystä, sillä ne hajottavat suurimman osan syanideista. Myös sulfidit häiritsevät määrittelyn värinmuodostusta, sulfidipitoisuuden ollessa yli 100 mg/l. Muita mahdollisesti häiritseviä yhdistettä ovat aldehydit, ketonit ja nitriitit pitoisuuden ollessa yli 5 mg/l sekä sulfiitti pitoisuuden ollessa yli 1 mg/l. Tiosyanaatti voi hieman häiritä määrittystä ja johtaa positiiviseen harhaan. Merkittäviä häiriöitä voi syntyä syanidi epäpuhtauksista tiosyanaatissa tai epätäydellisen tislauksen seurauksena. (SFS-EN ISO 14403-2. 2012, 2–3.)

4 VALIDOINTI

Validoinnilla tarkoitetaan analyysimenetelmän luotettavuuden ja pätevyyden testaamista. Validoinnilla arvioidaan menetelmän sekä laitteen soveltuvuutta ja suorituskäytettä tiettyyn tarkoitukseen. Validoinnilla saadaan tietoa siitä, millä tarkkuudella ja luotettavuudella määrittäminen voidaan suorittaa. Voidaan sanoa, että validointi on laadun osoittamista. Analyttisessä kemiassa validointi kohdistuu kaikkiin menetelmän vaiheisiin. Tämä tarkoittaa sitä, että validointi pätee vain testatulle laitteelle, pitoisuusalueelle ja näytematriisille. (Mäkinen, Suortti, Saares, Niemi & Marjanen. 1996. 6; Hägg. 2016, 7.)

Validoinnin vaatimukset asetetaan yleensä tapauskohtaisesti ja ne vaihtelevat menetelmän mukaan. Validoinnissa on myös otettava huomioon se, kenelle validointia tehdään. Tämän vuoksi testitulosten tulee täyttää asiakkaan tai laboratorion sille asettamat vaatimukset. Joissakin tapauksissa, kuten esim. elintarvikkeisiin liittyvissä määrittämisissä, tulee huomioida myös viranomaisvaatimukset. Validoinnin laajuus riippuu kuitenkin pitkälti analyysimenetelmästä sekä sen käyttötarkoituksesta. Yleensä validoinnin kohteena on jo valmiiksi kehitetty menetelmä (Ehder. 2005, 25; Hägg. 2016, 9–10, 14.)

Kokonaisuudessaan validointi koostuu suunnitelmasta, kokeellisesta osasta, tulosten tilastollisesta arvioinnista sekä dokumentoinnista. Validointimittaukset tulee tehdä aina kalibroidulle laitteelle ja mittaajan on tutustuttava menetelmään perusteellisesti. Ympäristövaikutuksien huomioimiseksi mittaukset suoritetaan yleensä pitkällä aikavälillä. Yhdellä koejärjestelyllä pystytään kuitenkin määrittämään useita validointiparametreja. Kvantitatiivisessa analytiikassa vähintään toistettavuus, lineaarisuus, spesifisyys ja määrittämiss raja voidaan yhdistää yhteen koesuoritukseen. (Mäkinen ym. 1996, 6.)

Menetelmän validoinnin katsotaan yleensä olevan hyvin tiiviisti sidoksissa menetelmän kehittämiseen, sillä monet menetelmän validointiin liittyvät mittausten menetelmän suorituskäytettä ilmaisevat parametrit arvioidaan yleensä osana menetelmän kehittämistä. On kuitenkin tärkeää muistaa, että menetelmän lopullinen versio validoidaan virallisesti. (Magnusson & Örnemark. 2004, 6.)

4.1 Validointisuunnitelma

Validointisuunnitelmassa määritellään yleensä validoinnin tarkoitus, validoinnin kohteena oleva laitteisto sekä mitattavat ominaisuudet ja koesarjat. Suunnitelmassa kerrotaan minkä vuoksi ja minkä tasoinen validointi ollaan tekemässä. Validointimittaukset tehdään aina kalibroidulla laitteella ja mittaajan tulee olla perehtynyt laitteen käyttöön ennen validointimittausten aloitusta. Tyypillisesti laboratorion sisäisellä validoinnilla tarkistetaan menetelmän kelpoisuutta laboratorion käyttöolosuhteissa, omilla näytteillä, työntekijöillä ja sertifioiduilla vertailunäytteillä suoritettuna. (Mäkinen ym. 1996, 6–7; Virtanen & Väntsi 2021, 1.)

Menetelmän validointiaste riippuu menetelmän käyttötarkoituksesta sekä käytetystä analyysitekniikasta. (Mäkinen ym. 1996, 7) Validointi on suoritettava mittausmenetelmälle silloin, kun on tarpeellista varmistaa tietyn analyttisen ongelman ratkaisussa käytettävien suoritusparametrien riittävyys. Näin menetellään muun muassa silloin kun jo käytössä olevaa menetelmää parannellaan tai laajennetaan uusiin tutkimusalueisiin, kehitetään kokonaan uutta menetelmää, otetaan käyttöön jo validoitu menetelmä uudessa laboratoriossa tai uudella laitteella sekä eri menetelmien yhtäpitävyyden vertailussa. Validoinnin suorituksen laajuus riippuu siitä, minkälaisia muutoksia mittausmenetelmään tehdään. (Hiltunen, Linko, Hemminki, Hägg, Järvenpää, Saarinen, Simonen & Kärhä. 2011, 26.)

4.2 Käsitteet ja määritelmät

Validoitavan menetelmän käyttöalueesta ja tutkittavista näytteistä riippuen määritellään sellaiset ominaisuudet, jotka ovat tulosten luotettavuuden kannalta välttämättömiä. Uutta menetelmää kehittäessä tulee menetelmä validoida täydellisesti, kun taas esimerkiksi standardimenetelmän käyttöönotossa riittää suppeampi validointi. Standardimenetelmää validoitaessa voidaan olettaa, että esimerkiksi selektiivisyys ja spesifisyys on määritelty jo standardisoinnin yhteydessä. Tällöin riittää, että yleisimmät ominaisuudet, kuten määrittämysraja, toistettavuus sekä tarkkuus tulee määritettyä. (Mäkinen ym. 1996, 6–8; Hiltunen ym. 2011, 26–27.)

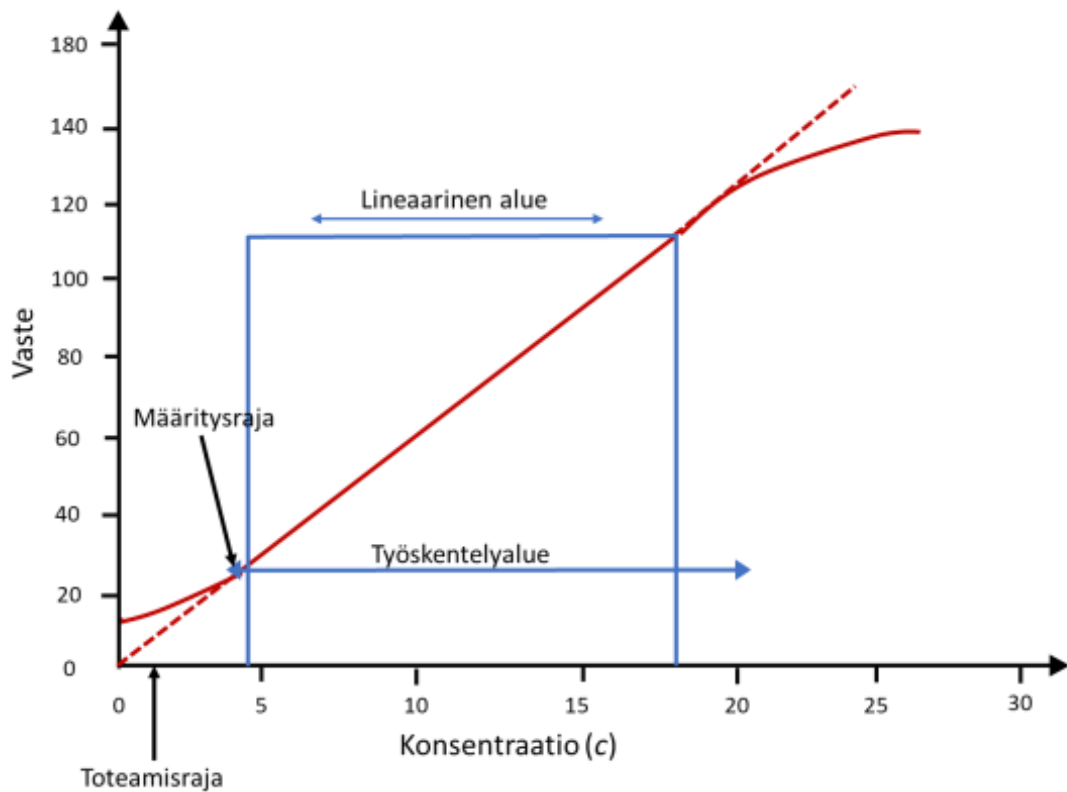
4.2.1 Spesifisyys ja selektiivisyys

Menetelmää voidaan pitää spesifisenä, kun se tuottaa vasteen tai signaalin ainoastaan yhdelle analyyttille. Menetelmän selektiivisyydellä tarkoitetaan menetelmän kykyä erottaa tutkittava analyytti mahdollisista muista vasteen tuottavista komponenteista huolimatta. Menetelmä on analysoitavalle aineelle spesifinen, mikäli se todetaan täysin selektiiviseksi. Analyysissä spesifisyyteen ja selektiivisyyteen vaikuttavat yleensä käytetty analyysitekniikka ja -menetelmä sekä näytteenkäsittely. (Mäkinen ym. 1996, 9; Hiltunen ym. 2011, 11.)

Spesifisyyskokeiden avulla voidaan varmistua siitä, että mittalaitteen antama vaste muodostuu vain yhdestä analyytistä. Spesifisyyskokeilla voidaan selvittää erilaisten taustatekijöiden mahdollisesti aiheuttamaa virhettä. Analyysissä tuntemattoman yhdisteen piikki voi esimerkiksi osua päällekkäin tutkittavan aineen kanssa, jolloin sitä on vaikeampi tunnistaa. Näytematriisi voi myös vaikuttaa analyysin antamaan signaaliin vahvistamalla tai heikentämällä sitä, joten mittauksia tulee tehdä erilaisilla matriiseilla. Menetelmää voidaan myös verrata muihin selektiivisyydeltään tunnettuihin menetelmiin tai analysoida tunnettua vertailuainetta. (Mäkinen ym. 1996, 10–15; Hiltunen ym. 2011, 11.)

4.2.2 Mittausalue ja lineaarisuus

Kvantitatiivisissa menetelmissä mittausalueella tarkoitetaan tutkittavan analyysin pitoisuusaluetta, jossa menetelmää voidaan käyttää tietyt epävarmuusehdot huomioon ottaen. Mittausalueen alarajana ei toimi analyysilaitteen ilmaisuraja, vaan se alkaa toteamis- tai määrittämissä rajoista ja rajoittuu laitteen kykyyn havainnoida analyysin pitoisuuden muutoksia (kuviot 3). Joskus mittausalue voi sisältää useampia lineaarisuusalueita, jolloin voidaan käyttää eri kalibrointisuoria tai sen sovitusta eri pitoisuusalueilla. Kalibrointisuoran sovituksista yleisimpiä ovat ensimmäisen asteen ja toisen asteen yhtälön suorat. Suoran sovitus valitaan sen mukaan, mikä yhtälö soveltuu parhaiten tutkittavaan pistejoukkoon. (Mäkinen ym. 1996, 16–17; Hiltunen ym. 2011, 11.)



KUVIO 3. Menetelmän lineaarinen alue, työskentelyalue sekä toteamis- ja määritysrajat (Ehder 2005, 7, muokattu.)

Menetelmän lineaarisuudella tarkoitetaan menetelmän kykyä tuottaa ennalta määritelty, hyväksyttävä lineaarinen korrelaatio tulosten ja tutkittavan aineen pitoisuuden välillä. Yleensä menetelmän lineaarinen alue on määritysaluea pienempi. Lineaarisuutta voidaan arvioida kalibrointisuoran tuloksista pienimmän neliösumman menetelmää käyttäen, eli laaditaan tuloksista regressioanalyysi. Regressioanalyysin avulla voidaan määrittää suoralle korrelaatiokerroin r , joka kertoo kuinka paljon suoran yhtälössä y :n muutoksesta x :n funktiona, selittyy tuloksista lasketulla lineaarisella mallilla. Jos selitysaste r^2 arvo lähenee yhtä, on muuttujien välillä selkeä yhteys. (Mäkinen ym. 1996, 17; Hiltunen ym. 2011, 12–13.)

Lineaarisuuden arviointiin usein käytetty tapa on residuaalien tarkasteleminen. Residuaalit ovat mitattujen y :n arvojen ja regressiosuoran avulla laskettujen y :n arvojen erotuksia kullekin x :n arvolle. Residuaaleista piirretään kuvaaja x :n funktiona, jota tarkastelemalla voidaan arvioida lineaarisen mallin soveltuvuutta. Jos residuaalit ovat jakautuneet tasaisesti nolliatason molemmiin puoliin, on kalibrointisuora lineaarinen. Mikäli kuvaajan pisteet muodostavat selkeän käyrän, tulisi

suoran sovituksessa käyttää toisen asteen yhtälöä, pienentää tutkittavaa pituusaluetta tai kokeilla vasteen korvaamista logaritmisella asteikolla. (Mäkinen ym. 1996, 18; Magnusson & Örnemark 2014, 29.)

4.2.3 Toteamis- ja määrittysrajat

Pieniä pituisuuksia määritettäessä on tiedettävä, milloin menetelmällä pystytään havaitsemaan haluttua komponenttia. Menetelmän toteamisrajasta (LOD) puhutaan silloin, kun määritettävä komponentti voidaan luotettavasti todeta ja jonka vaste eroaa merkittävästi nollanäytteen arvosta. Toteamisrajan määrittäminen perustuu taustan aiheuttaman häiriön tutkimiseen. Toteamisrajan tulee siis olla tarpeeksi suuri, ettei analyysin antaman vasteen voida katsoa johtuvan taustan aiheuttamasta satunnaisvaihtelusta. (Hiltunen ym. 2011, 13; Magnusson & Örnemark. 2014, 20–21.)

Tavallisesti toteamisraja määritettäessä lasketaan keskihajonta sekä keskiarvo nollanäytteiden rinnakkaismäärittysten tuloksista. Luotettavan validoinnin kannalta tulisi määrittää vähintään 10 rinnakkaismäärittystä. Edellä mainittujen arvojen avulla toteamisraja lasketaan kaavaa 1 käyttäen, jossa \bar{x}_0 nollanäytteen vasteiden keskiarvo ja s_0 nollanäytteiden vasteiden keskihajonta. (Hiltunen ym. 2011, 13; Magnusson & Örnemark. 2014, 21–24.)

$$\text{LOD} = \bar{x}_0 + 3 \cdot s_0 \quad (1)$$

Mikäli nollanäytteille ei saada riittävää vastetta, voidaan toteamisraja laskea myös regressiosuoran avulla. Kaavassa 2 on esitetty regressiosuoran avulla laskettu toteamisraja (LOD), jossa s_0 kuvaa analysoidun regressiosuoran leikkauskohdan keskihajontaa ja b_1 kuvaa regressiosuoran kulmakerrointa. (Magnusson & Örnemark 2014, 25; ISO 11843-2 2000, 6–10.)

$$\text{LOD} = \frac{3s_0}{b_1} \quad (2)$$

Toteamisrajan ja määritysrajan väliin jää niin sanottu harmaa alue, jolla analyytin kvantitointi sisältää huomattavan epävarmuuden, mutta se voidaan kuitenkin todeta luotettavasti. Määritysrajalla (LOQ) tarkoitetaan tällöin tutkittavan analyytin pienintä pitoisuutta, joka voidaan määrittää näytteestä hyväksyttävällä tarkkuudella. Määritysrajan voidaan yleensä katsoa olevan sama, kuin pienin pitoisuus standardisuoralla. On kuitenkin huomioitava, että oikeellisuus ja toistettavuus pysyvät halutuissa rajoissa. ($\leq 20\%$). (Hiltunen ym. 2011, 13; Hägg. 2016. 20, 26.)

Useimmiten määritysrajojen katsotaan olevan 5, 6 tai 10 kertaa nollanäytteen keskihajonta riippuen validointimenetelmästä. Mittaustulosten luotettavuutta voidaan arvioida suhteellisen keskihajonnan (RSD) avulla, jonka tulisi validointimitauksissa olla korkeintaan 10 %, kun käytetään kerrointa 10. Määritysraja voidaan edellä mainittua kerrointa apuna käyttäen laskea kaavalla 3, jossa \bar{x}_0 nollanäytteen vasteiden keskiarvo ja s_0 nollanäytteiden vasteiden keskihajonta. (Hiltunen ym. 2011, 13; Magnusson & Örnemark 2014, 24–25.)

$$\text{LOQ} = \bar{x}_0 + 10 \cdot s_0 \quad (3)$$

4.2.4 Täsmällisyys

Tulosten täsmällisyydellä kuvataan niiden yhtäpitävyyttä keskenään, kun määrittystä toistetaan useita kertoja. Täsmällisyys liittyy tulosten väliseen hajontaan, jota voidaan yleisesti arvioida keskihajonnan avulla. Puhuttaessa täsmällisyydestä, voidaan käyttää myös termejä toistotarkkuus ja täsmävyys. Yleensä täsmällisyys erotetaan kahteen sitä mittaavaan käsitteeseen, toistettavuus ja uusittavuus. (Mäkinen 1996, 40.)

Toistettavuudella kuvataan mittaustulosten yhtäpitävyyttä, kun määrittys tehdään lyhyellä aikavälillä toistettavissa olosuhteissa. Toistettavuutta voidaan mitata tekemällä useita rinnakkaismäärittäyksiä erilaisilla näytteillä ja pitoisuuksilla niin, että mittauksissa tekijä, laite, reagenssit, lämpötila ja muut olosuhteet ovat mahdollisimman yhtäläiset. Laadukkaissa mittauksissa näytesarjojen sisäisen vaihtelun tulisi olla näytesarjojen välistä vaihtelua pienempää. (Hiltunen ym. 2011, 19–20.)

Toistettavuutta voidaan kuvata mittaustulosten suhteellisen keskihajonnan (RSD) avulla. Yleensä suhteellinen keskihajonta ilmoitetaan prosentteina ja se saadaan laskettua kaavalla 4, jossa s kuvaa mittaustulosten keskihajontaa ja \bar{x} tulosten keskiarvoa. Suhteellisesta keskihajonnasta voidaan nähdä käytettävän myös termiä CV (eng. coefficient of variation). (Ellison & Williams 2012, 100, 54.)

$$RSD = CV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (4)$$

Menetelmän uusittavuutta voidaan tutkia, kun mittaukset tehdään samalla menetelmällä eri laboratoriossa, eri laitteella ja eri tekijän toimesta. Uusittavuusmittauksissa tulosten vaihtelu on yleensä suurempaa kuin toistettavuutta mitattaessa. Uusittavuutta tutkitaan tavallisesti laboratorioden välisissä vertailukokeissa varsinkin standardisoinnin yhteydessä. Laboratorion sisäisestä uusittavuudesta puhutaan silloin, kun samassa laboratoriossa tehdään samasta näytteestä useita määryksiä pitkällä aikavälillä. Tällöin esimerkiksi määryksen tekijä voi vaihtua mutta analyysilaitte on sama. (Mäkinen 1996, 40; Hiltunen ym. 2011, 20.)

Validoinnissa on otettava huomioon käytettävien kontrollinäytteiden ja analyysissä käytettävien luonnonnäytteiden mahdolliset näytematriisien eroavaisuudet. Tällöin laboratorion sisäinen uusittavuus $u(Rw)$ voidaan laskea kaavalla 5, jossa s_{RW} kuvaa kontrollinäytteestä tehtyjen toistomittausten keskihajontaa ja s_r luonnonnäytteistä tehtyjen toistomittausten keskihajontaa. (Nordtest 2017, 15–18.)

$$u(Rw) = \sqrt{s_{RW}^2 + s_r^2} \quad (5)$$

4.2.5 Todenmukaisuus

Mittausten todenmukaisuutta voidaan ilmaista poikkeaman (bias), eli systemaattisen virheen avulla. Poikkeama määritetään yleensä vertaamalla mittaustuloksia tunnetusta vertailumateriaalista saatuun viitearvoon, suorittamalla saantokokeita tai toisen tunnetun määrittämenetelmän avulla. Mittauksen todenmukaisuutta voidaan tutkia myös laboratorioden välisin vertailumittauksin. Validoinnissa käy-

tettävän vertailumateriaalin tulisi olla sertifioitu ja vastata matriisipohjaltaan mahdollisimman hyvin tutkittavaa näytettä. Joissain tapauksissa voidaan käyttää myös itse tehtyä vertailumateriaaleja, kun käytössä on puhtaita sertifioituja aineita. (Hiltunen ym. 2011, 18; Magnusson & Örnemark 2014, 31, 33.)

Poikkeama voidaan laskea kaavalla 6, jossa \bar{x} kuvaa mittaustulosten keskiarvoa ja μ mitattujen suureiden todellista arvoa. Poikkeaman määrittävistä riippuen μ :n arvoksi valitaan vertailumateriaalin todellinen arvo, saantoliuoksen oletettu arvo tai jo validoidulla menetelmällä saatu tulos, johon uutta menetelmää verrataan. Kaavassa 6 on käytetty poikkeaman ilmoittamiseen prosenttiosuutta, mutta se voidaan vaihtoehtoisesti ilmoittaa myös absoluuttisena arvona. (Hiltunen ym. 2011, 19–20; Magnusson & Örnemark 2014, 31.)

$$bias = \frac{|\mu - \bar{x}|}{\mu} \cdot 100\% \quad (6)$$

Menetelmän ja laboratorion kokonaispoikkeamaa $u(bias)$ arvioitaessa otetaan huomioon myös määrittäykseen liittyvä epävarmuus, kuten saatujen tulosten keskihajonta, vertailuarvoon liittyvä epävarmuus sekä mittausten lukumäärä. Kokonaispoikkeama $u(bias)$ voidaan laskea kaavalla 7, jossa $bias$ on kaavalla 6 määritetty mittaustulosten prosentuaalinen poikkeama, n mittausten lukumäärä ja $u(c_{ref})$ vertailuarvoon liittyvä epävarmuustekijä. (Nordtest 2017, 19; KVVY Tutkimus Oy 2018, 8–10.)

$$u(bias) = \sqrt{bias^2 + \left(\frac{RSD}{\sqrt{n}}\right)^2 + u(c_{ref})^2} \quad (7)$$

4.2.6 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus on mittauksen tulokseen liittyvä parametri, joka kuvaa mitattavalle suurelle saatujen arvojen hajontaa. Mittausepävarmuuden avulla saadaan käsitys tuloksen laadusta ja siksi sen kvantitatiivinen ilmoittaminen tulosten yhteydessä on tärkeää. Mittausepävarmuuden arvioinnissa tulisi ottaa huomioon

kaikki tuloksiin mahdollisesti vaikuttavat virhelähteet. Käytännössä tulosten mittausepävarmuus voi johtua monesta mahdollisesta lähteestä. Tärkeimmät epävarmuustekijät selviävät yleensä menetelmän validoinnin yhteydessä. Tällaisia ovat esimerkiksi matriisin vaikutukset, ympäristöolosuhteet, mittalaitteistot, mittausmenetelmään ja -menettelyyn sisältyvät likiarvot sekä tulosten satunnaisvaihtelu. (Mäkinen 1996, 53; Ellison & Williams 2012, 4–5.)

Mittausepävarmuuden avulla voidaan arvioida tulosten luotettavuutta, kun verrataan tuloksia keskenään ja arvioidaan työn tieteellistä arvoa. Pääasiassa mittausepävarmuutta arvioidaan satunnaisvirheen ja systemaattisen virheen avulla. Satunnaisvirheen osuutta arvioidaan yleensä varsinaisten näyttöiden rinnakkaismääritysten hajonnan perusteella, kun taas systemaattinen virhe saadaan selville kontrollinäytteiden tai varmennettujen vertailumateriaalien avulla. Useimmiten analyttisessä kemiassa käytetään laajennettua mittausepävarmuutta. (Mäkinen 1996, 53; Ellison & Williams 2012, 4.)

Laajennettua mittausepävarmuutta varten on ensin laskettava yhdistetty standardiepävarmuus u_c , jossa otetaan huomioon on laboratorion sisäinen uusittavuus $u(R_w)$ sekä on tulosten poikkeama, eli systemaattinen virhe $u(bias)$. Sisäinen uusittavuus $u(R_w)$ voidaan laskea käyttämällä kaavaa 5 ja systemaattinen virhe $u(bias)$ kaavan 7 avulla. Menetelmän yhdistetyn standardiepävarmuuden u_c laskemiseen käytetään seuraavaksi kuvattua kaavaa 8. (Nordtest 2017, 8–10.)

$$u_c = \sqrt{u(R_w)^2 + u(bias)^2} \quad (8)$$

Laajennetun mittausepävarmuuden U laskennassa käytetään peittävyyskerrointa k , jonka arvona käytetään tyypillisesti lukua 2. Tällöin laskettu tulos saadaan 95 %:n luottamusvälillä, jolloin noin 95 % tuloksista osuu mittausepävarmuusrajojen sisäpuolelle. Laajennettu mittausepävarmuus U saadaan laskettua kaavalla 9, jossa k on peittävyyskerroin ja u_c on kaavalla 8 avulla laskettu yhdistetty standardiepävarmuus. (Ellison & Williams 2012, 28; Nordtest 2017, 5–11.)

$$U = k \cdot u_c \quad (9)$$

4.2.7 Saanto

Saannolla tarkoitetaan menetelmän kykyä havaita tutkittavan analyytin kokonaismäärää. Saantokokeilla on tarkoitus osoittaa, sisältääkö näyte yhdisteitä, jotka häiritsevät määrittystä. Analyysimenetelmän saantoon saattavat vaikuttaa erilaiset häiriötekijät näytteen esikäsittelyssä. Tämän vuoksi tietyn analyysimenetelmän saanto jokaiselle aineelle on määritettävä erikseen mutta kaikkia häiriötekijöitä ei aina voida edes tunnistaa. (Mäkinen 1996, 34; Hiltunen ym. 2011, 16.)

Määritettävän aineen saantoa voidaan tutkia esimerkiksi vertaamalla uuden menetelmän tuloksia tunnetun ja varmistetun menetelmän tuloksiin tai lisäämällä näytteeseen tunnettu määrä menetelmällä tutkittavaa analyyttia. Saanto R saadaan laskettua kaavalla 10, jossa c_1 on tunnetuilla lisäyksillä tehtyjen mittausten keskiarvo, c_2 näytteen mittaustulos ilman tunnettua lisäystä ja c_3 on tunnetun lisäyksen laskennallinen arvo. Saanto on kaavassa ilmoitettu prosentteina. (Hiltunen ym. 2011, 16; Magnusson & Örnemark 2014, 31–33.)

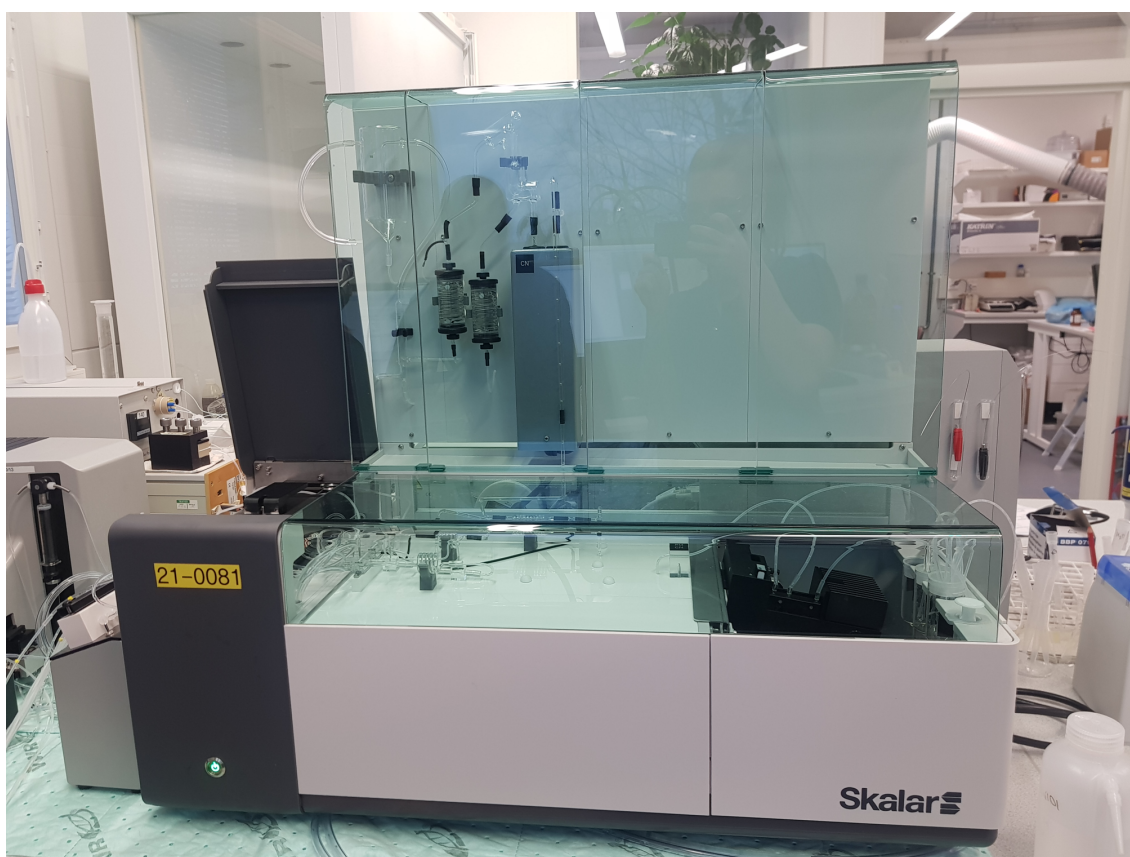
$$R = \frac{c_1 - c_2}{c_3} \cdot 100\% \quad (10)$$

5 KOKEELLINEN OSA

Kokeellisessa osassa kokonaissyanidi määritettiin validointia varten sertifioituista referenssimateriaaleista sekä luonnonnäytteistä. Määritykset tehtiin Skalar laitevalmistajan omaa menetelmäohjetta sekä standardia SFS-EN-ISO 14403-2:2012 hyödyntäen. Mittaukset suoritettiin 10 viikon aikana KVVY Tutkimus Oy:n puhdasvesilaboratorion tiloissa.

5.1 SFA-analyysilaitteisto

Syanidin määrittämiseen käytettiin Skalar segmentet flow -analysointilaitetta (laitenumero 21-0081). Laitteisto koostui seuraavista yksiköistä: näytteensyöttäjä, pumppu, San Compact™ kemian yksikkö UV-hajotus- ja tislauksyksiköllä sekä detektorilla varustettuna (Kuva 1).



KUVA 1. Menetelmän validoinnissa käytetty San Compact™ (Kuva: Anni-Rosa Apilainen)

Laitteet toimivat yhdessä ”Interface” -rajapintayksikön kanssa ja laitteiden toimintaa ohjataan laitevalmistajan kehittämän FlowAccess V3- ohjelmiston avulla. Ohjelmisto laskee detektorilta saadun vasteen mukaan syanidipitoisuuden automaattisesti jokaiselle näytteelle. Laitteiston tarkemmat tiedot on esitetty taulukossa 1.

TAULUKKO 1. Skalar SFA-laitteiston tekniset tiedot

laite	malli	sarjanumero
Skalar SFA San Compact™	2SAN39000	210119
Skalar Sampler	1052	131315
N86 LABOPORT vacumpump	N86KT.18	2.15994716
Skalar UV-digester	5549	211388
kyvetti (5 cm)	6435	-

5.2 Menetelmä

Käyttönotettava menetelmä validoitiin kokonaissyanidipitoisuuden määrittämiseksi erilaisista vesimatriiseista, kuten talous- ja luonnonvesistä sekä jätevesistä. Määritettävissä oleva pitoisuusalue oli 1–100 µg/l. Menetelmä käsitti orgaanisesti sitoutuneen syanidin, vapaiden syanidi-ionien, monimutkaisten yhdisteiden ja yksinkertaisiin metallisyanideihin sitoutuneiden syanidien summan, lukuun ottamatta kobolttikompleksiksi sitoutunutta syanidia. Menetelmä ei myöskään kertonut tiosyanaatti-yhdisteistä näytteissä. Menetelmä perustui standardiin SFS-EN-ISO 14403-2:2012.

Menetelmä kalibroitiin ennen jokaista ajoa koko alueelta 1–100 µg/l. Kalibrointiin käytettiin valmista kaupallista sertifioitua syanidin 1000 mg/l standardiliuosta. Kaikki kalibrointinäytteet ajettiin kahtena replikaattina samasta näyteputkesta. Kalibrointisuoran selitysaste r^2 tuli olla laitevalmistajan mukaan vähintään 0,999 ja suurimman standardin herkkyys noin 0,400AU, jotta kalibrointi voitiin hyväksyä. (Skalar. 2021; Skalar methods. n.d., 7.)

5.2.1 Näytteet

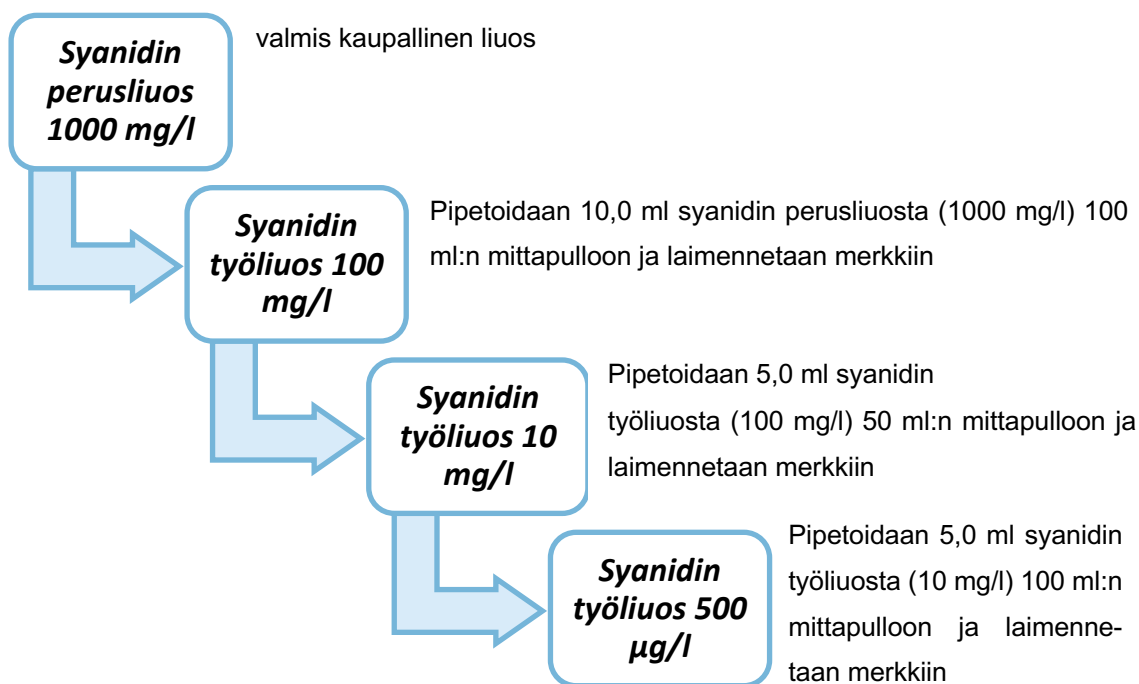
Näyte otettiin laboratorioon saapuneista analyysipulloista 100 ml polyeteenipulloon ja kestävästiin 1 M natriumhydroksidiliuoksella, kunnes näyteliuoksen pH oli 12. Määritys tehtiin säilötystä näytteestä viikon kuluessa säilönnästä. Näytteenoton ja määrityksen välisen ajan näyte säilytettiin jääkapissa, poissulkien paljon suolaa sisältävät näytteet kuten prosessivedet ja merivedet. Suolaiset näytteet laimennettiin kaksinkertaiseksi ennen kestäväntä matriisihäiriöiden sekä laitteiston tukkeutumisen välttämiseksi. Näytteet säilytettiin pimeässä huoneenlämmössä ennen mittausta. Paljon kiintoainetta sisältävät näytteet laskeutettiin tai sentrifugoitiin ennen määritystä ja näyte pipetoitiin näytekuppeihin liuoksen pinnalta niin, ettei kiintoainetta päätynyt laitteistoon.

Hapettavat yhdisteet testattiin KI-tärkkelyspaperilla ennen kestäväntä. Mikäli paperin väri muuttuu violetiksi, lisättiin näytteeseen muutama kide natriumtiosulfaattia tai kunnes KI-tärkkelyspaperin väri ei enää muuttunut. Ennen ajoa natriumtiosulfaatilla käsiteltyihin näytteisiin lisättiin kiinteää askorbiinihappoa 0,06 g per 100 ml näytettä, jonka jälkeen näytteet analysoitiin vuorokauden kuluessa. Myös sulfidien läsnäolo tarkastettiin lyijyasettaattipaperilla ennen kestäväntä. Mikäli näyte sisälsi sulfideja, lisättiin kiinteää lyijykarbonaattia näytteeseen, kunnes lyijyasettaattipaperi ei enää reagoinut. Näyte suodatettiin sininauhapaperilla ennen määritystä, ettei kiinteää lyijykarbonaattia päässyt laitteistoon.

5.2.2 Reagenssit

Kaikkien reagenssien tuli olla analyysipuhdasta laatua. Liuosten valmistamiseen, näytteiden laimentamiseen ja välineiden huuhteluun käytettiin kuplitettua ultra-puhdasta vettä (Milli-Q). Veden kuplittamiseen käytettiin heliumkaasua. Kuplittamisen tarkoituksena oli poistaa pieniä ilmakuplia, jotka saattaisivat häiritä analyysia kulkeutuessaan valotielle, ja sitä kautta vaikuttaa detektorin vasteeseen. Määrityksessä tarvittavat reagenssit, niiden valmistus sekä säilyvyys on kuvattu liitteessä 1.

Kalibroitistandardien valmistukseen käytettiin valmista kaupallista Merck 119533 liuosta. Pipetoinnit tehtiin täyspipetillä ja laimennuksessa käytettiin 0,01M natriumhydroksidiliuosta (liite1). Standardit valmistettiin kuvion 4 mukaan. Standardin työliuoksesta 500 µg/l näytteensyöttäjä laimensi itse kalibroitiliuokset 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80 ja 100 µg/l.



KUVIO 4. Standardiliuosten valmistus.

Laitteen pohjaviivan tason korjaukseen käytettiin drift-liuosta. Tällöin pohjaviivan tason muutokset ajon edetessä huomioitiin ja näytteiden pitoisuudet korjattiin vastaamaan todellista pitoisuutta. Drift-liuos valmistettiin pipetoimalla automaattipipetillä 0,8 ml syanidin 10 mg/l työliuosta (kuvio 1) 100 ml:n mittapulloon ja laimennettiin 0,01 M NaOH-liuoksella (liite 1) merkkiin. Liuos valmistettiin päivittäin. Drift voitiin valita ajettavaksi myös standardista 80 mg/l, jos ottoja putkesta oli korkeintaan 10 kappaletta.

Menetelmän kontrollointiin käytettyjen liuosten valmistamiseen käytettiin kaupallista Sigma-Aldrich 90157 liuosta, jonka pitoisuus oli 1000 mg/l. Pipetoinnit tehtiin täyspipetillä ja laimennuksessa käytettiin 0,01M natriumhydroksidiliuosta (liite1). Kontrolliliuosten valmistus on kokonaisuudessaan kuvattu liitteellä 2. Jokaisen määrittämissarjan alkuun ja loppuun tehtiin kontrollit 0, 2, 5, 50 ja 100 µg/l.

Nolla kontrollina käytettiin 0,01M NaOH-liuosta. Näytteistä tehtiin rinnakkaismääritys aina 10 näytteen välein. Lisäyskontrolli 50 µg/l tehtiin tarvittaessa matriisihäiriöiden varmistamiseksi suolapitoisista luonnonvesistä ja/tai jätevesistä.

5.2.3 Työturvallisuus

Happamissa olosuhteissa syanidiliuoksista vapautuu helposti myrkyllistä syaanivetykaasua, eli vetysyanidia. Vetysyanidia voi vapautua pelkästään jo ilman hiilidioksidin vaikutuksesta. Tämän vuoksi standardista poiketen kalibrointiliuosten valmistuksessa ei käytetty kiinteää kaliumsyanidia vaan valmista kaupallista liuosta, joka oli valmiiksi tehty tarpeeksi emäksiseksi (pH>12). Liuoksen sopivuus oli tarkistettu laitevalmistajalta ennen validointikokeiden aloittamista.

Tislausvaiheessa syanidiliuokset tehtiin happamiksi, minkä vuoksi analyysilaitteen kunto täytyi tarkistaa joka kerta ennen käyttöä. Vakuumipumpun tuli olla päällä, jotta vesikierto sekä kondensaattori toimivat tislausyksikössä. Tislausvaiheessa mahdollisesti syntynyt vetykaasu kulkeutui kuitenkin laitteistossa emäksiseen 0,1M natriumhydroksidivirtaan ja sitä kautta turvallisesti jätesäiliöön. Jätesäiliöön laitteisto pumppasi jatkuvasti vahvempaa 1M Natriumhydroksidia työturvallisuuden parantamiseksi.

Kaikki työssä käytettävät reagenssit tuli valmistaa asianmukaisia suojavaatteita käyttäen. KVVY Tutkimus Oy:n laboratorion tiloissa oli suojalasipakko ja sen lisäksi vaadittiin käytettäväksi umpinaisia työkenkiä. Työssä käytetty liuokset, kuten tislausreagenssi, kloramiini-T liuos sekä natriumhydroksidi olivat syövyttäviä, joten niiden käsittelyssä tuli olla erityisen huolellinen. UV-yksikön huollossa käytetty klooririkkihappo oli vahvasti syövyttävä. Sen käsittelyssä käytettiin kasvosuojainta, eikä ainetta saanut hävittää viemäriin. Klooririkkihappo jäte kerättiin erilliseen astiaan ja hävitettiin asianmukaisesti.

5.3 Validointimittaukset

Validointisuunnitelman mukaan oli määrä validoida menetelmälle mittausalue ja lineaarisuus, toteamis- ja määritysrajat, sisäinen uusittavuus ja systemaattinen virhe, menetelmän luotettavuus ja oikeellisuus sekä laajennettu mittausepävarmuus. Näiden parametrien määrittämiseksi esitettiin alustava mittaussuunnitelma, jonka mukaan validoinnissa edettiin. Mittausepävarmuus laskettiin Mukit-ohjelman avulla ja validoinnin aikana tavoitteeksi asetettiin yhdistetylle standardiepävarmuudelle u_c alle 10 % sekä laajennetulle mittausepävarmuudelle U alle 30 %

5.3.1 Lineaarisuuden ja mittausalueen määrittäminen

Menetelmän lineaarisuus määritettiin valmistamalla syanidin kalibrintiliuoksesta standardit 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 µg/l. Nolla liuoksena käytettiin 0,01 molaarista natriumhydroksidia, johon standardit laimennettiin. Standardit valmistettiin 500 µg/l syanidin työliuoksesta, josta näytteenottoajaksi laimensi standardit automaattisesti. Laimennoksista ajettiin standardisuora, jossa jokaisesta standardista otettiin kaksi ottoa, joille analysointilaborantti laski keskiarvon automaattisesti. Lineaarisuutta tutkittiin standardisuoran ja regressioanalyysin avulla.

5.3.2 Toteamis- ja määritysrajan määrittäminen

Validointimittauksissa toteamisraja sekä määritysraja määritettiin kymmenen näytteen mittaussarjoilla nollanäytteitä käyttäen KVVY Tutkimus Oy:n menetelmäohjeen LM18 mukaisesti. Vastoin yleistä käytäntöä, laskennasta jätettiin kuitenkin pois negatiivisen tuloksen saneet nollanäytteet, sillä niitä oli aineistossa suhteellisen vähän. Rajoja määrittäessä otettiin myös huomioon mittaustulosten epävarmuus.

5.3.3 Sisäinen uusittavuus ja systemaattinen virhe

Sisäinen uusittavuus ja systemaattinen virhe laskettiin kaupallisesta referenssimateriaalista 1000 mg/l CN (Sigma-Aldrich ICS012) valmistettujen kontrollinäytteiden ja rinnakkaismääritysten avulla. Kontrollinäytteitä valmistettiin validointia varten pitoisuuksilla 0, 2, 5, 10, 20, 50, 80 ja 100 µg/l. Laboratorion sisäistä uusittavuutta tutkittiin vertailumateriaalin rinnakkaismäärittäyksillä mahdollisimman pitkällä aikavälillä. Rinnakkaisten erotuksen perusteella tuloksista laskettiin keskihajonta.

Systemaattista virhettä arvioitiin myös saantokokeilla laitevalmistajan menetelmäohjeen mukaisesti kaliumheksasyanoferraatilla ja kaliumtiosyanaatilla. Saantokokeita ei katsota tarpeelliseksi tehdä rutiinianalytiikassa, koska turvallisuuden kannalta kiinteiden kemikaalien käsittelyä on hyvä välttää. Saantokokeita voidaan tehdä myöhemmin UV-B lampun toimintakyvyn testaamiseksi, mikäli määrittäyksissä ilmenee poikkeamia. Validointimittauksia varten saantokokeet päätettiin kuitenkin tehdä.

5.3.4 Luotettavuus ja oikeellisuus

Validointimittausten luotettavuutta tutkittiin saatavilla olleen vertailunäyte AXIO 6/2021 PT-AQ-17B-Cyanide avulla. Tuloksia verrattiin viitearvoon sekä laskettiin vertailunäytteen tietojen perusteella tulosten hyväksyttävyyttä kuvaava z-arvo. Lisäksi luotettavuutta ja oikeellisuutta tutkittiin kaupallisesta syanidistandardista 1000 mg/l CN (Sigma-Aldrich ICS012) valmistettujen kontrollinäytteiden avulla. Validointimittausten oikeellisuutta voitiin arvioida tulosten suhteellisen poikkeaman avulla (%).

5.3.5 Laajennettu mittausepävarmuus

Validointitulosten mittausepävarmuutta arvioitiin Suomen ympäristökeskuksen (SYKE) julkaisemalla Mukit-ohjelmalla, joka perustuu Nordtest raporttiin TR 537.

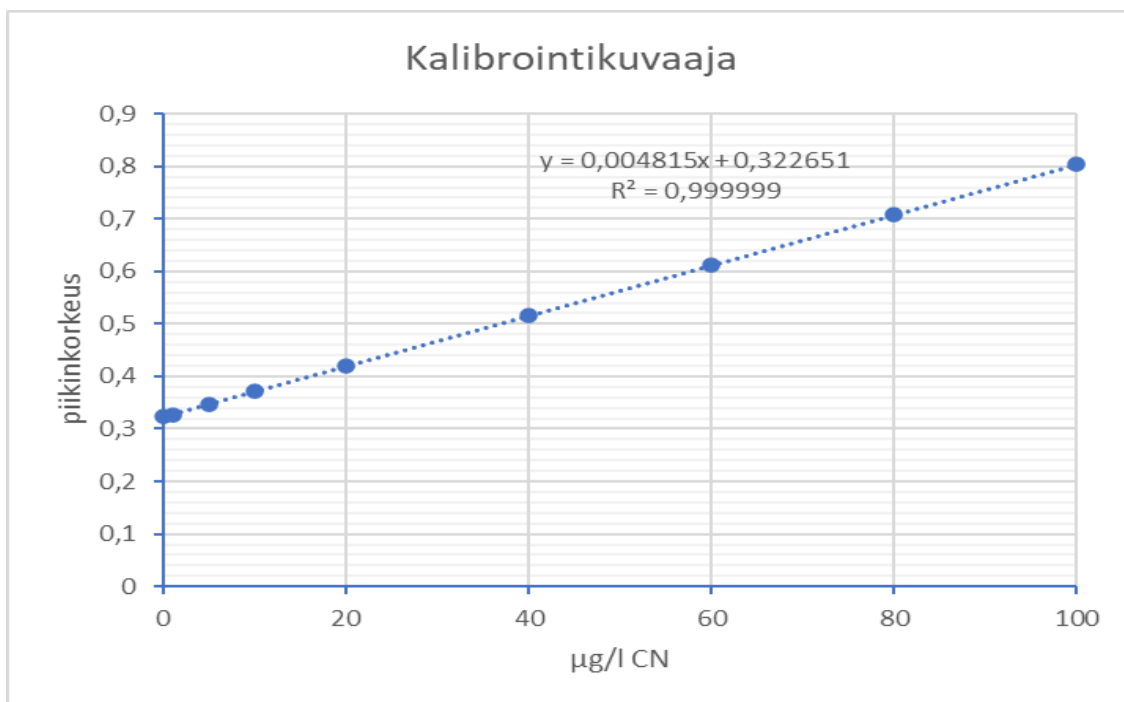
Laajennettu mittausepävarmuus lasketaan menettelytapaohjeen LM18 mukaisesti satunnaisvirheen ja systemaattisen virheen avulla. Nämä saatiin määritettyä kaupallisesta syanidistandardista valmistettujen kontrollinäytteiden avulla. Laskennassa käytettiin kolmea eri pitoisuusaluetta.

6 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

Uusi tarkempi Skalar CFA -analysointilaitteisto hankittiin vanhan iäkkään Lachat Quick Chem 8500 FIA- analysointilaitteen (laitenumero 189) tilalle. Validointimittauksia viivästytti kemian moduulia ohjaavan rajapintayksikön laitevika, minkä vuoksi validointisuunnitelmasta poiketen uusi laite validoitiin vain kokonaissyanidinin määrittäykseen eri näytematriiseille. Tämän vuoksi myös opinnäytetyön nimi päätettiin muuttaa vastaamaan paremmin työn sisältöä. Vapaan syanidinin määrittäminen validoidaan laitteistolle myöhemmin opinnäytetyön ulkopuolella. Opinnäytetyössä menetelmälle ei ollut tarpeellista tehdä täydellistä validointia, sillä standardimenetelmän käyttöönotossa riittää suppeampi validointi (Mäkinen ym. 1996, 6–8.). Selektiivisyys ja spesifisyys oli määritetty jo standardisoinnin yhteydessä laitevalmistajan toimesta.

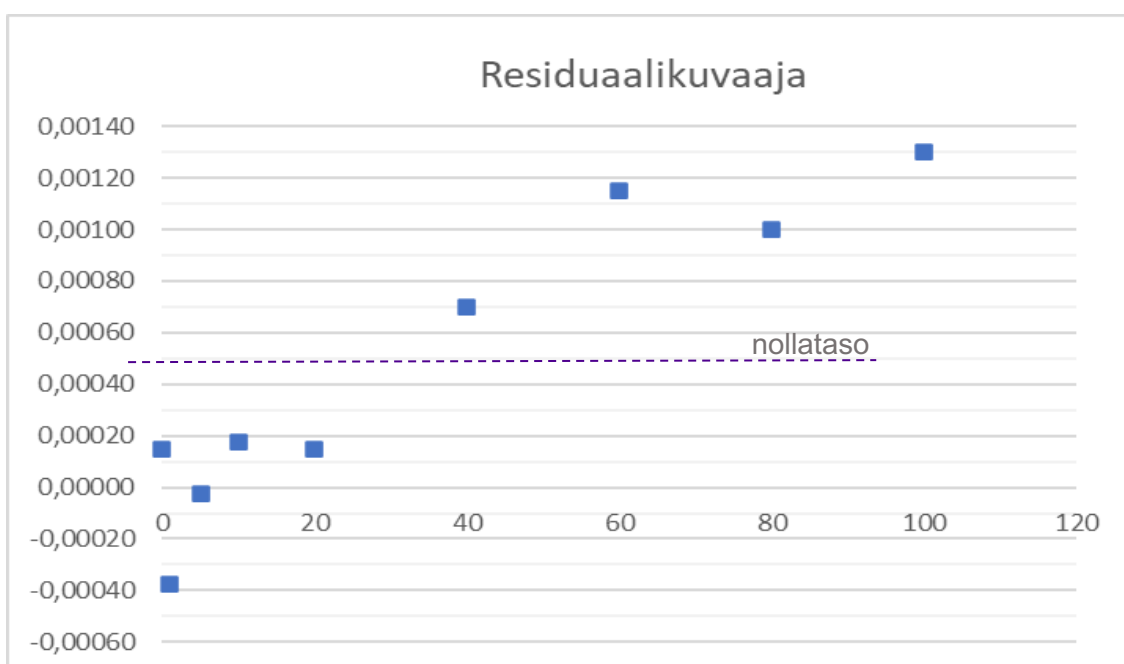
6.1 Menetelmän lineaarisuus

Mittausalue määritettiin kaupallisesta kaliumsyaniidistandardista 1000 mg/l CN (Merck 119533) valmistetun näytesarjan avulla ISO 14403 standardin mukaisesti. Kuviossa 5 nähdään syanidinin kalibrointikuvaaja, jossa piikin korkeus on esitetty pitoisuuden funktiona. Liitteessä 3 on esitetty standardilaimennosten mittaustulokset.



KUVIO 5. Syanidistandardien kalibrointikuvaaja.

Kuvion 5 kalibrointikuvaajassa on käytetty korjaamattomia piikin korkeuksia, minkä vuoksi suora ei ala nollasta. Suoran selitysasteen r^2 perusteella voidaan kuitenkin osoittaa, että lineaarinen sovitus on tähän menetelmään sopiva, sillä arvo on erittäin lähellä lukua 1. Tämä ei kuitenkaan yksinään riitä, vaan lineaarisuutta tulee arvioida myös kalibrointisuoran residuaalikuvaajan avulla (kuvio 6). (Mäkinen ym. 1996, 17–18.)



KUVIO 6. Lineaarisuusmittausten residuaalien jäännöskaavio.

Kuviosta 6 voidaan nähdä, että residuaalit jakautuvat tasaisesti nollatason molemmiin puolin, eivätkä muodosta mitään tiettyä kuviota. Tämän perusteella menetelmä voidaan todeta lineaariseksi. (Mäkinen ym. 1996, 18) Regressioanalyysi on saatu taulukon 2 tulosten perusteella, jossa on käytetty korjaamattomia piikin korkeuksia. Tämä on huomioitava myös jäännöskaavion tulkinnessa, sillä laskennassa nollataso on kohdassa 0,32285.

TAULUKKO 2. Lineaarisuuden laskentaan käytetyt arvot.

x	y				
ug/l CN teoreettinen	piikin korkeus	y laskettu	ero (y)	x mitattu	ero (x)
0	0,3229	0,3227	0,00015	0,00	0,000
1	0,3271	0,3275	-0,00038	0,98	0,020
5	0,3467	0,3467	-0,00003	4,90	0,100
10	0,3709	0,3707	0,00017	10,12	-0,120
20	0,4189	0,4187	0,00015	20,04	-0,040
40	0,5154	0,5147	0,00070	40,02	-0,020
60	0,6119	0,6107	0,00115	60,14	-0,140
80	0,7077	0,7067	0,00100	79,52	0,480
100	0,8040	0,8027	0,00130	100,28	-0,280

Taulukon 2 tulokset ovat mittaustulosten keskiarvoja, kun kutakin standardia kohden tehtiin neljä mittausta. Lasketut y:n arvot on saatu määritettyä lineaarisen kuvaajan suoran yhtälön perusteella ja niitä verrataan analyysimenetelmällä määritettyihin y:n arvoihin.

6.2 Menetelmän toteamis- ja määrittäysraja

Laitevalmistajan ilmoittama toteamisraja menetelmälle on 0,1 µg/l ja määrittäysraja 1 µg/l. Validointimittausten tuloksena toteamisraja menetelmälle laskettiin nolla näytteiden mukaan kaavalla 1.

$$\begin{aligned}
 LOD &= 0,0414 \frac{\mu g}{l} + 3 \cdot 0,0697 \frac{\mu g}{l} \\
 &= 0,2505 \frac{\mu g}{l} \\
 &\approx 0,25 \frac{\mu g}{l}
 \end{aligned}$$

Menetelmän määrittämysraja saatiin laskettua kaavalla 2. Laskennassa käytetyt nollanäytteet on esitetty liitteessä 4.

$$\begin{aligned} LOQ &= 0,0414 \frac{\mu g}{l} + 10 \cdot 0,0697 \frac{\mu g}{l} \\ &= 0,6689 \frac{\mu g}{l} \\ &\approx 0,67 \frac{\mu g}{l} \end{aligned}$$

6.3 Menetelmän sisäinen uusittavuus ja systemaattinen virhe

Laitevalmistajan ilmoittama saantoprosentti kaliumheksasyanoferraatille ($K_3[Fe(CN)_6]$) on 96,5 % ja kaliumtiosyanaatille (KSCN) on 0,2 %. Laitevalmistajan mukaan saantoasteen tulee kaliumheksasyanoferraatille olla vähintään 90 % tai suurempi ja kaliumtiosyanaatille alle 1 %. (Skalar Methods. n.d., 6.) Saantokokeista saatiin kaliumheksasyanoferraatille on 95,6 % ja kaliumtiosyanaatille 0,07 %. Saantokokeet katsotaan onnistuneeksi halutulla mittaustarkkuudella. Saanto näytteille laskettiin kaavan 10 mukaan ja liitteestä 5 löytyvät saantokokeiden mittaustulokset.

$$\begin{aligned} R_{K_3[Fe(CN)_6]} &= \frac{95,60 \frac{\mu g}{l} - 0 \frac{\mu g}{l}}{100 \frac{\mu g}{l}} \cdot 100\% \\ &= 95,60 \frac{\mu g}{l} \\ &\approx 95,6 \frac{\mu g}{l} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} R_{KSCN} &= \frac{0,67 \frac{\mu g}{l} - 0 \frac{\mu g}{l}}{10 \frac{\mu g}{l}} \cdot 100\% \\ &= 0,067 \frac{\mu g}{l} \\ &\approx 0,07 \frac{\mu g}{l} \end{aligned}$$

Kemikaalien punnitseminen oli haasteellista niiden sähköisyyden vuoksi, mikä on saattanut alentaa kaliumtiosyanaatin saantoa. Liuokset olivat myös erittäin herkkiä valolle, jolloin mittaustulosten vaihteluun vaikutti se aika, minkä liuos oli analyysiputkessa ennen mittausta. Voitiin huomata, että paras saanto saatiin, kun liuos kaadettiin analyysiputkeen juuri ennen näytteenottoa. Kaliumheksasyanoferraatin säilyvyys ja sitä kautta saanto parani mittauksissa huomattavasti, kun tislusreagenssiin lisättiin kuparisulfaattiliuosta laitevalmistajan menetelmöhjeen mukaan. Laskuissa on huomioitu vain nämä kuparisulfaattiliuoksen sisältävät liuokset.

6.4 Menetelmän luotettavuus ja oikeellisuus

Menetelmän luotettavuutta ja oikeellisuutta mitattiin syanidin kontrolliliuosten avulla. Tulokset on koottu alla olevaan taulukkoon 3. Tuloksille laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta (RSD). Tulosten RSD voitiin laskea kaavalla 4 ja poikkeama (bias) kaavalla 6. Nollanäytteen laskennoissa negatiiviset mittaustulokset on jätetty huomiotta. Kontrollinäytteiden mittaustulokset ovat nähtävillä liitteessä 6.

TAULUKKO 3. Kontrollinäytteiden mittaustulokset.

kontrolli	KL0	KL2	KL5	KL10	KL20	KL50	KL80	KL100
keskihajonta	0,03	1,97	4,82	9,93	20,19	50,94	80,39	101,71
keskihajonta	0,06	0,05	0,40	0,09	0,85	1,94	0,65	3,82
RSD (%)	1,99	2,28	8,23	0,95	4,19	3,82	0,81	3,75
bias (%)		0,72	3,53	0,74	0,96	1,87	0,49	1,72

Tuloksista nähdään, että kontrollinäytteiden suhteellinen keskihajonta sekä poikkeama on pientä. Validointimittauksissa luotettavan mittaustuloksen RSD tulisi olla korkeintaan 10 % varsinkin, kun määritetään toteamis- ja määrittäysrajoja. (Magnusson & Örnemark. 2014, 24.). Taulukosta 1 nähdään, että tämä toteutuu nollanäytteiden lisäksi myös muillakin kontrolleilla. Lisäksi analysoitiin syanidin vertailunäyte (AXIO 6/2021 PT-AQ-17B-Cyanide), jonka tulokset löytyvät liit-

teestä 7. Tuloksista nähdään, että vertailunäytteen z-arvo oli kummallakin laimenoksella todella hyvä. Tuloksia voidaan pitää hyväksyttävänä, kun $-2 \leq z \leq 2$ (Hiltunen ym. 2011, 71–72.).

6.5 Menetelmän mittausepävarmuus

Laajennettu mittausepävarmuus laskettiin menetelmäohjeen LM18 mukaisesti. Mittausepävarmuus on ilmoitettu 95 % kattavuusvälillä käyttäen Suomen ympäristökeskuksen Mukit-ohjelmaa ja kerrointa 2. Laskennassa käytettiin erilaisia pitoisuusalueita välillä 1–100 µg/l. Laitevalmistajan ilmoittama määräysraja 1 µg/l, ei kuitenkaan ollut käytännössä mahdollinen, mikä kävi ilmi mittausepävarmuuslaskennoista. Mittausepävarmuus määräysrajalla ei yleisen käytännön mukaan saa olla yli 60 %, joten määräysrajaksi oli sen vuoksi otettava 2 µg/l (KVVY Tutkimus Oy. 2021. LM18, 8.).

Laboratorion sisäinen uusittavuus $u(Rw)$ laskettiin luonnonnäytteiden sekä kontrollinäytteiden avulla kaavalla 5. Menetelmän ja laboratorion kokonaispoikkeama $u(bias)$ laskettiin kontrollinäytteiden avulla kaavalla 7. Liitteeseen 8 on koottu MUKit-ohjelman avulla lasketut mittausepävarmuuslaskelmat.

6.6 Laitteiden välinen vertailu

Validoinnissa saatuja tuloksia verrattiin aiemmin syanidin määrittämisessä käytetyn Lachat Instruments QuikChem 8000 -laitteistolla (standardi EPA 335.3: 1978) saatuihin tuloksiin huomioiden kyseisen laitteen määräysrajat 5 µg/l. Vertailussa käytettiin luonnonnäytteitä, jotka analysoitiin pääsääntöisesti viikon sisällä toisistaan. Vanhan laitteen määräysrajat ylittäviä tuloksia oli kuitenkin todella vähän, minkä vuoksi menetelmien vertailuun yleisesti käytettävää t-testiä ei voitu tehdä. T-testillä voidaan tutkia, eroavatko samasta näytteestä kahdella eri menetelmällä saatujen tulosten keskiarvot toisistaan. (Mäkinen ym. 1996, 62.). Kaikki laitteiden välillä mitatut tulokset löytyvät liitteestä 9, joista vertailtavissa olevat tulokset on koottu taulukkoon 4.

TAULUKKO 4. Laitteiden välisen vertailun tuloksia.

analysoitu		näyte ja laimennos	tulos (SFA) µg/l	tulos (FIA) µg/l	erotus %
(FIA)	(SFA)				
11.10.	02.11.	jätevesi	3,68	5,909	-37,72
01.11.	04.11.	ympäristönäyte	2,51	6,742	-62,77
20.12.	15.12.	jätevesi 2x	1,70	9,914	-82,85
14.12.	16.12.	jätevesi	2,54	10,854	-76,60
23.11.	26.11.	jätevesikaivo	22,11	18,297	20,84
11.10.	02.11.	teollinen jätevesi	28,48	50,324	-43,41
20.12.	16.12.	puhdistettu lauhdevesi 5x	137,7	139,454	-1,26
20.12.	16.12.	jätevesi kaivo 10x	188,4	235,070	-19,85
14.12.	15.12.	jätevesi 100x	2317	3337,71	-30,58
05.07.	02.11.	vertailunäyte 1000x	10640	11098	-4,13
05.07.	02.11.	vertailunäyte 200x	10090	11937	-15,47

Tuloksista nähdään, että useimmissa näytteissä uusi laite antaa matalamman tuloksen kuin vanha laite. Kuitenkin tulokset, jotka eroavat eniten ovat vanhan laitteen määritysrajan lähellä 5–10 µg/l, jossa tulosten epävarmuus on ±2 µg/l. Muulla alueella vanhan laitteen mittausepävarmuus on 20 % ja eri laitteilla mitattujen tulosten hajonta on satunnaisempaa. Näytteistä ei voitu niiden vähäisyyden vuoksi tehdä t-testiä, eikä tuloksista täten voida tehdä tilastollisesti luotettavia johtopäätöksiä.

7 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tässä opinnäytetyössä validoidulla kokonaissyanidin määritysmenetelmällä haettiin korvata laboratoriossa aiemmin käytössä ollut menetelmä. Uuden menetelmän toivottiin olevan työturvallisempi, nopeampi sekä vaivattomampi kuin edellisen menetelmä. Työturvallisuuden sekä vaivattomuuden osalta saavutettiin huomattava parannus, sillä aiemmalla menetelmällä käytössä olleet reagenssit voitiin korvata turvallisemmilla ja kauemmin säilyvillä liuoksilla. Uudella laitteella määrittämisen lisäksi myös laitteen käynnistyksen, sammutuksen ja laimennosten automatisointi lisäsivät määrittämisen helppoutta. Uusi automatisoitu menetelmä lisäsi myös analyysin tarkkuutta.

Opinnäytetyössä oli tavoitteena validoida samalle SFA-analysaattorille myös laboratoriossa uusi menetelmä vapaan syanidin määrittämiseen. Mittausten alussa ilmeni kuitenkin ongelmia interface rajapintayksikön kanssa, minkä vuoksi mitaukset viivästyivät usealla viikolla. Kokonais- ja vapaan syanidin määrittämiä ei voitu suorittaa rinnakkain eri reagenssien vuoksi. Vapaan syanidin validointi päätettiin jättää tekemättä, sillä kokonaissyanidin määrittämistä pidettiin laboratoriolle tärkeämpänä menetelmänä.

Validoinnin osalta työlle asetetut tavoitteet toteutuivat osittain. Menetelmä saatiin validoitua ja otettua käyttöön niin, että sitä on helppo kehittää jatkossa eteenpäin. Osalle näytematriiseista ei kuitenkaan saavutettu tarpeeksi luotettavia tuloksia käytössä olleiden näytteiden avulla. Luonnonnäytteistä varsinkin jäte- ja prosesivedet voitiin todeta hankaliksi analysoida, sillä matriisin vaikutusta oli vaikea ennustaa eikä syytä rinnakkaistulosten vaihtelevuudelle löydetty. Vaihtelu kyseisten näytteiden rinnakkaistuloksissa voidaan nähdä liitteen 9 kuvista.

Aiemmissä tieteellisissä julkaisuissa (Carr, Baird & Lin. 1997, 1543.) on tutkittu luonnossa esiintyviä orgaanisia aineita, joita todennäköisesti esiintyy jätevesissä. Syanidianalyysien aikana reaktiiviset orgaaniset yhdisteet tuottivat välituotteidensa kautta syanidia hapettuneita typpi-ioneja sisältäviin näytteisiin.

Tutkimuksissa syanideja tuottavien välituotteiden muodostuminen väheni kuitenkin suuresti, kun NO_x poistettiin sulfamiinihapolla ennen tislausta. (Carr, Baird & Lin. 1997, 1543.).

Validointimittauksissa laitevalmistajan lupaama määritysraja 1 µg/l ei ollut käytännössä mahdollinen liian suuren mittausepävarmuuden vuoksi. Laskelmien mukaan määritysrajaksi saatiin 0,67 µg/l, mutta epävarmuus määritysrajalla ei yleisen käytännön mukaan saa olla yli 60 % (KVVY Tutkimus Oy. 2021. LM18, 8.). Tämän vuoksi päädyttiin nostamaan määritysrajaa 2 µg/l. Menetelmällä määritettävien näytetyyppien syanidipitoisuus on yleensä 2 µg/l–500 µg/l ilmaistuna syanidi-ioneina laimentamattomassa näytteessä, joten korkeamman määritysrajan voitiin todeta riittävän KVVY Tutkimus Oy:n tarpeisiin.

Menetelmää voitaisiin kehittää lisäämällä näytteenkäsittelyyn vaihe ketonien, aldehydien, nitrilien ja sulfiittien ilmaisemiselle näytteistä. Näiden tiedetään tiettyinä pitoisuuksina aiheuttavan häiriötä (SFS-EN ISO 14403-2. 2012, 3.), mutta häiriöiden testaamiseen ei laitevalmistajan ohjeessa ole määritelty mitään menetelmää. Osa tutkittavista syanidinäytteistä ovat prosessivesiä ja jätevesiä, jotka saattavat sisältää kyseisiä häiriötekijöitä (Carr ym. 1997, 1543.). Mittausten aikana myös havaittiin, että näiden näytteiden rinnakkaismittauksissa sekä erilaisten laimennosten tuloksissa oli eniten vaihtelua.

Rinnakkaismittausten vaihtelevuuteen varsinkin pienillä pitoisuuksilla huomattiin vaikuttavan myös edellisen näytteen suuri syanidipitoisuus. Jos seuraava näyte oli pitoisuudeltaan huomattavasti edellistä pienempi, voitiin huomata sen vaikuttavan tulokseen positiivisesti. Edellisen näytteen piikki ei siis välttämättä ehtinyt kunnolla laskeutua ennen seuraavan näytteen piikkiä. Näytteiden syanidipitoisuutta ei voida arvioida näytteen väristä, jolloin näytteiden laimennoksia oli vaikea päätellä etukäteen. Suuren piikin todettiin kuitenkin vaikuttavan seuraavan näytteen tulokseen, vaikka analysoitu tulos olisi ylemmän määritysrajan sisällä. Näytteen analysointi-aikaa pidentämällä voitaisiin yrittää vaikuttaa piikin laskeutumiseen pohjaviivalle ennen seuraavaa näytettä. Mittausten aikana analyysi-aika nostettiin laitevalmistajan määrittämästä 80 sekunnista 120 sekuntiin, mutta ainakaan näin pienellä muutoksella ei todettu olevan huomattavaa merkitystä.

Näytteiden säilyvyyttä voitaisiin tutkia lisää, sillä validointimittausten aikana se ei pienten näytemäärien vuoksi ollut mahdollista. Näyte voitaisiin viikon ajan mitata jokaisena päivänä ja katsoa laskeeko mitattavan näytteen pitoisuus merkittävästi päivien kuluessa. Säilyvyyttä olisi hyvä tutkia varsinkin jäte- ja prosessivesien kohdalla, sillä eri päivänä tehdyt laimennokset eivät aina vastanneet kokonaispitoisuukseltaan toisiaan. Tulosten vaihtelevuus voi olla kuitenkin myös seurausta matriisihäiriöistä.

Opinnäytetyön tuloksena validoitu menetelmä voitiin ottaa käyttöön KVVY Tutkimus Oy:n puhdasvesi laboratoriossa kokonaissyanidin osalta. Jatkossa menetelmä voidaan validoida myös vapaalle syanidille laitevalmistajan ohjeen mukaan samoja validointimenettelyjä käyttäen.

LÄHTEET

Akcil, A., Botz, M., Mudder, T. 2005. Cyanide treatment: Physical, chemical, and biological processes. In book: Advances in Gold Ore Processing 2nd Edition. Netherlands:Elsevier

Baird, R. B., Eaton, A. D., Rice, E.V. 2017. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23rd Edition. Washington: American Public health Association

Carr, S. A., Baird, R. B., Lin, B. T. 1997. Wastewater derived interferences in analysis. County Sanitation Districts of Los Angeles County, San Jose Creek Water Quality Laboratory, 1965 S. Workman Mill Rd, Whittier, CA 90601, U.S.A. Luettu 10.5.2022 https://www.academia.edu/22720321/Wastewater_derived_interferences_in_cyanide_analysis

Ehder, T. 2005 Kemian metrologian opas J6/2005. Helsinki: Metrologian neuvottelukunta. Luettu 6.10.2021 <https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/MIKES/2005-J6.pdf>

Ellison, S. L. R. & Williams, A. 2012. Third edition. Eurachem/CITAC Guide CG 4. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. Luettu 24.3.2022 https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf

Finlex. 2015. Sosiaali- ja terveysministeriön asetus talousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista (1352/2015). Luettu 7.4.2022 <https://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2015/20151352>

Gomesa, P., Barretob, I., Carvalhoa, L., Pinheiroa, H., de Limaa, H., Silvaa, E., Filhoc, V., Fernandes, R. 2015 An approach of the historical aspects, the advantages and disadvantages of automated analyzers: Analysis in segmented flow (SFA) the Flow Analyzer - batch (FBA). Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. Luettu 12.4.2022. <https://www.jocpr.com/articles/an-approach-of-the-historical-aspects-the-advantages-and-disadvantages-of-automated-analyzers-analysis-in-segmented-flow.pdf>

Hiltunen, E., Linko, L., Hemminki, S., Hägg, M., Järvenpää, E., Saarinen, P., Simonen, S., Kärhä, P. 2011. Laadukkaan mittaamisen perusteet. 4. Julkaisu. Luettu 5.10.2021 <https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/MIKES/2011-J4.pdf>

Housecroft, C., Sharpe A. 2012. Inorganic Chemistry. 4th Edition. Lontoo: Pearson Education Limited

Hägg, M. 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy. Luettu 4.10.2021 <https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/technology/2016/T276.pdf>

ISO 11843-2. 2000. Capability of detection – Part 2. Methodology in the linear calibration case. Luettu 3.4.2022 <http://www.tncqhb.gov.tw/tnhealth/manasystem/FCK/FckFiles/file/upsinra/iso%2011843-2%20Capability%20of%20detection.pdf>

Jaszczak, E., Polkowska, Z., Narkowicz, S., Namieśnik, J. 2017. Cyanides in the environment—analysis—problems and challenges. Environmental Science and Pollution Research International. Luettu 20.4.2022. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11356-017-9081-7.pdf>

KVYV Tutkimus Oy. 2021. Toimintaohje LM 17. Laboratoriomenetelmien ja laitteiden verifiointi ja validointi

VVY Tutkimus Oy. 2021. Toimintaohje LM 18. Tulosten jäljitettävyyys, laadunohjaus ja mittausepävarmuus.

Magnusson, B. & Örnemark, U. 2014. Second Edition. The Fitness for Purpose of Analytical Method. A laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Luettu 6.10.2021. https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf

Manahan, S. 2010. Environmental Chemistry. 9th Edition. Boca Raton: Taylor and Francis Group, LLC

Mäkinen, I., Suortti, A.-M., Saares, R., Niemi, R. & Marjanen, J. (toim.) 1996. Ohjeita ympäristönäytteiden kemiallisten analyysimenetelmien validointiin. Suomen ympäristökeskuksen moniste 59. Helsinki: Suomen ympäristökeskus.

Nordtest. 2007. Nordtest TR 537. Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories. 4th edition. Suomen ympäristökeskus. Luettu 31.3.2022 http://nordtest.info/images/documents/nt-technical-reports/NT_TR_537_edition4_English_Handbook_for_calculation_of_measurement_uncertainty_in_environmental_laboratories.pdf

SFS-EN ISO 14403-2:en:2012. Water quality. Determination of total cyanide and free cyanide using flow analysis (FIA and CFA). Part 2: Method using continuous flow analysis (CFA)

Skalar Analytical B.V. 2022. San series: Märkämiaalliset automaattianalysaattorit. Luettu 4.4.2022 <https://fi.skalar.com/tuotteet/continuous-flow-virtausanalysaattori>

Skalar. 2021. Calibration certificate. Certificate number: 1-99373863-01

Skalar. 2008. The San++ continuous flow analyzer. Luettu 4.4.2022 https://cms.esi.info/Media/documents/Skala_Sancontinuous_ML.pdf

Skalar Methods. n.d. Catnr. I295-004w/r. Issue 060221/99373863

LIITTEET

Liite 1. Reagenssit

1(2)

TULUKKO 5. Reagenssien valmistus ja säilyvyys. (Jatkuu sivulla 49)

Reagenssi	Valmistus ja säilyvyys
0,01 M NaOH	Liuota 3 l mittapullossa 1,2 g NaOH-rakeita 2000 ml kuplitettua MQ-vettä. Täytä vedellä merkkiin. Liuos säilyy huoneenlämmössä viikon. (Liuosta käytetään näytteenottajan huuhteluliuoksena sekä standardien ja kontrollien laimentamiseen. Vältä liuoksen kontaminoitumista.)
0,1M NaOH	Liuota 500 ml mittapullossa 2 g NaOH-rakeita 400 ml kuplitettua MQ-vettä. Täytä vedellä merkkiin. Liuos säilyy huoneenlämmössä viikon.
1M NaOH	Liuota 2 l mittapullossa 80 g NaOH-rakeita 1800 ml kuplitettua MQ-vettä. Odota, että liuos jäähtyy huoneenlämpöiseksi ja täytä vedellä merkkiin
Tislausreagenssi	Liuota 1 l mittapullossa 18,3 g vedetöntä sitruunahappoa 700 ml kuplitettua MQ-vettä. Lisää 40 ml 1 M NaOH-liuosta ja säädä pH 3.8 suolahapolla (1 M) tai natriumhydroksidilla (1 M). Lisää 25 ml 1 M HCl ja täytä vedellä merkkiin. Liuos säilyy jääkaapissa 3kk
Puskuriliuos	Liuota 1 l mittapullossa 2,3 g NaOH-rakeita 500 ml kuplitettua MQ-vettä. Lisää 20,5 g kaliumvetyftalaattia ja laimenna vedellä noin 975 ml. Säädä pH 5,2 suolahapolla (1 M) tai natriumhydroksidilla (1 M). Täytä vedellä merkkiin. Liuos säilyy jääkaapissa pimeässä 3kk. Ajoerään liuosta lisätään Brij35 (30 %) n. 0,5 ml
Kloramiini-T	Liuota 1 l mittapullossa 2 g kloramiini-T:tä 800 ml kuplitettua MQ-vettä. Täytä vedellä merkkiin. Liuos säilyy jääkaapissa pimeässä 3kk Liuota 1 l mittapullossa 2 g kloramiini-T:tä 800 ml kuplitettua MQ-vettä. Täytä vedellä merkkiin. Liuos säilyy jääkaapissa pimeässä 3kk

Reagenssi	Valmistus ja säilyvyys
Värjäysreagenssi	Liuota 1 l mittapullossa 7 g NaOH-rakeita 500 ml kuplitettua MQ-vettä. Lisää 16,8 g 1,3-dimetyyliarbituraattihappoa ja 13,6 g 4-pyridiinikarboksylihappoa. Käytä apuna vesihautetta ja magneettisekoittajaa. Täytä vedellä noin 975 ml ja säädä pH 5,2 suolahapolla (1 M) tai natriumhydroksidilla (1 M). Täytä vedellä merkkiin. Liuos säilyy jääkaapissa pimeässä 3kk.
Natriumtiosulfaatti	Kiinteä kaupallinen natriumtiosulfaatti, esim. Merck 1.06512.0250
Askorbiinihappo	Kiinteä kaupallinen askorbiinihappo, esim. VWR 20150.290
Lyijykarbonaatti	Kiinteä kaupallinen lyijy(II)karbonaatti esim. Merck 1.07381.0250

Liite 2. Kontrolliliuosten valmistus

TAULUKKO 6. Kontrolliliuosten valmistus ja säilyvyys.

Kontrollinäyte	Valmistus ja säilyvyys
Kontrollinäytteen perusliuos 1000 mg/l	Käytetään valmista kaupallista liuosta esim. Sigma-Aldrich 90157 (erittäin myrkyllinen, ympäristölle vaarallinen). Liuos säilyy valmistajan ilmoittaman ajan. Huom. avattu pullo säilyy 1 vuoden.
Kontrollinäytteen työliuos 100 mg/l	Pipetoidaan täyspipetillä 10,0 ml kontrollinäytteen perusliuosta (2.14.1) 100 ml:n mittapulloon ja laimennetaan 0,01 M NaOH-liuoksella merkkiin. Liuos säilyy jääkaapissa 1 kk.
Kontrollinäytteen työliuos 1 mg/l	Pipetoidaan täyspipetillä 2,5 ml kontrollinäytteen työliuosta 250 ml:n mittapulloon ja laimennetaan 0,01 M NaOH-liuoksella merkkiin. Liuos valmistetaan päivittäin.
Kontrolliliuos 100 µg/l	Pipetoidaan täyspipetillä 10,0 ml kontrollinäytteen työliuosta 1 mg/l 100 ml mittapulloon ja laimennetaan 0,01 M NaOH-liuoksella merkkiin. Liuos valmistetaan päivittäin.
Kontrolliliuos 50 µg/l	Pipetoidaan täyspipetillä 5,0 ml kontrollinäytteen työliuosta 1 mg/l 100 ml mittapulloon ja laimennetaan 0,01 M NaOH-liuoksella merkkiin. Liuos valmistetaan päivittäin.
Kontrolliliuos 10 µg/l	Pipetoidaan täyspipetillä 1,0 ml kontrollinäytteen työliuosta 1 mg/l 100 ml mittapulloon ja laimennetaan 0,01 M NaOH-liuoksella merkkiin. Liuos valmistetaan päivittäin.
Kontrolliliuos 2 µg/l	Pipetoidaan täyspipetillä 4,0 ml kontrolliliuosta 50µg/l 100 ml mittapulloon ja laimennetaan 0,01 M NaOH-liuoksella merkkiin. Liuos valmistetaan päivittäin.
Lisäyskontrolli 50 µg/l	Lisäyskontrollia tehdään syanidin kalibrointityöliuoksesta 500 µg/l (liite 1). Työliuosta lisätään 9 ml:n näytettä 1 ml, jolloin kontrollinäytteen lopputilavuus on 10 ml. Liuos valmistetaan päivittäin.

Liite 3. Lineaarisuuden tulokset

TAULUKKO 7. Lineaarisuusmittausten tulokset.

Standardiliuos (µg/l)	Pitoisuus (µg/l)	Piikin korkeus	keskiarvot (µg/l)	Keskiarvot (piikki)	RSD
0	0,03	0,3185			
0	0,00	0,3195	0,02	0,3229	1,155
0	0,00	0,3319			
0	0,03	0,3215			
1	0,85	0,3221			
1	0,98	0,3242	0,92	0,3271	0,099
1	1,02	0,3365			
1	0,84	0,3257			
5	4,97	0,3408			
5	4,90	0,3428	5,00	0,3467	0,020
5	5,14	0,3557			
5	4,98	0,3474			
10	9,98	0,3637			
10	10,12	0,3678	10,03	0,3709	0,007
10	9,98	0,3781			
10	10,04	0,3739			
20	20,07	0,4097			
20	20,04	0,4152	20,00	0,4189	0,006
20	19,82	0,4238			
20	20,08	0,4267			
40	40,09	0,5011			
40	40,02	0,5108	40,04	0,5154	0,003
40	39,89	0,5172			
40	40,17	0,5325			
60	60,17	0,5928			
60	60,14	0,6071	60,08	0,6119	0,003
60	60,16	0,6115			
60	59,84	0,636			
80	80,09	0,6837			
80	79,52	0,6998	79,97	0,7077	0,004
80	80,06	0,7041			
80	80,21	0,7432			
100	99,79	0,7737			
100	100,28	0,7992	99,96	0,8040	0,002
100	99,93	0,7966			
100	99,84	0,8465			

Liite 4. Määritys- ja toteamisrajan laskennan tulokset

TAULUKKO 8. Määritys- ja toteamisrajan laskentaan käytetyt nollanäytteet.

pvm.	KLO		pvm.	KLO		selite	tulos
26.10.2021	0		01.11.2021	0,06		keskiarvo	0,03234556
27.10.2021	0		01.11.2021	0,06		keskihajonta	0,06452834
01.11.2021	0		26.10.2021	0,07			
26.10.2021	0,01		27.10.2021	0,07		toimintaraja	0,22593059
26.10.2021	0,01		01.11.2021	0,07		määritysraja	0,61310066
26.10.2021	0,01		03.11.2021	0,07			
27.10.2021	0,01		26.10.2021	0,09			
27.10.2021	0,01		01.11.2021	0,09			
01.11.2021	0,01		03.11.2021	0,09			
18.11.2021	0,02		26.10.2021	0,1			
27.10.2021	0,03		01.11.2021	0,1			
01.11.2021	0,03		27.10.2021	0,12			
01.11.2021	0,03		26.10.2021	0,13			
01.11.2021	0,04		27.10.2021	0,13			
09.11.2021	0,04		27.10.2021	0,13			
26.10.2021	0,05		02.11.2021	0,13			
01.11.2021	0,05		02.11.2021	0,13			
01.11.2021	0,05		02.11.2021	0,17			
26.10.2021	0,06						

Liite 5. Saantokokeiden tulokset

TAULUKKO 9. Saantokokeiden tulokset.

pvm.	kaliumheksa- syanoferaatti	kaliumtio- syanaatti		saanto % kaliumheksa- syanoferaatti	saanto % kaliumtio- syanaatti
10.marras	94,18	0,62		94,18 %	0,06 %
10.marras	94,03	0,62		94,03 %	0,06 %
10.marras	94,26	0,62		94,26 %	0,06 %
11.marras	95,48	0,79		95,48 %	0,08 %
11.marras	95,64	0,76		95,64 %	0,08 %
11.marras	95,97	0,75		95,97 %	0,08 %
16.tammi	96,15	0,65		96,15 %	0,07 %
16.tammi	96,67	0,63		96,67 %	0,06 %
16.tammi	96,19	0,62		96,19 %	0,06 %
18.tammi	95,7	0,71		95,70 %	0,07 %
18.tammi	95,13	0,73		95,13 %	0,07 %
19.tammi	96,25	0,62		96,25 %	0,06 %
19.tammi	97,21	0,57		97,21 %	0,06 %
Ka.	95,60	0,67		95,60 %	0,07 %
s	0,977689584	0,0698625			

Liite 7. Vertailunäytteen mittaustulokset

TAULUKKO 11. Saantokokeiden tulokset.

laite	Vertailukoe	Matriisi	Näyte	Lab. tulos	Järv. tulos mg/l	Lab. hajonta	Järv. hajonta	Lab. Z	Järv. z	Arvostelu	Näytteen	Analyysoija	laimennos
CFA	AXIO 6/2021	Jätevesi	PT-AQ-17B	10,64	10,63	10	10	0,009	0,009	ok	55241	ARA	x1000
CFA	AXIO 6/2021	Jätevesi	PT-AQ-17B	10,096	10,63	10	10	-0,502	-0,502	ok	55241	ARA	x200
FIA	AXIO 6/2021	Jätevesi	PT-AQ-17B	11,098	10,63	10	10	0,440	0,440	ok	55241	LHEM	x1000
FIA	AXIO 6/2021	Jätevesi	PT-AQ-17B	11,937	10,63	10	10	1,230	1,230	ok	55241	LHEM	x200

Liite 8. Mukit-ohjelman tulokset

TAULUKKO 12. Mukit -mittausepävarmuus ohjelman tulokset eri pitoisuusalueille.

30.1.2022

Summary of the method's measurement uncertainties

Method information

Method name LA166 Kokonaissyänidi, CFA-menetelmä
 Sample Type (Matrix) vesi
 Additional information Uusi laite

Calculated Uncertainties at Different Measurand Levels

Concentration range (µg/l)	Within-lab Reproducibility Data	u (Rw)	Bias Data	u (bias)	Combined standard uncertainty	Expanded uncertainty
1-5	Control sample and routine sample replicates	0,384 µg/l	Certified reference material / Control Sample	0,240 µg/l	0,453 µg/l	0,9054 µg/l
5-10	Control sample and routine sample replicates	7,116 %	Certified reference material / Control Sample	5,994 %	9,304 %	18,6084 %
5-10	Control sample and routine sample replicates	0,415 µg/l	Certified reference material / Control Sample	0,399 µg/l	0,576 µg/l	1,1513 µg/l
10-100	Control sample and routine sample replicates	4,700 %	Certified reference material / Control Sample	5,063 %	6,908 %	13,8159 %
20-50	Control sample and routine sample replicates	4,305 %	Certified reference material / Control Sample	5,217 %	6,764 %	13,5275 %

Liite 9. SFA- ja FIA-laitteistolla mitatut tulokset.

TAULUKKO 13. Luonnonnäytteiden mittaustulokset.

ajettu (FIA)	ajettu (CFA)	näytenro.	näytetyyppi	1.tulos (µg/l)	2.tulos (µg/l)	Δ	Ero% (rin.)	(FIA) tul
10.marras	10.marras	105790	4FORTUM/KVNorm	-0,54	-0,54		0,00 %	<5
25.loka	10.marras	100438	4FORTUM/KVNorm	-0,33	-0,45		-26,67 %	<5
1.marras	10.marras	104426	FORTUMUL/KVkoonta	-0,31	-0,31		0,00 %	<5
15.marras	15.marras	108604	FORTUMHU/HA(0,1)	-0,08	-0,07		-14,29 %	<5
1.marras	4.marras	102559	(4SCANTRE/Vesi 1) raakavesi	-0,06	-0,06		0,00 %	<5
1.marras	4.marras	102561	(4SCANTRE/Vesi 1) lähtevä vesi	-0,05	-0,05		0,00 %	<5
1.marras	4.marras	102549	jätevesi	-0,02	-0,04		-50,00 %	<5
1.marras	4.marras	102560	(4SCANTRE/Vesi 1) raakavesi	-0,04	-0,04		0,00 %	<5
15.marras	11.marras	107829	verkosto	-0,02	-0,04		-50,00 %	<5
1.marras	4.marras	103186	4SAVO.KA/Joensuu	-0,02	-0,03		-33,33 %	<5
25.loka	4.marras	101674	pohjavesi	0,02	-0,01		-300,00 %	<5
29.marras	26.marras	113152	verkosto	0,03	0,01		200,00 %	<5
15.marras	15.marras	108202	4FORTUM/HA	0,06	0,03		100,00 %	<5
4.loka	2.marras	93137	verkosto	0,01	0,04		75,00 %	<5
23.marras	26.marras	110750	raakavesi	0,08	0,04		100,00 %	<5
11.loka	3.marras	95096	talousvesi	0,03	0,05		40,00 %	<5
25.loka	3.marras	99836	verkosto	0,08	0,05		60,00 %	<5
23.marras	26.marras	110612	verkosto	0,08	0,05		60,00 %	<5
11.loka	3.marras	95136	4SAVO.KA/Joensuu	0,07	0,06		16,67 %	<5
18.loka	3.marras	96235	verkosto	0,04	0,06		33,33 %	<5
23.marras	26.marras	110748	raakavesi, uusi kaivo	0,1	0,09		11,11 %	<5
23.marras	26.marras	110749	raakavesi, vanha kaivo	0,14	0,09		55,56 %	<5
25.loka	3.marras	99837	vedenottamon vesi	0,09	0,13		30,77 %	<5
25.loka	3.marras	99905	4SCANTRE/vesi1	0,18	0,13		38,46 %	<5
18.loka	3.marras	98995	verkosto	0,12	0,14		14,29 %	<5
18.loka	3.marras	98166	1ETAPPI/HP3(0,2)	0,21	0,17		23,53 %	<5
4.loka	2.marras	92802	verkosto	0,17	0,18		5,56 %	<5
18.loka	3.marras	98195	pohjavesi	0,13	0,18		27,78 %	<5
20.syys	2.marras	88464	porakaivo	0,16	0,21		23,81 %	<5
29.syys	2.marras	92773	verkosto	0,27	0,21		28,57 %	<5
18.loka	3.marras	97498	Pohjavesi	0,16	0,21		23,81 %	<5
18.loka	3.marras	97481	1ETAPPI/KAIVO4(0,2)	0,33	0,23		43,48 %	<5
20.syys	2.marras	88051	1STORKOH/pp03	0,26	0,24		8,33 %	<5
18.loka	3.marras	98414	(4SAVO.KA)varikon kaivovesi	0,76	0,69		10,14 %	<5
20.syys	2.marras	88699	jätevesi	0,78	0,83		6,02 %	<5
20.syys	2.marras	87868	1STORKOH/pp21	1,1	1		10,00 %	<5
14.joulu	16.joulu	118726	jätevesi	1,45	1,3		11,54 %	<5
15.marras	16.marras	109451	4SAVO.KA/KUOPIO	1,36	1,35		0,74 %	<5
15.marras	11.marras	107604	14VIKBY/Avloppsv	1,5	1,42		5,63 %	<5
10.marras	10.marras	106854	4SAVO.KA/Joenssv	1,34	1,46		8,22 %	<5
20.joulu	15.joulu	119755	jätevesi 2x	1,7	1,68		1,19 %	9,914
25.loka	3.marras	101632	jätevesi	1,83	1,9		3,68 %	<5
11.loka	3.marras	94493	puhdistettu lauhdevesi	2,08	1,99		4,52 %	<5
18.loka	3.marras	96793	(6LH/KK2) kaivo	2,02	2,05		1,46 %	<5
14.joulu	16.joulu	116050	jätevesi	2,54	2,14		18,69 %	10,854
7.joulu	8.joulu	115248	jätevesi	2,22	2,23		0,45 %	<5
1.marras	4.marras	104417	ympäristönäyte	2,51	2,48		1,21 %	6,742
11.loka	2.marras	94787	6LSPUTKP/KP(YP)	3,24	3,36		3,57 %	<5
20.joulu	15.joulu	119920	4FORTUM/KVNorm 2x	3,44	3,38		1,78 %	<5
11.loka	4.marras	94788	6LSPUTKP/KP(AP)	3,28	3,41		3,81 %	5,909
11.loka	2.marras	94788	6LSPUTKP/KP(AP)	3,68	4,08		9,80 %	5,909
14.joulu	16.joulu	118296	jätevesi	6,13	4,92		24,59 %	<5
20.joulu	16.joulu	120599	jätevesi 5x	9,7	7,7		25,97 %	<5
23.marras	26.marras	110948	kaivo (jv)	22,11	23,19		4,66 %	18,297
11.loka	2.marras	95789	teollinen jätevesi	28,48	29,63		3,88 %	50,324
20.joulu	16.joulu	119297	puhdistettu lauhdevesi 5x	137,7	139,5		1,29 %	139,454
20.joulu	15.joulu	118955	kaivo (jv) 2x	168,24	163,14		3,13 %	235,075
20.joulu	16.joulu	118955	kaivo (jv) 10x	188,4	198,6		5,14 %	235,07
14.joulu	15.joulu	117803	jätevesi 100x	2317	2381		2,69 %	3337,71
5.heinä	2.marras	55241	vertailunäyte 200x (10,63mg/l)	10090	10096		0,06 %	11937
5.heinä	2.marras	55241	vertailunäyte 1000x (10,63mg/l)	10640	10640		0,00 %	11098