



Annukka Pyrä

# Uuden menetelmän käyttöönotto veden kemiallisen hapenkulutuksen määrittämiseen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja kemiantekniikka

Insinöörityö

11.4.2022

## Tiivistelmä

Tekijä:	Annukka Pyrä
Otsikko:	Uuden menetelmän käyttöönotto veden kemiallisen hapenkulutuksen määrittämiseen
Sivumäärä:	31 sivua + 3 liitettä
Aika:	11.4.2022
Tutkinto:	Insinööri (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Bio- ja kemiantekniikka
Ammatillinen pääaine:	Kemian prosessitekniikka
Ohjaajat:	Lehtori Eija Koriseva Laboratoriopäällikkö Emma Turpeenniemi

---

Tämän insinöörityön tavoitteena oli validoida standardin SFS 3036 mukainen menetelmä Aqva Finland Oy:n vesilaboratorioon veden kemiallisen hapenkulutuksen määrittämiseen. Validoinnin tavoitteena oli osoittaa menetelmän soveltuvuus laboratorioon. Validoinnin yhteydessä otettiin käyttöön TitroLine 5000 -titraattori sekä Grant Aqua Pro -lämpöhaude. Opinnäytetyön käytännön osuus toteutettiin Aqva Finland Oy:n laboratoriossa talvella 2021–2022.

SFS 3036:n mukaisessa menetelmässä veden kemiallinen hapenkulutus määritetään hapettamalla näyte permanganaatilla. Validoitavalla menetelmällä korvattaisiin osittain nykyinen laboratorioissa käytössä oleva dikromaattihapetusmenetelmä. Työssä vertailtiin edellä mainituilla menetelmillä saatuja tuloksia keskenään. Uudella menetelmällä saatavat tulokset eivät ole suoraan verrattavissa nykyisen menetelmän antamiin tuloksiin, koska kyseessä ovat eri hapetusmenetelmät, mutta menetelmien lineaarisuutta tarkasteltiin korrelaation avulla ja menetelmien välillä havaittiin vahva lineaarinen yhteys.

Validoinnissa määritettävät parametrit olivat määrittäminen, toistettavuus ja mittausepävarmuus. Näytematriiseina käytettiin kaivo- ja kunnallisvesiä. Standardisoituja vertailumateriaaleja ei ollut mahdollista käyttää validoitavien parametrien määrittämisessä.

Suoritettujen validoinnien ja saatujen tulosten perusteella voitiin todeta, että menetelmä soveltuu käytettäväksi Aqva Finland Oy:n vesilaboratorioon kemiallisen hapenkulutuksen määrittämiseen kaivo- ja kunnallisvesistä.

Avainsanat: COD, humus, validointi

## Abstract

Author: Annukka Pyrä  
Title: Commissioning of a New Method for the Determination of Chemical Oxygen Demand in Water  
Number of Pages: 31 pages + 3 appendices  
Date: 11 April 2022

Degree: Bachelor of Engineering  
Degree Programme: Biotechnology and Chemical Engineering  
Professional Major: Chemical Process Engineering  
Supervisors: Eija Koriseva, Senior Lecturer  
Emma Turpeenniemi, Laboratory Manager

---

The purpose of this thesis was to validate the method for determining the chemical oxygen demand of water according to the standard SFS 3036. The thesis was produced for Aqva Finland Oy. The aim of the validation was to demonstrate the suitability of the method for the laboratory. During validation TitroLine 5000 Titrator and Grant Aqua Pro Water Bath were introduced. The practical part of the thesis was done in Aqva Finland Oy's laboratory in the winter of 2021-2022.

In the method according to SFS 3036, the chemical oxygen demand is determined by oxidizing the sample with permanganate. The method to be validated would partially replace the current dichromate oxidation method used in the laboratory. The results obtained by the above-mentioned methods were compared. The results obtained with the new method are not directly comparable with the current method because of the different oxidation methods but the linear relationship between the methods was investigated by correlation.

The parameters to be determined in the validation were the limit of quantification, repeatability and measurement uncertainty. Well waters and drinking waters were used as sample matrix. It was not possible to use standardized reference materials.

Based on the validation performed and the results obtained it was found that the method is suitable for use in Aqva Finland Oy's laboratory for the determination of chemical oxygen demand of well waters and drinking waters.

Keywords: COD, humus, validation

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Humus	3
2.1	Humuspitoisuuden määrittäminen	4
2.2	COD <sub>Cr</sub> -menetelmä	5
2.3	COD <sub>Mn</sub> -menetelmä	6
3	Titraattorin ja lämpöhauteen käyttöönotto	9
3.1	Titraattori	9
3.2	Lämpöhaude	11
4	Menetelmän validointi	12
4.1	Suunnitelma	12
4.2	Kokeellinen osuus	13
4.3	Tilastolliset menetelmät	16
4.3.1	Määrittämissuunnitelma	17
4.3.2	Toistettavuus	18
4.3.3	Kokonaismittausepävarmuus	20
4.3.4	COD <sub>Cr</sub> - ja COD <sub>Mn</sub> -menetelmien välinen riippuvuus	23
4.4	Tulosten arviointi	24
4.5	Validoidun menetelmän käyttöönotto laboratoriossa	27
5	Yhteenveto	29
	Lähteet	30

## Liitteet

Liite 1: Validointisuunnitelma

Liite 2: Pipettien kalibrointitodistukset

Liite 3: Regressioanalyysi

## Lyhenteet

BOD	Biological Oxygen Demand. Biologinen hapenkulutus.
COD	Chemical Oxygen Demand. Kemiallinen hapenkulutus.
DOC	Dissolved Organic Carbon. Liuennut orgaaninen hiili.
KMnO <sub>4</sub>	Kaliumpermanganaatti
LOQ	Limit of Quantification. Määrittämysraja.
TOC	Total Organic Carbon. Orgaaninen kokonaishiili.

# 1 Johdanto

Vesien analysointi on yleistynyt ympäristövaatimusten lisääntyttyä ja laatuvaatimusten tarkennuttua. Veden laadun tutkiminen on tärkeää, koska käytetyn veden laatu vaikuttaa suoraan terveyteen. Kunnallisveden laatua seurataan jatkuvasti, jotta se täyttää lain määräämät kriteerit ja laatuvaatimukset, mutta myös mökin tai omakotitalon kaivoveden laatu olisi hyvä tutkia säännöllisin väliajoin, mikäli kaivovettä käytetään talousvetenä. Käyttöveden säännöllisellä analysoimisella varmistetaan säädösten mukainen vedenlaatu ja se, ettei veden käyttö aiheuta haittaa terveydelle. Aqva Finland Oy:n laboratoriossa tehdään kaivovesi-, luonnonvesi- ja kunnallisvesianalyyseja. Analyysihin sisältyy mikrobiologisia ja fysikaalis-kemiallisia määryksiä sekä alkuaineanalyysijä ja aistinvaraista arviointia. Analyysipalveluiden lisäksi yritys tarjoaa tuotteita veden puhdistukseen ja suodatukseen.

Aqva Finland Oy on Helsingissä vuonna 2010 perustettu yritys, joka nykyään palvelee asiakkaitaan ympäri Suomen ja Baltian. Aqva Finland Oy tarjoaa kattavan valikoiman vesikalusteita sekä tuotteita veden puhdistukseen ja käsittelyyn. [1.] Aqvan vesilaboratorio vastaa vesianalyysipalveluista ja on osana tuotekehitystä.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli uuden menetelmän validointi Aqva Finland Oy:n laboratorioon vesinäytteiden kemiallisen hapenkulutuksen määrytykseen. Veden kemiallisen hapenkulutuksen määrytyksellä saadaan viitteitä veden tilasta, humuspitoisuudesta ja sitä kautta myös veden puhdistustarpeesta. Laboratoriossa humuspitoisuusmääryksiä tehdään myös seuranta-analyysille, joista saadaan tärkeää tietoa yrityksen vedenpuhdistusyksikön tuotekehitykseen ja vedenpuhdistuslaitteiden toimivuuden seurantaan humussuodattimien osalta.

Uudella menetelmällä korvattaisiin osittain nykyiset fotometriset menetelmät. Laboratorion on tarkoitus kehittyä tulevaisuudessa akkreditoiduksi toimijaksi, jolloin laboratorioon tarvitaan virallinen menetelmä veden kemiallisen hapenkulutuksen määrittämiseksi. Menetelmän käyttöönottoa varten laboratorioon hankittiin kaksi

uutta laitetta, joiden käyttöönotto oli osa opinnäytetyötä. Opinnäytetyön käytännön osuus toteutettiin Aqva Finland Oy:n laboratoriossa talvella 2021–2022.

## 2 Humus

Humus on orgaanista, hajonnutta tai osittain hajonnutta ainesta vedessä. Luonnollinen orgaaninen aines vedessä näkyy veden värjäytymisenä ruskeankeltaiseksi. Mitä suurempi humuspitoisuus on, sitä tummemmaksi vesi värjäytyy. [2; 3.] Humusta esiintyy kaikkialla luonnonvesissä, soissa, maaperässä ja sedimentissä, ja sen pitoisuus vaihtelee sekä vuodenaikojen että vuosien välillä [4, s. 4; 6]. Suomessa vesistöt ovat hyvin humuspitoisia. Tämä selittyy pohjoisella sijainnilla ja maaperän tasaisuudella, joka mahdollistaa suotuisat oltavat orgaanisen aineksen kertymiselle. Humusta muodostuu paljon suoalueilla, joita Suomessa on runsaasti. [2; 3.] Myös sadevesillä on vaikutusta humuksen määrään, koska niiden mukana humusta huuhtoutuu vesistöihin. Työmaat ja maanmuokaus lisäävät humushuuhtoutumia [3]. Humuksen määrään vaikuttavat myös maaperän happamuus sekä ympäristön ioniset yhdisteet [4, s. 5].

Vedessä esiintyvän orgaanisen aineksen koostumukseen vaikuttavat merkittävästi vesistön maantieteellinen sijainti ja ympäristöolosuhteet, minkä vuoksi humusaineidenkin koostumuksessa on suuria eroja. Humusaineilla ei ole mitään tiettyä rakennekaavaa, vaan ne koostuvat useista erityyppisistä suurista ja monimutkaisista hiiliyhdisteistä, jotka ovat peräisin kasvien ja eläinten hajoamistuotteista. Humusaineet muodostavat paljon erityyppisiä monimutkaisia yhdisteitä useiden satojen orgaanisten molekyylien kanssa. [3; 4, s. 5–6; 5.] Erot humusaineiden rakenteessa ovat suurempia, kun vertaillaan eri vesilähteiden humusaineita. Saman vesilähteen humusaineiden perusrakenne on usein hyvin samanlainen alueesta riippumatta, ja niiden yhtäläisyydet ovat selvempiä kuin erot. [6, s. 436.]

Humuksesta suurin osa on hiiltä. Sen lisäksi se sisältää happea, vetyä ja typpeä. Karkeasti arvioituna noin puolet humuksesta on hiiltä, 40 % happea, 4–5 % vetyä ja 1–2 % typpeä. Näiden lisäksi se saattaa sisältää myös monia muita alkuaineita, kuten esimerkiksi rikkiä, fosforia ja metalleja. [4, s. 4–6.]

Humus aiheuttaa laatuongelmia veteen vaikuttaen veden väriin, makuun ja haajuun. Suuret humuspitoisuudet vaikeuttavat veden puhdistusprosessia ja voivat myös aiheuttaa karsinogeenisiä yhdisteitä reagoiessaan esimerkiksi veden puhdistuksessa käytetyn kloorin kanssa. [7.]

## 2.1 Humuspitoisuuden määrittäminen

Humuspitoisuuden määrittäminen antaa viitteitä veden tilasta. Humuspitoisuuden määrittämiseen ei ole yhtä tiettyä analyysimenetelmää, vaan pitoisuuksia voidaan määrittää monin eri menetelmin tilanteesta ja veden laadusta riippuen. Humuspitoisuuden määrittämiseksi on siis olemassa useita eri menetelmiä. Menetelmä valitaan analysoitavan veden laadun mukaan ja valintaan vaikuttaa myös se, kuinka tarkkaan pitoisuus halutaan määrittää.

Yksinkertaisimmillaan humuspitoisuutta voidaan määrittää veden väriluvun perusteella, jolloin veden väriä verrataan standardin väriin. Veden väriluvun avulla voidaan karkeasti määrittää esimerkiksi järven humuspitoisuutta. Tässä menetelmässä ei kuitenkaan oteta huomioon kaikkia muita veden väriin vaikuttavia tekijöitä, kuten esimerkiksi rauta- tai mangaanipitoisuutta, minkä vuoksi analyysimenetelmä ei ole tarkka. [4, s. 20; 8.]

Humuspitoisuus voidaan määrittää myös esimerkiksi määrittämällä sen absorbanssi UV-valon aallonpituusalueella UV-Vis-spektrofotometrillä. Absorbanssin määrittäminen spektrofotometrillä on yksinkertainen, nopea ja helppo menetelmä. Mittaukset tehdään näytteistä sellaisenaan. Vesi kaadetaan kyvetiin ja mitataan näytteen absorbanssi. Tämä menetelmä ei kuitenkaan sovi vahvasti kellertäville vesille, koska esimerkiksi raudan aiheuttama keltaisuus voi häiritä mittausta ja aiheuttaa virhettä tuloksessa. Ei myöskään ole olemassa yhtä tiettyä aallonpituutta, jolla olisi mahdollista määrittää kaikki veden sisältämät humusaineet. [6, s. 440.]

Humuspitoisuutta voidaan määrittää veden hiilen määrää mittaavilla menetelmillä. TOC (Total Organic Carbon) mittaa orgaanisen hiilen kokonaismäärää, ja

sillä saadaan määritettyä kaikki liuenneessa ja kiinteässä muodossa oleva orgaaninen hiili. TOC-määrittystä tehdessä näyte ei vaadi esikäsitteilyä, vaan hiilen määrä voidaan määrittää näytteestä sellaisenaan. DOC (Dissolved Organic Carbon) mittaa liuenneen orgaanisen hiilen määrää. DOC määritetään 0,45 µm:n huokoskoon suodattimella suodatetusta näytteestä, jolloin kiinteät partikkelit jäävät suodattimeen ja saadaan määritettyä ainoastaan veteen liuenneen hiilen määrä. Veden hiilen määrää määritettäessä ei kuitenkaan pystytä erottamaan humusaineiden hiiltä muista hiiliyhdisteistä. [6, s. 438–440.]

Humuspitoisuutta on mahdollista määrittää myös veden biologisen tai kemiallisen hapenkulutuksen avulla. Biologinen hapenkulutus (BOD, Biological Oxygen Demand) mittaa bakteerien kuluttaman happimäärän tietyn ajan kuluessa. Bakteerit käyttävät energianlähteenään vedessä olevaa orgaanista ainetta, mikä kuluttaa happea. BOD mittaa tätä bakteerien kuluttamaa happimäärää. Veden kemiallinen hapenkulutus (COD, Chemical Oxygen Demand) taas kuvaa sitä hapen määrää, jonka näytteessä oleva orgaaninen aine kuluttaa analyysimenetelmän mukaisissa olosuhteissa jonkin vahvan kemiallisen hapettimen läsnä ollessa. Usein hapettimena käytetään esimerkiksi kaliumpermanganaattia tai dikromaattia. [3; 4, s. 20–23.]

Humuspitoisuuden tarkka määrittäminen on hyvin haasteellista, koska humusaineet esiintyvät eri muodoissa ja aineiden koostumus riippuu paljon paikasta ja olosuhteista [4, s. 4]. Humusaineet on myös vaikea erottaa veden muusta orgaanisesta aineksesta.

## 2.2 COD<sub>Cr</sub>-menetelmä

Tällä hetkellä Aqva Finland Oy:n laboratoriossa on käytössä kemiallisen hapenkulutuksen määrittämiseen dikromaattihapetusmenetelmä. Dikromaatti on vahva hapetin. COD<sub>Cr</sub>-luku kertoo kemiallisen hapenkulutuksen, joka on määritetty hapettamalla näytevesi dikromaatilla [9]. Menetelmässä näytevesi kaadetaan näyteputkeen, jossa on väkevää rikkihappoa, elohopeasulfaattia, hopeakatalysaattori ja kaliumdikromaattia (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) ja kuumennetaan lämpöhauteessa

kahden tunnin ajan [10]. Kaliumdikromaatti hapettaa orgaanisen aineen hiilidioksidiksi ja vedeksi. Lopuksi näyteputket jäädytetään ja tulos mitataan spektrofotometrillä.

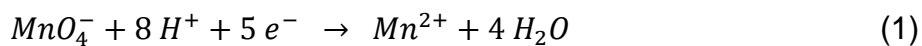
Nykyisen menetelmän haittapuolia ovat menetelmän hitaus, ongelmajätteen syntyminen ja lämpölaitteen pieni kapasiteetti. Näyteputkien valmistelu vie aikaa ja kieutus kestää kaksi tuntia. Lisäksi lämpölaitteessa on rajallinen määrä paikkoja näyteputkille ja kapasiteetti on melko pieni. Määrittäessä käsitellään vaarallisia aineita ja ongelmajätettä syntyy melko paljon. Elohopea on erittäin myrkyllistä ihmisille ja ekosysteemille, ja sen käyttö halutaan minimoida laboratoriossa.

Yleisesti COD<sub>Cr</sub>-menetelmää käytetään likaantuneille vesille ja jätevesille. Laboratoriossa analysoidaan pääasiassa kaivo- ja kunnallisvesiä. Puhtaiden vesien kemiallisen hapenkulutuksen määrittämiseen COD<sub>Mn</sub>-menetelmä soveltuu paremmin, koska ne eivät vaadi orgaanisen aineen hapettamiseksi yhtä vahvaa hapetinta kuin likavedet, joissa orgaanista ainesta on enemmän.

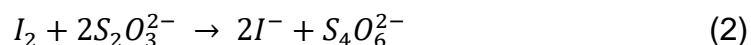
### 2.3 COD<sub>Mn</sub>-menetelmä

COD<sub>Mn</sub>-menetelmässä veden kemiallinen hapenkulutus määritetään hapettamalla näyte permanganaatilla. Menetelmää käytetään mm. purkuvesistöjen ja puhtaiden vesien orgaanisen aineksen määrän arviointiin. Menetelmä soveltuu käytettäväksi Aqva Finland Oy:n laboratorioon, koska laboratoriossa analysoidaan pääasiassa kaivovesiä ja kunnallisvesiä. Likaantuneiden vesien analysointiin on mahdollista edelleen käyttää COD<sub>Cr</sub>-menetelmää.

COD<sub>Mn</sub>-menetelmässä näyte happamoidaan rikkihapolla ja näytteeseen lisätään tunnettu määrä kaliumpermanganaattia. Hapettimena toimii permanganaatti-ioni, joka tässä on kaliumpermanganaatin muodossa. Näytettä pidetään kiehu- vassa vedessä vesihautteessa 20 minuuttia. Hapettuvat aineet pelkistävät osan permanganaatti-ionista Mn<sup>2+</sup>-ioniksi (kaava 1).



Kuumennetut näytteet jäädytetään ja näyteputkiin lisätään kaliumjodidiliuosta. Väritön jodidi hapettuu jodiksi, ja se havaitaan näytteen värin muuttumisena keltaiseksi. Jodidin lisäyksen jälkeen seos titrataan jodometrisesti. Jodometrinen titraus perustuu hapetus-pelkistysreaktioon. Seos titrataan tiosulfaattiliuoksella, jonka pitoisuus tunnetaan. Titraus perustuu jodin ja natriumtiosulfaatin väliseen reaktioon (kaava 2), jossa tiosulfaatti-ioni hapettuu tetrionaatti-ioniksi.



Titrauksen edetessä, mitä vähemmän seoksessa on jodia ( $\text{I}_2$ ), sitä vaaleamman keltaiseksi väri muuttuu. Titrauksen loppuvaiheessa seokseen lisätään tärkkelystä, joka reagoi jodin kanssa muodostaen voimakkaan sinisen värin. Tämän värimuutoksen avulla titrauksen päätepiste on helpommin havaittavissa. Tärkkelys toimii siis indikaattorina. Titrauksen päätepiste saavutetaan, kun seos muuttuu kirrkaaksi. Titrauksessa kuluneen tiosulfaatin määrän avulla voidaan määrittää  $\text{I}_2$  määrä, koska tiosulfaatin konsentraatio tunnetaan. Määritetyn  $\text{I}_2$  määrän avulla voidaan laskea pelkistymätön permanganaatin määrä. Näin saadaan selville hapenkulutus, mikä vastaa orgaanisen aineen määrää näytteessä.

Veden kemiallinen hapenkulutus voidaan laskea standardin SFS 3036 mukaan titraukseen kuluneen natriumtiosulfaattiliuoksen tilavuuden avulla seuraavasti:

$$\text{COD}_{\text{Mn}} = (V_2 - V_1) \cdot c_1 \cdot 800 \cdot f \quad (3)$$

$\text{COD}_{\text{Mn}}$  on näytteen kemiallinen hapenkulutus (mg/l)  
 $V_1$  on näytteen titraukseen kulunut natriumtiosulfaattiliuoksen tilavuus (ml)  
 $V_2$  on nollanäytteen titraukseen kulunut natriumtiosulfaattiliuoksen tilavuus (ml)  
 $c_1$  on natriumtiosulfaattiliuoksen konsentraatio (mol/l)  
 $f$  on laimennuskerroin  
kerroin 800 on puolet hapen (O) moolimassasta milligrammoiksi muutettuna jaettuna näytetilavuudella ( $\frac{16}{2} \cdot \frac{1000}{10}$ )

Tulos ilmoitetaan kahden merkitsevän numeron tarkkuudella milligrammoina litraa kohden (mg/l) ja tulositiloituksessa viitataan standardiin SFS 3036 [11].

Permanganaatti on heikompi hapetin kuin dikromaatti, joten COD<sub>Mn</sub>-arvo on tavallisesti huomattavasti pienempi kuin COD<sub>Cr</sub>-arvo, eivätkä nämä ole suoraan verrattavissa toisiinsa [12]. COD<sub>Mn</sub>-menetelmää ei voida käyttää merivesille tai muille sellaisille vesille, joiden kloridipitoisuus on yli 300 mg/l [11]. Likaantuneiden vesien määrittämiseen laboratoriossa käytetään COD<sub>Cr</sub>-menetelmää.

### 3 Titraattorin ja lämpöhauteen käyttöönotto

#### 3.1 Titraattori

Laboratorioon valikoitui TitroLine 5000 automaattinen titraattori (kuva 1), joka on varustettu tilavuudeltaan 50 ml:n annosteluyksiköllä. Titraattorin nesteannostelija on ISO 8655-6 vaatimusten mukainen. Titraattorissa on lisäksi magneettisekoittaja ja pH-elektrodi. Titraattoriin on mahdollista liittää näppäimistö, ja laitteessa on paikka USB-tikulle analyysitulosten tallentamista varten.



kuva 1. TitroLine 5000 automaattinen titraattori

Titraattori soveltuu moniin eri käyttötarkoituksiin. Titraattoriin on asennettu valmiiksi standardimenetelmiä, jotka on mahdollista ottaa suoraan käyttöön.

Titraattoriin on myös mahdollista luoda omia menetelmiä. Automaattista titrausta käytettäessä on mahdollista valita titrausmenetelmäksi lineaarinen-, dynaaminen- tai päätepistetitraus. Titraattorissa on valmiita laskentakaavoja, joista voidaan valita menetelmälle sopiva kaava, jolloin laite laskee tuloksen automaattisesti. Aqva Finland Oy:n laboratorioissa titraattoria hyödynnetään COD<sub>Mn</sub>-määrityksissä käyttäen manuaalista titrausta ja määrityksille luotiin titraattoriin oma menetelmä.

Titraattorin käyttöönotto aloitettiin kasaamalla laite käyttöönotto-oppaan ohjeiden mukaisesti. Kun kaikki osat oli liitetty paikoilleen ja vaadittavat alkuvalmistelut oli tehty, laitteeseen kytkettiin virta ja suoritettiin alkuhuuhtelut sekä pH-mittarin kalibrointi. Kalibrointi suoritettiin kolmella puskuriliuoksella.

Titraattoria käytettäessä on huomioitava, että titraattorin moitteeton toiminta edellyttää säännöllistä ja asianmukaista testausta ja huoltoa. Jos titraattoria ei käytetä yli kahteen viikkoon, annosteluyksikkö on hyvä tyhjentää ja puhdistaa, koska muuten venttiilin mäntä saattaa alkaa vuotaa, mikä taas voi johtaa mäntäbyretin vaurioitumiseen. [16.]

## 3.2 Lämpöhaude

Lämpöhaudetta tarvitaan laboratoriossa näytteiden kuumentamiseen ja kiehuttamiseen. Laboratorioon valikoitui vedellä lämpenevä Grant Aqua Pro -lämpöhaude (kuva 2).



Kuva 2. Grant Aqua Pro -lämpöhaude

Ennen käyttöönottoa lämpöhaude huuhdeltiin sisältä ionivaihdetulla vedellä ja tyhjennettiin kertaalleen. Tämän jälkeen vettä lisättiin tarvittava määrä näytteiden kuumentamiseen. Haluttu lämpötila asetettiin laitteen päädystä nuolinäppäimillä.

Lämpöhauteessa on suuri kapasiteetti, joten tarvittaessa näytteitä mahtuu kerrallaan laitteeseen useita kymmeniä.

## 4 Menetelmän validointi

Validoinnilla on tarkoitus osoittaa menetelmän soveltuvuus käyttötarkoitukseensa. Validoinnilla testataan menetelmän luotettavuutta, ja sen tarkoituksena on taata tulosten oikeellisuus. Laboratoriot vastaavat itse analyysitulosten laadusta, ja luotettavien tulosten saamiseksi tarvitaan validoituja analyysimenetelmiä. Validoinnilla parannetaan tulosten luotettavuutta, ja se on osoitus laadusta. [17, s. 1; 18, s. 6.]

Tässä työssä validoinnin kohteena oli SFS 3036:n mukainen menetelmä veden kemiallisen hapenkulutuksen määrittämiseksi kaivo- ja kunnallisvesistä. Validoinnilla oli tarkoitus osoittaa menetelmän soveltuvuus veden kemiallisen hapenkulutuksen määrittämiseen Aqva Finland Oy:n laboratoriossa. Validoinnin avulla varmistettiin, että menetelmällä saadaan luotettavia tuloksia ja että tulosten mittausepävarmuus tunnetaan.

Validoinnin yhteydessä vertailtiin COD<sub>Mn</sub>- ja COD<sub>Cr</sub>-menetelmiä ja tutkittiin niiden välistä lineaarista yhteyttä korrelaation avulla. Menetelmälle laadittiin myös työohje laboratorioon.

### 4.1 Suunnitelma

Menetelmän validointi aloitettiin validointisuunnitelman (liite 1) laatimisella ja koejärjestelyjen suunnittelulla. Tätä ennen oli perehdytty aihealueen kirjallisuuteen ja tutustuttu validoitavan menetelmän standardiin ja varmistettu, että kaikki tarvittavat välineet, laitteet ja kemikaalit löytyvät laboratorion. Validointisuunnitelmaan määritettiin näytematriisit, validoitavat parametrit ja arvioitiin validoinnin laajuus. Suunnitelmaan merkittiin myös työssä käytettävät laitteet ja reagenssit sekä määritettiin vastuuhenkilöt.

Validoinnissa käytettiin näytematriiseina kaivovesiä ja kunnallisvesiä. Näytemateriaalia pyrittiin saamaan mahdollisimman laajalta pitoisuusalueelta. Standardiliuoksia ei ollut mahdollista hyödyntää vertailumateriaalina, joten parametrit

määritettiin käyttäen näytematriiseja ja nollanäytteitä. Koska kyseessä on standardimenetelmä, voidaan olettaa, että menetelmän häiriöalttius ja spesifisyys on jo määritetty. [18, s. 8.] Määritysraja, toistettavuus ja mittausepävarmuus määritettiin ja tuloksia verrattiin standardissa oleviin tuloksiin.

## 4.2 Kokeellinen osuus

Työn kokeellinen osuus aloitettiin alkuvalmisteluilla. Vesihaude laitettiin lämpenemään, ja tarvittavat työvälineet ja reagenssit haettiin työpisteelle. Validointimittauksissa käytettiin vain kalibroituja laitteita ja pipettejä. Taulukkoon 1 on merkitty työssä käytetyt reagenssit.

Taulukko 1. COD<sub>Mn</sub>-pitoisuuden määrittämisessä käytettävät reagenssit

	LOT	Exp
Kaliumpermanganaattiliuos, 0,02mol/l	HC02910321	30.9.2023
Kaliumjodidiliuos, 0,1 mol/l	K20120J1	28.9.2022
Rikkihappo, 4 mol/l	20J094020	1.10.2022
Natriumtiosulfaattiliuos, 0,01 mol/l	21C034101	25.1.2023
Tärkkelys	20J074109	9.9.2025

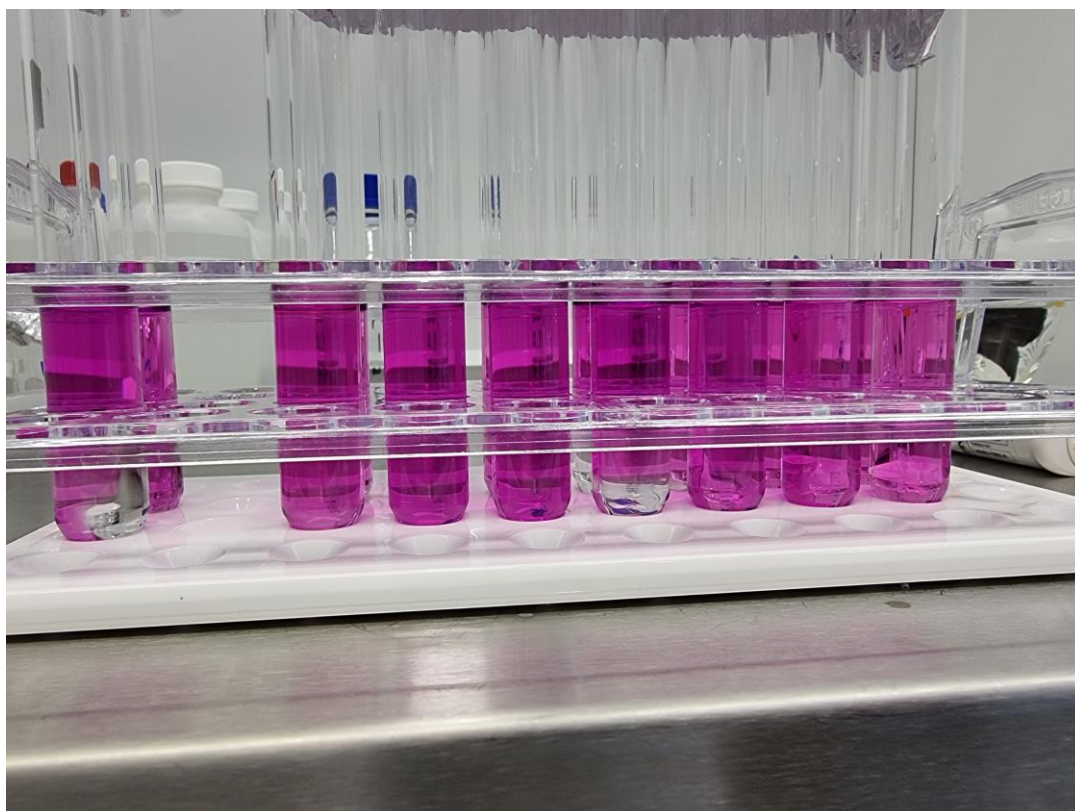
Reagenssiluoksista tehtiin tarvittavat laimennukset ja tärkkelysliuos valmistettiin standardin ohjeen mukaan. Laimennukset tehtiin käyttäen kaavaa

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2, \quad (4)$$

jossa  $c$  on konsentraatio ja  $V$  on tilavuus.

Uudet koeputket otettiin käyttöön ja ne keitettiin rikkihapolla happamaksi tehdessä permanganaattiliuoksessa, jotta niistä saatiin puhdistettua kaikki orgaaniset epäpuhtaudet. Sen jälkeen putket huuhdeltiin 25-prosenttisellä suolahappoliuoksella ja lopuksi tislattulla vedellä ja jätettiin kuivumaan.

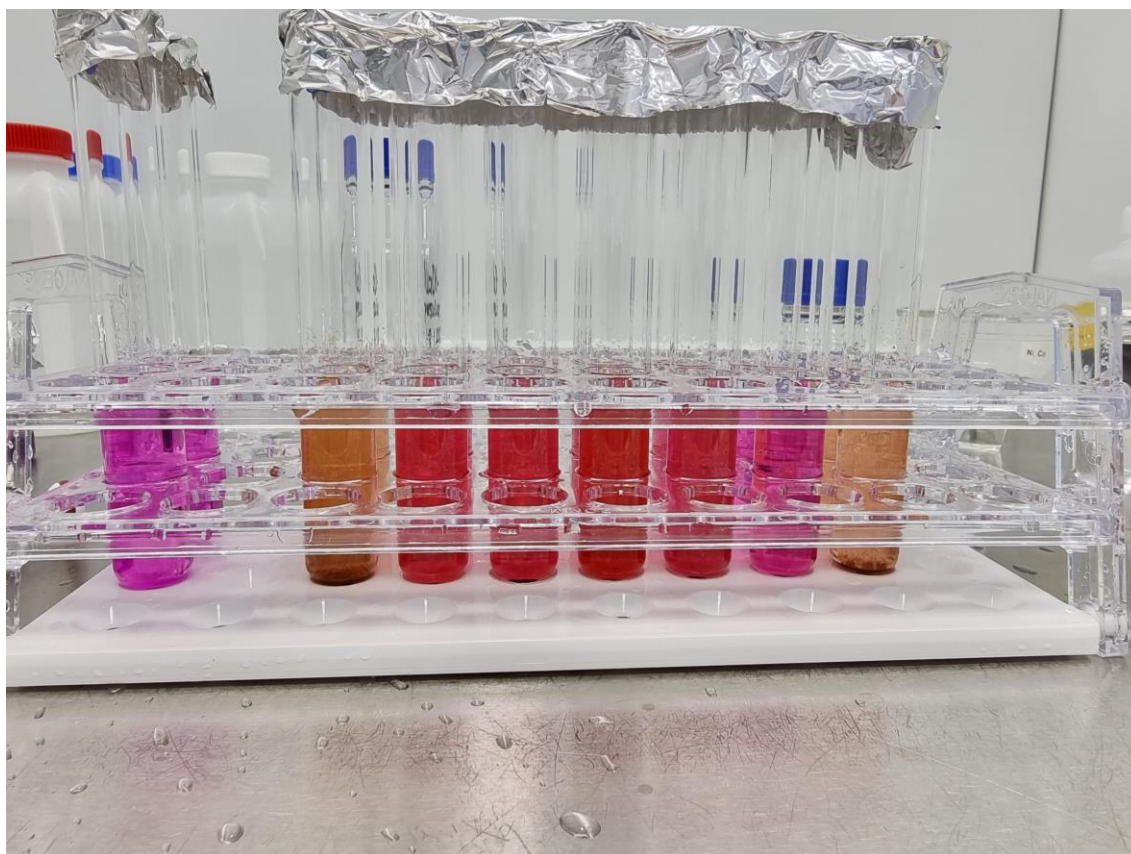
Puhdistettuihin putkiin pipetoitiin nollanäyte ja tutkittavat näytteet. Nollanäytteenä käytettiin ionivaihdettua vettä, ja tutkittavina näytteinä oli kaivo- ja kunnallisvesiä. Putkiin lisättiin rikkihappoa ja tunnettu määrä kaliumpermanganaattia ja suojattiin putkien suu (kuva 3).



Kuva 3. Putkiin pipetoitu näytteet ja kaliumpermanganaattiliuos

Putket siirrettiin telineessä vesihauteeseen ja pidettiin 20 minuuttia kiehuva vedessä. Tämän jälkeen putket siirrettiin kylmään veteen ja jäähdytettiin huoneenlämpöiseksi. Kuumennuksen aikana näytteen sisältämä orgaaninen aine hapettuu ja osa permanganaatti-ioneista pelkistyy  $Mn^{2+}$ -ioneiksi. Permanganaatin pelkistyminen  $Mn^{2+}$ -ioneiksi on havaittavissa näytteissä värimuutoksena.

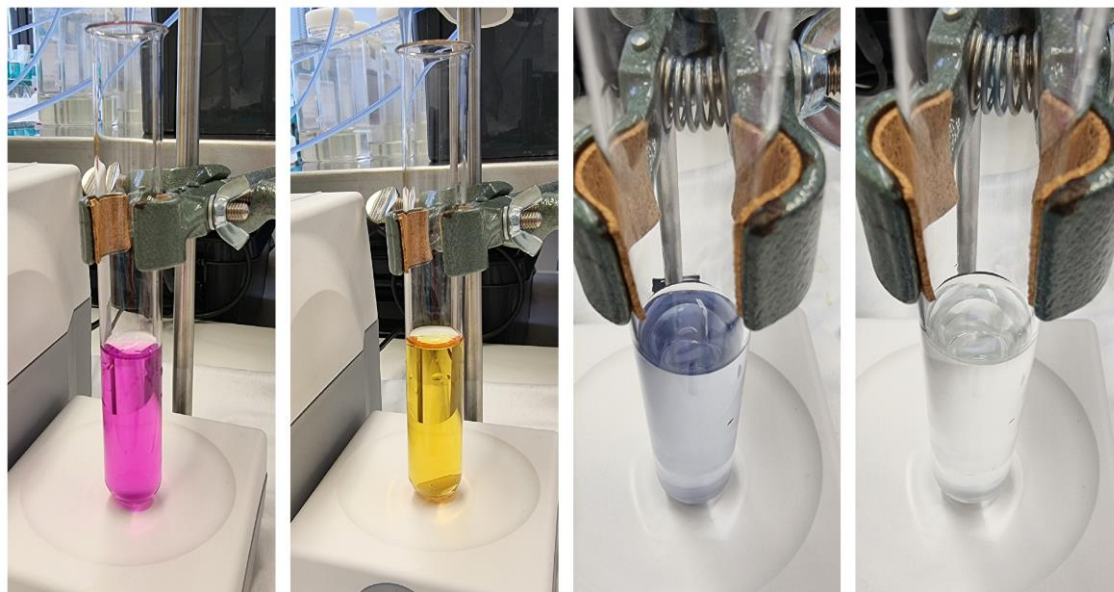
$Mn^{2+}$ -ionit ovat värittömiä ja permanganaatti-ioni taas voimakkaan violetti. Nollanäytteet tehtiin ionivaihdettuun veteen, joten väri pysyi niissä voimakkaan violetina (kuva 4), koska orgaanisen aineen hapettumista ja permanganaatti-ionien pelkistymistä ei tapahtunut.



Kuva 4. Näyteputket kiehutuksen jälkeen (nollanäytteet vasemmassa reunassa)

Huoneenlämpöiseksi jäädytettyyn näytteeseen lisättiin kaliumjodidia. Väritön jodidi hapettuu jodiksi, ja se havaitaan näytteen värin muuttumisena keltaiseksi (kuva 5). Jodidin lisäyksen jälkeen aloitettiin titraus tiosulfaattiliuoksella. Titrauksen loppuvaiheessa lisättiin tärkkelystä indikaattoriksi, jotta selkeän värimuutoksen avulla titrauksen päätepisteen saisi tarkasti määritettyä. Tärkkelys reagoi jodin kanssa muodostaen voimakkaan sinisen värin, jonka avulla ekvivalenttipiste on helposti havaittavissa.

Titratessa tiosulfaattiliuosta näytteeseen tiosulfaatti-ioni hapettuu tetratio-naatti-ioniksi ja jodi pelkistyy takaisin jodidiksi, joka havaitaan värin muuttumise-  
na sinisestä kirkkaaksi. Kuluneen tiosulfaatin määrän avulla saatiin laskettua  
näytteiden kemiallinen hapenkulutus.



Kuva 5. Havainnollistava kuva näytteen värimuutoksista  $\text{COD}_{\text{Mn}}$ -pitoisuuden määrittämisessä

Työturvallisuudesta huolehdittiin käyttämällä tarvittavia henkilösuojaimia ja syntyneet jätteet hävitettiin asianmukaisesti. Kaliumpermanganaattia ja rikkihappoa käsiteltäessä työskenneltiin vetokaapissa.

#### 4.3 Tilastolliset menetelmät

Validointi edellyttää, että menetelmän tietyt parametrit tunnetaan. Validoinnin vaatimukset ja laajuus riippuvat paljon siitä, mitä menetelmää ollaan validoimassa. Laboratorion itse kehittämä menetelmä vaatii laajemman validoinnin kuin virallisen standardimenetelmän validointi. [17, s. 11.] Kun standardimenetelmä otetaan käyttöön sellaisenaan, voidaan olettaa, että menetelmän spesifisyys ja häiriöalttius on jo tarkoin määritetty standardisoinnin yhteydessä. On

kuitenkin tarpeen määrittää yleisimmät ominaisuudet, kuten esimerkiksi määrittäysraja, toistettavuus ja mittausepävarmuus. Saatuja tuloksia on hyvä vielä verrata standardin tuloksiin. [18, s. 8.]

#### 4.3.1 Määrittäysraja

Määrittämällä menetelmän määrittäysraja (LOQ limit of quantification) saadaan selville pienin pitoisuus, joka menetelmällä voidaan määrittää hyväksyttävällä tarkkuudella [17, s. 7].

COD<sub>Mn</sub>-menetelmän määrittäysraja määritettiin tekemällä kahdeksan rinnakkaismäärittystä näytevedellä, jonka pitoisuus oli hyvin pieni. Määrittäykset tehtiin kiviainesnäytteellä. Rinnakkaismäärittäyksistä laskettiin keskihajonta, jonka avulla määritettiin menetelmän määrittäysraja.

Taulukkoon 2 on laskettu COD<sub>Mn</sub> pitoisuudet käyttäen kaavaa 3, jota käsitelty tarkemmin luvussa 2.3.

Taulukko 2. Rinnakkaismäärittäykset

	Tiosulfaatin kulutus (ml)	COD <sub>Mn</sub> (mg/l)
Nollanäyte (V <sub>2</sub> )	2,10	
Rinnakkaismäärittäykset		
1	2,01	0,72
2	2,04	0,48
3	2,04	0,48
4	2,06	0,32
5	2,03	0,56
6	2,05	0,40
7	2,03	0,56
8	2,00	0,80
	Otoskeskihajonta (s)	0,159
	Määrittäysraja (LOQ = 6s)	0,951
	<b>LOQ</b>	<b>1 mg/l</b>

Määrittäysraja (LOQ) laskettiin kaavalla

$$LOQ = 6s, \quad (5)$$

jossa  $s$  on otoskeskihajonta.

Otoskeskihajonta laskettiin kaavalla

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}, \quad (6)$$

jossa  $\bar{x}$  on havaintojen keskiarvo ja  $n$  on havaintojen lukumäärä.

#### 4.3.2 Toistettavuus

Menetelmän toistettavuudella (repeatability) arvioidaan sitä täsmällisyyttä, joka saavutetaan, kun menetelmää toistetaan samassa ympäristössä, samoilla laitteilla, samoissa olosuhteissa ja saman tekijän toimesta [17, s. 4; 18, s. 40].

Tässä menetelmän toistettavuutta arvoitiin tekemällä parittaisia rinnakkaismäärittäyksiä näytteistä eri pitoisuusalueilla. Toistettavuuden arviointiin määrittäyksiä tehtiin useista eri näytesarjoista eri päivinä. Testaus vain yhdellä koesarjalla saattaisi antaa liian optimaalisen tuloksen. Toistettavuus määritettiin rinnakkaismäärittäysten keskihajonnan avulla. Rinnakkaismäärittäysten tulokset taulukossa 3.

Taulukko 3. Parittaiset rinnakkaismääritykset

		Tulos 1	Tulos 2	Keskiarvo	Keskihajonta	Suhteellinen keskihajonta %	
	Näyte-tunniste	$x_1$ (mg/l)	$x_2$ (mg/l)	$\bar{x}$ (mg/l)	$s$ (mg/l)	$s_{ri}$	$s_{ri}^2$
1	23	7,5	7,5	7,5	0,00	0,00	0,00
2	19	5	5,4	5,2	0,28	5,44	29,59
3	25	6	5,9	5,95	0,07	1,19	1,41
4	31	5,7	5,8	5,75	0,07	1,23	1,51
5	1378	1,9	2	1,95	0,07	3,63	13,15
6	1383	1,2	1,2	1,2	0,00	0,00	0,00
7	4	1,5	1,4	1,45	0,07	4,88	23,78
8	56	3,4	3,4	3,4	0,00	0,00	0,00
9	59	1,9	1,8	1,85	0,07	3,82	14,61
10	39	1,7	1,9	1,8	0,14	7,86	61,73
11	54	1,1	1,0	1,05	0,07	6,73	45,35
12	71	7,1	7,1	7,1	0,00	0,00	0,00
13	58	2,1	1,9	2	0,14	7,07	50,00
14	62	2,4	2,2	2,3	0,14	6,15	37,81
15	64	2,2	2,2	2,2	0,00	0,00	0,00
16	65	3	3	3	0,00	0,00	0,00
17	78	8,6	8,5	8,55	0,07	0,83	0,68
					YHT.	48,82	279,62

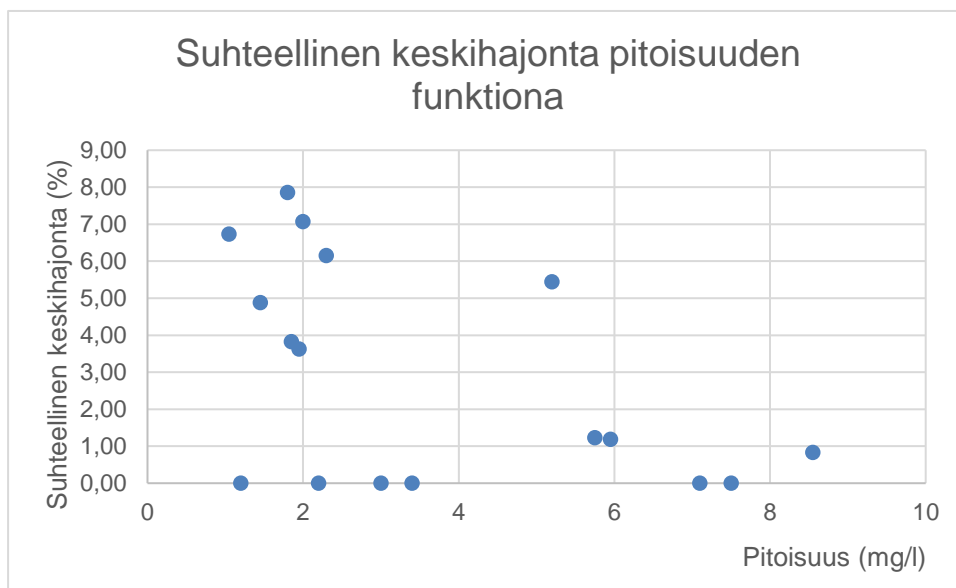
Satunnaisvirheen määrittämistä varten keskihajonnat laskettiin yhdistettynä kaavalla 7 [18, s. 49].

$$s_r = \sqrt{\frac{1}{n} \sum s_{ri}^2} = \sqrt{\frac{1}{17} \cdot 279,62} = 4,06 \% \quad (7)$$

Satunnaisvirheen luottamusväli 95 %:n todennäköisyydellä laskettiin kaavalla 8 [18, s. 49].

$$\pm t_{0,05} \cdot s_r = \pm 2,12 \cdot 4,06 \% = \pm 8,6 \% \quad (8)$$

Parittaisten rinnakkaismäärittysten suhteellinen keskihajonta on kuvattu pitoisuuden funktiona kuvassa 6. Kuvaajasta nähdään pitoisuuden vaikutus keskihajonnan suuruuteen. Suhteellinen keskihajonta on suurempaa pienillä pitoisuuksilla.



Kuva 6. Suhteellinen keskihajonta pitoisuuden funktiona

#### 4.3.3 Kokonaismittausepävarmuus

Mittausepävarmuus (measurement uncertainty) kuvaa tuloksen laadukkuutta. Se kuvaa sitä tulosaluetta, jonka sisällä oikea arvo on tietyllä todennäköisyydellä. Epävarmuuden arvioinnissa tulee ottaa huomioon kaikki ne tekijät, joilla on vaikutusta mittaustulokseen. [19, s. 38.]

Kokonaismittausepävarmuutta määritettäessä tuli ensin tunnistaa epävarmuutta aiheuttavat tekijät. Jokainen mittaus sisältää useita eri epävarmuustekijöitä ja ne tulee huomioida mittausepävarmuutta laskettaessa. Kokonaismittausepävarmuutta laskettaessa huomioitiin sekä satunnaiset että systemaattiset virhelähteet.

Epävarmuuden määrittämiseen käytettiin hyväksi laitteiden ja pipettien kalibroitodistuksia (liite 2), kemikaalien tuotetietoja, laitevalmistajan spesifikaatioita ja toistokokeilla määritettyä menetelmän satunnaisvirhettä. Epävarmuustekijät on merkitty taulukkoon 4.

Kokonaismittausepävarmuuden lisäksi määritettiin menetelmän laajennettu epävarmuus 95 %:n luottamustasolla kertomalla kokonaismittausepävarmuus kertoimella 2.

Taulukko 4. Epävarmuustekijät

	x	±a	u(x)	u(x)/x	u (%)
Menetelmän satunnaisvirhe	1		0,0406	0,0406	4,06
Annosteluyksikkö	1	0,0015	0,000612	0,000612	0,0612
Kaliumpermanganaatti	0,02 mol/l	0,00006	0,0000346	0,001732	0,1732
Natriumtiosulfaatti	0,1 mol/l	0,0002	0,0001155	0,001155	0,1155
Pipetti K053-10931-A	0,25 ml	0,0028	0,0011431	0,004572	0,4572
Pipetti K053-10764-A	1,00 ml	0,0028	0,0011431	0,001143	0,1143
Pipetti K053-10762-A	10,0 ml	0,0375	0,0153093	0,001531	0,1531

Kaliumpermanganaatin tuotespesifikaatioon oli merkitty tuotteen epävarmuudeksi  $\pm 0,00006$  mol/l. Arvo  $\pm a$  on annettu ilman luottamustasoa ja todellisen arvon sijaintia ääriarvoissa voitiin pitää todennäköisenä, joten standardiepävarmuus laskettiin kaavalla 9. [20, s. 26.] Natriumtiosulfaatin standardiepävarmuus laskettiin samalla kaavalla.

$$\frac{a}{\sqrt{3}} = \frac{0,00006}{\sqrt{3}} = 0,000035 \text{ mol/l} \quad (9)$$

Kalibroitodistukseen (liite 2) pipetin K053-10762-A laajennetuksi epävarmuudeksi (U) oli merkitty 10 ml:n mittauksissa  $\pm 0,075$  ml, joten epävarmuudeksi saatiin  $\pm 0,0375$  ml. Sisäiset mittaukset osoittivat, että ääriarvot eivät ole tyypillisiä, joten standardiepävarmuus pipetille laskettiin kaavalla 10. [20, s. 26.]

$$\frac{a}{\sqrt{6}} = \frac{0,0375}{\sqrt{6}} = 0,01531 \text{ ml} \quad (10)$$

Standardiepävarmuus laskettiin kaavalla 10 myös muille käytössä olleille pipe-  
teille sekä titraattorin annosteluyksikölle.

Kaliumpermanganaatin tilavuuden epävarmuus laskettiin kaavalla 11 [21, s. 33].

$$\sigma_V = |V'(c)| \cdot \sigma_c \quad (11)$$

$$\sigma_V = \left| -\frac{n}{c^2} \right| \cdot \sigma_c = \left| -\frac{0,2 \text{ ml} \cdot 0,02 \frac{\text{mol}}{\text{l}} \cdot 0,0000346 \frac{\text{mol}}{\text{l}}}{\left(0,02 \frac{\text{mol}}{\text{l}}\right)^2} \right| = 0,000346 \text{ ml}$$

Kaavan 3 tilavuuskomponenttien epävarmuudet määritettiin käyttäen laskettuja  
standardiepävarmuuksia seuraavasti:

$$u_{(V_1)} = \sqrt{0,000612^2 + 0,00114^2 + 0,00114^2 + 0,0153^2 + 0,000346^2} = 0,0154 \text{ ml}$$

$$u_{(V_2)} = \sqrt{0,000612^2 + 0,00114^2 + 0,00114^2 + 0,0153^2 + 0,000346^2} = 0,0154 \text{ ml}$$

$$u_{(V_2-V_1)} = \sqrt{0,0154^2 + 0,0154^2} = 0,0218 \text{ ml.}$$

Määritetyt epävarmuuskomponentit laskettiin yhdistettynä kaavalla 12.

$$\frac{u_c}{COD_{Mn}} = \sqrt{\left(\frac{u(x_1)}{x_1}\right)^2 + \left(\frac{u(x_2)}{x_2}\right)^2 + \dots + \left(\frac{u(x_i)}{x_i}\right)^2} \quad (12)$$

$$\frac{u_c}{COD_{Mn}} = \sqrt{\left(\frac{u(\text{toistettavuus})}{1}\right)^2 + \left(\frac{u_{(V_2-V_1)}}{(V_2 - V_1)}\right)^2 + \left(\frac{u_{(c_{Na_2S_2O_3})}}{c_{Na_2S_2O_3}}\right)^2}$$

$$= \sqrt{\left(\frac{0,0406}{1}\right)^2 + \left(\frac{0,0218}{1}\right)^2 + \left(\frac{0,000116}{0,1}\right)^2}$$

$$= 0,0461 = 4,6 \%$$

Laajennettu epävarmuus 95 %:n luottamustasolla laskettiin kaavalla 13.

$$U = 2 \cdot u_c = 2 \cdot 4,6 \% = 9,2 \% \quad (13)$$

#### 4.3.4 COD<sub>Cr</sub>- ja COD<sub>Mn</sub>-menetelmien välinen riippuvuus

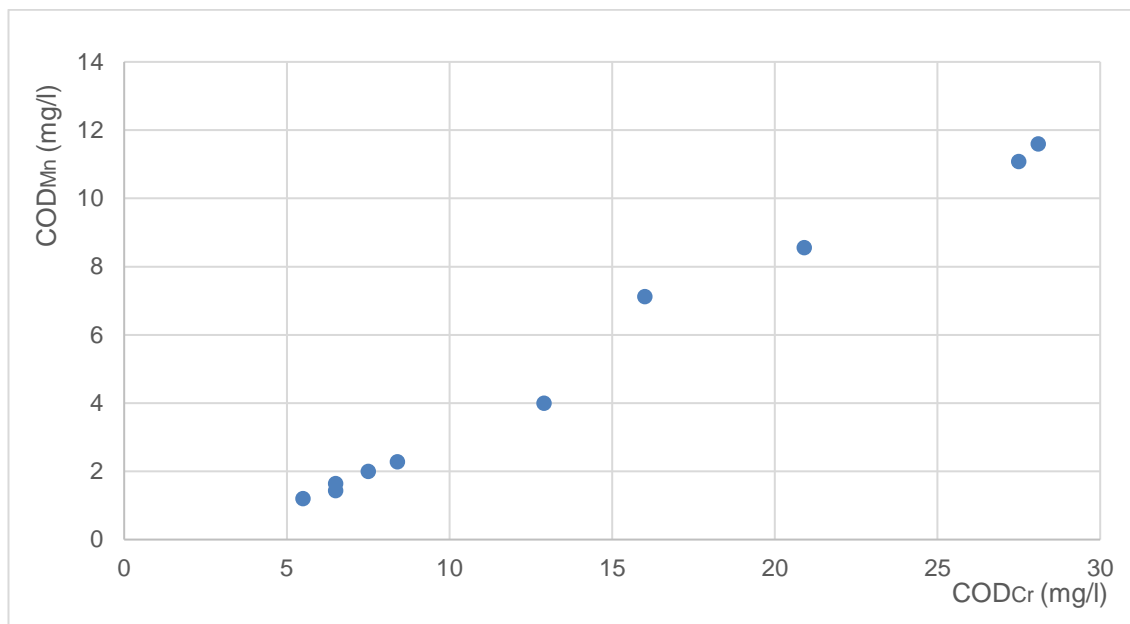
Menetelmien vertailuun valittiin 10 kaivovesinäytettä. Näytteitä pyrittiin saamaan mahdollisimman laajasti koko pitoisuusalueelta. Kustakin näytteestä määritettiin veden kemiallinen hapenkulutus molemmilla menetelmillä (COD<sub>Mn</sub> ja COD<sub>Cr</sub>), ja saadut tulokset on kirjattu taulukkoon 5. Menetelmien lineaarista yhteyttä tutkittiin korrelaatiokerroimen avulla. Korrelaatiokerroin sai arvon 0,994 (taulukossa 5), joka kuvaa vahvaa positiivista korrelaatiota. Korrelaatio kuvaa kahden muuttujan välistä lineaarista riippuvuutta ja se voi saada arvoja välillä -1...1.

Taulukko 5. Pitoisuuden määrittäminen eri menetelmillä

Näytetunniste	COD <sub>Mn</sub> (mg/l)	COD <sub>Cr</sub> (mg/l)
52	11,1	27,5
66	1,64	6,5
44	1,20	5,5
71	7,12	16
58	2,00	7,5
62	2,28	8,4
78	8,56	20,9
66	1,44	6,5
521	11,6	28,1
1145	4,00	12,9
	Korrelaatio	0,9942

Lineaarista riippuvuutta arvioitiin myös p-arvon avulla. Menetelmien välistä riippuvuutta ja korrelaatiokerroimen merkittävyyttä arvioitu p-arvon avulla tarkemmin luvussa 5.4.

Menetelmien lineaarisuutta havainnollistava kuvaaja on kuvassa 7, josta nähdään menetelmien välinen selkeä lineaarinen yhteys. Menetelmien välillä vahva on positiivinen korrelaatio: kun  $COD_{Cr}$ -arvo kasvaa, myös  $COD_{Mn}$ -arvo kasvaa.



Kuva 7.  $COD_{Mn}$ - ja  $COD_{Cr}$ -menetelmien välistä lineaarista yhteyttä havainnollista kuvaaja

Regressioanalyysillä (liite 3) sovitettiin suora, josta saatiin kulmakertoimen arvoksi 0,46 ja leikkauspisteeksi -1,45. Kun suora on muotoa  $y = ax + b$ , saadaan suoran yhtälöksi:  $COD_{Mn} = 0,47 \cdot COD_{Cr} - 1,45$ .

#### 4.4 Tulosten arviointi

##### Määrittäysraja

Määrittäysraja laskettiin kahdeksan rinnakkaismäärittäksen tuloksista. Rinnakkaismäärittäksiin käytettiin kaivovettä, jolla oli pieni  $COD_{Mn}$ -pitoisuus. Määrittäysrajaksi saatiin laskettua 1 mg/l kaavalla 5. Jos haluttaisiin päästä pienempään tulokseen, tulisi käyttää titraattoria tai byrettiä, jolla on vielä parempi titraustarkkuus.

Esimerkiksi titraattorin annosteluyksikön vaihtaminen nykyisestä 50 ml:n yksiköstä pienempään 20 ml:n yksikköön parantaisi titraustarkkuutta 0,025 ml:sta 0,005 ml:aan, ja tällä on jo huomattava vaikutus tarkkuuteen.

Menetelmän lineaarisuutta ei ollut mahdollista määrittää standardisuoran avulla, koska käytettävissä ei ollut standardiliuoksia. Määrittämisessä ei saatu myöskään tarpeeksi dataa suurilta pitoisuuksilta, jota olisi voitu käyttää menetelmän lineaarisen alueen arviointiin. Menetelmän standardissa SFS 3036 on maininta, että pitoisuudeltaan yli 10 mg/l näytteet tulee laimentaa, joten tätä arvoa voidaan pitää mittausalueen ylärajana. Mittausalueen ylärajaa voidaan arvioida uudestaan, kun rutiinimittauksissa on saatu kerättyä lisää dataa myös suurilla pitoisuuksilla.

COD<sub>Mn</sub>-menetelmän määrittämisalueeksi asetettiin 1–10 mg/l. Näytteet, joiden pitoisuus on yli 10 mg/l, tulee laimentaa ja pitoisuus tulee määrittää uudestaan.

### Toistettavuus

Toistettavuuden arviointiin tehtiin 17 parittaista rinnakkaismäärittystä ja näytteitä pyrittiin saamaan mahdollisimman laajasti koko pitoisuusalueelta. Määrittämisä tehtiin kolmena eri päivänä. Toistettavuus määritettiin rinnakkaismäärittysten keskihajonnan avulla (taulukko 3). Yhdistetyksi keskihajonnaksi saatiin lasketua 4,06 % (kaava 7), jonka avulla voitiin määrittää satunnaisvirheen luottamustavalli:

$$\pm t_{0,05} \cdot s_r = \pm 2,12 \cdot 4,06 \% = \pm 8,6 \%$$

SFS 3036 -standardiin on merkitty toistettavuus, joka on määritetty laboratorioissa kahdesta eri vedestä vuonna 1978. Suhteelliseksi keskihajonnaksi oli saatu 16 % ja 12 % vastaavien keskiarvojen ollessa 24 mg/l ja 42 mg/l. Standardiin merkityt keskihajonnat ovat siis suurempia kuin tässä validoinnissa lasketut. Tässä validoinnissa ei ollut näytemateriaalia yhtä suurilla pitoisuuksilla,

joten keskihajontaa ei ollut mahdollista määrittää suurilla pitoisuusalueilla. Standardissa ei ollut mainintaa, mikä näytematriisi määrittäisiin oli valittu tai kuinka monta toistokoetta niillä oli tehty, ja näillä tekijöillä on vaikutusta tulokseen. Standardiin merkityt tulokset on määritetty vuonna 1978, joten voidaan olettaa, että kuluneen 45 vuoden aikana myös mittalaitteiden tarkkuus on parantunut, mikä voi myös osaltaan vaikuttaa tulokseen.

### Kokonaismittausepävarmuus

Kokonaismittausepävarmuuden laskemiseen käytettiin laitteiden kalibroitodistuksiin merkittjä epävarmuuksia, laitevalmistajan spesifikaatioita sekä menetelmän satunnaisvirhettä. Kokonaismittausepävarmuus määritettiin laskemalla yhteen neliöidyt epävarmuuskomponentit ja summasta otettiin neliöjuuri. Kokonaismittausepävarmuudeksi saatiin 4,61 % (kaava 12), jonka avulla laskettiin laajennettu mittausepävarmuus 95 %:n luottamustasolla:

$$U = 2 \cdot u_c = 2 \cdot 4,6 \% = 9,2 \%$$

Menetelmän kokonaismittausepävarmuudeksi saatiin siis 9,2 %. Tavoitteena oli saada alle 20 %:n kokonaismittausepävarmuus ja tavoite tältä osin toteutui. Jos tulokseksi olisi saatu yli 20 %:n kokonaismittausepävarmuus, olisi se vaatinut epävarmuustekijöiden tarkempaa tarkastelua ja uusia mittauksia.

### COD<sub>Cr</sub>- ja COD<sub>Mn</sub>-menetelmien välinen riippuvuus

COD<sub>Cr</sub>- ja COD<sub>Mn</sub>-menetelmien välistä riippuvuutta tarkasteltiin korrelaation avulla. Korrelaatiokerroin sai arvon 0,99 (taulukko 5). Korrelaatiokerroin voi saada arvoja -1...1. Mitä enemmän arvo poikkeaa nolasta, sitä voimakkaampi riippuvuus muuttujien välillä on. Tämän perusteella voidaan siis todeta, että menetelmien välillä on voimakas riippuvuus.

Korrelaatiokerroimen merkitsevyyttä tarkasteltiin myös p-arvon avulla. P-arvo sai arvon  $4,68 \times 10^{-9}$ .

Hypoteesit:

$H_0$ : korrelaatiokerroin = 0

$H_1$ : korrelaatiokerroin  $\neq$  0

Johtopäätökset:

$p\text{-arvo} = 4,68 \times 10^{-9} < 0,001 = \alpha$ ,

joten  $H_0$  hylätään. Korrelaatiokerroin eroaa tilastollisesti merkitsevästi nolasta. Voidaan siis todeta, että korrelaatiokerroin on merkitsevä.

Regressioanalyysin (liite 3) tulosteeseen on laskettu myös standardisoidut residuaalit. Standardisoiduissa residuaaleissa ei ollut itseisarvoltaan yli 3:n residuaaleja, mikä tarkoittaa, ettei ole syytä epäillä kokeessa tapahtuneen virhettä. Havainnon 4 residuaali kuitenkin poikkeaa hieman muista. Havainnon 4 residuaali sai arvon 2,44 muiden havaintojen residuaalien sijoituessa arvojen  $-1,32 \dots 0,52$  välille. Tämä arvo havaitaan myös kuvassa 6 linjasta hieman poikkeavana arvona. On mahdollista, että näytteen käsittelyssä on tapahtunut jokin poikkeama jossain menetelmän vaiheessa, mikä aiheuttaa muista arvoista hieman poikkeavan tuloksen.

#### 4.5 Validoidun menetelmän käyttöönotto laboratoriossa

Validoinnin jälkeen menetelmä voidaan ottaa käyttöön Aqva Finland Oy:n laboratoriossa. Menetelmälle on luotu työohjeet laboratorioon.

Menetelmä ei sovellu vesille, joiden kloridipitoisuus on yli 300 mg/l. On myös huomioitava, että epäorgaanisten aineiden, kuten kloridin, nitriitin, rikkivedyn, rikkidioksidin ja kahdenarvoisen raudan, hapettumisella on vaikutusta tulokseen. [11.]

Näytteiden esikäsitelyssä ja säilytyksessä on huomioitava, että näytteet tulee säilyttää jääkaapissa 1–5 °C:n lämpötilassa valolta suojattuna. Näytteet tulee kestävöidä, jos niitä ei analysoida kahden vuorokauden kuluessa. Kestävöinnillä hidastetaan näytteessä tapahtuvia kemiallisia ja biologisia muutoksia. Kestävöidyt näytteet tulee analysoida 7 vuorokauden kuluessa.

COD<sub>Mn</sub>-menetelmällä saadut analyysitulokset ilmoitetaan kahden merkitsevän numeron tarkkuudella milligrammoina litraa kohden (mg/l) ja tulosilmoituksessa viitataan standardiin SFS 3036 [11].

Sosiaali- ja terveysministeriön asetuksen pienten yksiköiden talousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista 401/2001 mukaisesti talousveden laatusuositus COD<sub>Mn</sub> enimmäispitoisuudeksi on 5 mg/l. Tämä tieto tulee lisätä laboratorion testausselesteisiin menetelmän lisäyksen yhteydessä.

Validointi ei ole kertaluonteinen toimenpide, ja määritetyt parametrit eivät välttämättä pysy vakiona. Kun menetelmän käyttöönoton jälkeen mittausdataa on kerätty laboratoriossa rutiinimittauksissa lisää, on parametrit hyvä määrittää tarvittaessa uudestaan. Parametrien vaihtelua on hyvä seurata sisäisen laadunohjauksen avulla. Esimerkiksi satunnaisvirheen vaihtelua on hyvä seurata pidemmällä aikavälillä määritettyjen rinnakkaistulosten avulla. Mittausepävarmuus on myös hyvä arvioida uudelleen, kun aineistoa on enemmän. Uudelleenvalidointi tulee kyseeseen, jos menetelmään tehdään muutoksia tai sen käyttöä laajennetaan uusille näytematriiseille.

Titraattorin annosteluyksikön vaihtaminen nykyisestä 50 ml:n yksiköstä pienempään 20 ml:n yksikköön parantaisi titraustarkkuutta 0,025 ml:sta 0,005 ml:aan. Tällä tarkkuudella on jo huomattava merkitys pitoisuusarvoja määritettäessä.

## 5 Yhteenveto

Työn tavoitteena oli validoinnin avulla osoittaa SFS 3036 -standardin mukaisen menetelmän soveltuvuus käytettäväksi Aqva Finland Oy:n laboratoriossa. Suoritetun validoinnin ja saatujen tulosten perusteella voitiin todeta, että menetelmä soveltuu käytettäväksi laboratorioon veden kemiallisen hapenkulutuksen määrittämiseen kaivo- ja kunnallisvesistä. Menetelmä pätee testatuille näytematriiseille, pitoisuusalueille ja laitteille.

Validoitujen parametrien avulla saatiin alustava käsitys menetelmän suorituskyvystä ja toimivuudesta käyttötarkoitukseensa. Standardisoidun vertailumateriaalin puuttuminen rajasi validoitavien parametrien määrää suppeammaksi alustavasta suunnitelmasta, koska kaikkia parametrejä ei ollut mahdollista määrittää ilman varmennettua vertailumateriaalia. Validoinnissa määritettiin parametrit, jotka oli mahdollista määrittää käyttäen näytematriiseja ja nollanäytteitä. Määritettyjen parametrien avulla voitiin todeta menetelmän soveltuvuus käyttötarkoitukseensa.

Määritettyjä parametreja on hyvä tarkastella uudestaan, kun laboratoriossa on kerätty lisää mittausdataa rutiinimittauksissa. Toistettavuuden uudelleenarviointiin on hyvä kerätä mittausdataa parittaisilla mittauksilla pidemmällä aikavälillä, jotta tuloksia saataisiin mahdollisimman laajasti koko mittausalueelta satunnaisvirheen arviointiin.

Tulevaisuudessa validointia on mahdollista päivittää tarpeen mukaan. Jos menetelmää halutaan muuttaa tai laajentaa uusille näytematriiseille, se tulee validoida uudestaan.

## Lähteet

- 1 Aqva Finland Oy. Verkkoaineisto. <<https://www.aqva.fi/companyFI>>. Luettu 5.10.2022.
- 2 Humus on luonnollinen osa vesiekosysteemiä. Verkkoaineisto. Turveinfo. <<http://turveinfo.fi/ymparisto/humus/humus-on-luonnollinen-osa-vesiekosysteemia/>>. Luettu 2.9.2021.
- 3 Kangasluoma, Mari & Kainua, Kari. 2012. Turvetuotannon humuskuormitus ja humus vesistössä. Verkkoaineisto. Pöyry. <[http://turveinfo.fi/wp-content/uploads/2017/01/Humusesitys\\_180412.pdf](http://turveinfo.fi/wp-content/uploads/2017/01/Humusesitys_180412.pdf)>. Luettu 5.9.2021.
- 4 Kurri, Anni-Kaisa. 2011. Humuksen karakterisointi ja analytiikka. Pro gradu -tutkielma. Jyväskylän yliopisto.
- 5 Pihlaja, Arja. 2012. Perustietoa humuksesta. Verkkoaineisto. YSY. <<https://www.ysy.fi/@Bin/140239/Perustietoa+humuksesta.pdf>>. Luettu 4.11.2021.
- 6 Nollet, Leo M.L. 2007. Handbook of Water Analysis. 2nd ed. Florida: CRC Press.
- 7 Matilainen, Anu. 2007. Removal of the Natural Organic Matter in the Different Stages of the Drinking Water Treatment Process. Väitöskirja. Tampereen teknillinen yliopisto. Bio- ja ympäristötekniikan laitos.
- 8 Andersen, Tom; Forsius, Martin & Löfgren, Stefan. Veden väri. Verkkoaineisto. <[http://info1.ma.slu.se/IMA/Publikationer/brochure/Veden\\_vari.pdf](http://info1.ma.slu.se/IMA/Publikationer/brochure/Veden_vari.pdf)>. Luettu 10.10.2021.
- 9 SFS 3020. Veden kemiallisen hapen kulutuksen (COD<sub>cr</sub>) määrittäminen. Hapetus dikromaatilla. 1979. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto.
- 10 SFS 5504. Veden kemiallisen hapen kulutuksen (COD<sub>cr</sub>) määrittäminen suljetulla putkimenetelmällä. Hapetus dikromaatilla. 1988. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto.
- 11 SFS 3036. Veden kemiallisen hapen kulutuksen (COD<sub>Mn</sub> -arvon tai KMnO<sub>4</sub> -luvun) määrittäminen. Hapetus permanganaatilla. 1981. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto.

- 12 Oravainen, Reijo. 1999. Vesistötulosten tulkinta -opasvihkonen. Verkkoaineisto. <<https://kvvy.fi/wp-content/uploads/2015/10/opasvihkonen.pdf>>. Luettu 4.11.2021.
- 13 Laboratorioanalyysit. Mitta-analyysi eli volumetria. Verkkoaineisto. Opetushallitus. <[http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat\\_4\\_mitta-analyysi\\_eli\\_volumetria.html](http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_4_mitta-analyysi_eli_volumetria.html)>. Luettu 3.1.2022.
- 14 Lajunen, Lauri & Saarinen, Heikki. 2004. Analyttisen kemian perusteet. 4. muuttamaton painos. Oulu: Oulun yliopistopaino.
- 15 Velimatti, Ollilainen. 2020. Titrimetria. Luentotalenne. <<https://www2.helsinki.fi/fi/unitube/video/45062744-fb3d-4e2b-bfa4-3f92fe060f7d>>. Helsingin yliopisto.
- 16 TitroLine 5000 Titrator. 2018. Operating Manual. SI Analytics. Xylem, Inc. Version 180910.
- 17 Kemiallisten analyysimenetelmien validointiohje. 1997. Elintarvikevirasto. Helsinki.
- 18 Niemi, Ritva; Mäkinen, Irma; Saares, Riitta; Suortti, Anna-Mari & Marjanen, Jari (toim.). Suomen ympäristökeskus. 1996. Ohjeita ympäristönäytteiden kemiallisten analyysimenetelmien validointiin. Helsinki.
- 19 Eurachem. 2014. The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2nd ed.
- 20 Eurachem. 2012. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 3rd ed. Verkkoaineisto. <[https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012\\_P1.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf)>. Luettu 25.3.2022.
- 21 Miller, James & Miller, Jane. 2010. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. 6th ed. New York: Prentice Hall.

# Validointisuunnitelma

## VALIDOINTISUUNNITELMA

### COD<sub>Mn</sub>-MÄÄRITYKSIIN

8.1.2022

#### Kohde/Soveltamisala

Validoinnin kohteena on SFS 3036 mukainen menetelmä veden kemiallisen hapenkulutuksen määrittämiseksi kaivo- ja kunnallisvesistä.

#### Laitteet

Validoinnin yhteydessä otetaan käyttöön Titriline 5000- titraattori ja Grant Aqua Pro - lämpöhaude.

#### Näytteet

Kaivo- ja kunnallisvesiä  
Standardisoitua vertailumateriaalia ei käytössä.

#### Validoitavat parametrit

- Määritysraja
  - Määrittystä varten tehdään rinnakkaismäärittäyksiä (vähintään 8 määrittystä näytteestä, joilla pieni pitoisuus)
- Lineaarisuus
  - Verrataan COD<sub>Mn</sub>- ja COD<sub>C</sub>-menetelmää. Määrittäykset kummallakin menetelmällä kymmenestä näytteestä.
- Toistettavuus
  - Parittaisista määrittäyksistä (~15 määrittystä) laajalta pitoisuusalueelta.
- Mittausepävarmuus
  - Määritetään satunnaiset ja systemaattiset virheet. Lasketaan yhteen neliöidyt epävarmuuskomponentit ja otetaan summasta neliöjuuri.

#### Reagenssit

	LOT	exp
Kaliumpermanganaattiliuos, 0,02mol/l	HC02910321	30.9.2023
Kaliujodidiliuos, 0,1 mol/l	K2012031	28.9.2022
Rikkihappo, 4 mol/l	20J094020	1.10.2022
Natriumtiosulfaattiliuos, 0,01 mol/l	21C034101	25.1.2023
Täikkelys	20J074109	9.9.2025

### Laitteet ja välineet

Pipetit	Volume ( $\mu$ l)
K053-10931-A	100-1000
K053-10764-A	200-1000
K053-10762-A	1000-10000

#### Laitteet

Analyysivaaka
Titraattori TitroLine 5000
Lämpöhaude Grant Aqua Pro

- koeputket
- dekanterilasit
- koeputkiteline

### Kokeet

	Maanantai	Tiistai	Keskiviikko	Torstai	Perjantai
	Nollanäyte (ionivaihdettu vesi)	Nollanäyte	Nollanäyte	Nollanäyte	
COD <sub>Mn</sub> - menetelmällä	Kaivovesi 5x2 (parittaiset) Kunnallisvesi 5x2	Kaivovesi 6x2 (parittaiset)	Kaivovesi 6x2 (parittaiset)	Kaivovesi, jolla pieni pitoisuus (10 rinnakkaismäärittystä)	
COD <sub>Cr</sub> - menetelmällä	Kaivovesi 5x1	Kaivovesi 5x1			

Pidemmällä aikavälillä kerätään rutiininäytteiden mittaustuloksia parametrien uudelleenmäärittämiseksi.

## Laskukaavat

Tarvittavat reagenssiliuosten laimennukset lasketaan kaavalla 1.

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2 \quad (1)$$

COD<sub>Mn</sub>-pitoisuuksien laskemiseen käytetään kaavaa 2.

$$COD_{Mn} = (V_2 - V_1) \cdot c_1 \cdot 800 \cdot f \quad (2)$$

Määrittysrajan laskemiseen käytetään kaavaa 3.

$$LOQ = 6s \quad (3)$$

Parittaisten rinnakkaismääritysten suhteellinen keskihajonta lasketaan kaavalla 4.

$$s_r = \sqrt{\frac{1}{n} \sum s_{ri}^2} \quad (4)$$

Satunnaisvirheen 95 %:n luottamusväli lasketaan kaavalla 5.

$$\pm t_{0.05} \cdot s_r \quad (5)$$

Kokonaismittausepävarmuus lasketaan kaavalla 6.

$$u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + \dots + u_i^2} \quad (6)$$

Laajennettu mittausepävarmuus 95 %:n luottamustasolla lasketaan kaavalla 7.

$$U = 2 \cdot u_c \quad (7)$$

## Symboliluettelo

c	konsentraatio
V	tilavuus
f	laimennuskerroin
s	otoskeskihajonta
s <sub>r</sub>	suhteellinen otoskeskihajonta
t	testisuure
u	epävarmuustekijä
u <sub>c</sub>	kokonaismittausepävarmuus
U	laajennettu epävarmuus

**VASTUUHENKILÖT**

Nimi	Päivämäärä
Annukka Pyrä	18.2.2022
Emma Turpeenniemi	18.2.2022

# Pipettien kalibrointitodistukset

Pipetin K053-10762-A kalibrointitodistus

**Unity** Lab Services

Part of Thermo Fisher Scientific

**Thermo Fisher Scientific Oy**

**Pipette Service Center**

**Rahtikatu 2, FI-80100**

**Finland**

E-mail: info.pipettes@thermofisher.com

**ACCREDITED CALIBRATION LABORATORY**  
PISTON OPERATED PIPETTES

**FINAS**  
Finnish Accreditation Service  
K053 (EN ISO/IEC 17025)

## CALIBRATION REPORT as delivered

K053-10762-A

**Customer:** AQVA Finland Oy /

### Device information

Description:	Finnpipette F1 1-10ml	Manufacturer:	Thermo Fisher Scientific
Cat number:	4641120N	Serial number:	QH01643
Volume:	1000 - 10000 µl	Tip used:	Finntip 10 ml
Number of channels:	1	Calibration date:	7.2.2022
		Operator:	1826

### Calibration conditions:

Environmental device:	Almemo 2390-5	Balance type:	Sartorius MC210S
Environmental device s/n:	H06040297	Balance serial number:	91007112
Water Temperature (°C):	21,3	Evaporation trap in use:	Yes
Air temperature (°C):	22,1	Z correction factor (µl/mg):	1,0032
Air Pressure (hPa):	984,2	Y correction factor ((1/K)xK):	0,9991

### Measurement procedure

The calibration laboratory of Thermo Fisher Scientific Oy for piston operated pipettes (K053) has been accredited by FINAS (Finnish Accreditation Service) according to EN ISO/IEC 17025. The calibration is performed using the gravimetric test method according to Thermo Fisher Scientific standard operating procedure. The SOP follows the guidelines of the EN ISO 8655-6 standard. The device is calibrated for delivery (Ex) of the test liquid. The used test liquid is distilled/deionized water fulfilling the ISO 3696 Grade 3 requirements. The mass/volume conversion is done using the conversion table stated in EN ISO 8655-6 (Annex A). The obtained result is converted to correspond the reference temperature of 20 °C. Calculations are done using the following formula:  $V(\mu\text{l}) = m(\text{mg}) \times Z (\mu\text{l}/\text{mg}) \times Y ((1/K) \times K)$ . With variable volume devices the maximum volume, 50 % of the maximum volume and the minimum volume of the range or 10 % of the maximum volume (the higher value is used) are tested. With Fixed volume devices the nominal volume is tested. Ten (10) measurements are performed at each test volume.

### Measuring conditions

The test device is held at the calibration laboratory for minimum of 2 hours time to reach the temperature equilibrium. The environmental conditions of the laboratory are monitored and recorded during the calibration procedure. An evaporation trap is used to reduce the effect of liquid evaporation from the weighing containers.

### Measurement uncertainty

The stated uncertainty is the expanded uncertainty obtained by multiplying the calculated uncertainty with a coverage factor  $k = 2$ . This corresponds the statistical confidence level of 95%. The uncertainty budget is defined by company SOP following the guidelines of ISO/TR 20461 and fulfilling the requirements stated in the guide EA 4/02. The uncertainty budget contains a factor covering the operator difference.

### Traceability

The traceability of the volumetric device calibration result is based on accredited balance and environmental device calibration, which can be tracked to national and international standards. The mass-volume conversion is done according to EN ISO 8655-6 standard.

**Device conformity status: PASSED**

**Laboratory responsible:**  
(Signature and date)

  
Elina Maaranen

9.2.2022  
Date

Reproduction of the complete report is allowed. Parts of the report may only be reproduced with written approval of the calibration laboratory.

page 1 / 2

**RESULT SUMMARY AND VERIFICATION**

The systematic error (A) and the random error (s) of the volumetric device are compared to EN ISO 8655 acceptance specifications. The expanded measurement uncertainty (U) is not taken into consideration when assessing the status (PASSED or FAILED).

The expanded uncertainty values are obtained using coverage factor k=2.

	Volume ( $\mu\text{l}$ )	Mean vol. ( $\mu\text{l}$ )	A ( $\pm\mu\text{l}$ )	EN ISO 8655 ( $\pm\mu\text{l}$ )	Status	s ( $\mu\text{l}$ )	EN ISO 8655 ( $\mu\text{l}$ )	Status	U ( $\pm\mu\text{l}$ )
<b>Channel</b>	<b>1000</b>	<b>1001,0</b>	<b>1,0</b>	<b>60,0</b>	<b>PASSED</b>	<b>2,5</b>	<b>30,0</b>	<b>PASSED</b>	<b>40,9</b>
<b>1</b>	<b>5000</b>	<b>5004,6</b>	<b>4,6</b>	<b>60,0</b>	<b>PASSED</b>	<b>3,6</b>	<b>30,0</b>	<b>PASSED</b>	<b>41,0</b>
	<b>10000</b>	<b>10004,2</b>	<b>4,2</b>	<b>60,0</b>	<b>PASSED</b>	<b>4,8</b>	<b>30,0</b>	<b>PASSED</b>	<b>75,0</b>

**MEASUREMENT RESULTS**

Channel	1	1	1
Volume ( $\mu\text{l}$ )	1000	5000	10000
1	1000,0	5000,2	10012,5
2	1000,2	5003,9	10006,7
3	1004,9	5006,0	10002,9
4	1002,0	4998,5	10011,2
5	997,9	5001,2	9998,6
6	1001,1	5006,3	10006,0
7	1004,1	5008,4	10000,2
8	996,7	5009,5	9999,4
9	1002,5	5004,9	10001,7
10	1001,3	5007,0	10003,3

Comments: Tip lot: 2115480

Pipette has been adjusted

**Device conformity status: PASSED**

## Pipetin K053-10764-A kalibroitodistus

**Unity** Lab Services

Part of Thermo Fisher Scientific

Thermo Fisher Scientific Oy

Pipette Service Center

Rahtikatu 2, FI-80100

Finland

E-mail: info.pipettes@thermofisher.com

ACCREDITED CALIBRATION LABORATORY  
PISTON OPERATED PIPETTES**CALIBRATION REPORT as delivered**

K053-10764-A

**Customer :** AQVA Finland Oy /**Device information**

Description : Proline 200-1000µl  
 Cat number : BHM0070  
 Volume : 200 - 1000 µl  
 Number of channels : 1

Manufacturer : Bichit  
 Serial number : 2992-A WK- T  
 Tip used : FinnTip 1000  
 Calibration date : 8.2.2022  
 Operator : 1826

**Calibration conditions :**

Environmental device: Almemo 2390-5  
 Environmental device sn: H06040297  
 Water Temperature (°C): 21,5  
 Air temperature (°C): 21,4  
 Air Pressure (hPa): 990,8

Balance type : Sartorius MC210S  
 Balance serial number : 91007112  
 Evaporation trap in use : Yes  
 Z correction factor (µl/mg) : 1,0032  
 Y correction factor ((1/K)xK) : 0,9994

**Measurement procedure**

The calibration laboratory of Thermo Fisher Scientific Oy for piston operated pipettes (K053) has been accredited by FINAS (Finnish Accreditation Service) according to EN ISO/IEC 17025. The calibration is performed using the gravimetric test method according to Thermo Fisher Scientific standard operating procedure. The SOP follows the guidelines of the EN ISO 8655-6 standard. The device is calibrated for delivery (Ex) of the test liquid. The used test liquid is distilled/deionized water fulfilling the ISO 3696 Grade 3 requirements. The mass/volume conversion is done using the conversion table stated in EN ISO 8655-6 (Annex A). The obtained result is converted to correspond the reference temperature of 20 °C. Calculations are done using the following the formula:  $V(\mu\text{l}) = m(\text{mg}) \times Z (\mu\text{l}/\text{mg}) \times Y ((1/K) \times K)$ . With variable volume devices the maximum volume, 50 % of the maximum volume and the minimum volume of the range or 10 % of the maximum volume (the higher value is used) are tested. With Fixed volume devices the nominal volume is tested. Ten (10) measurements are performed at each test volume.

**Measuring conditions**

The test device is held at the calibration laboratory for minimum of 2 hours time to reach the temperature equilibrium. The environmental conditions of the laboratory are monitored and recorded during the calibration procedure. An evaporation trap is used to reduce the effect of liquid evaporation from the weighing containers.

**Measurement uncertainty**

The stated uncertainty is the expanded uncertainty obtained by multiplying the calculated uncertainty with a coverage factor  $k = 2$ . This corresponds the statistical confidence level of 95%. The uncertainty budget is defined by company SOP following the guidelines of ISO/TR 20461 and fulfilling the requirements stated in the guide EA 4/02. The uncertainty budget contains a factor covering the operator difference.

**Traceability**

The traceability of the volumetric device calibration result is based on accredited balance and environmental device calibration, which can be tracked to national and international standards. The mass-volume conversion is done according to EN ISO 8655-6 standard.

**Device conformity status: PASSED**

**Laboratory responsible :**  
 (Signature and date)

*Elina Maaranen*  
 Elina Maaranen

9.2.2022  
 Date

Reproduction of the complete report is allowed. Parts of the report may only be reproduced with written approval of the calibration laboratory.

page 1 / 2

**RESULT SUMMARY AND VERIFICATION**

The systematic error (A) and the random error (s) of the volumetric device are compared to EN ISO 8655 acceptance specifications. The expanded measurement uncertainty (U) is not taken into consideration when assessing the status (PASSED or FAILED).

The expanded uncertainty values are obtained using coverage factor k=2.

	Volume ( $\mu$ l)	Mean vol. ( $\mu$ l)	A ( $\pm\mu$ l)	EN ISO 8655 ( $\pm\mu$ l)	Status	s ( $\mu$ l)	EN ISO 8655 ( $\mu$ l)	Status	U ( $\pm\mu$ l)
<b>Channel</b>	<b>200</b>	<b>199,1</b>	<b>-0,9</b>	<b>8,0</b>	<b>PASSED</b>	<b>0,5</b>	<b>3,0</b>	<b>PASSED</b>	<b>5,5</b>
<b>1</b>	<b>500</b>	<b>501,5</b>	<b>1,5</b>	<b>8,0</b>	<b>PASSED</b>	<b>0,3</b>	<b>3,0</b>	<b>PASSED</b>	<b>5,6</b>
	<b>1000</b>	<b>1000,5</b>	<b>0,5</b>	<b>8,0</b>	<b>PASSED</b>	<b>1,0</b>	<b>3,0</b>	<b>PASSED</b>	<b>5,6</b>

**MEASUREMENT RESULTS**

Channel	1	1	1
Volume ( $\mu$ l)	200	500	1000
1	199,9	501,8	1001,9
2	199,2	501,3	1002,4
3	198,5	501,1	1001,0
4	198,8	501,6	1000,4
5	198,6	500,8	999,9
6	198,8	502,0	1000,3
7	198,8	501,7	999,8
8	199,8	501,4	1000,1
9	199,1	501,6	999,4
10	199,5	501,6	999,8

**Comments:** Tip lot: 18338U0\_2992-A WK-T 1902  
Pipette has been adjusted

**Device conformity status: PASSED**

Pipetin K053-10931-A kalibroitodistus

**Unity Lab Services**

Part of Thermo Fisher Scientific

Thermo Fisher Scientific Oy

Pipette Service Center

Rahtikatu 2, FI-80100

Finland

E-mail: info.pipettes@thermofisher.com

**ACCREDITED CALIBRATION LABORATORY**

PISTON OPERATED PIPETTES



**CALIBRATION REPORT as delivered**

K053-10931-A

**Customer :** AQUVA Finland Oy /

**Device information**

Description : Finnipette F2 100-1000µl  
Cat number : 4642090  
Volume : 100 - 1000 µl  
Number of channels : 1

Manufacturer : Thermo Fisher Scientific  
Serial number : MH69600  
Tip used : Finnip Flex 1000  
Calibration date : 24.2.2022  
Operator : 4578

**Calibration conditions :**

Environmental device: Almemo 2390-5  
Environmental device sn: H06040297  
Water Temperature (°C): 21.8  
Air temperature (°C): 22.0  
Air Pressure (hPa) : 992.6

Balance type : Sartorius MC210S  
Balance serial number : 91007112  
Evaporation trap in use : Yes  
Z correction factor (µl/mg) : 1.0033  
Y correction factor ((1/K)xK) : 0.9991

**Measurement procedure**

The calibration laboratory of Thermo Fisher Scientific Oy for piston operated pipettes (K053) has been accredited by FINAS (Finnish Accreditation Service) according to EN ISO/IEC 17025. The calibration is performed using the gravimetric test method according to Thermo Fisher Scientific standard operating procedure. The SOP follows the guidelines of the EN ISO 8655-6 standard. The device is calibrated for delivery (Ex) of the test liquid. The used test liquid is distilled/deionized water fulfilling the ISO 3696 Grade 3 requirements. The mass/volume conversion is done using the conversion table stated in EN ISO 8655 6 (Annex A). The obtained result is converted to correspond the reference temperature of 20 °C. Calculations are done using the following formula:  $V(\mu l) = m(mg) \times Z (\mu l/mg) \times Y ((1/K) \times K)$ . With variable volume devices the maximum volume, 50 % of the maximum volume and the minimum volume of the range or 10 % of the maximum volume (the higher value is used) are tested. With Fixed volume devices the nominal volume is tested. Ten (10) measurements are performed at each test volume.

**Measuring conditions**

The test device is held at the calibration laboratory for minimum of 2 hours time to reach the temperature equilibrium. The environmental conditions of the laboratory are monitored and recorded during the calibration procedure. An evaporation trap is used to reduce the effect of liquid evaporation from the weighing containers.

**Measurement uncertainty**

The stated uncertainty is the expanded uncertainty obtained by multiplying the calculated uncertainty with a coverage factor  $k = 2$ . This corresponds the statistical confidence level of 95%. The uncertainty budget is defined by company SOP following the guidelines of ISO/TR 20481 and fulfilling the requirements stated in the guide EA 4/02. The uncertainty budget contains a factor covering the operator difference.

**Traceability**

The traceability of the volumetric device calibration result is based on accredited balance and environmental device calibration, which can be tracked to national and international standards. The mass-volume conversion is done according to EN ISO 8655-6 standard.

**Device conformity status: PASSED**

**Laboratory responsible :**  
(Signature and date)

*Elina Maaranen*  
Elina Maaranen

25.2.2022  
Date

Reproduction of the complete report is allowed. Parts of the report may only be reproduced with written approval of the calibration laboratory.

page 1 / 2

**RESULT SUMMARY AND VERIFICATION**

The systematic error (A) and the random error (s) of the volumetric device are compared to EN ISO 8655 acceptance specifications. The expanded measurement uncertainty (U) is not taken into consideration when assessing the status (PASSED or FAILED).

The expanded uncertainty values are obtained using coverage factor k=2.

	Volume ( $\mu\text{l}$ )	Mean vol. ( $\mu\text{l}$ )	A ( $\pm\mu\text{l}$ )	EN ISO 8655 ( $\pm\mu\text{l}$ )	Status	s ( $\mu\text{l}$ )	EN ISO 8655 ( $\mu\text{l}$ )	Status	U ( $\pm\mu\text{l}$ )
<b>Channel 1</b>	<b>100</b>	<b>100,6</b>	<b>0,6</b>	<b>8,0</b>	<b>PASSED</b>	<b>0,3</b>	<b>3,0</b>	<b>PASSED</b>	<b>5,5</b>
	<b>500</b>	<b>501,4</b>	<b>1,4</b>	<b>8,0</b>	<b>PASSED</b>	<b>0,5</b>	<b>3,0</b>	<b>PASSED</b>	<b>5,6</b>
	<b>1000</b>	<b>1002,2</b>	<b>2,2</b>	<b>8,0</b>	<b>PASSED</b>	<b>1,2</b>	<b>3,0</b>	<b>PASSED</b>	<b>5,6</b>

**MEASUREMENT RESULTS**

Channel Volume ( $\mu\text{l}$ )	1 100	1 500	1 1000
1	100,1	500,6	999,5
2	100,6	500,5	1001,9
3	100,4	501,8	1001,7
4	100,5	501,0	1002,4
5	101,0	501,5	1002,7
6	100,6	501,4	1004,3
7	101,2	501,9	1002,0
8	100,6	501,6	1001,8
9	100,7	501,6	1002,4
10	100,3	501,8	1003,2

Comments: Tip lot: 20055A0

**Device conformity status: PASSED**

## Regressioanalyysi

Excelin regressioanalyysi COD<sub>Mn</sub>- ja COD<sub>Cr</sub>-menetelmien vertailuun.

### YHTEENVETO TULOSTUS

Regressiotunnusluvut	
Kerroin R	0,994218072
Korrelaatiok	0,988469575
Tarkistettu k	0,987028272
Keskivirhe	0,470225762
Havainnot	10

### ANOVA

	va	NS	KN	F	F:n tarkkuus	
Regressio	1	151,6424619	151,6424619	685,8166	4,8557E-09	<p-arvo
Jäännös	8	1,768898135	0,221112267			
Yhteensä	9	153,41136				

	Kertoimet	Keskivirhe	t Tunnusluvut	P-arvo	Alin 95%	Ylin 95%	Alin 95,0%	Ylin 95,0%
Leikkauspiste	-1,451204503	0,290754714	-4,99116415	0,001065	-2,121686074	-0,780722931	-2,12169	-0,78072
CODCr (mg/l)	0,468040379	0,017872254	26,18810024	4,86E-09	0,426826888	0,509253871	0,426827	0,509254

### JÄÄNNÖSTULOSTUS

Havainto	Ennustettu CODMn (mg/l)	Residuaalit	Standardoidut residuaalit
1	11,41990593	-0,339905928	-0,766705505
2	1,591057963	0,048942037	0,110395631
3	1,123017584	0,076982416	0,17364464
4	6,037441566	1,082558434	2,441862416
5	2,059098342	-0,059098342	-0,133304602
6	2,480334684	-0,200334684	-0,451882983
7	8,330839425	0,229160575	0,516903826
8	1,591057963	-0,151057963	-0,340732427
9	11,70073016	-0,100730156	-0,227210997
10	4,58651639	-0,58651639	-1,322969999

### TODENNÄKÖISYYS TULOSTUS

Prosenttipiste	CODMn (mg/l)
5	1,2
15	1,44
25	1,64
35	2
45	2,28
55	4
65	7,12
75	8,56
85	11,08
95	11,6