



Osaamista  
ja oivallusta  
tulevaisuuden  
tekemiseen

Mona Österman

# Laktoosimääritysmenetelmän validointi HPLC-RI-laitteistolle

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

19.3.2020

Tekijä Otsikko  Sivumäärä Aika	Mona Österman Laktoosimääritysmenetelmän validointi HPLC-RI-laitteistolle  30 sivua + 4 liitettä 19.3.2020
Tutkinto	Laboratorioanalytikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat	Vastaava tutkija Helena Simolin Tutkimusassistentti Kati Kivelä Yliopettaja Jukka Niiranen
<p>Opinnäytetyö tehtiin Valion tutkimus- ja tuotekehityksen kemian analyysipalvelulaboratoriossa.</p> <p>Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia mahdollisuutta korvata meijeriteollisuusnäytteille soveltuva entsyymaattinen laktoosimääritysmenetelmä nestekromatografisella menetelmällä. Menetelmän korvaamisesta oltiin kiinnostuneita, sillä uusi menetelmä olisi muun muassa luotettavampi ja kustannustehokkaampi. Kromatografisen menetelmän toimivuutta arvioitiin suorittamalla menetelmälle validointi. Saatuja tuloksia vertailtiin tilastollisin menetelmin.</p> <p>Validoitava menetelmä oli osittain uusi. Menetelmä oli muunneltu jo käytössä olevasta menetelmästä ja laitevalmistajan antamista suosituksista sopivaksi kokonaisuudeksi. Näytteinä käytettiin meijeriteollisuustuotteita sekä prosessinäytteitä. Validoinnissa tarkasteltiin validoitavalla menetelmällä saatuja tuloksia ja verrattiin referenssimenetelmien tuloksiin. Referenssimenetelmät olivat entsyymaattiset menetelmät Laktoosi ja glukoosi entsyymaattisesti ja Laktoosi ja galaktoosi entsyymaattisesti ja kromatografinen menetelmä Laktoosin määrittäminen ionikromatografisesti korkean suorituskyvyn nestekromatografilla (Dionex).</p> <p>Validoinnissa tarkasteltiin ensisijaisesti laktoosipitoisuutta mutta myös galaktoosin ja glukoosin tuloksia. Mittausepävarmuuden tulokset olivat hyvät ja niiden mukaan menetelmä oli toimiva. Toistettavuusmittauksien tulokset olivat myös raja-arvojen sisällä. Tilastollisista menetelmistä t-testi antoi raja-arvoja ylittäviä tuloksia, mutta tulos oli odotettavissa. Tästä syystä tulokselle ei annettu ensisijaista painoarvoa lopputulokseen. Validoinnin lopputuloksena oli, että menetelmällä ei voida korvata entsyymaattista menetelmää, mutta sillä voidaan määrittää laktoosipitoisuus.</p> <p>Tuloksista saatiin paljon hyödyllistä tietoa menetelmän toimivuudesta ja sitä voidaan hyödyntää lisättäessä menetelmään uusia sokereita.</p>	
Avainsanat	Validointi, HPLC-RI, laktoosi

Author Title	Mona Österman Validation of the Lactose Assay Method for HPLC-RI
Number of Pages Date	30 pages + 4 appendices 19 March 2020
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Helena Simolin, Senior Research Scientist Kati Kivelä, Research Assistant Jukka Niiranen, Principal Lecturer
<p>This thesis work was done at Valio Oy's research and development in chemistry analysis laboratory.</p> <p>The purpose of this study was to investigate the possibility of replacing the enzymatic lactose assay method for dairy industry samples with liquid chromatography method. There was interest in replacing the method, as the new method would be more reliable and cost-effective. The investigation was performed by validating the new method. The results of validation were examined by statistical methods.</p> <p>The method to be validated was partly new. The method had been modified from an old liquid chromatograph method in use and the column's manufacture recommendations into suitable driving conditions. Dairy products and process samples were used as samples. The results obtained with the method to be validated were compared with the results of the reference methods. The enzymatic reference methods were Enzymatic Determination of Lactose and Glucose and Enzymatic Determination of Lactose and Galactose and the chromatographic reference method was Determination of Lactose by Ion Chromatography with High-Performance Liquid Chromatography (Dionex).</p> <p>Validation focused primarily on lactose content but also the concentrations of galactose and glucose were measured. The results of the measurement uncertainty were good, and the method was found to be working. The results of the repeatability measurements were also within the limits. Of the statistical methods, the t-test gave results above the limit values, but the result was expected. For this reason, the result was not given priority in the outcome. The result of the validation was that the method cannot replace the enzymatic method but can determine the lactose concentration.</p> <p>The results provided a lot of valuable information about the method. The information can be utilized to validate other sugars in the method.</p>	
Keywords	Validation, HPLC-RI, lactose

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Sokerit	2
2.1	Laktoosi	2
2.2	Glukoosi ja galaktoosi	3
3	Laitteisto	4
3.1	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia	4
3.2	Hydrofiilinen vuorovaikutus nestekromatografia	6
3.3	Taitekerroindetektorit	8
4	Referenssimenetelmät	9
4.1	Ensymaattiset menetelmät	9
4.2	Kromatografinen menetelmä	11
5	Sokerianalytiikka	11
6	Validointi	13
6.1	Havaitsemis- ja määrittämiss raja	13
6.2	Mittausalue ja lineaarisuus	14
6.3	Oikeellisuus	14
6.4	Toistettavuus	14
6.5	Mittausepävarmuus	15
6.6	Näytteen esikäsittelyn optimointi	16
7	Kemikaalit ja laitteisto	16
8	Työn toteutus	17
8.1	Menetelmä	18
8.2	Esikäsittely	18
8.3	Ulkoinen kalibrointi	18
9	Validoinnin tulokset	18

9.1	Havaitsemis- ja määritysraja	19
9.2	Mittausalue ja lineaarisuus	19
9.3	Oikeellisuus	19
9.4	Toistettavuus	25
9.5	Mittausepävarmuus	26
9.6	Näytteen esikäsittelyn optimointi	27
10	Yhteenveto	28
	Lähteet	29
	Liitteet	
	Liite 1. Havaitsemisraja ja määritysraja	
	Liite 2. Oikeellisuus	
	Liite 3. Toistettavuus	
	Liite 4. Mittausepävarmuus	

## Lyhenteet

HILIC	<i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i> . Hydrofiilinen vuorovaikutus nestekromatografia.
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> . Korkean erotuskyvyn nestekromatografia.
HPLC-IC	<i>High Performance Liquid Chromatography-Ion Chromatography</i> . Korkean erotuskyvyn nestekromatografia – ionikromatografia.
RI	<i>Refractive Index</i> . Taitekerroindetektor.
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i> . Suhteellinen keskihajonta.

## 1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin Pitäjänmäellä sijaitsevan Valio Oy:n Tutkimus ja Tuotekehityksen kemian analyysipalvelussa. Analyysipalvelulaboratoriossa tutkitaan muun muassa näytteiden peruskoostumusta (kuiva-aine, proteiini, rasva ja tuhka), kivennäisaineita ja laktoosipitoisuutta. Valio Oy on vuonna 1905 perustettu suomalainen meijeri ja ruokatalo. Ensimmäinen laboratorio perustettiin vuonna 1916 ja Tutkimus ja Tuotekehitys täytti 100 vuotta vuonna 2017. Tunnettu kemisti ja nobelisti Artturi Ilmari Virtanen työskenteli Valion laboratoriossa noin 50 vuotta. Valion tunnetuimpia keksintöjä ovat muun muassa A.I.V-rehu, -voisuala, Valio Eila®-teknologia ja Valio Gefilus®-tuotteisto. [1.]

Pääraaka-aineena yritys käyttää maitoa, josta jalostaa erilaisia maitotuotteita, kuten juustoja, jogurtteja ja rahkoja. Valio on laajentanut toimintaansa vuosien aikana ja vuonna 2020 meijerituotteiden lisäksi tuotetaan muun muassa mehuja, demi- ja herajauheita sekä kasvipäisiä tuotteita. Tuotevalikoiman laajentuessa yritys tunnetaan nykyään meijerinä ja ruokatalona. [1.]

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia mahdollisuutta korvata entsyymaattinen laktoosin määritysmenetelmä kromatografisella menetelmällä. Entsyymaattisen menetelmän korvaamisesta oltiin kiinnostuneita, sillä kromatografinen menetelmä olisi toimiessaan luotettavampi kuin entsyymaattinen, analysoiminen olisi nopeampaa ja kromatografinen menetelmä mahdollistaisi useamman sokerin analysoimisen samalla kerralla. Tutkimus suoritettiin tekemällä vertailuvalidointi menetelmien välillä. Referenssimenetelminä käytettiin entsyymaattisia menetelmiä sekä kromatografista menetelmää. Entsyymaattiset menetelmät olivat Laktoosi ja glukoosi entsyymaattisesti ja Laktoosi ja galaktoosi entsyymaattisesti. Menetelmiä käytetään tuotteiden laktoosipitoisuuden analysoimiseen. Toisena referenssimenetelmänä käytettiin kromatografista menetelmää Laktoosin määrittäminen ionikromatografisesti korkean suorituskyvyn nestekromatografilla (Dionex), joka on käytössä tuotteiden laktoosittomuusanalyseissa. Tutkittavia parametrejä olivat menetelmän havaitsemisraja ja määritysraja, mittausalue ja lineaarisuus, oikeellisuus, toistettavuus ja menetelmän mittausepävarmuus. Menetelmien välille tehtiin myös parittainen kahden otoksen t-testi.

Näytteiksi pyrittiin valitsemaan mahdollisimman kattavasti erityyppisiä meijeriteollisuustuotteita, prosessinäytteitä ja laadunvarmistusnäytteitä (LV1 ja LV2), jotta saataisiin tietoa erityyppisten näytteiden tuloksista ja sitä kautta menetelmän toimivuudesta. Laktoosipitoisuuden lisäksi näytteistä tutkittiin myös galaktoosin ja glukoosin pitoisuudet.

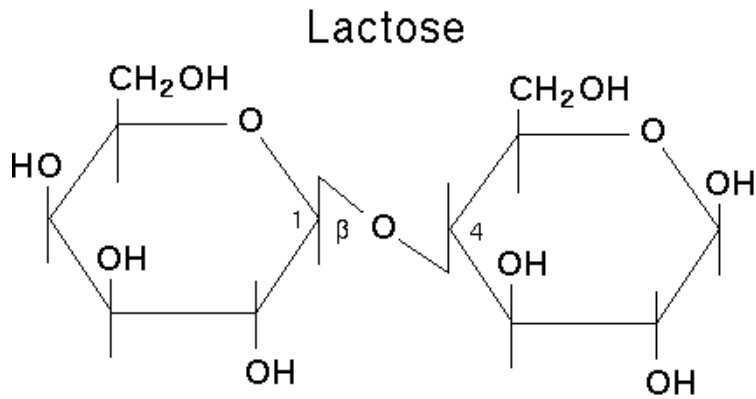
Kromatografisen menetelmän validointi suoritettiin nestekromatografilla, jossa kolonnina oli HILIC-kolonne ja detektorina taitekerroin detektori (RI). Menetelmä ei kokonaisuudessaan ollut aiemmin käytössä Valiolla.

## 2 Sokerit

Sokerit kuuluvat polysakkarideihin, jotka ovat yksi kolmesta ihmisen tarvitsemasta makromolekyylisestä. Makromolekyyleihin kuuluvat polysakkaridien lisäksi rasvat ja proteiinit. Polysakkaridit ovat monesta monosakkaridista koostuvia molekyylejä, joihin kuuluvat erilaiset sokerit, tärkkelykset ja kuidut. Elintarvikkeissa sokereita käytetään muun muassa rakenteen parantamiseen, makeuttamiseen, arominparannukseen ja kiteytymisen hallittamiseen. Myös monet maitotuotteet sisältävät luontaisesti erilaisia sokereita. Sokerimolekyylit koostuvat hiilestä, vedystä ja hapesta. Yksinkertaisimpia sokereita kutsutaan monosakkarideiksi, ja ne koostuvat yhdestä sokerimolekyylisestä. Disakkaridit sisältävät kaksi sokerimolekyylimä ja polysakkaridit useampia sokerimolekyylejä. [2; 3.] Sokereita voidaan analysoida usealla eri tavalla, ja niistä yleisimpiä ovat entsyymaattiset ja kromatografiset menetelmät. Yksi maailman laajuisesti analysoiduimmista sokereista sokerianalytiikassa on laktoosi, joka voi aiheuttaa suolisto-oireita. [4.] Kromatografisella menetelmällä on myös mahdollisuus havaita laittomasti lisätyt sokerit valmiista elintarvikkeista [5]. Opinnäytetyössä tutkitut sokerit olivat laktoosi, glukoosi ja galaktoosi.

### 2.1 Laktoosi

Laktoosi on disakkaridi, joka koostuu kahdesta sokerimolekyylisestä, galaktoosista ja glukoosista, jotka ovat liittyneet toisiinsa kemiallisilla sidoksilla. Laktoosin kemiallinen kaava on  $C_{12}H_{22}O_{11}$ . Kuvassa 1 on laktoosin rakennekaava. [3; 6.]



Kuva 1. Laktoosin rakennekaava. Laktoosi on disakkaridi, joka koostuu galaktoosista ja glukosista. [7.]

Elimistössä laktoosi ei imeydy disakkaridina vaan ruoansulatuselimistön laktaasientsyymi pilkkoo laktoosin monosakkarideiksi, glukosiksi ja galaktoosiksi. Monissa maitotuotteissa on luontaisesti laktoosia ja esimerkiksi maito sisältää laktoosia noin 5 g/100 g. Laktoosi-intoleranssia sairastavilta ihmisiltä puuttuu laktaasientsyymi, jolloin pilkkoutumaton laktoosi saattaa aiheuttaa voimakkaita suolisto-oireita. Tämän takia laktoosin analysointi on maailmanlaajuisesti tärkeää. [4; 8; 9.]

## 2.2 Glukoosi ja galaktoosi

Glukoosi ja galaktoosi ovat monosakkarideja, ja ne koostuvat molemmat yhdestä sokeirimolekyylistä. Glukoosilla ja galaktoosilla on sama kemiallinen kaava,  $C_6H_{12}O_6$ , ja ne voivat esiintyä sekä asyklisessä että sykliisessä muodossa. Vesiliuoksessa glukoosin muodot ovat tasapainossa ja pH:ssa 7 syklinen muoto on hallitseva. [10; 11.] Elimistö käyttää glukoosia ensisijaisena energian lähteenä elimistölle ja ainoana energianlähteenä aivoille [3].

### 3 Laitteisto

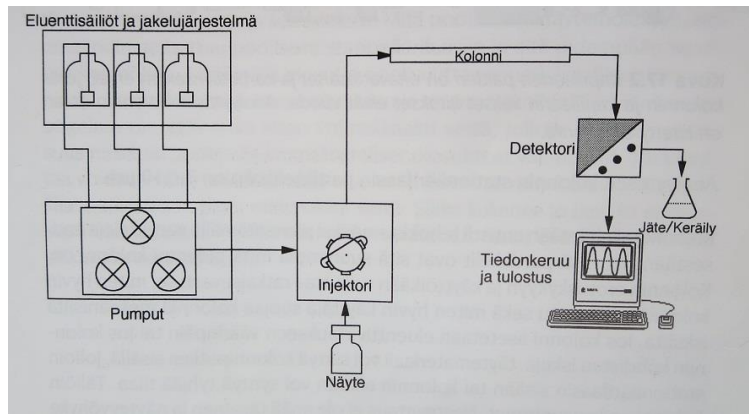
Kromatografia on menetelmä kemiallisten yhdisteiden erotteluun, tunnistamiseen ja puhdistamiseen. Kromatografinen erottelu perustuu tasapainoon, jossa toisiinsa liukenematomat stationäärifaasi ja liikkuva faasi ovat vuorovaikutuksessa keskenään. Näytemolekyylit kulkeutuvat dynaamisessa tasapainossa faasien välillä vuoroin sitoutuen stationäärifaasiin ja vuoroin irrotten liikkuvaan faasiin. Molekyylin etenemiseen vaikuttavia tekijöitä ovat sen adsorptio- ja partitio-ominaisuudet sekä erilaiset vuorovaikutukset faaseihin. Heikosti stationäärifaasiin sitoutuva molekyyli etenee nopeasti sen ollessa suurimman osan ajasta liikkuvassa faasissa, ja voimakkaasti stationäärifaasiin sitoutuva etenee hitaammin. [12, s. 140–141.]

Nestekromatografian absorptiokromatografiassa stationäärifaasi on kiinteä ja liikkuva faasi on neste, jolloin tasapainoon vaikuttavia tekijöitä ovat näytteen sisältämien komponenttien liukoisuusominaisuudet. Tasapainoon vaikuttaa myös näytteen poolisuus, jos stationäärifaasi on poolinen. Pooliset yhdisteet, sekä poolittomat yhdisteet ajoliuoksen ollessa heikosti pooliton, tarttuvat pooliseen stationäärifaasiin. Tällöin tasapainoon voidaan vaikuttaa muuttamalla ajoliuoksen poolisuutta. [12, s. 141–142.]

#### 3.1 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia

Korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) käytetään muun muassa orgaanisten yhdisteiden analysoimisessa. Analyysitekniikalla voidaan tutkia hyvin laajaa kirjoa näytteitä ja ainoa edellytys tutkittavalta näytteeltä on sen saaminen nestemäiseen muotoon, jossa sen tulee pysyä koko analyysin ajan. [12, s. 153.]

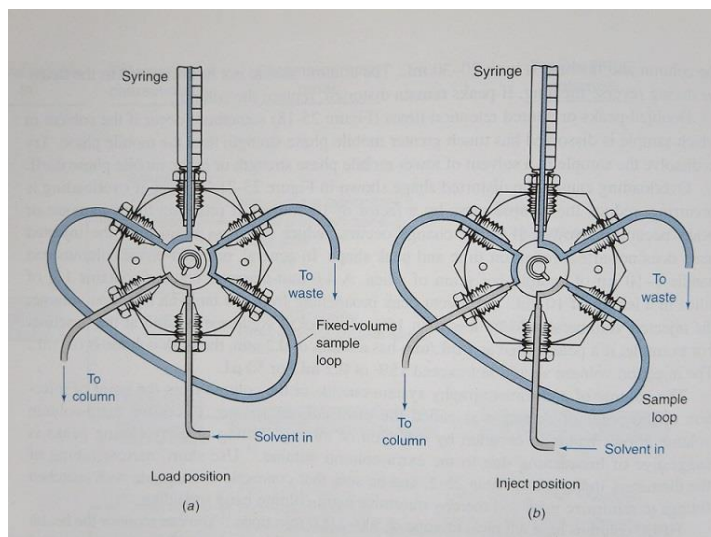
Nestekromatografi-laitteisto koostuu säilöpulloista, pumpuista, injektorista, kolonnista, detektorista ja tiedonkeruu- ja tulostuslaitteistosta. Laitteiston osat näkyvät kuvassa 2.



Kuva 2. Nestekromatografilaitteiston kaavakuva [12, s. 153].

Näyte syötetään injektorin kautta nestefaasiin. Neste kulkeutuu korkean paineen alla kapillaariputkissa pumppujen avulla kolonnille. Kolonnissa näyte erottuu eri komponenteiksi, joiden kulkeutuminen detektorille vie komponentille ominaisen ajan. Detektori havaitsee näytteen saapumisen ja antaa tiedon tiedonkeruulaitteistolle. [12, s. 153.]

Näyte voidaan syöttää nestevirtaan injektoimalla käsin tai automaattisesti. Automaattisessa injektioinnissa erisuuruiset injektio-tilavuudet ovat mahdollisia. Näytesilmukat ovat kooltaan 5–500 µl. Injektori yhdistää näytesilmukan ajoliuokseen, joka on korkean paineen alla ja kuljettaa näytteen kolonniin. Injektorin ollessa täyttöasennossa ajoliuos virtaa suoraan kolonniin. Kuvassa 3 injektorin rakenne. [12, s. 165.]



Kuva 3. Injektorin rakenne [13, s. 686].

Korkean erotuskyvyn nestekromatografiassa käytetään korkeaa painetta, jolloin pumpujen tulee kyetä pumppaamaan toistuvasti tasaisella virtausnopeudella korkeaa painetta vastaan. Virtausnopeuteen vaikuttavat ajoliuoksen viskositeetti, kolonnin mittasuhteet ja stationäärifaasin hiukkas- ja huokoisuusominaisuudet. [12, s. 163.]

Nestekromatografian kolonnit ovat materiaaliltaan terästä ja pituudeltaan 3–30 cm. Sisähalkaisija voi vaihdella 1–25 mm riippuen analyysistä. Fritit, eli huokoiset levyt, ovat kolonnin päissä ja pitävät täytemateriaalin paikallaan. Kapillaarin liitetään tiiviisti kolonniin kartiotiivisteiden avulla. Analyttisen kolonnin stationäärifaasin partikkelikoko on 3–10 µm. Mitä pienempi partikkelikoko kolonnissa on, sitä tehokkaampi sen erotuskyky on. [12, s. 154.] Kolonnit ovat kalliita ja ne likaantuvat herkästi. Näytteet tulee sentrifugoida tai suodattaa ennen näytepulloon laittoa tai käsin injektointia. Pääkolonnin suojaamiseksi voidaan käyttää myös esikolonnia, joka on materiaaliltaan samaa kuin pääkolonni. [13, s. 671.]

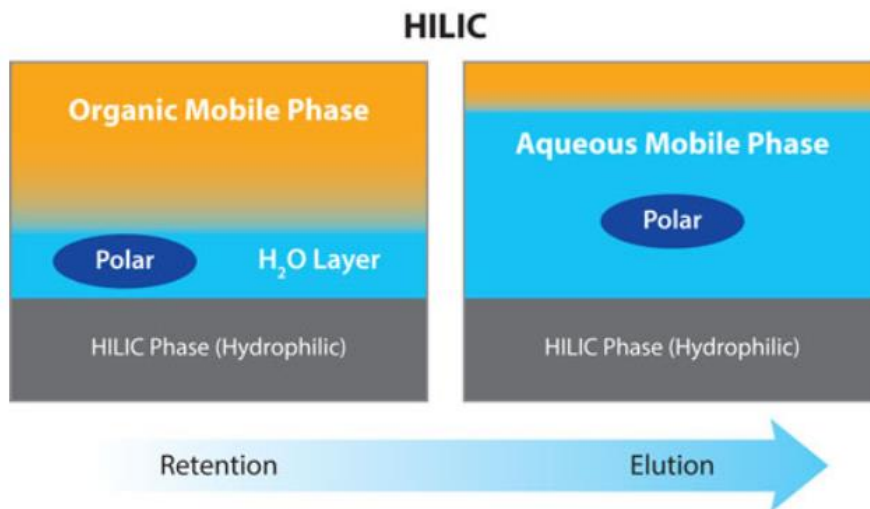
Detektoreja, jotka soveltuvat nestekromatografille, on useita erilaisia. Käytettyjä detektoreja ovat esimerkiksi UV/Vis-, DAD, fluoresenssi-, sähkökemiallinen-, johtokyky- ja taitekerroindetektorit. Hyvän detektorin tulisi olla herkkä pienille pitoisuuksille kaiken tyyppisillä näytteillä, antaa lineaarinen vaste ja kromatogrammipiikit eivät saisi leventyä. Detektorit eivät saa häiriintyä lämpötilan vaihtelusta tai liuottimen koostumuksesta. Nestekromatografissa käytetään myös usein kahta tai useampaa detektoria. [13, s. 686.]

Ajoliuos koostuu yleensä kahdesta tai useammasta komponentista. Liuoksia vaihtamalla tai niiden välistä suhdetta muuttamalla voidaan vaikuttaa analyysiolosuhteisiin. Mitä suurempi ajoliuoksen viskositeetti on, sitä suurempi stationäärifaasin aiheuttama vastapaine on. [12, s. 160.]

### 3.2 Hydrofiilinen vuorovaikutus nestekromatografia

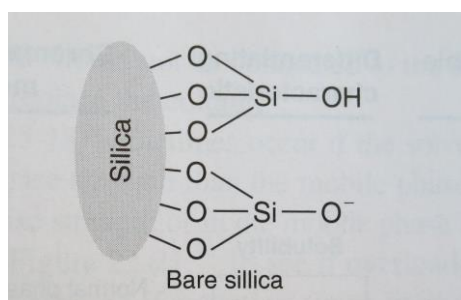
Hydrofiilistä vuorovaikutusta nestekromatografiaa (HILIC) käytetään usein sen kaltaisten näytteiden erottamiseen, jotka ovat kemiallisiltaan ominaisuuksiltaan liian poolisia molekyylejä erottuakseen käänteisfaasikolonnissa. Esimerkiksi polaarilla orgaanisilla ja biokeemiallisilla molekyyleillä on hydrofiilinen alue, jolloin molekyylit eivät pidä käänteisfaasikolonnissa ja erotu [13, s. 679]. HILIC-kolonnissa kiinteäfaasi on voimakkaasti poolinen ja

liikkuva faasi sisältää tyypillisesti 60–97 V-% aprotista orgaanista liuotinta kuten asetonitriliä, johon on sekoitettu vesipitoista puskuria. Liikkuvan faasin vesiosuus muodostaa kiinteän faasin pintaan ohuen vesikerroksen. Näytteessä olevat pooliset molekyylit liukenevat vesifaasiin ja ovat vuorovaikutuksessa suoraan poolisen kiinteänfaasin kanssa. Mitä suurempi orgaanisen liuottimen konsentraatio on, sitä huonommin poolinen liuos liukenee liikkuvaan faasiin ja kulkeutuu hitaammin kolonnin läpi detektorille. [13, s. 679–680] Kuvassa 4 on havainnollistettu orgaanisen liuottimen ja vesiosuuden vaikutusta molekyylien liikkumiseen faaseissa.



Kuva 4. Orgaanisen liuottimen konsentraation kasvaessa poolisen näytteen liukoisuus liikkuvaan faasiin huononee [14].

Kiinteän faasin materiaalit vaihtelevat, ja yleisimmin käytettyjä ovat paljas piioksidi-, dioli- ja amidifaasit. Kuvassa 5 kuvattu paljas piioksidifaasi.

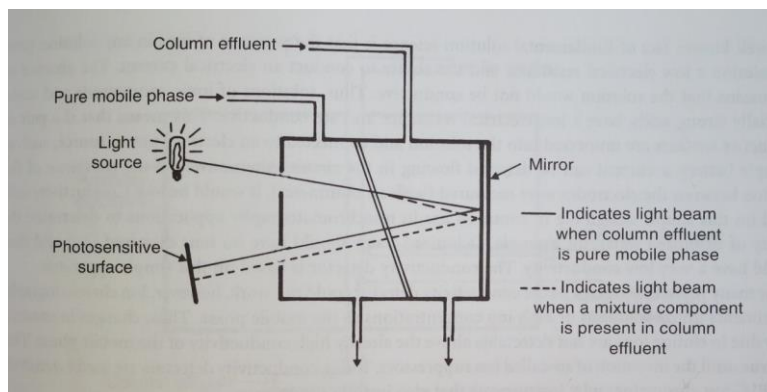


Kuva 5. HILIC-kolonnissa käytetty paljas piioksidifaasi [13, s.683].

HILIC-metodeissa pH:lla on oleellinen vaikutus tulokseen ja pH tulee ottaa huomioon menetelmän kehityksessä ja arvioinnissa. Liian korkea pH voi vaikuttaa komponenttien erottumiseen kolonnissa. Tämän vuoksi näyte tulee liuottaa liuokseen, joka ei nosta liikkuvan faasin pH:ta liian korkeaksi. Jos orgaanisen liuottimen pitoisuus on korkea liikkuvassa faasissa pH:n arvo voi nousta ja vaikuttaa näin komponenttien erottumiseen. pH vaikuttaa analyytin varaustilaan sen pKa:n perusteella. Myös puskurin pitoisuus voi vaikuttaa menetelmän toimivuuteen. Liikkuvan faasin korkea orgaaninen pitoisuus voi saostaa puskurisuoloja näytteen syöttäjän ja kolonnin väliseen putkeen tai kolonniin. Positiiviset puskuri-ionit saattavat myös häiritä tulosten tulkintaa samoilla retentioajoilla tutkittavien analyyttien kanssa. [14.]

### 3.3 Taitekerroindetektor

Taitekerroindetektor (Refractive index detector, RI) on niin sanottu yleisdetektor, joka havaitsee lähes kaikki liuenneet aineet, ja se on yleisesti käytetty detektor hiilihydraatti-analyyseissä. [13, s. 690–691; 15, s. 156–157.] Kahdella eri liuoksella on hyvin harvoin sama taitekerroin, joten taitekertoimen määrittäminen on erityisen hyödyllinen kvalitatiivisissa analyyseissä [16, s. 381]. Taitekerroindetektorin herkkyys ei kuitenkaan riitä tarkimpaan analytiikkaan, ja esimerkiksi UV-detektor on 1000 kertaa herkempi. Taitekerroin riippuu aineesta, lämmöstä, paineesta, valon aallonpituudesta ja aineen vahvuudesta. Taitekertoimen muuttuessa herkästi RI-detektoria voi käyttää vain isotermisessä ajossa, jossa lämpötila, paine ja virtausnopeus pysyvät vakioina. Kuvassa 6 yksinkertaistettu kaavakuva detektorista.



Kuva 6. Taitekerroindetektorin kaavakuva [16, s. 381].

Yleisimmin käytetyssä RI-detektorissa on kaksi läpivirtauskennoa, joista toisessa virtaa puhdas ajoliuos (pure mobile phase), joka toimii niin sanottuna vertailuliuksena ja toisessa kolonnissa kulkee kolonnista tuleva liuos (column effluent). Valon lähde (light source) ohjataan kennojen läpi peilin (mirror) kautta valoherkälle pinnalle (photosensitive surface), jossa havaitaan taitekertoimen muutokset eri liuosten välillä. Detektori havaitsee näyteliuoksen ja ajoliuoksen taitekertoimien eron, jonka perusteella saadaan määritettyä näytteen pitoisuus. [13, s. 690–691; 15, s. 172; 16, s381.]

HPLC-RI-laitteisto havaitsee myös molekyylit, joilla ei ole UV-absorptiota tai se on heikko. Tämän kaltaisia molekyylejä ovat esimerkiksi dieettisokerit. [4.]

## 4 Referenssimenetelmät

Validoinnissa käytetyt referenssimenetelmät olivat entsyymaattinen menetelmä ja kromatografinen menetelmä. Entsyymaattisessa menetelmässä käytettiin entsyymejä pilkkomaan sokerit haluttuun muotoon, jonka jälkeen pilkkoutuneet tuotteet mitattiin spektrofotometrisesti Arena-30-laitteistolla. Kromatografisessa menetelmässä käytettiin nestekromatografia, jossa näytteen komponentit eroteltiin ioninvaihtokolonnissa ja detektorina oli sähkökemiallinen detektori.

### 4.1 Entsyymaattiset menetelmät

Laktoosin ja glukoosin määrittämisessä käytettiin Valion sisäistä menetelmää Laktoosi ja glukoosi entsyymaattisesti (myöhemmin Ents. A), joka perustuu standardeihin ISO 5765-1 ja IDF 79-1 soveltaen. Menetelmä soveltuu meijeriteollisuustuotteille, jotka sisältävät laktoosia. Näytteet esikäsitellään Carrez-saostuksella ja entsyymaattiseen sokerien pilkkomiseen käytetään valmiita kittejä. Analysointi suoritetaan Arena-30-laitteistolla. [17.]

Entsyymaattisessa pilkkoutumisreaktiossa laktoosi hydrolysoituu D-glukoosiksi ja D-galaktoosiksi pH:ssa 6,6 beta-galaktosidaasi entsyymin ja veden vaikutuksesta seuraavan reaktion mukaisesti:

laktoosi + H<sub>2</sub>O -> D-glukoosi + D-galaktoosi.

D-glukoosi fosforyloituu heksokinaasin (HK) ja adensiini 5'-trifosfaatin (ATP) vaikutuksesta pH:ssa 7,6 glukoosi-6-fosfaatiksi (G-6-P). Reaktiossa muodostuu lisäksi adensiini-5'-difosfaattia (ADP) seuraavan yhtälön mukaisesti:



Glukoosi-6-fosfaattidehydrogenaasin (G6P-DH) vaikutuksesta nikotiiniamidiadeniini-nukleotidifosfaatti (NADP<sup>+</sup>) hapettaa G-6-P:n glukonaatti-6-fosfaatiksi. Reaktiossa muodostuu lisäksi nikotiiniamidiadeniini-dinukleotidifosfaattia (NADPH) seuraavan reaktion mukaisesti:



NADPH:n absorbanssi mitataan spektrofotometrisesti aallonpituudella 340 nm. NADPH:n määrä on stoikiometrisessä suhteessa D-glukoosin määrään ja näytteen alkuperäinen D-glukoosin pitoisuus saadaan hydrolysoimattomasta näytteestä. Laktoosin pitoisuus saadaan hydrolyysin aikana syntyneen D-glukoosimäärän ja hydrolysoimattoman näytteen glukoosin määrän erotuksesta. [17.]

Laktoosin ja galaktoosin määrittämisessä käytettiin Valion sisäistä menetelmää Laktoosi ja galaktoosi entsyymattisesti (myöhemmin Ents. B), joka perustuu standardeihin ISO 5765-2 ja IDF 79-2 soveltaen. Menetelmä soveltuu meijeriteollisuustuotteille, jotka sisältävät hyvin vähän laktoosia. Analyysissä näytteet esikäsitellään Carrez-saostuksella ja entsyymattiseen pilkkomiseen käytetään valmiita kittejä. Analysointi suoritetaan Arena-30-laitteistolla. [18.]

Analyysissä laktoosi hydrolysoidaan pH:ssa 5,0 D-glukoosiksi ja D-galaktoosiksi beta-galaktosidaasi-entsyymin ja veden vaikutuksesta seuraavan reaktion mukaisesti:



D-galaktoosi hapettuu galaktonihapoksi beta-galaktoosidehydrogenaasin (GAI-DH) vaikutuksesta pH:ssa 8,6 nikotiiniamidi-adeniinukleotidin ( $\text{NAD}^+$ ) avulla seuraavan reaktion mukaisesti:



Nikotiiniamidiadeniidehydrogenaasia (NADH) muodostuu laktoosin ja D-galaktoosiin stoikiometrisessä suhteessa. Pitoisuus saadaan mittaamalla näytteen absorbanssi aallonpituudella 340 nm. D-galaktoosin alkuperäinen pitoisuus saadaan hydrolysoimattomasta näytteestä. Laktoosin pitoisuus saadaan laskemalla hydrolysoimattoman näytteen galaktoosin ja hydrolyysin aikana syntyneen galaktoosin määrän erotus. [18.]

#### 4.2 Kromatografinen menetelmä

Laktoosin, galaktoosin ja glukoosin kromatografisessa määrittämisessä käytettiin Valion sisäistä menetelmää Laktoosin määrittäminen ionikromatografisesti korkean suorituskyvyn nestekromatografilla (Dionex) (myöhemmin HPLC-IC). Menetelmä soveltuu erityisesti laktoosittomille ja vähälaktoosisille meijeriteollisuustuotteille. Menetelmässä laktoosi määritetään vesiliuoksesta ionikromatografisesti. Näyte liuotetaan veteen ja saostetaan Carrez-saostuksella. Paljon rasvaa sisältävät tuotteet voidaan puhdistaa C-18-kiinteäfaasiuuttopatruunalla. Määrittäminen tapahtuu gradienttiohjelmalla, jossa ajoliuoksen NaOH-vesipitoisuus muuttuu ja kolonnin jälkeen lisätään vahvaa NaOH:a. Pitoisuus mitataan sähkökemiallisella detektorilla. Analyysit suoritetaan korkeansuorituskyvyn nestekromatografilla (Dionex ICS-3000), jossa on anioninvaihtokolonne (Carbo Pac PA 1 (4x250 mm)) ja sähkökemiallinen detektori (ED40). [19.]

## 5 Sokerianalytiikka

Sokerit kuuluvat tärkeimpiin ainesosiin ruoassa ja ruoan raaka-aineissa. Ne voivat esiintyä ruoka-aineissa luontaisesti tai lisättynä. Sokerit vaikuttavat ruoka-aineiden ravintoarvoihin, koostumukseen ja laatuun. Elintarviketeollisuudessa on tärkeää pystyä määrittämään sekä lisättyjen että luontaisesti esiintyvien sokerien määrä. [20, s. 69.] Sokerianalytiikassa yleisimmät analyysimenetelmät ovat entsyymaattiset ja kromatografiset

menetelmät. Monosakkarideille yleisimmin käytetyt menetelmät pitoisuuden määrittämiseksi on kaasui- tai nestekromatografiset menetelmät. Nämä soveltuvat myös laadulliseen määrittämiseen. Entsymaattiset menetelmät ovat tavallisesti spesifisiä yhdelle monosakkaridille, kun taas kromatografisilla menetelmillä voidaan määrittää yhden tai useamman monosakkaridin määrä ja laatu. [20, s. 82.]

Entsymaattisessa menetelmässä käytetään entsyymejä katalysoimaan reaktioita. Reaktion seurantaan tarvitaan laitteisto, joka pystyy seuraamaan katalysointireaktiota ja määrittämään tuotteen pitoisuuden. Lopputuotteiden pitoisuus mitataan spektrofotometrisesti. Menetelmät ovat usein nopeita ja spesifisiä. Glukoosin analysoinnissa laajimmin käytössä oleva entsyymi on glukoosioksidasi, joka katalysoi glukoosin hapettumisen. Toinen usein käytetty entsyymi on hexokinaasi. Galaktoosin ja laktoosin analysoinnissa galaktoosi dehydrogenoidaan ja laktoosi hapetetaan. [20, s. 82–85.]

Kromatografiset menetelmät ovat erottelutekniikoita, jotka erottelevat näytteen eri komponentit toisistaan kiinteässä faasissa. Nestekromatografilla on mahdollista tehdä erityyppisiä kemiallisia erottelutekniikoita erilaisten kolonnien ja kiinteän ja liikkuvan faasien valinnoilla. Normaalifaasikromatografiassa kiinteäfaasi on hydrofiilinen ja liikkuvan faasin hydrofiilisuus/hydrofobisuus vaihtelee tutkittavan analyytin mukaan. Käänteisfaasikromatografiassa kiinteäfaasi on hydrofobinen. [20, s. 79–80.]

Näytteen esikäsittely nestekromatografille riippuu näytteen puhtaudesta. Yksinkertaisimmillaan riittää näytteen liuotus, laimennus jos tarpeen, sekä suodatus näytepulloon. Jos näyte sisältää rasvaa ja proteiineja, ne tulee poistaa näytteestä ennen analysointia. Rasvaliukoiset komponentit voidaan poistaa sopivalla liuottimella ja proteiinit voidaan saostaa esimerkiksi entsyymaattisesti. Epäorgaaniset suolat saattavat vaikuttaa kolonnin toimintaan ja niiden poistamisessa voidaan käyttää kolonnia, jossa on anionin/kationinvaihtohartsia. [20, s. 74–75, 79–80.] Epäpuhtaudet näytteessä voivat häiritä myös detektorin toimintaa. Tuloksen määrittäminen esimerkiksi taitekerroindetektorilla hankaloituu, sillä epäpuhtaudet vaikuttavat taitekerroin suuruuteen. [15, s. 172.]

## 6 Validointi

Vertailuvalidointi suoritettiin laitteen validoinnista vastaavan tutkijan laatiman validointisuunnitelman mukaan. Tarkoituksena oli validoida laktoosimääritysmenetelmä nestekromatografilaitteistolle vertailemalla laitteella saatuja tuloksia entsyymaattisella menetelmällä [17; 18] saatuihin tuloksiin, sekä määrittää kromatografisen menetelmän mittausepävarmuus. Lisäksi käytössä oli myös toinen referenssimenetelmä [19], jolla suoritettiin osa vertailusta. Validointia varten analysoitiin erilaisia näytematriiseja kaikilla menetelmillä ja tuottamalla aineistoa mittausepävarmuuden laskemiseen. Lisäksi tutkittiin eri menetelmillä saatujen tulosten eroavaisuutta parittaisen kahden otoksen t-testillä 95 %:n luottamustasolla. Tutkitut parametrit olivat havaitsemisraja ja määritysraja, mittausalue ja lineaarisuus, oikeellisuus, toistettavuus ja mittausepävarmuus.

### 6.1 Havaitsemis- ja määritysraja

Havaitsemisraja on pienin pitoisuus, joka voidaan tutkitulle komponentille määrittää luotettavasti. Määritysraja on menetelmän alhaisin pitoisuusalaraja, jolla voidaan luotettavasti määrittää tulos ja jolle voidaan esittää epävarmuusarvio. [21, s. 21–23.]

Havaitsemisraja määritettiin mittaamalla useita kertoja standardiliuosta, joka sisälsi pienen pitoisuuden tutkittavaa analyyttiä (0,025 mg/ml). Tulos saatiin laskemalla keskihajonta saatujen tulosten keskiarvosta ja kertomalla se kolmella kaavan 1 mukaan.

$$\text{Havaitsemisraja} = 3 * X \quad (1)$$

jossa X on keskihajonta, joka on laskettu mitattujen pitoisuuksien keskiarvosta.

Määritysraja laskettiin samoista tuloksista kuin havaitsemisraja. Tulos saatiin laskemalla keskihajonta mitattujen tulosten keskiarvosta ja kertomalla tulos kymmenellä (kaava 2).

$$\text{Määritysraja} = 10 * X \quad (2)$$

jossa X on keskihajonta, joka on laskettu mitattujen pitoisuuksien keskiarvosta.

## 6.2 Mittausalue ja lineaarisuus

Mittausalue on pitoisuusalue, jolla menetelmä antaa tuloksen luotettavalla tarkkuudella. Lineaarisuus kuvaa menetelmän antamaa lineaarista korrelaatiota tulosten ja näytteiden pitoisuuden välillä. [22, s. 11–12.]

Mittausalue ja lineaarisuusalue määritettiin analysoimalla sekä normaalit standardiliuokset että standardinlisäysliuokset. Standardinlisäysliuokset valmistettiin lisäämällä laktoosittomaan maitoon laktoosistandardia siten, että loppupitoisuudet olivat 0,025; 0,050; 0,100; 0,249; 0,499; 0,998; 1,996 mg/ml. Normaaliin standardiliuosten pitoisuudet olivat samat.

## 6.3 Oikeellisuus

Oikeellisuus kuvaa menetelmän systemaattista virhettä. Oikeellisuus määritetään hyvin monen toiston tulosten keskiarvosta, jota verrataan ulkopuoliseen tulokseen. Parittainen kahdenotoksen t-testi on yksi tapa tutkia menetelmän oikeellisuutta. T-testi kuvaa eroavatko menetelmät merkitsevästi toisistaan 95 %:n luottamustasolla.

Oikeellisuus määritettiin tekemällä rinnakkaismittauksia ja vertailemalla niitä referenssimenetelmillä saatuihin tuloksiin. T-testissä tuloksille laskettuja arvoja  $t_{\text{laskettu}}$  ja  $t_{\text{kriittinen}}$  verrataan ja  $t_{\text{lasketun}}$  tulee olla alle  $t_{\text{kriittisen}}$ , jolloin menetelmät eivät eroa merkitsevästi luottamustasolla 95 %.

## 6.4 Toistettavuus

Toistettavuus kertoo menetelmän täsmällisyydestä. Mittaukset tulee suorittaa lyhyellä aikavälillä, samanlaisissa olosuhteissa ja näytteistä tehdään rinnakkaismäärittäviä

Toistettavuus määritettiin tekemällä rinnakkaismäärittäviä useampana päivänä. Tuloksia tarkasteltiin laskemalla niistä keskiarvo, keskihajonta, suhteellinen keskihajonta (Relative Standard Deviation, %RSD) ja 95 %:n luotettavuusväli.

## 6.5 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus koostuu sisäisestä uusittavuudesta  $u(R_w)$  (kaava 3) ja menetelmän ja laboratorion poikkeamasta  $u(\text{bias})$  (kaava 4). Laajennettu mittausepävarmuus saadaan kertomalla yhdistetty standardiepävarmuus  $u_c$  (kaava 6) kahdella (95 %:n luottamusväli). Alla listattuna käytetyt kaavat (3–6).

$$u(R_w) = \sqrt{S_{R_w}^2 + s_r^2} \quad (3)$$

jossa

$S_{R_w}$  on kontrollinäytteiden keskihajonta

$s_r$  on rinnakkaismääritysnäytteiden arvioitu keskihajonta otannasta.

$$u(\text{bias}) = \sqrt{\text{bias}_1^2 + \left(\frac{s_{\text{bias}_1}}{\sqrt{n_1}}\right)^2 + u(c_{\text{ref}_1})^2} \quad (4)$$

jossa

$$\text{bias}_1 = \frac{c_1 - c(\text{ref}_1)}{c(\text{ref}_1)} * 100 \% \quad (5)$$

$s_{\text{bias}_1}$  on mitatun konsentraation keskihajonta

$n_1$  on mittausten määrä

$u(c_{\text{ref}_1})$  on kontrollinäytteen pitoisuuden standardiepävarmuus

$c_1$  on mitattu konsentraatio

$c_{\text{ref}_1}$  on referenssinäytteen tunnettu pitoisuus.

$$u_c = \sqrt{u_{RW}^2 + u_{bias}^2} \quad (6)$$

Kerätyistä tuloksista laskettiin laajennettu mittausepävarmuus Measurement Uncertainty Kit (MUKit) -ohjelmalla. MUKit on laboratoriolle suunnattu mittausepävarmuuden arvioimiseen tarkoitettu tietokoneohjelma. Laskenta perustuu NordTest TR 537 -raporttiin. [23.]

## 6.6 Näytteen esikäsittelyn optimointi

Näytteen esikäsittelyn optimointia tutkittiin käyttämällä eri määriä Carrez-saostusreagensseja, jolla tutkittiin proteiinien saostumista näytteestä. Tutkimuksessa päädyttiin valitsemaan Carrez I- ja Carrez II -saostusreagensseille määriksi 0,6 ml; 0,8 ml ja 1,0 ml. Carrez-saostuksessa käytettävän NaOH:n määrät olivat 1,6 ml; 3,2 ml ja 4,8 ml. Analyysissä tutkittiin näytteiden saostumista analysoitujen laktoositulosten perusteella.

## 7 Kemikaalit ja laitteisto

Työssä käytetyt reagenssit olivat

- asetonitriili, Merck, tuotenumero 1.00029
- kaliumferrosyanidi 7,2 % ((K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>·3H<sub>2</sub>O), Carrez I, Taiga
- sinkkisulfaatti 14,4 % (ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), Carrez II, Taiga
- NaOH 0,1 M, Baker 7067
- suodatinpaperi VWr Folder qualitative filterpaper 305, koko 125 mm
- ruisku NORM-JECT 2 ml (3 ml)
- suodatin 0,2µm, Minisart 16534 Q, Sartorius.

Työssä käytetty laitteisto ja ajo-olosuhteet kuvattu alla olevassa taulukossa 1.

Taulukko 1. Työssä käytetyn nestekromatografian tiedot ja ajo-olosuhteet.

Nestekromatografi	Waters 2690
Kolonne	Luna® Omega 3 µm SUGAR
Kolonnin lämpötila	35 °C
Injektio-tilavuus	10 µl
Ajoliuos	75 % Asetonitrili vedessä
Virtausnopeus	1 ml/min
Tasapainotusaika	15 min

Kuvassa 7 työssä käytetty HPLC-RI-laitteisto.



Kuva 7. Kuvassa työssä käytetty HPLC-RI.

## 8 Työn toteutus

Työ toteutettiin osittain Valiolla käytössä olevan laktoosipitoisuusmääritysmenetelmän [19] mukaisesti. Menetelmästä otettiin käyttöön Carrez-saostustus ja suodatukset. Ajo-olosuhteet valittiin pääosin kolonnin valmistajan suositusten mukaisiksi.

## 8.1 Menetelmä

Validoitavassa menetelmässä homogenoitu näyte Carrez-saostetaan, laimennetaan tarvittaessa ja suodatetaan näytepulloon. Carrez-saostuksessa näytteen proteiinit saostuvat ja saos poistetaan suodattamalla. Pienet rasvapitoisuudet ja muut analysointia häiritsevät ainejäämät poistetaan ruiskusuodattimella. Esikäsitelty näyte analysoidaan HPLC-RI-laitteistolla, jossa on sokerien analysointiin soveltuva HILIC-kolonne.

## 8.2 Esikäsitely

Näytteet homogenoidaan tarpeen mukaan lämmittämällä (+40 °C) ja jäädyttämällä huoneen lämpöön tai hienontamalla näytettä esimerkiksi sauvasekoittimella. Homogenoitunut näyte liuotetaan veteen, saostetaan Carrez-saostuksella ja suodatetaan suodatinpaperin lävitse. Näytteet, joilla on korkea laktoosipitoisuus, laimennetaan ajoliuokseen, minkä jälkeen kaikki näytteet ruiskusuodatetaan näytepulloihin. Ruiskusuodattamattomia ja laimentamattomia näytteitä voidaan säilöä pakastimessa noin 2 viikkoa.

## 8.3 Ulkoinen kalibrointi

Menetelmässä käytettiin ulkoista kalibrointia. Kalibrointiliuokset valmistettiin valmiista kantaliuoksesta (10 g/l), joka sisälsi tutkittavat sokerit (laktoosi, glukoosi ja galaktoosi). Liuokset valmistettiin joko käyttämällä mittapulloja tai pipetoimalla määrät suoraan koeputkiin. Pitoisuusalueeksi valittiin 0,025–2 mg/ml. Alue määräytyi laitteelle mitatun määritysrajan ja mitta-alueen mukaan.

## 9 Validoinnin tulokset

Validoinnissa tutkittiin validoitavan menetelmän toimivuutta HPLC-RI-laitteistossa ja menetelmän eroa referenssimenetelmiin. Menetelmälle suoritettiin havaitsemis- ja määrittämissrajat, mitta-alue ja lineaarisuus, oikeellisuus, toistettavuus, ja mittausepävarmuus. Lisäksi menetelmässä käytetty Carrez-saostus optimoitiin.

### 9.1 Havaitsemis- ja määrittäysraja

Laitteen havaitsemisrajaksi mitattiin 0,007 mg/ml ja määrittäysrajan arvoksi saatiin 0,02 mg/ml. Tarkemmat tulokset liitteessä 1.

### 9.2 Mittausalue ja lineaarisuus

Mittausalue ja lineaarisuus määritettiin lisäämällä laktoosittomaan maitoon laktoosistandardia siten, että loppupitoisuudet olivat 0,025; 0,050; 0,100; 0,249; 0,499; 0,998; 1,996 mg/ml. Taulukossa 2 on kuvattu laktoosistandardinlisäys-liuosten valmistus.

Taulukko 2. Laktoosistandardinlisäys-liuosten valmistus.

STD	[mg/ml]	Laktoositon maito [ml]	STD [ml]	Liuotin [ml]	Kokonais-tilavuus [ml]
STD1	1,996	2	2	6	10
STD2	0,998	2	1	7	10
STD3	0,499	2	0,5	7,5	10
STD4	0,249	2	0,25	7,75	10
STD5	0,100	2	0,1	7,9	10
STD6	0,050	2	0,05	7,95	10
STD7	0,025	2	0,025	7,975	10

Normaalin standardisuoran ja laktoosistandardinlisäys-suoran välillä ei ollut merkittäviä eroja, ja saaduissa tuloksissa ei havaittu matriisin häiritsevän analyysiä.

### 9.3 Oikeellisuus

Parittainen kahden otoksen t-testi tehtiin matriisikohtaisesti kaikille tutkituille näytteille lukuun ottamatta toistettavuustestin näytteitä. Referenssimenetelminä olivat entsymaattiset menetelmät Ents. A ja Ents. B sekä kromatografinen menetelmä HPLC-IC. Entsymaattisella menetelmällä analysoidut LV2:n tulokset pyrittiin keräämään t-testiin siten, että vertailtailuun otettujen LV2:n sarjoissa oli analysoitu samat näytteet sekä entsymaattisella että HPLC-RI:lla jolloin tulosten vertailukelpoisuus parani. Taulukossa 3 on LV2-näytteelle tehdyn t-testin tulos.

Taulukko 3. T-testin tulos LV2-näytteelle. LV2:lle suoritettuna t-testin mukaan menetelmät eivät eronneet merkittävästi luottamustasolla 95 %.

LV2	HPLC-RI - Ents. A
	Laktoosi
t_laskettu	1,22
t_kriittinen	2,13
Otos	10

T-testin tulos LV2:lle oli hyvä. Laktoosipitoisuus näytteissä oli samaa luokkaa molemmilla menetelmillä, ja t-testin mukaan menetelmät eivät eroa merkitsevästi luottamustasolla 95 %.

Taulukossa 4 on näytesarjalle 1 lasketun t-testin tulos. Menetelmät eroavat merkitsevästi luottamustasolla 95 % t\_lasketun ylittäessä t\_kriittisen arvon.

Taulukko 4. T-testin tulos näytesarjalle 1. Näytteille suoritettuna t-testin mukaan menetelmät eroavat merkitsevästi luottamustasolla 95 %.

näytesarja 1	HPLC-RI - Ents. A
	Laktoosi
t_laskettu	6,91
t_kriittinen	2,26
Otos	10

Taulukossa 5 on verrattu näytesarjan 2 laktoositulosta sekä entsyymäattisen menetelmän tulokseen että HPLC-IC:n tulokseen. T\_laskettu ylittää molemmissa vertailuissa kriittisen arvon, ja menetelmät eroavat merkitsevästi luottamustasolla 95 %. Glukoosin osalta menetelmät eivät eroa merkitsevästi luottamustasolla 95 %, sillä t\_laskettu ei ylitä t\_kriittisen arvoa.

Taulukko 5. Näytesarjan 2 t-testin tulos. Näytesarjalle 2 suoritettuna t-testin mukaan menetelmät eroavat laktoosin osalta merkitsevästi luottamustasolla 95 %.

näytesarja 2	HPLC-RI - Ents. A, B		HPLC-RI - HPLC-IC
	Laktoosi	Glukoosi	laktoosi
t_laskettu	2,25	1,03	3,02
t_kriittinen	2,06	2,36	2,20
Otos	25	8	12

Otoksen määrä t-testissä erityisesti HPLC-RI – Ents. A, B:n osalta on kattava. Eroavaisuutta saattaa selittää näytteiden epähomogeenisuus.

Näytesarjan 3 t-testin tulokset ovat taulukossa 6, jonka mukaan t\_laskettu on huomattavasti korkeampi kuin t\_kriittinen. T-testin mukaan menetelmät eroavan merkitsevästi luottamustasolla 95 %.

Taulukko 6. Näytesarjan 3 t-testin tulos. Tulosten perusteella menetelmät eroavat merkitsevästi luottamustasolla 95 %.

näytesarja 3	HPLC-RI - Ents. A, B
	Laktoosi
t_laskettu	9,34
t_kriittinen	2,36
Otos	8

Näytesarja 3:n tyyppiset näytteet ovat usein epähomogeenisia, ja toistettavan tuloksen saaminen näytteestä on haastavaa. Epähomogeenisuus on saattanut osaltaan vaikuttaa näytteiden t-testin tulokseen.

Näytesarjassa 4 oli kaksi erillistä näytesarjaa, ja sarjat eroteltiin a-sarjaan ja b-sarjaan. Verrattaessa HPLC-RI:n tuloksia sekä entsyymaattiseen, että HPLC-IC:n tuloksiin jäädään alle t\_kriittisen arvon, jolloin menetelmät eivät eroa merkitsevästi luottamustasolla 95 %. Tulokset ovat taulukossa 7, jossa verrattu HPLC-RI:n tuloksia entsyymaattisen tuloksiin ja HPLC-IC:n tuloksiin.

Taulukko 7. Näytesarjojen 4a:n ja 4b:n laktoosipitoisuuksien t-testin tulokset. Sarjoille 4a ja 4b suoritettuna t-testin mukaan menetelmät eivät eronneet merkitsevästi luottamustasolla 95 %.

näytesarjat 4a, 4b	HPLC-RI - Ents. A, B	HPLC-RI - Ents. A, B	HPLC-RI - HPLC-IC	HPLC-RI - HPLC-IC
Laktoosi	4a	4b	4a	4b
t_laskettu	1,27	3,43	1,99	1,78
t_kriittinen	2,23	4,3	2,57	4,3
Otos	11	3	6	3

Tuloksia tarkasteltaessa tulee ottaa huomioon, että näytesarjan 4b otoskoko on hyvin pieni, mikä saattaa hieman vääristää tulosta. Verrattaessa menetelmillä saatuja laktoosituloksia (taulukko 8) voidaan kuitenkin todeta lähes kaikkien tulosten olevat hyvin lähellä toisiaan ja näin ollen pitää t-testin tulosta melko luotettavana.

Taulukko 8. Näytesarjojen 4a:n ja 4b:n mitatut laktoosipitoisuudet eri menetelmillä.

	HPLC-RI	Ents. A, B	HPLC-IC
Näyte	Laktoosi [%]	Laktoosi [%]	Laktoosi [%]
näytesarja 4a.1	4,71	4,58	
näytesarja 4a.2	4,75	4,50	
näytesarja 4a.3	4,64	4,59	
näytesarja 4a.4	4,54	4,41	
näytesarja 4a.5	4,52	4,50	
näytesarja 4a.6	4,33	4,46	
näytesarja 4a.7	4,41	4,38	
näytesarja 4a.8	4,56	4,64	4,56
näytesarja 4a.9	2,59	2,50	2,59
näytesarja 4a.10	1,08	0,99	1,00
näytesarja 4a.11	0,45	0,55	0,40
näytesarja 4a.12	0,14		0,11
näytesarja 4a.13			0,02
näytessarja 4b.1	2,85	2,81	2,84
näytessarja 4b.2	1,47	1,36	1,37
näytessarja 4b.3	0,88	0,79	0,81
näytessarja 4b.4	0,53		0,11
näytessarja 4b.5			0,01

Taulukossa 9 listattuna näytesarja 5 t-testin tulos. Tulosten mukaan menetelmät eroavat merkitsevästi luottamustasolla 95 %.

Taulukko 9. Näytesarja 5 t-testin tulos. Näytteille suoritettujen t-testien mukaan menetelmät eroavat merkitsevästi luottamustasolla 95 %.

näytesarja 5	HPLC-RI - Ents. B
	Laktoosi
t_laskettu	4
t_kriittinen	2,16
Otos	14

Tarkasteltaessa näytesarja 5:n laktoosituloksia (liite 2) voidaan todeta entsyymattisen menetelmän antavan lähes järjestelmällisesti matalampaa tulosta kuin kromatografisen. Myös toistettavuustestissä (kohta 9.4) HPLC-RI:lla analysoidun näytesarja 5:n kanssa samaan matriisiluokkaan kuuluvan näytesarja 9:n tulokset olivat samaa tasoa kuin HPLC-IC:lla saadut. Sen sijaan entsyymattisella menetelmällä saadut tulokset olivat odotetusti matalampia.

Osa näytesarjan 6 näytteistä oli melko epähomogeenisia, mikä osaltaan saattoi vaikuttaa tulokseen. Näytesarjan 6 tuloksen mukaan menetelmät eroavat merkitsevästi luottamustasolla 95 % (taulukko 10).

Taulukko 10. Näytesarja 6 t-testin tulos. Näytesarjalle 6 suoritettujen t-testien mukaan menetelmät eroavat merkitsevästi luottamustasolla 95 %.

näytesarja 6	HPLC-RI - Ents. B
	Laktoosi
t_laskettu	4,51
t_kriittinen	2,20
Otos	12

T<sub>kriittisen</sub> ja t<sub>lasketun</sub> välinen ero on huomattava, ja verrattaessa saatuja laktoosituloksia (liite 2) voitiin todeta tulosten välillä olevan eroa.

T-testien mukaan menetelmät eroavat merkitsevästi toisistaan luottamustasolla 95 %. Vain LV2:n ja näytesarjan 4 t-testien tulosten osalta menetelmät eivät eroa merkitsevästi toisistaan luottamustasolla 95 %. Osassa testeistä otoskoko on melko pieni, jolloin tulos ei välttämättä ole täysin luotettava, mutta suuntaa antava. Validoinnissa, jossa referenssimenetelmän tulostason tulisi olla samaa luokkaa validoitavan menetelmän kanssa, tulosten eron tulisi olla mahdollisimman pieni.

Toistettavuusmittausarjan laktoosin, glukoosin ja galaktoosin pitoisuuksia verrattiin referenssimenetelmillä saatuihin tuloksiin. Taulukossa 11 on verrattu laktoosia sisältävien tuotteiden laktoosituloksia referenssimenetelmillä saatuihin tuloksiin.

Taulukko 11. Laktoosia sisältävien tuotteiden toistettavuussarjan laktoosipitoisuuksien vertailu referenssimenetelmillä saatuihin tuloksiin.

	HPLC-RI [%]	Ents. B [%]	HPLC-IC [%]
	Laktoosi	Laktoosi	Laktoosi
näytesarja 7	2,49	2,77	2,53
näytesarja 8	3,05	2,59	3,11
näytesarja 9	7,05	6,12	7,05
näytesarja 10	4,67	4,58	4,73

HPLC-RI:lla ja HPLC-IC:lla saadut tulokset ovat kaikilla analysoiduilla näytematriiseilla hyvin lähellä toisiaan. Entsymaattisella menetelmällä saadut tulokset ovat matalimpia näytesarja 7:n tulosta lukuun ottamatta.

Laktoosittomista näytteistä tutkittiin laktoosin puuttuessa ensisijaisesti galaktoosin ja glukoosin pitoisuuksia. HPLC-RI:n tulokset verrattuna entsymaattisen menetelmän tuloksiin taulukossa 12.

Taulukko 12. Laktoosittomien näytteiden toistettavuussarjan galaktoosin ja glukoosin pitoisuuksien vertailu entsymaattisella menetelmällä saatuihin pitoisuuksiin.

	HPLC-RI [%]		Ents. A, B [%]	
	Galaktoosi	Glukoosi	Galaktoosi	Glukoosi
näytesarja 11	2,33	2,33	2,28	2,29
näytesarja 12	1,87	1,58	1,58	1,57
näytesarja 13	1,42	1,63	1,55	1,73
näytesarja 14	2,81	1,80	2,54	1,77

Tulokset ovat melko samaa luokkaa, mutta entsymaattisen menetelmän antamat tulokset ovat lähes kaikki hieman matalampia kuin kromatografisella menetelmällä saadut tulokset.

## 9.4 Toistettavuus

Toistettavuutta tutkittiin usealla eri näytematriisilla. Näytteiksi valittiin sekä laktoosia sisältäviä näytteitä sekä laktoosittomia näytteitä. Laktoosia sisältävät näytteet olivat

- näytesarja 7
- näytesarja 8
- näytesarja 9
- näytesarja 10.

Laktoosittomat näytteet olivat

- näytesarja 11
- näytesarja 12
- näytesarja 13
- näytesarja 14.

Laktoosia sisältävistä näytteistä tehtiin kaksi mittaussarjaa ja laktoosittomista näytteistä yksi mittaussarja. Tuloksista laskettiin keskiarvo, keskihajonta, suhteellinen keskihajonta (%RSD) ja 95 %:n luotettavuusväli. Tulokset olivat halutuissa rajoissa kaikilla mitatuilla matriiseilla. Liitteessä 3 kaikki toistettavuusmittauksista saadut tulokset.

Tulosten mukaan laktoosia sisältävien näytteiden toistettavuus oli hyvä kaikilla mitatuilla matriiseilla. Suhteellinen keskihajonta laktoosille oli suurin näytesarjassa 7 ensimmäisessä mittaussarjassa, 0,95 % ja pienin näytesarjassa 9 ensimmäisessä mittaussarjassa, 0,20 %. Taulukossa 13 listattu laktoosia sisältävien näytteiden suhteelliset keskihajonnat.

Taulukko 13. Laktoosia sisältävien näytteiden suhteelliset keskihajonnat (%RSD).

RSD %	1. sarja	2. sarja
Näyte	Laktoosi	Laktoosi
näytesarja 7	0,95	0,77
näytesarja 8	0,82	0,73
näytesarja 9	0,20	0,68
näytesarja 10	0,48	0,79

Taulukon 13 mukaan sarjojen välisissä tuloksissa oli havaittavissa vain pientä eroavaisuutta.

### 9.5 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuuden laskemisessa käytettiin yrityksen omia laadunvarmistusnäytteitä (LV1, LV2), rinnakkaismääritysnäytteitä (toistettavuusnäytesarja) ja referenssimateriaalia (LV2, määritetty entsyymaattisesti). Sisäinen uusittavuus  $u(R_w)$  määritettiin kontrollinäytteiden ja rinnakkaismääritysnäytteiden keskihajonnoista ja menetelmän ja laboratorion poikkeama  $u(\text{bias})$  laskettiin referenssimateriaalista. Mittausepävarmuus laskettiin MUKit-ohjelmalla, jossa käytettiin kohdassa 6.5 mainittuja kaavoja. Alla olevassa taulukossa 14 on esitetty mittausepävarmuuden tulokset.

Taulukko 14. Mittausepävarmuuden tulokset.

Pitoisuusalue [%]	$u(R_w)$ [%]	$u(\text{bias})$ [%]	Yhdistetty standardiepävarmuus [%]	Laajennettu mittausepävarmuus [%]
0,0025-0,2	2,65	2,40	3,51	8

Mittausepävarmuustulokset olivat hyvät, ja tulosten perusteella laite antoi luotettavaa tulostasoja. Liitteessä 4 MUKitin antamat tarkemmat tulokset mittausepävarmuudesta.

## 9.6 Näytteen esikäsittelyn optimointi

Näytteen esikäsittelyyn kuuluvaa Carrez-saostusta pyrittiin optimoimaan tutkimalla vaihtuuko valittujen saostusreagenssiemäärien vaihtelu proteiinien saostumiseen. Vaikutusta tutkittiin analysoimalla LV-näytteitä, joiden saostuksessa oli käytetty kolmea eri määrää saostusreagensseja. Käytetyt reagenssimäärät listattuna taulukossa 15.

Taulukko 15. Carrez-saostuksen optimoinnissa käytetyt saostusreagenssien määrät.

	Carrez I [ml]	Carrez II [ml]	NaOH [ml]
Carrez A	0,6	0,6	2,4
Carrez B	0,8	0,8	3,2
Carrez C	1,0	1,0	4,0

Taulukkoon 16 on koottu saostusanalyysien tulokset.

Taulukko 16. Saostuksen optimoinnissa analysoidut laktoositulokset.

Näyte	Laktoosi [%]	Lisätiedot
LV1	4,753	Carrez A
LV1	4,601	Carrez A
LV1	4,555	Carrez A
LV1	4,648	Carrez A
LV2	4,574	Carrez A
LV2	4,578	Carrez A
LV2	4,546	Carrez A
LV2	4,597	Carrez A
LV2	4,613	Carrez B
LV2	4,653	Carrez B
LV2	4,673	Carrez C
LV2	4,698	Carrez C

Tulosten mukaan reagenssien eri määrillä ei juurikaan ollut vaikutusta saostumiseen. Lopulliseksi saostustusreagenssimääräksi valikoitui Carrez B:n reagenssimäärät, jotka olivat suhteutettuna näytemäärän painoon samat kuin alkuperäisessä ohjeessa [19].

## 10 Yhteenveto

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia mahdollisuus korvata entsyymaattinen laktoosinmääritysmenetelmä nestekromatografisella menetelmällä. Tutkimus suoritettiin vertailuvalidoinnilla, jossa nestekromatografisen menetelmän antamia tuloksia verrattiin kahden eri referenssimenetelmän tuloksiin. Lisäksi menetelmälle laskettiin kerätystä aineistosta mittausepävarmuus.

HPLC-RI-menetelmässä käytettiin HILIC-kolonnia, joka soveltuu hyvin sokerien määrittämiseen HPLC-RI-laitteistolla. Validoinnin aikana laktoosi erottuikin kolonnissa hyvin ja laitteisto antoi luotettavia tuloksia.

Mittausepävarmuustulokset olivat hyvät ja tulosten perusteella laite antoi luotettavaa tulostasoa. Tutkittujen validointiparametrien tulokset, t-testiä osittain lukuun ottamatta, menivät haluttujen raja-arvojen sisälle ja olivat hyväksytyjä. T-testin mukaan menetelmät erosivat suurelta osin testatuilla näytteillä merkitsevästi luottamustasolla 95 %. Laitteiden antamien laktoosipitoisuuksien tulokset olivat kuitenkin samaa luokkaa kaikilla kolmella menetelmällä. Alun perin oli tiedossa, että entsyymaattisen menetelmän tulostaso saattaisi olla hieman matalampi. HPLC-RI:lla saadut tulokset olivatkin systemaattisesti korkeampia kuin entsyymaattisella menetelmällä saadut tulokset. T-testin tuloksista huolimatta voitiin validoinnin kokonaistulokseen olla tyytyväisiä ja tulostasoa pitää hyvänä.

Työssä tutkittiin ensisijaisesti laktoosipitoisuuden määrittystä, mutta samalla tutkittiin myös glukoosin ja galaktoosin pitoisuudet. Näiden osalta validointi jäi kuitenkin kesken ja sitä tulisi vielä jatkaa. Laboratorion ulkopuolista referenssimateriaalia oli melko vähän, joten olisi hyvä tehdä vertailuja lisää eri matriiseilla. Työstä saatiin kuitenkin arvokasta tietoa menetelmän toimivuudesta, jota voidaan hyödyntää esimerkiksi laajennettaessa menetelmää muihin sokereihin. Lopputulos validoinnille oli, että menetelmällä voidaan määrittää laktoosipitoisuutta, mutta näiden tulosten perusteella uusi menetelmä ei voi vielä korvata entsyymaattista menetelmää.

## Lähteet

- 1 Meijeri ja ruokatalo. Verkkoaineisto. Valio Oy. <valio.fi/yritys>. Luettu 14.1.2020.
- 2 Lääketieteen sanasto. Verkkoaineisto. DuoDemic Terveyskirjasto. <[https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=ltt02675](https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt02675)>. Luettu 16.12.2019.
- 3 Background on Carbohydrates & Sugars. Verkkoaineisto. International food Information Council Foundation. <<https://foodinsight.org/background-on-carbohydrates-sugars/>>. Luettu 30.10.2019.
- 4 The Analysis of Lactose in Milk and Cheese Products by HPLC with RI Detection. Verkkoaineisto. Pelkin Elmer. <[https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/APP\\_The\\_Analysis\\_of\\_Lactose\\_in\\_Milk\\_and\\_Cheese\\_Products\\_by\\_HPLC\\_Note\\_012755\\_01%20\(1\).pdf](https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/APP_The_Analysis_of_Lactose_in_Milk_and_Cheese_Products_by_HPLC_Note_012755_01%20(1).pdf)>. Luettu 5.11.2019.
- 5 Carbohydrate analysis. Verkkoaineisto. ScienceDirect. <<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/carbohydrate-analysis>>. Luettu 16.12.2019.
- 6 Lactose. Verkkoaineisto. Chem Blink. <<https://www.chemblink.com/products/63-42-3.htm>>. Luettu 17.12.2019.
- 7 What is lactose intolerance. Verkkoaineisto. Science of cooking. <[https://www.scienceofcooking.com/lactose\\_intolerance.htm](https://www.scienceofcooking.com/lactose_intolerance.htm)>. Luettu 22.1.2020.
- 8 Ravintotekijä: laktoosi. Verkkoaineisto. Fineli. <<https://fineli.fi/fineli/fi/ravintotekijat/2196>>. Luettu 30.10.2019.
- 9 Selvyyttä sokeriviidakkoon: Mitä eri sokerit ovat ja mitä tarkoittaa termit kuten sokeriton tai vähäsokerinen? Verkkoaineisto. Valio Oy. <<https://www.valio.fi/hyvinyvointi/selvyytta-sokeriviidakkoon/>>. Luettu 22.11.2019.
- 10 D-glucose. Verkkoaineisto. Pub Chem. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/GLUCOSE>>. Luettu 5.11.2019.
- 11 D-Galactose. Verkkoaineisto. Pub Chem. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6036>>. Luettu 5.11.2019.
- 12 Jaarinen, Soili & Niiranen, Jukka. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. 5. painos. Helsinki: Edita.

- 13 Harris, Daniel. 2016. Quantitative Chemical Analysis. 9. painos. New York: W. H. Freeman and Company.
- 14 How to Avoid Common Problems with HILIC Methods. Verkkoaineisto. Restek. <[https://www.restek.com/Technical-Resources/Technical-Library/General-Interest/general\\_GNAR2716-UNV](https://www.restek.com/Technical-Resources/Technical-Library/General-Interest/general_GNAR2716-UNV)>. Luettu 16.12.2019.
- 15 Nielsen, S Suzanne. 2010. Food analysis. 4. painos. USA: Springer.
- 16 Kenkel, John. 2003. Analytical Chemistry for Technicians. 3. painos. USA: CRC Press LLC.
- 17 Menetelmäohje: Laktoosi ja glukoosi entsyymaattisesti. 2017. Yrityksen sisäinen dokumentti. Valio Oy.
- 18 Menetelmäohje: Laktoosi ja galaktoosi entsyymaattisesti. 2018. Yrityksen sisäinen dokumentti. Valio Oy.
- 19 Menetelmäohje: Laktoosin määrittäminen ionikromatografisesti korkean suorituskyvyn nestekromatografilla (Dionex). 2017. Yrityksen sisäinen dokumentti. Valio Oy.
- 20 Cui, Steve. 2005. Food Carbohydrates. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- 21 Hägg, Margareta. 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy.
- 22 Mikes, Laadukkaan mittaamisen perusteet. J4/2011. Verkkoaineisto. Metrologian neuvottelukunta ja Mittatekniikan keskus, MIKES. <<https://www.vtt.fi/inf/pdf/MIKES/2011-J4.pdf>>. Luettu 27.11.2019.
- 23 Mittausepävarmuusohjelmisto. Verkkoaineisto. Suomen Ympäristökeskus. <[https://www.syke.fi/fi-FI/Palvelut/Laatu\\_ja\\_laboratoriopalvelut/Kalibrintipalvelut\\_ja\\_sopimuslaboratorio/MUkit\\_mittausepavarmuusohjelma](https://www.syke.fi/fi-FI/Palvelut/Laatu_ja_laboratoriopalvelut/Kalibrintipalvelut_ja_sopimuslaboratorio/MUkit_mittausepavarmuusohjelma)>. Luettu 23.1.2020.

## Havaitsemisraja ja määrittäysraja

Laitteelle määritettyjen havaitsemisrajan ja määrittäysrajan laskemiseen käytetyt arvot sekä lasketut tulokset.

Taulukko 1. Havaitsemisrajan ja määrittäysrajan tulokset.

Näyte	Pitoisuus [mg/ml]
Laktoosi 1	0,025095
Laktoosi 2	0,025250
Laktoosi 3	0,024315
Laktoosi 4	0,026349
Laktoosi 5	0,020972
Laktoosi 6	0,023236
Laktoosi 7	0,028895
Laktoosi 8	0,028847
Laktoosi 9	0,024807
Laktoosi 10	0,022914
Laktoosi 11	0,024595
Laktoosi 12	0,022676
Keskihajonta	0,002
Havaitsemisraja	0,007
Määrittäysraja	0,024

## Oikeellisuus

Näytesarjojen 5 ja 6 laktoositulokset kromatografisella menetelmällä (HPLC-RI) sekä entsyymaattisella menetelmällä.

Taulukko 2. Näytesarja 5:n laktoosipitoisuudet taulukoituina.

	HPLC-RI [%]	Ents. B [%]
	Laktoosi	Laktoosi
näytesarja 5.1	7,16	6,76
näytesarja 5.2	7,00	6,86
näytesarja 5.3	7,15	7,07
näytesarja 5.4	7,16	7,12
näytesarja 5.5	6,90	6,70
näytesarja 5.6	7,76	7,62
näytesarja 5.7	7,56	7,62
näytesarja 5.8	7,74	7,66
näytesarja 5.9	6,98	6,89
näytesarja 5.10	6,83	6,50
näytesarja 5.11	6,61	6,50
näytesarja 5.12	6,81	6,33
näytesarja 5.13	7,00	6,54
näytesarja 5.14	6,83	6,79

Taulukko 3. Näytesarja 6:n laktoositulokset HPLC-RI-laitteella.

	HPLC-RI [%]
Näyte	Laktoosi
näytesarja 6.1	4,39
näytesarja 6.2	5,52
näytesarja 6.3	6,34
näytesarja 6.4	5,25
näytesarja 6.5	4,85
näytesarja 6.6	4,19
näytesarja 6.7	6,09
näytesarja 6.8	5,55
näytesarja 6.9	5,23
näytesarja 6.10	5,59
näytesarja 6.11	5,73
näytesarja 6.12	6,73

## Toistettavuus

Toistettavuussarjan mittaustulokset.

Taulukko 4. Laktoosia sisältävien näytteiden toistettavuustulokset.

HPLC-RI [%]	1. sarja			2. sarja		
Näyte	Laktoosi	Galaktoosi	Glukoosi	Laktoosi	Galaktoosi	Glukoosi
näytesarja 7	2,514	0,637	0,093	2,501	0,672	0,092
näytesarja 7	2,492	0,662	0,095	2,494	0,646	0,085
näytesarja 7	2,491	0,623	0,084	2,518	0,662	0,089
näytesarja 7	2,49	0,658	0,101	2,465	0,658	0,080
näytesarja 7	2,442	0,614	0,084	2,482	0,676	0,098
näytesarja 7	2,491	0,627	0,088	2,509	0,645	0,086
Keskiarvo	2,487	0,637	0,091	2,495	0,660	0,088
Keskihajonta	0,024	0,019	0,007	0,019	0,013	0,006
%rsd	0,95	3,05	7,42	0,77	1,95	7,04
Luotettavuusväli 95 %	0,05	0,04	0,01	0,04	0,03	0,01
näytesarja 8	3,001			3,068		
näytesarja 8	2,972			3,084		
näytesarja 8	3,017			3,107		
näytesarja 8	3,017			3,058		
näytesarja 8	3,047			3,116		
näytesarja 8	3,003			3,076		
Keskiarvo	3,010			3,085		
Keskihajonta	0,025			0,023		
%rsd	0,82			0,73		
Luotettavuusväli 95 %	0,05			0,05		
näytesarja 9	7,029			7,009		
näytesarja 9	7,043			7,133		
näytesarja 9	7,047			7,049		
näytesarja 9	7,034			7,074		
näytesarja 9	7,007			7,011		
näytesarja 9	7,037			7,091		
Keskiarvo	7,033			7,061		
Keskihajonta	0,014			0,048		
%rsd	0,20			0,68		
Luotettavuusväli 95 %	0,03			0,10		
näytesarja 10	4,633			4,759		
näytesarja 10	4,625			4,736		
näytesarja 10	4,636			4,676		
näytesarja 10	4,622			4,670		
näytesarja 10	4,619			4,718		
näytesarja 10	4,679			4,678		
Keskiarvo	4,636			4,706		
Keskihajonta	0,022			0,037		
%rsd	0,48			0,79		
Luotettavuusväli 95 %	0,04			0,07		

Taulukko 5. Laktoosittomien näytteiden toistettavuussarjan tulokset.

HPLC-RI [%]	1. sarja		
Näyte	Laktoosi	Galaktoosi	Glukoosi
näytesarja 11		2,331	2,330
näytesarja 11		2,340	2,353
näytesarja 11		2,323	2,313
Keskiarvo		2,331	2,332
Keskihajonta		0,009	0,020
%RSD (%)		0,38	0,85
näytesarja 12		1,862	1,568
näytesarja 12		1,907	1,617
näytesarja 12		1,851	1,554
Keskiarvo		1,873	1,580
Keskihajonta		0,030	0,033
%RSD (%)		1,58	2,11
näytesarja 13	0,465	1,438	1,639
näytesarja 13	0,448	1,424	1,634
näytesarja 13	0,453	1,392	1,613
Keskiarvo	0,455	1,418	1,628
Keskihajonta	0,009	0,024	0,014
%RSD (%)	1,92	1,68	0,86
näytesarja 14		2,725	1,762
näytesarja 14		2,802	1,793
näytesarja 14		2,910	1,858
Keskiarvo		2,812	1,804
Keskihajonta		0,093	0,049
%RSD (%)		3,30	2,72

## Mittausepävarmuus

MUKit-ohjelman antamat tulokset mittausepävarmuudesta.

Step	Action	HPLC-RI_sokerit	24.5.2019																				
1	Specify Measurand	Concentration range: 0,0025 – 0,2 %																					
2	Quantify within-laboratory reproducibility, $u(R_w)$  A: Control sample B: Possible steps not covered by controlsample	<p><b>A: Control samples</b>            Period of measurements: 22.3.2019 - 10.5.2019            Number of control samples: 58            Average concentration: 4,671133 %            Standard deviation, <math>S_{RW}</math>: 2,27 %</p> <p><b>B: Routine replicate samples:</b>            Period of measurements: 5.4.2019 - 9.4.2019            Number of routine replicate samples: 24            Number of parallel measurements: 2            Concentration range: 2,462 - 7,088 %            Standard deviation estimate from range, <math>S_r</math>: 1,18 %</p> $u(R_w) = \sqrt{S_{R_w}^2 + s_r^2} = 2,56 \%$																					
3	Quantify method and laboratory bias, $u(bias)$	<p><b>Method and laboratory bias from certified reference material:</b>            Different certified reference materials count, N : 1</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>i</th> <th>1</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Certified concentration, <math>c_{ref1}</math></td> <td>4,58 %</td> </tr> <tr> <td>Standard uncertainty of certified concentration, <math>u(c_{ref1})</math></td> <td>2,18 %</td> </tr> <tr> <td>Measured concentration, <math>c_1</math></td> <td>4,623438 %</td> </tr> <tr> <td>Standard deviation of measured concentration, <math>s_{bias}</math></td> <td>1,40 %</td> </tr> <tr> <td>Number of Measurements <math>n_1</math></td> <td>16</td> </tr> <tr> <td><math>bias_1 = \frac{c_1 - c_{ref1}}{c_{ref1}} * 100 \%</math></td> <td>0,95 %</td> </tr> <tr> <td>Period of measurements</td> <td>2.4.2019-6.5.2019</td> </tr> <tr> <td>Matrix</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Additional information</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> $u(bias) = \sqrt{bias_1^2 + \left(\frac{s_{bias1}}{\sqrt{n_1}}\right)^2 + u(c_{ref1})^2} = 2,40 \%$		i	1	Certified concentration, $c_{ref1}$	4,58 %	Standard uncertainty of certified concentration, $u(c_{ref1})$	2,18 %	Measured concentration, $c_1$	4,623438 %	Standard deviation of measured concentration, $s_{bias}$	1,40 %	Number of Measurements $n_1$	16	$bias_1 = \frac{c_1 - c_{ref1}}{c_{ref1}} * 100 \%$	0,95 %	Period of measurements	2.4.2019-6.5.2019	Matrix		Additional information	
i	1																						
Certified concentration, $c_{ref1}$	4,58 %																						
Standard uncertainty of certified concentration, $u(c_{ref1})$	2,18 %																						
Measured concentration, $c_1$	4,623438 %																						
Standard deviation of measured concentration, $s_{bias}$	1,40 %																						
Number of Measurements $n_1$	16																						
$bias_1 = \frac{c_1 - c_{ref1}}{c_{ref1}} * 100 \%$	0,95 %																						
Period of measurements	2.4.2019-6.5.2019																						
Matrix																							
Additional information																							
4	Conver components to standard uncertainty	$u(R_w) = 2,56 \%$ $u(bias) = 2,40 \%$																					
5	Calculated combines standard uncertainty, $u_c$	$u_c = \sqrt{u_{R_w}^2 + u_{bias}^2} = 3,51 \%$																					
6	Calculated expanded uncertainty, $U$	$U = 2 \cdot u_c = 8 \%$																					