



Mira Tanninen

Dispersiomaaleissa käytettävän suoja-aineen kvantitatiivisen analyysimenetelmän validointi HPLC-laitteistolle

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

23.1.2022

Tiivistelmä

Tekijä:	Mira Tanninen
Otsikko:	Dispersiomaaleissa käytettävän suoja-aineen kvantitatiivisen analyysimenetelmän validointi HPLC-laitteistolle
Sivumäärä:	52 sivua + 8 liitettä
Aika:	23.1.2022
Tutkinto:	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Laboratorioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Ammatillinen pääaine:	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat:	Tutkija Leea Kuusimäki Laborantti Hanna Suutari Lehtori Mia Ruismäki

Opinnäytetyö toteutettiin PPG Tikkurilan laboratorioteknologian osaston analyttisessä laboratoriossa. Opinnäytetyön tavoitteena oli validoida dispersiomaaleissa käytettävän suoja-aineen kvantitatiivinen analyysimenetelmä korkean erotuskyvyn nestekromatografian (HPLC) laitteistolle. Tutkittavalle yhdisteelle oli jo olemassa analyysimenetelmä, jota käytetään laboratoriossa muiden suoja-aineiden analysointiin.

Työssä tarkasteltiin kahta eri analyttia, yhdisteitä A ja B. Yhdiste B hajoaa hydrolyysin seurauksena yhdisteeksi A. Opinnäytetyön tarkoituksena oli arvioida olemassa olevan analyysimenetelmän soveltuvuutta yhdisteen A analysointia varten sekä tarkastella menetelmän sopivuutta yhdisteen B analysointiin yhdisteenä A. Näytteinä käytettiin tunnetun pitoisuuden yhdistettä B sisältäviä maaleja.

Työn validointiparametreina olivat selektiivisyys ja spesifisyys, lineaarisuus, mittausalue ja herkkyys, toteamis- ja määritysrajat, tarkkuus sekä mittausepävarmuus. Parametreja tarkasteltiin standardiliuosarjojen, lämpötilaseurantastandardien, rutiinimaalinäytteiden, lisäysnäytteiden sekä saantokokeiden avulla.

Toteamis- ja määritysrajoiksi saatiin yhdisteelle A 0,8 ppm ja 2 ppm (vastaten maalissa 7 ppm ja 17 ppm) ja yhdisteelle B 0,4 ppm ja 1 ppm (3 ja 9 ppm). Liuosten säilyvyydessä jääkaapissa ja huoneenlämmössä ei havaittu muutoksia 1,5 kuukauden seurantajakson aikana. Menetelmän lineaariseksi alueeksi määriteltiin yhdisteelle A 2–100 ppm. Spesifisyys- ja selektiivisyystarkastelun perusteella todettiin, että noin 60–65 % yhdisteestä B on analysoitavissa yhdisteenä A. Injektion toistettavuuden sekä saantoprosenttien perusteella menetelmän tarkkuus todettiin riittäväksi. Yhdisteen A lisäyssuora onnistui, mutta yhdisteen B lisäyssuorasta ei voida tehdä johtopäätelmiä. Menetelmän mittausepävarmuus oli hyvin pieni. Validointi onnistui hyvin, mutta validoitu menetelmä vaatii lisää kehittämistä ja tutkimista ennen kuin se voidaan ottaa käyttöön.

Avainsanat: dispersiomaali, suoja-aine, HPLC, validointi

Abstract

Author: Mira Tanninen
Title: Quantitative Method Validation for a Preservative Used in Dispersion Paints for HPLC
Number of Pages: 52 pages + 8 appendices
Date: 23 January 2022

Degree: Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme: Laboratory Sciences
Professional Major: Laboratory Sciences
Supervisors: Leea Kuusimäki, Researcher
Hanna Suutari, Laboratory Technician
Mia Ruismäki, Senior Lecturer

This thesis study was implemented for PPG Tikkurila and the experimental work was performed in the analytical laboratory of the commissioner. The aim of the study was to validate a quantitative method of analysis for a preservative used in dispersion paints, when using high performance liquid chromatography (HPLC). An analytical method already exists for the test compound, and it is used in the laboratory for analyzing other preservatives. The two test compounds of the validation are analytes A and B. Compound B decomposes to compound A in hydrolysis. The purpose was to assess the suitability of the existing method of analysis for analyzing compound A as it is and analyzing compound B as compound A. The samples used in the validation were paints containing a known concentration of compound B.

The validation parameters viewed in this thesis study included selectiveness and specificity, linearity, measurement range and sensitivity, detection and determination limits, accuracy, and measurement uncertainty.

The limits of detection and determination were found at 0.8 ppm and 2 ppm for compound A (corresponding to 7 ppm and 17 ppm in paint) and at 0.4 ppm and 1 ppm for compound B (3 and 9 ppm). No changes were observed in a follow-up time of a month in the shelf life of the solution in refrigerator and room temperature. The linear measurement range of the method was defined as 2 to 100 ppm for compound A. Based on the specificity and selectivity analysis, it was found that about 60–65 % of compound B is analyzable as compound A. The accuracy of the method was found to be sufficient based on the repeatability of the injection and the yield percent. The standard addition line for compound A was successful, but no conclusions can be drawn from the addition line of compound B. The validation was successful, but the validated method requires further development and research before it can be used.

Keywords: Dispersion Paint, Preservative, HPLC, Validation

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Maalin koostumus	2
2.1	Vesiohenteiset dispersiomaalit	4
2.2	Dispersiomaaleissa käytettävät suoja-aineet	7
3	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC)	9
3.1	HPLC-laitteisto	10
3.1.1	Näytteensyöttö	11
3.1.2	Pumput	12
3.1.3	Kolonni	13
3.1.4	Detektori	14
3.2	Eluentti	16
4	Validointi	18
4.1	Selektiivisyys ja spesifisyys	20
4.2	Lineaarisuus, mittausalue ja herkkyys	20
4.3	Toteamis- ja määrittämissrajat	21
4.4	Tarkkuus	21
4.5	Mittausepävarmuus	22
5	Laitteet ja reagenssit	23
6	Kokeellinen osuus	24
7	Tulokset	28
7.1	Selektiivisyys ja spesifisyys	33
7.2	Lineaarisuus, mittausalue ja herkkyys	38
7.3	Toteamis- ja määrittämissraja	42
7.4	Tarkkuus	43
7.5	Mittausepävarmuus	48
8	Johtopäätökset	49

Liitteet

Liite 1: Yhdisteen A standardiliuosarjojen tulokset

Liite 2: Yhdisteen B standardiliuosarjojen tulokset

Liite 3: Kalibrointisuorat

Liite 4: Lämpötilaseurantanäytteiden tulokset

Liite 5: Maalinäytteiden tulokset

Liite 6: Saantokokeiden tulokset

Liite 7: Standardinlisäyssiiosarjojen tulokset

Liite 8: MUKit-ohjelman mittausepävarmuusraportti

Lyhenteet

DAD:	<i>Diode Array Detector</i> . Diodirividetektori.
ECHA:	Euroopan kemikaalivirasto.
ELS:	<i>Evaporative Light Scattering</i> . Haihduttava valonsironta.
FTIR:	<i>Fourier-transform infrared (spectroscopy)</i> . Fourierin muutosta käytävä infrapunaspektroskopia.
HPLC:	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> . Korkean erotuskyvyn nestekromatografia.
IR:	<i>Infrared</i> . Infrapuna.
LOD:	<i>Limit of detection</i> . Toteamisraja.
LOQ:	<i>Limit of quantitation</i> . Määritysraja.
MUKit:	<i>Measurement Uncertainty Kit</i> . Mittausepävarmuusohjelmisto.
RI:	<i>Refraction index</i> . Taitekerroin.
RSD:	<i>Relative Standard Deviation</i> . Suhteellinen keskihajonta.
SD:	<i>Standard Deviation</i> . Keskihajonta.
SYKE:	Suomen ympäristökeskus.
UV/Vis:	<i>Ultraviolet-visible</i> . Ultravioletti ja näkyvä valo.

1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin PPG Tikkurilan laboratorioteknologian osaston analyyttiläisessä laboratorioissa. Laboratorion tehtävänä on ensisijaisesti tukea PPG Tikkurilan asiakaspalvelutoimintaa, myyntiä, markkinointia, tuotantoa sekä tuotekehitystä. Laboratorion analyysimenetelmiin kuuluvat mm. maalin kuiva-aine- ja pigmenttipitoisuuden sekä sideaineen määrittäminen, maalin liuotekoostumuksen kvantitatiivinen analysointi kaasukromatografisesti sekä maalikalvoissa olevien pintavirheiden analysointi. Osa laboratorioissa käytettävistä analyysimenetelmistä on ISO-standardien mukaisia ja osa in-house-menetelmiä.

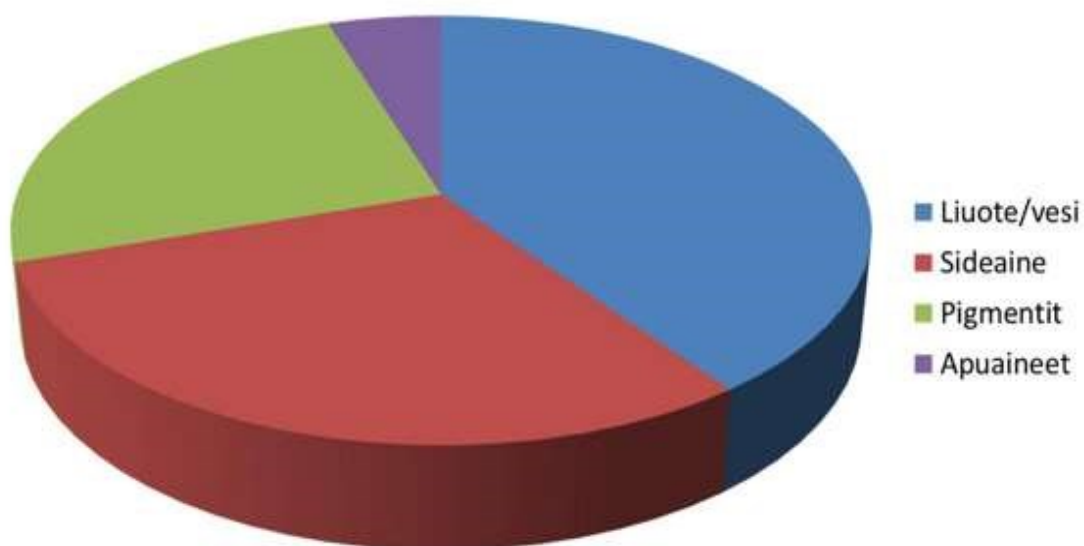
Työn tavoitteena oli validoida dispersiomaaleissa käytettävän suoja-aineen kvantitatiivinen analyysimenetelmä korkean erotuskyvyn nestekromatografian (HPLC) laitteistolle. Laboratorioissa on vakiintuneesti käytössä analyysimenetelmä, jonka käyttö on tarkoitus laajentaa työssä tutkittavalle yhdisteelle. Menetelmällä on tarkoitus analysoida yhdisteen B hydrolyysissa muodostamaa yhdistettä A. Yhdiste B on laajalti tunnettu suoja-aine, jota ei lisätä maaleihin sellaisenaan, mutta se toimii maalien raaka-aineiden säilöntäaineena. [1.] Yhdistettä käytetään sekä tuotteiden varastoinnin (in-can) että maalin kuivakalvon suojaamiseen [2]. Yhdiste A on yhdisteen B aktiivinen komponentti. Yhdistettä A voidaan käyttää myös sellaisenaan maalien suoja-aineena. [1.] Tikkurilalla maaleihin ei lisätä lainkaan yhdistettä A, vaan kyseinen yhdiste on täysin peräisin maalien raaka-aineiden säilöntäaineena käytetystä yhdisteestä B ja sen hydrolyysin lopputuotteista.

Kumpaakaan yhdisteistä A tai B ei ole analysoitu validoitavalla menetelmällä aiemmin, eikä tiedetä, kuinka suuri osa yhdisteestä B havaitaan yhdisteenä A. Yhdisteen A analysointia varten on tehty joitakin alustavia testejä, mutta tarkempia testejä eikä yhdisteiden A ja B välistä suhdetta ole tutkittu. Tässä työssä testataan siis olemassa olevan analyysimenetelmän soveltuvuutta yhdisteelle A, jota menetelmällä ei ole aiemmin tutkittu, sekä tarkastellaan menetelmän sopivuutta yhdisteen B analysointiin yhdisteenä A.

2 Maalin koostumus

Maalit ovat pintakäsittelyaineita, joilla voidaan suojata maalattavaa alustaa siihen kohdistuvalta rasitukselta ja pidentää näin maalattavan tuotteen tai kappaleen käyttöikää sekä tehdä maalattavasta alustasta esteettisempi [3]. Maalit ovat pigmenttipartikkeleiden ja nesteen dispersioita, ja ne koostuvat lukuisista eri komponenteista riippuen tuotteen käyttötarkoituksesta, halutuista ominaisuuksista sekä esimerkiksi ekologisista ja taloudellisista tekijöistä [4]. Pääasiassa maalit koostuvat neljästä komponentista: sideaineesta, liuotteista, pigmentteistä ja täyte- ja apuaineista (kuva 1) [3].

Maalien sisältämät komponentit voidaan luokitella haihtuviin ja haihtumattomiin komponentteihin: haihtuvia ovat orgaaniset liuottimet ja vesi ja haihtumattomia puolestaan sideaine, hartsit, apuaineet, väriaineet, pigmentit sekä täyteaineet. Maalit luokitellaan yleisesti niissä käytetyn sideaineen mukaan, mutta luokittelu voidaan tehdä myös käyttökohteen tai liuotinaineen mukaan, kuivumistavan perusteella sekä pohja-, pinta- ja erikoismaaleihin. [4.]



Kuva 1: Maalin koostumus [3].

Sideaineen tehtävänä on pitää maalikalvo koossa ja muodostaa tartunta maalikalvon ja alustan välille [5]. Sideaine ja sen määrä valitaan haluttujen kuivan maalikalvon ominaisuuksien, kuten sään- ja kulutuksenkeston sekä puhdistettavuuden, perusteella. Valinnalla ohjataan myös maalin soveltuvuutta erilaisille alustoille. [6.] Maalikalvon joustavuus, kovuus, kulutuksenkestävyys, kalvonmuodostus ja kiilto ovat sideaineesta riippuvaisia ominaisuuksia [7]. Maalien sideaineet ovat enimmäkseen orgaanisia, suurimolekyylisiä polymeerejä eli muoveja tai reaktiokykyisiä lakkahartseja, joista muodostuu polymeerejä maalin kuivussa [8]. Useimmat sideaineet ovat huoneenlämpötilassa kiinteitä tai jäykkiä nesteitä, ja tästä syystä sideaine liuotetaan tai dispergoidaan sopivaan nesteseen maalausta varten [7]. Yleisimpiä sideainetyyppejä ovat polymeeridispermiot, jotka perustuvat tyypillisesti polyakrylaattiin tai polyvinyliasetaattiin, sekä öljyt ja alkydit, jotka ovat puolestaan kokonaan tai osittain kasviöljypohjaisia [9].

Nestemäiset maalit sisältävät myös jotakin haihtuvaa nestettä, yhdistettä tai ohennetta, kuten vettä ja/tai orgaanisia liuotteita. Ne antavat maalille halutun juoksevuuden maalaustyötä varten ja haihtuvat levityksen ja kuivumisen aikana maalikalvosta. Liuotteella tarkoitetaan haihtuvaa nestettä tai nesteseosta, joka liottaa maalin sideaineen. Ohenne voi olla maalin sideaineen liuote tai seos liuotteesta ja apuliuotteesta. Koska orgaaniset liuotteet kehittävät haihtuessaan terveydelle ja ympäristölle haitallisia höyryjä, käytetään maaleissa yhä useammin ohenteena vettä. [7.] Myös Tikkurilalla yleisin maalien ohenne ja liuote on vesi [5]. Orgaaniset sideaineet eivät liukene veteen, mutta ne voidaan dispergoida. [7]. Vesiohenteisissa tuotteissa käytetään lisäksi kalvonmuodostajaa, jolla parannetaan maalikalvon ominaisuuksia. Yleisesti käytetty kalvonmuodostaja on propyleeniglykoli. [5.]

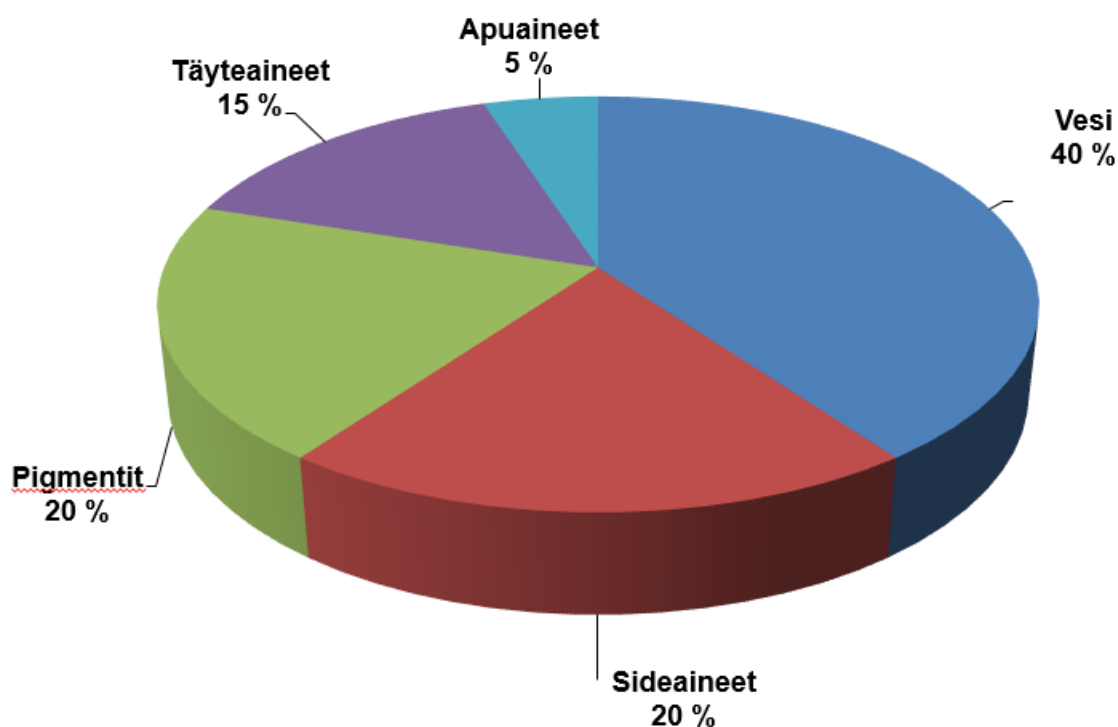
Pigmentit ovat veteen ja liuotteisiin liukenemattomia aineita, jotka antavat maalille halutun värin ja peittävyuden sekä suojaavat alustaa auringon ultravioletisäteilyltä [6]. Ne dispergoidaan sideaineeseen maalin valmistusvaiheessa. Pigmentit voidaan jakaa väri- ja korroosionestopigmentteihin sekä apupigmentteihin eli täyteaineisiin. [7.] Tavallisimpia pigmenttejä ovat valkoinen titaanioksidi sekä keltaiset, ruskeat, punaiset ja mustat rautaoksidit. Synteettisiä orgaanisia

pigmenttejä käytetään puhtaiden sinisten, vihreiden, punaisten, keltaisten ja oranssien värien valmistukseen. [6.] Sellaiset pigmentit, jotka eivät peitä tai värjää, ovat täyteaineita. Ne ovat liukenemattomia, hienojakoisia jauheita, joiden avulla voidaan säädellä maalin himmeyttä [7]. Täyteaineet ovat tavallisesti jauhettuja mineraaleja, kuten kalkkikiveä, liitua tai dolomiittia [6].

Apuaineilla säädellään muun muassa maalien kuivumis-, tasoittumis-, levitys- ja säilymisominaisuuksia. Niiden osuus valmistuskaavassa on hyvin pieni, useimmiten noin 0,1–1 %. [7.] Erilaisia apuaineita ovat esimerkiksi kuivikkeet, paksunusaineet, kosteuden sitoajat, laskeutumisen ja nahoittumisen estoaineet, UV-suoja-aineet, stabilointi-, dispergointi- ja vaahdonestoaineet sekä erilaiset suojaaineet, kuten homeenestoaineet ja korroosionestoaineet. [7; 9.] Maalien sisältämät apuaineet ovat usein liikesalaisuuksia, eikä niistä kerrota juurikaan tuoteselosteissa [7].

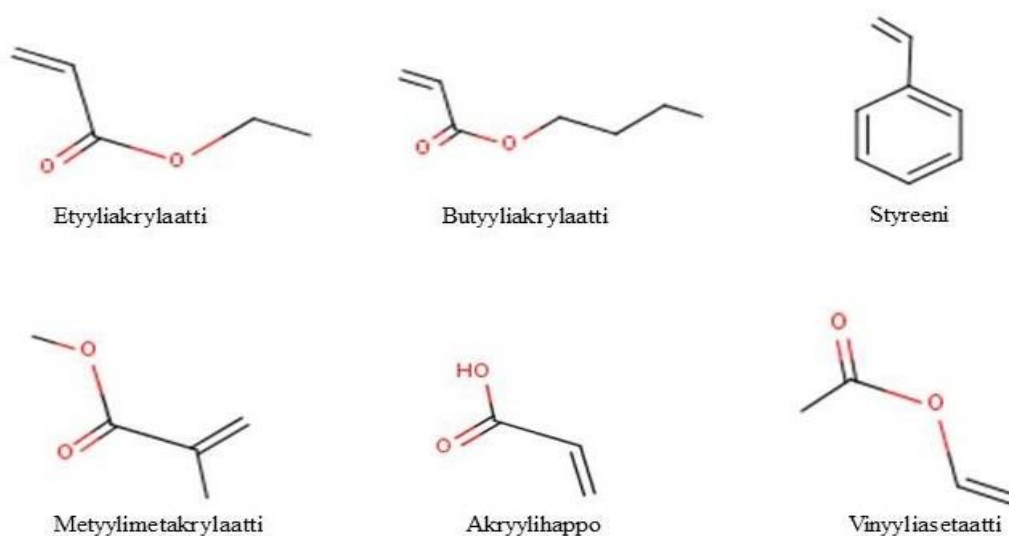
2.1 Vesiohenteiset dispersiomaalit

Käytetyimmät sideaineet maaleissa ovat erilaisia akryylisiä emulsiopolymeerejä eli akryylisiä latekseja. Kun maalin sideaine on lateksin tapaisesti esimerkiksi veden ja sideainepolymeerin dispersio, puhutaan dispersiomaaleista. [9.] Vesiohenteiset lateksit mielletään yleisesti sisustuksessa käytettävien maalien sideaineiksi, mutta dispersiomaaleja käytetään myös paljon rakennusmaalauksessa [7]. Vesiohenteisen dispersiomaalin tärkeimmät ominaisuudet ovat niiden applikointiin vaikuttavat reologiset ominaisuudet (aineen muodon muuttuminen siihen kohdistuvan voiman ansiosta), peittokyky, alustaan kiinnittyminen sekä elastisuus [10]. Sisämaaleissa tärkeimmät ominaisuudet liittyvät lähinnä kuiva-
kalvon ulkonäköön [11]. Dispersiomaalin tyypillinen koostumus on esitelty kuvassa 2.



Kuva 2: Dispersiomaalin koostumus [12].

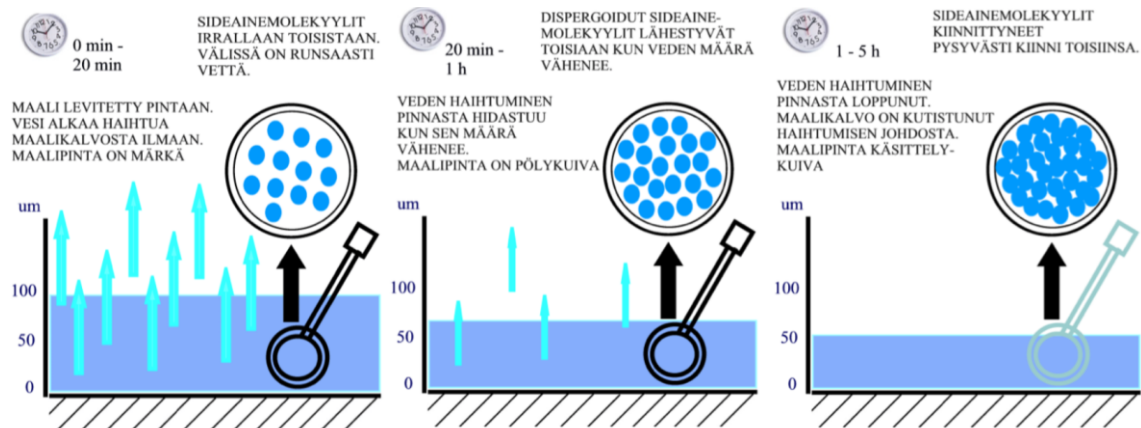
Dispersiomaalit ovat maailmanlaajuisesti suurin tuoteryhmä koko maalinvalmistusalalla. Vesiohenteisten dispersiomaalien sideaineet ovat raskaiden polymeeripartikkelien ja veden dispersioita, ja niiden moolimassa vaihtelee tyypillisesti 500–3000 M välillä. [10.] Ne valmistetaan emulsiopolymeroinnilla esimerkiksi styreeni-, butadieeni-, akrylaatti- tai vinyylimonomeereistä. Polymeeridispersioita voidaan stabiloida erilaisilla pinta-aktiivisilla aineilla ja suojaavilla kolloideilla, jolloin sideaineista valmistettavat dispersiomaalit ovat vesiohenteisia, vaikka itse sideaine ei ole vesiliukoinen. [11.] Kuvassa 3 esitellään kuuden vesiohenteisten dispersiomaalien sideaineiden valmistuksessa käytettävien monomeerin rakennekaavat.



Kuva 3: Vesiohenteisten dispersiomaalien sideaineiden valmistuksessa käytettyjä monomeerejä [11].

Yleisimmät vesiohenteisissa dispersiomaaleissa käytetyt polymeerit ovat vinyliasetaatti-, vinyylipropionaatti-, akrylaatti-metakrylaati- ja styreeni-akrylaattikopolymeerejä sekä styreeni-butadieenipolymeerejä. Euroopassa suosituimmat sideaineet ovat vinyliasetaattikopolymeerejä, akryylisiä latekseja tai styreeni-butadieenipolymeerejä. Vinyliasetaattikopolymeerit, joihin on lisätty pehmentimeksi akrylaattimonomeeriä (kuten butyyliakrylaattia), ovat sisämaalimarkkinoiden suosituimpia sideaineita. [13.]

Vesiohenteiset dispersiomaalit ovat fysikaalisesti kuivuvia maaleja. Fysikaalisesti kuivuvissa maaleissa sideainemolekyylit ovat irrallisina partikkeleina vedessä tai liuotimessa. Kun maali levitetään alustalleen, vesi tai liuotin haihtuu pois ja sideainepartikkelit lähentyvät toisiaan ja tarrautuvat lopulta yhteen (kuva 4). [14.]



Kuva 4: Vesiohenteisen dispersiomaalin kuivuminen alustaan [14].

Tyypillisesti fysikaalisesti kuivuvien maalien kuiva maalikalvo liukenee uudelleen liuottimeen ja pehmenee lämmössä, mutta dispersiomaalien sideaine ei liukene takaisin veteen. Dispersiomaaleissa käytetään kalvonmuodostusaineita alentamaan kalvonmuodostuslämpötilaa. Usein dispersiomaaleihin lisätään myös kuivumisen hidastusaineita, jotka hidastavat veden haihtumista maalikalvosta. Dispersiomaalien etuja ovat muun muassa hyvä vesihöyrynläpäisevyys, ympäristöystävällisyys, välineiden helppo puhdistaminen pelkällä vedellä, nopea kuivuminen, hyvä pesu- ja alkalinkestävyys sekä hyvät työstömahdollisuudet. [12.]

2.2 Dispersiomaaleissa käytettävät suoja-aineet

Bakteeri- ja sieneliöt aiheuttavat kontaminaatioherkissä vesiohenteisissa maaleissa muun muassa pahaa hajua, värinmuunnoksia ja homeen kasvua. Ne voivat aikaansaada myös haitallisia muutoksia esimerkiksi maalin viskositeettiin sekä pH-arvoon. Mikro-organismeja voi päätyä maaleihin vesipohjaisten maalien komponenttien mukana. Kontaminaatiota saattaa tapahtua myös esimerkiksi puutteellisen tuotantohygienian, kuten epäpuhtaiden säiliöiden tai työvälineiden kautta. Vesiohenteinen maali on mikro-organismeille varsin otollinen kasvualusta, koska se sisältää vettä sekä ravintoa (hiiltä ja typpeä) ja lämpötila

(20–30 °C) ja pH (7–9,5) ovat sopivat. Mikro-organismien aiheuttamien haittojen estämiseksi maaleihin lisätään erilaisia suoja-aineita, biosideja. [2.] Maaleissa käytetyt biosidit voidaan jakaa biosidiasetuksen ryhmittelyn mukaisesti PT6- ja PT7 –ryhmiin. PT6-luokan biosidit ovat tuotteiden varastoinnissa ("in-can") käytettyjä säilöntäaineita ja PT7-biosideja lisätään maaleihin kuivakalvojen ja pinnoitteiden säilyvyyden varmistamiseksi. [15.] Biosidia tulisi olla maalissa mahdollisimman vähän, mutta kuitenkin tarpeeksi, jotta siitä olisi hyötyä [2].

Yleisimpiä biosideja maaleissa ovat formaldehydiä vapauttavat aineet sekä isotiatsolonista johdetut heterosykliset typen ja rikin yhdisteet [1]. In-can-biosidien haluttuja ominaisuuksia ovat muun muassa korkea aktiivisuus bakteereja ja sieniä vastaan, pH-, Redox- ja lämpöstabiilisuus, vesiliukoisuus käyttökonentraatiossa, yhteensopivuus erilaisten tuotetyyppien kanssa, matala toksisuus/ekotoksisuus sekä kustannustehokkuus. Tärkeää on myös, ettei biosidi vaikuta tuotteen stabiilisuuteen tai reologiaan eikä se aiheuta värin muutoksia. [2.]

Koska biosidivalmisteiden tarkoitus on tappaa eliöitä, liittyy niiden käyttöön monenlaisia terveys- ja ympäristöriskejä [16]. Käytettyjen biosidivalmisteiden tulee olla Euroopan unionin (EU) biosidiasetuksen vaatimusten mukaisia. Asetuksen tavoitteena on parantaa biosidivalmistemarkkinoiden toimintaa EU:ssa ja varmistaa ihmisten terveyden ja ympäristön suojelu. Biosidiasetuksella säännellään myös biosidivalmisteiden myyntiä ja käyttöä, ja joitakin valmisteita saa myydä vain ammattilaisille. Yritysten tulee hakea valmisteiden käyttöä varten hyväksyntä Euroopan kemikaaliviraston ECHA:n biosidivalmisterekisterin R4BP:n kautta. [17.] Biosidien pitoisuuksien analysoinnissa voidaan hyödyntää esimerkiksi korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa.

3 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC)

Kromatografia on kemiallisten yhdisteiden erotus- ja analysointimenetelmä, joka perustuu tutkittavan seoksen komponenttien erilaiseen jakautumiseen stationäärifaasin eli paikallaan pysyvän faasin ja liikkuvan faasin kesken [18]. Liikkuva faasi voi olla joko nestettä, jolloin sitä kutsutaan ajoliuokseksi tai eluentiksi, tai kaasua, jolloin sitä kutsutaan kantajakaasuksi. Stationäärifaasi on eluenttiin liukenematon kiinteä aine tai neste. [19.]

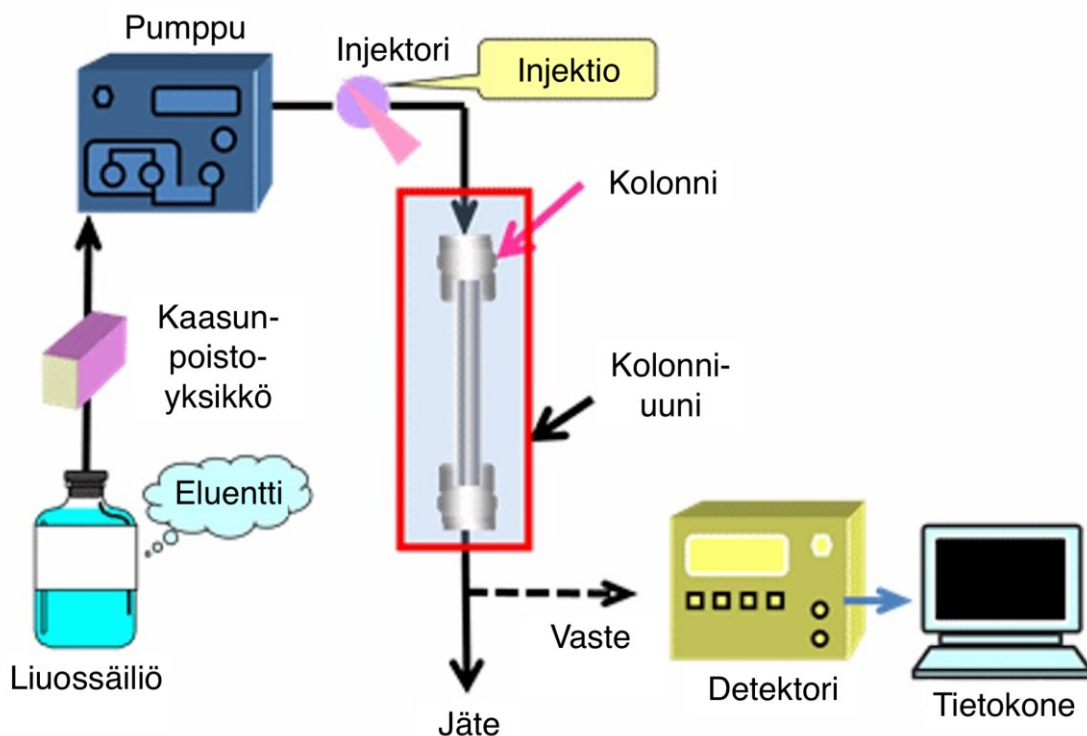
Nestekromatografiassa eluentti kulkee hienojakoisella absorbentilla täytetyn kolonnin läpi ja näytteen komplementit alkavat jakautua faasien välillä [19]. Komponenttien erottuminen voi perustua esimerkiksi adsorptioon, jossa aineet pyrkivät kiinnittymään kiinteän aineen pintaan, tai partitioon, jossa aineet liukenevat stationäärifaasiin ja liikkuvaan faasiin jakautumislain mukaan; rakenteeltaan erilaiset molekyylit kulkeutuvat eri nopeudella kolonnin läpi. [20.]

Stationäärifaasi on pakattu hyvin tiiviisti pylvään eli kolonnin sisälle, ja liikkuva faasi eli eluentti pakotetaan tämän kolonnin läpi suurta vastapainetta vastaan [21]. Näytteen on oltava liuksena sekä ennen injektointia että injektoinnin jälkeen. Tämä niin sanottu liukoisuusehto täyttyy, kun näyte tehdään eluointiliuokseen tai sitä heikompaan liuottimeen. [22.] Liikkuvan faasin eli eluointiliuoksen täytyy olla HPLC-laatua kolonnin pilaantumisen estämiseksi. Tästä johtuen eluointiliuos on suodatettava aina, varsinkin, jos liuoksen tekoon on käytetty kiinteitä aineita. [23.]

Tässä työssä hyödynnetään korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa (HPLC), joka on pylväskromatografiasta kehittynyt nestekromatografian muoto. Tekniikkaa voidaan hyödyntää laajalti sekä epäorgaanisten että orgaanisten yhdisteiden analysoinnissa, sillä soveltamisen ainoa edellytys on, että tutkittava näyte saadaan liukenemaan johonkin liuottimeen [20]. HPLC on korvaamaton nestekromatografian muoto mm. monien suurikokoisten orgaanisten molekyylien, kuten proteiinien, aminohappojen, lipidien ja lääkeaineiden analysoinnissa [23].

3.1 HPLC-laitteisto

HPLC-laitteisto koostuu tyypillisesti eluenttisäiliöstä, kaasunpoistoyksiköstä (degasser), korkean paineen tuottavasta pumpusta, injektorista, kolonniuunin sisällä sijaitsevista mahdollisesta esikolonnista sekä varsinaisesta erottelukolonnista, detektorista, tietojenkäsittelylaitteesta sekä jäteastiasta [20]. Tyypillinen HPLC-laitteisto on esitetty kuvassa 5.

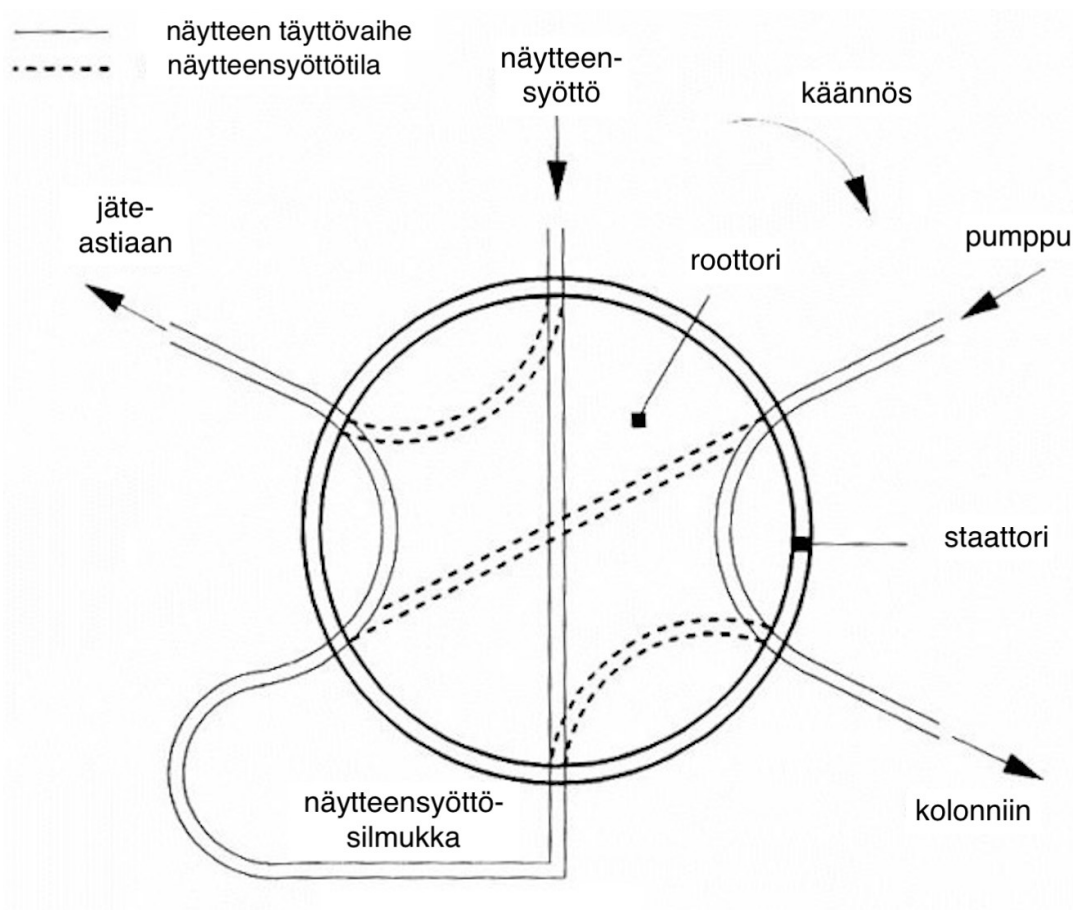


Kuva 5: HPLC-laitteisto [25, muokattu].

Laitteiston pumppu pumppaa eluenttia kolonnin läpi. Näyte injektoidaan näytteen syöttösilmukkaan, ja virtaava eluentti käännetään kulkemaan silmukan kautta. Eluentti työntää näytteen silmukasta kolonnin läpi detektorille. Näytteen sisältämät yhdisteet erottuvat toisistaan eluoituessaan kolonnin läpi ja saapuvat detektorille eluotumisjärjestyksessään. [19.] Näytekomponenttien eluutiojärjestys riippuu yhdisteiden poolisuudesta sekä niiden dissosiaatioasteesta. Käänteisfaasikromatografiassa liikkuva faasi on poolinen, jolloin pooliset näyteyhdisteet pysyvät siinä paremmin ja niiden vuorovaikutus stanionäärifaasin kanssa on vähäisempää. Näin ollen pooliset yhdisteet eluotuvat ensin. [24.]

3.1.1 Näytteensyöttö

Näytteensyöttö tapahtuu nestekromatografiassa yleensä joko automaattisella näytteensyöttäjällä (autosampler) tai manuaalisesti monitieventtiilien (kuvassa 6) avulla. Näyte injektoidaan typpäneulaisella ruiskulla monitieventtiin näytteensyöttösilmukkaan ("luuppi"), jonka tilavuus on aina vakio. Näytesilmukan täyttövaiheessa pumppu pumppaa eluenttia eli ajoliuosta suoraan kolonniin. Kun venttiili käännetään injektioasentoon, virtaussuunta injektorissa muuttuu niin, että pumppu työntää näytesilmukan sisällön eluentin avulla kolonniin ohuita teräskapillaareja pitkin. [26.] Näytevyöhykkeen levenemisen estämisen takia kapillaarit ovat mahdollisimman ohuita ja lyhyitä [20].



Kuva 6: Monitieventtiilin toiminta [26, muokattu].

Automaattisten näytteensyöttäjien venttiilisyteemi on edellä kuvatus kaltainen, mutta injektion suorittaa näytteenkäsitteljän sijasta tietokoneohjatun robottikäsi-varren päässä oleva ruisku. Automaattisen näytteensyöttäjän huomattava etu on se, että siihen voidaan ladata etukäteen useita kymmeniä, jopa satoja näytteitä ja standardeja, jotka ajetaan automaattisesti tietokoneelle ohjelmoidun ajo-ohjelman avulla. [26.]

3.1.2 Pumput

HPLC-laitteiston pumput ovat joko mäntä- tai ruiskupumppuja. Yleisimpiä nykyisissä laitteistoissa ovat mäntäpumput, sillä ne voivat pumpata ruiskupumppuista poiketen ajoliuosta keskeytyksettä. [27.] Pumppu pumpkaa eluointiliuosta tasaisella nopeudella kolonnin läpi. Sen täytyy toimia tarkasti, olla pulssiton ja toistettava sekä kestää suuria paineita; korkea paine tarvitaan liuottimen pumppaamiseen tiiviisti pakatun stationäärifaasin läpi. HPLC-laitteistossa pumppu pystyy tuottamaan tyypillisesti noin 300 baarin paineen. [20.] Tyypillisimmät virtausnopeukset vaihtelevat välillä 0,5–5 ml/min. Mikäli käytetään pakattuja kapillaarikonnieja, tarvitaan vieläkin pienempiä pienempiä virtausnopeuksia, jopa alle 0,1 µl/min. Nestekromatograafiseen systeemiin muodostuva paine riippuu käytettävästä kolonnista, sen pakkausmateriaalin partikkelikoosta, pituudesta, sisähalkaisijasta ja pakkauksen tiiviyydestä sekä eluentin koostumuksesta ja virtausnopeudesta. [24.] Yleensä pumppuilla voidaan myös tuottaa hyvin tarkasti kahden tai useamman liuottimen seoksia siten, että liuosten tilavuussuhteita voidaan analysoinnin aikana portaattomasti muuttaa. Tätä kutsutaan gradienttiajoksi. Isokraattisessa ajossa liuoskoostumus pysyy samana koko ajon ajan. [20.]

Ilmakuplat aiheuttavat suuria ongelmia HPLC-laitteiston pumpun ja detektorin toiminnassa. Kuplien syntymisen estämiseksi eluentin jakelujärjestelmästä eli pumpusta ja kapillaareista poistetaan ilma aina, kun laite on ollut ilman virtausta tai kun eluenttia tai kolonnin vaihdetaan. Kapillaari irrotetaan kolonnin alkupäästä ja ilmatonta eluenttia pumpataan suurella virtausnopeudella vuorollaan kaikista nestesäiliöistä. Nykyään laitteessa on pumpun ja kolonnin välissä erillinen venttiili, jonka avulla huuhtelu voidaan tehdä. [20.] Kaasut voidaan poistaa

ajoliuoksista ennen niiden käyttöä myös esimerkiksi keittämällä, ultraäänihau-teessa tai kuplittamalla heliumilla [22]. Nykyisissä HPLC-laitteistoissa on kaasujen poistoa varten usein valmiina degasser-yksikkö, joka poistaa ajoliuoksen il-makuplat käytön aikana pumppaamalla ajoliuoksen kaasua läpäisevän kalvon vieritse. Kalvon toisella puolella oleva tyhjiö imaisee ajoliuoksesta mahdolliset ilmakuplat. [26.]

3.1.3 Kolonni

Kromatografinen erottuminen tapahtuu HPLC-laitteiston kolonnissa. Nestekro-matografikolonnit tehdään ruostumattomasta teräksestä tai teräsputkeen asetet-tavasta lasiputkesta ja ne ovat noin 5–30 cm:n pituisia. [27.] Kolonni täytetään tiiviisti sopivalla, hienojakoisella kiinteällä jauheella tai sienimäisen rakenteen omaavalla stationäärifaasilla. Sen on oltava inertti ja mekaanisesti kestävä, eli se ei saa reagoida eikä myöskään puristua kokoon. [22.] Mitä pienempiä sta-tionäärifaasin hiukkaset ovat, sitä suurempi faasin pinta-ala on, ja sitä parempi pohjaluku voidaan saavuttaa. Optimaalinen pohjaluku on kääntäen verrannolli-nen partikkelin halkaisijaan. [20.]

Stationäärifaasin laatu määrää, onko kyseessä käänteisfaasi-, normaalifaasi-, ioninvaihto- vai eksklusiokromatografia [27]. Tässä työssä käytettiin käänteis-faasikolonnin, jonka stationäärifaasin materiaali on kemiallisesti modifioitua sili-kaa. Silikapartikkelin pinnalle on sidottu sopiva pooliton yhdisteryhmä, C18. Sili-kan lisäksi stationäärifaasina voidaan käyttää muun muassa polymeerejä, alu-miinioksidia, huokoista lasia, agarosia tai huokoista grafiittia. [24.] Käänteis-faasikromatografia on ylivoimaisesti kromatografian eniten käytetty muoto. Esi-merkiksi normaalifaasikromatografiassa ongelmana on eluointiliuoksessa epäpuhtautena oleva vesi, joka tarttuu helposti stationäärifaasin pintaan muut-taen sen ominaisuuksia: tällöin mittaukset eivät ole toistettavia. [19.]

Koska nestekromatografiset kolonnit ovat kalliita ja ne tukkeutuvat suhteellisen helposti, käytetään yleensä analyttisen kolonnin edessä suojana esikolonnin. Esikolonnin tarkoituksena on poistaa näytteessä olevia epäpuhtauksia, jotka saattaisivat häiritä analyttisen kolonnin toimintaa. Esikolonnit ovat yleensä

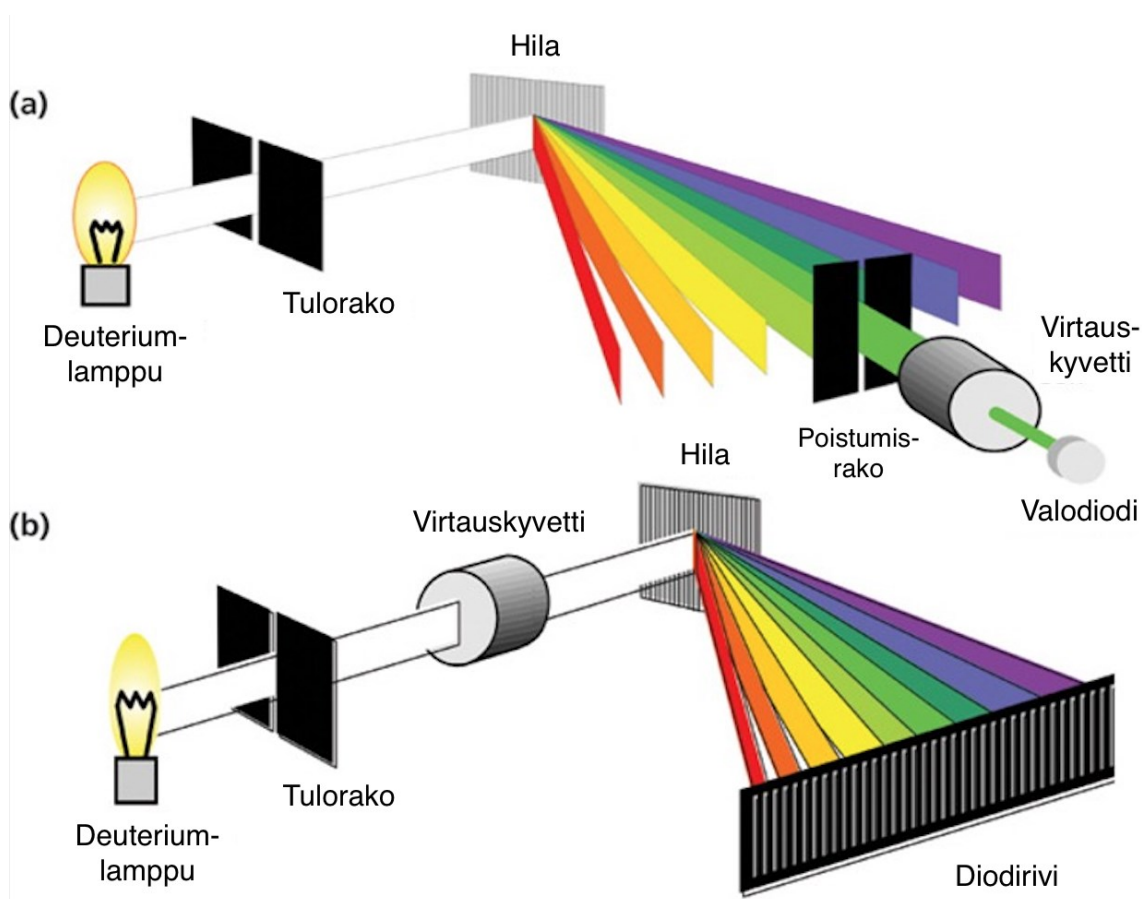
lyhyitä (alle 5 cm) ja ne on pakattu samalla tai samankaltaisella materiaalilla kuin analyyttinen kolonni. Lyhyen rakenteensa ansiosta esikolonnit ovat helppoja puhdistaa tai vaihtaa. Käytön ongelmana on se, että esikolonnit lisäävät vyöhykeleveämistä; mikäli vyöhykeleveäminen häiritsee analyysiä merkittävästi, voidaan esikolonniin sijaan käyttää myös hyvin pieniä suojakolonnieja analyyttisen kolonnin edessä. [24.]

Kolonni sijaitsee kolonniuunissa, jolla pyritään termostoimaan kolonni ja eluentti vakiolämpötilaan analyysin toistettavuuden parantamiseksi. Lämpötila vaikuttaa näytedyhdisteiden liukoisuuteen, niiden diffuusionopeuksiin sekä eluentin viskositeettiin, joten sillä on vaikutusta myös yhdisteiden retentioaikoihin. Lämpötila vaikuttaa myös eluentin pH-arvoon sekä yhdisteiden ionisoitumiseen. Vaikutus on kuitenkin merkittävä vain, jos yhdisteiden pK_a -arvot ovat lähellä eluentin pH-arvoa. Neutraalissa muodossa oleviin tai yli 95-prosenttisesti ionisoituneisiin yhdisteisiin pienellä lämpötilan vaihtelulla ei ole kovin suurta vaikutusta. [24.]

3.1.4 Detektori

Kolonnin jälkeen yhdisteet liikkuvat detektorille. Detektointi perustuu yhdisteiden spektrometriin, sähkökemiallisiin tai muihin fysikaalisiin ominaisuuksiin. [20.] Molekyylillä pitää olla siis jokin eluointiliuoksesta poikkeava ominaisuus, jota detektori voi mitata. Se tuottaa yhdisteen havaitessaan jonkin mitattavissa olevan vasteen, esimerkiksi absorbanssin. [22.] Nestekromatografiassa voidaan hyödyntää monenlaisia eri detektoreita, joilla on jokaisella omat etunsa ja huonot puolensa. Detektorin valinnassa on aina huomioitava käyttötarkoitus sekä detektorin soveltuvuus mittaukselle. [27.] UV/Vis- ja fluorenssispektrometrit perustuvat spektrometriaan. Taitekerroin- eli RI-detektorin toiminta perustuu eluentin taitekertoimen jatkuvaan mittaamiseen. Sähkökemiallinen detektori mittaa eluontiin johdettavaa jännitettä. ELS-detektori (evaporative light-scattering detector) mittaa valon hajoamista, ja sopii siksi yhdisteille, jotka haihtuvat huomattavasti huonommin kuin eluentti. Detektorina voidaan käyttää myös massaspektrometriä. [22.]

Yleisin nestekromatografiassa käytetty detektori on ultraviolettisäteilyn ja näkyvän valon absorbanssimittauksiin perustuva UV/Vis-detektori. Suuri osa molekyyleistä absorboi valoa, joten tekniikka soveltuu laajalle joukolle erilaisia yhdisteitä. [20.] UV/Vis-detektorit voidaan jaotella mittaustekniikan mukaisesti kiinteällä aallonpituudella mittaviin, vaihdettavalla aallonpituudella mittaviin sekä diodirivillä varustettuihin detektoreihin. Kahdella ensimmäisellä tyypillä voidaan mitata kerrallaan vain yhtä aallonpituutta, mutta diodirividetektorilla koko aallonpituusalue voidaan mitata samanaikaisesti (kuva 7). [28.] Detektori voidaan ohjelmoida mittaamaan myös tiettyä aallonpituusväliä, jolloin saadaan piikeille niiden ominaiset spektrit. Tällöin on mahdollista saada summa-absorbanssi kaikista absorbanssiarvoista tai yhdisteiden tunnistamisen kannalta tärkeä spektri tietystä kromatogrammissa esiintyvistä piikeistä. Myös absorbanssisuhde, eli ennalta valittujen aallonpituuksien absorbanssien suhde, on tärkeä yhdisteiden tunnistamisessa. Diodirividetektori antaa informaatiota absorbanssisuhteen muodossa yhdisteiden puhtaudesta ja mahdollistaa usean näytekomponentin samanaikaisen analysoinnin. [20.] UV/Vis-detektorien etuja ovat niiden herkkyys sekä laaja lineaarinen alue, joka kattaa 10^6 -kertaisen pitoisuusalueen. Sopivissa olosuhteissa detektorilla voidaan siis määrittää jopa nanogrammatason pitoisuuksia. UV/Vis-detektori sopii hyvin myös gradienttiajoon. [28.]



Kuva 7: Ylhäällä yhtä aallonpituutta mittaava UV/Vis-detektori ja alhaalla diodirividetectori [28, muokattu].

3.2 Eluentti

Eluentin valinta riippuu pitkälti stanionäärifaasista ja näytteen koostumuksesta. Nestekromatografiassa voidaan käyttää joko isokraattista ajoa tai gradienttisysteemiä. Isokraattisessa ajossa eluenttikoostumus pysyy muuttumattomana koko ajon ajan. Tällöin laitteistoon tarvitaan vain yksi pumppu ja tarvittava laitekonstruktio on siten yksinkertainen ja halpa. Isokraattisen systeemin avulla ei kuitenkaan voida analysoida kaikkia näytteitä, koska sen avulla ei päästä yhtä hyvään erotukseen kuin gradienttisysteemillä, ja analyysiajat ovat usein pitkiä. [24.] Gradienttisysteemissä eluentin koostumusta muutetaan joko jatkuvasti tai portaittain ajon aikana. Gradientiajossa eluutiovoimakkuuden kasvattaminen saa aikaan yhdisteiden retentioaikojen lyhenemisen. [22.] Myös eluentin virtausnopeutta voidaan muuttaa ajon aikana. Gradienttisysteemi aiheuttaa laitteistolle

suuremmat vaatimukset kuin isokraattinen systeemi: jokaista liuotinta varten tarvitaan yksi pumppu ja niiden sekoitusta varten tarvitaan liuottimien sekoitusyksikkö sekä pumppujen toimintaa ohjaava ohjainyksikkö. [24.]

Eluentin koostumus voidaan optimoida joko kokeilemalla tai käyttämällä tarkoitukseen suunniteltuja tietokoneohjelmia [20]. Optimoinnissa tyypillisiä parametrejä ovat eluentin koostumus, stationääri faasi, pH ja lämpötila. Nestekromatografiassa tyypillisimmin käytettyjä orgaanisia liuottimia ovat asetonitriili, metanoli ja muut alkoholit, tetrahydrofuraani ja dioksaani, hiilivetyliuottimet sekä klooratut liuottimet. Käänteisfaasinessekromatografisissa sovelluksissa käytetään yleensä asetonitriiliä, metanolia, etanolia sekä propanolia yhdessä veden kanssa. Suosituin orgaaninen modifioija on asetonitriili; vesi-asetonitriiliseoksella on alhaisin viskositeetti, joten sen avulla saavutetaan parhain erotustehokkuus. [24.] Metanolia käytetään lähinnä silloin, kun eluentissa halutaan käyttää suurempia määriä ionireagensseja tai suoloja, koska niillä on tyypillisesti suurempi liukoisuus metanoli-vesiseokseen kuin asetonitriili-vesiseokseen [27]. Muita alkoholeja kuten etanolia ja propanolia käytetään harvemmin johtuen niiden suuremmasta viskositeetista [24].

4 Validointi

Validointi tarkoittaa analyysimenetelmän pätevyysominaisuuksien sekä luotettavuuden testaamista. Analyysimenetelmän validoinnin tavoite on varmistaa ja osoittaa systemaattisesti, että menetelmä soveltuu käyttötarkoitukseensa, sen antamat tulokset ovat luotettavia ja tulosten epävarmuus tunnetaan. Validoitujen analyysimenetelmien käyttö on yksi olennaisimmista keinoista parantaa tulosten luotettavuutta. [29.] Validointi tehdään, kun vanhaa menetelmää muutetaan tai uudistetaan, menetelmä otetaan käyttöön uudessa laboratoriossa tai on kehitetty täysin uusi menetelmä. Myös otettaessa käyttöön uusi analyysilaitte on menetelmä validoitava kyseiselle laitteelle: vaikka menetelmä olisi standardisoitu, tulee laboratorion osoittaa, että se pystyy saamaan aikaiseksi luotettavia tuloksia menetelmää käyttäen. [30.]

Validointi koostuu validointisuunnitelman laatimisesta, kokeiden suorittamisesta, tulosten tilastollisesta arvioinnista sekä loppuraportista. Validointisuunnitelmassa määritellään validoinnin tarkoitus, kohde ja soveltamisala, käytettävä laitteisto, mitattavat parametrit, näyteaineisto eli matriisi sekä koesarjat. [30.] Menetelmää validoitaessa tehdään joukko validointisuunnitelmaan valittuja testejä, joiden tuottamat tulokset antavat tietoa esimerkiksi menetelmän spesifisyydestä, tarkkuudesta, täsmällisyydestä ja herkkydestä. Validointitoimenpiteiden laajuus riippuu tutkittavasta analyysimenetelmästä: menetelmän käyttöalueesta ja tutkittavista näytteistä riippuen määritellään ne ominaisuudet, jotka ovat tulosten luotettavuuden kannalta välttämättömiä. [29.] Testien perusteella saadut tulokset dokumentoidaan tarkasti ja analysoidaan tilastollisin menetelmin [30].

Tässä opinnäytetyössä testataan jo olemassa olevan menetelmän soveltuvuutta yhdisteelle, jota menetelmällä ei ole aiemmin tutkittu. Validointiparametreina työssä olivat selektiivisyys ja spesifisyys, lineaarisuus, mittausalue ja herkkyys, toteamis- ja määritysrajat, tarkkuus ja uusittavuus sekä mittausepävarmuus. Validointisuunnitelma on esitelty lyhyesti taulukossa 1.

Taulukko 1: Validointisuunnitelma.

Päivä	Valmistetaan	Ajetaan
1	Kalibrointiliuokset 1–8; 0,2–50 ppm Kontrollinäytteet; 7, 10 ja 15 ppm; HL & J Maalinäytteitä 3 kpl x 2	Kalibrointiliuokset 1–8; 0,2–50 ppm Kontrollinäytteet; 7, 10 ja 15 ppm (HL) Maalinäytteet
2	Maalinäytteitä 3 kpl x 2 Saantokokeet, 4 kpl; 10 & 60 ppm lisäykset	Kalibrointiliuokset, 5 pitoisuutta Kontrollinäytteet; 7, 10 ja 15 ppm (HL) Maalinäytteet Saantokokeet
3	Maalinäytteitä 3 kpl x 2 Standardinlisäyssuora; 5 pistettä	Kalibrointiliuokset, 5 pitoisuutta Kontrollit, lämpötilaseuranta (HL & J) Maalinäytteet Standardinlisäyssuora
4	Maalinäytteitä 3 kpl x 2 Saantokokeet, 4 kpl; 10 & 60 ppm lisäykset	Kalibrointiliuokset, 5 pitoisuutta Kontrollinäytteet; 7, 10 ja 15 ppm (HL) Maalinäytteet Saantokokeet
5		Kontrollit, lämpötilaseuranta (HL & J)
6	Kalibrointiliuokset 1–8; 0,2–50 ppm Maalinäytteitä 3 kpl x 2 LOD/LOQ-näytteet: 6x std 1 ppm ja reagenssinolla veteen	Kalibrointiliuokset 1–8; 0,2–50 ppm Kontrollit, lämpötilaseuranta (HL & J) Maalinäytteet LOD/LOQ-näytteet
7	Saantokokeet, 4 kpl; 10 & 60 ppm lisäykset LOQ: 10x maalinäyte, vähän ana- lyyttiä	Kalibrointiliuokset, 5 pitoisuutta Kontrollit, lämpötilaseuranta (HL & J) Saantokokeet LOQ-näytteet
8	Saantokokeet, 4 kpl; 10 & 60 ppm lisäykset	Kontrollit, lämpötilaseuranta (HL & J) Saantokokeet
9		Kalibrointiliuokset, 5 pitoisuutta Kontrollit, lämpötilaseuranta (HL & J)
10		Kontrollit, lämpötilaseuranta (HL & J)
11	Maalinäytteitä 3 kpl x 2	Kontrollit, lämpötilaseuranta (HL & J) Maalinäytteet
12	Maalinäytteitä 3 kpl x 2	Kontrollit, lämpötilaseuranta (HL & J) Maalinäytteet

4.1 Selektiivisyys ja spesifisyys

Spesifisyyden ja selektiivisyyden mittauskokeiden avulla voidaan varmistua siitä, että menetelmällä mitataan sitä mitä luullaan mitattavan: mitattava signaali on siis peräisin ainoastaan tutkittavasta yhdisteestä. Kokeilla voidaan varmistaa myös se, etteivät muut näytteen komponentit häiritse määrittystä. Spesifinen menetelmä tuottaa signaalin tai vasteen vain yhdelle analyytille, kun taas selektiivinen menetelmä voi tuottaa vasteen useammallekin yhdisteelle erottaen kuitenkin tutkittavan analyytin muista vasteista. Spesifisyyteen ja selektiivisyyteen vaikuttavat käytetty analyysimenetelmä, analyysitekniikka sekä valittu näytteen käsittely. [29.]

4.2 Lineaarisuus, mittausalue ja herkkyys

Mittausalue määritellään sinä pitoisuusalueena, jolla menetelmää voidaan käyttää. Mittausalueen alkupäänä toimii rajoittavana tekijänä menetelmän määrittämisraja (LOQ) ja loppupäänä mittalaitteen kyky havainnoida analyytin pitoisuuden muutoksia (detektio-ominaisuudet). [31.] Mittausalueeksi valitaan yleensä standardiliuosten avulla määritelty lineaarinen alue, mutta se voi olla myös laajempi, mikäli hyväksyttävä tarkkuus ja täsmällisyys saavutetaan myös epälineaarilla osalla. Mittausalue voi myös sisältää useita lineaarisuusalueita, jolloin näytteiden pienille ja suurille pitoisuuksille käytetään eri kalibrointisuoria. [29.]

Lineaarisuuden tarkastelulla selvitetään se mittausalueen pitoisuusalue, jossa kalibrointisuora täyttää lineaarisuuden ehdot. Lineaarinen alue voidaan selvittää tekemällä useita mittauksia standardeille tai standardinlisäysnäytteille. Mittauksia tulisi suorittaa vähintään kuudella eri pitoisuudella rinnakkaisilla injektioilla. Mittausten perustella piirretään kuvaaja, jossa mitattu vaste esitetään konsentraation funktiona. Lineaarisuutta arvioidaan residuaalien tarkastelulla: jos kalibrointisuora on lineaarinen, residuaalit jakautuvat vuorotellen nollassa molemmien puolin. [29.]

Herkkyys tarkoittaa menetelmän kykyä havaita pieniä näytepitoisuuden vaihte-
luita. Kun pieni muutos näytteen pitoisuudessa aiheuttaa suuren muutoksen de-
tektorin vasteessa, voidaan menetelmää kutsua herkäksi. Herkkyys voidaan
määrittää kalibrointisuoran kulmakertoimen avulla; käytettäessä lineaarista ka-
librointia herkkyys on suoran kulmakerroin. [29.]

4.3 Toteamis- ja määritysrajat

Määritysraja (LOQ) tarkoittaa näytetaustaa vastaan mitatun analyytin pienintä
pitoisuustasoa, joka voidaan määrittää riittävällä tarkkuudella. Määritysraja ase-
tetaan niin, että saatavat tulokset ovat luotettavia ja toistettavia. Määritysraja
voidaan arvioida rinnakkaisnäytteiden keskihajontojen avulla tai signaali-kohi-
nasuhteen (10:1) avulla. [30.]

Toteamisraja (LOD) on pienin pitoisuus, jolla voidaan todeta luotettavasti, sisäl-
tääkö näyte tutkittavaa yhdistettä. Analyytille mitatun vasteen tai määritetyn pi-
toisuuden tulee olla toteamisrajalla niin suuri, että sen ei voida tulkita johtuvan
taustan aiheuttamasta kohinasta. Määritys perustuu taustan hajonnan tutkimi-
seen; se voidaan tehdä laskemalla keskiarvo ja keskihajonta sellaisen näytteen
rinnakkaismääritysten tuloksista, joka ei sisällä lainkaan määritettävää yhdis-
tettä tai se sisältää sitä hyvin vähän. Mitä useampi rinnakkaismääritys suoritetaan,
sitä luotettavampi arvio toteamisrajalle saadaan. Määritettävän näytteen ja
arvioinnissa käytetyn näytteen tulisi olla matriiseiltaan samanlaisia, ja mikäli
tämä ei ole mahdollista, voidaan testauksessa käyttää nollanäytettä. Nollanäyt-
teeseen voidaan lisätä pieni määrä analysoitavaa yhdistettä tapauksissa, joissa
pelkkä nollanäyte ei anna mittasignaalia. [29.] Tässä opinnäytetyössä LOD- ja
LOQ-arvot määritetään PPG Tikkurilan käytössä olevilla kaavoilla suoran leik-
kauspisteen ja virhetarkastelun avulla.

4.4 Tarkkuus

Tarkkuus jaetaan kahteen osaan: oikeellisuuteen ja toistotarkkuuteen eli täs-
mällisyyteen. Se ilmaistaan suhteellisena poikkeamana todellisesta tai

odotetusta arvosta. Tarkkuuteen vaikuttavat virheet jaetaan systemaattisiin virheisiin ja satunnaisvirheisiin, ja niiden summaa kuvaa kokonaisvirhe. Tulosten tarkkuus rinnastetaan yleensä kokonaisvirheeseen. [29.]

Oikeellisuus tarkoittaa mittaustulosten keskiarvon ja todellisen arvon välistä yhtäpitävyyttä. Oikeellisuutta voidaan tutkia varmennetun vertailumateriaalin avulla, takaisinsaantokokeilla, pätevyyskokeilla ja vertaamalla saatuja tuloksia toisella jo validoidulla ja yleisesti hyväksytyllä menetelmällä saatuihin tuloksiin. Täsmällisyydellä tarkoitetaan tulosten keskinäistä yhtäpitävyyttä, kun määrittystä toistetaan useita kertoja. Se määritellään rinnakkaismäärittäisiin liittyvänä hajontana, kun mittaukset suoritetaan lyhyellä aikavälillä samalla menetelmällä joko saman tai eri tekijän toimesta samalla tai eri mittauslaitteella samassa laboratoriossa. [31.]

4.5 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus tarkoittaa kvantitatiivista arviota niistä rajoista, joiden sisäpuolella mittaustuloksen oletetaan olevan tietyllä todennäköisyydellä. Mittausten mittausepävarmuuteen käytännön töissä vaikuttavat monet mahdolliset tekijät, kuten näytteenotto, matriisin aiheuttamat häiriöt, massan ja tilavuuden määrittämiseen liittyvät epävarmuudet sekä satunnaisvaihtelut. [29.] Mittausepävarmuutta voidaan arvioida esimerkiksi tässäkin työssä käytetyn Suomen ympäristökeskuksen (SYKE) luoman Mittausepävarmuusohjelmiston (Measurement Uncertainty Kit, MUKit) avulla. MUKit-ohjelmiston laskenta perustuu Nordtest TR 537 -raporttiin. Ohjelmiston avulla voidaan arvioida mittausepävarmuuksia hyödyntäen esimerkiksi kontrollinäytteiden tuloksia, rutiininäytteiden rinnakkaistuloksia, laboratorioiden välisiä vertailukoe/pätevyystuloksia sekä saantokokeiden tuloksia. Yleisesti laboratorioilla tavoitteena on <20–25 %:n mittausepävarmuus.

5 Laitteet ja reagenssit

Työssä käytettiin seuraavia laitteita:

- HPLC-DAD-laitteisto
 - Agilent 1260 Infinity II LC System & DAD WR
 - C18 esikoloni ja koloni, Phenomenex
- koeputkisekoittaja (Vortex), VWR Reax Top
- ultraäänihaude, FinnSonic GN 1/2 EN 631
- sentrifugi, Sartorius Sigma 3K30
- vakuumsuodatin, Millipore WP6122050.

Käytetyt reagenssit olivat

- yhdiste A, 98,0 %, Biosynth Carbosynth
- yhdiste B, 96,0 %, Sigma-Aldrich
- yhdistettä C sisältävä liuos, 50,20 %, Acros
- yhdistettä D sisältävä liuos, 1,10 %, Thor
- yhdiste E, 98,0 %, TCI
- metanoli (CH₃OH), 99,8 %, HPLC-laatu, J.T. Baker
- asetonitrili (CH₃CN), HPLC-laatu, J.T. Baker
- ortofosforihappo (H₃PO₄), 85 %, HPLC-laatu, Fluka.

Työssä käytetyt reagenssiliuokset olivat

- 0,1 p-% ortofosforihappo
- suolaliuos.

6 Kokeellinen osuus

Työn kokeellisessa osiossa tarkasteltiin laboratoriossa käytössä olevan kvantitatiivisen analyysimenetelmän soveltuvuutta yhdisteiden A ja B analysointia varten. Koska menetelmä on laboratoriossa yhdisteiden C, D ja E osalta aktiivisessa käytössä, voitiin validoinnin aikana hyödyntää muutamia valmiina löytyviä liuoksia. Näihin liuoksiin kuuluivat muun muassa yhdisteistä C, D ja E valmistetut kontrolliliuokset (liuokset CDE), joita käytettiin ajoissa varmistamaan tulosten luotettavuus piikkien retentioaikoja ja pitoisuuksia tarkkailemalla sekä suolaliuos, jota hyödynnettiin näytteenkäsittelyssä.

Työturvallisuus huomioitiin laboratoriotyöskentelyssä tutustumalla tarkasti työssä käytettävien yhdisteiden käyttöturvallisuustiedotteisiin sekä käyttämällä tarpeellista suojatunusta. Reagensseja, näytteitä sekä standardiliuoksia käsiteltiin aina vetokaapissa pukeutuen henkilökohtaisiin suojavaarusteisiin, joihin kuuluivat työtakki, suojalasit sekä nitrilikäsineet. Tuotteet varastoitettiin alkuperäispakkauksissaan huolellisesti suljettuna suojattuna suoralta auringonvalolta kuivassa, viileässä ja hyvin ilmastoidussa tilassa. Jätteet hävitettiin PPG Tikkurilan toimintatapojen mukaisesti ja käytetyt työvälineet puhdistettiin asianmukaisesti ennen niiden huuhtelua viemäreihin.

Alkuperäistä validointisuunnitelmaa karsittiin ja muokattiin tiukan aikataulun vuoksi. Muun muassa mittausepävarmuuden tarkastelussa hyödynnettäviä kontrolli- ja maalinäytteitä analysoitiin aiottua vähemmän. Toteutunut validointipäiväkirja on esitelty taulukossa 2.

Taulukko 2: Validointipäiväkirja.

Päivä	Valmistettu	Ajettu
05.11.	A-standardit, 9 kpl, 0,3–50 ppm B-standardit, 6 kpl, 1–20 ppm Lämpötilaseurantanäytteitä	
10.11.		A-standardit, 9 kpl, 0,3–50 ppm B-standardit, 6 kpl, 1–20 ppm Lämpötilaseurantanäytteitä
12.11.	A-standardit, 3 kpl, 2–15 ppm B-standardit, 6 kpl, 1–20ppm	
16.11.	3x rinnakkaiset näytteet maaleista A ja B	A-standardit, 5 kpl, 2–20ppm B-standardit, 6 kpl, 1–20 ppm Lämpötilaseurantanäytteitä Valmistetut maalinäytteet
17.11.	3x rinnakkaiset näytteet maaleista C, D ja E	Valmistetut maalinäytteet
23.11.	2x rinnakkaiset näytteet maaleista A, B, C, D ja E	Valmistetut maalinäytteet Lämpötilaseurantanäytteitä
24.11.	A-standardit, 9 kpl, pit. 0,3–50 ppm	A-standardit, 9 kpl, 0,3–50 ppm
25.11.		Lämpötilaseurantanäytteitä
29.11.	A-lisäykset maaleihin A, B, C ja D	Valmistetut maalinäytteet
30.11.	B-lisäykset maaleihin A, B, C ja D	Valmistetut maalinäytteet
03.12.	2x rinnakkaiset näytteet nolla- maalista F	Valmistetut maalinäytteet
7.12.	A-lisäykset nollamaaliin F	Valmistetut lisäysnäytteet
9.12.	B-lisäykset nollamaaliin F	Valmistetut lisäysnäytteet
13.12.		B-standardit, 4 kpl, 0,065–1 ppm
21.12.	2x rinnakkaiset näytteet maaleista A, C ja D A- ja B-lisäykset maaleihin A ja D	Valmistetut maalinäytteet Valmistetut lisäysnäytteet

Ennen työn varsinaista aloitusta yhdisteistä A ja B valmistettiin n. 10 ppm:n standardit, jotka ajettiin validoitavalla menetelmällä. Koska puhtaat yhdisteet A ja B olivat jauhemaisia, tehtiin niistä myös IR-spektrit FTIR-laitteiston avulla.

Validointi aloitettiin valmistamalla sekä yhdisteestä A että yhdisteestä B standardiliuossarjat (kalibrointiliuokset). Standardipitoisuusalueeksi määriteltiin validoinnin alussa noin 0,2–50 ppm. Liuossarjat valmistettiin ja ajettiin validoinnin aikana eri pitoisuusalueilla yhdisteelle A kolmesti ja yhdisteelle B kahdesti. Valmistetut standardit säilytettiin tummissa lasipulloissa pimeässä kaapissa huoneenlämmössä. Standardiliuossarjat valmistettiin ja ajettiin noin viikon päästä toisistaan.

Standardiliuossarjoista valittiin muutamia standardiliuoksia, joita valmistettiin hieman enemmän kuin muita standardeja. Kukin valittu standardi jaettiin kahden pulloon, joista toista säilytettiin huoneenlämmössä muiden standardien tapaan ja toista jääkaapissa noin +5 °C:ssa. Näiden standardiliuosten avulla tarkasteltiin, kuinka hyvin liuokset säilyvät ja onko niiden säilyvyydessä eroa riippuen säilytyslämpötilasta. Seurattavia näytteitä valittiin aluksi melko paljon, mutta seurannan edetessä niitä karsittiin niin, että seurantaan jäivät yhdisteestä A valmistetut standardit pitoisuusalueella 0,3–10 ppm.

Validoinnissa hyödynnettävät maalinäytteet valmistettiin maaleista, joiden teoreettinen B-pitoisuus tunnettiin (A, B, C, D, E sekä nollamaali F). Näytteistä punnittiin kaksi rinnakkaista näytettä käyttäen ohjeen mukaista näytemäärää ja desorptioliuotinta. Näytteitä ravisteltiin Vortex-sekoittajalla noin 30 sekunnin ajan niin, että maalia ei jäänyt koeputkien reunoille. Koeputkiin lisättiin tunnettu määrä suolaliuosta. Reagenssiliuokset käsiteltiin tilavuuksina, mutta ne punnittiin 0,1 mg:n tarkkuudella. Näytteitä sekoitettiin punnitusten jälkeen uudelleen noin 30 sekuntia. Näytteet vietiin ultraäänihauteeseen 10 minuutin ajaksi, jonka jälkeen ne sekoitettiin vielä kertaalleen noin 30 sekunnin ajan Vortex-sekoittajalla. Näytteitä sentrifugoitiin 45 minuuttia 24 500 rpm:n nopeudella 5 °C lämpötilassa. Näytteistä erottunut kirkas neste pipetoitiin ja suodatettiin HPLC-

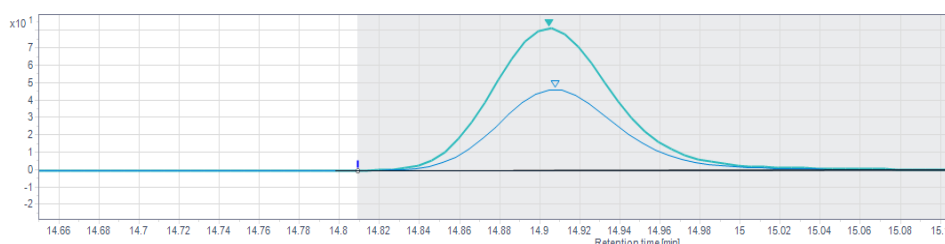
näytepulloihin vakuumsuodattimella käyttäen 0,45 µm:n hydrofiilisiä PTFE-suodattimia. Maalinäytteitä valmistettiin ja ajettiin viitenä päivänä.

Saantokokeiden näytteitä tehtiin aiemmin analysoituihin maaleihin (A, B, C ja D), joiden teoreettinen sekä validoitavalla analyysimenetelmällä mitattu A- tai B-pitoisuus tunnettiin. Maalinäytteisiin tehtiin lisäys sekä yhdisteellä A että yhdisteellä B. Maalia punnittiin muovipulloon isompi määrä kuin analyysiin tarvitaan ja sen päälle tehtiin A- tai B-lisäys. Näytteitä sekoitettiin Vortex-sekoittajalla noin 1,5 minuutin ajan kallistaen pulloja eri suuntiin. Näytteiden annettiin seistä noin puolen tunnin ajan, jonka jälkeen niitä sekoitettiin uudelleen Vortex-sekoittajalla näytteen homogeenisuuden varmistamiseksi. Jokaisesta lisäysnäytteestä valmistettiin normaalin näytteenkäsittelytavan mukaisesti kaksi rinnakkaisnäytettä, jotka ajettiin validoitavalla menetelmällä. Vahvempien lisäysnäytteiden kanssa samaan ajoon lisättiin myös yhdet injektiot lisäyksiin käytettyjä vahvoja A- ja B-standardeja (350 ja 500 ppm) liuosten pitoisuuksien ja näin ollen lisäysten varmistamiseksi.

Standardinlisäyssiuran näytteet valmistettiin maaliin F, joka ei sisältänyt lainkaan yhdistettä A tai B. Maalin puhtaus yhdisteiden suhteen varmistettiin ensin analysoimalla maali normaalinäytteen tapaisesti ja ajamalla näytteet validoitavalla metodilla. Kun maalin pitoisuus yhdisteiden A ja B suhteen saatiin varmistettua nolaksi, valmistettiin siitä standardinlisäyssiuran näytteet. Maalia punnittiin muovipulloihin ja näytteiden päälle tehtiin lisäys vahvalla A- tai B-standardilla. Yhdistettä A lisättiin maaleihin pitoisuusalueella 0,02–7 ppm ja yhdistettä B pitoisuusalueella 0,02–0,4 ppm. Ajoon lisättiin myös yhdet injektiot pelkkiä noin 100 ppm standardiliuoksia liuosten pitoisuuksien varmistamiseksi.

7 Tulokset

Yhdisteistä A ja B valmistettujen standardien (10 ppm) ajojen tulosten perusteella tarkasteltiin yhdisteiden kromatogrammeja, retentioaikoja sekä UV-spektrejä. Molempien yhdisteiden 10 ppm standardien kromatogrammit esitellään kuvassa 8. Hieman korkeampi piikki on yhdisteen A ja matalampi piikki yhdisteen B. Yhdisteiden retentioajat olivat samat, eikä kromatogrammien piikeissä ollut silmämääräisesti suuri eroja esimerkiksi leveyden tai resoluution suhteen.



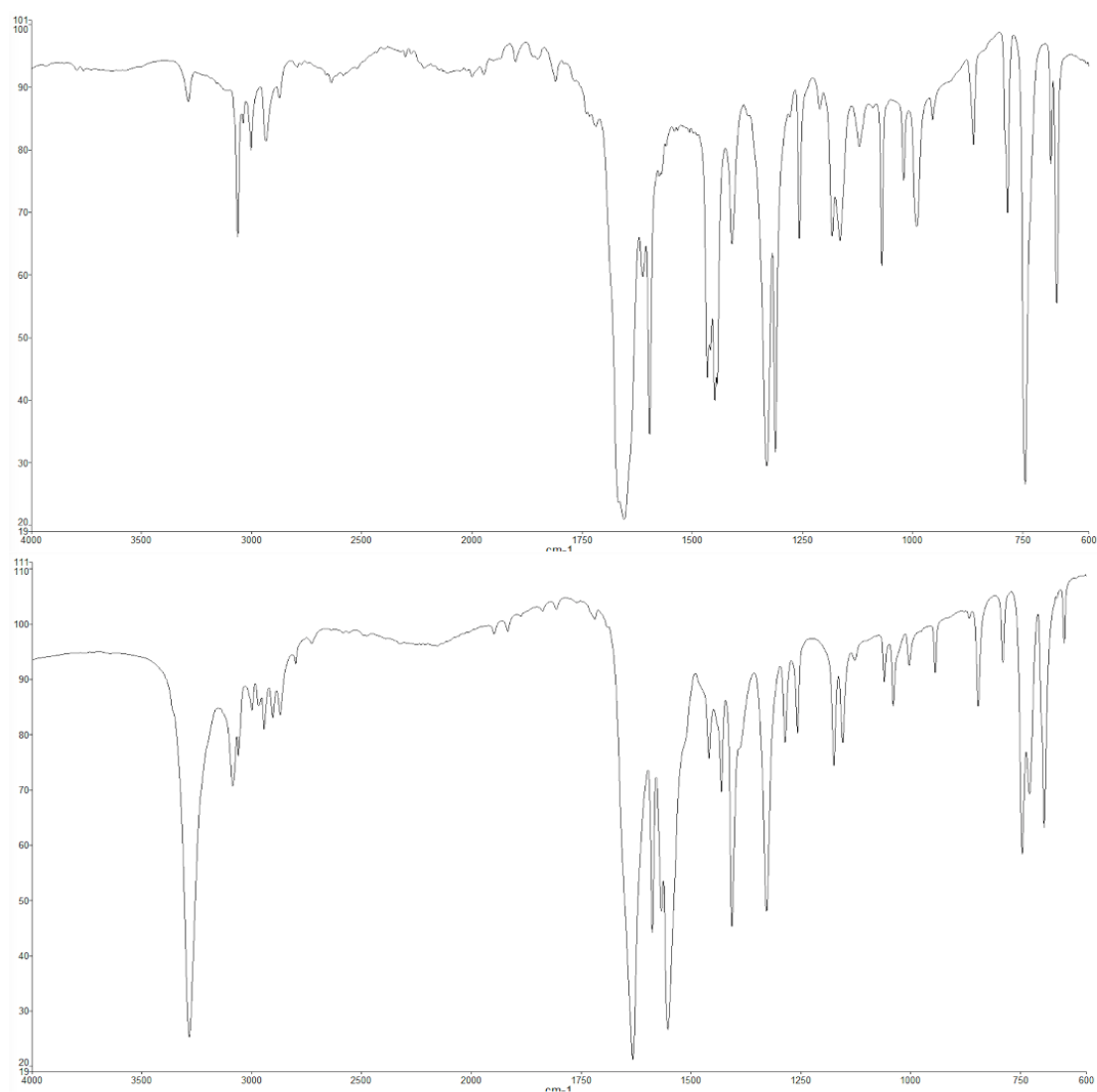
Kuva 8: Yhdisteiden A ja B piikit kromatogrammissa.

Yhdisteiden UV-spektrit olivat miltei identtiset (kuva 9). Ennen työn aloitusta olettamana oli, että yhdiste B ei muodostaisi piikkiä kromatogrammiin. Näin kuitenkin kävi, joten tulosten pohjalta päätettiin työssä tarkastella osittain myös yhdistettä B.



Kuva 9: Yhdisteiden A ja B UV-spektrit.

Kromatogrammien, retentioaikojen sekä UV-spektrien samankaltaisuuden perusteella päätettiin tarkastella myös yhdisteiden IR-spektrejä (kuva 10). Spektreissä on keskenään joitakin yhteisiä piikkejä, mutta kuten jo ennalta tiedettiin, ovat A ja B eri yhdisteet. Esimerkiksi funktionaalisten ryhmien alueella ($> 1500\text{ cm}^{-1}$) on havaittavissa selkeä ero amiini- ja/tai amidiryhmien (aaltoluku $3300\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$) välillä.



Kuva 10: Yhdisteen A (yläpuolella) ja yhdisteen B (alla) IR-spektrit.

Standardiliuoksia valmistettiin yhdisteelle A kolmena päivänä (5.11., 12.11. ja 24.11.) ja yhdisteelle B kahtena päivänä (5.11. ja 12.11.) Standardien valmistuspäivämäärät sekä mitatut pitoisuudet yhdisteelle A esitetään taulukossa 3.

Taulukko 3: Yhdisteestä A valmistetut standardiliuokset.

Valmistus	Pitoisuus (ppm)
5.11.	0,065
5.11.	0,123
24.11.	0,311
5.11.	0,314
5.11.	0,316
24.11.	0,512
5.11.	0,538
5.11.	0,926
24.11.	1,088
12.11.	1,260
24.11.	2,059
12.11.	2,172
12.11.	5,147
24.11.	5,198
5.11.	10,059
24.11.	10,284
24.11.	14,795
12.11.	14,929
24.11.	19,218
5.11.	19,512
5.11.	52,498
24.11.	54,110

Yhdisteen B valmistuspäivät sekä mitatut pitoisuudet ovat taulukossa 4.

Taulukko 4: Yhdisteestä B valmistetut standardiliuokset.

Valmistus	Pitoisuus (ppm)
5.11.	0,065
5.11.	0,129
5.11.	0,330
5.11.	0,620
5.11.	0,961
12.11.	1,125
5.11.	1,399
12.11.	2,234
12.11.	5,801
12.11.	10,132
12.11.	15,226
12.11.	20,426

Standardiliuossarja-ajojen tulokset ovat taulukoituna liitteissä 1 ja 2. Standardiliuossarjojen tulosten perusteella laadittiin kalibrointisuorat yhdisteelle A kaikille kolmelle ajopäivälle sekä eri päivien tuloksia yhdistellen pienille standardipitoisuuksille ja kaikille mitatuille standardimittaustuloksille. Yhdisteelle B tehtiin yksi kalibrointisuora, jonka pisteiksi valittiin kaikki 5.11. valmistetut standardit sekä 12.11. valmistetut 5–15 ppm standardit. Kalibrointikuvaajat tehtiin kalibrointiliuosten rinnakkaismääritysten keskiarvoista. Kaikki luodut kalibrointisuorat esitellään liitteessä 3. Validoitavan menetelmän tulostenkäsittelymetodin kalibrointisuoraksi määriteltiin HPLC-laitteistolla yhdisteellä A 24.11. ajetusta standardiliuossarjasta valmistettu suora. Yhdisteelle B luotiin oma metodinsa, jonka kalibrointisuoraksi asetettiin yhdisteen B suora mittausalueella 0,065–15 ppm.

Standardiliuossarjoista valittujen yhdisteen A lämpötilaseurantanäytteiden (HL, huoneenlämpö ja J, jääkaappi, noin +5 °C) ajotulokset ja metodin suoraa vasten lasketut pitoisuudet ovat taulukoituna liitteessä 4. Tulosten keskiarvot (AVG), keskihajonnat (SD) sekä suhteelliset keskihajonnat (RSD-%) esitellään taulukossa 5.

Taulukko 5: Lämpötilaseurantanäytteiden parametreja.

Yhdiste A, ppm	0,316	0,926	2,172	5,147	10,059
AVG, ppm (HL)	0,307	0,926	2,261	5,241	10,809
SD, ppm (HL)	0,005	0,008	0,017	0,034	0,396
RSD-% (HL)	1,5	0,8	0,8	0,7	3,7
AVG, ppm (J)	0,303	0,916	-	5,211	10,233
SD, ppm (J)	0,008	0,005	-	0,028	0,090
RSD-% (J)	2,6	0,5	-	0,5	0,9

Liuosten säilyvyydessä ei havaittu merkittäviä muutoksia 1,5 kuukauden aikana kummankaan lämpötilan suhteen. Korkein keskihajonta oli 0,316 ppm standardin jääkaapissa säilytetyn liuoksen mittaustuloksilla. Kaikkien liuosten suhteelliset keskihajonnat pysyivät 5 %:n sisällä (liite 4). Jääkaapissa säilytettyjen liuosten pitoisuudet olivat hieman matalammat huoneenlämmössä säilytettyjen liuosten pitoisuuksiin verrattuna.

Normaalimaalinäytteiden tulokset maaleista A, B, C, D ja E käsiteltiin sekä yhdisteen A avulla luodulla metodilla sekä yhdisteen B kalibroitisuoraa vasten. Ajojen tulokset esitellään liitteessä 5. Suorien avulla lasketut pitoisuuksien keskiarvot (AVG), keskihajonnat (SD), suhteelliset keskihajonnat (RSD-%) sekä prosentuaaliset osuudet teoreettisesta pitoisuudesta (%T) esitetään taulukossa 6.

Taulukko 6: Maalinäytteiden analysoitujen pitoisuuksien parametreja.

Teoreettinen B-pitoisuus, ppm	Maali	A-suora				B-suora			
		AVG, ppm	SD, ppm	RSD-%	%T	AVG, ppm	SD, ppm	RSD-%	%T
21	A	13,27	0,49	3,7	63	21,27	0,77	3,6	101
52	B	44,86	0,43	1,0	86	69,68	0,66	0,9	134
18	C	15,84	0,59	3,8	88	25,32	1,13	4,5	141
54	D	47,29	0,30	0,6	88	73,43	0,48	0,7	136
43	E	28,7	2,5	8,7	67	45,5	2,8	6,2	106
0	F	0,0	-	-	-	0,0	-	-	-

Taulukkoa tarkastelemalla voidaan todeta, että toistettavuus 1,5 kuukauden aikana kolme kertaa analysoiduille viidelle maalinäytteelle oli hyvä. Maalista E valmistettujen näytteiden suhteellinen keskihajonta oli suurin. Kun tuloksia peilataan B-suoraa vasten, nousevat maaleista B, C ja D valmistettujen näytteiden pitoisuudet noin 30–40 % yli niiden teoreettisesta eli maalin valmistuskaavan mukaisesta pitoisuudesta. Syy tähän saattaa olla esimerkiksi maalimatriisin vaihtelussa; maalin erilaisilla raaka-aineilla sekä pH:lla voi olla vaikutusta tutkittujen yhdisteiden käyttäytymiseen maalissa. Maaleissa käytettyjen raaka-aineiden ja siten maalin kaavan B-pitoisuus on raaka-ainetoimittajan ilmoittama, joten on myös mahdollista, että yhdistettä on raaka-aineissa todellisuudessa ilmoitettua enemmän.

7.1 Selektiivisyys ja spesifisyys

Selektiivisyyttä ja spesifisyyttä tarkastellaan menetelmän määräämällä UV-alueella. Menetelmä on spesifinen analyylille A tunnetulla aallonpituudella. Tarkastelussa verrataan kalibrointisuorien sekä standardinlisäyssuorien kulmakertoimia. Hyväksyttävä ero kulmakertoimissa on ± 5 %.

Liitteessä 3 esitettyjen kalibrointisuorien leikkauspisteet eli vakiotermit (a), kulmakertoimet (b), korrelaatiokertoimet (R) sekä selitysasteet (R^2) on kirjattu

taulukoon 7. Taulukon lihavoidut suorat ovat metodien luomiseen käytetyt kalibrointisuorat.

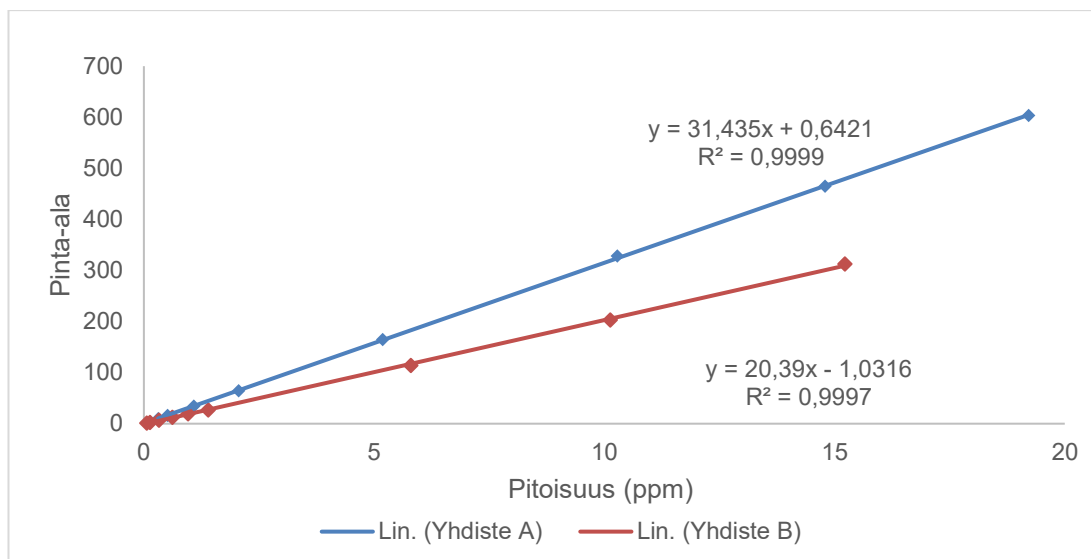
Taulukko 7: Kalibrointisuorien parametreja.

Maali	Päivämäärä	Pitoisuusalue, ppm	a	b	R	R ²
A	10.11.	0,065–0,9	0,16	31,82	0,99992	0,99983
A	10.11.	0,065–52	1,17	31,94	0,99999	0,99998
A	16.11.	2,1–19,5	5,59	31,80	0,99966	0,99932
A	24.11.	0,3–54	0,48	31,41	0,99998	0,99997
A	10.–24.11.	0,065–54	1,46	31,76	0,99989	0,99979
A	10.–24.11.	0,065–100	3,05	31,54	0,99991	0,99983
A	10.–24.11.	0,065–1	0,24	31,42	0,99984	0,99968
B	10.–16.11.	0,065–1,4	0,27	19,02	0,99956	0,99911
B	10.–16.11.	0,065–15	-1,03	20,39	0,99983	0,99966
B	3.12.	0,065–0,96	0,25	19,99	0,99839	0,99678

Standardisuorien kulmakertoimien suhde lasketaan kaikkien yhdisteistä A valmistettujen suorien kulmakertoimien keskiarvoista sekä yhdisteen B koko mitausalueen suorasta.

$$100 * \frac{20,39}{\frac{1,82+31,94+31,80+31,41+31,76+31,54+31,42}{7}} = 64,4 \%$$

Yhdisteiden A ja B standardisuorien kulmakertoimien suhde on 64,4 %, eli noin 60–65 % yhdisteestä B on analysoitavissa yhdisteenä A. Standardisuorien suhdetta havainnollistetaan kuvassa 11: tarkasteluun valitaan tulostenkäsittelymenetodien luomiseen käytetyt suorat. Yhdisteen A suoran tarkastelusta jätetään pois pitoisuuden 54 ppm piste, jotta yhdisteiden suorat ovat samalla pitoisuusalueella.



Kuva 11: Yhdisteiden A ja B standardisuorien vertailu.

Nollamaaliin F valmistetut standardinlisäyssiäsuorien näytteet sijoituivat yhdisteen A osalta pitoisuusalueelle 0,02–7 ppm ja yhdisteen B osalta alueelle 0,02–0,4 ppm. Suorien vakiotermit (a), kulmakertoimet (b), korrelaatiokertoimet (R) sekä selitysasteet (R^2) esitellään taulukossa 8. Tarkemmat tulokset ovat koottuna liitteessä 7.

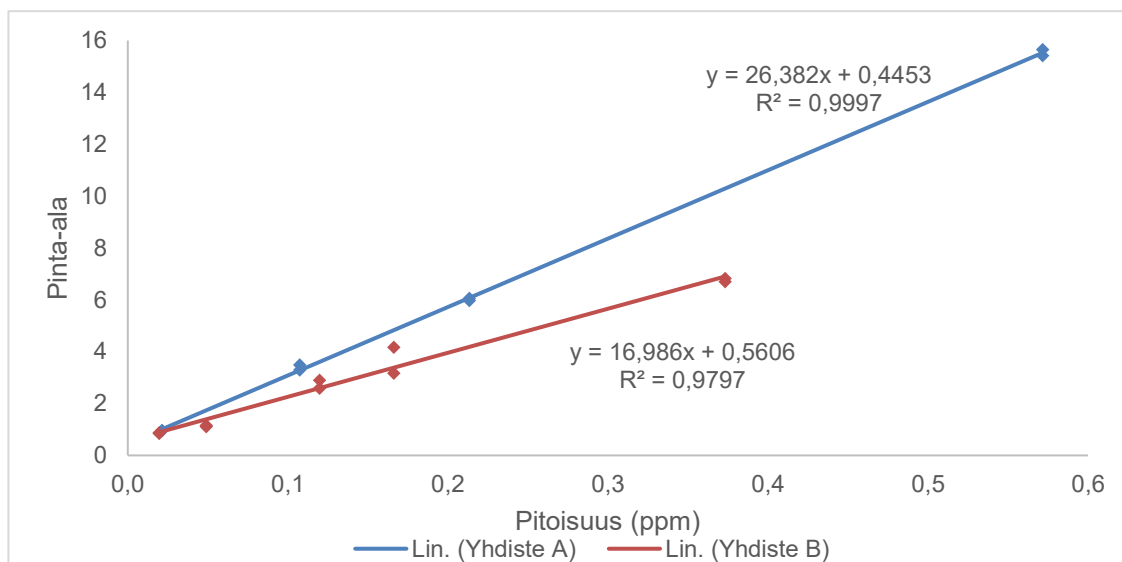
Taulukko 8: Standardinlisäyssiäsuorien parametreja.

Yhdiste	Päivämäärä	Pitoisuusalue, ppm	a	b	R	R^2
A	3.12.	0,02–6,9	-0,29	30,27	0,99787	0,99575
A	3.12.	0,02–0,57	0,45	26,38	0,99983	0,99966
B	9.12.	0,02–0,4	0,56	16,99	0,98980	0,97970

Standardinlisäyssiäsuorien kulmakertoimien suhde lasketaan yhdisteen A 0,02–0,57 ppm pitoisuusalueen suorasta ja yhdisteen B koko pitoisuusalueen suorasta.

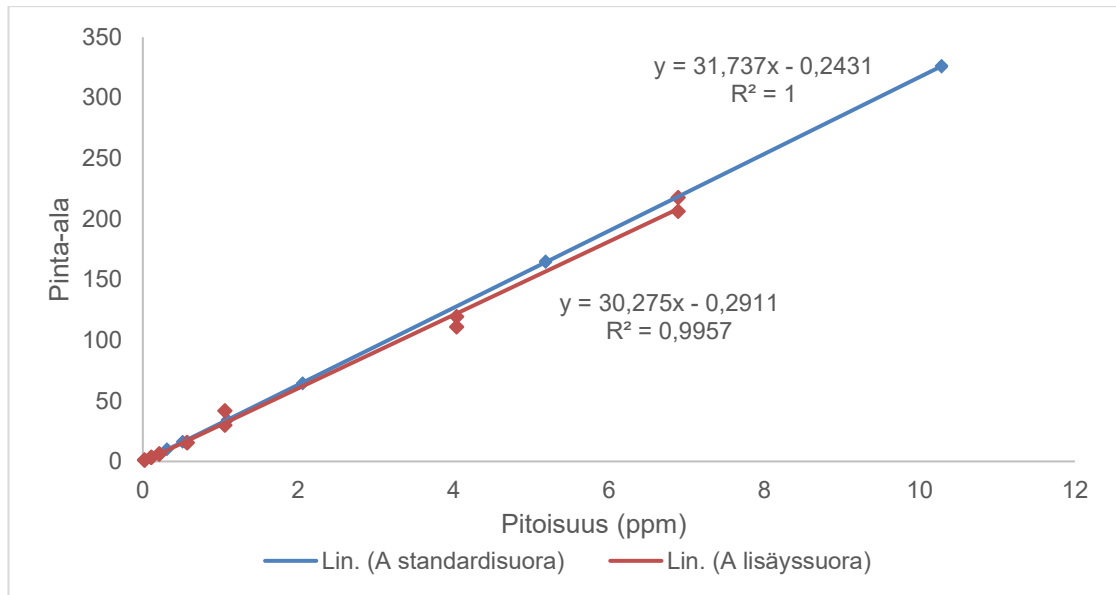
$$100 * \frac{16,99}{26,38} = 64,4 \%$$

Yhdisteiden A ja B standardinlisäyssiurien kulmakertoimien suhde on 64,4 %. Suhde on sama kuin yhdisteiden A ja B standardisuorien suhde. Suorien suhdetta havainnollistetaan kuvan 12 tarkastelussa, johon valitaan kaikki yhdisteen B pisteet sekä yhdisteen A pisteet pitoisuusalueelta 0,02–0,57 ppm.



Kuva 12: Yhdisteiden A ja B standardinlisäyssiurat.

Yhdisteen A standardisuoraa (metodin suora) sekä standardinlisäyssiurtaa vertaillaan kuvassa 13. Jotta suorat ovat samalla pitoisuusalueella, jätetään standardisuoran loppupään pisteitä tarkastelun ulkopuolelle ja suoraa tarkastellaan pitoisuusalueella 0,3–10 ppm. Standardinlisäyssiurtaa tarkastellaan koko sen pitoisuusalueella 0,02–7 ppm.



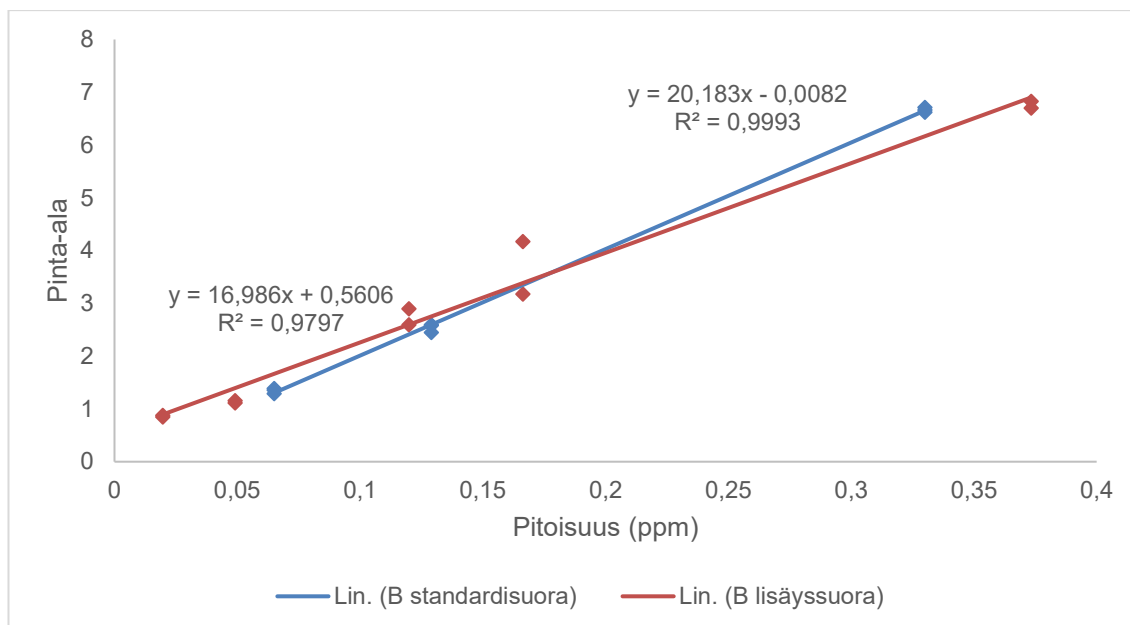
Kuva 13: Yhdisteen A standardisuora sekä standardinlisäyssi.

Standardisuoran ja standardinlisäyssi suoran kulmakertoimien ero lasketaan standardinlisäyssi suoran kulmakertoimen sekä standardisuorien kulmakertoimien keskiarvon avulla.

$$100 - 100 * \frac{30,27}{31,67} = 4,4 \%$$

Suorien välinen ero on 4,4 %. Ero on hyväksyttävän rajan ($\pm 5 \%$) sisällä eli standardinlisäyssi suora on onnistunut ja menetelmän on yhdisteen A osalta selektiivinen.

Yhdisteen B standardisuoran ja standardinlisäyssi suoran vertailu esitetään kuvassa 14. Jotta suorat ovat samalla pitoisuusalueella, jätetään standardisuoran loppupään pisteitä tarkastelun ulkopuolelle ja suoraa tarkastellaan pitoisuusalueella 0,065–0,6 ppm. Standardinlisäyssi suoraa tarkastellaan koko sen pitoisuusalueella 0,02–0,4 ppm.



Kuva 14: Yhdisteen B standardisuora sekä standardinlisäysuora.

Standardisuoran ja standardinlisäysuoran kulmakertoimien ero lasketaan standardinlisäysuoran kulmakertoimen sekä standardisuoran kulmakertoimen avulla.

$$100 - 100 * \frac{16,99}{20,39} = 16,7 \%$$

Suorien välinen ero 16,7 % on reilusti yli asetetun rajan ± 5 %. Standardinlisäysuora ei ole onnistunut. Huonoon tulokseen voi vaikuttaa se, että molempien yhdisteiden standardinlisäysuorien pitoisuusalueet ovat laskuvirheen takia huomattavasti aiottua pienemmät, ja etenkin yhdisteen B koko standardinlisäysuora on hyvin pienellä pitoisuusalueella. Vertailu olisi syytä tehdä uudelleen, jotta sen perusteella voitaisiin tehdä tarvittavat päätelmät.

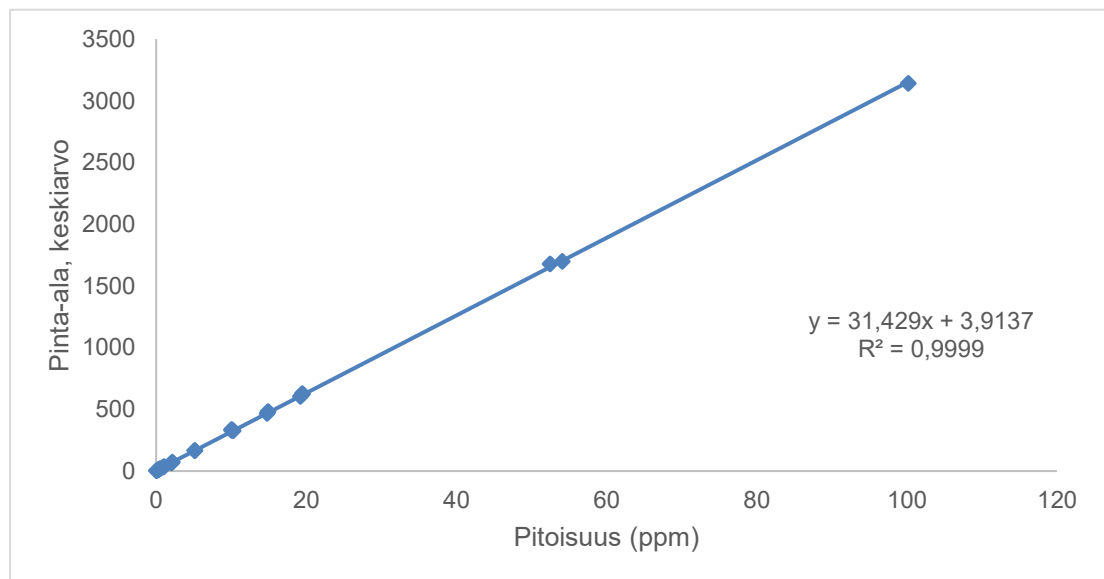
7.2 Lineaarisuus, mittausalue ja herkkyys

Suuntaa antavaksi standardipitoisuusalueeksi määriteltiin validoinnin alussa 0,2–50 ppm. Kalibrintiliuoksia valmistettiin pitoisuusalueelle 0,065–54 ppm. Tarkasteluun otetaan mukaan lisäksi lisäsnäytteiden ajossa injektoitu

välilaimennos pitoisuudella 100,2 ppm. Lineaarisuutta tarkastellaan suorien korrelaatiokertoimien sekä kalibrointikuvaajien residuaalitarkastelun avulla koko mittausalueelta sekä pienemmillä pitoisuuksilla. Residuaalikuvaajien pisteet määriteltiin kalibrointiliuosten rinnakkaismääritysten keskiarvoista. Standardiliuossarja-ajojen tulosten perusteella saadut piikkien pinta-alat, niiden keskiarvot sekä niistä lasketut pitoisuudet ovat taulukoituna liitteissä 1 ja 2.

Kalibrointiliuosten pistejoukkoa mahdollisimman hyvin kuvaavan käyrän yhtälö ja sovituksen hyvyttä kuvaava selitysaste R^2 lasketaan regressioanalyysillä Excelin avulla. Selitysasteesta R^2 saadaan korrelaatiokerroin R ottamalla siitä neliöjuuri. Korrelaatiokertoimelle asetetun tavoitteen mukaisesti sen on oltava $>0,996$.

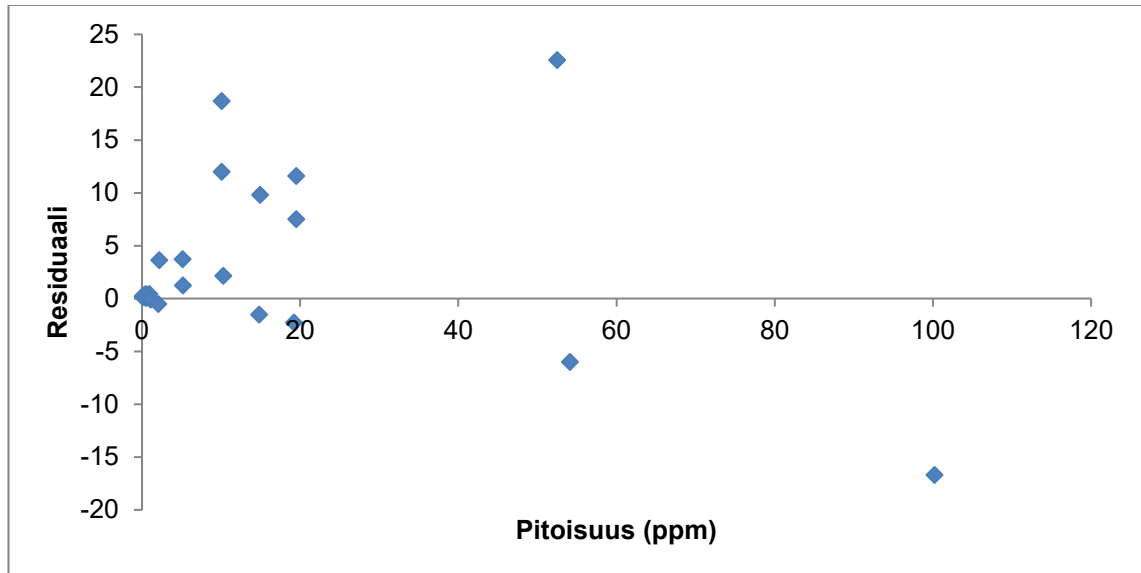
Yhdisteen A koko mittausalueelta 0,065–100 ppm laadittu suora esitellään kuvassa 15 ja residuaalitarkastelu kuvassa 16.



Kuva 15: Yhdisteen A kalibrointisuora koko mittausalueella 0,065–100 ppm.

Yllä olevaa suoraa laadittaessa on yhdistelty kaikki validoinnin aikana mitatut yhdisteen A standardiliuokset ja niiden tulokset. Suoran pisteet ovat siis peräisin kolmelta eri päivältä ja ne keskittyvät mittausalueen alkupäähän. Vaikka

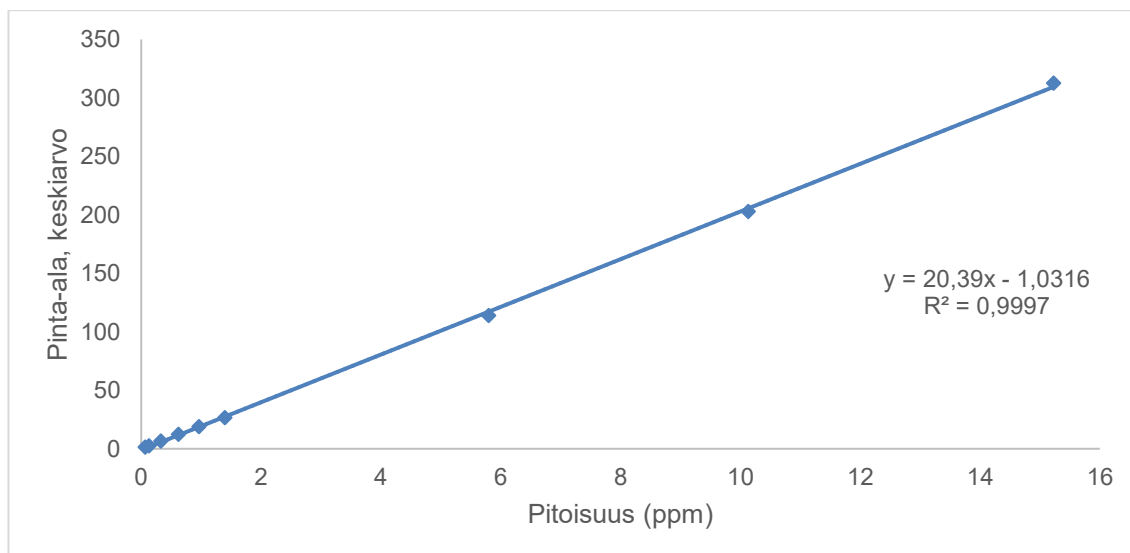
suoraan lisättiin kaukana alkuperäisestä mittausalueesta oleva 100,2 ppm piste, pysyi suoran korrelaatiokerroin ja siten myös selitysaste hyvänä ($>0,999$). Mittausalue on selitysasteen tarkastelun perusteella lineaarinen pitoisuusalueella 0,065–100 ppm.



Kuva 16: Yhdisteen A residuaalitarkastelu pitoisuusalueella 2–100 ppm.

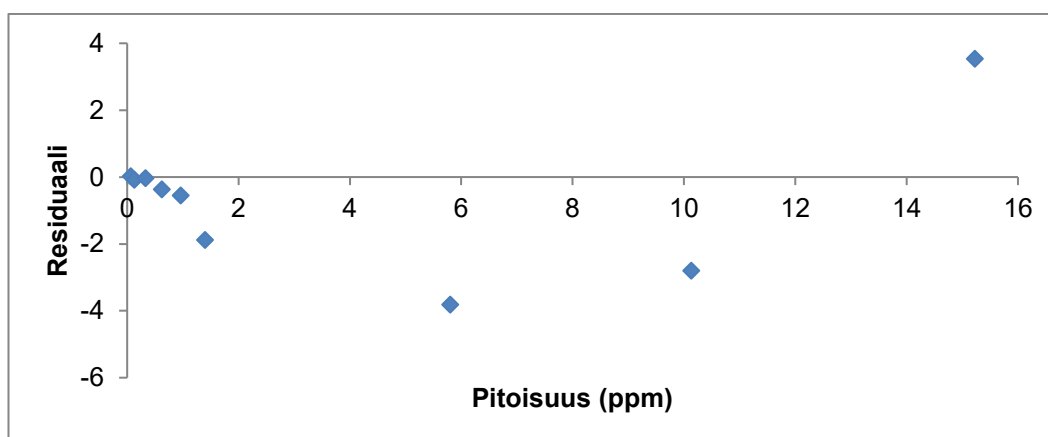
Residuaalitarkastelu tehdään menetelmän koko mittausalueelta 0,065–100 ppm. Residuaalit sijoittuvat molemmiin puolin nollassa muodostamatta selkeitä trendejä. Menetelmä on residuaalitarkastelun mukaan lineaarinen mittausalueella 0,065–100 ppm.

Yhdisteen B koko mittausalueelta 0,065–15 ppm laadittu suora esitellään kuvassa 17 ja residuaalitarkastelu kuvassa 18.



Kuva 17: Yhdisteen B kalibrintisuora koko mittausalueella 0,065–15 ppm.

Suoran korrelaatiokerroin ja selitysaste täyttävät lineaarisuuden ehdon ($R > 0,996$). Mittausalue on selitysasteen tarkastelun perusteella lineaarinen pitoisuusalueella 0,065–15 ppm.



Kuva 18: Yhdisteen B residuaalitarkastelu pitoisuusalueella 1–15 ppm.

Residuaalitarkastelu tehdään koko pitoisuusalueelta 0,065–15 ppm. Residuaalit sijoittuvat enimmäkseen nollassa alapuolelle. Havaittavissa on mahdollinen trendi, jossa < 5 ppm residuaalit pienenevät ja > 5 ppm residuaalit kasvavat. Mittausalueen ei voida todeta olevan residuaalitarkastelun perusteella varmasti lineaarinen.

Menetelmän herkkyys määritetään kalibrintisuoran kulmakertoimen avulla; käytettäessä lineaarista kalibrintia herkkyys on suoran kulmakerroin. Validoitavan metodin herkkyys on kalibrintisuoran kulmakertoimen mukaisesti 31,4 vaste/ppm.

7.3 Toteamis- ja määritysraja

Toteamis- ja määritysrajat selvitetään yhdisteelle A 0,065–1,088 ppm pitoisuusalueen standardiliuosarjan suoran avulla ja vastaavasti yhdisteelle B 0,065–1,399 ppm standardien avulla. Toteamisraja suoralla lasketaan PPG Tikkurilan menettelyohjeen kaavalla 1.

$$LOD = a + 3S_{y/x} \quad (1)$$

jossa

$a = 0,2441$ (suoran leikkauspiste)

$S_{y/x} = 0,004$ (suoran virhetarkastelu).

Määritysraja suoralla voidaan laskea PPG Tikkurilan menettelyohjeen kaavalla 2.

$$LOQ = a + 10S_{y/x} \quad (2)$$

jossa

$a = 0,0709$ (suoran leikkauspiste)

$S_{y/x} = 0,106$ (suoran virhetarkastelu).

Huomioimalla tyypillinen näytteenkäsittelytapa voidaan laskea LOD- ja LOQ-arvot maalissa kertomalla suoralla saatu LOD- tai LOQ-arvo näytteen kokonaismassalla ja jakamalla tulos näytemäärällä. Yhdisteiden A ja B LOD- ja LOQ-arvot suoralla sekä maalissa/näytteessä on kirjattu taulukkoon 9.

Taulukko 9: Yhdisteiden LOD- ja LOQ-arvot.

Yhdiste	Suoralla		Näytteessä	
	LOD, ppm	LOQ, ppm	LOD, ppm	LOQ, ppm
A	0,8	2,1	6,5	16,9
B	0,4	1,1	3,2	8,9

7.4 Tarkkuus

Menetelmän tarkkuutta tarkastellaan injektion toistettavuuden ja saantokokeiden avulla. Injektion toistettavuutta tarkastellaan kolmella eri pitoisuustasolla kolmen eri päivän lämpötilaseurantänäytteiden tuloksia hyödyntäen (taulukko 10). Tulosten suhteelliselle keskihajonnalle asetetaan raja $RSD \leq 1 \%$.

Taulukko 10: Huoneenlämmössä (HL) säilytettyjen lämpötilaseurantanäytteiden (yhdiste A) tuloksia.

A-standardi (ppm, HL)	Rinnakkaiset injektiot	Pinta-ala	AVG, pinta-ala	SD, pinta-ala	RSD-%
0,316	1	10,33	10,32	0,03	0,28
	2	10,29			
	3	10,347			
	1	10,255	10,22	0,05	0,49
	2	10,184			
	1	10,129	10,03	0,14	1,42
	2	9,928			
0,926	1	29,527	29,58	0,05	0,17
	2	29,626			
	3	29,596			
	1	29,537	29,60	0,09	0,31
	2	29,667			
	1	29,911	29,93	0,03	0,09
	2	29,949			
10,059	1	326,526	326,52	0,13	0,04
	2	326,65			
	3	326,381			
	1	335,556	335,61	0,09	0,03
	2	335,554			
	3	335,717			
	1	350,793	351,05	0,36	0,10
	2	351,304			

Yhden mitatun injektioparin suhteellinen keskihajonta on tarkastelun perusteella suurempi kuin asetettu vaatimus $RSD \leq 1 \%$. Kyseessä on standardista 0,316 ppm 25.11. ajettu injektiopari. Tuloksista voidaan havaita, että suhteelliset keskihajonnat pienenevät mitattavan standardin pitoisuuden kasvaessa. Tarkastelun perusteella injektion toistettavuuden voidaan todeta olevan riittävä.

Saantoprosentteja tarkastellaan saantokokeiden tulosten avulla. Hyväksi saannoksi luetaan välille 80–120 asettuva saantoprosentti. Tulosten suhteellisen keskihajonnan rajaksi asetetaan 5 %. Saantokokeiden tulokset esitellään tarkemmin liitteessä 6. Alla olevaan taulukkoon 11 on kirjattu lisäysnäytteen laskeutu teoreettinen pitoisuus, mittauksista saadut pitoisuuksien rinnakkaistulokset, saantoprosentit, saantoprosenttien keskiarvot (AVG-%), keskihajonnat sekä suhteelliset keskihajonnat. Taulukkoon 12 on kirjattu B-yhdisteen lisäysnäytteiden vastaavat parametrit.

Taulukko 11: Yhdisteen A lisäsnäytteet.

Maali	Teoreettinen pitoisuus, ppm	Pitoisuus suoralta, ppm	Saanto-%	AVG-%	SD-%	RSD-%
A	14,1	15,08	107	107	0,30	0,28
		15,14	107			
A	13,6	14,68	108	108	0,16	0,14
		14,71	108			
B	45,7	45,00	98	99	0,09	0,09
		45,06	99			
B	45,2	43,79	97	97	0,11	0,11
		43,86	97			
C	16,6	16,29	98	98	0,00	0,00
		16,29	98			
C	16,2	16,12	100	97	3,49	3,60
		15,32	95			
D	48,1	47,15	98	98	0,13	0,14
		47,06	98			
D	47,7	47,05	99	99	0,09	0,09
		46,99	99			
A	24,7	24,42	99	99	0,40	0,41
		24,28	98			
C	22,7	24,23	107	108	1,28	1,19
		24,64	109			
C	33,5	34,51	103	102	1,41	1,39
		33,84	101			

Saantoprosentit vaihtelevat välillä 97–108 %, ja suhteelliset keskihajonnat pysyvät kaikilla näytteillä alle kahden prosentin.

Taulukko 12: Yhdisteen B lisäsnäytteet.

Maali	Teoreettinen pitoisuus, ppm	Pitoisuus suoralta, ppm	Saanto-%	AVG-%	SD-%	RSD-%
A	22,2	25,2	114	113	0,76	0,68
		24,96	112			
A	21,6	23,69	110	109	0,26	0,24
		23,61	109			
B	70,7	72,82	103	103	0,04	0,04
		72,86	103			
B	70,1	71,72	102	102	0,07	0,07
		71,65	102			
C	26,3	27,62	105	105	0,32	0,31
		27,5	105			
C	25,7	27,03	105	105	0,63	0,60
		26,8	104			
D	74,4	75,62	102	102	0,15	0,15
		75,78	102			
D	73,8	75,62	102	103	0,35	0,35
		75,99	103			
A	30,0	31,05	104	103	0,57	0,55
		30,81	103			
C	33,9	33,4	99	98	0,69	0,70
		33,07	98			
C	48,3	50,83	105	108	3,40	3,16
		53,15	110			

Saantoprosentit vaihtelevat välillä 98–113 %. Näytteiden suhteellinen keskiarvo pysyy alle asetetun 5 %:n rajan. Molempien yhdisteiden saantoprosentit ja

suhteelliset keskihajonnat olivat hyviä ja niiden perusteella voidaan todeta, että menetelmän tarkkuus on hyvä.

7.5 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuutta tarkastellaan standardiliuosten sekä maalinäytteiden rinnakkaisten mittaustulosten avulla käyttäen Suomen Ympäristökeskuksen (SYKE) luomaa Mittausepävarmuusohjelmistoa (MUKit). Validoinnissa tavoitteena on alle 20–25 %:n mittausepävarmuus.

Mittausepävarmuuden tarkasteluun valittiin sekä yhdisteen A että yhdisteen B kalibrointisuoraa vasten lasketut maalinäytteiden mittaustulokset. Mittausalueen alarajaksi määriteltiin määrittäjärajaksi mukaan 2 ppm ja ylärajaksi metodin suoran suurin piste 54 ppm. Kontrollinäytteeksi valittiin yhdisteestä A valmistettu 10,059 ppm standardi. Laboratorion sisäistä uusittavuutta tarkasteltiin yhdisteen A saantokokeiden saantoprosenttien avulla.

MUKit-ohjelman luoma mittausepävarmuusraportti esitellään liitteessä 8. Menetelmän laajennetuksi mittausepävarmuudeksi 95 %:n luottamustasolla saatiin 12 %.

8 Johtopäätökset

Menetelmän validoinnin voidaan todeta onnistuneen yhdisteen A analysointia varten, mutta validointi ei ole tällaisenaan riittävä toteamaan menetelmän sopivuutta yhdisteen B analysoimiseksi yhdisteenä A. Analyysin tarkoituksenmukainen menettely on siis vielä testattava. Menetelmänkehitys suoritettiin rajatulla aikavälillä, jonka aikana laitteistoa käytettiin myös muihin analyyseihin. Validoinnin laajuutta supistettiin reilusti, eikä esimerkiksi mittausepävarmuuden tarkastelussa hyödynnettäviä kontrolli- ja maalinäytteitä voitu analysoida suunnitelman mukaisesti miltei jokaisella ajolla. Laskuvirheet vaikuttivat yhdisteen B standardinlisäyssiin sekä saantokokeisiin, joiden A- ja B-lisäykset jäivät suunniteltua pienemmiksi. Yhdistettä B ehdittiin tutkia validoinnin aikana huomattavasti vähemmän kuin yhdistettä A.

Validoinnin aikana selvitettiin, että yhdisteen B pitoisuudesta vain osa on nähtävissä yhdisteenä A. Yhdisteiden standardisuurien kulmakertoimissa on selkeä ero, jonka perusteella pääteltiin, että noin 60–65 % yhdisteestä B on analysoitavissa yhdisteenä A. Päätelmää tukee myös standardinlisäyssiin tismalleen sama kulmakertoimien suhde. Yhdisteiden molekyyliarakenteiden tarkastelun perusteella yhdestä B-molekyylistä syntyy hydrolyysissä 2 A-molekyyliä tuntemattoman ajan funktiona. Saantotestit osoittivat, että molemmat yhdisteet uuttuvat hyvin maalimatriisista. Maalin raaka-aineen B-pitoisuuden analysoimiseksi saataisi siten riittää yhdisteen B analysointi sellaisenaan. Maalimatriisi voi vaikuttaa yhdisteen B käyttäytymiseen eri tavalla liuokseen tehtyihin kalibrointistandardeihin verrattuna.

Lähteet

- 1 Sauer, Frank. 2017. Microbicides in Coatings. Hannover, Germany: Vincentz Network.
- 2 In-can biosidit. 2010. Yrityksen sisäinen dokumentti. Tikkurila Oyj.
- 3 Meriläinen, Roope. 2019. PCB-yhdisteiden käyttö maaleissa Suomessa. Insinööriyö. Metropolia Ammattikorkeakoulu. Theseus-tietokanta.
- 4 Mistä maalipurkin sisältö koostuu? 2013. Yrityksen sisäinen dokumentti. Tikkurila Oyj.
- 5 Puuproffa. 2018. Maalituotteet. Verkkoaineisto. <http://www.puuproffa.fi/Puu-Proffa_2012/7/pintakasittely/maalituotteet>. Luettu 12.10.2021.
- 6 Tikkurila Group. Raaka-aineet. Verkkoaineisto. <<https://www.tikkurila-group.com/fi/vastuullisuuskestavat-ratkaisut/raaka-aineet>>. Luettu 12.10.2021.
- 7 Holger, Alén. 1999. Maalit ja niiden käyttö. 2. uudistettu painos. Helsinki: Opetushallitus.
- 8 Teräsrakennusyhdistys. Korroosionestomaalit. Verkkoaineisto. <https://www.terasrakennusyhdistys.fi/document/1/155/aeca931/try_korroosionestomaalit.pdf>. Päivitetty 17.4.2015. Luettu 13.10.2021.
- 9 Vesiohenteiset sideaineet. 2015. Yrityksen sisäinen dokumentti. Tikkurila Oyj.
- 10 Huldén, Margareta. 1994. Water-Soluble Polymers and Surfactants in Latex Paints. Doctoral Thesis. Åbo Akademi. Åbo: Tema-Team Oy.
- 11 Turner, G.P.A. 1988. Introduction to Paint Chemistry and Principles of Paint Technology. 3. painos. US, New York: Chapman and Hall Ltd.
- 12 Yleistä maaleista. 2021. Yrityksen sisäinen dokumentti. Tikkurila Oyj.
- 13 Puustinen, Teemu. 2015. Vaahtoamisen estäminen vesiohenteisissa sisäseinämaaleissa. Diplomityö. Lappeenrannan teknillinen yliopisto. LUTpub-tietokanta.

- 14 Jokinen, Isto. Maalikemiaa. Verkkoaineisto. <<http://pintaweb.net/Kalvonmuodostus.pdf>>. Luettu 5.11.2021.
- 15 Biosidivalmisteryhmät. Verkkoaineisto. European Chemicals Agency. <<https://echa.europa.eu/fi/regulations/biocidal-products-regulation/product-types>>. Luettu 5.11.2021.
- 16 Maalituotteiden turvallisuus ympäristön ja käyttäjän näkökulmasta. 2013. Yrityksen sisäinen dokumentti. Tikkurila Oyj.
- 17 Biosidit. Verkkoaineisto. Turvallisuus- ja kemikaalivirasto. <<https://tukes.fi/kemikaalit/biosidit>>. Luettu 5.11.2021.
- 18 Hänninen, Hanna; Karppinen, Maarit; Leskelä, Markku & Pohjakallio, Maija. 2018. Tekniikan kemia. 14., uudistettu painos. Keuruu: Edita.
- 19 Lehtonen, Pekka & Sihvonen, Marja-Liisa. 2009. Laboratorioalan analyttinen kemia. 2. painos. Helsinki: Opetushallitus.
- 20 Jaarinen, S. ja Niiranen, J. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. 5., uudistettu painos. Helsinki: Edita.
- 21 Clark, Jim. 2007. High Performance Liquid Chromatography - HPLC. Verkkoaineisto. Chemguide.co.uk. <<https://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html>>. Muokattu kesäkuu 2016. Luettu 24.11.2021.
- 22 Harris, Daniel C. 2016. Quantative Chemical Analysis. Ninth edition. New York: W.H. Freeman and Company.
- 23 Aksela Maija-Katariina, Laitelainen Tarja, Mäkelä Marja-Leena. ja Virkkala Touko. 1996. Mikrokemiallinen laboratorio. Helsinki: Opetushallitus.
- 24 Riekkola, Marja-Liisa ja Hyötyläinen, Tuulia. 2002. Kolonnikromatografia ja kapillaarielektro- migraatiotekniikat. 2. painos. Helsinki: Yliopistopaino.
- 25 HPLC System Components. Verkkoaineisto. Galak Chromatography. <<https://galaklc.com/hplc-system-components/>>. Luettu 24.11.2021.
- 26 Poppe, H. 1992. Column liquid chromatography. Teoksessa Chromatography Part A: Fundamentals and Techniques. 5. painos. Amsterdam: Elsevier.
- 27 Braithwaite, A. & Smith, F. 1996. Chromatographic methods. 5. painos. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers

- 28 Dong, M. W. & Wysocki, J. 2019. Ultraviolet Detectors: Perspectives, Principles, and Practices. Teoksessa LCGC North America, Volume 37, Issue 10, s. 750–759. Saatavilla osoitteessa <<https://www.chromatographyonline.com/view/ultraviolet-detectors-perspectives-principles-and-practices>>.
- 29 Ruismäki, Mia ja Pyysalo, Pirkko. 2007. Analyysimenetelmän validointi. Menettelyohje. Metropolia Ammattikorkeakoulu.
- 30 Moldenhauer, Jeanne. 2003. Laboratory Validation: A Practitioner's Guide. United States: PDA.
- 31 Ruismäki, Mia. 2020. Analyysimenetelmän validointi. Luentomoniste. Metropolia Ammattikorkeakoulu.

Liite 1. Yhdisteen A standardiliuossarjojen tulokset

Valmistus	Ajo	A-pitoisuus, ppm	Area	ppm/Area	A-Pitoisuus, ppm (suoralta)	Tarkkuus, %	AVG, Area	SD, Area	3*SD	3*SD/Area	ppm/AVG, Area	ppm/AVG, Area*100	%AVG:sta
5.11.2021	10.11.2021	0,065	2,225	0,029	0,033	51	2,244	0,02	0,07	3,1 %	0,029	2,90	5,86 %
		0,065	2,238	0,029	0,033	51							
		0,065	2,270	0,029	0,034	53							
5.11.2021	10.11.2021	0,123	3,986	0,031	0,088	72	4,005	0,05	0,16	3,9 %	0,031	3,07	0,18 %
		0,123	4,065	0,030	0,091	74							
		0,123	3,965	0,031	0,087	71							
5.11.2021	10.11.2021	0,314	10,240	0,031	0,284	90	10,049	0,17	0,51	5,1 %	0,031	3,12	-1,56 %
		0,314	9,993	0,031	0,276	88							
		0,314	9,915	0,032	0,274	87							
5.11.2021	10.11.2021	0,316	10,330	0,031	0,287	91	10,322	0,03	0,09	0,9 %	0,031	3,06	0,49 %
		0,316	10,290	0,031	0,285	90							
		0,316	10,347	0,031	0,287	91							
5.11.2021	10.11.2021	0,538	17,536	0,031	0,512	95	17,356	0,20	0,59	3,4 %	0,031	3,10	-0,76 %
		0,538	17,388	0,031	0,508	94							
		0,538	17,144	0,031	0,500	93							
5.11.2021	10.11.2021	0,926	29,527	0,031	0,888	96	29,583	0,05	0,15	0,5 %	0,031	3,13	-1,74 %
		0,926	29,626	0,031	0,891	96							
		0,926	29,596	0,031	0,890	96							
5.11.2021	10.11.2021	10,059	328,621	0,031	10,249	102	328,894	0,24	0,73	0,2 %	0,031	3,06	0,59 %
		10,059	329,093	0,031	10,264	102							
		10,059	328,968	0,031	10,260	102							
5.11.2021	10.11.2021	19,512	626,178	0,031	19,562	100	626,330	0,15	0,44	0,1 %	0,031	3,12	-1,26 %
		19,512	626,342	0,031	19,567	100							
		19,512	626,470	0,031	19,571	100							
5.11.2021	10.11.2021	52,498	1676,823	0,031	52,446	100	1676,322	0,46	1,39	0,1 %	0,031	3,13	-1,80 %
		52,498	1676,230	0,031	52,428	100							
		52,498	1675,912	0,031	52,418	100							
SUM		253,05	8115,318	0,831									
AVG		9,37	300,567	0,031								3,08	
SD				0,001									

Suoran parametrit

a 1,17

b 31,95

r 0,999989

r2 0,999977

LOD 0,31

LOQ 1,03

SUM

AVG

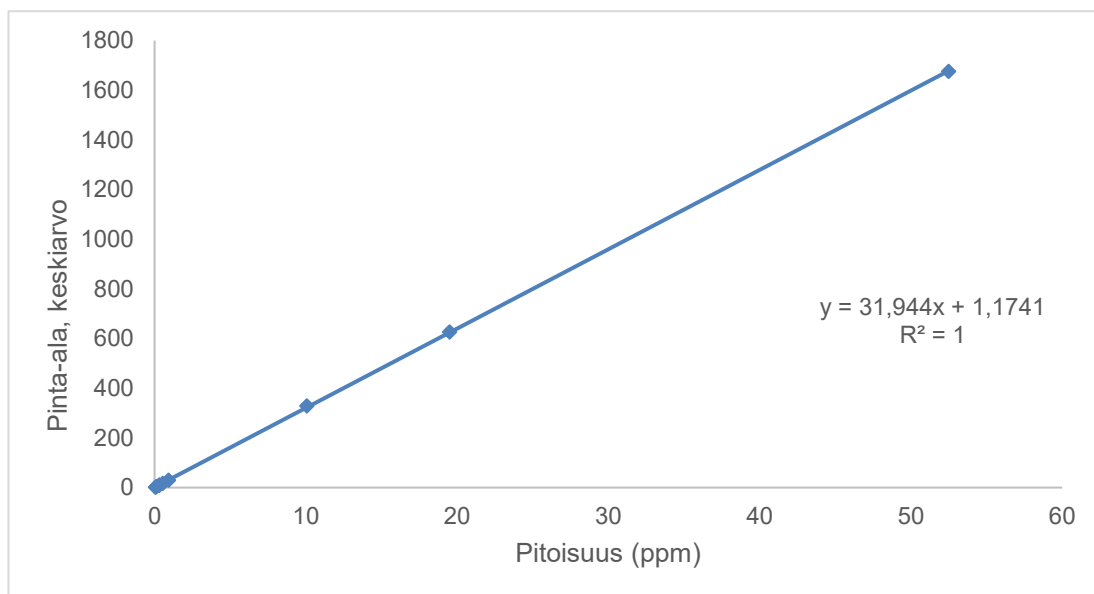
SD

Liite 2. Yhdisteen B standardiliuossarjojen tulokset

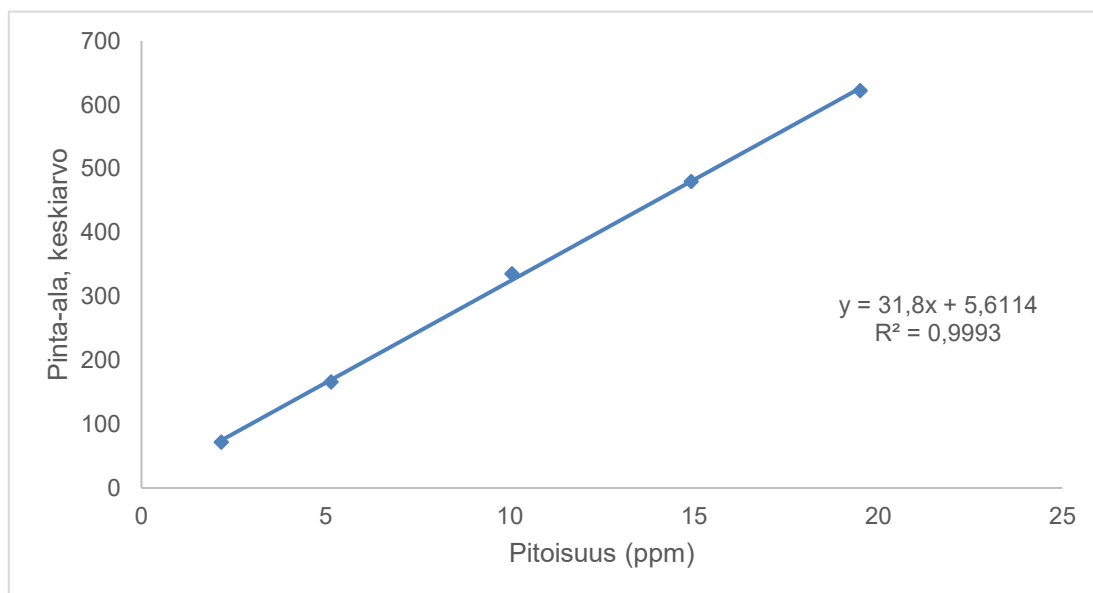
Valmistus	Ajo	B-pitoisuus,	Area	ppm/Area	B-Pitoisuus, ppm	Tarkkuus, %	AVG, Area	SD, Area	3*SD	3*SD/Area	ppm/AVG, Area	ppm/AVG, Area*100	%AVG:sta
5.11.2021	10.11.2021	0,065	1,383	0,047	5,122	7880	1,344	0,05	0,14	10,6 %	0,048	4,84	2,45 %
		0,065	1,358	0,048	5,030	7738							
		0,065	1,291	0,050	4,781	7356							
5.11.2021	10.11.2021	0,065	1,574	0,041	5,830	8969	1,506	0,06	0,19	12,8 %	0,043	4,32	12,96 %
		0,065	1,446	0,045	5,356	8239							
		0,065	1,499	0,043	5,552	8541							
5.11.2021	10.11.2021	0,129	2,594	0,050	9,607	7448	2,542	0,08	0,24	9,5 %	0,051	5,07	-2,35 %
		0,129	2,450	0,053	9,074	7034							
		0,129	2,583	0,050	9,567	7416							
5.11.2021	10.11.2021	0,129	2,622	0,049	9,711	7528	2,594	0,04	0,13	4,9 %	0,050	4,97	-0,31 %
		0,129	2,615	0,049	9,685	7508							
		0,129	2,545	0,051	9,426	7307							
5.11.2021	10.11.2021	0,330	6,663	0,050	24,678	7478	6,665	0,04	0,13	1,9 %	0,050	4,95	0,13 %
		0,330	6,623	0,050	24,530	7433							
		0,330	6,709	0,049	24,848	7530							
5.11.2021	10.11.2021	0,620	12,309	0,050	45,589	7353	12,216	0,14	0,42	3,4 %	0,051	5,08	-2,38 %
		0,620	12,056	0,051	44,652	7202							
		0,620	12,282	0,050	45,489	7337							
5.11.2021	10.11.2021	0,961	18,812	0,051	69,674	7250	18,950	0,13	0,40	2,1 %	0,051	5,07	-2,30 %
		0,961	18,962	0,051	70,230	7308							
		0,961	19,075	0,050	70,648	7352							
5.11.2021	10.11.2021	1,399	26,611	0,053	98,559	7045	26,515	0,14	0,41	1,5 %	0,053	5,28	-6,43 %
		1,399	26,575	0,053	98,426	7035							
		1,399	26,358	0,053	97,622	6978							
12.11.2021	16.11.2021	5,801	114,198	0,051	422,956	7291	113,912	0,25	0,75	0,7 %	0,051	5,09	-2,72 %
		5,801	113,801	0,051	421,485	7266							
		5,801	113,737	0,051	421,248	7262							
12.11.2021	16.11.2021	10,132	202,172	0,050	748,785	7390	202,815	0,70	2,09	1,0 %	0,050	5,00	-0,77 %
		10,132	203,557	0,050	753,915	7441							
		10,132	202,717	0,050	750,804	7410							
12.11.2021	16.11.2021	15,226	312,465	0,049	1157,278	7601	312,527	0,48	1,43	0,5 %	0,049	4,87	1,73 %
		15,226	313,030	0,049	1159,370	7614							
		15,226	312,086	0,049	1155,874	7591							
SUM		104,57	2104,76	1,636									
AVG		3,17	63,78	0,050								4,96	
SD				0,002									

Suoran parametrit

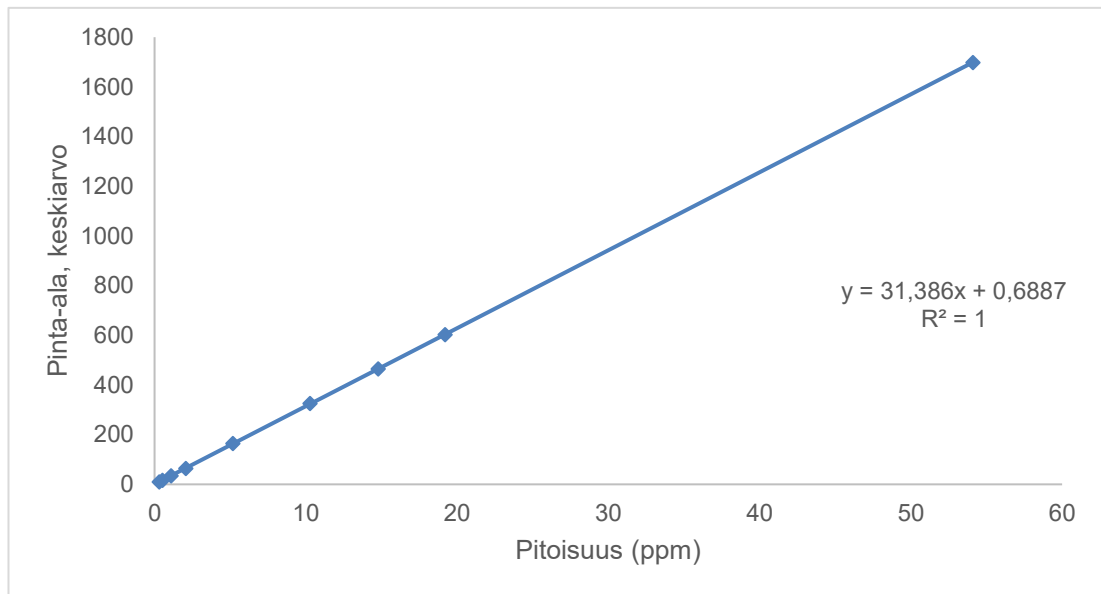
a	0,27
b	19,02
r	0,999555
r2	0,99951
LOD	0,04
LOQ	0,12

Liite 3. Kalibrointisuorat

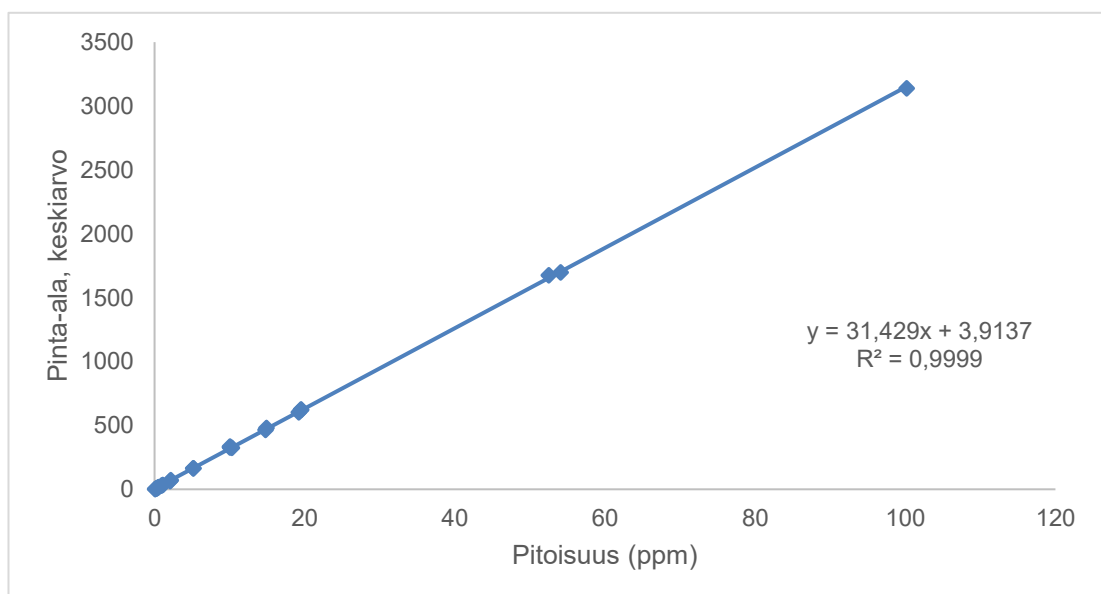
Kuva 1: Yhdisteen A kalibrointisuora 10.11. mittausalueella 0,065–52 ppm.



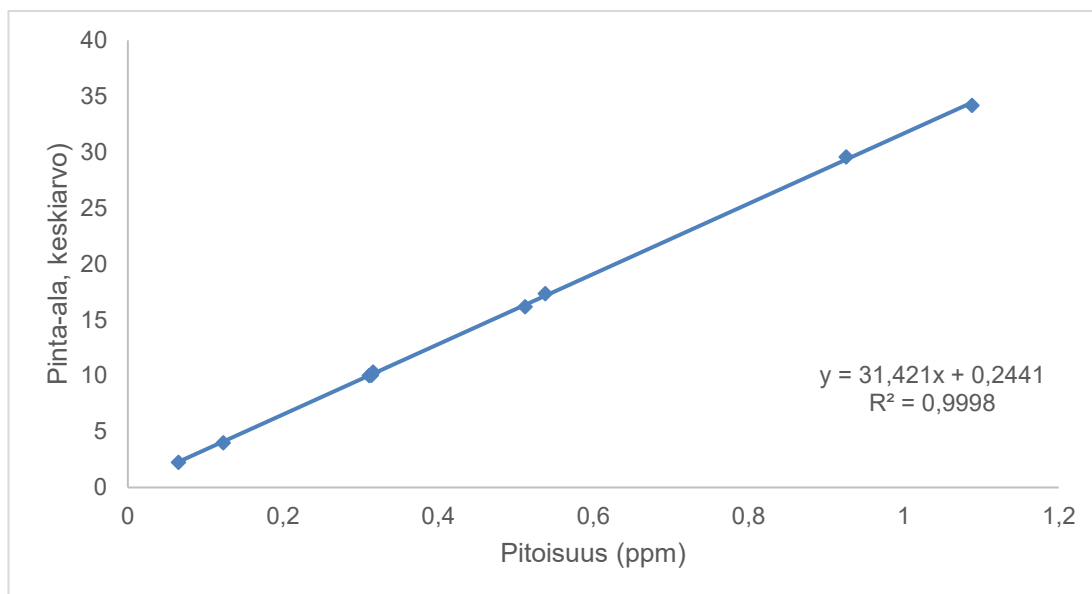
Kuva 2: Yhdisteen A kalibrointisuora 16.11. mittausalueella 2–20 ppm.



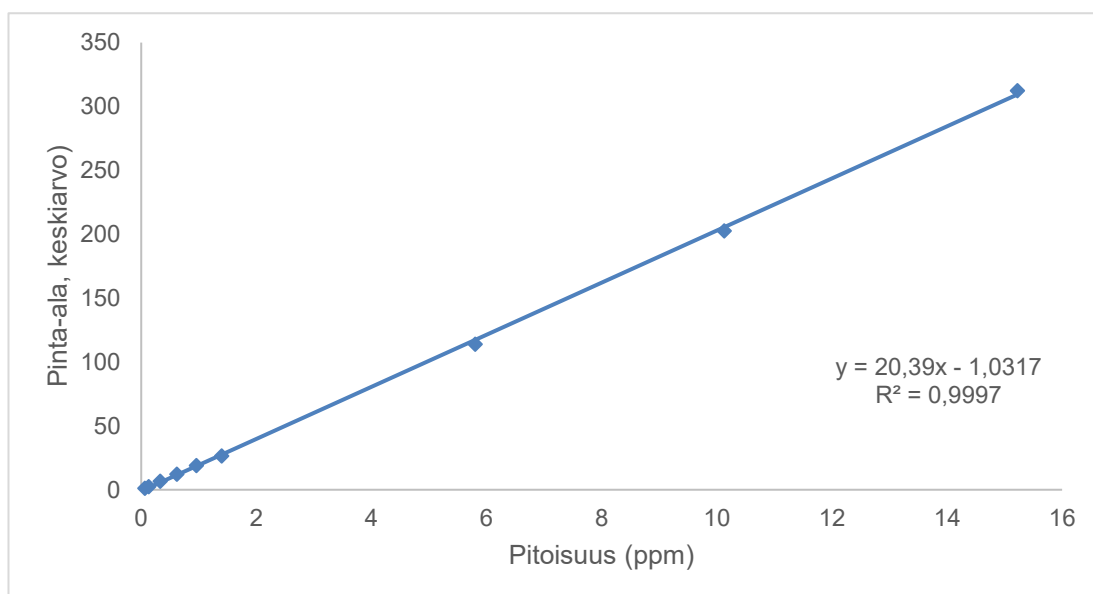
Kuva 3: Yhdisteen A kalibrintisuora 24.11. mittausalueella 0,3–55 ppm.



Kuva 4: Yhdisteen A kalibrintisuora koko mittausalueella 0,065–100 ppm.



Kuva 5: Yhdisteen A kalibrointisuora mittausalueella 0,065–1 ppm.



Kuva 6: Yhdisteen B kalibrointisuora mittausalueella 0,065–15 ppm.

Liite 4. Lämpötilaseurantänäytteiden (yhdiste A) tulokset

Ajo	Standardin pitoisuus, HL, ppm	Pinta-ala	Pitoisuus suoralta, ppm
10.11.	0,316*	10,330	0,311
		10,290	0,309
		10,347	0,311
23.11.	0,316*	10,255	0,308
		10,184	0,306
25.11.	0,316*	10,129	0,304
		9,928	0,298
10.11.	0,926*	29,527	0,922
		29,626	0,925
		29,596	0,925
23.11.	0,926*	29,537	0,923
		29,667	0,927
25.11.	0,926*	29,163	0,911
13.12.	0,926*	29,911	0,935
		29,949	0,936
16.11.	2,172**	72,101	2,279
		72,073	2,278
		72,005	2,276
23.11.	2,172**	71,679	2,265
		71,668	2,265
25.11.	2,172**	70,696	2,234
13.12.	2,172**	70,972	2,243
		71,141	2,248
16.11.	5,147**	165,94	5,268
16.11.	5,147**	165,85	5,265
		165,8	5,264
		163,79	5,200
23.11.	5,147**	164,02	5,207
10.11.	10,059*	328,59	10,45
		328,62	10,451
		329,44	10,466
16.11.	10,059*	335,56	10,672
		335,55	10,672
		335,72	10,677
23.11.	10,059*	350,79	11,157
		351,3	11,174
		363,56	10,367

Ajo	Standardin pitoisuus, J, ppm	Pinta-ala	Pitoisuus suoralta, ppm
10.11.	0,316*	10,174	0,306
		10,216	0,307
		10,147	0,305
23.11.	0,316*	10,175	0,306
		10,15	0,305
25.11.	0,316*	9,753	0,292
		9,598	0,287
13.12.	0,316*	10,267	0,309
		10,228	0,308
10.11.	0,926*	29,348	0,917
		29,367	0,917
		29,299	0,915
23.11.	0,926*	29,359	0,917
		29,422	0,919
25.11.	0,926*	28,960	0,904
13.12.	0,926*	29,414	0,919
		29,377	0,918
16.11.	5,147**	164,927	5,236
		164,753	5,23
		164,82	5,233
23.11.	5,147**	163,139	5,179
		162,993	5,174
25.11.	5,147**	164,186	5,212
10.11.	10,059*	321,582	10,227
		321,445	10,216
		320,96	10,207
16.11.	10,059*	323,067	10,274
		323,118	10,276
		323,073	10,274
23.11.	10,059*	318,483	10,128
		318,288	10,122
25.11.	10,059*	317,759	10,105
13.12.	10,059*	328,106	10,367
		328,205	10,367

* = Standardin valmistuspäivä 5.11, ** = Standardin valmistuspäivä 12.11.

Liite 5. Maalinäytteiden tulokset

				A-suora	B-suora
Ajo	Teoreettinen B-pitoisuus, ppm	Maali	Pinta-ala	Saatu pitoisuus, ppm	
16.11.	21	A	52,481	13,35	21,14
			50,802	13,37	21,19
			49,912	12,40	19,66
23.11.	21	A	55,398	13,71	21,67
			54,071	13,89	21,98
21.12.	21	A	53,715	12,96	21,44
			53,754	13,18	21,81
16.11.	52	B	170,028	45,08	70,03
			176,807	45,31	70,37
			184,879	45,01	69,88
23.11.	52	B	175,305	44,21	68,67
			172,632	44,70	69,43
17.11.	18	C	63,690	16,46	25,94
			62,383	16,60	26,18
			64,025	15,78	24,87
23.11.	18	C	61,617	14,92	23,53
			59,911	15,34	24,21
21.12.	18	C	64,549	16,05	26,53
			64,645	15,73	26,00
17.11.	54	D	177,817	47,40	73,62
			193,358	47,13	73,16
			183,449	47,69	74,06
23.11.	54	D	184,818	46,88	72,79
			181,677	47,34	73,51
17.11.	43	E	119,614	30,58	47,69
			120,202	30,63	47,76
			113,679	30,57	47,69
23.11.	43	E	108,756	29,41	45,91
			115,544	29,71	46,35
21.12.	43	E	103,964	25,29	41,69
			103,813	25,01	41,24
3.12.	0	F	0,00	0,00	0,00
			0,00	0,00	0,00

Liite 6. Saantokokeiden tulokset

Ajo	Maali	Maalin A-pitoisuus, ppm	A-lisäys, µg	Teoreettinen pitoisuus, ppm	Pinta- ala	Saatu pitoisuus, ppm	Saanto-%	AVG-%	SD-%	RSD-%
30.11.	A	13,27	4,1	14,1	56,221	15,08	107	107	0,30	0,3
					56,439	15,14	107			
30.11.	A	13,27	1,8	13,6	54,325	14,68	108	108	0,16	0,1
					54,417	14,71	108			
30.11.	B	44,86	4,4	45,7	168,320	45,00	98	99	0,09	0,1
					168,510	45,06	99			
30.11.	B	44,86	1,9	45,2	166,111	43,79	97	97	0,11	0,1
					166,353	43,86	97			
30.11.	C	15,84	4,1	16,6	62,005	16,29	98	98	0,00	0,0
					61,999	16,29	98			
30.11.	C	15,84	1,7	16,2	63,352	16,12	100	97	3,49	3,6
					60,245	15,32	95			
30.11.	D	47,29	4,1	48,1	175,527	47,15	98	98	0,13	0,1
					175,204	47,06	98			
30.11.	D	47,29	1,9	47,7	177,695	47,05	99	99	0,09	0,1
					177,467	46,99	99			
21.12.	A	13,27	52,1	24,7	94,853	24,42	99	99	0,40	0,4
					95,232	24,28	98			
21.12.	C	15,84	49,2	22,7	99,240	24,23	107	108	1,28	1,2
					100,021	24,64	109			
21.12.	C	15,84	87,9	33,5	129,912	34,51	103	102	1,41	1,4
					126,195	33,84	101			

Ajo	Maali	Maalin B-pitoisuus, ppm	B-lisäys, µg	Teoreettinen pitoisuus, ppm	Pinta- ala	Saatu pitoisuus, ppm	Saanto-%	AVG-%	SD-%	RSD-%
30.11.	A	21,27	4,7	22,2	62,629	25,20	114	113	0,76	0,7
					62,057	24,96	112			
30.11.	A	21,27	1,7	21,6	53,504	23,69	110	109	0,26	0,2
					53,328	23,61	109			
30.11.	B	69,68	5,0	70,7	170,969	72,82	103	103	0,04	0,04
					171,072	72,86	103			
30.11.	B	69,68	1,9	70,1	171,280	71,72	102	102	0,07	0,07
					171,113	71,65	102			
30.11.	C	25,32	5,0	26,3	65,850	27,62	105	105	0,32	0,3
					65,562	27,50	105			
30.11.	C	25,32	2,0	25,7	67,933	27,03	105	105	0,63	0,6
					67,349	26,80	104			
30.11.	D	73,43	5,0	74,4	183,178	75,62	102	102	0,15	0,2
					183,557	75,78	102			
30.11.	D	73,43	1,9	73,8	178,423	75,62	102	103	0,35	0,4
					179,295	75,99	103			
21.12.	A	21,27	43,6	30,0	74,828	31,05	104	103	0,57	0,6
					75,003	30,81	103			
21.12.	C	25,32	42,9	33,9	81,184	33,40	99	98	0,69	0,7
					80,725	33,07	98			
21.12.	C	25,32	114,5	48,3	118,994	50,83	105	108	3,40	3,2
					121,957	53,15	110			

Liite 7: Standardinlisäyssiäsuorasarjojen tulokset

Ajo	Maali	Maalin A/B-pitoisuus, ppm	A-lisäys, µg	Teoreettinen pitoisuus, ppm	Pinta- ala	Saatu pitoisuus, ppm	Saanto- %	AVG-%	SD-%	RSD-%
7.12.	F	0	281,7	6,89	206,156	6,82	99	102	3,86	3,8
					217,538	7,20	104			
7.12.	F	0	164,9	4,04	110,996	3,68	91	94	4,78	5,1
					119,273	3,95	98			
7.12.	F	0	42,8	1,06	29,729	0,99	94	112	26,20	23,3
					41,615	1,38	131			
7.12.	F	0	23,5	0,57	15,421	0,52	91	91	0,87	1,0
					15,648	0,53	92			
7.12.	F	0	8,7	0,21	6,053	0,21	98	98	0,99	1,0
					5,977	0,21	97			
7.12.	F	0	4,4	0,11	3,293	0,12	110	113	4,60	4,1
					3,485	0,13	116			
7.12.	F	0	0,9	0,02	0,960	0,04	192	192	0,00	0,0
					0,959	0,04	192			

Ajo	Maali	Maalin A/B-pitoisuus, ppm	B-lisäys, µg	Teoreettinen pitoisuus, ppm	Pinta- ala	Saatu pitoisuus, ppm	Saanto-%	AVG-%	SD-%	RSD-%
9.12.	F	0	15,2	0,37	6,699	0,36	97	98	1,51	1,55
					6,755	0,37	99			
9.12.	F	0	6,7	0,17	4,167	0,21	127	110	24,66	22,41
					2,877	0,15	93			
9.12.	F	0	4,9	0,12	2,847	0,14	115	108	10,62	9,87
					2,592	0,12	100			
9.12.	F	0	2	0,05	1,110	0,03	65	68	4,31	6,33
					1,156	0,04	71			
9.12.	F	0	0,8	0,02	0,876	0,02	97	92	7,22	7,86
					0,846	0,02	87			

Liite 8. MUKit-ohjelman mittausepävarmuusraportti

MEASUREMENT UNCERTAINTY ESTIMATION

Step	Action	Analysis of preservatives in dispersion paints	1/20/2022																																																																																																																													
1	Specify Measurand	Measurand: A Concentration range: 2 - 54 ppm Sample Type (Matrix): Dispersion paints Analysis Principle (Analyzer etc.): HPLC																																																																																																																														
2	Quantify within-laboratory reproducibility, $u(R_w)$ A: Control sample B: Possible steps not covered by control sample	A: Control samples: Number of control samples: 21 Average concentration: 10.41305 ppm Standard deviation, s_{Rw} : 2.91 % B: Routine replicate samples : Number of routine replicate series: 25 Number of parallel measurements: 2 Concentration range: 3.815 - 47.725 ppm Pooled standard deviation, s_r : 1.49 % $u(R_w) = \sqrt{s_{Rw}^2 + s_r^2} = 3.27 \%$																																																																																																																														
3	Quantify method and laboratory bias, $u(bias)$	Method and laboratory bias from recovery tests: Standard uncertainty of standard solution concentration, $u(conc)$: 0.50 % Standard uncertainty of standard solution volume, $u(vol)$: 0.50 % Recovery test count, N : 22 <table border="1"> <thead> <tr> <th>i</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> <th>7</th> <th>8</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Recovery of added analyte, $Recovery_i$</td> <td>107.00 %</td> <td>107.00 %</td> <td>108.00 %</td> <td>108.00 %</td> <td>98.00 %</td> <td>99.00 %</td> <td>97.00 %</td> <td>97.00 %</td> </tr> <tr> <td>Approximated concentration</td> <td>15 ppm</td> <td>15 ppm</td> <td>15 ppm</td> <td>15 ppm</td> <td>45 ppm</td> <td>45 ppm</td> <td>45 ppm</td> <td>45 ppm</td> </tr> <tr> <td>Standard solution added</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Date</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th>i</th> <th>9</th> <th>10</th> <th>11</th> <th>12</th> <th>13</th> <th>14</th> <th>15</th> <th>16</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Recovery of added analyte, $Recovery_i$</td> <td>98.00 %</td> <td>98.00 %</td> <td>100.00 %</td> <td>95.00 %</td> <td>98.00 %</td> <td>98.00 %</td> <td>99.00 %</td> <td>99.00 %</td> </tr> <tr> <td>Approximated concentration</td> <td>15 ppm</td> <td>15 ppm</td> <td>15 ppm</td> <td>15 ppm</td> <td>45 ppm</td> <td>45 ppm</td> <td>45 ppm</td> <td>45 ppm</td> </tr> <tr> <td>Standard solution added</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Date</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th>i</th> <th>17</th> <th>18</th> <th>19</th> <th>20</th> <th>21</th> <th>22</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Recovery of added analyte, $Recovery_i$</td> <td>99.00 %</td> <td>98.00 %</td> <td>107.00 %</td> <td>109.00 %</td> <td>103.00 %</td> <td>101.00 %</td> </tr> <tr> <td>Approximated concentration</td> <td>25 ppm</td> <td>25 ppm</td> <td>25 ppm</td> <td>25 ppm</td> <td>35 ppm</td> <td>35 ppm</td> </tr> <tr> <td>Standard solution added</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Date</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	i	1	2	3	4	5	6	7	8	Recovery of added analyte, $Recovery_i$	107.00 %	107.00 %	108.00 %	108.00 %	98.00 %	99.00 %	97.00 %	97.00 %	Approximated concentration	15 ppm	15 ppm	15 ppm	15 ppm	45 ppm	45 ppm	45 ppm	45 ppm	Standard solution added									Date									i	9	10	11	12	13	14	15	16	Recovery of added analyte, $Recovery_i$	98.00 %	98.00 %	100.00 %	95.00 %	98.00 %	98.00 %	99.00 %	99.00 %	Approximated concentration	15 ppm	15 ppm	15 ppm	15 ppm	45 ppm	45 ppm	45 ppm	45 ppm	Standard solution added									Date									i	17	18	19	20	21	22	Recovery of added analyte, $Recovery_i$	99.00 %	98.00 %	107.00 %	109.00 %	103.00 %	101.00 %	Approximated concentration	25 ppm	25 ppm	25 ppm	25 ppm	35 ppm	35 ppm	Standard solution added							Date							
i	1	2	3	4	5	6	7	8																																																																																																																								
Recovery of added analyte, $Recovery_i$	107.00 %	107.00 %	108.00 %	108.00 %	98.00 %	99.00 %	97.00 %	97.00 %																																																																																																																								
Approximated concentration	15 ppm	15 ppm	15 ppm	15 ppm	45 ppm	45 ppm	45 ppm	45 ppm																																																																																																																								
Standard solution added																																																																																																																																
Date																																																																																																																																
i	9	10	11	12	13	14	15	16																																																																																																																								
Recovery of added analyte, $Recovery_i$	98.00 %	98.00 %	100.00 %	95.00 %	98.00 %	98.00 %	99.00 %	99.00 %																																																																																																																								
Approximated concentration	15 ppm	15 ppm	15 ppm	15 ppm	45 ppm	45 ppm	45 ppm	45 ppm																																																																																																																								
Standard solution added																																																																																																																																
Date																																																																																																																																
i	17	18	19	20	21	22																																																																																																																										
Recovery of added analyte, $Recovery_i$	99.00 %	98.00 %	107.00 %	109.00 %	103.00 %	101.00 %																																																																																																																										
Approximated concentration	25 ppm	25 ppm	25 ppm	25 ppm	35 ppm	35 ppm																																																																																																																										
Standard solution added																																																																																																																																
Date																																																																																																																																

		<p>Date _____</p> $u(c_{recovery}) = \sqrt{u(conc)^2 + u(vol)^2} = 0.71 \%$ $RMS_{bias} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (100\% - Recovery_i)^2}{N}} = 4.46 \%$ $u(bias) = \sqrt{RMS_{bias}^2 + u(c_{recovery})^2} = 4.51 \%$
4	Convert components to standard uncertainty	$u(R_w) = 3.27 \%$ $u(bias) = 4.51 \%$
5	Calculate combined standard uncertainty, u_c	$u_c = \sqrt{u(R_w)^2 + u(bias)^2} = 5.57 \%$
6	Calculate expanded uncertainty, U	$U = 2 \cdot u_c = 11.2 \%$