

Inka Peltokangas

FIA-menetelmän kehitys ja validointi ammoniummäärityksiin

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

10.11.2015

Tekijä(t) Otsikko	Inka Peltokangas FIA-menetelmän kehitys ja validointi ammoniummäärityksiin
Sivumäärä Aika	49 sivua + 5 liitettä 10.11.2015
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Syventävä kemiallinen analytiikka
Ohjaaja(t)	Erikoistutkija Jukka Seppälä Lehtori Kari Raatikainen
<p>Kaasumainen ammoniakki (NH_3) liukenee veteen ionimuodossa, muuttuen ammoniumiksi (NH_4^+). Ammoniumpitoisuudet ovat vesistöissä yleisesti hyvin pieniä, etenkin valtamerissä. Ammoniumin määrittämiseen käytetään vallitsevasti indofenolisäyteen perustuvaa spektrometristä menetelmää, joka ei välttämättä ole kuitenkaan herkkyydeltään riittävä.</p> <p>Virtausinjektioanalysointimenetelmä (FIA) on käytetty menetelmä määrittäessä useita muita ravinteita, kuten fosfaattia ja nitriittiä. Automaattista hyödyntävä FIA sekoittaa itse näyte- ja reagenssivirrat keskenään, jolloin analyysi yksinkertaistuu, nopeutuu ja lisäksi kontaminaation riski vähenee. Eduistaan huolimatta ammoniumin analysointiin FIA ei ole vakiintunut yhtä suurella mittakaavalla kuin muiden ravinteiden, vaikka julkaisuja on olemassa.</p> <p>Työn tavoitteena oli kehittää, optimoida ja validoida ammoniumin määrittämiseen soveltuva fluorometrinen FIA-menetelmä ja vertailla näitä tuloksia spektrometrisen analyysin kanssa. Opinnäytetyö suoritettiin Suomen Ympäristökeskuksen (SYKE) Merikeskuksessa, merieko-logian laboratoriossa.</p> <p>Ammoniumin analysointiin soveltuva menetelmä onnistuttiin kehittämään ja optimoimaan, mutta määrittämissuorituskyky jäi varsin korkeaksi. Vaikka fluorometrinen FIA-menetelmä osoittautui herkemmäksi kuin käytössä ollut spektrofotometrinen analyysi, metodi ei ollut tarpeeksi tasainen ja siten mittausepävarmuus oli suuri. Toinen suuri ongelmakohta oli menetelmän häiriönkestävyys suolaiseen näytematriisiin, sillä yksiselitteistä korjauskerrointa ei saatu lasket-tua. Tulosten perusteella voidaan todeta, että menetelmä vaatii vielä lisäkehittelyä.</p>	
Avainsanat	FIA, ammonium, fluoresenssi, validointi, optimointi

Author(s) Title	Inka Peltokangas Improvement and validation of FIA-method for ammonium determination
Number of Pages Date	49 pages + 5 appendices 10 November 2015
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Programme	Laboratory Sciences
Specialisation option	Advanced Chemical Analysis
Instructor(s)	Senior Research Scientist Jukka Seppälä Lecturer Kari Raatikainen
<p>Gaseous ammonia (NH_3) dissolves in water as ions, changing to ammonium (NH_4^+) form. The concentration of ammonium is usually quite small in water systems, especially in oceans. The spectrometric indophenol blue method is commonly used to determine ammonium, but the sensitivity of this analysis is not always sufficient enough.</p> <p>Flow injection analysis (FIA) is a widely used method to determine several other nutrients such as phosphate and nitrite. FIA takes advantage of automatism by mixing sample and reagent lines. Because of this, the analysis becomes simpler, faster and the risk of contamination decreases. Despite its benefits and the numerous ammonium-related publications, FIA has not been able to establish its position in ammonium analyses as the spectrometric method has done.</p> <p>The objective of the thesis was to improve, optimize and validate a fluorometric method that would be able to determine ammonium and also to compare the results of the fluorometric FIA analysis to those of the spectrometric indophenol blue method. The thesis was performed in a marine research laboratory at the Finnish Environment Institute (SYKE).</p> <p>The improvement and optimization of the ammonium method succeeded but however, the limit of quantification was still quite high. Even though the fluorometric FIA-method proved to be more sensitive than the formerly used spectrometric analysis, the method was not stable enough - thus, the measurement uncertainty was high. Another major problem was the method's trouble with salt water and consequently the lack of an unequivocal correction factor. On the basis of the results, the method still needs more development.</p>	
Keywords	FIA, ammonium, fluorescence, validation, optimization

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoria	2
2.1	Typen kierto	2
2.1.1	Typpikuorma ja Itämeri	3
2.2	Ammoniumin mittaamenetelmät	4
2.3	Virtausinjektioanalysointilaite (FIA)	5
2.3.1	Toimintaperiaate	6
2.3.2	Peristalttinen pumppu, näytteenottojärjestelmä, kaasudiffuusiokammio ja detektori	7
2.3.3	Soveltaminen ammoniumin mittaamiseen	8
2.4	Fluoresenssispektrometri	9
3	Optimointi ja validointi	10
3.1	Validoinnin parametrit	11
3.1.1	Lineaarisuus, mittausalue ja herkkyys	11
3.1.2	Toteamis- ja määritysraja	12
3.1.3	Tarkkuus ja toistettavuus	13
3.1.4	Saanto	14
3.1.5	Mittausepävarmuus	15
3.1.6	Näytematriisin vaikutus	16
3.2	Optimointi	16
4	Välineet ja reagenssit	16
4.1	FIA-laitteisto	17
4.2	Reagenssit ja niiden valmistus	18
5	Menetelmät	20
5.1	FIA-menetelmä	20
5.1.1	Validoinnin suoritus	22
5.1.2	Optimoinnin suoritus	24
5.2	Indofenolisäyteen perustuva spektrofotometrinen menetelmä	25

6	Tulokset	26
6.1	Validointi	26
6.1.1	Lineaarisuus, herkkyys ja mittausalue	26
6.1.2	Määritys- ja toteamisraja	29
6.1.3	Tarkkuus ja toistettavuus	29
6.1.4	Mittausepävarmuus	30
6.1.5	Näytematriisin vaikutus	31
6.1.6	Kahden eri menetelmän vertailu	32
6.2	Optimointi	32
6.2.1	Näytesilmukan pituus	33
6.2.2	Pumpun nopeus	34
6.2.3	Lämpötilan vaikutus	35
6.2.4	Detektori	36
6.2.5	Vastapaineyksikkö	38
6.2.6	Kaasudiffuusiokammion virtaussuunta	39
7	Yhteenveto	40
	Lähteet	48
	Liitteet	
	Liite 1. Validoinnin primääriset mittaustulokset	
	Liite 2. Optimoinnin primääriset mittaustulokset	
	Liite 3. Mittausepävarmuus MUKit-ohjelmalla	
	Liite 4. Ammoniumin (NH ₄ ⁺) määrittäminen FIA-ravinneanalyysointilaitteella	
	Liite 5. Laskuesimerkkejä	

Lyhenteet

FIA Virtausinjektioanalyysi (flow injection analysis)

OPA o-Ftaalialdehydi (o-phthaldialdehyde)

LOQ Määrittäysraja (Limit of quantification)

LOD Toteamisraja (Limit of detection)

1 Johdanto

Ammoniumin tarkka määrittäminen merivedestä on osoittautunut haasteelliseksi analyysiksi yleisyydestään huolimatta. Indofenoliniseen perustuva spektrofotometrinen menetelmä saattaa antaa todellisesta arvosta jonkin verran poikkeavan tuloksen etenkin pieniä pitoisuuksia analysoidessa, vaikka metodi on laajasti käytössä. Luonnonvesissä alle mikromolaariset ammoniumpitoisuudet ovat tyyppisiä, joten mittausmenetelmältä vaaditaan huomattavaa herkkyttä (Holmes ym. 1999: 1801.)

Pienten pitoisuuksien lisäksi analyysia vaikeuttaa kontaminaatoriski. Ammonium ei säily vesinäytteissä pitkään, joten nopea määrittäminen on tarpeellinen. Käytettävän laitteen on oltava tarpeeksi automatisoitu, jotta näytteen käsittelyyn ja analysointiin vaadittava aika saadaan minimoitua.

Opinnäytetyön tavoite on parantaa ammoniumin määrittäksen herkkyttä ottamalla käyttöön fluoresenssidetektorilla varusteltu FIA-ravinneanalysaattori ja vertailla saatuja tuloksia spektrofotometrisen menetelmän kanssa. Eniten odotusta osakseen saa määrittäysraja, joka halutaan saada mahdollisimman matalaksi. Pienten pitoisuuksien lisäksi myös jätevesien ja leväkasvatuskokeiden korkeat ammoniumpitoisuudet pyritään analysoimaan samalla laitteella, joten dynaamisen mittausalueen on oltava mahdollisimman laaja. Validointiparametreja lineaarisuuden lisäksi ovat määrittäys- ja toteamisraja, herkkyys, tarkkuus, toistettavuus, saanto, mittausepävarmuus sekä näytematriisin vaikutus. Työn toinen tavoite on herkkyyden parantamisen lisäksi myös selvittää, voiko FIA:n automatiikkaa hyödyntää jatkuvatoimisissa mittauksissa.

Opinnäytetyö toteutettiin Suomen Ympäristökeskuksen Merikeskuksessa, meriekologian laboratoriossa. Merikeskus on erikoistunut toiminnassaan erityisesti Itämeren tilan tutkimiseen, ilmoittaen tavoitteekseen tiedon tuottamisen ja uusien suojeluratkaisujen keksimisen. Vesistöjen ravinteiden tutkiminen on tärkeä osa Merikeskuksen toimintaa, ravinteiden runsaus tai vähyys kertoo meren tilasta paljon (SYKE Suomen ympäristökeskus 2013.)

2 Teoria

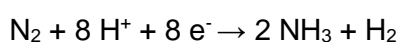
Typen luonnollinen kierto on ekosysteemille elintärkeää. Ravinteiden saanti on tiukasti yhteydessä organismien kasvuun, joten liiallinen typen määrä johtaa helposti vesistöjen rehevöitymiseen.

2.1 Typen kierto

Typpi on yksi elollisten organismien tärkeimmistä ravinteista, se esiintyy laajamittaisesti niin proteiinien kuin nukleiinihappojenkin rakennusaineena. Yleisyydestään huolimatta vapaana oleva typpi on lähes saavuttamaton kaasumaisessa N₂-muodossaan, ollen useimmiten ekosysteemin rajoittava tekijä. Osaksi typpisykliä N₂-molekyyli pääsee silloin, kun se muutetaan muuksi muodoksi (Bernhard 2010.)

Luonnonvesissä esiintyy useita typen muotoja ilmakehästä tulleen typpikaasun (N₂) lisäksi. Ammonium (NH₄⁺), nitriitti (NO₂⁻) ja nitraatti (NO₃⁻) ovat kaikki epäorgaanisia ravinteita, joiden pitoisuudet ovat pieniä etenkin oligotrofisissa ekosysteemeissä. Epäorgaanisten ravinteiden lisäksi vesistöissä on myös orgaanisia yhdisteitä, muun muassa proteiineja ja nukleiinihappoja. Liukoisten yhdisteiden lisäksi typpiyhdisteitä esiintyy paljon vesistöjen pohjasedimenteissä. Sedimenttiin sitoutunut typpi on useimmiten biologisesti tavoittamattomassa muodossa (Wetzel 1983: 223, 254.)

Ilmakehästä melkein 80 % on typpikaasua, mutta silti sen hyödyntäminen on hankalaa. Typpikaasu on hyvin stabiilia, joten sidoksen purkamiseen vaaditaan paljon energiaa. Abioottisessa prosessissa salamointi rikkoo typpisidoksia. Samankaltaista biologista prosessia kutsutaan typensidonnaksi, jotkut organismit pystyvät muuttamaan ilmakehässä olevan typen käyttökelpoiseen muotoon. Tämän prosessin suorittavat useimmiten prokaryootit, esimerkiksi palkokasvien juurinystryöissä elävät *Rhizobium*-bakteerit. Jotkut näistä typensitojaorganismeista ovat symbioottisia, toiset puolestaan pärjäävät itsenäisesti. Kaikilla näillä organismeilla on kuitenkin samankaltainen reaktiota (kaava 1) katalysoiva entsyymikompleksi nitrogenaasi (Bernhard 2010.)



(Kaava 1)

Nitrifikaatiossa yleensä prokaryootit hajottavat muodostuneen ammoniakkin nitriitiksi ja nitraatiksi. Reaktio on aerobinen, hapen konsentraation on oltava vedessä vähintään 0,3 mg/l (Wetzel 1983: 236). Ensimmäisessä vaiheessa ammoniakki hapettuu välituotteen hydroksyyliamiinin (NH_2OH) kautta nitriitiksi (kaava 2). Nitrifikaation seuraavassa osassa (kaava 3) nitriitti (NO_2^-) hapettuu nitraatiksi (NO_3^-). Sekä nitriitin että nitraatin muodostumisessa vapautuu vain vähän energiaa, joten saannot ovat alhaiset (Bernhard 2010.)



Denitrifikaatiossa nitraatti muuttuu biologisesti inertiksi typpikaasuksi (N_2) välivaiheiden kautta (kaava 4). Happamissa ja kylmissä vesistöissä denitrifikaatio hidastuu (Wetzel 1983: 237 - 238.) Jätevesistöissä denitrifikaatio on merkittävä prosessi ylimääräisten ravinteiden poistajana (Bernhard 2010.)



Heterotrofiset eli toisenvaraiset bakteerit tuottavat päätuotteenaan ammoniakkia hajottaessaan orgaanista materiaalia. Vedessä ammoniakki esiintyy pääosin ammonium-ionina (NH_4^+), mutta pH:sta riippuen myös ammoniumhydroksidina (NH_4OH). Happamassa vedessä ammoniumin määrä on suhteessa huomattavasti suurempi ammoniumhydroksidiin verrattuna, emäksisessä ympäristössä suhde tasaantuu.

Kasvit eivät voi hyödyntää suoraan nitraattia (NO_3^-), yhdiste on pakko muuttaa ammoniakiksi. Kasveille ja leville kaikista energiatehokkain typen muoto on NH_4 -typpi, vaikka joskus ammoniumhydroksidin myrkyllisyys saattaa aiheuttaa NO_3 -typpiravinteen suosimisen (Wetzel 1983: 233.)

2.1.1 Typpikuorma ja Itämeri

Vesistöjen rehevöityminen on niin sisävesien kuin merienkin ongelma. Eliöiden kasvua rajoittaa fyysisten olosuhteiden lisäksi myös ravinteiden puute, erityisen tärkeitä ovat typpi ja fosfori. Ylimääräiset ravinteet hyödynnetään tehokkaasti, jolloin kasvien ja kasvisplanktonien määrä lisääntyy huomattavasti. Vesi samentuu ja hapen määrä vähenee

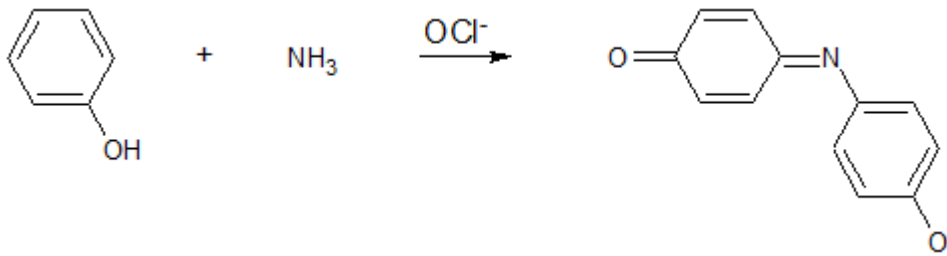
rehevöityneissä systeemeissä biomassan lisääntymisen myötä, jolloin osa lajeista ei pärjää enää muuttuneissa olosuhteissa. Vesistöjen pohjaliejuun varastoituu ravinteita, mutta osa näistä vapautuu takaisin etenkin hapettomissa olosuhteissa prosessissa, jota kutsutaan sisäiseksi kuormitukseksi (Biologian ja maantieteen opettajien liitto.)

Mereen typpi päätyy yleensä jokiveden mukana, mutta myös ilmalaskeumana ja suorana pistekuormituksen. Pistekuormitusta aiheuttaa muun muassa kalankasvatus, jätevedenpuhdistamot sekä yhdyskunnat (Suomen ympäristökeskus SYKE 2014.) Toisin kuin pistekuormitus, hajakuormitus on peräisin monesta eri lähteestä eivätkä vaikutukset ole pelkästään paikallisia. Hajakuormituksena voidaan pitää maa- ja metsätaloutta, teollisuudesta ja liikenteestä ilmaan joutuvia typpipäästöjä sekä haja-asutusta.

Itämeri on muuttunut 1900-luvun alusta lähtien nopeasti. Ihmisistä johtuva typpikuorma on lisääntynyt huomattavasti esiteollisesta ajasta lähtien, erityisesti sinilevän määrä on kasvanut paljon rehevöitymisen myötä. Luonnostaan ravinnekuormalle Itämeri on herkkä sijaintinsa ja luonnonolosuhteiden vuoksi. Itämeri on matala, sillä on laaja valuma-alue, se on vähäsuolainen eikä veden vaihtuvuus ole suurta. Vaikka ulkoinen kuormitus on laskenut 1980-luvulta lähtien, Itämeren ravinnetilanteen parantaminen vaatii vielä suurempia toimenpiteitä (Pitkänen 2008.)

2.2 Ammoniumin mittaamenetelmät

Yleisesti käytetty indofenolimenetelmä eli Berthelotin reaktio mittaa ammoniakkin ja ammoniumin summaa, ionitasapaino on veden pH-arvosta riippuvainen (Grasshoff 1976: 127 - 128). Spektrofotometrillä mitattava indofenolisininen syntyy ammoniakkin reagoitessa fenolin kanssa, hypokloriitin ollessa läsnä (kuva 1). Lopputuote voidaan mitata aallonpituudella 625 nm (Harris 2010: 414.) Reaktiota katalysoi nitroprussidi-ioni ja ylimäärä hypokloriittia. Vedessä esiintyvät Mg- ja Ca-ionit saattavat saostua pH:n ollessa suurempi kuin 9,6, mutta trinatriumsitraattia lisäämällä häiriötekijöitä voidaan vähentää (Grasshoff 1976: 127 - 128.) Reaktion pH:n on oltava välillä 10,4 - 11,3 (Koroleff 1979: 31). Indofenolisinisen muodostuminen on hidasta, lämmitys tai reagenssien lisäys nopeuttaa reaktiota (Grasshoff 1976: 128.) Indofenolimenetelmän heikkous on sen kyky määrittää pieniä ammoniumpitoisuuksia, pelkästään reagenssien aiheuttama vaste on jo huomattava (Holmes ym. 1999: 1801).



Kuva 1. Ammoniakin reaktio fenolin kanssa hypokloriitin ollessa läsnä (Harris 2010: 414)

Nesslerin reaktiossa ammoniakki reagoi elohopean, kaliumin ja jodin kanssa emäksisissä olosuhteissa, jolloin muodostuu kellertävä yhdiste. Lopputuote analysoidaan spektrofotometrisesti aallonpituusalueella 400 - 425 nm. Vesinäyte ei välttämättä vaadi esikäsitteilyä, mutta veden värillisyyttä ja sameutta aiheuttavat ionit (kuten Ca²⁺, Fe²⁺ sekä Mg²⁺) saattavat vaikuttaa lopputulokseen. Ionien sitominen esimerkiksi etyleenidiamiinitetra-asetaatilla (EDTA:lla) voi poistaa ongelman (Jeong ym. 2013.)

Nesslerin reaktion lopputuote on kolloidi, jolloin yhdisteen koostumus ei ole homogeenistä (Hansen & Nielsen 1939: 309). Indofenolimenetelmä on Nesslerin reaktiota noin neljä kertaa herkempi eikä siinä synny myrkyllistä elohopeajätettä (Koroleff 1979: 31)

Ammoniumin mittaukseen käytetään yllä olevien menetelmien lisäksi useita muita sovelluksia, jotka eivät ole kuitenkaan yhtä suosittuja. Titrimetrisessä menetelmässä vesinäytettä titrataan laimealla rikkihapolla, analyysin päätepisteessä väri muuttuu vaalean purpuraksi. Toisessa menetelmässä hyödynnetään ammoniakkin ja ammoniumin välistä tasapainoreaktiota - kun pH on tasan 11, on tasapaino voimakkaasti ammoniakkin puolella. Ammoniakille selektiivinen elektrodi mittaa muuttunutta potentiaalia (Jeong ym. 2013.)

2.3 Virtausinjektioanalysointilaite (FIA)

Ensimmäistä kertaa virtausinjektioanalytiikan (FIA) toimintaperiaate keksittiin 1970-luvulla, saksalaisten Ruzickan ja Hansenin vastatessa kehitystyöstä. Historiansa aikana FIA on käynyt läpi kolme suurta vaihetta. 1975 kehitettiin virtausinjektioanalysointilaite (FI), 90-luvulla tähän systeemiin lisättiin Lab-on-Valve eli monitieventtiili sekä lopuksi *bead injection* (BI) -tekniikka (Yebra-Biurrun 2009: 1 - 2.) *Bead injection* perustuu tutkittavien yh-

disteiden sitoutumiseen kiinteään faasiin, jolloin analyysin tulos on spesifisempi. Monitieventtiili vaikuttaa puolestaan virtauksien kulkureitteihin, jolloin suoraa injektointia ei tarvita (Kolev & McKelvie 2008: 36 – 37.)

2.3.1 Toimintaperiaate

Analyysimenetelmänä FIA on suosittu, nopea ja helppokäyttöinen. Erilaisia käyttöominaisuuksia on paljon kvantitatiivisen kemiallisen analytiikan puolella, monipuolisena tunnettu FIA on saavuttanut vakaan jalansijan markkinoilla. Menetelmän yksi suurista eduista on mittava automatiikka, tämä ominaisuus helpottaa analyysia ja säästää aikaa. Reagenssien ja näytteiden kulutukset ovat varsin pieniä kontrolloitujen virtausnopeuksien vuoksi, jolloin myös mahdollisesti haitallista jätettä syntyy vähemmän. Ympäristöystävälliseksi kuvattu FIA on siitä hyödyllinen, ettei näytettä ole pakko esikäsitellä - analyysin aikana laite sekoittaa itse tarvittavat reagenssit (Yebra-Biurrun 2009.)

FIA:n eduiksi voidaan luetella myös turvallisemmat työskentelyolosuhteet sekä kontaminaatoriskin pieneneminen. Suljettuna systeeminä FIA on vain vähäisessä määrin kosketuksessa ilman kanssa, joten haitallisten kemikaalien kanssa ei tarvitse olla jatkuvassa vuorovaikutuksessa. Automaattinen reagenssien ja näytteiden käsittely vähentää inhi millisen erehdyksen mahdollisuutta, joten tarkkuuskin on suurempi. (Yebra-Biurrun 2009: 3 - 4.)

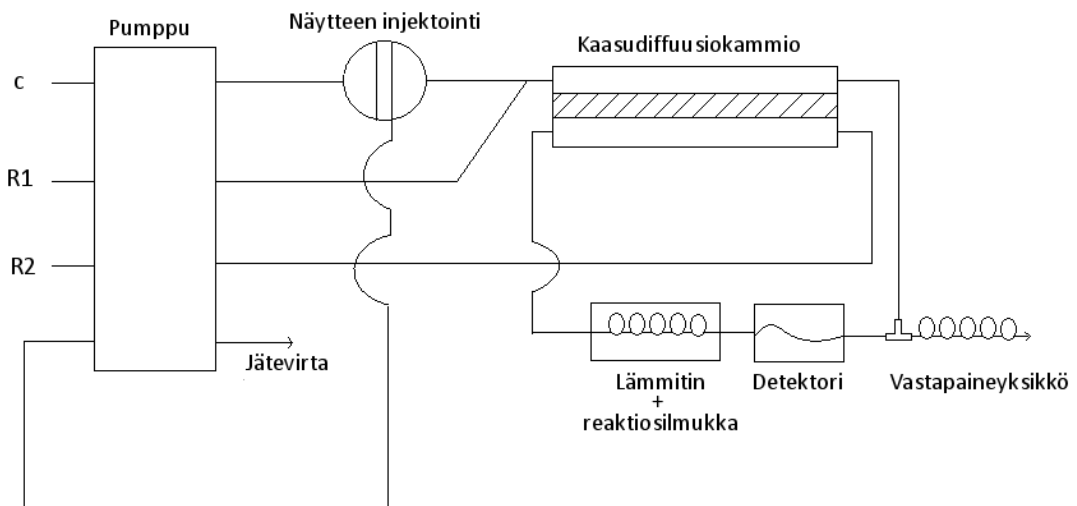
Yksinkertaistettuna FIA-tekniikassa liuosmuotoinen näyte injektoidaan kantajavirtaan tai muuhun haluttuun liuokseen, jolloin syntyy näytevyöhyke. Ajon aikana näyteliuoksen kohdemolekyylit muodostavat reagenssiliuoksen kanssa sellaisen yhdisteen, joka voidaan havaita detektorilla. Näytevyöhyke laimenee ajon aikana, mutta tähän ominaisuuteen vaikutetaan muun muassa injektioilavuudella, virtausnopeudella sekä letkun pituudella ja paksuudella (Yebra-Biurrun 2009: 2 - 3.)

FIA:n yksi tärkeimmistä fyysisistä kvantitatiivisuuteen vaikuttavista ominaisuuksista on näytevyöhykkeen hallittu dispersio. Linjastossa liikkuessaan virtauksesta tulee laminaarista. Analyttisesti laminaarinen virtaus ei ole toivottavaa, sillä hajaantunut näytevyöhyke pienentää herkkyyttä. Luonnostaan tapahtuva diffuusio tarjoaa ratkaisun ongelmaan. Diffuusion vuoksi molekyylit tasoittavat konsentraatioeroja siirtymällä vahvem masta liuoksesta laimeampaan. Ilmiön seurauksena virtauksen laminaarinen luonne muuttuu nopeuden ollessa tarpeeksi hidas. Välttämätöntä diffuusion toiminnalle on myös

läpimitaltaan tarpeeksi kapea putkisto, jotta molekyylit ei tarvitse siirtyä pitkää matkaa (Yebara-Biurrun 2009: 4 - 5.)

2.3.2 Peristalttinen pumppu, näytteensyöttäjä, kaasudiffuusiokammio ja detektori

Tavallinen FIA-laitteisto koostuu pumpusta, näytteensyöttäjästä, reaktiosilmukasta sekä detektorista (kuva 2). Laitteen kokoonpano voi vaihdella paljon sen mukaan, millaiseen käyttöön FIA tulee (Yebara-Biurrun 2009: 7.) Varsin yleinen lisäosa on reaktiosilmukkaan lisättävä lämmitin, jolla nopeutetaan detektorilla havaittavan yhdisteen muodostumista (Yebara-Biurrun 2009: 12).

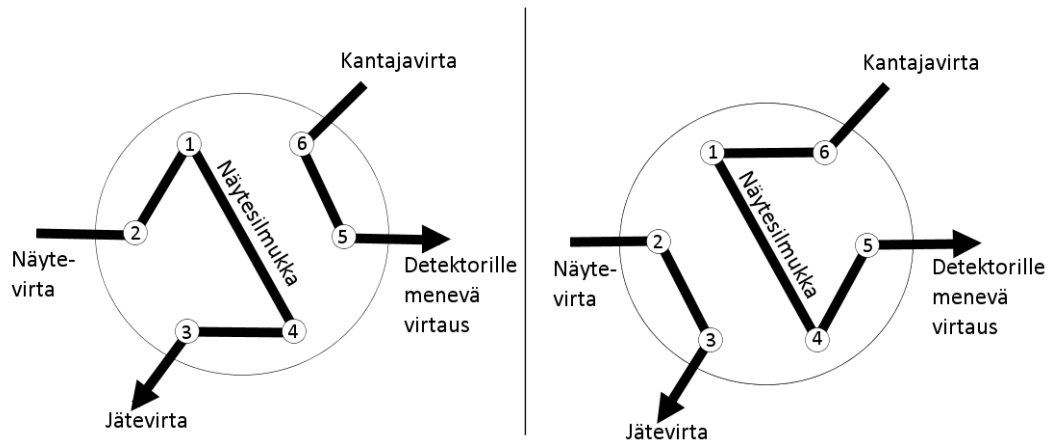


Kuva 2. FIA-laitteisto kaasudiffuusiokammioilla ja vastapaineysikköillä

Pumpun tehtävä on liikuttaa näyte-, kantaja- ja reagenssivirtauksia putkistoissa. Tyypillisesti käytettyjen peristalttisten pumppujen kapasiteetti linjastojen määrän suhteen on enintään 16, mutta yleensä käytössä on neljä linjaa. Peristalttinen pumppu koostuu pyörivistä rullista, joiden liike ja puristusvoima saavat nesteen liikkumaan putkissa (Yebara-Biurrun 2009: 7 - 8.)

Näytteensyöttäjäyksiköitä on kahta eri laatua - toinen perustuu näytemäärän tilavuuteen, toinen puolestaan kuluneeseen aikaan. Ensimmäiseksi mainitussa menetelmässä FIA-laitteissa on usein näytesilmukka ja venttiili suoran injektioinnin sijaan. Venttiin vaihta-

essa asentoa virtaukset vaihtavat kulkureittejään, injektioilassa ollessaan silmukka täyttyy näytteestä ja latausasennossa puolestaan kantajavirta siirtyy kulkemaan silmukan läpi. Käytetyin tilavuuteen perustuva injektiosysteemi on kuusiporttinen venttiili (kuva 3). Aikaan perustuvissa näytteensyöttäjäyksiköissä virtausnopeus ja kulunut aika voidaan muuttaa tilavuusyksiköksi (Yebra-Biurrun 2009: 9 - 11.)



Kuva 3. Kuusiporttinen venttiili, vasemmalla silmukka täyttyy näytteestä ja oikealla kantajasta (Yebra-Biurrun 2009: 10)

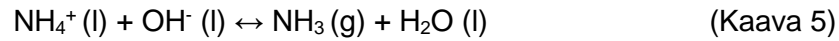
Kaasun diffundoitumiseen perustuvissa kammiomenetelmissä näytevirta ei sekoitu suoraan reagenssiluoksen kanssa, kuten yksinkertaisemmassa FIA-sovelluksessa. Diffundoitumisen mahdollistavassa kammiossa huokoinen hydrofobinen kalvo sallii ainoastaan kaasujen kulkemisen läpi, jolloin menetelmästä tulee varsin selektiivinen. Kaasudiffuusiokammiossa näytevirta ja johdosreagenssi kulkevat eri puolella, jolloin kohdemolekyylit kaasumaisena siirtyvät näytteestä reagenssivirtaan, muodostaen toivotun yhdisteen (Cerdà ym. 2014: 87 - 88.)

FIA ei ole sidottu vain yhdenlaisen detektorin pariin, erilaisten sovellusten kirjo on laaja. Havainnointiyksikkönä voidaan käyttää esimerkiksi spektrofotometriä, potentiometriä, kromatografia (HPLC) tai fluorometriä (Yebra-Biurrun 2009: 13.)

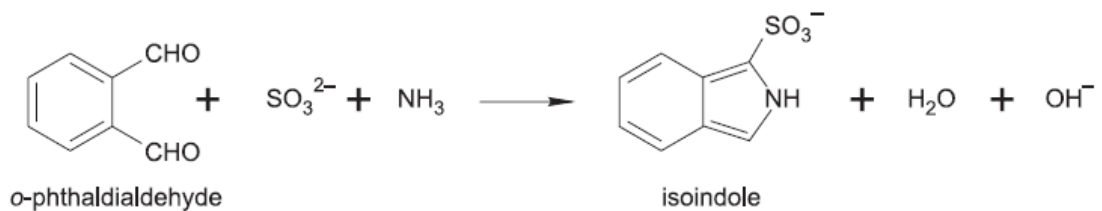
2.3.3 Soveltaminen ammoniumin mittaukseen

Ammonium-ioni (NH_4^+) muuttuu kaasumaiseksi ammoniakiksi (NH_3) ollessaan alkalisissa olosuhteissa (kaava 5). Fluorometrinen FIA-menetelmä perustuu o-ftaalialdehdydin,

natriumsulfiitin ja ammoniakkin väliseen reaktioon, tetraboraattipuskurin pitäessä olosuhteet alkalisina (Cerdà ym. 2014: 209.) Reaktiossa (kuva 4) syntyy yhdiste, joka on fluoresoiva isoindolin johdannainen (Felix & Cardoso 2012: 143).



Vesinäytteissä olevat primääriset amiinit ja aminohapot reagoivat samalla tavalla kuin ammoniakki - kuvasta 4 voidaan todeta, että ammoniakkin paikalla voisi olla esimerkiksi edellä mainittu primäärinen amiini ($\text{NH}_2\text{-R}$). Häiriötekijöiden vuoksi fluoresenssin menetelmä kärsii taustan korkeasta vasteesta. Kaasudiffuusiokammiota (2.3.2.) käytettäessä selektiivisyys kasvaa, sillä vain kaasumaiset yhdisteet pääsevät reagoimaan johdosreagenssin kanssa hydrofobisen membraanin läpi (Cerdà ym. 2014: 209.) Etenkin merivesinäytteissä häiriötekijöiden minimoiminen muodostuu varsin tarpeelliseksi.



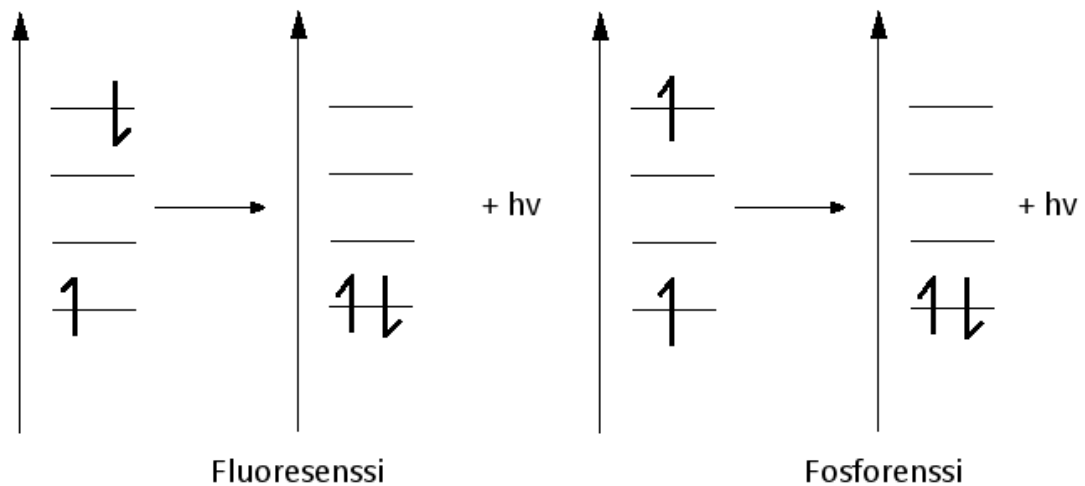
Kuva 4. Ftaalialdehydin (o-phthalaldehyde) reaktio ammoniakkin ja sulfiitin kanssa fluoresoivaksi isoindolin (isoindole) johdannaiseksi (Felix & Cardoso 2012: 143)

2.4 Fluoresenssispektrometri

Fluoresenssispektrometria on herkkä menetelmä, joten se soveltuu erinomaisesti pitoisuudeltaan pienien yhdisteiden määrittämiseen. Näytteen on kuitenkin fluoresoitava tai muodostettava fluoresoiva johdannainen, lisäksi sen on absorboitava riittävästi virittävää valoa. Herkkyytensä vuoksi menetelmä on hyvin häiriöherkkä, etenkin lämpötila ja pH muuttavat intensiteettiä.

Molekyylillä on kykeneväinen absorboimaan valoa sille tyypillisillä aallonpituuksilla. Molekyylin absorboitunut energia saa elektronin siirtymään ylemmälle energiatasolle eli toisin sanoen virittymään. Kun elektroni palautuu takaisin perustasolle lyhyen ajan jälkeen, vapautuu prosessissa fotoni eli molekyyli emittoi. Emittoituneen fotonin aallonpituus on suurempi kuin aikaisemmin tapahtuneen absorptioon.

Emissio voidaan jakaa kahteen eri luokkaan, fosforensiin sekä fluoresenssin. Eroavaisuudet liittyvät elektronien spintiloihin (kuva 5), pidempikestoisessa fosforensissa elektronin spintila vaihtaa suuntaa. Fluoresenssispektrometri mittaa kokonaisemissiota, joten käytännössä ei ole väliä, kummasta lajista puhutaan. Kestoajan perusteella fluoresenssi ja fosforenssi voidaan periaatteessa erottaa toisistaan.



Kuva 5. Fluoresenssin ja fosforensin ero elektronitasolla (Jaarinen & Niiranen 2008: 66)

Monokromaatin läpi ohjattu valonlähde (esimerkiksi ksenonlamppu tai LED) virittää tutkittavan yhdisteen elektronit, aiheuttaen niiden eksitoitumisen eli ylemmälle elektronitilalle siirtymisen. Fluoresenssispektrometrilla voidaan mitata perustasolle palaavien elektronien emittoimaa energiaa. Fluoresenssispektrometrilla näytteestä emittoitunut valo siirretään linseillä eteenpäin, lopulta valodiodille. Detektori ilmoittaa tuloksen aallonpituuden funktiona, emission intensiteetin mukaisesti.

Eksitaatiota voidaan mitata kahden optisen suodattimen laitteella, muuttamalla viritysvaion aallonpituutta emissioaallonpituuden ollessa vakio. Muodoltaan eksitaatiospektri on emissiospektrin peilikuva ja usein absorptiospektrin kaltainen (Jaarinen & Niiranen 2008: 66 - 68.)

3 Optimointi ja validointi

Menetelmän kehityksessä optimointi ja validointi ovat välttämättömiä. Optimoinnilla parannetaan laitteen toimintakykyä ja validoinnilla varmistetaan tulosten luotettavuus.

3.1 Validoinnin parametrit

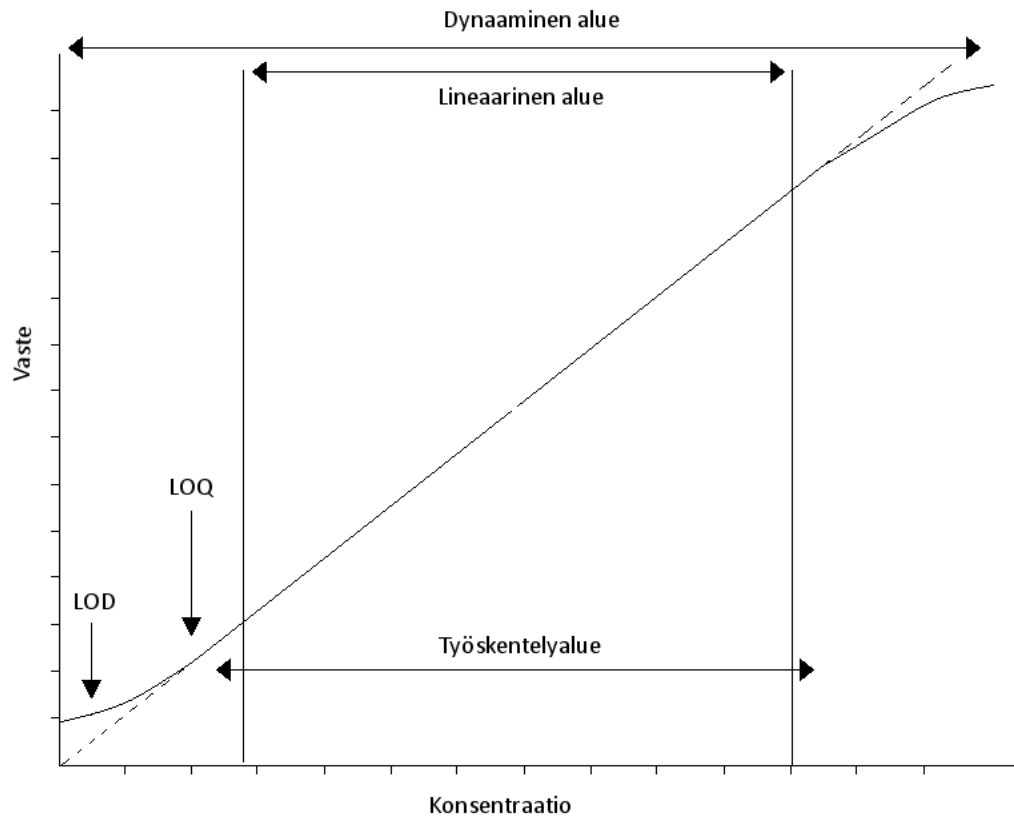
Validoinnilla varmistetaan, että laite soveltuu käyttötarkoitukseensa ja osoitetaan tulosten luotettavuus. Validointi on esimerkiksi tarpeen silloin, kun kehitetään uusi menetelmä tai parannetaan vanhaa (Ehder 2005: 25 - 26.) Tutkittavia parametreja validoinnissa ovat muun muassa lineaarisuus, mittausalue, herkkyys, toteamis- ja määrittäysraja, tarkkuus- ja toistettavuus, saanto sekä mittausepävarmuus. Näiden lisäksi tärkeää on myös tutkia erilaisia näytematriiseja, jotta voidaan varmistaa menetelmän selektiivisyys.

3.1.1 Lineaarisuus, mittausalue ja herkkyys

Mikäli menetelmä antaa hyväksyttävän lineaarisen korrelaation mitattujen arvojen ja näytteiden pitoisuuksien välille, voidaan analyysiä kutsua lineaariseksi. Lineaarisuuden selvittämiseksi valmistetaan mielellään vähintään viisi pitoisuudeltaan erilaista standardiliuosta, joiden tarkka konsentraatio on tiedossa (Ehder 2005: 28.) Liuosten välinen kalibrointikäyrä muodostaa lineaarisen mittausalueen, jossa herkkyys eli suoran kulmakerroin on aina vakio. Mikäli kulmakerroin on liian pieni, ei eri pitoisuuksia voida selvittää tarpeeksi luotettavasti. Suuri kulmakerroin nostaa herkkyyttä, sillä pienikin muutos vaikuttaa mitattuun arvoon (Jaarinen & Niiranen 2008: 18.)

Laskennallisesti lineaarisuus selvitetään muodostamalla regressiosuora käyttämällä pienimmän neliösumman menetelmää. Laskusta saatu residuaaliarvo ilmoittaa, kuinka paljon laskennallinen piste poikkeaa mitatusta. Lineaarisella mittausalueella residuaalit ovat satunnaisesti jakautuneita, kolmen tai useamman samanmerkkisen arvon peräkkäinen joukko kertoo epälineaarisuudesta. Korrelaatiokerroin r puolestaan ilmoittaa, kuinka hyvin kalibrointipisteet osuvat suoralle. Ihanteellisessa tilanteessa kertoimen neliö r^2 eli selitysaste on tasan 1 (Jaarinen & Niiranen 2008: 25 - 26.)

Analyysi saattaa sisältää useita eri mittaosalueita (kuva 6). Luotettava tulos voidaan saada vain työskentelyalueen sisältä, joka koostuu lineaarisesta mittausalueesta. Dynaaminen alue on työskentelyaluetta laajempi, mutta kalibrointikäyrä saattaa olla epälineaarinen etenkin suurissa ja pienissä pitoisuuksissa (Jaarinen & Niiranen 2008: 18.) Työskentelyalueella mittausvirhe on aina oltava sallittujen rajojen sisällä (Ehder 2005: 28).



Kuva 6. Eri alueiden erot, kuvassa LOQ on määrittäysraja ja LOD toteamisraja (Jaarinen & Niiranen 2008: 18)

3.1.2 Toteamis- ja määrittäysraja

Toteamisraja (limit of detection, LOD) ilmoittaa sen pienimmän pitoisuuden, joka voidaan luotettavasti erottaa nollatasosta. Toteamisraja määritetään analysoimalla useita nollanäytteitä ja laskemalla näille rinnakkaismäärittäyksille keskihajonta (95 %:n todennäköisyydellä) sekä keskiarvo. Yleensä toteamisrajan laskemisessa käytetään nollanäytteen kolminkertaista keskihajontaa keskiarvon lisäksi (kaava 6).

$$\text{LOD} = \bar{x} \pm 3 \cdot s \quad (\text{Kaava 6})$$

missä \bar{x} = nollanäytteiden keskiarvo
 s = nollanäytteiden keskihajonta

Kvantitatiivisen analyysin pienintä mahdollista luotettavaa pitoisuustasoa näytematriisissa kutsutaan määrittäysrajaksi (Jaarinen & Niiranen 2008: 13). Määrittäysraja eli LOQ

(limit of quantitation) on yleensä 6 tai 10 kertaa nollanäytteen keskihajonnan suuruinen (kaava 7) ja mahdollisesti kalibrointikäyrän alhaisin piste. (Ehder 2005: 30).

$$\text{LOQ} = x \pm 6 \cdot s \quad (\text{Kaava 7})$$

missä x = nollanäytteiden keskiarvo
 s = nollanäytteiden keskihajonta

Siinä missä määrittämissä raja on kvantitatiivisen analyysin alin raja, toteamisraja ilmoittaa pelkästään kvalitatiivisesti analyysin olemassaolosta. Mikäli tulos on toteamisrajan ja määrittämissä rajan välillä, ei tarkkaa pitoisuutta voida antaa (Jaarinen & Niiranen 2008: 13.)

3.1.3 Tarkkuus ja toistettavuus

Mittauksen tarkkuus eli oikeellisuus ilmoittaa, onko analyysimenetelmän antama vaste lähellä oikeaa tulosta. Oikeellisuus lasketaan käyttämällä mittaustuloksista saatua keskiarvoa, jota verrataan todelliseen arvoon. Toistotarkkuus tarkastelee keskiarvon sijasta samoissa olosuhteissa mitattujen, toisistaan riippumattomien tulosten keskinäistä yhtenäisyyttä. Systemaattista virhettä kuvaa oikeellisuus, satunnaisvirhe toistotarkkuutta (Ehder 2005: 35 - 37.)

Oikeellisuutta eli poikkeamaa mitataan vertaamalla menetelmän mittaustuloksia referenssiarvoon. Yleensä referenssinä käytetään sertifioitua kaupallista vertailuliuosta, mutta myös mahdollisesti toista, jo validoitua menetelmää voi hyödyntää vertailuarvona. Ideaalitulanteessa referenssimateriaali on samankaltainen näytteen kanssa, jolloin erilainen matriisi ei pääse aiheuttamaan mittausepävarmuutta. Oikeellisuutta mitattaessa referenssinäytteitä on hyvä olla useita, esimerkiksi 6 - 10 kappaletta. Oikeellisuuden arvo E (kaava 8) ilmoitetaan suhteellisenä lukuna (Jaarinen & Niiranen 2008: 34.)

$$E = \frac{|x - \mu|}{\mu} \cdot 100 \% \quad (\text{Kaava 8})$$

missä x = mittaustulosten keskiarvo
 μ = vertailumateriaalin sertifioitu arvo

Toistettavuus testataan lyhyellä aikavälillä, mahdollisimman samankaltaisissa olosuhteissa. Toistotarkkuutta määrittäessä valmistetaan useita eri rinnakkaisnäytteitä, jotka eroavat pitoisuudeltaan toisistaan. Toistosarjojen välinen hajonta on yleensä suurempaa kuin niiden sisäinen hajonta, mutta merkittävästi suurempi ero kertoo todellisesta vaihtelusta. Sarjojen välisten mittausolosuhteiden muutos voi selittää osan virheestä (Ehder 2005: 35 - 37.) Toistotarkkuus voidaan laskea muun muassa jakamalla mittaustulosten keskihajonta keskiarvolla, jolloin saadaan niin kutsuttu CV-prosentti (kaava 9).

$$CV \% = \frac{s}{x} \cdot 100 \% \quad (\text{Kaava 9})$$

missä s = mittaustulosten keskihajonta
 x = mittaustulosten keskiarvo

3.1.4 Saanto

Tutkittavan analyytin kokonaismäärä voi muuttua esikäsittelyn jälkeen useista eri syistä. Tulokseen vaikuttavia häiriötekijöitä ei ole aina mahdollista määrittää, joten analyytin saantoprosentti on oleellista mitata erikseen jokaiselle eri menetelmälle. Saantoa tutkitaan muun muassa lisäämällä sertifioitua vertailumateriaalia näytteeseen tai vertailemalla saatuja tuloksia toisen, jo validoidun menetelmän kanssa. Laskennallisesti saanto on yleensä prosenttimuodossa (kaava 10).

$$\text{Saanto R} = \left(\frac{C1 - C2}{C3} \right) \times 100 \% \quad (\text{Kaava 10})$$

missä C1 = lisäyksen sisältävien mittausten keskiarvo
 C2 = analyytin pitoisuus ilman lisäystä
 C3 = lisäyksen laskennallinen konsentraatio

Edellä mainitussa kaavassa tarkastellaan, katoaako analyysissä mahdollisesti analyyttiä tai aiheutuuko häiriötekijöistä vääriä positiivisia tuloksia (Ehder 2005: 32 - 33.) Joissakin analyyseissä näytetaustan korkea vaste voidaan ohittaa käyttämällä sisäisen standardin metodia. Sisäinen standardi on tutkittavan analyytin kaltainen yhdiste, jota lisätään kaikkiin standardiliuoksiin ja näytteisiin sama määrä (Jaarinen & Niiranen: 21 - 22.)

3.1.5 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus ilmoittaa sen vaihteluvälin, jonka sisälle mittatulos osuu jollain todennäköisyydellä. Mittausepävarmuutena voidaan käyttää esimerkiksi keskihajontaa tai sen monikertaa, mutta useimmiten parametri koostuu useista eri osista (Ehder 2005: 18.)

Mittausmenetelmän kokonaisepävarmuus (u) yhdistää analyysiin kuuluvat epävarmuustekijät, jotka voidaan laskea esimerkiksi joko arvioidulla tai mitatulla keskihajonnalla. Yhtä tekijää voidaan tarkastella jakamalla keskihajonta epävarmuustekijällä, jolloin puhutaan suhteellisesta standardiepävarmuudesta. Suhteelliset standardiepävarmuudet yhdistämällä saadaan suhteellinen kokonaisepävarmuus (kaava 11).

$$u_r(y) = \sum_{i=1}^n \frac{u(x)}{x} \quad (\text{Kaava 11})$$

missä $u_r(y)$ = suhteellinen kokonaisepävarmuus
 $u(x)$ = mittausmenetelmän epävarmuus
 x = epävarmuustekijä

Absoluuttinen mittausepävarmuus saadaan kertomalla analyysitulosta suhteellisella kokonaisepävarmuudella (kaava 12). Yleensä analyttisessä kemiassa mittausepävarmuus ilmoitetaan laajennettuna epävarmuutena (U), jolloin yhdistetty mittausepävarmuus $u(y)$ kerrotaan kertoimella 2. Kerroin vastaa luotettavuustasoa 95 % (Jaarinen & Niiranen 2008: 35 - 36.)

$$u(y) = u_r(y) \cdot y \quad (\text{Kaava 12})$$

missä $u(y)$ = absoluuttinen mittausepävarmuus
 $u_r(y)$ = suhteellinen kokonaisepävarmuus
 y = yksittäinen mittaustulos

Mittaustulokseen vaikuttavat hyvin monet eri tekijät - muun muassa matriisin aiheuttamat häiriöt, näytteenotto, ympäristöolosuhteet, punnitus sekä tilavuuden määrittäminen. Mittausepävarmuutta määrittäessä hyödynnetään niin kirjallisuustietoja, laboratorioden välisiä vertailumittauksia, analyysin laadunvarmistuksen ja validoinnin tuloksia sekä vertailumateriaalien ilmoitettuja epävarmuuksia (Ehder 2005: 19, 23.)

3.1.6 Näytematriisin vaikutus

Selektiivisyys kertoo, kuin kuinka spesifisesti voidaan analysoida tutkittava yhdiste erilaisista näytematriiseista. Häiriötekijät voivat nostaa tai laskea vastetta niin, että näytteen analysoitu pitoisuus ei vastaa todellisuutta. Selektiivisyyden tutkimiseen voidaan käyttää esimerkiksi saantokokeita (3.1.4) sekä useita erilaisia näytematriiseja (Ehder 2005: 27.)

Merivesinäytteissä muun muassa korkeat suolapitoisuudet saattavat aiheuttaa ongelmia. Näytematriisissa olevat epäpuhtaudet voivat nostaa tai laskea analyytin vastetta, jolloin saatu mittaustulos ei vastaa todellisuutta. Joissain tapauksissa voidaan valmistaa standardiliuokset samaan näytematriisiin, jolloin taustan virhe saadaan minimoitua.

3.2 Optimointi

Optimoinnin tavoite on parantaa laitteen toimintakykyä esimerkiksi nostamalla herkkyttä, vähentämällä häiriötekijöitä tai nopeuttamalla ajoa. Optimoinnin lähtökohta on aina laitteen käyttötarkoituksen pohtiminen, sillä erilaiset tavoitteet ovat keskeisessä asemassa muutoksia tehdessä. Pieniin konsentraatioihin keskittyessä analyytin antaman vasteen on oltava mahdollisimman suuri, mutta suurissa pitoisuuksissa ongelma voi olla päinvastainen.

Laitteen komponenttien ominaisuudet ovat ratkaisevassa asemassa, kun halutaan tehdä muutoksia analyysimenetelmään. Analyytin saantoon voi vaikuttaa voimakkaasti esimerkiksi reaktiolämpötilan, injektioilavuuden tai detektorin asetusten muuttaminen. Optimoitavat tekijät ovat hyvin paljon laitteen ominaisuuksista kiinni - FIA-laitteelle tyypillisiä muutoskohteita yleisten parametrien lisäksi ovat muun muassa pumpun nopeus, näytesilmukan pituus ja mahdollisen vastapaineyksikön asentaminen. Kaasudiffuusiokammion varustellun FIA-analysaattorin optimoitaviin ominaisuuksiin voi kuulua myös teflon-kalvon kummallakin puolella liikkuvien virtauksien suuntien muutos.

4 Välineet ja reagenssit

Analyysissä käytettiin A-luokan mittapulloja, jotka olivat aina varattu samoille reagensseille kontaminaatoriskin pienentämiseksi. Lasiset osat happopestiin 2 M suolahapolla vähintään kerran viikossa, uudet mitta- ja säilöntäpullot pidettiin yön yli happopesussa.

4.1 FIA-laitteisto

FIA-laitteisto koostui useista eri osista, joten laitteen muokkaaminen oli helppoa (kuva 7). Laite koostui näytteenottajasta, pumpusta, venttiilistä, kaasudiffuusiokammioista, lämmittimestä, reaktiosilmukasta sekä detektorista (2.3.2, kuva 2). Pumppu liitettiin tietokoneeseen LabJack U12-laitteella. FIA:n osat on tarkemmin lueteltu taulukossa 1.



Kuva 7. FIA-analysaattorin osat

Kuvassa 7 näytteenotin on A, B pumppu, C venttiili ja D kaasudiffuusiokammio. Reaktiosilmukka on kohdassa E, kiertyneenä lämmittimen F ympärille. Lämmittimen jälkeen on detektori kohdassa G, sen jälkeen H edustaa vastapaineikköä ja I tietokonetta.

Taulukko 1. FIA-analysaattorin osat

	Valmistaja	Tuote
Kaasudiffuusiokammio	FIALab	P/N 790031 80 mm x 1 mm
Pumppu	Watson-Marlow	403U/VM4
Detektori	FIALab	PMT-FL 100 µl
Näytteenottaja	Aim Lab	AIM3200
Lämmitin	Watlow	EZ-Zone

Venttiili	VICI	Cheminert C22
Kapillaariletku	Upchurch	Tub PEEK Grn 1/16 x 0,30

4.2 Reagenssit ja niiden valmistus

Reagenssien valmistukseen käytettävä ammoniakkip vapaa vesi (Millipore Q-POD) oli ultrapuhdasta ja suodatettua (Millipak ® Express 0,22 µm). FIA-laitteella suoritettavaan analyysiin tarvittavat reagenssit on lueteltu taulukossa 2.

Taulukko 2. FIA-analyysiin tarvittavat reagenssit

	Valmistaja	Tuotenumero	Puhtaus
Natriumhydroksidi	Merck	1.06498.1000	≥ 99,0 %
o-Ftaalialdehydi (OPA)	Sigma	P1378-25G	≥ 97,0 %
Natriumtetraboraatti	Sigma-Aldrich	S9640-500G	≥ 99,5 %
Natriumsulfiitti	Merck	1.06657.0500	97,0 % - 100,5 %
Etanoli	Altia	ETAX Aa	99,5 m-%
NH ₄ ⁺ (1000 µg/ml)	AccuStandard	IC-NH4-10X-1	
NH ₄ ⁺ (1000 mg/l)	Merck	1.19812.0500	

Reagenssi 1 valmistettiin kiinteästä natriumhydroksidista. NaOH-kiteitä punnittiin 160 g ja nämä liuotettiin 1000 ml:n mittapullossa ultrapuhtaaseen veteen. Tästä tehtiin laimennos mittaamalla 200 ml natriumhydroksidiliuosta 1000 ml:n mittapulloon ja täyttämällä ultrapuhtaalla vedellä merkkiin asti. Lopullinen reagenssi 1 saatiin aikaiseksi pipetoimalla 5 ml edellä mainittua natriumhydroksidiliuosta 200 ml:n mittapulloon ja täyttämällä ultrapuhtaalla vedellä merkkiin asti. Reagenssi 1 oli valmistettava joka päivä uudelleen. Kaikki NaOH-liuokset säilytettiin hyvin suljetuissa polyeteenipulloissa.

Reagenssi 2 valmistettiin punnitsemalla 10 g natriumtetraboraattia 500 ml:n mittapulloon ja täyttämällä merkkiin asti ultrapuhtaalla vedellä. Natriumtetraboraatti saatiin liukenemaan veteen käyttämällä voimakasta sekoitusta. Tämän jälkeen punnittiin erilliseen as-

tiaan 400 mg o-ftaalialdehydiä ja liuotettiin se 2 ml:aan etanolia. OPA sekoitettiin etanoliiin voimakkaalla sekoituksella, liuoksen valonarkuuden vuoksi käytettiin foliota. Kun OPA:n väri muuttui kirkkaaksi, sekoittaminen voitiin lopettaa. Kolmatta reagenssia varten natriumsulfiittia punnittiin erilliseen astiaan 120 mg ja se liuotettiin 2 ml:aan ultrapuhdasta vettä, kevyt sekoitus riitti liukenemiseen.

Natriumtetraboraattiliuokseen lisättiin OPA kokonaan, 0,20 µm suodattimen läpi. Natriumsulfiittiliuosta pipetoitiin mukaan 1,5 ml. Reagenssi 2 säilyi tummassa lasipullossa kuukauden, käyttövalmista liuos oli vasta 24 h valmistamisen jälkeen. Reagenssi 2 oli valmistettava vetokaapissa, sillä OPA on akuutisti toksista, syövyttävää ja lisäksi myrkyllistä ympäristölle.

Kantajaliuoksena käytettiin ultrapuhdasta vettä, jota kuplitettiin heliumkaasulla noin yhden minuutin ajan ilmakuplien poistamiseksi. Jos kantajaliuosta oli enemmän kuin 1 l, kuplitusta voitiin jatkaa pidempään.

NH₄⁺-standardi valmistettiin kantaliuoksesta (AccuStandard), jonka konsentraatio oli 1000 µg/ml. 200 µmol/l välikantalaimennos tehtiin pipetoimalla 360 µl kantaliuosta 100 ml:n mittapulloon ja täyttämällä ultrapuhdaalla vedellä merkkiin asti. Standardiliuokset valmistettiin tästä välikannasta ultrapuhdaaseen veteen taulukon 3 mukaisesti. Välikanta säilyi jääkaapissa kaksi viikkoa, mutta standardiliuokset valmistettiin uudelleen joka päivä.

Taulukko 3. Standardiliuosten valmistus välikannasta (200 µmol/l)

	1 µmol/l	2 µmol/l	5 µmol/l	7 µmol/l	10 µmol/l
Välikanta (ml)	1	1	5	3,5	5
Mittapullo (ml)	200	100	200	100	100

Kontrolliliuokset valmistettiin Merck-merkkisestä kantaliuoksesta, jonka konsentraatio oli 1000 mg/l. Välikantaliuos valmistettiin pipetoimalla 1 ml kantaliuosta 200 ml:n mittapulloon ja täyttämällä ultrapuhdaalla vedellä merkkiin asti, jolloin konsentraatio oli 277 µmol/l. Vahvempi kontrolliliuos tehtiin välikannasta pipetoimalla 3 ml 200 ml:n mittapulloon ja täyttämällä merkkiin ultrapuhdaalla vedellä, lopulliseksi konsentraatioksi tuli 4,16

$\mu\text{mol/l}$. Pienempi kontrolli ($0,416 \mu\text{mol/l}$) valmistettiin pipetoimalla 1 ml vahvempaa kontrollia 10 ml:n mittapulloon ja täyttämällä merkkiin ultrapuhtaalla vedellä. Välikanta säilyi jääkaapissa kaksi viikkoa, standardiliuokset valmistettiin uudelleen joka päivä.

5 Menetelmät

FIA-analyysin alkuperäisen menetelmäohjeen laatija on FIAlab Instruments Inc. Ammoniumin mittaaminen spektrofotometrisesti perustui Suomen ympäristökeskuksen työohjeeseen. FIA-menetelmälle tehty tarkempi työohje on liitteessä 4.

5.1 FIA-menetelmä

Analyysiä varten valmistettiin joka päivä uudelleen standardi- ja kontrolliliuokset sekä reagenssi 1. Kantajana toimivaa ultrapuhdasta vettä kerättiin ennen ajoa lasiseen pulloon noin 500 ml ja kuplitettiin heliumkaasulla 1 min ajan.

Ennen ajoa käynnistettiin näytteenottaja, pumppu, lämmitin, detektori ja tietokone. Detektorin asetukset olivat E_x 365 nm ja E_M 430 nm. Näytteiden, standardien ja kontrollien sijainnit määritettiin csv-tiedostoa käyttämällä (kuva 8). Tyypillisessä järjestyksessä ensin oli kaksi nollanäytettä, sitten standardiliuokset (std1 - std5) ja niiden jälkeen jälleen nollanäyte. Nollanäytteen jälkeen tulivat varsinaiset näytteet ja sitten kontrollit ja mahdollinen uusi toistettavuutta tarkistava standardi, lopuksi nollanäyte.

Ennen ajon aloitusta letkuja huuhdeltiin ultrapuhtaalla vedellä muutama minuutti ja sen jälkeen vielä tarkastettiin reagenssien kanssa pohjaviivan tasaisuus nollanäytteillä. Tämän jälkeen varsinainen ajo käynnistettiin. Ajon ylimääräistä pysäytystä varottiin, sillä OPA saattoi kiteytyä linjastoon ollessaan paikallaan.

```

NH4_01715.csv - Notepad
File Edit Format View Help
rack 1 , 1, Blank, B, B, B, B
rack 1 , 2, sample1, 0, 0, 0, 0
std rack , 1, std1, 1, 1, 1, 1
std rack , 2, std2, 2, 2, 2, 2
std rack , 3, std3, 5, 5, 5, 5
std rack , 4, std4, 7, 7, 7, 7
std rack , 5, std5, 10, 10, 10, 10
rack 1 , 2, sample2, 0, 0, 0, 0
rack 1 , 3, sample3, ?, ?, ?, ?
rack 1 , 4, sample4, ?, ?, ?, ?
rack 1 , 5, sample5, ?, ?, ?, ?
rack 1 , 6, sample6, ?, ?, ?, ?
rack 1 , 7, sample7, 0.416, 0.416, 0.416, 0.416
rack 1 , 8, sample8, 4.16, 4.16, 4.16, 4.16
std rack , 3, std6, 5, 5, 5, 5
rack 1 , 2, sample9, 0, 0, 0, 0

```

Kuva 8. Näytteitä sisältävän ajon csv-tiedosto

Ajon kulkua ohjailtiin koodin avulla (koodi 1). Koodi luki ainoastaan ne rivit, joiden edessä ei ollut '-'merkkiä. Riveillä 1 - 6 käynnistettiin ohjelmisto ja ladattiin näytteiden paikat. Riveillä 7 - 15 määritettiin peristalttisen pumpun nopeus, huuhdeltiin näytteenottaja 50 sekunnin ajan ja siirryttiin ensimmäiseen koeputkeen. Tätä näytettä kulki laitteen läpi 500 sekuntia, kunnes injektioneula siirtyi seuraavaan koeputkeen (rivit 16 - 19). Neulan siirryessä venttiili kääntyi niin, että näytesilmukkaan meni kantajan sijasta ensimmäistä näytettä 80 sekunnin ajan ja sen jälkeen venttiili vaihtui takaisin samaan asemaan (rivit 20 - 22). Näytesilmukasta kaasudiffuusiokammiolle etenevää näytevirtaa analysoitiin detektorilla 315 sekunnin ajan (rivit 23 - 27). Tämän jälkeen palattiin riville 16 ja jatkettiin ohjelmaa niin pitkään, kunnes näytteitä ei ollut enempää. Lopuksi määritettiin, pitääkö näytteenottajan neulaa huuhdella ja suljettiin laite (rivit 30 - 37).

```

1. ' Test Assay (NH4)
2. ' FIA Template for NH4 analyses using FIA-FL
3. ' Global Logon
4. ' logon to all components
5. Sample Description
6. ' load sample description file
7. Instrument Valve Load
8. ' set delay time, start pump to prime lines
9. Peristaltic Pump CounterClockwise(%) 20
10. autosampler Wash
11. autosampler Pump On
12. Delay (sec) 50
13. autosampler Pump Off
14. Next Sample

```

```
15. Delay (sec) 500
16. LoopStart (#) 5000
17. ' inject sample, load next sample
18. Analyte New Sample
19. Next Sample
20. Instrument Valve Inject
21. Delay (sec) 80
22. Instrument Valve Load
23. Delay (sec) 15
24. PMT Start Scans
25. ' perform reference scan and start absorbance scans
26. Delay (sec) 315
27. PMT Stop Scans
28. ' refresh plots and update concentrations
29. Refresh Plot

30. If SampleID < 0 then
31. autosampler Wash
32. autosampler Pump On
33. Delay (sec) 10
34. autosampler Pump Off
35. End If

36. Loop End
37. Peristaltic Pump Off
```

Koodi 1. Ajo-ohjelma ammoniummittauksiin

5.1.1 Validoinnin suoritus

Lineaarisuus ja herkkyys määritettiin mittaamalla kolme standardisuoraa eri päivinä, aina uusilla liuoksilla. Standardiliuosten konsentraatiot olivat 1 $\mu\text{mol/l}$, 2 $\mu\text{mol/l}$, 5 $\mu\text{mol/l}$, 7 $\mu\text{mol/l}$ ja 10 $\mu\text{mol/l}$. Mittauksissa käytettiin rinnakkaisia standardeja, jolloin tulosten luotettavuus oli parempi. Saaduista kuvaajista laskettiin residuaalit ja tarkasteltiin, esiintyykö niissä mahdollisesti ei-toivottuja epäsatunnaisuuksia. Mittausalueen saturoitumista tutkittiin laimentamalla pitoisuudeltaan 1000 $\mu\text{mol/l}$ standardiliuosta aina puoleen, kunnes laimein liuos oli 3,9 $\mu\text{mol/l}$. Kalibrointikäyrästä valittiin silmämääräisesti lineaarinen alue, jota tarkasteltiin vielä residuaalikuvaajalla. Kun lineaarinen ja määrittämisraja alue saatiin selville, voitiin samalla myös todeta mittausalue.

Toteamis- ja määrittämisrajaa selvitetiin mittaamalla kolmena eri päivänä kymmen nollanäytettä. Tuloksissa tarkasteltiin nollanäytteiden keskiarvojen keskiarvoa sekä keskihajontaa, jolloin jokaiselle päivälle saatiin omat tulokset. Fluoresenssi muutettiin standardisuoran sovituksen yhtälöä käyttämällä konsentraatioksi ja lopuksi saatiin kolmen päivän konsentraatioiden keskiarvot määritettyä.

Tarkkuutta ja toistettavuutta määrittäessä mitattiin kolmena eri päivänä sertifioidun vertailumateriaalin pitoisuus käyttämällä kahta rinnakkaista näytettä. Referenssin tuotenumero oli QC SW3.1B, keskihajonta 0,265 ja ammoniumpitoisuus 2,03 $\mu\text{mol/l}$. Referenssimateriaalin lisäksi mittaukseen käytettiin myös kontrollinäytettä (4,16 $\mu\text{mol/l}$), joita analysoitiin kolmena eri päivänä. Aikaisemmin mainittua referenssinäytettä mitattiin FIA-analysaattorin lisäksi spektrofotometrillä, jolloin voitiin vertailla kahta eri menetelmää. Referenssin suolapitoisuus oli 11 ‰, joten tämä huomioitiin laskuissa.

Näytematriisin vaikutusta tutkittiin mittaamalla erilaisia suolanäytteitä. Ensimmäisessä ja toisessa kokeessa käytettiin trooppista merisuolaa, josta valmistettiin Itämerelle ja valtamerialle tyypillisiä suolapitoisuuksia - suolapitoisuudet olivat 2 ‰, 4 ‰, 6 ‰, 8 ‰, 10 ‰, 20 ‰ ja 30 ‰. Ensimmäinen suolaliuos valmistettiin punnitsemalla 2 g merisuolaa happopeestyyn 1 l mittapulloon ja täyttämällä ultrapuhtaalla vedellä merkkiin asti, jolloin suolapitoisuudeksi tuli 2 ‰. Muut suolanäytteet valmistettiin vastaavasti. Mittauksia varten tehtiin standardi 5 $\mu\text{mol/l}$ ultrapuhtaan veden lisäksi myös suolaliuoksiin, jolloin voitiin tutkia matriisin vaikutusta. Kolmannessa kokeessa käytettiin trooppisen merisuolan sijasta natriumkloridia, mutta olosuhteet olivat muuten samat. Neljännessä kokeessa testattiin myös suolanollien aiheuttamaa vastetta natriumkloridilla.

Saanto mitattiin analysoimalla merivesinäytteitä, joihin oli tehty tunnettu lisäys. Lisäyksen laskennallinen konsentraatio oli 1 $\mu\text{mol/l}$ tai 7 $\mu\text{mol/l}$ päivästä riippuen. Saantokoe tehtiin useampana eri päivänä, yleensä neljästä eri näytteestä. Lisäys tehtiin noin 45 minuuttia ennen näytteiden ajoa, sillä ammonium hajoaa nopeasti merivedessä.

Mittausepävarmuus laskettiin kahdelle eri pitoisuusalueelle. Suuremman pitoisuusalueen (2 - 10 $\mu\text{mol/l}$) mittausepävarmuus laskettiin mittaamalla kontrollinäyte (4,16 $\mu\text{mol/l}$) ja referenssinäyte (2,03 $\mu\text{mol/l}$) kolmena eri päivänä. Pienemmän pitoisuusalueen (0,20 $\mu\text{mol/l}$ - 2 $\mu\text{mol/l}$) mittausepävarmuus laskettiin samasta referenssinäytteestä, mutta kontrollinäyte oli konsentraatioltaan 0,42 $\mu\text{mol/l}$. Näiden lisäksi käytettiin useita eri rinnakkaismittauksia, muun muassa erilaisia standardeja ja näytteitä. Mittausepävarmuus laskettiin kummassakin tapauksessa suhteellisena, eli vastaus oli prosenttimuodossa.

5.1.2 Optimoinnin suoritus

FIA-laitteen optimointi keskittyi näytesilmukan pituuteen, pumpun nopeuteen, lämmittimen lämpötilaan sekä detektorin asetuksien muuttamiseen. Näiden tekijöiden lisäksi huomioitiin myös ilmakupliin vaikuttava vastapaineyksikkö sekä kaasudiffuusiokammiossa liikkuvien virtauksien suunnan vaikutus.

Näytesilmukan alkuperäinen pituus oli 25 cm. Pidemmällä näytesilmukalla pyrittiin suurempaan vasteeseen, joten ensimmäisessä kokeessa oli pituudeltaan erilaisia silmukoita - intensiteettiä testattiin pituuksilla 25 cm, 50 cm, 75 cm ja 100 cm. Näytesilmukan toimivuutta mitattiin nollanäytteellä sekä standardeilla 5 $\mu\text{mol/l}$ ja 10 $\mu\text{mol/l}$, käyttäen kahta rinnakkaista. Saatujen mittauspisteiden perusteella luotiin jokaiselle näytesilmukan pituudelle oma kalibrointikäyrä. Kalibrointisuorien yhtälöiden kulmakertoimia käytettiin lopullisiin tuloksiin, kun haluttiin tarkastella pituuksien vaikutusta. Toisella mittauskerralla koeolosuhteet olivat muuten samanlaiset kuin aikaisemmin, mutta näytesilmukan pituudet olivat 100 cm ja 150 cm.

Lähtötilanteessa pumpun nopeus oli 30 %. Pumpun nopeutta säätämällä haluttiin saada suurempi vaste, mutta reaktioaika ei saanut kasvaa liaksi tai piikkien muodot vääristyä. Pumpun nopeutta testattiin nollanäytteellä sekä standardeilla, joiden konsentraatiot olivat 5 $\mu\text{mol/l}$, 25 $\mu\text{mol/l}$ ja 50 $\mu\text{mol/l}$. Kokeessa testattiin rinnakkaisten standardien ja nollanäytteiden intensiteettiä pumpun nopeuksilla 15 %, 20 %, 25 %, 30 % ja 35 %. Saaduista mittauspisteiden arvoista luotiin kalibrointikäyrät, joiden kulmakertoimia käytettiin lopullisiin tuloksiin.

Lämmittimen lämpötila oli aluksi 65 °C, mutta lämpötilaa haluttiin korottaa suuremman vasteen toivossa. Koetilannetta varten valmistettiin standardiliuokset 5 $\mu\text{mol/l}$, 25 $\mu\text{mol/l}$ sekä 50 $\mu\text{mol/l}$, joista mitattiin rinnakkaiset eri lämpötiloissa. Matalin lämpötila oli 50 °C ja korkein 75 °C, kokeessa lämpötilaa nostettiin aina viidellä (5) asteella. Tuloksia varten tehtiin mitattujen nollanäytteiden kautta kulkevat kalibrointikäyrät, joiden kulmakertoimia tarkasteltiin mahdollisen saturoitumisen vuoksi. Intensiteetin muutoksen lisäksi tarkasteltiin myös lämpötilan vaikutusta piikkien muotoihin.

Detektorin asetukset optimoitiin kokeilemalla, miten integraatioaika vaikuttaa vasteeseen. Suhteellisen pitkällä integraatioajalla saadaan paljon vastetta lisääntyneen datan vuoksi, mutta toisaalta mahdolliset häiriöt voivat aiheuttaa ongelmia piikkien muotoihin.

Alkuperäisessä menetelmäohjeessa integraatioaika oli 100 msec. Kokeessa voitiin käyttää integraatioaikoja, jotka olivat välillä 50 - 200 msec, joten varsinaiseen mittaussarjaan valittiin integraatioajan arvoiksi 50 msec, 75 msec, 100 msec, 125 msec, 150 msec sekä 200 msec. Mittausliuoksena käytettiin standardiliuosta 5 $\mu\text{mol/l}$, jonka aiheuttama vaste vähennettiin nollanäytteen tuloksesta. Kuvaajan tekoon käytettiin saatua erotusta.

Detektorin tasaisuutta tutkittiin kiniinisulfaattiliuoksella, jonka konsentraatio oli 0,05 mol/l. Kiniinisulfaattiliuos siirrettiin kyvetiin ja intensiteetin muutosta mitattiin 45 minuutin ajan. Suoran sovitus käytämällä tutkittiin, muuttuuko vaste ajan myötä. Suoran yhtälöstä voitiin laskea mahdollinen prosentuaalinen muutos.

Epävarmuutta aiheuttavat ilmakuplat haluttiin optimoida pois, joten vastapaineyksikkö muodostettiin käyttämällä ajon lopussa 180 cm pitkää letkua, joka oli kapeudeltaan 0,20 mm. Vastapaineyksikkö asennettiin yhdistämällä detektorilta lähtevä jäteletku NaOH-poistovirtaan. Ensimmäisen vastapaineyksikön testauksen jälkeen kokeiltiin kapillaariletkua, jonka halkaisija oli 0,30 mm ja pituus 99 cm. Tuloksissa vertailtiin seitsemän nollanäytteen keskihajontaa ilman vastapaineyksikköä ja vastapaineyksikön kanssa.

Kaasudiffuusiokammiossa virtaukset liikkuvat aluksi samaan suuntaan teflonkalvon kummallakin puolella. Alkuperäisestä menetelmäohjeesta poiketen OPA-reagenssin virtaussuunta vaihdettiin vastakkaiseksi. Muutoksen aiheuttamaa eroa tarkasteltiin valmistamalla 10 $\mu\text{mol/l}$ standardiliuos, jota testattiin rinnakkaisena kummallakin virtaussuunnalla. Intensiteettejä vertailtiin toisiinsa ja tulosten perusteella laskettiin prosenttiero.

5.2 Indofenoliniseen perustuva spektrofotometrinen menetelmä

Standardi- ja kontrolliliuokset valmistettiin kappaleen 4.2 mukaisesti mutta standardiliuoksia oli vain kaksi – 1 $\mu\text{mol/l}$ ja 5 $\mu\text{mol/l}$. Näiden liuosten lisäksi menetelmään kuului kolmen muun reagenssin valmistus – fenolin, trinatriumsitraatin ja trionin (dikloro-s-triat-siini-2,4,6-(1H,3H,5H)-trionin natriumsuola dihydraatti). Jokainen kolme reagenssia alkaloitiin natriumhydroksidilla.

SYKE Merikeskuksen käytössä ollut spektrofotometrinen menetelmä käytti hypokloriitin sijasta trionia, jolloin onnistuttiin välttymään jatkuvalta hypokloriitin määrytykseltä. Menetelmän lineaarinen alue oli trionin kanssa 0,25 $\mu\text{mol/l}$ - 90 $\mu\text{mol/l}$.

Näytteisiin pipetoitiin työohjeen mukaiset määrät reagensseja ja lämmityksen jälkeen mitattiin värin intensiteettiä spektrofotometrillä, käyttäen aallonpituutta 630 nm. Kerran kuu- kaudessa määritettiin F-arvo, jonka vaihteluväli oli rajattu arvoihin 9,5 - 11,0. F-arvon määritykseen käytettiin sekä standardi- että kontrolliliuoksia, muissa mittauksissa käy- tettiin pelkästään kontrolleja. Reagenssien laatua tarkkailtiin vertailemalla nollanäyttei- den aiheuttamaa vastetta sellaisiin näytteisiin, joihin oli lisätty reagensseja tuplamäärä. Kaikista näytteistä, kontrolleista ja standardeista valmistettiin kolme rinnakkaista.

6 Tulokset

Validoinnin primääriset mittaustulokset löytyvät liitteestä 1 ja optimoinnin puolestaan liit- teestä 2. Tulosten merkitystä on selitetty kappaleessa 7.

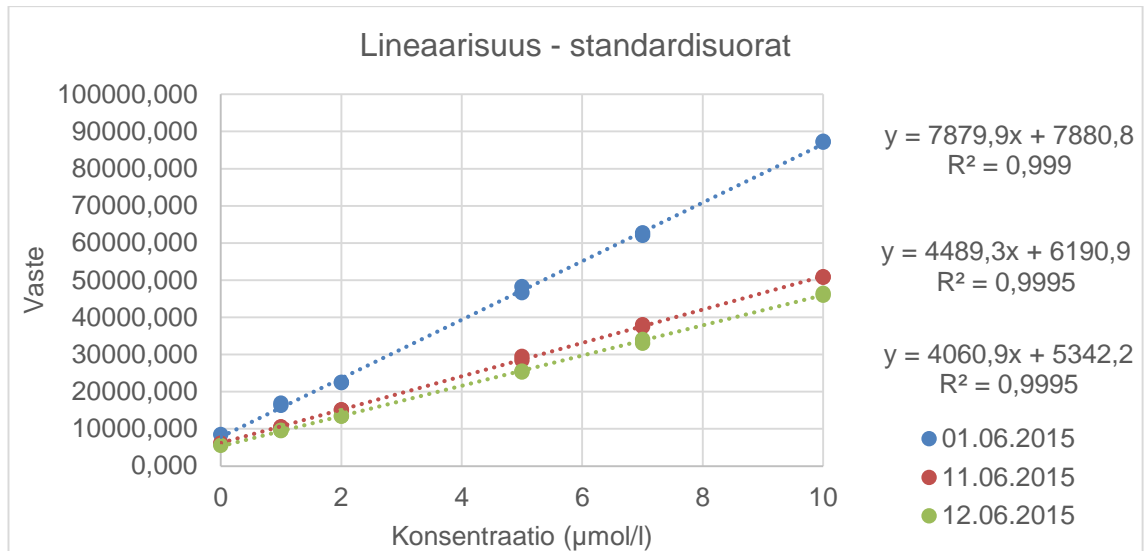
6.1 Validointi

Validointi suoritettiin aikavälillä 18.5.2015 – 10.7.2015. MUKit-ohjelmalla suoritettun mit- tausepävarmuuden arvioinnin lomake on liitteessä 3. Laskuesimerkit ovat liitteessä 5.

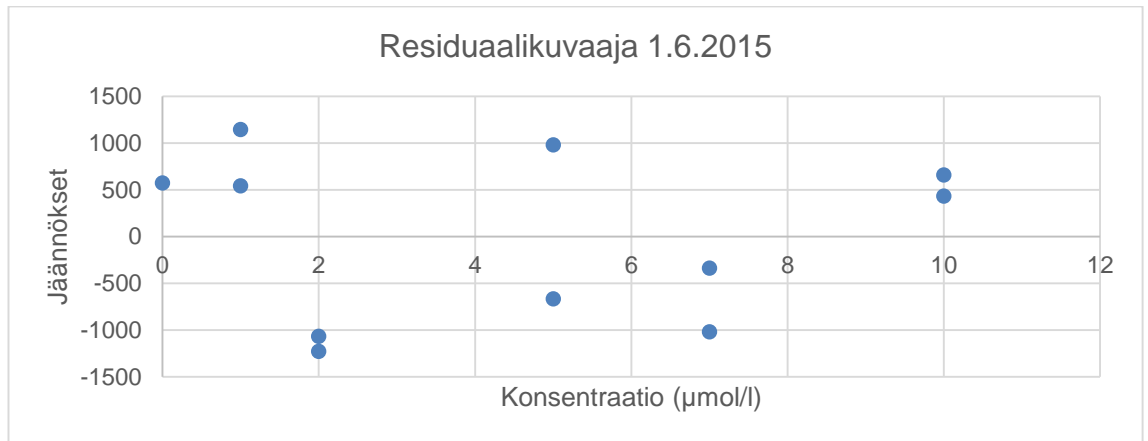
6.1.1 Lineaarisuus, herkkyys ja mittausalue

Lineaarisuutta ja herkkyyttä analysoitiin tekemällä kolmena eri päivänä standardisuorat samoilla pitoisuuksilla. Ensimmäinen lineaarisuuden määrittäminen oli 1.6.2015, toinen 11.6.2015 ja kolmas 12.6.2015. Mittausalueen saturoitumista tutkittiin 18.5.2015.

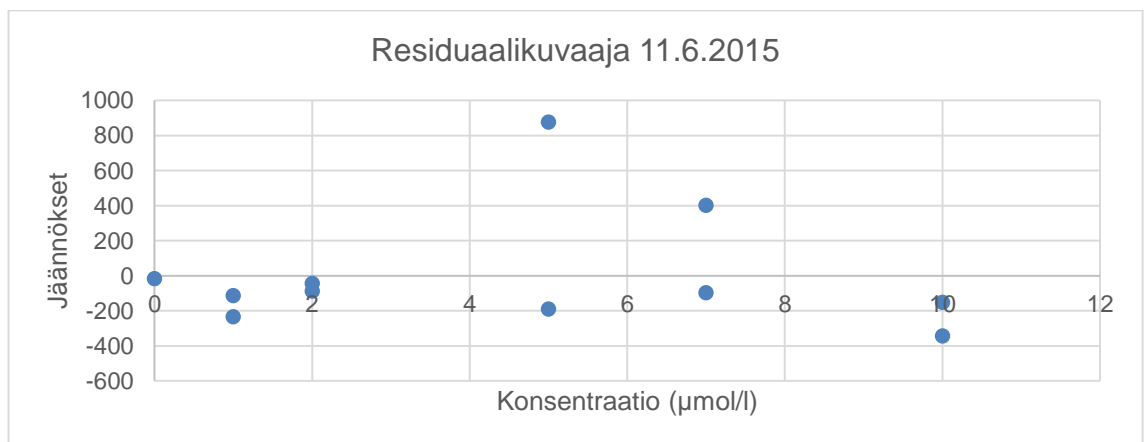
Ensimmäisellä kerralla suoran kulmakerroin eli herkkyys oli kaikista suurin, toisella ja kolmannella kerralla suunnilleen sama (kuvio 1). Regressiokuvaajista nähtiin, kuinka ar- vot jakaantuvat varsin tasaisesti negatiiviselle ja positiiviselle puolelle (kuviot 2, 3 ja 4). Analyysi oli lineaarinen alueella 1 µmol/l - 10 µmol/l, mutta pitoisuusalueella 3,9 µmol/l - 62,5 µmol/l residuaalit jakaantuivat vielä satunnaisesti (kuvio 6). Tätä suuremmilla pitoi- suuksilla vaste ei noussut enää samassa suhteessa kuin aikaisemmin (kuvio 5). Satu- roituminen alkoi silloin, kun fluoresenssin arvo oli yli 460 000 (liite 1).



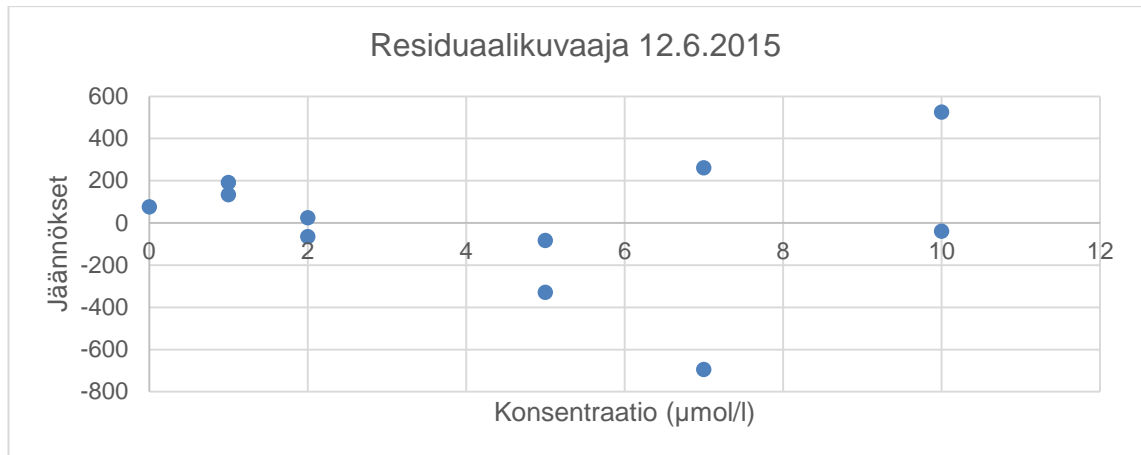
Kuvio 1. Kolmen päivän eri kalibrointisuorat



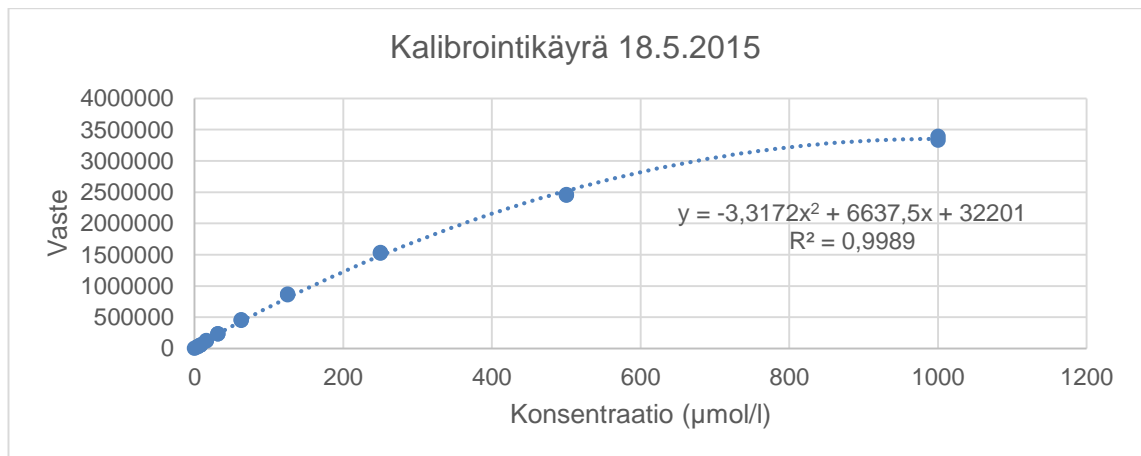
Kuvio 2. 1.6.2015 mitatun standardisuoran residuaalikuvaaja



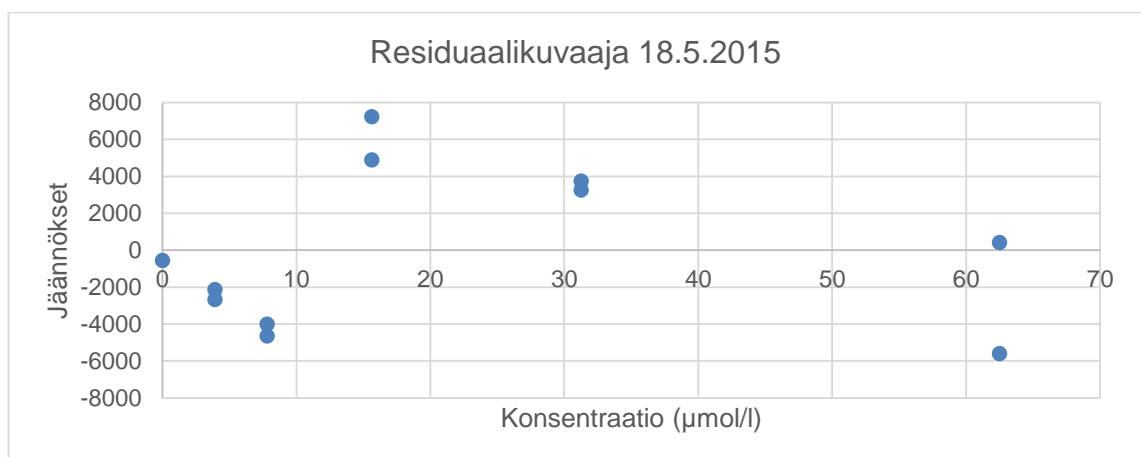
Kuvio 3. 11.6.2015 mitatun standardisuoran residuaalikuvaaja



Kuvio 4. 12.6.2015 mitatun standardisuoran residuaalikuvaaja



Kuvio 5. 18.5.2014 mitattu kalibrintikäyrä pitoisuusalueella 3,9 - 1000 µmol/l



Kuvio 6. 18.5.2015 mitatun standardisuoran residuaalikuvaaja välillä 3,9 - 62,5 µmol/l

6.1.2 Määritys- ja toteamisraja

Määritys- ja toteamisraja selvitettiin analysoimalla kolmena eri päivänä kymmenen nollanäytteen keskiarvoja. Ensimmäinen määrittäminen tehtiin 1.6.2015, toinen 11.6.2015 ja kolmas 12.6.2015. Kolmen päivän keskiarvon perusteella määritettiin lopulliset arvot (taulukko 4). Lopulliseksi määritysrajaksi FIA-menetelmälle tuli keskiarvon perusteella 0,18 $\mu\text{mol/l}$ ja toteamisrajaksi 0,12 $\mu\text{mol/l}$. Pohjaviivan hajonnan vuoksi määritysrajaksi ehdotettiin 0,20 $\mu\text{mol/l}$ ja toteamisrajaksi 0,14 $\mu\text{mol/l}$. Spektrofotometrisen menetelmän määritysraja oli 0,25 $\mu\text{mol/l}$.

Taulukko 4. Kolmen päivän laskennalliset määritys- ja toteamisrajat ($\mu\text{mol/l}$)

	1.6.2015	11.6.2015	12.6.2015	Keskiarvo	Ehdotettu
Määritysraja	0,17	0,18	0,20	0,18	0,20
Toteamisraja	0,13	0,10	0,12	0,12	0,14

6.1.3 Tarkkuus ja toistettavuus

Tarkkuutta eli systemaattista virhettä selvitettiin mittaamalla referenssinäytettä (2,03 $\mu\text{mol/l}$) kolmena eri päivänä. Referenssinäytteen suolapitoisuus oli 11 %. Suolapitoisuuden vaikutukseen ei saatu kunnollista vastausta, joten tulosten luotettavuus kärsi huomattavasta epävarmuudesta (6.1.5). Suuren epävarmuustekijän vuoksi tarkkuus laskettiin myös mittaamalla kolmena eri päivänä konsentraatioiltaan 4,16 $\mu\text{mol/l}$ olevaa kontrolliliuosta (6.1.4, taulukko 7). Tarkkuus laskettiin sivulla 13 olevan kaavan 8 avulla kummallekin mittaukselle erikseen. Taulukossa 5 on lueteltu mitatut ja korjatut arvot referenssille yksikössä $\mu\text{mol/l}$. Laskennallinen tarkkuus ja toistettavuus ovat taulukossa 6, korjatut arvot laskettiin taulukon 10 mukaisesti, käyttämällä suolapitoisuusarvoa 10 %.

Toistettavuus eli satunnaisvirhe määritettiin samoista referenssi- ja kontrollinäytteistä kuin tarkkuus, mutta korjattujen arvojen sijasta käytettiin alkuperäisiä vertailumateriaalituloksia. Toistettavuuden laskuun käytettiin sivulla 14 olevaa kaavaa 9. Tarkkuus ja toistettavuus mitattiin 26.5.2015, 29.5.2015, 1.6.2015 ja 3.6.2015.

Taulukko 5. Referenssin konsentraatio yksikössä $\mu\text{mol/l}$

	26.5.2015	26.5.2015	29.5.2015	29.5.2015	1.6.2015	1.6.2015	Ka.
Mitattu	2,68	2,63	2,80	2,76	2,83	2,78	2,75
Korjaus	1,86	1,90	1,96	1,99	1,97	2,01	1,95

Taulukko 6. Laskennallinen tarkkuus ja toistettavuus, ref. on referenssi ja kont. kontrolli

Tarkkuus (ref.)	Tarkkuus (kont.)	Toistettavuus (ref.)	Toistettavuus (kont.)
3,99 %	2,05 %	2,83 %	3,91 %

6.1.4 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuuden laskemiseen käytettiin muun muassa erilaisia kontrolliliuoksia. Pienemmälle pitoisuusalueelle (0,20 - 2 $\mu\text{mol/l}$) käytettiin kontrolliliuosta, jonka konsentraatio oli 0,42 $\mu\text{mol/l}$. Isommalle alueelle (2 - 10 $\mu\text{mol/l}$) käytetty kontrolli oli pitoisuudeltaan 4,16 $\mu\text{mol/l}$. Kummallekin pitoisuusalueelle käytettiin kontrollinäytteiden lisäksi suolakertoimella korjattua referenssinäytettä (6.1.3, taulukko 5). Mittausepävarmuus laskettiin MUKit-ohjelmalla (liite 3), jolloin tarvittiin myös useita rinnakkaismittausten tuloksia. Rinnakkaismittausten tulokset ovat liitteessä 1. Kontrollinäytteiden tulokset ovat taulukossa 7 yksikössä $\mu\text{mol/l}$ ja mittausepävarmuus on taulukossa 8.

Taulukko 7. Kontrolliliuosten konsentraatio yksikössä $\mu\text{mol/l}$

0,42 $\mu\text{mol/l}$	Ka. 0,42 $\mu\text{mol/l}$	4,16 $\mu\text{mol/l}$	Ka. 4,16 $\mu\text{mol/l}$
0,49	0,47	4,30	4,25
0,45		4,33	
0,49		4,27	
0,43		4,37	
0,49		3,96	

Taulukko 8. Mittausepävarmuus MUKit-ohjelmalla

Pitoisuusalue	Yhdistetty epävarmuus	Laajennettu epävarmuus
0,2 - 2 µmol/l	9,99 %	20 %
2 - 10 µmol/l	9,01 %	19 %

6.1.5 Näytematriisin vaikutus

Näytematriisin vaikutusta tutkittiin valmistamalla erilaisia suolavesinäytteitä, joita käytettiin 5 µmol/l standardiliuoksen tekoon. Ensimmäiset suolanäytteet (taulukko 9) valmistettiin 22.5.2015 trooppisesta merisuolasta niin, että liuosten suolapitoisuudet olivat 2 ‰, 4 ‰, 6 ‰, 8 ‰, 10 ‰, 20 ‰ sekä 30 ‰. Toinen suolapitoisuuden testaus suoritettiin 2.6.2015 (taulukko 10) samoilla promillepitoisuuksilla, mutta uusituilla suolaliuoksilla. Kolmannella kerralla (3.7.2015) olosuhteet olivat muuten samanlaiset kuin aikaisemmin, mutta trooppisen merisuolan sijasta käytössä oli NaCl (taulukko 11). Pelkästään NaCl-suolaliuosten aiheuttamaa vastetta tutkittiin 6.7.2015 (taulukko 12).

Taulukko 9. Suolapitoisuuden (trooppinen merisuola) vaikutus vasteeseen 22.5.2015

Suolapit.	0 ‰	2 ‰	4 ‰	6 ‰	8 ‰	10 ‰	20 ‰	30 ‰
Saanto	100 %	122 %	122 %	122 %	127 %	131 %	153 %	146 %

Taulukko 10. Suolapitoisuuden (trooppinen merisuola) vaikutus vasteeseen 2.6.2015

Suolapit.	0 ‰	2 ‰	4 ‰	6 ‰	8 ‰	10 ‰	20 ‰	30 ‰
Saanto	100 %	123 %	130 %	136 %	133 %	129 %	133 %	139 %

Taulukko 11. Suolapitoisuuden (NaCl) vaikutus vasteeseen 3.7.2015

Suolapit.	0 ‰	2 ‰	4 ‰	6 ‰	8 ‰	10 ‰	20 ‰	30 ‰
Saanto	100 %	112 %	128 %	142 %	148 %	162 %	185 %	194 %

Taulukko 12. Suolapitoisten nollanäytteiden (NaCl) vaste 6.7.2015

Suolapit.	0 ‰	2 ‰	4 ‰	6 ‰	8 ‰	10 ‰	20 ‰	30 ‰
Saanto	100 %	102 %	103 %	103 %	104 %	107 %	108 %	104 %

Rinnakkaisten mittausten välillä oli eroja, varsinkin trooppista merisuolaa käyttäessä (liite 1). Tulosten perusteella yksiselitteistä saantoprosenttia eri suolapitoisuuksille ei saatu määritettyä, sillä trooppinen merisuola ja NaCl erosivat toisistaan huomattavasti.

6.1.6 Kahden eri menetelmän vertailu

Kahta eri menetelmää verrattiin käyttämällä sertifioitua referenssimateriaalia (6.1.3), jota mitattiin kolmena eri päivänä rinnakkaisena (taulukko 5). Toinen analyysistä oli SYKE Merikeskuksen käytössä oleva spektrofotometrinen menetelmä (5.2), joka oli jo validoitu. Näytematriisin suurista epävarmuustekijöistä johtuen FIA-analyysin tulos kärsi huomattavasta epäluotettavuudesta (6.1.5). Tavoitearvo analyysille oli 2,03 µmol/l. Spektrofotometrisen menetelmän tulos oli 1,92 µmol/l ja FIA:lla mitattu puolestaan 1,95 µmol/l.

Taulukko 13. FIA:n ja spektrofotometrisen menetelmän keskiarvojen vertailu

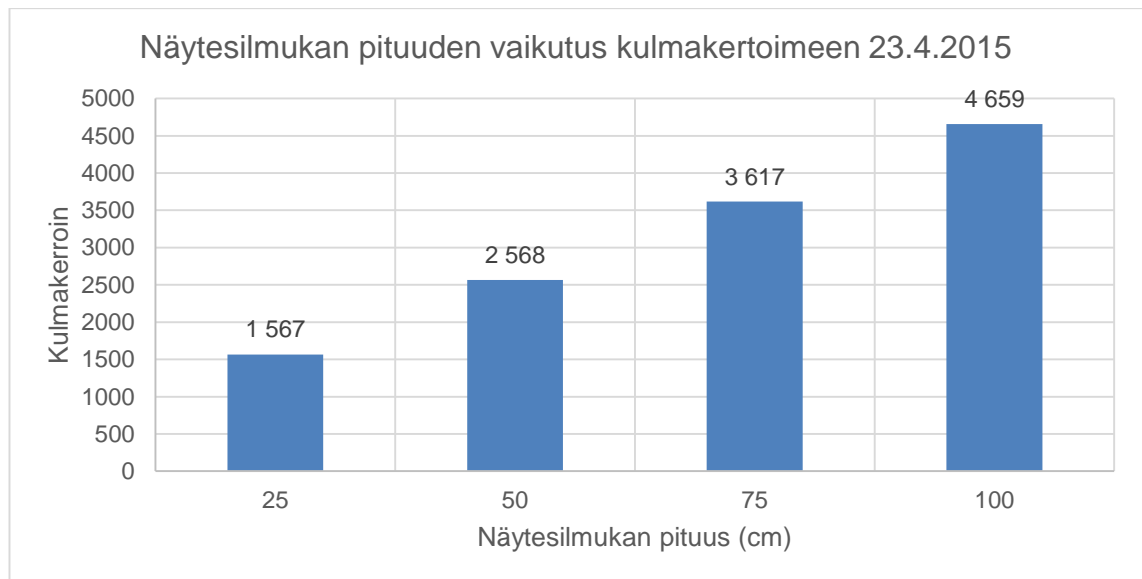
	Spektrofotometri	FIA korjattu (6.1.3)
26.5.2015		1,88 µmol/l
28.5.2015	1,77 µmol/l	
29.5.2015	2,03 µmol/l	1,97 µmol/l
1.6.2015	1,95 µmol/l	1,99 µmol/l
Keskiarvo	1,92 µmol/l	1,95 µmol/l

6.2 Optimointi

Optimointi suoritettiin aikavälillä 22.4. - 11.5.2015. Vastapaineyksikkö asennettiin 20.5.2015.

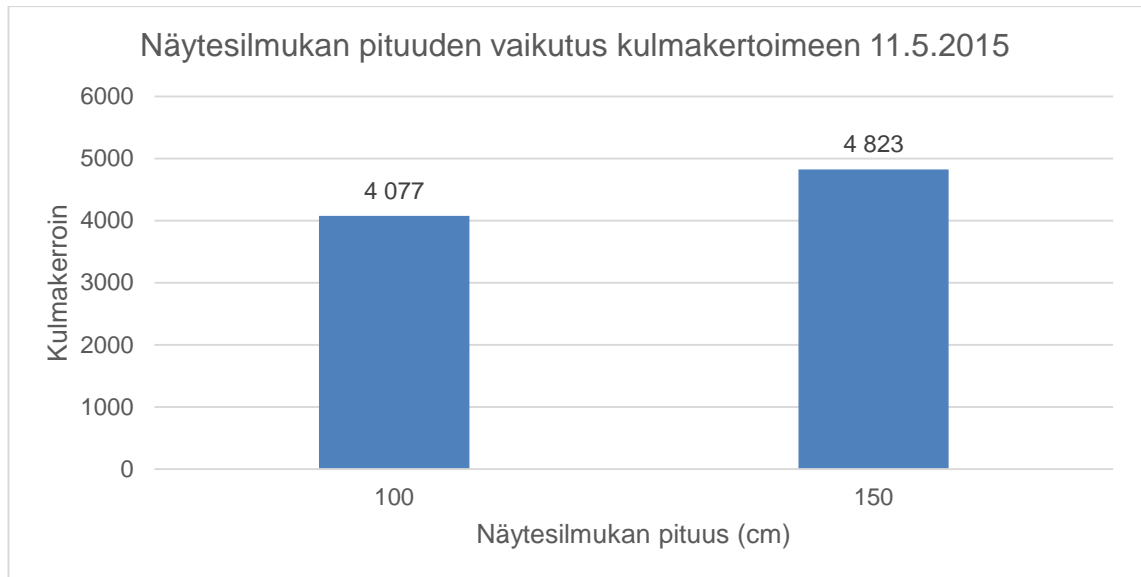
6.2.1 Näytesilmukan pituus

Näytesilmukan pituuden vaikutusta vasteeseen testattiin 23.4.2015 valmistamalla standardien 5 $\mu\text{mol/l}$ ja 10 $\mu\text{mol/l}$ kautta kulkeva kalibrointisuora. Lähtötilanteessa näytesilmukan pituus oli 25 cm. Ensimmäisessä kokeessa (kuvio 7) oli neljä (4) pituudeltaan erilaista näytesilmukkaa - 25 cm, 50 cm, 75 cm ja 100 cm. Näytesilmukan pidentäminen nosti kulmakerrointa huomattavasti, mutta haittapuolia ei havaittu.



Kuvio 7. Kulmakertoimen kasvu näytesilmukan pituuksilla 25 cm, 50 cm, 75 cm ja 100 cm

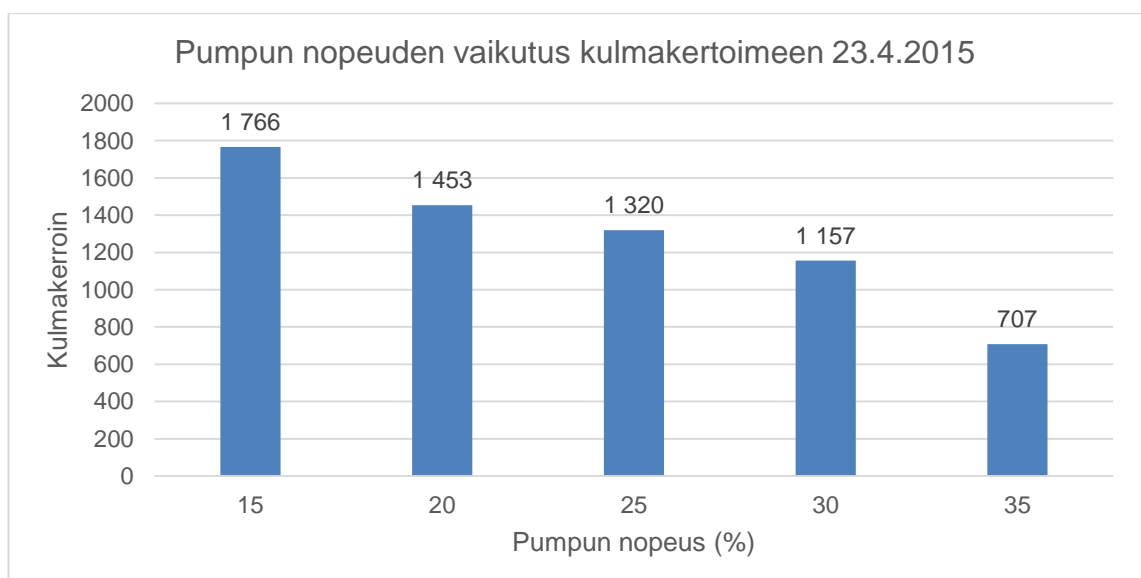
Näytesilmukan pituutta nostettiin vielä lisää seuraavassa kokeessa, joka suoritettiin 11.5.2015. Vertailussa oli kaksi pituudeltaan erilaista näytesilmukkaa - toinen oli 100 cm ja pidempi 150 cm (kuvio 8). Vaste nousi jälleen silmukan pituuden myötä, mutta negatiivisia vaikutuksia ei ollut piikkien muodoissa. Analyysiaikaa ei haluttu pidentää kohtuuttomasti, joten näytesilmukan lopulliseksi pituudeksi valikoitui 150 cm.



Kuvio 8. Kulmakertoimen kasvu näytesilmukan pituuksilla 100 cm ja 150 cm

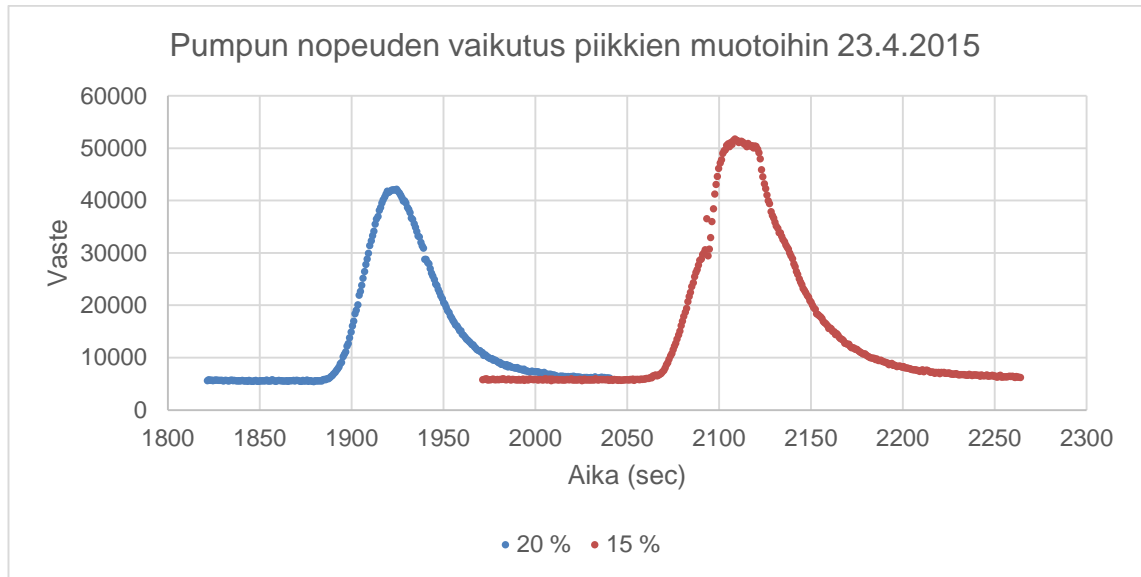
6.2.2 Pumpun nopeus

Pumpun nopeutta testattiin 23.4.2015 prosenteilla 15, 20, 25, 30 ja 35 (kuvio 9), käyttäen standardeja 5 $\mu\text{mol/l}$, 25 $\mu\text{mol/l}$ ja 50 $\mu\text{mol/l}$. Tuloksista nähtiin, kuinka nopeuden hidastaminen kasvatti kalibrointikäyrän kulmakerrointa. Kun pumpun nopeus oli 20 %, reaktioaika oli 220 sekuntia ja 294 sekuntia nopeuden ollessa 15 %.



Kuvio 9. Kulmakertoimen muutos pumpun nopeuden muuttuessa

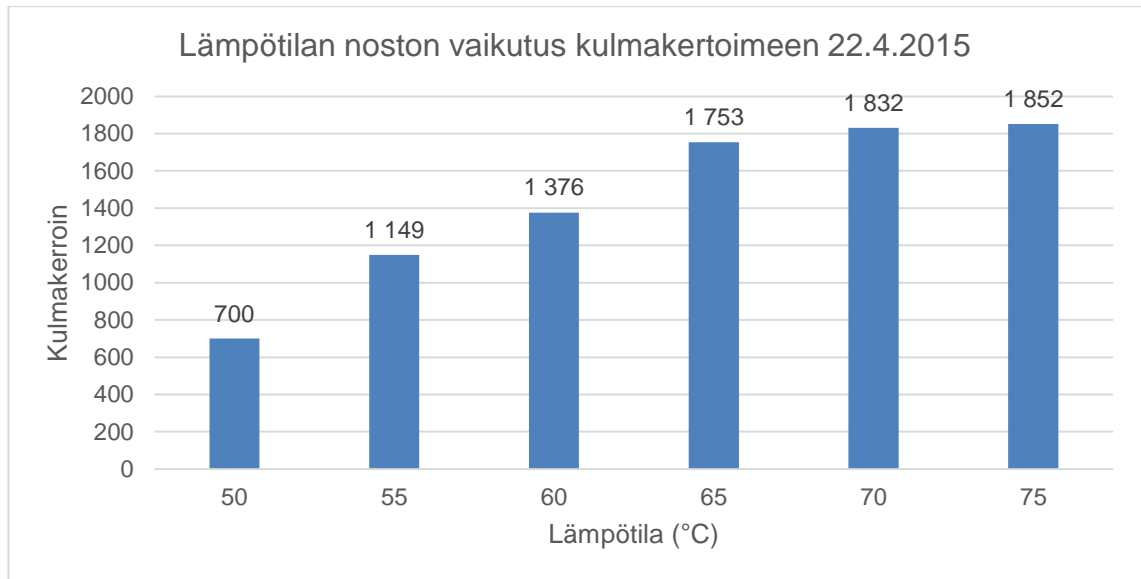
Mahdollisimman korkean vasteen ja riittävän nopean reaktioajan lisäksi tarkasteluun joutui myös piikin muoto. Kun pumpun nopeus oli 15 %, piikit olivat toisinaan epämuodostuneita (kuvio 10). Pumpun nopeudeksi valittiin tulosten perusteella 20 %.



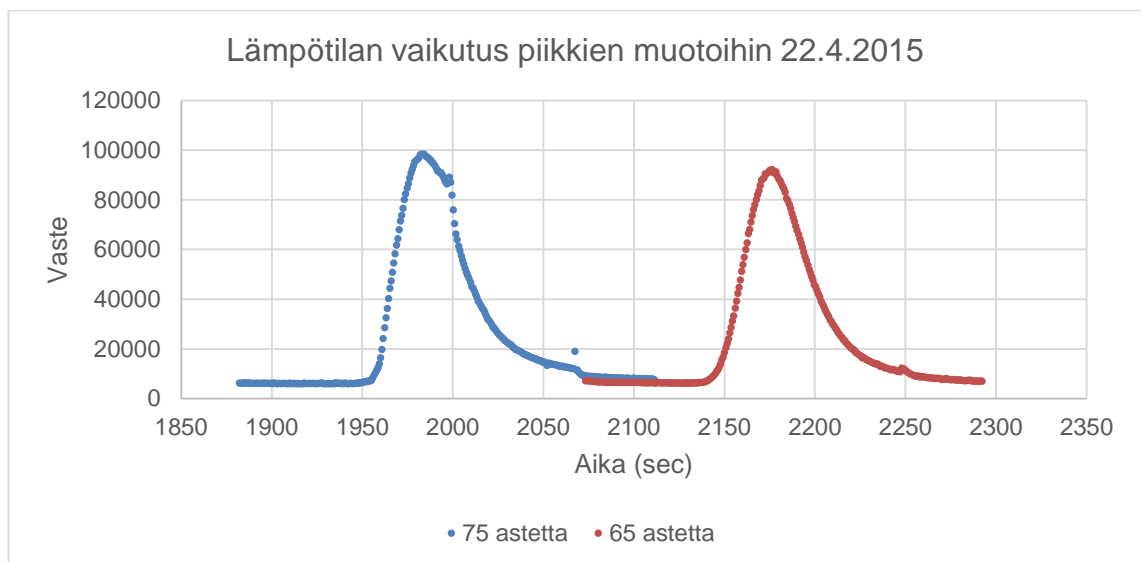
Kuvio 10. Piikkien muodon vaihtelu pumpun nopeuksilla 20 % ja 15 %

6.2.3 Lämpötilan vaikutus

Lämpötilaa testattiin 22.4.2015 alueella 50 - 75 °C, viiden (5) asteen välein (kuvio 11), käyttäen standardeja 5 µmol/l, 25 µmol/l ja 50 µmol/l. Vaste nousi nopeasti, kun lämpötilaa nostettiin alarajoilta ylöspäin. Kun lämpötila oli välillä 65 °C - 75 °C, ei vaste muuttunut yhtä nopeasti. Lopulliseksi lämpötilaksi valittiin 65 °C, sillä sitä korkeampi lämpötila aiheutti ilmakuplien muodostumista reaktiosilmukkaan. Ilmakuplat näkyivät kuvaajassa, aiheuttaen mahdollista epätarkkuutta (kuvio 12).



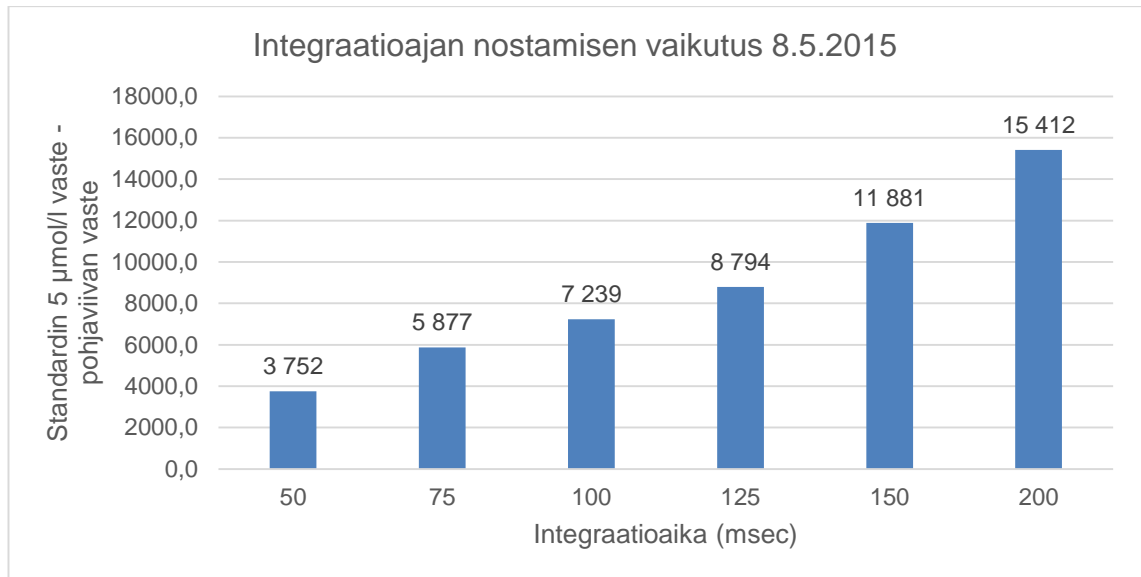
Kuvio 11. Lämpötilan muutoksen vaikutus



Kuvio 12. Piikin muodon vaihtelu lämpötiloissa 75 °C ja 65 °C

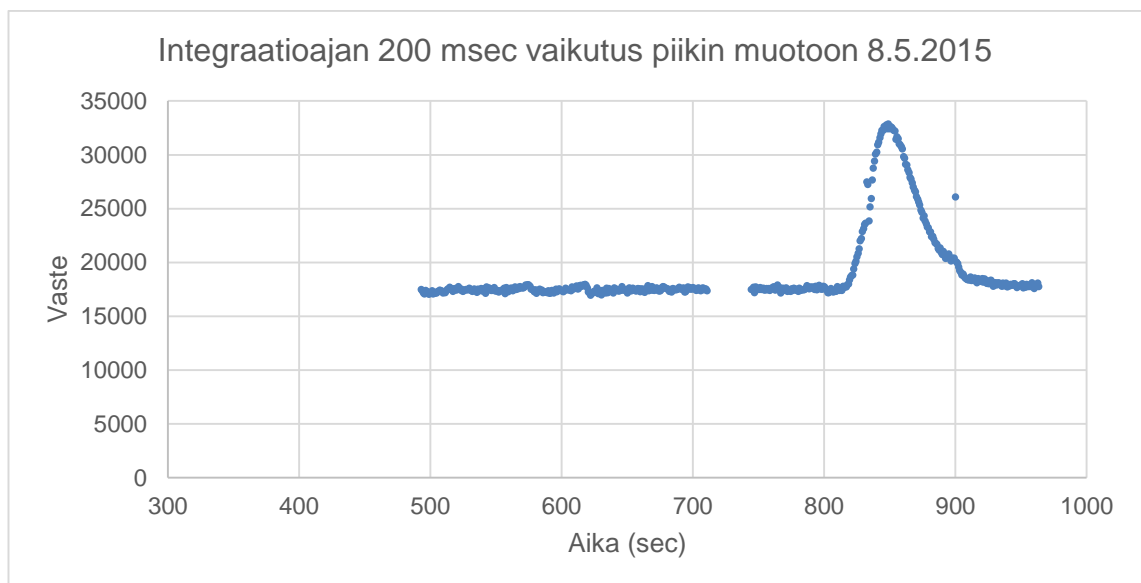
6.2.4 Detektori

Lähtötilanteessa integrointiaika oli 100 msec. Mahdollinen alue oli 50 - 200 msec, joten 8.5.2015 suoritetussa kokeessa käytettiin arvoja 50 msec, 75 msec, 100 msec, 125 msec, 150 msec sekä 200 msec. Kokeessa käytettiin standardia 5 $\mu\text{mol/l}$, jonka antamasta vasteesta vähennettiin pohjaviivan taso ja erotus merkattiin ylös. Tuloksista huomattiin, että vaste nousi huomattavasti integrointiajan kasvaessa (kuvio 13).



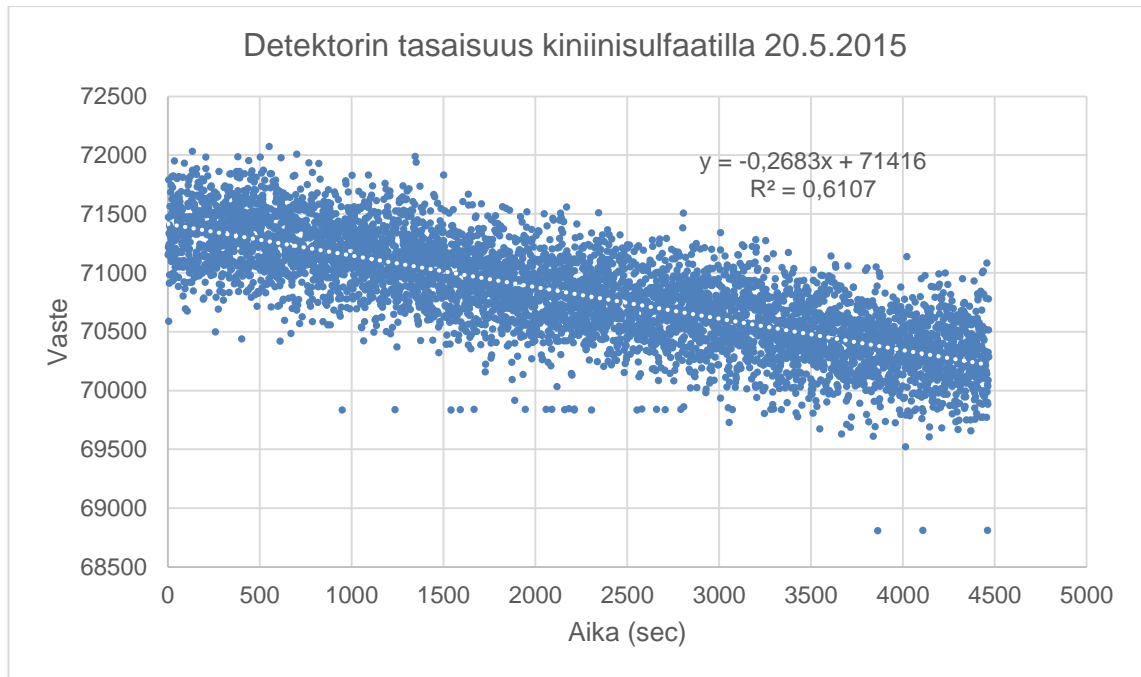
Kuvio 13. Integraatioajan vaikutus fluoresenssiin

Integraatioajan nostaminen vaikutti positiivisesti vasteeseen, mutta piikin muodossa esiintyi epätasaisuuksia. Kun integrointiaika oli yli 125 msec, heilahtelut aiheuttivat ongelmia (kuvio 14). Lopulliseksi arvoksi valittiin 125 msec.



Kuvio 14. Piikin heilahtelu integrointiajalla 200 msec

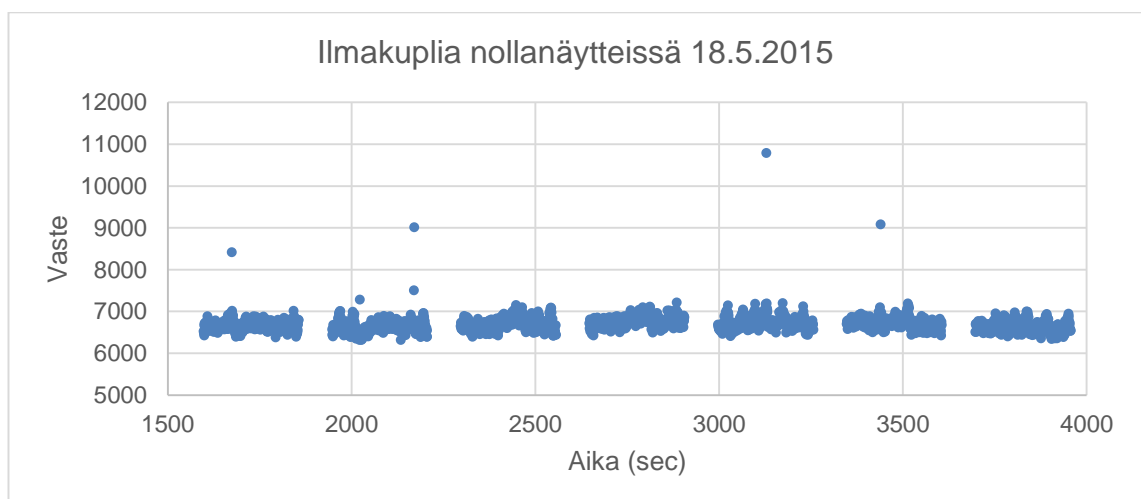
Kiniinisulfaattiliuoksella testattiin detektorin vakaus 20.5.2015 (kuvio 15). Kuvaajasta huomattiin, että vaste pienenee 0,27 yksikköä sekunnissa. Kalibrointikäyrän yhtälöstä saatiin selville, että 4500 sekunnin eli 75 minuutin aikana muutos on alle 2 %.



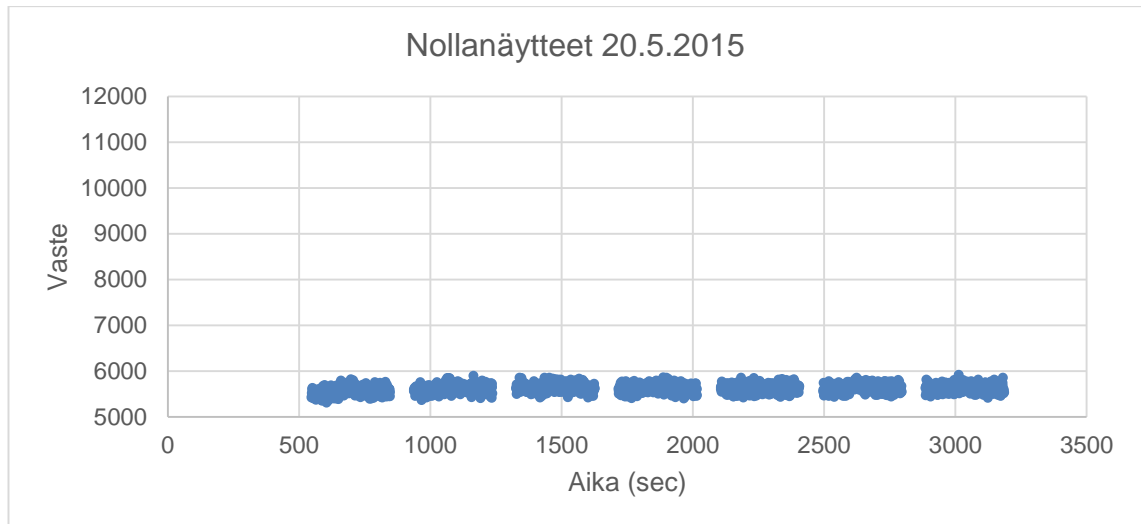
Kuvio 15. Detektorin toimintakyvyn testaus kiniinisulfaatilla

6.2.5 Vastapaineyksikkö

Reaktiosilmukkaan muodostuvien ilmakuplien vuoksi laitteeseen asennettiin vastapaineyksikkö 20.5.2015. Vastapaineyksikön myötä ilmakuplien määrä pieneni huomattavasti (kuviot 16 ja 17). Kaasudiffuusiokammioon muodostui kuitenkin liikaa painetta, joten uudeksi vastapaineyksiköksi valittiin 99 cm pitkä letku, joka oli kapeudeltaan 0,30 mm.



Kuvio 16. Nollanäytteiden ilmakuplia ilman vastapaineyksikköä



Kuvio 17. Nollanäytteiden ilmakuplattomuus vastapaineyksiköllä (180 cm, 0,20 mm)

Vastapaineyksikön aiheuttamaa muutosta tarkasteltiin laskemalla seitsemän nollanäytteen keskiarvo kahtena eri päivänä (taulukko 14). Ensimmäisenä päivänä (18.5.2015) vastapaineyksikköä ei ollut ja ilmakuplia esiintyi melko runsaasti, toisena koepäivänä (20.5.2015) ilmakuplia ei ollut juuri lainkaan vastapaineyksikön asentamisen jälkeen. Keskihajonta pieneni 54 % muutoksen myötä.

Taulukko 14. Vastapaineyksikön jälkeinen keskihajonnan muutos

	18.5.2015	20.5.2015	Muutos
Keskihajonta	180	83	- 54 %

6.2.6 Kaasudiffuusiokammion virtaussuunta

Alkuperäisessä menetelmäohjeessa nesteet liikkuvat samaan suuntaan kaasudiffuusiokammiossa. 8.4.2015 virtaus teflonteipin alla oleva OPA-virtaus vaihdettiin vastakaissuuntaiseksi, 7.4.2015 virtaus kulki vielä perinteisesti. Kumpanakin päivänä mitattiin rinnakkaisena 10 $\mu\text{mol/l}$ standardiliuos. Lopulliseksi muutosprosentiksi (taulukko 15) saatiin + 58 %.

Taulukko 15. Kaasudiffuusiokammion virtaussuuntien vaikutus intensiteettiin

	7.4.2015	8.4.2015	Muutos
Intensiteetti	14641	23143	+ 58 %

7 Yhteenveto

Lineaarisuutta tutkittiin valmistamalla kolme standardisuoraa pitoisuusalueella 1 µmol/l - 10 µmol/l (6.1.1). Mittauspisteiden tasaista jakautumista nollatason molemmille puolille tarkasteltiin käyttämällä Excel-ohjelmaa, jolla laskettiin residuaaliarvot. Tuloksista selvisi, että menetelmä on lineaarinen alueella 1 - 10 µmol/l. Residuaalit jakaantuivat kolmena eri päivänä tasaisesti nollatason kummallekin puolelle, mutta 11.6.2015 (kuvio 3) arvot olivat useammin negatiivisia kuin positiivisia. Yleensä kolme samanmerkkistä arvoa tarkoittaa epälineaarisuutta, rinnakkaisia käyttämällä määrä nousee kuuteen. Kuvaaja täyttää ehdon, vaikka se ei ole yhtä tasaisesti nollatason kummallekin puolelle jakautunut kuin kaksi muuta residuaalikuvaajaa. Lineaarisuuteen on voinut vaikuttaa esimerkiksi yksittäinen arvo, joka on vääristänyt tulosta. Standardisuorien selitysasteet olivat välillä 0,999 - 0,9995 (kuvio 1), joten pisteet osuivat kohtuullisen hyvin suoralle.

Lineaarisuutta tutkimalla voitiin myös tarkastella analyysimenetelmän herkkyyttä. Kuviossa 1 herkkyys on välillä 4061 - 7880, joten vaihtelua on runsaasti. Fluorometrinen menetelmä eroaa tältä osin huomattavasti spektrofotometrisestä, sillä fluorometrinen metodi on aina suhteellinen ja tulokset saattavat vaihdella paljon päivän aikaan. Eri päivien keskinäinen vaihtelu johtaa siihen, että toisinaan analyysimenetelmällä on mahdollista analysoida pienempiä pitoisuuksia ja toisinaan taas metodi ei ole yhtä tarkka.

Mittausalue saatiin selville mittaamalla standardisuoran saturoitumista. Uusi kalibroitinkäyrä valmistettiin pitoisuusalueelle 3,9 µmol/l - 1000 µmol/l, laimentamalla aina vahvasta puoleen. Lineaarinen metodi oli silloin, kun konsentraatio oli välillä 3,9 µmol/l - 62,5 µmol/l (kuvio 6). Kun fluoresenssi oli yli 460 000, alkoi kalibroitinkäyrän saturoituminen. Menetelmän herkkyyden vaihtelun vuoksi oli oleellista, että vahvempia kalibroitiliuoksia tehdessä kiinnitetään huomiota myös fluoresenssin arvoon pelkän konsentraation sijaan.

Määritys- ja toteamisraja laskettiin mittaamalla kolmena eri päivänä kymmenen nollanäytteen keskiarvojen keskiarvo ja standardisuoraa käyttämällä tulokset saatiin muutettua yksikköön $\mu\text{mol/l}$ (6.1.2). Määritysraja oli välillä $0,17 \mu\text{mol/l}$ - $0,20 \mu\text{mol/l}$, toteamisraja oli puolestaan $0,10 \mu\text{mol/l}$ - $0,13 \mu\text{mol/l}$. Määritysrajan keskiarvo oli $0,18 \mu\text{mol/l}$ ja toteamisrajan $0,12 \mu\text{mol/l}$, vertailuun käytetyn spektrofotometrisen menetelmän määritysraja oli $0,25 \mu\text{mol/l}$.

Korkeiden määritys- ja toteamisrajojen syynä oli lähinnä se, että pohjan heilahtelu oli varsin mittavaa (liite 1). Ilman suurta keskihajontaa määritys- ja toteamisrajat olisivat voineet olla hyvinkin paljon pienemmät. Nollanäytteiden suurelle keskihajonnalle ei keksitty erityistä selitystä, etenkin kun välillä vaste kasvoi ja välillä pieneni ajon edetessä. Nollanäytteiden keskiarvojen keskiarvoa käyttämällä tilanne kuitenkin vääristyi hieman, sillä tulokset näyttivät näin paremmilta. Menetelmän kehityksen ensimmäisinä päivinä huomattiin ilmakuplat, joiden vuoksi jouduttiin käyttämään keskiarvoa korkeimman arvon sijaan. Vaikka ilmakuplat saatiin paljon paremmin hallittua vastapaineyksikön myötä, silti jättydyttiin keskiarvoon tulosten vertailukelpoisuuden vuoksi. Näiden syiden vuoksi ehdotettiin, että määritysrajaksi tulisi $0,20 \mu\text{mol/l}$ ja toteamisrajaksi $0,14 \mu\text{mol/l}$.

Tarkkuutta (systemaattista virhettä) ja toistettavuutta (satunnaisvirhettä) analysoitiin mittaamalla kolmena eri päivänä referenssinäytettä, jonka konsentraatio oli $2,03 \mu\text{mol/l}$ ja suolapitoisuus 11 % (6.1.3). Suolapitoisten näytteiden kanssa oli kuitenkin ongelmia, joten referenssimateriaalin lisäksi laskuihin käytettiin myös kontrollinäytettä, jonka konsentraatio oli $4,16 \mu\text{mol/l}$ (6.1.4). Referenssiä käytettäessä tarkkuus piti laskea korjatuista pitoisuuksista, mutta toistettavuus voitiin aina laskea laitteen antamista tuloksista.

Referenssistä laskettu tarkkuus eli systemaattinen virhe oli 3,99 %, kontrollista laskettu tarkkuus puolestaan 2,05 %. Toistettavuus eli satunnaisvirhe oli 2,83 % referenssiä käyttämällä ja 3,91 % kontrollin kanssa (taulukko 6.) Tarkkuus ja toistettavuus olivat kaikilla mittauksilla melko hyvät. Kontrollin suuri keskihajonta aiheutti suuremman virheen toistettavuudessa, tarkkuudessa puolestaan referenssinäytteen keskiarvo ei ollut yhtä lähellä oikeaa arvoa. Liuosten matriisipohja tuntui vaikuttavan paljon tuloksiin. Referenssin kanssa epävarmuutta aiheutti suuresti suolapitoinen näyte, jolle ei löydetty yksiselitteistä kerrointa, lisäksi jouduttiin käyttämään suolapitoisuutta 10 % oikean arvon sijaan. Kontrollin tulokset olivat varmempia, mutta toisaalta kontrollinäytteitä oli vain viisi (5).

Mittausepävarmuutta tutkiessa mitattiin kahta eri kontrollinäytettä vähintään kolmena eri päivänä (6.1.4), sekä pienelle (0,2 - 2 µmol/l) että suurelle mittausalueelle (2 - 10 µmol/l) erikseen. Kontrollinäytteiden lisäksi käytettiin myös referenssinäytettä kummallekin pitoisuusalueelle (6.1.3). MUKit-ohjelma vaati erikseen rinnakkaismittauksia, joten näitä oli useampia laskuissa (liite 1). Pienelle mittausalueelle laskettu yhdistetty mittausepävarmuus oli 20 %, mittauslaitteen virhe (bias) oli 7,85 % referenssinäytteitä käyttämällä ja laboratorion sisäisten toistettavuuskokeiden hajonta oli 6,18 %. Suurella mittausalueella yhdistetty mittausepävarmuus oli puolestaan 19 %, mittauslaitteen virhe oli sama mutta laboratorion sisäisten toistettavuuskokeiden tulos oli 4,42 % (liite 3.)

Mittausepävarmuus oli melko suuri, mutta ei mikään mahdoton. Toistettavuuskokeiden suuret hajonnat nostivat virhettä, kuten myös referenssimateriaalin korkea virheprosentti (6,66 %). Referenssimateriaalia käyttämällä virheen mahdollisuus oli jatkuvasti läsnä yksiselitteisen suolakertoimen puuttumisen vuoksi. Epävarmuutta kontrollinäytteisiin toi niiden vähäinen määrä, mutta toistettavuuden arviointiin käytettyjä näytteitä oli 18 isolla alueella ja 23 pienellä. Rinnakkaismittauksissa näkyvät erot vastaavat varsin hyvin todellisuutta, sillä laskuihin käytettiin niin suolaisia merivesinäytteitä kuin standardisuoran pisteitä. Mittausepävarmuus oli pienissä pitoisuuksissa hieman suurempi kuin suurissa, joten odotukset osuivat siltä osin oikeaan.

Näytematriisin vaikutusta analysoitiin tekemällä erilaisia suolaliuoksia (6.1.5). Kahtena eri päivänä suolaliuoksena käytettiin trooppista merisuolaa, kolmantena ja neljäntenä kertana käytössä oli NaCl. Trooppista merisuolaa käytettäessä standardin 5 µmol/l vaste nousi suolapitoisuuden kasvun myötä, mutta ensimmäisessä kokeessa (taulukko 9) saantoprosentti oli 153 % kun näytteen pitoisuus oli 20 ‰ ja 146 % suolapitoisuuden ollessa 30 ‰. Toisella mittauksella (taulukko 10) trooppisen merisuolan pitoisuus nousi kohtuullisen tasaisesti, mutta saantoprosentti oli suurempi suolapitoisuudella 6 ‰ kuin 8 ‰. Trooppista merisuolaa käyttämällä ei saatu aikaan yksiselitteistä saantoprosenttia, sillä kahden eri päivän tuloksissa oli suuria eroja varsinkin korkeissa suolapitoisuuksissa. Rinnakkaisten mittausten välillä oli eroja, toisinaan huomattavasti. Saantoprosentit olivat välillä 122 % - 153 %, joten menetelmä reagoi voimakkaasti suolaan.

Saantoprosentti nousi huomattavasti myös silloin, kun käytössä oli pelkästään NaCl (taulukko 11). Vaste nousi melko tasaisesti, mutta tulokset eivät olleet erityisen verrannollisia trooppisen merisuolan kanssa. Saantoprosentti oli korkeimmillaan 194 %. Rinnakkaismittaukset olivat huomattavasti toistettavampia aikaisempaan trooppiseen merisuolaan

verratessa. Pelkkiä suolaliuoksia käyttämällä saantoprosentti oli korkeintaan 104 % (taulukko 12). Referenssimateriaalia (6.1.3, taulukko 6) käyttämällä todettiin, että suolapitoisuuden korjaus osuu melko hyvin kohdalleen. Hieman liian pieni tulos saattaa johtua muun muassa mittausepävarmuudesta, mutta korjauskerroin voi olla silti liian suuri.

Menetelmä reagoi suolaliuoksiin voimakkaasti, vedessä olevat epäpuhtaudet saattavat nostaa vastetta. Epäpuhtauksista muun muassa sulfiitin tiedetään nostavan vastetta, mutta toisaalta saantoprosentti nousi kaikista voimakkaimmin silloin, kun liuokset oli tehty NaCl:iin eikä suolaseoksesta koostuvaan trooppiseen merisuolaan. Tarkkaa syytä tähän ei vielä tiedetä, menetelmä tarvitsee lisää kehitystyötä erilaisten näytematriisien vaikutuksen selvittämiseksi. Vaihtoehtoisesti standardit voidaan valmistaa suoraan samaan liuokseen kuin missä näytteetkin ovat, mutta tämä vie enemmän aikaa.

Kahta eri menetelmää verratessa (6.1.6) käytössä oli sama referenssimateriaali (6.1.3), joka oli jo mainittu edellä. Spektrofotometrillä voitiin analysoida referenssinäyte ilman mittavaa epävarmuustekijää, sillä suolaisen näytteen korjauskerroin oli 1,04. Keskiarvoksi referenssille tuli 1,92 $\mu\text{mol/l}$ spektrofotometrillä, FIA-menetelmällä keskiarvo oli 1,95 $\mu\text{mol/l}$. Ero oli erittäin pieni, joten tulos oli varsin onnistunut. Suuresta epävarmuustekijästä johtuen kuitenkin ei voitu varmasti todeta, oliko tulos onnistunut sattumalta vai oliko korjauskerroin oikeassa. Rinnakkaismittauksia oli kuitenkin kaksi kolmena eri päivänä, joten täysin pelkästä sattumasta tuskin oli kyse.

Saantoprosenttia yritettiin määrittää pipetoimalla näytteiden päälle standardiliuosta niin, että ammoniumkonsentraatioksi tuli vähintään 1 $\mu\text{mol/l}$ tai jossain tapauksissa 7 $\mu\text{mol/l}$. Lisäsnäytteitä verrattiin käsittelemättömiin näytteisiin, mutta kunnollisia tuloksia ei saatu. FIA-laitteen kanssa oli silloin suuria ongelmia, sillä laitteen antama intensiteetti pieneni jatkuvasti ajon aikana. Tämä yksinään ei kuitenkaan selitä sitä, miksi lisäyksen tulokset olivat aivan liian pieniä ja toisinaan katosivat kokonaan. Yksi selitys katoavalle ammoniumille olivat näytteissä olevat kasvit ja levät, jotka käyttävät typpiyhdisteitä ravinnokseen. Tämä pyrittiin huomioimaan siten, että lisäsnäytteet valmistettiin noin 30 minuuttia ennen niiden ajoa. Tästä huolimatta 1 $\mu\text{mol/l}$ lisäys oli kadonnut kokonaan. 7 $\mu\text{mol/l}$ lisäys ei kadonnut kokonaan, mutta pitoisuus oli erittäin pieni.

Saantokokeen tuloksia ei käytetty validoinnissa, sillä laitteen ongelmat vaikuttivat liikaa. FIA-laitteen vaste tippui hyvin voimakkaasti muutaman tunnin sisällä kaikilla standardeilla ja kontrolleilla, joten tulosten luotettavuus ei ollut parhain.

Optimointiin kuului monta osaa, yksi niistä oli näytesilmukan pituus (6.2.1). Pituuden vaikutusta vasteeseen testattiin käyttämällä erilaisia näytesilmukoita. Eri kalibroitikäyrä tehtiin jokaiselle eri silmukan pituudelle, jolloin voitiin vertailla suorien kulmakertoimia. 25 cm pitkää näytesilmukkaa käyttämällä suoran kulmakerroin oli 1567, 100 cm pitkällä näytesilmukalla kerroin oli puolestaan 4659 (kuvio 7). Saturoitumista ei näkynyt kulmakertoimissa, sillä 50 cm ja 75 cm pitkillä näytesilmukoilla vaste nousi tasaisesti. Vasteen nousu ei kuitenkaan ollut ainut muutos, jota seurattiin. Piikkien muotoa tarkasteltiin jatkuvasti, mutta muutoksia ei esiintynyt. Näytti siltä, että näytesilmukkaa pidentämällä myös tulokset paranivat suuremman vasteen myötä.

Hyvien tulosten vuoksi näytesilmukan pituutta testattiin vielä uudestaan. Käytössä olivat 100 cm ja 150 cm pitkät näytesilmukat. 100 cm pitkällä näytesilmukalla suoran kulmakerroin oli 4077 ja 150 cm pitkällä puolestaan 4823 (kuvio 8). Mitään vaikutuksia piikkien muotoihin ei havaittu pidemmälläkään näytesilmukalla. Tulosten perusteella voitiin olettaa, että laimentumista tapahtui paljon. Jos näyte oli yhtä vahvaa jatkuvasti, silloin kuvaaja ei olisi ollut piikki vain pikemminkin muodoltaan neliömäinen. Luultavasti pidemmillä näytesilmukoilla laimentumista ei olisi päässyt tapahtumaan yhtä suuressa mitta-kaavassa, jolloin piikkien muodot olisivat alkaneet kärsiä. Tulosten perusteella oikeaksi näytesilmukan pituudeksi valittiin 150 cm, sillä myös ajoaika pidentyi pituuden myötä.

Pumpun nopeutta testattiin valmistamalla eri nopeuksille standardisuorat, jolloin voitiin verrata suorien kulmakertoimia (6.2.2). Pumpun nopeus vaihteli välillä 15 % - 35 %, mittaukset suoritettiin aina viiden (5) prosentin välein. Kulmakerroin oli 1766 kun nopeus oli 15 % ja 707 nopeuden ollessa 35 % (kuvio 9). Kulmakerroin pieneni voimakkaasti siirryttäessä suurempiin nopeuksiin. Tämä oli oletettavissa, sillä pidemmällä ajanjaksolla ammonium kerkesi reagoimaan paremmin johdosreagenssin OPA:n kanssa. Nopeudella 15 % piikin muoto vääristyi, jolloin tulokset eivät olleet enää niin hyviä (kuvio 10). Muodon vääristyminen johtui luultavasti siitä, että hitaamman nopeuden vuoksi virtaus ei ollut enää niin tasaista. Tämän pystyi huomaamaan paljaalla silmällä, sillä hitaissa nopeuksissa virtaus ei ollut tasaista vaan liikkui nykien. Lopulliseksi pumpun nopeudeksi valittiin näillä perusteilla 20 %.

Lämpötilaa tarkasteltiin mittaamalla standardisuora eri asteissa (6.2.3). Ohjelma aloitettiin lämpötilasta 50 °C ja sitä nostettiin aina viiden (5) asteen välein. 75 °C oli ohjelman lopullinen lämpötila. Kulmakerroin oli 700 lämpötilalla 50 °C, 1753 kun lämpötila oli 65 °C ja 1852 lämpötilassa 75 °C (kuvio 11). Saturoitumista selkeästi tapahtui, sillä pienissä

asteissa vaste nousi nopeammin korkeisiin verrattuna. Saturoitumisen lisäksi piikkien muodoissa havaittiin muutoksia, sillä korkeissa lämpötiloissa muoto ei ollut tarpeeksi symmetrinen (kuvio 12). Ongelmat johtuivat luultavasti osittain ilmakuplista, sillä lämpötilan noustessa ilmakuplia muodostui reaktiosilmukkaan huomattavasti enemmän kuin aikaisemmin. Kun lämpötila oli 65 °C, ilmakuplien määrä oli suhteellisen pieni, vaste tarpeeksi korkea ja piikkien muoto hyvä. Lopulliseksi lämpötilaksi valikoitui 65 °C.

Detektorin asetuksia testattiin muuttamalla integraatioaikaa alueella 50 msec - 200 msec (6.2.4). Integraatioajan muutoksen tarkasteluun käytettiin pelkästään standardin antamaa vastetta, josta vähennettiin pohjan korkeus. Kun integraatioaika oli 50 msec, vaste oli 3752 ja 15 412 integraatioajalla 200 msec (kuvio 13). Muutos oli erityisen suuri, vaste nousi voimakkaasti integraatioajan noston myötä. Integraatioaikaa pidentäessä dataa kerääntyi enemmän, jolloin arvot luonnollisesti kasvoivat. Haittapuolena olivat mahdolliset ilmakuplat ja muut häiriötekijät, jotka saattoivat näkyä helpommin mittauksissa. Tämän huomasi tuloksia tarkastellessa, sillä integraatioajalla 200 msec piikin muodossa näkyi epäsäännöllisiä alueita (kuvio 14). Piikkien muotojen vuoksi valittiin lopulliseksi arvoksi 125 msec, vaikka vaste oli parempi integraatioajan ollessa suurempi.

Detektorin tasaisuutta tutkittiin kiniinisulfaattiliuoksella. Kiniinisulfaattiliuos pidettiin kyvetissä 45 minuutin ajan, vastetta tutkittiin jatkuvasti. Vasteen laskusta piirrettiin kuvaaja, jolloin voitiin arvioida, kuinka tasainen detektori on. Tuloksista nähtiin, että vaste laskee ajan myötä, mutta vain 0,27 yksikköä sekunnissa (kuvio 15). Aikaan suhteutettuna virhe oli 2 %. FIA-laitteen kanssa oli intensiteettiongelmia, sillä vaste tippui ajon myötä, toisinaan hyvin huomattavasti. Detektorin virhe ei selitä silti kaikkia ongelmia.

Vastapaineyksikköä pohdittiin laitettavaksi ilmakuplien vuoksi, sillä reaktiosilmukassa liikkuva neste ei pysynyt enää tarpeeksi yhtenäisenä linjana. Vastapaineyksikön vaikutusta testattiin analysoimalla seitsemän nollanäytettä ennen ja jälkeen asennuksen (6.2.5). Ilmakuplien määrän väheneminen oli havaittavissa silmin, vastapaineyksikön asentamisen jälkeen niitä näkyi vain muutama. Nollanäytteiden keskihajonnat laskettiin erikseen kummallekin päivälle, jolloin voitiin verrata muutosta käytännössä. Tulosten perusteella keskihajonta pieneni 54 % vastapaineyksikön kanssa (taulukko 14).

Vastapaineyksikköä käyttämällä muutos oli mittava, mutta toisinaan kaasudiffuusiokammio ja letkujen liitokset keräsivät itseensä painetta. Laite saattoi vuotaa, vaikka letkuja ja ruuveja kiristettiin, lisäksi reaktiosilmukassa neste liikkui sykähdyksittäin. Linjastojen

vuotojen vuoksi vaihdettiin toiseen vastapaineyksikköön, joka ei ollut yhtä kapea ja pitkä. Uudella yksiköllä ilmakuplia ei näkynyt muutamaa lukuun ottamatta eikä vuotoja ei tapahtunut samalla tavalla, lisäksi reaktiosilmukassa oleva neste liikkui jälleen tasaisesti.

Kaasudiffuusiokammion toimivuutta testattiin kokeilemalla, mitä virtaussuuntien muutos saa aikaan (6.2.6). Ensimmäisessä kokeessa virtaus kulki samaan suuntaan teflon-kalvon molemmin puolin, toisena päivänä vaihdettiin OPA-virtauksen suuntaa. Intensiteettiero oli varsin huomattava, sillä vastakkaissuuntaisella virtauksella muutos oli + 58 % (taulukko 15). Vastakkaissuuntainen virtaus saattaa aiheuttaa enemmän painetta, jolloin ammoniakki siirtyy helpommin teflon-kalvon läpi OPA-virtaan.

Menetelmän kehityksessä törmättiin monenlaisiin ongelmiin. Suurimmat ongelmat liittyivät intensiteetin laskuun, näytematriisin saanto-ongelmiin sekä mittaustulosten epätasaisuuteen. Optimointi sujui helpommin kuin validointi, jota jouduttiin jatkamaan varsin pitkään näytematriisin testauksen ja kontrollien osalta.

Intensiteetin lasku näkyi selkeästi tuloksissa vastapaineyksikön asentamisen jälkeen. Kahden tunnin aikana rinnakkaisissa kontrollinäytteissä saattoi tapahtua 50 % lasku. Ongelmaa yritettiin ratkaista tarkastamalla linjastojen liitokset ja katsomalla, että neste varmasti virtasi tasaisesti. Suurimpien intensiteetti-ongelmien aikana kaasudiffuusiokammio usein vuosi, vaikka ruuveja oli kiristetty. Ongelma saatiin lopulta ratkaistua niin, että venttiili ja kaasudiffuusiokammio puhdistettiin sisältä, letkujen päät tasattiin ja kaikki liittimet kiinnitettiin käyttämällä ruuvimeisseliä kevyesti. Ilman työkalua kiristäessä linjastoihin jäi luultavasti paineeltaan erilaisia alueita, jolloin vuotoja esiintyi. Lopuksi kokeiltiin ajaa standardia 5 $\mu\text{mol/l}$ useita peräkkäin, tuloksissa ei näkynyt enää ongelmia.

Suolapitoisuuden ongelmat jäivät osittain ratkaisematta. Vaikka hajontaa tuloksissa oli jonkin verran, silti referenssinäytteen suolakorjausprosentti saattoi osua melko hyvin kohdalleen. Saantoprosentti oli ensimmäisellä kerralla 131 % (6.1.5, taulukko 9) ja toisella kerralla 129 % (taulukko 10), kun suolapitoisuus promilleina oli 10. Tuloksista nähtiin, että kahdella eri menetelmällä tulos oli varsin sama (6.1.6, taulukko 13). Vaikka suolanäytteiden kanssa kysymyksiä jäi paljon, silti tulosten valossa näyttää siltä, että ainakin joltain osin onnistuttiin löytämään oikea korjauskerroin. Pelkästä sattumasta tuskin oli kyse. Näytematriisi kuitenkin tuntui vaikuttavan hyvin voimakkaasti esimerkiksi saantonäytteisiin, sillä lisätty ammonium katosi tunnin sisällä lähes kokonaan. Meressä olevat kasvit ja levät saattoivat käyttää ammoniumia ravinnokseen, mutta tuskin niin nopeasti.

Koko FIA-analyysiä varjostava ongelma oli tulosten epätasaisuus. Ajon aikana näkyvät pohjaviivan heilahtelut vaikeuttivat analyysiä huomattavasti, toisinaan myös kontrollin tulokset olivat kummallisia ja piikeissä esiintyi satunnaisesti epäsymmetrisyyttä. Ongelmaa oli hankala poistaa, mutta osittain vakautta onnistuttiin lisäämään. Kun OPA suodatettiin boraattiliuokseen pelkästään pipetoimisen sijaan, toisinaan näkyvät hiukkaset katosivat. Reagenssi 2 valmistettiin aina niin, että se sai olla vähintään 24 tuntia sekoittumassa. Pumppuletkujen vaihdolla oli myös merkitystä, letkujen piti olla jatkuvasti kireitä. Toimenpiteiden jälkeen pohjaviiva oli vakaampi, mutta ongelmia silti esiintyi edelleen. Usein mitattiin 2 - 3 nollanäytettä ennen varsinaisen ajon alkua, jolloin laite kerkesi tasaantua.

Ennen FIA-menetelmän kehitystä odotukset olivat pienen määritysrajan lisäksi myös laajassa mittausalueessa. Validoidun menetelmän lineaarinen mittausalue ylittää varsin korkealle (62,5 $\mu\text{mol/l}$), mutta ei ihan leväkasvatuksen vaatimiin pitoisuuksiin (1000 $\mu\text{mol/l}$). Levänäytteitä voidaan aina laimentaa tai vastaavasti validoida laite vahvemmille pitoisuuksille esimerkiksi pienentämällä detektorin lämpötilaa. Työn yksi tavoitteista ei kuitenkaan täytynyt - jatkuvatoimisiin mittauksiin FIA-laite tuskin soveltui. Jatkuvatoimissa mittauksissa laite voisi itse mitata aktiivisesti näytteitä, mutta niin automaattinen menetelmä ei ole. Tulosten laatua on jatkuvasti tarkkailtava mahdollisten epätasaisuuksien vuoksi, lisäksi OPA saattaa kiteytyä linjastoihin virtauksen pysähtyessä.

Laitteessa havaittiin toisinaan pieniä vaaleita kiteitä kaasudiffuusiokammiossa ja ruskeita kiteitä linjastoissa. Ruskeat kiteet ovat luultavasti kiteytynyttä OPA:a, vaaleat puolestaan reaktioissa syntyneitä sivutuotteita. Kaasudiffuusiokammion lisäksi vaaleita kiteitä esiintyi myös venttiilin sisällä. Ruskeat OPA-kiteet aiheuttivat selkeästi virtausnopeuksien muutosta, mutta valkoisten kiteiden aiheuttamat vaikutukset eivät tulleet esille.

Ongelmista huolimatta menetelmää saatiin kehitettyä huomattavasti eteenpäin. Vastetta saatiin paljon ylöspäin, näytteitä onnistuttiin analysoimaan ja validointikin onnistui suurimmaksi osaksi hyvin. FIA-menetelmän seuraava kehityskohde on selkeästi suolapitoisuuden testaus. Jos yleispätevää suolapitoisuuden korjauskerrointa ei saada aikaiseksi, standardiliuokset voidaan aina valmistaa samaan näytematriisiin tai vastaavasti kokeilla saantonäytteitä. Saantonäytteiden ongelmiin ratkaisu voisi olla joko suodatus tai sentrifugointi steriileillä suodattimilla.

Lähteet

Bernhard, A. 2010. The Nitrogen Cycle: Processes, Player, and Human Impact. Nature Education Knowledge [verkkojulkaisu]. Viitattu 8.10.2015. Saatavissa: <http://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-nitrogen-cycle-processes-players-and-human-15644632>.

Cerdà, V., Ferrer, L., Avivar, J. & Cerdà, A. 2014. Flow Analysis A Practical Guide. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier. 288 s. ISBN 978-0-444-59596-6.

Ehder, T. 2005. Kemia metrologian opas. Mikes Metrologia J6/2005. Helsinki: Kemia ja mikrobiologian jaosto & kemian työryhmä.

Felix, E. & Cardoso, A. 2012. A Method for Determination of Ammonia in Air using Oxalic Acid-Impregnated Cellulose Filters and Fluorimetric Detection. Journal of the Brazilian Chemical Society. Vol 23:1. S. 142 - 147.

Grasshoff, K. 1976. Methods of Seawater Analysis. New York & Weinheim: Verlag Chemie. 317 s. ISBN 3-527-25631-8.

Hansen, P. & Nielsen, V. 1939. Colorimetric determination of ammonia with thymol-hypobromite reagent. J. Biol. Chem. S. 309 - 316.

Harris, D. 2010. Quantitative Chemical Analysis. 8. p. New York, USA: W.H. Freeman and Company. 750 s. ISBN 978-1-4292-1815-3.

Holmes, R., Aminot, A., Kérouel, R., Hooker, B. & Peterson, B. 1999. A Simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. Vol 56:10. S. 1801 - 1808.

Itämeren typpikuorma Suomesta 1970-2013. 2014. Suomen ympäristökeskus SYKE [verkkojulkaisu]. Viitattu 10.9.2015. Saatavissa: http://www.ymparisto.fi/fi-FI/Meri/Mika_on_Itameren_tila/Itameren_typpikuorma_Suomesta_19702013%2831457%29

Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. 5. - 6. p. Helsinki: Edita Prima Oy. 223 s. ISBN 978-951-37-4445-8.

Jeong, H., Park, J. & Kim, H. 2013. Determination of NH₄⁺ in Environmental Water with Interfering Substances Using Modified Nessler Method. Journal of Chemistry [verkkojulkaisu]. Viitattu 11.9.2015. Saatavissa: <http://www.hindawi.com/journals/jchem/2013/359217>.

Kolev, S. & McKelvie, I. 2008. Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier. 808 s. ISBN 978-0-444-53094-3.

Koroleff, F. 1979. Meriveden yleisimmät kemialliset analyysimenetelmät. 7. p. Helsinki: Merentutkimuslaitos. 60 s. ISBN 951-46-4543-X.

Merikeskus. 2013. SYKE Suomen ympäristökeskus [verkkajulkaisu]. Viitattu 10.9.2015. Saatavissa: http://www.syke.fi/fi-FI/SYKE_Info/Organisaatio/Merikeskus%282646%29

Pitkänen, H. 2008. Itämeren rehevöityminen - onko mitään tehtävissä?. Tieteessä tapahtuu. Vol 26:5. S. 21 - 25.

Suomen sisävedet ja Itämeri pilaantuvat herkästi. Biologian ja maantieteen opettajien liitto [verkkajulkaisu]. Viitattu 12.9.2015. Saatavissa: https://peda.net/yhdistykset/bmoly/koulutus/eyy/yhteinen_ymparisto/rehev%C3%B6ityminen

Wetzel, R. 1975. Limnology. 2. p. Orlando, USA: Saunders College Publishing. 767 s. ISBN 0-03-057913-9.

Yebra-Biurrun, M. 2009. Flow Injection Analysis of Marine Samples. New York, USA: Nova Science Publishers, Inc. 312 s. ISBN 978-1-60741-506-0.

Validoinnin primääriset mittaustulokset**Standardisuorat**

Taulukko 16. 18.5.2015, 26.5.2015 ja 29.5.2015 valmistettujen standardisuurien mittauspisteet

Pitoisuus ($\mu\text{mol/l}$)	Vaste 18.5.2015	Pitoisuus ($\mu\text{mol/l}$)	Vaste 26.5.2015	Pitoisuus ($\mu\text{mol/l}$)	Vaste 29.5.2015
0,00	5635,03	0,00	5494,06	0,00	11002,80
3,91	31802,47	0,50	9554,89	1,00	18123,26
3,91	32351,77	0,50	9350,97	1,00	18089,56
7,81	58114,09	0,50	9469,10	5,00	46258,01
7,81	58763,89	1,00	12765,17	5,00	47406,18
15,63	126581,30	1,00	13120,36	10,00	88721,04
15,63	124226,00	1,00	12892,17	10,00	88451,46
31,25	235755,70	2,00	20205,90		
31,25	236250,00	2,00	20211,74		
62,50	453208,10	2,00	20300,11		
62,50	459231,00	5,00	42707,70		
125,00	871520,10	5,00	43761,50		
125,00	860662,80	5,00	44619,83		
250,00	1538633,00	7,00	60748,21		
250,00	1528143,00	7,00	61361,24		
500,00	2453345,00	7,00	60524,54		
500,00	2460568,00	10,00	83560,70		
1000,00	3333638,00	10,00	83772,10		
1000,00	3395721,00	10,00	83953,45		

Taulukko 17. 1.6.2015, 3.6.2015, 11.6.2015 ja 12.6.2015 valmistettujen standardisuurien arvot

Pitoisuus (µmol/l)	Vaste 1.6.2015	Vaste 3.6.2015	Vaste 11.6.2015	Vaste 12.6.2015
0,00	8443,11	38072,11	6175,49	5385,18
1,00	16295,37	44938,30	10568,37	9508,69
1,00	16898,61		10446,23	9565,30
2,00	22563,94	52856,23	15126,90	13464,63
2,00	22405,88		15081,97	13374,61
5,00	46608,69	72663,77	29515,40	25553,18
5,00	48256,84		28447,47	25308,05
7,00	62700,13	87601,25	38017,76	34027,80
7,00	62018,80		37519,40	33072,56
10,00	87116,09	111627,30	50932,07	46488,38
10,00	87340,71		50740,41	45925,35

Residuaalit

Taulukko 18. 18.5.2015, 1.6.2015, 11.6.2015 ja 12.6.2015 tehtyjen residuaalikuvaajien arvot

Päivämäärä	Pitoisuus	Ennustettu	Residuaali
18.5.2015	0,00 µmol/l	6184,78	-549,75
	3,91 µmol/l	34473,28	-2670,81
	3,91 µmol/l	34473,28	-2121,51
	7,81 µmol/l	62761,78	-4647,69
	7,81 µmol/l	62761,78	-3997,89
	15,62 µmol/l	119338,77	7242,53
	15,62 µmol/l	119338,77	4887,23

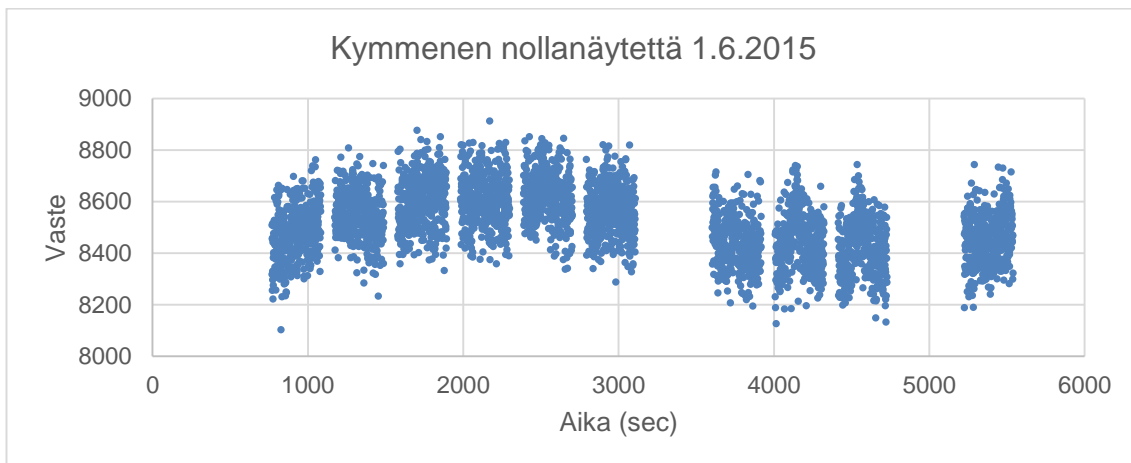
	31,25 µmol/l	232492,75	3262,95
	31,25 µmol/l	232492,75	3757,25
	62,50 µmol/l	458800,71	-5592,61
	62,50 µmol/l	458800,71	430,29
1.6.2015	0,00 µmol/l	7871,32	571,79
	1,00 µmol/l	15752,59	542,78
	1,00 µmol/l	15752,59	1146,02
	2,00 µmol/l	23633,87	-1069,93
	2,00 µmol/l	23633,87	-1227,99
	5,00 µmol/l	47277,69	-669,00
	5,00 µmol/l	47277,69	979,15
	7,00 µmol/l	63040,23	-340,10
	7,00 µmol/l	63040,23	-1021,43
	10,00 µmol/l	86684,05	432,04
	10,00 µmol/l	86684,05	656,66
11.6.2015	0,00 µmol/l	6191,94	-16,45
	1,00 µmol/l	10681,14	-112,77
	1,00 µmol/l	10681,14	-234,91
	2,00 µmol/l	15170,34	-43,44
	2,00 µmol/l	15170,34	-88,37
	5,00 µmol/l	28637,95	877,45
	5,00 µmol/l	28637,95	-190,48
	7,00 µmol/l	37616,36	401,40
	7,00 µmol/l	37616,36	-96,96
	10,00 µmol/l	51083,97	-151,90

	10,00 µmol/l	51083,97	-343,56
12.6.2015	0,00 µmol/l	5308,95	76,22
	1,00 µmol/l	9374,46	134,23
	1,00 µmol/l	9374,46	190,85
	2,00 µmol/l	13439,96	24,67
	2,00 µmol/l	13439,96	-65,35
	5,00 µmol/l	25636,48	-83,30
	5,00 µmol/l	25636,48	-328,43
	7,00 µmol/l	33767,49	260,31
	7,00 µmol/l	33767,49	-694,93
	10,00 µmol/l	45964,00	524,38
	10,00 µmol/l	45964,00	-38,65

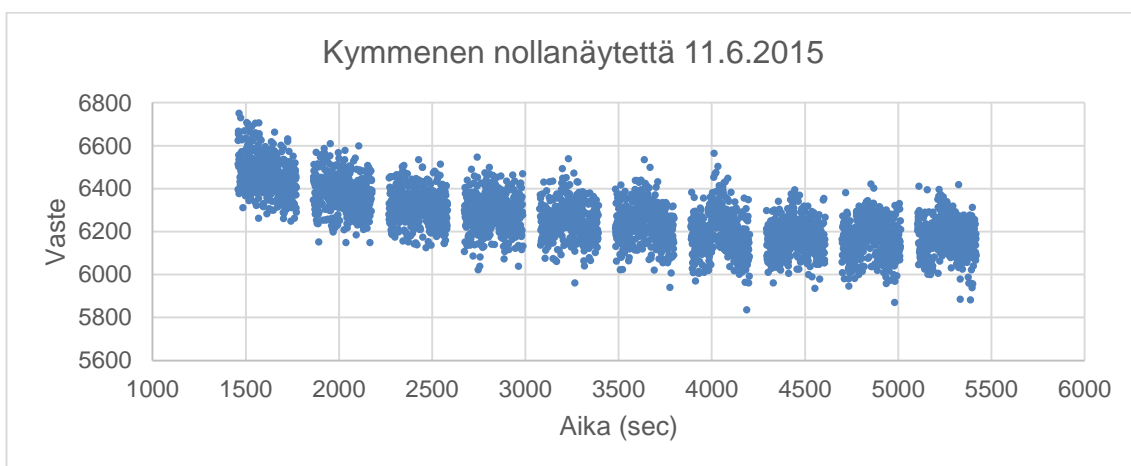
Toteamis- ja määrittämissrajat

Taulukko 19. 1.6.2015, 11.6.2015 ja 12.6.2015 mitattujen nollanäytteiden vasteiden keskiarvot

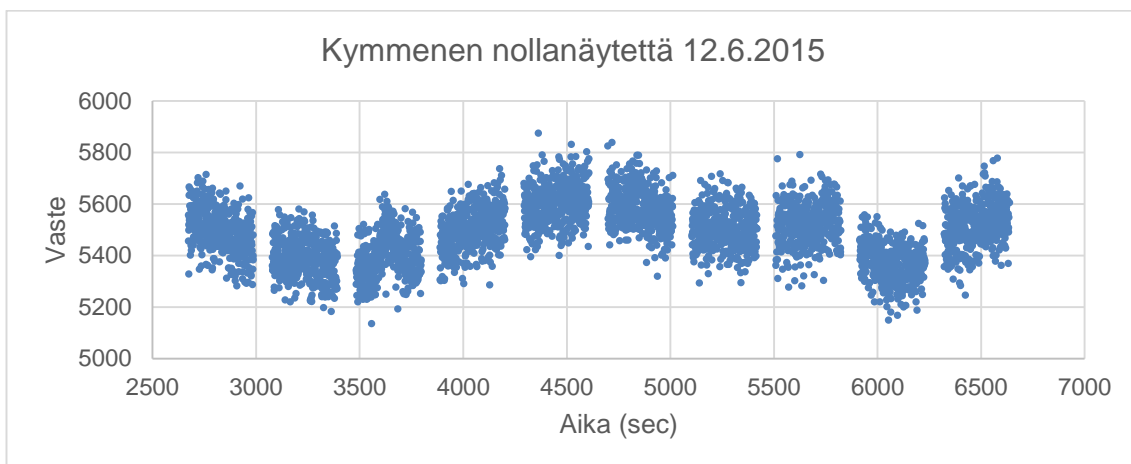
	Vaste 1.6.2015	Vaste 11.6.2015	Vaste 12.6.2015
Keskiarvo	8519,11	6264,56	5489,83
Keskihajonta	123,42	127,40	109,59



Kuvio 18. 1.6.2015 laskettuun määritys- ja toteamisrajaan käytetyt nollanäytteet



Kuvio 19. 11.6.2015 laskettuun määritys- ja toteamisrajaan käytetyt nollanäytteet



Kuvio 20. 12.6.2015 laskettuun määritys- ja toteamisrajaan käytetyt nollanäytteet

Mittausepävarmuus

Taulukko 20. Suuremman kontrolliliuoksen (4,16 µmol/l) vasteet

	Vaste 29.5.2015	Vaste 1.6.2015	Vaste 3.6.2015
Mittaus 1	43361,27		69131,52
Mittaus 2	43102,43	42295,97	66422,88

Taulukko 21. Pienemmän kontrolliliuoksen (0,42 µmol/l) vasteet ja pitoisuudet (µmol/l)

	1.7.2015	7.7.2015	8.7.2015	9.7.2015	10.7.2015
Vaste	14331,17	12480,87	16655,96	15993,68	15906,16
Pitoisuus	0,49	0,43	0,45	0,49	0,49

Taulukko 22. MUKit-ohjelmassa käytettyjen rinnakkaismittausten konsentraatiot (µmol/l)

	Pieni pitoisuusalue			Suuri pitoisuusalue	
26.5.2015	1,90	1,86	26.5.2015	1,90	1,86
	0,55	0,52		1,91	1,91
	1,00	0,97		4,77	4,91
	1,91	1,91		7,07	7,15
29.5.2015	1,99	1,96	29.5.2015	9,98	10,01
	0,95	0,95		1,99	1,96
1.6.2015	2,01	1,97	29.5.2015	4,30	4,27
	1,04	1,12		4,63	4,78
	1,84	1,82		10,17	10,14
8.7.2015	0,27	0,24	1.6.2015	2,01	1,97
	0,23	0,24		4,90	5,11

	0,21	0,22		6,96	6,87
9.7.2015	0,28	0,26		10,07	10,10
	0,26	0,26	3.6.2015	4,33	3,96
	0,24	0,24	8.7.2015	3,20	3,12
	0,25	0,25		2,53	2,40
	1,16	1,18		2,84	2,90
	0,25	0,26		2,07	2,15
	1,33	1,24			
	0,24	0,24			
	10.7.2015	0,21	0,20		
0,21		0,21			
0,24		0,24			

Näytematriisi

Taulukko 23. 22.5.2015 mitattujen suolaliuosten arvot

Suolapit.	0 ‰	2 ‰	4 ‰	6 ‰	8 ‰	10 ‰	20 ‰	30 ‰
Mittaus 1	44255	54246	54420	53804	55878	58901	71281	62449
Mittaus 2	44163	53879	53497	54462	56587	57201	64420	66757
Keskiarvo	44209	54062	53959	54133	56233	58051	67850	64603

Taulukko 24. 2.6.2015 mitattujen suolaliuosten arvot

Suolapit.	0 ‰	2 ‰	4 ‰	6 ‰	8 ‰	10 ‰	20 ‰	30 ‰
Mittaus 1	81534	98005	103090	112645	106572	102653	106647	111153
Mittaus 2	78546	99679	105940	105661	106781	103146		
Keskiarvo	80040	98841	104514	109153	106676	102899	106647	111153

Taulukko 25. 3.7.2015 mitattujen suolaliuosten arvot

	0 ‰	2 ‰	4 ‰	6 ‰	8 ‰	10 ‰	20 ‰	30 ‰
Mittaus 1	28429	31816	36232	40127	41881	45904	52930	55096
Mittaus 2	28322	32013	36662	40417	41990	45912	52227	55474
Keskiarvo	28375	31914	36447	40272	41936	45908	52579	55285

Taulukko 26. 6.7.2015 mitattujen suolaliuosten arvot

	0 ‰	2 ‰	4 ‰	6 ‰	8 ‰	10 ‰	20 ‰	30 ‰
Mittaus 1	10976	11177	11488	11466		11778	11947	11483
Mittaus 2	11057	11192	11171	11290	11472	11891		11470
Keskiarvo	11017	11184	11330	11378	11472	11835	106647	11477

Kahden eri menetelmän vertailu, referenssinäyte

Taulukko 27. 28.5.2015 - 1.6.2015 saadut mittaustulokset spektrofotometriltä absorbanssina

	1x reag	2x reag	Kontrolli 0,42 µM	Kontrolli 4,16 µM	Standardi 1 µM	Standardi 5 µM	Referenssi	Referenssi
28.5.2015	0,06	0,10	0,10	0,43	0,15	0,53	0,23	0,22
29.5.2015	0,06	0,10	0,10	0,43			0,25	0,25
1.6.2015	0,06	0,10	0,10	0,45			0,24	0,24

Taulukko 28. 26.5.2015, 29.5.2015 ja 1.6.2015 saadut referenssitulokset FIA-menetelmällä

	Vaste 26.5.2015	Vaste 29.5.2015	Vaste 1.6.2015
Mittaus 1	26140,02	31653,99	30177,83
Mittaus 2	25726,21	31334,13	29776,78

Optimoinnin primääriset mittaustulokset

Näytesilmukan pituus

Taulukko 29. 23.4.2015 mitatut vasteet eri näytesilmukan pituuksilla

	25 cm	50 cm	75 cm	100 cm
0 µmol/l	9017	10004	9391	9153
5 µmol/l	16880	23681	26986	31254
5 µmol/l	16256	23242	27006	31845
10 µmol/l	25349	35819	46783	55148
10 µmol/l	23874	35850	44106	55890

Taulukko 30. 11.5.2015 mitatut vasteet eri näytesilmukan pituuksilla

	100 cm	150 cm
0 µmol/l	7464	7515
5 µmol/l	27537	32532
5 µmol/l	27585	31473
10 µmol/l	48237	56363
10 µmol/l		55319

Pumpun nopeus

Taulukko 31. 23.4.2015 mitatut vasteet eri pumpun nopeuksilla

	15 %	20 %	25 %	30 %	35 %
0,00 µmol/l	5732,69	5462,93	5354,02	5161,18	4947,82
5,00 µmol/l	13426,40	13818,37	12300,6	8965,83	8558,06

5,00 µmol/l	14684,22	14180,01	12629,52	9677,84	8248,14
25,00 µmol/l	51745,83	42826,88	42589,56	32012,19	21735,00
25,00 µmol/l	54383,86	42160,99	37856,15	30353,16	27059,18
50,00 µmol/l	103494,60	73367,52	67040,53	60245,33	42590,86
50,00 µmol/l	83406,95	84460,1	76022,71	64061,08	37657,46

Lämpötilan vaikutus

Taulukko 32. 22.4.2015 mitatut vasteet eri lämpötiloissa

	50 °C	55 °C	60 °C	65 °C	70 °C	75 °C
0 µmol/l	5767	5916	6114	5988	6046	6125
5 µmol/l	9400	11844	14312	15032	14939	16668
5 µmol/l	12123	11447	13636	14988	16290	14631
25 µmol/l	22418	35782	45657	47808	67004	50449
25 µmol/l	25136	34764	47936	47332	48684	54041
50 µmol/l	42900	63825	78257	95603	101888	98437
50 µmol/l	40501	62791	71892	92367	92955	99362

Detektor

Taulukko 33. 8.5.2015 mitatut vasteet eri integraatioajoilla

	50 msec	75 msec	100 msec	125 msec	150 msec	200 msec
0 µmol/l	4431	6961	9017	10494	13155	17462
5 µmol/l	8183	12838	16256	19288	25036	32874

Mittausepävarmuus MUKit-ohjelmalla

Pieni lineaarisuusalue (0,20 µmol/l - 2 µmol/l)

Step	Action	Measurand	7.10.2015																				
1	Specify Measurand	Concentration range: 0,2 - 2																					
2	Quantify within-laboratory reproducibility, $u(R_w)$ A: Control sample B: Possible steps not covered by control sample	<p>A: Control samples: Matrix: Ultrapuhdas vesi Period of measurements: 24.6.2015 - 10.7.2015 Number of control samples: 5 Average concentration: 0,469 Standard deviation, S_{Rw} : 5,50 %</p> <p>B: Routine replicate samples : Period of measurements: 26.5.2015 - 10.7.2015 Number of routine replicate samples: 23 Number of parallel measurements: 2 Concentration range: 0,2065 - 1,990954 Standard deviation estimate from range, S_r : 2,82 %</p> $u(R_w) = \sqrt{S_{Rw}^2 + S_r^2} = 6,18 \%$																					
3	Quantify method and laboratory bias, $u(bias)$	<p>Method and laboratory bias from certified reference material: Different certified reference materials count, N : 1</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>i</th> <th>1</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Certified concentration, $c_{ref\ i}$</td> <td>2,03</td> </tr> <tr> <td>Standard uncertainty of certified concentration, $u(c_{ref\ i})$</td> <td>6,66 %</td> </tr> <tr> <td>Measured concentration, c_i</td> <td>1,949000</td> </tr> <tr> <td>Standard deviation of measured concentration, S_{bias}</td> <td>2,83 %</td> </tr> <tr> <td>Number of Measurements, n_i</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>$bias_i = \frac{c_i - c_{ref\ i}}{c_{ref\ i}} \cdot 100\%$</td> <td>-3,99 %</td> </tr> <tr> <td>Period of measurements</td> <td>26.5.2015 - 1.6.2015</td> </tr> <tr> <td>Matrix</td> <td>Suolapitoinen vesi, 11 promillea</td> </tr> <tr> <td>Additional information</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> $u(bias) = \sqrt{bias_1^2 + \left(\frac{S_{bias_1}}{\sqrt{n_1}}\right)^2 + u(c_{ref\ 1})^2} = 7,85 \%$		i	1	Certified concentration, $c_{ref\ i}$	2,03	Standard uncertainty of certified concentration, $u(c_{ref\ i})$	6,66 %	Measured concentration, c_i	1,949000	Standard deviation of measured concentration, S_{bias}	2,83 %	Number of Measurements, n_i	6	$bias_i = \frac{c_i - c_{ref\ i}}{c_{ref\ i}} \cdot 100\%$	-3,99 %	Period of measurements	26.5.2015 - 1.6.2015	Matrix	Suolapitoinen vesi, 11 promillea	Additional information	
i	1																						
Certified concentration, $c_{ref\ i}$	2,03																						
Standard uncertainty of certified concentration, $u(c_{ref\ i})$	6,66 %																						
Measured concentration, c_i	1,949000																						
Standard deviation of measured concentration, S_{bias}	2,83 %																						
Number of Measurements, n_i	6																						
$bias_i = \frac{c_i - c_{ref\ i}}{c_{ref\ i}} \cdot 100\%$	-3,99 %																						
Period of measurements	26.5.2015 - 1.6.2015																						
Matrix	Suolapitoinen vesi, 11 promillea																						
Additional information																							
4	Convert components to standard uncertainty	$u(R_w) = 6,18 \%$ $u(bias) = 7,85 \%$																					
5	Calculate combined standard uncertainty, u_c	$u_c = \sqrt{u(R_w)^2 + u(bias)^2} = 9,99 \%$																					
6	Calculate expanded uncertainty, U	$U = 2 \cdot u_c = 20 \%$																					

Suuri mittausalue (2 µmol/l - 10 µmol/l)

Step	Action	Measurand	7.10.2015																				
1	Specify Measurand	Concentration range: 2 - 10																					
2	Quantify within-laboratory reproducibility, $u(R_w)$ A: Control sample B: Possible steps not covered by control sample	<p>A: Control samples: Matrix: Ultrapuhdas vesi Period of measurements: 26.5.2015 - 3.6.2015 Number of control samples: 5 Average concentration: 4,245325 Standard deviation, s_{Rw} : 3,91 %</p> <p>B: Routine replicate samples : Period of measurements: 26.5.2015 - 10.7.2015 Number of routine replicate samples: 18 Number of parallel measurements: 2 Concentration range: 1,882916 - 10,1545 Standard deviation estimate from range, s_r : 2,07 %</p> $u(R_w) = \sqrt{s_{Rw}^2 + s_r^2} = 4,42 \%$																					
3	Quantify method and laboratory bias, $u(bias)$	<p>Method and laboratory bias from certified reference material: Different certified reference materials count, N : 1</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>i</th> <th>1</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Certified concentration, $c_{ref\ i}$</td> <td>2,03</td> </tr> <tr> <td>Standard uncertainty of certified concentration, $u(c_{ref\ i})$</td> <td>6,66 %</td> </tr> <tr> <td>Measured concentration, c_i</td> <td>1,949000</td> </tr> <tr> <td>Standard deviation of measured concentration, s_{bias}</td> <td>2,83 %</td> </tr> <tr> <td>Number of Measurements, n_i</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>$bias_i = \frac{c_i - c_{ref\ i}}{c_{ref\ i}} \cdot 100\%$</td> <td>-3,99 %</td> </tr> <tr> <td>Period of measurements</td> <td>26.5.2015 - 1.6.2015</td> </tr> <tr> <td>Matrix</td> <td>Suolapitoinen vesi, 11 promillea</td> </tr> <tr> <td>Additional information</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> $u(bias) = \sqrt{bias_1^2 + \left(\frac{s_{bias_1}}{\sqrt{n_1}}\right)^2 + u(c_{ref\ 1})^2} = 7,85 \%$	i	1	Certified concentration, $c_{ref\ i}$	2,03	Standard uncertainty of certified concentration, $u(c_{ref\ i})$	6,66 %	Measured concentration, c_i	1,949000	Standard deviation of measured concentration, s_{bias}	2,83 %	Number of Measurements, n_i	6	$bias_i = \frac{c_i - c_{ref\ i}}{c_{ref\ i}} \cdot 100\%$	-3,99 %	Period of measurements	26.5.2015 - 1.6.2015	Matrix	Suolapitoinen vesi, 11 promillea	Additional information		
i	1																						
Certified concentration, $c_{ref\ i}$	2,03																						
Standard uncertainty of certified concentration, $u(c_{ref\ i})$	6,66 %																						
Measured concentration, c_i	1,949000																						
Standard deviation of measured concentration, s_{bias}	2,83 %																						
Number of Measurements, n_i	6																						
$bias_i = \frac{c_i - c_{ref\ i}}{c_{ref\ i}} \cdot 100\%$	-3,99 %																						
Period of measurements	26.5.2015 - 1.6.2015																						
Matrix	Suolapitoinen vesi, 11 promillea																						
Additional information																							
4	Convert components to standard uncertainty	$u(R_w) = 4,42 \%$ $u(bias) = 7,85 \%$																					
5	Calculate combined standard uncertainty, u_c	$u_c = \sqrt{u(R_w)^2 + u(bias)^2} = 9,01 \%$																					
6	Calculate expanded uncertainty, U	$U = 2 \cdot u_c = 19 \%$																					

AMMONIUMIN (NH₄⁺) MÄÄRITYS FIA-RAVINNEANALYSAATTORILLA

1 Soveltamisala

Menetelmä soveltuu ammoniumnäytteille pitoisuusalueella 0,20 µM - 62,5 µM. Suuremmat pitoisuudet laimennetaan. Määritysraja menetelmälle on 0,20 µM, toteamisraja 0,14 µM.

Suolapitoisuudet nostavat voimakkaasti vastetta, joten standardisuorat on syytä tehdä näytematriisiin.

2 Periaate

OPA eli o-ftaalialehydi muodostaa natriumsulfiitin kanssa fluoresoivan yhdisteen ollessaan alkalisisessa puskurissa, natriumtetraboraattiliuoksessa.

3 Reagenssit

Reagenssien on oltava analyysipuhdasta laatua. Liuosten valmistukseen käytetään ultrapuhdasta Milli-Q-vettä, ellei toisin mainita.

3.1 Ammoniakkivapaa vesi

Reagenssien valmistukseen ja näytteiden laimennoksiin käytetään ultrapuhdasta Milli-Q-vettä. Membraanisudattimen läpimitta on 0,22 µm. Kantajana toimivaa Milli-Q-vettä kuplitetaan heliumkaasulla 1 min ajan.

3.2 Etanoli

Etanolin on oltava Aa-laatua, 99,5 til-%. Etanolia käytetään o-ftaalialehydin (3.4) valmistukseen.

3.3 Natriumhydroksidi, 20 mM

Reagenssi 1 valmistetaan pipetoimalla 5 ml 0,8 molaarista NaOH:ia 200 ml:n mittapulloon. Merkkiin täytön jälkeen liuos siirretään muoviseen säilytysastiaan. Reagenssi 1 on uusittava joka päivä.

3.4 o-Ftaalialehydi (OPA), 6 mM (Sigma P1378)

Punnitaan 400 mg o-ftaalialehydiä 2 ml:aan etanolia (3.2). Vaatii voimakkaan sekoituksen ja on suojattava valolta. Liuoksen voi jättää jääkaappiin yön yli (4 - 8 astetta). Valmista OPA on silloin, kun se kirkastuu, väriltään liuos on joko keltaista (ilman jääkaappia) tai valkoista (yön yli jääkaapissa oltuaan). Mahdolliset liukenemattomat hiukkaset on suodatettava.

3.5 Natriumtetraboraatti dekahydraatti, 0,05 M (Sigma-Aldrich S9640)

Punnitaan 10 g natriumtetraboraatti dekahydraattia 500 ml:n mittapulloon. Täytetään merkkiin ultrapuhtaalla vedellä.

3.6 Natriumsulfiitti, 2 mM (Merck 1.06657.0500)

Liuotetaan 120 mg natriumsulfiittia 2 ml:aan ultrapuhdasta vettä. Liukenee helposti.

3.7 Reagenssi 2

Siirretään boraattiliuos (3.5) tummaan lasipulloon ja lisätään astiaan OPA-liuos (3.4) kokonaan suodattimen läpi, natriumsulfiittiliuosta (3.6) pipetoidaan 1,5 ml. Yhteistilavuus on yli 500 ml. Liuos on säilytettävä valolta suojattuna ja sitä saa käyttää aikaisintaan 24 h valmistuksen jälkeen. Käyttökelpoinen liuos on kuukauden ajan. Natriumsulfiitti saattaa reagoida ilman kanssa, jos korkki on pitkään auki. Vähäinen natriumsulfiitin lisäys voi poistaa ongelman.

3.8 HCl, 10 mM

Vahvasta suolahaposta (12 M, m-% 37) valmistetaan laimennos (1 M) mittaamalla 83 ml tätä liuosta 1000 ml:n mittapulloon. 1 M välikantaa pipetoidaan 2,5 ml 250 ml:n mittapulloon ja täytetään ultrapuhtaalla vedellä merkkiin.

3.9 Standardit

Standardit valmistetaan kaupallisesta liuoksesta (AccuStandard), jonka konsentraatio on 1000 mg/l. 200 µM välikanta tehdään pipetoimalla 360 µl kantaliuosta 100 ml:n mittapulloon. Välikanta säilyy jääkaapissa (4 - 8 astetta) kaksi viikkoa. Tästä välikannasta valmistetaan käyttöstandardit (taulukko 1), liuottimena ammoniakivapaa vesi (3.1). Käyttöstandardit valmistetaan uudelleen joka päivä.

Taulukko 1. Standardiliuosten valmistus välikannasta (200 µM)

	1 µM	2 µM	5 µM	7 µM	10 µM
Välikanta (ml)	1	1	5	3,5	5
Mittapullo (ml)	200	100	200	100	100

3.10 Kontrollit

Kontrollit valmistetaan ammoniumliuoksesta (Merck 1.19812.0500), jonka konsentraatio on 1000 mg/l. Tätä ammoniumliuosta pipetoidaan 1 ml 200 ml:n mittapulloon, tämä

välikanta säilyy kaksi viikkoa jääkaapissa (4 - 8 astetta). Suurempi kontrolli valmistetaan pipetoimalla 3 ml välikantaa 200 ml:n mittapulloon, pienempi kontrolli puolestaan tehdään pipetoimalla 1 ml suurempaa kontrollia 10 ml:n mittapulloon.

4 Laitteet ja välineet

FIA-laitteisto

- Fluoresenssilaitteisto (FIALab, PMT-FL)
- Kaasudiffuusiokammio (SMFC-STR 1 mm x 80 mm x 0,8 mm)
- Venttiili (VICI Cheminert)
- Peristalttinen pumppu (Watson-Marlow 403U/VM4) + LabJack U12
- Näytteenotin (AIM 3200 / 3300)
- Lämmitin (WATLOW EZ-Zone)

Mittausvälineet

- 1 x 10 ml mittapullo
- 4 x 100 ml mittapullo
- 5 x 200 ml mittapullo
- 1 x 250 ml mittapullo
- 1 x 500 ml mittapullo
- 1 x 1000 ml mittapullo
- Automaattipipettejä (1 - 5 ml ja alle 500 - 1000 µl)
- 100 ml mittalasi

Säilytys

- Tumma lasipullo (yli tai tasan 500 ml)
- Lasipullo (yli 500 ml)
- Muovinen säilytysastia (yli tai tasan 200 ml)

5 Analysointi

Analysoinnissa käytettävät koeputket on pestävä hapolla (2 M HCl) käytön jälkeen. Avonaisissa pulloissa on käytettävä parafilmiä kontaminaation välttämiseksi.

5.1 Näytteet

Näytteiden käsittely ei vaadi erillisiä toimenpiteitä. Happopestyt koeputket huuhdotaan 2 - 3 kertaa näytteellä.

Suolapitoisia näytteitä analysoidessa on syytä tehdä standardiliuokset samaan matriisiin!

5.2 Laitteen käynnistys

Käynnistetään näytteenottaja, pumppu, detektori ja tietokone. Lämmitin kannattaa käynnistää vasta sitten, kun letkuissa ei ole ilmaa.

Valitaan tietokoneen työpöydältä fiareg30032015_NH4.reg, sen jälkeen FIALab for Windows 5.0. Ohjelman avaamisen jälkeen valitaan kuvake FIALab ja sieltä logon. Venttiilin toiminta on varmistettava settings-välilehden kautta, valitsemalla "injection valve on / off" vuorotellen. Oikein toimiessaan venttiili naksahuttaa aina vaihdon myötä. Toiminnan varmistuksen jälkeen kirjaudutaan sisään muiden laitteiden ohjelmistoihin. PMT pitää asettaa arvoon 125 msec, autosamplerin portti puolestaan on vaihdettava portista 4 porttiin 5. Oikea ajo-ohjelma on nimellä NH4 työpöydän kansiossa "FIA Ammoniakki". Ajo-ohjelman kautta valitaan "sample definition file", työpöydän kansiossa "FIA Ammoniakki" on aikaisempia csv-päätteisiä tiedostoja.

Ajo lähtee käyntiin valitsemalla start. Ennen varsinaista ajoa on hyvin oleellista tarkistaa pohjaviivan taso ammoniakivapaalla vedellä. Pohjaviivan lisäksi on tarkistettava virtauksen tasaisuus, etenkin lämmittimessä ollessaan neste saattaa liikkua hitaammin.

5.3 Käytön jälkeinen pesu

Laitteen pesuun voidaan käyttää 10 mM HCl-liuosta (3.8). Letkuja huuhdotaan n. 5 min hapolla ja sitten 5 - 10 min vedellä.

5.4 Ongelmat

Venttiilin toiminnassa saattaa esiintyä mahdollista epävarmuutta. Ennen ajoa on varmistettava, että venttiili varmasti kääntyy. Ongelmat saattavat johtua tukoksesta tai siitä, etteivät venttiiliin menevät letkut ole tarpeeksi tiukasti ruuvattu kiinni. Jos venttiili ei toimi settings-välilehden kautta ollenkaan, kannattaa irrottaa hetkeksi joko usb-piuha tai mustan VICI-laitteen johto.

Toisinaan laitteessa esiintyy liian suuresta paineesta johtuvaa vuotoa, yleensä kaasudiffuusiokammiossa. Ruuvien kiristäminen auttaa, lisäksi on varmistettava että laitteen muut letkut ovat tarpeeksi kireitä. Vastapaineysikön on oltava 99 cm ja 0,30 mm, ei pidempi / kapeampi.

Pohjaviivan epätasaisuus voi johtua venyneistä pumppuletkuista tai siitä, että OPA:n valmistuksesta on kulunut liian vähän aikaa. OPA:n mahdollinen kiteytyminen saattaa myös aiheuttaa ongelmia virtausnopeuteen ja siten pohjaviivan tasaisuuteen. Kaasudiffuusiokammio on toisinaan syytä avata ja tarkistaa mahdollisten kiteytymien vuoksi, lisäksi lämmittimen letkuja voi vaihtaa.

6 Tulosten laskeminen

FIALab ohjelmisto tekee standardisuoran valmiiksi. Analysis-ikkunan välilehden Calibration Report-kuvakkeesta saa txt-päätteisen tulostiedoston standardisuorasta ja näyt-

teistä. Koko mittausdata on mahdollista saada talteen Analysis-ikkunan Data-välilehden kautta dat-päätteisenä. Ilmakuilien poistoon voi käyttää Excel-ohjelmaa, mutta useampaa suurta peräkkäistä arvoa ei saa poistaa.

7 Laadunvarmistus

Standardisuoran lisäksi analysoidaan kontrollit (3.10), joiden pitoisuutta tarkkaillaan. Ammoniakkivapaata vettä (3.1) ajetaan vähintään kolmesti yhden ajon aikana, mittaamalla nollassa sekä ennen että jälkeen standardien ja näytteiden.

8 Työturvallisuus

o-Ftaalialdehydi on akuutisti myrkyllistä nieltynä, lisäksi se on syövyttävää ja välittömästi myrkyllistä vesieliöille. Käsittelyn on tapahduttava vetokaapissa.

9 Päivityshistoria

31.8.2015 Tehty Inka Peltokangas

Laskuesimerkkejä

Tulosten laskemiseen käytettiin tarkkoja arvoja.

Määrittys- ja toteamisraja

$$\text{LOD (1.6.2015)} = x \pm 3 \cdot s = 8519,11 \pm 3 \cdot 123,42 = 8889,37$$

$$\text{Suoran sovitukselta: } x = \frac{8889,4 - 7890,2}{7878,6} = 0,13 \text{ (}\mu\text{mol/l)}$$

Tarkkuus

$$E \text{ (ref.)} = \frac{|x - \mu|}{\mu} \cdot 100 \% = \frac{|1,95 - 2,03|}{2,03} \cdot 100 \% = 3,99 \%$$

Toistettavuus

$$\text{CV \% (ref.)} = \frac{s}{x} \cdot 100 \% = \frac{0,0776}{2,75} \cdot 100 \% = 2,83 \%$$