

# **TON:n määrittäminen komposti-, maa- ja kasvinäytteistä kolorimetrisesti Aquakem 250 -laitteistolla**

Menetelmän validointi

Jere Liiri

OPINNÄYTETYÖ  
Maaliskuu 2020

Insinööri (AMK)  
Laboratoriotekniikka

## TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Laboratoriotekniikan tutkinto-ohjelma

LIIRI, JERE:

TON:n määrittäminen komposti-, maa- ja kasvinäytteistä kolorimetrisesti Aquakem 250-laitteistolla

Menetelmän validointi

Opinnäytetyö 47 sivua, joista liitteitä 6 sivua  
Maaliskuu 2020

---

Opinnäytetyö tehtiin syksyn 2019 ja kevään 2020 aikana Eurofins Viljavuuspalvelu Oy:lle, joka on Mikkelissä toimiva maatalouslaboratorio. Opinnäytetyön tavoitteena oli validoida valmis kaupallinen menetelmä nitraatti- ja nitriittitypen summan (TON) määrittämiseksi kasvi-, komposti- ja maanäytteistä sekä vesi- että kaliumkloridiuutolla Thermo Fisherin Aquakem 250 -analyysilaitteella. Tarkoituksena oli määrittää menetelmälle laajennettu epävarmuus, lineaarisuus ja määrittäysraja analysoimalla molemmilla uuttotavoilla standardi-, nolla- ja rinnakkaisnäytteitä, sekä tunnettuna käytettävää näytettä ja tunnettuja TON-pitoisuuksia sisältäviä näytteitä vähintään 30 kappaletta kutakin määrittäysrajan ja epävarmuuden osoittamiseksi luotettavasti.

Validoinnin tuloksena saatiin molemmille uuttotavoille määritettyä keskeiset validointiparametrit riittävän luotettavasti, vaikka näytemäärät jäivätkin noin puoleen tavoitellusta 30:stä. Menetelmien epävarmuudet ja määrittäysrajat osoittautuivat lopulta hyvin suuriksi. Määrittäysrajaksi vesiutuille saatiin lopulta  $101 \frac{\mu\text{g}}{\text{l}}$  ja kaliumkloridiuutteille  $167 \frac{\mu\text{g}}{\text{l}}$ , jotka olivat hyvin suuria sen vuoksi, että uuttoliuosta joudutaan hankalien näytematriisien vuoksi laimentamaan hyvin paljon. Laajennetuiksi kokonaisepävarmuuksiksi 95 % todennäköisyydellä saatiin vesiutolla 36 % ja kaliumkloridiuutolla 29 %, mutta näiden suuruudet olivat analysoitavien kohteiden heterogeenisyyden ja näytematriisin vuoksi ymmärrettäviä.

Vaikka validoinnin tulosten perusteella menetelmä osoittautui varsin epätarkaksi, ei siitä kuitenkaan ole varsinaista haittaa, sillä menetelmällä saatuja tuloksia käytetään esimerkiksi lannoitusosuuksiin, joissa vaadittu tarkkuus ei ole kovin suuri. Validoinnin tulosten luotettavuutta on mahdollista parantaa jatkamalla validointia menetelmän käyttöönoton jälkeen. Menetelmän luotettavuutta on kuitenkin hyvin hankala parantaa, sillä ylivoimaisesti merkittävimmäksi epävarmuuden lähteeksi osoittautuivat itse näytteet.

---

Asiasanat: validointi, TON, kasvi, komposti, maa

## **ABSTRACT**

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

LIIRI, JERE:

Colorimetric Determination of TON in Soils, Composts and Plants with Aquakem 250 Analyser  
Validation of the Method

Bachelor's thesis 47 pages, appendices 6 pages  
March 2020

---

The study was made for Eurofins Viljavuuspalvelu Oy in Mikkeli, Finland. The objective of the study was to validate a method for colorimetric determination of TON in soils, composts and plants with an Aquakem 250 photometric analyser, and to put the method into operation. The purpose of the study was to determine the uncertainty, limit of quantitation and linearity of the method of analysis by statistical methods.

The data was analysed with water and potassium chloride extractions. Parameters of validation were determined separately for both methods of extraction.

As the result of the study, significant uncertainties were found with both extractions and limits of quantitations were also found to be high. However, the results of the validation were reliable enough.

According to data, the most significant source for uncertainty was observed to be the samples themselves. Because of the heterogeneity of the samples and complexity of the matrixes, the accuracy of the method cannot be improved considerably.

---

Key words: validation, TON, soil, compost, plant

## SISÄLLYS

1	JOHDANTO .....	7
2	TYPEN KIERTO .....	8
3	KOLORIMETRIA.....	9
	3.1 Yleistä .....	9
	3.2 Häiriötekijät .....	10
4	VALIDOINTIPARAMETRIT .....	11
	4.1 Lineaarisuus.....	11
	4.2 Määrittäjäraja .....	11
	4.3 Epävarmuus .....	12
	4.3.1 Täsmällisyys ja toistettavuus .....	12
	4.3.2 Systemaattinen virhe .....	13
	4.3.3 Kokonaisepävarmuus ja laajennettu kokonaisepävarmuus .....	14
5	MATERIAALIT JA MENETELMÄT .....	16
	5.1 Reagenssit, standardiliuokset ja välineet .....	16
	5.2 Uutot ja suodatukset .....	17
	5.2.1 Kasvinäytteiden esikäsittely .....	17
	5.2.2 Kompostinäytteiden esikäsittely.....	18
	5.2.3 Maanäytteiden esikäsittely .....	19
	5.3 Aquakem 250 .....	19
	5.4 Lineaarisuus.....	21
	5.5 Täsmällisyys, toistettavuus, systemaattinen virhe ja määrittäjäraja .....	22
6	TULOSTEN KÄSITTELY .....	24
	6.1 Lineaarisuus.....	24
	6.1.1 Vesiutto .....	24
	6.1.2 Kaliumkloridiuutto .....	27
	6.2 Määrittäjäraja .....	30
	6.3 Systemaattinen virhe.....	32
	6.3.1 Vesiutto .....	32
	6.3.2 Kaliumkloridiuutto .....	33
	6.4 Täsmällisyys ja toistettavuus.....	35
	6.4.1 Vesiutto .....	35
	6.4.2 Kaliumkloridiuutto .....	36
	6.5 Kokonaisepävarmuus.....	37
7	POHDINTA .....	39
	LÄHTEET.....	41
	LIITTEET .....	42

Liite 1. Menetelmä pitoisuuksille 1-10 mg/l .....	42
Liite 2. Menetelmä pitoisuuksille 0-1 mg/l .....	43
Liite 3. Standardisuora vesiuutolle, pitoisuuksille 0-1 mg/l .....	44
Liite 4. Standardisuora vesiuutolle, pitoisuuksille 1-10 mg/l.....	45
Liite 5. Standardisuora kaliumkloridiuutolle, pitoisuuksille 0-1 mg/l....	46
Liite 6. Standardisuora kaliumkloridiuutolle, pitoisuuksille 1-10 mg/l..	47

**LYHENTEET JA TERMIT**

Analyytti	Mitattava aine
Matriisi	Näytteen kaikki muut aineet paitsi analyytti
Nitraattityppi	Nitraattimuodossa oleva typpi
Nitriittityppi	Nitriittimuodossa oleva typpi
RSD	Suhteellinen keskihajonta
TON	Nitraatti- ja nitriittitypen summa

## 1 JOHDANTO

Tämä opinnäytetyö tehtiin Eurofins Viljavuuspalvelu Oy:lle syksyn 2019 aikana. Viljavuuspalvelu on Mikkelin Graanilla sijaitseva maatalouslaboratorio, joka tutkii pääasiassa maa-, rehu ja lantanäytteitä tarkoituksena auttaa parantamaan maatalouden harjoittajien tehokkuutta muun muassa lannoitus- ja viljelysuosiksin.

Opinnäytetyön tavoitteena oli validoida ja ottaa käyttöön ThermoFisher Scientificin kaupallinen menetelmä nitraatti- ja nitriittitypen summan määrittämiseksi komposti-, maa-, ja kasvinäytteistä sekä vesi- että kaliumkloridiuutolla kolorimetrisesti ThermoFisherin Aquakem 250 -laitteistolla. Tarkoituksena mitata tunnettuja pitoisuuksia sisältäviä näytteitä, rinnakkaisnäytteitä, nollanäytteitä useita kertoja pitkän ajan kuluessa systemaattisen ja satunnaisvirheen määrittämiseksi, ja saada lopulta määritettyä menetelmille laskennallisesti laajennettu kokonaisuvarmuus.

Validoitava kaupallinen menetelmä on alun perin tehty vain vesinäytteille, joten vaadittu esikäsittely ja saavutetut epävarmuudet ovat alkuperäisestä menetelmästä poikkeavia. Menetelmän kehitystä ei kuitenkaan tässä työssä käsitellä.

## 2 TYPEN KIERTO

Typpi on keskeisimpiä ravinteita kasvien kasvulle. Vaikka typpeä on ilmakehässä 78 %, ei se kuitenkaan ole kasveille saatavilla suoraan, vaan typpi muuttuu kasveille kelpolliseksi ammoniumtypeksi ( $\text{NH}_4^+$ ) bakteerien toiminnan seurauksena. Ammoniumtyppeä syntyy myös maaperässä ammonifikaatiolla orgaanisesta typestä mikrobien toimesta. Ammoniumtyppeä käyttävät kasvien lisäksi myös nitrifikaatiobakteerit, jotka hapettavat ammoniumtypen nitriittitypeksi ( $\text{NO}_2^-$ ) ja edelleen nitraattitypeksi ( $\text{NO}_3^-$ ), jota myös kasvit voivat hyödyntää. Näiden hapettuneiden epäorgaanisten tyyppien yhteenlasketusta määrästä käytetään nimitystä TON (Total oxidized nitrogen). Nitraattityppeä käyttävät myös denitrifikaatioon kykenevät mikrobit, jotka pelkistävät nitraattityppeä takaisin kaasumaiseksi alkuainetyypeksi ( $\text{N}_2$ ). (Follet 2008, 19-22)

Kasvien pääasillisesti käyttämät typen muodot ovat ammoniumtyppi ja nitraattityppi. Näiden pitoisuudet maatalousmaissa vaihtelevat suuresti, jopa 3-4 kertaluokkaa. Kasvit yleensä käyttävät näistä sitä, jota on helpommin saatavilla. Nitraattityppi on yleensä vallitseva muoto hapekkaissa maissa. (Zhang, Wu & Hang 2019)



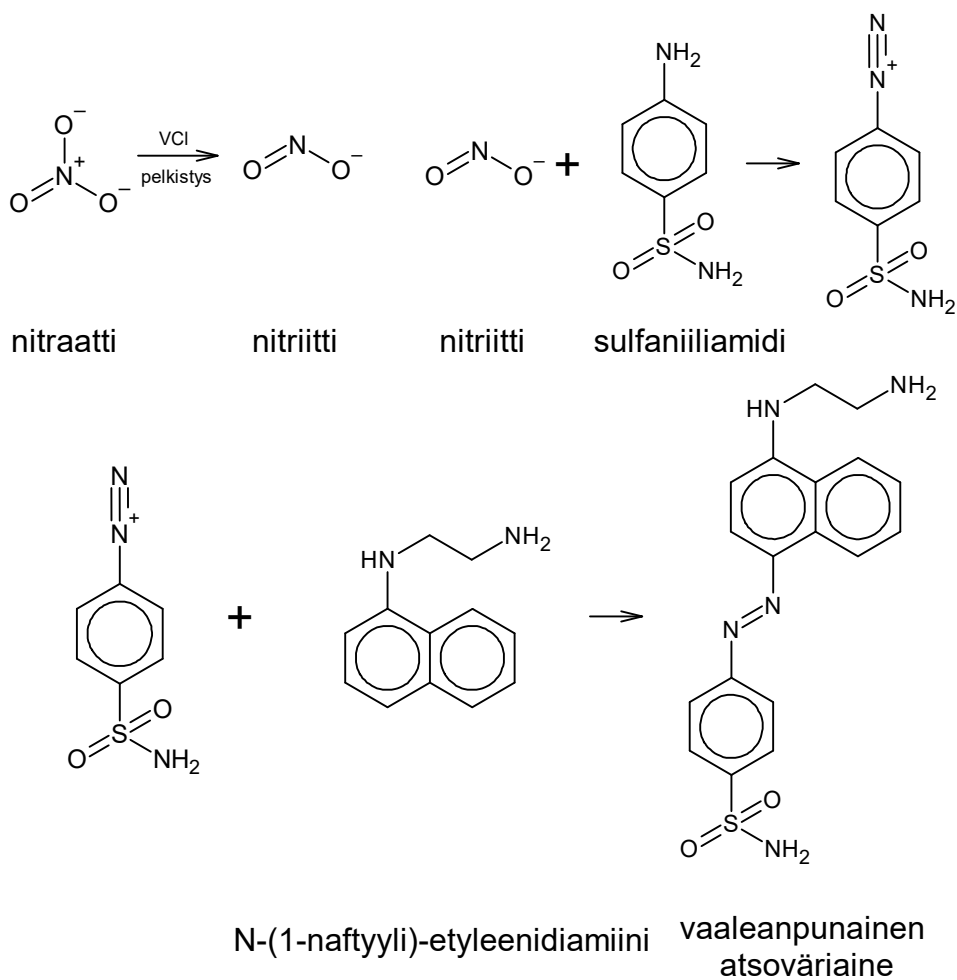
### 3 KOLORIMETRIA

#### 3.1 Yleistä

Kolorimetrialla tarkoitetaan sellaista määrittystä, jossa värillisen näytteen värin intensiteetin perusteella määritetään analyytin konsentraatio  $c$  näytteessä. Mittaaminen perustuu Lambert-Beerin lakiin, jonka perusteella näytteen absorbanssi  $A$  riippuu suoraan verrannollisesti näytteen konsentraatiosta  $c$ , kun mitataan samaa ainetta, samalla aallonpituudella ja valo kulkee näytteen läpi saman matkan. (Housecroft & Constable 2006, 349)

Mittaukseen valittava aallonpituus riippuu näytteen väristä. Tietyn värinen näyte absorboi jotain aallonpituutta näkyvän valon alueelta selvästi muita enemmän. Tätä absorption maksimiaallonpituutta käytetään mittaukseen. (Housecroft & Constable 2006, 350)

Määritettäessä värittömän yhdisteen tai ionin pitoisuutta, analyytti tulee muokata värilliseksi yhdisteeksi (Housecroft & Constable 2006, 351). Esimerkiksi nitriitin määrittämisessä sulfaniiliamidi reagoi happamissa olosuhteissa nitriitin kanssa, ja muodostaa diatsoyhdisteen, joka puolestaan reagoi N-(1-naftyyli)-etyleenidiamiinin kanssa, jolloin muodostuu vaaleanpunainen atsoväriaine (SFS 3030 1990, 1) (KUVIO 1).



KUVIO 1. Värillisen yhdisteen muodostaminen nitriitti-ionista (OZ Biosciences n.d., muokattu)

### 3.2 Häiriötekijät

Kolorimetriseen määrittämiseen liittyy muutamia keskeisiä häiriötekijöitä. Näitä ovat esimerkiksi näytteen värillisuus, jolloin haluttu värireaktio häiriintyy (Salo ym. 2013, 12). Muita keskeisiä häiriötä aiheuttavia tekijöitä ovat näytteessä olevat kiinteät hiukkaset (SFS 3030).

## 4 VALIDOINTIPARAMETRIT

### 4.1 Lineaarisuus

Lineaarisuus on menetelmän ominaisuus, joka kertoo lineaarisen riippuvuuden analyytin konsentraation ja analyysilaitteen mittaaman vasteen välillä. Lineaarisuuden toteamiseksi tarvitaan vähintään viisi standardinäytettä, joissa on erisuuret pitoisuudet analyyttiä. Standardinäytteistä mitatuista vasteista muodostetaan pienimmän neliösumman menetelmällä regressiosuora pitoisuuden funktiona. Lineaarisuus voidaan varmemmin todentaa, kun mitataan standardeista vasteet useampaan kertaan. (Hiltunen ym. 2011, 12-13)

Lineaarinen alue voidaan määrittää silmämääräisesti kuvaajaa katsomalla, sekä muodostamalla pisteiden pystysuorista etäisyyksistä regressiosuorasta kuvaaja. Lineaarisella alueella pisteiden tulisi olla normaalijakautuneesti molemmin puolin ja mahdollisimman lähellä regressiosuoraa (Jaarinen & Niiranen 2008, 25-26).

### 4.2 Määrittäysraja

Määrittäysraja  $c_{LOQ}$ , on analyytin pienin pitoisuus, joka analyysimenetelmällä voidaan luotettavalla tarkkuudella määrittää. Määrittäysraja lasketaan Kansainvälisen teoreettisen ja sovelletun kemian liiton, IUPAC:n oletuksen mukaan nollanäytteiden keskiarvon  $\bar{x}_0$  ja niiden kymmenkertaisen keskihajonnan  $s_0$  summana. Mikäli pienillä pitoisuuksilla suhteellinen keskihajonta (RSD) oletetaan vakioksi, edellä mainitulla tavalla määriteltynä suhteellinen keskihajonta pitoisuudella  $c_{LOQ}$  olisi noin 10 %. (Eurachem 2014, 24) Määrittäysraja lasketaan siis:

$$c_{LOQ} = \bar{x}_0 + 10s_0 \quad (1)$$

### 4.3 Epävarmuus

Epävarmuus on mittaustulokseen liittyvä parametri, joka kuvaa tulosten hajontaa, jonka voidaan mielekkäästi todeta kuuluvan mitattuun suureeseen. Mittaustuloksen epävarmuus aiheutuu useista tekijöistä, kuten näytteenoton virheistä, näytteen epätasalaatuisuudesta, näytematriisista, mittaukseen liittyvistä häiriöistä, mittavälineiden epätarkkuudesta, sekä lämpötilasta ja ilmankosteudesta. (Eurachem 2012, 4)

#### 4.3.1 Täsmällisyys ja toistettavuus

Täsmällisyys  $s_r$  on ”Sellaisten näyttämien tai suureen mitattujen arvojen yhtäpitävyys, jotka on saatu toistomittauksilla tutkittaessa samaa tai samankaltaisia kohteita hyvin määritellyissä olosuhteissa” (SFS-OPAS 99 2010). Täsmällisyys todetaan mittaamalla pitkän aikavälin kuluessa samaa näytettä useita toistoja. Saaduista mittaustuloksista lasketaan suhteellinen keskihajonta (RSD). Näin saadaan arvioitua sarjojen välistä hajontaa. (Eurachem 2012, 18-19)

Suhteellinen keskihajonta lasketaan seuraavasti:

$$RSD = \frac{\sigma}{\bar{x}} \quad (2)$$

jossa

$\sigma$  =keskihajonta

$\bar{x}$  =keskiarvo.

Toistettavuus  $s$  puolestaan tarkoittaa lyhyen aikavälin kuluessa tapahtuvaa hajontaa, joka tyypillisesti suoritetaan tekemällä eri pitoisuuksia analyyttiä sisältävistä näytteistä rinnakkaismäärittäyksiä, näin saadaan selvitettyä sarjan sisäinen hajonta. Näytesarjojen välinen hajonta on tyypillisesti suurempaa kuin sarjojen sisäinen, mutta jos sarjojen välinen hajonta on sisäistä hajontaa merkittävästi suurempi, täytyy syytä tähän pyrkiä selvittämään. (Hiltunen ym. 2011, 19)

Rinnakaisnäytteistä lasketaan suhteelliset keskihajonnat (RSD), ja nämä yhdistetään neliöllisesti toisiinsa seuraavasti:

$$s = \sum_{i=1}^n \sqrt{\frac{RSD_i^2}{n}} \quad (3)$$

jossa  $n$  on rinnakkaismääritysten lukumäärä.

### 4.3.2 Systemaattinen virhe

Mittauksen systemaattinen virhe määritetään mittaustulosten poikkeamana todellisesta arvosta. Tätä poikkeamaa kutsutaan harhaksi  $B$ . Harha  $B$  voidaan määrittää esimerkiksi vertaamalla laboratorion omia tuloksia laboratorioden välisten vertailunäytteiden tulosten keskiarvoon. Systemaattinen virhe lasketaan harhojen keskiarvosta. (Hiltunen ym 2011, 16-17)

Harha voidaan myös määrittää vertaamalla tuloksia tunnettuja pitoisuuksia sisältävistä referenssinäytteistä niiden todelliseen arvoon. Tässä on hyvä muistaa, että eri pitoisuusalueella harha  $B$  voi olla eri suuri johtuen esimerkiksi uutossa tapahtuvan häviön poikkeavuuksista eri pitoisuusalueilla. Tästä syystä eri pitoisuusalueilta määritettyjä harhoja tulee verrata toisiinsa, ja tarkastella onko kannattavaa käsitellä systemaattista virhettä erikseen eri pitoisuuksilla.

(Eurachem 2012, 19)

Harha  $B$  lasketaan todellisen arvon  $T$  ja mittaustuloksen  $x$  avulla seuraavasti (Hiltunen ym 2011, 16):

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

Systemaattinen virhe  $s_{sv}$  voidaan korjata muun muassa korjauskertoimella, ja jättää se huomioimatta kokonaisvirheestä. Kuitenkin mikäli systemaattinen virhe on määritetty laboratorioden välisissä tutkimuksissa, ei korjauskertoimien käyttäminen ole suotavaa, sillä mediaanituloksella ei välttämättä ole näytteen pitoisuuden todellinen arvo. (Hiltunen ym. 2011, 71) Korjauskerroin  $f$  voidaan laskea harhojen keskiarvosta  $\bar{B}$  seuraavasti:

$$f = \frac{1}{\frac{(100 + B)}{100}} \quad (5)$$

Systemaattiselle virheelle lasketaan uusiutuvuus  $s_{su}$ , joka kuvaa systemaattisen virheen epävarmuutta. Tämä lasketaan harhojen keskiarvon keskihajontana. Harhojen keskihajonnan  $\sigma$  ja näytteiden lukumäärän  $n$  avulla systemaattisen virheen uusiutuvuus  $s_{su}$  saadaan laskettua kaavalla:

$$s_{su} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (6)$$

(Hiltunen ym. 2011, 46)

### 4.3.3 Kokonaisepävarmuus ja laajennettu kokonaisepävarmuus

Kokonaisepävarmuus  $u$  saadaan laskettua, kun määritetyt suhteellisten epävarmuuksien neliöt lasketaan yhteen, ja summasta otetaan neliöjuuri (Hiltunen ym. 2011, 46). Tässä validoinnissa epävarmuus muodostuu täsmällisyydestä  $s_r$ , toistettavuudesta  $s$ , systemaattisesta virheestä  $s_{sv}$  ja systemaattisen virheen toistuvuudesta  $s_{su}$ . Kokonaisepävarmuus  $u$  saadaan siis laskettua kaavalla:

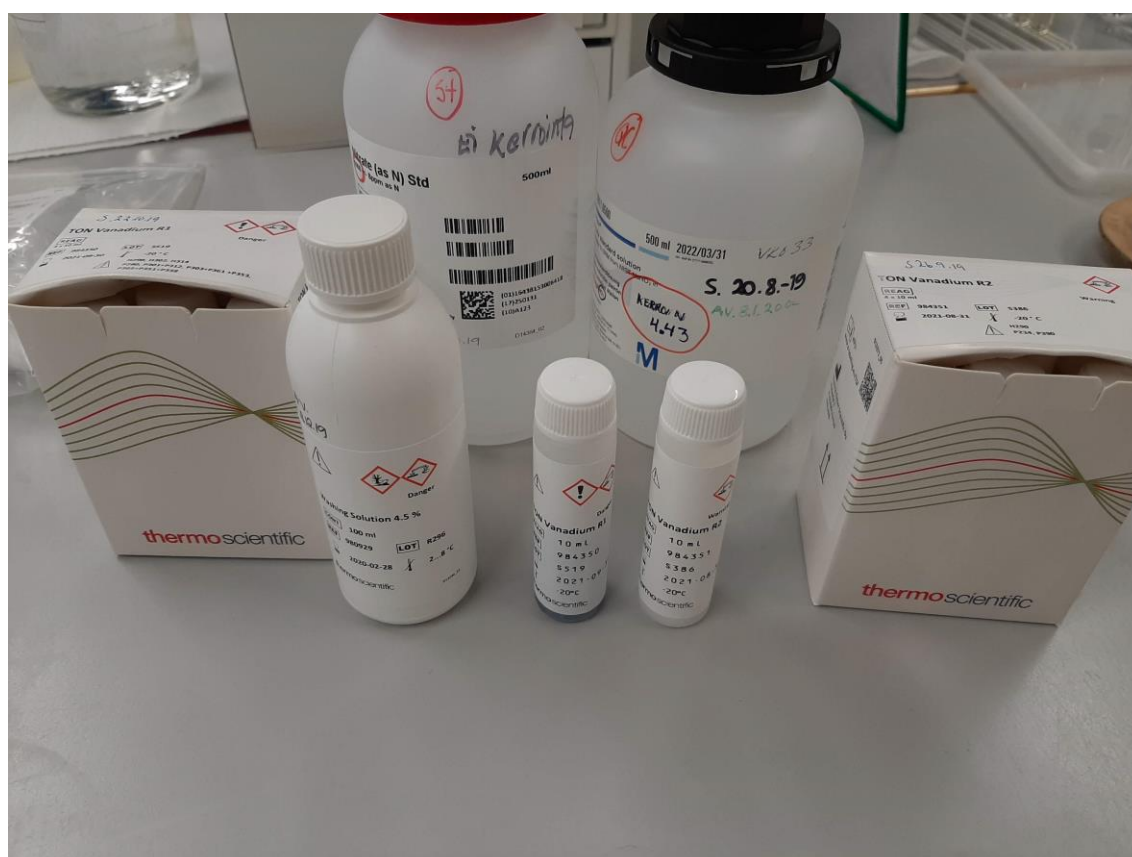
$$u = \sqrt{s^2 + s_r^2 + s_{sv}^2 + s_{su}^2} \quad (7)$$

Yllä olevalla kaavalla laskettu kokonaisepävarmuus kertoo, että mittaustulos  $x$  on 68 % todennäköisyydellä välillä  $x \pm ux$ . Koska tämä ei ole riittävä todennäköisyys, lasketaan laajennettu kokonaisepävarmuus  $U$ . Kertomalla kokonaisepävarmuus kahdella, saadaan normaalijakautuneille tuloksille 95 % todennäköisyys. (Hiltunen ym. 2011, 46-47)

## 5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 5.1 Reagenssit, standardiliuokset ja välineet

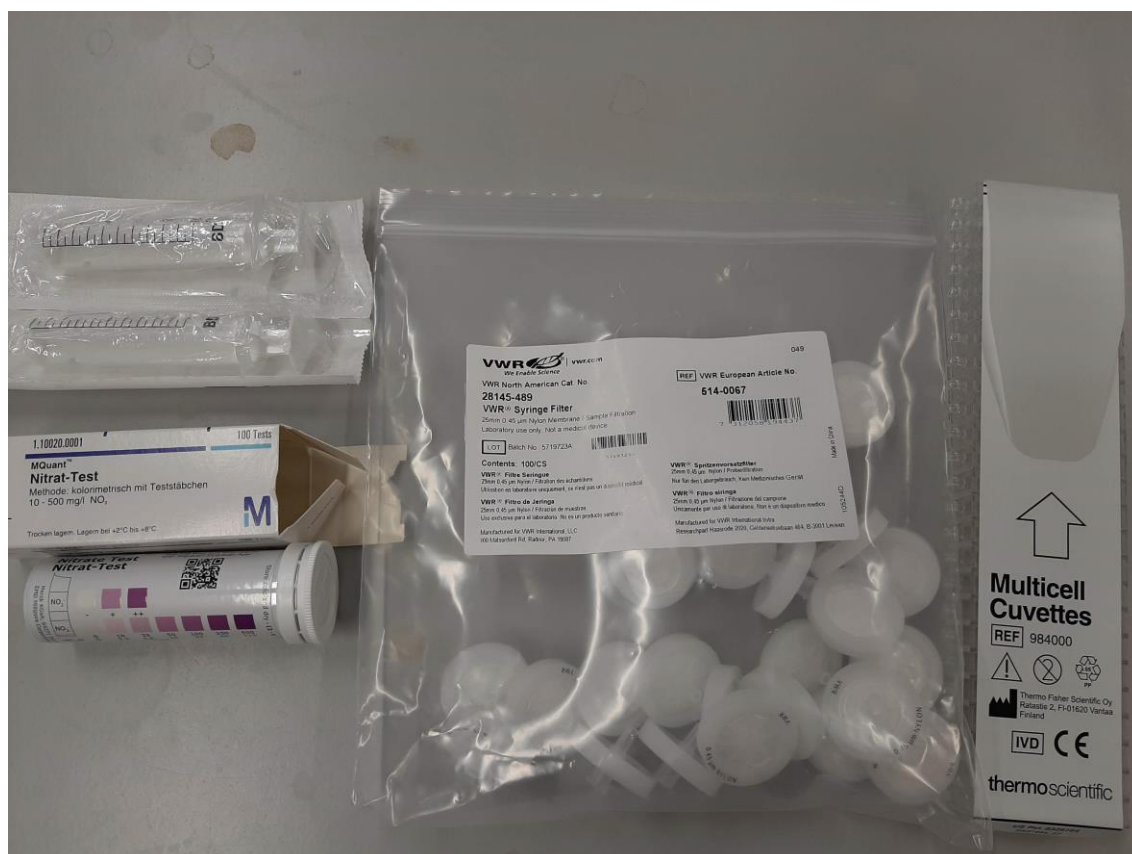
Menetelmässä käytetään hyvin vähän reagensseja. Standardisuoran tekemiseen käytettiin Merckin  $1000 \frac{\text{mg}}{\text{l}}$  nitraattiliuosta, ja kontroleja varten toisen valmistajan, Thermo Fisherin  $1000 \frac{\text{mg}}{\text{l}}$  nitraattityypiliuosta. Lisäksi TON:n määrittämisessä käytettiin Thermo Fisherin menetelmän valmiita kaupallisia reagensseja. Reagenssi 1 sisältää tuntemattomat pitoisuudet suolahappoa ja vanadiinikloridia nitraatin hapettamiseen nitriitiksi. Reagenssi 2 puolestaan sisältää tuntemattomat pitoisuudet suolahappoa, sulfaniiliamidia ja N-(1-naftyyli)-etyleenidiamiinia muodostamaan vaaleanpunaisen atsoväriaineen nitriitti-ionin kanssa. Lisäksi menetelmässä käytetään uuttamiseen ja näytteen laimentamiseen  $2 \frac{\text{mol}}{\text{l}}$  kaliumkloridiliuosta ja ultrapuhdasta vettä, sekä 4,5 % hypokloriittiliuosta laitteen puhdistamiseen. Reagenssit ja standardiliuokset kuvassa 1.



KUVA 1. Reagenssit, standardiliuokset ja puhdistusaine



Uutteiden karkeaan suodatukseen käytetään Ahlström Muncktell 00R 185 mm -suodatinpaperia. Tarkempaan suodatukseen käytetään 0,45 mm ruiskusuodattimia. Lisäksi ennen analyysiä käytetään Merckin MQuant™ -nitraattitestiliuskoja näytteiden nitraattipitoisuuden suuruusluokan selvittämiseksi. Aquakem 250 -laite käyttää Thermo Fisherin monisäiliöisiä kyvettejä. Menetelmässä käytettävät välineet kuvassa 2.



KUVA 2. Ruiskusuodattimet, nitraattitestiliuskat ja kyvetit

## 5.2 Uutot ja suodatukset

### 5.2.1 Kasvinäytteiden esikäsittely

Kasvinäytteistä mitataan TON vain vesiutolla. Noin 3 g kuivattua ja hienonnettua kasvinäytettä punnitaan 100 ml leveäkaulaiseen mittapulloon. Pulloon lisätään 50 ml ultrapuhdasta vettä. Näytteitä pidetään ravistelijassa 30 minuutin ajan, jonka jälkeen näytteet suodatetaan 50 ml mittapulloihin. Tämän jälkeen näytteistä

osa ruiskusuodatetaan koeputkiin. Näytteiden nitraattipitoisuus arvioidaan pikatestillä, jonka jälkeen näytteen värin ja pitoisuuden mukaan tehdään laimennokset vialeihin. Kasvinäytteille joudutaan yleensä tekemään satakertainen tai hyvin tumman näytteen, esimerkiksi nokkosien kohdalla jopa tuhatkertainen laimennos, jotta näytteestä saadaan kirkas.

### 5.2.2 Kompostinäytteiden esikäsittely

Kompostinäytteitä mitataan sekä ultrapuhtaalla vedellä että 2 M kaliumkloridiliuoksella uutettuina. Vesiuuttoisia näytteitä punnitaan 30 g, ja kaliumkloridiuuttoisia 10 g korkilliseen muovipurkkiin. Vesiuuttoisiin lisätään 300 ml ultrapuhdasta vettä ja kaliumkloridiuuttoisiin 100 ml kaliumkloridiliuosta. Näytteitä uutetaan ravistelijassa tunnin ajan, jonka jälkeen ne suodatetaan 100 ml korkillisiin muovipulloihin (KUVA 3). Tämän jälkeen näytteistä osa ruiskusuodatetaan koeputkiin. Näytteiden nitraattipitoisuus arvioidaan pikatestillä, jonka jälkeen näytteen värin ja pitoisuuden mukaan tehdään laimennokset vialeihin.



KUVA 3. Kompostinäytteiden suodatus

### 5.2.3 Maanäytteiden esikäsitteily

60 ml jauhattua maanäytettä siirretään korkilliseen muovipurkkiin. Maanäytteen joukkoon lisätään 300 ml ultrapuhdasta vettä, ja uutetaan tunnin ajan ravistelijassa. Näytteet suodatetaan 100 ml korkillisiin muovipulloihin, kuten kompostinäytteet, ja ruiskusuodatetaan vielä samaan tapaan, kuten komposti- ja kasvinäytteet.

### 5.3 Aquakem 250

Thermo Fisherin Aquakem 250 on vesi- ja ympäristöanalyysiin suunniteltu fotometrinen analyysilaitte (KUVA 4). Laitteelle voidaan tehdä määritysmenetelmä, joka sisältää muun muassa reagenssilisäyksiä, laimentamisia, inkubaatioaikoja, näytteen signaalin nollauksia ja näytteen absorbanssin mittauksia.



KUVA 4. Aquakem 250

TON:n määrittelyksiin luotiin kaksi erilaista menetelmää, ensimmäinen pitoisuusalueelle  $1 - 10 \frac{\text{mg}}{\text{l}}$  (TAULUKKO 1; LIITE 1), ja toinen vastaavasti  $0 - 1 \frac{\text{mg}}{\text{l}}$  pitoisuusalueelle (TAULUKKO 2; LIITE 2). Lisäksi näistä luotiin vielä kaksi erilaista versiota vesiuutolle ja kaliumkloridiuutolle, joiden ero on vain se, että ensimmäisessä näyte laimennetaan ultrapuhtaalla vedellä ja toisessa 2 M kaliumkloridiliuoksella. Alla olevassa taulukossa menetelmä suuremmille pitoisuuksille.

TAULUKKO 1. Menetelmä  $1 - 10 \frac{\text{mg}}{\text{l}}$  pitoisuusalueelle

Toimenpide	Suure	Määrä/laatu	Suure	Määrä/laatu
reagenssin lisäys	reagenssi	R1 & R2 2:1	tilavuus ( $\mu\text{l}$ )	126
inkubointi	aika (s)	120		
vasteen mittaus				
näytteen lisäys	tilavuus ( $\mu\text{l}$ )	10		
inkubointi	aika (s)	1200		
sekoitus				
vasteen mittaus	aallonpituus (nm)	540		

Ja pienemmille pitoisuuksille menetelmä alla.

TAULUKKO 2.

Toimenpide	Suure	Määrä/laatu	Suure	Määrä/laatu
reagenssin lisäys	reagenssi	R1 & R2 1:1	tilavuus ( $\mu\text{l}$ )	120
inkubointi	aika (s)	120		
vasteen mittaus				
näytteen lisäys	tilavuus ( $\mu\text{l}$ )	120		
inkubointi	aika (s)	2800		
sekoitus				
vasteen mittaus	aallonpituus (nm)	540		

## 5.4 Lineaarisuus

Menetelmän lineaarisuus määritettiin siten, että standardiliuoksesta laimennettiin käsin liuokset, joiden nitraattityypipitoisuudet olivat 0,1; 1 ja 10  $\frac{\text{mg}}{\text{l}}$ . Kutakin kaksi kappaletta sekä vedellä että kaliumkloridilla laimennettuna. Lisäksi toisesta standardiliuoksesta laimennettiin kontrollinäytteet pitoisuuksilla 0,3; 0,8; 5 ja 8  $\frac{\text{mg}}{\text{l}}$ . Näitäkin kahdet kappaleet vedelle ja kaliumkloridille. Lisäksi standardisuorissa käytettiin nollanäytteinä vettä ja kaliumkloridiliuosta. Käsin laimennetuista standardiliuoksista annettiin laitteen laimentaa pientä standardisuoraa varten standarditaulukon 3 mukaisesti.

TAULUKKO 3. Standardilaimennokset pitoisuusalueelle 0-1  $\frac{\text{mg}}{\text{l}}$

alkup. pitoisuus $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	laimennuskerroin	lopullinen pitoisuus $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
0	1	0
0	1	0
100	10	10
100	10	10
100	5	20
100	5	20
100	3	33
100	3	33
100	2	50
100	2	50
100	1	100
100	1	100
1000	5	200
1000	5	200
1000	4	250
1000	4	250
1000	2	500
1000	2	500
1000	1	1000
1000	1	1000

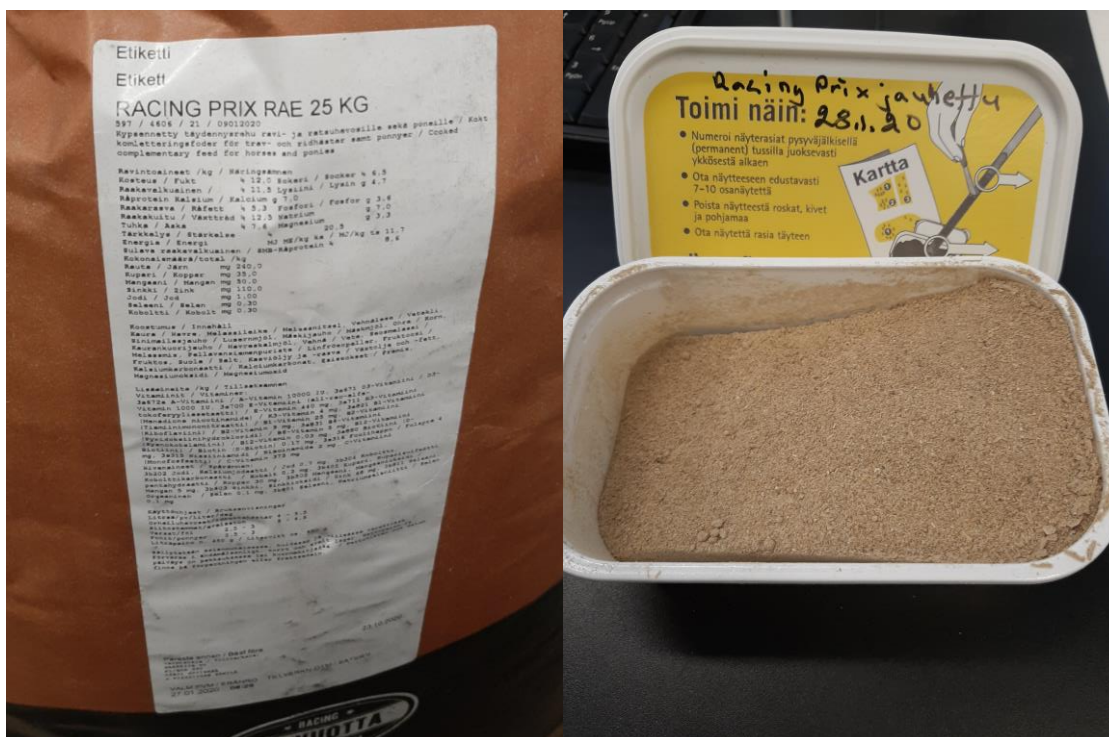
Vastaavasti suurelle standardisuoralle laimennokset taulukon 4 mukaisesti.

TAULUKKO 4. Standardilaimennokset pitoisuusalueelle 1-10  $\frac{\text{mg}}{\text{l}}$ 

alkup. Pitoisuus mg·l <sup>-1</sup>	laimennuskerroin	lopullinen pitoisuus mg·l <sup>-1</sup>
0	1	0,00
0	1	0,00
10	10	1,00
10	10	1,00
10	5	2,00
10	5	2,00
10	2	5,00
10	2	5,00
10	1,5	6,67
10	1,5	6,67
10	1	10,00
10	1	10,00

### 5.5 Täsmällisyys, toistettavuus, systemaattinen virhe ja määrittäysraja

Täsmällisyyden arvioimiseksi mitattiin tunnettuna näytteenä käytettävää kaupallista materiaalia, jonka tiedettiin sisältävän nitraattia. Kasvinäytteissä tunnettuna näytteenä toimi kuivattu ja jauhettu hevosille tarkoitettu täydennysrehu, joka on sekoitus erilaisia viljatuotteita (KUVA 5). Tätä näytettä käytettiin vesiuutoissa täsmällisyyden määrittämiseen. Komposti ja maanäytteissä tunnettuna näytteenä käytettiin kukkamultaa, jolla puolestaan määritettiin täsmällisyys kaliumkloridiuutoille. Kyseiset tuotteet valittiin sen vuoksi, että niiden matriisi mukailisi mahdollisimman hyvin oikeita näytteitä, ja ne olisivat yhtä heterogeenisiä. Jokaisen näytteiden analysoinnin yhteydessä analysoitiin aina tunnettua näytettä, ja tätä näytettä pyrittiin saamaan pitkän aikavälin kuluessa analysoitua mahdollisimman monta kertaa sekä kaliumkloridiuutolla että vesiuutolla.



KUVA 5. Kasvinäytteiden yhteydessä käytetty tunnettu näyte

Toistettavuuden määrittämiseksi näytesarjan vähintään yhdestä näytteestä tehtiin 2-3 rinnakkaismäärittystä. Näitä myös pyrittiin saamaan mahdollisimman monta, jotta tulos olisi mahdollisimman luotettava. Maa- kasvi- ja kompostinäytteitä ei eroteltu toisistaan, vaan jaottelu tapahtui pelkästään uuttotavan perusteella.

Määrittäjänsä varten näytesarjassa analysoitiin yleensä yksi nollanäyte, joka ei sisältänyt näytettä, mutta jolle suoritettiin uutto ja muut toimenpiteet, joita muillekin näytteille.

Systemaattisen virheen arvioimiseksi jouduttiin tyytymään kontrollinäytteistä saattuihin tuloksiin, koska laboratorioden välisiä vertailunäytteitä oli huonosti saatavilla tai niistä saatavat tulokset eivät ehtisi tähän validointiin. Kontrollinäytteistä määritettäessä systemaattista virhettä on se etu, että niiden todellinen pitoisuus tiedetään, mutta myös hyvin suuri heikkous siinä, että niillä ei ole samanlaista näytematriisia kuin komposteista- maista tai kasveista saaduilla uutteilla.

## 6 TULOSTEN KÄSITTELY

### 6.1 Lineaarisuus

Lineaarisuuden määrittämiseksi tutkittiin standardisuorien korrelaatiokertoimia ja jäännöskuvaajia. Hyväksyttäväksi korrelaatiokertoimeksi asetettiin 0,996. Jäännösten puolestaan haluttiin olevan mahdollisimman normaalijakautuneet regressiosuoran molemmin puolin.

#### 6.1.1 Vesiuutto

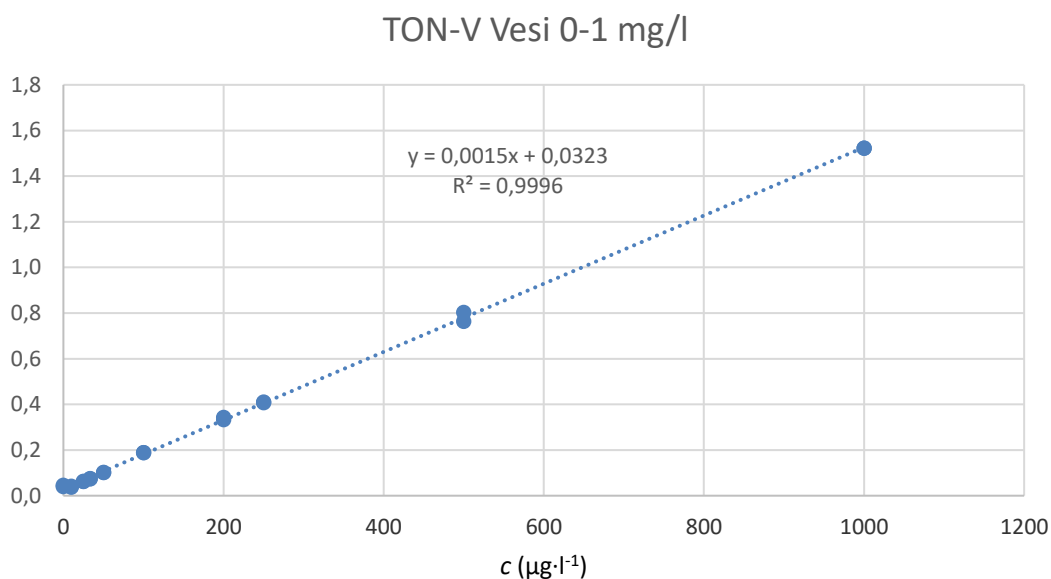
Standardisuora pitoisuuksille  $0 - 1 \frac{\text{mg}}{\text{l}}$  onnistui odotusten kaltaisesti. Lukuun ottamatta nollastandardia, jonka vaste oli suurempi kuin pienimmän standardin. Standardien vasteet, mitatut pitoisuudet ja lasketut pitoisuudet taulukossa 5.

TAULUKKO 5. Vesiuuton pienemmän standardisuoran vasteet ja pitoisuudet

Claskettu $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	Vaste	Cmitattu $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
0	0,040	5,108
0	0,046	9,038
10	0,037	3,282
10	0,041	5,931
25	0,063	20,466
25	0,063	20,632
33	0,075	28,486
33	0,074	27,673
50	0,102	46,853
50	0,102	46,805
100	0,188	104,360
100	0,189	104,546
200	0,343	208,094
200	0,333	201,348
250	0,410	252,485
250	0,408	251,567
500	0,803	515,868
500	0,764	489,704
1000	1,522	997,204
1000	1,522	997,216

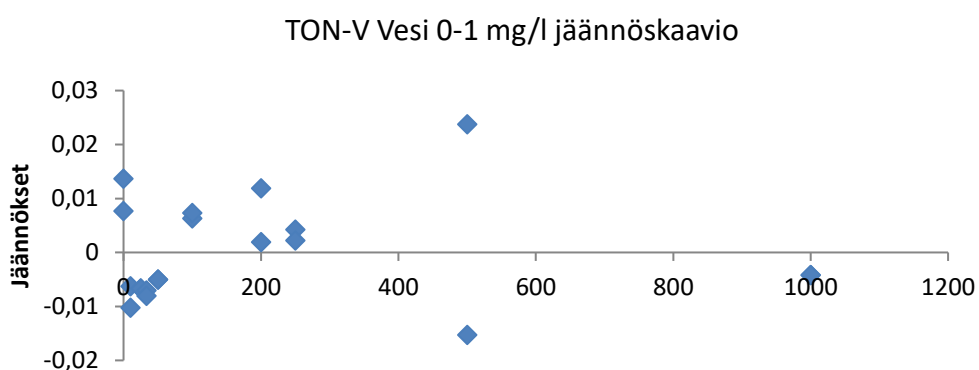


Standardisuora vaikutti korrelaatiokertoimen perusteella lineaariselta (KUVIO 2). Korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,9996, joka oli selvästi yli vaatimusten.



KUVIO 2. Standardisuora vesiutolle, pitoisuuksille 0-1 mg/l

Linearisuutta tarkasteltiin myös jäännöskuvaajan avulla (KUVIO 3). Kuvaajan perusteella jäännökset ovat hyvin normaalijakautuneet. Standardisuora, vasteet ja pitoisuudet vesiuton pienemmälle standardisuoralle liitteessä 3.



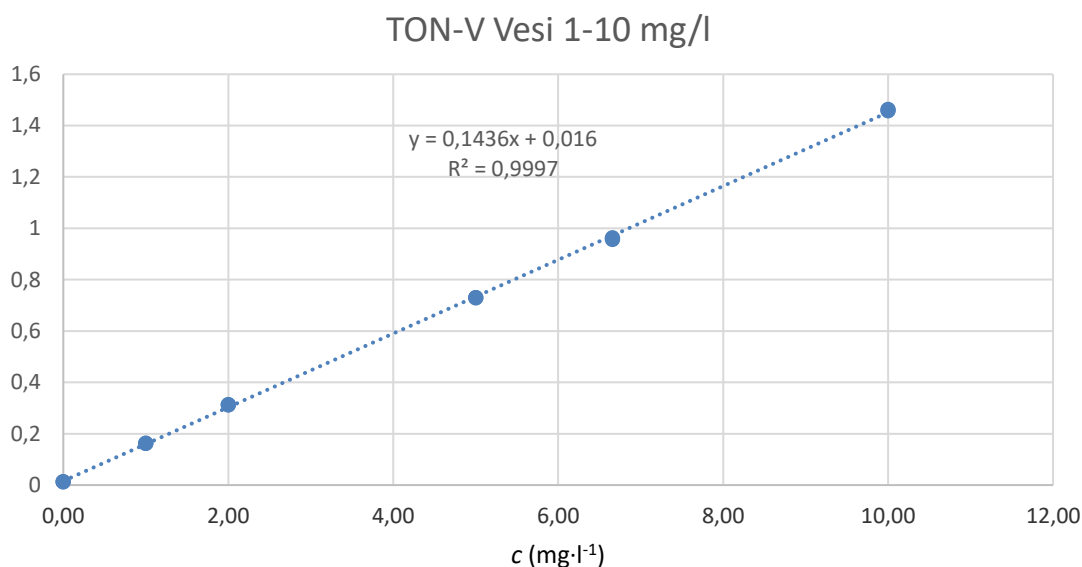
KUVIO 3. Jäännöskuvaaja vesiuton 0-1 mg/l standardinäytteistä

Suuremmille,  $1 - 10 \frac{\text{mg}}{\text{l}}$  standardeille mitatut vasteet, sekä lasketut ja mitatut pitoisuudet taulukossa 6. Mitatut pitoisuudet osuivat varsin lähelle laskettuja arvoja.

TAULUKKO 6. Vesiuuton suuremman standardisuoran vasteet ja pitoisuudet

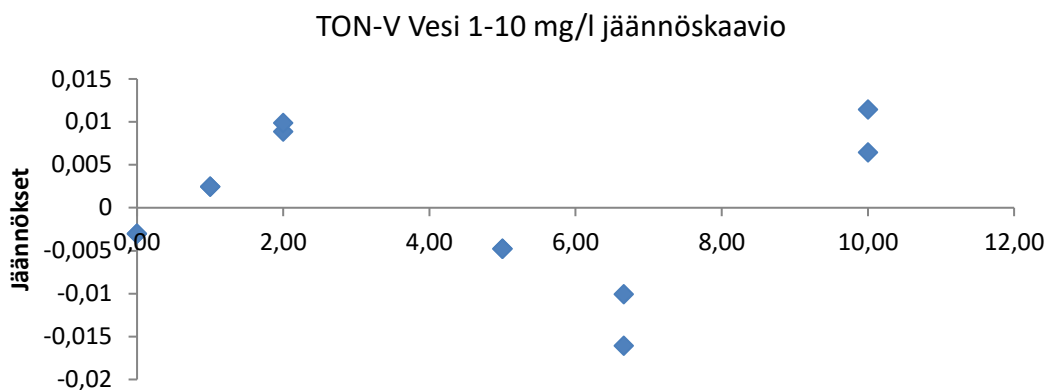
$C_{\text{laskettu}}$ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	Vaste	$C_{\text{mitattu}}$ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
0,00	0,013	-0,055
0,00	0,013	-0,053
1,00	0,162	1,011
1,00	0,162	1,010
2,00	0,312	2,079
2,00	0,313	2,081
5,00	0,729	5,006
5,00	0,729	5,008
6,66	0,956	6,580
6,66	0,962	6,618
10,00	1,458	10,005
10,00	1,463	10,044

Suuremmalle standardisuoralle saatiin vielä parempi korrelaatiokerroin kuin pienelle. Korrelaatiokerroimeksi saatiin 0,9997, joka on hyvin lähellä täydellistä lineaarista riippuvuutta. Standardisuora näyttää myös silmin tarkasteltuna olevan varsin lineaarinen (KUVIO 4).



KUVIO 4. Standardisuora vesiuutolle, pitoisuuksille 1-10 mg/l

Standardisuoran lineaarisuutta tarkasteltiin myös jäännöskuvaajan avulla (KUVIO 5). Mittauspisteet eivät ole yhtä hyvin normaalijakautuneet kuin pienemmällä standardisuoralla, mutta selkeää kuviota ne eivät muodosta. Liitteessä 4 on esitetty laitteelta saatu standardisuora, standardien mitatut pitoisuudet ja vasteet.



KUVIO 5. Jäännöskuvaaja vesiuuton 1-10 mg/l standardinäytteistä

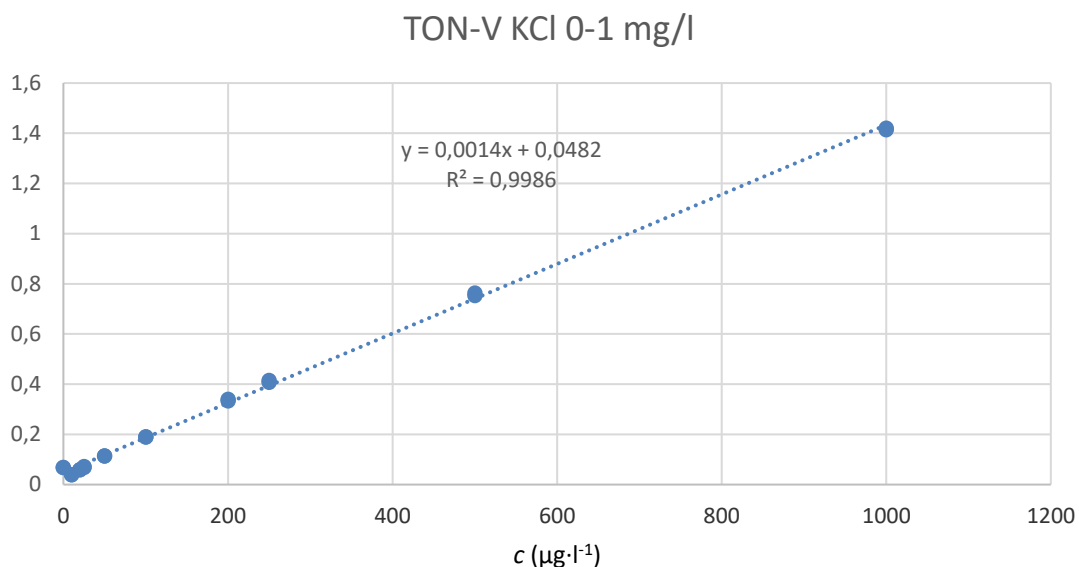
### 6.1.2 Kaliumkloridiuutto

Standardisuorat määritettiin kaliumkloridiuutolle vastaavaan tapaan kuin vesiuutolle. Pienemmille standardeille mitatut pitoisuudet ja vasteet taulukossa 7. Pienimmille standardeille mitatut pitoisuudet eivät ollenkaan vastanneet niille lasketuja pitoisuuksia.

TAULUKKO 7. KCl-uuton pienemmän standardisuoran vasteet ja pitoisuudet

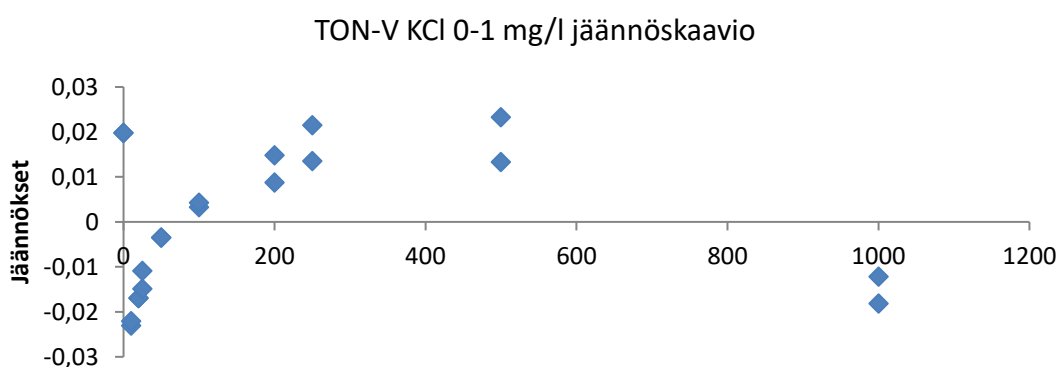
$C_{\text{skattu}}$ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	Vaste	$C_{\text{mitattu}}$ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
0	0,068	14,493
0	0,068	14,119
10	0,039	-6,59
10	0,04	-6,298
20	0,059	7,997
20	0,059	7,827
25	0,072	16,819
25	0,068	13,968
50	0,114	47,377
50	0,114	47,772
100	0,19	102,539
100	0,191	102,794
200	0,34	210,545
200	0,334	206,3
250	0,416	265,853
250	0,408	259,789
500	0,754	509,918
500	0,764	517,024
1000	1,421	991,222
1000	1,415	986,529

Standardisuorasta muodostui kuitenkin vaatimusten mukainen (KUVIO 6). Korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,9986, joka tarkoittaa kuitenkin varsin hyvää lineaarisuutta.



KUVIO 6. Standardisuora kaliumkloridiuutolle, pitoisuuksille 0-1 mg/l

Jäännöskuvaajaa tarkastelemalla oli helppo havaita, että mittauspisteistä muodostuu selkeä kuvio (KUVIO 7). Pisteet ovat kuitenkin sen verran lähellä regressiosuoraa, ettei siitä ole merkittävää haittaa. Laitteelta saatu kaliumkloridiuutelle tehty pienempi standardisuora, vasteet ja mitatut pitoisuudet liitteessä 5.



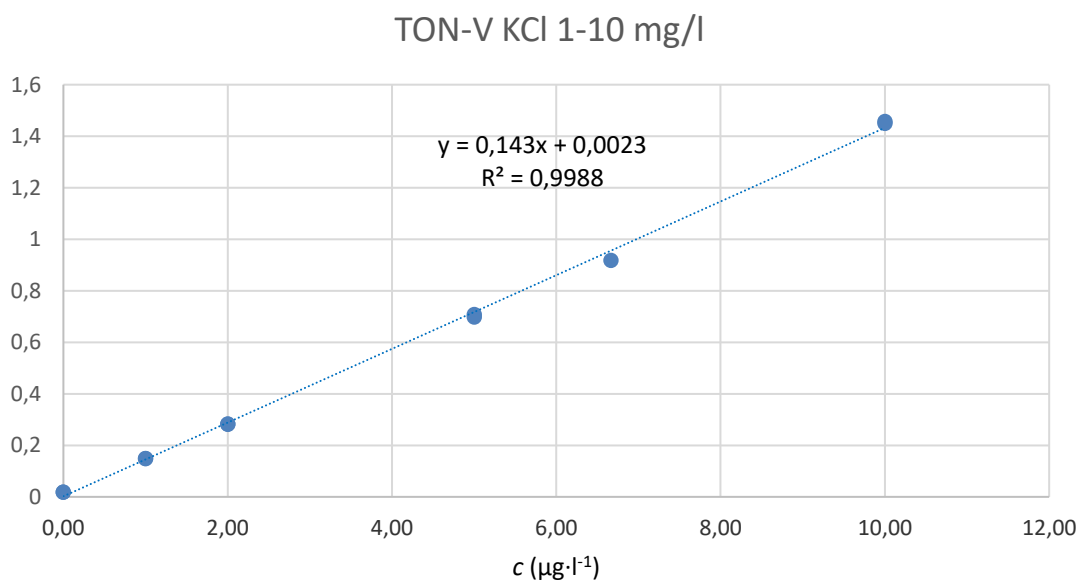
KUVIO 7. Jäännöskuvaaja kaliumkloridiuuton 0-1 mg/l standardinäytteistä

Suurempien standardien pitoisuudet poikkesivat hieman vähemmän lasketuista arvoista kuin pienempien standardien (TAULUKKO 8). Mittauspiste standardille, jonka laskettu pitoisuus oli  $6,67 \frac{\text{mg}}{\text{l}}$ , kuitenkin oli varsin kaukana tästä.

TAULUKKO 8. KCl-uuton suuremman standardisuoran vasteet ja pitoisuudet

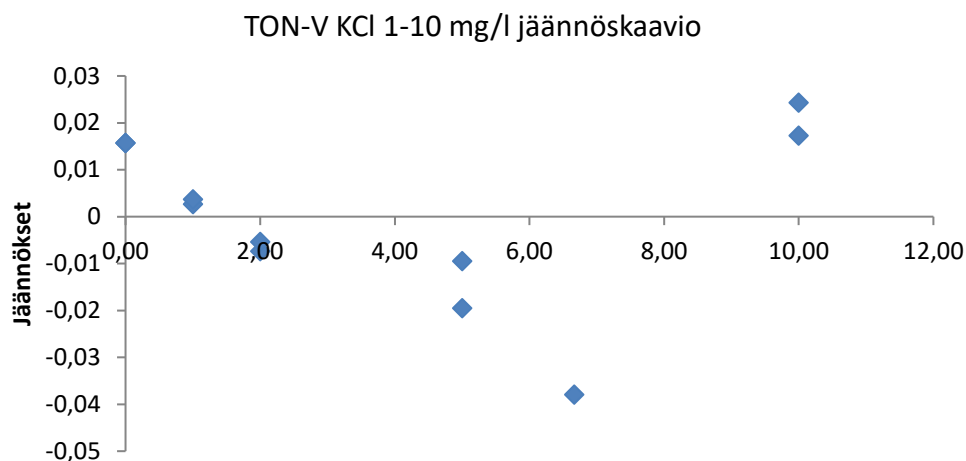
$C_{\text{laskettu}}$ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	Vaste	$C_{\text{mitattu}}$ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
0,00	0,018	0,111
0,00	0,018	0,109
1,00	0,148	1,022
1,00	0,149	1,024
2,00	0,281	1,951
2,00	0,283	1,061
5,00	0,698	4,863
5,00	0,708	4,931
6,67	0,918	6,406
10,00	1,457	10,171
10,00	1,45	10,119

Standardisuora näytti hyvin lineaariselta, vaikka yksi mittauspiste onkin vähän erillään regressiosuorasta (KUVIO 8). Korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,9988, joka oli vaatimuksiin nähden riittävän hyvä.



KUVIO 8. Standardisuora kaliumkloridiuutolle, pitoisuuksille 1-10 mg/l

Lineaarisuutta tarkastellessa jäännöskuvaajan avulla, havaitaan, että pisteet eivät ole normaalijakautuneita (KUVIO 9). Tätä ei kuitenkaan todettu merkittäväksi ongelmaksi hyvän korrelaation vuoksi. Laitteelta saatu standardisuora, mitatut pitoisuudet ja vasteet kaliumkloridiuutolle tehdylle suuremmalle standardisuoralle liitteessä 6.



KUVIO 9. Standardisuora kaliumkloridiuutolle, pitoisuuksille 1-10 mg/l

## 6.2 Määrittäysraja

Määrittäysrajat laskettiin nollanäytteistä kaavan (1) mukaisesti. Vesiutolla tehdyille nollanäytteille mitatut pitoisuudet  $c_0$  ja mittauspäivämäärät keskiarvoineen ja -hajontoineen taulukossa 9. Pitoisuudet määritettiin pienemmän standardisuoran avulla.

TAULUKKO 9. Nollanäytteiden pitoisuudet vesiutolla

pvm	$c_0$ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
1.10.2019	8,30
1.10.2019	10,98
3.10.2019	-0,16
3.10.2019	0,38
8.10.2019	-6,38
8.10.2019	-4,79
11.10.2019	4,47
11.10.2019	5,91
16.10.2019	-0,12
16.10.2019	30,55
10.11.2019	10,39
10.11.2019	7,41
14.11.2019	-6,25
14.11.2019	-3,93
keskiarvo	4,05
keskihajonta	9,72

Määrittärajaksi vesiuutolla tehdyille näytteille saadaan kaavalla (1) laskettuna:

$$\begin{aligned}
 c_{\text{LOQ}} &= \bar{x}_0 + 10s_0 \\
 &= 4,05 \frac{\mu\text{g}}{\text{l}} + 10 \cdot 9,72 \frac{\mu\text{g}}{\text{l}} \\
 &\approx 101 \frac{\mu\text{g}}{\text{l}}
 \end{aligned} \tag{8}$$

Kaliumkloridiuuttolla valmistetuista nollanäytteistä laskettiin samaan tapaan keskiarvon ja keskihajonnan avulla määrittärajaksi. Nollanäytteiden pitoisuudet  $c_0$  ja mittauspäivämäärät taulukoituna alla (TAULUKKO 10).

TAULUKKO 10. Kaliumkloridiuuttolla valmistettujen nollanäytteiden pitoisuudet

pvm	$c_0$ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
15.10.2019	38,18
15.10.2019	39,92
28.10.2019	-8,14
28.10.2019	-4,80
12.11.2019	-1,40
12.11.2019	-1,77
12.11.2019	11,05
12.11.2019	10,89
12.11.2019	5,86
13.11.2019	-0,58
13.11.2019	-0,46
13.11.2019	-17,62
13.11.2019	-16,27
20.11.2019	-1,98
26.11.2019	-11,76
11.12.2019	0,69
keskiarvo	2,61
keskihajonta	16,39

Nollanäytteiden pitoisuuksien keskiarvon  $\bar{x}$  ja keskihajonnan  $\sigma$  perusteella määrittärajaksi saadaan:

$$\begin{aligned}
 c_{\text{LOQ}} &= \bar{x}_0 + 10s_0 \\
 &= 2,61 \frac{\mu\text{g}}{\text{l}} + 10 \cdot 16,39 \frac{\mu\text{g}}{\text{l}} \\
 &\approx 167 \frac{\mu\text{g}}{\text{l}}
 \end{aligned} \tag{9}$$

## 6.3 Systemaattinen virhe

### 6.3.1 Vesiutto

Vesiutolla tapahtuvalle määrittelykselle määritettiin systemaattinen virhe  $s_{sv}$  ja systemaattisen virheen uusiutuvuus  $s_{su}$  kontrollinäytteiden avulla (TAULUKKO 11). Kontrollinäytteitä mitattiin 62 kappaletta neljällä eri pitoisuudella. Näytteiden mitatun ja lasketun pitoisuuden avulla näytteistä laskettiin harhat  $B$  kaavan (4) mukaisesti. Harhojen keskiarvosta saatiin systemaattinen virhe  $s_{sv}$ , ja harhojen keskiarvojen keskihajonnalla laskettiin systemaattisen virheen uusiutuvuus  $s_{su}$  kaavan 6 mukaisesti. Systemaattiseksi virheeksi  $s_{sv}$  saatiin 2,43 % ja systemaattisen virheen uusiutuvuudeksi  $s_{su}$  0,56 %. Koska systemaattinen virhe on kokonaisuuden kannalta vähäinen, ei nähty tarpeelliseksi jakaa otantaa kahteen populaatioon pitoisuusalueen mukaan, vaikka erot harhoissa olivatkin merkittäviä. Samasta syystä korjauskertoimia ei lähdetty käyttämään, vaan systemaattinen virhe lisättiin kokonaisvirheeseen.

TAULUKKO 11. Vesiuttomenetelmän systemaattinen virhe

$C_{\text{todellinen}}$ mg·l <sup>-1</sup>	$C_{\text{mitattu}}$ mg·l <sup>-1</sup>	$B$ %
5,00	5,140	2,80
8,00	8,080	1,00
5,00	5,100	2,00
8,00	7,980	-0,25
0,30	0,329	9,73
0,80	0,803	0,37
0,30	0,343	14,44
0,80	0,806	0,74
5,00	5,260	5,20
8,00	8,190	2,37
5,00	5,250	5,00
8,00	8,090	1,13
5,00	5,250	5,00
8,00	8,050	0,63
5,00	5,250	5,00
8,00	8,050	0,63
0,30	0,318	5,93
0,80	0,825	3,16
0,30	0,325	8,33
0,80	0,836	4,54
0,30	0,333	11,13
0,80	0,805	0,58
0,30	0,343	14,43
0,80	0,829	3,64



0,80	0,838	4,79
0,30	0,339	12,87
0,30	0,315	5,15
0,80	0,815	1,85
0,30	0,314	4,71
0,80	0,814	1,81
5,00	5,010	0,20
8,00	7,920	-1,00
5,00	4,840	-3,20
8,00	7,820	-2,25
0,30	0,288	-4,16
0,80	0,796	-0,47
0,30	0,292	-2,66
0,80	0,762	-4,73
5,00	5,020	0,40
8,00	8,100	1,25
5,00	5,040	0,80
8,00	8,040	0,50
0,30	0,317	5,66
0,80	0,833	4,15
0,30	0,327	9,16
0,80	0,806	0,71
5,00	5,240	4,80
8,00	8,240	3,00
5,00	5,310	6,20
8,00	8,260	3,25
0,30	0,285	-4,97
0,80	0,767	-4,10
0,30	0,286	-4,78
0,80	0,769	-3,82
5,00	5,180	3,60
8,00	7,920	-1,00
5,00	5,090	1,80
8,00	7,890	-1,38
0,30	0,303	0,85
0,80	0,796	-0,54
0,30	0,315	5,01
0,80	0,796	-0,50
systemaattinen virhe		2,43
systemaattisen virheen uusiutuvuus		0,56

### 6.3.2 Kaliumkloridiuutto

Kaliumkloridiuuttomenetelmälle määritettiin systemaattinen virhe  $s_{sv}$  ja systemaattisen virheen uusiutuvuus  $s_{su}$  vastaavalla tavalla kuin vesiuuttomenetelmälle. Kontrollinäytteitä mitattiin yhteensä 43 kappaletta. Systemaattiseksi virheeksi  $s_{sv}$  saatiin 2,47 % ja systemaattisen virheen uusiutuvuudeksi  $s_{su}$  0,50 % (TAULUKKO 12). Populaation jakamisen suhteen tehtiin samanlainen johtopäätös kuin vesiuuttoiselle menetelmälle, virhe on kokonaisuuden kannalta niin pieni,

ettei tämä tekisi mitään vaikutusta kokonaisepävarmuuden määrittämisen oikeellisuuteen.

TAULUKKO 12. Kaliumkloridiuuttomenetelmän systemaattinen virhe

$C_{\text{todellinen}}$ mg·l <sup>-1</sup>	$C_{\text{mitattu}}$ mg·l <sup>-1</sup>	$B$
0,30	0,336	10,74
0,80	0,848	5,61
0,30	0,327	8,12
0,80	0,832	3,90
5,00	5,030	0,60
8,00	7,930	-0,88
5,00	5,060	1,19
8,00	8,120	1,48
5,00	5,090	1,77
8,00	8,270	3,26
5,00	5,170	3,29
8,00	8,300	3,61
0,30	0,333	9,97
0,80	0,796	-0,56
0,30	0,304	1,38
0,80	0,770	-3,83
0,30	0,310	3,29
0,80	0,774	-3,39
0,30	0,298	-0,70
0,80	0,770	-3,94
0,30	0,317	5,31
0,80	0,798	-0,19
5,00	5,090	1,77
8,00	8,160	1,96
5,00	5,120	2,34
8,00	8,250	3,03
0,30	0,337	11,10
0,80	0,842	4,95
5,00	5,180	3,47
8,00	8,170	2,08
5,00	5,180	3,47
8,00	8,210	2,56
0,30	0,307	2,34
0,80	0,816	1,96
0,30	0,302	0,77
0,80	0,793	-0,88
0,30	0,310	3,24
0,80	0,832	3,83
0,30	0,304	1,43
5,00	5,150	2,91
8,00	8,060	0,74
5,00	5,080	1,57
8	8,110	1,36
systemaattinen virhe		2,47
systemaattisen virheen uusiutuvuus		0,50

## 6.4 Täsmällisyys ja toistettavuus

### 6.4.1 Vesiuutto

Vesiuuttomenetelmän täsmällisyyden  $s_r$  laskemiseksi mitattiin TON-pitoisuus tunnetusta näytteestä yhteensä kymmenen kertaa (TAULUKKO 14). Mittaustuloksista saatiin laskettua kaavan (2) perusteella suhteellinen keskihajonta (RSD). Täsmällisyydeksi  $s_r$  saatiin 16,6 %, joka tarkoittaa merkittävää hajontaa.

TAULUKKO 14. Vesiuuttomenetelmän täsmällisyys

pvm	TON mg·kg <sup>-1</sup>
27.8.2019	121,4
29.8.2019	112,5
29.8.2019	104,6
2.9.2019	131,3
2.9.2019	146,8
4.9.2019	100,5
19.9.2019	94,5
8.10.2019	100,4
15.1.2020	92,1
15.1.2020	93,9
keskiarvo	109,8
keskihajonta	18,2
RSD (%)	16,6

Toistettavuuden  $s$  määrittämiseksi TON-pitoisuus mitattiin 13:sta rinnakkaismäärittetystä näytteestä (TAULUKKO 15). Rinnakkaismäärittysten tuloksista laskettiin suhteelliset keskihajonnat (RSD), ja ne yhdistettiin neliöllisesti toisiinsa kaavan (3) mukaisesti. Toistettavuudeksi saatiin 6,08 %, joka on merkittävästi pienempi kuin täsmällisyyden arvo.

TAULUKKO 15. Vesiuttomenetelmän toistettavuus

TON1 mg·kg <sup>-1</sup>	TON2 mg·kg <sup>-1</sup>	RSD %	RSD <sup>2</sup> %
83,66	90,50	5,55	30,78
300,32	307,72	1,72	2,96
26,18	26,19	0,03	0,00
23,31	22,02	4,03	16,26
4321,50	4458,33	2,20	4,86
764,52	671,99	9,11	82,98
206,20	255,52	15,11	228,20
11,79	10,63	7,32	53,56
25,94	27,23	3,43	11,78
112,94	121,55	5,19	26,94
355,34	336,02	3,95	15,62
96,14	99,16	2,18	4,76
169,50	166,02	1,47	2,16
Toistettavuus (%)			6,08

#### 6.4.2 Kaliumkloridiuutto

Täsmällisyys  $s_r$  kaliumkloridiuuttomenetelmälle määritettiin samaan tapaan kuin vesiuttomenetelmälle. Tunnetun näytteen TON-pitoisuus mitattiin 16 kertaa, ja niistä laskettiin suhteellinen keskihajonta (TAULUKKO 16). Täsmällisyydeksi  $s_r$  saatiin 11,0 %, joka kertoo suuresta hajonnasta näytesarjojen välillä.

TAULUKKO 16. Kaliumkloridiuuttomenetelmän täsmällisyys

pvm	TON mg·kg <sup>-1</sup>
11.10.2019	224,8
11.10.2019	221,4
11.10.2019	206,0
15.10.2019	179,2
28.10.2019	188,3
12.11.2019	201,5
12.11.2019	210,2
12.11.2019	206,0
13.11.2019	177,7
13.11.2019	193,0
20.11.2019	199,4
26.11.2019	159,4
11.12.2019	207,6
12.12.2019	176,9
12.12.2019	250,9
12.12.2019	210,4
keskiarvo	200,8
keskihajonta	22,1
RSD (%)	11,0

Toistettavuuden  $s$  määrittämiseksi tehtiin rinnakkaismääritykset kymmenestä kompostinäytteestä (TAULUKKO 17). Toistettavuus laskettiin kuten vesiuutteistakin rinnakkaismääritysten suhteellisten keskihajontojen neliöllisen yhdistämisen kautta. Toistettavuudeksi saatiin 9,11 %, joka on hyvin lähellä täsmällisyyden arvoa, mikä on positiivinen asia, sillä hajonta sarjojen sisällä ja niiden välillä ei juurikaan eroa toisistaan.

TAULUKKO 17. Kaliumkloridiuuttomenetelmän toistettavuus

TON1 mg·kg <sup>-1</sup>	TON2 mg·kg <sup>-1</sup>	TON3 mg·kg <sup>-1</sup>	RSD %	RSD <sup>2</sup> %
1,15	1,02	1,07	6,01	36,14
0,94	0,91	0,79	8,69	75,57
1,00	1,02	1,04	2,32	5,40
0,95	0,89	0,88	4,09	16,70
499,63	445,35		8,12	65,98
557,38	434,82		17,47	305,13
1,20	1,18	1,22	1,62	2,62
0,87	0,94	0,96	4,93	24,28
0,89	0,83		4,93	24,34
2,10	1,66		16,55	273,88
toistettavuus (%)				9,11

## 6.5 Kokonaisepävarmuus

Kokonaisepävarmuus  $u$  lasketaan toistettavuudesta  $s$ , täsmällisyydestä  $s_r$ , systemaattisesta virheestä  $s_{sv}$  ja systemaattisen virheen uusiutuvuudesta  $s_{su}$  kaavan (7) mukaisesti. Vesiuuttomenetelmälle kokonaisepävarmuudeksi  $u$  saadaan:

$$\begin{aligned}
 u &= \sqrt{s^2 + s_r^2 + s_{sv}^2 + s_{su}^2} \\
 &= \sqrt{6,08^2 + 16,6^2 + 2,43^2 + 0,56^2} \\
 &\approx 17,8 \%
 \end{aligned}
 \tag{10}$$

Kokonaisepävarmuudesta  $u$  lasketaan vesiuuttomenetelmälle laajennettu kokonaisepävarmuus  $U$ :

$$\begin{aligned}U &= 2u \\ &= 2 \cdot 17,8 \% \\ &\approx 35,6 \%\end{aligned}\tag{11}$$

Kokonaisepävarmuudet  $u$  ja laajennetut kokonaisepävarmuudet  $U$  molemmille menetelmille taulukoituna alla (TAULUKKO 18).

TAULUKKO 18. Menetelmien epävarmuudet

Uutto	$s$ %	$s_r$ %	$s_{sv}$ %	$s_{su}$ %	$u$ %	$U$ %
Vesi	6,08	16,6	2,43	0,56	17,8	35,7
2M KCl	9,11	11,0	2,47	0,54	14,5	29,0

## 7 POHDINTA

Molempien menetelmien lopulliset laajennetut kokonaisepävarmuudet olivat suhteellisen suuria, noin 30 %, eli tulos on 95 % varmuudella 30 % sisällä mittaustuloksesta. Toisaalta tätä tulosta on hankala pienentää, sillä suuri epävarmuus johtuu näytteen matriisista ja heterogeenisyydestä, sillä suurimmat epävarmuuden lähteet olivat toistettavuus ja täsmällisyys, eli sarjojen sisäinen ja niiden välinen hajonta.

Toistettavuuden ja täsmällisyyden tuloksista voidaan päätellä, että kaliumkloridiuutossa käytetty kukkamulta on näytteenä hyvin lähellä kompostinäytteiden matriisia, sillä kaliumkloridiuutoissa toistettavuuden ja täsmällisyyden arvot olivat huomattavan lähellä toisiaan, vaikka sarjojen välillä oleva hajonta osoittautuikin olevan hieman suurempaa, mutta se on tyypillistä (Hiltunen ym. 2011, 19). Sen sijaan vesiuutoissa tunnettuna käytetyn rehuvalmisteiden matriisi on mahdollisesti kasvinäytteistä poikkeava, sillä kasvinäytteistä tehtyjen rinnakkaisnäytteiden hajonta oli huomattavasti pienempää kuin tunnettuna näytteenä käytetystä rehuvalmisteesta mitattujen tulosten hajonta.

Vesiuuttojen täsmällisyyden huonoa tulosta selittää myös osittain se, että näytteiden tuloksia mitattiin erivahvaisista laimennoksista. Laimennoksissa saattaa olla pientä värieroa, vaikka ne silminnähdessä näyttäisivät molemmat kirkkailta. Näytteen kirkkaudella on vaikutusta mittaustulokseen (Salo ym. 2013, 12). Jotta kirkkaudesta aiheutuva vaihtelu saataisi poistettua, tulisi näytteiden kirkkaudet silmämääräisen tarkastelun sijaan mitata. Tämä onnistuisi esimerkiksi määrittämällä veden väriluku komparaattorimenetelmällä (SFS 3030 1990, 1). Mikäli näytteiden värilukua ei mitata, tulisi näytteitä laimentaa reilusti yli tarpeen, jotta näyte olisi varmasti väritön.

Vaikka näytematriisista aiheutuvaa vaihtelua ei saada pienennettyä, on validoinnin tulosten tarkkuudessa kuitenkin vielä parantamisen varaa. Sekä kaliumkloridiuutoissa että vesiuutoissa suoritettiin toistoja varsin vähän, yleensä noin 10-15. Mikäli toistojen määrä nostettaisiin ajan myötä 30:een, paranisi tulosten luotettavuus huomattavasti.

Tulosten luotettavuutta parantaisi myös, jos systemaattisen virheen määrittäisiin myöhemmin käyttäen laboratoriodenvälisten vertailunäytteiden tuloksia harhojen laskennassa, sillä kontrollinäytteissä ei ole mitään matriisia, joka mitaustuloksiin vaikuttaa.

Pienten pitoisuuksien kontrollinäytteissä, sekä etenkin standardeissa ja nollanäytteissä hajonta oli suurta, ja määrittäjäraja oli siten myös suhteellisen korkea molemmilla menetelmillä. Poikkeamia havaittiin myös samasta vialista injektioitujen kaksoismäärittysten välillä. Esimerkiksi vesiuton nollastandardien välillä on nähtävissä tällainen hajonta. Tätä selittää esimerkiksi injektioneulaan mahdollisesti kertyvät epäpuhtaudet. Tämä koskee nollastandardien lisäksi myös standardinäytteitä, joissa on pienet pitoisuudet analyyttia. Injektioneulan lisäksi tätä hajontaa selittää mahdolliset epäpuhtaudet kyveteissä, sekä laitteen epätarkkuus. Näistä epäpuhtauksista, sekä laitteesta itsestään johtuvan hajonnan pienentämiseksi on hyvin vähän tehtävissä, ja analyysimenetelmissä joudutaan tyytymään verraten korkeaan määrittäjärajaan, sekä huonoon lineaarisuuteen pienillä pitoisuuksilla.



## LÄHTEET

Eurachem. 2012. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 3. painos.

Eurachem. 2014. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2. painos.

Follet, R. 2008. Chapter 2. Transformation and Transport Processes of Nitrogen in Agricultural Systems. [pdf]. Lincoln: USDA-ARS / UNL Faculty

Hiltunen, E., Linko, L., Hemminki, S., Hägg, M., Järvenpää, E., Saarinen, P., Simonen, S. & Kärhä, P. 2011. Laadukkaan mittaamisen perusteet. Espoo: Mittatekniikan keskus.

Housecroft, C. E. & Constable, E. C. 2006. Chemistry: An Introduction to Organic, Inorganic and Physical Chemistry. 3. painos. Englanti: Pearson Education Limited

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

OZ Biosciences. n.d. Nitric Oxide Detection Kit. Luettu 18.3.2020.

<https://www.ozbiosciences.com/viability-stress/112-nitrite-detection.html>

Salo, T., Palojärvi, A., Finni, S., Vestberg, M., Kapuinen, P., Tontti, T., Ylivainio, K., Parikka, P., Nummila, M., Maunuksela, L., Lindström, K., Orasmaa, S. & Paulin, L. 2013. Orgaanisten lannoitevalmisteiden vaikutus kasvien kasvuun - testimenetelmät: Test methods of plant nutrition effect and plant growth promoting for organic fertilizer products. Jokioinen: MTT

SFS 3030. 1990. Veden nitriitti- ja nitraattitypen summan määrittäminen. Helsinki: Suomen standardisoimisliitto SFS. Luettu 4.3.2020. Vaatii käyttöoikeuden.

<https://on-line.sfs.fi/fi/index.html.stx>

Zhang, K., Wu, Y. & Hang, H. 2019. Differential contributions of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> to nitrogen use in response to a variable inorganic nitrogen supply in plantlets of two Brassicaceae species in vitro. Plant Methods 15, 86 (2019).

LIITTEET

Liite 1. Menetelmä pitoisuuksille 1-10 mg/l

Document number: D09838\_04\_applic\_TON-V\_High, Date: 11/11, s.w. 7.2.AQ2

**Calibration parameters TON-V High**

Calibration type	POLYNOMIAL
Repeat time (d)	30
Points/Calibrator	Duplicate
Acceptance	MANUAL
Type of calibrators	SERIES
Curve direction	ASCENDING
Calibrator id	
Concentration	
Dil. ratio 1 +	

Factor	
Abs. error (m/A)	
Rel. error (%)	
Response limit (m/A)	
Mn	
Max	
Calibrator	
S-TON-V-0	0
S-TON-V-20	20
S-TON-V-20	20
S-TON-V-20	20
S-TON-V-20	20
S-TON-V-20	20

Bias	
Bias correction in use	
Bias corr. repeat time (d/hrs)	
Bias corr. limit (m/A)	
Total	
Incremental	
Bias call id	

**Test flow TON-V High**

Blank	YES	Normal cuvette											
Cd reduction	NO												
Reagent		Incubation		Blank		Sample		Incubation		Additional mixing		End point	
TON-V-2:1	Time (sec.)	120	Resp. Min	Volume (µl)	10	Time (sec.)	1200	Wavelength (nm)	540				
Volume (µl)	128		Resp. Max	Disp. with	WATER	Volume (µl)	54	Sides wavel. (nm)	NONE				
Disp. with	EXTRA			Dilution with	WATER	Volume (µl)	40	Wash reagent	WATER				
Volume (µl)	40			Wash reagent	WATER	Wash reagent	WATER	Meas. type	NORMAL				
Wash reagent	NONE												
NONE													

**Aquakem Total Oxidized Nitrogen (Vanadium) - code: 984350 (R1), 984351 (R2)**

Check the method description for the specific information of the reagent(s) and calibrator(s).  
 Ⓢ Determination limit (measuring range low).  
 This is a suggestive application. The user should adjust the test parameters to suite their own sample matrices and concentrations.  
 This Application must always be validated by the user. Information in this Application note can change without any prior notice.



Liite 2. Menetelmä pitoisuuksille 0-1 mg/l

Document number: D09840\_04\_applic\_TON-V\_SW Date: 11/11, s.w. 7.2 AQ2

Calibration parameters TON-V-SW

Calibration type: POLYNOMIAL  
 Repeat time (t): 30  
 Points/Calibrator: Duplicate  
 Acceptance: MANUAL  
 Type of calibrators: SEPARATE  
 Curve direction: ASCENDING  
 Calibrator id:   
 Concentration:   
 Dil. ratio 1 +

Calibrator	Factor	Abs. error (mA)	Rel. error (%)	Response limit (mA)	Min	Max	Conc. (µg)	Dil. ratio 1 +
S-TON-0							0	0
S-TON-20							20	0
S-TON-40							40	0
S-TON-60							60	0
S-TON-80							80	0
S-TON-100							100	0

Bias:   
 Bias correction in use: NO  
 Bias corr.: repeat time (dd/hh):   
 Bias corr.: limit (mVA):   
 Total:   
 Incremental:   
 Bias cal. id:

Test flow TON-V-SW

Blank: YES  NO   
 Cf reduction: YES  NO   
 Normal cuvette: YES  NO   

Reagent	Incubation	Blank	Sample	Incubation	Additional mixing	End point
TON-V-13	120	Resp. Min Resp. Max	Volume (µl) 120 Dilp. with EXTRA	Time (sec.) 2800		Wavelength (nm) 540 Slope wavel. (nm) NONE
Dilp. with			Volume (µl) 40 Dilution with WATER			Wave. type NONE
Volume (µl)			Volume (µl) 40 Dilution with WATER			Wave. type NONE
Wash reagent			Wash reagent WATER			Wave. type NONE
NONE			Wash reagent WATER			Wave. type NONE

Aquakem Total Oxidized Nitrogen (Vanadium) Saline Water - code: 984350 (R1), 984351 (R2)

Check the method description for the specific information of the reagent(s) and calibrator(s).  
 Determination limit (measuring range low).  
 This is a suggestive application. The user should adjust the test parameters to suite their own sample matrices and concentrations.  
 This Application must always be validated by the user. Information in this Application note can change without any prior notice.



## Liite 3. Standardisuora vesiuutolle, pitoisuuksille 0-1 mg/l

-----  
 Calibration results                      Aquakem 7.2                      Page: 1

Nablabs Jyväskylä  
 Aquakem 250 sn:E2119614

4.3.2020 11:18  
 -----

Test      Ton-V 1:1H

Accepted                      5.12.2019      11:55

Resp. = A \* Conc. <sup>2</sup> + B \* Conc. + C

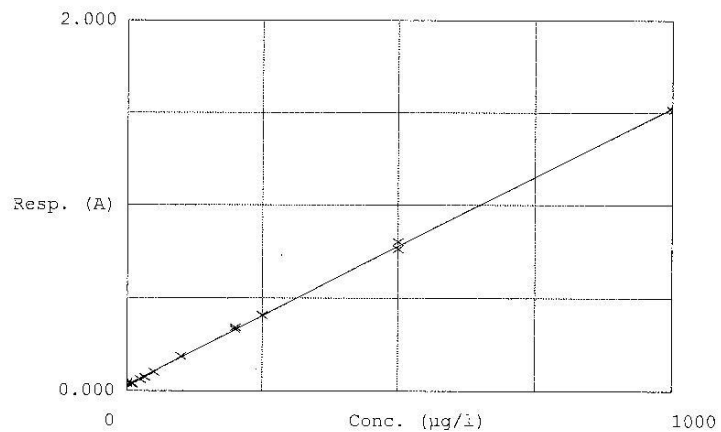
A = 0

B = 0.001

C = 0.032

Coeff. of det.                      0.999569

Errors



	Calibrator	Response	Calc. con.	Conc.	Errors
1	NO3-N 0	0.040	5.108	0.000	
2	NO3-N 0	0.046	9.038	0.000	
3	NO3-N 100	0.037	3.282	10.000	
4	NO3-N 100	0.041	5.931	10.000	
5	NO3-N 100	0.063	20.466	25.000	
6	NO3-N 100	0.063	20.632	25.000	
7	NO3-N 100	0.075	28.486	33.333	
8	NO3-N 100	0.074	27.673	33.333	
9	NO3-N 100	0.102	46.853	50.000	
10	NO3-N 100	0.102	46.805	50.000	
11	NO3-N 100	0.188	104.360	100.000	
12	NO3-N 100	0.189	104.546	100.000	
13	NO3-N 1000	0.343	208.094	200.000	
14	NO3-N 1000	0.333	201.348	200.000	
15	NO3-N 1000	0.410	252.485	250.000	
16	NO3-N 1000	0.408	251.567	250.000	
17	NO3-N 1000	0.803	515.868	500.000	
18	NO3-N 1000	0.764	489.704	500.000	
19	NO3-N 1000	1.522	997.204	1000.000	
20	NO3-N 1000	1.522	997.216	1000.000	
21	QCNO3-300H (cont)	0.494	309.235	300.000	

## Liite 4. Standardisuora vesiuutolle, pitoisuuksille 1-10 mg/l

=====  
 Calibration results                      Aquakem 7.2                      Page: 1

Nablabs Jyväskylä  
 Aquakem 250 sn:E2119614

4.3.2020 11:19  
 -----

Test        TON-V isoH

Accepted                      19.9.2019     9:37

Resp. = A \* Conc. ^ 2 + B \* Conc. + C

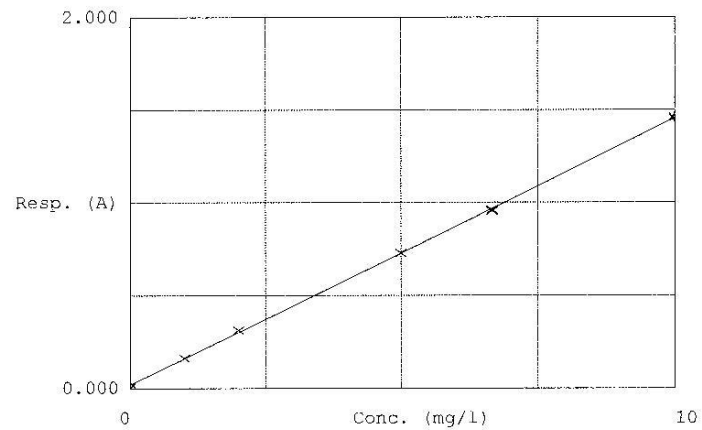
A =                              0

B =                              0.139

C =                              0.021

Coeff. of det.                0.999792

Errors



	Calibrator	Response	Calc. con.	Conc.	Errors
1	NO3-N 0	0.013	-0.055	0.000	
2	NO3-N 0	0.014	-0.053	0.000	
3	NO3-N 10.0	0.162	1.011	1.000	
4	NO3-N 10.0	0.162	1.010	1.000	
5	NO3-N 10.0	0.312	2.079	2.000	
6	NO3-N 10.0	0.313	2.081	2.000	
7	NO3-N 10.0	0.729	5.006	5.000	
8	NO3-N 10.0	0.729	5.008	5.000	
9	NO3-N 10.0	0.956	6.580	6.667	
10	NO3-N 10.0	0.962	6.618	6.667	
11	NO3-N 10.0	1.458	10.005	10.000	
12	NO3-N 10.0	1.463	10.044	10.000	

Calibrator        Information  
 -----

NO3-N 0  
 NO3-N 10.0

## Liite 5. Standardisuora kaliumkloridiuutolle, pitoisuuksille 0-1 mg/l

Calibration results

Aquakem 7.2

Page: 1

Nablabs Jyväskylä  
Aquakem 250 sn:E2119614

4.3.2020 11:18

Test Ton-V 1:1K

Accepted 9.12.2019 11:56

Resp. = A \* Conc. ^ 2 + B \* Conc. + C

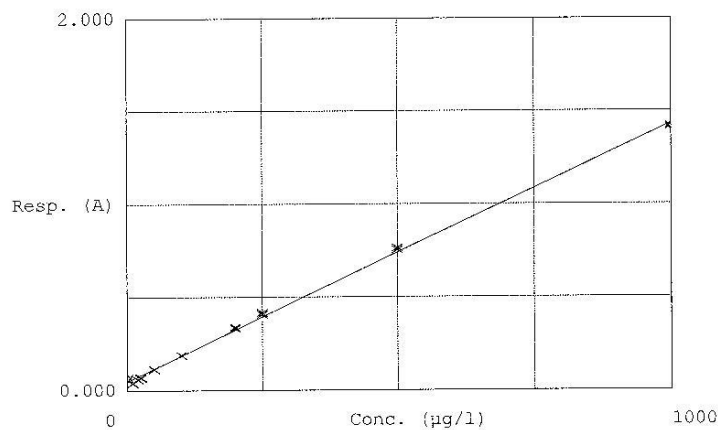
A = 0

B = 0.001

C = 0.048

Coeff. of det. 0.998559

Errors



	Calibrator	Response	Calc. con.	Conc.	Errors
1	NO3-N 0 KC	0.068	14.493	0.000	
2	NO3-N 0 KC	0.068	14.119	0.000	
3	NO3-N 100K	0.039	-6.590	10.000	
4	NO3-N 100K	0.040	-6.298	10.000	
5	NO3-N 100K	0.059	7.997	20.000	
6	NO3-N 100K	0.059	7.827	20.000	
7	NO3-N 100K	0.072	16.819	25.000	
8	NO3-N 100K	0.068	13.968	25.000	
9	NO3-N 100K	0.114	47.377	50.000	
10	NO3-N 100K	0.114	47.772	50.000	
11	NO3-N 100K	0.190	102.539	100.000	
12	NO3-N 100K	0.191	102.794	100.000	
13	NO3-N1000K	0.340	210.545	200.000	
14	NO3-N1000K	0.334	206.300	200.000	
15	NO3-N1000K	0.416	265.853	250.000	
16	NO3-N1000K	0.408	259.789	250.000	
17	NO3-N1000K	0.754	509.918	500.000	
18	NO3-N1000K	0.764	517.024	500.000	
19	NO3-N1000K	1.421	991.222	1000.000	
20	NO3-N1000K	1.415	986.529	1000.000	
21	QCNO3-300K(cont	0.431	276.005	300.000	

## Liite 6. Standardisuora kaliumkloridiuutolle, pitoisuuksille 1-10 mg/l

=====  
 Calibration results                      Aquakem 7.2                      Page: 1

Nablabs Jyväskylä  
 Aquakem 250 sn:E2119614

4.3.2020 11:20  
 -----

Test      TON-V isoK

Accepted                      26.9.2019      13:58

Resp. = A \* Conc. ^ 2 + B \* Conc. + C

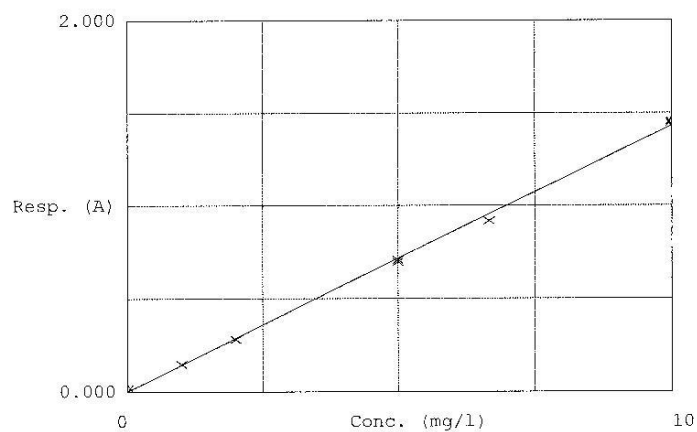
A =                      0

B =                      0.143

C =                      0.002

Coeff. of det.                      0.998820

Errors



	Calibrator	Response	Calc. con.	Conc.	Errors
1	NO3-N 0	0.018	0.111	0.000	
2	NO3-N 0	0.018	0.109	0.000	
3	NO3-N 10.0	0.148	1.022	1.000	
4	NO3-N 10.0	0.149	1.024	1.000	
5	NO3-N 10.0	0.281	1.951	2.000	
6	NO3-N 10.0	0.283	1.961	2.000	
7	NO3-N 10.0	0.698	4.863	5.000	
8	NO3-N 10.0	0.708	4.931	5.000	
9	NO3-N 10.0	0.918	6.406	6.667	
10	NO3-N 10.0	1.457	10.171	10.000	
11	NO3-N 10.0	1.450	10.119	10.000	

Calibrator      Information  
 -----

NO3-N 0  
 NO3-N 10.0