

KEMIAN LAITOS
JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

**Kenttäkolorimetrin kahden menetelmän validointi ja vesi-
näytteenotto**

Kandidaatintutkielma ja tutkimusprojekti

22.3.2021

Heidi Kauranen



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

Tiivistelmä

Tämän kandidaatintutkielman kirjallisuuskatsauksessa tarkastellaan menetelmän validointia, vesinäytteenottoa sekä spektrofotometriä. Kokeellisessa osuudessa käsitellään Spectroquant Move 100 -kenttäkolorimetrin soveltumista jäteyhtiö Sammakkokangas Oy:n suodatuskentän vesien analysointiin. Tutkimus tehtiin Keski-Suomen Ympäristöosaajat osuuskunnalle, joka muun muassa analysoi vesinäytteitä ja on myös hoitanut Sammakkokangas Oy:n suodatuskentän vesien omavalvontaa.

Kolorimetrin menetelmistä tarkasteltiin kokonaisfosforin (114543) ja raudan (114549) määritysmenetelmiä. Tarkempaan menetelmänä, jonka antamiin tuloksiin kolorimetrin tuloksia verrattiin, käytettiin ICP-OES:ä (induktiivisesti kytketty plasma – optinen emissio -spektrometri). Suodatuskentän toiminnan seurannassa riittää, että tulokset ovat tarkempien arvojen kanssa samaa suuruusluokkaa ja rinnakkaisnäytteillä saadut tulokset ovat lähellä toisiaan.

Tuloksista havaittiin, että rautamenetelmällä tulokset ovat samaa suuruusluokkaa ICP-OES-tulosten kanssa. Rinnakkaisnäytteiden välinen poikkeama oli suurimmillaan 28 %. Lisäksi havaittiin, että menetelmään kuuluva suodattaminen parantaa tuloksia selkeästi. Todettiin kuitenkin myös, että suodatuskentän näytteissä on niin paljon kiintoainesta, että ruiskusuodatus ei onnistu. Suodatinpaperilla suodattaen saadaan parannettua tuloksia, mutta paperilla suodattaminen on kenttäoloissa varsin työlästä. Fosforimenetelmällä saadut tulokset poikkesivat ICP-OES-tuloksista vähemmän kuin rautamenetelmän tulokset, ja rinnakkaisnäytteiden välinen poikkeama oli suurimmillaan 4 %. Molemmat menetelmät sopivat siis Sammakkokankaan suodatuskentän vesien seurantaan.

Esipuhe

Tämä kandidaatintutkielma ja tutkimusprojekti tehtiin Jyväskylän yliopistossa kevään 2020 ja kevään 2021 välisenä aikana. Työn ohjaajana toimi analyyttisen kemian ja kiertotalouden professori Ari Väisänen. Työ tehtiin yhteistyössä Keski-Suomen Ympäristöosaajat osuuskunnan kanssa jäteyhtiö Sammakkokangas Oy:n suodatusvesinäytteillä.

Kirjallisessa osuudessa aiheet rajattiin sellaisiksi, joihin kirjoittajan oli kokeellisen osuuden kannalta oleellista perehtyä. Optisen emissiospektroskopian käsittely päätettiin kuitenkin jättää pois kirjallisesta osuudesta, jotta työn pituus pysyisi kohtuullisena. Professori Väisänen ystävällisesti lainasi työhön liittyvää kirjallisuutta ja lisäksi sitä on etsitty Jyväskylän analyyttisen kemian laboratorion kirjavarannoista sekä kirjastosta.

Haluan kiittää professori Ari Väisästä projektiin tarttumisesta ja asiantuntevasta ohjauksesta. Lisäksi haluan kiittää Keski-Suomen Ympäristöosaajat osuuskunnan jäseniä ympäristöalan lehtori, FT Tarja Hyötyläistä ja ympäristönhoitaja, kouluttaja Jaana Tullilaa mielenkiintoisesta tutkimusaiheesta, projektin mahdollistamisesta ja tuesta sekä Sammakkokangas Oy:n toimitusjohtaja Outi Ruuskaa tilojen käyttömahdollisuudesta. Kiitokset myös läheisilleni, erityisesti avo-
puolisolleni Janille, tuesta ja kannustuksesta.

SISÄLLYSLUETTELO

Tiivistelmä.....	i
Esipuhe	ii
SISÄLLYSLUETTELO	iii
1 Johdanto	1
2 Teoria	2
2.1 Vesinäytteenotto.....	2
2.1.1 Näytteenoton suunnittelu.....	2
2.1.2 Näytteenoton haasteet	3
2.1.3 Vesinäytteen ottaminen	4
2.1.4 Näytteiden kestäväointi.....	7
2.2 Menetelmän validointi.....	7
2.2.1 Selektiivisyys	9
2.2.2 Lineaarisuus ja mittausalue	10
2.2.3 Toteamis- ja määrittäysraja	13
2.2.4 Herkkyys	14
2.2.5 Tarkkuus.....	15
2.2.6 Häiriökestävyys ja toimintavarmuus.....	19
2.2.7 Menetelmän ja mittauksen epävarmuus	20
2.3 Spektrofotometria.....	21
3 Käytetyt reagenssit ja laitteet	22
4 Menetelmät.....	23
5 Näytteiden analysointi.....	25
6 Tulokset.....	27
6.1 Rautamittausten tulokset	27
6.2 Kokonaisfosforimittausten tulokset.....	29
7 Yhteenveto	31
8 Kirjallisuusluettelo	32
9 Liitteet	34

1 Johdanto

Kierrätyksen ja jätteen polttamisen lisääntymisen myötä kaatopaikoille kertyvän jätteen määrä on vähentynyt, mutta silti osa jätteestä päätyy yhä läjitettäväksi kaatopaikoille. Kaatopaikoilla valuma- ja suotovesiin liukenee jätteistä ympäristölle haitallisia aineita, kuten typpeä, fosforia, suoloja, kiintoainesta, liuennetta orgaanisia aineita, metalleja ja metallipitoisia orgaanisia yhdisteitä. Kaatopaikkavesien laatuun vaikuttavat erityisesti jätteiden määrä ja laatu, jätetäytön ikä ja hajoamisvaihe sekä kaatopaikan koko ja sen pohja- ja seinämärakenteet.¹

Suomessa kaatopaikkatoimintaa ohjataan ja säädellään useilla eri laeilla. Esimerkiksi valtioneuvoston asetus kaatopaikasta² (331/2013) määrää, että kaatopaikkavedet on kerättävä ja puhdistettava tehokkaasti joko kaatopaikalla tai johdettava muualle puhdistettavaksi. Lisäksi valtioneuvoston asetuksen ja kaatopaikan ympäristöluvan perusteella määräytyy millaisia asioita kaatopaikkavesistä ja kaatopaikkaa ympäröivistä pinta- ja pohjavesistä on syytä tutkia ja kuinka tiheästi seuranta on tehtävä.² Ympäristönsuojelulaki³ (527/2014) ja jätelaki⁴ (646/2011) puolestaan määräävät, että jätteiden käsittely- ja kaatopaikkatoiminnasta ei saa aiheutua ympäristön pilaantumisen vaaraa ja mahdolliset päästöt on pyrittävä minimoimaan.

Jos kaatopaikkavesiä ei voida johtaa jätevedenpuhdistamolle puhdistettavaksi, vedet voidaan puhdistaa kaatopaikalle rakennettavilla, fysikaalisia, kemiallisia ja biologisia prosesseja hyödyntävillä käsittelyjärjestelmillä. Käsittelymenetelmän valinnassa olennaista on puhdistettavan veden laatu. Erilaisia käsittelymenetelmiä on runsaasti, mutta useimmilla voidaan vaikuttaa vain tiettyyn vähennettävään ominaisuuteen, joten puhdistustarpeesta riippuen menetelmiä voidaan yhdistellä. Esimerkiksi laskeuttamalla voidaan poistaa vettä raskaampia partikkeleita, ilmastamalla tehostaa biologista hajoamista ja kosteikkokäsittelyillä poistaa muun muassa kiintoainesta, typpeä ja orgaanista ainesta.⁵

Tässä tutkimuksessa perehdyttiin kaatopaikkavesien analysointiin kenttäkäyttöisellä kolorimetriellä. Kirjallisuuskatsauksessa käsitellään vesinäytteenottoa, menetelmän validointia ja spektrofotometriaa. Kokeellisessa osuudessa selvitettiin sopivatko Spectroquant Move 100 -kenttäkolorimetrin rauta- ja kokonaisfosforimenetelmät jäteyhtiö Sammakkokangas Oy:n suodatuskentän vesien seurantatutkimuksiin. Sammakkokankaan jätevesien puhdistuksessa

hyödynnetään tasaus- ja laskeutusaltaita sekä maasuodatusta. Lisäksi tasausaltaaseen on tehty ilmastuksen ja orgaanisen materiaalin avulla kokeiluja biologisten prosessien hyödyntämisestä.

2 Teoria

2.1 Vesinäytteenotto

Luonnonvedet tai luonnon vaikutusten alaiset vesialueet ovat jatkuvasti muuttuvia systeemejä, joten tällaisista vesistä näytteiden otto vaatii huolellisuutta ja suunnitelmallisuutta. Jos otettu näyte ei vastaa tutkittavaa systeemiä eli on epäedustava, näytteestä saadut tulokset eivät anna tietoa systeemistä, jota on ollut tarkoitus tutkia.⁶ Erilaisia tutkimuksia ja näytetyyppejä varten on olemassa näytteenotto- ja käsittelyohjeita, joita löytyy esimerkiksi lähteestä 6. Avataan seuraavissa alaluvuissa näytteenoton suunnittelua ja haasteita sekä vesinäytteen ottamista ja kestäväintä.

2.1.1 Näytteenoton suunnittelu

Näytteenoton suunnittelu aloitetaan toteamalla mitä tietoa tutkittavasta kokonaisuudesta tai systeemistä halutaan. Nämä päätökset ohjaavat käytettävien analyysimenetelmien, näytteenottotapojen sekä näytteiden määrän, ottopaikan ja -ajan valitsemista. Näytteellä tarkoitetaan analysoitavaksi otettua osaa fysikaalisesta ympäristöstä. Analyytti on näytteestä analysoitava atomi, ioni tai molekyyli.⁷ Hyvän näytteen tulisi olla edustava eli vastata tutkittavaa kokonaisuutta mahdollisimman hyvin erityisesti tutkittavan ominaisuuden osalta.⁸

Näyte voidaan ottaa kertainäytteenä eli yhdellä kertaa tai kokoomanäytteenä useista näytteistä tai näyte-eristä yhdistäen.^{6,7,9} Kertainäytteen analysointi antaa tietoa systeemin tilasta näytteenottohetkellä ja samasta paikasta toistuvasti otetuilla kertainäytteillä saadaan tietoa systeemin muutoksista ja tilan vaihtelusta.⁶ Kokoomanäytteeeseen näyte-erät voidaan ottaa esimerkiksi tietyltä alueelta eri paikoista tai samasta kohdasta säännöllisin aikavälein. Tällöin saadaan määritettyä analyyttien keskiarvoinen pitoisuus tietyllä alueella tai tietyllä ajanjaksolla.^{6,9} Lisäksi ympäristössä tapahtuvia muutoksia voidaan seurata jatkuvasti, esimerkiksi asettamalla pH-

anturi jätevesivirtaan. Mitatut arvot dokumentoidaan tietokoneella tai muulla tiedonkeruulaitteella.⁷

Analyysimenetelmä valitaan tutkittavan analyytin ominaisuuksien ja pitoisuuden sekä näytetaustan perusteella. Valintaan vaikuttaa se, halutaanko menetelmän antavan kvantitatiivisia vai kvalitatiivisia tuloksia ja kuinka tarkkoja tuloksia tarvitaan. Lisäksi menetelmää valittaessa on huomioitava analysointiin kuluva aika, tarvittavien näytteiden määrä, aika, jossa näytteet tulisi analysoida ja analyysin hinta. Näytteenottoa ja -määrää valittaessa on huomioitava tutkimuksen tavoitteen ja menetelmän asettamien vaatimusten lisäksi ympäristöolosuhteet ja näytteenoton turvallisuus. Suunniteltu näytteenottoa voi esimerkiksi jäätyä talvella tai reitti näytteenottoa voi muuttua liian vaikeakulkuiseksi. Lisäksi tulee huomioida, kuinka näytteet pakataan kuljetuksen ajaksi, kuinka pitkä kuljetusmatka on ja onko näytteitä tarpeen kestäväidä.^{6,7}

2.1.2 Näytteenoton haasteet

Näytteenotto voi olla tutkimuksen suurin epävarmuuslähde ja epäedustava näyte estääkin todennukaisen tuloksen saamisen koko analyysin osalta. Edustavan näytteen ottaminen ja näytteen säilyttäminen ovatkin näytteenoton suurimmat haasteet. Edustavan näytteen ottamista vaikeuttaa luonnon dynaamisuus ja heterogeenisuus. Otettu näyte kuvaa systeemiä vain kyseisellä hetkellä ja esimerkiksi sääolot muuttavat tutkittavaa systeemiä jatkuvasti. Otetuissa näytteissä erilaiset kemialliset ja biologiset reaktiot jatkuvat, jolloin näyte ei enää vastaa tutkittavaa systeemiä. Reaktioita voidaan pyrkiä hidastamaan tai estämään säilyttämällä näytettä mahdollisimman viileässä tai lisäämällä näytteeseen sopivaa kestäväintireagenssia.⁶⁻⁸

Näyte voi myös kontaminoitua joko näytettä otettaessa, kuljetuksen aikana tai säilytyksen ja analysoinnin aikana. Kontaminaation taustalla voivat olla epäpuhtaudet välineissä, säilytysasioissa tai reagensseissa. Lisäksi esimerkiksi ilman pienhiukkaset tai analyytin adsorboituminen säilytysastian seinämiin voivat vaikuttaa näytteen edustavuuteen.^{6,7}

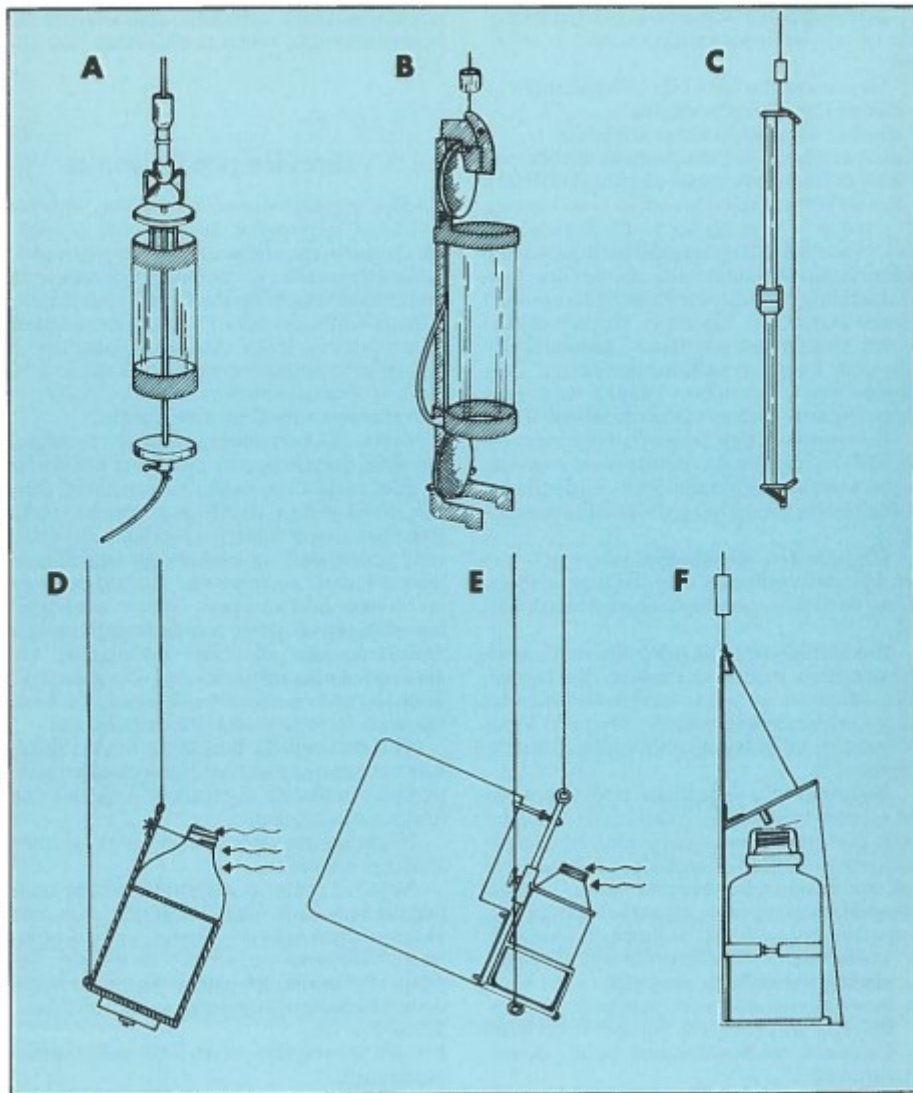
2.1.3 Vesinäytteen ottaminen

Näytesäiliöiksi tai -pulloiksi löytyy useasta eri materiaalista valmistettuja vaihtoehtoja. Näyteastian valintaan vaikuttavat tutkittava analyytti ja sen pitoisuus, näytetausta ja -tyyppi sekä tavoiteltava määrittystarkkuus.^{6,7} Näyteastia ei saisi reagoida näytteen kanssa eikä siitä saisi liueta mitään näytteeseen. Näyte ei saisi myöskään absorboitua astian seinämiin ja se täytyy voida sulkea tiiviisti. Lasi- ja muovipullot ovat käytössä yleisimpiä. Teflon on lasia ja muovia reagoimattomampi materiaali, mutta myös kallista. Yleisesti orgaanisille analyyteille suositellaan borosilikaattilasista valmistettua pulloa ja epäorgaanisille analyyteille polyeteenistä tai polypropeenista valmistettua muovipulloa.^{6,7,9}

Käytettävät näyteastiat ja näytteenottimet tulee puhdistaa ennen käyttöä ja jokaisen käyttökerran välissä. Useimmiten välineet voidaan pestä synteettisellä pesuaineella ja huuhtomalla useaan kertaan ionittomalla vedellä. Välineitä puhdistettaessakin on kuitenkin huomioitava määrittävät analyytit. Käytettävä pesuaine ei saa sisältää määritettävää analyyttiä ja hanavedellä huuhtelua tulee välttää, sillä se sisältää veden lisäksi useita muita aineita. Lisäksi joillekin määrittäyksille, kuten esimerkiksi metallimäärittäyksille, näytepullojen pesuun on erityisohjeita, kuten laimeassa typpihapossa liottaminen. Vedellä huuhtottavien pullojen puhtaus voidaan tarkistaa täyttämällä noin 3 % pestyistä pulloista ionittomalla vedellä ja pyörittämällä niitä siten, että vesi osuu pullon sisäpinnolle. Tämän jälkeen veden sähkönjohtavuus mitataan. Mikäli sähkönjohtavuus on alittaa arvon 0,1 mS/m, pullot ovat riittävän puhtaita. Puhtaat pullot säilytetään laboratoriovedellä täytettyinä ja suljettuina tai tiettyjen analyyttien tapauksessa annetaan kuivua ennen sulkemista ja säilytystä.^{6,7}

Vesinäytteille löytyy useita erilaisia näytteenottimia, joilla näyte voidaan ottaa halutusta syvyydestä.^{6,7,9} Näytteenotin lasketaan vajerin avulla mahdollisimman pystysuorasti haluttuun syvyyteen, jossa sen annetaan olla paikoillaan 15 sekuntia. Näytteenottosyvyys mitataan veden pinnasta näytteenottimen puoliväliin. Näytteenotinta voidaan laskea aluksi nopeammin, mutta haluttua syvyyttä lähestyttäessä laskunopeutta tulee vähentää. Usein vajeria pitkin voidaan pudottaa paino, joka sulkee ottimen. Tämän jälkeen näytteenotin vedetään ylös. Liikkeen tulee olla näytteenottosyvyydessä niin hidasta, ettei suuria virtauksia synny.^{6,9} Esimerkkejä näytteenottimista on esitetty kuvassa 1.

Näytteenottoimeen voidaan kiinnittää lämpömittari, jonka avulla saadaan lämpötila näytteenotosyvyydessä ja saadaan tietoa samasta syvyydestä otettavien näytteiden vertailukelpoisuudesta. Mittarin lukema tulee lukea heti, kun näytteenotin on nostettu. Jos näytteitä otetaan eri syvyyksiltä, näytteenotto tulee aloittaa pinnasta ja jatkaa sitten pohjaa kohti. Viimeinen näyte otetaan yleensä yksi metri pohjan yläpuolelta.^{6,9} Mikäli näyte halutaan veden pintakerroksesta, näyte voidaan ottaa suoraan näytepulloon, välttämällä kuitenkin veden pinnalla kelluvien hiukkasten ja roskien joutumista näytteen sekaan.¹⁰ Jos näytteenottopaikka on matala, on varottava pulloon osumista pohjaan. Jos näytettä ei haluta tietyltä syvyydeltä, näyte voidaan ottaa avoimella astialla vedenpinnan alta. Astia voi olla esimerkiksi ämpäri. Näytteenottamista helpottaa, jos astia on jatkettavan varren päässä ja mitta-asteikolla varustettu. Neljäs vaihtoehto on ottaa näyte pumpun avulla. Näytteeseen ei tule kerätä roskia, vaan ne tulee tarvittaessa siivilöidä pois.^{6,9}



Kuva 1. Erilaisia näytteenottimia.⁶

Pullot, jotka on säilytetty ionivaihdetulla vedellä täytettyinä, tyhjenetään vasta näytteenotto-paikalla. Pulloja tyhjenettäessä vesi tulee kaataa riittävän kauas näytteenotto paikasta. Näyte-pullojen korkit tulee pitää puhtaana, kun pullot eivät ole suljettuja ja näytteet tulee siirtää näyte-pulloihin mahdollisimman pian näytteen ottamisen jälkeen. Näytteenottimesta otetaan ensimmäisenä näytteet liuenneiden kaasujen, kuten hapen tai hiilidioksidin, tutkimista varten. Näitä määrityksiä varten pullot tulee täyttää täyteen siten, että pullosta valuu 2–3 kertaa pullon tilavuuden verran näytettä yli. Pulloon ei saa jäädä ilmakuplia ja se tulee täyttää piripintaan ennen sulkemista. Näiden näytteiden jälkeen voidaan ottaa näytteet muita analyysejä varten. Jokainen näytepullo tulee huuhdella kolmesti näytevedellä ennen lopullista täyttämistä. Näyte kaadetaan pulloon hitaasti pyörteisyyttä välttämällä. Pulloihin jätetään pieni ilmavara sekoittamista varten, lukuun ottamatta niitä näytteitä, jotka tulee suojata ilmasta. Tällaiset näytteet täytetään piripintaan. Pulloihin merkitään heti näytteenoton jälkeen tai mieluummin jo ennen maastoon lähtöä mitä määritystä varten kyseinen näyte on otettu sekä mistä paikasta näyte on otettu ja mihin aikaan.^{6,7,9}

Näytteet kuljetetaan laboratorioon tukevissa, kannellisissa kylmälaatikoissa tai -laukuissa. Kylmälaatikot suojaavat näytteitä rikkoontumiselta, valolta ja lämpötilan muutoksilta. Osa näytteistä voi olla tarpeen viilentää nopeasti, jolloin kylmälaatikkoon voidaan lisätä kylmävaraajia tai hiilihappojäätä. Näytteet eivät saa kuitenkaan päästä jäätymään, joten pakkassäissä laatikoihin voidaan lisätä tarvittaessa myös lämmittämiä. Kuljetusajan tulee olla mahdollisimman lyhyt ja esimerkiksi näytteet bakteerianalyysejä varten tulisi toimittaa laboratorioon mieluiten kahdessa tunnissa näytteenotosta. Kemiallisten analyysien näytteiden toimittamisessa ei ole yhtä kiire, mutta nekin tulee toimittaa 24 tunnin sisällä näytteenotosta. Laboratoriossa näytteet säilytetään viileässä ja pimeässä. Säilytyslämpötilan tulee olla $(4 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$.^{6,9}

Näytteenotosta tulee tehdä kenttämuistio, johon kirjataan ennen näytteenotto paikalta poistumista tarkat paikat, joista näytteet on otettu sekä näytteenottoajat ja -päivät, näytteiden lämpötilat $0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ tarkkuudella ja mahdollisesti lisätyt kestäväintiaineet ja niiden määrät. Kenttämuistiota on suositeltavaa täyttää sitä mukaa kun näytteiden otto etenee. Lisäksi kenttämuistioon merkitään mitä tutkimusta varten näytteet on otettu, näytteiden ottajan nimi, maastossa tehtyjen mittausten tulokset ja lyhyt kuvaus näytteenottosäästä sekä maininnat mahdollisista näytteisiin

vaikuttavista poikkeamista maastossa. Tällaisia ovat esimerkiksi vesistöissä kelluvat kuolleet kalat tai näytteenottoaikan läheisyyteen tehdyt uudet ojitukset.^{6,9}

2.1.4 Näytteiden kestäväointi

Näytteet tulee analysoida mahdollisimman pian näytteenoton jälkeen. Joitakin määrittämiä varten otetut näytteet eivät kestä säilytystä ja ne tulee analysoida mieluiten jo maastossa. Jos näytettä ei voida analysoida kenttäolosuhteissa ja näyte tarvitsee kuljettaa laboratorioon, näyte voi olla tarpeen kestäväoidä. Kestäväointi tarkoittaa näytteen säilytyskestävyyden lisäämistä. Kestäväoinnilla pyritään hidastamaan näytteessä sekä näytteen ja näytepullon välillä tapahtuvia biologisia, kemiallisia ja fysikaalisia muutoksia. Tällaisia muutoksia ovat esimerkiksi yhdisteiden hapettuminen, saostuminen ja absorboituminen näytepullon seinämiin. Lisäksi vedessä elävät bakteerit ja muut organismit voivat tuottaa, kuluttaa tai muuttaa yhdisteitä eri muotoon.^{6,7}

Kestäväointi voidaan tehdä muuttamalla näytteen pH-arvoa, lisäämällä bakteereja tappavaa ainetta, pakastamalla tai uuttamalla tutkittava analyysi erilleen näytetaustasta. Myös näytteiden säilyttäminen viileässä ja pimeässä pidentää säilymisaikaa.^{6,7,9} Käytettävä kestäväointimenetelmä valitaan tutkittavan analyysin, näytetaustan, näytepullon ja säilytysajan perusteella. Näyte voi olla tarpeen kestäväoidä jo maastossa, mutta mikäli määritysmenetelmä ei edellytä tätä, kestäväointi voidaan tehdä laboratoriossa näytteenotto-päivän aikana.⁶ Kestäväointiaineet voidaan myös annostella näytepulloihin valmiiksi ennen maastoon lähtemistä. Osa näytteistä on tarpeen suodattaa ennen analysointia ja suodatusta myös suositellaan, jos näytettä säilytetään pitkään.^{7,9} Suodattamalla voidaan poistaa suurimmat orgaaniset hiukkaset, jotka voisivat reagoida näytteen sisältämien komponenttien tai analyysin kanssa.⁷ Suodatuskäsittelyn vaativien näytteiden kestäväoinnissa on kuitenkin huomattava, että kestäväointiaine tulee lisätä vasta suodatuksen jälkeen, sillä esimerkiksi hapon lisääminen ennen suodatusta voi johtaa kolloidisessa tai hiukkasmaisessa muodossa olevien metallien liukenemiseen näytteeseen.⁹

2.2 Menetelmän validointi

Tutkimusmenetelmän validoinnin tarkoitus on osoittaa, että menetelmä on sopiva suunniteltuun käyttötarkoitukseen ja -olosuhteisiin, sekä tieteellisesti pätevä. Menetelmä täytyy siis

objektiivisesti testata näytteillä, joiden tutkimiseen menetelmä validoidaan, ja tuloksista on tilastollisesti osoitettava, että saadut suorituskykyparametrit vastaavat menetelmälle asetettuja vaatimuksia.^{11,12} Validointi antaa tietoa myös menetelmän epävarmuudesta ja yhtenevien parametrien käyttö mahdollistaa menetelmien vertailun keskenään.^{12,13} Useat järjestöt, kuten esimerkiksi International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) ja kemian mittausten jäljitettävyyttä ja hyviä laatukäytäntöjä ajava eurooppalaisten organisaatioiden verkosto Eurachem, antavat ohjeita tutkimusmenetelmän validointiin liittyen ja esimerkiksi National Institute of Standards and Technology (NIST) tarjoaa varmennettuja vertailumateriaaleja, joiden avulla voidaan saada tietoa menetelmän tarkkuudesta tietyillä näytetaustoilla.^{13,14}

Menetelmän validointia tekevät luonnollisesti useimmiten uuden menetelmän kehittäjät, mutta myös kemiallisen analytiikan parissa työskentelevät. Menetelmä tulisi validoida aina kun menetelmä otetaan käyttöön, käytetään uutta mittalaitetta tai jos käyttäjä tai käytävä laboratorio vaihtuu. Lisäksi validointi on tarpeen, mikäli menetelmään tehdään uudistuksia tai laadunvarmistuksessa havaitaan muutoksia menetelmässä.^{11,12} Mikäli aiemmin validoitua menetelmää kuten julkaistua standardia tai kaupallisen valmistajan tarjoamaa mittausjärjestelmää, käytetään uudessa laboratoriossa, koko validointiprosessia ei tarvitse toistaa. Menetelmän toimivuus täytyy kuitenkin kokeellisesti osoittaa kyseisen laboratorion käytössä. Tällöin voidaan validoinnin sijaan puhua varmentamisesta (engl. verification).¹⁰ Validoinnissa voidaan hyödyntää laboratorioden välisiä vertailumittauksia, joiden avulla saadaan tietoa esimerkiksi menetelmien systemaattisista virheistä ja uusittavuudesta.¹² Vertailumittauksien perusteella voidaan osoittaa myös laboratorion tulosten oikeellisuus ja vertailukelpoisuus. Vertailumittaukset kuuluvat siis olennaisena osana laboratorion tai organisaation akkreditointiin eli kolmannen osapuolen tekemään arviointiin laboratorion pätevydestä tehtäväänsä.^{8,12}

Yleisesti validointiprosessissa käydään läpi ja arvioidaan viisi osa-aluetta, jotka ovat järjestelmän edellytykset, näytteenotto, näytteiden valmistelu, analyysi ja tulosten arviointi. Järjestelmän edellytyksiin sisältyvät mittalaitteen sopivuus suunniteltuun tarkoitukseen, mittauksen suorittavien analyttikkojen pätevyys ja käytettävien aineiden kuten reagenssien ja vertailumateriaalien sopivuus analytiikkaan. Näytteenottovaiheessa tulee huomioida valittavan aineiston edustavuus ja näytteenottotavan sopivuus analyysin tarkoitukseen. Vaihe on menetelmän merkittävä epävarmuuslähde, joten oikein suunnitellulla ja toteutetulla näytteenotolla voidaan vaihtaa merkittävästi koko menetelmän epävarmuuteen.^{12,13} Näytteiden valmistelu on usein

aikaa vievin vaihe prosessissa. Sopivaa käsittelytapaa valittaessa tulee huomioida näytteen näytetausta, näytteen koko, käytettävä mittauslaite, sekä tutkittavat analyytit ja niiden konsentraatiot. Koko validointiprosessin ajan on pidettävä mielessä, että prosessissa on käytävä läpi kaikki mahdolliset näytetaustat, joiden tutkimiseen menetelmää on tarkoitus käyttää, sekä pitoisuudet tavoitellulta mittausalueelta.^{13,15}

Analyysitavan valintaan vaikuttavat näytteen ominaisuuksien lisäksi sen kustannukset ja nopeus.¹³ Näytteen analyysi tuottaa usein tietoa näytteen jostakin ominaisuudesta, kuten esimerkiksi näytteen absorboiman valon määrästä, jonka avulla saadaan tietoa analyytin läsnäolosta tai pitoisuudesta näytteessä.¹⁰ Toimivan analyysitavan tulee tuottaa tulos riittävän pienellä epävarmuudella.¹³ Analyysitavan valinnan ja analysoinnin suorittamisen jälkeen validointiprosessi päättyy tulosten arviointiin ja dokumentointiin. Arviointi tehdään yleisesti selvittämällä laaja joukko suorituskypäparametreja tilastollisin keinoin. Parametrien määrittämisen avulla voidaan todeta, täyttääkö menetelmä sille osoitetut vaatimukset.^{10,13} Validointiohjeita antavien järjestöjen ohjeet määritettävistä parametreista ja niiden tärkeydestä vaihtelevat hieman. Tässä tutkielmassa esitellään Eurachemin¹⁰ ja Mittatekniikan keskuksen¹² (MIKES) mainitsevat parametrit selektiivisyys, lineaarisuus, mittausalue, toteamis- ja määrittäysraja, herkkyys, tarkkuus, saanto, häiriökestävyys, toimintavarmuus ja mittausepävarmuus sekä näiden termien alle kuuluvat parametrit täsmällisyys, toistettavuus, uusittavuus, todenmukaisuus ja poikkeama. Määritetyt suorituskypäparametrit kirjataan validointiraporttiin. Validointiraportin laajuus ja sisältö voivat vaihdella suoritettun validoinnin mukaan.¹² Kattava ohjeistus validointiraportin laatimiseen on esitetty Eurachemin validointioppaassa¹⁰. Raporttiin kirjataan suorituskypäparametrien ja niiden tulkinnan lisäksi muun muassa mittausepävarmuuden ja häiriötekijöiden arviointiperusteet, johtopäätökset menetelmän sopivuudesta käyttötarkoitukseensa sekä tiedot käytetyistä vertailumateriaaleista ja niiden varmentamisesta, laitteiden kalibroinnista ja laboratorion sisäisistä ja ulkoisista vertailumittauksista.¹²

2.2.1 Selektiivisyys

Selektiivisyys kuvaa tutkimusmenetelmän kykyä erottaa tutkittava analyytti tarkasti häiritseviä komponentteja sisältävästä seoksesta tai näytetaustasta.^{10,12} Termi spesifisyys on lähellä selektiivisyyttä ja niitä usein käytetäänkin virheellisesti synonyymeinä.¹³ Spesifinen menetelmä on täysin selektiivinen tutkittavalle analyyttille eli menetelmän tuloksiin ei aiheudu häiriöitä

näytetaustan muista komponenteista.^{12,13} Selektiivisyyttä voidaan tutkia lisäämällä näytteisiin mahdollisia häiriötekijöitä ja vertailemalla tuloksia. Mikäli näytetausta sisältää mahdollisesti tuntemattomia häiriötekijöitä, selektiivisyyttä voidaan arvioida analysoimalla näyte muilla tunnetusti selektiivisillä menetelmillä.¹⁰

Häiritsevät komponentit voivat suurentaa tai pienentää tutkimusmenetelmän antamaa mittaus-suureen arvoa. Häiriövaikutukset voidaan jakaa kahteen tyyppiin, jotka voivat esiintyä systeemissä myös yhtäaikaisesti. Toinen häiriötyypeistä on suhteellinen häiriö (englanniksi *proportional tai rotational effect*), jossa häiriötekijät muuttavat menetelmän antamaa mittaussuureen arvoa tai -signaalia. Sen suuruus riippuu usein signaalin suuruudesta eli analyytin pitoisuudesta ja vaikuttaa kalibroitaisuoran kulmakertoimeen. Systemaattinen häiriö (engl. *fixed tai translational effect*) puolestaan ei riipu analyytin pitoisuudesta vaan johtuu näyteliuksen sisältämistä häiriötekijöistä. Tällöin puhutaan usein taustahäiriöstä, joka muuttaa kalibraatiosuoran kulmakerrointa.¹⁰

2.2.2 Lineaarisuus ja mittausalue

Suorituskykyparametri lineaarisuus kuvaa menetelmän kykyä antaa tietyllä pitoisuusvälillä monotoninen riippuvuus mittausten antaman tuloksen ja analyytin pitoisuuden välillä.^{12,15} Käytettävän mittauslaitteen voidaan ajatella koostuvan sisääntulosta (x), muuntajasta ja ulostulosta (y). Mikäli ulostulon muutoksen suhde sisääntulon muutokseen on vakio, mittauslaite antaa lineaarisia tuloksia.^{8,13} Lineaarisuus määritetään kalibraatiomittauksilla eli mittaamalla laitteella tunnetun pitoisuuden omaavia standardiliuoksia, jotka valitaan tasaisesti tutkittavalta pitoisuusväliltä.^{10-12,15} Menetelmän mittausalue määritetään lineaarisuusmääritysten avulla, joten jo lineaarisuutta määritettäessä on järkevää valita kalibraatiostandardit väliltä, joka ylittää odotetun tai halutun mittausalueen pitoisuusvälin ± 10 prosentilla.^{8,10}

Erilaiset näytetaustat voivat vaikuttaa menetelmän kykyyn määrittää analyyttipitoisuus ja aiheuttaa poikkeamia lineaarisuudesta. Kalibraatiomittaukset tulee siis toistaa jokaiselle erilaiselle näytetaustalle, joiden käyttöön menetelmä validoidaan.^{10,16} Eri lähteiden mukaan kalibraatiomittaukset on suositeltavaa tehdä käyttäen vähintään viittä tai kuutta pitoisuudeltaan poikkeavaa näytettä. Lisäksi jokaisella pitoisuudella tehdään useampi toisto.¹¹⁻¹³ Lähteiden^{10,11,13}

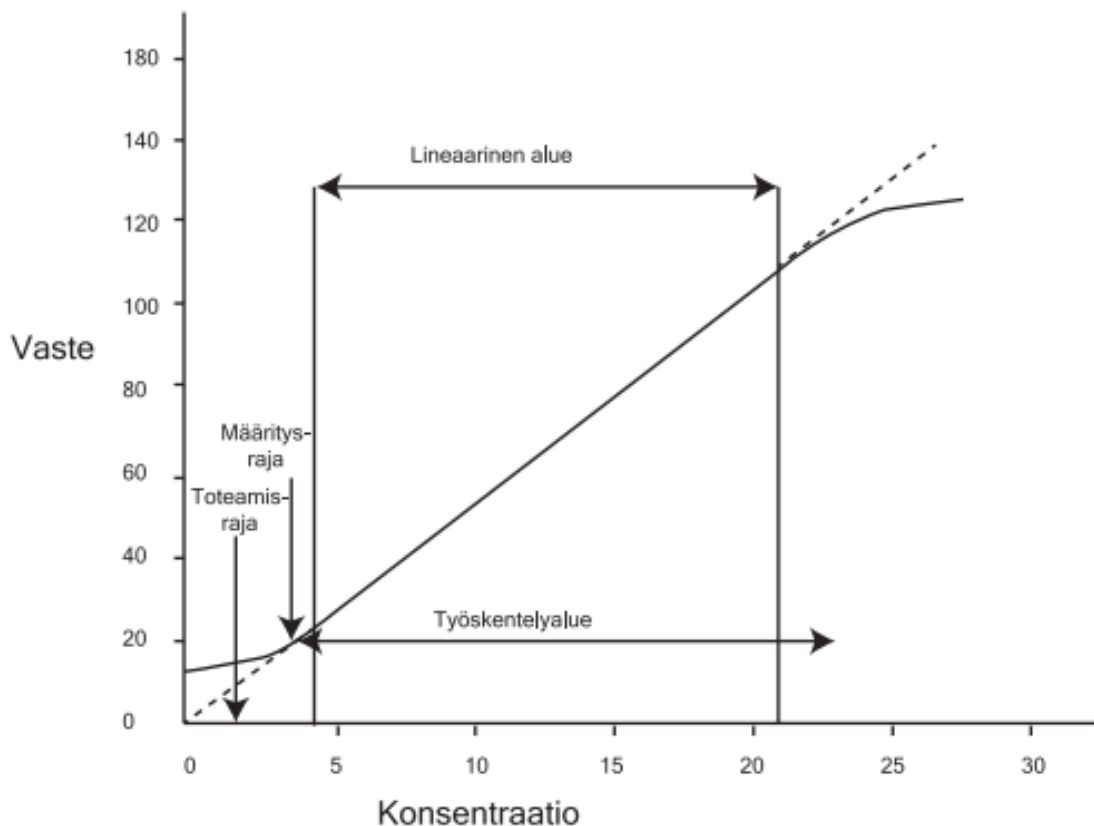
mukaan kaksi tai kolme toistoa kullakin pitoisuudella on riittävä määrä. Saaduista kalibraatiotuloksista muodostetaan kuvaaja pitoisuuden funktiona. Tässä vaiheessa on huomattava, että mitauslaitteen antamien tulosten tulee olla suoraan verrannollisia pitoisuuteen eli tarvittaessa mitaustulokset tulee muuntaa laskennallisesti.¹⁰ Mittaukset voidaan toistaa myös eri päivinä, jolloin voidaan havaita mahdolliset näytetaustan sisäiset muutokset, jotka voivat muuttaa lineaarista aluetta. Tällaista näytetaustan vaikutusta tuloksiin voidaan tutkia mittaamalla näytteitä, joihin on lisätty tunnetut määrät analyyyttiä, sekä näytteitä, joihin ei ole tehty lisäyksiä. Jos tuloksista muodostettavat kalibraatiokäyrät ovat yhdensuuntaiset, näytetaustan mahdolliset sisäiset muutokset/häiriöt eivät vaikuta lineaarisuuteen.¹⁶

Useissa julkaisuissa menetelmän lineaarisuuden osoitukseksi esitetään kalibraatiokäyrälle tehdyn suoran sovituksen korrelaatiokerroin, r , jonka arvo on lähellä lukua yksi.¹³ Korrelaatiokerroin ei kuitenkaan suoraan kerro lineaarisuudesta ja sen arvo riippuu myös kalibraatiopisteiden määrästä.^{11,13} Lineaarisuuden ja korrelaatiokertoimen välillä on silti yhteys, sillä jos menetelmä on lineaarinen, korrelaatiokertoimen arvo on yksi. Vastaava implikaatio toiseen suuntaan – jos $r = 1$, niin menetelmä on lineaarinen – ei puolestaan päde.¹³ Korrelaatiokerrointa ei siis tulisi käyttää ainoana lineaarisuuden mittarina. Sen sijaan lineaarisuus voidaan osoittaa tutkimalla jäännöskaaviota.^{15,16} Jäännösarvot kuvaavat mitaustuloksena saadun todellisen y :n arvon ja regressiokäyrältä ennustetun y :n arvon erotusta esitettynä jokaiselle eri x :n arvolle eli jokaiselle pitoisuudelle. Jos jäännösarvot jakaantuvat satunnaisesti nollan molemmin puolin, menetelmä on tutkitulla alueella lineaarinen.^{10,16} Mikäli jäännöskaaviossa on havaittavissa systemaattisia trendejä, ne viittaavat epälinearisuuteen tai mitaustulosten varianssien ei-homogeenisuuteen. Tällöin on suositeltavaa käyttää painotettua regressiota.^{10,15,16} Joissakin tapauksissa voidaan käyttää myös ei-lineaarisen funktion sovittamista tuloksiin. Tosin tällöin tutkittavien näytteiden määrää tulee lisätä.¹⁰

Toinen vaihtoehtoinen tapa lineaarisuuden määrittämiseen on vastekertoimien (engl. response factors) avulla.^{15,16} Vastekertoimet saadaan jakamalla jokainen mitaustulos eli vaste mitatun standardiliuoksen pitoisuudella. Kertoimista tehdään kuvaaja pitoisuuden suhteen. Pitoisuusvälillä, jossa menetelmä on lineaarinen, muodostuvan käyrän tulisi olla vaakasuora viiva lähellä nollaa.^{15,16} Pienillä pitoisuuksilla kuvaajassa esiintyy positiivisia poikkeamia vaakasuoruudesta ja suurilla pitoisuuksilla negatiivisia poikkeamia. Kertoimista saadun kuvaajan ylä- ja alapuolelle piirretään kaksi yhdensuuntaista suoraa, jotka ovat 95 % ja 105 % vastekertoimien

muodostaman suoran arvosta tai arvojen keskiarvosta.^{15,16} Mikäli vastekertoimista muodostuva suora leikkaa nämä lisätyt suorat, menetelmä on lineaarinen leikkauspisteiden rajaamalla pitoisuusvälillä. Vastaavasti, jos leikkauspisteitä ei löydy, menetelmä on lineaarinen koko tutkitulla pitoisuusvälillä, jos pienin konsentraatioista on toteamisrajaa suurempi.¹⁵

Termi mittausalue eli toiminta-alue (engl. working range) kuvaa sitä pitoisuusväliä, jolla menetelmä tai mittauslaite tuottaa tuloksia hyväksyttävällä epävarmuudella.^{8,10} Lisäksi menetelmälle tulee olla osoitettu täsmällisyys, tarkkuus ja lineaarisuus kyseisellä pitoisuusvälillä.¹³ Mittausalueen alaraja on määritysraja ja ylärajan muodostavat ne pitoisuudet, joilla havaitaan merkittäviä poikkeamia analyttisessä herkkyudessa.¹⁰ Mittausalue on siis laajempi kuin menetelmän lineaarinen alue.^{12,13} Lineaarisen alueen ja mittausalueen suhteutumista toisiinsa on havainnollistettu kuvassa 2.



Kuva 2. Esimerkki mittausalueen määrittämisestä varten muodostettavasta kuvaajasta.⁸ Kuvassa on havainnollistettu parametrien, lineaarinen alue, työskentely- eli mittausalue, määritysraja ja toteamisraja, sijoittumista toistensa suhteen.

Mikäli tutkittava näyte täytyy esikäsitellä, esimerkiksi liuottaa tai laimentaa, ennen varsinaista mittausta, on mittausaluetta määritettäessä tutkittava kahta eri mittausaluetta, menetelmän ja laitteen mittausalueita. Laitteen mittausaluetta tutkittaessa täytyy todistaa laitteen vasteen lineaarisuus tai muu tunnettu riippuvuus, jota vaste noudattaa. Määrittäminen tehdään lineaarisuuden määrittämisen ohjeiden mukaan konsentraatioväliltä, joka ylittää odotetun mittausalueen ± 10 prosentilla. Lisäksi täytyy osoittaa, että laitteen toiminta-alue on yhdenmukainen menetelmän käyttötarkoituksen edellyttämän toiminta-alueen kanssa ja että laitteen kalibrointimenetelmä on sopiva. Kalibrointimenetelmän sopivuutta voidaan arvioida kalibraatiomittausten tuloksista muodostetun kuvaajan ja jäännöskaavioiden avulla sekä arvioimalla menetelmän mittausalue.¹⁰

Menetelmän toiminta-alue tulee niin ikään määrittää jokaiselle erilaiselle näytetaustalle, ja sen määrittämiseksi tarvitaan näytteet tunnetuilla pitoisuuksilla sekä nollanäytteet. Nollanäyte on matriisillinen eli näytetaustallinen näyte, jossa ei ole tutkittavaa analyyttiä. Näytteiden tulee edustaa 6–10 eri pitoisuutta ja kattaa koko tutkittava pitoisuusväli. Mittauslaite kalibroidaan tutkittavan menetelmän mukaisesti ja analysoitaville näytteille tehdään kaikki menetelmässä esitetyt käsittelyt. Näytteet mitataan kaksi tai kolme kertaa, ja analyyttipitoisuus lasketaan, mikäli mittauslaite ei anna sitä suoraan tulokseksi. Mittaustuloksista muodostetaan kuvaaja, josta on esitetty esimerkki kuvassa 2. Kuvaajasta voidaan silmämääräisesti arvioida mittausalueen ala- ja ylärajat. Niiden tueksi esitetään tulokset täsmällisyys- ja poikkeamamäärittämisistä, jos ne on määritetty koko mittausalueelta.¹⁰

2.2.3 Toteamis- ja määrittämiss raja

Toteamisraja (engl. limit of detection, LOD) määritellään pienimpänä analyyttipitoisuutena, joka voidaan luotettavasti havaita ja joka eroaa nollanäytteen arvosta merkittävästi.^{10,13,15-17} Pitoisuuden tarkkaa arvoa ei voida kuitenkaan välttämättä määrittää.^{13,15,16} Suomeksi toteamisrajan synonyymeinä voidaan käyttää havaitsemisrajaa ja ilmaisurajaa.⁸ Yleisesti toteamisraja määritetään tutkimalla nollanäytteitä.^{10,12} Tarvittaessa voidaan käyttää myös näytteitä, joiden pitoisuus on lähellä arvioitua toteamisrajan arvoa. Mikäli kumpiakaan edellä mainituista vaihtoehdoista ei ole saatavilla, määrittäminen voidaan tehdä myös reagenssinollilla, jotka sisältävät kaikki menetelmää noudatettaessa rutiininäytteeseen lisättävät reagenssit ja liuottimet.¹⁰ Näytetyypistä riippumatta näytteillä tehdään 6–10 rinnakkaista määrittäystä ja tuloksista lasketaan

keskiarvo, x , ja keskihajonta, s .^{10,12} Saatujen tulosten avulla toteamisraja arvioidaan seuraavasti^{12,15}

$$\text{toteamisraja} = x + 3 \cdot s. \quad (1)$$

Toteamisrajaa määritettäessä on huomioitava, että menetelmän ja mittauslaitteen toteamisrajat eroavat toisistaan. Jos näytteet analysoidaan suoraan ilman menetelmään kuuluvia esikäsitteilyitä, tulokseksi saadaan pelkkä laitteen toteamisraja. Menetelmän toteamisrajaa määritettäessä jokaiselle näytteelle on siis tehtävä kaikki rutiininäytteillekin tehtävät esikäsitteilyt.¹⁰

Määrittämissraja (engl. limit of quantification, LOQ) kuvaa pienintä pitoisuustasoa, joka voidaan määrittää kvantitatiivisesti riittävällä täsmällisyydellä.^{10,13,15} Määrittämissrajalle tulee siis voida esittää epävarmuusarvio.¹⁷ Määrittämissraja määritetään samoin kuin toteamisraja nollanäytteitä tutkimalla, mutta määrittämissrajan yhtälö on muotoa

$$\text{määrittämissraja} = x + k \cdot s, \quad (2)$$

jossa k on 5, 6 tai 10.^{10,12,13,16,18} IUPACin oletusarvo kertoimelle k on 10, joka vastaa 10 % suhteellista keskihajontaa.^{10,18} Määrittämissraja on arvoltaan suurempi kuin toteamisraja ja näiden parametrien väliin jää alue, jolla analyytin läsnäolo näytteessä voidaan todeta luotettavasti, mutta sen pitoisuuden määrittäminen antaa epäluotettavan arvon.¹²

2.2.4 Herkkyys

Herkkyys kuvaa menetelmän kykyä erottaa pienet muutokset analyyttipitoisuudessa tai -määrässä. Menetelmä on siis herkkä, jos pieni pitoisuuden muutos aiheuttaa suuren muutoksen mittausvasteessa.¹⁶ Herkkyys määritellään lineaarisuutta ja mittausaluetta määritettäessä tehtävistä kalibraatiomittauksista saatavan kuvaajan kulmakertoimena.^{10,16,19} Jos menetelmä on lineaarinen, herkkyysarvo on sama kaikilla lineaarisen alueen pitoisuuksilla.^{13,15} Herkkyys ei ole tärkeimpiä suorituskykyparametreja ja sen arvo voi riippua mittausasetuksista ja olla siten sattumanvarainen.^{10,19} Herkkyysarvo määrittämisestä on kuitenkin hyötyä tutkittaessa esimerkiksi spektrofotometrillä mittausjärjestelmää, sillä mitattava absorbanssi noudattaa Beer-Lambertin lakia. Herkkyysarvo voidaan tällöin käyttää mittausjärjestelmän toiminnan tarkastamiseen.¹⁰

2.2.5 Tarkkuus

Menetelmän tarkkuus (engl. accuracy) kuvaa menetelmällä mitatun mittaussuureen arvon ja suureen todellisen arvon yhtäpitävyyttä.^{8,10,11,16} Termin nimeämisessä on suurta vaihtelua validointiohjeita antavien järjestöjen kesken. Jotkin järjestöt nimeävät edellä esitetyn määritelmän kuvaaman parametrin todenmukaisuudeksi tai poikkeamaksi.¹³ Määritellään tarkkuus tässä tutkielmassa kuitenkin yllä esitettyyn tapaan yhtenevästi EURACHEM¹⁰ määritelmän kanssa. Mitatun arvon ja suureen todellisen arvon yhtäpitävyyteen vaikuttavat menetelmässä esiintyvät systemaattiset ja satunnaiset virheet.¹⁰ Tarkkuuden voidaan siis ajatella koostuvan kahdesta näitä virheitä kuvaavasta parametrusta: todenmukaisuudesta (engl. trueness) ja täsmällisyydestä (engl. precision).^{10,11,15,16} Näiden parametrien lisäksi tarkkuuden ilmaisutapana käytetään yhä useammin menetelmän epävarmuutta, jolloin tulokseksi saadaan yksi luku.¹⁰

2.2.5.1 Täsmällisyys

Täsmällisyys (engl. precision) kuvaa toistomittauksilla saatujen tulosten keskinäistä lähekkäisyyttä ja menetelmässä esiintyviä satunnaisia virheitä.^{8,10} Vanhentunut, mutta kuvaavampi synonyymi täsmällisyydelle on toistotarkkuus. Täsmällisyyteen sisältyvät termit toistettavuus ja uusittavuus.⁸ Toistettavuus (engl. repeatability) on se täsmällisyys, joka saadaan, kun toistomittaukset suorittaa sama analyttikko samoilla laitteilla lyhyellä aikavälillä.^{8,10,16} Uusittavuus (engl. reproducibility) puolestaan kuvaa mittausten täsmällisyyttä, kun mittaukset tehdään eri laboratorioissa eri laitteilla käyttäen samaa menetelmää ja näytettä.^{12,16} Lisäksi voidaan puhua toistettavuuden ja uusittavuuden määritelmien väliin jäävästä osittaisesta täsmällisyydestä (engl. intermediate precision), joka saavutetaan, kun mittaukset tehdään pitkällä aikavälillä yhdessä laboratoriossa samalla menetelmällä ja näytteellä. Mittauksen voi tällöin suorittaa eri analyttikko käyttäen eri välineitä ja laitteita, esimerkiksi eri vaakaa.^{8,10,16}

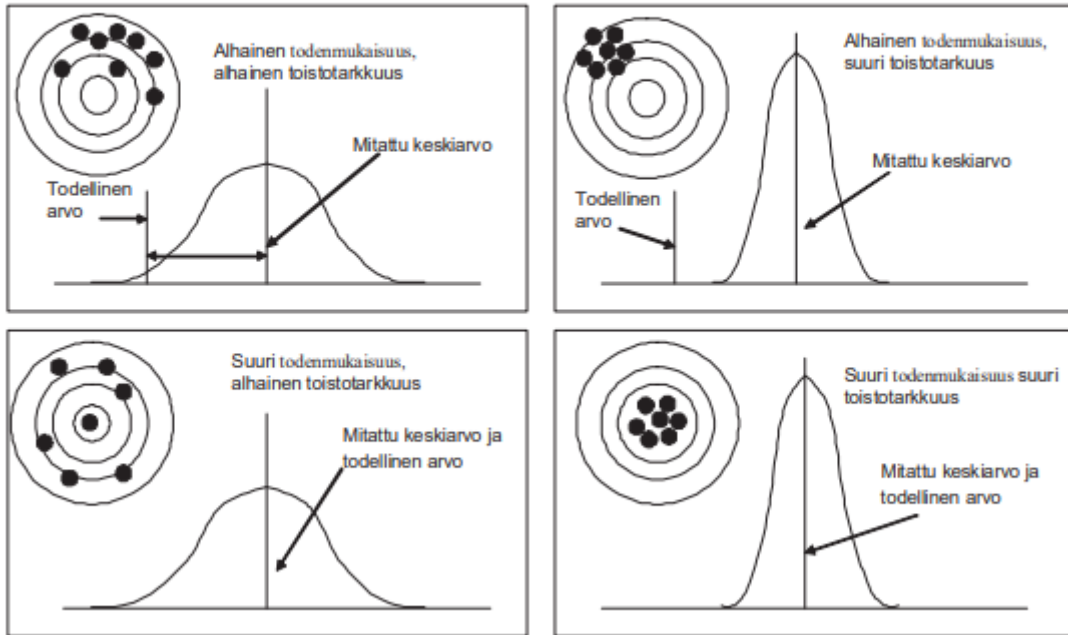
Täsmällisyys määritetään toistokokeilla.^{8,10} Toistettavuustäsmällisyys voidaan määrittää tyypiltään ja pitoisuudeltaan erilaisten näytteiden rinnakkaismäärittäyksillä ja uusittavuustäsmällisyys laboratorioden välisin vertailumittauksin. Uusittavuus määritetään kuitenkin usein vain standardointivaiheessa.¹² Rutiinikäytössä esiintyvien tyyppillisten vaihteluiden esille tuomiseksi ja luotettavan täsmällisyysarvion saamiseksi, toistokokeisiin tulee kuitenkin sisällyttää kaikki

mahdolliset rutiinikäyttöön liittyvät poikkeamat käyttöolosuhteissa sekä erilaiset näytetyypit ja analyyttipitoisuudet. Toistokokeiden toistojen määrä vaihtelee eri ohjeistuksissa, mutta riittävä toistojen määrä tiettyä näytettä kohti on yleensä 6–15 välillä.¹⁰

2.2.5.2 Todenmukaisuus, poikkeama ja saanto

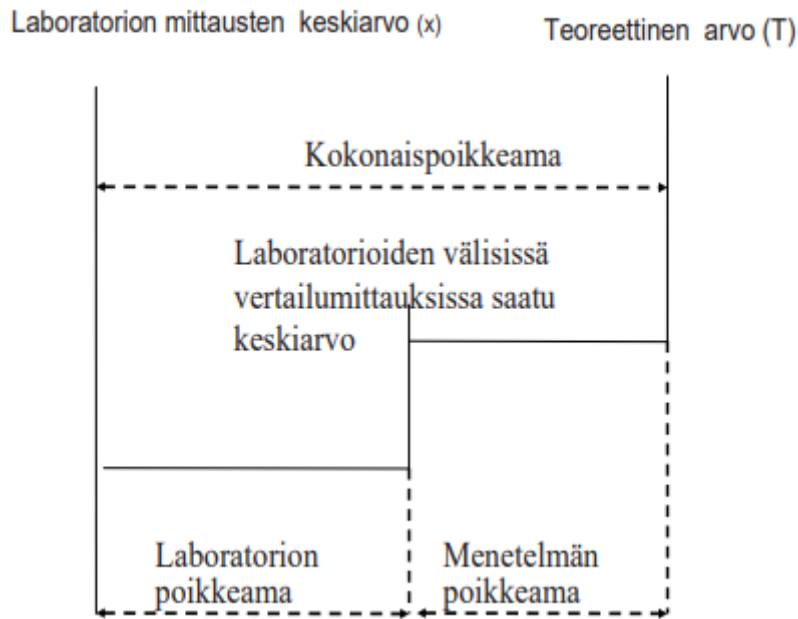
Menetelmän todenmukaisuus (engl. trueness) kuvaa menetelmän systemaattista virhettä ja se määritellään äärettömästä määrästä mittauksia saadun keskiarvon ja hyväksyttävän vertailuarvon tai todellisen arvon yhtäpitävyytenä.^{8,10,11,16} Kuvassa 3 on havainnollistettu todenmukaisuutta ja täsmällisyyttä sekä niiden eroa. Ääretöntä määrää mittauksia ei voida tehdä, joten käytännössä todenmukaisuus ilmaistaan poikkeamana (engl. bias).^{8,10} Poikkeamaa määritettäessä on huomioitava, että sen suuruus voi riippua näytetaustasta tai näytteen pitoisuustasosta. Poikkeama määritetään yleisesti vertaamalla toistomittauksilla saatua tulosten keskiarvoa vertailuarvoon, joka saadaan joko vertailumateriaalista tai toisella jo validoidulla menetelmällä. Kolmas vaihtoehto määrittää poikkeama on saantokokeiden avulla.^{8,10,16} Termi saanto kuvaa koko analyysimenetelmän kykyä mitata tutkittavan analyytin kokonaismäärä ja sitä pidetään usein myös erillisenä validointiparametrinä. Se tulee määrittää osana validointiprosessia, vaikka poikkeama määritettäisiin toistomittauksilla.^{12,15,16}

Todenmukaisuus kuvaa systemaattisten virheiden osuutta ja toistotarkkuus satunnaisia virheitä



Kuva 3. Havainnollistus termeistä täsmällisyys (kuvassa toistotarkkuus) ja todenmukaisuus sekä niiden eroista.⁸

Poikkeama koostuu menetelmälle ominaisista, laboratoriosta riippumattomista, systemaattisista virheistä, sekä laboratorion systemaattisista virheistä. Kokonaispoikkeama koostuu näistä kahdesta poikkeamatyypistä ja muodostuu teoreettisen arvon ja laboratoriossa saadun keskiarvon välille. Laboratorion poikkeama voidaan arvioida eri laboratorioiden välisistä vertailumittauksista, mutta mikäli tällaista tietoa ei ole saatavissa, laboratorio voi määrittää ainoastaan kokonaispoikkeaman.^{10,12} Kuvassa 4 on havainnollistettu kokonaispoikkeaman muodostumista. Kuvasta poiketen poikkeamatyypit voivat kuitenkin vaikuttaa myös vastakkaisiin suuntiin.



Kuva 4. Kokonaispoikkeaman muodostuminen laboratorion ja menetelmän poikkeamista.⁸

Määritettäessä poikkeama vertailumateriaalien avulla analysoidaan 6–10 rinnakkaista vertailumateriaalinäytettä ja lasketaan saaduista tuloksista tulosten keskiarvo ja keskihajonta. Saatua tulosta verrataan vertailumateriaalin tunnettuun arvoon ja lasketaan poikkeama B yhtälöllä

$$B = x - T, \quad (3)$$

jossa x on tulosten keskiarvo ja T on tunnettu vertailuarvo. Poikkeama esitetään yleisesti prosentteina, jolloin $B(\%)$ lasketaan yhtälöllä

$$B(\%) = \frac{x - T}{T} \cdot 100. \quad (4)$$

Vertailumateriaali vaikuttaa paljon tulosten luotettavuuteen. Ideaalinen vertailumateriaali on sertifioitu vertailumateriaali (engl. certified reference material, CRM), jonka näytetausta/matriisi vastaa näytteitä, joita menetelmällä on tarkoitus tutkia. Lisäksi vertailumateriaalin ominaisuusarvojen tulisi olla lähellä oikeiden näytteiden arvoja. Jos tällaisia vertailumateriaaleja ei ole saatavissa, vertailumateriaalit voidaan valmistaa itse lisäämällä tunnettu määrä puhdasta sertifioitua vertailumateriaalia tarkoitukseen sopivaan näytetaustaan.^{10,12}

Jos vertailumateriaaleja ei ole saatavissa, poikkeama voidaan määrittää saantokokeiden avulla. Määrittystä varten näytteeseen tai nollanäytteeseen lisätään tunnettu määrä analyyttiä.

Validoitavalla menetelmällä määritetään analyyttipitoisuus näytteestä, johon on lisätty analyyttiä sekä vastaavasta näytteestä, johon lisäystä ei ole tehty. Kumpaakin näytetyyppiä tulee mitata 6–10 rinnakkaista rinnakkaisnäytettä eli replikaattia.^{10,16} Saanto, R , esitetään saantoprosenttina ja lasketaan yhtälöllä

$$R(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \cdot 100 \%, \quad (5)$$

jossa C_1 on tunnetuilla lisäyksillä tehtyjen mittausten keskiarvo, C_2 on mittaustulosten keskiarvo näytteistä, joihin ei ole lisätty analyyttiä, ja C_3 tunnetun lisäyksen laskennallinen arvo. Mitä suurempi saantoprosentti on, sitä pienempi poikkeama menetelmässä esiintyy ja menetelmän todenmukaisuus on suurempi. Ongelmallista tässä määrittystavassa on se, että lisätty analyytti ei välttämättä sitoudu näytetaustaan yhtä tiukasti kuin näytteessä luonnostaan esiintyvä analyytti, jolloin saadaan tavallisilla näytteillä saatavaa saantoa suurempi saantoprosentti.^{10,12,16}

Kolmas vaihtoehto on arvioida menetelmän käyttökelpoisuus toisen menetelmän avulla. Menetelmän tulee olla validoitu ja sen tarkkuus tunnettu. Arviointi voidaan tehdä menetelmällä, joka antaa tuloksia yleisesti pienemmällä epävarmuudella kuin validoitava menetelmä. Menetelmän epävarmuus voi olla myös samaa suuruusluokkaa validoitavan menetelmän kanssa. Tällöin on tarkoitus osoittaa, että menetelmien tuloksissa ei ole merkittävää poikkeamaa ja käytössä oleva menetelmä voidaan esimerkiksi korvata uudella menetelmällä. Käytettävien näytteiden ei tarvitse olla sertifioituja vertailumateriaaleja, vaan sekä vertailuarvo, että validoitavan menetelmän tulosten keskiarvo voidaan määrittää oikeilla näytteillä. Poikkeama lasketaan samoin kuin vertailumateriaaleilla määritettäessä, yhtälöillä (3) ja/tai (4).¹⁰

2.2.6 Häiriökestävyys ja toimintavarmuus

Häiriökestävyys ja toimintavarmuus kuvaavat menetelmän kykyä antaa muuttumattomia tuloksia, kun koeolosuhteisiin tehdään pieniä muutoksia.^{10,13,16,19} Nämä parametrit antavat siis viitteen menetelmän luotettavuudesta normaalissa käytössä, jossa tapahtuu usein pieniä muutoksia menetelmässä esiteltyihin käyttöolosuhteisiin, ja laboratorioiden menettelytavat poikkeavat menetelmän toimintaohjeista huolimatta hieman toisistaan.^{10,12} Tällaisia muutoksia voivat aiheuttaa esimerkiksi reagenssien ja muiden materiaalien ikä ja valmistaja, analyttikoiden väliset

erot sekä erot laitteissa kuten lämmityslaitteiden tehossa. Englanniksi käytetään yleensä termiä ruggedness tai myös robustness.^{10,12,19}

Häiriökestävyyttä ja toimintavarmuutta arvioidaan tekemällä tarkoituksella pieniä muutoksia koeolosuhteisiin.^{10,12,16,19} Kokeissa käytetään vertailumateriaaleja tai oikeita näytteitä.¹⁰ Muutettavat olosuhteet valitaan arvioimalla mitkä muuttujat voisivat mahdollisesti aiheuttaa muutoksia tuloksiin ja niitä muunnellaan siinä suuruusluokassa, mitä laboratoriossa voidaan olettaa esiintyvän.¹² Jokaista olosuhteiden muutosta voidaan tutkia yksitellen tai myös useampi kerrallaan, sillä useimpien muuttujien vaikutus on hyvin pieni.¹⁹ Tuloksista poimitaan ne muuttujat, joilla on suurin vaikutus menetelmän tuloksiin ja niiden tilastollinen merkittävyys määritetään.¹⁰

2.2.7 Menetelmän ja mittauksen epävarmuus

Menetelmän epävarmuus kuvaa kyseisellä menetelmällä tehdyn määrittelyn epävarmuutta. Tähän epävarmuuteen huomioidaan kaikki menetelmän vaiheet näytteenotosta lähtien. Puhuttaessa mittauksen epävarmuudesta tarkoitetaan ainoastaan menetelmään kuuluvan mittauksen epävarmuutta, joka kuvaa mittaustulokseksi saatujen arvojen hajontaa.^{12,13,20} Epävarmuuden arviointi sekoitetaan usein virhearvion tekemiseen. Epävarmuusarvioon ei kuitenkaan sisällytetä virheitä vaan virheet korjataan ja arviossa otetaan huomioon korjausten epävarmuudet.⁸

Menetelmän epävarmuus ei ole varsinaisesti suorituskykyparametri, sillä sen suuruutta arvioidessa huomioidaan menetelmä laajemmin kuin pelkän mittauksen osalta, toisin kuin muita suorituskykyparametrejä määritettäessä. Epävarmuuden määrittäminen antaa kuitenkin tietoa menetelmän sopivuudesta käyttötarkoitukseensa ja mahdollisuuden verrata tuloksia muiden vastaavien tulosten kanssa, minkä vuoksi se on yksi tärkeimmistä validoinnissa määritettävistä asioista.^{10,13,16}

Mittauksen epävarmuus määritetään arvioimalla epävarmuuskomponentit ja laskemalla ne liittäen yhteen.⁸ Epävarmuusarvion tekemisessä olennaista on tunnistaa epävarmuuslähteet, kuten esimerkiksi toistettavien kokeiden olosuhteiden muutokset, standardien ja

vertailumateriaalien epätarkat arvot tai mittaajan virhe analogisia mittalaitteita lukiessa, ja hahmottaa, kuinka paljon mikäkin epävarmuuslähteistä vaikuttaa tutkitun suureen epävarmuuteen ja onko epävarmuuslähteiden välillä jonkinlainen riippuvuus.²⁰ Eri epävarmuuskomponenttien suuruudet voidaan arvioida joko tilastollisesti tai muilla keinoilla. Epävarmuuskomponentti, jonka suuruus voidaan määrittää tilastollisesti, luokitellaan tyyppin A epävarmuudeksi ja muilla tavoin eli esimerkiksi aiempien mittaustulosten, laitteen kalibrointitodistuksen tai kokemukseen perustuvan arvioinnin avulla määritelty epävarmuuskomponentti tyyppin B epävarmuudeksi.^{8,20} Tässä tutkielmassa ei käsitellä laajemmin epävarmuutta, sillä se on hyvin laaja aihe. Lisätietoa ja täsmällisiä ohjeita epävarmuuden määrittämiseksi löytyy esimerkiksi lähteestä 20.

2.3 Spektrofotometria

Spektrofotometria ja kolorimetria ovat menetelmiä, joissa analyytin pitoisuus vesinäytteessä määritetään näytteen absorboiman valon perusteella. Kun absorboituva valo on näkyvän valon spektrin alueelta, liuos on ihmissilmällä tarkasteltuna värillinen ja analyyttipitoisuus voidaan määrittää esimerkiksi silmämääräisesti vertaamalla näytteen väriä esimerkiksi standardiliuosten sarjaan tai laimentamalla näytettä, kunnes se on saman sävyistä tunnetun standardiliuoksen kanssa. Nykyään absorboituneen valon määrän määrittämisessä käytetään kuitenkin tarkempaa, spektrofotometristä menetelmää, jossa absorboituneen valon määrä määritetään valosähköisesti. Valona voidaan tällöin käyttää myös valoa näkyvän valon spektrin ulkopuolelta, kuten esimerkiksi ultraviolettivaloa, ja aallonpituutta voidaan muuttaa halutusti. Tällöin puhutaan spektrofotometriasta, kun taas kolorimetrialla viitataan joko silmämääräiseen arviointiin tai spektrofotometriseen mittaamiseen tietyllä aallonpituudella.^{21,22}

Spektrofotometriaan liittyy olennaisesti Beer-Lambertin laki, josta puhutaan myös Beerin lakina.²² Sen mukaan liuokseen absorboituneen monokromaattisen valon määrä on suoraan verrannollinen liuoksen pitoisuuteen.²³ Yhtälönä Beer-Lambertin laki ilmaistaan seuraavasti

$$A = \epsilon cl \quad (6)$$

jossa A on absorbanssi, ϵ on molaarinen absorptiokerroin, c on analyyttipitoisuus ja l on valon läpäisemän liuoskerroksen paksuus.²² Absorbanssi voidaan määritellä myös transmittanssin, T , avulla. Transmittanssi kuvaa analysoitavaan näytteeseen kohdistetun valon intensiteetin, I_0 , ja

näytteen läpäisseen valon intensiteetin, I , suhdetta ja transmittanssin ja absorbanssin välillä on logaritminen yhteys²³

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = \log_{10} \left(\frac{1}{T} \right) = -\log_{10} T. \quad (7)$$

Analyytin pitoisuuden määrittämiseksi verrataan siis näytteen läpäisseen monokromaattisen valon intensiteettiä valon alkuperäiseen intensiteettiin ja saatua absorbanssia verrataan tunnetun pitoisuuden näytteiden muodostamaan kuvaajaan tai pitoisuus lasketaan Beer-Lambertin lailla, jos molaarinen absorptiokerroin on tiedossa. Näytetaustasta aiheutuva absorptio huomioidaan mittaamalla nollanäyte mittausten aluksi ja vähentämällä saatu absorbanssi mitattavista näytteistä ja standardeista.^{22,23}

Jotta analyytti voidaan havaita tehokkaasti ja luotettavasti, sen tulisi absorboida valoa jollain tietyllä aallonpituudella voimakkaasti ja vastaavasti kyseisellä aallonpituudella muiden näytetaustan aineiden absorption tulisi olla vähäistä. Lisäksi absorboituneen valon määrän tulisi olla verrannollinen analyyttipitoisuuteen. Jotkin analyytit voivat itsessään absorboida riittävästi, mutta usein analyytti on tarpeen muuttaa joksikin toiseksi, analyytin sisältäväksi, yhdisteeksi, joka absorboi voimakkaammin. Tällaiset yhdisteet ovat usein kompleksiyhdisteitä ja koska suurin osa kolorimetriassa hyödynnettävistä yhdisteistä on värillisiä, reagensseista puhutaan värinmuodostusreagensseista. Värinmuodostumisreaktiolle ja muodostuvalle yhdisteelle olisi toivottavaa, että väri on voimakas, se säilyy analyysin ajan, värin muodostusreaktio on nopea, lämpötilan vaihtelulla ei ole suurta vaikutusta ja ylimäärä reagenssia aiheuttaa aina saman muutoksen. Jos näytteessä esiintyy kahta värillistä yhdistettä, jotka eivät vuorovaikuta keskenään kemiallisesti, niiden absorbanssit ovat additiivisia ja yhdisteiden pitoisuudet voidaan määrittää vaihtamalla aallonpituutta.^{21,22} Tämän työn kokeellisen osuuden värinmuodostusreaktioista on kerrottu Menetelmät-osiossa.

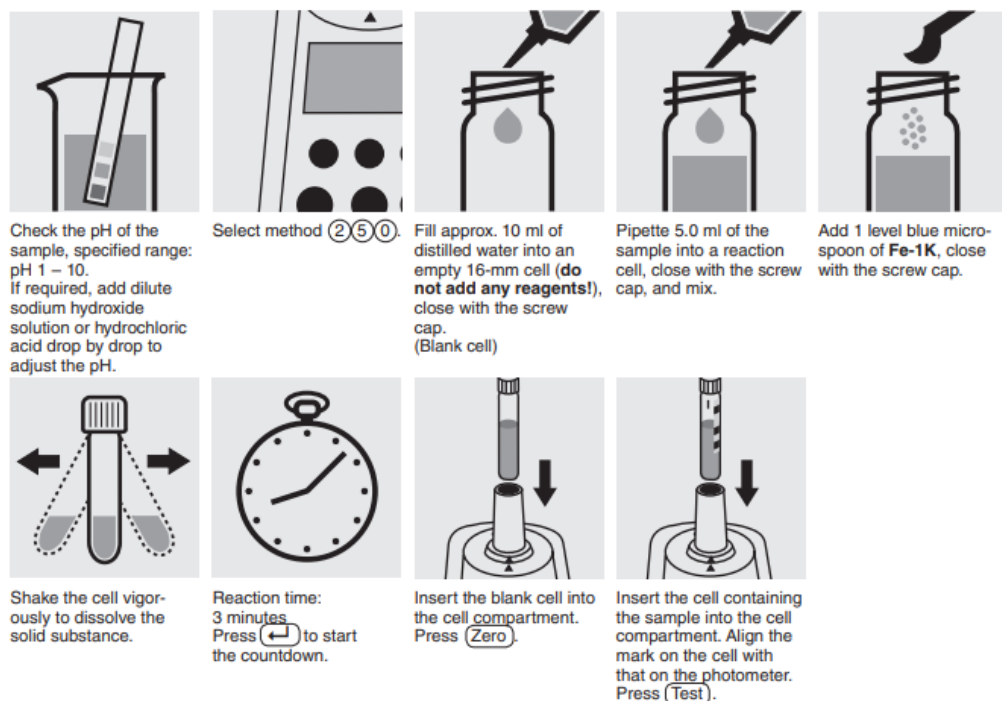
3 Käytetyt reagenssit ja laitteet

Tutkittavat näytteet olivat jäteyhtiö Sammakkokangas Oy:n suodatuskentän näytteenotto pisteistä otettuja vesinäytteitä. Näytteiden kestäväintiin käytettiin väkevää typpihappoa. Analyysit tehtiin ICP-OES-laitteistolla ja Spectroquant Move 100 -kolorimetrillä. Kolorimetrillä tehdyissä määrittelyissä käytettiin kolorimetrin kanssa yhteensopivia testipakkauksia, jotka

sisältävät lasiset reaktioputket ja tarvittavat reagenssit. Täsmällistä tietoa testipakkausten reagenssien sisällöstä ei ole saatavilla. Lämmittimenä käytettiin kuivahaudetta (VWR analoginen blokkilämmitin), jonka lämmityspalassa oli sopivat reiät reaktioputkille. Alkuainestandardeina käytettiin 1000 mg/l rautaliuosta ja kaliumdivetyfosfaattiliuosta, joka oli fosforin suhteen pitoisuudeltaan 1000 mg/l.

4 Menetelmät

Tässä tutkimuksessa käytettiin spektrofotometrisinä määrittämenetelminä Spectroquant Move 100 -kolorimetrin menetelmiä 114549 raudalle ja 114543 kokonaisfosforille. Näihin menetelmiin on saatavilla testipakkauksia, joiden avulla mittaukset suoritettiin. Valmistaja ei ole ilmoittanut reagenssien tarkkaa sisältöä, mutta avataan tässä hieman menetelmien kemiallisia reaktioita saatavilla olevan tiedon, menetelmäohjeiden ja reagenssien käyttöturvallisuustiedotteiden, perusteella. Kuvissa 5 ja 6 on esitetty kolorimetrin käyttöohjeessa esitetyt mittaushjeet. Testipakkausten mukana tulevat tarkemmat menetelmäohjeet löytyvät liitteistä 1 ja 2.



Kuva 5. Mittausohje raudan määrittämiseksi Spectroquant Move 100 -kolorimetrillä.²⁴

Raudan testiputkessa on valmiina askorbiinihappoa, ammoniumtioglykolaattia ja tioglykoli-happoa sisältävä orgaanisten yhdisteiden vesiliuos. Kun näytettä lisätään testiputkeen, askorbiinihappo pelkistää kaikki rautaionit rauta(II)ioneiksi ja tioglykolaatti toimii puskuriliuoksena reaktioille. Testiputkeen lisätään Fe-1K-reagenssia, joka on triatsiinijohdannaisen sisältävä orgaanisten yhdisteiden seos. Triatsiinijohdannainen reagoi rauta(II)ionien kanssa muodostaen punertavan violetin kompleksiyhdisteen.

Check the pH of the sample, specified range: pH 0 – 10. If required, add dilute sulfuric acid drop by drop to adjust the pH.

Pipette 5.0 ml of the sample into a reaction cell, close with the screw cap, and mix.

Add 1 dose of P-1K using the green dose-metering cap, close with the screw cap.

Heat the cell in the thermoreactor at 120 °C (100 °C) for 30 minutes.

Remove the cell from the thermoreactor and place in a test-tube rack to cool to room temperature.

Select method 380.

Add 5 drops of P-2K, close with the screw cap, and mix.

Add 1 dose of P-3K using the blue dose-metering cap, close with the screw cap.

Shake the cell vigorously to dissolve the solid substance.

Reaction time: 5 minutes. Press to start the countdown.

Fill approx. 10 ml of distilled water into an empty 16-mm cell (**do not add any reagents!**), close with the screw cap. (Blank cell)

Insert the blank cell into the cell compartment. Press .

Insert the cell containing the sample into the cell compartment. Align the mark on the cell with that on the photometer. Press .

Quality assurance:

To check the measurement system (test reagents, measurement device, and handling) we recommended to use Spectroquant® CombiCheck 10, Cat.No. 114676, or the Standard solution for photometric applications, CRM, Cat.No. 125046.

Ready-to-use phosphate standard solution Certipur®, Cat.No. 119898, concentration 1000 mg/l PO₄³⁻, can also be used after diluting accordingly.

To check for sample-dependent effects the use of addition solutions (e.g. in CombiCheck 10) is highly recommended.

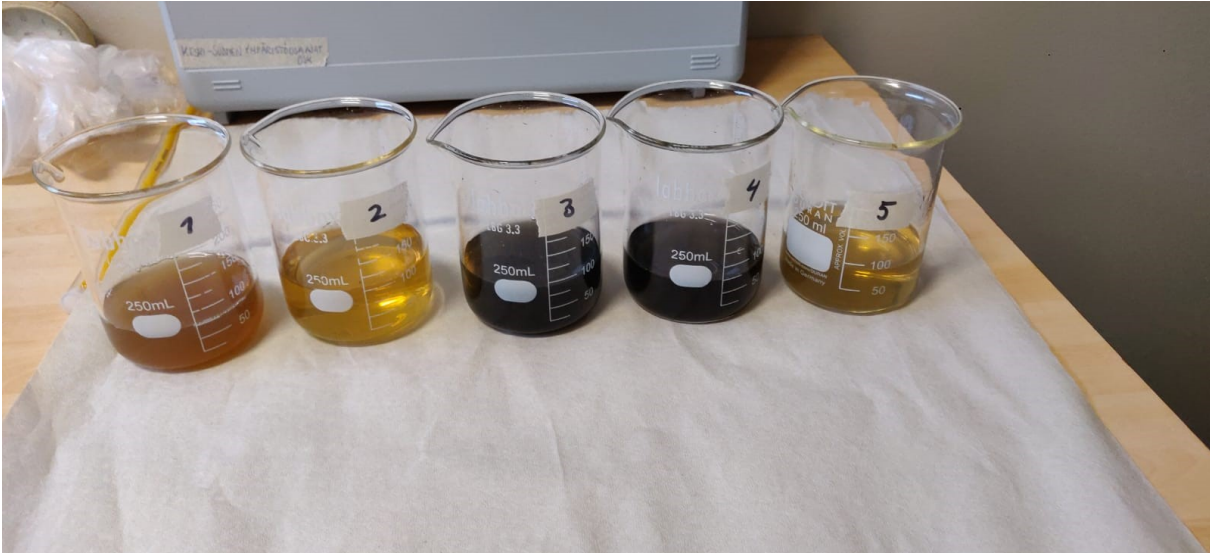
Release 08/2020 - Spectroquant® Move 100

Kuva 6. Mittausohje kokonaisfosforin määrittämiseksi Spectroquant Move 100 -kolorimet-rillä.²⁴

Kokonaisfosforia määritettäessä näytteelle täytyy tehdä hajotuskäsittely, jotta kaikki näytteessä oleva fosfori on ionimuodossa. Hajotusta varten testiputkeen lisätään P-1K-reagenssia, joka on epäorgaanisten yhdisteiden seos ja sisältää natriumnitraattia ja kaliumpersulfaattia. Tämän jälkeen testiputkea lämmitetään 120 °C 30 minuuttia. Hajotusprosessin aikana kaikki fosforia sisältävät yhdisteet pilkkoutuvat ja hapettuvat ortofosfaatti-ioneiksi. Reaktioseoksen jäähtyttyä siihen lisätään P-2K-reagenssia eli rikkihapon vesiliuosta, joka sisältää ammoniumheptamolybdaattia. Ortofosfaatti- ja molybdaatti-ionit muodostavat tällöin molybdofosforihappoa. Viimeisenä testiputkeen lisätään P-3K-reagenssia eli askorbiinihappoa, joka pelkistää molybdofosforihapon fosfomolybdeenisiniseksi (PMB).

5 Näytteiden analysointi

Näytteet haettiin Sammakkokangas Oy:n suodatuskentältä 15.9.2020. Näytteet kuljetettiin kylmälaukussa Jyväskylän yliopistolle ja kestäväintiin lisäämällä 1 ml väkevää typpihappoa 1 litraa näytettä kohti. Mahdollisista näytepisteistä valittiin pisteet 1, 3 ja 5, jotta saatiin selkeästi erityyppisiä näytteitä. Piste 1, biokentän rauhoituskaivo, on ensimmäinen suodatusalueen näytepisteistä. Piste 3 on noin puolella välissä suodatusprosessia ennen maasuodatusta. Kyseisessä vesialtaassa oli tämän tutkimuksen aikaan sinne lisättyä haketta, joten vesi oli hyvin tummaa ja sameaa. Piste 5 on viimeinen suodatuskentän näytepisteistä ja siitä vesi virtaa luontoon. Kuvassa 7 on esitetty kaikkien suodatuskentän mittauspisteiden näytteet.



Kuva 7. Näytevesien sävyt. Kuva on otettu 4.11.2020, mutta kuvan näytteet ovat ulkoisesti hyvin samanlaisia kuin 15.9.2020 otetut näytteet.

Laboratoriossa menetelmien ja kolorimetrin toimintaa testattiin mittaamalla laitteella synteettisiä näytteitä, alkuperäisiä näytteitä mittausalueelle laimennettuina ja näytteitä tunnetuilla lisäyksillä. Kolorimetrillä saatuja tuloksia verrattiin ICP-OES-laitteistolla saatuihin tuloksiin. Kolorimetrillä tehdyistä rautamittauksista suurin osa tehtiin ilman suodatusta ja muutama suodatuksella. Suodatus kuuluu rautamenetelmään ja optimaalinen suodatustapa olisi membraanisuo-datus 0,45 μm suodattimella.⁶ Kyseinen suodatin kuitenkin tukkeutui liian helposti analysoitavista näytteistä. Tutkimuksessa pyrittiin siis selvittämään, että minkä verran poikkeamaa syntyy, jos sameaa näytettä ei suodateta ja samalla testattiin suodatinpaperin läpi suodattamisen sopivuutta menetelmään.

Saatujen tulosten ja havaintojen perusteella kirjoitettiin suomenkieliset mittaus- ja työskentelyohjeet (Liite 3) testipakkausten mukana tulleita menetelmäohjeita hyödyntäen. Toimintaohjeet suunnattiin siten, että ne voisivat toimia opettelun tukena, jos Keski-Suomen Ympäristöosaajat osuuskunnan toimintaan liittyisi uusi henkilö, jolla ei ole juurikaan kokemusta kemiallisista kenttämittauksista. Toimintaohjeita ja menetelmiä testattiin vielä kenttäolosuhteissa 4.11. Tuolloin osuuskunnan jäsen teki mittaukset ohjeiden mukaisesti jokaisesta viidestä suodatuskentän pisteestä. Rautanäytteet suodatettiin tuolloin suodatinpaperilla (Whatman 41), jotta voitiin testata suodatuksen onnistumista kenttäoloissa.

6 Tulokset

6.1 Rautamittausten tulokset

Likimain kaikille laboratoriossa tehdyille kolorimetrimittauksille tehtiin rinnakkaisnäyte ja tulostaulukoissa ilmoitetut tulokset ovat rinnakkaisnäytteiden keskiarvoja. Laboratoriossa tehdyissä rautamittauksissa suurin rinnakkaisnäytteiden välinen ero oli 28 %. Jokainen mittaus myös toistettiin kolorimetrillä viiteen kertaan eli saman testiputken antama arvo mitattiin laitteella viidesti. Yksittäiselle rinnakkaisnäytteelle tulos laskettiin näiden toistomittausten keskiarvona. Laitteen antamien tulosten vaihtelu oli hyvin pientä, rautamäärityksissä suurin toistojen välinen ero oli 11 %.

Taulukossa 1 on esitetty synteettisillä ja tunnettujen lisäysten näytteillä laboratoriossa tehdyistä mittauksista saadut tulokset. Synteettiset näytteet tehtiin 1000 mg/l rautastandardiliuoksesta ja kaliumdivetyfosfaattiliuoksesta, joka oli fosforin suhteen pitoisuudeltaan 1000 mg/l. Synteettiset näytteet sisälsivät sekä rautaa että fosforia 0,5 mg/l ja 3,0 mg/l. Tunnettujen lisäysten näytteet tehtiin 100 ml mittapulloihin siten, että näytettä tuli pulloon 10 ml sekä lisäksi lisäys 100 mg/l standardiliuosta ja ionivaihdettua vettä merkkiviivaan asti. Lisäksi tehtiin yksi tunnetun lisäyksen näyte tummimmasta näytteestä pienemmällä laimennossuhteella. 50 ml mittapulloon mitattiin tällöin 10 ml näytettä sekä lisäys 100 mg/l standardiliuosta ja tarvittava määrä vettä. Mittaukset näytteistä tehtiin ilman suodatusta.

Taulukko 1. Rautamittausten tulokset synteettisille ja tunnettujen lisäysten näytteille.

Näyte	Kolorimetri (mg/l)	ICP-OES (mg/l)
Synteettinen näyte 0,5 mg/l	0,59	0,58
Synteettinen näyte 3,0 mg/l	3,08	3,06
Näyte 1 tunnetulla lisäyksellä	3,64	3,38
Näyte 3 tunnetulla lisäyksellä	0,86	0,69
Näyte 5 tunnetulla lisäyksellä	2,42	2,45
Näyte 3 tunnetulla lisäyksellä pienemmällä laimennossuhteella	2,70	2,22

Taulukossa 2 on esitetty mittaustulokset alkuperäisistä tai laimennetuista näytteistä laboratoriossa tehdyille rautamäärityksille. Saman näytteen erilaisia laimennoksia tutkimalla pyrittiin selvittämään, onko näytteen värillä vaikutusta tuloksiin. Taulukossa 2 viimeisinä on esitetty suodatuksella tehtyjen mittausten tulokset.

Taulukko 2. Rautamittausten tulokset alkuperäisille tai laimennetuille näytteille. Laimennetuille näytteille saadut tulokset on kerrottu laimennuskertoimella koskemaan laimentamatonta näytettä.

Näyte	Kolorimetri (mg/l)	ICP-OES (mg/l)
Näyte 1 1:10-laimennoksella	25,18	24,83
Näyte 5 laimentamattomana	1,59	1,27
Näyte 3 1:2-laimennoksella	4,04	2,62
Näyte 3 1:5-laimennoksella	3,80	3,13
Näyte 3 1:2-laimennoksella suodatettuna	3,20	2,62
Näyte 3 1:5-laimennoksella suodatettuna	3,54	3,13

Raudalle tehtyjen kenttämittausten tulokset on esitetty taulukossa 3. Koska mittauksiin käytävissä ollut aika oli lyhyt, kullakin näytteellä tehtiin vain yksi mittaus, jonka tulos mitattiin kolorimetrillä kolmesti. Toistomittauksista saatujen tulosten vaihtelu oli pientä, suurimmillaan 13 %. Jokainen näyte suodatettiin suodatinpaperilla ennen näytteen lisäämistä testiputkeen. Taulukossa esitetyt tulokset ovat laimennettujen näytteiden tuloksia. Laimennosten osalta noudatettiin tutkimuksen ohessa tehtyjä mittaushjeita (Liite 3) eli näytteille 1 ja 2 tehtiin 1:10-laimennos, näytteille 3 ja 4 1:2 laimennos ja näyte 5 mitattiin ilman laimentamista.

Taulukko 3. Kenttäoloissa, suodatuksella tehtyjen rautamittausten tulokset. Laimennetuille näytteille saadut tulokset on kerrottu laimennuskertoimella vastaamaan laimentamatonta näytettä.

Näyte	Rautapitoisuus kolorimetrillä (mg/l)	Rautapitoisuus ICP-OES:llä (mg/l)
1	32,27	27,79
2	2,43	2,04
3	1,84	2,23
4	4,54	5,00
5	1,17	1,24

6.2 Kokonaisfosforimittausten tulokset

Myös fosforimittauksissa likimain jokaiselle laboratoriossa tehdyille kolorimetrimittaukselle tehtiin rinnakkaisnäyte ja tulostaulukoissa esitetyt luvut ovat rinnakkaisnäytteille saatujen tulosten keskiarvoja. Rinnakkaisnäytteiden suurin ero oli 4 %. Yksittäisistä testiputkista kolorimetrillä mitattujen toistomittausten tulosten suurin ero oli myös 4 %. Fosforimenetelmään kuuluu näytteiden suodatus tarvittaessa, jos hajotettu näyte on samea.²⁵ Tutkituilla näytteillä hajotetut näytteet olivat kuitenkin kirkkaita ja sakattomia, joten niitä ei ollut tarpeen suodattaa. Syn-teettiset ja tunnettujen lisäysten näytteet tehtiin samaan tapaan kuin rautamittauksille (luku 6.1). Tulokset on esitetty taulukossa 4. Taulukossa 5 on puolestaan esitetty alkuperäisille tai laimennetuille näytteille saadut kokonaisfosforimittausten tulokset.

Taulukko 4. Kokonaisfosforimittausten tulokset synteettisille ja tunnettujen lisäysten näytteille.

Näyte	Kolorimetri (mg/l)	ICP-OES (mg/l)
Synteettinen näyte 0,5 mg/l	0,60	0,53
Synteettinen näyte 3,0 mg/l	3,66	2,96
Näyte 1 tunnetulla lisäyksellä	3,26	3,14
Näyte 3 tunnetulla lisäyksellä	1,22	1,01
Näyte 5 tunnetulla lisäyksellä	2,57	2,42
Näyte 3 tunnetulla lisäyksellä pienemmällä laimennossuhteella	3,28	3,07

Taulukko 5. Kokonaisfosforimittausten tulokset alkuperäisille tai laimennetuille näytteille. Laimennetuilla näytteillä saadut tulokset on kerrottu vastaavalla laimennuskertoimella vastaamaan laimentamatonta näytettä.

Näyte	Kolorimetri (mg/l)	ICP-OES (mg/l)
Näyte 1 1:10-laimennoksella	22,17	14,23
Näyte 5 laimentamattomana	1,87	1,62
Näyte 3 1:2-laimennoksella	5,93	4,92
Näyte 3 1:5-laimennoksella	6,28	4,92

Kenttäoloissa tehtyjen kokonaisfosforimittausten tulokset on esitetty taulukossa 6. Rajallisen mittausajan vuoksi mittauksille ei tehty rinnakkaisnäytteitä. Yksittäiset testiputket mitattiin kuitenkin kolorimetrillä kolmesti ja suurimmillaan toistojen välinen ero oli 3 %. Taulukossa esitetyt arvot ovat laimennetuille näytteille saatuja tuloksia. Laimennokset tehtiin kuten rautamääritystenkin tapauksessa eli näytteille 1 ja 2 tehtiin 1:10-laimennos, näytteille 3 ja 4 1:2-laimennos ja näyte 5 mitattiin laimentamatta. Näytteen 1 pitoisuus oli laimennuksesta huolimatta yli mittausalueen ylärajan eli 5 mg/l. Tämän havainnon johdosta päivitettiin mittausohjetta (Liite 3).

Taulukko 6. Kenttäoloissa tehtyjen kokonaisfosforimittausten tulokset.

Näyte	Fosforipitoisuus (mg/l) kolorimetrillä	Rautapitoisuus (mg/l) ICP- OES:llä
1	Yli 50	47,74
2	3,73	3,02
3	5,73	4,31
4	4,72	4,10
5	3,13	2,98

7 Yhteenveto

Tutkimuksen tavoite oli selvittää soveltuvatko menetelmät jäteyhtiö Sammakkokangas Oy:n suodatuskentän vesien seurantatutkimuksiin. Tulosten oli siis tarpeen olla melko lähellä ICP-OES-tuloksia, sama suuruusluokka oli riittävä tarkkuus. Lisäksi rinnakkaisnäytteillä saatujen tulosten tuli olla lähellä toisiaan.

Rautamittauksista havaittiin, että näytteen sameus vaikuttaa selkeästi tuloksiin. Kirkkaista ja vain hieman värillisistä liuoksista mitattaessa tulokset olivat tarkempia kuin sameampien näytteen tapauksessa. Suodatus suodatinpaperilla paransi selkeästi tulosten todenmukaisuutta. Kenttämittauksissa todettiin kuitenkin, että kenttäolosuhteissa paperilla suodattaminen on työlästä ja aikaa vievää. Tutkimuksissa havaittiin myös, että näytteen värillä voi olla hieman vaikutusta tuloksiin, mutta näytteen sameus on selvästi merkittävämpi tekijä.

Kokonaisfosforimäärittysten tuloksissa on havaittavissa, että kaikki kolorimetrin tulokset olivat systemaattisesti suurempia kuin tarkemmalla menetelmällä saadut tulokset. Tulosten parantamiseksi korjauskertoimeksi voitaisiin suositella lukua 0,8 kolorimetrillä ja ICP-OES:llä määritettyjen tulosten prosentuaalisen eron perusteella. Laboratoriossa tehtyjen määrittysten perusteella samasta näytteestä tehtyjen rinnakkaisnäytteiden välillä on hyvin vähän eroa. Koska kenttämenetelmä antaa melko säännönmukaisesti suurempia arvoja kuin tarkempi menetelmä, poikkeaman satunnaisen vaihtelun taustalla erityisesti kenttäolosuhteissa ovat todennäköisesti mitaustarkkuus varsinkin laimennettaessa sekä näytetaustan vaikutus hajotuksen tehokkuuteen.

Loppupäätelmä tutkimuksesta on, että molemmat menetelmät soveltuvat Sammakkokankaan suodatuskentän toiminnan seurantaan. Molemmilla menetelmillä tulokset olivat tarkemman menetelmän kanssa samaa suuruusluokkaa. Lisäksi rinnakkaisnäytteiden väliset erot olivat pieniä ja samasta testiputkesta kolorimetrillä mitatut tulokset erosivat toisistaan vain hiukan.

8 Kirjallisuusluettelo

1. Kaartinen, T.; Eskola, P.; Vestola, E.; Merta, E. ja Mroueh, U., Uudet jätteenkäsittelykeskusten vesienhallintatekniikat, VTT, Espoo, 2009. Saatavilla osoitteessa <https://cris.vtt.fi/en/publications/new-techniques-for-waste-water-treatment-of-waste-treatment-cente>.
2. Valtioneuvoston asetus kaatopaikoista (331/2013), <https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2013/20130331> (3.3.2021).
3. Ympäristönsuojelulaki (527/2014), <https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2014/20140527> (3.3.2021).
4. Jätelaki (646/2011), <https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2011/20110646> (3.3.2021).
5. Marttinen, S.; Rintala, J.; Jokela, J. ja Kettunen, R., *Jätteiden hajoaminen kaatopaikalla sekä kaatopaikkavesien muodostuminen, ominaisuudet ja käsittely*, Jyväskylän yliopisto, 2000.
6. Mäkelä, A.; Antikainen, S.; Mäkinen, I.; Kivinen, J. ja Leppänen, T., *Vesitutkimusten näytteenottomenetelmät*, Vesi- ja ympäristöhallitus, Helsinki, 1992.
7. Radojevic, M. ja Bashkin, V. N., *Practical environmental analysis*, 2. painos, RSC Publishing, Cambridge, Yhdistynyt kuningaskunta, 2009.
8. Hiltunen, E.; Linko, L.; Hemminki, S.; Hägg, M.; Järvenpää, E.; Saarinen, P.; Simonen, S. ja Kärhä, P., *Laadukkaan mittaamisen perusteet*, Mittatekniikan keskus MIKES ja Työ- ja Elinkeinoministeriö TEM, Espoo, 2011.
9. Bartram, J. ja Ballance, R., *Water Quality Monitoring : A Practical Guide to the Design and Implementation of Freshwater Quality Studies and Monitoring Programmes*, E & FN Spon, Lontoo, Yhdistynyt kuningaskunta, 1996.
10. Magnusson, B. ja Örnemark, U. (toim.), *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 2 painos, 2014. Saatavilla osoitteessa <https://eurachem.org/index.php/publications/guides>.

11. Stöckl, D.; D'Hondt, H. ja Thienpont, L. M., Method validation across the disciplines—Critical investigation of major validation criteria and associated experimental protocols, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, **2009**, 877(23), 2180–2190.
12. Ehder, T. (toim.), *Kemian metrologian opas*, Mittatekniikan keskus MIKES, Helsinki, 2005.
13. Araujo, P., Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, **2009**, 877(23), 2224–2234.
14. About Eurachem, <https://www.eurachem.org/index.php/mnu-about>, Eurooppalainen yhteistoimintaelin Eurachem (15.4.2020).
15. González, G. A. ja Herrador, Á M., A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles, *TrAC Trends Anal. Chem.*, **2007**, 26(3), 227–238.
16. Taverniers, I.; De Loose, M. ja Van Bockstaele, E., Trends in quality in the analytical laboratory. II. analytical method validation and quality assurance, *TrAC Trends Anal. Chem.*, **2004**, 23(8), 535–552.
17. Linko, S. ja Komppa, V., *Analyttisen ja kliinisen kemian laadunvarmistussanasto*, Eurachem-Suomi : KRP, rikostekninen laboratorio, Helsinki, 1997.
18. Currie, L. A., Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities: (IUPAC recommendations 1995), *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 391(2), 105–126.
19. Thompson, M.; Ellison, S. L. R. ja Wood, R., Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC technical report), *Pure App. Chem.*, **2002**, 74(5), 835–855.
20. JCGM, Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM), 2010. Saatavilla osoitteesta <https://www.bipm.org/en/publications/guides/gum.html>.
21. Snell, F. D. ja Snell, C. T., *Colorimetric Methods of Analysis: Including Some Turbidimetric and Nephelometric Methods, Volume 1*, 3 painos, D. Van Nostrand company, Yhdysvallat, 1963.
22. Wilson, A. L., *The Chemical Analysis of Water: General Principles and Techniques*, the Society for Analytical Chemistry, Lontoo, Yhdistynyt Kuningaskunta, 1974.
23. Hamilton, L. F. ja Simpson, S. G., *Quantitative Chemical Analysis*, 12 painos, The Macmillan Company, New York, Yhdysvallat, 1964.
24. Merck KGaA, *Operating Manual Spectroquant Colorimeter Move 100*, 2020. Saatavilla osoitteesta https://www.merckmillipore.com/FI/en/product/Colorimeter-Move-100,MDA_CHEM-173632?CatalogCategoryID= (12.11.2020).

25. Merck KGaA, 114549 - *Spectroquant Phosphate Cell Test*, 2019. Saatavilla osoitteesta https://www.merckmillipore.com/FI/en/product/Phosphate-Cell-Test,MDA_CHEM-114543 (12.11.2020).

26. Merck KGaA, 114549 - *Spectroquant Iron Cell Test*, 2019. Saatavilla osoitteesta https://www.merckmillipore.com/FI/en/product/Iron-Cell-Test,MDA_CHEM-114549 (12.11.2020).

9 Liitteet

Liite 1: Testipakkauksen menetelmäohje²⁶ rautapitoisuuden määrittämiseen Spectroquant-kolorimetrillä.

Liite 2: Testipakkauksen menetelmäohje²⁵ kokonaisfosforipitoisuuden määrittämiseen Spectroquant-kolorimetrillä.

Liite 3: Toimintaohje rauta- ja fosforipitoisuuksien määrittämiseksi Sammakkokangas Oy:n suodatuskentän vesistä Spectroquant Move 100 -kenttäkolorimetrillä (sivut 37–44).

LIITE 1: Testipakkauksen menetelmäohje rautapitoisuuden määrittämiseen Spectroquant-kolorimetriä.

7.75430.0008-xxxxxxx msp.

October 2019

Supelco

1.14549.0001

Spectroquant® Iron Cell Test

Fe

1. Method

All iron ions are reduced to iron(II) ions by ascorbic acid. In a thioglycolate-buffered medium these react with a triazine derivative to form a red-violet complex that is determined photometrically.

2. Measuring range and number of determinations

Measuring range	Number of determinations
0.05 - 4.00 mg/l Fe	25

For programming data for selected photometers / spectrophotometers see www.service-test-kits.com.

3. Applications

This test measures bivalent and trivalent iron in its dissolved form as well as fresh colloidal iron(III) hydroxide. Samples must be decomposed by digestion before iron oxides, aged iron hydroxide, and complex-bound iron can be measured (see section 6).

Sample material:

Groundwater, surface water, and seawater
Drinking water
Industrial water
Wastewater and percolating water
Food after appropriate sample pretreatment

4. Influence of foreign substances

This was checked individually in solutions containing 2 and 0 mg/l Fe. The determination is not yet interfered with up to the concentrations of foreign substances given in the table. Cumulative effects were not checked; such effects can, however, not be excluded.

Concentrations of foreign substances in mg/l or %							
Al ³⁺	1000	Cu ²⁺	10 (100 ²⁺)	NO ₂ ⁻	100	EDTA	10
Ca ²⁺	1000	Hg ²⁺	10	Pb ²⁺	10	Surfactants	≥ 1 %
Cl ⁻	1000	Mg ²⁺	1000	PO ₄ ³⁻	1000	Na-acetate	5 %
CN ⁻	100	Mn ²⁺	1000	SiO ₂ ²⁻	1000	NaCl	20 %
Co ²⁺	5	MoO ₄ ²⁻	50	Zn ²⁺	1000	NaNO ₂	20 %
Cr ³⁺	100	NH ₄ ⁺	1000			Na ₂ SO ₄	20 %
Cr ₂ O ₇ ²⁻	50	NI ²⁺	10				

¹⁾ when approx. 100 mg of thiourea is placed in the reaction cell before the sample is added

²⁾ tested with nonionic, cationic, and anionic surfactants

5. Reagents and auxiliaries

Please note the warnings on the packaging materials!

The test reagents are stable up to the date stated on the pack when stored closed at +15 to +25 °C.

Package contents:

1 bottle of reagent Fe-1K
25 reaction cells
1 sheet of round stickers for numbering the cells

Other reagents and accessories:

Nitric acid 65 % for analysis EMSURE®, Cat. No. 100456
Spectroquant® Crack Set 10C, Cat. No. 114688
+ thermoreactor

or

Spectroquant® Crack Set 10, Cat. No. 114687
+ empty cells 16 mm with screw caps (25 pcs), Cat. No. 114724
+ thermoreactor

MQuant® Iron Test, Cat. No. 110004,

measuring range 3 - 500 mg/l Fe²⁺

MQuant® Universal indicator strips pH 0 - 14, Cat. No. 109535

Sodium hydroxide solution 1 mol/l Titripur®, Cat. No. 109137

Hydrochloric acid 1 mol/l Titripur®, Cat. No. 109057

Thiourea GR for analysis, Cat. No. 107979

Spectroquant® CombiCheck 90, Cat. No. 118700

Iron standard solution CRM, 0.1000 mg/l Fe, Cat. No. 133018

Iron standard solution CRM, 0.300 mg/l Fe, Cat. No. 133019

Iron standard solution CRM, 1.00 mg/l Fe, Cat. No. 133020

Pipette for a pipetting volume of 5.0 ml

6. Preparation

- Analyze immediately after sampling. Otherwise preserve with nitric acid 65 % (1 ml nitric acid per 1 l of sample solution).
- Undissolved or complex-bound iron can be determined after pretreatment of the sample using one of the Spectroquant® Crack Sets. **In this case it is no longer necessary to add reagent R-3 (from the Crack Set 10) or reagent R-2K (from the Crack Set 10C)!**
- Check the iron content with the MQuant® Iron Test. Samples containing more than 4.00 mg/l Fe must be diluted with distilled water **prior to** digestion.
- The pH must be within the range 1 - 10.** Adjust, if necessary, with sodium hydroxide solution or hydrochloric acid.
- Filter turbid samples.

7. Procedure

Pretreated sample (10 - 40 °C)	5.0 ml	Pipette into a reaction cell and mix.
Reagent Fe-1K	1 level blue microspoon (in the cap of the Fe-1K bottle)	Add, close the cell tightly, and shake vigorously until the reagent is completely dissolved.
Leave to stand for 3 min (reaction time), then measure the sample in the photometer.		

Notes on the measurement:

- For photometric measurement the cells must be clean. Wipe, if necessary, with a clean dry cloth.
- Measurement of turbid solutions yields false-high readings.
- The pH of the measurement solution must be within the range 3.2 - 4.5.
- The color of the measurement solution remains stable for at least 60 min after the end of the reaction time stated above.

8. Analytical quality assurance

recommended before each measurement series
To check the photometric measurement system (test reagents, measurement device, handling) and the mode of working, the iron standard solutions CRM (see section 5) or Spectroquant® CombiCheck 90 can be used. Besides a **standard solution** with 1.00 mg/l Fe, this article also contains an **addition solution** for determining sample-dependent interferences (**matrix effects**).

Additional notes see under www.qa-test-kits.com.

For quality and batch certificates for Spectroquant® test kits see the website, where you will find all data in production control, that are determined in accordance with ISO 8466-1 and DIN 38402 A51.

9. Notes

- Reclose the reagent bottle immediately after use.
- The test reagents must not be run off with the wastewater! Information on disposal can be obtained at www.disposal-test-kits.com.**

Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany,
Tel. +49(0)6151 72-2440
www.analytical-test-kits.com

EMD Millipore Corporation, 400 Summit Drive
Burlington MA 01803, USA, Tel. +1-978-715-4321
Sigma-Aldrich Canada Co. or Millipore (Canada) Ltd.
2149 Winston Park, Dr. Oakville, Ontario, L6H 6J8
Phone: +1 800-565-1400



Liite 2: Testipakkauksen menetelmäohje kokonaisfosforipitoisuuden määrittämiseen Spectroquant-kolorimetriellä.

7.75426.0005-xxxxxxxxx msp.

March 2019

Supelco

1.14543.0001
1.14543.0007

Spectroquant® Phosphate Cell Test

P

for the determination of orthophosphate and total phosphorus
USEPA approved for drinking water and wastewater

1. Method

In sulfuric solution orthophosphate ions react with molybdate ions to form molybdophosphoric acid. Ascorbic acid reduces this to phosphomolybdenum blue (PMB) that is determined photometrically.
The method is analogous to EPA 365.2+3, APHA 4500-P E, and DIN EN ISO 6878.

2. Measuring range and number of determinations

Measuring range	Number of determinations
0.05 - 5.00 mg/l PO ₄ -P 0.2 - 15.3 mg/l PO ₄ -P 0.11 - 11.46 mg/l P ₂ O ₅	25

For programming data for selected photometers / spectrophotometers see www.service-test-kits.com.

3. Applications

This test measures only orthophosphate. Samples must be decomposed by digestion before total phosphorus can be measured (see section 6).

Sample material:

Groundwater and surface water, seawater
Drinking water
Wastewater
Nutrient solutions for fertilization
Soils after appropriate sample pretreatment
Food after appropriate sample pretreatment


4. Influence of foreign substances

This was checked individually in solutions containing 2 and 0 mg/l PO₄-P. The determination is not yet interfered with up to the concentrations of foreign substances given in the table. Cumulative effects were not checked; such effects can, however, not be excluded.

Concentrations of foreign substances in mg/l or %					
Ag ⁺	1000	F ⁻	50	Pb ²⁺	25
AsO ₄ ³⁻	0.2	Fe ²⁺	1000	S ²⁻	2.5
Ca ²⁺	1000	Hg ²⁺	10	SiO ₃ ²⁻	1000
Cd ²⁺	1000	Mg ²⁺	1000	SO ₃ ²⁻	1000
CN ⁻	1000	Mn ²⁺	1000	Zn ²⁺	1000
Cr ³⁺	1000	NH ₄ ⁺	1000	EDTA	1000
Cr ₂ O ₇ ²⁻	5	Ni ²⁺	500	Surfactants ¹⁾	100
Cu ²⁺	250	NO ₂ ⁻	1000	COD (K-hydrogen phthalate)	150 ²⁾
				Na-acetate	1 %
				NaCl	5 %
				NaNO ₃	10 %
				Na ₂ SO ₄	10 %

Reducing agents interfere with the determination.

¹⁾ tested with nonionic, cationic, and anionic surfactants

²⁾  A higher COD may impair the efficacy of the digesting mixture in the determination of total phosphorus and thus result in false-low readings. Up to a maximum of 300 mg/l COD, this can be avoided by adding 2 doses of reagent P-1K instead of 1.

5. Reagents and auxiliaries

Please note the warnings on the packaging materials!

The test reagents are stable up to the date stated on the pack when stored closed at +15 to +25 °C.

Package contents:

1 bottle of reagent P-1K
1 bottle of reagent P-2K
1 bottle of reagent P-3K
25 reaction cells
1 green dose-metering cap
1 blue dose-metering cap
1 sheet of round stickers for numbering the cells

Other reagents and accessories:

MQuant® Phosphate Test, Cat. No. 110428, measuring range 10 - 500 mg/l PO₄³⁻ (3.3 - 163 mg/l PO₄-P)
MQuant® Universal indicator strips pH 0 - 14, Cat. No. 109535
Sulfuric acid 0.5 mol/l Titripur®, Cat. No. 109072
Spectroquant® CombiCheck 10, Cat. No. 114676
Phosphorus (total) standard solution CRM, 0.400 mg/l PO₄-P, Cat. No. 125046
Phosphorus (total) standard solution CRM, 4.00 mg/l PO₄-P, Cat. No. 125047
Hydrochloric acid 25 % for analysis EMSURE®, Cat. No. 100316

Pipette for a pipetting volume of 5.0 ml
Thermoreactor


6. Preparation

- Use only phosphate-free detergents to rinse glassware. Otherwise fill with hydrochloric acid (approx. 10 %) and leave to stand for several hours.

At the first use replace the screw caps of the reagent bottles P-1K and P-3K by the corresponding dose-metering caps:

Reagent P-1K: green dose-metering cap
Reagent P-3K: blue dose-metering cap

Hold the respective reagent bottle vertically and, at each dosage, press the slide all the way into the dose-metering cap. Before each dosage ensure that the slide is completely retracted.

 Reclose the reagent bottles with the corresponding screw caps at the end of the measurement series, since the function of the reagents is impaired by the absorption of atmospheric moisture.

- Analyze immediately after sampling.
- Digestion for the determination of total phosphorus (Wear eye protection!):

Pretreated sample	5.0 ml	Pipette into a reaction cell.
Reagent P-1K	1 dose ¹⁾	Add, close the cell tightly, and mix.

Heat the cell at 120 °C in the preheated thermoreactor for 30 min. Allow the closed cell to cool to room temperature in a test-tube rack.
Do not cool with cold water!

¹⁾ in the case of high COD values: 2 doses

- Check the phosphate content with the MQuant® Phosphate Test. Samples containing more than 5.00 mg/l PO₄-P must be diluted with distilled water prior to digestion. Alternatively, it is also possible to use the Spectroquant® Phosphate Cell Test Cat. No. 114729 (measuring range 0.5 - 25.0 mg/l PO₄-P).
- The pH must be within the range 0 - 10. Adjust, if necessary, with sulfuric acid.
- Filter turbid samples.

7. Procedure

Pretreated sample (10 - 35 °C)	5.0 ml	Pipette into a reaction cell and mix or - after digestion for total phosphorus - shake the tightly closed cell vigorously after cooling.
Reagent P-2K ¹⁾	5 drops ²⁾	Add, close the cell tightly, and mix.
Reagent P-3K ¹⁾	1 dose	Add, close the cell tightly, and shake vigorously until the reagent is completely dissolved.

Leave to stand for 5 min (reaction time), then measure the sample in the photometer.

¹⁾ In the case of high chloride contents, it is recommended to switch the sequence of the reagents P-2K and P-3K.

²⁾ Hold the bottle vertically while adding the reagent!

Notes on the measurement:

- For photometric measurement the cells must be clean. Wipe, if necessary, with a clean dry cloth.
- Measurement of turbid solutions yields false-high readings.
- The pH of the measurement solution must be within the range 0.80 - 0.95.
- The color of the measurement solution remains stable for at least 60 min after the end of the reaction time stated above.

8. Analytical quality assurance

recommended before each measurement series
To check the photometric measurement system (test reagents, measurement device, handling) and the mode of working, the phosphorus (total) standard solutions CRM (see section 5) or Spectroquant® CombiCheck 10 can be used. Besides a standard solution with 0.80 mg/l PO₄-P, CombiCheck 10 also contains an addition solution for determining sample-dependent interferences (matrix effects).

Additional notes see under www.qa-test-kits.com.

For quality and batch certificates for Spectroquant® test kits see the website, where you will find all data in production control, that are determined in accordance with ISO 8466-1 and DIN 38402 AS1.

9. Notes

- Reclose the reagent bottles immediately after use.
- Information on disposal can be obtained at www.disposal-test-kits.com.

Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany,
Tel. +49(0)6151 72-2440
www.analytical-test-kits.com

EMD Millipore Corporation, 400 Summit Drive
Burlington MA 01803, USA, Tel. +1-978-715-4321
Sigma-Aldrich Canada Co. or Millipore (Canada) Ltd.
2149 Winston Park Dr. Oakville, Ontario, L6H 6J6
Phone: +1 800-555-1496



LIITE 3: Toimintaohje rauta- ja fosforipitoisuuksien määrittämiseksi Sammakkokangas Oy:n suodatuskentän vesistä Spectroquant Move 100 -kenttäkolorimetrillä

Toimintaohje rauta- ja kokonaisfosforipitoisuuksien määrittämiseksi jäteyhtiö Sammakkokangas Oy:n suodatuskentän vesistä Spectroquant Move 100 -kenttäkolorimetrillä:

Nämä ohjeet on kirjoitettu jäteyhtiö Sammakkokangas Oy:n suodatuskentän valumavesien analysointia varten testiputkien mukana tulevaa mittausohjetta mukailleen validointiprosessissa tehdyillä havainnoilla täydennettynä. Nämä ohjeet koskevat vain Spectroquant rautamenetelmää 114549 ja fosforimenetelmää 114543.

Yleiset ohjeet:

Lue tämä ohje ja perehdy testiputkien ja reagenssien käyttöturvallisuustiedotteisiin ennen mittausten aloittamista. Huomioi erityisesti millaisia vaaroja reagenssit voivat aiheuttaa, minkälaisia oireita niille altistuminen aiheuttaa ja kuinka erilaisissa tapaturmatilanteissa tulisi toimia. Tutustu myös Spectroquant kolorimetrin käyttöohjeisiin, jos et ole käyttänyt laitetta aiemmin.

Reagensseja ja testiliuoksia ei saa kaataa viemäriin tai laittaa sekajätteeseen. Käytön jälkeen sulje reagenssiastiat ja testiputket tiiviisti ja pakkaa ne alkuperäiseen pakkaukseen. Pakkaukset varastoidaan ja toimitetaan isompina erinä jätekeskukseen.

Laimennosohjeet:

Tee Sammakkokankaan suodatuskentän vesistä seuraavat laimennokset:

- 1. Rauhoituskaivo, biokenttä (Rk bio): 1:20- tai 1:10-laimennos
- 2. Rauhoituskaivo, penkan vesi (Rk penkka): 1:10-laimennos
- 3. Ilmastetusta vedestä näyte (KOK): 1:2-laimennos
- 4. Maasuodatin, tuleva (MTU): 1:2-laimennos

- 5. Maasuodatin, lähtevä (MLÄ): Ei laimennosta

Nämä laimennokset on valittu validointiprosessia varten 15.9.2020 otettujen näytteiden pitoisuuksien perusteella. Laimennosohjetta on syytä päivittää pitoisuuksien muuttuessa. Esimerkiksi, jos pisteistä 1 ja 2 tehdyillä 1:10-laimennoksilla saadut tulokset pienenevät lähelle mittausalueen alarajaa, uutena laimennoksena voidaan kokeilla 1:5-laimennosta. Tai vastaavasti, jos pisteistä 3 ja 4 tehdyillä 1:2-laimennoksilla tulokset kasvavat lähelle mittausalueen ylärajaa, uutena laimennoksena kannattaa kokeilla 1:5-laimennosta.

Päivitys 4.11: Kyseisenä päivänä tehdyissä (määritysmenetelmien toimintaa testaavissa) mitauksissa pisteen 1 pitoisuus oli yli mittausalueen 1:10-laimennoksella. Näytepisteen 1 näytteelle kannattaa siis jatkossa tehdä 1:20-laimennos.

Näytteet laimennetaan tislatulla vedellä (tai akkuvedellä) ennen mahdollista hajotusta. Laimennosuhteella 1:10 tarkoitetaan, että näytettä mitataan laimennokseen 1 osa ja vettä 9 osaa. Laimennosta on hyvä tehdä hieman enemmän kuin on tarpeen pipetoida. Laimennoksia voi tehdä esimerkiksi 10 millilitraa, jolloin 1:10-laimennokseen mitataan 1 ml näytettä ja 9 ml vettä ja 1:2-laimennokseen 5 ml näytettä ja 5 ml vettä.

Laimennoksista mitatut tulokset tulee muuntaa koko näytettä koskeviksi mittauksen jälkeen. 1:10-laimennoksesta saatu tulos kerrotaan kymmenellä ja 1:2-laimennoksesta saatu tulos kahdella.

Rautapitoisuuden määrittäminen Spectroquant "Cell Test" testiputkilla (menetelmä 114549):

Tällä menetelmällä voidaan määrittää vesinäytteestä liuenneiden Fe^{2+} - ja Fe^{3+} -ioneiden sekä tuoreen kolloidisen rauta(III)hydroksidin ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) yhteispitoisuus. Näytteen kokonaisrautapitoisuuden määrittämistä varten komplekseihin sitoutuneet ja veteen liukenemattomat rautayhdisteet tulee hajottaa. Spectroquant-tuotemerkiltä löytyy reagenssisarjoja hajotusta varten. Niiden tiedot löytyvät testiputkipakkauksen mukana tulevasta mittausohjeesta.

Kaikki näytteen rautaionit pelkistetään rauta(II)ioneiksi askorbiinihapolla. Tioglykolaatilla puskuroidussa liuoksessa rauta(II)ionit reagoivat triatsiinijohdannaisen kanssa muodostaen punavioletin kompleksin, joka määritetään spektrofotometrisesti. Tämän menetelmän mittausalue on 0,05–4,00 mg/l.

Pakkauksen mukana tulevassa mittausohjeessa on esitelty mitkä ja millä pitoisuuksilla eri aineet ja yhdisteet vaikuttavat menetelmän toimivuuteen. Sammakkokankaan suodatuskentän vesiä analysoitaessa ei ole olettavissa häiriötä kyseisistä aineista. Muita näytteitä tutkittaessa mahdolliset häiriötekijät tulee käydä läpi.

Näytteen esikäsittely:

- Analysoi näyte mieluiten heti näytteenoton jälkeen. Muutoin kestävä näyte lisäämällä 1 ml väkevää (65 %) typpihappoa yhteen litraan näytettä. Suodata näyte **ennen** kestävointiä.
- Jos haluat määrittää näytteen kokonaisrautapitoisuuden, tee hajotus Spectroquant Crack Set -reagensseilla ja kyseisen pakkauksen ohjeiden mukaisesti.
- Laimenna näytteet tarvittaessa. Näytteen rautapitoisuuden tulee olla välillä 0,05–4,00 mg/l. Kokonaisrautaa määritettäessä tee laimennos ennen hajotusta. Rautapitoisuuden voi arvioida testiliuskoilla (MQuant Iron Test) tai jos tutkittavat näytteet ovat Sammakkokankaan suodatuskentältä, laimennokset voidaan tehdä ohjeen alkupuolella annettujen ohjeiden mukaan.
- Tarkista näytteen pH. Sen pitäisi olla välillä 1–10. Tarvittaessa säädä se sopivaksi natriumhydroksidi- tai suolahappoliuoksella.
- Suodata sameat näytteet. Raudalle paras suodatustapa on ruiskusuodatus 0,45 µm membraanin läpi. Koska osassa Sammakkokankaan suodatuskentän vesistä esiintyy niin paljon kiintoainesta, että membraani tukkeutuu helposti, suodatuksen voi tehdä suodatinpaperilla (Whatman 41).

Mittausohje:

- Pipetoi 5,0 ml esikäsiteltyä näytettä (näytteen lämpötila 10–40 °C) reaktioputkeen. Sulje putki ja sekoita.
- Kiinnitä kolorimetriin sovitin 16 mm pyöreitä putkia varten. Käynnistä kolorimetri ja valitse menetelmä 250.
- Lisää yksi tasapäinen mikrolusikallinen reagenssia Fe-1K reaktioputkeen ja sulje putki. (Lusikka on reagenssipurkin korkissa. Sulje reagenssipurkki heti käytön jälkeen.)
- Ravista putkea voimakkaasti, kunnes reagenssi on **täysin** liennut. (HUOM. Huomioita-osuudessa on kerrottu lisäohjeita tätä vaihetta koskien.)
- Käynnistä reaktioajan (3 min.) ajastin kolorimetristä painamalla nuolta näppäimessä 8. Anna reaktioputken seistä reaktioajan ajan.
- Tee nollanäyte: Laita tyhjään 16 mm pyöreään putkeen noin 10 ml tislattua vettä. Tarkista, että putken ulkopinta on puhdas.
- (Ravista reaktioputkea reaktion täydellisyyden varmistamiseksi.)
- Laita nollanäyte kolorimetriin ja paina Zero-painiketta.
- Tarkista, että reaktioputken ulkopinta on puhdas. Laita reaktioputki kolorimetriin siten, että reaktioputkessa oleva merkki (kaksi viivaa etiketin yläosassa) ja kolorimetrin nuolet asettuvat samaan linjaan. Paina Test-painiketta.
- Jos mitattu näyte oli laimennettu, laske laimentamattoman näytteen pitoisuus.

Huomioi myös:

- Suodatinpaperin saa asettumaan suppiloon helposti taivuttamalla sen ensin kaksin kerroin ja sitten vielä uudelleen kaksin kerroin. Ympyrän neljäsosan muotoinen paperi asetetaan nyt suppiloon ja sitä raotetaan siten, että se asettuu suppilon pohjalle. Paperin pysymistä paikallaan suppilossa voidaan helpottaa kastelemalla suppilossa oleva paperi muuttamalla pisaralla tislattua vettä.
- Sameat näytteet antavat virheellisen suuria tuloksia.
- Mitattavien näyteputkien pintojen täytyy olla puhtaita. Pyyhi putket tarvittaessa puhtaalla ja kuivalla liinalla.
- Fe-1K-reagenssin liukeneminen voi olla erilaista eri näytteisiin. Jos näytteen pohjalle alkaa muodostua selkeää violettiä väriä jo ennen ravistelua, reagenssi liukenee näytteeneseen helposti. Jos reagenssi liukenee huonosti, liuksen väri muuttuu ravistelusta huolimatta hitaasti. Tällöin ravistelua kannattaa jatkaa pidempään. Ravistelua tulee riittävästi ainakin, jos putkea ravistellaan niin kauan, että kiinteää reagenssia ei enää näy ja lisäksi ravistellaan saman verran lisää.

- Reaktion täydellisyyden voi varmistaa ravistelemalla reaktioputkea voimakkaasti ensimmäisen tuloksen mittaamisen jälkeen ja antamalla putken seistä viisi minuuttia, jonka jälkeen ravistelu toistetaan. Putken annetaan taas seistä viisi minuuttia, jonka jälkeen mittaus toistetaan. Jos tuloksien välillä on yli 0,05 mg/l ero, reaktio ei välttämättä ole vielä täydellinen ja tämä ravistelukoe kannattaa toistaa.
 - Muodostunut väri säilyy muuttumattomana vähintään 60 minuuttia reaktioajan jälkeen.
 - Valmiin mittausliuoksen pH:n täytyy olla välillä 3,2–4,5. Jos mittausliuoksen pH ei ole kyseisellä välillä, jotain on mennyt liuosta tehdessä pieleen.
 - Fe-1K-reagenssi on herkkä ilmankosteudelle. Sulje reagenssipurkki siis mahdollisimman pian käytön jälkeen ja varmista mittaukset lopetettuasi, että purkki on tiiviisti kiinni.
 - Varmista mittausten päätyttyä, että jokainen reaktioputki on tiiviisti suljettu.

Kokonaisfosforipitoisuuden määrittäminen Spectroquant "Cell Test" testiputkilla (menetelmä 114543):

Tällä menetelmällä voidaan määrittää vesinäytteen ortofosfaattipitoisuus. Näytteestä voidaan siis analysoida sen fosfaattipitoisuus tai kokonaisfosforipitoisuus. Kokonaisfosforin määrittämistä varten näytteet täytyy hajottaa. Testiputkien pakkauksessa on hajotusreagenssi, jonka lisäksi hajotusta varten tarvitaan kuivahaude. Tämä ohje keskittyy kokonaisfosforipitoisuuden määrittämiseen. Menetelmän mittausalue kokonaisfosforia määritettäessä on 0,05–5,00 mg/l.

Ortofosfaatti-ionit (PO_4^{3-}) reagoivat rikkihappoa sisältävässä liuoksessa molybdaatti-ionien kanssa muodostaen fosfomolybdiinihappoa. Askorbiinihappo pelkistää sen fosfomolybdeeniniseksi, joka määritetään spektrofotometrisesti.

Pakkauksen mukana tulevassa mittausohjeessa on esitelty reaktioita mahdollisesti häiritsevät aineet. Sammakkokankaan suodatuskentän vesien analysoinnissa huomiota tulee kiinnittää kemiallisen hapenkulutuksen (COD) arvoihin. Spectroquant-kolorimetrillä on mahdollista analysoida näytteiden kemiallinen hapenkulutus, joten se kannattaa tehdä ennen kokonaisfosforin määrittämistä. Suuret COD-arvot vaikuttavat hajotuksen tehokkuuteen ja siten pienentävät

saatavia tuloksia. Alle 150 mg/l COD-arvot eivät vaikuta kokonaisfosforin määrittämiseen. Jos COD-arvo on välillä 150–300 mg/l, korkean kemiallisen hapenkulutuksen vaikutus voidaan kompensoida lisäämällä P-1K-reagenssia kaksi annosta yhden sijaan. Huomioi näytteistä tehtävät laimennokset arvioidessasi tarvetta reagenssimäärän lisäämiselle. Jos Sammakkokankaan suodatuskentän vesistä tehdään tämän ohjeen alussa esitetyt laimennokset, kaikkien laimennettujen näytteiden COD-arvot voivat jäädä alle 150 mg/l, eikä reagenssin lisäystä tarvita.

Reagenssien annostelu ja annoskorkkien käyttö:

- Reagenssit P-1K ja P-3K annostellaan pakkauksen mukana tulevilla annostelukorkeilla. Annostelukorkki kierretään reagenssipurkkeihin samaan tapaan kuin purkkien omat kierrekorkit.
 - Reagenssi P-1K annostellaan **vihreällä** annostelukorkilla.
 - Reagenssi P-3K annostellaan **sinisellä** annostelukorkilla.
- Kun annostelet reagenssia annostelukorkilla, käännä purkki ylösalaisin **pystysuoraan** ja varmista, että reagenssi ei ole jäänyt korkin reunalle kasaan. Paina vipu **kokonaan** pohjaan. Oikea reagenssi määrä putoaa purkista painamisen aikana. Varmista ennen jokaista annosta, että **vipu on palautunut alkuperäiseen asentoon täysin**.
- Vaihda alkuperäiset korkit P-1K- ja P-3K-reagensseihin mittausarjan päätteeksi. Ilmankosteudelle altistuminen heikentää reagenssien toimintaa.
- P-2K-reagenssipurkissa on kiinteä tippakärki kierrekorkin alla. Lisätessäsi reagenssia käännä pullo ylösalaisin **pystysuoraan**. **Huom.** Pisarat voivat tippua pullosta nopeasti. Varo puristamasta reagenssipurkkia.

Näytteen esikäsittely:

- Käytä lasitavaroiden pesuun fosfaatitonta pesuainetta. Muutoin täytä astiat noin 10 % suolahapolla ja anna seistä usean tunnin ajan.
- Analysoi näytteet heti näytteenoton jälkeen.
- Laimenna näytteet tarvittaessa. Näytteen fosfaattipitoisuuden tulee olla välillä 0,05–5,00 mg/l. Näytteen fosfaattipitoisuuden voi arvioida testiliuskoilla (MQuant Phosphate Test) tai Sammakkokankaan suodatuskentän näytteitä analysoidessa laimennokset voidaan tehdä tämän ohjeen alkupuolella annettujen laimennosohjeiden mukaan. Näyte laimennetaan ennen hajotusta.

- Tarkista näytteen pH. Sen tulee olla välillä 0–10. Tarvittaessa säädä rikkihapolla.
- Kokonaisfosforia määritettäessä tee hajotus:
 - Pipetoi 5,0 ml esikäsiteltyä näytettä reaktioputkeen.
 - Lisää yksi annos (tai kaksi annosta) reagenssia P-1K reaktioputkeen. Sulje reaktioputki tiiviisti ja sekoita.
 - Lämmitä reaktioputkea esilämmitetyssä kuivahauteessa 120 °C lämmössä 30 minuuttia.
 - Nosta lämmitetty reaktioputki koeputkitelineeseen jäähtymään ja anna sen jäähtyä huoneenlämpöiseksi. **Älä jäähdytä kylmällä vedellä.**
- Jos hajotettu näyte on samaa tai näytteessä näkyy kiinteää ainesta, suodata tai dekantoi se. Dekantointia varten anna näytteen seistä ja kiinteän aineksen painua reaktioputken pohjalle. Kaada sitten neste suppilon avulla tyhjään, kuivaan ja puhtaaseen 16 mm putkeen varovasti siten, että kiinteä aines jää alkuperäisen reaktioputken pohjalle. Suodatuksen voi tehdä usealla eri tavalla. Pyri saamaan koko näyteliuos talteen. Esimerkiksi suodatinpaperilla suodatettaessa kastele paperia muutamalla pisaralla tislattua vettä ennen suodatusta, jotta niin suuri osa näyteliuksesta ei imeytyisi paperiin.

Mittausohje:

- Ravista hajotuskäsiteltyä jäähtynyttä reaktioputkea voimakkaasti. (Jos määrität näytteen pelkkää fosfaattipitoisuutta (ei kokonaisfosforipitoisuutta): pipetoi 5,0 ml esikäsiteltyä näytettä (10–35 °C) reaktioputkeen ja sekoita.)
- Kiinnitä kolorimetriin sovitin 16 mm pyöreitä putkia varten. Käynnistä kolorimetri ja valitse menetelmä 380.
- Lisää viisi pisaraa reagenssia P-2K reaktioputkeen. Sulje putki tiiviisti ja sekoita.
- Lisää yksi annos reagenssia P-3K reaktioputkeen. Sulje putki tiiviisti ja ravista putkea voimakkaasti, kunnes reagenssi on kokonaan liuennut.
- Käynnistä reaktioajan (5 min.) ajastin kolorimetristä painamalla nuolta näppäimessä 8. Anna reaktioputken seistä reaktioajan ajan.
- Tee nollanäyte: Laita tyhjään 16 mm pyöreään putkeen noin 10 ml tislattua vettä. Tarkista, että putken ulkopinta on puhdas.
- Aseta nollanäyte kolorimetriin ja paina Zero-painiketta.

- Tarkista, että reaktioputken ulkopinta on puhdas. Laita reaktioputki kolorimetriin siten, että reaktioputkessa oleva merkki (kaksi viivaa etiketin yläosassa) ja kolorimetrin nuolet asettuvat samaan linjaan. Paina Test-painiketta.
- Jos mitattu näyte oli laimennettu, laske laimentamattoman näytteen pitoisuus.

Huomioi myös:

- Mitattavien näyteputkien pintojen täytyy olla puhtaita. Pyyhi putket tarvittaessa puhtaalla ja kuivalla liinalla.
- Muodostunut väri säilyy muuttumattomana vähintään 60 minuuttia reaktioajan jälkeen.
- Valmiin mittausliuoksen pH:n täytyy olla välillä 0,80–0,95. Jos mittausliuoksen pH ei ole kyseisellä välillä, jotain on mennyt liuosta tehdessä pieleen.
- Suurilla kloridipitoisuuksilla vaihda P-2K- ja P-3K-reagenssien lisäysjärjestys.
- Sameat näytteet antavat virheellisen suuria tuloksia.
- Varmista mittausten päätyttyä, että jokainen reaktioputki on tiiviisti suljettu.