



Tärkkelysmäärityksen validointi

Tamara Jääskeläinen

OPINNÄYTETYÖ
Kesäkuu 2021

Laboratoriotekniikka

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratoriotekniikka

JÄÄSKELÄINEN, TAMARA:
Tärkkelysmäärityksen validointi

Opinnäytetyö 44 sivua, joista liitteitä 4 sivua
Kesäkuu 2021

Opinnäytetyö tehtiin KVVY Tutkimus Oy:n elintarvikekemian osastolle Porin toimipisteeseen. Laboratoriossa käytössä ollut tärkkelysmäärityksen menetelmä koettiin aikaavieväksi ja vaivalloiseksi, minkä vuoksi menetelmä haluttiin vaihtaa nopeampaan ja vähemmän työtä vaativaan menetelmään. Opinnäytetyön tavoitteena oli ottaa käyttöön ja validoida uusi tärkkelysmäärityksen menetelmä. Tarkoituksena oli käyttää kaupallista Megazyme Total Starch Assay Kit (AA/AMG) -menetelmäpakkausta ja mitata useasta eri elintarvikematriisista tärkkelyspitoisuus spektrofotometrisesti. Menetelmää tarvitaan erityisesti erään asiakkaan näytteiden määritykseen, minkä vuoksi validoinnissa keskityttiin perunatärkkelys-, perunajauho-, härkäpaputärkkelys- ja härkäpapuproteiininäytteisiin.

Validoinnissa saatiin määritettyä asiakkaan näytteet toistettavuudeltaan ja oikeellisuudeltaan hyväksyttävästi. Akkreditoituun, GBA:n laboratorion suorittamaan määritykseen, verrattuna ainoastaan tärkkelyspitoisuudeltaan hyvin pienen härkäpapuproteiinin virheprosentti oli liian suuri. GBA:n laboratoriossa tutkitutettiin myös koostumukseltaan tuntemattomia näytteitä, mutta näistä näytteistä validoinnin yhteydessä saadut tulokset eivät olleet yhteneväisiä GBA:n tulosten kanssa. Validoinnissa saadut huomattavasti korkeammat tulokset voivat johtua näytteiden mahdollisesti sisältämistä sokereista tai näytteisiin säilytyksen aikana kertyneestä kosteudesta. Menetelmän ulkoista laadunarviointia varten mitattiin lisäksi LGC:n järjestämän pätevyyskoekierroksen (Qmas Round: MT295 MT4832) interkalibrointinäyte, josta saatiin hyväksyttävä tulos.

Validoitua menetelmää voidaan käyttää KVVY Tutkimus Oy:n elintarvikelaboratoriossa tärkkelyspitoisuuden määritykseen. Jatkossa menetelmää voitaisiin kehittää ottamalla käyttöön kylmäkuivaus näytteiden esikäsittelyyn paljon kosteutta sisältävien elintarvikkeiden kohdalla ja laajentaa validointi kattamaan myös tärkkelyspitoisuus kuiva-ainetta kohti sekä etanolipesu sokeria sisältäville näytteille. Asiakkaan toiveena olisi lisätä kokonaistärkkelyksen määrityksen rinnalle vielä resistentin tärkkelyksen määrittäminen.

Asiasanat: tärkkelys, kokonaistärkkelys, megazyme, α -amylaasi, amylogluko-
sidaasi

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Engineering

JÄÄSKELÄINEN, TAMARA:
Implementation and Method Validation for Starch Determination

Bachelor's thesis 44 pages, appendices 4 pages
June 2021

The aim of this thesis was to implement and validate a new method for the determination of starch to replace the previous method at the food chemistry department of KVVY Tutkimus Oy. The previous method was considered time-consuming and laborious, and the new method was intended to shorten the analysis time as well as reduce the amount of active work required. The new method is based on a kit provided by Megazyme.

The purpose of this work was to use Total Starch Assay Kit (AA/AMG) by Megazyme to measure spectrophotometrically the starch content in various food products. The method will be mostly required for a specific customer's samples, which is why the main focus was on four sample matrices including potato flour, potato protein, fava bean flour and fava bean protein.

The results of eight different samples were compared with a laboratory performing accredited measurement of total starch content. The comparison showed that the customer's samples had been successfully determined during the validation process, except for fava bean protein. However, four samples of unknown composition yielded significantly higher concentrations compared with the other laboratory. One explanation for the too high measurement results could be possible sugar components in the samples. In addition to sending samples to another laboratory, an LGC AXIO Proficiency Testing sample (Qmas Round MT295 MT4832) was analysed. The result of the intercalibration sample was on an acceptable level according to the performance assessment score set by LGC.

The validated method can be used for the determination of starch at KVVY Tutkimus Oy. In the future, the method could be validated for dry-freezing of samples that have high moisture contents and for starch determination per dry weight. Furthermore, ethanol washing could be introduced to the pretreatment process to ensure that no interfering sugar compounds are left in the sample. The possibility for determination of resistant starch will also be investigated.

Key words: starch, total starch, megazyme, α -amylase, amyloglucosidase

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	7
2	TÄRKKELYS.....	8
	2.1 Esiintyminen ja rakenne	8
	2.2 Tärkkelys ravinnonlähteenä	10
	2.2.1 Resistentti tärkkelys.....	10
	2.2.2 Resistentin tärkkelyksen terveystvaikutukset	11
3	TÄRKKELYKSEN MÄÄRITYS	13
	3.1 Tärkkelyksen määritysmenetelmiä	13
	3.2 Tärkkelyksen entsyymaattinen määrittäminen	13
	3.3 Häiriötekijöitä entsyymaattisessa määrittäyksessä	14
	3.4 Megazymen menetelmäpakkauksen toimintaperiaate	15
4	ANALYYSIMENETELMÄN VALIDOINTI.....	17
	4.1 Validoinnin tarkoitus	17
	4.2 Validointiparametrit	17
	4.2.1 Lineaarisuus ja mittausalue	17
	4.2.2 Havaitsemis- ja määritysraja	19
	4.2.3 Toistettavuus	20
	4.2.4 Oikeellisuus	21
	4.2.5 Mittausepävarmuus	22
5	MITTAUS- JA MÄÄRITYSMENETELMÄT	23
	5.1 Megazyme Total Starch -menetelmäpakkauksen	23
	5.2 Spektrofotometri.....	24
6	TYÖN SUORITUS	25
	6.1 Liuokset.....	25
	6.2 Näytteiden käsittely	25
	6.3 Validointi	27
	6.3.1 Lineaarisuuden määrittäminen	27
	6.3.2 Havaitsemis- ja määritysrajan määrittäminen.....	27
	6.3.3 Toistettavuuden määrittäminen	28
	6.3.4 Luotettavuuden ja oikeellisuuden määrittäminen.....	28
7	TULOKSET	29
	7.1 Menetelmän lineaarisuus	29
	7.2 Menetelmän havaitsemis- ja määritysraja	30
	7.3 Menetelmän toistettavuus	31
	7.4 Menetelmän luotettavuus ja oikeellisuus.....	32
	7.5 Menetelmän mittausepävarmuus	34

8 POHDINTA	35
LÄHTEET	38
LIITTEET	41
Liite 1. Standardisuora	41
Liite 2. Luonnonnäytteiden rinnakkaismääritykset	42
Liite 3. Kontrollinäytteiden mittaustulokset	44

LYHENTEET JA TERMIT

AMG	amyloglukosidaasi
DMSO	dimetyylisulfoksidi
EFSA	Euroopan elintarviketurvallisuusviranomainen / European food safety authority
GOPOD	glukoosin oksidaasi / peroksidaasi reagenssi
In vitro	elimistön ulkopuolella tehty koe, esimerkiksi koeputkessa
LOD	havaitsemisraja / limit of detection
LOQ	määritysraja / limit of quantification
RSD	suhteellinen keskihajonta / relative standard deviation

1 JOHDANTO

Tärkkelys on hiilihydraatti, jota esiintyy muun muassa viljoissa ja perunassa. Yleisesti ottaen tärkkelys kattaa ihmisen ruokavaliossa suurimman osan energiantarpeesta. Luonnollisen energianlähteen lisäksi tärkkelystä hyödynnetään teollisesti monissa eri elintarvikkeissa tuomaan haluttuja ominaisuuksia, kuten sakeutta. Tärkkelyspitoisuuden mittaaminen tarjoaa siis tietoa elintarvikkeen energiapitoisuudesta sekä teollisessa tärkkelyksen tuotannossa tietoa eristetyn tärkkelyksen puhtaudesta. (BeMiller 2019, 160, 178.)

Opinnäytetyö tehtiin KVVY Tutkimus Oy:n elintarvikeosastolle Porin toimipisteeseen. Työn tavoite oli ottaa käyttöön ja validoida menetelmä tärkkelyksen määrittämiseen elintarvikkeista. Uudella menetelmällä tähdättiin käytössä olevan työlään ja hitaan tärkkelyksen analysointimenetelmän korvaamiseen nopeammalla ja vaivattomalla menetelmällä. Opinnäytetyön tarkoitus oli käyttää kaupallista Megazyme Total Starch (AA/AMG) -menetelmäpakkausta kokonaistärkkelyspitoisuuden mittaamiseen erilaisista elintarvikenäytteistä. Mittauksessa on käytetty menetelmää, jolla resistentti tärkkelys saadaan sisällytettyä mukaan kokonaistärkkelyspitoisuuteen.

2 TÄRKKELYS

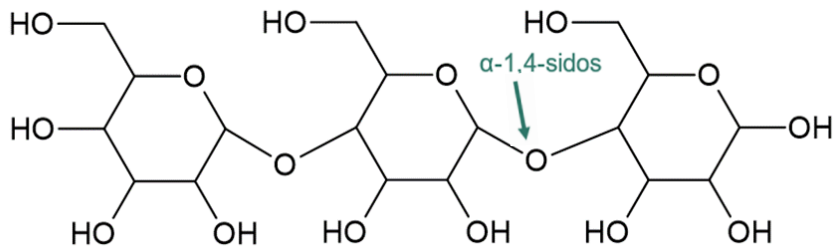
2.1 Esiintyminen ja rakenne

Kasvit varastoivat glukoosia vararavinnokseen tärkkelyksen muodossa. Kasvit tarvitsevat tärkkelystä energiantuotantoon, kasvuun ja lisääntymiseen, ja sitä tuotetaan lehtivihreässä fotosynteesin avulla. Osa tärkkelyksestä on lyhytaikaista tärkkelystä, jonka kasvi käyttää yöaikaan metabolisminsa ylläpitoon, kun fotosynteesi ei ole mahdollista. Pitkäaikaisemmaksi vararavinnoksi tarkoitettu tärkkelys varastoidaan juuriin, mukuloihin ja siemeniin. (Pfister & Zeeman 2016, 2782; Lockyer & Nugent 2017, 11.)

Tärkkelys kuuluu hiilihydraatteihin, mutta on siinä mielessä erityislaatuinen, että se esiintyy erillisissä partikkeleissa, joita kutsutaan tärkkelysjyväsiksi. Kasvien vararavintona toimivat tärkkelysjyväset ovat solunsisäisiä, kompakteja ja kristallimaisia sokeripitoisia muodostumia, jotka voivat kasvista riippuen olla erikokoisia. Esimerkiksi riisin tärkkelysjyväset ovat kooltaan pieniä, 3–5 µm, kun taas vehnän tärkkelysjyväset voivat olla kooltaan 10–30 µm. (Corke & Zhu 2019, 85.)

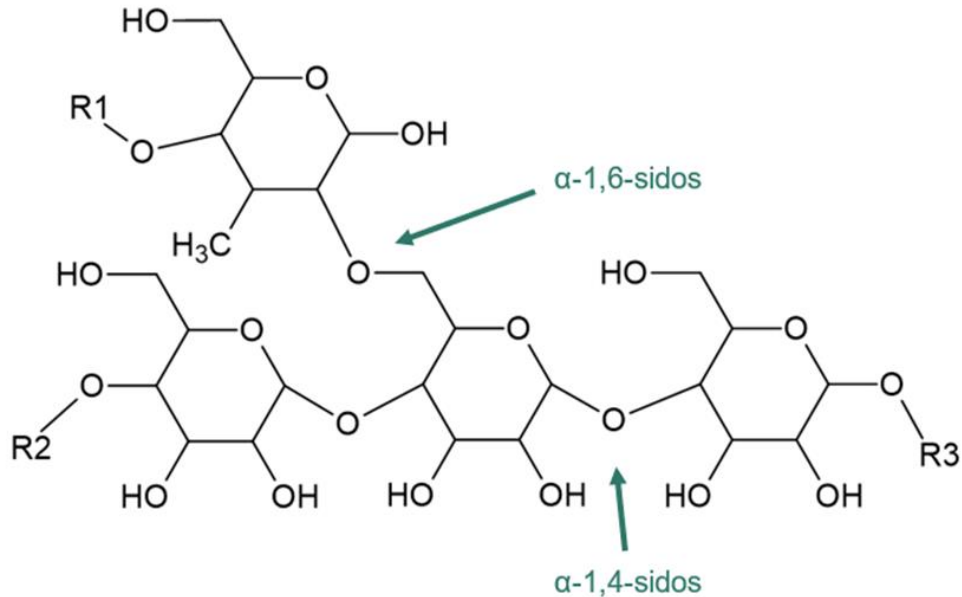
Rakenteellisesti luonnossa esiintyvät tärkkelysjyväset koostuvat kasvista riippumatta kahdesta eri polysakkaridista: amyloosista ja amylopektiinistä. Sekä amyloosin että amylopektiinin perusyksikkö on α -D-glukoosi, joka liittyy seuraavaan perusyksikköön glykosidisella sidoksella. Tärkkelys on siis yhdiste, jonka kemiallinen kaava voidaan esittää muodossa $(C_6H_{10}O_5)_n$. (Bertoft 2004, 57.)

Amyloosin yksinkertaistettu rakenne on esitetty kuviossa 1. Amyloosi koostuu yleensä noin muutamasta sadasta α -D-glukoosista, jotka liittyvät toisiinsa α -1,4-sidoksilla muodostaen lineaarisia tai hyvin vähän haaroittuneita ketjuja. Amyloosiketjuilla on helikaalinen rakenne, jonka sisäpuoli on hydrofobinen, koska hydroksyyliyhdyttävät asetuttavat spiraalin ulkolaidalle niin, että vetyatomit linjautuvat helikaalirakenteen sisäpuolelle. Yleisesti noin 25 % tärkkelyksestä on amyloosia. (BeMiller 2019, 163–164; Corke & Zhu 2019, 87.)



KUVIO 1. Amyloosi (Pubchem 2021, muokattu)

Amylopektiinin yksinkertaistettu rakenne on havainnollistettu kuviossa 2. Amylopektiini on huomattavasti amyloosia suurikokoisempi polymeeri ja runsaasti haaroittunut. Amylopektiini koostuu tuhansista α -D-glukoosiyksiköistä, joiden muodostamat ketjut haaroittuvat α -1,6-sidoksilla. Myös amylopektiinissä esiintyy jossain määrin helikaalista rakennetta. Amylopektiini on useimpien tärkkelysten pääasiallinen rakenneos ja suurin osa tärkkelyksistä koostuu noin 75-prosenttisesti amylopektiinistä. (Bertoft 2004, 57; BeMiller 2019, 164; Corke & Zhu 2019, 87.)



KUVIO 2. Amylopektiini (Sigma-Aldrich 2021, muokattu)

2.2 Tärkkelys ravinnonlähteenä

Tärkkelys on ihmisten kuluttamasta ravintoaineiden kokonaismäärästä merkittävintä, sillä maailmanlaajuisesti jopa 70–80 % ihmisten syömästä energiasta on peräisin tärkkelyksestä. Suurin osa tästä saadaan viljoista, kuten riisistä, maissista ja vehnästä sekä perunoista, bataatista ja maniokista. Lisäksi tärkkelystä esiintyy myös vihanneksissa ja hedelmissä, mutta vähäisempiä määriä kuin viljoissa. Luonnossa esiintyvän tärkkelyksen ohella elintarviketeollisuudessa tuotettua tärkkelystä lisätään moniin tuotteisiin, joissa se toimii geelitymisominaisuutensa vuoksi muun muassa sakeutusaineena, stabilointiaineena, geelityttäjänä, täyteaineena ja sidosaineena. Esimerkiksi monissa leivoksissa, leivitteissä, makeisissa, kastikkeissa, majoneeseissa, salaatikastikkeissa, maitotuotteissa, kuten juustokakuissa ja jogurteissa, sekä marja- ja mehukeitoissa tärkkelys vaikuttaa tuotteen koostumukseen. Tärkkelyksen geelitymiseen vaikuttaa lämpötila sekä amyloosin ja amylopektiinin suhteesta. (Lang 2004, 483; Taggart 2004, 382–388; BeMiller 2019, 160, 178–180.)

Ihmisen ruuansulatusjärjestelmässä α -amylaasi, glukoamylaasi ja sakkaraasi-isomaltasi pilkkovat tärkkelystä D-glukoosiksi, joka imeytyy ruuansulatuskanavasta verenkiertoon ja käytetään energianlähteenä. Tärkkelystä on olemassa kolme eri tyyppiä – nopeasti imeytyvä, hitaasti imeytyvä ja resistentti tärkkelys. Nopeasti imeytyvä tärkkelys nostaa nopeasti verensokeria, mutta nousua seuraa verensokeritason pudotus, kun taas hitaasti imeytyvä tärkkelys pitää verensokerin tasaisena. Tärkkelys imeytyy hitaammin, kun amyloosia on runsaasti suhteessa amylopektiiniin. (Lehmann & Robin 2007, 346; Lockyer & Nugent 2017, 11.) Resistentistä tärkkelyksestä kerrotaan luvuissa 2.2.1 ja 2.2.2.

2.2.1 Resistentti tärkkelys

Resistentti tärkkelys on tärkkelystä, jota ihmisen ruuansulatuselimistön entsyymit eivät kykene pilkkomaan. Resistentti tärkkelys ei siis hajoa ohutsuolessa, vaan fermentoituu bakteerien vaikutuksesta paksusuolella. Resistenttiä tärkkelystä esiintyy luonnostaan joissain kasveissa, kuten banaaneissa ja pavuissa sekä kei-

tetyissä ja jäädytetyissä perunoissa tai sitä voi syntyä ruuan prosessoinnin seurauksena. Rungas amyloosin määrä suhteessa amylopektiiniin on liitetty resistentin tärkkelyksen pitoisuuteen, sillä amylopektiini imeytyy nopeasti ruuansulatuksesta, kun taas amyloosi imeytyy hitaasti. (Ranhotra 2001, 424–426; Lockyer & Nugent 2017, 11.)

2.2.2 Resistentin tärkkelyksen terveystaikutukset

Eläinkokeissa muun muassa rotilla ja hamstereilla on onnistuttu osoittamaan resistentin tärkkelyksen alentavan veren kolesterolipitoisuutta sekä triglyseridejä. Resistentti tärkkelys saattaa alentaa kolesterolia jopa tehokkaammin kuin kolesterolilääkkeenä käytetty kolestyramiini. Lisäksi resistentin tärkkelyksen on havaittu vaikuttavan positiivisesti myös veren sokeripitoisuuteen. Lisäämällä resistenttiä tärkkelystä elintarvikkeisiin, kuten leipään, voitaisiin laskea tuotteen glykeemistä indeksiä ja tarjota näin diabeetikoille vaihtoehtoja sokeriarvoja tasapainottavasta ruuasta. (Ranhotra 2001, 424–425.)

Hiilihydraattien laatu ja glykeeminen indeksi vaikuttavat riskiin sairastua tyypin 2 diabetekseen. Wolever (2013, 197–199) on tutkinut matalan glykeemisen indeksin ruokavalion vaikutusta insuliiniherkkyyteen ja insuliinin tuottoon henkilöillä, joilla on havaittu riski sairastua tyypin 2 diabetekseen. Tutkimuksessa neljän kuukauden ruokavalion noudattamisen jälkeen matalan glykeemisen indeksin hiilihydraatteja kuluttaneiden koehenkilöiden insuliiniherkkyyden ja insuliinintuotannon havaittiin kasvaneen merkittävästi verrattuna koehenkilöihin, jotka noudattivat korkean glykeemisen indeksin ruokavaliota. Korkean glykeemisen indeksin ruokavaliota noudattaneiden insuliiniherkkyys ja insuliinintuotanto oli puolestaan heikentynyt tutkimuksen aikana. (Wolever 2013, 197–199.)

Lyhytketjuisista rasvahapoista butyyrihapon tiedetään ehkäisevän syöpäsolujen kasvua paksusuolella. Resistentti tärkkelys kasvattaa butyyrihapon määrää paksusuolella sekä laskee ulosteen pH:ta ja kasvattaa ulostemassaa edistämällä näin paksusuolen toimintaa ja terveyttä. (Ranhotra 2001, 426.)

Vaikka *in vitro*- ja eläinkokeet osoittavat resistentin tärkkelyksen laskevan esimerkiksi kolesterolia ja vaikuttavan suotuisasti veren sokeriarvoihin sekä paksusuolen toimintaan, Lockyer ja Nugent (2017, 27) esittävät, että lisää pitkän aikavälin tutkimustuloksia ihmisillä tarvitaan, jotta terveysvaikutukset voidaan luotettavasti todistaa. EFSA (European Food Safety Authority) on kuitenkin hyväksynyt väitteen, jonka mukaan nopeasti imeytyvän tärkkelyksen korvaaminen resistentillä tärkkelyksellä aiheuttaa aterian jälkeen matalamman veren glukoositason nousun. EFSA ei kuitenkaan vahvista väitettä, että resistentin tärkkelyksen lisäämisellä elintarvikkeisiin voitaisiin saavuttaa sama terveysvaikutus, vaan nopeasti imeytyvä tärkkelys pitää nimenomaan korvata resistentillä tärkkelyksellä (EFSA 2011, 7; Lockyer & Nugent 2017, 27.)

3 TÄRKKELYKSEN MÄÄRITYS

3.1 Tärkkelyksen määrittymenetelmiä

Tärkkelyksen määrittymiseen käytettyjä menetelmiä ovat muun muassa hapetus-pelkistystitraus (jodi-jodidi), polarimetria, HPLC, kaasu-nestekromatografia, lähi-infrapunaspektroskopia, kapillaarielektroforeesi sekä entsyymaattinen määrittäminen ja UV-vis -spektroskopia. Jodia hyödyntävät menetelmät perustuvat siniseen väriin, jota trijodidi-ioni muodostaa tärkkelyksen kanssa. Jodin ja tärkkelyksen muodostaman kompleksin on kuitenkin todettu muodostuvan lähinnä vain amyloosin kanssa, sillä amyloosin rakenne on helikaalinen, kun taas amylopektiinissä helikaalista rakennetta esiintyy vain hieman. Tämän vuoksi jodiin perustuvat menetelmät eivät anna tarkkaa kuvaa kokonaistärkkelyksestä vaan kertovat ennemminkin näytteen amyloosipitoisuudesta. (Peris-Tortajada 2004, 189, 192.)

3.2 Tärkkelyksen entsyymaattinen määrittäminen

Entsyymaattisissa määrittämissä hyödynnetään nimensä mukaisesti entsyymejä. Tärkkelys hajotetaan α -amylaasin ja amyloglukosidaasin avulla glukoosiksi ja näytteen glukoosipitoisuus määritetään spektrofotometrisesti. (Megazyme 2020, 3.)

Näytteet valmistellaan määrittämistä varten ensin jauhamalla hienoksi (\varnothing 0,5 mm). Paljon vettä sisältävät näytteet, kuten tuoreet vihannekset ja hedelmät, hajotetaan ensin tehosekoittimella ja kylmäkuivataan. Näytteelle määritetään märkäpaino, kuivapaino ja kosteusprosentti. (McCleary, Charmier & McKie 2018, 4.)

Kokonaistärkkelyksen määrittämisessä voidaan käyttää sekä kemiallista käsittelyä että lämpökäsittelyä näytteen sisältämän tärkkelyksen liuottamiseksi. Eri menetelmät eroavat kuitenkin käytettyjen reagenssien ja reagenssien konsentraatioiden sekä lämpökäsittelyn keston ja tavan osalta. (Liu & Liu 2020, 2.) Useimmille entsyymaattisille menetelmille yhteistä on näytteen sisältämän tärkkelyksen hajottaminen glukoosiksi termostabiiliin α -amylaasin ja amyloglukosidaasin (AMG)

avulla. Liukoiseen muotoon saatettu tärkkelys hydrolysoidaan glukoosiksi amyloglukosidaasilla, minkä jälkeen glukoosin oksidaasi-peroksidaasi -reaktiossa muodostuva värireaktio mitataan spektrofotometrillä. (Peris-Tortajada 2004, 194.)

Entsyaattisetkin menetelmät eroavat kuitenkin toisistaan esikäsitteilyn osalta. Yhtenä vaihtoehtona on esimerkiksi käsitellä näytettä kaotrooppisella agentilla, kuten DMSO:lla (dimetyylisulfoksidi) tärkkelyksen geelyttämiseksi, minkä jälkeen tärkkelys liuotetaan ja osittain depolymerisoidaan inkuboimalla 100 °C:ssa termostabiiliin α -amylaasin kanssa pH:ssa 7. Näin saadaan suurin osa tärkkelyksestä lähes täysin liukoiseen muotoon. Seuraavaksi malto-oligosakkaridit hydrolysoidaan amyloglukosidaasin avulla glukoosiksi, joka mitataan spektrofotometrisesti aallonpituudella 510 nm. Värireaktion saa aikaan glukoosin oksidaasi-peroksidaasi/4-amino-antipyriini/p-hydroksybentsoehappo eli GOPOD-reagenssi fosfaattipuskurissa pH:n ollessa 7,4. Toisissa menetelmissä näytettä käsitellään α -amylaasissa inkuboinnin jälkeen emäksisellä liuoksella, kuten NaOH tai KOH. Lopuksi liuennut tärkkelys hydrolysoidaan amyloglukosidaasilla glukoosiksi ja GOPOD-reagenssin kanssa syntynyt väri mitataan kuten muissakin menetelmissä. Emäskäsittelyllä varmistetaan retrogradoituneen amyloosin liukeneminen ja näin korkea saanto amyloosille. (Peris-Tortajada 2004, 194; Liu & Liu 2020, 2.)

ISO 15914 -standardin mukaan näytteestä poistetaan ensin 40-%:sella etanolilla liukoiset sokerit, minkä jälkeen näyte hajotetaan ja tärkkelys liuotetaan DMSO:lla 100 °C:ssa. DMSO-käsittelyä seuraa suolahapon lisäys 60 °C:ssa. Liuennut tärkkelys hajotetaan glukoosiksi amyloglukosidaasi-entsyymillä. Glukoosi määritetään kvantitatiivisesti värireaktion perusteella heksokinaasimenetelmällä ja mitataan aallonpituudella 340 nm. (SFS-EN ISO 15914 2004, 2, 7.)

3.3 Häiriötekijöitä entsyymäntisessä määrittäksessä

Tärkkelyksen hydrolysointi glukoosiksi amyloglukosidaasin avulla ei ole täysin ongelmattonta, sillä amyloglukosidaasi voi vapauttaa glukoosia eläinperäisissä näytteissä myös esimerkiksi maksan tai lihasten glykogeeneistä. Myös hiivoissa

on glykogeeniä, josta amyloglukosidaasi voi vapauttaa glukoosia. Amyloglukosidaasi vapauttaa myös näistä lähteistä glukoosia, koska glykogeenit ovat hiilihydraatteja, jotka sisältävät samalla tavoin α -1,4-sidoksia ja α -1,6-sidoksia kuin tärkkelyskin, ja amyloglukosidaasi hajottaa juuri näitä sidoksia. (Hall 2009, 42.) Tämän vuoksi tärkkelyksen entsyymimittaus ei Hallin (2009, 42) mukaan mittaa ainoastaan kasvien sisältämää tärkkelystä, vaan ennemmin glukaanin kokonaismäärää, josta voidaan vapauttaa glukoosia.

Tärkkelyksen hajotuksessa näytteen huolellinen homogenisointi on tarpeellista, sillä paakkujen tai mikrogeelin muodostuminen voi tuottaa virheellisiä tuloksia. Näyte tulee myös aluksi jauhaa riittävän hienojakoiseksi, jotta määrittäessä käytettävän näytteen partikkelikoko ei ole liian suuri, mikä estää tärkkelyksen tehokkaan erottumisen. (SFS-EN ISO 15914:2005, 5; Hall 2009, 43.)

Liian korkeita tärkkelyspitoisuuksia saadaan, jos näyte sisältää tärkkelyksen lisäksi muita hiilihydraatteja, joista vapautuu entsyymien vaikutuksesta glukoosia. Entsyymien toiminnan pysäyttämiseksi käytetyt happolisäykset voivat myös aiheuttaa sukroosin hydrolysoitumista ja näin glukoosin vapautumista. Glukoosin vapautumista näytteen muista hiilihydraateista voidaan ehkäistä uuttamalla määrittästä häiritsevät hiilihydraatit etanolilla, minkä jälkeen näyte sentrifugoidaan ja supernatantti kaadetaan pois. Pesu toistetaan vähintään kahdesti. (SFS-EN ISO 15914:2005, 5; Hall 2009, 43.)

3.4 Megazymen menetelmäpakkauksen toimintaperiaate

Megazyme Total Starch Assay Kit (AA/AMG) ® -menetelmäpakkauksen entsyymimittauksella analyysimenetelmällä mitataan näytteen kokonaistärkkelyspitoisuus. Megazymen menetelmässä tärkkelys hydrolysoidaan glukoosiksi kahdessa vaiheessa. Ensimmäisessä vaiheessa käytetään termostabiilia α -amylaasia ja näytettä inkuboidaan kiehuvaan vesihauteeseen. Tässä vaiheessa näytteen sisältämä tärkkelys liukenee ja hydrolysoituu maltodekstriineiksi. Toisessa vaiheessa maltodekstriinit hydrolysoidaan glukoosiksi amyloglukosidaasin avulla. D-glukoosi hapetetaan D-glukonaatiksi, mikä vapauttaa D-glukoosia vastaavan mooli-

määrän vetyperoksidia. Vapautunut vetyperoksidi mitataan kolorimetrisen reaktion perusteella aallonpituudella 510 nm. Värimuodostuksessa hyödynnetään GOPOD-reagenssia, joka sisältää 4-aminoantipyriiniä ja p-hydroksibentsoehappoa. Peroksidaasin pelkistäessä aiemmassa vaiheessa vapautuneen vetyperoksidin, syntyy samalla p-hydroksibentsoehaposta ja 4-aminoantipyriinistä kinoniimiini-väriainetta, joka voidaan mitata spektrofotometrisesti. (Vasanthan 2001; Megazyme 2020, 3.)

Resistenttiä tärkkelystä sisältävät näytteet voidaan esiliuottaa kylmällä 1,7 M NaOH-liuoksella, minkä jälkeen näyte neutralisoidaan natriumasetaattipuskurilla pH 5:een ja näytettä inkuboidaan 50-asteisessa vesihauteessa α -amylaasin ja amyloglukosidaasin kanssa. Tämän jälkeen näyte värjätään GOPOD-reagenssin avulla samoin kuin edellä on esitetty. Vaihtoehtoinen käsittely resistentille tärkkelykselle on inkubointi 100 °C:ssa DMSO:n kanssa. (Megazyme 2020, 3.)

Megazymen menetelmäpakkauksessa tulosten laskemiseen käytetään laskukaavaa, joka on esitetty kaavassa 1 (Megazyme 2020, 15):

$$Tärkkelys(\%) = \Delta A \cdot F \cdot EV \cdot \frac{D}{W} \cdot 0,90, \quad (1)$$

jossa ΔA on näytteen absorbanssi luettuna reagenssinollanäytettä vasten (sokeanäytteen absorbanssi vähennetty), F on kerroin, jolla absorbanssiarvot muunnetaan μg :ksi tärkkelystä (100 μg jaettuna absorbanssilla, joka saatiin 100 μg :llä D-glukoosia), EV on ekstraktiutilavuus, D on laimennuskerroin, W on näytteen punnittu massa milligrammoina ja 0,90 on kerroin, jolla määrittäessä mitattu glukoosi muunnetaan anhydroglukoosiksi, jota tärkkelyksessä esiintyy.

4 ANALYYSIMENETELMÄN VALIDOINTI

4.1 Validoinnin tarkoitus

Validoinnilla tarkoitetaan prosessia, jossa vahvistetaan mittauksiin perustuvalla objektiivisella näytöllä, että tiettyyn tarkoitukseen aiottu menetelmä täyttää sille asetetut vaatimukset ja on tieteellisesti pätevä käyttötarkoitukseensa. Kun validoitua menetelmää käytetään oikeaoppisesti, saadaan tuloksia, joita voidaan hyödyntää sille osoitettuun tarkoitukseen. Menetelmän validointia varten tulee tietää, mihin tuloksia tarvitaan sekä millaisia laatuvaatimuksia tuloksilla on, eli esimerkiksi millainen epävarmuus tuloksilla saa olla. Validointi on tarpeen muun muassa silloin, kun otetaan käyttöön uusi menetelmä tai laajennetaan käytössä olevaa menetelmää koskemaan esimerkiksi uusia näytematriiseja. (Ehder 2005, 25–26; Prichard & Barwick 2007, 73.)

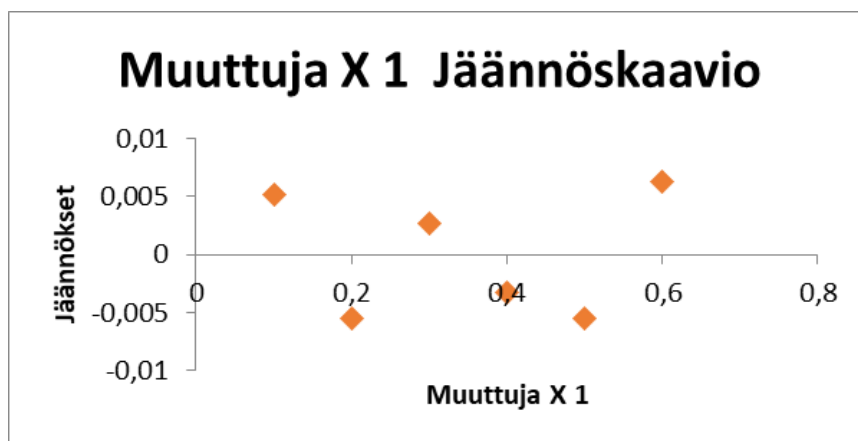
4.2 Validointiparametrit

Menetelmän validoinnissa suoritetaan joukko mittauksia, joilla määritetään, täytyvätkö menetelmälle asetetut suorituskyvyn parametrit. Tyypillisiä validoinnissa määritettäviä parametreja ovat lineaarisuus ja mittausalue, havaitsemis- ja määrittämissrajat, tarkkuus ja toistettavuus, oikeellisuus ja mittausepävarmuus. (Ehder 2005, 26.)

4.2.1 Lineaarisuus ja mittausalue

Jotta menetelmä on lineaarinen, on näytteen pitoisuuden ja menetelmän antaman vasteen välillä oltava lineaarinen korrelaatio. Lineaarisuutta testataan validoinnissa mittaamalla useita pitoisuudeltaan erilaisia näytteitä ja tutkimalla vasteen ja pitoisuuden välistä korrelaatiota mittaustulosten perusteella piirretyltä regressiosuoralta joko silmämääräisesti tai tilastotieteellisin menetelmin. Lineaarisen regressioanalyysin residuaaleilla tarkoitetaan koepisteiden etäisyyttä regres-

siosuorasta. Residuaalien avulla menetelmän lineaarisuutta voidaan tutkia luotettavammin kuin regressiosuoran selitysasteen (R^2) avulla. Esitettäessä residuaalit konsentraation funktiona tulee pisteiden asettua normaalijakautuneesti nollan molemmiin puolin muodostamatta mitään havaittavaa kuviota, kuten kuviossa 3. (Ehder 2005, 28–29; Thompson 2006, 1.)



KUVIO 3. Residuaalit normaalijakautuneet (Thompson 2006, 2, muokattu)

Mikäli residuaalit asettuvat nollan ympärille muodostaen jonkin tietyn kuvion, on malli enemmän epälineaarinen kuin lineaarinen. Yleensä residuaalien muodostama havaittava kuvio on joko ylöspäin aukeava tai alaspäin aukeava U:n mallinen kaari, kuten kuviossa 4. (Thompson 2006, 1.)



KUVIO 4. Residuaalit eivät ole normaalijakautuneet (Thompson 2006, 2, muokattu)

Lineaarisuuden tutkimisen yhteydessä määritetään myös menetelmän mittausalue, jolla mittaustulosten epävarmuus on hyväksyttävällä tasolla. Mittausalue on usein hieman laajempi kuin lineaarinen alue. (Ehder 2005, 28–29.)

4.2.2 Havaitsemis- ja määritysraja

Havaitsemisraja on pienin konsentraatio analyyttia, joka voidaan tietyllä luotettavuudella havaita. Havaitsemisrajalla pitoisuutta ei voida kuitenkaan luotettavasti määrittää kvantitatiivisesti. Havaitsemisraja voidaan määrittää mittaamalla toistuvasti nollanäytettä tai näytettä, joka sisältää analyyttia hyvin vähän. Nollanäytteitä mittaamalla saadaan selville menetelmän tausta, joka tulee ottaa huomioon. Yleisesti havaitsemisrajaksi asetetaan kaavan 2 mukaisesti nollanäytteiden keskiarvo k , johon lisätään nollanäytteiden keskihajonta s_0 kolminkertaisena. Havaitsemisrajan pitoisuudeksi määritetään niin suuri pitoisuus, ettei sen ole enää mahdollista johtua taustan vaihtelusta. (Ehder 2005, 29–30; Prichard & Barwick 2007, 56.)

$$LOD = k + 3 \cdot s_0 \quad (2)$$

Mikäli nollanäytteille ei saada riittävää vastetta, voidaan havaitsemisraja laskea myös regressiosuoran analyysin perusteella kaavalla 3, jossa s_0 on regressiosuoran leikkauskohdan otoskeskihajonta ja b_1 regressiosuoran kulmakerroin. (Emea 2006, 13.)

$$LOD = \frac{3 \cdot s_0}{b_1} \quad (3)$$

Määritysraja (LOQ) on pienin pitoisuus, joka voidaan määrittää kvantitatiivisesti hyväksytyllä luotettavuustasolla. Yleinen käytäntö on asettaa määritysrajaksi nollanäytteiden keskiarvo k , johon lisätään 10 kertaa nollanäytteiden keskihajonta s_0 , kuten kaavassa 4 on esitetty. (Prichard & Barwick 2007, 88.)

$$LOD = k + 10 \cdot s_0 \quad (4)$$

Myös LOQ voidaan laskea regressioanalyysin perusteella samoin kuin LOD. Määritysrajan laskemisessa kertoimena on 10, kun se havaitsemisrajan kaavassa on 3. (Emea 2006, 14.) Kaavassa 5 on esitetty määritysrajan laskeminen regressioanalyysin perusteella.

$$LOQ = \frac{10 \cdot s_0}{b_1} \quad (5)$$

4.2.3 Toistettavuus

Toistettavuus kuvaa mittaustulosten vaihtelua, kun samoissa olosuhteissa tehdään toistomittauksia lyhyellä aikavälillä. Toistettavuutta tutkittaessa tehdään rinnakkaismääryksiä erilaisista näytteistä, mutta tekijä, laite, reagenssit, lämpötila ja muut olosuhteet ovat samat. Toistettavuutta kuvaa mittaustulosten suhteellinen keskihajonta, RSD. Suhteellisesta keskihajonnasta käytetään myös termiä CV, eng. coefficient of variation. RSD ilmoitetaan prosentteina, ja se lasketaan kaavalla 6, jossa s on mittaustulosten keskihajonta ja x on mittaustulosten keskiarvo.

$$RSD = CV = \frac{s}{x} \cdot 100\% \quad (6)$$

Uusittavuutta tutkitaan myös mittaamalla rinnakkaismääryksiä, kuten toistettavuutta, mutta vaihtuvissa olosuhteissa. Mittaus voidaan tehdä esimerkiksi samalla menetelmällä, mutta eri laboratoriossa eri laitteella eri tekijän toimesta. Ellei toisin mainita, todennäköisyys sille, että rinnakkaistulokset samasta näytemateriaalista osuvat ilmoitetulle toistettavuuden tai uusittavuuden vaihtelevuuden tasolle, on 95 %. (Ehder 2005, 37; Prichard & Barwick 2007, 57, 79, 144.)

Laboratorion sisäinen uusittavuus $u(R_w)$ voidaan määrittää laadunvalvontanäytteestä tehtyjen toistomittausten keskihajonnan s_{RW} ja luonnonnäytteistä tehtyjen toistomittausten keskihajonnan s_r avulla kaavan 7 mukaisesti. (Nordtest 2003, 11–13.)

$$u(R_w) = \sqrt{s_{RW}^2 + s_r^2} \quad (7)$$

4.2.4 Oikeellisuus

Menetelmän oikeellisuus määritetään mittaamalla useita kertoja pitoisuudeltaan tunnettua vertailunäytettä. Vertailunäytteen tulisi mieluiten olla sertifioitu vertailumateriaali, joka vastaa mahdollisimman hyvin matriisipohjaa, jota menetelmällä on tarkoitus mitata. Oikeellisuutta voi tutkia myös laboratorioiden välisten vertailumittausten avulla. (Ehder 2005, 35.)

Oikeellisuutta kuvaa vertailunäytteiden rinnakkaismääritysten avulla laskettu prosentuaalinen poikkeama (*bias*), joka määritetään kaavalla 8, jossa x on rinnakkaismääritysten keskiarvo ja x_{ref} sertifioitu vertailuarvo. (Ehder 2005, 31.)

$$bias = \frac{x - x_{ref}}{x_{ref}} \cdot 100\% \quad (8)$$

Poikkeaman määrittämiseen liittyy kuitenkin myös epävarmuutta, johon vaikuttavat saatujen mittaustulosten keskihajonta, mittausten lukumäärä ja vertailuarvoon liittyvä epävarmuus. Menetelmän ja laboratorion kokonaispoikkeamassa $u(bias)$ otetaan huomioon myös tämä laskettuun poikkeamaan liittyvä epävarmuus. Kokonaispoikkeama $u(bias)$ lasketaan kaavan 9 mukaisesti:

$$u(bias) = \sqrt{bias^2 + \left(\frac{s_{bias}}{\sqrt{n}}\right)^2 + u(c_{ref})^2} \quad (9)$$

Kaavassa 9 *bias* on kaavalla 8 laskettu prosentuaalinen poikkeama mittaustuloksille, s_{bias} on mittaustulosten keskihajonta, n on mittausten lukumäärä ja $u(c_{ref})$ on vertailuarvosta johtuva epävarmuustekijä. (Nordtest 2003, 16.)

4.2.5 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuudessa yhdistyvät menetelmän toistotarkkuus ja oikeellisuus. Mittausepävarmuus tarkoittaa sitä arvoaluetta, jonka sisällä mittaustuloksen todellisen arvon voidaan sanoa olevan tietyllä luotettavuudella. (Prichard & Barwick 2007, 58.)

Menetelmän yhdistetyssä standardiepävarmuudessa u_c otetaan huomioon laboratorion sisäinen uusittavuus $u(R_w)$ (laskettu kaavalla 7) sekä menetelmän ja laboratorion kokonaispoikkeama $u(bias)$ (laskettu kaavalla 9). Menetelmän yhdistetty standardiepävarmuus u_c lasketaan kaavan 10 mukaisesti.

$$u_c = \sqrt{u(R_w)^2 + u(bias)^2} \quad (10)$$

Yhdistetyn standardiepävarmuuden u_c pohjalta lasketaan laajennettu mittausepävarmuus U , jonka laskemisessa käytetään peittävyyskerrointa $k = 2$. Käyttämällä peittävyyskerrointa 2 saavutetaan noin 95 %:n luotettavuus sille, että mitatun suureen todellinen arvo sisältyy mittaustuloksessa raportoidulle välille tulos \pm epävarmuus. Laajennettu mittausepävarmuus U lasketaan kaavalla 11, jossa k on peittävyyskerroin ja u_c yhdistetty standardiepävarmuus. (Nordtest 2003, 9.)

$$U = k \cdot u_c \quad (11)$$

5 MITTAUS- JA MÄÄRITYSMENETELMÄT

5.1 Megazyme Total Starch -menetelmäpakkaus

Tärkkelyksen määrittämisessä käytettiin Megazyme Total Starch (AA/AMG) K-TSTA-50A -menetelmäpakkausta. Menetelmä perustuu standardeihin AOAC 996.11 ja AACC 76-13.01. Pakkaus sisältää kuusi reagenssipulloa, jotka on esitetty taulukossa 1, sekä ohjeet määrittämisen suorittamiseen.

TAULUKKO 1. Megazymin menetelmäpakkauksen sisältö

Pullo	Sisältö
1	Termostabiili α -amylaasi
2	Amyloglukosidaasi
3	GOPOD-reagenssipuskuri
4	GOPOD-reagenssientsyymit
5	D-glukoosin standardiliuos (1,0 mg/ml)
6	Standardoitu maissitärkkelyskontrolli

Menetelmäpakkauksen sisältö on esitetty kuvassa 1.



KUVA 1. Megazyme Total Starch -pakkauksen sisältö

Megazymin pakkauksen ohjeista käytettiin menetelmää b (Determination of total starch content of samples containing resistant starch), jolla saadaan määritettyä

kokonaistärkkelys näytteistä, jotka sisältävät resistenttiä tärkkelystä. Valinta perustui näytematriisiin, jonka määrittämiseen menetelmää on enimmäkseen tarkoitus käyttää.

5.2 Spektrofotometri

Mittauksissa käytettiin Agilentin Cary 60 -spektrofotometriä ja näkyvän valon aallonpituudelle sopivaa OG kyvettä 10 mm:n valotiellä. Mittaukset tehtiin aallonpituudella 510 nm.

6 TYÖN SUORITUS

6.1 Liuokset

Määrittelyssä tarvittavien liuosten valmistus on kuvattu taulukossa 2.

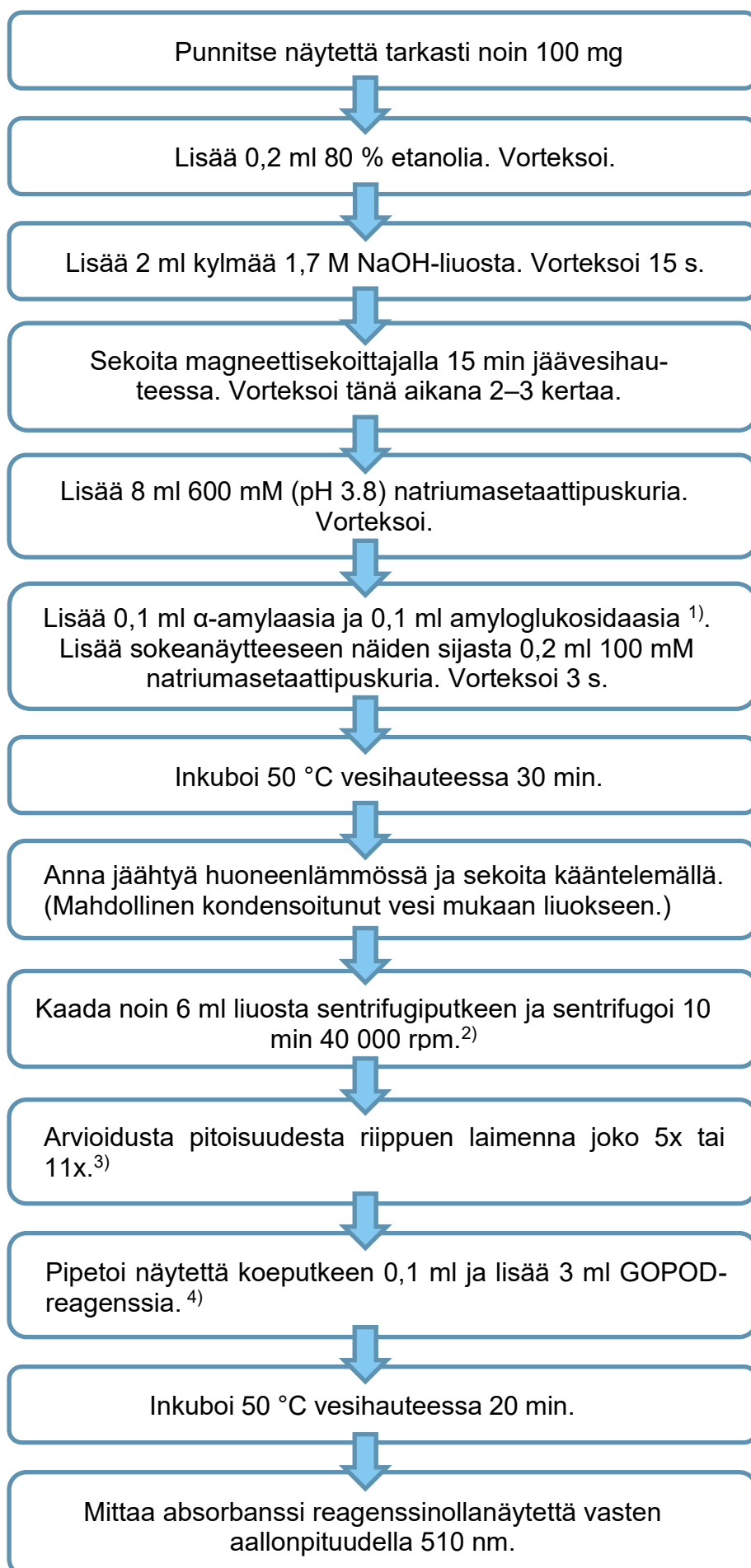
TAULUKKO 2. Liuosten valmistus

Liuos	Valmistus
GOPOD-reagenssi	Pullo 3 laimennetaan 1000 ml:ksi UHP-vedellä. Tähän liuotetaan pullon 4 sisältö.
100 mM natriumasetaattipuskuri (pH 5.0) + 5 mM kalsiumklorididihydraatti	5,8 ml etikkahappoa (1,05 g/ml) lisätään 900 ml:aan UHP-vettä, pH:n säätö (5.0) lisäämällä 1 M (4g/100ml) NaOH-liuosta. Liuotetaan 0,74 g kalsiumklorididihydraattia ja tilavuus säädetään UHP-vedellä 1000 ml:ksi.
600 mM natriumasetaattipuskuri (pH 3.8) + 5 mM kalsiumklorididihydraatti	34,8 ml etikkahappoa (1,05 g/ml) lisätään 800 ml:aan UHP-vettä, pH:n säätö (3.8) lisäämällä 4 M (16g/100ml) NaOH-liuosta. Liuotetaan 0,74 g kalsiumklorididihydraattia ja tilavuus säädetään UHP-vedellä 1000 ml:ksi.
1,7 M NaOH	34 g NaOH liuotetaan 500 ml:aan UHP-vettä.

GOPOD-reagenssi peitetään foliolla liuoksen suojaamiseksi valolta, ja se säilyy noin 3 kuukautta jääkaapissa (2–5 °C).

6.2 Näytteiden käsittely

Mittaukset tehtiin Megazymen menetelmäohjeen b (Megazyme 2020, 10–11) mukaisesti, kuten kuviossa 5 on esitetty. Jauhemaiset näytteet punnittiin sellaiseen ja kokonaiset perunat hajotettiin tehosekoittimella ennen punnitusta.



KUVIO 5. Analyysin suoritus (muokattu Megazyme 2020, 10–11)

1) Sekä α -amylaasi että amyloglukosidaasi ovat viskooseja, ja näitä kehoitetaan menetelmäpakkauksen ohjeessa pipetoi-
maan toistopipetillä. Työssä näiden reagenssien lisäys tehtiin kuitenkin automaattipipetillä käyttämällä käänteistä pipe-
tointia.

2) Menetelmäpakkauksen ohjeessa sentrifugointi suoritetaan kaatamalla noin 2 ml näytettä 2 ml:n Eppendorf-putkeen ja
sentrifugoimalla 5 min 13 000 rpm. Laboratoriossa käytettävissä oleva sentrifugi oli kooltaan suurempi, joten näytteitä
sentrifugoitii noin 6 ml 10 min 40 000 rpm.

3) Näytelaimennokset tehtiin 100 mM natriumasetaattipuskuriin.

4) Näytteiden lisäksi valmistettiin 4 kpl D-glukoosistandardia (0,1 ml laimentamatonta standardia + 3 ml GOPOD-reagens-
sia) sekä reagenssinollanäytteet (0,1 ml 100 mM natriumasetaattipuskuria + 3 ml GOPOD-reagenssia).

6.3 Validointi

Validointisuunnitelmassa asetettiin määritettäviksi validointiparametreiksi lineaar-
isuus, havaitsemis- ja määrittäysraja, toistettavuus, oikeellisuus ja mittausepävar-
muus sekä esitettiin näiden määrittämiseen alustava mittausuunnitelma. Mukit-
ohjelmalla laskettavan mittausepävarmuuden tavoitteeksi asetettiin yhdistetyn
standardiepävarmuuden u_c osalta alle 10 % ja laajennetun mittausepävarmuuden
 U osalta alle 30 %.

6.3.1 Lineaarisuuden määrittäminen

Menetelmän lineaarisuutta testattiin valmistamalla D-glukoosin standardiliuok-
sesta kahdeksan pitoisuudeltaan erilaista laimennosta 100 mM natriumasetaatti-
puskuriin. Standardiliuosten pitoisuudet olivat 0,04; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,8; 0,9 ja
1,0 g/l. Standardilaimennoksista ajettiin standardisuora, jota vasten ajettiin jo-
kaista standardilaimennosta kolme kappaletta. Lineaarisuutta tarkasteltiin stan-
dardisuoran regressioanalyysin avulla.

6.3.2 Havaitsemis- ja määrittäysrajan määrittäminen

Nollanäytteitä mittaamalla ei saatu riittävää vastetta havaitsemis- ja määrittäysra-
jan laskemista varten. Tämän vuoksi menetelmän havaitsemis- ja määrittäysrajan
asettamisessa hyödynnettiin standardisuoran regressioanalyysia.

6.3.3 Toistettavuuden määrittäminen

Menetelmän toistettavuutta tutkittiin mittaamalla rinnakkaismääriytyksiä 13:sta eri näytematriisista. Rinnakkaismääriytyksiä tehtiin usealla eri kerralla 3–10 kappaletta näytettä kohden. Näytematriiseina olivat perunatärkkelys, perunaproteiini, härkäpaputärkkelys, härkäpapuproteiini, lihaseos, esikeitetty peruna, raaka peruna sekä kuusi koostumukseltaan tuntematonta jauhemaista näytettä. Muita näytteitä punnittiin noin 100 mg, paitsi perunaproteiinia, jota punnittiin noin 500 mg näytteen alhaisen tärkkelyspitoisuuden vuoksi. Lisäksi Megazymen maissi-jauhekontrollinäytteen tuloksia käytettiin toistettavuuden arvioinnissa.

6.3.4 Luotettavuuden ja oikeellisuuden määrittäminen

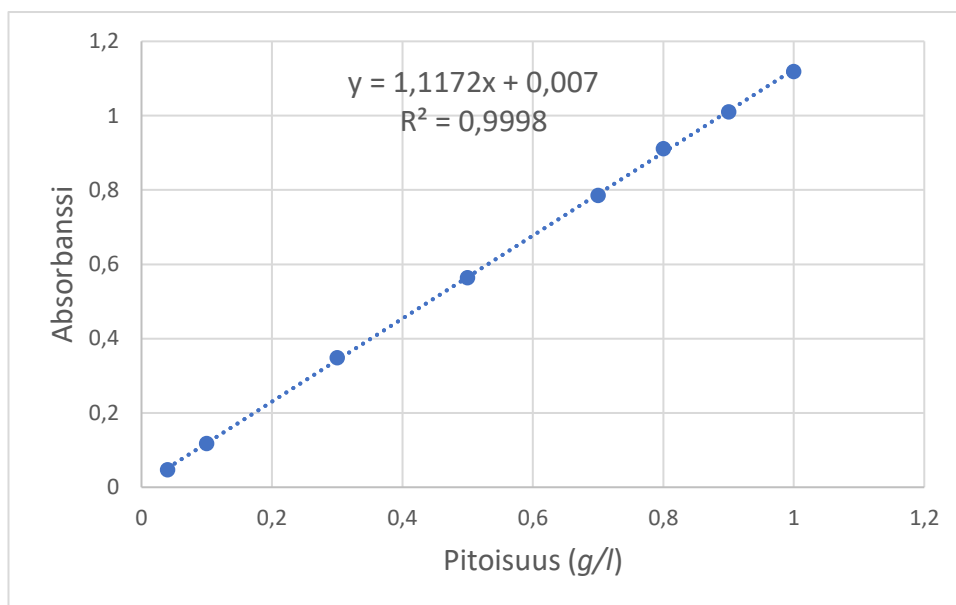
Menetelmän oikeellisuutta arvioitiin mittaamalla interkalibrointinäytettä (LGC Meat And Fish Analysis Scheme QMAS MT295). Mittauksia tehtiin yhteensä 6 kpl kahtena eri päivänä. Tuloksia verrattiin viitearvoon sekä laskettiin LGC:n tietojen perusteella tulosten hyväksyttävyyttä kuvaava z-arvo. Lisäksi menetelmän luotettavuutta ja oikeellisuutta arvioitiin kontrollinäytteiden tulosten perusteella. Kontrollinäytteelle laskettiin mittaustulosten pohjalta myös menetelmän valvontakorttiin hälytys- ja toimintarajat.

Interkalibrointinäytteen ja kontrollinäytteen lisäksi luotettavuutta ja oikeellisuutta arvioitiin lähettämällä neljä validoinnin yhteydessä mitattua näytettä toisen tärkkelysmittaukselle akkreditoidun laboratorion mitattavaksi.

7 TULOKSET

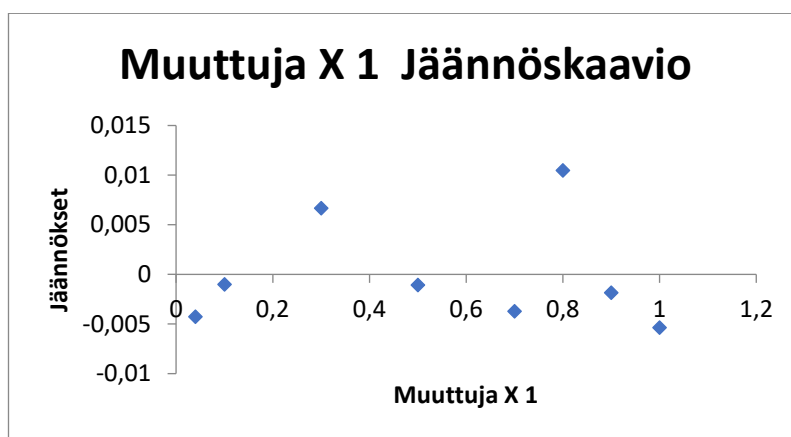
7.1 Menetelmän lineaarisuus

Kuviossa 6 nähdään D-glukoosin standardisuora. Standardilaimennosten mitauksista saadut absorbanssit on esitetty liitteessä 1.



Kuvio 6. D-glukoosin standardisuora

Selityskertoimen R^2 ei ole täysin luotettava lineaarisuuden todistamisessa, vaikka arvo onkin lähellä 1,0:aa ($R^2 = 0,9998$). Lineaarisuuden arvioimisessa korrelaatiokerrointa olennaisempi on regressioanalyysissä residuaalien asettuminen normaalijakautuneesti nollan molemmiin puolin muodostamatta mitään tiettyä havaittavissa olevaa kuviota. Kuviossa 7 on esitetty standardisuoran residuaalien jännöskaavio. Residuaalit eivät muodosta mitään tiettyä kuviota, mikä tukee suoran lineaarisuutta. (Thompson 2006, 1.)



Kuvio 7. Regressioanalyysin jännöskaavio

Suoraa vasten mitattiin kolme rinnakkaista standardilaimennosta kustakin eri pitoisuudesta ja laskettiin näille suhteellinen keskihajonta *RSD* sekä suoralta saatu pitoisuus ja virheprosentti *E-%*. Tulokset on esitetty taulukossa 3. Suhteellinen keskihajonta on pientä, ja virheprosentti on muissa laimennoksissa pieni paitsi pitoisuudeltaan pienimmän (0,04 g/l) laimennoksen kohdalla.

TAULUKKO 3. Standardilaimennokset

Standardiliuos (g/l)	Pitoisuus suoralla (g/l)	RSD	E-%
0,04	0,0358	1,5	-12,7
0,1	0,0984	1,0	-1,6
0,3	0,2993	0,3	-0,2
0,5	0,4931	0,9	-1,4
0,7	0,6901	1,2	-1,4
0,8	0,7942	1,1	-0,7
0,9	0,8923	1,3	-0,9
1,0	0,9889	0,4	-1,1

7.2 Menetelmän havaitsemis- ja määrittäysraja

Menetelmäpakkauksen valmistajan mukaan havaitsemisraja on 0,18 g/100 g, joka tulee absorbanssierosta 0,020, kun näytettä on punnittu 100 mg ja uuttotilavuus on 10,2 ml (Megazyme 2020, 4).

Standardisuoran regressioanalyysissä suoran kulmakertoimeksi b_1 ja leikkauspisteen keskivirheeksi s_0 saadut arvot on esitetty taulukossa 4.

TAULUKKO 4. Regressioanalyysi

Leikkauspisteen keskivirhe s_0	Kulmakerroin b_1
0,0040157969	1,117199221

Kun arvot sijoitetaan kaavaan 3, saadaan havaitsemisrajaksi (LOD) 0,011 g/l, joka vastaa määrittäksessä näytteen tärkkelyspitoisuutta 0,11 g/100 g. Todellisuudessa menetelmällä tuskin saadaan havaittua alhaisempia pitoisuuksia kuin pakkauksen valmistaja, joten havaitsemisrajana käytetään Megazymen asettamaa rajaa 0,18 g/100 g.

$$LOD = \frac{3 \cdot 0,0040157969}{1,117199221} = 0,01078 \text{ (g/l)}$$

Menetelmän määrittäysraja laskettiin kaavalla 5. Määrittäysrajaksi saatiin 0,04 g/l, joka vastaa määrittäksessä tärkkelyspitoisuutta 0,4 g/100 g. Näin laskettu määrittäysraja on myös sama kuin standardisuoran ensimmäinen piste.

$$LOQ = \frac{10 \cdot 0,0040157969}{1,117199221} = 0,03595 \text{ (g/l)}$$

7.3 Menetelmän toistettavuus

Näytteiden rinnakkaismäärittäyksille laskettiin kaavan 6 mukaisesti suhteellinen keskihajonta RSD(%). Tulokset on esitetty taulukossa 5. Liitteeseen 2 on koottu rinnakkaismäärittäysten mittaustulokset absorbandsseineen.

TAULUKKO 5. Näytteiden rinnakkaismäärittäykset

Näyte	Tärkkelys g/100g	RSD %
Perunatärkkelys	81,4	1,3
Perunaproteiini	< 0,4 (0,13)	(2,0)
Härkäpaputärkkelys	82,6	0,5
Härkäpapuproteiini	2,2	1,0
Esikeitetty peruna	13,8	4,2
Raaka peruna 1	11,5	6,1

Raaka peruna 2	13,5	7,0
Lihaseos	6,7	4,7
Jauhe1	27,5	10,9
Jauhe2	25	2,3
Jauhe3	30,7	4,0
Jauhe4	24,6	9,5
Jauhe5	26,6	7,6
Jauhe6	49,2	1,2

Taulukosta 5 havaitaan, että pitoisuuden ollessa yli 30,7 g/100 g on suhteellinen keskihajonta *RSD* alle 1,3 %. Näytteen pitoisuuden ollessa alle 30,7 g/100g on suhteellisissa keskihajonnoissa hieman enemmän vaihtelua, mutta tulokset ovat kuitenkin edelleen toistettavuudeltaan hyväksyttäviä. Erot suhteellisessa keskihajonnassa voivat selittyä myös näytematriisien perusteella.

7.4 Menetelmän luotettavuus ja oikeellisuus

Luotettavuuden ja oikeellisuuden arvioinnissa käytettyjen Megazymen menetelmäpakkauksen kontrollinäytteen (Standardoitu maissitärkkelys, 83 %) tulokset on esitetty taulukossa 6. Liitteeseen 3 on koottu kontrollinäytteen tulokset absorbansseineen. Tuloksia hyödynnettiin myös toistettavuuden määrittämisessä luonnontäytteen rinnakkaismääritysten lisäksi. Tuloksille laskettiin *RSD* kaavan 6 mukaan ja prosentuaalinen harha (*E%*) kaavalla 8.

TAULUKKO 6. Kontrollinäytteiden tulokset

Keskiarvo		
(g/100g)	RSD	E%
86,5	2,5	4,2

Kontrollinäytteiden suhteellinen keskihajonta ja virheprosentti ovat pieniä. Toisaalta kontrollinäytteen tulokset ovat toistuvasti vähän korkeampia kuin vertailuarvo.

Lisäksi määritettiin LGC:n pätevyyskoekierroksen MT295 MT4832 interkalibrointinäyte. Interkalibrointinäytteestä saadut tulokset on esitetty taulukossa 7. LGC:n antama viitearvo interkalibrointinäytteelle oli 4,9 g/100 g. Virheprosentti saadulle

tulokselle on huomattavan korkea, mutta toisaalta pätevyyskoekierroksella määritetyn z-arvon puolesta tulos on hyväksytyjen arvojen rajoissa. Tulokset ovat hyväksyttäviä, kun $-2 \leq z \leq 2$.

TAULUKKO 7. Interkalibroitinäyte

Keskiarvo (g/100g)	RSD	E%	z-arvo
6,7	4,7	36	1,18

Ulkoisena näyttönä menetelmälle käytettiin vertailua toisen laboratorion kanssa. Laboratoriossa on käytössä kokonaistärkkelyksen analysoinnille akkreditoitu menetelmä. Laboratorioon lähetettiin validoinnin yhteydessä mitatuista näytteistä kahdeksan kappaletta ja vertailulaboratorion ilmoittamien tulosten perusteella laskettiin virheprosentti omille tuloksille. Vertailun tulokset on esitetty taulukossa 8.

TAULUKKO 8. Vertailu toiseen laboratorioon

Näyte	Vertailulaboratorion		
	Oma tulos (g/100g)	tulos (g/100g)	E%
Perunatärkkelys	81,4	75,1	8,4
Perunaproteiini	< 0,4	< 0,1	-
Härkäpaputärkkelys	82,6	75,5	9,4
Härkäpapuproteiini	2,2	1,4	57,1
Jauhe 2	25,0	18,8	33,0
Jauhe 3	30,7	25,0	22,8
Jauhe 4	24,6	18,2	35,2
Jauhe 6	49,2	40,5	21,5

Vertailun perusteella perunatärkkelyksen, perunaproteiinin ja härkäpaputärkkelyksen tulokset ovat vielä hyväksyttävissä rajoissa, eli virheprosentti on puolet menetelmälle lasketusta laajennetusta mittausepävarmuudesta. Menetelmän laajennettu mittausepävarmuus U on esitetty taulukossa 9. Pitoisuudeltaan pienen härkäpapuproteiinin kohdalla virheprosentti on merkittävästi liian suuri, vaikka toisaalta absoluuttinen virhe on alle yhden gramman. Pienessä pitoisuudessa virheprosentista tulee kuitenkin nopeasti suuri. Myöskään koostumukseltaan tuntemattomat elintarvikejauheet eivät menneet vertailussa läpi.

7.5 Menetelmän mittausepävarmuus

Mittausepävarmuuden laskemisessa hyödynnettiin Suomen ympäristökeskuksen (SYKE) julkaisemaa Mukit-ohjelmaa, joka perustuu Nordtest raporttiin TR 537. Laskemisessa käytettiin rinnakkaismääritysten ja Megazymen maissijauhekontrollinäytteen mittaustuloksia. Taulukossa 9 on nähtävissä MUKit-ohjelmalla tehdyn mittausepävarmuuslaskelman yhteenveto.

TAULUKKO 9. MUKit-epävarmuuslaskelma

$u(R_w)$	$u(bias)$	u_c	U
5,98 %	6,56 %	8,87 %	18 %

Laboratorion sisäisen uusittavuuden $u(R_w)$ laskemisessa on käytetty sekä kontrollinäytteen että luonnonnäytteiden tuloksia. Menetelmän ja laboratorion kokonaispoikkeaman $u(bias)$ laskemisessa on käytetty kontrollinäytteen tuloksia. Kontrollinäytteen vertailuarvon standardiepävarmuudeksi $u(c_{ref})$ on asetettu 5 %. Yhdistetty standardiepävarmuus u_c on alle 10 %, ja laajennettu mittausepävarmuus U on alle 30%.

8 POHDINTA

Tässä opinnäytetyössä validoidulla kokonaistärkkelyksen menetelmällä haluttiin korvata laboratoriossa aiemmin käytössä ollut menetelmä. Uuden menetelmän toivottiin olevan nopeampi ja vaivattomampi kuin edellinen menetelmä. Nopeuden ja vaivattomuuden osalta saavutettiin huomattava parannus, sillä ennen määrittäminen kesti yli vuorokauden ja nyt tulokset saatiin muutamassa tunnissa, eikä analyysissä tarvittu työläisiä suodatuksia.

Validoinnin osalta työlle asetetut tavoitteet toteutuivat osittain – menetelmä saatiin käyttöönotettua niin, että sitä on helppo kehittää jatkossa eteenpäin, mutta toisaalta osalla näytematriiseista ei saavutettu toivottuja tuloksia. Mahdollisen tulevan asiakkaan näytteistä suurin osa saatiin toistettavasti määritettyä vertailulaboratorion tuloksiin nähden niin, että saadun mittaustuloksen virheprosentti pysyi lasketun epävarmuuden sisällä pidettäessä vertailulaboratorion tulosta oikeana tuloksena. Asiakkaan näytteistä ainoastaan pitoisuudeltaan pienen härkäpapuproteiinin virheprosentti 57,1 % oli liian suuri. Tavoitteena oli, että virheprosentti olisi korkeintaan puolet menetelmälle lasketusta laajennetusta mittausepävarmuudesta U . Menetelmälle laskettu laajennettu mittausepävarmuus oli 18 %, kuten taulukossa 9 on esitetty. Myös interkalibrointinäyte saatiin menetelmällä määritettyä hyväksyttävästi.

Saadut mittaustulokset olivat systemaattisesti suurempia vertailuarvoon nähden. Maissijauhekontrollin, interkalibrointinäytteen, perunatärkkelyksen ja härkäpaputärkkelyksen tulokset olivat hyväksyttävissä määrin suurempia kuin vertailuarvot. Härkäpapuproteiinin sekä koostumukseltaan tuntemattomien jauhenäytteiden 1-6 tulokset olivat virheprosenttiltaan liian suuria ollakseen hyväksyttävissä rajoissa.

Liian suuret tulokset voisivat selittyä näytteiden mahdollisesti sisältämällä sokeilla. Sokerit, kuten sakkaroosi ja fruktoosi, voitaisiin poistaa näytteestä etanolipesulla ennen määrittäystä. Muutoin tärkkelystä glukoosiksi hajottavat entsyymit voivat hajottaa myös muista hiilihydraateista glukoosia, joka käsitetään näin virheellisesti tärkkelyksestä saaduksi glukoosiksi. (Hall 2009, 43.) Jatkossa näytteille voisi tehdä etanolipesun, jotta saadaan selville, olisiko liian korkeat tulokset

saatu pesun ansiosta hyväksyttävälle tasolle. Myös tuntemattomat näytteet olisi hyvä käsitellä etanolipesulla, jos ei ole varmuutta, sisältääkö näyte sokereita, jotka voisivat nostattaa tärkkelystulosta virheellisesti.

Interkalibrointinäytteestä saatiin z-arvoltaan hyväksyttävä tulos, mutta virheprosenttiltaan (36 %) tulos ei kuitenkaan ollut hyväksyttävä. Liian korkea tulos voisi selittyä edellä mainituilla sokereilla, mikä voitaisiin korjata etanolipesulla. Lisäksi interkalibrointinäyte oli matriisiltaan lihaseos ja Hall (2009, 42) nostaa esiin eläinperäisissä tuotteissa olevat glykogeenit yhdeksi mahdolliseksi tekijäksi, jos näytteelle saadaan liian suuria tuloksia.

Näytteiden käsittelyssä ongelmaksi nousi maissijauhekontrollin geeliytyminen NaOH-inkuboinnissa sekä perunatärkkelysnäytteen paakkuuntuminen digestioputken pohjan reunoille. Maissijauhekontrollin geeliytymisestä ei päästy eroon, mutta perunatärkkelysnäytteeseen muodostuneet paakut saatiin melko hyvin hajotettua spaattelilla. Jatkossa digestioputkina käytetään koeputkia, joiden pohjan ja seinän väli on pyöreämpi, jolloin näyte ei magneettisekoittajalla sekoittaessa kerry yhtä helposti pohjan reunoille.

Tuoreiden, ei-jauhemaisten näytteiden hajottamisessa käytettiin tehosekoitinta ja raastinta. Tällä hajotuksella näytettä ei saatu hajotettua riittävän pieneksi vastaamaan ohjetta, eli halkaisijaltaan 0,5 mm:n kokoiseksi. Ainoastaan esikeitetty peruna saatiin hyvin hajotettua morttelissa. Megazymen esikäsittelypakkauksessa näytteen hajotukseen suositellaan Wiley-jauhatusmyllyä, jossa näyte läpäisee 0,5 mm siivilän. Näytteiden liian vähäinen hajotus voidaan havaita rinnakkaismääritysten perusteella lasketusta suhteellisesta keskihajonnasta, eli RSD:stä. Raakojen perunoiden kohdalla RSD on 6 % ja 7 %, kun valmiiksi jauhemaisten näytteiden kohdalla RSD on alle 2 %. Toisaalta koostumukseltaan tuntemattomien jauhenäytteiden kohdalla suhteellinen keskihajonta vaihtelee paljon ja on välillä 1,2–10,9 %. Toistettavuuden vaihtelu näiden näytteiden kohdalla voi johtua mahdollisesti määrittystä häiritsevistä muista hiilihydraateista, jotka voitaisiin poistaa edellä mainitulla etanolipesulla (Hall 2009, 43).

McCleary ym. (2019, 4) ohjeistavat kylmäkuivaamaan tuoreet vihannekset ja hedelmät, kun näyte on ensin hajotettu tehosekoittimella. Näytteelle määritetään

märkápaino ja kuivapaino, ja kylmäkuivauksen jälkeen näyte vielä jauhetaan ja määrittys tehdään kuivatusta näytteestä. Jatkossa etenkin tuoreiden näytteiden, kuten vihannesten ja hedelmien, määrittys olisi kannattavaa tehdä kuivatusta ja jauhetusta näytteestä, jotta näyte saadaan hajotettua riittävän pieneksi ja homogeeniseksi. Muutoinkin kaikki näytteet voisi kuivata ja määrittää näytteille kosteusprosentin. Vaikka näyte olisikin valmiiksi jauhemainen ja määrittys tehtäisiin näytteestä sellaisenaan, olisi kosteusprosentin avulla mahdollista laskea näytteelle tulos kuivapainoa kohti.

Työssä keskityttiin validoimaan esikäsitteilypakkauksen menettelytapaa b, jota käytetään resistenttiä tärkkelystä sisältävien näytteiden kokonaistärkkelyksen määrittämiseen (Megazyme 2020, 11). Jatkossa voitaisiin validoida myös menetelmätapa a, jossa määritetään myös kokonaistärkkelys, mutta näytteistä, joissa ei ole resistenttiä tärkkelystä (Megazyme 2020, 10). Näin voitaisiin myös varmistaa, etteivät liian korkeat tulokset johtuneet resistentin tärkkelyksen sisällyttämisestä kokonaistärkkelykseen, sillä joissain tapauksissa kokonaistärkkelykseen saatetaan haluta sisällyttää ainoastaan ruuansulatuksessa hajoava tärkkelys.

LÄHTEET

BeMiller, J. N. 2019. Carbohydrate Chemistry for Food Scientists. 3. painos. Elsevier Inc.

Bertoft, E. 2004. Analysing Starch Structure. Teoksessa Eliasson, A. (toim.) Starch in Food – Structure, Function and Applications. Cambridge, Englanti: Woodhead Publishing Limited, 57–81.

Corke, H. & Zhu, F. 2019. Starch Properties and Modification in Grains and Grain Products. Teoksessa Beta, T. & Camire, M. E. (toim.) Cereal Grain-Based Functional Foods – Carbohydrate and Phytochemical Components. Food Chemistry, Function and Analysis No. 6. Englanti: The Royal Society of Chemistry, 85–102.

Ehder, T. (toim.) 2005. Kemian metrologian opas J6/2005. Helsinki: Metrologian neuvottelukunta. Luettu 18.1.2021. <https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/MIKES/2005-J6.pdf>

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). 2011. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to resistant starch and reduction of post-prandial glycaemic responses (ID 681), “digestive health benefits” (ID 682) and “favours a normal colon metabolism” (ID 783) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal 2011;9(4):2024.

Emea. European Medicines Agency. 2006. Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (CPMP/ICH/381/95). Julkaistu 1995. Luettu 29.1.2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf

Hall, M. 2009. Determination of Starch, Including Maltooligosaccharides, in Animal Feeds: Comparison of Methods and a Method Recommended for AOAC Collaborative Study. Journal of AOAC International 92(1), 42–49.

Horton, D. (toim.) 2012. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. Volume 68. Elsevier Science & Technology.

Lang, V. 2004. Development of a range of industrial cereal-based foodstuffs high in slowly digestible starch. Teoksessa Eliasson, A. (toim.) Starch in Food – Structure, Function and Applications. Cambridge, Englanti: Woodhead Publishing Limited, 477–504.

Lehmann, U. & Robin, F. 2007. Slowly digestible starch – its structure and health implications: a review. Trends in Food Science & Technology 18 (2007), 346–355.

Liu, K. & Liu, Q. 2020. Enzymatic determination of total starch and degree of starch gelatinization in various products. Food Hydrocolloids 103 (2020) 105639.

Lockyer, S. & Nugent, A.P. 2017. Health effects of resistant starch. Nutrition Bulletin 42 (1), 10–41. British Nutrition Foundation.

McCleary, B. V., Charmier, L. M. J., McKie, V. A. Measurement of Starch: Critical Evaluation of Current Methodology. 2018. Starch - Stärke 2019, 71, 1800146, 1–13.

Megazyme. 2020. Total Starch. Assay Procedure. (Amyloglucosidase / α -amylase method). K-TSTA-50A / K-TSTA-100A. Data Booklet. Luettu 5.2.2021. https://www.megazyme.com/documents/Assay_Protocol/K-TSTA-100A_DATA.pdf

Nordtest. 2003. Nordtest raportti TR 537. Mittausepävarmuuden laskentaopas ympäristölaboratorioille. Versio 1.3 elokuu 2003. Suomen ympäristökeskus.

Peris-Tortajada, M. 2004. Measuring Starch in Food. Teoksessa Eliasson, A. (toim.) Starch in Food – Structure, Function and Applications. Cambridge, Englanti: Woodhead Publishing Limited, 185–207.

Pfister, B. & Zeeman, S.C. 2016. Formation of starch in plant cells. Cellular and Molecular Life Sciences (2016) 73: 2781-2807.

Prichard, E. & Barwick, V. 2007. Quality Assurance in Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, Ltd.

Pubchem. 2021. Amylose chain. Luettu 15.1.2021. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/53477771>

Ranhotra, G. 2001. Resistant Starch: Health Aspects and Food Uses. Teoksessa: McCleary, B.V. & Prosky, L. (toim.). Advanced Dietary Fibre Technology. Englanti: Blackwell Science Ltd, 424–429.

SFS-EN ISO 15914:2005. Animal feeding stuffs. Enzymatic determination of total starch content.

Sigma-Aldrich. 2021. Amylopectin from potato starch. Luettu 15.1.2021. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a8515?lang=fi®ion=FI>

Taggart, P. 2004. Starch as an ingredient: manufacture and applications. Teoksessa Eliasson, A. (toim.) Starch in Food – Structure, Function and Applications. Cambridge, Englanti: Woodhead Publishing Limited, 363–392.

Thompson, M. 2006. Amc technical brief. Is my calibration linear? Analytical Methods Committee. AMCTB No 3. The Royal Society of Chemistry. Luettu 29.1.2021. https://www.rsc.org/images/calibration-linear-technical-brief-3_tcm18-214846.pdf

Vasanthan, T. 2001. Enzymatic Quantitation of Total Starch in Plant Products. Current Protocols in Food Analytical Chemistry 00(1), E2.2.1–E2.2.9. Luettu 5.2.2021. <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471142913.fae0202s00>

Wolever, T.M.S. 2013. Role of carbohydrates in the Prevention of Type 2 Diabetes. Teoksessa Shi, Y.-C. & Maningat, C.C. (toim.) Resistant Starch: Sources, Applications and Health Benefits. Chicago: John Wiley & Sons, 191–206.

LIITTEET

Liite 1. Standardisuora

TAULUKKO 10. Standardilaimennosten mittaukset

Standardiliuos (g/l)	Absorbanssi	Pitoisuus suoralla (g/l)	RSD	E-%
0,04	0,0474			
0,04	0,0470	0,0358		
0,04	0,0472	0,0360	1,5	-12,7
0,04	0,0469	0,0357		
0,1	0,1177			
0,1	0,1181	0,0994		
0,1	0,1159	0,0975	1,0	-1,6
0,1	0,1169	0,0984		
0,3	0,3488			
0,3	0,3421	0,2999		
0,3	0,3420	0,2999	0,3	-0,2
0,3	0,3401	0,2982		
0,5	0,5645			
0,5	0,5626	0,4973		
0,5	0,5580	0,4932	0,9	-1,4
0,5	0,5531	0,4888		
0,7	0,7853			
0,7	0,7849	0,6963		
0,7	0,7813	0,6931	1,2	-1,4
0,7	0,7678	0,6810		
0,8	0,9112			
0,8	0,9021	0,8012		
0,8	0,8978	0,7974	1,1	-0,7
0,8	0,8830	0,7841		
0,9	1,0106			
0,9	1,0186	0,9055		
0,9	0,9956	0,8849	1,3	-0,9
0,9	0,9976	0,8867		
1,0	1,1188			
1,0	1,1149	0,9917		
1,0	1,1065	0,9842	0,4	-1,1
1,0	1,1140	0,9909		

Liite 2. Luonnonnäytteiden rinnakkaismääritykset

1(2)

TAULUKKO 11. Rinnakkaismääritykset

Näyte		Punnittu (mg)	Laimennos- kerroin	Absorbanssi	Tärkkelys (g/100g)
Perunatärkkelys	Rin1	98,2	11	0,8946	81,9
	Rin2	99,4	11	0,8886	80,4
	Rin3	95,7	11	0,8660	81,4
	Rin4	103,1	11	0,9338	81,4
	Rin5	96,9	11	0,8547	79,3
	Rin6	108,1	11	0,9769	81,3
	Rin7	110,9	11	0,9973	80,9
	Rin8	123,6	11	1,1222	81,6
	Rin9	107,1	11	0,9892	83,0
	Rin10	99,6	11	0,9148	82,5
Perunaproteiini	Rin1	500,1	1	0,0800	< 0,18 (0,13)
	Rin2	511	1	0,0795	< 0,18 (0,13)
	Rin3	507,2	1	0,0780	< 0,18 (0,12)
Härkäpaputärkkelys	Rin1	100	11	0,9166	82,3
	Rin2	89,8	11	0,8270	82,7
	Rin3	91,7	11	0,8382	82,1
	Rin4	85,4	11	0,7905	83,2
	Rin5	107,9	11	0,9929	82,7
Härkäpapuproteiini	Rin1	90,9	1	0,2421	2,17
	Rin2	94,7	1	0,2508	2,16
	Rin3	100,2	1	0,2649	2,16
	Rin4	95,4	1	0,2581	2,21
	Rin5	96	1	0,2574	2,19
	Rin6	92,8	1	0,2457	2,16
Esikypsennetty peruna	Rin1	102,7	5	0,3324	13,3
	Rin2	92,8	5	0,3244	14,3
	Rin3	92	5	0,3293	14,6
	Rin4	103,1	5	0,3436	13,6
	Rin5	98,3	5	0,3222	13,4
Raaka peruna 1	Rin1	163,2	5	0,4562	11,5
	Rin2	169,5	5	0,4440	10,7
	Rin3	86,8	5	0,2324	11,0
	Rin4	142,6	5	0,4047	11,6
	Rin5	89	5	0,2721	12,5
Raaka peruna 2	Rin1	187,7	5	0,6521	14,1
	Rin2	104,4	5	0,3067	12,0
	Rin3	218,2	5	0,7087	13,2
	Rin4	208,9	5	0,7353	14,3
	Rin5	133,8	5	0,4507	13,7
Lihaseos	Rin1	113,1	1	0,8998	6,50
	Rin2	108,8	1	0,9367	7,03

2(2)

	Rin3	162,7	1	1,3035	6,84
	Rin4	110,4	1	0,7988	6,17
	Rin5	117,6	1	0,9238	6,90
	Rin6	109,9	1	0,9059	6,58
Jauhe 1	Rin1	107,5	11	0,3839	32,8
	Rin2	93,1	11	0,2868	28,3
	Rin3	100,3	11	0,2922	26,8
	Rin4	93,3	11	0,2553	25,2
	Rin5	90,9	11	0,2413	24,4
	Rin6	102,2	11	0,3075	27,7
Jauhe 2	Rin1	99,9	11	0,2675	24,4
	Rin2	114,7	11	0,3240	25,7
	Rin3	111,3	11	0,3023	24,7
	Rin4	98,3	11	0,2608	24,6
	Rin5	92,2	11	0,2523	25,4
Jauhe 3	Rin1	103,2	5	0,7690	30,8
	Rin2	108	5	0,8217	31,4
	Rin3	106,4	5	0,7919	30,7
	Rin4	124	5	0,9735	33,1
	Rin5	97,2	5	0,6879	29,7
Jauhe 4	Rin1	99,7	11	0,3094	28,7
	Rin2	102,5	11	0,2573	23,2
	Rin3	116,9	11	0,2971	23,5
	Rin4	128	11	0,3316	24,4
	Rin5	101,7	11	0,2508	23,3
Jauhe 5	Rin1	90,5	11	0,2675	27,2
	Rin2	99,7	11	0,3140	29,0
	Rin3	85,5	11	0,2223	23,9
	Rin4	89	11	0,2394	25,2
	Rin5	88,6	11	0,2613	27,7
Jauhe 6	Rin1	97,9	11	0,5158	48,8
	Rin2	96,5	11	0,5218	50,1
	Rin3	108,3	11	0,5765	49,3
	Rin4	109,6	11	0,5637	48,5
	Rin5	111,5	11	0,5807	49,1

Liite 3. Kontrollinäytteiden mittaustulokset

TAULUKKO 12. Kontrollinäytteet

Maissi	Punnittu (mg)	Laimennoskerroin	Absorbanssi	Tärkkelys (g/100g)
1	94,1	11	0,9026	87,25
2	93,4	11	0,86415	84,19
3	45,8	11	0,4276	84,42
4	43,1	11	0,4088	85,79
5	43,9	11	0,41275	85,04
6	59,2	11	0,55155	84,08
7	76,3	11	0,715627	84,25
8	41,6	11	0,394677	85,22
9	54,4	11	0,512077	84,56
10	51,5	11	0,490177	85,5
11	43	11	0,434791	91,2
12	35,6	11	0,347441	88,02
13	37,1	11	0,362641	88,16
14	49,8	11	0,493782	88,74
15	63,2	11	0,627382	88,84
16	57,9	11	0,576832	89,16
17	94,9	11	0,934445	88,44
18	92,1	11	0,894445	87,23
19	44	11	0,431795	88,15
20	52,2	11	0,509345	87,64
21	106,5	11	1,003977	84,71
22	97,3	11	0,907577	83,82
23	93,6	11	0,874377	83,94
24	98,8	11	0,984682	88,49
25	113,3	11	1,099732	86,18
26	108,8	11	1,057882	86,33
27	102,6	11	0,95095	85,2
28	102,7	11	0,95575	85,54
29	85,8	11	0,83055	88,11
30	100,7	11	0,95685	88,15
31	84,2	11	0,75765	82,35
32	80,8	11	0,7263	83,85
33	79,1	11	0,73815	85,93
34	76,3	11	0,69855	85,92
35	96,8	11	0,9305	88,99
36	86	11	0,82655	90,69