

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Laboratoriotekniikka

2012

Maria Järvi

ELINTARVIKETEOLLISUUDEN JÄTEVESIEN ANALYYSIMENETELMIEN VALIDOINTI



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Maria Järvi

ELINTARVIKETEOLLISUUDEN JÄTEVESIEN ANALYYSIMENETELMIEN VALIDOINTI

Opinnäytetyö tehtiin Net-Foodlab Oy:n toimeksiannosta. Työn tarkoituksena oli validoida neljä menetelmää elintarviketeollisuuden jätevesille tehtäviin analyyseihin. Validoitavat menetelmät olivat manometrinen respirometrinen menetelmä biokemiallisen hapenkulutuksen mittaamiseen sekä fotometriset kyvettitestimenetelmät kemiallisen hapenkulutuksen, kokonaistypen ja kokonaisfosforin määrittämiseksi. Validoinnin tavoitteena oli määrittää menetelmän mittausepävarmuus sekä todistaa menetelmien soveltuvan käyttötarkoitukseensa ja antavan tarkkoja ja toistettavia tuloksia.

Kemiallisen hapenkulutuksen, kokonaistypen ja kokonaisfosforin testaamiseen validoidut kyvettitestit olivat kaupallisia testikittejä. Validointitulosten perusteella näiden kolmen menetelmän todettiin soveltuvan käyttötarkoitukseensa.

Biokemiallisen hapenkulutuksen mittaus perustui manometriseen respirometriseen menetelmään, jossa mitataan mikrobien hapenkulutuksesta aiheutuvaa paineenmuutosta suljetussa tilassa. Testit suoritettiin Oxi-Top® IS 6-laitteistolle, joka mittaa hiilidioksidin määrän muutosta kaasufaasissa. Opinnäytetyön aikana BOD-menetelmälle tehtiin validointisuunnitelma ja menetelmälle tehtiin alustavia validointitestejä, mutta rajallisen aikataulun ja laitteiston pienen kapasiteetin vuoksi validointia ei ehditty suorittaa, vaan sen sijaan selvitettiin menetelmän luonnetta ja testitulosten perusteella luotiin ohjeet validointiparametrien testaukseen.

Validoiduille menetelmille laskettiin mittausepävarmuus, jossa otettiin huomioon kaikki analyyseissä mahdollista virhettä aiheuttavat tekijät. Mittausepävarmuus on arvio rajoista, joiden sisällä mittaus tulos on tietyllä todennäköisyydellä. COD_{Cr}-menetelmän mittausepävarmuudeksi saatiin ±5 %, kokonaistypin menetelmälle ±15 % ja kokonaisfosforin menetelmälle ±10 %. BOD₇-menetelmälle voidaan laskea mittausepävarmuus, kun kaikki validointitestit on hyväksytysti suoritettu.

Elintarviketeollisuudesta peräisin olevat jätevedet vaihtelevat suuresti koostumukseltaan riippuen prosessista, josta ne ovat peräisin. Jäteveden koostumus saattaa aiheuttaa erityisiä toimenpiteitä ennen analyysia. Esimerkiksi jäteveden kemiallinen hapenkulutus on merkittävä tekijä muissa tarkastelun kohteena olleissa analyyseissä ja se on tunnettava, jotta näytteet voidaan käsitellä oikein.

ASIASANAT:

validointi, jätevesi, kemiallinen analyysi, kemiallinen hapenkulutus, kokonaistyyppi, kokonaisfosfori, biokemiallinen hapenkulutus, vesianalyysi

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Laboratory Technology

2012 | 53

FM Hanna Hänninen, FT Anu Johansson

Maria Järvi

VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES FOR FOOD INDUSTRY WASTEWATERS

This thesis was commissioned by Net-Foodlab Oy. The purpose of the thesis was to validate four analytical procedures for food technology wastewaters. The analysis methods comprised a manometric respirometric method for the determination of biochemical oxygen demand and photometric cell test methods for chemical oxygen demand, total nitrogen, and total phosphorus. The aim of the validation was to specify the uncertainties of the measurements and to prove the methods suitable for their intended use and to provide precise and reproducible results.

The validated cell tests for chemical oxygen demand, total nitrogen and total phosphorus measurements were commercially available test kits. As a result of the validation of these three methods, they were found suitable for their intended use.

The measurement of biological oxygen demand is based on a manometric respirometric method where the pressure change caused by microbial oxygen demand is measured in a sealed state. The tests were carried out with OxiTop® IS 6 system which measures the change in the amount of carbon dioxide in the gaseous phase. During the thesis project, the validation master plan was created and preliminary validation tests were performed for the BOD method, but because of the limited schedule and the low capacity of the equipment, there was not enough time to perform the validation. The properties of the method were studied and the instructions compiled for validation tests were based on the results of preliminary tests.

Measurement uncertainty was calculated for the methods that passed the validation tests. All the error-causing factors in the analyses were taken into account. Uncertainty of measurement is an evaluation of the limits within which the measurement result lies in a given probability. The uncertainty of the COD_{Cr} analysis is ±5 % whereas for the nitrogen analysis it is 15 % and for total phosphorus ±10 %. The uncertainty of the BOD₇ analysis can be calculated after all the validation test results have been accepted.

The composition of food industry wastewaters varies depending on the process from which they originate. The composition may require special measures before the analysis. For example the chemical oxygen demand of the wastewater is a significant factor in other analyses studied in this thesis and it must be known for correct treatment of samples.

KEYWORDS:

validation, wastewater, chemical analysis, chemical oxygen demand, total nitrogen, total phosphorus, biochemical oxygen demand, water analysis

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	7
2 VALIDOINTI	9
2.1 Validointiparametrit	10
2.1.1 Spesifisyys ja selektiivisyys	10
2.1.2 Tarkkuus	10
2.1.3 Toistotarkkuus	11
2.1.4 Toteamis- ja määrittäysraja	11
2.1.5 Lineaarisuus ja mittausalue	12
2.1.6 Häiriöalttius	13
2.2 Mittausepävarmuus	13
2.3 Validoinnin raportointi	14
3 JÄTEVESI	15
4 VALIDOITAVAT MENETELMÄT	17
4.1 Testikitit	17
4.2 Kemiallinen hapenkulutus	20
4.3 Kokonaistyyppi	21
4.4 Kokonaisfosfori	21
4.5 Biokemiallinen hapenkulutus	22
5 KYVETTITESTIMENETELMIEN VALIDOINTIEN SUORITUS	27
5.1 Validointitestien suoritus	27
5.1.1 Spesifisyys ja selektiivisyys	28
5.1.2 Tarkkuus	28
5.1.3 Toistettavuus	28
5.1.4 Laboratorion sisäinen toistettavuus	28
5.1.5 Lineaarisuus	29
5.1.6 Toteamis- ja määrittäysraja	29
5.1.7 Matriisin vaikutus	30
5.2 Laitteet, välineet ja reagenssit	30
5.3 Validoinnit	32
5.3.1 Kemiallinen hapenkulutus (COD _{Cr})	32

5.3.2 Kokonaistyyppi	34
5.3.3 Kokonaisfosfori	37
5.4 Validointien tulokset	39
6 BOD₇-MENETELMÄN TESTAUSTEN SUORITUS	43
6.1 Laitteet, välineet ja reagenssit	44
6.2 Suoritetut testit	46
6.2.1 Menetelmän testaus	46
6.2.2 Testit standardiliuoksella	47
6.2.3 Ongelmakohtia	47
6.3 Validointisuunnitelma	48
7 JOHTOPÄÄTÖKSET	49
LÄHTEET	52

LIITTEET

- Liite 1. COD: Näytteen esikäsittely ja analyysin suoritusohje
- Liite 2. COD: Tarkkuus- ja lineaarisuustestien liuokset
- Liite 3. COD: Validoinnin mittaustulokset
- Liite 4. COD: Fotometrin virheen määrittäminen
- Liite 5. Kokonaistyyppi: Näytteen esikäsittely ja analyysin suoritusohje
- Liite 6. Kokonaistyyppi: Tarkkuus- ja lineaarisuustestien liuokset
- Liite 7. Kokonaistyyppi: Validoinnin mittaustulokset
- Liite 8. Kokonaistyyppi: Fotometrin virheen määrittäminen
- Liite 9. Kokonaistyyppi: Reagenssilisäysten aiheuttama epävarmuus
- Liite 10. Kokonaisfosfori: Näytteen esikäsittely ja analyysin suoritusohje
- Liite 11. Kokonaisfosfori: Tarkkuus- ja lineaarisuustestien liuokset
- Liite 12. Kokonaisfosfori: Validoinnin mittaustulokset
- Liite 13. Kokonaisfosfori: Fotometrin virheen määrittäminen
- Liite 14. Kokonaisfosfori: Reagenssilisäysten aiheuttama epävarmuus
- Liite 15. BOD₇: Näytteen esikäsittely, standardiliuoksen valmistus ja analyysin suoritusohje
- Liite 16. BOD₇: Menetelmän testaus
- Liite 17. BOD₇: Validointisuunnitelma

KUVAT

Kuva 1. Termoreaktori.	18
Kuva 2. Fotometri.	19
Kuva 3. OxiTop®-laitteisto ja infrapunaohjain.	25

KUVIOT

Kuvio 1. Biokemiallinen hapenkulutus: kuvaaja.	24
--	----

TAULUKOT

Taulukko 1. Validoinneissa käytetyt laitteet ja välineet.	30
Taulukko 2. Validoinneissa käytetyt reagenssit.	31
Taulukko 3. Mittausepävarmuuden lähteet COD-analyysissä.	34
Taulukko 4. Kokonaistyyppianalyysin mittausepävarmuuden lähteet.	36
Taulukko 5. Kokonaisfosforianalyysin mittausepävarmuuden lähteet.	39
Taulukko 6. COD-analyysin validoinnin yhteenveto.	40
Taulukko 7. Kokonaistyyppianalyysin validoinnin yhteenveto.	41
Taulukko 8. Kokonaisfosforimenetelmän validoinnin yhteenveto.	41
Taulukko 9. BOD-menetelmän testauksissa käytetyt laitteet ja välineet.	44
Taulukko 10. BOD-menetelmän testauksissa käytetyt reagenssit.	45

1 JOHDANTO

Laatu on tänä päivänä välttämätön vaatimus analyttisissä laboratorioissa. Validointi on osa laadunhallintaa ja sen avulla voidaan todistaa analyysitulosten luotettavuus; tulosten on oltava tarkkoja ja toistettavia. Hyväksytty validointi osoittaa menetelmän soveltuvan käyttötarkoitukseensa.

Opinnäytetyö tehtiin Net-Foodlab Oy:ssa talven 2011-2012 aikana. Net-Foodlab Oy on turkulainen tutkimuslaboratorio, joka tuottaa laadunhallinta-, kehittämis- ja laboratoriopalveluita ja on erikoistunut elintarvikealan laadunhallintaan. Laboratorio on ISO 17025-akkreditoitu, mikä edellyttää, että käytössä olevat menetelmät on validoitu. Laboratoriossa tehdään kemiallisia ja mikrobiologisia mittauksia teollisuudelle, suurtalouksille ja kaupalle. Lisäksi Net-Foodlab Oy tarjoaa koulutuspalveluja sekä laadunhallintajärjestelmien kehitys- ja konsultointipalveluja.

Tässä opinnäytetyössä validoitiin kolme menetelmää elintarviketeollisuuden jätevesien analyysille. Menetelmät kemiallisen hapenkulutuksen, kokonaisyhdistyksen ja kokonaisfosforin mittaukseen olivat fotometrisia kyvettitestejä. Lisäksi neljännelle menetelmälle, OxiTop® -menetelmälle biokemiallisen hapenkulutuksen määrittämiseen, suoritettiin alustavia validointitestejä sekä laadittiin validointisuunnitelma. OxiTop® -laitteisto mittaa biokemiallista hapenkulutusta mikrobien hengitysprosessista johtuvan paineenmuutoksen perusteella, eli se on manometrinen respirometrinen menetelmä. Menetelmän hankalan luonteen ja pienen kapasiteetin vuoksi sen validointi on hyvin aikaavievä prosessi ja sitä jatketaan opinnäytetyössä laaditun validointisuunnitelman mukaisesti.

Validoinnin yhteydessä menetelmille määritettiin myös mittausepävarmuus, joka on arvio rajoista, joiden sisällä mittaustulos on tietyllä todennäköisyydellä. Mittausepävarmuus määritettiin niille menetelmille, joiden validointi vietiin opinnäytetyössä loppuun asti, eli kemialliselle hapenkulutukselle, kokonaisyhdistykselle ja kokonaisfosforille.

Menetelmät, joissa on käytössä kaupallinen testikitti, olivat jo valmiiksi tuttuja Net-Foodlab Oy:lle. Sen sijaan OxiTop® -menetelmä oli täysin uusi menetelmä. Aiemmin biokemiallista hapenkulutusta oli mitattu kyvettitestillä heikoin tuloksin.

Vesi on tärkeä elementti elämän kannalta ja sen laatu vaikuttaa luontoon ja terveyteen. Siksi jätevedet on käsiteltävä asianmukaisesti ennen niiden päästämistä ympäristöön. Esimerkiksi orgaanisen aineen määrä jätevedessä on tunnettava suunniteltaessa sen puhdistusprosessia. Orgaanisen aineen määrää voidaan tutkia kemiallisen ja biokemiallisen hapenkulutuksen avulla.

Teollisuudesta peräisin olevan jäteveden koostumus vaihtelee paljon riippuen prosessista, josta se on peräisin. Erityisesti orgaanisen aineen määrässä voi olla suuriakin vaihteluita. Jäteveden koostumus vaikuttaa myös näytteen käsittelyyn tarkastelun kohteena olevissa mittausmenetelmissä. Esimerkiksi korkea COD_{Cr}-pitoisuus aiheuttaa häiriötä kokonaistyyppi- ja kokonaisfosforianalyseissa ja se on tunnettava määritettäessä BOD₇-mittauksen näytilavuutta. Teollisuudesta peräisin oleva jätevesi sisältää hyvin todennäköisesti pesu- ja desinfiointiaineita, jotka tuhoavat mikrobeja tai inhiboivat niiden toimintaa, mikä taas aiheuttaa toimenpiteitä BOD-analyysiin.

2 VALIDOINTI

Validointi on laadunhallinnan toimenpide, joka koostuu ennalta suunnitelluista mittauksista. Mittausten avulla pyritään osoittamaan analyysimenetelmän pätevyys. Validoinnin avulla arvioidaan menetelmän soveltuvuutta käyttötarkoitukseensa sekä analyysitulosten luotettavuutta. (1)

Validointitestien avulla osoitetaan, että menetelmä mittaa juuri sitä, mitä se on tarkoitettu mittaamaan ja että sen antamat tulokset ovat oikeita ja niiden epävarmuus tunnetaan. Validointia varten laaditaan validointisuunnitelma, jossa määritellään menetelmälle validoitavat parametrit ja niiden hyväksymiskriteerit sekä ohjeet testien suoritukseen. Validointisuunnitelmassa arvioidaan myös validoinnin laajuus. Hyväksymiskriteerit voivat olla laboratorion itsensä määrittämiä tai ne voidaan saada asiakkaalta tai viranomaiselta. Validointi voidaan hyväksyä vain jos kaikki hyväksymiskriteerit täyttyvät. (2) Yleensä validoinnissa käytetään apuna varmennettuja vertailumateriaaleja, jotka ovat homogeenisia aineita, joissa on tunnettu määrä yhtä tai useampaa analyyttiä. (1).

Validointi suoritetaan silloin, kun otetaan käyttöön uusi menetelmä tai kun vanhaan menetelmään tehdään muutoksia (2). Validointi on tarpeen myös silloin, kun menetelmä otetaan käyttöön toisessa laboratoriossa tai kun otetaan käyttöön uusi laite (3). Uuden menetelmän tapauksessa validointi on osa menetelmän kehitystä, sillä menetelmää voidaan validoinnin aikana muunnella siten, että hyväksymiskriteerit saavutetaan. Validoinnin laajuus riippuu menetelmästä; jos kyseessä on standardimenetelmä, sille voidaan suorittaa suppeampi validointi kuin laboratorion omalle tai muulle standardoimattomalle menetelmälle. (2)

Net-Foodlab Oy:ssa pyritään käyttämään mahdollisimman paljon standardimenetelmiä tai jonkin menetelmäkokoelman menetelmiä. Joissain tilanteissa käytetään myös laboratorion omia sisäisiä menetelmiä tai esimerkiksi standardimenetelmien muunnoksia. (4)

Validoinnissa on tärkeää myös asianmukainen dokumentointi. Tulokset ja johtopäätökset kootaan validointiraporttiin, jonka yhteydessä arkistoidaan myös alkuperäinen tulosaineisto. Validoinnin hyväksymisen jälkeen analyysimenetelmän toimintaa tarkkaillaan jatkossa erilaisin laadunvarmistustoimenpitein, esimerkiksi kontrollinäytteiden avulla. (2)

2.1 Validointiparametrit

Validointiparametrien valinta riippuu tarkastelun kohteena olevasta menetelmästä ja laboratorion omista käytännöistä, eli mitä sen laatujärjestelmässä on asiasta sanottu. Rinnakkaisten määritysten määrä päätetään tapauskohtaisesti.

2.1.1 Spesifisyys ja selektiivisyys

Spesifisyys ja selektiivisyys antavat tietoa siitä, miten hyvin analyytti voidaan määrittää niin, että muut näytteen komponentit eivät häiritse analyysia. Menetelmän ollessa spesifinen se antaa vasteen ainoastaan tutkittavalle analyyttille. Selektiivinen menetelmä sen sijaan antaa vasteen myös muille komponenteille, mutta analyytin vaste on selvästi erotettavissa muista. Jos menetelmä ei ole selektiivinen, analyysissa ilmenee systemaattinen virhe, joka vääristää tuloksia. (2) Vain harvat menetelmät ovat täysin spesifisiä analyyttille (3). Mikäli näytteessä on komponentteja, jotka häiritsevät analyysin selektiivisyyttä, niiden vaikutusta voidaan tutkia esimerkiksi lisäämällä näytteeseen häiritsevää ainetta ja tarkastelemalla sen vaikutusta tulokseen.

2.1.2 Tarkkuus

Tarkkuus kuvaa mittaustuloksen ja teoreettisen arvon läheisyyttä. Se voidaan määrittää vertaamalla mittaustulosta vertailumateriaalilla saatuun tulokseen. Mikäli vertailumateriaalia ei ole saatavilla, muita vaihtoehtoja tarkkuuden mää-

ritykseen ovat standardinlisäysmenetelmä sekä mittaustulosten vertaaminen jo validoidulla menetelmällä saatuihin tuloksiin. (2)

Joissain tapauksissa vertailumateriaaleja, joissa analyytin pitoisuus on tunnettu, on saatavilla kaupallisesti. Paras mahdollinen vertailumateriaali on matriisi-pohjainen, sertifioitu ja mahdollisimman samankaltainen tutkittavan näytteen kanssa. Jos kaupallista vertailumateriaalia ei ole saatavilla, se voidaan usein valmistaa itse. Tarkkuutta voidaan tarkastella myös laboratorioden välisissä vertailumittauksissa. (3) Sertifioidun vertailumateriaalin avulla tarkkuus on helposti todistettavissa, sillä sertifioidun vertailumateriaalin hajoamistuotteet tunnetaan ja se on jäljitettävissä. (5)

2.1.3 Toistotarkkuus

Toistotarkkuus kuvaa määritysten satunnaisvaihtelua ja siihen liittyy kolme tekijää; menetelmän toistettavuus, laboratorion sisäinen toistettavuus sekä uusittavuus. (5) Toistettavuus on täsmällisyyttä, joka saavutetaan käytettäessä samaa menetelmää, laitetta, ympäristöä ja analyysin suorittajaa. Se voidaan määrittää suorittamalla useita rinnakkaisia analyyseja. Rinnakkaisten näytteiden tuloksista lasketaan niiden keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta. (2) Laboratorion sisäinen toistettavuus suoritetaan samalla tavalla kuin toistettavuustesti, mutta mittaus suoritetaan eri päivinä tai mittauksen tekijä tai mittauslaite jne. vaihtuu. (5) Laboratorion sisäinen toistettavuus kuvaa toistettavuutta pitkällä aikavälillä. Uusittavuus taas on täsmällisyyttä, jossa on käytössä sama näyte ja sama menetelmä, mutta se suoritetaan eri laboratoriossa. Uusittavuus siis on toistotarkkuutta erilaisissa olosuhteissa. Analyysimenetelmän uusittavuutta arvioidaan siis tekemällä vertailua eri laboratorioden välillä. (2)

2.1.4 Toteamis- ja määrittämiss raja

Toteamisraja on pienin analyytin pitoisuus, joka menetelmällä voidaan todeta luotettavasti. Se voidaan määrittää esimerkiksi laimentamalla näytteitä ja mit-

taamalla niitä, kunnes saavutetaan alhaisin havaittavissa oleva analyytin pitoisuus. Toteamisraja voidaan määrittää myös visuaalisesti, signaali/kohinasuhteella tai laskemalla nollanäytteen hajonnan tai määritysrajan perusteella. (5)

Määritysraja on pienin analyytin pitoisuus, joka voidaan määrittää niin, että mittauksen tarkkuus on riittävä. (2) Tilanteesta riippuen määritysrajaksi todetaan yleensä 5, 6 tai 10 kertaa nollanäytteen keskihajonta. (3) Määritysraja voidaan määrittää myös visuaalisesti tai testaamalla toistettavuutta pienillä pitoisuuksilla. (5) Toteamis- ja määritysrajan väliin jää alue, jolla analyytti voidaan todeta luotettavasti, mutta sen kvantitointi on hyvin epävarmaa. (3)

2.1.5 Lineaarisuus ja mittausalue

Mittausalue on se alue, jolla mittaustulosten tarkkuus ja toistotarkkuus ovat hyväksyttävissä rajoissa. Lineaarinen alue sen sijaan on alue, jolla analyytin vaste käyttäytyy lineaarisesti suhteessa sen konsentraatioon. Mittausalue voi siis olla suurempi kuin lineaarinen alue. Mittausalueen alaraja on analyytin määritysraja. (2) Yleensä analyysimenetelmän mittausalueeksi valitaan lineaarinen alue. (5)

Mittausalue määritetään standardiliuosten avulla. Yleinen käytäntö on valmistaa nollanäytteen lisäksi viisi standardia eri pitoisuuksilla jäljitettävästä vertailumateriaalista. Tuloksista laaditaan pienimmän neliösumman menetelmällä regressiosuora, josta voidaan arvioida menetelmän lineaarinen alue. (3) Regressiosuoran avulla saadaan tietää myös korrelaatiokerroin, kulmakerroin, y-akselin leikkauspiste sekä jäännössummat. (5) Lineaarisuustestin tulosten tarkastelu suoritetaan taulukkolaskentaohjelman avulla.

Herkkyys on regressiosuoran kulmakerroin ja se kertoo, kuinka pieni muutos analyytin pitoisuudessa aiheuttaa muutoksen vasteessa. (2) Lineaarisella alueella mittalaitteen herkkyys on vakio. (1)

2.1.6 Häiriöalttius

Häiriöalttius kuvaa, miten erilaiset muutokset tai häiriöt vaikuttavat analyysiin. Jos menetelmä on luotettava, se sietää hyvin häiriöitä. Menetelmän häiriön-sietokykyä voidaan testata muuttamalla esimerkiksi näytteen esikäsittelyä, pH:ta tai lämpötilaa. Jos häiriöaltistus aiheuttaa tuloksiin normaalia mittauserpävarmuutta suuremman muutoksen, tekijä vaikuttaa mittaustulokseen merkittävästi. (2)

2.2 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus kuvaa mittaustulosten odotettua vaihtelua. Sitä tarvitaan, kun arvioidaan analyysituloksen tarkkuutta tai verrataan eri laboratorioita toisiinsa. Mittausepävarmuus on kvantitatiivinen arvio rajoista, joiden sisällä mittaustulos on tietyllä todennäköisyydellä ja se voidaan laskea tilastollisten menetelmien avulla. (3)

Analyysin kokonaisvirhe voidaan määrittää, kun tunnetaan satunnainen ja systemaattinen virhe. Satunnainen virhe saattaa nimensä mukaisesti tapahtua milloin vain, mutta sitä voidaan pienentää huolellisella työskentelyllä ja vakioituilla olosuhteilla. Satunnaisvirhettä voidaan vähentää myös tekemällä useita rinnakkaisia määryksiä. Systemaattinen virhe vaikuttaa tuloksiin aina samalla tavalla. Systemaattisen virheen voi aiheuttaa esimerkiksi virhe analyysin olosuhteissa, vääränlainen liuos tai vika analyysilaitteessa. Sitä voidaan tutkia vertailumateriaalin avulla. (1) Systemaattista virhettä aiheuttavat tekijät pyritään mahdollisuuksien mukaan minimoimaan tai ottamaan laskennallisesti huomioon. (2)

Kokonaisepävarmuuden arvioinnissa on otettava huomioon kaikkien analyysin vaiheiden epävarmuudet. Kokonaisepävarmuus on analyysin eri vaiheiden epävarmuuksien neliösumman neliöjuuri. Laajennetulla epävarmuudella voidaan ilmaista, millä pitoisuusalueella analyysitulokset ovat tietyllä todennäköisyydellä. Laajennettu epävarmuus lasketaan kokonaisepävarmuudesta kertomalla

kokonaisepävarmuus halutun luotettavuustason t-jakauman kertoimella. Yleensä käytetään 95 % luotettavuustasoa, jolloin t-jakauman kerroin on 2. (1)

2.3 Validoinnin raportointi

Validointitulosten perusteella laaditaan menetelmäohje, jossa kuvataan menetelmän periaate, sovellusalue, näytteen mahdollinen esikäsittely sekä tarvittavat laitteet, välineet ja reagenssit. Menetelmäohje sisältää ohjeet analyysin suoritukseen sekä tulosten käsittelyyn. Lisäksi menetelmäohjeessa on analyysiin liittyvät työturvallisuusasiat sekä ohjeet jätteiden käsittelyyn. (1)

Validoinnista laaditaan myös validointiraportti, jossa kuvataan validointitestien suoritus ja tulokset sekä todetaan, täyttyvätkö hyväksymiskriteerit. Lisäksi siihen kirjataan työn tavoite, toteutus sekä käytetyt laitteet, välineet ja reagenssit. Validointiraportin sisältö riippuu menetelmälle suoritettujen validoinnin laajuudesta. (3) Validointiraportin yhteyteen arkistoidaan myös validoinnin alkuperäinen tulosaineisto. (2)

3 JÄTEVESI

Teollisuusjätevesi on teollisuustuotantoon tai muuhun elinkeinon harjoittamiseen käytettyjen kiinteistöjen käytöstä poistamaa vettä. (6) Elintarviketehtaissa suurin osa jätevedestä syntyy raaka-aineen käsittelyssä sekä laitteistojen pesemisessä. (7) Myös jäädytykseen kuluu huomattava määrä vettä. Kokonaisuudessaan elintarviketeollisuuden tuottaman jäteveden osuus kaikesta teollisuusjätevedestä on pieni. (8) Elintarviketeollisuuden ravinnekuormituksen merkittävimpiä tekijöitä ovat orgaaninen kiintoaine, typpi ja fosfori. Ravinnekuormitus aiheuttaa rehevöitymistä vesistöissä. Raskasmetallipäästöjä elintarviketehtaat eivät juuri aiheuta. (9)

Teollisuuden jätevesien ongelmana ovat usein niiden aiheuttamat hajuhaitat. Haju johtuu yleensä biologisesti hajoavista orgaanisista yhdisteistä ja se muodostuu viemäriin sisäpinnoilla bakteeritoiminnan seurauksena. Jäteveden viipyessä pitkään hapettomassa tilassa viemäriverkostossa syntyy myös sulfaatin pelkistyessä rikkiyhdisteitä. Rikkivety aiheuttaa lisäksi korroosiota viemäriverkostossa. Yksi keino vähentää rikkivedystä ja hajusta syntyviä ongelmia on alentaa jäteveden biokemiallista hapenkulutusta. Teollisuuden jätevedet sisältävät myös komponentteja, jotka voivat aiheuttaa tukkeutumista viemäriverkostossa, esimerkiksi, hiekkaa, rasvoja, lietemäisiä aineita sekä kiintoainetta. (6)

Teollisuusjätevesille on ominaista, että sen määrässä ja laadussa saattaa olla suuriakin vaihteluita. Tehtaat voivat johtaa jätevetensä vesistöön oma puhdistamon tai yleisen viemäriin ja kunnallisen puhdistamon kautta. Suuremmilla tehtailla on usein oma puhdistamo, jossa jätevesi käsitellään ennen sen päättämistä viemäriverkostoon. Esikäsittelyn helpottamiseksi on tärkeää tuntea jäteveden laatu, jotta voidaan arvioida, millaisen käsittelyn jätevesi tarvitsee. Esikäsittelyä jätevedelle vaaditaan silloin, kun se sisältää vesistölle tai vedenhuoltolaitokselle haitallisia aineita. (6)

Orgaanisen aineen määrä vaikuttaa siihen, minkälaisen biologisen käsittelyn jätevesi tarvitsee puhdistuksessa. Orgaanisen aineen määrää jätevedessä voidaan tutkia mittaamalla biokemiallista hapenkulutusta (BOD), kemiallista hapenkulutusta (COD) ja kokonaisorgaanista hiiltä (TOC). Jätevedenpuhdistamon tavoitteena on poistaa tai hajottaa orgaaninen aines vedestä. (10)

Elintarviketeollisuudesta peräisin oleva jätevesi eroaa yhdyskuntajätevedestä nimenomaan korkean orgaanisen aineen konsentraation vuoksi. Elintarviketeollisuuden jäteveden koostumus on usein monimutkainen ja vaihtelut esimerkiksi BOD-arvossa tai pH:ssa voivat olla suuria. (11) Väärin käsitelty jätevesi aiheuttaa ongelmia ekosysteemissä. Esimerkiksi jokien ja järvien saastumisen osatekijänä on jätevesien pääseminen niihin. Jätevesissä voi olla paljon epäorgaanisia epäpuhtauksia jotka voivat olla helposti biohajoavia, mutta aiheuttavat kuitenkin kuormitusta ekosysteemissä. (12)

Teollisuusjäteveden puhdistus riippuu pitkälti prosessista, mistä se on peräisin. Puhdistuksen ensimmäisessä vaiheessa jätevedestä poistetaan kiintoaine yksinkertaisilla selkeytystekniikoilla. Hienojakoinen kiintoaine voidaan poistaa esimerkiksi suodattamalla. Seuraavassa puhdistusvaiheessa jätevedestä poistetaan öljyt ja rasva, jonka jälkeen poistetaan biohajoavat orgaaniset aineet esimerkiksi aktiivilieteprosessilla. Aktiivilieteprosessi on biokemiallinen prosessi, jossa käytetään happea ja mikro-organismeja hapettamaan biologisesti orgaanisia aineita. Seuraavaksi jätevedestä poistetaan synteettiset orgaaniset aineet. Näiden aineiden kohdalla on useita vaihtoehtoja puhdistusmenetelmäksi, riippuen siitä, minkälainen orgaaninen aine on kyseessä. Jäteveden hapot ja emäkset neutraloidaan. Jos jätevedessä on myrkyllisiä aineita, niitä voidaan poistaa esimerkiksi saostamalla. (11)

4 VALIDOITAVAT MENETELMÄT

Jätevesimäärittäykseen on olemassa useita erilaisia analyysimenetelmiä. Tässä opinnäytetyössä kemialliselle hapenkulutukselle, kokonaistypelle ja kokonaisfosforille validoitiin fotometrinen kyvettitesti -menetelmä. Biokemiallisen hapenkulutuksen mittaamiseen tarkasteltiin OxiTop®-menetelmää, joka perustuu paineenmuutoksen mittaamiseen suljetussa tilassa.

4.1 Testikitit

Testikitit kemiallisen hapenkulutuksen, kokonaistypen ja kokonaisfosforin mittaamiseen ovat fotometrisia kyvettitestejä, joiden toiminta perustuu siihen, että kemiallinen reaktio muuttaa analyytin värilliseksi, jolloin sen intensiteetti voidaan määrittää fotometrisesti. Värin intensiteetti mitattuna absorbanssina on suoraan verrannollinen analyytin konsentraatioon. Kittien reagenssit sisältävät analyytille selektiivisiä reaktion kannalta välttämättömiä aineita, kuten pH-puskureita ja naamiointiaineita. (13)

Näytteen hajotusprosessi tapahtuu termoreaktorissa. Analyytti voi olla näytteessä monessa muodossa; ionina, kompleksina tai kiinteänä aineena, ja hajottamalla se saadaan muutettua analysoitavaan muotoon. Yleensä hajottavat aineet ovat happojen ja hapettavien aineiden yhdistelmiä, joskus myös emäksiä käytetään. Hajottamistapa riippuu analyytistä ja näytematriisista. (13)



Kuva 1. Termoreaktori.

Käytössä oleva termoreaktori on Spectroquant TR 320 (kuva 1.) ja siitä löytyy testikiteille valmiiksi tallennetut lämpötilaohjelmat. Oikea lämpötilaohjelma valitaan kitin ohjeiden mukaisesti. Termoreaktorissa on 12 paikkaa kyveteille.

Fotometria perustuu siihen, että valonsäteen transmittoituessa värillisen liuoksen läpi säde menettää intensiteettiään, eli liuos absorboi osan valosta. Absorbanssiaallonpituus riippuu mitattavasta analyytistä. Aallonpituus valitaan volframihalogeenilampun emittoimasta spektristä käyttäen kapeita rako-suodattimia tai muuta monokromaattoria. Absorption intensiteettiä voidaan kuvata transmittanssilla, T , tai suhteellisella transmittanssilla, $T\%$. (13)

$$T = I/I_0$$

I_0 Alkuperäinen valon intensiteetti

I Transmittoituneen valon intensiteetti

Absorbanssi on suoraan verrannollinen konsentraatioon:

$$A = -\log T$$

Bouguer'in ja Lambertin testaukset osoittivat, että absorptio riippuu kyvetin absorboivan kerroksen paksuudesta. Beer osoitti konsentraation ja absorbanssin välisen yhteyden ja nämä kaksi luonnonlakia on yhdistetty Lambert-Beerin laiksi, jota kuvaa seuraava yhtälö: (13)

$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

ε_{λ} molaarinen absorptiviteetti (1/mol · cm)

c analyytin konsentraatio (mol/l)

d kyvetin paksuus (cm)



Kuva 2. Fotometri.

Käytössä oleva fotometri on Spectroquant Nova 60 (kuva 2.), jossa on valmiina tallennetut ohjelmat eri testikiteille. Fotometri tunnistaa käytettävän menetelmän kyvetissä olevan viivakoodin perusteella ja mittaa analyyttien konsentraatiot yksikössä mg/l.

4.2 Kemiallinen hapenkulutus

Kemiallinen hapenkulutus (COD_{Cr}) kuvaa sitä happimäärää joka kuluu kaliumdikromaatin hapettaessa jäteveden sisältämiä orgaanisia aineita. Se ei siis suoraan kerro jäteveden orgaanisen aineen määrää, vaan sen hapen määrää, joka orgaanisen aineen hapettamiseen kuluu. (14) Validoitu menetelmä perustuu standardiin ISO 15705.

Sekä teollisuus- että yhdyskuntajätevedet voivat sisältää paljon orgaanista ainetta ja vesistöön päästessään ne aiheuttaisivat vesiin liunneen hapen ehtymistä. Vesieliot eivät voi elää ympäristössä, jossa on liian vähän happea, joten korkeat orgaanisten aineiden pitoisuudet johtaisivat niiden tuhoutumiseen. (15)

Biokemiallinen ja kemiallinen hapenkulutus eroavat toisistaan siten, että BOD kuvaa yhdisteiden biohajoamiseen kuluva happimäärää ja on siis biologinen ilmiö. Kemiallisessa hapenkulutuksessa näyte hapetetaan kemiallisesti, jolloin sekä biologisesti hajoavat että biologisesti inertit yhdisteet hapettuvat. Kemiallinen hapenkulutus on siis aina biologista hapenkulutusta suurempi. Teollisuusjätevesissä on runsaasti yhdisteitä, joita ei voida biologisesti hapettaa. Näin ollen mittaamalla jäteveden kemiallinen hapenkulutus saadaan tietää todellinen orgaanisen aineen määrä ja sen perusteella voidaan suunnitella puhdistusprosessia. (14)

Kemiallinen hapenkulutus mitataan hapettamalla näyte kuumassa rikki-pitoisessa kaliumdikromaattiliuoksessa termoreaktorissa lämpötilassa $148\text{ }^{\circ}\text{C}$ kahden tunnin ajan. Liuoksessa on hopeasulfaattia katalyyttinä edistämässä haponkestävien aineiden hapettumista. Mahdolliset pienet kloridimäärät naamioidaan elohopea(II)sulfaatilla. Fotometrillä mitataan hapettamisen jälkeen jäljelle jääneiden vihreiden Cr^{3+} -ionien konsentraatio. (16)

Menetelmällä ei voida mitata joitain heterosyklisiä yhdisteitä, sillä ne eivät hapeutu riittävästi. Myöskään kvaternaarisia typpiyhdisteitä ja haihtuvia orgaanisia yhdisteitä ei voida mitata, koska typpi muuttuu ammoniumioneiksi ja helposti haihtuvat yhdisteet haihtuvat hapettumisen sijaan. (16)

4.3 Kokonaistyyppi

Kokonaistypellä tarkoitetaan kaikkea veden sisältämää typpeä. Typpi voi olla vedessä vapaana ammoniakkinä, ammoniumina, nitriittinä, nitraattina ja orgaanisina typpiyhdisteinä, jotka voivat muuttua nitraatiksi. Hapetuksessa kaikki orgaaniset typpiyhdisteet eivät kuitenkaan muutu kvantitatiivisesti nitraatiksi. (17)

Typpiyhdisteet aiheuttavat suurina pitoisuuksina vesistöjen rehevöitymistä, sillä typpi on tärkeä ravinne kasveille. (18) Siksi jätevedenpuhdistamoilla pyritään pienentämään jäteveden sisältämän typen määrää.

Validoitava menetelmä perustuu kokonaistypen määrittämiseen fotometrisesti jätevesinäytteestä. Koroleffin menetelmällä orgaaniset ja epäorgaaniset yhdisteet muuttuvat nitraateiksi. Tämä perustuu käsittelyyn hapettavalla aineella termoreaktorissa. Hapetus suoritetaan standardin ISO 11905-1 mukaisesti. Nitraatti reagoi 2,6-dimetyylifenolin (DMP) kanssa liuoksessa, joka on tehty happamaksi rikki- ja fosforihapon avulla. Reaktiossa muodostuu 4-nitro-2,6-dimetyylifenolia, jonka pitoisuus määritetään fotometrisesti. Nitraatin määrittäminen perustuu standardiin ISO 7890/1. (19)

4.4 Kokonaisfosfori

Typen tavoin fosfori on tärkeä ravinne, joka suurina pitoisuuksina aiheuttaa vesistöjen rehevöitymistä. Kokonaisfosforilla tarkoitetaan kaikkien fosforin eri muotojen yhteismäärää. Kokonaisfosforin mittaaminen perustuu standardiin ISO 6878. Standardin mukaisella menetelmällä voidaan mitata joko pelkän ortofosfaatin määrää tai näytteen sisältämän kokonaisfosforin määrää. Validointi suoritettiin kokonaisfosforimääritykselle.

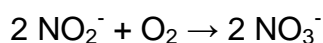
Rikkipitoisessa liuoksessa ortofosfaatti-ionit reagoivat molybdaatti-ionien kanssa muodostaen molybdofosforihappoa. Molybdofosforihappo pelkistetään

askorbiinihapolla fosfomolybdeenisiniseksi (PMB), joka määritetään fotometrisesti. (20).

Erona ortofosfaatin ja kokonaisfosforin määrittämisessä on se, että kun halutaan mitata kokonaisfosforia, fosforyhdisteet on muutettava ortofosfaatiksi ennen mittausta. Polyfosfaatti sekä jotkut orgaaniset fosforyhdisteet saadaan mukaan määrittämiseen, kun ne muutetaan molybdaattireaktiiviseksi ortofosfaatiksi rikkihappohydrolyysillä. Monet muut orgaaniset fosforyhdisteet saadaan muutettua ortofosfaatiksi peroksidisulfaatin avulla. (21) Termoreaktorissa tehtävä hajotus suoritetaan siis silloin, kun määritetään näytteen kokonaisfosforipitoisuutta.

4.5 Biokemiallinen hapenkulutus

Biokemiallinen hapenkulutus on tärkeä ja laajalti käytetty parametri jäteveden laadun tarkkailussa. Se kuvaa hapen määrää, joka kuluu orgaanisen aineen biohajoamiseen jätevedessä. BOD-arvossa näkyy kuitenkin myös hapettavien epäorgaanisten aineiden kuluttama happi sekä nitrifikaatioon kulunut happi. (22) Nitrifikaatio on tapahtuma, jossa ammoniumtyppi hapettuu nitraatiksi, joka edelleen hapettuu nitriitiksi ja se voidaan estää inhibiittorilla. (23) Nitrifikaation aiheuttavat tietyt bakteerit, kuten *Nitrosomonas* -suvun bakteerit sekä nitrobakteerit. Nitrifikaation reaktioyhtälö on seuraava: (10)

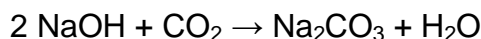


Nitrifikaatioinhibiittorina käytetään allyyliureaa (ATU) tai 2-kloori-6-trikloorimetyyli-pyridiiniä (TCMP). Nitrifikaatioinhibiittori estää ammoniakkin hajotuksesta vastaavien bakteerien toimintaa tuhoamatta kuitenkaan hiilyhdisteitä hajottavia mikro-organismeja. (24)

Biokemiallisen hapenkulutusten määrittäminen tavanomaisin testimenetelmin on melko hidasta. Määrittämiseen on olemassa myös uusia nopeita menetelmiä, mutta perinteisissä testeissä on etunsa; ne ovat käytössä kaikkialla maailmassa, joten tulokset ovat vertailukelpoisia keskenään, ja niihin ei tarvita kalliita lait-

teita. Tavanomaisia BOD-määritysmenetelmiä ovat manometrinen respirometrinen menetelmä, happianturilla tehtävä mittaus, jodometrinen titraus sekä UV-absorptiomittaus. (22)

Mikrobit hengittävät sisään happea ja ulos hiilidioksidia. Biokemiallinen hapenkulutus voidaan määrittää joko suorasti mittaamalla hapen määrää tai epäsuorasti mittaamalla hiilidioksidin määrää. (24) Manometrisessa respirometrisessä menetelmässä mitataan hiilidioksidin määrää ja muutosta paineessa. Yksi mooli happea on tilavuudeltaan sama kuin yksi mooli hiilidioksidia, joten happi muuttuessaan hiilidioksidiksi ei suoraan vaikuta paineeseen. Mittauspullon kaulassa oleva natriumhydroksidi reagoi hiilidioksidin kanssa muodostaen natriumkarbonaattia: (24)



Näin muodostunut hiilidioksidi poistuu kaasufaasista ja paineen muutos voidaan mitata. Negatiivinen paineenmuutos muutetaan BOD-arvoksi seuraavalla kaavalla: (24)

$$\text{BOD} = \frac{M(\text{O}_2)}{R \cdot T_m} \cdot \left(\frac{V_{\text{tot}} - V_l}{V_l} + \alpha \frac{T_m}{T_0} \right) \cdot p(\text{O}_2)$$

$M(\text{O}_2)$ Happimolekyylin molekyylimassa (32 000 mg/mol)

R Kaasuvakio (83,144 L · hPa / (mol·K))

T_0 Lämpötila (273,15 K)

T_m Mittauslämpötila (293,15 K)

V_{tot} Pullon tilavuus (ml)

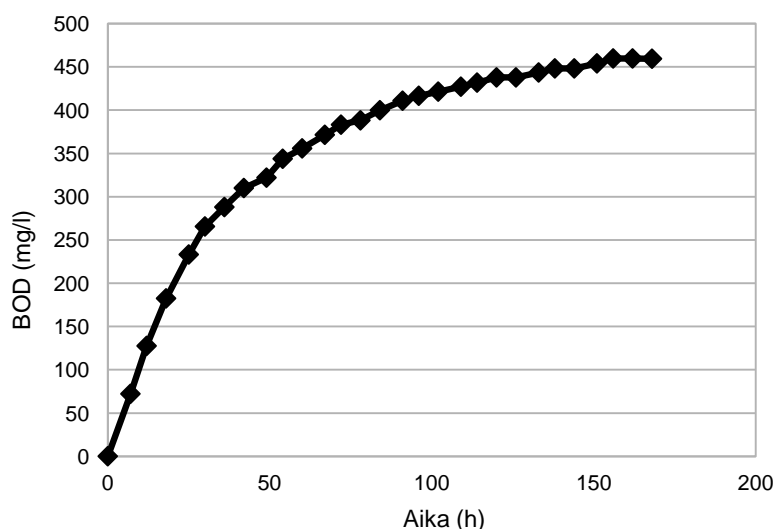
V_l Näytteen tilavuus (ml)

α Bunsen-absorptiokerroin (0,03103)

$\Delta p(\text{O}_2)$ Hapen osapaineen muutos (hPa)

Koska mikro-organismit ovat eläviä, ne vaativat tietynlaiset elinolosuhteet selvitäkseen. Ne tarvitsevat tarpeeksi ravinteita sekä tietyn pH-alueen. Ennen mittausta onkin varmistettava, että mikrobit kykenevät elämään näytevedessä, sillä muuten biokemiallista hapenkulutusta ei voida mitata. Esimerkiksi myrkylliset ja desinfioivat aineet tappavat mikrobeja. (24) Mikäli näyte sisältää mikrobeille myrkyllisiä tai niiden toimintaa inhiboivia aineita, se pitää ottaa käsittelyssä huomioon. Näytettä on laimennettava riittävästi ja siihen on lisättävä ravinneliuoksia. Nollanäytteisiin ja vertailunäytteisiin on ravinteiden lisäksi lisättävä myös ymppeä, joka voi olla esimerkiksi yhdyskuntajätevedettä. (25)

Biokemiallinen hapenkulutus voidaan määrittää viiden (BOD_5) tai seitsemän (BOD_7) vuorokauden aikana. Seitsemän vuorokautta kestävä inkuboinnin tarkoituksena on, että mittaus voidaan käynnistää minä päivänä tahansa niin, että se päättyy työpäivänä. (26) OxiTop®-menetelmää käytettäessä ei tosin ole väliä, milloin mittaus päättyy, koska anturit säilyttävät mittaustulokset muistissaan. Seuraavassa kuviossa nähdään biokemiallisen hapenkulutuksen kehitys seitsemän päivän aikana. Näyte on elintarviketehtaasta peräisin oleva tehtaan oman puhdistamon läpi kulkenut jätevesi.



Kuvio 1. Biokemiallinen hapenkulutus: kuvaaja.

Seitsemän vuorokauden inkubointi on käytössä lähinnä vain Skandinavian maissa. (24) Validoitava menetelmä oli $BOD_7(ATU)$, mikä tarkoittaa, että inku-

bointi kesti seitsemän päivää ja nitrifikaation estämiseksi käytettiin allyyliureaa.

OxiTop®-menetelmä on manometrinen respirometrinen menetelmä. Analyysi perustuu paineenmuutokseen suljetussa tilassa, jossa jäljitellään pienessä mitataavassa jätevedenpuhdistamolla tapahtuvaa prosessia. Pullon korkkina on OxiTop®-mittauspää, jonka paineanturi mittaa muutoksen paineessa ja tallentaa tiedot muistiinsa. Laitteistoon kuuluu kuusipaikkainen magneettisekoitusalus, kuusi näytepulloa ja OxiTop®-päät sekä infrapunaohjain OxiTop® Controller 110 joka kommunikoi OxiTop®-päiden kanssa infrapunavälityksellä. Näytteiden inkubointi tapahtuu 20 ± 1 °C:ssa seitsemän vuorokauden ajan. OxiTop®-laitteistoja on saatavilla 6- ja 12-paikkaisina. Tässä opinnäytetyössä validoitu laitteisto oli 6-paikkainen laitteisto, joka on kuvassa 3. Analyysille on myös kaupallisesti saatavilla nitrifikaatioinhibiittorireagenssi, joka on allyyliureaa, sekä NaOH-tabletteja.



Kuva 3. OxiTop®-laitteisto ja infrapunaohjain.

Lämpötila on merkittävä tekijä mittauksen kannalta. Se muuttaa painetta mittauspullon sisällä ja lisäksi vaikuttaa mikro-organismien biokemialliseen

aktiivisuuteen. Kun lämpötila nousee, monet biokemialliset reaktiot nopeutuvat ja vastaavasti lämpötilan laskiessa ne hidastuvat. Tämän vuoksi lämpötila ei saa poiketa yhtä astetta enempää + 20 °C:sta. (23)

OxiTop®-menetelmän etuna on suhteellisen helppo käytettävyys ja se, että se on muita BOD-menetelmiä ympäristöystävällisempi mittausmenetelmä, sillä käytössä ei ole elohopeaa sisältäviä elektrodeja. Laitteistoon on saatavilla Achat OC -ohjelma, jolla tulokset saadaan siirrettyä infrapunaohjaimesta suoraan tietokoneelle. (27)

Manometrinen respiometrinen menetelmä jäljittelee luonnollisia olosuhteita lähimmin biokemiallisen hapenkulutuksen mittausmenetelmistä. Näytepullossa on happea sekä liuenneessa muodossa että kaasufaasissa ja niiden määrää tasoitetaan koko inkuboinnin ajan voimakkaalla sekoituksella. (24)

5 KYVETTITESTIMENETELMIEN VALIDOINTIEN SUORITUS

Validoinnit suoritettiin Net-Foodlab Oy:n laboratoriossa. Kaikki menetelmät olivat tarkoitettu elintarviketeollisuudesta peräisin olevien jätevesien analyysiin. Menetelmiä testattiin jätevesinäytteellä ennen validointisuunnitelman laatimista. Validoinnin jälkeen menetelmille laskettiin mittausepävarmuudet ja laadittiin validointiraportit. Validointiraporteissa kuvattiin validointitestien suoritukset sekä todettiin hyväksymiskriteerien täyttyminen. Mittausepävarmuus laskettiin ottamalla huomioon kaikki analyysissa epävarmuutta aiheuttavat tekijät, kuten pipetoinnit, reagenssilisäykset ja laitteiden aiheuttamat virheet. Näistä epävarmuuksista laskettiin neliöiden summa, josta otettiin neliöjuuri. Tämä kokonaisepävarmuus kerrottiin t-jakauman kertoimella 2, jolloin saadaan mittausepävarmuus luotettavuustasolla 95 %.

Kaikille testikiteille oli kaupallisesti saatavilla olevat CombiCheck-vertailulioukset, jotka oli tarkoitettu Merckin valmistamien testikittien laadunvarmistukseen. COD- ja kokonaisfosforimenetelmien validoinnissa käytettiin CombiCheck 20 -vertailuliousta ja kokonaistyyppimenetelmälle käytössä oli CombiCheck 50 -liuos. Standardiliuosten mukana toimitettiin myös matriisin vaikutuksen tarkasteluun sopiva liuos.

Validoinnissa jokainen näyte mitattiin fotometrillä vähintään kaksi kertaa. Näin pyrittiin välttämään satunnaista virhettä. Rinnakkaisten tulosten avulla voidaan myös laskea fotometrin aiheuttama epävarmuus analyyseissa.

5.1 Validointitestien suoritus

Menetelmät olivat hyvin samankaltaisia suoritustavoiltaan, joten myös validointiparametrien testaukset ovat hyvin samanlaisia keskenään. Validoitaviksi para-

metreiksi valittiin tarkkuus, toistettavuus, laboratorion sisäinen toistettavuus, toteamis- ja määritysraja, lineaarisuus sekä matriisin vaikutus.

5.1.1 Spesifisyys ja selektiivisyys

Menetelmien spesifisyyttä ja selektiivisyyttä tarkasteltiin validointien edetessä, mutta niille ei katsottu tarpeelliseksi suorittaa erillisiä testauksia. Jokaisen testikittin ohjeessa oli taulukoituna analyyseja häiritsevät aineet ja niiden pitoisuudet elintarviketeollisuuden jätevedessä ovat niin pieniä, etteivät ne aiheuta virhettä tuloksissa.

5.1.2 Tarkkuus

Tarkkuusmittauksessa nollanäytteeseen lisättiin tunnettu määrä CombiCheck-standardia ja tulosta verrattiin teoreettiseen tulokseen. Liuoksia tehtiin kolme rinnakkaista satunnaisten virheiden välttämiseksi. Hyväksymisrajoiksi asetettiin samat arvot, jotka oli ilmoitettu analyysimenetelmän tarkkuudeksi kittien ohjeissa.

5.1.3 Toistettavuus

Toistettavuusmittaukset suoritettiin kahdella eri laimennustasolla. Samasta näytteestä tehtiin viisi rinnakkaista näytettä, joiden pitoisuudet määritettiin samoissa olosuhteissa lyhyellä aikavälillä. Tuloksista laskettiin rinnakkaisten näytteiden keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta. Kaikille kolmelle analyysimenetelmälle hyväksymisrajaksi asetettiin RSD <5 %.

5.1.4 Laboratorion sisäinen toistettavuus

Laboratorion sisäisen toistettavuuden testaus suoritettiin mittaamalla Combi-Check –vertailuliuosta eri mittauspäivinä muiden validointiparametrien yhtey-

dessä. Tuloksista laskettiin keskiarvo, keskihajonta sekä suhteellinen keskihajonta. Testejä tehtiin kolmena eri päivänä ja liuoksia oli aina kaksi rinnakkaista. Jatkossa laboratorion sisäistä toistettavuutta seurataan CombiCheck –vertailuliuosten avulla. Tulosten on pysyttävä 95 % sisällä lasketusta mittaus-epävarmuudesta.

5.1.5 Lineaarisuus

Lineaarisuuden mittausta varten valmistettiin kolme standardisuoraa, joihin kuului vähintään kuusi liuosta eri pitoisuuksilla. Standardiliuokset valmistettiin CombiCheck –vertailuliuoksista. Tuloksista piirrettiin kuvaajat, joissa y-akselilla oli konsentraatio ja x-akselilla absorbanssi. Akselit ovat näin päin, jotta suoran kulmakerrointa voidaan verrata kittien ohjeissa ilmoitettuihin herkkyysarvoihin. Standardisuorat piirrettiin taulukkolaskentaohjelman regressiosuora –työkalun avulla, jolloin saatiin selville suoran kulmakerroin, y-akselin leikkauspiste, suoran korrelaatiokerroin sekä jäännössummat.

Hyväksymisrajaksi regressiosuoran korrelaatiokertoimelle asetettiin $>0,95$. Lisäksi jäännösten tulee olla tasaisesti molemmilla puolilla suoraa ja suoran tulee kulkea suunnilleen origon kautta.

5.1.6 Toteamis- ja määrittämiss raja

Määrittämiss rajan testauksessa mitattiin erittäin laimea näyte kolme kertaa. Näytteitä tehtiin vähintään kaksi rinnakkaista. Laimennuksella pyrittiin pääsemään lähelle mittausalueen alarajaa. Tuloksista laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta. Hyväksymisrajana oli kittien ohjeissa ilmoitettu määrittämiss raja. Määrittämiss rajaksi asetettiin COD- ja fosforianalyseissa 10 x tulosten keskihajonta ja typpianalyysissä 6 x keskihajonta. Toteamisrajaksi määritettiin puolet määrittämiss rajasta.

5.1.7 Matriisin vaikutus

Matriisin vaikutusta testattiin CombiCheck –vertailuliuksen mukana olevalla R-2 –standardinlisäysliuoksella. Jätevesinäytteestä valmistettiin kahdenlaisia näytteitä matriisin vaikutuksen tarkastelua varten; A-näytteissä ei ollut lisättyä standardia, B-näytteisiin lisättiin standardinlisäysliuosta kyvettiin pipetoimisen jälkeen. Mittaukset tehtiin vähintään kahdella eri laimennustasolla ja molemmista laimennuksista tehtiin kaksi rinnakkaista näytettä.

Tulokset laskettiin seuraavalla kaavalla:

$$C = B - A$$

Mikäli C on standardinlisäysliuoksen ohjeessa ilmoitettujen hyväksymisrajojen sisällä, näytteen matriisi ei vaikuta häiritsevästi analyysiin. Jos C ei ole rajojen sisällä, näytteestä A mitattu tulos on virheellinen ja tarvitsee asianmukaisen esikäsittelyn.

5.2 Laitteet, välineet ja reagenssit

Kyvettitestimenetelmät muistuttavat suoritustavoiltaan toisiaan ja niissä käytettiin samoja laitteita ja välineitä. Validoinneissa käytetyt laitteet ja välineet on kirjattu taulukkoon 1.

Taulukko 1. Validoinneissa käytetyt laitteet ja välineet.

Laite/väline	Valmistaja/malli	Tunnistenumero
Automaattititraattori	Metrohm	2123
pH-mittari	Mettler Toledo MA235	2016
Termoreaktori	Merck Spectroquant TR 320	2231
Fotometri	Merck Spectroquant Nova 60	2230
DIN AS –luokan täys- pipettejä 1-50 ml	Hirschmann	

(jatkuu)

Taulukko 1. (jatkuu)

Mittapulloja		
Automaattipipettejä	Biohit Proline	
pH-indikaattori (alue 0-14)	Merck	Cat. No. 1.09535.0001
Tyhjiä 16 mm kierrekorkillisia kyvettejä	Merck Spectroquant	Cat. No. 1.14724.0001, Lot. HC813726
COD-kyvettitestikitti	Merck Spectroquant	Cat. No. 1,14541.0001, Lot. HC083505 ja HC122887
N-kyvettitestikitti	Merck Spectroquant	Cat. No. 1.00613.0001, Lot. HC063057 ja HC89782
PO ₄ -P-kyvettitestikitti	Merck Spectroquant	Cat. No. 1.4543.0001, Lot. HC064583 ja HC083595

Kyvettitestimenetelmien validoinneissa käytettiin testikittien sisältämiä reagensseja ja CombiCheck –standardiliuoksia. Testikittien tiedot on kirjattu taulukkoon 1, sillä kitti sisälsi myös analyysissa tarvittavia välineitä. CombiCheck –liuosten tiedot ovat seuraavassa taulukossa:

Taulukko 2. Validoinneissa käytetyt reagenssit.

Reagenssi	Valmistaja	Tunnistenumero	Pitoisuus
CombiCheck 20 –standardiliuos	Merck Spectroquant	Cat. No. 124675.0001, Lot. HC153644	R-1: 750 ±75 mg/l COD, 8,0 ±0,7 mg/l PO ₄ P R-2: 200 ±40 mg/l COD, 5,0 ±0,5 mg/l PO ₄ -P
CombiCheck 50 –standardiliuos	Merck Spectroquant	Cat. No. 1.14695.0001, Lot. HC11496	R-1: 5,0 ±0,7 mg/l N R-2: 3,0 ±0,5 mg/l N
Näyte: elintarviketehtaan jätevesi			

Standardiliuokset oli tarkoitettu kyvettitesiten laadunvarmistukseen. Standardiliuokset sisälsivät myös muita analyytteja tarkastelun kohteena olevien analyyttien lisäksi.

5.3 Validoinnit

Kemiallisen hapenkulutuksen, kokonaistypen ja kokonaisfosforin mittausmenetelmille validoitiin edellä kuvatut parametrit. Hyväksymisrajat määritettiin laboratorion omien käytäntöjen mukaan sekä testikittien ohjeiden perusteella.

5.3.1 Kemiallinen hapenkulutus (COD_{Cr})

Kemiallisen hapenkulutuksen mittaamiseen validoitiin Merckin valmistama kyvettitestikitti, jonka kataloginnumero oli 1.14541.0001. Testikitin mittausalue on 25-1500 mg/l COD. Näytteen esikäsittely ja analyysin suoritusohje on kuvattu liitteessä 1. Vertailuliuksena COD-menetelmän validoinnissa käytettiin CombiCheck 20 –liuosta, jonka COD-pitoisuus on 750 ± 75 mg/l.

Tarkkuus- ja lineaarisuustesteissä käytettyjen liuosten valmistus on kuvattu liitteessä 2. Kaikki COD-menetelmän validointitulokset ovat liitteessä 3.

COD-menetelmän validointi tehtiin CombiCheck 20 –standardiliuoksella. Tarkkuutta pystyttiin mittaamaan vain 750 mg/l COD asti, koska se oli standardiliuksen pitoisuus. Hyväksymisrajaksi asetettiin ± 30 mg/l COD, mikä on sama kuin kitin ohjeessa annettu analyysin tarkkuus. Keskimääräinen ero todelliseen tulokseen oli -5,8 mg/l. Kaikki tulokset olivat hyväksymisrajojen sisällä, joten validoinnin tulos hyväksyttiin.

Toistettavuus määritettiin laimentamattomalla jätevesinäytteellä ja 1:2 laimennetulla näytteellä. Tulokseksi saatiin RSD% 1,1 %, joten tulos hyväksyttiin.

Laboratorion sisäistä toistettavuutta testattiin kolmena päivänä. Testitulosten suhteellinen keskihajonta oli 0,4 %, eli laboratorion sisäinen toistettavuus oli hyvä.

Lineaarisuustesti suoritettiin tarkkuustestin yhteydessä. Kitin ohjeen mukaan absorbanssin noustessa 0,010 A analyytin konsentraatio nousee 17 mg/l. Tätä arvoa verrattiin suoran kulmakertoimeen. Kaikissa standardisuorissa oli hyväksyttävä korrelaatiokerroin ja jäännössummat olivat tasaisesti kummallakin puolella suoraa. Lineaarisuus todettiin alueella 0-1000 mg/l COD, mutta jatkuu todennäköisesti lähelle mittausalueen ylärajaa (1500 mg/l). Suorien kulmakertoimien perusteella absorbanssin noustessa 0,010 A, COD-konsentraatio nousee 17 mg/l. Validoinnin tulos hyväksyttiin.

Määritysrajaa tarkasteltiin 1:40 laimennetulla näytteellä. Laimennus tehtiin näytteestä, jonka kemiallinen hapenkulutus oli noin 1000 mg/l. Näin päästiin lähelle kitin ohjeen määritysrajaa, joka oli 25 mg/l. Näytteiden keskiarvoksi laskettiin 22,4 mg/l, keskihajonnaksi 2,1 mg/l ja suhteelliseksi keskihajonnaksi 9,5 %.

Kittiohjeen mukaan analyysimenetelmän määritysraja on 25 mg/l. Sen alla hajonta on suuri ja tulokset eivät ole luotettavia. Validointitulosten perusteella määritysraja on 10 x keskihajonta:

$$10 \times 2,1 \text{ mg/l} = 21 \text{ mg/l}$$

Toteamisrajaksi määritettiin puolet määritysrajasta:

$$25 \text{ mg/l} / 2 = 12,5 \text{ mg/l} \approx 13 \text{ mg/l}$$

Matriisin vaikutusta tutkittiin ensin laimentamattomalla ja 1:2 näytteellä. Molemmista tehtiin neljä rinnakkaista näytettä, joista kahteen lisättiin CombiCheck 20 R-2 –liuosta. Liuosta lisättiin 0,10 ml. Hyväksymisraja on CombiCheck 20 R-2 –liuoksen ohjeen mukainen, 200 ± 40 mg/l COD. Tulokset ovat sallituissa rajoissa, mutta ne ovat lähellä hyväksymisrajojen molempia ääripäitä eivätkä ne ole tasaisesti jakautuneet. Analyysi suoritettiin uudelleen laimentamattomalla näytteellä ja laimennuksilla 1:2 ja 1:10. Tulosten perusteella todettiin, että matriisin vaikutus on liian suuri laimentamattomassa näytteessä. Analyysia tehdessä näyte on siis laimennettava vähintään 1:2.

Kaikkien validointiparametrien tulokset olivat hyväksyttävissä rajoissa, joten validointi hyväksyttiin ja menetelmälle voitiin laskea mittausepävarmuus. Mittaus-

epävarmuuden laskemisessa otettiin huomioon kaikki analyysissä epävarmuutta aiheuttavat tekijät. Fotometrin aiheuttama virhe laskettiin kaikkien niiden rinnakkaisten mittausten perusteella, jotka ovat toteamisrajan yläpuolella. Rinnakkaiset mittaukset on taulukoitu liitteeseen 4. Rinnakkaisten mittausten erojen keskiarvoksi laskettiin 1,49 mg/l ja prosentuaalisten erojen keskiarvoksi 0,9 %. Mittausepävarmuus laskettiin seuraavalla tavalla (esimerkkinä 1:2 laimennettu näyte):

Taulukko 3. Mittausepävarmuuden lähteet COD-analyysissä.

Virhelähde	Virheen suuruus	Virheen neliö
Laimennus: mittapullo	100 ml $\pm 0,10$ ml → $\pm 0,1$ %	0,01
Laimennus: pipetti	50 ml $\pm 0,05$ ml → $\pm 0,1$ %	0,01
Pipetointi kyvetiin	3,0 ml $\pm 0,03$ ml → $\pm 1,0$ %	1
Fotometri	$\pm 0,9$ %	0,81
Toistettavuus	$\pm 1,1$ %	1,21
Vaihtelu kittierän mukaan	$\pm 0,73$ %	0,5329

Neliöiden summa = 3,7529

$\sqrt{3,7529} = 1,9372\dots$

$1,9372\dots \times 2 = 3,8744\dots$

Laimennuksilla 1:4 ja 1:10 mittausepävarmuudeksi saatiin 3,8 %. Mittausepävarmuus pyöristettiin ± 5 %.

5.3.2 Kokonaistyyppi

Kokonaistyyppimenetelmä oli myös Merckin valmistama kyvettitestikitti. Testikitin kataloginumero oli 1.00613.0001 ja sen mittausalue oli 0,5-15,0 mg/l N. Ohje näytteen esikäsittelyyn ja analyysin suoritukseen on liitteessä 5. Vertailu-

liuksena käytettiin CombiCheck 50 –standardia, jonka kokonaistyyppipitoisuus on $5,0 \pm 0,7$ mg/l.

Kokonaistyyppimenetelmän lineaarisuus- ja tarkkuusmittauksissa käytettyjen liuosten valmistus on liitteessä 6. Validoinnin mittaustulokset ovat liitteessä 7.

Kokonaistyyppimenetelmän ohjeessa COD-pitoisuuden ylärajaksi oli annettu 700 mg/l. Mikäli pitoisuus on suurempi, se aiheuttaa liian pieniä tuloksia. Lineaarisuustestin yhteydessä todistettiin suuren COD-arvon vaikutus analyysiin.

Tarkkuusmittauksen liuokset valmistettiin CombiCheck 50 –standardista. Analyysin tarkkuutta pystyttiin mittaamaan 5,0 mg/l N asti. Hyväksymisraja kokonaistyyppianalyysin tarkkuudelle oli $\pm 0,8$ mg/l N. Keskimäärin ero todelliseen tulokseen oli -0,05 mg/l. Kaikki tulokset olivat hyväksymisrajojen sisällä.

Toistettavuusmittaukset suoritettiin 1:2 ja 1:4 laimennetuilla näytteillä. Tulokseksi saatiin RSD% 2,8 %, joten hyväksymiskriteeri täyttyi.

Laboratorion sisäistä toistettavuutta testattiin kolmena eri päivänä. Tulosten suhteellinen keskihajonta oli 1,84 %, eli laboratorion sisäinen toistettavuus oli myös tässä analyysissä hyvä.

Ohjeen mukaan absorbanssin noustessa 0,010 A, kokonaistyyppikonsentraatio nousee 0,2 mg/l. Kaikissa regressiosuorissa on hyväksyttävät korrelaatio-kertoimet ja jäännössummat ovat melko tasaisesti jakautuneet. Lineaarisuus todettiin alueella 0-8,0 mg/l N, mutta jatkuu todennäköisesti mittaalueen ylärajaan (15,0 mg/l N) asti. Yli 8,0 mg/l N pitoisuuksilla korkea kemiallinen hapenkulutus (yli 700 mg/l) häiritsi analyysia aiheuttaen liian pieniä tuloksia, joten lineaarisuutta ei voitu tarkastella korkeammilla pitoisuuksilla. Absorbanssin noustessa 0,010 A kokonaistyyppikonsentraatio nousee 0,2 mg/l. Lineaarisuustestin tulokset hyväksyttiin.

Kokonaistyyppimenetelmän määritysrajaa tarkasteltiin 1:10 laimennetulla CombiCheck 50 –liuksella. 1:10 Tulosten keskiarvoksi saatiin 0,47 mg/l, keskihajonnaksi 0,06 mg/l ja suhteelliseksi keskihajonnaksi 12,1 %. Hyväksymisrajana oli vähintään kitin ohjeen mukainen määritysraja (0,5 mg/l). Sen alla hajonta on suuri ja tulok-

set eivät ole luotettavia. Validointitulosten perusteella määritysraja on 6 x keskihajonta:

$$6 \times 0,6 \text{ mg/l} = 0,36 \text{ mg/l}$$

Toteamisrajaksi määritettiin puolet määritysrajasta:

$$0,36 \text{ mg/l} / 2 = 0,18 \text{ mg/l}$$

Kokonaistyyppimittauksessa matriisin vaikutusta tutkittiin CombiCheck 50 R-2 –liuoksella, jota lisättiin näytteeseen 0,10 ml. Hyväksymisraja oli $3,0 \pm 0,5$ mg/l. Matriisin vaikutusta testattiin 1:2, 1:4 ja 1:10 laimennetuilla näytteillä, joista kaikista tehtiin neljä rinnakkaista. Jokaisesta laimennuksesta kahteen näytteeseen lisättiin standardinlisäysliuosta. Tuloksista todettiin, että matriisin vaikutus ei ole analyysia häiritsevää tekijä.

Kaikki validointimittaukset suoritettiin hyväksytysti, joten menetelmälle voitiin laskea mittausepävarmuus. Kokonaistyyppimittauksen kaikki rinnakkaiset mittaukset on taulukoitu liitteeseen 8. Fotometrin virheeksi määritettiin niiden perusteella 2,02 %. Reagenssin N-1K annoskoolle ja reagenssin N-2K tipoille määritettiin myös epävarmuudet. Punnitustulokset löytyvät liitteestä 9. Mittausepävarmuus laskettiin seuraavalla tavalla (esimerkkinä 1:2 laimennettu näyte):

Taulukko 4. Kokonaistyyppianalyysin mittausepävarmuuden lähteet.

Virhelähde	Virheen suuruus	Virheen neliö
Laimennus: mittapullo	100 ml $\pm 0,10$ ml → $\pm 0,1$ %	0,01
Laimennus: pipetti	50 ml $\pm 0,05$ ml → $\pm 0,1$ %	0,01
Pipetointi kyvetiin	10 ml $\pm 0,02$ ml → $\pm 0,2$ %	0,04
N-1K annos	$\pm 5,2$ %	27,04
N2-K 6 tippaa	$\pm 2,2$ %	4,84
N-3K pipetointi	± 1 %	1
Fotometri	$\pm 2,0$ %	4
Toistettavuus	$\pm 2,8$ %	7,84
Vaihtelu kittierän mukaan	$\pm 1,4$ %	1,96

Neliöiden summa = 46,74

$\sqrt{46,74} = 6,836\dots$

$6,836\dots \times 2 = 13,673\dots \approx 13,7$

Mittausepävarmuudeksi laskettiin laimennuksilla 1:2, 1:4 ja 1:10 13,7 %. Kokonaistyyppianalyysin mittausepävarmuus pyöristettiin ± 15 %:iin.

5.3.3 Kokonaisfosfori

Muiden testikittien tavoin kokonaisfosforimittaukseen tarkoitettu kitti oli myös Merckin valmistama. Sen kataloginnumero oli 1.14543.0001. Testikitin mittausalue oli 0,05-5,00 mg/l $\text{PO}_4\text{-P}$. Ohje näytteen esikäsittelyyn ja analyysin suoritukseen on liitteessä 10. Fosfaattikitille suositeltu standardiliuos oli CombiCheck 10, jonka fosfaattipitoisuus on $0,8 \pm 0,08$ mg/l, mutta käytössä oli CombiCheck 20 –vertailuliuos, koska tällöin voitiin käyttää samaa liuosta kuin COD-menetelmän validoinnissa. CombiCheck 20 –liuoksen fosfaattipitoisuus on $8,0 \pm 0,7$ mg/l, joten se sopi validoitavalle testikitille laimennuksen jälkeen.

Tarkkuuden ja lineaarisuuden mittauksissa käytettyjen liuosten valmistus on liitteessä 11. Kaikki mittaustulokset löytyvät liitteestä 12.

Kokonaisfosforimäärityksessä häiritsevän COD-arvon raja on 300 mg/l. Mikäli COD on suurempi, analyysitulokset ovat liian pieniä. Kemiallisen hapenkulutuksen häiritsevä vaikutus todistettiin oikeellisuus- ja uusittavuustestien yhteydessä.

Kokonaisfosforimenetelmän tarkkuutta mitattiin CombiCheck 20 –standardiluoksella. Hyväksymisrajaksi asetettiin kitin ohjeessa ilmoitettu tarkkuus eli $\pm 0,07$ mg/l $\text{PO}_4\text{-P}$. Keskimääräinen ero todelliseen tulokseen oli $-0,02$ mg/l, joten validoinnin tulos hyväksyttiin.

Kokonaisfosforianalyysin toistettavuutta mitattiin laimennuksilla 1:4 ja 1:5. Tulokseksi saatiin RSD% 1,1 %, joten tulos hyväksyttiin.

Kokonaisfosforianalyysin laboratorion sisäisen toistettavuus –testi suoritettiin CombiCheck 20 –vertailuliuksella. Standardiliuoksesta tehtiin ensin 1:2 laimennuksia, mutta niissä korkea kemiallinen hapenkulutus häiritsi analyysia pienentäen tuloksia. Toisessa testauksessa vertailuliuos laimennettiin 1:4. Suhteellinen keskihajonta oli 0,25 %, eli laboratorion sisäinen toistettavuus oli tämänkin analyysin kohdalla hyvä.

Kitin ohjeessa kerrotaan absorbanssin noustessa 0,010 A konsentraation nousevan 0,02 mg/l. Kaikkien standardisuorien kohdalla validointikriteerit täyttyivät. Lineaarisuus todettiin 4 mg/l pitoisuuteen asti, mutta jatkuu todennäköisesti ainakin mittausalueen ylärajaan, eli 5,0 mg/l asti. Absorbanssin noustessa 0,010 A analyytin konsentraatio nousi 0,02 mg/l. Lineaarisuustestin tulokset hyväksyttiin.

Kokonaisfosforin määritysrajaa tarkasteltiin 1:100 laimennetulla jätevesinäytteellä. Sen pitoisuudeksi arvioitiin 0,04 mg/l. Näytteiden keskiarvoksi saatiin 0,013 mg/l, keskihajonnaksi 0,005 mg/l ja suhteelliseksi keskihajonnaksi 35,4 %.

Ohjeen mukainen määritysraja on 0,05 mg/l. Validointitulosten perusteella määritysraja on 10 x keskihajonta:

$$10 \times 0,005 \text{ mg/l} = 0,05 \text{ mg/l}$$

Määritysrajaksi saatiin sama kuin kitin ohjeessa. Toteamisraja on puolet määritysrajasta:

$$0,05 \text{ mg/l} / 2 = 0,025 \text{ mg/l} \approx 0,03 \text{ mg/l}$$

Kokonaisfosforianalyysissa standardinlisäysliuoksena käytettiin CombiCheck 20 R-2 –liuosta, jota lisättiin kyvetiin näytteen pipetoimisen jälkeen 0,05 ml. Hyväksymisraja oli $0,5 \pm 0,05$ mg/l PO₄-P. Matriisin vaikutusta tutkittiin laimennuksilla 1:2, 1:4 ja 1:10. Matriisin vaikutus oli olematon eikä se ole häiritsevää tekijä analyysissa.

Kaikki validointikokeet suoritettiin hyväksytysti ja menetelmälle laskettiin mittausepävarmuus. Kokonaisfosforimenetelmän kaikki rinnakkaiset mittaukset ovat liitteessä 13. Myös kaikille lisättäville reagensseille laskettiin mittausepävarmuudet. Punnitustulokset ovat liitteessä 14.

Taulukko 5. Kokonaisfosforianalyysin mittausepävarmuuden lähteet.

Virhelähde	Virheen suuruus	Virheen neliö
Laimennus: mittapullo	100 ml $\pm 0,10$ ml → $\pm 0,1$ %	0,01
Laimennus: pipetti	50 ml $\pm 0,05$ ml → $\pm 0,1$ %	0,01
Pipetointi kyvetiin	5 ml $\pm 0,05$ ml → $\pm 0,1$ %	1
P-1K annos	$\pm 2,6$ %	6,76
P-2K 5 tippaa	$\pm 2,2$ %	4,84
P-3K annos	$\pm 2,5$ %	6,25
Fotometri	$\pm 0,1$ %	0,01
Toistettavuus	$\pm 1,1$ %	1,21
Vaihtelu kittierän mukaan	$\pm 1,1$ %	1,21

Neliöiden summa = 21,3

$\sqrt{21,3} = 4,615\dots$

$4,615\dots \times 2 = 9,231\dots \% \approx 9,2\%$

Mittausepävarmuus on sama laimennuksilla 1:4 ja 1:10. Menetelmän mittausepävarmuus pyöristettiin $\pm 10\%$:iin.

5.4 Validointien tulokset

Kemiallisen hapenkulutuksen mittaamiseen tarkoitettu menetelmä täytti validoinnin hyväksymiskriteerit. Validointi hyväksyttiin ja menetelmälle laskettiin mittausepävarmuus. Mittausepävarmuudeksi saatiin laimennustasosta riippumatta $\pm 5\%$.

Taulukko 6. COD-analyysin validoinnin yhteenveto.

Validointiparametri	Tulos	Hyväksymisraja	Hyväksytty/ hylätty
Spesifisyys/ selektiivisyys	-	-	Hyväksytty
Tarkkuus	-5,8 mg/l	±30 mg/l	Hyväksytty
Toistettavuus	RSD 1,1 %	RSD <5 %	Hyväksytty
Laboratorion sisäinen toistettavuus	RSD 0,41 %	-	Hyväksytty
Lineaarisuus	$R^2 = 1$ Jäännökset tasaisesti molemmilla puolilla suoraa ja suora kulkee suunnilleen origon kautta	$R^2 < 0,95$ Jäännökset tasaisesti molemmilla puolilla suoraa ja suora kulkee suunnilleen origon kautta	Hyväksytty
Toteamis- ja määritys- raja	Toteamisraja 13 mg/l Määritysraja 25 mg/l	Määritysraja vähintään kitin ohjeen mukainen, 25 mg/l	Hyväksytty
Matriisin vaikutus	Laimennetuissa näytteissä tulokset ovat rajoissa	200 ±40 mg/l	Hyväksytty

Validoinnin perusteella COD-menetelmän todistettiin antavan luotettavia tuloksia. Menetelmä sopii käyttötarkoitukseensa, joka on asiakaselintarviketehtaan jätevesien kemiallisen hapenkulutuksen määrittäminen. Näyte on analyysia varten laimennettava 1:2 tai enemmän, jotta matriisi ei vaikuta häiritsevästi analyysiin.

Myös kokonaistyyppianalyysimenetelmä täytti validointikriteerit. Validoinnin hyväksymisen jälkeen tyyppianalyysi mittauserävarmuudeksi laskettiin ±15 %.

Taulukko 7. Kokonaistyyppianalyysin validoinnin yhteenveto.

Validointiparametri	Tulos	Hyväksymisraja	Hyväksytty/ hylätty
Spesifisyys/ selektiivisyys	-	-	Hyväksytty
Tarkkuus	-0,05 mg/l	±0,8 mg/l	Hyväksytty
Toistettavuus	RSD 2,8 %	RSD <5 %	Hyväksytty
Laboratorion sisäinen toistettavuus	RSD 1,84 %	-	Hyväksytty
Lineaarisuus	R ² = 1 Jäännökset tasaisesti molemmilla puolilla suoraa ja suora kulkee suunnilleen origon kautta	R ² < 0,95 Jäännökset tasaisesti molemmilla puolilla suoraa ja suora kulkee suunnilleen origon kautta	Hyväksytty
Toteamis- ja määrittys- raja	Toteamisraja 0,36 mg/l Määrittysraja 0,18 mg/l	Määrittysraja vähintään kitin ohjeen mukainen, 0,5 mg/l	Hyväksytty
Matriisin vaikutus	Tulokset rajoissa, matriisi ei vaikuta	3,0 ±0,5 mg/l	Hyväksytty

Myös kokonaistyyppien mittaukseen tarkoitettujen kyvettitestien todistettiin validoinnin perusteella antavan oikeita tuloksia. Tämäkin menetelmä siis sopii asiakkaan jätevesien analysointiin.

Kokonaisfosforin mittaamenetelmä täytti kahden muun menetelmän tavoin hyväksytysti kaikki validointikriteerit. Menetelmän mittausepävarmuus on ±10 %.

Taulukko 8. Kokonaisfosforimenetelmän validoinnin yhteenveto.

Validointiparametri	Tulos	Hyväksymisraja	Hyväksytty/ hylätty
Spesifisyys/ selektiivisyys	-	-	Hyväksytty
Tarkkuus	-0,02 mg/l	±0,07 mg/l	Hyväksytty
Toistettavuus	RSD 1,1 %	RSD <5 %	Hyväksytty
Laboratorion sisäinen toistettavuus	RSD 0,41 %	-	Hyväksytty

(jatkuu)

Taulukko 8. (jatkuu)

Lineaarisuus	$R^2 = 1$ Jäännökset tasaisesti molemmilla puolilla suoraa ja suora kulkee suunnilleen origon kautta	$R^2 < 0,95$ Jäännökset tasaisesti molemmilla puolilla suoraa ja suora kulkee suunnilleen origon kautta	Hyväksytty
Toteamis- ja määrittysraja	Toteamisraja 0,025 mg/l Määrittysraja 0,05 mg/l	Määrittysraja vähintään kitin ohjeen mukainen, 0,05 mg/l	Hyväksytty
Matriisin vaikutus	Tulokset rajoissa, matriisi ei vaikuta	0,5 ±0,05 mg/l	Hyväksytty

Kaikki kyvettitestimenetelmät todistettiin luotettaviksi. Jatkossa näiden kaikkien kolmen menetelmän toimintaa tarkkaillaan CombiCheck –vertailuluoksilla säännöllisesti. Jos menetelmiä aletaan käyttää toisen asiakasyrityksen jätevesille, niille on suoritettava erinäisiä validointitestejä, mutta ei kuitenkaan täysmittaista validointia.

6 BOD₇-MENETELMÄN TESTAUSTEN SUORITUS

BOD-menetelmän testaus ja validointisuunnitelman kirjoittaminen aloitettiin vasta muiden validointien loppumetreillä. Muiden menetelmien tavoin myös BOD-menetelmällä on tarkoitus tehdä mittauksia elintarviketeollisuuden jätevesille. BOD-menetelmälle ollaan ottamassa käyttöön uutta mittausmenetelmää. Validoitavat parametrit ovat tarkkuus, toistettavuus, laboratorion sisäinen toistettavuus ja lineaarisuus. Toteamis- ja määrittämissrajat on tarkoitus tutkia muiden validointiparametrien yhteydessä.

BOD-menetelmä osoittautui melko hankalaksi, sillä pienetkin muutokset menetelmän suorituksessa näkyvät tuloksissa. Esimerkiksi ympin tuoreus saattaa vaikuttaa analyysiin. Menetelmä vaatii useita testauksia ja koska laitteiston kapasiteetti on melko pieni ja mittausaika pitkä, validointia ei ehditty rajallisen aikataulun puitteissa suorittaa vaan menetelmälle suoritettiin erilaisia testejä ja niiden pohjalta laadittiin validointisuunnitelma, jossa pyrittiin ottamaan huomioon menetelmän ongelmakohdat mahdollisimman hyvin.

Käytössä oli WTW:n valmistama OxiTop® IS 6 -laitteisto. Laitteiston mittausalue on 0-4000 mg/l BOD. Ohjeet näytteen esikäsittelyyn, standardiliuoksen valmistukseen ja analyysin suoritukseen on liitteessä 15. Vertailuliuoksena käytettiin itse valmistettua glukoosi-glutamiinihappostandardia, jonka BOD tunnetaan. Liuoksen, jossa on 150 ± 1 mg glukoosia ja glutamiinihappoa, teoreettinen hapenkulutus on 307 mg/l. (24) Liuoksen kokemukseräinen BOD₇ on kuitenkin 225 ± 20 mg/l happea. (26)

6.1 Laitteet, välineet ja reagenssit

Seuraavassa taulukossa on BOD₇-menetelmän tarkastelussa käytetyt laitteet ja välineet:

Taulukko 9. BOD-menetelmän testauksissa käytetyt laitteet ja välineet.

Laite/väline	Valmistaja/malli	Tunnistenumero
Ylivuotopullot (164 ja 432 ml)		
OxiTop® IS 6 -laitteisto: mit- tauspullot (510 ml), magnee- tit, kumikotelot, sekoitusalus- ta	WTW	
OxiTop® Controller OC100	WTW	
Lämpökaappi	Termaks	2265
Lämpömittari		2121 ja 2332
pH-mittari	Mettler Toledo MA235	2016
Analyysivaaka	Precisa XT220A	2264
COD-kyvettitestikitti	Merck Spectroquant	Cat. No. 1.14541.0001, Lot. HC083505
Automaattipipettejä	Biohit Proline	

Taulukossa 10 on lueteltu BOD₇-menetelmän testeissä käytetyt reagenssit. Kemiällisen hapenkulutuksen mittauksessa tarvittavat reagenssit kuuluvat taulukossa 9 mainittuun testikittiin.

Taulukko 10. BOD-menetelmän testauksissa käytetyt reagenssit.

Reagenssi	Valmistaja	Tunnistenumero	Pitoisuus
Nitrifikaatioinhibiittori NTH 600 (C ₄ H ₈ N ₂ S)	WTW	Order No 209 331	5 g/l
Natriumhydroksidi NHP 600 (NaOH)	WTW	Order No 209 140, Index No 011-002- 00-6	
Ympäri, esiselkeytetty yhdyskuntajätevesi			COD n. 300 mg/l
Ympäri, jälkiselkeytetty yhdyskuntajätevesi			COD n. 50 mg/l
Kaliumvetyfosfaatti (KH ₂ PO ₄)	Merck	Cat. No. 1.04873.0250, Lot. A0047373927	
Dikaliumvetyfosfaatti (K ₂ HPO ₄)	VWR BDH Prolabo	Cat. No. 26931.263 Batch. 11H230034	
Dinatriumvetyfosfaattihepta-hydraatti (Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O)	Merck	Cat. No. 1.06574.1000, Lot. A283074 202	
Ammoniumkloridi (NH ₄ Cl)	VWR BDH Prolabo	Cat. No. 21236.291, Batch. 08L3000	
Magnesiumsulfaattihepta-hydraatti (MgSO ₄ ·7 H ₂ O)	VWR BDH Prolabo	Cat. No. 25167.298, Batch. 09D070001	
Vedetön kalsiumkloridi (CaCl ₂)	VWR BDH Prolabo	Cat. No. 22328.262, Batch. 11G130012	
Rauta(III)-kloridiaheksahydraatti (FeCl ₃ ·6 H ₂ O)	Merck	Cat. No. 1.03943.0250, Lot. B0507943138	
Glukoosi (C ₆ H ₁₂ O ₆)	VWR BDH Prolabo	prod. 101174Y, Batch 11H310004	
Glutamiinihappo (C ₅ H ₉ NO ₄)	Alfa Aesar	A15031, Lot. 10160151	
Näyte: elintarviketehtaan jätevesi			

6.2 Suoritetut testit

BOD₇-menetelmälle suoritetut testit olivat alustavia validointitestejä, joiden tuloksia voidaan myös hyödyntää validoinnissa. Alustavia testejä suoritettiin sekä näytteellä että standardilla. Menetelmää testattiin tehtaan oman puhdistamon läpi kulkeneella jätevedellä sekä puhdistamattomalla jätevedellä. Puhdistamattomassa jätevedessä ei ollut valmiiksi mikrobeja, koska jätevesi ei ollut käynyt läpi biologista puhdistusta.

Puhdistamattomalla jätevedellä järkeviä tuloksia ei saatu, sillä ympäri oli todennäköisesti riittämätön kyseiselle jätevedelle, joka saattoi sisältää mikrobeja tuhoavia aineita, kuten tuotantolaitteiden puhdistuksesta peräisin olevia pesuaineita. Muutenkin ympäriin laadun todettiin olevan merkittävä tekijä analyysissä. Pakastetut ympäriin eivät aina toimineet ja liian väkevä ympäriin aiheutti väärien tuloksia. Ympäriinä käytettiin yhdyskuntajätevettä. Esiselkeytettyä ja jälkiselkeytettyä jätevettä sekoitettiin niin, että ympäriin kemiallinen hapenkulutus olisi noin 100-200 mg/l.

6.2.1 Menetelmän testaus

Menetelmää testattiin elintarviketehtaan jätevedellä, joka oli kulkenut tehtaan oman puhdistamon läpi ja näin ollen sille oli tehty myös biologinen puhdistus. Jätevesinäytteen COD-arvoksi mitattiin noin 1300 mg/l, jonka perusteella biokemiallisesti hapenkulutukseksi arvioitiin 700-1000 mg/l.

Näytteestä tehtiin kaksi 1:4 laimennusta, jolloin ne osuivat mittausalueelle 0-400 mg/l ja yksi 1:2 laimennus, jonka mittausalue oli 0-800 mg/l. Analyysissä käytettiin laimennusvettä, jonka valmistus on kuvattu liitteessä 15 ja analyysi suoritettiin samassa liitteessä olevien ohjeiden mukaisesti. Testin tulokset ovat liitteessä 16. Tulokseksi saatiin, että näytteen BOD₇ oli 920 mg/l, mikä oli noin 70 % kemiallisesta hapenkulutuksesta. Testin perusteella menetelmä toimii odotetulla tavalla.

6.2.2 Testit standardiliuoksella

Glukoosi-glutamiinihappostandardia voidaan käyttää esimerkiksi menetelmän tarkkuuden ja toistettavuuden testaamiseen. Standardiliuoksesta tehtyjä näytteitä testattiin eri päivinä, joten tulosten perusteella voitiin myös hieman arvioida laboratorion sisäistä toistettavuutta. Standardiliuosmittausten tuloksia on liitteessä 16.

Osa standardiliuoksilla suoritetuista mittauksista antoi vääriä tuloksia, joka todennäköisesti johtui huonosta ympästä. Ympästä säilytettiin pakastimessa ja sulatettiin tarvittaessa, joten mikrobit ovat saattaneet tuhoutua jossain vaiheessa. Tuoreella ympäällä menetelmä antoi aina hyviä tuloksia ja osa pakastimessakin olleista ympeistä toimi hyvin. Viiden standardiliuosmittauksen keskiarvo oli 221 mg/l, keskihajonta 12,4 mg/l ja suhteellinen keskihajonta 5,6 %. Myös laimennetuilla standardiliuoksilla päästiin hyväksymisrajojen sisälle.

6.2.3 Ongelmakohtia

Liitteessä taulukoidut tulokset ovat onnistuneita, mutta opinnäytetyön aikana tehtiin myös useita epäonnistuneita mittauksia. Suurin osa vastaan tulleista ongelmista johtui ympin tehosta. Validointia suoritettaessa on siis tärkeää, että ympin teho ei ole heikentynyt tai ettei se ole liian väkevää. Ympin kemiallisen hapenkulutuksen on oltava alle 300 mg/l. Sopivaksi ympin lisäysmääräksi standardiliuoksille todettiin testeissä 1 % näytetilavuudesta. Lämpötilavaihtelut aiheuttavat myös ongelmia analyysissa, mutta ne voidaan välttää suorittamalla inkubointi lasiovellisessa inkubointikaapissa, jota ei tarvitse avata mittauksen aikana.

Ongelmia tuli vastaan myös puhdistamattoman jätevesinäytteen kanssa; tulokset olivat laimeilla näytteillä odotetun kaltaisia, mutta väkevämmillä näytteillä tulokset jäivät reilusti alle odotetun. Syy tähän voi olla ympissä tai veden mahdollisesti sisältämässä mikrobeja tuhoavissa aineissa, kuten pesuaineissa. Syyn selvittäminen vaatii kuitenkin lisää testauksia.

6.3 Validointisuunnitelma

Opinnäytetyön aikana BOD-menetelmälle tehtiin validointisuunnitelma, johon tehtiin paljon muutoksia testien myötä. Ongelmakohdat on pyritty ottamaan huomioon mahdollisimman hyvin. Validointisuunnitelma on valmis toteutettavaksi. Validointisuunnitelma on liitteessä 17.

7 JOHTOPÄÄTÖKSET

Kyvettitestimenetelmä kemiallisen hapenkulutuksen mittaamiseen validoitiin onnistuneesti. Matriisin vaikutuksesta todettiin, että näytettä on laimennettava vähintään 1:2 ennen mittausta, jotta matriisin häiritsevä vaikutus ei vääristäisi tuloksia. Menetelmän mittausepävarmuudeksi määritettiin 95 % luotettavuustasolla ± 5 %.

COD-menetelmän tavoin kokonaistyyppimenetelmä täytti validoinnin hyväksymiskriteerit ja validointi hyväksyttiin. 95 % luotettavuustasolla mittausepävarmuudeksi laskettiin ± 15 %.

Myös kokonaistyyppimenetelmän tarkoitettuna kyvettitestimenetelmän validointi hyväksyttiin. Menetelmän mittausepävarmuudeksi 95 % luotettavuustasolla määritettiin ± 10 %.

Kaikki kyvettitestimenetelmät siis todettiin luotettaviksi ja sopivan käyttötarkoitukseensa. Menetelmiä tarkkaillaan jatkossa CombiCheck –liuosten kanssa. Mittausepävarmuuden on pysyttävä sallituissa rajoissa. Vaihtelut menetelmien mittausepävarmuusarvoissa johtuvat esimerkiksi analyysin aikana tehtävistä reagenssilisäyksistä. COD-mittauksessa reagensseja ei tarvitse lisätä, vaan kaikki on valmiiksi kyvetissä.

Mikäli menetelmillä aletaan mittaamaan uuden asiakasyrityksen jätevesiä tai muuten erilaisia jätevesiä, menetelmille on suoritettava validointitestejä. Näin voidaan varmistua siitä, että menetelmä antaa luotettavia tuloksia erilaisilla näytteillä.

BOD₇-menetelmä on valmis validoitavaksi. Validointitestiä suoritusohjeet on kirjattu liitteessä 17 olevaan validointisuunnitelmaan hyväksymisrajoineen. Validointisuunnitelmaan voidaan tehdä tarvittaessa muutoksia validoinnin aikana, mikäli menetelmä sitä vaatii.

Menetelmän testausten perusteella sen todistettiin toimivan niin kuin pitäisi, mutta esimerkiksi ympin laadusta johtuvat ongelmat vaativat lisätarkastelua, jotta voidaan todistaa, että analyysin epäonnistumisen syy on juuri ympissä. Mahdollisuuksien mukaan on parasta käyttää tuoretta ymppiä, mutta mikäli sitä ei ole saatavilla, on käytettävä pakastettua ymppiä. Pakastimessa olleen ympin toimintaan on syytä kiinnittää erityistä huomiota, sillä esimerkiksi liian nopea sulatus saattaa vaurioittaa mikrobeja.

Toinen ymppiin liittyvä asia, joka vaatii lisätarkastelua, on ympin sopeutuminen uuteen elinympäristöön eli näytteeseen. Testauksissa oli nähtävissä, että biokemiallinen hapenkulutus ei alkanut heti mittauksen alussa, vaan vasta useiden tuntien kuluttua. Tällä tuskin kuitenkaan on suurtakaan merkitystä lopputuloksessa, koska jo noin viiden vuorokauden kuluttua biokemiallinen hapenkulutus on lähestulkoon sama kuin seitsemän vuorokauden kuluttua. Mikäli näytteessä on valmiiksi mikrobeja, biokemiallinen hapenkulutus alkaa kasvaa heti analyysin alettua. Mittauksen alussa nähtävä sopeutumisvaihe on nähtävillä siis nollanäytteissä ja standardeissa sekä jätevesinäytteissä, joille ei ole tehty biologista puhdistusta.

Mitattaessa standardiliuosten biokemiallista hapenkulutusta kuvaajassa oli silloin tällöin nähtävissä selkeitä taantumia. Biokemiallisen hapenkulutuksen äkillinen hidastuminen johtuu todennäköisesti ympin mikrobikannasta ja sen uusiutumisenesta.

Biokemiallista hapenkulutusta määritettäessä erityisesti väkevillä näytteillä on otettava huomioon, että pullossa olevan hapen on riitettävä seitsemäksi vuorokaudeksi. Tämän vuoksi näytteet ja laimennusvesi ilmastetaan sekoittamalla ennen mittausta. Sekoitus varmistaa, että pullon kaasufaasista liukenee happea näytteeseen mittauksen aikana. Suoritetuissa testeissä ei ollut ongelmia hapen riittävyyden kanssa. BOD₇-menetelmässä ongelmia ilmenee myös näytteen ollessa epähomogeeninen, jolloin rinnakkaisten näytteiden BOD₇-arvo saattaa poiketa suurestikin toisistaan.

Biokemiallisen hapenkulutuksen mittausmenetelmä on myös erittäin herkkä lämpötilan vaihteluille. Analyysi vaatii 20 ± 1 °C lämpötilan, joten se on suoritettava jäädyttävässä inkubointikaapissa. Parhaiten mittaukseen sopii lasiovella varustettu inkubointikaappi, jolloin mittaustulokset voidaan lukea lasioven läpi infrapunalukijalla.

Kaikissa menetelmissä näytteen on hyvä olla mahdollisimman tuore mittauksen alussa. Biokemiallista hapenkulutusta mitattaessa näytteen säilytysajoille ja lämpötiloille on annettu tarkat ohjeet. Biologisen puhdistuksen läpi kulkenut jätevesi sisältää mikrobeja, joten biokemiallista hapenkulutusta tapahtuu koko ajan. Tällöin myös näytteen kemiallinen hapenkulutus pienenee. Asiakas-elintarviketehtaalta peräisin olevassa puhdistamattomassa jätevedessä ei juuri tapahdu muutoksia tarkastelun kohteena olevien analyyttien pitoisuuksissa.

LÄHTEET

1. Jaarinen, S. Niiranen, J. (1995) Laboratorion analyysitekniikka. 2. painos. AEL. Helsinki.
2. Elintarvikevirasto (1997) Kemiallisten analyysimenetelmien validointiohje, valvonta 10/1997. Helsinki.
3. MIKES, Ehder, T. (toim.) (2005) Kemian metrologian opas J6/2005. Helsinki.
4. Johansson, A. (2003) Kemiallisten menetelmien validointiohje , versio 1. Toimintaohjeet NFL 011. Net-Foodlab Oy.
5. Storberg, M. (2011) Laatu lääke- ja diagnostiikkateollisuudessa. Laatu ja metrologia –kurssin opintomoniste.
6. Peltonen, P., Enström, A. & Pääkkönen, J. (2007) Teollisuuden jätevesien erityispiirteet. Kunnossapito 1/2007. Saatavilla www-muodossa: www.promaint.net/alltypes.asp?menu_id=645.
7. Meloni, E. (2005) Elintarviketeollisuuden jätevedet ja niiden käsittely. Kehittyvä elintarvike 2/2005. Saatavilla www-muodossa: kehittyvaelintarvike.fi/teemajutut/24-elintarvike-teollisuuden-jatevedet-ja-niiden-kasittely.
8. Vainikainen, A. (2010) Yhteenveto elintarviketeollisuusliiton vuonna 2010 toteuttamasta ympäristövastuun kyselystä. Elintarviketeollisuusliitto ETL. [online, viitattu 19.2.2012]. Saatavilla www-muodossa: www.sinebrychoff.fi/SiteCollectionDocuments/ETL-ymparistovastuun_raportti_2010.pdf.
9. Elintarviketeollisuusliitto ry (2005) Elintarviketeollisuuden ympäristövastuun raportti. Elintarviketeollisuusliitto ETL. [online, viitattu 19.2.2012]. Saatavilla www-muodossa: www.etl.fi/www/fi/julkaisut/Julkaisut/ETL_ympvastuuraportti_FINAL_0703161.pdf.
10. Maier, R. M., Pepper, I. L. & Greba, C. B. (2009) Environmental Microbiology. 2. painos. Academic Press.
11. Klein, G. (2009) Wastewater Management. Global Media. Jaipur, Intia.
12. Chan, Y. J., Chong, M. F., Law, C. L & Hassel, D. G. (2009) A Review on Anaerobic-aerobic Treatment of Industrial and Municipal Wastewater. Chemical Engineering Journal. **155**: 1-18.
13. Merck Spectroquant. Spectroquant Nova 60 General Information. Fotometrin ohje.
14. Manivasakam, N. (2009) Physico-chemical Examination of Water Sewage and Industrial Effluents. Global Media. Meerut, Intia.
15. Walters, M. Osti, G. R. & Hang, N. D.. Determination of Chemical Oxygen Demand (COD) of Waste Water. [online, viitattu 3.2.2012]. www-osoite: www.waltersmunde.com/projects/DeterminationofChemicalOxygenDemand.pdf.
16. Merck Spectroquant (2006) COD Cell Test 1.14541.001. Testikitin ohje.
17. International Organization of Standardization (1997) ISO 11905-1:1997: Water Quality. Determination of Nitrogen. Part 1: Method Using oxidative Digestion with Peroxidesulfate. ISO-standardi.
18. Scragg, A. (1999) Environmental Biotechnology. Pearson Education Limited.

19. Merck Spectroquant (2008) Nitrogen (total) Cell Test 1.00613.0001. Testikitin ohje.
20. Merck Spectroquant (2006) Spectroquant Phosphate Cell Test 1.14543.0001. Testikitin ohje.
21. International Organization of Standardization (2004) ISO 6878:2004: Water Quality. Determination of Phosphorus. Ammonium Molybdate Spectrometric Method. ISO-standardi.
22. Roppola, K., Kuokkanen, T., Rämö, J., Prokkola, H. & Heiska, E. (2007) Comparison Study of Different Tests in the Determination of BOD₇ Evaluated in a Model Domestic Sewage. Journal of Automated Methods and Management in Chemistry 2007:29761. Saatavilla www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1920587/.
23. Laukkanen, T. (2007) Ohjeita BHK-mittauslaitteiston käyttösovellutuksista jätevedenpuhdistamolla. Teknillinen korkeakoulu. Prosessiteollisuuden ympäristötekniikka. Vesihuoltotekniikka. Helsinki.
24. WTW (2003) Principles of Measuring Technique: BOD Primer. CD-rom.
25. WTW. Respirometric Determination of the BOD₅ of Sewage Polluted with Inhibitory or Toxic Substances Using the OxiTop® Measuring System. Application Report O2 500232.
26. Suomen standardisoimisliitto (1998) SFS-EN 1899.1: Veden laatu. Biokemiallisen hapenkulutuksen (BOD_n) määrittäminen n vuorokauden kuluttua. Osa 1: Laimennus- ja siirrostusmenetelmä. Alllyylitiourealisäys. SFS-standardi.
27. Global Water. OxiTop BOD Measurement Instrumentation. [online, viitattu 3.3.2012]. [www.osoite: www.globalw.com/downloads/WQ/oxitopB.pdf](http://www.globalw.com/downloads/WQ/oxitopB.pdf).
28. WTW. Respirometric BOD₅ Determination of Domestic Wastewater Using the OxiTop® Control or OxiTop® Measuring System. Application Report O2 500230.

COD: näytteen esikäsittely ja analyysin suoritusohje

Esikäsittely

Ennen analyysia jätevesinäyte homogenoidaan sekoittamalla ja sen kloridipitoisuus tarkastetaan esimerkiksi titraamalla. Jos kloridipitoisuus on yli 0,2 % (2000 mg/l) näytettä on laimennettava.

Kloridipitoisuuden tarkistus suoritettiin titraamalla kaksi rinnakkaista näytettä hopeanitraatilla. Asiakasyrityksen jäteveden kloridipitoisuus oli alle titrausmenetelmän määritysrajan (0,04 %), joten sen kloridipitoisuus ei häiritse analyysia. Näytteen pH:n tuntemista ei COD-mittauksessa vaadita. pH-arvo kuitenkin mitattiin ja todettiin, että jäteveden pH on noin 6.

Analyysin suoritus

Analyysissa pipetoidaan 3 ml sopivasti laimennettua näytettä kyvetiin, jossa on valmiina tarvittavat reagenssit. Kierrekorkki suljetaan ja näytettä sekoitetaan. Kyveti asetetaan termoreaktoriin 2 h ajaksi lämpötilaan 148 °C (lämpötila-ohjelma 1).

Hapetuksen jälkeen näytteen annetaan jäähtyä 10 minuutin ajan, sekoitetaan ja annetaan jäähtyä huoneenlämpöön. Jäähtyneen näytteen kemiallinen hapenkulutus mitataan fotometrillä.

COD: Tarkkuus- ja lineaarisuutestien liuokset

Tarkkuuden ja lineaarisuuden testaamisessa käytettiin samoja liuoksia. Liuokset valmistettiin CombiCheck 20 –standardista, jonka COD-konsentraatio on 750 ± 75 mg/l. Näytteet pipetoitiin automaattipipetillä seuraavan taulukon mukaisesti:

Näyte	V _{CombiCheck 20} (ml)	V _{kok.} (ml)	c _{COD} (mg/l)
1	0	3,5	0
2	0,7	3,5	150
3	1,4	3,5	300
4	2,1	3,5	450
5	2,8	3,5	600
6	3,5	3,5	750

Laimennukset tehtiin UP-vedellä. Myös laimennusvesi pipetoitiin automaattipipetillä. Jokaista liuosta tehtiin kolme rinnakkaista.

Lineaarisuuden testauksessa analysoitiin lisäksi 1:1 näyte, jonka pitoisuus oli noin 1000 mg/l COD. Myös näitä mitattiin kolme rinnakkaista.

Kemiallinen hapenkulutus: Validoinnin mittaustulokset

Tarkkuus

Näytteistä tehtiin kaksi rinnakkaista mittausta, joiden keskiarvoa verrattiin teoreettiseen tulokseen. Liuokset oli valmistettu CombiCheck 20 – vertailuliuoksesta.

Näyte	c _{COD} (1) (mg/l)	c _{COD} (2) (mg/l)	Keskiarvo (mg/l)	Teoreettinen (mg/l)	Ero teoreettiseen (mg/l)
1.1	0	0	0	0	0
1.2	144	144	144	150	-6
1.3	285	285	285	300	-15
1.4	451	450	450,5	450	+0,5
1.5	593	592	592,5	600	-7,5
1.6	743	743	743	750	-7
2.1	0	0	0	0	0
2.2	129	130	129,5	150	-20,5
2.3	294	295	294,5	300	-5,5
2.4	446	445	445,5	450	-4,5
2.5	590	592	591	600	-9
2.6	742	742	742	750	-8
3.1	0	0	0	0	0
3.2	148	148	148	150	-2
3.3	299	299	299	300	-1
3.4	439	439	439	450	-11
3.5	589	589	589	600	-11
3.6	738	738	738	750	-12

Liuoksen 2.2 valmistuksessa on todennäköisesti tapahtunut virhe, joten tulos hylättiin. Keskimäärin ero teoreettiseen arvoon oli -5,8 mg/l.

Toistettavuus

Toistettavuustestaus suoritettiin jätevesinäytteillä. Jokainen näyte mitattiin kaksi kertaa ja rinnakkaisista mittauksista laskettiin keskiarvot.

Näyte	c _{COD} (1.) (mg/l)	c _{COD} (2.) (mg/l)	Keskiarvo (mg/l)	Alkuperäinen näyte (mg/l)
1 (1:1)	1041	1038	1029,5	1039,5
2 (1:1)	1040	1041	1040,5	1050,5
3 (1:1)	1029	1029	1029	1029
4 (1:1)	1020	2019	1019,5	1019,5
5 (1:1)	1027	1026	1026,5	1026,5
6 (1:2)	526	527	525,5	1053
7 (1:2)	521	522	521,5	1043
8 (1:2)	524	525	524,5	1049
9 (1:2)	522	525	523,5	1047
10 (1:2)	524	525	524,5	1049

Näytteiden keskiarvo on 1040 mg/l, keskihajonta 11,1 mg/l ja suhteellinen keskihajonta 1,1 %.

Laboratorion sisäinen toistettavuus

Mittaukset suoritettiin CombiCheck 20 –standardiliuoksella eri päivinä. Testit tehtiin muiden validointiparametrien testausten yhteydessä.

pvm	Näyte	c _{COD} (1.) (mg/l)	c _{COD} (2.) (mg/l)	Keskiarvo (mg/l)
20.12.11	1	738	739	738,5
20.12.11	2	738	738	738
23.12.11	1	742	744	743
23.12.11	2	742	743	742,5
3.1.12	1	741	741	741
3.1.12	2	735	735	735

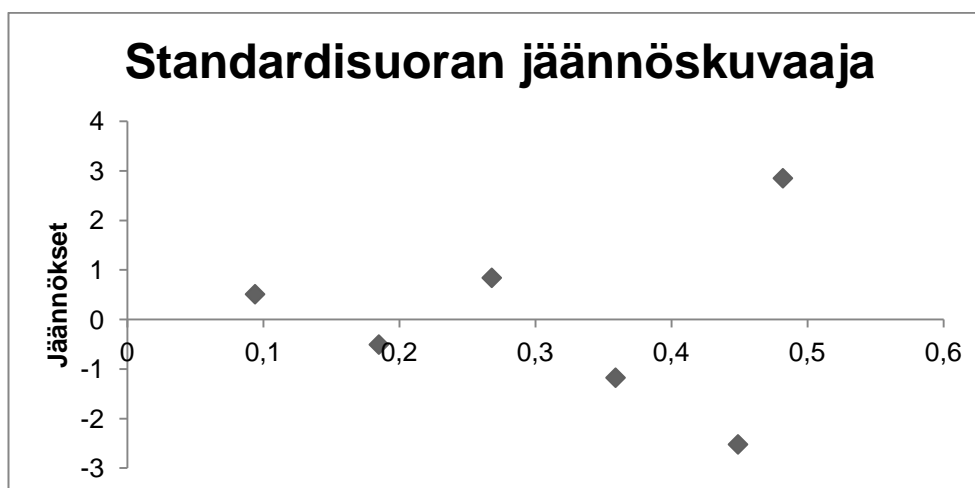
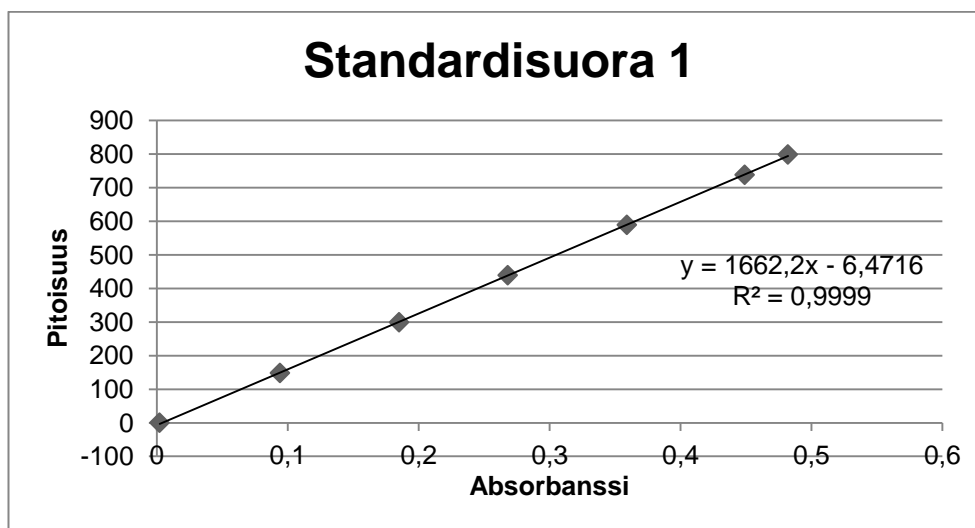
Näytteiden COD-konsentraatioiden keskiarvo on 739,7 mg/l, keskihajonta 3,1 mg/l ja suhteellinen keskihajonta 0,4 %.

Lineaarisuus

Lineaarisuustestissä valmistettiin liuokset kolmelle rinnakkaiselle standardisuoralle. Standardisuorat olivat keskenään samanlaisia. Mittaustulokset ovat seuraavassa taulukossa:

Näyte	c_{COD (1.)} (mg/l)	c_{COD (2.)} (mg/l)	Keskiarvo (mg/l)	Absorbanssi (A)
1.1	0	0	0	0,002
1.2	148	148	148	0,094
1.3	299	299	299	0,185
1.4	439	439	439	0,268
1.5	589	589	589	0,359
1.6	738	738	738	0,449
1.7	798	799	798,5	0,482
2.1	0	0	0	0,002
2.2	144	144	144	0,092
2.3	285	285	285	0,177
2.4	451	450	450,5	0,274
2.5	593	592	592,5	0,360
2.6	743	743	743	0,451
2.7	923	923	923	0,558
3.1	0	0	0	0,000
3.2	129	130	129,5	0,083
3.3	294	295	294,5	0,182
3.4	446	445	445,5	0,273
3.5	590	592	591	0,360
3.6	742	742	742	0,450
3.7	893	891	892	0,542

Tuloksista muodostettiin kolme standardisuoraa. Esimerkki standardisuorasta:



Kaikkien standardisuorien kohdalla korrelaatiokerroin oli hyväksymisrajan yläpuolella. Myös jäännöskuvaaja oli kunnossa ja suorat kulkivat origon kautta.

Toteamis- ja määrittäysraja

Määrittäysrajan mittaus suoritettiin 1:40 laimennetulla jätevesinäytteellä:

Näyte	$c_{\text{COD (1.)}}$ (mg/l)	$c_{\text{COD (2.)}}$ (mg/l)	$c_{\text{COD (3.)}}$ (mg/l)	Keskiarvo (mg/l)
1.1	21	20	21	20,1
1.2	22	24	23	23
2.1	24	26	25	25
2.2	23	21	20	21,3

Tulosten keskiarvo on 22,4 mg/l, keskihajonta 2,1 mg/l ja suhteellinen keskihajonta 9,5 %.

Matriisin vaikutus

Ensin matriisin vaikutusta testattiin 1:1 ja 1:2 näytteellä:

Näyte	$c_{\text{COD (1.)}}$ (mg/l)	$c_{\text{COD (2.)}}$ (mg/l)	Keskiarvo (mg/l)	$C = B - A$ (mg/l)	Erotus 200 mg/l:aan (mg/l)
A1 (1:1)	981	981	981	-	-
A2 (1:1)	977	979	978	-	-
B1 (1:1)	1153	1154	1153,5	172,5	-27,7
B2 (1:1)	1211	1210	1210,5	232,5	+32,5
A1 (1:2)	520	519	519,5	-	-
A2 (1:2)	513	514	513,5	-	-
B1 (1:2)	686	686	686	172,5	-27,5
B2 (1:2)	682	684	683	169,5	-30,5

Tulokset ovat rajoissa, mutta vaihtelu on suurta. Toisella testauskerralla käytettiin 1:1, 1:2 ja 1:10 näytteitä.

Näyte	C _{COD (1.)} (mg/l)	C _{COD (2.)} (mg/l)	Keskiarvo (mg/l)	C = B - A (mg/l)	Erotus 200 mg/l:aan (mg/l)
A1 (1:1)	962	960	961	-	-
A2 (1:1)	931	932	931,5	-	-
B1 (1:1)	1102	1108	1105	144	-56
B2 (1:1)	1081	1079	1080	148,5	-51,5
A1 (1:2)	440	439	439,5	-	-
A2 (1:2)	442	442	442	-	-
B1 (1:2)	621	624	662,5	183	-17
B2 (1:2)	628	629	628,5	186,5	-13,5
A1 (1:10)	85	82	83,5	-	-
A2 (1:10)	77	78	77,5	-	-
B1 (1:10)	264	265	264,5	181	-19
B2 (1:10)	271	269	270	192,5	-7,5

Laimentamattomassa näytteessä matriisin vaikutus on liian suuri. Näyte on laimennettava analyysia tehdessä vähintään 1:2. Laimennetuissa näytteissä pitoisuus ei poikkea ± 40 mg/l enempää 200 mg/l:sta.

COD: Fotometrin virheen määrittäminen

Fotometrin virhe laskettiin kaikkien niiden rinnakkaisten mittausten perusteella, jotka olivat toteamisrajan yläpuolella. Mittaustuloksista laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta. Poikkeama keskiarvosta (%) on laskettu erotusten keskiarvosta.

$C_{\text{COD (1.)}}$ (mg/l)	$C_{\text{COD (2.)}}$ (mg/l)	Keskiarvo (mg/l)	$C_{\text{COD (1.)}} - C_{\text{COD (2.)}}$ (mg/l)	Poikkeama keskiarvosta (%)
506	508	507	2	0,39%
510	509	509,5	1	0,20%
520	517	518,5	3	0,58%
100	98	99	2	2,02%
107	103	105	4	3,81%
96	99	97,5	3	3,08%
523	519	521	4	0,77%
560	554	557	6	1,08%
535	530	532,5	5	0,94%
257	255	256,5	2	0,78%
258	256	257	2	0,78%
264	260	262	4	1,53%
1041	1038	1039,5	3	0,29%
1040	1041	1040,5	1	0,10%
1029	1029	1029	0	0,00%
1020	1019	1019,5	1	0,10%
1027	1026	1026,5	1	0,10%
526	527	525,5	1	0,19%
521	522	521,5	1	0,19%
524	525	524,5	1	0,19%
522	525	523,5	3	0,57%
524	525	524,5	1	0,19%
738	739	738,5	1	0,14%
738	738	738	0	0,00%
742	744	743	2	0,27%
742	743	742,5	1	0,13%
741	741	741	0	0,00%
735	736	735	1	0,14%
144	144	144	0	0,00%
285	285	285	0	0,00%
451	450	450,5	1	0,22%
593	592	592,5	1	0,17%
743	743	743	0	0,00%

(jatkuu)

(jatkuu)

923	923	923	0	0,00%
129	130	129,5	1	0,77%
294	295	294,5	1	0,34%
446	445	445,5	1	0,22%
590	592	591	2	0,34%
742	742	742	0	0,00%
893	891	892	2	0,22%
148	148	148	0	0,00%
299	299	299	0	0,00%
439	439	439	0	0,00%
589	589	589	0	0,00%
738	738	738	0	0,00%
798	799	798,5	1	0,13%
21	20	20,5	1	4,88%
22	24	23	2	8,70%
24	26	25	2	8,00%
23	21	22	2	9,09%
981	981	981	0	0,00%
977	979	978	2	0,20%
1153	1154	1153,5	1	0,09%
1211	1210	1210,5	1	0,08%
520	519	519,5	1	0,19%
513	514	513,5	1	0,19%
686	686	686	0	0,00%
682	684	683	2	0,29%
962	960	961	2	0,21%
931	932	931,5	1	0,11%
1102	1108	1105	6	0,54%
1081	1079	1080	2	0,19%
440	439	439,5	1	0,23%
442	442	442	0	0,00%
621	624	662,5	3	0,45%
628	629	628,5	1	0,16%
85	82	83,5	3	3,59%
77	78	77,5	1	1,29%
264	265	264,5	1	0,38%
271	269	270	2	0,74%

Rinnakkaisten mittausten erotusten keskiarvo on 1,49 mg/l ja prosentuaalisten erojen keskiarvoksi saatiin 0,87 % \approx 0,9 %, joka on fotometrin mittaus-epävarmuus.

Kokonaistyyppi: Näytteen esikäsittely ja analyysin suoritusohje

Esikäsittely

Ensin näyte homogenoidaan ja sen kloridipitoisuus tarkastetaan. Jos kloridipitoisuus on yli 0,1 %, näytettä on laimennettava. Näytteen kemiallinen hapenkulutus mitataan COD-kyvettitestillä. Jos COD on yli 700 mg/l, näyte laimennetaan niin, että pitoisuus on alle 700 mg/l.

Analyysin suoritus

Näytettä pipetoidaan 10 ml tyhjään kyvettiin, johon annoslusikallinen N-1K:ta lisätään. Näytettä sekoitetaan. Seuraavaksi lisätään kuusi tippaa N-2K – reagenssia, joka on natriumhydroksidia, ja sekoitetaan hyvin. Näytteen annetaan olla termoreaktorissa 120 °C:ssa 1 h ajan (lämpötilaohjelma 3), jonka jälkeen sen annetaan jäähtyä 10 minuutin ajan, sekoitetaan ja annetaan jäähtyä huoneenlämpöön. Jäähtyneestä näytteestä pipetoidaan 1 ml reaktiokyvettiin ja lisätään 1 ml reagenssia N-3K. Näytteen annetaan seistä 10 minuuttia ennen mittausta fotometrillä. Väri pysyy stabiilina noin 30 minuutin ajan.

Kokonaistyyppi: Tarkkuus- ja lineaarisuutestien liuokset

Tarkkuuden ja lineaarisuuden testaamisessa käytettiin samoja liuoksia. Liuokset valmistettiin CombiCheck 50 -standardista, jonka N-konsentraatio on $5,0 \pm 0,7$ mg/l. Näytteet pipetoitiin automaattipipetillä seuraavan taulukon mukaisesti:

Näyte	$V_{\text{CombiCheck 50}}$ (ml)	$V_{\text{kok.}}$ (ml)	c_N (mg/l)
1	0	11	0
2	2,2	11	1
3	6,6	11	3
4	11	11	5

Laimennukset tehtiin UP-vedellä. Myös laimennusvesi pipetoitiin automaattipipetillä. Jokaista liuosta tehtiin kolme rinnakkaista.

Lineaarisuustestissä analysoidaan CombiCheck 50 –liuoksesta valmistettujen näytteiden lisäksi seuraavat jätevesinäytteestä tehdyt laimennukset:

Näyte	Arvioitu c_N (mg/l)
1:2	7,5
7:10	10,5
3:4	12
1:1	15

Näytteestä tehtyjen liuosten avulla lineaarista aluetta voitiin tutkia pitemmälle kuin vertailuliuoksella. 1:1 näytteen COD on yli 700 mg/l, mikä on häiritsevän pitoisuuden raja analyysissa.

Kokonaistyyppi: Validoinnin mittaustulokset

Tarkkuus

Näytteistä tehtiin kaksi rinnakkaista mittausta, joiden keskiarvoa verrattiin teoreettiseen tulokseen. Liuokset oli valmistettu CombiCheck 50 – vertailuliuksesta.

Näyte	c _N (1.) (mg/l)	c _N (2.) (mg/l)	Keskiarvo (mg/l)	Teoreettinen (mg/l)	Ero teoreettiseen (mg/l)
1.1	0	0	0	0	0
1.2	0,9	1,0	0,95	1	-0,05
1.3	2,8	2,8	2,8	3	-0,2
1.4	5,0	4,9	4,95	5	-0,05
2.1	0	0	0	0	0
2.2	0,9	0,9	0,9	1	-0,1
2.3	2,9	2,9	2,9	3	-0,1
2.4	5,1	5,0	5,05	5	+0,05
3.1	0	0	0	0	0
3.2	1,0	1,0	1,0	1	0
3.3	2,9	2,9	2,9	3	-0,1
3.4	5,0	5,0	5,0	5	0

Keskimääräinen ero teoreettiseen tulokseen on -0,05 mg/l.

Toistettavuus

Toistettavuustestissä käytettiin jätevesinäytteitä. Jokainen näyte mitattiin kaksi kertaa ja rinnakkaisista mittauksista laskettiin keskiarvot.

Näyte	c _N (1.) (mg/l)	c _N (2.) (mg/l)	Keskiarvo (mg/l)	Alkuperäinen näyte (mg/l)
1 (1:2)	8,0	8,0	8,0	16,0
2 (1:2)	8,1	8,2	8,15	16,3
3 (1:2)	7,9	7,9	7,9	15,8

(jatkuu)

(jatkuu)

4 (1:2)	7,5	7,5	7,5	15,0
5 (1:2)	8,2	8,1	8,15	16,3
6 (1:4)	4,0	4,0	4,0	16,0
7 (1:4)	3,8	3,8	3,8	15,2
8 (1:4)	4,0	4,1	4,05	16,2
9 (1:4)	3,9	3,9	3,9	15,6
10 (1:4)	3,9	3,9	3,9	15,6

Näytteiden keskiarvo 15,8 mg/l, keskihajonta 0,45 mg/l ja suhteellinen keskihajonta 2,8 %.

Laboratorion sisäinen toistettavuus

Mittaukset suoritettiin CombiCheck 50 –standardiliuoksella eri päivinä. Testit tehtiin muiden validointiparametrien yhteydessä.

pvm	Näyte	c _{N(1.)} (mg/l)	c _{N(2.)} (mg/l)	Keskiarvo (mg/l)
27.12.11	1	5,1	5,1	5,1
27.12.11	2	5,2	5,1	5,15
5.1.12	1	5,1	5,2	5,15
5.1.12	2	5,1	5,0	5,05
12.1.12	1	4,9	4,9	4,9
12.1.12	2	5,1	5,1	5,1

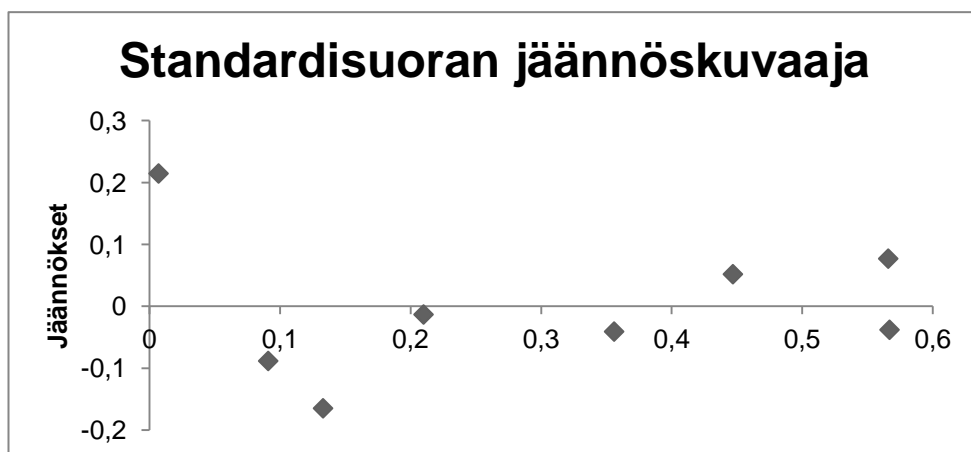
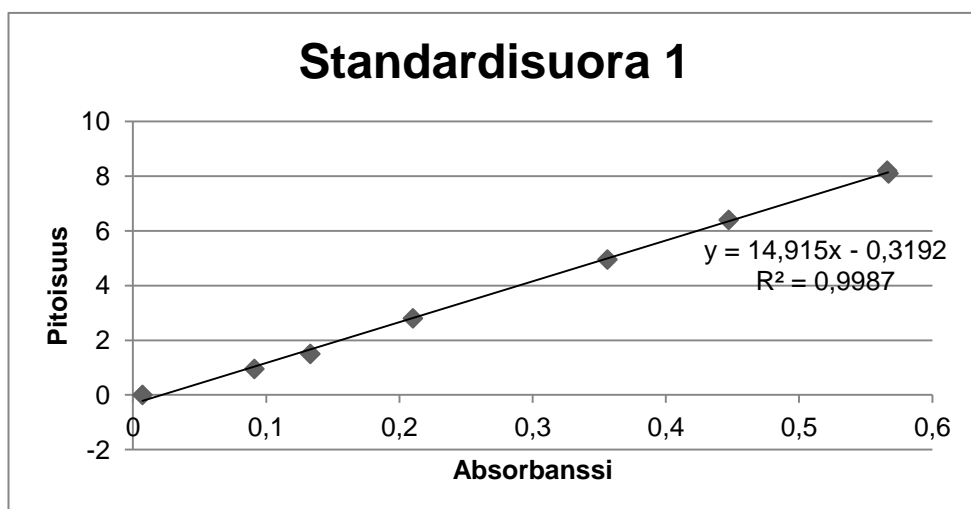
Näytteiden kokonaistyyppikonsentraatioiden keskiarvo on 5,075 mg/l, keskihajonta 0,094 mg/l ja suhteellinen keskihajonta 1,84 %.

Lineaarisuus

Lineaarisuutta testattiin kolmella rinnakkaisella standardisuoralla. Mittaustulokset seuraavassa taulukossa:

Näyte	c _{N(1.)} (mg/l)	c _{N(2.)} (mg/l)	Keskiarvo (mg/l)	Absorbanssi (A)
1.1	0	0	0	0,007
1.2	0,9	1,0	0,95	0,091
1.3	2,8	2,8	2,8	0,210
1.4	5,0	4,9	4,95	0,356
1.5 (1:2)	6,4	6,4	6,4	0,447
1.6 (7:10)	8,1	8,1	8,1	0,567
1.7 (3:4)	8,2	8,2	8,2	0,566
1.8 (1:1)	1,5	1,5	1,5	0,133
2.1	0	0	0	0,001
2.2	0,9	0,9	0,9	0,082
2.3	2,9	2,9	2,9	0,216
2.4	5,1	5,0	5,05	0,356
2.5 (1:2)	6,2	6,2	6,2	0,432
2.6 (7:10)	8,8	8,8	8,8	0,607
2.7 (3:4)	0,8	0,8	0,8	0,085
2.8 (1:1)	1,3	1,3	1,3	0,115
3.1	0	0	0	0,009
3.2	1,0	1,0	1,0	0,095
3.3	2,9	2,9	2,9	0,222
3.4	5,0	5,0	5,0	0,362
3.5 (1:2)	5,5	5,6	5,55	0,397
3.6 (7:10)	3,9	3,9	3,9	0,290
3.7 (3:4)	5,7	5,6	5,65	0,406
3.8 (1:1)	2,3	2,3	2,3	0,185

Näytteestä laimennettujen liuosten kokonaistyyppikonsentraatio riippuu esimerkiksi näytteen homogeenisuudesta. 1:1 näytteissä COD on yli 700 mg/l, mikä aiheuttaa liian pieniä mittaustuloksia. Esimerkki standardisuorasta:



Kaikki standardisuorat täyttivät validointisuunitelmassa asetetut hyväksymiskriteerit.

Toteamis- ja määrittäysraja

Määrittäysrajan tarkastelu suoritettiin 1:10 laimennetulla CombiCheck 50 – liuoksella:

Näyte	$c_{N(1.)}$ (mg/l)	$c_{N(2.)}$ (mg/l)	$c_{N(3.)}$ (mg/l)	Keskiarvo (mg/l)
1.1	0,4	0,4	0,4	0,4
1.2	0,5	0,4	0,4	0,43
1.3	0,5	0,5	0,5	0,5
2.1	0,5	0,5	0,6	0,53
2.2	0,6	0,5	0,5	0,53
2.3	0,5	0,4	0,4	0,43

Tulosten keskiarvo 0,47 mg/l, keskihajonta 0,057 mg/l ja suhteellinen keskihajonta 12,1 %.

Matriisin vaikutus

Matriisin vaikutusta testattiin 1:2, 1:4 ja 1:10 näytteillä:

Näyte	$c_{N(1)}$ (mg/l)	$c_{N(2)}$ (mg/l)	Keskiarvo (mg/l)	$C = B - A$ (mg/l)	Erotus 3,0 mg/l:aan (mg/l)
A1 (1:2)	8,1	8,2	8,15	-	-
A2 (1:2)	8,8	8,7	8,75	-	-
B1 (1:2)	10,3	10,3	10,3	2,15	-0,85
B2 (1:2)	12,0	12,0	12,0	3,25	+0,25
A1 (1:4)	3,9	3,9	3,9	-	-
A2 (1:4)	3,5	3,5	3,5	-	-
B1 (1:4)	6,9	7,0	6,95	3,05	+0,05
B2 (1:4)	6,5	6,5	6,5	3,0	0
A1 (1:10)	1,4	1,4	1,4	-	-
A2 (1:10)	1,3	1,3	1,3	-	-
B1 (1:10)	4,8	4,8	4,8	3,4	+0,4
B2 (1:10)	4,3	4,3	4,3	3,0	0

Tulokset ovat rajoissa $3,0 \pm 0,5$ mg/l yhtä lukuun ottamatta. Näytteessä on todennäköisesti tapahtunut pipetointivirhe. Tulokset eivät poikkea $\pm 0,5$ mg/l enempää 3,0 mg/l:sta.

Kokonaistyyppi: Fotometrin virheen määrittäminen

Fotometrin virhe laskettiin kaikkien niiden rinnakkaisten mittausten perusteella, jotka olivat toteamisrajan yläpuolella. Mittaustuloksista laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta. Poikkeama keskiarvosta (%) on laskettu erotusten keskiarvosta.

$C_{N(1.)}$ (mg/l)	$C_{N(2.)}$ (mg/l)	Keskiarvo (mg/l)	$C_{N(1.)} - C_{N(2.)}$ (mg/l)	Poikkeama keskiarvosta (%)
7,5	7,7	7,6	0,2	2,63%
7,6	7,6	7,6	0	0,00%
6,7	6,8	6,75	0,1	1,48%
4	4,1	4,05	0,1	2,47%
5,5	5,5	5,5	0	0,00%
4,1	4,1	4,1	0	0,00%
5	5	5	0	0,00%
6,8	6,8	6,8	0	0,00%
4,5	4,5	4,5	0	0,00%
4,6	4,6	4,6	0	0,00%
4,6	4,6	4,6	0	0,00%
8	8	8	0	0,00%
8,1	8,2	8,15	0,1	1,23%
7,9	7,9	7,9	0	0,00%
7,5	7,5	7,5	0	0,00%
8,2	8,1	8,15	0,1	1,23%
4	4	4	0	0,00%
3,8	3,8	3,8	0	0,00%
4	4,1	4,05	0,1	2,47%
3,9	3,9	3,9	0	0,00%
3,9	3,9	3,9	0	0,00%
5,1	5,1	5,1	0	0,00%
5,2	5,1	5,15	0,1	1,94%
5,1	5,2	5,15	0,1	1,94%
5,1	5	5,05	0,1	1,98%
4,9	4,9	4,9	0	0,00%
5,1	5,1	5,1	0	0,00%
0,9	1	0,95	0,1	10,53%
2,8	2,8	2,8	0	0,00%
5	4,9	4,95	0,1	2,02%
6,4	6,4	6,4	0	0,00%

(jatkuu)

(jatkuu)

8,1	8,1	8,1	0	0,00%
8,2	8,2	8,2	0	0,00%
1,5	1,5	1,5	0	0,00%
0,9	0,9	0,9	0	0,00%
2,9	2,9	2,9	0	0,00%
5,1	5	5,05	0,1	1,98%
6,2	6,2	6,2	0	0,00%
8,8	8,8	8,8	0	0,00%
0,8	0,8	0,8	0	0,00%
1,3	1,3	1,3	0	0,00%
1	1	1	0	0,00%
2,9	2,9	2,9	0	0,00%
5	5	5	0	0,00%
5,5	5,6	5,55	0,1	1,80%
3,9	3,9	3,9	0	0,00%
5,7	5,6	5,65	0,1	1,77%
2,3	2,3	2,3	0	0,00%
0,4	0,4	0,4	0	0,00%
0,5	0,4	0,45	0,1	22,22%
0,5	0,5	0,5	0	0,00%
0,5	0,5	0,5	0	0,00%
0,6	0,5	0,55	0,1	18,18%
0,5	0,4	0,45	0,1	22,22%
0,4	0,4	0,4	0	0,00%
0,6	0,7	0,65	0,1	15,38%
0,5	0,4	0,45	0,1	22,22%
8,1	8,2	8,15	0,1	1,23%
8,8	8,7	8,75	0,1	1,14%
10,3	10,3	10,3	0	0,00%
12	12	12	0	0,00%
3,9	3,9	3,9	0	0,00%
3,5	3,5	3,5	0	0,00%
6,9	7	6,95	0,1	1,44%
6,5	6,5	6,5	0	0,00%
1,4	1,4	1,4	0	0,00%
1,3	1,3	1,3	0	0,00%
4,8	4,8	4,8	0	0,00%
4,3	4,3	4,3	0	0,00%

Rinnakkaisten mittausten erotusten keskiarvo on 0,03 mg/l prosentuaalisten erojen keskiarvoksi saatiin 2,02 % \approx 2,0 %, joka on fotometrin aiheuttama mittausepävarmuus.

Kokonaistyyppi: Reagenssilisäysten aiheuttama epävarmuus

N-1K-reagenssissa on annoslusikka. Lasketaan annoksen massalle epävarmuus. Annos punnittiin kymmenen kertaa.

Punnitus	Massa (g)	Ero keskiarvoon (g)	Ero keskiarvoon (%)
1.	0,0668	0,00689	9,35
2.	0,0730	0,00069	0,94
3.	0,0705	0,00319	4,33
4.	0,0713	0,00239	3,24
5.	0,0784	0,00471	6,39
6.	0,0724	0,00129	1,75
7.	0,0760	0,00231	3,13
8.	0,0790	0,00531	7,21
9.	0,0804	0,00671	9,11
10.	0,0691	0,00459	6,23

Tulosten keskiarvo on 0,074 g, erojen keskiarvo 0,004 g ja prosentuaalisten erojen keskiarvo 5,2 %. N-1K reagenssilisäyksen epävarmuus on siis 5,2 %.

N-2K reagenssissa on tippakorkki. Lasketaan annoksen (6 tippaa) epävarmuus.

Punnitus	Massa (g)	Ero keskiarvoon (g)	Ero keskiarvoon (%)
1.	0,3855	0,00458	1,20
2.	0,3838	0,00288	0,76
3.	0,3676	0,01332	3,50
4.	0,3815	0,00058	0,15
5.	0,3846	0,00368	0,97
6.	0,3917	0,01078	2,83
7.	0,3923	0,01138	2,99
8.	0,3545	0,02642	6,94
9.	0,3787	0,00222	0,58
10.	0,3890	0,00808	2,12

Tulosten keskiarvo on 0,38 g, erojen keskiarvo 0,008 g ja prosentuaalisten erojen keskiarvo 2,2 %. N-2K reagenssilisäyksen epävarmuus on siis 2,2 %.

Kokonaisfosfori: Näytteen esikäsittely ja analyysin suoritusohje

Esikäsittely

Näyte homogoidaan sekoittamalla ennen mittausta. Kokonaisfosforianalyysia häiritsevän COD-arvon raja on 300 mg/l. Jos COD on yli 300 mg/l, näyte on laimennettava. Muuten laimennetaan siten, että mittaustulokset osuvat mittausalueelle.

Analyysin suoritus

Näytettä pipetoidaan 5 ml reaktiokvyettiin ja lisätään annos P-1K, reagenssia. Näytettä sekoitetaan. Jos näytteen kemiallinen hapenkulutus on 150-300 mg/l, sen häiritsevää vaikutusta voidaan pienentää lisäämällä P-1K:ta kaksi annosta. Näytteen pH tarkastetaan ja säädetään tarvittaessa rikkihapolla pH-alueelle 0-10. Näyte laitetaan termoreaktoriin 30 minuutin ajaksi 120 °C:een (lämpötila-ohjelma 2) ja annetaan sen jäähtyä huoneenlämpöön.

Jäähtynyttä näytettä sekoitetaan ja siihen lisätään viisi tippaa P-2K-reagenssia, sekoitetaan ja lisätään yksi annos P-3K-reagenssia jonka jälkeen sekoitetaan, kunnes reagenssit ovat kokonaan lienneet. Näytteen annetaan seistä viisi minuuttia. Tässä vaiheessa näyte saa sinisen värin, jonka voimakkuus riippuu sen sisältämän fosforin määrästä. Väri pysyy stabiilina noin tunnin ajan. Näytteen kokonaisfosforipitoisuus mitataan fotometrilla.

Kokonaisfosfori: Tarkkuus- ja lineaarisuustestien liuokset

Tarkkuuden ja lineaarisuuden testaamisessa käytettiin samoja liuoksia. Liuokset valmistettiin CombiCheck 20 –standardista, jonka PO₄-P-konsentraatio on 8,0 ±0,7 mg/l. Näytteet pipetoitiin automaattipipetillä seuraavan taulukon mukaisesti:

Näyte	V _{CombiCheck 20} (ml)	V _{kok.} (ml)	c _{PO4-P} (mg/l)
1	0	6	0
2	0,75	6	1
3	1,5	6	2
4	2,25	6	3
5	3	6	4
6	3,75	6	5

Liuokset laimennettiin UP-vedellä. Myös laimennusvesi pipetoitiin automaattipipetillä.

Kokonaisfosfori: Validoinnin mittaustulokset

Tarkkuus

Näytteistä tehtiin kaksi rinnakkaista mittausta, joiden keskiarvoa verrattiin teoreettiseen tulokseen. Liuokset oli valmistettu CombiCheck 20 – vertailuliuksesta. Liuoksilla, jonka COD on yli 300 mg/l, tulokset ovat vääristyneitä. 4 mg/l PO₄-P –liuoksessa COD on noin 350 mg/l.

Näyte	C _{PO4-P} (1.) (mg/l)	C _{PO4-P} (2.) (mg/l)	Keskiarvo (mg/l)	Teoreettinen (mg/l)	Ero teoreettiseen (mg/l)
1.1	0	0	0	0	0
1.2	1,01	1,01	1,01	1	+0,01
1.3	1,96	1,96	1,96	2	-0,04
1.4	2,94	2,94	2,94	3	-0,06
1.5	3,97	3,97	3,97	4	-0,03
1.6	3,08	3,08	3,08	5	-1,92
2.1	0	0	0	0	0
2.2	1,00	1,00	1,00	1	0
2.3	1,97	1,97	1,97	2	-0,03
2.4	2,95	2,96	2,955	3	-0,045
2.5	3,90	3,90	3,9	4	-0,1
2.6	3,44	3,44	3,44	5	-0,56
3.1	0	0	0	0	0
3.2	0,99	0,99	0,99	1	-0,01
3.3	1,95	1,95	1,95	2	-0,05
3.4	2,96	2,96	2,96	3	-0,04
3.5	2,63	2,64	2,635	4	-1,135
3.6	3,27	3,28	3,275	5	-1,725

Kun jätetään pois liuokset, joissa COD:n häiritsevä vaikutus näkyy, saadaan keskimääräiseksi eroksi todelliseen tulokseen verrattuna -0,02 mg/l.

Toistettavuus

Näytteet olivat jätevesinäytteitä. Jokainen näyte mitattiin kaksi kertaa ja rinnakkaisista mittauksista laskettiin keskiarvot.

Näyte	C_{PO4-P} (1.) (mg/l)	C_{PO4-P} (2.) (mg/l)	Keskiarvo (mg/l)	Alkuperäinen näyte (mg/l)
1 (1:4)	1,09	1,09	1,09	4,26
2 (1:4)	1,09	1,09	1,09	4,36
3 (1:4)	1,08	1,07	1,075	4,30
4 (1:4)	1,07	1,07	1,07	4,28
5 (1:4)	1,09	1,09	1,09	4,36
6 (1:5)	0,86	0,86	0,86	4,30
7 (1:5)	0,85	0,85	0,85	4,25
8 (1:5)	0,85	0,85	0,85	4,25
9 (1:5)	0,85	0,85	0,85	4,25
10 (1:5)	0,88	0,87	0,875	4,375

Näytteiden keskiarvo 4,30 mg/l, keskihajonta 0,05 mg/l ja suhteellinen keskihajonta 1,1 %.

Laboratorion sisäinen toistettavuus

Mittaukset suoritettiin CombiCheck 20 –standardiliuoksen 1:2 laimennuksella eri päivinä. Testit tehtiin muiden validointiparametrien yhteydessä.

pvm	Näyte	C_{PO4-P} (1.) (mg/l)	C_{PO4-P} (2.) (mg/l)	Keskiarvo (mg/l)
22.12.11	1	3,23	3,25	3,24
22.12.11	2	3,44	3,44	3,44

1:2 laimennuksen korkea COD häiritsi analyysia, joten testaus suoritettiin 1:4 laimennuksella:

pvm	Näyte	C _{PO4-P} (1.) (mg/l)	C _{PO4-P} (2.) (mg/l)	Keskiarvo (mg/l)
24.1.12	1	1,99	1,99	1,99
24.1.12	2	1,99	1,99	1,99
25.1.12	1	1,98	1,98	1,98
25.1.12	2	1,99	1,99	1,99

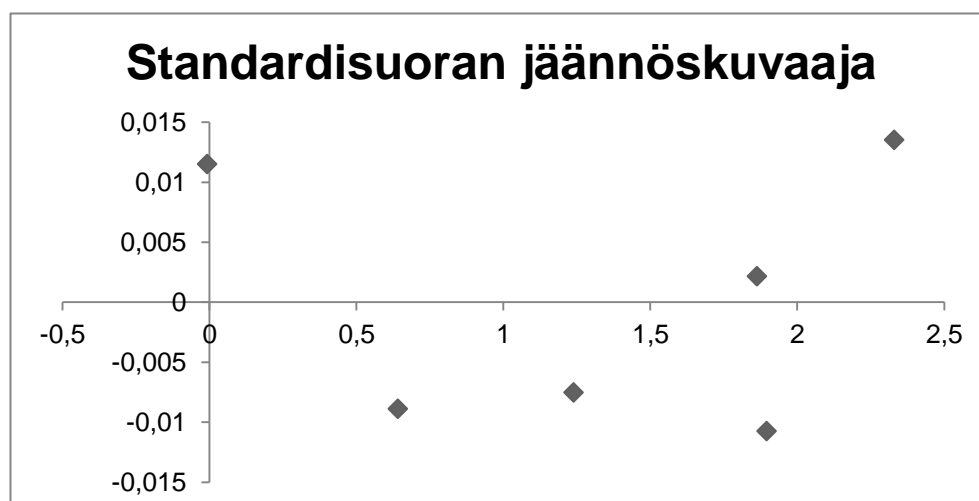
Näytteiden kokonaistyyppikonsentraatioiden keskiarvo on 1,9875 mg/l, keskihajonta 0,005 mg/l ja suhteellinen keskihajonta 0,25 %.

Lineaarisuus

Lineaarisuutta testattiin kolmella rinnakkaisella standardisuoralla. Mittaus- tulokset seuraavassa taulukossa:

Näyte	C _{PO4-P} (1.) (mg/l)	C _{PO4-P} (2.) (mg/l)	Keskiarvo (mg/l)	Absorbanssi (A)
1.1	0	0	0	-0,009
1.2	1,02	1,02	1,02	0,640
1.3	1,98	1,98	1,98	1,238
1.4	2,99	2,99	2,99	1,862
1.5	3,02	3,04	3,02	1,895
1.6	3,75	3,75	3,75	2,329
2.1	0	0	0	-0,008
2.2	1,01	1,01	1,01	0,636
2.3	1,98	1,98	1,98	1,238
2.4	2,98	2,99	2,985	1,862
2.5	3,79	3,80	3,795	2,363
2.6	4,48	4,46	4,47	2,780
3.1	0	0	0	-0,010
3.2	1,01	1,01	1,01	0,634
3.3	1,96	1,96	1,96	1,228
3.4	2,96	2,96	2,96	1,846
3.5	3,99	3,99	3,99	2,478
3.6	3,65	3,66	3,655	2,283

Tuloksista muodostettiin kolme standardisuoraa. Esimerkki kuvaajasta:



Validoinnin hyväksymiskriteerit täyttyivät kaikilla standardisuorilla.

Toteamis- ja määrittäysraja

Määrittäysrajan mittaus suoritettiin 1:100 laimennetulla jätevesinäytteellä:

Näyte	$c_{\text{PO}_4\text{-P (1.)}}$ (mg/l)	$c_{\text{PO}_4\text{-P (2.)}}$ (mg/l)	$c_{\text{PO}_4\text{-P (3.)}}$ (mg/l)	Keskiarvo (mg/l)
1.1	0,02	0,01	0,01	0,013
1.2	0,02	0,02	0,02	0,02
2.1	0,01	0,01	0,01	0,01
2.2	0,01	0,01	0,01	0,01

Tulosten keskiarvo 0,013 mg/l, keskihajonta 0,005 mg/l ja suhteellinen keskihajonta 35,4 %.

Matriisin vaikutus

Matriisin vaikutusta testattiin 1:2, 1:4 ja 1:10 näytteillä:

Näyte	C_{PO4-P} (1.) (mg/l)	C_{PO4-P} (2.) (mg/l)	Keskiarvo (mg/l)	C = B – A (mg/l)	Erotus 0,5 mg/l:aan (mg/l)
A1 (1:2)	2,26	2,27	2,265	-	-
A2 (1:2)	2,37	2,37	2,37	-	-
B1 (1:2)	2,78	2,78	2,78	0,515	+0,015
B2 (1:2)	2,88	2,86	2,87	0,5	0
A1 (1:4)	1,08	1,08	1,08	-	-
A2 (1:4)	1,06	1,06	1,06	-	-
B1 (1:4)	1,58	1,58	1,58	0,5	0
B2 (1:4)	1,57	1,57	1,57	0,51	+0,01
A1 (1:10)	0,42	0,42	0,42	-	-
A2 (1:10)	0,42	0,42	0,42	-	-
B1 (1:10)	0,96	0,96	0,96	0,54	+0,04
B2 (1:10)	0,94	0,95	0,945	0,52	+0,02

Matriisin vaikutus ei ole häiritsevää, sillä tulokset eivät poikkea $\pm 0,05$ mg/l enempää 0,5 mg/l:sta.

Kokonaisfosfori: Fotometrin virheen määrittäminen

Fotometrin virhe laskettiin kaikkien niiden rinnakkaisten mittausten perusteella, jotka olivat toteamisrajan yläpuolella. Mittaustuloksista laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta. Poikkeama keskiarvosta (%) on laskettu erotusten keskiarvosta.

$C_{PO4-P(1)}$ (mg/l)	$C_{PO4-P(2)}$ (mg/l)	Keskiarvo (mg/l)	$C_{PO4-P(1)} - C_{PO4-P(2)}$ (mg/l)	Poikkeama keskiarvosta (%)
1,07	1,08	1,075	0,01	0,93%
1,03	1,03	1,03	0	0,00%
1,14	1,14	1,14	0	0,00%
0,43	0,43	0,43	0	0,00%
0,41	0,41	0,41	0	0,00%
0,4	0,4	0,4	0	0,00%
2,24	2,24	2,24	0	0,00%
2,23	2,23	2,23	0	0,00%
2,31	2,31	2,31	0	0,00%
1,07	1,07	1,07	0	0,00%
1,08	1,08	1,08	0	0,00%
1,11	1,11	1,11	0	0,00%
1,01	1,01	1,01	0	0,00%
1,96	1,96	1,96	0	0,00%
2,94	2,94	2,94	0	0,00%
3,97	3,97	3,97	0	0,00%
3,08	3,08	3,08	0	0,00%
1	1	1	0	0,00%
1,97	1,97	1,97	0	0,00%
2,95	2,96	2,955	0,01	0,34%
3,9	3,9	3,9	0	0,00%
3,44	3,44	3,44	0	0,00%
0,99	0,99	0,99	0	0,00%
1,95	1,95	1,95	0	0,00%
2,73	2,73	2,73	0	0,00%
2,63	2,64	2,635	0,01	0,38%
3,27	3,28	3,28	0,01	0,30%
1,09	1,09	1,09	0	0,00%
1,09	1,09	1,09	0	0,00%
1,08	1,07	1,075	0,01	0,93%
1,07	1,07	1,07	0	0,00%
1,09	1,09	1,09	0	0,00%
0,86	0,86	0,86	0	0,00%

(jatkuu)

(jatkuu)

0,85	0,85	0,85	0	0,00%
0,85	0,85	0,85	0	0,00%
0,85	0,85	0,85	0	0,00%
0,88	0,87	0,86	0,01	1,16%
3,23	3,25	3,24	0,02	0,62%
3,44	3,44	3,44	0	0,00%
2,78	2,77	2,775	0,01	0,36%
3,07	3,07	3,07	0	0,00%
3,82	3,815	3,815	0	0,00%
4,07	4,07	4,07	0	0,00%
1,99	1,99	1,99	0	0,00%
1,99	1,99	1,99	0	0,00%
1,98	1,98	1,98	0	0,00%
1,99	1,99	1,99	0	0,00%
1,02	1,02	1,02	0	0,00%
1,98	1,98	1,98	0	0,00%
2,99	2,99	2,99	0	0,00%
3,02	3,04	3,02	0,02	0,66%
3,75	3,75	3,75	0	0,00%
1,01	1,01	1,01	0	0,00%
1,98	1,98	1,98	0	0,00%
2,98	2,99	2,985	0,01	0,34%
3,79	3,8	3,795	0,01	0,26%
4,48	4,46	4,47	0,02	0,45%
1,01	1,01	1,01	0	0,00%
1,96	1,96	1,96	0	0,00%
2,96	2,96	2,96	0	0,00%
3,99	3,99	3,99	0	0,00%
3,65	3,66	3,655	0,01	0,27%
2,26	2,27	2,265	0,01	0,44%
2,37	2,37	2,37	0	0,00%
2,78	2,78	2,78	0	0,00%
2,88	2,86	2,87	0,02	0,70%
1,08	1,08	1,08	0	0,00%
1,06	1,06	1,06	0	0,00%
1,58	1,58	1,58	0	0,00%
1,57	1,57	1,57	0	0,00%
0,42	0,42	0,42	0	0,00%
0,42	0,42	0,42	0	0,00%
0,96	0,96	0,96	0	0,00%
0,94	0,95	0,945	0,01	1,06%

Rinnakkaisten mittausten erotusten keskiarvo on 0,003 mg/l prosentuaalisten erojen keskiarvoksi saatiin 0,12 % \approx 0,1 %, mikä on fotometrin virhe.

Kokonaisfosfori: Reagenssilisäysten aiheuttamat epävarmuudet

P-1K-reagenssissa on annoskorkki. Lasketaan annoksen massalle epävarmuus. Annos punnittiin kymmenen kertaa.

Punnitus	Massa (g)	Ero keskiarvoon (g)	Ero keskiarvoon (%)
1.	0,0601	0,00352	6,22
2.	0,0560	0,00058	1,03
3.	0,0548	0,00178	3,15
4.	0,0555	0,00108	1,91
5.	0,0554	0,00118	2,09
6.	0,0556	0,00098	1,73
7.	0,0599	0,00332	5,87
8.	0,0556	0,00098	1,73
9.	0,0557	0,00088	1,56
10.	0,0572	0,00062	1,10

Punnitustulosten keskiarvo on 0,05658 g, keskihajonta 0,0015 g ja suhteellinen keskihajonta 2,6 %.

P-2K –reagenssissa on tippakorkki. Lasketaan annoksen massalle epävarmuus. Annos (5 tippaa) punnittiin kymmenen kertaa.

Punnitus	Massa (g)	Ero keskiarvoon (g)	Ero keskiarvoon (%)
1.	0,2399	0,00692	2,97
2.	0,2466	0,01362	5,85
3.	0,2339	0,00092	0,39
4.	0,2321	0,00088	0,38
5.	0,2240	0,00898	3,85
6.	0,2350	0,00202	0,87
7.	0,2241	0,00888	3,81
8.	0,2353	0,00232	1,00
9.	0,2319	0,00108	0,46
10.	0,2270	0,00598	2,57

Punnitustulosten keskiarvo on 0,23298 g, keskihajonta 0,00516 g ja suhteellinen keskihajonta 2,2 %.

P-3K –reagenssissa on annoskorkki. Lasketaan annoksen massalle epävarmuus. Annos punnittiin kymmenen kertaa.

Punnitus	Massa (g)	Ero keskiarvoon (g)	Ero keskiarvoon (%)
1.	0,0763	0,00185	2,48
2.	0,0795	0,00505	6,78
3.	0,0767	0,00225	3,02
4.	0,0739	0,00055	0,74
5.	0,0732	0,00125	1,68
6.	0,0716	0,00285	3,83
7.	0,0739	0,0005	0,67
8.	0,0730	0,00145	1,95
9.	0,0733	0,00115	1,54
10.	0,0731	0,00135	1,81

Punnitustulosten keskiarvo on 0,07445 g, keskihajonta 0,001825 g ja suhteellinen keskihajonta 2,5 %.

BOD₇: Näytteen esikäsittely, standardiliuoksen valmistus ja analyysin suoritusohje

Esikäsittely

Ennen analyysia näyte homogenoidaan ja sen kemiallinen hapenkulutus mitataan. COD-arvon perusteella arvioidaan BOD, joka on yleensä 0,5-0,8 x COD. Kun BOD on arvioitu, voidaan määrittää laitteiston ohjeiden perusteella oikea näytetilavuus. Näytettä voidaan laimentaa, jotta sen BOD-arvo saadaan halutulle tasolle tai jos näyte sisältää mikrobeja tuhoavia aineita.

Jos analyysia ei aloiteta kahden tunnin kuluessa näytteenotosta, näyte on säilytettävä <4 °C:ssa. Jos aikaa kuluu yli 6 h, säilytysaika on huomioitava tuloksissa. Näytettä ei saa säilyttää eikä pakastaa. Ennen näytteen tilavuuden mittausta näytettä kyllästetään hapella ravistelemalla sitä oin 15 minuutin ajan. Näytteen pH:n tulee olla mahdollisimman neutraali ja sitä säädetään tarvittaessa rikkihapolla tai natriumhydroksidilla (suositus pH 6,6-7,2).

Laimennusveden valmistus:

Laimennusvettä varten valmistetaan seuraavat ravinneliuokset, jotka säilyvät 6 kk ajan 0-4 °C:ssa säilytettynä:

Fosfaattipuskuriliuos (pH 7,2): 8,5 g KH₂PO₄, 21,75 g K₂HPO₄, 33,4 g Na₂HPO₄·7H₂O ja 1,7 g NH₄Cl liuotetaan 500 ml:aan RO-vettä ja laimennetaan 1000 ml:ksi.

Magnesiumsulfaatti heptahydraattiliuos: 22,5 g MgSO₄·7H₂O liuotetaan RO-veteen ja laimennetaan 1000 ml:ksi.

Kalsiumkloridiliuos: 27,5 g vedetöntä CaCl₂ liuotetaan RO-veteen ja laimennetaan 1000 ml:ksi.

Rauta(III)kloridi heksahydraattiliuos: 0,25 g FeCl₃·6H₂O liuotetaan RO-veteen ja laimennetaan 1000 ml:ksi.

Laimennusveteen pipetoidaan kutakin ravinneliuosta 1 ml ja laimennetaan 1000 ml:ksi RO-vedellä. Laimennusvettä ilmastetaan 1 h ajan esimerkiksi sekoittamalla, jonka jälkeen sen annetaan seistä vähintään 1 h ennen käyttöä. Lämpötila säädetään 20 ± 2 °C:een.

Ympä: Ympäinä käytetään yhdyskuntajätevettä, jonka COD on max 300 mg/l. Ympä suodatetaan pumpulin läpi, jonka jälkeen sen annetaan seistä vuorokauden ajan ennen käyttöä. Ympäin COD mitataan ja sitä laimennetaan tarvittaessa. Lisättävä määrä on noin 1 % näytteen kokonaistilavuudesta. Ympäiä voidaan pakastaa.

Glukoosi-glutamiinihappostandardin valmistus:

D-glukoosia ja L-glutamiinihappoa kuivataan lämpökaapissa 1 h ajan 105 °C:ssa ja jäähdytetään eksikaattorissa. Molempia punnitaan 150 ± 1 mg, liuotetaan laimennusveteen ja laimennetaan 1000 ml:ksi. Standardiliuoksen BOD₇ on 225 ± 20 mg/l.

Analyysin suoritus

Mittausalue arvioidaan COD:n perusteella ja määritetään näytetilavuus seuraava taulukon mukaisesti. Näytetilavuudet on määritetty siten, että laskukaava kertoimista saadaan järkeviä. Näytteet mitataan mahdollisuuksien mukaan tarkoitukseen valmistetuilla ylivuotopulloilla. Nitrifikaatioinhibiittoria lisätään taulukon mukaisesti tai vaihtoehtoisesti 20 tippaa 1000 ml:aan näytettä ennen näytteen mahdollista laimentamista.

Mittausalue	Näytetilavuus	Nitrifikaatioinhibiittori (ATU)
0-40 mg/l	432 ml	9 tippaa
0-80 mg/l	365 ml	7 tippaa
0-200 mg/l	250 ml	5 tippaa
0-400 mg/l	164 ml	3 tippaa
0-800 mg/l	97 ml	2 tippaa
0-2000 mg/l	43,5 ml	1 tippaa
0-4000 mg/l	22,7 ml	1 tippaa

Näytteiden lämpötilaksi säädetään 15-21 °C. Mittauspulloon lisätään ensin taulukon mukainen määrä nitrifikaatioinhibiittoria, jonka jälkeen mitataan näyte, joka on laimennettu tarvittaessa laimennusvedellä. Yksi mitattavista näytteistä on aina nollanäyte, jolla määritetään laimennusveden biokemiallinen hapenkulutus. Näytteen tilavuudesta 1 % on lisättyä ympppiä, joka on yhdyskuntajätettä. Ympppi on lisättävä aina standardeihin ja blank-näytteisiin sekä sellaisiin näytteisiin, joissa mikrobeja on hyvin vähän.

Kun näyte ja ympppi on siirretty mittauspulloon, lisätään pulloon magneetti ja asetetaan NaOH-kori paikoilleen. NaOH-koriin laitetaan kaksi NaOH-tablettia. OxiTop®-päät kierretään tiiviisti kiinni pulloihin ja pullot asetetaan sekoitus-alustalle. Sekoitus käynnistetään, kun OxiTop-mittauspäät on käynnistetty ja ohjelmoitu oikealle näytetilavuudelle OxiTop Controller –ohjaimella. Näytteitä inkuboidaan 20 ± 1 °C:ssa 7 vuorokauden ajan.

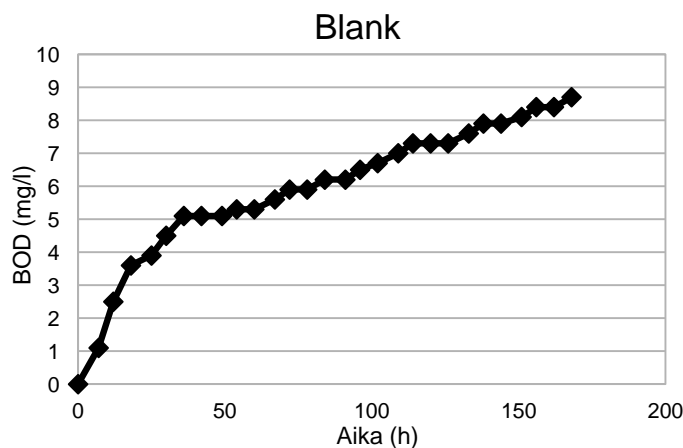
BOD₇: Menetelmän testaus

Menetelmän testaus

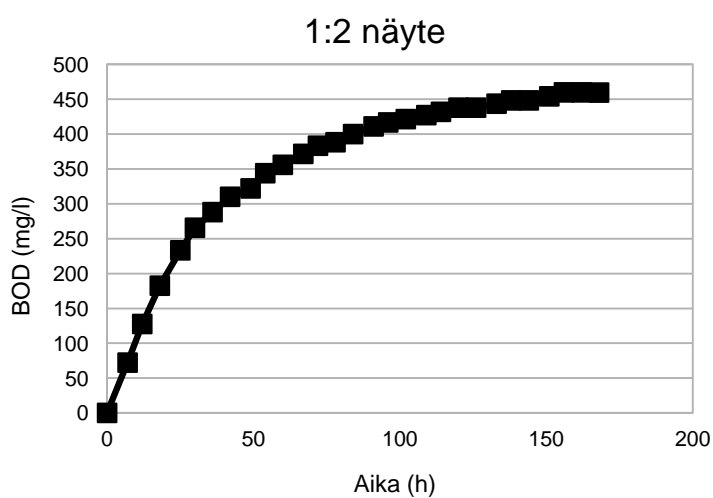
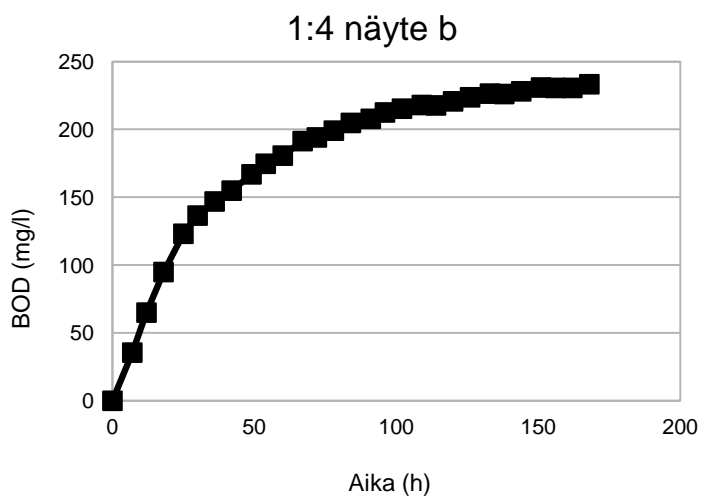
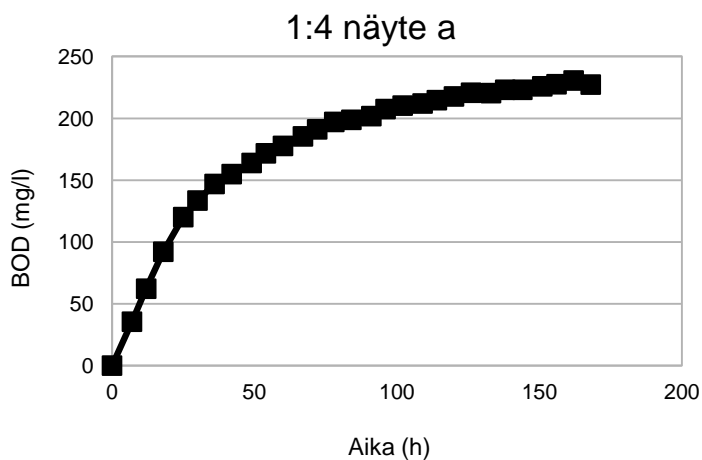
Näytteinä oli 1:2 ja 1:4 laimennettu jätevesi. Näiden lisäksi mitattiin blank-arvo pelkästä laimennusvedestä.

Aika (h)	Blank: BOD (mg/l)	1:4 a: BOD (mg/l)	1:4 b: BOD (mg/l)	1:2: BOD (mg/l)
0	0	0	0	0
12	2,5	62,2	65	127,5
25	3,9	120,1	123,1	233,1
36	5,1	146,9	146,9	287,9
49	5,1	163,9	166,9	321,9
60	5,3	177,7	180,7	355,7
72	5,9	191,1	194,1	383,1
84	6,2	198,8	204,8	399,8
96	6,5	207,5	212,5	416,5
109	7,0	212	218	427
120	7,3	217,7	220,7	437,7
133	7,6	220,4	226,4	443,4
144	7,9	223,1	228,1	448,1
156	8,4	227,6	230,6	459,6
168	8,7	227,3	233,3	459,3
Alkup. näyte	-	909,2	932,8	918,6

Tuloksista muodostettiin kuvaajat:



Näytteistä muodostettiin kuvaajat, kun niiden BOD-arvoista oli vähennetty laimennusveden eli blank-näytteen BOD:



Tulosten perusteella alkuperäisen näytteen BOD₇ on 920 mg/l, mikä on näytteiden keskiarvo. Tulosten keskihajonta on 12 mg/l ja suhteellinen keskihajonta 1,3 %. Tulos on noin 70 % kemiallisesta hapenkulutuksesta.

Testit standardiliuoksella

Seuraavissa taulukossa on standardiliuosten ja siitä valmistettujen laimennusten mittaustulokset, joissa saatiin oikeanlaisia tuloksia eli ympäri oli toimiva. Mittaustuloksista on vähennetty laimennusveden biokemiallinen hapenkulutus. Näytteet on nimetty mittauksen aloituspäivämäärien mukaisesti. Ensimmäisessä taulukossa laimentamattomat standardit, joiden BOD₇ on 225 ±20 mg/l:

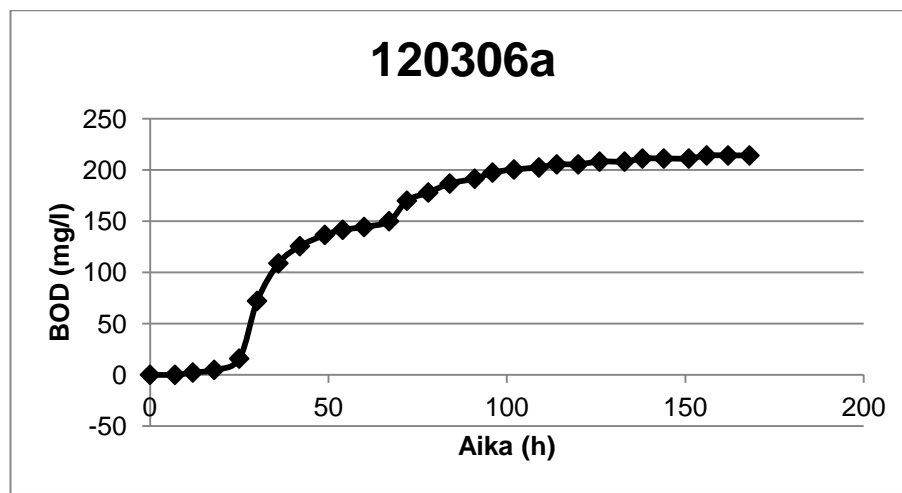
Aika (h)	120214a	120214b	120306a	120306b	120306c
0	0	0	0	0	0
12	3,1	2,1	2,2	2,2	2,2
25	58	43,9	15,8	10,2	13
36	98,9	118,9	108,9	97,4	97,4
49	121,9	143,9	136,6	125,6	130,6
60	146,7	149,7	144,3	139,3	147,3
72	157,1	154,1	170	164	175
84	187,8	182,8	186,8	174,8	186,8
96	204,5	196,5	197,5	183,5	194,5
109	212	207	202,5	191,5	202,5
120	217,7	214,7	205,5	197,5	205,5
133	223,4	220,4	208,2	200,2	211,2
144	228,1	226,1	211,2	200,2	214,2
156	223,6	230,6	214,2	202,2	216,2
168	236,3	230,3	214,2	205,2	219,2
Ero teoreettiseen (mg/l)	+11,3	+5,3	-10,8	-19,8	-5,8

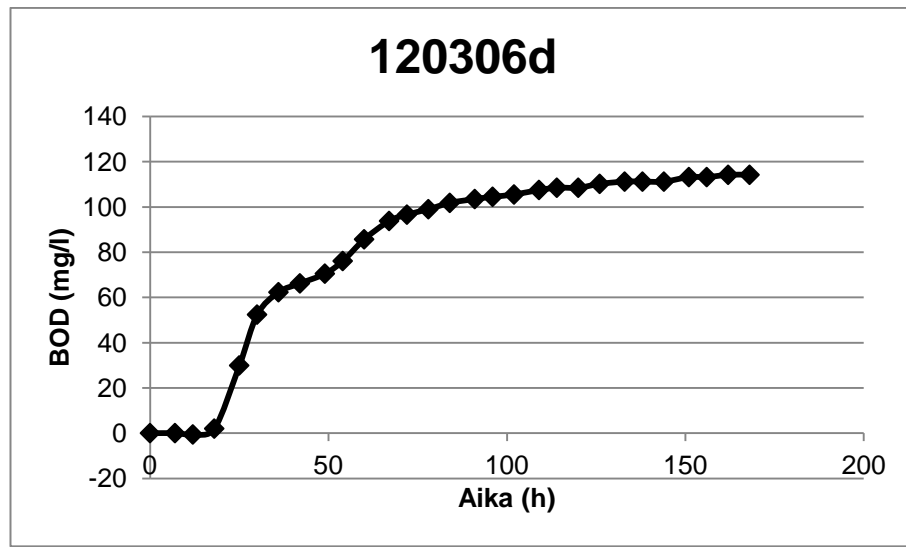
Tulosten keskiarvo on 221 mg/l, keskihajonta 12,4 mg/l ja suhteellinen keskihajonta 5,6 %.

1:2 mg/l BOD –laimennuksissa tuloksen tulee olla 112,5 ± 20 mg/l ja 3:4 laimennuksessa 157,5 ± 20 mg/l.

Aika (h)	120220a (157,5 mg/l)	120220b (112,5 mg/l)	120306d (112,5 mg/l)	120306e (112,5 mg/l)
0	0	0	0	0
12	2	2	0	-0,6
25	2,8	42,3	27,1	29,9
36	43,4	61,7	59,5	62,3
49	85,4	65,6	66,2	70,5
60	93,8	67,1	80	85,7
72	96,4	76,7	89,6	96,6
84	99,1	83,5	95	101,8
96	119,1	89,1	98,5	104,5
109	129,8	93	101,5	107,5
120	133,5	95,5	103,5	108,5
133	137,2	96,2	104,2	111,2
144	140,2	101,2	104,2	111,2
156	144,2	102,2	107,2	113,2
168	146,2	103,2	107,2	114,2
Ero teoreettiseen	-113	-7,5	-5,3	+1,7

Kaikkien standardiliuosten ja siitä tehtyjen laimennusten kuvaajat olivat samantyyppisiä. Alussa on vaihe, jossa mikrobit ovat sopeutuneet uuteen elinympäristöön. Esimerkkejä kuvaajista:





BOD₇: Validointisuunnitelma

Validointisuunnitelman alussa on kuvattu työturvallisuus ja jätteiden hävitys. Lisäksi validointisuunnitelmassa on selitetty analyysimenetelmän periaate ja annettu ohjeet näytteen käsittelyyn, liuosten valmistukseen ja analyysin suoritukseen. Myös tarvittavat reagenssit, välineet ja laitteet on mainittu validointisuunnitelman alussa. Nämä asiat on kuvattu tämän opinnäytetyön muissa osissa, joten tässä liitteessä on se validointisuunnitelman osa, jossa on ohjeet parametrien testauksiin.

Menetelmän testaus

Menetelmää testataan sillä näytteellä, jonka mittaukseen menetelmää on tarkoitus käyttää. Menetelmän testaus suoritetaan kaksi kertaa ja sen tavoitteena on selvittää, antaako menetelmä odotetunlaisia tuloksia ja arvioida karkeasti, mikä on kemiallisen ja biokemiallisen hapenkulutuksen suhde kyseisen asiakkaan jätevedessä.

Spesifisyys ja selektiivisyys

Menetelmän spesifisyyttä ja selektiivisyyttä tarkkaillaan validoinnin edetessä ja tarpeen vaatiessa niille suunnitellaan testauksia. Menetelmä on spesifinen, sillä se mittaa paineen muutosta, joka johtuu hiilidioksidin reaktiosta natriumhydroksidin kanssa.

Menetelmää häiritsee nitrifikaatiosta johtuva hapenkulutus. Tämä estetään nitrifikaatioinhibiittorilla, jolloin menetelmä on spesifinen biokemialliselle hapenkulutukselle.

Analyysia häiritsevät aineet eivät vaikuta sen spesifisyyteen, mutta voivat vääristää mittaustuloksia jopa niin, että biokemiallista hapenkulutusta ei tapahdu ollenkaan. Häiritseviä aineita ovat inhiboivat ja myrkylliset aineet, kuten fenolit, raskasmetallit ja syanidiyhdisteet sekä kloori ja muut mikrobeja tappavat yhdisteet.

Tarkkuus

Mittauksen tarkkuutta tarkastellaan mittaamalla näytettä, jonka BOD on tunnettu, ja vertaamalla tulosta teoreettiseen tulokseen. Liuoksia tehdään vähintään kaksi rinnakkaista.

Valmistetaan glukoosi-glutamiinihappostandardista taulukon mukaiset näytteet. Laimennus tehdään RO-vedellä, johon on lisätty ravinneliuokset.

Näyte	V(std) (ml)	V(kok.) (ml)	BOD (mg/l)
1	0	432	0
2	250	500	112,5
3	250	500	112,5
4	164	164	225
5	164	164	225
6	164	164	225

Näyte	Mittausalue	Näyte-tilavuus (ml)	NTH 600 (tippaa)	Ymppi (ml) COD = n. 150 mg/l
Blank	0-40 mg/l	432	9	4,3
BOD 112,5 mg/l	0-200	250	5	2,5
BOD 225 mg/l	0-400	164	3	1,6

Hyväksymisraja: Pitoisuus \pm 20 mg/l

Toistettavuus

Toistettavuus testataan viidellä rinnakkaisella standardiliuosnäytteellä, joiden pitoisuus on 225 mg/l. Tuloksista lasketaan näytteiden keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta.

Hyväksymisraja RSD% <10%

Laboratorion sisäinen toistettavuus

Toistettavuustestaus suoritetaan mittaamalla vertailuliuosta (glukoosi-glutamiinihappostandardi) eri mittauskerroilla muiden validointiparametrien testauksen yhteydessä. Tuloksista lasketaan keskiarvo, keskihajonta sekä suhteellinen keskihajonta. Liuoksia tehdään aina kaksi rinnakkaista satunnaisten vir-

heiden minimoimiseksi. Tulosten perusteella arvioidaan, millä tasolla laboratorion sisäinen toistettavuus on.

Lineaarisuus

Lineaarisuustestissä mitataan ensin näytteen COD, jonka perusteella arvioidaan BOD. Arvioidun BOD-arvon perusteella määritetään mahdollinen testattava alue.

Esimerkki: Näytteen COD on 1500 mg/l

Näyte	Arvioitu BOD (mg/l)	Mittausalue (mg/l)	V(näyte) (ml)	V(kok) (ml)	NTH (tip-paa)	V(ympäri) (ml)	V(näyte) (ml)
1 (Blank)	0	0-40	0	432	9	4,3	432
2	300	0-400	50	250	3	1,6	164
3	600	0-800	100	250	2	1	97
4	900	0-2000	150	250	1	0,4	43,5
5	1200	0-2000	200	250	1	0,4	43,5
6	1500	0-2000	43,5	43,5	1	0,4	43,5

Mittaustulokset kirjataan kerran vuorokaudessa. Mittauspisteiden välille piirretään viiva, jolloin muodostuu biokemiallista hapenkulutusta esittävä kuvaaja. Seitsemännen vuorokauden BOD-arvoista tehdään kuvaaja, jossa on BOD-arvo vs. alkuperäisen näytteen määrä liuoksessa. Näin muodostuu suora, josta voidaan tarkastella analyysin lineaarisuutta. Lineaarisuuden tarkastelu tapahtuu taulukkolaskentaohjelmalla.

Hyväksymisrajat: Korrelaatiokerroin: >0,95, jäännökset tasaisesti suoran molemmilla puolilla ja suora kulkee suunnilleen origon kautta.

Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus lasketaan, kun validointi on hyväksytysti suoritettu. Mittausepävarmuudessa otetaan huomioon kaikki analyysissä olevat virhelähteet. Virheiden neliösummasta otetaan neliöjuuri joka kerrotaan kahdella ja näin saadaan mittausepävarmuus 95 % luotettavuustasolla.