



FIA-RAVINNEANALYSAATTORIN OPTIMOINTI JA VALIDOINTI FOSFAATTIFOSFORIMITTAUKSIIN

Hanna Mäkelä

Opinnäytetyö
Joulukuu 2014
Laboratorioalan
koulutusohjelma

TAMPEREEN AMMATTIKORKEAKOULU
Tampere University of Applied Sciences

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma

MÄKELÄ, HANNA:

FIA-ravinneanalyyttorin optimointi ja validointi fosfaattifosforimittauksiin

Opinnäytetyö 58 sivua, joista liitteitä 9 sivua
Joulukuu 2014

Fosforin ollessa epäorgaanisessa liuenneessa muodossa, fosfaattifosforina, se on helpos-
ti hyödynnettävissä kasvien ja etenkin levien ravinteena merissä. Fosfaattipitoisuuksien
määrittämiseen käytetään FIA-ravinneanalyyttoria, jonka toiminta perustuu virtausin-
jektio-tekniikkaan. Näyte- ja reagenssivirta syötetään jatkuvaan kantajavirtaan, jossa ne
sekoittuvat toisiinsa dispersion vaikutuksesta. Analyyyti ja reagenssit muodostavat yh-
dessä värillisen lopputuotteen. Muodostuneen värillisen kompleksiyhdisteen intensiteet-
ti voidaan mitata spektrofotometrisesti.

Opinnäytetyö tehtiin Suomen Ympäristökeskuksen (SYKE) Merikeskuksessa. Työn
tavoitteena oli parantaa FIA-ravinneanalyyttorin herkkyyttä fosfaattimittauksissa,
joissa näytteenä käytetään merivettä. Toisena tavoitteena oli saada laaja dynaaminen
mittausalue, joka mahdollistaisi laitteen käytön leväkasvatuskokeissa. Tarkoituksena oli
tehdä laitteelle optimointi, jossa valittaisiin tavoitteisiin parhaiten soveltuvat asetukset.
Optimoinnissa valittuihin, herkkyyttä parantaviin, mittauskonfiguraatioihin perustuen
laitteelle tehtiin validointi. Validoinnissa määritettiin toteamis- ja määrittämissä, tark-
kuus, toistettavuus ja mittausepävarmuus.

Opinnäytetyölle asetetut tavoitteet saavutettiin työn aikana. Optimoinnin perusteella
valittujen mittausasetuksien avulla FIA-ravinneanalyyttorin herkkyys parani huomattavasti.
Myös laaja dynaaminen mittausalue saatiin toteutettua käyttämällä lyhyempää
kyvettä tai valitsemalla aallonpituusmittaukseen sopivaksi.

Asiasanat: FIA (flow injection analysis), fosfaattifosfori, optimointi, validointi

ABSTRACT

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

MÄKELÄ, HANNA:

Optimization and Validation of Flow Injection Analyser for Phosphate Phosphorus Measurements

Bachelor's thesis 58 pages, appendices 9 pages
December 2014

Phosphate is an inorganic soluble form of phosphorus. Phosphate is easily exploited as a nutrient by plants and especially algae, e.g. in seas. Flow injection analyzer (FIA) is widely used to determine phosphorus concentrations. FIA is based on flow injection techniques, where the well-defined volume of a liquid sample and reagent is injected into the carrier stream. The injected sample forms a zone which is dispersed into the carrier stream. The sample and the reagents form a strongly colored complex compound whose intensity is determined by spectrophotometry.

This Bachelor's thesis was made in co-operation with Finnish Environment Institute (SYKE) Marine Research Centre. The objective of the thesis was to improve sensitivity of the FIA nutrient analyzer in phosphate measurements. The second objective was to have a wide dynamic measurement range which would make it possible to use FIA in algae growth tests. The purpose was to optimize the apparatus and find the best configurations to improve its sensitivity. The device was then validated on the basis of these configurations. Limit of detection and quantification, accuracy, repeatability and uncertainty of measurement were defined in the validation.

The objectives set of the thesis were reached. Sensitivity of the FIA nutrient analyzer improved significantly because of the configurations based on optimization. Also the wide dynamic measurement range was realised by using a shorter cuvette or choosing a suitable wavelength for the measurement.

Key words: FIA (Flow Injection Analysis), phosphate phosphorus, optimization, validation

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	TEORIATAUSTA.....	8
2.1	Fosfaattifosfori levien kasvuravinteena	8
2.2	Virtausinjektioanalyysit (FIA)	9
2.3	Fosfaattifosforin mittausperiaate FIA-analysaattorilla	12
2.4	Optimointi ja validoinnin parametrit	12
2.4.1	Lineaarinen mittausalue	13
2.4.2	Toteamis- ja määrittysraja	15
2.4.3	Tarkkuus.....	15
2.4.4	Saanto.....	17
2.4.5	Toistettavuus	17
2.4.6	Mittausepävarmuus	18
3	MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....	19
3.1	FIALab-2600.....	19
3.2	Reagenssien valmistus	21
3.3	Optimointi	23
3.4	Validointi	26
4	OPTIMOINNIN TULOKSET.....	28
4.1	Carry over -ilmiö.....	28
4.2	Lineaarisuus	28
4.3	Kyvetin valotien pituuden vaikutus	31
4.4	Reaktiolämpötilan vaikutus	31
4.5	Näytesilmukan pituuden merkitys	33
4.6	Reaktioajan pituus.....	34
4.7	Spektrometrin asetukset	36
4.8	Pumpun nopeus.....	37
4.9	Pysäytetty virtaus	38
5	VALIDOINNIN TULOKSET.....	39
6	POHDINTA.....	42
	LÄHTEET.....	48
	LIITTEET	50
	Liite 1. FIA-analysaattorin ajo-ohjelma	50
	Liite 2. Standardiliuosten valmistus fosfaattianalyyseihin ja reagenssien säilyvyysajat.....	52
	Liite 3. Carry over -testin tulokset.....	54
	Liite 4. Samples to average - asetuksen tulokset 880 nm:lla mitattuna.....	55

Liite 5. Validoinnin mittaustuloksia 57

1 JOHDANTO

Yksi tärkeimmistä pääravinteista meressä on fosfori, jota kasvit ja etenkin levät käyttävät ravinteena. Se esiintyy meressä liukoisena fosfaattiyhdisteenä, ortofosfaattina, joka on helposti kasvien käytettävissä olevassa muodossa. Fosfaattipitoisuuksien mittaaminen on tärkeää arvioitaessa Itämeren tilaa ravinnekuormituksen ja rehevöitymisen kannalta sekä arvioitaessa leväkukintojen määriä kevät- ja kesäkausina.

Merentutkimuksessa on usein tarpeellista, että käytössä olevat laitteet ovat helposti liikuteltavissa ja ne sopivat vaihtelevaan kenttätyöskentelyyn. Tämä koetaan tarpeelliseksi silloin, kun mittauspisteet vaihtelevat useasti tai tehdään lyhyempiaikaisia projekteja tietyllä alueella. Osa mittausasemista sijaitsee sellaisilla alueilla, joihin ei henkilöstöä ole mahdollista sijoittaa koko mittausjakson ajaksi. Tällaisissa tilanteissa laitteelta odotetaan varmatoimisuutta, monikäyttöisyyttä ja automatisointimahdollisuutta. Automatisoinnilla mahdollistetaan mittauksien saanti ilman paikan päällä olevaan työntekijää.

Meriveden fosfaattipitoisuuksien määrittämisessä käytetään yleisesti FIA-ravinneanalyyttoria, jonka toiminta perustuu virtausinjektiotekniikkaan. Näyte ja reagenssit syötetään jatkuvaan kantajavirtaan, jossa ne reagoivat keskenään muodostaen värillisen lopputuotteen. Fosfaatin määrittäminen perustuu kolorimetriaan ja värillisen lopputuotteen pitoisuus mitataan laitteen yhteydessä olevalla spektrofotometrillä.

Opinnäytetyön tavoitteena oli parantaa uuden FIA-ravinneanalyyttorin herkkyyttä fosfaattimittauksissa. Herkkyyden tavoittelu on olennaista mitattaessa Itämeren vesinäytteitä, joissa fosfaattipitoisuudet ovat pieniä. Työssä tavoiteltiin myös laajempaa dynaamista mittausaluetta leväkasvatuskokeita ajatellen, joissa fosfaatin määrä muuttuu kasvatuksen aikana. Työn tarkoituksena oli tehdä laitteelle optimointi, jonka avulla laitteen herkkyys parani ja dynaaminen mittausalue olisi mahdollisimman laaja. Optimoinnissa selvitettyjä herkkyyttä parantavia asetuksia käyttäen laitteelle tehtiin validointi, jossa selvitettiin toteamisraja, määrittämisraja, toistettavuus, tarkkuus ja mittaus epävarmuus.

Opinnäytetyö toteutettiin Suomen Ympäristökeskuksen Merikeskuksessa meriekologianlaboratoriossa. Merikeskuksen toiminta keskittyy Suomea ympäröivän Itämeren

tutkimukseen. Keskuksen tavoitteena on tuottaa uutta tietoa Itämeren tilasta ja siinä tapahtuvista muutoksista, joiden avulla voitaisiin ylläpitää tai parantaa meren tilaa. (Suomen Ympäristökeskus 2014b.)

2 TEORIATAUSTA

2.1 Fosfaattifosfori levien kasvuravinteena

Fosfori on yksi tärkeimmistä ravinteista merissä ja levät käyttävät sitä ravinteena, typen ja piin lisäksi. Tästä pääasiallisesti levien käyttämästä fosforiyhdisteestä käytetään nimitystä fosfaattifosfori. (MTT 2008.) Se esiintyy luonnon merissä ortofosfaattina, joka on helposti hyödynnettävässä liukoisessa muodossa (Wetzel 1983, 255-256). Ortofosfaatilla on neljä yleistä esiintymismuotoa meriveden pH:sta riippuen: H_3PO_4 , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} ja PO_4^{3-} (Warwick, Guerreiro & Soares 2012, 1-11).

Yleisesti ottaen fosfaatit ovat yhdisteinä niukkaliukoisia, jonka vuoksi meriympäristössä fosforia pidetään yhtenä kasvien kasvua rajoittavana tekijänä typen lisäksi. Kasvua rajoittava tekijä määräytyy meren tilan mukaan, sillä ravinteiden pitoisuudet Itämeressä riippuvat suurelta osin alueesta, vuodenajasta ja syvyydestä. Itämeressä esiintyy sekä fosfori- että typpirajoitteisia alueita. (Tamminen & Andersen 2007, 121-138.)

Suurin osa Itämereen päätyvästä fosforista kulkeutuu jokivesien mukana mereen. Fosforia liukenee luonnollisesti maaperästä eroosion vaikutuksesta ja kulkeutuu sadevesien mukana jokiin ja sitä kautta mereen. (Suomen ympäristökeskus SYKE 2014a.) Merkittäviä fosforin lähteitä ja Itämeren fosforikuormaan vaikuttavia tekijöitä ovat teollisuus, kalaviljelylaitokset, maa- ja metsätalous, sekä yhdyskuntien ja teollisuuden vedenpuhdistamot (European Environment Agency 2005). Maataloudessa lannoitusta pidetään yhtenä suurimpana tekijänä rehevöitymisessä (Suomen ympäristökeskus SYKE 2014a). Niukkaliukoisina fosfaatit huuhtoutuvat kuitenkin hitaasti maaperästä vesistöihin, joka hillitsee lannoituksen vesistöjä rehevöittävää vaikutusta. Toiseksi suurin kuormittaja on jätevedet ja niiden mukana kulkeutuvat fosfaattipitoiset pesuaineet. (Itämeriportaali, fosforin kierto.)

Osa merivedessä olevasta fosforista vapautuu eliöiden käytettäväksi sisäisen kuormituksen vuoksi. Tällä tarkoitetaan merenpohjaan sedimentoituneen eloperäisen aineksen sisältämän fosforin liukenemista uudelleen käytettäväksi fosfaatiksi. Hapellisissa olosuhteissa fosfori esiintyy rautayhdisteinä, ferrifosfaattina ja ferrihydroksidifosfaattikompleksina. Hapen vähentyessä meren pohjassa eloperäisen aineksen hajotuk-

sen vaikutuksesta, nämä yhdisteet pelkistyvät ferroyhdisteiksi muuttaen niiden fosfaatit liukoiseen muotoon ja näin vapautuvat veteen levien käytettäväksi. (Vahtera 2007, 186-192.)

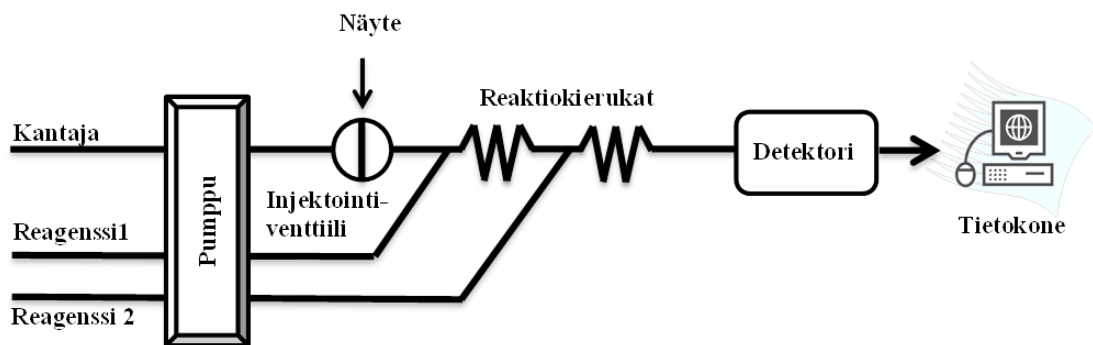
Fosfaattimäärien mittaaminen on osa ympäristöseurantaa, jonka tarkoituksena on antaa tietoa Itämeren tilasta ja rehevöitymisestä (Itämeriportaali, Ravinteet ja rehevöityminen). Suomessa Itämeren fosfaattipitoisuutta seurataan Suomen Ympäristökeskuksen toimesta. Ravinneanalyysit tehdään avoimella Itämerellä ympäri vuoden tutkimusalusten Aranda ja Muikku matkojen aikana otetuista näytteistä sekä Alg@line -hankkeen kauppalaivojen automaattisista näytteenottojärjestelmän näytevesistä. (Itämeriportaali, Alg@line tuo ajantasaisia tietoja kauppalaivoilta; Itämeriportaali Avomeriseuranta)

2.2 Virtausinjektioanalyysit (FIA)

Virtausinjektioanalyysit (*Flow injection analysis*, FIA) kehitettiin ensimmäisenä Saksalaisten henkilöiden Ruzickan ja Hansenin toimesta 1970 -luvun puolessa välissä. Ne kehitettiin tutkijoiden tarpeesta saada automatisoidumpi, pienoiskokoon tehty, monipuolinen ja edullinen tekniikka nopeisiin Virtausinjektioanalyysit perustuvat virtausinjektiotekniikkaan. (Lajunen & Perämäki 2004, 65) Se on suosittu, yksinkertainen, nopea ja monipuolinen tekniikka, joka on vakiintuneessa asemassa analyttisessä kemiassa ja yleisessä käytössä kvantitatiivisissa kemiallisissa analyyseissä (Yebra-Biurrin 2009, 1). Ekonomisuus näkyy laitteen vähäisessä näyte- ja reagenssikulutuksessa, jolloin myös syntyvän jätteen määrä on pieni (Lajunen & Perämäki, 66). Virtausinjektiotekniikan on osoitettu soveltuvan automatisointiin kaikilla analysoinnin alueilla näytteen esikäsittelystä aina tietojen käsittelyyn asti. Lisäksi FIA:lla on mahdollista suorittaa analyysejä, jotka ovat vaikeita ja monissa tapauksissa toteuttamiskelvottomia perinteisillä laboratoriotekniikoilla. (Yebra-Biurrin 2009, 1.)

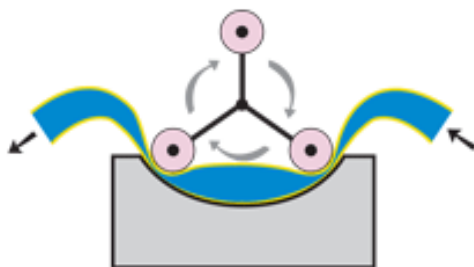
Virtausinjektioanalyysit ovat käyneet läpi kolme kehitysvaihetta. Ensimmäisen, kun virtausinjektiotekniikka (*flow injection*, FI) kehitettiin 1970 -luvulla. Toisen muutoksen, kun sen lisäksi kehitettiin *sequential injection* (SI)-tekniikka 1990 -luvulla ja hiljattain ilmestyneen lab-on-valve (LOV)-venttilisysteemin sekä *bead injection* (BI)-tekniikan kolmantena kehitysvaiheena. (Yebra-Biurrin 2009, 1-2.)

Nykyaikainen FIA-analysaattori koostuu peristalttisesta pumpusta, injektioventtiilistä, reaktiokierukoista, läpivirtauskyvetistä ja havainnointiyksiköstä sekä näytteenottimesta. Laitteeseen voidaan yhdistää myös lämmitin reaktiokierukan yhteyteen nopeuttamaan kemiallisia reaktioita. (Yebra-Biurrun 2009, 14.) Näyte syötetään kantajavirtaan, jossa se kulkee eteenpäin nestevyöhykkeenä. Kantaja- ja näytevirtaan yhdistetään reagenssit, jotka sekoittuvat toisiinsa reaktiokierukassa dispersion vaikutuksesta ja reagoivat keskenään muodostaen värillisen lopputuotteen (kuvio 1). Lopputuote ajetaan läpivirtauskyvetiin, jossa havainnointiyksikön avulla mitataan analyytin pitoisuus. (Yebra-Biurrun 2009, 2-3.)



KUVIO 1. Malli FIA-ravinneanalysaattorin toiminnasta, jossa näyte ja reagenssit yhdistetään jatkuvaan kantajavirtaan ja analyytin pitoisuus havaitaan läpivirtausdetektorin avulla

FIA -laitteistossa kantaja- ja reagenssiluokset saadaan virtaamaan letkujen läpi peristalttisen pumpun avulla. Kuvioista 2 nähdään, kuinka peristalttinen pumpu siirtää nestettä eteenpäin letkussa pyörivien rullien avulla. Rullat puristavat joustavia letkuja, mikä saa aikaan jatkuvan virtauksen. Peristalttiseen pumpuun voi olla kytkettynä yhdestä kuuteentoista kantaja-/reagenssilinjaa laitteistosta riippuen. (Yebra-Biurrun 2009, 7-9.)

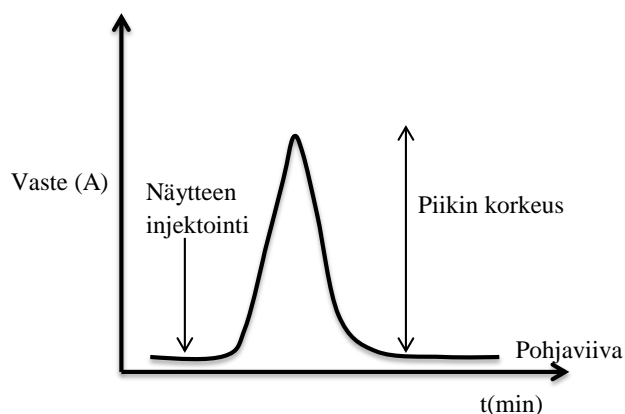


KUVIO 2. Peristalttinen pumpu koostuu rullista, jotka työntävät nestettä eteenpäin letkuissa saaden aikaan jatkuvan virtauksen (Harvard Apparatus. Pump Selection Guide)

Näytteen injektointia säädellään FIA-analysointilaitteisiin kehitetyillä kaksisuuntaisilla venttiileillä (FIALab 2600 Series on Multi-Channel Analyzers). Näyte kerätään näytesilmukkaan, jonka pituus määrittelee injektoidavan näytteen tilavuuden. Kun venttiili asetetaan lataa-asentoon (load), näytesilmukka täyttyy näyteliuoksella. Injektointiasennossa (inject) näytettä injektoidaan haluttu tilavuus kantajavirtaan. (Yebra-Biurrun 2009, 9-12.)

Analyytin pitoisuuden mittaamiseen voidaan käyttää monenlaisia havainnointitekniikoita, kuten esimerkiksi spektrofotometriä, nefelometriä, fluoresenssia, ja atomiabsorptiospektrometriä. FIA-analysointilaitteita voi olla joissain tapauksissa myös yhdistettynä kromatografiseen systeemiin. Näistä kuitenkin yleisimmin käytössä spektrofotometri. (Abubakr 2010, 153)

FIA-analysointilaitteen havainnointiyksikkö mittaa jatkuvasti kyvetissä kulkevan liuoksen vastetta, kun kyseessä on spektrofotometri. Laitteen piirtämä spektri on ensin lähellä nollatasoa, kun laite mittaa ainoastaan kantajavirtaa. Näytteen saapuessa kyvetiin vaste alkaa hiljalleen kasvaa ja näytevyöhykkeen päättyessä taas laskea kohti nollatasoa. Näin analyytistä piirtyy näin spektrikuvaaja piikin muodossa (kuvio 3). (Yebra-Biurrun 2009, 15.)

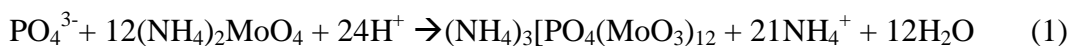


KUVIO 3. Piikin muodostuminen FIA-analysointilaitteella näyteinjektoinnin jälkeen (Yebra-Biurrun 2009, 15.)

2.3 Fosfaattifosforin mittauseriaate FIA-analysaattorilla

Fosforin määrittämisessä kemialliset analyysit perustuvat fosforin reaktiivisuuteen molybdaattien kanssa sekä fosforiyhdisteiden reaktiivisuuden muutoksiin kompleksissa entsyymi ja happohydrolyysin aikana, kun ne muuttuvat ortofosfaateiksi (Wetzel 1983 256). Käytettäessä FIA-analysaattoria fosfaattipitoinen näyte liikkuu ionivaihdettua vettä olevan kantajavirran mukana. Ensimmäisenä näytteeseen sekoitetaan reagenssi, joka sisältää ammoniummolybdaattia, kaliumantimonitratraattia ja se on tehty happamaksi väkevällä rikkihapolla. Tämän jälkeen lisätään toinen askorbiinihappoa sisältävä reagenssi ja lämmitetään liuosta vahvemman reaktion aikaan saamiseksi.

Fosfaatin määrittämisen standardimenetelmä on kolorimetrinen. Ammoniummolybdaatti ja kaliumantimonitratraatti reagoivat happamissa olosuhteissa ortofosfaatin (PO_4^{3-}) kanssa. Liuoksessa molybdaatti- ja antimoni-ionit muodostavat antimonifosfomolybdaatti kompleksiyhdisteen, joka havaitaan keltaisena värin muutoksena. Syntynyt keltainen kompleksiyhdiste pelkistyy askorbiinihapon toimesta siniseksi molybdaatti kompleksiyhdisteeksi. (SFS-EN ISO 6878 2004, 1.) Menetelmässä tapahtuva reaktio on esitetty reaktioyhtälössä 1 (Warwick, Guerreiro & Soares 2012, 3):



Pitoisuuden määrittäminen perustuu värin muutokseen liuoksessa, joka mitataan spektrometrin avulla aallonpituudella 880 nm. Laitteen antamasta signaalista riippuen voidaan käyttää myös muita aallonpituuksia. Saatu absorbanssi lukema on suoraan verrannollinen analyytin pitoisuuteen liuoksessa. (SFS-EN ISO 6878 2004, 3)

2.4 Optimointi ja validoinnin parametrit

Laitteita optimoidaan parempien mittaustulosten aikaan saamiseksi. Optimoinnin tarkoitus on yleensä parantaa laitteen mittauserkkyyttä, tarkkuutta ja stabiilisuutta. Tavoitteina voi olla myös alhainen toteamisraja, laaja dynaaminen mittauserialue ja lyhyt analyysiaika. Mittauslaitteet on tehty yleispäteviksi ja toimiviksi erilaisiin mittauksiin. Usein on kuitenkin tarve kohdistaa laitteen käyttö tiettyyn analytiikkaan, joka vaatii erilaisten mittauserialueiden yhdistelemistä. Muuttamalla laitevalmistajan oletusase-

tuksia haluttuun suuntaan voidaan vaikuttaa laitteen mittaustarkkuuteen, herkkyYTEEN ja muihin ominaisuuksia. Optimoinnin perimmäinen tarkoitus on saada laite toimimaan halutuissa olosuhteissa ja mittaamaan haluttuja pitoisuusalueita tietyllä menetelmällä. Se on osa menetelmän kehitystyötä matriisiin ja käyttötarkoitukseen sopivaksi.

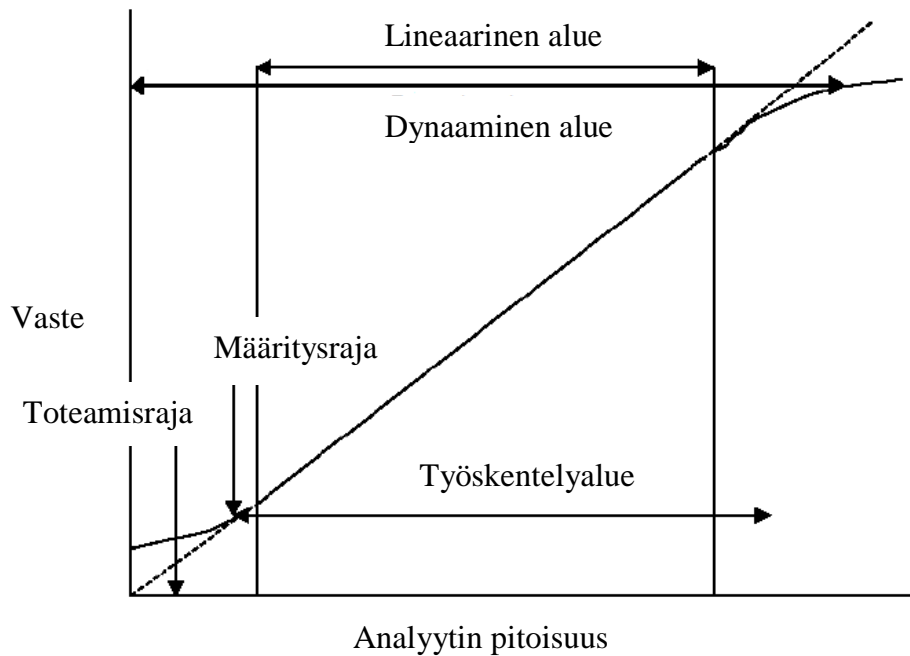
Optimoinnissa haetulla herkkyydellä tarkoitetaan menetelmän kykyä havaita pienet pitoisuuksien muutokset. Menetelmän ollessa herkkä, pieni pitoisuuden muutos aiheuttaa detektorin vasteessa suuren muutoksen. Tätä arvioidaan kalibrointisuoran kulmakertoimen avulla. Lineaarista kalibrointia käytettäessä kalibrointisuoran kulmakerroin b vastaa herkkyyden arvoa. (Mäkinen, Suortti, Saare, Niemi & Marjanen 1996, 29.)

Validoinnin tarkoituksena on varmistaa menetelmän tieteellinen pätevyys sen käyttötarkoitukseensa niissä olosuhteissa, joissa sitä käytetään. Tärkeää on, että arvioidaan mittausmenetelmän suorituskykyä ja sen soveltuvuutta haluttuun käyttötarkoitukseen. (Pikkarainen 2000, 11.) Validoinnissa menetelmän sopivuutta käyttötarkoitukseensa osoitetaan seuraavilla parametreilla: toteamisraja, määrittäysraja, lineaarisuus, tarkkuus, toistettavuus, mittausepävarmuus, mittausalue, selektiivisyys ja spesifisyys. (Ehder 2005, 25.)

2.4.1 Lineaarinen mittausalue

Menetelmän kalibroinnilla määritetään analyytin pitoisuuden ja detektorin vasteen välinen yhteys eli kalibrointisuora. Linearisella mittausalueella kalibrointikäyrä on suora ja tällä alueella mittauslaitteen herkkyys on vakio (kuvio 3). Analyytin pitoisuus ja sen tuottaman vasteen taso, absorbanssi, ovat suoraan verrannollisia toisiinsa eli niiden välillä on lineaarinen korrelaatio. (Jaarinen & Niiranen 2005, 19.) Lineaarista mittausaluetta rajaa alussa toteamis- ja määrittäysraja. Loppupäässä rajoittavana tekijänä on detektorin kyky havainnoida analyytin pitoisuuden muutokset. (Mäkinen ym. 1996, 16.)

Dynaaminen alue on yleensä laajempi kuin lineaarinen alue. Dynaamisella alueella kalibrointisuora voi olla epälineaarinen vasteen muuttuessa pitoisuuden myötä. Epälineaarinen alue tulee esiin etenkin suurilla pitoisuuksilla mitattaessa, mutta joskus myös pienillä pitoisuuksilla. (Jaarinen & Niiranen 2005, 18.)



KUVIO 4. Lineaarinen alue (Edher 2005, 29)

Lineaarisuutta voidaan tarkastella silmämääräisesti kalibrintisuorasta, korrelaatiokerroimen avulla ja residuaaleja tarkastelemalla. Korrelaatiokerroimen tulisi olla hyvin lähellä arvoa +1. Jos arvo poikkeaa suuresti tästä, mittauksiin liittyy hajontaa tai kalibrointi ei ole lineaarinen. Kalibrintisuoran lineaarisuus voidaan helposti todeta piirtämällä residuaalikuvaaja kalibrintiliuosten pitoisuuden funktiona. Residuaali tarkoittaa lasketun ja mitatun pisteen erotusta pitoisuuden funktiona (Jaarinen & Niiranen 2005, 25)

Spektrofotometriin mittauksiin ja lineaarisuuteen liittyy hyvin olennaisesti Lambert-Beerin laki. Valon kulkiessa kyvetissä olevan näytteen läpi sen intensiteetti pienenee. Intensiteetin pieneneminen on ominaista kullekin aineelle ja sen määrittävät näytteen pitoisuus, paksuus ja käytettävä säteilyn aallonpituus sekä aineen absorptio-ominaisuudet. Spektrofotometrit mittaavat tulevan ja näytteen läpi kulkevan valon intensiteetin suhdetta. Tähän perustuu myös haastavuus pitoisuuden muutoksen havainnoinnissa mitattaessa hyvin pienissä ja suurissa pitoisuuksissa. Absorbanssin ollessa pieni, vain osa valosta absorboituu näytteeseen, jolloin pieni pitoisuuden muutos on vaikea määrittää. Suurissa pitoisuuksissa näytteen läpi menee niin vähän valoa, että sen mittaus on epätarkkaa. (Jaarinen & Niiranen 2005, 51-53.)

2.4.2 Toteamis- ja määrittäysraja

Toteamisrajalla eli LOD:lla (limit of detection) tarkoitetaan sellaista analyytin pitoisuutta, joka voidaan todeta luotettavasti ja se eroaa merkittävästi nollanäytteen arvosta. (Jaarinen & Niiranen 2005, 13) Määritettävän komponentin antaman vasteen tulee olla niin suuri, että sen ei voida katsoa aiheutuvan satunnaisvaihtelusta taustassa. Määrittäys perustuu taustasignaalin hajonnan tutkimiseen mittaamalla peräkkäisiä nollanäytteitä. Toteamisrajan arvo on se pitoisuus, joka saadaan, kun nollanäytteiden keskiarvoon lisätään kolminkertainen keskihajonta seuraavasti kaavan 1 tavalla. (Ehder 2005, 29.):

$$LOD = x + 3 \cdot s , \quad (1)$$

missä

x = nollanäytteiden keskiarvo

s = nollanäytteiden keskihajonta.

Termillä määrittäysraja eli LOQ (limit of quantitation) tarkoitetaan pienintä pitoisuutta, joka on mahdollista mitata hyväksyttävällä tarkkuudella ja täsmällisyydellä. Määrittäysraja eroaa selkeästi näytetaustasta ja toteamisrajasta. Analyytin pitoisuuden ollessa määrittäysrajan ja toteamisrajan välillä voidaan todeta analyyttiä olevan näytteessä, mutta alle määrittäysrajan verran. Määrittäysraja lasketaan kaavan 2 tavalla. (Jaarinen & Niiranen 2005, 13.):

$$LOQ = x + 6 \cdot s , \quad (2)$$

missä

x = nollanäytteiden keskiarvo

s = nollanäytteiden keskihajonta.

2.4.3 Tarkkuus

Mittauslaitteelta vaaditaan kykyä antaa todellisia arvoja vastaavia vasteita, jonka lisäksi myös mittaustulosten ja todellisten arvojen tulisi olla yhteensopivia (Edher 2005, 35).

Näytteitä mitattaessa halutaan siis mittaustulosten olevan mahdollisimman tarkkoja ja todenmukaisia. Tarkkuus tarkoittaa todellisen arvon ja tulosten keskiarvon yhtäpitävyyttä. (Mäkinen ym. 1996,33.)

Menetelmän tarkkuutta määritetään arvioimalla systemaattista virhettä ja satunnaisvirhettä, joiden tulisi tarkassa menetelmässä olla mahdollisimman pieniä. Systemaattinen virhe vaikuttaa mittaustuloksiin aina samalla tavalla. Systemaattista virhettä analyysissä aiheuttaa virheellinen kalibrointi, olosuhteet, näytteen kemialliset muutokset ennen analysointia ja nollanäytteen virheellinen arviointi. (Mäkinen ym. 1996, 33.) Satunnaisvirhettä tapahtuu kaikissa analyysissä eikä sitä voi ennalta ennustaa. Se johtuu menetelmän teossa tapahtuneesta sattumanvaraisesta vaihtelusta. Satunnaisvirheen vähentämiseen voidaan vaikuttaa parantamalla työskentelytarkkuutta ja vakioimalla mittaolosuhteet. (Jaarinen & Niiranen 2005, 32)

RSD(%) -arvo (eli satunnaisvirhe, suhteellinen keskihajonta tai vaihtelukerroin) kertoo kuinka paljon mitattujen näytteiden mittaustulokset poikkeavat toisistaan eli se määrittelee mittaustulosten keskinäisen paikkansapitävyyden. Se voidaan laskea seuraavasti kaavan 3 avulla (Jaarinen & Niiranen 2005, 31-32):

$$RSD (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\% , \quad (3)$$

missä

s = keskihajonta

\bar{x} = keskiarvo

Tarkkuudella mitataan systemaattista virhettä. Se ilmoitetaan usein poikkeamana todellisista arvoista ja yksikkönä käytetään prosentteja. Tarkkuus voidaan laskea seuraavan kaavan 4 mukaisesti (Mäkinen ym. 1996, 33):

$$Tarkkuus - \% = \frac{100 \cdot (X - \mu)}{\mu} , \quad (4)$$

missä

X = mitattujen tulosten keskiarvo

μ = näytteen todellinen pitoisuus

2.4.4 Saanto

Tarkkuuteen liittyvää systemaattista virhettä voidaan arvioida myös saantoprosentin avulla. Saantokoe tehdään yleensä silloin, kun on syytä epäillä, ettei käytettävällä menetelmällä saada mitattua tutkittavan analyytin kokonaismäärää. Koe suoritetaan mittamalla alkuperäisen näytteen pitoisuus, jonka lisäksi valmistetaan toinen tunnetun määrän analyyttiä sisältävä näyte ja mitataan sen pitoisuus. (Jaarinen & Niiranen 2005, 30) Saantoprosentti voidaan laskea kaavan 5 tavoin (Mäkinen ym. 1996, 34):

$$R = \frac{(S-U)}{C} \cdot 100\% , \quad (5)$$

missä

U = alkuperäisen näytteen pitoisuus

S = näytteen pitoisuus lisäyksen jälkeen

C = tunnettu standardiliuoksen pitoisuus

2.4.5 Toistettavuus

Toistettavuudella tarkoitetaan mittaustulosten keskinäistä yhtäpitävyyttä, kun mittaukset tehdään samalla menetelmällä, lyhyen ajan kuluessa, saman tekijän toimesta, samalla laitteella ja samoissa olosuhteissa. Toistettavuus lasketaan keskihajonnan ja keskiarvon avulla ja tulos ilmoitetaan prosentteina kaavan 6 tavoin (Mäkinen ym. 1996, 40):

$$\text{Toistettavuus} - \% = 100 - \left(\frac{s}{x} \cdot 100 \right) , \quad (6)$$

missä

s on keskihajonta

x on mittaustulosten keskiarvo

2.4.6 Mittausepävarmuus

Mittaussuureen arvojen oletettua vaihtelua kuvataan mittausepävarmuudella. Tätä käytetään yleensä silloin, kun halutaan varmistua mittaustuloksen riittävästä tarkkuudesta. Mittausepävarmuus on muodoltaan vaihteluväli eli arvio rajoista, jonka sisäpuolella oletetaan mittaustulosten olevan tietyllä todennäköisyydellä. Mittaustuloksen mittausepävarmuuteen voivat vaikuttaa monet tekijät, kuten matriisin vaikutus, näytteenotto, ympäristöolosuhteet, massan ja tilavuuden määrittämisestä aiheutuvat epävarmuudet ja satunnainen vaihtelu. (Ehder 2005, 18-19.)

Kokonaisepävarmuus eli yhdistetty mittausepävarmuus u_c voidaan laskea kaavan 7 avulla:

$$u_c = \sqrt{u(RSD\%)^2 + u(tarkkuus - \%)^2} , \quad (7)$$

missä

$u(RSD\%)$ on satunnaisvirhe

$u(tarkkuus-\%)$ on systemaattinen virhe

Laajennettu epävarmuus saadaan kertomalla kokonaisepävarmuus kertoimella k kaavan 8 tavalla:

$$U = k \cdot u_c , \quad (8)$$

missä

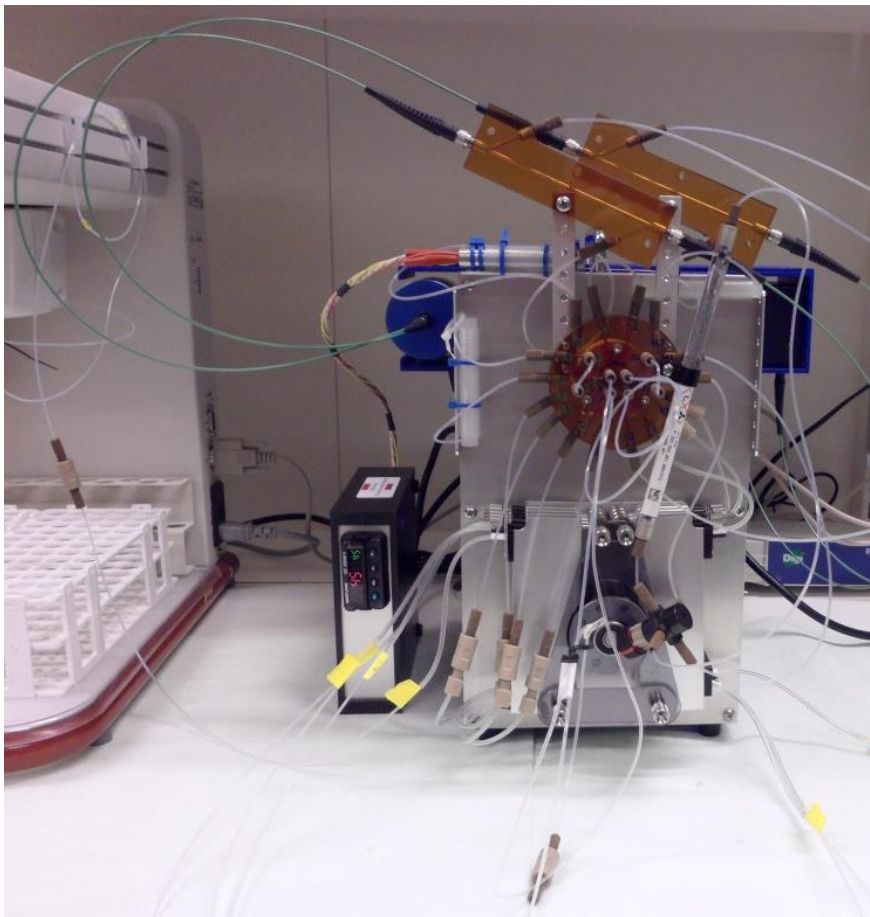
u_c on kokonaisepävarmuus

k on kerroin 2, joka vastaa 95 % luottamusväliä

3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1 FIALab-2600

Tässä opinnäytetyössä toteutetuissa mittauksissa käytettiin kaksikanavaista FIALab-2600 ravinneanalysaattoria (kuva 1). Kolorimetrisiin mittauksiin pohjautuva analysaattori on suunniteltu märkäkemian ravinnepitoisuuksien sekä muiden parametrien mittaamiseen vedestä, maaperänäytteistä, meijeri- ja elintarviketuotteista. Laitteella pystytään fosfaatin lisäksi määrittämään muun muassa nitriittiä, nitraattia ja ammoniakkia.



KUVA 1. Opinnäytetyössä käytetty FIALab-2600 kaksikanavainen ravinneanalysaattori

FIALab-2600 -laitteen perusrakenteeseen kuuluu kaksi spektrometria, kaksi kyvettä, valonlähde, valokuitukaapelit, reagenssiletkut, reaktiokierukat, lämmitin, peristalttinen pumppu ja näytteenotin sekä tietokone ohjelmiseen (taulukko 1). Kaksikanavaisuus mahdollistaa kahden ravinteen mittauksen samanaikaisesti. Spektrometrin laajan mittausalueen ja valonlähteen leveän spektrin (460 nm -1000 nm) ansiosta taas

pystytään käyttämään useaa aallonpituutta samanaikaisesti. (FIALab 2600 Series of Multi-Channel Analyzers.)

TAULUKKO 1. Tarkemmat tiedot FIALab-2600 analysaattorin osista ja niiden merkeistä

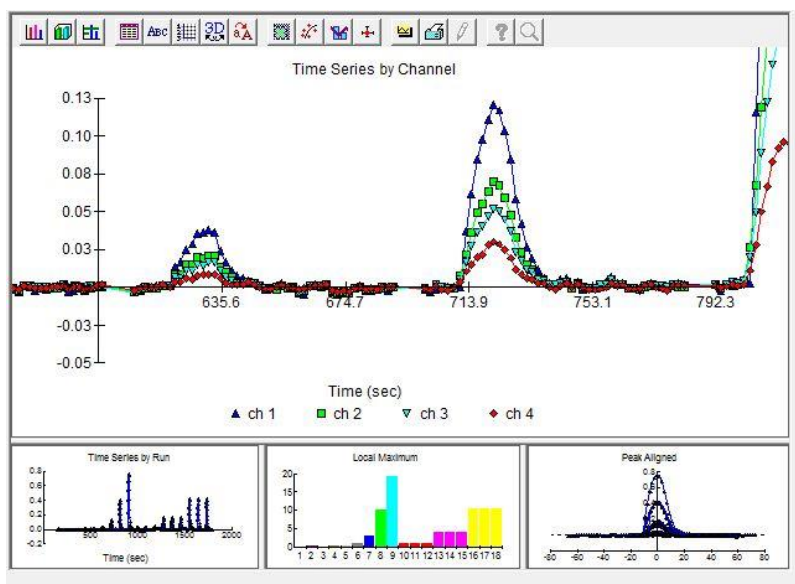
Laite	Kaksikavanainen FIALab -2600
Spektrometri	USB-4000, Ocean optics
Valonlähde	HL-2000 Tungsten halogeenilamppu, Ocean optics
Pumppu	Peristalttinen pumppu, 8 rullaa
Kyvetti	1 cm / 10 cm
Näytteenotin	AIM3200
Lämmitin	FTCOIL 90
Muita osia	Optinen valokuitukaapeli Reagenssiletkut Kaksisuuntainen injektointiventtiili

Työssä käytetty FIA-analysaattori voidaan kuvitteellisesti jakaa kahtia sen etuosassa olevan pumpun ja injektioventtiilin kohdalta, nitraatti- ja fosfaattipuoleen. Nitraattimäärityksiin tarvittavat osat näkyvät oikealla puolella ja fosfaattimäärityksiin tarvittavat vasemmalla puolella. Nitraatin määritykseen kuuluu kadmiumpylväs, reaktiokierukka, kyvetti ja spektrometri. Fosfaattipuolelle kuuluu puolestaan kaksi reaktiokierukkaa, lämmityselementti, kyvetti ja spektrometri.

Peristalttisella pumpulla laitteen letkuihin saadaan aikaan jatkuva virtaus. Pumppu imee koko mittauksen ajan kantajavettä sekä reagensseja letkuihin. Näyte kulkeutuu automaattiselta näytteenottimelta pumpun läpi näytesilmukkaan injektioventtiilin ollessa lataa-asennossa. Venttiilin ollessa injektointi-asennossa näyte injektoidaan kantajavirtaan ja samaan aikaan spektrometri alkaa mitata kyvetin läpikulkevan kantaja- ja reagenssiluoksen intensiteettiä, jota käytetään nollanäytteenä. Näyte kulkeutuu virtauksen mukana kahden reagenssikierukan läpi, joissa jälkimmäisessä on lämmityselementti. Tämän jälkeen näyte kulkeutuu läpivirtauskyvetille spektrometrin mitattavaksi.

Valonlähteenä käytettävä Tungsten lamppu on kytketty valokuitukaapeliin, jonka kautta valo kulkeutuu kyvetin läpi spektrometrille. Spektrometri mittaa aineen absorptiota ja

havaitsee aineen läpi tulevan valon intensiteetin. Detektori muuttaa valon sähkösignaalin vasteen muotoon, jonka avulla saadaan kuvion 4 kaltaisia kuvaajia (Jaarinen & Niiranen 2005, 57.)



KUVIO 5. Esimerkki työssä käytetyn FIA-analysaattorin piirtämistä kuvaajista detektorin antaman signaalin perusteella. Eriväriset kuvaajat on havainnollistavat neljällä eri aallonpituudella tehtyjä mittauksia

Laitetta ohjataan ajo-ohjelmaan syötettävien koodien avulla. Jokaiselle laitteen toiminnolle on oma käskykoodi, jonka avulla laite saadaan tekemään mittaus halutulla tavalla. Näytteenoton ohjausta ja kalibrointisuoran piirtoa varten on oma taulukkonsa. Siihen määritetään näytteiden ja standardien nimet, pitoisuudet sekä paikat näytteenottimella. Laaditun ajo-ohjelman ja taulukon avulla laite suorittaa mittauksen. Piirtynyttä kalibrointisuoraa pystytään muokkaamaan mittauksen jälkeen, jos sille on tarvetta. Liitteessä 1 on esitelty laitteen käyttämä näytteen/standardin määrittystaulukko ja ajo-ohjelma koodimuodossa.

3.2 Reagenssien valmistus

FIA-ravinneanalysaattorilla suoritettavissa mittauksissa käytettiin kahta reagenssiliuosta värireaktioiden aikaansaamiseksi. Nämä liuokset olivat molybdaatti värireagenssin käyttöliuos ja askorbiinihappo pelkistysliuos. Kaikista reagenssiliuoksista tuli poistaa mahdolliset ilmakuplat kuplittamalla liuoksia heliumkaasulla, jotta ne eivät häiritse mittaus- ta. Jos kyvetissä on mittaushetkellä ilmakuplia, niin liuoksesta mitattu vasteen arvo vää-

ristyy. Kuplituksessa paineen tuli olla 140 kPa ja kuplitusaika 1 minuutti litraa kohden. Kaikki reagenssien valmistukseen käytetyt astiat olivat happopestyjä ja liuokset valmistettiin puhdistettuun ionivaihdettuun veteen, jotta vältettäisiin mahdolliset kontaminaatiot.

Molybdaattivärireagenssin käyttöliuoksen valmistukseen tarvittiin seuraavia kolmea reagenssia; väkevää rikkihappoa, ammoniummolybdaattikantaliuosta ja kaliumantimonitartraattikantaliuosta. Ammoniummolybdaattikantaliuos valmistettiin liuottamalla 40,0 g ammonium molybdaattia $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 800 ml:n ionivaihdettua vettä, jonka jälkeen liuos laimennettiin yhdeksi litraksi mittapullossa. Kaliumantimonitartraatti $(\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\cdot 0,5\text{H}_2\text{O})$ kantaliuos valmistettiin liuottamalla 3,0 g kaliumantimonitartraattia litran mittapullossa ensin 800 ml:n ionivaihdettua vettä ja sen jälkeen laimennettiin ionivaihdetulla vedellä yhdeksi litraksi.

Molybdaatti värireagenssi käyttöliuos tehtiin edellä mainituista liuoksista seuraavasti. Mitattiin litran mittapulloon 500 ml:a ionivaihdettua vettä ja sekoitettiin siihen 35 ml:a väkevää rikkihappoa. Rikkihappo tuli lisätä hiljalleen, sillä liuos kuumeni huomattavasti. Liuoksen lämpötilan tasaannuttua lisättiin 72 ml:a kaliumantimonitartraatti kantaliuosta ja 213 ml:a kaliumantimonitartraatti kantaliuosta. Tämän jälkeen sekoitettiin hyvin ja laimennettiin ionivaihdettuun veteen yhdeksi litraksi mittapullossa.

Askorbiinihappopelkistysliuos valmistettiin liuottamalla 60 g askorbiinihappoa $(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6)$ noin 800 ml vettä litran mittapullossa. Tässä vaiheessa liuos kuplitettiin heliumilla, jonka jälkeen liuokseen lisättiin 1,0 g natriumlauryylisulfaattia $(\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S})$ ja laimennettiin litraksi mittapullossa ionivaihdetulla vedellä.

Tässä menetelmässä kantajaliuoksena oli ionivaihdettu vesi. Laitteiston letkujen huuhteluun käytettiin natriumhydroksidi-EDTA huuhteluainetta. Tämä valmistettiin liuottamalla 65,0 g natriumhydroksidia (NaOH) ja 6,0 g EDTA-dinatriumsuolaa $(\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8\cdot 2\text{H}_2\text{O})$ yhteen litraan vettä.

Mittauksiin käytetyt standardit tehtiin Accu standard- merkkisestä kaupallisesta standardiliuoksesta, jonka pitoisuus oli 1000 mg/l. Standardien tarkemmat valmistusohjeet ja reagenssien säilyvyysajat ovat näkyvissä liitteessä 2 (taulukko 10). Näytteinä käytetyt

fosfaattiliuokset tehtiin kaupallisesta Merck kantaliuoksesta, joka sisälsi fosfaattia 1000 mg/l.

3.3 Optimointi

Optimoinnissa pyrittiin määrittämään laitteelle sen parhaat ominaisuudet, jolla pystyttäisiin parantamaan laitteen herkkyyttä. Aluksi mittauksissa käytettiin laitevalmistajan antamia suositusasetuksia, joita optimoinnin aikana muutettiin aina yksi ominaisuus kerrallaan. Suositus reaktiolämpötilaksi oli 35 °C ja pumpun nopeudeksi 55 %. Mittauksissa suositeltiin myös käyttämään 10 cm:n kyvettä ja 75 cm:n mittaista näytesilmukkaa. Laitteessa oli kaksi reaktiokierukkaa, jotka vaikuttavat reaktioaikaan. Fosfaatin mittaamiseen voidaan käyttää neljää aallonpituutta 880 nm, 780 nm, 710 nm ja 580 nm. Vaikka optimoinnissa havainnoitiin kaikkia käytettäviä aallonpituuksia, laitevalmistajan suosittelema aallonpituutta 880 nm pidettiin oletetusti parhaimpana vaihtoehtona, sillä absorptiomaksimi on tällä aallonpituudella.

Optimointi suoritettiin kahden kuukauden aikana, jolloin mittauksiin saatiin mukaan myös olosuhteiden vaihtelusta johtuvat muutokset mittauksissa. Fosfaatin standardiliuokset valmistettiin Accu Standard- merkkisestä kantaliuoksesta. Käytetyt standardiliuokset olivat pitoisuudeltaan seuraavat; 0,526 µmol/l, 1,053 µmol/l, 3,159 µmol/l, 10,59 µmol/l, 31,59 µmol/l ja 52,65 µmol/l.

Carry over-testi

Carry over -ilmiötä havainnollistettaessa mitattiin aina kaksi peräkkäistä nollanäytettä ja kaksi pitoisuudeltaan 21,06 µmol/l liuosta liitteessä 3 olevan taulukon 11 esittämässä järjestyksessä. Näytteitä oli yhteensä 21 kappaletta ja nollanäytteenä käytettiin ionivaihdettua vettä. Varsinainen näyteliuos valmistettiin välikantaliuoksesta, jonka pitoisuus oli 526,6 µmol/l. Välikantaliuos tehtiin Merck:n kaupallisesta fosfaatin kantaliuoksesta, jonka pitoisuus oli 10 526,64 µmol/l (=1000 mg PO₄/l), pipetoimalla sitä 10 ml:a ja laimentamalla 250 ml:ksi ionivaihdetullavedellä mittapullossa. Välikantaliuoksesta valmistettiin näyteliuos pipetoimalla välikantaliuosta 0,4 ml:a ja laimentamalla se 10 ml:ksi.

Lineaarisuusalueen määrittäminen 10 cm ja 1 cm kyveteillä

Kalibrointisuoran lineaarisen mittausalueen yläraja määritettiin mittaamalla 1 cm:n ja 10 cm:n kyveteillä pitoisuudeltaan erilaisia olevia liuoksia aina kaksi samansuuruisia liuosta peräkkäin. Liuosten pitoisuuden olivat välillä 0-105,3 µmol/l. Taulukossa 2 on esitetty näytteiden järjestys mittauksessa sekä niiden valmistus kantaliuoksesta, jonka pitoisuus oli 526,6 µmol/l.

TAULUKKO 2. Lineaarisuuden määrittämisessä käytettyjen näyteliuosten pitoisuudet, mittausjärjestys ja niiden valmistus kantaliuoksesta (526,6 µmol/l)

Näyte	Pitoisuus	Kantaliuosta (ml)	Ionivaihdettuavettä (ml)
1	0	0	10
2	0	0	10
3	5,265	0,1	9,9
4	5,265	0,1	9,9
5	1053	0,2	9,8
6	10,53	0,2	9,8
7	21,06	0,4	9,6
8	21,06	0,4	9,6
9	31,59	0,6	9,4
10	31,59	0,6	9,4
11	42,12	0,8	9,2
12	42,12	0,8	9,2
13	52,65	1	9
14	52,65	1	9
15	63,18	1,2	8,8
16	63,18	1,2	8,8
17	84,24	1,6	8,4
18	84,24	1,6	8,4
19	105,3	2	8
20	105,3	2	8

Kyvetin valotien pituuden vaikutus

FIA -laitteella mitattaessa on mahdollista käyttää erimittaisia kyvettejä, joiden pituudet ovat 1 cm tai 10 cm. Näiden kyvettien mittausominaisuuksia määritettiin tekemällä kalibrointisuorat valittuja standardeja käyttäen ja vertailemalla näitä suoria toisiinsa.

Reaktiolämpötilan vaikutus

Lämpötilan vaikutusta määritettiin säätämällä laitteen vastuksen lämpötilaa, jonka ympärillä menevässä letkussa näyte ja reagenssit kulkevat. Laitteella mitattiin kalibrointisuorat valituissa lämpötiloissa. Mittaukset suoritettiin kahtena eri päivänä, ensimmäisenä mitattiin kalibroinnit lämpötiloissa 25°C, 35°C ja 45°C. Toisena päivänä mitattiin lämpötiloilla 45°C, 55°C ja 65°C. Molempina päivinä mittaus on tehty 45°C:ssa, jotta eri kalibrointisuoria voidaan luotettavasti verrata toisiinsa.

Näytesilmukan pituuden merkitys

Laite kerää näytteen erilliseen näytesilmukkaan ennen injektointia kantajavirtaan ja sekoitusta reagensseihin. Silmukan pituutta muuttamalla injektoitavan näytteen tilavuus muuttuu. Mitä enemmän näytettä injektoidaan, sitä vahvempi on värireaktio ja laitteen antama vaste. Tämän näyteluupin ohjepituudeksi oli annettu 75 cm. Pituuden vaikutusta selvittäessä mittauksiin otettiin mukaan myös pituudeltaan 10 cm, 37,5 cm ja 112,5cm olevat näytesilmukat. Mittaus suoritettiin näillä kaikilla pituuksilla käyttämällä optimointiin valittuja standardeja.

Reaktioajan pituus

Reaktioajan pituuden vaikutusta fosfaattimittauksiin selvitettiin lisäämällä pituutta yhden reaktiokierukan verran letkuihin, joissa näyte ja reagenssit sekoittuvat ennen lämmittintä. Mittauksiin käytettiin optimointiin valmistettuja standardeja, jotka mitattiin peräkkäin ensin alkuperäisellä letkun mitalla ja sitten pidennetyllä letkulla.

Pumpun nopeuden säätämällä vaikutettiin nesteen virtausnopeuteen ja siten myös reaktioajan pituuteen. Pumpun nopeus säädettiin alkuperäisen 55 %:n sijaan 30 %:in, jolla ajettiin kalibrointi.

Viimeisenä optimoinnissa otettiin huomioon mahdollisuus ajon manuaalisesta pysäytyksestä, joka mahdollistaisi pidemmän reaktioajan. Tämä toteutettiin ohjaamalla laitetta manuaalisesti siten, että näyte ja reagenssit ajettiin kantajavirran mukana 10 cm:n

kyvettiin, jossa virtaus pysäytettiin. Ajo oli pysäytettynä 20 minuuttia, jonka aikana detektorin havaitsema signaalin vaste kerättiin talteen kuvamuodossa.

Spektrometrin asetukset

Laitteen perusominaisuuksien tarkastelun jälkeen siirryttiin tekemään muokkauksia ajo-ohjelmaan ja detektorin signaalin havainnointiasetuksiin. Detektori mittaa näytteestä saatua vastetta tietyllä taajuudella. Muuttamalla spektrometrin asetusta ”Samples to Average” saatiin määritettyä, kuinka monta tällä taajuudella tehtyä mittausta keskiarvoistettiin. Keskiarvoistuksen tarkoituksena on vähentää spektrisignaalin hälyä. Asetuksen arvoiksi valittiin 1, 5, 10 ja 20, joilla kalibrointi ajettiin.

3.4 Validointi

Validoinnissa käytettiin niitä laitteen herkkyyttä parantavia ominaisuuksia ja asetuksia, jotka oli optimoinnin tulosten perusteella parhaiksi todettu. Mittaukset suoritettiin kahden viikon aikana, samoissa olosuhteissa ja saman tekijän toimesta. Validoinnissa laitteelle säädettiin seuraavat ajoasetukset; aallonpituus 880 nm, 10 cm:n kyvetti, 112,5 cm:n näytesilmukka, 45°C:een reaktiolämpötila, pumpun nopeus 55 % ja Samples to average 10.

Määritettäviä parametreja olivat toteamis- ja määritysraja, tarkkuus, toistettavuus ja mittausepävarmuus. Validointi suoritettiin käyttämällä seuraavia standardeja 0,26 $\mu\text{mol/l}$, 0,526 $\mu\text{mol/l}$, 1,053 $\mu\text{mol/l}$, 3,159 $\mu\text{mol/l}$ ja 10,59 $\mu\text{mol/l}$. Mittauksiin käytetyt muut liuokset valmistettiin kaupallisesta Merck-kantaliuoksesta, jonka pitoisuus oli 1000 mg/l.

Toteamis- ja määritysrajan kvantitatiivisessa määrittämisessä näytteen tulee olla matriisiltaan samanlainen kuin mitattavat näytteet, mutta se saa sisältää itse määritettävään yhdistettä. Toteamis- ja määritysrajan määrittäminen tehtiin mittaamalla 10 rinnakkaisnäytettä MQ- vettä.

Tarkkuuden määrittämisessä analysoitiin referenssimateriaaleja neljä rinnakkaisnäytettä kolmena peräkkäisenä päivänä. Referenssimateriaalina käytettiin pitoisuudeltaan 4,21 $\mu\text{mol/l}$ olevaa fosfaatin standardiliuosta (Merck).

Toistettavuus määritettiin kolmessa eri pitoisuudessa, jotka valittiin kattavasti lineaariselta mittausalueelta. Pitoisuudet olivat 1,05 $\mu\text{mol/l}$, 4,21 $\mu\text{mol/l}$ ja 10,50 $\mu\text{mol/l}$. Kustakin näytteestä tehtiin kolme rinnakkaismittausta ja ne analysoitiin kolmena peräkkäisenä

Mittausepävarmuuden mittaamiseen käytettiin näytettä, jonka pitoisuus oli 4,21 $\mu\text{mol/l}$. Näytettä mitattiin yhteensä kymmenen kertaa kolmen päivän aikana. Jokaisessa mittauksessa tehtiin kalibrointi ja mitattiin yksi näyte.

4 OPTIMOINNIN TULOKSET

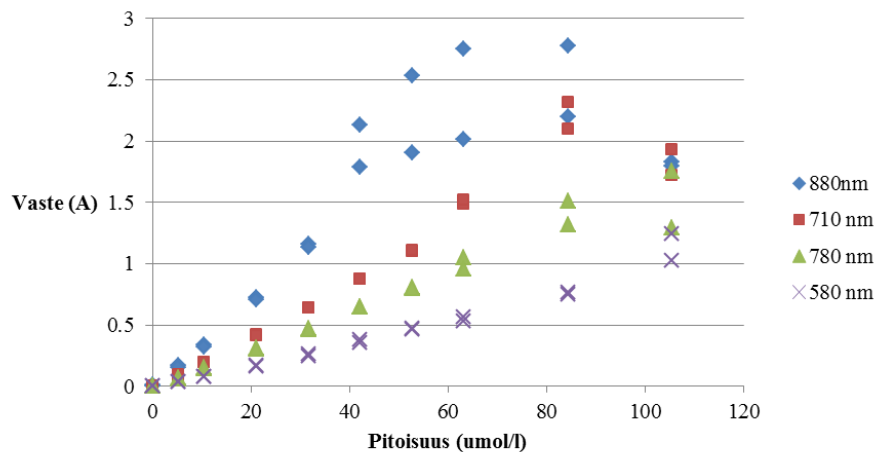
4.1 Carry over -ilmiö

Mittaustulosten perusteella näytteiden välillä tapahtuu hieman kontaminaatiota eli injektioinnin aikana edellistä näytettä sekoittuu seuraavaan. Edellä oleva vahvan pitoisuuden omaava näyte oli seuraavaa vahvaa näytettä 4,02 % pienempi. Tällöin nollanäytteellä oli hieman pienentävä vaikutus seuraavaan vahvan pitoisuuden omaavaan näytteeseen. Tarkasteltaessa suuren pitoisuuden vaikutusta nollanäytteeseen, ei siinä havaittu tapahtuvan kulkeutumista. Vaikka kulkeutumista ei tapahtunut huomattavan paljon, päätettiin silti standardien injektointi järjestys tämän perusteella vaihtaa kulkemaan pienimmästä suurimpaan. Mittaustulokset on nähtävissä liitteessä 3 taulukossa 11.

4.2 Lineaarisuus

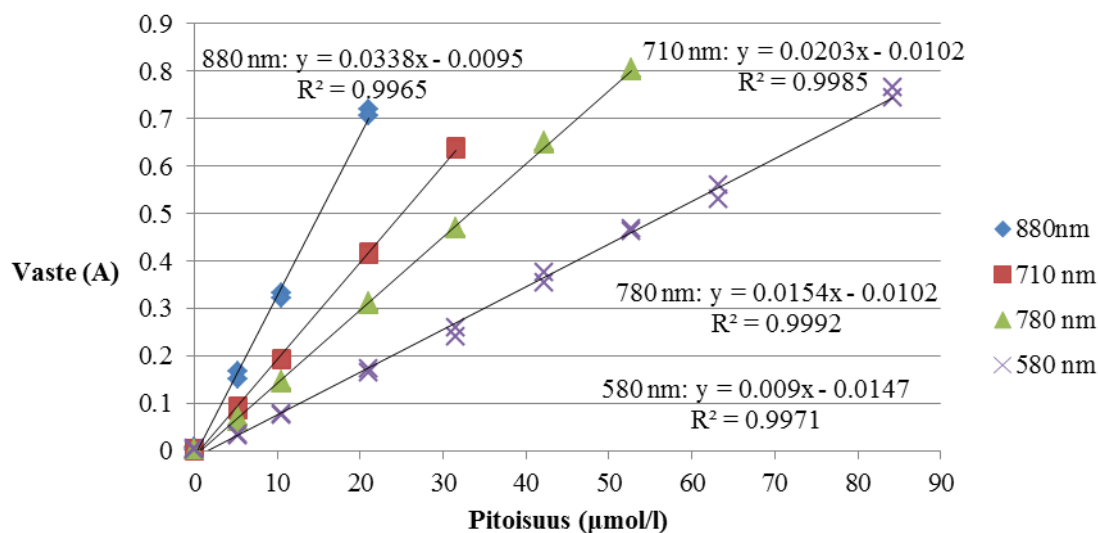
10 cm kyvetillä

Mittaus suoritettiin käyttäen rinnakkaisia standardeja, jotta nähtäisiin myös samojen näytteiden välinen ero mittauksessa, tarkasteltaessa lineaariseen alueen rajoja (kuvio 6). Kuviosta 6 huomataan mentäessä lineaarisen alueen ulkopuolelle, että laitteen mittaama vaste ei ole luotettava ja se ei pysty määrittämään rinnakkaisnäytteitä samoiksi.



KUVIO 6. Lineaarisuustestin kaikki mittaustulokset neljällä aallonpituudella mitattuna. Rinnakkaisten mittaustulosten luotettavuus heikkenee ja suora alkaa kaartua, kun liuoksen antama vaste ylittää 0,8 A rajan, jolloin suora ei ole enää lineaarinen.

Lineaarisuuden rajaksi valittiin mittaustulosten perusteella 0,8 A, jonka jälkeen suora ei ole lineaarinen ja mittaustulokset eivät ole enää luotettavia. Jatkoanalyysissä on otettu huomioon vain ne standardit, joiden vaste ei ylitä tätä rajaa. Kuviossa 7 nähdään rajattu lineaarinen alue mitattuna neljällä eri aallonpituudella.



KUVIO 7. Absorbanssi yksikköön 0,8A rajattu lineaarinen alue, jossa mittaukset on suoritettu aallonpituuksilla 880 nm, 710 nm, 780 nm ja 580 nm aallonpituuksilla

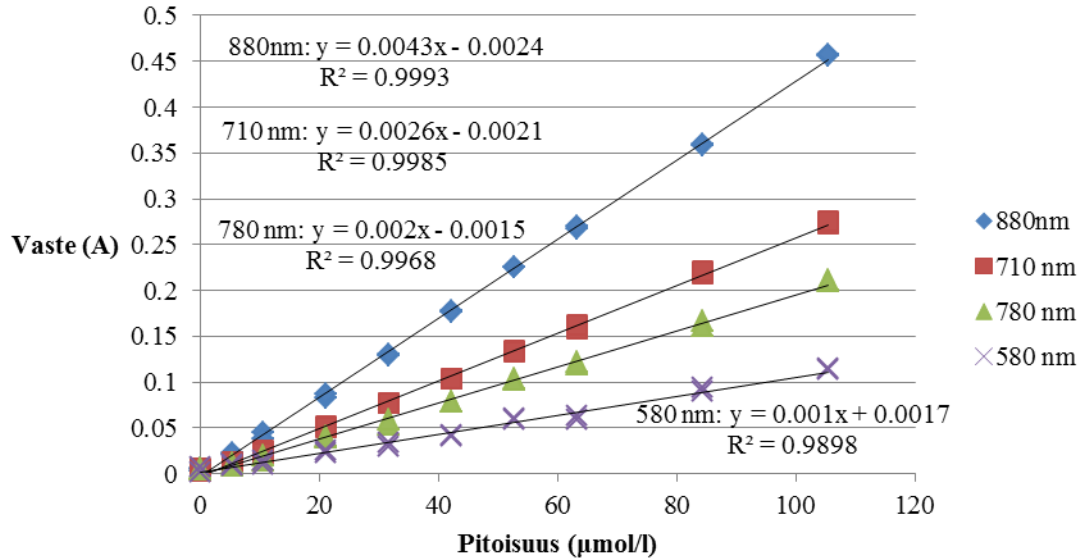
Tuloksissa on vertailtu kaikkia käytettäviä aallonpituuksia 880 nm, 780 nm, 710 nm ja 580 nm. Näistä kuitenkin 880 nm on se aallonpituus, jolla pystytään mittaamaan pienimpiä pitoisuuksia 10 cm kyvetiä käytettäessä eli herkkyys on parempi. Taulukossa 3 nähdään ne arvot, joita voidaan tällaisella kalibroinnilla suurimmillaan mitata ilman, että näytteitä tarvitsisi laimentaa.

TAULUKKO 3. Lineaarisen mittausalueen ylärajat mitattuna aallonpituudella 880 nm ja 10 cm:n kyvetillä. Ylärajat on laskettu 0,8 A:n mukaan, johon lineaarinen alue päättyy

Aallonpituus (nm)	Yläraja (µmol/l)
880nm	24.0
710 nm	39.9
780 nm	52.6
580 nm	90.5

1 cm kyvetillä

Määrittäessä lineaarisuutta 1 cm kyvetillä kaikkien mitattujen näytteiden antamat vasteet jäivät reilusti alle 0,8 A. Esitetyt kalibrointisuorat ovat kaikilla aallonpituuksilla mitattuna lineaarisia (kuvio 8). Myös 1 cm kyvetin kohdalla aallonpituudella 880 nm saadaan paras herkkyys mittaauksessa.



KUVIO 8. Lineaariset mittaalueet, joissa mittaus on tehty 1 cm kyvetillä ja neljällä eri aallonpituudella

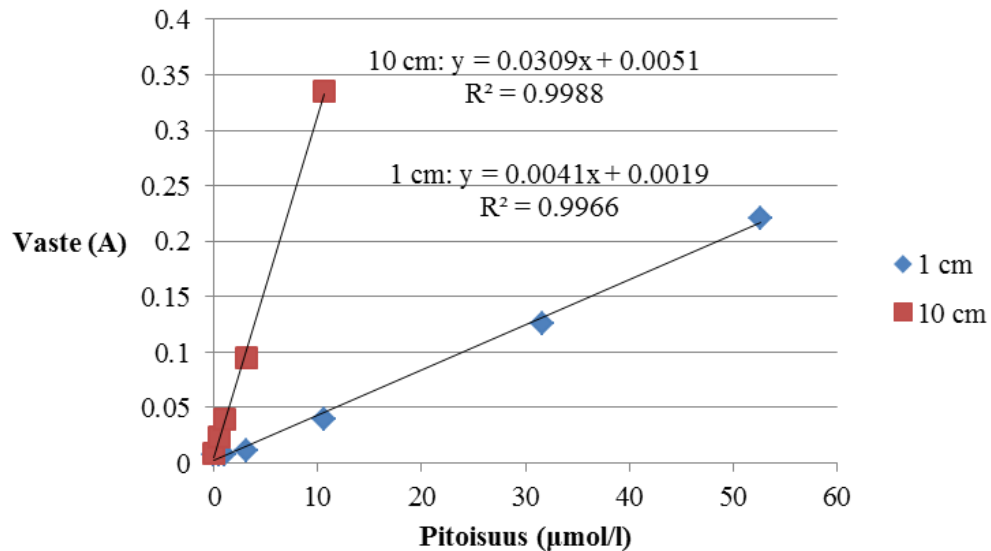
Lineaarisuusalueetta määrittäessä selvisi, että 1 cm:n kyvetin käyttö soveltuu parhaiten suurien fosfaattipitoisuuksien mittaukseen laajan mittaalueensa perusteella. Tällä kyvetillä voidaan mitata fosfaattipitoisuuksia aina jopa noin 800 µmol/l asti aallonpituudesta riippuen (taulukko 4).

TAULUKKO 4. Lineaarisen mittaalueen ylärajat mitattuna aallonpituudella 880 nm ja 1 cm:n kyvetillä. Ylärajat on laskettu 0,8 A:n mukaan, johon lineaarinen alue päättyy

Aallonpituus (nm)	Yläraja (µmol/l)
880nm	186.6
710 nm	308.5
780 nm	400.75
580 nm	798.3

4.3 Kyvetin valotien pituuden vaikutus

Kahta erimittaista kyvetiä vertailtaessa tuloksena on, että 10 cm:n kyvetillä saadaan parempi herkkyys saavutettua. Kuviosta 9 nähdään, että kalibrointisuoran kulmakerroin on suurempi 10 cm:n kyvetillä, ja siten tällä kyvetillä mitattu pieni pitoisuus antaa suuremman vasteen kuin 1 cm:n kyvetillä mitattaessa.

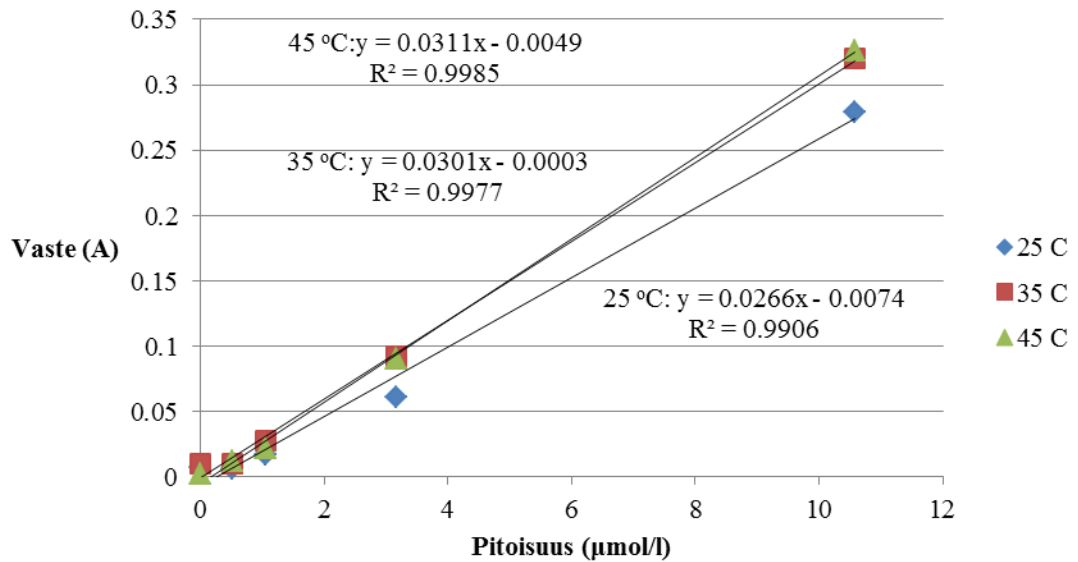


KUVIO 9. Kahdelle eri mittaiselle kyvetille laaditut kalibrointisuorat 880 nm aallonpituudella mitattuna.

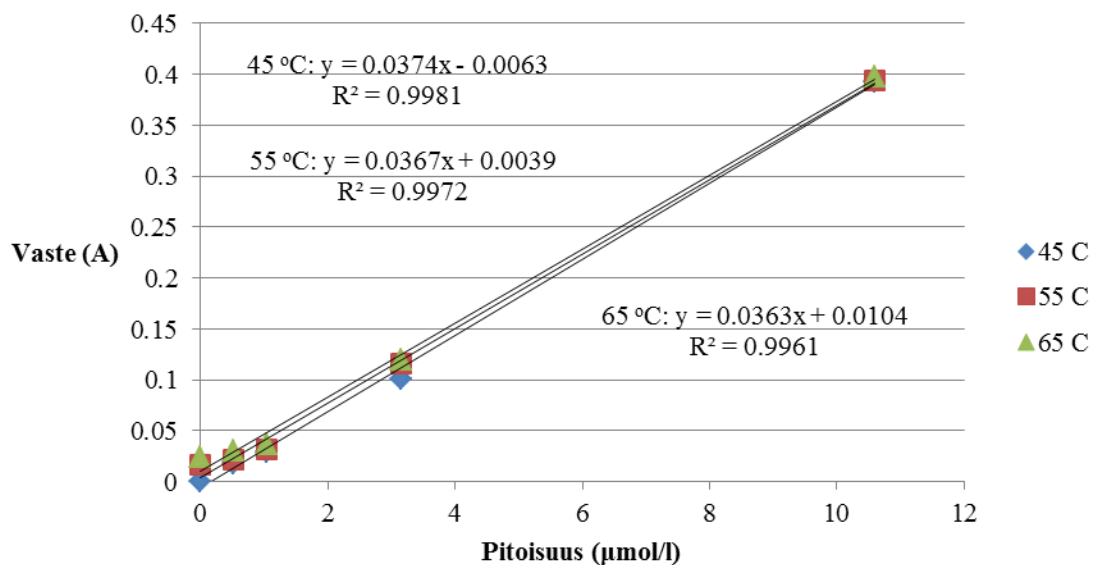
Tarkasteltaessa kyvetien mittausalueen ylärajoja, 1 cm kyvetille tämä on 195,76 µmol/l ja 10 cm kyvetille 25,71 µmol/l. Laitteen mittaamien vasteiden ero on 7,6-kertainen. Lambert-Beerin lain mukaan eron tulisi olla kymmenkertainen. Pidentämällä kyvetiä saadaan parannettua herkkyyttä, joten jatkoanalyysiin valittiin 10 cm kyveti.

4.4 Reaktiolämpötilan vaikutus

Koska lämpötilavertailussa tehdyn mittaukset tehtiin eri päivinä, on niiden kalibrointisuorien arvojen välillä eroja. Molemmissa mittauksissa on kuitenkin käytetty 45 °C:een lämpötilaan, jolloin tuloksia voidaan verrata toisiinsa. Tulokset on nähtävissä selkeästi kuvioista 10 ja 11.



KUVIO 10. Ensimmäisen päivän mittauksista laaditut kalibrintisuorat, jotka on mitattu 25°C, 35°C ja 45°C:ssa käyttäen aallonpituutta 880 nm



KUVIO 11. Toisen päivän mittauksista laaditut kalibrintisuorat, jotka on mitattu 45°C, 55°C ja 65°C:ssa aallonpituudella 880 nm

Parhaiten lämpötilan vaikutuksen huomaa vertailtaessa mittausalueen ylärajoja eli niitä pitoisuuksia joita voidaan suurimmillaan kyseisellä kalibrintisuoralla mitata (taulukko 5). Suurin ero on 25 ja 35 °C:ssa tehtyjen mittausten kalibrintisuorien välillä. Tämä tarkoittaa sitä, että herkkyys paranee, kun lämpötilaa nostetaan. Toisessa mittauksessa 45, 55 ja 65 °C:ssa tehtyjen mittausten herkkyydessä ei ole huomattavaa eroa. Siirryttäessä 35°C:sta mittaamaan 45°C:lla ero on hyvin pieni, mutta osoittaa kuitenkin herkkyyden kasvavan. Lopulta päädyttiin valitsemaan reaktiolämpötilaksi 45 C jatko-

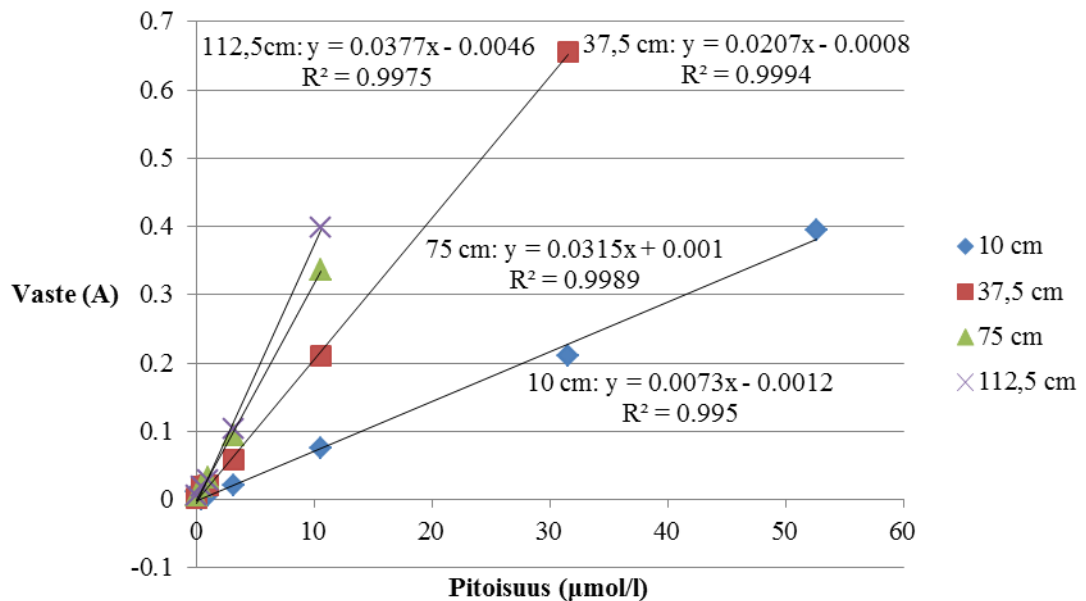
analyysien mittaukseen, sillä tämän korkeammalla lämpötilalla ei juuri ole vaikutusta reaktion tapahtumiseen.

TAULUKKO 5. Lineaarisen mitta-alueen ylärajat mittauksissa käytetyille lämpötiloille. Ylärajan pitoisuus on laskettu lineaarisen alueen rajan 0,8 A:n mukaan

	Lämpötila (°C)	Yläraja (µmol/l)
1. Mittaus	25	30,4
	35	26,6
	45	25,9
2. Mittaus	45	21,6
	55	21,7
	65	21,8

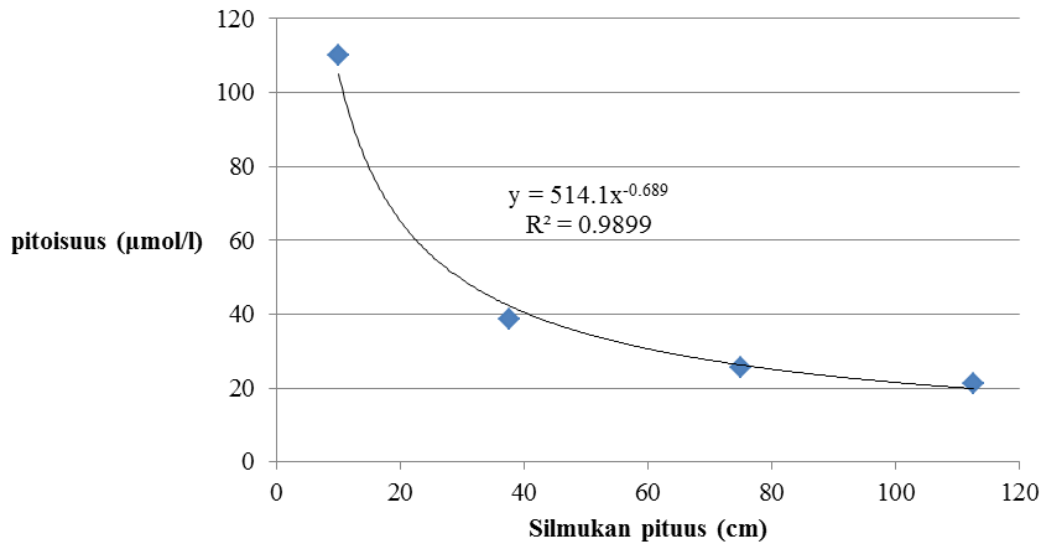
4.5 Näytesilmukan pituuden merkitys

Injektoitavan näytteen määrää saadaan muutettua näytesilmukan pituutta säätämällä. Mittauksessa vertailtiin 10 cm, 37,5 cm, 75 cm ja 112,5 cm mittaisia näytesilmukoita (kuvio 12).



KUVIO 12. Aallonpituudella 880 nm ja neljällä eripituuisella näytesilmukalla määritetyt kalibrointisuorat sekä niiden suoranyhtälöt ja korrelaatiokertoimet

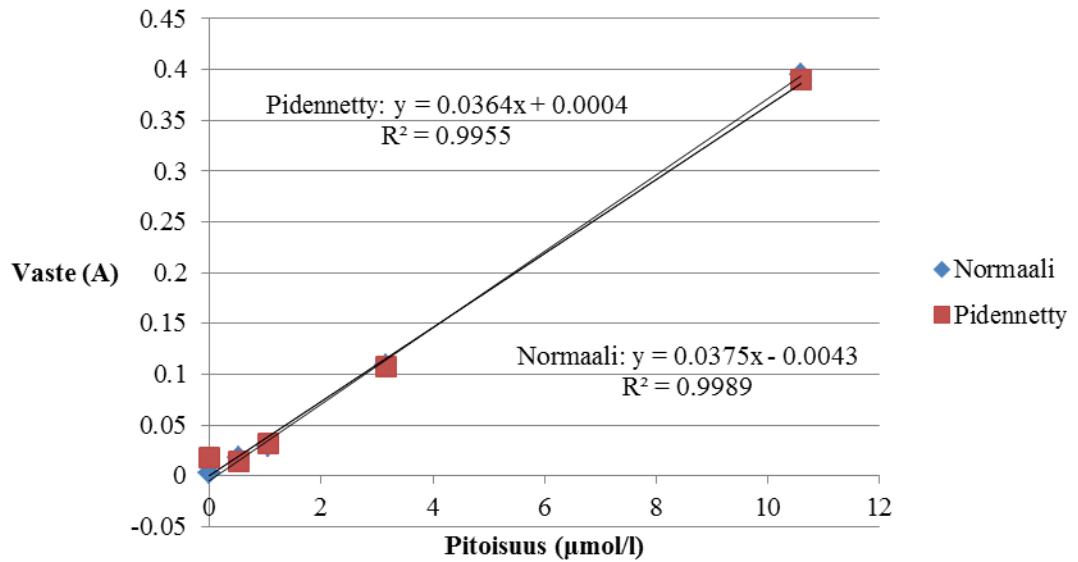
Kuvion 13 kalibroitaisuoria tarkasteltaessa nähdään, että 112,5 cm:n näytesilmukalla mitatun suoran kulmakerroin on suurin eli herkkyys on paras tällä pituudella mitattuna. Pituuden lisäyksen vaikutus on nähtävissä myös kuviosta 12, jossa mittausalueen yläraja on pystyakselilla ja näytesilmukan pituus vaaka-akselilla. Mittausalueen yläraja pienenee pidennettäessä näytesilmukkaa ja näin ollen myös herkkyys paranee.



KUVIO 13. Logaritminen kuvaaja, josta nähdään miten näytesilmukan pituuden lisäys vaikuttaa mittausherkkyyteen. Herkkyys kasvaa pidennettäessä silmukan pituutta, ja näin ollen myös mittausalue pienenee. x-akseli ilmoittaa näytesilmukan pituuden ja y-akselilla nähdään mittausalueen ylärajan arvo eli suurin määritettävä pitoisuus, joka on mahdollista mitata kyseisellä silmukan pituudella

4.6 Reaktioajan pituus

Reaktioaikaa pyrittiin lisäämään pidentämällä reaktioletkun pituutta yhdellä reaktiokierukalla. Tällöin näyte ja reagenssit ehtivät sekoittua toisiinsa paremmin. Kuviossa 14 nähdään eri reaktioajoilla tehtyjen mittausten kalibroitaisuorat. Molempien kalibroitaisuorien suoran yhtälöt ja siten myös kulmakertoimet ovat hyvin lähellä toisiaan.



KUVIO 14. Kalibrointisuorat mittauksista, joissa reaktioaikaa pidennettiin lisäämällä yksi reaktiokierukka laitteen alkuperäisen kahden reaktiokierukan lisäksi

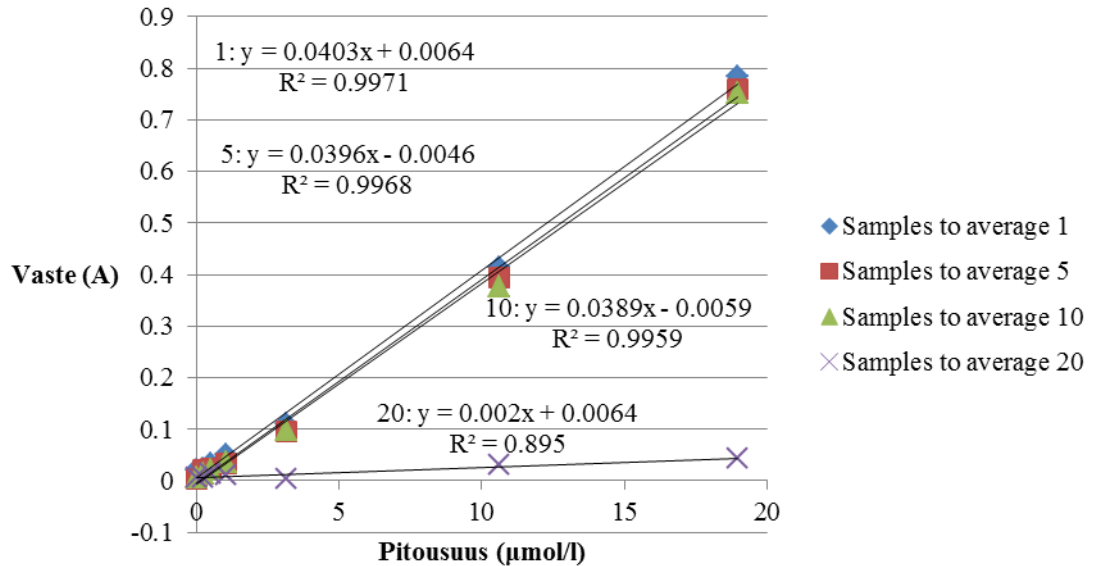
Laskemalla, 0,8 A rajaa käyttäen, näille kalibroinneille mittausalueen ylärajat, niiden välillä on vain 0,5 $\mu\text{mol/l}$ ero. Taulukosta 6 nähdään mittausalueen ylärajojen arvot. Mittausten perusteella reaktioajan pidennys yhdellä reaktiokierukalla ei ollut merkittävä.

TAULUKKO 6. Lineaarisen mittausalueen ylärajat, jotka ilmaisevat suurinta mahdollista määritettävää pitoisuutta

Pituus	Yläraja
Kaksi kierukkaa	22.0
Kolme kierukkaa	21.5

4.7 Spektrometrin asetukset

Spektrometrin asetuksista signaalin keräyksen keskiarvoistusta vertailtiin neljällä eri asetuksen arvolla; 1, 5, 10 ja 20. Näillä muutoksilla saadut kalibrointisuorat ovat esitettyinä kuviossa 15.

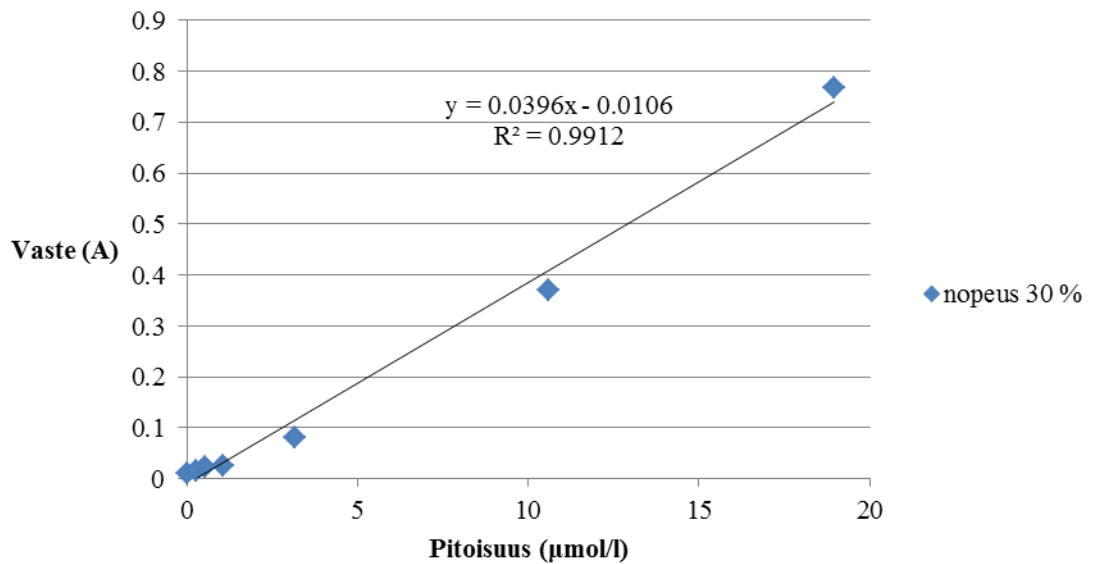


KUVIO 15. Neljällä eri keskiarvoistus-asetuksella saadut kalibrointisuorat mitattuna aallonpituudella 880 nm

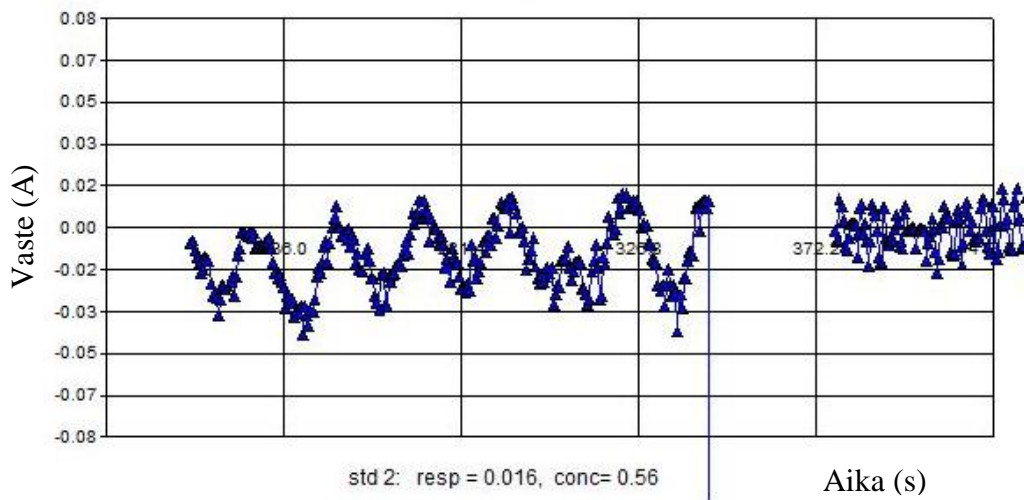
Asetuksen arvolla 1 laitteen piirtämistä spektreistä nähtiin, että niissä esiintyy paljon ylimääräistä hälyä signaalissa, jotka vaikeuttavat analyytin pitoisuuden detektointia. Laite mittaa näytteen pitoisuuden piikkien korkeuden perusteella ja hälyinen signaali aiheuttaa liian korkeita piikkejä. Laite saattaa valita juuri tämän hälypiikin kohdan, jolloin näytteen mitattu pitoisuus vääristyy. Täten se antaa vaihtelevia, epäluotettavia tuloksia ajoittain. Asetus arvolla 20 keskiarvoisti signaalin keräystä liikaa, jolloin tulokseksi saatiin toisistaan todella paljon eroavia absorbansseja/pitoisuuksia. Kalibrointisuoria ja spektrikuvaajia tarkasteltaessa tultiin siihen tulokseen, että asetusta arvolla 10 käytetään jatkossa mittauksiin. Mittaustulokset on nähtävillä liitteessä 4 taulukoissa 12-15.

4.8 Pumpun nopeus

Pumpun nopeutta koetettiin vaihtaa 55 %:n sijaan 30 %:in. Kuviossa 16 nähdään saatu kalibrintisuora, josta ei pelkästään voi vielä päätellä ettei nopeus soveltuisi mittauksiin. Laitteen piirtämässä spektrikuvaajassa kuitenkin näkyi pumpun hitaasta nopeudesta johtuvaa pulssia eli aaltomaista kuviota (kuvio17). Tästä johtuen ei ajettu vertailevaa kalibrintia samana päivänä nopeudella 55 %. Tämän perusteella pumpun nopeus myös pidettiin jatkossakin 55 %:ssa.



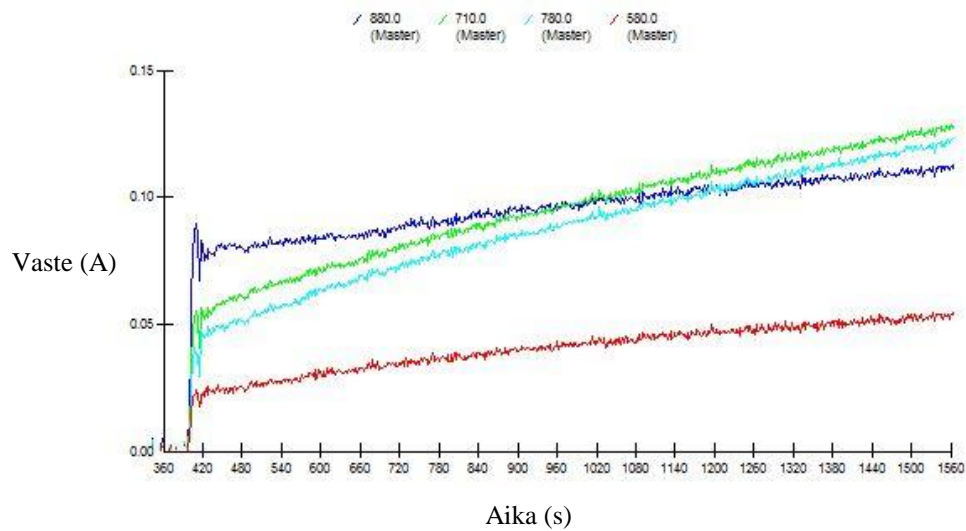
KUVIO 16. Pumpun nopeudella 30 % saatu kalibrintisuora mitattuna aallonpituudella 880 nm



KUVIO 17. Hitaammalla pumpun nopeudella (30%) tehdyssä mittauksessa, pumpun pyörimistahti aiheutti spektrikuvaajaan aaltomaista kuviota

4.9 Pysäytetty virtaus

Pysäytetyn virtauksen ajossa kerättiin signaalia 20 minuutin ajan. Kuviossa 18 nähdään tänä aikana kerätyn signaalin muutos sinisenä viivana mitattuna aallonpituudella 880 nm. Pysäytyksen aikana saatu vaste kohosi vain noin 0,02 absorbanssiyksikköä. Tästä päätelmänä, että pysäytettyä virtausta mittauksissa ei kannata alkaa suunnitella, koska vaikutus ei ole huomattava.



KUVIO 18. Pysäytetyn ajon aikana tapahtuva vasteen muutos spektrissä ajan funktiona, jossa tumman sinisenä näkyy aallonpituus 880 nm, vihreänä 710 nm, turkoosina 780 nm ja punaisena 580 nm

5 VALIDOINNIN TULOKSET

Toteamis- ja määritysraja laskettiin nollanäytteiden keskiarvon ja keskihajonnan avulla. Mittauksessa saadut mittaustulokset näkyvät liitteessä 5 olevassa taulukossa 16. Toteamisrajaksi saatiin 0,40 µmol/l ja määritysrajaksi 0,72 µmol/l.

Tarkkuutta ja systemaattista virhettä määrittävistä mittauksista tarkkuudeksi saatiin 0,7 %, jolloin tulokset poikkeavat enimmillään tämän verran todellisesta arvosta. Fosfaatin saanto keskiarvoista laskettuna on 98,3 % ja satunnaisvirhe 2,3 %. Mittaustulokset on nähtävillä liitteessä 5 olevassa taulukossa 17.

Toistettavuusmittauksissa käytettiin kolmea eri pitoisuudeltaan olevaa näytettä, joiden pitoisuudet olivat 1,05 µmol/l, 4,21 µmol/l ja 10,50 µmol/l. Ensimmäiselle näytteelle toistettavuudeksi saatiin 95,1 %, toiselle näytteelle, 92,2 % ja kolmannelle näytteelle 98,5 % (taulukko 7).

TAULUKKO 7. Toistettavuusmittauksessa mitattujen näytteiden tulokset, joista on laskettu keskiarvo, keskihajontaa sekä näiden avulla toistettavuus ja satunnaisvirhe (RSD%)

Mittauspäivä	Näyte 1 1,05 µmol/l	Näyte 2 4,21 µmol/l	Näyte 3 10,50 µmol/l
29.9.2014	1,15	4,99	10,49
29.9.2014	1,02	4,94	10,51
29.9.2014	1,05	4,99	10,56
1.10.2014	1,05	4,91	10,87
1.10.2014	1,07	5,06	10,48
1.10.2014	1,03	5,03	10,57
2.10.2014	0,96	4,17	10,81
2.10.2014	1,03	4,26	10,81
2.10.2014	1,01	4,34	10,77
Keskiarvo	1,04	4,74	10,65
Keskihajonta	0,05	0,37	0,16
Toistettavuus	95,1 %	92,2 %	98,5 %
Satunnaisvirhe (RSD%)	4,94 %	7,82 %	1,50 %

Kokonaispävarmuudeksi saatiin mittaustulosten perusteella laskettua 2,36 %. Laajennetuksi epävarmuudeksi saatiin 4,72 %. Mittausepävarmuustestissä saadut mittaustulokset ja niistä lasketut parametrit ovat esitettyinä taulukossa 8.

TAULUKKO 8. Mittausepävarmuus testissä mitatut tulokset liuoksella, jonka pitoisuus oli 4,21 $\mu\text{mol/l}$, ja näiden perusteella lasketut parametrit

Päivämäärä	Näyte
6.10.2014	4,28 $\mu\text{mol/l}$
6.10.2014	4,19 $\mu\text{mol/l}$
6.10.2014	4,34 $\mu\text{mol/l}$
6.10.2014	4,24 $\mu\text{mol/l}$
7.10.2014	4,20 $\mu\text{mol/l}$
7.10.2014	4,29 $\mu\text{mol/l}$
8.10.2014	4,14 $\mu\text{mol/l}$
8.10.2014	4,18 $\mu\text{mol/l}$
8.10.2014	4,00 $\mu\text{mol/l}$
8.10.2014	4,10 $\mu\text{mol/l}$
Keskiarvo	4,20 $\mu\text{mol/l}$
Keskihajonta	0,10 $\mu\text{mol/l}$
Satunnaisvirhe (RDS- %)	2,34 %
Systemaattinen virhe	-0,31 %
Kokonaispävarmuus	2,36 %
Laajennettu epävarmuus	4,72 %

Validoinnin mittaustulokset on yhdistetty taulukkoon 9, jossa näkyy arvot parametreille toteamis- ja määrittäysraja, tarkkuus, saantoprosentti, toistettavuus, kokonaisepävarmuus ja laajennettu epävarmuus.

TAULUKKO 9. Yhteenveto validoinnissa määritettyjen parametrien tuloksista

Parametri	Arvo
Toteamisraja	0,40 µmol/l
Määrittäysraja	0,72 µmol/l
Tarkkuus	0,73 %
Saantoprosentti	98,3 %
Toistettavuus	Näyte 1: 95,1 %, näyte 2: 92,2 %, näyte 3: 98,5 %
Kokonaisepävarmuus	2,36 %
Laajennettu epävarmuus	4,72 %

6 POHDINTA

Työn tavoitteena oli parantaa FIA-analysaattorin herkkyyttä fosfaattimittauksiin, joissa näytteenä käytetään merivettä. Lisäksi haluttiin saada laaja dynaaminen mittausalue, jotta laitetta voitaisiin hyödyntää leväkasvatuskokeiden fosfaattipitoisuuden määrittämiseen. Työssä tehtiin FIA-analysaattorille optimointi, jossa selvitettiin eri asetusten vaikutus laitteen herkkyyteen. Laite validoitiin herkkyyttä parantavilla asetuksilla ja siinä määritettiin toteamis- ja määrittämissrajat, tarkkuus, toistettavuus, kokonaisuvarmuus ja laajennettavuus. Saatujen tulosten pohjalta pohdittiin eri asetusten vaikutusta herkkyyteen sekä laitteen soveltuvuutta, validoinnin tulosten perusteella, merivesi- ja leväkasvatuskoenäytteiden mittaukseen.

Carry over -ilmiössä on kyse laboratoriovälineiden tai laitteiston kontaminoitumisesta analytyillä. Laitteistoon absorboitunut analyty aiheuttaa signaalin muutosta mitattavissa näytteissä. Varsinkin FIA:n kaltaisessa laitteistossa näytteiden injektointien välissä injektointineulaa ei huuhdella, mikä saattaa edesauttaa analytyin kulkeutumista näytteestä toiseen. Tehdyn carry over-testin perusteella kontaminoitumisen määrä ei ollut kovinkaan merkittävä. Nollanäytteellä oli selkeästi enemmän vaikutusta seuraavaan vahvaan pitoisuuteen, kun taas vahva näyte ei vaikuttanut juurikaan nolla näytteeseen suuremman tavoin. Testin perusteella mittauksissa tulee kuitenkin välttää suuria pitoisuus eroja peräkkäisten standardien ja näytteiden välillä.

Lineaarista aluetta tarkasteltiin kahdenkymmenen kalibrointinäytteen avulla, joiden pitoisuudet vaihtelivat välillä 0-105,3 $\mu\text{mol/l}$. Lineaarisuusalue määritettiin ensin 10 cm:n kyvetillä ja mittauksiin käytettiin aallonpituuksia 880 nm, 710 nm, 780 nm ja 580 nm. Näillä aallonpituuksilla mitatuista tuloksista huomattiin rinnakkaisten näytteiden pitoisuuksien eron kasvavan ja suoran kaartuvan, kun näytteen vaste ylittää 0,8 absorptiokertoimen. Lineaarisuuden rajaksi valittiin tämä arvo, jonka jälkeen suora ei ole enää lineaarinen ja mittauksien tulokset ovat epäluotettavia. Käytetyistä aallonpituuksista analytyin absorptiomaksimi sijaitsee 880 nm:ssa, jota käytettiin perustellessa aallonpituuden valintaa (Grasshoff, Kremling & Ehrhardt 1983, 128). Aallonpituudella 880 nm määritetyllä lineaarisella mittausalueella voidaan suurimmillaan mitata pitoisuudeltaan 24 $\mu\text{mol/l}$ olevia näytteitä ja tätä vahvemmat näytteet tulee laimentaa mittausalueeseen sopiviksi tai mitata toisella aallonpituudella.

Lineaarisen alueen vasteen ylärajaksi valittiin 1 cm:n kyvetin kohdalla myös 0,8 A ja kaikki mittauksissa käytetyt kalibrointiliuokset pysyivät lineaarisella alueella. Tätä kyvettä käyttämällä voidaan suurimmillaan määrittää fosfaattipitoisuuksia 800 $\mu\text{mol/l}$ asti valitusta aallonpituudesta riippuen. Lyhyemmällä 1 cm: kyvetillä tehdyt mittaukset osoittivat, että sillä saadaan aikaiseksi laaja dynaaminen mitta-alue ja tätä pituutta käyttämällä pystytään mittaamaan hyvin suuriakin pitoisuuksia.

FIA-analysointia käytettäessä on mahdollista valita mittauksiin eripituiset kyvetit. Kyvetin pituudella pystytään vaikuttamaan laitteen herkkyyteen ja vertailussa olleista 1 cm:n ja 10 cm:n kyveteistä parempi herkkyys oli pidemmällä 10 cm:n kyvetillä. Kyvetin valotien pituus määrittelee mitattavan näytteen paksuuden, joka vaikuttaa mitattavaan intensiteettiin eli siihen kuinka valo läpäisee mitattavan näytteen. Pieniä pitoisuuksia pystytään mittaamaan luotettavammin pidemmällä kyvetillä, koska silloin laimeaa näytettä mahtuu valotiehen enemmän ja näin ollen mitattu absorptio on suurempi kuin käytettäessä lyhyttä kyvettä.

Aallonpituuden ja kyvetin valotien pituuden valinnalla voidaan vaikuttaa mitta-alueen laajuuteen. Käyttämällä erilaisia yhdistelmiä saadaan aikaan niin sanottu optinen laimennos ilman, että näytettä tarvitsisi konkreettisesti laimentaa. Tämä vähentää virhettä tehtäessä laimennosta käsin. Optista laimennosta pystytään hyödyntämään mittauksissa FIA-analysointilla, kun on mahdollista käyttää erimittaisia kyvetejä tai useaa aallonpituutta samanaikaisesti.

Rektiolämpötilalla on olennainen vaikutus reaktion kulkuun, sen nopeuteen ja voimakkuuteen. Tehdyissä lämpötilavertailuissa lämpötilan nostolla saatiin nopeutettua tapahtuvaa värireaktiota. FIA-analysointissa reagoimisaika on vain muutamia kymmeniä sekunteja, johtuen jatkuvasta virtauksesta, jolloin lämpötilan nosto on tarpeellinen herkkyyden parantamiseksi. Tehtyjen kokeiden perusteella ei kuitenkaan ole tarpeellista nostaa lämpötilaa korkeammalle kuin 45 °C:een, sillä lämpötilan nostolla ei ole enää suurta vaikutusta herkkyyteen. Manuaalisissa käsin tehtävissä fosfaatinmääritysmenettelyissä reagenssilisäysten jälkeen ei käytetä lämmitystä lainkaan, vaan värin kehitymisaika on pidempi noin 10- 30 minuuttia (Grasshoff, Kremling & Ehrhardt 1999, 174).

Näytesilmukan pituuden merkitys herkkyyteen on selkeä tehtyjen mittauksien ja niistä laadittujen kalibrointisuorien perusteella (kuvio 12). Silmukan pituushan määritteli in-

jektoitavan näytteen tilavuuden. Mitä pidempi tämä silmukka on, sitä enemmän näytettä injektoidaan kantajavirtaan ja näin ollen reagenssien kanssa reagoivan analyytin, fosfaatin, määrä on suurempi. Analyytin suurempi määrä nostaa mitattavan vasteen suuruutta samalla parantaen laitteen herkkyyttä. Tämä johtuu näytteen suuremmasta dispersiosta reagensseihin. Kappaleen 4.5 kuvion 13 perusteella voidaan sanoa, että näytesilmukan pituus verrattain mitta-alueen ylärajanarvoon pienentyy logaritmisesti, jolloin silmukan pituuden venytys äärimmilleen ei enää merkittävästi paranna herkkyyttä.

Näytteen reaktioaikaa pyrittiin pidentämään asentamalla laitteeseen yksi reaktiokierukka lisää. Tällä lisäyksellä ei mittaustulosten perusteella ollut vaikutusta mittauksen herkkyyteen, sillä kalibrointisuorien kulmakertoimet olivat lähes samat. Yhden reaktiokierukan lisäyksellä saatiin muutamia sekunteja lisättyä reaktioaikaa, mutta sen merkitys jäi vähäiseksi.

Reaktioaikaan ja siten värireaktion voimakkuuteen pyrittiin vaikuttamaan myös pumpun nopeutta muuttamalla ja pysäyttämällä virtaus manuaalisesti näytteen ollessa kyvetissä. Pumpun nopeuden hidastaminen ei onnistunut, sillä pumpun pyörimistahti aiheutti spektrikuvaajaan rytmitystä kappaleen 4.8 kuviossa 17 näkyvällä tavalla. Laite mittaa näytteen pitoisuuden piikin korkeuden perusteella, jolloin aaltoilevuus spektrikuvaajassa haittaa määrittystä.

Virtauksen manuaalisella pysäytyksellä ei myöskään ollut suurta vaikutusta reaktion kulkuun. Mittaukseen valittu reaktioaika, 20 minuuttia, valittiin perinteisen käsin tehtävän fosfaatin määritysmenetelmän avulla. Reaktiossa muodostuva sininen molybdaattikompleksiyhdiste pysyy stabiilina, muuttumattomana yli tunnin ajan (Grasshoff ym. 1999, 174). Tästä huolimatta mittaus tulee kuitenkin tehdä 10-30 minuutin kuluttua reagenssilisäyksestä (Grasshoff ym. 1999, 74; SFS-EN ISO 6878, 2004). Spektrometrin mittaama vaste nousi 20 minuutin pysäytyksen aikana vain noin 0,2 absorbanssiyksikköä. Tämä muutos ei ollut niin merkittävä, että kannattaisi alkaa jatkossa suunnittelemaan menetelmään virtauksen pysäytystä.

Spektrometrin samples to average-asetuksella pyrittiin vähentämään detektorin mittaaman signaalin hälyn määrää, piirtyvässä spektrikuvaajassa. Työtä aloitettaessa asetusarvo oli 1 eli kaikki tietyllä taajuudella tehdyt mittaukset otettiin huomioon. Tällä asetuksella spektrikuvaajaan piirtyi paljon hälypiikkejä, jotka vaikeuttivat näytteiden pitoi-

suuksien havainnointia. Asetusarvolla 20 mittauksia puolestaan keskiarvoistettiin liikaa, minkä vuoksi tällä asetuksella mitatut näytteiden vasteet eroavat toisistaan huomattavasti (liite 4; taulukko 15). Asetuksilla 5 ja 10 tehtyjen mittaustulosten välinen ero oli hyvin pieni, mutta lopulta päädyttiin valitsemaan asetus 10 jatkomittauksiin, sen ollessa myös laitevalmistajan suosittama.

Validoinnissa analyytin toteamisrajaksi mitattiin 0,4 $\mu\text{mol/l}$ ja määritysrajaksi 0,72 $\mu\text{mol/l}$. Toisen Merikeskuksessa rutiinikäytössä merivesimittauksissa olevan ravineanalysointilaitteen toteamisraja on 0,03 $\mu\text{mol/l}$ ja määritysraja 0,04 $\mu\text{mol/l}$. FIA-analysointilaitteelle määritetty toteamisraja on kymmenkertainen näihin verrattuna ja määritysraja 18-kertainen. Nykymuodossaan oleva laite ei tämän vuoksi sovellu Itämeren fosfaattipitoisuuksien mittaukseen. Kokeellisiin leväkasvatuskokeisiin se kuitenkin soveltuu, sillä niissä fosfaattipitoisuudet ovat noin 20-100 $\mu\text{mol/l}$ kokeen alkaessa.

FIA-analysointilaitteelle määritetty mittaustarkkuus on todella hyvä, 0,7 %. Tämä tarkoittaa, että mitatut tulokset poikkeavat toisistaan enimmillään tämän verran. Alhaisia pitoisuuksia mitattaessa laitteen tulee olla tarkka, jotta pystytään erottamaan pienetkin vasteen vaihtelut ja tulokset ovat luotettavia sekä tasalaatuisia. Laite havaitsee myös hyvin tarkasti kaiken näytteen sisältämän analyytin määritetyn saantoprosentin perusteella.

Toistettavuus määritettiin kolmella eri pitoisuudella, koska toistettavuus on usein pitoisuudesta riippuvainen. Toistettavuus oli kaikilla pitoisuuksilla mitattuna yli 90 %, mikä on hyvä tulos. Tuloksista huomattiin, että toistettavuus oli paras aivan mitta-alueen yläpäässä. Mittausalueen alkupäähän mentäessä toistettavuus laskee hieman, mikä oli oletettavaa jo määritettyjen toteamis- ja määritysrajojen perusteella. Oletettavasti FIA-analysointilaitteen toistettavuus pienissä pitoisuuksissa paranisi, jos toteamis- ja määritysrajoja saataisiin alemmaksi sekä värireaktiota vahvemmakeksi.

FIA-analysointilaitteella määritetyt mittausepävarmuudet olivat alhaiset, kokonaisepävarmuus vain 2,36 % ja laajennettu epävarmuus 4,72 %. Mittaustuloksien mittausepävarmuudet voivat johtua muutoksista matriisissa. Sen koostumuksessa saattaa vaihdella valmistuksesta riippuen tai johtuen reagenssien sekoituksesta laitteella. Standardien ja näytteiden valmistus sisältää aina epävarmuutta, kun työ tehdään käsin pipetoimalla. Myös ympäristötekijät, kuten huonelämpötilan vaihtelu, saattaa vaikuttaa mittausepä-

varmuuteen. Mitatut epävarmuudet olivat kuitenkin niin alhaiset, etteivät ne aiheuta jatkotoimenpiteitä.

Työssä saatujen tulosten perusteella saavutettiin sille asetetut tavoitteet ja FIA-analysointilaitteen herkkyyttä saatiin parannettua optimoinnissa valittujen asetusten avulla. Laitteella on melko alhainen toteamis- ja määrittämiss raja, se on tarkka ja havaitsee näytteen sisältämän analyytin 98 %:sti, toistettavuus on hyvä koko mittausalueella sekä mitausepävarmuudet ovat alhaiset.

Luonnonvesinäytteitä mitattaessa toteamis- ja määrittämiss rajan olisi hyvä olla pienemmät. Merivesinäytteiden mittauksessa FIA-analysointilaitteen käyttö ei tällaisenaan ole mahdollista, sillä lähellä nollaa olevia pienimpiä pitoisuuksia ei pystytä määrittämään tarkasti. Esimerkiksi vuonna 2000-2013 Algaline-hankkeen määrittämät fosfaattipitoisuudet Itämerellä olivat suurimmillaan noin 1 µmol/l (Itämeriportaali 2014). Vaihtoehtoja jatkotoimenpiteille pienten pitoisuuksien mittauksen parantamiseen ovat värireaktion vahvistaminen ja pidemmän, jopa 1 m mittaisen, läpivirtauskyvetin käyttö. Toinen rajoittava tekijä laitteen käytössä, merivesinäytteiden mittaamiseen, on meriveden matriisiin sisältämä suola. Meriveden suolaisuuden vaikutusta ei ole otettu huomioon tehdyissä mittauksissa. Matriisin suolaisuuden muutos vaikuttaa spektrometrin mittaamaan vasteeseen, jolloin käytetyt standardit ja nollanäytteet tulee valmistaa myös suolaveteen.

Leväkasvatuskokeissa periaatteena on, että kasvatukseen lisätään tietty määrä ravinteita, kuten fosfaattia ja nitraatti. Kokeissa käytetään huomattavasti suurempia fosfaattipitoisuuksia (20-100 µmol/l), kuin luonnonvesinäytteet sisältävä, koska halutaan maksimoida levämäärää. Ravinteiden pitoisuuden muutosta mitataan kasvatuksen aikana tietyin aikaväleillä, kunnes ravinteet levien hyödyntämänä loppuvat. Tällaisiin kokeisiin laitteelta vaaditaan laajaa dynaamista mittausaluetta, jolla voidaan mitata fosfaattipitoisuutta koko kasvatuksen ajan. FIA-analysointilaitteella laaja dynaaminen mittausalue saadaan käyttämällä osittain erimittaisia kyvettejä ja valitsemalla aallonpituus mitattavien pitoisuuksien mukaan.

Yhtenä tärkeänä tarkasteltavana asiana työn aikana oli FIA-analysointilaitteen automatisointi mahdollisuudet. Automatisointi vähentäisi kustannuksia, kun laite voitaisiin asentaa sinne mistä näyte tulee, meren äärelle. Tällöin näytteitä ei tarvitsisi erikseen hakea mereltä ja kuljettaa laboratorioon analysoitavaksi työntekijän toimesta. FIA-analysointilaitteiden

soveltuu monilta osin automatisointiin, sen helppokäyttöisyyden, muunneltavuuden, vähäisen reagenssikulutuksen ja nopeiden mittausaikojen perusteella. Se on myös hyvin kenttäkelpoinen pienen kokonsa ja helpon liikuteltavuuden ansiosta. Laite on yksinkertainen purkaa ja koota uudelleen. Täysin automatisoidun laitteen kannalta yksi tärkeimmistä ominaisuuksista on myös varmatoimisuus. Laitteiston tulisi toimia ilman työntekijää pitkiäkin aikoja häiriöttä. Työtä tehtäessä FIA-analysaattori ei osoittanut olevan vielä tarpeeksi varmatoiminen, jotta se voitaisiin tällaisenaan täysin automatisoida. Mittauksissa ongelmana oli usein nollanäyte, joka aiheutti poikkeuksellisen suuren vasteen ja siten väärästi kalibrointisuoran asentoa. Ajoittaisia ongelmia oli myös ajoasetusten kanssa, jotka piti tarkistaa aina ennen mittauksen aloitusta mahdollisten muutosten varalta.

LÄHTEET

Abubakr, M.I. 2010. An Overview of the Generation and Recent Versions of Flow Injection Techniques. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 40 (150-158)

Ehder, T. 2005. *Kemian metrologian opas*. Mittatieteenlaitos, MIKES. Helsinki: Metrologian neuvottelukunta. Kemian ja mikrobiologian jaosto. Kemian työryhmä.

European Environment Agency. 2005. *Source Apportionment of Nitrogen and Phosphorus Inputs into the Aquatic Environment*. EEA Report 7.

FIALab 2600 Series of Multi-Channel Analyzers. FIALab Instruments Inc. Tulostettu 10.12.2014. PDF-tiedosto. <http://flowinjection.com/products/fia-analyzers?sid=70:fialab-multi-channel-series>

Grasshoff, K., Kremling, K. & Ehrhardt, M. 1999. *Methods of Seawater Analysis*. 3.painos. Germany: Verlag Chemie GmbH Wiley-VCH

Harvard Apparatus. *Pump Selection Guide*. A Harvard Bioscience Company. Luettu 4.12.2014
http://www.harvardapparatus.com/webapp/wcs/stores/servlet/haisku1_10001_11555_44038_-1_HAI_ProductDetail_N_37295

Itämeriportaali. n.d. Algaline tuo ajantasaista tietoa kauppalaivoilta. Luettu 14.12.2014
http://www.itameriportaali.fi/fi/tietoa/itameren_tila/algaline/fi_FI/algaline_seuranta/

Itämeriportaali. n.d. Avomeriseuranta. Luettu 14.12.2014
http://www.itameriportaali.fi/fi/tietoa/itameren_tila/avomeriseuranta/fi_FI/avomeriseuranta/

Itämeriportaali. n.d. Fosforin kierto. Ilmatieteenlaitos. Luettu 24.11.2014
http://www.itameriportaali.fi/fi/tietoa/uhat/rehevoityminen/fi_FI/fosforin_kierto/

Itämeriportaali. 2014. Itämeren kauppalaivojen mittaamat ravinteet ja levien runsaus. Suomen Ympäristökeskus. Päivitetty 7.11.2014. Luettu 10.12.2014.
http://www.ymparisto.fi/fi-FI/Meri/Mika_on_Itameren_tila/Itameren_kauppalaivojen_mittaamat_ravint%2831481%29

Itämeriportaali. n.d. Ravinteet ja rehevöityminen. Suomen Ympäristökeskus. Luettu 13.12.2014
http://www.itameriportaali.fi/fi/tietoa/itameren_tila/avomeriseuranta/fi_FI/ravinteet/

Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2005. *Laboratorion analyysitekniikka*. 5. painos. Helsinki: Edita Prima Oy.

Lajunen, L.H.J. & Perämäki P. 2004. *Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission*. 2. painos. United Kingdom: The Royal Society of Chemistry.

MTT. 2008. *Käsitteitä*. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus. Luettu 24.11.2014
<https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/www/Hankkeet/Jaloittelutarhat/Ymp%C3%A4rist>

%C3%B6vaikutukset/K%C3%A4sitteit%C3%A4

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

Pikkarainen, A. 2000. Laadunvarmistus ja laadunohjaus analyttisessä laboratoriossa. Merentutkimuslaitos. No. 41. Helsinki

SFS-EN ISO 6878. 2004. Water quality - Determination of phosphorus - Ammonium molybdate spectrometric method

Suomen ympäristökeskus SYKE. 2014a. Itämeren fosforikuorma Suomesta 1970-2013. Ympäristöhallinnon yhteinen verkkopalvelu. Päivitetty 13.10.2014 Luettu 24.11.2014. http://www.ymparisto.fi/fi-FI/Meri/Mika_on_Itameren_tila/Itameren_fosforikuorma_Suomesta_19702013%2831444%29

Suomen Ympäristökeskus. 2014b. Merentutkimus. Ympäristöhallinnon yhteinen verkkopalvelu. Julkaistu 13.10.2014. Päivitetty 31.10.2014. Luettu 2.12.2014. <http://www.ymparisto.fi/fi-FI/Meri/Merentutkimus>

Tamminen, T. & Andersen, T. 2007. Seasonal Phytoplankton Nutrient Limitation Patterns as Revealed by Bioassays over Baltic Sea Gradients of salinity and Eutrophication. *Marine Ecology Progress series* 340, 121-138.

Vahtera, E., Conley, D.J., Gustafsson, B.G., Kuosa, H., Pitkänen, H., Savchuk, O.P, Tamminen, T., Viitasalo, M., Voss, M., Wasmund, N. & Wulff F. 2007. Internal Ecosystem Feedbacks Enhance Nitrogen-fixing Cyanobacteria Blooms and Complicate Management in the Baltic Sea. *Royal Swedish Academy of sciences. Ambio* 36 (2-3), 186-194

Warwick, C., Guerreiro, A. & Soares, A. 2012. Sensing and Analysis of Soluble Phosphates in Environmental Samples: A Review. *Biosensors and Bioelectronics* 41, 1-11.

Wetzel, R.G. 1983. *Limnology*. 2. painos. USA: Saunders College Publishing.

Yebra-Biurrun, M.C. 2009. *Flow Injection Analysis of Marine Samples*. New York: Nova Science Publisher, Inc

LIITTEET

Liite 1. FIA-analysaattorin ajo-ohjelma

----Notes-----

Sample DEF Table: 1 std rack 1 Blank -1 0 1 0
 Sample DEF Table: 2 std rack 1 std1 -1 0 1 0
 Sample DEF Table: 3 std rack 2 std2 -1 0 1 0
 Sample DEF Table: 4 std rack 3 std3 -1 0 1 0
 Sample DEF Table: 5 std rack 4 std4 -1 0 1 0
 Sample DEF Table: 6 std rack 5 std5 -1 0 1 0
 Sample DEF Table: 7 std rack 6 std6 -1 0 1 0
 Sample DEF Table: 8 std rack 7 std7 -1 0 1 0
 Sample DEF Table: 9 rack 1 1 MQ -1 0 1 0

Local Maximum

0 False 1

-----Channel Selection settings-----

1 Master 880.0 14575.5185546875 0

2 Master 710.0 43065.15234375 0

3 Master 780.0 31850.818359375 0

4 Master 580.0 21463.51953125 0

-----spectrometer settings-----

Master 3 3 0.2178819 -5.732133E-06 -3.894819E-10 344.1826 51 -2.835282E-03 6564.256 520
 413

Slave 1 1 3 0.2150759 -5.089553E-06 -4.864714E-10 344.5065 64 1.167524E-03 38964.35 650
 740

7/16/2014 1:51:32 PM

FIALab for Windows 5.9.321

' PO4 tests with 4 wavelength

' FIA Template For FIALab-2500 System

' Global Logon ' logon to all components

Sample Description ' load sample description file

Instrument Valve Load

' Set Wavelengths

Hardware Settings Wavelength 1 (nm) 880

Hardware Settings Wavelength 2 (nm) 710

Hardware Settings Wavelength 3 (nm) 780

Hardware Settings Wavelength 4 (nm) 580

'Reference Wavelength1 520

'Reference Wavelength2 650

```
'set delay time, start pump to prime lines
Peristaltic Pump Clockwise(%) 55
Instrument Valve Load
autosampler Wash
autosampler Pump On
Delay (sec) 40
autosampler Pump Off
Next Sample
Delay (sec) 80
Hardware Settings Optimize Integration

LoopStart (#) 5000

'inject sample, load next sample
Analyte New Sample
Next Sample
Instrument Valve Inject
Delay (sec) 3

'perform reference scan and start absorbance scans
Spectrometer Reference Scan
Spectrometer Absorbance Scanning
Delay (sec) 11
Instrument Valve Load
Delay (sec) 71
Spectrometer Stop Scanning

'Refresh plots and update concentrations
Refresh Plot

If SampleID < 0 then
autosampler Wash
autosampler Pump On
Delay (sec) 5
autosampler Pump Off
End If

Loop End
-----
```

Liite 2. Standardiliuosten valmistus fosfaattianalyysiin ja reagenssien säilyvyysajat

Tässä liitteessä on esitetty kokonaisuudessaan standardien valmistusohjeet. Näitä standardeja on valikoiden käytetty optimoinnin ja validoinnin mittauksissa. Kaikki liuosten laimennukset on tehty Millipore Integral 5 -laitteen ionivaihdetulla vedellä. Standardien säilyvyysaika on yksi viikko.

Standardit ja niiden välikannat on valmistettu seuraavasta Accu Standard-merkkisestä kantaliuoksesta, jonka pitoisuus oli $1000 \mu\text{g} (\text{PO}_4)/\text{ml} = 10529,64 \mu\text{mol/l}$

PO_4 Välikanta 1: $526,476 \mu\text{mol/l}$, valmistetaan pipetoimalla 5 ml kantaliuosta ($1000 \mu\text{g/ml}$) 100 ml:n mittapulloon

PO_4 Välikanta 2: $105,3 \mu\text{mol/l}$, valmistetaan pipetoimalla 20 ml 1.välikantaliuosta 100 ml:n mittapulloon.

Standardien valmistus:

Std 1.	Nolla: Ionivaihdettuvesi
Std 2.	$0,263 \mu\text{mol/l}$: Pipetoidaan 1,25 ml välikantaliuosta 2. $V= 500 \text{ ml}$
Std 3.	$0,526 \mu\text{mol/l}$: Pipetoidaan 2,5 ml välikantaliuosta 2. $V=500 \text{ ml}$
Std 4.	$1,053 \mu\text{mol/l}$: Pipetoidaan 2,5 ml välikantaliuosta 2. $V=250 \text{ ml}$
Std 5.	$3,159 \mu\text{mol/l}$: Pipetoidaan 3,0 ml välikantaliuosta 2. $V=100 \text{ ml}$
Std 6.	$10,59 \mu\text{mol/l}$: Pipetoidaan 2,0 ml välikantaliuosta 1. $V=100 \text{ ml}$
Std 7.	$18,95 \mu\text{mol/l}$: Pipetoidaan 3,6 ml välikantaliuosta 1. $V=100 \text{ ml}$
Std 8.	$31,59 \mu\text{mol/l}$: Pipetoidaan 6,0 ml välikantaliuosta 1. $V=100 \text{ ml}$

Std 9. 52,65 $\mu\text{mol/l}$: Pipetoidaan 10,0 ml välikantaliuosta 1 V=100 ml

Muut validoinnissa käytettyjen liuosten kantaliuokset:

Kantaliuokset (Merck) c (PO_4) =1000 mg/l,

PO_4 välikanta 1: 210,5 $\mu\text{mol/l}$, valmistetaan pipetoimalla kantaliuosta 1 ml ja laimentamalla 50 ml:ksi mittapullossa

PO_4 välikanta 2: 526,476 $\mu\text{mol/l}$, valmistetaan Merck:stä pipetoimalla sitä 2,5 ml ja laimentamalla 50 ml:ksi mittapullossa.

Standardien ja reagenssien säilyvyys:

TAULUKKO 10. Mittauksessa käytettyjen reagenssien säilytys ja säilyvyysajat

Liuos	Säilytys
Ammoniummolybdaatti-kantaliuos	Muovipullossa jääkaapissa, 6 kk
Kaliumantimonitratraatti-kantaliuos	Tummassa lasipullossa jääkaapissa
Molybdaattivärireagenssin käyttöliuos	Huoneenlämmössä, käyttökelpoista kunnes muuttuu siniseksi
Askorbiinihappo	Jääkaapissa, käyttökelpoista viikon ajan

Liite 3. Carry over -testin tulokset

TAULUKKO 11. Carry over -testin näytteiden järjestys ja niiden todelliset pitoisuudet sekä mittauksessa saadut tuloksen

Näyte nro.	Todellinen pitoisuus ($\mu\text{mol/l}$)	Mitattu pitoisuus ($\mu\text{mol/l}$)	Vaste (A)
1.	21,06	16,976	0,6864
2.	0	0,081	0,0042
3.	0	0,088	0,0045
4.	21,06	16,759	0,6776
5.	21,06	17,253	0,6976
6.	0	0,096	0,0048
7.	0	0,365	0,0157
8.	21,06	16,797	0,6792
9.	21,06	17,711	0,7161
10.	0	-0,018	0,0002
11.	0	0,396	0,0169
12.	21,06	17,006	0,6876
13.	21,06	17,919	0,7245
14.	0	0,293	0,0128
15.	0	0,108	0,0053
16.	21,06	16,955	0,6856
17.	21,06	17,144	0,6932
18.	0	0,588	0,0247
19.	0	0,075	0,0039
20.	21,06	16,514	0,6678
21.	21,06	17,527	0,7086

Liite 4. Samples to average - asetuksen tulokset 880 nm:lla mitattuna

TAULUKKO 12. Mittaustulokset, joissa asetuksena samples to average 1

Standardi	Mitattu pitoisuus ($\mu\text{mol/l}$)	Todellinen pitoi- suus ($\mu\text{mol/l}$)	Vaste (A)
Nolla	0,363	0	0,021
1.	0,425	0,263	0,0235
2.	0,679	0,526	0,0338
3.	1,096	1,053	0,0506
4.	2,573	3,159	0,1101
5.	10,082	10,59	0,4129
6.	19,323	18,95	0,7854

TAULUKKO 13. Mittaustulokset, joissa asetuksena samples to average 5

Standardi	Mitattu pitoisuus ($\mu\text{mol/l}$)	Todellinen pitoi- suus ($\mu\text{mol/l}$)	Vaste (A)
Nolla	0,232	0	0,0046
1.	0,644	0,263	0,0209
2.	0,731	0,526	0,0244
3.	0,961	1,053	0,0334
4.	2,563	3,159	0,0969
5.	10,082	10,59	0,3945
6.	19,328	18,95	0,7605

TAULUKKO 14. Mittaustulokset, joissa asetuksena samples to average 10

Standardi	Mitattu pitoisuus ($\mu\text{mol/l}$)	Todellinen pitoi- suus ($\mu\text{mol/l}$)	Vaste (A)
Nolla	0,286	0	0,0052
1.	0,512	0,263	0,014
2.	0,709	0,526	0,0217
3.	1,109	1,053	0,0372
4.	2,65	3,159	0,0972
5.	9,822	10,59	0,3762
6.	19,453	18,95	0,7508

TAULUKKO 15. Mittaustulokset, joissa asetuksena samples to average 20

Standardi	Mitattu pitoisuus ($\mu\text{mol/l}$)	Todellinen pitoi- suus ($\mu\text{mol/l}$)	Vaste (A)
Nolla	-0,724	0	0,0057
1.	-0,542	0,263	0,0061
2.	3,392	0,526	0,0136
3.	1,733	1,053	0,0105
4.	-2,055	3,159	0,0032
5.	12,149	10,59	0,0305
6.	18,842	18,95	0,0433

Liite 5. Validoinnin mittaustuloksia

Toteamis- ja määrittäysrajan mittaauksessa saadut tulokset on näkyvissä taulukossa 15. Tuloksien keskihajonnaksi saatiin 0,107 $\mu\text{mol/l}$ ja keskiarvoksi 0,0787 $\mu\text{mol/l}$.

TAULUKKO 16. Saadut mittaustulokset toteamis- ja määrittäysrajan määrittämistä varten

Stan- dardi ($\mu\text{mol/l}$)	1. päivä		2. päivä		3. päivä	
	C($\mu\text{mol/l}$)	Vaste (A)	C($\mu\text{mol/l}$)	Vaste (A)	C($\mu\text{mol/l}$)	Vaste (A)
nolla	0	0	0	0,0049	0,0204	0,0044
1: 0,263	0,226	0,0101	0,207	0,0069	0,1866	0,0111
2: 0,526	0,481	0,021	0,459	0,0169	0,4791	0,023
3: 1,053	1,019	0,044	1,056	0,0404	1,359	0,058
4: 3,159	3,118	0,135	3,105	0,121	3,0131	0,125
5: 10,59	10,607	0,458	10,61	0,4164	10,44	0,424
Näyte						
MQ-vesi	0,066	0,0032	0,192	0,0064	-0,0962	0,0011
MQ-vesi	0,104	0,0048	0,0951	0,0026	0,0127	0,0054
MQ-vesi	0,043	0,0022	0,193	0,0064	0,104	0,009
MQ-vesi	0,078	0,0037	0,168	0,0054	0,142	0,0105
MQ-vesi	0,028	0,0015	0,191	0,0063	0,0532	0,007
MQ-vesi	0,056	0,0028	0,148	0,0046	-0,111	0,0005
MQ-vesi	0,022	0,0013	0,415	0,0151	0,106	0,0091
MQ-vesi	-0,008	0	0,0303	0	-0,124	0
MQ-vesi	0,047	0,0024	0,0303	0	0,218	0,0135
MQ-vesi	0,104	0,0048	0,0303	0	0,0278	0,006

TAULUKKO 17. Tarkkuuden määrittämiseen tehdyt mittaukset suoritettiin kolmen päivän aikana ja näytteenä olevan liuoksen pitoisuus oli 4,21 µmol/l. Tuloksista määritettiin keskiarvo ja -hajonta, satunnaisvirhe, saanto- % ja tarkkuus- %

Mittauspäivä	Näyte (4,21 µmol/l)
29.9.2014	4,2186 µmol/l
29.9.2014	4,3088 µmol/l
29.9.2014	4,1659 µmol/l
29.9.2014	4,3629 µmol/l
1.10.2014	4,1499 µmol/l
1.10.2014	4,4439 µmol/l
1.10.2014	4,2082 µmol/l
1.10.2014	4,3054 µmol/l
2.10.2014	4,1476 µmol/l
2.10.2014	4,1137 µmol/l
2.10.2014	4,2565 µmol/l
2.10.2014	4,2081 µmol/l
Keskiarvo	4,24 µmol/l
Keskihajonta	0,098 µmol/l
Satunnaisvirhe (RSD- %)	2,3 %
Saanto- %	98,3 %
tarkkuus- %	0,73 %