

LAPPEENRANNAN TEKNILLINEN YLIOPISTO
Teknillinen tiedekunta
LUT Kemia
Kemian laboratorio
BJ10A0102 Kandidaatin työ ja seminaari

MUSTIKKAMEHUN VALMISTUSPROSESSIT

Bilberry juice manufacturing processes

Tekijä: Maria Hakala
Tarkastaja: Professori Heli Sirén
5.6.2013

Symboliluettelo

A	Absorbanssi, -
a	näytteen absorptiviteetti, L/(gcm)
c	näytteen konsentraatio, g/L
D	Dipolimomentin arvo, Debye
$i.d.$	kapillaariputken halkaisija, μm
l	kyvetin pituus, cm
L_{ef}	kapillaariputken efektiivinen pituus, cm
m/z	näytteen massa/varaus- suhde, -
$MWCO$	Molecular Weight Cut Off, Da
T	Lämpötila, $^{\circ}\text{C}$
t_{inj}	näytteen injektointiaika, s
V	Jännite, kV
λ_d	detektointi allonpituus, nm

Lyhenneluettelo

CE	kapillaarielektroforeesi
DAD	Diode array detector
ESI	Electrospray ionization
$HPLC$	High-performance liquid chromatography
$UV-Vis$	Ultraviolet-visible spectroscopy

Sisällys

1.	Johdanto	2
2.	Mustikka	3
3.	Tuotantoprosessi	5
3.1.	Esikäsittely	5
3.2.	Mehun puristus.....	7
3.3.	Kirkastus	7
3.4.	Suodatus	8
3.5.	Konsentroidi.....	9
3.6.	Pastörinti	9
4.	Analytiikka	10
4.1.	Nestekromatografia.....	10
4.2.	Kapillaarielektroforeesi.....	12
4.3.	UV-Vis	14
4.4.	Massaspektrometria	15
5.	Kokeellinen osa	16
6.	Näytteiden valmistus ja käytetyt menetit	16
7.	Tulokset	18
8.	Johtopäätökset.....	23
	Lähteet	25

1. Johdanto

Ihmiset ovat nykyään tietoisempia ruuastaan ja siitä mitä se sisältää. Luonnonmarjat ovat siten tulleet taas kiinnostaviksi terveysvaikutteidensa vuoksi. Marjoista valmistettujen tuotteiden sisältöä on tutkittu viimeaikoina tämän vuoksi runsaasti. Prosessointitavat vaikuttavat siihen, miten marjoissa esiintyvät herkästi antioksidantit säilyvät lopputuotteeseen asti. Uusia esikäsittelymenetelmiä on kehitetty, jotta kaikki terveysvaikutteiset yhdisteet säilyisivät mahdollisimman hyvin.

Varsinaisen kiinnostuksen kohteena on flavonoidit. Flavonoidit voidaan jakaa seuraaviin ryhmiin: flavanoneihin, flavanononeihin, flavanonoleihin, flavoleihin, flavan-3-oleihin, isoflavoneihin ja antosyanideihin. Jaottelu eri ryhmiin tapahtuu yhdisteen rakenteen perusteella. Antosyaanit taas ovat antosyanidien glykosideja ja asyyliklykosideja. Tässä työssä esiteltävät flavonoidit kuuluvat flavonoleihin ja antosyanideihin. [13,14]

Tässä työssä esitellään mustikkamehun valmistusprosessi ja se miten prosessointi vaikuttaa mustikassa esiintyviin antosyaaneihin. Kuten yleensä prosesseja on monia erilaisia ja varsinaisesti mustikalle ei erityistä omaa prosessia ole. Työssä onkin tämän vuoksi esitelty muiden marjojen mehun valmistukseen käytettävistä prosesseista koottu yksi prosessi. [3,4,6,9] Tässä työssä oletetaan, että mustikka on samankaltainen marja prosessoitavana kun mustaherukka, joten suuri osa prosesseista, joita käytetään mustaherukkamehun valmistukseen, on sovellettu myös mustikkamehun valmistukseen. Työssä käsitellään myös analytiikka, jolla näiden kyseisten yhdisteiden olemassaoloa voidaan seurata.

2. Mustikka

Yleisesti Suomen metsissä esiintyvä mustikka (*Vaccinum myrtillus*) on puolukan sukuinen varpukasvi (kuva 1). Mustikan marjat ovat pyöreitä ja yleensä väritykseltään sinisiä, koska niitä peittää ohut vahakerros. Vahakerroksen puuttuessa mustikat voivat olla väriltään mustia. [1]

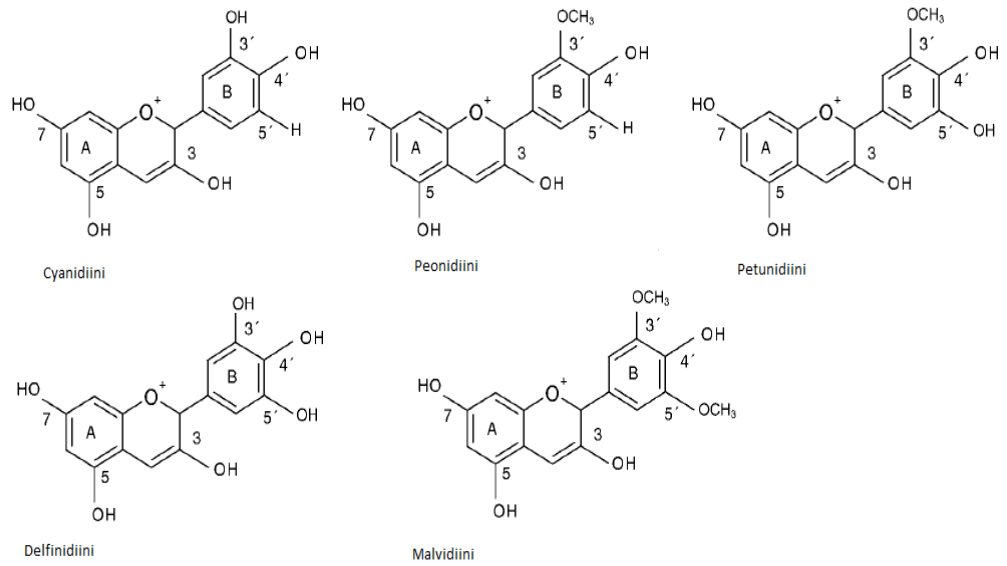


Kuva 1 Mustikka (*Vaccinum myrtillus*) [1]

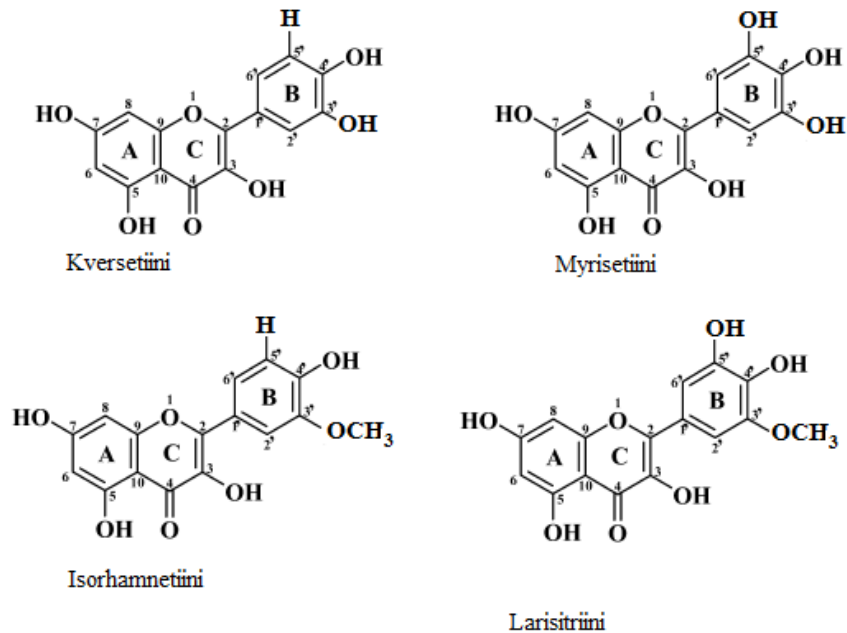
Mustikoita kerätään metsistä yksityiseen käyttöön sekä sellaisenaan myyntiin. Osa kuitenkin prosessoidaan eri tuotteiksi, kuten mehuksi ja hilloiksi. Mustikassa tiedetään olevan paljon ihmisen terveydelle hyödyllisiä aineita. Mielenkiinto mustikkaa kohtaan on kasvanut maailmalla merkittävästi viime aikoina. Kiinnostus on lähinnä kohdistunut antosyaaneihin, jotka ovat tutkimusten mukaan merkittävimpiä terveysvaikuttavia aineita mustikassa. Antosyaanikompositiota on tutkittu muun muassa viidellätoista eri antosyaanien glukosideilla. [2]

Antosyanidit ovat pH riippuvaisia ja niiden väri vaihtelee sinisestä punaiseen. Mustikassa esiintyviä antosyanideja ovat delfinidiini, syanidiini, petunidiini, peonidiini, ja malvinidiini. Nämä esiintyvät yleensä yhdistyneinä galaktoosiin, glukoosiin ja arabinoosiin. Perusrakenteet ovat esitetty kuvassa 2. Mustikoista on havaittu myös muitakin flavonoideja kuin antosyaaneja. Flavonoleista kversetiinin, myrisetiinin, isorhamnetiinin ja laristiriinin glukosideja, galaktosideja, arabinosideja, ksylosideja ja glukuronideja on saatu eristettyä ja tunnistettua mustikasta. Näiden rakenteet on esitetty kuvassa 3. Flavonolien ja

antosyaanien määrä mustikoissa riippuu kasvupaikasta ja monesta eri ympäristötekijästä. [8]



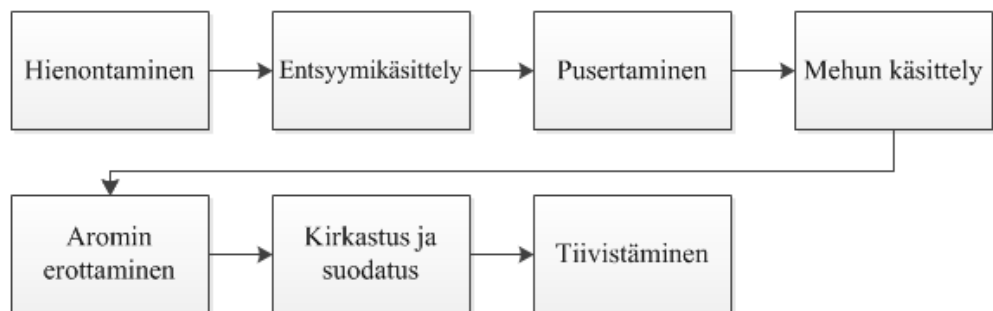
Kuva 2 Antosyanidien rakennekaaviot [2]



Kuva 3 Flavonolien rakenne kaaviot [8]

3. Tuotantoprosessi

Mehun valmistusprosessi on riippuvainen, millaisesta marjasta tai hedelmästä mehua valmistetaan ja siitä, millaista mehuvalmistetta ollaan valmistamassa. Kuitenkin periaatteessa prosessi koostuu seitsemästä eri yksikköprosessista, jotka ovat esitetty kuvan 4 lohkokaaviossa. Seuraavissa kappaleissa on esitetty osaprosessit tarkemmin. [3]



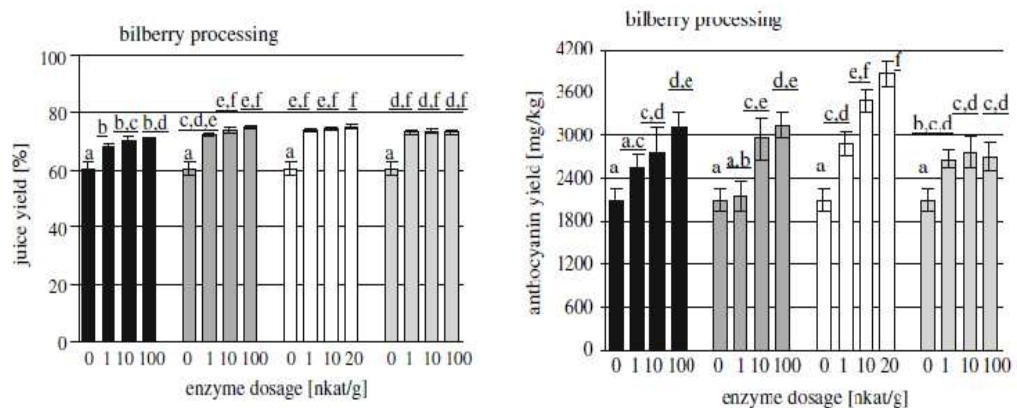
Kuva 4 Mehun valmistuksen yksikköprosessit

3.1. Esikäsittely

Mustikoiden kasvukausi on lyhyt ja niitä joudutaan kuljettamaan pikiäkin matkoja. Marjat pakastetaan, jolloin niiden käyttöaika pitenee ja laatu säilyy. Ennen prosessointia ne on sulatettava sopivaan lämpötilaan. Sulien marjojen rakenne rikotaan, jotta marjojen rakenteisiin sitoutunut mehu saataisiin hyödynnettyä. Toivottava puristamiseen soveltuva marjakoko on 5-8 millimetriä. Massan hajottamiseen on useita eri laitteita kuten vasaramylly, hiertomylly ja hiertomylly jauhalevyillä. Mustikalle tosin riittää myös marjojen hellävaraisempi murskaus, koska sen rakenne on hauraampi kuin esimerkiksi karpalon. [9]

Kasvin solurakenteista mehua ei saada mekaanisesti, jolloin on käytettävä esikäsittelyä. Yleisesti on käytetty entsyymikäsittelyä, joka hajottaa pektiiniä. Tällöin mehun saanti lisääntyy ja antioksidanttien saanti paranee. Pektini on kasvin ei-puumaisten osien soluseinämässä esiintyvä polysakkaridi, joka pitää kasvisoluja kiinni toisissaan. Marjojen kypsyessä vapautuu luonnostaankin pektiiniä hajottavia entsyymejä, jolloin marjojen rakenne heikkenee. Näitä samoja pektiiniä hajottavia entsyymejä, pektinaaseja, käytetään myös esikäsittelyssä.

Hajotetun marjamassan lämpötila entsyymikäsitelystä on noin 50 °C. Reaktioaika riippuu massassa olevan pektiinin määrästä. Pektiniin hajoamista voidaan seurata alkoholitestillä. Mikäli massassa on hajoamatonta pektiiniä jäljellä, alkoholin lisäys aiheuttaa massan hyytelöitymisen. Pektiniin hajottaminen helpottaa myöhemmässä vaiheessa mahdollisesti tehtävää kirkastusta, sillä pektiini aiheuttaa osittain mehussa esiintyvää sameutta. [3,9]



Kuva 5 Entsyymien lisäyksen vaikutus mehun saantoon eri entsyymipitoisuuksilla verrattuna antosyaanien saantoon eri entsyymipitoisuuksilla. Vasemmalta oikealle kuvaajassa mustalla Econase CE, tumman harmaalla Biopectinase CCM, valkoisella Pectinex Smash XXL, vaaleanharmaalla Pectinex BE 3-L. Kirjaimet a-f edustavat eri datasarjoja. (Koponen *et al* 2008) [6]

Entsyymikäsitelystä käytettäviä kaupallisia entsyymejä valmistavat muun muassa AB Enzymes (Suomi), Quest International Ireland (Irlanti) ja Novozymes (Tanska, Sveitsi). Aiemmissä tutkimuksissa on todettu, että entsyymien runsas lisääminen (1000 nkat/g marjamassaa) massaan parantaa mehun saantoa jopa 19 %. Vuonna 2008 tehdyssä tutkimuksessa Koponen *et al.* [6] on todennut, että vähäisemmälläkin määrällä (1 nkat/g marjamassaa) voidaan päästä samankaltaisiin tuloksiin. Kuvassa 5 on esitetty, miten eri pektinolyttiset entsyymit, kuten pektinaasi, vaikuttavat mustikoista saatavan mehun määrään. Koska entsyymit vaikuttavat kiintoaineen hajoamiseen, niiden määrän lisääminen ei oikeastaan vaikuta mehun saantoon. Kuten on oletettavaa, samoilla entsyymien lisäyksillä on kuitenkin suuri merkitys antosyaanien saantoon. [6]

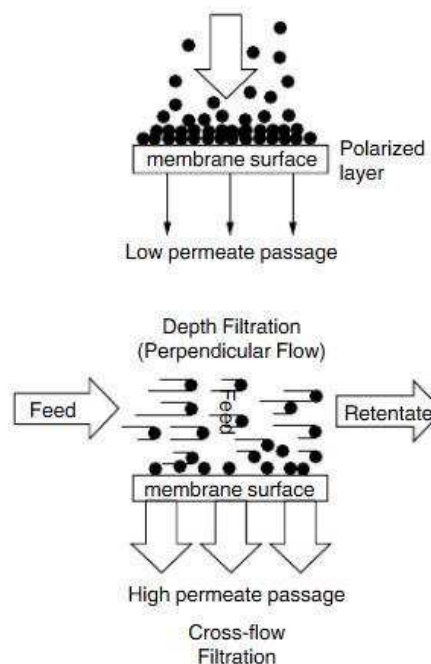
3.2. Mehun puristus

Tyypillinen tapa erottaa mehu massasta on puristaminen. Mehun puristamiseen marjoista käytetään tyypillisesti pneumaattisia puristimia, koska ne ovat hellävaraisempia verrattuna mekaaniseen puristimeen. Puristus voidaan tehdä esimerkiksi täryseulalla tai pyörivällä seulalla. Yleensä käytetään myös apuaineita, jotta mehu saadaan tehokkaasti poistettua marjoista. Normaalisti apuaineina käytetään selluloosakuituja ja riisin kuoria. [4,9]

3.3. Kirkastus

Puristetun mehun sameus johtuu suurimmaksi osaksi pektiinistä, jota esiintyy marjojen soluseinämässä. Myös puristusvaiheessa irtoava kiintoaine aiheuttaa sameutta. Mehun kirkastukseen käytetään erilaisia menetelmiä, jotka voivat olla fysikokemiallisia, mekaanisia tai näiden kahden yhdistelmä. Fysikokemialliset menetelmissä hyödynnetään mineraalisia kirkastusaineita, kuten piimaahappo tai bentoniitti. Yleisesti käytössä on myös luonnonmukaisia orgaanisia aineita, kuten gelatiinia tai orgaanisia polymeereja, kuten polyvinyylipolypyrrolidoni. Kaikkien toimintaperiaate perustuu kirkastukseen käytettävän aineen varautuneisuuteen. Materiaalien tulee olla elintarviketeollisuuden laatu- ja puhtausvaatimuksen täyttäviä materiaaleja. [4]

Ristivirtaussuodatuksella voidaan poistaa helposti ja tehokkaasti sameutta aiheuttavat yhdisteet. Membraanit, joilla suodatus toteutetaan, ovat yleensä ultrasuodatusmembraaneja. Näiden membraanien katkaisukoko (MWCO Molecular weight cut-off) voi olla 500-750 kDa. Valmistusmateriaaleja membraaneille on useita, esimerkiksi polyamidi, regeneroitu selluloosa tai polyeetterisulfoni. Kuvassa 6 on esitetty ristivirtaussuodatuksen periaate verrattuna suodatuksen kohtisuoralla virtauksella. [9]



Kuva 6 Ristivirtaus suodatuksen periaate verrattuna kohtisuoravirtaus suodatukseen [9]

Kohtisuorassa virtauksessa partikkelit jäävät kalvon pinnalle tukkeeksi. Membraanin pinta on yleensä heikosti varauksellinen. Nesteessä olevat ionisoituneet yhdisteet asettuvat membraanin pinnalle, ja näiden päälle taas muodostuu seuraava kerros. Tätä kutsutaan polarisoituneeksi kerrokseksi. Ristivirtaussuodatuksessa syöttö kulkee membraanin pinnan suuntaisesti horisontaalitasossa. Permeaatti kulkee paineen vaikutuksesta membraanin läpi ja retentaatti jatkaa membraanin suuntaisesti. Membraanin suuntainen virtaus estää molekyyliä jäämästä membraanin pinnalle tukkimaan huokokset. [9]

3.4. Suodatus

Suodatuksessa laitevalinnat perustuvat oletukseen, että suodatettavassa mehussa on olemassa lietekerros. Suodatuksissa voidaan käyttää apuaineina piidioksidia tai perliittiä. Näissäkin materiaalivalinnoissa on huomioitava, että apuaineiden tulee olla puhtaudeltaan elintarvikelaatua. Laitteina voidaan käyttää esimerkiksi jatkuvatoimista vakuumsuodatinta tai levysuodatinta. Uudempia vaihtoehtoja suodatukselle on viimeaikoina käytetyt ultra- ja mikro-suodatus. Membraanitekniikka voi myös mahdollistaa useampien vaiheiden yhdistämisen,

kuten suodatuksen, konsentroidin ja pastöroinnin yhdistämisen yhdeksi vaiheeksi. [4,9]

3.5. Konsentroidi

Suurin osa mehu tuotteista konsentroidaan varastointi- ja kuljetuskustannusten minimoimiseksi. Konsentroidinnissa on otettava huomioon aromi- ja väriaineiden säilyvyys, joka vaikuttaa prosessin valintaan. Perinteisesti haihdutus suoritetaan haihduttimilla, joissa käytetään höyryä lämmönsiirtoaineena. Höyry takaa hieman miedommat olosuhteet, jolloin tärkeiden aineiden hävikki olisi mahdollisimman pieni. Konsentroidi on myös mahdollista suorittaa menetelmillä, jotka vaikuttavat mehun koostumukseen vähemmän kuin perinteinen haihdutus. Näitä menetelmiä ovat konsentroidi jäädyttämällä tai membraanierotuksella. [4,9]

Konsentroidi jäädyttämällä

Suodatettu mehu jäädytetään vedessä nolla asteiseksi, jolloin vesi jäätyy ja muodostuneet kiteet voidaan erottaa seoksesta. Menetelmä ei kuitenkaan sovellu suodattamattomille mehuille, koska sameutta aiheuttava kiinteä aine joudutaan poistamaan yhdessä jääkiteiden kanssa. Menetelmä on myös kallis jäädyttämiseen tarvittavan energian vuoksi, joten se soveltuu ainoastaan mehuille, jotka ovat hyvin lämpöherkkiä. [4,9]

Konsentroidi membraanierotuksella

Hyödyntämällä membraanitekniikkaa mehujen konsentroidi ja sterilointi voidaan suorittaa käyttäen yhtä menetelmää, jolloin prosessia saadaan yksinkertaistettua. Suodattamalla mehu membraanin läpi voidaan erottaa bakteerit ja virukset, sekä samalla vähentää mehun vesipitoisuutta. [4,9]

3.6. Pastöroidi

Pastöroidi suoritetaan yleensä kuljettamalla mehu lämmönsiirtimen läpi, jolloin mehu kuumenee +88 - +90 °C lämpötilaan. Kuumentaminen kestää vain 3 minuuttia. Pastöroidin kuumentamalla soveltuu ainoastaan mehuille, joiden pH on maksimissaan 4. Myöskään lämpöherkille mehuille, kuten mustikkamehu, tämä ei välttämättä sovellu. Tällöin tarvitaan muita menetelmiä. Eräs

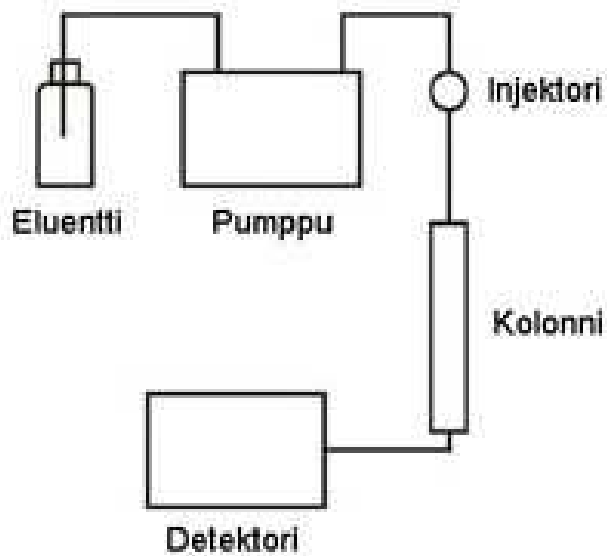
lämpöherkille materiaaleille soveltuva menetelmä on suodattaminen. Membraanit ovat tässäkin varteenotettava vaihtoehto, sillä niiden huokoskoko on tarpeeksi pieni suodattamaan bakteerit ja virukset. [4,9]

4. Analytiikka

Analytiikka jaetaan yleisesti kahteen osaan, erotukseen ja tunnistukseen. Tässä osiossa erotusta käsittelevät nestekromatografia ja kapillaarielektroforeesi ja tunnistusta UV-Vis ja massaspektrometria (MS).

4.1. Nestekromatografia

Yleinen menetelmä erottaa kasveista bioflavonoideja on korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC). Nestekromatografiassa näyte ja siitä tutkittavat komponentit ovat nestemäisessä muodossa. Liikkuva faasi, eli eluentti, voi olla vettä, puskuriliuosta ja/tai orgaanista liuotinta. Hienojakoisesta kiintoaineesta, jolla kolonni on pakattu, käytetään nimitystä stationaarifaasi. Kolonnimateriaalin avulla yhdisteet saadaan erilleen toisistaan. Tutkittavat yhdisteet vaikuttavat eluentin ja stationaarifaasin valintaan. Nestekromatografia voidaan jakaa normaalifaasinestekromatografiaan, jossa stationaarifaasi on liikkuvaa faasia poolisempi ja käänteisfaasikromatografiaan, jossa liikkuva faasi on poolisempi. Menetelmä perustuu liikkuvan faasin kuljettamien näytesyhdisteiden vuorovaikutukseen stationaarifaasin kanssa. Yhdisteet, jotka kiinnittyvät heikosti stationaarifaasiin, liikkuvat nopeasti kolonnin läpi, kun taas vahvasti kiinnittyvät yhdisteet viipyvät kolonnissa pidemmän aikaa. Nestekromatografiassa käytetään laitteeseen liitettyä detektoria, jolla tunnistetaan yhdistevyöhykkeet niiden erotuttua toisistaan. Tunnistus saadaan matemaattisesti ilmaistua kuvaajaksi, joka on nimeltään kromatogrammi. [5]



Kuva 7 HPLC laitteiston kaavionkuva [18]

Hedelmien ja marjojen polyfenoleja tutkittaessa käytetään pääasiassa käänteisfaasikromatografiaa. Mustikkamehun antosyaaneja ja polyfenoleja tutkittaessa gradienttieluutiosta käytetään muurahaishappoa ja asetonitriilistä ja metanolista valmistettuja seoksia (taulukko I). Asetonitriiliä käytetään osana liikkuvaa faasia sen dipolimomentin vuoksi. Asetonitriilin dipolimomentin arvo on 3,44 D, kun taas vedelle arvo on 1,87 D. Vesi on siis vähemmän ionista kuin asetonitriili. Muurahaishappo taas toimii haihtuvana pH:n muuttajana. Erotuksen aikana eluenttien suhdetta liikkuvassa faasissa muutetaan, jotta stationaarifaasista saadaan kaikki yhdisteet erottumaan ja kulkeutumaan detektorille. [6,7, 21]

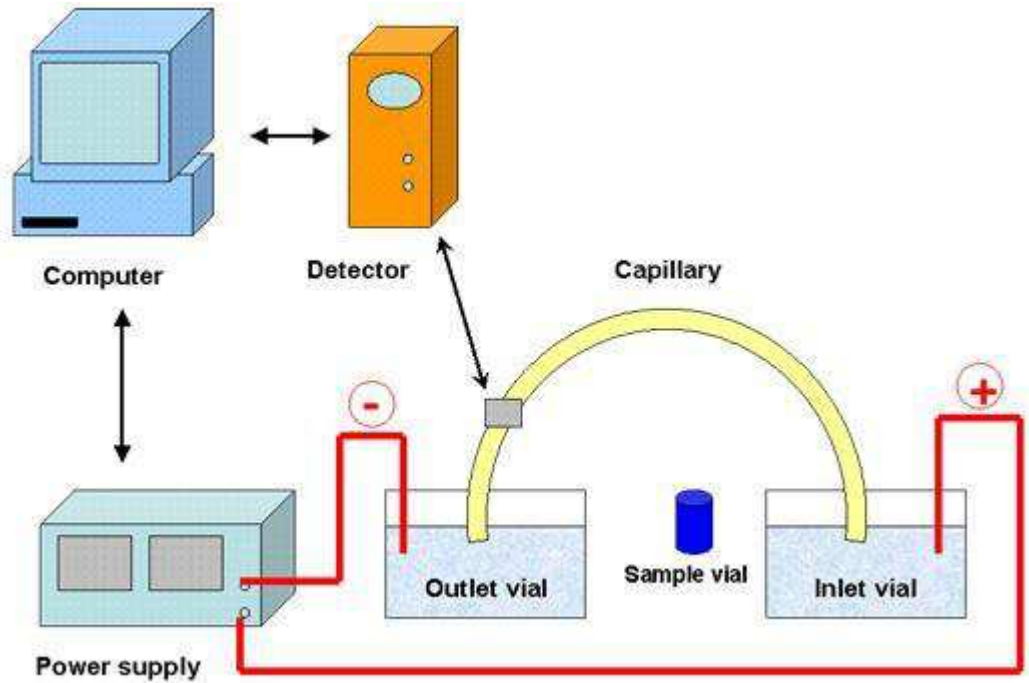
Taulukko I Kirjallisuudessa esitettyjä eri nestekromatografiamenetelmiä fenolisten yhdisteiden tunnistamiseen mustikasta [6,8,10]

Esikäsitely	Eluentit	Kolonne	Detektointi	Lähde
4.7 mL entsyymikäsitelty näyte, pH alennus < 1 HCl (50 µL, c(HCl 12 ml/L), suodatus 0,45 µm GH polypropyleeni-suodattimen läpi	A: 8,5 % (v/v) muurahaishappo B: asetonitriili: metanoli (85:15, v/v)	250x4,6 mm i.d., 5 µm LiChroCart Purospher Star RP-18e + 4x4 mm i.d. suojakolonne	520 nm	Koponen <i>et al.</i> [6]
Pakastekuivatut marjat (0,2700g), sekoitus eluenteilla (10% B, 90%A), sekoitus 1min, sonikointi 10min, sekoitus, sentrifugointi (4500 rpm, 5min, 4°C), uutto 3x2 mL, suodatus regeneroidun selluloosa-suodattimen läpi	A: 8,5 % (v/v) muurahaishappo B: asetonitriili: metanoli (85:15, v/v)	150x4,6 mm i.d., 5 µm Phenomenex Gemini + 4x3mm C-18 esikolonne	520 nm	Lätti <i>et al.</i> [10]
4.7 mL entsyymikäsitelty näyte, pH alennus < 1 HCl (50 µL, c(HCl 12 ml/L), suodatus 0,45 µm suodattimen läpi	A: 0,25 % (v/v) muurahaishappo B: asetonitriili: metanoli (85:15, v/v)	250x4,6 mm i.d., 5 µm LiChroCart Purospher Star RP-18e + 4x4 mm i.d. suojakolonne	360 nm	Koponen <i>et al.</i> [8]

4.2. Kapillaarielektroforeesi

Kapillaarielektroforeesia voidaan myös käyttää fenolisten yhdisteiden erottamiseen. Menetelmä perustuu näyteliuoksessa olevien dissosioituneiden ja dissosioitumattomien yhdisteiden elektro-osmoottiseen virtaukseen sähkökentässä kapillaariputkessa. Kuvan 7 mukaisesti kapillaarin päät ovat puskuriliuoksissa, joissa on eri varaukset. Näyte injektoidaan kapillaariin tietyn aikaa, joka on määritettävissä. Erotustehokkuuteen vaikuttavat lämpötila, kapillaariputken

pituus, sähkövirta, injektointi nopeus ja käytetyt puskurit. Erottavat komponentit detektoidaan esimerkiksi UV-Vis -menetelmällä. [11]



Kuva 8 Kapillaarielektroforeesilaitteiston toimintaperiaate [11]

Ehala *et al.* [12] on käyttänyt menetelmässään 50 g mustikoita, jotka on uutettu 100 mL metanoli/vesi liuokseen. Metanolia seoksessa on 70 % ja vettä 30 %. Tähän on vielä lisätty 1 % suolahappoa ja 20 mg L-askorbiinihappoa siten, että lopulliseksi määräksi on saatu 150 mL. Taulukossa II on esitetty menetelmässä käytetyt laiteparametrit.

Taulukko II Ehala *et al.* esittämän menetelmän laiteparametrien arvot flavonolien tunnistuksessa [12]

Laiteparametri	Symboli	Arvot laiteparametreille	Yksikkö
Detektointi alue	λ_d	210	nm
Jännite	V	20	kV
Lämpötila	T	25	°C
Kapillaarin halkaisija	i.d.	50	μm
Kapillaarin efektiivinen pituus	L_{ef}	39	cm
Injektointiaika	t_{inj}	20	s

Puskurina toimii 35 mM natriumtetraboraatti, jonka pH on 9,3. Tällä menetelmällä tunnistetut yhdisteet ovat trans-resveratrol, kanelihappo, klorogeenihappo, ferulahappo, p-kumariinihappo, kversetiini, (+)-katekiini ja kahvihappo. [12]

4.3. UV-Vis

UV-Vis -menetelmät perustuvat yhdisteiden absorboimaan valoon tietyllä aallonpituudella. Aallonpituus riippuu yhdisteelle ominaisesta väristä. Keskeinen osa UV-Vis menetelmän teoriaa on Lambert- Beerin laki, joka voidaan kirjoittaa yhtälön 1 muodossa

$$A = acl \quad (1)$$

jossa	A	absorbanssi, -
	a	absorbtiviteetti, L/(gcm)
	c	konsentraatio, g/L
	l	kyvetin pituus, cm

Menetelmää voi käyttää yksittäisten aineiden tunnistamiseen tai, kuten analysoinneissa usein, tunnistamaan useita yhdisteitä näytteestä. Useita yhdisteitä

sisältävistä näytteistä tunnistaminen tapahtuu spektristä, jossa eri yhdisteiden absorbanssit näkyvät piikkeinä. Menetelmä on yksinkertainen ja tarkka, koska yhdisteillä on niille ominaiset absorbanssialueet ja mittaukseen käytettävä aallonpituus voidaan rajata sen perusteella. UV-Vis -menetelmään on usein fenolisten yhdisteiden tunnistamisessa yhdistetty diodirivi-ilmaisim, jonka avulla yhdellä ajolla voidaan saada useita tuloksia. DAD-UV-Vis -menetelmä nestekromatografiaan yhdistettynä on tällä hetkellä käytetyin menetelmä, koska sillä on matalat kustannukset, se on herkkä ja erotustehokkuus on hyvä. [15,17]

4.4. Massaspektrometria

Massaspektrometrillä tunnistaminen perustuu menetelmässä tapahtuvaan kolmeen vaiheeseen, jotka ovat näytteen höyrystyminen, esiintyvien neutraalien molekyylien ionisoituminen ja syntyneiden ionien erottelu massa/varaus (m/z) -suhteen perusteella. Ionit johdetaan sähkökentän läpi magneettikenttään, jolloin niiden kulkusuunta kaartuu. Ionien massa vaikuttaa kaarteeseen suuruuteen ja siihen mihin kohtaan se osuu detektorilla. Massaspektrometrin detektori tunnistaa hiukkasen varauksen, kun se osuu siihen tai kulkee sen läpi. Nestekromatografian ja kapillarielektroforeesin yhteydessä massaspektrometriassa on käytetty sähkösumutus-ionisaatiota (ESI). Uutena tekniikkana on myös käytetty laserionisointia [16,17]

5. Kokeellinen osa

Kokeellisessa osassa tarkoituksena on tutkia mustikkamehusta ja pakastetuista mustikoista flavonoidien määrää. Mustikat ja mustikkamehu ovat ruokakaupasta ostettuja tuotteita. Mustikat ovat pakasteita, joita on esikäsitelty tuotannossa siten, että ne ovat turvallisia käyttää. Mustikkamehun tuotanto on esitetty kirjallisessa osiossa. Käsittelymenetelmät vaikuttavat flavonoidien määrään kummassakin tuotteessa.

Flavonoidien tutkimusmenetelminä toimivat kapillaarielektroforeesi ja nestekromatografia. Tutkittavat yhdisteet ovat kversetiini, delfinidiinikloridi ja pelargonidiinin 3-O-glukosidi. Näiden malliaineiden avulla mustikasta ja mustikkamehusta identifioidaan yhdisteet ja suoritetaan kvantifiointi. Saatuja tuloksia voidaan verrata kirjallisuudessa esiintyviin arvoihin.

6. Näytteiden valmistus ja käytetyt metodit

Analysointia varten valmistettiin delfinidiinikloridista, pelargonidiinin 3-O-glukosidikloridista ja kversetiinistä liuokset. Delfinidiinikloridi ja pelargonidiinin 3-O-glukosidi olivat Sigman valmistamia ja delfinidiinikloridi on HPLC laatua, jonka puhtaus on yli 97 %. Pelargonidiinin 3-O-glukosidikloridi on laadultaan analyttinen standardi. Näistä valmistettiin 100 ppm liuokset liuottamalla yhdisteet puhtaaseen metanoliin ja edelleen liuokset, joiden pitoisuudet olivat 25 ppm. Laimennokset tehtiin 20 % metanoli-vesiliuoksella. Kversetiinistä valmistettiin ensin 1000 ppm perusliuos puhtaaseen metanoliin. Tästä valmistettiin 25 ppm liuos laimentamalla 20 % metanoli-vesiliuokseen. Kalibrointisuoraa varten kversetiinistä valmistettiin liuokset, joiden pitoisuudet olivat 0,1 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm ja 25 ppm. Aluksi laimennokset tehtiin 20 % metanoli-vesiliuokseen, mutta kversetiini sakkautui jo mittapulloissa. Sakkautumisen estämiseksi tehtiin 70 % metanoli-vesiliuokseen.

Identifiointia varten mustikasta ja mustikkamehusta valmistettiin näytteet hyvin yksinkertaisesti: Pakastemustikat sulatettiin, murskattiin ja niistä kerätty neste suodatettiin 0,45 µm mikro-suodattimen läpi. Mustikkamehu myös suodatettiin mikro-suodattimen läpi partikkelien poistamiseksi. Kvantifiointia varten

valmistettiin 1:3 laimennokset, jotka tehtiin veteen. CE -analysointia varten valmistettiin puskuri, joka muodostui 10 mM natriumvetyfosfaatista ja 25 mM natriumtetraboraatista. Puskurin pH säädettiin arvoon 9,6 käyttämällä kiinteää natriumhydroksidia.

Kapillaarielektroforeesilla käytettiin kolmea eri menetelmää analysointiin. Menetelmät mukailivat Ren *et al.*[19] kehittämää menetelmää. Taulukossa III on esitettyä kaikkien muuttuvien laiteparametrien arvot eri analyyseissa erotuksen aikana.

Taulukko III Eri ajoissa käytetyt muuttuvat laiteparametrit

Laiteparametri	Symboli	Parametrin arvo			Yksikkö
Detektointi alue	λ_d	210	210	210	nm
Jännite	V	20	25	25	kV
Lämpötila	T	25	20	25	°C
Injektointi paine x aika	p x t	0,5x5	0,5x5	0,7x5	mbar x s

Nestekromatografiassa käytettiin MetaCarb87H kolonnia. Muut parametrit on esitetty taulukossa IV. Gradientiajo on nähtävissä taulukossa V.

Taulukko IV Ajossa käytetyt laiteparametrit ja eluentit

Parametri	Parametrin arvo	Yksikkö
Virtaus	0,7	mL/min
Eluentti	A: 0,1 M muurahaishappo B: Metanoli	% / %
Injektio-tilavuus	10	μ L
Lämpötila	30	°C
Detektointi-aallonpituus	270	nm

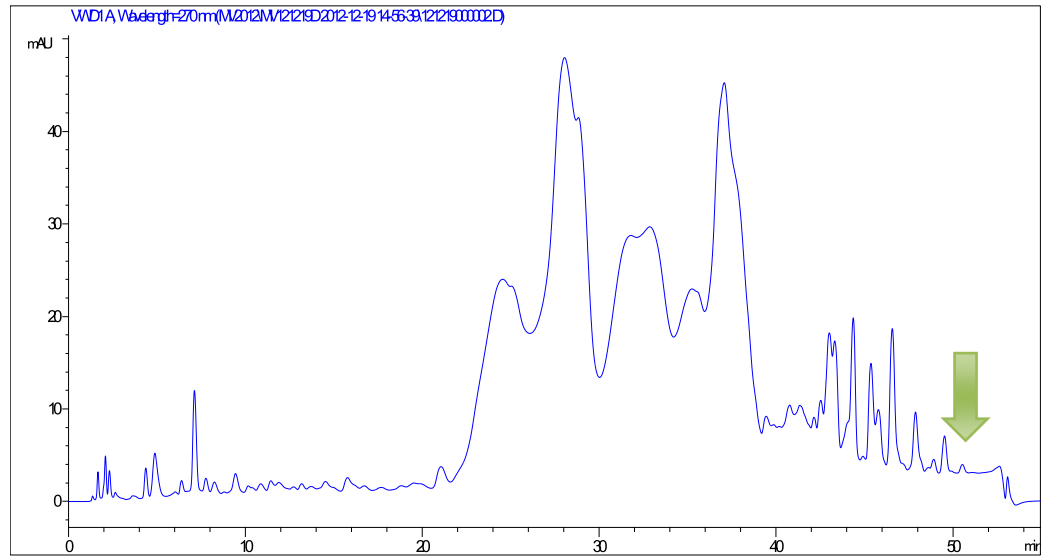
Taulukko V Gradienttiao

t, min	A, %	B, %
0	100	0
10	90	10
30	82	18
50	40	60
55	100	0

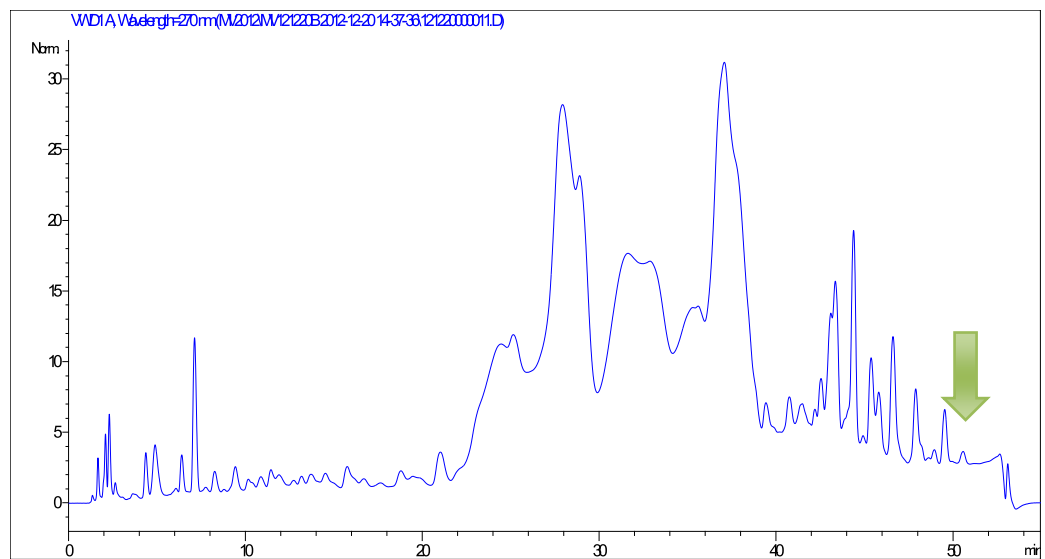
7. Tulokset

Kapillaarielektroforeesilla käytetty menetelmä perustui kirjallisuudesta saatuun menetelmään. Menetelmän testauksessa huomattiin ettei se ole täysin toimiva. Tämän vuoksi menetelmää muunneltiin taulukon III mukaisesti jännitettä, lämpötilaa ja injektointia säätelemällä. Tästä huolimatta CE:llä tehdyissä erotuksissa ei saatu riittävän hyviä tuloksia. Laitteessa esiintyi erinäisiä ongelmia ja ainoastaan merkkiaineista saatiin signaalit. Nämä piikit kuitenkin esiintyvät samalla alueella ja tämän lisäksi huomattiin, että vesi antaa samaan kohtaan piikin. Määrittystä haittaavien asioiden vuoksi oli todettava, että kapillaarielektroforeesi ei ollut tällä kertaa sovelias menetelmä. Tämän todettuani menetelmä vaihdettiin nestekromatografiseen menetelmään, jossa tunnistaminen tapahtui myös UV-Vis - spektrofotometrialla.

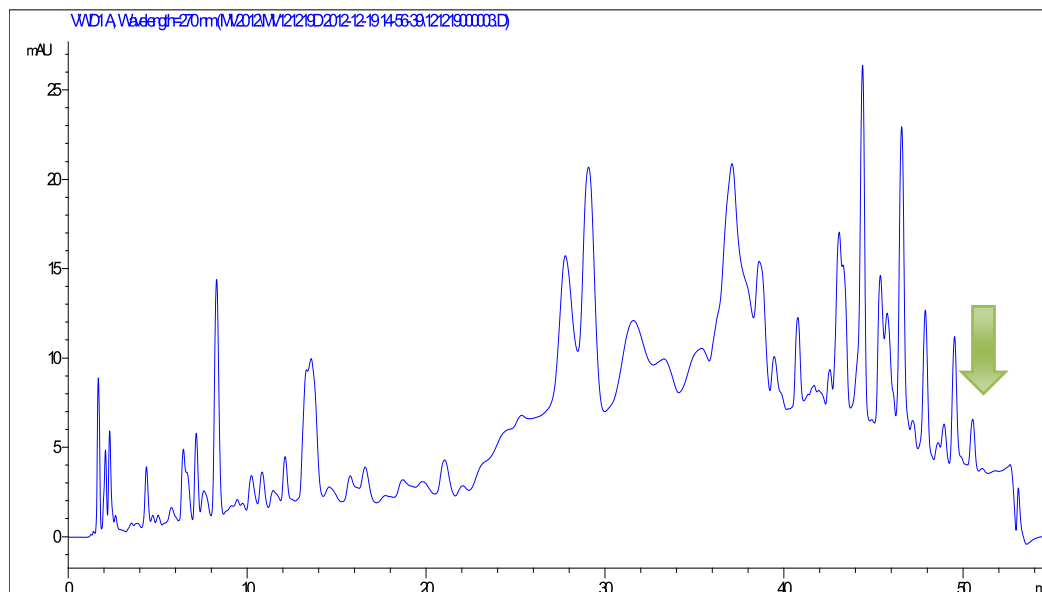
Ensimmäisillä ajoilla (kuvat 9 ja 11) voitiin jo huomata, että menetelmä toimi ja kuvaajaan saatiin piikkejä, joista oli mahdollista arvioida, mitä yhdisteistä mehussa ja itse mustikassa todennäköisesti on. Tunnistaminen oli kuitenkin delfinidiinikloridin ja pelargonidiinin 3-O-glukosidi kloridin kohdalla vaikeaa, koska piikit sijoittuivat kohdalle, jossa näytteissä esiintyy suuret määrät muitakin yhdisteitä. Kversetiini pystyttiin tunnistamaan ja näytteissä esiintyvä yhdiste oli hyvin erottunut muista, joten se pystyttiin myös kvantifioimaan. Kuvassa 10 on laimennetusta mustikasta saatu kromatogrammi ja kuvassa 12 taas laimennetusta mustikkamehusta saatu kromatogrammi. Kuvissa kversetiini esiintyy noin 50 minuutin kohdalla.



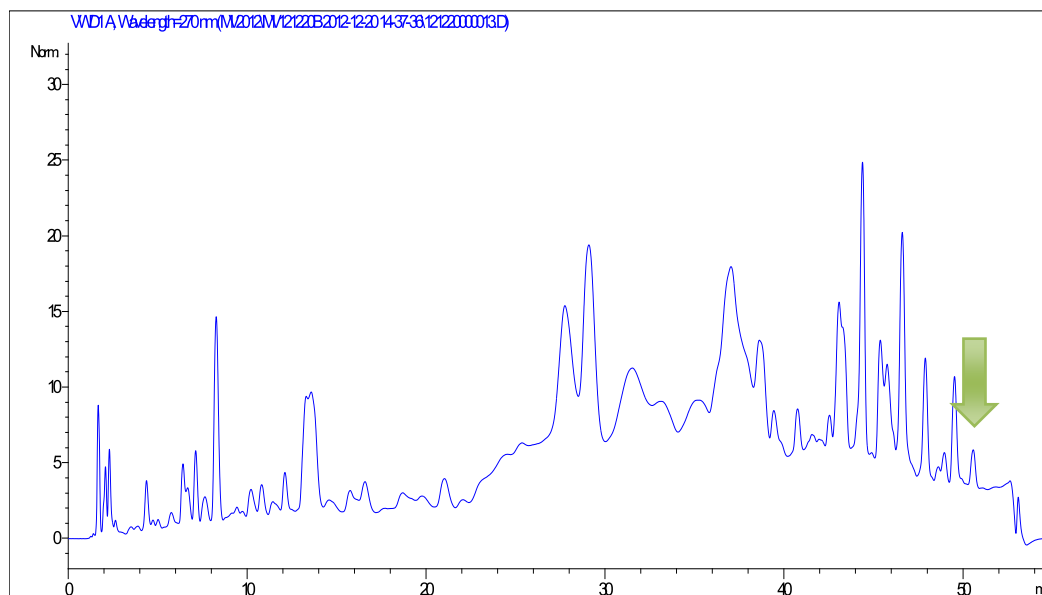
Kuva 9 HPLC kromatogrammi mustikasta. Kversetiinin aiheuttama piikki nuolen osoittamassa kohdassa.



Kuva 10 HPLC kromatogrammi laimennetusta mustikasta. Käytetty laimennussuhde 1:3. Kversetiinin aiheuttama piikki nuolen osoittamassa kohdassa.

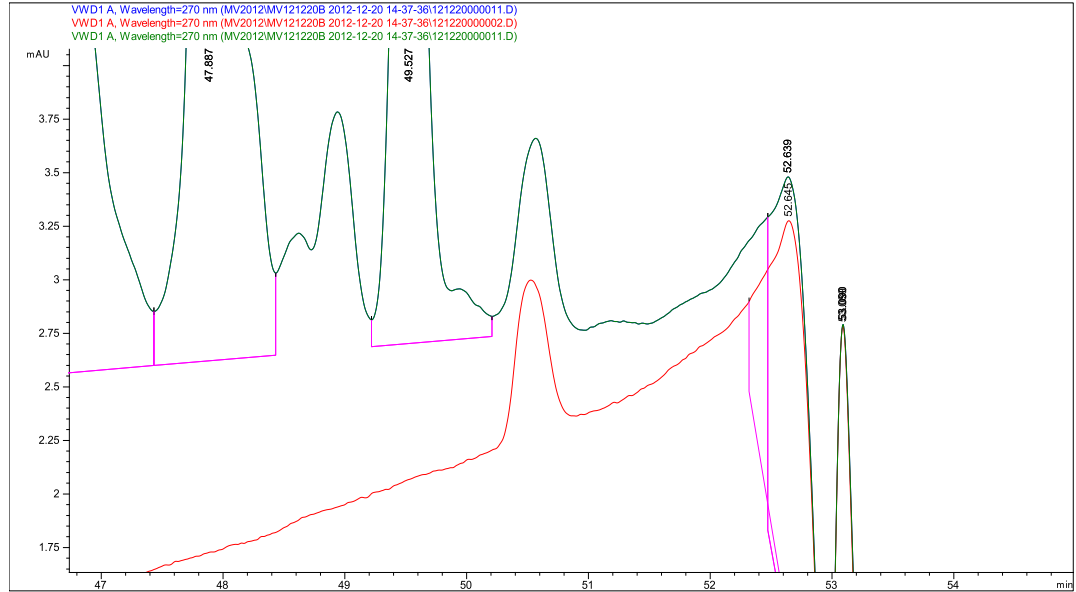


Kuva 11 HPLC kromatogrammi mustikkamehusta. Kversetiinin aiheuttama piikki nuolen osoittamassa kohdassa.

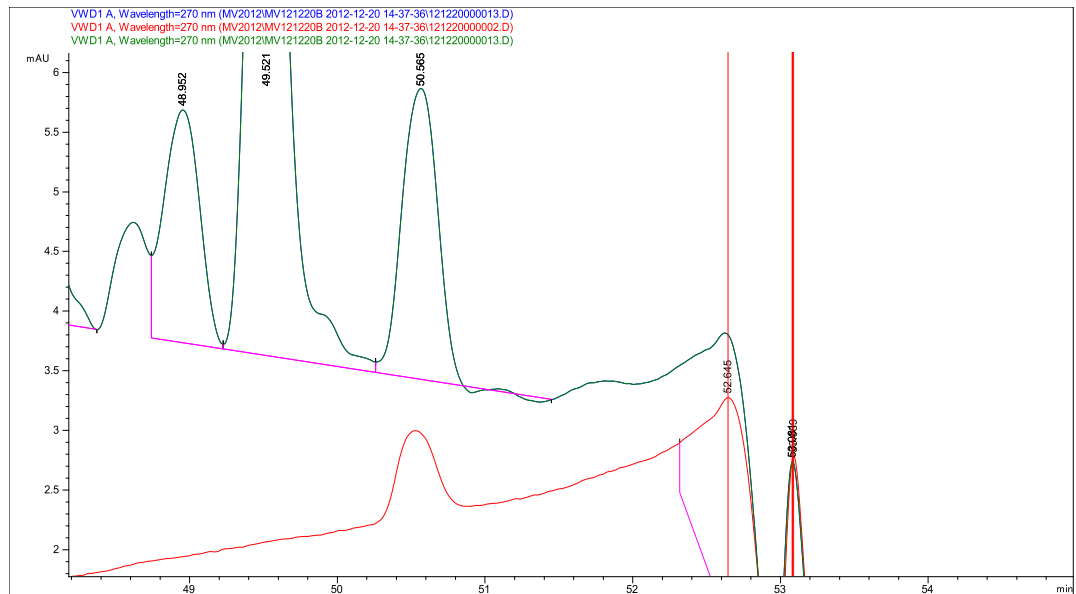


Kuva 12 HPLC kromatogrammi laimennetusta mustikkamehusta. Käytetty laimennussuhde 1:3. Kversetiinin aiheuttama piikki nuolen osoittamassa kohdassa.

Kuvista 13 ja 14 on nähtävissä kversetiinin tunnistus laimennetusta mustikasta ja mustikkamehusta. Tunnistus suoritettiin 0,1 ppm kalibrintiliuoksella, joka oli laimennettu 70 % metanolilla.



Kuva 13 Kromatogrammit mustikasta (vihreä) ja kversetiinistä (punainen).



Kuva 14 Kromatogrammi laimennetusta mustikkamehusta (vihreä) ja kversetiinistä (punainen). Käytetty laimennosuhde 1:3.

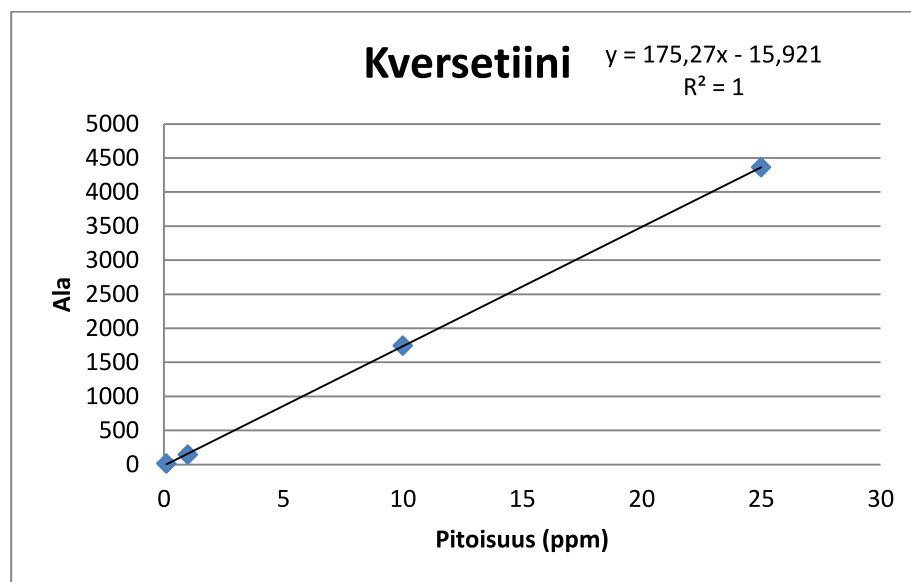
Kversetiinin määrä pystyttiin määrittämään kalibrointisuoran avulla, joka oli tehty viidellä eri pitoisuudella 0,1 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm ja 25 ppm. Taulukossa IV on nähtävissä rinnakkaisajojen piikkien pinta-alat ja niiden keskiarvot. Pitoisuus 5 ppm kuitenkin väärästi suoraa siten, että tulokset olivat negatiiviset. Kun tämä piste poistettiin suoralta, tulokset vastasivat saatuja kromatogrammissa esiintyvien piikkien pinta-aloja. Liuoksesta, jossa on kversetiinia 1 ppm, on ainoastaan yksi arvo, koska ajoja suoritettaessa pullojen paikat vaihtuivat. Tulos

on kuitenkin verrattu aikaisempien ajojen tuloksiin ja luku on verrattavissa kyseisiin arvoihin.

Taulukko VI Kversetiinin kalibroitiluoosten pitoisuudet, mitatut alat ja alojen keskiarvot

Pitoisuus (ppm)	Ala	Alan keskiarvo
0,1	12,7	
	12,6	12,65
1	143,5	
		143,5
5	1076,6	
	1075,2	1075,9
10	1743,4	
	1744,2	1743,8
25	4364,8	
	4362,4	4363,6

Kuvassa 15 kversetiinin kalibroitisuora taulukon VI arvojen perusteella.



Kuva 15 Kversetiinin kalibrointisuora pitoisuuksilla 0,1 ppm, 1 ppm, 10 ppm ja 25 ppm

Suoran avulla lasketut pitoisuudet on esitetty taulukossa VII.

Taulukko VII Kalibrointisuoran avulla lasketut kversetiinipitoisuudet

Näyte	Kversetiinin Ala	Kversetiinin Alan keskiarvo	Pitoisuus (ppm)	Laimennos	Todellinen pitoisuus (ppm)
Mustikka	15,6			3 ml/10 ml	
	12,6	14,1	0,17		0,6
Mustikkamehu	40,1			3 ml/10 ml	
	39,8	39,95	0,32		1,1

Tuloksien perusteella mustikassa ja mustikkamehussa on kversetiiniä hyvin vähän. Mustikassa 0,6 ppm ja mustikkamehussa 1,1 ppm. Tulokset ovat yhteneväiset saatujen kromatogrammien kanssa.

8. Johtopäätökset

Tarkoituksena kokeellisessa osassa oli tutkia mustikkamehusta ja pakastetuista mustikoista flavonoidien määrää kapillaarielektroforeesilla ja nestekromatografialla. Tutkittavat yhdisteet ovat kversetiini, delfinidiinikloridi ja pelargonidiini 3-O-glukosidikloridi. Näiden malliaineiden avulla mustikasta ja mustikkamehusta identifioitiin yhdisteet ja suoritettiin kvantifiointi.

Kapillaarielektroforeesille kirjallisuuden perusteella löytyi yksi menetelmä, joka ei kuitenkaan soveltunut kuin kversetiinin erottamiseen ja tunnistamiseen. Tämän vuoksi käytettiin toista menetelmää, joka ei varsinaisesti soveltunut mustikalle, mutta sillä on pystytty aikaisemmin erottamaan ja tunnistamaan flavonoideja muista marjoista. Tuloksia tällä menetelmällä ei saatu, koska laitteessa ilmeni ongelmia ja menetelmä ei ollut soveltuva. Menetelmää tulee kehittää mustikkamehulle sopivaksi, jolloin aiheen tutkimista tulisi jatkaa.

Nestekromatografialla sitä vastoin pystyttiin onnistuneesti tunnistamaan ja kvantifioimaan kversetiiniä. Muutkin flavonoidit olisivat mahdollisesti olleet tunnistettavissa, mutta ei kvantifioitavissa. Kirjallisuuden perusteella nestekromatografia on erittäin soveltuva menetelmä tähän tarkoitukseen ja sillä on pystytty tunnistamaan hyvinkin tarkasti eri flavonoideja. Mustikoista saadut tulokset ovat pieniä verrattuna kirjallisuudessa esitettyihin arvoihin. Tähän vaikuttaa esimerkiksi se, että kaupoissa myytävät pakastemustikat säteilytetään

ennen pakkaamista niiden desinfiointiseksi. Lisäksi näytettä ei esikäsitelty mitenkään, joten piikki on jäänyt pieneksi. Sopivalla esikäsitteilyllä yhdisteet voisi saada selkeämmin esille.

Garzón *et al.* on tutkinut mustikoista muun muassa kversetiinin osuutta. Tutkimuksessaan he toteavat, että suomalaisissa mustikoissa flavonoidien määrä on 11,2 mg/ 100 g tuoreita marjoja. Tästä määrästä 72 % eli 8,2 mg/ 100 g tuoreita marjoja on kversetiiniä ja sen eri muotoja. [20] Mittauksissa pakastemustikalle saatiin kversetiinin määräksi 0,6 mg/L. Tämä arvo ei ole suoraan verrattavissa Garzón *et al.* tuloksiin, sillä mitattua tulosta ei pystytä esittämään samassa yksikössä. Lisäksi flavonoidien määrä riippuu monista eri tekijöistä, esimerkiksi kasvupaikasta ja käsittelystä tuotannossa. Tässä työssä käytetyt mustikat olivat pakastemustikoita, jotka ovat tuotannossa käsitelty turvallisiksi, esimerkiksi säteilyttämällä. Tämä saattaa vaikuttaa mustikoiden flavonoidipitoisuuteen. Mustikkamehusta ei varsinaisesti ole yksittäisiä tuloksia kversetiinin määrästä kirjallisuudessa. Tällaisissa tuotteissa keskitytään fenolisten aineiden kokonaismäärään. Mehussa kuitenkin esiintyi kversetiiniä enemmän kuin mustikassa. Tähän vaikuttaa mehun prosessointi, jossa kiinnitetään enemmän huomiota flavonoidien talteenottoon. Kuten kirjallisessa osassa on esitetty, entsyymikäsitteily mehunvalmistuksessa esikäsitteilynä on parantanut mehujen flavonoidipitoisuuksia. Tästä syystä pitoisuudet voivatkin olla suhteutettuna suurempia mehussa kuin pakastemustikassa.

Lähteet

1. Arktisetaromit, mustikka, saatavilla:
<http://www.arktisetaromit.fi/fi/arktiset+aromit/marjat/luonnonmarjat/mustikka/>, viitattu 28.12.2012
2. Lätti A.,K., Riihinen K. R., Kainulainen P. S., Analysis of Anthocyanin variation in wild populaiton of bilberry (*vaccinum myrtillus L.*) in Finland; *Journal of Agricultur and Food Chemistry*; 2008, 56 (190-196)
3. Saarela A.-M., Määttä S., Hyvönen P., von Wright A., *Elintarvikeprosessit, Savonia-ammattikorkeakoulu*, 2005, 186-190
4. Vatai, G., *Separation technologies in the processing of fruit juices, Separation, extraction and concentration processes in the food, beverage and nutraceutical industries*, 2010 s. 381-394, Knovel
5. Huikko K., *Bioflavonoidien ja ellageenihapon nestegromatografinen määrittäminen marjoista, kasviksista ja hedelmistä, Pro Gradu –tutkielma, Helsingin yliopisto*, (1997)
6. Koponen J.M., Buchert J, Poutanen K.S, Törrönen A.R., Effect of pectinolytic juice production on the extractability and fate of bilberry and blackberry anthocyanins, *European Food Technology* 2008, 227(485-494)
7. Haminiuk C.W.I., Maciel G.M., Plata-Oviedo M.S.V., Peralta R.M., Invited review Phenolic compounds in fruits- an overview, *International Journal of Food Science and Technology* 2012, 47 (2023-2044)
8. Koponen J.M., Happonen A.M., Auriola S., Kontkanen H., Buchert J, Poutanen K.S., Törrönen R.A., Characterization and Fate of Black Currant and Bilberry Flavonols in Enzyme-Aided Processing, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56 (3136-3144)
9. Barrett, D.,M., Somogyi, L., Ramaswamy, H., *Processing fruits science and technology* 2nd edition, CRC Press, 2005, s. 73-96
10. Lätti, A.K., Riihinen, K.R., Kainulainen, P.S., Analysis of anthocyanin variation in wild populations of bilberry (*Vaccinium myrtillus L.*) in Finland, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56 (190-196)
11. Petre, C.F., Alkaline oxidation of hydrosulfide and methyl mercaptide by iron/cerium oxide-hydroxide in presence of dissolved oxygen. Possible application for removal of Total Reduced Sulfur (TRS) emissions in the

- Pulp & Paper industry, 2007, saatavilla <http://archimede.bibl.ulaval.ca/archimede/fichiers/24330/apa.html>, Viitattu 28.12.2012
12. Ehala, S., Vaher, M., Kaljurand, M., Characterization of Phenolic Profiles of Northern European Berries by Capillary Electrophoresis and Determination of their Antioxidant Activity, *Journal of agricultural and food chemistry*, 2005, 53 (6484-6490)
 13. Pietta, P.-G., Flavonoids as antioxidants, *Journal of natural products*, 2000, 63 (1035-1042)
 14. Hou, Z., Qin, P., Zhang, Y., Cui, S., Ren, G., Identification of anthocyanins isolated from black rice (*Oryza sativa* L.) and their degradation kinetics, *Food research international*, 2011, 50 (691-607)
 15. Denney, R.C., Visible and ultraviolet spectroscopy, 1987, John Wiley&sons s. 1-21,
 16. Howe, I., Williams, D.H., Bowen, R.,D., Mass spectrometry principles and applications, 2nd ed. 1981, s. 1-25
 17. Haminiuk, C.W.I., Maciel, G.M., Plata-Oviedo, M.S.V., Peralta, R.M., Invited review Phenolic compounds in fruits – an overview, *International Journal of Food Science and Technology* 2012, 47 (2023–2044)
 18. Laine A., Polaaristen yhdisteiden analytiikkaan soveltuvat nestekromatografia-massaspektrometria-menetelmät, Pro gradu -tutkielma, Jyväskylän yliopisto, 2009
 19. Ren, Z.-Y., Zhang, Y., Shi, Y.-P., Simultaneous determination of nine flavonoids in *Anaphalis margaritacea* by capillary zone electrophoresis, *Talanta*, 2009, 78 (959-963)
 20. Garzón, G.A., Narváez, C.E., Riedl, K.M., Schwartz, S.J., Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale* Swartz) from Colombia, *Food Chemistry*, 2010, 122 (980-986)
 21. R. Stenutz, Tables for chemistry, Dipole moment, 2013, saatavilla <http://www.stenutz.eu/chem/solv28.php>, Viitattu 21.5.2013