

Niko Kristian Bragge

Nestekromatografisen analyysimenetelmän kehitys etikka-, glykoli-, maito-, muurahais-, propioni- ja sitruunahapon samanaikaiselle määrittelykselle

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

13.5.2013

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Niko Kristian Bragge Nestekromatografisen analyysimenetelmän kehitys etikka-, glykoli-, maito-, muurahais-, propioni- ja sitruunahapon samanaikaiselle määrittelykselle 29 sivua + 6 liitettä 13.5.2013
Tutkinto	Laboratorioanalyytikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioala
Ohjaajat	Sr. Research scientist Jukka Hietala Yliopettaja Pekka Lehtonen
<p>Tämä opinnäytetyö toteutettiin Kemira Oyj:n ChemSolutions-osastolle Espoon R&D-keskuksessa, joka sijaitsee Espoon Suomenojalla.</p> <p>Työn tavoitteena oli selvittää, voidaanko kehittää perinteiselle nestekromatografialaitteistolle analyysimenetelmä etikka-, glykoli-, maito-, muurahais-, propioni- ja sitruunahapon samanaikaista määrittelyä varten.</p> <p>Työssä saatiin kerättyä tarpeeksi tietoa pohjamenetelmän kehitykseen, jossa ei otettu huomioon erilaisista näytematriiseista tulevia virheitä tai samankaltaisten yhdisteiden aiheuttamaa virhettä mitattavissa signaaleissa. Hapot erotettiin 16,5 min ajoajalla käyttäen 2 ml/l H₃PO₄-liuosta sekä asetonitriligradienttia käänteisfaasikolonilla. Yhdisteet mitattiin 210,0 nm:n aallonpituudella käyttäen diodirividetektoria.</p> <p>Menetelmälle todettiin mittaus- ja toteamisrajoiksi 26 mg/l ja 23 mg/l. Lineaarinen alue hapoille oli 50 mg/l - 1000 mg/l ja 1000 mg/l - 5000 mg/l. Menetelmä osoittautui toistettavaksi lyhyellä aikavälillä yhden henkilön toimesta.</p> <p>Pohjamenetelmän selvityksestä jäivät puuttumaan saantokokeet, todellisten näytteiden mittaukset sekä selvitys esikäsittelymenetelmien vaikutuksesta mittaustuloksiin. Menetelmä soveltuu tutkimusnäytteisiin, joihin on käytetty puhdasaineita, sekä näytteisiin, jotka eivät sisällä merkittäviä pitoisuuksia muita yhdisteitä.</p>	
Avainsanat	etikkahappo, glykolihappo, maitohappo, muurahaishappo, propionihappo, sitruunahappo, nestekromatografia, käänteisfaasi

Author(s) Title	Niko Kristian Bragge Liquid chromatographic method development for analysis of acetic, citric, formic, glycolic, lactic and propionic acid
Number of Pages Date	29 pages + 6 appendices 13 May 2013
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructor(s)	Jukka Hietala, Sr. Research scientist Pekka Lehtonen, Principal Lecturer
<p>This thesis was conducted for Kemira Oyj ChemSolutions-segment in Kemira Espoo R&D center located in Suomenoja, Espoo.</p> <p>The objective was to find out if it was possible to use traditional liquid chromatography to simultaneously analyze acetic, citric, formic, glycolic, lactic and propionic acid from one sample in one run.</p> <p>Enough data was collected to make a base method that does not take in account errors caused by a different sample matrix or error caused by similar compounds during measurement. The acids were separated with a 16,5 minute run time using 2 ml/l H₃PO₄-solution and acetonitrile as solvents with a reverse-phased column. The acids were measured with a diode-array detector using 210,0 nm wavelength.</p> <p>The limit of detection and measurement were measured to be 23 mg/l and 26 mg/l respectively. The linear area of the method ranges from 50 mg/l to 1000 mg/l and from 1000 mg/l to 5000 mg/l. The method proved repeatable in a short timeframe when conducted by one person.</p> <p>Several measurements such as recovery tests, analysis of actual samples and the effect of sample pre-treatment were not conducted during method development. The method works for samples made from laboratory chemicals and samples that do not have significant quantities of other compounds.</p>	
Keywords	Acetic acid, citric acid, formic acid, glycolic acid, lactic acid, propionic acid, liquid chromatography, reverse-phase

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Teoria	2
2.1	Nestekromatografia-menetelmä ja -laitteisto	2
2.2	Käytetyt kromatografiset parametrit	2
2.3	Analyyttien fysikaaliset ja kemialliset tiedot	3
2.4	Validointimenetelmät	5
3	Kemikaalit, laitteisto ja turvallisuus	6
3.1	Käytetyt reagenssit ja laitteet	6
3.2	Turvallisuus ja työskentelymenetelmät	8
4	Liuosten valmistus	9
4.1	Valmistustapa	9
4.2	Lähtömenetelmän sovelluksessa käytetyt liuokset ja laimennokset	9
4.3	Kuutta happoa sisältävät kantaliuokset	11
4.4	Liuosten laimennokset	12
5	Menetelmän kehitys	15
5.1	Lähtömenetelmän soveltaminen eri hapoille	15
5.2	Liuottimien vaikutus yhdisteiden erottumiseen	16
5.3	Gradientin haku	17
5.4	Menetelmän kalibrointi	18
6	Menetelmän toimivuus	21
6.1	Toimivuuden selvittämisen toteutus	21
6.2	Resoluutio	21
6.3	Toteamis- ja määritysraja	21
6.4	Lineaarisuus	22
6.5	Toistettavuus	23
7	Lopullinen analyysimenetelmä	25
8	Yhteenveto	28
	Lähteet	29

Liitteet

Liite 1. Menetelmän alustava kalibrointi

Liite 2. Menetelmän lopullinen kalibrointi

Liite 3. Resoluutio

Liite 4. Toteamis- ja määrittäysraja

Liite 5. Lineaarisuus

Liite 6. Toistettavuus

1 Johdanto

Tämä opinnäytetyö toteutettiin Kemira Oyj:n Espoon R&D-keskuksessa ChemSolutions-osastolle kesän 2012 ja syksyn 2012 aikana. Kemira on kansainvälinen vesikemiaan keskittyvä yhtiö, jonka keskeisiä asiakkaita ovat runsaasti vettä kuluttavat teollisuudenalat. Kemira tarjoaa veden hallintaratkaisuja, joilla lisätään asiakkaiden energia-, vesi- ja raaka-ainetehokkuutta. ChemSolutions on asiakastarvelähtöinen tutkimusosasto, jonka tarkoituksena on palvella asiakkaitaan rehu-, ruoka-, kemikaali- ja lääketieteellisyydessä valmistamalla kemikaaleja ja kehittämällä asiakaskohtaisia sovelluksia asiakkaiden eri tarpeisiin. Lokakuussa 2012 yrityksessä tapahtuneiden organisaatiomuutosten takia menetelmä päättyi muiden osastojen käyttöön ChemSolutions-osaston sijaan. [1.]

Tarve kehittää menetelmä etikka-, glykoli-, maito-, muurahais-, propioni- ja sitruunahapon yhtäaikaiselle analysoinnille tulee tuotantoprosesseista saatavista näytteistä ja tutkimusluonteisista kokeista, joissa näitä happoja esiintyy vaihtelevissa pitoisuuksissa erilaatuisissa neste- ja kiintoainematriiseissa. Menetelmä vähentäisi rasiitusta analytiikan osastolta ja nopeuttaisi ChemSolutionsin tutkimusprojektien etenemistä. Menetelmää sovellettaisiin kvantitatiivisissa määrityksissä, joissa näyte punnitaan ja liuotetaan vesipohjaiseen eluettiin mahdollisimman vähällä esikäsitteilyllä ja analysoitaisiin nestekromatografi-diodirividetektorilaitteistolla (LC-DAD). Tällä yhtäaikaisella ajolla voitaisiin todeta tiettyjen happojen läsnäolo näytteessä ja saada selville niiden pitoisuus lyhyessä ajassa. Menetelmä toimii pohjana tuoteseurannassa ja laadunvarmistuksessa käytettäviin analyyseihin.

Monilla laite- ja tarvikevalmistajilla on tarjota valmiita menetelmiä heikkojen happojen yhtäaikaiseen analysointiin ja tarjolla on spesifisiä nestekromatografiakolonneja, jotka on kehitetty varta vasten näiden yhdisteiden kvalitatiivista ja kvantitatiivista analytiikkaa varten. Opinnäytetyötä tehdessä käytössä oli perinteisiä vesipohjaisille ja orgaanisille eluenteille sopivia C18-kolonneja, joille menetelmä toteutettiin.

2 Teoria

2.1 Nestekromatografia-menetelmä ja -laitteisto

Nestekromatografia on kromatografian laji, jossa liikkuvana faasina on neste ja stationäärifaasina kiinteä aine. Menetelmä käyttää käänteisfaasikromatografiaa, jossa käytössä olleiden kolonnien stationäärifaasina on polaariton oktadekyylihiiliketju (C_{18}). Liikkuvana faasina toimii polaariton tai heikosti polaarinen neste. Analyytit kiinnittyvät stationäärifaasiin ja irtautuvat nestevirran sekä korkean paineen vaikutuksesta, liikkuen molempien faasien välillä fysikaalisten ominaisuuksiensa perusteella aiheuttaen yhdisteiden erottumisen toisistaan. Yhdisteet saapuvat detektorille eri ajankohtina, jolloin yhdisteet voidaan tunnistaa niiden retentioajan avulla ja kvantitoida signaalin voimakkuuden perusteella. [2, s. 556, 563, 575-580.]

Menetelmän kehityksessä käytettiin isokraattista sekä gradienttieluutiota yhdisteiden erottumisen selvittämiseen. Isokraattisessa eluutiossa nestevirran koostumus ei muutu ajoaikana eli pysyy samankaltaisena alusta loppuun. Gradienttieluutiossa nestevirran koostumus muuttuu ajoaikana nostaten yhden tai useamman eluentin pitoisuutta, mikä laskee muun tai muiden eluenttien prosenttiosuutta nestevirrasta. Isokraattinen eluutio on yksinkertaisempi ja helpompi toteuttaa, mutta gradienttieluutio antaa mahdollisuuden kontrolloida sekä hienosäätää analyyttien saapumista detektorille suuremmalla tarkkuudella useamman parametrin ansiosta. [2, s. 565.]

Menetelmää kehittäessä detektorina käytettiin perinteistä UV/Vis-alueella toimivaa diodirividetektoria. Nestevirran saapuessa detektorille yhdisteet absorboivat detektorista tulevaa valoa ja saatava signaali on suhteessa nestevirrassa olevan yhdisteen pitoisuuteen. [3, s. 166.]

2.2 Käytetyt kromatografiset parametrit

Kromatografisissa menetelmissä yhdisteiden saapuessa detektorille ne antavat signaalin, joka havaitaan jonkin suuruusena piikkinä tai pinta-alana. Kromatografisessa analyysissä saadaan kromatogrammi, josta nähdään missä järjestyksessä yhdisteet ovat saapuneet detektorille ja kuinka suuren signaalin ne ovat antaneet.

Retentioajalla (t_r) kuvataan aikaa, joka yhdisteellä kestää päästä mittauksen alusta detektorille. Viiveajalla (t_M) kuvataan aikaa, mikä tässä tapauksessa nestevirralla kestää kulkea menetelmän alusta detektorille ja tämän avulla voidaan laskea yhdisteille todellinen retentioaika (t'_r) kaavalla $t'_r = t_r - t_M$.

Resoluutiolla kuvataan kahden piikin erottumista toisistaan ja sen avulla voidaan saada numeerinen arvo sille, kuinka hyvin piikit ovat erottuneet toisistaan. Resoluutio voidaan laskea kaavalla $R = \frac{1,177(t_2 - t_1)}{(W_2 + W_1)}$, missä t_2 ja t_1 ovat kahden eri yhdisteen retentioajat, W_2 ja W_1 piikkien leveydet piikin keskikohdasta mitattuna. Yhdisteiden resoluution ollessa 1,0 piikit ovat 3 % päällekkäin, joten resoluution tulisi olla yli 1,0, jotta piikit erottuisivat toisistaan kunnolla. [3, s. 142-147; 4, s. 508-512.]

2.3 Analyyttien fysikaaliset ja kemialliset tiedot

Etikka-, glykoli-, maito-, muurahais-, propioni- ja sitruunahappo ovat rakenteeltaan yksinkertaisia heikkoja orgaanisia happoja, ja niitä esiintyy luonnossa biologisessa aineenvaihdunnassa ja monissa kemiallisissa käymisprosesseissa pää- sekä sivutuotteina.

Analyyteillä olevat fysikaaliset vakiot vaihtelevat happovakion sekä muiden ominaisuuksien osalta, kuten taulukosta 1 käy ilmi. Analyytit pysyvät stabiileina 21 °C:n lämpötilassa eli huoneenlämmössä ja oktanoli-vesi-jakaantumiskvotientin ($\log P_{ow}$) mukaan kaikki paitsi propionihappo liukenevat enemmän veteen kuin oktanoliin.

Taulukko 1. Happojen fysikaaliset vakiot

Happo	M g/mol	pKa -log(K _a)	log P _{ow}	MP °C	BP °C
Etikkahappo	60,05	4,76	-0,17	16,6	117,9
Glykolihappo	76,05	3,83	-1,11	78-80	100
Maitohappo	90,08	3,86	-0,27	16,8	122 ¹⁵ mmHg
Muurahaishappo	46,03	3,75	-0,54	8,4	100,8
Propionihappo	74,08	4,88	0,33	-21,5	141,1
Sitruunahappo	192,12	2,79	-1,64	153,0	Hajoaa
MP = sulamispiste BP = kiehumispiste M = molekyyli massa					

Jakaantumiskvatio antaa suuntaa mahdollisen orgaanisen eluutin käytölle menetelmässä, koska negatiiviset logaritmiarvot ilmaisevat konsentraation olevan suurempi vedessä kuin oktanolissa jakaantumiskvatioon kaavan mukaisesti.

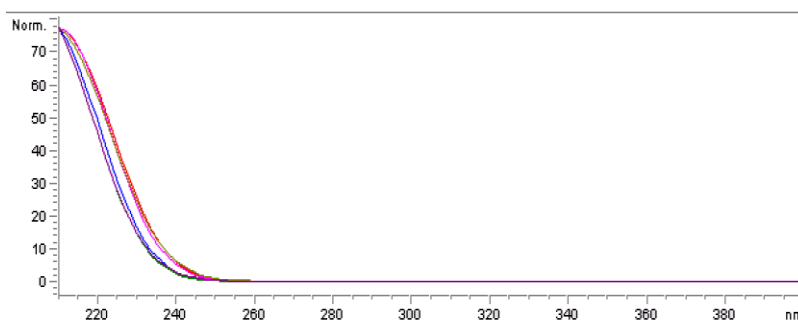
$$\log P_{o/w} = \log \frac{c(\text{oktanolissa})}{c(\text{vedessä})} \quad (1)$$

Jakaantumiskvatio ei kuitenkaan takaa yhdisteen käyttäytyvän samalla tavalla muissa orgaanisissa liuottimissa, mutta lukuarvo antaa suuntaa yhdisteen liukoisuudesta orgaanisen liuottimen ja veden välillä.

Happovakion logaritminen arvo (pKa) perusteella arvioitiin käytettävän vesipohjaisen eluutin pH-arvoa. Happovakio esittää yhdisteen pitoisuuksien jakautumista happomuodon ja konjugoituneen emäksen välillä ja logaritminen arvo on verrattavissa pH-arvoon, sillä happovakio ottaa protonien määrän huomioon.

Matalin happovakion arvo on sitruunahapolla. Vesipohjaisen eluutin pH-arvon kannattaa näiden arvojen perusteella olla alle 2,8, jotta voidaan taata kaikkien happojen olevan samassa muodossa.

Yhteisenä tekijänä näille hapoille on niiden UV-absorptio 210 nm aallonpituudella. Happojen spektrit eivät suuresti eroa toisistaan 210 – 400 nm aallonpituudella kuten kuviossa 1 nähdään. Hapoilla ei ole minkäänlaista absorptiota 250 nm jälkeen, joten yhdisteiden optimiabsorptio on ennen 220 nm aallonpituutta.



Kuvio 1. Analyttien mitatut UV-spektrit

Analysoitavat hapot ovat vesiliukoisia ja liukenevat myös orgaanisiin liuottimiin kuten metanoliin ja asetonitriliin. [4; 5.]

2.4 Validointimenetelmät

Menetelmänkehityksessä käytettiin validointimenetelmiä, validointiparametreja sekä kromatografisia suureita menetelmän toimivuuden ja luotettavuuden testaamiseksi. Menetelmän toimivuutta selvitettiin mittaamalla lineaarisuuksia, toteamisrajoja ja määritysrajoja. Menetelmän antamien tulosten luotettavuutta selvitettiin toistettavuudella sekä erotustekijöitä ja resoluutioita laskemalla. [3, s. 11, 142-148.]

Lineaarisuus kuvaa kvantitatiivisen menetelmän kykyä antaa lineaarinen korrelaatio analyysin pitoisuuden ja saadun tuloksen välillä määritetyllä mittausalueella. Jos yhdisteen pitoisuuden kasvaessa mittalaitteen antama signaali kasvaa tietyssä suhteessa samaa tahtia, menetelmä todetaan lineaariseksi mitattavalla alueella. [3, s. 13.]

Toteamisraja eli detektoriraja (limit of detection, LOD) kuvaa pienintä pitoisuutta, joka voidaan havaita luotettavasti. Raja todetaan mittaamalla useaan otteeseen nollanäyte, joka sisältää pienimmän hyväksyttävän pitoisuuden määritettävää yhdistettä tai yhdisteitä. Toteamisraja lasketaan nollanäytteestä saatavien tietojen perusteella kaavalla $Toteamisraja = nollanäyttemittausten\ keskiarvo \pm 3 * keskihajonta$. [3, s. 13.]

Määritysrajalla (Limit of quantitation, LOQ) kuvataan pienintä mitattavaa pitoisuutta, jonka tulos voidaan todeta tietyllä tasolla luotettavaksi. Raja voidaan todeta mittaamalla nollanäytettä useampaan otteeseen kuten toteamisrajaa määritettäessä. Määritysraja lasketaan kaavalla $Määritysraja = nollanäyttemittausten\ keskiarvo \pm 10 * keskihajonta$. Vaikka yhdiste voidaan havaita määritysrajan alapuolelta, saatavaa tulosta ei voida pitää luotettavana vaan määritysrajan alapuolella olevana. [3, s. 13.]

Toistettavuudella tarkoitetaan menetelmän tulosten pysyvyyttä mittausolosuhteiden pysyessä samana. Jos tietyllä aikavälillä mitattuna samasta näytteestä tulee sama tulos olosuhteita muuttamatta, menetelmän toistettavuus on hyvä tällä aikavälillä. Toistettavuutta voidaan määrittää mittaamalla sama näyte samoissa olosuhteissa useampana päivänä ja vertaamalla saatuja tuloksia toisiinsa tilastollisilla menetelmillä tai näytteen ollessa tunnettu standardi, vertaamalla standardinäytteen arvoon. [3, s. 12.]

3 Kemikaalit, laitteisto ja turvallisuus

3.1 Käytetyt reagenssit ja laitteet

Menetelmää kehittäessä käytettiin useita eri reagensseja ja liuottimia. Laitteissa käytetyn metanolin ja asetonitriliin sarjanumeroita, valmistajaa sekä tuotenumeroa ei ollut otettu ylös menetelmää kehittäessä. Liuottimet olivat HPLC-laatuksia 99,9 %:n puhtaudella. Taulukossa 2 esitetyistä kemikaaleista Merckin valmistamaa glykoliyhappoa ja VWR:n valmistamaa maitohappoa käytettiin vasta viimeisen kantaliuoksen valmistukseen.











Taulukko 2. Käytetyt reagenssit ja tuotetiedot

Kemikaali	Valmistaja	Cas	Eränumero	Tuotenumero	Ilmoitettu puhtaus
Propionihappo	Sigma-aldrich	79-09-4	0001392796	81910-1I (100941792)	99,5 %
Sitruunahappo, monohydraatti.	VWR	77-92-9	10C11034	20276.292	100,1 %
Glykoliyhappo	VWR	79-14-1	S4216404 610	8.04104.0100	99,0 %
L(+)-maitohappo	Acros organics	79-33-4	A0229937	189870010	90,0 %
DL-maitohappo	VWR	50-21-5	11G290011	101384Q	89,8 %
Etikkahappo	VWR	64-19-7	11h220513	20104.334	99,9 %
Glykoliyhappo	Merck	79-14-1	L012046906 221	1.04106.0100	99,5 %
Muurahaishappo	Fluka analytical	64-18-6	S2BA2240	-	98,0 %
Fosforihappo	Merck	7664-38-2	K41751852	1.00552.0256	85,0 %
Metanoli	-	67-56-1	-	-	99,9%
Asetonitrili	-	75-05-8	-	-	99,9%

Käytettyjen maitohappojen puhtaus on alle 90 %, joten menetelmää toteuttaessa niiden puhtaus tarkistettiin vertaamalla reagensseja erääseen Kemiran tuotteeseen, joka sisälsi vain maitohappoa ja etikkahappoa.

Taulukko 3.

Käytettyjen reagenssien laadut ja turvallisuusmerkinnät [6.]

Kemikaali	Ilmoitettu laatu	Turvallisuusmerkinnät [6]	R-lausekkeet [6]	S-lausekkeet [6]
Propionihappo	-		10-34	23-36-45
Sitruunahappo, monohydraatti.	Normapur		36	26
Glykoli-happo	Synthesis		22-34	26-36/37/39-45
L(+)-maitohappo	-		34-41	26-39
DL-maitohappo	Analar		38-41	26-39
Etikkahappo	-		10-35	23-26-45
Muurahaishappo	Analysis		10-35	23-26-45
Fosforihappo	Suprapur		34	26-45
Metanoli	HPLC		11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45
Asetonitrili	HPLC		11-20/21/22-36	16-36/37

Kemikaalien käsittelyyn liittyvät turvallisuusmerkinnät ja kemikaalien laatu on esitetty taulukossa 3. Suurin osa kemikaaleista on syövyttäviä, haitallisia tai helposti syttyviä, jonka takia turvallisuuteen kiinnitettiin enemmän huomiota.

Laitteistona opinnäytetyössä käytettiin perinteisiä laboratoriotyövälineitä vaa'osta automaattipipetteihin ja noudatettiin Kemiran sisäisiä ohjeita niiden käytössä. Laitteina olivat nestekromatografit, joilla menetelmä kehitettiin. Sarjanumeroita tai muita tunnistetietoja ei otettu ylös niistä kromatografien osista, joita ei vaihdettu.

Käytetyt nestekromatografit koostuivat pumpusta, degaserista, autosampleri-injektori-yhdistelmästä, kolonnista ja diodirividetektorista. Opinnäytetyössä käytettiin kahta erilaista kolonnia, Atlantis C18 (250 x 4,6 mm) sekä Phenomenex Synergi 4u Hydro-RP 80 A (250 x 4,6 mm).

3.2 Turvallisuus ja työskentelymenetelmät

Opinnäytetyötä toteuttaessa noudatettiin yleistä turvallisuutta tukevia työskentelytapoja sekä Kemira Oyj:n sisäisiä laboratoriotyöskentelyohjeita.

Suurin osa kemikaaleista on syövyttäviä happoja ja orgaanisia liuottimia, joten niiden käsittelyssä ja työn suunnittelussa otettiin huomioon vaadittava turvallisuus ja työskentely suoritettiin vaadittavien ohjeiden mukaisesti. Työskentely väkevien kemikaalien kanssa suoritettiin vetokaapissa.

4 Liuosten valmistus

4.1 Valmistustapa

Liuokset valmistettiin punnitsemalla reagensseja 4 desimaalin tarkkuuden omaavilla vaa'oilla mittapulloihin, jotka lopulta täytettiin vedellä merkkiviivaan asti. Liuokset laimennettiin aina pienempiin mittapulloihin kalibrointia tai muita mittauksia varten käyttäen automaattipipettejä. Nestekromatografiseen analyysiin tarkoitetut liuokset suodatettiin kertakäyttöruiskujen ja 0,45 µm:n ruiskusuodattimien avulla nestekromatografian autosamplerille sopiviin näytepulloihin, jotka suljettiin tiivistä sille tarkoitetulla työkalulla.

4.2 Lähtömenetelmän sovelluksessa käytetyt liuokset ja laimennokset

Lähtömenetelmän kehityksen alussa valmistettiin glykoli happoliuos, maitohappoliuos sekä glykoli-, muurahaish- ja propionihappoa sisältävä liuos. Glykoli happoliuos tehtiin punnitsemalla 0,5892 g 50 ml:n mittapulloon ja maitohappoliuos punnitsemalla 0,7510 g 50 ml:n mittapulloon. Kolmen hapon liuos valmistettiin pipetoimalla 1 ml edellä mainittua glykoli happoliuosta 10 ml:n mittapulloon. Mittapulloon lisättiin 5 ml valmista standardia, joka sisälsi 1,527 mg/ml muurahaishappoa ja 1,033 mg/ml propionihappoa. Mittapullot täytettiin merkkiin milli-Q-vedellä. Glykoli happoliuoksen pitoisuus oli 11,784 mg/ml ja maitohappoliuoksen 15,02 mg/ml. Kolmen hapon seos sisälsi 1,1784 mg/ml glykoli happoa, 0,7635 mg/ml muurahaishappoa ja 0,5165 mg/ml propionihappoa.

Taulukko 4. Puhdasaineliuosten pitoisuudet

Reagenssi	Massa (g)	Pitoisuus (mg/ml)
Etikkahappo	5,1460	102,92
Glykoli happo (99,0%)	5,0913	101,83
L(+)-maitohappo	5,4995	109,99
Muurahaishappo	5,2109	104,22
Propionihappo	5,1810	103,62
Sitruunahappo, monohydraatti	5,2452	104,90

Puhdasaineliuokset valmistettiin punnitsemalla reagensseja yksittäisiin 50 ml:n mittapulloihin taulukossa 4 ilmoitetut määrät. Puhdasaineliuksille laskettiin pitoisuus ja liuokset merkittiin. Puhdasaineliuokset säilöttiin niiden väkevyyden takia muita projekteja ja analyysejä varten asianmukaisin merkinnöin.

Alustavaa menetelmää varten valmistettiin kaksi kantaliuosta, jotka sisälsivät etikka-, glykoli-, muurahais- ja propionihappoa. Liuokset valmistettiin punnitsemalla reagensseja taulukossa ilmoitetut määrät 100 ml:n mittapulloihin yksi reagenssi kerrallaan. Vaaka taarattiin aina lisäysten välissä.

Taulukko 5. Neljä happoa sisältävät kantaliuokset

Ensimmäinen kantaliuos		
Reagenssi	Punnitus (g)	Pitoisuus (mg/ml)
Etikkahappo	0,2329 g	2,329 mg/ml
Glykoli (99,0 %)	0,1114 g	1,114 mg/ml
Muurahaishappo	0,1226 g	1,226 mg/ml
Propionihappo	0,1022 g	1,022 mg/ml
Toinen kantaliuos		
Reagenssi	Punnitus (g)	Pitoisuus (mg/ml)
Etikkahappo	0,1299 g	1,299 mg/ml
Glykoli (99,0 %)	0,1072 g	1,072 mg/ml
Muurahaishappo	0,1082 g	1,082 mg/ml
Propionihappo	0,1235 g	1,235 mg/ml

Ensimmäisestä kantaliuksesta valmistettiin laimennokset kalibrointia varten, jotta saatua menetelmää voidaan hyödyntää muissa projekteissa ja analyyseissä.

Taulukko 6. Ensimmäisen kantaliuoksen laimennosten pipetointimäärät ja pitoisuudet

Laimennos	Pipetoitu määrä (ml)	Lopputilavuus (ml)	Happopitoisuus (mg/ml)			
			Etikka	Glykoli	Muurahais	Propioni
1	1,25	25	0,1165	0,0557	0,0613	0,0511
2	2,50	25	0,2329	0,1140	0,1226	0,1022
3	5,00	25	0,4658	0,2228	0,2452	0,2044
4	10,0	20	1,1645	0,5570	0,6130	0,5110

Laimennokset valmistettiin pipetoimalla ensimmäistä kantaliuosta mittapulloihin, jotka täytettiin merkkiviivaan asti milli-Q-vedellä. Pipetointimäärät ja saadut pitoisuudet on esitetty taulukossa 6. Laimennokset käsiteltiin kappaleessa 4.1 esitetyllä tavalla.

4.3 Kuutta happoa sisältävät kantaliuokset

Menetelmänkehityksessä ja validointimittauksissa käytettiin useita eri pitoisuuksia sisältäviä liuoksia. Liuokset valmistettiin eri aikoihin mittauksesta riippuen. Kantaliuokset numeroitiin niiden valmistusjärjestyksen perusteella ja myöhemmin tässä opinnäytetyössä kantaliuoksiin viitataan niiden numeron tai tunnuksen perusteella.

Ensimmäinen kantaliuos valmistettiin kehitystyön alussa tehdyistä 100 mg/ml puhdasaineliuoksista. Puhdasaineliuoksia pipetoitiin 5 ml per liuos 50 ml:n mittapulloon automaattipipetillä, jonka kärki vaihdettiin aina pipetoinnin jälkeen. Kantaliuoksen pitoisuudeksi tuli noin 10 mg/ml per happo.

Toinen kantaliuos valmistettiin punnitsemalla happoja 100 ml mittapulloon. Reagenssit punnittiin analyysi-vaa'alla yksi kerrallaan mittapulloon ja vaaka taarattiin aina lisäyksen jälkeen.

Mittapulloon lisättiin 0,2536 g etikkahappoa, 0,2261 g muurahaishappoa, 0,2315 g propionihappoa, 0,2916 g sitruunahappoa, 0,3229 g L(+)-maitohappoa ja 0,3414 g 99,0% glykoli-happoa. Mittapullo täytettiin milli-Q-vedellä merkkiin asti.

Kolmas kantaliuos valmistettiin punnitsemalla reagensseja mahdollisimman pieniä määriä 100 ml:n mittapulloon. Vaaka taarattiin aina lisäyksen jälkeen. Mittapulloon punnittiin 0,0834 g etikkahappoa, 0,0487 g muurahaishappoa, 0,0510 g propionihappoa, 0,0834 g sitruunahappoa, 0,0930 g L(+)-maitohappoa ja 0,0227 g 99,0 % glykoli-happoa. Mittapullo täytettiin milli-Q-vedellä merkkiviivaan asti.

Viimeinen kantaliuos, joka nimettiin kantaliuos F:ksi, valmistettiin punnitsemalla reagensseja 100 ml:n mittapulloon mahdollisimman tarkasti. Vaaka taarattiin aina reagenssin lisäyksen jälkeen ja vaa'an annettiin asettua. Mittapulloon punnittiin 1,0557 g etikkahappoa, 1,0509 g 99,5 % glykoli-happoa, 1,2152 g DL-maitohappoa, 1,1141 g muurahaishappoa, 1,0376 g propionihappoa ja 1,0505 g sitruunahappoa. Mittapullo täytettiin milli-Q-vedellä merkkiin asti ja pulloon merkittiin kemikaalipitoisuudet. Maitohapon pitoisuus suhteutettiin sille ilmoitettuun 89,9 %:n puhtauteen.

Taulukko 7. Kantaliuosten lopulliset happopitoisuudet kolmen desimaalin tarkkuudella

Happopitoisuus (mg/ml)	Kantaliuos 1	Kantaliuos 2	Kantaliuos 3	Kantaliuos F
Etikkahappo	10,292	2,536	0,834	10,557
Glykolinahappo	10,183	3,414	0,227	10,509
Maitohappo	9,899	3,229	0,930	10,912
Muurahaishappo	10,422	2,261	0,487	11,141
Propionihappo	10,362	2,315	0,510	10,376
Sitruunahappo	10,490	2,916	0,834	10,505

Kantaliuosten pitoisuudet on kerätty koosteena taulukkoon 7. Vain kantaliuoksissa 1 ja F on otettu käytetyn maitohapon puhtaus huomioon.

4.4 Liuosten laimennokset

Valmistetuista kantaliuoksista tehtiin useita eri laimennoksia tarpeiden mukaan. Laimennokset valmistettiin pipetoimalla automaattipipetillä tietty millilitramäärä mittapulloon, joka laimennettiin merkkiin milli-Q-vedellä.

Kantaliuos 2:sta valmistettiin laimennoksia kalibrointi-, toteamisraja- ja määritysrajamittauksia varten. Laimennokset valmistettiin pipetoimalla automaattipipetillä 25 ml:n mittapulloihin kantaliuosta taulukossa 8 ilmoitetut määrät. Mittapullot täytettiin merkkiin milli-Q-vedellä. Laimennosten pitoisuus johdettiin seuraavasta kaavasta.

$$q_1 V_1 = q_2 V_2 \rightarrow q_2 = \frac{q_1 V_1}{V_2} \quad (2)$$

Kaavassa q_1 kuvaa kantaliuoksen pitoisuutta (mg/ml), V_1 pipetoitua määrää (ml), q_2 laimennoksen pitoisuutta (mg/ml) ja V_2 laimennoksen kokonaistilavuutta (ml). Esimerkkinä vahvimman laimennoksen etikkahappopitoisuus laskettiin seuraavasti

$$q_2 = \frac{2,536 \frac{mg}{ml} * 15,0 ml}{25,0 ml} = 1,522 \frac{mg}{ml}.$$

Taulukko 8. Kantaliuos 2:n laimennokset

Happojen pitoisuus (mg/ml)	Pipetoitu määrä (ml per 25 ml)							
	0,05 ml	0,1 ml	0,5 ml	1,0 ml	2,0 ml	5,0 ml	10,0 ml	15,0 ml
Etikka	0,005	0,010	0,051	0,101	0,203	0,507	1,014	1,522
Glykoli	0,007	0,014	0,068	0,137	0,273	0,683	1,366	2,048
Maito	0,006	0,013	0,065	0,129	0,258	0,646	1,292	1,937
Muurahais	0,005	0,009	0,045	0,090	0,181	0,452	0,904	1,357
Propioni	0,005	0,009	0,046	0,093	0,185	0,463	0,926	1,389
Sitruuna	0,006	0,012	0,058	0,117	0,233	0,583	1,166	1,750

Kantaliuos F:stä tehtiin laimennokset laskien pitoisuudet kaavassa 2 esitetyllä kaavalla. Laimennokset valmistettiin kalibrointia ja linearisuusmittauksia varten. Linearisuusmittauksia varten tehdyt laimennokset valmistettiin 20 ml:n mittapulloihin, joihin kantaliuosta pipetoitiin taulukossa 9 ilmoitetut määrät. Mittapullot täytettiin milli-Q-vedellä merkkiin asti. 1,0 mg/ml pitoisuuden omaavaa laimennosta käytettiin myös kalibroinnin teossa.

Taulukko 9. Linearisuusmittauksia varten tehtyjen laimennosten pitoisuudet

Happojen pitoisuus (mg/ml)	Pipetoitu määrä (ml per 20 ml)				
	2,0 ml	4,0 ml	6,0 ml	8,0 ml	10,0 ml
Etikka	1,056	2,111	3,167	4,223	5,279
Glykoli	1,051	2,102	3,153	4,204	5,255
Maito	1,091	2,183	3,274	4,365	5,456
Muurahais	1,114	2,228	3,342	4,456	5,571
Propioni	1,038	2,075	3,113	4,150	5,188
Sitruuna	1,051	2,101	3,152	4,202	5,253

Kalibrointia varten valmistetut laimennokset tehtiin pipetoimalla taulukossa 10 ilmoitettu määrä sopivaan mittapulloon, joka täytettiin milli-Q-vedellä merkkiin asti. Kalibrointilaimennokset tehtiin erikokoisiin mittapulloihin käytössä olleiden lasiastioiden vähäisyyden vuoksi. Kalibroinnissa käytettiin lineaarisuusmittaukseen valmistettua 2,0 ml / 20 ml laimennosta suurimpana pisteenä.

Taulukko 10. Kalibrointia varten tehtyjen laimennosten pitoisuudet

Happojen pitoisuus (mg/ml)	Pipetoitu määrä (ml / mittapullon tilavuus)				
	0,5 ml / 10 ml	1,0 ml / 10 ml	1,25 ml / 50 ml	2,5 ml / 50 ml	0,75 ml / 10 ml
Etikka	0,053	0,106	0,264	0,528	0,792
Glykoli	0,053	0,105	0,263	0,526	0,788
Maito	0,055	0,109	0,273	0,546	0,818
Muurahais	0,056	0,111	0,279	0,557	0,836
Propioni	0,052	0,104	0,259	0,519	0,778
Sitruuna	0,053	0,105	0,263	0,525	0,788

Kaikki laimennokset käsiteltiin kappaleen 4.1 mukaisesti. Laimennoksia säilytettiin opinnäytetyön teon ajan.

5 Menetelmän kehitys

5.1 Lähtömenetelmän soveltaminen eri hapoille

Menetelmää lähdettiin kehittämään eteenpäin aikaisemmin käytössä olleesta menetelmästä, joka soveltui etikka-, muurahais- ja propionihapon analysointiin. Menetelmässä käytettiin liuottimina asetonitriliä ja vettä, johon oli lisätty H₂PO₄:ää 1 ml/l suhteella. Menetelmän ajoaika on 17 min, injektio-tilavuus 5 µl, liuotinvirtaus 1 ml/min ja gradientit taulukon 11 mukaiset. Kolonnina tässä metodissa on Atlantis C-18 (250 mm x 4,6 mm) ja käytetty nestekromatografi oli analyttisen osaston vakituksessa käytössä.

Taulukko 11. Lähtömenetelmän gradientti

Aika (min)	Happovesi (%)	Asetonitrili (%)
0.00	100	0
14.00	50	50
14.01	100	0

Menetelmällä ajettiin 1/10-laimennettu glykolihappoliuos ja 1/10-laimennettu maitohappoliuos. Maitohappo hajosi useammaksi piikiksi kyseisellä gradientti- ja liuotinyhdistelmällä, joten se jätettiin pois menetelmästä, kunnes kehitettävä menetelmä siirrettiin eri laitteelle. Menetelmällä ajettiin glykoli-, muurahais- ja propionihappoliuos ja selvitettiin, mihin yhdisteiden piikit asettuvat kromatogrammissa. Glykolihappo ja muurahaihappo ajautuivat päällekkäin, joten gradienttia alettiin muuttaa. Gradientti muutettiin syöttämään pelkkää happovettä aluksi 2 min ennen asetonitriligradientin alkamista ja kokeiltiin 4 min pitoaikaa. Muutokset eivät vaikuttaneet yhdisteiden erottumiseen.

Laitteiston kolonni vaihdettiin Phenomenex Synergi 4u Hydro-RP 80 A:han (mitat 250 mm x 4,6 mm). Liuos ajettiin uudestaan 4 min pitoaikaa käyttäen ja yhdisteet saatiin erottumaan toisistaan. Kokeiltiin 0,5 min, 2 min ja 4 min pitoaikoja ja todettiin 2 min pitoaika parhaimmaksi, koska 0,5 min ajalla pohjaviiva heikkeni ja 4 min ei tuottanut mitään etua.

Menetelmällä ajettiin kaksi eri etikka-, glykoli-, muurahais- ja propionihappokantaliuosta. Yhdisteet erottuivat hyvin ja kantaliuokset olivat verrannollisia, joten laitteelle tehtiin kalibroituisuorat ensimmäisen kantaliuoksen laimennoksista. Tämä menetelmä tuli käyttöön eräässä projektissa alustavien tuloksien saamiseksi. Menetelmän kehitystä jatkettiin eri laitteella.

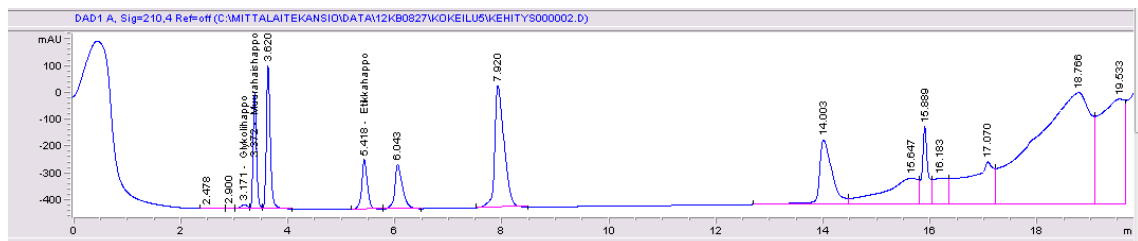
5.2 Liuottimien vaikutus yhdisteiden erottumiseen

Liuottimien vaikutusta yhdisteiden erottumiseen kokeiltiin käyttämällä liuottimina metanolia, asetonitriliä ja fosforihapolla hapotettua vettä erilaisina gradientteina. Fosforihappopitoisuutta vedessä vaihdeltiin ja vesipohjaisten liuottimien pH-arvo mitattiin tiedonkeruuta ja vertailua varten. Mitatut pH-arvot fosforihappo-eluentille on esitetty taulukossa 12.

Taulukko 12. Happovesiliuosten pH-arvot

Fosforihapon osuus liuoksesta	pH-arvo
2,0 ml/l	2,16
2,5 ml/l	1,79
4,0 ml/l	1,61
5,0 ml/l	1,59

Pelkällä fosforihappo-vesi-liuoksella yhdisteet erottuivat hyvin propionihappoa lukuunottamatta. Happovesi-metanoli-gradientilla yhdisteet erottuivat heikosti kuvion 2 mukaisesti ja maitohappo hajosi useammaksi piikiksi. Päädyttiin käyttämään asetonitriligradianttia 2 ml/l happoveden kanssa, koska sillä saatiin yhdisteet erottumaan parhaiten ja nopeiten.

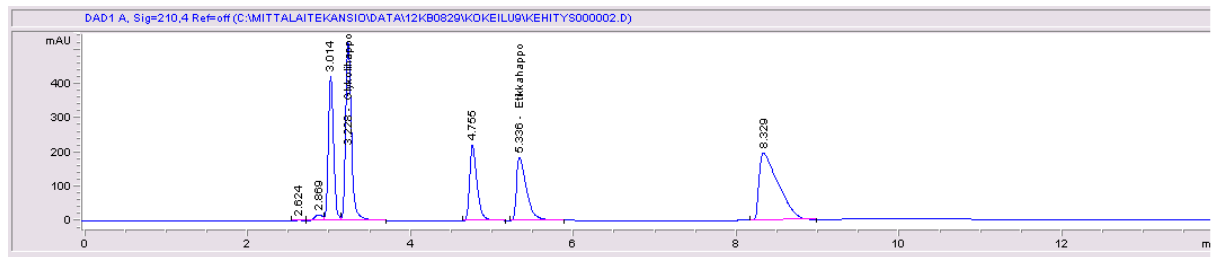


Kuvio 2. Metanoli-happovesi-gradientti

Puhdasaineliuksilla selvitetiin missä järjestyksessä hapot tulevat detektorilla. Glykolihappo saapuu ensimmäisenä ja sitä seuraa muurahaishappo, maitohappo, etikkahappo, sitruunahappo ja viimeisenä saapuu propionihappo.

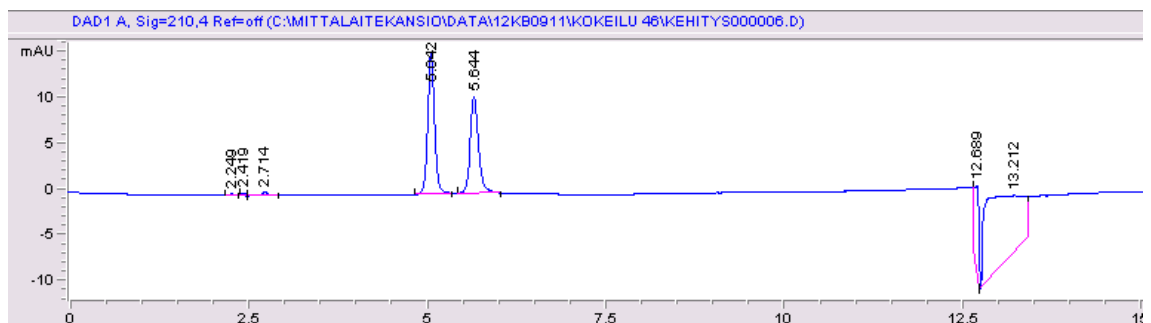
5.3 Gradientin haku

Maitohappo hajosi useammaksi piikiksi asetoniitriligradientilla, mutta pelkällä hapotetulla vedellä maitohappo pysyi yhtenä piikkinä. Propionihappo ei tullut alle 14 minuutissa detektorille pelkällä happovedellä, mikä selviää kuviosta 3.



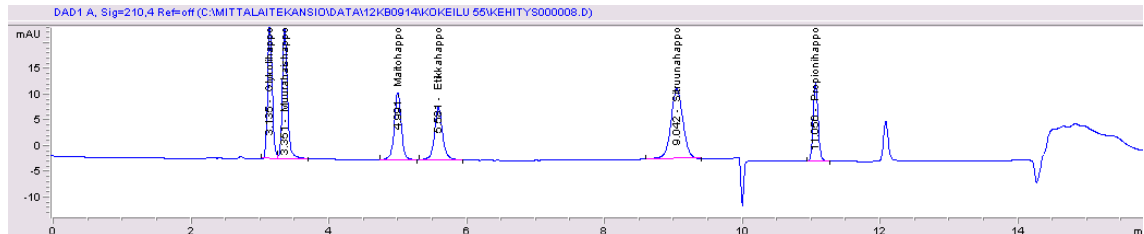
Kuvio 3. Isokraattinen ajo happovedellä

Asetoniitriligradientin alkukohtaa siirrettiin myöhemmäksi ja optimisijainniksi todettiin kohta, jolloin maitohappo oli jo kulkeutunut nestevirran mukana detektoria kohti. Asetoniitriligradientin päätehtävä menetelmässä on nopeuttaa propionihapon kulkeutumista detektorille ja vahvistaa sen piikkiä. Maitohappo-liuksissa on mukana jonkin asteen epäpuhtautta, josta johtuu kromatogrammin loppupäässä näkyvä piikki. Tämä varmistettiin eräällä Kemiran tuotteella, jossa on pelkästään maito- ja etikkahappoa. Maitohapon luotettavuus menetelmässä varmistettiin tällä ajolla ja piikkien pinta-aloja verrattiin kemikaalipuhtaudella suhteutettuun pinta-alaan, jolloin pitoisuudet täsmäsivät.



Kuvio 4. Kemiran tuotteen kromatogrammi

Lopullisessa menetelmässä asetonitriligradietti saavuttaa 25 %-osuuden nestevirrasta 10,5 min kohdalla ja nostetaan siitä 50 %-osuuteen. Gradientti pidetään 50 %:ssa 2 min ajan mahdollisten analysoitavien näytteiden sisältämien epäpuhtauksien poistamiseksi laitteistosta. Laitteistoa huuhdotaan menetelmän lopussa 4 min pelkällä happovedellä, jotta laitteisto tasoittuu seuraavaa ajoa varten.

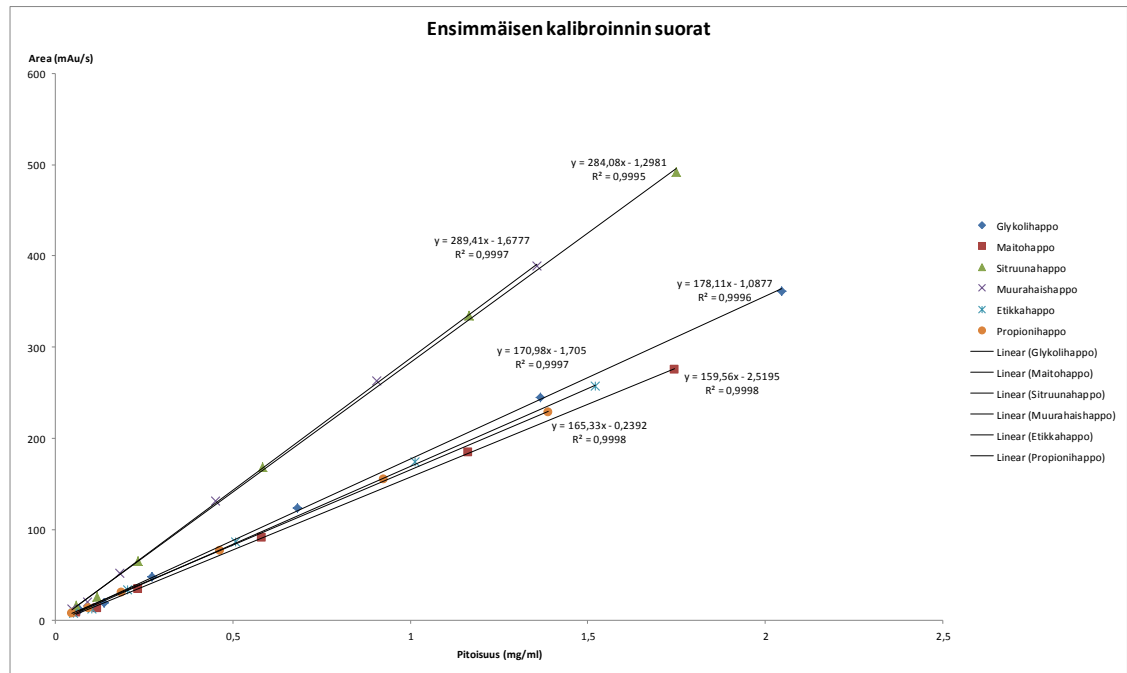


Kuvio 5. Lopullinen kromatogrammi kaikilla hapoilla

Yhdisteiden lopullisiksi retentioajoiksi saatiin glykolihapolle 3,1 min, muurahaishapolle 3,3 min, maitohapolle 4,9 min, etikkahapolle 5,4 min, sitruunahapolle 8,5 min ja propionihapolle 10,9 min. Kuviossa 5 näkyvä 12 min kohdalla tuleva piikki johtuu käytetyssä maitohapossa olevasta epäpuhtaudesta ja 14 min jälkeen tuleva poikkeama johtuu liuottingradientista, kuten 10 min kohdalla oleva negatiivinen piikki.

5.4 Menetelmän kalibrointi

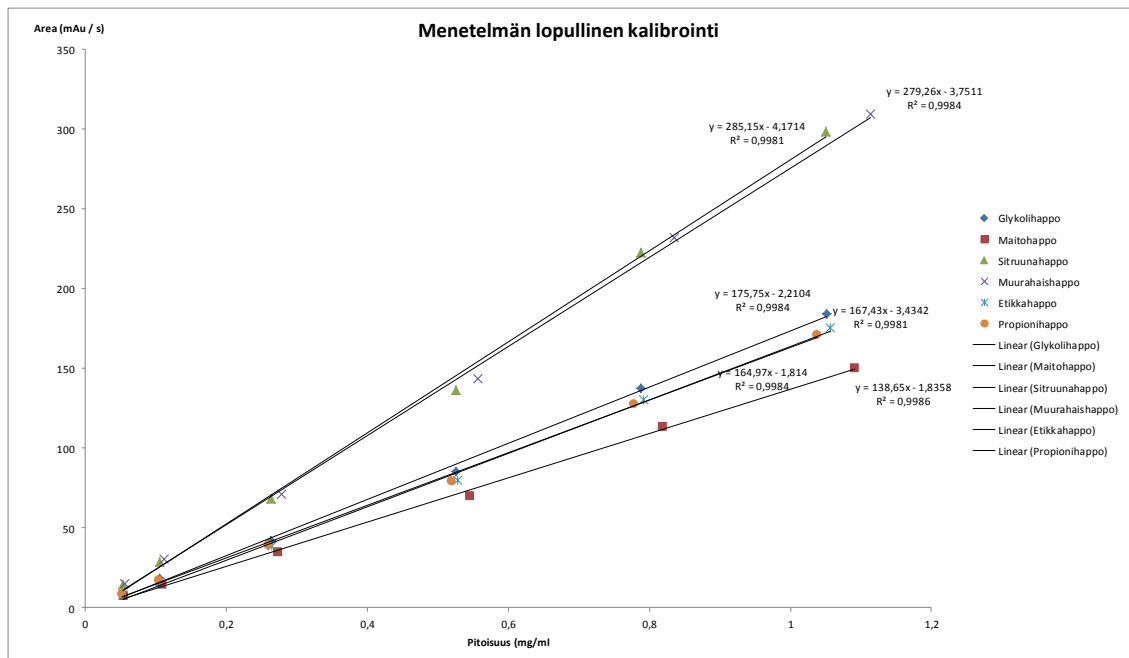
Alustava kalibrointi tehtiin kantaliuos 2:sta tehdyillä laimennoksilla käyttäen 0,050 mg/ml pitoisuutta pienimpänä mittauspisteenä ja 2,000 mg/ml pitoisuutta suurimpana. Laimennosten happopitoisuudet on esitetty kappaleessa 4.4 taulukossa 8.



Kuvio 6. Ensimmäisen kalibroinnin suorat

Taulukoitujen mittaustulosten ja laimennosten pitoisuuksien perusteella piirrettiin x,y-kuvaajat hapoille käyttäen pitoisuutta x-arvona ja kromatogrammista saatua piikin pinta-alaa y-arvona. Sijoitettujen lineaaristen suorien avulla saatiin suoran yhtälö, jonka perusteella voidaan määrittää mitattavan näytteen pitoisuus johtamalla se suoran yhtälöstä seuraavasti $y = mx + b \rightarrow x = \frac{y-b}{m}$. Alustavaa kalibrointia käytettiin selvittäessä menetelmän toimivuutta. Kuviossa 6 on kaikkien happojen suorat ja signaalien vahvuudet, pitoisuudet, yksittäiset suorat ja suorien yhtälöt on esitetty liitteessä 1.

Lopullinen kalibrointi menetelmälle tehtiin kantaliuos F:stä tehdyillä laimennoksilla, joiden pitoisuudet on esitetty kappaleessa 4.4 taulukossa 10. Kalibrointi toteutettiin käyttäen 0,050 mg/ml pitoisuutta pienimpänä pisteenä ja 1,000 mg/ml pitoisuutta suurimpana pisteenä. Laimennokset mitattiin ja analyyttien piikkien pinta-alojen ja pitoisuuksien avulla piirrettiin kuvaajat. Kuviossa 7 näkyy suorien yhtälöt ja korrelaatiokertoimet.



Kuvio 7. Lopullisen kalibroinnin suorat

Suorien korrelaatiokertoimet ovat hyväksyttävissä rajoissa 0,9980 ja 0,9995 välillä, mutta suorista käy selkeästi ilmi, että laimennoksissa tai kantaliuoksessa saattaa olla virhettä. Lopullinen kalibrointi jätettiin laitteelle menetelmän mahdollista jatkokehitystä ja analyysjä varten. Lopullisen kalibroinnin kerätty mittausdata, yksittäiset suorat ja suorien yhtälöt on esitetty liitteessä 2.

6 Menetelmän toimivuus

6.1 Toimivuuden selvittämisen toteutus

Menetelmälle tehtiin useita validointimittauksia ja laskennallisia parametreja, joiden tarkoituksena oli selvittää menetelmän toimivuutta ja mittausvirhettä sekä antaa luottamus menetelmästä saatuihin tuloksiin. Validointiparametreina olivat resoluutio, lineaarisuus, toistettavuus sekä toteamis- ja määrittäysraja.

Menetelmän validointi toteutettiin erillisinä mittauksina, joissa käytettiin eri kantaliuoksista laimennettuja liuoksia. Validointiparametrin riippuen mittaukset toteutettiin eri päivänä tai useampaan kertaan eri laimennoskerroimilla.

6.2 Resoluutio

Resoluutio (R) laskettiin kuvaajasta mittaamalla piikkien huipun retentioaika (t_r) ja piikin leveys piikin puolestavälillä (W). Resoluutiolla selvitetään ovatko lähellä kulkevat piikit nimellisesti glykoli- ja muurahaishappo. Resoluution ollessa 1 piikit ovat 3 % päällekkäin ja arvon pienentyessä kyseinen prosenttiosuus kasvaa suuremmaksi. Muurahaishapon ja glykolihapon piikkien välinen resoluutio-arvo on 2 eli piikit eivät ole päällekkäin. Muiden happojen väliset arvot ja laskut on esitetty liitteessä 3, mutta arvojen vertailu ei ole tarpeellista lukujen suuren eron takia.

6.3 Toteamis- ja määrittäysraja

Validoinnissa mitattiin toteamis- ja määrittäysraja, jotta saadaan numeerinen arvo happojen pienimmälle mitattavalle pitoisuudelle. Kaikkia happoja sisältävästä kantaliuoksesta 2 tehtiin mitattava liuos laimentamalla 0,05 ml 25 ml:ksi, jolloin laimennoskerroimeksi saatiin 1/500. Laimennettu näyte mitattiin 10 kertaa, jotta saataisiin tarpeeksi tietoa tilastolliseen arkasteluun. Mittausdatasta laskettiin toteamis- ja määrittäysrajat keskiarvojen ja hajontojen perusteella teoriaosuudessa esitetyillä kaavoilla, jolloin rajat signaalien suhteen saatiin seuraavan taulukon 13 mukaisiksi. Yksittäisten mittauksien signaalien suuruudet sekä laskut on esitetty liitteessä 4.

Taulukko 13. Toteamis- ja mittausrajat signaalille

Yhdiste	Toteamisraja (mAu/s)	Mittausraja (mAu/s)
Glykolinahappo	1,12 ± 0,11	1,12 ± 0,36
Muurahaishappo	1,12 ± 0,11	1,12 ± 0,36
Maitohappo	1,21 ± 0,13	1,21 ± 0,42
Etikkahappo	0,91 ± 0,19	0,91 ± 0,64
Sitruunahappo	0,73 ± 0,14	0,73 ± 0,46
Propionihappo	1,31 ± 0,26	1,31 ± 0,87

Signaalit muunnettiin pitoisuusarvoihin lopullisten kalibroinnin yhtälöillä. Pitoisuusarvot eivät ole tarkkoja, koska mittauspisteet ovat kalibrintisuorien ulkopuolella. Kyseiset arvot antavat selvän käsityksen menetelmän määrittämis- ja toteamisrajasta. Laskukaavat, laskut ja luvut on esitetty liitteessä 4.

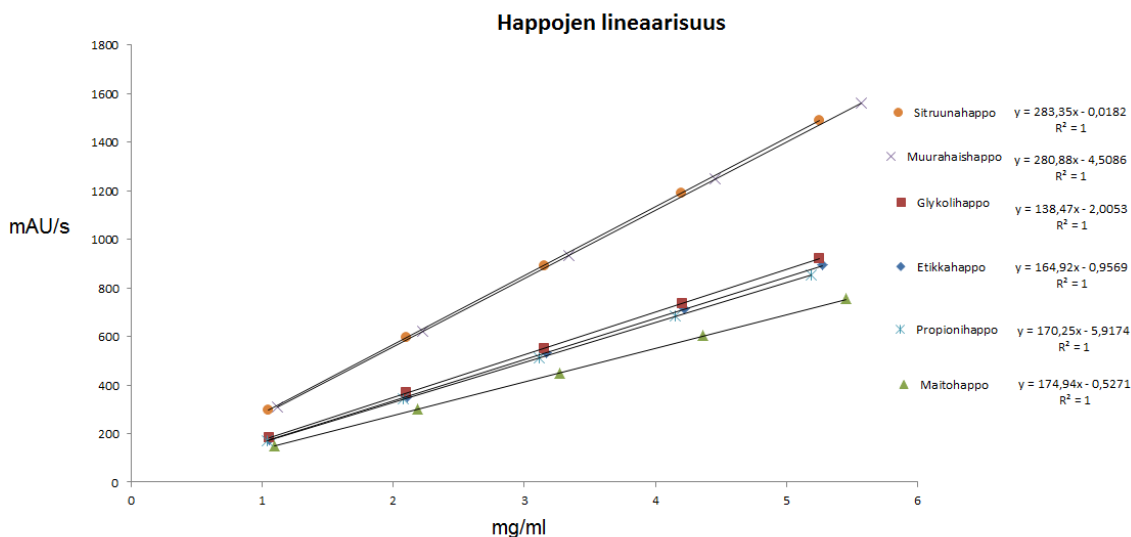
Taulukko 14. Menetelmän määrittämis- ja toteamisrajat lopullisen kalibroinnin mukaan

Yhdiste	Toteamisraja (mg/l)	Mittausraja (mg/l)
Glykolinahappo	12,3 ± 0,6	12,3 ± 2,0
Muurahaishappo	10,0 ± 0,4	10,0 ± 1,5
Maitohappo	21,6 ± 1,2	21,6 ± 4,0
Etikkahappo	14,3 ± 0,8	14,3 ± 2,7
Sitruunahappo	9,2 ± 0,9	9,2 ± 3,1
Propionihappo	5,6 ± 2,8	5,6 ± 9,4

Käyttäen kaikkein suurinta yhteenlaskettua arvoa toteamis- ja mittausrajoista, menetelmän toteamisrajaksi hapoille voidaan käyttää lähimpään kokonaislukuun pyöristettyä arvoa 23,0 mg/l ja mittausrajalle 26,0 mg/l.

6.4 Lineaarisuus

Lineaarisuudella tutkittiin aluetta, jolla mitattavien happojen signaali korreloi lineaarisesti pitoisuuden suhteen. Mittaukset toteutettiin F-kantaliuksella, josta mitattiin laimennokset. Saadut mittauks tulokset taulukoitiin ja niiden avulla piirrettiin kuvaaja.



Kuvio 8. Happojen lineaarisuus

Saadun kuvion ja numeeristen arvojen pohjalta todettiin happojen olevan lineaarisia 1 mg/ml ja 5 mg/ml välisellä alueella korrelaatiokertoimien perusteella. Happojen yksittäiset suorat ja laskukaavat on esitetty liitteessä 5.

Lineaarisuutta tutkittiin isommalla alueella menetelmän mahdollisia jatkosovelluksia varten. Lopullinen kalibrointi toteutettiin pienemmällä mitta-alueella 0,050 mg/ml ja 1,000 mg/ml välille samasta kantaliuoksesta, joka on nähtävissä opinnäytetyön kappaleessa 5.4. Pienemmällä alueella mahdolliset käytännötyöskentelyn virheet nousevat suuremmaksi, mikä näkyy pienemmillä pitoisuusalueilla heikompana korrelaatiokertoimena.

6.5 Toistettavuus

Tulosten luotettavuuden lisäämiseksi toteutettiin mittauksia useampana päivänä samasta näytteestä, jotta saataisiin selville millainen menetelmän toistettavuus on lyhyellä aikavälillä. Liitteessä 6 on esitetty analyysimenetelmällä saadut mittaustulokset.

Taulukko 15. Toistettavuusmittausten tulokset

Mittauspäivä	Happojen pitoisuus (mg/ml)					
	Etikkahappo	Glykoli-happo	Maito-happo	Muurahais-happo	Propioni-happo	Sitruuna-happo
12.9.2012	0,5127	0,6978	0,5865	0,4590	0,4658	0,5889
17.9.2012	0,5097	0,6965	0,6080	0,4548	0,4650	0,5889
19.9.2012	0,5148	0,7014	0,6186	0,4565	0,4650	0,5871
21.9.2012	0,5072	0,7024	0,6229	0,4543	0,4668	0,5900

Taulukon 15 mittaustulosten perusteella laskettiin keskiarvo ja keskihajonta yhdisteille. Tulokset on esitetty taulukoissa neljän desimaalin tarkkuudella. Toistettavuusmittausten pitoisuudet oli laskettu alustavalla kalibroinnilla.

Taulukko 16. Toistettavuusmittausten keskiarvot ja hajonnat

Happo	Keskiarvo (mg/ml)	Hajonta (mg/ml)	Hajonta suhteessa keskiarvoon
Etikkahappo	0,511	0,003	0,658 %
Glykoli-happo	0,700	0,003	0,406 %
Maitohappo	0,609	0,016	2,668 %
Muurahais-happo	0,456	0,002	0,468 %
Propionihappo	0,466	0,001	0,185 %
Sitruunahappo	0,589	0,001	0,202 %

Yhdisteiden eri päivinä mitattujen tulosten hajonta on pieni verrattuna mittaustulosten keskiarvoon, joka todistaa mittausten olevan toistettavissa mitatulla aikavälillä. Mittaukset sisältävät mittauskohtaisen eron toisiinsa, mutta vain maitohapon hajonta suhteessa keskiarvoon on yli yhden prosenttiyksikön.

7 Lopullinen analyysimenetelmä

Analyysimenetelmän kehityksessä tehtyjen mittausten, laskelmien ja arvioiden perusteella saatiin kehitettyä pohjamenetelmä etikka-, glykoli-, maito-, muurahais-, propioni- ja sitruunahapolle. Useiden parametrien ja mittaustulosten pohjalta saatiin kerättyä tarpeeksi tietoa menetelmän toimivuudesta ja soveltuvuudesta analysoitaessa näytteitä, jotka eivät sisällä yhdisteitä, joiden absorptioalue on mitattavalla aallonpituudella.

Taulukko 17. Ajometodin tiedot

Nestevirtaus	1 ml/min
Injektioilavuus	5 µl
Ajoaika	16,5 min
Käytetyt liuottimet	2 ml/l H ₃ PO ₄ Asetonitrili
Mittausaallonpituus	210 nm
Kolonni	Phenomenex Synergi 4u Hydro-RP 80 A
Laitteiston painerajat	Max 300 bar Min 2 bar

Laitteistossa käytettiin tasaista 1 ml/min nestevirtausta ja näyteliuosta injektioitiin 5 µl ajoon. Kehityksessä selvitettiin 2 ml/l H₃PO₄-vesiliuoksen ja asetonitriliin antavan luotettavimmat piikit ajometodissa yhdisteiden mitattavalla 210,0 nm:n aallonpituudella.

Taulukko 18. Liuotingradientin tiedot

Aika (min)	2 ml/l H ₃ PO ₄	Asetonitrili
4,00	100 %	0 %
10,50	75 %	25 %
10,51	50 %	50 %
12,50	50 %	50 %
12,51	100 %	0 %

Laitteelle tehty lopullinen ajometodin kesto on 16,5 min. Ensimmäisen 4 min jälkeen nestevirta muuttuu lineaarisesti happamasta vesiliuoksesta vesi-asetonitrili-seokseen 75 % / 25 % -suhteella. Gradientti nousee välittömästi 50/50-suhteeseen, kun edellä mainittu suhde on saavutettu laitteiston puhdistusta varten. Analysoitavat yhdisteet saapuvat detektorille alle 11 min, minkä perusteella ajoaika voitaisiin lyhentää, mutta laitteistoa puhdistetaan loppuaika, jotta mahdolliset näytteiden sisältämät epäpuhtaudet poistuisivat ja kromatogrammin pohjaviiva asettuisi ennen seuraava ajoa.

Taulukko 19. Happojen retentioajat

Happo	Retentioaika	Happo	Retentioaika
Etikka	5,40 min	Muurahais	3,30 min
Glykoli	3,10 min	Propioni	10,90 min
Maito	4,80 min	Sitruuna	8,50 min

Yhdisteiden retentioajoiksi saatiin taulukon 19 mukaiset ajat. Sitruunahapon retentioaika vaihtelee hieman jokaisen ajokerran jälkeen, mutta siirtymä vaihteli 1,0 min verran, jolloin se ei vaikuttanut muiden yhdisteiden piikkeihin.

Menetelmän mittausalueen toteamisrajaksi todettiin 0,023 mg/ml ja määritysrajaksi 0,026 mg/ml, jonka perusteella toteutettiin kalibrointi alkaen 0,050 mg/ml ja loppuen noin 1,000 mg/ml haposta riippuen. Lineaarisuusmittauksista todettiin menetelmän lineaarisen alueen olevan suurempi, mutta kalibrointi toteutettiin pienimmälle luotettavalle mittausalueelle. Toistettavuus lyhyellä aikavälillä yhden henkilön toimesta osoittautui riittäväksi ja yhdisteet erottuivat kromatogrammiin selkeiksi, tarpeeksi symmetrisiksi piikeiksi.

Taulukko 20. Analyysimenetelmän tiedot

Happojen retentioajat			
Happo	Retentioaika	Happo	Retentioaika
Etikka	5,40 min	Muurahais	3,30 min
Glykoli	3,10 min	Propioni	10,90 min
Maito	4,80 min	Sitruuna	8,50 min
Ajometodin tiedot			
Nestevirtaus		1 ml/min	
Injektioilavuus		5 µl	
Ajoaika		16,5 min	
Käytetyt liuottimet		2 ml/l H ₃ PO ₄ , Asetonitrili	
Mittausaallonpituus		210 nm	
Kolonne		Phenomenex Synergi 4u Hydro-RP 80 A	
Laitteiston painerajat		Max 300 bar, Min 2 bar	
Liuotingradientin tiedot			
Aika (min)	2 ml/l H ₃ PO ₄	Asetonitrili	
4,00	100 %	0 %	
10,50	75 %	25 %	
10,51	50 %	50 %	
12,50	50 %	50 %	
12,51	100 %	0 %	
Menetelmän tiedot			
Toteamisraja (suurimman mukaan)		0,023 mg/ml	
Määritysraja (suurimman mukaan)		0,026 mg/ml	
Todettu mittausalue		0,050 mg/ml – 5,000 mg/ml	
Käytetty mittausalue		0,050 mg/ml – 1,000 mg/ml	

Menetelmän lopulliset tiedot kerättiin taulukkoon 20 tiivistelmänä. Yhdisteiden retentioajat saattavat vaihdella, mikäli ajometodia kokeillaan toisella laitteella.

8 Yhteenveto

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää analyysimenetelmä etikka-, glykoli-, maito-, muurahais-, propioni- ja sitruunahapon samanaikaiselle määrittelykselle. Analyysimenetelmä saatiin kehitettyä perinteiselle UV/Vis-nestekromatografilaitteistolle, jolla voidaan mitata edellä lueteltuja happoja. Menetelmä soveltuu tutkimusnäytteisiin, joihin on käytetty puhtasaineita sekä näytteisiin, jotka eivät sisällä merkittäviä pitoisuuksia muita yhdisteitä. Happoja voidaan mitata laajalla lineaarisella alueella, mutta pieniä konsentraatioita ei menetelmällä voida luotettavasti mitata. Saatu pohjamenetelmä jäi tutkimuskäyttöön Kemira Oyj:lle ja kerättyä tietoa voidaan soveltaa tarkempien menetelmien kehitykseen, joko kaikkien tai yksittäisten happojen analysointiin.

Menetelmänkehityksestä jäivät puuttumaan todellisten näytteiden mittaukset, saantokokeet ja erilaisten esikäsittelymenetelmien vaikutus yhdisteiden analysointiin. Tässä lopputyössä kehitettyä menetelmää tulisi edelleen testata todellisten näytteiden kanssa ja selvittää erilaisten esikäsittelymenetelmien vaikutus analyysituloksiin. Menetelmän jatkokehityksessä testattavina esikäsittelymenetelminä sopisi happojen eristäminen nesteliuksesta kiinteäfaasiuutolla, tislauksella tai neste-neste-uutolla. Todellisilla näytteillä voidaan tutkia menetelmän soveltuvuutta samankaltaisia happoja sisältäville näytteille, pyörähaihdutuksella konsentroiduille näytteille sekä edellä mainitulla esikäsittelymenetelmillä käsitellyille näytteille.

Opinnäytetyöprosessi tuotti paljon arvokasta kokemusta ja uusia näkökulmia tutkimusperäiseen työhön. Harmin aiheiksi jäi menetelmän soveltumattomuus pienille pitoisuuksille ja ajan puute, jonka takia analyysimenetelmää ei ehditty hioa täydelliseksi timantiksi. Kehitetty menetelmä silti osoittautui toimivaksi puhtasaineilla ja toivon menetelmästä olevan hyötyä Kemiran henkilöstölle heidän työssään.

Lähteet

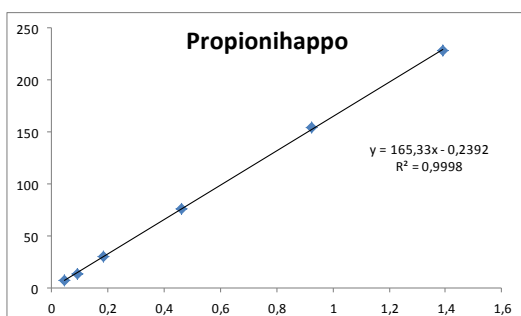
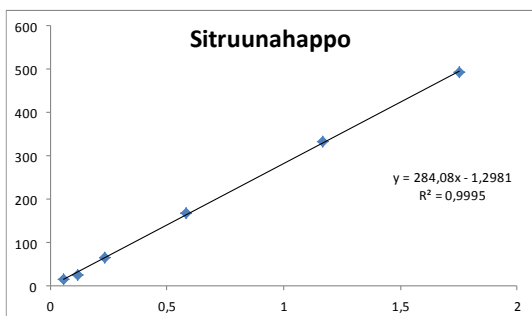
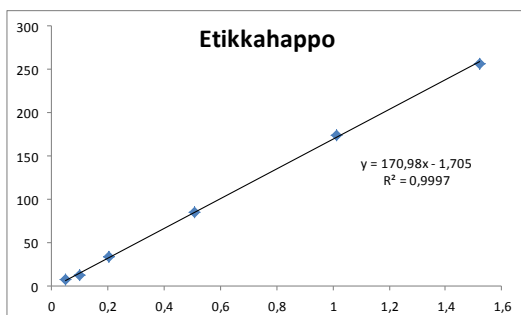
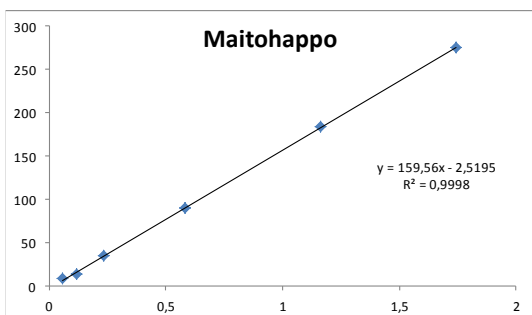
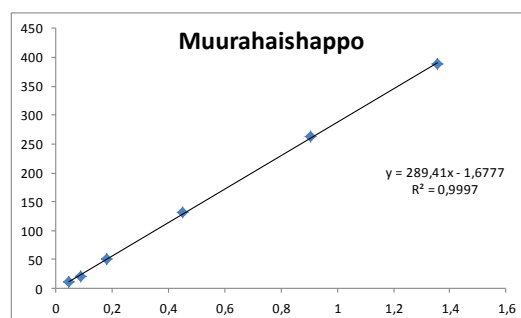
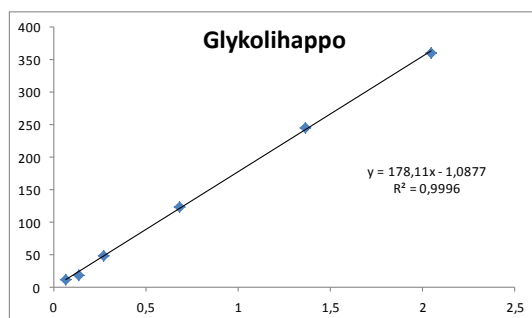
- 1 Kemira - water is the connection, verkkodokumentti, <http://www.kemira.com/fi/aboutus/pages/default.aspx> , 26.9.2012.
- 2 Harris, Daniel C.: Quantitative Chemical Analysis, 7th edition, 2007, W.H. Freeman and Company, USA.
- 3 Niiranen, J. & Jaarinen, S.: Laboratorion analyysitekniikka, 5-6. painos, Edita Publishing Oy, 2008, Helsinki.
- 4 CRC Handbook of Chemistry and Physics, 48th ed. 1967-1968, 1967 The Chemical Rubber Co, USA.
- 5 The Pubchem Project, verkkotietokanta, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> , 26.9.2012.
- 6 Sigma-Aldrich, verkkotietokanta, <http://www.sigmaaldrich.com/finland.html> , 26.4.2013.

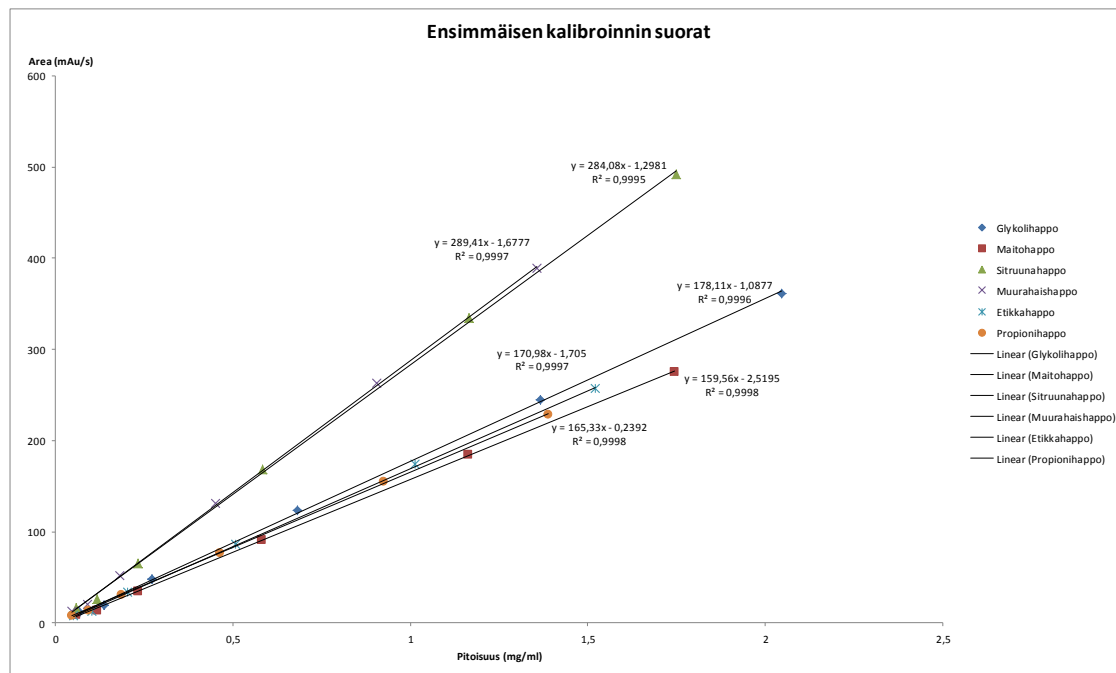
Menetelmän alustava kalibrointi

	Laimennos	mg/ml	Area		Laimennos	mg/ml	Area
Glykolihappo	1	0,06828	11,802	Muurahaishappo	1	0,04522	12,225
	2	0,13656	19,126		2	0,09044	20,316
	3	0,27312	48,163		3	0,18088	51,611
	4	0,6828	123,17		4	0,4522	131,26
	5	1,366	244,75		5	0,9044	262,83
	6	2,048	361,28		6	1,357	388,65
Maitohappo	1	0,058122	8,654	Etikkahappo	1	0,05072	7,992
	2	0,11624	13,356		2	0,10144	12,988
	3	0,23249	34,556		3	0,20288	33,312
	4	0,58122	90,599		4	0,5072	85,816
	5	1,162	184,15		5	1,014	173,66
	6	1,744	274,9		6	1,522	257,03
Sitruunahappo	1	0,05832	16,155	Propionihappo	1	0,0463	7,748
	2	0,11664	26,073		2	0,0926	13,67
	3	0,23328	65,306		3	0,1852	30,793
	4	0,5832	168,68		4	0,463	76,354
	5	1,166	334,02		5	0,926	154,64
	6	1,75	491,99		6	1,389	228,22

Suorien arvot

	m	b
Glykoli	178,1115	-1,08773
Murkku	289,4118	-1,67771
Maito	159,5585	-2,51952
Etikka	170,9792	-1,70505
Sitruuna	284,0767	-1,29809
Propioni	165,3267	-0,23916





Suoran arvot

Muurahaishapto

$$y = 279,41x - 1,6777$$

$$R^2 = 0,9997$$

Sitruunahapto

$$y = 284,08x - 1,2981$$

$$R^2 = 0,9995$$

Glykolihapto

$$y = 178,11x - 1,0877$$

$$R^2 = 0,9996$$

Etikkahapto

$$y = 170,98x - 1,705$$

$$R^2 = 0,9997$$

Propionihapto

$$y = 165,33x - 0,2392$$

$$R^2 = 0,9998$$

Maitohapto

$$y = 159,56x - 2,5195$$

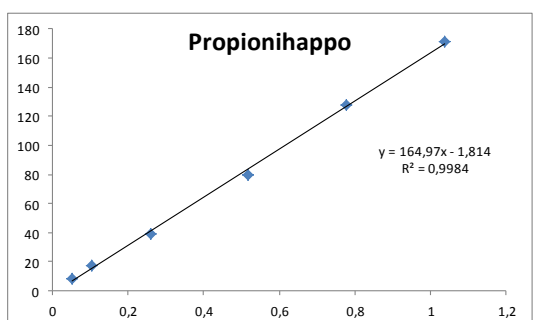
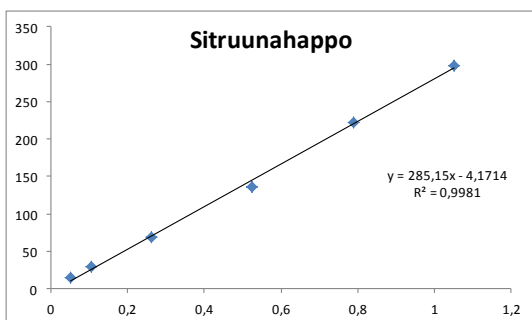
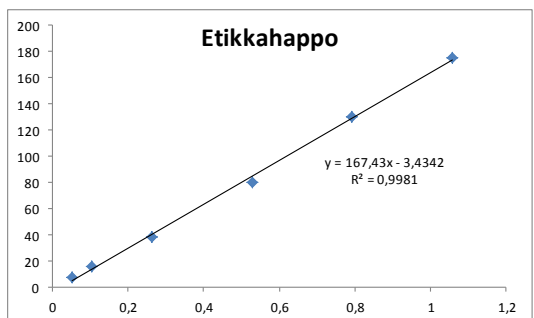
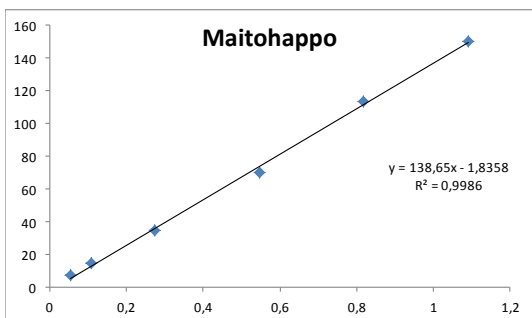
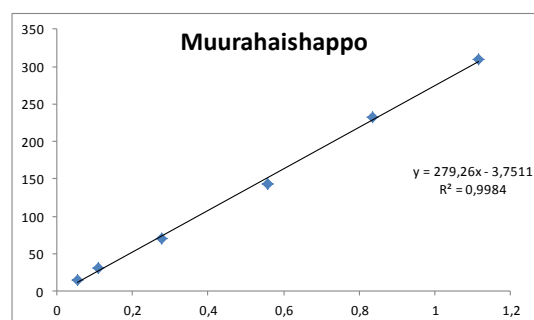
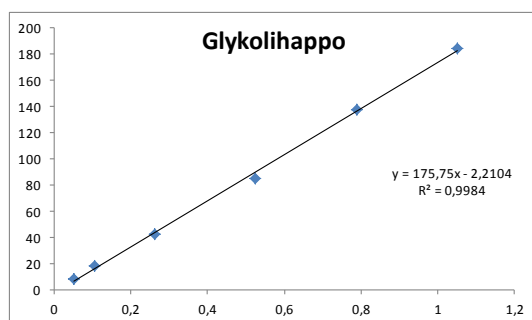
$$R^2 = 0,9998$$

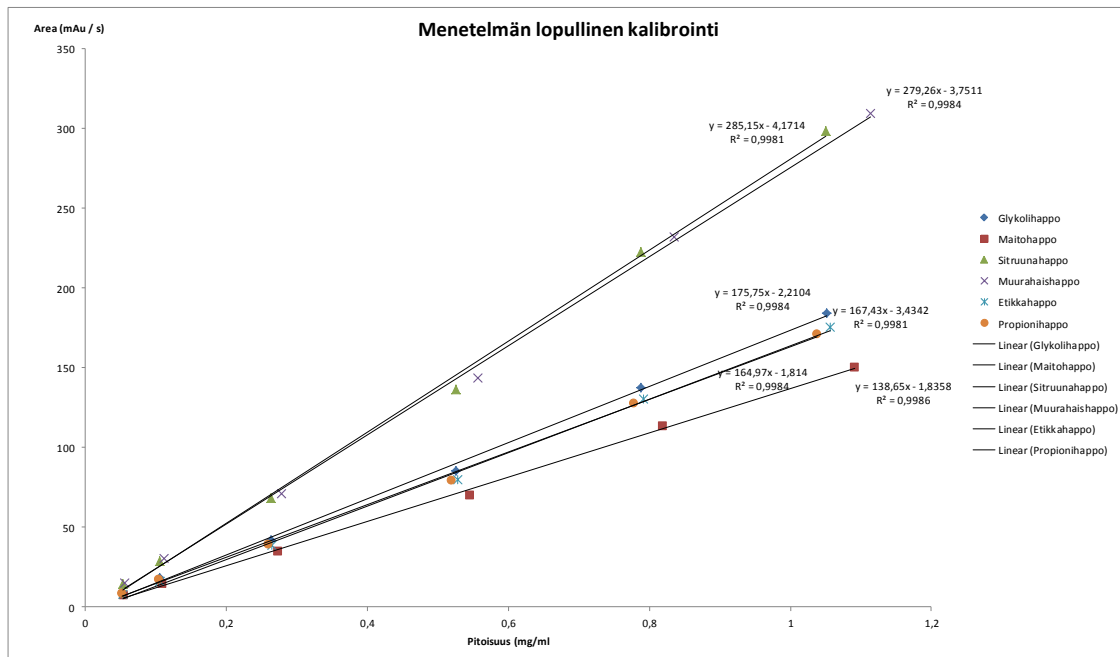
Menetelmän lopullinen kalibrointi

	Laimennos	mg/ml	Area		Laimennos	mg/ml	Area
Glykolihappo	1	0,0525	8,801	Muurahaishappo	1	0,05571	14,861
	2	0,10509	18,201		2	0,11141	30,679
	3	0,26273	42,202		3	0,27853	70,815
	4	0,52545	85,175		4	0,55705	143,53
	5	0,78818	137,76		5	0,83558	232,26
	6	1,051	184,06		6	1,114	309,81
	Laimennos	mg/ml	Area		Laimennos	mg/ml	Area
Maitohappo	1	0,05456	7,092	Etikkahappo	1	0,05279	7,688
	2	0,10912	14,616		2	0,10557	16,076
	3	0,27281	34,568		3	0,26393	38,634
	4	0,54562	70,05		4	0,52785	79,925
	5	0,81844	113,49		5	0,79178	130,27
	6	1,091	150,08		6	1,056	175,27
	Laimennos	mg/ml	Area		Laimennos	mg/ml	Area
Sitruunahappo	1	0,05253	14,232	Propionihappo	1	0,05188	8,498
	2	0,10505	28,683		2	0,10376	17,151
	3	0,26263	68,31		3	0,2594	39,035
	4	0,52525	136,48		4	0,5188	79,393
	5	0,78788	222,51		5	0,7782	127,83
	6	1,05	298,43		6	1,038	170,87

Suorien arvot

	m	b
Glykoli	175,7524	-2,21043
Murku	279,2627	-3,75111
Maito	138,6492	-1,83583
Etikka	167,4345	-3,43422
Sitruuna	285,1515	-4,17144
Propioni	164,9652	-1,81397





Suorien arvot

Sitruunahappo
$y = 285,15x - 4,1714$
$R^2 = 0,9981$
Muurahaishappo
$y = 279,26x - 3,7511$
$R^2 = 0,9984$
Glykolihapo
$y = 175,75x - 2,2104$
$R^2 = 0,9984$
Etikkahappo
$y = 167,43x - 3,4342$
$R^2 = 0,9981$
Propionihappo
$y = 164,97x - 1,814$
$R^2 = 0,9984$
Maitohappo
$y = 138,65x - 1,8358$
$R^2 = 0,9986$

Resoluutio

		Etikka	Glykoli	Maito	Muurahais	Propioni	Sitruuna
Retentioaika (min)	tr	5,444	3,109	4,881	3,317	10,927	8,52
Todellinen retentio (min)	t'r	2,744	0,409	2,181	0,617	8,227	5,82
Piikin leveys (5% korkeudelta) (min)	W	0,1194	0,0716	0,1035	0,077	0,0753	0,1916
Piikin etureunan leveys (min)	W_a	0,067	0,0403	0,055	0,039	0,041	0,0931

Resoluutio $R = (1,177 \cdot (t_2 - t_1)) / (w_2 + w_1)$

Hapot		Retentioajat		Piikkien leveydet		Resoluutio
1	2	tr1	tr2	W1	W2	R
Glykoli	Muurahais	3,11	3,32	0,07	0,08	1,65
Muurahais	Maito	3,32	4,88	0,08	0,10	10,20
Maito	Etikka	4,88	5,44	0,10	0,12	2,97
Etikka	Sitruuna	5,44	8,52	0,12	0,19	11,64
Sitruuna	Propioni	8,52	10,93	0,19	0,08	10,61

Toteamis- ja määrittäysraja

Happo	Mittausten areat (mAu/s)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Glykoli	1,165	1,068	1,110	1,124	1,143	1,172	1,141	1,140	1,073	1,090
Murkku	1,236	1,199	1,150	1,229	1,233	1,239	1,208	1,290	1,186	1,157
Maito	0,934	0,952	0,935	0,885	0,837	0,929	0,865	0,965	1,005	0,795
Etikka	0,728	0,744	0,727	0,770	0,745	0,699	0,607	0,764	0,732	0,736
Sitruuna	1,272	1,300	1,282	1,518	1,314	1,256	1,304	1,170	1,326	1,332
Propioni	0,825	0,603	0,679	0,547	0,654	0,675	1,048	0,581	0,684	0,518

Happo	Keskiarvo	Hajonta	Toteamisraja (mAu/s)			Määrittäysraja (mAu/s)		
Glykoli	1,123	0,036	1,123	±	0,109	1,123	±	0,365
Murkku	1,123	0,036	1,123	±	0,109	1,123	±	0,365
Maito	1,213	0,042	1,213	±	0,126	1,213	±	0,420
Etikka	0,910	0,064	0,910	±	0,191	0,910	±	0,638
Sitruuna	0,725	0,046	0,725	±	0,138	0,725	±	0,461
Propioni	1,307	0,087	1,307	±	0,262	1,307	±	0,875

(average) (stdev)

Kalibrintisuoralle sijoitettuna

Happo	m	b	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Glykoli	178,094	-1,0739	0,013	0,012	0,012	0,012	0,012	0,013	0,012	0,012	0,012	0,012
Murkku	289,5	-1,7	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
Maito	159,6	-2,5	0,022	0,022	0,022	0,021	0,021	0,022	0,021	0,022	0,022	0,021
Etikka	171,0	-1,7	0,014	0,014	0,014	0,015	0,014	0,014	0,014	0,015	0,014	0,014
Sitruuna	284,1	-1,3	0,009	0,009	0,009	0,010	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009
Propioni	165,3	-0,2	0,006	0,005	0,006	0,005	0,005	0,006	0,008	0,005	0,006	0,005

Suoran yhtälö: $y = m * x - b$, missä

y=area

x=pitoisuus

b=korrelaatiokerroin

Happo	Keskiarvo	Hajonta	Toteamisraja (mg/ml)			Määrittäysraja (mg/ml)		
Glykoli	0,012	0,00020	0,012	±	0,00061	0,012	±	0,00205
Murkku	0,010	0,00015	0,010	±	0,00044	0,010	±	0,00145
Maito	0,022	0,00040	0,022	±	0,0012	0,022	±	0,004
Etikka	0,014	0,00027	0,014	±	0,00081	0,014	±	0,0027
Sitruuna	0,009	0,00031	0,009	±	0,00092	0,009	±	0,00308
Propioni	0,006	0,00094	0,006	±	0,00282	0,006	±	0,00939

(average) (stdev)

Lopulliset raja-arvot

Happo	Toteamisraja (mg/l)			Määrittäysraja (mg/l)		
Glykoli	12,3	±	0,6	12,3	±	2,0
Murkku	10,0	±	0,4	10,0	±	1,5
Maito	21,6	±	1,2	21,6	±	4,0
Etikka	14,3	±	0,8	14,3	±	2,7
Sitruuna	9,2	±	0,9	9,2	±	3,1
Propioni	5,6	±	2,8	5,6	±	9,4

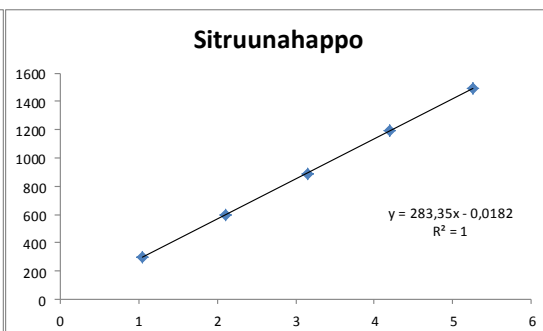
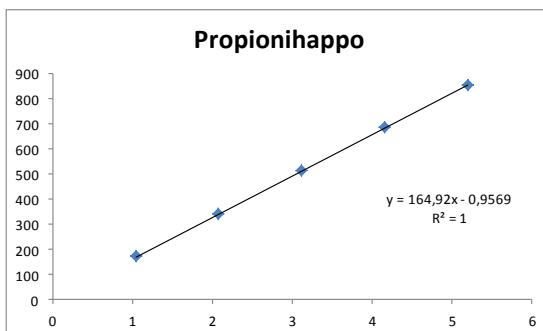
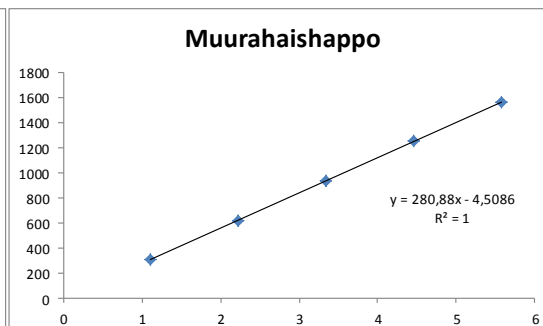
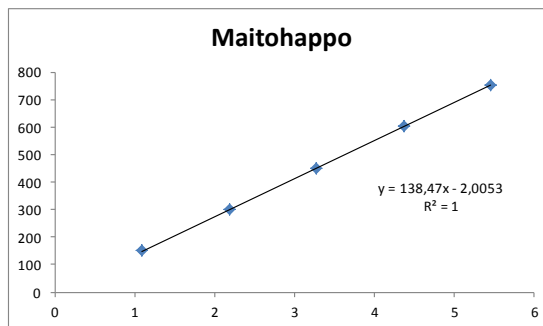
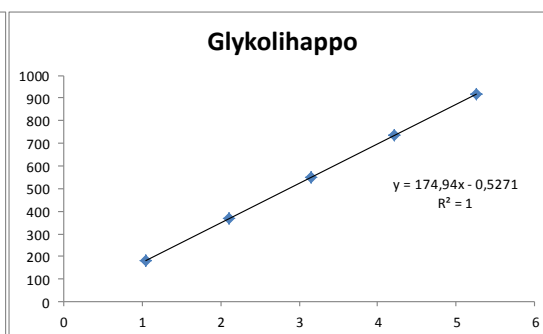
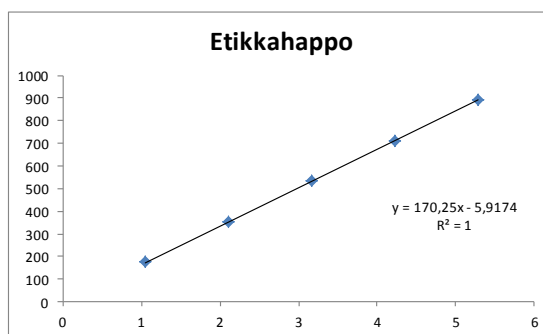
Yhteenlaskettu suurin arvo

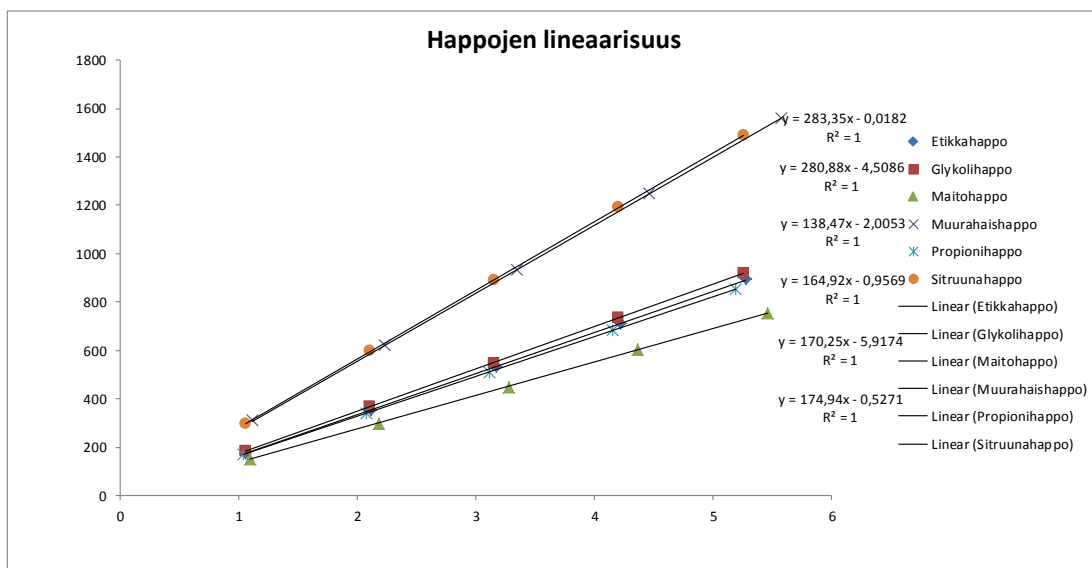
Happo	Toteamisraja	Määrittäysraja
Glykoli	12,95 mg/l	14,38 mg/l
Murkku	10,48 mg/l	11,50 mg/l
Maito	22,76 mg/l	25,55 mg/l
Etikka	15,09 mg/l	16,98 mg/l
Sitruuna	10,17 mg/l	12,32 mg/l
Propioni	8,38 mg/l	14,96 mg/l

Lineaarisuus

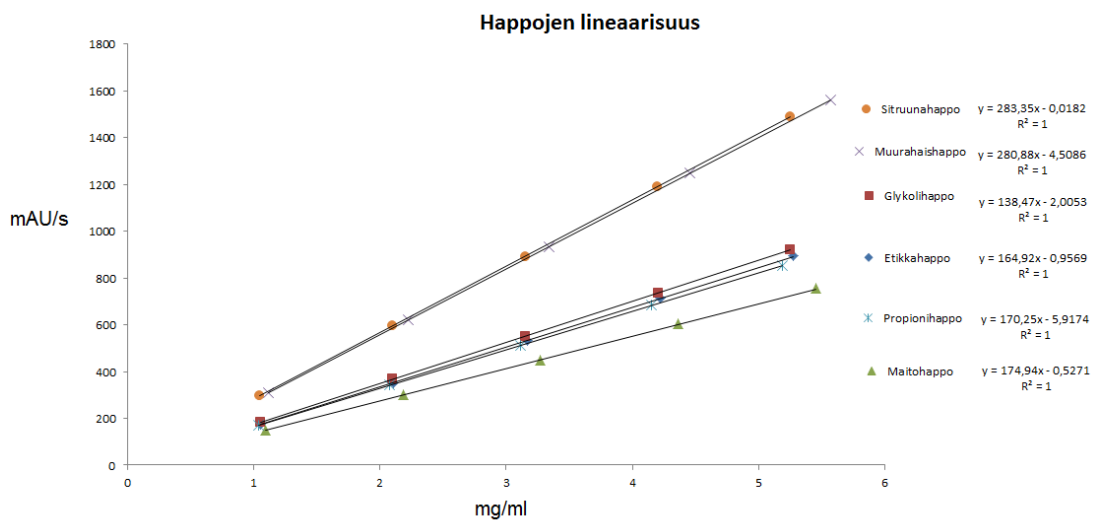
Liuos	Area (mAU/s)					
	Etikka	Glykoli	Maito	Muurahais	Propioni	Sitruuna
2,0 ml / 20 ml	175,2667	184,0609	150,0832	309,8103	170,8708	298,4312
4,0 ml / 20 ml	352,3669	367,2313	299,7442	620,9896	341,2566	596,7399
6,0 ml / 20 ml	532,1866	549,0733	449,7798	931,4871	510,7891	889,2477
8,0 ml / 20 ml	713,0228	735,4818	602,8601	1248,273	683,9223	1190,491
10,0 ml / 20 ml	893,6232	919,1448	754,0346	1560,804	855,1184	1489,834

Liuos	Laimennoskerroin	Happopitoisuus					
		Etikka	Glykoli	Maito	Muurahais	Propioni	Sitruuna
2,0 ml / 20 ml	0,1	1,0557	1,0509	1,09125	1,1141	1,0376	1,0505
4,0 ml / 20 ml	0,2	2,1114	2,1018	2,182499	2,2282	2,0752	2,101
6,0 ml / 20 ml	0,3	3,1671	3,1527	3,273749	3,3423	3,1128	3,1515
8,0 ml / 20 ml	0,4	4,2228	4,2036	4,364998	4,4564	4,1504	4,202
10,0 ml / 20 ml	0,5	5,2785	5,2545	5,456248	5,5705	5,188	5,2525





Kuvankäsittelyohjelmalla selvennetty kuva



Toistettavuus

Mitattu liuos:

Kantaliuos 2:n laimennos, 5 ml per 25 ml (noin 5 mg/ml per happo)

Päivä	Happopitoisuus (mg/ml)					
	Etikka	Glykoli	Maito	Murkku	Propioni	Sitruuna
12.9.2012	0,512728	0,6978	0,586533	0,459031	0,465809	0,588938
17.9.2012	0,509689	0,69647	0,607996	0,454821	0,465019	0,588919
19.9.2012	0,514813	0,701425	0,618604	0,45653	0,464976	0,587107
21.9.2012	0,507164	0,702409	0,622939	0,454286	0,466809	0,589972
	Etikka	Glykoli	Maito	Murkku	Propioni	Sitruuna
Keskiarvo	0,511099	0,699526	0,609018	0,456167	0,465653	0,588734
Hajonta	0,003363	0,002842	0,016251	0,002136	0,00086	0,001191

	Happopitoisuus (mg/l)					
	Etikka	Glykoli	Maito	Murkku	Propioni	Sitruuna
Keskiarvo	511,0986	699,5259	609,0179	456,1671	465,6532	588,734
Hajonta	3,36259	2,84238	16,25131	2,135838	0,860412	1,191032
	Hajonta verrattuna keskiarvoon (%)					
	0,657914	0,406329	2,668445	0,468214	0,184775	0,202304

