



TEKNIikka JA LIIKENNE

Laboratorioala

OPINNÄYTETYÖ

**ARSEENIN JA LYIJYN MÄÄRITYS FRUKTOOSISTA JA KSYLITOLISTA
ICP-OES-TEKNIKALLA – MENETELMÄN OPTIMOINTI JA VALIDOINTI**

**Työn tekijä: Maiju Lahti
Työn ohjaajat: Mia Ruismäki
Maria Heinonen**

Työ hyväksytty: __. __. 2009

**Mia Ruismäki
lehtori**



ALKULAUSE

Tämä opinnäytetyö tehtiin Danisco Sweeteners Oy:n Kotkan tehtaan laboratoriolle.

Haluan kiittää erityisesti laboratorioanalyttikko Maria Heinosta hyvistä neuvoista ja kärsivällisestä ohjauksesta koko opinnäytetyöprojektin ajan. Lisäksi kiitän muuta laboratoriohenkilökuntaa suuresta avusta ja opastuksesta päivittäisessä työskentelyssä.

Kiitos aktiivisesta valvonta- ja ohjaustyöstä kuuluu myös opinnäytetyöni ohjaavalle opettajalle lehtori Mia Ruismäelle.

Kotkassa 11.3.2009

Maiju Lahti

TIIVISTELMÄ

Työn tekijä: Maiju Lahti	
Työn nimi: Arseenin ja lyijyn määrittäminen fruktoosista ja ksylitolista ICP-OES-tekniikalla – menetelmän optimointi ja validointi	
Päivämäärä: 11.3.2009	Sivumäärä: 44 s. + 2 liitettä
Koulutusohjelma: Laboratorioala	
Työn ohjaajat: Lehtori, FM Mia Ruismäki Laboratorioanalytikko Maria Heinonen	
<p>Tämä opinnäytetyö tehtiin Danisco Sweeteners Oy:n Kotkan tehtaan laboratoriossa. Työn tavoitteena oli yhdistää menetelmät ”Arseenin ja lyijyn määrittäminen fruktoosista ICP-OES-tekniikalla” sekä ”Arseenin ja lyijyn määrittäminen ksylitolista ICP-OES-tekniikalla”. Lisäksi uusi, yhdistetty menetelmä oli optimoitava ja validoitava.</p> <p>Fruktoosi ja ksylitoli valmistetaan luonnosta peräisin olevista raaka-aineista. Luonnosta niihin kontaminoituu elimistöille haitallisia metalleja, joihin arseeni ja lyijy lukeutuvat. Ma-keutusaineista saatavalle arseenin ja lyijyn määrälle on asetettu raja-arvot, minkä vuoksi niiden pitoisuutta fruktoosissa ja ksylitolissa on tarkkailtava.</p> <p>Optimoinnissa selvitettiin fruktoosimatriisisen kalibroinnin toimivuus sekä fruktoosi- että ksylitolinäytteitä analysoitaessa, sopiva näytematriisipitoisuus, sekä laitteen herkkyiden kannalta optimaalisimmat näytteensyöttöominaisuudet ja taustankorjausasetukset. Uudelle menetelmälle pyrittiin saavuttamaan alhaiset määrittämissrajat laitteen herkkyiden maksimoinnilla. Validoinnissa määritettiin tarkkuus, täsmällisyys, spesifisyys, toteamis- ja määrittämissraja, lineaarisuus sekä mittausalue.</p> <p>Menetelmää testattiin arseenin määrittämisessä pitoisuusalueella 0,0 – 3,0 ppm, ja lyijyn osalta alueella 0,0 – 0,5 ppm. Optimointimittauksissa fruktoosikalibroinnin todettiin antavan lisänsäilytykselle samat tulokset riippumatta siitä, oliko näytteet valmistettu fruktoosi- vai ksylitolimatriisiin. Sopivaksi näytematriisin määräksi valittiin 20 %. Näytteensyötön ja taustankorjauksen testauksissa muokattiin yhdistettävien menetelmien pohjalta asetukset optimaaliseksi laitteiston herkkyysvaatimusten saavuttamiseksi. Validoinnissa menetelmän toteamisrajoiksi saatiin sekä arseenille että lyijylle 0,02 ppm, ja määrittämissrajoissa päästiin kummankin analyysin kohdalla tavoitteeseen 0,1 ppm. Menetelmä todettiin selektiiviseksi ja tarkaksi keskiarvosaannon ollessa arseenille 94 % ja lyijylle 98 %. Saantokokeet tehtiin arseenipitoisuudella 0,1 – 3,0 ppm ja lyijypitoisuudella 0,1 – 0,5 ppm. Menetelmän todettiin olevan näillä alueilla myös toistettava, spesifinen ja lineaarinen.</p>	
Avainsanat: arseeni, lyijy, ICP-OES, optimointi, validointi	

ABSTRACT

Name: Maiju Lahti	
Title: Determination of Arsenic and Lead in Fructose and Xylitol with ICP-OES-Technique – Optimization and Validation of the Method	
Date: March 11, 2009	Number of pages: 44 pp. + 2 appendices
Department: Laboratory Sciences	
Instructors: Mia Ruismäki, M. Sc Maria Heinonen, Laboratory Analyst	
<p>The purpose of this study was to combine two separate analysis methods, “Determination of Arsenic and Lead in Fructose-“ and “Determination of Arsenic and Lead in Xylitol with ICP-OES-Technique”, and optimize and validate this new, combined method into use. The study was carried out at the laboratory of the Danisco Sweeteners Ltd. Kotka factory.</p> <p>Sweeteners are manufactured from natural raw materials and consequently toxic heavy metal contaminations, like arsenic and lead, may be found in fructose and xylitol. There are regulations for the concentration limits of these metals, and that is why the heavy metal load has to be controlled.</p> <p>In the optimizing part, the fructose matrix calibration’s functionality was tested by analyzing both fructose- and xylitol samples. Also the appropriate sample matrix concentration, sample introduction features and background correction was optimized. By maximizing the sensitivity of the ICP-OES, lower limits of detection were pursued. In the validation, the accuracy, precision, specificity, limit of detection and -quantification, linearity and working range of the method had to be determined.</p> <p>The method was tested for arsenic in concentration range 0.0 – 3.0 ppm and for lead in range 0.0 – 0.5 ppm. In the optimization it was discovered, that fructose matrix calibration gave the similar result for the spiked parallel samples irrespective of the sample matrix. The selected optimal sample matrix quantity was 20 %. In the sample introduction- and background correction testing the optimal settings were modified in order to gain the needed ICP-OES’s sensitivity. In the validation the limit of detection was found to be 0.02 ppm for arsenic and lead, and the limit of quantification for both elements was 0.1 ppm. Based on the validation results, the new method can be considered as selective and accurate, with the average recovery being 94 % for arsenic and 98 % for lead. The recovery tests were carried out on measurement range 0.1 – 3.0 ppm for arsenic and 0.1 – 0.5 ppm for lead. In these arsenic and lead concentrations the method was also found reproducible, specific and linear.</p>	
Keywords: arsenic, lead, ICP-OES, optimization, validation	

SISÄLLYS

ALKULAUSE

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

LYHENNELUETTELO

1	JOHDANTO	1
2	ICP-OES-TEKNIikka	2
2.1	Tekniikan periaate	3
2.2	Tekniikan edut	4
2.3	Tekniikan heikkoudet	4
3	ICP-OES-LAITTEISTO	6
3.1	Näytteensyöttöjärjestelmä	6
3.2	Induktiivisesti kytketty plasma	9
3.3	Optiikka ja detektori	10
4	ICP-OES-MENETELMÄN OPTIMOINTI	13
5	ICP-OES-MENETELMÄN VALIDOINTI	14
5.1	Tarkkuus, spesifisyys ja selektiivisyys	14
5.2	Täsmällisyys	14
5.3	Toteamis- ja määrittäysraja	15
5.4	Lineaarisuus ja mittausalue	15
5.5	Häiriöalttius	16
5.6	Mittausepävarmuus	16
6	TYÖN TOTEUTUS	17
6.1	Laitteisto	17
6.2	Reagenssit, välineistö, kalibrointiliuosten ja näytteiden valmistus	18
6.3	Optimointi	19
6.3.1	<i>Laitteiston huuhtelu</i>	20
6.3.2	<i>Näytteensyöttö</i>	22
6.3.3	<i>Matriisivertailu ja matriisin määrä näytteissä</i>	24

6.3.4	<i>Taustankorjaus</i>	25
6.4	Validointi	28
7	TULOKSET JA TULOSTEN KÄSITTELY	30
7.1	Tarkkuus ja selektiivisyys	30
7.2	Täsmällisyys	32
7.3	Toteamis- ja määritysraja	33
7.4	Spesifisyys	35
7.5	Lineaarisuus	37
7.6	Mittausalue	40
8	PÄÄTELMÄT	41
	VIITELUETTELO	43
	LIITTEET	
	LIITE 1	Validoinnin saantokoemittausten tulokset
	LIITE 2	Validoinnin lineaarisuusmittausten regressioanalyysin tulokset

LYHENNELUETTELO

AOAC	<i>Association of Analytical Communities</i>
APA	<i>Auto Peak Adjustment</i>
CID	<i>Charge Injection Device</i>
ICP	<i>Inductively Coupled Plasma</i>
LOD	<i>Limit of Detection</i>
LOQ	<i>Limit of Quantification</i>
OES	<i>Optical Emission Spectroscopy/Spectrometer</i>
ppm	<i>Parts per million</i>
QC	<i>Quality Control</i>
RF	<i>Radio Frequency</i>
USP	<i>United States Pharmacopoeia</i>

1 JOHDANTO

Tämä opinnäytetyö tehtiin Danisco Sweeteners Oy:n Kotkan tehtaiden laboratoriolle. Laboratoriossa analysoidaan lyijyä ja arseenia makeutusainenäytteistä, makeutusaineesta riippuen eri menetelmillä. Menetelmät ovat validoimattomia, ja näytteitä on lähetettävä analysoitaviksi ulkopuoliseen laboratorioon. Opinnäytetyön tavoitteena oli yhdistää, optimoida ja validoida ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry*)-menetelmä arseenin sekä lyijyn määrittämiseksi fruktoosista ja ksylitolista.

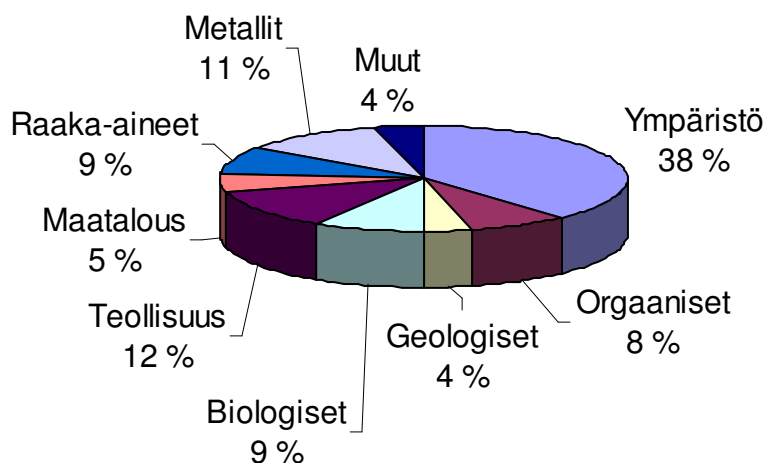
Danisco-konserni koostuu kuudesta divisioonasta, joista yksi on Sweeteners. Sweeteners-divisioonan tuotesarjaan kuuluvat erikoismakeutusaineet sekä niihin liittyvät ainesosat. Sokereiden korvaamiseen tai niiden määrän alentamiseen käytetyt makeutusaineet valmistetaan luonnon raaka-aineista, kuten puusta, maitosokerista ja sukroosista. Makeutusaineiden käytöllä elintarvikkeissa on terveysvaikutteiden lisäksi vaikutusta tuotteen hajoamiseen elimistössä sekä koostumukseen. Makeutusaineilla makeutetut tuotteet eivät vahingoita hampaita, niillä on alhainen glykeeminen indeksi ja ne ovat sokeittomia tai vähäsokerisia tai niihin ei ole lisätty sokeria. Tällaiset elintarvikkeet auttavat välttymään elämäntapasairauksilta, kuten liikalihavuudelta, diabetekselta ja hammasvaurioilta.

Kotkan tehtailla tuotanto aloitettiin vuonna 1912 raakasokerin jalostuksen merkeissä. Vielä samana vuonna tehdas yhdistyi kuuden muun suomalaisen sokeritehtaan kanssa perustaen yhdessä Suomen Sokeri Oy:n. Makeutusaineiden valmistukseen Kotkan tehtailla siirryttiin 1960-luvun lopulla. Ensimmäisiä tuotteita olivat fruktoosi, glukoosi ja sorbitoli, mutta muutamaa vuotta myöhemmin alettiin tehdä myös ksylitolia ja muita polyoleja. Nykyään Danisco Sweeteners Oy:n Kotkan tehtaiden päätuotteita ovat ksylitoli ja fruktoosi, joiden myynti ulottuu 50 maahan ympäri maailman.

Makeutusaineet ovat yleisiä elintarvikkeiden ainesosia, minkä vuoksi niiden vuotuinen kulutus henkilöä kohden on hyvin suuri. Makeutusaineiden sisältämille, kontaminaatioista aiheutuville, elimistölle haitallisille metalleille on asetettu sallitut pitoisuudet. Lyijykontaminaatiot ovat lähtöisin luonnollisesta imeytymisestä maaperästä tai käsittelyn eri vaiheista. [1, s. 4616.] Makeutusaineiden sisältämä arseeni on peräisin luonnosta [2, s. 163].

2 ICP-OES-TEKNIikka

ICP-emissiospektrometria on yksi tärkeimmistä alkuaineanalyysitekniikoista. Sen avulla voidaan mitata noin 70 erilaisissa matriiseissa olevaa alkuainetta. ICP-OES:lla analysoitavat näytteet ovat pääasiassa nestemäisiä, mutta joskus myös kiinteitä tai kaasuja. [3, s. 1 – 2.] Nopeimmillaan alkuainemäärityksiä voidaan tehdä tunnissa tuhansia [4, s. 83]. Kuvassa 1 on esitetty jakauma ICP-OES:n käytöstä eri sovelluksissa [3, s. 5].

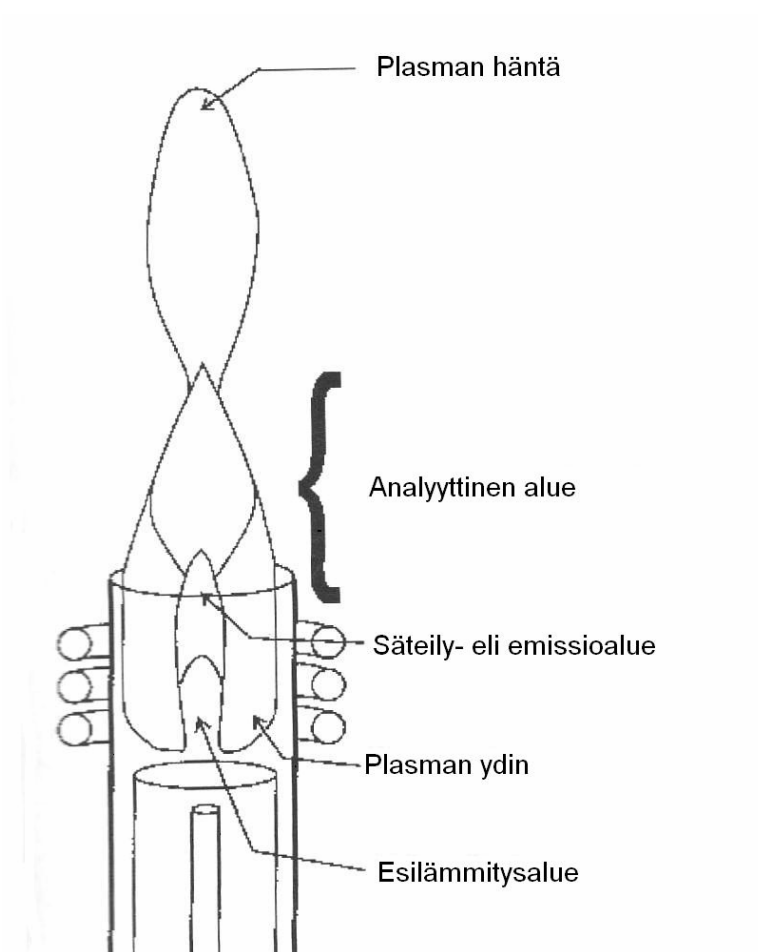


Kuva 1. ICP-OES-tekniikkaa käytetään useissa erilaisissa sovelluksissa. Eniten sitä käytetään ympäristöperäisten näytteiden analysoinnissa. [3, s. 5.]

ICP-OES:lla analysointi perustuu lämpötilaltaan useita tuhansia asteita olevaan plasmaan. Plasman lämmön vaikutuksesta näyteliuotin haihtuu, näyte höyrystyy ja lopulta atomisoituu sekä osin ionisoituu. [4, s. 83.] Plasmassa atomit ja ionit virittyvät, ja viritystilan purkautuessa atomit ja ionit emittoivat kullekin alkuaineelle spesifistä elektromagneettista säteilyä [3, s. 3]. Tästä säteilystä näytteen sisältämät alkuaineet ja niiden pitoisuudet saadaan selville optiikan ja detektorin avulla.

2.1 Tekniikan periaate

Plasman alue, jonka läpi näyteaerosoli analysoitaessa kulkee, on nimeltään analyyttikanava. Se on plasman näkyvä, kirkkaanvärinen osio. Plasma voidaan jakaa analyttisiltä osiltaan viiteen alueeseen; plasman ydin-, esilämmitys-, säteily- ja analyttiseen alueeseen, sekä plasman "häntään" (kuva 2). [3, s. 25.]



Kuva 2. Plasma on jaettavissa viiteen eri analyttiseen alueeseen. Niihin kuuluvat esilämmitysalue, plasman ydin, emissio- ja analyttinen alue, sekä plasman häntä. [3, s. 25.]

Ulkopuolelta, induktiokäämistä plasmaan johtuva energia kytkeytyy plasmaan sen ytimessä, ja niinpä ydin onkin plasman kuumin alue. Ytimen kautta energiaa siirtyy muualle plasmaan, pääasiassa kantokaasun mukana saapuvaan näyteaerosoliin. Esilämmitysalueella näyte kuivuu, kuiva-ainetta suuraa ja höyrystyy. Seuraava alue on säteily- eli emissioalue, jolla tapahtuu atomisaatiota, eksitaatiota ja täten valon emittoitumista. Myöhemmin valoa

emittoituu, kun atomit muodostavat ioneja vapauttamalla elektroneja. Ionisia siirtymiä tapahtuu eniten analyyttisellä alueella, joka sijaitsee plasman ytimen ulkopuolella. Plasman hännän kohdalla plasmaan ei enää siirry energiaa, joten lämpötila alkaa laskea. Ionit muodostavat elektronien kanssa atomeja, jotka reagoivat keskenään muodostaen molekyylejä. Näytteen keskimääräinen viipymisaika plasmassa on vain muutamia millisekunteja. [3, s. 25; 12.]

Virittyneiden atomien ja ionien viritystilan purkautumisen seurauksena emittoitunut valo jaetaan monokromaattorilla spektriiksi. Näytteessä olleet alkuaineet ovat tunnistettavissa emittoituvien spektriviivojen aallonpituuksien, ja alkuainepitoisuudet spektriviivojen intensiteettien perusteella. [4, s. 83.]

2.2 Tekniikan edut

ICP-OES:lla mitattaessa kemiallisia häiriöitä ei juuri tapahdu, sillä plasman inertti argonkaasu ei tuota plasmaan häiritseviä reaktiotuotteita. Näytteen analyytit saadaan mitattua helposti, sillä plasman korkeassa lämpötilassa yhdisteet atomisoituvat ja virittyvät tehokkaasti. [4, s. 89.] ICP-OES:lla säävutetaan lyhyet analyysiajat; koska kaikki alkuaineet emittoivat valoa plasmassa samanaikaisesti, voidaan eri alkuaineiden emittoivien valojen intensiteetit mitata samalla tai peräkkäin toistensa jälkeen. Myös mittausalue on laaja, useimmiten se ulottuu kuudenteen kertaluokkaan asti. [3, s. 1.] Laaja mittausalue mahdollistaa sekä pienten että suurten pitoisuuksien mittauksen samoilla säädöillä, joten laimennoksia ja konsentrointia ei tarvita [4, s. 83].

2.3 Tekniikan heikkoudet

ICP-OES-tekniikkaan liittyy myös useita heikkouksia. Niihin lukeutuu kiinteiden näytteiden vaatima, joskus hyvin työläskin, esikäsittely [5]. Tavoitteena on saada näyte liukenemaan johonkin liuottimeen. Näytteille suoritettava esikäsittely riippuu näytetyypistä ja tutkittavasta analyytistä [6].

Häiriötilanteista 90 % aiheutuu kuitenkin näytteesyöttöjärjestelmästä. Nykyään ICP-OES mittaa alkuaineita $\mu\text{g/l}$ tasolle asti, joten näytteen kontaminoinumisen välttämiseksi on kiinnitettävä erityistä huomiota reagenssien ja

välineiden puhtauteen. Korkeat analyttipitoisuudet saattavat joissakin tapauksissa aiheuttaa laitteistoon kontaminaatioita, eli muistiefektin. Muistiefekti vaikuttaa seuraavan näytteen mittaustuloksen tarkkuuteen aiheuttamalla liian suuren signaalin. Ilmiö on havaittavissa tarkastelemalla toistomittauksia, jolloin alkupään toistomittauksien pitoisuudet ovat seuraavia korkeampia. Jos muistiefektiä on havaittavissa, auttaa pesuliuksen happopitoisuuden nostaminen parista prosentista kymmeneen. Muistiefektin välttämiseksi voidaan myös käyttää automaattista pesuajan pidennystä korkeiden pitoisuuksien yhteydessä. [7.]

Tekniikkaan liittyy myös spektraalisia ongelmia. ICP-OES:lla mitatut spektrit ovat erittäin emissioviivarikkaita, ja myös spektraalisia häiriöitä esiintyy paljon. Yleisin spektraalinen häiriö ICP-OES-tekniikassa on jonkin analyytin aikaansaama jatkuva spektri aallonpituuksilla, joilla sijaitsee myös analysoitavien alkuaineiden emissioviivoja. Tällainen häiriö voidaan eliminoida taustankorjauksella. Spektraalisessa peittämässä analyyttien emissioviivat ovat spektrissä päällekkäin, tai jäävät näkymättömiin voimakkaamman matriisialkuaineen viivan alle. Yhden analyytin signaali on kuitenkin detektoitavissa useammalla eri emissioaallonpituudella, jolloin signaali voidaan mitata häiriöttömällä aallonpituudella. Mittauksia häiritsevät komponentit voidaan myös poistaa näytteistä erilaisilla esikäsittelymenetelmillä. [4, s. 89.]

Ulkoisten tekijöiden, kuten plasmahuoneen lämpötilan ja ilmastonin, vakiointi ja tasaisena pitäminen vaikuttavat mittausten stabiiliuteen. Myös näytteiden stabiilius vaikuttaa – mikäli mitattavat aineet eivät pysy liuoksessa stabiilina, ei mittauksilla ole pohjaa. [7.]

Koska ICP-OES-laitteistossa käytetään argonia näytteen kuljettamiseen ja kaasumaiseen olomuotoon muuttamiseen, plasman muodostamiseen ja jäähdyttämiseen, kuluu argonia näihin toimenpiteisiin yhteensä noin 20 l/min. Esimerkiksi yksi 50 l:n 200 bar:n kaasupullo riittää vain noin kahdeksan tunnin ajoon. [8.] Argonin suuren kulutuksen vuoksi tekniikan käyttökustannukset ovat melko korkeat.

3 ICP-OES-LAITTEISTO

ICP-OES-laitteisto koostuu näytteensyöttöjärjestelmästä, plasmasta, optiikasta ja detektorista. Tämän työn mittauksissa käytetyssä ICP-OES-laitteessa, *Iris Intrepid II XDL*:ssä, on *Meinhard*-sumutin, sykloninen sumutinkammio, pidennetty soihtu, *Echelle*-optiikka ja CID (*Charge Injection Device*)-detektori.

3.1 Näytteensyöttöjärjestelmä

Näytteensyöttöjärjestelmän tehtävänä on saada näyte muotoon, jossa se voidaan syöttää plasmaan plasman stabiiliuteen ja analyytistä saatavaan emissiosignaaliin vaikuttamatta [3, s. 39]. Näytteensyöttöjärjestelmään kuuluu automaattisesta näytteensyöttäjän jälkeen pumppu, sumutin ja plasmasoihduun johtava sumutinkammio.

ICP-OES:lla analysoitavasta nestemäisestä näytteestä muodostetaan pieniä pisaroita, jotka hajotetaan sumuttamalla hienojakoiseksi aerosoliksi. Mitä pienempiä pisarat ovat, sitä helpommin käy niiden kuivaus ja myöhemmät hajotusvaiheet plasmassa. Jos plasmaan pääsee liian suuria määriä näyteaerosolia, plasma sammuu. Näin tapahtuu, sillä kytkentäenergia ei riitä koko prosessin, kuivauksesta eksitaatioon, suorittamiseen. Määrät, jotka ovat lähellä plasman sammumiselle kriittistä näytemäärää, tekevät plasmasta epästabiilin. Epästabiili plasma taas pienentää analyytin antamaa signaalia. Näytettä on kuitenkin syötettävä plasmaan tarpeeksi hyvän herkkyuden saavuttamiseksi. Myös näytteen fysikaaliset ominaisuudet, kuten viskositeetti, pintajännitys ja tiheys vaikuttavat plasmaan sumutettavan aerosolin määrään. [3, s. 39 – 40.] Kokonaisuudessaan näytteensyöttöjärjestelmään syötetystä näytteestä vain 1 % kulkeutuu aerosolina plasmaan, 99 % päätyy jätteisiin [8].

Pumppu

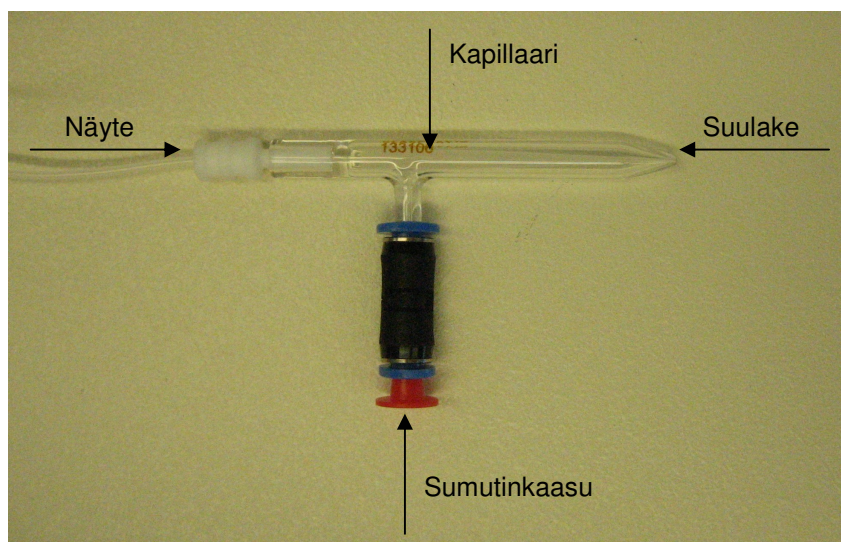
Tavallisimmin käytetty pumpputyyppejä on peristalttinen pumppu. Pumpun tehtävänä on siirtää sen läpi virtaavaa liuosta eteenpäin näytteensyöttöjärjes-

telmässä niin tasaisesti kuin mahdollista. Mitä enemmän pyöriviä rullia pumpussa on, sitä parempi pumppaustiheys sillä saavutetaan. Hyvällä pumpulla päästään lyhyempiin analyysiaikoihin, tai vaihtoehtoisesti samalla mittauksen kestolla saavutetaan parempi toistettavuus. Toinen pumpun toimivuuteen vaikuttava tekijä on pumpun pidikkeiden näytteensyöttö-, näytteenpoisto- ja huuhteluletkuihin aiheuttava paine. Liian matala tai korkea paine alentaa analyysien toistettavuutta. [3, s. 55 – 56.]

Sumutin

Sumutin muuttaa nestemäisen näytteen aerosoliksi. Kaksi yleisintä käytössä olevaa sumutintyyppiä ovat ultraääni- ja pneumaattinen sumutin. Ultraäänisumuttimella näyte pumpataan levyille, joka värisee ultraäänitaajuudella muodostaen näyteliuksesta pisaroita. Pneumaattisessa sumuttimessa näytesumun saa aikaan kantajakaasun muodostama alipainealue, joka hajottaa liuoksen pieniksi pisaroiksi. Pneumaattisesta sumuttimesta on useita variaatioita, joista yleisimpiä ovat konsentrisen, eli *Meinhard*-sumutin (kuva 3), *Cross-Flow*-sumutin sekä *Babington*-sumutin. [3, s. 41.]

Meinhard-sumutinta käytettäessä saavutetaan pienimmät hajonnat näytteensyötössä [4, s. 86]. Lisäksi likaantuessa se on erittäin helppo pyyhkiä ulkopuolelta, mutta kapillaariin joutunut lika on vaikea puhdistaa [8.]



Kuva 3. *Meinhard*-sumuttimen rakenne

Sumutinkammio

Sumutinkammio on näytteensyöttöjärjestelmässä kytkettynä sumuttimeen ja plasmasoihduun. Sen päätehtävä on poistaa sumuttimesta tulevat liian suuret pisarat niin, etteivät ne pääse plasmaan. Sumutinkammion geometrisesta muodosta ja kantajakaasun virtausnopeudesta riippuen pisaroille määräytyy raja, jonka alittavat pisarat kulkeutuvat edelleen plasmaan. Yli jäävät näytepisarat valuvat pumpun kautta jäteastiaan. Yleisimmin käytettyjä sumutinkammioita ovat *Scott*- ja sykloninen kammio (kuva 4), joista *Scott*-malli on ollut käytössä ICP:n alkuajoista lähtien. Syklonisen kammion käyttö parantaa herkkyyttä noin 50 %:lla. [3, s. 49; 54.]



Kuva 4. Sykloninen sumutinkammio *Meinhard*-sumuttimeen ja plasmasoihduun kiinnitettynä

Sumutinkammioita valmistetaan muun muassa lasista, kvartsista ja polymeereistä. Sopiva materiaali valitaan niin, että kammio kestää analysoitavien näytteiden valmistuksessa ja pesussa käytettävät liuottimet, hapot ja muut reagenssit, sekä sumutinkammiossa vallitsevaa jatkuvaa kosteutta. Pintamateriaalin vaurioituminen alentaa tulosten toistettavuutta. [3, s. 51.]

3.2 Induktiivisesti kytketty plasma

RF-generaattori

Plasmaa ylläpitävän, induktiokäämiin johdettavan energian synnyttää RF (*Radio Frequency*) -generaattori. Yleensä ICP-OES:lla mitattaessa asetettu RF-virta on välillä 800 ja 1500 W, jonka on tasaisesti jatkuvan emissiosignaalin saavuttamiseksi pysyttävä stabiilina. [3, s. 37 – 38.]

Plasmasoihtu

Induktiokäämiä plasmalta suojaa plasmasoihtu. Plasmasoihtu koostuu kolmesta sisäkkäisestä kvartsiputkesta, joista sisimmässä kulkee näyte sumutinkaasussa, keskimmaisessä soihtua plasman lämmöstä aiheutuvalta sulamiselta estävänä jäähdyttävänä kaasuna argonia, ja uloimmassa plasma-kaasuna argonia. Monissa laitteissa on käytössä lyhyt soihtu, jonka uloin putki ulottuu juuri peittämään induktiokäämin. Pidentetyt soihtut taas estävät ympäröivän ilman pääsyn plasmaan, mikä vähentää selkeästi plasman ja ilman yhdessä muodostamien haitallisten kaasujen, kuten otsonin ja typpioksidien syntyä. Täten myöskään typen oksidit eivät aiheuta spektriin ylimääräistä taustaa sille ominaisella aallonpituudella. [3, s. 14 – 15.]

Plasma

Induktiivisesti kytketty plasma synnytetään ulkoisella radiotaajuuksisella magneettikentällä [4, s. 84], ja sen ylläpitämiskaasuna käytetään yleisimmin argonia. Argon on suosituin plasmakaasu, sillä jalokaasuksi argonilla on suhteellisen korkea järjestysluku, ja täten sen elektronikuori on helposti polarisoitavissa. Tästä johtuen argon myös luovuttaa elektroneja helpommin muihin jalo- ja molekyylikaasuihin verrattuna. Argonia käytettäessä säästyy siis energiaa, ja verrattuna muihin vaihtoehtoihin on se myös suhteellisen edullista. [3, s. 11.]

Plasma on ionisoitunutta kaasua, jossa positiivisesti varautuneet argonionit ja negatiivisesti varautuneet elektronit liikkuvat itsenäisesti. Näiden varautuneiden partikkeleiden liike määräytyy ulkoisen elektromagneettisen kentän aikaansaaman argonionien ja elektronien kiihtyvyyden mukaan. Neutraaleis-

ta partikkeleista tulee varauksellisia niiden törmätessä varauksellisiin partikkeleihin, ja näin myös ne kiihtyvät liikkeeseen. [3, s. 11.]

Plasman lämpötila ei ole tasainen, vaan plasma on jakautunut kuuteen eri vyöhykkeeseen, jotka ovat lämpötilaltaan 5 300 – 10 000 K. Näyteaerosolia sisältävä kantokaasu syötetään plasman kuumimman, rengasmaisen alueen keskelle. Kantokaasu ja täten myös sen sisältämä näyteaerosoli saa energiansa täältä alueelta, ja saavuttaa lämpötilamaksiminsa juuri plasmarenkaan jälkeen. Näytteen läpäistyä plasman kuumimman alueen, ei näytteeseen enää siirry energiaa, mikä johtaa näytteen energian purkautumiseen säteilynä. Seurauksena myös plasman lämpötila laskee tällä alueella. [3, s. 12.]

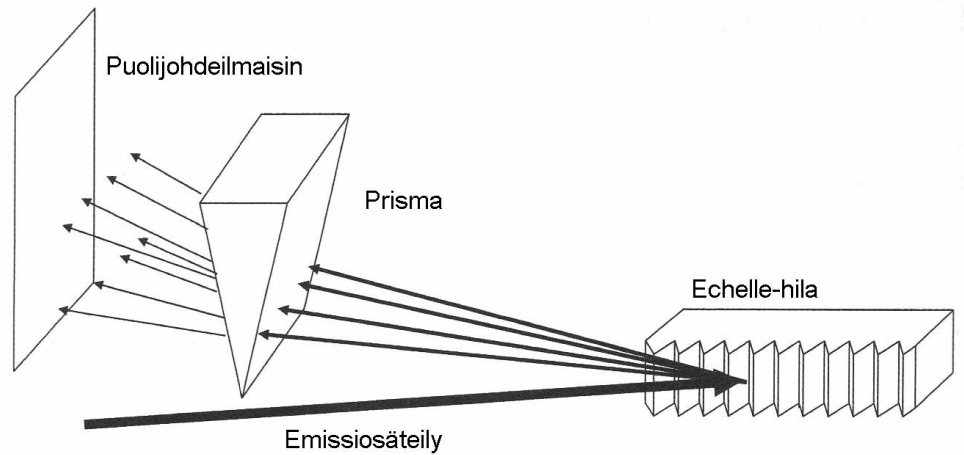
Spektrometri voi lukea plasmaa kahdesta geometrisesta suunnasta, radiaalisesti, eli sivulta, tai aksiaalisesti, eli pituussuunnassa [3, s. 32]. Arseenia ja lyijyä mitataan aksiaalisella ICP-OES-tekniikalla.

3.3 Optiikka ja detektori

Optiikaltaan ICP-OES-laitteita on olemassa kahdenlaisia; simultaanilaitteita, joissa kaikki emissioviivat mitataan samanaikaisesti, sekä sekvenssilaitteita, joissa emissioviivat mitataan peräkkäin toistensa jälkeen. [3, s. 75.] Sen lisäksi, että laitteita on kahta tyyppiä, on niihin vielä valittavissa useita eri optikkajärjestelmiä ja detektoreita.

Optiikka

Echelle-optiikan hila on mekaanisesti uritettu, ja siinä on noin 50 – 100 uraa millimetriä kohden. Täten hilalla saavutetaan todella hyvä resoluutio [3, s. 77]. Hilan reunaan kohdistuneesta emissiosäteilystä hyödynnetään korkeiden kertalukujen emissioviivoja, ja hilalla voidaan valita kullakin aallonpituudella kertaluokka, jolla saavutetaan suurin emissiointensiteetti. Hilan jälkeen kertaluvut erotetaan toisistaan prisman avulla. [4, s. 87.] *Echelle*-järjestelmän toiminta on esitetty pääpiirteittäin kuvassa 5.

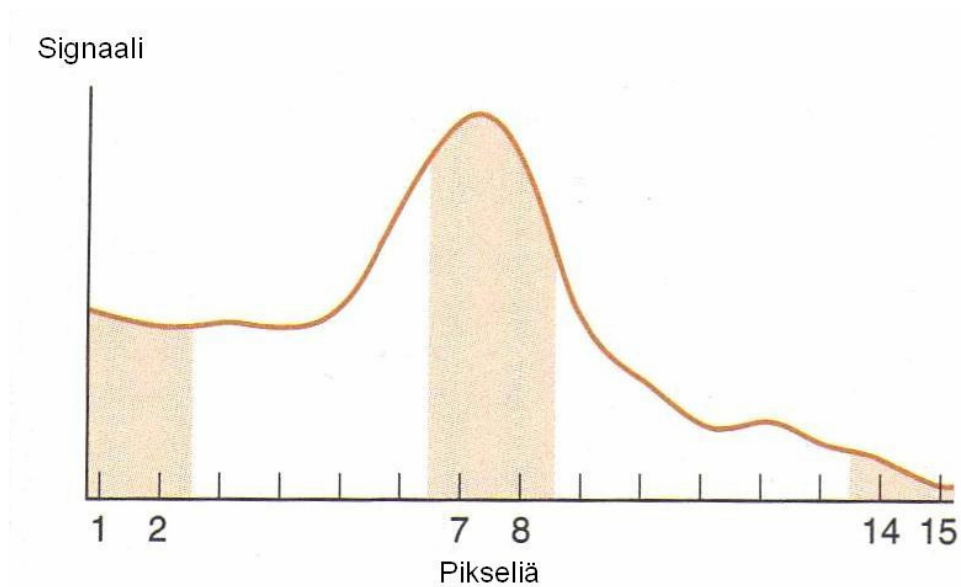


Kuva 5. Echelle-järjestelmässä emissiosäteily kohdistuu hilaan, jonka jälkeen eri kertalukujen emissioviivat erotetaan prismalla. Spektri muodostetaan puolijohdeilmaisimella. [4, s. 88.]

Joissakin simultaani- ja sekvenssispektrometreissä on käytössä myös *Paschen-Rungen*-järjestelmä. Optiikka on järjestetty ympyrän muotoon, ja kovera hila kohdistaa spektrin detektoreille. Sekvenssilaitteissa käytetään eniten *Czerny-Turner*- ja *Ebert*-järjestelmää. Nämä optiikkatyypit perustuvat kääntyvään hilaan. [3, s. 75 – 77.]

CID-detektori

CID-detektori on yksi ICP-OES-tekniikassa käytössä olevista puolijohdedetektoreista [3, s. 87]. Sillä saavutetaan korkea herkkyys ja laaja lineaarinen alue alhaisella kohina-arvolla [9, s. 493]. Spektri muodostuu emissiotäplistä puolijohdeilmaisimen pinnalla [4, s. 87]. Kuvassa 6 on esitetty taustan vähentäminen CID-detektorilla kerätystä emissiospektristä. Kuvassa näkyy 15 pikselin laajuinen alue, joka kuvaa analyytin aiheuttamaa signaalia ja sitä ympäröivää taustaa. Pikselit 7 – 8 on valittu kuvaamaan piikkiä ja pikselit 1 – 2 vasemmanpuoleista- sekä 14 – 15 oikeanpuoleista taustankorjaajaa. Kun piikin pikseleiden keskiarvosignaali vähennetään taustankorjainten keskiarvosignaali, saadaan selville analyytin vasteen suuruus. [10, s. 507.]



Kuva 6. Taustankorjauksen periaate CID-detektorilla [10, s. 507]. Analyyttipiikin pinta-ala saadaan vähentämällä analyytin signaalista (pikselit 7 – 8) taustankorjaajien (pikselit 1 – 2 ja 14 – 15) keskiarvosignaali.

4 ICP-OES-MENETELMÄN OPTIMOINTI

Menetelmää kehitettäessä optimointi suoritetaan parhaiden mahdollisten tulosten saavuttamiseksi. Useimmiten hyvät tulokset saavutetaan laitevalmistajan oletusasetuksilla, ja optimointia tarvitaankin vain menetelmissä, joille laitteen analyttinen suorituskyky ei ole riittävä. Tällöin on kyse vaikeiden analyttien määrittämisestä tai hankalien näytteiden analysoinnista. [3, s. 153.]

Optimoinnissa on huomioitava päätavoite, joka yleensä on alhainen toteamisraja, herkkyden-, tarkkuuden- tai pitkäaikainen stabiiliuden parantaminen, spektraalisten ja epäspektraalisten häiriöiden poissulkeminen tai lyhyt analyysiaika. Näihin ominaisuuksiin vaikuttavien tekijöiden säätämistä on kuitenkin harkittava kokonaisuutena. Esimerkiksi 10 %:n parannus herkkyydessä laskee merkittävästi menetelmän pitkäaikaista stabiiliutta, kun taas parannus toteamisrajassa pidentää analyysiaikaa. Useamman analyttin menetelmää optimoitaessa on huomioitava, että kun suorituskyky yhden analyttin määrittämiseksi nousee, voi se toisella laskea. [3, s. 154.]

5 ICP-OES-MENETELMÄN VALIDOINTI

5.1 Tarkkuus, spesifisyys ja selektiivisyys

Tarkassa menetelmässä ei ilmene systemaattista virhettä, ja satunnaisvirhettäkin on havaittavissa vain vähän. ICP-OES-tekniikassa tarkkuus ja spesifisyys ovat käytännössä yhteydessä toisiinsa, sillä analyytin määrittäminen tapahtuu sille spesifisellä emissioaallonpituudella. Spektraaliset häiriöt aiheuttavat analyytisellä viivalla epäspesifistä signaalia, mikä taas johtaa virheelliseen tulokseen. Tarkkuuteen vaikuttaa myös epäspektraalisten häiriöiden korjaus tai korjauksen puuttuminen. [3, s. 158.]

Menetelmän tarkkuutta voidaan tutkia esimerkiksi takaisinsaantokokeilla. Tarkka menetelmä on myös selektiivinen, sillä tarkka menetelmä pystyy luotettavasti tunnistamaan analyytin aikaan saaman vasteen muista vasteista. [11.] Spesifisyys on todennettavissa identifiointitestillä [12, s. 6].

5.2 Täsmällisyys

Täsmällisyys koostuu uusittavuudesta ja toistettavuudesta. Uusittavuus kertoo mittaustulosten yhtäpitävyydestä, kun näytteen analysoivat eri henkilöt, eri aikana, eri laboratorioissa ja eri laitteella. [11.]

Menetelmän toistettavuus kuvaa sen lyhytaikaista stabiiliutta, ja on rinnastettavissa mittausten keskihajontaan. Lyhytaikaiseen stabiiliuteen vaikuttavat näytteensyöttösystemin ja plasman vaihtelut sekä detektorin kohina. Vaikka toistettavuus ei ole tarkkuuden mitta, on se silti tärkeä tuloksen luotettavuudesta kertova parametri. [3, s. 160.]

Laboratorion sisäinen toistettavuus taas kertoo mittaustulosten yhtäpitävyydestä muuttuvissa olosuhteissa laboratorion sisällä; päivä, tekijä ja laite. Laboratorion sisäinen toistettavuus saadaan määritettyä Päivästä päivään -testillä. Päivästä päivään -testin mittaustulosten tulisi sijoittua empiirisesti määritetyn *Horwitzin* yhtälön rajoihin. Yhtälö perustuu AOAC:n (*Association of Analytical Communities*) laboratorioden välisten vertailututkimusten aineistoon, ja se on osoitettu päteväksi tekniikasta ja menetelmästä riippumatta. *Horwitzin* yhtälön periaate on, että laboratorioden tulosten välinen suh-

teellinen keskihajonta, RSD (%), on riippuvainen ainoastaan analysoidun näytteen analyttipitoisuudesta. Yhtälö on esitettyä kaavassa 1:

$$RSD (\%) = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad (1)$$

missä C on analyttikonsentraatio massaosuutena.

Horwitzin yhtälöllä saadaan laskettua eri laboratorioden välillä mittaustuloksissa sallittu RSD (%). Saman laboratorion sisällä suoritetuissa mittauksissa, kuten Päivästä päivään -testissä, saa RSD (%) olla vain $\frac{2}{3}$ *Horwitz*-arvosta. [11.]

5.3 Toteamis- ja määrittäysraja

Toteamisraja (LOD) kuvaa analyttipitoisuutta, jonka signaali on selvästi erotettavissa taustasta. Tämä ei kuitenkaan tarkoita, että signaali olisi mitattavissa ja kvantitoitavissa. Toteamisraja on yksinkertaisimmin määritettävissä nollanäytteen uusittavuudesta. [3, s. 161 – 162.]

Määrittäysraja (LOQ) on menetelmällä matalin kvantitoitavissa oleva analyttipitoisuus. Myös määrittäysraja voidaan selvittää nollanäyttemenetelmällä. [3, s. 165.]

5.4 Lineaarisuus ja mittausalue

Menetelmän mittausalueella tarkoitetaan pitoisuusaluetta, jolla tarkkuuden, täsmällisyyden ja lineaarisuuden on todettu olevan riittävä [11]. Mittausalue alkaa menetelmän määrittäysrajasta ja asetetaan päättyväksi suurimman kalibrointiliuoksen pitoisuuteen. Mittausalueen ylärajana on viimeistään lineaarisen alueen päätepiste. Lineaarisen alueen kuudenteen kertaluokkaan ulottuminen on kuitenkin harvinaista rutiinianalyseissä, sillä korkeita analyttipitoisuuksia mitattaessa tapahtuu muistiefektiä. Muistiefektin ilmeneminen ra-

joittaakin mittausalueen yleensä noin neljanteen kertaluokkaan. [3, s. 164 – 165.]

Signaalin lineaarista riippuvuutta analyyttipitoisuudesta tulisi arvioida visuaalisesti kalibrintisuoran kuvaajasta. Jos lineaarista riippuvuutta on visuaalisesti havaittavissa, tulisi se todentaa sopivalla tilastollisella menetelmällä, esimerkiksi residuaalikuvaajalla tai regressioanalyysillä. [13, s. 3.]

5.5 Häiriöalttius

Menetelmän häiriöttömyys on todennettava validoinnissa [3, s. 159]. Häiriöttömyyden todentamiseksi on kyettävä esittämään, ettei pieni muutos analyttisissä toimintatavoissa, joita mittauksissa käytetään, vaikuta merkittävästi tulokseen. ICP-OES-tekniikassa häiriöalttiuden testaaminen on vaikeaa, tai lähes käytännössä mahdotonta toteuttaa, sillä mittauksiloksiin vaikuttavat niin monet eri parametrit. Mittauksissa tapahtuvaa vaihtelua on kuitenkin mahdollista seurata kontrollinäytteellä. QC (*Quality Control*) -näytettä voidaan pitää jatkuvana menetelmän häiriöttömyyden todentajana. [3, s. 167.]

5.6 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus kertoo mittauksilosalueen, jonka sisälle todellinen arvo tietyllä todennäköisyydellä sijoittuu. Mittauksilotos sisältää aina epävarmuuslähteitä, jotka liittyvät näytteenottoon, esikäsittelyyn ja itse mittauksitapahtumaan. Virheitä on satunnaisia ja systemaattisia, joista systemaattinen virhe pyritään menetelmää validoidessa poistamaan tai huomioimaan laskennallisesti. [14, s. 16.]

Laboratorion sisäistä uusittavuutta voidaan pitää jonkinlaisena lähtökohtana menetelmän mittausepävarmuutta arvioitaessa. Laboratorion sisäistä uusittavuutta tarkkailtaessa tulevat useimmat epävarmuustekijät huomattua. Tarvittaessa voidaan lisäksi ottaa huomioon mahdolliset muut merkittävät mittauksiloksen epävarmuutta lisäävät tekijät. [14, s. 18.]

6 TYÖN TOTEUTUS

Tässä työssä tavoiteltiin kahden käytössä olevan menetelmän yhdistämistä: ”Arseenin ja lyijyn määrittäminen fruktoosista ICP-OES-tekniikalla” sekä ”Arseenin ja lyijyn määrittäminen ksylitolista ICP-OES-tekniikalla”. Yhdistetty menetelmä tuli myös optimoida ja validoida. Uudella menetelmällä oli tavoitteena saada analysoitua samalla standardisuoralla arseenia ja lyijyä sekä fruktoosi- että ksylitolinäytteistä. Standardisuoran liuosten matriisina käytettiin fruktoosia. Lisäksi haasteena oli alhaisempien määrittäysrajojen saavuttaminen; vanhojen menetelmien rajat olivat arseenille 0,5 ppm ja lyijylle 0,3 ppm, kun niiden uudessa menetelmässä haluttiin molempien olevan 0,1 ppm. ”Arseenin ja lyijyn määrittäminen fruktoosista ja ksylitolista ICP-OES-tekniikalla” –menetelmälle oli suoritettava täysvalidointi. Menetelmä on *In House* –tyyppiä, joten sille oli määritettävä USP:n (*United States Pharmacopoeia*) suositusten mukaisesti tarkkuus, täsmällisyys, spesifisyys, toteamis- ja määrittäysraja, lineaarisuus sekä mittausalue.

6.1 Laitteisto

Mittaukset suoritettiin *Thermo Electronin* valmistamalla ICP-OES:lla, *IRIS Intrepid II XDL*:lla, johon oli kytkettynä *Cetac ASX-510 AutoSampler* –näytteensyöttäjä. ICP-laitteisto koostui seuraavista *Hosmed Oy:n* komponenteista:

- sumutin: *Sea Spray Nebulizer*, Tj14186300
- sumutinkammio: *Cyclonic Spray Chamber, Extended Neck*, Tj14451500
- keskiputki: *Torch Quartz Center Tube, 2 mm*, Tj13650201
- soihtu: *Torch Quartz Dual View*, Tj12644005

Mittaukset tehtiin ajo-ohjelmalla ”As Pb fruktoosi optimointi” ja tulokset käsiteltiin *TEVA ICP Software* –ohjelmistolla.

6.2 Reagenssit, välineistö, kalibrointiliuosten ja näytteiden valmistus

Työn liuosten valmistukseen käytettiin ultrapuhdasta *MilliQ*-vettä, sekä seuraavia reagensseja:

- 1000 ppm arseeniliuos, Romil, Code E3AS4
- 1000 ppm kalsiumliuos, Romil, Code E3CA4
- 1000 ppm lyijyliuos, Romil, Code E3PB4
- 1000 ppm natriumliuos, Romil, Code E3NA4
- 1000 ppm nikkeli-liuos, Romil, Code E3NI4
- 67 – 69 % HNO₃, Romil SpA Super Purity Acid, Code H566
- 69 – 70 % HNO₃, p.a., J.T. Baker, Cas NO 7697-37-2

Kaikki standardiliuokset sekä näytteet valmistettiin 15 % *super purity*-tyyppihapolla pestyihin mittapulloihin. Matriisina käytettiin testattua arseeni- ja lyijyvapaata fruktoosia (8135147 4350951406, MFD 2.4.2008) sekä ksylitolia (8136899 4351025080, MFD 24.7.2008). Kalibrointi suoritettiin fruktoosimatriisiin valmistetuilla liuksilla, joiden arseenipitoisuudet olivat 0,00, 0,05, 0,10, 0,50, 1,00 ja 3,00 ppm sekä lyijypitoisuudet 0,00, 0,05, 0,10, 0,20, 0,30 ja 0,50 ppm.

Fruktoosi- ja ksylitolimatriisiin valmistetut liuokset eivät vaatineet näytteenkäsittelyä ennen analysointia, sillä nämä makeutusaineet olivat vesiliukoisia, ja niiden myötä myös tutkittavat analyytit siirtyivät liuoksiin. Analyyttien täydellisen matriisistaan vapautumisen takaamiseksi lisättiin näytteisiin 3 tilavuus-% 67 – 69 % *super purity*-tyyppihappoa. Tyyppihappo toimi tässä tapauksessa myös säilöntäaineena, joten sitä lisättiin näytteiden tavoin myös standardiliuoksiin.

Emissioviivojen päivittäisessä paikallaan pysymisen tarkastamisessa käytetty APA (*Auto Peak Adjustment*)-näyte oli ultrapuhtaaseen veteen valmistettu seosliuos, joka sisälsi arseenia 10 ppm, kalsiumia 1 ppm, lyijyä 10 ppm, natriumia 10 ppm ja nikkeliä 1 ppm. Myöskään APA-liuos ei tarvinnut muun-

laista näytteenkäsittelyä, kuin 3 tilavuus-% 67 – 69 % *super purity*-tyyppihappolisäyksen.

6.3 Optimointi

Optimoinnin päätavoitteina oli saada mittauksissa arseenille ja lyijylle mahdollisimman suuret signaalit, eli intensiteettiarvot ja laaja suhteellinen intensiteettialue, mitkä laskevat mittaustulosten suhteellista hajontaa. Lisäksi tarkkailtiin laitteiston mahdollista kontaminoitumista. Optimointi suoritettiin 10 % näytematriisia sisältävillä liuoksilla, mutta validointia ei 10 % liuoksilla saatu suoritettua. Validoinnin epäonnistuttua saantokokeissa, joissa saantonäytteiden arseeni- sekä lyijypitoisuus oli 0,1 ppm, päätettiin validointi aloittaa uudelleen 20 % näytematriisia sisältävillä liuoksilla. Näytteen matriisimäärää nostettaessa kasvaa varsinaisen näytematriisin, tässä tapauksessa fruktoosin ja ksylitolin, lisäksi myös näytteen sisältämän analyytin, kuten arseenin ja lyijyn, määrä. Täten näytematriisiosuuden kasvaessa nousee myös saatava signaali samassa suhteessa. Näin saavutetaan kalibroinnille laajempi suhteellinen intensiteettialue ja mittausten suhteellinen hajonta laskee. Näytematriisiosuutta kasvatettaessa myös osa optimoinnista oli tehtävä uudelleen. Optimoinnissa laitteiston määritysasetukset olivat taulukon 1 mukaiset.

Taulukko 1. ICP-OES-laitteiston määrittämissä asetukset optimoinnissa

Plasmakaasu (Ar 99,998 %)	15,0 l/min
Lisäkaasu (Ar 99,998 %)	0,5 l/min
Sumuttimen virtaus	0,55/0,56/0,57/0,60 l/min
Näytteenottoaika	30/60/90 s
Huuhteluaika	60/90/120 s
Pumpun kierrosluku	130 rpm
Aallonpituus	As 189,042 nm/Pb 220,353 nm
Soihdun orientaatio	aksaalinen
RF-virta	1,35 kW
Alimatriisi-ikkuna	27 pikseliä
Alimatriisin korkeus	3 pikseliä
Toistomittauksia	3
Korrelaatiokerroin	> 0,999
QC-näyte	± 15 %
Pisteen maksimipoikkeama (%) suoralta	± 15 %

6.3.1 Laitteiston huuhtelu

Laitteiston huuhtelua testattiin näytesarjalla, joka sisälsi eri pitoisuuksia arseenia ja lyijyä omaavia näytteitä. Sarjan mittaustuloksissa seurattiin nollanäytteen mahdollista kontaminoitumista mittausten edetessä. Käytössä olevien menetelmien arseenin ja lyijyn määrittämiseksi fruktoosista ja ksylitolista huuhteluliuksena oli käytössä 10 % HNO₃ *super purity* ja huuhteluaikana 60 s ja 90 s. Huuhtelun tehokkuutta vertailtiin hapon kulutuksen minimoimiseksi kahdella eri huuhteluliuksella; 5 % HNO₃:lla ja 10 % HNO₃ *super purity*:lla (taulukko 2). Kontaminaatiota ei ollut havaittavissa, eikä mittaustulosten suhteellinen hajonta juurikaan vaihdellut eri huuhteluliuksia käytettäessä. Laajempi suhteellinen intensiteettialue näytteille, joiden arseenipitoisuudet olivat 0,0 – 2,0 ppm sekä lyijypitoisuudet 0,0 – 0,4 ppm, saavutettiin 10 % HNO₃ *super purity* -liuksella, joka täten valittiin käytettäväksi laitteiston huuhteluun.

Taulukko 2. Optimi laitteiston huuhteluliuos valittiin vertailemalla 5 % typpihapolla ja 10 % *super purity* –typpihapolla saatuja tuloksia.

	5 % HNO ₃	10 % HNO ₃ <i>super purity</i>
Suhteellinen intensiteettialue As 0,0 - 2,0 mg/kg (Cts/S)	6,35	6,47
Suhteellinen intensiteettialue Pb 0,0 - 0,4 mg/kg (Cts/S)	2,03	2,05
RSD (%) As 0,0 mg/kg	10,71	12,79
RSD (%) Pb 0,0 mg/kg	1,69	1,15
RSD (%) As 0,5 mg/kg	1,26	0,40
RSD (%) Pb 0,1 mg/kg	2,28	0,31
RSD (%) As 2,0 mg/kg	0,47	0,60
RSD (%) Pb 0,4 mg/kg	0,93	0,74
RSD (%) keskiarvo	2,89	2,67

Huuhteluliuoksen lisäksi optimoitiin huuhtelu-aika. Huuhtelua optimoitiin ajoilla 60 s, 90 s ja 120 s (taulukko 3). Kontaminaatiota ei ilmennyt eri huuhtelu-ajoilla. Myöskään mittaustulosten suhteelliset hajonnat eivät vaihdelleet merkittävästi eri huuhtelu-aikojen välillä, joten menetelmän huuhtelun kestoksi valittiin 120 s, jolla saavutettiin näytesarjalle parhaimmat suhteelliset intensiteettialueet.

Taulukko 3. Optimi huuhtelu-aika etsittiin vertailemalla mittaustuloksia huuhtelun keston ollessa 60 s, 90 s ja 120 s.

	60 s	90 s	120 s
Suhteellinen intensiteettialue As 0,0 - 2,0 mg/kg (Cts/S)	6,91	6,93	7,00
Suhteellinen intensiteettialue Pb 0,0 - 0,4 mg/kg (Cts/S)	2,11	2,06	2,10
RSD (%) As 0,0 mg/kg	4,44	3,40	4,00
RSD (%) Pb 0,0 mg/kg	0,94	1,58	0,95
RSD (%) As 0,5 mg/kg	0,74	0,43	3,43
RSD (%) Pb 0,1 mg/kg	1,07	1,07	0,62
RSD (%) As 2,0 mg/kg	0,61	0,92	0,75
RSD (%) Pb 0,4 mg/kg	0,05	0,33	0,82
RSD (%) keskiarvo	1,31	1,29	1,76

Ennen validoinnin aloittamista 20 % matriisia sisältävillä näytteillä varmistettiin 10 % HNO₃ *super purity* -liuoksen ja 120 s:n ajan riittävän laitteiston

huuhteluun. Kontaminaatiota ei ilmennyt ja mittausten suhteellinen hajonta oli alhaista, joten huuhteluparametreja ei ollut tarvetta muuttaa.

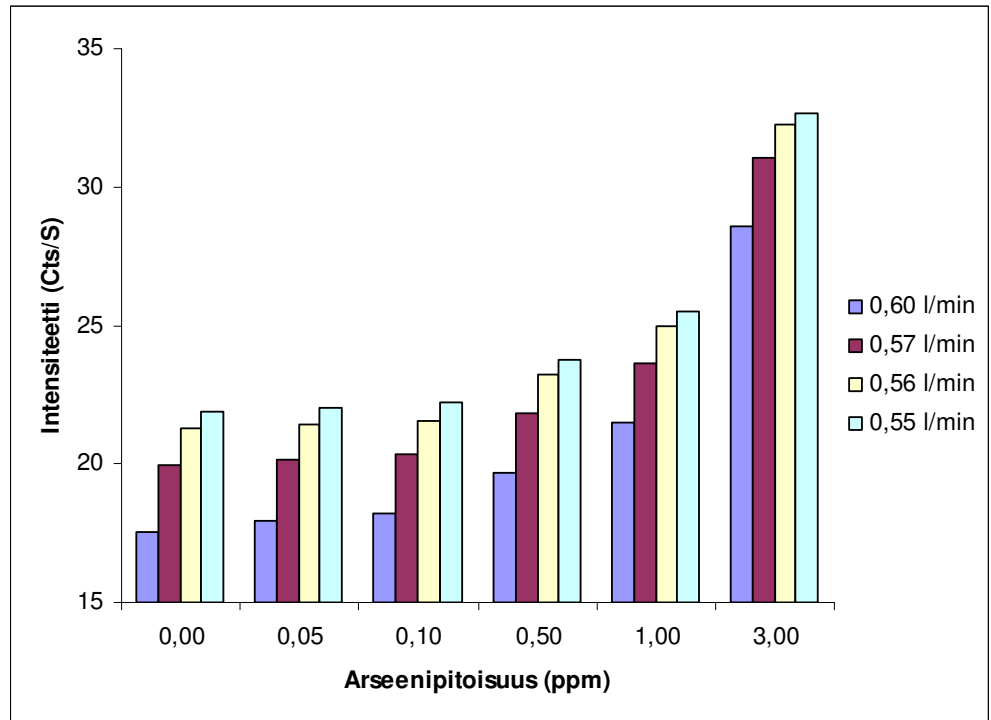
6.3.2 Näytteensyöttö

Aiemmin käytetyissä menetelmissä arseenin ja lyijyn määrittämiseksi fruktoosista ja ksylitolista näytteensyöttöaikana oli käytetty 30 s ja 90 s. Sumuttimen virtauksena oli 0,60 l/min. Optimoinnilla pyrittiin etsimään näytteensyöttöolosuhteet, joilla saavutettaisiin alhainen suhteellinen hajonta ja suuret signaalit. Mittausten suhteellista hajontaa seurattiin vertailemalla tuloksia 30 s:n, 60 s:n sekä 90 s:n näytteensyötöllä (taulukko 4). Alhaisimmat suhteelliset hajonnat sekä laajimmat suhteelliset intensiteettialueet näytesarjalle saavutettiin 30 s:n näytteensyöttöajalla, mikä valittiin käytettäväksi menetelmässä.

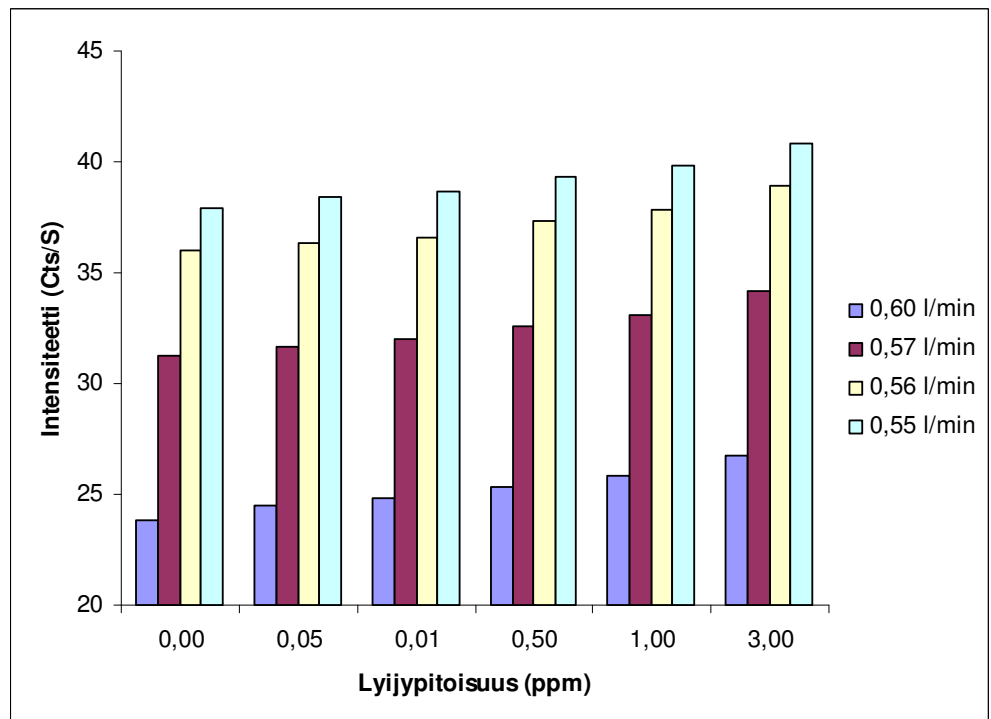
Taulukko 4. Näytteensyöttöajan optimoinnissa mittaustuloksia vertailtiin 30 s:n, 60 s:n ja 90 s:n näytteensyötöllä.

	30 s	60 s	90 s
Suhteellinen intensiteettialue As 0,0 - 2,0 mg/kg (Cts/S)	6,93	6,89	6,88
Suhteellinen intensiteettialue Pb 0,0 - 0,4 mg/kg (Cts/S)	2,08	2,09	2,10
RSD (%) As 0,0 mg/kg	3,80	4,46	5,29
RSD (%) Pb 0,0 mg/kg	0,69	0,92	3,09
RSD (%) As 0,5 mg/kg	2,20	0,46	1,98
RSD (%) Pb 0,1 mg/kg	0,60	1,36	1,59
RSD (%) As 2,0 mg/kg	0,48	0,46	1,06
RSD (%) Pb 0,4 mg/kg	0,44	0,87	0,56
RSD (%) keskiarvo	1,37	1,42	2,26

Sumuttimen virtausta säätämällä tavoiteltiin mahdollisimman suuria signaaleja analyyteille. Signaalien suuruutta testattiin virtausnopeuksilla 0,60 l/min, 0,57 l/min, 0,56 l/min ja 0,55 l/min. Korkeimmat intensiteettivasteet molemmille analyyteille saatiin sumuttimen virtauksella 0,55 l/min, ja se valittiin menetelmän määritysasetukseksi. Mittaustulokset on esitetty kuvissa 7 ja 8. Vaikka intensiteetit kasvoivat virtausta laskettaessa, ei sitä kuitenkaan voitu laskea enää alhaisemmaksi, jotta systeemissä pysyy vaadittu vastapaine.



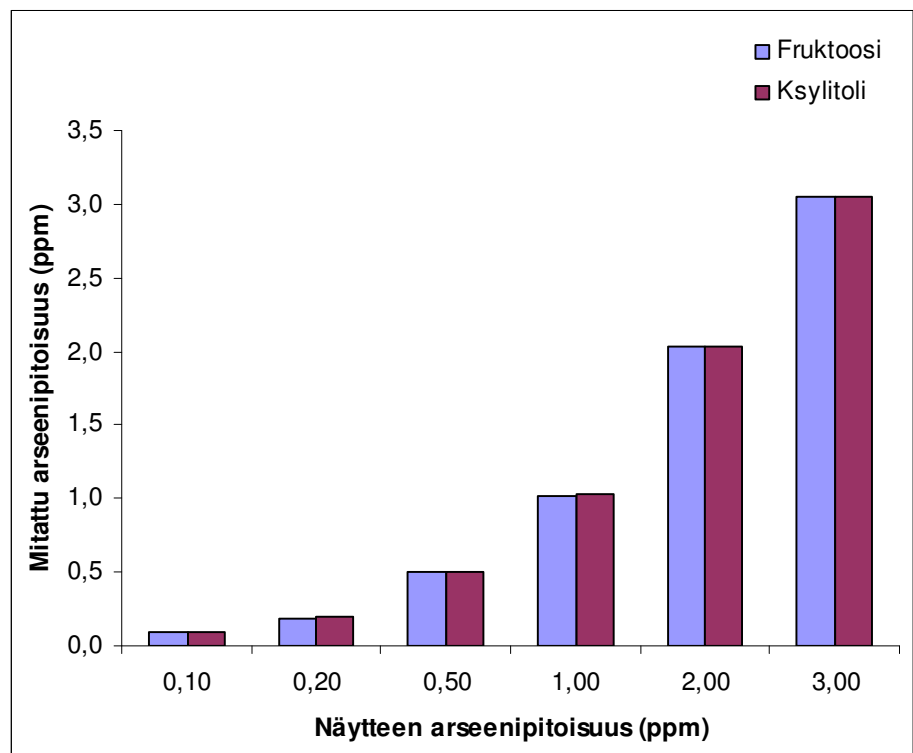
Kuva 7. Sumuttimen virtausnopeuden vaikutus mitattuun intensiteettilukemaan arseenia määrittäessä



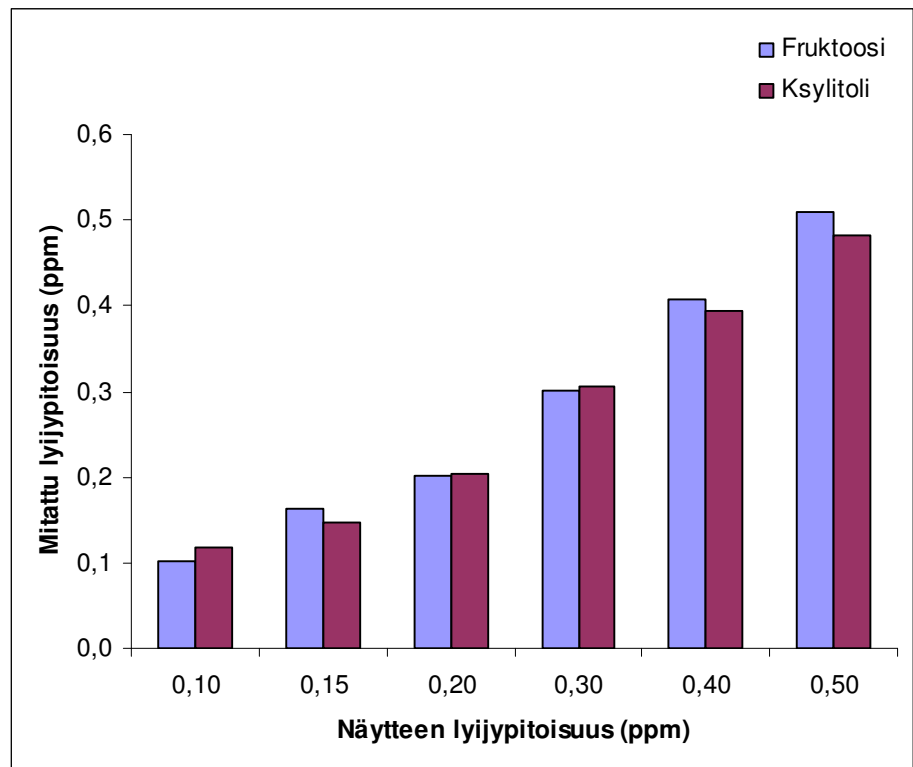
Kuva 8. Sumuttimen virtausnopeuden vaikutus mitattuun intensiteettilukemaan lyijyä määrittäessä

6.3.3 Matriisivertailu ja matriisin määrä näytteissä

Uuteen menetelmään oli tavoitteena yhdistää kaksi menetelmää, joissa käytetään eri matriiseja, joten oli testattava saadaanko samalla tavoin valmistetuille fruktoosi- ja ksylitolimatriisisille näytteille samat pitoisuudet. Kalibrointisuora valmistettiin fruktoosimatriisiin, jonka avulla määritettiin fruktoosi- ja ksylitolimatriisiin tehtyjen näytteiden sisältämä arseenin ja lyijyn määrä. Molempiin matriiseihin valmistettiin näytesarjat, jotka kattoivat koko halutun kalibrointialueen pitoisuudet. Mittaustuloksista voitiin todeta, että näytteille saatiin samat pitoisuudet matriisista riippumatta (kuvat 9 ja 10), joten kahden menetelmän yhdistäminen onnistui hyvin.



Kuva 9. Fruktoosi- ja ksylitolimatriisisille näytteille mitattujen arseenipitoisuuksien vertailu



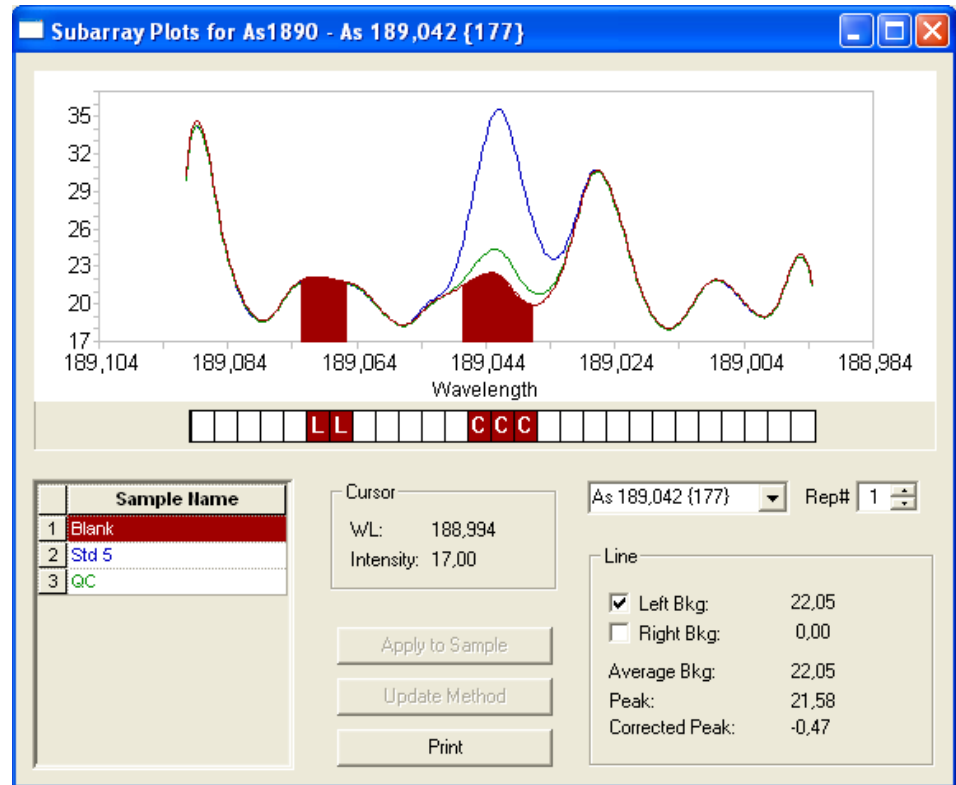
Kuva 10. Fruktoosi- ja ksylitolimatriisisille näytteille mitattujen lyijypitoisuuksien vertailu

Matriisin määrän vaikutusta laitteella saatavien signaalien suuruuteen verrattiin suorittamalla rinnakkain kalibroinnit 10 % ja 20 % näytematriisia sisältävillä liuksilla. Matriisiosuudeltaan 20 % liuksilla arseenin kalibrointialueen laajuudeksi saatiin 22,2 Cts/S ja lyijyn 5,4 Cts/S, kun taas 10 % liuksilla vastaavat lukemat olivat arseenille 10,3 Cts/S ja lyijylle 2,8 Cts/S.

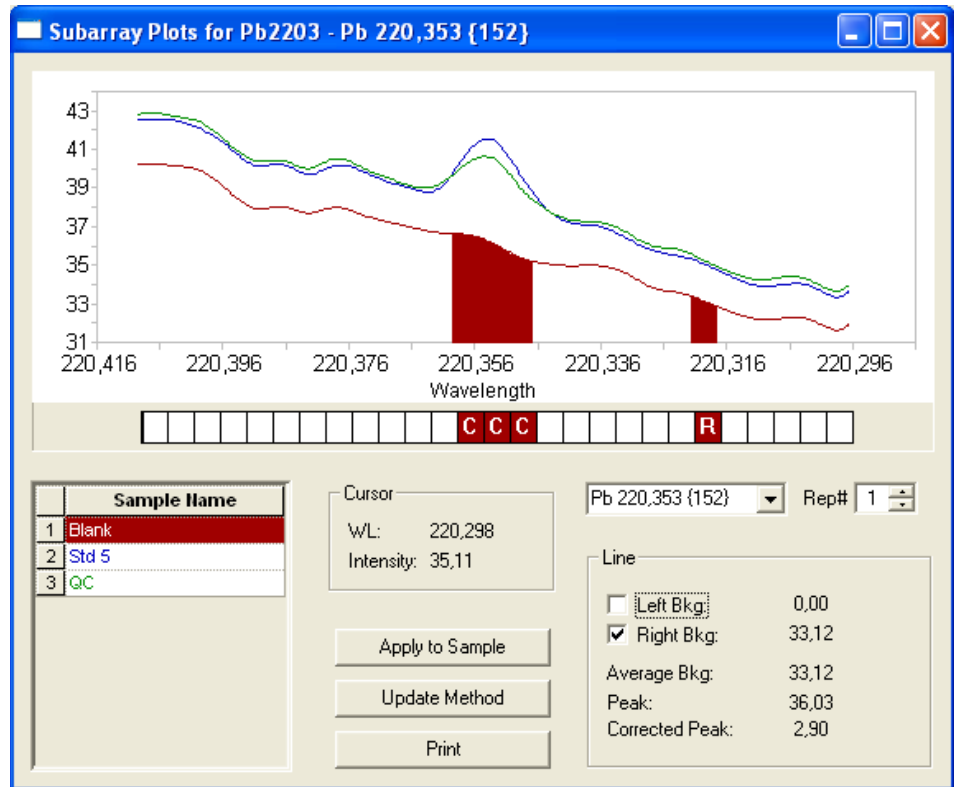
6.3.4 Taustankorjaus

Yhdistettävissä menetelmissä arseenin taustankorjauksessa on käytössä yksi, vasen, taustankorjaaja (kuva 11) ja lyijyn yksi, oikeanpuoleinen, korjaaja (kuva 12). Koska yleisohjeena on, että taustankorjauksessa olisi suotavaa käyttää sekä oikean- että vasemmanpuoleista korjaajaa, kokeiltiin, laajentaisiko tämä muutos lyijyn intensiteettialuetta, jolloin myös toistettavuus parani. Taustankorjaajat asetettiin tasaisesti lyijypiikin molemmiin puolin (kuva 13). Arseenin osalta muutoksia ei tehty, sillä intensiteettialue oli jo aluksi riit-

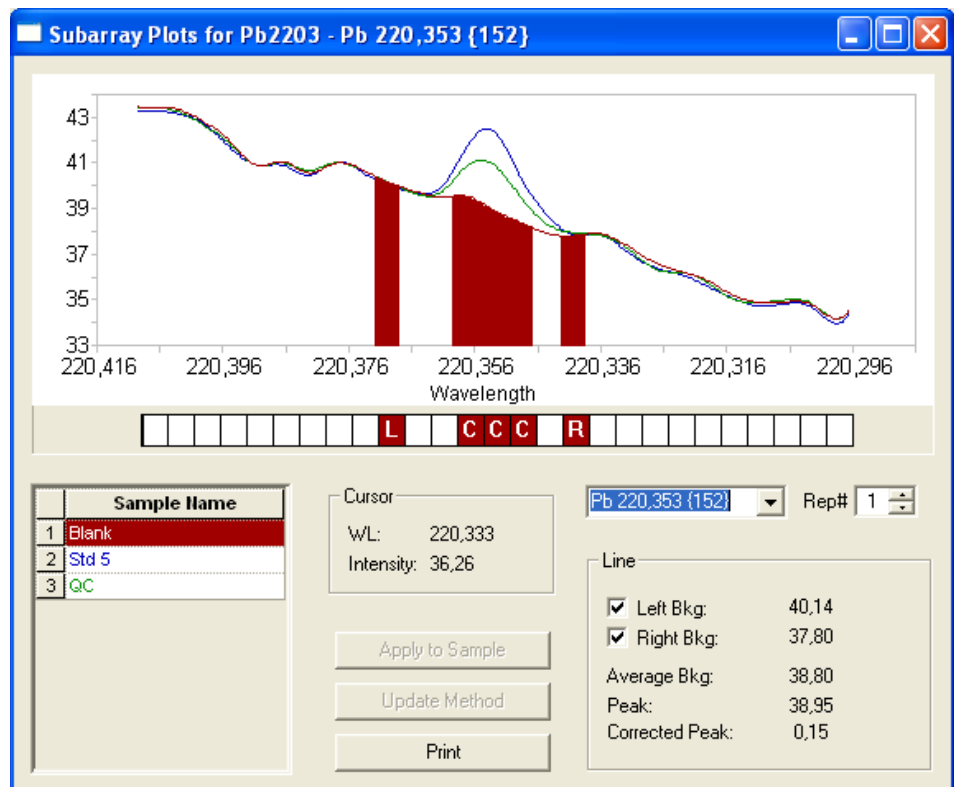
tävän laaja, ja lisäksi arseenin spektrin muodosta johtuen toiselle taustankorjaajalle ei olisi paikkaa löytynyt.



Kuva 11. Arseenin analyttisignaalin (CCC) taustankorjaus yhdellä korjaajalla (LL)



Kuva 12. Lyijyn analyttisignaalin (CCC) taustankorjaus yhdellä korjaajalla (R)



Kuva 13. Lyijyn analyttisignaalin (CCC) taustankorjaus kahdella korjaajalla (L ja R)

Kalibrointi suoritettiin erilaisilla lyijyn taustankorjauksilla, ja tuloksia vertailtiin keskenään. Kahta taustankorjaajaa käytettäessä kalibroinnin suhteellinen intensiteettialue jäi kapeammaksi kuin yhdellä korjaajalla; yhdellä taustankorjaajalla kalibrointialueen laajuudeksi saatiin 2,8 Cts/S ja kahdella 2,5 Cts/S. Koska kapeampi intensiteettialue kasvattaisi tulosten hajontaa, jätettiin yhden korjaajan taustankorjaus myös lyijyn osalta käyttöön.

6.4 Validointi

Validointia suoritettaessa laitteistolle asetettiin optimoinnin pohjalta taulukon 5 mukaiset määrittämissä asetukset.

Taulukko 5. ICP-OES:n määrittämissä asetukset validoinnissa

Plasmakaasu (Ar 99,998 %)	15,0 l/min
Lisäkaasu (Ar 99,998 %)	0,5 l/min
Sumuttimen virtaus	0,55 l/min
Näytteenottoaika	30 s
Huuhteluaika	120 s
Pumpun kierrosluku	130 rpm
Aallonpituus	As 189,042 nm/Pb 220,353 nm
Soihdun orientaatio	akseliallinen
RF-virta	1,35 kW
Alimatriisi-ikkuna	27 pikseliä
Alimatriisin korkeus	3 pikseliä
Toistomittauksia	3
Korrelaatiokerroin	> 0,999
QC-näyte	± 15 %
Pisteen maksimipoikkeama (%) suoralta	± 15 %

Menetelmän validoinnissa käytettiin 20 % näytematriisia sisältäviä liuoksia. Validoinnissa määritettiin tarkkuus, toistettavuus, spesifisyys, toteamis- ja määritysraja, lineaarisuus sekä mittausalue. Lisäksi menetelmän häiriöalttiutta tarkkailtiin päivittäin APA-testillä, sekä jokaisen mittaussarjan yhteydessä standardoinnilla sekä QC (*Quality Control*) -näytteellä.

APA-testissä kaikkia laitteella jatkuvasti määritettäviä alkuaineita sisältävä liuos mitataan, ja tuloksista tarkastetaan emissioviivojen paikallaan pysyminen. Ennen kunkin näytesarjan mittausten aloitusta suoritetaan menetelmälle standardointi kalibroitisuoran nolla- sekä suuripitoisimmalla liuoksella. Standardoinnilla saatu suora sovitetaan kalibroinnissa saatuun suoraan, ja kalibroinnin paikkaansa pitävydestä kertovalle *Re-slope*-lukemalle oli asetettu sallittu ylä- ja alaraja. Standardoinnin poiketessa kalibroinnista yli sallitun vaihteluvälin ei mittauksia voida jatkaa kalibroitua uusimatta. QC-näytteen pitoisuus on tunnettu, ja sille saatua mittaustulosta verrataan oikeaan arvoon. Arvolle on menetelmäkohtaisesti asetettu maksimipoikkeama, ja jotta sarjan mittaustulokset ovat julkaisukelpoisia, ei tämä poikkeama saa ylittyä. QC-näyte analysoidaan jokaisen standardoinnin yhteydessä sekä mittaussarjassa kymmenen näytteen välein ja näytesarjan päätyttyä.

7 TULOKSET JA TULOSTEN KÄSITTELY

7.1 Tarkkuus ja selektiivisyys

Tarkkuuden määrittämiseksi valmistettiin kymmenen rinnakkaista saantokoenäytettä arseenipitoisuuksilla 0,1 ppm, 0,5 ppm ja 3,0 ppm, sekä lyijypitoisuuksilla 0,1 ppm, 0,3 ppm ja 0,5 ppm. Näytteet valmistettiin sekä fruktoosi-, että ksylitolimatriisiin. Saantoprosentit laskettiin kaavalla 2 ja mittaustulokset on esitetty taulukoissa 6, 7 ja 8.

$$\%R = \frac{(S - U)100\%}{C} \quad (2)$$

missä S on validoitavalla menetelmällä näytteelle analysoitu pitoisuus, U näytteen analyttipitoisuus ja C standardiliuoksen teoreettinen pitoisuus.

Taulukko 6. 0,1 ppm arseenia ja lyijyä sisältävien saantokoenäytteiden tulokset

	FRUKTOOSI		KSYLITOLI	
	As	Pb	As	Pb
	saanto-%	saanto-%	saanto-%	saanto-%
1	91	96	97	107
2	86	97	96	94
3	88	96	89	106
4	85	103	95	100
5	88	103	88	104
6	86	105	94	107
7	88	97	89	99
8	89	98	92	101
9	90	101	92	108
10	89	102	99	103
Keskiarvo	88	100	93	103
Keskihajonta	1,9	3,3	3,9	4,6
RSD (%)	2,2	3,3	4,2	4,5

Taulukko 7. 0,5 ppm arseenia ja 0,3 ppm lyijyä sisältävien saantokoenäytteiden tulokset

	FRUKTOOSI		KSYLITOLI	
	As	Pb	As	Pb
	saanto-%	saanto-%	saanto-%	saanto-%
1	93	93	95	97
2	91	91	95	98
3	91	94	95	96
4	89	94	94	97
5	90	95	96	97
6	91	92	94	94
7	91	92	95	95
8	90	94	95	93
9	90	93	95	95
10	93	93	94	97
Keskiarvo	91	93	95	96
Keskihajonta	1,2	1,2	0,7	1,7
RSD (%)	1,3	1,3	0,7	1,8

Taulukko 8. 3,0 ppm arseenia ja 0,5 ppm lyijyä sisältävien saantokoenäytteiden tulokset

	FRUKTOOSI		KSYLITOLI	
	As	Pb	As	Pb
	saanto-%	saanto-%	saanto-%	saanto-%
1	99	99	98	97
2	99	98	98	99
3	100	102	98	99
4	99	99	99	98
5	99	101	98	99
6	99	101	99	99
7	98	98	99	98
8	99	101	98	99
9	98	99	99	98
10	98	99	99	99
Keskiarvo	99	100	98	98
Keskihajonta	0,4	1,3	0,2	0,6
RSD (%)	0,4	1,3	0,2	0,6

Arseenia määritettäessä saantoprosentit sijoittuivat välille 85 – 100 % ja saantokokeiden tulosten keskiarvo oli 94 %. Lyijyn saantoprosentit olivat välillä 91 – 108 % ja keskiarvosaanto oli 98 %. AOAC:n vaatimusten mukaan mittauksissa tutkituilla pitoisuusalueilla keskiarvosaannon tulisi olla 80 – 110 %, joten saadut tulokset ovat hyväksyttäviä. Menetelmä voidaan täten todeta tarkaksi sekä selektiiviseksi arseenille ja lyijylle.

7.2 Täsmällisyys

Menetelmän toistettavuutta tarkkailtiin arseenipitoisuuksilla 0,1 ppm, 0,5 ppm ja 3,0 ppm, sekä lyijypitoisuuksilla 0,1 ppm, 0,3 ppm ja 0,5 ppm. Eri arseeni- ja lyijypitoisuuksia sisältävät näytteet valmistettiin fruktoosi- ja ksylitolimatriisiin, ja kustakin tehtiin kymmenen rinnakkaismäärittystä (taulukot 9, 10 ja 11).

Taulukko 9. Toistettavuusmittausten tulokset arseeni- ja lyijypitoisuudella 0,1 ppm

	FRUKTOOSI		KSYLITOLI	
	As ppm	Pb ppm	As ppm	Pb ppm
1	0,0974	0,1102	0,1060	0,1096
2	0,1029	0,0989	0,1022	0,1055
3	0,1013	0,1084	0,1043	0,1134
4	0,1023	0,1026	0,1095	0,1044
5	0,1104	0,0956	0,1018	0,1048
6	0,1066	0,1020	0,1059	0,1104
7	0,1030	0,1003	0,1087	0,1091
8	0,1041	0,1035	0,1028	0,1028
9	0,0960	0,1106	0,1048	0,1010
10	0,1036	0,1022	0,1029	0,1101
Keskiarvo	0,1028	0,1034	0,1049	0,1071
Keskihajonta	0,0041	0,0049	0,0027	0,0040
RSD (%)	4,0	4,8	2,5	3,7

Taulukko 10. Toistettavuusmittausten tulokset arseenipitoisuudella 0,5 ppm ja lyijypitoisuudella 0,3 ppm

	FRUKTOOSI		KSYLITOLI	
	As ppm	Pb ppm	As ppm	Pb ppm
1	0,4496	0,2800	0,4924	0,3047
2	0,4597	0,2833	0,4917	0,2967
3	0,4521	0,2808	0,4894	0,2914
4	0,4537	0,2767	0,4859	0,2971
5	0,4466	0,2810	0,4805	0,2996
6	0,4564	0,2832	0,4859	0,2954
7	0,4558	0,2814	0,4856	0,2982
8	0,4557	0,2803	0,4818	0,2927
9	0,4564	0,2825	0,4821	0,2967
10	0,4618	0,2777	0,4851	0,2902
Keskiarvo	0,4548	0,2807	0,4860	0,2963
Keskihajonta	0,0045	0,0022	0,0041	0,0042
RSD (%)	1,0	0,8	0,8	1,4

Taulukko 11. Toistettavuusmittausten tulokset arseenipitoisuudella 3,0 ppm ja lyijypitoisuudella 0,5 ppm

	FRUKTOOSI		KSYLITOLI	
	As ppm	Pb ppm	As ppm	Pb ppm
1	2,9500	0,5001	2,9500	0,4947
2	2,9590	0,5002	2,9450	0,4879
3	2,9420	0,4950	2,9460	0,4899
4	2,9410	0,5043	2,9470	0,4949
5	2,9350	0,4918	2,9430	0,4975
6	2,9580	0,5187	2,9420	0,4984
7	2,9340	0,5023	2,9390	0,4907
8	2,9380	0,5057	2,9480	0,4959
9	2,9310	0,4893	2,9460	0,4972
10	2,9400	0,5045	2,9380	0,5037
Keskiarvo	2,9428	0,5012	2,9444	0,4951
Keskihajonta	0,0098	0,0083	0,0039	0,0046
RSD (%)	0,3	1,7	0,1	0,9

Uusittavuuden määrittämistä ei tehty, sillä sitä ei katsottu tarpeelliseksi tämän menetelmän validoinnin yhteydessä. Päivästä päivään -testiin osallistui seitsemän laboratorion työntekijää. Kukin osallistujista suoritti oman kalibroinnin, valmisti omat näytteet ja analysoi ne. Näytteet valmistettiin fruktoosimatriisiin, ja niiden pitoisuus oli menetelmän määritysrajaa vastaava, eli ne sisälsivät arseenia ja lyijyä kumpaakin 0,1 ppm. Näytteitä tehtiin kuusi rinnakkaista.

Päivästä päivään -testiä ei saatu suoritettua loppuun tämän opinnäytetyön aikataulun puitteissa. Kun kaikki mittaustulokset ovat valmistuneet, lasketaan laboratorion sisäinen toistettavuus varianssianalyysiä käyttäen. Laboratorion sisällä tulosten RSD (%):n tulisi olla pitoisuudella 0,1 – 0,9 ppm enintään 15 %, ja pitoisuudella 1 – 9 ppm enintään 11 %.

7.3 Toteamis- ja määritysraja

Toteamis- ja määritysraja määritettiin fruktoosi- ja ksylitolimatriisiin valmistettujen nollanäytteiden toistomittausten keskihajonnan perusteella. Mittaustulokset ovat nähtävissä taulukosta 12. Toteamisraja laskettiin kaavan 3 mukaisesti, ja määritysraja kaavalla 4.

$$LOD = 3 \cdot s \quad (3)$$

$$LOQ = 10 \cdot s \quad (4)$$

missä s on keskihajonta.

Taulukko 12. Menetelmälle määritetyt toteamis- ja määrittäysraja

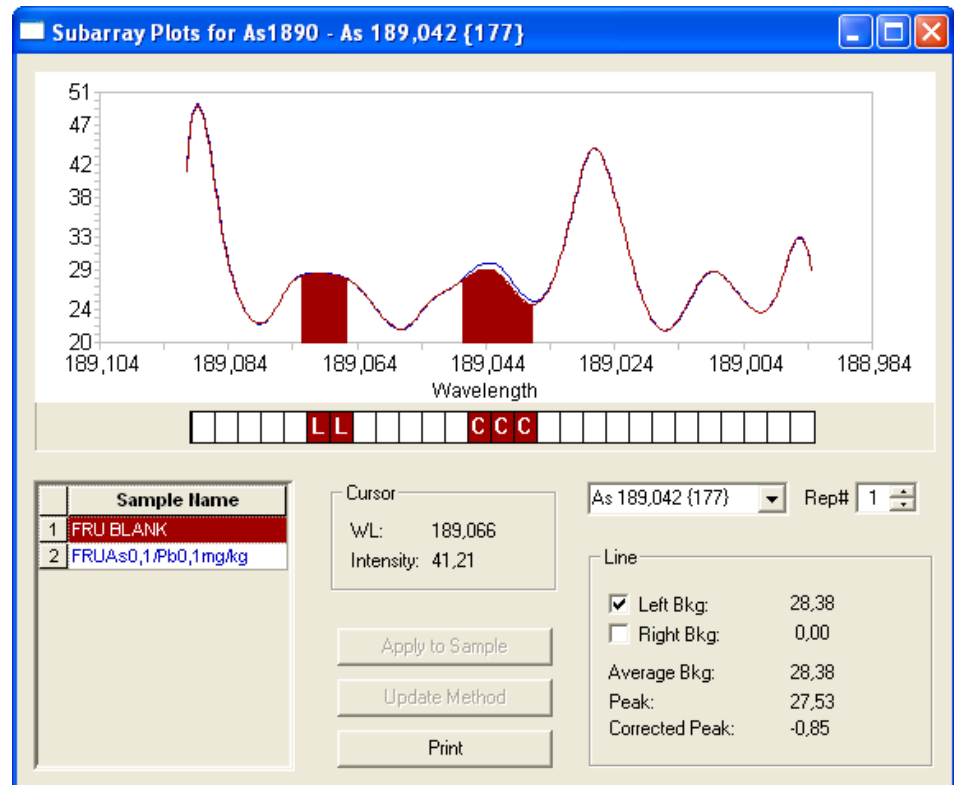
	FRUKTOOSI		KSYLITOLI	
	As ppm	Pb ppm	As ppm	Pb ppm
1	-0,0212	0,0067	-0,0176	0,0133
2	-0,0280	-0,0010	-0,0162	0,0116
3	-0,0287	0,0113	-0,0198	0,0023
4	-0,0185	0,0098	-0,0083	0,0133
5	-0,0194	0,0118	-0,0179	0,0092
6	-0,0228	0,0135	-0,0175	0,0114
7	-0,0259	0,0022	-0,0089	0,0030
8	-0,0250	0,0083	-0,0131	0,0107
9	-0,0132	0,0114	-0,0126	0,0126
10	-0,0194	0,0047	-0,0118	0,0086
Keskiarvo	-0,0222	0,0079	-0,0144	0,0096
Keskihajonta	0,0048	0,0047	0,0040	0,0040
RSD (%)	21,70	59,53	27,80	41,50
Toteamisraja	0,014	0,014	0,012	0,012
Määrittäysraja	0,048	0,047	0,040	0,040

Menetelmän laskennalliseksi toteamisrajaksi arseenille ja lyijylle saatiin sekä fruktoosi- että lyijymatriisissa 0,02 ppm. Määrittäysrajaksi voitaisiin tulosten perusteella asettaa fruktoosinäytteissä arseenille ja lyijylle 0,05 ppm, sekä ksytilolinäytteissä molemmille analyyteille 0,04 mg/kg.

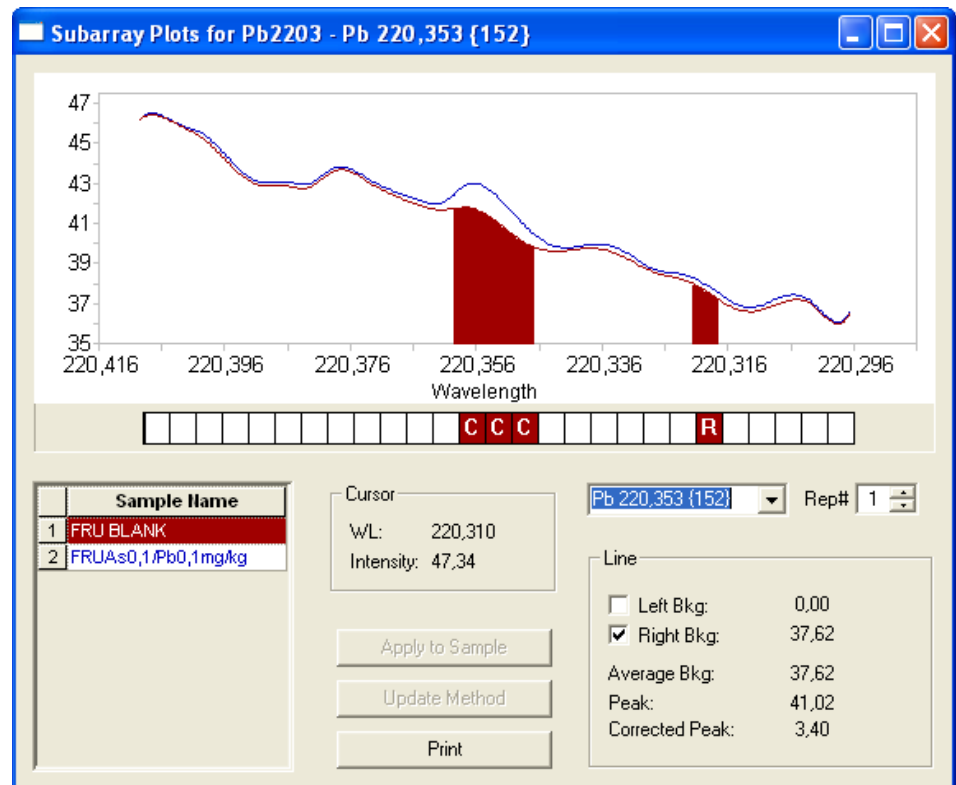
Koska alhaisemmille määrittäysrajoille ei ole tarvetta, valittiin arseenin ja lyijyn määrittäysrajaksi 0,1 ppm. Teoreettisesti laskettu määrittäysraja on lisäksi todennettava myös käytännössä, mikä suoritettiin vertaamalla nollanäytteiden sekä arseenia ja lyijyä 0,1 ppm sisältävien näytteiden spektrejä keskenään (kuvat 14, 15, 16 ja 17). Arseeni- ja lyijypitoisuus 0,1 ppm aiheutti muutosta spektreihin, joten menetelmälle valittu määrittäysraja voitiin hyväksyä.

7.4 Spesifisyys

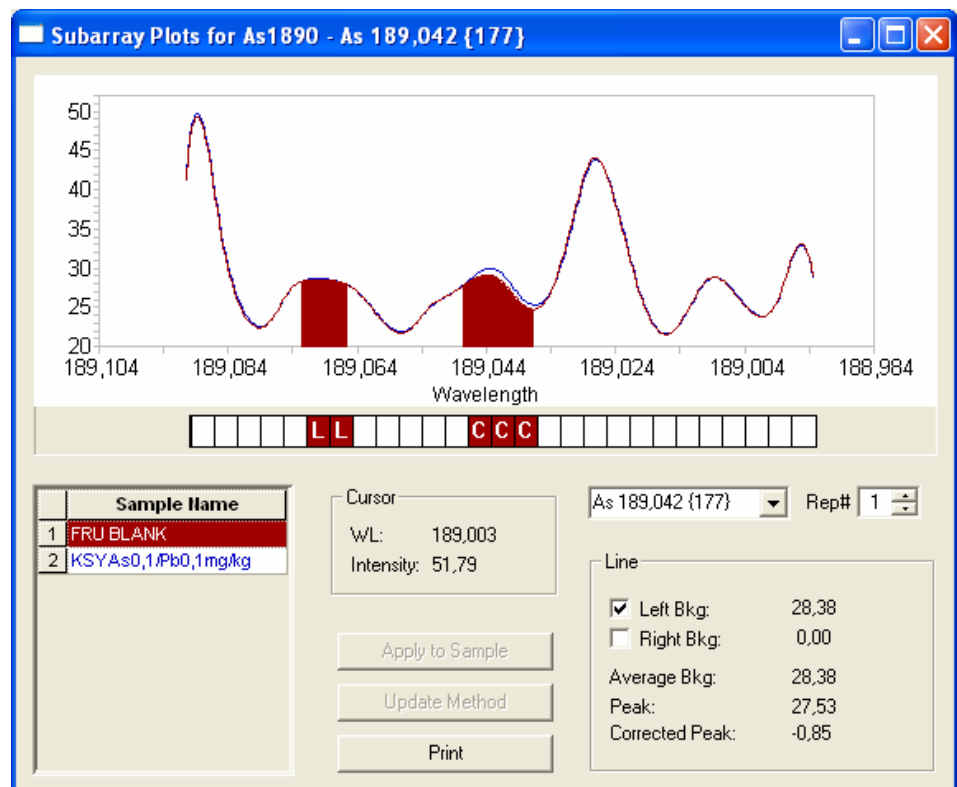
Menetelmän spesifisyys varmennettiin identifiointitestillä, jossa analysoitiin peräkkäin näytteet, joista ensimmäinen oli nollanäyte ja toinen sisälsi arseenia ja lyijyä molempia 0,1 ppm. Identifiointitestin spektrit on esitetty kuvissa 14, 15, 16 ja 17.



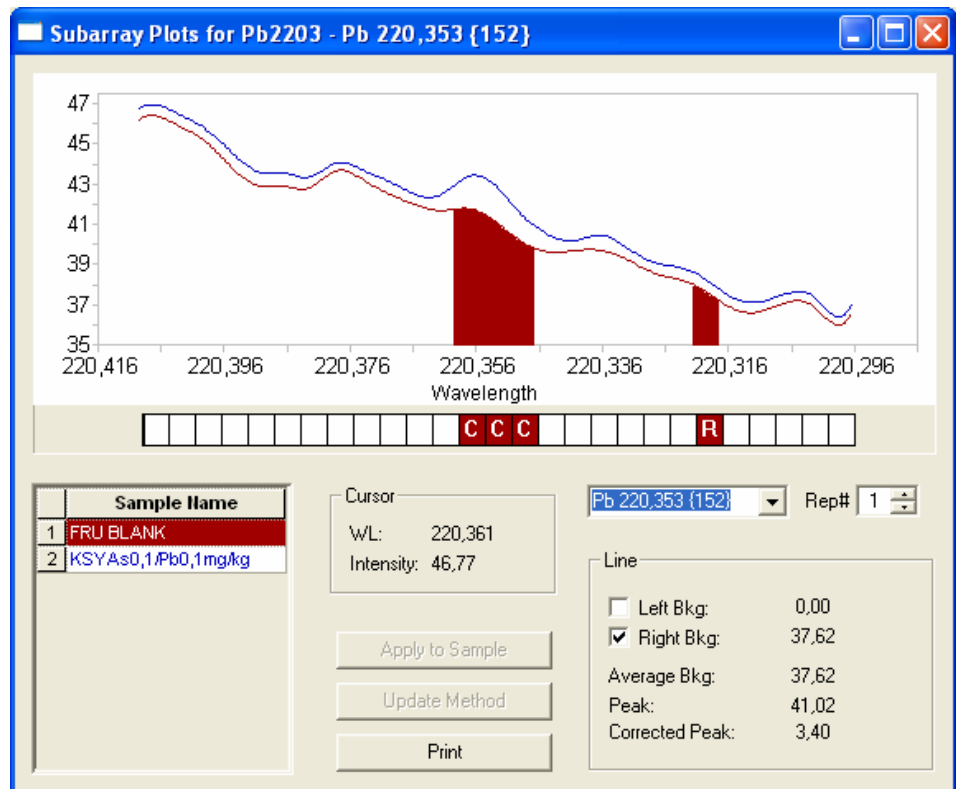
Kuva 14. Fruktosimatriisisen nollanäytteen ja arseenia 0,1 ppm sisältävän fruktoosinäytteen spektrien vertailu



Kuva 15. Fruktosimatriisisen nollanäytteen ja lyijyä 0,1 ppm sisältävän fruktoosinäytteen spektrien vertailu



Kuva 16. Fruktosimatriisisen nollanäytteen ja arseenia 0,1 ppm sisältävän ksyylitolinäytteen spektrien vertailu



**Kuva 17. Fruktosimatriisisen nollanäytteen ja lyijyä 0,1 ppm sisältävän ksyli-
tolinäytteen spektrien vertailu**

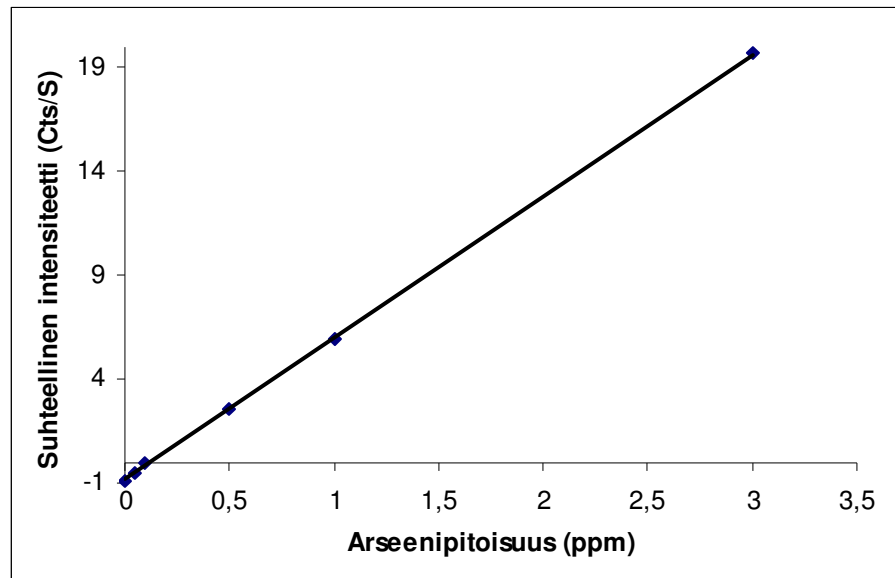
Nollanäytteiden ja tutkittavaa analyyttiä sisältävien näytteiden spektrejä vertailtiin analyytin mittausaallonpituuden kohdalta. Spektreistä on nähtävissä, että 0,1 ppm arseenia ja lyijyä sisältävien näytteiden spektrit eroavat nollanäytteen spektristä. Täten menetelmä voidaan todeta spesifiseksi arseenille ja lyijylle.

7.5 Lineaarisuus

Menetelmän lineaarisuutta eli analyyttipitoisuuden ja sille mitatun vasteen suhdetta tutkittiin toistomittauksilla kalibrintisuoran näytteistä ja tekemällä näistä tuloksista regressioanalyysi. Arseenin ja lyijyn regressioanalyysien kokonaistulokset ovat esillä liitteessä 1. Taulukosta 13 on nähtävissä arseenin ja taulukosta 14 lyijyn lineaarisuusmittausten tulokset fruktoosimatriisissa. Kuvassa 18 on regressiosuora arseenille ja kuvassa 19 lyijylle.

Taulukko 13. Arseenin kalibrointialueen lineaarisuusmittausten tulokset

Näyte	1	2	3	Keskiarvo
	As suhteellinen intensiteetti (Cts/S)	As suhteellinen intensiteetti (Cts/S)	As suhteellinen intensiteetti (Cts/S)	As suhteellinen intensiteetti (Cts/S)
As 0,00 ppm	-0,8676	-0,8416	-0,8670	-0,8587
As 0,05 ppm	-0,4776	-0,4800	-0,5257	-0,4944
As 0,10 ppm	-0,2049	0,1481	-0,1863	-0,0810
As 0,50 ppm	2,5400	2,5050	2,5270	2,5240
As 1,00 ppm	5,9980	5,9520	5,9890	5,9797
As 3,00 ppm	19,7400	19,6400	19,6200	19,6667

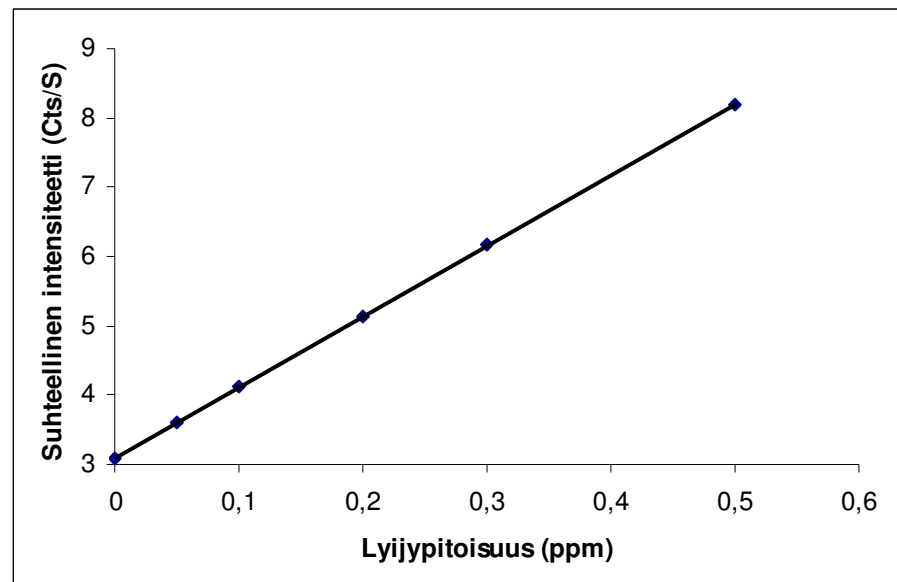


Kuva 18. Arseenin regressiosuora

REGRESSIOTUNNUSLUVUT ARSEENILLE	
Korrelaatiokerroin	0,99994
Selitysaste	0,99987
Keskivirhe	0,08592
Havainnot	18
F:n tarkkuus	1,3027E-32

Taulukko 14. Lyijyn kalibrointialueen lineaarisuusmittausten tulokset

Näyte	1	2	3	Keskiarvo
	Pb suhteellinen intensiteetti (Cts/S)	Pb suhteellinen intensiteetti (Cts/S)	Pb suhteellinen intensiteetti (Cts/S)	Pb suhteellinen intensiteetti (Cts/S)
Pb 0,00 ppm	3,0620	3,1000	3,0750	3,0790
Pb 0,05 ppm	3,5520	3,6390	3,6470	3,6127
Pb 0,10 ppm	4,1530	4,0870	4,1080	4,1160
Pb 0,20 ppm	5,1040	5,1650	5,0970	5,1220
Pb 0,30 ppm	6,1660	6,1760	6,1670	6,1697
Pb 0,50 ppm	8,3010	8,1520	8,1520	8,2017



Kuva 19. Lyijyn regressiosuora

REGRESSIOTUNNUSLUVUT LYIJYLLE	
Korrelaatiokerroin	0,99974
Selitysaste	0,99948
Keskivirhe	0,04180
Havainnot	18
F:n tarkkuus	1,0016E-27

Arsenin sekä lyijyn regressiosuorista on visuaalisesti pääteltävissä, että menetelmä on lineaarinen tutkituilla pitoisuusalueilla. F:n tarkkuus on todennäköisyys konsentraation kyvylle ennustaa intensiteettiä.

$H_0 = x:n$, eli konsentraatioarvon perusteella ei pystytä ennustamaan yhtään $y:n$, eli intensiteettiarvoa.

$H_1 =$ ainakin yksi $y:n$ arvo on ennustettavissa $x:n$ arvon perusteella.

Koska arseenin ja lyijyn regressiosuorien $F:n$ tarkkuudet ovat alle 0,05, hylätään H_0 , ja voidaan $x:n$ arvon todeta ennustavan ainakin yhden $y:n$ arvon 95 %:n todennäköisyydellä. Regressioanalyysien tulosten perusteella voidaan lineaarisen suoran katsoa sopivan kalibrointisuoran sovituskäyttöksi.

7.6 Mittausalue

Validoinnissa tämän opinnäytetyön puitteissa suoritettujen mittausten perusteella voidaan todeta, että tarkkuus, toistettavuus ja lineaarisuus täyttävät niille asetetut vaatimukset menetelmälle suunnitelluilla mitta-alueilla arseenille 0,1 – 3,0 ppm ja lyijylle 0,1 – 0,5 ppm. Jos laboratorion sisäiselle toistettavuudelle asetetut ehdot täyttyvät Päivästä päivään -testissä, voidaan nämä pitoisuusalueet vahvistaa menetelmän mitta-alueiksi.

8 PÄÄTELMÄT

Tämän työn päämääränä oli yhdistää kaksi analyysimenetelmää, "Arseenin ja lyijyn määrittäminen fruktoosista ICP-OES-tekniikalla", ja "Arseenin ja lyijyn määrittäminen ksylitolista ICP-OES-tekniikalla", sekä optimoida ja validoida uusi, yhdistetty menetelmä. Yhdistetyn menetelmän kalibrointiliuosten matriisina oli tarkoituksena käyttää fruktoosia, joten optimoinnissa tarkasteltiin mahdollisuutta analysoida erimatriisisia näytteitä tällä kalibroinnilla. Myös näytteiden optimaalinen näytematriisipitoisuus oli selvitettävä. Tavoitteena oli, että matriisipitoisuus olisi mahdollisimman pieni laitteen turhan kuormittamisen välttämiseksi, mutta kuitenkin tarpeeksi suuri vaadittua täsmällisyyttä ajatellen. Mittauksissa käytetylle laitteelle parhaan mahdollisen herkkyyden saavuttamiseksi oli näytteensyöttöominaisuudet optimoitava. Näytteensyötön lisäksi herkkyyttä on mahdollista kasvattaa detektoinnissa optimaalisella taustankorjauksella. Hyvällä herkkyydellä haluttiin päästä alhaiseen määrittämissrajaa ja riittävään täsmällisyyteen. Menetelmän validoinnissa oli vaatimusten mukaan määritettävä tarkkuus, täsmällisyys, spesifisyys, toteamis- ja määrittämissrajat, lineaarisuus sekä mittausalue, ja arvioitava menetelmälle mittausepävarmuus.

Optimoinnissa tavoitteisiin päästiin hyvin. Fruktoosi- ja ksylitolinäytteet on mahdollista analysoida fruktoosipohjaisella kalibroinnilla ja riittävän kokeilun jälkeen myös sopiva näytematriisipitoisuus löydettiin. Näytteensyöttöominaisuuksista optimoitiin pesuliuos, huuhteluaika, näytteensyöttöaika ja sumuttimen virtaus. Myös taustankorjauksen eri mahdollisuuksia kokeiltiin, ja todettiin jo vanhoissa menetelmissä käytössä olleiden taustankorjausten olevan optimaalisimmat.

Validoinnissa ei tämän opinnäytetyön puitteissa riittänyt aika kaikkien ennalta suunniteltujen parametrien määrittämiselle. Laboratorion sisäisestä toistettavuudesta kertova Päivästä päivään -testi jäi kesken, joten menetelmän täsmällisyyttä ei saatu täysin selville, ja niinpä myöskään mittausaluetta ei voitu valita, eikä mittausepävarmuutta pystytty arvioimaan. Saatujen mittaus tulosten perusteella menetelmän todettiin olevan sekä arseenia että lyijyä määrittäessä tarkka, toistettavuudeltaan täsmällinen ja tavoitteena olleella mittausalueella lineaarinen. Validoinnissa saavutettiin myös molemmille analyteille tavoitellut määrittämissrajat.

Toisin kuin tavoitteena oli, ei menetelmää voitu vielä tässä opinnäytetyössä suoritettujen mittausten ja niissä saatujen tulosten perusteella ottaa käyttöön. Ennen käyttöönottoa on Päivästä päivään -testi suoritettava hyväksyttävästi. Lisäksi menetelmälle arvioidaan mittausepävarmuus Päivästä päivään -testin mittaustuloksista tehdyn varianssianalyysin perusteella. Kuitenkin näyttäisi siltä, että onnistuneen menetelmien yhdistämisen ja tavoitemäärittämissä saavuttamisen ansiosta voidaan Danisco Sweeteners Oy:n Kotkan tehtaitten laboratorioissa lähitulevaisuudessa alkaa julkaista itse arseeni- ja lyijymäärittysten tulokset fruktoosi- ja ksylitolinäytteille, eikä näytteitä tarvitse enää lähettää ulkopuoliseen laboratorioon analysoitavaksi.

VIITELUETTELO

- [1] Allen, Lori B. – Antonia, Amber, Extraction and Analysis of Lead in Sweeteners by Flow-Injection Donnan Dialysis with Flame Atomic Absorption Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2001), s. 4615 – 4618.
- [2] Allen, Lori B. ym., Methods for the Determination of Arsenic, Cadmium, Copper, Lead, and Tin in Sucrose, Corn Syrups, and High-Fructose Corn Syrups by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (1997), s. 162 – 165.
- [3] Nölte, Joachim, *ICP Emission Spectrometry, A Practical Guide*. Weinham: Wiley-VHC Verlag GmbH & Co. KGaA. 2003.
- [4] Jaarinen, Soili – Niiranen, Jukka, *Laboratorion analyysitekniikka*. 5., uudistettu painos. Helsinki: Edita Prima Oy. 2005.
- [5] Ekman, Asta, *ICP-MS-tekniikka: Laitteiston virittäminen, validointi ja näytteen analysointi*. Luentomateriaali. Metropolia Ammattikorkeakoulu. 9.10.2008.
- [6] Ekman, Asta, *Alkuaineiden määrittäminen maanäytteistä ICP-MS-tekniikalla/Näytteiden esikäsittely*. Luentomateriaali. Metropolia Ammattikorkeakoulu. 30.9.2008.
- [7] Köymäri, Harri, *Näytteensyöttöön ja näytteisiin liittyvistä aiheista: kontaminaatio, muistiefekti, stabiilisuus, korkeat suolapitoisuudet ja HF-varusteista*. Luentomateriaali kurssilta ICP-käyttöpäivä. Thermo Electron Corporation/Hosmed Oy. 29.3.2006
- [8] Ekman, Asta, *ICP-MS-tekniikka*. Luentomateriaali. Metropolia Ammattikorkeakoulu. 30.9.2008.
- [9] Beauchenheim, Diane ym, Plasma Emission Spectrometry. *Analytical Chemistry* 66 (1994), s. 462R – 499R.
- [10] Harris, Daniel C., *Quantitative Chemical Analysis*. Sixth Edition. New York: W. H. Freeman and Company. 2003.
- [11] Danisco Sweeteners Oy, *Analyysimenetelmän validointi*. Toimintaohje, 01033 versio 3/28.08.2008.
- [12] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), ICH Harmonised Tripartite Guideline, *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)* [PDF-tiedosto]. 11/2005 [viitattu 2.3.2009]. Saatavissa: <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>
- [13] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), *Guidance for Industry, Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology* [PDF-tiedosto]. 11/1996 [viitattu 30.1.2009]. Saatavissa: <http://www.fda.gov/Cder/Guidance/1320fnl.pdf>

- [14] Elintarvikevirasto, Kemiallisten analyysimenetelmien validointiohje [PDF-tiedosto]. 10/1997 [viitattu 6.2.2009]. Saatavissa: http://www.palvelu.fi/evi/files/55_519_200.pdf

As ja Pb 0,1 ppm

	FRUKTOOSI				KSYLITOLI			
	As		Pb		As		Pb	
	ppm	saanto-%	ppm	saanto-%	ppm	saanto-%	ppm	saanto-%
1	0,0914	91	0,0956	96	0,0974	97	0,1072	107
2	0,0863	86	0,0970	97	0,0964	96	0,0937	94
3	0,0881	88	0,0964	96	0,0891	89	0,1063	106
4	0,0848	85	0,1025	103	0,0947	95	0,0995	100
5	0,0875	88	0,1031	103	0,0875	88	0,1041	104
6	0,0862	86	0,1046	105	0,0940	94	0,1071	107
7	0,0880	88	0,0970	97	0,0890	89	0,0991	99
8	0,0892	89	0,0976	98	0,0922	92	0,1013	101
9	0,0899	90	0,1006	101	0,0920	92	0,1083	108
10	0,0887	89	0,1018	102	0,0994	99	0,1030	103
Keskiarvo	0,0880	88,0	0,0996	99,6	0,0932	93,2	0,1030	103,0
Keskihajonta	0,0019	1,94	0,0033	3,25	0,0039	3,92	0,0046	4,61
%RSD	2,20		3,27		4,21		4,48	

As 0,5 ja Pb 0,3 ppm

	FRUKTOOSI				KSYLITOLI			
	As		Pb		As		Pb	
	ppm	saanto-%	ppm	saanto-%	ppm	saanto-%	ppm	saanto-%
1	0,4644	93	0,2803	93	0,4766	95	0,2898	97
2	0,4568	91	0,2736	91	0,4764	95	0,2939	98
3	0,4533	91	0,2814	94	0,4736	95	0,2874	96
4	0,4472	89	0,2814	94	0,4711	94	0,2912	97
5	0,4504	90	0,2857	95	0,4800	96	0,2921	97
6	0,4531	91	0,2766	92	0,4714	94	0,2823	94
7	0,4553	91	0,2752	92	0,4769	95	0,2834	94
8	0,4474	89	0,2828	94	0,4750	95	0,2787	93
9	0,4492	90	0,2801	93	0,4748	95	0,2834	94
10	0,4629	93	0,2798	93	0,4688	94	0,2912	97
Keskiarvo	0,4540	90,8	0,2797	93,2	0,4745	94,9	0,2873	95,8
Keskihajonta	0,0060	1,20	0,0036	1,21	0,0033	0,66	0,0051	1,69
%RSD	1,32		1,30		0,70		1,77	

As 3,0 ppm ja Pb 0,5 ppm

	FRUKTOOSI				KSYLITOLI			
	As		Pb		As		Pb	
	ppm	saanto-%	ppm	saanto-%	ppm	saanto-%	ppm	saanto-%
1	2,9560	99	0,4958	99	2,9460	98	0,4861	97
2	2,9560	99	0,4913	98	2,9510	98	0,4935	99
3	2,9880	100	0,5076	102	2,9370	98	0,4936	99
4	2,9570	99	0,4952	99	2,9550	99	0,4903	98
5	2,9580	99	0,5071	101	2,9500	98	0,4925	99
6	2,9580	99	0,5048	101	2,9540	98	0,4957	99
7	2,9520	98	0,4921	98	2,9610	99	0,4915	98
8	2,9630	99	0,5050	101	2,9440	98	0,4930	99
9	2,9400	98	0,4929	99	2,9580	99	0,4896	98
10	2,9490	98	0,4953	99	2,9540	98	0,4961	99
Keskiarvo	2,9577	98,6	0,4987	99,7	2,9510	98,4	0,4922	98,4
Keskihajonta	0,0124	0,41	0,0066	1,32	0,0071	0,24	0,0030	0,60
%RSD	0,42		1,32		0,24		0,61	

YHTEENVETO, ARSEENI

<i>Regressiotunnusluvut, arseeni</i>	
Kerroin R	0,99994
Korrelaatiokerroin	0,99987
Tarkistettu korrelaatiokerroin	0,99987
Keskivirhe	0,08592
Havainnot	18

ANOVA

	<i>va</i>	<i>NS</i>	<i>KN</i>	<i>F</i>	<i>F:n tarkkuus</i>
Regressio	1	932	932	126284	1,30E-32
Jäännös	16	0,118	0,00738		
Yhteensä	17	932			

	<i>Kertoimet</i>	<i>Keskivirhe</i>	<i>t Tunnusluvut</i>	<i>P-arvo</i>	<i>Alin 95%</i>
Leikkauspiste	-0,838	0,0251	-33,3	3,24E-16	-0,892
Muuttuja X 1	6,83	0,0192	355	1,30E-32	6,79

<i>Ylin 95%</i>	
Leikkauspiste	-0,785
Muuttuja X 1	6,87

YHTEENVETO, LYIJY

<i>Regressiotunnusluvut, lyijy</i>	
Kerroin R	0,99974
Korrelaatiokerroin	0,99948
Tarkistettu korrelaatiokerroin	0,99945
Keskivirhe	0,04180
Havainnot	18

ANOVA

	<i>va</i>	<i>NS</i>	<i>KN</i>	<i>F</i>	<i>F:n tarkkuus</i>
Regressio	1	54,0	54,0	30935	1,00E-27
Jäännös	16	0,0280	0,00175		
Yhteensä	17	54,1			

	<i>Kertoimet</i>	<i>Keskivirhe</i>	<i>t Tunnusluvut</i>	<i>P-arvo</i>	<i>Alin 95%</i>
Leikkauspiste	3,09	0,0149	208	7,05E-29	3,06
Muuttuja X 1	10,2	0,0582	176	1,00E-27	10,1

<i>Ylin 95%</i>	
Leikkauspiste	3,12
Muuttuja X 1	10,4