



JÄTEVEDEN KEMIALLINEN HAPENKULUTUS

Menetelmän siirto ja validointi

Heini Hämäläinen

Opinnäytetyö
Toukokuu 2013
Laboratorioalan
koulutusohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma

HEINI HÄMÄLÄINEN:

Jäteveden kemiallinen hapenkulutus : Menetelmän siirto ja validointi

Opinnäytetyö 49 sivua, joista liitteitä 5 sivua
Toukokuu 2013

Tämä opinnäytetyö tehtiin Kokemäenjoen vesistön vesiensuojeluyhdistys ry:n jätevesilaboratoriossa kesän 2012 aikana. Opinnäytetyön tavoitteena oli siirtää laboratoriossa käytössä oleva veden kemiallisen hapenkulutuksen dikromaattihapetusmenetelmä (COD_{Cr}) toisen valmistajan reaktioputkille ja spektrofotometrille, sekä osoittaa menetelmän pätevyys validoimalla tärkeimmät parametrit. Työn tarkoituksena oli saavuttaa alhaisempi COD_{Cr} -arvon määrittäysraja, sekä parantaa menetelmän luotettavuutta ja tulosten tarkkuutta.

Veden kemiallisella hapenkulutuksella tarkoitetaan sitä hapen määrää, jonka näytteessä oleva orgaaninen aine kuluttaa menetelmän mukaisissa olosuhteissa voimakkaan hapettimen läsnä ollessa. COD_{Cr} -menetelmässä käytetään hapettimena kaliumdikromaattia, joka kykenee hapettamaan orgaanisen aineen lähes täydellisesti hiilidioksidiksi ja vedeksi. Siksi menetelmä soveltuu erityisesti teollisuuden jätevesien analytiikkaan. Määrittäminen suoritetaan reaktioputkilla, jotka sisältävät tarvittavat reagenssit. Reaktioputket mitataan näkyvän valon alueella toimivalla spektrofotometrillä.

Menetelmän validointi suoritettiin käyttäen varsinaisia vedenpuhdistamoiden jätevesinäytteitä. Menetelmälle määritettiin toteamis- ja määrittäysraja, lineaarisuus, toistettavuus, systemaattinen virhe, satunnaisvirhe ja mittausepävarmuus. Lisäksi testattiin reaktioputkissa tapahtuvan hapetusreaktion täydellisyyttä, sekä putkissa olevien kemikaalien kykyä poistaa mittaustuloksia vääristävän kloridin aiheuttamaa häiriötä. Menetelmän validointi perustui ISO 15705:2002 -standardiin sekä laboratorion omaan sisäiseen validointiohjeeseen.

Validoinnin avulla saatiin osoitettua, että menetelmä tuottaa riittävän tarkkoja tuloksia ja soveltuu käyttötarkoitukseensa. Näytteiden epähomogeenisuus ja mittaustulosten epätasainen jakautuminen pitoisuusalueittain heikensivät hieman tulosten tilastollisen analysoinnin luotettavuutta. Silti menetelmän määrittäysraja alitti sekä vanhan menetelmän määrittäysrajan, että valmistajan reaktioputkille ilmoittaman määrittäysrajan. Uusi COD_{Cr} -menetelmä osoittautui kahden pitoisuusalueen reaktioputkilla työskennellessä vanhaa menetelmää työläämmäksi. Työn tavoitteet kuitenkin täyttyivät ja menetelmä saatiin päivitettyä laboratorion asiakkaiden tarpeita vastaavaksi. Uuden menetelmän ansiosta saadaan jatkossa määritettyä luotettavasti ja täsmällisesti pieniäkin COD_{Cr} -pitoisuuksia.

Asiasanat: validointi, COD_{Cr} , kemiallinen hapenkulutus, jätevesi, spektrofotometri

ABSTRACT

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

HEINI HÄMÄLÄINEN:

Chemical Oxygen Demand of Wastewater : Method Transference and Validation

Bachelor's thesis 49 pages, appendices 5 pages
May 2013

This Bachelor's Thesis was carried out for the wastewater laboratory of Water Protection Association of the River Kokemäenjoki during summer 2012. The aim of this thesis was to transfer the dichromate method of the chemical oxygen demand (COD_{Cr}) used by the laboratory to reaction tubes and spectrometer of the another manufacturer. The competency of the method was proved by validating the most important parameters. The purpose of this study was to achieve the lower quantitation limit of COD_{Cr} value and improve the reliability of the method and accuracy of the results.

The chemical oxygen demand, COD value, can be considered as the amount of oxygen consumed by the organic matter when a water sample is treated under the test conditions in the presence of a strong oxidant. When measuring COD_{Cr} value the samples are oxidized with potassium dichromate, which is capable of oxidizing almost completely the organic constituent to carbon dioxide and water. Therefore, the method is suitable especially for the analytics of industrial wastewater samples. Determination of COD_{Cr} value is carried out with sealed reaction tubes containing the necessary reagents. Tubes are measured with spectrometer functional in the visible light region.

Actual wastewater samples of water treatment plants were used to validate this method. The following parameters were determined: limits of detection and quantification, linearity, systematic error, random error, repeatability and measurement uncertainty. The ability of oxidize and remove the interference caused by chloride ions were also tested with reaction tubes. The validation was based on the International Standard ISO 15705:2002 and the laboratory's own internal validation directive.

The validation proved that the method is suitable for its use and generates results which are precise enough. Inhomogeneity of the water samples and unequal distribution of the measurement results impaired the reliability of the statistical analysis of the results. However, the quantitation limit of the method was below the quantitation limit of the old method as well as the limit declared by the manufacturer of test tubes. The new COD_{Cr} method turned out to be more laborious than the old method when working with test tubes with two different concentration ranges. However, the validation fulfilled the requirements and the method was updated to match the needs of the laboratory's customers. Due to the new method even small COD_{Cr} concentrations can be determined reliably and accurately in the future.

Key words: validation, COD_{Cr} , chemical oxygen demand, wastewater, spectrophotometer

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	TEOREETTINEN TAUSTA	8
2.1	Veden kemiallinen hapenkulutus.....	8
2.2	Dikromaattihapetus	8
2.3	COD _{Cr} -määritys suljetulla putkimenetelmällä	10
2.3.1	Näytteiden hapetus	10
2.3.2	Näytteiden mittaus	11
2.3.3	Menetelmän valvonta	12
2.4	Työturvallisuus	13
3	LAITTEISTO JA VÄLINEET	14
3.1	Reaktioputket	14
3.2	Polttohaude	16
3.3	Spektrofotometri	17
4	MENETELMÄN VALIDOINTI.....	21
4.1	Validoinnin tarkoitus	21
4.2	Toteamis- ja määrittäysraja.....	21
4.3	Lineaarisuus ja mittausalue.....	22
4.4	Systemaattinen virhe ja satunnaisvirhe.....	22
4.5	Mittausepävarmuus	23
4.6	Toistettavuus	24
4.7	Menetelmien vertailu	24
5	TYÖN SUORITUS	25
5.1	Referenssinäytteet	25
5.2	Kalibrointiliuokset	25
5.3	Hapettavuuden ja häiriönpoiston tarkastelu.....	29
5.4	Validointisarjat.....	30
6	TULOKSET	32
6.1	Toteamis- ja määrittäysraja.....	32
6.2	Lineaarisuus ja mittausalue.....	33
6.3	Hapettavuus ja häiriönpoisto	34
6.4	Mittausepävarmuus ja toistettavuus.....	36
6.5	Menetelmien vertailu	38
7	POHDINTA.....	40
	LÄHTEET.....	43
	LIITTEET	45
	Liite 1. Reaktioputkien hapettavuuden ja häiriönpoiston tulokset.....	45

Liite 2. Mittausepävarmuus ja toistettavuus.....	47
Liite 3. Menetelmien vertailu t-testin avulla	48

1 JOHDANTO

Opinnäytetyön kokeellinen osuus suoritettiin Kokemäenjoen vesistön vesiensuojeluyhdistyksen (KVVY) jätevesilaboratoriossa Tampereella. Kokemäenjoen vesistön vesiensuojeluyhdistys toimii Kokemäenjoen ja Karvianjoen vesistöjen alueilla. Vesiensuojeluyhdistyksen palveluihin kuuluvat tutkimusohjelmien tekeminen, sertifioitu näytteenotto, laboratorioanalyysit sekä tutkimus- ja raportointipalvelut. Yhdistyksen toiminta keskittyy ympäristölupiin liittyviin tarkkailuihin ja selvityksiin. KVVY:n laboratorio on analyysimäärältään Suomen suurin ympäristö- ja tutkimuslaboratorio. Laboratorion asiakkaita ovat vesilaitokset, vesistöalueen kunnat ja yksityiset asiakkaat. (Kokemäenjoen vesistön vesiensuojeluyhdistys ry 2012.)

Opinnäytetyön tavoitteena oli siirtää KVVY:n laboratoriossa käytössä oleva veden kemiallisen hapenkulutuksen dikromaattihapetusmenetelmä (COD_{Cr}) toisen valmistajan reaktioputkille ja spektrofotometrille. Tavoitteena oli myös osoittaa menetelmän pätevyys validoimalla tärkeimmät parametrit. Työn tarkoituksena oli saavuttaa alhaisempi COD_{Cr} -arvon määrittäysraja laboratorion asiakkaiden toiveesta. Validoinnin avulla myös parannettiin menetelmän luotettavuutta ja tulosten tarkkuutta.

Veden kemiallisella hapenkulutuksella tarkoitetaan sitä hapen määrää, jonka näytteessä oleva orgaaninen aine kuluttaa menetelmän mukaisissa olosuhteissa voimakkaan hapettimen läsnä ollessa. Veden kemiallista hapenkulutusta käytetään talousvesien, luonnonvesien ja teollisuuden jätevesien analyyseissä. COD_{Cr} -menetelmässä käytetään hapettimena kaliumdikromaattia, joka on syöpävaarallinen yhdiste. Kaliumdikromaatti kykenee hapettamaan orgaanisen aineen lähes täydellisesti hiilidioksidiksi ja vedeksi. Menetelmässä vesinäytteet hapetetaan kuumassa kaliumdikromaatin rikkihappoliuoksessa, jonka jälkeen niiden kromi-ionien konsentraatio mitataan fotometrisesti. (ISO 15705:2002, 1.)

Työn tavoitteena oli siirtää menetelmä Hach Langen valmistamille kahden eri pitoisuusalueen reaktioputkille, jotka sisältävät tarvittavat reagenssit. Reaktioputket mitataan Hach DR 2800 -laitteella, joka on näkyvän valon alueella toimiva spektrofotometri. DR 2800 sisältää useita valmiita analyysimenetelmiä eri yhdisteiden määrittämiseen. Laite

tunnistaa automaattisesti oikean menetelmän reaktioputkessa olevan viivakoodin avulla. (Hach Company 2012.)

Menetelmän validointi perustui ISO 15705:2002 -standardiin sekä laboratorion omaan sisäiseen toimintaohjeeseen. Validointi suoritettiin päivittäisten analyysien yhteydessä ja näytteinä käytettiin varsinaisia vedenpuhdistamoille tulevia ja puhdistamoilta poistuvia jätevesiä. Validointiin valittiin mukaan kattavasti koko pitoisuusalueelta näytteitä, joilla oli mahdollisimman erilainen matriisi. Menetelmälle määritettiin toteamis- ja määrittäysraja, toistettavuus, systemaattinen virhe, satunnaisvirhe ja mittausepävarmuus. Lisäksi arvioitiin menetelmän lineaarisuutta ja reaktioputkissa tapahtuvan hapetusreaktion täydellisyyttä. Validoinnin yhteydessä testattiin myös reaktioputkissa olevien kemikaalien kykyä poistaa mittaustuloksia vääristävän kloridin aiheuttamaa häiriötä.

2 TEOREETTINEN TAUSTA

2.1 Veden kemiallinen hapenkulutus

Veden kemiallista hapenkulutusta (Chemical Oxygen Demand, COD) käytetään laajalti talousvesien, luonnonvesien ja teollisuuden jätevesien analyyseissä. Kemiallisella hapenkulutuksella tarkoitetaan sitä hapen määrää, jonka näytteessä oleva liuennut ja suspendoitunut orgaaninen aine kuluttaa menetelmän mukaisissa olosuhteissa voimakkaan hapettimen läsnä ollessa. (Sawyer, McCarty & Parkin 2003, 625; Virtanen 2011, 1.)

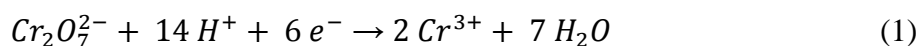
Veden kemiallinen hapenkulutus on tärkeä mittari, jolla voidaan arvioida käsiteltyjen jätevesien orgaanista laatua ja kuormittavuutta. Jätevedenpuhdistamoiden ilmastusaltaat on mitoitettu hajottamaan tietty määrä orgaanista ainetta. Mikäli orgaanista ainetta on ilmastuslaitteiden hapetustehoon nähden liikaa, voivat jätevesien sisältämät happea kulluttavat aineet aiheuttaa ongelmia jätevedenpuhdistusprosessissa. Happitason aleneminen ilmastusaltaissa voi aiheuttaa esimerkiksi bakteereiden liikakasvua ja huonosti laskeutuvaa lietettä. (Suomen Vesilaitosyhdistys ry 2011, 32.)

COD-arvolla voidaan yhdessä veden biologisen hapenkulutuksen (BHK₇) kanssa arvioida jäteveden laatua. Jos BHK/COD -suhde on yli 0,5, jäteveden orgaaninen aine on helposti hajoavaa eikä jätevesi todennäköisesti ole kovin myrkyllistä. Esimerkiksi meijeriteollisuudessa jäteveden orgaaninen aines on peräisin maidosta ja se koostuu maitosokerista, valkuaisesta ja rasvasta. Meijerijätevesien BHK/COD -suhde on keskimäärin 0,65, sillä jätevesien sisältämät rasva- ja valkuaisaineet ovat vaikeasti hajoavia, ja sitä kautta kuormittavia tekijöitä COD-arvoissa. Myös metsäteollisuuden jätevesien COD-arvo on yleensä korkea, vaikkakin ne ovat usein vähäravinteisia. (Suomen Vesilaitosyhdistys ry 2011, 53–54.)

2.2 Dikromaattihapetus

Erilaiset kemialliset hapettimet ovat jo pitkään olleet käytössä saastuneiden vesien hapenkulutusten määrittämisessä. Aikaisemmin kaliumpermanganaatti oli käytetyin hapetin, mutta nykyisin kaikkein käytännöllisimpänä menetelmänä pidetään COD_{Cr} -määrittystä,

jossa hapettimena toimii kaliumdikromaatti. Dikromaattihapetusta voidaan käyttää erityäin laajalla pitoisuusalueella, ja siksi se soveltuu sekä luonnonvesille, että teollisuuden jätevesille. Kaliumdikromaatti on suhteellisen edullinen yhdiste ja kuivaamisen jälkeen suoraan sellaisenaan käytettävissä liuoksiin. Kuitenkin kaliumdikromaattia suositaan lähinnä siksi, että se on permanganaattia voimakkaampi hapetin, joten se kykenee hapettamaan orgaanisen aineen lähes täydellisesti hiilidioksidiksi ja vedeksi. (ISO 15705:2002, 1; Sawyer, McCarty & Parkin 2003, 625–626.) Hapetusreaktion ensimmäisessä vaiheessa jokainen dikromaatti-ioni vapauttaa liuokseen kaksi Cr^{6+} -ionia, jotka toimivat voimakkaina hapettimina. COD_{Cr} -määritykset perustuvat reaktioon, jossa Cr^{6+} -ioni pelkistyy kahdeksi Cr^{3+} -ioniksi. Hapetusreaktio on kokonaisuudessaan ilman välivaiheita kuvattu kaavassa (1). (Harris 2007, 338.)



Reaktion on tapahduttava happamassa liuoksessa ja korkeassa lämpötilassa, jotta kaliumdikromaatti kykenee hapettamaan orgaanisen aineen. Tuloksena syntyy runsaasti haihtuvia yhdisteitä. Aikaisemmin määrittäminen suoritettiin avoimissa systeemeissä käyttämällä refluksikondensaattoreita, joiden avulla näyte sai kiehua ilman merkittävää haihtuvien yhdisteiden hävikkiä. Nykyään COD_{Cr} -määrittäminen suoritetaan suljetulla putkimenetelmällä valmiita reaktioputkia käyttäen. (Sawyer ym. 2003, 626.) Vesinäytteet hapetetaan kuumassa kaliumdikromaatin rikkihappoliuoksessa, jonka jälkeen niiden kromi-ionien konsentraatio mitataan fotometrisesti tietyllä aallonpituudella. Kemiallisen hapenkulutuksen arvo lasketaan happena näytteen kuluttamasta dikromaattimäärästä siten, että 1 mooli dikromaattia vastaa 1,5 moolia happea. (Virtanen 2011, 1.)

Dikromaattimenetelmän avulla orgaanisista yhdisteistä hapetuu tavallisesti 90–100 %. Reaktion täydellisyys riippuu kuitenkin tutkittavan veden koostumuksesta. Tietyt orgaaniset yhdisteet eivät hapetu dikromaatin avulla ilman katalyyttiä. Tällaisia yhdisteitä ovat esimerkiksi rasvahapot, joilla on alhainen molekyylimassa. Hopeaionin on todettu toimivan tehokkaana katalyyttinä COD -määrittämisessä. Aromattiset hiilivedyt ja pyriidiini eivät hapetu dikromaatin avulla missään olosuhteissa. (ISO 15705:2002; Sawyer ym. 2003, 625.)

Jätevesissä esiintyvät pelkistyneet epäorgaaniset ionit voivat hapettua määrityksen mukaisissa olosuhteissa ja sen vuoksi aiheuttaa vääristymiä tuloksiin. Merkittävin häiriöte-

kijä reaktiossa on kloridi, koska sitä esiintyy normaalisti korkeina pitoisuuksina jätevesissä. Yli 2000 mg/l kloridipitoisuus vaikuttaa kemialliseen hapenkulutukseen tuloksia suurentavasti hapettuessaan klooriksi. Häiriö voidaan poistaa osittain käyttämällä elohopea(II)sulfaattia, joka sitoo näytteessä olevat kloridi-ionit kloromerkuraatti(II)-kompleksiksi. Lisäksi yli 50 mg/l nitriittipitoisuus aiheuttaa häiriötä hapettuessaan nitraatiksi. Nitriitin aiheuttama häiriö voidaan poistaa lisäämällä sulfamiinihappoa dikromaattiliuokseen. Myös rikkivedyn, rikkidioksidin tai kaksiarvoisen raudan hapettuminen saattaa aiheuttaa virheitä tuloksiin. (ISO 15705:2002, 2; Sawyer ym. 2003, 629.)

2.3 COD_{Cr} -määritys suljetulla putkimenetelmällä

Kokemäenjoen vesistön vesiensuojeluyhdistyksen laboratoriossa otettiin käyttöön COD_{Cr} -menetelmä, joka perustuu ISO 15705:2002 -standardiin ja reaktioputkien mukana tuleviin valmistajan ohjeisiin. Niiden pohjalta on laadittu laboratorion sisäinen menetelmäohje, jossa on lyhyesti kuvattu jokainen työvaihe.

2.3.1 Näytteiden hapetus

COD_{Cr} -määrityksen ensimmäisessä vaiheessa näytteet kestäväidään lisäämällä 100 ml:n vesinäytteeseen 1 ml 4 mol/l rikkihappoa. Kestäväidyt näytteet säilytetään kylmässä ja COD_{Cr} -määritys tulee tehdä niistä viikon kuluessa. Näytepullot ravistellaan ennen näytteenottoa niin hyvin, että mahdollinen pullon pohjalle suspendoitunut aines sekoittuu tasaisesti koko näytetilavuuteen. (Hach Lange 2008; Hach Lange 2011; Virtanen 2011, 4.)

Määrityksessä käytetään Hach Langen valmiita reaktioputkia kahdelle eri pitoisuusalueelle. Vesilaitoksille tulevat jätevedet sekä erilaiset prosessivedet pipetoidaan yleensä suuremman pitoisuusalueen putkiin. Vastaavasti vesilaitoksilta lähtevät vedet ja luonnonvedet pipetoidaan pienemmän pitoisuusalueen putkiin. Reaktioputket ravistellaan huolellisesti koeputkiravistelijalla, jotta putken pohjalle laskeutunut sakka sekoittuu tasaisesti. Sekoitetusta vesinäytteestä pipetoidaan tarkasti automaattipipetillä 2,0 ml näytettä reaktioputkeen ja suljetaan putken korkki tiiviisti. Mikäli näytteitä pitää laimentaa, laimennokset tehdään mittapulloihin ennen vesinäytteen pipetoimista reaktioput-

keen. Yleisesti käytetyt laimennoskertoimet ovat 2, 5, 10 ja 20, mutta joskus näytteestä joutuu tekemään jopa 50-kertaisen laimennoksen. Laimennoskerroin otetaan huomioon tuloksia laskettaessa. (Hach Lange 2008; Hach Lange 2011; Virtanen 2011, 3–5.)

Kun näytteet on pipetoitu reaktioputkiin, ne sekoitetaan vielä kaikki kertaalleen kääntelemällä putkia muutaman kerran ylösalaisin. Sen jälkeen ne siirretään vetokaappiin polttohauteeseen, joka on esilämmitetty 150 °C:een. Polttohaude sisältää paikan 25 reaktioputkelle. Näytteitä pidetään polttohauteessa 2 tuntia. Polttohaude jäähtyy jonkin verran, kun viileämmät reaktioputket asetetaan sinne. Ajan mittaaminen aloitetaan siitä, kun polttohaude on lämmennyt uudelleen vaadittuun lämpötilaan. (Hach Lange 2008; Hach Lange 2011; Virtanen 2011, 5.)

2.3.2 Näytteiden mittaus

Näytteiden hapetuksen jälkeen reaktioputket nostetaan koeputkitelineeseen jäähtymään. Putkien jäähtyttyä pari minuuttia ne sekoitetaan kääntelemällä ylösalaisin, jotta putken korkkiin tiivistynyt vesi sekoittuu näytteeseen. Sen jälkeen näytteiden annetaan jäähtyä huoneenlämpöisiksi. (Virtanen 2011, 5.)

Reaktioputken pinnan täytyy olla puhdas ennen mittausta. Siksi jokainen reaktioputki pyyhitään ensin pehmeällä paperilla, jonka jälkeen huoneenlämpöinen putki asetetaan fotometriin. Fotometri pyörittää putkea etsiessään siitä viivakoodia, ja valitsee automaattisesti oikean menetelmän. Kun näyttöön ilmestyy lukema, mittaus on valmis ja voidaan siirtyä seuraavan näytteen mittaamiseen. Mitatun näytteen COD_{Cr} - arvo saadaan suoraan fotometrin näytöltä. Kuitenkin mahdollinen laimennuskerroin on huomioitava lopullista tulosta laskettaessa. (Virtanen 2011, 5–6.) Laite ilmoittaa, mikäli näytteen tulos on reaktioputken mittausalueen ylä- tai alapuolella. Silloin kyseinen näyte on määritettävä uudelleen joko pitoisuusalueelle sopivilla putkilla tai laimentaen.

Näytteitä ei tarvitse mitata hapetuspäivänä. Jos näyte on silmämääräisesti samea tai sakinainen, sakan annetaan laskeutua yön yli ja näyte mitataan seuraavana päivänä. Vaihtoehtoisesti näyte voidaan myös sentrifugoida ja mitata sen jälkeen. (Virtanen 2011, 5–6.)

2.3.3 Menetelmän valvonta

COD-testiä käytetään määrittämään näytteen sisältämä orgaaninen aines, minkä vuoksi on tärkeää, että näytteeseen ei pääse orgaanista ainetta ulkopuolisista lähteistä. Koska ulkoisen orgaanisen aineen eliminoiminen on vaikeaa, määrittämisessä käytetään nollanäytteitä, joiden sisältämä orgaaninen aines vähennetään näytteiden tuloksista. Jokaista näytesarjaa kohti valmistetaan laaduntarkkailua varten kaksi nollanäytettä kummankin pitoisuuden putkeen 2,0 millilitrasta milli-Q-vettä, joka on ionivaihdettua ja käänteisosmoosilla puhdistettua laboratorion analyysiin tarkoitettua ultrapuhdasta vettä. Nollanäytteet käsitellään samalla tavalla kuin varsinaiset näytteet ja mitataan kunkin näytesarjan alussa. (Sawyer ym. 2003, 627; Virtanen 2011, 5.)

Jokaisessa näytesarjassa tulee olla myös tunnettuja kontrollinäytteitä ja varsinaisten näytteiden rinnakkaisnäytteitä tulosten oikeellisuuden varmistamiseksi. Kontrolliliuokset on valmistettu kaupallisesta referenssiaineesta, jota säilytetään 10 ml ampulleissa. Ampullista pipetoidaan automaattipipetillä 6,25 ml referenssiainetta 250 ml:n mittapulloon ja täytetään se merkkiin milli-Q-vedellä. Lisäksi ampullista pipetoidaan toista erää varten 2,5 ml referenssiainetta 100 ml:n mittapulloon ja täytetään se vedellä merkkiin. Näin valmistetun kontrollin odotusarvo on 1255 mg/l. Samasta referenssiampullista pipetoidaan vielä pienempää kontrollia varten 1 ml automaattipipetillä 1000 ml mittapulloon ja täytetään se vedellä merkkiin. Pienemmän kontrollin odotusarvo on 50,2 mg/l. Kontrolliliuokset säilytetään 100 ml:n eriin ja säilytetään kylmiössä. Jokaiseen näytesarjaan valmistetaan kontrollinäytteet pipetoimalla 2,0 ml kumpaakin kontrolliliuosta omiin reaktioputkiinsa. Kontrollit mitataan näytesarjan alussa. Lisäksi jokaisessa määrittämissarjassa yksi näyte 25:stä on rinnakkaismäärittäminen. (Virtanen 2011, 2, 7; Väntsi & Mattsson 2012, 2–3.) Kontrollinäytteiden valmistus on esitetty taulukossa 1.

TAULUKKO 1. Kontrollinäytteiden valmistus

Referenssiaineen pipetointimäärä (ml)	Kontrollin määrä (ml)	Kontrollin odotusarvo (mg/l)
6,25	250	1255
2,5	100	1255
1	1000	50,2

Polttohauteen lämpötilaa seurataan jokaisen käyttökerran aikana digitaalimittarilla. Ennen lämpötilan lukemista mittarin annetaan olla hauteessa noin 10 minuuttia sen jälkeen kun polttohaude on lämmennyt vaadittuun lämpötilaan. (Virtanen 2011, 7.)

2.4 Työturvallisuus

Kaliumdikromaatin käyttö hapetuksessa on aiemmin tuottanut suuria määriä nestemäistä ongelmajätettä. Menetelmässä käytetyt hapot, sekä kromi, hopea ja elohopea ovat myrkyllisiä luonnolle ja eliöille, minkä vuoksi menetelmää kehitettäessä on alettu kiinnittää enemmän huomiota ympäristön kuormittamisen minimointiin. Dikromaattihapetuksessa onkin erittäin tärkeää huomioida menetelmään liittyvät työturvallisuusriskit. Reaktioputket sisältävät hyvin haitallisia yhdisteitä, minkä vuoksi niitä on käsiteltävä varovaisesti. Valmiiden reaktioputkien ansiosta ISO 15705:2002 -standardin mukaisen COD_{Cr} -määrityksen työturvallisuus on kuitenkin paljon parempi kuin aikaisemmin käytössä olleiden menetelmien, sillä liuoksia ei tarvitse enää käsitellä putkien valmistamista varten. Suljetun putkimenetelmän käyttöönotto on myös mahdollistanut pienemmät näyte- ja reagenssimäärät. Näytteet on helppo pakata määrityksen jälkeen takaisin alkupe- räispakkauksiinsa ja toimittaa ongelmajätekeräykseen. (ISO 15705:2002, 11; Sawyer ym. 2003, 628; Virtanen 2011, 8.)

Kaliumdikromaatti on karsinogeeni eli ihmiselle syöpää aiheuttava yhdiste. Pitkäaikainen kaliumdikromaatille altistuminen voi aiheuttaa keuhkosityöpää, periytyviä perimävaurioita ja heikentää hedelmällisyyttä. Se on voimakkaasti ihoa, silmiä ja hengitysteitä ärsyttävä ja syövyttävä aine. Kaliumdikromaattia käsitellään aina vetokaapissa tai hyvin ilmastoidussa tilassa asianmukaisia suojavarusteita käyttäen. (Isvet 2010; Virtanen 2011, 8.)

Hopeasulfaattiliuos on erittäin syövyttävä, sekä silmiä, ihoa ja hengitysteitä ärsyttävä yhdiste. Liuos aiheuttaa iholle joutuessaan kirvelyä, rakkoja ja palovammoja. Elohopeasulfaatti on erittäin myrkyllistä nieltynä ja ihon läpi imeytyneenä, että pölynä hengitetynä. Sekä hopeasulfaatin, että elohopeasulfaatin kanssa työskentely tapahtuu ainoastaan vetokaapissa, tai muussa hyvin ilmastoidussa tilassa. Elohopeasulfaatin vuoksi reaktioputket säilytetään kuivassa, viileässä ja valolta suojattuna. (Virtanen 2011, 8.)

3 LAITTEISTO JA VÄLINEET

3.1 Reaktioputket

Kokemäenjoen vesistön vesiensuojeluyhdistyksen laboratoriossa haluttiin siirtää ISO 15705:2002 -standardin mukainen COD_{Cr}-menetelmä Hach Langen valmistamille reaktioputkille. Menetelmässä haluttiin ottaa käyttöön kahden eri pitoisuusalueen reaktioputket. Aikaisemmin käytössä olivat olleet vain yhdet putket, jotka kattoivat koko mittausalueen.

Menetelmä siirrettiin Hach Langen valmiille reaktioputkille LCK 314 ja LCK 514. LCK 314 (kuvassa 1) on tarkoitettu 15–150 mg/l COD_{Cr}-arvon omaaville vesille, eli sellaisille vesille, jotka eivät sisällä paljon orgaanista ainetta (Hach Lange 2011). Tällaisia vesiä ovat esimerkiksi luonnonvedet ja vesilaitosten puhdistetut vedet. LCK 314-putket ovat normaalisti vaalean keltaisia. Kun niihin pipetoidaan analysoitavaa näytettä, putkessa olevan liuoksen väri muuttuu kellertäväksi. Mikäli vesinäytteen COD_{Cr}-arvo on yli 150 mg/l, putkessa oleva liuos värjäytyy sinertäväksi. Tällöin vesinäyte on pipetoitava uudelleen LCK 514-putkeen. Reaktioputken liuoksen väri eri näytepitoisuuksilla on esitetty tarkemmin kuvassa 6 (s. 28).



KUVA 1. LCK 314 -reaktioputket (Hach Lange 2011)

LCK 514 -putket (kuvassa 2) on tarkoitettu vesille, joiden COD_{Cr}-pitoisuus on 100–2000 mg/l (Hach Lange 2008). Tällaisia vesiä on suurin osa jätevesilaboratorioon tulevasta jäte- ja prosessivesistä. Käyttämättömät LCK 514 -putket ovat normaalisti orans-

sinpunaisia. Kun niihin pipetoidaan analysoitavaa näytettä, putkessa olevan liuoksen väri muuttuu vihertäväksi. Mitä turkoosimpaa väristä tulee, sitä todennäköisemmin analysoitavaa vettä joutuu laimentamaan. Kuvassa 3 on käytettyjä reaktioputkia, joista viimeinen on silminnähden sinertävän vihreä. Kyseisen reaktioputken COD_{Cr}-pitoisuus on liian suuri mitattavaksi ilman laimennusta. LCK 514 -reaktioputkien liuoksen väri eri näytepitoisuuksilla on esitetty tarkemmin kuvassa 7 (s. 28).



KUVA 2. LCK 514 -reaktioputket (Hach Lange 2008)



KUVA 3. Käytettyjä COD_{Cr}-reaktioputkia (Heini Hämäläinen 2013)

Molempien reaktioputkien toimintaperiaate on samanlainen, kuin kappaleessa 2.1 on selitetty. Eri pitoisuusalueiden putkissa lopullinen COD_{Cr} -arvo kuitenkin määräytyy eri hapetusasteisen kromin pitoisuuden kautta. Dikromaatti-ionien vapauttamat Cr^{6+} -ionit pelkistyvät reaktiossa Cr^{3+} -ioneiksi. LCK 314 -putkissa COD_{Cr} -arvo määräytyy reaktiossa jäljelle jääneen oranssin Cr^{6+} -ionin perusteella, kun taas LCK 514 -putkissa fotometri mittaa pelkistyneen vihreän Cr^{3+} -ionin konsentraation. Reaktioputkien sisältämässä kaliumdikromaatin määrässä on eroa, jotta putkilla päästäisiin eri pitoisuusalueille. Hapetusreaktio on kuitenkin sama molemmissa reaktioputkissa. (Mattsson 2013.)

Reaktioputket sisältävät kaliumdikromaattia ja rikkihappoa. Lisäksi putkissa on hopeasulfaattia katalyyttinä ja elohopea(II)sulfaattia kloridin aiheuttaman häiriön poistamiseen. Reaktioputken kyljessä on viivakoodi, jonka avulla fotometri tunnistaa automaattisesti oikean menetelmän. (Hach Company 2007; Hach Lange 2008; Hach Lange 2011.)

Aikaisemmin laboratoriossa olivat olleet käytössä Merckin valmistamat reaktioputket, jotka olivat tarkoitettu mitta-alueelle 25–1500 mg/l. Uudet Hach Langen reaktioputket eroavat vanhoista Merckin putkista ainoastaan kooltaan, sillä putkiin pipetoidaan analysoitavaa vettä 2 ml entisen 3 ml sijaan. Uusien reaktioputkien pienemmän koon ansiosta polttohaude lämpenee vaadittuun 150 °C:n lämpötilaan nopeammin putkien lisäämisen jälkeen. Putket myös jäähtyvät huomattavasti nopeammin kuin isommat Merckin putket. Hach Langen reaktioputkien etuna on myös se, että niillä saadaan luotettavammin mitattua pieniä COD_{Cr} -arvoja, ja lisäksi LCK 314 -reaktioputkilla pystyttiin mahdollistamaan menetelmän määrittämissä rajojen alentaminen.

3.2 Polttohaude

Määrittystä varten laboratorion vetokaappiin on sijoitettu kaksi Hachin 45600 -polttohaudetta (kuvassa 4), joissa reaktioputkien hapetus tapahtuu. Polttohauteella säävytetään Hachin testijärjestelmässä kemiallisen hapenkulutuksen vaatima lämpötila 150 astetta. Laitetta käytetään hapettamaan korkeassa lämpötilassa reaktioputkia, joissa on pieniä määriä terveydelle vaarallisia kemikaaleja. Hauteessa on tarkoitus käyttää vain Hachin valmistamia putkia. Kumpaankin polttohauteeseen mahtuu 25 reaktioputkea. (Hach Company 2004.)



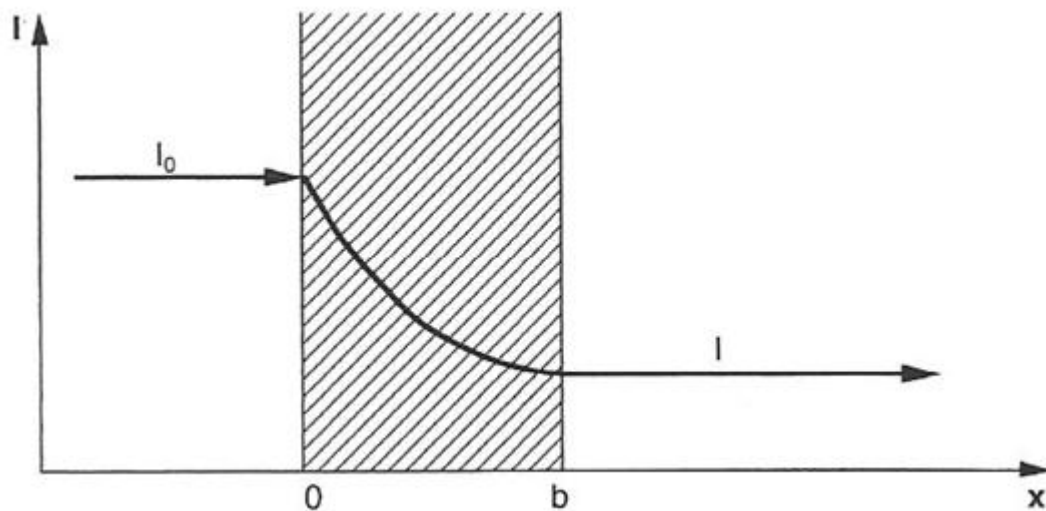
KUVA 4. Hach 45600 -polttohaude (Heini Hämäläinen 2013)

Polttohauteessa on mahdollista valita ajastinkäyttö sekä lämpötilan säätö. Laitteen lämpötilakytkin on asetettu 150 asteeseen, jolloin lämpötila pysyy vakiona ± 2 asteen rajoissa. Kuumennusyksikön lämpötila tarkistetaan asettamalla laitteen mukana toimitettavan lämpömittarin sille varattuun koloon. Polttohauteen lämpötilaa seurataan jokaisen käyttökerran yhteydessä. (Hach Company 2004.) Lämpötilan seuranta on kuvattu kapaleessa 2.2.3.

3.3 Spektrofotometri

COD_{Cr} -arvon mittaaminen reaktioputkista suoritetaan spektrometrisesti. Spektrometria perustuu eri aineiden kykyyn absorboida eli pidättää valoa eri aallonpituuksilla. Absorptiossa fotonin eli valohiukkasen energia siirtyy atomille, ja saa atomin ulkoelektronin virittymään korkeammalle energiatasolle. Yhdisteet absorboivat valoa tietyllä aallonpituudella, joko IR-, UV-, tai näkyvän valon alueella. (Jaarinen & Niiranen 2008, 46–50.)

Spektrofotometrisia mittauksia suoritetaan laitteilla, jotka mittaavat aineen absorptansseja. Näitä laitteita käytetään aineiden tunnistamiseen, sekä niiden puhtausasteen ja pitoisuuden määrittämiseen liuoksessa. Spektrometri kykenee erottamaan aallonpituuksia toisistaan ja mittaamaan kutakin aallonpituutta vastaavat intensiteetit. Laitteiden toiminta perustuu Lambert-Beerin lakiin, joka on yksi spektroskopiassa käytetyimmistä laeista. Lain mukaan valon absorptio määrä on suoraan verrannollinen valon aineessa kulkemaan matkaan ja aineen konsentraatioon liuoksessa, jolloin sähkömagneettisen säteilyn absorboituminen riippuu absorboivan aineen määrästä eksponentiaalisesti. (Jaarinen & Niiranen 2008, 46, 51.) Lambert-Beerin laki perustuu säteilyn intensiteetin pieneneeseen kullekin aineelle ominaisella tavalla, kun säteily kulkee näytteen läpi. Intensiteetin pieneminen (kuvio 1) aiheutuu siitä, kun näyte absorboi itseensä valoa tietyllä aallonpituudella. Intensiteetin pieneminen riippuu valon kulkemasta matkasta, näytteeseen tulevan valon aallonpituudesta ja näytteen pitoisuudesta.



KUVIO 1. Valon intensiteetin pieneminen näytteessä (Jaarinen & Niiranen 2008, 51, muokattu)

Näytteeseen tulevan säteilyn intensiteettiä tietyllä aallonpituudella merkitään I_0 :lla. Kun säteily on kulkenut näytteessä matkan dx , sen intensiteetti, $I(\lambda)$, on pienentynyt määrällä $dI(\lambda)$. Spektrometrilla mitataan näytteeseen tulevan ja näytteen läpäisseen säteilyn intensiteettien suhdetta. (Jaarinen & Niiranen 2008, 51–52.) Näytteen läpäisseen valon osuutta sanotaan transmittanssiksi T , ja se lasketaan kaavan (2) avulla:

$$T(\lambda) = \frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)} \quad (2)$$

Lambert-Beerin lain avulla lasketaan näytteen absorbanssi. Absorbanssin arvo on suoraan verrannollinen näytteen konsentraatioon. (Jaarinen & Niiranen 2008, 51–52.) Lambert-Beerin lain mukaan absorbanssi A lasketaan kaavan (3) avulla:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot b \quad (3)$$

jossa ε on molaarinen absorptiokerroin, c konsentraatio ja b säteilyn näytteessä kulkema matka senttimetreinä. Molaarinen absorptiokerroin on kullekin aineelle ominainen luku, joka kuvaa tietyllä aallonpituudella absorboituvan valon määrää. (Harris 2007, 381.) Absorbanssin ja transmittanssin välillä on logaritminen yhteys kaavan (4) mukaisesti:

$$A(\lambda) = \log\left(\frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)}\right) = -\log T(\lambda) \quad (4)$$

COD_{Cr} -arvon mittauksessa käytetään Hachin DR 2800 -fotometriä (kuvassa 5). Hach DR 2800 on näkyvän valon aallonpituudella toimiva spektrofotometri. Pienen kokonsa ja helppokäyttöisyytensä ansiosta DR 2800 on taloudellinen laite suorittamaan usein toistuvia analyysejä ja se soveltuu tehokkaan akkunsa ansiosta myös kenttätyöskentelyyn. Laitteeseen on esiasennettu yli 200 valmista analyysimenetelmää eri yhdisteiden määrittämiseksi. Useista parametreista on olemassa analyysit niin pieniin kuin suuriin pitoisuuksiin, ja tarvittaessa saatavilla on myös lisäohjelmia. Analyysit tapahtuvat kaupallisilla koeputkilla, jotka sisältävät kaikki tarvittavat reagenssit. Lisäksi laitteessa on avoin mittaustila, jossa voi suorittaa normaaleja kyvettimittauksia. (Hach Company 2012; Hyxo Oy 2005.)

Mittaaminen tapahtuu asettamalla reaktioputki spektrofotometriin, jolloin laitteen lasersäde tunnistaa putkessa olevan viivakoodin avulla oikean menetelmän. Näin kaikki reaktioputket tulee automaattisesti mitattua oikeilla menetelmillä. Kun reaktioputki pyörii, laite mittaa sen kymmenen kertaa ja ilmoittaa mittausten keskiarvon eliminoiden suuret virhearvot, jotka saattavat johtua esimerkiksi putken pinnassa olleista epäpuhtauksista. Mittaustulos näkyy välittömästi laitteen näytöllä yksikössä mg/l COD_{Cr}. (Hach Company 2012; Hyxo Oy 2005.)

Aikaisemmin Kokemäenjoen vesistön vesiensuojeluyhdistyksen laboratorioissa COD_{Cr} -mittaukset suoritettiin Spectroquant NOVA 60 -fotometrillä. Vanha laite oli toimintaperiaatteeltaan samanlainen kuin DR 2800, mutta mittauksen alussa laite piti nollata näy-

tesarjaan tehdyllä nollanäytteellä. Menetelmä haluttiin siirtää DR 2800 -laitteelle, sillä laitetta ei tarvitse erikseen nollata, mikä nopeuttaa mittausta. DR 2800 takaa täsmällisemmät tulokset ja on selkeiden, suomenkielisten valikoiden ja suuren kosketusnäytön ansiosta helppokäyttöinen spektrofotometri. Menetelmä saatiin myös yhtenäisemmäksi ottamalla käyttöön saman valmistajan reaktioputket ja spektrofotometri.



KUVA 5. Hach DR 2800 -spektrofotometri (Heini Hämäläinen 2013)

4 MENETELMÄN VALIDOINTI

4.1 Validoinnin tarkoitus

Validoinnin tarkoituksena on arvioida analyttisen menetelmän soveltuvuutta tiettyyn käyttötarkoitukseen. Kemiällisen analyysimenetelmän validoinnilla pyritään osoittamaan, että menetelmä on tieteellisesti pätevä ja luotettava olosuhteissa, joissa sitä käytetään. Menetelmä tulee validoida silloin, kun halutaan todistaa, että sen suorituskykyparametrit ovat riittäviä ratkaisemaan tietty analyttinen ongelma. (Mittatekniikan keskus 2005.)

Validointiprosessi aloitetaan yleensä tekemällä validointisuunnitelma, josta käy ilmi miksi validointi tehdään ja kuinka laaja validointi on tarpeen. Suunnitelmassa määritellään ne suorituskykyparametrit, joita validoinnissa halutaan tarkastella ja arvioida. (Jaarinen & Niiranen 2008, 11; Virtanen & Väntsi 2012, 1.) Tässä työssä käytetyt menetelmän suorituskykyä arvioivat parametrit on selitetty seuraavissa kappaleissa.

Validointi kohdistuu kaikkiin menetelmän eri vaiheisiin ja se on pätevä vain testatulle matriisille, pitoisuusalueelle ja laitteelle. Validoinnin tuloksista saatu tieto sekä taustaineisto kerätään yhteen ja tilastoidaan, ja niiden perusteella osoitetaan menetelmän luotettavuus. Validoinnista laaditaan tavallisesti raportti, josta selviää validoinnin yksityiskohdat sekä niistä tehdyt päätelmät. (Mäkinen, Suortti, Saares, Niemi & Marjanen 1996, 6.)

4.2 Toteamis- ja määrittäysraja

Toteamis- eli detektoriraja on määritettävän analyytin pienin pitoisuus, joka voidaan todeta luotettavasti ja joka eroaa merkitsevästi nollanäytteen arvosta. Toteamisrajalla analyytillä määritetyn pitoisuuden tulee olla niin suuri, että sen ei enää voida katsoa johtuvan taustan satunnaisvaihtelusta. (Jaarinen & Niiranen 2008, 13; Mittatekniikan keskus 2005.) Määrittäys- eli kvantitointiraja tarkoittaa mitatun analyytin pienintä pitoisuutta, jolle voidaan tietyllä luotettavuustasolla suorittaa kvantitatiivisia mittauksia. Toteamis- ja määrittäysraja lasketaan nollanäytteen keskihajonnan avulla, yleensä luotta-

mustasolla 95 %. (Mäkinen, Suortti, Saares, Niemi & Marjanen 1996, 29–30.) To-
teamisraja lasketaan kaavan (5) avulla:

$$L_D = \text{nollanäytteen keskiarvo} + 3 \cdot s \quad (5)$$

jossa L_D on toteamisraja (*limit of detection*) ja s on nollanäytteiden keskihajonta. Määri-
tysraja L_Q (*limit of quantitation*) lasketaan vastaavasti kertomalla nollanäytteen keskiha-
jonta kymmenellä. (Mäkinen ym. 1996, 30.) Määritysraja voidaan tarkastaa näytteellä,
jonka pitoisuus on määritysrajan tuntumassa (Virtanen & Väntsi 2012, 3).

4.3 Lineaarisuus ja mittausalue

Lineaarisuudella tarkoitetaan analyttisen menetelmän kykyä antaa tietyllä alueella hy-
väksyttävä lineaarinen korrelaatio tulosten ja näytteiden pitoisuuden välillä. Lineaari-
suuden määrittäminen tehdään yleensä vähintään viidellä jäljitettävästi valmistetulla
näytteellä, joiden mitattavan aineen pitoisuus kattaa koko mittausalueen eli analyttisen
toiminta-alueen. Tuloksien avulla laaditaan regressiosuora, josta voidaan arvioida mene-
telmän lineaarinen alue. Regressiosuoran korrelaatiokertoimen neliö R^2 kuvaa kalib-
roinnin onnistuneisuutta. Ideaalisen kalibroinnin korrelaatiokertoimen arvo on 1. (Mitta-
tekniikan keskus 2005.)

Lineaarisuustutkimusten avulla määritetään samalla myös analyysimenetelmän luotetta-
va mittausalue, jolla hyväksyttävä tarkkuus ja täsmällisyys voidaan saavuttaa. Menetel-
män mittausalueella mittalaitteen virheen tulisi pysyä tunnetuissa rajoissa (Jaarinen &
Niiranen 2008, 13; Mittatekniikan keskus 2005).

4.4 Systemaattinen virhe ja satunnaisvirhe

Systemaattinen virhe vaikuttaa menetelmän tarkkuuteen. Se ilmenee aina samansuurui-
sena, kun tietty suure mitataan toistuvasti samoissa olosuhteissa. Systemaattinen virhe
voi johtua väärästä mittaustavasta tai virheellisestä mittalaitteen kalibroinnista. Määri-
tyksessä on systemaattista virhettä, kun saatu tulos on toistuvasti suurempi tai pienempi
kuin mitatun analyytin pitoisuuden todellinen arvo. Systemaattinen virhe voidaan mää-

rittää kontrollinäytteellä, jonka todellinen pitoisuus tunnetaan. (Mäkinen ym. 1996, 33.) Systemaattinen virhe lasketaan keskiarvon poikkeamana odotetusta arvosta kaavan (6) avulla:

$$y = \frac{100(\bar{x} - a)}{a} \quad (6)$$

jossa y on systemaattinen virhe, \bar{x} on kontrollien keskiarvo ja a on kontrollien odotusarvo. Tulos ilmoitetaan yleensä prosentteina. Systemaattisen virheen arviointi voidaan myös tehdä saantokokeella standardin lisäyksen avulla. (Mäkinen ym. 1996, 34).

Satunnaisvirhe määritetään varsinaisten näytteiden rinnakkaismäärityksistä. Satunnaisvirhe on ennustamaton eikä pysy vakiona, ja siksi sen vaihteluita seurataan sisäisen laadunohjauksen avulla. Satunnaisvirhe z lasketaan kaavan (7) avulla:

$$z = \sqrt{\frac{\sum d_{ri}^2}{2n}} \quad (7)$$

jossa d_{ri} on kahden rinnakkaisnäytteen suhteellinen erotus ja n on tulosparien määrä. Suhteellinen erotus laskettiin jakamalla tulosparin erotus niiden keskiarvolla. (Mäkinen ym. 1996, 48–49.)

4.5 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus koostuu eri epävarmuustekijöistä ja ilmoittaa arvion rajoista, joiden sisällä mittaustuloksen todellisen arvon voidaan tietyllä todennäköisyydellä katsoa olevan. Eri vaiheiden epävarmuustekijöitä yhdistettäessä saadaan kokonaisepävarmuus eli yhdistetty mittausepävarmuus. (Mittatekniikan keskus 2005; Mäkinen ym. 1996, 53–54.) Kokonaisepävarmuus voidaan laskea kaavan (8) avulla:

$$\text{Kokonaisepävarmuus-\%} = \sqrt{y^2 + z^2} \quad (8)$$

jossa y on kontrollinäytteistä saatu systemaattinen virhe ja z on varsinaisten näytteiden rinnakkaismäärityksistä saatu satunnaisvirhe. Kokonaisepävarmuudesta saadaan laajennettu mittausepävarmuus kertomalla se kertoimella 2, joka vastaa 95 %:n luotettavuusväliä. (Mäkinen ym. 1996, 54; Virtanen, Väntsi & Mattsson 2012, 9).

4.6 Toistettavuus

Toistettavuus tarkoittaa mittaustulosten yhtenevyyttä, kun mittaukset suoritetaan määrittämällä sama näyte samalla laitteella, lyhyellä aikavälillä saman tekijän toimesta. Toistettavuutta kuvataan peräkkäisten mittaustulosten suhteellisella keskihajonnalla (RSD, variaatiokerroin). Toistettavuudelle voidaan määrittää ennalta tavoitearvo, kuten esimerkiksi $> 5 \%$. (Mittatekniikan keskus 2005; Virtanen & Väntsi 2012, 4.) Toistettavuus lasketaan kaavan (9) avulla:

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \% \quad (9)$$

jossa s on rinnakkaisnäytteiden keskihajonta ja \bar{x} keskiarvo (Virtanen, Väntsi & Mattsson 2012, 7.)

4.7 Menetelmien vertailu

Kun uusi menetelmä on validoitu edellisissä kappaleissa esitellyillä tavoilla, uudella menetelmällä saatuja tuloksia voidaan verrata vanhalla menetelmällä saatuihin tuloksiin. Kahdella eri menetelmällä samasta näytteestä saatuja tuloksia voidaan verrata kaksisuuntaisen t-testin avulla. (Mäkinen ym. 1996, 61–62.) T-testi lasketaan kaavalla (10):

$$t = \frac{|\bar{d}|}{\sqrt{\frac{s_d^2}{n}}} \quad (10)$$

jossa \bar{d} on vertailtavien tulosparien erotusten keskiarvo, s_d^2 on tulosparien erotusten varianssi ja n on tulosparien lukumäärä. T-testin arvoa verrataan t-testitaulukon 2-suuntaisen testin 5 % merkitsevyystasolla saatuun arvoon 2,093. (Mäkinen ym. 1996, 62–64, 80.)

5 TYÖN SUORITUS

5.1 Referenssinäytteet

Veden kemiallista hapenkulutusta määritettäessä jokaisessa 25 näytteen sarjassa tulee olla tunnettuja referenssi- eli kontrollinäytteitä tulosten oikeellisuuden varmistamiseksi (Väntsi & Mattsson 2012, 2). Kontrollinäytteiksi valittiin molemmille putkille kaksi COD_{Cr} -pitoisuudeltaan erilaista näytettä, joilla saatiin varmennettua tulosten oikeellisuus putkien koko mittausalueella. Lisäksi käytettiin vanhassa menetelmässä jo mukana olleita kaupallisia referenssiluoksia.

15–150 mg/l pitoisuusalueen reaktioputkille valmistettiin 15 mg/l ja 120 mg/l kontrollinäytteet, ja lisäksi kontrollinäytteenä käytettiin 50,2 mg/l kaupallista referenssiluosta. 100–2000 mg/l pitoisuusalueen putkille valmistettiin 120 mg/l ja 1800 mg/l kontrollinäytteet kaupallisen 1255 mg/l referenssiluoksen lisäksi. 15 mg/l liuos todettiin hyväksi kontrollinäytteeksi, koska se oli lähellä pienemmän pitoisuusalueen reaktioputkien määritysrajaa, ja se oli myös pienin kalibrointiliuos, jota käytettiin putkien lineaarisuuden määrittämiseen. 1800 mg/l taas oli lähellä suuremman pitoisuusalueen putkien ylärajaa. 120 mg/l liuos soveltui pitoisuutensa ansiosta kummallekin putkelle, joten samaa liuosta voitiin käyttää molempien reaktioputkien kontrollinäytteenä.

Kaupallisten referenssiluosten valmistus on kerrottu kappaleessa 2.2.3.. 1800 mg/l kontrollinäyte valmistettiin pipetoimalla 18 ml KHP-standardiliuosta (5000 mg/l) 50 ml:n mittapullon ja laimennettiin milli-Q-vedellä merkkiin. KHP-liuoksen valmistus on kerrottu seuraavassa kappaleessa. Muut kontrollinäytteet valmistettiin kalibrointiliuoksista, joiden valmistus kerrotaan seuraavassa kappaleessa.

5.2 Kalibrointiliuokset

Menetelmän lineaarisuuden määrittämiseksi molemmille reaktioputkille valmistettiin kalibrointiliuokset nousevilla pitoisuuksilla. Kalibrointiliuoksia ja kontrollinäytteitä varten valmistettiin standardiliuos kaliumvetyftalaatista (KHP, molekyylikaava C₈H₅KO₄) ISO 15705:2002 -standardin mukaisesti. Liuoksesta valmistettiin kuitenkin

ohjeessa mainitun 10 000 mg/l sijasta puolet laimeampi liuos 5000 mg/l, jotta sen laimentaminen kalibrointiliuoksia varten olisi helpompaa. Noin 10 grammaa kaliumvetyftalaattia kuivattiin $105\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$:ssa 2 tunnin ajan, jonka jälkeen sitä punnittiin tarkasti 4,251 grammaa ja liuotettiin noin 700 ml:aan. Liuos laimennettiin litraksi, jolloin siitä saatiin 5000 mg/l KHP-standardiliuos. (ISO 15705:2002, 4.)

Standardiliuoksesta valmistettiin suuremman pitoisuusalueen putkille 100, 500, 1000, 1500 ja 2000 mg/l kalibrointiliuokset (ISO 15705:2002, 4). Liuoksiin pipetoitavat KHP-standardin määrät laskettiin yhtälön (11) mukaisesti:

$$c_1V_1 = c_2V_2 \quad (11)$$

jossa c_1 on KHP-standardiliuoksen konsentraatio 5000 mg/l, V_1 on standardiliuosta tarvittava määrä, c_2 on halutun kalibrointiliuoksen konsentraatio ja V_2 kalibrointiliuoksen haluttu tilavuus 100 ml. Liuoksiin pipetoitiin KHP-standardia 2, 10, 20, 30 ja 40 ml ja ne laimennettiin vedellä 100 ml:n mittapulloihin. (ISO 15705:2002, 4.) 100–2000 mg/l kalibrointiliuosten valmistus on esitetty taulukossa 2.

TAULUKKO 2. 100–2000 mg/l kalibrointiliuosten valmistus

KHP-standardiliuoksen konsentraatio 5000 mg/l		
KHP-liuoksen pipetoitintimäärä (ml)	Kalibrointiliuoksen määrä (ml)	Kalibrointiliuoksen odotusarvo (mg/l)
2	100	100
10	100	500
20	100	1000
30	100	1500
40	100	2000

15–150 mg/l pitoisuusalueen putkille valmistettiin ISO 15705:2002 -standardin mukaisesti 30, 60, 90, 120 ja 150 mg/l kalibrointiliuokset ja lisäksi vielä ylimääräinen 15 mg/l liuos. Tätä varten KHP-standardiliuoksesta tehtiin välilaimennos laimentamalla 100 ml liuosta milli-Q-vedellä 500 ml:ksi, jolloin saatiin 1000 mg/l KHP-standardiliuos. Kalibrointiliuoksiin pipetoitavat 1000 mg/l KHP-standardin määrät laskettiin yhtälön (11) mukaisesti, jolloin V_1 arvoiksi saatiin 1,5, 3, 6, 9, 12 ja 15 ml. Kaksi ensimmäistä kalibrointiliuosta valmistettiin 200 ml:n mittapulloihin, jolloin KHP-standardiliuoksen pipe-

tointimääräksi saatiin 3 ml ja 6 ml. Loput kalibrintiliukset valmistettiin normaalisti 100 ml:n mittapulloihin. 15 mg/l ja 120 mg/l liuoksia käytettiin lisäksi putkien kontrollinäytteinä. Laimentamisen jälkeen kaikkiin valmiisiin kalibrintiliuksiin lisättiin 1 ml rikkihappoa (4 M), joka oli valmistettu laimentamalla 220 ml väkevää rikkihappoa 500 ml:aan milli-Q -vettä. Rikkihapon lisääminen parantaa liuosten säilyvyyttä. Kalibrintiliukset ja kontrollinäytteet, sekä alkuperäiset standardiliukset säilytettiin jääkaapissa valolta suojattuna. (ISO 15705:2002, 4.) Taulukossa 3 on esitetty 15–150 mg/l kalibrintiliuosten valmistus.

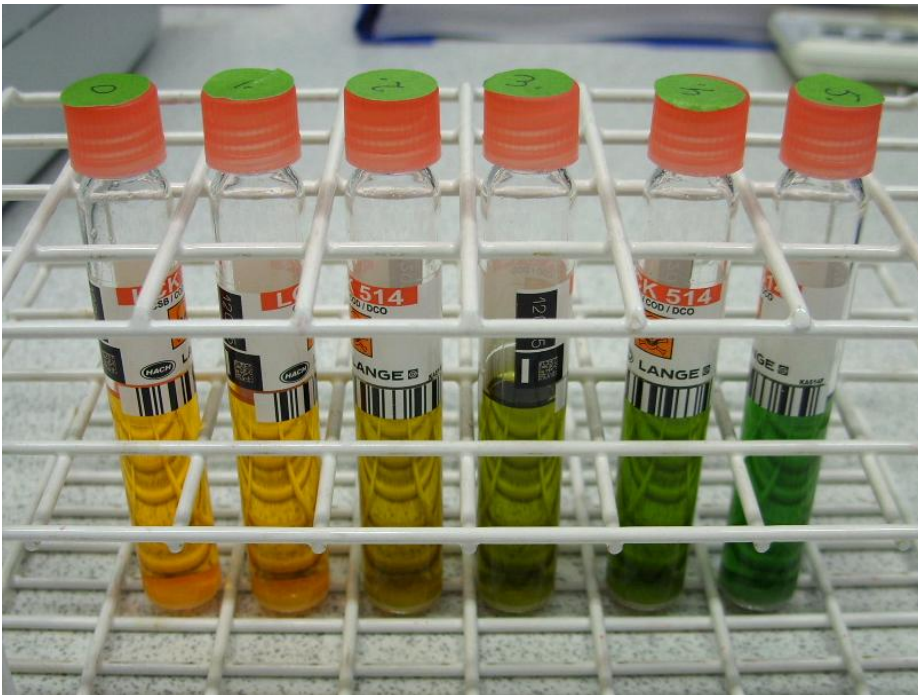
TAULUKKO 3. 15–150 mg/l kalibrintiliuosten valmistus

KHP-liuoksen konsentraatio 1000 mg/l		
KHP-liuoksen pipetointimäärä (ml)	Kalibrintiliuoksen määrä (ml)	Kalibrintiliuoksen odotusarvo (mg/l)
3	200	15
6	200	30
6	100	60
9	100	90
12	100	120
15	100	150

Molempien putkien kalibrintiliukset mitattiin samassa näytesarjassa. Kummallekin putkelle valmistettiin kaksi nollanäytettä, joiden tulosten keskiarvo vähennettiin varsinaisista tuloksista. Pienemmän pitoisuusalueen kalibrintiliukset pipetoitiin LCK 314 -putkiin ja kontrolliksi otettiin 50,2 mg/l -referenssiluos. Suuremman pitoisuusalueen kalibrintiliukset LCK 514 -putkiin ja kontrollina käytettiin 1255 mg/l -referenssiluos. Reaktioputket hapetettiin lämpöhauteessa ja niiden COD_{Cr} -pitoisuudet mitattiin kappaleessa 2.2 kuvatulla tavalla. Kuvista 6 ja 7 havaitaan, miten reaktioputken sisältämä liuos reagoi näyteliuoksen COD_{Cr} -pitoisuuteen muuttamalla väriä. Putkien värimuutoksista on kerrottu tarkemmin kappaleessa 3.1.



KUVA 6. LCK 314 -putkien kalibrintiliuokset hapetuksen jälkeen (Heini Hämäläinen 2012)



KUVA 7. LCK 514 -putkien kalibrintiliuokset hapetuksen jälkeen (Heini Hämäläinen 2012)

Kalibrintiliuosten tuloksista piirrettiin molemmille putkille regressiosuorat taulukkolaskentaohjelmalla. Kalibrintisuorien lineaarisuutta arvioitiin residuaalien eli kalibrointisuoran pisteiden ja sovitetun suoran välisten virheiden avulla. Suorien R^2 -arvon avulla tutkittiin menetelmän lineaarisuutta.

5.3 Hapettavuuden ja häiriönpoiston tarkastelu

COD_{Cr}-määrityksen tulosten tarkkuus on riippuvainen siitä, miten täydellisesti hapetus on reaktioputkissa tapahtunut. ISO 15705:2002 -standardiin perustuvassa menetelmässä monet orgaaniset yhdisteet ja suurin osa epäorgaanisista pelkistävästä yhdisteistä hapetuu 90–100 %:sti. Standardin mukaan hapettavuus tarkastetaan natriumasetaattistandardeilla, joiden odotettu COD_{Cr}-arvo on noin 70–80 % suurimman kalibrointiliuoksen pitoisuudesta. Liuosten, jotka sisältävät natriumasetaattia 160 mg/l ja 900 mg/l, teoreettinen COD_{Cr}-arvo on 125 mg/l ja 702 mg/l (ISO 15705:2002, 12).

Kidevedettömästä natriumasetaatista tehtiin kaksi testiliuosta, joiden teoreettiset COD_{Cr}-arvot olivat 125 mg/l ja 1404 mg/l. Jälkimmäisen testiliuoksen pitoisuus kaksinkertaitettiin standardissa mainitusta 702 mg/l:sta, jotta voitaisiin tarkastella hapettavuutta reaktioputkien mittausalueen yläpäässä. 125 mg/l liuos valmistettiin punnitsemalla 160 mg natriumasetaattia litran mittapulloon. 1404 mg/l liuos valmistettiin punnitsemalla kaksinkertainen määrä natriumasetaattia standardin ohjeeseen verrattuna, eli 180 mg 100 ml:n mittapulloon.

COD_{Cr}-määrityksen mukaisissa olosuhteissa näytematriisissa olevat pelkistyneet epäorgaaniset ionit voivat hapettua ja sen vuoksi aiheuttaa vääristymiä tuloksiin. Merkittävin häiriötekijä reaktiossa on kloridi-ioni. Yli 2000 mg/l kloridipitoisuus vaikuttaa kemialliseen hapenkulutukseen tuloksia suurentavasti. Häiriö voidaan poistaa elohopea(II)sulfaatilla. (Sawyer ym. 2003, 629.) Reaktioputkien valmistajan mukaan putket kykenevät poistamaan 1500 mg/l kloridipitoisuuden aiheuttaman häiriön, mutta ISO 15705:2002 -standardissa on mainittu, että kloridipitoisuus ei saisi ylittää 1000 mg/l. Kloridikontrolli valmistettiin ISO 15705:2002 -standardin mukaisesti.

Kloridikontrolliksi valmistettiin 100 ml:n mittapulloon COD_{Cr}-arvoltaan 120 mg/l liuos, johon lisättiin tunnettu määrä natriumkloridia. Kontrollin valmistus on kerrottu kappaleessa 5.2. Liuoksesta tehtiin kloridipitoisuudeltaan 1000 mg/l, joten siihen piti punnita kloridia 100 mg. Punnittavan kloridin määrä natriumkloridina laskettiin yhtälön 12 avulla:

$$m(\text{NaCl}) = \frac{M(\text{NaCl})}{M(\text{Cl}^-)} \cdot X \quad (12)$$

jossa $m(\text{NaCl})$ on tarvittava natriumkloridin massa, $M(\text{NaCl})$ natriumkloridin molekyylimassa, $M(\text{Cl})$ kloridin molekyylimassa ja X on haluttu kloridin massa eli 100 mg. Natriumkloridia punnittiin liuokseen 165,02 mg.

LCK 314 -reaktioputkille tehtiin näytesarja kymmenestä putkesta, joista viiteen pipetoitiin 160 mg/l -asetaatiliuosta ja toiseen viiteen kloridikontrollia. Lisäksi mitattiin kertaalleen kontrolliliuokset 15 mg/l, 50,2 mg/l ja 120 mg/l. Kahteen putkeen valmistettiin myös nollanäyte, joiden tulosten keskiarvo vähennettiin näytteiden tuloksista. LCK 514 -reaktioputkille tehtiin samanlainen sarja 1800 mg/l -asetaatiliuoksesta, kloridikontrollista sekä kontrolleista 120 mg/l, 1255 mg/l ja 1800 mg/l.

5.4 Validointisarjat

Validointisarjoihin otettiin näytteiksi oikeita vedenpuhdistamoille tulevia ja puhdistamoilta poistuvia jätevesiä. Näytteet olivat jo kertaalleen analysoituja laboratorion toimesta. Näytteiden vanhalla menetelmällä saatujen tulosten perusteella mukaan valittiin koko pitoisuusalueelta näytteitä, joilla olisi mahdollisimman erilainen näytematriisi.

Validointisarjoja tehtiin viisi. Jokainen sarja sisälsi neljä jätevesinäytettä rinnakkaismäärityksinä eli pipetoituna kahteen reaktioputkeen. Lisäksi jokaisessa sarjassa oli kolme kontrolliliuosta, joita pipetoitiin neljään reaktioputkeen. LCK 314 -putkien kontrollinäytteet olivat 15 mg/l, 50,2 mg/l ja 120 mg/l ja LCK 514 -putkien 120 mg/l, 1255 mg/l ja 1800 mg/l. Kaikissa sarjoissa oli myös neljä nollanäytettä. Viidestä validointisarjasta nollanäytteille ja kontrolleille saatiin siis 20 tulosta ja jätevesinäytteille 40 tulosta eli 20 tulosparia. Taulukossa 3 on esimerkki LCK 314 -putkien validointisarjasta.

TAULUKKO 3. LCK 314 -putkien validointisarja

Näyte	Putkien määrä kpl
Nolla	4
Kontrolli 15 mg/l	4
Referenssi 50,2 mg/l	4
Kontrolli 120 mg/l	4
Jätevesinäyte 1	2
Jätevesinäyte 2	2
Jätevesinäyte 3	2
Jätevesinäyte 4	2

Nollanäytteiden tuloksien avulla laskettiin menetelmän toteamis- ja määrittäysraja. Kontrollinäytteiden tuloksista laskettiin systemaattinen virhe. Varsinaisten jätevesinäytteiden tuloksista laskettiin satunnaisvirhe, toistettavuus ja mittausepävarmuus. Lisäksi validoinnissa ja vanhalla menetelmällä saatuja tuloksia vertailtiin kaksisuuntaisen t-testin avulla.

6 TULOKSET

6.1 Toteamis- ja määrittäysraja

Toteamis- ja määrittäysraja laskettiin nollanäytteiden tuloksista. Nollanäytteitä oli valmistettu kuhunkin validointisarjaan neljä kappaletta. Yhden validointisarjan nollanäytteiden mitatuista tuloksista laskettiin keskiarvo, joka vähennettiin jokaisesta saman sarjan näytteiden tuloksista, myös itse nollanäytteistä. Sama laskutoimitus tehtiin kaikille validointisarjoille. Näin käsitellyille nollanäytteille saatiin sekä positiivisia, että negatiivisia tuloksia yhtä paljon, ja tulosten vaihteluvälistä tuli pienempi. Menetelmän toteamisrajat laskettiin nollanäytteiden lopullisista tuloksista yhtälön (5) avulla (s. 22). Määrittäysrajat laskettiin kertomalla nollanäytteiden keskihajonta kymmenellä.

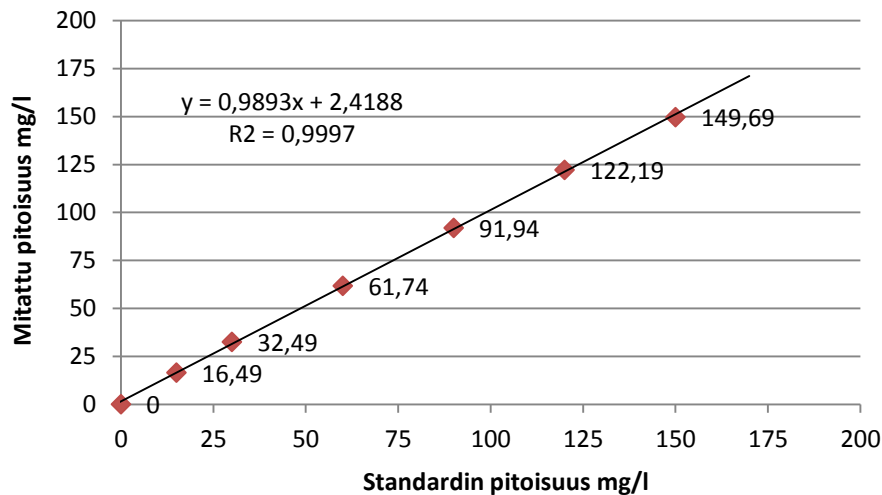
LCK 314 -reaktioputkien toteamisrajaksi saatiin 3,67 mg/l ja määrittäysrajaksi 12,20 mg/l (taulukko 4). Valmistajan ilmoittama määrittäysraja pienen pitoisuusalueen putkille oli 15 mg/l, joten tulos oli kelvollinen. Se myös alitti vanhan menetelmän määrittäysrajan 30 mg/l COD_{Cr}. LCK 514 -reaktioputkien määrittäysrajaksi oli ilmoitettu 100 mg/l COD_{Cr}. Toteamisrajaksi saatiin 3,90 mg/l ja määrittäysrajaksi 13,00 mg/l. Toteamis- ja määrittäysrajoja laskettaessa nollanäytteiden keskiarvo oli vähennetty tuloksista, sillä myös nollanäytteet piti käsitellä kuten varsinaiset näytteet. Tällä tavalla laskettu määrittäysraja ei kuitenkaan välttämättä sovellu LCK 514 -putkille, joten siksi tuloksissa otettiin huomioon myös ilman nollakäsittelyä saadut toteamis- ja määrittäysrajat 34,67 mg/l ja 79,92 mg/l.

TAULUKKO 4. Menetelmän toteamis- ja määrittäysrajat

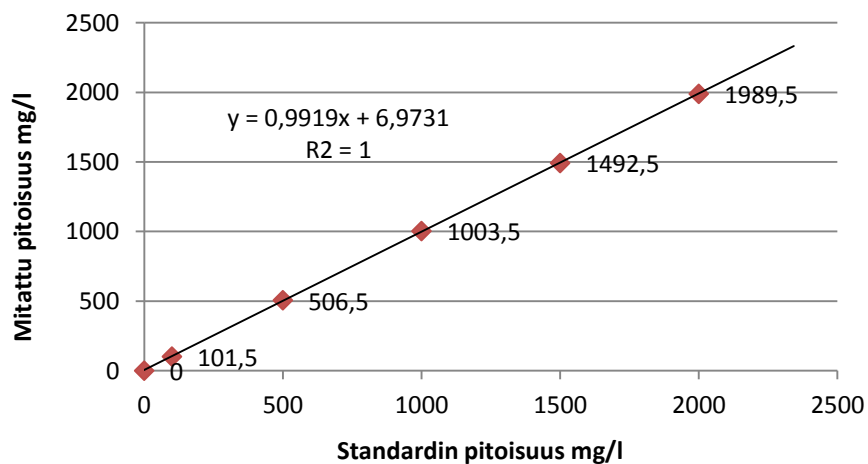
Reaktioputki	Toteamisraja (mg/l)	Määrittäysraja (mg/l)	Valmistajan ilmoittama määrittäysraja (mg/l)
LCK 314	3,67	12,20	15
LCK 514 ₁₎	3,90	13,00	100
LCK 514 ₂₎	34,67	79,92	100

6.2 Lineaarisuus ja mittausalue

Menetelmän lineaarisuutta tutkittiin kalibrointi- eli standardiliuosten mittaustulosten avulla. Liuosten kanssa samassa sarjassa mitattujen nollanäytteiden keskiarvo vähennettiin tuloksista. Taulukkolaskentaohjelmalla piirrettiin kuvaaja, joka esittää standardiliuoksen mitatut COD_{Cr} -pitoisuudet liuoksen oletettujen pitoisuuksien funktiona. LCK 314 -reaktioputkien kalibrointisuoran (kuviossa 2) korrelaatiokertoimen neliöksi eli R² -arvoksi saatiin 0,9997. Regressiosuoran katsottiin olevan lineaarinen koko mittausalueella 15–150 mg/l. LCK 514 -putkien kalibrointisuoran (kuvio 3) R² -arvoksi saatiin tasan 1, mikä kertoo suoran olevan täydellisen lineaarinen mittausalueella 100–2000 mg/l.

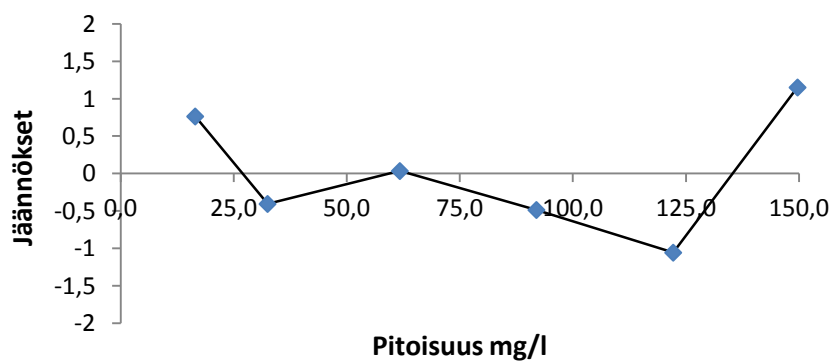


KUVIO 2. LCK 314 -reaktioputkien (15–150 mg/l) kalibrointisuora

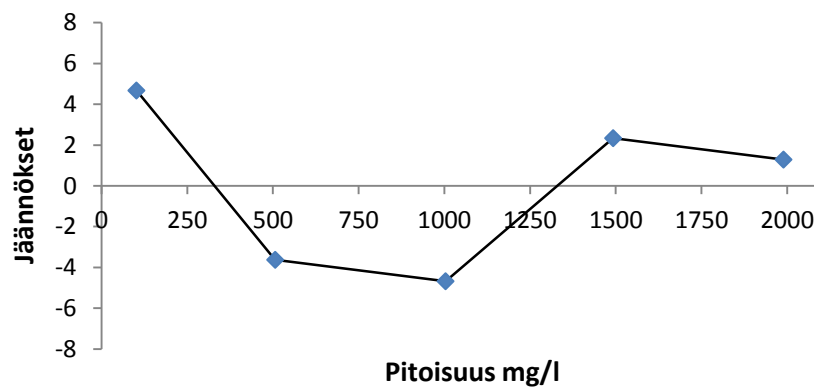


KUVIO 3. LCK 514 -reaktioputkien (100–2000 mg/l) kalibrointisuora

Kalibrointisuorien lineaarisuutta voidaan tarkemmin arvioida residuaalien avulla. Residuaali eli jäännösvirhe on mitatun arvon ja regressiosuoralta lasketun y :n arvon erotus. Kalibrointisuora on lineaarinen, mikäli residuaalit jakautuvat vuorotellen x -akselin molemmiin puolin. Mittaustuloksista tehtiin graafiset esitykset (kuviot 4 ja 5), jotka kuvaavat residuaaleja kalibrointiliuosten mitattujen pitoisuuksien funktiona. Residuaalipisteet jakautuvat tasaisesti nollatason ylä- ja alapuolelle. Kun residuaaleja tarkastellaan yhdessä regressiosuorien korrelaatiokertoimien kanssa, voidaan menetelmän lineaarisuuden todeta olevan riittävä.



KUVIO 4. 15–150 mg/l kalibrointisuoran residuaalit



KUVIO 5. 100–2000 mg/l kalibrointisuoran residuaalit

6.3 Hapettavuus ja häiriönpoisto

Reaktioputkessa tapahtuvan hapetusreaktion täydellisyyttä testattiin natriumasetaattiliuosten avulla. Liuokset sisälsivät natriumasetaattia 160 mg/l ja 1800 mg/l ja niiden teoret-

tinen COD_{Cr} -arvo oli 125 mg/l ja 1404 mg/l. Mittaustuloksista laskettiin viiden mittauksen keskiarvo ja saantoprosentti. Liuosten kanssa samassa sarjassa mitattujen nollanäytteiden keskiarvo vähennettiin tuloksista.

Hapettavuusmittausten tulokset on koottu liitteeseen 1 ja esitetty taulukossa 5. ISO 15705:2002 -standardiin perustuvassa menetelmässä yhdisteiden tulisi hapettua 90–100 %:sti. LCK 314- reaktioputkilla testiliuoksen saantoprosentiksi saatiin noin 94 %. LCK 514 -putkilla liuosten saantoprosentit olivat 101 % ja 94,4 %. Molemmilla reaktioputkilla kummankin liuoksen hapettavuuden saantoprosentit asettuivat standardin määrittelemälle 90–100 %:n välille, joten tulokset olivat odotettuja.

TAULUKKO 5. Reaktioputkien hapettuvuuksien tulokset

Reaktioputki	Liuos COD _{Cr} -arvo 125 mg/l		Liuos COD _{Cr} -arvo 1404 mg/l	
	Keskiarvo (mg/l)	Saanto- %	Keskiarvo (mg/l)	Saanto- %
LCK 314	117,49	93,99	-	-
LCK 514	126,30	101,04	1325,10	94,38

COD_{Cr} -määrityksen mukaisissa olosuhteissa näytteen suuri kloridipitoisuus aiheuttaa vääristymää tuloksiin. ISO 15705:2002 -standardin mukaan kloridipitoisuus ei saisi ylittää 1000 mg/l. Kloridikontrolliksi valmistettiin COD_{Cr} -arvoltaan 120 mg/l ja kloridipitoisuudeltaan 1000 mg/l liuos. Mittaustuloksista laskettiin viiden mittauksen keskiarvo ja saantoprosentti. Liuosten kanssa samassa sarjassa mitattujen nollanäytteiden keskiarvo vähennettiin tuloksista.

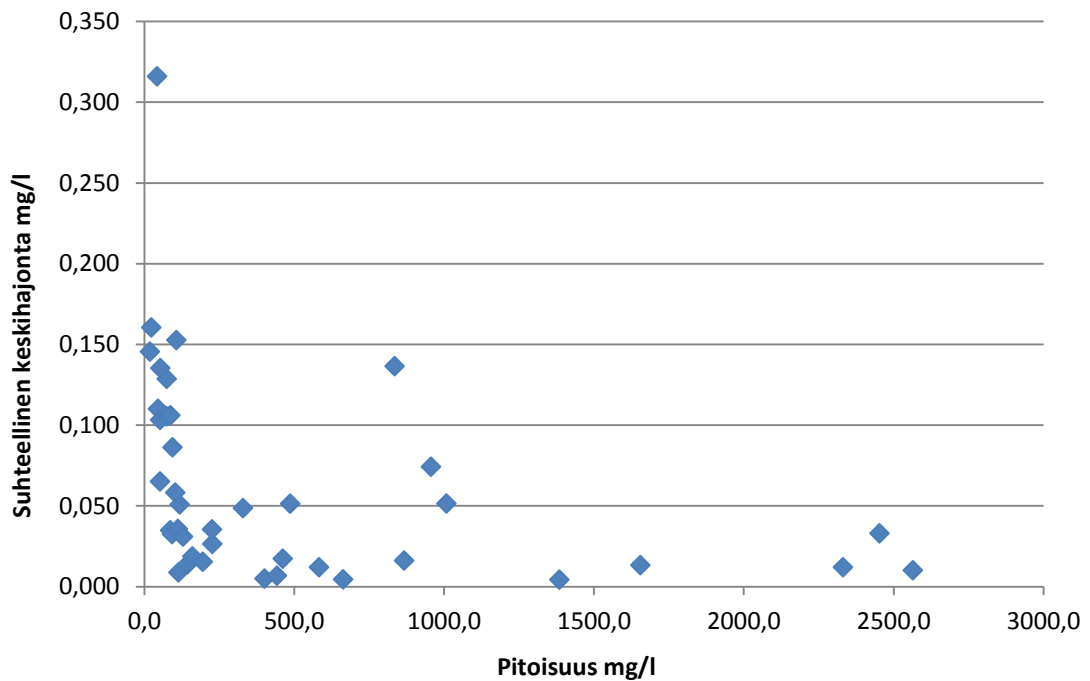
Häiriönpoistomittausten tulokset on koottu liitteeseen 1 ja esitetty taulukossa 6. Tuloksista havaitaan, että 1000 mg/l kloridia sisältävä näyte antaa hyväksyttäviä tuloksia saantoprosenttien ollessa 98,9 % ja 107,4 %. Reaktioputkien häiriönpoistomekanismi riittää hyvin 1000 mg/l kloridipitoisuuden aiheuttaman häiriön poistamiseen.

TAULUKKO 6. Häiriönpoiston tulokset

Reaktioputki	COD _{Cr} 120 mg/l, Cl ⁻ 1000 mg/l	
	Keskiarvo (mg/l)	Saanto- %
LCK 314	118,69	98,91
LCK 514	128,85	107,38

6.4 Mittausepävarmuus ja toistettavuus

Yhdistetty mittausepävarmuus laskettiin molemmille reaktioputkille kontrollinäytteistä saatujen systemaattisten virheiden ja varsinaisten näytteiden rinnakkaismäärittämisistä saatujen satunnaisvirheiden avulla. Tulosten perusteella näytteiden rinnakkaismäärittämisestä suhteellisten keskihajontojen voitiin todeta olevan riippuvaisia konsentraatioista, minkä vuoksi satunnaisvirheet ja mittausepävarmuudet laskettiin kolmella eri pitoisuusalueella. Kuviossa 6 on esitetty määrittämisistä saatujen tulosten suhteelliset keskihajonnat pitoisuuden funktiona. Suhteelliset keskihajonnat ovat pienillä pitoisuuksilla suurimmillaan. Kuvion perusteella mittausalue jaettiin kolmeen pitoisuusalueeseen, jotka olivat < 50 mg/l, 50–100 mg/l ja > 100 mg/l COD_{Cr}.



KUVIO 6. Suhteellisen keskihajonnan riippuvuus pitoisuudesta

Systemaattiset virheet kaikille pitoisuusalueille laskettiin kunkin alueen kontrolliliuosten tuloksista yhtälön (6) mukaisesti (s. 23). Alle 50 mg/l COD_{Cr} -pitoisuusalueella käytettiin 15 mg/l kontrolliliuosta, 50–100 mg/l COD_{Cr} -alueella 50,2 mg/l liuosta ja yli 100 mg/l COD_{Cr} -alueella oli käytössä kolme kontrolliliuosta 120, 1255 ja 1800 mg/l. Taulukkoon 7 on koottu kaikkien kontrollinäytteiden mittausten keskiarvot, keskihajonnat ja systemaattiset virheet.

TAULUKKO 7. Menetelmän kontrollinäytteiden tulokset

Kontrollinäyte mg/l	Mittausten keskiarvo mg/l	Keskihajonta	Systemaattinen virhe (%)
15	14,655	1,969	-2,300
50,2	50,185	3,348	-0,030
120	124,0	2,995	3,333
1255	1306,3	13,599	4,088
1800	1794,5	10,814	-0,306

Satunnaisvirheet ja mittausepävarmuudet laskettiin pitoisuusalueittain varsinaisten näytteiden rinnakkaismäärittysten tuloksista yhtälöiden (7) ja (8) avulla (s. 23). Kokonaisepävarmuudesta saatiin laajennettu mittausepävarmuus kertomalla se kertoimella 2, joka vastaa 95 %:n luotettavuusväliä. Lisäksi validointisarjojen välistä toistettavuutta arvioitiin kontrollinäytteiden mittaustulosten suhteellisten keskihajontojen avulla yhtälön (9) mukaisesti (s. 24). Taulukkoon 8 on koottu menetelmän satunnaisvirheet, toistettavuudet sekä kokonais- ja laajennetut mittausepävarmuudet pitoisuusalueittain. Laskutoimitukset näytteiden tuloksista ovat kokonaisuudessaan liitteessä 2.

Menetelmän kokonaisepävarmuudeksi pitoisuusalueittain saatiin < 50 mg/l alueella 2,71 % ja 50–100 mg/l alueella 0,63 %. Tuloksiin on laskettu 100 mg/l pitoisuusalueelle kolme mittausepävarmuutta, koska alueella oli kolme kontrolliliuosta. Mittausepävarmuudet laskettiin käyttäen erikseen jokaisen kontrolliliuoksen systemaattista virhettä. Pitoisuusalueen mittausepävarmuudet voidaan kuitenkin yhdistää laskemalla kokonaisepävarmuus epävarmuuskomponenttien neliösummana (Nordtest 2012). Tässä tapauksessa yhdistetty mittausepävarmuus laskettiin > 100 mg/l kontrolliliuoksista saattujen systemaattisten virheiden avulla. Kokonaisepävarmuus voidaan laskea yhtälön (13) mukaisesti:

$$u_c = \sqrt{\frac{(y_1^2 + y_2^2 + y_3^2 \dots + y_n^2)}{n}} \quad (13)$$

jossa u_c on yhdistetty kokonaisepävarmuus, y on systemaattinen virhe ja n on epävarmuuskomponenttien eli systemaattisten virheiden lukumäärä (Nordtest 2012). Yli 100 mg/l alueella kokonaismittausepävarmuuksiksi saatiin 3,35 %, 4,10 % ja 0,47 %, joista

yhtälön (13) mukaisen laskutoimituksen jälkeen yhdistetyksi mittausepävarmuudeksi saatiin 3,05 %.

Menetelmän toistettavuus oli paras yli 100 mg/l pitoisuusalueella ja huonoin kaikkein pienimmillä pitoisuuksilla. Toistettavuus on laskettu validointisarjoissa käytettyjen kontrollien suhteellisten keskihajontojen avulla, joten se kertoo sarjojen välisestä toistettavuudesta. Yli 100 mg/l pitoisuusalueella toistettavuus on hyväksyttävissä rajoissa.

TAULUKKO 8. Menetelmän satunnaisvirheet, toistettavuudet ja mittausepävarmuudet pitoisuusalueittain

Pitoisuusalue mg/l	Satunnaisvirhe (%)	Toistettavuus (%)	Mittausepävarmuus (%)	
			Kokonais-	Laajennettu
< 50	1,429	13,44	2,708	5,416
50 - 100	0,633	6,671	0,633	1,267
> 100 ₁₎	0,356	2,415	3,352	6,705
> 100 ₂₎	0,356	1,041	4,103	8,206
> 100 ₃₎	0,356	0,603	0,469	0,938

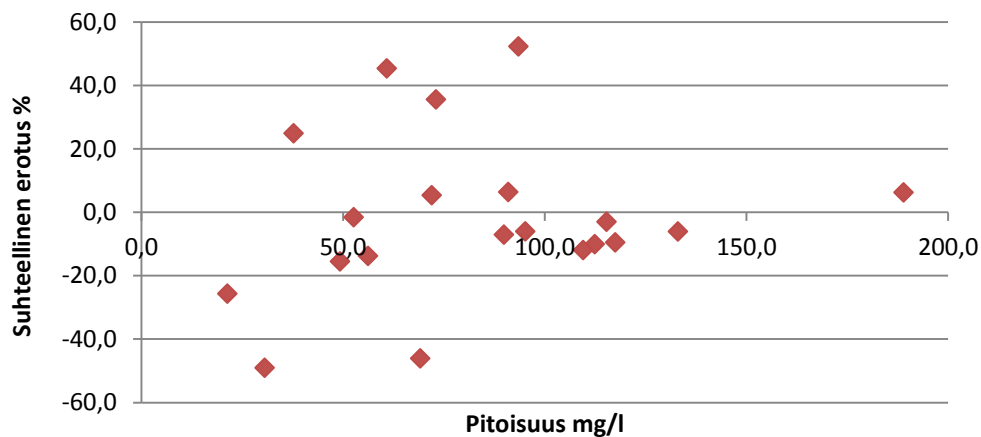
6.5 Menetelmien vertailu

Uudella menetelmällä saatuja tuloksia verrattiin vanhalla menetelmällä samasta näyttestä saatuihin tuloksiin kaksisuuntaisen t-testin avulla yhtälön (10) mukaisesti (s. 24). Tuloksista laskettiin vanhan ja uuden menetelmän tulosten keskiarvo, tulosparien erotus ja varianssi, sekä t-testin arvo. Kaksisuuntaisen testin t-arvoa verrattiin t-testitaulukon 5 % merkitsevyystasolla saatuun arvoon 2,093. Vertailu tehtiin erikseen molemmille reaktioputkille. Lasketut t-arvot olivat pienempiä kuin t-tilukkoarvo 2,093, joten menetelmät eivät 95 %:n todennäköisyydellä eroa toisistaan. Tulokset on koottu taulukkoon 9 ja laskutoimitukset on esitetty liitteessä 3.

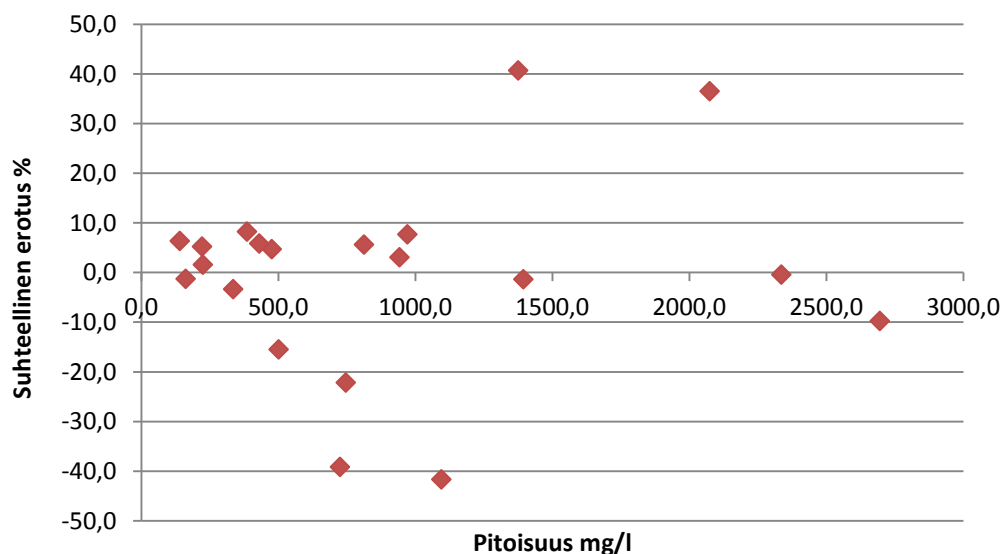
TAULUKKO 9. Menetelmien vertailu t-testin avulla

Reaktioputki	Tulosparien lkm	t-tilukkoarvo	Laskettu t-arvo
LCK 314	20	2,093	0,081
LCK 514	20	2,093	0,247

Menetelmien eroavaisuuksia tarkasteltiin myös kuvioiden 7 ja 8 avulla, joissa on esitetty vanhan ja uuden menetelmän tulosten suhteelliset erotukset pitoisuuden funktiona. Kuvion 7 perusteella LCK 314 -reaktioputkilla eniten eroa vanhan menetelmän tuloksiin oli näytteillä, joiden pitoisuus oli alle 100 mg/l COD_{Cr}. Kuviosta ei kuitenkaan havaita systemaattista eroavaisuutta vanhaan menetelmään. LCK 514 -reaktioputkilla (kuvio 8) vanhalla ja uudella menetelmällä mitattujen tulosten välillä oli eniten eroa suurilla pitoisuuksilla virheprosentin ollessa suurimmillaan lähes 42 %. Myös pienempien pitoisuuksien joukossa oli muutama näyte, jossa esiintyi suurta eroa vanhaan tulokseen verrattuna. Nämä erot voivat johtua esimerkiksi hankalasta näytematriisista.



KUVIO 7. LCK 314 -reaktioputkien (15–150 mg/l) ja vanhan menetelmän välinen vertailu tulosparien suhteellisten erotusten avulla



KUVIO 8. LCK 514 -reaktioputkien (100–2000 mg/l) ja vanhan menetelmän välinen vertailu tulosparien suhteellisten erotusten avulla

7 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli siirtää Kokemäenjoen vesistön vesiensuojeluyhdistyksen laboratoriossa käytössä oleva veden kemiallisen hapenkulutuksen dikromaattihapetusmenetelmä toisen valmistajan reaktioputkille ja spektrofotometrille, jotta saataisiin luotettavammin mitattua pieniä COD_{Cr} -arvoja. Siirron yhteydessä oli tarpeen osoittaa menetelmän pätevyys ja luotettavuus validoimalla tärkeimmät parametrit. Tärkeä osa validointia oli saavuttaa alhaisempi COD_{Cr} -arvon määrittäysraja laboratorion asiakkaiden toiveesta. Validointi perustui ISO 15705:2002 -standardiin sekä laboratorion omaan sisäiseen toimintaohjeeseen ja niiden sisältämiin validointiparametreihin. Validoinnissa saatujen tulosten perusteella menetelmän luotettavuutta ja tulosten tarkkuutta onnistuttiin parantamaan.

Työn tavoitteena oli alentaa COD_{Cr} -arvon määrittäysrajaa ja sen avulla saada tarkempia tuloksia näytteistä, joiden COD_{Cr} -arvo on pienempi kuin vanhan menetelmän määrittäysraja 30 mg/l. LCK 314 -reaktioputkien määrittäysrajaksi saatiin 12,20 mg/l. Määrittäysraja alitti sekä valmistajan ilmoittaman määrittäysrajan, että vanhan määrittäysrajan, joten tältä osalta tavoitteet täyttyivät. LCK 514 -reaktioputkien määrittäysrajaksi oli ilmoitettu 100 mg/l, ja määrittäysrajaksi saatiin 13,00 mg/l. Toteamis- ja määrittäysrajoja laskettaessa nollanäytteiden keskiarvo oli vähennetty tuloksista, sillä myös nollanäytteet haluttiin käsitellä kuin varsinaiset näytteet. LCK 514 -reaktioputkien nollanäytteiden tulosten välillä oli kuitenkin jonkin verran hajontaa, eivätkä tulokset olleet kovin luotettavia. Siksi LCK 514 -putkien tuloksissa otettiin huomioon myös ilman nollakäsittelyä saatu määrittäysraja 79,92 mg/l. Ilman nollanäytteiden vähennystä saatuja tuloksia voidaan pitää myös reaktioputken mittausalueen kannalta järkevämpinä.

Menetelmän lineaarisuuden määrittämiseksi molemmille reaktioputkille valmistettiin kalibrintiliuokset, joiden mittaustuloksista piirrettiin taulukkolaskentaohjelmalla kalibrintisuorat. Suorien korrelaatiokertoimien avulla arvioitiin menetelmän lineaarisuutta. Molempien reaktioputkien regressiosuorat olivat lineaarisia koko mittausalueella. Kun regressiosuorien korrelaatiokertoimia tarkasteltiin yhdessä residuaalien eli jäännösvirheiden avulla, menetelmän lineaarisuuden katsottiin olevan riittävä.

COD_{Cr} -määrittäyksen tulosten tarkkuus on riippuvainen siitä, miten täydellisesti hapetus on reaktioputkissa tapahtunut, ja miten paljon näytteet sisältävät määrittäystä häiritseviä

yhdisteitä. Reaktioputkien kykyä hapettaa orgaaninen aines mahdollisimman täydellisesti testattiin natriumasetaattiliuosten avulla ja häiriönpoisto testattiin 1000 mg/l kloridia sisältävällä näytteellä. Molemmilla reaktioputkilla kummankin liuoksen hapettavuuden saantoprosentit asettuivat sallittuihin rajoihin, ja häiriönpoistomekanismin todettiin riittävän hyvin 1000 mg/l kloridipitoisuuden aiheuttaman häiriön poistamiseen.

Tulosten perusteella näytteiden rinnakkaismääritysten suhteellisten keskihajontojen todettiin olevan riippuvaisia konsentraatioista, minkä vuoksi mittausalue jaettiin kolmeen pitoisuusalueeseen. Systemaattiset virheet kaikille pitoisuusalueille laskettiin kunkin alueen kontrolliliuosten tuloksista, ja satunnaisvirheet ja mittausepävarmuudet laskettiin pitoisuusalueittain varsinaisten näytteiden rinnakkaismääritysten tuloksista. Menetelmän kokonaisepävarmuudeksi pitoisuusalueittain saatiin < 50 mg/l alueella 2,71 % ja 50–100 mg/l alueella 0,63 %. Yli 100 mg/l alueella yhdistetyksi mittausepävarmuudeksi saatiin 3,05 %. Yleensä mittaustulosten keskihajonta ja siten myös mittausepävarmuus pienenee pitoisuuksien kasvaessa. Suurempien kontrolliliuosten kokonaisepävarmuus on kuitenkin hieman suurempi kuin kontrolliliuoksen 50,2 mg/l mukaan laskettu mittausepävarmuus. Kaikki lasketut mittausepävarmuudet ovat kuitenkin hyväksyttäviä.

Menetelmän toistettavuus laskettiin kontrollinäytteiden suhteellisten keskihajontojen avulla, joten se kertoo sarjojen välisestä toistettavuudesta. Yli 100 mg/l pitoisuusalueella toistettavuus on alle 5 %, joten sitä voidaan pitää hyväksyttävänä. Toistettavuus oli huonoin alle 50 mg/l pitoisuusalueella, jonka RSD-arvoksi saatiin yli 13 %.

Määritykset eivät alle 50 mg/l pitoisuusalueen mittausepävarmuuden ja toistettavuuden kannalta olleet riittävän luotettavia tilastolliseen tarkasteluun, sillä tuloksia kertyi ainoastaan neljä kappaletta. Sopivien näytteiden löytäminen kyseiselle pitoisuusalueelle oli haastavaa, sillä vanhan menetelmän määritysraja oli 30 mg/l, joten kaikki sitä pienemmät COD_{Cr} -arvot oli ilmoitettu tuloksissa olevan alle määritysrajan. Näytteitä ei voitu ottaa validointiin mukaan, koska tulosten tarkkaa COD_{Cr} -arvoa ei tiedetty. Tällaiset tulokset olisivat olleet hyödyttömiä etenkin menetelmien vertailussa. Validointiin voitiin siis periaatteessa ottaa mukaan ainoastaan COD_{Cr} -arvoltaan yli 30 mg/l näytteet, minkä vuoksi alle 50 mg/l näytteitä kertyi riittämätön määrä.

Uudella menetelmällä saatuja tuloksia verrattiin vanhalla menetelmällä samasta näytteestä saatuihin tuloksiin kaksisuuntaisen t-testin avulla. Lasketut t-arvot olivat pienem-

piä kuin t-taulukkoarvo, joten menetelmien ei 95 %:n todennäköisyydellä katsottu eroavan toisistaan. Menetelmien eroavaisuuksia tarkasteltiin myös vanhan ja uuden menetelmän tulosten suhteellisten erotusten avulla. Merkittävä havainto oli, että vanhalla ja uudella menetelmällä mitattujen tulosten välillä oli ollut eniten eroa yli 1500 mg/l pitoisuuksilla. Erot johtuvat todennäköisesti siitä, että vanhassa menetelmässä COD_{Cr} -näytteet sai laimentaa automaattipipetillä suoraan reaktioputkeen. Tulosten perusteella jatkossa näytteitä ei enää laimenneta reaktioputkeen, vaan laimennokset tehdään aina mitauspullon kautta. Mittapullolaimennoksilla voidaan huomattavasti parantaa tulosten luotettavuutta.

Vanhan ja uuden menetelmän välisiä eroja tarkasteltaessa myös pienempien pitoisuuksien joukossa havaittiin muutama näyte, jossa esiintyi suurta eroa vanhaan tulokseen verrattuna. Tulosten luotettavuutta heikentää osaltaan reaktioputkiin pipetoitava näyteliuoksen määrä. Vanhassa menetelmässä putkiin pipetoitiin 3 ml näytettä, kun uudessa menetelmässä pipetoitava määrä on 2 ml, mikä aiheuttaa enemmän pipetoinnissa syntyvää virhettä. Pieni pipetointimäärä tuottaa ongelmia etenkin epähomogeenisia näytteitä määritettäessä. Jotkut jätevedet sisältävät niin runsaasti orgaanista ainesta, että niistä on oikeastaan mahdotonta saada pipetoitua kahta täysin samanlaista rinnakkaisnäytettä. Jos näyte sisältää paljon näkyviä epäpuhtauksia, automaattipipetin muovikärki menee pipetoitaessa tukkoon. Tällöin kärjestä joutuu leikkaamaan pienen palan pois ja menetelmän luotettavuus voidaan jälleen kyseenalaistaa. Työssä käytetyt automaattipipetit olivat kalibroituja, mutta niitä ei erikseen validointia varten tarkastettu.

Uusi COD_{Cr} -menetelmä osoittautui vanhaan menetelmään verrattuna yllättävän työlääksi, sillä kahden pitoisuusalueen reaktioputkilla työskentely ja mittapulloihin laimentaminen jonkin verran hidastavat määrittystä. Oma työskentelyä pystyy kuitenkin nopeuttamaan, kun määrittäykseen rutinoituu ja samalla oppii tuntemaan erilaiset näytematriisit sekä muistamaan jätevesinäytteiden yleisimmät laimennoskertoimet. Joka tapauksessa menetelmän siirto ja validointi onnistui, työlle asetetut tavoitteet saavutettiin ja uusi COD_{Cr} -menetelmä saatiin heti otettua käyttöön KVVY:n laboratoriossa. Tärkeintä oli, että validoinnin avulla menetelmä saatiin päivitettyä laboratorion asiakkaiden tarpeita vastaavaksi, ja näin ollen tulevaisuudessa saadaan määritettyä luotettavasti ja tarkasti pieniäkin COD_{Cr} -pitoisuuksia.

LÄHTEET

Hach Company. 2004. COD Reactor Model 45600 & THM Reactor Model 49100 Instrument Manual. [pdf]. Päivitetty 03.03.2004. Luettu 07.03.2013. http://www.hawqi.engineering.uiowa.edu/CWQP/sop/CODE_COD_reactormanual.pdf

Hach Company. 2007. DR 2800 Spectrophotometer Procedures Manual. [pdf]. Luettu 12.12.2012. <http://www.hach.com/dr-2800-portable-spectrophotometer-with-lithium-ion-battery/product-downloads?id=7640439012>

Hach Company. 2012. DR 2800™ Portable Spectrophotometer Data Sheet. [pdf]. Luettu 12.12.2012. <http://www.hach.com/dr-2800-portable-spectrophotometer-with-lithium-ion-battery/product-downloads?id=7640439012>

Hach Lange. 2008. LCK514 COD Chemical Oxygen Demand. [pdf]. Julkaistu 13.11.2008. Tulostettu 21.05.2012. <http://www.hach-lange.co.uk/view/product/EU-LCK514/?productCode=EU-LCK514>

Hach Lange. 2011. LCK314 COD Chemical Oxygen Demand. [pdf]. Julkaistu 14.09.2011. Tulostettu 21.05.2012. <http://www.hach-lange.co.uk/view/product/EU-LCK314/?productCode=EU-LCK314>

Harris, D.C. 2007. Quantitative Chemical Analysis. 7. painos. New York: W. H. Freeman and Company.

Hyxo Oy. 2005. DR 2800 VIS -spektrofotometri. [pdf]. Julkaistu 01.11.2005. Luettu 15.1.2013. <http://hyxodemo-frontend.toimisait.fi/fi/tuotteet/g/laboratoriolaitteet/spektrofotometrit/40/DR-2800>

ISO 15705. 2002. International Standard ISO 15705:2002. Water Quality - Determination of the Chemical Oxygen Demand Index (ST-COD) - Small-scale Sealed Tube Method. Switzerland : International Standard.

Isvet. 2010. Kaliumdikromaatin käyttöturvallisuustiedote. [pdf]. Päivitetty 28.10.2010. Luettu 9.1.2013. <http://www.isvet.fi/tiedotteet/kaliumdikromaatti.pdf>

Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. 5.-6. painos. Helsinki: Edita Prima Oy.

Kokemäenjoen vesistön vesiensuojeluyhdistys ry. 2012. Luettu 24.10.2012. <http://www.kvvy.fi/>

Mattsson, R. kemisti. 2013. VS: Opinnäytetyö ja arviointilomake. Sähköpostiviesti. riikka.mattsson@kvvy.fi. Luettu 14.5.2013

Mittatekniikan keskus. 2005. Kemian metrologian opas. Julkaisu J6/2005. [pdf]. Luettu 17.11.2012. http://www.mikes.fi/documents/upload/j6_05_b5_nettiin.pdf

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

Nordtest. 2012. Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories. [pdf]. Luettu 21.3.2013.
http://www.nordtest.info/images/documents/nt-technical-reports/nt_tr_537_ed3_1_English_Handbook%20for%20Calculation%20of%20Measurement%20uncertainty%20in%20environmental%20laboratories.pdf

Sawyer, C. N., McCarty, P. L. & Parkin, G. F. 2003. Chemistry for Environmental Engineering and Science. 5. painos. New York: McGraw-Hill Companies Inc.

Suomen Vesilaitosyhdistys ry. 2011. Teollisuusjätevesiopus. Asumajätevesistä poikkeavien jätevesien johtaminen viemäriin. Vesilaitosyhdistyksen julkaisusarja nro 50. Helsinki.

Virtanen, J. 2011. Menetelmäohje: Veden kemiallisen hapenkulutuksen (COD_{Cr}) määrittäminen suljetulla putkimenetelmällä. Hapetus dikromaatilla, mittaus spektrofotometrisesti. Päivitetty 17.03.2011. Kokemäenjoen vesistön vesiensuojeluyhdistys ry. Tampere.

Virtanen, J. & Väntsi, S. 2012. Toimintaohje: Laboratoriomenetelmien ja laitteiden validointi. Kokemäenjoen vesistön vesiensuojeluyhdistys ry. Tampere.

Virtanen, J., Väntsi, S. & Mattsson, R. 2012. Toimintaohje: Tulosten jäljitettävyys, laadunohjaus ja mittausepävarmuus. Päivitetty 12.04.2012. Kokemäenjoen vesistön vesiensuojeluyhdistys ry. Tampere.

LIITTEET

Liite 1. Reaktioputkien hapettuvuuden ja häiriönpoiston tulokset

1(2)

LCK 314 (15–150 MG/L) REAKTIOPUTKIEN TULOKSET

Nollanäytteet:	Kontrollit mg/l	Mitattu mg/l	Tulos mg/l
-1,98	15	15,99	21,08
-8,19	50,2	39,00	44,09
ka= -5,085	120	115,00	120,09

Hapettuvuus:

Na-asettaatti (COD_{Cr}-arvo 125 mg/l)	
Mitattu mg/l	Tulos mg/l
110	115,09
112	117,09
114	119,09
113	118,09
113	118,09
ka =	117,49
Saanto %	93,99 %

Häiriönpoisto:

1000 mg/l Cl-kontrolli (COD_{Cr}-arvo 120 mg/l)	
Mitattu mg/l	Tulos mg/l
122	122,69
118	118,69
116	116,69
116	116,69
ka =	118,69
Saanto %	98,91 %

Liite 1. Reaktioputkien hapettavuuden ja häiriönpoiston tulokset

2(2)

LCK 514 (100–2000 MG/L) REAKTIOPUTKIEN TULOKSET

Nollanäytteet:	Kontrollit mg/l	Mitattu mg/l	Tulos mg/l
13,80	120	148	133,50
15,20	1255	1307	1292,50
ka= 14,5	1800	1793	1778,50

Hapettavuus:

Na-asettaatti (COD _{Cr} -arvo 125 mg/l)		Na-asettaatti (COD _{Cr} -arvo 1404 mg/l)	
Mitattu mg/l	Tulos mg/l	Mitattu mg/l	Tulos mg/l
136	121,50	1324	1309,50
140	125,50	1342	1327,50
143	128,50	1343	1328,50
144	129,50	1345	1330,50
141	126,50	1344	1329,50
ka =	126,30	ka =	1325,50
Saanto %	101,04 %	Saanto %	94,38 %

Häiriönpoisto:

1000 mg/l Cl-kontrolli (COD _{Cr} -arvo 120 mg/l)	
Mitattu mg/l	Tulos mg/l
114	127,10
118	131,10
115	128,10
116	129,10
ka =	128,85
Saanto %	107,38 %

Liite 2. Mittausepävarmuus ja toistettavuus

tulokset	näyte	vanha tul.	x ₁	x ₂	ka	s	S _r	x ₂ - x ₁	d _{ri}	(d _{ri}) ²	y %	u %	U %						
15-50 mg/l	15444	24	17,2	19,9	18,6	1,9	10,3	2,7	0,146	0,021	-2,300	2,708	5,416						
	12156	33	35,7	49,1	42,4	9,5	22,3	13,4	0,316	0,100									
	Kontrollina:	14025	38	21,2	24,9	23,1	2,6	11,4	3,7	0,161				0,026					
	15 mg/l	12274	47	69,8	79,4	74,6	6,8	9,1	9,6	0,129				0,017					
	n = 4								yht (d_{ri}) :	0,163									
									S_r % (z) :	1,429									
									RSD % :	13,440									
50-100 mg/l	13435	53	42,9	47,9	45,4	3,5	7,8	5,0	0,110	0,012	-0,030	0,633	1,267						
	12862	53	52,2	55,6	52,2	2,4	4,6	3,4	0,065	0,004									
	Kontrollina:	15320	60	49,6	55,0	52,3	3,8	7,3	5,4	0,103				0,011					
	50,2 mg/l	12252	60	84,5	87,5	86,0	2,1	2,5	3,0	0,035				0,001					
		12294	69	114,9	120,9	117,9	4,2	3,6	6,0	0,051				0,003					
		13107	70	70,0	77,8	73,9	5,5	7,5	7,8	0,106				0,011					
		12724	85	49,6	56,8	53,2	5,1	9,6	7,2	0,135				0,018					
		14022	88	89,8	97,9	93,9	5,7	6,1	8,1	0,086				0,007					
		12682	93	82,1	91,3	86,7	6,5	7,5	9,2	0,106				0,011					
		13089	98	90,8	93,8	92,3	2,1	2,3	3,0	0,033				0,001					
	n = 10								yht (d_{ri}) :	0,080									
									S_r % (z) :	0,633									
									RSD % :	6,671									
> 100 mg/l	15698	116	100,0	106,0	103,0	4,2	4,1	6,0	0,058	0,003	1)								
	13074	117	113,1	114,1	113,6	0,7	0,6	1,0	0,009	0,000				3,333	3,352	6,705			
Kontrollina:	12532	118	98,6	114,9	106,8	11,5	10,8	16,3	0,153	0,023									
120 mg/l	13338	123	109,9	113,9	111,9	2,8	2,5	4,0	0,036	0,001									
1255 mg/l	14456	135	142,9	144,9	143,9	1,4	1,0	2,0	0,014	0,000									
1800 mg/l	13331	137	127,0	131,0	129,0	2,8	2,2	4,0	0,031	0,001	2)								
	12531	162	158,5	161,5	160,0	2,1	1,3	3,0	0,019	0,000				4,088	4,103	8,206			
	12194	183	193,4	196,4	194,9	2,1	1,1	3,0	0,015	0,000									
	12863	215	223,6	229,6	226,6	4,2	1,9	6,0	0,026	0,001									
	13273	222	217,6	225,6	225,6	5,7	2,5	8,0	0,035	0,001									
	12248	340	320,9	336,9	328,9	11,3	3,4	16,0	0,049	0,002				3)					
	14460	369	399,8	401,8	400,8	1,4	0,4	2,0	0,005	0,000							-0,306	0,469	0,938
	13321	417	440,7	443,7	442,2	2,1	0,5	3,0	0,007	0,000									
	12483	464	461,5	486,5	486,5	17,7	3,6	25,0	0,051	0,003									
	13314	539	457,7	465,7	461,7	5,7	1,2	8,0	0,017	0,000									
12243	789	777,9	891,9	834,9	80,6	9,7	114,0	0,137	0,019										
12359	828	661,5	664,5	663,0	2,1	0,3	3,0	0,005	0,000										
13283	866	575,7	582,7	582,7	4,9	0,8	7,0	0,012	0,000										
13309	927	920,7	991,7	956,2	50,2	5,3	71,0	0,074	0,006										
14482	933	981,9	1033,8	1007,9	36,7	3,6	51,9	0,051	0,003										
15434	1095	1632,8	1654,8	1654,8	15,6	0,9	22,0	0,013	0,000										
12884	1322	852,6	866,6	866,6	9,9	1,1	14,0	0,016	0,000										
12458	1403	1378,5	1384,5	1384,5	4,2	0,3	6,0	0,004	0,000										
13257	1695	2371,6	2452,6	2452,6	57,3	2,3	81,0	0,033	0,001										
12358	2340	2302,9	2330,9	2330,9	19,8	0,8	28,0	0,012	0,000										
12246	2826	2550,9	2576,9	2563,9	18,4	0,7	26,0	0,010	0,000										
	n = 26								yht (d_{ri}) :	0,066									
									S_r % (z) :	0,356									
									RSD % :	1,558									
Laajennettu mittausepävarmuus 95% luottamustasolla									yht:	2,474	0,309								
									ka (d_r) :	0,062	0,485								
u % = kokonaisepävarmuus																			
U % = laajennettu mittausepävarmuus																			
RSD % = toistettavuus																			
y = systemaattinen virhe																			
z = satunnaisvirhe																			
1) 120 mg/l kontrollinäyte																			
2) 1255 mg/l kontrollinäyte																			
3) 1800 mg/l kontrollinäyte																			

Liite 3. Menetelmien vertailu t-testin avulla

1(2)

LCK 314 (15–150 MG/L) reaktioputkien t-testin tulokset

näyte	vanha tulos	oma tulos ka	ka vanha & oma	$d_i = x_2 - x_1$	d_i^2	d_{ri}
12252	60	86,0	73,0	26,00	676,00	35,616
12274	47	74,6	60,8	27,60	761,76	45,395
12724	85	53,2	69,1	-31,80	1011,24	-46,020
12194	183	194,9	189,0	11,90	141,61	6,298
12294	69	117,9	93,5	48,90	2391,21	52,327
12156	33	42,4	37,7	9,40	88,36	24,934
12682	93	86,7	89,9	-6,30	39,69	-7,012
12532	118	106,8	112,4	-11,25	126,56	-10,011
12862	53	52,2	52,6	-0,80	0,64	-1,521
13074	117	113,6	115,3	-3,40	11,56	-2,949
13089	98	92,3	95,2	-5,70	32,49	-5,991
13107	70	73,9	72,0	3,90	15,21	5,420
14025	38	23,1	30,5	-14,95	223,50	-48,976
13435	53	45,4	49,2	-7,60	57,76	-15,447
14022	88	93,9	90,9	5,85	34,22	6,434
13338	123	111,9	117,5	-11,10	123,21	-9,451
15444	24	18,6	21,3	-5,45	29,70	-25,617
15320	60	52,3	56,2	-7,70	59,29	-13,713
15698	116	103,0	109,5	-13,00	169,00	-11,872
13331	137	129,0	133,0	-8,00	64,00	-6,015
			summa (d _i):	6,50	6057,02	-28,170
			keskiarvo (\bar{d}):	0,33	302,85	-1,409
					(summa d _i) ² :	42,250
					varianssi s _d ² :	318,679
					s _d :	17,852
					t-testi:	0,081

Liite 3. Menetelmien vertailu t-testin avulla

2(2)

LCK 514 (100–2000 MG/L) reaktioputkien t-testin tulokset

näyte	vanha tulos	oma tulos ka	ka vanha & oma	$d_i = x_2 - x_1$	d_i^2	d_{ri}
12243	789	834,9	812,0	45,90	2106,81	5,7
12246	2826	2563,9	2695,0	-262,10	68696,41	-9,7
12248	340	328,9	334,5	-11,10	123,21	-3,3
12358	2340	2330,9	2335,5	-9,10	82,81	-0,4
12359	828	663,0	745,5	-165,00	27225,00	-22,1
12458	1403	1384,5	1393,8	-18,50	342,25	-1,3
12483	464	486,5	475,3	22,50	506,25	4,7
12531	162	160,0	161,0	-2,00	4,00	-1,2
12863	215	226,6	220,8	11,60	134,56	5,3
12884	1322	866,6	1094,3	-455,40	207389,16	-41,6
13257	1695	2452,6	2073,8	757,60	573957,76	36,5
13273	222	225,6	223,8	3,60	12,96	1,6
13283	866	582,7	724,4	-283,30	80258,89	-39,1
13309	927	956,2	941,6	29,20	852,64	3,1
13314	539	461,7	500,4	-77,30	5975,29	-15,4
13321	417	442,2	429,6	25,20	635,04	5,9
14456	135	143,9	139,5	8,90	79,21	6,4
14460	369	400,8	384,9	31,80	1011,24	8,3
14482	933	1007,9	970,4	74,85	5602,52	7,7
15434	1095	1654,8	1374,9	559,80	313376,04	40,7
			summa (d_i):	287,15	1288372,05	-8,5
			keskiarvo (\bar{d}):	14,36	64418,60	-0,4
					(summa d_i) ² :	82455,123
					varianssi s_d^2 :	67592,068
					s_d :	259,985
					t-testi:	0,247