

Kjeldahl-analysaattorin käyttöönotto ja kiinteiden ympäristönäytteiden analyysimenetelmän kehitys ja validointi

Heidi Svensberg

OPINNÄYTETYÖ
Huhtikuu 2024

Laboratoriotekniikka

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratoriotekniikan tutkinto-ohjelma

SVENSBURG, HEIDI:

Kjeldahl-analysaattorin käyttöönotto ja kiinteiden ympäristönäytteiden analyysimenetelmän kehitys ja validointi

Opinnäytetyö 50 sivua, joista liitteitä 5 sivua
Huhtikuu 2024

Opinnäytetyön toimeksiantajan, SGS Finland Oy:n, toisesta toimipisteestä on tuotu Karkkilan toimipisteeseen Kjeldahl-menetelmää varten FOSS Kjeltec -analysaattori, jolla on määritetty pieniä typpipitoisuuksia. Laitteistot otettiin käyttöön ja siirtovalidoitiin. Laitteella analysoitujen kiinteiden ympäristönäytteiden analyysimenetelmä kehitettiin ja validoitiin vastaamaan Karkkilan mittausolosuhteita ja laatuvaatimuksia.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää ja validoida menetelmä kiinteiden ympäristönäytteiden, erityisesti sedimenttien eli hiekka- ja maanäytteiden, analysointia varten. Tavoitteena oli saada analyysimenetelmä laboratorion jokapäiväiseen käyttöön.

Tarkoituksena oli toteuttaa menetelmän kehitys ja validointi määrittämällä erilaisia validointiparametreja tilastomatemaattisin menetelmin. Validointiparametrejä ajettiin usean päivän aikana tekemällä rinnakkaisia määrittämiä erilaisilla menetelmää vastaavilla standardinäytteillä ja näytematriiseilla. Parametrien avulla oli tarkoitus määrittää menetelmän rajat, kuten toteamis- ja määrittämissrajat, mittausalue ja lineaarisuus, toistettavuus ja tarkkuus sekä mittausepävarmuudet, jotka kuvaavat analyysimenetelmän toimivuutta ja laadukkuutta.

Kotkan kiinteiden ympäristönäytteiden analyysimenetelmää kehitettiin yhtenäisemmäksi Karkkilan toimipisteen menetelmän kanssa ja validoinnissa päästiin tavoitearvoihin tai toimeksiantajalle riittävään läheisiin arvoihin. Lopputuloksena toimeksiantajan laboratorio saa toisen typpianalysaattorin analyysikäyttöön pienten pitoisuuksien määrittämiä varten.

Asiasanat: validointi, menetelmäkehitys, Kjeldahl, FOSS Kjeltec -analysaattori, kokonaistyyppi, sedimentti

ABSTRACT

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

SVENSBERG, HEIDI:

Deployment of Kjeldahl Analyser with Development and Validation of the Analytical Method for Solid Environmental Samples

Bachelor's thesis 50 pages, appendices 5 pages
April 2024

A FOSS Kjelttec analyser has been relocated from another SGS Finland Oy laboratory to Karkkila, where it will be put into operation and validated for the Kjeldahl method, which measures nitrogen concentrations in solid environmental samples. The analyser will be used to develop and validate a new method for analysing samples with lower nitrogen concentrations, which will meet the quality requirements and measurement conditions of the Karkkila laboratory.

The goal of this thesis was to validate the new method using a statistical-mathematical approach, which involves running parallel determinations on different samples and sample matrices, such as sediment, sand, and soil, over several days. The validation parameters were used to determine the limits of the method and the measurement uncertainties that characterise its performance and quality.

The method for solid environmental samples was developed and validated to be consistent with the previous method and to achieve target values or values close enough for Karkkila laboratory's standards. As a result, Karkkila received a second analyser available for analytical use for nitrogen determinations, providing increased capacity for nitrogen analysis in solid environmental samples.

Key words: validation, method development, Kjeldahl, FOSS Kjelttec analyser, total nitrogen, sediment

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	5
2	SEDIMENTIN TYPEN KIERTO JA TYPPIPITOISUUDET	7
	2.1 Sedimentin typen kierto.....	7
	2.2 Sedimenttien tyypipitoisuudet	8
3	KJELDAHL-MENETELMÄ JA -LAITTEISTO	10
	3.1 Kjeldahl-menetelmä	10
	3.2 Laitteisto ja toimintaperiaate	11
4	MENETELMÄN VALIDOINTI JA VALIDOINTIPARAMETRIT	13
	4.1 Mittausalue ja lineaarisuus.....	13
	4.2 Toteamisraja (LOD) ja määrittäysraja (LOQ)	14
	4.3 Toistettavuus.....	15
	4.4 Tarkkuus	17
	4.5 Mittausepävarmuus.....	19
5	LAITTEEN KÄYTTÖÖNOTTO, MENETELMÄN KEHITYS JA VALIDOINTI.....	22
	5.1 Laitteiston käyttöönotto	22
	5.2 Menetelmän kehittäminen	23
	5.2.1 Vakionäyte ja kalibrointinäytteet	24
	5.2.2 Kaupallinen suolahappo	24
	5.2.3 Reagenssimäärien muutokset	25
	5.2.4 Märkäpolttolaitteiston poltto-ohjelman muuttaminen.....	25
	5.3 Validointi	26
6	TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU	29
	6.1 Menetelmäkehitys	29
	6.2 LOD ja LOQ	30
	6.3 Lineaarinen alue.....	31
	6.4 Toistettavuus ja menetelmän kokonaishajonta	35
	6.5 Tarkkuus ja menetelmän saanto	36
	6.6 Laajennettu mittausepävarmuus	37
7	POHDINTA	42
	LÄHTEET.....	44
	LIITTEET	46
	Liite 1. Mittausdata ja tulokset toteamis- ja määrittäysrajoille	46
	Liite 2. Mittausdata standardinäytteillä mittausalueeseen, lineaariseen alueeseen, toistettavuuteen sekä mittausepävarmuuteen	47
	Liite 3. Mittausalueen ja lineaarisen alueen mittausdata standardinlisäysnäytteillä	49

1 JOHDANTO

Tämän opinnäytetyön toimeksiantaja SGS Finland Oy on kansainvälinen tarkastus-, testaus-, verifiointi- ja sertifiointiyritys, jolla on Suomessa kaksi ympäristöanalyysilaboratoriota Karkkilassa ja Kotkassa. SGS Finland Oy tarjoaa muun muassa lannoite-, maanparannusaine- ja ympäristöanalytiikkaa. Yksi tarjottavista analyyseista on kiinteiden ympäristönäytteiden kokonaistypen määrittäminen Kjeldahl-menetelmällä. (SGS n.d.) Opinnäytetyö suoritettiin Karkkilan laboratoriossa, jossa on ollut käytössä FOSS Tecator Line -analysaattori typpiyhdisteiden määrittämiseen muun muassa lannoite- ja kompostinäytteistä, mutta koska yrityksen tavoitteena on keskittää Kjeldahl-typianalyysitoiminta laboratorioden välillä, Kotkan toimipisteen analysaattori on tuotu Karkkilaan.

Kotkasta tullutta analysaattoria on aiemmin käytetty pienien typpipitoisuuksien määrittämiseen jätevesistä ja sedimenteistä. Menetelmää ja analysaattoria tullaan hyödyntämään erityisesti sedimentin typpipitoisuuden analysointiin, joka on tärkeää, koska se antaa tietoa ravinteiden kiertokulusta vesiekosysteemeissä. Typpi on keskeinen ravinne levien ja muiden vesieliöiden kasvulle, ja liiallinen typpi voi johtaa rehevöitymiseen, mikä voi vaikuttaa kielteisesti veden laatuun ja vesieliöstöön. Siksi sedimentin typpipitoisuuden seuranta voi auttaa tunnistamaan mahdollisia typpipilaantumisen lähteitä ja antaa tietoa hoitostrategioista rehevöitymisen lieventämiseksi. (Herbert 1999, 564; Vahanen 2014, 4, 14.)

Toimipisteiden kiinteiden ympäristönäytteiden kokonaistyyppimenetelmien välillä on kuitenkin huomattavia eroja. Menetelmien epäyhteneväisyys voi aiheuttaa vaihtelua kokonaistyyppipitoisuuksissa vaikuttaen tulosten tarkkuuteen ja luotettavuuteen, minkä vuoksi tavoitteena tässä opinnäytetyössä on ottaa uusi analysaattori käyttöön sekä kehittää ja validoida analyysimenetelmä yhteneväisemmäksi Karkkilan menetelmän kanssa. Menetelmää on tarkoitus kehittää lisäämällä siihen uusia laadunvarmistusnäytteitä, kuten maanäytevakio ja saantostandardit, sekä muuttaa reagenssimääriä ja esikäsitteilyä vastaamaan Karkkilan menetelmää. Validointi toteutetaan määrittämällä useita sarjoja standardinäytteitä rinnakkaisina määrittämisinä usean päivän ajalta sekä tutkimalla laitteen saantoa ja tarkkuutta varmennettujen vertailunäytteiden avulla.

Ympäristönäytteiden kemiallisten analyysimenetelmien tarkkuuden ja luotettavuuden varmistamiseksi on julkaistu useita validointioppaita, joita hyödynnetään tämän validointiprosessin apuvälineinä. Näitä ovat muun muassa Eurachemin opas "The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics", Suomen ympäristökeskuksen moniste 59 "Ohjeita ympäristönäytteiden kemiallisten analyysimenetelmien validointiin" ja Elintarvikeviraston, eli nykyisen Ruokaviraston, Valvonta-sarjan julkaisu 10/1997 "Kemiallisten analyysimenetelmien validointiohjeessa". Näissä oppaissa annetaan ohjeita validointiprosessista, mukaan lukien toteamis- ja määrittäysrajojen, mittausalueen ja lineaarisen alueen, tarkkuuden, toistettavuuden sekä mittausepävarmuuden määrittämisestä. Lisäksi menetelmän taustaa pohjustetaan kansainvälisiin standardeihin, kuten EN 16169:2012 "Sludge, treated biowaste and soil – Determination of Kjeldahl nitrogen", ja laitevalmistaja FOSSin ohjeeseen "Determination of Nitrogen according to Kjeldahl using Block Digestion and Steam Distillation". Näiden lisäksi menetelmän kehittämisessä käytetään aikaisempia yrityksen kokonaistyyppimenetelmiä.

Yhdenmukaisemman analyysimenetelmän kehittäminen ja validointi parantaa typpianalyysitulosten tarkkuutta ja luotettavuutta, mikä on tärkeää vesiekosysteemien ravinteiden kiertokulun seurannassa ja rehevöitymisen lieventämiseen tähtäävien hoitostrategioiden suunnittelussa (Herbert 1999, 564; Vahanen 2014, 4, 14.) Kun laboratorio saa käyttöönsä typpianalysointilaitteen pienien typpipitoisuuksia varten, se voi analysoida laajemman valikoiman näytteitä, mikä parantaa sen valmiuksia ja kilpailukykyä markkinoilla.

2 SEDIMENTIN TYPEN KIERTO JA TYPPIPITOISUUDET

Sedimentillä tarkoitetaan maanpinnalle kerrostunutta soraa, hiekkaa, savea tai turvetta, joka on peräisin geologisista prosesseista, kuten rapautumisesta, eroosiosta, kuljetuksesta tai kerrostumisesta (Tieteen termipankki 2019). Sedimenttiä muodostuu sedimentaation vaikutuksesta, jota voi tapahtua sekä ilmassa että vedessä. Sedimentaatiolla tarkoitetaan irtaimen aineksen laskeutumista tai kerrostumista maanpinnalle tai vesistön pohjaan. (Tieteen termipankki 2024.) Maaperän ja sedimentin ominaisuuksia ja eri aineiden pitoisuuksia mitataan erilaisilla pilaantuneisuustutkimuksilla, joista saadaan tietoa alueellisesta maaperän kunnosta, mihin ympäristö ja ihmisten toiminta vaikuttavat (Vahanen 2014, 4).

2.1 Sedimentin typen kierto

Typen kiertokulkuun sedimenteissä vaikuttavat monimutkaiset sääntelymekanismit, joihin liittyy sekä fysikaaliskemiallisia että biologisia tekijöitä. Jotta voitaisiin ymmärtää typen kiertokulkua sääteleviä tekijöitä sedimenteissä, on ymmärrettävä, miten typen kiertokulun muodostavia yksittäisiä, mikrobiologisia prosesseja tapahtuu. Näitä prosesseja ovat ammonifikaatio eli ammoniumin vapautuminen orgaanisesta aineesta, nitrifikaatio eli ammoniumin hapettuminen nitraatiksi sekä denitrifikaatio eli nitraatin pelkistyminen typeksi ja typpioksidiksi. (Herbert 1999, 564.)

Monimutkaisten typpipitoisten makromolekyylien mineralisoitumista sedimenteissä tunnetaan vielä huonosti. Tiedetään kuitenkin, että elävä aines sisältää typpipitoisia makromolekyyliä, kuten nukleiinihappoja ja proteiineja, joita vapautuu solujen kuollessa hajottajaeliöiden käyttöön. Tätä typpipitoisen aineksen vapautumista nimetään ammonifikaatioksi. (Herbert 1999, 568–569.)

Kaikki sedimenttien orgaanisen typen hajoamisen aikana syntyvä ammoniumtyppi ei kuitenkaan ole mikrobien käytettävissä, vaan osa voi hapettua nitraatiksi hapettumisvyöhykkeellä. Tätä ammoniakin hapettumisprosessia kutsutaan nitrifikaatioksi, joka muodostaa yhteyden typen kierron pelkistyneen ja hapettuneen

puolen välille. Ammoniakin hapettuminen nitraatiksi on kaksivaiheinen prosessi, jossa ammoniakkia hapettavat bakteerit tuottavat nitriittiä, joka puolestaan hapetuu nitriittioksidien katalysoimana nitraatiksi. (Herbert 1999, 570–573.)

Nitrifikaatioon liittyy pelkistyneen typen hapettuminen aerobisten mikrobien välityksellä, kun taas denitrifikaatio on pelkistävä prosessi. Denitrifikaatio on keskeinen prosessi sedimenttien typen kierrossa, koska se vähentää mikrobien käytettävissä olevan typen määrää, kun kaasumaiset lopputuotteet vapautuvat ilmakehään. Kaikki typen kierron prosessit ovat riippuvaisia maaperän ja sedimentin fyysikaaliskemiallisista ominaisuuksista, jotka vaikuttavat typen kiertoprosessien nopeuteen ja muotoon. (Herbert 1999, 573–577.)

2.2 Sedimenttien typpipitoisuudet

Vesiekosysteemien maa-aineksen ja sedimenttien sisältämän typen on mahdollista olla sitoutuneena kerrostumien orgaaniseen ainekseen. Säkylän Pyhäjärvellä tehdyssä järvisedimenttitutkimuksessa (2002) Pyhäjärven sedimentissä typpi esiintyy ammoniumtyyppinä (NH_4^+), jonka pitoisuus kasvaa aina mitä syvemmältä sedimenttiä on tutkittu. (Gran & Lehtoranta 2002, 22.) Tärkeimmät tekijät, jotka säätelevät epäorgaanisten tyypilajien, kuten nitraatin ja ammoniumin, pitoisuuksia vesiekosysteemien vesipatsaissa, ovat sedimentin ja veden rajapinnan kautta tapahtuva vuorovaikutus. (Herbert 1999, 564.)

Sedimenttitutkimuksia tehdään, jotta saadaan selvyyttä järvi- ja merialueiden pohjasedimenttien pilaantuneisuudesta esimerkiksi aloittaessa uusia rakennusprojekteja tai maanparannusprojekteja. Sedimentin typpipitoisuudelle ei ole kuitenkaan määritetty selkeitä raja-arvoja tai vertailuarvoja. Vahanen Environment Oy:n (2014) suorittamassa Sompasaaren sedimenttitutkimuksen raportissa on mainittu, että kokonaistyppipitoisuudet voivat fosforin lisäksi lisätä meriveden ravinnekkuutta ruoppaus- ja täyttötöiden yhteydessä. (Vahanen 2014, 4, 14.)

Tuotetun tutkimuksen pohjalta todettiin, että typpipitoisuudet ovat selkeästi koholla etenkin näytteissä, joissa orgaanisen aineksen määrä on suuri. Raportin

perusteella sedimentin kokonaistyyppipitoisuus, joka määritettiin testilaboratorioissa Kjeldahl-menetelmällä, vaihteli noin 100–7000 mg N/kg kuiva-ainetta kohden laboratoriokohtaisilla mittausepävarmuuksilla 100–800 mg/kg. (Vahanen 2014, 17–20.) Vastaavasti Säkylän Pyhäjärvellä tehdystä sedimenttitutkimuksesta (2002) on todettu, kuinka eloperäisen aineksen ja kokonaistypen pitoisuudella on yhteys. Kokonaistypen pitoisuuden arvoitiin keskimäärin olevan noin 8,7 mg N/g eli noin 8700 mg N/kg. Sedimentaatiopohjalla valtaosan epäorgaanisesta tyypestä uskottiin vapautuvan ammoniumtyypinä sedimentistä veteen samalla kun nitraatti- ja nitriittityppeä sitoutuu sedimenttiin. (Gran & Lehtoranta 2002, 22–25.)

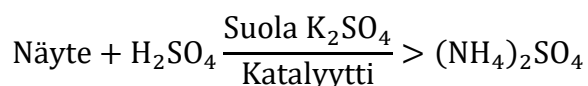
3 KJELDAHL-MENETELMÄ JA -LAITTEISTO

Kjeldahl-menetelmä on vanha ja tunnettu menetelmä typpiyhdisteiden määrittämiseen. Se koostuu yksinkertaisista kemiallisista ja fysikaaliskemiallisista reaktioista, joiden seurauksesta saadaan määritettyä erilaisten tutkittavien analyyttien typpipitoisuuksia. Kjeldahl-menetelmää varten on luotu laitteistoja, joiden avulla saadaan määritettyä eri typpiyhdisteitä kiinteistä ja nestemäisistä matriiseista.

3.1 Kjeldahl-menetelmä

Menetelmän tausta on peräisin tanskalaisen kemistin, Johan Kjeldahlin (1849–1900), vuonna 1883 kehittämästä metodista, jossa arvioidaan yhdisteiden orgaanisen typen pitoisuuksia. Menetelmässä orgaanisen aineksen tyyppi muuttuu väkevällä rikkihapolla lämmitettynä ammoniumsulfaatiksi, jonka ammoniakki vapautetaan emäksisen liuoksen avulla. Näyte tislataan ja typen määrä määritetään titraamalla. (Daintith & Gjertsen 1999, 301.)

Kjeldahl-menetelmä kiinteistä ympäristönäytteistä perustuu siihen, kuinka tulo-kostea tai kuivattua ja homogenisoitua näytettä digestoidaan eli hajotetaan märkämpötilassa väkevässä rikkihapossa (H_2SO_4). Tällöin suurin osa typpiyhdisteistä muuntuu ammoniumsulfaatiksi ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), joka on liuenneena rikkihappoon. Hajotusreaktiossa rikkihapon kiehumislämpötilaa nostetaan lisäämällä seokseen katalyyttinä toimivaa kaliumsulfaatin (K_2SO_4) ja kuparisulfaattipentahydraatin ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) seosta. (EN 16169 2012, 5–6.) Edellä kuvattua tapahtumaa kuvataan reaktiolla



(FOSS n.d., 4).

Orgaanista ainetta sisältävien näytteiden hajotus vaatii usein voimakkaat hapettavat olosuhteet. Perinteisessä orgaanisten näytteiden märkämpötilassa näytettä

poltetaan avoimissa astioissa korotetussa lämpötilassa. Esimerkiksi Kjeldahl-menetelmässä on käytössä pitkäkaulaiset Kjeldahl-putket, joissa tapahtuu happojen ilmajäähdytteistä refluksointia. Hajotuslämpötilan kohottamisessa käytetään esimerkiksi hiekkahaudetta tai sähköisesti kuumennettavaa alumiinilohkoa usealla näytepaikalla. Pääosin epäorgaanista ainesta sisältävät näytteet, kuten sedimenttinäytteet, sisältävät kuitenkin usein jonkin verran orgaanista ainesta, jolloin märkäpoltto menetelmää on mahdollista soveltaa niiden kokonaistypen määrittämiseen. (Laiho, Perämäki & Sirén 2009, 72–73.)

Märkäpoltettuun näytteeseen lisätään tislauvaiheessa natriumhydroksidia (NaOH), jonka vaikutuksesta ammoniumsulfaatin ammoniummolekyylit (NH_4^+) muutetaan ammoniakiksi (NH_3). Ammoniakki kondensoidaan jäähdytysjärjestelmän avulla, jolloin neste valuu vastaanottoliuokseen, joka koostuu boorihaposta (H_3BO_3) sekä indikaattoriväriaineista, kuten bromikresolivihreästä ja metyylipunaisesta. Muodostuneesta liuksesta analysoidaan ammoniakkin pitoisuus titraamalla se rikki- tai suolahapolla (HCl). (EN 16169 2012, 5–8.)

3.2 Laitteisto ja toimintaperiaate

Menetelmä koostuu kolmesta suuremmasta vaiheesta, jotka ovat näytteen esikäsittely, näytteen sisältämien tyyppiyhdisteiden hajotus märkäpoltolla sekä tislauvaihe, jossa typen määrä määritetään titraamalla. Näistä vaiheista märkäpolttoon ja tislaukseen käytetään esimerkiksi FOSS Kjeltec Systemsin Tecator Line -laitteistoja. (FOSS n.d., 12–13.)

Näyte esikäsitellään punnitsemalla sopiva määrä ja lisäämällä tarvittavat määrät reagensseja jokaiseen ajettavaan näyteputkeen. Näyteteline asetetaan sitten märkäpolttolaitteeseen, joka on mahdollisesti kytkettynä neutralointiyksikköön. Märkäpolttolaitteeseen on usein yhdistetty hissi, joka toimii automaattisesti märkäpoltto-ohjelman mukaan säädellen näytetelineen polttoa. Märkäpoltossa putkia kuumennetaan lämpölevyllä useammasta kymmenestä minuutista useaan tuntiin riippuen menetelmän ja näytteiden vaatimuksista. Laitteeseen kytketyn neutralointiyksikön on tarkoitus kuljettaa ja neutraloida näytteistä märkäpoltton aikana muodostuneita rikkihappohöyryjä. (FOSS n.d., 12.)

Märkäpolttohajotuksen jälkeen näytteet ajetaan esimerkiksi automaattinäytteen-syöttäjällä varustetulla tisluslaitteella. Tislusvaiheessa laite lisää näyteputkeen tietyn määrän ionivaihdettua vettä sekä titrausastiaan tietyn määrän vastaanotto-liuosta. Tämän jälkeen putkeen lisätään nelinkertainen määrä natriumhydroksidia neutraloimaan putkessa olevaa rikkihappoa. Laite kuumentaa putkea ja tuottaa höyryä tislaten näytettä vähintään neljän minuutin ajan. Putkesta vapautuva höyry ohjautuu titrausastiaan ja se titrataan tietyn molaarisella titrausliuoksella, kunnes titraus saavuttaa päätepisteensä tietyssä indikaattorivärisä. (FOSS n.d., 12–13.)

Kjeldahl-menetelmällä saadut tulokset esitetään usein muodoissa %-typpi, %-proteiini, mg N/l, g N/l sekä mg N/100 ml. Jokaista määrittystä kohden ajetaan nollanäyte, jonka kulutus vähennetään näytteen kulutuksesta. Nollanäyte sisältää kaikki näytteenkäsittelyssä käytetyt reagenssit eli katalyytin ja väkevän rikkiha-pon. (FOSS n.d., 13–14.) Nollanäytteen tulos otetaan huomioon tulosten las-kussa siten, että esimerkiksi kiinteiden näytteiden tulos (w_N) muodossa mg N/kg voidaan laskea kaavalla 1

$$w_N = \frac{(V_1 - V_0) \cdot c(H^+) \cdot M_N \cdot 100}{m \cdot w_{dm}}, \quad (1)$$

joissa V_1 ja V_0 ovat näytteen ja nollanäytteen titrauksessa kuluneet titraushapon määrät (ml), $c(H^+)$ on titraushapon vetyatomien konsentraatio (mol/l), M_N on typen moolimassa (14,007 g/mol), m on näytteen määrä kilogrammoina (kg) ja w_{dm} on näytteen kuiva-aineprosentti (%). (EN 16169 2012, 9.)

4 MENETELMÄN VALIDOINTI JA VALIDOINTIPARAMETRIT

Validointi on osa toimivaa laatujärjestelmää, jolla varmistetaan menetelmien oikea käyttötarkoitus sekä se, että menetelmien antamat tulokset ovat luotettavia ja niiden mittausepävarmuudet tunnetaan. Laboratorio voi itse päättää hyväksytävyyden kriteerit, mutta siihen voivat vaikuttaa esimerkiksi asiakkaiden toivomukset tai viranomaisten määräykset. (Elintarvikevirasto 1997, 1.)

Menetelmään kuuluu usein näytteen esikäsittely sekä analysointi, ja kaikki tämä on osa menetelmän validointia. Menetelmän validointi on pätevä vain tietyille näyttematriiseille, pitoisuusalueelle sekä laitteelle, joten jos näitä lähtee muuttamaan, tulee validointi aina tehdä uudestaan. Menetelmän validointi edellyttää, että tietyt menetelmää kuvaavat ominaisuudet tiedetään. Näitä ovat esimerkiksi mittausalue ja sen lineaarisuus, toteamis- ja määrittäysrajat, toistettavuus, tarkkuus ja mittausepävarmuus. (Elintarvikevirasto 1997, 1; Ehder 2005, 25–26.)

4.1 Mittausalue ja lineaarisuus

Mittausalueella tutkitaan tutkittavan yhdisteen pitoisuuden ja mittalaitteen vasteen välistä yhteyttä. Mittausalue kuvaa menetelmän suurinta käytettävissä olevaa pitoisuusaluetta, jonka alarajana on usein menetelmän toteamis- tai määrittäysraja ja sen ylärajana mittalaitteen kyky havainnoida analysoitavan yhdisteen pitoisuuden muutoksia. Lineaarilla alueella tarkoitetaan sitä mittausalueen osaa, jossa tutkittavan yhdisteen vaste käyttäytyy konsentraatioon nähden lineaarisesti. Tämä alue voi olla joko koko mittausalueelta tai jaettu useampaan pitoisuusalueeseen. (Mäkinen, Marjanen (toim.), Niemi, Saares & Suortti 1996, 16; Magnusson & Örnemark 2014, 27–28.)

Menetelmän mittausalue on alue, jolla analyysitulokset saavat hyväksyttävän tarkkuuden ja täsmällisyyden. Mittausalue ja siihen sisältyvä lineaarinen alue määritetään tutkimalla tietyltä pitoisuusalueelta sarja vaihtelevan pitoisuuden näytteitä. Tähän yleensä hyödynnetään standardi- tai standardinlisäysnäytteiden

sarjoja yleisimmin vähintään viidellä eripitoisella standardilla usean toiston verran. (Elintarvikevirasto 1997, 5.; Magnusson & Örnemark 2014, 27–28.)

Regressioanalyysi on tilastollinen menetelmä, jossa pyritään sovittamaan pistejoukkoon mahdollisimman hyvin sitä kuvaava suora. Mittausalueen ja lineaarisuuden määrittämisessä saaduista tuloksista piirretään graafinen esitys mitatusta vasteesta konsentraation funktiona. Tähän pistejoukkoon voidaan sovittaa suora, jolle saadaan sitä vastaava yhtälö muodossa $y = a + bx$ ja selitysaste (R^2). Sovitettu suora perustuu pienimmän neliöiden summaan, johon viitataan termillä regressiosuora. Tämän sovitetun suoran ja sen yhtälön avulla voidaan tehdä silmämääräinen arvio pistejoukon lineaarisuudesta. (Elintarvikevirasto 1997, 5–6; Magnusson & Örnemark 2014, 27–28.)

Sovitetun regressiosuoran avulla voidaan määrittää pitoisuuksia vastaavat lasketut arvot, joita voidaan verrata mitattuun vasteeseen. Arvojen erotus kertoo mitauspisteiden poikkeamisesta lasketulta kalibrointisuoralta. Tästä voidaan toteuttaa graafinen esitys, jossa ideaalitapauksessa kuvaajan pisteet asettuisivat tasaisesti nollatason molemmille puolille. (Elintarvikevirasto 1997, 16.) Tällä tarkoitetaan residuaaleja eli mitattujen y-akselin arvojen ja regressiosuoralta laskettujen y-arvojen erotuksia. Kalibrointisuoran ollessa lineaarinen, residuaalit jakautuvat vuorotellen nollatason molemmiin puolin (Mäkinen 1996, 18; Magnusson & Örnemark 2014, 28.)

4.2 Toteamisraja (LOD) ja määrittäysraja (LOQ)

Menetelmän pienin pitoisuus, jolla voidaan luotettavasti todeta, että näyte sisältää tutkittavaa yhdistettä, kutsutaan toteamisrajaksi. Toteamisrajan (limit of detection, LOD) tulee olla sen verran suuri, että tutkittavalle yhdisteelle mitatun vasteen tai pitoisuuden ei voida katsoa aiheutuvan taustan aiheuttamasta satunnaisvaihtelusta. Taustaa voidaan tutkia nollanäytteiden avulla, jolloin taustalle lasketaan keskiarvo ja keskihajonnat. (Elintarvikevirasto 1997, 6–7; Magnusson & Örnemark 2014, 20.)

Toteamisraja voidaan määrittää usean sarjan rinnakkaisten nollanäytteiden avulla, kun nollanäytteiden keskimääräiseen arvoon (x_0) lisätään k kertaa nollanäytteiden keskihajonta (s_0). Kerroin k määräytyy sen mukaan, kuinka suuren virhemahdollisuuden haluaa asettaa toteamisrajalle. Kertoimen ollessa 3 toteamisen varmuus on noin 99 %, jolloin pitoisuudet saattavat vielä mennä reilusti toteamisrajan alapuolelle. Mikäli toteamisen varmuuden halutaan olevan yli 99 %, tulisi kertoimen olla 6, jolloin toteamiseen liittyvät virhemahdollisuudet vähenvät. Toteamisrajan kaava (2) voidaan esittää muodossa

$$LOD = x_0 + k \cdot s_0, \quad (2)$$

jossa x_0 on nollanäytteiden keskiarvo, k on valittu kerroin ja s_0 nollanäytteiden keskihajonta. (Elintarvikevirasto 1997, 6–7; Magnusson & Örnemark 2014, 24.)

Pienintä analysoitavaa tutkittavan yhdisteen pitoisuutta, joka voidaan määrittää hyväksyttävällä tarkkuudella ja täsmällisyydellä, kutsutaan määritysrajaksi (limit of quantitation, LOQ). Määritysraja on toteamisrajaa korkeampi ja on usein osa lineaarista aluetta. Vaikka toteamis- ja määritysrajan väliin jää niin sanottua harmaata aluetta, voidaan tutkittavan yhdisteen pitoisuus silti todeta luotettavasti. Määritysraja voidaan laskea myös nollanäytteiden avulla samalla tavoin kuin toteamisraja, mutta kertoimen k arvo valitaan eri tavalla. Kertoimen arvolla 10 pitoisuuden suhteellisen standardipoikkeama vastaa noin 10 %. Määritysrajan laskukaava (3) voidaan esittää muodossa

$$LOQ = x_0 + k \cdot s_0, \quad (3)$$

jossa x_0 on nollanäytteiden keskiarvo, k on valittu kerroin ja s_0 nollanäytteiden keskihajonta (Elintarvikevirasto 1997, 7; Magnusson & Örnemark 2014, 24.)

4.3 Toistettavuus

Toistettavuudella tarkoitetaan täsmällisyyttä, joka saavutetaan toistettavissa olosuhteissa tehdyillä määrityksillä. Toistettavuutta tutkitaan lyhyellä aikavälillä, jol-

loin mittaukset suoritetaan samalla menetelmällä ja laitteella, samassa ympäristössä sekä samalla henkilökunnalla. (Elintarvikevirasto 1997, 4; Magnusson & Örnemark 2014, 35.)

Menetelmän toistettavuus osoitetaan usein määrittämällä useita rinnakkaismäärittäyksiä eri pitoisuusalueen näytteillä. Näiden näytteiden tulisi muistuttaa mahdollisimman läheisesti tutkittavien näytteiden matriisia sekä sisältää sopiva määrä tutkittavaa yhdistettä. Tällaisena näytteenä voi hyödyntää myöhemmin menetelmässä käytettävää referenssimateriaalia eli niin sanottua vakionäytettä, jota voidaan hyödyntää myös menetelmän laadunvarmistuksessa. (Elintarvikevirasto 1997, 4.; Magnusson & Örnemark 2014, 19–20.)

Toistettavuuskokeita tulisi toistaa suorittamalla näytesarjoja ja tutkimalla rinnakkaisnäytteiden välistä keskihajontaa tai suhteellista keskihajontaa. Toistettavuutta voidaan tutkia sekä pelkillä standardeilla että standardinlisäysnäytteillä, jolloin tutkitaan myös näytematriisin riippuvuutta tutkittavan yhdisteen pitoisuuteen. Usein sarjan sisäinen hajonta on pienempää kuin sarjojen välinen hajonta, minkä vuoksi toistettavuutta tutkitaan useammalla sarjalla. (Elintarvikevirasto 1997, 4–5, 19.; Magnusson & Örnemark 2014, 54–55.)

Tilastollisesti toistettavuutta tutkitaan sarjan sisäisenä keskihajontana, sarjojen välisenä keskihajontana sekä kokonaishajontana. Sarjan sisäinen hajonta kuvaa lyhytaikaista vaihtelua, jota on vaikea vähentää. Laskukaavasta 4 sisäiseksi keskihajonnaksi (s_w) saadaan

$$s_w^2 = \frac{\sum X^2 - \frac{\sum B^2}{n}}{m - 1} \quad (4)$$

$$s_w = \sqrt{\frac{\sum X^2 - \frac{\sum B^2}{n}}{m - 1}},$$

jossa X on yksittäinen tulos, B on sarjan rinnakkaistulosten summa, n on rinnakkaisten lukumäärä ja m sarjojen lukumäärä. Sarjojen välinen hajonta kuvaa pitkäaikaista vaihtelua, jonka lähteitä yleensä selvitetään ja vähennetään. Tämä sarjojen välinen keskihajonta (s_b) voidaan laskea kaavalla 5 muodossa

$$s_b^2 = \frac{\left(\frac{\sum B^2}{n} - \frac{(\sum B)^2}{mn} \right) - \left(\frac{\sum X^2 - \frac{\sum B^2}{n}}{m-1} \right)}{n} \quad (5)$$

$$s_b = \sqrt{\frac{\left(\frac{\sum B^2}{n} - \frac{(\sum B)^2}{mn} \right) - \left(\frac{\sum X^2 - \frac{\sum B^2}{n}}{m-1} \right)}{n}}$$

(Mäkinen 1996, 42–45.; Magnusson & Örnemark 2014, 54–55.)

Näitä arvoja voidaan hyödyntää kokonaishajonnan määrittämisessä. Kokonaishajonta (s_t) kuvaa yksittäisten tulosten kokonaisvaihtelua ja se lasketaan kaavalla 6 muodossa

$$s_t^2 = s_b^2 + s_w^2 \quad (6)$$

$$s_t = \sqrt{s_b^2 + s_w^2}$$

(Mäkinen 1996, 42–45.; Magnusson & Örnemark 2014, 54–55.)

4.4 Tarkkuus

Riittävä tarkkuus on yksi analyysimenetelmän ensisijaisista tavoitteista. Sillä kuvataan mittauksissa saadun ja tuntemattoman oikean arvon läheisyyttä. Tarkkuus ilmaistaan yleensä suhteellisenä keskihajontana (%) todellisesta tai odotetusta arvosta. Tarkkuutta tutkitaan muun muassa referenssiaineen arvon ja määrittämisessä saatujen arvojen keskiarvon erotuksella, saantokokeilla sekä vertailemalla referenssimenetelmään tai interkalibroinnin antamiin tuloksiin. (Elintarvikevirasto 1997, 2–4; Magnusson & Örnemark 2014, 35.)

Tarkkuus sisältää yleensä virhettä, joka on esitetty systemaattisena virheenä, satunnaisvirheenä sekä näiden kahden summana saatuna kokonaisvirheenä. Sekä systemaattisen virheen että satunnaisvirheen tulisi olla mahdollisimman pienet.

(Elintarvikevirasto 1997, 3; Magnusson & Örnemark 2014, 35.) Systemaattinen virhe voi olla peräisin esimerkiksi virheellisestä kalibroinnista tai nollanäytteen arvioinnista, kyvyttömyydestä määrittää kaikkia tutkittavan yhdisteen muotoja, määritysolosuhteista tai näytteiden mahdollisesta muuntumisesta, kuten kontaminoitumisesta, ennen analysointia (Mäkinen ym. 1996, 33; Elintarvikevirasto 1997, 3). Satunnaisvirhe johtuu sarjojen sisäisestä ja sarjojen välisestä vaihtelusta, joka ei välttämättä pysy vakiona. Satunnaisvirhettä seurataan yleensä sisäisessä laadunvarmistuksessa jokaisen mittauksen yhteydessä. (Mäkinen ym. 1996, 41, 48; Magnusson & Örnemark 2014, 35–36.)

Tarkkuuden tutkimisessa voidaan hyödyntää myös vertailumateriaaleja, joiden tulisi saada mittausepävarmuuden puitteissa yhtä suuret pitoisuudet. Vertailumateriaalit tulisi valita niin, että ne vastaavat menetelmällä tutkittavia näytematriiseja. (Elintarvikevirasto 1997, 3; Magnusson & Örnemark 2014, 35.) Vertailukokeiden arvoa voidaan mitata analyysimenetelmällä saatuihin tuloksiin laskeamalla poikkeama todellisesta tai odotetusta arvosta eli tarkkuusprosentti (T -%) kaavalla 7

$$T - \% = \frac{X - \mu}{\mu} \cdot 100\%, \quad (7)$$

jossa X on määrittämällä saatu tulos ja μ on todellinen eli vertailumateriaalin arvo. (Mäkinen ym. 1996, 33–34; Magnusson & Örnemark 2014, 30–31.)

Mikäli vertailumateriaalia ei ole käytettävissä, voidaan tarkkuus määrittää lisäyskokeilla, kuten standardinlisäyksillä, näytteeseen, joka sisältää vähän tai ei ollenkaan tutkittavaa yhdistettä. Lisäykset tulisi tehdä usealla eri pitoisuudella yleensä lineaarisella alueella. (Elintarvikevirasto 1997, 3.) Näille lisäyksille voidaan laskea saanto (R) kaavalla 8 muodossa

$$R = \frac{(S - U)}{C} \cdot 100 \%, \quad (8)$$

jossa S on lisäyksen sisältävän näytteen pitoisuus, U on näytteen alkuperäinen pitoisuus ja C on tunnettu lisätyn standardiliuoksen pitoisuus (Mäkinen ym. 1996, 34; Magnusson & Örnemark 2014, 31–32.)

Tarkkuutta voidaan tutkia myös vertaamalla jollain toisella hyväksytyllä menetelmällä saatuja tuloksia saatuihin tuloksiin. Tulosten eron merkitsevyyttä voidaan tutkia sopivalla t -testillä, jonka määrittämistä varten täytyy laskea kaavalla 9 arvioitu keskihajonta (s) kummastakin määrittäyksestä saatujen keskihajontojen avulla

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad (9)$$

$$s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}},$$

jossa s_1 ja s_2 ovat kahden eri menetelmän tulosten keskihajonnat, n_1 ja n_2 ovat määrittysten lukumäärät sekä niistä johdetut vapausasteet n_1 ja $n_2 - 2$. Tästä saadaan testisuureen t arvo laskettua kaavalla 10 muodossa

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} \quad (10)$$

jossa \bar{x}_1 ja \bar{x}_2 ovat eri menetelmillä saadut pitoisuuksien keskiarvot, s on kaavasta 9 johdettu keskihajonta sekä n_1 ja n_2 ovat määrittysten lukumäärät. (Elintarvikevirasto 1997, 3, 21; Miller & Miller 1993, 55–58.)

4.5 Mittausepävarmuus

Menetelmä sisältää aina jonkinlaista mittausepävarmuutta, joka on kvantitatiivinen esitys siitä, kuinka laadukkaita tulokset ovat. Se on arvio siitä, millaisissa rajoissa mittaustuloksen oletetaan olevan tietyllä todennäköisyydellä. Menetelmän mittausepävarmuuden lähteitä voi tulla esimerkiksi näytteenotosta, matriisista, esikäsitteystä tai näytteiden mittaamisesta, mittaolosuhteista sekä sattunnaisesta tai systemaattisesta vaihtelusta. (Elintarvikevirasto 1997, 10; Ehder 2005, 19.) Mittausepävarmuuden kvantitatiivinen ilmoittaminen on tärkeää ja sitä käytetään, kun arvioidaan tulosten luotettavuutta, verrataan tuloksia keskenään

tai tehdään johtopäätöksiä tuloksista ja tehdystä työstä. (Mäkinen ym. 1996, 53; Magnusson & Örnemark 2014, 38.)

Mittausepävarmuuden määrittäminen voidaan tehdä kokeellisilla mittauksilla tai hyödyntämällä varmennettuja vertailumateriaaleja. Mittausepävarmuuteen vaikuttavat satunnaisvirhe ja systemaattinen virhe. Mittausepävarmuuden satunnaisvirheen (u_1) arvioimisessa hyödynnetään rinnakkaisten tulosten (x_{i1} ja x_{i2}) keskiarvoa (\bar{x}_1), keskihajontaa (s_i) sekä suhteellista keskihajontaa (s_i (%)). Näistä voidaan muodostaa kuvaaja, joka havainnollistaa suhteellisen keskihajonnan riippuvuuden pitoisuudesta. (Mäkinen ym. 1996, 53–57.)

Systemaattisen virheen arvioimisessa hyödynnetään määrittämisen tuloksien (x_i) eroa teoreettisesta arvosta (T) sekä näiden arvojen suhteellista erotusta (d_r (%)). Suhteellisten erotusten keskiarvon (\bar{d}_r (%)) avulla saadaan kaavalla 11 systemaattisen virheen (u_2) osuutta vastaava suhteellisten erotusten keskihajonta (s_{dr} (%)). Kaavalla 11 laskettu systemaattinen virhe (u_2) esitetään muodossa

$$u_2 = s_{dr}(\%) = \sqrt{\frac{\sum (d_r(\%) - \bar{d}_r(\%))^2}{n - 1}}, \quad (11)$$

jossa n on määrittämisen lukumäärä. (Mäkinen ym. 1996, 53–57.)

Menetelmän lopullinen mittaustulokseen liittyvä kokonaisepävarmuus ilmaistaan laajennettuna mittausepävarmuutena. Kokonaisepävarmuus saadaan laske-
malla yhteen neliöidyt epävarmuuskomponentit ja ottamalla tästä neliöjuuri (Elin-
tarvikevirasto 1997, 10–11). Kokonaismittausepävarmuus (u_c) lasketaan kaavalla
12 muodossa

$$u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2}, \quad (12)$$

jossa u_1 on arvio satunnaisvirheestä ja u_2 on kaavasta 11 saatu arvio systemaattisesta virheestä. Kertomalla tämä arvo jollain kertoimella k , joka vastaa tietyn

suuruista luotettavuusväliä, saadaan laajennettu mittausepävarmuus. Esimerkiksi kerroin kaksi vastaa luotettavuusväliä 95 %. Kaavalla 13 saadaan laajennettu mittausepävarmuus (U)

$$U = k \cdot u_c. \quad (13)$$

(Mäkinen ym. 1996, 53–57.)

5 LAITTEEN KÄYTTÖÖNOTTO, MENETELMÄN KEHITYS JA VALIDOINTI

Opinnäytetyön kokeellinen osa sisältää analyysilaitteiston käyttöönoton ja siirtovalidoinnin sekä kiinteiden ympäristönäytteiden analyysimenetelmän suunnittelun, kehittämisen ja validoinnin. Laitteistolle suoritettiin siirron jälkeiset toiminnalliset testaukset ja laadunvarmistustoimenpiteet. Samanaikaisesti määritettiin uusia parametreja kehitettävälle analyysimenetelmälle vastaamaan muuttuneita mittaolosuhteita.

5.1 Laitteiston käyttöönotto

Käyttöön otettava ja siirtovalidoitava laitteisto oli FOSS Tecator Line Kjeldahl-analyysilaitteisto. Analyysilaitteisto on yrityksen toisesta toimipisteestä tuotu Kjeltec 8400 -analysaattori 20-paikkaisella Kjeltec 8420 Sampler -näytteenäyttäjällä (kuva 1).



KUVA 1. Kjeltec 8400 -analysaattori 20-paikkaisella Kjeltec 8420 Sampler -näytteenäyttäjällä

Analyysilaitteistolle tehtiin ensimmäisen asennuksen yhteydessä toimintatestit, minkä jälkeen laitteella tehtiin validointia varten erilaisia testiajoja tutkien laitteen ja menetelmän toimivuutta. Samalla analyysilaitteiston lisäksi otettiin käyttöön

myös uusi märkäpolttolaitteisto, joka koostuu 20-paikkaisesta ja hissillisestä Digester 2520 -märkäpolttolaitteesta kytkettynä Scrubber 2501 -neutralointiyksikköön (kuva 2).



KUVA 2. 20-paikkainen ja hissillinen Digester 2520 -märkäpolttolaite kytkettynä Scrubber 2501 -neutralointiyksikköön

Toimipisteessä on aikaisemmin ollut samanlainen märkäpolttolaite käytössä, joten uuteen märkäpolttolaitteeseen asennettiin vanhan polttolaitteen poltto-ohjelmat. Märkäpolttolaitteisto toimi aikaisemmin vesijohtoliitännällä, joten uutena menetelmään tuli neutralointiyksikön (kuvassa vasemmalla) käyttöönotto ja liittäminen osaksi esikäsitteilymenetelmää. Märkäpolttolaitteisto toi muutoksia menetelmäohjeeseen sekä reagensseihin, mutta muuten laitteistoa käytettiin vastaavalla tavalla kuin aikaisempaa polttolaitetta.

5.2 Menetelmän kehittäminen

Uutta analyysimenetelmää kehitettiin useiden parannusten avulla, kuten sisällyttämällä menetelmään uusi referenssinäyte sekä tekemällä muutoksia reagenssi-määriin ja -laatuihin. Lisäksi märkäpolttoon käytetty poltto-ohjelma optimoitiin nopeammaksi ja resurssitehokkaammaksi sekä yhtenäiseksi Karkkilan menetelmän kanssa. Näillä muutoksilla yhdenmukaistettiin kokonaistyyppimenetelmät, virtaviivaistettiin analyysiprosessia ja tehostettiin sitä.

5.2.1 Vakionäyte ja kalibrointinäytteet

Aikaisemmassa menetelmässä käytettiin märkäpolton sekä laitteen toiminnan varmistamisessa glysiiniliuosta saannon määrittämisessä. Liuos ei kuitenkaan vastannut menetelmällä analysoitavia näytematriiseja, joten käyttöön otettiin laboratoriossa jo validoinneissa ja analyyseissä ollut maanäytevakio. Laitteen päivitystä kalibrointia ja saantoa varten lisättiin lisäksi kaksi standardiliuosta, jotka ovat olleet osana Karkkilan aikaisempaa menetelmää.

Maanäytevakio on kuivattua ja 1 mm -seulan läpi seulottua homogeenista savi- maajauhetta, jonka tarkoitus on toimia märkäpolton ja analyysilaitteen laadunvarmistuksessa. Näytettä on tarkoitus punnita tietty määrä ja märkäpolttaa se jokaisen ajon yhteydessä. Näyte vastaa matriisiltaan tutkittavia näytteitä, joten sen saantoa voidaan käyttää vertailumateriaalina polton onnistumisesta.

Laitteelle ei aikaisemmassa menetelmässä tehty erillistä kalibrointia, jolla voitaisiin varmistaa eri pitoisuusalueiden saannot. Tätä varten menetelmään lisättiin 1000 mg N/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -liuos sekä 2000 mg N/L NH_4Cl -liuos, jotka tulee sisällytetyksi jokaiseen laitteistoa valmistelevaan lämmitysajoon. Lämmitysajo on tarkoitus ajaa aina ennen näytteitä ja ajolla on tarkoitus lämmittää laite valmiiksi ja tarkistaa, että kalibrointistandardien pitoisuudet vastaavat oikeita arvoja.

5.2.2 Kaupallinen suolahappo

Aikaisemmassa menetelmäohjeessa ohjeistettiin valmistamaan 0,02 M suolahappoliuos kaupallisesta 0,1 M suolahaposta. Tämä kuitenkin vaati aina erillisen pitoisuuden testaamisen titraamalla, mikä kuluttaa ylimääräistä työaikaa. Lisäksi laite vaatisi aina uuden titrauksen värikalibroinnin liuoksen vaihtuessa.

Uudessa menetelmässä suolahappo vaihdettiin kaupalliseen 0,02 M suolahappoon, jolloin vältyttäisiin ylimääräisiltä liuosten valmistuksilta. Tätä liuosta varten luotiin oma reagenssin seurantatiedosto liuosten laadun, kulutuksen ja voimasaolon seuranta varten.

5.2.3 Reagenssimäärien muutokset

Aikaisemmassa menetelmässä oli hyödynnetty märkäpolton reagenssimääränä kahta Kjeltabs-puristetablettia ja 12 millilitraa väkevää rikkihappoa. Karkkilan toimipisteessä on kuitenkin huomattu, että yksi tabletti ja 10 ml rikkihappoa ovat riittäneet polttamaan näyte ja saamaan kaikki vapautettavissa olevat typpiyhdisteet liukenemaan rikkihappoon. Tämä siis otettiin toimintaan myös uuden menetelmän kanssa, joka yhtenäisti kummankin menetelmän esikäsittelyssä käytettävät reagenssimäärät samoiksi.

Rikkihapon määrän pienentämisestä seurasi se, että laitteen titrauksessa kuluvan natriumhydroksidiliuoksen määrä voitiin myös vähentää. Tämä voidaan vähentää 50 millilitrasta 40 millilitraan, joka riittää neutraloimaan happomäärän. Tämä vastasi myös vanhan laitteen reagenssimääriä, jolloin kulutus on paremmin seurattavissa.

5.2.4 Märkäpolttolaitteiston poltto-ohjelman muuttaminen

Alkuperäinen kiinteiden näytteiden poltto-ohjelma oli määritetty aikaisemmassa laitteen toimipisteessä. Se kuitenkin muutettiin vastaamaan nykyisen laboratoriossa käytössä ollutta poltto-ohjelmaa, sillä yhtenäisen poltto-ohjelman käyttö yksinkertaistaa määrittämiä, jolloin samana päivänä märkäpoltettuja näytteitä voi ajaa molemmilla analysointilaitteilla yhtäaikaaisesti.

Kotkan menetelmän poltto-ohjelmassa märkäpolttolaitteen lämpötilan annettiin nousta ensin 420 °C:een, jonka jälkeen polttoteline laskettiin hissillä lämmityskuoppiin noin kahden tunnin ajaksi. Poltto kuitenkin kesti kokonaisuudessaan lähemmäs 3,5 tuntia, sillä lämpölevyn lämpeneminen 420 °C lämpötilaan vaatii huomattavasti aikaa ja energiaa.

Karkkilassa on ollut käytössä poltto-ohjelma, joka nostaa lämpötilan ensin 60 °C:een ja laskee telineen alas, jonka jälkeen kuoppien nostetaan 390 °C lämpö-

tilaan. Tämä koko prosessi kestää noin kolme tuntia, jonka päätteeksi hissi nostaa telineen ylös. Karkkilan poltto-ohjelma vastasi odotuksia ja toimi hyvin myös tutkittavilla näytematriiseilla, joten menetelmän poltto-ohjelma muutettiin vastaamaan kyseistä ohjelmaa.

5.3 Validointi

Validoinnissa hyödynnettiin useita eri ohjemateriaaleja, kuten validointioppaita, laitevalmistajan ohjeita, kansainvälisiä standardeja sekä aikaisempia menetelmäohjeita. Validoinnissa määritettiin useita validointiparametrejä, jotka olivat toteamis- ja määritysraja, mittausalue ja lineaarinen alue, toistettavuus, tarkkuus sekä mittausepävarmuus.

Toteamis- ja määritysrajan mittauksissa analysoitiin märkäpoltettujen nollanäytteiden pitoisuuksia. Nollanäytteet esikäsiteltiin samalla tavoin kuin näytteet lisäten tyhjäan polttoputkeen yksi Kjeltabs-puristetabletti sekä 10 millilitraa väkevää rikkihappoa. Toteamisrajan tavoitteeksi asetettiin 50 mg N/kg ja määritysrajan tavoitteeksi 500 mg N/kg.

Mittausalueet määritettiin sekä matriisittomilla että matriisillisilla näytteillä 1000 mg N/l NH₄Cl -standardiliuoksilla. Validoinnissa analysoitiin kuusi sarjaa pitoisuusalueella 50–30 000 mg N/kg standardinäytteitä sekä viisi sarjaa pitoisuusalueella 500–20 000 mg N/kg standardilisäysnäytteitä rinnakkaisina määrityksinä. Taulukossa 1 on esitetty standardeja vastaavat pipetointilavuudet ja typpi-pitoisuudet.

TAULUKKO 1. Standardiliuoksen (1000 mg N/L NH₄Cl) pipetointilavuudet ja vastaavat typpipitoisuudet

Standardiliuos (mL)	Pitoisuus (mg N/kg)
0	0
0,05	50
0,1	100
0,25	250
0,5	500
1	1000
5	5000
10	10 000
15	15 000
20	20 000
25	25 000
30	30 000

Standardinäytteitä ajettiin kymmeneltä eri pitoisuudelta titrauslaitteella ilman märkäpolttoa. Standardinlisäykset tehtiin maanäytevakioon, jotka märkäpoltettiin analyysia varten. Nollanäytteinä standardinäytteissä käytettiin tyhjää polttoputkea ja standardinlisäysnäytteissä märkäpoltettua maanäytevakiota, josta on vähennetty myös nollanäyte. Mittausalueen tavoitteeksi asetettiin 50–30 000 mg N/kg.

Lineaarisuutta tutkittiin matriisittomalla pitoisuusalueella 50–30 000 mg N/kg ja matriisillisella pitoisuusalueella 250–20 000 mg N/kg. Määrityksessä hyödynnettiin tilastomatemattisina työkaluina regressioanalyysia. Lineaarisen alueen tavoitteeksi asetettiin 500–25 000 mg N/kg.

Toistettavuuden määrittämisessä hyödynnettiin mittausalueen määrityksessä tuotettua standardimittausten dataa. Menetelmän toistettavuus määritettiin tutkimalla sarjojen sisäistä ja välistä hajontaa sekä yhdistämällä nämä kokonaishajonnaksi. Suhteelliseksi kokonaishajonnan tavoitteeksi asetettiin 3–5 %.

Tarkkuutta tutkittiin useamman standardinlisäyssarjojen rinnakkaisten standardinäytteiden keskihajontoina. Lisäksi tutkittiin vertailukokeen näytteistä saatujen arvojen eroa vertailuarvoon sekä referenssimenetelmällä saatuihin arvoihin. Tarkkuuden tavoitteeksi asetettiin takaisinsaannoksi 95–105 %.

Mittausepävarmuus määritettiin tutkimalla useammalla standardi- ja standardinlisäyssarjalla satunnaisvirhettä ja systemaattista virhettä. Lisäksi laskettiin näiden avulla kokonaisepävarmuus ja muodostettiin menetelmän laajennettu mittausepävarmuus. Laajennetun mittausepävarmuuden tavoitteena oli 10 %.

6 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

Menetelmää kehitettiin usealla eri tavalla sekä parantaen tulosten luotettavuutta että vähentämällä menetelmään käytettäviä resursseja, kuten reagenssien ja energian kulutusta sekä ajallista hukkaa. Validoinnissa päästiin sekä tavoitearvoihin että tavoitearvoja parempiin tuloksiin, jotka yhdessä tekevät menetelmästä käyttötarkoituksenmukaisen ja toimivan kokonaisuuden.

6.1 Menetelmäkehitys

Menetelmästä poistettiin glysiiniliuos, jota oli alun perin käytetty polton varmistamisen reagenssina sekä laitteen saannon varmistajana. Glysiinin sijaan menetelmään lisättiin jo vanhalla laitteella käytössä olevat 1000 mg N/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ standardiliuos sekä 2000 mg N/kg NH_4Cl kontrollistandardiliuos (Luoma 2022). Standardin EN 126169:2012 mukaan toimintatestiliuoksena voidaan hyödyntää muun muassa ammoniumsulfaattia, asetaniilidia, L-askorbiinihappoa, sulfaanihappoa tai muita aminohappoja, joten ammoniumsulfaatti korvaa glysiinin hyvin typpi-pitoisuuden tarkastusliuoksena (EN 126169 2012, 8). Lisäksi menetelmään lisättiin vakionäytteeksi maanäyte, joka ajetaan jokaisen sarjan yhteydessä. Maanäytevakion on tarkoitus varmentaa märkäpolton onnistuminen ja oikean pitoisuuden saanto.

Kotkan menetelmässä käytettiin aikaisemmin itse valmistettua 0,02 M suolahappoa, joka korvattiin kaupallisella 0,02 M suolahapolla. Tämä toi tarkkuutta menetelmään, sillä kaupallisen suolahapon kulutus pysyi vakiona eikä uuden liuoksen pitoisuutta tarvitse aina tarkistaa titraamalla. Tällä säästettiin sekä aikaa että resursseja.

Aikaisemman menetelmän märkäpoltto-ohjelma oli alun perin monivaiheisempi ja vaati korkeamman lämpötilan (420 °C). Tämä kuitenkin muutettiin vastaamaan toimipisteessä jo aikaisemmin käytössä olevaa poltto-ohjelmaa, sillä sen on todettu polttavan näytteet tasalaatuisesti alhaisemmassa lämpötilassa (390 °C)

säästään sekä laitteistoa että aikaa (Luoma 2022). Mikäli tulokset halutaan saman päivän aikana, muutos mahdollistaa tämän. Lisäksi standardissa EN 16169:2012 on mainittu, että digestio ei saa ylittää 400 °C mahdollisen analyytinhäviön vuoksi, joten menetelmä vastaa tällöin myös standardimenetelmää (EN 16169 2012, 6).

Reagenssien määriä muutettiin jonkin verran menetelmää kehittäessä. Alun perin menetelmässä ennen märkäpolttoa jokaiseen näytteeseen lisättiin kaksi Kjeltabs-puristetablettia sekä 12 millilitraa väkevää rikkihappoa. Tämä voitiin kuitenkin toimipisteen vanhan laitteen menetelmäohjetta mukaillen laskea yhteen puristetablettiin ja 10 millilitraan rikkihappoa (Luoma 2022). Tämän myötä myös tislausvaiheessa polttoputkeen lisättävän natriumhydroksidin määrää voitiin laskea 50 millilitrasta 40 millilitraan. Tämä muutos säästää sekä reagensseja että yrityksen resursseja.

6.2 LOD ja LOQ

Kumpaakin määrittystä varten mitattiin kahdesta märkäpoltetusta sarjasta yhteensä kahdenkymmenen nollanäytteen pitoisuudet yksikössä mg N/kg. Nollien antamat tulokset laskettiin vähentämällä kaikista nollanäytteistä määrittelyssä saatu pienin mitattu suolahapon kulutus. Tällöin saatiin pienimmät mahdolliset pitoisuudet, jotka laitteella voitiin luotettavasti saada. (FOSS n.d., 13–14.)

Toteamisraja saatiin laskettua kaavalla 2, jossa kertoimeksi k asetettiin 3. Toteamisraja (LOD) oli tällöin

$$LOD = x_0 + 3 \cdot s_0 \quad (2)$$

$$\approx 45 \frac{\text{mg N}}{\text{kg}}.$$

Määrittäysraja saatiin vastaavasti laskettua kaavalla 3, jossa kertoimeksi k asetettiin 5. Määrittäysraja (LOQ) oli tällöin

$$LOQ = x_0 + 5 \cdot s_0 \quad (3)$$

$$\approx 65 \frac{\text{mg N}}{\text{kg}}.$$

Näihin kerätty analyysidata on esitetty liitteessä 1, josta nähdään nollanäytteille määritetyt keskiarvot ja keskihajonnat. Analyysidatan perusteella toteamisrajaksi saatiin mittausepävarmuuden puitteissa noin 45 mg N/kg ja määritysrajaksi noin 65 mg N/kg, mitkä esitetään taulukossa 2.

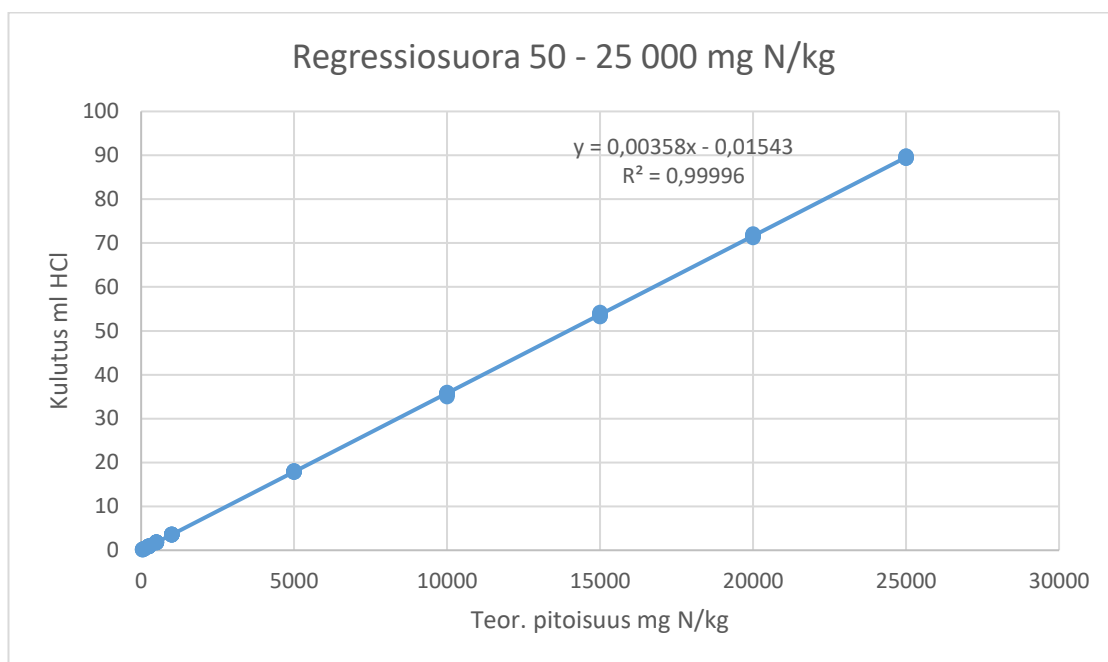
TAULUKKO 2. Lopulliset toteamis- ja määritysrajat

Toteamisraja (mg N/kg)	Määritysraja (mg N/kg)
45	65

Kiinteiden näytteiden menetelmälle ei ollut aikaisemmin validoitu toteamis- tai määritysrajaa yksikössä mg N/kg, joten validoinnin ensisijaisena tavoitteena oli määrittää ne. Tavoitteena toteamisrajalle oli 50 mg N/kg ja määritysrajalle 500 mg N/kg. Mittauksissa saavutettu toteamisraja oli pienempi kuin tavoite, mutta kuitenkin suurempi kuin aikaisemman menetelmän määritysraja (20 mg N/kg) (Tuutti 2022). Määritysraja sen sijaan laski tavoitteeseen nähden huomattavasti, sillä se oli alun perin asetettu korkeaksi. Korkeampaan toteamisrajaan ja määritysrajaan vaikuttavat todennäköisesti laboratorion mittausolosuhteet, kuten käytössä olleet kuluneet Kjeldahl-polttoputket, joiden uurteissa saattaa olla jämiä aikaisemmista näytteistä.

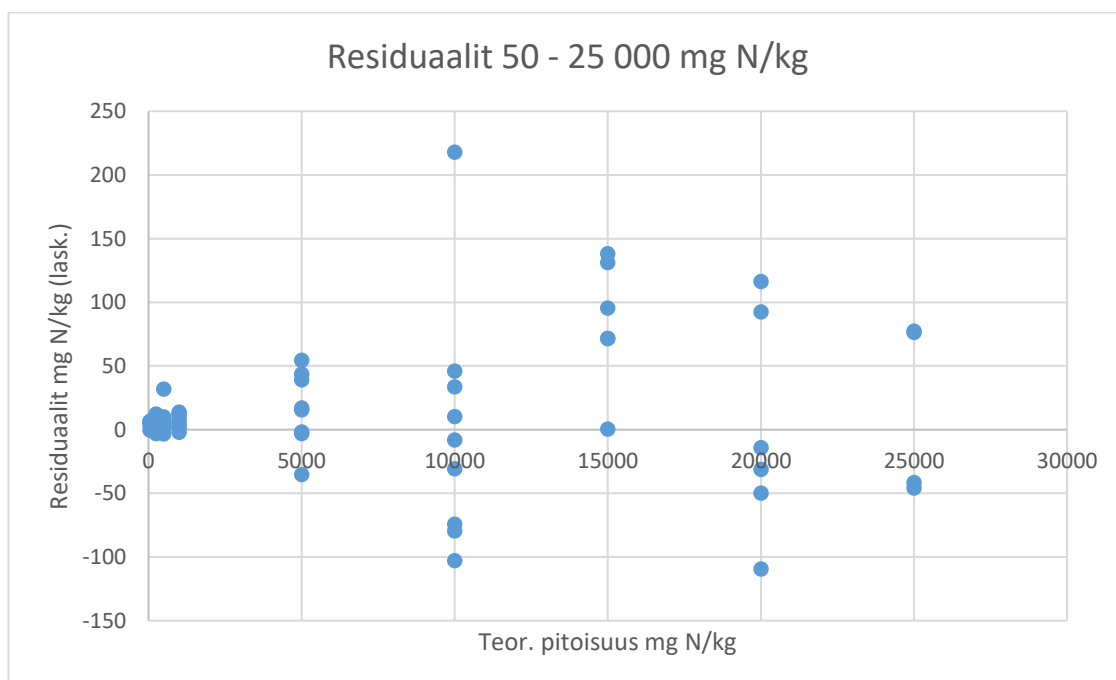
6.3 Lineaarinen alue

Mittausaluetta ja lineaarista aluetta varten mitattiin viisi sarjaa standardinäytteitä (1000 mg N/L NH₄Cl) pitoisuusalueelta 50–25 000 mg N/kg sekä neljä sarjaa standardinlisäysnäytteitä maanäytevakioon pitoisuusalueelta 250–20 000 mg N/kg. Mittausalueen määrittämisestä kerätty data esitetään liitteessä 2. Datan perusteella voitiin muodostaa kalibrintisuora suolahapon kulutuksen (ml HCl) riippuvuudelle teoreettisesta pitoisuudesta (mg N/kg). Matriisittoman pitoisuusalueen (50–25 000 mg N/L) datasta muodostettiin regressiosuora, joka on esitetty kuviossa 1.



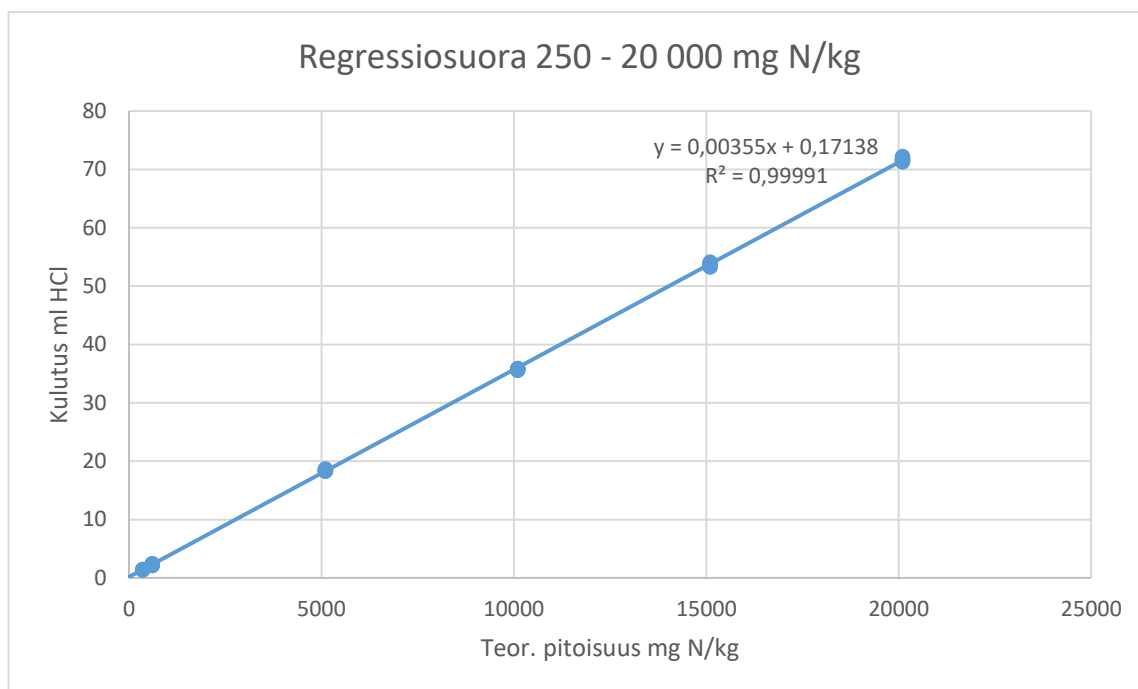
KUVIO 1. Regressiosuora standardinäytteille pitoisuusalueella 50–25 000 mg N/kg.

Kuvion 1 regressiosuoran perusteella muodostettiin suoralta laskettujen kulutus-ten perusteella laskettujen pitoisuuksien residuaalit kuviossa 2.



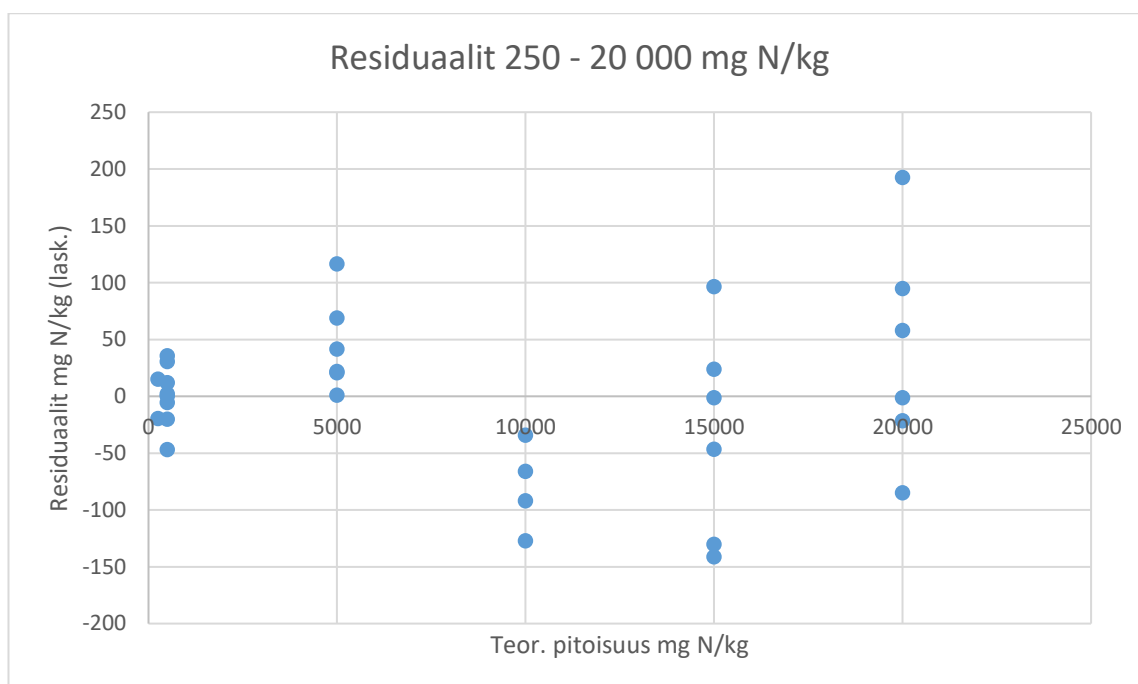
KUVIO 2. Regressiosuoran residuaalien kuvaaja pitoisuusalueella 50–25 000 mg N/kg.

Mittausaluetta tutkittiin myös standardinlisäyksillä matriisiin, eli maanäytevakioon, pitoisuusalueella 250–20 000 mg N/kg. Tämän data on esitetty liitteessä 3, jonka perusteella muodostettiin kuviossa 3 esitetty regressiosuora.



KUVIO 3. Regressiosuora standardinlisäysnäytteille pitoisuusalueella 250–20 000 mg N/kg.

Kuvion 3 regressiosuoran perusteella muodostettiin suoralta laskettujen kulutus-ten perusteella laskettujen pitoisuuksien residuaalit kuviossa 4.



KUVIO 4. Kalibrintisuoran residuaalien kuvaaja pitoisuusalueella 250–20 000 mg N/kg.

Kuvioiden 1 ja 3 regressiosuorien perusteella havaittiin, että lasketut pitoisuudet olivat lineaarisesti riippuvia teoreettisista pitoisuuksista. Tämä huomattiin myös selitysasteista R^2 , jotka olivat molemmat yli 0,9999. Kuvioiden 2 ja 4 residuaalit on määritetty laskennallisesti, mutta kuviosta huomataan, että arvot näyttäisivät suunnilleen asettuvan 0-arvon kummallekin puolelle. Eniten arvojen heittelemistä tapahtui suuremmilla, eli yli 10 000 mg N/kg, pitoisuuksilla. Ne kuitenkin pysyttelivät mittausepävarmuuden sisällä.

Aikaisemmin määritettiin toteamisrajaksi 45 mg N/kg ja määritysrajaksi 65 mg N/kg, joten mittausalueeksi voidaan mittausdatan perusteella asettaa 45–25 000 mg N/kg ja lineaariseksi alueeksi 65–20 000 mg N/kg. Nämä on esitetty taulukossa 3.

TAULUKKO 3. Lopullinen mittausalue ja lineaarinen alue

Mittausalue (mg N/kg)	Lineaarinen alue (mg N/kg)
45–25 000	65–20 000

Aikaisempi menetelmän mittausalue oli 20–2000 mg N/kg, mutta lineaarista aluetta ei ollut erikseen määritelty (Tuutti 2022). Tavoitteiksi mittausalueelle asetettiin 50–30 000 mg N/kg ja lineaariseksi alueeksi 500–20 000 mg N/kg. Mittaustuloksissa siis päästiin pienempiin alarajoihin sekä mittausalueessa että lineaarisella alueella. Saavutettu mittausalueen alaraja on kuitenkin huomattavasti suurempi kuin aikaisempi raja, mikä johtunee laboratorioden välisten mittaolosuhteiden eroista. Lisäksi pipetoinnit suoritettiin sekä automaatti- että täyslasipipeilla, joten automaattipipettien epätarkkuus nähdään alle 10 mL pipetoinneissa.

6.4 Toistettavuus ja menetelmän kokonaishajonta

Toistettavuutta tutkittiin standardinäytteiden avulla arvioimalla sarjojen sisäistä ja välistä keskihajontaa sekä niiden pohjalta kokonaishajontaa mittausalueella. Mitauksissa tutkittiin pitoisuuksien keskihajontoja varianssisuhteen avulla sekä näiden keskiarvoja.

Sarjojen sisäiset keskihajonnat määritettiin kaavalla 4, sarjojen väliset kaavalla 5 ja kokonaishajonta kaavalla 6. Standardinäytteille sarjojen sisäinen hajonta vaihteli välillä 0,1–1,9 %, sarjojen välinen vaihtelu välillä 0–1,1 % ja kokonaishajonta välillä 0,5–2,0 %. Näiden tulokset on laskettu liitteen 2 datasta ja tulokset on esitetty taulukossa 4.

TAULUKKO 4. Toistettavuusmittausten tulokset eri pitoisuuksilla.

Pitoisuus (mg N/kg)	Sarjojen sisäinen hajonta s_w (%)	Sarjojen välinen hajonta s_b (%)	Kokonaishajonta s_t (%)
250	1,344	0	1,344
500	1,878	0,438	1,928
1000	0,413	1,059	1,137
5000	0,706	1,081	1,291
10000	0,649	0,985	1,180
15000	0,981	0,480	1,092
20000	0,132	0,544	0,559

Kotkan menetelmälle toistettavuutta tarkasteltiin alun perin satunnaisvirheen avulla. Tämän validoinnin yhteydessä kuitenkin tutkittiin useamman sarjan perusteella kokonaishajontaa, jonka tavoitteeksi asetettiin 3–5 %. Taulukon 4 kokonaishajonnat kuitenkin pysyttelevät alle 2 %, joka on tavoitetta pienempi.

6.5 Tarkkuus ja menetelmän saanto

Tarkkuutta tutkittiin vertailumateriaalin, referenssimenetelmän sekä standardinlisäysten avulla. Vertailumateriaalimittauksissa tutkittiin SYKE MET 11/2023 sedimenttinäytettä, joka vastasi menetelmällä tutkittavia näytematriiseja. Arvojen perusteella laskettiin tarkkuusprosentti T -% eli poikkeama vertailuarvosta oli noin -0,65 % käyttäen kaavaa 7 eli saanto olisi noin 99,35 %. Tämä esitetään taulukossa 5.

TAULUKKO 5. Tarkkuus vertailumateriaalin avulla määritettynä.

Näyte	Vertailuarvo μ (mg N/kg)	Tulosten keskiarvo \bar{x} (mg N/kg)	Keskihajonta s (mg N/kg)	Tarkkuuspoikkeama T -%
SYKE MET 11/2023	4310	4281,8	99,2	-0,65

Menetelmällä oli Kotkassa mitattu myös muita vertailumateriaaleja, joiden tarkkuus vaihteli -0,99–8,20 % poikkeamina todellisesta arvosta. Nämä näytteet olivat komposteja ja yhdyskuntalietteitä, joten ne eivät täysin vastanneet tällä menetelmällä tutkittavia näytematriiseja. Voidaan kuitenkin todeta, että laite antaa tarkkuudeltaan enemmän korkeita kuin matalia tuloksia.

Vertailunäyte mitattiin myös toimipisteen vanhalla laitteella, joka on malliltaan identtinen, mutta vanhempi kuin validoitava laite. Tulosten välistä eroa tutkittiin kaavojen 9 ja 10 t -testin avulla. T -testi antoi arvoksi noin 0,408, joka on pienempi kuin kaksisuuntaisen t -testin arvo $t_{0,05}(2) = 4,303$. Tämän vuoksi laitteiden antamien tulosten erot eivät ole merkittäviä (Mäkinen 1996, 80). Menetelmien keski-

hajonta on kyseiselle näytteelle noin 71,6 mg N/kg, joka suhteellisena poikkeamana on noin 0,017 %. Laskuihin käytetyt arvot sekä menetelmien keskihajonnat on esitetty taulukossa 6.

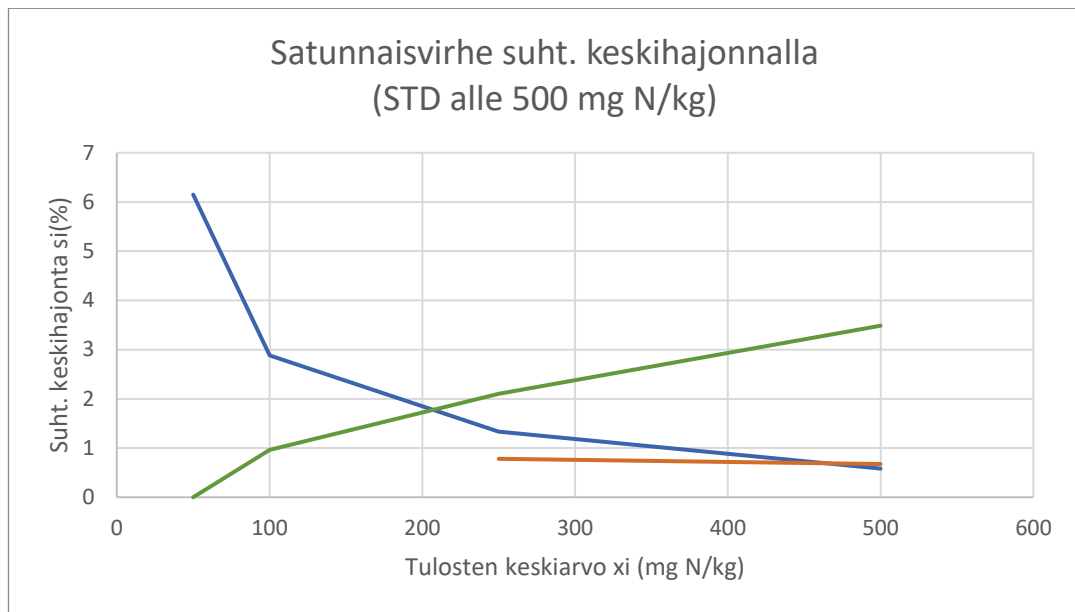
TAULUKKO 6. Tarkkuus vertaamalla referenssimenetelmällä saatuihin tuloksiin.

	Tulokset x (mg N/kg)	Tulosten keskihajonta s (mg N/kg)	Menetelmien keskihajonta s (mg N/kg)	Menetelmien suhteellinen keskihajonta s (%)
Vanha	4267,2	20,6	71,6	0,017
	4238,1			
Uusi	4211,7	99,2		
	4352,0			

Tarkkuutta tutkittiin myös standardinlisäysnäytteillä pitoisuusalueella 500–20 000 mg N/kg. Näille arvoille määritettiin saantoprosentit kaavalla 8, josta saantoprosenteiksi koko alueelta saatiin 97–109 % ja keskiarvoksi noin 100 %. Tarkkuuden tavoitesaannoksi asetettiin 95–105 %, mikä saavutettiin osittain. Koska tarkkuus määritettiin maanäytevakioon tehdyillä standardinlisäyksillä, näytteen pohjan pitoisuus saattoi aiheuttaa mittaustuloksiin epävarmuutta. Pitoisuusheitto on kuitenkin sen verran pieni, että tarkkuus pysyy hyväksyttävissä rajoissa.

6.6 Laajennettu mittausepävarmuus

Mittausepävarmuutta tutkittiin rinnakkaisina määriytyksinä viidellä standardinäytesarjalla ja neljällä standardinlisäysnäytesarjalla pitoisuusalueilla alle 500 mg N/kg ja 500–20 000 mg N/kg. Tuloksista tehtiin arviot satunnaisvirheille sekä laskettiin kaavalla 11 systemaattiset virheet ja kaavalla 12 kokonaisepävarmuus. Tästä muodostettiin lopulliset laajennetut mittausepävarmuudet kaavalla 13. Tulokset on määritetty liitteiden 2 ja 3 mittausdatojen perusteella. Useamman sarjan satunnaisvirheet standardinäytteillä alle 500 mg N/kg pitoisuuksille esitetään kuviossa 5, jossa x_i on mitattujen pitoisuuksien keskiarvo ja s_i (%) on tulosten suhteellinen keskihajonta.



KUVIO 5. Satunnaisvirhe standardinäytteillä alle 500 mg N/kg.

Tästä voidaan arvioida satunnaisvirheen (u_1) olevan noin 7 %, kun pitoisuus on alle 500 mg N/kg. Tästä voidaan määrittää systemaattinen virhe, joka on noin 2,9 %. T -testistä saatu arvo $t = 2,651$ on kuitenkin korkeampi kuin $t_{0,05}(24) = 2,064$, joten systemaattinen virhe (u_2) arvioidaan olevan 5 % (Mäkinen 1996, 80). Näin ollen kokonaisepävarmuus (u_c) on

$$u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2} \quad (12)$$

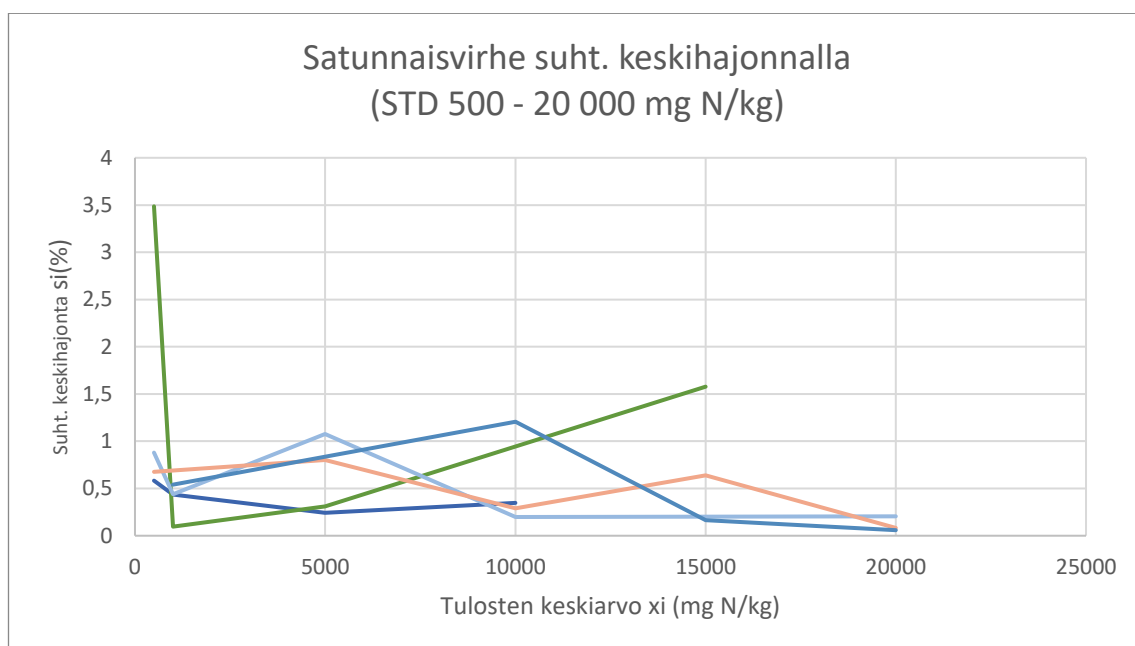
$$\approx 8,602 \%$$

ja laajennettu mittausepävarmuus (U) alle 500 mg N/kg pitoisuuksille, kun kertoimeksi k on asetettu 2

$$U = 2 \cdot u_c \quad (13)$$

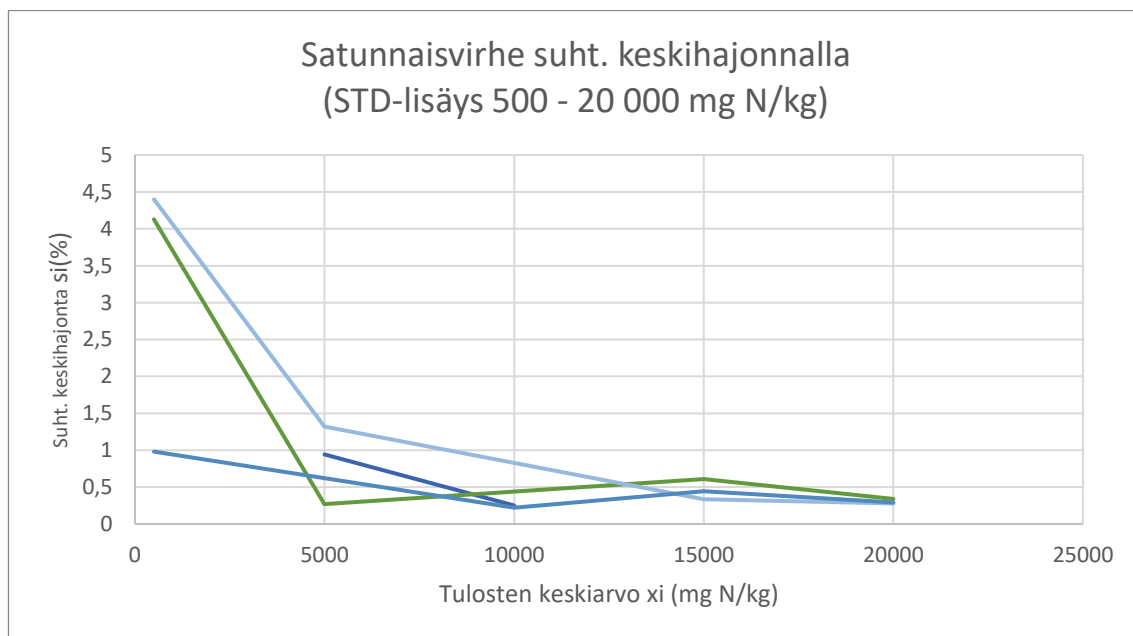
$$= 17,205 \% \approx 20 \%$$

Vastaavalla tavalla määritettiin pitoisuusalueen 500–20 000 mg N/kg mittausepävarmuus käyttäen sekä standardinäytteitä että standardinlisäysnäytteitä. Standardinäytteiden satunnaisvirhe useamman sarjan näytteille on esitetty kuviossa 6.



KUVIO 6. Satunnaisvirhe standardinäytteillä alueella 500–20 000 mg N/kg.

Kuviosta 6 huomataan, että satunnaisvirhe pysyttelee standardinäytteillä 5 % alapuolella. Vastaavasti useamman sarjan standardinlisäysnäytteiden satunnaisvirhe on esitetty kuviossa 7.



KUVIO 7. Satunnaisvirhe standardinlisäysnäytteillä alueella 500–20 000 mg N/kg.

Kuvion 7 perusteella standardinlisäysnäytteillä satunnaisvirheet pysyttelevät myös alle 5 %, joten standardi- ja standardinlisäysnäytteiden yhdistetty satunnaisvirhe pitoisuusalueella 500–20 000 mg N/kg on 5 %.

Systemaattiset virheet on laskettu samalla tavoin kuin aikaisemmassa kohdassa, jossa standardinäytteille systemaattiseksi virheeksi saatiin noin 1,3 % ja t-testin arvoksi 8,067, joka on huomattavasti suurempi kuin $t_{0,05}(44) = 2,015$. Standardinlisäysnäytteillä systemaattiseksi virheeksi arvioitiin 4,7 % t-testin arvolla $t_{0,05}(28) = 2,048$, joka on merkittävä (Mäkinen 1996, 80). Näin ollen systemaattinen virhe voidaan arvioida olevan noin 5 % alueella 500–20 000 mg N/kg.

Kokonaisepävarmuus alueella 500–20 000 mg N/kg laskettiin tällöin satunnaisvirheellä 5 % ja systemaattisella virheellä 5 %, jolloin tulokseksi saatiin $u_c = 7,071$ % ja laajennetuksi mittausepävarmuudeksi U noin 14,142 % eli pyöristettynä 15 %. Mittaustulokset esitetään koottuna vielä taulukossa 7.

TAULUKKO 7. Laajennetun mittausepävarmuuden tulokset.

Pitoisuusalue (mg N/kg)	Satunnais- virhe (%)	Systemaattinen virhe (%)	Kokonais- epävarmuus (%)	Laajennettu Mittaus- epävarmuus (%)
Alle 500	7	5	8,602	20
500–20 000	5	5	7,071	15

Mittausepävarmuuden tavoitteeksi asetettiin standardipoikkeamaksi 5 %. Mittauksissa kuitenkin lähestyttiin enemmän tilastomatemattisesti tuloksia, jolloin voitiin määrittää laajennetut mittausepävarmuudet satunnaisvirheiden ja systemaattisten virheiden avulla. Satunnaisvirheet ja systemaattiset virheet ovat kuitenkin noin 5 %, joten tavoite saavutettiin tältä osin.

Aikaisempi menetelmän laajennettu mittausepävarmuus oli noin 25 % (Tuutti 2022). Tässä validoinnissa mittausepävarmuudessa päästiin aikaisempaa pienempiin prosentteihin. Mittausepävarmuuden muutos pienempään johtunee muutoksesta kaupalliseen 0,02 M suolahappoon, jonka pitoisuusvaihtelut ovat

huomattavasti vähäisemmät kuin itse valmistetun liuoksen. Toisaalta menetelmässä ilmenevä epävarmuus saattaa johtua standardimäärittelyksissä pipetoinneista, sillä osaan standardeista käytettiin automaattipipettejä (0,05–5 ml) ja osaan täyspipettejä (10–25 ml). Myös Kjeldahl-polttoputket ovat monen vuoden takaisen käytön jäljiltä naarmuuntuneita, jolloin uurteisiin on saattanut jäädä taustaan vaikuttavia pitoisuuksia.

7 POHDINTA

Tämä opinnäytetyö suoritettiin SGS Finland Oy:n Karkkilan toimipisteessä, jonne yritys halusi keskittää typpiyhdisteiden määrittämiseen keskittyvän Kjeldahl-analytiikan. Opinnäytetyönä toimeksiantajalle kehitettiin ja validoitiin menetelmä kiinteiden ympäristönäytteiden, kuten sedimenttien, hiekkamaiden ja maanäytteiden, kokonaistyyppipitoisuuksien analysoimiseen FOSS Kjeltec -analysaattorilla aikaisempiin Kjeldahl-menetelmiin pohjautuen. Menetelmä validoitiin käyttäen tilastomatemattisia analyysimenetelmiä ja datan käsittelyä, joissa suoritettiin rinnakkaisia määryksiä eri näytteille ja näytematriiseille useiden päivien ajan. Uuden kehitetyn menetelmän todettiin olevan käyttötarkoituksen mukainen sekä täyttävän toimipisteen laatuvaatimukset.

Alun perin menetelmää lähdettiin siirtovalidoimaan noudattaen Kotkan toimipisteen laatimaa kiinteiden ympäristönäytteiden kokonaistyyppimenetelmää. Menetelmän validointia varten oli kerätty mittausdataa jo useamman viikon ajalta, mutta menetelmä kuitenkin osoittautui sen verran poikkeavaksi Karkkilassa käytetystä menetelmästä, että siihen lähdettiin tekemään parantavia muutoksia.

Siirtymällä kaupalliseen suolahappoon titraushappona tulosten luotettavuus kasvoi, sillä titraushappo ei jokaisella valmistuserällä poikennut edellisestä. Tämä johti siihen, että validointiprosessi palasi lähes alkupisteeseen, mikä osittain pitkitti laitteen käyttöönottoon tarvittavaa aikaa. Muutoksia menetelmään olivat muun muassa jokaisen ajon yhteydessä ajettava lämmitysohjelma, joka sisältää nollanäytteen, standardin ja kontrollistandardin sekä maanäytevakion. Lisäksi menetelmän esikäsittelyssä energiaa ja aikaa kuluttava märkäpoltto-ohjelma vaihdettiin Karkkilassa käytössä olleeseen poltto-ohjelmaan, jonka todettiin polttavan yhtä tasalaatuisesti näytteet verrattuna aikaisempaan ohjelmaan.

Uuden menetelmän todettiin olevan monilta osin yhteneväinen toimipisteen aikaisemman ympäristönäytteiden kokonaistyyppimenetelmän kanssa, kuten esikäsittelyn, reagenssien määrien sekä laadunvarmistuksen kannalta. Menetelmä tuo mukanaan uudenlaisen analyysitekniikan Karkkilan laboratorioon tarjoten pie-

nempien typpipitoisuuksien määrittämiseen tarvittavat laitteet ja menetelmät. Validointi oli suhteessa suppeampi kuin jos laite olisi ollut toimipisteelle uusi. Sille kuitenkin suoritettiin kaikki toimipisteen vaatimuksiin nähden tarvittavat testaukset ja todennukset sekä laitteen että menetelmän käyttöönottoa varten.

Opinnäytetyön suorittaminen oli palkitseva kokemus, sillä sen myötä sai kokemusta sekä validoinnista että analyysimenetelmän kehittamisestä. Validointiprosessin myötä tuli myös tutuksi, miten menetelmän erilaiset raja-arvot selvitetään ja mitä toimivalta ja käyttötarkoituksenmukaiselta menetelmältä yleisesti vaaditaan. Validointiprosessi toteutettiin hyvin omatoimisesti validointisuunnitelmasta, analyysidatan keräämiseen sekä validointiraportin ja menetelmäohjeen päivitykseen saakka. Lisäksi yrityksen henkilökuntaa tullaan perehdyttämään uuden laitteen käyttöön ja menetelmäohjeeseen sekä käytäntöön varmistaen menetelmän toimivuus ja selkeys.

Uusi menetelmä tulee helpottamaan toimipisteen henkilökuntaa, jotka tulevat analysoimaan Kjeldahl-menetelmällä kokonaistyyppiä. Yhtenevämmät menetelmät mahdollistavat työntekijöiden nopean perehdyttämisen säästäten työntekijöiden työaika ja yrityksen resursseja. Lisäksi SGS Finland Oy:n Karkkilan toimipiste kykenee jatkossa tarjoamaan asiakkailleen laajemman valikoiman analyysia pienempien typpipitoisuuksien määrittämistä varten. Tämä myös mahdollistaa yritykselle mahdollisuuden tarjota asiakkailleen tavan seurata eri ympäristöjen typpipitoisuuksia ja saada parempi käsitys ympäristön saastumisesta ja ihmisten toiminnan vaikutuksista.

LÄHTEET

Daintith, J. & Gjertsen, D. 1999. A Dictionary of Scientists. Oxford Paperback Reference. Yhdysvallat: Oxford University Press.

Ehder, T (toim.). 2005. MIKES julkaisu J6/2005. Kemian metrologian opas. Helsinki: Metrologian neuvottelukunta.

Elintarvikevirasto. 1997. Kemiallisten analyysimenetelmien validointiohje. Valvonta-sarjan julkaisu 10/1997. Helsinki.

EN 16169. 2012. Sludge, treated biowaste and soil – Determination of Kjeldahl nitrogen. European Committee for Standardization. Vaatii käyttöoikeuden.

FOSS. N.d. Application Note 300. Determination of Nitrogen according to Kjeldahl using Block Digestion and Steam Distillation.

Gran, V. & Lehtoranta, J. 2002. Sedimentistä veteen vapautuvat ravinteet Säky-län Pyhäjärvellä. Suomen ympäristökeskuksen moniste 247. Helsinki: Edita Oyj.

Herbert, R. 1999. Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. FEMS Microbiology Reviews. Volume 23. Issue 5. 563–590. Verkkoartikkeli. Viitattu 18.3.2024. <https://academic.oup.com/femsre/article/23/5/563/532943>

Laiho, J., Perämäki, P. & Sirén, H. 2009. Esikäsittelyn käsikirja. Ohjeita vesi-, ympäristö- ja prosessitekniikan sekä lääketeollisuuden laboratorioille. Ylöjärvi: Kemian kustannus Oy.

Luoma, E. 2022. Kokonaistypen määrittäminen Kjeldahl-menetelmällä. SGS Finland Oy. Saatavilla SGS Finland Oy:n verkkokirjastossa. Vaatii käyttöoikeuden.

Magnusson, B. & Örnemark, U. 2014. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Second edition. Pdf-dokumentti- Viitattu 20.3.2024. https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf

Miller, J. C. & Miller, J. N. 1993. Statistics for Analytical Chemistry. 3rd Edition. Ellis Horwood Limited.

Mäkinen, I., Marjanen, J. (toim.), Niemi, R., Saares, R. & Suortti, A. 1996. Ohjeita ympäristönäytteiden kemiallisten analyysimenetelmien validointiin. Suomen ympäristökeskuksen moniste 59. Helsinki.

SGS. N.d. Analytiikka. Verkkosivu. Viitattu 18.3.2024. <https://www.sgs.fi/fi-fi/campaigns/sgs-analytics-finland-oy/analytiikka>

Tieteen termipankki. 2024. Geologia. Sedimentaatio. Verkkosivu. Viitattu 18.2.2024. <https://tieteentermipankki.fi/wiki/Geologia:sedimentaatio>

Tieteen termipankki. 2019. Geologia. Sedimentti. Verkkosivu. Viitattu 8.2.2024. <https://tieteentermipankki.fi/wiki/Geologia:sedimentti>

Tuutti, T. 2022. Kokonaistyyppi kiinteistä ympäristönäytteistä Kjeldahl-analysaattorilla ja märkäpoltolla. SGS Finland Oy. Saatavilla SGS Finland Oy:n verkkokirjastossa. Vaatii käyttöoikeuden.

Vahanen. 2014. Sedimenttitutkimusraportti. Sukeltajan suorittama näytteenotto Sompasaaren alueen sedimentistä. Helsingin kaupunkisuunnitteluvirasto. Pdf-dokumentti. Viitattu 17.2.2024. https://www.hel.fi/hel2/ksv/julkaisut/yos_2014-10.pdf

LIITTEET

Liite 1. Mittausdata ja tulokset toteamis- ja määrittysrajoille

TAULUKKO 8. Nollanäytteiden kulutusten pohjalta muodostettu mittausdata.

Määrittys	ml HCl	ml HCl – ml HCl_minimi	Kerroin	mg N/kg	Ajopvm.	
1	0,405	0,1004	0,281708	28,2834	25.01.2024	
2	0,4151	0,1105	0,281708	31,1287		
3	0,4151	0,1105	0,281708	31,1287		
4	0,3905	0,0859	0,281708	24,1987		
5	0,3733	0,0687	0,281708	19,3533		
6	0,3611	0,0565	0,281708	15,9165		
7	0,3635	0,0589	0,281708	16,5926		
8	0,4004	0,0958	0,281708	26,9876		
9	0,3537	0,0491	0,281708	13,8318		
10	0,3635	0,0589	0,281708	16,5926		
11	0,3267	0,0221	0,281556	6,2224	02.02.2024	
12	0,3955	0,0909	0,281556	25,5934		
13	0,3881	0,0835	0,281556	23,5099		
14	0,3291	0,0245	0,281556	6,8981		
15	0,3218	0,0172	0,281556	4,8428		
16	0,3463	0,0417	0,281556	11,7409		
17	0,3193	0,0147	0,281556	4,1389		
18	0,3832	0,0786	0,281556	22,1303		
19	0,3046	0	0,281556			(minimi)
20	0,3562	0,0516	0,281556	14,5283		
Keskiarvo (mg N/kg)				18,0852061		
Keskihajonta (mg N/kg)				8,757727542		
Suhteellinen keskihajonta (%)				48,42481474		
Toteamisraja LOD (mg N/kg)				44,35838871	≈ 45	
Määrittysraja LOQ (mg N/kg)				61,8738438	≈ 65	

Liite 2. Mittausdata standardinäytteillä mittausalueeseen, lineaariseen alueeseen, toistettavuuteen sekä mittausepävarmuuteen

1 (2)

TAULUKKO 9. Standardinäytteiden mittausdata validointiin

Määrittys	Teor. Pitoisuus	Kulutus	Kerroin	Tulos	REG-suoran kulutus	REG-suoran tulos	Tulos - REG-suoran tulos	Ajopvm.
	mg N/kg	ml HCl	mg N/ ml HCl	mg N/kg	ml HCl	mg N/kg	mg N/kg	
1	50	0,16211	0,280585	45,486	0,164	45,925	-0,439	30.01.2024
2	50	0,17685	0,280585	49,621	0,164	45,925	3,697	
3	100	0,3537	0,280585	99,243	0,343	96,179	3,064	
4	100	0,36843	0,280585	103,376	0,343	96,179	7,197	
5	250	0,90143	0,280585	252,928	0,880	246,943	5,985	
6	250	0,91863	0,280585	257,754	0,880	246,943	10,811	
7	500	1,78076	0,280585	499,655	1,776	498,216	1,438	
8	500	1,7955	0,280585	503,791	1,776	498,216	5,574	
9	1000	3,57134	0,280585	1002,065	3,567	1000,763	1,302	
10	1000	3,59345	0,280585	1008,269	3,567	1000,763	7,506	
11	5000	17,88865	0,280585	5019,290	17,895	5021,133	-1,842	
12	5000	17,95006	0,280585	5036,521	17,895	5021,133	15,388	
13	10000	35,52186	0,280585	9966,908	35,806	10046,595	-79,688	
14	10000	35,69625	0,280585	10015,839	35,806	10046,595	-30,756	
15	25000	89,37448	0,280585	25077,155	89,538	25122,983	-45,828	
16	25000	89,38921	0,280585	25081,288	89,538	25122,983	-41,695	
17	50	0,18667	0,281556	52,558	0,164	46,084	6,474	02.02.2024
18	50	0,18667	0,281556	52,558	0,164	46,084	6,474	
19	100	0,36352	0,281556	102,351	0,343	96,512	5,839	
20	100	0,35861	0,281556	100,969	0,343	96,512	4,457	
21	250	0,89652	0,281556	252,421	0,880	247,798	4,623	
22	250	0,92354	0,281556	260,028	0,880	247,798	12,231	
23	500	1,79795	0,281556	506,224	1,776	499,940	6,283	
24	500	1,88883	0,281556	531,812	1,776	499,940	31,871	
25	1000	3,61064	0,281556	1016,598	3,567	1004,226	12,372	
26	1000	3,61556	0,281556	1017,983	3,567	1004,226	13,757	
27	5000	17,95497	0,281556	5055,331	17,895	5038,507	16,824	
28	5000	18,03357	0,281556	5077,462	17,895	5038,507	38,954	
29	10000	35,84178	0,281556	10091,472	35,806	10081,360	10,112	
30	15000	53,97052	0,281556	15195,729	53,717	15124,212	71,517	
31	15000	53,97052	0,281556	15195,729	53,717	15124,212	71,517	

2 (2)

	Teor. pitoisuus	Kulutus	Kerroin	Tulos	REG- suoran kulutus	REG- suoran tulos	Tulos - REG- suoran tulos	
Määrittys	mg N/kg	ml HCl	mg N/ ml HCl	mg N/kg	ml HCl	mg N/kg	mg N/kg	Ajopvm.
32	500	1,76357	0,288744	509,221	1,776	512,704	-3,483	09.02.2024
33	500	1,78567	0,288744	515,602	1,776	512,704	2,898	
34	1000	3,55906	0,288744	1027,659	3,567	1029,864	-2,205	
35	1000	3,58117	0,288744	1034,043	3,567	1029,864	4,179	
36	5000	17,7732	0,288744	5131,913	17,895	5167,145	-35,232	
37	5000	18,04584	0,288744	5210,636	17,895	5167,145	43,492	
38	10000	35,44939	0,288744	10235,815	35,806	10338,745	-102,930	
39	10000	35,54887	0,288744	10264,539	35,806	10338,745	-74,206	
40	20000	71,45389	0,288744	20631,914	71,627	20681,945	-50,031	
41	20000	71,24818	0,288744	20572,517	71,627	20681,945	-109,429	
42	25000	89,8019	0,288744	25929,800	89,538	25853,546	76,255	
43	250	0,88424	0,283123	250,348	0,880	249,176	1,172	
44	250	0,89406	0,283123	253,129	0,880	249,176	3,952	
45	500	1,79304	0,283123	507,650	1,776	502,722	4,928	
46	500	1,81023	0,283123	512,517	1,776	502,722	9,795	
47	5000	17,88374	0,283123	5063,289	17,895	5066,538	-3,249	
48	5000	18,0876	0,283123	5121,007	17,895	5066,538	54,468	
49	10000	35,7773	0,283123	10129,359	35,806	10137,446	-8,087	
50	10000	35,92467	0,283123	10171,082	35,806	10137,446	33,636	
51	15000	53,71753	0,283123	15208,641	53,717	15208,354	0,288	
52	15000	54,20448	0,283123	15346,508	53,717	15208,354	138,154	
53	20000	72,03725	0,283123	20395,366	71,627	20279,261	116,105	
54	20000	71,95312	0,283123	20371,547	71,627	20279,261	92,286	
55	25000	89,81046	0,283123	25427,362	89,538	25350,169	77,194	
56	250	0,88424	0,285105	252,101	0,880	250,921	-1,180	05.03.2024
57	250	0,89161	0,285105	254,202	0,880	250,921	-3,281	
58	1000	3,52959	0,285105	1006,304	3,567	1016,883	10,580	
59	1000	3,55661	0,285105	1014,007	3,567	1016,883	2,876	
60	10000	35,04167	0,285105	9990,554	35,806	10208,430	217,876	
61	10000	35,64467	0,285105	10162,473	35,806	10208,430	45,957	
62	15000	53,25699	0,285105	15183,833	53,717	15314,845	131,012	
63	15000	53,38226	0,285105	15219,548	53,717	15314,845	95,297	
64	20000	71,67742	0,285105	20435,589	71,627	20421,260	-14,329	
65	20000	71,73698	0,285105	20452,570	71,627	20421,260	-31,310	

Liite 3. Mittausalueen ja lineaarisen alueen mittausdata standardinlisäysnäytteillä

1 (2)

TAULUKKO 10. Standardinlisäysnäytteiden mittausdata validointiin

Määrittys	STD	Vakion punnitus	Teor. pitoisuus	Kulutus	Kerroin	Ajopvm.
	mg N/kg	g	mg N/kg	ml HCl	mg N/ml HCl	
1	500	1,506	604,227	2,152	0,281556	25.01.2024
2	500	1,5041	604,227	2,427	0,281556	
3	5000	1,501	5104,227	18,306	0,281556	
4	5000	1,5027	5104,227	18,547	0,281556	
5	10000	1,5036	10104,227	35,610	0,281556	
6	10000	1,5033	10104,227	35,736	0,281556	
7	500	1,5	604,227	2,247	0,282925	15.02.2024
8	500	1,5008	604,227	2,360	0,282925	
9	5000	1,4996	5104,227	18,380	0,282925	
10	5000	1,507	5104,227	18,449	0,282925	
11	15000	1,5003	15104,227	53,361	0,282925	
12	15000	1,5013	15104,227	53,818	0,282925	
13	20000	1,5	20104,227	72,263	0,282925	
14	20000	1,5021	20104,227	71,918	0,282925	
15	250	1,498	354,227	1,361	0,283123	20.02.2024
16	250	1,5013	354,227	1,484	0,283123	
17	500	1,5014	604,227	2,319	0,283123	
18	500	1,5044	604,227	2,444	0,283123	
19	5000	1,498	5104,227	18,375	0,283123	
20	5000	1,5024	5104,227	18,714	0,283123	
21	15000	1,5009	15104,227	53,907	0,283123	
22	15000	1,5038	15104,227	54,163	0,283123	
23	20000	1,5058	20104,227	71,787	0,283123	
24	20000	1,4996	20104,227	71,506	0,283123	
25	500	1,5116	604,227	2,299	0,285105	05.03.2024
26	500	1,5001	604,227	2,326	0,285105	
27	10000	1,5148	10104,227	35,831	0,285105	
28	10000	1,5077	10104,227	35,942	0,285105	
29	15000	1,6244	15104,227	53,326	0,285105	
30	15000	1,5046	15104,227	53,659	0,285105	
31	20000	1,5526	20104,227	71,578	0,285105	
32	20000	1,504	20104,227	71,284	0,285105	

2 (2)

	Tulos	Tulos – KA VAKIO	REG- suoran kulutus	REG- suoran tulos	REG- suoran tulos – KA VAKIO	Tulos – REG- suoran tulos	
Määrittys	mg N/kg	mg N/kg	ml HCl	mg N/kg	mg N/kg	mg N/kg	Ajopvm.
1	605,810	501,583	2,318	652,536	548,309	-46,725	25.01.2024
2	683,266	579,039	2,318	652,536	548,309	30,731	
3	5154,225	5049,998	18,302	5152,940	5048,713	1,286	
4	5221,999	5117,772	18,302	5152,940	5048,713	69,059	
5	10026,292	9922,065	36,062	10153,389	10049,162	-127,097	
6	10061,562	9957,335	36,062	10153,389	10049,162	-91,826	
7	635,858	531,631	2,318	655,709	551,482	-19,851	15.02.2024
8	667,826	563,599	2,318	655,709	551,482	12,116	
9	5200,139	5095,912	18,302	5178,001	5073,774	22,138	
10	5219,595	5115,369	18,302	5178,001	5073,774	41,595	
11	15097,290	14993,063	53,822	15227,538	15123,311	-130,248	
12	15226,547	15122,320	53,822	15227,538	15123,311	-0,991	
13	20445,104	20340,877	71,582	20252,307	20148,080	192,797	
14	20347,291	20243,064	71,582	20252,307	20148,080	94,984	
15	385,259	281,032	1,430	404,752	300,526	-19,494	20.02.2024
16	420,029	315,802	1,430	404,752	300,526	15,277	
17	656,468	552,241	2,318	656,166	551,939	0,302	
18	691,934	587,708	2,318	656,166	551,939	35,768	
19	5202,370	5098,143	18,302	5181,607	5077,380	20,763	
20	5298,338	5194,111	18,302	5181,607	5077,380	116,730	
21	15262,188	15157,962	53,822	15238,144	15133,917	24,045	
22	15334,685	15230,458	53,822	15238,144	15133,917	96,541	
23	20324,433	20220,206	71,582	20266,412	20162,185	58,021	
24	20244,983	20140,756	71,582	20266,412	20162,185	-21,429	
25	655,462	551,235	2,318	660,760	556,534	-5,298	05.03.2024
26	663,166	558,939	2,318	660,760	556,534	2,405	
27	10215,519	10111,293	36,062	10281,367	10177,140	-65,847	
28	10247,206	10142,979	36,062	10281,367	10177,140	-34,161	
29	15203,616	15099,389	53,822	15344,844	15240,617	-141,228	
30	15298,505	15194,278	53,822	15344,844	15240,617	-46,339	
31	20407,227	20303,000	71,582	20408,321	20304,094	-1,094	
32	20323,543	20219,316	71,582	20408,321	20304,094	-84,778	