

Katja Vähämäki

SafTest–menetelmä

Opinnäytetyö
Kevät 2011
Tekniikan yksikkö
Bio- ja elintarviketekniikka



SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU

Opinnäytetyön tiivistelmä

Koulutusyksikkö: Tekniikan yksikkö

Koulutusohjelma: Bio- ja elintarviketekniikka

Tekijä: Katja Vähämäki

Työn nimi: SafTest–menetelmä

Ohjaaja: Merja Kyntäjä

Vuosi: 2011

Sivumäärä: 39

Liitteiden lukumäärä: 6

SafTest–menetelmä on standardisoitu testausjärjestelmä, joka perustuu entsyymaattisiin reaktioihin. Tällä menetelmällä voidaan määrittää tarkasti rasvasta, öljystä sekä muista monimutkaisista aineista muun muassa peroksidit, vapaat rasvahapot sekä kokonaisrasvan määrä. Laitteisto koostuu spektrofotometristä, suodatinyksiköstä, lämpöhauteesta ja Vortex- sekä koeputkisekoittimesta. Menetelmällä saadaan tuloksia nopeasti, jopa muutamassa minuutissa.

Työn tarkoituksena oli testata SafTest–menetelmän soveltuvuutta ja saatujen tulosten oikeellisuutta Valio Oy Seinäjoen tehtaan aluelaboratorion käyttöön. Menetelmällä on mahdollista korvata työlääät ja aikaa vievät uutto- ja titrausmenetelmät. Työssä testattiin peroksidipitoisuutta ja vapaiden rasvahappojen sekä kokonaisrasvan määrää. Tutkimusmenetelmänä käytettiin toistettavuutta sekä tutkittiin oikeellisuutta vertaamalla SafTest–menetelmällä saatuja tuloksia perinteisin menetelmin saatuihin tuloksiin. Testattavia tuotteita oli Kevyt Levi 40, Oivariini 75 ja voiöljy. Tuotteita oli huononnettu erilaisin säilytyskeinoin, koska näissä tulokset olivat suurempia.

Tutkimus osoitti, että SafTest–menetelmän toistettavuus oli luotettava. Menetelmien vertailuissa poikkeamat olivat osittain melko suuria. SafTest menetelmän käyttöönotto Seinäjoen tehtaan laboratorioon ei tutkimuksen pohjalta tullut ajankohtaiseksi.

Avainsanat: rasvat, rasvahapot, rasvapitoisuus, pilaantuminen

SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Thesis abstract

Faculty: School of Technology

Degree programme: Food Processing and Biotechnology

Author: Katja Vähämäki

Title of thesis: SafTest system

Supervisor: Merja Kyntäjä

Year: 2011 Number of pages: 39 Number of appendices: 6

SafTest System is a standardized testing system, which is based on enzymatic reactions. With this system it is possible to determine accurately peroxide, free fatty-acid content and fat content, from fat and oil. The equipment consists of spectrophotometer, filtration unit, a heating block, Vortex and a test tube mixer. The method gives results very quickly, even in a few minutes.

The purpose of the thesis was to test the feasibility and correctness of SafTest method for use at Valio Oy Seinäjoki Regional Laboratory. With this system it is possible to remove time consuming and labor intensive steps from the extraction and titration process. In the thesis the amount of peroxides, the amount of free fatty acids and fat content were tested. The repeatability and correctness are used as research method. The results are verified by comparing them to results achieved by traditional methods. The tested products were Kevyt Levi 40, Oivariini 75 and butter oil. The tested products were aged by methods of storage to achieve clearer results.

The research stated that SafTest system's repeatability was reliable, however variations between different methods were quite large. Based on this study Valio's laboratory in Seinäjoki was not willing to take SafTest in use, at the present state.

Keywords: fats, fatty acids, fat content, spoilage

SISÄLTÖ

Opinnäytetyön tiivistelmä.....	2
Thesis abstract.....	3
SISÄLTÖ	4
Käytetyt termit ja lyhenteet	5
Kuvio- ja taulukkoluetelo.....	6
1 JOHDANTO	8
2 PERINTEISET MÄÄRITYSMENETELMÄT	9
3 RASVAT	12
4 SAFTEST MENETELMÄ.....	15
4.1 Laitteet ja välineet	16
4.2 Testisarjat sekä muut tarvittavat kemikaalit.....	18
5 TYÖOHJE	22
5.1 Alkutoimet	22
5.2 Näytteen esikäsittely	23
5.3 Vapaiden rasvahappojen määrittäminen	23
5.4 Peroksidipitoisuuden määrittäminen	24
5.5 Kokonaisrasvan määrittäminen	25
5.6 Laimennokset.....	27
5.7 Tulosten laskeminen	27
6 SAFTEST MENETELMÄN TESTAAMINEN JA TULOSTEN TARKASTELU	31
6.1 Toistettavuustutkimus	31
6.2 Oikeellisuustutkimus	33
7 POHDINTA JA YHTEENVETO	38
LÄHTEET	39

Käytetyt termit ja lyhenteet

Sentrifugointi	Partikkelien erottamista toisistaan sentrifugilla, jonka toiminta perustuu pyörimisnopeuteen ja keskipakovoimaan.
T&K	Helsingissä sijaitseva Valio Oy:n tutkimus- ja kehittämiskeskus.
FFA	Free fatty acids eli vapaat rasvahapot.
Fe	Raudan kemiallinen lyhenne.
Kaseiini	Maidon fosforipitoisia proteiineja.
Membraani	Solua ympäröivä kalvo.
Homogeeninen	Tasalaatuinen seos.
Suodos	Suodattimen läpi mennyttä ainetta, josta on erotettu esimerkiksi sakat.
Faasi	Kuvaa aineen olomuotoa, esimerkiksi nestefaasi.
Kontaminaatio	Tarkoittaa ei-toivottujen materiaalien ja aineiden läsnäoloa ja kosketusta. Esimerkiksi eri aineiden sekaantuminen keskenään voi aiheuttaa kontaminaatiota.
Variaatiokerroin	Kertoo tulosten suhteellisen hajonnan. Saadaan kun jaetaan tulosten keskihajonta tulosten keskiarvolla. Ilmoitetaan prosentteina.
Korrelaatiokerroin	Mittaa kahden muuttujan välistä riippuutta. Mitä lähempänä kerroin on lukua 1, sitä suurempi riippuvuus on muuttujien välillä.

Kuvio- ja taulukkoluetelo

KUVIO 1. Triglyseridin rakenne. (Turpeenoja, L 1999, 72.)	12
KUVIO 2. Vapaa rasvahappo.....	13
KUVIO 3. Peroksidi.	14
KUVIO 4. Spektrofotometri ja tulosteyksikkö (a), suodatinyksikkö (b).....	16
KUVIO 5.koeputkisekoitin (a), Vortex sekoitin(b), lämmityslohko (c).	16
KUVIO 6. AciSafe testisarjan reagenssit ja kalibrointinäytteet.	18
KUVIO 7. PeroxySafe testisarjan reagenssit ja kalibrointinäytteet.	19
KUVIO 8. Percent Fat testisarjan reagenssit ja kalibrointinäyte.....	20
KUVIO 9. Kontrollinäytteet L, M ja H.....	21
KUVIO 10. Vapaiden rasvahappojen kalibrointikäyrä.	28
KUVIO 11. Peroksidipitoisuuden kalibrointikäyrä.	29
KUVIO 12. Rasvaprocentin kalibrointikäyrä.	30
TAULUKKO 1. Perinteisten menetelmien kemikaalien riskitekijöitä.	11
TAULUKKO 2. Laimennossuhteet.	26
TAULUKKO 3. Toistettavuustutkimuksen tuloksien keskiarvot ja keskihajonnat...	32

TAULUKKO 4. Kokonaisrasvamäärityksen tulokset ja vertailu tulokset.	34
--	----

TAULUKKO 5. Oikeellisuustutkimuksen FFA tulokset ja vertailutulokset.....	35
---	----

1 JOHDANTO

Valio Oy on yksi Suomen johtavista meijerituotteiden valmistajista. Valio Oy:llä on Suomessa 15 tuotantolaitosta, joista yksi sijaitsee Seinäjoella. Valio Seinäjoen tehtaalla valmistetaan tuoretuotteita, maitojauheita sekä ravintorasvoja. Työkokemustani olen kartuttanut Valio Oy Seinäjoen tehtaalla noin kolmen vuoden ajan. Työskennellessäni rehulaboratoriossa ajankohtaiseksi tuli opinnäytetyön aiheen etsiminen. Pian selvisikin, että laboratoriodiagnostiikkaa markkinoivalta Medinor Oy:ltä oli tulossa uusi laitteisto testattavaksi Valio Seinäjoen aluelaboratorioon. Tästä laitetestauksesta sain opinnäytetyöni aiheen.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää SafTest–menetelmän soveltuvuutta Valio Oy Seinäjoen tehtaalla aluelaboratorion käyttöön. Valio Oy Seinäjoen tehtaalla valmistetaan ravintorasvoja, joista tehdään erilaisia laatua mittaavia analyysejä. Tällä hetkellä suurin osa rasvanäytteistä lähetetään Valion tutkimus ja kehittämiskeskukselle Helsinkiin, jossa niistä määritetään muun muassa peroksidipitoisuus ja vapaiden rasvahappojen määrä. Ainoastaan rasvapitoisuuden määrittäminen voidaan suorittaa Seinäjoen tehtaalla aluelaboratoriossa.

Oletuksena oli, että huononnetuissa näytteissä peroksidipitoisuus ja vapaiden rasvahappojen määrä on suurempi kuin tuoreissa näytteissä. Näin ollen tässä työssä käytettäviä rasvanäytteitä huononnettiin erilaisin säilytysmenetelmin. Osa näytteistä säilytettiin aluksi +45–asteisessa lämpökaapissa, minkä jälkeen ne pakastettiin. Säilytysmenetelminä käytettiin myös kylmäsäilytystä sekä tuoreena pakastamista. Tutkimukset suoritettiin noin 6–12 kuukautta tutkittavien näytteiden *parasta ennen* -päiväysten jälkeen. Tässä työssä määrittämiä tehtiin Oivariini- (75%), Kevyt Levi- (40%) ja voiöljynäytteistä (100%).

2 PERINTEISET MÄÄRITYSMENETELMÄT

Valio Oy:n perinteiset määrittämenetelmät käsittävät standardimenetelmiä, joita käytetään erityyppisiin rasvamäärittäyksiin. Tässä työssä käsitellään rasvan happoisuutta sekä peroksidi- ja rasvapitoisuutta. Näistä happoisuus- ja peroksidimäärittäykset tehdään Valion T&K:lla Helsingissä ja ainoastaan rasvapitoisuus voidaan määrittää Valio Seinäjoen tehtaan aluelaboratoriossa.

Rasvan happoisuus eli vapaiden rasvahappojen määrä FFA määritetään vedettömällä emästitrauksella käyttäen automaattititraattoria. Mikäli tutkittava rasvanäyte ei ole nestemäinen, se tulee ensimmäiseksi sulattaa lämpökaapissa tai vesihauteessa. Jos näytteessä ilmenee sameutta, se on valutettava suodatinpaperin läpi. Rasvanäytteen tulee olla kirkas ja se ei saa sisältää vettä. Määrittäykset tehdään puhtaasta rasvasta, joten näytteestä tulee erottaa rasva sentrifugoimalla. Rasvanäyte punnitaan ja liuotetaan isopropanoli-petrolieetteriin, jossa käytetään indikaattorina tymolisinistä. Tämä seos titrataan tietyn vahvuisella tetra-n-butyylimmoniumhydroksidilla. Titrauksen päätepisteen huomioimiseen käytetään potentiometristä fotoelektrodia. Automaattititraattori ilmoittaa rasvan happoisuuden millimoolina 100 grammaa rasvaa kohden. Tässä työssä vapaiden rasvahappojen osuus, FFA%, ilmoitettiin grammoina öljyhappoa 100 grammassa rasvaa (FFA % g 18 / 100 g). (Valio Oy 2007, 1–5.)

FFA% lasketaan kaavasta

$$FFA\% = \frac{282 * FA}{1000} \quad (1)$$

jossa FA on rasvan happoisuus

282 on öljyhapon moolipaino

Peroksidiluvun määritysmenetelmä perustuu peroksidien kykyyn hapettaa rauta-atomit hapetustilalta +II hapetustilaan +III ja Fe(III):n kykyyn muodostaa värillinen kompleksiyhdiste tiosyanaatti-ionien kanssa. Fe(II) ei muodosta värillistä kompleksia. Tässäkin määrittämisessä rasvanäytteen tulee olla puhdasta rasvaa ja erotus tehdään rasvanhappoisuusmäärittämisessä kerrotulla menetelmällä. Sulaa rasvaa pipetoidaan koeputkeen 200 mg ja lisätään joukkoon kloroformi-metanoliseosta 9,7 ml, johon rasva liuotetaan sekoittamalla. Tämän jälkeen lisätään vielä 0,05 ml ammoniumtiosyanaattiliuosta sekä 0,05 ml rautakloridiliuosta ja sekoitetaan hyvin. Sokeakoe tehdään samalla tavalla, mutta ilman rasvanäytettä. Peroksidiluku lasketaan rauta(III)standardin avulla joka mitataan sokeakokeen ja näytteen rinnalla. Koeputkia seisotetaan 5–10 minuuttia, jonka jälkeen liuosten absorbanssit mitataan sokealiuosta vastaan spektrofotometrillä käyttäen aallonpituutta 500 nm. Peroksidipitoisuus ilmoitetaan milliekvivalentteina aktiivista happea yhtä kilogrammaa kohden rasvaa (meq O₂/kg). (Maunumaa 1999, 1–5.)

Peroksidipitoisuus lasketaan kaavasta

$$\text{Peroksidipitoisuus} = \frac{X}{55,84 * m} \quad (2)$$

jossa X on muodostuneen rauta(III) määrä

m on rasvanäytteen massa

Röse-Gottlieb–menetelmällä määritetään rasvapitoisuus. Tutkittavaan näytteeseen lisätään ammoniakkiliuosta. Tämä estää kaseiinin saostumisen etanolilisäyksen jälkeen. Etanolia käytetään hajottamaan rasvapallosten membraani. Tämän jälkeen rasva uutetaan näytteestä dietyylieetterillä ja petroleieetterillä. Käytetyt liuottimet haihdutetaan ja jäljelle jäänyt rasva punnitaan. Rasvapitoisuus ilmoitetaan painoprosentteina tuorepainosta. (Valio Oy 2009, 1.)

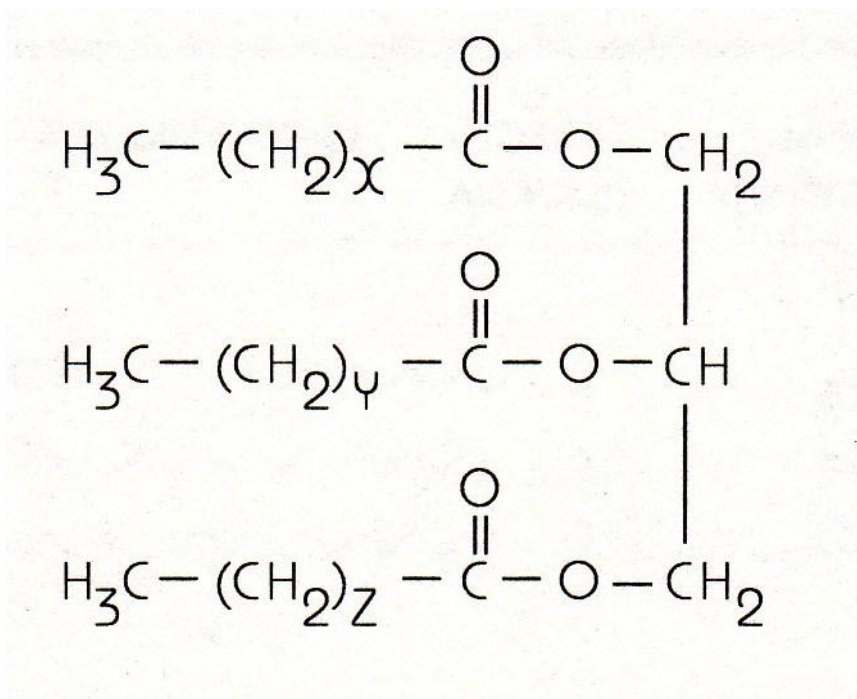
Taulukossa 1 on esitetty perinteisissä määritysmenetelmissä käytettyjen kemikaalien riskejä ja niiden torjuntaa.

TAULUKKO 1. Perinteisten menetelmien kemikaalien riskitekijöitä (Valio oy 2009).

<i>kemikaalin nimi</i>	<i>riskit</i>	<i>riskien torjunta</i>
Dietyylieetteri	helposti syttyvä, ärsyttää ja kuivattaa ihoa, limakalvoja ja silmiä	työskentely vetokaapissa, henkilökohtaiset suojaimet, ESD-kengät
Petrolieetteri	helposti syttyvä, ärsyttää ja kuivattaa ihoa, limakalvoja ja silmiä	työskentely vetokaapissa, henkilökohtaiset suojaimet, ESD-kengät
Ammoniumhydroksidiliuos, 25%	Ärsyttää ihoa, höyryjen hengittäminen vaarallista	suojakäsineet ja suojalasit, työskentely vetokaapissa
Kloroformi	karsinogeeni, ärsyttää ihoa, silmiä ja limakalvoja	työskentely vetokaapissa, suojakäsineet ja hengityssuojain
Metanoli	myrkyllinen nieltynä, helposti syttyvä	työskentely vetokaapissa, suojakäsineet ja hengityssuojain
Tetra-n-butyyliammoniumhydroksidi	syövyttävä, myrkyllinen nieltynä	työskentely vetokaapissa, suojakäsineet
Isopropanoli	myrkyllinen nieltynä, helposti syttyvä	työskentely vetokaapissa, suojakäsineet

3 RASVAT

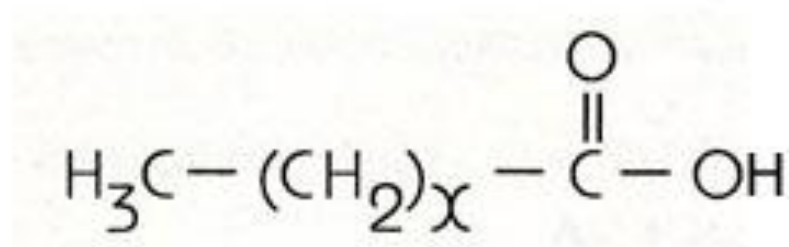
Lipidit ovat ryhmä erilaisia rasva-aineita, joihin kuuluvat myös varsinaisiksi rasvoiksi mielletävät triglyseridit. Triglyseridejä kutsutaan myös yksinkertaisiksi lipideiksi niiden rakenteen vuoksi. Triglyseridit sisältävät ainoastaan hiiltä, vetyä ja happea. Glyserolin ja kolmen rasvahapon esteröityessä syntyy triglyseridejä. Luonnon triglyserideissä esiintyvät rasvahapot ovat usein pitkiä hiiliatomeista koostuvia ketjuja. Ketjuissa on yleisimmin 12–22 hiiliatomia ja määrä on parillinen. (Turpeenoja 2005, 70–71.) Kuviossa 1 on esitetty triglyseridin rakenne, jossa X, Y ja Z merkitsevät CH₂-ryhmien lukumäärää rasvahapossa. Esimerkiksi öljyhapossa on 18 hiiliatomia, joten X on 16.



KUVIO 1. Triglyseridin rakenne. (Turpeenoja 1999, 72.)

Rasvat ja öljyt voidaan yleisesti luokitella eläin- ja kasvirasvoiksi. Eläinrasvat lajitellaan edelleen nisäkäsrasvoihin (tali, ihra) ja maitorasvaan. Maitorasvalle on tyypillistä suuri määrä rasvahappoja. Enemmistö rasvahapoista on palmitiinihappoa, steariinihappoa ja öljyhappoa. (deMan 1999, 33–37.) Rasvahapot ovat joko tyydyttyneitä tai tyydyttymättömiä. Eläinrasvoissa esiintyy tyydyttyneitä rasvahappoja ja kasvirasvoissa tyydyttymättömiä. (Turpeenoja 2005, 70–71.)

Rasvan happoisuus on tunnusluku, joka kuvaa sen vapaiden rasvahappojen määrää ja sen kautta eltaantumisen astetta (Valio Oy 2007, 1). Rasvat muodostuvat kolmen rasvahapon kiinnittyessä glyserolin runkoon muodostaen triglyseridin. Normaalisti rasvahapot ovat kiinnittyneinä runkoon, kuten triglyseridissä, ja harvemmin solussa esiintyy vapaana leijaillevia rasvahappoja (kuvio 2).

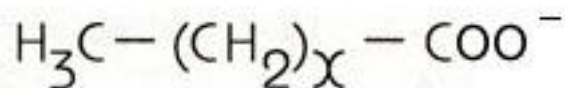


KUVIO 2. Vapaa rasvahappo.

Jos tällaisia vapaana leijuvia rasvahappoja esiintyy solussa, niitä kutsutaan vapaiksi rasvahapoiksi. Vapaita rasvahappoja ilmestyy, kun lipidit hajoavat tuotteissa ja siksi ne ovat hyviä pilaantumisen mittareita. On osoitettu, että vapailla rasvahapoilla on terveydelle sekä hyödyllisiä että haitallisia vaikutuksia. Vapaiden

rasvahappojen määrittämisen taito on hyvin tärkeää elintarvike- ja kosmetiikkateollisuudessa. (The SafTest System 2003, 5.)

Rasvojen ja öljyjen hapettuessa syntyy lipidiperoksideja. Hapettuminen on elektronien luovuttamista atomeista ja molekyyleistä. Triglyseridin altistuessa ilmalle, se reagoi hapen kanssa. Happi on elektronegatiivinen, joten se tarrautuu positiivisesti varautuneisiin atomeihin kuten vetyyn. Näin ollen reagoineeseen happiatomiin jää yksi vapaa elektroni ja syntyy vapaita radikaaleja, joita kutsutaan peroksideiksi. Kuviossa 3 on esitetty peroksidi. Miinusmerkki viimeisen happiatomin perässä osoittaa, että happi on reagoinut.



KUVIO 3. Peroksidi.

Yhden peroksidin muodostuminen kiihdyttää helposti muidenkin peroksidien muodostumista. Peroksidit tuhoavat kemikaaleja kehossamme, ruokatuotteissa sekä muissa biologisissa aineissa. Ruuassa peroksidien esiintyminen vaikuttaa välittömästi makuun. Hapettunut materiaali pystyy muuttumaan uudeksi aineeksi, joka eroaa kemialliselta rakenteelta alkuperäisestä ja saattaa olla jopa myrkyllinen. Nämä ovat hyviä syitä eltaantumisen ja käyttökelvottomuuden tarkasteluun. (SafTest System 2003, 3.)

4 SAFTEST–MENETELMÄ

SafTest–menetelmä on standardisoitu testausjärjestelmä, joka perustuu entsyymaattisiin reaktioihin, joilla voidaan tarkasti määrittää peroksidit, alkenaalit, malonaldehydit, vapaat rasvahapot sekä rasvapitoisuus. Laite-esittelijän mukaan tällä menetelmällä voidaan korvata kokonaan työlää ja aikaa vievät uutto- ja titrausmenetelmät. Menetelmää käytetään tällä hetkellä muun muassa kalaöljyvalmistuksessa sekä öljyteollisuudessa Norjassa. Menetelmällä voidaan testata rasvojen ja öljyjen lisäksi myös muita hyvinkin monimutkaisia aineita, jotka kuitenkin sisältävät öljyä.(Asu 2010.)

SafTest menetelmällä on mahdollista saada tuloksia muutamassa minuutissa ja kokonaisen testisarjan tekemiseen kuluu aikaa muutama tunti. Menetelmä on monipuolinen useiden testisarja vaihtoehtojen vuoksi. Määrittämiä voidaan tehdä tuotannon jokaisessa vaiheessa. Saatavilla olevat mikroanalyttiset testit antavat tietoa rasvan laadusta sekä näytteen rasvapitoisuudesta. Toisin sanoen SafTest menetelmä on sarja testejä, joilla voidaan määrittää öljykomponentin tuoreus hyvin pienistä määristä näytettä. Esimerkiksi voituotteilla näytemääräksi riittää 0,20 grammaa.

Menetelmä on helpompi kuin perinteiset menetelmät, ja nopea tiedon keruu antaa käyttäjälle paremman käsityksen tuotteen koostumuksesta sekä laadusta. Laitteisto sisältää pienen työaseman, joten se on helppokäyttöinen myös pienissä laboratorio- ja tuotantotiloissa. Tällä menetelmällä on mahdollista saada useita tuloksia päivässä, koska sitä voidaan käyttää yhtäjaksoisesti koko työpäivän ajan. Toistuvalla testaamisella voidaan myös hankkia tietoa tuotteen säilyvyydestä sekä erien koostumuksista. (The SafTest System 2003, 1.)

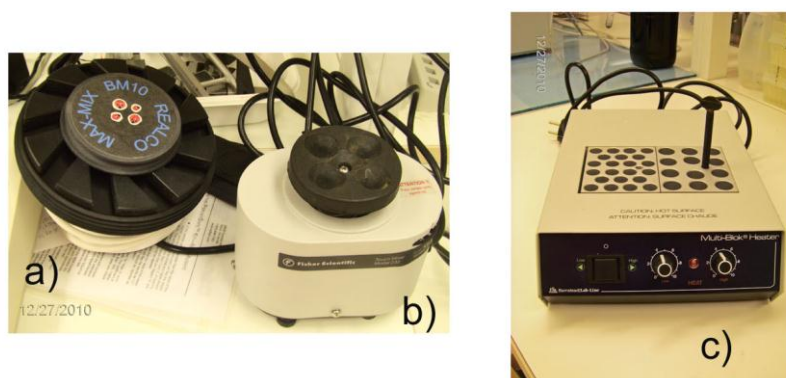
4.1 Laitteet ja välineet

SafTest-laitteisto koostuu pienestä työasemasta, joka sisältää SafTest Analyzer-laitteen, joka käsittää spektrofotometrin (Micro Chem II) ja siihen liitetyn tulostinyksikön. Työasemaan kuuluu myös vakuumpumppu, jota käytetään suodatukseen. Kuviossa 4 on esitetty työaseman päälaitteet.



KUVIO 4. Spektrofotometri ja tulosteyksikkö (a), suodatinyksikkö (b).

Lisäksi tarvitaan Vortex-sekoitinta, koeputkisekoitinta sekä lämmityslohkoa (kuvio 5). (Package Insert for FASafe/AciSafe.)



KUVIO 5. Koeputkisekoitin (a), Vortex-sekoitin(b), lämmityslohko (c).

Seuraavaan on listattu työssä tarvittavia välineitä:

- lasiset 10 ml koeputket + korkit
- muoviset 15 ml kartiomaiset näyteputket + korkit
- erikokoisia automaattipipetit + kärjet
- koeputkitelineet
- ajastinkello
- Kimwip liinat
- lasikuulat
- lämpömittari. (Package Insert for FASafe/AciSafe.)

Spektrofotometri. Spektrofotometri on laite, jossa tapahtuu dispersiota eli eri aallonpituuksien erottelua toisistaan. Laite myös mittaa jokaista aallonpituutta vastaavat intensiteetit. Intensiteetti on käsite, joka kuvaa energian siirtymistä aallon mukana pinnan läpi pinta-alayksikköä kohden. Laitteella mitataan näytteeseen tulevan ja sen läpi kulkeneen valon intensiteettien suhde aallonpituuden funktiona. Kun säteily kulkee näytteen läpi, sen intensiteetti pienenee. Pienenemiseen vaikuttaa aineen pitoisuus ja paksuus sekä tulevan säteilyn aallonpituus. (Jaarinen & Niiranen 2005, 46–55.)

Tässä työssä käytetään näkyvän valon aallonpituutta, joka on 360–800 nm. Näkyvän valon spektrofotometrissa näyte asetetaan valonsäteen tielle lasisessa koeputkessa. Näytettä liuotettaessa tulee huomioida millä aallonpituusalueella mittaukset tehdään. Näkyvän valon aallonpituusalueella riittää, että liuotin on kirkas. Mittausolosuhteet tulee olla sellaiset, että saadaan luotettava absorbanssiarvo. Tähän voidaan vaikuttaa näytteen laimentamisella. Optimaalinen mittausalue on absorbanssivälillä 0,3...1,0, jolloin virheiden vaikutus mitattavaan absorbanssiin on pienin. Ensimmäiseksi spektrofotometrillä mitataan kalibrointinäytteet. Tuloksista muodostetaan kalibrointikäyrä. Sopivan laimennoksen jälkeen näytteisiin lisätään tarvittavia reagenssiaineita ja suoritetaan mittaukset. Näytteen pitoisuus saadaan selville lukemalla kalibrointikäyrältä tulos kun näytteen absorbanssi on saatu mittauksella. Mikäli absorbanssi on suuri eikä

osu kalibrintikäyrälle, tulee näytettä laimentaa lisää luotettavan tuloksen saamiseksi. (Jaarinen, S & Niiranen, J 2005, 58-61.)

4.2 Testisarjat sekä muut tarvittavat kemikaalit

SafTest menetelmä koostuu kahdeksasta erilaisesta testisarjasta. Neljä testisarjaa on tarkoitettu öljy- sekä rasvanäytteille ja toiset neljä muille monimutkaisimmille aineille, jotka eivät ole puhdasta öljyä, mutta kuitenkin sisältävät sitä. Erot näiden testisarjojen välillä ovat testeissä käytetyissä kemikaaleissa, testausajoissa sekä spektrofotometrin asetuksissa. Tässä työssä käytettäviä testisarjoja ovat PeroxySafe (peroksidin määrittäminen), AciSafe (vapaiden rasvahappojen määrittäminen) sekä Percent Fat (kokonaisrasvan määrittäminen). Muita testisarjoja ovat AldeSafe, AlkalSafe, CitriSafe, Shelf Life Predictor ja ProteSafe. (The SafTest System 2003, 1-2.)

AciSafe. AciSafe testisarjaa käytetään vapaiden rasvahappojen mittaamiseen öljyistä, rasvoista, lihasta sekä muista ruoka-aineista. Näytettä tarvitaan vain pieni määrä ja valmistelutoimenpiteeksi riittää näytteen laimentaminen. Rasvan erottamista sentrifugoimalla ei tarvita, kuten perinteisessä FFA määrittäyksessä. AciSafe testisarja sisältää reagenssit A ja B sekä kalibrintinäytteet 1-5 (kuvio 6).



KUVIO 6. AciSafe testisarjan reagenssit ja kalibrintinäytteet.

Reagensseissa sekä kalibrintiaineissa käytetyt kemikaalit ovat suurelta osin salassa pidettyä tietoa, mutta joitain tietoja on kuitenkin saatavilla. Reagenssi A sisältää alkoholia ja reagenssiin on lisätty stabiloimisaineita. Reagenssi B toimii pH indikaattorina. Kalibrintinäytteet 1-5 sisältävät jokainen tietyn pitoisuuden glyseryylitriasetaattia. Tulokset ilmoitetaan öljyhappoprosenttina (%) näytettä kohti. (MP biomedicals 2011.)

PeroxySafe. PeroxySafe testisarjaa käytetään määrittäessä rasvan peroksiedeja tai peroksidiarvoja öljyistä, rasvoista, lihasta sekä muista ruoka-aineista. Valmistelutoimenpiteet ja näytemäärät ovat samat kuin FFA määityksessä, eikä rasvan erottamista tämänkään testisarjan kanssa tarvita. ProxySafe testisarja sisältää reagenssit A-C sekä kalibrintinäytteet 1-4 (kuvio 7).



KUVIO 7. PeroxySafe testisarjan reagenssit ja kalibrintinäytteet.

Reagenssien ja kalibrointinäytteiden osalta tiedetään, että Reagenssi A sisältää alkoholia ja reagenssiin on lisätty stabiloimisaineita. Reagenssi B toimii pH indikaattorina ja reagenssi C sisältää raudan suoloja. Kalibrointinäytteet 1-4 sisältävät jokainen tietyn pitoisuuden rasvan peroksidea. Tulokset ilmoitetaan milliekvivalentteina kiloa näytettä kohden (meq/kg). (MP biomedical 2011.)

Percent Fat. Percent Fat testisarjaa käytetään rasvapitoisuuden määrittämiseen erilaisista ruoka-aineista kuten meijerituotteista, äidinmaidonkorvikkeista, kekseistä sekä perunalastuista. Rasvapitoisuuden määrittäminen tällä menetelmällä on huomattavasti nopeampaa kuin perinteisellä menetelmällä tehty määrittäminen, jossa rasva erotetaan uuttamalla. Testi on kehitetty määrittämään rasvapitoisuutta näytteistä, joiden kokonaisrasvan määrä on 0,5-90 prosenttia. Testisarja sisältää reagenssit A ja Blank ja yhden kontrollinäytteen (kuvio 8) sekä viisi kalibrointinäytettä (MP biomedical 2011).



KUVIO 8. Percent Fat testisarjan reagenssit ja kalibrointinäyte.

SafTest kontrollinäytteitä ovat L=low, M=medium ja H=high (kuvio 9). Kontrollinäytteitä käytetään PeroxySafe ja AciSafe testisarjojen yhteydessä. Kontrollinäytteiden mukana toimitetaan raja-arvot kyseisille näytteille. Testisarjojen kalibrointiaineet ja reagenssit sekä kontrollinäytteet eivät ole myrkyllisiä ja kaikki kemikaalit voidaan hävittää kaatamalla viemäriin.



KUVIO 9. Kontrollinäytteet L, M ja H.

SafTest Preparation Reagent -nimistä reagenssia käytetään näytteiden laimentamiseen. Reagenssi sisältää isopropanolia ja siihen on lisätty stabiloimisaineita. Tällä reagenssilla laimennetut näytteet hävitetään haihduttamalla. (MP biomedical 2011.)

5 TYÖOHJE

Tässä työssä käytetään yleisiä laboratorio käytäntöjä. Laboratoriotakin ja suojakäsineiden käyttö on suositeltavaa. Työskentely vetokaapissa ei ole tarpeen. Rasvamäärityksen reagenssit tahrivat vaatteita ja työvälineitä. Pipetoinnit suoritetaan pääasiassa automaattipipeteillä. Pipetoinneissa on aina oltava huolellinen ja pipetin kärjet on vaihdettava jokaisen pipetoinnin yhteydessä. Ainoastaan samaa ainetta pipetoitaessa voidaan käyttää samaa kärkeä, mutta tällöin on vältettävä kontaminaatoriskiä. Kaikki työssä käytettävät reagenssit ovat vesipohjaisia ja ne voidaan hävittää kaatamalla viemäriin. Laimentamiseen käytettävä aine sisältää isopropanolia, joka tulee hävittää haihduttamalla. Työn lopussa jätteet lajitellaan omiin jäteastioihin ja kaikki SafTestiin kuuluvat aineet siirretään jääkaappiin. Spektrofotometri ja muut sähkölaitteet sammutetaan. (Package Insert for FASafe/AciSafe.)

5.1 Alkutoimet

Käytettävien testisarjojen on oltava huoneenlämpöisiä ennen määritysten aloittamista. Testisarjat, kontrollinäytteet sekä laimentamiseen käytettävä Preparation Reagent otetaan jääkaapista tasaantumaan huoneenlämpöön noin tunti ennen työn aloittamista. Samaan aikaan voidaan käynnistää spektrofotometri ja lämmityslohko. Lämmityslohko asetetaan lämpenemään 37–42 °C:een. Lämmityslohkoon laitetaan lämpömittari, josta voidaan helposti tarkastaa oikea lämpötila. (Preparation Samples for MSA Assays.)

5.2 Näytteen esikäsittely

Tutkittavia näytteitä varten nimetään tarvittava määrä muovisia kartiomaisia 15 ml:n näyteputkia. Näyteputkista irrotetaan korkit ja putkiin lisätään 4 lasikuulaa sekä 1,8 millilitraa Preparation Reagenttia laimentamaan näytettä. Tutkittavaa näytettä punnitaan 0,20 g ($\pm 0,05$ g) näyteputken korkin keskiosaan. Korkit kiinnitetään näyteputkiin ja ravistellaan niin, että näyte sekaantuu nesteeseen joukkoon. Saatua laimennos on 1:10, mikä täytyy ottaa huomioon lopullisten tulosten tarkastelussa. Näyteputkia sekoitetaan Vortex-sekoittajalla noin minuutin ajan, minkä jälkeen näytteet laitetaan lämmityslohkoon 15 minuutin ajaksi. Lämmityksen aikana seurataan liukenemista ja tarvittaessa sekoitetaan näytteitä.

Jokaista näytettä varten nimetään lasinen koeputki. Lasiset koeputket asetetaan suodatinyksikköön ja kiinnitetään suodattimet putkien päälle. 15 minuutin lämmitysajan jälkeen kaadetaan jokaisesta näyteputkesta näyte omaan suodatimeen ja suljetaan suodattimien kannet. Suodatinyksikkö käynnistetään ja kasvatetaan painetta hiljalleen 5–10 yksikköön. Suodoksen tulee olla homogeeninen ja mahdollisimman kirkas. Rasvaisilla näytteillä suodos saattaa jäädä hieman sameaksi. Mikäli suodokseen tulee selvästi kaksi eri faasia, se tulee suodattaa uudelleen käyttäen uutta suodatinta. Suodattimet ovat kertakäyttöisiä, joten on muistettava merkitä selkeästi käytetyt suodattimet. Suodokset voidaan poistaa suodatinyksiköstä ja laittaa lämpölohkoon odottamaan testin suoritusta. (Preparation Samples for MSA Assays.)

5.3 Vapaiden rasvahappojen määrittäminen

Tässä määrittämisessä käytetään AcSafe-testisarjaa sekä kontrollinäytteitä low, medium ja high. Nimetään lasikoeputket jokaiselle kalibrointinäytteelle (5 kpl), kontrollinäytteille (3 kpl) sekä tutkittaville näytteille. Nimettyihin koeputkiin pipetoidaan kyseistä ainetta 100 μ l. Ajastinkello säädetään valmiiksi 10 minuuttiin. Seuraavaksi jokaiseen koeputkeen pipetoidaan 2,35 ml Reagent A:ta. Lopuksi vielä pipetoidaan jokaiseen koeputkeen 0,15 ml Reagent B:tä. Käynnistetään ajastinkello heti viimeisen pipetoinnin jälkeen. Koeputket suljetaan korkeilla ja sekoitetaan niitä Vortex-sekoittimella 30 sekunnin ajan. Jäljellä olevaksi ajaksi

koeputket laitetaan lämpölohkoon (37–44 °C). Erittäin tärkeää on tehdä mittaukset heti 10 minuutin kuluttua.

Ennen mittausten suorittamista tarkastetaan, että spektrofometrissä on käytössä aallonpituussuodatin 570/690. Aloitetaan mittaukset painamalla näppäintä *RUN* ja valitaan *Aci/MSA*-ohjelma *Enterillä*. Varsinaisten näytteiden rinnakkaismittausten lukumääräksi valitaan 3 ja painetaan *Enter*. Ennen jokaista mittausta pyyhitään mitattavan näytteen koeputki Kimwip–paperilla, koska sormenjäljet ja muu lika vääristävät tulosta. Kun näytöllä lukee *"Read Blank, Insert Tube"* asetetaan tislattua vettä sisältävä koeputki lukijaan. Mittaus kestää ainoastaan muutaman sekunnin, joten koeputket tarvitsee vain käyttää nopeasti lukijassa. Seuraavaksi näytölle tulee teksti *"Cal #_Insert Tube"*, jolloin syötetään lukijaan kalibrintinäytteet järjestyksessä yhdestä viiteen. Kalibrintiliuosten jälkeen näytölle tulee teksti *"Store Cal Data"*. Tähän vastataan painamalla *YES*. Kun näytölle ilmestyy teksti *"Smpl#_Rep#_"*, kontrollinäytteet low:sta alkaen asetetaan kolmesti peräkkäin lukijaan. Myös kaikki mitattavat näytteet syötetään kolmesti peräkkäin lukijaan. Kun kaikki näytteet on mitattu, painetaan *STOP*-näppäintä, jonka jälkeen tulostusyksiköstä tulostuu yhteenveto tehdyistä määrittämisistä. (Testing Samples with the AciSafe Kit –MSA Assays.)

5.4 Peroksidipitoisuuden määrittäminen

Peroksidipitoisuuden määrittämiseen käytetään PeroxySafe–testisarjaa sekä samoja kontrollinäytteitä kuin vapaiden rasvahappojen määrittämisessä. Määrittäminen aloitetaan jälleen nimeämällä lasikoeputket jokaiselle kalibrintinäytteelle (4 kpl), kontrollinäytteille (3 kpl) sekä tutkittaville näytteille. Aloitetaan pipetoimalla jokaiseen koeputkeen kyseistä ainetta 200 µl. Tämän jälkeen koeputkisiin pipetoidaan ensin Reagent A:tä 2,1 ml, jonka jälkeen Reagent B:tä 0,15 ml ja lopuksi Reagent C:tä 0,25 ml. Viimeisen pipetoinnin jälkeen toimitaan kuten FFA–määrittämisessä käynnistämällä 10 minuutin ajastus ja suljetaan koeputket korkeilla. Koeputkia sekoitetaan aluksi Vortex–sekoittimella noin 10 sekunnin ajan, minkä jälkeen koeputket laitetaan koeputkisekoittajaan loppu ajaksi. Viiden minuutin kohdalla tarkastetaan koeputket ja liuoksien ollessa kirkkaita annetaan niiden

pyöriä sekoittajassa loppuaika. Jos yhdessäkin liuoksessa on sameutta, kaikki koeputket siirretään lämmityslohkoon viimeiseksi viideksi minuutiksi ennen mittauksen suorittamista.

Mittaukset suoritetaan spektrofotometrillä samoin kuin vapaiden rasvahappojen määrittämisessä käyttäen kuitenkin ohjelmaa *PER/MSA*. Aallonpituussuodattimena on edelleen 570/690. (Testing Samples with the PeroxySafe Kit –MSA Assays.)

Spektrofotometriin tallentuu viimeiseksi tehdyt kalibroinnit jokaisesta määrittämisestä. Mittauksia voidaan suorittaa ilman kalibrointinäytteitä, mikäli halutaan käyttää samaa kalibrointisuoraa. Tällöin mittausohjelma valitaan *STAT*-komennon alta, jolloin lukijaan syötetään aluksi tislattu vesinäyte, minkä jälkeen lukijaan voidaan syöttää tutkittavat näytteet. Tämä mahdollistaa suurienkin näytemäärien testaamisen pienessä ajassa. Mikäli näytteitä on paljon, on huomioitava koeputkisekoittajaan mahtuvien näytteiden määrä. Tällöin täytyy käyttää samaa kalibrointisuoraa näytteiden määrittämiseksi. (Testing Samples with the AciSafe Kit –MSA Assays.)

5.5 Kokonaisrasvan määrittäminen

Kokonaisrasvan määrittämisessä käytetään Percent Fat –testisarjaa. Näytteen laimentamisen määrä riippuu odotettavissa olevasta rasvaprosentin määrästä ruuassa tai öljyssä, jota tutkitaan. Taulukosta 2 nähdään suositellut laimennossuhteet, kun tiedetään, mille välille rasvaprosentin ennustetaan sijoittuvan.

TAULUKKO 2. Laimennossuhteet.

Suosittel laimennossuhde	Odotettu rasva%
1:4	0,0-1,6
1:8	0,5-1,25
1:16	1,0-2,4
1:32	2,0-5,0
1:64	4,0-10,0
1:128	8,0-20,0
1:256	16,0-40,0
1:400	24,0-64,0
1:500	30,0-80,0

Laimennossuhde voidaan myös laskea kaavasta

$$Laimennossuhde = \frac{1}{\left(\frac{rasva\%}{0,16} \right)} \quad (3)$$

jossa rasva% on odotettavissa oleva rasvaprosentti

Rasvapitoisuuden määrittäminen aloitetaan samoin kuin edelliset määrittäykset, merkitsemällä jokaiselle näytteelle, viidelle kalibrointinäytteelle, kontrollinäytteelle sekä reagenssi Blank näytteelle omat lasikoeputket. Tässä määrittäyksessä koeputkiin pipetoidaan kyseistä ainetta 25 µl, minkä jälkeen jokaiseen koeputkeen pipetoidaan 1 ml Reagent A:ta. Koeputket suljetaan korkeilla ja käännettäessä varovasti koeputkia neljä kertaa, näytteitä ei saa sekoittaa voimakkaasti. Asetetaan näytteet 40-asteiseen lämmityslohkoon 10 minuutin ajaksi, minkä jälkeen tulokset mitataan spektrofotometrillä.

Rasvamäärittäyksessä käytettävä aallonpituussuodatin on 550/690, mikä poikkeaa muissa määrittäyksissä käytetyistä suodattimista. Aloitetaan mittaukset painamalla näppäintä *RUN* ja valitaan *%FAT*-ohjelma *Enterillä*. Mittaukset suoritetaan samalla tavalla kuin FFA-määrittäyksessä. Ainoana lisäyksenä on Reagent Blank-näytteen mittaaminen tislattun vesinäytteen jälkeen. Kun näytölle tulee teksti *"Reagent Blank"*, syötetään lukijaan kyseinen näyte. Tämän jälkeen mittaukset

jatkuvat kuten aiemmissa määrittelyissä. (Testing Samples with the Percent Fat Kit.)

5.6 Laimennokset

Laimennoksen tarkoituksena on saada mitattava komponentti mitattavalle tasolle. Mikäli näytteen tuloksen perässä lukee Hi, näytteen tulos on yli korkeimman standardin, jolloin näyte täytyy laimentaa luotettavan tuloksen saamiseksi (Preparation Samples for MSA Assays). Laimennos tehdään suodatetusta näyteliuksesta lisäämällä siihen Preparation Reagenttia. Tässä työssä on suurimmaksi osaksi käytetty laimennossuhdetta 1:10. Tuloksen mennessä yli korkeimman standardin on kyseisestä laimennosta uudelleen laimennettu käyttäen laimennossuhdetta 1:2.

Laimennos saadaan kaavasta

$$D = \frac{X}{(X + Y)} \quad (4)$$

jossa D on laimennos

X on näytteen määrä

Y on laimentimen määrä

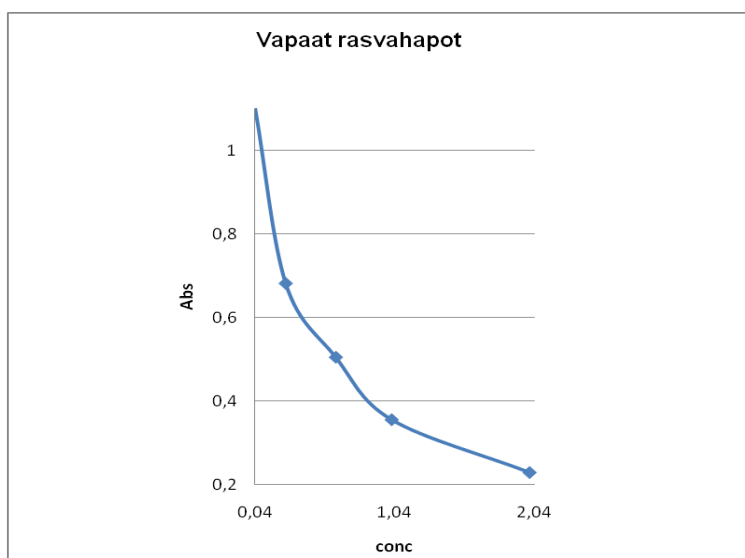
Lopullinen laimennos sarjalaimennoksissa on laimennosten kertoma. Kun toinen laimennos B tehdään liuoksesta A, lopulliseksi laimennokseksi saadaan A*B, esimerkiksi (1:10)*(1:2)=1:20.

5.7 Tulosten laskeminen

Spektrofotometriin liitetystä tulostusyksiköstä tulostuu jokaisen määrittelyn jälkeen saadut tulokset. Liitteessä 1 on esitetty peroksidimäärittelystä saatu tuloste. Tulosteen yläreunaan muodostuu kuvaajaan kalibroitikäyrä, joka on hieman erilainen eri määrittelyissä. Konsentraatiot ja absorbanssit näkyvät

kuvaajan alapuolella. Näiden alapuolelta alkaa varsinaisten näytteiden tulokset. Tuloksissa näkyy kolme mittausta ja laskettu keskiarvo. Ensimmäiset kolme mittausta ovat kontrollinäytteet. Kontrollinäytteitä tulee verrata annettuihin raja-arvoihin (liite 2). Mikäli näytetuloksen perässä lukee Hi, tulos on mennyt yli korkeimman kalibrointituloksen. Tällöin näyte tulee laimentaa ja mitata uudelleen luotettavan tuloksen saamiseksi. Näytetuloksen perässä voi olla myös teksti LO, joka tarkoittaa, että tulos on mennyt alimman kalibrointituloksen alle. Tällainen tulos tulee ilmoittaa merkillä < (alin kalibrointitulos). (Testing Samples with the AciSafe Kit –MSA Assays.)

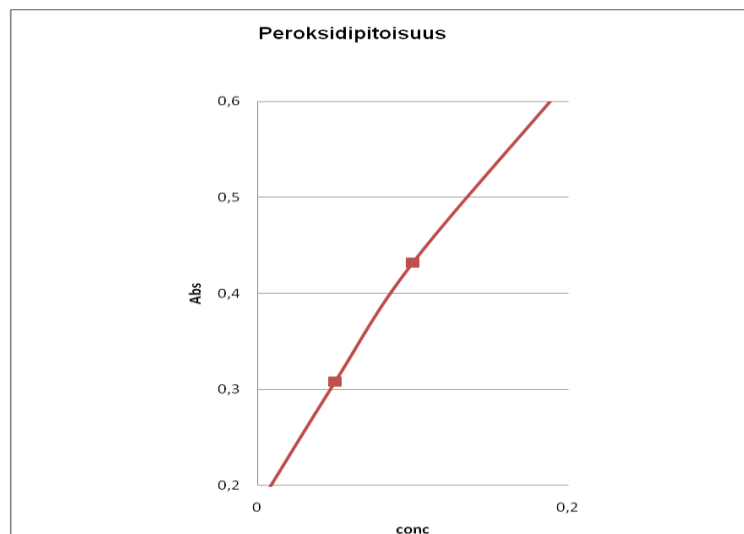
Vapaiden rasvahappojen määrittämisessä kuvaajan tulee olla laskeva, kuten kuviosta 10 nähdään.



KUVIO 10. Vapaiden rasvahappojen kalibrointikäyrä.

SafTest Analyzer laite laskee vapaiden rasvahappojen tulokseksi öljyhapon prosenttiosuuden näytelaimennoksessa. (Testing Samples with the AciSafe Kit –MSA Assays.)

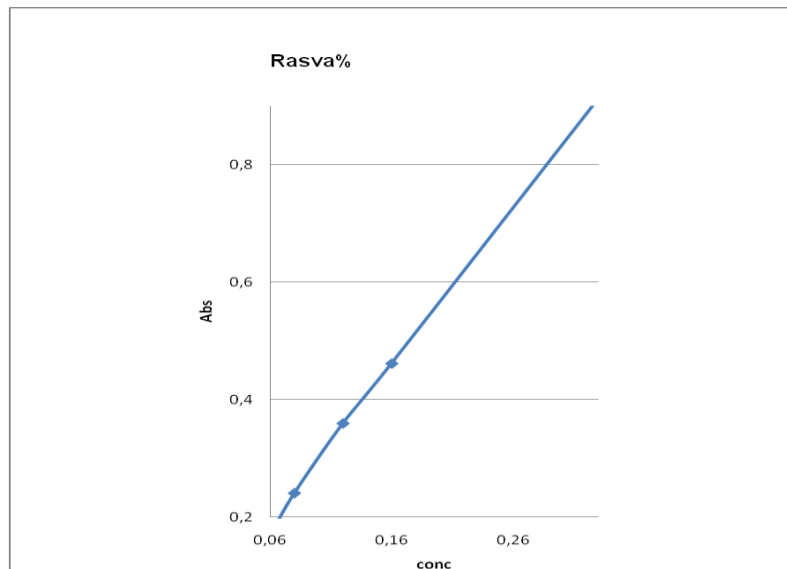
Peroksidipitoisuutta määrittäessä kalibrointikäyrän tulee olla lineaarisesti nouseva (kuvio 11).



KUVIO 11. Peroksidipitoisuuden kalibrointikäyrä.

SafTest Analyzer laskee peroksidipitoisuuden milliekvivalentteina kilogrammaa rasvaa kohti näytelaimennoksessa. (Testing Samples with the PeroxySafe Kit – MSA Assays.)

Kokonaisrasvan määrittämisessä saatu kalibrointikäyrä on esitetty kuviossa 12.



KUVIO 12. Rasvaprosentin kalibrointikäyrä.

Kokonaisrasvan määrittämisessä tulokset kertovat paljonko näyte sisältää rasvaa prosentteina. (Testing Samples with the Percent Fat Kit.)

Jokaisessa määrittämisessä lopullinen tulos lasketaan laimennoskerroin huomioiden. Rasvapitoisuuden määrittämisessä on myös huomiotava laimennosaineen tiheys, koska laimennoskerroin on suuri. Ennen tulosten julkaisemista on hyvä tarkastella variaatiokerrointa ja peroksidimäärittämisessä lisäksi korrelaatiokerrointa. Kaikissa määrittämissä variaatiokertoimen (tulosteessa %CV) tulee olla alle 10 %. Peroksidimäärittämisessä korrelaatiokertoimen (tulosteessa corr) tulee olla vähintään 0,990. (Testing Samples with the Percent Fat Kit, Testing Samples with the PeroxySafe Kit –MSA Assays, Testing Samples with the AciSafe Kit –MSA Assays.)

6 SAFTEST–MENETELMÄN TESTAAMINEN JA TULOSTEN TARKASTELU

SafTest–menetelmän testaamiseen käytettiin eri säilytysmenetelmin huononnettuja rasvanäytteitä (liite 3), koska huononnetuissa näytteissä pitoisuuksien tulisi olla suuremmat ja näin ollen tarkastelun helpompaa. Tutkittavina näytteinä olivat voiöljy, Oivariini 75 % ja Kevyt Levi 40 %. Alkuperäisenä tarkoituksena oli myös tutkia erityyppisiä maitojauheita, mutta näiden osalta tutkimukset jätettiin kesken näytteiden huonon liukenemisen vuoksi. Liitteessä 4 on kuitenkin esitetty toistettavuus tutkimuksella saatuja tuloksia maitojauheista.

Tutkimukseen käytettiin PeroxySafe-, AciSafe- sekä PercentFat–testisarjoja. Työssä tutkittiin menetelmän toistettavuutta testaamalla useita kertoja samaa näytettä sekä oikeellisuutta vertaamalla saatuja tuloksia perinteisin menetelmin saatuihin tuloksiin.

6.1 Toistettavuustutkimus

Toistettavuustutkimukseen valittiin kolme näytetyyppiä; voiöljy, Oivariini 75% sekä Kevyt Levi 40%. Näistä tehtiin viisi rinnakkaista määrittystä lähtien aina määrittelyn alusta eli näytteen punnitsemisesta. Mittauksia tehtiin eri päivinä, joten myös kalibrointinäytteet ja kontrollinäytteet mitattiin jokaisen määrittelyn yhteydessä. Liitteessä 5 on esitetty tarkasti kaikki punnitukset, laimennokset sekä saadut tulokset. Näytetyypeistä Kevyt Levi 40 liukeni huonoiten isopropanolia sisältävään liuottimeen. Suodatuksessa kyseisestä näytteestä jäi usein sakkaa suodattimeen.

Taulukossa 3 on esitetty keskiarvot ja keskihajonnat saaduista tuloksista. Keskiarvolaskuissa ei ole kuitenkaan huomioitu liitteessä 5 esitettyjä tuloksia, joiden perässä on merkintä hylätty. Hylätyt tulokset poikkeavat suuresti muista saman tuoteryhmän saaduista tuloksista. Syy poikkeamiin on melko selvä.

Määrittämiseen tuli käyttää kertakäyttöisiä lasikoeputkia. Lasikoeputkien loppuessa ja tilauksen saapumista odotellessa työssä testattiin myös pestyjä lasikoeputkia. Tämä kuitenkin osoittautui virheitä aiheuttavaksi toimenpiteeksi, koska huolellinenkaan puhdistus ei saanut lasikoeputkista uuden veroisia, vaan niihin jääneet värierot vääristivät tuloksia spektrofotometrimittauksessa.

TAULUKKO 3. Toistettavuustutkimuksen tuloksien keskiarvot ja keskihajonnat.

Vapaat rasvahapot (FFA)

	voiöljy	Oivariini 75	Kevyt Levi 40	keskiarvo
keskiarvo	0,85	<0,39	1,63	
keskihajonta	0,10	<0,01	0,21	0,10

Peroksidipitoisuus (proksidipit.)

	voiöljy	Oivariini 75	Kevyt Levi 40	keskiarvo
keskiarvo	1,77	1,70	2,77	
keskihajonta	0,14	0,17	0,36	0,22

Tuloksia tarkasteltaessa on myös huomioitava, että Oivariini-näytettä määrittäessä vapaiden rasvahappojen kaikki tulokset menivät alle alimman kalibrointinäytteen, joten tulos ilmoitetaan <0,39.

Toistettavuustestauksen perusteella SafTest-menetelmän toistettavuus oli hyvä. Tämän osoittivat lasketut keskihajonnat. Keskihajontojen vaihteluväli on 0,01–0,36. Pääosin keskihajonnat olivat kuitenkin alle 0,20 luokkaa, ainoastaan

peroksidipitoisuuden määrittämisessä tuotteesta Kevyt Levi 40 saatujen tulosten keskihajonta oli hieman korkeampi 0,36. Kevyt Levin määrittämisessä virheitä aiheutti sen huono liukenevuus isopropanoliin. Kummassakin määrittämisessä keskihajontojen keskiarvot olivat kuitenkin hyvin pienet 0,10 (FFA) ja 0,21 (peroksidipit).

6.2 Oikeellisuustutkimus

Oikeellisuustutkimukseen valittiin neljä näytettä jokaisesta näytetyypistä. Näytteistä punnittiin ja liuotettiin yksi suodos. Suodoksesta tehtiin SafTest-menetelmällä mittaukset kahtena rinnakkaisena. Liitteessä 6 on esitetty kaikki punnitustulokset sekä SafTest-tulokset ja laimennoskertoimet FFA- ja peroksidimäärittämisistä. Rinnakkaismittauksissa saatujen tulosten keskiarvoja verrattiin Valion T&K:lla perinteisin menetelmin saatuihin tuloksiin peroksidipitoisuuksista ja vapaista rasvahapoista. SafTest-menetelmän tulos muutettiin Röse-Gottlieb-rasvamäärittäyksen rasvaprosenttituloksen avulla vastaamaan vertailumenetelmien yksiköitä. Kokonaisrasvan määrä perinteisellä menetelmällä määritettiin Valio Seinäjoen laboratoriossa.

Taulukossa 4 on esitetty kokonaisrasvamäärittämisessä saadut tulokset SafTest-menetelmällä sekä perinteisellä menetelmällä. SafTest-rasvamäärittäyksen herkkyysalue on 0,5–90 (MP biomedical 2011). Tämä tulee hyvin esille voiöljyistä saaduissa tuloksissa, jotka poikkeavat suuresti RG-menetelmällä saaduista tuloksista. Myös Oivariinin määrittämisessä tulokset olivat suuresti poikkeavia. Kevyt Levin määrittämisessä sen sijaan tulokset olivat kohtalaisia. Tästä voidaan päätellä, että menetelmällä saadaan luotettavempia tuloksia hieman alhaisemman rasvaprosentin sisältävistä näytteistä. SafTest-menetelmällä saatujen arveluttavien rasvaprosenttitulosten vuoksi käytettiin muissa määrittämisissä RG-menetelmällä saatuja rasvaprosentteja muuntaessa SafTest-tuloksia vertailutulosten yksiköiden kanssa vastaaviksi.

TAULUKKO 4. Kokonaisrasvamäärityksen tulokset ja vertailu tulokset.

Näyte numero	Näyte	SafTest rasva%	RG rasva%
1	voiöljy	84,24	100
2	voiöljy	94,11	100
5	voiöljy	90,62	100
6	voiöljy	92,94	100
8	Oivariini 75	66,21	74,95
9	Oivariini 75	70,82	75,44
10	Oivariini 75	66,63	75,47
11	Oivariini 75	71,17	76,01
13	Kevyt Levi 40	39,73	39,14
14	Kevyt Lev i40	42,28	39,7
15	Kevyt Levi 40	39,12	40,1
17	Kevyt Levi 40	39,15	39,77

Vapaiden rasvahappojen eli FFA määrityksen tulokset ja vertailutulokset on esitetty taulukossa 5. Kolmannessa sarakkeessa on ilmoitettu SafTest-menetelmällä saadut tulokset, joihin on huomioitu laimennoskerroin. Seuraavassa sarakkeessa on esitetty lasketut FFA-pitoisuudet rasvassa. Laskuissa on käytetty perinteisellä menetelmällä saatuja rasvapitoisuusarvoja.

TAULUKKO 5. Oikeellisuustutkimuksen FFA tulokset ja vertailutulokset.

Näyte nro	näyte	FFA %öljyhappoa näytteessä	FFA %öljyhappoa rasvassa	FFA %öljyhappoa rasvassa keskiarvo	vertailutulos mg/öljyhappoa 100 g rasvaa
1	voiöljy	0,87	0,87	0,78	0,22
1	voiöljy	0,69	0,69		
2	voiöljy	0,54	0,54	0,64	0,22
2	voiöljy	0,73	0,73		
5	voiöljy	0,39	0,39	0,57	0,17
5	voiöljy	0,75	0,75		
6	voiöljy	0,40	0,4	0,55	0,17
6	voiöljy	0,70	0,7		
8	oivariini	0,39	0,52	0,52	0,13
8	oivariini	0,39	0,52		
9	oivariini	0,39	0,52	0,52	0,12
9	oivariini	0,39	0,51		
10	oivariini	0,39	0,52	0,51	0,11
10	oivariini	0,39	0,51		
11	oivariini	0,40	0,52	0,52	0,12
11	oivariini	0,39	0,52		
13	kevyt levi	0,86	2,19	3,23	0,2
13	kevyt levi	1,67	4,28		
14	kevyt levi	1,08	2,73	3,79	0,19
14	kevyt levi	1,93	4,86		
15	kevyt levi	1,39	3,46	3,92	0,18
15	kevyt levi	1,76	4,39		
17	kevyt levi	1,44	3,63	4,42	0,12
17	kevyt levi	2,07	5,20		

Ongelmia vertailussa aiheuttivat yksiköt. Täyttä varmuutta ei ollut SafTest-menetelmän ja vertailumenetelmän yksiköiden vastaavuudesta. Tässä kuitenkin verrattiin tuloksia keskenään olettaen niiden olevan vertailukelpoisia.

Huomiota tulostarkastelussa herätti näytteiden mittaustulosten jakauma. SafTest-menetelmällä saatujen tulosten jakauma oli 0,51–4,42. Vertailumenetelmällä vastaava tulosjakauma oli kuitenkin vain 0,11–0,22. Vertailumenetelmän tulosjakauma ihmetyttää, sillä näytteet olivat kuitenkin huononnettuja, minkä perusteella oletettiin tulostenkin olevan suurempia. Tästä voidaan päätellä, että SafTest-menetelmällä oli parempi erottelukyky.

Voiöljyn ja Oivariinin tulostasoissa oli eroa -0,4 yksikköä. Kevyt Levi poikkesi joukosta. Liukenevuuden vaikeus näkyi Kevyt Levin tuloksissa. Sen tulostasossa oli eroa -3,7 yksikköä ja myös rinnakkaistuloksissa oli suuria eroja.

Taulukossa 6 on esitetty peroksidipitoisuusmäärittämisessä saadut tulokset SafTest-menetelmällä sekä vertailumenetelmällä. Taulukon tulokset on ilmoitettu kuten FFA-tilauksessa. Lisäksi peroksiditaulukossa on muutettu yksiköt vastaamaan vertailumenetelmän yksiköitä kertomalla sarakkeessa 4 esitetyt tulokset 0,5:llä.

Peroksidipitoisuuden määrittämisessä saadut tulokset olivat vertailukelpoisia ja parempia kuin FFA-määrittämisessä. Tulosjakauma oli SafTestin tuloksissa 0,15–4,24 ja vertailumenetelmän tuloksissa 0,21–4,1, joten tulosjakaumissa ei suuria eroja ollut eri menetelmillä. Edelleen ongelmana oli Kevyt Levin huono liukenevuus ja tässä määrittämisessä rinnakkaistuloksissa oli kaikkein suurinta hajontaa. Oikeellisuustutkimuksen perusteella voidaan päätellä, että peroksidipitoisuuden määrittäminen SafTest-menetelmällä oli luotettava.

TAULUKKO 6. Oikeellisuustutkimuksen peroksidipitoisuudet ja vertailutulokset.

Näyte nro	näyte	Peroksidipit. meq/kg näytettä	Peroksidipit. meq/kg rasvaa	Peroksidipit. Muutettu mmol happea/kg rasvaa	Peroksidipit. mmol happea/kg rasvaa Keskiarvo	vertailutulos mmol happea/kg rasvaa
1	voiöljy	1,54	1,54	0,77	0,81	2,30
1	voiöljy	1,71	1,71	0,86		
2	voiöljy	6,03	6,03	3,02	3,84	4,10
2	voiöljy	9,33	9,33	4,67		
5	voiöljy	0,36	0,36	0,18	0,21	0,26
5	voiöljy	0,47	0,47	0,24		
6	voiöljy	0,82	0,82	0,41	0,62	1,50
6	voiöljy	1,17	1,67	0,84		
8	oivariini	1,71	2,29	1,14	1,10	3,90
8	oivariini	1,58	2,11	1,06		
9	oivariini	1,27	1,69	0,84	0,78	2,00
9	oivariini	1,08	1,43	0,72		
10	oivariini	0,37	0,49	0,25	0,15	0,21
10	oivariini	0,09	0,11	0,06		
11	oivariini	0,73	0,96	0,48	0,45	1,10
11	oivariini	0,65	0,85	0,43		
13	kevyt levi	3,65	9,32	4,66	4,24	3,90
13	kevyt levi	3,00	7,66	3,83		
14	kevyt levi	3,32	8,35	4,18	3,67	4,00
14	kevyt levi	2,51	6,32	3,16		
15	kevyt levi	3,00	7,47	3,74	3,23	3,90
15	kevyt levi	2,19	5,45	2,73		
17	kevyt levi	0,49	1,22	0,61	0,71	0,53
17	kevyt levi	0,65	1,63	0,81		

7 POHDINTA JA YHTEENVETO

SafTest–menetelmän testaaminen aloitettiin toistettavuustutkimuksella. Toistettavuutta tutkittiin samasta näytteestä viitenä rinnakkaisena mittauksena ja näytteistä tehtiin sekä FFA– että peroksidimääritykset. Tämän tutkimuksen perusteella näytteiden toistettavuus oli luotettavaa. Oikeellisuustutkimuksessa tuloksia verrattiin perinteisin menetelmin saatuihin tuloksiin. Jokaisesta tuoteryhmästä valittiin näytteitä, joista tehtiin rinnakkaismääritykset ja näiden keskiarvoja käytettiin vertailuun. Tässä tutkimuksessa määritettiin FFA:n ja peroksidipitoisuuden lisäksi rasvapitoisuus. Tämän tutkimuksen osalta ainoastaan peroksidipitoisuus määritykset oli luotettavia ja saadut tulokset hyviä verrattuna perinteisin menetelmin saatuihin tuloksiin.

Työssä ilmeni muutamia ongelmakohtia, jotka vaikuttivat oikeellisuustutkimuksessa vertailuun. Rasvapitoisuuden määrityksessä saadut tulokset poikkesivat suuresti vertailutuloksista. Ainoastaan pienemmän rasvapitoisuuden sisältävästä Kevyt Levi näytteestä saadut tulokset olivat kelvollisia. Toisena ongelmana oli FFA–määrityksen yksikkö. Täydelliseen varmuuteen yksiköiden täsmävyvyydestä ei päästy. Saattaa siis olla, että SafTest–menetelmällä saadut tulokset eivät ole vertailukelpoisia kyseisten vertailutulosten kanssa.

Tutkimuksen kohteena olivat ainoastaan huononnetut näytteet. Tuoreiden näytteiden tutkiminen olisi pitänyt sisällyttää työhön, koska todellisuudessa tutkimuskohteena ovat tuoreet näytteet. Vertailutulosten suuret erot saattoivat johtua myös siitä, että perinteisin menetelmin määritykset tehtiin Valion T&K:lla vasta muutama viikko SafTest–määritysten jälkeen.

Tämän tutkimuksen pohjalta saatujen tulosten perusteella ei SafTest–menetelmän käyttöönotto vielä tullut ajankohtaiseksi Valio Seinäjoen tehtaan aluelaboratoriossa. Käytettävyydeltään menetelmä kuitenkin soveltuisi Seinäjoen laboratorion käyttöön ja olisi mahdollista myös sijoittaa tuotantoon.

LÄHTEET

- Asu, A. xxx.xxx@xxx.fi 15.11.2010. SafTest. [Henkilökohtainen sähköpostiviesti]. Vastaanottaja: Katja Vähämäki. [Viitattu 9.4.2011].
- deMan, J. 1999. Principles of Food Chemistry. Third edition. Meryland: Aspen Publisher.
- Jaarinen, S & Niiranen, J. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. 5. uudistettu painos. Helsinki: Edita Prima Oy.
- Maunumaa, M-K. 1999. Peroksidiluvun määrittäminen maitovalmisteista erotetusta rasvasta.
- MP biomedical. 2011. [Verkkosivusto]. Food Quality/Biodiesel: Kits/Prep Reagent/Controls. [Viitattu 16.4.2011]. Saatavana: http://www.mpbio.com/product_info.php
- Package Insert for FASafe/AciSafe. SafTest Inc.
- Preparing Samples for MSA Assays. Solon: SafTest Inc.
- The SafTest System. 2003. The SafTest System: Undrstanding and using SafTest Kits and equipment. Solon: SafTest Inc.
- Testing Samples with the Percent Fat Kit. Tempe: SafTest.
- Testing Samples with the PeroxySafe Kit –MSA Assay. Solon:SafTest.
- Testing Samples with the AciSafe Kit –MSA Assays. Solon: SafTest Inc.
- Turpeenoja, L. 2005. Biokemiaa.4. painos. Vantaa: Dark Oy.
- Valio Oy. 2007. Rasvan happoisuuden määrittäminen vedettömällä emästitrauksella automaattititraattorilla ravintorasvoista. Kemiallisten menetelmien käsikirja.
- Valio Oy. 2009. Rasvapitoisuuden määrittäminen Röse-Gottlieb –menetelmällä maitovalmisteista. Kemiallisten menetelmien käsikirja.

LIITE 1. Peroksidimäärittelyn tuloste

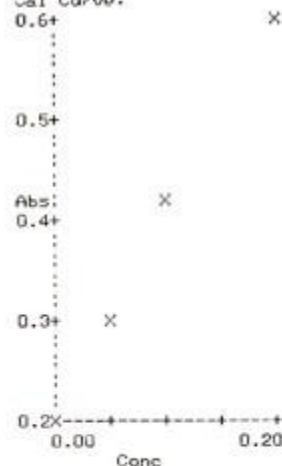
11/26/10 03:45:13
 *** MicroChem II ***
 *** EBI Source Scientific ***
 PROTOCOL: PER MSA
 TECH ID : _____

LOT # : _____

EXP DATE: _____

Data Reduction: Linear Regression
 Transformation: Linear/Linear
 Wavelength : 570 nm
 Units : MEG/KG

Equation Of Line:
 Slope: 2.2084
 Intercept: 0.1913
 Corr: 0.9964
 Cal Curve:



Calibrator Data:

Conc	Abs	Predic	Diff	%Diff
0.000	0.177	-0.007	-0.007	100.000
0.050	0.308	0.053	0.003	5.747
0.100	0.432	0.109	0.009	8.070
0.200	0.622	0.195	-0.005	-2.644

Sample Data:

Smpl	Abs	Conc	%CV
1	0.3892	0.0896	
	0.3882	0.0892	
	0.3889	0.0895	
Mean:	0.389	0.089	0.3
ID:			

LIITE 2. Kontrollinäytteiden raja-arvot

Vapaiden rasvahappojen kontrollinäytteiden raja-arvot

Low	0,309-0,435
Medium	0,562-0,722
High	0,950-1,278

Peroksidipitoisuuden kontrollinäytteiden raja-arvot

Low	0,053-0,081
Medium	0,111-0,141
High	0,171-0,198

Rasva% kontrollinäytteen raja-arvo

Control	0,089-0,124
----------------	-------------

Vapaiden rasvahappojen määrittämisestä saadut keskiarvot ja keskihajonnat kontrollinäytteiden raja-arvoille

ka	0,365	0,707	1,184
s	0,028	0,076	0,261

Peroksidipitoisuuksien määrittämisestä saadut keskiarvot ja keskihajonnat kontrollinäytteiden raja-arvoille

ka	0,0817	0,14251	0,188
s	0,010739853	0,01378	0,011

LIITE 3. Näyteluettelo

Näyte nro	Tuote	Valmistus pvm	Parasta ennen pvm	Säilytys
1	Voiöljy	11/09	5/10	kylmässä
2	Voiöljy	11/09	5/10	huononnettu lämpökaapissa n. 1 kk +45°C, jonka jälkeen pakastettu
3	Voiöljy	11/09	5/11	huononnettu lämpökaapissa n. 1 kk +45°C, jonka jälkeen säilytys kylmässä
4	Voiöljy	22.1.2010	22.7.2010	kylmässä
5	Voiöljy	22.1.2010	22.7.2010	pakastettu tuoreena 25.1.2010
6	Voiöljy	22.1.2010	22.7.2010	huononnettu lämpökaapissa n. 1 kk +45°C, jonka jälkeen pakastettu
7	Voiöljy	22.1.2010	22.7.2010	huononnettu lämpökaapissa n. 1 kk +45°C, jonka jälkeen säilytys kylmässä
8	Oivariini 75	21.8.2009	19.11.2009	kylmässä
9	Oivariini 75	20.1.2010	20.4.2010	kylmässä
10	Oivariini 75	20.1.2010	20.4.2010	pakastettu 1.3.2010
11	Oivariini 75	28.4.2010	27.7.2010	kylmässä
12	Oivariini 75	27.8.2010	25.11.2010	kylmässä
13	Kevyt Levi 40	2.12.2009	27.7.2010	kylmässä
14	Kevyt Levi 40	16.12.2009	10.2.2010	kylmässä
15	Kevyt Levi 40	13.1.2010	10.3.2010	kylmässä
16	Kevyt Levi 40	20.1.2010	17.3.2010	kylmässä
17	Kevyt Levi 40	20.1.2010	17.3.2010	pakastettu tuoreena 21.1.2010

LIITE 4. Maitojauheiden toistettavuustutkimus

Näyte	Punnittu (g)		FFA	Laimennos kerroin		FFA tulos %öljyhappoa näytteessä
rasvainen maitojauhe	1,0057		0,082	3,983		0,33
rasvainen maitojauhe	1,0017		0,074	3,995		0,30
rasvainen maitojauhe	1,0175	<	0,04	3,948	<	0,16
rasvainen maitojauhe	1,0154	<	0,04	3,955	<	0,16
kirnumaitojauhe	1,0017	<	0,04	3,995	<	0,16
kirnumaitojauhe	1,0136	<	0,04	3,960	<	0,16
kirnumaitojauhe	0,9882	<	0,04	4,036	<	0,16
kirnumaitojauhe	1,0168	<	0,04	3,950	<	0,16
startti vasikanjuomajauhe	1,0041		0,134	3,988		0,53
startti vasikanjuomajauhe	1,0084		0,091	3,975		0,36
startti vasikanjuomajauhe	1,0231	<	0,04	3,932	<	0,16
startti vasikanjuomajauhe	1,0096		0,089	3,971		0,35

Näyte	Punnittu (g)		Peroksidipit.		Laimennos kerroin		Peroksidipit. meq/kg näytettä
rasvainen maitojauhe	1,0057		0,041		3,983		0,163
rasvainen maitojauhe	1,0017	<	0,05	<	3,995	<	0,200
rasvainen maitojauhe	1,0175		0,0219		3,948		0,086
rasvainen maitojauhe	1,0154		0,025		3,955		0,099
kirnumaitojauhe	1,0017		0,011		3,995		0,044
kirnumaitojauhe	1,0136	<	0	<	3,960	<	0,000
kirnumaitojauhe	0,9882		0,01		4,036		0,040
kirnumaitojauhe	1,0168		0,006		3,950		0,024
startti vasikanjuomajauhe	1,0041		0,182		7,976		1,452
startti vasikanjuomajauhe	1,0084		0,048		7,950		0,382
startti vasikanjuomajauhe	1,0231		0,107		7,865		0,842
startti vasikanjuomajauhe	1,0096		0,12		7,943		0,953

LIITE 5. Toistettavuustutkimus (1/2)

Vapaiden rasvahappojen määrittäminen

Näyte nro.	Näyte	Punnittu (g)	FFA	laimennos kerroin	FFA tulos %öljyhappoa näytteessä
1	voiöljy	0,2182	0,084	9,2493	0,776942255
1	voiöljy	0,193	0,073	10,326	0,753829016
1	voiöljy	0,1932	0,113	10,317	1,165795 hylätty
1	voiöljy	0,2029	0,093	9,8714	0,918036964
1	voiöljy	0,2085	0,098	9,6331	0,944043165
8	oivariini 75	0,2076	<0,04	9,6705	<0,3868208
8	oivariini 75	0,1974	<0,04	10,119	<0,4047416
8	oivariini 75	0,2007	<0,04	9,9686	<0,3987443
8	oivariini 75	0,2092	<0,04	9,6042	<0,3841682
8	oivariini 75	0,204	<0,04	9,8235	<0,392941
13	kevytlevvi 40	0,2149	0,17	9,376	1,593918101
13	kevytlevvi 40	0,203	0,258	9,867	2,54568 hylätty
13	kevytlevvi 40	0,2048	0,196	9,7891	1,91865625
13	kevytlevvi 40	0,2015	0,159	9,933	1,579347395
13	kevytlevvi 40	0,2042	0,145	9,8149	1,423158668

LIITE 5. Toistettavuustutkimus (2/2)

Peroksidipitoisuuden määrittäminen

Näyte nro.	Näyte	Punnittu (g)	Peroksidipit.	laimennos kerroin	Peroksidipit. meg/kg näytettä
1	voiöljy	0,2182	0,193	9,2493	1,785
1	voiöljy	0,193	0,163	10,326	1,683
1	voiöljy	0,1932	0,199	10,317	2,053 hylätty
1	voiöljy	0,2029	0,171	9,8714	1,688
1	voiöljy	0,2085	0,176	9,6331	1,695
1	voiöljy	0,2049	0,176	9,7848	1,722
8	oivariini 75	0,2076	0,188	9,6705	1,818
8	oivariini 75	0,1974	0,07	20,237	1,417 hylätty
8	oivariini 75	0,2007	0,185	9,9686	1,844
8	oivariini 75	0,2092	0,181	9,6042	1,738
8	oivariini 75	0,204	0,172	9,8235	1,690
13	kevytleppi 40	0,2149	0,232	9,376	2,175 hylätty
13	kevytleppi 40	0,203	0,146	19,734	2,881
13	kevytleppi 40	0,2048	0,14	19,578	2,741
13	kevytleppi 40	0,2015	0,157	19,866	3,119
13	kevytleppi 40	0,2042	0,15	19,63	2,944

LIITE 6. Oikeellisuustutkimus (1/2)

Näyte nro	näyte	punnittu (g)	FFA	Laimennos kerroin	Tulos % öljyhappoa/kg näyte
1	voiöljy	0,2034	0,088	9,849557522	0,8668
1	voiöljy	0,2028	0,07	9,875739645	0,6913
2	voiöljy	0,2028	0,074	9,875739645	0,7308
2	voiöljy	0,2074	0,056	9,678881389	0,5420
5	voiöljy	0,2076	0,078	9,670520231	0,7543
5	voiöljy	0,2054	<0,04	9,76338851	<0,390535
6	voiöljy	0,2064	0,072	9,720930233	0,6999
6	voiöljy	0,2009	<0,04	9,959681434	<0,398387
8	oivariini 75	0,2068	<0,04	9,704061896	<0,388162
8	oivariini 75	0,2059	<0,04	9,742107819	<0,389684
9	oivariini 75	0,2081	<0,04	9,64968765	<0,385987
9	oivariini 75	0,2031	<0,04	9,862629247	<0,394505
10	oivariini 75	0,2084	<0,04	9,637236084	<0,385489
10	oivariini 75	0,2057	<0,04	9,750607681	<0,390024
11	oivariini 75	0,2046	<0,04	9,797653959	<0,391906
11	oivariini 75	0,2009	<0,04	9,959681434	<0,398387
13	kevyt levi 40	0,2062	0,172	9,729388943	1,6735
13	kevyt levi 40	0,2038	0,087	9,83218842	0,8554
14	kevyt levi 40	0,2081	0,2	9,64968765	1,9299
14	kevyt levi 40	0,2097	0,113	9,583690987	1,0830
15	kevyt levi 40	0,2076	0,182	9,670520231	1,7600
15	kevyt levi 40	0,1988	0,138	10,05432596	1,3875
17	kevyt levi 40	0,2045	0,211	9,80195599	2,0682
17	kevyt levi 40	0,2009	0,145	9,959681434	1,4442

LIITE 6. Oikeellisuustutkimus (2/2)

Näyte nro	näyte	punnittu (g)	Peroksidipit.	Laimennos kerroin	Peroksidipit. meg/kg näyte
1	voiöljy	0,2034	0,174	9,849557522	1,713823009
1	voiöljy	0,2028	0,156	9,875739645	1,540615385
2	voiöljy	0,2028	0,189	49,37869822	9,332573964
2	voiöljy	0,208	0,125	48,26923077	6,033653846
5	voiöljy	0,2076	0,049	9,670520231	0,473855491
5	voiöljy	0,2054	0,037	9,76338851	0,361245375
6	voiöljy	0,2064	0,12	9,720930233	1,166511628
6	voiöljy	0,2009	0,082	9,959681434	0,816693878
8	oivariini 75	0,2068	0,163	9,704061896	1,581762089
8	oivariini 75	0,2059	0,176	9,742107819	1,714610976
9	oivariini 75	0,2081	0,112	9,64968765	1,080765017
9	oivariini 75	0,2031	0,129	9,862629247	1,272279173
10	oivariini 75	0,2084	0,009	9,637236084	0,086735125
10	oivariini 75	0,2057	0,038	9,750607681	0,370523092
11	oivariini 75	0,2046	0,066	9,797653959	0,646645161
11	oivariini 75	0,2009	0,073	9,959681434	0,727056745
13	kevyt levi 40	0,2062	0,154	19,45877789	2,996651794
13	kevyt levi 40	0,2038	0,157	19,43341404	3,051046005
14	kevyt levi 40	0,2081	0,13	19,2993753	2,508918789
14	kevyt levi 40	0,2097	0,132	19,34104046	2,553017341
15	kevyt levi 40	0,2076	0,113	19,34104046	2,185537572
15	kevyt levi 40	0,1988	0,156	19,208413	2,996512428
17	kevyt levi 40	0,2045	0,066	9,80195599	0,646929095
17	kevyt levi 40	0,2009	0,05	9,737864078	0,486893204