

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Laboratoriotekniikka

2013 - 290813

Marion Rauvola

DEOKSINIVALENOLIN MÄÄRITYS VILJASTA SEMIKVANTITATIIVISELLA PIKATESTILLÄ



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Marion Rauvola

DEOKSINIVALENOLIN MÄÄRITYS VILJASTA SEMIKVANTITATIIVISELLA PIKATESTILLÄ

Fusarium-sienet eli punahomeet ovat viljalle yleisiä patogeeneja ympäri maailman. Ne heikentävät sadon laatua ja aiheuttavat terveydellisen haitan lisäksi merkittäviä taloudellisia tappioita viljelijöille. *Fusarium*-sienten määrä Suomessa kasvavissa viljoissa riippuu pitkälti kasvupaikasta, sääolosuhteista ja lajikkeiden alttiudesta homeelle. Homeiden tuottamista toksineista deoksinivalenoli (DON) on yleisin ja tutkituin hometoksiini. Euroopan komission asetuksessa (EY) No 1881/2006 asetetaan enimmäisraja-arvot toksineille elintarvikkeissa. DON-pitoisuuden lakisääteiset raja-arvot ovat kauralla 1,75 ppm ja muille viljoille 1,25 ppm.

Opinnäytetyössä testattiin pikamenetelmän toimivuus ja luotettavuus kolmella eri viljalajilla. DON-pitoisuuksia mitattiin prosessoimattomasta viljasta lähellä lakisääteisiä raja-arvopitoisuuksia. Määrittelyyn käytetty Rida®QuickDON-pikatesti ja tuloksen lukemiseen suunniteltu lukijalaite ovat laajalti käytössä viljakaupassa määritettäessä DON-pitoisuuksia ostettavasta viljasta. Testauksen antamia tuloksia verrattiin akkreditoidulla menetelmällä saatuihin tuloksiin ja tuloksia vertailtiin 95 % luottamustasolla toisiinsa. Tulosten raportoinnissa ja mitatun tuloksen mittausepävarmuuden laskemisessa noudatettiin lainsäädännön ohjeistusta. Työn tuloksista voidaan päätellä, että Rida®QuickDON-pikatesti ja tuloksen lukemiseen käytettävä Rida®Quick Scan-lukijalaite täyttävät Euroopan komission asetuksen (EY) 401/2006 asettamat vaatimukset kvantitatiiviselle DON-toksiinin määrittelykselle prosessoimattomasta viljasta.

ASIASANAT:

Fusarium-sienet, *Fusarium*-toksiinit, Deoksinivalenoli, sivuvirtaustesti, pikatesti, mittausepävarmuus

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Degree Programme in Biotechnology and Food Technology | Laboratory Technology

2013 | 65 pages

Instructors: Taina Hovinen, Senior Lecturer and Jukka Kaitaranta, Principal Lecturer

Marion Rauvola

DETERMINATION OF DEOXYNIVALENOL IN GRAIN BY SEMI-QUANTITATIVE QUICK TEST

Fusarium fungi causing brown foot rot are common pathogens in grain around the world. They reduce the crop quality and cause health risk in addition to significant financial losses for farmers. The presence of *Fusarium* fungi during cultivation in Finland depends largely on the growing area, the weather conditions and the susceptibility of the grain variety to fungi. *Fusarium* fungi produce toxins of which deoxynivalenol (DON) is the most common and studied toxin. EC Regulation No 1881/2006 sets the limits for mycotoxins in food. The DON limits are 1.75 ppm in oats and 1.25 ppm in other grain species.

The validity and reliability of the quick method were tested in this thesis for three different grain species. The DON concentrations were measured from unprocessed grain around the statutory threshold levels. The Rida®QuickDON quick test with a Rida®Quick Scan reader, which were also used in this thesis, are widely used in the grain trade to measure DON. The results were compared with those obtained by an accredited GC-MS method and at 95 per cent significance level. The legislation guidelines were followed when reporting the results and the measurement uncertainty of the calculation. According to the study, the Rida®QuickDON method with a Rida®Quick Scan reader fulfills the requirements of the Commission Regulation (EC) 401/2006 for a quantitative determination of DON content in unprocessed grain.

KEYWORDS:

Fusarium fungi, *Fusarium* toxin, deoxynivalenol, lateral flow test, quick test, measurement uncertainty

SISÄLTÖ

SANASTO	7
1 JOHDANTO	8
2 SUOMALAISESSA VILJASSA ESIINTYVÄT HOMEMYRKYT	10
2.1 <i>Fusarium</i> -suvun homesienet	10
2.2 <i>Fusarium</i> -toksiinit	11
2.2.1 Deoksinivalenoli	11
2.2.2 T-2 ja HT-2	12
2.2.3 Zearalenoni, fumonisiinit ja nivalenoli	13
2.2.4 Muut <i>Fusarium</i> -toksiinit	13
2.3 Viljan turvallisuusseurantatutkimukset Suomessa	14
3 LAINSÄÄDÄNTÖ	17
3.1 Lakisääteiset vaatimukset analyysimenetelmälle	18
4 RIDA®QUICK DON-MÄÄRITYS	21
4.1 Rida®QuickDON	21
4.2 Rida®QuickScan-semikvantitatiivinen lukijalaite	22
4.3 Mittausmenetelmä	23
5 RIDA®QUICK DON-PIKAMENETELMÄN VALIDOINTISUUNNITELMA	24
5.1 Toistettavuus ja oikeellisuus	24
5.2 Uusittavuus	25
5.3 Oikeellisuus lakisääteisellä raja-arvoalueella	25
5.4 Spesifisyys	26
6 TYÖN SUORITUS	27
6.1 DON-määritysmenetelmät	27
6.1.1 RidaQuickDON-menetelmä	27
6.1.2 Referenssimenetelmä	28
6.2 Testin toistettavuus ja oikeellisuus eri viljalajeilla	28
6.3 Menetelmän toistettavuus viljanäytteiden DON-pitoisuuden ollessa raja-arvoalueella	28
6.4 Näytteen laimennus	29

6.5 Laboratorioiden välinen toistettavuus	30
6.6 Tilastollinen tulosten käsittely	31
6.7 Reagenssit ja välineet	32
6.8 Näytteen käsittely ja ennen mittausta suoritettavat toimenpiteet	32
7 TULOKSET	34
7.1 Testin toistettavuus eri viljalajeille	34
7.1.1 Kaura	34
7.1.2 Ohra	35
7.1.3 Kevätvehnä	37
7.1.4 Yhteenveto testin toistettavuudesta eri viljalajeille	38
7.2 Menetelmän toistettavuus viljanäytteiden DON-pitoisuuden ollessa raja-arvoalueella	39
7.2.1 Yhteenveto menetelmän toistettavuuden testauksesta viljanäytteiden DON-pitoisuuksien ollessa lähellä raja-arvopitoisuuksia	40
7.3 Näytteen laimennus	41
7.3.1 Yhteenveto kauranäytteen laimennuksesta	41
7.4 Laboratorioiden välinen toistettavuus	42
7.4.1 Yhteenveto vertailunäytteiden tuloksista	45
8 JOHTOPÄÄTÖKSET	46
LÄHTEET	48

LIITTEET

- Liite 1. Kauranäytteet.
- Liite 2. Ohranäytteet.
- Liite 3. Kevätvehnänäytteet.
- Liite 4. Menetelmän toistettavuuden testaus viljanäytteiden DON-pitoisuuden ollessa raja-arvoalueella.
- Liite 5. Laimennustestaus.
- Liite 6. Laboratorioiden välinen toistettavuus.
- Liite 7. Screening deoxynivalenol in oat using a quick-method with comparison to a quantitative GC-MS analysis.

KUVAT

Kuva 1. Trikotekeenien molekyylirakenne. Erot sivuryhmissä määrittävät toksiinin ja sen ominaisuudet (8).	11
Kuva 2. Deoksinivalenolin rakennekaava (10).	12
Kuva 3. T-2 ja HT-2 toksiinien ero molekyylirakenteessa (15).	13
Kuva 4. DON-toksiinien pitoisuudet eri viljoissa vuosina 2000–2006. (12).	15
Kuva 5. Vuoden 2011 turvallisuusseurantanäytteiden DON-toksiinipitoisuudet eri viljalajeissa (18).	16
Kuva 6. Rida®QuickDON-testiliuska. Vasemmalla on testiliuskan rakennekuva ja oikealla kaksi reagoineutta testiliuskaa, joista alemmassa positiivinen tulos (27).	21
Kuva 7. Rida®QuickScan-laitteisto salkussa (26).	23
Kuva 8. Näytteen mittaaminen lukija-laitteella.	23
Kuva 9. Näytekaavio kaura- ja vehnänäytteiden jakoon laboratorioden välillä.	31
Kuva 10. Regressioanalyysi kauran tuloksista. Pearsonin korrelaatio oli 0,935.	35
Kuva 11. Regressioanalyysi ohran tuloksista. Pearsonin korrelaatio 0,931.	36
Kuva 12. Vehnän regressioanalyysi. Pearsonin korrelaatio 0,935.	37

TAULUKOT

Taulukko 1. Lakisääteiset DON-toksiinin enimmäispitoisuudet elintarvikkeissa (22).	17
Taulukko 2. Mittaustuloksen tarkkuuden osoittamiseksi asetuksen määrittämät termit (25).	18
Taulukko 3. Asetuksessa (EY) N:o 401/2006 määritellyt vaatimukset kvantitatiivisessa analyysissä (25).	19
Taulukko 4. α :n antamat kertoimet standardiepävarmuuden laskukaavaan mitatun DON-pitoisuuden mukaan (25).	20
Taulukko 5. Viljalajien rinnakkaiset tulokset. Rida-määrittäyksessä n=6 ja GC-MS-menetelmässä n=1.	39
Taulukko 6. Toistettavuuden testaus viljojen lakisääteisten DON-pitoisuusraja-arvojen lähellä.	40
Taulukko 7. Kauranäytteen laimennustestausten antamat tulokset, n=6.	41
Taulukko 8. Kolmen rinnakkaisten näytteiden Rida-analyysien tulokset eri laboratorioissa mitattuina vehnä- ja kauranäytteillä.	43
Taulukko 9. Kahden rinnakkaisten näytteiden tulokset eri laboratorioissa mitattuina kaura- ja vehnänäytteistä.	44

SANASTO

Deoksinivalenoli	12,13-epoksi-3,7,15 -trihydroksitrikotek-9-en-8- oni eli DON
Fumonisiini	1,2,3-propaanitrikarboksyylihappo, 1,1'-(1-(12-amino-4,9,11-trihydroksi-2-metyylitridekyli)-2-(1-metyylipentyli) -1,2-etaanidiyyli) esterit eli FB1. Luonnossa esiintyvät myös FB2 ja FB3 muodot toksineista
<i>Fusarium</i> -sienet	Punahomeita, joita esiintyy viljoissa
Homotoksiinit	Viljoissa esiintyvien homeiden tuottamia myrkyllisiä yhdisteitä
HT-2	15-asetatti-3 α , 4 β -dihydroksi -8 α -[3-metyylibutyryyli-oksi]-12,13-epoksitrikotek-9-en
MTT	Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus
Nivalenoli	3- α ,4- β ,7- α ,15-tetrahydroksiscirp-9-en-8 -one;12,13 -epoksi-3,4,7,15-tetrahydroksitrikotek-9-en-8-one eli NIV
T-2	4 β ,15-diasetaatti-3 α , dihydroksi-8 α -[3-metyylibutyryyli-oksi] – 12,13-epoksitrikotek-9-en
Trikotekeenit-ryhmä	Homotoksineja, jotka ovat molekyyliarakenteeltaan nelirenkaisia seskviterpeenejä. Tunnistettu yli 200 erilaista yhdistettä.
VYR	Vilja-alan yhteistyöryhmä, joka on yritysten, yhteisöjen ja maa- ja metsätalousministeriön perustama yhteisrahoitteinen toimielin, jonka tarkoitus on edistää kotimaisen viljelyn ja viljelyketjujen toimivuutta
Zearalenoni	(4S12E)-15,17-dihydroksi-4metyyli-3-oksabisyklo[12.4.0]oktadeka-12,15,17,19-tetraen-2,8-dioni eli ZEA

1 JOHDANTO

Fusarium-sienet eli punahomeet ovat viljalle yleisiä patogeenejä ympäri maailman. Ne aiheuttavat terveydellisen haitan lisäksi merkittäviä taloudellisia menetyksiä viljelijöille heikentäen sadon laatua ja altistaen viljan kasvisairauksille. *Fusarium*-sienten aineenvaihdunnan tuloksena viljaan syntyy hometoksiineita. Yleisin ja tutkituin *Fusarium*-toksiini on deoksinivalenoli (DON). Pelloilla viljaa vaivaavassa homesienessä saattaa jo kasvupaikalla muodostua hometoksiineja, jotka lisääntyvät edelleen viljaa varastoitaessa. Pellolla homesienistä vapaa vilja voi homehtua varastossa kostuessaan ja viljaan voi syntyä hometoksiineja liittyen huonoon varastointiin (1).

Fusarium-sienten määrä Suomessa kasvavissa viljoissa riippuu pitkälti kasvupaikasta, sääolosuhteista ja lajikkeiden alttiudesta homeelle (2). Yksi homelaji voi tuottaa yhtä tai useampaa eri toksiinia (3).

Tämän opinnäytetyön tavoite oli testata Rida®QuickDON-pikatestin ja testiliuskojen lukemiseen suunnitellun Rida®QuickScan-semikvantitatiivisen lukijalaitteen toimivuus määrittäessä eri viljalajeilla DON-pitoisuuksia lähellä lakisääteisiä raja-arvoalueita. Pikatesti ja lukijalaitte ovat R-Biopharm (Darmstadt, Germany) kehittämiä tuotteita ja ne on tarkoitettu käytettäväksi nopeaan deoksinivalenolin määrittämiseen viljanäytteistä. Kvantitatiiviset analyysit, kuten kaas- ja nestekromatografiset analyysit ovat hitaita ja kalliita DON-pitoisuuden testaamiseen viljasta, joten kysyntää luotettavalle ja nopealla analyysimenetelmälle on viljakaupan piirissä. Viljateollisuudessa ostettavasta viljaerästä testataan DON-pitoisuus ja se vaikuttaa viljan laatuluokitukseen.

Testauksessa käytettiin viljanäytteitä, jotka olivat Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksen (MTT) viljojen turvallisuusseurantänäytteitä vuodelta 2012. Valituista viljanäytteistä määritettiin semikvantitatiivisella pikamenetelmällä DON-pitoisuudet. Vertailutuloksina käytettiin akkreditoidulla menetelmällä saatuja tuloksia. Yhteistyöhön saatiin mukaan vilja-alan kaupallinen toimija ja tämä

mahdollisti samojen viljanäytteiden testauksen kolmessa eri laboratoriossa. Saatuja Rida-analyysien tuloksia viljanäytteistä vertailtiin keskenään.

Yhtenä osana opinnäytetyötä tehtiin validointisuunnitelma, josta tehtiin testauksia soveltuvien osien vilja-alan toimijan kiinnostuksen mukaan.

Opinnäytetyö oli jatkoa projektityölle, jossa testattiin Rida-pikamenetelmää MTT:n kauranäytteillä. Projektityön tulokset esitettiin posterina Euroopan *Fusarium*-seminaarissa Ranskassa 12.–16.5.2013 (4). Posteriesitys on liitteessä 7. Projektityöstä saatuja tuloksia käytettiin pohjana opinnäytetyön suunnittelussa.

2 SUOMALAISESSA VILJASSA ESIINTYVÄT HOMEMYRKYT

Vuodesta 1999 asti on Suomessa Vilja-alan yhteistyöryhmän (VYR) toimesta tehty viljojen turvallisuusseurantaa tavoitteena saada enemmän tietoa mm. *Fusarium*-sienten ja niiden tuottamien toksiinien esiintymisestä, hallinnasta ja ehkäisemisestä maamme viljasadoissa. Turvallisuusseurannassa tutkitaan myös torjunta-ainejäämiä ja raskasmetallipitoisuuksia viljoissa. (5).

2.1 *Fusarium*-suvun homesienet

Fusarium- eli punahomeet ovat viileän ilmaston maissa yleisimpiä homekontaminaatioita viljoissa. Tutkimusten mukaan kevätiljat ovat herkempiä sienten muodostumiselle kuin syysviljat. Syynä tähän on kevätiljojen myöhäinen puinitiajankohta pelloilta, jolloin syksyinen kosteus ja lisääntynyt sateiden esiintyminen edesauttavat homeiden muodostumista. Jyvien sienitartunta saattaa johtaa kasvukauden aikana toksiinien muodostumiseen tähkässä (2).

Homeet ja hometoksiinit säilyvät maassa kasvijätteissä ja siemenissä. Viljelyteknisillä toimenpiteillä ja oikeanlaisella säilönnällä homeiden ja niiden tuottamien toksineiden määrää saadaan pienennetyksi viljoissa. Punahomeen vaivat tähkät ovat usein pieniä ja huonokuntoisen näköisiä. Hometartunta altistaa viljan myös muille kasvitaudeille ja heikentää satoa määrällisesti ja laadullisesti. (5)

Viljassa oleva home on voinut tarttua kukinnon kautta jyviin. Homeen ja sen tuottaman toksinin määrään vaikuttaa lajikkeen kestävyys, sääolosuhteet, viljelyaika ja siementen käsittely. Suuri homeen määrä ei automaattisesti korreloi korkean toksiinipitoisuuden kanssa (6).

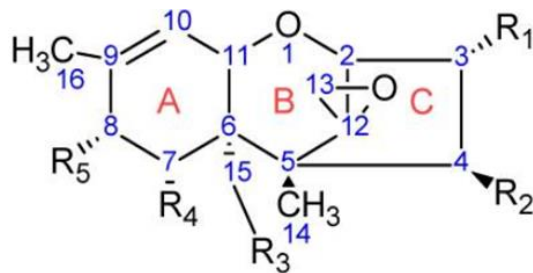
Yleisimmät *Fusarium*-toksiinien tuottajat ovat: *F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. tricinctum* ja *F. sporotrichioides*. Toiset homelajit suosivat lämpimämpiä ja kuivempia oloja kuin toiset, joten *Fusarium*-homeita esiin-

tyy ympäri maailman. Meillä pohjoisessa viihtyvät parhaiten *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* ja *F. langsethiae*. Suomen yleisin laji on *F. avenaceum* (2).

2.2 *Fusarium*-toksiinit

Fusarium-sukuun kuuluvat sienet tuottavat aineenvaihdunnan tuloksena lukuisia eri toksiineja. Yksi *Fusarium*-sieni tuottaa usein monia erilaisia toksiineja ja yhdellä hometoksiinilla voi olla useita erilaisia haittavaikutuksia ihmisten ja eläinten terveyteen. Toksiinipitoisuudeltaan raja-arvot ylittävällä viljalla ei ole enää elintarvikekäyttöä, joten viljan kaupallinen arvo pienenee (7).

Yleisimpiä ja tutkituimpia *Fusarium*-toksiineja ovat deoksinivalenoli, HT-2- ja T-2-toksiinit, zearalenoni, nivalenoli ja fumonisiini. Neljä ensimmäistä näistä kuuluvat trikotekeeneihin ja ovat molekyyliarakenteeltaan kuvan 1. kaltaisia (7; 8).

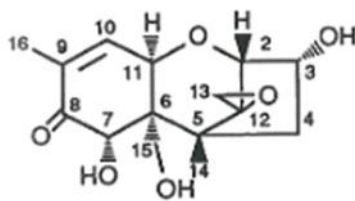


Kuva 1. Trikotekeenien molekyyli rakenne. Erot sivuryhmissä määrittävät toksiinin ja sen ominaisuudet (8).

2.2.1 Deoksinivalenoli

Deoksinivalenoli, 12,13-epoksi-3,7,15-trihydroksitrikotek-9-en-8-oni eli DON (kuva 2.) on *Fusarium*-sukuun kuuluvien homesienten *F. graminearum* ja *F. culmorum* tuottama mykotoksiini (9).

4-DEOXYNIVALENOL
(DON, vomitoxin)



$C_{15}H_{20}O_6$

M.W. 296.1260

Species:

F. graminearum

F. culmorum

Kuva 2. Deoksinivalenolin rakennekaava (10).

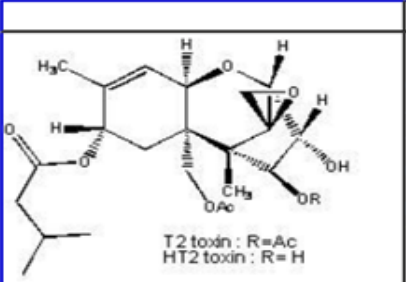
Deoksinivalenoli kuuluu molekyyliarakenteensa vuoksi B-luokan trikotekeeneihin ja on yleisin esiintyvä trikotekeeni maailmassa. Molekyylikoko on iso, 296,13 g/mol (10). DON on vesiliukoinen, korkeita lämpötiloja kestävä yhdiste (11). Nykyään trikotekeeneita on eristetty yli 200 yhdistettä (8). DON eristettiin ensimmäisen kerran 1980 (8).

DON:a tuottava *Fusarium*-sieni leviää kukinnon kautta jyviin ja DON jää suurimmaksi osaksi jyvän kuoriosaan epätasaisesti levittyneenä (6). DON:a tuottavien homesienten tartunta tulee yleisemmin kasvijätteen mukana edellisen satokauden puintijätteistä. *F. graminearum* ja *F. culmorum* selviävät hyvin Suomen olosuhteissa, jotka ovat viileät ja kosteat (12). Näiden homesienten optimaaliset kasvuolosuhteet ovat 21- 25 °C veden aktiivisuuden ollessa luokkaa 0,87 – 0,88 (13).

DON aiheuttaa ihmisille pahoinvointia, ruoansulatuselimistön tulehduksia, ripulia, päänsärkyä ja huimausta sekä alentaa vastustuskykyä. Eläimille DON aiheuttaa pienikasvuisuutta, oksentelua, ruokahaluttomuutta, ripulia, alentunutta tuottavuutta ja heikentynyttä vastustuskykyä (6; 14)

2.2.2 T-2 ja HT-2

Suurin T-2 ja HT-2-toksiinien tuottaja Suomessa on *F. langsethiae* (1). T-2-toksiinista muodostuu luonnossa hydrolyysin seurauksena HT-2-toksiinia, jolloin neljännessä hiilessä oleva asetaattiryhmä muuntuu hydroksiryhmäksi (kuva 3.). HT-2 ja T-2-toksiinit esiintyvät viljassa yhdessä. (15).

 <p>T2 toxin : R=Ac HT2 toxin : R=H</p>	<p>CAS N° - formula : - molecular weight : - white crystals : UV absorption : LD50 (bw mice) : TDI:</p>	<p>T2 toxin [21259-20-1] C₂₄H₃₄O₉ 466 amu (mp = 151.5 °C) < 200 nm 4 mg/kg (po) 0.06 µg/kg bw</p>	<p>HT2-toxin [26943-87-2] C₂₂H₃₂O₈ 424.49 amu (mp = 152 °C) < 200 nm 9 mg/kg (ip) 0.06 µg/kg bw</p>
--	---	---	---

Kuva 3. T-2 ja HT-2 toksiinien ero molekyyliarakenteessa (15).

Kaurasta on löydetty T-2 ja HT-2-toksiineja eniten verratessa muista viljoista mitattuihin T-2 ja HT-2 pitoisuuksiin. Kokonaispitoisuudet ovat olleet kaurassa keskiarvoltaan hieman alle 0,2 ppm. Muista viljoista mitatut kokonaispitoisuudet ovat olleet kymmenesosa tästä eli n. 0,02 ppm (1). T-2 ja HT-2-toksiineille ei ole säädetty lakisääteistä kokonaispitoisuusraja-arvoa viljoissa. Komission suosituksessa 2013/165/EU, joka on annettu 27.3.2013, ilmoitetaan 2015 julkaistavasta komission tiedotteesta, jossa tullaan raportoimaan T-2 ja HT-2 seurannan tuloksista. Suosituksessa ohjeistetaan analyysimenetelmän tarkkuudesta, jolla T-2 ja HT-2-toksiineja määritetään elintarvike- ja rehunäytteistä (16).

2.2.3 Zearalenoni, fumonisiinit ja nivalenoli

Zearalenonia (ZEA) on harvoin löydetty Suomessa kasvaneesta viljasta, mutta tuontielintarvikkeissa sitä on havaittu viljoissa, saksanpähkinöissä, soijapavuisissa ja banaaneissa. Zearalenonia havaitaan usein yhdessä DON, T-2 ja HT-2 toksiinien kanssa. Fumonisiineja esiintyy tuontielintarvikkeissa, kuten vehnässä, riisissä ja maississa. Nivalenolia (NIV) tuottaa Suomessa *F. cerealis* ja *F. poae*. Lainsäädäntö sisältää näiden toksiinien pitoisuusraja-arvot (1).

2.2.4 Muut *Fusarium*-toksiinit

Elintarvikkeissa on havaittu myös muita, kuin edellä mainittuja, trikotekeeneihin kuuluvia toksiineja. Tällaisia ovat esim. 3-asetyyli-DON (3-AcDON), 15-asetyyli-DON (15-AcDON), fusarenon-X (F-X) ja diasetoksiskirpenoli (DAS). Näille tok-

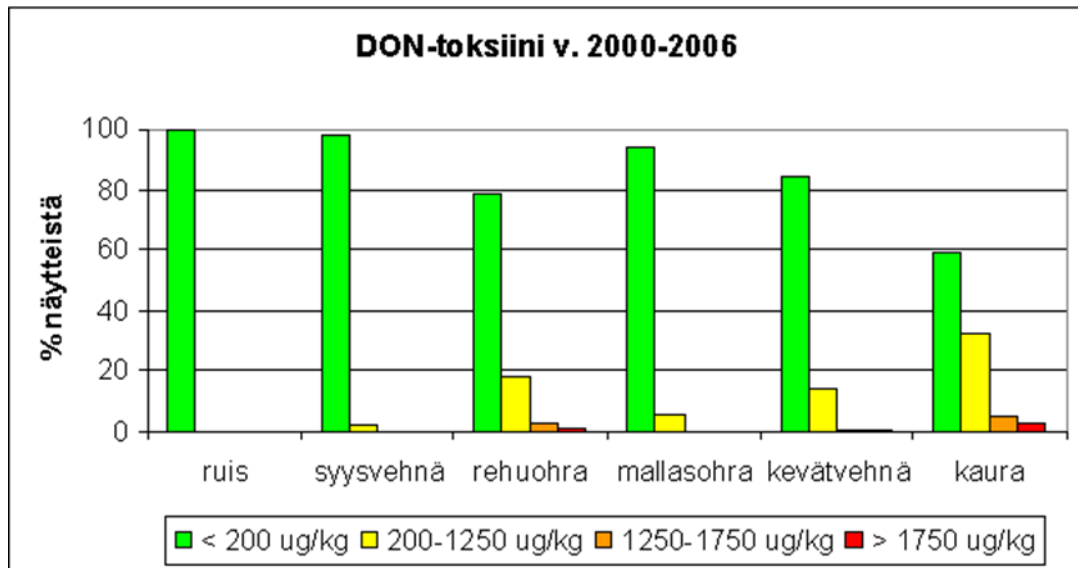
siineille ei ole säädetty enimmäispitoisuuksia, mutta komission asetuksessa ohjeistetaan viljojen kanssa toimintaan, joka ehkäisee ja vähentää näiden pitoisuuksia elintarvikkeissa (1).

Useat *Fusarium*-homeet tuottavat ns. uusia *Fusarium*-toksiineja. *F. avenaceum*, *F. tricinctum* ja *F. poae* tuottavat moniliformiinia (MON) ja enniatiineja (ENNs). *F. sporotrichioides* ja *F. poae* tuottavat beauverisiiniä (BEA), joka molekyylirakenteeltaan muistuttaa enniatiineja (ENNs). Nämä toksinit ovat erittäin yleisiä suomalaisissa viljoissa ja maailmanlaajuisestikin yleisimpiä kontaminantteja viljoissa (1).

2.3 Viljan turvallisuusseurantatutkimukset Suomessa

Ensimmäisen kerran Suomessa tehtiin viljojen turvallisuusseurantatutkimusta vuonna 1999 maa- ja metsätalousministeriön (MMM) johtamassa seitsemän vuotisessa tutkimuksessa. Tutkimus noudatti ja toteutti kansallisen viljastrategian päämääriä. Tutkimuksessa näytteitä kerättiin kattavasti koko Suomesta vuosittain ja viljoista edustettuina olivat rehuohra-, mallasohra-, kaura-, kevätvehnärui- ja syysvehnänäytteet. Näytteitä otettiin 100 – 170 kpl/ vuosi. Näytteistä on määritetty tyypillisimmät *Fusarium*-toksiinit. Viljelijät toimittivat tiedot viljelyteknisistä toimenpiteistä sekä viljelyn ja sadonkorjuun ajankohdista. Kuvassa 4. nähdään deoksinivalenolin esiintyminen eri viljalajeissa tutkimusvuosien aikana. Kauran ja ohran DON-pitoisuudet ovat olleet korkeimmat ja pitoisuudet kevätvehnässä ovat suuremmat kuin syysvehnässä (12).

Turvallisuusseurantatutkimuksen perusteella kartoitettiin homeiden levinneisyyttä ja keinoja homeiden ja niiden muodostamien toksinien vähentämiseksi ja ehkäisemiseksi viljassa. Viljojen turvallisuustietoseurannan (1999 – 2006) raporttien yhteenvedossa mainitaan homeiden ja hometoksiinien määrän hallintakeinoina siementen kunnostus, peittäus, kuorinta ja lajittelu, viljelykierto, sadonkorjuun ajoitus ja viljan kuivaus (12).

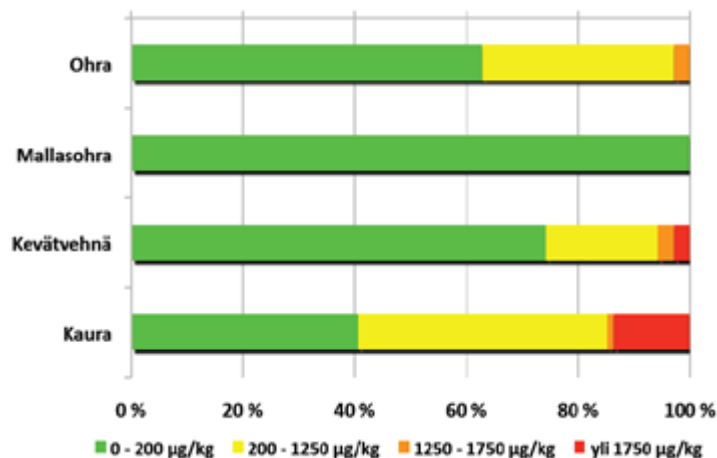


Kuva 4. DON-toksiinien pitoisuudet eri viljoissa vuosina 2000–2006. (12).

Myös muut tutkimukset vahvistavat kauran ja ohran olevan herkimpiä home-tartunnoille ja niistä on mitattu korkeita *Fusarium*-toksiinipitoisuuksia. Testauksissa on huomattu lajikekohtaisia eroja home-tartuntojen alttiudelle ja toksiinipitoisuuksille (2).

Vuonna 2003–2006 tehtiin MTT:n toimesta kenttäkokeita neljällä eri kaura- ja ohralajikkeella tarkoituksena selvittää *Fusarium*-tartunnan mekanismeja. Erityisesti kiinnostuksen kohteena oli ympäristötekijöiden ja viljelymenetelmien (syys- ja suorakylvöt ja kasvitautien torjunta) merkitys homeiden ja toksiinien syntyyn. Tulokset osoittivat, että suoraviljely on muuttanut *Fusarium*-kantoja, mutta muuten viljelymenetelmien vaikutusta ei tutkimuksessa voitu osoittaa (17).

Vuoden 2011 turvallisuusseurantanäytteiden DON-pitoisuuksien jakautuminen esitetään kuvassa 5. Kaurassa, ohrassa ja kevätvehnässä olivat suurimmat DON-pitoisuudet (18).



Kuva 5. Vuoden 2011 turvallisuusseurantanäytteiden DON-toksiinipitoisuudet eri viljalajeissa (18).

VYR:n tiedotteessa 21.9.2011 kerrottiin toksiinipitoisuuksien vaihdelleen suuresti viljaerien ja -lajien mukaan. Vuoden 2011 kasvukausi oli sateinen ja lämmin ja viljaerät, jotka puitiin elokuun puoliväliin mennessä, olivat parhaiten säilyneet hometartunnoilta (19).

VYR:n tiedotteessa 10.1.2013, joka koskee vuoden 2012 turvallisuusseurantanäytteitä, samoja, joita tässä tutkimuksessa käytettiin, kerrotaan *Fusarium*-hometartuntojen yleistyneen viljoissa vasta elokuusta alkaen. Kasvukausi oli poikkeuksellinen johtuen sääolosuhteista, joiden vuoksi kylvöt ja sadonkorjuu ajoittuivat pitkälle ajanjaksolle. Kesä- ja elokuun sademäärät olivat suuria ja vaihtelivat paikkakunnittain. Suuret sademäärät aiheuttivat suosiolliset kasvuolosuhteet *Fusarium*-homeille ja tämä näkyi suurina hometoksiinipitoisuuksina teollisuuden ja kaupan viljanäytteissä, erityisesti kaura- ja kevätvehnänäytteissä. Kaikista analysoiduista näytteistä 92 % alitti lakisääteisen DON-pitoisuusarvon elintarvikekäyttöön tarkoitetussa prosessoimattomassa viljassa (20).

3 LAINSÄÄDÄNTÖ

Lainsäädäntö velvoittaa *Fusarium*-toksiinien pitoisuuksien valvontaan elintarvikkeissa. Valvontaa suoritetaan viranomaisvalvontana ja omavalvontana. Oma-valvonta tulee toteuttaa laadullisista ja ennaltaehkäisevistä syistä tiloilla, myllyissä, teollisuudessa ja kaupoissa (21).

Asetuksessa (EY) N:o 1881/ 2006 ja myöhemmin sen muutoksessa (EY) N:o 1126/2007 säädetään suurimmat sallitut pitoisuudet *Fusarium*-toksiineille elintarvikkeissa. Asetuksessa (EY) N:o 401/2006 on näytteenoton ohjeistus ja kriteerit analyysimenetelmille toksiineja määritettäessä. Suositus 2006/583/EY ohjeistaa oikeaan toimintaan hometoksiinien minimoimiseksi elintarvikkeissa (21; 22; 23).

Taulukossa 1. esitetään DON-toksiinin enimmäispitoisuudet eri elintarvikkeissa. Prosessoimattomassa kaurassa raja-arvo on 1750 µg/kg, kun muissa prosessoimattomissa viljoissa se on 1250 µg/kg. Pienten lasten viljapohjaisissa ruoissa raja-arvo on 200 µg/kg (22; 23)

Taulukko 1. Lakisääteiset DON-toksiinin enimmäispitoisuudet elintarvikkeissa (22).

Elintarvike	Enimmäismäärä (µg/kg)
Prosessoimaton kaura	1750
Muut prosessoimattomat viljat	1250
Jauhot, leseet ja alkio, pastat (suoraan elintarvikkeeksi myytävät tuotteet)	750
Leipä, kakut, leivokset, keksit ja pikkuleivät, viljavälipalat sekä hiutaleet	500
Pienten lasten viljapohjaiset ruoat ja muut ruoat	200

Rehuviljoja koskeva säädös on valmisteilla EU:ssa mutta nykyinen suositus rehuissa on DON:n pitoisuuden osalta $< 8\,000\text{ }\mu\text{g/kg}$. Eläinryhmäkohtaisesti suositusarvot vaihtelevat (24).

3.1 Lakisääteiset vaatimukset analyysimenetelmälle

Asetus (EY) N:o 401/2006 ja myöhemmin sen muutoksessa (EY) N:o 178/2010 asetetaan vaatimukset menetelmän toistotarkkuudelle, jolla hometoksiineja määritetään. Asetuksessa myös annetaan määritelmät ja vaatimukset tilastomaatemaattisille laskutoimituksille, joita tuloksien tulkinnassa tulee käyttää sekä tarkkuus, jolla tulos tulee ilmoittaa. Taulukossa 2. on tästä asetuksesta ote, johon on koottu raportoinnissa käytettävät laskutoimitukset ja niiden selitykset analyysitulosten yhteydessä (25).

Taulukko 2. Mittaustuloksen tarkkuuden osoittamiseksi asetuksen määrittämät termit (25).

r	toistettavuuden arvo, jonka alapuolella toistettavissa olosuhteissa (eli sama näyte, sama määrittäjä, samat laitteet, sama laboratorio ja lyhyt aika-väli) saadun kahden yksittäisen testituloksen välinen absoluuttinen ero sijaitsee tietyllä todennäköisyydellä (yleensä 95 %) eli $r = 2,8 \times s_r$
s_r	toistettavissa olosuhteissa saaduista tuloksista laskettu standardipoikkeama
RSD_r	toistettavissa olosuhteissa saaduista tuloksista laskettu suhteellinen standardipoikkeama $[(s_r / \bar{x}) \times 100]$
R	uusittavuuden arvo, jonka alapuolella uusittavassa olosuhteissa (eli määrittäjän saamat identtiset näytteet eri laboratorioissa käyttäen samaa standardimenetelmää) saatujen yksittäisten testitulosten välinen absoluuttinen ero sijaitsee tietyllä todennäköisyydellä (yleensä 95 %), $R = 2,8 \times s_R$
s_R	uusittavissa olosuhteissa saaduista tuloksista laskettu standardipoikkeama
RSD_R	uusittavissa olosuhteissa saaduista tuloksista laskettu suhteellinen standardipoikkeama $[(s_R / \bar{x}) \times 100]$

Lainsäädännössä asetetut deoksinivalenolia koskevat vaatimukset toistettavuuden RSD_r % ja uusittavuuden RSD_R % osalta esitetään taulukossa 3. Rinnakkaisten tulosten suhteellisen keskihajonnan tulee olla ≤ 20 %, jotta menetelmä on hyväksyttävissä DON-toksiinin määrittämiseen.

Taulukko 3. Asetuksessa (EY) N:o 401/2006 määritellyt vaatimukset kvantitatiivisessa analyysissä (25).

Pitoisuus $\mu\text{g/kg}$	RSD_r %	RSD_R %	Saanto
$> 100 \leq 500$	≤ 20	≤ 40	60 – 110
> 500	≤ 20	≤ 40	70 – 120

Kun käytetään analyysimenetelmää, jota ei ole täysin validoitu, asetuksessa ohjeistetaan käyttämään tarkoitukseen sopivaa tapaa tulosten tarkkuuden laskemisessa. Menetelmän hyväksyttävyys arvioidaan laskemalla standardiepävarmuus tuloksesta (25).

Standardiepävarmuus lasketaan kaavalla:

$$Uf = \sqrt{(LOD/2)^2 + (\alpha \times C)^2}$$

jossa

- Uf on standardiepävarmuuden enimmäisarvo ($\mu\text{g/kg}$)
- LOD on menetelmän toteamisraja ($\mu\text{g/kg}$)
- α on C:n arvoon sidottu numeerinen vakiotekijä. Käytetyt arvot ovat taulukossa 4.
- C on mitattu pitoisuus ($\mu\text{g/kg}$)

Taulukossa 4. on esitetty α :n kertoimet. Kerroin määräytyy kaavaan mitatun DON-pitoisuuden mukaan. Pitoisuuden ollessa 1,001 – 10,00 ppm on kerroin 0,12.

Taulukko 4. α :n antamat kertoimet standardiepävarmuuden laskukaavaan mitatun DON-pitoisuuden mukaan (25).

C ($\mu\text{g/kg}$)	α
≤ 50	0,2
51 - 500	0,18
501 - 1000	0,15
1001 – 10 000	0,12
$> 10\,000$	0,1

Määrittystulos ilmoitetaan muodossa $X \pm U$, jossa X on määrittystulos ja U on laajennettu mittausepävarmuus. Mittausepävarmuudessa käytetään kattavuuskerrointa 2 ja luotettavuustaso on 95 % (25).

Lainsäädännön mukaan viljaerästä otetun näytteen määrittystuloksen perusteella viljaerä voidaan hyväksyä tai hylätä edellä olevien tulkitsemissääntöjen mukaan.

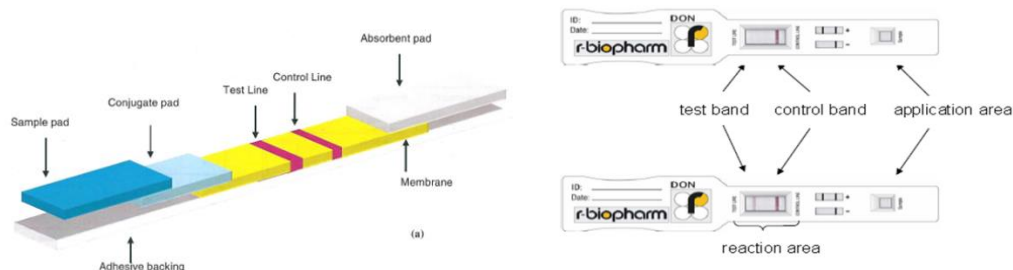
Tämän opinnäytetyön tulosten tarkastelun pohjaksi otettiin lainsäädännön vaatimukset ja tulokset esitettiin tämän mukaisesti.

4 RIDA®QUICK DON-MÄÄRITYS

Rida®QuickScan-lukijalaite on R-Biopharmin kehittämä mittalaite, joka on tarkoitettu nopeaan deoksinivalenolin määrittämiseen viljanäytteistä. Rida®QuickScan-lukijalaite on suunniteltu käytettäväksi yhdessä Rida®QuickDON-pikatestin kanssa. Rida®QuickScan-lukijalaitteella voidaan mitata DON:n lisäksi aflatoksiinia ja fumosiinia (26).

4.1 Rida®QuickDON

Rida®QuickDON-pikatesti on sivuvirtaustesti (lateral flow test) ja sen toiminta perustuu immunologiseen reaktioon testialustalla. Spesifinen vasta-aine tunnistaa DON-molekyylin ja kiinnittyy tähän. Immunogromatografinen testiliuska sisältää näytealustan, konjugaattialustan, testiviivan, kontrolliviivan, membraanin, imutyynyn ja kiinnitystuen (27). Kuvassa 6. nämä osat havainnollistetaan testiliuskalla. Testiliuskassa on kontrolliviiva (kuva 6.), joka värjäytyy testin aikana ja siten osoittaa testin toimivan. Näytteen ollessa DON-toksiinin osalta positiivinen värjäytyy kontrolliviivan viereen toinen viiva. Näytteen ollessa negatiivien DON-toksiinin osalta, värjäytyy pelkkä kontrolliviiva. Jos näytteen toksiinipitoisuus on korkea, kontrolliviiva näkyy heikkona ja tämä vaikuttaa tuloksen oikeellisuuteen (28; 29).



Kuva 6. Rida®QuickDON-testiliuska. Vasemmalla on testiliuskan rakennekuva ja oikealla kaksi reagoineutta testiliuskaa, joista alemmassa positiivinen tulos (27).

Rida®QuickDON-testikitin mukana tulevat uuttopuskuriliuos, stop-reagenssi, testiliuskat (20 kpl) ja visuaaliseen testaukseen käytettävä arviointikortti. Pakkauksen testiliuskojen loputtua ei jäljelle jääneitä liuoksia enää käytetä, vaan ne hävitetään. Uusi pakkaus otetaan käyttöön ja jokaisella kittierällä on oma erätunnus, joka skannataan lukijalla käytettäessä RidaQuickScan-laitetta. Erätunnuksen vaihtuessa uuden kittierän mukana tulee laatutodistus, josta on nähtävissä RidaQuickDON-testin antama mittaustulos käytettäessä RidaQuickScan-lukijaa. Laatutodistuksessa on kolmen mittauksen tavoitearvovälit ja mitatut arvot. Näillä arvoilla ei voi laskea mittausepävarmuutta tuloksien yhteydessä (30).

4.2 Rida®QuickScan-semikvantitatiivinen lukijalaite

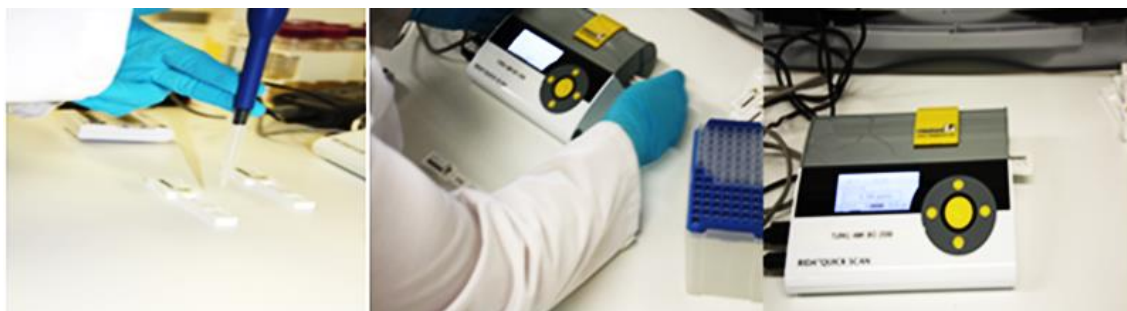
Rida®QuickScan-lukijalaite on sivuvirtaustestin lukija, joka mittaa näytevyöhykkeen intensiteettiä RidaQuickDON-testiliuskasta. Laitteen mittausaluet ovat 0,5 – 5,5 ppm (1 g näytettä + 15 mL uuttoliuosta) tai 0,3 – 0,9 ppm (2 g + 15 mL). Mittalaitetta käytettäessä näyteliuskaan ei lisätä stop-reagenssia. Laite kalibroidaan laitteen mukana tulevalla kalibroititikulla.

Rida®QuickScan-lukijalaitteen sivulla on kolo, johon testiliuska työnnetään ja mittaus aloitetaan painamalla laitteen edessä olevaa painiketta. Nuolinäppäimillä siirrytään valikosta toiseen. Laitteessa on sadan mittaustuloksen muisti, minkä jälkeen laite aloittaa kierroksen uudelleen ja uudet tulokset kirjaantuvat vanhojen päälle. Tulokset voi tulostaa tai ladata suoraan tietokoneelle lukijalaitteesta. Kuvassa 7. on Rida®QuickScan-laite (29).

Mitattava näyte pipetoidaan testiliuskan testikaivoon ja 5 min vaikutusajan jälkeen testiliuska työnnetään lukijalaitteeseen. Tulos lukijalaitteesta saadaan muutamassa sekunnissa. Mittaustoiminto esitetään kuvassa 8.



Kuva 7. Rida®QuickScan-laitteisto salkussa (26).



Kuva 8. Näytteen mittaus lukija-laitteella.

4.3 Mittausmenetelmä

Näytteen esikäsittely ja mittaus suoritetaan valmistajan ohjeen mukaisesti (28). Toimintapa käydään läpi sivulla 27.

5 RIDA®QUICK DON-PIKAMENETELMÄN VALIDOINTISUUNNITELMA

Validoinnin tarkoituksena on osoittaa menetelmän kelpoisuus ja saatujen mittauksien luotettavuus. Validointi suunnitellaan menetelmän käyttötarkoituksen mukaan ja validointitestien vaatimukset mietitään lainsäädännön pohjalta. (31).

Työssä testattava menetelmä oli semikvantitatiivinen pikamenetelmä, jossa näytteen esikäsittely mittausta varten suoritettiin laitevalmistajan ohjeiden mukaisesti. Näyte jauhettiin (1 mm:n seula) tasalaatuisiksi ennen testausta. Luki-jalalaitteeseen ei mittaustilanteessa syötetty näytteenkäsittelytietoja, kuten punnittua massaa tai pipetoitua tilavuutta. Tuloksen oikeellisuuteen vaikuttavat kriittiset tekijät ovat näytteenotto, näytteen jauhatus, mittaus ja mittaustuloksen mit-tausepävarmuuden laskeminen. Validointisuunnitelmassa ei otettu kantaa näytteenottoon. Validointisuunnitelman mukaista testausta tässä työssä ei tehty, vaan suunnitelmasta poimittiin viljakaupan tarpeen kannalta oleelliset testaukset. Näitä olivat toistettavuuden ja oikeellisuuden testaukset sekä oikeellisuuden testaus lakisääteisellä raja-arvoalueella.

5.1 Toistettavuus ja oikeellisuus

Toistettavuuden ja oikeellisuuden määrittämiseksi tehdään kuusi rinnakkaista näytettä punnitsemalla näytettä tarkasti 1,000 g ja tekemällä näytteen käsittely valmistajan antaman ohjeen mukaan. Tuloksista lasketaan toistettavuuden tuloksena keskiarvo, keskihajonta, suhteellinen keskihajonta ja vaihteluväli. Oikeellisuuden määrittämiseksi tulosten keskiarvoa verrataan oikeana pidettyyn arvoon. Oikeana arvona käytetään GC-MS-menetelmän arvoa, kun testaus tehdään turvallisuusseurantanäytteellä. Kaupallista standardia käytettäessä, oikeana arvona käytetään reagenssivalmistajan ilmoittamaa arvoa. Tulosten vertailu tehdään t-testillä 95 % luotettavuustasolla.

Lainsäädäntö vaatii, että tulosten suhteellisen keskihajonnan tulee olla $\leq 20\%$. Eri menetelmillä saatujen tulosten tulee olla yhteneväiset t-testin, 95 % luottamustasolla.

5.2 Uusittavuus

Uusittavuustesti tehdään samalla näytteellä tai standardilla kuten toistettavuuskoe, mutta eri päivänä ja eri kittierällä. Tehdään kuusi rinnakkaista mittausta. Tuloksista lasketaan keskiarvo, keskihajonta, suhteellinen keskihajonta ja vaihteluväli. Mitattujen tuloksien keskiarvoa verrataan t-testillä 95 % luottamustason mukaan aikaisemmin mitattuihin toistettavuuden tuloksien keskiarvoon.

Vaatuksena uusittavuuden testauksessa on että, tulosten keskiarvojen tulee olla yhteneväiset 95 % luottamustason mukaan. Uusittavuuden testauksen tuloksien suhteellisen keskihajonnan tulee olla $\leq 20\%$ jotta menetelmä täyttää lainsäädännön vaatimukset.

5.3 Oikeellisuus lakisääteisellä raja-arvoalueella

Näytteinä käytetään viljan turvallisuusseurantatutkimuksen kaura-, vehnä- ja ohranäytteitä. Validointiin valitaan ne viljanäytteet, joiden kvantitatiivisella GC-MS-menetelmällä mitatut DON-pitoisuudet ovat tavoitteellisesti 80, 100 ja 120 % lakisääteisistä raja-arvoista ja jokaisesta näytteestä tehdään kuusi rinnakkaismäärittystä. Vertailussa käytetään kuuden rinnakkaisen näytteen keskiarvoa.

Testauksen tarkoitus on osoittaa pikamenetelmän oikeellisuus lakisääteisellä raja-arvoalueella mitattaessa DON-pitoisuuksia viljanäytteistä. Mittaustuloksista lasketaan keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta sekä poikkeama oikeana pidetystä arvosta (GC-MS-arvo). T-testillä verrataan Rida-analyysillä saatuja mittaustuloksia kvantitatiivisella analyysillä saatuihin mittaustuloksiin siten, että kvantitatiivista tulosta käsitellään kuin se olisi oikea arvo.

Lainsäädäntö vaatii, että tulosten suhteellisen keskihajonnan tulee olla $\leq 20\%$. Eri menetelmillä saatujen tulosten tulee olla yhteneväiset t-testin, 95 % luottamustasolla.

5.4 Spesifisyys

Laitteen spesifisyyttä DON-toksiinille tutkitaan standardinlisäysmenetelmällä. Näytteeksi valitaan viljanäyte, jossa ei GC-MS-analyysin perusteella ole *Fusarium*-toksiineja. Näyte esikäsitellään ensin normaalisti valmistajan ohjeen mukaisesti mutta uuttopuskurillisäyksen jälkeen konsentroitua toksiinia lisätään Falcon-putkeen ja ravistellaan hyvin. Tämän jälkeen näytettä käsitellään normaalin käytännön mukaisesti valmistajan analyysiohjeen mukaisesti ja lopuksi tulos luetaan testiliuskalta lukijalaitteella. Tutkittavat *Fusarium*-toksiinit ovat 3AcDON, T-2 ja HT-2 jotka kuuluvat trikotekeeneihin kuten DON. Käytettävät materiaalit ovat: Romer labs:n, (Tulln, Itävalta) konsentroituja toksiiniliuoksia, joiden toksiinipitoisuus on 100 µg/mL eli 100 ppm. Toksiinien tavoitepitoisuuden liuoksissa tulee olla $> 0,5$ ppm:n laitevalmistajan ilmoittaman lukijalaitteen kvantitointirajan vuoksi.

Vaatimuksena spesifisyyden testaukselle on että, RidaQuickDON-pikatestimenetelmän tulee antaa DON-pitoisuudeksi $\leq 0,5$ ppm (ei värireaktiota), ja luettaessa testiliuska RidaQuickScan-mittauslaitteella, tulee sen antaa DON-pitoisuudeksi $\leq 0,5$ ppm. Valmistajan laitekäsikirjan mukaan laite antaa aina lukeman $\leq 0,5$ ppm, jos DON-toksiinia ei ole tai sitä on vähemmän kuin 0,5 ppm.

6 TYÖN SUORITUS

Opinnäytetyössä testattiin kauralla, ohralla ja kevätevehnällä RidaQuickDON-pikatestimenetelmän luotettavuus DON-toksiinin määrittämisessä. Testauksia tehtiin näytteillä, joiden DON-toksiinipitoisuudet olivat lakisääteisen raja-arvon lähellä. Työssä tutkittiin myös Rida-analyysien tulosten yhtenevääsyyttä eri laboratorioissa ja testattiin menetelmän toimivuus, voiko näytettä laimentaa. Laitevalmistajan mukaan Rida-lukijalaitteen ylämäärittäysraja DON-toksiinille on 5,5 mg/kg.

6.1 DON-määrittäysmenetelmät

Työn testaukset tehtiin Rida-pikamenetelmällä Turun ammattikorkeakoulussa ja referenssimenetelmällä tehdyt testaukset suoritettiin MTT:llä.

6.1.1 RidaQuickDON-menetelmä

RidaQuickDON-menetelmää käytettiin käyttöohjeen mukaisesti. (28). Toimintatapa oli seuraava:

Tasalaatuista jauhattua viljanäytettä punnittiin analyysivaa'alla tarkasti 1,000 g 50 mL:n Falcon-putkeen. Näytteeseen lisättiin Rida®QuickDON-kittipaketin mukana tulevaa uuttopuskuriliuosta 15 mL automaattipipetillä. Falcon-putki suljettiin ja näytettä ravisteltiin voimakkaasti kolmen minuutin ajan. Sedimenttikerros erotettiin supernatantista sentrifugoimalla näyte 10 min 3500 g. Supernatantista pipetoitiin automaattipipetillä 100 µL liuosta testiliuskan näytekaivoon. Tulos luettiin 5 min kuluttua RidaQuickScan-mittalaitteella.

Laitevalmistajan mukaan tuloksen oikeellisuuden kannalta on oleellista, että käytettävät reagenssit ja laitteet ovat huoneenlämpöisiä. Näytettä pipetoitaessa testiliuskan näytekaivoon ei saa tulla irtonaisia partikkeleita tuloksen luotettavuuden takaamiseksi.

6.1.2 Referenssimenetelmä

Referenssimenetelmänä käytettiin GC-MS-menetelmää, joka on kehitetty triko-tekeenien analysoimiseksi viljanäytteistä. Jauhettua näytettä (1 mm seula) punnittiin 20 g, ja se uutettiin 84 % asetonitriliin. Uutos pestiin MycoSep # 227 SPE pylväs-kolonnilla (Romer Labs AG, Itävalta) ja siirrettiin silyloituun koeputkeen ja haihdutettiin kuivaksi. Sisäisenä standardina menetelmässä käytettiin 19-nortestosteronia, jota ei esiinny viljassa luontaisesti. Mittausepävarmuus oli 25,5 %, laajennettu 51 %, satunnainen virhe oli 23,3 % ja systemaattinen virhe oli 12,3 %. (32; 33). Referenssimenetelmä erottaa DON:n johdannaiset 3-asetyylideoksinivalenolin (3-AcDON) ja 15-asetyylideoksinivalenolin (15AcDON) DON:sta, joten näiden johdannaisten mahdollinen läsnäolo ei nostanut DON-pitoisuutta referenssituloksissa.

GC-MS-menetelmällä saatuja mittaustuloksia käytettiin vertailuarvoina Rida-analyysiarvoille. GC-MS-menetelmä oli MTT:n akkreditoima ja MTT:n tutkimusryhmä teki nämä analyysit.

6.2 Testin toistettavuus ja oikeellisuus eri viljalajeilla

Pikamenetelmän toistettavuus ja oikeellisuus kaura- ja ohra- ja kevätvehnänäytteille testattiin kuudella rinnakkaisella näytteellä. Lisäksi mitattiin DON-pitoisuudeltaan erilaisia näytteitä kaikista kolmesta viljalajista. Tuloksia verrattiin GC-MS-analyysin tuloksiin 95 % luottamustasolla.

6.3 Menetelmän toistettavuus viljanäytteiden DON-pitoisuuden ollessa raja-arvoalueella

Testauksen tarkoituksena oli osoittaa määrityksen luotettavuus DON-pitoisuuden ollessa raja-arvoalueella. Näytteenä käytettiin prosessoimattomia viljanäytteitä. Testattavat näytteet valittiin GC-MS-analyysitulosten mukaan. Prosessoimattoman kauran lakisääteinen DON-pitoisuusraja näytteessä on

1,75 ppm, joten näytteet valittiin tämän pitoisuuden molemmiin puolin siten, että raja-arvoon verrattuna DON-pitoisuus oli 80, 100 ja 120 % näytteissä. Näytteitä valittiin yksi jokaisesta pitoisuusalueesta ja näytteistä tehtiin aina kuusi rinnakkaista määrittystä.

Ohralla ja vehnällä prosessoimattoman viljan DON-pitoisuuksien raja-arvot ovat 1,25 ppm näytettä kohden. Näytteet valittiin ja testattiin ohralle ja vehnälle samalla periaatteella kuin kauralle. Kevätvehnä- ja ohranäytteillä ei ollut käytettävissä juuri 80, 100 ja 120 % DON-pitoisuusarvoja lakisääteisiin verrattuna, mistä syystä testaukseen valittiin näitä arvoja lähinnä vastaavat näytteet. Tuloksia verrattiin GC-MS-analyysin tulokseen 95 % luottamustasolla.

6.4 Näytteen laimennus

Näytteen laimennus testattiin yhdellä kauranäytteellä kolmella eri tavalla, joista jokaisesta tehtiin kuusi rinnakkaista näytettä laimennustapaa kohti. Lopuksi tehtiin yksi mittaus laimentamattomasta kauranäytteestä vertailuarvoksi. Laimennettava kauranäyte ja DON-toksiinivapaa kauranäyte valittiin GC-MS-analyysitulosten mukaan. Tuloksia verrattiin GC-MS-analyysin tulokseen 95 % luottamustasolla.

Ensimmäinen laimennustapa oli sekoittaa laimennettavaa näytettä ja DON-toksiinivapaata näytettä (nollanäyte), keskenään. Molempia näytteitä punnittiin tarkasti 4 g ja näytteet sekoitettiin keskenään samassa astiassa. Homogenoidusta näytteestä punnittiin tarkasti 1 g näytettä ja näytteen jatkokäsittely tehtiin ohjeen mukaisesti.

Toinen laimennustapa oli valmistaa molemmat näytteet eli laimennettava näyte ja nollanäyte, sentrifugointivaiheeseen saakka omina näytteinään. Tämän jälkeen molempien näytteiden supernatanteista pipetoitiin 5 mL samaan putkeen ja sekoitettiin. Näytteen mittaus suoritettiin ohjeen mukaisesti.

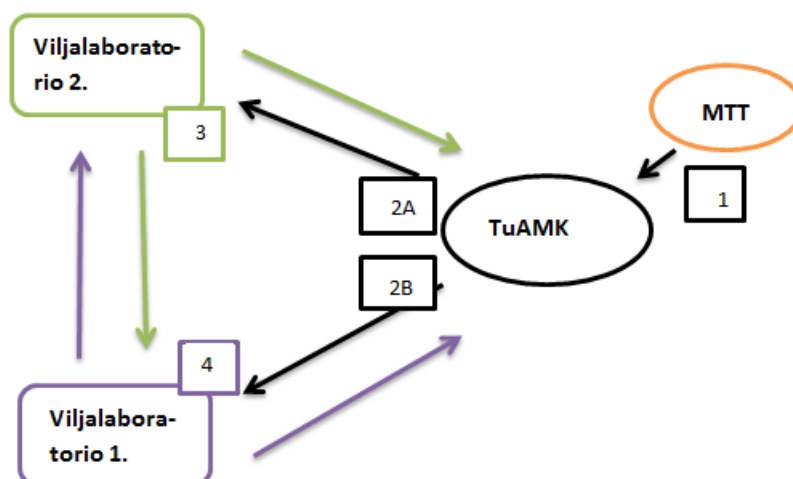
Kolmas laimennustapa oli valmistaa laimennettava näyte normaalisti sentrifugointivaiheeseen saakka. Puhtaasta uuttopuskurista ja näytteen supernatantista

pipetoitiin molemmista 5 mL samaan putkeen ja sekoitettiin. Näytteen mittaus suoritettiin ohjeen mukaisesti.

6.5 Laboratorioiden välinen toistettavuus

Vertailunäytteillä haluttiin testata eri laboratorioiden Rida-analyysien toistettavuus samoilla näytteillä. Ensimmäisessä näytesarjassa on 12 kaura- ja 12 vehnänäytettä, joista tunnettiin GC-MS-analyysitulokset. Analysointivaiheessa GC-MS-tulokset eivät olleet laboratorioiden käytettävissä. Nämä näytteet testattiin kahdessa eri laboratoriossa. Eri menetelmien antamia tuloksia vertailtiin parittaisen t-testin 95 % luottamustason mukaan.

Toisessa näytesarjassa oli kolme rinnakkaista näytettä, jotka testattiin kolmessa eri laboratoriossa. Näistä näytteistä ei ollut GC-MS-vertailutuloksia. Kaikki näytteet punnittiin valmiiksi näyteputkiin (50 mL Falcon-putki) siinä laboratoriossa, mistä näytteet tulivat ja mittauslaboratorioissa suoritettiin näytteen esikäsittely ja mittaus analyysiohjeen mukaan. Kuvassa 9. esitetään näytekaavio, jonka mukaan näytteet jaettiin. Näytteen lähettävä laboratorio mittasi näytteen myös itse. Eri laboratorioiden antamia Rida-analyysien tuloksia vertailtiin parittaisen t-testin 95 % luottamustason mukaan. Tuloksia tarkasteltiin pareittain, kaksi laboratoriota kerrallaan.



1. Kvantitatiivisesti (GC-MS) analysoidut jauhonäytteet (MTT)
- 2A. TuAMK-jauhonäytteet (kevätnä 12 kpl) viljalaboratorio 2. analysoitavaksi
- 2B. TuAMK-jauhonäytteet (kaura 12 kpl) viljalaboratorio 1. analysoitavaksi
3. Viljalaboratorio 2. jauhonäytteet (kevätnä 12 kpl) viljalaboratorio 1. ja TuAMK:lle analysoitaviksi
4. Viljalaboratorio 1. jauhonäytteet (kaura 12 kpl) viljalaboratorio 2. ja TuAMK:lle analysoitaviksi

Kuva 9. Näytekaavio kaura- ja vehnänäytteiden jakoon laboratorioden välillä.

6.6 Tilastollinen tulosten käsittely

Rida-analyysillä saatuja tuloksia verrattiin GC-MS-referenssimenetelmällä saattuihin tuloksiin. Tuloksista tehtiin regressioanalyysi ja parittainen t-testi 95 % luotettavuustasolla tulosten yhtenevyyden tarkastelemiseksi. Rinnakkaisista tuloksista laskettiin keskiarvo (ka), keskihajonta(s) ja suhteellinen keskihajonta (RSD %). Testauksissa GC-MS-referenssimenetelmällä saatua tulosta käsiteltiin oikeana arvona, johon rinnakkaisten tulosten keskiarvoa verrattiin t-testillä 95 % luottamustasolla. Absoluuttiset eroavaisuudet laskettiin vähentämällä GC-MS-analyysin tuloksesta testauksessa mitattu Rida-analyysillä saatu mitta-arvo. Prosentuaalisia eroavaisuuksia tarkasteltaessa GC-MS-tuloksesta vähennettiin Rida-analyysin tulos ja jaettiin GC-MS-tuloksella sekä kerrottiin sadalla. Mittausepävarmuus laskettiin EU-asetuksen ohjeistuksen mukaan U_f eli standardiepävarmuuden enimmäisarvo sovellettuna tapaukseen, jossa menetelmää

ei ole täysin validoitu (kohta 3.1). Laajennettu mittausepävarmuus analyysituloksille laskettiin 95 % luottamustasolla, kattavuuskertoimella 2, lasketun standardiepävarmuuden enimmäisarvon mukaan (34; 25).

6.7 Reagenssit ja välineet

Opinnäytetyössä käytettiin vuoden 2012 turvallisuusseurantanäytteitä, 30 kpl kaura-, 20 kpl ohra- ja 21 kpl kevätvehnänäytteitä. Lisäksi vilja-alan toimijan kahden eri viljalaboratorion 12 kpl kaura- ja 12 kpl vehnänäytteitä käytettiin rinnakkaisten Rida-analyysien testauksessa.

Testauksessa käytetty reagenssikitti oli R-Biopharmin valmistama pikatestikitti:

Rida®QuickDON Immunochromatographischer Test R-Biopharm AG, Darmstadt, Saksa. Lot # 14083 exp. 2014–07, test strip: Batch # 8B81A993 exp. 2014–07 ja extraction buffer 450 ml: Lot # 12083 exp. 2014–07

Testauksessa käytettiin seuraavia laitteita ja välineitä:

Sentrifugi Heraus, bio 1694

Vaaka Mettler Toledo, AB204-S, tarkkuus 0,1mg, bio 1556 ja GWB, Mettler BB 2400 tarkkuus 0,01g

Automaattipipetit Biohitt, 1 – 5 mL, 7019233, A125 ja 50 – 1000 µL, 9100331 bio 2010B, kalibrointi 19.11.12.

Rida®QuickScan-semikvantitatiivinen lukijalaite, r-Biopharm

6.8 Näytteen käsittely ja ennen mittausta suoritettavat toimenpiteet

Viljanäytteen käsittely aloitettiin jauhamalla näyte tasalaatuiseksi jauhoksi. Tässä testauksessa jyvät jauhettiin laboratoriomyllyillä MTT:llä ja vilja-alan toimijan kahdessa viljalaboratoriossa. Testaukset suoritettiin vilja-alan toimijan kahdessa eri viljalaboratoriossa ja Turun ammattikorkeakoulun laboratoriossa.

Viljalaboratorio 1. käyttämä laboratoriomylly oli Koneteollisuus Oy:n laboratoriomylly KT 30, käytössä oli hienoin säätö 2800 rpm ja rouhiva jauhatus. Viljalaboratorion kauranäytteiden seulontatulokset: $500\ \mu\text{m} < 850\ \mu\text{m} < 1000\ \mu\text{m}$. Visuaalisesti tarkasteltuna viljalaboratorio 1. jauhamat kauranäytteet olivat karkeimpia ja näytteiden pinnalla oli puoliintuneita akanoita.

Viljalaboratorio 2. käyttämä laboratoriomylly oli Laboratorio mill 3100 Falling number, jauhatusaika oli 30s + jälkikäynti 30 s ja käytössä leikkaava jauhatus. Seulakoko oli 0,8 mm. Viljalaboratorion vehnänäytteiden seulontatulokset olivat: $210\ \mu\text{m} < 500\ \mu\text{m} < 710\ \mu\text{m}$

MTT:n (GC-MS-menetelmä) käyttämä mylly oli leikkaava laboratoriomylly ja seulakoko oli 1mm. Turun amk:n käyttämät näytteet.

Ennen mittauksia suoritettiin vaa'an kalibrointi seurantapunnuksella ja Rida-QuickScan – lukijalaitteen kalibrointi kalibrointitikulla. Lukijalaite oli ennen kalibrointia n. 30 min päällä.

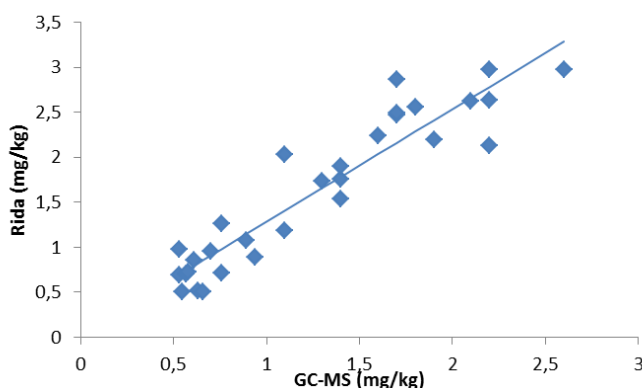
Näytteet punnittiin kertakäyttölusikoita käyttäen suoraan Falcon-putkiin.

7 TULOKSET

7.1 Testin toistettavuus eri viljalajeille

7.1.1 Kaura

Kauranäytteitä oli 30 kpl (liite 1. (1/3)). Menetelmän toistettavuus kauralla testattiin kuudella rinnakkaisella mittauksella. Mittaustulosten keskiarvo oli 0,8 ppm \pm 0,6 ppm, hajonta 0,1 ppm ja suhteellinen keskihajonta oli 14 % (Liite 1. (2/3)). Systeemin toistettavuus testattiin mittaamalla sama näyte kuudella eri testiliuskalla. Lisäksi yksi em. testiliuskoista mitattiin kuusi kertaa lyhyen ajanjakson aikana. Systeemin toistettavuuden mittausten keskiarvo oli 0,8 ppm \pm 0,6, keskihajonta oli 0,1 ppm ja suhteellinen keskihajonta oli 16 %. Saman testiliuskan lukeminen lyhyen ajan sisällä antoi tulokseksi 0,8 ppm \pm 0,6 ppm, keskihajonta oli 0,02 ppm ja suhteellinen keskihajonta oli 2 % (Liite 1. (3/3)). Nämä testaukset tehtiin ensimmäisten testausten joukossa, joten toisin kuin ohralla ja vehnälle, ne eivät ole mukana yksittäisten näytteiden tuloksissa, jotka löytyvät liitteistä. Testattavaksi näytteeksi valikoitui silloisen kiinnostusten mukaan näyte, jonka DON-pitoisuus oli 0,76 ppm (GC-MS), koska 0,750 ppm on lakisääteinen raja-arvo suoraan myytäväksi tarkoitetuilla elintarvikkeilla. Kuvassa 10. kauranäytteiden tuloksien kuvaaja, jossa on regressiosuora Rida-analyysin tuloksista verrattuna GC-MS-analyysin tuloksiin.



Kuva 10. Regressioanalyysi kauran tuloksista. Pearsonin korrelaatio oli 0,935.

Absoluuttiset erot eri menetelmillä mitattujen yksittäisten mittaustulosten välillä olivat -1,17 – 0,15 ppm:n väliltä ja prosentuaaliset erot vaihtelivat välillä – 84,91 – 22,73 % (Liite 1. (1/3)).

Eri menetelmillä saatuja tuloksia vertailtiin parittaisella t-testillä. Laskettu t-testisuureen arvo oli 5,694. Vastaava taulukkoarvo on 2,042 (t-taul. 95 %, 2-suun., n=30) (Liite 1. (3/3)). Näin ollen menetelmien tulokset poikkesivat toisistaan 95 % luotettavuustasolla.

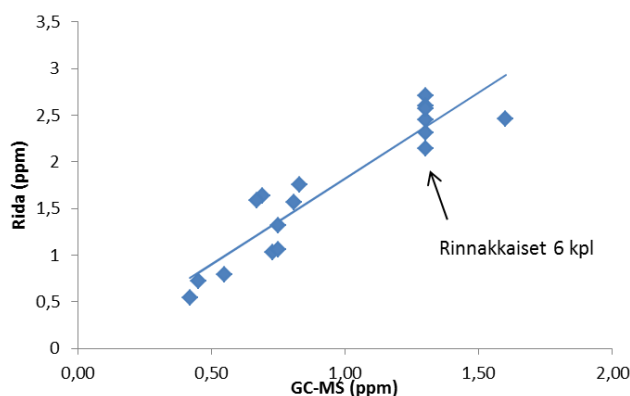
Verrattaessa Rida-analyysillä mitattujen kuuden rinnakkaisen näytteen keskiarvoa GC-MS-analyysin tulokseen todettiin että, tulokset eivät poikenneet toisistaan 95 % luotettavuustasolla. Laskettu t-arvo oli 1,117. Vastaava taulukkoarvo on 2,571 (t-taul. 95 %, 2-suun., n=6) (Liite 1. (3/3)).

Rida-menetelmällä analysoitiin myös näytteitä, joissa ei ollut havaittu DON-toksiinia GC-MS-analyysissa. Rida-analyysillä saadut tulokset olivat yhteneväiset GC-MS-analyysitulosten kanssa eli DON-toksiinia ei löytynyt (tulos < 0,5 ppm) (Liite 1. (3/3)).

7.1.2 Ohra

Ohranäytteitä oli 20 kpl (liite 2. (1/2)). Menetelmän toistettavuus ohralla testattiin kuudella rinnakkaisella mittauksella näytteestä, jonka DON-pitoisuus GC-MS-menetelmällä oli 1,30 ppm. Mittaustulosten keskiarvo oli 2,5 ppm, keskihajonta

oli 0,2 ppm ja suhteellinen keskihajonta oli 9 %. Kuvassa 11. ohranäytteiden tuloksien kuvaaja, jossa on regressiosuora Rida-analyysin tuloksista verrattuna GC-MS-analyysin tuloksiin.



Kuva 11. Regressioanalyysi ohran tuloksista. Pearsonin korrelaatio 0,931.

Regressioanalyysin kuvaajasta (kuva 11.) nähdään Rida-analyysin antama hajonta kuudelle rinnakkaiselle näytteelle. Absoluuttiset erot eri menetelmillä mitattujen yksittäisten mittaustulosten välillä olivat -1,41 – (-0,12) ppm:n väliltä ja prosentuaaliset erot vaihtelivat välillä -137,7 – (-28,6) % (Liite 2. (1/2)).

Eri menetelmillä saatuja tuloksia vertailtiin parittaisella t-testillä. Laskettu t-testisuureen arvo oli 7,854. Vastaava taulukkoarvo on 2,120 (t-taul. 95 %, 2-suun., n=17) (Liite 2. (2/2)). Näin ollen menetelmien tulokset poikkesivat toisistaan 95 % luotettavuustasolla.

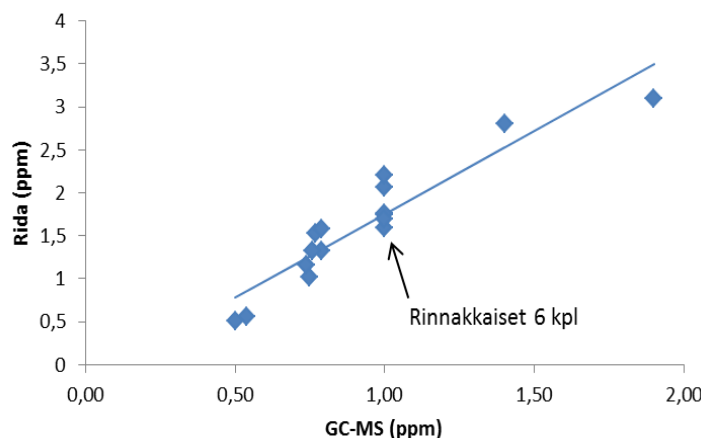
Verrattaessa Rida-analyysillä mitattujen kuuden rinnakkaisen näytteen keskiarvoa GC-MS-analyysin tulokseen todettiin että, tulokset poikkesivat toisistaan 95 % luotettavuustasolla. Laskettu t-arvo oli 13,612. Vastaava taulukkoarvo on 2,571 (t-taul. 95 %, 2-suun., n=6) (Liite 2. (2/2)).

Rida-menetelmällä analysoitiin myös näytteitä, joiden DON-toksiinipitoisuus GC-MS-analyysin mukaan oli alle pikamenetelmän lukija-laitteen kvantitointirajan. Kahdeksasta alhaisen DON-pitoisuuden omaavasta näytteestä (GC-MS,

0,19 – 0,44 ppm) kuusi ei antanut lukemaa Rida-analyysillä. Kahden näytteen lukemat olivat 0,54 (näyte 12) ja 0,72 ppm (näyte 17) (Liite 2. (1/2)).

7.1.3 Kevätvehnä

Vehnänäytteitä oli 21 kpl (liite 3. (1/2)). Menetelmän toistettavuus vehnällä testattiin kuudella rinnakkaisella mittauksella näytteestä, jonka DON-pitoisuus GC-MS-menetelmällä oli 1,00 ppm. Mittaustulosten keskiarvo oli 1,8 ppm, keskihajonta oli 0,2 ppm ja suhteellinen keskihajonta oli 13 %. Kuvassa 12. on vehnä näytteiden tuloksien regressiokuvaaja molempien menetelmien antamista yksittäisistä mittaustuloksista.



Kuva 12. Vehnän regressioanalyysi. Pearsonin korrelaatio 0,935.

Regressioanalyysin kuvaajasta (kuva 12.) nähdään Rida-analyysin antama hajonta kuudelle rinnakkaiselle näytteelle. Absoluuttiset erot eri menetelmillä mitattujen yksittäisten mittaustulosten välillä olivat -1,40 – (-0,01) ppm:n väliltä ja prosentuaaliset erot vaihtelivat välillä -121 – (-2) % (Liite 3. (1/2)).

Eri menetelmillä saatuja tuloksia vertailtiin parittaisella t-testillä. Laskettu t-testisuureen arvo oli 3,544. Vastaava taulukkoarvo on 2,131 (t-taul. 95 %, 2-suun., n=16)(Liite 3. (2/2)). Näin ollen menetelmien antamat tulokset poikkesivat toisistaan 95 % luotettavuustasolla.

Verrattaessa Rida-analyysillä mitattujen kuuden rinnakkaisen näytteen keskiarvoa GC-MS-analyysin tulokseen todettiin että, tulokset poikkesivat toisistaan 95 % luotettavuustasolla. Laskettu t-arvo oli 8,561. Vastaava taulukkoarvo on 2,571 (t-taul. 95 %, 2-suun., n=6) (Liite 3. (2/2)).

Rida-menetelmällä analysoitiin myös näytteitä, joiden DON-toksiinipitoisuus GC-MS-analyysin mukaan oli alle pikamenetelmän lukija-laitteen kvantitointirajan (GC-MS 0,17–0,35 ppm). Nämä näytteet eivät antaneet lukemaa Rida-analyysillä. Kaikkien näytteiden tulokset esitetään liitteessä 3. (1/2).

7.1.4 Yhteenveto testin toistettavuudesta eri viljalajeille

Taulukkoon 5. on koottu kolmen viljalajin kuuden rinnakkaisen näytteen toistettavuustestien tulosten keskiarvo (\bar{x}), keskihajonta (s) ja suhteellinen keskihajonta (RSD %). Taulukkoon on laskettu Rida-analyysille standardiepävarmuuden arvo (U_f), jolla tuloksen mittausepävarmuus ilmoitetaan. Laajennettu mittausepävarmuus lasketaan 95 % luottamustasolla, $k=2$. Kuuden rinnakkaisen mitaustulokset voidaan ilmoittaa muodossa kaura $0,8 \text{ ppm} \pm 0,6 \text{ ppm}$, ohra $2,5 \text{ ppm} \pm 0,8 \text{ ppm}$ ja vehnä $1,8 \text{ ppm} \pm 0,7 \text{ ppm}$.

Standardiepävarmuuden l. mittausepävarmuuden laskeminen kohdan 3.1 kaavan mukaan:

$$\text{Kaura: } U_f = \sqrt{(0,5 \text{ mg/kg} / 2)^2 + (0,15 \times 0,81 \text{ mg/kg})^2} = 0,28 \text{ ppm}$$

$$\text{Ohra: } U_f = \sqrt{(0,5 \text{ mg/kg} / 2)^2 + (0,12 \times 2,46 \text{ mg/kg})^2} = 0,39 \text{ ppm}$$

$$\text{Vehnä: } U_f = \sqrt{(0,5 \text{ mg/kg} / 2)^2 + (0,12 \times 1,84 \text{ mg/kg})^2} = 0,33 \text{ ppm}$$

Laajennettu mittausepävarmuus saadaan kertomalla standardiepävarmuus kattavuuskertoimelle 2 eli $\pm U$, ($k=2$) on $U_f \times 2$

Taulukko 5. Viljalajien rinnakkaiset tulokset. Rida-määrittäyksessä $n=6$ ja GC-MS-menetelmässä $n=1$.

	DON – pitoisuus			
		KAURA	OHRA	VEHNÄ
	GC-MS (ppm)	0,76	1,30	1,00
Rida	ka (ppm)	0,8	2,5	1,8
	s (ppm)	0,12	0,21	0,24
	RSD %	14	9	13
	U_f (ppm)	0,28	0,39	0,37
	$\pm U$, $k=2$ (ppm)	0,6	0,8	0,7
	$\pm U$ %	68	32	40

Referenssimenetelmänä käytetyn GC-MS-menetelmän laajennettu mittausepävarmuus on ± 51 % (32). Huomioiden tämä ja Ridan mittaustuloksiin lasketut mittausepävarmuudet ($\pm U$, $k=2$) kahden eri menetelmän antamissa tuloksissa (taulukko 5.) olivat tulokset yhteneväiset kaikilla viljalajeilla. Lakisääteinen RSD % kvantitatiivisessa analyysissä on ≤ 20 %, joten Rida - menetelmän rinnakkaisten tulokset ovat tämän mukaan hyviä.

Kaikkien viljalajien tulokset poikkesivat kahden menetelmän välillä parittaisen t-testin 95 % luottamustason mukaan toisistaan mitattaessa yksittäisiä viljanäytteitä.

Verrattaessa kuuden rinnakkaisen kauranäytteen tulosten keskiarvoa GC-MS-analyysin tulokseen t-testillä, tulokset eivät poikenneet toisistaan 95 % luotettavuustasolla. Laskettu t-arvo oli 1,117. Vastaava taulukkoarvo on 2,571 (t-taul. 95 %, 2-suun., $n=6$). Liite 1. (3/3). Ohran (Liite 2. (2/2)) ja vehnän (Liite 3. (2/2)) kuuden rinnakkaisen tulokset poikkesivat toisistaan 95 % luottamustasolla.

7.2 Menetelmän toistettavuus viljanäytteiden DON-pitoisuuden ollessa raja-arvoalueella

Testaus suoritettiin kaikilla kolmella viljalajilla kolmella näytteellä, joista jokaisesta tehtiin kuusi rinnakkaista analyysiä. Taulukosta 6. nähdään GC-MS:n antamat tulokset, Ridan kuudelle rinnakkaiselle näytteelle antamien tulosten kes-

kiarvo, keskihajonta, suhteellinen keskihajonta ja standardiepävarmuus. Liitteessä 4. kohdissa (1/3),(2/3) ja (3/3) esitetään kaikkien näytteiden mittaustulokset.

Taulukko 6. Toistettavuuden testaus viljojen lakisääteisten DON-pitoisuusraja-arvojen lähellä.

	GC-MS (ppm)	Rida (n=6)						±U, k=2	±U %
		ka (ppm)	s (ppm)	Vaihteluväli (ppm)	RSD %	lask. t-testi	Uf		
Kaura	1,4	1,7	0,1	0,2	5	8,019	0,32	0,6	38
	1,7	2,0	0,2	0,5	9	4,028	0,34	0,7	35
	2,1	2,3	0,2	0,5	10	2,369	0,37	0,8	32
Ohra	0,81	1,8	0,4	1,1	22	6,027	0,33	0,7	37
	1,3	2,3	0,3	0,7	13	8,534	0,38	0,8	32
	1,6	2,3	0,4	0,9	16	4,796	0,37	0,8	32
Kevätvehnä	0,79	1,3	0,1	0,4	10	9,607	0,30	0,6	45
	1,0	1,6	0,4	0,8	23	4,031	0,31	0,6	40
	1,4	2,1	0,3	0,7	12	6,845	0,36	0,7	34

Lasketut t-arvot olivat kaikilla viljoilla suuremmat kuin t-tilausarvo t (taul. 95 %, 2-suunt., n=6 on 2,571, lukuun ottamatta kauran testausta tasolla 2,1 ppm. t-arvojen laskuissa ei ole huomioitu mittausepävarmuutta erikseen. Laskutoimitukset esitetään liitteestä 4.

7.2.1 Yhteenveto menetelmän toistettavuuden testauksesta viljanäytteiden DON-pitoisuuksien ollessa lähellä raja-arvopitoisuuksia

Kaikkien kolmen viljalajien tulokset mitattuna molemmilla menetelmillä poikkesivat 95 % luottamustasolla toisistaan.

Tarkasteltaessa GC-MS- ja Rida-menetelmien tuloksia huomioiden molempien menetelmien mittausepävarmuudet, tulokset ovat yhtenevät.

Tämän mukaan Rida®Quick Scan- pikatesti toimii vaadittavalla luotettavuustasolla lähellä enimmäispitoisuuksia määritettäessä DON-toksiinipitoisuuksia viljanäytteistä huomioon ottaen mittaustuloksissa mittausepävarmuuden.

7.3 Näytteen laimennus

Taulukkoon 7. on kerätty kolmella eri tavalla (kohta 6.4) laimennetun kauranäytteen tulokset. Kaikilla näytteillä laskettu t-arvo oli suurempi kuin taulukkoarvo, t (taul. 95 %, 2-suunt., n=6) on 2,571. Laskutoimitukset esitetään liitteestä 5.

Taulukko 7. Kauranäytteen laimennustestausten antamat tulokset, n=6.

		Rida (n=6)							
	GC-MS (ppm)	ka (ppm)	s (ppm)	RSD %	lask. t-testi	DON-toksiinin tulos	Uf (ppm)	$\pm U$, k=2	$\pm U$ %
Laim. 1	2,2	1,4	0,2	14	3,328	2,7	0,41	0,8	30
Laim. 2	2,2	1,3	0,2	13	3,266	2,7	0,40	0,8	31
Laim. 3	2,2	1,3	0,1	9	4,126	2,6	0,40	0,8	31

Näyte laimennettiin suhteessa 1:2 testauksen alussa, joten mitattujen tulosten (Rida) keskiarvo täytyi kertoa kahdella oikean tuloksen saamiseksi. Nämä arvot löytyvät taulukosta 7. sarakkeesta DON-toksiinin tulos. Tätä laskettua arvoa käytettiin verrattaessa tulosta GC-MS-analyysin tulokseen.

Tulokset voidaan ilmoittaa muodossa 2,7 ppm \pm 0,8 ppm, 2,7 ppm \pm 0,8 ppm ja 2,6 ppm \pm 0,8 ppm.

Testauksen lopuksi mitattiin laimentamaton näyte erikseen Rida-analyysillä ja mittaustulokseksi saatiin 2,2 ppm \pm 0,7 ppm.

7.3.1 Yhteenveto kauranäytteen laimennuksesta

Vertailuarvoon (GC-MS) nähden t-testin 95 % luottamustason mukaan menetelmien tulokset poikkesivat toisistaan kaikilla kolmella laimennustavalla. Verrattaessa kahden menetelmän tuloksia kaikilla kolmella laimennustavalla huomioiden molempien menetelmien mittausepävarmuudet, tulokset olivat yhtenevät. Laimentamattoman näytteen mittaaminen antoi Rida-analyysillä tuloksen 2,2 ppm ja GC-MS-analyysi antoi tulokseksi 2,2 ppm.

7.4 Laboratorioiden välinen toistettavuus

Kolmen eri laboratorion tutkimien kaura- ja vehnänäytteiden DON-tulokset on koottu taulukkoon 8. Parittaisen t-testin mukaan tulokset eivät eronneet toisistaan 95 % luottamustasolla. Tuloksia tarkasteltiin pareittain (kaksi laboratoriota kerrallaan). Laskutoimitukset esitetään liitteestä 6. (1/4) ja (2/4). Rinnakkaismääritysten kaikkien kolmen mittauksen antaessa tuloksen, on taulukkoon laskettu keskiarvo, – hajonta ja suhteellinen keskihajonta. Menetelmä ei anna numerista tulosta, jos näytteen DON-pitoisuus on $< 0,5$ ppm.

Taulukko 8. Kolmen rinnakkaisten näytteiden Rida-analyysien tulokset eri laboratorioissa mitattuina vehnä- ja kauranäytteillä.

VEHNÄ								
Viljalab.2. (ppm)	Viljalab.1. (ppm)	Amk (ppm)	ka (ppm)	s (ppm)	RSD %	Uf (ppm)	$\pm U$, k=2 (ppm)	$\pm U$ %
<0,5	<0,5	< 0,5						
0,52	<0,5	0,51						
<0,5	<0,5	< 0,5						
2,16	2,64	2,96	2,6	0,4	16	0,40	0,8	30
3,01	3,4	3,22	3,2	0,2	6	0,46	1,0	29
5,5	4,59	> 5,5						
0,87	<0,5	< 0,5						
0,93	0,93	0,83	0,9	0,06	6	0,28	0,6	63
0,76	0,77	0,76	0,8	0,006	1	0,27	0,6	72
0,5	<0,5	< 0,5	0,5					
0,5	<0,5	< 0,5	0,5					
1,19	1,31	1,58	1,4	0,2	15	0,30	0,6	44
KAURA								
Viljalab.2. (ppm)	Viljalab.1. (ppm)	Amk (ppm)	ka (ppm)	s (ppm)	RSD %	Uf (ppm)	$\pm U$, k=2 (ppm)	$\pm U$ %
1,62	1,45	1,59	1,6	0,1	6	0,31	0,6	40
2,08	1,91	1,63	1,9	0,2	12	0,34		
1,22	1,62	1,12	1,3	0,3	20	0,30	0,6	45
1,44	1,87	1,91	1,7	0,3	15	0,33	0,6	37
<0,5	<0,5	<0,5						
2,28	2,12	1,83	2,1	0,2	11	0,35	0,8	34
<0,5	<0,5	<0,5						
1,14	1,34	1,43	1,3	0,1	11	0,29	0,6	45
1,48	0,97	0,99	1,2	0,3	25	0,30	0,6	53
2,07	1,76	1,65	1,8	0,2	11	0,33	0,6	36
3,55	4,13	3,24	3,6	0,5	12	0,50	1,0	28
3,01	3,48	3,89	3,5	0,4	13	0,48	1,0	28

Toisena vertailutestauksena olivat kahden laboratorion mittaukset rinnakkaisista kaura- ja vehnänäytteistä, taulukko 9. Näistä näytteistä oli myös GC-MS-analyysin tulokset vertailuarvoiksi. Mitatut arvot ja t-testin laskutoimitukset esitetään liitteessä 6. (3/4) ja (4/4).

Taulukko 9. Kahden rinnakkaisten näytteiden tulokset eri laboratorioissa mitattuina kaura- ja vehnänäytteistä.

Kahden laboratorion tulokset samoista viljanäytteistä								
VEHNÄ								
GC-MS (ppm)	Rida							
	Amk (ppm)	Viljalab.2 (ppm)	ka (ppm)	s (ppm)	RSD %	Uf (ppm)	±U, k=2 (ppm)	±U %
1,90	3,1	3,38	3,2	0,2	6	0,46	0,9	29
0,35	<0,5	<0,5						
0,77	1,53	1,31	1,4	0,2	11	0,30	0,6	43
0,37	<0,5	<0,5						
1,40	2,8	2,23	2,5	0,4	16	0,39	0,8	31
1,00	1,59	1,8	1,7	0,1	9	0,32	0,6	38
0,79	1,58	1,18	1,4	0,3	21	0,30	0,6	43
3,90	>5,5	4,25	4,3					
0,75	1,02	0,95	1,0	0,05	5	0,28	0,6	56
0,79	1,32	1,5	1,4	0,1	9	0,30	0,6	43
0,54	0,56	0,7	0,6	0,1	16	0,27	0,5	85
0,50	0,51	<0,5	0,5					
KAURA								
GC-MS (ppm)	Rida							
	Amk (ppm)	Viljalab.1 (ppm)	ka (ppm)	s (ppm)	RSD %	Uf (ppm)	±U, k=2 (ppm)	±U %
1,7	2,47	2,34	2,4	0,1	3,8	0,38	0,8	32
1,9	2,2	2,12	2,2	0,1	2,6	0,36	0,7	33
1,1	2,03	1,36	1,7	0,5	28	0,32	0,6	38
2,6	2,97	3,24	3,1	0,2	6	0,45	0,9	29
0,7	0,95	0,97	1,0	0,01	1,5	0,29	0,6	60
1,4	1,76	1,94	1,9	0,1	7	0,33	0,7	36
0,61	0,86	0,87	0,9	0,01	1	0,28	0,6	65
6,2	4,11	4,18	4,2	0,05	1	0,56	1,1	27
2,2	2,98	2,62	2,8	0,1	9	0,42	0,8	30
0,94	0,89	1,16	1,0	0,2	19	0,28	0,6	54
0,45	<0,5	<0,5						
0,55	<0,5	<0,5						

7.4.1 Yhteenveto vertailunäytteiden tuloksista

Tarkasteltaessa kolmen laboratorion kaura- ja vehnänäytteitä (taulukko 8.) Rida-analyysien antamat tulokset (Liite 6. (1/4) ja (2/4)) eivät poikenneet toisistaan parittaisen t-testin 95 % luottamustason mukaan.

Kahden laboratorion Rida-mittaustuloksia (taulukko 9.) verratessa kauranäytteiden tulokset (Liite 6. (3/4)) eivät poikenneet toisistaan 95 % luottamustasolla. Myös vehnänäytteiden mittaustulokset (Liite 6. (4/4)) eivät eronneet toisistaan 95 % luottamustasolla. Verrattaessa tuloksia kahden eri menetelmän (Rida ja GC-MS) välillä kauranäytteiden tulokset eivät eronneet toisistaan 95 % luottamustasolla. Vehnänäytteitä tarkastellessa tulokset menetelmien välillä erosivat 95 % luottamustasolla kvantitatiivisesta analyysistä. Laite on optimoitu vehnälle, joten saatu luotettavampi tulos kauralle oli yllättävää. Vertailtaessa vehnän tuloksia ja huomioiden molempien menetelmien mittausepävarmuudet, tulokset kohtaavat ja ovat yhtenevät.

Verrattaessa GC-MS-analyysien yksittäisiä tuloksia Rida-analyysien tuloksiin ilman, että mittausepävarmuus huomioidaan, voidaan todeta GC-MS-analyysien tulosten olevan pienempiä. Näytteet, jotka GC-MS-analyysin mukaan ovat alle lakisääteisen pitoisuuden DON-toksiinin osalta, ovatkin Rida-analyysilla mitattuina yli raja-arvon. Esimerkkinä vehnän GC-MS tulos 1,0 ppm ja Rida-analyysien tulokset 1,6 ppm ja 1,8 ppm.

Koko vertailutestausta tarkastellessa viljanäytteiden alhaisen DON-pitoisuuden vuoksi Rida-analyysit antoivat yhteneväisen < 0,5 ppm lukeman muutamaa lukemaa lukuun ottamatta. Yksi analyysitulos ylitti lukijalaitteen mittausalueen kahden muun laboratorion lukijalaitteen osuessa mittausalueelle samalla näytteellä.

8 JOHTOPÄÄTÖKSET

Rida-pikatestin toimivuus testattiin kolmella viljalajilla (kaura 30 kpl, ohra 20 kpl ja vehnä 21 kpl). Pikamenetelmällä ja kvantitatiivisella menetelmällä saatiin yhteneväiset tulokset, kun menetelmien laajennetut mittausepävarmuudet otettiin huomioon. Ilman mittausepävarmuuksia tarkasteltuna Rida-analyysien tulokset antoivat muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta isompia DON-pitoisuuksia kuin akkreditoidun GC-MS-analyysien tulokset. Suurilla pitoisuuksilla (≥ 2 ppm) Rida-analyysin mittaustulokset olivat lähempänä GC-MS-tuloksia kuin pienillä, lähellä lakisääteisiä pitoisuusrajoja olevilla mittaustuloksilla. Rida-analyysien laajennettu mittausepävarmuus oli suurempi pienillä (< 1.0 ppm) pitoisuuksilla kuin suuremmilla pitoisuuksilla. Kun mitattiin näytteitä, jotka olivat GC-MS-menetelmän mukaan DON-toksiinivapaita tai DON-pitoisuus oli alempi kuin rida-analyysin määrittämisraja, Rida-analyysi ei antanut lukemaa kahta ohran mittaustulosta lukuun ottamatta.

Lainsäädännön edellyttämä keskihajonta rinnakkaisissa viljanäytteissä määritettäessä DON-toksiinia on ≤ 20 %. Rida®QuickDON-pikamenetelmä täyttää nämä vaatimukset. Menetelmän toistettavuutta testattiin kaura- ja vehnänäytteillä (yht. 48 kpl). Testaukset suoritettiin kolmessa eri laboratoriossa eri henkilöiden tekeminä samoista jauhetuista ja punnituista näytteistä. Näiden rinnakkaisten näytteiden Rida-analyysien tulokset olivat yhtenevät keskenään 95 % luottamustasolla.

Työssä testattiin myös näytteen laimentamisen vaikutusta analyysitulokseen. Laimennustapoja oli kolme ja laimennustapa ei vaikuttanut näytteen DON-pitoisuuteen. Näyteviljan laimentaminen puhtaalla viljalla oli tekotapana paras, koska näytteen käsittely oli tässä menetelmässä helpointa. Laimennustapa, jossa pelkkä uuttopuskuri lisättiin laimennettavan näytteen supernatanttiin, oli laimennustavoista nopein. Uuttopuskurin suuri määrä vaikeutti kuitenkin näytteen pipetointia, koska näyte vaahtoutui.

Tämän opinnäytetyön perusteella Rida®QuickDON-pikatesti ja tuloksen lukemiseen käytettävä Rida®Quick Scan-lukijalaite täyttävät Euroopan komission asetuksen (EY) 401/2006 asettamat vaatimukset kvantitatiiviselle analyysille DON-toksiinin määrittelykselle prosessoimattomasta viljasta. Mittaustulokseen lasketaan näytekohtaisesti laajennettu mittausepävarmuus (U_f = standardiepävarmuuden enimmäisarvo validoimattomassa menetelmässä ja laajennetun mitta-usepävarmuuden laskeminen U_f -arvosta 95 % luottamustasolla, $k=2$). Mittausepävarmuuden laskeminen Rida-analyysillä mitattuun yksittäiseen mittaustulokseen viljanäytteestä on tärkeää tuloksen oikeellisuuden kannalta. Tämän opinnäytetyön tulosten perusteella DON-toksiinin pitoisuus viljanäytteessä voi kvantitatiivisella menetelmällä mitattuna olla pienempi kuin Rida-analyysillä saatu tulos. Kun mittausepävarmuus otetaan mukaan tulokseen, voidaan parhaiten välttyä virheellisiltä DON-positiivisilta tuloksilta. Rida®QuickScan-lukijalaite antaa tuloksen kahden desimaalin tarkkuudella, mutta testauksen tulosten keskihajonnan perusteella tulos ilmoitetaan yhden desimaalin tarkkuudella.

Kun Rida-analyysi antaa näytteelle tuloksen, joka ylittää lakisääteisen raja-arvon mittausepävarmuus huomioon otettuna, on mittaustulos syytä varmentaa akkreditoidulla kvantitatiivisella menetelmällä.

LÄHTEET

1. **Evira.** *Elintarvikkeiden ja talousveden kemialliset vaarat.*: Eviran julkaisuja 15/2010, 2010.
2. **Högnäsbacka, M.; Kangas, A.; Parikka, P. ja Weckman, A.** *Punahomealittius ohra- ja kauralajikkeissa.* : Maataloustieteen Päivät 2010, 2010.
3. **Jestoi, M. ja Kokkonen, M.** *"Uudet" Fusarium-mykotoksiinit suomalaisessa viljassa:* Maataloustieteen Päivät 2008, 2008.
4. 12 th European Fusarium Seminar 12-16 may 2013. [Online] 21. 5 2013. [Viitattu: 5. 8 2013.] <https://colloque.inra.fr/efs2013>.
5. **MMM Vilja-alan yhteistyöryhmä/Turvallisuustyöryhmä.** Punahomeet viljassa: Viljelytekniset toimenpiteet homeetoksiiniriskin pienentämiseksi. 2007.
6. **Agronet.fi.** Viljan laatu. [Online] 5. 8 2013. [Viitattu: 5. 5 2013.]
7. **Hallikainen, A.; Hietaniemi, V.; Hirvonen, T.; Kartio, M.; Koivisto, T.; Kronberg-Kippilä, C.; Liukkonen, K-H.; Ovaskainen, M-L.; Rantala, T. ja Sinkko, H.** *Fusarium-toksiinit: Saanti viljasta ja viljatuotteista aikuisilla Suomessa.*: Elintarviketurvallisuusvirasto Evira, 2008. ISSN 1796-4660, ISBN 978-952-225-017-9.
8. **Blackwell, B.A.; Eudes, F.; Foroud, N.A.; Hazendonk, P. ja Shank, R.A.** Toxins — Open Access Toxinology Journal. [Online] 3. 12 2011. [Viitattu: 5. 5. 2013.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3268455/>. PMCID: PMC3268455.
9. *Some major mycotoxins and their mycotoxicones.* **Richard, J. L.** 119, 27. 3 2007, International journal of food microbiology, ss. 3-10.
10. **Miller, J.D ja Trenholm, H.L.** *Mycotoxins in grain.* [toim.] Inc. American Association of Cereal Chemists. Second printing. St.Paul : Eagen press, 1997. s. 139. 0-9624407-5-2.
11. **European Food Safety Authority.** *Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Deoxynivalenol (DON) as undesirable substance in animal feed.* s.l. : The EFSA journal, 2007. s. 6/42. EFSA-Q-2003-036.
12. **Hietaniemi, V.; Kartio, P.; Ketoja, E.; Koivisto, T.; Peltonen, S.; Pitkänen, T.; Rämö, S. ja Varimo, K.** *Viljojen mykotoksiinit Suomessa.*: Maataloustieteen Päivät 2008, 2008.
13. *Safety evaluation of certain mycotoxins in food.* : Joint FAO/WHO expert committee on food additives, 2001. Organization technical report series 47.
14. **Aamot, H. U.; Hofgaard, I. S.; Brodal, G.; Elen, O.; Jestoi, M.; Klemsdall, S. S.** *Evaluation of rapid test kits for quantification of deoxynivalenol in naturally contaminated oats and wheat.* : Wageningen Academic Publishers, 2012. ss. 339-350. ISSN 1875-0710 (Print), 1875-0796 (Online).
15. Veterinary and Agrochemical Research Centre. [Online] Coda-Cerva, 2013. [Viitattu: 5. 8 2013.] http://www.coda-cerva.be/index.php?option=com_content&id=135&Itemid=295&lang=en.
16. *Komission suositus 2013/165/EY.*
17. **Hietaniemi, V.; Jalli H.; Parikka, P.; Rämö S. ja Vihervirta T.** *Vaikuttaako muokkaus ja tautitorjunta viljan Fusarium-tartuntaan ja mykotoksiinien määrään?:* Maataloustieteen Päivät 2006, 2006.

18. **Hietaniemi, V.; Koivisto, T.; Parikka, P. ja Rämö, S.** Vilja- ja öljykasvipäivät Hämeenlinnassa. [Online] 16. 2 2012. [Viitattu: 2013. 7 5.] http://www.vyr.fi/www/fi/liitetiedostot/tapahtumat/vilja_ ja_ oljykasvipaiva_2012/Hietaniemi_16022012_web.pdf.
19. **Vilja-alan yhteistyöryhmä, VYR.** Viljan hometoksiinipitoisuuksissa suurta vaihtelua. [Online] Maa- ja metsätalousministeriö, 20. 9 2011. [Viitattu: 11. 6 2013.] http://www.vyr.fi/www/fi/index.php?we_objectID=160.
20. **Vilja-alan yhteistyöryhmä, VYR.** Punahomeet iskivät viljaan vasta sadonkorjuun kynnyksellä. [Online] Maa- ja metsätalousministeriö, 11. 1 2013. [Viitattu: 11. 6 2013.] http://www.vyr.fi/www/fi/ajankohtaista/arkisto.php?we_objectID=276.
21. *Komission suositus 2006/583/EY.*
22. *Komission asetus 2006/1881/EY.*
23. *Komission asetus 2007/1126/EY.*
24. *Komission suositus 2006/576/EY.*
25. *Komission asetus 2006/401/EY.*
26. **Mediq.** Elintarvikeanalytiikan laitteet. [Online] 2012. [Viitattu: 30. 1 2013.] <http://www.mediq.fi/laboratorio/pienlaitteet/elintarvikeanalytiikanlaitteet/>.
27. **Binder, J; Richard, J. L.; Zheng, M. S.;** [Mycopathologia 161, 261-273] [toim.] Romer Labs. Singapore : s.n., 5 2006. A review of Rapid methods for the analysis of mycotoxins. PMID: 16649076.
28. **R-Biopharm AG.** Analyysiohje. RidaQuick DON 10-09-09. Art. No: R5904.
29. —. Käyttöohje RidaQuickScan. 1.0.0.
30. **Henkilökohtainen tieto: Koskinen, Mari.** *Tuotepäällikkö, elintarvike- ja bioanalytiikka, Mediq.* 5. 2 2013.
31. **Valvonta/ Elintarvikevirasto.** Mikrobiologisten menetelmien validointiohje. Helsinki : Elintarvikevirasto, 1997. ISBN: 951-732-068-X, ISSN 1235-2756.
32. **Henkilökohtainen tieto: Rämö, Sari.** *Tutkija, FM, Kasvintuotannon tutkimus, MTT.* 2013.
33. *Contents of trichothecenes in oats during official variety, organic cultivation and nitrogen fertilization trials in Finland.* **Eurola, Merja; Hietaniemi, Veli; Kangas, Arjo; Kontturi, Markku; Niskanen, Markku; Rämö, Sari; Saastamoinen, Marketta.** 13, 2004, Agricultural and food science, ss. 54-67.
34. **Miller, J.N. ja Miller, J.C.** *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry.* [toim.] Pearson Education Limited. Fourth edition 2000. Dorchester : Henry Ling Ltd., 2000. ISBN 0 130 22888 5.
35. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). [Online] 3. 12. 2011. [Viitattu: 5. 5. 2013.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3268455/#!po=70.5128>. PMID: PMC3268455.

Kauranäytteet

Taulukko 1. Kauranäytteet 30 kpl ja DON-analyysitulokset sekä mittausepävarmuus.

Näyte	Rida (mg/kg) DON	MTT (mg/kg) DON	Ero (%)	erotus (ppm)	Uf (ppm)	± U, k=2 (ppm)	± U %
1	0,69	0,53	-30,19	-0,16	0,27	0,5	78
2	0,98	0,53	-84,91	-0,45	0,29	0,6	59
3	0,5	0,55	9,09	0,05	0,26	0,5	104
4	0,7	0,57	-22,81	-0,13	0,27	0,5	77
5	0,72	0,58	-24,14	-0,14	0,27	0,5	76
6	0,86	0,61	-40,98	-0,25	0,28	0,6	65
7	0,52	0,63	17,46	0,11	0,26	0,5	101
8	0,51	0,66	22,73	0,15	0,26	0,5	103
9	0,95	0,7	-35,71	-0,25	0,29	0,6	61
10	0,71	0,76	6,58	0,05	0,27	0,5	77
11	1,26	0,76	-65,79	-0,5	0,29	0,6	46
12	1,08	0,89	-21,35	-0,19	0,28	0,6	52
13	0,89	0,94	5,32	0,05	0,27	0,5	61
14	1,18	1,1	-7,27	-0,08	0,29	0,6	49
15	2,03	1,1	-84,55	-0,93	0,35	0,7	34
16	1,73	1,3	-33,08	-0,43	0,32	0,6	38
17	1,54	1,4	-10,00	-0,14	0,31	0,6	40
18	1,76	1,4	-25,71	-0,36	0,33	0,7	37
19	1,9	1,4	-35,71	-0,5	0,34	0,7	36
20	2,24	1,6	-40,00	-0,64	0,37	0,7	33
21	2,47	1,7	-45,29	-0,77	0,39	0,8	31
22	2,49	1,7	-46,47	-0,79	0,39	0,8	31
23	2,87	1,7	-68,82	-1,17	0,43	0,9	30
24	2,56	1,8	-42,22	-0,76	0,40	0,8	31
25	2,2	1,9	-15,79	-0,3	0,36	0,7	33
26	2,62	2,1	-24,76	-0,52	0,40	0,8	31
27	2,13	2,2	3,18	0,07	0,36	0,7	34
28	2,63	2,2	-19,55	-0,43	0,40	0,8	31
29	2,98	2,2	-35,45	-0,78	0,44	0,9	29
30	2,97	2,6	-14,23	-0,37	0,44	0,9	29

Taulukko 2. DON-pikamenetelmän toistettavuuden testaus kuudella rinnakkaisella kauranäytteellä.

näyte	Punnitus (g)	Rida (ppm)	GC-MS (ppm)	ero	ero%	Vaihteluväli	Uf (ppm)	±U, k=2 (ppm)	±U %
1	1,0032	0,68	0,76	0,08	10,53	0,29	0,27	0,5	79
2	1,0032	0,94		-0,18	-23,68		0,29	0,6	61
3	1,0021	0,8		-0,04	-5,26		0,28	0,6	69
4	1,0012	0,76		0	0,00		0,27	0,5	72
5	1,0015	0,97		-0,21	-27,63		0,29	0,6	60
6	1,0021	0,73		0,03	3,95		0,27	0,5	75
ka		0,81		-0,05			0,28	0,6	68
s		0,1169							
RSD%		14,37							

Taulukko 3. Systeemin toistettavuuden testaus yhdellä näytteellä joka luetaan kuudella eri testiliuskalla (kaura).

6. näytteestä	Lukema (ppm)	Vaihteluväli	Uf (ppm)	±U, k=2 (ppm)	±U %
1	0,96	0,32	0,29	0,6	60
2	0,84		0,28	0,6	67
3	0,69		0,27	0,5	78
4	0,81		0,28	0,6	69
5	1,01		0,28	0,6	55
6	0,72		0,27	0,5	76
ka	0,84		0,28	0,6	67
s	0,1273				
RSD%	15,19				

Taulukko 4. Systeemin toistettavuuden testaus lukemalla samaa testiliuskaa kuudesti lyhyen ajan sisällä (kaura).

6. näytteestä	Lukema (ppm)	Vaihteluväli	Uf (ppm)	±U, k=2 (ppm)	±U %
1	0,78	0,05	0,28	0,6	70,8
2	0,80		0,28	0,6	69,3
3	0,81		0,28	0,6	68,6
4	0,82		0,28	0,6	68,0
5	0,83		0,28	0,6	67,3
6	0,83		0,28	0,6	67,3
ka	0,81		0,28	0,6	68,5
s	0,0194				
RSD%	2,39				

Taulukko 5. Kauranäytteiden (30 kpl) parittainen t-testi GC-MS-analyysin ja Rida-analyysin tulosten välillä.

Parittainen t-testi näytteistä		
ka	-0,352	0,352
s	0,338591403	
±t	5,69412982	
t (taul.95%,2-suunt., n=30) =	2,045	
2,042 < 5,694	95 % luotettavuustasolla Rida-tulokset poikkeavat GC-MS:n tuloksista.	

Taulukko 6. Menetelmän testauksen kuuden rinnakkaisen tuloksen keskiarvon vertailu t-testillä GC-MS:n arvoon, jota pidetään oikeana mittaustuloksena.

lask. ±t	1,11749 (GC-MS - arvoa pidetään oikeana arvona)
t (taul.95%,2-suunt., n=6) =	2,571
1,117 < 2,571, menetelmän tulos ei poikkea 95 % luotettavuustasolla GC-MS- menetelmän tuloksesta	

Taulukko 7. Kauranäytteet, joiden DON-pitoisuus on GC-MS-analyysin mukaan alle lukijalaitteen kvantitointirajan, eivät antaneet Rida-analyysillä lukemaa.

näyte	RIDA	GC-MS				
	DON (mg/kg)	DON (mg/kg)	T-2 (mg/kg)	HT-2 (mg/kg)	NIV (mg/kg)	3-AcDON
297-1	< 0,5		0,34	0,41		
278-2	< 0,5	<0,025	0,27	1,1	0,039	
297-9	< 0,5	0,17	1,3	2,5		<0,025
353-22	< 0,5	0,036			0,32	
309-19	< 0,5	0,071		<0,025	0,15	<0,025
std	1,67	1,431	Kaupallinen std. valmistajan ilmoittama pitois.			
kont.	0,55	0,53				

Ohranäytteet

Taulukko 8. Ohranäytteet 20 kpl ja DON-analyysitulokset sekä mittausepävarmuus. Menetelmän toistettavuuden testauksena kuusi rinnakkaista yhdestä näytteestä (näytteet 20–25).

Näyte	Massa (g)	Rida (ppm) DON	MTT (ppm) DON	Ero	Ero %	Uf (ppm)	±U, k=2 (ppm)	±U %
1	1,0046	< 0,5	0,20					
2	1,0046	< 0,5	0,24					
3	1,0063	1,03	0,73	-0,3	-41,10	0,28	0,6	54
4	1,0025	2,46	1,60	-0,86	-53,75	0,39	0,8	31
5	1,0036	< 0,5	0,20					
6	1,0049	< 0,5	0,19					
7	1,0025	1,57	0,81	-0,76	-93,83	0,31	0,6	40
8	1,0088	< 0,5	0,38					
9	1,0042	< 0,5	0,44					
10	1,0078	1,75	0,83	-0,92	-110,84	0,33	0,7	37
11	1,0087	< 0,5	0,38					
12	1,004	0,54	0,42	-0,12	-28,57	0,26	0,5	97
13	1,0048	0,79	0,55	-0,24	-43,64	0,28	0,6	70
14	1,0051	1,32	0,75	-0,57	-76,00	0,30	0,6	45
15	1,0051	1,64	0,69	-0,95	-137,68	0,32	0,6	39
16	1,0081	1,06	0,75	-0,31	-41,33	0,28	0,6	53
17	1,0071	0,72	0,45	-0,27	-60,00	0,27	0,5	76
18	1,0064	1,59	0,67	-0,92	-137,31	0,31	0,6	40
19	1,0064	< 0,5	0,39					
20	1,0043	2,71	1,30	-1,41	-108,46	0,48	1,0	35
21	1,0045	2,45	1,30	-1,15	-88,46	0,44	0,9	36
22	1,0038	2,31	1,30	-1,01	-77,69	0,43	0,9	37
23	1,0078	2,14	1,30	-0,84	-64,62	0,41	0,8	38
24	1,0005	2,6	1,30	-1,3	-100,00	0,463249	0,9	36
25	1,0048	2,57	1,30	-1,27	-97,69	0,459467	0,9	36

Taulukko 9. Parittainen t-testi kaikista ohranäytetuloksista, jotka antoivat luke-
man Rida-analyysilla.

Parittainen t-testi näytteistä		
ka	-0,77647	0,776471
s	0,407599	
±t	7,854465	
t (taul.95%,2-suunt., n=17) =	2,120	
2,120 < 7,854 95 % luotettavuustasolla tulokset poikkeavat GC-MS:n tuloksista.		

Taulukko 10. Kuuden rinnakkaisen ohranäytteen mittaustuloksen keskiarvo, -hajonta ja suhteellinen keskihajonta. GC-MS-analyysin tulos oli 1,30 ppm.

Kuusi rinnakkaista(ppm)	
ka	2,46
s	0,209
RSD%	8,50
<i>Uf</i>	0,39
$\pm U$, k=2	0,8
$\pm U$	31

Taulukko 11. DON-pikamenetelmän testauksen kuuden rinnakkaisen mittaustuloksen keskiarvon vertailu t-testillä GC-MS:n arvoon, jota pidetään oikeana arvona.

$\pm t$	13,611644	(GC-MS - arvoa pidetään oikeana arvona)
t (taul.95%,2-suunt., n=6) = 2,571		
13,612 > 2,571, menetelmän tulos poikkeaa 95 % luotettavuustasolla GC-MS- menetelmän tuloksesta		

Taulukko 12. Kevätvehnänäytteet 21 kpl ja DON-analyysitulokset sekä mittaus-epävarmuus. Menetelmän toistettavuuden testauksena kuusi rinnakkaista yhdestä näytteestä. (Näytteet 11–16).

No	Näyte	Massa (g)	Rida (ppm) DON	MTT (ppm) DON	Ero	Ero %	Uf (ppm)	±U, k=2 (ppm)	±U %
1	260-5	1,0031	<0,5	0,35					
2	260-6	1,0044	3,1	1,90	-1,20	-63,16	0,45	0,9	29
3	278-6	1,004	<0,5	0,19					
4	278-7	1,0041	<0,5	0,35					
5	278-8	1,0018	<0,5	0,17					
6	278-9	1,0051	<0,5	0,22					
7	297-14	1,0051	1,53	0,77	-0,76	-98,70	0,31	0,6	41
8	336-10	1,0011	<0,5	0,37					
9	336-11	1,0033	2,8	1,40	-1,40	-100,00	0,42	0,8	30
10	336-12	1,0022	<0,5	0,19					
11	336-13	1,0039	2,07	1,00	-1,07	-107,00	0,35	0,7	34
12	336-13	1,0059	2,21	1,00	-1,21	-121,00	0,36	0,7	33
13	336-13	1,0036	1,59	1,00	-0,59	-59,00	0,31	0,6	40
14	336-13	1,0041	1,74	1,00	-0,74	-74,00	0,33	0,7	37
15	336-13	1,004	1,76	1,00	-0,76	-76,00	0,33	0,7	37
16	336-13	1,0023	1,69	1,00	-0,69	-69,00	0,32	0,6	38
17	336-14	1,0028	1,58	0,79	-0,79	-100,00	0,31	0,6	40
18	349-1	1,0052	<0,5	0,33					
19	349-3	1,0073	1,02	0,75	-0,27	-36,00	0,28	0,6	55
20	349-4	1,0071	1,32	0,79	-0,53	-67,09	0,30	0,6	45
21	349-5	1,0034	0,56	0,54	-0,02	-3,70	0,26	0,5	94
22	349-6	1,0005	<0,5	0,23					
23	349-8	1,0033	1,16	0,74	-0,42	-56,76	0,29	0,6	49
24	349-9	1,0048	0,51	0,50	-0,01	-2,00	0,26	0,5	103
25	349-10	1,0071	1,32	0,76	-0,56	-73,68	0,30	0,6	45
26	349-11	1,0049	>5,5	3,90					

Taulukko 13. Parittainen t-testi kaikista vehnänäytetuloksista, jotka antoivat lukeman Rida-analyysillä.

Parittainen t-testi näytteistä		
ka	0,617975	0,617975
s	0,697439	
$\pm t$	3,54425	
t (taul.95%,2-suunt., n=16) =2,131		
2,131<3,544	95 % luotettavuustasolla tulokset poikkeavat GC-MS:n tuloksista.	

Taulukko 14. Kuuden rinnakkaisen vehnänäytteen mittaustuloksen keskiarvo, -hajonta ja suhteellinen keskihajonta. GC-MS-analyysin tulos oli 1,00 ppm.

Kuusi rinnakkaista(ppm)	
ka	1,84
s	0,2413
RSD%	13,09
Uf	0,33
$\pm U$, k=2	0,7
$\pm U$	36

Taulukko 15. DON-pikamenetelmän testauksen kuuden rinnakkaisen tuloksen keskiarvon vertailu t-testillä GC-MS:n arvoon, jota pidetään oikeana arvona.

$\pm t$	8,5607916 (GC-MS - arvoa pidetään oikeana arvona)
t (taul.95%,2-suunt., n=6) = 2,571	
8,561 > 2,571, menetelmän tulos poikkeaa 95 % luotettavuustasolla GC-MS- menetelmän tuloksesta	

Taulukko 16. Menetelmän toistettavuuden testaus viljanäytteiden DON-pitoisuuden ollessa raja-arvoalueella (kaura).

	punnittu m. (g)	mitattu DON (ppm)	GC-MS(ppm)	Ero (ppm)	Ero %	Uf (ppm)	±U, k=2 (ppm)	±U %
Näyte 1.	1,0069	1,6	1,4	-0,2	-14,29	0,32	0,6	39
	1,0035	1,6	1,4	-0,2	-14,29	0,32	0,6	39
	1,0075	1,84	1,4	-0,44	-31,43	0,33	0,7	36
	1,0053	1,7	1,4	-0,3	-21,43	0,32	0,6	38
	1,0058	1,72	1,4	-0,32	-22,86	0,32	0,6	38
	1,0029	1,69	1,4	-0,29	-20,71	0,32	0,6	38
ka		1,69	ppm			0,32	0,6	38
s		0,08909						
RSD %		5,27						
Vaihteluväli		-0,24	ppm					
lask. ±t		8,0194	(GC-MS - arvoa pidetään oikeana arvona)					
t (taul.95%,2-suunt., n=6) = 2,571								
8,019> 2,571, menetelmän tulos poikkeaa 95 % luotettavuustasolla GC-MS- menetelmän tuloksesta								
	punnittu m. (g)	mitattu DON (ppm)	GC-MS(ppm)	Ero (ppm)	Ero %	Uf (ppm)	±U, k=2 (ppm)	±U %
Näyte 2.	1,0024	1,89	1,7	-0,19	-11,18	0,34	0,7	36
	1,0084	1,82	1,7	-0,12	-7,06	0,33	0,7	36
	1,0085	2,28	1,7	-0,58	-34,12	0,37	0,7	33
	1,0021	2,05	1,7	-0,35	-20,59	0,35	0,7	34
	1,0084	1,95	1,7	-0,25	-14,71	0,34	0,7	35
	1,0032	1,87	1,7	-0,17	-10,00	0,34	0,7	36
ka		1,98	ppm			0,34	0,7	35
s		0,16825						
RSD %		8,51						
Vaihteluväli		0,46	ppm					
lask. ±t		4,0280	(GC-MS - arvoa pidetään oikeana arvona)					
t (taul.95%,2-suunt., n=6) = 2,571								
4,028> 2,571, menetelmän tulos poikkeaa 95 % luotettavuustasolla GC-MS- menetelmän tuloksesta								
	punnittu m. (g)	mitattu DON (ppm)	GC-MS(ppm)	Ero (ppm)	Ero %	Uf (ppm)	±U, k=2 (ppm)	±U %
Näyte 3.	1,006	2,00	2,1	0,1	4,76	0,35	0,7	35
	1,0016	2,46	2,1	-0,36	-17,14	0,39	0,8	31
	1,0031	2,06	2,1	0,04	1,90	0,35	0,7	34
	1,0043	2,53	2,1	-0,43	-20,48	0,39	0,8	31
	1,0087	2,43	2,1	-0,33	-15,71	0,38	0,8	32
	1,0058	2,45	2,1	-0,35	-16,67	0,39	0,8	32
ka		2,32	ppm			0,37	0,7	32
s		0,22921						
RSD %		9,87						
Vaihteluväli		0,53	ppm					
±t		2,3689	(GC-MS - arvoa pidetään oikeana arvona)					
t (taul.95%,2-suunt., n=6) = 2,571								
2,369 < 2,571, menetelmän tulos ei poikkeaa 95 % luotettavuustasolla GC-MS- menetelmän tuloksesta								

Taulukko 17. Menetelmän toistettavuuden testaus viljanäytteiden DON-pitoisuuden ollessa raja-arvoalueella (ohra).

Ohra								
	punnittu m. (g)	mitattu DON (ppm)	GC-MS(ppm)	Ero (ppm)	Ero %	Uf (ppm)	±U, k=2 (ppm)	±U %
Näyte 1.	1,008	1,96	0,81	-1,15	-142	0,34	0,7	35
	1,0028	1,43	0,81	-0,62	-77	0,30	0,6	42
	1,0071	1,89	0,81	-1,08	-133	0,34	0,7	36
	1,0087	1,23	0,81	-0,42	-52	0,29	0,6	47
	1,0074	2,34	0,81	-1,53	-189	0,38	0,8	32
	1,0056	1,92	0,81	-1,11	-137	0,34	0,7	35
ka		1,80	ppm			0,33	0,7	37
s		0,40034						
RSD %		22,30						
Vaihteluväli		1,11	ppm					
±t		6,026785535	(GC-MS - arvoa pidetään oikeana arvona)					
t (taul.95%,2-suunt., n=6) = 2,571								
6,027 > 2,571, menetelmän tulos poikkeaa 95 % luotettavuustasolla GC-MS- menetelmän tuloksesta								
	punnittu m. (g)	mitattu DON (ppm)	GC-MS(ppm)	Ero (ppm)	Ero %	Uf (ppm)	±U, k=2 (ppm)	±U %
Näyte 2.	1,01	2,07	1,30	-0,77	-59,23	0,35	0,7	34
	1,01	2,55	1,30	-1,25	-96,15	0,40	0,8	31
	1,00	2,60	1,30	-1,30	-100,00	0,40	0,8	31
	1,01	1,87	1,30	-0,57	-43,85	0,34	0,7	36
	1,00	2,41	1,30	-1,11	-85,38	0,38	0,8	32
	1,00	2,52	1,30	-1,22	-93,85	0,39	0,8	31
ka		2,34	ppm			0,38	0,8	32
s		0,29757						
RSD %		12,73						
Vaihteluväli		0,73	ppm					
±t		8,533528653	(GC-MS - arvoa pidetään oikeana arvona)					
t (taul.95%,2-suunt., n=6) = 2,571								
8,534 > 2,571, menetelmän tulos poikkeaa 95 % luotettavuustasolla GC-MS- menetelmän tuloksesta								
	punnittu m. (g)	mitattu DON (ppm)	GC-MS(ppm)	Ero (ppm)	Ero %	Uf (ppm)	±U, k=2 (ppm)	±U %
Näyte 3.	1,0061	1,74	1,60	-0,14	-8,75	0,33	0,7	37
	1,0058	2,66	1,60	-1,06	-66,25	0,41	0,8	30
	1,0084	2,13	1,60	-0,53	-33,13	0,36	0,7	34
	1,0069	2,55	1,60	-0,95	-59,38	0,40	0,8	31
	1,0009	2,66	1,60	-1,06	-66,25	0,41	0,8	30
	1,0014	2,18	1,60	-0,58	-36,25	0,36	0,7	33
ka		2,32	ppm			0,37	0,7	32
s		0,36775						
RSD %		15,85						
Vaihteluväli		0,92	ppm					
±t		4,795739014	(GC-MS - arvoa pidetään oikeana arvona)					
t (taul.95%,2-suunt., n=6) = 2,571								
4,796 > 2,571, menetelmän tulos poikkeaa 95 % luotettavuustasolla GC-MS- menetelmän tuloksesta								

Taulukko 18. Menetelmän toistettavuuden testaus viljanäytteiden DON-pitoisuuden ollessa raja-arvoalueella (vehnä).

Kevätvehnä								
	punnittu m. (g)	Rida DON (ppm)	GC-MS(ppm)	Ero (ppm)	Ero %	Uf (ppm)	±U, k=2 (ppm)	±U %
Näyte 1.	1,0021	1,95	1,00	-0,95	-95,00	0,34	0,7	35
	1,0019	1,77	1,00	-0,77	-77,00	0,33	0,7	37
	1,0034	2,01	1,00	-1,01	-101,00	0,35	0,7	35
	1,0066	1,33	1,00	-0,33	-33,00	0,30	0,6	45
	1,0045	1,28	1,00	-0,28	-28,00	0,29	0,6	46
	1,0044	1,21	1,00	-0,21	-21,00	0,29	0,6	48
ka		1,59	ppm			0,31	0,6	40
s		0,35958						
RSD %		22,59						
Vaihteluväli		0,8	ppm					
lask. ±t		4,030501281	(GC-MS - arvoa pidetään oikeana arvona)					
t (taul.95%,2-suunt., n=6) = 2,571								
4,031> 2,571, menetelmän tulos poikkeaa 95 % luotettavuustasolla GC-MS- menetelmän tuloksesta								
	punnittu m. (g)	Rida DON (ppm)	GC-MS(ppm)	Ero (ppm)	Ero %	Uf (ppm)	±U, k=2 (ppm)	±U %
Näyte 2.	1,01	1,95	1,40	-0,55	-39,29	0,34	0,7	35
	1,01	2,02	1,40	-0,62	-44,29	0,35	0,7	34
	1,01	2,08	1,40	-0,68	-48,57	0,35	0,7	34
	1,00	2,50	1,40	-1,10	-78,57	0,39	0,8	31
	1,00	1,80	1,40	-0,40	-28,57	0,33	0,7	37
	1,00	2,31	1,40	-0,91	-65,00	0,37	0,7	32
ka		2,11	ppm			0,36	0,7	34
s		0,25409						
RSD %		12,04						
Vaihteluväli		0,7	ppm					
lask. ±t		6,84466525	(GC-MS - arvoa pidetään oikeana arvona)					
t (taul.95%,2-suunt., n=6) = 2,571								
6,845> 2,571, menetelmän tulos poikkeaa 95 % luotettavuustasolla GC-MS- menetelmän tuloksesta								
	punnittu m. (g)	Rida DON (ppm)	GC-MS(ppm)	Ero (ppm)	Ero %	Uf (ppm)	±U, k=2 (ppm)	±U %
Näyte 3.	1,0071	1,26	0,79	-0,47	-59,49	0,29	0,6	46
	1,0059	1,51	0,79	-0,72	-91,14	0,31	0,6	41
	1,009	1,41	0,79	-0,62	-78,48	0,30	0,6	43
	1,0037	1,27	0,79	-0,48	-60,76	0,29	0,6	46
	1,0017	1,36	0,79	-0,57	-72,15	0,30	0,6	44
	1,0012	1,12	0,79	-0,33	-41,77	0,28	0,6	51
ka		1,32	ppm			0,30	0,6	45
s		0,13556						
RSD %		10,26						
Vaihteluväli		0,39	ppm					
±t		9,606865025	(GC-MS - arvoa pidetään oikeana arvona)					
t (taul.95%,2-suunt., n=6) = 2,571								
9,607> 2,571, menetelmän tulos poikkeaa 95 % luotettavuustasolla GC-MS- menetelmän tuloksesta								

Taulukko 19. Kauranäytteen laimennus kolmella eri tavalla

Laimennus 1. Sekoitetaan nollanäytettä ja laimennettavaa näytettä

Näyte	m (g)	Rida (ppm)	kerroin 2	ero	Vaihteluväli (ppm)	Uf (ppm)	Uf (ppm) kerroin 2	±U, k=2 (ppm)	±U %		m (g)	DON GC-MS (ppm)
1	1,0036	1,39	2,78	-0,58	0,84	0,30	0,42	0,8	30	nollanäyte	4,971	0,028
2	1,0019	1,50	3,00	-0,80		0,31	0,44	0,9	29	laim. näyte	3,981	2,2
3	1,004	1,47	2,94	-0,74		0,31	0,43	0,9	29			
4	1,0059	1,08	2,16	0,04		0,28	0,36	0,7	33			
5	1,0058	1,16	2,32	-0,12		0,29	0,37	0,7	32			
6	1,0067	1,49	2,98	-0,78		0,31	0,44	0,9	29			
ka (ppm)		1,35	2,70	-0,50		0,30	0,41	0,8	30			
s (ppm)		0,182802	0,37									
RSD %			13,56									
±t	3,328 (GC-MS - arvoa pidetään oikeana arvona)											
t (taul.95%,2-suunt., n=6) = 2,571												
3,328 > 2,571, menetelmän tulos poikkeaa 95 % luotettavuustasolla GC-MS- menetelmän tuloksesta												

Laimennus 2. Molemmat näytteet tehdään fuukaukseen saakka omina näytteinä.

Supernatanteista pipetoidaan 5 ml molemmista ja sekoitetaan

Näyte		Rida (ppm)	kerroin 2	ero	Vaihteluväli (ppm)	Uf (ppm)	Uf (ppm) kerroin 2	±U, k=2 (ppm)	±U %	nollanäyte	m (g)	laim.näyte	m (g)
7	5 ml + 5 ml	1,41	2,82	-0,62	0,84	0,30	0,42	0,8	30	1*	1,009	1	1,0034
8		1,14	2,28	-0,08		0,28	0,37	0,7	33	2*	1,0045	2	1,0045
9		1,43	2,86	-0,66		0,30	0,42	0,8	30	3*	1,0021	3	1,005
10		1,29	2,58	-0,38		0,29	0,40	0,8	31	4*	1,0037	4	1,0063
11		1,55	3,10	-0,90		0,31	0,45	0,9	29	5*	1,0043	5	1,0083
12		1,13	2,26	-0,06		0,28	0,37	0,7	33	6*	1,0024	6	1,005
ka (ppm)		1,33	2,65	-0,45		0,30	0,40	0,8	31				
s (ppm)		0,168731	0,34										
RSD %			12,73										
±t	3,266 (GC-MS - arvoa pidetään oikeana arvona)												
t (taul.95%,2-suunt., n=6) = 2,571													
3,266 > 2,571, menetelmän tulos poikkeaa 95 % luotettavuustasolla GC-MS- menetelmän tuloksesta													

Laimennus 3. Laim. Näyte valmistetaan norm. Fuugaukseen saakka, jonka jälkeen näytettä otetaan 5 ml + 5 ml puhdasta puskuri sekoitetaan keskenään

Näyte	m (g)	Rida (ppm)	kerroin 2	ero	Vaihteluväli (ppm)	Uf (ppm)	Uf (ppm) kerroin 2	±U, k=2 (ppm)	±U %
13	1,0065	1,54	3,08	-0,88	0,66	0,31	0,45	0,9	29
14	1,002	1,25	2,50	-0,30		0,29	0,39	0,8	31
15	1,0066	1,21	2,42	-0,22		0,29	0,38	0,8	32
16	1,0026	1,25	2,50	-0,30		0,29	0,39	0,8	31
17	1,0073	1,29	2,58	-0,38		0,29	0,40	0,8	31
18	1,007	1,27	2,54	-0,34		0,29	0,39	0,8	31
ka (ppm)		1,30	2,60	-0,40		0,29	0,40	0,8	31
s (ppm)		0,119736	0,24						
RSD %			9,20						
±t	4,125586 (GC-MS - arvoa pidetään oikeana arvona)								
t (taul.95%,2-suunt., n=6) = 2,571									
4,126 > 2,571, menetelmän tulos poikkeaa 95 % luotettavuustasolla GC-MS- menetelmän tuloksesta									

Taulukko 20. Viljalaboratorio 1. kauranäytteet (12 kpl), jotka testattiin viljalab.1., viljalab. 2. ja amk:ssa

viljalab.1						AMK					
Kaura			Viljalab.2								
näyte	massa (g)	1mitattu DON (ppm)	näyte	massa (g)	2mitattu DON (ppm)	näyte	massa (g)	3mitattu DON (ppm)	Ero 1Ridan ja 2Ridan tulosten välillä	Ero 1Ridan ja 3Ridan tulosten välillä	Ero 2Ridan ja 3Ridan tulosten välillä
1		1,45	1	1,0044	1,62	1	1,0063	1,59	-0,17	-0,14	0,03
2		1,91	2	1,0092	2,08	2	1,0036	1,63	-0,17	0,28	0,45
3		1,62	3	1,0049	1,22	3	1,0016	1,12	0,4	0,5	0,1
4		1,87	4	1,0072	1,44	4	1,0032	1,91	0,43	-0,04	-0,47
5		<0,5	5	1,002	<0,5	5	1,0120	<0,5			
6		2,12	6	1,0002	2,28	6	1,0049	1,83	-0,16	0,29	0,45
7		<0,5	7	1,0074	<0,5	7	1,0040	<0,5			
8		1,34	8	1,0003	1,14	8	1,0022	1,43	0,2	-0,09	-0,29
9		0,97	9	1,0017	1,48	9	1,0044	0,99	-0,51	-0,02	0,49
10		1,76	10	1,0037	2,07	10	1,0026	1,65	-0,31	0,11	0,42
11		4,13	11	1,0018	3,55	11	1,0022	3,24	0,58	0,89	0,31
12		3,48	12	1,003	3,01	12	1,0036	3,89	0,47	-0,41	-0,88

Taulukko 21. Lasketut t-arvot rinnakkaisille analyysituloksille (kaura), jotka ovat taulukossa 20. Näytteitä tarkasteltiin pareittain

Parittainen t-testi, 1Rida ja 2Rida	
ka	0,076
s	0,383556457
±t	0,626591204
t (taul.95%,2-suunt., n=10) = 2,262	
0,627 < 2,262, 95 % merkitsevyystasolla tulosten välillä ei ole eroa	
Parittainen t-testi, 1Rida ja 3Rida	
ka	0,14
s	0,369204851
±t	1,173419141
t (taul.95%,2-suunt., n=10) = 2,262	
1,173 < 2,262, 95 % merkitsevyystasolla tulosten välillä ei ole eroa	
Parittainen t-testi, 2Rida ja 3Rida	
ka	0,061
s	0,4679376
±t	0,4122322
t (taul.95%,2-suunt., n=10) = 2,262	
0,412 < 2,262, 95 % merkitsevyystasolla tulosten välillä ei ole eroa	

Taulukko 22. Viljalaboratorio 2. vehnänäytteet (12 kpl), jotka testattiin viljalab.1., viljalab. 2. ja amk:ssa

viljalab.2											
Vehnä			Viljalab.1			AMK					
näyte	massa (g)	1mitattu DON (ppm)	näyte	massa (g)	2mitattu DON (ppm)	näyte	massa (g)	3mitattu DON (ppm)	Ero 1Ridan ja 2Ridan tulosten välillä	Ero 1Ridan ja 3Ridan tulosten välillä	Ero 2Ridan ja 3Ridan tulosten välillä
1	1,00	<0,5	1		<0,5	1	1,00	< 0,5			
2	1,00	0,52	2		<0,5	2	1,00	0,51		0,01	
3	1,00	<0,5	3		<0,5	3	1,00	< 0,5			
4	1,00	2,16	4		2,64	4	1,00	2,96	-0,48	-0,8	-0,32
5	1,00	3,01	5		3,4	5	1,00	3,22	-0,39	-0,21	0,18
6	1,00	5,5	6		4,59	6	1,00	> 5,5	0,91		
7	1,00	0,87	7		<0,5	7	1,00	< 0,5			
8	1,00	0,93	8		0,93	8	1,00	0,83	0	0,1	0,1
9	1,00	0,76	9		0,77	9	1,00	0,76	-0,01	0	0,01
10	1,00	0,5	10		<0,5	10	1,00	< 0,5			
11	1,00	0,5	11		<0,5	11	1,00	< 0,5			
12	1,00	1,19	12		1,31	12	1,00	1,58	-0,12	-0,39	-0,27

Taulukko 23. Lasketut t-arvot rinnakkaisille analyysituloksille (vehnä), jotka ovat taulukossa 22.

Parittainen t-testi, 1Rida ja 2Rida		
ka	-0,015	0,015
s	0,494722144	
±t	0,074268651	
t (taul.95%,2-suunt., n=6) = 2,571		
0,074 < 2,571, 95 % merkitsevyystasolla tulosten välillä ei ole eroa		
Parittainen t-testi, 1Rida ja 3Rida		
ka	-0,22	0,215
s	0,337327734	
±t	1,56121256	
t (taul.95%,2-suunt., n=6) = 2,571		
1,561 < 2,571, 95 % merkitsevyystasolla tulosten välillä ei ole eroa		
Parittainen t-testi, 2Rida ja 3Rida		
ka	-0,06	0,06
s	0,223495	
±t	0,6003002	
t (taul.95%,2-suunt., n=5) = 2,776		
0,600 < 2,776, 95 % merkitsevyystasolla tulosten välillä ei ole eroa		

Taulukko 24. DON-analyysitulokset (kaura), jotka mitattiin amk:ssa ja viljalaboratorio 1.

AMK			Viljalab.1						
näyte	massa (g)	1mitattu DON (ppm)	näyte	massa (g)	2mitattu DON (ppm)	Ero Ridan tulosten välillä	GC-MS (ppm)	Ero 1Ridan ja GC-MS tulosten välillä	Ero 2Ridan ja GC-MS tulosten välillä
1	0,9999	2,47	1	1,0017	2,34	0,13	1,7	0,77	0,64
2	1,0018	2,2	2	1,0034	2,12	0,08	1,9	0,3	0,22
3	1,0045	2,03	3	1,0089	1,36	0,67	1,1	0,93	0,26
4	1,004	2,97	4	1,0075	3,24	-0,27	2,6	0,37	0,64
5	1,00	0,95	5	1,0049	0,97	-0,02	0,7	0,25	0,27
6	1,0044	1,76	6	1,0070	1,94	-0,18	1,4	0,36	0,54
7	1,02	0,86	7	1,0030	0,87	-0,01	0,61	0,25	0,26
8	1,0048	4,11	8	1,0068	4,18	-0,07	6,2	-2,09	-2,02
9	1,0021	2,98	9	1,0068	2,62	0,36	2,2	0,78	0,42
10	1,0048	0,89	10	1,0053	1,16	-0,27	0,94	-0,05	0,22
11	1,0014	<0,5	11	1,0042	<0,5		0,45		
12	1,02	<0,5	12	1,0038	<0,5		0,55		

Taulukko 25. Parittaisen t-testin arvot ja tulosten vertailu 95 % luottamustasolla.

Parittainen t-testi, 1Rida ja 2Rida	
ka	0,042
s	0,292073
t (taul.95%,2-suunt., n=10) = 2,262	
0,455 < 2,262, 95 % merkitsevyystasolla tulosten välillä ei ole eroa	
Parittainen t-testi, 1Rida ja GC-MS	
ka	0,187
s	0,85431
±t	0,692191
t (taul.95%,2-suunt., n=10) = 2,262	
0,692 < 2,262, 95 % merkitsevyystasolla tulosten välillä ei ole eroa	
Parittainen t-testi, 2Rida ja GC-MS	
ka	0,145
s	0,779049
±t	0,588577
t (taul.95%,2-suunt., n=10) = 2,262	
0,589 < 2,262, 95 % merkitsevyystasolla tulosten välillä ei ole eroa	

Taulukko 26. analyysituloksille (kaura), jotka mitattiin amk:ssa ja viljalaboratorio 2.

AMK			Viljalab.2						
näyte	massa (g)	1mitattu DON (ppm)	näyte	massa (g)	2mitattu DON (ppm)	Ero Ridan tulosten välillä	GC-MS (ppm)	Ero 1Ridan ja GC-MS tulosten välillä	Ero 2Ridan ja GC-MS tulosten välillä
1	1,0044	3,1	1	1,0024	3,38	-0,28	1,90	1,20	1,48
2	1,0041	<0,5	2	1,0045	<0,5		0,35		
3	1,0051	1,53	3	1,0045	1,31	0,22	0,77	0,76	0,54
4	1,0011	<0,5	4	1,0033	<0,5		0,37		
5	1,0033	2,8	5	1,0026	2,23	0,57	1,40	1,40	0,83
6	1,0036	1,59	6	1,0073	1,8	-0,21	1,00	0,59	0,80
7	1,0028	1,58	7	1,0066	1,18	0,4	0,79	0,79	0,39
8	1,0049	>5,5	8	1,0024	4,25		3,90		0,35
9	1,0073	1,02	9	1,0089	0,95	0,07	0,75	0,27	0,20
10	1,0071	1,32	10	1,0062	1,5	-0,18	0,79	0,53	0,71
11	1,0034	0,56	11	1,0043	0,7	-0,14	0,54	0,02	0,16
12	1,0048	0,51	12	1,0052	<0,5		0,50	0,01	

Taulukko 27. Parittaisen t-testin arvot ja tulosten vertailu 95 % luottamustasolla.

Parittainen t-testi, 1Rida ja GC-MS	
ka	0,62
s	0,481779
±t	3,853772
t (taul.95%,2-suunt., n=9) = 2,306	
3,854 > 2,306, 95 % merkitsevyystasolla tulosten välillä on eroa	
Parittainen t-testi, 2Rida ja GC-MS	
ka	0,61
s	0,409695
±t	4,442329
t (taul.95%,2-suunt., n=9) = 2,262	
4,442 > 2,262, 95 % merkitsevyystasolla tulosten välillä on eroa	
Parittainen t-testi, 1Rida ja 2Rida	
ka	0,05625
s	0,313365943
±t	0,507710009
t (taul.95%,2-suunt., n=8) = 2,365	
0,508 < 2,365, 95 % merkitsevyystasolla tulosten välillä ei ole eroa	

Screening deoxynivalenol in oat using a quick-method with comparison to a quantitative GC-MS analysis

M. Rauvola¹, T. Hovinen¹, S. Rämö², V. Hietaniemi², J. Kaitaranta¹

¹Turku University of Applied Sciences, Lemminkäisenkatu 30, 20520 Turku, Finland and

²MTT Agrifood Research Finland, 31600 Jokioinen, Finland

Introduction

Fusarium appearance in grain depends on various aspects and in Finland oat is the most sensitive grain to this contamination. The Commission Regulation (EC) No 1831/2003 sets the limits for mycotoxins in food and their analysis is increasingly conducted as a measure to grain approval for trade. The quantitative measurements usually are time consuming and expensive and thus new methods have been developed and commercialized for the semi quantitative quick analysis of specific mycotoxins.

In this study the Rida® Quick DON method with Rida® Quick Scan reader were tested to the determination of deoxynivalenol (DON) in oat. The results were compared to those obtained with an accredited GC-MS method.

Principles of RIDA®QUICK DON test

The test is an immunochromatographic lateral flow test. It is based on the antigen-antibody reaction on the test strip reading with DON. The results are read with RIDA®QUICK SCAN. The test which has been validated for wheat, triticale and corn samples is manufactured by i-Biopharm AG, Germany.

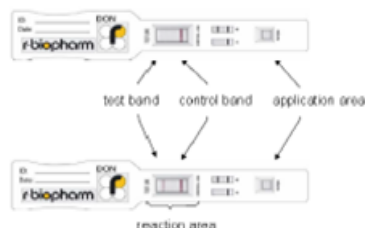
Experimental

Altogether 30 oat samples were analyzed by two different methods. The repeatability of the quick method was tested with six parallel samples and the repeatability of the system was tested with a single sample so that the sample was read on six different test strips. The same strip was read six times within 1.5 min to check the repeatability of the device. The repeatability and reproducibility were also tested in two consecutive days. Specificity of the device was tested with five different samples.

RIDA®QUICK DON analysis

Ground grain sample (1.0 g; 1 mm sieve) was taken into a Falcon tube and 15 ml of Rida®Quick DON extraction buffer was added. The mixture was manually shaken for 3 min before centrifugation for 10 min (3 500 g). The clear supernatant (100 µl) was pipetted onto the application area of the test strip and the result was read after 5 min.

The test strips with bands are shown below.

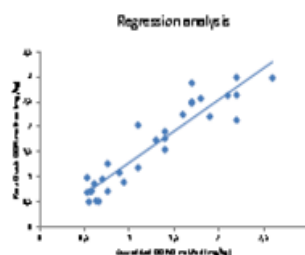


Reference trichothecenes analysis

Trichothecenes were analyzed as described in Hietaniemi et al. (2004). In brief, ground grain samples (20 g; 1 mm sieve) were extracted with 84 % acetonitrile. The raw extract was purified with MycoSep #227 SPE column (Romer Labs AG, Austria) and transferred to a silylated test tube and evaporated into dryness. DON, other trichothecenes and 19-nortestosterone (internal standard) were identified and quantified as their TMSI-derivatives by GC-MS. Uncertainty for DON was 25.5 % (expanded 51 %), the random error being 23.3 % and the systematic error is 12.3 %.

Results

For the interpretation of the results the linear regression analysis was made and paired t test was applied to reveal the 95 per cent significance level. Thereafter the 30 oat samples containing 0.5 – 2.6 ppm DON as measured by GC-MS were applied to the regression analysis.



Person's Correlation 0.935

t_{table} 95 %, 2- tailed, n= 30) = 2.042

t = 5.694

Paired t test shows that there are differences on the 95 % significance level between the results.

The percentage difference between the individual values ranges from -85 to 23 %, and the absolute differences were between -1.17 and 0.15 ppm.



Source: www.biopharm.com



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Precision of the method

An oat sample with the DON content of 0.76 ppm (GC-MS analysis) resulted on average 0.81 ppm when analyzed with the quick method in six parallel samples the RSD percentage being 14. Respectively, another oat sample containing 1.70 ppm DON resulted on average 1.98 ppm in Rida analyses with RSD 9 %.

The repeatability of the analytical system itself in six determinations resulted on average 0.94 ppm with RSD 15 %. When the same test strip was read in sequence for six times the reader counts averaged 0.81 ppm with RSD % of only 2.4.

Reproducibility

The reproducibility was tested using three samples with the DON contents of 0.7, 1.1, and 1.7 ppm (n=6).

Sample	GC-MS (ppm)	Rida av. (ppm)	RSD %
1	0.7	0.95	27.1
2	1.1	1.61	14.6
3	1.7	2.21	4.2

Commercial standard (Check sample Deoxynivalenol in wheat, Romer Labs, 1.431 ppm ± 0.256 ppm) resulted on average 2.11 ppm with RSD 21 %.

Cross reactions

The DON content in five selected samples was below 0.5 ppm (GC-MS analysis) but the samples contained varying amounts of other trichothecenes which, however, did not seem to affect the DON analysis with the Rida® Quick DON method.

Conclusion

Based on this study the semi quantitative Rida® Quick DON met the requirements of the Commission Regulation (EC) 401/2006 for a quantitative DON determination which should show the RSD percentage equal or less than 20. It is, however, suggested that a single result indicating the DON content close to the legislative limits should be reconfirmed with an accredited quantitative analysis.

Reference

Hietaniemi et al., 2004. Contents of trichothecenes in oats during official variety, organic cultivation and nitrogen fertilization trials in Finland. *Agricultural and Food Science* 13, 54-67.

email: sari.ramo@mtt.fi or
marion.rauvola@students.turkuamk.fi

