

LAPPEENRANNAN TEKNILLINEN YLIOPISTO
TEKNILLINEN TIEDEKUNTA
LUT KEMIA
Kemiantekniikan koulutusohjelma
Soveltavan kemian laboratorio
Kandidaatin työ

PUNAVIININ FLAVONOIDIEN TUNNISTAMINEN

TYÖN TEKIJÄ: Pia Anttila
TYÖN TARKASTAJA JA OHJAAJA: Dosentti, TkT Tuomo Sainio

SISÄLLYS

JOHDANTO	2
1 FLAVONOIDIT	3
1.1 Ominaisuudet.....	3
1.2 Jaottelu.....	4
1.2.1 Flavonolit.....	5
1.2.2 Antosyaniinit.....	6
1.2.3 Katekiinit.....	7
1.2.4 Flavonit.....	9
1.2.5 Flavanonit.....	10
1.2.6 Muut flavonoidit.....	11
1.3 Merkitys ihmiselle	11
2 FLAVONOIDIEN TUNNISTUSMENETELMIÄ	13
2.1 Tunnistukseen vaikuttavat ominaisuudet.....	13
2.2 Tunnistusmenetelmät.....	14
2.2.1 Kaasukromatografia.....	15
2.2.2 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia.....	17
2.2.3 Kapillaarielektroforeesi.....	19
2.2.4 Massaspektrometria.....	21
2.2.5 Ydinmagneettinen resonanssispektrometria.....	22
2.3 Tunnistusmenetelmien vertailu.....	23
3 PUNAVIININ FLAVONOIDIT	27
3.1 Punaviini.....	27
3.2 Flavonoidipitoisuudet	30
3.3 Flavonoidien saanti punaviinistä	33
4 PUNAVIININ FLAVONOIDIEN TUNNISTAMINEN	33
4.1 Tunnettujen flavonoidien tunnistaminen	34
4.2 Tuntemattomien flavonoidien tunnistaminen	37
YHTEENVETO	39
LÄHDELUETTELO	41

JOHDANTO

Työn tarkoituksena on tutustua flavonoidien kemiallisiin ominaisuuksiin ja rakenteeseen, niiden esiintymiseen punaviinissä, punaviinin valmistusprosessin eri vaiheisiin ja käytetyimpiin flavonoidien tunnistusmenetelmiin.

Kappaleessa 1 käsitellään flavonoideja yleisesti kemiallisten yhdisteiden näkökulmasta keskittymällä erilaisten flavonoidien jaotteluun ja jaotteluperiaatteisiin niiden rakenteen ja ominaisuuksien mukaan. Tarkoituksena on myös löytää erilaisille flavonoideille parhaimpia ja ihmisille helposti saatavilla olevia ravintolähteitä. Kappaleessa tutkitaan myös flavonoidien pitoisuuksia ja niiden mahdollisia terveysvaikutuksia sekä niiden muita merkityksiä ihmisen hyvinvoinnille.

Kappaleessa 2 tutustutaan erilaisiin flavonoideille soveltuviin ja yleisesti käytettyihin tunnistusmenetelmiin, kaasukromatografiaan, korkean erotuskyvyn nestekromatografiaan ja kapillaarielektroforeesiin sekä käytetyimpiin spektrometriisiin menetelmiin, massaspektrometriaan ja ydinmagneettiseen resonanssispektroskopiaan. Kappaleessa 3 tutustaan työssä tutkittavaan näytteen, punaviinin, valmistusprosessiin ja käsitellään tarkemmin punaviinistä aikaisemmin löydettyjä flavonoideja ja niiden pitoisuuksia punaviinissä. Kappaleessa 4 selvitetään kuinka punaviinin flavonoidien tunnistaminen käytännössä tapahtuu kun tunnistettavista flavonoidiyhdisteitä on tehty perusteltava hypoteesi tai kun tunnistettavat flavonoidiyhdisteet ovat ennestään tuntemattomia.

1 FLAVONOIDIT

Flavonoidit ovat kasvien kevytrakenteisia aineenvaihduntatuotteita, jotka muodostuvat kasvisolujen flavonoidisynteeseissä. Ne voidaan jakaa kuuteen erilaiseen alaryhmään rakenteensa perusteella. Niillä on myös monia ihmisen terveydelle ja hyvinvoinnille tärkeitä ominaisuuksia.

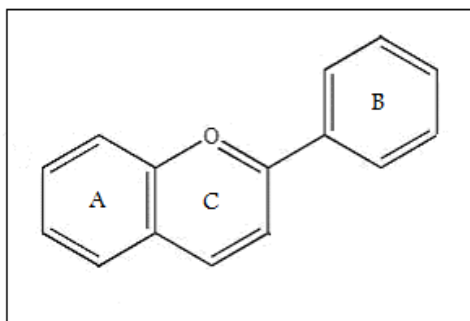
1.1 Ominaisuudet

Flavonoidit ovat kasvien kevytrakenteisia aineenvaihduntatuotteita, joita kasvit tuottavat suojellakseen itseään mm. sienitauteja, viruksia ja bakteereja vastaan. Flavonoidit ovat fenolisia yhdisteitä, jotka muodostavat yhdessä muiden fenoliyhdisteiden kanssa fytokeemikaalien ryhmän, johon kuuluvat flavonoidien lisäksi fenolihapot, fenoliset polymeerit, lignaanit ja stilbeenit. Flavonoideja esiintyy yleisesti kaikkialla kasvukunnassa, jossa antavat kukille, hedelmille ja marjoille niille omaisen värin maun ja rakenteen. Ne myös suojaavat kasveja auringon liialliselta UV-säteilyltä, eläimiltä ja tuhohyönteisiltä. /1/

Flavonoidit muodostuvat kasvisoluissa yleisen fenyylipropanoidien synteessin ja spesifisten jatkobiosynteesien myötä fenyylialaniinista para-kumariinihapoksi ja tämän kautta flavonoideiksi entsyymien avustuksella. Muita fenyylipropanoidien synteessin jatkotuotteita ovat mm. lignaanit ja ligniinit. Synteessin valontarpeen takia suurimmat flavonoidipitoisuudet sijaitsevat kasvien lehdistä ja muista maanpäällisistä kasvin osista. Poikkeuksena edellä mainittuun muodostaa sipuli, jossa flavonoideja on runsaasti myös maanalaisessa sipuliosassa. Flavonoidit voivat sijaita myös kasvin rasvaliukoisessa osassa sytoplasmassa. /1, 2, 3, 4/

Eläinkunnassa flavonoideja ei esiinny, sillä eläinsolut ovat kykenemättömiä syntetisoimaan niitä itse. Luonnosta on löydetty yli 8000 erilaista flavonoidiyhdistettä, joiden lukumäärää kasvattaa flavonoidien esiintyminen glykosideina eli sokerijohdannaisina. Tällöin yhdisteen flavonoidiosaan on liittynyt sokeriyhdiste, tavallisimmin glukoosi, galaktoosi, arabinoosi, ramnoosi tai rutinoosi. Flavonoideja esiintyy pieniä määriä myös vapaina aglykoneina, eli sokeriosattomina flavonoideina sekä metyylijohdannaisina. /2, 3, 5/

Kaikkein flavonoidiryhmien yhdistävä tekijänä on niiden perusrakenne C6-C3-C6-kolmoisrengas, difenyylipropaani, joka on esitettyä Kuvassa 1. Kaikki flavonoidit rakentuvat perusrakenteen mukaisesti koostuen kahdesta bentseenirenkaasta A ja B, joita yhdistää happea sisältävä heterosyklinen rengas C ja alaryhmästä ja flavonoidiyhdisteestä riippuva, vaihteleva määrä hydroksyyliiryhmiä. Eroavaisuudet eri flavonoidialaryhmien välillä löytyvät erilaisesta heterosyklisestä renkaasta ja alaryhmien sisällä hydroksyyliiryhmien määrästä. Heterosyklisellä renkaalla ja sen mahdollisella sokeriosalla on myös suuri vaikutus flavonoidien ominaisuuksiin, sillä glykosidinen ryhmä aiheuttaa suurimmassa osassa flavonoidialaryhmiä niiden vesiliukoisuuden. /2/

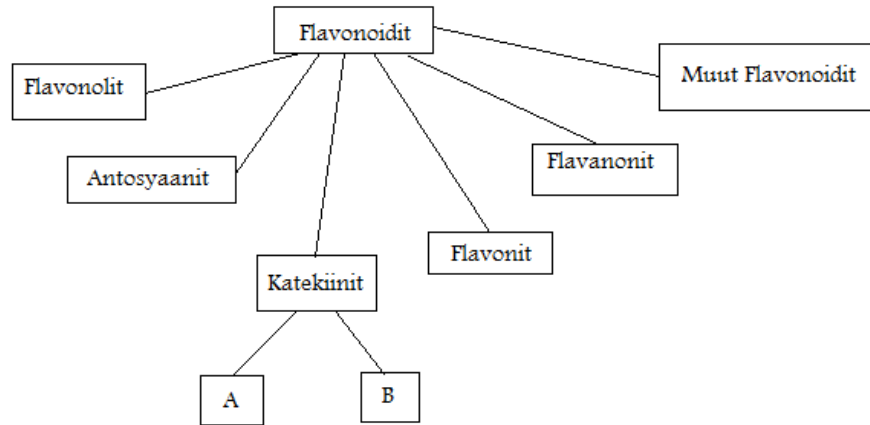


Kuva 1. Flavonoidiyhdisteiden perusrakenne C6-C3-C6- kolmoisrengas. /2/

Pitkälle hapettuneet flavonoidit, kuten flavanonit, flavonit, flavonolit ja suurin osa antosyaaniineista, kestävät suhteellisen hyvin lämpöä, kuivuutta, happea ja happamuutta, joka mahdollistaa kyseisiä yhdisteitä sisältävien elintarvikkeiden prosessoinnin ja käytön ruuanlaitossa flavonoideja tuhoamatta. Flavonoidit tuhoutuvat kuitenkin suhteellisen nopeasti valon vaikutuksesta, mikä on huomioitava flavonoideja sisältävien raaka-aineiden kuljetuksessa ja varastoinnissa sekä varsinkin niiden analysoinnissa punaviinistä. /2/

1.2 Jaottelu

Flavonoidit voidaan jaotella eriävien rakenteittensa perusteella erilaisiin alaryhmiin, joiden määrä vaihtelee riippuen jaotteluperusteesta. Tavallisesti alaryhmien määrä vaihtelee 5-12 välillä. Jatkossa jaotellaan flavonoidit kuuteen (6) erilaiseen alaryhmään: flavonolit, antosyaanit katekiinit, flavonit ja flavanonit sekä "muut flavonoidit", jotka eivät rakenteensa puolesta kuulu viiteen edellä mainittuun alaryhmään. Jaottelu on esiteltyä Kuvassa 2.

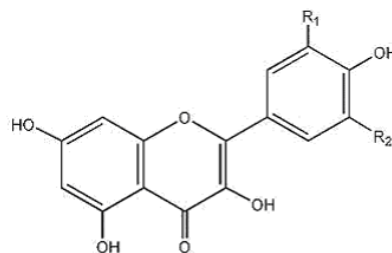


Kuva 2. Flavonoidien jaottelu kuuteen alaryhmään rakenteensa perusteella

Jaottelu perustuu tarkoitukselle luoda selkeä kuva juuri punaviinistä löytyville flavonoideille ja esitellä pintapuolisesti myös muita luonnosta löytyviä flavonoideja. Yhdistävä tekijä kaikille viidelle ensimmäiselle ryhmälle on OH-ryhmän rooli yhdisteen C-renkaassa (Kuva 1). Jatkossa esitellään kuuden flavonoidiryhmän perusrakennetta, ryhmään kuuluvia flavonoideja, ryhmän ominaisuuksia ja pyritään löytämään jokaiselle ryhmälle parhaimmat flavonoidilähteet. /1/

1.2.1 Flavonolit

Flavonolit ovat vaaleankeltaisia huonoliukoisia yhdisteitä, joiden C-renkaan C3:ssa on ei-fenolinen OH-ryhmä sekä kaksoissidos C2:n ja C3:n välissä. Flavonolit esiintyvät mono-, di- tai triglykosideina. Flavonolien ryhmään kuuluvat mm. kversetiini, kemferoli ja myriseteiini. Kuvassa 3 on esiteltyä flavonolien perusrakenne, jossa R1 ja R2 nimikkeet kuvaavat erilaisia funktionaalisia ryhmiä /2, 6, 7/



Kuva 3. Flavonolien perusrakenne /2, 8/

Eri flavonolit eroavat funktionaalisilta ryhmiltään, joka on esiteltyä Taulukossa I. Rakenteeltaan eroavat funktionaaliset ryhmät sijaitsevat kuitenkin samoissa kohdissa kaikissa eri antosyaaneissa. Flavonoleissa toistuvat funktionaaliset ryhmät ovat antosyaanien tapaan – H, -OH ja – OCH₃ ryhmät. Funktionaaliset ryhmät sijaitsevat myös samoissa kohdissa flavonoidien perusrakennetta, mutta erona antosyaaneihin flavonolien heterosyklisen renkaan happiatomi ei ole positiivisesti varautunut, kuten antosyaaneilla. /2, 8/

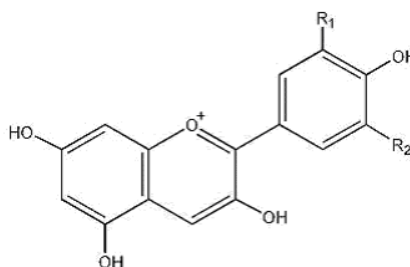
Taulukko I. Erilaisten flavonolien rakenne-eroavaisuudet /2, 8/

	R ₁	R ₂
Kemferoli	H	H
Kverseteeni	OH	H
Myriseteiini	OH	OH
Isoramnetiini	OCH ₃	H

Flavonolit ovat yleisiä kasvien lehdistä, kukissa, hedelmissä ja marjoissa. Erityisesti niissä kasveissa, joissa on vähän flavoneja, flavonolien määrä on huomattava. Flavonolien esiintymistä suurina pitoisuuksina on pidetty merkinä kasvin fylogeneettisestä primitiivisyydestä, koska niitä esiintyy tasaisesti kasvin eri osissa ja koska niillä ei ole erikoistuneita tehtäviä kuten flavoneilla. Tärkeimmät lähteet flavonoleille ovat sipuli, juolukka, tyrni, karpalo, tee ja punaviini. /2, 6, 7/

1.2.2 Antosyaniinit

Antosyaniineihin kuuluu useita eri flavonoideja, kuten syanidiini, delfinidiini, pelargonidiini, peonidiini, petunidiini ja malvidiini. Kuvassa 4 on esiteltyä antosyaanien perusrakenne, jossa R₁ ja R₂ nimikkeet kuvaavat erilaisia funktionaalisia ryhmiä /7, 8/



Kuva 4. Antosyaanien perusrakenne /8/

Eri antosyaanit eroavat funktionaalisilta ryhmittään, joka on esiteltynä Taulukossa II. Rakenteeltaan eroavat funktionaaliset ryhmät sijaitsevat kuitenkin samoissa kohdissa kaikissa eri antosyaaneissa. Antosyaniineissa toistuvat funktionaaliset ryhmät ovat – H, -OH ja – OCH₃ ryhmät. /7/

Taulukko II. Erilaisten antosyaniinien rakenne-eroavaisuudet /7/

	R ₁	R ₂
Pelargonidiini	H	H
Syanidiini	OH	H
Delfinidiini	OH	OH
Petunidiini	OCH ₃	OH
Malvidiini	OCH ₃	OCH ₃

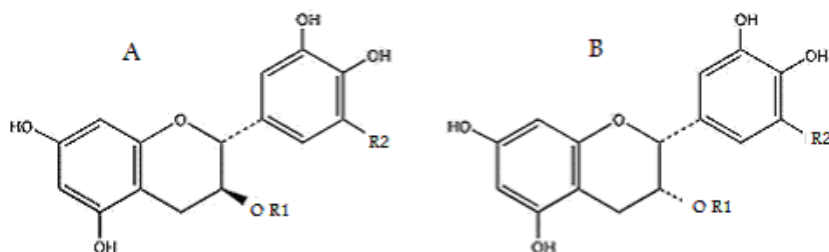
Antosyaniinien helpoiten havaittavain ominaisuus on niiden vesiliukoisina väriaineina toimiminen marjoissa. Tämä näkyy tumman sinisenä, punaisena tai mustana värityksenä marjojen pinnoilla ja sisäosissa. Väriaineet myös houkuttelevat hyönteisiä ja muita eläimiä mahdollistaen pölyttymisen ja kasvien siementen levityksen. Väritykseltään antosyaanit ovat ainutlaatuisia, sillä muiden flavonoidien väritys on lähempänä keltaista kuin antosyaniinien tummempia sävyjä. /2, 5, 6/

Antosyaanien ihmiselimestölle tärkein ominaisuus on niiden antioksidanttina toimiminen. Käytännössä antosyaanit estävät ihmisen soluissa tapahtuvaa hapettumista. Antosyaniinien tutkimuksen yhteydessä on myös huomattu niiden positiivinen vaikutus syöpäsolujen kasvun estämisessä. Kasveista on löydetty tähän mennessä yli 200 erilaista antosyaania, joista noin 70 erilaisista hedelmistä. /1, 6/

1.2.3 Katekiinit

Katekiinit, toiselta nimeltään flavan-3-olit, ovat värittömiä ja vesiliukoisia, hapelle herkkiä yhdisteitä. Ne ovat määrällisesti suurin flavonoidiryhmä vihreissä kasveissa. Esimerkiksi kuivatusta teeledistä jopa kolmannes (30 %) on monomeeristä katekiinia. Muita tärkeitä lähteitä ovat suklaa ja punaviini. Katekiinit eivät esiinny kasveissa glykosyloituneina tai metyloituneina, mutta voivat esteröityä gallihapon kanssa. Kasveista on tunnistettu yli kymmenen (10) erilaista katekiinia. Katekiinien alaryhmään kuuluvat mm. katekiini,

gallokatekiini, epikatekiini, epikatekiinigallaatti ja epigallokatekiinigallaatti. Kuvassa 5 on esiteltyä katekiinien kaksi perusrakennetta, joissa R1 ja R2 nimikkeet kuvaavat erilaisia funktionaalisia ryhmiä /2, 7/



Kuva 5. Katekiinien perusrakenne /8/

Katekiinit voidaan jakaa kahteen ryhmään, jotka ovat esiteltyinä kuvassa T osina A ja B. Kahden ryhmän välinen ero on niiden toisen funktionaalisen ryhmän sidos perusflavonoidirakenteeseen. Eri katekiinit eroavat funktionaalisilta ryhmiltään muiden ryhmien tapaan. Katekiinien välisiä eroavaisuuksia on esiteltyä Taulukossa III. /8/

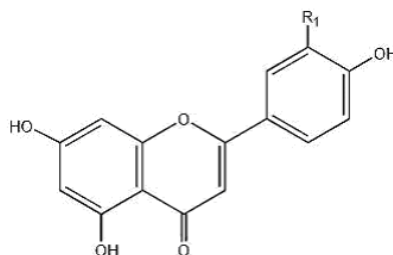
Taulukko III. Erilaisten katekiinien rakenne-eroavaisuudet /8/

		R1	R2
Ryhmä A	Katekiini	H	H
	Gallokatekiini	H	OH
Ryhmä B	Epikatekiini	H	H
	Epigallokatekiini	H	OH
	Epikatekiinigallaatti	Gallihappo	H
	Epigallokatekiinigallaatti	Gallihappo	OH

Rakenteeltaan eroavat funktionaaliset ryhmät sijaitsevat samoissa kohdissa kaikissa eri katekiineissa. Katekiineissa toistuvat funktionaaliset ryhmät ovat H- ja OH- ryhmät sekä gallihappo. Verrattaessa katekiinien rakennetta esimerkiksi antosyaaneihin, havaitaan funktionaalisten ryhmien sijainnissa samankaltaisuutta (R2 funktionaalinen ryhmä), mutta myös selkeää eroavaisuutta (R1 funktionaalinen ryhmä). Heterosyklisen renkaan happiatomi ei ole positiivisesti varautunut, kuten antosyaaneilla vaan varaukseton kuten flavonoleilla. /2, 8/

1.2.4 Flavonit

Flavonit ovat vaaleankeltaisia yhdisteitä, joita on kukkien terälehdissä, lehdistä, siemenissä ja hedelmissä. Niissä on kaksoissidos C-renkaassa C2:n ja C3:n välissä, mutta ei OH-ryhmää C3:ssa. Flavonit esiintyvät tavallisesti 7-Oglykosideina. Flavonien alaryhmään kuuluvat mm apigeniini ja luteoliini. Kuvassa 6 on esiteltyä flavonien perusrakenne, jossa R1 ja R2 nimikkeet kuvaavat erilaisia funktionaalisia ryhmiä /2, 7/



Kuva 6. Flavonien perusrakenne

Eri flavonit eroavat funktionaalista ryhmältään, joka on esiteltyä Taulukossa IV. Eroavaisuutena muihin edellä mainittuihin flavonoidialaryhmiin, flavoneilla on vain yksi vaihtuva funktionaalinen ryhmä. Kyseinen ryhmä sijaitsee samassa kohdassa flavonoidirakennetta, kuin antosyaanien, flavonolien ja katekiinien vaihtuva ryhmä, mutta erotuksena kyseisiin ryhmiin, flavoneilla on vain yksi funktionaalinen ryhmä. Flavonolien ja katekiinien tapaan flavonien heterosyklisen renkaan happiatomi on varaukseton. Toistuvat funktionaaliset ryhmät flavoneissa ovat – H ja -OH ryhmät. /8/

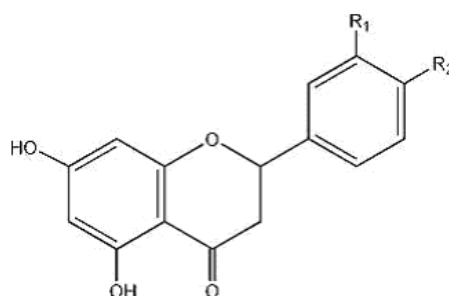
Taulukko IV. Erilaisten flavonien rakenne-eroavaisuudet /8/

	R ₁
Apigeniini	H
Luteoliini	OH

Tärkeitä lähteitä ovat lehtiselleri, paprika, persilja, timjami. Hedelmissä niitä on vähän; poikkeuksen muodostavat sitrushedelmät, joissa on metoksyloituja flavoneja. Flavonit edustavat korkeamman asteista flavonoidituotantoa kuin primitiivisemmät flavonolit. Lehtivihanneksissa voivat sisältää yllättävän korkeita flavonipitoisuuksia, jopa 7 % kuivapainosta. /2, 7/

1.2.5 Flavanonit

Flavanonit ovat vaaleankeltaisia tai värittömiä veteen liukenemattomia yhdisteitä. Flavoneista ne eroavat siten, että niissä on tyydyttynyt sidos C2:n ja C3:n välillä. Ruoassa niitä on pääasiassa sitruhedelmissä. Flavanonit esiintyvät tavallisesti diglykosideina, joissa C7:än OH-ryhmään on liittynyt rutinoosi tai neohesperidoosi. Flavanonien alaryhmään kuuluvat mm. naringeniini ja hesperetiini. Kuvassa 7 on esiteltyä flavanonien perusrakenne, jossa R1 ja R2 nimikkeet kuvaavat erilaisia funktionaalisia ryhmiä /7/



Kuva 7. Flavanonien perusrakenne. /8/

Eri flavanonit eroavat funktionaalisilta ryhmiltään muiden ryhmien tapaan. Eroavaisuuksia flavanonien välillä on esiteltyä Taulukossa V. Rakenteeltaan eroavat funktionaaliset ryhmät sijaitsevat samoissa kohdissa kaikissa eri flavanoneissa. /8/

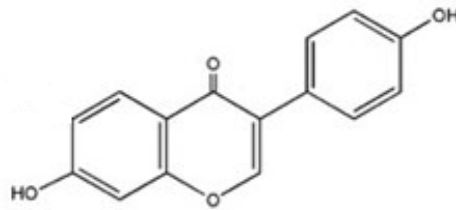
Taulukko V. Erilaisten flavanonien rakenne-eroavaisuudet /8/

	R ₁	R ₂
Naringeniini	H	OH
Eriodiktyoli	OH	OH
Hesperetiini	OH	OCH ₃

Toistuvat funktionaaliset ryhmät flavanoneissa ovat antosyaanien tapaan – H, -OH ja OCH₃ ryhmät. Verrattaessa flavanonien rakennetta esimerkiksi flavoleihin, flavoneihin ja antosyaaneihin, havaitaan funktionaalisten ryhmien sijainnissa samankaltaisuutta (R1 funktionaalinen ryhmä), mutta myös selkeää eroavaisuutta (R2 funktionaalinen ryhmä). R2 funktionaalisen ryhmän sijainti on lisäksi ainutlaatuinen verrattuna muihin flavonoideihin. Heterosyklisen renkaan happiatomi ei ole positiivisesti varautunut, vaan varaukseton kuten kaikilla muilla edellä mainituilla flavonoideilla pois lukien antosyaaneilla. /8/

1.2.6 Muut flavonoidit

Edellä mainittuihin viiteen (5) flavonoidiryhmään rakenteensa perusteella kuulumattomat flavonoidit voidaan eritellä omaksi ryhmäkseen, muiksi flavonoideiksi. Muihin flavonoideihin kuuluvat mm. isoflavonoidit, flavaanit, kalkonit, dihydrokalkonit, dihydroflavonolit ja auronit. Isoflavonoideja on tunnistettu yli 800 erilaista, joten Kuvassa 8 on esiteltynä muiden flavonoidien esimerkkirakenteena isoflavonoidin perusrakenne. /1, 5/



Kuva 8. Isoflavonoidin (muut flavonoidit) perusrakenne /8/

Isoflavonoidi eroaa, muiden flavonoidien tapaan, viidestä edellä mainitusta ryhmästä rakenteensa perusteella kuten Kuvasta 8 voidaan todeta. Isoflavonoidissa B-rengas on liittyneenä C-renkaan eri hiileen kuin muissa aikaisemmissa flavonoideissa. Useimmat kasvit eivät pysty syntetisoimaan niitä ja tämän vuoksi niiden esiintyvyys erilaisessa kasveissa on lukumäärältään vähäisempi /1/

Huolimatta isoflavonoidin käytöstä esimerkkirakenteena, muiden flavonoidien rakenteet ovat hyvin erilaisia eikä niille kaikille voida osoittaa suuria yhtäläisyyksiä ryhmän sisällä. Muiden flavonoidien flavonoidiryhmä on muodostettu puhtaasti huomioimaan se tosiasia, että flavonoideja on selkeästi enemmän kuin viidessä aikaisemmassa mainitussa ryhmässä mainitut. /1, 5/

1.3 Merkitys ihmiselle

Flavonoidit ovat olleet viime vuosina suosittuja tutkimuskohteita. Huolimatta 1970-luvun terveyttä uhkaavista tuloksista, on nykyään saatu myös näyttöä flavonoidien terveysvaikutteista ja niiden tärkeydestä ihmisen elimistön toiminnalle. Huolimatta terveysvaikutuksistaan, flavonoidien riittävä saanti ei

kuitenkaan ole turvattu keskimääräisessä ihmisravinnossa vaan se vaatii oikeanlaisen ruokavalion täyttyäkseen.

Flavonoidit osallistuvat elimistöön käytettäväksi päästessään moniin ihmisellekin tärkeisiin biologisiin reaktioihin, kuten mm. solujen antioksidanteina. Antioksidanteina ne sieppaavat vapaita radikaaleja ja estävät vapaiden radikaalien muodostumista sitomalla metalleja, kuten kuparia, sinkkiä ja rautaa. Ne ovat myös kemiallisesti reaktiivisia ja pystyvät siten sitoutumaan makromolekyyleihin, kuten entsyymeihin, muihin proteiineihin ja DNA:han. Ne vaikuttavat solukalvojen läpäisevyyteen ja aineiden aktiiviseen kuljetukseen kalvojen läpi ja myös inhiboivat lukuisten entsyymien toimintaa ja vaikuttavat siten ihmisen aineenvaihduntaan. Monien terveyteen positiivisesti vaikuttavien ominaisuuksiensa takia flavonoideja kutsutaan myös P-vitamiineiksi korostamaan niin merkitystä ihmisen hyvinvoinnille. /1, 2, 3/

Elintarvikkeista saatavien fenolihydrideiden tutkimuksesta on tullut entistäkin tärkeämpää aiempien tutkimuksien antaessa viittauksia ihmiselle positiivisista terveysvaikutuksista. Tämänkaltaisia vaikutuksia ovat mm. veren antioksidanttisuuden suurentaminen, LDL-kolesterolin hapettumisen vähentäminen, solujen DNA:n hapetusvaurioiden vähentäminen, verihituleiden sakkautumistaipumuksen vähentäminen, verisuonten endoteelin toiminnan parantuminen, verenpaineen alentuminen, energia-aineenvaihdunnan tehostuminen, erityisesti rasvojen palamisen tehostuminen. Flavonoidien on myös raportoitu vaikuttavan mm. immuunijärjestelmään. Niiden on myös arveltu estävän syöpää, allergioita, tulehduksia, virusinfektioita ja veritulppien muodostumista. /1, 2, 7/

Huolimatta raportoiduista terveysvaikutteista flavonoideilla saattaa olla myös terveydelle haitallisia vaikutuksia liian suurina määrinä nautittuna. 1970-luvulla flavonoideilla raportointiin olevan karsinogeenisia ja mutageenisia ominaisuuksia. Nämä tulokset kuitenkin ohitettiin flavonoidien terveydelle hyväksi olevien ominaisuuksien tultua ilmi. Tietyissä olosuhteissa on kuitenkin huomattu flavonoidien toimiminen myös pro-oksianttina. Lopullisten terveysvaikutusten todellinen rooli ihmisen terveydelle on siis vielä avoin. /1/

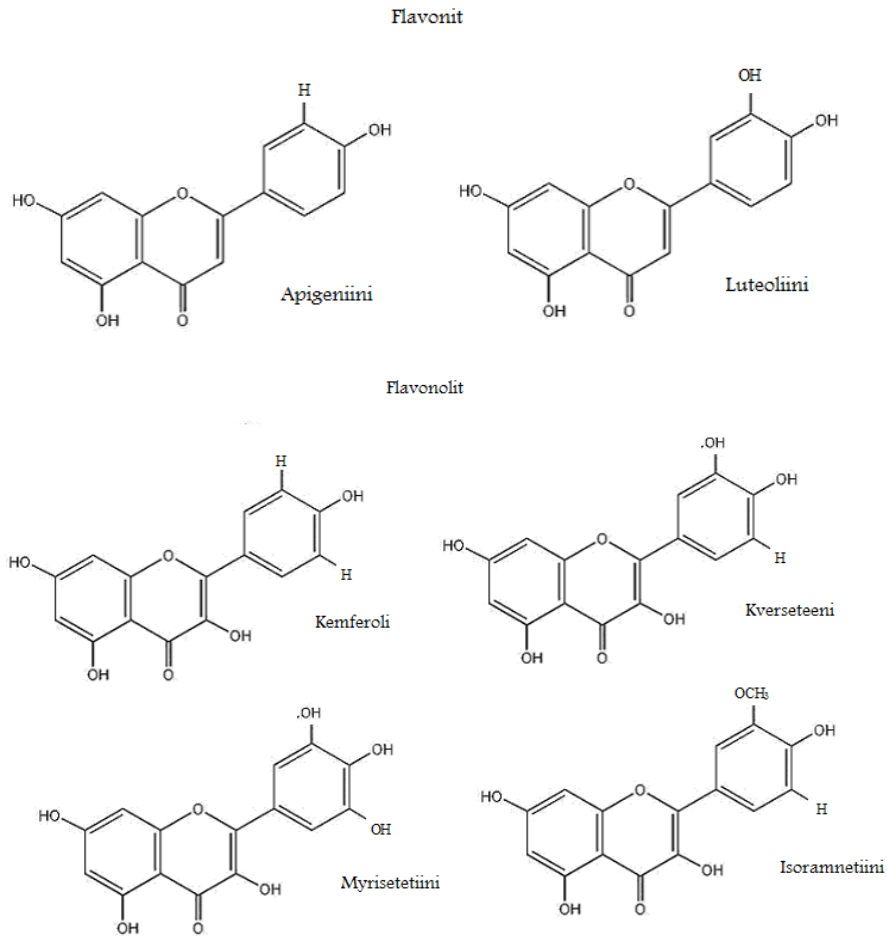
2 FLAVONOIDIEN TUNNISTUSMENETELMIÄ

Flavonoidien tunnistamiseen on käytetty useita erilaisia menetelmiä vuosien saatossa. Kappaleessa tutustutaan viiteen yleisimpään flavonoidien tunnistamisessa käytettyyn menetelmään; kolmeen kromatografiseen ja kahteen spektrometriseen menetelmään. Kromatografisista menetelmistä tutustutaan kaasukromatografiaan, korkean erotuskyvyn nestekromatografiaan ja kapillaarielektroforeesiin. Spektrometrisistä menetelmistä tutustutaan massaspektrometriaan ja ydinmagneettiseen resonanssispektrometriaan.

2.1 Tunnistukseen vaikuttavat ominaisuudet

Lähdettäessä tunnistamaan flavonoideja punaviinistä on muistettava flavonoidien samankaltaisuus yhdisteiden kesken. Menetelmän on siis oltava riittävän tarkka tunnistamisen onnistumiseksi. On myös hyvä todeta ettei punaviinissä esiinny kaikkia löydettyjä flavonoidiyhdisteitä vaan rajaamalla tunnistamistyö tiettyihin flavonoidiryhmiin saadaan parempia ja tarkempia tuloksia. Lisäksi on myös huomioitava flavonoidien luonne kemiallisena yhdisteenä menetelmän valinnan ja käytön yhteydessä. Käytännössä tämä tarkoittaa, että glykosidisen sokeriosan sisältävien flavonoidien vesiliukoisuuden ansiosta niiden uuttamiseen voidaan käyttää laimeita happoliuoksia, metanolia ja etanolia. Mikäli flavonoidit halutaan määrittää aglykoneina eli ilman sokeriosaa, glykosidinen ryhmä tulee poistaa hydrolysoimalla kuumennuksen ja konsentroidun happoliuoksen avulla. Näin näytteeseen saadaan erotetuksi sokeriosaksi ja vapaaksi flavonoidiksi. Varsinkin kaasukromatografia käytettäessä flavonoidien tunnistamiseen näytteestä on usein myös poistettava määrittäviä häiritseviä näyteaineen rasva. /1, 5/

Flavonolien ja flavononien esiintyvyys punaviinissä on aikaisemmin tehtyjen tutkimusten pohjalta selkeästi muita flavonoidiryhmiä todennäköisempää. Tutkittavan yhdistejoukon rajaamiseksi keskitytään aikaisemmin löydettyjen flavonoidien tunnistamismenetelmiin tunnistamistyön konkretisoimiseksi. Kuvassa 9 on esiteltyinä aikaisemmin löydettyjen punaviinissä esiintyvien flavonoidiyhdisteiden rakenne.



Kuva 9. Punaviinissä esiintyvien yleisimpien flavonolien ja flavononien rakenteet

Kuvasta 9 nähdään tutkittavien yhdisteiden erottavat tekijät, joita ovat B- ja C-renkaiseen liittyneet H-, OH ja OCH₃ – ryhmät. Yhdistävänä tekijänä toimii A-renkaan samanlainen rakenne. Eroavaisuudet flavonoidiyhdisteiden välillä saattavat olla niinkin pieniä kuin yhden vetyatomin verran, jolloin se asettaa erityisvaatimuksia tunnistusmenetelmän valinnalle.

2.2 Tunnistusmenetelmät

Nykyaikaisia kvalitatiivisia kemiallisten yhdisteiden tunnistusmenetelmiä ovat pääasiassa erilaiset spektrometriset ja kromatografiset menetelmät, joilla tunnistetaan alkuaineita, yhdisteitä tai yhdisteryhmiä. Näistä menetelmistä kromatografisen tunnistusmenetelmien tuloksena saadaan kromatogrammi eli kuvaaja, joka näyttää graafisesti detektorin vasteen eluutioajan funktiona. Kromatografiassa pyritään yleensä määrittävien komponenttien täydelliseen erottamiseen mahdollisimman lyhyessä ajassa. Erottamisen jälkeen

komponenttien tunnistaminen on mahdollista. Kuten kaikissa kemiallisissa analyyseissa, tulosten tulee olla toistettavia sekä kvalitatiivisessa että kvantitatiivisessa mielessä. /9/

Spektrometrinen menetelmä tuottaa tuloksena spektri eli kuvaaja joka näyttää tuotetun säteilyn hajonnan yhdisteessä. Spektri luodaan hajottamalla säteily eri aallonpituus- tai taajuuskomponentteihinsa spektroskoopilla. Yhdisteiden tunnistaminen tapahtuu vertaamalla saatua spektriä spektrikirjastojen arvoihin ja etsimällä samankaltaisuuksia tai käyttämällä sitä pohjana uuden yhdisteen tunnistamiseen yhdisteen fraktioitumisen perusteella ja selvittämällä yhdisteen komponentit fraktio kerrallaan. Tällä tavoin voidaan määrittää mm. tutkittavan näytteen alkuainekoostumus tai näytteessä olevan yhdisteen muita kvalitatiivisia ominaisuuksia. Erityisesti massa- ja ydinmagneettinen resonanssispektroskopiaa käytetään laajasti orgaanisen kemian tutkimuksissa ja niitä on käytetty runsaasti flavonoidien tunnistamistyössä. Spektrometrinen menetelmä suuri erottelukyky perustuu siihen, että absorptio ja emissio usein liittyvät materiaalin rakenteessa tapahtuviin resonanssi-ilmiöihin, jotka voivat olla taajuuden suhteen hyvin selektiivisiä ja eri aineille luonteenomaisia. /10, 11/

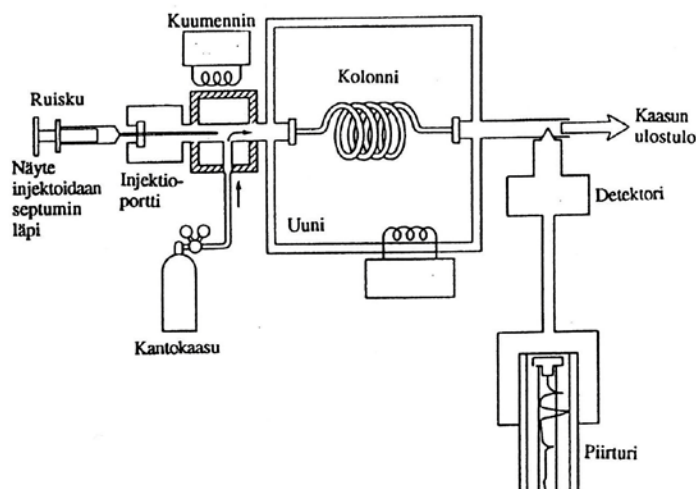
Spektrometrilaitteistot on usein liitetty yhteen kromatografialaitteiston kanssa, jolloin näytteen eri komponentit saadaan eroteltua ja analysoitua erikseen. Tällöin kromatografialaitteisto toimii yhdisteen erotuksessa ja spektrometrinen laitteisto yhdisteen tunnistamisessa eli kromatografisen menetelmän detektorina. Näin saadaan parannettua tulosten tarkkuutta ja luotettavuutta. /10, 12/

2.2.1 Kaasukromatografia

Kaasukromatografia on erittäin tehokas kaasukomponenttien mitta- ja tunnistusmenetelmä. Kaasukromatografiassa (GC) tarkoitetaan fysikaalista erotusmenetelmää, jolla näytekaasun komponentit saadaan erilleen toisistaan niiden jakautuessa paikallaan olevan ja liikkuvan faasin kesken. Kaasukromatografiassa liikkuva faasi on kaasu ja stationäärisfaasina on kantaja-aineeseen tai lasipintaan sidottu nestefaasi. Neste on tavallisesti ohuena kalvona hienojakoisen kiinteän kantaja-aineen pinnalla tai hyvin kapean lasi- tai metalliputken sisäpinnalla. Jos näytteessä olevien komponenttien

jakautumiskertoimet nesteen ja kaasun välillä ovat erilaiset, komponentit erottuvat toisistaan kolonnissa. Kaasukromatografiaa käytetään helposti höyrystyvien aineiden kvalitatiiviseen ja kvantitatiiviseen analyysiin. Flavonoidien analysoinnissa sitä käytetään yleensä vain isoflavonoidien tunnistamisessa. Erityispiirteenä kaasukromatografian käytössä flavonoidien tunnistamisessa on flavonoidien saattaminen silyylijohtannaiseksi ennen kuin sen analysointi laitteistolla on mahdollista. /1, 9/

Kaasukromatografian toimintaperiaate on seuraavanlainen: Kaasusäiliöstä tulevan kantokaasun paine ja virtausnopeus säädetään sopivaksi. Kaasuna käytetään inerttejä kaasuja, kuten argonia, vetyä, typpeä ja heliumia. Eri detektorityypit toimivat parhaiten ero kantajakaasujen yhteydessä. Näyte syötetään ruiskulla ohuen septumin läpi injektoriin, jonka lämpötila on säädettävissä. Näyte höyrystyy ja alkaa kulkea kaasuvirran mukana kolonnissa, joka on lämmitettävässä kolonniuunissa, jonka lämpötilaa voidaan säätää lämpötilaohjelman mukaan. Kolonni on useimmiten kapillaarikolonni tai pakattu kolonni. Kolonnissa tapahtuvan kromatografisen erottumisen jälkeen komponentit poistuvat yksi kerrallaan kolonnista detektorille. Detektori havaitsee kolonnista tulevat yhdisteet ja tietokone tallentaa tiedot, tai vanhemmissa laitteissa piirturi vain piirtää kromatogrammin, jossa on detektorin antama signaali ajan funktiona. Kaasukromatografian rakenne ja toimintaperiaate ovat esiteltyinä Kuvassa 10. /13, 14/



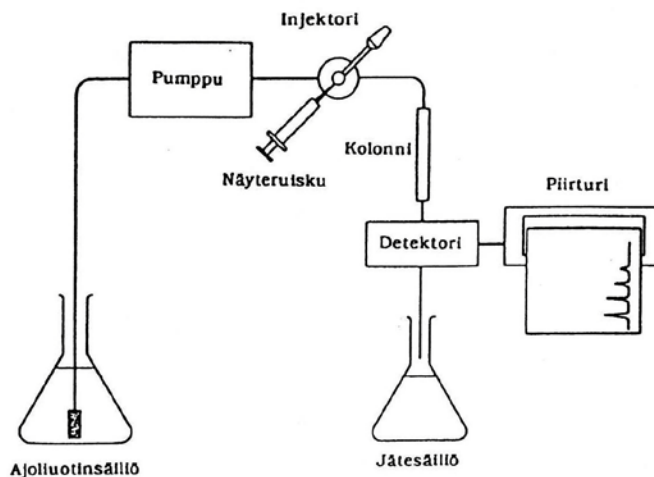
Kuva 10. Kaasukromatografian rakenne ja toimintaperiaate /14/

Detektorina eli ilmaisimena voi toimia monen tyyppisiä erilaisia detektoreita. Tavallisimmat yleisdetektorit ovat liekki-ionisaatioilmaisim (FID) ja lämmönjohtokykyilmaisim. Detektorin antama signaali on verrannollinen aineen konsentraatioon tai massavirtaan. /13/

2.2.2 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia

Nestekromatografia on tärkeä menetelmäryhmä, koska useimmat yhdisteet eivät ole riittävän haihtuvia kaasukromatografiaa varten. Nykyaikainen korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC) käyttää korkeata painetta pakottaakseen eluentin kulkemaan hyvin hienojakoisilla jauheilla pakattujen kolonnien läpi. Se on laajalti käytetty sekä epäorgaanisten, että orgaanisten yhdisteiden analyysitekniikka. Se on myös yleisin flavonoidien tunnistamiseen käytetty menetelmä. /9, 14/

Yksinkertaisimmassa muodossaan korkean erotuskyvyn nestekromatografialaitteisto koostuu eluentisäiliöstä, korkean paineen tuottavasta liuospumpusta, injektorista, kolonnista ja valitusta detektorilaitteistosta. Useimmissa laitteistoissa on lisäksi mahdollisuus kontrolloida kolonnin ja eluentin lämpötilaa. Näytekomponenttien erilaiset vuorovaikutukset stationäärifaasin ja eluentin välillä aiheuttavat erottumisen, ja erottuneet komponentit voidaan havaita detektorin avulla. Detektorilaitte on yleensä liitetty yhteen tietokoneen kanssa tulosten keräämiseksi, käsittelemiseksi ja tallentamiseksi. HPLC:n yksinkertaistettu rakenne on esiteltyä Kuvassa 11. Modernisoidessa ja monimutkaistaessa HPLC:n rakennetta siihen voidaan tarvittaessa lisätä mm. liuosten kaasunpoistoyksikkö, seospumppu, automaattinen näytteensyöttäjä ja kolonniuuni. /9/



Kuva 11. HPLC:n rakenne. /14/

HPLC:n periaate perustuu näytteessä olevien yhdisteiden erottumiseen kolonnissa. Toimintaperiaatteena on pakottaa liuotettu näyte kulkemaan, tiivisti hienojakoisella stationäärifaasilla pakatun kolonnin lävitse. Lähes poikkeuksetta flavonoidien tunnistuksessa yhdisteet erotetaan käänteisfaasikolonneilla. Kolonnin jälkeen on detektori (esim. massaspektrometri), joka havaitsee kolonnista tulevat komponentit. Menetelmää käytetään yhä enenevässä määrin orgaanisille huonosti höyrystyville yhdisteille esim. lääkeaineille /9, 15/

Nestekromatografiassa käytetään myös useita erilaisia detektoreita. Detektointi perustuu joko yhdisteiden spektrometriin, sähkökemiallisiin tai muihin fysikaalisiin ominaisuuksiin. Ideaalinen detektori on herkkä kaikille analyyteille ja antaa lineaarisen vasteen laajalla konsentraatioalueella. Nestekromatografian yhteydessä käytetään yleensä UV-, taitekerroin- tai sähkökemiallisia detektoreita. Kaikkein yleisin nestekromatografiassa käytetty detektori on UV-detektori, sillä hyvin useat yhdisteet absorboivat UV-valoa. UV-detektori on suhteellisen herkkä, sen lineaarinen vastealue on laaja ja lämpötilan tai eluentin koostumuksen vaihtelut eivät juuri häiritse detektointia

Sähkökemiallisten detektorien toiminta perustuu kapasitanssin (dielektrisyysvakiodetektorit), resistanssin (johtokykydetektorit), potentiaalilin (potentiometriset detektorit) tai virran (kulometriset, polarografiset ja amperometriset detektorit) mittaamiseen. Lisäksi johtokykydetektoria käytetään

paljon erityisesti ionikromatografiassa. Muita detektoreja käytetään lähinnä erikoistapauksissa. /9/

Usein nestekromatografiassa käytetty detektori, diodirividetektori, on erilaisista spektrometrisistä detektoreista monipuolisin. Sitä voidaan käyttää kuten tavanomaista UV -detektoria, eli mittaamaan eluaatin absorbanssia yhdellä aallonpituudella. Enemmän informaatiota on mahdollista saada, kun mittaus suoritetaan samanaikaisesti kahdella tai useammalla eri aallonpituudella, jolloin tuloksena saadaan useita kromatogrammeja. Detektori voidaan ohjelmoida myös mittaamaan tiettyä aallonpituusväliä, jolloin saadaan piikeille niille ominaiset spektrit. Tällöin on mahdollista saada summa-absorbanssi kaikista absorbanssiarvoista tai yhdisteiden tunnistamisen kannalta tärkeä spektri tietyistä kromatogrammissa esiintyvistä piikistä. Myös absorbanssisuhde on tärkeä yhdisteiden tunnistamisessa. /9/

Muiden kromatografisten menetelmien tavoin HPLC mahdollistaa monen aineen samanaikaisen analysoinnin. Nestekromatografialla voidaan yleensä analysoida sellaisia haihtumattomia yhdisteitä, joiden kaasukromatografinen analysointi olisi mahdotonta. HPLC:llä voidaan analysoida mm. proteiineja, aminohappoja, lipidejä, ympäristön haitta-aineita, suuria biologisia molekyyliä, sekä lääkeaineita. HPLC:n soveltamisen ainoa edellytys periaatteessa on, että tutkittava aine saadaan liukenemaan johonkin liuottimeen. Flavonoidien analysointiin HPLC soveltuu näin hyvin flavonoidien vesiliukoisuuden takia. Käytännössä voi ilmetä muitakin rajoituksia, kuten näytteen ja liuotimen välinen reaktio kuten saostuminen. Kaasukromatografiaan verrattuna HPLC:n etuna on, että näyte ei muutu detektoinnissa, vaan se voidaan kerätä talteen jatkoanalysointia varten. /9/

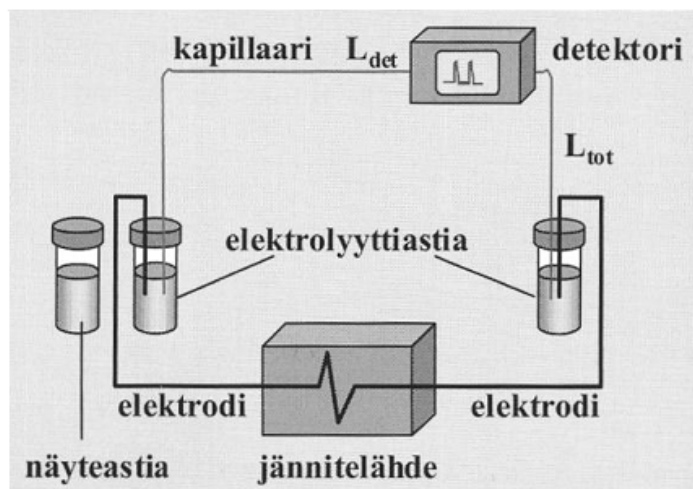
2.2.3 Kapillaarielektroforeesi

Kapillaarielektroforeesi (CE) on erotusmenetelmä, joka perustuu varattujen yhdisteiden erilaisiin liikkuvuuksiin sähkökentässä. Sillä voidaan tutkia aina pieniä molekyyliä kuten epäorgaanisia ioneja, orgaanisia happoja, aminohappoja, peptidejä ja hiilihydraatteja sekä suuria molekyyliä kuten proteiineja ja jopa eläviä soluja. Kapillaarielektroforeesi on suhteellisen uusi analyysimenetelmä, jonka etuina ovat nopeus, yhdisteiden tehokas erottuminen ja vähäinen liuottimien

tarve. Se soveltuu HPLC:n tavoin haihtumattomien ja huonosti höyrystyvien yhdisteiden määrittämiseen ja on osittain syrjäyttämässä HPLC:tä erilaisissa analyyseissä. Flavonoidien analysoinnissa kapillaarielektroforeesia on käytetty vielä suhteellisen vähän, mutta sen käyttö on todistettu mahdolliseksi tähän tarkoitukseen. /13, 14/

CE-tekniikka perustuu eri kemiallisiin vuorovaikutuksiin erotuksen aikana kuin kromatografia, näin ollen CE-tekniikka antaa lisätietoa yhdisteistä kromatografiaan verrattuna. Elektroforeettiseen liikkuvuuteen vaikuttavat sekä erotettavan molekyylin että väliaineen ominaisuudet. Elektrolyyttiliuos pysyy muuttumattomana koko erottumisen ajan eikä sen johtokyvyssä tai sähkökentän voimakkuudessa tapahdu merkittäviä muutoksia erotuksen aikana. /13, 14/

Laitteistoon kuuluu lämpötilakontrolloitu kapillaari, virtalähde, automaattinen näytteensyöttömenetelmä ja detektori. Nestemäinen näyte injektoidaan sopivalla tavalla kapillaariin, jonka kumpikin pää on upotettu puskuriliuokseen. Kapillaarielektroforeesin rakenne on esiteltynä Kuvassa 12. / 13, 14, 16/



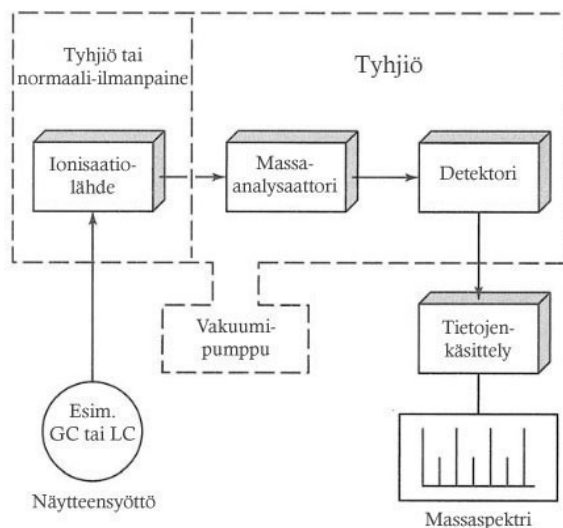
Kuva 12. Kapillaarielektroforeesin rakenne ja toimintaperiaate /16/

Kun systeemiin kytketään virta, näytteessä olevat aineet kulkeutuvat erilaisilla nopeuksilla, kapeina vyöhykkeinä kohti detektoria. Näytevyöhykkeet ovat erityisen kapeita, koska kapillaarin sisälle muodostuu elektro-osmoottinen virtaus. Analyysi tapahtuu useimmiten polyimidillä päällystetyissä silikakapillaareissa, jotka kunnostetaan ennen analyysiä emäksisellä liuoksella. /13, 14/

2.2.4 Massaspektrometria

Massaspektrometria (MS), on spektrometrinen menetelmä, jolla voidaan selvittää atomien ja molekyylien moolimassaa ja määrittää yhdisteen rakennetta yhdisteen fragmentoitumisen perusteella. Käytännössä tämä tapahtuu ionisoimalla analyyttinä toimivaa näytettä ja havainnoimalla tyhjiössä ionisoidun molekyylin liikeradan reagoitua erilaisiin sähkö- ja magneettikenttien yhdistelmiin. Massaspektrometrimittauksia voidaan tehdä kaikissa näytteen olomuodoissa kaiken kokoisille niin poolisille kuin poolittomille yhdisteille hyvinkin pienistä näytemääristä, jopa alle 1 µm näyte voi olla riittävä. Riittävän näytemäärän suuruuteen vaikuttaa tunnistamisessa käytettävä laitteisto ja käytetyn laitteiston herkkyys. /10, 11, 12/

Massaspektrometrilaitteisto koostuu näytteensyöttösystemistä, ionisaatiolähteestä, massa-analysaattorista ja detektorista. Analysaattorissa muodostuneet ionit erotellaan ja detektori kertoo niiden massa/varaus-suhteen (m/z). Yleensä massaspektrometrilaitteistoa ohjataan tietokoneella, jonka avulla myös tulosten tallennus ja käsittely tapahtuvat. Massaspektrometrilaitteiston rakenne on esiteltyä Kuvassa 13. /10, 12/



Kuva 13. Massaspektrometrilaitteiston rakenne /12/

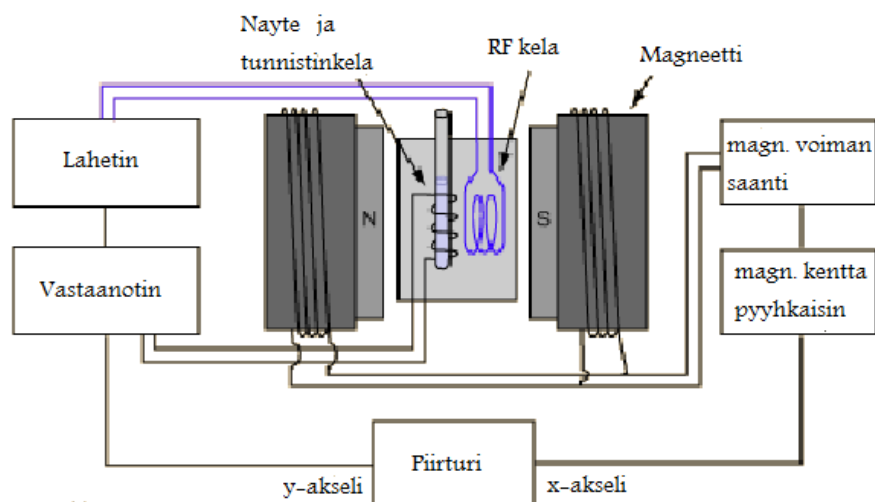
Hiukkassäteilyä lajitellaan massaspektrometrian avulla erimassaisiin ryhmiin, jolloin tuloksena saadusta massaspektristä voidaan selvittää yhdisteen molekyyliaino. Tämä on samalla massaspektrometrian ensisijainen käyttökohde

yhdisteiden tutkimuksissa. Massaspektrin avulla saadaan myös tietoa molekyylin rakenteesta yhdisteen fragmentoitumisen perusteella. Massaspektrissä esiintyvät spektriipiikit kertovat varautuneiden hiukkasten painon eli ns. massa/varaussuhteen ja piikkien korkeus niiden suhteellisen yleisyyden. Molekyylin tai ionin fragmentoituminen riippuu molekyylin hiilirungosta ja siinä olevista funktionaalisista ryhmistä. Massaspektrometrian avulla voidaan todeta esimerkiksi reaktionseurannassa halutun tuotteen saanti toteamalla toivotun tuotteen massapiikin olemassaolon spektrissä. /10, 12/

2.2.5 Ydinmagneettinen resonanssispektrometria

Ydinmagneettinen resonanssispektrometria (NMR) perustuu siihen, että magneettisten atomiydinten energiatilat ja ydinten käyttäytyminen magneettikentässä riippuvat ydinten fysikaalis-kemiallisesta ympäristöstä. Nämä riippuvuudet näkyvät ydinmagneettisen resonanssisignaalin spektrissä. Se on myös ainoa menetelmä, jolla nesteeseen liuotetusta molekyylistä voidaan ratkaista sekä rakenne että sen kolmiulotteinen avaruusrakenne. Menetelmällä soveltuu myös kiinteiden ja kaasumaisten näytteiden analysointiin.

NMR-spektrometrilaitteisto koostuu lähettimestä, näyte- ja tunnistinkelasta, RF-kelasta, magneetista, magneettisen kentän pyyhkäisimestä, piirturista ja vastaanottimesta ja sen rakenne on esiteltyä kuvassa 14. NMR-menetelmässä mitattavasta yhdisteestä saadaan tulokseksi NMR-spektri, josta nähdään yhdisteen atomien kemialliset siirtymät, signaalien intensiteetit sekä niiden jakautumat. Yleensä yhdisteitä tutkittaessa näytteistä ajetaan ^1H ja ^{13}C NMR-spektrit, sillä näiden alkuaineiden atomien molemmat isotoopit ovat vakaita. /10, 11/



Kuva 14. NMR-laitteiston rakenne /10/

NMR-menetelmän toimintaperiaatteena on, että atomit asetetaan aluksi voimakkaaseen magneettikenttään. Tämän jälkeen niille annetaan erilaisia pulsseja, jolloin atomit emittoivat radiotaajuista säteilyä. Voimakkaalla sähkö- tai kestopäätelöllä muodostetussa ulkoisessa magneettikentässä protonien magneettinen momentti asettuu siten kentän suuntaiseksi tai sille vastakkaiseksi. Kukin atomi emittoi säteilyä sen omalla taajuudellaan, johon vaikuttaa mm. kyseisen atomin kemiallinen ympäristö. Vertaamalla annettuja pulsseja eri atomien emittoimiin pulsseihin voidaan niistä päätellä atomien keskinäiset sijainnit ja analysoida tutkittavan näytteen yhdisteiden rakennetta. /10, 17/

2.3 Tunnistusmenetelmien vertailu

Työn lopullisena tarkoituksena on määrittää aiempien kappaleiden perusteella juuri punaviinin flavonoideille sopivin tunnistusmenetelmä. Tunnistusmenetelmän valintaan vaikuttavat niin punaviinin kuin flavonoidien ominaisuudet kuin myös menetelmien tunnettavuus ja kehityskelpoisuus. Menetelmien hyviä ja huonoja puolia flavonoidien tunnistamisen suhteen on esiteltyä Taulukossa VI.

Taulukko VI. Erilaisten tunnistusmenetelmien käyttö yleisesti kemiallisten yhdisteiden näkökulmasta /10, 11, 12, 13, 14, 15, 16/

Kromatografinen menetelmä	Menetelmän hyvät puolet	Menetelmän huonot puolet
Kaasu-kromatografia	Kaasukomponenttien erottelukyky on hyvä	Kromatogrammin yksi piikki saattaa sisältää useampia komponentteja
	Erittäin tehokas kaasukomponenttien mittaus- ja tunnistusmenetelmä	Näyte muuttuu muotoaan detektoinnin myötä
Korkean erotuskyvyn neste-kromatografia	Ainoa ehto käytölle yhdisteen liukeneminen johonkin liuottimeen	Näytteen ja liuottimeen välinen reaktio, kuten saostuminen, mahdollinen
	Monen aineen samanaikaisen analysoinnin mahdollisuus	
	Näyte ei muutu detektoinnissa, vaan se voidaan kerätä talteen jatkoanalysointia varten	Flavonolit ovat huonoliukoisia
	Soveltuu haihtumattomien ja huonosti höyrystyvien yhdisteiden määrittämiseen	
Kapillaari-elektroforeesi	Uusi menetelmä	Lyhyt käyttöhistoria
	Nopeus	
	Yhdisteiden tehokas erottuminen	Elektroforeettiseen liikkuvuuteen vaikuttavat sekä erotettavan molekyylin että väliaineen ominaisuudet
	Soveltuu haihtumattomien ja huonosti höyrystyvien yhdisteiden määrittämiseen	
	Vähäinen liuottimien tarve	

Massaspektrometri	Yhdisteen rakenne voidaan ratkaista kaikista näytteen olomuodoista	
	Massamittauksissa tarvittavat näytemäärät ovat pieniä (< 1 µm)	
	Soveltuu kaiken kokoisille poolisille ja poolittomille yhdisteille	
	Käytetyin spektrometrinen menetelmä flavonoidien tunnistamisessa	
Ydinmagneettinen resonanssi-spektrometria	Yhdisteen rakenne voidaan ratkaista kaikista näytteen olomuodoista	Suhteellisen pienet signaalit
	Monet tutkittavat aineet pysyvät entisellään	
	Ainoa menetelmä, jolla pystytään selvittämään yhdisteen kolmiulotteinen rakenne	
	Antaa tietoa molekyylien tai niiden osien liiketiloista	Suurehkot instrumentaaliset kustannukset

Selvitettäessä parhaimman tunnistusmenetelmän valintaa, on myös huomioitava paitsi tunnistettavan yhdisteen vaatimukset, myös käytävissä olevat resurssit ja yhdistettä sisältävän raaka-aineen ominaisuudet ja saatavuus. Taloudellisesta ja ajankäytöllisestä näkökulmasta punaviinien flavonoidien tunnistamismenetelmien valintaan vaikuttavat erityisesti käyttötarkoitukseen sopivuus, ajankäyttö, liuottimien tarve, mahdolliset esikäsitteilyjen kustannukset, tunnistamistehokkuus, virhelähteiden syntyminen riskit ja tunnistamistarkkuus.

Kaasukromatografilla tunnistettaessa yhdisteitä, on huomioitava että kaasukromatografiaa käytetään flavonoidien tunnistamisessa yleensä vain isoflavonoidien tunnistamisessa. Isoflavonoidien esiintyvyys punaviinissä ei ole kuitenkaan selkeästi eniten esiintyvien flavonolien ja flavononien kaltaista. Lisävaikeutensa punaviinin flavonoidien tunnistamistyöhön tuo kaasukromatografian vaatima flavonoidien saattaminen silyylijohtannaiseksi, ennen kuin analysointi laitteistolla on mahdollista. Voidaan näin sulkea kaasukromatografia pois suositeltavista menetelmistä punaviinin flavonoidien tunnistamiseen huonoiten tarkoitukseensa soveltuvana.

Jättämällä kaasukromatografiaa menetelmänä pois flavonoidien tunnistamiseen huonoiten soveltuvana, jäljellä jäävät korkean erotuskyvyn nestekromatografia ja kapillaarielektroforeesi. Molemmat menetelmät soveltuvat haihtumattomien ja huonosti höyrystyvien yhdisteiden tunnistamiseen. Molemmilla menetelmillä on monia hyviä ominaisuuksia, suurin eroavaisuus löytyy menetelmien tunnettavuudesta.

Spektrometrisista menetelmistä tunnetuin ja selkeästi käytetyin menetelmä on massaspektrometria, jonka avulla voidaan määrittää kaiken kokoisia niin poolisia kuin poolittomiakin yhdisteitä hyvin pienistä näytemääristä. Verrattuna ydinmagneettiseen resonanssispektrometriaan, sen instrumentaalisen kustannukset ovat selkeästi pienemmät kuin jälkeen mainitulla. Massaspektrometri on kustannustehokkain valinta näistä kahdesta ja ydinmagneettisen resonanssispektrometrin käyttöön kannattaa turvautua vain erityistapauksissa, jotka kannattaa teettää muualla välttämällä instrumentaaliset kustannukset. Jos laitteisto on saatavilla, kannattaa ydinmagneettiseen resonanssispektrometriaan turvautua flavonoidien rakenteiden tunnistamisessa.

Parhaimpiin ja luotettavimpiin tuloksiin päästään yhdistämällä kromatografisen menetelmän spektrometrisen menetelmän kanssa, jolloin spektrometrilaitteisto toimii kromatografisen laitteen detektorina ja kromatografi näytteen yhdisteiden molekyylien erottajana. Parhaimmat yhdistelmät flavonoidien tunnistamiseksi punaviininäytteestä ovat HPLC-MS ja CE-MS. Erityistapauksissa, kuten flavonoidien eroavaisuuksien löytyessä vain avaruudellisesta rakenteesta, voidaan näiden menetelmien lisäksi turvautua instrumentaalisesti kalliimpaan spektrometriseen menetelmään, ydinmagneettiseen resonanssispektrometriaan.

3 PUNAVIININ FLAVONOIDIT

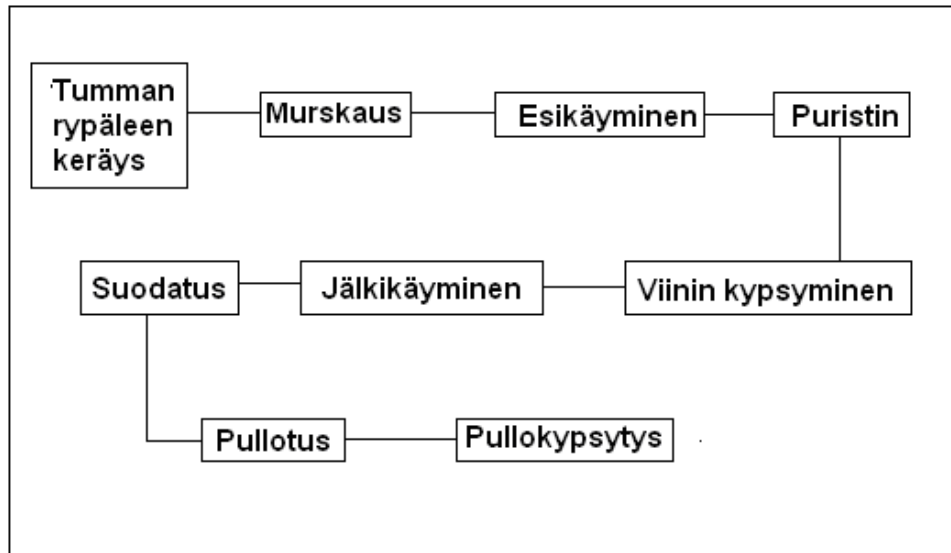
Kappaleessa tutustutaan itse tutkittavaan näytteeseen, punaviinin, ja sen valmistusprosessiin. Huomioidaan myös punaviinin raaka-aineiden vaikutus punaviinin flavonoidipitoisuuksiin ja tutustutaan aikaisemmin tehtyjen tutkimusten tuloksiin flavonoidien pitoisuuksista punaviinissä ja punaviinissä käytetyissä rypäleissä.

3.1 *Punaviini*

Punaviinin koostumus rakentuu 75–90 prosenttisesti biologisesti puhtaasta vedestä, joka tulee suoraan viiniköynnöksen kasvumaaperästä, 8,5–15 prosenttisesti sokerin käydessä syntyneestä alkoholista, jäännössokerista, jota on viinityypistä (kuiva, puolikuiva, puolimakea ja makea) riippuen 0,5-50 g, väriaineista, orgaanisista hapoista, kuten viini-, omena- ja maitohapoista, aminohapoista, mineraaleista ja erilaisista vitamiineista, kuten A-, B1-, B2-, B6-, B12- ja C-vitamiineista. Punaviini sisältää myös tanniineja, jota on noin 0,1-2,5 g. Tanniinit ovat fenolisia yhdisteitä, mutta eroavat niistä suuren molekyyli­massansa takia. Ne ovat erittäin hydroksyloituneita yhdisteitä ja ne voivat muodostaa liukenemattomia komplekseja hiilihydraattien ja proteiinien kanssa. Kaikkiaan punaviinin on arvioitu sisältävän yli 900 erilaista komponenttia. /1, 18/

Punaviiniä valmistetaan viiniköynnöksen rypäleistä, sokerista ja hiivoista. Viiniköynnöstä voidaan viljellä lähes kaikkialla maailmassa lukuun ottamatta napa-alueita. Laadukkaan viinin valmistukseen tarvittava mehu saadaan vain sellaisista rypäleistä, jotka ovat kasvaneet ja kypsyneet tietyissä ilmastollisissa olosuhteissa. Viiniviljelykselle suotuisat olosuhteet ovat päiväntasaajan molemmin puolin 30–50 leveysasteiden välissä. Viinitarhat sijaitsevat yleensä n. 200–500 metriä merenpinnan yläpuolella ja usein jokien varsilla. Mieto­jen viinien valmistus, kuten punaviinin, alkaa rypäleitten kypsyttyä. Kypsymisen ajoitus vaikuttaa tulevan viinin laatuun. Rypäleen sisältämien veden, sokerin, uutteiden ja happojen tasapaino saattaa vaihdella jopa päivittäin. Rypäleet poimitaan useimmiten koneellisesti, rypäleiden oikea-aikaisen korjuun varmistamiseksi. /18/

Punaviinin valmistaminen perustuu rypälemehun käymiseen, joka on kemiallinen prosessi mehun sokerien ja hiivabakteerien soluissa olevien entsyymien välillä. Käymisessä mehuun kehittyy etyylialkoholia, hiilidioksidia, glyseriiniä, meripihkahappoa, estereitä, aldehydejä, erilaisia suoloja, maitohappoja, parkkihappoja, tanniineja ja erilaisia alkoholeja. Käymiseen vaikuttavia tekijöitä ovat lämpötila, paine, sokerit, kemikaalit ja erilaiset hiivat. /18/



Kuva 15. Punaviinin valmistusprosessin lohkokaaavio /18/

Punaviini valmistetaan tummista rypäleistä. Sadon korjuun jälkeen rypäleet viedään murskaamoon, jossa ruotiaines poistetaan joko kokonaan tai osittain. Poistettavan ruotiaineksen määrä vaihtelee viinialueittain ja rypäleiden keräysvuosittain. Jättämällä ruotiainesta helpotetaan puristamista, alennetaan happoisuutta ja edesautetaan käymisprosessia. Prosessissa raaka-aineena käytetyt rypäleet kerätään yhteen ja puhdistetaan, sekä poistetaan rypäleiden pensaspun osat. Rypäleet murskataan siemen, mehu ja rypäleenkuoriseokseksi, johon lisätään viinilaadusta riippuen oikean kaltainen ja oikea määrä hiivaa. /18/

Ruotiaineksen poistamisen jälkeen rypälekuoriseos ja hiiva johdetaan esikäymisastiaan fermentoitumaan. Fermentoinnissa on halutusta viinilaadusta riippuen erilaisia vaihtoehtoja fermentoinnin suorittamiseksi. Valittavia muuttujia prosessissa ovat mm. lämpötila, hiiva, uuttomenetelmä ja käytettävän rypäleen lajike. Esikäymisaika vaihtelee sen mukaan, minkä tyyppistä viiniä halutaan valmistaa. Esikäymisvaiheessa rypäleen kuoret ovat mukana käymismehussa.

Käymistankkeina käytetään suurehkoja puuastioita tai isoja lasitettuja betoni-, teräs- tai lasikuitutankkeja. Noin vuorokauden esikäymisen jälkeen kuoret nousevat pinnalle. /18/

Esikäymisen loputtua tai sen loppuvaiheessa käynyt mehu ja kuoret puristetaan, jonka jälkeen mehu siirretään yleensä pienempiin astioihin jälkikäymään. Jälkikäymisastioina toimivat vesilukolliset astiat. Paremman flavonoidipitoisuuden saamiseksi rypäleistä on myös kannattavaa suosia kylmäpuristusta. Alkoholikäymisen jälkeen alkaa biologinen käyminen, manolaktinen käyminen, jonka aikana bakteerit muuttavat viinissä olevan omenahapon maitohapoksi ja hiilidioksidiksi. Nykyaikaisessa viininvalmistuksessa mehuun lisätään entsyymejä ja bakteereja, jotta manolaktinen käyminen tapahtuisi normaalin käymisen yhteydessä. /1/

Käymisen yhteydessä syntyy runsaasti sakkaa, joka on pääasiallisesti kuolleita hiivasoluja. Sakan erottamiseksi viiniin lisätään usein saostusainetta, kuten gelatiinia, betoniittia tai liivatetta, jolloin saostunut sakka valuu astian pohjalle. Tämän jälkeen viini juoksutetaan toiseen astiaan, jolloin sakka jää edellisen astian pohjalle. Viini juoksuttamista tapahtuu koko käymisprosessin ajan. Viini voidaan lisäksi pastöroida kuumentamalla sitä puolen tunnin ajan 60–85 °C:ssa, jolloin haitalliset bakteerit ja hiivat kuolevat. Tämä toimenpide suoritetaan kuitenkin yleensä vain huokeissa viineissä. Pastörinti myös tuhoaa joitakin punaviinin flavonoideja, joten flavonoidipitoisuuden vähenemisen estämiseksi pastörintia kannattaa välttää. /1, 18/

Suurin osa viineistä kypsytetään isohkoissa astioissa tai tankeissa. Kypsytysaika vaihtelee viinityypin ja viinivuoden mukaan. Ennen pullotusta viini kirkastetaan lisäämällä saostusainetta ja sen jälkeen suodattamalla viini, johon käytetään yleensä piimaa- tai levysuodattimia. Yhtenä keinona saostuvien aineiden poistamiseksi viinistä on kylmäkäsittely, jossa viini jäähdytetään 0 °C tienoille ja suodatetaan. /18/

Nykyään pullottaminen tapahtuu lähes yksinomaan koneellisesti. Viinien pilaantumisen estämiseksi voidaan käyttää säilöntäaineina pieniä määriä

rikkidioksidia, askorbiinihappoa ja sorbiinihappoa, jotka estävät homeiden ja villihiivojen haitallisen vaikutuksen. Askorbiinihappo estää hapettumisen pullotusvaiheessa. Viini vaatii säilyäkseen ilmatiiviin, suljetun tilan. /18/

3.2 Flavonoidipitoisuudet

Flavonoidipitoisuudet kasveissa, tässä tapauksessa punaviinin rypäleissä, ovat tiukasti sidoksissa flavonoideja sisältävään kasvilajiin ja -lajikkeeseen sekä olosuhteisiin joissa kasvi on kasvanut ja kasvin kehitysvaiheeseen. Rypäleiden ja muiden kasvien flavonoidipitoisuuksiin vaikuttavia ympäristötekijöitä ovat mm. maantieteellinen sijainti, lämpötila, maaperän ravinteet ja suolaisuus, kasvupaikan valoisuus ja valon voimakkuus, valoisa aika, ilmansaasteet, ulkoinen kemikaalikäsittely ja sademäärä. Yleisesti tiedetään, että polyfenolisia yhdisteitä on kaikissa viineissä ja ne ovat peräisin rypäleiden kuorista, siemenistä ja kannoista /2, 18/

Ympäristöolosuhteisiin voidaan vaikuttaa viljelyteknisesti, lajikevalinnalla ja mahdollisesti hyödyntämällä kasvua luonnostaan hidastavia stressitekijöitä. Erilaiset prosessoinnit, kuivaaminen ja säilyttäminen vaikuttavat flavonoidien pitoisuuksiin. Käytetyn rypälelajin valinnalla on myös suuri vaikutus punaviinin flavonoidipitoisuuksiin. Riitta Törrönen on esitellyt vuoden 1997 elintarvikeviraston julkaisussaan *Elintarvikkeiden flavonoidit* eri punaviineissä käytettyjen rypäleiden flavonoidipitoisuuksia, joiden arvot ovat esiteltyinä Taulukossa VII. /1, 2/

Taulukko VII. Flavonoidipitoisuuksia (mg/L) punaviineissä käytettävissä eri rypälelajikkeista /2/

Flavonoidi	Punaviinin rypälelajike		
	Cabernet Sauvignon	Merlot	Malbec
Katekiini	7.6	11.1	16.3
Epikatekiini	11.6	11.3	6.3
Proantosyanidiini A2	1.5	11.2	1.8
Proantosyanidiini B2	9.2	6.1	2.4
Proantosyanidiini B3	38.5	2.9	1.6
Proantosyanidiini B4	15.7	19.1	5.4
Myriseteiini	2.6	6.1	3.2
Kversetiini	10.4	14.8	7.8

Taulukon lukemista nähdään punaviinin valmistuksessa käytetyn rypälelajikkeen selkeä vaikutus flavonoidipitoisuuksiin. Parhaimmat flavonoidipitoisuudet on saavutettu edellä mainitussa kokeessa Cabernet Sauvignon rypäleillä kun etsitään korkeimpia pitoisuuksia ja Merlot kun etsitään flavonoidipitoisuuksiltaan suurinta rypälelajiketta. Kokeen tulokset eivät kuitenkaan anna kuvaa punaviinien valmistusvaiheiden tai rypäleiden poimintavuoden vaikutuksesta punaviinien flavonoidipitoisuuksiin. Flavonoidipitoisuuksien kannalta merkityksellistä, milloin ja missä kehitysvaiheessa sato korjataan. Eroavaisuuksia ilmenee jo päiväkohtaisesti ja ympäristötekijöiden vertailussa on myös huomioitava vuosivaihteluiden merkitys.

Eri punaviinien välistä flavonoidipitoisuuserosta saadaan selkeämpi kuva tutkimalla flavonoidipitoisuuksia erilaisissa valmiissa punaviineissä huomioiden samalla myös punaviinin ikä ja rypäleiden poimintavuosi. Käytetään vertailun pohjana vuoden 2005 *Fang Fang et al.* tehtyä tutkimusta punaviinien flavonoidipitoisuuksista korkean erotuskyvyn nestekromatografilla tutkittuna. Tehdyn tutkimuksen tulokset ovat esitettynä Taulukossa VIII. Kokeen näytteistä on määritetty näytteille korkean erotuskyvyn nestekromatografian avulla kolme flavonoidipitoisuutta, joiden arvoista on otettu keskiarvo. /19/

Taulukko VIII. Flavonolien ja flavonien flavonoidipitoisuudet seitsemässä (7) erilaisessa punaviininäytteessä. /19/

Flavonoidi (Flavonoidi- alaryhmä)	Hua-xia 1999 (mg/L)	Hua- xia 1995 (mg/L)	Hua- xia 1994 (mg/L)	Hua-xia 1992 (mg/L)	Hua-xia Zone A (mg/L)	Dragon- seal 2002 (mg/L)	Dragon- seal 2001 (mg/L)
Myriseteiini (Flavonoli)	3.96 ± 0.39	3.13 ± 0.18	2.84 ± 0.31	4.45 ± 0.39	2.77 ± 0.24	2.77 ± 0.12	1.57 ± 0.14
Luteoliini (Flavoni)	0.28 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.24 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.96 ± 0.04	0.43 ± 0.04
Kverseteeni (Flavonoli)	0.72 ± 0.08	0.22 ± 0.07	0.17 ± 0.01	4.87 ± 0.41	1.37 ± 0.13	2.65 ± 0.20	1.75 ± 0.20
Kemferoli (Flavonoli)	0.20 ± 0.01	0.16 ± 0.01	-	0.15 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.08 ± 0.00	0.06 ± 0.02
Isoramne- tiini (Flavonoli)	0.13 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.54 ± 0.06	0.19 ± 0.01	0.46 ± 0.02	0.30 ± 0.06
Galangiini (Flavonoli)	0.0130 ± 0.0058	0.0130 ± 0.0014	0.016 ± 0.0014	0.014 ± 0.0029	0.0410 ± 0.0058	-	0.02 ± 0.0010
Pitoisuus yhteensä	5.30 ± 0.46	3.80 ± 0.27	3.29 ± 0.32	10.22 ± 0.41	4.75 ± 0.35	6.93 ± 0.32	4.13 ± 0.14

Taulukosta VIII nähdään selkeästi eri punaviininäytteiden flavonoidipitoisuuksien lisäksi myös saman viinin rypäleiden kasvatusvuoden vaikutus punaviinin flavonoidien kokonaispitoisuuteen. Tämän voidaan olettaa johtuvan rypäleiden erilaisista kasvatusolosuhteista ja muuttuneista punaviinin valmistusprosessin muuttujista, kuten esim. sademääristä, punaviinin säilytystilan valoisuudesta sekä lämpötilaeroista rypäleiden poimintavuosien välillä.

Eniten punaviininäytteissä esiintyvä flavonoidi on tuloksien perusteella myriseteiini, jota jokainen viininäyte selkeästi sisälsi. Toinen pitoisuuksiltaan huomattava flavonoli on kverseteeni. Muita huomioitavia flavonoideja ovat luteoliini, kemferoli ja isoramnetiini. Galangiinin pitoisuudet punaviinissä ovat suuruusluokaltaan selkeästi muita pienempiä ollen vain sadasosan muiden

flavonoidien pitoisuuksista. Voidaan myös todeta flavonolien ja flavononien olevan punaviinissä esiintyvistä flavonoideista tärkeimpiä ja pitoisuuksiltaan merkittävimpiä

Verrattaessa punaviinin ja valkoviinin flavonoidipitoisuuksia voidaan todeta punaviinin olevan ylivertainen valkoviiniin nähden. Esimerkiksi katekiinin pitoisuus punaviinissä on lähes viisinkertainen valkoviinin verrattuna. Punaviinissä esiintyy myös flavonoideja, joita valkoviinissä ei ole lainkaan. Tämä voidaan päätellä puhtaasti muistamalla punaviinin ja valkoviinin valmistuksien eroavaisuus, jossa punaviinin valmistuksessa käytettävät rypäleiden kuoret poistetaan valkoviinin valmistuksessa aikaisessa vaiheessa valmistusprosessia pois ja näin rypäleiden flavonoidipitoisuudet eivät siirry valkoviiniin yhtä tehokkaasti kuin punaviiniin. /2, 18/

3.3 Flavonoidien saanti punaviinistä

Ihmisen flavonoidien kokonaissaanniksi on arvioitu noin 50–150 mg/vrk riippuen tutkittavan henkilön ruokavaliosta. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksen (MTT) vuonna 1999 tekemän tutkimuksen mukaan ihmisen keskimääräinen flavonoidien kokonaissaanti voidaan arvioida olevan noin 55 mg/vrk. Huolimatta suhteellisen suuresta flavonoidien saannista, vain murto-osa imeytyy ihmisen elimistöön ja on jopa vain 1 prosenttiyksikön luokkaa. Käytännössä päivän määrän kokonaissaanti esimerkiksi punaviinistä on hyvin epätodennäköistä, sillä esimerkiksi kverseteenin saanti punaviinistä on noin 10 mg/l, joka tarkoittaisi päivittäisen flavonoidimäärän saamiseksi yli 5,5 litran punaviinin nauttimista. /1/

4 PUNAVIININ FLAVONOIDIEN TUNNISTAMINEN

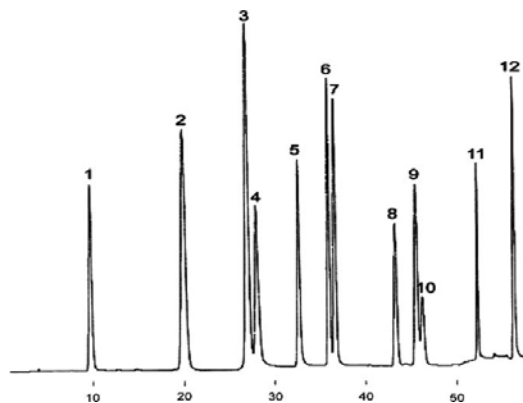
Punaviinin flavonoideja tunnistettaessa on huomioitava tunnistettavien flavonoidien tunnettavuus. Etsittäessä jo tunnettuja flavonoideja erilaisista punaviininäytteistä, tunnistamisen apuna voidaan käyttää flavonoidien retentioaikojen standardiarvoja ja pyrkiä löytämään yhteneväisyyksiä retentioaikojen välillä. Etsittäessä uusia flavonoideja, ei standardiarvoja voida

käyttää vaan on mietittävä mm. spektrometrinen menetelmien käyttöä flavonoidiyhdisteen tarkan rakenteen määrittämiseksi.

4.1 Tunnettujen flavonoidien tunnistaminen

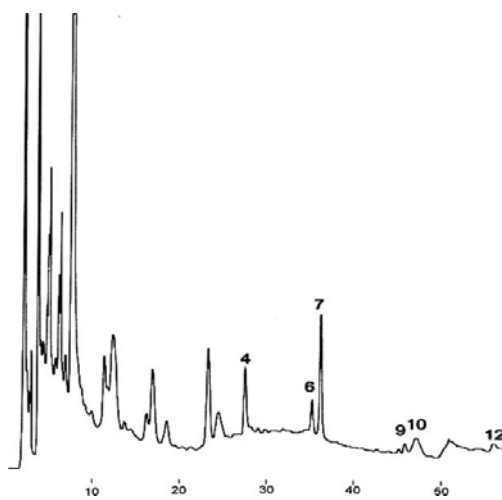
Kemiallisia yhdisteitä tunnistettaessa käytetään yleensä vertailuainetta tai erilaisista kirjastoista löytyviä ainearvoja yhdisteiden löytämiseksi. Tutustutaan seuraavaksi punaviinin flavonoidien tunnistamista käytännössä käyttäen kirjallisuuden avulla saatuja ainearvoja ja tutkimuksissa saatuja tuloksia osoittaen samalla yhdisteiden tunnistamisen peruseräotteita käytännössä. On hyvä kuitenkin todeta, että kaikkien flavonoidien täydellistä tunnistamista vertaamalla saatuja tuloksia kirjallisuuden ja spektrikirjastojen arvoihin tai ns. esimerkkinäytteeseen haittaa se tosiasia, ettei kaikkia flavonoidikonjugaatteja ole kaupallisesti saatavilla. /1, 19, 20/

Flavonoidien tunnistamiseksi käytännössä on oleellista esitellä tunnistamista esimerkkitapauksen kautta. Esimerkkitaapauksessa (Kuvat 16 ja 17) on käytetty korkean erotuskyvyn nestekromatografia flavonoidien tunnistamisen työkaluna. Tunnistettaessa tiettyjä flavonoidiyhdisteitä tunnistuksessa verrataan näytteestä saadun kromatogrammin arvoja vertailuaineiden kromatogrammeissa esiintyviin diagnostisiin ioneihin. Yhdisteiden tunnistaminen perustuu retentioaikoihin, jotka ovat kullekin yhdisteelle niille ominaisia. Tunnistaminen perustuu standardiarvojen ja saatujen tuloksien vertailuun ja yhteneväisten tekijöiden löytämiseen. Työn helpottamiseksi on hyvä tehdä hypoteesi mahdollisista näytteestä löytyvistä yhdisteistä ja selvittää niiden standardiarvot. Tunnistaminen voidaan aloittaa myös suoraan näytteen tuloksista ja aloittaa tunnistaminen määrittämällä saatujen tuloksien mukaisten retentioaikojen mukaisia tuloksia vastaava standardiyhdiste. /20/



Kuva 16. Punaviinin flavonoidien standardinäytteen arvot kromatogrammina ja taulukoituna /19/

Flavonoidi	Retentioaika (min)	Detektioaika $\times 10^{-2}$ (mg/L)
Rutiniini (1)	9.833	2.34
Kversetriini (2)	19.85	3.60
Fiseteeni (3)	26.767	1.46
Myriseteiini (4)	27.783	2.53
Moriini (5)	32.467	2.30
Luteoliini (6)	35.783	1.74
Kversetiini (7)	36.458	1.62
Apigeniini (8)	43.163	2.78
Kemferoli (9)	45.467	2.11
Isoramnetiini (10)	46.135	2.88
Ranneteiini (11)	52.158	1.00
Galangiini (12)	56.178	1.30



Kuva 17. Erään punaviininäytteen flavonoidien tunnistamistulokset kromatogrammina ja taulukoituna /19/

	Retentioaika (min)	Retentioaika (%)	CV	Piikin ala (%)	CV
Myriseteiini (4)	27.783	0.724		2.5	
Luteoliini (6)	35.783	0.855		2.6	
Kverseteeni (7)	36.458	0.801		1.4	
Kemferoli (9)	45.467	1.07		1.9	
Isoramnetiini (10)	52.158	0.371		1.3	
Galangiini (12)	56.781	0.801		3.6	

Tarkasteltaessa flavonoidien teoreettisia standardiarvoja Kuvassa 16 ja tehdyn tutkimuksen saatuja arvoja Kuvassa 17, huomataan selkeä yhteneväisyys retentioajoissa tiettyjen yhdisteiden välillä. Havaitun yhteneväisyyden perusteella voidaan vahvasti olettaa tutkitun näytteen sisältävän flavonoidiyhdisteistä myriseteiiniä, luteoliinia, kverseteeniä, kemferolia, isoramnetiinia ja galangiinia. Flavonoidien yhdisteiden pitoisuudet näytteessä ovat suoraan verrannollisia kromatogrammin piikin korkeuteen, josta yhdisteen pitoisuus voidaan laskennallisesti määrittää Lambert-Beerin lain mukaisesti yhtälöiden 1 ja 2 avulla. Laskennallinen yhdisteiden pitoisuuksien määrittäminen soveltuu kaikkien flavonoidien pitoisuuksien määrittämiseen, kun tutkittavan yhdisteen absorbanssi tai intensiteetti on määritelty. /21/

$$A = -\log(I/I_0) \quad (1)$$

Jossa

A on absorbanssi

I on näytteen läpäisevä intensiteetti

I₀ on näytteen alkuperäinen intensiteetti

$$A = \varepsilon * b * c \quad (2)$$

jossa

A on absorbanssi, -

ε on molaarinen absorptiviteettikerroin, dm³/mol*cm

b on valon kulkema matka kyvetissä, cm

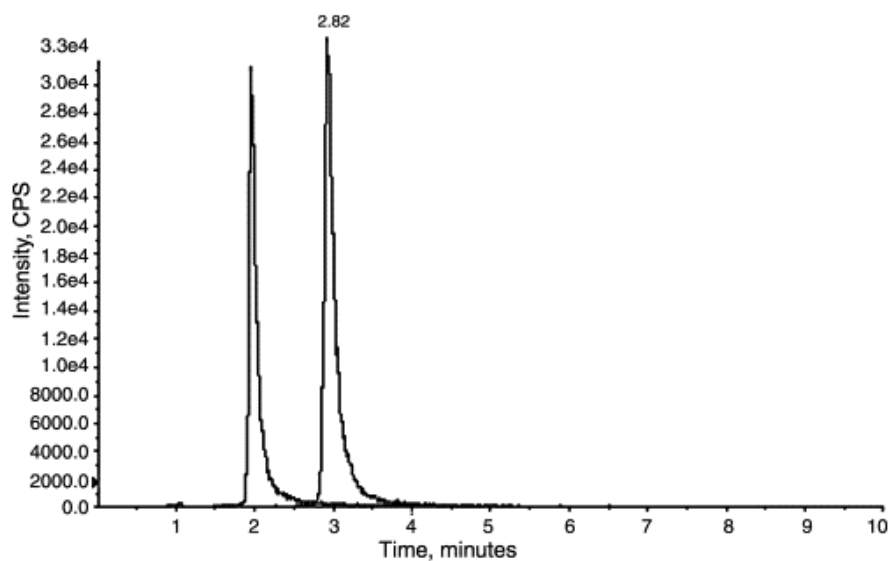
c on liuoksen konsentraatio, mol/dm³

Flavonoideja voidaan siis tunnistaa vertaamalla niiden saamia retentioaikoja ns. standardiarvoihin ja niiden pitoisuuksia määrittää Lambert-Beerin lain yhtälöiden avulla. Muita tunnistamistapoja jo tunnettujen flavonoidien tunnistamiselle ovat

mm. saatujen spektrien vertailu ns. kirjastospektreihin, jolloin voidaan todistaa tietyn flavonoidiyhdisteen esiintyvyys tai puuttuminen punaviininäytteestä tai tietyn flavonoidiyhdisteen pitoisuuden muutos saman punaviinin eri näytteissä vertaamalla kromatogrammin piikkien korkeuksia.

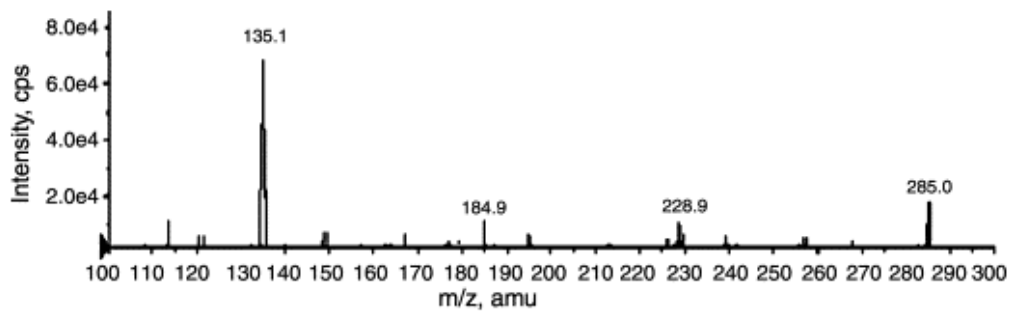
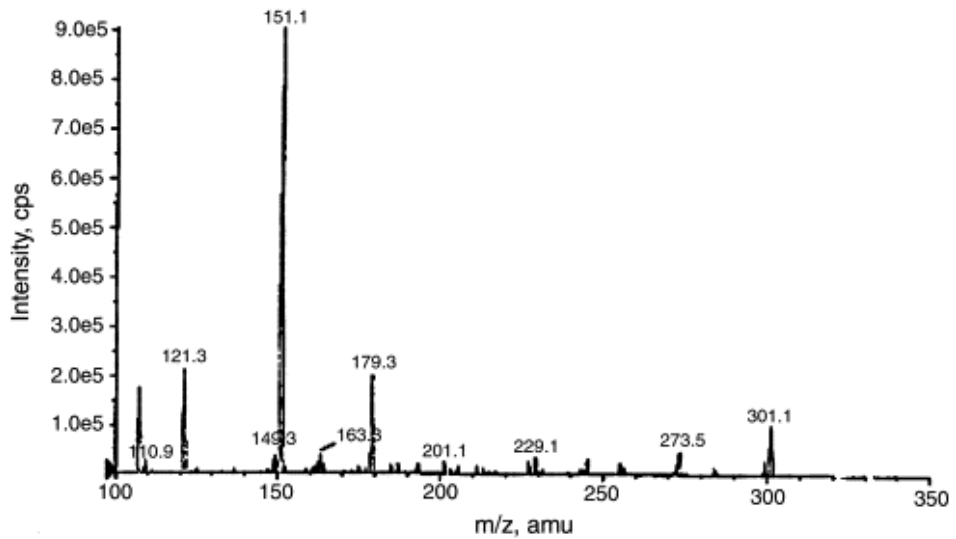
4.2 *Tuntemattomien flavonoidien tunnistaminen*

Tunnistettaessa yhdisteitä ilman aikaisemmin tehtyä hypoteesia näytteen sisältämistä yhdisteistä on hyvä aloittaa tunnistaminen tulkitsemalla saatua kromatogrammia. Kromatogrammin analysoinnin jälkeen todennäköisesti on turvaututtava myös spektrometrin antamaan informaation ennen kuin kokonaisvaltainen flavonoidien tunnistaminen on mahdollista. Kuvassa 18 on esiteltyä satunnaisen näytteen ajosta saatu kromatogrammi, josta huomataan sen sisältävän kaksi kromatogrammiipiikkiä.



Kuva 18. Erään satunnaisen näytteen kromatogrammi. /22/

Kromatogrammien piikkien yhdisteitä vastaavat retentioajat ovat 2.0 minuuttia ja 2.8 minuuttia. Mahdollisuutena tässä vaiheessa tunnistusta on löytää retentioaikoja vastaavat flavonoidiyhdisteet vertailemalla niitä kirjallisuudesta löytyviin retentioaikoihin käytetyllä aallonpituudella tai hajottamalla yhdiste molekyyleiksi ja tunnistamalla yhdiste fraktio kerrallaan esimerkiksi massa-varaussuhteen avulla. Kuvassa 19 on esiteltyä Kuvan 18 näytteen kromatogrammiipiikkien massaspektrometrit.



Kuva 19. Erään näytteen massaspektrometrit kuvan 18 retentioaikoja vastaaville yhdisteille. /22/

Yhdistämällä saadut fraktiot toimivaksi kokonaisuudeksi, todetaan massaspektreistä saatujen fraktioiden kokonaisuuksien vastaavan flavonoideja kverseteeni ja fiseteeni. Varmistetaan saatu tulos vertaamalla saatuja retentioaikoja myös kirjallisuuden arvoihin tässä vaiheessa ja todetaan tunnistus onnistuneeksi. Täysin uusien flavonoidien tapauksessa kirjallisuuden arvoihin ei voida tukeutua niiden puuttumisen vuoksi, joten tämän kaltaisissa tapauksissa kannattaa turvautua myös ydinmagneettisen resonanssispektrometrin käyttöön yhdisteen kolmiulotteisen rakenteen määrittämiseksi.

YHTEENVETO

Flavonoidit ovat kevytrakenteisia kasvin sekundäärisiä aineenvaihduntatuotteita, joilla on monia vaikutuksia ihmisen hyvinvointiin ja terveyteen. Niiden perusrakenne koostuu C3-C6-C3 hiilirenkaista ja ne voidaan jaotella useampaan eri alaryhmään riippuen perusrakenteeseen liittyvien molekyylien laadusta ja määrästä. Tässä työssä flavonoidit ovat jaoteltuina kuuteen (6) eri ryhmään: flavonoleihin, antosyaaneihin, katekiineihin, flavanoneihin, flavoneihin ja muihin flavonoideihin. Muut flavonoidit -flavonoidiryhmä sisältää kaikki viiteen ensimmäiseen ryhmään tässä tapauksessa kuulumattomat flavonoidit.

Punaviinin flavonoidien määrään vaikuttavat useat eri ominaisuudet, kuten itse viinin valmistus. Punaviinin valmistusprosessi koostuu rypäleiden keräyksestä, murskauksesta, esikäymisestä ja puristuksesta, jota seuraa viinin kypsyminen ja punaviinin jälkikäyminen. Jälkikäymisen jälkeen punaviini suodatetaan ja johdetaan pullokypsytykseen, josta punaviini jatkaa matkaansa pulloitukseen. Valitsemalla flavonoideille optimaalisimmat olosuhteet viinin valmistamisen aikana, voidaan flavonoidien määrä punaviinissä maksimoida. Tämä tarkoittaa käytännössä niiden prosessimuuttujien välttämistä, jotka tuhoavat punaviinin flavonoideja, kuten valo.

Punaviinin flavonoidien määrään eniten vaikuttava ominaisuus on juuri siinä käytettyjen rypäleiden flavonoidipitoisuus. Tähän vaikuttavia ympäristötekijöitä ovat mm. maantieteellinen sijainti, lämpötila, maaperän ravinteet ja suolaisuus, kasvupaikan valoisuus ja valon voimakkuus, valoisa aika, ilmansaasteet, ulkoinen kemikaalikäsittely ja sademäärä. Näihin tekijöihin voidaan vaikuttaa niin viljelytekniisesti, lajikevalinnalla ja mahdollisesti hyödyntämällä kasvua luonnostaan hidastavia stressitekijöitä.

Flavonoidien tunnistamiseen on käytetty useita menetelmiä, näistä käytetyimpinä kromatografiset ja spektrometriset menetelmät. Niiden käyttäminen punaviinin flavonoidien tunnistamisessa antaa mahdollisuuden sekä jo tunnettujen flavonoidien tunnistamiseen että uusien flavonoidiyhdisteiden löytämiseen. menetelmän yhdistäminen. Punaviininäytteen flavonoidien suositeltaviksi

tunnistamismenetelmiksi valittiin korkean erotuskyvyn nestekromatografia yhdistettynä massaspektrometriin (HPLC-MS) ja kapillaarielektroforeesi yhdistettynä massaspektrometriin (CE-MS). Tunnistusmenetelmän valinnan yhteydessä tunnustetaan kuitenkin myös ydinmagneettisen resonanssispektrometrian merkitys flavonoidiyhdisteiden tunnistamisessa epäselvissä tunnistamistapauksissa. Punaviininäytteen flavonoidiyhdisteiden tunnistamisessa tukeudutaan edellä mainittujen menetelmien ajotuloksiin, kromatogrammeihin ja spektreihin, joiden perusteella voidaan suorittaa flavonoidiyhdisteiden kokonaisvaltainen tunnistaminen.

LÄHDELUETTELO

1. Hyvärinen H.: *Kasvipäriset biomolekyylit – fenoliset yhdisteet ja terpeenit*, kirjallisuuskatsaus, 2001, s. 3, 14–30, 45–50, 61–62, 66–68 (98)
2. Törrönen, R., *Elintarvikkeiden flavonoidit*. Helsinki 1997. Elintarvikeviraston julkaisuja 5/1997
3. Hannula M., *Marjojen flavonoidien uuttaminen*, Lappeenrannan teknillinen korkeakoulu, kemiantekniikan osasto, diplomityö 2001
4. Pimentol F. A., Nitzke J. A., Klipel C. B., de Jong E. V.: *Chocolate and red wine – A comparison between flavonoids content*, Food Chemistry 120 (2010) s. 109-112
5. Mattila P., Piironen V., Ollilainen V.: *Elintarvikekemian ja –analytiikka*, Helsinki University Press, 2001
6. Törrönen R., Riihinen K.: *Marjat arvokkaita polyfenolien lähteitä*, Kehittyvä elintarvike 04/04, s. 12 – 13, 2004
7. Törrönen R.: *Tutkimustietoa marjojen terveellisyydestä ja terveysvaikutuksista*, Elintarvikkeiden terveysvaikutusten tutkimuskeskus (ETTK), Joulukuu 2006
8. Oregon State University, Linus Pauling Institute, *Micronutrient Information Center: Flavonoids*, <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/> [Viitattu 26.08.2010]
9. Harris D.C.: *Quantitative Chemical Analysis*, 6. painos, W. H. Freeman and Company, 1999
10. Sirén H.: *Orgaanisen kemian syventävät tiedot*, luentomateriaali, LUT Kemia, Lappeenrannan teknillinen yliopisto, 2009
11. Higson S. P. J.: *Analytical chemistry*, Oxford University press, 2006
12. Laine A.: *Polaaristen yhdisteiden analytiikkaan soveltuvat nestekromatografia-massaspektrometria-menetelmät*, Pro gradu – tutkielma, Jyväskylän yliopisto, Kemian laitos, Laakeainekemian maisteriohjelma, 2009
13. Härkönen S., Lähteenmäki I., Välimaa T.: *Teollisuuden mittaustekniikka – analyysimittaukset*, 1997, s. 144–148 (162)
14. Aksela M., Laitelainen T., Mäkelä M-L., Virkkala T.: *Mikrokemiallinen laboratorio*, Opetushallitus, 1996, s. 35,37 (152)

15. Franzén R., *Kromatografia ja Massaspektrometria*, Tampereen teknillinen yliopisto, 2005
16. Riekkola M-L., Hyötyläinen T., *Kolonnikromatografia ja elektromigraatiotekniikat*. Helsinki: Yliopistopaino. 2. uud. painos. 2002 (2000).
17. Havsteen B. H.: *The biochemistry and medical significance of the flavonoids*, Pharmacology & Therapeutics, Volume 96, Issues 2-3, November-December 2002, Pages 67-202, 2002
18. Kaukinen M., Nylund M., Siikala P.: *Alkoholijuominen käsikirja 1, miedot alkoholijuomat*, 1988, s. 11, 22–26, 36, 42 (267)
19. Fang F., Li J.-M., Pan Q.-H., Huang W.-D.: *Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging*, Centre for Viticulture and Enology, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, 2005
20. MIKES: Metrologia: Kvalitatiivisen kemian metrologian opas orgaanisten yhdisteiden tunnistamiseen, julkaisu J5/2006, Mittatekniikan keskus, 2006
21. Ocean optics, Technical Resources: Beer-Lambert Law, <http://www.oceanoptics.com/technical/beerslaw.asp> [viitattu 6.12.2010]
22. Wang L., Morris M. E.: *Liquid chromatography–tandem mass spectroscopy assay for quercetin and conjugated quercetin metabolites in human plasma and urine*, Journal of Chromatography B Volume 821, Issue 2, 25 July 2005, Pages 194-201, 2005