



HAA5-yhdisteiden määrittäminen ta- lousvedestä

Menetelmän kehitys ja validointi

Ella Salmivirta

OPINNÄYTETYÖ
Marraskuu 2023

Laboratoriotekniikan tutkinto-ohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratoriotekniikka

SALMIVIRTA, ELLA:
HAA5-yhdisteiden määrittäminen talousvedestä
Menetelmän kehitys ja validointi

Opinnäytetyö 51 sivua, joista liitteitä 2 sivua
Marraskuu 2023

HAA5-yhdisteille, eli mono-, di- ja trikloorietikkahapoille sekä mono- ja dibromietikkahapoille, on Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivissä 2020/2184 asetettu vähimmäisvaatimukset ihmisten käyttöön tarkoitettussa vedessä. Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää ja validoida analyysimenetelmä HAA5-yhdisteiden määrittämiseksi talousvedestä nestekromatografi-massaspektrometrilaitteyhdistelmälle. Tavoitteena oli kehittää menetelmä, joka täyttää direktiivissä analyysimenetelmille asetetut vaatimukset.

Työn kokeellinen osuus suoritettiin Eurofins Environment Testing oy:n Lahden toimipisteen orgaanisella osastolla. Menetelmän kehittämisen perustana käytettiin nestekromatografi-massaspektrometrin laitevalmistajan esittämää menetelmää yhdisteiden analysoimiseksi. Kokeellisen osuuden aikana oli tarkoitus validoida menetelmän määrittämisraja sekä mittausepävarmuus, joille oli direktiivissä 2020/2184 asetettu suoritusarvot. Näiden lisäksi oli tarkoitus validoida menetelmän herkkyys, mittausalue, lineaarisuus, selektiivisyys, tarkkuus, toistettavuus sekä toteamisraja.

Kokeellisen osuuden aikana ilmeni useita haasteita, ja menetelmän kehittämiseen kului odotettua enemmän aikaa. Kuluneen ajan takia validointia ei ollut mahdollista toteuttaa täysin kaikkien suunniteltujen validointiparametrien osalta. Mittausepävarmuutta sekä menetelmän sisäistä uusittavuutta ei rajallisen ajan vuoksi validoitu kokeellisen osuuden aikana. Toistettavuus ja tarkkuus validoitiin onnistuneesti.

Opinnäytetyön aikana kehitetyllä menetelmällä saavutettiin lähes direktiivissä 2020/2184 asetettu suoritusarvo analyysimenetelmän määrittämisrajalle. Kehitetyn menetelmän herkkyys ja tarkkuus validoitiin onnistuneesti kaikilla tutkittavilla yhdisteillä. Näiden lisäksi menetelmän selektiivisyys, toistettavuus sekä toteamisraja validoitiin onnistuneesti kaikilla tutkittavilla yhdisteillä lukuun ottamatta trikloorietikkahappoa. Menetelmän lineaarisuutta ja mittausaluetta ei luotettavasti validoitu kokeellisen osuuden aikana.

Asiasanat: HAA5, menetelmäkehitys, validointi, nestekromatografi-massaspektrometri

ABSTRACT

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

ELLA SALMIVIRTA:
Determination of Five Haloacetic Acids in Drinking Water
Development and Validation of Method

Bachelor's thesis 51 pages, appendices 2 pages
November 2023

Directive 2020/2184 of the European Parliament and the Council sets minimum requirements for HAA5 compounds, i.e., mono-, di- and trichloroacetic acids and mono- and dibromoacetic acids, in water intended for human consumption. The purpose of the thesis was to develop and validate a method for the determination of HAA5 compounds in drinking water by a liquid chromatograph-mass spectrometer. The goal was to develop a method that meets the requirements set for analysis methods in the directive.

The experimental part of the thesis was carried out in the organic department of Eurofins Environment Testing's Lahti laboratory. The basis for the method development was method developed by the manufacturer of the liquid chromatograph-mass spectrometer. During the experimental part, the purpose was to validate the limit of quantification of the method and the measurement uncertainty, for which performance values were set in directive 2020/2184. Additionally, sensitivity, measurement range, linearity, selectivity, accuracy, repeatability, and limit of detection were selected as parameters to be validated.

During the experimental part, several challenges emerged, and method development took more time than expected. Therefore, it was not possible to validate all the planned parameters. Due to the elapsed time, measurement uncertainty and intermediate precision were not validated during the experimental part. However, **repeatability** and accuracy were successfully validated.

The method developed during the thesis roughly achieved the performance value set in directive 2020/2184 for the limit of quantification. The sensitivity and accuracy of the developed method were successfully validated with all HAA5's. In addition to these, selectivity, reproducibility, and limit of detection of the method were successfully validated with all compounds, except trichloroacetic acid. The linearity of the method and the measurement range were not reliably validated.

Key words: HAA5, method development, validation, liquid chromatography-mass spectrometry

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	7
2	TALOUSVESI JA HAA5-YHDISTEET.....	8
	2.1 Talousveden desinfioinnin sivutuotteena syntyvät yhdisteet	8
	2.2 Talousveden laatuvaatimukset.....	8
	2.3 HAA5-yhdisteet	9
	2.4 HAA5-yhdisteiden analytiikka.....	10
	2.4.1 Kiinteäfaasiuutto	11
3	NESTEKROMATOGRAFIA-MASSASPEKTROMETRIA	13
	3.1 Erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia.....	13
	3.1.1 Käänteisfaasinestekromatografia	14
	3.2 Massaspektrometria.....	14
4	VALIDOINTI.....	18
	4.1 Validointi	18
	4.2 Validointiparametrit	18
	4.2.1 Herkkyys.....	19
	4.2.2 Mittausalue ja lineaarisuus	19
	4.2.3 Selektiivisyys	20
	4.2.4 Tarkkuus ja toistettavuus.....	20
	4.2.5 Toteamis- ja määritysraja	22
	4.2.6 Mittausepävarmuus	23
5	KOKEELLINEN OSUUS	25
	5.1 Menetelmän kehityksen tausta.....	25
	5.2 Laitteisto.....	25
	5.3 Reagenssit.....	27
	5.4 Analyysimenetelmän kehitys.....	28
	5.4.1 Laitteparametrien optimointi	28
	5.4.2 Matriisihäiriö	28
	5.5 Näytteenkäsittely.....	29
	5.5.1 Suorainjektio.....	29
	5.5.2 Kiinteäfaasiuutto	29
	5.6 Menetelmän validointi	31
6	MENETELMÄN KEHITYKSEN TULOKSET	33
	6.1 Matriisin vaikutus kolonnin vasteeseen	33
	6.2 Kiinteäfaasiuuton saanto verrattuna suorainjektioon ja haihdutustesti.....	34

7	VALIDOINNIN TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU	36
7.1	Menetelmän toteamis- ja määrittämisraja sekä mittausalue.....	36
7.2	Menetelmän lineaarisuus	37
7.3	Menetelmän herkkyys ja selektiivisyys.....	40
7.4	Tarkkuus ja toistettavuus	41
7.5	Validoinnin yhteenveto	43
8	POHDINTA	45
	LÄHTEET	47
	LIITTEET	50
	Liite 1. Validointistandardien ja -näytteiden standardikuvaajat.....	50
	Liite 2. Validointitulokset	51

LYHENTEET

HAA	Haloetikkahapot (Haloacetic Acids)
MCAA	Monokloorietikkahappo (Monochloroacetic acid)
DCAA	Dikloorietikkahappo (Dichloroacetic acid)
TCAA	Trikloorietikkahappo (Trichloroacetic acid)
MBAA	Monobromietikkahappo (Monobromoacetic acid)
DBAA	Dibromietikkahappo (Dibromoacetic acid)
SPE	Kiinteäfaasiuutto (Solid Phase Extraction)
UPLC	Erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia (Ultra-Performance Liquid Chromatography)
ESI	Sähkösumutus-ionisaatio (Electrospray Ionisation)

1 JOHDANTO

Raakaveden desinfiointin ansiosta vesijohtoverkoston jakelemaa talousvettä voidaan pitää turvallisena sekä mikrobiologisesti käyttökelpoisena. Desinfiointin aikana voi kuitenkin syntyä haitallisina sivutuotteina kemiallisia epäpuhtauksia. Sivutuotteena syntyvät yhdisteet saattavat suurina pitoisuuksina olla terveydelle vaarallisia ja monet näistä yhdisteistä luokitellaankin pitkäaikaisessa altistuksessa syöpävaarallisiksi. HAA-yhdisteet ovat yksiä tavallisimpia talousveteen desinfiointin sivutuotteina muodostuvia yhdisteitä. HAA-yhdisteillä tarkoitetaan etikkahapon johdannaisia, jossa etikkahappoon on kiinnittynyt yksi tai useampi halogeeniatomi, yleensä kloori- tai bromiatomi (Bitton 2011, 218; Hänninen ym. 2010, 28–29.).

Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa toimeksiantajayritykselle menetelmä HAA5-yhdisteiden, eli mono-, di-, ja trikloorietikkahappojen sekä mono- ja dibromietikkahappojen, määrittämiseksi talousvedestä. Työn tarkoituksena oli kehittää ja validoida nestekromatografi-massaspektrometrille menetelmä HAA5-yhdisteet määrittämiseen vesimatriisista. Haloetikkahappojen analytiikka on tyypillisesti toteutettu kaasukromatografisesti tai ioninvaihtokromatografialla. Menetelmissä on haasteina näytteiden työläs ja monivaiheinen esikäsittely sekä suhteellisen pitkät analyysiajat, jotka lisäävät virhelähteiden määrää laajentaen koko analyysin epävarmuutta. Opinnäytetyön aika kehitettävän menetelmän tarkoituksena on kehittää menetelmä, jossa näytteiden esikäsittely olisi mahdollisimman suoraviivaista ja analyysi tuotannollisesti kannattava.

Opinnäytetyö tehtiin Eurofins Environment Testing Finland oy:lle, joka on ympäristönäytteiden analytiikkaan erikoistunut laboratorioalan yritys. Yritys on osa suurempaa maailmanlaajuista Eurofins-konsernia. Opinnäytetyö tehtiin Lahden toimipisteessä, jossa on tarjolla kattavan analyysivalikoiman ympäristö- ja talousvesinäytteistä teollisuuden ja yksityisten tahojen tarpeisiin.

2 TALOUSVESI JA HAA5-YHDISTEET

2.1 Talousveden desinfioinnin sivutuotteena syntyvät yhdisteet

Vesijohtoverkoston veden lähteinä Suomessa käytetään sekä pinta- että pohjavesiä. Vesi on desinfioitava ennen sen soveltumista jakeluun talouksille ja tätä käsittelemätöntä vettä kutsutaan raakavedeksi (Vesi.fi n.d.). Talousveden desinfioinnilla tarkoitetaan raakaveden sisältämien patogeenien tappamista kemiallisesti tai fysikaalisesti. Desinfioinnin tavoitteena on taata talousveden turvallinen käyttö ja vähentää vedestä aiheutuvien terveystarkkuuksien mahdollisuutta. Ihmisten terveyden ja hyvinvoinnin varmistamiseksi tehdyistä ennaltaehkäisevistä toimita talousveden desinfioinnin keksimistä voidaan pitää yhtenä merkittävimmistä (Bitton 2011, 218.).

Raakaveden tavallisempia desinfiointitapoja ovat klooraus, ultraviolettisäteilyllä käsittely sekä otsonointi. Suomessa yleisimmin raakavesi desinfioidaan klooraamalla. Raakaveden sisältäessä runsaasti orgaanista ainesta, eli humusta, voi desinfioinnin yhteydessä veteen syntyä ympäristölle ja ihmisten terveydelle vaarallisia kemiallisia epäpuhtauksia. Kloorauksessa käytettävä kloori reagoi raakaveden humuksen kanssa muodostaen kloorattuja yhdisteitä, kuten haloetikkahappoja ja trihalometaaneja. Järvi- ja pintavesien humuspitoisuus on tyypillisesti suurempi kuin pohjavesien. Desinfioinnin sivutuotteita esiintyy huomattavasti enemmän alueilla, joissa käytetään raakavesilähteinä järvi- tai pintavesiä verrattuna pohjavesiin (Hänninen ym. 2010, 28–29; THL, 2023.).

2.2 Talousveden laatuvaatimukset

Talousveden laatuvaatimukset Suomessa on säädetty sosiaali- ja terveysministeriön asetuksissa sekä Euroopan unionin juomavesidirektiivissä. Juomavesidirektiivi 2020/2184 vastaa ihmisen käyttöön tarkoitetun veden turvallisuudesta. HAA5-yhdisteet, eli mono-, di- ja trikloorietikkahappo sekä mono- ja dibromietikkahappo lisättiin direktiiviin vuonna 2020 ja jäsenvaltioiden on vuoteen 2026

mennessä tehtävä toimenpiteet, jotta yhdisteiden pitoisuusseuranta talousvesistä toteutuu (Direktiivi 2020/2184/EU, 1).

HAA5-yhdisteiden pitouuksien yhteissumman on oltava alle 60 µg/l ihmisen käyttöön tarkoitetussa vedessä. HAA5-yhdisteiden pitoisuus on mitattava asetetun direktiivin mukaan ihmisen käyttöön tarkoitetusta vedestä, jos veden desinfiointimenetelmänä käytetään sellaisia menetelmiä, jotka voivat aiheuttaa HAA5-yhdisteiden muodostumisen. HAA5-yhdisteiden analysointiin käytetyn menetelmän määrittäjärajana on oltava vähintään 18 µg/l ja mittausepävarmuuden 50 %. Analysoidut tulokset on ilmoitettava vähintään yhden merkitsevän numeron tarkkuudella (Direktiivi 2020/2184/EU, 32).

2.3 HAA5-yhdisteet

HAA-yhdisteillä, eli haloetikkahapoilla, tarkoitetaan etikkahapon johdannaisten joukkoa, jossa osa tai kaikki etikkahapon α -hiilen vetyatomeista ovat substituutuneet halogeeniatomilla. HAA-yhdisteet ovat siis pienimolekyylisiä karboksyylihappoja. Yleisimmin tarkoitetaan niitä etikkahapon johdannaisia, joissa vetyatomit ovat mono-, di- tai trisubstitoituneet klooriatomin, bromiatomin tai kummankin kanssa. HAA-yhdisteistä viisi, eli niin sanotut HAA5-yhdisteet ja kemiallisia ominaisuuksia ovat lueteltuna taulukossa 1 (National Center for Biotechnology Information. 2023a, 2023b, 2023c, 2023d, 2023e).

TAULUKKO 1. HAA5-yhdisteet ja niiden kemialliset ominaisuudet

Yhdiste	Lyhenne	Moolimassa	pKa
monokloorietikkahappo	MCAA	94,5	2,87
dikloorietikkahappo	DCAA	128,94	1,26
trikloorietikkahappo	TCAA	163,38	0,51
monobromietikkahappo	MBAA	138,95	2,89
dibromietikkahappo.	DBAA	217,84	1,48

Edellä mainittujen viiden HAA-yhdisteen lisäksi mahdollisia kloori- ja bromi kongeneerejä voi olla tribromietikkahappo, bromikloorietikkahappo, diklooribromietikkahappo sekä dibromikloorietikkahappo. Yhdessä HAA5-yhdisteiden

kanssa nämä neljä muodostavat HAA9-yhdisteiden joukon (Reckhow, Rees & Bryan 2004.).

Klooratut HAA-yhdisteet muodostuvat raakaveden desinfiointin sivutuotteena, veden sisältämän humuksen reagoidessa desinfiointissa käytettävän kloorin kanssa. Raakaveden sisältäessä runsaasti bromia, veteen muodostuu myös bromia tai bromia sekä klooria sisältäviä HAA-yhdisteitä. (Buchanan 2011, 20.) HAA-yhdisteiden muodostuminen lisääntyy desinfioitavan veden pH:n laskiessa. Vastaavasti pH:n kasvaessa HAA-yhdisteiden konsentraatio pienenee samalla kuitenkin kasvattaen trihalometaanien muodostumiskonsentraatiota (WHO 2017, 186–187).

HAA-yhdisteet ovat tutkimusten perusteella nisäkkäiden soluja tai geeniperimää vahingoittavia, mutageenisia ja teratogeenisiä. Bromattujen haloetikkahappojen on tutkittu olevan kloorattuja etikkahappoja haitallisempia. HAA-yhdisteiden kongeneereistä yhden halogeenin omaavat HAA-yhdisteet ovat potentiaalisesti ihmiselle haitallisimpia, koska ne ovat biologisia molekyyliä alkyloivia (Pals, Ang, Wagner & Plewa 2011.). Yhdisteille altistutaan tutkimusten perusteella pääosin juomalla yhdisteitä sisältävää vettä. Altistuminen voi myös tapahtua hengitysteiden kautta sekä ihokosketuksessa tilanteissa, jossa veden klooraus on hyvin voimakasta, esimerkiksi uimahalleissa. Pieniä määriä HAA-yhdisteitä voidaan myös havaita elintarvikkeissa näiden desinfiointin jäljiltä (Cardador & Gallego 2011.).

2.4 HAA5-yhdisteiden analytiikka

HAA5-yhdisteitä analysoidaan yleensä kaasukromatografisesti tai ioninvaihtokromatografialla. Yhdysvaltojen ympäristösuojeluvirasto (US EPA) on määrittänyt standardisoidut menetelmät HAA9-yhdisteiden määrittämiseksi kaasukromatografisesti (Method 552.1, 552.2, 552.3) sekä ioninvaihtokromatografialla (Method 557).

HAA5-yhdisteiden kaasukromatografinen analysointi perustuu analyttien uuttoon näytematriisista ja tästä edelleen johdoksen muodostamiseen analyyteistä,

eli niiden derivatisointiin. Uutto toteutetaan neste-neste-uuttona (Method 552.1 ja 552.2). Uutetut analyytit derivatisoidaan metyyliestereiksi, jotta vahvasti pooliset HAA5-yhdisteet voidaan saattaa kaasukromatografiseen analyysiin sopivaan haihtuvaan muotoon. (Domino ym. 2003.) Ioninvaihtokromatografinen analyysi ei vaadi näytteiden esikäsitteilyä. Laadunvarmistustoimenpiteinä näytteisiin lisätään sisäisen standardin liuosta, jonka jälkeen näytteet voidaan injektoida suoraan laitteelle ilman suodatusta tai konsentroitua. (Zaffiro & Zimmerman 2009, 4.)

Kaasu- ja ioninvaihtokromatografian lisäksi HAA-yhdisteitä on analysoitu myös nestekromatografisesti. HAA-yhdisteiden nestekromatografisen analyysin etuina verrattuna edellä mainittuihin analyysitapoihin voidaan pitää näytteiden vähäistä esikäsitteilytarvetta sekä lyhyttä analyysiaikaa. Nestekromatografilla on saatu tuloksia esimerkiksi käänteisfaasinestekromatografiaa käyttäen (De-Alwis, Adams, Schlittenbauer & Willmer 2020.).

2.4.1 Kiinteäfaasiuutto

Analyysimatriisiin sisältäessä runsaasti häiriötekijöitä voidaan kiinteäfaasiuuttoa, eli SPE:tä (*Solid Phase Extraction*), käyttää näytteen puhdistukseen. SPE on kromatografinen esikäsitteilytekniikka, jossa paineen tai vakuumin avulla nestemäinen näyte ajetaan kiinteällä sorbentilla pakatun kolonnin läpi. Analyytit retentoituvat valikoituvasti sorbenttiin, jolloin näytteen sisältämät häiriötekijät voidaan pestä liuottimella. Tukittavat analyytit eluoidaan tämän jälkeen kolonnista mahdollisille jatkokäsittelylle (Dean 2009, 50.).

Yleisesti SPE:ssä käytetyt sorbenttimateriaalit ovat modifioituja piioksidea, eli silikapohjaisia. Sorbenttimateriaalit voidaan jaotella karkeasti kolmeen kategoriaan, normaalifaasiin, käänteiseen faasiin sekä ioninvaihtoon. Ioninvaihtosorbentti sisältää ionisoidun tai ionisoituvan funktionaalisen ryhmän, kuten sekundääriisen amiinin tai karboksyylihapon. Sorbenttimateriaalin varautuneen funktionaalisen ryhmän ja näytteen sisältämän vastakkaisesti varautuneen yhdisteen välille muodostuu elektrostaattinen vetovoima tai ionisidos. Anioninvaihtosorbentti on positiivisesti varautunut, eli tämä uuttaa näytteen negatiivisesti varautuneet

komponentit (Dean 2009, 50; Wells 2003, 90.). Sorbentit voidaan luokitella heikkoihin ja vahvoihin. Vahvat sorbentit ovat pH:sta riippumatta aina varautuneita, kun taas heikkojen varaus muuttuu pH:n muutoksen seurauksena. Heikko anioninvaihtosorbentti sisältää primäärisen, sekundäärisen tai tertiäärisen amiinin, joka on neutraali korkeassa pH:ssa ja positiivisesti varautunut matalassa (Watson 2018.).

SPE:tä on käytetty esikäsitteilymenetelmänä HAA-yhdisteiden analytiikassa puhdistamaan, eristämään sekä derivatisoimaan. Benanou, Acobas & Sztajn bok (1998) saavuttivat HAA5-yhdisteille 72–103 % saantoprosentit käyttämällä anioninvaihtosorbenttia. Priento-Blanco ym. (2012) tutkimuksessa sorbenttimateriaaleina käytettiin kolmea eri polymeerisorbenttia. Saantoprosentiksi näille saavutettiin 27–102 % (Benanou, Acobas & Sztajn bok 1998; Priento-Blanco ym. 2012).

3 NESTEKROMATOGRAFIA-MASSASPEKTROMETRIA

3.1 Erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia

Kromatografia on analyysitekniikka, jonka avulla voidaan erotella, puhdistaa tai eristää näytteen sisältämät komponentit toisistaan. Komponenttien erottuminen toisistaan perustuu yhdisteen vuorovaikutukseen kahden faasin, pysyvän ja liikkuvan faasin välillä. Karkeasti kromatografiset menetelmät voidaan jakaa nestekromatografiin ja kaasukromatografiin menetelmiin. Nestekromatografiassa liikkuvana faasina käytetään nestemäistä eluenttia ja kaasukromatografiassa inerttiä kaasua (Vitha 2017, 1.). Nestekromatografiassa pysyvä faasi on hienojakoista kiinteää ainetta, joka on tiiviisti pakattu kolonniin. Pysyvän faasin pakkausmateriaali riippuu käytetystä nestekromatografiatekniikasta, yleisimmin kolonni on pakattu huokoisella piioksidilla, jota on modifioitu käytetyn tekniikan perusteella (Vitha 2017, 149.).

Korkean erotuskyvyn nestekromatografiassa liikkuva faasi, eli eluentti, pumpataan koneellisesti pysyvän faasin, eli kolonnin läpi tietyllä virtausnopeudella. Nestekromatografinen laitteisto koostuu eluenttisäiliöistä, pumpusta, injektorista, kolonnista sekä detektorista. Eluentti kulkee injektorin läpi kuljettaen näytteen kolonniin. Näytteen komponenttien erilaiset vuorovaikutukset kolonnin ja eluentin kanssa aiheuttavat niiden erottumisen toisistaan. Kolonnista näytteen erottuneet komponentit eluoituvat detektorille, jolla nämä voidaan havaita. Eluentin, kolonnin sekä näytteiden lämpötilaa on mahdollista kontrolloida laitteen mukaan (Riekkola & Hyötyläinen 2002, 137–138.).

Erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia (UPLC, *Ultra-Performance Liquid Chromatography*) on suorituskyvyltään korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa parempi. UPLC:tä voidaan käyttää korkeammassa paineessa, jopa 15000 psi:ssä, korkean erotuskyvyn nestekromatografian kestäessä painetta vain 6000 psi:in asti. Korkeampi paine mahdollistaa partikkelikooltaan pienempien kolonnien käytön, jonka ansiosta UPLC:llä saavutetaan korkeampi herkkyys sekä erotelukyky (International Labmate Limited, 2021.). Korkeampi paine mahdollistaa

myös lyhyempien ja kapeampien kolonnien käytön, lyhentäen analyysiaikaa ja vähentäen tarvittavan eluentin määrää (Vitha 2017, 213.).

3.1.1 Käänteisfaasinestekromatografia

Käänteisfaasinestekromatografia on laboratorioissa yleisimmin käytetty neste-kromatografiatekniikka. Sen vahvuuksina voidaan pitää stabiileja pysyvän faasin materiaaleja sekä eluenttigradienttien yksinkertaista käyttöä. Eluenttigradientilla tarkoitetaan eluentin koostumuksen muutosta analyysin aikana. Menetelmässä yleisesti käytetyt eluentit, ovat yhteensopivia massaspektrometrin vaatimaan ionisaatioon (Ketola ym. 2010, 174.).

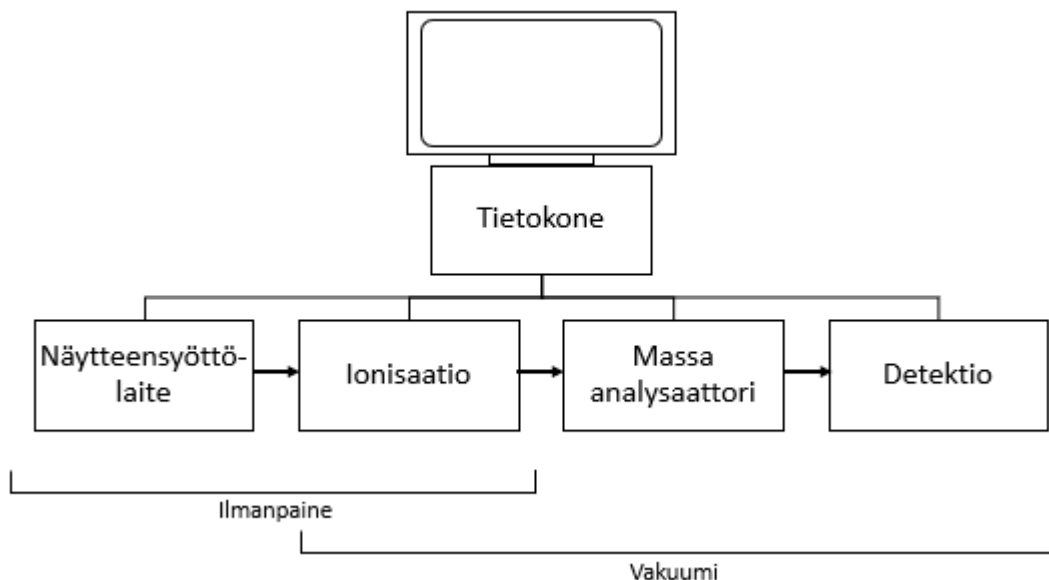
Käänteisfaasinestekromatografiassa yhdisteiden erottuminen perustuu analyytin, pysyvän faasin ja eluentin välillä vaikuttaviin heikkoihin, poolittomiin ja epäspesifiisiin voimiin, eli van der Waalsin voimiin sekä dispersiovoimiin. Eluentti on aina pysyvää faasia poolisempi, esimerkiksi vesi tai orgaaninen liuotin kuten metanoli tai asetonitrili. Eluentin poolisuuden ja pysyvän faasin poolittomuuden seurauksena yhdisteen poolisuuden kasvaessa tämän pidäytyminen pysyvään faasiin vähenee ja yhdisteet eluoituvat laskevasti poolisuusjärjestyksessä (Ketola ym. 2010, 174.).

3.2 Massaspektrometria

Massaspektrometria on analyysitekniikka, joka perustuu atomin, molekyylin tai molekyylifragmentin massojen analysointiin. Massaspektrometri ei suoraan mitata siihen syötetyn komponentin massaa, vaan se antaa vasteen komponentista muodostuneen ionin massan ja varauksen suhdeluvulle, massa-varaus-suhteelle m/z (Barker 1999, 1–2.).

Massaspektrometrinen laitteisto koostuu näytteensyöttölaitteesta, ionisaatiolähteestä, massa-analysaattorista ja detektorista. Laitteisto on kytkettynä tietokoneeseen, jolla ohjataan massaspektrometriä ja kerätään saatu mittausdata.

Massaspektrometrinen laitteiston pääosat ovat esitettyinä kuviossa 1. Massa-analysaattori sekä detektori ovat vakuuissa, ympäröivien kaasumolekyylien aiheuttaman häiriön minimoimiseksi. Ionisaatio voi käytetyn ionisaatiotekniikan mukaan tapahtua vakuuissa tai ilmanpaineessa (Ketola ym. 2010, 15.).



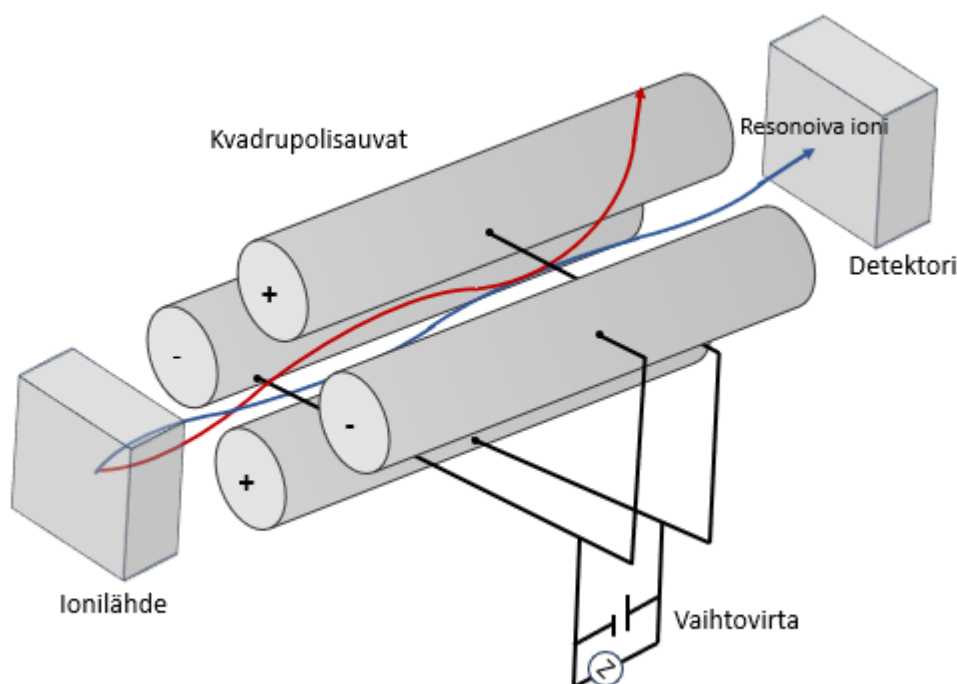
KUVIO 1. Massaspektrometrinen laitteiston osat (Ketola ym. 2010, 15, muokattu).

Ilmanpaineessa tapahtuvista ionisaatiotekniikoista sähkösumutus-ionisaatio (ESI, *Electrospray Ionisation*) on yksi tavallisimmin käytetyistä. ESI ei varsinaisesti ionisoi näytteen komponentteja, vaan sen avulla varautuneet yhdisteet saadaan muutettua nestefaasista kaasufaasiin. Näytteen sisältämät yhdisteet on siis saatettava ionisoituneeseen muotoon eluentin kemiallisia ominaisuuksia muokkaamalla. ESI soveltuu erityisen hyvin poolisten molekyylien ionisaatioon (Ketola ym. 2010, 15.).

Näytteensyöttäjistä ohjataan näyte kapillaariin, jossa tämä aerolisoidaan yleensä sumutuskaasun ja korkean jännitteen avulla. Pisan sisällämän liuottimen haihtuessa pisan varaustiheys kasvaa samalla kasvattaen pisan sisältämien saman varauksisten ionien hylkimistä, eli repulsiota. Varaustiheyden saatuttaessa Rayleighin rajan eli pisteen, jossa repulsiio on pintajännitystä suurempi, pisara hajoaa edelleen pienemmiksi pisaroiksi. Tämä toistuu, kunnes pisara on kooltaan niin pieni, että se pystyy tuottamaan yksittäisen kaasufaasi-ionin.

Muodostuneet kaasufaasissa olevat ionit johdetaan massa-analysaattoriin (Ketola ym. 2010, 68–73.).

Massaspektrometriassa käytetään massa-analysaattoreita, jotka erottelevat sumutuksessa muodostuneet ionit niiden energian, liikemäärän tai nopeuden perusteella. Yleisimmin laboratorioissa on käytössä kvadrupoli-massa-analysaattori. Kvadrupoli on esitettyä kuvassa 1. Kvadrupoli koostuu neljästä saman suuntaisesta metallisauvasta eli elektrodista. Vastakkaiset elektrodit ovat kytkettyinä toisiinsa siten, että toisella parilla on positiivinen jännite ja toisella negatiivinen. Elektrodisauvojen välille muodostuu sähkökenttä, johon ionin saapuessa ne joutuvat kohtisuoraan värähdysliikkeeseen. Ionin värähdysliikkeen ollessa liian suuri, se törmää elektrodien eikä pääse kulkeutumaan detektorille. Elektrodien asetetaan sellainen jännite, että vain tietyn m/z varaussuhteen omaavat ionit pääsevät kulkeutumaan kvadrupolin läpi detektorille (Riekkola & Hyötyläinen 2002, 49; Ketola ym. 2010, 28, 92.).



KUVA 1. Kvadrupolimassa-analysaattorin kaaviokuva (Riekkola & Hyötyläinen 2002, 50, muokattu).

Tandemmassaspektrometria eli MS/MS hyödyntää kahta tai useampaa massa-analysaattoria. Ensimmäisessä massa-analysaattorissa eristetyille ionille

tehdään haluttu reaktio, jonka tuotteet analysoidaan toisella massa-analysointilaitteella. MS/MS etuina on sen spesifisyys sekä analysoitavien näytteiden laajempi skaala. Analysoitava ioni eristetään ensimmäisessä massa-analysointilaitteessa, joten analysoitavan näytteen ei tarvitse olla puhdas. (Ketola ym. 2010, 116.).

Massaspektrometria on erittäin hyödyllinen silloin kun analysoidaan atomimassaltaan suhteellisen pieniä ja poolisia molekyylejä. Kromatografiassa pienten ja poolisten molekyylien retentio on yleensä heikkoa ja kemiallisilta ominaisuuksiltaan hyvin samankaltaiset komponenttien retentioajat voivat olla samat, joka häiritsee niiden detektiota. Massaspektrometrin yhdistäminen neste- tai kaasukromatografiin mahdollistaa näiden yhdisteiden kvantitatiivisen ja kvalitatiivisen mittaamisen, koska massaspektrometri kykenee erottelemaan yhdisteet niiden massan mukaan. Näistä syistä massaspektrometri on tehokkain kromatografisissa tekniikoissa käytetty detektor (Harris 2010, 502.).

4 VALIDOINTI

4.1 Validointi

Kemiallisen mittausmenetelmän validointi on tärkeää menetelmän suorituskykyä arvioidessa. Validoinnin tavoitteena on varmistaa ja osoittaa systemaattisesti, että analyttinen menetelmä on asianmukainen tälle tarkoitettuun käyttötarkoitukseen. Menetelmän validointi toteutetaan, jos on tarpeellista varmistaa, että menetelmän suorituskykyä kuvaavat parametrit vastaavat menetelmän käyttötarkoituksen asettamia rajoja (Matveinen ym. 2005, 25–26; Mäkinen ym. 1996, 6.).

Validointia vaativia tilanteita ovat esimerkiksi uutta menetelmää käyttöön ottaessa, vanhaa jo validoitua menetelmää paranneltaessa tai siirrettäessä menetelmä analysoitavaksi uudelle laitteelle, kahden eri menetelmän vastaavuutta verrattaessa tai jos laboratorion laadunvarmistustoimenpiteiden avulla huomataan muutoksia menetelmässä. Menetelmän validointi on siis pätevä vain testatulle laitteelle, matriisille ja pitoisuusalueelle. Validointikokonaisuuteen kuuluu validointisuunnitelma, kokeiden suoritus, validointitulosten tilastollinen arviointi ja tarkka dokumentointi sekä raportointi (Matveinen ym. 2005, 25–26; Mäkinen ym. 1996, 6.).

4.2 Validointiparametrit

Validoinnissa tutkittavia validointiparametreja ovat muun muassa toteamis- ja määritysraja, mittausalue, mittausepävarmuus, lineaarisuus, tarkkuus sekä menetelmän selektiivisyys ja spesifisyys. Nämä parametrit ovat menetelmän ominaisuuksia, jotka kuvaavat tämän suorituskykyä. Validoitavat parametrit määritellään menetelmäkohtaisesti riippuen validoinnin laajuudesta sekä menetelmätyypistä (Magnusson & Örnemark 2014, 13–14.).

4.2.1 Herkkyys

Menetelmän herkkyys kuvaa tämän kykyä havaita analysoitavan komponentin pitoisuuden muutokset. Menetelmän ollessa herkkä detektorin reagoi herkästi pieniinkin pitoisuuden muutoksiin. Menetelmän herkkyys määritellään yleensä lineaarisen kalibrointisuoran kulmakertoimena (Mäkinen ym. 1996, 28.). Menetelmän herkkyys ei ole erityisen tärkeä menetelmän suorituskykyä kuvaava parametri, mutta sillä on kuitenkin muutama hyödyllinen käyttötarkoitus. Herkkyyden avulla voidaan arvioida käytetyn laitteen suorituskykyä ja havaita tässä muutoksia (Magnusson & Örnemark 2014, 30.).

4.2.2 Mittausalue ja lineaarisuus

Kvantitatiivisen menetelmän mittausalueella tarkoitetaan sitä pitoisuuksien joukkoa, jolla menetelmä tuottaa tuloksen sallittujen virhemarginaalien rajoissa. Mittausalue pienin pitoisuus on usein menetelmän toteamis- tai määrittäysraja. Alueen suurimman pitoisuuden rajoittavana tekijänä voidaan pitää analyysilaitteen detektorin ominaisuuksien aiheuttamaa rajausta; millä pitoisuusalueella detektori ei enää pysty havainnoimaan pitoisuuden muutosta. Menetelmän mittausalueella ei tarkoiteta vain menetelmän lineaarista aluetta, vaan mittausalue voi pitää sisällään useitakin lineaarisia alueita (Mäkinen ym. 1996, 16.).

Menetelmän lineaarinen alue kuvastaa sitä menetelmän pitoisuusaluetta, jossa detektorin antama vaste on suoraan verrannollinen näytteen pitoisuuteen. Lineaarisuus voidaan määrittää tekemällä vähintään viidellä pitoisuustasolla määritykset, jotka yleensä toistetaan useaan kertaan kullakin pitoisuustasolla. Tuloksista muodostetaan pienimmän neliösumman menetelmällä regressiosuora (Matveinen ym. 2005, 28.).

Regressiosuorasta menetelmän lineaarisuutta voidaan arvioida lineaarisen regressioanalyysin avulla. Selitysaste R^2 kuvastaa kuinka hyvin saadut tulokset vastaavat muodostettua regressiosuoraa. R^2 saa arvoja välillä $[0,1]$. Arvon ollessa 1, kuvaa muodostettu suora täydellisesti kaikkia muuttujan vaihteluita ja

menetelmän voidaan todeta olevan lineaarinen (Nummenmaa 2021, 499.). Selitystasteen lisäksi menetelmän lineaarisuutta arvioidaan jäännöstermien, eli residuaalien, avulla. Menetelmän ollessa lineaarinen, residuaalit normaalijakautuvat nollan molemmin puolin. Residuaalien analysointi toteutetaan yleensä residuaalikuvaajaa tarkastelemalla (Nummenmaa 2021, 452.).

4.2.3 Selektiivisyys

Selektiivisyys kuvaa menetelmän kykyä määrittää tarkasti ja spesifisesti tavoiteltu analyytti tai analyytit, kun näytematriisi sisältää näiden lisäksi muita yhdisteitä. Menetelmällä mitatun signaalin on oltava peräisin vain tutkitusta analyytistä, jotta menetelmää voidaan pitää selektiivisenä. Selektiivisessä menetelmässä näytematriisin muut yhdisteet eivät häiritse analyysitulosta vahvistamalla tai heikentämällä signaalia. Menetelmän analyysitekniikka vaikuttaa tämän selektiivisyyteen, esimerkiksi kromatografisia menetelmiä voidaan yleisesti pitää selektiivisempinä kuin happo-emästitrausta. Harva menetelmä on kuitenkin täysin selektiivinen (Matveinen ym. 2005, 28.).

Näytematriisin sisältäessä tutkittavaa yhdistettä, menetelmän selektiivisyys on mahdollista havainnoida kalibrintisuoran kulmakertoimien avulla. Selektiivisyys voidaan määrittää vertailemalla normaalia kalibrintisuoran kulmakertoimien näytematriisiin tehtyyn kulmakertoimeen. Kalibrintisuorien lineaarisen regressiosovituksen kulmakertoimien välisen vaihteluvälin ollessa $\pm 5\%$, voidaan vaihtelun olettaa syntyvän matriisien eri analyyttipitoisuuksista, eikä matriisin aiheuttamasta häiriöstä (Mäkinen ym. 1996, 15.).

4.2.4 Tarkkuus ja toistettavuus

Menetelmän mittatulosten tarkkuudella, eli poikkeamalla, tarkoitetaan mitattujen tulosten yhdenmukaisuutta mitattavan suureen oikean arvon kanssa. Menetelmän tarkkuutta voidaan arvioida saantokokeilla. Saantokokeissa analysoitaviin näytteisiin lisätään tunnettu määrä tutkittavia yhdisteitä. Näytteet analysoidaan

lisäksi sellaisenaan ilman lisäystä. Yhdessä sarjassa lisäys analysoidaan tyypillisesti 6–10 rinnakkaisena ja näiden keskiarvosta lasketaan saanto R kaavan 1 mukaisesti.

$$R = \frac{x - x_0}{T} \cdot 100 \%, \quad (1)$$

jossa x on rinnakkaismääritysten keskiarvo, x^0 on alkuperäisen näytteen pitoisuus ja T lisätyn standardiliuoksen pitoisuus. Saantoa voidaan myös jossain tapauksissa tarkastella menetelmän näennäisenä saantona R' kaavan 2 osoittamalla tavalla.

$$R' = \frac{x}{x_{ref}} \cdot 100 \%, \quad (2)$$

jossa x on rinnakkaismääritysten keskiarvo ja x_{ref} on referenssin arvo (Matveinen ym. 2005, 31; Mäkinen ym. 1996, 34; Magnusson & Örnemark 2014, 31.).

Saantotestien tulos voidaan usein hyväksyä, jos sen arvoksi saadaan $100 \pm 5 \%$. Saantotestien avulla voidaan osoittaa sisältääkö analysoitavat näytteet mahdollisesti määritystä häiritseviä tekijöitä (Matveinen ym. 2005, 31; Mäkinen ym. 1996, 34).

Menetelmän toistettavuudella tarkoitetaan menetelmällä saatujen mittaustulosten vastaavuutta, kun mittaukset on tehty lyhyen aikavälin sisällä samanlaisissa mittausolosuhteissa. Menetelmän toistettavuutta voidaan arvioida tekemällä useita rinnakkaismäärityksiä laadultaan erilaisista näytteistä eri pitoisuustasoilla. Jokaisesta materiaalista lasketaan rinnakkaismittausten keskihajonta SD ja suhteellinen keskihajonta $RSD \%$ kaavojen 3 ja 4 osoittamalla tavalla (Matveinen ym. 2005, 37; Magnusson & Örnemark 2014, 37.).

$$SD = \sqrt{\left(\frac{\sum(x_i - x)^2}{n - 1}\right)} \quad (3)$$

missä x_i on mitattu tulos, \bar{x} mitattujen rinnakkaismääritysten keskiarvo, n rinnakkaismääritysten lukumäärä.

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

missä SD on keskihajonta ja \bar{x} mitattujen rinnakkaismääritysten keskiarvo (Nummenmaa 2021, 117–118.).

Menetelmässä esiintyy todellista vaihtelua, jos rinnakkaisten sarjojen välillä esiintyvä hajonta on sarjojen sisäistä hajontaa suurempi. Tällöin menetelmää ei ole toistettava ja syy vaihtelulle on pyrittävä selvittämään (Matveinen ym. 2005, 37.).

4.2.5 Toteamis- ja määrittysraja

Menetelmän toteamisrajalla tarkoitetaan pienintä pitoisuutta, jolla menetelmällä voidaan luotettavasti todeta määritettävä komponentti. Pienimmän pitoisuuden on merkittävästi erottava nollanäytteen pitoisuudesta. Toteamisraja määritetään analysoimalla taustan aiheuttamaa hajontaa nollanäytteistä (Matveinen ym. 2005, 29–30; Mäkinen ym. 1996, 29–30.). Kromatografisissa tekniikoissa nollanäytteistä ei aina havaita signaalia, jolloin toteamisrajan määrittämiseen käytetään yleensä pienen pitoisuuden testinäytteitä. Testinäytteiden analytyttikonsentraation tulee olla lähellä menetelmän odotettua toteamisrajaa. Testinäytteet analysoidaan yleensä kymmenenä rinnakkaismäärittäksenä, joista lasketaan näiden keskihajonta SD . Yhtälössä 4 on esitetty toteamisrajan LOD laskemisen kaava.

$$LOD = SD \cdot 3 \quad (4)$$

jossa SD on pienen pitoisuuden testinäytteen rinnakkaismäärittysten keskihajonta (Magnusson & Örnemark 2014, 21–24.).

Usein kalibrointikäyrän pienimpänä pitoisuutena käytetään menetelmän määrittysrajaa. Määrittysraja on määritettävän komponentin pienin pitoisuus, jolle voidaan esittää perusteltu epävarmuusarvio. Määrittysraja lasketaan yleensä

toteamisrajan tavoin, käyttäen kertoimena kolmen sijasta kymmentä. Määritysrajan LOQ laskemisen kaava on esitetty yhtälössä 5. Keskihajonnan ollessa suhteellisen vakaa pienillä konsentraatioilla, vastaa yhtälön 5 mukaan laskettu määräysraja 10 %:sta suhteellista keskihajontaa.

$$LOQ = SD \cdot 10 \quad (5)$$

jossa SD on pienen pitoisuuden testinäytteen rinnakkaismääritysten keskihajonta (Magnusson & Örnemark 2014, 24).

Toteamis- ja määräysrajan väliin jää pitoisuusalue, jossa menetelmällä voidaan haluttu komponentti luotettavasti todeta. Tutkittu komponentin kvantitatiivinen määrittäminen sisältää kuitenkin varteenotettavan epävarmuuden tällä pitoisuusalueella (Matveinen ym. 2005, 30; Mäkinen ym. 1996, 29–30.).

4.2.6 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuuden avulla voidaan arvioida menetelmällä saadun tuloksen laatua sekä luotettavuutta. Parametri kuvaa menetelmällä saatujen tulosten oletettua vaihtelua. Menetelmän mittausepävarmuus on tunnettava, jotta voidaan luotettavasti arvioida mittaustuloksen tarkkuuden riittävyyttä esimerkiksi tulosten perusteella johtopäätöksiä tehtäessä tai eri laboratorioden saamien tuloksien vertailussa. Mittaustuloksen mittausepävarmuutta arvioidessa on otettava huomioon kaikki menetelmän ominaisuudet, jotka voivat vaikuttaa mittausepävarmuuteen. Näitä voivat olla esimerkiksi matriisin vaikutus, tilavuuden ja massan määrittämiseen liittyvät epävarmuudet, vertailuarvot sekä satunnaisvaihtelut (Matveinen ym. 2005, 18–20.).

Mittausepävarmuutta määrittäessä on selvitettävä menetelmän satunnainen sekä systemaattinen virhe. Nämä yhdessä muodostavat menetelmän kokonaisvirheen. Menetelmän satunnaisen virheen suuruutta voidaan arvioida rinnakkaismääritysten avulla. Systemaattisen virhe voidaan määrittää kontrollinäytteiden

sekä vertailumateriaalien, joiden tutkittavan yhdisteen pitoisuus tiedetään tarkasti, avulla (Mäkinen ym. 1996, 53–55.).

5 KOKEELLINEN OSUUS

5.1 Menetelmän kehityksen tausta

Menetelmän kehityksen taustana käytettiin Waters Corporationin menetelmää ”Determination of Haloacetic Acids and Acrylamide in Drinking Water by Direct Injection Using Liquid Chromatography-Tandem Quadrupole Mass Spectrometry”. Menetelmässä käytetty kolonni sekä eluentti on koottu taulukkoon 2. Menetelmällä saavutetaan yksittäiselle HAA9-yhdisteelle määritysrajaksi 0,5 µg/l. Saanto vaihteli menetelmällä 97 prosentista 102 prosenttiin ja menetelmällä analysoitujen rinnakkaismääritysten suhteellinen keskihajonta oli alle 8 % kaikilla testatuilla pitoisuuksilla (De-Alwis ym. 2020.).

TAULUKKO 2. Menetelmässä käytetty kolonni sekä eluentti

Kolonni	ACQUITY UPLC HSS C18 SB 1,8 µm, 2,1 x 100 mm
Eluentti A	0,05 % etikkahappo: UHP-vesi
Eluentti B	0,05 % etikkahappo: metanoli

Opinnäytetyössä menetelmän kehitys ja validointi suoritettiin HAA5-yhdisteille. Nämä eroavat menetelmäkehityksen taustana käytettävästä menetelmästä, johon oli sisällytetty näiden lisäksi myös tribromietikkahappo, bromikloorietikkahappo, diklooribromietikkahappo, dibromikloorietikkahappo sekä akryyliamidin analysointi. Rajallisen ajan vuoksi työssä keskityttiin vain edellä mainittuun viiteen, jotka olivat Euroopan parlamentin talousvesidirektiiviin lisätty vuonna 2020.

5.2 Laitteisto

Opinnäytetyön kokeellisessa osassa käytettiin kahta nestekromatografi-massaspektrometri-laiteyhdistelmää. Menetelmän kehitys suoritettiin lähes kokonaan Waters Corporationin ACQUITY UPLC I-Class nestekromatografia yhdistettynä Xevo TQ-MS massaspektrometriin. Lopullinen validointi toteutettiin kuitenkin kaksi sukupolvea uudemmalta ja herkemmalta Waters Corporationin ACQUITY

UPLC I-Class PLUS nestekromatografille, jossa detektorina oli Xevo TQ-XS massaspektrometri. Validoinnissa käytetty laitteisto on esiteltynä kuvassa 2. Massaspektrometrin ionisaattorina käytettiin molemmissa laitteissa sähkösumutusioniisaatiota negatiivisella polarisaatiolla.



KUVA 2. Waters Corporation ACQUITY UPLC I-Class PLUS Xevo TQ-XS UPLC-MS/MS -laiteyhdistelmä.

Nestekromatografिन ajo-olosuhteina käytettiin kahden eluentin gradientti ohjelmaa. Eluenttina A käytettiin laboratorion puhdasvesipohjaista eluenttia ja eluenttina B liuotinpohjaista eluenttia. Työn aikana käytetyt kolonnit ovat listattuna taulukkoon 3. Menetelmän kehitys suoritettiin osittain molemmilla kolonneilla. Validointi suoritettiin käyttäen kolonnia 2. Kokeellisen osuuden aikana tapahtuneen laitevian takia menetelmää ei voitu validoida menetelmän kehityksessä käytetyllä laitteella. Kolonnia 2 ei alkuperäisen suunnitelman mukaan ollut tarkoitus käyttää työn aikana, mutta laitevian takia tätä käytettiin menetelmää validoitaessa.

TAULUKKO 3. Menetelmän kehitykseen käytetyt kolonnit sekä eluentit A ja B

Kolonne 1	Kinetex C18 1,7 µm, 2,1 x 100 mm
Eluentti A	0,1 % etikkahappo UHP-vesi
Eluentti B	0,1 % etikkahappo metanoli
Kolonne 2	ACQUITY HSS T3 1,8 µm, 2,1 x 100 mm
Eluentti A	0,1 % etikkahappo UHP-vesi
Eluentti B	0,1 % etikkahappo: metanoli

5.3 Reagenssit

Työn kokeellisessa osuudessa käytettiin HAA5-yhdisteiden menetelmän kehitykseen ja validointiin kiinteitä aineita sekä kaupallista sertifioitua liuosseosta. Näiden reagenssien puhtausaste, valmistaja sekä käyttötiedot on esitetty taulukossa 4. HAA5-yhdisteiden perusliuokset valmistettiin kiinteistä reagensseista. Reagenssien puhtausaste otettiin huomioon niistä valmistettujen standardiliuoksien pitoisuuksia laskettaessa. Kiinteiden aineiden lisäksi päätettiin ottaa menetelmään mukaan kaupallinen seos EPA 552.2 MIX, joka sisältää HAA9-yhdisteitä pitoisuudella 2000 mg/l.

TAULUKKO 4. Työssä käytettyjen reagenssien puhtausaste, valmistaja sekä aineen tiedot

Yhdiste	Puhtausaste (%)	Valmistaja	Tiedot
MCAA	98,9	Sigma-Aldrich	Kiinteä aine
DCAA	98,8	Sigma-Aldrich	Kiinteä aine
TCAA	100	Sigma-Aldrich	Kiinteä aine
MBAA	99,3	Dr. Ehrenstorfer	Kiinteä aine
DBAA	99,4	Dr. Ehrenstorfer	Kiinteä aine
EPA 552.2. MIX	-	Merck	HAA9-yhdisteiden 2000 mg/l liuos metyyli-tert-butyylietterissä

Kiinteistä aineista valmistettiin standardiliuoksen perusliuokset punnitsemalla kutakin kiinteää ainetta tarkasti noin 20 mg. Punnittu reagenssi liuotettiin 10 ml metanolia ja liuoksen lopullinen tarkka pitoisuus laskettiin punnitun massan sekä

yhdisteen puhtausasteen avulla. Perusliuoksista valmistettiin metanoliin laimentamalla 10 mg/l pitoiset työliuokset. Työliuosten lisäksi valmistettiin standardiliuosseos metanoliin, jossa jokaisen tutkittavan yhdisteen pitoisuus oli 10 mg/l.

5.4 Analyysimenetelmän kehitys

5.4.1 Laiteparametrien optimointi

Menetelmäkehityksessä optimoitiin massaspektrometrin laiteparametrit kullekin tutkittavalle yhdisteelle. Optimointi suoritettiin valmistamalla kustakin yhdisteestä 1 mg/l vahvuinen liuos metanoliin, joka syötettiin suoraan massaspektrometriin. Laiteparametrit optimoitiin analyysiohjelma MassLynx:ssä olevaa automaattista Intelli start -ohjelmistolla. Optimoinnin aikana yhdisteille saatiin useampi molekyyli-ioni-tuoteioni-pari, joista vahvimman signaalin tuottamat valittiin lopulliseen menetelmään. Massaspektrometrin optimoinnissa saadut molekyyli-ioni-tuoteioni-parit on esitetty taulukossa 5.

TAULUKKO 5. MS/MS-menetelmän molekyyli-ioni-tuoteioni-parit.

Yhdiste	Addukti	molekyyli-ioni > tuoteioni (m/z)
MCAA	[M-H] ⁻	92,8 > 34,9
DCAA	[M-H] ⁻	126,7 > 82,9
TCAA	[M-COOH] ⁻	118,6 > 34,9
MBAA	[M-H] ⁻	138,6 > 80,8
DBAA	[M-H] ⁻	218,6 > 80,8

Nestekromatografian laiteparametreinä käytettiin toimeksiantajayrityksen käytössä olevan menetelmän laiteparametrejä. Parametrien toiminta testattiin analysoimalla laboratorion puhdasveten kiinteistä aineista valmistetut testinäytteet.

5.4.2 Matriisihäiriö

Matriisin aiheuttaman häiriön suuruutta tutkittiin kummallakin työn aikana käytetyllä massaspektrometri-nestekromatografi laiteyhdistelmällä sekä kummallakin

työn aikana käytetyllä kolonnilla. Tukittaviksi vesimatriiseiksi valittiin talousvesimatriisiin lisäksi kolme muuta vesimatriisia mahdollisimman kattavan kuvan hahmottamiseksi menetelmän käyttölaajuudesta. Matriisitesteihin valittiin matriiseiksi talousvesi, pintavesi, murtovesi sekä jätevesi.

Kustakin matriisista valmistettiin testinäytteet, joiden teoreettinen pitoisuus tutkitaville HAA5-yhdisteelle oli 100 µg/l. Talousvesimatriisiin tiedettiin olevan analyysin tulevan käyttötarkoituksen kannalta oleellisin matriisi, joten tästä valmistettiin testinäyte myös pitoisuudella 10 µg/l. Testinäytteet valmistettiin EPA 552.2. MIX:stä valmistetusta työliuoksesta. Testinäytteiden lisäksi matriisinäytteet analysoitiin sellaisenaan ilman lisäyksiä. Testinäytteiden piikkien muotoja sekä signaalien vahvuuksia verrattiin laboratorioveteen valmistettuihin näytteisiin.

5.5 Näytteenkäsittely

5.5.1 Suorainjektio

Suorainjektion näytteenkäsittely suoritettiin ensin laboratorion puhdasveteen ja tämän jälkeen neljään eri vesimatriisiin. Näytettä mitattiin 50 ml ja näytteeseen pipetoitiin standardiliuosseosta niin että saavutettiin haluttu pitoisuus. Esimerkiksi lisätään 500 µl 10 mg/l vahvuista standardiliuosseosta 50 ml:aan, jolloin lopulliseksi näytepitoisuudeksi saadaan 100 µg/l. Valmistetuista näytteistä suodatettiin noin 1 ml membraanisuodattimella näyteampulleihin, jonka jälkeen näytteet olivat valmiina laiteanalyysiin.

5.5.2 Kiinteäfaasiuutto

Menetelmää kehittäessä tutkittiin kiinteäfaasiuuttoa mahdollisena vaihtoehtoisena näytteiden esikäsittelytapana. Kiinteäfaasiuutossa käytettiin heikolla anioninvaihdolla toimivia kaupallisia kiinteäfaasiuuttokolonneja, jotka ovat yhteensopivia kuvassa 3. esitetyn vakuumlaitteiston kanssa. Käytettyjen kolonnein

sorbenttimateriaalilla oli kaksi pKa arvoa, 6 ja 9,7. Vakuumlaitteisto toimii vesi-imun avulla, joka on yhdistettynä Woulffin pulloon.



KUVA 3. Vakuumlaitteisto yhdistettynä Woulffin pulloon ja vesi-imuun

Testinäytteet valmistettiin sekä laboratorion puhdasveteen että hanaveteen. Testinäytteet valmistettiin lisäämällä EPA 552.2. MIX laimennosta vesinäytteisiin niin, että teoreettinen lopullinen pitoisuus kullekin tutkittavalle yhdisteelle oli 100 µg/l. Kiinteäfaasiuutolla esikäsiteltyjen näytteiden antaman signaalin vahvuutta verrattiin suorainjektiolla esikäsiteltyiden näytteiden antamaan signaaliin ja näistä laskettiin näennäinen saanto.

Kiinteäfaasiuutto kolonnit huuhdeltiin happamalla metanolilla, jonka jälkeen ne aktivoitiin metanolilla. Aktivoituihin kiinteäfaasiuuttukolonneihin imettiin 50 ml valmistettu testinäytettä vakuumin avulla, jonka jälkeen kolonnit kuivattiin typpivirrassa. Kuivatuista kolonneista analyytit eluoiitiin koeputkiin ja haihdutettiin automaattihaihduttajalla 30 °C vesihauteessa kuiviin. Haihdutettuihin koeputkiin lisättiin 1 ml UHP-vettä, jonka jälkeen näytteet olivat valmiita laiteanalyysille.

Kuiviin haihduttamisen epäiltiin aiheuttavan yhdisteiden haihtumisen. Tämän pois sulkemiseksi tehtiin haihdutustestit. Haihdutustesteissä koeputkiin 1 ja 2 lisättiin metanolia sekä EPA 552.2. MIX laimennosta niin että HAA5-yhdisteiden loppupitoisuus oli 100 µg/l. Koeputkeen 1 pipetoitiin 1 ml UHP-vettä, jonka jälkeen

molemmista koeputkista haihdutettiin metanoli. Koeputkeen 2 lisättiin haihdutuksen jälkeen 1 ml UHP-vettä, jonka jälkeen molemmat testinäytteet olivat valmiina laiteanalyysille.

5.6 Menetelmän validointi

Validoinnin tavoitteena oli osoittaa menetelmän toimivuus sekä soveltuvuus HAA5-yhdisteiden analysointiin talousvesinäytteistä direktiivin 2020/2184 linjauksien suorituserojen puitteissa. Menetelmän määrittämissä tavoitteeksi asetettiin HAA5-yhdisteiden määrittämissä summan olevan alle 18 µg/l. Menetelmä oli tarkoitettu validoida toteamis- ja määrittämissä, mittausalueen, selektiivisyyden, lineaarisuuden, herkkyuden, tarkkuuden ja toistettavuuden osalta. Tarkkuuden hyväksymisrajaksi asetettiin 20 % ja toistettavuuden 10 % toimeksiantajayrityksen käytäntöjen mukaisesti.

Validointi toteutettiin valmistamalla standardinäytteet sekä validointinäytteet taulukon 6 kuvaamalla tavalla. Standardinäytteet valmistettiin laboratorion hanaveteen ja validointinäytteet näytematriisiin. Matriisiin sisältämät anionit, kuten kloridi, saattavat aiheuttaa analyttien epätyypillisen eluoitumisen. Näytematriisiksi valittiin tästä syystä talousvesi, jonka mitattu vapaaan kloorin pitoisuus oli yli kolminkertainen laboratorion hanaveteen verrattuna.

Standardinäytteet ja validointinäytteet valmistettiin kaupallisesta EPA 552.2 MIX-liuoksen 10 mg/l vahvuisesta laimennoksesta. Standardinäytematriisi ja näytematriisi analysoitiin myös sellaisenaan, ilman HAA5-yhdisteiden lisäystä. Kaikkien parametrien validointi suoritettiin analysoimalla matriisinäytteet sekä valmistetut standardinäytteet kertaalleen kymmenenä rinnakkaisena.

TAULUKKO 6. Validoinnissa analysoitujen validointinäytteiden sekä standardinäytteiden pitoisuudet c

Standardi	c (µg/l)	Validointinäyte	Teoreettinen c (µg/l)
st 0	0	Näyte 1	0,5
st 1	1	Näyte 2	1
st 2	5	Näyte 3	5
st 3	10	Näyte 4	10
st 4	50	Näyte 5	50
st 5	100	Näyte 6	100

Validointinäytteiden ja standardinäytteiden lisäksi laboratorion hanaveteen valmistettiin referenssinlisäysnäyte, jolla varmistettiin standardinäytteiden paikkansapitävyys. Referenssinäyte valmistettiin kiinteistä aineista metanoliin liuotettua HAA5-standardiliuosta.

6 MENETELMÄN KEHITYKSEN TULOKSET

6.1 Matriisin vaikutus kolonnin vasteeseen

Matriisitesteissä huomattiin pinta-, murto- ja jätevesimatriisien sisältävän menetelmää häiritseviä tekijöitä runsaasti. Näytteiden antamat vasteet olivat huomattavasti heikommat tai piikkien muodot olivat hyvin epäsäännöllisiä, joten näistä matriiseista ei ollut mahdollista luotettavasti laskea saantoa. Näytteen ei havaittu sisältävän tutkittavia yhdisteitä ennen niiden lisäystä.

Talousvesimatriisinäytteistä analysoitujen näytteiden signaalien vahvuuksista laskettiin saannot verrattuna laboratorion hanaveteen. Lasketut saannot HAA5-yhdisteille TQ-MS ja TQ-XS laitteilla on esitetty taulukossa 7. Menetelmän näennäinen saanto laskettiin kaavan 2 esittämällä tavalla. Esimerkiksi pitoisuustasolla 100 µg/l saatu saanto monokloorietikkahapolle TQ-MS-laitteella.

$$R_{MCAA} = \frac{1403,3}{1330,2} \cdot 100 \% = 105,495 \%$$

TAULUKKO 7. Talousvesimatriisin saanto R verrattuna laboratorion puhdasvetteen TQ-MS ja TQ-XS laitteilla.

TQ-MS	$R_{MCAA} \%$	R_{DCAA}	R_{TCAA}	R_{MBAA}	R_{DBAA}
10 µg/l	93,1	107,7	-	32,0	92,9
100 µg/l	105,5	102,0	108,7	96,1	85,4
TQ-XS	$R_{MCAA} \%$	R_{DCAA}	R_{TCAA}	R_{MBAA}	R_{DBAA}
10 µg/l	130	112,5	115,7	102,3	108,0
100 µg/l	102,5	100,0	132,7	97,7	96,2

Tuloksien perusteella matriisi ei aiheuta merkittävää häiriötä suurilla pitoisuuksilla. Pienillä pitoisuuksilla matriisi aiheuttaa merkittävät häiriöt trikloori- ja monobomietikkahappojen analyysiin. Matriisihäiriö aiheutti molemmille yhdisteille piikkien leviämistä sekä piikkien asymmetristä muotoa. Triklootietikkahapolla leviäminen oli niin suurta, ettei piikkiä voitu erottaa luotettavasti taustakohinasta.

6.2 Kiinteäfaasiuuton saanto verrattuna suorainjektioon ja haihdutustesti

Kiinteäfaasiuutetut näytteet analysoitiin ja saatujen signaalien vahvuuksia verrattiin suorainjektoitujen näytteiden signaaliin. Signaalien vahvuuksista laskettiin näennäinen saanto kaavan 2 esittämällä tavalla. Yhdisteille lasketut saannot ovat koottuna taulukkoon 8. Esimerkiksi kiinteäfaasiuutetun näytteen monokloorietikkahapon näennäinen saanto, verrattuna suorainjektioilla esikäsiteltyyn näytteeseen.

$$R_{MCAA} = \frac{1300}{8000} \cdot 100 \% = 16,25 \%$$

TAULUKKO 8. Kiinteäfaasiuutettujen näytteiden näennäinen saanto R verrattuna suorainjektioilla esikäsiteltyihin näytteisiin.

UHP-vesi	R_{MCAA}	R_{DCAA}	R_{TCAA}	R_{MBAA}	R_{DBAA}
Ei pesua	22,5	14,8	16,0	2,5	16,2
Metanolipesu	16,3	15,2	23,1	0,4	13,1

Taulukossa esiteltyjen tulosten perusteella voidaan todeta kiinteäfaasiuutettujen näytteiden saantojen olevan huomattavasti pienempiä verrattuna suorainjektioilla esikäsiteltyihin näytteisiin. SPE-kolonniin huuhtelu metanolilla alensi tai ei vaikuttanut merkittävästi HAA5-yhdisteiden saantoon lukuun ottamatta trikloorietikkahappoa. Trikloorietikkahapon saanto lähes kaksinkertaistui.

Haihdutustestien näytteiden signaalien vahvuuksia verrattiin suorainjektioilla valmistettujen näytteiden signaaleihin ja näistä laskettiin näennäinen saanto kaavan 2 esittämällä tavalla. Taulukossa 9 on esitetty haihdutustestin näennäiset saannot. Esimerkiksi kuiviin haihdutetun monokloorietikkahapon näennäinen saanto, verrattuna suorainjektioilla esikäsiteltyyn näytteeseen

$$R_{MCAA} = \frac{7500}{8000} \cdot 100 \% = 93,75 \%$$

TAULUKKO 9. Haihdutustestien tulokset

	R_{MCAA}	R_{DCAA}	R_{TCAA}	R_{MBAA}	R_{DBAA}
Kuiviin	93,8	90,9	115,4	81,8	96,2
Vesi lisäys	116,3	100,0	113,5	100,0	103,8

Haihdutustestien perusteella kuiviin haihduttaminen vähensi menetelmän saantoa 8–23 prosenttiyksikköä. Trikloorietikkahapon saanto kasvoi kuiviin haihduttamisesta 2 prosenttiyksikköä. Tulosten perusteella voidaan todeta, ettei kuiviin haihduttamisella ole merkittävää vaikutusta menetelmän saantoon.

Käytetyn anioninvaihtosorbenttimateriaalin pKa arvot olivat 6 ja 9,7. Kolonnit huuhdeltiin emäksisellä metanolilla, jonka jälkeen ne aktivoitiin puhtaalla metanolilla. Aktivoinnissa käytetyn metanolin määrä ei mahdollisesti huuhdellut kokonaan emäksistä metanolia jättäen anioninvaihtosorbenttiin osittain varatutumattomaksi. Varautuneet HAA-yhdisteet eivät mahdollisesti tästä syystä retentoituneet hyvin sorbenttiin, koska näiden välille ei muodostunut elektrostaattisia voimia (Watson 2018; Wells 2003, 90.). Aktivoinnissa käytetyn metanolin määrää lisäämällä sekä tämän pH:ta laskemalla voitaisiin varmistaa sorbenttiin varautuminen.

7 VALIDOINNIN TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELO

7.1 Menetelmän toteamis- ja määrittäysraja sekä mittausalue

Menetelmän toteamis- ja määrittäysrajat laskettiin pienimmällä havaittavalla pitoisuustasolla olevan validointinäytteen 10 rinnakkaismäärittäyksen keskihajonnasta. Dikloori-, monobromi- ja dibromietikkahapoille pienin validointinäytteen pitoisuustaso oli 0,5 µg/l. Mono- ja trikloorietikkahapolle pienin pitoisuustaso oli 5 µg/l. Keskihajontojen avulla toteamis- sekä määrittäysraja voidaan laskea kaavojen 4 ja 5 osoittamalla tavalla. Esimerkiksi dikloorietikkahapon toteamisraja LOD_{DCAA} ,

$$LOD_{DCAA} = 0,0328 \cdot 3 = 0,0983$$

sekä määrittäysraja LOQ_{DCAA} ,

$$LOQ_{DCAA} = 0,0328 \cdot 10 = 0,328$$

HAA5-yhdisteiden pienimpien pitoisuuksien validointinäytteiden keskihajonnat on esitetty taulukossa 10. Taulukossa on lisäksi esitetty keskihajontojen perusteella lasketut kunkin tutkittavan yhdisteen toteamis- ja määrittäysraja, sekä lasketujen määrittäysrajojen yhteissumma.

TAULUKKO 10. HAA5-yhdisteiden 10 validointinäytteen rinnakkaismäärittäyksen keskihajonnat SD , toteamis- ja määrittäysrajat sekä määrittäysrajojen summa

Yhdiste	0,5 µg/l			5 µg/l	
	DCAA	MBAA	DBAA	MCAA	TCAA
SD	0,0328	0,0396	0,1241	0,6429	1,3846
Toteamisraja LOD	0,0983	0,1187	0,3723	1,9289	4,1539
Määrittäysraja LOQ	0,328	0,396	1,241	6,4293	13,846
Σ HAA5 määrittäysrajat					22,2403

Ennen validoinnin aloittamista menetelmän määrittäysrajan kriteeriksi asetettiin HAA5-yhdisteiden määrittäysrajojen summan olevan enintään 18 µg/l. Määrittäysrajojen summaksi validoinnissa saatiin 22 µg/l, joten menetelmällä saavutettiin

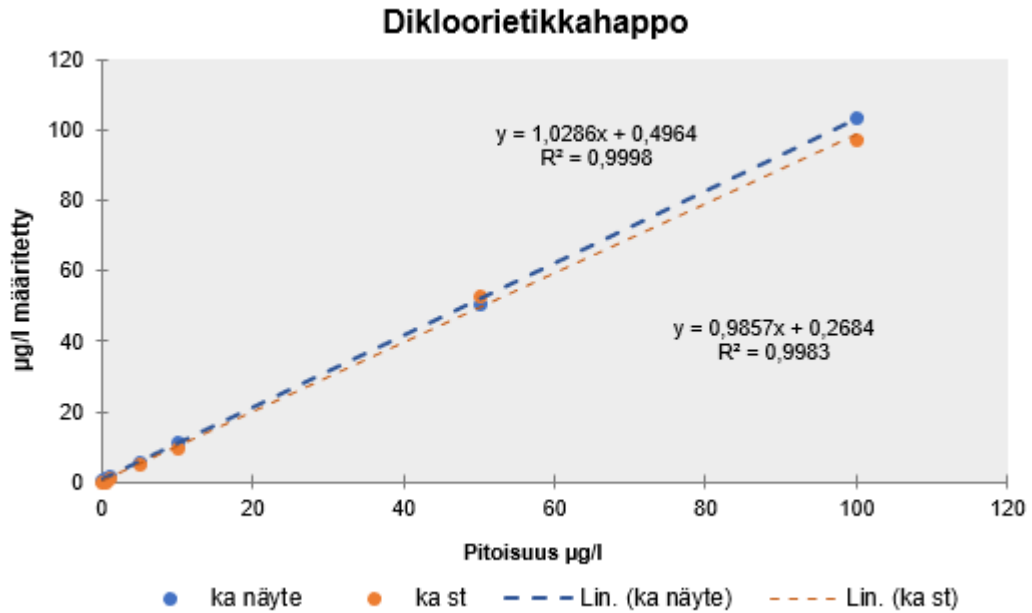
lähies toivottu tulos. Trikloorietikkahapon määritysraja on yli puolet HAA5-yhdisteiden määritysrajojen kokonaissummasta. Toteamis- ja määritysrajojen validointi voidaan tämän perusteella todeta onnistuneen muilla HAA5-yhdisteillä.

Menetelmän mittausalue rajautuu HAA5-yhdisteiden toteamisrajojen summaan ja suurimman standardinäytteen pitoisuuteen. Menetelmän mittausalueeksi saatiin toisin sanoen 6,7–100 µg/l.

7.2 Menetelmän lineaarisuus

Menetelmän lineaarisuutta tutkittiin mono- ja dikloorietikkahapon sekä mono- ja dibromietikkahapon osalta pitoisuusalueella 1–100 µg/l. Mono- trikloorietikkahappojen osalta lineaarisuutta testattiin pitoisuusalueella 5–100 µg/l. 5 µg/l oli pienimmän standardin pitoisuus, joka ylitti yhdisteiden toteamisrajat.

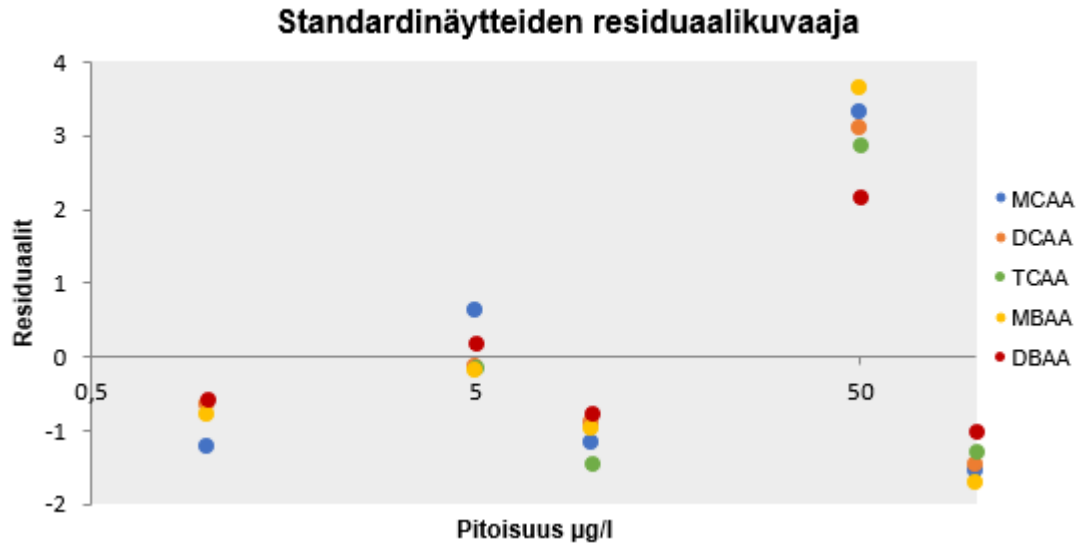
Standardinäytteiden ja validointinäytteiden kymmenestä rinnakkaismittauksesta laskettiin keskiarvot. Lasketuista keskiarvoista kullekin yhdisteelle muodostettiin lineaarisella regressiolla standardisuorat, jossa mitattu pitoisuus on ilmaistuna teoreettisen pitoisuuden funktiona. Kuviossa 2 on esitettyä esimerkkinä dikloorietikkahapon standardi- ja validointinäytteiden muodostetut suorat. Kaikkien yhdisteiden standardikuvaajat ovat liitteessä 1. Kuviossa on esitettyä suorien yhtälöt sekä selitysasteet R^2 .



KUVIO 2. Dikloorietikkahapon standardi- ja validointinäytteiden lineaariset regressiosuorat.

Standardikuvaajasta voidaan silmämääräisesti sanoa menetelmän olevan lineaarinen pitoisuusalueella 1–100 $\mu\text{g/l}$. Kuvaajasta nähdään standardinäytteiden selityssasteen R^2 olevan 0,9983 ja validointinäytteiden R^2 olevan 0,9998. Tämän perusteella validointinäytteiden muodostamaa suoraa voidaan pitää lineaarisempänä kuin standardinäytteiden, koska tämän selityssaste on lähempänä ideaaliarvoa 1 (Nummenmaa 2021, 499.).

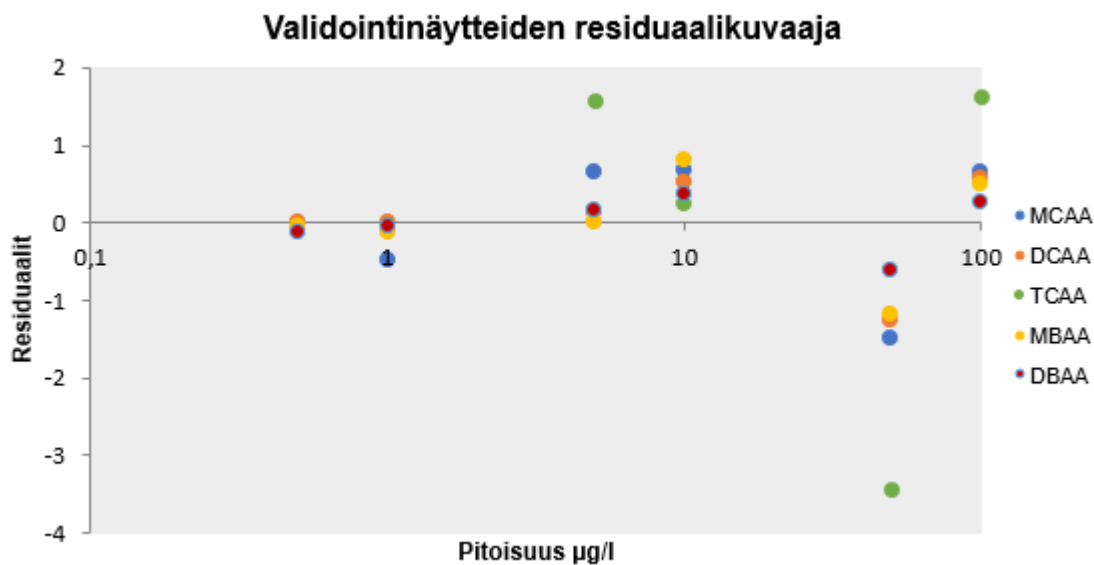
Menetelmän lineaarisuutta validoidessa tarkasteltiin myös regressiokuvaajia. Valmistetuista standardinäytteistä sekä validointinäytteistä muodostettiin residuaalikuvaajat. Standardinäytteiden residuaalikuvaaja HAA5-yhdisteille on esitettyä kuvioissa 3.



KUVIO 3. HAA5-yhdisteiden validointistandardien residuaalikuvaaja

Residuaalikuvaajasta nähdään standardinäytteiden residuaalien jakautuvan nol-
lan molemmin puolin. Standardin st 4 residuaalit ovat kuitenkin kaikilla HAA5-
yhdisteillä selkeästi muita standardeja suurempia. Yksittäisen standardin huo-
mattavasti suurempi residuaali voidaan selittää standardin valmistuksessa käy-
neellä virheellä. Mahdollisilla lisämittauksilla olisi mahdollista varmistaa yksittäi-
sen standardin poikkeavuuden lähde (Mäkinen ym. 1996, 18.).

Standardinäytteiden rinnalla analysoitiin eri näytematriisiin valmistetut validointi-
näytteet. Näiden residuaalikuvaajaa tarkastelemalla ja vertaamalla standardi-
näytteiden kuvaajaan voidaan arvioida menetelmän lineaarisuutta. Kuviossa 4 on
esitettyinä valmistettujen validointinäytteiden residuaalikuvaaja HAA5-yhdisteille.



KUVIO 4. HAA5-yhdisteiden validointinäytteiden residuaalikuvaaja

Kuvaajasta nähdään, ettei standardinäytteiden kuvaajassa esiintyvää trendiä havaita, vaan näytteiden residuaalit normaalijakautuvat nollan molemmin puolin. Todennäköisesti yksittäisen standardinäytteen poikkeava residuaali johtuu standardinäytteen st 4 valmistusvirheestä.

Menetelmällä ei saatu tulosta pienimmällä standardipitoisuudella mono- ja trikloorietikkahapolle. Menetelmän lineaarisuus mono- ja trikloorietikkahapoille jäi validoimatta koska lineaarisuuden määrittämiseksi luotettavasti vaaditaan määrittäykset vähintään viidellä pitoisuustasolla (Matveinen ym. 2005, 28.). Muiden HAA5-yhdisteiden osalta menetelmän lineaarisuutta ei voida luotettavasti arvioida st 4 mahdollisen valmistusvirheen vuoksi. Saadut tulokset kuitenkin viittaavat menetelmän olevan lineaarinen mittausalueella.

7.3 Menetelmän herkkyys ja selektiivisyys

Menetelmän herkkyyttä sekä selektiivisyyttä arvioitiin valmistettujen kalibrointistandardien ja validointinäytteiden muodostamien regressiosuorien kulmakerroimien avulla. Valmistettujen kalibrointistandardien muodostaman regressiosuoran kulmakerroin kk_{st} kuvaa menetelmän herkkyyttä. Selektiivisyys saadaan laskemalla kalibrointistandardien ja validointinäytteiden regressiosuorien

kulmakertoimien prosentuaalinen ero. Esimerkiksi monokloorietikkahapon selektiivisyys

$$\text{Selektiivisyys } \%_{MCAA} = 100 - \left(\frac{1,002}{0,9753} \cdot 100 \% \right) = -2,737 \%$$

Selektiivisyys laskettiin kullekin HAA5-yhdisteelle. HAA5-yhdisteiden standardinäytteiden sekä validointinäytteiden kulmakertoimet *kk* ja näiden suhteen laskettu selektiivisyys % ovat koottu taulukkoon 11.

TAULUKKO 11. Standardinäytteiden ja validointinäytteiden regressiosuorien kulmakertoimet *kk* HAA5-yhdisteille ja selektiivisyys %.

	MCAA	DCAA	TCAA	MBAA	DBAA
<i>kk</i> _{st}	0,9753	0,9857	0,9915	0,9831	0,9991
<i>kk</i> _{näytteet}	1,0021	1,0286	1,0598	1,0328	1,0103
Selektiivisyys %	-3	-4	-7	-5	-2

Menetelmää voidaan pitää selektiivisenä kulmakertoimien suhteen ollessa ± 5 % (Mäkinen ym. 1996, 15). Tämän perusteella menetelmä on selektiivinen HAA5-yhdisteille, lukuun ottamatta triklootietikkahappoa. Trikloorietikkahapon osalta kulmakertoimien suhde on yli asetetun ± 5 % rajan, joten näytematriisin aiheuttaa todellista häiriötä analyysiin. Menetelmä voidaan siis todeta olevan selektiivinen mono- ja dikloorietikkahappojen sekä mono- ja dibromietikkahappojen osalta.

7.4 Tarkkuus ja toistettavuus

Saantokokeilla saatujen tulosten perusteella voidaan laskea menetelmän tarkkuus. Validointinäytteiden kymmenen rinnakkaismäärityksen keskiarvot lasketaan jokaisella pitoisuustasolla. Keskiarvojen avulla lasketaan saanto *R* kaavan 1 osoittamalla tavalla. Esimerkiksi dikloorietikkahappomäärityksen saanto R_{DCAA10} pitoisuustasolla 10 $\mu\text{g/l}$.

$$R_{DCAA10} = \frac{11,305 \mu\text{g/l} - 0,505 \mu\text{g/l}}{10 \mu\text{g/l}} \cdot 100 \% = 108,0 \%$$

Koko menetelmän tarkkuus saadaan kaikkien pitoisuustasojen saantojen keskiarvon avulla. Taulukkoon 12 on koottuna validointinäytteiden saanto R ja näistä laskettu keskiarvo, eli menetelmän tarkkuus.

TAULUKKO 12. Validointinäytteiden saanto R % sekä näiden keskiarvo Ka , eli tarkkuus.

Näyte	R % _{MCAA}	R % _{DCAA}	R % _{TCAA}	R % _{MBAA}	R % _{DBAA}
Näyte 1	-	103,8	-	106,2	83,4
Näyte 2	-	102,2	-	98,1	100,7
Näyte 3	141,9	105,4	107,6	104,8	105,0
Näyte 4	120,9	108,0	93,9	112,0	105,2
Näyte 5	99,2	100,3	96,8	101,0	99,9
Näyte 6	101,4	103,4	106,9	103,8	101,3
Ka	115,9	103,9	101,3	104,3	99,2

Tarkkuuden raja-arvoksi asetettiin 100 ± 20 %, joten menetelmän tarkkuus validoitiin onnistuneesti kaikille HAA5-yhdisteille. Taulukon 13 esittämistä tuloksista voidaan kuitenkin huomata monokloorietikkahapon tarkkuuden olevan asetetun rajojen ulkopuolella pitoisuustasoilla $5 \mu\text{g/l}$ ja $10 \mu\text{g/l}$.

Validointistandardien sekä validointinäytteiden rinnakkaismääritysten keskihajontaa SD sekä keskiarvoa käytettiin menetelmän toistettavuuden arvioinnissa. HAA5-yhdisteiden suhteellinen keskihajonta RSD % laskettiin kaavan 4 osoittamalla tavalla. Esimerkiksi kymmenen validointinäytteen rinnakkaismittauksen suhteellinen keskihajonta RSD %_{DCAA10} dikloorietikkahapolle pitoisuustasolla $10 \mu\text{g/l}$

$$RSD \%_{DCAA10} = \frac{0,1044}{11,305} \cdot 100 \% = 0,9238 \%$$

Suhteellinen keskihajonta laskettiin sekä validointistandardeista että validointinäytteistä jokaisella pitoisuustasolla. Menetelmän lopullinen toistettavuus saatiin kullekin tutkittavalle yhdisteelle kaikkien laskettujen suhteellisten keskihajontojen keskiarvosta. Kaikki lasketut RSD % ja näiden keskiarvo on koottuna taulukkoon

13. Taulukossa on punaisella merkitty, toistettavuus ylittää validoinnissa asetetun tavoitearvon.

TAULUKKO 13. Standardinäytteiden ja validointinäytteiden kymmenen rinnakkaisen mittauksen suhteellinen keskihajonta *RSD* % ja näiden *ka* eli menetelmän toistettavuus.

Näyte	<i>RSD</i>	<i>RSD</i>	<i>RSD</i>	<i>RSD</i>	<i>RSD</i>
	% _{MCAA}	% _{DCAA}	% _{TCAA}	% _{MBAA}	% _{DBAA}
std 1	-	6,0	-	8,3	16,8
std 2	7,3	1,5	(42,2)	3,1	4,9
std 3	5,3	1,6	23,6	2,5	4,0
std 4	2,8	0,2	5,4	1,1	3,2
std 5	1,9	1,5	5,8	0,8	3,0
Näyte 1	-	3,2	-	7,5	15,0
Näyte 2	-	3,6	-	8,7	13,9
Näyte 3	9,1	1,0	(25,7)	2,8	6,9
Näyte 4	5,6	0,9	19,7	2,1	4,8
Näyte 5	4,8	0,7	10,4	1,5	3,7
Näyte 6	2,0	1,3	4,7	1,6	2,9
Toistettavuus (ka)	4,9	2,0	11,6	3,6	7,2

Menetelmän toistettavuus täyttää sille asetetun rajan 10 % kaikkien HAA5-yhdisteiden osalta lukuun ottamatta trikloorietikkahappoa. Trikloorietikkahapolle saatu toistettavuudeksi saatiin 11,6 %, joten myös tämän osalta päästiin lähelle asetettua raja-arvoa. Trikloorietikkahapon määritysrajaksi saavutettiin 13,8 µg/l, joten toistettavuutta arvioidessa ei huomioitu määritysrajaa huomattavasti alhaisemman pitoisuustason 5 µg/l standardi- ja validointinäytteiden suhteellisia keskihajontoja. Taulukkoon 14 toistettavuuden laskemisessa sivuutetut tulokset on merkattu sulkumerkein.

7.5 Validoinnin yhteenveto

Menetelmän herkkyys, mittausalue, selektiivisyys, tarkkuus ja toistettavuus täyttivät validoinnissa asetetut suoritusarvot mono-, ja di-halogenoiduilla yhdisteillä.

Trikloorietikkahappo aiheutti ongelmia menetelmää kehittäessä ja yhdiste validoitiin onnistuneesti ainoastaan herkkyden, mittausalueen sekä tarkkuuden osalta. Menetelmän lineaarisuutta ei ollut mahdollista luotettavasti arvioida kokeellisen osuuden aikana. HAA5-yhdisteiden yhteenlasketussa määritysraja lähes täytti juomavesidirektiivissä asetetun suoritusarvon. Trikloorietikkahapon totemis- ja määritysraja oli yli puolet HAA5-yhdisteiden kokonaissummasta, jonka perusteella validointi onnistui näiden parametrien osalta muille tutkittaville yhdisteille. Lopulliset validointitulokset on koottuna liitteeseen 2.

Taulukkoon 14 on koottu HAA5-yhdisteiden validoinnin onnistuminen. Taulukkoon on merkattuna ✓-merkillä yhdisteen validoinnin täyttäessä kullekin parametille asetetut tavoitteet. Taulukossa punainen x-merkki kertoo, että validointia ei voinut toteuttaa tai validointiparametrille asetetut raja-arvot ylittyivät.

TAULUKKO 14. HAA5-yhdisteiden validoinnin onnistuminen

	MCAA	DCAA	TCAA	MBAA	DBAA
Herkkyys	✓	✓	✓	✓	✓
Mittausalue	✓	✓	✓	✓	✓
Lineaarisuus	x	x	x	x	x
Selektiivisyys	✓	✓	x	✓	✓
Tarkkuus	✓	✓	✓	✓	✓
Toistettavuus	✓	✓	x	✓	✓
Totearaja	✓	✓	x	✓	✓
Määritysraja	✓	✓	x	✓	✓

Menetelmän mittausepävarmuuden validointia ei ollut mahdollista toteuttaa työn kokeellisen osuuden aikana. Validointi jäi suorittamatta, koska parametrin validointiin vaaditaan joko vertailukoetuloksia tai pidemmän aikavälin rinnakkaismäärittämiä, joista saannon avulla voitaisiin laskea menetelmän mittausepävarmuus (Matveinen ym. 2005, 18–20.). Toimeksiantajayritys osallistuu HAA5-yhdisteiden vertailukokeisiin tulevaisuudessa, josta saatujen tulosten nojalla menetelmän mittausepävarmuus voidaan validoida.

8 POHDINTA

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää ja validoida menetelmän viiden HAA-yhdisteen määrittämiseen talousvesinäytteistä. Tavoitteena oli kehittää mahdollisimman tehokas ja suoraviivainen menetelmä yhdisteiden määrittämiseksi. Menetelmäkehityksen aikana oli tarkoituksena kokeilla kahta vaihtoehtoista esikäsitelymenetelmää, suorainjektiota ja kiinteäfaasiuuttoa. Menetelmän validoinnilla oli tarkoituksena osoittaa menetelmän toimivuus laboratorion olosuhteissa analyysimenetelmille asetettujen suoritusarvojen puitteissa.

Työ ei edennyt suunnitellun aikataulun mukaan, koska menetelmän kehitykseen aikana esiintyi ennalta-arvaamattomia ongelmia ja kehitystyöhön kului odotettua enemmän aikaa. Erityisesti trikloorietikkahapon detektio osoittautui odotettua haasteellisemmaksi menetelmän kehitystä aloittaessa massaspektrometrin laiteparametrien optimoinnissa. Optimointi suoritettiin yhdisteelle useaan otteeseen ennen menetelmälle sopivan molekyyli-ioni-tuoteioni-pari havaitsemista. Tämän lisäksi menetelmän kehityksessä käytetty nestekromatografi-massaspektrometri-laiteyhdistelmä oli osan kokeellisesta osuudesta epäkunnossa, jolloin menetelmän kehitystä ei voitu jatkaa tällä laitteella.

Toimeksiantajayrityksen käytäntöjen mukaisesti ennen menetelmän käyttöönottoa menetelmän validointiin kuuluu herkkyys, mittausalue, lineaarisuus, selektiivisyys, tarkkuus, toistettavuus, toteamis- ja määrittämiss raja, sisäinen uusittavuus sekä mittausepävarmuus. Herkkyys, mittausalue, selektiivisyys, tarkkuus, toistettavuus sekä toteamis- ja määrittämiss raja validoitiin onnistuneesti kaikilla muilla HAA5-yhdisteillä lukuun ottamatta trikloorietikkahappoa. Edellä mainittujen ongelmien takia validointi jäi puutteelliseksi, koska tarpeellisten pidemmän aikavälin rinnakkaismäärittysten suorittamiseen ei työn puitteissa ollut aikaa. Menetelmän kehityksen ja validoinnin perusteella menetelmää tulee jatkokehittää ennen varsinaista käyttöönottoa. Pidempiaikaisia lisäanalyyysien avulla voitaisiin saada kattavampi kuva menetelmän tehokkuudesta.

Validoinnissa tehtyjen saantokokeiden tuloksia tarkastellessa on lisäksi hyvä huomioda, ettei tutkittavan analyytin lisäksi matriisiin täysin vastaa luonnollisesti

tutkittavaa yhdistettä sisältävää näytettä. Saanto on tyypillisesti lisäysnäytteissä epärealistisen korkea (Magnusson & Örnemark 2014, 24).

Näytteen säilyvyyttä ja kestäväinnin vaikutusta ei tutkittu kokeellisen osan aikana. Säilyvyyden tutkiminen voitaisiin toteuttaa analysoimalla samasta näytteestä useampi rinnakkainen näytesarja pidemmällä aikavälillä. Kestäväintiin on kirjallisuudessa käytetty esimerkiksi ammoniumkloridia sekä natrium tiosulfaattia. Yhdisteet sitovat näytteen sisältämän vapaan kloorin klooriamiineiksi, estäen HAA5-yhdisteiden muodostumisen säilytyksessä samalla vähentäen näytteen mikrobiologista hajoamista (Pepich, ym. 2004).

LÄHTEET

Barker, J. 1999. Mass Spectrometry: Analytical Chemistry by Open Learning. 2. painos. Iso-Britannia: John Wiley & Sons Ltd.

Benanou, D., Acobas, F. & Sztajn bok, P. 1998. Analysis of haloacetic acids in water by a novel technique: simultaneous extraction– derivatization. Water research (Oxford) 32 (9), 2798–2806.

Berrio, A., Barbosa, S., Arias, J., Marcolin, L., & Primel, E. 2022. Use of Direct Aqueous Injection and Solid Phase Extraction Coupled with Hydrophilic Interaction Chromatography to Analyze Haloacetic Acids in Drinking Water Samples. Journal of the Brazilian Chemical Society 33 (3), 281–290.

Bitton, G. 2011. Wastewater Microbiology. 4. painos. Yhdysvallat: John Wiley & Sons Inc.

Bruzzoniti, M.C., De Carlo, R.M. & Sarzanini, C. 2011. The Challenging Role of Chromatography in Environmental Problems. Chromatographia 73 (1), 15–28.

Buchanan, K. 2011. Water Disinfection. New York. Nova Science Publishers, Inc.

Cardador, M. J. & Gallego M. 2011. Haloacetic acids in Swimming Pools: Swimmer and Worker Exposure. Environmental science & technology 45 (13), 5783–5790.

De-Alwis, J., Adams, S., Schlittenbauer, L. & Willmer, H. 2020. Determination of Haloacetic Acids and Acrylamide in Drinking Water by Direct Injection Using Liquid Chromatography-Tandem Quadrupole Mass Spectrometry. Waters Corporation. Viitattu 15.2.2023. <https://www.waters.com/nextgen/fi/en/library/application-notes/2020/determination-of-haloacetic-acids-and-acrylamide-in-drinking-water-by-direct-injection-using-liquid-chromatography-tandem-quadrupole-mass-spectrometry.html>

Dean, J. 2009. Extraction Techniques in Analytical Sciences. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.

Direktiivi 2020/2184/EU. Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi ihmisten käyttöön tarkoitetun veden laadusta. Euroopan unionin virallinen lehti 16.12.2020. Luettu: 3.5.2023. <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2020/2184/oj?locale=fi>

Domino, M. M., Pepich, B. V., Munch, D. J., Fair, P. S., & Xie, Y. 2003. Method 552.3 determination of haloacetic acids and dalapon in drinking water by liquid-liquid microextraction, derivatization, and gas chromatography with electron capture detection. Cincinnati, OH: Environ. Prot. Agency.

Ellison, S. & Williams, A. (toim.). 2012. Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 3. Painos. ISBN 978-0-948926-30-3. Saatavilla. www.eurachem.org.

Harris, D. 2010. Quantitative Chemical Analysis. 8. painos.

Hänninen, O., Leino, O., Kuusisto, E., Komulainen, H., Meriläinen, P., Haverinen-Shaugnessy, U., Miettinen, I. & Pekkanen, J. 2010. Elinympäristön altisteiden terveysvaikutuksen Suomessa. Ympäristö ja Terveys-lehti 3:2010. Kuopio

International Labmate Limited. 2021. HPLC vs UPLC – What’s the Difference. Chromatography Today. Verkkosivusto. Viitattu 8.3.2023. <https://www.chromatographytoday.com/news/hplc-uhplc/31/breaking-news/hplc-vs-uplc-whats-the-difference/56814>

Ketola, R., Kostiainen, R., Kotiaho & T., Vainiotalo, P. 2010. Massaspektrometrian perusteet. Suomen Massaspektrometrian Seura ry. Helsinki: Hakapaino.

Magnusson, B. & Örnemark U. (toim.). 2014. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2. painos. ISBN 978-91-87461-59-0. Saatavilla. www.eurachem.org

Matveinen, K., Isotalo, H., Kantanen, M-L., Mäkinen, I., Nuotio, K., Pohjola, V., Riutta, O., Venäläinen, E-R., Ehder, T. (toim.). Hirvi, T., Komppa, V., Linko, S., Nieminen, J., Vartiainen, T. & Walden, J. 2005. Kemian metrologian opas. Julkaisu 6/2005. Helsinki: Mittatekniikan keskus.

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

National Center for Biotechnology Information. 2023a. PubChem Compound Summary for CID 300, Chloroacetic acid. Verkkosivusto. Viitattu 8.10.2023 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chloroacetic-acid>.

National Center for Biotechnology Information. 2023b. PubChem Compound Summary for CID 6227, Bromoacetic acid. Verkkosivusto. Viitattu 8.10.2023 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bromoacetic-acid>.

National Center for Biotechnology Information. 2023c. PubChem Compound Summary for CID 6421, Trichloroacetic Acid. Verkkosivusto. Viitattu 8.10.2023 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trichloroacetic-Acid>.

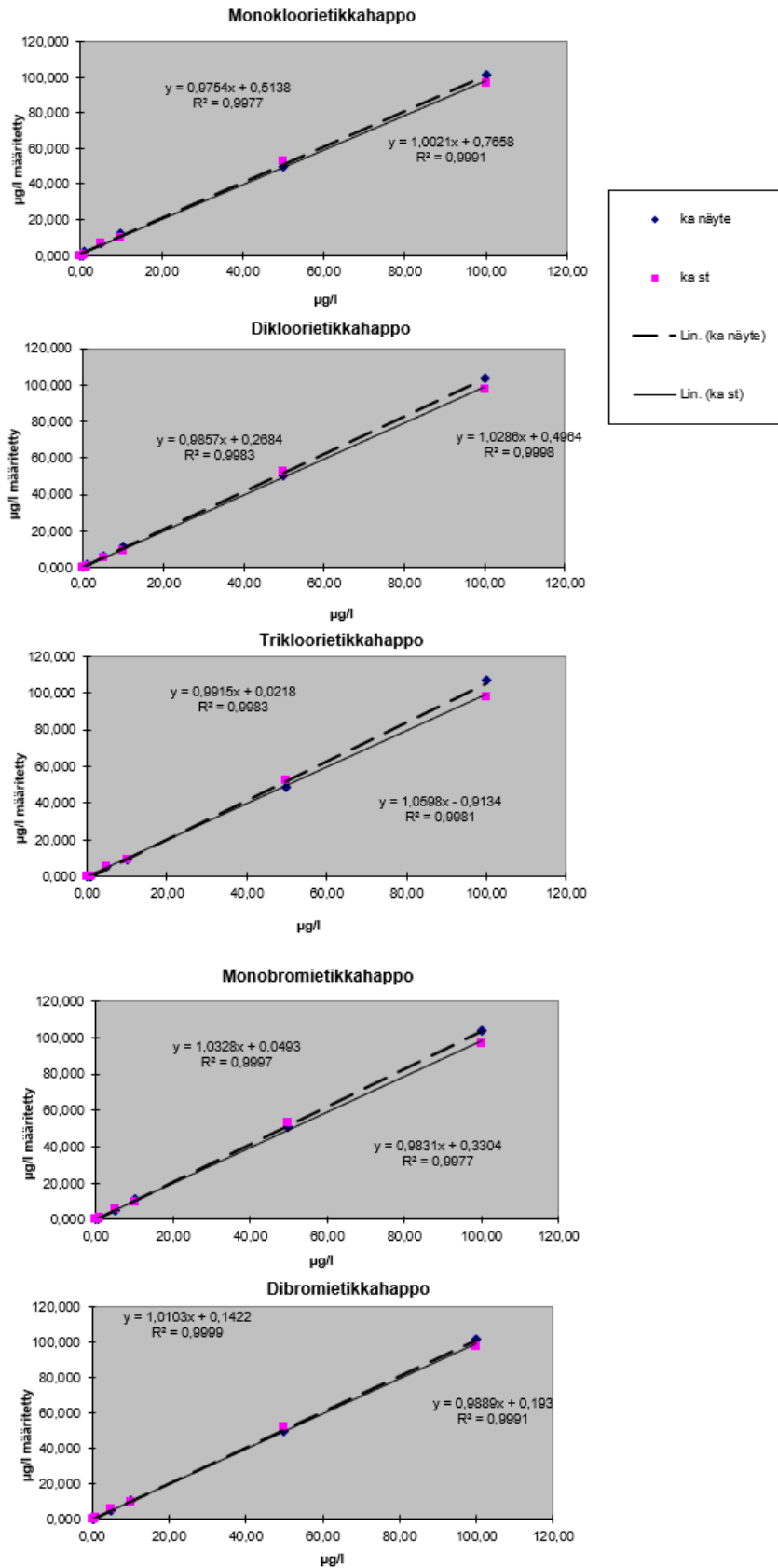
National Center for Biotechnology Information. 2023d. PubChem Compound Summary for CID 6597, Dichloroacetic acid. Verkkosivusto. Viitattu 8.10.2023. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dichloroacetic-acid>.

National Center for Biotechnology Information. 2023e. PubChem Compound Summary for CID 12433, Dibromoacetic acid. Verkkosivusto. Viitattu 8.10.2023. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dibromoacetic-acid>.

- Nikolaou, A. D., Golfinopoulos, S. K., Kostopoulou, M. N. & Lekkas, T. D. 2002. Determination of Haloacetic Acids in Water by Acidic Methanol Esterification-GC-ECD Method. *Water Research*. 36, 1089–1094.
- Nummenmaa, L. 2021. *Tilastotieteen käsikirja*. Helsinki: Tammi.
- Pals, J., Ang, J., Wagner, E. & Plewa, M. 2011. Biological Mechanism for the Toxicity of Haloacetic Acid Drinking Water Disinfection Byproducts. *Environmental science & technology* 45 (13), 5791–5797.
- Pepich, B. V., Domino, M. M., Dattilio, T. A., Fair, P. S., & Munch, D. J. 2004. Validating sample preservation techniques and holding times for the approved compliance monitoring methods for haloacetic acids under the US EPA's stage 1 D/DBP rule. *Water Research (Oxford)* 38 (4), 895–902.
- Prieto-Blanco, M. C., Alpendurada, M. F., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., Machado, S., & Gonçalves, C. 2012. Improving methodological aspects of the analysis of five regulated haloacetic acids in water samples by solid-phase extraction, ion-pair liquid chromatography and electropray tandem mass spectrometry. *Talanta (Oxford)*, 94, 90–98.
- Reckhow, D. A., Rees, P., & Bryan, D. 2004. Watershed sources of disinfection byproduct precursors. *Water Science & Technology* 4 (4), 61-69.
- Riekkola, M-L. & Hyötyläinen, T. 2002. *Kolonnikromatografia ja kapillaarielektrokromatografia*. 2. painos. Helsinki: Yliopistopaino.
- Vesi.fi. n.d. Raakavesi. Verkkosivusto. Viitattu 26.5.2023.
<https://www.vesi.fi/sanasto/raakavesi/>
- Vitha, M. F. 2017. *Chromatography: principles and instrumentation*. Hoboken, New Jersey: Wiley.
- Watson, D. 2018. How It Works: Ion-Exchange SPE. *LCGC North America* 36(1), 66.
- Wells, M. 2003. Principles of Extraction and the Extraction of Semivolatile Organics from Liquids. Teoksessa Mitra, S. (ed.) *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 37–138
- WHO. 2017. *Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum*. Geneva: World Health Organization;. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- Zaffiro, A. & Zimmerman M. 2009. Method 557: Determination of Haloacetic Acids and Dalapoon in Drinking Water by Ion Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (IC-ESI_MS/MS). Versio 1.0. Ohio: U.S. Environmental Protection Agency.

LIITTEET

Liite 1. Validointistandardien ja -näytteiden standardikuvaajat



Liite 2. Validointitulokset

	Monokloorietikkahappo	Dikloorietikkahappo	Triklloorietikkahappo	Monobromietikkahappo	Dibromietikkahappo
Yhdiste					
Selektiivisyys	-2,7365	-4,3474	-6,8869	-5,0510	-2,1685
Toteamisraja	1,9288	0,0983	4,1539	0,1187	0,3723
Määrittäysraja	6,4293	0,3275	13,8463	0,3957	1,2409
Lineaarisuus	0,9977	0,9983	0,9983	0,9977	0,9991
Mittausalue	2,43 - 100	0,098 - 100	4,154 - 100	0,119 - 100	0,372 - 100
Herkkyys	0,9754	0,9857	0,9915	0,9831	0,9889
Mittausepävarmuus					
Sisäinen uusittavuus					
Tarkkuus	-15,8630	-3,8533	-1,2998	-4,3466	0,7559
Toistettavuus	4,8500	1,9545	11,6000	3,6364	7,1909