
LASERDIFFRAKTIOMENETELMÄN KEHITYS JA VALIDOINTI

Ksylitolin partikkelikoko



Ammattikorkeakoulun opinnäytetyö

Bio- ja elintarviketekniikka

Visamäki, syksy 2014

Anni Kolli



VISAMÄKI

Bio- ja elintarviketekniikka
Elintarviketeknologia

| | | |
|------------------|--|-------------------|
| Tekijä | Anni Kolli | Vuosi 2014 |
| Työn nimi | Laserdiffraktiomenetelmän kehitys ja validointi – Ksylvitolin partikkelikoko | |

TIIVISTELMÄ

Ksylvitoli on kiteinen viisihiilinen makeutusaineena käytetty polioli eli so-kerialkoholi. Sen laadunvarmistuksessa yksi tärkeimmistä on partikkelikoon määrittäminen. Koko voidaan määrittää laserdiffraktioanalyysillä, joka perustuu valon sirontakulmaan partikkelin pinnalta. Laboratoriossa tehtävien analyysien luotettavuutta lisää validointi. Validointi on menetelmän tai laitteen testaus, jolla varmistetaan näiden soveltuvuus haluttuun käyttötarkoitukseen.

Opinnäytetyö tehtiin Danisco Sweeteners Oy:n Kotkan tehtaan toimeksiantona. Työn tarkoituksena oli ottaa käyttöön laserdiffraktiolaitteen R7-linssi, luoda metodi ja validoida se. Validointi suoritettiin ISO 13320-1-standardin mukaisesti. Testattavia parametreja olivat toistettavuus ja tarkkuus. R7-linssin mitta-alue on laajempi kuin aikaisemmin käytettyn R6-linssin. Lisäksi verrattiin näytteitä vanhan ja uuden metodin välillä.

Menetelmä saatiin kehitettyä R7-linssille. Se myös läpäisi validoinnin. Vertailussa metodien välillä havaittiin näytekoolla olevan suuri merkitys. Työn tuloksena saatiin ksylvitolille määritettyä vakionäytemäärä, joka takaa vertailukelpoisia ja aiempaa luotettavampia tuloksia. Virheiden määrää vähentävät automaattisesti valikoituvat parametrit valittaessa ksylvitoli, verrattuna aikaisempaan, jolloin jokainen parametri oli valittava erikseen.

Parannuksia työhjeisiin ja laitteen suojaukseen tehtiin, koska R7-linssi on herkempi ympäristön häiriöille kuin R6-linssi. Tulevaisuudessa myös tehdään valmistamalle fruktoosille on hyvä määrittää vakionäytemäärä, jotta siinäkin “käsialan” vaikutus poistuisi.

Avainsanat ksylvitoli, validointi, laserdiffraktio, partikkelikoko

Sivut 52 s. + liitteet 1 s.

VISAMÄKI

Degree Programme in Biotechnology and Food Engineering
Food Technology

| | | |
|-------------------------------------|---|------------------|
| Author | Anni Kolli | Year 2014 |
| Subject of Bachelor's thesis | Development and Validation of the Laser diffraction Method – Particle Size of the Xylitol | |

ABSTRACT

Xylitol is a five-carbon polyol, a sugar alcohol, which is used as a sweetener. One of the most important factors in verifying the quality of xylitol is determining its particle size. The particle size can be determined using a method called laser diffraction which is based on measuring the scattering angle of the light from the surface of a particle. Validation is a way of testing a device or a method to make sure that it is suitable for the desired usage.

This thesis was commissioned by a production facility of Danisco Sweeteners Ltd which is located in Kotka, Finland. The purpose of the thesis was to introduce a grade R7-lens, create a method of usage for the lens and validate this method. The validation process was completed according to ISO 13320-1 standard. The parameters tested were repeatability and accuracy of the new method. The measuring range of R7-lens is greater than the range of previously used R6-lens. A comparison between the old and the new method was also conducted by using the same samples in both methods.

A working method to use R7-lens was produced and the validation of this method was also a success. When the comparison between old and new method was performed it was observed that the sample size had a large impact on the end result.

As a result of the thesis a standard sample size was established. This guarantees comparable and reliable results when using the laser diffraction analysis method. A standard operating procedures (SOP) was also created to reduce the possibility of error when setting up the device. In the old method every parameter was input manually one by one. Improvements were made for the shielding and working instructions of the analysis device because grade R7-lens is much more susceptible to interference of surrounding conditions. In the future it would be wise to establish a standard sample size for the fructose produced at the plant to eliminate the user's "personal touch" from distorting the analysis result.

Keywords xylitol, validation, laser diffraction, particle size

Pages 52 p. + appendices 1 p.

SISÄLLYS

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | JOHDANTO..... | 1 |
| 2 | KSYLITOLI | 2 |
| 2.1 | Rakenne ja ominaisuudet | 2 |
| 2.2 | Teollinen valmistus | 3 |
| 2.2.1 | Ksyloosin valmistus..... | 4 |
| 2.2.2 | Ksylitolin valmistus..... | 5 |
| 3 | PARTIKKELIKOON MITTAUS | 7 |
| 3.1 | Partikkelien koko ja muoto | 8 |
| 3.2 | Visuaalinen tarkastelu | 9 |
| 3.3 | Seulonta..... | 9 |
| 3.4 | Sedimentaatio | 10 |
| 3.5 | Laserdiffraktio..... | 11 |
| 3.5.1 | Valonlähde ja linssioptiikka | 12 |
| 3.5.2 | Detektori | 14 |
| 3.5.3 | Näytteen syöttäminen | 14 |
| 3.5.4 | Laskentaan käytetyt teoriat..... | 15 |
| 4 | MENETELMÄN VALIDOINTI..... | 17 |
| 4.1 | Selektiivisyys ja spesifisyys | 17 |
| 4.2 | Lineaarisuus ja mittausalue | 18 |
| 4.3 | Toteamis- ja määrittämiss raja | 18 |
| 4.4 | Saanto | 18 |
| 4.5 | Virheet..... | 19 |
| 4.6 | Häiriökestävyys ja toimintavarmuus..... | 19 |
| 4.7 | Tarkkuus, toistettavuus ja uusittavuus | 20 |
| 4.8 | Mittausepävarmuus | 21 |
| 5 | MENETELMÄN KEHITYS JA VALIDOINTI | 21 |
| 5.1 | Käytetty laitteisto ja materiaalit | 21 |
| 5.2 | Esikokeet | 24 |
| 5.3 | Laserdiffraktiomenetelmän luominen | 25 |
| 5.4 | Validointi..... | 26 |
| 5.5 | Vertailu R6-linssillä mitattuihin näytteisiin | 27 |

| | | |
|-------|---|----|
| 6 | TULOKSET | 29 |
| 6.1 | Esikokeet | 29 |
| 6.2 | Uusi menetelmä..... | 30 |
| 6.3 | Validointi..... | 31 |
| 6.4 | Vertailu R6-linssillä mitattujen näytteiden kanssa..... | 34 |
| 6.4.1 | T-testi..... | 34 |
| 6.4.2 | Regressioanalyysi | 36 |
| 6.4.3 | Uudet regressioanalyysit | 42 |
| 7 | JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA | 49 |
| | LÄHTEET | 50 |

Liite 1 Menetelmän luomisen ajoparametrit

1 JOHDANTO

Ksylitoli on kiteinen makeutusaine, joka kuuluu polioleihin eli sokerialkoholeihin. Sitä käytetään esimerkiksi purukumeissa, makeisissa ja lääkkeissä. Valmistus tapahtuu ksyloosista hydraamalla ja kiteyttämällä. Ksyloosia saadaan kasveista, yleisimmin puiden hemiselluloosasta sellunkeiton sivutuotteena. Ksylitolin yksi laatukriteereistä on partikkelikoko ja sen jakauma. Kiteiden on oltava tietyn kokoisia eikä hienoainesta saa olla liikaa.

Partikkelien kokoa ja kokojakaumaa voidaan mitata usealla eri menetelmällä. Yksi on laserdiffraktio. Se perustuu valonsirontaan partikkeleista. Sirontakulma on riippuvainen partikkelin koosta. Monokromaattinen lasersäde kulkeutuu näytevirran läpi siroten. Säteet johdetaan Fourer-in-linssin läpi detektorille, josta tiedot siirtyvät tietokoneelle analysoitaviksi. Menetelmä on kasvattanut suosiotaan, koska se on nopea ja helppokäyttöinen. Sillä pystytään mittaamaan kokojakaumaa laajasti nanometreistä millimetreihin.

Laboratorioiden tehtävänä on vastata laadunvarmistamisesta. Luotettavien ja oikeellisten tulosten saamiseksi menetelmiä ja laitteita validoidaan. Validoinnin tarkoituksena on todentaa, että menetelmä sopii tarkoitukseensa ja täyttää asetetut vaatimukset sekä antaa luotettavia tuloksia. Uuden menetelmän käyttöönotossa on syytä suorittaa validointi.

Opinnäytetyön toimeksiantaja on Dansico Sweeteners Oy:n Kotkan tehtaan laboratorio. Tehdas kuuluu amerikkalaiselle DuPont-konsernille (E.I. du Pont de Nemours and Company). Kotkassa valmistetaan ksylitolia ksyloosista ja fruktoosia sakkaroosista. Tehdas aloitti sokerinpuhdistamon vuonna 1912. Erikoismakeuttajia se on tuottanut vuodesta 1968 lähtien. Ksylitolin tuotanto aloitettiin vuonna 1974. Nykyään tehdas työllistää noin 120 henkilöä ja toimii ympäri vuorokauden. Tuotteista yli 95 prosenttia menee vientiin.

Opinnäytetyön tarkoituksena on luoda menetelmä ksylitolin partikkelikoon mittaamiseen laserdiffraktiolaitteelle ja validoida se sekä verrata uutta ja vanhaa menetelmää keskenään. Luvussa kaksi käsitellään ksylitolia, sen ominaisuuksia ja valmistamista. Kolmannessa luvussa käsitellään partikkelien koon mittaamista ja esitellään muutamia yleisiä mittaamenetelmiä. Luvussa neljä käsitellään laboratoriomenetelmien validointiparametreja. Viidennessä luvussa esitellään työn tekeminen. Luvussa kuusi raportoidaan tulokset ja viimeisessä seitsemännessä luvussa esitetään johtopäätökset.

2 KSYLITOLI

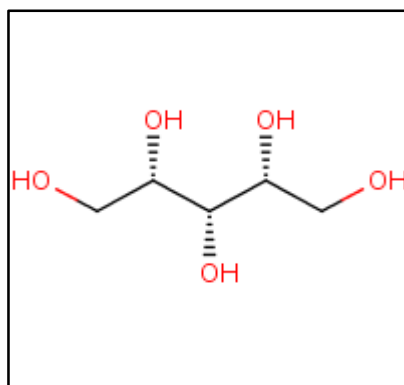
Ksylitoli on viisihiilinen sokerialkoholi eli polioli. Sitä valmistetaan teollisesti hydraamalla kemiallisesti D-ksyloosia. Ksyloosia saadaan puiden kuten koivun hemiselluloosasta sellunkeiton sivutuotteena kromatografisesti erottamalla. Luonnossa ksylitolia esiintyy pieniä määriä myös kasviksissa ja hedelmissä. (Granström, Izumori & Leisola 2007a, 277; 2007b, 273.)

Elintarviketeollisuus käyttää ksylitolia makeutusaineena. Pääasiallisia käyttökohteita ovat purukumit, makeiset ja hammastahnat. Myös lääke ja kosmetiikkateollisuus hyödyntävät ksylitolin ominaisuuksia. (Granström, Izumori & Leisola 2007a, 277; 2007b, 273.) Sitä voidaan käyttää myös kosteudensäilyttäjänä, naamioimaan muita ainesosia ja suonensisäisten tuotteiden energianlähteenä (Saltmarsh 2013, 259).

Ksylitoli maistuu lähes yhtä makealle kuin tavallinen sokeri, sakkaroosi, mutta siinä on melkein puolet vähemmän energiaa. Ksylitolin jälkimaku on viileänraikas. Sillä on terveyttä edistäviä vaikutuksia kuten hampaitten reikiintymisen ja pienten lasten korvatulehdusten estäminen. (Granström, Izumori & Leisola 2007a, 277; 2007b, 273.)

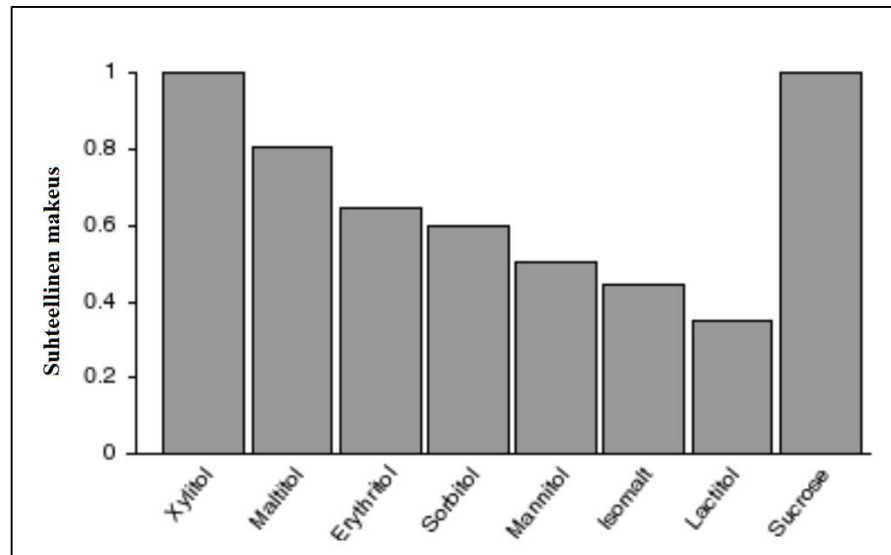
2.1 Rakenne ja ominaisuudet

Ksylitoli on hiilihydraatti, joka kuuluu polioleihin eli sokerialkoholeihin. Ksylitolin molekyylikaava on $C_5H_{12}O_5$ ja molekyylimassa 152,146 g/mol. Rakenteeltaan ksylitoli on kiteistä. Sen kiderakenne on monokliininen. Kuviossa 1. on ksylitolin rakennekaava. Kiteiden sulamispiste on 93,5 °C ja kiehumispiste 216 °C. (HSDB 2012.) Ksylitolilla ei ole rakenteessaan pelkistävää ryhmää, joten Maillardin reaktiota eli ruskettumista ei pysty tapahtumaan. Ksylitolia voidaan käyttää laajalla pH-alueella (1–11), koska se on hyvin stabiili. (Zacharis 2012, 351.)



Kuvio 1. Ksylitolin rakennekaava (HSDB 2012).

Makeudeltaan ksylitoli on makein sokerialkoholeista (kuvio 2). Se yltää lähes sakkaroosiin makeuteen. Sitä voidaan käyttää sokerittomissa tuotteissa makeuttajana. Ksylitolia voidaan yhdistellä muihin sokerialkoholeihin, jolloin tuotteista tulee yhtä makeita kuin sokerilla makeutetut. Ksylitoli auttaa saavuttamaan myös sokerimaisen suutuntuman tuotteisiin, joissa on käytetty muita makeutusaineita kuten aspartaamia. (Zacharis 2012, 349–350.)

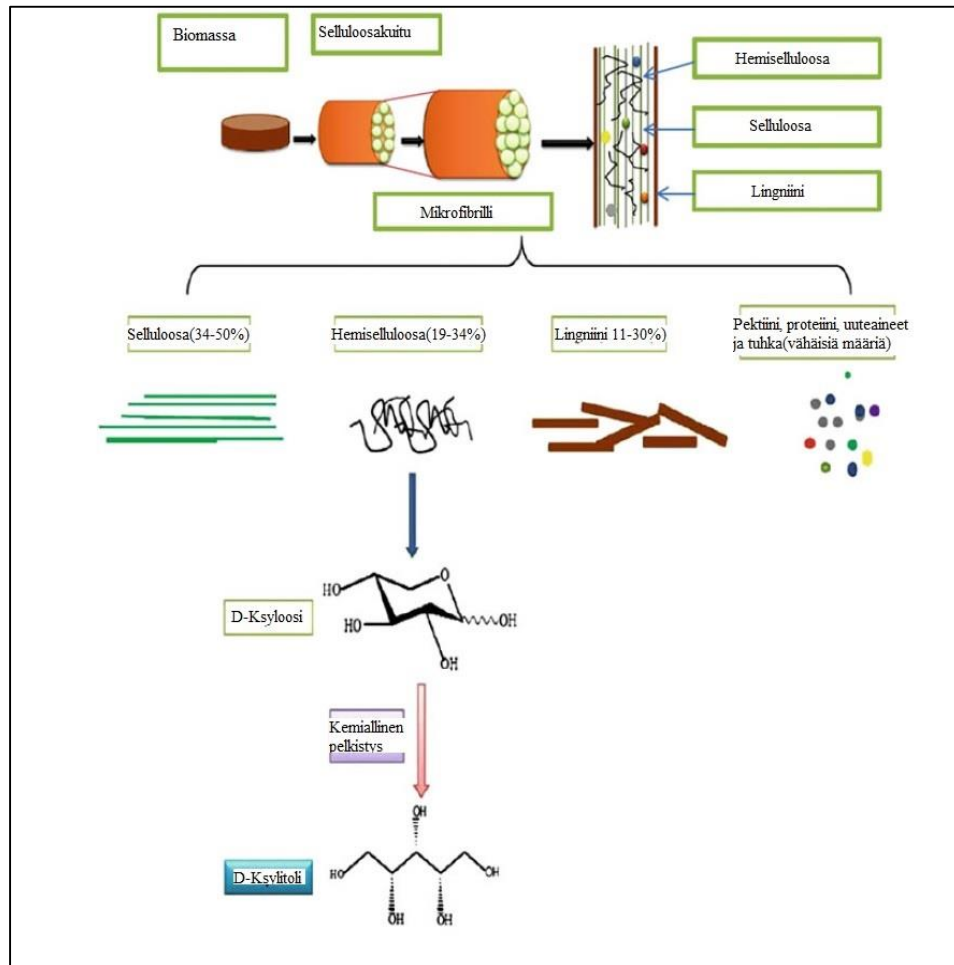


Kuvio 2. Sokerialkoholien ksylitolin, maltitolin, eritrytolin, sorbitolin, mannitolin, isomaltin ja laktitolin suhteellinen makeus verrattuna sakkaroosiin. (Mukaillen Zacharis 2012, 349).

Ksylitoli absorboi energiaa ympäristöstä mihin se liukenee. Yhden ksylitoligramman liuottamiseen vaaditaan 145 J energiaa, joka on sokereiden ja sokerialkoholien korkein tunnettu arvo. Tästä johtuu viileänraikas jälkimaku. Viileä maku korostaa esimerkiksi mintun omaa makua. Hedelmien ja marjojen aromi koetaan ksylitolin vaikutuksesta tuoreeksi ja mehukkaaksi. Viilennysvaikutus tapahtuu vain kiteiden liukenemishetkellä. Nestemäisissä ja amorfisissa tuotteissa ei vaikutusta tapahdu. (Zacharis 2012, 350.)

2.2 Teollinen valmistus

Ksylitolia valmistetaan hydraamalla eli lisäämällä vetyä ksyloosiin ja kiteyttämällä. Ksyloosia saadaan kasvien hemiselluloosasta. Sitä saadaan yleisimmin sulfaattisellunkeiton sivutuotteena. Erityisen paljon ksyloosia on koivun kuduissa, josta juontuu ksylitolin nimittäminen koivusokeriksi. (Sirviö 2009; Kainiemi 2012.) Kuviossa 3 (s. 4) on esitetty biomassasta saatavan ksyloosin koostumus ja valmistaminen ksylitoliksi.



Kuvio 3. Biomassan ksyyloosin koostumus ja valmistus ksyytoliksi (Mukaiillen Mpabanga, Chandel, da Silva & Singh 2012, 67).

2.2.1 Ksyyloosin valmistus

Ksyyloosi on ksyytolin valmistuksen raaka-aine. Ksyyloosi on hyvin yleinen monosakkaridi luonnossa. Puun kuiduissa sitä on hemiseluloosaosassa. Sen päätyypit ovat ksyylaani ja glukomannaani. Puun kuidut koostuvat pääasiallisesti selluloosasta, joka on pitkä suora polysakkaridi. Hemiseluloosa suojaa selluloosaa ja ligniini lujittaa puun rakennetta täyttämällä vapaat välit (kuvio 3). Hemiseluloosa on heterogeeninen ryhmä, joiden yleisimpiä komponentteja ovat pentoosit (β -D-ksyyloosi, α -L-arabiinooosi), heksoosit (β -D-mannoosi, β -D-glukoosi, α -D-galaktoosi) ja uronihapot (α -D-glukuroni-, α -D-4-O-metyyligalakturoni- ja α -D-galakturoni-happo). (Gírio, Carvalherio, Durate & Bogel-Lukasik 2012, 3–5.)

Selluteollisuudessa keitetään puuhaketta selluksi sulfaattikeitossa. Keittoliuoksessa on liukenemattomia ligniinejä, heksoosi- ja pentoosisokereita, orgaanisia happoja ja keittokemikaaleja. Aikaisemmin liuos päätyi jätevesien sekaan, mutta se on nykyisin kielletty. Liuoksesta voidaan ottaa haihduttamalla lämpö ja rikki talteen uudelleen käyttöä varten. Tämä on uusi

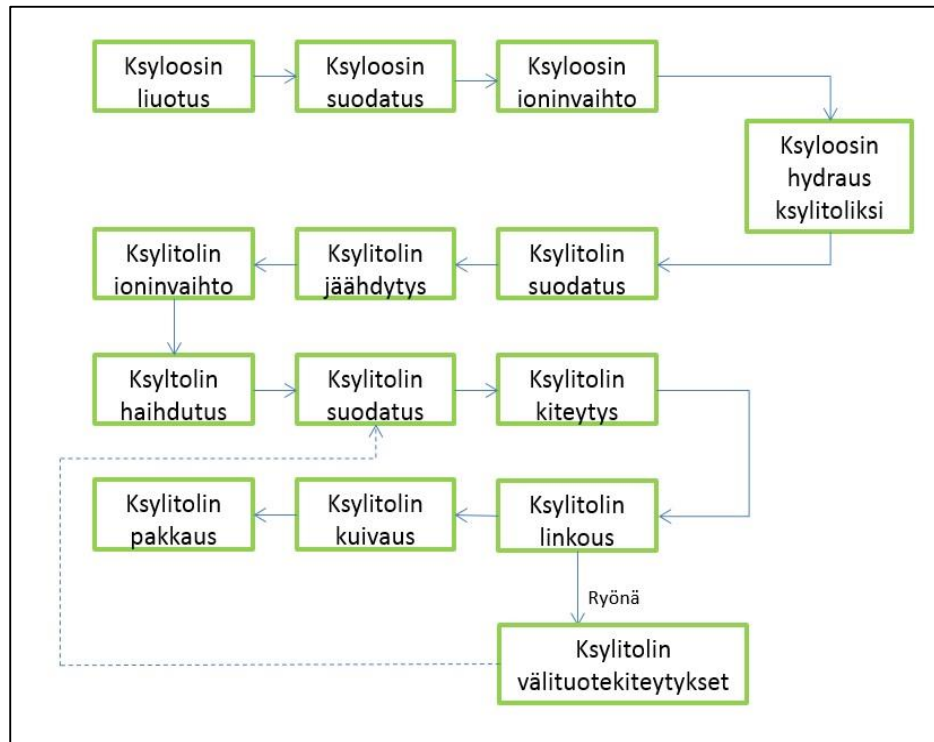
ympäristöuhka korkeiden rikkipitoisuuksien vuoksi. Liuoksen hyödyntäminen eteenpäin ja jakaminen komponenteikseen vähentää ympäristön kuormitusta. (Heikkilä, Puuppo, Tylli, Nikander, Nygren, Lindroos & Eroma 1999.)

Sellun happamassa sulfaattikeitossa käytetään tyypillisesti emäksiä Mg^{2+} , Ca^{2+} , NH_4^- ja Na^+ . Keiton aikana ksylaani hydrolysoituu ksyloosimonosakkarideiksi. Neutraalissa sulfaattikeitossa saadaan oligomeerejä, jotka pitää vielä hydrolysoida yksittäisiksi ksyloosimonosakkarideiksi. Keitoissa saatavan ksyloosin määrä vaihtelee keitto-olosuhteiden mukaan. Liuoksesta erotettava ksyloosi on oltava erittäin puhdasta, jotta ksylitolin valmistuksessa käytetyt katalyytit eivät häiriintyisi. Puhdistus on aikaavievää ja monivaiheista. Ksyloosi erotetaan ja puhdistetaan kromatografisesti erotuskolonneissa. Kolonneja käytetään kationien ja anionien erottamiseen. Kolonnien pituus on 2,5 metristä 5 metriin. Puhdistusvaiheita on useita peräkkäin. Puhdistettu ksyloosi kiteytetään ja toimitetaan ksylitolitehtaalle. (Heikkilä ym. 1999; Melaja & Hämäläinen 1978.)

2.2.2 Ksylitolin valmistus

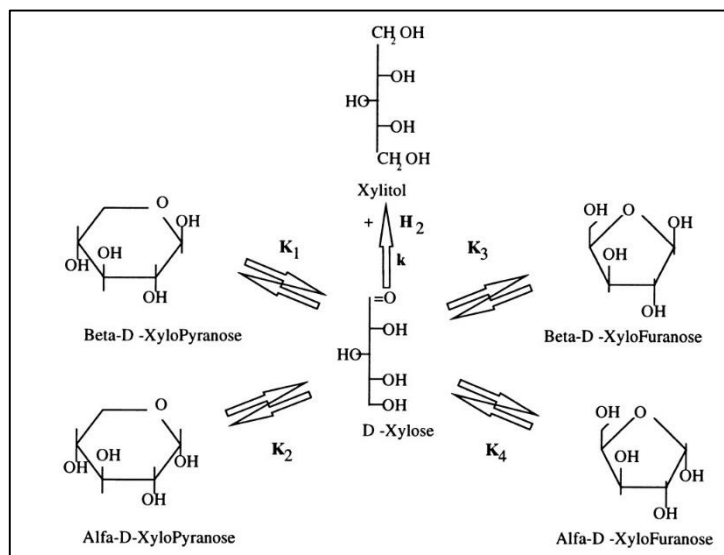
Kuviossa 4 (s. 6) on esitetty ksylitolin valmistus ksyloosikiteistä. Alkukäsittelyssä ksyloosi liuotetaan ja puhdistetaan. Puhdistus on kaksivaiheinen. Aluksi ksyloosiliuos suodatetaan ja sitten ajetaan ioninvaihtokolonnin läpi. Tämä esipuhdistus vaaditaan, koska hydrausvaiheessa tarvitaan täysin puhdasta ksyloosia. (Kainiemi 2014.)

Hydrauksessa katalyytin, kovan paineen ja lämpötilan avulla ksyloosi muuttuu ksylitoliksi. Katalyytteinä käytetään Raneyn katalyyttejä ja jalometalleja kuten ruteniumia, palladiumia, rodiumia ja platinaa. Yleinen on Raneyn nikkelikatalyytti. Hydrauskattilassa ihanteellinen paine on 10 000 – 13 000 kPa. Lämpötila nostetaan noin 130 °C:een. Hydraus suoritetaan panoksittain. (Kainiemi 2014; Heikkilä ym. 1999.)



Kuvio 4. Ksylitolin valmistaminen ksyloosikiteistä. (Mukaillen Kainiemi 2014).

Kuviossa 5 on esitetty D-ksyloosin tasapainokuva D-ksylitoliksi. Kuvioista nähdään, että ksyloosista muodostuu pyranooseja ja furanooseja, jotka palaavat takaisin ksyloosiksi. Ksylitoliksi reitti on yhdensuuntainen. (Mikkola, Sjöholm, Salmi & Mäki-Arvela 1999, 77.)



Kuvio 5. D-ksyloosin tasapainokuva (Mukaillen Mikkola 1999, 77).

Seuraavissa vaiheissa poistetaan saadusta ksylitolista epäpuhtauksia. Lisäksi ksylitolia haihdutetaan, jotta kiteytys olisi tehokkaampaa. Heti hydrauksen jälkeen saatu tuote suodatetaan epäpuhtauksista ja jäädytetään. Jäädytystä tarvitaan, jotta ioninvaihtokolonnit kestäisivät liuoksen. Kolonneissa erotetaan ionit pois. Kolonneita voidaan järjestää peräkkäin, jolloin saadaan poistettua vahvat anionit ja kationit kuin myös heikot anionit ja kationit. Ennen kiteytystä on vielä suodatusvaihe, jossa poistetaan ultravioletti- ja näkyvän valon alueella absorboivat aineet sekä roskat. (Kainiemi 2014.)

Kiteytys tapahtuu kaksivaiheisesti. Aluksi on haihdutuskiteytys, jossa muodostuu kiteiden ytimiä. Niiden ympärille kasvavat kiteet. Kiteytys tapahtuu alipaineessa, koska silloin lämpötilaa ei tarvitse nostaa liian korkeaksi. Lämpötila on noin 60 °C, jonka jälkeen siirrytään jäädytyskiteytyksen puolelle. Siinä lämpötilaa lasketaan asteittain alemmas. Kaksivaiheisessa kiteytyksessä on helpompi hallita kiteiden keskipartikkelikoko. Aikaa kuluu myös vähemmän, kuin yksivaiheisessa. Ksylitolin puhtaudeksi saadaan yli 90 prosenttia kuiva-aineesta. (Kainiemi 2014; Heikkilä ym. 1999; Jaffe & Weinert 1976.)

Kiteytyksen jälkeen kiteet erotetaan liuoksesta linkouksella. Linkouksessa syntynyt ryönä kierrätetään suodatusvaiheeseen ennen kiteytystä. Näin saadaan kaikki mahdollinen ksylitoli talteen. Saadut kiteet kuivataan ja pakataan. Pakkaamossa voidaan yhdistää eri kiteytyseriä yhteen. Kiteitä on myös mahdollista jauhaa. (Kainiemi 2014; Heikkilä ym. 1999.)

3 PARTIKKELIKOON MITTAUS

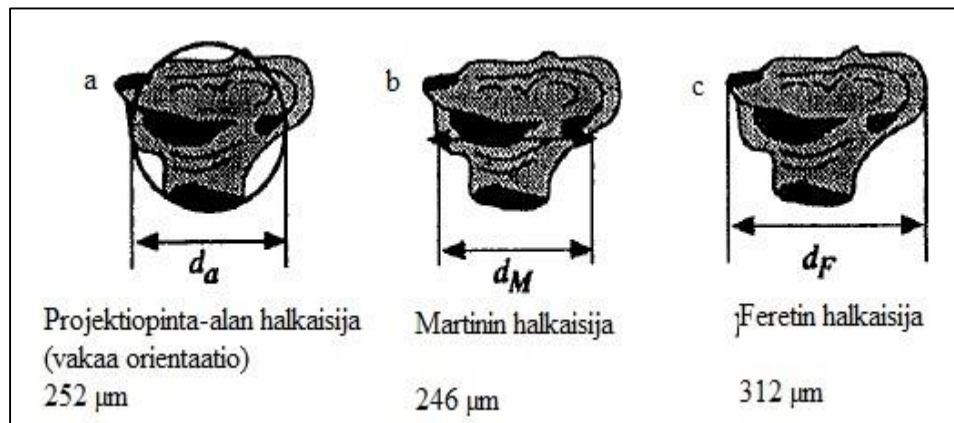
Partikkeleista koostuvia aineita on hyvin paljon maailmassa. Yli 75 prosenttia teollisuudessa käytetyistä materiaaleista on partikkelimuodossa. Ne voivat olla kiinteitä, nestemäisiä tai kaasumaisia, sekä näiden sekoituksia. On kuivia jauheita, kuten sokerit, jauhot ja pigmentit, nesteseoituksia eli emulsioita ja suspensioita, kuten maito ja veri, kuivia sekoituksia, kuten sedimentit ja lääkkeet, aerosoleja, kuten sumut ja suihkeet ja kaasukuplia aineissa, kuten kermavaahto ja eristevaahdot. Partikkelien koko vaihtelee nanometreistä millimetreihin. Kokojakauma vaihtelee hyvin kapeasta laajaan. (Merkus 2009, 1–2.)

Partikkelien koko ja sen jakauma on tärkeä mittaus partikkelimaiset tuotteiden valmistuksessa. Ne määrittävät monia tuotteiden ominaisuuksia. Niiden avulla seurataan prosessin laatua, tuotteen ominaisuuksia myöhemmässä prosessin vaiheessa ja loppukäytössä (Merkus 2009, 3–4.) Erilaisia mittaus-tapoja on useita ja niiden ymmärtämiseen tarvitaan ymmärrys myös koosta ja muodosta. Tässä luvussa esitellään muutamia tunnettuja ja yleisesti käytettyjä menetelmiä: visuaalinen tarkastelu, seulonta, sedimentaatio ja laserdiffraktio.

3.1 Partikkelien koko ja muoto

Vain pyöreitä partikkeleita voidaan mitata pelkän halkaisijan avulla. Muun muotoisten kohdalla on käytettävä muitakin mittoja. Epäsäännöllisiä partikkeleita voidaan verrata pyöreisiin. Ekvivalenttihalkaisijat voidaan määrittää esimerkiksi tilavuuden, pinnan pinta-alan, projektion pinta-alan ja Stokesin lain perusteella. Halkaisija on sen pyöreän partikkelin halkaisija, jolla on sama tilavuus, pinnan pinta-ala, projektion pinta-ala tai sama putoamisarvo laminaarivirtauksessa. (Merkus 2009, 13–17.)

Kuviossa 6 on esitetty eri halkaisijan mittoja samalle kvartsi­partikkelille. Kuviossa 1a on projektion pinta-alan halkaisija $252 \mu\text{m}$. 1b on Martinin halkaisija ($246 \mu\text{m}$) ja 1c Feretin halkaisija ($312 \mu\text{m}$). Martinin halkaisija on se linja, joka halkaisee projektion pinta-alan kahteen yhtä suureen osaan. Linja voi olla missä suunnassa tahansa. Feretin halkaisija puolestaan on kahden tangentin välimatka, jotka ovat partikkelin vastakkaisilla puolilla. (Allen 2003, 152.)



Kuvio 6. Kvartsikiteen kokoja käyttäen projektion pinta-alan, Martinin ja Feretin halkaisijoita (Allen 2003, 61).

Partikkelien muoto vaikuttaa suuresti mm. pakkausominaisuuksiin. Kvalitatiivisia termejä on listattu kirjallisuudessa. Näitä on esimerkiksi neulamainen, kulmikas, kuituinen, pallomainen, epäsäännöllinen, ja levymäisyys. Partikkelien muoto on yhteydessä sen kokoon. Erilaisia suhdelukuja voidaan laskea määrittäessä muotoa. Paksuus (T , thickness) on lyhin etäisyys kahden samansuuntaisen tason välillä, jotka ovat partikkelin vastakkaisilla puolilla. Leveys (B , breadth) on lyhyin etäisyys kahden samansuuntaisen partikkelin vastapuolilla olevan tason välillä kohtisuoraan paksuutta määrittävien tasoihin nähden. Pituus (L , length) on tasojen etäisyys, jotka ovat kohtisuoraan paksuuden ja leveyden tasoihin nähden. Näiden avulla voidaan määrittää Heywoodin suhteet: levymäisyys­suhde $m = B/T$ ja venymäisyys­suhde $n = L/B$. (Allen 2003, 69–71.)

3.2 Visuaalinen tarkastelu

Visuaalinen tarkastelu tarkoittaa lähinnä partikkelien mikroskopointia. Määrittämiseen käytetään kolmea eri tekniikkaa: valomikroskooppia, pyyhkäisyelektronimikroskooppia (scanning electron microscopy SEM) ja läpäisyelektronimikroskooppia (transmission electron microscopy TEM). (Merkus 2009, 196.) Valomikroskoopin toiminta-alue on 0,8–150 μm ja resoluutio noin 0,2 μm . SEM-mikroskoopin alue on 0,1–1000 μm ja resoluutio 10 nm. TEM-mikroskoopin alue on 0,01–10 μm ja resoluutio 5 nm. Yli 150 μm partikkelien tutkimiseen riittää suurennuslasi. (Allen 2003, 144–145.)

Mikroskopointi on suositeltavaa tehdä aina ensimmäisenä, kun tutkitaan partikkeleita, koska se antaa arvion koosta ja jauhemaisuudesta. Mikroskooppi antaa myös tietoa partikkelien muodosta ja pintarakenteesta paljon paremmin kuin muut menetelmät. (Allen 2003, 142.)

Mikroskooppi on absoluuttinen metodi partikkelien koon mittaamiseen. Se on ainoa tapa, jossa tutkitaan ja mitataan yksittäisiä partikkeleita. Ne voidaan määrittää niin kvalitatiivisesti eli laadullisesti kuin kvantitatiivisesti eli määrällisesti. Kvalitatiivisessa analyysissä käytetään termejä kuten pyöreys, neulamaisuus jne. Kvantitatiivisessa analyysissä termit ovat täsmällisempiä kuten pystysuora halkaisija. (Allen 2003, 142.)

Koon määrittämiseen voidaan käyttää standardisoituja asteikkoruutuja, joille tutkittava näyte asetetaan. Tämän avulla saadaan silmämääräisesti kokojakauma selville. Visuaalinen tarkastelu voidaan tehdä myös automaattisesti koneen avulla. Kameran ottaman kuvan perusteella tietokone pystyy erottamaan partikkelit toisistaan ja määrittämään niiden koon. (Allen 2003, 154–158; Horiba 2012, 23–24.)

3.3 Seulonta

Seulat ovat yksi käytetyimmistä partikkelien kokojakauman määrittämiseen käytetyistä menetelmistä maailmassa. Se on vuosituhansia tunnettu, kohtuullisen halpa ja helppo menetelmä. Seuloissa on yleensä langasta punottu verkko. (Allen 2003, 208–210.) Lankojen materiaalina voidaan käyttää ruostumatonta terästä, pronssia tai messinkiä (Lillavenkatesa, Dapkunas & Lum 2001, 28). Reiät ovat yleensä neliönmuotoisia, mutta on olemassa myös pyöreillä ja suorakulmaisilla rei'illä varustettuja seuloja (Allen 2003, 208–210). Pyöreäreikäiset seulat lajittelevat partikkelit vain yhden mitan mukaisesti. Neliönmuotoiset seulovat kahden samansuuntaisen pinnan ja lävistäjän mittojen mukaan. (Loveland & Whalley 2000, 292.)

Perinteisiä seuloja on saatavilla 125 mm:stä 20 μm :iin. Koko dA määritellään pienimmän neliömäisen reiän mukaan, josta partikkeli mahtuu kulkeutumaan läpi. Seuloille voidaan antaa myös verkkonumero, joka ilmaisee kuinka monta lankaa on käytetty yhden tuuman matkalla. (Allen 2003, 208–

210.) Erikokoiset seulat pinotaan päällekkäin, niin että suurin on päällimmäisenä. Peräkkäisten seulojen suhde on yleensä noin $4\sqrt{2}$. Näyte asetetaan seulan päälle ja ravistelun aikana näyte kulkeutuu verkon aukkojen läpi alaspäin. Tietyn kokoiset partikkelit jäävät tietyn seulan päälle, jolloin kokojakauma saadaan punnitsemalla seulalle jäänyt näytemäärä. (Lillavenkatesa ym. 2001, 28–30.)

Tavallisin seulonta on kuivaseulonta, jossa kuivaa jauhemaista näytettä punnitaan. Ravistelijat ravistelevat tai pyörittävät seuloja tietyllä taajuudella tietyn ajan. Märkäseulamenetelmissä käytetään nestettä apuna. Näillä pystytään erottelemaan hienompia kuin $75 \mu\text{m}$ partikkeleita. (Lillavenkatesa ym. 2001, 30–32.)

Seulonnan tulokset esitetään fraktioiden prosenttiosuuksina. Niistä voidaan esittää joko kumulatiivinen kuvaaja tai pylväskuvaaja, jossa on esitetty kukin seulakoon osuus prosentteina. Molemmat kuvaavat partikkelien kokojakaamaa. (Lillavenkatesa ym. 2001, 35–36.)

3.4 Sedimentaatio

Sedimentaatioon perustuvat partikkelikokomääritykset pohjautuvat Stokesin lakiin. Partikkelit laskeutuvat nesteessä painovoiman vaikutuksesta. Stokesin laki on esitetty kaavassa 1. (Loveland & Whalley 2000, 294.)

$$t = \frac{18\eta h}{(\rho - \rho_0)gd^2} \quad (1)$$

jossa

t = aika, jona partikkeli liikkuu matkan h rajanopeudellaan [s]

h = matkan pituus [cm]

ρ = partikkelin tiheys [g/cm³]

ρ_0 = liuoksen tiheys [g/cm³]

g = putoamiskiihtyvyys [cm/s²]

d = partikkelin (pyöreä) halkaisija [cm]

η = liuoksen viskositeetti [poise] (1 poise = 0,1 Pa/s)

SI-järjestelmän mukaisilla yksiköillä laki muokkaantuu kaavan 2 mukaiseksi.

$$t = \frac{18\eta}{(\rho - \rho_0)\omega^2 d^2} \ln\left(\frac{R}{S}\right) \quad (2)$$

jossa

ω = sentrifuugin kulmanopeus (kierroksia per sekunti * 2π)

S = partikkelin etäisyys sentrifuugin akselista alussa [cm]

R = partikkelin kulkema matka [cm] ajassa t [s]

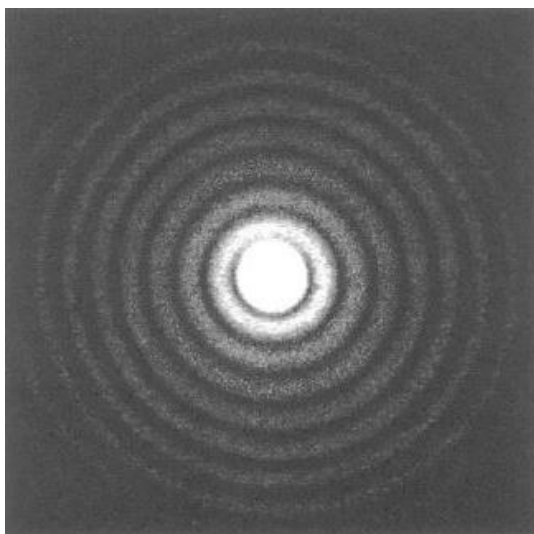
Kaavat pätevät, kun pallomaiset partikkelit ovat kiinteitä ja tasaisia, partikkelit laskeutuvat riippumattomasti toisistaan sekä partikkelien ja nesteen välillä ei tapahdu reaktioita tai leikkauksia. Lisäksi astian halkaisijan pitää olla selvästi suurempi kuin partikkelien. Partikkelien on saavutettava rajanopeutensa. Sen on oltava hidas. (Loveland & Whalley 2000, 294–295.)

Sedimentaatiotekniikat voidaan jakaa suspensointityypin, mittauseriaatteen ja voimakentän mukaan. Suspensointityyppejä ovat homogeeninen ja lähtöviiva. Mittauseriaatteita ovat inkrementaalinen ja kumulatiivinen. Voimakenttiä ovat gravitaatio ja sentrifugi. (Allen 2003, 359–360.)

Tavallisesti mittalaitteet käyttävät mittaamiseen röntgensädettä tai valonsädettä. Molemmissa saadaan selville partikkelien konsentraatio tietyllä korkeudella säteen intensiteetin heikkenemisen perusteella. Intensiteetti heikkenee röntgensäteillä absorboitumalla ja valonsäteillä siroamalla. Mitä suurempia ovat partikkelit, sitä nopeammin ne laskeutuvat. Kaavan 2 avulla saadaan laskettua partikkelien halkaisijat. (Lillavenkatesa ym. 2001, 49–50.)

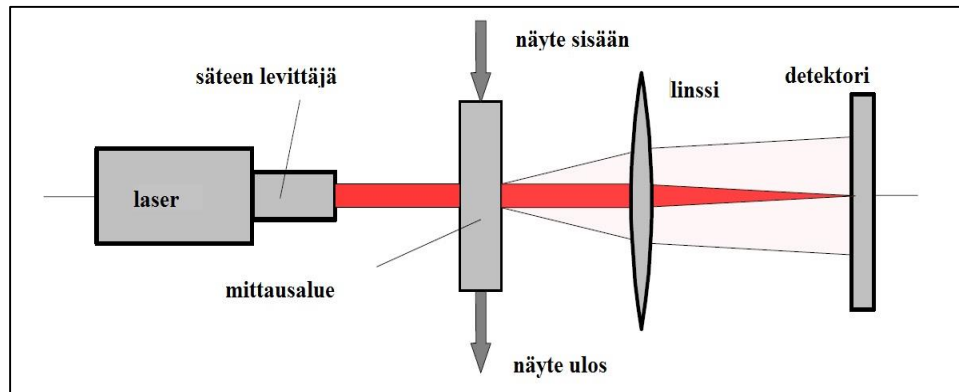
3.5 Laserdiffraktio

Laserdiffraktio hyödyntää valon ominaisuutta, kun se osuu partikkelin pintaan. Valon ja partikkelin välillä tapahtuu sirontaa eli diffraktiota ääri-voista, taittumista, heijastumista partikkelin sisään ja ulos ja absorboitumista sisäänpäin. Valon sirontaominaisuudet keksi Fraunhofer 1800-luvulla. (Sympatec GmbH 1998a, 34; Röthele & Witt 1999; ISO 13320-1 1999, 16.) Sironneen valon intensiteettikuvio riippuu partikkelin koosta. Mitä isompi on sirontakulma, sitä pienempiä ovat partikkelit. Kuviossa 7 on esitetty yhden pyöreän partikkelin diffraktiokuvio. Kaikki laitteet olettavat partikkeleiden olevan tasaisen pyöreitä. (ISO 13320-1 1999, IV.)



Kuvio 7. Pyöreän partikkelin diffraktiokuvio (Mukaiillen Xu 2000, 79).

Kuviossa 8 on esitetty laserdiffraktiolaitteiston osat. Valonlähteestä lähtee monokromaattinen säde, jota muokataan säteenlevittäjässä yhdensuuntaiseksi. Säde kulkeutuu näyttilään, jossa se valaisee näytteen ja siroaa partikkeleista. Siroamiskulmista muodostuu jokaiselle partikkelille yksilöllinen sirontakuvio. Linssin avulla tapahtuu Fourierin muunnos kuviolle. Monielementti detektori havainnoi muuntuneen intensiteetti kuvion signaalin. Se lähettää tiedot tietokoneelle analysoitavaksi. Tulosten laskennassa käytetään joko Fraunhoferin approksimaatiota taikka Mien teoriaa. (Xu 2000, 111–112.)

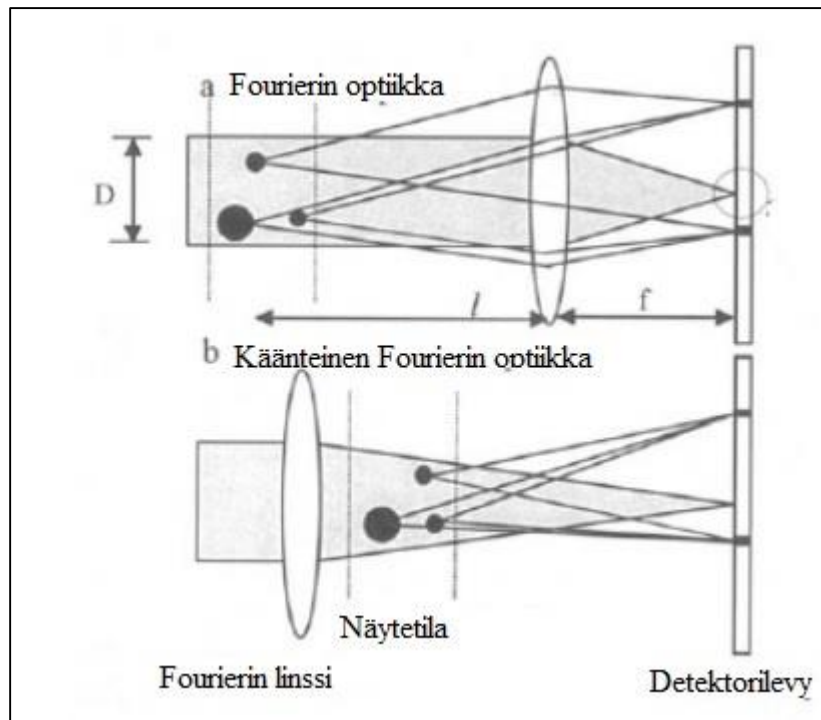


Kuvio 8. Laserdiffraktiolaitteiston kuvaus (Mukaiillen Röthele & Witt 1999).

3.5.1 Valonlähde ja linssioptiikka

Valonlähteenä käytetään pääasiallisesti joko valkoista valoa lähettävää wolframi-halogeneeni lamppua tai jatkuvaa laservaloa. Laser on käytetympi ja sillä on monia etuja. Se on hyvin stabiili, kestää pitkään, lähettää monokromaattista valoa ja sillä on pitkä avaruudellinen ja ajallinen koherenssi. Yleisin laser on helium-neon aallonpituudella 632,8 nm. (Xu 2000, 126.)

Linssi voidaan asettaa näytteen jälkeen, jolloin puhutaan Fourierin optiikasta tai ennen näytettä, jolloin kyseessä on käänteinen Fourierin optiikka. Kuviossa 9 (s. 13) on havainnollistettu linssin paikka ja säteiden kulku näissä tapauksissa. Detektori on asetettu linssin polttopisteeseen. (Xu 2000, 129.)



Kuvio 9. Laserdiffraktiossa käytettyjen Fourierin ja käänteisen Fourierin optiikan järjestelyt (Mukaiillen Xu 2000, 128).

Fourierin optiikassa (kuvio 9a) näytepartikkelit kulkeutuvat tietyn etäisyyden päässä linssin edessä. Linssi tarkentaa häiriöttömät säteet niin, etteivät ne häiritse sironneita säteitä. Se myös muuttaa sironneen valon paikan funktioksi detektorille. Linssi taittaa tietyllä kulmalla sironneen valon tietylle detektorielementille, eikä se riipu partikkelin paikasta näytetilassa. Suurin mahdollinen sirontakulma θ_{max} , jonka sirontaintensiteetin linssi pystyy vielä kokoamaan, voidaan laskea kaavalla 3. (Xu 2000, 129.)

$$\theta_{max} = \tan^{-1} \frac{d_L + D}{2l} \quad (3)$$

jossa

l = Näytetilan ja linssin etäisyys

d_L = Linssin koko

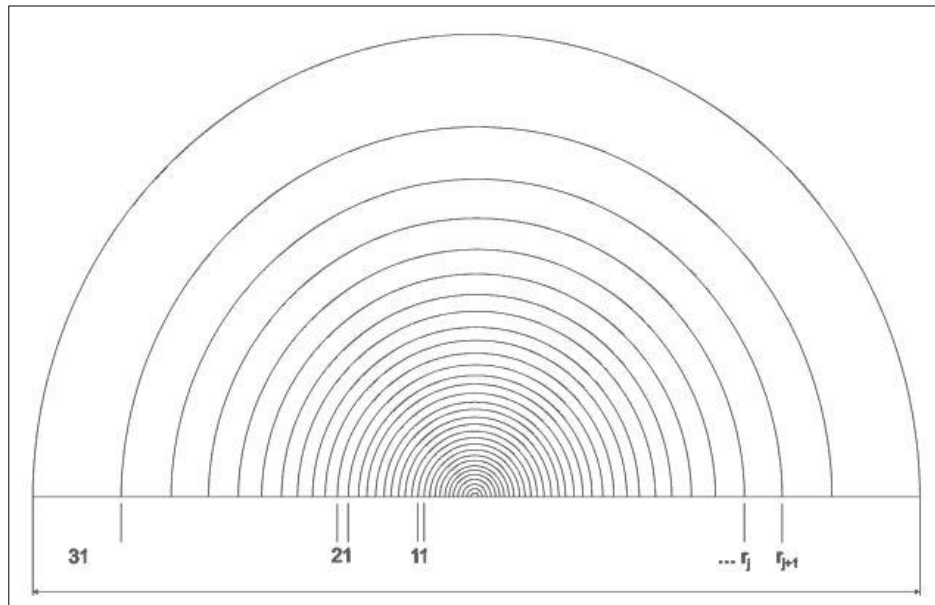
D = Säteen dimensio

Käänteisessä Fourierin optiikassa linssi (kuvio 9b) on ennen näytetilaa. Kolimoidun säteen sijaan, partikkelit valaistetaan linssin kokoavalla säteellä. Sironnut valo kulkeutuu suoraan detektorille. Linssin kokoa rajoittavat tekijät näin ollen poistuvat. (Xu 2000, 131.)

3.5.2 Detektori

Detektori on laitteiston hienostunein osa. Detektori koostuu useasta erillisistä herkistä elementistä, jotka eivät ole toistensa päällä, ovat samanmuotoisia, kiinni toisissaan ja joiden heijastuskyky on nolla. Elementit suurenevät logaritmisesti. (Röthele & Witt 1999.) Detektorin materiaalina käytetään yleisesti silikonia, koska sillä on laaja dynaaminen alue, se on hyvin herkkä ja kestää pitkään käytössä (Xu 2000, 134).

Kuviossa 10 on esitetty detektorin kuva. Se on koottu 31 puoliympyrän muotoisesta elementistä. Yleisesti elementtejä on noin 32 kappaletta detektoreissa. Tämä varmistaa korkean signaali-häiriösuhteen, luotettavan muodon syntyvälle kuvalle ja tunnistaa karkean hännän mitatussa kokojakamassa. (Röthele & Witt 1999.)



Kuvio 10. Puoliympyrädetektorin 31 elementtiä (Mukaillen Röthele & Witt 1999).

3.5.3 Näytteen syöttäminen

Näytteen syöttämisessä on tärkeintä saada partikkelit kulkeutumaan säteeseen erottamatta erikokoja. Ei-toivottuja vaikutuksia ovat myös ilmakuplat, lämpöturbulenssi, hiertyminen ja kasaantuminen. Syöttöjä on suunniteltu kuiville jauheille, nesteessä oleville näytteillä ja aerosolisuihkuille. (Xu 2000, 139.)

Jauheilla väliaineena on yleensä ilma. Jauheet kulkeutuvat näytealueen läpi paineen ja/tai vakuumin avulla. Tasaisen näytevirran aikaansaaminen on erittäin tärkeää, jottei synny kasaantumia. Pienten partikkelien osalta, alle

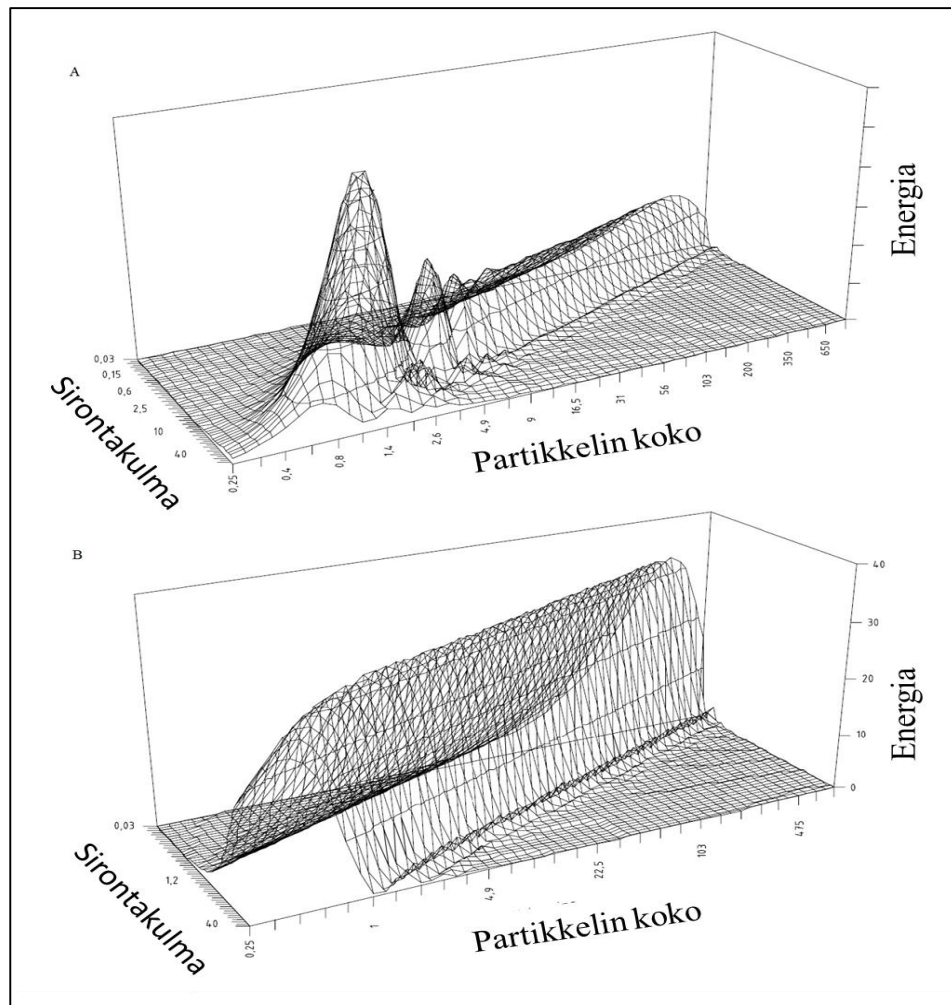
5 μm , ongelma on suuri, johtuen staattisista varauksista ja koheesiovoimista. Näitä voidaan estää käyttämällä apuaineena silikaa tai hiiltä, jotka ovat niin pieniä, etteivät ne muuta kokojakaamaa. Erottelua saadaan näytteen syöttöön käyttämällä syöttölaitteita. Niissä on suppilo ja tärinä, jotka saavat näytteen kulkeutumaan tasaisesti kohti sädettä. (Xu 2000, 140–142.)

Nestesyötössä näyte on suspensoitu vesi- tai orgaaniseen liuokseen. Neste toimii näytteen levittäjänä ja kuljettajana säteelle. Neste kiertää jatkuvasti, jotta partikkelit läpäisisivät säteen useamman kerran sattumanvaraisessa suunnassa. Pumppu kierrättää näyteliuosta. Se voi olla sentrifugaalinen tai peristalttinen. Ultraäänellä tai sekoittimella voidaan auttaa tasaisen jakautumisen aikaansaannissa. (Xu 2000, 139.)

Aerosoleja mitattaessa sopiva adapteri on sijoitettuna säteen lähelle, jotta näyte voidaan suihkuttaa säteeseen suoraan suuttimesta. Säädintä voidaan käyttää kontrolloimaan suihkun pituutta, nopeutta ja kiihtyvyyttä. Säteen toiselle puolelle on laitettu suodatin tai vakuumi, joka kerää aerosolin partikkelit talteen. (Xu 2000, 139.)

3.5.4 Laskentaan käytetyt teoriat

Kuviossa 11 (s.16) ovat esitettynä kuvaajat valon energiasta suhteessa sirontakulmaan ja partikkelien kokoon nähden. A kohdassa on käytetty Mien teoriaa laskennassa ja B kohdassa Fraunhoferin approksimaatiota. Mittaukseen on käytetty lateksipartikkeleita väliaineena vesi. Näytteessä on ollut erikokoisia partikkeleita, joiden tilavuus on ollut sama.



Kuvio 11. Valon energia hajontakuviosta sirontakulman ($^{\circ}$) ja partikkelien koon (μm) mukaan käsiteltynä Mie teorialla (A) ja Fraunhoferin approksimaatiolla (B) (Mukaiillen ISO 13320-1 1999, 20–21).

Kuten kuviosta 11 nähdään eroavat mallit toisistaan. $20\ \mu\text{m}$:n kohdalla kuviot ovat samankaltaisia. Tästä pienempien kokojen osalta erot kasvavat ja alle $10\ \mu\text{m}$:stä alaspäin kuviot ovat täysin erilaiset. Fraunhoferin approksimaatiossa detektorin signaalin energia ei juuri muutu koon pienentyessä. Mien teorialla taas vaihtelua on paljon. (ISO 13320-1 1999, 19–21.)

Fraunhoferin approksimaatio ottaa huomioon vain valon diffraktiovaikutuksen partikkeliin. Se olettaa partikkelien olevan pyöreitä ja läpinäkymättömiä. Valon oletetaan siroavan ekvalentisti laajojen ja kapeiden kulmien välillä. Partikkeleiden tulee myös olla huomattavasti suurempia kuin käytetty aallonpituus. Näistä olettamuksista johtuen, laskentaan käytetyt kaavat ovat yksinkertaistettuja. (Horiba 2012, 16; ISO 13320-1 1999, 17–18.)

Mien teoria on laajempi ja ottaa huomioon kaikki valon ja partikkelin väliset vuorovaikutukset. Se on myös huomattavasti monimutkaisempi laskea. Laskentaan tarvitaan väliaineen ja partikkelin kompleksinen taitekerroin,

jossa on mukana todellinen ja imaginääri osa. Myös tässä teoriassa on oletamuksia. Partikkelien on oltava pyöreitä ja läpinäkyviä. Partikkelien ja väliaineen taitekertoimien erotus täytyy olla pieni. Mien teoriaa käytettäessä on näytteen koostuttava samasta aineesta. (Horiba 2012, 16; ISO 13320-1 1999, 17–18; Röthele & Witt 1999.)

Nykyisissä laitteissa käytetään laskennassa pääosin Mien teoriaa, vaikka se vaatii monimutkaisia parametreja laskentaan. Se antaa yleensä vähemmän vääristyneen kokojakauman kuin Fraunhoferin approksimaatio. Alle 50 µm:n partikkeleissa on parempi käyttää Mien teoriaa, koska Fraunhoferin approksimaatiolla ei saada tarpeeksi tarkkoja tuloksia sitä pienemmistä partikkeleista. (ISO 13320-1 1999, 18–19.)

4 MENETELMÄN VALIDOINTI

Validointi on tärkeä osa laboratorion toimintaa. Analyysimenetelmän validoinnissa osoitetaan sen soveltuvuus haluttuun käyttötarkoitukseen. Suunniteltujen mittaussarjojen avulla selvitetään menetelmän eri parametrit. Tulokset näistä kootaan yhteen sekä muu tieto ja tausta-aineisto. Näiden perusteella voidaan todeta menetelmän luotettavuus ja sopivuus. (Jaarinen & Niiranen 2005, 11.)

Validointi liittyy tärkeänä osana menetelmän kehitykseen. Useat validoinnin parametrit, jotka ilmaisevat menetelmän suorituskykyä, arvioidaan kehityksen osana. Validoinnin parametreja ovat selektiivisyys ja spesifisyys, lineaarisuus, mittausalue, toteamisraja, määrittäysraja, poikkeama, saanto, häiriönkestävyys, toimintavarmuus, tarkkuus, toistettavuus, uusittavuus ja mittausepävarmuus. (Ehder 2005, 25–26.)

Validointi on suoritettava, kun halutaan todentaa parametrien olevan riittäviä tietyn analyttisen ongelman ratkaisemiseen. Ajankohtaista validointi on silloin, kun kehitetään uutta menetelmää, menetelmää on uudistettu, otetaan käyttöön uusi laite, vanhassa menetelmässä on osoitettu muutoksia sekä kahden eri menetelmän tulosten yhtäpitävyyden osoittaminen. (Ehder 2005, 26.) Kaikkia validoinnin parametreja ei välttämättä tarvitse tutkia. Laajuus riippuu tutkittavan menetelmän ominaisuuksista ja muutosten suuruudesta. Tiettyjen muutosten jälkeen on suoritettava uudellevalidointi. (ICH 2005, 2.)

4.1 Selektiivisyys ja spesifisyys

Selektiivisyydellä tarkoitetaan menetelmän kykyä määrittää tarkasti ja spesifisesti tiettyä analyyttiä. Näytematriisissa esiintyy myös muita komponentteja. Nämä muut komponentit eivät häiritse määrittystä. Selektiivisyyttä mitataan analyytin saannolla. Mittauksiin voidaan käyttää puhtaita aineita, seoksia ja kompleksisia matriiseja. (Ehder 2005, 27.)

Spesifisyys on menetelmän kykyä mitata vain haluttua analyyttiä. Mitä suurempi on menetelmän selektiivisyys, sitä suurempi on myös sen spesifisyys. Kovinkaan moni menetelmä ei ole täysin spesifi. Molempien testaaminen on laite- ja yhdistekohtaista. (Ehder 2005, 27.)

4.2 Lineaarisuus ja mittausalue

Lineaarisuudessa tulosten ja tutkittavien aineiden pitoisuuksien välillä on lineaarinen korrelaatio. Mittausalueella mittalaitteen virhe on tiedossa ja määritellyissä rajoissa. (Jaarinen & Niiranen 2005, 13.)

Lineaarisuus määritellään yleensä vähintään viiden eri pitoisuuden omaavan näytteen avulla, joista tehdään useampi toisto. Tuloksista saadaan regressiosuora pienimmän neliösumman menetelmällä. Silmämääräisesti graafista voidaan arvioida lineaarinen alue. Samalla voidaan määrittää myös luotettava mittausalue, jolla on hyväksyttävä tarkkuus ja täsmällisyys. (Ehder 2005, 28–29.)

4.3 Toteamis- ja määrittäysraja

Toteamisraja on analyytin pitoisuus, joka eroaa nollanäytteen arvosta merkittävästi sekä voidaan luotettavasti 95 prosentin todennäköisyydellä todeta mittalaitteen signaalin taso. Toteamisraja voidaan laskea kaavalla 4. (Jaarinen & Niiranen 2005, 13.)

$$\text{toteamisraja} = \text{nollanäytteen keskiarvo} \pm 3 * s \quad (4)$$

jossa
s= keskihajonta

Määrittäysraja eli kvantitointiraja on analyytin pienin pitoisuus, jolle kvantitatiivissa eli määrällisissä mittauksissa voidaan tehdä tietyllä luotettavuustasolla. (Jaarinen & Niiranen 2005, 13.) Määrittäysraja lasketaan yleensä kertomalla nollanäytteen keskiarvo 5, 6 tai 10 kertaa nollanäytteen keskihajonta. Toteamis- ja määrittäysrajan väliin jää alue, jolla voidaan luotettavasti todeta olevan analyyttiä. Pitoisuutta ei voida todeta, muuta kuin ”alle määrittäysrajan”. (Ehder 2005, 30.)

4.4 Saanto

Saanto tarkoittaa näytteessä olevaa analyytin tai vertailuaineen määrää esikäsittelyiden jälkeen määritettynä menetelmällä. Sitä voidaan kutsua koko menetelmän tehoksi havaita tutkittavaa analyyttiä. Esikäsittelyt voivat häiritä saantoa ja tiettyä tekijää on vaikea tunnistaa. Saanto on määritettävä aina aine ja menetelmäkohtaisesti. Sitä voidaan tutkia vertaamalla saatua

tulosta saannoltaan tunnetun menetelmän tuloksiin, vertaamalla sertifioidulla matriisipohjaisella vertailumateriaalilla saatuihin tuloksiin tai tunnettujen lisäysten avulla. Saantoprosentti voidaan laskea tunnetun lisäyksen laskennallisesta arvosta kaavalla 5. (Ehder 2005, 32–33.)

$$Saanto (\%)R = \frac{C_1 - C_2}{C_3} * 100 \% \quad (5)$$

jossa:

C_1 = useampien tunnetuilla lisäyksillä tehtyjen mittausten keskiarvo

C_2 = mittaustulos näytteestä ilman tunnettua lisäystä

C_3 = tunnetun lisäyksen laskennallinen arvo

Ideaalitapauksessa menetelmä pystyy havaitsemaan koko lisätyn analyytin määrän, jolloin $C_1 - C_2 = C_3$. On mahdollista käyttää korjauskerrointa, jos saanto jää aina alle 100 prosentin eikä siihen pystytä vaikuttamaan koejärjestelyin. (Jaarinen & Niiranen 2005, 30–31.)

4.5 Virheet

Systemaattinen virhe eli poikkeama vaikuttaa mittaustapahtumassa aina samalla tavalla. Se aiheutuu yleensä mittalaitteesta. Satunnainen virhe on ennustamaton ja sitä tapahtuu aina. Menetelmän kokonaisvirhe voidaan määrittellä, kun tunnetaan molemmat. (Jaarinen & Niiranen 2005, 31–32.)

Satunnaisvirhe nimensä mukaisesti sattumanvaraisesti suurentaa tai pienentää tulosta. Satunnaisvirhe lasketaan riittävän usean rinnakkaismäärityksen keskiarvon, keskihajonnan ja suhteellisen keskihajonnan perusteella (kaava 6). (Jaarinen & Niiranen 2005, 32.)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_i^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (6)$$

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} * 100 \%$$

jossa

SD = keskihajonta

x_i = yksittäinen havaintoarvo

\bar{x} = mittausten keskiarvo

n = mittausten lukumäärä

RSD = suhteellinen keskihajonta

4.6 Häiriökestävyys ja toimintavarmuus

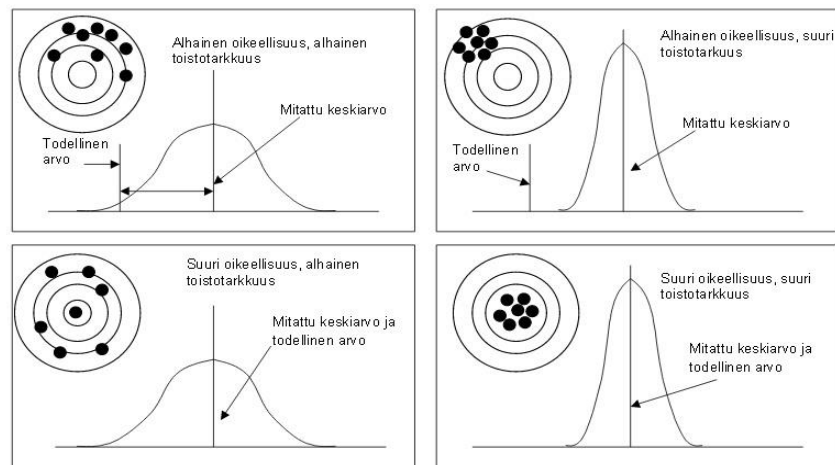
Häiriökestävyys tarkoittaa tulosten herkkyyttä pienille muutoksille olosuhteissa ja suorituksen eri vaiheissa. Toimintavarmuus kuvaa menetelmän ky-

kyä tuottaa hyväksyttäviä tuloksia huolimatta pienistä poikkeamista mitausmenetelmän yksityiskohdissa. Häiriöt joko vaikuttavat tai eivät vaikuta tuloksiin. (Ehder 2005. 33–34.)

Häiriökestävyyttä ja toimintavarmuutta testataan tekemällä tarkoituksenmukaisesti pieniä todellisuudessa mahdollisia muutoksia ja havaitsemalla niiden vaikutukset. Muutettavia tekijöitä voivat olla mm: suorittava henkilö, pH, lämpötila ja reagenssien ikä. Suuresti vaikuttavia muutoksia on tutkittava lisää ja määrittää hyväksyttävät rajat. Menetelmäkuvaukseen on kirjattava huomattavasti vaikuttavat tekijät. (Ehder 2005 34.)

4.7 Tarkkuus, toistettavuus ja uusittavuus

Tarkkuus voi olla mittalaitteen tai mittauksen tarkkuutta. Laitteen tarkkuus tarkoittaa sen kykyä antaa vasteita, jotka ovat lähellä oikeaa arvoa. Mittauksen tarkkuus on tuloksen ja tosiarvon yhteensopivuus. Tarkkuutta määritetään arvioimalla systemaattisia ja satunnaisia virheitä. Oikeellisuus kertoo systemaattisten virheiden osuuden ja toistotarkkuus satunnaisen virehiden. Kuviossa 12 on esitetty mittausten oikeellisuuden ja toistotarkkuuden erot. (Ehder 2005, 35–36.)



Kuvio 12. Oikeellisuuden ja toistotarkkuuden välinen ero (Mukaiillen Ehder 2005, 36).

Toistettavuus ilmaisee usean peräkkäisen mittauksen täsmällisyyttä lyhyellä aikavälillä. Olosuhteet kuten lämpötila, tekijä, laitteet yms. ovat samoja mittausten välillä. (ICH 2005, 5.) Toistettavuus määritellään tekemällä useita rinnakkaismäärytyksiä näytteistä (Ehder 2005, 37).

Uusittavuudella tarkoitetaan täsmällisyyttä, joka saadaan, kun samasta näytteestä tehdään mittaus eri laboratoriossa ja eri laitteilla. Kun halutaan standardisoida menetelmä, suoritetaan eri laboratorioden vertailukokeita. (Ehder 2005, 37.)

4.8 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus on vaihteluväli, jolle mittaustulos sijoittuu yleensä 95 prosentin todennäköisyydellä. Kokonaisepävarmuus (u , uncertainty budget) on analyysin eri vaiheiden epävarmuuksien summa. Tekijöiden määrittämiseen käytetään arvioitua tai mitattua keskihajontaa, jolloin epävarmuus lasketaan kuin keskihajontakin. Kaavan 6 s on tällöin $u(x)$. (Jaarinen & Niiranen 2005, 35.)

Yksittäisen tekijän vaikutus tuloksen luotettavuuteen otetaan huomioon suhteellisen standardiepävarmuuden avulla. Se lasketaan kaavalla 7. (Jaarinen & Niiranen 2005, 35.)

$$u_r(x) = \frac{u(x)}{x} \quad (7)$$

jossa

$u_r(x)$ = suhteellinen standardiepävarmuus

$u(x)$ = kokonaisepävarmuus

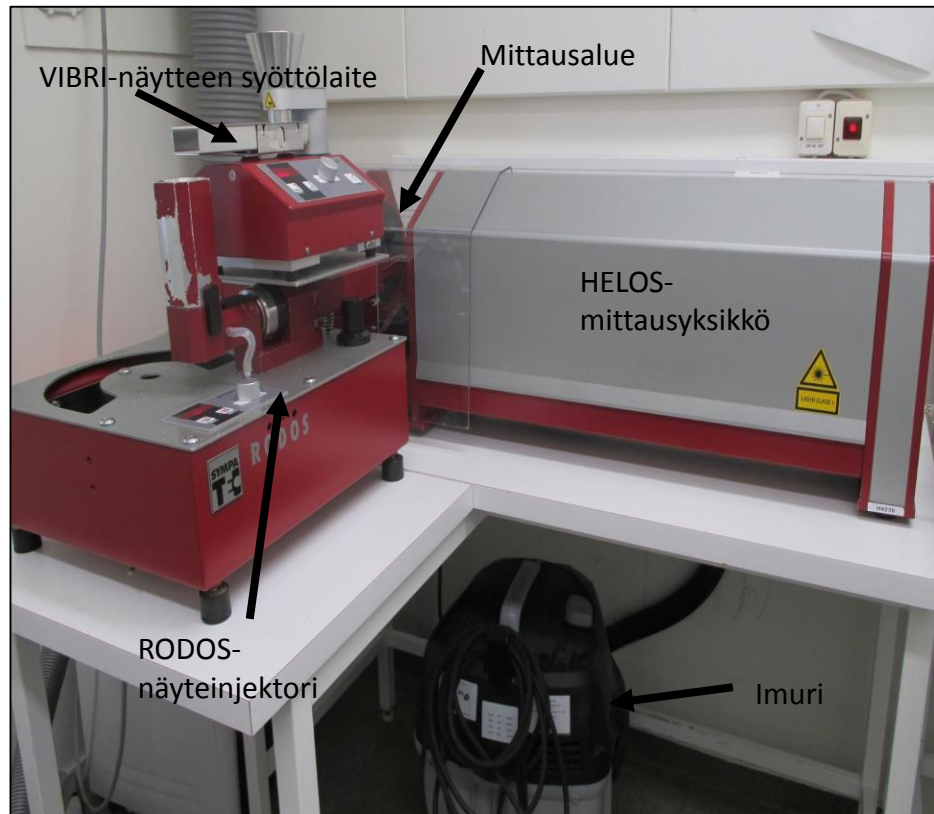
x = yksittäisen tekijän vaikutus

5 MENETELMÄN KEHITYS JA VALIDOINTI

Työ suoritettiin kevään 2014 aikana Danico Sweeteners Oy:n Kotkan tehtaan laboratoriossa. Tarkoituksena oli ottaa käyttöön ja validoida lasediffraktiolaitteen R7-linssi ksylitolin partikkelikoon mittaamiseen. Aiemmin kiteisen ksylitolin mittaukset tehtiin R6-linssillä. Jauhetun ksylitolin keskipartikkelijakauma analysoidaan seulasarjaa käyttäen. Validointi suoritettiin ISO 13320-1 -standardin mukaisesti.

5.1 Käytetty laitteisto ja materiaalit

Kuvassa 1 (s. 22) on esitetty mittauksiin käytetty laserdiffraktiolaitteisto. Laitteen valmistaja on SympaTEC GmbH. Se koostuu VIBRISYÖTTÖLAITTEESTA, RODOS T41 -näyteinjektorista ja HELOS MAGIC KFS -mittausyksiköstä. Laitteen laser on helium-neon laser, jonka aallonpituus on 632,8 nm. Näyte asetetaan VIBRIin suppiloon, joka nousee ja kuljetin tärisyttää näytteen RODOS-injektoriin, joka kuljettaa sen mittausalueelle. Paine syöttää näytteen alueen yli. Laitteen detektori lähettää datansa tietokoneelle. Laitetta hallinnoitiin ja tulokset analysoitiin WINDOX 5.8.0.0 -ohjelmalla.



Kuva 1. SympaTECin laserdiffraktiolaitteen kokoonpano. (Kuva: Anni Kolli, 2014)

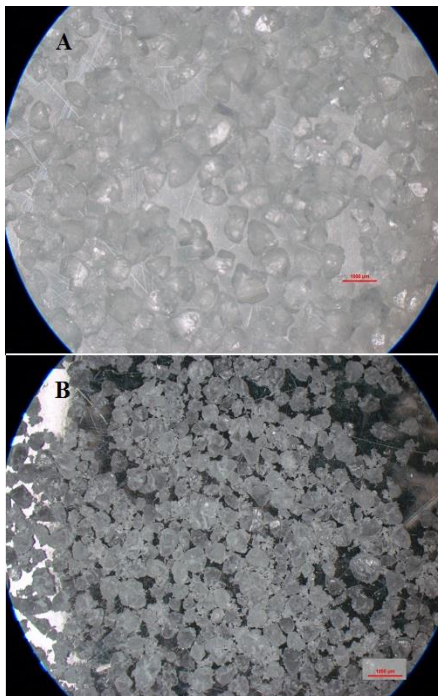
R6-linssin mittausalue on $0,5/9,0-1750 \mu\text{m}$. R7-linssin rajat ovat $0,5/18,0-3500 \mu\text{m}$. Alarajan ensimmäinen luku on integraaliraja, jota suurempia partikkeleja analysoidaan. (Sympatec 1998a, 9.) R7-linssillä on siis suurempi mittausalue. Se on tärkeä ottaa käyttöön, koska nykyisin tuotannossa olevan ksylitolin keskipartikkelikoko lähentelee R6-linssin ylärajaa. R7-linssi on kuitenkin herkempi ympäristön häiriöille kuin R6-linssi, joten se on otettava huomioon tulevassa käytössä (Cantin 2014.)

Laitteen linssit ovat yhdessä linssirevolverissa (kuva 2, s. 23). Linssit vaihdetaan WINDOX-ohjelmalla. Valitun linssin toimintaetäisyys säätyy automaattisesti oikeaksi. R6-linssin maksimietäisyys näytteestä on $\leq 566 \text{ mm}$ ja R7-linssillä $\leq 1132 \text{ mm}$. Näillä etäisyyksillä pystyy laite havaitsemaan koko näytteen. (Sympatec 1998a, 21.)



Kuva 2. HELOS yksikön linssirevolveri sekä detektori. (Kuva: Anni Kolli, 2014)

Testauksiin käytetyt näytteet olivat peräisin samasta kiteytyserästä. Kiteytyserän numero oli 1553 ja näytteet oli otettu 24.4.2014. Näytteet saapuivat laboratorioon teräskannuissa. Menetelmän luomiseen käytettiin näytettä, joka oli otettu kuivurista ja validointiin pakkaamosta otettua näytettä. Kuvassa 3 on mikroskooppikuva (Nikon SMZ1000) kummastakin näytteestä. Pakkaamon näytteessä kiteet olivat jonkin verran hajonneet kuljetuksessa verrattuna kuivuriäytteeseen. Kiteet ovat hyvin heterogeenisiä molemissa. Tämä vaikuttaa hyvin paljon näytteiden analysointiin. Rinnakkaiset näytteet voivat erota toisistaan suuresti. Tämä voi tuoda ongelmia validoinnin suorittamiseen.



Kuva 3. Mikroskooppikuva kuivurista(A) ja pakkaamosta(B) otetuista ksylitolikiteistä. (Kuva: Anni Kolli, 2014)

5.2 Esikokeet

Validointisuunnitelmapalaverissa valittiin muutettaviksi parametreiksi syöttönopeus, paine ja syöttösuppilon korkeus. R6-linssin olosuhteet olivat syöttönopeus 80 %, paine 0,5 bar ja syöttösuppilon korkeus 3,0 mm. Nykyisessä menetelmäohjeessa näytemääräksi oli määrätty ruokalusikallinen (Karjalainen 2013). Se ei ole tarkka määrä ja riippuu hyvin paljon suorittavan henkilön ”käsialasta”. Rinnakkaisten näytteiden koko on voinut vaihdella. Tämä lisää analyysin tulosten epäluotettavuutta. Näytemäärä haluttiin vakioida, jotta yksi muuttuja saataisiin poistettua.

Ohjelmalle oli säädetty ksylitolin tiheys $2,81 \text{ g/cm}^3$ ja muotokerroin 1,00. Joka päivä ennen mittauksia suoritettiin signaalitesti, jolla tarkastettiin detektorin puoliympyräelementtien kunto ja linssin puhtaus. Ennen jokaista mittausta suoritettiin referenssimittaus ilman näytteitä, jotta taustan signaali saatiin selville. Ennen näytteen syöttöä tapahtui 10 sekunnin puhdistus. Laite aloitti näytteen mittaamisen, kun optinen konsentraatio ylitti 1,5 %:a ja lopetti mittauksen, kun se laski yli viideksi sekunniksi alle 1,5 %:n. Nämä arvot olivat kaikissa kokeissa samat.

Näytteenä käytettiin kuivurinäytettä. Ennen mittauksia näyte seulottiin käsin 2,36 mm seulan läpi, jotta kidekimput eivät häiritsisi mittausta. Aluksi punnittiin vaa’alla (Mettler Toledo PB3001 S/Flat), kuinka paljon ruokalusikalla sai ksylitolia otettua. Ajoja suoritettiin eri ajoparametrein ja näytemäärin. Paine oli esikokeissa koko ajan 0,5 bar.

Yhdestä ajosta suoritettiin kaksi rinnakkaista määritystä. Tuloksista seurattiin erityisesti optista konsentraatiota. ISO 13320-1 -standardin mukaan sen pitäisi olla yli 5 %:a. Vanhalla menetelmällä arvo on liikkunut 2 ja 3 %:n välillä. Taulukossa 1 on esitetty kokeisiin käytetyt ajoparametrit ja näytteen massa.

Taulukko 1. Esikokeiden ajoparametrit ja näytteen massa

| Suppilon korkeus [mm] | Syöttönopeus [%] | Näytemäärä [g] |
|-----------------------|------------------|----------------|
| 3,5 | 75 | 9,0 |
| 4,0 | 75 | 9,0 |
| 3,0 | 70 | 9,5 |
| 3,5 | 70 | 9,5 |
| 4,0 | 70 | 9,5 |
| 3,0 | 90 | 9,5 |
| 3,0 | 90 | 19,6 |
| 3,0 | 80 | 10,0 |
| 3,5 | 70 | 10,0 |
| 4,0 | 70 | 10,0 |
| 4,0 | 90 | 10,0 |
| 3,0 | 90 | 10,0 |
| 3,0 | 90 | 15,0 |
| 3,0 | 90 | 20,0 |

5.3 Laserdiffraktiomenetelmän luominen

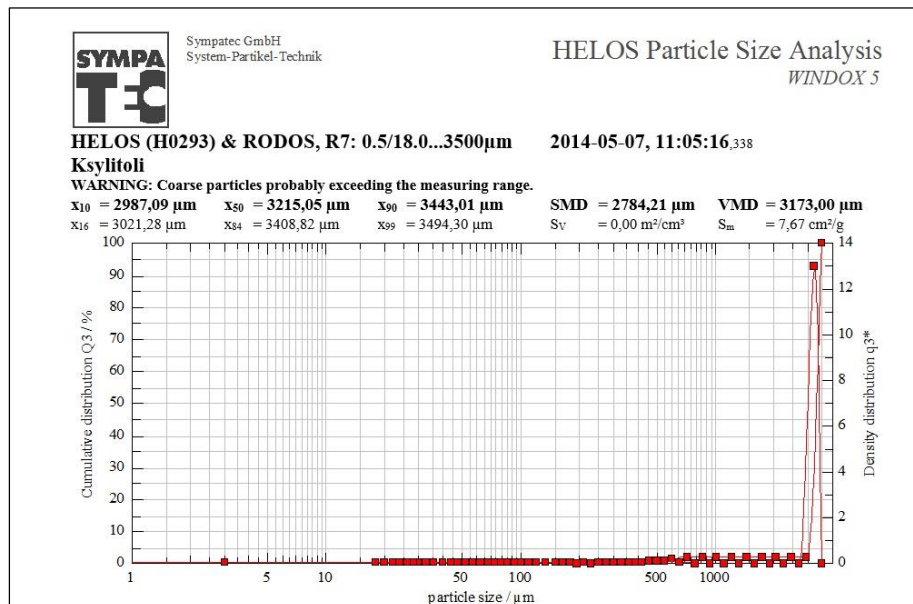
Valitut ajoparametrit olivat syöttönopeus 70, 80 ja 90 %, syöttösuppilon korkeus 3,0; 3,5 ja 4,0 mm sekä paine 0,5; 0,75 ja 1,0 bar. R6-linssin ajoparametrit olivat: syöttönopeus 80 %, syöttösuppilon korkeus 3,0 mm ja paine 0,5 bar. Testattavat parametrit otettiin näiden lähipiiristä. Painetta ei haluttu nostaa yli 1,0 barin, koska kiteet olisivat voineet hajota.

Näytteenä oli kuivurista saatua samaa ksylitolierää. Ennen mittaamista näyte seulottiin käsin 2,36 mm seulan läpi, jotta kidekimput eivät häiritse mittaamista.

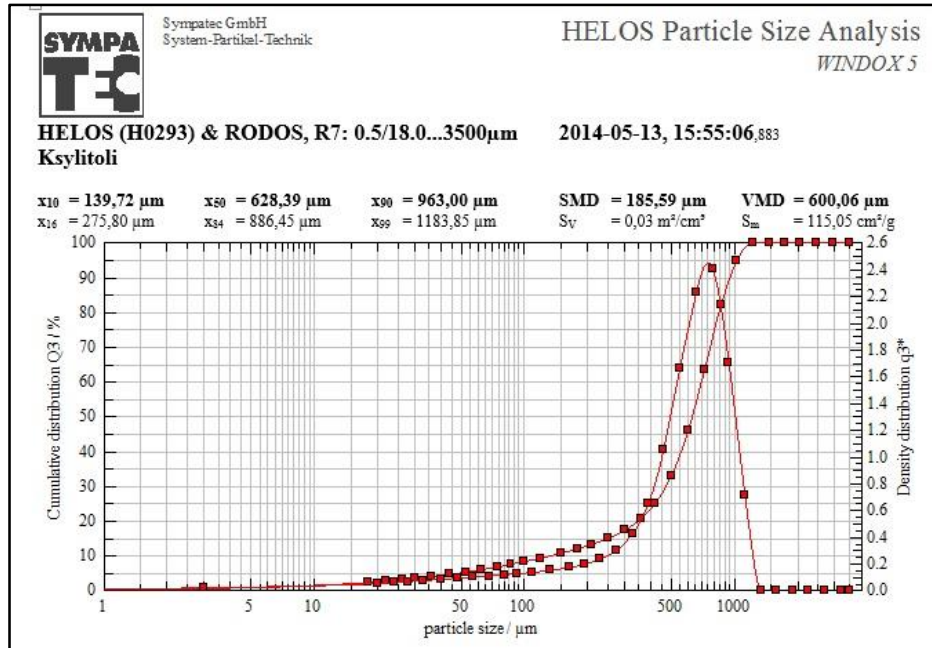
Näytettä saatiin esikokeiden perusteella vakioitua. Nopeus ja korkeus valittiin WINDOX-ohjelman avulla. Paine säädettiin manuaalisesti paine-ruuvia vääntämällä. Jokainen yhdistelmä testattiin. Yhteensä testejä tuli 27 kappaletta.

Testissä yhdellä yhdistelmällä tehtiin kymmenen hyväksyttävää ajoa. Epämääräisen kuvaajan antaneet tulokset hylättiin, kuten haamukuvaaja kuviossa 13. Kuviossa 14 (s. 26) on esitetty esimerkki hyväksytystä kuvaajasta.

Tuloksista kerättiin fraktioiden X_{10} , X_{50} , X_{90} sekä optisen konsentraation arvot. X_{50} on keskipartikkelikoko eli jakaumasta on 50 % kertynyt tällä kohdalla, X_{10} on se partikkelikoko jossa on jakaumasta kertynyt 10 % ja X_{90} 90 %. Arvoista laskettiin Microsoft Office Excel-ohjelmalla keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta.



Kuvio 13. Esimerkki haamukuvaajasta, joiden tulokset hylättiin.



Kuvio 14. Esimerkki hyväksytystä kuvaajasta.

Menetelmäksi valittiin ne ajoparametrit, jotka antoivat pienimmät suhteelliset keskihajonnat eri fraktiolla. Lisäksi katsottiin optista konsentraatiota. Sen toivottiin olevan mahdollisimman korkea.

5.4 Validointi

Menetelmä validoitiin ISO 13320-1 -standardin mukaisesti. Standardia noudattaen testattiin menetelmän toistettavuus ja tarkkuus. Muita validoinnin parametreja ei tälle laitteelle ja näytteelle voida järkevästi suorittaa. Validointi voidaan katsoa onnistuneeksi, jos keskipartikkelikokoon X₅₀ suhteellinen keskihajonta ei ylitä 3 %:a sekä X₁₀ ja X₉₀ hajonta ylitä 5 %:a.

Toistettavuutta testattaessa ajettiin kymmenen hyväksyttävää ajoa pakkaamonäytteellä vakioidulla näytemäärällä. Tuloksista kerättiin fraktioiden X₁₀, X₅₀, X₉₀ partikkelikoot. Niistä laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta.

Tarkkuus testattiin seulotulla pakkaamon näytteellä, koska standardi vaati käyttämään tunnetun partikkelikoon omaavaa näytettä. Seulottu fraktio, josta lopullinen näyte otettiin, oli 600 ja 425 μm seulojen väli. Seuloja seulottiin Retsch AS400 -sekoittajalla 6 minuuttia minuutin intervalleissa. Nopeus oli 275 rpm. Seulan 425 μm päältä punnittiin vakiomäärä näytettä ja ajettiin kymmenen hyväksyttyä ajoa. Tuloksista kerättiin fraktioiden X₁₀, X₅₀ ja X₉₀ partikkelikoot. Niistä laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta.

5.5 Vertailu R6-linssillä mitattuihin näytteisiin

Kehitettyä menetelmää haluttiin verrata vanhaan R6-linssin olosuhteisiin ja selvittää antaako uudet ajo-olosuhteet erilaisia tuloksia. Liian suuri hienoisuus epäiltiin osittain johtuvan ei-validoidusta menetelmästä. Vanhoja näytteitä valittiin 30 kappaletta, jotta voitiin tehdä tilastollisia analyyskejä. Näytteet ajettiin kehitetyllä ja validoidulla menetelmällä. Näytemäärä oli vakio. Näytteistä ajettiin rinnakkaiset analyysit. Analyysien keskipartikkelikoko X_{50} ei saanut erota toisistaan yli 25 μm .

Kahden rinnakkaisen ajon tuloksista WINDOX-ohjelmalla laskettiin keskiarvo. Näistä tuloksista kerättiin X_{16} , X_{50} ja X_{84} partikkelikoot ja fraktion <150 μm prosenttiosuus. Näytteen hajonta laskettiin kaavalla 8.

$$\text{Hajonta} = \frac{X_{84} - X_{16}}{2 * X_{50}} * 100 \quad (8)$$

Menetelmien tuloksia verrattiin toisiinsa Microsoft Office Excel-ohjelman verrannollisten parien t-testin avulla. Lisäksi suoritettiin regressioanalyysi ja muodostettiin residuaalikuvaajat pienimmän neliösumman menetelmällä. Analyysit suoritettiin keskipartikkelikoon X_{50} , hajonnan ja fraktion alle 150 μm tuloksista.

Verrannollisten parien t-testiä voidaan käyttää, kun halutaan selvittää kahden eri menetelmän eroja. Testillä verrataan eroaako mittausten keskiarvot toisistaan. Nollahypoteesiksi H_0 asetetaan, että molempien mittaustulosten keskiarvo perusjoukossa on sama $\mu_1 = \mu_2$. Testisuure noudattaa t-jakaumaa vapausastein $n-1$, jos nollahypoteesi on tosi ja oletetaan havaintoparien erotuksen noudattavan likimäärin normaalijakaumaa. Saatua t-arvoa verrataan kriittiseen t-arvoon. Vaihtoehtoinen hypoteesi tulee voimaan, jos testisuure on suurempi kuin kriittinen arvo. Testisuure voidaan laskea kaavalla 9. (Holopainen & Pulkkinen 2012, 190–191.)

$$t = \frac{\bar{d}}{\frac{s_d}{\sqrt{n}}} \quad (9)$$

jossa

\bar{d} = havaintoparien erotusten keskiarvo

s_d = erotusten keskihajonta

n = havaintoparien lukumäärä

Regressioanalyysissä pyritään löytämään muuttujien välillä mahdollisesti oleva yhteys. Yhteyttä kuvataan mallilla. Mallissa luodaan kuvaaja tutkittavien muuttujien välille. X-akselille tulee selittävä ja y-akselille selitettävä muuttuja. Pisteparien joukkoon piirretään regressiosuora, joka pyritään asettamaan mahdollisimman sopivaksi. Tämä tapahtuu pienimmän ne-

liösumman menetelmällä. Menetelmässä saadun suoran kummallekin puolelle sijoittuu suunnilleen saman verran havaintoja mahdollisimman lähelle. Regressiosuoran yhtälö on muotoa $y=b_0+b_1x$. (Holopainen & Pulkkinen 2012, 259–262.)

Saatua mallin hyvyyttä ja tilastollista merkitsevyyttä tutkitaan eri arvoihin. Selityskerroin eli selityskaste kertoo mallin kyvystä selittää selitettävän muuttujan vaihtelua. Selityskerroin saadaan korrelaatiokerroimen avulla. T-arvo kertoo poikkeako parametrin arvo tilastollisesti nolasta. Kriittisiä t-arvoja on taulukoitu eri vapausastein, mutta pääsääntöisesti sen tulisi olla vähintään kaksi, jos parametri poikkeaa nolasta. F-arvo kertoo johtuuko korrelaatio sattumasta. Saatua F-arvoa verrataan taulukoituun kriittiseen F-arvoon. Jos se on suurempi kuin kriittinen arvo, ei sattumalla ole osuutta korrelaatioon. P-arvo on hylkäämisvirheen todennäköisyys. Se kertoo kuinka suuri on todennäköisyys, jos nolahypoteesi hylätään vaikka se olisi totta. Taulukossa 2 on esitetty p-arvojen hylkäämisvirheen todennäköisyydet. (Holopainen & Pulkkinen 2012, 177, 277–279.)

Taulukko 2. p-arvojen hylkäämisvirheen todennäköisyydet (Holopainen & Pulkkinen 2012, 177)

| | |
|--------------------------|--|
| 1. $p \leq 0,001$ | Tulos on tilastollisesti erittäin merkitsevä |
| 2. $0,001 < p \leq 0,01$ | Tulos on tilastollisesti merkitsevä |
| 3. $0,01 < p \leq 0,05$ | Tulos on tilastollisesti melkein merkitsevä |

Tulosten perusteella haluttiin vielä testata, kuinka ne muuttuvat, jos R6-linssilläkin näytemäärä on vakio. Näytteet mitattiin uudestaan vakionäytemäärällä ja R6-linssin parametreilla. Näistä tuloksista tehtiin samat tilastolliset analyysit.

6 TULOKSET

Tässä luvussa esitetään saadut tulokset. Aluksi on raportoitu esikokeiden tulokset, sitten menetelmän luomisen ja validoinnin tulokset. Lopuksi on kirjattu menetelmien vertailun tulokset.

6.1 Esikokeet

Esikokeiden tarkoituksena oli tutustua laitteen toimintaan ja löytää optimi-näytekoko. Optinen konsentraatio haluttiin nostaa viiden prosentin kohdalle. Näytemäärän etsiminen lähti selvittämällä kuinka paljon ruokalusikkaan mahtuu ksylitolikiteitä. Noin 9 grammaa ksylitolia oli tasaisesti täy-tyssä lusikallisessa ja kukkurallisessa lusikassa oli noin 17,5 g.

Taulukossa 3 on kuvattu esikokeiden tulokset optisen konsentraation osalta. Tulokset ovat rinnakkaisten ajojen keskiarvoja. Lisäksi laskettiin keskiha-jonnat ja suhteelliset keskihajonnat. Kovin luotettavia ne tulokset eivät ole, koska ne on laskettu vain kahdesta arvosta. Esikokeet suoritettiin kahdessa osassa ja taulukossa punainen rivi erottaa osat toisistaan. Aluksi testattiin 9 g:n näytemäärällä ja kahdella eri olosuhteella. Näytemäärää lisättiin 9,5 g:n, jolla testattiin kolme eri olosuhdetta. Ensimmäisen testauksen lopuksi pun-nittiin ksylitolia määrä, jonka koko täytti syöttösuppilon suoran osan. Tämä oli 19,8 g. Konsentraatioarvot vaihtelivat 2,9 %:sta 3,64 %:iin.

Toisessa osiossa näytemäärä oli aluksi 10 g sitten 15g ja lopuksi 20 g. Op-tinen konsentraatio saatiin korkeimmaksi 20 g näytemäärällä. Se oli 4,5 %. Vaikka arvo ei noussut yli halutun 5 %:n, päätettiin näytemääräksi 20 g. Suurempaa määrää ei testattu, koska silloin näytemäärä olisi ollut jo liian suuri käytännön syistä.

Taulukko 3. Esikokeiden optisen konsentraation tulokset

| Suppilon korkeus [mm] | Syöttönopeus [%] | Näytemäärä [g] | Optinen konsentraatio [%] |
|--------------------------|---------------------|-------------------|------------------------------|
| 3,5 | 75 | 9,0 | 3,51 |
| 4,0 | 75 | 9,0 | 3,64 |
| 3,0 | 70 | 9,5 | 2,90 |
| 3,5 | 70 | 9,5 | 3,10 |
| 4,0 | 70 | 9,5 | 3,18 |
| 3,0 | 90 | 9,5 | 3,02 |
| 3,0 | 90 | 19,8 | 3,60 |
| | | | |
| 3,0 | 80 | 10,0 | 3,33 |
| 3,5 | 70 | 10,0 | 2,94 |
| 4,0 | 70 | 10,0 | 2,95 |
| 4,0 | 90 | 10,0 | 3,15 |
| 3,0 | 90 | 10,0 | 3,12 |
| 3,0 | 90 | 15,0 | 4,21 |
| 3,0 | 90 | 20,0 | 4,50 |

6.2 Uusi menetelmä

Menetelmän luomisessa testattiin kaikki parametrivaihtoehdot. Yhdellä vaihtoehdolla suoritettiin kymmenen rinnakkaista ajoa, jotta voitiin saada luotettavampia tuloksia. Taulukossa 4 on esitetty fraktioiden X_{10} , X_{50} ja X_{90} keskiarvot (k.a.), keskihajonnat (SD) ja suhteelliset keskihajonnat (RSD%), sekä optiset konsentraatiot (C_{opt}). Liitteessä 1 on esitetty kaikkien vaihtoehtojen ajoparametrit.

Taulukko 4. Parametrivaihtoehtojen fraktioiden X_{10} , X_{50} ja X_{90} tulokset sekä optiset konsentraatiot

| | X_{10} [μm] | | | X_{50} [μm] | | | X_{90} [μm] | | | C_{opt} [%] |
|----|----------------------------|-------|-------|----------------------------|-------|-------|----------------------------|-------|-------|---------------|
| | k.a. | SD | RSD % | k.a. | SD | RSD % | k.a. | SD | RSD % | k.a. |
| 1 | 440,78 | 19,96 | 4,53 | 764,68 | 17,51 | 2,29 | 1095,11 | 46,78 | 4,27 | 3,35 |
| 2 | 477,69 | 33,98 | 7,11 | 790,06 | 20,83 | 2,64 | 1132,31 | 39,13 | 3,46 | 3,20 |
| 3 | 485,23 | 18,41 | 3,79 | 799,73 | 16,11 | 2,01 | 1139,58 | 32,54 | 2,86 | 3,24 |
| 4 | 445,93 | 16,81 | 3,77 | 768,03 | 15,70 | 2,04 | 1090,74 | 24,16 | 2,22 | 3,42 |
| 5 | 436,89 | 10,46 | 2,40 | 756,61 | 12,50 | 1,65 | 1068,21 | 31,96 | 2,99 | 3,11 |
| 6 | 451,98 | 23,42 | 5,18 | 771,5 | 16,80 | 2,18 | 1095,67 | 48,13 | 4,39 | 2,94 |
| 7 | 417,30 | 18,30 | 4,39 | 748,53 | 17,80 | 2,38 | 1064,71 | 52,39 | 4,92 | 2,86 |
| 8 | 465,49 | 18,87 | 4,05 | 777,91 | 11,51 | 1,48 | 1085,61 | 25,34 | 2,33 | 2,63 |
| 9 | 438,90 | 14,68 | 3,35 | 764,88 | 14,36 | 1,88 | 1092,01 | 31,21 | 2,86 | 2,67 |
| 10 | 451,87 | 15,88 | 3,52 | 772,44 | 14,66 | 1,90 | 1105,85 | 41,11 | 3,72 | 3,99 |
| 11 | 439,75 | 6,46 | 1,47 | 771,44 | 8,81 | 1,14 | 1106,98 | 26,21 | 2,37 | 3,97 |
| 12 | 444,28 | 18,45 | 4,15 | 775,80 | 16,86 | 2,17 | 1115,88 | 30,65 | 2,75 | 3,92 |
| 13 | 456,93 | 34,97 | 7,65 | 779,40 | 23,23 | 2,98 | 1117,65 | 27,54 | 2,46 | 3,73 |
| 14 | 459,16 | 19,15 | 4,17 | 774,52 | 19,27 | 2,49 | 1081,42 | 43,44 | 4,02 | 3,65 |
| 15 | 460,35 | 24,20 | 5,26 | 782,60 | 19,45 | 2,49 | 1106,21 | 35,26 | 3,19 | 3,54 |
| 16 | 441,19 | 24,51 | 5,56 | 756,88 | 19,70 | 2,60 | 1060,11 | 30,57 | 2,88 | 3,20 |
| 17 | 482,43 | 16,31 | 3,38 | 793,17 | 12,94 | 1,63 | 1102,09 | 29,76 | 2,70 | 3,00 |
| 18 | 458,66 | 15,12 | 3,30 | 774,05 | 11,68 | 1,51 | 1089,68 | 19,11 | 1,75 | 2,92 |
| 19 | 478,72 | 17,24 | 3,60 | 793,34 | 13,32 | 1,68 | 1141,85 | 27,59 | 2,42 | 4,55 |
| 20 | 456,51 | 25,99 | 5,69 | 778,52 | 19,76 | 2,54 | 1129,39 | 22,85 | 2,02 | 4,60 |
| 21 | 461,56 | 17,62 | 3,82 | 788,39 | 18,59 | 2,36 | 1127,39 | 46,65 | 4,14 | 4,53 |
| 22 | 433,38 | 35,03 | 8,08 | 766,98 | 23,62 | 3,08 | 1109,47 | 33,41 | 3,01 | 4,66 |
| 23 | 481,72 | 19,10 | 3,96 | 791,11 | 16,06 | 2,03 | 1096,19 | 25,24 | 2,30 | 4,14 |
| 24 | 471,83 | 34,54 | 7,32 | 779,48 | 26,66 | 3,42 | 1081,84 | 38,32 | 3,54 | 3,82 |
| 25 | 456,18 | 18,92 | 4,1 | 771,07 | 15,39 | 2,00 | 1076,72 | 22,45 | 2,09 | 3,67 |
| 26 | 471,97 | 16,60 | 3,52 | 789,12 | 12,01 | 1,52 | 1101,86 | 30,23 | 2,74 | 3,59 |
| 27 | 438,98 | 25,98 | 5,92 | 766,01 | 19,44 | 2,54 | 1101,05 | 31,30 | 2,84 | 3,66 |

Taulukkoon on merkitty punaisella ne tulokset, jotka ylittivät standardin vaatimukset. Vihreällä on merkitty kunkin fraktion viisi pienintä suhteellisen keskihajonnan arvoa.

Parametriyhdistelmä numero 11 päätettiin valita metodiksi, koska sen suhteellinen keskihajonta fraktion X_{50} osalta oli 1,14 %, joka oli kaikkien arvojen pienin. Myös fraktion X_{10} RSD% oli viiden pienimmän joukossa. Fraktion X_{90} RSD% oli 2,37 %. Se ei ollut pienimpien joukossa, mutta matalimmasta päästä. Optinen konsentraatio oli 3,97 %. Se oli kohtuullisen

korkea, vaikkei ylittänyt tahdottua 5 %. Mikään testatuista parametrikombinaatioista ei sitä ylittänyt. Parhaimmat ylsivät 4,66 (nro 22) ja 4,60 %:iin (nro 20), mutta niiden RSD%:t olivat liian korkeita.

Parhaimman yhdistelmän olosuhteet olivat paine 0,5 bar, syöttönopeus 90 % ja syöttösuppilon korkeus 3,5 mm. Näytemäärä oli vakio 20 g. Näillä parametreilla suoritettiin validointi.

6.3 Validointi

Validointi aloitettiin testaamalla toistettavuus kymmenen peräkkäisen hyväksytyin ajon perusteella. Tarkkuus suoritettiin seulotulla fraktiolla samoin kymmenen hyväksytyin ajon sarjalla. Seulottu fraktio 600 ja 425 μm seulojen väli ei ole kuitenkaan aivan sama mitattaessa laserdiffraktiolaitteella, koska menetelmä antaa pyöreän partikkelin ekvalenttihalkaisijan. Tuloksissa on näin ollen yli 600 μm partikkeleita.

Taulukossa 5 on esitetty toistettavuuden ensimmäisen sarjan tulokset. Muuten validoinnin tämä osio olisi ollut hyväksytty, mutta fraktion X_{10} suhteellinen keskihajonta oli 5,15 %, joten se ei täyttänyt standardin vaatimusta.

Taulukko 5. Toistettavuuden ensimmäiset tulokset

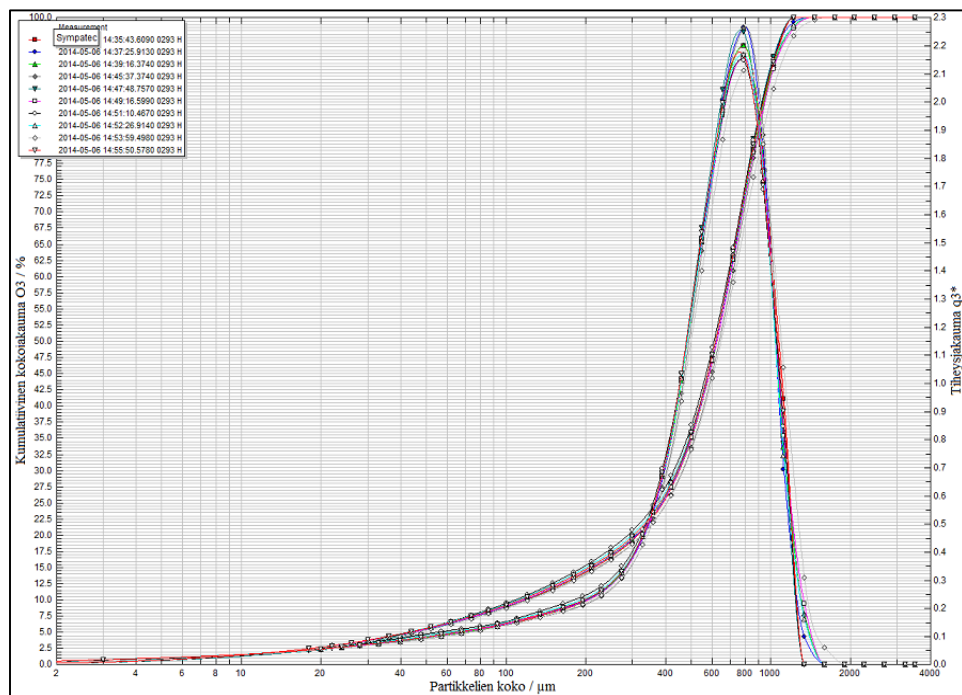
| | X_{10} [μm] | X_{50} [μm] | X_{90} [μm] |
|--------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 1 | 118,19 | 593,47 | 971,98 |
| 2 | 120,78 | 590,76 | 953,40 |
| 3 | 111,21 | 569,49 | 935,97 |
| 4 | 107,94 | 574,16 | 936,62 |
| 5 | 112,27 | 587,88 | 950,25 |
| 6 | 103,96 | 558,64 | 917,36 |
| 7 | 121,59 | 605,69 | 994,64 |
| 8 | 114,35 | 577,15 | 947,61 |
| 9 | 116,36 | 598,06 | 959,79 |
| 10 | 120,70 | 596,31 | 968,69 |
| k.a. | 114,74 | 585,16 | 953,63 |
| SD | 5,91 | 14,73 | 21,72 |
| RSD % | 5,15 | 2,52 | 2,28 |

Koesarja päätettiin uusiksi. Sen tulokset ovat taulukossa 6 (s. 32). Toisessa sarjassa fraktion X_{10} suhteellinen keskihajonta oli 3,81 %, X_{50} 1,79 % ja X_{90} 2,16 %. Menetelmä antaa näin ollen toistettavia tuloksia standardin vaatimissa puitteissa. Kuviossa 15 (s. 32) on esitetty kaikkien kymmenen ajon käyrät samassa kuvaajassa. Vasemmalla reunalla on kumulatiivinen jakauma prosentteina. Oikealla puolella on partikkeleiden tiheysjakauma.

Kuviostakin voidaan nähdä, että käyrät ovat toistensa kaltaisia, joten poikkeamia ei ole paljoa.

Taulukko 6. Toistettavuuden toiset tulokset.

| | X_{10} [μm] | X_{50} [μm] | X_{90} [μm] |
|--------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 1 | 119,54 | 624,2 | 987,72 |
| 2 | 117,27 | 622,48 | 974,11 |
| 3 | 118,18 | 623,83 | 988,02 |
| 4 | 121,25 | 637,2 | 994,68 |
| 5 | 118,1 | 616,81 | 970,65 |
| 6 | 117,56 | 623,7 | 995,13 |
| 7 | 109,43 | 608,62 | 976,12 |
| 8 | 111,88 | 616,2 | 982,47 |
| 9 | 124,78 | 647,13 | 1045,63 |
| 10 | 114,15 | 615,89 | 981,74 |
| k.a. | 117,21 | 623,61 | 989,63 |
| SD | 4,46 | 11,18 | 21,33 |
| RSD % | 3,81 | 1,79 | 2,16 |



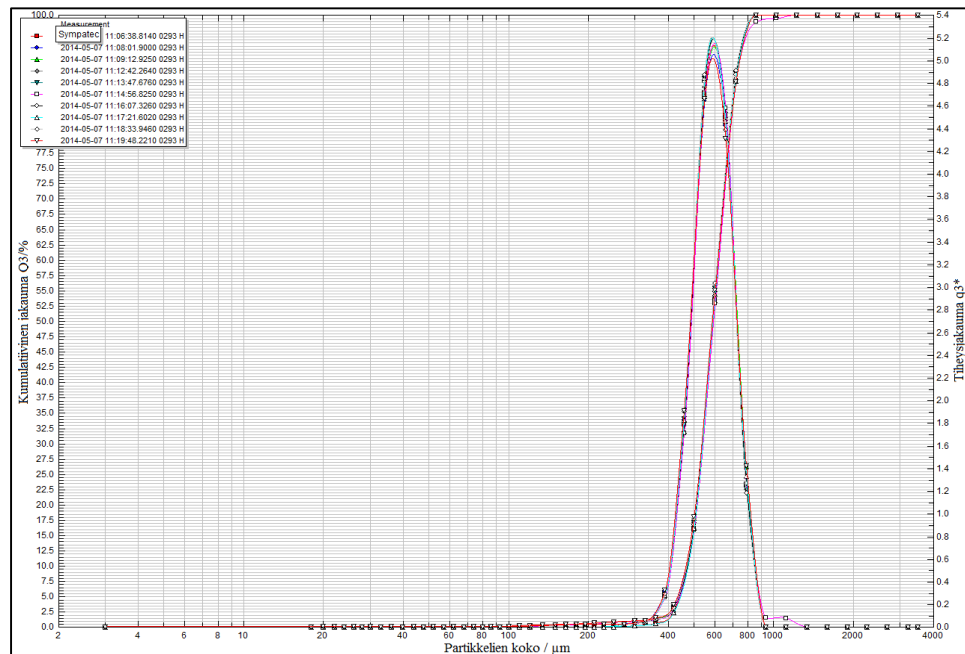
Kuvio 15. Toistettavuuden kymmenen ajon tulokset.

Taulukossa 7 (s. 33) on esitetty tarkkuuden kymmenen hyväksytyin ajon tulokset. Fraktion X_{10} suhteellinen keskihajonta oli 0,64 %, X_{50} 0,43 % ja X_{90}

1,00 % . Standardin vaatimukset täyttyivät erittäin hyvin. Kuviossa 16 (s.33) on esitettyä kaikkien kymmenen ajon tuloskäyrät. Ne eivät juuri toisista poikkea.

Taulukko 7. Tarkkuuden tulokset

| | X₁₀ [µm] | X₅₀ [µm] | X₉₀ [µm] |
|--------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 1 | 463,76 | 590,85 | 731,73 |
| 2 | 457,72 | 589,03 | 731,95 |
| 3 | 461,36 | 590,94 | 731,49 |
| 4 | 459,26 | 587,57 | 717,88 |
| 5 | 459,53 | 586,02 | 718,04 |
| 6 | 463,79 | 592,25 | 732,66 |
| 7 | 460,56 | 587,48 | 719,22 |
| 8 | 464,42 | 588,45 | 732,5 |
| 9 | 457,83 | 583,97 | 716,94 |
| 10 | 455,61 | 586,63 | 732,03 |
| k.a. | 460,38 | 588,32 | 726,44 |
| SD | 2,96 | 2,53 | 7,28 |
| RSD % | 0,64 | 0,43 | 1,00 |



Kuvio 16. Tarkkuuden kymmenen ajon tuloskäyrät.

Seulottu väli oli 425–600 µm. Tuloksista nähdään, että laserdiffraktiolla saadaan suurempia arvoja. Menetelmät eivät ole suoraan verrannollisia toisensa kanssa, koska laserdiffraktiomenetelmä antaa pyöreän partikkelin ekvivalenttihalkaisijan, kun taas seulat antavat pienimmän mahdollinen lävistäjän.

6.4 Vertailu R6-linssillä mitattujen näytteiden kanssa

T-testi ja regressioanalyysit suoritettiin Microsoft Office Excell-ohjelmalla keskipartikkelikoon X_{50} , hajonnan ja fraktion <150 µm suhteen. Vanhoja näytteitä valittiin 30 kpl, jotka mitattiin uudestaan kehitetyllä menetelmällä. Lopuksi näytteet ajettiin uudestaan R6-linssillä vakionäytemäärällä. Näille tuloksille suoritettiin regressioanalyysit.

6.4.1 T-testi

Taulukossa 8 on esitettyä t-testin tulokset keskipartikkelikoon X_{50} suhteen 5 %:n merkitsevyystasolla. Nollahypoteesi ja vaihtoehtoinen hypoteesi ovat $H_0 : \mu_1 = \mu_2$; $H_1 : \mu_2 < \mu_1$. Taulukossa on molemmilla linseillä tehtyjen mittausten keskiarvot ja varianssit. Nollahypoteesin mukaisesti keskiarvojen pitäisi olla samat, jolloin ero on nolla. Vapausasteita on havaintojen lukumäärä vähennettynä yhdellä.

T-testin testisuure ja arvo on 4,911. Se on paljon enemmän, kuin kriittiset arvot. Näin ollen nollahypoteesi hylätään 5 %:n merkitsevyystasolla eli mitaukset eivät vastaa toisiaan. Taulukoitu p-arvo kertoo erehtymisriskin, jos nollahypoteesi hylätään. Tässä tapauksessa tulos on tilastollisesti erittäin merkitsevä, koska p-arvo on 0,000016 eli erehtymisriski on vain 0,0016 %.

Taulukko 8. T-testin tulokset keskipartikkelinkoon X_{50} suhteen

| Parittainen kahden otoksen t-testin keskiarvolle | | |
|--|-------------|-------------|
| | $X_{50} R7$ | $X_{50} R6$ |
| Keskiarvo | 726,5670 | 686,690667 |
| Varianssi | 2455,480911 | 1984,624662 |
| Havainnot | 30 | 30 |
| Pearsonin korrelaatio | 0,557816 | |
| Arvioitu keskiarvojen ero | 0 | |
| vapausaste | 29 | |
| t Tunnusluvut | 4,911777 | |
| P(T<=t) yksisuuntainen | 0,000016 | |
| t-kriittinen yksisuuntainen | 1,699127 | |
| P(T<=t) kaksisuuntainen | 0,000032 | |
| t-kriittinen kaksisuuntainen | 2,045230 | |

Taulukossa 9 on esitettyä hajonnan suhteen tehdyn t-testin tulokset. Testin testisuure on 2,279. Kriittisiin arvoihin verrattuna se on suurempi. Hajonnan mukaan tulokset eivät vastaa toisiaan. P-arvo on 0,01508, jolloin erehtymisriski on 1,5 %. Tulos on tilastollisesti melkein merkitsevä.

Taulukko 9. T-testin tulokset hajonnan suhteen

| Parittainen kahden otoksen t-testin keskiarvolle | | |
|--|-------------------|-------------------|
| | <i>Hajonta R7</i> | <i>Hajonta R6</i> |
| Keskiarvo | 51,989641 | 50,429906 |
| Varianssi | 21,131068 | 29,467266 |
| Havainnot | 30 | 30 |
| Pearsonin korrelaatio | 0,732479 | |
| Arvioitu keskiarvojen ero | 0 | |
| vapausaste | 29 | |
| t Tunnusluvut | 2,279754 | |
| P(T<=t) yksisuuntainen | 0,015081 | |
| t-kriittinen yksisuuntainen | 1,699127 | |
| P(T<=t) kaksisuuntainen | 0,030161 | |
| t-kriittinen kaksisuuntainen | 2,045230 | |

Taulukossa 10 on esitettyä t-testin tulokset fraktion alle 150 µm suhteen. Testisuure on itseisarvoltaan 1,9778. Se on suurempi kuin kriittinen arvo. Näin ollen nollassa hypoteesi hylätään fraktion <150 µm osalta. Menetelmät eivät vastaa toisiaan tämänkään osalta. Tulos on tilastollisesti vain melkein merkitsevä.

Taulukko 10. T-testin tulokset fraktion <150 µm suhteen

| Parittainen kahden otoksen t-testin keskiarvolle | | |
|--|-------------------|-------------------|
| | <i><150 R7</i> | <i><150 R6</i> |
| Keskiarvo | 9,81 | 10,312667 |
| Varianssi | 2,517055 | 3,116675 |
| Havainnot | 30 | 30 |
| Pearsonin korrelaatio | 0,659797 | |
| Arvioitu keskiarvojen ero | 0 | |
| vapausaste | 29 | |
| t Tunnusluvut | -1,977857 | |
| P(T<=t) yksisuuntainen | 0,028758 | |
| t-kriittinen yksisuuntainen | 1,699127 | |
| P(T<=t) kaksisuuntainen | 0,057517 | |
| t-kriittinen kaksisuuntainen | 2,045230 | |

6.4.2 Regressioanalyysi

Taulukossa 11 on esitetty regressioanalyysi keskipartikkelikoon X_{50} perusteella 95 %:n luottamustasolla. Riippuvuutta kuvaa myös kuvio 17 (s. 37), jossa x-akselilla on R6-linssillä mitattujen näytteiden keskipartikkelikoko X_{50} ja y-akselilla samojen näytteiden X_{50} tulokset R7-linssillä mitattuna. Kuvajaaja on piirrettynä regressiosuora, joka kuvaa ennustemallia. Tämän mallin mukaisesti arvojen pitäisi sijoittua.

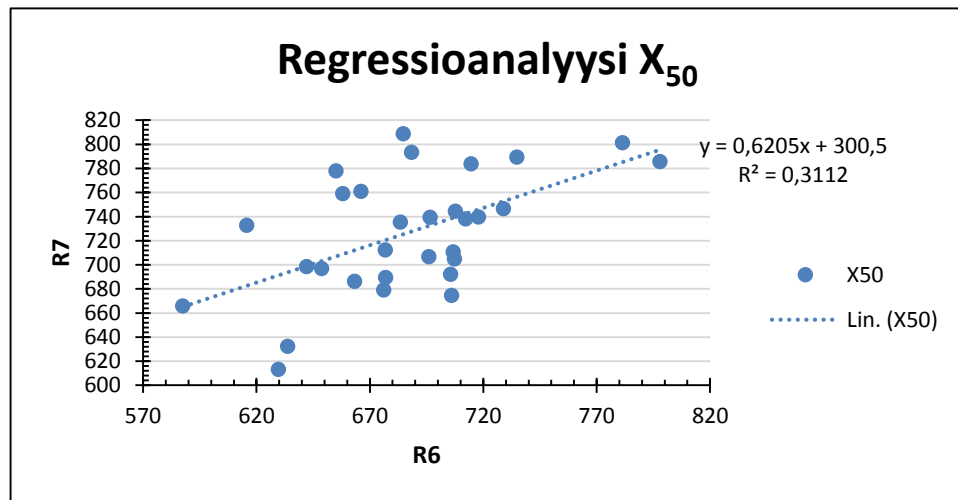
Taulukko 11. Regressioanalyysin tulokset keskipartikkelikoon X_{50} mukaan

| YHTEENVETO TULOSTUS X50 | | | | | |
|--|------------------|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| <i>Regressiotunnusluvut</i> | | | | | |
| Kerroin R | 0,5578 | | | | |
| Korrelaatio- kerroin | 0,3112 | | | | |
| Tarkistettu korrelaatio- kerroin | 0,2866 | | | | |
| Keskivirhe | 41,8550 | | | | |
| Havainnot | 30 | | | | |
| ANOVA | | | | | |
| | <i>va</i> | <i>NS</i> | <i>KN</i> | <i>F</i> | <i>F:n tarkkuus</i> |
| Regressio | 1 | 22157,306 | 22157,306 | 12,64798 | 0,001360 |
| Jäännös | 28 | 49051,639 | 1751,844 | | |
| Yhteensä | 29 | 71208,946 | | | |
| <i>t Tunnuslu-</i> | | | | | |
| | <i>Kertoimet</i> | <i>Keskivirhe</i> | <i>vut</i> | <i>P-arvo</i> | |
| Leikkauspiste | 300,4965 | 120,047 | 2,503 | 0,01841 | |
| X50 R6 | 0,62046 | 0,174 | 3,556 | 0,00136 | |
| | <i>Alin 95 %</i> | <i>Ylin 95 %</i> | <i>Alin 95,0 %</i> | <i>Ylin 95,0 %</i> | |
| Leikkauspiste | 54,5908 | 546,402 | 54,590 | 546,402 | |
| X50 R6 | 0,2631 | 0,9778 | 0,2631 | 0,9778 | |

Taulukosta ja kuvaajasta nähdään, että selityskerroin R^2 on 0,3112. Kerroin ilmaisee kuinka monta prosenttia R7-linssillä mitattujen arvojen vaihtelusta voidaan selittää R6-linssin arvojen avulla. Tässä tapauksessa vain 32 %. Se on hyvin matala, koska mitä lähempänä kerroin on ykköstä, sitä paremmin voidaan y-arvojen vaihtelua selittää x:n avulla. F-arvo kertoo johtuuko korrelaatio sattumasta. Sitä verrataan taulukoituun kriittiseen F-arvoon. Keskipartikkelikoon F-arvo on 12,6 ja se on suurempi kuin kriittinen arvo 5 % merkitsevyystasolla 4,17 kun vapausasteita on 28. Näin ollen korrelaatiota ei voida katsoa johtuvaksi sattumasta.

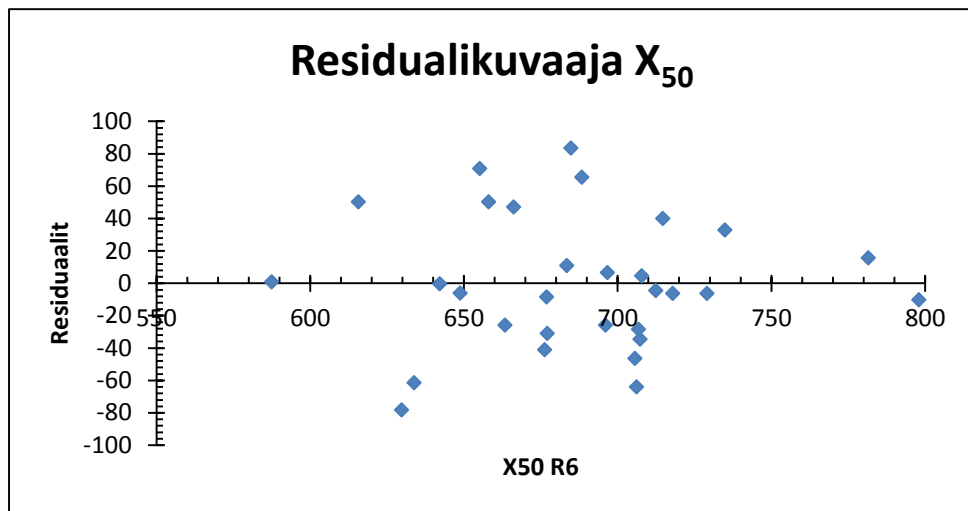
Taulukosta voidaan tulkita mahdollisten regressiosuorien kulmakertoimet ja y-akselin leikkauspisteet. 95 %:n todennäköisyydellä. Y-akselin leikkauspiste on välillä 54,59–546,40 ja kulmakerroin 0,26–0,977 välillä. Regressiosuoran leikkauspiste on 300,496 ja kulmakerroin 0,620. Näiden t-arvot ovat suurempia kuin kaksi, joten ne poikkeavat nolasta ja voidaan näin olettaa olevan käyttökelpoisia. Leikkauspisteen p-arvo on 0,018 eli se on tilastollisesti melkein merkitsevä ja kulmakertoimen p-arvo on 0,001 eli se on erittäin merkitsevä.

Kulmakertoimen ollessa 1 vastaisivat menetelmät täysin toisiaan. Kuten kuvaajastakin nähdään, ovat arvot hyvin hajallaan ja saadut välit hyvin suuret. Menetelmiä ei voida verrata luotettavasti toisiinsa.



Kuvio 17. Regressioanalyysi keskipartikkelikoon X₅₀ perusteella.

Vertaamalla regressiosuoraa mitattuihin havaintoihin saadaan residuaali- eli jäännöskuvaaja, joka on esitetty kuviossa 18 (s. 38) keskipartikkelikoon osalta. Siinä nähdään, kuinka suuri on erotus ennustettujen ja mitattujen arvojen välillä. Kuvaaja vahvistaa käsitystä siitä, että mitatut arvot ovat kaukana ja hajallaan nolatasosta.



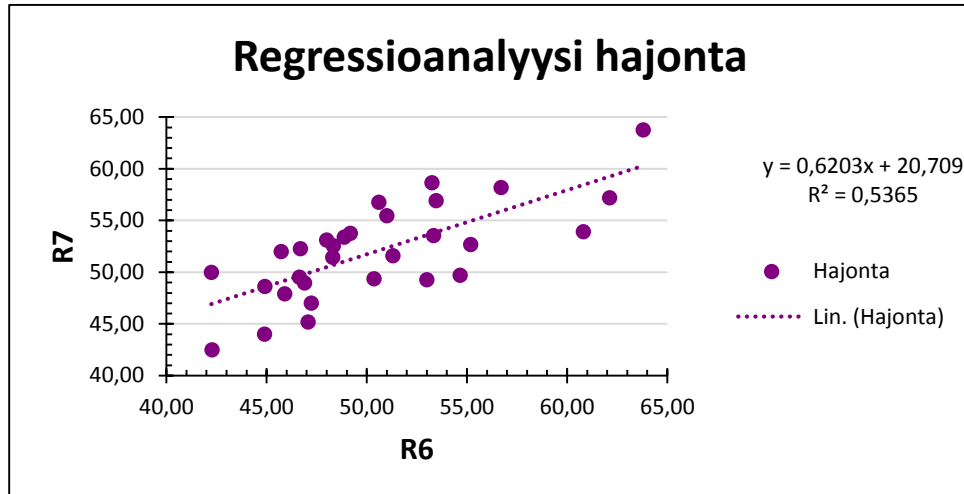
Kuvio 18. Residuaalikuvaaja keskipartikkelikoon X_{50} osalta.

Sama analyysi suoritettiin hajonnan perusteella vanhan metodin ja uuden metodin tulosten kesken. Taulukossa 12 (s. 39) on esitetty hajonnan perusteella lasketut regressiotunnusluvut ja ANOVA-taulukko. Tulosten perusteella hajonnan osalta voidaan selittää 53 % vaihtelusta R6-linsillä tehtyjen mittausten avulla. Selitysaste ei tässäkin ole kovin korkea. F-arvon perusteella korrelaatiokerroin ei johdu sattumasta, koska F-arvo on 32,4. Se on huomattavasti suurempi kuin kriittinen arvo 4,17.

Taulukko 12. Regressioanalyysin tulokset hajonnan perusteella

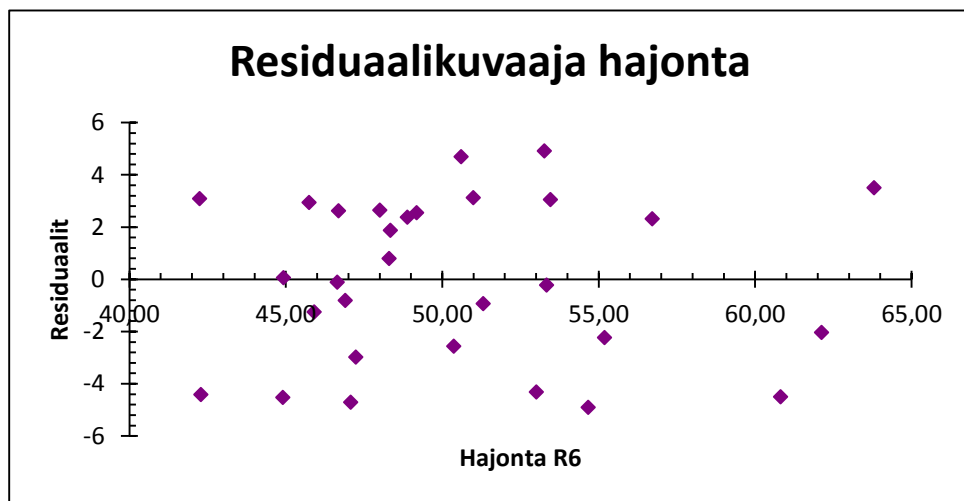
| YHTEENVETO TULOSTUS Hajonta | | | | |
|--|-----------|-----------|-----------|---------------------|
| <i>Regressiotunnusluvut</i> | | | | |
| Kerroin R | | 0,73248 | | |
| Korrelaatiokerroin | | 0,53652 | | |
| Tarkistettu korrelaatiokerroin | | 0,51997 | | |
| Keskivirhe | | 3,18489 | | |
| Havainnot | | 30 | | |
| ANOVA | | | | |
| | <i>va</i> | <i>KN</i> | <i>F</i> | <i>F:n tarkkuus</i> |
| Regressio | 1 | 328,783 | 32,413 | 4,19081E-06 |
| Jäännös | 28 | 10,143 | | |
| Yhteensä | 29 | | | |
| <i>Kertoimet t Tunnusluvut P-arvo</i> | | | | |
| Leikkauspiste | 20,709 | 3,748 | 0,000821 | |
| X50 R6 | 0,620 | 5,693 | 4,190E-06 | |
| <i>Alin 95 % Ylin 95 % Alin 95,0 % Ylin 95,0 %</i> | | | | |
| Leikkauspiste | 9,391 | 32,026 | 9,391 | 32,026 |
| X50 R6 | 0,3971 | 0,8434 | 0,3974 | 0,8434 |

Kuviossa 19 (s. 39) on esitetty regressioanalyysin kuvaaja hajonnan osalta. Regressiosuoran kulmakerroin on 0,62 ja leikkauspiste 20,7. T-arvot ovat yli kaksi, joten ne eroavat nolasta. Molempien kertoimien p-arvot ovat pienempiä kuin 0,001, joten tulos on tilastollisesti erittäin merkittävä. Ennustetun regressiosuoran kulmakerroin on 95 %:n varmuudella välillä 0,397–0,843 ja y-akselin leikkauspiste välillä 9,391–32,026.



Kuvio 19. Regressioanalyysin kuvaaja hajonnan osalta.

Kuviossa 20 on esitetty hajonnan residuaalikuvaaja. Kuten siitä voidaan nähdä, ovat pisteet hajallaan ja osa kaukanakin nollassa. Tässäkin tapauksessa menetit eivät juurikaan vastaa toisiaan.



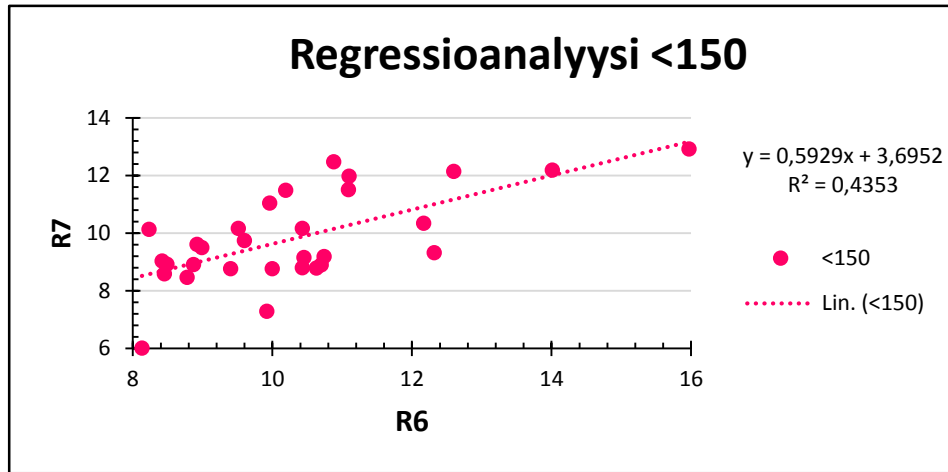
Kuvio 20. Residuaalikuvaaja hajonnan perusteella.

Analyysi tehtiin myös fraktion <150 µm tuloksista. Taulukossa 13 (s. 41) on esitetty regressioanalyysin yhteenvedo. Korrelaatiokerroin on 0,435 eli malli selittää vain 45 % R7-linssin tulosten vaihtelusta R6-linssin tulosten perusteella. Se on hyvin matala, eikä se johdu sattumasta, koska F-arvo on paljon yli kriittisen F-arvon 4,17.

Taulukko 13. Regressioanalyysin tulokset fraktion <150 µm mukaan.

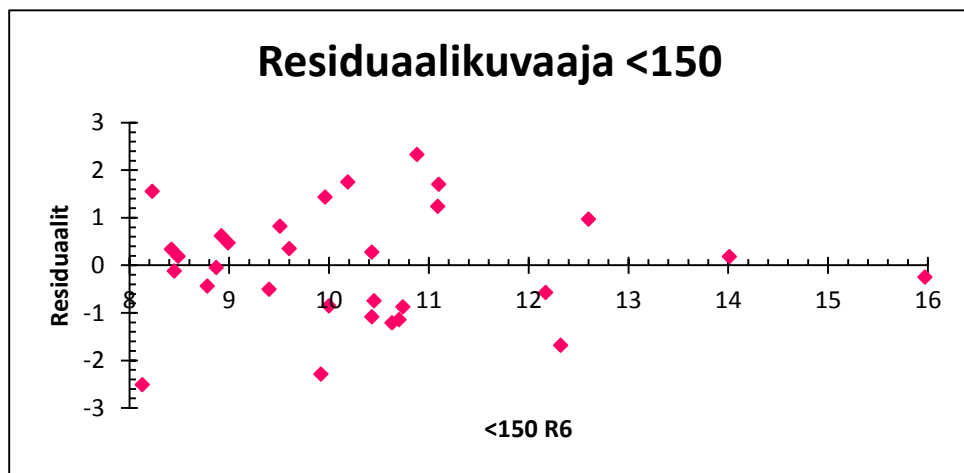
| YHTEENVETO TULOSTUS <150 | | | | | |
|--|------------------|-------------------------|----------------------------|--------------------|---------------------|
| <i>Regressiotunnusluvut</i> | | | | | |
| Kerroin R | 0,6597 | | | | |
| Korrelaatio- kerroin | 0,4353 | | | | |
| Tarkistettu korrelaatio- kerroin | 0,4151 | | | | |
| Keskivirhe | 1,2132 | | | | |
| Havainnot | 30 | | | | |
| ANOVA | | | | | |
| | <i>va</i> | <i>NS</i> | <i>KN</i> | <i>F</i> | <i>F:n tarkkuus</i> |
| Regressio | 1 | 31,776 | 31,776 | 21,586 | 0,000072 |
| Jäännös | 28 | 41,217 | 1,472 | | |
| Yhteensä | 29 | 72,994 | | | |
| | <i>Kertoimet</i> | <i>Keski- virhe</i> | <i>t Tunnuslu- vut</i> | <i>P-arvo</i> | |
| Leikkauspiste | 3,6952 | 1,334 | 2,768 | 0,009869 | |
| X50 R6 | 0,5929 | 0,127 | 4,646 | 0,000072 | |
| | <i>Alin 95 %</i> | <i>Ylin 95 %</i> | <i>Alin 95,0 %</i> | <i>Ylin 95,0 %</i> | |
| Leikkauspiste | 0,9613 | 6,4290 | 0,9613 | 6,4290 | |
| X50 R6 | 0,3315 | 0,8543 | 0,3315 | 0,8543 | |

Kuviossa 21 (s. 42) on esitetty regressioanalyysin kuvaaja fraktion <150 µm osalta. Regressiosuoran kulmakerroin on 0,5929 ja y-akselin leikkauspiste 3,695. Näiden t-arvot ovat suurempia kuin kaksi, joten tuloksia voidaan pitää käyttökelpoisina. P-arvo leikkauspisteen osalta on 0,0098, joten se on tilastollisesti merkitsevä ja kulmakertoimen on 0,00007 eli se on tilastollisesti erittäin merkitsevä. Ennustetun regressiosuoran kulmakerroin on 95 %:n varmuudella välillä 0,3315–0,854 ja y-akselin leikkauspiste välillä 0,961–6,429. Suurta yhteyttä ei menetelmien välillä voida myöskään todentaa fraktion <150 µm osalta.



Kuvio 21. Regressioanalyysin tulokset fraktion <150 µm mukaan.

Kuviossa 22 on esitetty fraktion <150 µm residuaalikuvaaja. Pisteet ovat hajallaan nollassa molemmilla puolilla. Epäilyksenä oli, että R6-linssin menetelmä olisi antanut suurempia fraktion osuuksia. Tämä olisi tarkoittanut, että residuaalikuvaajassa olisi ollut nollassa alapuolella selvästi enemmän pisteitä. Se ei pidä paikkaansa, koska pisteet ovat jakautuneet suurin piirtein puoliksi. Epäilystä ei voida todistaa oikeaksi.



Kuvio 22. Residuaalikuvaaja fraktion <150 µm mukaan.

6.4.3 Uudet regressioanalyysit

Vanhojen näytteiden mittauksessa R6-linssillä ei ollut käytetty mitään tarkkaa näytämäärää. Tämän takia haluttiin tutkia vielä, kuinka regressio tulokset muuttuisivat, kun näytteet ajatettaisiin uudestaan määritellyllä vakio-

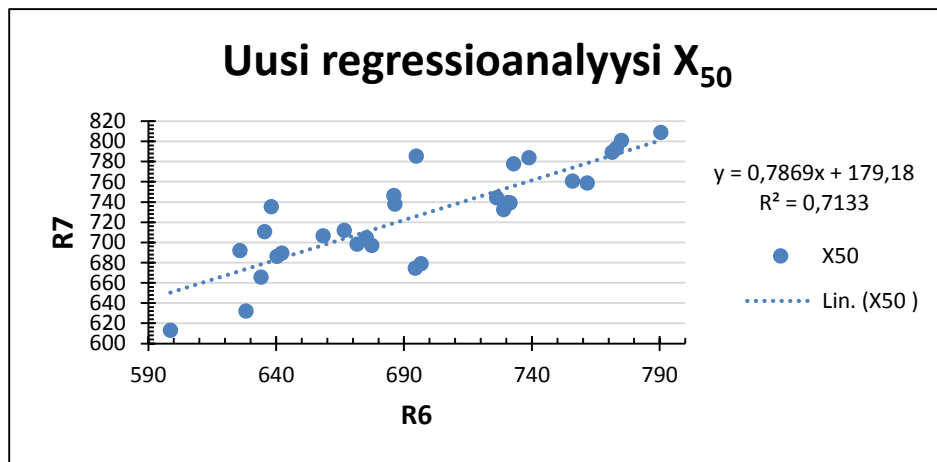
massalla. Näytteet mitattiin uudestaan R6-linssillä käyttäen 20 g näytettä. Regressioanalyysi suoritettiin keskipartikkelikoon X₅₀, hajonnan ja fraktion <150 µm tulosten osalta.

Taulukossa 14 on esitetty keskipartikkelikoon X₅₀ uudet regressiokertoimet ja ANOVA-tilaus. Uusi korrelaatiokerroin on 0,713. Se on huomattavasti parempi kuin alkuperäinen 0,311. Malli pystyy siis selittämään 71,3 % vaihteluista. F-arvo on huomattavasti suurempi kuin kriittinen arvo 4,17, joten sattuman osuutta ei ole tuloksissa.

Taulukko 14. Regressioanalyysin uudet tulokset keskipartikkelikoon X₅₀ osalta

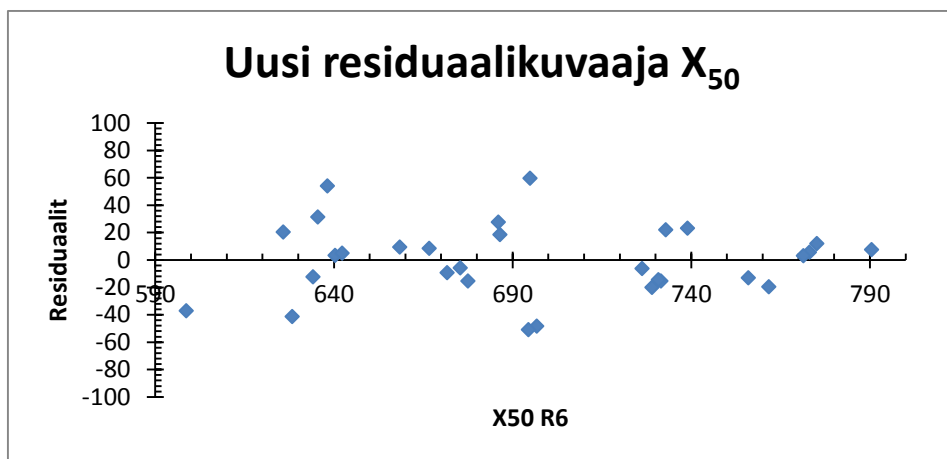
| YHTEENVETO TULOSTUS X50 | | | | | |
|--|------------------|-------------------|-----------|---------------|---------------------|
| <i>Regressiotunnusluvut</i> | | | | | |
| Kerroin R | 0,8445 | | | | |
| Korrelaatiokerroin | 0,7132 | | | | |
| Tarkistettu korrelaatiokerroin | 0,7030 | | | | |
| Keskivirhe | 27,003 | | | | |
| Havainnot | 30 | | | | |
| ANOVA | | | | | |
| | <i>va</i> | <i>NS</i> | <i>KN</i> | <i>F</i> | <i>F:n tarkkuus</i> |
| Regressio | 1 | 50792,277 | 50792,277 | 69,657 | 4,43107E-09 |
| Jäännös | 28 | 20416,669 | 729,16676 | | |
| Yhteensä | 29 | 71208,946 | | | |
| <i>t Tunnusluvut</i> | | | | | |
| | <i>Kertoimet</i> | <i>Keskivirhe</i> | <i>t</i> | <i>P-arvo</i> | |
| Leikkauspiste | 179,178 | 65,770 | 2,724 | 0,0109 | |
| X50 R6 | 0,786 | 0,094 | 8,346 | 4,431E-09 | |
| <i>Alin 95 % Ylin 95 % Alin 95,0 % Ylin 95,0 %</i> | | | | | |
| Leikkauspiste | 44,452 | 313,904 | 44,452 | 313,904 | |
| X50 R6 | 0,593 | 0,980 | 0,593 | 0,980 | |

Kuviossa 23 on esitetty uuden regressioanalyysin kuvaaja fraktion X_{50} perusteella. Regressiosuoran kulmakerroin on 0,7869 ja y-akselin leikkauspiste 179,18. Näiden t-arvot ovat yli kaksi, jolloin niitä voidaan käyttää. Leikkauspisteen p-arvo on 0,0109, joten se on tilastollisesti melkein merkitsevä. Kulmakerroin on erittäin merkitsevä, koska sen p-arvo on hyvin paljon alle 0,001.



Kuvio 23. Uusi regressioanalyysikuvaaja keskipartikkelikoon X_{50} perusteella.

Kuviossa 24 on esitetty uusi residuaalikuvaaja keskipartikkelikoon suhteen. Verrattuna alkuperäiseen kuvaajaan, ovat pisteet lähempänä nollatasoa. Näin ollen menetöt vastaavat paremmin toisiaan.



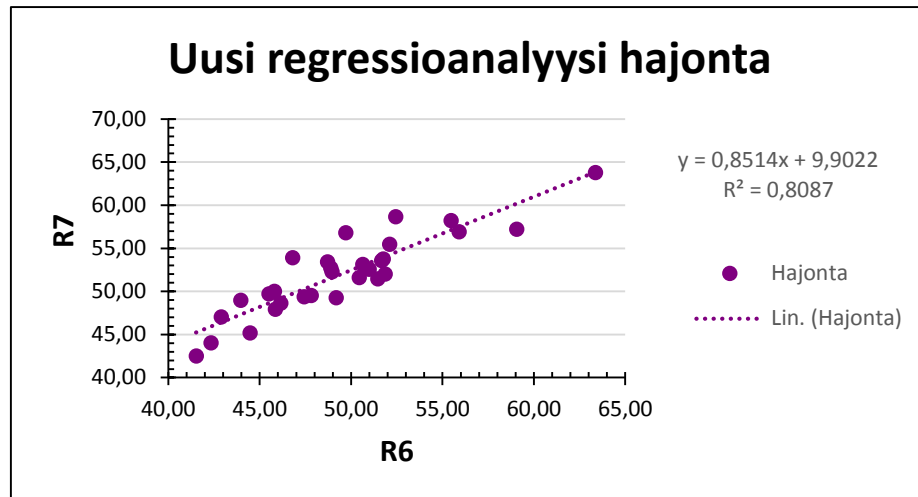
Kuvio 24. Uusi residuaalikuvaaja keskipartikkelikoko X_{50} suhteen.

Taulukossa 15 on esitetty yhteenveto hajonnan regressioanalyysistä. Uusi korrelaatiokerroin on 0,899. Se lähentelee jo suurta korrelaation arvoa. Myös tässä korrelaatio nousi huomattavasti alkuperäisestä arvosta 0,536. Sattumalla ei ole osuutta parempaan korrelaatiokertoimeen, koska F-arvo on erittäin paljon suurempi kuin kriittinen F-arvo.

Taulukko 15. Regressioanalyysin yhteenveto hajonnan perusteella

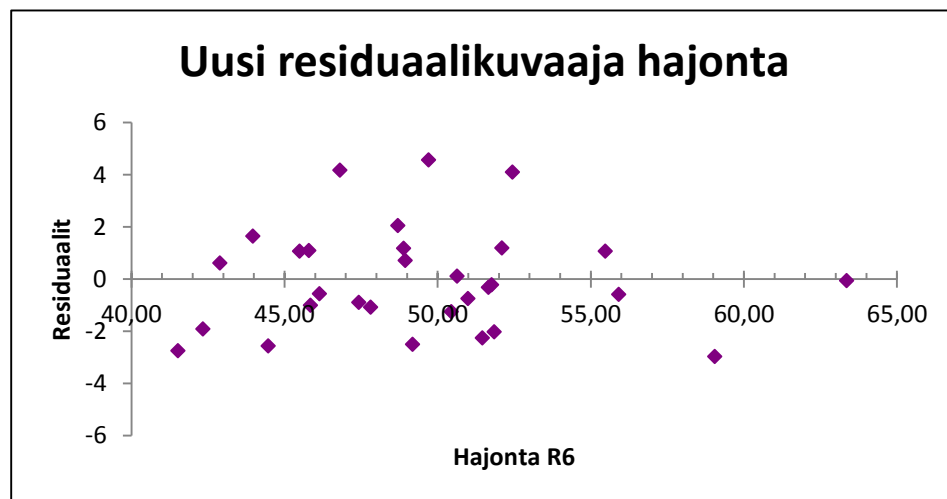
| YHTEENVETO | | | | | |
|--|-----------|-----------|-----------|----------|---------------------|
| TULOSTUS Hajonta | | | | | |
| <i>Regressiotunnusluvut</i> | | | | | |
| Kerroin R | | 0,899 | | | |
| Korrelaatiokerroin | | 0,808 | | | |
| Tarkistettu korrelaatiokerroin | | 0,801 | | | |
| Keskivirhe | | 2,045 | | | |
| Havainnot | | 30 | | | |
| ANOVA | | | | | |
| | <i>va</i> | <i>NS</i> | <i>KN</i> | <i>F</i> | <i>F:n tarkkuus</i> |
| Regressio | 1 | 495,598 | 495,598 | 118,400 | 1,44E-11 |
| Jäännös | 28 | 117,202 | 4,185 | | |
| Yhteensä | 29 | 612,800 | | | |
| <i>Kertoimet Keskivirhe t Tunnusluvut P-arvo</i> | | | | | |
| Leikkauspiste | 9,902 | 3,885 | 2,548 | 0,016 | |
| X50 R6 | 0,851 | 0,078 | 10,881 | 1,44E-11 | |
| <i>Alin 95 % Ylin 95 % Alin 95,0 % Ylin 95,0 %</i> | | | | | |
| Leikkauspiste | 1,942 | 17,862 | 1,942 | 17,862 | |
| X50 R6 | 0,691 | 1,011 | 0,691 | 1,011 | |

Kuviossa 25 (s. 46) on esitetty hajonnan uusi regressioanalyysin kuvaaja. Regressiosuoran kulmakerroin on 0,8514 ja y-akselin leikkauspiste 9,90. Leikkauspisteen t-arvo on 2,548 ja kulmakertoimen 10,881. Nämä ovat suurempia kuin kaksi, joten ne voidaan olettaa oikeiksi. P-arvojen tarkastelu osoittaa, että leikkauspisteen kerroin on tilastollisesti melkein merkitsevä ja kulmakertoimen on erittäin merkitsevä. Ennustetun regressiosuoran kulmakerroin on 95 %:n varmuudella välillä 0,691–1,011 ja y-akselin leikkauspiste välillä 1,94–17,86.



Kuvio 25. Uusi regressioanalyysin kuvaaja hajonnan osalta.

Kuviossa 26 on esitetty hajonnan uusi residuaalikuvaaja. Verrattuna alkuperäiseen kuvaajaan, ovat pisteet lähentyneet paljon nollassa.



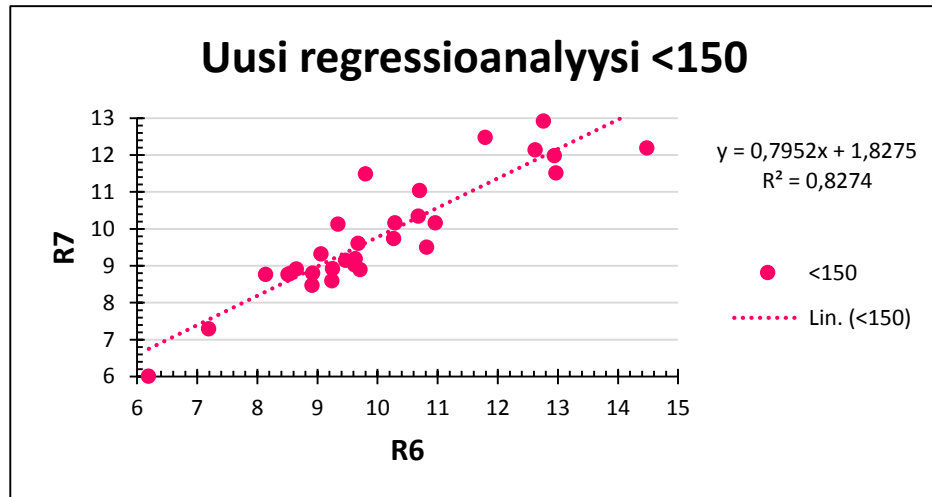
Kuvio 26. Uusi residuaalikuvaaja hajonnasta.

Taulukossa 16 (s. 47) on esitetty fraktion <150 µm uudet regressiotunnusluvut ja ANOVA-taulukko. Korrelaatiokerroin on 0,827 eli malli pystyy selittämään 82,7 % R7-linssin mittausten arvojen vaihtelusta R6-linssin mittausten arvojen avulla. Korrelaatio parani erittäin paljon alkuperäiseen verrattuna. F-arvo on 134,194, joten se ylittää huomattavasti kriittisen F-arvon 4,17.

Taulukko 16. Uuden regressioanalyysin tulokset fraktion <150 µm mukaan

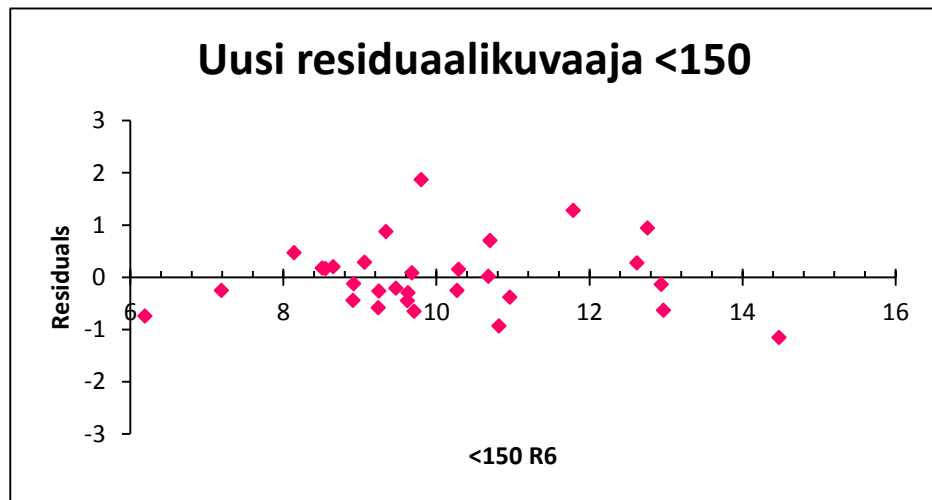
| YHTEENVETO TULOSTUS <150 | | | | | |
|--|------------------|-------------------|----------------------|--------------------|---------------------|
| <i>Regressiotunnusluvut</i> | | | | | |
| Kerroin R | | 0,909 | | | |
| Korrelaatio- kerroin | | 0,827 | | | |
| Tarkistettu korrelaatio- kerroin | | 0,821 | | | |
| Keskivirhe | | 0,670 | | | |
| Havainnot | | 30 | | | |
| ANOVA | | | | | |
| | <i>va</i> | <i>NS</i> | <i>KN</i> | <i>F</i> | <i>F:n tarkkuus</i> |
| Regressio | 1 | 60,393 | 60,393 | 134,194 | 3,40E-12 |
| Jäännös | 28 | 12,601 | 0,450 | | |
| Yhteensä | 29 | 72,994 | | | |
| | <i>Kertoimet</i> | <i>Keskivirhe</i> | <i>t Tunnusluvut</i> | <i>P-arvo</i> | |
| Leikkaus- piste | 1,827 | 0,699 | 2,611 | 0,014 | |
| X50 R6 | 0,795 | 0,068 | 11,584 | 3,4E-12 | |
| | <i>Alin 95 %</i> | <i>Ylin 95 %</i> | <i>Alin 95,0 %</i> | <i>Ylin 95,0 %</i> | |
| Leikkaus- piste | 0,393 | 3,261 | 0,393 | 3,261 | |
| X50 R6 | 0,654 | 0,935 | 0,654 | 0,935 | |

Kuviossa 27 (s. 48) on esitetty uusi regressioanalyysin kuvaaja fraktion <150 µm mukaan. Regressiosuoran kulmakerroin on 0,7952. Sen t-luku on 11,58 eli hyvin paljon yli kahden. Kulmakertoimen p-arvo on hyvin paljon vähemmän kuin 0,001, joten tulos on tilastollisesti erittäin merkitsevä. 95 %:n todennäköisyydellä kulmakerroin asettuu välille 0,654–0,935. Y-akselin leikkauspiste on 1,8275. T-luku on 2,611, joten sekin ylittää kahden rajan, joten piste on todennäköinen. P-arvo leikkauspisteelle on 0,014 eli tulos on tilastollisesti melkein merkitsevä. Y-akselin leikkauspiste sijoittuu 95 %:n todennäköisyydellä 0,393–3,261 välille.



Kuvio 27. Uusi regressioanalyysin kuvaaja fraktion <150 μm osalta.

Kuviossa 28 on esitetty fraktion <150 μm uusi residuaalikuvaaja. Pisteet ovat hyvin paljon tiivistyneet nollassa lähetyville verrattuna alkuperäiseen.



Kuvio 28. Uusi residuaalikuvaaja fraktion <150 μm tuloksista.

Testien erona oli vain näytemäärä, joka oli uusissa vakioitu 20 g:n myös mitattaessa R6-linssillä. Koska eri linssien tulosten vastaavuus parani huomattavasti, voidaan päätellä, että näytemäärä vaikuttaa suuresti tuloksiin.

7 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA

Ksylitolin partikkelikoon mittaamiseen saatiin luotua uusi metodi käyttäen laserdiffraktiolaitteen R7-linssiä. Menetelmä läpäisi validoinnin lopulta hyvin. Toistettavuus ei ensimmäisellä kerralla läpäissyt standardin vaatimuksia. Ensimmäisessä sarjassa keskiarvot olivat matalampia kuin toisessa, joten näytteenotossa on todennäköisesti tapahtunut virhettä. Näytteeksi on valikoitunut pienempiä partikkeleita, jolloin X_{10} osuuksissa on ollut suurempaa eroa. Toisella sarjalla suhteelliset keskihajonnat laskivat vaaditun rajan alle.

Menetelmää ei validoitu tarkkuuden osalta täysin optimaalisesti, koska ei ollut käytössä täysin tunnetun näytettä. Seulottunäyte ei vastannut täysin todellista. Validoinnin parametrit testaus täytti kuitenkin hyvin.

R7-linssin herkkyys ympäristön häiriöihin otettiin ohjeistuksessa ja toiminnassa huomioon. Mittausalueen suojana ollutta pleksilasia tiivistettiin, jotta eivät ilmvirtaukset häiritse mittausta. Huoneessa olevaa ilmastointilaitetta ei saa pitää päällä mittausten aikana samasta syystä. Laitteen pöytää ei saa tärastää ja liikkumista ylipäätään pitää välttää.

Suurta hienoainesosuutta ei voitu osoittaa johtuvaksi R6-linssin ja vanhan menetelmän sopimattomuudesta. Vertailusta saatiin kuitenkin selville, että näytemäärällä on suuri vaikutus tuloksiin. Määrän vakiointi tuo niihin verrattavuutta ja luotettavuutta. Nyt ei enää jokaisen työntekijän “käsiälällä” ole niin suurta merkitystä.

Ohjelmaan luotu valmis menetelmä (SOP standard operating procedures) vähentää inhimillisten virheiden mahdollisuutta. Ohjelma automaattisesti säätää oikean linssin, suppilon korkeuden ja syöttönopeuden. Tämä helpottaa ja nopeuttaa työskentelyä. Aikaisemmin jokainen parametri täytyi valita erikseen valikoista. Näytteen punnitukseen kuuluva lisäaika vanhaan verrattuna ei ole kovin suuri.

Kun menetelmä otettiin normaaliin käyttöön, tuli haamupiikeistä ongelmia. Niitä muodostui paljon ja tarvittiin monta ajoa hyväksyttävien tulosten saamiseksi. Laitteen valmistajan edustajan konsultointi auttoi ongelmaan. Aikaisemmin tarkentaminen tapahtui vain referenssimittausta ennen, mutta nyt myös ennen näytteen ajoa. Tämä muutos ei vaadi uudelleenvalidointia.

Fruktoosin ajo-olosuhteille luotiin myös valmis menetelmä. Se helpottaa ja varmentaa laitteen käyttöä. Tulevaisuudessa olisi hyvä määrittää myös fruktoosille vakionäytemäärä, jotta senkin kohdalla päästäisiin verrattavampiin tuloksiin.

LÄHTEET

- Allen, T. 2003. Powder Sampling and Particle Size Determination. Amsterdam: Elsevier B.V.
- Cantin, O. 2014. Service Engineer. Sympatc GmbH. Puhelinkeskustelu 13.5.2014.
- Ehder, T. 2005. Kemia metrologian opas. Metrologian neuvottelukunta J6/2005. Helsinki:MIKES. Viitattu 15.4.2014. http://www.finas.fi/documents/upload/j6_05_b5_nettiin.pdf
- Eroma, O-P., Golde, M. Heikkilä, H. Nygren, J. & Tylli, M. 1997. Method for producing xylitol. Patentihakemus WO 1997049658 A1. Hakemusnumero PCT/FI1997/000402. Viitattu 6.8.2014. <http://www.google.st/patents/WO1997049658A1?cl=en>
- Gírio, F. M., Carvalheiro, F., Duarte, L. C. & Bogel-Lukasik, R. 2012. Deconstruction of the Hemicellulose Fraction from Lignocellulosic Materials into Simple Sugars. Teoksessa da silva, S. S. & Chandel, A. K. (Toim.) D-Xylitol. Fermentative Production, Application and Commercialization. Berlin:Springer-Verlag.
- Granström, T., Izumori, K. & Leisola, M. 2007. A rare sugar xylitol. Part I: the biochemistry and biosynthesis of xylitol. Mini-review. Applied Microbiology and Biotechnology 74 (2) 277–281.
- Granström, T., Izumori, K. & Leisola, M. 2007. A rare sugar xylitol. Part II: biotechnological production and future applications of xylitol. Mini-review. Applied Microbiology and Biotechnology 74 (2) 273–276.
- Heikkilä, H., Puuppo, O., Tylli, M., Nikander, H., Nygren, J., Lindroos, M. & Eroma, O-P. 1999. Method for Producing Xylitol. US Patenti nro 5,998,607. Patentin päiväys 7.12.1999. Viitattu 11.7.2014 <http://www.google.com/patents/US5998607>
- Holopainen, M. & Pulkkinen, P. 2012. Tilastolliset menetelmät. 5.-7.-painos. Helsinki:SanomaPro Oy
- HORIBA. 2012. A Guidebook to particle size analysis. Irvine,CA:HORIBA. Viitattu 15.4.2014. https://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/eMag/PSA/Guidebook/pdf/PSA_Guidebook.pdf
- HSDB Hazardous Substances Data Bank. 2012. Xylitol. U.S. National Library of Medicine. Viitattu 14.5.2014. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+87-99-0>

ICH International Conference of Harmonization. 2005. Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1). 4. painos. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH harmonized tripartite guideline.

ISO 13320-1. 1999. Particle size analysis – Laser diffraction methods – Part 1: General principles. Geneva: International Organization for Standardization.

Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. 5. uudistettu painos. Helsinki:Edita Publishing Oy.

Jaffe, G. & Weinert, H. 1976. Aqueous crystallization of xylitol. US patentti nro 3,985,815. Viitattu 30.8.2014. <http://www.google.com/patents/US3985815>

Kainiemi, M. 2014. DuPont N&H Kotkan tehdas. Tehtaan yleisesittely. 16.4.2014. Henkilöstön koulutus.

Kaineimi, M. 2012. Tuotannon yleiskuvaus ja toiminnan tarkoitus. Danisco Sweeteners Oy. Versio 1. Tulostettu 16.4.2014.

Karjalainen, M. 2014. Keskipartikkelikoon, hajonnan ja fraktioiden määrittäminen käsiseuloilla. Danisco Sweeteners Oy. Toimintakäsikirja. Versio 2. Tulostettu 15.4.2014.

Karjalainen, M. 2013. Kidekoon määrittäminen laserdiffraktiolaitteella. Danisco Sweeteners Oy. Toimintakäsikirja. Versio 9. Tulostettu 14.4.2014.

Lillavenkatesa, A., Dapkunas, S.J. ja Lum, L.-S.H., 2001 Particle Size Characterization. Special Publication 960-1. Washington, USA:National Institute of Standards and Technology. Viitattu 11.6.2014. http://www.nist.gov/customcf/get_pdf.cfm?pub_id=850451

Loveland, P. & Whalley. 2000 Particle Size Analysis. Teoksessa Smith, K. & Mullins, C. (toim.) Soil and Environmental Analysis : Physical Methods. 2. painos. New York:CRC Press, 281–314.

Merkus, H.G. 2009. Particle Size Measurements. Pijnacker: Springer Science+Business Media B.V.

Melaja, A. & Hämäläinen, L. 1978. Process for making xylose. US patentti 4,075,406. Viitattu 7.8.2014. <https://www.google.com/patents/US4075406>

Mikkola, J-P., Sjöhol, R., Salmi, T. & Mäki-Arvela, P. 1999. Xylose hydrogenation: kinetic and NMR studies of the reaction mechanisms. Catalysis Today 48(1999) 73–81.

Mpabanga, T.P., Chandel, A. K., da Silva, S.S. & Singh, O.V. 2012 . Detoxification Strategies Applied to Lignocellulosic Hydrolysates for Improves Xylitol Production. Teoksessa da silva, S. S. & Chandel, A. K. (Toim.) D-Xylitol. Fermentative Production, Application and Commercialization. Berlin:Springer-Verlag.

Niiranen, S. 2008. Analyysimenetelmän validointi. Danisco Sweeteners Oy. Toimintakäsikirja. Versio 3. Tulostettu 7.4.2014.

Röthele, S. 2000. The Importance of Particle Size Analysis. Pharmaceutical Manufacturing International. 99–101 Viitattu 15.5.2014. http://www.sym-patec.com/docs/LaserDiffraction/publications/LD_2000_importanceofparticle.pdf

Röthele, S. & Witt, W. 1999. Laser Diffraction: Millennium-Link of Particle Size Analysis. Powder Handling & Process 11 (1). Viitattu 15.4.2014. https://www.sympatec.com/docs/LaserDiffraction/publications/LD_2000_millenniumlink.pdf

Saltmarsh, M. 2013. Essential Guide to Food Additives. 4. painos. Cambridge: Royal Society of Chemistry.

Sirviö, K. 2009. Ksylitoli. Terve suu. 15.9.2009. Duodecim. Viitattu 6.8.2014. http://www.terveyskirjasto.fi/kotisivut/tk.koti?p_artikkeli=trs00019

Sympatec GmbH. 1998a. HELOS Central Unit Operating Instructions. System-Partikel-Technik. Käyttöohje. Clausthal-Zellerfeld:Sympatec GmmbH.

Sympatec GmbH. 1998b. RODOS Operating Instructions. System-Partikel-Technik. Käyttöohje. Clausthal-Zellerfeld:Sympatec GmmbH.

Sympatec GmbH. 1997. Performance Features of the HRLD-Mode of the HELOS Evaluation. System-Partikel-Technik. Käyttöohje. Clausthal-Zellerfeld:Sympatec GmmbH.

Zacharis, C. 2012. Xylitol. Teoksessa O'Donell, K. & Kearsley, M. (toim.) Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology. 2. painos. Somerset, NJ, USA: Wiley-Blackwell, 348–377.

Xu, R. 2000. Light Scattering Methods. Hingham, MA, USA: Kluwer Academic Publishers.

MENETELMÄN LUOMISEN AJOPARAMETRIT

| | Syöttönopeus [%] | Suppilon korkeus [mm] | Paine [bar] |
|-----------|-------------------------|------------------------------|--------------------|
| 1 | 80 | 3,0 | 0,5 |
| 2 | 90 | 3,0 | 0,5 |
| 3 | 70 | 3,0 | 0,5 |
| 4 | 80 | 3,0 | 0,75 |
| 5 | 90 | 3,0 | 0,75 |
| 6 | 70 | 3,0 | 0,75 |
| 7 | 90 | 3,0 | 1,0 |
| 8 | 80 | 3,0 | 1,0 |
| 9 | 70 | 3,0 | 1,0 |
| 10 | 80 | 3,5 | 0,5 |
| 11 | 90 | 3,5 | 0,5 |
| 12 | 70 | 3,5 | 0,5 |
| 13 | 80 | 3,5 | 0,75 |
| 14 | 90 | 3,5 | 0,75 |
| 15 | 70 | 3,5 | 0,75 |
| 16 | 90 | 3,5 | 1,0 |
| 17 | 80 | 3,5 | 1,0 |
| 18 | 70 | 3,5 | 1,0 |
| 19 | 80 | 4,0 | 0,5 |
| 20 | 90 | 4,0 | 0,5 |
| 21 | 70 | 4,0 | 0,5 |
| 22 | 80 | 4,0 | 0,75 |
| 23 | 90 | 4,0 | 0,75 |
| 24 | 70 | 4,0 | 0,75 |
| 25 | 90 | 4,0 | 1,0 |
| 26 | 80 | 4,0 | 1,0 |
| 27 | 70 | 4,0 | 1,0 |