



Sulfidin määrittäminen jätevedestä: menetelmän käyttöönotto ja va- lidointi

Juuso Kuusisto

OPINNÄYTETYÖ
Marraskuu 2021
Laboratoriotekniikan tutkinto-ohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratoriotekniikka

KUUSISTO, JUUSO

Sulfidin määrittäminen jätevedestä: menetelmän käyttöönotto ja validointi

Opinnäytetyö 53 sivua, joista liitteitä 1 sivu
Marraskuu 2021

Opinnäytetyön tarkoituksena oli ottaa käyttöön ja validoida standardin mukainen menetelmä sulfidipitoisuuden määrittämiseksi jätevedestä spektrofotometrillä. Menetelmä perustuu ISO 13358 standardiin.

Työ toteutettiin Eurofins Nab Labs Oy:n Rauman toimipisteessä. Standardimenetelmä otettiin käyttöön laboratoriossa uutena menetelmänä. Menetelmän myötä laboratorion tarjoamien analyysipalvelujen valikoima laajenee. Tämä tulee lisäämään laboratoriossa tehtävien analyysien lukumäärää.

Menetelmän käyttöönotossa laitteisto saatettiin toimintakuntoon analyysia varten. Samalla varmistettiin, että laitteistolla voidaan määrittää sulfidia halutuista näytteistä. Validoinnissa kerättiin menetelmästä kokeellisesti mittaustuloksia, joille tehtiin tilastollista tarkastelua regressioanalyysillä. Validointiparametrit olivat lineaarisuus, määrittämiss raja, mittausepävarmuus ja matriisinvaikutus. Validointi suoritettiin validointisuunnitelman mukaan, joka sisälsi kokeellisen osan ja teoreettisen osan. Kokeellisessa osassa tehtiin mittauksia laitteistolla ja teoreettisessa osassa laskettiin määrittämiss raja validointiparametrit.

Validoinnin perusteella pikamenetelmä saatiin validoitua kaikilta muilta osin paitsi määrittämiss rajan suhteen ja matriisin kanssa pikamenetelmä ei toiminut. Kuplitusmenetelmää ei saatu validoitua ja ennen menetelmän käyttöönottoa sille pitää tehdä lisää validointianalyyskejä.

Asiasanat: sulfidi, rikkivety, vesianalyysi, kuplitus

ABSTRACT

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

KUUSISTO, JUUSO

Determination of Sulfide in Wastewater: Commissioning and Validation of Method

Bachelor's thesis 53 pages, appendices 1 page

November 2021

The purpose of this study was to do commissioning and validation of the method for determination of sulfide in wastewater by spectrophotometer. The method is based on ISO 13358 standard.

The study was performed at Eurofins Nab Labs Oy laboratory in Rauma. The standard method was commissioned as a new method in the laboratory. With this method, the laboratory's assortment of analytical services becomes greater. This will increase the number of analyses done in the laboratory.

At the commissioning of the method, the apparatus was made ready for analysis. At the same time, it was ensured, that sulfide may be determined from desired samples with the apparatus. At validation experiments were made to gather measurements, for which statical examination was made with regression analysis. Validation parameters were linearity, determination limit, measurement uncertainty and effect of matrix. Validation was performed according to validation plan, which included an experimental part and a theoretical part. In the experimental part measurements were made with the apparatus and in the theoretical part specified validation parameters were calculated.

Validation of the fast method was successful on all other parts except determination limit, and the method was not functional with a matrix. Validation of the stripping method was unsuccessful, and before commissioning, more validation must be done for it.

Key words: sulfide, hydrogen sulfide, water analysis, stripping

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	6
2	Sulfidi	7
	2.1 Yleisesti sulfideista	7
	2.2 Rikkivedyn vaikutus ihmiseen	7
	2.3 Sulfidi vedessä	8
	2.4 Sulfidin määrittäminen.....	8
	2.4.1 Spektrofotometrinen menetelmä.....	9
	2.4.2 Titrimetrinen menetelmä.....	9
	2.5 Näytteen käsittely	9
3	UV-Vis Spektrometria	11
	3.1 Teoria.....	11
	3.2 Spektrometrin esittely.....	12
4	Validointi	14
	4.1 Validoinnin toteutus.....	14
	4.2 Validointisuunnitelma	15
	4.3 Tulosten tilastollinen käsittely ja tulkinta.....	16
	4.4 Validointiparametrit	17
	4.4.1 Selektiivisyys ja spesifisyys	17
	4.4.2 Herkkyys.....	18
	4.4.3 Lineaarisuus ja mittausalue	18
	4.4.4 Toteamis- ja määrittäysraja	19
	4.4.5 Häiriökestävyys ja toimintavarmuus	19
	4.4.6 Tarkkuus.....	19
	4.4.7 Toistettavuus	21
	4.4.8 Uusittavuus.....	21
	4.4.9 Mittausepävarmuus	22
	4.5 Vertailumateriaalit ja niiden hyödyntäminen.....	23
5	Menetelmän kehitys.....	25
	5.1 Käytetty standardi	25
	5.2 Näytteen käsittely	26
	5.3 Pikamenetelmän käyttöönotto	26
	5.4 Kuplitusmenetelmän käyttöönotto	27
	5.4.1 Matriisi	32
6	Sulfidin määritysanalyysin validointi.....	34
	6.1 Validointisuunnitelma	34
	6.1.1 Koesarjat	34

6.1.2 Validointiparametrit.....	34
6.2 Pikamenetelmä	35
6.2.1 Standardisuoran lineaarisuus pikamenetelmälle	35
6.2.2 Määrittäjäraja pikamenetelmälle	37
6.2.3 Mittausepävarmuus pikamenetelmälle	38
6.2.4 Matriisinvaikutus pikamenetelmälle	40
6.3 Kuplitusmenetelmä.....	41
6.3.1 Standardisuoran lineaarisuus kuplitusmenetelmälle	41
6.3.2 Mittausepävarmuus kuplitusmenetelmälle	44
6.3.3 Matriisin vaikutus kuplitusmenetelmälle.....	45
6.4 Ajan vaikutus väriin	46
7 Yhteenveto.....	49
LÄHTEET.....	51
LIITTEET	53
Liite 1. Studentin t-arvotaulukko.....	53

1 JOHDANTO

Opinnäytetyön aiheena oli analyysimenetelmän käyttöönotto ja validointi sulfidipitoisuuden määrittämiseksi jätevesinäytteistä. Laboratorioilta vaaditaan kykyä tuottaa luotettavia tuloksia. Tämä voidaan varmistaa validoimalla käytettävät analyysimenetelmät. Validoinnilla varmistetaan myös, että menetelmä soveltuu aiotuun käyttötarkoitukseen. Validoinnit kuuluvat usein osaksi laboratorion sisäistä laatujärjestelmää ja niillä varmistetaan, että uudet menetelmät ylläpitävät laboratorion laatua.

Eurofins Nab Labs Oy on Suomessa toimiva laboratorioalan yritys, jonka päätoimenkuvaan kuuluu kemiallisten ja fysikaalisten analyysipalvelujen tuottaminen. Yritys kuuluu maailmanlaajuiseen Eurofins konserniin. Rauman laboratorio on erikoistunut metsäklusterin erikoisanalytiikkaan, mutta palveluun kuuluvat myös energia- ja kemianteollisuus. Pääosin analyysit tehdään standardien pohjalta, mutta joitain menetelmiä on kehitetty laboratoriossa sisäisesti. Laadunhallinnan perustana on sisäinen laatujärjestelmä. Laboratorio haluaa nyt kasvattaa analyysipalvelujensa määrää ja siksi sinne haluttiin validoida ja käyttöönottaa menetelmä sulfidinmääritykselle jätevesistä.

Sulfidi on rikin ioni, joka muodostaa herkästi myrkyllistä rikkivetykaasua. Siksi sulfidia pidetään ympäristölle vaarallisena ja sen pitoisuuksia tarkkaillaan. Sulfidia muodostuu monissa teollisuuden prosesseissa ja siksi on vaarana, että se päätyy jätevesiin. Näistä syistä on tärkeää, että sulfidi voidaan määrittää luotettavasti ja tarkasti jätevesistä, jottei sulfidipitoista jätettä päädy ympäristöön.

2 Sulfidi

2.1 Yleisesti sulfideista

Rikki esiintyy maaperässä, vesistöissä ja ilmassa yleisesti sulfideina ja sulfaatteina. Sulfidi on rikin hapetusluvulla $-II$ esiintyvä muoto. Luonnossa sulfidi esiintyy yleisesti rikkivetykaasuna H_2S , jolle on tunnusomaista mädän kananmunan tuoksu. Teollisuudessa sulfideja käytetään metalliyhdisteinä erilaisissa tuotteissa, kuten paristoissa, värjäysaineissa, myrkyllisten yhdisteiden ja alkuaineiden saostamisessa. Koska sulfideja käytetään paljon teollisuudessa, kulkeutuu niitä teollisuuden jätevesien, savukaasujen ja kiinteän jätteen mukana ympäristöön. (Rayner-Canham & Overton 2006, 427–433.)

Rikki voi esiintyä hapetusluvuilla $(-II)$, $(-I)$, $(+II)$, $(+IV)$ ja $(+VI)$, kuten yhdisteissä H_2S , S_2^{2-} , $S_2O_3^{2-}$, SO_2 and SO_4^{2-} . Emäksiset sulfidit ovat vesiliukoisia mutta kaikki muut ovat joko liukenemattomia tai sitten ne hydrolysoituvat muodostaen yleensä H_2S kaasua ja metallihydroksidin. Sulfidit saadaan yleensä hajotettua vedestä pitkään keittämällä. (Rich 2007, 415–416.)

Rikkivetykaasu on väritön ja huoneenlämmössä helposti syttyvä kaasu. Rikkivedyn moolimassa on 34,08 g/mol. Sen liukoisuus veteen 20°C lämpötilassa on noin 4 g/l. Rikkivety pystyy liukenemaan myös alkoholiin, eetteriin, kerosiiniin ja raakaöljyyn. (Chou 2003, 5.)

2.2 Rikkivedyn vaikutus ihmiseen

Koska rikkivety on kaasu, sen yleisin siirtymisreitti ihmiseen on hengityksen mukana keuhkoihin kulkeutuminen. Suurella annoksella (pitoisuus yli 700 mg/m³) voi olla jopa kuolemaan johtavat seuraukset. (Beauchamp ym. 1984). Muita mahdollisia seurauksia rikkivedyn hengittämisellä on esitetty alla olevassa taulukossa 1.

Taulukko 1. Rikkivedyn vaikutus ihmiseen (Amoore & Hautala 1983; Jäppinen, Viikka, Marttila & Haahtela 1990; Vanhoorne, De Rouck & De Bacquer 1995; Bhambhani & Singh 1991; Bhambhani ym. 1996, 1997; IPCS 1981; Ahlborg 1951; Hirsch & Zavala 1999; Spolayr 1951; Beauchamp ym. 1984)

Rikkivedyn pitoisuus (mg/m ³)	Oire/ seuraus
0,011	Hajukynnys
2,8	Astmaa sairastavilla hengenhdistusta
5,0	Lisääntyneet silmävaivat
7–14	Lisääntynyt veren laktaattipitoisuus, hapetuskyvyn lasku
5–29	Silmien ärtyminen
28	Heikotus, päänsärky ja huimaus
>140	Hajuaistin häiriötä
>560	Hengitysvaikeuksia
≥700	Kuolema

2.3 Sulfidi vedessä

Juomavedessä rikkivedyn pystyy maistamaan ja haistamaan pitoisuuden ollessa 0,05–0,1 mg/l. Vaikka rikkivety on myrkyllistä, sen pitoisuuteen vedessä ei ole Maailman terveysjärjestöllä suositusta. Rikkivedyn myrkyllisyydestä nautittuna ei ole tietoa, koska on epätodennäköistä, että rikkivetyä sisältävää vettä tulisi nautittua myrkyllistä annosta. Maailman terveysjärjestö kuitenkin suosittelee, että juomavedessä rikkivedyn ei pitäisi haista tai maistua. (WHO 2017, 226.)

2.4 Sulfidin määrittäminen

Sulfidia voidaan määrittää monilla eri tavoilla, kuten spektrofotometrisesti UV-Vis laitteistolla (Reese ym. 2011) tai ICP-OES laitteella (Lewin, Walsh & Miles 1987) tai kromatografisesti IC-laitteistolla (Kolotitina & Dolgonosov 2005). Kaikissa näissä menetelmissä sulfidi joudutaan muuttamaan toiseen muotoon, koska yleisesti sulfidia on hankala määrittää suoraan. Tämän vuoksi se muutetaan tavallisesti H₂S muotoon eli rikkivedyksi. Rikkivedyn määrittämiseen on kehitetty monia menetelmiä ja sitä on helpompi määrittää kuin sulfidia.

2.4.1 Spektrofotometrinen menetelmä

Spektrofotometrinen menetelmä perustuu siihen, että liukseen, joka sisältää sulfidia, lisätään happamaksi tehtyä dimetyyli-*p*-fenyyliidiamiinia. Tämän seurauksena dimetyyli-*p*-fenyyliidiamiini muodostaa sulfidin kanssa leukometyleenisinisen värin. Kun tähän liukseen lisätään rauta(III)ioneja, leukometyleenisininen hapettuu metyleenisiniseksi. Tämän absorbanssi voidaan mitata aallonpituudella 665 nm. (ISO 13358 1997)

2.4.2 Titrimetrinen menetelmä

Titrimetrisessä menetelmässä sulfidia sisältävään liukseen lisätään jodidia, joka reagoi happamissa olosuhteissa sulfidin kanssa. Lopputuotteena tästä reaktiosta saadaan kaliumsulfaattia (K_2S), joka voidaan takaisintitrata natriumtiosulfaatti ($Na_2S_2O_3$) liuoksella. Tämän kulutuksen avulla voidaan laskea kaavalla (1) tutkitavan liuoksen sulfidipitoisuus.

$$\rho = \frac{16000 \cdot c \cdot (V_1 - V_2)}{V_3}, \quad (1)$$

jossa ρ on tutkitun liuoksen sulfidipitoisuus, c on natriumtiosulfaattiliuoksen konsentraatio, V_1 on nollanäytteen titrauskulutus, V_2 on näytteen titrauskulutus ja V_3 on titratun näytteen tilavuus. (SFS 3042 1977, 4–5.)

2.5 Näytteen käsittely

Sulfidi on herkästi haihtuva yhdiste ja siksi on tärkeää, että näytteet käsitellään sulfidin haihtumisen estämiseksi, jos pitoisuusmittausta ei pystytä tekemään välittömästi. Näytteen säilömiseen soveltuu tiiviisti suljettava pullo. Näyte säilötään

sinkkiasetaatin avulla emäksisisissä olosuhteissa. Emäksisisissä olosuhteissa sulfidi ei pääse haihtumaan rikkivetynä vaan se pysyy liukoisessa muodossa (Rich 2007, 415–416).

3 UV-Vis Spektrometria

3.1 Teoria

Sähkömagneettinen säteily voi toimia energian välittäjänä. Sähkömagneettinen säteily voidaan luokitella sen taajuuden f tai aallonpituuden λ mukaan. Taajuuden kasvaessa aallonpituus pienenee ja vastaavasti taajuuden pienentyessä aallonpituus kasvaa. Sähkömagneettisella säteilyllä aallonpituus ja taajuus ovat suhteessa fotonin energiaan Planckin vakion ja valonnopeuden avulla. Kaavassa (2) on esitetty tämä energian suhde. Planckin vakio on $6.62 \cdot 10^{-34}$ Js ja valonnopeus tyhjiössä on $2.998 \cdot 10^{10}$ cm/s. (Patnaik & Dean 2004.)

$$E = hf = \frac{hc}{\lambda}, \quad (2)$$

jossa E on sähkömagneettisen säteilyn energia tyhjiössä, h on Planckin vakio, f on taajuus, c on valonnopeus tyhjiössä ja λ on aallonpituus (Patnaik & Dean 2004).

Sähkömagneettista säteilyä voidaan mitata spektrofotometrillä, joka on optinen mittaustilaite. Laitetta käytetään yleisesti laboratorioissa liuoksien pitoisuuden ja puhtauden mittaamiseen sekä aineiden määrittämiseen. Laitetta voidaan käyttää siis kvantitatiiviseen ja kvalitatiiviseen analysointiin. Spektrofotometrin periaate perustuu Lambert-Beerin lakiin, jonka mukaan sähkömagneettisen säteilyn absorboituminen riippuu absorboivan aineen määrästä kaavan 3 mukaisesti. Lambert-Beerin laki olettaa, että absorboivan aineen värin määrä on lineaarisesti korreloitava. Näin ei kuitenkaan yleensä ole vaan värin korrelaatio pitoisuuteen muuttuu konsentraation mukaan. Onneksi pienellä alueella tarkasteltuna väri on niin lähellä lineaarista korrelaatiota että, korrelaation voidaan olettaa olevan lineaarinen. (Owen 2000, 18–20.)

$$A = \epsilon bc, \quad (3)$$

jossa A on absorbanssi, ϵ on molaarinen absorptiokerroin, c on konsentraatio ja b on valon kulkema matka. (Owen 2000, 18–20.)

Yleisesti spektrofotometrisessä menetelmässä näytteeseen ohjataan tietyn aallonpituuden omaavaa sähkömagneettista säteilyä. Näytteessä kulkiessaan tämä sähkömagneettinen säteily vaimenee, sillä näytteen atomit absorboivat sähkömagneettista säteilyä, mikä näkyy säteilyn intensiteetin pienenemisenä. Tämä säteilyn intensiteetti voidaan mitata ja sitä voidaan verrata tunnettuihin pitoisuuksiin, jolloin voidaan kaavan 2 avulla päätellä näytteen pitoisuus. (Patnaik & Dean 2004.)

3.2 Spektrometrin esittely

Laboratoriossa käytössä oleva spektrofotometri on Shimadzu UV-1800, joka on esitetty kuvassa 1. Laboratoriossa spektrofotometriä ohjataan siihen liitettyllä tietokoneella, mutta spektrometriä voidaan ohjata myös laitteen omilla näppäimillä. Tällöin ei kuitenkaan pystytä käyttämään tietokoneella olevia laskentaohjelmia ja -kaavoja ja laitteen käyttäminenkin on hieman monimutkaisempaa. Spektrometri kykenee mittaamaan aallonpituuksia välillä 190–1100 nm, eli aallonpituuksia infrapuna-alueelta aina näkyvän valon kautta ultraviolettisäteilyn alueelle. (Shimadzu 2008.)



Kuva 1. Shimadzu UV-1800 spektrofotometri

4 Validointi

Validoinnilla tutkitaan mittausmenetelmän suorituskykyä ja osoitetaan, kuinka hyvin menetelmä soveltuu käyttötarkoitukseensa. Kaupallisen laboratorion toiminta perustuu vahvasti validoitujen menetelmien käyttöön. Validoiduilla menetelmillä asiakkaille voidaan osoittaa laboratorion laatu ja menetelmien luotettavuus. Tämä on tärkeää, sillä vastuu luotettavista tuloksista on analyyseja suorittavalla laboratorion. Validointia tarvitaan esimerkiksi silloin, kun kehitetään uutta menetelmää, parannellaan olemassa olevaa menetelmää, osoitetaan kahden menetelmän yhtäpitävyys tai siirrettäessä validoitu menetelmä toiseen laboratorioon. (Jaarinen & Niiranen 2008, 8.)

Mittausmenetelmä tulee validoida, kun halutaan varmistaa riittävä suorituskyky menetelmälle. Erityisesti validointi tulisi tehdä, kun menetelmässä havaitaan jokin analyttinen ongelma. Tämän tyyppisiä ongelmia ovat esimerkiksi menetelmän siirtäminen uudelle laitteelle tai toiseen toimipisteeseen, menetelmän laajentaminen uusille matriiseille tai menetelmän kehitys uudelle käyttöalalle. (Matveinen 2005, 26; Mäkinen ym. 1996, 6.)

4.1 Validoinnin toteutus

Validointi sisältää validointisuunnitelman, kokeiden suorituksen, tulosten tilastollisen arvioinnin ja dokumentoinnin. Laboratoriossa kokeista saadut tulokset kirjataan tarkasti ja ne analysoidaan sopivilla tilastollisilla menetelmillä (Mäkinen ym. 1996, 6.) Analyysitulosten ja mahdollisten muiden tietojen pohjalta arvioidaan menetelmän luotettavuutta. Tämän luotettavuuden arviointiin käytetään myös tausta-aineistoja. Jos tulokset ovat hyviä ja validointia ei tarvitse tehdä uudestaan, laaditaan näiden tietojen pohjalta validointiraportti. Tässä validointiraportissa selvitetään menetelmän soveltuvuus aiottuun käyttötarkoitukseen. Lisäksi raportissa selvitetään myös suorituskykyä mittaavilla parametreilla menetelmän luotettavuus. Tämän lisäksi olisi hyvä laatia menetelmäohje, jolla voidaan varmistaa menetelmän luotettavuus. (Jaarinen & Niiranen 2008, 11–15.)

Menetelmän validointi voi olla joko nopea prosessi, joka kestää vain muutaman päivä tai se voi viedä jopa kuukausia. Tämä riippuu menetelmästä ja sen käyttötarkoituksesta. Menetelmän validoinnin tekijän tulee olla hyvin perehtynyt tehtäviin mittauksiin ja käytettäviin laitteisiin. Tällä varmistetaan, että saadaan luotettavia tuloksia. Lisäksi mittaukset tulisi tehdä riittävän pitkän ajanjakson aikana, jotta olosuhteista johtuvat muutokset saadaan mittausdataan mukaan. (Mäkinen ym. 1996, 6.)

Menetelmää voidaan pitää validoituna, kun menetelmä tuottaa tarkkoja tuloksia ja tulokset ovat tilastollisen seurannan piirissä. Menetelmää tulee siis seurata jatkuvasti ja sen luotettavuutta arvioidaan sitä käytettäessä. Uusintavalidointi tulee tehdä, jos laadunvarmistuksessa havaitaan muutoksia menetelmässä. (Mäkinen ym. 1996, 6.)

4.2 Validointisuunnitelma

Validointi pohjautuu validointisuunnitelmaan, joka tehdään validoinnin alussa. Validointia tehdessä on kuitenkin mahdollista, että menetelmää joudutaan muuttamaan ja tällöin validointisuunnitelmaakin voidaan joutua muuttamaan. Validointisuunnitelmassa määritetään validoinnin tarkoitus, käytettävä laitteisto, määritettävät ominaisuudet ja tehtävät koesarjat. (Mäkinen ym. 1996, 7.)

Validoinnin tarkoitus kuvaa miksi validointia tehdään ja minkä asteinen validointi on kyseessä. Validointiasteeseen vaikuttaa menetelmän käyttötarkoitus, sisältö ja analyysitekniikka. Myös analyysin luotettavuudelle asetetut vaatimukset vaikuttavat validointiasteeseen. Tämä vaikuttaa siihen minkälaisia määrittämiä tehdään ja kuinka paljon sekä kuinka laajoja mittauksia tehdään. Lisäksi näillä on vaikutusta, kuinka laajasti ja miten tuloksia käsitellään ja raportoidaan. (Mäkinen ym. 1996, 7.)

Laitteiston määrittämisessä kuvataan validoinnissa käytettävä laitteisto. Tällä laitteistolla tehdään validointimittauksia koesarjoista ja luonnollisesti tämän laitteiston tulee olla kalibroitu. Koesarjoja edustavat nollanäytteet, standardinäytteet ja varsinaiset näytteet. (Mäkinen ym. 1996, 6–7.)

Validoinnissa määritettävät ominaisuudet päätetään validointiasteen mukaan. Kaikki ominaisuudet, jotka ovat tulosten luotettavuuden kannalta oleellisia, määritetään. Tämä tarkoittaa, että esimerkiksi standardimenetelmän validoinnissa määritettäviä ominaisuuksia voi olla huomattavasti vähemmän kuin itse kehitetyn uuden menetelmän validoinnissa. (Mäkinen ym. 1996, 7.)

4.3 Tulosten tilastollinen käsittely ja tulkinta

Validoinnissa mittaukset suoritetaan yleensä useaan otteeseen ja näistä tuloksista lasketaan keskiarvo. Mittaustuloksista lasketaan keskihajonta, joka kuvaa yksittäisten mittaustulosten hajontaa keskiarvon ympärillä. Keskiarvo, keskihajonta, suhteellinen keskihajonta ja variaatiokerroin ovat parametreja, joita käytetään validointidatan käsittelyssä ja validointiparametrien laskennassa. Variaatiokerroin on suhteellinen keskihajonta ilmaistuna prosentteina. (Lehtonen 2002, 99.)

Keskiarvo lasketaan kaavalla (4), keskihajonta lasketaan kaavalla (5), suhteellinen keskihajonta (RSD) lasketaan kaavalla (6) ja variaatiokerroin lasketaan kaavalla (7).

$$x_{ka} = \frac{\sum x_i}{n}, \quad (4)$$

jossa x_{ka} on keskiarvo, x_i on yksittäinen havainto ja n on havaintojen lukumäärä. (Lehtonen 2002, 98.)

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - x_{ka})^2}{n - 1}}, \quad (5)$$

jossa s on keskihajonta, x_i on yksittäinen havainto, x_{ka} on havaintojen keskiarvo ja n on havaintojen lukumäärä. (Lehtonen 2002, 98.)

$$s_{rel} = \frac{s}{x_{ka}}, \quad (6)$$

jossa s_{rel} on suhteellinen keskihajonta, s on keskihajonta ja x_{ka} on havaintojen keskiarvo. (Lehtonen 2002, 98.)

$$s_{rel} - \% = \frac{s \cdot 100\%}{x_{ka}}, \quad (7)$$

jossa $s_{rel} - \%$ on variaatiokerroin, s on keskihajonta ja x_{ka} on havaintojen keskiarvo. (Lehtonen 2002, 98.)

4.4 Validointiparametrit

Validointiparametrit ovat validoinnissa tutkittavia ominaisuuksia ja ne ilmaisevat menetelmän suorituskykyä. Validointiparametreja ovat selektiivisyys ja spesifisyys, herkkyys, lineaarisuus, mittausalue, toteamis- ja määritysraja, tarkkuus, toistettavuus, uusittavuus, häiriökestävyys ja mittausepävarmuus (Mäkinen ym. 1996, 6; Matveinen ym. 2005, 28). Seuraavaksi on esitelty tarkemmin näitä parametreja.

4.4.1 Selektiivisyys ja spesifisyys

Selektiivisyys (selectivity) kuvaa menetelmän kykyä määrittää kyseessä olevaa ainetta tai aineita seoksesta, jossa on monia komponentteja siten, että muut komponentit eivät häiritse määrittystä. Spesifisyys (specificity) kuvaa menetelmän kykyä mitata vain haluttua ainetta. Menetelmää voidaan pitää spesifisenä, jos se on täysin selektiivinen tutkitulle aineelle. Selektiivisyys ja spesifisyys täytyy määrittää jokaiselle laitteelle ja yhdisteelle erikseen, sillä ne ovat laite- ja yhdistekohtaisia. Selektiivisyyttä voidaan määrittää vertaamalla tutkitun menetelmän tuloksia selektiivisyydeltään tunnettujen menetelmien tuloksiin. Selektiivisyyttä voidaan tutkia erilaisten matriisien, puhtaiden aineiden tai seosten avulla (Matveinen ym. 2005, 27).

4.4.2 Herkkyys

Herkkyys (sensitivity) kuvaa menetelmän kykyä havaita näytteen pitoisuuden pienet vaihtelut. Menetelmää voidaan sanoa herkäksi, jos pieni pitoisuuden muutos aiheuttaa suuren muutoksen detektorin vasteessa. Tätä voidaan määrittää standardisuoran kulmakertoimen avulla. (Mäkinen ym. 1996, 28.)

4.4.3 Lineaarisuus ja mittausalue

Lineaarisuus (linearity) kuvaa menetelmän kykyä antaa tietyllä alueella tutkittavan aineen pitoisuuden ja tulosten välille lineaarinen korrelaatio (Matveinen ym. 2005, 28). Lineaarisuutta arvioimalla voidaan määrittää mittausalue (measuring range), jossa standardisuoraa voidaan pitää lineaarisena. Kvantitatiivisessa analytiikassa menetelmille tulee määrittää mittausalue, jossa menetelmää voidaan luotettavasti käyttää. Mittausalue on yleensä lineaarinen alue. (Mäkinen ym. 1996, 16.)

Korrelaatiokerroin kuvaa kalibroitipisteiden osumista standardisuoralle. Korrelaatiokertoimen arvo voi saada arvoja -1 – $+1$. Mitä enemmän kertoimen arvo poikkeaa yhdestä, sitä enemmän hajontaa liittyy kalibroitimittauksiin tai vaihtoehtoisesti kalibrointi ei ole lineaarinen. (Jaarinen & Niiranen 2008, 25.)

Lineaarisuus määritetään yleensä nollanäytteellä ja vähintään viidellä tunnetun pitoisuuden standardinäytteellä. Näiden standardinäytteiden pitoisuuksien tulisi kattaa haluttu mittausalue (Matveinen ym. 2005, 28). Mittausalue voi kuitenkin sisältää useita lineaarisia alueita, joissa voidaan käyttää esimerkiksi eri standardisuoria suurille ja pienille näytepitoisuuksille (Mäkinen ym. 1996, 16).

4.4.4 Toteamis- ja määritysraja

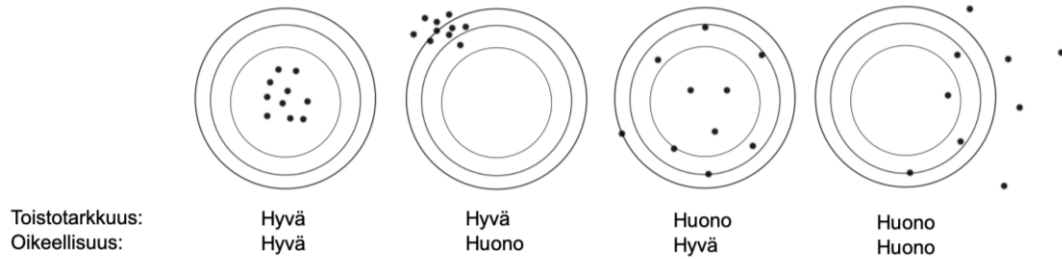
Toteamisraja (limit of detection, LOD) kuvaa määritettävän aineen pienintä pitoisuutta, joka voidaan todeta luotettavasti. Tämän pitoisuuden tulee poiketa nollanäytteen aiheuttamasta signaalista huomattavasti. Määritysraja (limit of determination/quantitation, LOQ) kuvaa määritettävän aineen pienintä pitoisuutta, joka voidaan määrittää luotettavasti. Toteamisrajan ja määritysrajan väliin jää harmaa alue, jossa määritettävä aine voidaan havaita mutta sen pitoisuutta ei voida määrittää luotettavasti. Pieniä pitoisuuksia määrittäessä on tärkeää tietää, että milloin menetelmällä voidaan luotettavasti määrittää tutkittavaa ainetta. (Matveinen ym. 2005, 29–30).

4.4.5 Häiriökestävyys ja toimintavarmuus

Häiriökestävyys (ruggedness) kuvaa menetelmän tulosten herkkyyttä pienille muutoksille olosuhteissa ja suorituksen eri vaiheissa. Toimintavarmuus (robustness) kuvaa menetelmän tulosten herkkyyttä mittausten menetelmän yksityiskohtien muutoksille. Häiriökestävyyttä ja toimintavarmuutta määrittäessä aiheutetaan tarkoituksella pieniä muutoksia menetelmän suoritukseen ja tutkitaan näiden muutosten aiheuttamaa muutosta tuloksissa. Muutoksia voivat olla esimerkiksi eri lämpötila, pH-arvo, reagenssien ikä ja määrityksen suorittava henkilö. (Matveinen ym. 2005, 33.)

4.4.6 Tarkkuus

Tarkkuus (accuracy) kuvaa mitatun tuloksen ja todellisen arvon yhteen pitävyyttä. Tarkkuus kertoo mittauslaitteelle sen kyvyn antaa tuloksia, jotka vastaavat todellista arvoa. (Matveinen ym. 2005, 35.) Tulosjoukolle tarkkuus kuvaa tulosten systemaattista ja satunnaista virhettä. Tällöin puhutaan mittausten oikeellisuudesta ja toistotarkkuudesta. Kuvassa 2 on esitetty toistotarkkuuden ja oikeellisuuden eroa. (Lehtonen 2002, 96.)



Kuva 2. Toistotarkkuus ja oikeellisuus

Oikeellisuus (trueness) kuvaa useiden mittausten tulosten keskiarvon yhteen pitävyttä todellisen arvon kanssa. Tämä kuvaa menetelmän systemaattista virhettä. Kun oikeellisuus on hyvä, voidaan ajatella, että menetelmällä ei ole systemaattista virhettä tai sitä on todella vähän. (Matveinen ym. 2005, 35.) Toistotarkkuus (precision) kuvaa tunnetuissa olosuhteissa tehtyjen mittausten keskinäistä virhettä. Tämä ilmaistaan yleensä hajontana. (Matveinen ym. 2005, 35.) Toistotarkkuus kuvaa menetelmän satunnaisvirhettä. Analyysimenetelmän toistotarkkuuden määrittämiseen liittyvät läheisesti toistettavuus ja uusittavuus. (Lehtonen 2002, 96.)

Menetelmän oikeellisuus kuvataan yleensä poikkeaman avulla prosentteina. Oikeellisuus voidaan määrittää mittaamalla useita, yleensä 6–10, rinnakkaisnäytettä, joiden tarkka pitoisuus tiedetään. Tuloksista lasketaan kaavan (8) avulla suhteellinen poikkeama. Poikkeaman merkitsevyyttä voidaan arvioida kaavalla (9) eli t-testillä. Mikäli t-testissä t-arvo on pienempi kuin t-taulukkoarvo poikkeamalla ei ole merkitystä mittauksiin.

$$B(\%) = \frac{X_{ka} - T}{T} \cdot 100 \%, \quad (8)$$

jossa B% on suhteellinen poikkeama teoreettisesta arvosta, X_{ka} on mittausten keskiarvo ja T on teoreettinen arvo. (Matveinen ym. 2005, 31.)

$$t = \frac{|X_{ka} - T|}{\frac{s}{\sqrt{n}}}, \quad (9)$$

jossa t on t-testiarvo, X_{ka} on mittausten keskiarvo, T on teoreettinen arvo, s on keskihajonta ja n on havaintojen lukumäärä. (Mäkinen ym. 1996, 34.)

4.4.7 Toistettavuus

Toistettavuus (repeatability) kuvaa menetelmän peräkkäisten mittaustulosten paikkansapitävyyttä, kun mittaukset tehdään samoissa olosuhteissa. Tämä tarkoittaa, että mittaukset tehdään lyhyellä aikavälillä, samoilla laitteilla ja saman tekijän toimesta. Toistettavuus määritetään tekemällä useita rinnakkaismäärittäyksiä erilaisilla näytteillä ja eri pitoisuuksilla. (Mäkinen ym. 1996, 41.)

Näytesarjoilla sisäinen vaihtelu on yleensä pienempää kuin näytesarjojen välinen vaihtelu. Jos näin ei ole, tulee asiaa tutkia. Syy vaihteluun voi löytyä analyysitekijöistä, jotka pysyvät näytesarjan sisällä samoina, mutta muuttuvat sarjojen välillä. Näitä tekijöitä voivat olla esimerkiksi lämpötila, säilyvyys ja homogeenisuus. (Matveinen ym. 2005, 37.) Standardisuoran muutokset voivat vaikuttaa osaltaan sarjojen väliseen hajontaan. Sarjojen sisäiseen hajontaa puolestaan voi vaikuttaa kontaminaatio. (Mäkinen ym. 1996, 41.)

4.4.8 Uusittavuus

Uusittavuus (reproducibility) kuvaa menetelmän peräkkäisten mittaustulosten paikkansapitävyyttä, kun mittaukset tehdään muuttuneissa olosuhteissa. Näitä muuttuneita olosuhteita voivat olla esimerkiksi mittausperiaate, mittauslaite, mittausmenetelmä, havainnoitsija, paikka ja aika. Uusittavuus kertoo siis tulosten täsmällisyydestä, kun mittaukset tehdään samalla menetelmällä, samasta näytteestä mutta eri laboratoriossa, eri laitteilla ja eri henkilön toimesta. Uusittavuutta tutkitaan laboratorioden välisillä vertailukokeilla erityisesti standardoinnin yhteydessä. Laboratorion sisäistä uusittavuutta voidaan tutkia tekemällä samalla näytteellä useita mittauksia pitkän ajan kuluessa. (Matveinen ym. 2005, 37.)

4.4.9 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus (measurement uncertainty) kuvaa mittausvirheen suuruutta (Ellison & Williams 2012, 4). Tämä arvioi siis tulosten osumista tiettyjen rajojen sisälle. Mittausepävarmuutta käytetään, koska yksittäisen mittauksen virhettä ei tiedetä. Yleensä mittausepävarmuus ilmaistaan laajennettuna epävarmuutena, jossa peittävyyskerroin k on 2, mikä vastaa luottamustasoa 95 %. (Jaarinen & Niiranen 2008, 35–36.)

Mittausvirhe koostuu satunnaisvirheestä ja systemaattisesta virheestä, jotka yhdessä muodostavat kokonaisvirheen (Lehtonen 2002, 97). Satunnaisvirhettä on mahdoton ennustaa ja sitä esiintyy jokaisessa mittauksessa. Tämä johtuu siitä, että mittauksissa on monia muuttujia, joiden vaikutusta on mahdotonta ennustaa. Systemaattinen virhe aiheuttaa tulosten keskiarvon liikkumista johonkin suuntaan. Tämä voi johtua esimerkiksi virheellisestä kalibroinnista tai laitteen kontaminaatiosta. Systemaattinen virhe voidaan tunnistaa ja näin ollen myös poistaa mittauksista. Arvioimalla satunnaisvirhe ja systemaattinen virhe, voidaan mittausepävarmuus määrittää. (Ellison & Williams 2012, 5, 6.)

Systemaattinen virhe voidaan arvioida kaavan (10) avulla ja satunnaisvirhe kaavojen (11) ja (12) mukaisesti. Yhdistetty mittausepävarmuus saadaan yhdistämällä eri virhekomponentit yhteen kaavan (13) avulla ja edelleen laajennettu mittausepävarmuus kaavan (14) avulla.

$$S_{dr}(\%) = \sqrt{\frac{\sum [d(\%) - d(\%)_{ka}]^2}{n - 1}}, \quad (10)$$

jossa $S_{dr}(\%)$ on systemaattinen virhe, $d(\%)$ on määrittämisen ja teoreettisen arvon suhteellinen erotus, $d(\%)_{ka}$ on suhteellisten erotusten keskiarvo ja n on havaintojen lukumäärä. (Mäkinen ym. 1996, 57.)

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum [s_{rel}(\%)]^2}{n}}, \quad (11)$$

jossa s_r on yhdistetty suhteellinen keskihajonta, s_{rel} (%) on suhteellinen keskihajonta (%) ja n on havaintojen lukumäärä. (Mäkinen ym. 1996, 49.)

$$x(95\%) = \pm t_{0,05} \cdot s_r, \quad (12)$$

jossa x (95 %) on satunnaisvirhe luottamisvälillä 95 %, $t_{0,05}$ on t-taulukkoarvo (1-suuntainen testaus ja 95 %-todennäköisyys) ja s_r on yhdistetty suhteellinen keskihajonta. (Mäkinen ym. 1996, 49.)

$$u_c = \sqrt{\sum u_i^2}, \quad (13)$$

jossa u_c on yhdistetty mittausepävarmuus ja u_i on epävarmuustekijä. (Mäkinen ym. 1996, 54.)

$$U = k \cdot u_c, \quad (14)$$

jossa U on laajennettu mittausepävarmuus, u_c on yhdistetty mittausepävarmuus ja k on peittävyyskerroin. (Mäkinen ym. 1996, 54.)

4.5 Vertailumateriaalit ja niiden hyödyntäminen

Vertailumateriaali on materiaali tai aine, joka on riittävän homogeeninen, vakaa ja tunnettu, jolloin sitä voidaan käyttää mittauslaitteen kalibrointiin, mittausmenetelmän arviointiin tai materiaalien määrittämiseen. Vertailumateriaalit voidaan jakaa eri tyyppeihin, kuten puhtaisiin aineisiin, standardiliuoksiin, vertailumateriaaleihin ja vertailukappaleisiin. Vertailumateriaalien kemiallinen koostumus on määritelty tietyssä väliaineessa tai synteettisessä seoksessa. (Matveinen ym. 2005, 39.)

Kansainvälinen standardisointijärjestö ISO on luokitellut vertailumateriaalit varmennettuihin (CRM, certified reference material) ja varmentamattomiin vertailumateriaaleihin (RM, reference materials). Varmennettu eli sertifioitu vertailuma-

teriaali on materiaali, jonka ominaisarvo on varmennettu. Tällä saadaan varmistettua jäljitettävyys halutuille ominaisuuksille. Vertailumateriaalin mukana tulee sertifikaatti, jossa on tiedot jäljitettävyydestä sekä mittausepävarmuudesta. (Matveinen ym. 2005, 39–40.)

Vertailumateriaalit ovat tärkeitä apuvälineitä mittausmenetelmien kehittämisessä ja validoinnissa. Esimerkiksi systemaattisen virheen määrittämisessä sopivalla vertailumateriaalilla voidaan arvioida menetelmän mittausepävarmuudesta. Näitä vertailumateriaaleja voidaan käyttää myös muissa validoinnin parametrien määrittämisissä, kuten selektiivisyyden ja spesifisyyden määrittämisessä ja oikeellisuuden ja toistotarkkuuden määrittämisessä. Vertailumateriaalin tulee olla mahdollisimman lähellä validoitavassa menetelmässä käytettävää matriisia ja konsentraatiota. Parasta olisi käyttää myös montaa sopivaa vertailumateriaalia. (Matveinen ym. 2005, 41–42.)

5 Menetelmän kehitys

5.1 Käytetty standardi

Menetelmä on spektrofotometrinen menetelmä, joka perustuu standardiin ISO 13358 (ISO 13358 1997). Standardin menetelmä perustuu siihen, että sulfidi siirretään näytteestä kantajakaasun avulla sinkkiasetaattiliuokseen. Sulfidi saadaan helposti haihtuvaan muotoon käyttämällä reaktioastiassa pH 4 puskuria ja EDTA liuosta. Tästä muodostuva rikkivety saadaan siirrettyä typpikaasun avulla sinkkiasetaattiabsorptioliuokseen. Tähän liuokseen lisätään happamaksi tehtyä dimetyyli-*p*-fenyyli-diamiiniliuosta, jolloin se muodostaa sulfidin kanssa leukometyleenisinisen värin. Kun tähän liuokseen lisätään rauta(III)ioneja, leukometyleenisininen hapettuu metyleenisiniseksi. Tämän absorbanssi mitataan aallonpituudella 665 nm.

Menetelmässä värjäysreagensseina toimivat hapan dimetyyli-*p*-dimetyylifenyyli-diamiini ja ammoniumrauta(III)sulfaatti. Kantajakaasuna toimii analyysilaatuinen typpikaasu. Laimennuksissa ja reagenssien valmistuksessa käytettiin ultrapuhdasta vettä, josta oli poistettu happi keittämällä sitä 20 min. Tämä tehtiin rikkivedyn hapettumisen estämiseksi. Hapeton vesi valmistettiin käyttöpäivittäin, millä varmistettiin tulosten luotettavuus. (ISO 13358 1997, 2.)

Standardilla (ISO 13358 1997) voidaan määrittää sulfidia pitoisuusalueella 0,04 mg/l – 1,5 mg/l. Laimentamalla näytettä voidaan määrittää myös korkeampia pitoisuuksia. Veteen liukenevat sulfidit voidaan määrittää kokonaisuudessaan ja liukenemattomat sulfidit voidaan määrittää joko kokonaan tai osittain riippuen niiden ominaisuuksista, kuten ikääntymisestä. Ikääntyneessä näytteessä sulfidit voivat haihtua vedestä, jolloin niiden määrittäminen ei onnistu (Chou 2003, 6). Polysulfideja ei pystytä määrittämään tällä menetelmällä kokonaan ja joitain sulfideja ei pystytä määrittämään lainkaan, kuten elohopeasulfidia (ISO 13358 1997, 1).

Jotkin ionit, kuten syanidi tai jodidi, voivat häiritä menetelmää, jos näiden pitoisuus on tarpeeksi suuri. Seuraavat ionit eivät häiritse menetelmää, kunhan niiden

pitoisuus ei ylitä annettuja raja-arvoja. Syanidi raja-arvolla 2 mg/l, jodidi raja-arvolla 20 mg/l, Sulfiitti raja-arvolla 700 mg/l, tiosulfaatti raja-arvolla 900 mg/l ja tiosyanaatti raja-arvolla 900 mg/l. Lisäksi hiilisulfidi raja-arvolla 10 mg/l ja etaanitioli raja-arvolla 1 mg/l eivät aiheuta virhettä mittauksiin. (ISO 13358 1997, 1.)

5.2 Näytteen käsittely

Näytteen käsittely toteutetaan standardin (ISO 13358 1997, 5) osoittamalla tavalla. Näyte säilötään hiokselliseen pulloon, johon lisätään 10 ml sinkkiasetaattia, jonka päälle lisätään näyte. Tästä säädetään pH natriumhydroksidilla välille 8,5–9. Tämä vaihe on näytteenottajan vastuulla, sillä näyte tulee säilöä, jos näytettä säilytetään yli 15 min ennen mittausta. Näytteen käsittelyn voi myös toteuttaa ISO 5667-3 standardin mukaan.

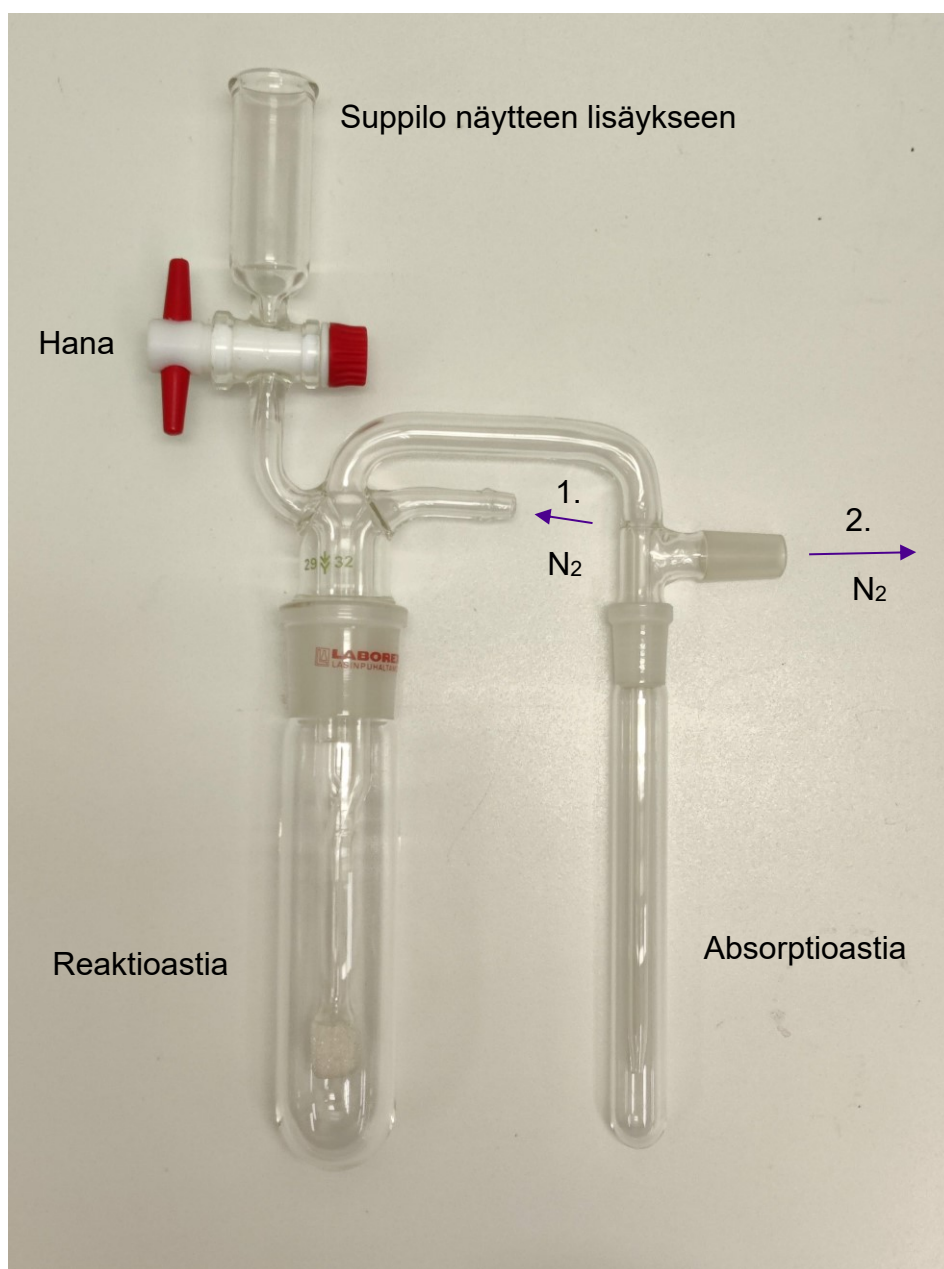
5.3 Pikamenetelmän käyttöönotto

Työ alkoi niin sanotun pikamenetelmän testaamisella. Pikamenetelmä vastaa ISO 13358 standardissa oleva menetelmää, jossa määritetään kalibroitaisuoran standardien pitoisuudet.

Tässä jätetään kuplittaminen pois ja lisätään värjäysreagenssit suoraan näytteisiin. Tällä tavalla tehtiin standardit ja standardisuora. Lisäksi pikamenetelmää kehitettiin matriisia sisältäviin näytteisiin, mutta näiden kohdalla huomattiin, että värikkäät matriisit aiheuttavat virhettä. Tästä voitiin todeta, että kuplitusmenetelmä on tarpeellinen. Pikamenetelmän kanssa käytettiin aikaa noin kaksi viikkoa ennen kuin saatiin kuplittamiseen tarvittavat välineet. Näiden kahden viikon aikana pikamenetelmän todettiin kuitenkin olevan toimiva ja sitä käytettiin todentamaan työliuoksen pitoisuutta muutamissa kuplitusmenetelmän testeissä, koska pikamenetelmä on nopeampi kuin titrausmenetelmä.

5.4 Kuplitusmenetelmän käyttöönotto

Kuplitusmenetelmää päästiin toteuttamaan noin kahden viikon kuluttua työn alkamisesta, koska menetelmään tarvittavaa tyyppiä odotettiin. Kuplitusmenetelmälle alku oli haastava ja luotettavia tuloksia oli vaikea toteuttaa. Kuplitusmenetelmälle käytettiin standardin mukaisesti pikamenetelmän standardisuoraa. Käytössä kuplitukseen oli kuvassa 3 esitetty laitteisto. Kuvassa 3 olevassa laitteistossa reaktioastiana toimii 100 ml koeputki, jossa on kuplituslaitteeseen sopiva hios. Absorptioastiana toimii 25 ml hioksellinen koeputki.

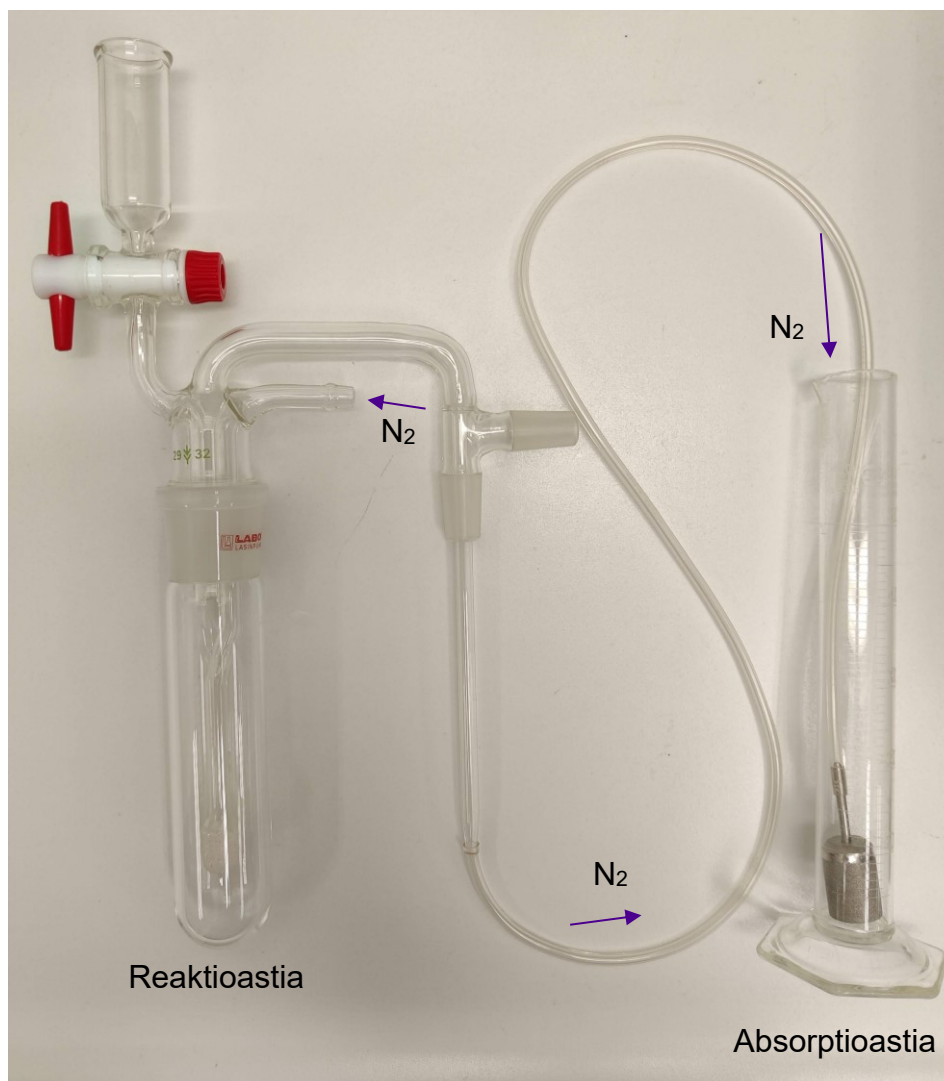


Kuva 3. Sulfidin johtamislaitteisto

Kuvan 3 laitteistossa typpi johdetaan reaktioastiaan nuolen 1. suunnasta. Typpi, jonka mukana rikkivety kulkeutuu, siirtyy reaktioastiasta lasiputkea pitkin absorptioastiaan. Absorptioastiassa rikkivety jää absorptioliuokseen. Typpi pääsee ulos nuolen 2. suuntaan.

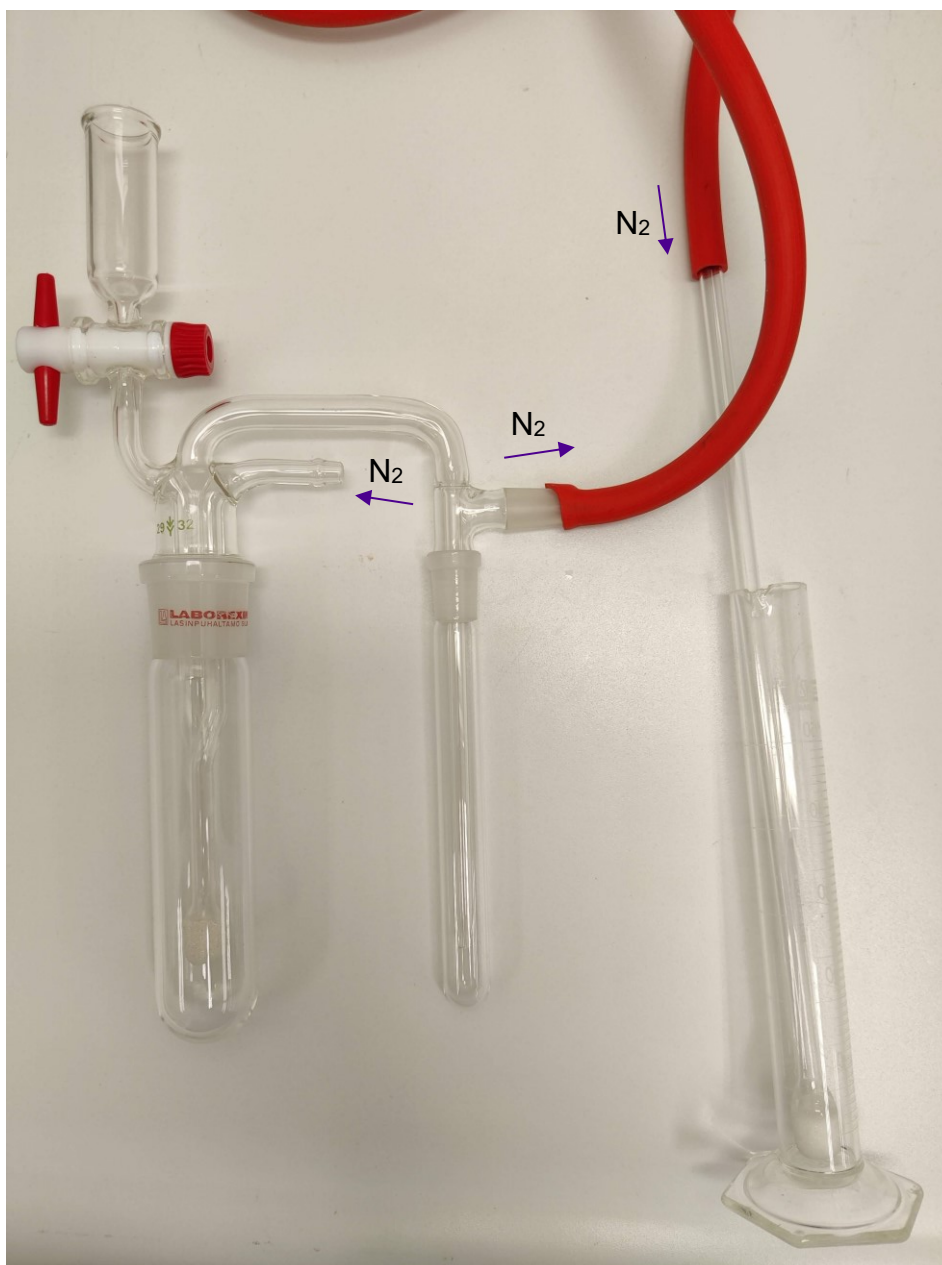
Ensimmäisellä yrityksellä kokeiltiin laitteen toimivuutta ja kuplitettiin vettä. Tästä huomattiin, että käytössä olevalla laitteistolla veden pysyminen absorptioastiassa oli haastavaa, sillä käytössä olleesta pienestä koeputkesta, vesi pulppusi ulos typen mukana.

Tähän haettiin ratkaisua etsimällä sopivampaa absorptioastiaa, jota ei kuitenkaan heti löytynyt. Koska kuplitusta oli hankala toteuttaa, päätettiin typpivirta johtaa mittalasiin muoviletkulla, jonka päässä on kuplituspää. Tämä laitteisto on esitetty kuvassa 4. Laitteistolla saatiin jonkin verran sulfidia absorptioliuokseen, muttei kuitenkaan koko määrää. Mitattu sulfidipitoisuus oli 0,074 mg/l ja todellinen sulfidipitoisuus oli 0,5 mg/l.



Kuva 4. Kuplituslaite, jossa typpi johdetaan mittalasiin

Näiden tulosten pohjalta testattiin, katoaako sulfidia ensimmäisen absorptioastian ohi. Kuvassa 5 on esitetty laitteisto, jossa ensimmäisestä absorptioastiasta typpi johdetaan letkulla toiseen astiaan. Letkun päässä on taas kuplittajapää ja absorptioastiana toimii mittalasi. Koska ensimmäinen astia on pieni koeputki, standardissa mainittua sinkkiasetaatin määrää jouduttiin vähentämään puoleen eli 10 ml, mutta mittalasiin saatiin laitettua standardin ohjeen mukainen 20 ml sinkkiasetaattia. Tästä huomattiin, että ensimmäisestä absorptioastiasta ei pääse sulfidia läpi. Tästä pääteltiin, että joko sulfidi reagoi jonkin kanssa tai sulfidia jää reaktioastiaan ja siksi sulfidipitoisuus näyttää pieneltä. Mitattu sulfidipitoisuus oli 0,112 mg/l ensimmäisessä astiassa, toisessa astiassa sulfidipitoisuus oli 0,014 mg/l ja todellinen sulfidipitoisuus oli 0,3 mg/l.



Kuva 5. Laitteisto, jossa 2 absorptioastiaa

Seuraavaksi haluttiin tutkia jääkö sulfidia reaktioastiaan tunnin kuplituksen jälkeen. Sulfidipitoisuuden määrittäminen ei kuitenkaan onnistu kolorimetrisellä menetelmällä reagenssiliuoksesta, koska reagenssiliuoksessa oleva EDTA haittaa määrittystä. Reagenssiliuoksessa oleva EDTA reagoi raudan kanssa nopeammin kuin rauta ehtii reagoida värjäysreagenssin kanssa ja metyleenisinistä väriä ei pääse syntymään. Tästä syystä seuraavista testeistä jätettiin EDTA pois. EDTA toimii kuplituksessa apuaineena ja toisessa sulfidin määrittämiseen soveltuvassa standardissa SFS 3042 (1977) sitä ei käytetä lainkaan, joten menetelmän pitäisi toimia. Lisäksi ilman EDTA:ta olevan reagenssiliuoksen pitoisuus kokeiltiin tun-

netulla pitoisuudella ilman kuplitusta pikamenetelmällä, jotta huomataan voiko ilman EDTA:ta olevasta reagenssiliuoksesta määrittää sulfidipitoisuutta. Tässä määrittämisessä ei havaittu ongelmia ja kaikki sulfidi pystyttiin määrittämään, joten kuplitusta testattiin ilman EDTA:ta.

Ilman EDTA:ta tehdyissä testeissä kaikki sulfidi näyttää kadonneen reaktioastiasta tunnin kuplituksella, mutta absorptioastiassa on edelleen liian vähän sulfidia. Tästä pääteltiin, että absorptioliuoksessa on jotain vikaa tai että sulfidi pääsee haihtumaan jostain välistä laitteistosta. On myös mahdollista, että ilman EDTA:ta reaktioastiassa kuplitus toimii eri tavalla ja näin ollen menetelmän toimivuutta ei voi arvioida tällä kokeilulla.

Seuraavaksi haluttiin varmistua, että sulfidia ei pääse katoamaan huonoista liitoksista. Joten tästä eteenpäin kiinnitettiin erityistä huomiota siihen, että liitokset ovat tiiviit ja kaikissa kokeiluissa niiden havaittiin olevan ilmatiiviit. Tämä kokeiltiin vesi saippualiuoksella ja mistään välistä ei havaittu tulevan kuplia. Lisäksi kiinnitettiin myös erityistä huomiota näytteen lisäämiseen, sillä sulfidi saattaa ehtiä haihtumaan näytettä lisättäessä, jos näyte muuttuu nopeasti rikkivetykaasuksi. Tämä kuitenkin pyrittiin minimoimaan käyttämällä laitteistossa olevaa suppiloa näytteen lisäämiseen. Näilläkin erityishuomioilla ei havaittu sulfidipitoisuuden lisääntymistä ja tulokset olivat edelleen vähän liian matalia. Mitattu sulfidipitoisuus oli 0,246 mg/l ja todellinen sulfidipitoisuus oli 0,4 mg/l.

Näiden tulosten pohjalta päätettiin kokeilla, onko absorptioliuoksessa jotain vikaa. Tämä aloitettiin tekemällä uusi absorptioliuos, jolla tehtiin kuplituskokeilu. Tämän kokeilun tulos oli samanlainen kuin aikaisemminkin ja saatu sulfidipitoisuus oli 0,274 mg/l, kun todellinen sulfidipitoisuus oli 0,4 mg/l. Seuraavaksi päätettiin kokeilla absorptioliuoksen kuplittamista. Tämä toteutettiin kuplittamalla absorptioliuosta, johon oli suoraan lisätty näytettä. Tätä seosta kuplitettiin tyypellä 30 min ja tulos oli saman suuntainen kuin standardin mukaisesti kuplitetulla näytteellä. Mitattu sulfidipitoisuus oli 0,284 mg/l ja todellinen sulfidipitoisuus oli 0,4 mg/l. Tästä huomiosta seuraten päätettiin kokeilla toisen standardin (SFS 3042 1977) absorptioliuosta. Tämän toisen standardin absorptioliuokseen ei kuitenkaan saatu jäämään sulfidia muutaman kuplituskokeilun aikana ja, koska aika oli käymässä vähiin, päätettiin tämä absorptioliuos unohtaa.

Standardin ISO 13358 absorptioliuoksen kanssa havaittiin jatkuvasti liian pieniä tuloksia. Tässä vaiheessa päätettiin kokeilla, että onko sulfidin häviäminen kuplituksen aikana lineaarista ja onko mahdollista kuplittaa kaikki standardit ja tehdä niistä oma standardisuora. Tämä menetelmä näytti toimivan ja siitä saatu standardisuora vaikutti hyvältä. Tätä standardisuoraa käytettiin validoinnissa sulfidin määrittämiseen kuplitusmenetelmällä. Lopullinen kuplituslaite on kuvan 3 mukainen laitteisto, mutta suuremmalla 25 ml koeputkella absorptioastiana.

5.4.1 Matriisi

Menetelmän kehityksessä käytettiin kolmea eri matriisia, jotta saavutettaisiin laaja kuva matriisin vaikutuksesta. Näillä kolmella matriisilla havaittiin kuitenkin, että ne kuohuivat, kun niihin ohjattiin typpivirta. Näillä näytteillä reaktioastiana käytetty koeputki osoittautui liian pieneksi ja näytettä pääsi reaktioastiasta absorptioastiaan. Tämän seurauksena reaktioastiaksi otettiin suurempi 250 ml keit-topullo sopivalla hioksella, joka oli sopivan pituinen kuplituslaitteelle.

Kuvassa 6 on esitetty tämä suuremmalla reaktioastialla varustettu kuplituslaitteisto. Mittauslaitteistoa ei ehditty kokeilemaan kuin yhdellä matriisilla, mutta ennen menetelmän käyttöönottoa on tarpeellista tutkia muillakin matriiseilla kuplituksen tuloksia. Tästä syystä matriisin vaikutus validointia ei ehditty tekemään täydellisesti.



Kuva 6. Kuplituslaitteisto suuremmalla reaktioastialla

6 Sulfidin määritysanalyysin validointi

Validoinnissa oli tarkoitus varmistaa uuden menetelmän toimivuus ja osoittaa menetelmän soveltuvan sulfidin määrittämiseen jätevesinäytteistä. Tavoitteena oli siis uuden menetelmän käyttöönotto, jonka validointi suoritettiin validointisuunnitelman mukaisesti.

6.1 Validointisuunnitelma

Validointisuunnitelma tehtiin yhdessä Rauman vastaavan kemistin kanssa validoinnin aikana ja sitä ennen. Lisäksi suunniteltiin koesarjoja ja validointiparametreja. Validoinnissa haluttiin kiinnittää erityistä huomiota tulosten luotettavuuteen, sillä menetelmä on vielä uusi laboratoriolle. Validoinnista riitti suppea validointi, koska menetelmä on standardin mukainen (Jaarinen & Niiranen 2008, 11–15). Validoinnin tuloksia oli tarkoitus hyödyntää validointiraportin tekemisessä ja laboratorion sisäisessä laadunvalvonnassa.

6.1.1 Koesarjat

Koesarjoiksi valittiin nollanäytteitä, matriisia sisältäviä näytteitä ja näytteitä, joissa ei ollut matriisia. Kaikki materiaalit olivat itse valmistettuja ja niiden pitoisuudet olivat tiedossa. Näytteissä käytetyt sulfidiliuokset valmistettiin analyysilaatuisista natriumsulfidikiteistä ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$). Sulfidin kantaliuosten tarkka pitoisuus määritettiin ennen analysointia tirusmenetelmällä. Optimitilanteessa käytössä olisi ollut varsinaisia näytteitä ja referenssinäytteitä, joiden pitoisuudet ovat tarkasti tiedossa.

6.1.2 Validointiparametrit

Validointiparametreiksi päätettiin ottaa standardisuoran lineaarisuus, määrittäminen raja, mittausepävarmuus sekä näytematriisin vaikutus mittaukseen. Lisäksi tutkittiin, miten metyleenisininen väri säilyy, kun näytettä säilytetään kylmässä. Nämä

parametrit valittiin validoinnin tarkoituksen mukaan ja näillä voitiin osoittaa laitteen toiminta määrittelyissä.

6.2 Pikamenetelmä

Pikamenetelmälle tehtiin validoinnissa kaikki validointisuunnitelman mittaukset eli standardisuoran lineaarisuus, määrittelyraja, mittausepävarmuus sekä tutkittiin matriisin vaikutusta mittaukseen.

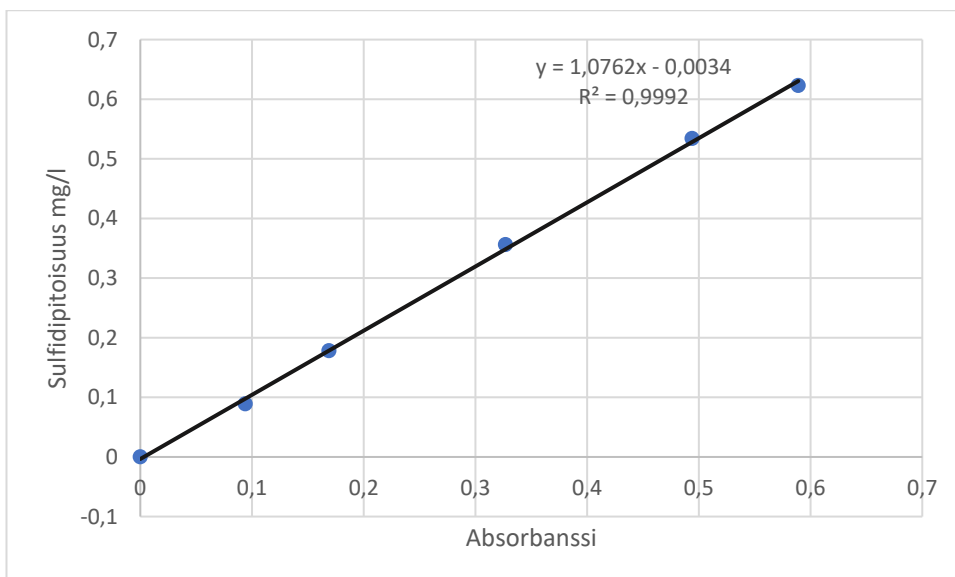
6.2.1 Standardisuoran lineaarisuus pikamenetelmälle

Lineaarisuutta varten valmistettiin tunnetun pitoisuuden omaavat standardit. Standardit valmistettiin kantaliuoksesta, jonka pitoisuus varmistettiin titrausmenetelmällä. Näytteet laimennettiin hapettomalla ultrapuhtaalla vedellä. Standardien pitoisuudet ja niiden antamat absorbanssit on esitetty taulukossa 2.

TAULUKKO 2. Standardien pitoisuudet ja absorbanssit

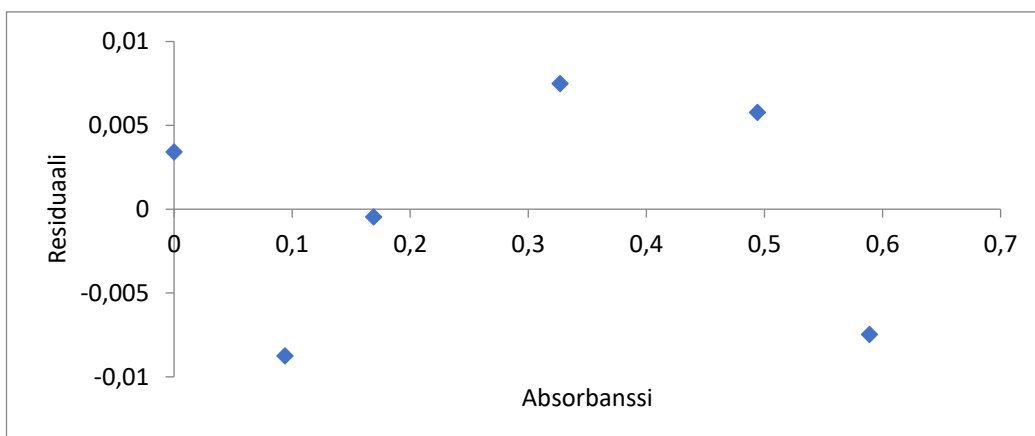
Standardi	Pitoisuus	Absorbanssi
0	0	0
1	0,089	0,094
2	0,178	0,169
3	0,356	0,327
4	0,534	0,494
5	0,623	0,589

Pikamenetelmälle saatiin laskettua standardien absorbansseista standardisuora, joka on esitetty kuviossa 1. Standardisuorassa sulfidipitoisuus on esitetty absorbanssin funktiona. Tämän lisäksi kuviossa 1 on myös esitetty suoran korrelaatiokerroin ja suoran kaava.



Kuvio 1. Pikamenetelmän standardisuora

Pikamenetelmän standardisuoran korrelaatiokerroin on 0,9992 ja kulmakerroin on 1,0762. Kuviossa 2 on esitetty standardisuoran residuaalikuvaaja.



Kuvio 2. Sulfidin residuaalikuvaaja

Residuaalikuvaajassa voidaan havaita standardien muodostavan kaaren, mikä kuvaa, että sulfidin absorbanssit eivät noudata lineaarista korrelaatiota. Kuitenkin residuaalien absoluuttinen ero on niin pieni, että tästä ei ole haittaa ja residuaalikuvaaja saattaa olla vain sattumaa. Tämä voi kuitenkin johtua myös siitä, että standardisuora on juuri lineaarisella rajalla. Tämä voitaisiin varmistaa tekemällä uudet standardit ja kokeilemalla niitä. Korrelaatiokerroin on kuitenkin suoralle hyvä ja siksi standardisuoran voidaan todeta olevan toimiva ja menetelmälle so-piva.

6.2.2 Määritysraja pikamenetelmälle

Pikamenetelmälle määritettiin määritysraja 10 rinnakkaisella mittauksella pitoisuudella 0,05 mg/l. Mittaukset tehtiin kahden päivän aikana ja molempina päivinä mitattiin 5 näytettä. Mittauksissa käytettiin kuvion 1 standardisuora absorbanssien määrittämiseen. Nämä määritysrajan tulokset on esitetty taulukossa 3. T-arvo on laskettu kaavalla 9 ja t-tilukkoarvo on katsottu Studentin t-arvotaulukosta, joka löytyy liitteenä 1.

TAULUKKO 3. Määritysrajan tulokset

	Laskettu pitoisuus (mg/l)	Mitattu pitoisuus (mg/l)
1	0,050	0,046
2	0,050	0,040
3	0,050	0,041
4	0,050	0,047
5	0,050	0,044
6	0,050	0,047
7	0,050	0,048
8	0,050	0,050
9	0,050	0,049
10	0,050	0,050
Keskiarvo, \bar{x}_{ka}	0,0462	
Keskihajonta, s	0,00352	
Laskettu t-arvo	3,413	
t-tilukkoarvo (95 %, vapausaste 9, 1-suuntainen)	1,833	

Määritysten keskiarvostakin voidaan havaita, että tulokset ovat hieman alakanttiin, mikä oli toisaalta odotettavissa, kun määritys tehdään standardien pitoisuuksien ulkopuolella. Lasketusta t-arvosta voidaan kuitenkin huomata sen olevaan suurempi kuin taulukkoarvo, joten tulokset eivät ole 95 % sisällä. Tästä johtuen menetelmää ei voida pitää validoituna määritysrajalle ja validointi pitäisi tehdä uudestaan. Määritysrajalle voidaan kokeilla korkeampaa pitoisuutta, jolloin päästään todennäköisesti lähemmäs oikeaa arvoa.

6.2.3 Mittausepävarmuus pikamenetelmälle

Mittausepävarmuus määritettiin pikamenetelmälle systemaattisen virheen ja satunnaisvirheen summana. Menetelmälle määritettiin mittausepävarmuus ja laajennettu mittausepävarmuus, koska haluttiin olla mahdollisimman kriittisiä menetelmää kohtaan.

Systemaattisen virheen määrittämisessä sulfidin pitoisuudelle laskettiin jokaiselle tulokselle teoreettisen ja mitatun pitoisuuden välinen suhteellinen ero kaavalla 8. Tästä laskettiin systemaattinen virhe kaavalla 10. Laskennan tulokset on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4. Systemaattinen virhe pikamenetelmälle

Teoreettinen (mg/l)	Mitattu (mg/l)	Suhteellinen poikkeama (%)
0,307	0,281	-8,469
0,307	0,302	-1,629
0,307	0,306	-0,326
0,307	0,304	-0,977
0,307	0,303	-1,303
0,307	0,309	0,651
0,383	0,397	3,731
0,383	0,372	-2,801
0,383	0,371	-3,062
0,383	0,372	-2,801
0,383	0,372	-2,801
0,383	0,423	10,525
0,383	0,383	0,073
0,383	0,382	-0,188
0,383	0,402	5,038
0,383	0,428	11,831
Suhteellisen poikkeaman keskiarvo (%)		0,468
Systemaattinen virhe (%)		5,145

Systemaattisen virheen suhteelliseksi arvoksi saatiin sulfidipitoisuudelle 5,145 %. Systemaattinen virhe on menetelmälle noin 5 %, mikä on vähän korkea määrittelykseen. Kuitenkin standardissa (ISO 13358 1997, 8) on mainittu kokonaisvirheen suuruudeksi noin 7 %, joten työssä tehdyt mittaukset ovat linjassa tämän kanssa.

Satunnainen virhe määritettiin mittausten rinnakkaistulosten avulla. Näille tuloksille laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta. Määrittelyt ovat samat kuin systemaattisen virheen käsittelyssä, jossa määrittely 1 ja 2 on tehty pitoisuudella 0,307 ja määrittely 3, 4 ja 5 on tehty pitoisuudella 0,383. Rinnakkaistuloksista yhdistettiin suhteelliset keskihajonnat kaavan 11 avulla koskemaan koko määrittelyä. Tästä laskettiin satunnaisvirhe luottamusvälille 95 % kaavalla 12. Nämä tulokset on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5. Satunnaisvirhe pikamenetelmälle

Määrittely	Keskiarvo	Keskihajonta	Suhteellinen keskihajonta
1	0,302	0,0045	0,0149
2	0,305	0,0032	0,0105
3	0,380	0,0147	0,0388
4	0,389	0,0032	0,0083
5	0,389	0,0113	0,0290
Yhdistetty suhteellinen keskihajonta			0,0234
Satunnaisvirhe luottamusvälillä 95 %			0,0472

Satunnaisvirheeksi saatiin menetelmälle 95 % luottamusvälillä 0,0472. Tämä on satunnaisvirheeksi hyvä ja satunnaisvirheestä ei pitäisi olla haittaa menetelmässä.

Kokonaismittausepävarmuus pikamenetelmälle laskettiin kaavalla 13. Tähän hyödynnettiin edellä laskettuja virheitä systemaattiselle ja satunnaiselle virheelle. Kokonaismittausepävarmuudesta laskettiin laajennettu mittausepävarmuus menetelmälle kaavalla 14. Nämä tulokset on esitetty alla olevassa taulukossa 6.

Taulukko 6. Pikamenetelmän mittausepävarmuudet

Kokonaismittausepävarmuus	5,145 %
Laajennettu mittausepävarmuus	10,29 %

Laajennetuksi mittausepävarmuudeksi pikamenetelmälle saatiin 10,29 %, Kun haluttu luottamusväli oli 95 %. Tulos on kohtalaisen hyvä laajennetuksi mittausepävarmuudeksi ja näihin tuloksiin voidaan olla tyytyväisiä. Standardissa (ISO 13358 1997, 8) mainitaan mittauksen kokonaisvirheeksi noin 7 %, joten tulos on siihen nähden hyvä.

6.2.4 Matriisinvaikutus pikamenetelmälle

Matriisin vaikutusta pikamenetelmälle määritettiin mittaamalla näytteitä, joiden pitoisuus tunnetaan ja joissa on jätevesimatriisia 10 ml. Jokaiselle matriisille tehtiin 5 rinnakkaista määrittystä. Menetelmälle kokeiltiin kolmea eri matriisia, joissa itessään ei ollut sulfidia. Tarkka sulfidipitoisuus määritettiin titrausmenetelmällä ja sulfidipitoisuus näytteissä oli 0,469 mg/l. Tämä menettelytapa oli toimiva, mutta parasta olisi ollut, jos olisi saatu oikeita näytteitä, joiden sulfidipitoisuus tunnetaan. Taulukossa 7 on esitetty matriisin vaikutusta mittauksiin.

Taulukko 7. Matriisin vaikutus pikamenetelmälle

Näyte	Pitoisuuden keskiarvo	Suhteellinen poikkeama (%)	t-arvo
Matriisi 1	0,388	-17,270789	2,1883
Matriisi 2	0,356	-24,093817	3,4297
Matriisi 3	0,379	-19,189765	2,5690

Kaikille matriiseille t-arvo oli yli taulukkoarvon 2,132, joten kaikkien mittausten poikkeama on merkittävä. Tämä on toki nähtävissä myös poikkeaman suuruutena, sillä kaikille matriiseille poikkeama on yli 15 %. Kaikki matriisit olivat kuitenkin

kin värillisiä liuoksia, joten poikkeaman suuruus saattaa johtua myös siitä. Matriisien väri saattaa vaikuttaa absorbanssiin, mutta myös matriisissa olevat muut aineet voivat häiritä määrittystä.

6.3 Kuplitusmenetelmä

Kuplitusmenetelmälle tehtiin validoinnissa standardisuoran lineaarisuus, mitausepävarmuus sekä tutkittiin matriisin vaikutusta. Määrittäjärajaa ei ehditty ajan puutteen vuoksi tekemään kuplitusmenetelmälle. Lisäksi matriisin vaikutus jäi vaajaaksi, sillä aika loppui kesken.

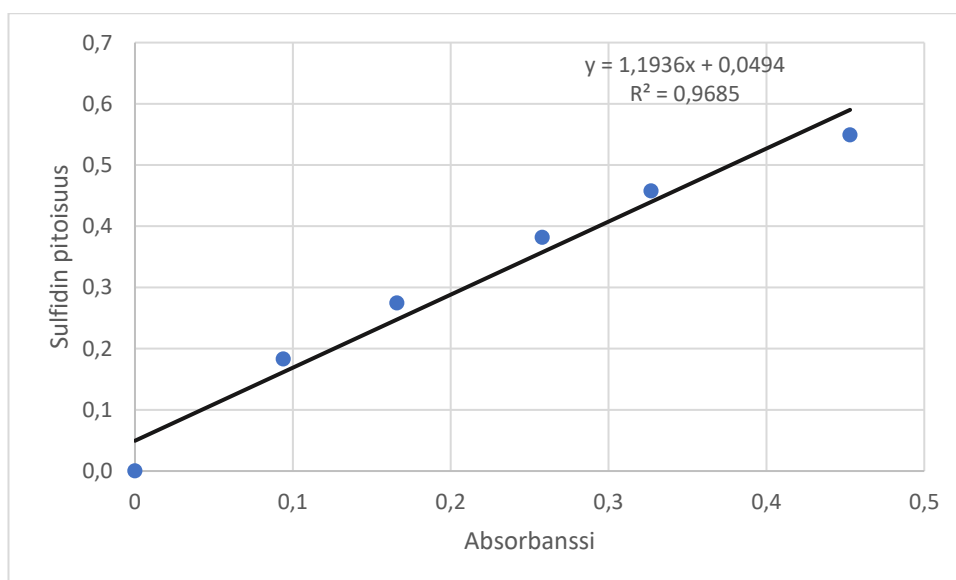
6.3.1 Standardisuoran lineaarisuus kuplitusmenetelmälle

Lineaarisuutta tutkittaessa kuplitusmenetelmällä valmistettiin tunnetun pitoisuuden omaavat standardit samoin kuin pikamenetelmälle. Standardien pitoisuudet ja niiden antamat absorbanssit aallonpituudella 665 nm on esitetty taulukossa 8.

TAULUKKO 8. Standardien pitoisuudet ja absorbanssit

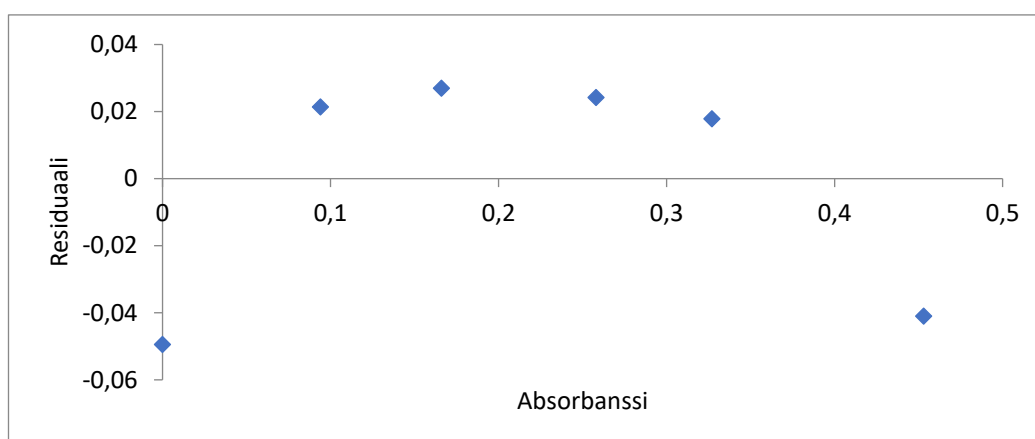
Standardi	Pitoisuus	Absorbanssi
0	0	0
1	0,183	0,094
2	0,275	0,169
3	0,382	0,258
4	0,458	0,327
5	0,549	0,453

Kuplitusmenetelmälle laskettiin standardien absorbansseista standardisuora, joka on esitetty kuviossa 3. Standardisuorassa sulfidipitoisuus on esitetty absorbanssin funktiona. Tämän lisäksi kuviossa 3 on myös esitetty suoran korrelaatiokerroin ja suoran kaava.



Kuvio 3. Kuplitusmenetelmän standardisuora

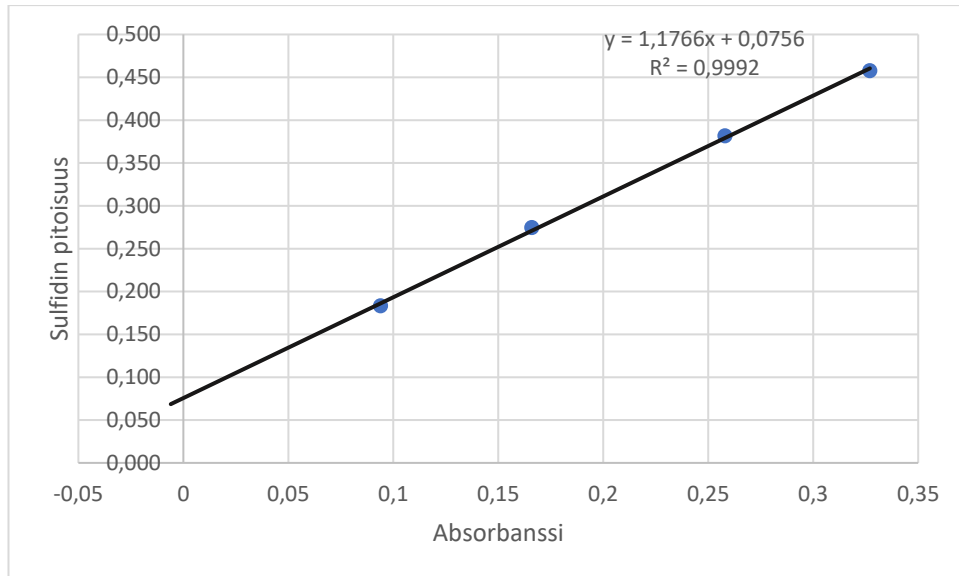
Pikamenetelmän standardisuoran korrelaatiokerroin on 0,9685 ja kulmakerroin on 1,1936. Kuviossa 4 on esitetty standardisuoran residuaalikuvaaja.



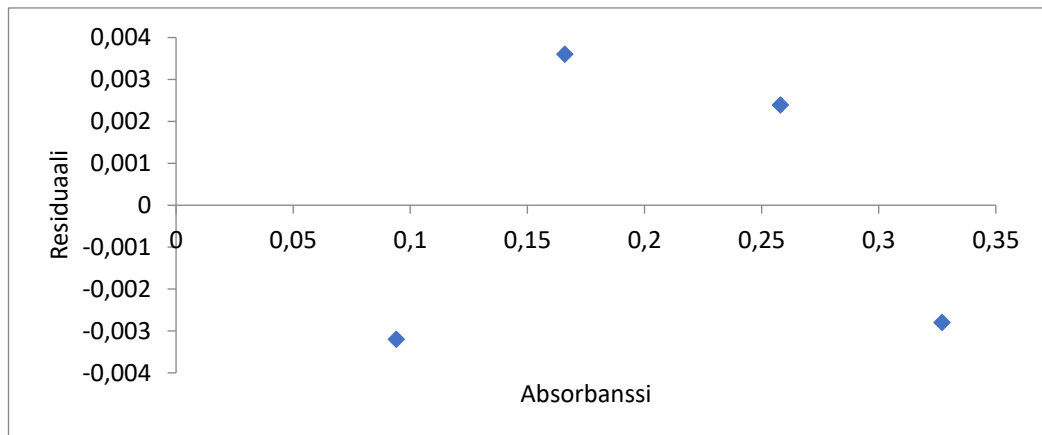
Kuvio 4. Kuplitusmenetelmän residuaalikuvaaja

Residuaalikuvaajassa voidaan havaita matalilla absorbansseilla olevan hyvin linjassa vaikkakin ne antavat liian korkeita tuloksia. Suurin standardi on taas liian pieni, mikä voi olla vain satunnainen mittavirhe. Tämä pitäisi varmistaa tekemällä uusia mittauksia. Tämä voi kuitenkin johtua myös siitä, että standardisuora on juuri lineaarisella rajalla. Nollanäyte on myös liian alhainen suoraan verrattuna. Standardisuoran laatu voitaisiin varmistaa tekemällä uudet standardit ja kokeilemalla niitä. Korrelaatiokerroin on kuitenkin suoralle siedettävä ja ennen menetelmän käyttöönottoa standardit olisi hyvä testata uudestaan, ainakin suurin standardi. Mikäli jätetään suurin standardi ja nollanäyte pois saadaan standardisuora,

jossa on hyvä lineaarisuus mutta silloin mitta-alue on pienempi. Alla kuvioissa 5 ja 6 on esitetty standardisuora ja residuaalikuvaaja ilman nollanäytettä ja suurinta standardia.



Kuvio 5. Kuplitusmenetelmän standardisuora ilman nollanäytettä ja suurinta standardia



Kuvio 6. Kuplitusmenetelmän residuaalikuvaaja ilman nollanäytettä ja suurinta standardia

Kuvioista 5 ja 6 voidaan havaita, että korrelaatiokertoimen arvo saadaan nyt hyväksi (0,9992) ja residuaalikuvaajassa pisteet asettuvat nyt paremmin nollan molemmille puolille. Nyt kuitenkin lineaarinen alue rajoittuu 0,1–0,35 mg/l, joten mitta-alue jää kovin pieneksi ja näytteitä voitaisiin joutua laimentamaan usein, mikä ei ole optimaalista laboratoriotyöskentelyn kannalta. Tämä kuitenkin osoittaa, että

menetelmässä on toivoa ja lisämäärityksillä siihen voidaan saada hyvä lineaarisuus. Kaikissa mittauksissa pitoisuuden määrittämiseen käytettiin kuitenkin kuvion 3 mukaista standardisuoraa, jossa suurin standardi ja nollanäyte ovat mukana.

6.3.2 Mittausepävarmuus kuplitusmenetelmälle

Mittausepävarmuus kuplitusmenetelmälle määritettiin samoin kuin pikamenetelmälle. Koska kuplitusmenetelmä on hitaampi kuin pikamenetelmä ja aika oli vähissä, määrittämiseen saatiin tehtyä vain 8 mittauksia tavoitteena olleen 10 sijaan. Systemaattisen virheen tulokset kuplitusmenetelmälle on esitetty taulukossa 9.

Taulukko 9. Systemaattinen virhe kuplitusmenetelmälle

Teoreettinen (mg/l)	Mitattu (mg/l)	Suhteellinen poikkeama (%)
0,38016	0,270	-2,233
0,38016	0,335	18,176
0,38016	0,258	-6,000
0,38016	0,300	7,186
0,18304	0,086	-16,931
0,18304	0,091	-13,670
0,27456	0,165	-10,277
0,27456	0,164	-10,712
Suhteellisen poikkeaman keskiarvo (%)		-4,308
Systemaattinen virhe (%)		12,628

Suhteellisen poikkeaman keskiarvo on -4,308 eli menetelmä antaa tuloksia, jotka ovat noin 4 % liian matalia, tämä on menetelmälle kuitenkin suhteellisen hyvä. Systemaattiseksi virheeksi menetelmälle tulee 12,628, mikä on melko suuri mutta näin ole odotettavissakin sillä menetelmän korrelaatiokerroin ei ole kovin hyvä. Tämä edelleen vahvistaa näkemystä, että menetelmää pitää vielä testata ja kehittää. Satunnaisvirheen tulokset kuplitusmenetelmälle on esitetty taulukossa 10

Taulukko 10. Satunnaisvirhe kuplitusmenetelmälle

Määrittäminen	Keskiarvo	Keskihajonta	Suhteellinen keskihajonta
1	0,4105	0,0549	0,134
2	0,3824	0,0354	0,093
3	0,1550	0,0042	0,027
4	0,2457	0,0008	0,003
Yhdistetty suhteellinen keskihajonta			0,082
Satunnaisvirhe luottamustasvällällä 95 %			0,176

Satunnaisvirheeksi saatiin menetelmälle 95 % luottamustasvällällä 0,176. Tämä on satunnaisvirheeksi kohtalaisen hyvä ja satunnaisvirheestä ei pitäisi olla haittaa menetelmässä. Kokonaismittausepävarmuus ja laajennettu mittausepävarmuus on esitetty taulukossa 11.

Taulukko 11. Kokonaismittausepävarmuus ja laajennettu mittausepävarmuus kuplitusmenetelmälle

Kokonaismittausepävarmuus	12,629 %
Laajennettu mittausepävarmuus	25,258 %

Kokonaismittausepävarmuudeksi saatiin kuplitusmenetelmälle 12,629 % ja laajennetuksi mittausepävarmuudeksi saatiin kuplitusmenetelmälle 26,258 %. Nämä tulokset eivät ole kovin hyviä ja tämä kertoo, että menetelmässä on suhteellisen paljon virhettä. Menetelmälle kannattaa tämänkin pohjalta tehdä lisää määrittämiä ja menetelmän kehitystä, jotta virhettä saadaan pienemmäksi.

6.3.3 Matriisin vaikutus kuplitusmenetelmälle

Matriisin vaikutus kuplitusmenetelmälle määritettiin samoin kuin pikamenetelmälle, mutta ajan puutteen vuoksi käytettiin vain 1 matriisia ja rinnakkaismäärittämiä ei ehditty tehdä kuin 5. Luotettavan tuloksen varmistamiseksi rinnakkaismäärittämiä olisi pitänyt tehdä enemmän. Taulukossa 12 on esitetty matriisin vaikutusta kuplitusmenetelmälle. Teoreettinen arvo sulfidipitoisuudelle on 0,337

mg/l ja t-taulukkoarvo 95 % peittävyydelle 1-suuntaiselle ja 4 vapausasteelle on 2,132.

Taulukko 12. Matriisin vaikutus kuplitusmenetelmään

Näyte	Pitoisuuden keskiarvo	Suhteellinen poikkeama (%)	t-arvo
Matriisi 1	0,233	-30,86053412	5,892

Tuloksista voidaan huomata, että menetelmä ei sovellu kovin hyvin kyseisen matriisin kanssa ja poikkeama on suhteellisen suuri. T-arvo on myös yli taulukkoarvon, joten poikkeamaa voidaan pitää merkittävänä. Menetelmä ei siis ole kovin toimiva matriisille. Ratkaisuksi menetelmää kannattaisi kehittää matriiseille sopivaksi ja tehdä kunnollinen validointi niille ennen menetelmän käyttöönottoa.

6.4 Ajan vaikutus väriin

Metyleenisinisen värin muuttumista ajan suhteen mitattiin kahteen otteeseen ensin päivän sisällä ja sitten monen vuorokauden ajan. Ajan vaikutusta tutkittiin absorbanssin muuttumisella. Näissä mittauksissa näytteiden tarkka pitoisuus ei ole niin oleellista, kuin muissa mittauksissa. Tässä haluttiin erityisesti tutkia, että tarvitseeko näytteet mitata heti värjäysreagenssien lisäyksen jälkeen vai voiko näytteitä mitata suuremmissa erissä, vaikka osa joutuisi odottamaan mittausta pidempään. Tulokset ilmoitetaan absorbanssina mutta se vastaa melkein suoraan sulfidipitoisuutta.

Taulukoissa 13 ja 14 aika kuvaa aikaa, joka on kulunut värjäysreagenssien lisäämisestä. Absorbanssi mitattiin aallonpituudella 665 nm ja 1,0 cm kyvetillä. Taulukossa 13 on esitetty ajan vaikutus yhden päivän aikana ja taulukossa 14 on esitetty ajan vaikutus monen vuorokauden ajalta.

TAULUKKO 13. Ajan vaikutus absorbanssiin yhden päivän aikana

Aika	Näyte ja sen absorbanssi				
	Pika I	Pika II	Pika III	Kuplitus I	Kuplitus II
15 min	0,427	0,221	0,321	0,214	0,217
2 h	0,431	0,223	0,317	0,211	0,211
4 h	0,427	0,229	0,321	0,211	0,213

TAULUKKO 14. Ajan vaikutus absorbanssiin monen vuorokauden aikana

Aika	Näyte ja sen absorbanssi				
	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5
15 min	0,094	0,166	0,305	0,327	0,453
1 vrk	0,088	0,158	0,292	0,325	0,448
2 vrk	0,086	0,154	0,290	0,326	0,450
3 vrk	0,088	0,157	0,289	0,326	0,448
6 vrk	0,086	0,156	0,283	0,322	0,446
9 vrk	0,082	0,154	0,288	0,320	0,437

Taulukossa 13 on päivän sisällä tehtyjä mittauksia. Näistä mittauksista voidaan huomata, että 15 min kohdalla mitatut absorbanssit eivät juurikaan muutu 4 h aikana. Monen vuorokauden mittauksista voidaan huomata, että absorbanssi vähenee pikkuhiljaa päivien myötä. Alla olevissa taulukoissa 15 ja 16 on esitetty prosentteina värin väheneminen verrattuna alkuperäiseen absorbanssiin, jokaiselle pitoisuudelle erikseen.

Taulukko 15. Absorbanssin muutos prosentteina alkuabsorbanssiin verrattuna yhden päivän aikana

Aika	Näyte ja sen absorbanssin muutos (%)				
	Pika	Pika	Kuplitus	Pika	Kuplitus
15min	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2 h	-0,94	-0,90	2,76	1,25	1,40
4 h	0,00	-3,62	1,84	0,00	1,40

Taulukko 16. Absorbanssin muutos prosentteina alkuabsorbanssiin verrattuna monen vuorokauden aikana

Aika	Näyte ja sen absorbanssin muutos (%)				
	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5
15 min	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1 vrk	6,38	4,82	4,26	0,61	1,10
2 vrk	8,51	7,23	4,92	0,31	0,66
3 vrk	6,38	5,42	5,25	0,31	1,10
6 vrk	8,51	6,02	7,21	1,53	1,55
9 vrk	12,77	7,23	5,57	2,14	3,53

Taulukosta 15 voidaan huomata, että päivän aikana värille ei juurikaan tapahdu muutosta ja absorbanssi pysyy 5 % sisällä toisistaan, mikä on hyvä arvo eikä lisää merkittävästi virhettä. Monen vuorokauden testissä (taulukko 16) huomataan, että pitoisuuksien ero prosentteina kasvaa keskimäärin yli 5 % kolmannen päivän kohdalla. Ennen kolmatta päivää tehtyjä tuloksia voidaan pitää luotettavina. Pitoisuudella on oletetusti myös vaikutusta muutoksen suuruuteen ja suuremmille pitoisuuksille muutos on prosentteina pienempi kuin pienille pitoisuuksille. Yli viikon odottelun jälkeen pienille sulfidipitoisuuksille (< 0,2 mg/l) voidaan odottaa jo yli 10 % virhettä absorbanssiin.

Näiden tulosten pohjalta voidaan todeta, että olisi hyvä saada mittaukset tehtyä saman päivän aikana värireagenssien lisäämisestä. Mittausta voidaan odottaa maksimissa kaksi vuorokautta värireagenssien lisäämisestä ja olettaa edelleen tulosten olevan kohtalaisen hyviä. Tällöin voidaan virheen olettaa jäävän alle 5 %, värin häipymisen takia.

7 Yhteenveto

Opinnäytetyön tarkoituksena oli käyttöönottaa ja validoida menetelmä sulfidipitoisuuden määrittämiselle jätevesistä. Validoinnilla oli ideana tarkistaa menetelmän toimivuus laboratoriossa ja käytössä olevilla välineillä.

Työ ei kulkenut täysin aikataulun mukaan sillä menetelmän käyttöönotto oli työlämpää kuin alussa oli suunniteltu. Tämän takia validointi jäi joiltain osin validointisuunnitelmasta vajaaksi ja esimerkiksi rinnakkaisia tuloksia ei saatu tarpeeksi luotettavaan validointiin. Tästä johtuen ennen menetelmän käyttöönottoa tulisi tehdä lisää määryksiä erityisesti erilaisilla matriiseilla.

Pikamenetelmä vaikuttaa toimivan hyvin mutta validoinnissa mukana oleville matriiseille se ei ole tarpeeksi luotettava menetelmä. Erilaisille matriiseille menetelmä saattaa olla toimiva mutta sen luotettavuudesta ei voida näiden tulosten perusteella antaa varmuutta. Pikamenetelmälle saatiin testattua määrysrajaa, mutta siinä tulosten keskihajonta oli liian suurta luotettavan rajan määrittämiseen. Tästä johtuen ennen pikamenetelmän käyttöönottoa tulisi määrysraja määrittää rinnakkaisilla määryksillä uudestaan. Menetelmä vaikuttaa muilta osin luotettavalta ja se voidaan niiden perusteella ottaa käyttöön laajennetulla mittausepävarmuudella 10,29 % (taulukko 6).

Kuplitusmenetelmä vaikuttaa muuten toimivalta, mutta menetelmälle tarvitsee tehdä lisää määryksiä luotettavan validointituloksen saavuttamiseksi. Matriisin kanssa mitattaessa poikkeama (taulukko 12) on liian suuri, jotta menetelmää voidaan pitää luotettavana. Kuplitusmenetelmälle tulee myös määrittää määrysraja, jotta saadaan määritettyä luotettavan määryksen raja-arvo. Kuplitusmenetelmä vaatii myös standardisuoraan korkeammalle sulfidipitoisuudelle (<0,4 mg/l) uuden määryksen. Kokonaisuudessaan kuplitusmenetelmän käyttöönotto vaihe oli onnistunut, mutta validointia joudutaan jatkamaan ennen menetelmän käyttöönottoa.

Molemmille, pikamenetelmälle ja kuplitusmenetelmälle pätee, että metyleenisininen väri poistuu näytteistä vähitellen ja mitä aikaisemmin näytteet mitataan vär-

jäysreagenssien lisäyksen jälkeen, kuitenkin 10 min odotuksen jälkeen, sitä luotettavampia tuloksia saadaan. Menetelmälle voidaan olettaa, että lisää virhettä ei tule huomattavasti, jos mittaukset tehdään kahden vuorokauden sisällä värireagenssien lisäyksestä.

Kaiken kaikkiaan molemmille menetelmille käyttöönotto oli onnistunut. Pikamenetelmä on toimiva ja se saatiin validoitua muilta osin paitsi määritysrajalle. Kuplitusmenetelmälle tarvitsee vielä tehdä lisää määrittäyksiä ennen menetelmän käyttöönottoa ja samalla menetelmälle tulee tehdä validointi.

LÄHTEET

Ahlborg, G. 1951. Hydrogen sulfide poisoning in shale oil industry. *Archives of Industrial Hygiene and Occupational Medicine*, 3.

Amoore, J. & Hautala, E. 1983. Odor as an aid to chemical safety: odor thresholds compared with threshold limit values and volatilities for 214 industrial chemicals in air and water dilution. *Journal of Applied Toxicology*, 3.

Beauchamp, R. Jr, Bus, J., Popp, J., Boreiko, C. & Andjelkovich, D. 1984. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 13.

Bhambhani, Y. & Singh, M. 1991. Physiological effects of hydrogen sulfide inhalation during exercise in healthy men. *Journal of Applied Physiology*, 71.

Bhambhani, Y., Burnham, R., Snyder, G., MacLean, I. & Martin, T. 1996. Effects of 5 ppm hydrogen sulfide inhalation on biochemical properties of skeletal muscle in exercising men and women. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 57.

Bhambhani, Y., Burnham, R., Snyder, G. & MacLean, I. 1997. Effects of 10-ppm hydrogen sulfide inhalation in exercising men and women. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 39.

Chou, C. 2003. Hydrogen sulfide: human health aspects. World Health Organization & International Programme on Chemical Safety. World Health Organization. Luettu 3.11.2021. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42638>

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

Hirsch, A. & Zavala, G. 1999. Long term effects on the olfactory system of exposure to hydrogen sulphide. *Occupational and Environmental Medicine*, 56.

IPCS. 1981. Hydrogen sulfide. World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Environmental Health Criteria 19). Geneva.

ISO 13358. 1997. Water quality – Determination of easily released sulfide. Geneva: International Organization for Standardization. Luettu 12.9.2021. Vaatii käyttöoikeuden. <https://online.sfs.fi/fi/index.html.stx>

Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. 6. painos. Helsinki: Edita.

Jäppinen, P., Vilka, V., Marttila, O. & Haahtela, T. 1990. Exposure to hydrogen sulphide and respiratory function. *British Journal of Industrial Medicine*, 47.

- Kolotitina, N. & Dolgonosov, A. 2005. Ion-chromatographic determination of borates and sulfides with the use of a developing column. *Journal of Analytical Chemistry* 60.
- Lehtonen, P. 2002. *Kemian laskut laboratoriossa*. 2. painos. Helsinki: Opetushallitus.
- Lewin, K., Walsh, J. & Miles, D. 1987. Determination of sulphide in groundwaters by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 2.
- Matveinen, K., Isotalo, H., Kantanen, M-L., Mäkinen, I., Nuotio, K., Pohjola, V., Riutta, O., Venäläinen, E-R., Ehder, T. (toim.). Hirvi, T., Komppa, V., Linko, S., Nieminen, J., Vartiainen, T. & Walden, J. 2005. *Kemian metrologian opas*. Julkaisu 6/2005. Helsinki: Mittatekniikan keskus.
- Mäkinen, I., Suortti, A-M., Saares, R., Niemi, R. & Marjanen, J. (toim.). 1996. *Ohjeita ympäristönäytteiden kemiallisten analyysimenetelmien validointiin*. Helsinki: Suomen Ympäristökeskus.
- Owen, T. 2000. *Fundamentals of modern UV-visible spectroscopy*. Agilent Technologies.
- Patnaik, P. & Dean, J. 2004. *Dean's Analytical Chemistry Handbook*. 2. painos. New York: McGRAW-HILL.
- Rayner-Canham, G. & Overton, T. 2006. *Descriptive Inorganic Chemistry*. 4. Painos. New York: W.H Freeman.
- Reese, B., Finneran, D., Mills, H., Zhu, M. & Morse, J. 2011. Examination and Refinement of the Determination of Aqueous Hydrogen Sulfide by the Methylene Blue Method. *Aquatic Geochemistry* 17.
- Rich, R. 2007. *Inorganic reactions in water*. 1. Painos. Bluffton: Springer.
- SFS 3042. 1977. *Jäteveden sulfidin määrittäminen. Kolorimetrinen menetelmä*. Helsinki: Suomen Standardoimisliitto SFS. Luettu 12.9.2021. Vaatii käyttöoikeuden. <https://online.sfs.fi/fi/index.html.stx>
- Shimadzu. 2008. *Instruction manual Operation Guide UV-1800*. Luettu 24.10.2021.
- Spolyar, L. 1951. Three men overcome by hydrogen sulfide in starch plant. *Industrial Health Monthly*, 11.
- Vanhoorne, M., De Rouck, A. & De Bacquer, D. 1995. Epidemiological study of eye irritation by hydrogen sulfide and/or carbon disulphide exposure in viscose rayon workers. *Annals of Occupational Hygiene*.
- WHO. 2017. *Guidelines for drinking-water quality*. 4 painos. Health criteria and other supporting information. Geneva: World Health Organization.

LIITTEET

Liite 1. Studentin t-arvotaulukko

t-testin kriittiset arvot

Vapaus- asteet	1-suuntainen testi merkitsevyystasolla			2-suuntainen testi merkitsevyystasolla		
	5%	1%	0.1%	5%	1%	0.1%
1	6.314	31.82	318.3	12.71	63.66	636.6
2	2.920	6.965	22.33	4.303	9.925	31.60
3	2.353	4.541	10.21	3.182	5.841	12.92
4	2.132	3.747	7.173	2.776	4.604	8.610
5	2.015	3.365	5.894	2.571	4.032	6.869
6	1.943	3.143	5.208	2.447	3.707	5.959
7	1.895	2.998	4.785	2.365	3.499	5.408
8	1.860	2.896	4.501	2.306	3.355	5.041
9	1.833	2.821	4.297	2.262	3.250	4.781
10	1.812	2.764	4.144	2.228	3.169	4.587
11	1.796	2.718	4.025	2.201	3.106	4.437
12	1.782	2.681	3.930	2.179	3.055	4.318
13	1.771	2.650	3.852	2.160	3.012	4.221
14	1.761	2.624	3.787	2.145	2.977	4.140
15	1.753	2.602	3.733	2.131	2.947	4.073
16	1.746	2.583	3.686	2.120	2.921	4.015
17	1.740	2.567	3.646	2.110	2.898	3.965
18	1.734	2.552	3.610	2.101	2.878	3.922
19	1.729	2.539	3.579	2.093	2.861	3.883
20	1.725	2.528	3.552	2.086	2.845	3.850
21	1.721	2.518	3.527	2.080	2.831	3.819
22	1.717	2.508	3.505	2.074	2.819	3.792
23	1.714	2.500	3.485	2.069	2.807	3.768
24	1.711	2.492	3.467	2.064	2.797	3.745
25	1.708	2.485	3.450	2.060	2.787	3.725
26	1.706	2.479	3.435	2.056	2.779	3.707
27	1.703	2.473	3.421	2.052	2.771	3.689
28	1.701	2.467	3.408	2.048	2.763	3.674
29	1.699	2.462	3.396	2.045	2.756	3.660
30	1.697	2.457	3.385	2.042	2.750	3.646
31	1.696	2.453	3.375	2.040	2.744	3.633
32	1.694	2.449	3.365	2.037	2.738	3.622
33	1.692	2.445	3.356	2.035	2.733	3.611
34	1.691	2.441	3.348	2.032	2.728	3.601
35	1.690	2.438	3.340	2.030	2.724	3.591
36	1.688	2.434	3.333	2.028	2.719	3.582
37	1.687	2.431	3.326	2.026	2.715	3.574
38	1.686	2.429	3.319	2.024	2.712	3.566
39	1.685	2.426	3.313	2.023	2.708	3.558
40	1.684	2.423	3.307	2.021	2.704	3.551
41	1.683	2.421	3.301	2.020	2.701	3.544
42	1.682	2.418	3.296	2.018	2.698	3.538
43	1.681	2.416	3.291	2.017	2.695	3.532
44	1.680	2.414	3.286	2.015	2.692	3.526
45	1.679	2.412	3.281	2.014	2.690	3.520
46	1.679	2.410	3.277	2.013	2.687	3.515
47	1.678	2.408	3.273	2.012	2.685	3.510
48	1.677	2.407	3.269	2.011	2.682	3.505
49	1.677	2.405	3.265	2.010	2.680	3.500
50	1.676	2.403	3.261	2.009	2.678	3.496
51	1.675	2.402	3.258	2.008	2.676	3.492
52	1.675	2.400	3.255	2.007	2.674	3.488
53	1.674	2.399	3.251	2.006	2.672	3.484
54	1.674	2.397	3.248	2.005	2.670	3.480
55	1.673	2.396	3.245	2.004	2.668	3.476
56	1.673	2.395	3.242	2.003	2.667	3.473
57	1.672	2.394	3.239	2.002	2.665	3.469
58	1.672	2.392	3.237	2.002	2.663	3.466
59	1.671	2.391	3.234	2.001	2.662	3.463
60	1.671	2.390	3.232	2.000	2.660	3.460

(Mäkinen ym. 1996, 80)