



Elisa Savelainen

Entsyymiaktiivisuusmenetelmän validointi pipettirobotilla

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

17.11.2023

Tiivistelmä

Tekijä: Elisa Savelainen
Otsikko: Entsyymiaktiivisuusmenetelmän validointi pipettirobotilla
Sivumäärä: 35 sivua + 4 liitettä
Aika: 17.11.2023

Tutkinto: Laboratorioanalytiikka (AMK)
Tutkinto-ohjelma: Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat: Laboratorion tiiminvetäjä Pauliina Prokkola
Lehtori Tiina Soininen

Opinnäytetyö tehtiin Roal Oy:lle, joka on teollisia entsyymejä valmistava bioteknologia-alan yritys. Työn tarkoituksena oli validoida laadunvalvontalaboratorion uusi entsyymiaktiivisuusmenetelmä käyttäen Tecan Fluent -pipettirobottia. Analyysimenetelmänä käytettiin kolorimetristä DNS-menetelmää, joka perustuu pelkistävien sokereiden määrittämiseen.

Validointi tehtiin neljällä eri entsyymivalmisteella: kahdella nestenäytteellä ja kahdella kuivänäytteellä, joista tehtiin erilaisia laimennoksia. Määritettäväksi validoinnin käsitteiksi valittiin lineaarisuus, mittausepävarmuus, uusittavuus, toistettavuus sekä toteamis- ja määrittämissrajat. Substraatin tarkka kuvaaminen jätetään työssä mainitsematta sen salassapitovaatimuksen takia. Työssä myös selvitettiin, onko substraatin pakastuksella vaikutusta tulosten luotettavuuteen.

Toistettavuutta selvitettiin tutkimalla yhden analytiikan mittaus tulosten sisäisiä keskiarvoja ja keskihajontoja ja uusittavuutta selvitettiin kolmen analytiikan keskinäisistä vastaavista. Yhdestä nestenäytteestä tehtiin analyyseja myös tutkimuksen ja tuotekehityksen laboratoriossa ja niiden tuloksia käsiteltiin uusittavuusmittauksissa. Mittausepävarmuudelle oli oma laskentaosio validointipohjalla. Lineaarista mittausaluetta mitattiin tekemällä useita eri laimennoksia oletetulta absorptiosialueelta.

Suurimmaksi osaksi validoinnissa verrattiin suhteellisia keskihajontoja ja keskiarvoja. Tavoitteena oli saada keskihajonnat alle 10 %:iin, ja tässä onnistuttiin hyvin. Uusittavuusmittauksien keskiarvoissa oli eri analytiikkajoiden välillä tilastollisesti merkitsevää eroavuutta, mutta tulokset olivat muuten arvoiltaan tarpeeksi samaa luokkaa keskenään. Mittausepävarmuudeksi ja laajennetuksi mittausepävarmuudeksi oli tavoitteena saada alle 20 %, ja tässäkin onnistuttiin. Lineaariseksi mittausalueeksi saatiin ~0,2–1,2, mikä eroaa hieman absorptiosarvovälin alkuoletuksesta ~0,2–1,3. Validointi on onnistunut ja uuden entsyymiaktiivisuusmenetelmän käyttöä voidaan jatkaa.

avainsanat: entsyymiaktiivisuus, pipettirobotti, validointi

Abstract

Author: Elisa Savelainen
Title: Validation of an Enzyme Activity Method with a Pipetting Robot
Number of Pages: 35 pages + 4 appendices
Date: 17 November 2023

Degree: Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme: Laboratory Sciences
Supervisors: Pauliina Prokkola, Laboratory Team Leader
Tiina Soininen, Senior Lecturer

The thesis work was carried out for biotechnology company Roal Oy, which manufactures industrial enzymes. The purpose was to validate a new enzyme activity method using Tecan Fluent pipetting robot. The analyzing method was a colorimetric DNS-method, which is based on the quantification of reducing sugars.

Four different enzyme products were used in the validation: two liquid products and two dry matter products with different dilutions. The validation parameters that were used were linearity, measurement uncertainty, reproducibility, repeatability and limits of quantification and determination.

The repeatability measurements were done by one analyst and the reproducibility measurements by three different analysts. Analyses were also done from one liquid sample in the research and development laboratory, and the results were examined in the reproducibility measurements. The measurement uncertainty was calculated from the validation Excel. The linearity was examined by making different dilutions from the assumed linear absorbance range.

The main examined statistical parameters were averages and standard deviations from the data. The goal to get the standard deviation results under 10 % was successful. There was a statistically significant difference between the averages in the reproducibility results, but they did not vary considerably. The goal for the measurement uncertainty to get under 20 % was successful. The linearity range was 0.2–1.2, which is a little narrower than the assumed absorbance range 0.2–1.3.

The results show that the validation was successful, and thus the use of the enzyme activity method can be continued.

Keywords: enzyme activity, pipetting robot, validation

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Entsyymit teollisuudessa	2
2.1	Teollisuusentsyymit	2
2.2	Hydrolaasit	2
3	Entsyymiaktiivisuus ja mittausmenetelmät	3
3.1	Entsyymiaktiivisuuden mittaaminen	3
3.2	Kolorimetrinen DNS-menetelmä	3
4	Tecan Fluent -pipettirobotin toimintaperiaate	4
5	Validoinnissa käytetyt käsitteet	6
5.1	Toteamis- ja määrittämissrajat	6
5.2	Lineaarisuus	7
5.3	Toistettavuus	10
5.4	Uusittavuus	10
5.5	Mittausepävarmuus	10
5.6	Hypoteesien testaus	11
5.7	Riippumattomien otosten t-testi	11
6	Työn suoritus ja analyysin vaiheet	12
6.1	Näytteet	12
6.2	Analyysin kulku	13
6.2.1	Alkuvalmistelut	13
6.2.2	Laimennosvaihe	13
6.2.3	Ajon käynnistäminen Tecan Fluent 780 -pipettirobotilla	14
6.2.4	Analyysiohjelman vaiheet Tecan Fluent 780 -pipettirobotilla	14
6.2.5	Analyysi kuoppalevylukijalla	16
6.3	Validoinnissa käytetyt mittaustavat	18
7	Tulokset	19
7.1	Toteamis- ja määrittämissrajat	19
7.2	Lineaarisuus	19

7.3	Toistettavuus	24
7.4	Uusittavuus	25
7.5	Mittausepävarmuus	30
8	Yhteenveto	32
	Lähteet	34

Liitteet

Liite 1: Lineaarisuusmittaustulokset

Liite 2: Jäännöstermitarkastelutulokset lineaarisuusmittauksista

Liite 3: Toistettavuus-, uusittavuus- ja mittausepävarmuustulokset

Liite 4: Tutkimuksen ja tuotekehityksen laboratorion tulokset näytteestä 1

Liite 5: Pakastetusta substraatista tehdyt mittaukset

Lyhenteet

DNS: 3,5-dinitrosalisyylihappo

LOQ: Limit of quantification, määritysraja

LOD: Limit of detection, toteamisraja

RSD: Relative standard deviation, suhteellinen keskihajonta

SD: Standard deviation, keskihajonta

1 Johdanto

Teollisia entsyymejä valmistava Roal Oy on bioteknologia-alan yritys, jonka ydinosaamista ovat *Trichoderma*-, *Aspergillus*- ja *Bacillus*-fermentoinnit, joista jalostetaan neste- ja jauhetuotteita eri teollisuusalojen sovelluksiin. Yli 90 % tuotteista menee vientiin maailmanlaajuisesti, ja tarkoituksena on luoda tervettä kestävää kasvua teollisten entsyymien maailmanlaajuisilla markkinoilla. [1.]

Entsyymituotteisiin kuuluvat elintarvike-, rehu-, tekstiili- ja tekniset entsyymit, joita valmistetaan tuotannossa fermentointiprosessilla nykyaikaisella teknologialla [2].

Opinnäytetyön tarkoituksena oli validoida Tecan Fluent -pipettirobotille asennettu analyysiohjelma, jota käytetään entsyymiaktiivisuuden määrittämiseen. Menetelmän validointi on tarpeellista, jotta voidaan saada varmennus sille, että se toimii sille tarkoitettuun käyttöön soveltuvalla tavalla. Tavoitteena on saada mittaustulokset tiettyjen raja-arvojen sisälle, jotta saadaan varmuus menetelmän oikeellisuudesta ja luotettavuudesta.

Entsyymiaktiivisuusmenetelmän validoinnissa määritettäviksi käsitteiksi valikoituivat toteamis- ja määritysrajat, lineaarisuus, toistettavuus, uusittavuus ja mittausepävarmuus. Analyyseissa mitattiin eri entsyymivalmisteita neste- ja jauhemuodossa eri laimennoksia tekemällä. Mittaustuloksia tutkittiin validointiin tarkoitetun laskentapohjan avulla, jolla saatiin määritettyä validoinnin käsitteet. Olennaisin tieto saatiin keskiarvoja, keskihajontoja ja suhteellisia keskihajontoja tarkastelemalla.

2 Entsyymit teollisuudessa

2.1 Teollisuusentsyymit

Monilla teollisuudenaloilla hyödynnetään entsyymikatalysoituja reaktioita, sillä niiden käyttö kasvattaa tuotantotehokkuutta ja synnyttää taloudellisia säästöjä. Bakteerit, hiivat ja homeet soveltuvat hyvin entsyymien tuotantoon niiden edullisuuden, tehokkuuden ja nopeuden ansiosta. [3.]

Elintarviketeollisuudessa ja leivonnassa käytettyjä elintarvike-entsyymeitä käytetään muun muassa viinien valmistuksessa ja taikinan parantajina. Rehuentsyymeitä käytetään kohentamaan ravintoaineiden imeytymistä eläimen ruuansulatuselimistössä, ja tekniset entsyymit auttavat muun muassa farkkukankaan käsittelyssä ja pesuaineiden valmistuksessa. [4.]

Mikrobit soveltuvat hyvin entsyymien teolliseen tuotantoon, sillä ne kasvavat nopeasti halvoilla raaka-aineilla ja tuottavat korkeita proteiinipitoisuuksia sekä solun sisälle että kasvuliuokseen [5, s. 112].

2.2 Hydrolaasit

Entsyymit jaotellaan kuuteen pääluokkaan niiden katalysoimien reaktioiden perusteella, joissa kussakin on alaluokkia sen mukaan, millaisia substraatteja entsyymit käyttävät ja mitä reaktioita ne katalysoivat. Näitä pääluokkia ovat oksidoreduktaasit, transferaasit, hydrolaasit, lyaasit, isomeraasit ja ligaasit [5, s. 55].

Suurin osa teollisuusentsyymeistä on hydrolaaseja, jotka pilkkovat muun muassa tärkkelyksen, selluloosan ja proteiinien kaltaisia polymeerejä tai oligomeerisia dekstriinejä, raffiinoosia, sakkaroosia ja laktoosia. Hydrolaaseja tuotetaan *Aspergillus*- ja *Trichoderma*-suvun homeista sekä *Bacillus*-suvun bakteereista [5, s. 112].

3 Entsyymiaktiivisuus ja mittaamenetelmät

3.1 Entsyymiaktiivisuuden mittaaminen

Entsyymien aktiivisuus ilmoitetaan yleensä aktiivisuusyksikkönä U, unit. Tällöin 1 U muuntaa 1 mikromoolin substraattia reaktiotuotteiksi minuutissa ($\mu\text{mol}/\text{min}$) ja spesifinen aktiivisuus on U/mg. Entsyymiaktiivisuutta mitataan määrittämällä syntyneen lopputuotteen määrä aikayksikössä tai määrittämällä kuluneen substraatin määrä. Lopputuotteen määrän mittaaminen on useimmiten tarkempi ja herkempi mittaustapa, koska aineen syntymistä on helpompi mitata kuin pitoisuuden alenemista. Lopputuotteena saadaan värillistä tuotetta, jonka syntymistä voidaan mitata spektrofotometrillä. [5, s.53.]

Fotometria on yksi käytetyimpiä entsyymiaktiivisuuden mittaamiseen käytettyjä analyysimenetelmiä sen luotettavuuden, selkeän tekniikan ja kohtuullisen hintaisen laitteiston ansiosta [6].

3.2 Kolorimetrinen DNS-menetelmä

3,5-dinitrosalisyylihappoa (DNS) käytetään pelkistävien sokereiden pitoisuuden määrittämiseen. Kun emäksinen DNS-reagenssi reagoi pelkistävien sokereiden kanssa, se pelkistyy 3-amino-5-nitrosalisyylihapoksi. Reaktiossa muodostuva oranssin värinen tuote, joka absorboi valoa aallonpituudella 540 nm, mitataan spektrofotometrillä. [7.] Mitä tummempi väri ilmenee, sitä suurempi pelkistävien sokereiden pitoisuus on. Kun reaktio-olosuhteet on säädetty oikein, syntyneen värin voimakkuus eli absorbanssi on suoraan verrannollinen entsyymien määrään, joka voidaan laskea [5, s.53].

4 Tecan Fluent -pipettirobotin toimintaperiaate

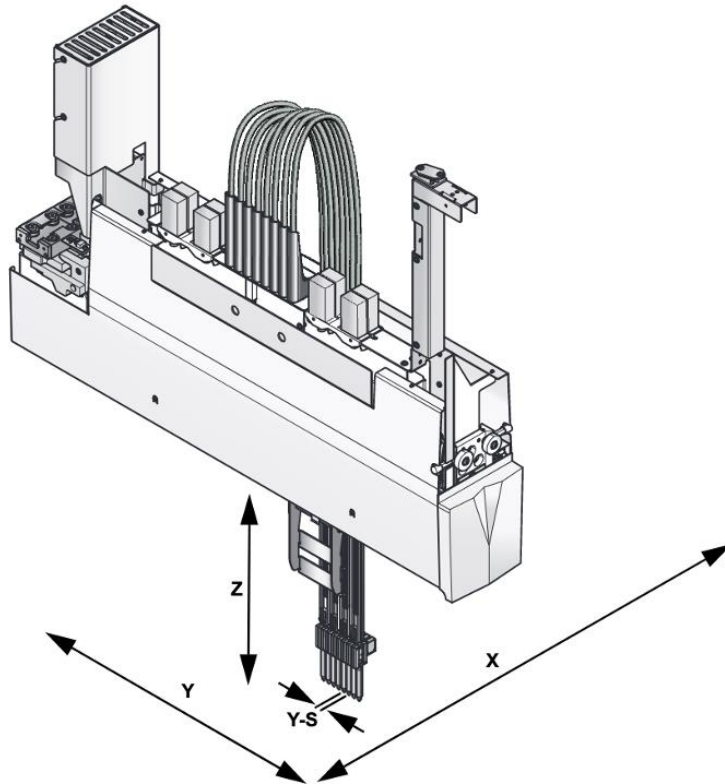
Tecan Fluent -pipettirobotin etuihin kuuluu tuottavuuden ja analyysimenetelmien tarkkuuden lisääminen. Laitetta pystytään ohjelmoimaan FluentControl-ohjelmiston avulla, ja kosketusnäyttö selkeyttää käyttöä. Laite räätälöidään vastaamaan kunkin laboratorion tarpeita valitsemalla mukaan tarvittavat moduulit. Laite on ohjelmitavissa FluentControl-ohjelmiston avulla. [8.] Alla olevassa kuvassa 1 on Tecan Fluent 780 -pipettirobotti kokonaisuudessaan, josta nähdään robotin työpöytä, robottikädet, pipetinkärjet ja kosketusnäyttö.



Kuva 1. Tecan Fluent 780 -pipettirobotti [9].

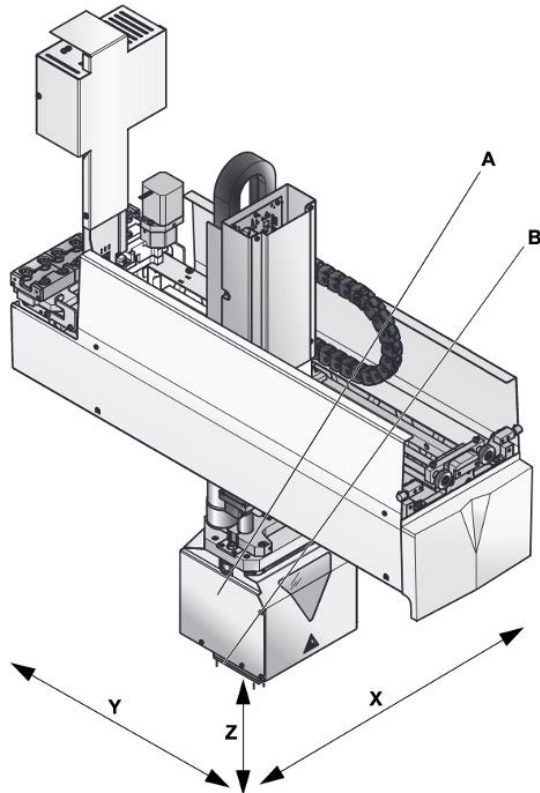
Laitteesta löytyy kaksi automatisoitua nesteteenannostelussa toimivaa robottikättä sekä kuoppalevyjä siirtävä vastaava. Niiden etuihin kuuluu nopeat ja sulavat liikkeet sekä liikeratatoiminto z-akselilla alhaalta ylös.

Kuvassa 2 on havainnollistava kuva 8-kärkisen joustavan robottikäsiarven rakenteesta ja liikeradoista (Liquid Flexible Channel Arm; Liquid FCA). Sen toimintoihin kuuluu reagenssien ja näytteiden pipetoiminen eri tilavuuksilla. Kärkien etäisyyttä toisistaan voidaan vaihdella jousto-ominaisuuden ansiosta. [9.]



Kuva 2. Flexible channel arm (FCA-robottikäsi). X: liikerata vasemmalta oikealle, Y: kärkien liikerata edestä taakse, Y-S: kärkien etäisyys toisistaan (9–38 mm), Z: liikerata alhaalta ylös. [9.]

Toinen automatisoidussa nesteenkäsittelyssä käytetty MCA384-robottikäsi toimii korkealla nopeudella, pipetointitarkkuudella ja mahdollistaa korkean tuottavuuden automatisoidulla nesteenkäsittelyllä. Sillä on 384 samanaikaisesti liikkuvaa kanavaa, joiden avulla sillä pystytään pipetoimaan 384-kaivoisiin kuoppalevyihin. Sen avulla pipetointinopeutta ja -tehokkuutta saadaan lisättyä suuremmissa kuoppalukemissa. Kuvasta 3 nähdään sen rakenne ja liikeradat. [9.]



Kuva 3. Multiple channel arm (MCA-robottikäsivarsi). A: 384-kanavainen pipetointipää, B: adapteri kärjille. X: liikerata vasemmalta oikealle. Y: liikerata edestä taakse. Z: liikerata alhaalta ylös. [9.]

5 Validoinnissa käytetyt käsitteet

5.1 Toteamis- ja määrittämissrajat

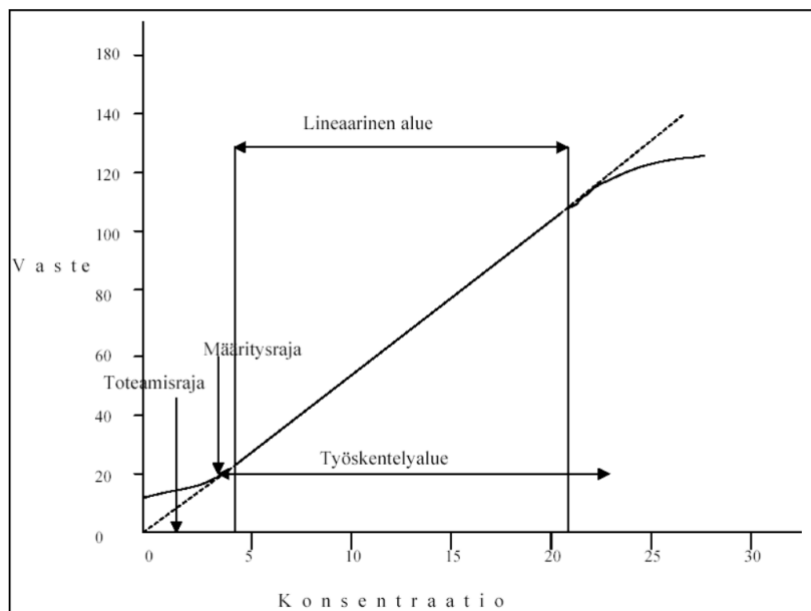
Toteamisraja on pienin pitoisuus tutkittavaa yhdistettä tai muuta biologista tekijää, joka voidaan todeta luotettavasti. Kvantitatiivisessa kemiassa toteamisrajan määrittäminen perustuu taustan hajonnan tutkimiseen analysoimalla nollanäytettä toistuvasti. Käytännössä se määritetään pitoisuudeksi, joka on yhtä suuri kuin kolme kertaa nollanäytteen keskihajonta. Nollanäytteen sijasta voidaan käyttää myös näytettä, joka sisältää hyvin pienen pitoisuuden mittaavaa analyyyttiä. [10.]

Määrittämissraja tulee todeta käyttäen sopivaa varmennettua vertailumateriaalia. Useimmiten suositellaan 6–10 mittauksen toistamista. Se on tavallisesti

kalibrointikäyrän alhaisin piste nollanäyte pois lukien. Useimmiten määritysrajojen katsotaan olevan 5, 6 tai 10 kertaa nollanäytteen keskihajonta. Toteamisrajan ja määritysrajan väliin jää alue, jolla analyytti voidaan luotettavasti todeta, mutta sen kvantifiointi sisältää huomattavan epävarmuuden. [10.]

5.2 Lineaarisuus

Lineaarisuudella tarkoitetaan analyyttisen menetelmän kykyä antaa tietyllä alueella hyväksyttävä lineaarinen korrelaatio tulosten ja näytteiden tutkittavan aineen pitoisuuden välillä. Lineaarisuuden määrittäminen suositellaan tehtäväksi yleensä vähintään viidellä eripitoisella näytteellä nollanäytteen lisäksi, joiden mitattavan aineen pitoisuus kattaa koko vaadittavan mittausalueen. Lineaarisuustutkimusten avulla määritetään analyysimenetelmän luotettava mittausalue, jolla hyväksyttävä tarkkuus ja täsmällisyys voidaan saavuttaa. [11.] Alla olevasta kuvasta 4, jossa on esitettyä vasteen suhde määritettyyn pitoisuuteen, voidaan silmämääräisesti arvioida menetelmän lineaarinen alue [11, s. 29].



Kuva 4. Analyysimenetelmän lineaarisuus [11].

Mittausalueella tarkoitetaan sitä analyytin pitoisuusaluetta, jossa menetelmää voidaan käyttää käyttötarkoitukseensa soveltuvalla tarkkuudella.

Optimipitoisuusalueella kalibrintisuora on lineaarinen. Lineaarinen alue kuvaa sitä mittausaluetta, jolla analysoitavan yhdisteen vaste käyttäytyy lineaarisesti konsentraatioon nähden. Mittausalueen alkupäässä on rajoittavana tekijänä menetelmän toteamis- tai määritysraja ja loppupäässä mittalaitteen kyky havainnoida analyytin pitoisuuden tai suureen muutoksia. [10.]

Tulosten avulla laaditaan regressiosuora käyttämällä pienimmän neliösumman menetelmää ja graafisesta esityksestä voidaan silmämääräisesti arvioida menetelmän lineaarinen alue [11, s. 29]. Regressiosuora mallintaa kahden muuttujan välistä lineaarista yhteyttä ja siitä käytetään kaavaa 1.

$$\hat{Y} = b_0 + b_1 \cdot x \quad (1)$$

jossa

\hat{Y} = Y-muuttujan ennustettu arvo

b_0 = regressiosuoran vakiotermi

b_1 = regressiokerroin

x = X-muuttujan arvo

Pienimmän neliösumman menetelmä perustuu regressioanalyysin jäännöstermien tarkasteluun, jossa jokaiselle Y-muuttujan arvolle y_i voidaan määrittää mallin avulla ennustettu arvo \hat{Y}_i . Jäännöstermit eli residuaalit kuvaavat todellisen Y-muuttujan arvon ja ennustetun arvon \hat{Y} erotusta ja pienemmän neliösumman menetelmän avulla pyritään määrittämään regressiosuora, jota käytettäessä neliöityjen jäännöstermien yhteenlaskettu summa olisi mahdollisimman pieni. [12, s. 238.]

Pistejoukkoon sovitetun regressiosuoran yhtälön parametrit lasketaan pienimmän neliösumman menetelmän avulla seuraavilla kaavoilla 2 ja 3 muodostamalla muuttujien X ja Y havaintoarvoista havaintopareja [12, s. 239].

$$b_1 = \frac{n(\sum x_i y_i) - (\sum x_i)(\sum y_i)}{n(\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2} \quad (2)$$

$$b_0 = \frac{\sum y_i - b_1(\sum x_i)}{n} = \bar{y} - b_1 \bar{x} \quad (3)$$

jossa

b_1 = kulmakerroin

b_0 = leikkauspiste

n = havaintoarvojen lukumäärä

x_i = X-muuttujan havaintoarvot

y_i = Y-muuttujan havaintoarvot

\bar{y} = Y-muuttujan havaintoarvojen keskiarvo

\bar{x} = X-muuttujan havaintoarvojen keskiarvo

Jäännöstermit kuvastavat selittämättä jäänyttä vaihtelua. Ne sisältävät muun muassa malliin kuulumattomien muuttujien vaikutuksen, mittaus- tai tallennusvirheet ja satunnaisvaihtelun. [13.]

Pistejoukkoa mallinnetaan regressiosuoralla, joka kulkee sen läpi.

Jäännöstermit määritellään jokaisen pisteen pystysuorana etäisyytenä regressiosuorasta. Jäännöstermien summa pienenee tai kasvaa sen mukaan, missä asennossa ja mihin kohtaan koordinaatistoa suora asettuu pisteisiin

nähdessä. Regressioanalyysin tehtävänä on täten määrittää paras mahdollinen paikka ja asento suoralle. [12.]

Korrelaatiokertoimella mitataan muuttujien välisen yhteyden voimakkuutta ja se on standardoitu muuttujien välisen lineaarisen yhteyden estimaatti, jolloin kaikkien mahdollisten muuttujaparien välinen korrelaatio on jokin luku välillä $[-1, 1]$. Muuttujien välillä ei ole lineaarista yhteyttä, jos korrelaatiokerroin on lähellä nollaa. Mitä lähempänä korrelaatiokertoimen itseisarvo on arvoa 1 sitä voimakkaampi ja systemaattisempi on lineaarinen yhteys. [12.]

5.3 Toistettavuus

Toistettavuus on tulosten välinen yhtäpitävyys, kun määritykset tehdään samoissa olosuhteissa, samasta näytteestä, samalla menetelmällä, saman tekijän toteuttamana, samalla laitteella samassa laboratorioissa, lyhyen aikavälin sisällä. Toistettavuutta voidaan testata joko kvalitatiivisesti tai kvantitatiivisesti. [11.]

5.4 Uusittavuus

Uusittavuus on tulosten välinen yhtäpitävyys, kun määritykset tehdään samalla menetelmällä muuttaen yhtä tai useampaa seuraavista: mittauslaite, suorituspaikka, suorittaja tai muu oleellinen tekijä tai tehden mittaukset aikaväleihin, jotka ovat pitkät verrattuna yksittäisen mittauksen kestoajaksi. [11.]

Uusittavuutta testattaessa voi vaatimuksena olla, että vertailtavat tulokset vastaavat toisiaan 95 %:n luottamustasolla.

5.5 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus kuvaa yleisluonteista mittaustulosten vaihtelua, ja se on määritelty virherajojen avulla. Jokaiseen menetelmään liittyy tietty epävarmuus, joka johtuu virheistä tai epätarkkuuksista näytteenotossa, näytteen

säilytyksessä, laitteissa ja analyysin eri vaiheissa. Mittausepävarmuus on tulokseen liittyvä arvio rajoista, joiden välissä ”oikea” arvo on tietyllä todennäköisyydellä. Mittausepävarmuuden määritelmässä esiintyvä parametri voi olla esim. keskihajonta tai puolet luottamusvälin leveydestä. [10.]

5.6 Hypoteesien testaus

Tilastollisten testien avulla tutkitaan perusjoukosta tehtyjen olettamusten eli hypoteesien paikkansa pitävyyttä. Toista vaihtoehtoista nimitetään nollahypoteesiksi H_0 ja toista vaihtoehtoiseksi hypoteesiksi H_1 . Nollahypoteesi on perusolettamus ja sitä pidetään totena, kunnes toisin pystytään osoittamaan. Jos löydetään todisteet nollahypoteesia vastaan, se hylätään ja vaihtoehtoinen hypoteesi tulee voimaan. [13, s.175–176.]

Hylkäämisvirheen tekemisen todennäköisyyttä kutsutaan merkitsevyytasoksi. Tilasto-ohjelmien automaattisesti laskemaa hylkäämisvirheen todennäköisyyttä kutsutaan p-arvoksi. Se osoittaa, kuinka suuri on väärän johtopäätöksen todennäköisyys, jos nollahypoteesi hylätään. Toisin sanoen se osoittaa, kuinka suurella todennäköisyydellä vaihtoehtoinen hypoteesi on väärä. [13, s. 177.]

5.7 Riippumattomien otosten t-testi

Riippumattomien otosten t-testi on yksi käytetyimpiä tilastollisia testejä, ja sitä käytetään kahden otoksen keskiarvojen vertailemiseen, kun testin ennakkoletukset täyttyvät. Oletuksiin kuuluu, että satunnaismuuttujan jakaumat perusjoukossa noudattavat normaalijakaumaa ja keskihajontojen voidaan olettaa olevan molemmissa perusjoukoissa samansuuruisia. [12, s.186.] Testisuure saadaan laskettua kaavalla 4.

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (4)$$

jossa

\bar{x}_i = tulosten keskiarvo

s_i = tulosten keskihajonta

n_i = tulosten otoskoko

Testisuure noudattaa t-jakaumaa vapausastein $df = n_1 + n_2 - 2$. Testisuureen itseisarvosta tulee suuri, kun muuttujien keskiarvojen erotuksen itseisarvo on suuri.

6 Työn suoritus ja analyysin vaiheet

6.1 Näytteet

Analysoitavina näytteinä käytettiin kahta kuiva- ja kahta nestenäytettä, joissa oli eri entsyymiaktiivisuustasot. Näytteet olivat peräisin *Trichoderma*- ja *Aspergillus*-homekannoista. Toinen nestenäyte oli analyysissä käytettävä vertailunäyte, josta tehtiin analyyseja myös tutkimuksen ja tuotekehityksen laboratoriossa. Varsinaisiin analyysimittauksiin valikoitui vertailunäyte, toinen kuivanäytteistä sekä nestenäyte.

Kuivanäytteitä punnittiin noin 0,5 g 100 ml:n mittapulloihin ja suurimpaan osaan mittauksista päädyttiin analysoimaan vain toista kuivanäytettä. Nestenäytettä punnittiin noin 0,25 g 25 ml:n mittapulloihin ja vertailunäyte asiroitiin suoraan 2 ml:n Eppendorf-putkesta. Punnitut nestenäytteet täytettiin merkkiin 0,05 M natriumasetaattipuskuriliuoksella, jonka pH oli 5,0. Kuivanäytteet punnittiin vetokaapissa käyttäen moottoroitua hengityssuojainta, kertakäyttöistä suojatakkaa, -laseja, -käsineitä sekä hiusverkkoa entsyymien allergisoivuuden

takia. Ne täytettiin myös 0,05 M natriumasetaattipuskuriliuoksella hieman merkin alle ja laitettiin magneettisekoitukseen liukenemaan 20–30 minuutiksi ennen lopullista merkkiin täyttämistä.

6.2 Analyysin kulku

6.2.1 Alkuvalmistelut

Substraatti valmistettiin joka kerta erikseen, sillä pakastetusta sulatettuna siihen muodostui herkästi sakkaa ja saadut tulokset olivat matalampia.

Substraattijauhetta punnittiin 0,25 g 100 ml:n mittapulloon, liuotettiin 0,05 M natriumasetaattipuskuriin magneettisekoituksessa ja täytettiin merkkiin. Ennen laimennosvaihetta käynnistettiin Tecan Fluent -pipettirobotti, siihen kytketty tietokone ja analyysiohjelma sekä laitettiin kosketusnäytön asetukset valmiiksi, mihin kuului muun muassa kuoppalevyblokkien esilämmitys.

6.2.2 Laimennosvaihe

Tarkoituksena oli löytää sopivat laimennoskertoimet eri entsyymiaktiivisuuspitoisuustason omaaville näytteille, jolloin absorbanssiarvo osui tasaisesti oletetulle lineaariselle alueelle 0,2–1,3. Näytteet laimennettiin 0,05 M natriumasetaattipuskuriliuoksella, jonka pH oli 5,0 käyttäen automatisoitua kosketusnäytöllistä Hamilton Microlab 600 controller -ruiskulaimenninta. Soveltuvimmat laimennokset näytteille saatiin selvitettyä jakamalla näytteen arvioitu entsyymiaktiivisuus sadalla, josta voitiin vielä lähteä hiomaan tarkempaa suuntaa laimennokselle. Vertailunäytteessä laimennoskertoimena käytettiin 1:900, kuivanäytteessä 1:2 ja nestenäytteessä 1:35. Laimennetut näytteet säilyivät noin neljä tuntia, joten niitä ei ollut välttämätöntä mitata välittömästi laimentamisen jälkeen.

6.2.3 Ajon käynnistäminen Tecan Fluent 780 -pipettirobotilla

Laimennosvaiheen jälkeen näyteputket siirrettiin Tecan Fluent -pipettirobotille ja tehtiin tarvittavat valmistelut ennen ajon käynnistämistä. Tähän kuului olennaisimpana reagenssien ja kuoppalevyjen asettelu oikeille paikoille kosketusnäytön ohjeistuksen mukaisesti sekä näytemäärän ilmoittaminen ohjelmaan. Tarvittaviin reagensseihin kuuluivat 70 ml 0,05 M natriumasetaattipuskuriliuosta, 25 ml substraattiliuosta, 100 ml entsyymireaktion pysäytykseen käytettyä DNS-reagenssia, sekä 2 ml standardiliuosta, josta pipettirobotti laimentaa eri pitoisuudet standardisuoraa varten. Noin tunnin kestävään analyysiohjelmaan kuului kaksi vaihetta: entsyymireaktiovaihe sekä DNS-reaktiovaihe. Yhteen ajoon mahtuu maksimissaan 32 näytettä.

6.2.4 Analyysiohjelman vaiheet Tecan Fluent 780 -pipettirobotilla

Ensimmäiseen osioon kuuluu entsyymireaktiovaihe ja toiseen osioon värinmuodostava DNS-reaktiovaihe. Ajon alussa tapahtuu substraatin lisäys syväkuoppalevyille, minkä jälkeen nollanäytekuoppiin ja standardinäytekuoppiin lisätään DNS-reagenssi. Standardisuorat laimennetaan seitsemällä eri pitoisuudella standardiliuoksesta ja laimennospisteistä tehdään kolme rinnakkaismäärittystä. 90 sekuntia kestävän 1 000 rpm:n sekoitusvaiheen jälkeen alkaa reaktion aloitusvaihe, jolloin näytekuoppiin lisätään näytemäärät koeputkista, jonka jälkeen levyä sekoitetaan 10 sekunnin ajan. Inkubointiaika 37 °C:ssä kestää 15 minuuttia.

Reaktion pysäytysvaiheessa DNS-reagenssin lisäys näytekuoppiin pysäyttää entsyymireaktion, jonka jälkeen tulee 10 sekunnin sekoitus. Seuraavaksi lisätään sama määrä näytettä nollanäytteisiin kuin varsinaisissa näytteissä ja sekoitetaan minuutin ajan. DNS-reaktiovaihetta varten robottikäsi siirtää syväkuoppalevyn sekoituksesta kuumennetulle blokille, jolloin 8 minuuttia kestävä inkubointi alkaa 105 °C:ssä. Tämän jälkeen kuumennettu blokki jäädytetään 4 °C:seen ja 5 minuutin jälkeen levy siirretään sekoitukseen 3 minuutiksi. Lopuksi tulee minuutin kestävä sekoitusvaihe 20 °C:ssa.

Taulukossa 1 on tiivistettynä analyysiohjelman eri vaiheet, kestoajat ja reagenssien lisäykset näytteiden ja nollanäytteiden osalta.

Taulukko 1. Analyysinvaiheiden kulku Tecan Fluent 780 -pipettirobotilla.

Reaktio	Reagenssit	Näyte	Nollanäyte
entsyymireaktio-vaihe	substraatti	225 µl	225 µl
	DNS-reagenssi	-	335 µl
	sekoitus 1 000 rpm/90 s	sekoitus	sekoitus
	entsyyminäytteen lisäys	25 µl	-
	sekoitus 1 000 rpm/10 s	sekoitus	sekoitus
	inkubointi	15 min 37°C	15 min 37°C
	DNS-reagenssi	375 µl	-
	sekoitus 1 000 rpm/10 s	sekoitus	sekoitus
	entsyyminäytteen lisäys	-	25 µl
	sekoitus 1 000 rpm/60 s	sekoitus	sekoitus
DNS-reaktiovaihe	inkubointi; syväkuoppalevyn siirto sekoituksesta kuumennetulle blokille	8 min 105°C	8 min 105°C
	Blokkien jäähditys 4 °C	5 min	5 min
	Syväkuoppalevyn siirto sekoitukseen 20 °C	3 min	3 min
	sekoitus 1 000 rpm/60 s	sekoitus	sekoitus

DNS-reaktiovaiheen jälkeen FCA-robottikäsivarsi pipetoi syväkuoppalevyn reaktioseoksista 200 µl 96-kuoppaiselle mittauslevylle, minkä jälkeen voidaan aloittaa analyysi kuoppalevylukijalla.

Kuvassa 5 näkyy Tecan Fluent -pipettirobotin työpöytä kokonaisuudessaan. Meneillään on analyysivaihe, jossa FCA-robottikäsivarsi pipetoi syväkuoppalevyille.



Kuva 5. Pipetointi syväkuoppalevyille Tecan Fluent -pipettirobotilla.

6.2.5 Analyysi kuoppalevylukijalla

DNS-reagenssin aiheuttama värinmuutos näytteissä kuoppalevyillä nähdään kuvasta 6. Ensimmäisellä rivistöllä vasemmalta oikealle katsottuna näkyy yksi kolmesta standardisuoran rinnakkaismäärityksestä. Seuraavaksi tulee nollanäytteet, varsinaiset näytteet ja lopuksi loput kaksi standardisuoran rinnakkaismäärityksistä.



Kuva 6. Valmiit näytteet kuoppalevyillä menossa mitattaviksi spektrofotometriin.

Ajon jälkeen valmis näytekupalevy siirrettiin alla olevan kuvan 7 Tecan Infinite M200 -spektrofotometriin, joka mittasi näytteiden absorbanssiarvot aallonpituudella 540 nm.



Kuva 7. Tecan Infinite M200 -spektrofotometri.

Mitatuista näytteistä laskettiin Excel-analyysiohjelmalla entsyymiaktiivisuus (U/g), entsyymikonsentraatiot laimennoksessa (g/ml), sokereiden pelkistävät pääät ($\mu\text{mol/ml}$) sekä keskiarvot, keskihajonnat ja suhteelliset keskihajonnat. Alla on avattu, miten entsyymiaktiivisuus lasketaan analyysiohjelmalla.

$$\text{absorbanssierotus} = \text{entsyyminäytteen absorbanssi} - \text{nollanäytteen absorbanssi} \quad (5)$$

$$\text{entsyymikonsentraatio} = \text{massa (g)} / \text{tilavuus (ml)} / \text{jatkolaimennos} \quad (6)$$

$$\text{pelkistävät pääät } (\mu\text{mol/ml}) = \frac{1}{x} * (\text{absorbanssierotus} - b) \quad (7)$$

jossa x = kulmakerroin ja b = leikkauspiste

$$\text{entsyymiaktiivisuus} = \text{pelkistävät pääät} / \text{entsyymikonsentraatio} / \text{reaktioaika} \quad (8)$$

Analyysiohjelma vähentää suorien pisteiden absorbanssiarvoista nollanäytteen absorbanssit ja laskee kunkin suoran pisteen entsyymikonsentraation keskiarvot. Suorien pisteiden keskiarvoista muodostetaan suora, joka osoittaa tulosten oikeellisuuden ja selitysasteen.

6.3 Validoinnissa käytetyt mittaustavat

Lineaarisuusmittaukset tehtiin yhdestä nestenäytteestä useilla eri laimennoksilla lineaarisen mittausalueen selvittämiseksi. Mittauksia tehtiin eri kerroilla vaihtelevilla laimennospisteillä. Näytteen aiemmissa mittauksissa käytetystä laimennuskertoimesta 1:35 ja sillä saatujen absorbanssiarvojen keskiarvon ~0,5 avulla saatiin laskettua lineaariselle alueelle osuvan absorbanssiarvon laimennoskerroin kaavalla 9.

$$a = \frac{35 \cdot 0,5}{b} \quad (9)$$

a = selvittävä laimennoskerroin

b = haluttu absorbanssiarvo

35 = näytteestä aiemmin käytetty laimennoskerroin

0,5 = näytteestä aiemmin saatujen absorbanssiarvojen keskiarvo

Tehtiin laimennospisteet kahdeksalla eri laimennoksella, joista oli neljä rinnakkaismäärittystä. Ensimmäisellä mittauskerralla mittauksiin sisältyi myös pisteet, jotka olivat oletetun lineaarisen mittausalueen ulkopuolella, jotta nähtiin ero lineaarisen ja epälineaarisen alueen välillä. Toisella mittauskerralla tarkoituksena oli tehdä laimennospisteet pienemmältä absorbanssiarvoväliltä, jotka olisivat tarkemmin lineaarisella mittausalueella.

Uusittavuusmittaukset tehtiin kolmen eri analyysintekijän suorittamana. Kaikissa mittauksissa käytettiin samaa laitteistoa ja toimittiin työohjeen mukaisesti. Kolmesta eri näytteestä tehtiin 15 rinnakkaismäärittystä.

Toistettavuusmittaukset tehtiin yhden analyysintekijän suorittamana samoista kolmesta näytteestä ja samoilla punnituksilla kuin uusittavuusmittauksissa 15 rinnakkaismäärittelyksellä.

7 Tulokset

7.1 Toteamis- ja määrittäysrajat

Toteamis- ja määrittäysrajat testattiin tutkimusosastolla analysoimalla vettä 40 kertaa. Toteamisraja eli LOD saatiin kaavalla 10 lisäämällä pitoisuuden keskiarvoon keskihajonta kerrottuna kolmella. Määrittäysraja LOQ saatiin kaavalla 11 lisäämällä pitoisuuden keskiarvoon keskihajonta kerrottuna kuudella. Tulosten keskiarvoksi saatiin 0,469 U/g ja keskihajonnaksi +/- 0,199 U/g.

$$\text{LOD} = \text{pitoisuuden keskiarvo} + (3 \cdot s) \quad (10)$$

$$0,469 \text{ U/g} + (3 \cdot 0,199 \text{ U/g}) = 1,066 \text{ U/g} \approx 1,1 \text{ U/g}$$

$$\text{LOQ} = \text{pitoisuuden keskiarvo} + (6 \cdot s) \quad (11)$$

$$0,469 \text{ U/g} + (6 \cdot 0,199 \text{ U/g}) = 1,663 \text{ U/g} \approx 1,7 \text{ U/g}$$

Toteamisrajaksi saatiin 1,1 U/g ja määrittäysrajaksi saatiin 1,7 U/g. Koska entsyymivalmisteet ovat tyypillisesti voimakkaasti konsentroituja, arvoilla ei ole käytännön merkitystä tuloksiin.

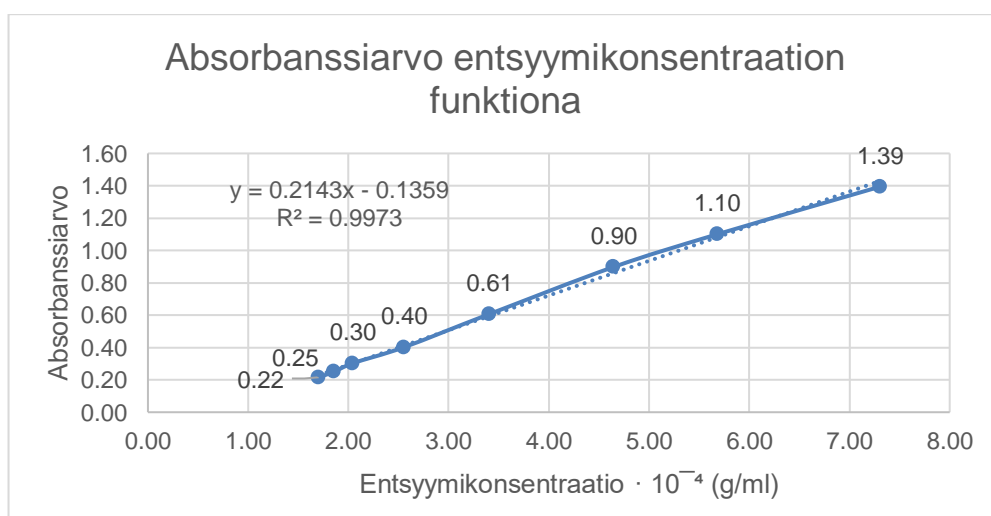
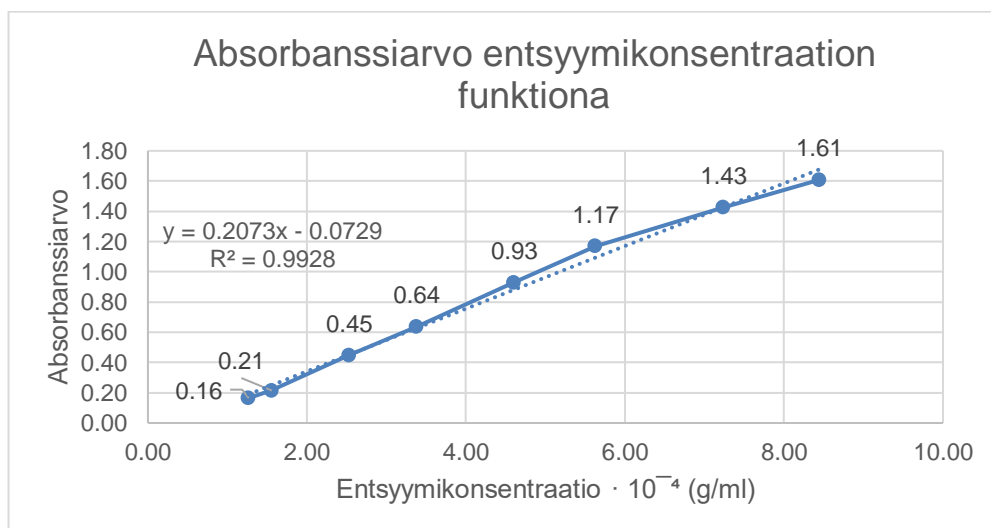
7.2 Lineaarisuus

Lineaariseksi mittausalueeksi arvioitiin absorbanssiarvoväliä 0,2–1,3 ja tarkoituksena oli selvittää, pitääkö arvio paikkansa. Tavoitteena oli saada korrelaatiokertoimeksi vähintään 0,999 ja rinnakkaisnäytteiden suhteelliseksi keskihajonnaksi alle 10 %.

Alla olevissa kuvaajissa (kuva 8) on esitetty absorbanssiarvot entsyymikonsentraation funktiona. Entsyymikonsentraatiot on laskettu kaavalla 6 jokaisessa laimennospisteessä. Voidaan silmämääräisesti nähdä, että lineaarisuus on suurinta absorbanssialueilla ~0,2–1,2. Toisen mittauskerran kuvaajasta nähdään, että pienimmällä laimennoksella tehty piste ylittää

lineaarisen alueen arvioidun ylärajan absorbanssiarvolla $\sim 1,4$. Voidaan todeta, että lineaarisuus vähenee lievästi absorbanssiarvon 1,3 ylityttyä.

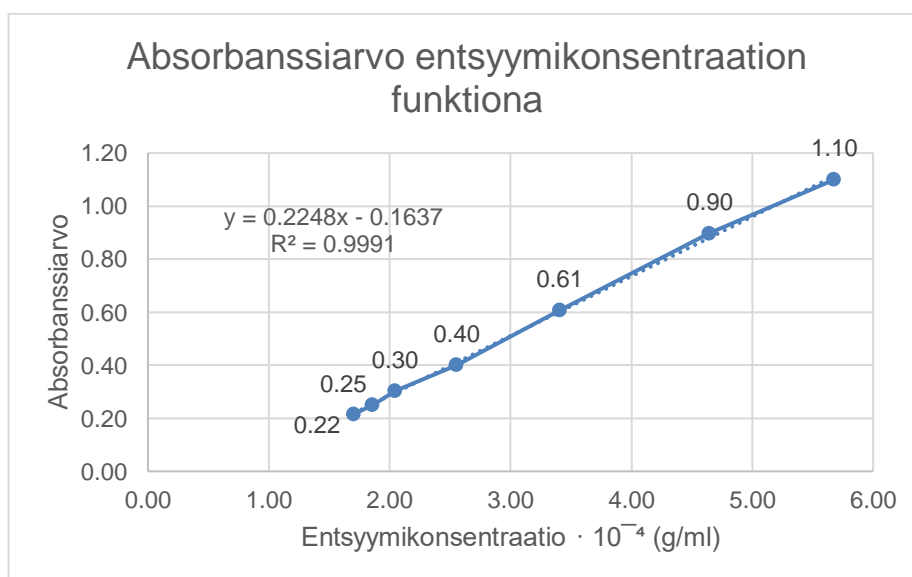
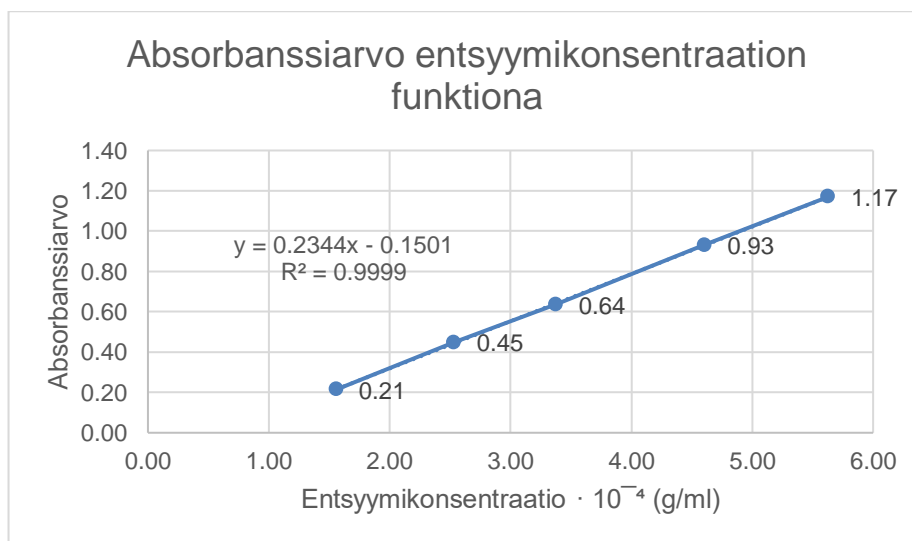
Kuvaajille on laskettu korrelaatiokerroimet Excel-ohjelman avulla. Tarkemmat mittaustulokset kuvaajista löytyvät liitteestä 1.



Kuva 8. Ensimmäisen ja toisen mittauskerran lineaarisuuskuvaajat.

Tehtiin lisäksi suorat edellisten suorien lineaaristen alueiden pisteistä, joille saatiin selkeästi suurempi korrelaatiokerroin. Alla olevista kuvaajista (kuva 9) nähdään, että korrelaatiokerroin on molemmissa vähintään 0,999. Korkeampi

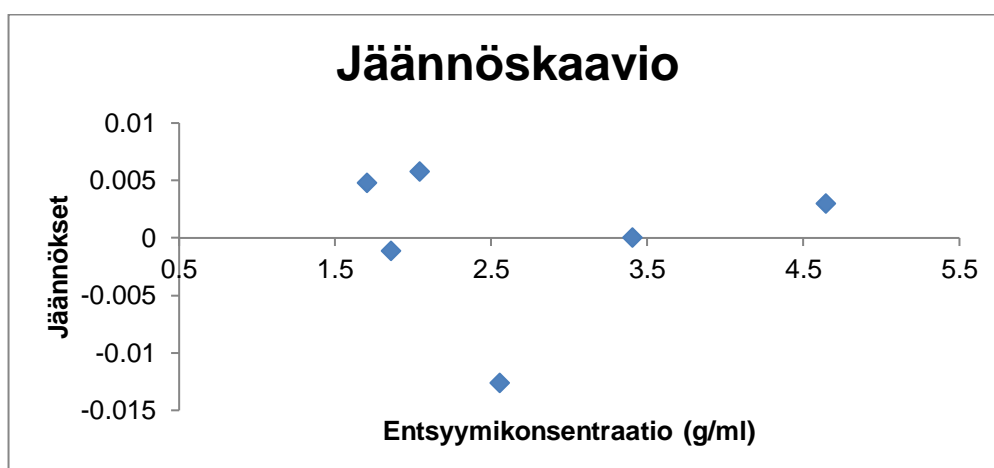
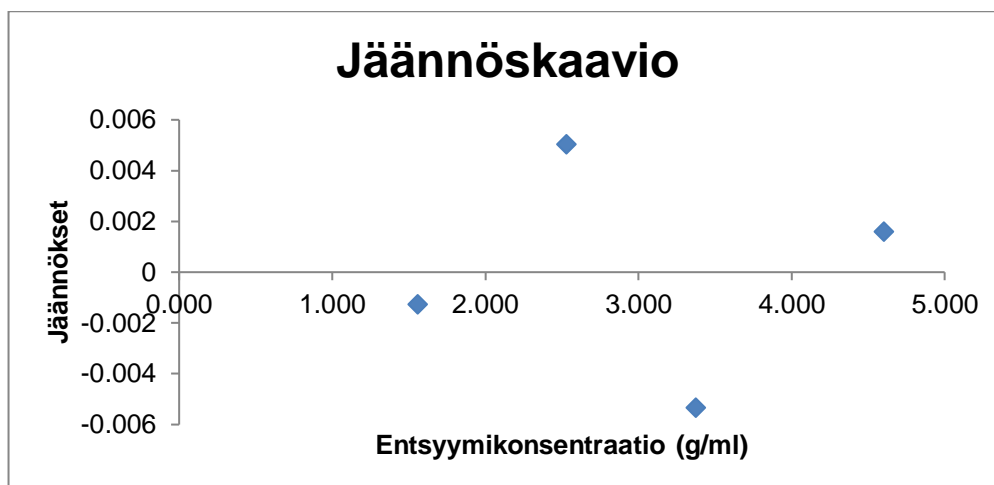
korrelaatiokerroin osoittaa, että lineaarisuus on suurinta absorbanssivälillä ~0,2–1,2.



Kuva 9. Ensimmäisen ja toisen mittauskerran lineaarisuuskuvaajat lineaariselta alueelta.

Tehtiin Excel-ohjelman regressioanalyysillä jäännöstermitarkastelu molempien kuvaajien lineaaristen mittausalueiden laimennospisteille. Kuvasta 10 nähdään, että jäännöstermit asettuvat molemmissa jäännöskaavioissa satunnaisesti nollatason molemmille puolille, joten voidaan todeta lineaarisuuden olevan hyvä

absorbanssiarvovälillä $\sim 0,2-1,2$. Tarkemmat tulokset regressioanalyysistä löytyvät liitteestä 2.



Kuva 10. Jäännöstermikuvaajat ensimmäiseltä ja toiselta mittauskerralta laimennospisteillä 18–65 ja 18–60.

Alla olevassa taulukossa 2 näkyy laimennospisteet, absorbanssiarvot (abs ero), entsyymiaktiivisuuden keskiarvo (U/g), entsyymikonsentraatio (g/ml), keskihajonta (SD) ja suhteellinen keskihajonta (RSD%), jotka saatiin Excel-laskentaohjelmalla laskettua.

Taulukko 2. Ensimmäisen ja toisen mittauskerran lineaarisuusmittaustulokset eri laimennospisteillä.

Ensimmäisen mittauskerran tulokset					
laimennos	abs ero	keskiarvo (U/g)	entsyymikonsentraatio (g/ml)	SD (U/g)	RSD%
1:12	1,6082	3413	0,00084433	35	1,0 %
1:14	1,4255	3553	0,00072371	49	1,4 %
1:18	1,1702	3799	0,00056289	77	2,0 %
1:22	0,9306	3760	0,00046055	94	2,5 %
1:30	0,6361	3647	0,00033773	94	2,6 %
1:40	0,4488	3607	0,00025330	216	6,0 %
1:65	0,2144	3310	0,00015588	34	1,0 %
1:80	0,1643	3401	0,00012665	88	2,6 %
Toisen mittauskerran tulokset					
1:14	1,3945	3613	0,00073029	26	0,7 %
1:18	1,1001	3714	0,00056800	96	2,6 %
1:22	0,8977	3757	0,00046473	116	3,1 %
1:30	0,6066	3588	0,00034080	127	3,5 %
1:40	0,4024	3349	0,00025560	332	9,9 %
1:50	0,3030	3312	0,00020448	389	11,7 %
1:55	0,2511	3142	0,00018589	36	1,2 %
1:60	0,2156	3053	0,00017040	22	0,7 %

Keskihajonta laskettiin kaavalla 12.

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (12)$$

x_i = havaintoarvot

\bar{x} = keskiarvo

n = havaintojen lukumäärä

Suhteellinen keskihajonta saatiin laskettua kaavalla 13.

$$100 \cdot \frac{\text{keskiarvo}}{\text{keskihajonta}} \quad (13)$$

7.3 Toistettavuus

Tulosten toistettavuutta tutkittiin kolmesta näytteestä yhden analyysintekijän suorittamana tarkastelemalla keskihajontoja (SD) ja suhteellisia keskihajontoja (RSD%). Suhteellisten hajontojen tavoitteeksi oli saada alle 10 %, ja tässä onnistuttiin hyvin. Alla olevassa taulukossa 3 on esitetty mittaustulokset, jossa näyte 1 on vertailunäyte, näyte 2 on kuivanäyte ja näyte 3 on nestenäyte. Tarkemmat mittaustulokset näkyvät liitteessä 3.

Taulukko 3. Toistettavuuden keskiarvot, keskihajonnat ja suhteelliset keskihajonnat näytteistä 1, 2 ja 3.

Näyte	Keskiarvo (U/g)	SD (U/g)	RSD%
1	868	20,33	2,34
2	635	10,60	1,67
3	3556	117,94	3,32

7.4 Uusittavuus

Uusittavuutta tutkittiin samoista kolmesta näytteestä kolmen eri analyysin tekijän suorittamina. Excel-laskentaohjelmalla laskettiin eri analyysin tekijöiden mitattujen näytteiden yhteiset keskiarvot, keskihajonnat sekä suhteelliset keskihajonnat. Suhteellinen keskihajonta laskettiin kaavalla 13. Tarkemmat mittaustulokset löytyvät liitteestä 3. Suhteelliseksi keskihajonnaksi saatiin kaikista näytteistä alle 10 %. Näytteessä 1 oli selkeästi matalampi suhteellinen keskihajonta. Näytteiden sisäiset mittaustulokset eri analyysintekijöiden suorittamina on esitetty taulukossa 4, jossa näyte 1 on vertailunäyte, näyte 2 on kuivanäyte ja näyte 3 on nestenäyte.

Taulukko 4. Näytteiden sisäisten mittaustulosten keskiarvot, keskihajonnat (SD) ja suhteelliset keskihajonnat (RSD%) uusittavuusmittauksissa.

Näyte	Keskiarvo (U/g)	SD (U/g)	RSD%
1	853	26,95	3,16
2	574	46,79	8,16
3	3368	244,46	7,26

Alla olevassa taulukossa 5 on eriteltyinä analyysintekijöiden sisäisten mittaustulosten keskiarvot, keskihajonnat ja suhteelliset keskihajonnat. Suhteelliset keskihajonnat olivat melko samaa luokkaa eri analyysin tekijöiden suorittamina, vaikka pientä vaihtelua löytyikin. Tarkemmat mittaustulokset löytyvät liitteestä 3.

Taulukko 5. Eri analyysintekijöiden sisäisten tulosten keskiarvot, keskihajonnat ja suhteelliset keskihajonnat näytteistä 1, 2 ja 3.

Näyte	tekijä	keskiarvo (U/g)	SD (U/g)	RSD%
1	A	868	20,33	2,3 %
	B	841	19,38	2,3 %
	C	851	33,07	3,9 %
2	A	635	10,60	1,7 %
	B	526	9,23	1,8 %
	C	561	7,16	1,3 %
3	A	3556	117,94	3,3
	B	3472	173,95	5,0
	C	3077	62,69	2,0

Keskiarvotuloksista laskettiin suhteellinen virhe kaavalla 14. Suhteellisella virheellä tarkoitetaan absoluuttisen virheen suuruutta suhteutettuna mittaustulokseen [14].

$$\frac{(x_i - x_0)}{x_0} \cdot 100 \quad (14)$$

jossa

$(x_i - x_0)$ = absoluuttinen virhe

x_0 = saatu todellinen arvo

Esimerkiksi jos verrataan tekijöiden A ja B keskiarvotuloksia, jaetaan tekijöiden A ja B keskiarvojen erotus eli absoluuttinen virhe analyysintekijän B keskiarvolla seuraavasti:

$$\frac{A_{keskiarvo} - B_{keskiarvo}}{B_{keskiarvo}} \quad (15)$$

Taulukossa 6 on samasta näytteestä lasketut suhteellisen virheen tulokset kahden eri analyysintekijän välillä. Tuloksista nähdään, että näytteessä 1 suhteellinen virhe on pienintä ja alle 10 % kaikissa vertailuissa. Näytteistä 2 ja 3 on saatu korkeampaa tulosta, mikä selittyy yhden analyysintekijän saamalla poikkeavammalla keskiarvolla.

Taulukko 6. Lasketut suhteellisen virheen tulokset.

Näyte	tekijät	$\frac{(x_i - x_0)}{x_0}$	$\frac{(x_i - x_0)}{x_0} \cdot 100$
1	A+B	0,0321	3,21 %
	A+C	0,0200	2,00 %
	B+C	0,0119	1,19 %
2	A+B	0,2072	20,72 %
	A+C	0,1319	13,19 %
	B+C	0,0665	6,65 %
3	A+B	0,0242	2,42 %
	A+C	0,1557	15,57 %
	B+C	0,1284	12,84 %

Tehtiin riippumattomien otosten kaksisuuntainen t-testi kahden eri analyysintekijän keskiarvoista, jotta nähtiin, onko eri tekijöiden tulosten keskiarvoilla tilastollisesti merkitsevää eroa 95 %:n luottamustasolla. T-testi laskettiin kolmesta näytteestä Excel-ohjelmalla ja tulokset näkyvät taulukossa 7.

T-testissä käytetyt hypoteesit:

H0: näytteiden keskiarvot eivät eroa toisistaan

H1: näytteiden keskiarvot eroavat toisistaan

P-arvon ollessa alle 0,05 (5 %) H1-hypoteesi toteutuu. Alla olevassa taulukossa 7 on Excel-ohjelmalla lasketut T-testillä saadut p-arvojen tulokset.

Taulukosta 7 nähdään, että suurin osa p-arvoista on alle 0,05, jolloin näytteiden keskiarvot eroavat toisistaan 95 %:n luottamustasolla. Näytteessä 1 on kaksi p-arvon 0,05 ylittävää tulosta ja näytteessä 3 on yksi p-arvon 0,05 ylittävä tulos. Näistä voidaan todeta, että keskiarvot eivät eroa toisistaan 95 %:n luottamustasolla.

Taulukko 7. T-testillä lasketut p-arvot ja prosenttiosuudet kahden analyysintekijän välillä näytteistä 1, 2 ja 3.

Näyte	tekijät	p-arvo	%
1	A+B	0,0008	0,08 %
	A+C	0,1125	11,25 %
	B+C	0,2955	29,55 %
2	A+B	1E-22	0,00 %
	A+C	8E-18	0,00 %
	B+C	5E-12	0,00 %
3	A+B	0,1350	13,5 %
	A+C	4E-12	0,00 %
	B+C	2E-07	0,00 %

Näytteestä 1 oli tehty mittausanalyysieja samaa analyysiohjelmaa käyttäen tutkimuksen ja tuotekehityksen laboratoriossa. Tulosten keskiarvot, keskihajonnat sekä suhteelliset keskihajonnat ovat matalampia laadunvalvontalaboratoriossa tehtyihin verrattuna. Keskiarvoksi saatiin 830,51 U/g, keskihajonnaksi 17,52 U/g ja suhteelliseksi keskihajonnaksi 2,1 %. Tarkemmat tulokset löytyvät liitteestä 4.

Tehtiin t-testi Excel-ohjelmalla, jossa verrattiin tutkimuksen ja tuotekehityksen laboratoriossa mitattujen tulosten keskiarvoa laadunvalvontalaboratoriossa mitattujen kaikkien analyysientekijöiden tulosten keskiarvoon. T-testin p-arvon prosenttiosuudeksi saatiin 0,00711 %, mikä on myös selkeästi alle 5 %.

Analyysimittauksia tehtiin myös pakastetusta substraatista, jotta saatiin selville, onko substraatin tuoreudella merkitystä luotettaviin tuloksiin. Analyysimittaus tehtiin kerran näytteistä 1 ja 3 samoilla rinnakkaismäärityksillä ja laimennoksilla kuin muut uusittavuusmittaukset. Molempien näytteiden tuloksissa entsyymiaktiivisuus oli selkeästi matalampaa kuin kaikissa muissa kyseisten näytteiden uusittavuusmittauksissa.

Taulukossa 8 on näytteistä 1 ja 3 saadut entsyymiaktiivisuuden mittaustulosten keskiarvot, keskihajonnat sekä suhteelliset keskihajonnat pakastetusta substraatista tehtynä sekä uusittavuusmittauksissa saadut vastaavat arvot tuoreesta substraatista tehtynä mittaustulosten vertailun selkeyttämiseksi. Tarkemmat mittaustulokset pakastetusta substraatista löytyvät liitteestä 5.

Taulukko 8. Pakastetusta substraatista saadut entsyymiaktiivisuuksien keskiarvot, keskihajonnat SD ja suhteelliset keskihajonnat RSD % näytteistä 1 ja 3.

Näyte	keskiarvo U/g	SD (U/g)	RSD %
1 (pakastettu)	784	25	3,19
1 (tuore)	853	26,95	3,16
3 (pakastettu)	2773	54	1,95
3 (tuore)	3368	244,46	7,26

7.5 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus laskettiin näytteille käyttäen sille tarkoitettua laskentapohjaa. Tavoitteena oli saada mittausepävarmuudeksi ja laajennetuksi mittausepävarmuudeksi alle 20 %.

Kokonaismittausepävarmuus eli yhdistetty mittausepävarmuus laskettiin kaavalla 16.

$$U(c) = \sqrt{S_r^2 + S_{RW}^2} \quad (16)$$

jossa

S_r = toistettavuuden keskihajonta

S_{RW} = toistettavuuden ja uusittavuuden yhdistetty keskihajonta

Kattavuuskerroin $k = 2$ vastaa noin 95 % luottamustasoa. Laajennettu mittausepävarmuus saatiin laskettua kertomalla yhdistetty mittausepävarmuus kattavuuskertoimella 2 alla olevan kaavan 17 mukaisesti.

$$U = u(c) * k \quad (17)$$

jossa

$$u(c) = \text{yhdistetty mittausepävarmuus } (S_r + S_{RW})$$

k = kattavuuskerroin

Taulukossa 9 on laboratorion sisäiset mittausepävarmuustulokset. Näyte 1 on vertailunäyte, näyte 2 on kuivanäyte ja näyte 3 on nestenäyte. Excel-laskentataulukko löytyy liitteestä 3. Alla on avattu, mitä taulukon 9 lyhenteet tarkoittavat.

S_r = toistettavuuden keskihajonta

S_{RW} = toistettavuuden ja uusittavuuden yhdistetty keskihajonta

$$u(c) = \text{yhdistetty mittausepävarmuus } (S_r + S_{RW})$$

U = laajennettu mittausepävarmuus

C = uusittavuuden keskiarvo

$$\% U = 100 * U / C$$

Taulukko 9. Laboratorion sisäiset mittausepävarmuustulokset.

Näyte	Sr	SRW	u(c)	U	C	% U	Tulos
1	20,328	26,954	33,76	68	853	8	853±8
2	10,595	46,79	47,97	96	754	13	754±13
3	117,936	244,456	271,42	543	3368	16	3368±16

Näytteistä laskettu mittausepävarmuus on kaikissa näytteissä alle 20 % (%U), joten tavoitteessa on onnistuttu. Pienin ja paras tulos on saatu vertailunäytteestä 1 päästessään alle 10 %:iin.

8 Yhteenveto

Opinnäytetyön tavoitteena oli validoida uusi entsyymiaktiivisuusmenetelmä Tecan-Fluent -pipettirobotia käyttäen, jotta menetelmän toimivuuden luotettavuus ja tulosten oikeellisuus pystyttiin todentamaan. Suurimmaksi osaksi validoinnissa tutkittiin suhteellisia keskihajontoja ja keskiarvoja.

Toteamis- ja määritysrajat olivat riittävän matalat. Koska entsyymivalmisteet ovat tyypillisesti voimakkaasti konsentroituja, arvoilla ei ollut käytännön merkitystä tuloksiin.

Lineaarisuusmittausten tavoitteena oli täsmentää lineaarisen mittausalueen absorbanssiarvorajoja. Oletettu lineaarinen mittausalue 0,2–1,3 jäi hieman epävarmaksi, mutta mittauksista voitiin todeta lineaarisuuden vähenevän absorbanssiarvon 1,3 ylityttyä. Suurinta lineaarisuus oli absorbanssialueella ~0,2–1,2 ja ylitti tavoitteen 0,999. Lineaarisuusmittausten rinnakkaisnäytteiden suhteellinen keskihajonta oli kaikilla mittauskerroilla alle 20 % ja selkeä valtaosa oli alle 5 %.

Toistettavuudessa tarkasteltiin yhden analyysintekijän sisäisiä suhteellisia keskihajontoja ja uusittavuudessa kolmen tekijän keskinäisiä vastaavia. Molemmissa arvot osuivat alle 10 %:n tavoitteeseen. Toistettavuudessa suhteelliset keskihajonnat olivat parempia, muutaman prosentin luokkaa. Tämä on ihan odotettavaakin, sillä tulokset ovat peräisin samalta analyysintekijältä.

Uusittavuusmittauksista tehdyt t-testit osoittivat, että suurin osa näytteiden mittaustuloksista saaduista keskiarvoista erosivat tilastollisesti merkitsevästi toisistaan. Näytteessä 1 ero analyysintekijöiden välillä oli pienintä. Mittaustuloksiin on osaltaan voinut vaikuttaa myös eroavaisuudet näytteiden

entsyymiaktiivisuustasoissa. Vaikka mittaustuloksilla oli tilastollisesti merkitsevää eroavaisuutta ja osa suhteellisista virhetuloksista ylittää 10 %:n rajan, ei sillä ollut validoinnin onnistumisen kannalta merkitystä, sillä näytteen sisäiset suhteelliset keskihajonnat ovat kaikki alle 10 %.

Mittausepävarmuus laskettiin validointipohjan avulla ja kaikista näytteistä saatiin alle 20 %. Näyte 1 alitti 10 %:n rajan. Laajennettu mittausepävarmuus oli myös alle 20 % kaikilla näytteillä.

Työssä selvisi, että substraatin pakastuksella on vaikutusta tulosten luotettavuuteen. Pakastetun substraatin taipumus muodostaa sakkaa vaikutti epätoivotulla tavalla tuloksiin antaen liian matalia arvoja. Substraatin tuoreudella ja ainemuodolla on siis tärkeä rooli analyysin onnistumisen kannalta.

Validointi on onnistunut, sillä suhteelliset keskihajonnat ovat tarpeeksi pieniä ja alittavat selkeästi 10 %:n tavoitteen. Uutta entsyymiaktiivisuusmenetelmän käyttöä voidaan luotettavin mielin jatkaa.

Lähteet

- 1 Yritysesittely. Verkkoaineisto. Roal Oy.<<https://www.roal.fi/en/yritys/>>. Luettu 15.2.2023.
- 2 Tuoteportfolio. Verkkoaineisto. Roal Oy. <https://www.roal.fi/tuoteportfolio/#elintarvike_entsyymit>. Luettu 15.10.2023.
- 3 Yli-Peltola, Minna 2009. Entsyymit kemian ja biologian opetuksen yhdistävänä tekijänä lukiossa. Pro-gradu -tutkielma. Jyväskylän yliopisto. Kemian laitos. Opettajankoulutus. Verkkoaineisto. <https://jyx.jyu.fi/bitstream/handle/123456789/21725/URN_NBN_fi_jyu-200908213746.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Luettu 2.3.2023.
- 4 Tuotteet-osaaminen. Verkkoaineisto. Roal Oy. <<https://www.roal.fi/tuotteet-osaaminen/>>. Luettu 15.2.2023.
- 5 Aittomäki, Esa; Eerikäinen Tero; Leisola Matti; Ojamo Heikki; Suominen Ilari & von Weymarn Niklas. 2002. Bioprosessitekniikka. WSOY Porvoo.
- 6 Aehle Wolfgang. 2007. Enzymes in Industry. Third, Completely Revised Edition. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim.
- 7 Estimation of reducing sugars by dinitrosalicylic acid method. Verkkoaineisto. <https://faculty.ksu.edu.sa/sites/default/files/lab_2_21.pdf>. Luettu 2.3.2023
- 8 Triolab. Tuotevalikoima. Tecan Fluent -pipetointirobotti. Verkkoaineisto. <<https://www.triolab.fi/tuotevalikoima/tecan-fluent-pipetointirobotti/>>. Luettu 7.3.2023
- 9 Tecan reference manual Fluent. Verkkoaineisto. <https://www.tecan.com/hubfs/RM_Fluent_EN_399937_V1_5.pdf >. Luettu 10.8.2023.
- 10 Hägg, Margareta 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Teknologian tutkimuskeskus VTT OY. Verkkoaineisto. <<https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/technology/2016/T276.pdf>>. Luettu 13.3.2023.
- 11 Ehder, Tapio 2005. Kemian metrologian opas. Metrologian neuvottelukunta. Kemian ja mikrobiologian jaosto. Verkkoaineisto.

<<https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/MIKES/2005-J6.pdf>>. Luettu 7.3.2023.

- 12 Holopainen, Martti & Pulkkinen, Pekka. 2014. Tilastolliset menetelmät. 1. painos. Sanoma Pro Oy. 1. Helsinki.
- 13 Holopainen, Martti & Pulkkinen, Pekka. 2014. Tilastolliset menetelmät. 5-painos. Sanoma Pro Oy. Helsinki.
- 14 Fysiikka luonnontieteenä. Verkkoaineisto.
<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjStLzRI5GCAxWQAxAHUKTDwoQFnoECC4QAQ&url=https%3A%2F%2Fpeda.net%2Fid%2Fa399f4027%3Afile%2Fdownload%2F7986f456ddf8bc503c6528a8c5b255ba118e3d11%2F3._Mittaaminen.ppt&usg=AOvVaw2KTPQd-ZflvvITHWKcXOVD&opi=89978449>. Luettu 20.10.2023.

Lineaarisuusmittaustulokset

Ensimmäisen mittauskerran tulokset

näyte		laim	abs ero	U/g	stdev	RSD
1231		12	1,6082	3413	35	1,0 %
1231		14	1,4255	3553	49	1,4 %
1231		18	1,1702	3799	77	2,0 %
1231		22	0,9306	3760	94	2,5 %
1231		30	0,6361	3647	94	2,6 %
1231		40	0,4488	3607	216	6,0 %
1231		65	0,2144	3310	34	1,0 %
1231		80	0,1643	3401	88	2,6 %

Toisen mittauskerran tulokset

näyte		laim	abs ero	U/g	stdev	RSD
1231		14	1,3945	3613	26	0,7 %
1231		18	1,1001	3714	96	2,6 %
1231		22	0,8977	3757	116	3,1 %
1231		30	0,6066	3588	127	3,5 %
1231		40	0,4024	3349	332	9,9 %
1231		50	0,3030	3312	389	11,7 %
1231		55	0,2511	3142	36	1,2 %
1231		60	0,2156	3053	22	0,7 %

Jäännöstermitarkastelutulokset lineaarisuusmittauksista

SUMMARY OUTPUT								
Regression Statistics								
Multiple R	0,9998956							
R Square	0,9997912							
Adjusted R S	0,9996868							
Standard Error	0,0053575							
Observations	4							
ANOVA								
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>			
Regression	1	0,274831	0,274831	9575,031	0,0001044			
Residual	2	5,741E-05	2,87E-05					
Total	3	0,2748884						
	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95,0%</i>	<i>Upper 95,0%</i>
Intercept	-0,149248	0,0077034	-19,3744	0,0026535	-0,182393	-0,116103	-0,182393	-0,116103
	5,6289	0,2341272	0,0023927	97,852087	0,0001044	0,244422	0,2238324	0,244422
RESIDUAL OUTPUT								
<i>Observation</i>	<i>1,1701750</i>	<i>Residuals</i>						
1	0,9290248	0,0015752						
2	0,6414697	-0,00532						
3	0,4437961	0,0050039						
4	0,2157093	-0,001259						

Regression Statistics								
Multiple R	0,99971719							
R Square	0,99943445							
Adjusted R S	0,99929306							
Standard Error	0,00696933							
Observations	6							
ANOVA								
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>			
Regression	1	0,34334055	0,34334055	7068,76554	1,1997E-07			
Residual	4	0,00019429	4,8572E-05					
Total	5	0,34353483						
	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95,0%</i>	<i>Upper 95,0%</i>
Intercept	-0,1779364	0,00794968	-22,382831	2,359E-05	-0,2000083	-0,1558646	-0,2000083	-0,1558646
	5,68	0,23087851	0,00274607	84,075951	1,1997E-07	0,22325419	0,23850282	0,22325419
RESIDUAL OUTPUT								
<i>Observation</i>	<i>Predicted 1,1</i>	<i>Residuals</i>						
1	0,89495601	0,00304399						
2	0,60889754	-0,0018975						
3	0,41218905	-0,010189						
4	0,29421013	0,00878987						
5	0,25126672	-0,0002667						
6	0,21548056	0,00051944						

Toistettavuus-, uusittavuus- ja mittausepävarmuustulokset

Toistettavuusmittaukset																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Average	STD	RSD%	
Näyte 1	858	864	856	857	879	893	902	848	862	833	890	895	866	859	843	868	20,328259	2,3	850,1
Näyte 2	630	646	631	619	647	628	623	633	633	622	653	640	642	623	637	645	867,666667	2,34	867,666667
Näyte 3	3436	3564	3502	3455	3484	3525	3543	3354	3334	3726	3596	3493	3611	3724	3788	3555,666667	117,93962	3,32	3555,666667

Uusittavuusmittaukset																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Average	SD	RSD%	Average	STD	RSD%
Näyte 1 (repli A)	858	864	856	857	879	893	902	848	862	833	890	895	866	859	843	868	20,328259	2,3	850,1	26,973851	3,16
Näyte 1 (repli B)	811	836	845	838	831	866	843	838	860	840	870	861	843	843	803	841	10,382859	2,3	850,1	10,382859	1,21
Näyte 1 (repli C)	850	854	857	859	859	859	859	859	859	859	859	859	859	859	859	859	10,382859	2,3	850,1	10,382859	1,21
Näyte 2 (repli A)	640	644	644	644	647	628	627	633	622	653	642	642	623	637	645	645	10,995187	2,7	573,7	46,790184	8,16
Näyte 2 (repli B)	513	524	537	521	514	526	513	522	524	536	543	537	531	534	518	526	9,2782565	1,8	561	7,8184905	1,3
Näyte 2 (repli C)	551	563	560	554	559	552	559	558	561	571	570	577	563	556	561	561	7,8184905	1,3	561	7,8184905	1,3
Näyte 3 (repli A)	3436	3564	3502	3455	3484	3525	3543	3354	3334	3726	3596	3493	3611	3724	3788	3556	117,93962	3,3	3368,3	244,65015	7,26
Näyte 3 (repli B)	3064	3033	3120	3097	2968	3117	3018	3009	3180	3063	3096	3017	3060	3077	3060	3077	62,485202	2,0	3077	62,485202	2,0

Method uncertainty calculated to the products:

Product	U1		U2		U3		C	U	%U	Result
	$s_r = u(r)$	$S_{Rw} = u(Rw)$	$u(bias)$	$u(c)$	$u(c)$	$\%U$				
Näyte 1	20,328	26,954	33,76	853	8	± %				
Näyte 2	10,595	46,79	47,97	754	13	± %				
Näyte 3	117,936	244,456	271,42	3368	16	± %				

Tutkimuksen ja tuotekehityksen laboratorion tulokset näytteestä 1

	1	2	3	4	Average	Range			plate position
1	822,00	803,00	806,00	858,00	822,25	55	23.02.2022	Run1	A7-D7
2	799,00	813,00	829,00	812,00	813,25	30			E7-H7
3	803,00	808,00	804,00	846,00	815,25	43			A8-D8
4	808,00	812,00	828,00	797,00	811,25	31			E8-H8
5	804,00	823,00	828,00	853,00	827,00	49	23.02.2022	Run2	A7-D7
6	812,00	831,00	831,00	822,00	824,00	19			E7-H7
7	806,00	816,00	817,00	849,00	822,00	43			A8-D8
8	854,00	831,00	820,00	839,00	836,00	34	02.03.2022	Run1	A7-D7
9	842,00	823,00	833,00	800,00	824,50	42			E7-H7
10	835,00	832,00	819,00	877,00	840,75	58	17.03.2022	Run1	A7-D7
11	805,00	795,00	822,00	850,00	818,00	55			E8-H8
12	822,00	827,00	831,00	880,00	840,00	58	17.03.2022	Run2	A7-D7
13	816,00	810,00	818,00	805,00	812,25	13			E8-H8
14	857,00	844,00	835,00	843,00	844,75	22	13.04.2022	Run1	A7-D7
15	846,00	843,00	840,00	844,00	843,25	6			E8-H8
16	848,00	859,00	858,00	841,00	851,50	18	13.04.2022	Run2	E7-H7
17	869,00	883,00	868,00	863,00	870,75	20			A8-H8
18	839,00	833,00	831,00	817,00	830,00	22	13.04.2022	Run3	A7-D7
19	836,00	832,00	829,00	816,00	828,25	20			E8-H8
20	872,00	867,00	855,00	868,00	865,50	17	14.04.2022	Run1	A7-D7
21	844,00	849,00	849,00	835,00	844,25	14			E8-H8
22	838,00	859,00	840,00	828,00	841,25	31	14.04.2022	Run2	E7-H7
23	840,00	830,00	827,00	828,00	831,25	13			A8-H8
24	784,00	810,00	814,00	815,00	805,75	31	2.6.2022	Run1	D7-H7
25	788,00	807,00	800,00	804,00	799,75	19			D9-H9
calculated limits:									
OEG:	883,07	upper intervention limit							
OWG:	865,55	upper warning limit							
X	830,51	Average							
UWG:	795,47	lower warning limit							
UEG:	777,95	lower intervention limit							
Range:	77,82								

Pakastetusta substraatista tehdyt mittaukset

Tehty pakastetusta substraatista								time	15 min					
näyte	punn g	liuotus ml	laim	abs	abs bl	erotus	enz kons laimennetus	pelkistäviä	päitä µmol	Aktivisuus				
								red. µmol/	U/g	avg	SD all	RSD all	RSD dilutid	RSD reaction
vertailu	1	1	900	0,5415	0,1299	0,4116	0,00111111	12,6743	760	759	10,59	1,4 %	0,4 %	0,2 %
vertailu	1	1	900	0,5432	0,1304	0,4128	0,00111111	12,7063	762					
vertailu	1	1	900	0,5476	0,1303	0,4173	0,00111111	12,8262	770					
vertailu	1	1	900	0,5325	0,1309	0,4016	0,00111111	12,4076	744					
vertailu	1	1	900	0,5428	0,1310	0,4118	0,00111111	12,6796	761	791	30,37	3,8 %	3,8 %	1,7 %
vertailu	1	1	900	0,5549	0,1317	0,4232	0,00111111	12,9836	779					
vertailu	1	1	900	0,5866	0,1301	0,4565	0,00111111	13,8716	832					
vertailu	1	1	900	0,5636	0,1314	0,4322	0,00111111	13,2236	793					
vertailu	1	1	900	0,5743	0,1299	0,4444	0,00111111	13,5489	813	805	13,78	1,7 %	0,4 %	1,8 %
vertailu	1	1	900	0,5629	0,1314	0,4315	0,00111111	13,2049	792					
vertailu	1	1	900	0,5641	0,1311	0,4330	0,00111111	13,2449	795					
vertailu	1	1	900	0,5812	0,1321	0,4491	0,00111111	13,6742	820					
vertailu	1	1	900	0,5542	0,1312	0,4230	0,00111111	12,9782	779	778	991,45	127,4 %	88,9 %	1,1 %
vertailu	1	1	900	0,5626	0,1323	0,4303	0,00111111	13,1729	790					
vertailu	1	1	900	0,5470	0,1318	0,4152	0,00111111	12,7703	766					
1231	0,2646	25	35	0,5372	0,1312	0,4060	0,00030240	12,5249	2761					
1231	0,2599	25	35	0,5294	0,1302	0,3992	0,00029703	12,3436	2770	2788	52,69	1,9 %	1,6 %	0,4 %
1231	0,259	25	35	0,5268	0,1318	0,3950	0,00029600	12,2316	2755					
1231	0,2542	25	35	0,5232	0,1323	0,3909	0,00029051	12,1223	2782					
1231	0,2565	25	35	0,5425	0,1326	0,4099	0,00029314	12,6289	2872					
1231	0,2657	25	35	0,5459	0,1327	0,4132	0,00030366	12,7169	2792	2764	53,92	2,0 %	2,3 %	0,8 %
1231	0,2546	25	35	0,5315	0,1330	0,3985	0,00029097	12,3249	2824					
1231	0,2575	25	35	0,5209	0,1322	0,3887	0,00029429	12,0636	2733					
1231	0,2568	25	35	0,5155	0,1325	0,3830	0,00029349	11,9116	2706					
1231	0,2568	25	35	0,5327	0,1302	0,4025	0,00029349	12,4316	2824	2752	67,73	2,5 %	1,2 %	2,4 %
1231	0,2548	25	35	0,5161	0,1328	0,3833	0,00029120	11,9196	2729					
1231	0,2527	25	35	0,5210	0,1320	0,3890	0,00028880	12,0716	2787					
1231	0,257	25	35	0,5091	0,1318	0,3773	0,00029371	11,7596	2669					
1231	0,253	25	35	0,5158	0,1331	0,3827	0,00028914	11,9036	2745	2792	67,48	2,4 %	#AKO/0!	2,4 %
1231	0,2537	25	35	0,5329	0,1334	0,3995	0,00028994	12,3516	2840					

näyte		laim	abs ero	U/g	stdev	RSD
vertailu		900	0,4108	759	11	1,4 %
vertailu		900	0,4309	791	30	3,8 %
vertailu		900	0,4395	805	14	1,7 %
vertailu		900	0,4186	778	991	127,4 %
1231		35	0,3987	2788	53	1,9 %
1231		35	0,3958	2764	54	2,0 %
1231		35	0,3880	2752	68	2,5 %
1231		35	0,3911	2792	67	2,4 %

Analyyysi	U/g	ero %	
eka 1.9.2022	3399	22 %	
drift testi 1	3029	25 %	Saksan tulc ero, suhteellinen
drift testi 3	2759	28 %	3415
linear. 3.1.2023	3581	21 %	2863 27 %