

Teemu Pesälä

**KOKONAISTYPEN MÄÄRITYSMENETELMÄN VALIDOINTI KIIN-
TEISTÄ YMPÄRISTÖNÄYTTEISTÄ**

KOKONAISTYPEN MÄÄRITYSMENETELMÄN VALIDOINTI KIIN- TEISTÄ YMPÄRISTÖNÄYTTEISTÄ

Teemu Pesälä
Opinnäytetyö
Kevät 2016
Laboratorioalan koulutusohjelma
Oulun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun seudun ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma, laiteanalytiikan sv

Tekijä: Teemu Pesälä

Opinnäytetyön nimi: Kokonaistypen määritysmenetelmän validointi kiinteistä ympäristönäytteistä

Työn ohjaajat: Ilkka Välimäki, Matti Nieminen

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Kevät 2016

Sivumäärä: 30 + 3 liitettä

Tämän opinnäytetyön aiheena oli kiinteiden ympäristönäytteiden kokonaistypen määritysmenetelmän validointi. Validointi tehtiin akkreditointia varten. Validoitu analyysimenetelmä perustuu Kjeldahl-menetelmään.

Validoinnin tavoitteena oli osoittaa menetelmän tulosten luotettavuus sekä oikeellisuus ja määrittää sen suorituskykyä kuvaavia tunnuslukuja, kuten mittausalue, määritysraja jne. Näiden määrittämiseksi analysoitiin sertifioituja vertailumateriaaleja, QC-liuosta eri pitoisuustasoilla sekä reaalisista näytteistä tehtyjä duplikaatteja.

Validoinnin tulosten perusteella menetelmä toimii hyvin, eikä akkreditoinnin myöntämiselle pitäisi olla estettä.

Asiasanat: kokonaistyyppi, kjeldahl, validointi

SISÄLLYS

TIIVISTELMÄ	3
SISÄLLYS	4
1 JOHDANTO	6
2 KOKONAISTYYPPI	7
3 KOKONAISTYYPEN MÄÄRITYSMENETELMIÄ	8
3.1 Kjeldahl-menetelmä	8
3.1.1 Hajotus	8
3.1.2 Tislaus	10
3.1.3 Titraus	11
3.2 Dumas-menetelmä	12
4 MENETELMÄN VALIDOINTI	14
4.1 Selektiivisyys ja spesifisyys	14
4.2 Lineaarisuus ja mittausalue	15
4.3 Toteamisraja ja määrittäysraja	16
4.4 Poikkeama	17
4.5 Saanto	18
4.6 Häiriökestävyys/toimintavarmuus	19
4.7 Tarkkuus, oikeellisuus ja toistotarkkuus	19
4.8 Toistettavuus	20
4.9 Mittausepävarmuus	20
5 VALIDOITAVA MENETELMÄ	22
6 VALIDOINNIN SUORITUS	23
6.1 Toteamis- ja määrittäysraja	23
6.2 Mittausalue	23
6.3 Oikeellisuus, tarkkuus ja laboratorion poikkeama	24
6.4 Laboratorion sisäinen uusittavuus	24
6.5 Mittausepävarmuus	24
6.5.1 Laboratorion poikkeama	25
6.5.2 Laboratorion sisäinen uusittavuus	26
7 VALIDOINNIN TULOKSET	27
8 YHTEENVETO	29

LÄHTEET

30

LIITTEET

Liite 1 Vertailumateriaalien analyysitulokset

Liite 2 Duplikaattinäytteiden analyysitulokset

Liite 3 QC-liuoksen analyysitulokset

1 JOHDANTO

Tämä opinnäytetyö tehtiin Ahma Ympäristö Oy:n Oulun toimipisteelle (entinen Suomen Ympäristöpalvelu Oy). Työn tarkoituksena oli validoida yrityksen sisäinen kiinteiden ympäristönäytteiden kokonaistypen määrittäminen menetelmä. Menetelmä on ollut yrityksen käytössä pitkään, ja se haluttiin validoida uudelleen akkreditointia varten.

Validoinnin tavoitteena oli osoittaa menetelmän antamien tulosten oikeellisuus ja luotettavuus sekä määrittää menetelmän suorituskykyä kuvaavia tunnuslukuja. Laboratorion poikkeamaa, oikeellisuutta ja tarkkuutta arvioitiin sertifioidujen vertailumateriaalien avulla. Laboratorion sisäistä uusittavuutta arvioitiin OC-liuoksen ($n > 20$) sekä reaalista näytteistä tehtyjen duplikaattien ($n = 50$) avulla.

2 KOKONAISTYYPPI

Kokonaistyyppi (Total Nitrogen, TN) määritellään ammoniumtypen (NH_4^+), nitraattitypen (NO_3^-), nitriittitypen (NO_2^-) ja orgaanisen typen (N_{org}) summana. Kjeldahl-tyyppi (N_{kjel}) määritellään ammoniumtypen ja orgaanisen typen summana. (1, s. 1.)

$$N_{kjel} = NH_4^+ + N_{org}$$

Siten kokonaistyyppi voidaan määritellä Kjeldahl-typen, nitraattitypen ja nitriittitypen summana.

$$TN = N_{kjel} + NO_3^- + NO_2^-$$

Tässä opinnäytetyössä kokonaistypellä tarkoitetaan useimmiten Kjeldahl-tyyppiä.

3 KOKONAISTYPEN MÄÄRITYSMENETELMIÄ

Kokonaistypen määrittämiseen on kaksi toisistaan hyvin paljon poikkeavaa menetelmää. Tunnetumpi näistä on klassinen Kjeldahl-menetelmä. Kjeldahl-menetelmän on kehittänyt tanskalainen kemisti Johan Kjeldahl 1800-luvulla (2, s. 3). Kjeldahl työskenteli Carlsbergin olutpanimon laboratoriossa, ja yksi hänen tehtävistään oli kehittää nopea ja toistettava menetelmä typen määrittämiseen, jolla pysyisi määrittämään proteiinipitoisuuden viljan jyvistä (3, s.11). Näin syntyi Kjeldahl-menetelmä, jonka Kjeldahl esitteli Danish Chemical Societyn tapaamisessa vuonna 1883 (2, s. 3).

Toisen, Kjeldahl-menetelmää vanhemman, kehitti ranskalainen kemisti Jean-Baptiste Dumas vuonna 1831. Dumas-menetelmää kutsutaan usein myös polttomenetelmäksi. (4, s. 1.)

3.1 Kjeldahl-menetelmä

Kjeldahl-menetelmä koostuu kolmesta osasta, jotka ovat hajotus, tislauksen ja titraus. Ensimmäiseksi tehtävä hajotus on näistä osista kaikkein tärkein ja myös monimutkaisin suorittaa. (3, s. 11.)

3.1.1 Hajotus

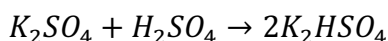
Hajotuksen tarkoituksena on saada näytteessä oleva orgaaninen typi muutettua ammoniumioneiksi (5, s.10). Hajoaminen saadaan aikaan lisäämällä näytteeseen konsentroitua rikkihappoa (H_2SO_4) ja kuumentamalla näytettä korkeassa lämpötilassa.

Hajotusta ennen näyte esikäsitellään, jonka tarkoituksena on homogenisoida näyte. Tarvittaessa näyte kuivataan ennen homogenisointia ja kuiva-ainepitoisuus lasketaan. Suositeltava partikkelikoko näytteelle on alle 1 mm. (5, s. 19.)

Näytettä punnitaan hajotukseen 0,5–5 g sen mukaan, mikä on näytteen oletettu typpipitoisuus (5, s. 18). Mikäli näyte on nestemäinen (esim. jätevesi), sopiva näytemäärä on 25–100 ml (5, s. 20).

Klassisessa Kjeldahl-menetelmässä rikkihappoa lisätään 25 ml näytegrammaa kohden. Nykyaikaisilla hajotusblokeilla rikkihappoa käytetään yleensä 12 ml grammaa kohti. Lopullinen rikkihapon määrä riippuu näytetyypistä ja mahdollisista muista hajotukseen lisätyistä reagensseista. Yleensä hajotukseen lisätään suolaa ja katalyyttiä. Pelkän rikkihapon käyttäminen ei ole käytännöllistä, koska tällöin hajotuksen rajoittavana tekijänä on rikkihapon kiehumispiste 338 °C. Hajotuksen kriittinen lämpötila on 373 °C, jonka ylittämiseksi lisätään suolaa hajotukseen. (3, s. 17, 18.)

Suolana käytetään kaliumsulfaattia (K_2SO_4), koska se liukenee hyvin rikkihappoon. Muita suoloja on kokeiltu useita kertoja historian saatossa, mutta ne eivät ole onnistuneet korvaamaan kaliumsulfaattia. (3, s. 22.) Osa kaliumsulfaatista reagoi rikkihapon kanssa muodostaen kaliumvetysulfaattia alla olevan reaktioyhtälön mukaisesti:



Yksi gramma kaliumvetysulfaattia kuluttaa n. 0,3 ml rikkihappoa, mikä täytyy ottaa huomioon hapon määrässä. (3, s. 19.)

Hapon ja suolan suhde on yksi tärkeimmistä tekijöistä hajotuksessa. Suhde lasketaan jakamalla rikkihapon määrä (ml) kaliumsulfaatin määrällä (g). Optimaalisella happo-suolasuhteella saadaan hapon kiehumispiste säädettyä sopivaksi. Optimaalinen suhde riippuu näytetyypistä. Tyypillinen suhde hajotuksen alkaessa on 1,4–2,0. Näytteille, joilla hapon kulutus on suuri (esim. rasvaiset näytteet), suhde hajotuksen alkaessa voi olla jopa 2,5–2,8. (3, s. 23.)

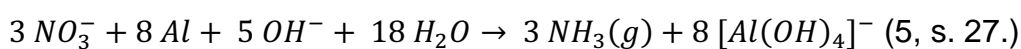
Mikäli suhde on liian korkea, hapon kiehumispiste nousee liian korkeaksi. Tällöin on mahdollista, että osa näytteessä olevasta typestä haihtuu pois typpikaasuna (N_2). Liian matalalla suhteella puolestaan hajotusaika pitenee. (3, s. 23.) Lisäksi liian matalalla suhteella voi tapahtua ulossuolautumista näytteseoksen jäähtyessä hajotuksen jälkeen. Tällöin seoksen sisään voi jäädä happotaskuja, jotka reagoivat kiivaasti tislausvaiheessa. (2, s. 4.)

Hajotuksen keston ja tehokkuuteen voidaan vaikuttaa suolan lisäksi myös katalyyteillä (3, s. 24). Tyypillisimmät katalyytit ovat elohopea, kupari, titaani ja

seleeni (5, s. 22). Näistä elohopea on kaikkein tehokkain katalyytti. Elohopea muodostaa hajotuksen aikana kompleksin ammoniumionien kanssa, joka on rikottava hajotuksen jälkeen lisäämällä siihen natriumsulfiittia tai natriumtiosulfaattia (2, s. 4). Negatiivisten ympäristövaikutuksien takia elohopean sijasta käytetään nykyään muita katalyyttejä. Korvaaviksi katalyyteiksi on valikoitunut pääasiassa kupari ja jossain määrin myös seleeni. Näitä käytetään yli 90 %:ssa nykyään tehtävistä hajotuksista. Kupariyhdisteistä käytetään etenkin kuparisulfaattia ($CuSO_4$), joka on hyvä kompromissi nopeuden, tehokkuuden ja ympäristövastavuuden välillä. (3, s. 26.)

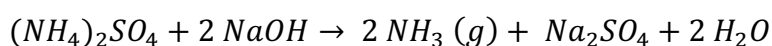
Kjeldahl-menetelmä kehitettiin alun perin proteiinien määrittämiseen. Suolan ja katalyyttien lisäämisen myötä se laajeni myös muun tyyppisiin näytteisiin. On kuitenkin tyyppiyhdisteitä, joita ei saada hajotuksessa muuttumaan ammoniumioneiksi suola- ja katalyyttilisäyksistä huolimatta. Tällaisia ns. refraktorisia yhdisteitä ovat yhdisteet, joissa typpi on hapettuneessa tai rengasrakenteisessa muodossa. Näytteet, jotka sisältävät refraktorisia yhdisteitä, täytyy käsitellä ennen hajotusta tai hajotuksen jälkeen. (3, s. 28, 35.)

Esimerkiksi nitraattityppi (NO_3^-) on refraktorinen yhdiste. Nitraattitypen määrittämiseksi näyte täytyy käsitellä pelkistimellä. Yksi käytetty pelkistin nitraattitypen määrittämiseen on Devardan seos. Devardan seos on lejeerinki, joka koostuu alumiinista (44–46 %), kuparista (49–51 %) ja sinkistä (4–6 %). Devardan seos pelkistää nitraattitypen ammoniumioneiksi seuraavan reaktioyhtälön mukaisesti:



3.1.2 Tislaus

Hajotuksen jälkeen näytteseoksen annetaan jäähtyä ja yleensä näyte laimennetaan vedellä. Tämän jälkeen näytteeseen lisätään konsentroitua natriumhydroksidia ($NaOH$) niin paljon, että näytteseos on riittävän emäksinen ($pH > 11$). Natriumhydroksidin tarkoitus on muuttaa ammoniumionit ammoniakiksi alla olevan reaktioyhtälön mukaisesti:



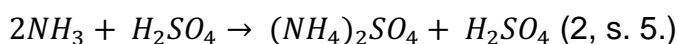
Natriumhydroksidin lisäämisen jälkeen näyteseosta sekoitetaan ja käynnistetään lämmitys. (2, s. 4.)

Tislauksessa vapautuva ammoniakkikaasu johdetaan vastaanottoliuokseen, jonka tehtävänä on absorboida ammoniakkikaasu. Vastaanottoliuoksena käytetään joko tunnettua happoliuosta (H_2SO_4 tai HCl) tai boorihapon (H_3BO_3) vesiliuosta. Vastaanottoliuokseen lisätään sopivaa indikaattoria. (2, s. 5.)

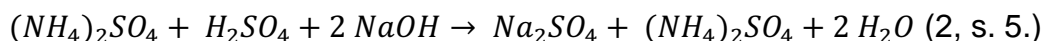
3.1.3 Titraus

Kjeldahl-analyysin viimeisessä vaiheessa, titrauksessa, määritetään vastaanottoliuokseen sitoutuneen typen määrä. Titraus suoritetaan joko takaisin titrauksena tai suorana titrauksena riippuen käytetystä vastaanottoliuoksesta (2, s. 5).

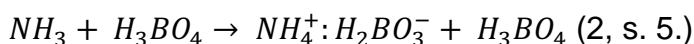
Vastaanottoliuoksen ollessa tunnettua H_2SO_4 -liuosta tapahtuu tislausvaiheessa seuraava reaktio (ei värinmuutosta):



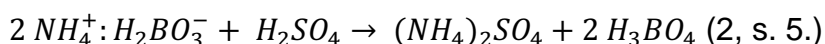
Jäljelle jäänyt rikkihappo titrataan tunnetulla emäksellä (esim. $NaOH$). Titrauksessa tapahtuu alla oleva reaktio (värinmuutos päätepisteessä):



Mikäli vastaanottoliuoksena käytetään boorihapon vesiliuosta, muodostaa boorihappo tislausvaiheessa ammoniumionien kanssa ammonium-boraattikompleksin seuraavan reaktioyhtälön mukaisesti (värinmuutos):



Tislauksessa muodostunut ammonium-boraattikompleksi titrataan tunnetulla happoliuoksella (esim. H_2SO_4), jolloin päätepisteessä tapahtuu käänteinen värinmuutos. Titrattaessa tapahtuu oheinen reaktio:



Titrauksen jälkeen näytteen typpipitoisuuden laskukaava riippuu käytetystä vastaanottoliuoksesta. Mikäli vastaanottoliuoksena on käytetty tunnettua happoliuosta, typpipitoisuus lasketaan kaavan 1 avulla.

$$Typpi - \% = \frac{[(hapon\ määrä\ (ml) * hapon\ N) - (blank\ (ml) * emäksen\ N)] - (emäksen\ määrä\ (ml) * emäksen\ N) * 1,4007}{näytteen\ massa\ (g)} \quad KAAVA\ 1$$

missä $N = normaalisuus$ (2, s. 6.)

Vastaanottoliuoksen ollessa boorihapon vesiliuosta, typpipitoisuus lasketaan kaavan 2 avulla.

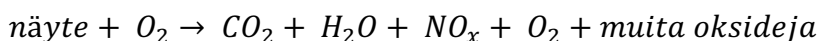
$$Typpi - \% = \frac{(hapon\ määrä\ (ml) - blank\ (ml)) * hapon\ N * 1,4007}{näytteen\ massa\ (g)} \quad KAAVA\ 2$$

missä $N = normaalisuus$ (2, s. 6.)

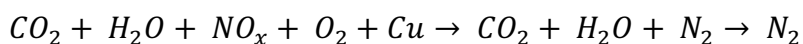
3.2 Dumas-menetelmä

Dumas-menetelmässä näyte poltetaan nopeasti korkeassa lämpötilassa puhtaan hapen läsnä ollessa. Palotuotteet johdetaan pelkistyskammion läpi ja ylimääräiset yhdisteet poistetaan. Lopulta molekyyli muodossa oleva typpi johdetaan detektorille. Dumas-menetelmä vaatii hyvin homogeenisen näytteen. (4, s. 1.)

Menetelmä voidaan jakaa kolmeen vaiheeseen, jotka ovat polttaminen, pelkistys ja erotus sekä detektointi. Polttovaiheessa näyte kuumennetaan uunissa korkeaan lämpötilaan (n. 1000 °C) ja poltetaan nopeasti puhtaan hapen läsnä ollessa. Palotuotteina syntyy useita kaasumaisia yhdisteitä, joita ovat mm. hiilidioksidi, vesihöyry ja erilaiset typen oksidit (NO_x). (4, s. 1.)



Pelkistys ja erotusvaiheen aluksi kaasuseos ohjataan kuumen kuparisen pelkistyskammion läpi. Kuuma kupari poistaa seoksesta hapen ja muuttaa typen oksidit typpikaasuksi (N_2). Tämän jälkeen kaasuseos johdetaan loukkujen läpi, jotka poistavat seoksesta vesihöyryn ja hiilidioksidin. (4, s. 1.)



Viimeisessä vaiheessa, detektoinnissa, typpikaasu johdetaan detektorille. Detektorin signaali muunnetaan näytteen kokonaistyyppipitoisuudeksi. (4, s. 1.)

Verrattuna Kjeldahl-menetelmään Dumas-menetelmän eduksi voidaan laskea se, ettei menetelmällä ole rajoituksia näytteen sisältämien typpiyhdisteiden suhteen. Nykyaikaisilla alkuaineanalyysointilaitteilla menetelmä on myös huomattavan paljon nopeampi kuin Kjeldahl-menetelmä. Yksi analyysi kestää muutamia minuutteja, kun Kjeldahl-analyysi kestää vähintään tunnin. Dumas-menetelmä ei käytä myrkyllisiä tai haitallisia kemikaaleja. (6, s. 2.)

4 MENETELMÄN VALIDOINTI

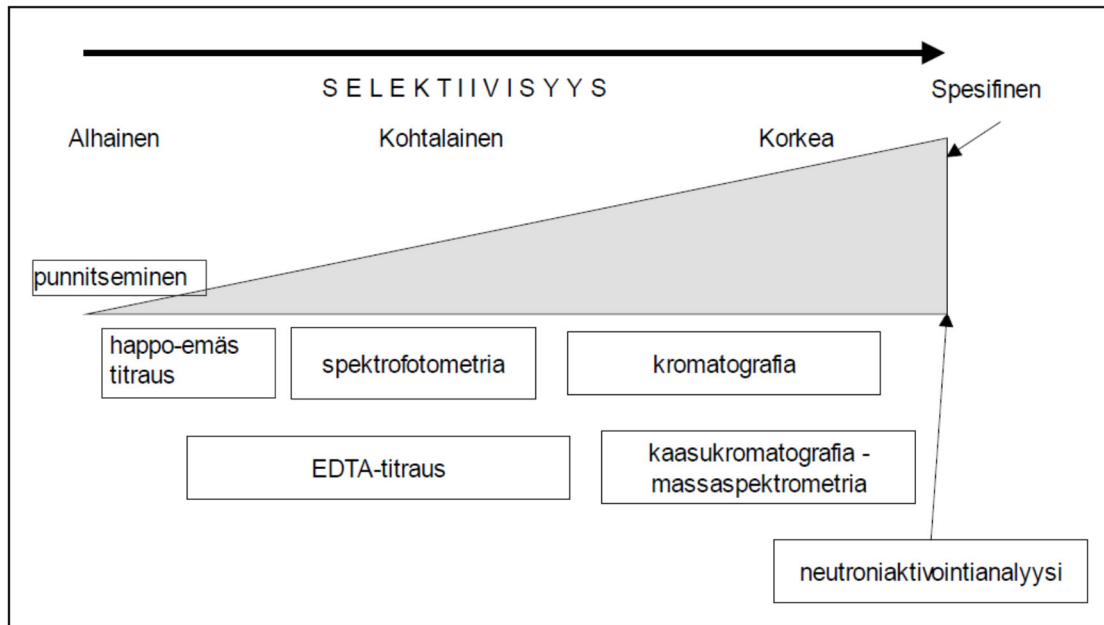
Kemiallisen mittausmenetelmän validoinnilla tarkoitetaan menettelyä, jolla osoitetaan analyttisen mittausmenetelmän sopivuus aiottuun käyttötarkoitukseen. Tämän vuoksi validointi on tärkeä toimenpide menetelmän antamien tulosten luotettavuuden varmistamiseksi. Validoinnilla osoitetaan, että menetelmän suoritustapa on ymmärretty ja että menetelmä on pätevä sen käyttöolosuhteissa. (7, s. 25.)

Kemiallisen mittausmenetelmän validoinnissa tutkitaan useita sen suorituskykyyn vaikuttavia parametreja. Menetelmälle tehtävän validoinnin laajuus riippuu menetelmän käyttötarkoituksesta, käytetystä laitteistosta sekä menetelmän käyttöolosuhteista. (7, s. 25–26.) Validoinnista pyritään tekemään mahdollisimman kattava, mutta aina ei ole tarkoituksenmukaista suorittaa kaikkia mahdollisia toimenpiteitä (8, s. 66).

Validoinnissa tutkittavia parametreja ovat selektiivisyys ja spesifisyys, lineaarisuus, mittausalue, toteamisraja, määritysraja, poikkeama (bias), saanto, häiriökestävyys/toimintavarmuus, tarkkuus ja oikeellisuus, toistotarkkuus, toistettavuus ja mittausepävarmuus (7, s. 25–26).

4.1 Selektiivisyys ja spesifisyys

Menetelmä on selektiivinen, jos se pystyy määrittämään analysoitavan aineen monikomponenttisisä matriisissa siten, etteivät matriisin muut komponentit häiritse sitä (7, s. 27). Jos menetelmä on täysin selektiivinen analysoitavalle aineelle tai aineryhmälle, kutsutaan menetelmää spesifiseksi (8, s. 92). Täysin spesifisiä menetelmiä on harvassa (kuva 1).

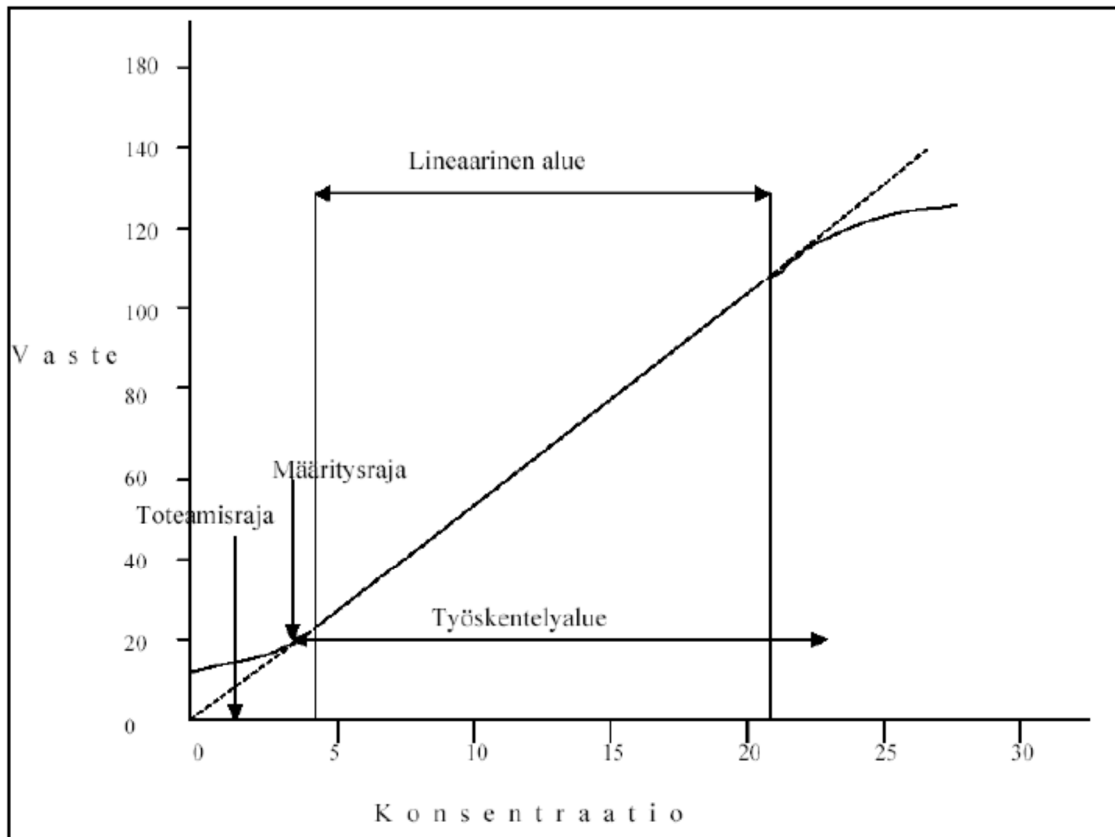


KUVA 1. Eri menetelmien spesifisyys (7, s. 28)

4.2 Lineaarisuus ja mittausalue

Lineaarisuudella tarkoitetaan menetelmän kykyä tuottaa tietyllä alueella riittävä lineaarinen korrelaatio tutkittavan analyytin pitoisuuden ja tulosten välillä. Kvantitatiivisessa työskentelyssä lineaarisuus määritetään yleensä viidellä standardiliuksella, joiden pitoisuudet kattavat koko mittausalueen. (Kuva 2.)

Mittausalue on pitoisuusalue, jolla menetelmän tulokset saavuttavat hyväksyttävän tarkkuuden ja toistotarkkuuden. Mittausalue on yleensä laajempi kuin lineaarinen alue. (8, s. 106.)



KUVA 2. Menetelmän lineaarisuus (7, s. 29)

4.3 Toteamisraja ja määrittysraja

Toteamisrajalla (*limit of detection*) tarkoitetaan pienintä määritettävän analyytin pitoisuutta, joka analyysimenetelmällä voidaan havaita. Yleensä toteamisraja määritetään keskihajonnan avulla kaavan 3 mukaisesti. (8, s. 102.)

$$LOD = \mu_B + 3s_0$$

KAAVA 3

missä μ_B = nollanäytteiden tulosten keskiarvo

$$s_0 = \text{mittaussarjan keskihajonta}$$

Määrittysrajalla (*limit of quantitation*) tarkoitetaan pienintä määritettävän analyytin pitoisuutta, jolle voidaan esittää epävarmuusarvio (7, s. 30). Myös määrittysraja määritellään yleensä nollanäytteiden keskihajonnan avulla kaavan 4 mukaisesti (8, s. 102).

$$LOQ = \mu_B + 10s_0$$

KAAVA 4

missä $\mu_B = \text{nollanäytteiden tulosten keskiarvo}$

$s_0 = \text{mittaussarjan keskihajonta}$

4.4 Poikkeama

Poikkeamalla (bias) tarkoitetaan mittalaitteen systemaattista virhettä. Se voi aiheutua esimerkiksi seuraavista syistä:

- systemaattinen mittalaitteen väärin lukeminen
- väärän kalibroinnin perusteella säädetty mittalaite
- rajallinen havaitsemistehokkuus
- mittalaitteen epäkuntoisuus. (7, s. 31.)

Menetelmää validoitaessa on tärkeää tietää koko analyysimenetelmän systemaattinen kokonaisvirhe eli kokonaispoikkeama (B). Kokonaispoikkeama on mittaustuloksen ja teoreettisen arvon välinen ero ja se lasketaan kaavan 5 mukaisesti. (7, s. 31.)

$$B = x - T$$

KAAVA 5

missä $x = \text{useiden mittaustulosten keskiarvo}$

$T = \text{teoreettinen arvo}$

Kokonaispoikkeama voidaan ilmoittaa myös prosentteina kaavan 6 mukaisesti (7, s. 31).

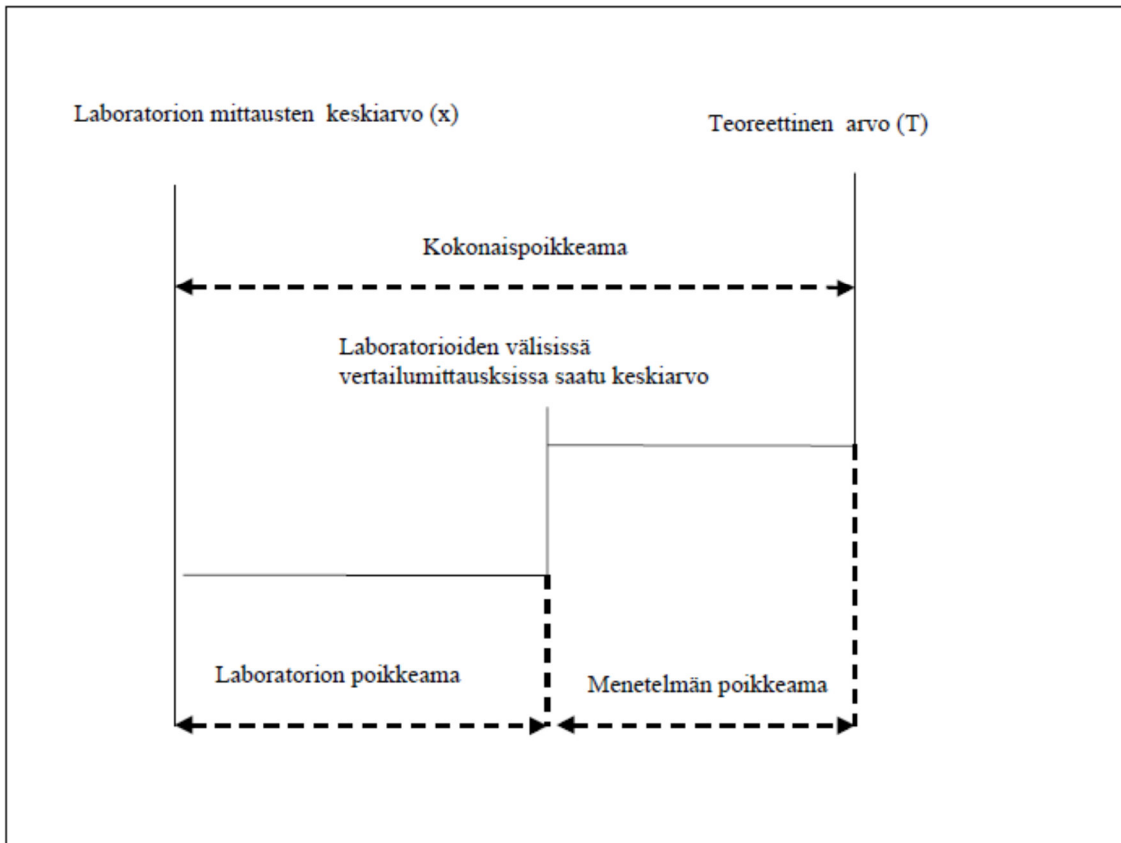
$$B(\%) = \frac{x-T}{T \cdot 100}$$

KAAVA 6

missä $x = \text{useiden mittaustulosten keskiarvo}$

$T = \text{teoreettinen arvo}$

Analyysimenetelmän kokonaispoikkeama muodostuu laboratorion omien systemaattisten virheiden lisäksi myös menetelmään sisältyvistä systemaattisista virheistä (kuva 3).



KUVA 3. Analyysimenetelmän poikkeamatyypit (7, s. 32)

4.5 Saanto

Saannolla tarkoitetaan analyysimenetelmän kykyä havaita tutkittavan analyytin kokonaismäärä (7, s. 32).

Määritettävän analyytin saantoa voidaan tutkia seuraavilla tavoilla:

- vertaamalla standardoituun vertailumateriaaliin
- vertaamalla tuloksia luotettavaksi osoitetun menetelmän tuloksiin
- tunnetun lisäyksen takaisinsaantokokeella. (8, s. 114.)

Saanto ilmoitetaan yleensä prosentteina kaavan 7 mukaisesti (8, s. 114).

$$R = \frac{S-U}{c} * 100 \%$$

KAAVA 7

missä $R = \text{saanto} - \%$

$S = \text{lisäyksen sisältämän näytteen mitattu pitoisuus}$

$U =$ näytteen alkuperäinen mitattu pitoisuus

$C =$ lisäyksestä johtuva tunnettu konsentraation kasvu

4.6 Häiriökestävyys/toimintavarmuus

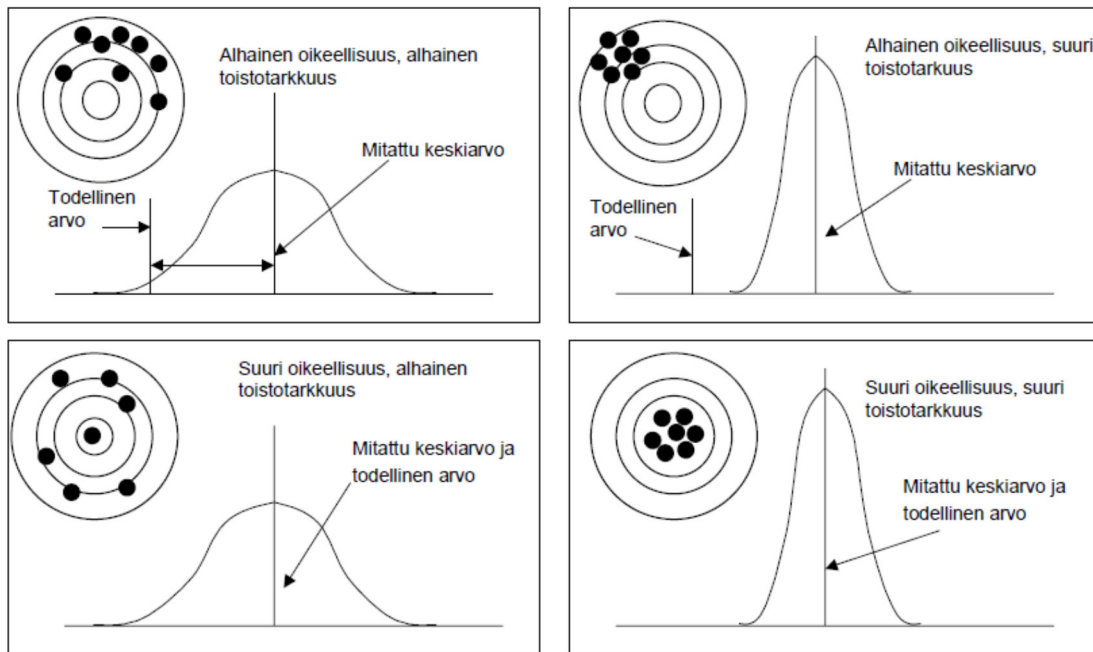
Häiriökestävyydellä tarkoitetaan menetelmän antamien tulosten herkkyyttä menetelmän pienille muutoksille. Toimintavarmuudella tarkoitetaan menetelmän kykyä tuottaa hyväksytyjä tuloksia menetelmän pienistä poikkeamista huolimatta. (7, s. 33.)

On tavallista, että eri laboratorioden menettelytavat eroavat toisistaan, vaikka käytettäisiin samaa menetelmää. Eroilla voi olla vaikutusta menetelmän toimintavarmuuteen. Laboratoriot testaavat häiriökestävyyttä ja toimintavarmuutta tekemällä menetelmään todellisissa tilanteissa ilmeneviä muutoksia ja seuraavat niiden vaikutuksia menetelmään. (7, s.34.)

4.7 Tarkkuus, oikeellisuus ja toistotarkkuus

Tarkkuudella tarkoitetaan menetelmän antamien tuloksien ja todellisen arvon läheisyyttä (8, s. 112). Oikeellisuudella tarkoitetaan useiden mittausten tuloksien keskiarvon läheisyyttä todellisen arvon kanssa (7, s. 35). Näin ollen tarkkuus karakterisoi menetelmän systemaattista ja satunnaisvirhettä, kun taas oikeellisuus karakterisoi pelkästään systemaattista virhettä (8, s. 112). Toistotarkkuudella tarkoitetaan menetelmän antamien keskenään riippumattomien tulosten vastaavuutta ja se yleisimmin ilmoitetaan keskihajontana (8, s. 107).

Kuva 4 havainnollistaa yllä olevia käsitteitä.



KUVA 4. Menetelmän oikeellisuuden ja toistotarkkuuden välinen ero (7, s. 36)

4.8 Toistettavuus

Toistettavuudella tarkoitetaan toistotarkkuuden lajia, missä mittaukset tehdään lyhyellä aikavälillä toistettavissa olosuhteissa (8, s. 107). Toistettavuus määritetään tekemällä rinnakkaismääryksiä eri pitoisuuksilla olevista näytesarjoista (7, s. 37).

4.9 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuudella tarkoitetaan mittaustulokseen liittyvää arviota, joka ilmoittaa välin, jonka sisällä todellisen arvon voidaan olettaa olevan tietyllä todennäköisyydellä. Mittausepävarmuuden ilmoittaminen tulosten yhteydessä on oleellista tulosten luotettavuuden kannalta. (8, s. 119.)

Yleensä mittausepävarmuus määritetään systemaattisen virheen (poikkeama) ja satunnaisvirheen avulla, ja se lasketaan kaavan 8 mukaisesti (8, s. 122).

$$u = \sqrt{(S_{err})^2 + (R_{err})^2}$$

KAAVA 8

missä u = mittausepävarmuus

S_{err} = systemaattisen virheen estimaatti

R_{err} = satunnaisvirheen estimaatti

Mikäli mittausepävarmuus lasketaan varmennetun vertailumateriaalin tuloksista, lasketaan mittausepävarmuus kaavan 9 avulla (8, s. 126).

$$u = \sqrt{u(R_w)^2 + (u(bias))^2}$$

KAAVA 9

missä $u(R_w)$ = laboratorion sisäinen uusittavuus

$u(bias)$ = systemaattinen virhe (*bias*)

5 VALIDOITAVA MENETELMÄ

Validointi kattoi kaksi yrityksen sisäistä menetelmää:

- syp4.04: raakavalkuaisen (rehuanalyysi) ja kokonaistypen määrittäminen kasvinäytteistä
- syp5.04: kokonaistypen määrittäminen kasvualustoista ja lietteistä.

Validoinnissa käytettiin seuraavia laitteistoja:

Märkäpolttolaitteistot: Foss Tecator 2020 ja Foss Tecator Digestion Unit 20 varustettuina vesisuihkupumpuilla toimivilla kaasunpoistojärjestelmillä. Typpianalysaattori: Foss Tecator Kjeltec 2300.

Menetelmän sovellusalueena ovat kasvien, kasvualustojen ja lietteiden kokonaistypen määrittäykset. Menetelmän periaate on seuraava:

Näytteessä oleva typpi hajotetaan rikkihappopoltolla ammoniumsulfaatiksi käyttäen katalyyttinä kalium- (K_2SO_4) ja kuparisulfaattia ($CuSO_4$). Katalyytin avulla rikkihapon kiehumispiste saadaan nostettua lämpötilaan 400 °C, jossa näytteen komponentit hajoavat paremmin kuin puhtaan rikkihapon kiehumispisteessä.

Liuoksessa oleva ammoniumtyppi määritetään Kjeldahl-tislauksen ja titrauksen avulla, joiden periaate on seuraava: Ammoniumionit (NH_4^+) muutetaan emäksen ($NaOH$) avulla ammoniakiksi (NH_3). Syntynyt ammoniakki tislataan vesihöyryllä vastaanottoliuokseen (boorihappo) ja titrataan tunnetulla happoliuoksella (0,1 M HCl) bromkresolivihreä/metyylipuna -liuos indikaattorina. Käytetty laitteisto suorittaa HCl -titrauksen automaattisesti.

Menetelmän perustana ovat seuraavat ohjeet:

- ISO 937:1978 – 1978-12-01 Meat and meat products – Determination of nitrogen content (Reference method)
- ISO 1871:1975 – 1975-12-01 Agricultural food products – General directions for the determination of nitrogen by the Kjeldahl method.

6 VALIDOINNIN SUORITUS

Validointi tehtiin akkreditointia varten. Validoinnin tavoitteena oli osoittaa tai määrittää:

- menetelmällä tuotettujen tulosten oikeellisuus ja vertailukelpoisuus kansainvälisiin referenssimateriaaleihin nähden
- menetelmän suorituskykyä kuvaavat tunnusluvut, kuten määrittäysraja, mitta-alue ja mitta-epävarmuus jne.

Kaikki validointiin liittyvät mittaukset tehtiin 12.6.2013 – 13.8.2013.

6.1 Toteamis- ja määrittäysraja

Toteamis- ja määrittäysraja tutkittiin mittaamalla nollanäyte (tyhjä putki) 10 kertaa. Tuloksista laskettiin keskihajonta s_0 . Toteamisraja (LOD) ja määrittäysraja (LOQ) laskettiin seuraavilla kaavoilla 10 ja 11.

$$LOD = 3s_0 \quad \text{KAAVA 10}$$

$$LOQ = 10s_0 \quad \text{KAAVA 11}$$

Rajat muutettiin typpipitoisuudeksi kaavalla 12.

$$Kok. N = \frac{V_{HCl} \cdot M_{HCl} \cdot 14,007}{m} \quad \text{KAAVA 12}$$

missä: V_{HCl} = titraushapon kulutus

$$M_{HCl} = \text{titraushapon molaarisuus} \left(0,09982 \frac{\text{mol}}{\text{l}} \right)$$

m = massa, mitä kohden typpipitoisuus lasketaan (2 g)

6.2 Mittausalue

Mittausalueen yläpää tutkittiin tekemällä ammoniumkloridista (NH_4Cl) niin väkevä näyte, ettei vastaanottoastian tilavuus riittänyt kaiken ammoniumtyypin titraamiseen. Titrauskulutus muutettiin typpipitoisuudeksi kohdassa 6.1 esitetyllä kaavalla 12.

6.3 Oikeellisuus, tarkkuus ja laboratorion poikkeama

Tulosten oikeellisuutta, tarkkuutta ja laboratorion poikkeamaa (u_{Bias}) arvioitiin analysoimalla sertifioituja vertailumateriaaleja, joita olivat

- NCS DC73349: Bush Branches and Leaves, NCS
- 1547 P.Leaves: Peach Leaves, NIST
- NJV 94-2 E.Peat: Energy Peat (Sphagnum), Swedish University of Agricultural Sciences
- 1573a T.Leaves: Tomato Leaves, NIST
- OC M.Sludge A: QC Municipal Sludge A, VKI.

6.4 Laboratorion sisäinen uusittavuus

Laboratorion sisäisen uusittavuuden (u_{Rw}) arvioimiseksi tehtiin duplikaattimäärityksiä reaalista näytteistä ($n = 50$) sekä analysoitiin pitkällä aikavälillä ($n > 20$) QC-liuosta eri pitoisuustasoilla. Käytetyt näytteet:

- neulaset
- rehut
- turpeet
- humukset
- sedimentit
- lietteet
- QC-liuos (ammoniumstandardiliuos 1000 mg/l).

6.5 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuudet tehtiin Nordtest raportti TR 537 -teoksessa esitettyjen periaatteiden mukaisesti. Epävarmuusarviot laskettiin ns. laajennettuna mittausepävarmuutena eri pitoisuustasoille (95 %:n luottamustaso, $k = 2$) kaavan 13 avulla.

$$U = 2 * \sqrt{u(bias)^2 + u(R_w)^2}$$

KAAVA 13

missä $U =$ laajennettu mittausepävarmuus

$u(bias) = \text{laboratorion poikkeama}$

$u(R_w) = \text{laboratorion sisäinen uusittavuus}$

6.5.1 Laboratorion poikkeama

Laboratorion poikkeama, $u(bias)$, arvioitiin varmennettujen vertailumateriaalien avulla. Tällöin se voidaan laskea kaavan 14 avulla.

$$u(bias) = \sqrt{(RMS_{bias})^2 + u(Cref)^2} \quad \text{KAAVA 14}$$

missä $RMS_{bias} = \sqrt{\frac{\sum(bias_i)^2}{n}}$

$$u(Cref) = \text{vertailumateriaalin sertifikaatista} \left(\frac{U}{2}\right)$$

$bias = \text{poikkeama vertailuarvosta prosentteina}$

$S_{bias} = \text{näytteiden keskihajonta}$

Varmennettujen vertailumateriaalien osalta havaittujen poikkeamien tilastollinen merkisyys testattiin luottamusvälitarkastelulla (S = merkittävä poikkeama, NS = ei merkittävä poikkeama).

95 %:n luottamusväli laskettiin kaavalla 15.

$$\mu = \bar{x} \pm (t_{0,05(v)}) * \frac{S_N}{\sqrt{n}} \quad \text{KAAVA 15}$$

missä $\mu = \text{todellinen arvo}$

$\bar{x} = \text{tulosten keskiarvo}$

$t_{0,05(v)} = \text{kaksi suuntaisen } t - \text{jakauman arvo}$

$S_N = \text{keskihajonta}$

$n = \text{määritysten lkm}$

6.5.2 Laboratorion sisäinen uusittavuus

Laboratorion sisäistä uusittavuutta, $u(R_w)$, arvioitaessa analysoitiin QC-liuosta eri pitoisuustasoilla sekä reaalista näytteistä tehtyjä rinnakkaismäärittäyksiä. Näin saatiin yhdistettyä pitkä ja lyhyt aikaväli sekä reaalin näytematriisi. Estimattia laskettaessa käytettiin kaavaa 16.

$$u(R_w) = \sqrt{R1^2 + R2^2}$$

KAAVA 16

missä $R1 = QC - liuokset$

$R2 = duplikaattidata$

7 VALIDOINNIN TULOKSET

Kaikki taulukoissa 1-6 olevat lukuarvot ovat pyöristettyjä. Laskelmat on kuitenkin tehty tarkoilla lukuarvoilla Microsoft Excel -ohjelmassa. Kaikki validoinnin tulokset on laskettu 2 g näytemäärää kohti.

TAULUKKO 1. Menetelmän toteamis- ja määrittäysraja

n	s ₀	LOD	LOQ	LOQ (käytettävä)
		mg/kg	mg/kg	mg/kg
10	0,012417	26,042	86,80668	100

TAULUKKO 2. Menetelmän mittausalue

Mittausalue:	Alaraja (LOQ)	Yläraja
	mg/kg	mg/kg
	100	53000

TAULUKKO 3. QC-liuoksen typpipitoisuudet eri pipetointimäärillä (R1 estimaatit uusittavuushajontaan u_{Rw})

QC-liuoksen pitoisuudet (mg/kg) (n>20)	1 ml	2 ml	10 ml	20 ml	40 ml
Keskiarvo	391,57	801,82	3885,47	7753,67	15510,40
Keskihajonta	33,50	26,26	22,68	33,16	46,51
R1	8,55	3,28	0,58	0,43	0,30

TAULUKKO 4. Duplikaattinäytteiden hajonnat (R2 estimaatti uusittavuushajontaan u_{Rw})

Duplikaattinäytteiden hajonnat (n=50)	
RSD	1,47
R2*	1,89

* R2 estimaatiksi valittiin 75-prosenttitason prosenttipiste.

TAULUKKO 5. Vertailumateriaalien tulokset ja laboratorion poikkeama (*u*bias)

Näyte	ka.	sd	n	ka:n luottamusv.	vp	vp:n luottamusv.	u(Cref)	M	SRM	bias
	g/kg	g/kg			g/kg		%	(S/NS)	ka.saanto, %	%
NCS DC73349	15,1	0,21	10	14,9 - 15,2	15,0	14,7 - 15,3	1,00	NS	100,5	0,5
1547 P.Leaves	29,2	0,31	10	29,0 - 29,5	29,4	28,2 - 30,6	2,04	NS	99,4	-0,6
NJV 94-2	11,2	0,17	10	11,0 - 11,3	11,0	10,6 - 11,5	2,05	NS	101,4	1,4
1573a	30,3	0,29	10	30,1 - 30,5	30,3	28,8 - 31,8	2,48	NS	100,1	0,1
QC M.Sludge A	44,3	0,59	10	43,9 - 44,7	44,0	43,4 - 44,6	0,68	NS	100,6	0,6
							ka. uCref	1,65		
									RMSbias	0,8
									uBias	1,82

TAULUKKO 6. Mittausepävarmuus

Pitoisuusalue	Käytettävät						
mg/kg	R1	R2	U(rw)	u(bias)	u	U	U
100-500	8,55	1,89	8,76	1,82	8,95	17,90	20
500-1000	3,28	1,89	3,78	1,82	4,20	8,40	10
>1000	0,58	1,89	1,98	1,82	2,69	5,38	6

8 YHTEENVETO

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli validoida uudelleen Ahma Ympäristö Oy:n pitkään käytössä ollut kokonaistypen määrittäminen menetelmä akkreditointia varten. Menetelmä on ns. Kjeldahl-menetelmä.

Validointiin liittyvät mittaukset suoritettiin kesän 2013 aikana. Validoinnin tavoitteena oli osoittaa menetelmän tulosten oikeellisuus ja luotettavuus sekä määrittää sen suorituskykyä kuvaavia tunnuslukuja.

Oikeellisuutta, tarkkuutta ja laboratorion poikkeamaa arvioitiin analysoimalla serтифициoituja vertailumateriaaleja, joita oli 5 kappaletta. Laboratorion sisäistä uusittavuutta puolestaan arvioitiin analysoimalla pitkällä aikavälillä QC-liuosta eri pitoisuustasoilla sekä tekemällä rinnakkaismäärittämiä reaalista näytteistä.

Validointi onnistui kokonaisuutena erittäin hyvin. Varmennettujen vertailumateriaalien analyysituloksissa ei havaittu tilastollisesti merkittäviä poikkeamia. Kaikkien viiden vertailumateriaalin keskimääräiset saannot poikkesivat maksimissaan 0,6 %, joka on mielestäni erinomainen tulos.

Vertailumateriaalien tulokset ovat hyvä esimerkki tämän Kjeldahl-menetelmään pohjautuvan analyysimenetelmän luotettavuudesta. Tätä tukee myös tekemäni koonti menetelmässä käytettävän kontrollinäytteen tuloksista. Keräsin kaikki menetelmällä tehdyt kontrollinäytteen analyysitulokset yli kolmen vuoden ajalta ($n > 100$) ja laskin tuloksille suhteellisen keskihajonnan, joka oli vain 1,3 %.

Määrittämissrajat, laboratorion poikkeamat, sisäiset uusittavuudet ja laajennetut mittausepävarmuudet ovat menetelmän sovellusalueen edellyttämällä tasolla. Näiden tulosten valossa akkreditoinnin myöntämiselle ei pitäisi olla estettä.

LÄHTEET

1. Definition of Total Nitrogen. United Nations Institute for Training and Research. Saatavissa:
<http://www2.unitar.org/cwm/publications/cbl/prtr/pdf/cat5/nitrogen.pdf>. Hakupäivä 31.7.2014.
2. A Guide To Kjeldahl Nitrogen Determination Methods And Apparatus. Labconco. Saatavissa:
<http://www.expotechusa.com/catalogs/labconco/pdf/KJELDAHLguide.PDF>. Hakupäivä 6.8.2014.
3. Persson, Jan-Åke – Wennerholm, Mårten – O'Halloran, Stephen 2008. Handbook For Kjeldahl Digestion. 4. painos. Tanska: FOSS.
4. Dumas nitrogen and total nitrogen content. VELP Scientifica. Saatavissa:
http://www.velp.com/en/service_support/dumas_nitrogen. Hakupäivä: 7.8.2014.
5. Egli, Huldrych 2008. Kjeldahl Guide. 2. painos. Sveitsi: BÜCHI Labortechnik AG.
6. Müller, Jürgen 2014. A White Paper from FOSS: Dumas or Kjeldahl for reference analysis?. Tanska: FOSS.
7. Ehder, Tapio 2005. Kemian metrologian opas. Helsinki: MIKES.
8. Välimäki, Ilkka 2010. T440203 Laboratorion laatutoiminta 3 op. Opintojakson oppimateriaali keväällä 2012. Oulu: Oulun seudun ammattikorkeakoulu, Tekniikan yksikkö.
9. Nordtest raportti TR 537. 2007. Mittausepävarmuuden laskentaopas ympäristölaboratorioille. Suomen Ympäristökeskus.

	NCS BB&L	1547 P.Leaves	NJV 94-2 E.Peat	1573a T.Leaves	QC M.Sludge A
Kuiva-aine %	93,47	94	91,7	93,47	94,08
Varmennettu pit. N%	1,5±0,03	2,94±0,12	1,10±0,045	3,03±0,15	44 g/kg SD 1,5

	Massa (g)	Kulutus (ml)	Pitoisuus (g/kg)	Ka:ta kohden (g/kg)	N %
NCS BB&L	0,9546	9,5538	13,9932	14,9708	1,50
	0,9672	9,6254	13,9144	14,8865	1,49
	0,9472	9,4738	13,9844	14,9614	1,50
	1,0118	10,1648	14,0465	15,0278	1,50
	0,9326	9,551	14,3191	15,3195	1,53
	0,9695	9,883	14,2529	15,2487	1,52
	0,9506	9,8182	14,4410	15,4499	1,54
	0,9613	9,7686	14,2081	15,2007	1,52
	0,9385	9,2894	13,8394	14,8062	1,48
	0,9834	9,7983	13,9310	14,9043	1,49
1547 P.Leaves	0,5107	10,0478	27,5086	29,2644	2,93
	0,5469	10,9073	27,8851	29,6650	2,97
	0,5372	10,5714	27,5143	29,2706	2,93
	0,6049	11,8974	27,4999	29,2552	2,93
	0,5231	10,4134	27,8337	29,6103	2,96
	0,5428	10,671	27,4870	29,2415	2,92
	0,5028	9,9006	27,5314	29,2888	2,93
	0,512	10,0822	27,5327	29,2901	2,93
	0,5464	10,5674	27,0408	28,7668	2,88
	0,5407	10,4177	26,9388	28,6583	2,87
NJV 94-2 E.Peat	1,3353	9,6558	10,1105	11,0256	1,10
	1,2653	9,5431	10,5453	11,4998	1,15
	1,3255	9,7796	10,3158	11,2495	1,12
	1,3947	10,2197	10,2452	11,1725	1,12
	1,3121	9,6686	10,3029	11,2354	1,12
	1,2266	9,0167	10,2780	11,2083	1,12
	1,2535	9,1636	10,2213	11,1464	1,11
	1,3601	9,8666	10,1428	11,0609	1,11
	1,005	7,2001	10,0169	10,9236	1,09
	1,1975	8,6262	10,0718	10,9834	1,10
1573a T.Leaves	0,5157	10,3653	28,1027	30,0660	3,01
	0,5502	11,166	28,3753	30,3576	3,04
	0,5242	10,5753	28,2071	30,1777	3,02
	0,5586	11,333	28,3666	30,3483	3,03
	0,6004	12,4204	28,9239	30,9446	3,09
	0,6012	12,239	28,4636	30,4521	3,05
	0,5950	12,1428	28,5341	30,5276	3,05
	0,5281	10,7604	28,4889	30,4791	3,05
	0,7562	15,1773	28,0621	30,0226	3,00
	0,8075	16,2036	28,0564	30,0165	3,00
QC M.Sludge A	0,3663	10,8553	41,4350	44,0423	4,40

VERTAILUMATERIAALIEN ANALYYSITULOKSET

LIITE 1/2

0,3707	11,0876	41,8194	44,4509	4,45
0,4996	14,7384	41,2468	43,8423	4,38
0,7482	22,1482	41,3889	43,9933	4,40
0,3598	10,6486	41,3803	43,9842	4,40
0,3872	11,5412	41,6753	44,2977	4,43
0,3697	11,0334	41,7275	44,3532	4,44
0,3538	10,5761	41,7956	44,4256	4,44
0,4041	11,8688	41,0658	43,6499	4,36
0,4742	14,6082	43,0723	45,7826	4,58

DUPLIKAATTINÄYTTEIDEN ANALYYSITULOKSET

LIITE 2/1

Näyte	Massa (g)	Kulutus (ml)	Ka pit. %	Pitoisuus (g/kg)	Ka:ta kohden (g/kg)	Keskiarvo (g/kg)	SD	RSD
K75-1 (rehu)	0,753	18,044	93,3	33,505	35,911	35,693	0,387	1,085
	0,753	17,813		33,098	35,474			
K76-4 (neulas)	0,8459	10,187	94,8	16,838	17,762	17,660	0,181	1,024
	0,7678	9,140		16,645	17,558			
38-13 (turve)	2,73	6,561	26,94	3,360	12,472	12,695	0,395	3,109
	3,31	8,239		3,480	12,918			
8-13 (turve)	3,3439	31,106	52,3	13,006	24,868	24,896	0,049	0,196
	3,2865	30,639	52,3	13,035	24,923			
15-13 (liete)	0,7966	21,125	98,4	37,078	37,681	37,417	0,468	1,252
	0,7700	20,133	98,4	36,559	37,153			
15-13 (humus)	4,40	5,976	10,4	1,899	18,259	18,882	1,103	5,844
	5,93	8,603	10,4	2,028	19,504			
15-13 (liete)	3,01	19,483	18,98	9,050	47,681	47,395	0,508	1,071
	3,00	19,185	18,98	8,941	47,109			
15-13 (turve)	3,08	10,137	40,96	4,602	11,235	11,449	0,380	3,319
	4,41	15,069	40,96	4,777	11,664			
28-13 (liete)	2,220	19,798	29,84	12,469	41,787	41,275	0,907	2,198
	2,410	20,966	29,84	12,164	40,763			
28-13 (liete)	2,220	24,334	35,285	15,326	43,434	42,867	1,006	2,346
	2,310	24,659	35,285	14,925	42,300			
28-13 (liete)	2,380	25,486	34,865	14,972	42,944	42,693	0,445	1,043
	2,160	22,860	34,865	14,797	42,442			
28-13 (maa)	4,870	8,928	71,145	2,563	3,603	3,578	0,044	1,236
	5,14	9,293	71,145	2,528	3,553			
28-13 (maa)	4,73	8,125	67,68	2,402	3,548	3,541	0,013	0,367
	4,80	8,211	67,68	2,392	3,534			
28-13 (maa)	4,95	8,065	73,88	2,278	3,084	3,066	0,031	1,005
	5,15	8,297	73,88	2,252	3,049			
29-13 (liete)	2,280	13,603	23,84	8,342	34,992	35,178	0,330	0,937
	2,650	15,979	23,84	8,431	35,364			
29-13 (liete)	1,000	33,215	84,71	46,441	54,823	54,975	0,268	0,488
	1,260	42,082	84,71	46,697	55,126			
33-13 (liete)	2,710	21,670	28,45	11,180	39,297	40,015	1,273	3,181
	2,850	23,622	28,45	11,589	40,733			

DUPLIKAATTINÄYTTEIDEN ANALYYSITULOKSET

LIITE 2/2

33-13 (neulas)	0,8014	12,714	95,8	22,182	23,155	23,309	0,273	1,173
	0,8072	12,977	95,8	22,478	23,463			
33-13 (neulas)	0,7694	10,115	95,7	18,382	19,208	19,057	0,268	1,408
	0,7793	10,084	95,7	18,092	18,905			
KL472/4 (lanta)	0,754	16,847	94,37	31,241	33,105	33,019	0,151	0,458
	0,907	20,164	94,37	31,080	32,934			
34-13 (kompos- ti)	2,0514	8,212	22,11	5,597	25,313	25,908	1,054	4,070
	2,3980	10,050	22,11	5,860	26,503			
34-13 (kompos- ti)	1,2502	8,627	37,19	9,648	25,943	25,885	0,103	0,399
	1,3751	9,446	37,19	9,605	25,827			
35-13 (liete)	5,750	22,579	10,16	5,490	54,040	53,688	0,623	1,161
	3,450	13,371	10,16	5,419	53,337			
35-13 (liete)	3,960	32,721	21,385	11,553	54,023	53,583	0,780	1,455
	4,380	35,602	21,385	11,365	53,143			
36-13 (liete)	5,020	17,358	22,53	4,835	21,459	21,295	0,290	1,361
	5,100	17,366	22,53	4,761	21,132			
36-13 (liete)	3,310	15,841	15,3	6,691	43,735	43,142	1,051	2,435
	4,990	23,234	15,3	6,510	42,550			
36-13 (kasvi)	1,0221	10,186	94,97	13,934	14,672	14,679	0,013	0,090
	1,0800	10,774	94,97	13,948	14,687			
37-13 (lehti)	0,773	22,251	89,05	40,225	45,172	45,071	0,178	0,394
	0,868	24,861	89,05	40,047	44,971			
38-13 (turve)	2,890	11,700	27,6	5,660	20,509	20,170	0,600	2,976
	3,230	12,645	27,6	5,474	19,832			
38-13 (turve)	3,56	12,460	32,92	4,894	14,866	14,618	0,439	3,002
	3,32	11,233	32,92	4,731	14,371			
K72-13 (neu- las)	0,8170	9,201	96,71	15,745	16,281	16,243	0,068	0,420
	0,7866	8,816	96,71	15,671	16,204			
38-13 (turve)	3,85	21,104	32,265	7,664	23,754	23,951	0,350	1,461
	4,06	22,625	32,265	7,792	24,149			
39-13 (liete)	2,610	23,277	27,365	12,469	45,567	46,065	0,883	1,917
	2,980	27,158	27,365	12,742	46,563			
39-13 (lehti)	0,707	20,188	94,24	39,902	42,340	42,315	0,046	0,108

DUPLIKAATTINÄYTTTEIDEN ANALYYSITULOKSET

LIITE 2/3

	0,729	20,788	94,24	39,853	42,289			
39-13 (lehti)	0,748	22,062	91,95	41,233	44,843	44,660	0,324	0,726
	0,769	22,505	91,95	40,896	44,477			
39-13 (lehti)	0,708	25,492	89	50,342	56,564	55,835	1,292	2,314
	0,684	23,983	89	49,045	55,106			
39-13 (lehti)	0,7434	22,250	78,97	41,847	52,991	52,825	0,295	0,559
	0,7684	22,854	78,97	41,584	52,658			
39-13 (lehti)	0,7821	26,821	89,17	47,948	53,771	53,650	0,215	0,401
	0,8310	28,369	89,17	47,732	53,529			
40-13 (liete)	3,650	41,236	17,77	15,796	88,892	89,642	1,330	1,484
	2,230	25,619	17,77	16,063	90,393			
40-13 (liete)	6,880	16,642	11,2	3,382	30,197	29,896	0,535	1,789
	3,470	8,226	11,2	3,315	29,594			
K74-13 (neulas)	0,68	8,034	98,24	16,519	16,815	16,724	0,161	0,963
	0,78	9,116	98,24	16,341	16,634			
K72-13 (neulas)	0,8116	9,220	94,18	15,884	16,865	17,195	0,584	3,396
	0,8050	9,502	94,18	16,504	17,524			
K75-13 (rypsi)	0,868	23,293	96,67	37,543	38,836	38,941	0,187	0,480
	1,009	27,229	96,67	37,746	39,047			
K76-13 (neulas)	0,758	6,145	96,12	11,330	11,787	11,909	0,217	1,823
	0,771	6,381	96,12	11,565	12,032			
K76-13 (neulas)	0,7478	8,666	94,98	16,203	17,059	16,998	0,108	0,637
	0,8370	9,630	94,98	16,087	16,937			
K72-13 (neulas)	0,7391	6,355	96,53	12,021	12,453	12,521	0,120	0,957
	0,7474	6,496	96,53	12,152	12,588			
K69-13 (neulas)	0,7354	7,233	96,04	13,751	14,318	14,455	0,243	1,678
	0,7267	7,284	96,04	14,014	14,592			
K69-13 (neulas)	0,8034	6,488	95,61	11,291	11,809	11,713	0,171	1,457
	0,7723	6,135	95,61	11,107	11,617			
K69-13 (neulas)	0,7740	6,798	96,53	12,279	12,721	12,684	0,064	0,507

DUPLIKAATTINÄYTTEIDEN ANALYYSITULOKSET

LIITE 2/4

	0,7349	6,417	96,53	12,209	12,648			
K68-13 (neulas)	0,779	8,021	96,04	14,406	15,000	14,972	0,049	0,327
	0,741	7,606	96,04	14,353	14,945			

Pipetointi:

Pohjataso	Saantokoe %	1ml	2ml	10ml	20ml	40ml
0,3500	99,6	0,458	1,151	5,581	11,124	22,174
0,3520	99,7	0,542	1,075	5,544	11,040	22,141
0,3490	99,5	0,600	1,058	5,531	11,066	22,195
0,3000	99,3	0,621	1,197	5,631	11,131	22,158
0,3800	99,8	0,604	1,141	5,574	11,043	22,121
0,2980	99,4	0,604	1,188	5,527	11,047	22,183
0,3000	99,4	0,535	1,154	5,525	11,072	22,162
0,2800	99,5	0,559	1,190	5,529	11,139	22,119
0,3250	99,4	0,522	1,102	5,524	11,063	22,078
0,3580	100,4	0,503	1,157	5,583	11,067	22,235
0,3600	100,4	0,593	1,134	5,579	11,090	22,141
0,3620	100,2	0,587	1,158	5,569	11,006	22,212
0,2400	99,6	0,591	1,163	5,538	11,163	22,253
0,2470	100,1	0,600	1,192	5,610	11,113	22,226
0,2470	99,8	0,608	1,180	5,547	11,168	22,356
0,2550	100,4	0,600	1,172	5,582	11,105	22,230
0,2900	99,7	0,549	1,168	5,539	11,094	22,152
0,3420	100,4	0,493	1,140	5,507	11,112	22,183
0,3567	100,7	0,486	1,113	5,531	11,015	22,140
0,3600	100,5	0,522	1,134	5,579	11,165	22,317
0,3550	100,4	0,590	1,119	5,588	11,091	22,142
	Pitoisuus (mg/kg)	1ml	2ml	10ml	20ml	40ml
		319,833	804,932	3901,618	7776,53	15501,82
		378,767	751,451	3875,542	7717,597	15478,54
		419,174	739,846	3866,663	7736,123	15516,22
		434,274	837,090	3936,572	7781,354	15490,21
		422,180	797,661	3896,724	7719,974	15464,42
		421,970	830,308	3863,937	7722,491	15508,04
		374,013	806,959	3862,539	7740,248	15492,94
		390,721	831,916	3865,545	7787,156	15463,09
		364,715	770,327	3861,49	7733,746	15434,36
		351,292	808,916	3902,876	7736,752	15544,25
		414,280	792,418	3900,08	7753,111	15478,4
		410,086	809,545	3893,229	7694,178	15528,31
		413,162	813,321	3871,627	7804,144	15556,84
		419,244	833,035	3921,542	7769,12	15538,24
		424,767	824,856	3877,709	7807,43	15628,63
		419,174	819,263	3902,247	7763,527	15540,83
		383,730	816,676	3872,256	7755,488	15486,23
		344,651	796,822	3849,606	7768,421	15508,11
		339,827	778,296	3866,733	7700,609	15477,98
		364,925	792,418	3900,08	7805,193	15601,72
		412,253	782,211	3906,302	7753,88	15479,17