

Opinnäytetyö (AMK)

Laboratorioala

2010

Jussi Ritala

# VALMISPUTKIMENETELMÄN VALIDOINTI AKTIIVISEN KLOORIN MÄÄRITYKSEEN



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Laboratorioalan koulutusohjelma

Opinnäytetyön valmistumisajankohta: Syksy 2010 | Sivumäärä: 47

Ohjaajat: Niina Kohonen (Lounais-Suomen vesi- ja ympäristötutkimus Oy); Taina Hovinen (Turun AMK)

**Tekijä: Jussi Ritala**

## VALMISPUTKIMENETELMÄN VALIDOINTI AKTIIVISEN KLOORIN MÄÄRITYKSEEN

Tämän opinnäytetyön toimeksiantaja oli Lounais-Suomen vesi- ja ympäristötutkimus Oy, joka on vesien tarkkailuun ja suojeluun erikoistunut yhtiö. Työn tarkoituksena oli validoida menetelmävaihdosta varten uusi aktiivisen kloorin määrittymenetelmä. Menetelmässä klooripitoisuutta mitataan Hach Langen DR 2800 fotometrillä valmistuen näytteet Dr. Langen valmiskyvettipakkaus LCK 310/343:lla. Uuden menetelmän toivottiin tuovan analyysiin nopeutta ja sujuvuutta. Validoinnin tarkoituksena oli varmistaa menetelmän toimivuus akkreditointia varten.

Aktiivisia klooriyhdisteitä mitataan talous- ja uima-allasvesistä. Yhdisteet voidaan jakaa vapaaseen ja sidottuun aktiiviseen kloorijäännökseen. Yhdisteiden pitoisuuden mittaaminen perustuu hapettavien klooriyhdisteiden reaktioon *N,N*-dietyyli-1,4-fenyleenidiamiinin kanssa, jossa syntyy kolorimetrisesti mitattava värillinen reaktiotuote. Kyvettipakkauksessa on kaikki tarvittavat reagenssit valmiina, ja näyte tarvitsee vain pipetoida sille tarkoitettuun kyvetiin. Se asetetaan fotometriin, ja laite antaa tuloksen.

Validoinnissa tarkasteltiin lineaarisuutta, määrittämissä rajoissa satunnaista ja systemaattista virhettä, mittausepävarmuutta, ja verrattiin uuden ja vanhan menetelmän tuloksia toisiinsa. Testit suoritettiin keväällä 2010 käyttäen normaaliin näytesarjaan kuuluvia näytteitä, sekä synteettisiä näytteitä.

Menetelmälle suoritetuista validointitesteistä saatiin asetetun vaatimustason täyttävät tulokset yhtä testiä lukuun ottamatta. Kahden menetelmän tulosten välillä ilmeni merkittävä ero, joka tosin asettui mittausepävarmuuden rajoihin. Menetelmä todettiin käyttötarkoitukseensa soveltuvaksi vaaditulla tarkkuudella ja toistettavuudella. Analyysia saatiin nopeutettua ja yksinkertaistettua, joten menetelmävaihdos saavutti tavoitteensa.

ASIASANAT: validointi, aktiivinen kloori, kolorimetrinen mittaus, fotometri

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Laboratory Technology

Date: Autumn 2010 | Total number of pages: 47

Instructors: Niina Kohonen (Lounais-Suomen vesi- ja ympäristötutkimus Oy); Taina Hovinen (Turku University of Applied Sciences)

Author: Jussi Ritala

## VALIDATION OF CUVETTE TEST FOR ACTIVE CHLORINE

This thesis was commissioned by Lounais-Suomen vesi- ja ympäristötutkimus Oy which specializes in water monitoring and protection. The purpose was to validate a new method for the determination of active chlorine. In the analysis chlorine content is measured by a Hach Lange DR 2800 photometer and Dr. Lange cuvette test kit LCK 310/343 is used in sample preparation. A new method was to expedite and facilitate the analysis. The aim of the validation was to ensure method performance for accreditation.

Active chlorine compounds are measured from pool and drinking water. The compounds can be divided into free and combined active chlorine. The assay is based on the reaction of oxidizing chlorine and *N,N*-diethyl-*p*-phenylenediamine resulting into a colorimetrically measureable pink reaction product. The test kit includes all the necessary reagents, and one will only need to pipette the sample into the cuvette which is then placed in the photometer and the device gives the result.

During the validation, linearity, limit of determination, random and systematic errors, and measurement uncertainty were examined, and the results obtained by the old and the new method were compared. Tests were carried out in spring 2010 using samples of a normal measuring series, as well as synthetic samples.

All of the validation tests were qualified except one. The results of the two methods differed significantly, although the differences remained within the limits for measurement uncertainty. The method was found suitable for the intended use with required accuracy and precision. The analysis was accelerated and simplified, so the change of method reached its goals.

KEYWORDS: validation, active chlorine, colorimetric measurement, photometer

# SISÄLTÖ

<b>1 JOHDANTO</b>	<b>6</b>
<b>2 TALOUS- JA UIMA-ALLASVESIEN KLOORAUS</b>	<b>7</b>
2.1 Aktiivinen kloori	8
2.2 Kloorinäytteet	8
<b>3 AKTIIVISEN KLOORIN MÄÄRITYS</b>	<b>9</b>
3.1 Menetelmän periaate	9
3.2 Spektrofotometrinen mittaus	10
<b>4 KÄYTTÖÖNOTETTAVA MENETELMÄ</b>	<b>11</b>
4.1 Fotometri	11
4.2 Näyteputket	13
4.3 Mittauksen vaiheet	13
4.4 Erot vanhaan menetelmään	14
4.5 Menetelmänkehitys	16
<b>5 VALIDOINTI</b>	<b>17</b>
5.1 Validointi laatujärjestelmän osana	17
5.2 Kyvettitestien validointi	19
<b>6 VALIDOINTITESTIEN SUORITUS</b>	<b>20</b>
6.1 Lineaarisuus	20
6.2 Määritysraja	23
6.3 Satunnaisvirhe	23
6.4 Systemaattinen virhe ja tarkkuus	24
6.5 Mittausepävarmuus	25
6.6 Menetelmävertailu	26
<b>7 TULOSTEN ESITTELY JA KÄSITTELY</b>	<b>26</b>
7.1 Lineaarisuus	27
7.2 Määritysraja	31
7.3 Satunnaisvirhe	31
7.4 Systemaattinen virhe	34
7.5 Mittausepävarmuus	36
7.6 Menetelmävertailu	36
7.7 Säilyvyys	39
7.8 Häiriötekijät	40
7.9 Kustannuslaskelmat	41

<b>8 YHTEENVETO</b>	<b>41</b>
<b>LÄHTEET</b>	<b>43</b>
<b>LIITTEET</b>	
1 Näytemittaukset uudella menetelmällä	
2 Näytemittaukset vanhalla menetelmällä	
3 Nollanäytetulokset uudella menetelmällä	
4 Kontrollinäytetulokset uudella menetelmällä	
<b>KUVAT</b>	
Kuva 1. Analyysiin käytettävät välineet	12
<b>KUVIOT</b>	
Kuvio 1. DPD:n spektri	14
Kuvio 2. Kalibrintisuora	27
Kuvio 3. Jäännökset pitoisuuden funktiona	29
Kuvio 4. Rinnakkaismääritysten tulosten lineaarisuus	32
Kuvio 5. X-kortti	33
Kuvio 6. r-kortti	34
Kuvio 7. Menetelmävertailu: vapaa kloori	37
Kuvio 8. Menetelmävertailu: kokonaiskloori	37
Kuvio 9. Vapaan kloorin häviävyys	39
Kuvio 10. Kokonaiskloorin häviävyys	40
<b>TAULUKOT</b>	
Taulukko 1. Allasvesien laatuvaatimuksia	9
Taulukko 2. DR 2800:n toiminnan spesifikaatioita	11
Taulukko 3. Erot standardiohjeeseen	15
Taulukko 4. Kalibrintisuoran pisteet	22
Taulukko 5. Vasteet	27
Taulukko 6. Mallien vertailu	28
Taulukko 7. y-akselin leikkauspisteen luottamusrajat	29
Taulukko 8. Kalibrintisuorien vertailu	30
Taulukko 9. Kalibrintisuoran luottamusvälit	30
Taulukko 10. Lasketut mittausrajat	31
Taulukko 11. Satunnaisvirhe	32
Taulukko 12. Saantokokeen tulokset	35
Taulukko 13. Menetelmien erot	37
Taulukko 14. Mittausepävarmuuden rajat keskiarvoille	38

## Johdanto

Lounais-Suomen vesi- ja ympäristötutkimus Oy on vesistöjen, jätevesien, sekä talous- ja uimavesien tutkimukseen erikoistunut yhtiö. Se on Lounais-Suomen vesiensuojeluyhdistyksen omistuksessa, ja sen toiminta painottuu pääosin jätevesikuormittajien, kalankasvattamojen ja kaatopaikkojen velvoitetarkkailuun. Yhdistyksessä jäseninä on alueen kuntia, yrityksiä sekä muita yhteisöjä. Sen toiminnan tarkoituksena on edistää vesiensuojelua toimialueellaan.<sup>1</sup>

Yhtiön laboratorio on akkreditoitu standardin SFS-EN ISO/IEC 17025:2005 *Testaus- ja kalibrointilaboratorioiden pätevyys. Yleiset vaatimukset* mukaan, ja se on Elintarvikeviraston hyväksymä tutkimuslaboratorio.<sup>1</sup> Sen toimintaan kuuluu fysikaalis-kemiallisia, mikrobiologisia, biologisia sekä aistinvaraisia määrittämiä ja tutkimuksia. Analyysivalikoima sisältää aktiivisen kloorin määrittämisen mm. uima- ja juomavesistä. Tämä opinnäytetyö käsittelee kyseiseen käyttötarkoitukseen valittua uutta menetelmää ja sen validointia.

Käytössä ollut vanha spektrofotometrinen menetelmä oli koettu liian hitaaksi ja aikaa vieväksi. Spektrofotometri on vanha, ja sen rikkoutuessa varaosia ei välttämättä ole enää saatavilla. Kloorin määrittäminen pitää suorittaa näytteistä mahdollisimman nopeasti niiden saapuessa laboratorioon, sillä se reagoi näytteessä olevien hapettuvien aineiden kanssa. Näytteitä saapuu usein paljonkin ilman ennakkotietoa eikä niihin voi varautua. Tulosten luotettavuuden kannalta olisi tärkeää, ettei näytteiden mittauksia jouduttaisi jättämään seuraavaan päivään. Uuden menetelmän toivottiin tuovan nopeutta ja sujuvuutta, säilyttäen kuitenkin vaadittavan luotettavuuden.

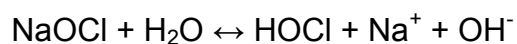
Uuteen menetelmään sisältyy Dr. Langen valmistamat valmiskyvetit, joiden mittaukseen käytettäisiin Hach Langen DR 2800 fotometria. Se on periaatteeltaan vanhaa menetelmää vastaava. Menetelmä aiottiin akkreditoida, joten validointi oli tällöin välttämätöntä.

# 1 Talous- ja uima-allasvesien klooraus

Validoitavalla menetelmällä on tarkoitus mitata erilaisia uima- ja talousvesiä, joihin on lisätty hapettavia klooriyhdisteitä desinfiointitarkoitukseen. Kloori voi olla kuitenkin useana eri yhdisteenä vedessä riippuen pH:sta ja veteen joutuvista muista yhdisteistä, joiden kanssa klooriyhdisteet reagoivat.<sup>2</sup>

Klooridesinfiointi on suosituin tapa turvata sekä uima- että juomaveden mikrobiologinen laatu. Voimakas hapettavuus on kloorin desinfiointikyvyn perusta. Veteen liuotettuna se esiintyy alikloorihapokkeena tai hypokloriitti-ionina. Veden pH määrää kumpaa yhdistettä se sisältää enemmän. Alempi pH suosii alikloorihapoketta, joka on hypokloriittia noin kymmenen kertaa tehokkaampaa desinfiointissa. Tällöin käytännössä vaikuttava desinfiointiaine vedessä on alikloorihapoke, jonka muodostus lisääntyy sitä mukaa, mitä alemmas pH-arvosta 9 mennään. Allasveden pH on oltava välillä 6,5–7,6, jotta alikloorihapokkeen desinfiointivaikutus olisi riittävä taulukossa 1 (sivu 9) esitetyillä vapaan kloorin pitoisuuksilla<sup>4</sup>.<sup>3</sup>

Veteen lisättäessä esimerkiksi kaasumainen kloori ja natriumhypokloriitti dissosioituvat alikloorihapokkeeksi seuraavien reaktioiden kautta<sup>2</sup>:



Kloori voidaan lisätä veteen eri yhdisteinä riippuen mm. tavoiteltavasta klooraustehokkuudesta ja tarvittavasta desinfektion vaikutusajasta. Käytettäviä kemikaaleja ovat kloorikaasu, natriumhypokloriittiliuos, kiteinen kalsiumhypokloriitti, klooriamiiniliokset ja veteen liuotettava kaasumainen klooridioksidi. Uima-allasvesissä käytössä ovat etenkin kloorikaasu ja hypokloriitit. Klooriamiinit ja klooridioksidi soveltuvat juomaveden desinfiointiin ja mikrobikasvun hillintään verkostoissa hyvän pysyvyytensä ansiosta. Klooridioksidia ei kuitenkaan käsitellä tässä opinnäytetyössä enempää, sillä sen analysoinnille ei ole tällä hetkellä olemassa vaatimuksia eikä kysyntää.<sup>5</sup>

Bakteerien tappamisen lisäksi kloori auttaa poistamaan veteen joutunutta likaa. Uimavesiin irtoaa ammoniumia sekä ureaa hien ja virtsan mukana. Reaktiossa kloorin kanssa näistä syntyy klooriamiineja. Ne hiljalleen ne hajoavat ja näin poistavat lika-aineet vedestä. Klooriamiinit ovat niin sanottua sitoutunutta klooria. Sen määrä uimavedessä kuvaa veden puhtautta.<sup>2</sup>

### 1.1 Aktiivinen kloori

Aktiivisella kloorilla tarkoitetaan klooriyhdisteitä, jotka pystyvät toimimaan hapettimina. Kloorikaasu on voimakas hapetin, ja sen johdannaisyhdisteet, kuten hypokloriitit, kloorin hapot ja hapokkeet ovat myös hapettimia tehokkuudeltaan vaihdellen. Aktiivinen kloori on jaettu vesissä esiintymismuotojensa perusteella vapaaseen ja sitoutuneeseen aktiiviseen klooriin.<sup>2</sup>

Vapaa aktiivinen kloori tarkoittaa kloorimolekyylin ( $\text{Cl}_2$ ) lisäksi muita hapettavia klooriyhdisteitä, kuten alikloorihapoketta ( $\text{HOCl}$ ) ja hypokloriitti-onia ( $\text{OCl}^-$ ). Aktiivinen klooriyhdiste määritellään sitoutuneeksi, kun siihen on liittynyt jokin typen yhdiste. Sitoutuneita klooriyhdisteitä ovat esimerkiksi orgaaniset ja epäorgaaniset mono- ja diklooriamiinit ( $\text{NH}_2\text{Cl}$ ,  $\text{NHCl}_2$ ), sekä typpikloridi ( $\text{NCl}_3$ ).<sup>2</sup>

Klooriyhdisteiden suhteellinen desinfiointitehokkuus voidaan esittää seuraavassa järjestyksessä<sup>2</sup>:



### 1.2 Kloorinäytteet

Yleisimmät kloorinäytteet Lounais-Suomen vesi- ja ympäristötutkimus Oy:ssä ovat uima-allasvesiä, mutta myös talousvesinäytteitä tulee säännöllisesti. Näissä klooriyhdisteitä esiintyy vaihtelevia määriä, sillä talousvesiverkostoissa desinfiointikemikaalien määrät ovat vähäisempiä uimavesiin verrattuna. Sitoutuneen kloorin määrä näytteissä vaihtelee luonnollisesti mm. altaan käyttötarkoituksen mukaan. Taulukossa 1 on mainittu joitakin klooripitoisuuden raja-arvoja uima-allasveden laatuvaatimuksia sisältävästä asetuksesta<sup>4</sup>.



Uimavesinäytteiden pitoisuudet painottuvat näiden rajojen läheisyyteen, kun taas verkostovesissä pitoisuudet ilmenevät lähinnä joko määritysrajan ylittävänä tai alittavina määrinä.

Taulukko 1. Allasvesien laatuvaatimuksia

	pH-arvo	Klooripitoisuus (mg/l)
Sidottu kloori	6,5 – 7,6	≤ 0,4
Vapaa kloori	≤ 7,3	≥ 0,3
	≥ 7,3	≥ 0,4
	≤ 1,2 mg/l	

Uima-altaiden näytteiden otosta vastaavat työhön koulutuksen saaneet terveystarkastajat. Näytteet tuodaan laboratorioon ruskeissa lasipulloissa, jotka on täytetty mahdollisimman täyteen ilmakosketuksen välttämiseksi. Tämän käytännön tarkoituksena on hidastaa aktiivisten klooriyhdisteiden reagointia hapettavien aineiden kanssa. Valo, sekoittaminen ja lämpö nopeuttavat reaktioita. Näytteet tulisikin mitata aina mahdollisimman pian niiden saavuttua laboratorioon.

## 2 Aktiivisen kloorin määrittäminen

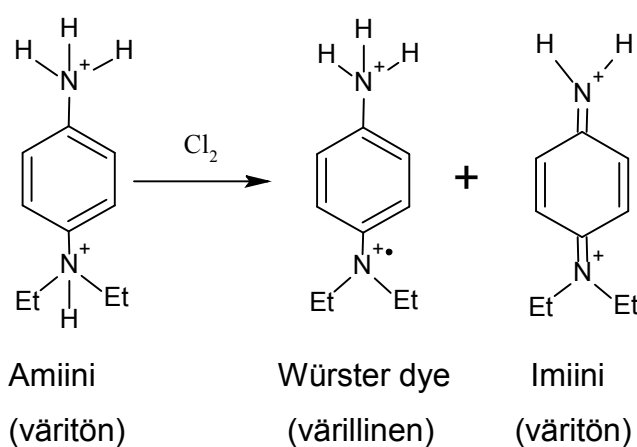
Aktiivisen kloorin kvantitatiiviset määrittämenetelmät perustuvat tavalla tai toisella kloorin hapettavuuteen. On olemassa erilaisia kolorimetrisia ja titrimetrisia menetelmiä. Näistä kolorimetrisen mittauksen etuna titrimetrisiin menetelmiin verrattuna on nopeus. Siksi se soveltuu paremmin käyttöön pitkiinkin näytesarjoihin.<sup>6</sup>

### 2.1 Menetelmän periaate

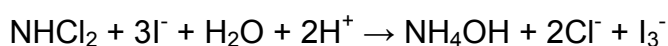
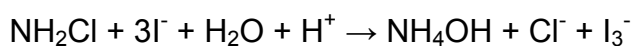
Käyttöön otettavan menetelmän periaate on sama, kuin vanhassa spektrofotometrisessä menetelmässä. Aktiivinen kloori hapettaa *N,N*-dietyyli-1,4-fenyleenidiamiinin muodostaen pH-alueella 6,2-6,5 suhteellisen pysyvän vapaan radikaalin, jolla on punertava väri. Havaittu väri mitataan fotometrisesti.

Klooriamiinit reagoivat hitaasti DPD:n kanssa. Niiden sisältämä kloori kvantitoidaan kaliumjodidin avulla. Jodidi hapettuu ensin kloorin vaikutuksesta trijodidiksi, joka sitten hapettaa DPD:n värilliseen muotoon. Värillinen reaktiotuote saattaa hapettua vielä värittömäksi imiiniksi, jos hapettavia aineita on paljon suhteessa DPD:n määrään.<sup>6</sup>

Alla on kuvattu DPD:n eli *N,N*-dietyyli-1,4-fenyleenidiamiinin reaktio kloorin kanssa pääpiirteissään. Kaaviossa on oikealla ensin muodostuva värillinen yhdiste, ja sen jälkeen mahdollinen syntyvä väritön hapetustuote<sup>6</sup>:



Alla on jodidin reaktio monoklooriamiinin ja diklooriamiinin kanssa. Syntyvä trijodidi-ioni reagoi kloorimolekyylin tavoin DPD:n kanssa yllä esitetyllä tavalla<sup>6</sup>:



## 2.2 Spektrofotometrinen mittaus

Spektrofotometrinen mittaus perustuu Lambertin ja Beerin lakiin, jonka mukaan sähkömagneettisen säteilyn intensiteetti pienenee, kun säteily kulkee näyteaineen läpi. Kullakin aineella on yksilöllinen ja muuttumaton absorptiospektri. Tätä ominaisuutta voidaan hyödyntää aineiden pitoisuuden määrittämisessä. Mittaukseen valitaan aallonpituus, jolla näyte absorboi voimakkaimmin ilman häiritsevien komponenttien absorptiota. Spektrofotometreissa ja fotometreissa on säteilylähde, josta valonsäde johdetaan näytteen läpi, jolloin mitataan muuttunut säteilyn intensiteetti.

### 3 Käyttöönottettava menetelmä

Uuden menetelmän pohjana on Dr. Langen kehittämä niin sanottu kyvettitesti. Siihen kuuluu Hach Lange DR 2800 fotometri ja tähän yhteensopivat mittausputket. Tämänkaltaiset testit on kehitetty tuomaan analyysiin yksinkertaisuutta ja nopeutta luotettavuuden pahasti kärsimättä. Analyysit on suunniteltu niin, että ne voidaan suorittaa niin laboratoriossa kuin kenttäolosuhteissakin<sup>7, 8</sup>.

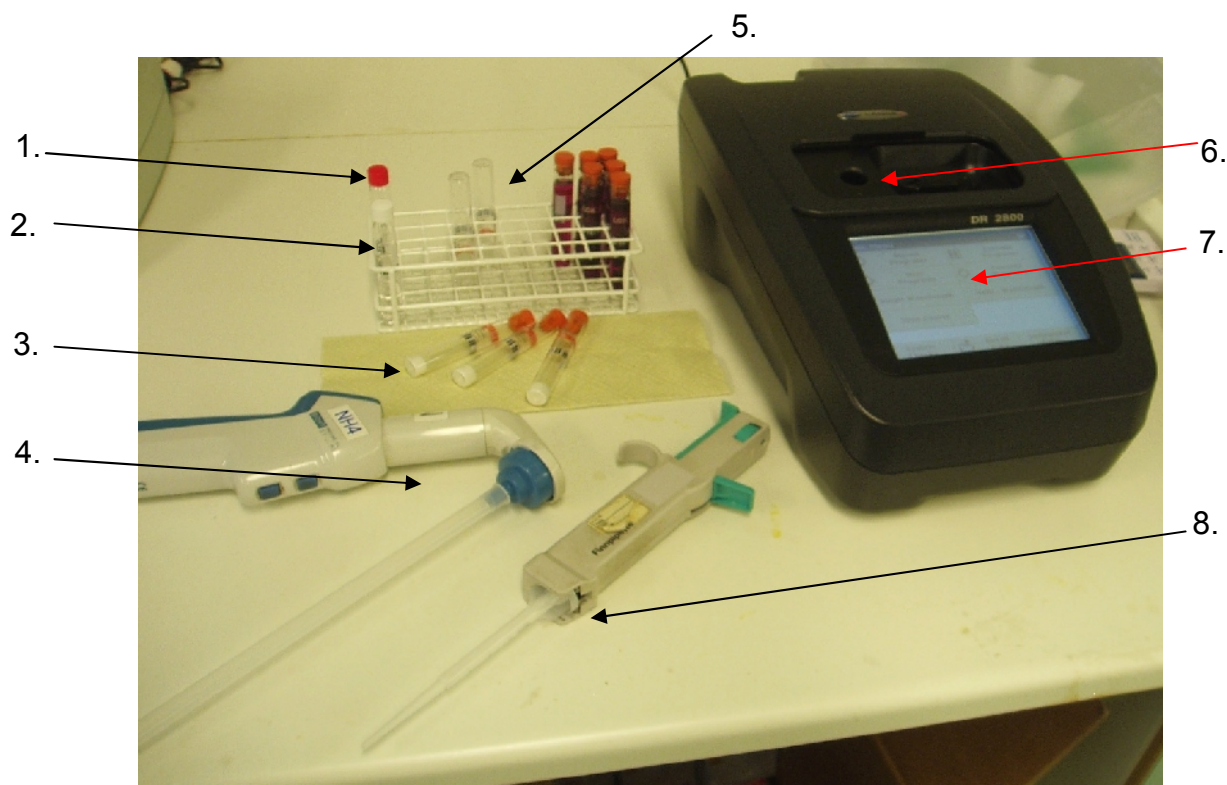
#### 3.1 Fotometri

Mittauksiin käytettävä fotometri on kuvassa 2 näkyvä Hach Langen malli DR 2800. Sillä voidaan mitata erilaisia Dr. Langen valmisputkiin perustuvia menetelmiä tai myös luoda omia menetelmiä<sup>9</sup>. Laite soveltuu sekä kenttä-, että laboratoriokäyttöön<sup>7</sup>.

Laitteen ominaisuuksiin kuuluu spektrofotometrin normaalit toiminnot, kuten mittaukset eri aallonpituuksilla, aallonpituusalueiden skannaus ja mittaukset ajan funktiona. Fotometri käyttää volframilamppua, jolla saavutetaan jatkuva mittausalue näkyvän valon aallonpituuksilla 340 – 900 nm, yhden nanometrin resoluutiolla. Sen optiikassa on referenssisäde, joka kompensoi lampun vanhenemisesta ja jännitevaihteluista johtuvia säteilyn intensiteetin muutoksia<sup>7</sup>. Tarkempia tietoja laitteesta on kuvattu taulukossa 2.<sup>9</sup>

Taulukko 2. DR 2800:n toiminnan spesifikaatioita

Aallonpituus	Tarkkuus	±1,5 nm
	Toistettavuus	< 0,1 nm
Fotometrinen	Tarkkuus	0–0,5 Abs: 5 mAbs 0,50–2,0 Abs: 1 %
	Lineaarisuus (546 nm:ssa)	0–2 Abs: < 0.5 %
Spektraalinen kaistanleveys		max 5 nm



Kuva 1. Analyysiin käytettävät välineet

1. Kaliumjodidiliuos, 2. Nollausputki, 3. Näyteputki, 4. Pipetti näytteen annosteluun, 5. näytesokeaputki, 6. kyvettipesä, 7. kosketusnäyttö, 8. stepperi kaliumjodidille

Laite tunnistaa kloorinmääritysputket niiden viivakoodista, kun putki asetetaan laitteen kyvettipesään. Samalla se hakee automaattisesti menetelmään asetetun aallonpituuden ja absorbanssin muuntokertoimen siihen asetetulta kalibrintisuoralta. Laite pyörittää putkea ympäri ja ottaa kymmenen mittauslukemaa. Jos jokin mittauksista on poikkeava esimerkiksi naarmun tai lian takia, laite hylkää tämän tuloksen ja laskee lopullisen arvon muiden tulosten perusteella. Dr. Langen pikamenetelmillä tulos saadaan siis näytölle asettamalla vain kyvetti laitteeseen näytteen käsittelyn jälkeen. Muita toimintoja ohjataan kosketusnäytön kautta.<sup>8</sup>

Fotometrille ei ole suoritettu käyttöönottotarkastusta, vaan sen toimivuus testataan validoinnissa. DR 2800 suorittaa myös aina käynnistettäessä itsetarkistuksen, jossa se käy läpi systeemin, lampun, filterin hienosäädön, aallonpituuden tarkistuksen ja jännitetestin. Jos laite havaitsee muutoksia

verrattuna edelliseen tarkistukseen, on käytävä läpi perusteellisempi systeemitesti.<sup>9</sup>

### 3.2 Näyteputket

Dr. Langen valmisputkipakkaus LCK 310/343 sisältää näytteiden mittaukseen tarkoitettut putket, fotometrin nollausputken ja kaliumjodidia sisältävän putken. Pakkaus on tarkoitettu kloorin, otsonin ja klooridioksidin mittaamiseen jätevesistä, juomavesistä ja uima-allasvesistä. Kaikki kyvettitestin reagenssit voidaan hävittää viemäriin ja kyvetit lasinkeräykseen, joten analyyseistä ei kerry lainkaan ongelmajätettä<sup>11, 10</sup>

Näyteputkissa on pulveriseos, joka sisältää fosfaattipuskuriliuoksen ainekset, *N,N*-dietyyli-1,4-fenyleenidiamiinia ja etyleenidiamiinitetraetikkahappoa eli EDTA:ta. Jälkimmäinen poistaa muun muassa rauta(III)- ja kupari(II)-häiriötä<sup>6, 12</sup>

### 3.3 Mittauksen vaiheet

Mittaus on yksinkertainen. Aluksi laite nollataan nollauskyvetillä. Näyte pipetoidaan sitä varten olevaan putkeen, ja tätä käännellään hieman aineiden sekoittamiseksi. Näytteen vapaa kloori mitataan kahden minuutin kuluttua sekoittamisesta. Putki asetetaan laitteen kyvettipesään, ja laite antaa pitoisuuden laskettuna sen sisään asetetulta kalibrointisuoralta. Pitoisuuden lisäksi on myös mahdollista valita tulokseksi absorbanssi tai transmittanssi. Tämän jälkeen samaan näytteeseen lisätään kaliumjodidia. Jälleen odotetaan kaksi minuuttia, ja mitataan kokonaiskloori, samoin kuin vapaa kloori.<sup>10</sup>

Useimmiten, asiakkaan toiveiden mukaisesti, näytteistä kirjataan tulokseksi vapaa kloori, kokonaiskloori, ja näiden erotuksena laskettava sitoutunut kloori. Laite antaa näytteelle tuloksen milligrammoina litraa kohden, mutta tuloksessa huomioidaan vielä myös näytesokea ja näytesarjan nollanäytteiden keskiarvo. Mikäli näytteen pitoisuus ei ole mittausalueella, se laimennetaan MilliQ-vedellä. Tulos lasketaan alla olevalla kaavalla.

$$c(\text{Cl}_2) = l \times c - c_s - c_0, \text{ missä}$$

$l$  = laimennoskerroin

$c$  = näytteen tulos

$c_s$  = näytesokean tulos

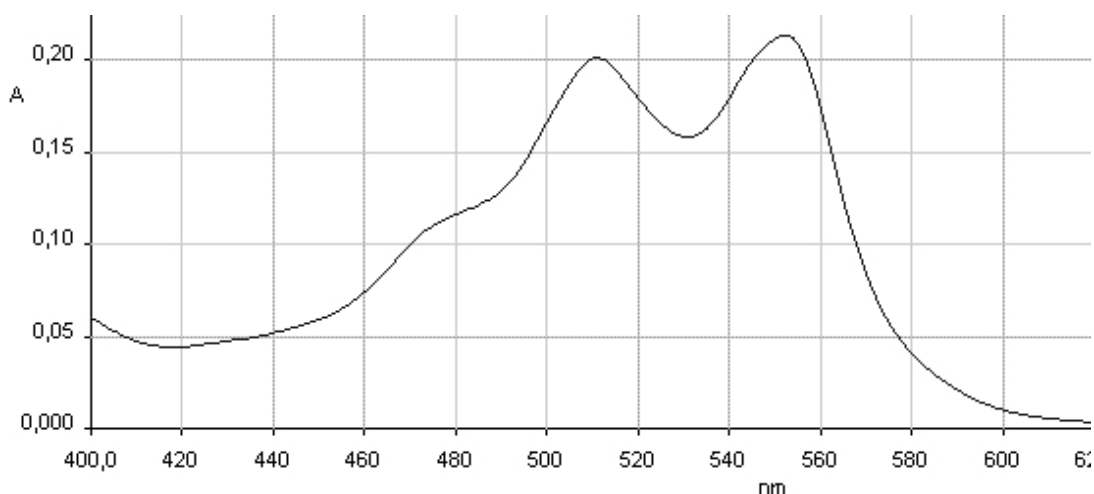
$c_0$  = nollanäytteiden keskiarvo

### 3.4 Erot vanhaan menetelmään

Klooripitoisuuden spektrofotometrinen mittaus perustuu standardiohjeeseen ISO 7393/2. Käyttöönottettava ja vanha menetelmä eroavat toisistaan ja standardin täsmällisessä noudattamisessa joissakin kohdin. Erot on koottu taulukkoon 3.

Vanhassa spektrofotometrissa käytössä oli läpivirtauskyvetti. Se sinänsä saattoi olla nopeuden kannalta parempi ratkaisu kuin manuaalisesti käytettävät kyvetit, mutta uuden menetelmän kertakäyttökyvetit ovat kuitenkin vielä tätä käytännöllisempiä ja nopeampia käytössä. Niiden kanssa aikaa ei kulu kyvetin esi- eikä jälkihuuhdeluihin.

Vanhassa menetelmässä mittausaallonpituudeksi oli valittu 525 nm. Uusi menetelmä noudattaa tässä tapauksessa standardiohjetta, sillä käytettävä aallonpituus on 510 nm. Kuvio 1 voidaan todeta tämän olevan toinen DPD:n aallonpituusmaksimeista.



Kuvio 1. DPD:n spektri

ISO 7393/2-ohjeessa vapaan kloorin mittausta kuvataan näin: astiaan, jossa on 5 ml puskuriliuosta ja 5 ml DPD-liuosta lisätään 100 ml näytettä, sekoitetaan ja mitataan välittömästi. Kokonaiskloorin mittausta eroaa tästä siinä, että astiassa on valmiina myös kiteistä kaliumjodidia noin 1 gramma. Kokonaiskloorinäytteen sekoituksen jälkeen sille annetaan reagointiaikaa 2 minuuttia ennen mittausta. Standardissa on todettu myös, että edellä mainitut reagenssit voidaan korvata kaupallisilla pulveriseoksilla.<sup>12</sup>

Kustannuksellisista syistä vanhassa menetelmässä reagenssimääriä on pienennetty viidesosaan ISO-standardiin nähden. Muilta osin mittaustapahtuma on standardin mukainen. Kyvettitestissä mittakaava on vielä pienempi. Vanhan menetelmän reagenssit valmistettiin itse liuoksiksi, ja niitä säilytettiin kylmässä. Uuden menetelmän reagenssien pulveriseos on standardin mukainen, ja kuivasäilytys edistää niiden säilyvyyttä<sup>6</sup>.

Taulukko 3. Erot standardiohjeeseen

Kuvaus		ISO-STD	Vanha	Uusi menetelmä
Kyvetit		Halkaisija vähintään 1 cm	Läpivirtauskyvetti, halkaisija 1 cm	Kertakäyttökyvetti, halkaisija 1,3 cm
Aallonpituus		510 nm	525 nm	<b>Vastaa standardia</b>
Reagenssien olomuoto		Liuoksina tai pulverina, KI kiteistä	Liuoksina, KI kiteistä	Pulverina, KI liuksena
Reagenssien lisäysjärjestys kokonaiskloorissa		Näyte lisätään muihin	<b>Vastaa standardia</b>	Jodidi lisätään vasta näytteen jälkeen
Näytemäärä		100 ml	20 ml	7 ml
Mittaushetki (aineiden sekoituksesta lähtien)	Vapaa	Välittömästi	<b>Vastaa standardia</b>	2 min kuluttua
	Kokonaiskloori	2 min kuluttua	<b>Vastaa standardia</b>	Samasta putkesta vapaan kloorin kanssa; 2 min kuluttua jodidilisäyksestä

Valmisputkimenetelmä eroaa edellä mainitusta standardista siinä, että samasta näytteestä mitataan sekä vapaa, että kokonaiskloori. Tämän takia kaliumjodidin lisääminen liuokseen tapahtuu eri vaiheessa kuin standardiohjeessa. Menettely saattaa vaikuttaa joidenkin sidottujen klooriyhdisteiden reagoivuuteen. Hach Langen mukaan kloorin mittaus kyseisellä menetelmällä kuitenkin vastaa standardia ISO 7393/2<sup>13</sup>.

### 3.5 Menetelmänkehitys

Kyseistä menetelmää ei ollut käytetty tai testattu aiemmin eikä siitä ollut olemassa menetelmäohjetta ennen validointityötä. Sen toiminta piti siis käydä läpi vaihe vaiheelta ja selvittää käytännöllisin tapa suorittaa analyysi ennen validointitesteihin ryhtymistä.

Dr. Langen pikaohjeen mukaiseen menetelmään tehtiin pieniä muutoksia ja tarkennuksia. Kloorikitin ohjeessa näyteputken täyttö arvioidaan noin yhden senttimetrin päähän yläreunasta. Tilavuudelle haluttiin tarkempi määritelmä, ja se asettui seitsemään millilitraan. Dr. Langen ohjeessa kaliumjodidille käytettäväksi tilavuudeksi mainitaan kolme pisaraa. Edellisen tapaan tähänkin määritettiin tarkaksi tilavuudeksi 75 µl annostellen FinnpiPETin stepperillä. Tästä käytännöstä kuitenkin luovuttiin validoinnin jälkeen, sillä se koettiin liian työlääksi ja liikaa kaliumjodidia kuluttavaksi (stepperin kärkeä ei voi täysin tyhjentää näytteisiin). Kolme pisaraa todettiin kuitenkin riittäväksi määräksi.<sup>10</sup>

Fotometrinen mittaus vaatii näytesokeiden käyttöä, kun on pienikin syy epäillä, että näytteen komponentit absorboivat mittausaallonpituudella. Vanhassa menetelmässä näytesokeat olivat vakiokäytössä. Kloorin valmispakkaus ei sisällä näytesokeille omaa putkityyppiä, joten sellaiset otettiin käyttöön tyhjennetyistä ja puhdistetuista näyteputkista.



## 4 Validointi

Validointi suoritetaan, kun halutaan osoittaa analyysimenetelmän luotettavuus. Sen tuloksena saadaan tietoa menetelmän antamien tulosten totuudenmukaisuudesta sekä mittausepävarmuudesta.<sup>14</sup>

Tarkastelun perusteellisuuden määrää se, kuinka tiukasti menetelmä noudattaa kyseiseen analyysiin asetettua menetelmästandardia. Täysin standardin mukaiset menetelmät saattaisivat vaatia validointiin vain esimerkiksi määritysrajan ja mittausepävarmuuden, kun taas modifioidut standardimenetelmät tarvitsevat näiden lisäksi muita testejä. Tämän opinnäytetyön yhteydessä voidaan puhua modifioidusta standardimenetelmästä. Valmisputkimenetelmä noudattaa suurimmalta osin ISO 7393/2-standardia.<sup>14</sup>

Validointi sisältää suunnitelman, kokeiden toteutuksen, tulosten tilastollisen tarkastelun ja raportoinnin. Suunnitelmaan on koottu testit, joita aiotaan suorittaa. Menetelmä on validi silloin, kun se täyttää sille asetetut vaatimukset kussakin testissä. Jokaiselle osa-alueelle asetetaan tällöin hyväksymisrajat joihin pitää päästä. Tuloksille tehdään tilastollinen tarkastelu ja niitä verrataan asetettuihin vaatimuksiin. Jos menetelmän toiminnassa havaitaan puutteita, ne pyritään korjaamaan, ja validointi suoritetaan tämän jälkeen niiltä osin uudestaan.<sup>14</sup>

Validoinnissa saadut tulokset kerätään talteen ja arkistoidaan, jotta niiden perusteella tehdyt johtopäätökset voidaan milloin tahansa tarkistaa. Validointiraportti on dokumentti, johon on koottu saadut tulokset ja niistä tehdyt arviot. Validoinnin jälkeen menetelmälle voidaan hakea akkreditointia, jolloin näitä dokumentteja tarvitaan.

### 4.1 Validointi laatu järjestelmän osana

Validoinnin tarpeellisuus talous- ja allasveden tutkimuslaboratoriossa juontuu monen viranomaisvaatimuksen kautta. Terveystieteiden tutkimuslain 49 a §:n mukaan laboratorion tulee täyttää Elintarvikeviraston hyväksyntä<sup>16</sup>. Tähän vaaditaan

mm. kirjallista laatu järjestelmää ja osoitus tutkimusten luotettavuudesta. Talous- ja allasvesien analyysihin pitää käyttää asetusten mukaan joko SFS-EN-standardien tai ISO-standardien mukaisia, tai määritystarkkuudeltaan ja luotettavuudeltaan niitä vastaavia menetelmiä<sup>4,17</sup>. Testauslaboratorioiden ja niissä käytettyjen menetelmien pätevyyden Suomessa toteaa FINAS-akkreditointipalvelu. Validointi on ehdoton edellytys sille, että menetelmä voidaan osoittaa riittävän tarkaksi ja luotettavaksi.

On tärkeää, että analyysi suoritetaan jatkossakin samalla lailla kuin se on tehty validoinnin aikana. Valmisputkimenetelmän validoinnin yhteydessä työstettiin uusi menetelmäohje, joka perustui validoinnissa käytettyihin työtapoihin. Sen mukaisesti suoritettuna analyysin pitäisi tuottaa tuloksia niiden virherajojen sisällä, jotka on validoinnilla asetettu.

Analysoinnin jatkoseuranta tehdään erilaisilla valvontakorteilla. Lounais-Suomen vesi- ja ympäristötutkimus Oy:n laboratoriossa on käytössä laadunvarmistukseen tarkoitettut x-kortti ja r-kortti. X-kortilla seurataan kontrollinäytteiden tulostasoa ja r-kortilla rinnakkaismääritysten eroavaisuutta. Niistä voidaan havaita, jos yksittäinen näyte poikkeaa sille asetetuista rajoista, tai jos tuloksissa on pidemmällä aikavälillä systemaattista suuntausta keskiarvon suhteen. Raja-arvot eivät ole pysyviä, sillä esimerkiksi satunnaisvirheen suuruus voi vaihdella ajan mittaan. Toiminta- ja hälytysrajat aktiivisen kloorin analyysille lasketaan aina uudestaan, kun valmistetaan uusi kontrolliliuos.<sup>15</sup>

Akkreditoituna laboratoriona Lounais-Suomen vesi- ja ympäristötutkimus Oy osallistuu vuosittain laboratoriodenvälisiin vertailukokeisiin, myös aktiivisen kloorin määrittämisen osalta<sup>1</sup>. Kokeilla kartoitetaan laboratorion pätevyyttä ja mahdollisia tulostasojen eroja muihin laboratorioihin nähden. Tulosten perusteella mm. lasketaan analyysille mittausepävarmuuksia.

Validointi on osoitus menetelmän toimivuudesta, kun analysoija on ammattitaitoinen. Tämä ei tietenkään yksin riitä takaamaan tulosten laatua, vaan ketjun pitää olla laadullisesti katkeamaton ja jäljitettävissä aina

näytteenotosta tulosten käsittelyyn asti. Validi menetelmä on täten merkittävä osa laatujärjestelmää, mutta kuitenkin vain osa oikein tapahtuvien ja seurattujen toimintojen summaa.

#### 4.2 Kyvettitestien validointi

Hach Lange suosittelee valmisputkimenetelmiensä validointiin seuraavia parametreja: mittausepävarmuus, detektointi- ja määrittäysraja, selektiivisyys, lineaarisuus, toistettavuus, oikeellisuus sekä häiriöalttius<sup>13</sup>. Kun otetaan huomioon, että uuden menetelmän kemialliset reaktiot ja mittaustapahtumat ovat samat kuin vanhassa menetelmässä, voidaan olettaa, että selektiivisyydessä ei ole muutoksia näiden välillä. Näyteputkien EDTA poistaa rauta- ja kuparihäiriötä samoin kuin vanhankin menetelmän DPD-reagenssissa<sup>6</sup>.

Selektiivisyyttä ja häiriöalttiutta koskien tarkasteltavaksi otettiin hapettavat mangaaniyhdisteet, joita saattaa esiintyä joissakin luonnonvesissä, ja pieninä määrinä juomavesissä. Häiriön poistoon oli olemassa metodi vanhaa menetelmää varten. Tällöin sen toiminta tarvitsi vain testata uudella menetelmällä. Häiriöalttiutta sivuttiin myös muutamilla muilla kokeilla, kuten säilyvyyskokeiden ja menetelmien vertailun alueella.

Testattavaksi valittiin:

- Lineaarisuus
- Määrittäysraja
- Satunnaisvirhe
- Systemaattinen virhe
- Mittausepävarmuus
- Menetelmävertailu

## 5 Validointitestien suoritus

Validointitestit suunniteltiin laboratorion ohjeiston mukaisiksi. Apuna hyödynnettiin tietoa aiemmista vastaavien menetelmien käyttöönotoista. Suunnittelusta vastasi pääasiassa laboratorion laatupäällikkö. Tulokset laskettiin Suomen Ympäristökeskuksen ohjeiston ja laboratorion omien tulostenkäsittelyohjeiden mukaan. Kaikki testit suoritettiin 95 prosentin luottamustasolla.

Validointitestit suoritettiin pääasiassa aikavälillä 30.3. – 4.6.2010. Niihin käytettiin normaaliin näytesarjaan kuuluvia näytteitä. Näitä ovat aidot laboratorioon saapuvat asiakasnäytteet sekä laboratorion käyttämät laadunvarmistusnäytteet. Laadunvarmistukseen sisältyvät nollanäytteet sekä itse valmistettu kontrolliliuos, jonka pitoisuus on tarkistettu standardinmukaisella titrausmenetelmällä. Näiden lisäksi systemaattisen virheen kartoittamiseksi valmistettiin standardinlisäysnäyte, jossa vesinäytteeseen oli lisättyä tunnettu määrä kontrolliliuosta.

### 5.1 Lineaarisuus

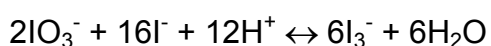
Analyysimenetelmälle on tärkeää, että se antaa kullekin pitoisuudelle aina yhtä lähellä todellista olevan vasteen. Vasteen on hyvä noudattaa jotakin matemaattista yhtälöä, jonka perusteella tulos voidaan laskea. Mittausalue saattaa jakautua useampiin erillisiin lineaarisuusalueisiin, joihin kuhunkin soveltuu erilainen yhtälö. Vasteiden tulosjoukko ei myöskään välttämättä noudata suoran muotoa, vaan esimerkiksi toisen asteen yhtälöä. Kussakin tapauksessa täytyy kuitenkin osoittaa, että saadut vasteet soveltuvat valittuun yhtälöön riittävän hyvin.<sup>14</sup>

Hach Langen viivakoodimenetelmät sisältävät valmiiksi kalibrointikäyrän, jonka perusteella tulokset voidaan laskea. Tämän menetelmän valmiin käyrän soveltuvuutta tahdottiin verrata itse luotavaan käyrään. Alkuajatuksena oli, että alkuperäistä käyrää voitaisiin käyttää jatkossakin.

Menetelmälle tehtiin kalibrointisuora perustuen ISO 7393/2-standardiohjeen kalibrointimetodiin. Se rajattiin koskemaan pitoisuusaluetta 0,05 – 2,0 mg/l, mikä on valmistajan ilmoittama mittausalue. Mittausalue on suppeampi kuin vanhassa menetelmässä.

Mittausalueen ylärajan määrää se, kuinka suureksi valmistaja on asettanut DPD:n määrän näyteputkissa. Hapettimen ja DPD:n reagoidessa syntyy kaksi hapetustuotetta. Väriällisen tuotteen synnylle on eduksi, että hapettimen määrä suhteessa DPD:hen on pieni. Kun taas hapettimen osuus kasvaa, värittömän imiini-muodon synty on suotuisampaa. Tämä voi aiheuttaa kalibroinnin epälineaarisuutta, kun väritön tuote haalistaa näytteen väriä pitoisuusalueen yläpäässä. Hach-yhtiö on kuitenkin optimoinut DPD-reagenssiensa pitoisuuden, joten kalibrointisuorassa ei pitäisi tämän mukaan ilmetä merkittävää kaareutumista.<sup>6</sup>

Suoran valmistuksessa ei käytetty klooriyhdisteitä, vaan samalla tavoin reagoivaa kaliumjodaattia, jota on saatavana hyvin puhtaana, kiinteänä reagenssina. Sitoutuneen kloorin tapaan tämä hapettaa jodidi-ionin trijodidiksi. Reaktioon tarvitaan happamat olosuhteet, johon käytettiin rikkihappoa. Reaktio DPD:n kanssa on kuitenkin pH:sta riippuvainen, joten näyteliuokset neutraloitiin natriumhydroksidilla ennen mittausta. Jodaatin ja jodidin reaktio tapahtuu seuraavalla tavalla<sup>18</sup>:



Kaliumjodaatista tehtiin punnitsemalla ja liuottamalla välilaimennoksen kautta 10 mg/l työliuos, sisältäen myös kaliumjodidia 1 g/l. Työliuosta annostellen 100 ml mittapulloihin valmistettiin taulukon 4 mukaiset standardinäytteet. 1 ml työliuosta vastaa noin 0,141 µmol klooria. Ensimmäinen standardi sisälsi vain MilliQ-vettä ilman kaliumjodidia, joten sen tulos teoriassa vastaa nollanäytteiden vapaata klooria, kun muut standardit mitattiin enemmän kokonaisklooria vastaavasti.

Taulukko 4. Kalibrintisuoran pisteet

STD	pipetoitava määrä (ml)	pitoisuus (mg Cl <sub>2</sub> /l)
S1	0	0,000
S2	0,3	0,030
S3	0,5	0,050
S4	2,5	0,249
S5	5	0,497
S6	10	0,994
S7	20	1,988

Kaksi nollan jälkeistä standardia pipetoitiin automaattipipetillä, loppuihin käytettiin täyspipettejä. Kustakin standardiliuoksesta tehtiin kaksi rinnakkaismittausta.

Lineaarisuuden tarkastelussa käytettiin pienimmän neliösumman menetelmää, jossa pitoisuuksista ja vasteista muodostettiin yhtälö ( $y = kx + b$ ). Tarkastelussa huomioitiin mittauspisteiden jäännökset, regressiosuoran y-akselin leikkauspiste sekä sen korrelaatio. Tulokset laskettiin Microsoft Office Excelin Regressio-työkalua apuna käyttäen.

Suoran soveltuvuutta tulosjoukkoon kuvaa jäännösten asettuminen x-akselin suhteen. Jäännökset ( $\varepsilon$ ) ovat mitattujen ja suoralta laskettujen y-arvojen erotuksia. Y-akselin leikkauspisteen arvioinnissa käytettiin kaavan 4 luottamusväliä. Luottamusvälin laskemiseen tarvittavat residuaalien keskihajonta  $s_{y/x}$  ja regressiokertoimen  $a$  keskihajonta  $s_a$  saatiin kaavojen 2 ja 3 tuloksina.<sup>14</sup>

Kalibrintipisteitä sovitettiin sekä lineaariseen, että epälineaariseen yhtälöön. Lineaarisen mallin soveltuvuutta arvioitiin vertaamalla malleja toisiinsa alla kuvatulla tavalla. Keskihajonta laskettiin kaavalla 2. Varianssien erotus  $DS^2$  laskettiin kaavalla 5. Testiarvo PG saatiin vertaamalla  $DS^2$ -arvoa lineaarisen käyrän varianssiin kaavalla 6. Saatua lukua verrattiin t-taulukkoarvoon.<sup>14</sup>

$$\varepsilon = y_i - \hat{y}_i, \text{ missä} \quad (1)$$

$$y_i = \text{mitattu arvo}$$

$$\hat{y}_i = \text{regressiosuoralta laskettu arvo}$$

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - a}}, \text{ missä} \quad (2)$$

$a = 2$  (lineaarinen) tai  $3$  (toisen asteen yhtälö)

$n =$  jäännösten lukumäärä

$$s_a = s_{y/x} \times \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{(n-1)s_x^2}}, \text{ missä} \quad (3)$$

$\bar{x} = x$ -arvojen keskiarvo

$s_x =$  kaikkien  $x$ -arvojen keskihajonta

$$a: a \pm t_{(0,05, n-2)} \times s_a \quad (4)$$

$$DS^2 = (n-2)s_{(y/x)1}^2 - (n-3)s_{(y/x)2}^2, \text{ missä} \quad (5)$$

$s_{(y/x)1}^2 =$  epälineaarisen käyrän varianssi

$s_{(y/x)2}^2 =$  lineaarisen käyrän varianssi

$$PG = \frac{DS^2}{s_{(x/y)2}^2} \quad (6)$$

## 5.2 Määrittäysraja

Valmistaja on antanut laitteen määrittäysrajaksi 0,05 mg/l. Määrittäysraja laskettiin tavallisten näytesarjojen nollanäytteistä. Laskuun käytettiin kaavaa 7. Siinä  $\mu_B =$  nollanäytteiden keskiarvo, ja  $s$  niiden keskihajonta. <sup>14</sup>

$$\text{Määrittäysraja} = \mu_B + 10s \quad (7)$$

## 5.3 Satunnaisvirhe

Luotettavalta menetelmältä vaaditaan, ettei tuloksissa ole liikaa satunnaista hajontaa. Analyysi pitäisi olla toistettavissa niin, että tulokset olisivat

tilastollisesti samaa tasoa. Aktiivisen kloorin määrittämisen toistettavuutta rajoittaa kloorin herkkä reagoivuus. Samasta näytteestä ei voida tehdä eri päivinä useita mittaussarjoja, vaan mittaukset tulisi tehdä aina mahdollisimman nopeasti. Keinotekoisien näytteiden avulla voitaisiin seurata analyysin toistettavuutta myös pitkällä aika välillä. Validointia varten satunnaisvirheen suuruus määritettiin kuitenkin autenttisista näytteistä, koska näytematriisilla voi olla asiaan vaikutusta.

Satunnaisvirheen laskeminen tehtiin rinnakkaismääritysten perusteella. Tuloksia kerättiin noin puolentoista kuukauden ajan, kunnes analyysisarjoja kertyi yli 20 kappaletta. Tällä määrällä saavutetaan riittävä kattavuus näytteidenvälisestä hajonnasta<sup>15</sup>. Vapaan kloorin ja kokonaiskloorin määrittämistulosten satunnaisuutta ei ollut tarvetta käsitellä erikseen, joten niille määritettiin yhteinen satunnaisvirhe. Rinnakkaistulosten suhteelliset keskihajonnat yhdistettiin kaavalla 8. Yhdistetyn suhteellisen keskihajonnan luotettavuusväli laskettiin kaavalla 9.<sup>14</sup>

$$s_r = \sqrt{\frac{1}{n} \sum s_{ri}^2}, \text{ missä} \quad (8)$$

$s_{ri}$  = yhden rinnakkaisparin suhteellinen keskihajonta

$$\pm t_{0,05} \times s_r \quad (9)$$

#### 5.4 Systemaattinen virhe ja tarkkuus

Systemaattinen virhe kuvaa kuinka paljon mittaustulokset poikkeavat todellisesta arvosta. Poikkeamaa voivat aiheuttaa esimerkiksi kalibroinnin virheet, väärin mitatut nollanäytteet ja laitteen nollaus. Valmisputki-menetyksessä systemaattisen virheen tasoon vaikuttaa myös se, ettei reagensseja valmisteta itse.

Systemaattisen virheen määrittämiseksi valmistettiin ns. standardinlisäysnäyte. Tarkoituksena oli, että sen matriisi olisi autenttisen näytteen kaltainen, ja nähtäisiin sisältääkö se määrittämistä häiritseviä yhdisteitä. Näytteeseen lisättiin



hypokloriitti-liuosta, jonka pitoisuus määritettiin standardin ISO 7393/3 mukaisella jodometrisella titrausmenetelmällä, joka on akkreditoitu. Testissä ei voitu käyttää kaupallista klooristandardiliuosta kustannuksellisista ja säilyvyyteen liittyvistä syistä.

Standardinlisäysnäytteen pohjana oli klooriyhdisteitä sisältävää allasvettä, jonka pitoisuus määritettiin kahdella rinnakkaismittauksella. Standardinlisäysnäytteestä tehtiin kymmenen rinnakkaismäärittystä. Tämän ja puhtaan allasveden erotuksesta laskettiin saanto, ja sen prosentuaalinen osuus verrattavasta tuloksesta kaavalla 10. Saantoprosentista saatiin systemaattisen virheen suuruus (poikkeama 100 %:sta). Keskihajonnan  $s$  avulla saannolle laskettiin luottamusväli  $R$ .<sup>14</sup>

$$R = \frac{(S - U) \times 100\%}{C}, \text{ missä} \quad (10)$$

$C$  = lisätyn standardiliuoksen pitoisuus (tunnettu)

$U$  = näytteen alkuperäinen pitoisuus (mitattu)

$S$  = lisäyksen sisältävän näytteen pitoisuus (mitattu)

$$R \pm t_{0,05} s \quad (11)$$

## 5.5 Mittausepävarmuus

Analyysitulokset eivät ole koskaan absoluuttisen oikeita. Niihin vaikuttavat satunnaiset ja systemaattiset virhelähteet. Validoinnin tärkeimpiä tarkoituksia on selvittää, kuinka luotettavia yksittäiset tulokset ovat. Mittausepävarmuus kuvaa rajoja, joiden sisällä todellinen tulos on mittaustulokseen nähden.

Menetelmän kokonaismittausepävarmuus laskettiin satunnaisen ja systemaattisen virheen aiheuttamista osittaisista epävarmuustekijöistä. Laajennettu mittausepävarmuus saatiin kertomalla kokonaismittausepävarmuus kattavuuskertoimella  $k$ , joka on tässä yhteydessä luku 2 vastaten 95 % luottamusväliä.

$$U = k \times \sqrt{\sum u_i^2} \quad (12)$$

## 5.6 Menetelmävertailu

Menetelmävaihdoksen yhteydessä analyysien tulostaso saattaa muuttua. Toivottavaa olisi kuitenkin, että jos samaan tarkoitukseen on olemassa kaksi akkreditoitua menetelmää, saataisiin molemmilla menetelmillä samansuuntaisia tuloksia. Tällöin voitaisiin hätätilanteissa käyttää kumpaa menetelmää tahansa, kun tuloksissa ei ilmene merkittäviä eroja menetelmien kesken.

Asiakkaat säätävät klooripitoisuuksia omien kenttälaitteidensa tulosten mukaan, mutta lainsäädäntö velvoittaa käyttämään tarkkailussa akkreditoitua laboratorion analyysijä. Luotettavuuden ja asiakastyytyväisyyden kannalta tulostason pysyvyys on tärkeää.

Käyttöön otettavaa menetelmää verrattiin vanhaan akkreditoituun kloorinmäärittämenetelmään mittaamalla useita näytteitä niillä molemmilla. Laskennassa erotettiin vapaan kloorin ja kokonaiskloorin tulokset johtuen kokonaiskloorin määrittämenetelmien eroista menetelmien välillä. Tulosparien erotuksista  $d_i$  laskettiin keskiarvo  $\bar{d}$  ja varianssi  $s_d^2$ , joiden perusteella suoritettiin t-testi erojen merkitsevyydestä.

$$\bar{d} = \frac{\sum d_i}{n}, \text{ missä} \quad (13)$$

$n = \text{tulosparien lukumäärä}$

$$s_d^2 = \frac{\sum d_i^2 - (\sum d_i)^2 / n}{n - 1} \quad (14)$$

$$t = \frac{\bar{d}\sqrt{n}}{s_d} \quad (15)$$

## 6 Tulosten esittely ja käsittely

Saadut mittaustulokset kirjattiin ylös ja ne tallennettiin laboratorion omiin arkistoihin. Näytesarjojen mittaustulokset löytyvät myös tämän opinnäytetyön liitteistä. Laboratoriolla on ollut käytössä valmiit taulukkopohjat eri osa-alueita varten, joten validointitestien tulokset saatiin nopeasti valmiiksi akkreditointia

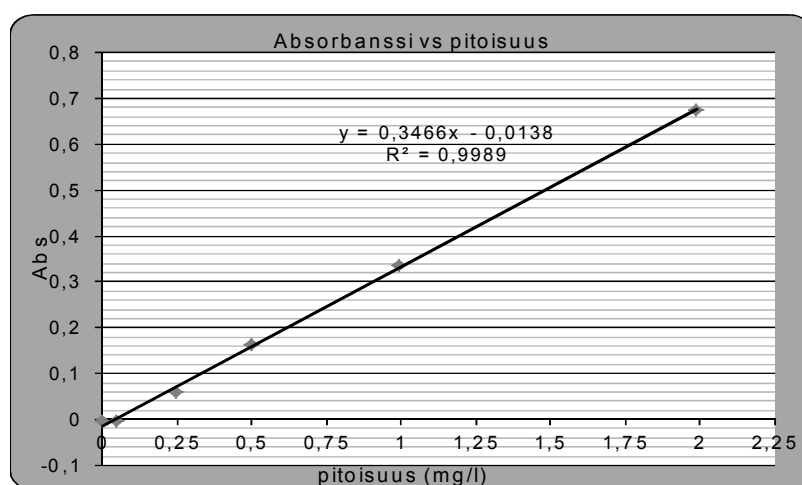
odottamaan. Opinnäytetyön kokonaisuuden kannalta oli kuitenkin mielekästä, että laskin kaikki tulokset myös itsenäisesti, noudattaen kuitenkin laboratoriossa hyväksi todettuja tapoja.

## 6.1 Lineaarisuus

Kunkin kalibrointipisteen rinnakkaismittauksista laskettiin absorbanssien keskiarvot (ka), jotka näkyvät taulukossa 5. Keskihajonnat (s) osoittautuivat kohtuullisiksi. Suurimmat hajonnat painottuvat mittausalueen ylä- ja alarajoille. Kalibrointipiste S2 pudotettiin pois myöhemmistä tarkasteluista, koska sen antama vaste oli sama kuin standardilla S3, mutta hajonta oli suurempi kuin sillä. Standardinäytteen pitoisuus oli kuitenkin myös valmistajan antaman informaation perusteella oletetun määrittämissä rajojen alla, ja se oli peräisin vanhan menetelmän kalibrointisuoralta. Muista pisteistä luotu kalibrointisuora näkyy kuviossa 2.

Taulukko 5. Vasteet

	Todellinen pitoisuus mg/l	Abs. ka	Abs. s	Jäännökset
S1	0	-0,0025	0,0005	0,01126
S2	0,03	-0,0015	0,0015	-
S3	0,05	-0,0015	0,0005	-0,00507
S4	0,249	0,0585	0,0005	-0,01405
S5	0,497	0,164	0	0,005486
S6	0,994	0,3345	0,0005	0,003711
S7	1,988	0,674	0,001	-0,00134



Kuvio 2. Kalibrointisuora

Vanhalla menetelmällä kalibrointituloksiin soveltui useimmiten parhaiten toisen asteen yhtälö. Siksi oli syytä olettaa, että myös käyttöönotettavan menetelmän kuvaaja saattaisi olla kaartuva suoran sijaan. Kuviossa 2 näkyvän lineaarisen kalibrointisuoran lisäksi luotiin siis myös epälineaarinen malli. Tämä ei poikennut silmämääräisesti lineaarisesta sovituksista. Sen yhtälössä toisen asteen termi on melko pieni (ks. taulukko 6), mikä kuvaa myös kaarevuuden vähäisyyttä.

Molempien kalibrointipisteistä piirrettyjen kuvaajien korrelaatiokerroin oli 0,9994. Tämän lisäksi malleja verrattiin F-testillä, joka suoritettiin laskentakaavoilla 2,5 ja 6. Testituloksena oli, että lineaarinen malli soveltuu tulosjoukkoon hyvin. Testin luotettavuutta heikentää se, että vertailuarvon vapausasteet ovat pienet (1 ja 3). Testiarvo PG on kuitenkin merkittävästi F-vertailuarvoa pienempi, joten tulosta voidaan pitää oikeana. Jatkossa tarkastellaan vain lineaarista mallia, koska se on näistä kahdesta paremmin soveltuva. Taulukkoon 6 on koottu näitä kahta mallia käsitteleviä suureita sekä F-testin tulokset.

Taulukko 6. Mallien vertailu

	Lineaarinen	Epälineaarinen
Suoran yhtälö	$y = 0,3466x - 0,0138$	$y = -0,0013x^2 + 0,3493x - 0,0143$
Selitysaste	0,9989	0,9989
Korrelaatiokerroin	0,9994	0,9994
Käyrän varianssi	$9,89 \times 10^{-5}$	$1,25 \times 10^{-4}$
PG		0,1638
F-arvo		10,13

Lineaarisen mallin jäännökset nähdään taulukossa 5 ja niiden visuaalinen tarkastelu esitetään kuviossa 2. Jäännökset näyttävät hajaantuvan molemmille puolille nollassa eikä niiden asettumisessa ole havaittavissa kaareutumista tai merkittävää suoralta poikkeamista. Ne siis täyttävät asetetut vaatimukset.



Kuvio 3. Jäännökset pitoisuuden funktiona

y-akselin leikkauspisteen luottamusrajat olivat taulukon 7 mukaiset. Nolla sisältyy kyseiselle välille, joten suoran voidaan sanoa kulkevan origosta riittävällä varmuudella. Käytännössä kuitenkin mittauksessa on systemaattista virhettä, sillä kloorin nollapitoisuudelle saadaan laitteella pieni negatiivinen vaste. Sen suuruus on kuitenkin hyväksyttävä, ja nollasta poikkeaminen kompensoidaan vähentämällä nollanäytteen tulos näytteen tuloksesta.

Taulukko 7. y-akselin leikkauspisteen luottamusrajat

Alaraja 95 %	Yläraja 95 %
-0,029002	0,001479

Tulosjoukko täyttää lineaarisuuden tärkeimmät ehdot pitoisuusalueella 0,05 – 2,0 mg/l. Nollan tuntumassa lineaarisuuden toteutuminen on epävarmaa. Pienillä näytepitoisuuksilla ei ole kuitenkaan suurta tarvetta tarkoille tuloksille. Esimerkiksi verkostovesien analysointia varten lineaarisuusalueen jatkamisen sijaan voidaan laskea toteamisraja, jolla osoitetaan pieni kloorijäännös.

#### Alkuperäisen kalibroinnin arviointi

Edellä suoritetun mitta-alueen tarkastelun tarkoitus oli ainoastaan osoittaa lineaarisuuden toteutuminen. Varsinaisena kalibroitamiseksi tulosten laskemiseen aiottiin jatkossakin käyttää laitteeseen valmistajan toimesta

asettamaa suoran yhtälöä. Haluttiin kuitenkin varmistua, että ulkopuolisen suorittama kalibrointi vastaa myös laboratorion sisällä suoritettua kalibrointia. Taulukko 8 esittää lineaarisuustarkastelun standardinäytteistä saatuja tuloksia kummallakin suoralla. Kumpikin sarja on laskettu absorbansseista, jotka löytyvät taulukosta 5 (sivu 27). Yhtälöissä pitoisuus on absorbanssin funktiona, eli päinvastoin kuin lineaarisuuden tarkastelun yhteydessä.

Taulukko 8. Kalibrointisuorien vertailu

	Oma suora	Alkuperäinen suora	Todellinen pitoisuus
Yhtälö; y =	$2,8816x+0,0404$	$2,9390x$	-
kal. pisteet: 1	0,0332	-0,0065	0
(mg/l) 2	0,0361	-0,0045	0,05
3	0,2090	0,1715	0,249
4	0,5130	0,4825	0,497
5	1,004	0,984	0,994
6	1,983	1,98	1,988

Tuloksissa nähdään selkeitä eroavaisuuksia, jotka kasvavat kohti mittausalueen alarajaa. Erojen merkitsevyys kuitenkin todetaan parhaiten tilastollisella tarkastelulla. Omalle kalibrointisuoralle laskettiin Excel<sup>®</sup>:n regressiotyökalulla tarvittavat luottamusrajat (taulukko 9), joiden avulla verrattiin kahta yhtälöä keskenään. Alkuperäisen suoran yhtälön kulmakerroin ja vakiotermin sisältyvät laskettuihin luottamusväleihin, joten suorat todettiin yhteneviksi.

Taulukko 9. Kalibrointisuoran luottamusvälit

	Alaraja	Yläraja
Suoran kulmakerroin	2,7461	3,0170
Y-akselin leikkauspiste	-0,002	0,083

Valmisputkimenetelmän kalibroinneissa ei pitäisi ilmetä suuria eroja, kun laite on kokoajan sama ja sen optiikka ottaa huomioon lampun vanhenemisen. Reagenssit tulevat suoraan valmistajalta, ja niiden tasalaatuisuudesta ei voi tietää mitään. Menetelmälle on tällöin vaikea asettaa uuden kalibrointisuoran valmistusfrekvenssiä. Sen tarpeellisuudenkin näkisi vasta, kun suoraa on tehty useampia pitkällä aikavälillä, ja niitä verrattu toisiinsa. Tarkistuskalibrointi on

kuitenkin päätetty suorittaa vuosittain. Validoinnin kaikkiin mittaustuloksiin on käytetty menetelmän alkuperäistä suoraa, ja sitä käytettiin myös validoinnin jälkeen, kuten oli suunniteltu.

## 6.2 Määrittäysraja

Näytesarjojen nollanäytteistä laskettuna määrittäysrajaksi saatiin noin 0,03 mg/l. Pitoisuuden 0,05 mg/l alapuolella liikutaan kuitenkin hieman harmaalla alueella, kuten lineaarisuuden yhteydessä kävi ilmi. Tulokset ovat peräisin neljästätoista näytesarjasta. Suuremmalla otoksella määrittäysraja saattaisi olla korkeampi. On siis hyvä asettaa mittausalueen alarajaksi valmistajan suosittama 0,05 mg/l.

Juomaveden klooripitoisuudelle ei ole Suomessa asetuksia tai direktiivejä, joten määrittäysrajaa ei voi suhteuttaa lainsäädännölliseen vaatimukseen, kuten joissakin toisissa juomavesianalyseissa. On myös kyseenalaista, kuinka hyvin verkostovesinäytteiden klooripitoisuus säilyy näytteenotosta analysointiin asti. Tästä syystä alhaiset klooripitoisuudet olisi luontevaa ilmoittaa toteamisrajan ylittävänä pitoisuutena. Toteamisrajan laskukaava on muutoin sama kuin määrittäysrajan, mutta keskihajonnan kertoimena oli luvun kymmenen sijaan luku kolme<sup>14</sup>. Toteamisrajaksi saatiin 0,007 mg/l.

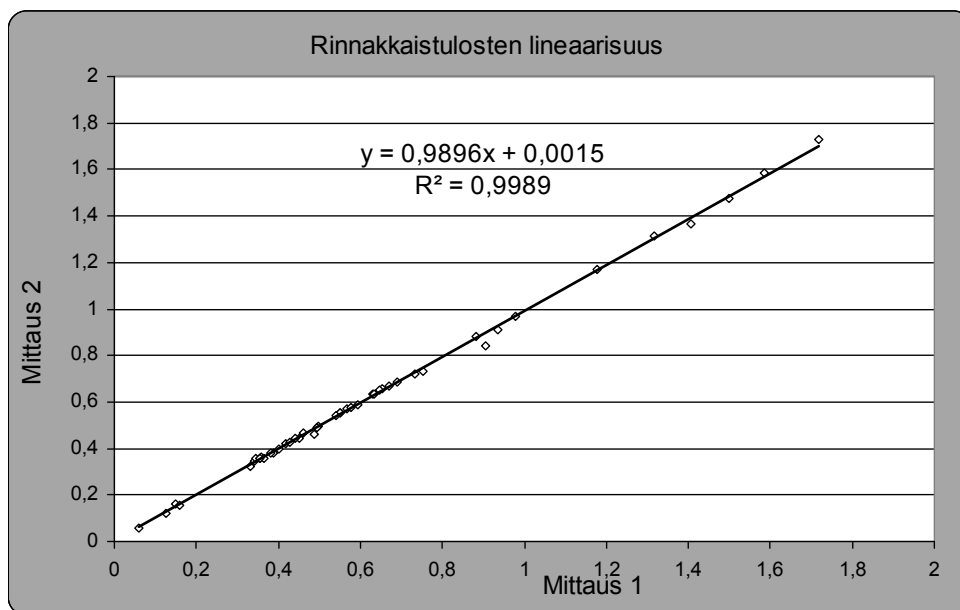
Taulukko 10. Lasketut mittausrajat

Arvo	(mg/l)
Keskiarvo	-0,0030
Keskihajonta	0,0034
Määrittäysraja	0,03
Toteamisraja	0,007

## 6.3 Satunnaisvirhe

Kloorinäytteiden lyhytikäisyyden takia mittauksia ei voitu suorittaa samasta näytteestä eri päivinä. Tämän takia sarjojen välistä hajontaa ei voida tälle menetelmälle määrittää. Kuitenkin jatkossa kontrollinäytteen satunnaisvirhettä seurataan X-kortin avulla mittaamalla siitä kaksi rinnakkaistulosta kussakin näytesarjassa.

Rinnakkaisparien suhteellisten keskihajontojen yhdistäminen edellytti, että erot eivät ole riippuvaisia pitoisuudesta. Alla oleva kuvaaja osoittaa tulosparien toisiaan vastaavuutta. Suoralta poikkeavien pisteiden voidaan sanoa olevan satunnaisia, ja kuvaajan kulmakerroin on lähellä lukua yksi. Mitään merkittävää kaareutumista ei siis havaita. Tämän perusteella tuloksille voitiin laskea yhdistetty suhteellinen keskihajonta.



Kuvio 4. Rinnakkaismääritysten tulosten lineaarisuus

Näytteiden tulokset mitattiin ja laskettiin kappaleessa 3.3 kuvatulla tavalla. Yhteensä 23 näytteestä määritettiin sekä vapaa, että kokonaiskloori. Tulospareja tällöin saatiin yhteensä 46, joista pudotettiin pois viisi kappaletta. Syynä oli, että niiden keskihajontoina oli nolla, joka vääristäisi lopullisen hajonnan laskentaa. Tämä on laboratorion asettama käytäntö.

Taulukko 11. Satunnaisvirhe

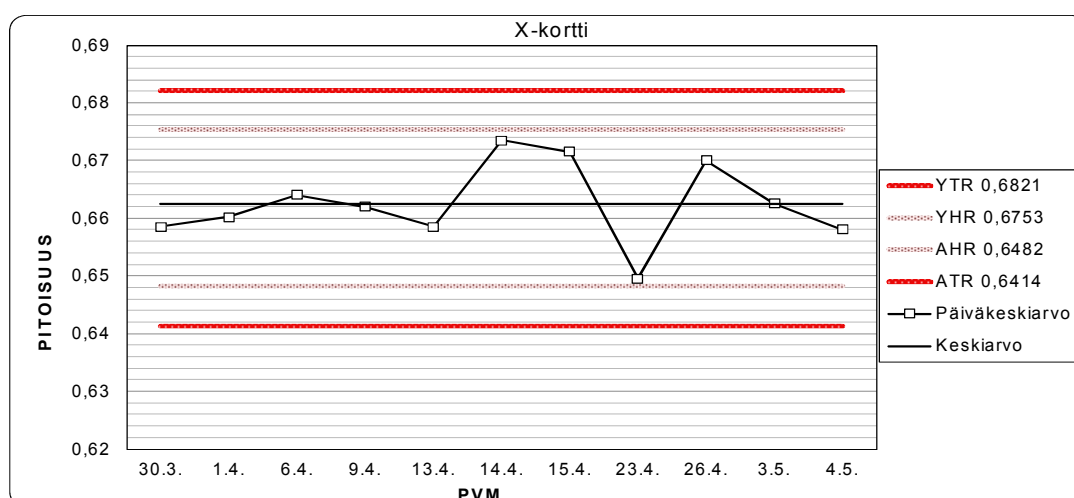
n (kaikki)	46
n (muut kuin $s_r = 0$ )	41
$\sum (s_{ri}^2)$	141,55
$s_r(\text{yhd.}) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum (s_{ri}^2)}$	1,86 %
$\pm t \times s_r$	$\pm 3,99$ %



Yhdistetty suhteellinen keskihajonta näiden näytteiden perusteella oli noin 1,86 prosenttia. Tulokselle asetettiin 95 % luottamusväli, joka oli  $\pm 3,99$  % ( $< 5$  %). Satunnaisvirhettä seurataan Lounais-Suomen vesi- ja ympäristötutkimus Oy:ssä päivittäin. Näytesarjat sisältävät yhden rinnakkaismäärityksen satunnaisesti valitusta näytteestä jokaista 15 näytettä kohden. Näin saadaan käsitys mahdollisista pitkän aikavälin muutoksista. Rinnakkaismäärityksiä ei käytetä varsinaisten tulosten laskussa, vaan ainoastaan laadunvarmistuksessa.

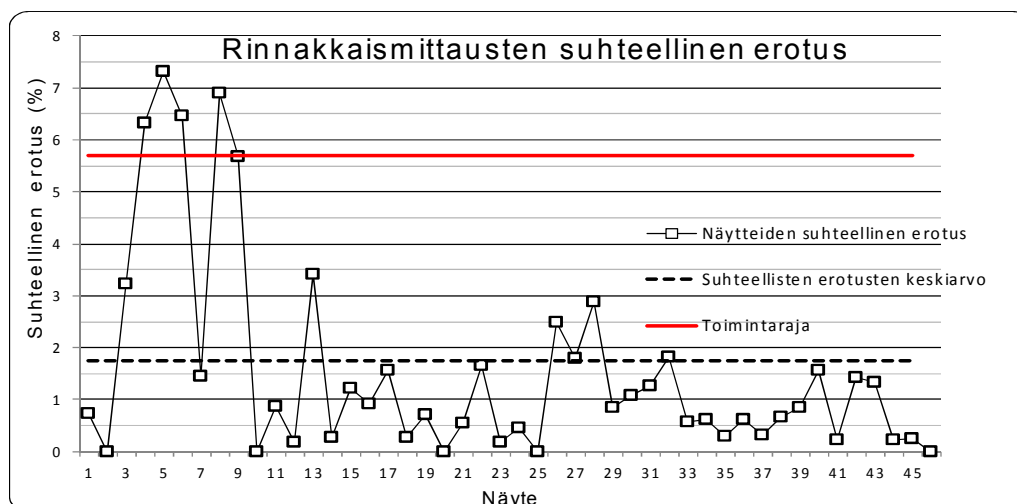
### Laadunvarmistus

Lounais-Suomen vesi- ja ympäristötutkimus Oy:n laatujärjestelmän mukaisesti jokaisena määrittämissäpäivinä mitataan näytesarjan alussa ja lopussa kaksi kontrollinäytettä, sekä jokaista alkavaa 15 näytettä kohti yksi rinnakkaismittaus. Kontrollinäytteitä ovat nollanäytteet sekä pitoisuudeltaan tunnettu hypokloriittiliuos. Kontrollien avulla luodulla *X-kortilla* seurataan satunnaisvirheen vaihtelua määrittämissäpäivinä. Tuloksista lasketaan kontrolliliuoksille hälytys- ja toimintarajat. Niiden avulla analysoija voi jo ennen tulosten kirjaamista valvoa analyysin toimivuutta ja tulostason oikeellisuutta. Rajojen luotettavuus on sitä parempi, mitä enemmän näytteitä niiden laskemiseen on käytetty, toisaalta suuri laskentadata tiukentaa valvontarajat epärealistisen tiukoiksi. Laskuihin käytetään 20–50 mittaussarjan tuloksia. Alla esitetty X-kortti on siis vain esimerkki, sillä näytesarjoja ei ole kertynyt riittävästi.<sup>15</sup>



Kuvio 5. X-kortti

Rinnakkaismäärittämisestä koostetaan *R-kortti*. Sillä seurataan rinnakkaisnäytteiden suhteellisia erotuksia keskiarvoon ja laskettuun toimintaraajaan.



Kuvio 6. r-kortti

r-kortista nähdään analysointikokemuksen vaikutus suhteellisiin erotuksiin. Ensimmäisten rinnakkaismäärittäysten erot vääristävät keskiarvoa, ja lähes kaikki suhteelliset erotukset ovatkin keskiarvon alapuolella. Samasta syystä myös toimintaraja on todellista korkeammalla. r-kortin rajojen laskemiseen tulisi käyttää 20–60 analyysirajaa. Vaatimus ei täyty validointitulosten osalta, sillä rinnakkaismäärittämisä tehtiin tällöin useita samassa näytesarjassa. Todellisten rajojen laskentaan niin X- kuin r- korttissakin vaadittiin validoinnin jälkeen vielä joitakin mittaussarjoja. <sup>15</sup>

#### 6.4 Systemaattinen virhe

Lisätyn hypokloriittiliuoksen pitoisuus määritettiin seuraavalla tavalla. Standardilisäsnäytteen pohjana olevan aidon näytteen pitoisuus mitattiin kuten minkä tahansa näytteen. 2,5 ml hypokloriittiliuosta laimennettiin 500 ml:ksi näyteliuoksella. Tästä lisätyn hypokloriitin pitoisuus laskettiin lisäsnäytteen ja allasvesinäytteen pitoisuuksien erotuksesta. Vertailuarvona oli titrausmenetelmällä määritetty näyte, jossa 2,5 ml samaa hypokloriittiliuosta oli

laimennettuna MilliQ-vedellä 500 ml:ksi. Titraattorilla saatu vertailutulos oli 0,4175 mg/l.

Taulukko 12. Saantokokeen tulokset

Näyte	Pitoisuus (mg/l)	Lisäys (mg/l)	Saanto- %
Allasvesi (2 n ka.)	0,633		
Lisäysnäyte nro 1	1,0405	0,4075	97,58
2	1,0405	0,4075	97,58
3	1,0505	0,4175	99,97
4	1,0405	0,4075	97,58
5	1,0405	0,4075	97,58
6	1,0405	0,4075	97,58
7	1,0405	0,4075	97,58
8	1,0405	0,4075	97,58
9	1,0405	0,4075	97,58
10	1,0405	0,4075	97,58
Keskiarvo (%)			97,82
Keskihajonta (%)			0,76

Saantoprosentti arvioitiin välille 97,4 – 98,3 % titrausmenetelmän avulla. Kun yleisesti käytetään 95 % luottamustasoa, voidaan saannon todeta olevan riittävän lähellä sataa prosenttia (95–105 %). Saantoprosentin keskiarvon perusteella systemaattinen virhe on:

$$100 \% - 97,82 \% = 2,18 \%$$

Tulos on teoreettista arvoa alempi. Tästä voidaan päätellä, että näytteessä ei todennäköisesti ole muita hapettavia aineita tulosta vääristäviä pitoisuuksia. Testitulokset eivät välttämättä kuitenkaan täysin vastaa todellisuutta, sillä vertailutulos saatiin saman laboratorion toisella analyysimenetelmällä. Molemmissa menetelmissä on samoja laboratorionsisäisiä virhelähteitä.

## 6.5 Mittausepävarmuus

Satunnaiset ja systemaattiset virhelähteet yhdistämällä saatu laajennettu mittausepävarmuus laskettiin kaavalla 12:

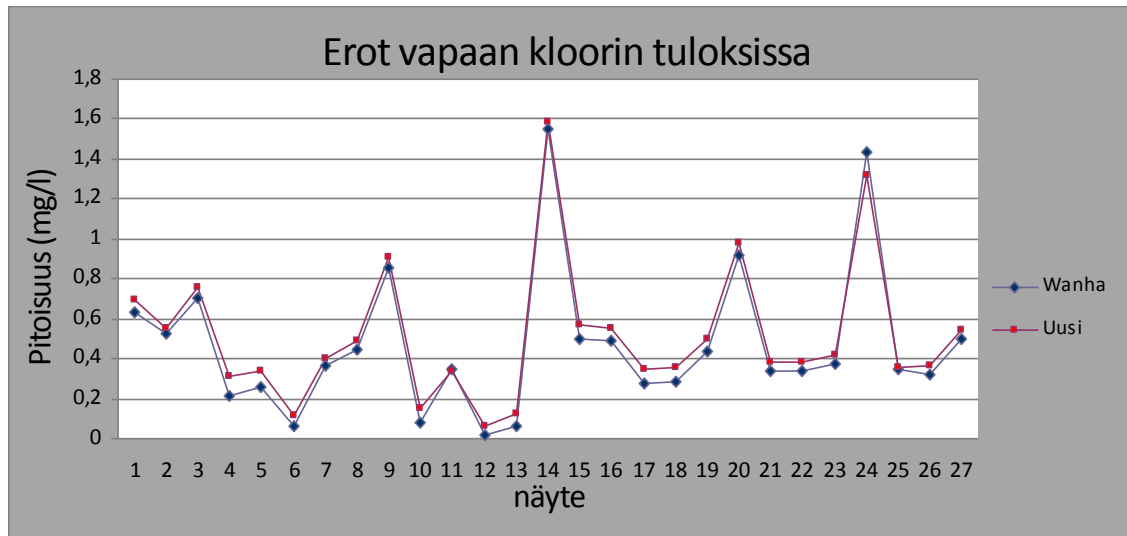
$$U = 2 \times \sqrt{(1,85\%)^2 + (2,18\%)^2} = 5,73 \%$$

Mittausepävarmuus esitetään laboratoriossa yleensä viiden prosenttiyksikön välein, joten tulos pyöristyy ylöspäin kymmeneen prosenttiin. Vanhan menetelmän mittausepävarmuus on myös 10 %, joten tulosten luotettavuus ei laskenut menetelmävaihdoksen yhteydessä. Todellisuudessa mittausepävarmuuteen vaikuttaa paljon erilaisia asioita, mitä tässä tarkastelussa ei ole käsitelty. Esimerkiksi näytteenoton epävarmuus on merkittävä osa analyysiketjua, mutta sen suuruutta ei voida määrittää, kun laboratorio ei vastaa näytteiden ottamisesta. Tämän lisäksi perusteellisemmassa tarkastelussa otettaisiin huomioon mm. kaikkien mittalaitteiden virherajat. Mittausepävarmuuden laskenta suoritetaan uudestaan silloin, kun menetelmälle saadaan laboratoriodenvälisiä vertailutuloksia. Tällä saatetaan kompensoida systemaattisen virheen laskentatavan puutteita.

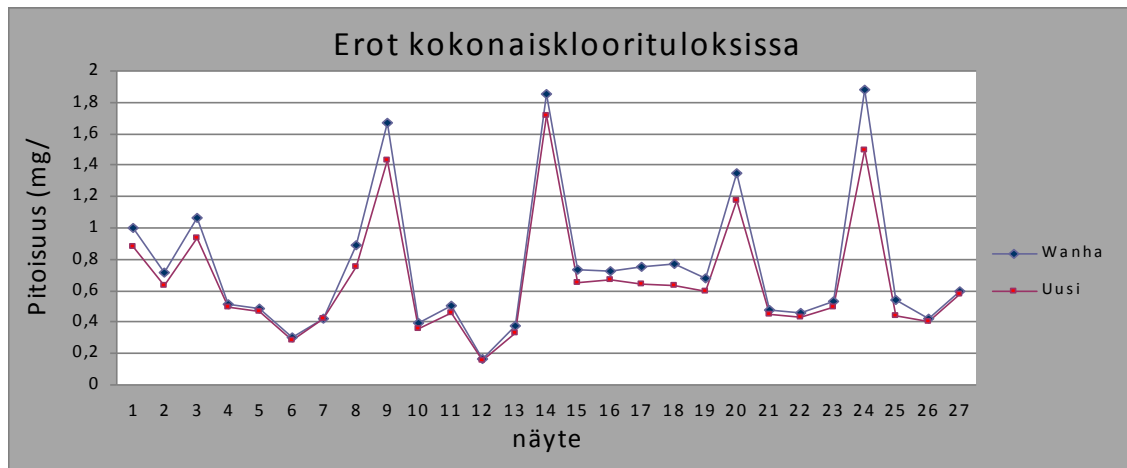
Käytännössä mittausepävarmuuden suuruus vaikuttaa klooriyhdisteiden pitoisuuksille asetettuihin raja-arvoihin. Esimerkiksi sidottua klooria saa uimavedessä olla kymmenen prosentin mittausepävarmuudella mitattuna korkeintaan  $0,90 \times 0,4 \text{ mg/l} = 0,36 \text{ mg/l}$  (ks. taulukko 1).<sup>14</sup>

## 6.6 Menetelmävertailu

Käyttöön otettavan ja vanhan menetelmän vertaamiseksi mitattiin näytteitä molemmilla menetelmillä. Järjestys oli pääsääntöisesti se, että käytössä olevalla menetelmällä mitattiin ensin näytesarja, jonka jälkeen samat näytteet mitattiin uudella menetelmällä. Käytäntöä vaihdettiin välillä, jotta voitiin todeta, ettei mittausjärjestys vaikuta merkittävästi tulosten eroavaisuuksiin. Hypoteesina oli, että jälkimmäisestä mittauksesta saataisiin aina pienempi tulos. Näin ei kuitenkaan ollut. Tilastollisen tarkastelun tulokset ovat taulukossa 13.



Kuvio 7. Menetelmävertailu: vapaa kloori



Kuvio 8. Menetelmävertailu: kokonaiskloori

Taulukko 13. Menetelmien erot

		Vapaa kloori	Kokonaiskloori
Näytemäärä		27	
Tulosten keskiarvo	Uusi menetelmä	0,514	0,666
	Vanha menetelmä	0,469	0,750
Erotusten keskiarvot (mg/l)		0,044	-0,083
Erotusten kesihajonnat (mg/l)		0,039	0,086
t-testiarvot		5,7	-4,9
t-taulukkoarvo		2,06	

Erot menetelmien antamissa tuloksissa ovat merkittäviä. Syitä ja niiden merkittävyyttä on vaikea arvioida, mutta joitakin arvioita voidaan esittää. T-testin käyttö tässä tapauksessa olisi luotettavinta, jos tulosparien erotukset jakautuisivat normaalisti. Jakaumat painottuvat kuitenkin hieman niiden keskiarvoista poispäin.

Valmisputkimenetelmässä sekä vapaan, että kokonaiskloorin mittauksia edeltää 2 minuutin odotusaika. Tämä erottaa menetelmät vapaan kloorin mittauksen kohdalla. Mittaushetken mahdollinen vaikutus tuloksiin tutkittiin, mutta mittauslukema ei muuttunut suuresti sekoituksen jälkeen kahden minuutin aikana (muutos pari yksikköä Absorbanssin kolmannessa desimaalissa).

Vanhassa menetelmässä on erilainen reagenssien lisäysjärjestys kokonaiskloorin mittauksessa kuin uudessa menetelmässä. Tulosten erojen syy todennäköisesti jollain tavalla riippuu jodidista ja sen reagoinnista. Kokonaiskloorimittauksessa osa näytteessä mahdollisesti olevasta sidottuihin klooriyhdisteisiin kuuluvasta typpikloridista ei reagoi, kun kaliumjodidi lisätään vasta, kun näyte on sekoitettu muihin reagensseihin<sup>12</sup>.

Aiemman menetelmän mittausepävarmuus on 10 %, ja uudelle asetettu epävarmuus 10 %. Näiden avulla tuloksille luodut epävarmuusrajat kohtaavat. Jo pelkästään vanhan menetelmän 10 % mittausepävarmuus huomioimalla uuden menetelmän tulokset saadaan tämän epävarmuusrajojen sisään.

Taulukko 14. Mittausepävarmuuden rajat keskiarvoille

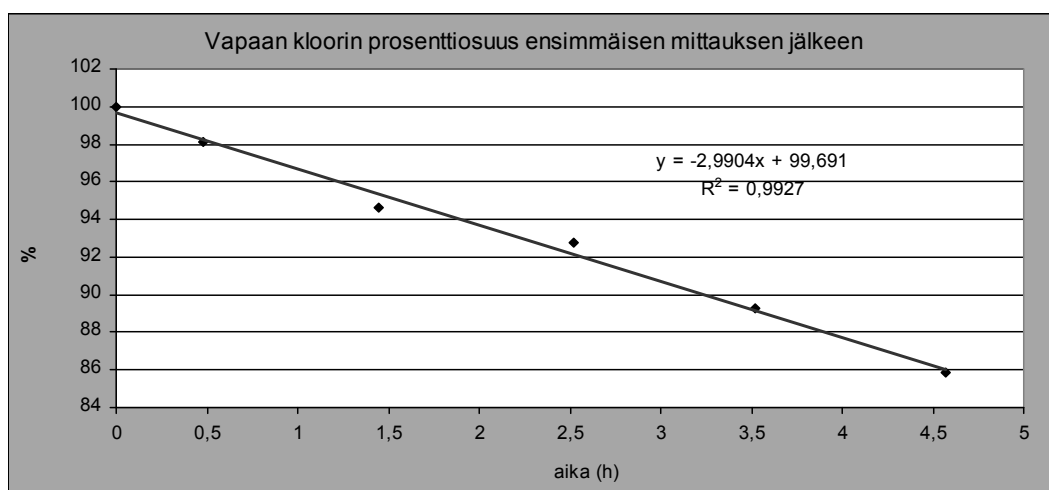
	Vapaa kloori	Kokonaiskloori
Uusi menetelmä	0,463–0,565	0,600–0,733
Vanha menetelmä	0,422–0,516	0,675–0,825

## 6.7 Säilyvyys

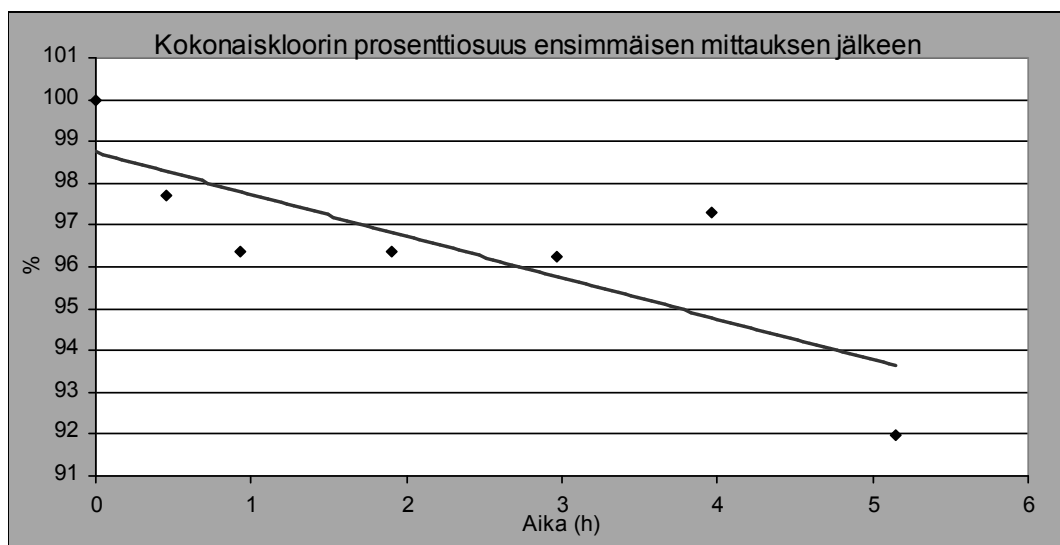
Validointitestejä ennen oletuksena oli, että aktiivisten klooriyhdisteiden reagoiminen olisi niin nopeaa, että se vaikuttaisi rinnakkaismittauksiin. Reagointinopeus eli yhdisteiden pitoisuuden laskun nopeus haluttiin siksi määrittää edes suuntaa antavasti.

Tutkittavana näytteenä toimi aivan tavallinen allasvesinäyte, jonka pitoisuutta mitattiin ajan kuluessa. Mitatuista pitoisuuksista laskettiin vielä prosentuaalinen pitoisuuden lasku ensimmäisen mittaustuloksen suhteen. Tuloksista piirrettiin suuntaa antavat suorat (kuviot 11 ja 12). Mitatusta näytteestä vapaan kloorin pitoisuus putosi 10 % noin kolmessa tunnissa, ja kokonaiskloori 5 % noin neljässä tunnissa. Alle tunnissa kumpikaan näistä ei häviä muutamaa prosenttia enempää, joten tämän ei pitäisi näkyä rinnakkaismittauksissa.

Testi ei anna koko totuutta yhdisteiden reagointiajasta. Todellisuudessa pitoisuus alkaa laskea jo heti näytteenoton jälkeen. Vaatisi runsaasti lisäselvitystä, jos haluttaisiin laskea keskimääräinen ajankulu näytteenoton ja analysoinnin välillä. Silti voitaisiin vain arvailla, mikä näytteen pitoisuus oli sen ottohetkellä. Näytteenottoajankohdan huomioiminen siirtäisi vain x-akselin asteikkoa.



Kuvio 9. Vapaan kloorin häviävyys



Kuvio 10. Kokonaiskloorin häviävyys

## 6.8 Häiriötekijät

Hapettunut mangaani reagoi sitoutuneen kloorin tapaan. Sen aiheuttaman häiriön poistoon käytettiin vanhalla menetelmällä tioasetamidi-liuosta. Se poistaa vedestä kaiken muun hapettavan aineksen, paitsi mangaanin. Näin saadaan mangaanin aiheuttama häiriö mitattua, ja tulos vähennettyä näytteen kokonaistuloksesta.

Häiriön poistoa testattiin Mn(II):a sisältävillä keinotekoisilla liuoksilla, mangaania sisältävillä talousvesinäytteillä ja mangaanipitoisella luonnonvesinäytteellä. Häiriön poisto oli tarkoitus kehittää lähinnä luonnonvesille. Havaittiin kuitenkin, että valmisputkia käytettäessä Mn(II) ei tuottanut määritysrajaa ylittävää tulosta, kuten ei myöskään talousvesien sisältämä mangaani. Luonnonvedessä sen sijaan mangaani reagoi DPD:n kanssa. Tarkkaa klooripitoisuutta tällaisesta näytteestä ei kuitenkaan voida mitata, sillä hypokloriittilisäyksen saanut näyteerä ei antanut lisäystä vastannutta tulosta analyysissä. Tämä johtui mahdollisesti näytteen matriisista. Mangaanihäiriön poiston jatkokehittelystä tämän seurauksena luovuttiin.



## 6.9 Kustannuslaskelmat

Reagenssien osalta valmisputket ovat hieman kalliimpia kuin vanhan menetelmän itse valmistetut liuokset. Kustannuksista on kuitenkin pois reagenssien valmistukseen kuluvalta ajalta maksettava laborantin palkka. Menetelmävaihdoksella saavutettiin huomattavaa ajansäästöä myös itse analysoinnissa, mikä onkin suurin hintaan vaikuttava tekijä. Tällöin, analysoijasta riippuen, voidaan saavuttaa edellisen menetelmän hintataso, tai jopa alittaa se.

Uusi menetelmä saattaa olla yleisten myös hyödykkeiden osalta edukkaampi. Lasiastioiden käyttötarve analyysissa väheni menetelmävaihdoksessa merkittävästi kertakäyttökyvettien ansiosta. Lisäksi voidaan olettaa pienen, uutta tekniikkaa käyttävän fotometrin kuluttavan vähemmän sähköä kuin suuren ja vuosikymmeniä vanhan spektrofotometrin.

## 7 Yhteenveto

Työn tarkoituksena oli validoida aktiivisen kloorin määrittämiseen tarkoitettu uusi menetelmä. Syynä menetelmävaihdokseen olivat vanhassa määrittämissä ilmenneet ajankäytölliset ongelmat. Uusi analyysimenetelmä perustui kloorin määrittämiseen tarkoitettuun Dr. Langen LCK 310/343 kyvettitestiin. Validoinnissa tarkasteltiin lineaarisuutta, määrittämissärajaa, satunnaista ja systemaattista virhettä, mittausepävarmuutta, ja verrattiin uuden ja vanhan menetelmän tuloksia toisiinsa.

Aktiivisen kloorin määrittämiseen tarkoitettua uuden menetelmän käyttöönotto ja validointi onnistuivat toivotulla tavalla. Tulokset osoittivat menetelmän soveltuvaksi kyseiseen käyttötarkoitukseen valitulla luotettavuustasolla, menetelmävertailua lukuun ottamatta. Vanha ja uusi menetelmä eivät vertailtaessa saavuttaneet tavoiteltua yhtäläisyyttä, mutta tulosten erot eivät olleet menetelmien mittausepävarmuusrajoja ylittäviä.

Määritysraja asetettiin testituloksesta poiketen Dr. Langen ilmoittamaan rajaan 0,05 mg/l. Tämä osoittautui hyväksi ratkaisuksi, sillä validoinnin jälkeiset mittaukset ovat tuottaneet nollanäytteiden pitoisuuksiin suuremman hajonnan kuin mitä validoinnin aikana dokumentoitiin.

Systemaattisen virheen tarkastelussa käytetyn standardiliuoksen pitoisuus tunnettiin vain laboratorion toisen akkreditoitun menetelmän määritystuloksen perusteella. Menettelytapa oli kuitenkin paras, mikä tässä tapauksessa oli mahdollista valita. Laboratorion sisäisen systemaattisen virheen vaikutus tuloksessa selviää, kun vuotuisista laboratorioden välisistä vertailukokeista saadaan tulokset. Mittausepävarmuuden ja kalibroinnin tarkistukset tullaan käymään laboratoriossa läpi vuosittain.

Menetelmä läpäisi validoinnin jälkeen FINAS-akkreditointipalvelun arvioinnin, joten tehdylle työlle saatiin virallinen sinetti. Se on nykyään säännöllisessä käytössä, ja se on todettu sujuvammaksi ja nopeammaksi edelliseen menetelmään verrattuna. Menetelmänvaihdos siis kannatti.

## LÄHTEET

- <sup>1</sup> Laatuksikirja. versio 3.13. Lounais-Suomen vesi- ja ympäristötutkimus Oy
- <sup>2</sup> Seppänen, H. 1990. Vesihygienia ja desinfektio. Hämeenlinna: Karisto Oy
- <sup>3</sup> Juomaveden desinfiointimenetelmistä. Vesitalous 2/2009.
- <sup>4</sup> Uima-allasveden laatu ja valvonta. 2008. Sosiaali- ja terveysministeriö; Opetusministeriö; Suomen uimaopetus- ja hengenpelastusliitto. [Viitattu 15.9.2010] Allasvesien laatuvaatimukset saatavilla www-muodossa: <http://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2002/20020315>
- <sup>5</sup> Valve, M.; Isomäki, E. 2007. Klooraus – tuttu ja turvallinen? Vesitalous 4/2007
- <sup>6</sup> Harp, D. L. 2002. Current Technology of Chlorine Analysis for Water and Wastewater. Hach Company. [Viitattu 14.3.2010] Saatavilla www-muodossa: <http://www.hach.com/fmmimghach?/CODE%3AL70191473|1>
- <sup>7</sup> Hyxo Oy. DR 2800 tuote-esite. [Viitattu 7.11.2010] Saatavilla www-muodossa: [http://www.hyxo.fi/get\\_file.php?file=spektrofotometri\\_dr\\_2800.pdf&extra=home](http://www.hyxo.fi/get_file.php?file=spektrofotometri_dr_2800.pdf&extra=home)
- <sup>8</sup> Laboratory analysis cuvette test. Hach Lange. [Viitattu 9.11.2010] Saatavilla www-muodossa: [http://www.hach-lange.es/shop/action\\_q/download%3Bdocument/DOK\\_ID/14781331/type/pdf/lkz/ll/spkz/en/TOKEN/9lZksxpS37C58xLjYpDUv3bcEpQ/M/NFr2AA](http://www.hach-lange.es/shop/action_q/download%3Bdocument/DOK_ID/14781331/type/pdf/lkz/ll/spkz/en/TOKEN/9lZksxpS37C58xLjYpDUv3bcEpQ/M/NFr2AA)
- <sup>9</sup> DR 2800 Käyttöohje. [Viitattu 20.10.2010] Saatavilla www-muodossa: <http://www.hach.com/fmmimghach?/CODE%3ADOC022.53.00720-200920615|1>
- <sup>10</sup> Lange. LCK 310/343-kyvettipakkauksen lyhyt käyttöohje.
- <sup>11</sup> Dr. Lange. Handbook of Photometrical Operation Analysis. [Viitattu 13.11.2010] Saatavilla www-muodossa: [http://lms.uni-duisburg.de/Lehre/Material/WasserAnaPrak/Wasseranalytik/Cuvette\\_test/Cuvette\\_test\\_handbook.pdf](http://lms.uni-duisburg.de/Lehre/Material/WasserAnaPrak/Wasseranalytik/Cuvette_test/Cuvette_test_handbook.pdf)
- <sup>12</sup> ISO-standardi 7393/2-1985. Water quality – Determination of free chlorine and total chlorine – Part 2: Colorimetric method using *N,N*-diethyl-1,4-phenylenediamine, for routine control purposes. Kansainvälinen standardisoimisjärjestö.
- <sup>13</sup> Hach Lange. Validation of cuvette test for drinking water. [Viitattu 14.3.2010] Saatavilla www-muodossa: [http://shop.hach-lange.com/shop/action\\_q/download%3Bdocument/DOK\\_ID/14787863/type/pdf/lkz/IT/spkz/it/TOKEN/sHrENDnVwJ-U16tdUXEkj4yS18/M/CkqlnQ](http://shop.hach-lange.com/shop/action_q/download%3Bdocument/DOK_ID/14787863/type/pdf/lkz/IT/spkz/it/TOKEN/sHrENDnVwJ-U16tdUXEkj4yS18/M/CkqlnQ)
- <sup>14</sup> Mäkinen, I.; Suortti, A-M.; Saares, R.; Niemi, R.; Marjanen, J. J. 1996. Ohjeita ympäristönäytteiden kemiallisten analyysimenetelmien validointiin. Helsinki. Suomen Ympäristökeskus.
- <sup>15</sup> Laadunvarmistusnäytteiden tulosten käsittely. Versio 3. Lounais-Suomen vesi- ja ympäristötutkimus Oy
- <sup>16</sup> FINLEX®. Terveystensuojelulaki 19.8.1994/763. [Viitattu: 4.12.2010] Saatavilla www-muodossa: <http://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/1994/19940763>
- <sup>17</sup> FINLEX®. Sosiaali- ja terveysministeriön asetus talousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista 461/2000. [Viitattu 4.12.2010] Saatavilla www-muodossa: <http://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2000/20000461>
- <sup>18</sup> Harris, D. C. 2007. Quantitative Chemical Analysis. 7<sup>th</sup> edition. 2. painos. USA: W. H. Freeman and Company.

Tulokset on ilmoitettu yksikössä mg/l.

pvm	näyte- nro	Näytteiden tulokset						
		Nolla ka.		Näyte- sokea ka.	Vapaa kloori		Kokonaiskloori	
		Vapaa	Kok.		Tulos 1	Tulos 2	Tulos 1	Tulos 2
30.3.10	3835	0,001	0,004	-	0,692	0,687	0,887	0,883
6.4.10	3973	-0,007	-0,0015	-0,020	0,524	0,524	0,61	0,610
13.4.10	4421	-0,0025	0,005	-0,014	0,738	0,714	0,926	0,903
15.4.10	4617	-0,0065	-0,0005	-0,020	0,463	0,433	0,713	0,700
15.4.10	4618	0,002	0,0045	-0,020	0,888	0,824	1,39	1,35
23.4.10	4721	0,0005	0,007	-0,020	0,130	0,140	0,341	0,344
23.4.10	4764	0,0005	0,007	-0,0195	0,322	0,327	0,448	0,453
23.4.10	4767	0,0005	0,007	-0,0205	0,040	0,036	0,145	0,143
23.4.10	4732	0,0005	0,007	-0,0215	0,106	0,099	0,317	0,311
26.4.10	5012	-0,0055	0,0015	-0,0205	1,56	1,56	1,70	1,71
3.5.10	5395	-0,004	0,0075	-0,0235	0,539	0,544	0,638	0,642
3.5.10	5396	-0,004	0,0075	-0,0225	0,523	0,524	0,654	0,656
4.5.10	5438	-0,0015	0,005	-0,0215	0,322	0,334	0,629	0,633
4.5.10	5444	-0,0015	0,005	-0,020	0,334	0,333	0,619	0,621
4.5.10	5445	-0,0015	0,005	-0,0215	0,476	0,470	0,577	0,573
5.5.10	5613	-0,003	0,004	-0,0225	0,953	0,944	1,16	1,15
10.5.10	5772	-0,007	0,002	-0,0225	0,358	0,352	0,429	0,422
10.5.10	5775	-0,007	0,002	-0,022	0,351	0,35	0,408	0,407
10.5.10	5776	-0,007	0,002	-0,0215	0,390	0,393	0,476	0,469
10.5.10	5774	-0,007	0,002	-0,020	1,29	1,29	1,48	1,46
10.5.10	5773	-0,007	0,002	-0,020	0,332	0,334	0,423	0,424
11.5.10	5907	-0,002	0,000	-0,0215	0,340	0,334	0,380	0,379
11.5.10	5908	-0,002	0,000	-0,021	0,519	0,518	0,556	0,556

Tulokset on ilmoitettu yksikössä mg/l, ja niissä on huomioitu nollanäytteen ja näytesokean antama vaste.

pvm	näytenro	Vapaa kloori		Kokonaiskloori	
		Tulos 1	Tulos 2	Tulos 1	Tulos 2
30.3.2010	3835	0,691	0,686	0,883	0,879
6.4.2010	3973	0,551	0,551	0,6315	0,6315
13.4.2010	4421	0,7545	0,7305	0,935	0,912
15.4.2010	4617	0,489	0,459	0,733	0,720
15.4.2010	4618	0,906	0,842	1,4055	1,3655
23.4.2010	4721	0,1495	0,1595	0,354	0,357
23.4.2010	4764	0,341	0,346	0,4605	0,4655
23.4.2010	4767	0,060	0,056	0,1585	0,1565
23.4.2010	4732	0,127	0,12	0,3315	0,3255
26.4.2010	5012	1,586	1,586	1,719	1,729
3.5.2010	5395	0,5665	0,5715	0,654	0,658
3.5.2010	5396	0,5495	0,5505	0,669	0,671
4.5.2010	5438	0,345	0,357	0,6455	0,6495
4.5.2010	5444	0,3555	0,3545	0,634	0,636
4.5.2010	5445	0,499	0,493	0,5935	0,5895
5.5.2010	5613	0,9785	0,9695	1,1785	1,1685
10.5.2010	5772	0,3875	0,3815	0,4495	0,4425
10.5.2010	5775	0,380	0,379	0,428	0,427
10.5.2010	5776	0,4185	0,4215	0,4955	0,4885
10.5.2010	5774	1,317	1,317	1,498	1,478
10.5.2010	5773	0,359	0,361	0,441	0,442
11.5.2010	5907	0,3615	0,3555	0,4015	0,4005
11.5.2010	5908	0,540	0,539	0,577	0,577

Tulokset on ilmoitettu yksikössä mg/l.

pvm	Vapaa kloori		Kokonaiskloori	
	Tulos 1	Tulos 2	Tulos 1	Tulos 2
30.3.2010	0,003	-0,001	0,004	0,004
1.4.2010	-0,005	-0,007	0,000	-0,002
6.4.2010	-0,007	-0,007	-0,003	0,000
8.4.2010	-0,001	-0,003	0,006	0,004
9.4.2010	-	-	-0,001	-
13.4.2010	-	-	-0,004	-0,001
13.4.2010	-0,005	0,000	0,005	0,005
14.4.2010	-0,004	-0,009	0,003	-0,004
15.4.2010	-0,001	0,005	0,003	0,006
23.4.2010	-0,001	0,002	0,006	0,008
26.4.2010	-0,005	-0,006	0,001	0,002
3.5.2010	-0,004	-0,004	0,008	0,007
4.5.2010	-0,001	-	0,006	0,004
5.5.2010	-0,003	-	0,004	-
10.5.2010	-0,007	-	0,002	-
11.5.2010	-0,002	-	0,000	-
4.6.2010	-	-	-0,006	-0,004

Tulokset on ilmoitettu yksikössä mg/l.

pvm	Mittauslukema	Nolla ka.
30.3.2010	0,663	0,004
30.3.2010	0,662	0,004
1.4.2010	0,661	-0,001
1.4.2010	0,659	-0,001
1.4.2010	0,661	-0,001
1.4.2010	0,657	-0,001
1.4.2010	0,658	-0,001
6.4.2010	0,663	-0,0015
6.4.2010	0,662	-0,0015
9.4.2010	0,661	-0,001
13.4.2010	0,664	0,005
13.4.2010	0,663	0,005
14.4.2010	0,673	-0,0005
15.4.2010	0,677	0,0045
15.4.2010	0,675	0,0045
23.4.2010	0,662	0,007
23.4.2010	0,651	0,007
26.4.2010	0,675	0,0015
26.4.2010	0,668	0,0015
3.5.2010	0,670	0,008
4.5.2010	0,661	0,005
4.5.2010	0,665	0,005