



TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

KLOROGEENIHAPON ANALYTIikka JA RIKASTAMINEN PERUNANKUORESTA

Reeta Moilanen

Opinnäytetyö
Joulukuu 2016
Energia- ja ympäristötekniikka
Laboratoriotekniikan koulutus



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Energia- ja ympäristötekniikka
Laboratoriotekniikan koulutus

MOILANEN, REETA:

Klorogeenihapon analytiikka ja rikastaminen perunankuoresta

Opinnäytetyö 45 sivua
Joulukuu 2016

Opinnäytetyö tehtiin Kajaanissa kesällä 2016 Oulun yliopiston Kajaanin yliopistokeskukseen kuuluvassa Mittaustekniikan yksikössä. Työ liittyi hankkeeseen, jonka tarkoituksena on perunateollisuudesta tarpeettomaksi jäävien perunankuorijätteiden sisältämien yhdisteiden hyödyntäminen. Hankkeen yhtenä tavoitteena on etsiä perunankuorijätteiden raaka-aine-, prosessointi- ja uuttomahdollisuuksia klorogeenihapon rikastamiseen, joka on opinnäytetyöni aiheena.

Tavoitteena oli tutkia klorogeenihapon rikastamista perunankuoresta menetelmillä, joita tulevaisuudessa voidaan hyödyntää teollisuudessa. Tarkoituksena oli löytää ne käsittelymenetelmät perunalle, jotka edesauttavat klorogeenihappopitoisuuden säilymistä ja rikastamista perunankuorimassassa. Nestekromatografinen analyysimenetelmä, jota käytettiin klorogeenihappojen määrittämiseen tuhtkimusnäytteistä validoitiin. Perunankuorimassan esikäsittelymenetelmänä testattiin erilaisia sulatus- ja kuorintamenetelmiä. Klorogeenihapon erottamiseen kuorimassasta tutkittiin elintarvikesovelluksissa hyväksyttäviä vesi- ja etanoliliuoksia. Vertailumenetelmänä käytettiin hapanta metanoliuuttoa, joka on tunnetusti tehokas ja yleisesti käytetty tekniikka fenolisten yhdisteiden uutossa. Klorogeenihapon rikastamista perunankuorimassauutteista tutkittiin pylväskromatografisilla ja kryokonsentraatioon sekä alipainehaihdutukseen perustuvilla tekniikoilla.

Tulosten perusteella paras säilyvyys klorogeenihapolle saadaan, kun kuorinta suoritetaan puolikypsälle perunalle. Pakastetun perunankuorimassan sulatuksessa mikroaaltouunin käyttö oli tutkituista menetelmistä säilyvyyden kannalta paras vaihtoehto. Validoinnissa saatujen parametrien perusteella voidaan todeta käytetyn HPLC- analyysimenetelmän olevan hyvin soveltuva käyttötarkoitukseensa. Sen sijaan klorogeenihapon konsentroidin menetelmät kaipaisivat vielä lisätutkimuksia, jotta löydetään teollisuusprosessissa parhaiten hyödynnettävä menetelmä.

ABSTRACT

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

MOILANEN, REETA:
Chlorogenic Acid Analytics and Enrichment of Potato Peels

Bachelor's thesis 45 pages
December 2016

This thesis was done in the University of Oulu, Kajaani University Consortium, Unit of Measurement Technology during the summer of 2016. This work was linked to a project which has a purpose to exploit valuable compounds in potato peel waste produced in the potato industry. The subject of the project is to search for possibilities in different type of potato peel raw materials and processing for enrichment of chlorogenic acid, which is the main subject of my thesis.

The purpose of this thesis was to investigate whether it is possible to enrich the chlorogenic acid from potato peels using methods that could be utilized in the industry in the future. The aim was to find those treatment methods for potatoes, which will contribute to the preservation of the chlorogenic acid content in potato peels. Pretreatment methods were studied in a variety of melting and peeling applications. The second aim was to find a food applicable extraction solutions (water and ethanol) for sample processing, whereas acidic methanol was used a reference solvent for quantitative analysis of chlorogenic acid. The method, which was used in the determination of chlorogenic acid was validated.

Results showed that the best stability of chlorogenic acid was obtained when the peeling was done to a medium rare potato. Using a microwave oven to melt frozen potato peel was the best studied method for extending preservation time of chlorogenic acid. On basis of the results obtained in the validation, it can be said that the used HPLC method was valid and reliable for determination of chlorogenic acid. More research is needed to find an efficient enrichment method of chlorogenic acid from potato peels that could be applied to the industrial scale.

Key words: chlorogenic acid, HPLC, validation, analytics

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	TEOREETTINEN TAUSTA	7
2.1	Klorogeenihappo.....	7
2.2	Korkean erotuskyvyn nestekromatogafi (HPLC)	8
2.3	Rikastaminen	10
2.3.1	Pyöröhaihdutus.....	11
2.3.2	Refraktometri	11
2.4	Validoinnin tarkoitus	12
2.4.1	Menetelmän toistettavuus.....	12
2.4.2	Toteamis- ja määrittäysraja.....	12
2.4.3	Lineaarisuus	13
2.4.4	Systemaattinen virhe	13
3	TYÖN SUORITUS	15
3.1	Näytteet.....	15
3.2	Näytteiden käsittely	16
3.3	Sulatuskoesarja 1	16
3.4	Sulatuskoesarja 2	17
3.5	Kuorintakoesarja.....	18
3.6	Uuttoliuksen testaus.....	19
3.7	Rikastaminen	19
3.8	Validointi	23
4	TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELO	24
4.1	Sulatuskoesarja 1	24
4.2	Sulatuskoesarja 2	29
4.3	Kuorintakoesarja.....	33
4.4	Uuttoliuksen testaus.....	34
4.5	Rikastaminen	35
4.5.1	Kryokonsentroidi	35
4.5.2	Sumukuivaus	36
4.5.3	PVPP-pylväs	37
4.6	Validointi	38
4.6.1	Menetelmän toistettavuus.....	38
4.6.2	Toteamis- ja määrittäysraja.....	39
4.6.3	Lineaarisuus	39
4.6.4	Systemaattinen virhe	40

5 POHDINTA.....	42
LÄHTEET.....	45

1 JOHDANTO

Peruna on yksi tärkeimmistä ravintokasveista Suomessa ja sitä käytetään kotitalouksissa ruoanvalmistuksessa ja teollisuudessa raaka-aineena. Perunat ovat maanalla kasvavien varsien mukuloita, joiden muoto, väri ja koko vaihtelevat lajin mukaan. Perunan raaoissa mukuloissa on 17 mg/100g klorogeenihappoa, näin ollen sitä pidetään potentiaalisena tutkimuskohteena.

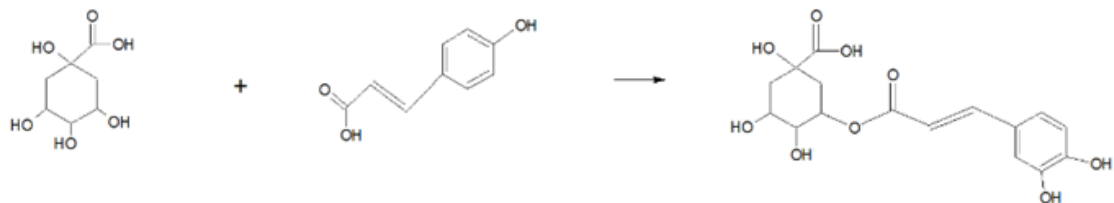
Opinnäytetyön aiheena oli klorogeenihapon analytiikka ja rikastaminen perunankuoresta. Tavoitteena oli tutkia, onko klorogeenihapon rikastaminen perunankuoresta mahdollista. Tarkoituksena oli löytää perunateollisuuteen ne käsittelymenetelmät, jotka eivät tuhoa perunankuorimassasta löytyviä hyödynnettäviä yhdisteitä. Tarkoituksena oli saada selville sulatus-, kuorinta-, uutto-, ja sulatusmenetelmät, jotka edesauttavat klorogeenihapon säilymistä perunankuorimassassa. Työ toteutettiin siten, että perunalle tehtiin erilaisia kuorinta-, sulatus- ja uuttokokeita, joiden aikana ja jälkeen klorogeenihappopitoisuus mitattiin. Käsittelyjen jälkeen perunankuorimassaa säilytettiin erilaisissa lämpötiloissa kahden viikon ajan ja pitoisuuden muutoksia seurattiin kolmena eri ajankohtana. Tarkoituksena oli myös löytää elintarvikesovelluksiin kelpaava uuttoliuos analytiikassa käytetyn happaman metanolin tilalle.

Klorogeenihapon määrittämiseen käytetty nestekromatografinen menetelmä validoitiin, jotta pystyttiin todistamaan sen pätevyys kyseiseen määrittämiseen. Menetelmälle määritettiin sen toistettavuus, toteamisraja, määrittämiss raja, lineaarisuus ja systemaattinen virhe. Näiden parametrien avulla pystyttiin toteamaan menetelmän toimivuuden klorogeenihapon määrittämiseen.

2 TEOREETTINEN TAUSTA

2.1 Klorogeenihappo

Klorogeenihappo (chlorogenic acid CGA) on fenolinen karboksyylihappo eli sen bentseenirenkaaseen on suoraan kiinnittyneenä hydroksyyli-ryhmä. Happoa on runsaasti kahvipavuuissa, mutta niitä löytyy myös hedelmistä ja kasveista. Klorogeenihappoa on eniten kahvi- ja perunateollisuuden sivuvirroissa. Se on vesiliukoinen yhdiste ja sitä muodostuu, kun kahvi- ja kiinihappo muodostavat esterin (kuvio 1). Hajoamistuotteena elimistössä muodostuu pääasiassa kahvihappoa. (Vilhunen, 10.)



KUVIO 1. Klorogeenihappoa syntyy kun kahvi- ja kiinihappo muodostavat esterin (Vilhunen, muokattu)

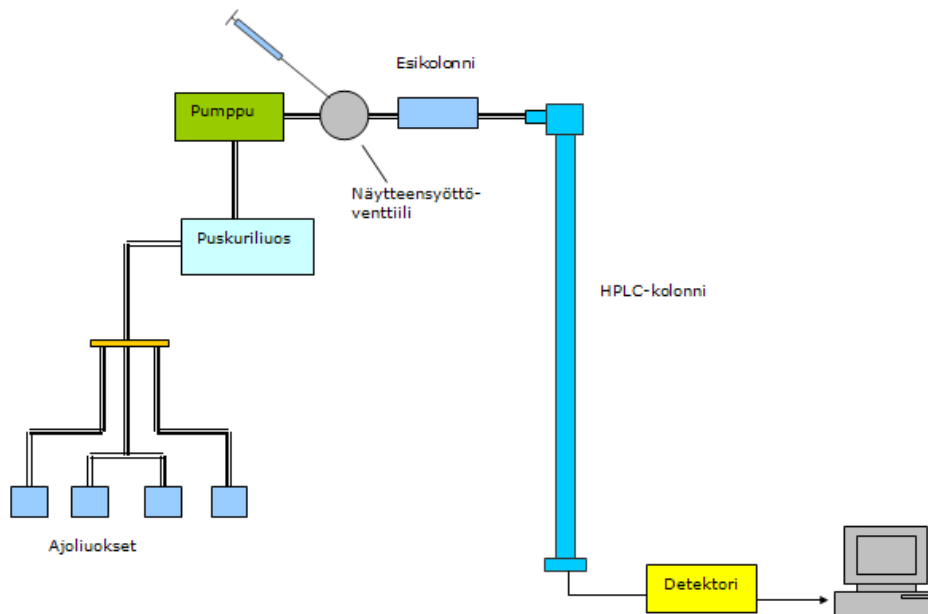
Klorogeenihapolla on antioksidanttisia vaikutuksia eli sen tehtävänä elimistössä on estää muiden yhdisteiden hapettuminen. Sillä on todettu olevan ehkäisevää vaikutusta sydän- ja verisuonitauteihin. (The journal of nutrition, 66). Joitakin klorogeenihappoa sisältäviä kasveja käytetään yrtilääkkeinä esimerkiksi sydän- ja verisuonitautien, anemian ja reuman itsehoidossa. (Zeiger, 4.)

Klorogeenihappopitoisuus perunan raaissa mukuloissa on 17 mg/100g ja siitä noin puolet on perunan kuorissa. Lämpötila ja maaperän koostumus vaikuttavat perunan klorogeenihappopitoisuuteen. Pitoisuus kasvaa, kun peruna altistuu kylmälle, viruksille tai kolhiintuu. Säilytyksen tulee tapahtua matalassa lämpötilassa pimeässä, koska altistuminen valolle lisää klorogeenihapon määrää perunassa. Keittäminen ja käsittely mikroaaltouunissa vähentävät pitoisuutta 35- 55 % alkuperäisestä, kun taas höyrytetty peruna sisältää saman määrän klorogeenihappoa kuin raaka peruna. (Zeiger, 7-8.)

2.2 Korkean erotuskyvyn nestekromatografi (HPLC)

Kromatografia on menetelmä kemiallisten yhdisteiden erottamiseen ja tunnistamiseen, joten sitä käytettiin työssä klorogeenihapon määrittämiseen näytteistä. Kromatografian periaatteena on se, että aineiden erottuminen tapahtuu liikkuvan ja liikkumattoman faasin välillä. Liikkumaton faasi on kiinteä ja liikkuva faasi nestettä tai kaasua. Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (high performance liquid chromatography HPLC) on yksi kromatografian muoto, jota käytetään erityisesti kvantitatiiviseen analysointiin. (Opetushallitus.)

Laitteisto koostuu alla olevan kuvion (kuvio 2) mukaisesti pumpusta, injektorista, kolonnista ja detektorista. Tutkittava näyte injektoidaan näytteensyöttöventtiilin kautta kolonniin, jossa se etenee kolonnissa virtaavan ajoliuoksen mukana. Ajoliuoksen tasaisen virtauksen kolonnissa saa aikaan pumppu. Näyte höyrystyy kolonnissa ja siitä erottuvat partikkelit liikkuvat sitä pitkin ja saapuvat eri aikoihin detektorille. Erottuminen perustuu yhdisteiden vuorovaikutukseen ajoliuoksen ja kolonnin kanssa. Detektori havaitsee eri komponenttien tuottamat signaalit ja piirtää niistä kuvaajan ajan funktiona. (Jaarinen & Niiranen 2005, 154.)



KUVIO 2. Korkean erotuskyvyn nestekromatografian periaate (Opetushallitus, muokattu)

Pumppu saa aikaan ajoliuoksen liikkumisen kolonnia pitkin, joten siltä vaaditaan luotettavaa toimintakykyä erilaisilla virtausnopeuksilla ja paineilla. Pumpun avulla saadaan aikaiseksi portaaton liuosten tilavuussuhteiden muuttaminen ajon aikana. Pumput ovat materiaaliltaan terästä ja ne ovat yleensä resiprookkipumppuja, jossa kammiossa oleva mäntä edestakaisin liikkeessaan työntää eluentia venttiilin kautta kolonnin. Pumppua ei saa käyttää kuivana, joten täytyy pitää huolta eluentin riittävydestä. (Jaarinen & Niiranen 2005, 162–163.)

Ajoliuoksena käytetään yleensä vähintään kahta erilaista seosta. Liuosten välistä suhdetta muuttamalla saadaan selville ne olosuhteet, joissa näytteen komponentit saadaan parhaiten erottumaan toisistaan. Analyyseissä on käytetty gradienttiajtoa, jossa ajoliuosten välistä suhdetta muutetaan ajon aikana. Gradienttiajtoa käytetään silloin, kun näytteen sisältämät komponentit ovat poolisuudeltaan erilaisia. Tämä aiheuttaa sen, että joillekin komponenteille lyhyen retentioajan antava ajoliuosten suhde antaa toisille komponenteille kohtuuttoman pitkän retentioajan. (Jaarinen & Niiranen 2005, 160- 162.)

Näyte syötetään kolonniin automaattisen tai manuaalisen injektorin avulla. Näytteensyöttövaiheessa pumppu pumppaa ajoliuosta kolonniin. Kun näyte injektoidaan ruiskulla näytteensyöttösilmukkaan, niin virtaava ajoliuos kulkee silmukan kautta ja kuljettaa näytteen mukanaan kolonniin. Automaattista näytteensyöttäjää käytettäessä voidaan laatia laitteelle ajo-ohjelma, jonka mukaan laite analysoi näytteet. (Jaarinen & Niiranen 2005, 165.)

Tutkittavan näytteen tulee olla kokonaan liuenneena, koska erilaiset partikkelit voivat tukkia laitteiston osia. Ajoliuokset ja näytteet tuleekin suodattaa ennen niiden käyttöä. Näytettä liuottaessa tulee ottaa huomioon käytettävä ajoliuos, jottei niiden reagoidessa muodostu esimerkiksi sakkaa. Jotta näyte ei saostuisi, se liuotetaan ajoliuokseen tai sitä heikompaan liuokseen. (Jaarinen & Niiranen 2005, 170.)

Kromatografinen erottelu tapahtuu kolonnissa, joten sen valintaan tulee kiinnittää erityistä huomiota. Kolonni on teräsputki, joka on pakattu hyvin pienillä kiinteillä stationääripartikkeleilla, joiden tehtävänä on kuljettaa näytteen komponentteja eteenpäin. Ennen varsinaista kolonnia suositellaan käytettäväksi esikolonnia. Esikolonnin tehtävänä on suojata varsinaista kolonnia keräämällä mahdolliset epäpuhtaudet näytteestä. Yleisimmät

stationääri faasit ovat adsorptiofaasit, kemiallisesti sidotut faasit ja ioninvaihtofaasit. Opinnäytetyön klorogeenihapon määrityksissä on käytetty kemiallisesti sidottua faasia eli silikapohjaista faasia. Suurin osa faasin sisältämisestä silikan hydroksyyliyhdisteistä on korvattu suoraketjuisilla hiilivedyillä, joissa on poolisia substituutioryhmiä. Työssä käytetty kolonni on C18-materiaalia, jossa suurin osa hydroksyyliyhdisteistä on korvattu oktadekyyliyhdisteillä. (Jaarinen & Niiranen 2005, 156.)

Detektori on laitteen osa, joka pystyy erottelemaan tutkittavat yhdisteet. Sen havaitsemista yhdisteistä saadaan kromatogrammi. Yhdisteen antaman signaalin suuruus on suoraan verrannollinen näytteen konsentraatioon ja injektoituun näytemäärään. Nestekromatografiassa ei ole yleisdetektoreja, joten detektori tulee valita tutkittavien yhdisteiden mukaan. Yleisin detektori on UV/Vis-detektori, jota käytetään, kun tutkittavan yhdisteen absorptio tapahtuu UV-säteilyn tai näkyvän valon alueella. Opinnäytetyön analyyseissä käytetyssä laitteistossa on käytetty diodirividetektoria, joka on UV/Vis-detektori. Diodirivillä varustetulla detektorilla saadaan aikaan UV/Vis-spektri millä tahansa aallonpituudella. (Jaarinen & Niiranen 2005, 165- 166.)

2.3 Rikastaminen

Rikastaminen on teollisuudessa käytetty menetelmä, jossa tutkittavasta näytteestä poistetaan hyödytön aines. Työssä rikastamisen kohteena on perunankuorimassa, josta halutaan rikastaa klorogeenihappoa. Testauksessa käytetään kolmea eri keinoa: kryokonsentroidintia, sumukuivausta ja polyvinyylipolypyrrolidonista tehtyä pylvästä. (CEMIS-Oulu, a.)

Kryokonsentroidinti on erotusmenetelmä, jota käytetään erityisesti elintarviketeollisuudessa konsentroimaan esimerkiksi proteiineja ja vesiliukoisia vitamiineja. Menetelmän periaatteena on se, että jäätyneestä näytteestä erotetaan sentrifugoimalla erilleen jäänyt vesi ja tutkittava yhdiste. Tällöin tutkittavan yhdisteen pitoisuus erotetussa nesteessä on suurempi kuin alkuperäisessä näytteessä. (Khajehei & Niakousari, 1-2.)

Sumukuivaus on teollisuudessa käytetty keino, jolla kuivataan nestemäisiä materiaaleja. Se on prosessi, jossa nestemäinen liuos sumutetaan pieninä pisaroina kuumaan kaasuvir-

taan, jolloin liuotin haihtuu ja kuivauksen tuloksena muodostuu jauhetta. Kuivausta jatketaan kunnes saavutetaan haluttu kosteuspitoisuus muodostuvissa partikkeleissa. (CEMIS-Oulu, a.)

Polyvinyylipolypyrrolidoni (PVPP) on yhdiste, jota käytetään elintarviketeollisuudessa stabilointiaineena. Oluttuotannossa PVPP:a käytetään oluen kirkastuksessa, koska se muodostaa peptidisidoksen tanniinien kanssa ja saostaa ne astian pohjalle. Peptidisidoksella tarkoitetaan kahden aminohapon välistä amidisidosta. (Ashland.) Rikastuksen testauksessa PVPP:n tarkoitus on sitoa näytteen sisältämä klorogeenihappo, jonka jälkeen se irrotetaan etanolipesujen avulla.

2.3.1 Pyöröhaihdutus

Pyöröhaihdutus on nopeutettua alipainehaihdutusta, jota käytetään esimerkiksi liuottimen tai veden poistoon näytteestä. Lämpövesihauteessa olevaa näytekolvia pyöritetään moottorin avulla, jolloin lämmönsiirto nopeutuu ja haihtuminen tehostuu. Testauksissa pyöröhaihdutusta käytettiin etanolin poistoon näytteestä, jotta sen etanolipitoisuus olisi alle 10 % jatkokäsittelyä varten. (Orgaanisen kemian verkosto.)

2.3.2 Refraktometri

Refraktometri on laite, jolla mitataan nesteen taitekerrointa. Näytteen taitekerroin määrittellään valon nopeuksien suhteen tyhjiössä. Kertoimen suuruuteen vaikuttaa valon eri etenemisnopeus kussakin aineessa. Taitekertoimen avulla saadaan selville liukoisen aineen kuten sokerin kokonaispitoisuus näytteessä. Mittaamalla taitekerrointa saadaan myös selville näytteen tiheys, lämpötila ja liuenneiden aineiden konsentraatio näytteessä. Rikastamisen eri työvaiheissa näytteistä määritettiin liuenneiden aineiden konsentraatio. Konsentraatio saatiin Brix-arvona joka kertoo montako prosenttia nestemäisestä näytteestä on liuenneita aineita. (CEMIS- Oulu, b.)

2.4 Validoinnin tarkoitus

Validoinnin tarkoituksena on saada selville menetelmän soveltuvuus käyttötarkoitukseen. Validointi suositellaan tehtäväksi silloin kun kyseessä on uuden menetelmän kehittäminen tai jo olemassa olevaa menetelmää halutaan parantaa. Validointi on suoritettava uudelleen, jos menetelmää tullaan parantamaan, uudistamaan tai laitetta vaihdetaan. Mittaustuloksista lasketaan erilaisia parametreja, jotka ilmaisevat mittaumenetelmän sopivuuden kyseistä määrittystä varten. Menetelmälle on tehtävä tarvittavat muutokset, jos saadut parametrit siitä viestivät. (Mittatekniikan keskus, 25–26.)

Työssä validoidaan menetelmä, jota käytetään HPLC:llä fenolisten happojen määrittämiseen. Validointi koskee fenolisista hapoista vain klorogeenihappoa. Menetelmän validoinnissa tutkittavat asiat ovat menetelmän toistettavuus, toteamisraja, määrittäysraja, lineaarisuus ja systemaattinen virhe.

2.4.1 Menetelmän toistettavuus

Menetelmän toistettavuudella tarkoitetaan mittaustulosten yhtenevyyttä, kun mittaukset suoritetaan samalla näytteellä ja samalla laitteella lyhyellä aikavälillä. Menetelmän toistettavuus määritetään niin, että standardia numero 3 mitataan 6 kertaa. Saaduista tuloksista lasketaan keskihajonta, joka kuvaa tulosten ryhmittymistä keskiarvon ympärille. Mitä vähemmän saadut tulokset poikkeavat keskiarvosta, sitä pienempi on keskihajonta. (Mittatekniikan keskus, 37.)

2.4.2 Toteamis- ja määrittäysraja

Toteamis- ja määrittäysraja lasketaan standardisuorasta saatujen tulosten avulla. Yhtälöissä tarvittavat leikkauskohdan keskihajonta ja kulmakerroin saadaan tekemällä Excel-ohjelmalla regressioanalyysi tuloksista, jotka saadaan toistettavuutta mitattaessa. Toteamisraja on pienin mahdollinen pitoisuus, joka voidaan menetelmällä luotettavasti todeta. Raja (LOD) lasketaan yhtälön 1 avulla. (Jaarinen & Niiranen 2005, 13.)

$$C(LOD) = \frac{3 \cdot S_0}{B_1} \quad (1)$$

missä

S_0 = leikkauskohdan keskihajonta

B_1 = kulmakerroin

Määritysraja (LOQ) lasketaan yhtälöllä 2 ja se on pienin mahdollinen pitoisuus, joka voidaan määrittää luotettavasti. Se on myös pienin mahdollinen pitoisuus, jolla voidaan tehdä kvantitatiivinen määrittys. (Jaarinen & Niiranen 2005, 13.)

$$C(LOQ) = \frac{10 \cdot S_0}{B_1} \quad (2)$$

missä

S_0 = leikkauskohdan keskihajonta

B_1 = kulmakerroin

2.4.3 Lineaarisuus

Lineaarisuudella tarkoitetaan menetelmän kykyä antaa tietyllä alueella hyväksyttävä lineaarinen korrelaatio näytteiden ja standardisuoran välillä. Standardisuora ajetaan kolme kertaa peräkkäin ja sen täytyy kattaa koko mittausalue. Saaduista tuloksista nähdään, ovatko muodostuneet suorat lineaarisia. Tuloksien avulla tehdään regressiosuora, josta voidaan arvioida menetelmän lineaarinen alue. (Jaarinen & Niiranen 2005, 13.)

2.4.4 Systemaattinen virhe

Systemaattinen virhe vaikuttaa menetelmän tarkkuuteen ja se ilmenee aina samansuuruisena, kun tiettyä näytettä mitataan muuttamatta mittausolosuhteita. Kun mittausolosuhteita ei muuteta niin systemaattinen virhe voi johtua väärästä mittaustavasta tai mittalaitteesta

tapahtuvasta virheestä. Systemaattinen virhe lasketaan siten, että standardia, jonka pituus tunnetaan, mitataan 6 kertaa. Virhe lasketaan keskiarvon poikkeamana tiedetystä pituisuudesta yhtälön 3 avulla. (Mittaustekniikan keskus, 30–31.)

$$B\% = \frac{(x - a)}{a \cdot 100} \quad (3)$$

missä

$B\%$ = systemaattinen virhe

x = saatujen tulosten keskiarvo

a = standardien odotusarvo

3 TYÖN SUORITUS

3.1 Näytteet

Tutkittavat perunankuorimassat (kuva 1) ovat tulleet perunateollisuuden prosessista, höyrykuorinnasta. Näytteet on toimitettu ja säilytetty pakasteina ja sitä on otettu käyttöön aina vain tarvittava määrä. Kuorintakokeessa näytteenä on käytetty myös kaupasta ostettua perunaa Rosamunda-lajiketta.



KUVA 1. Sulatuskokeissa käytettyä näytettä. (Kuva: R. Moilanen 2016.)

Kaikki tutkimuksissa käytetyt näytteet käsiteltiin menetelmällä, jota on aikaisemmin käytetty fenolisten yhdisteiden metanoliuuttoon marjoista. Tällä menetelmällä pystyttiin määrittämään kvantitatiivisesti klorogeenihapon pitoisuus raaka-aineessa ja prosessien välivaiheissa. Uuttoliuksena käytettiin metanolia, jossa on 0,01 %:a suolahappoa (hapan metanoli) ja laitteistona ultraäänihaudetta ja sentrifugia. Prosessin kehityksessä käytettiin happaman metanolin sijaan etanolia ja vettä, joita voidaan käyttää elintarvikkeiden ja lisäravinteiden prosessoinnissa.

3.2 Näytteiden käsittely

Näytettä punnittiin 5 grammaa ja siihen lisättiin 10 ml hapanta metanolia, jonka jälkeen sitä uutettiin ultraäänihauteessa 10 minuuttia. Uuttamisen jälkeen näytettä sentrifugoitiin 10 minuuttia kierrosnopeudella 3500 rpm. Uuttoliuos kerättiin talteen ja suodatettiin GHP-suodattimen (huokoskoko:0,45 μm) läpi näytepulloon.

Näytteet analysoitiin Agilentin 1100-laitteistolla (kuva 2), jossa ajoliuoksena käytettiin metanolia ja 0,3 %:sta muurahaishappoa erilaisissa suhteissa alkaen suhteesta 10:90. Injektioilavuutena oli 10 μl , virtausnopeutena 0,2 ml/min ja ajoaikana 50 min. Kolonnina käytettiin Agilentin C18 käänteisfaasikolonnia, detektorina diodirividetektori (UV/Vis) ja spektrimäärityksen aallonpituusalueena 190–900 nm. Klorogeenihappo detektoitiin aallonpituudella 320 nm.



KUVA 2. Analyseissa käytetty HPLC-laitteisto. (Kuva: R. Moilanen 2016.)

3.3 Sulatuskoesarja 1

Työssä tutkittiin kuutta erilaista sulatusmenetelmää ja näytteiden pitoisuuksien muutoksia seurattiin viikon ajan. Näytteille tehtiin taulukon 1 mukaiset käsittelyt, jonka jälkeen ne uutettiin happamalla metanolilla. Näytteille tehtiin klorogeenihappomääritys, jonka jälkeen näytteitä säilytettiin huoneenlämmössä viikon ajan. Klorogeenihappo-pitoisuus

mitattiin alussa, 1. ja 7. vuorokauden kohdalla. Näytteiden 8-10 pitoisuusmääritykset tehtiin vuorokauden myöhemmin. Näytteille (kuva 3) tehtiin myös analysointi kapillarielektroforeesilla, jotta nähtäisiin mahdolliset muutokset etikkahappo-, maitohappo ja sokeripitoisuuksissa. Analysoinnin ja tulosten laskemisen suoritti Mittaustekniikan yksikön projektitutkija.

TAULUKKO 1. Näytteiden käsittelyt

Näyte	Käsittely
16C340/8	Sulatus mikroaaltouunissa ja huoneenlämmössä yön yli
16C340/9	Sulatus huoneenlämmössä
16C340/10	Sulatus mikroaaltouunissa ja pakastus heti
16C340/11	Sulatus huoneenlämmössä
16C340/12	Sulatus kuumassa vedessä (vesihaude 90 °C)
16C340/13	Lisätty lämmintä vettä (39°C)
16C340/14	Lisätty kuumaa vettä (92°C) ja pidetty vesihauhteessa (90°C)



KUVA 3. Sulatuskoesarjan 1 näytteet nro 11–14. (Kuva: R. Moilanen 2016.)

3.4 Sulatuskoesarja 2

Ensimmäisen sarjan tulosten perustella tutkittiin sulatusta mikroaaltouunissa uudelleen. Mikroaaltouunissa sulatettiin noin 100 grammaa näytettä, jonka jälkeen massa jaettiin kolmeen osaan. Näytteille tehtiin taukukossa 2 nähtävät käsittelyt, jonka jälkeen ne uutettiin hapan-metanolilla ennen klorogeenihappopitoisuuden määrittystä. Näytteitä säilytettiin kahden viikon ajan joko huoneenlämmössä tai jääkaapissa, jonka aikana pitoisuus

määritettiin 1., 7. ja 14. vuorokauden kohdalla. Näytteet (kuva 4) analysoitiin myös kapillaarielektroforeesilla etikkahapon, maitohapon, fruktoosin ja glukoosin mahdollisten pitoisuusmuutosten seuraamiseksi.

TAULUKKO 2. Näytteiden käsittelyt

Näyte	Käsittely	Säilytys
16C340/15	Sulatus mikroaaltouunissa	huoneenlämpö, pimeä
16C340/16	Sulatus mikroaaltouunissa	jääkaappi
16C340/17	Sulatus mikroaaltouunissa	huoneenlämpö, valoisa



KUVA 4. 16C430/15–16 7 vrk näytteet uuton jälkeen. (Kuva: R. Moilanen 2016.)

3.5 Kuorintakoesarja

Kuorintakoesarjan näytekäsittelyt tehtiin taulukon 3 mukaisesti. Kaksi ensimmäistä koekilua tehtiin raa'alle perunalle ja muissa testeissä käsiteltiin puolikypsäksi tai kypsäksi höyrytettyä perunaa. Näytteen numero 5 kuoret kuumennettiin kuorinnan jälkeen 93 °C:een.

TAULUKKO 3. Näytteiden käsittelyt

Näyte:	Käsittely	Höyrytys- aika, min
Pkkoe 1	Perunan kuorinta vedessä	0
Pkkoe 2	Perunan kuorinta raakana	0
Pkkoe 3	Kypsä peruna ja kuorinta heti	28
Pkkoe 4	Puoli kypsä peruna ja kuorinta heti	14
Pkkoe 5	puoli kypsä peruna, kuorinta heti ja kuorien kiehaus	18

Kuorimisen jälkeen näytteiden 1 ja 2 kuoret murskattiin sauvasekoittimella, jotta uuttoi-
hin saataisiin mahdollisimman hienonnettu näyte. Näytteet 3-5 olivat kuorinnan jälkeen
niin homogeenisiä, että niitä pystyttiin käyttämään sellaisenaan. Kuorille tehtiin hapam-
metanoli-uutto, jonka jälkeen klorogeenihappopitoisuus määritettiin.

3.6 Uttoliuoksen testaus

Testauksessa käytettiin neljää eri aikaan kerättyä teollisuusprosessin höyrykuorinnasta
tulevaa perunankuorimassaa. Testattavina uuttoliuksina käytettiin referenssinä hapanta
metanolia ja varsinaisina liuottimina etanolia ja vettä. Jokaiselle näytteelle tehtiin uutot
kolmella eri liuoksella. Metanoli- ja vesinäytteitä säilytettiin huoneenlämmössä valoi-
sassa viikko ja niille tehtiin uutot 1. ja 7. vuorokauden kohdalla.

3.7 Rikastaminen

Kryokonsentroidi aloitettiin näytteenkäsittelyllä, jossa sekoitettiin 100 grammaa jäistä
perunankuorimassaa ja 200 grammaa vettä. Sekoituksen jälkeen neste ja kuoret erotettiin
toisistaan mehulingon avulla. Saatu neste sentrifugoitiin 4 °C:een lämpötilassa ja kierros-
nopeudella 4500 rpm 15 minuutin ajan. Sentrifugoinnin jälkeen neste jaettiin näyteputkiin
10 ml:n annoksiin. Putket siirrettiin pakastimeen ja käsittelyä jatkettiin seuraavana päi-
vänä. Tehtiin kolme rinnakkaista näytettä, jotta tulokset olisivat luotettavampia.

Kryokonsentroinnissa käytettiin Millipore:n putkia (centrifugal filter units), joissa on suodatin keskellä putkea. Jäätynyt näyte siirrettiin putkeen ja sentrifugoitiin 15 minuuttia lämpötilassa 4 °C:tta ja kierrosnopeudella 4500 rpm. Suodattunut näyte siirrettiin uuteen putkeen ja jäljelle jäänyt jääpala toiseen (kuva 5). Konsentroitunut näyte ja jääpalat punnittiin, jonka jälkeen niiden klorogeenihappo-pitoisuus määritettiin. Näytteiden Brix-arvo mitattiin refraktometrillä, jotta nähdään liukoisen aineen osuus näytteestä.

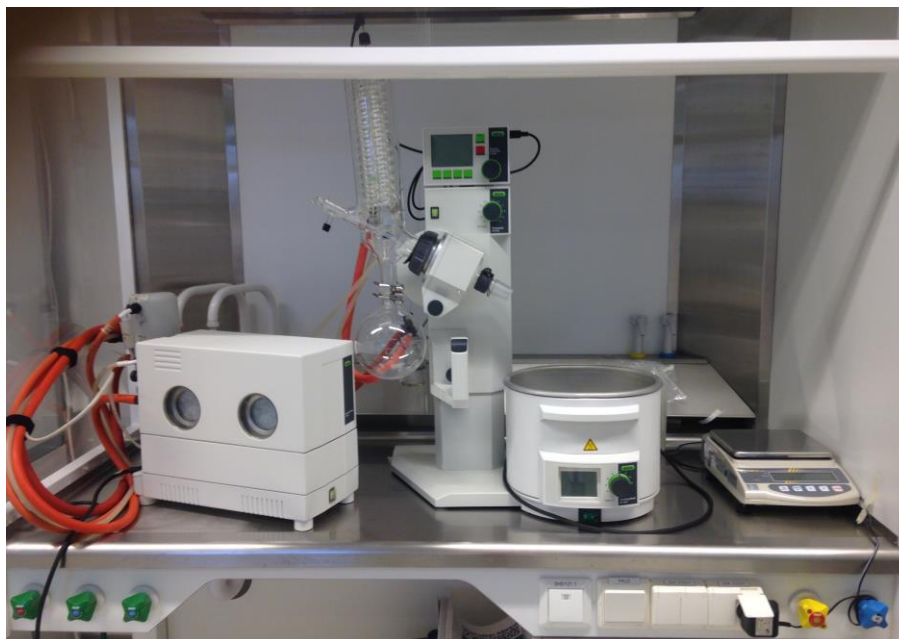


KUVA 5. Kryokonsentroitunut näyte. (Kuva: R. Moilanen 2016.)

Kryokonsentrointi suoritettiin vielä toisen kerran, jonka jälkeen kahteen kertaan konsentroidut näytteet yhdistettiin. Yhdistäminen tehtiin, jotta saataisiin mahdollisimman suuri tilavuus väkevää liuosta sumukuivausta varten. Yhdistetyn näytteen Brix-arvo mitattiin myös jokaisen konsentroinnin ja näytteiden yhdistämisen jälkeen. Näytteiden kuiva-ainepitoisuus määritettiin, jotta tiedettäisiin onko se saavuttanut riittävän kuiva-aineprosentin jatkokäsittelyä varten.

Työssä testattiin myös etanolin vaikutusta uuttoliuoksena ennen sumukuivausta ja siitä tehtiin myös kolme rinnakkaista uuttoaerää. Jäistä perunankuorimassaa punnittiin 100 grammaa, johon lisättiin 200 grammaa A-laatuista (94 %) etanolia. Näytettä sekoitettiin lapasekoittajalla 15 minuuttia, jonka jälkeen näyte murskattiin sauvasekoittimella. Näyte suodatettiin maitosuodattimen läpi, josta erottunut neste ja kuorimassa punnittiin. Ennen klorogeenihapon määrittämistä näytteestä poistettiin suurin osa etanolista alipainehaih-

dutuksella. Haihdutus suoritettiin, koska sumukuivaukseen menevän näytteen etanolipitoisuus saa olla enintään 10 %. Työssä käytettiin BÜCHI rotavapor R-210 –laitteistoa, jossa alipaineen lähteenä oli vesisuihkupumppu (kuva 6)



KUVA 6. Pyöröhaihdutus-laitteisto. (Kuva: R. Moilanen 2016.)

Alipainehaihdutus aloitettiin paineesta 500 mbar, josta lähdettiin laskemaan painetta hitaasti alaspäin kunnes saavutettiin 70 mbar. Näyte oli vesihauteessa, jonka lämpötila oli 50 °C. Alipainehaihdutuksen jälkeen näytteen klorogeenihappopitoisuus määritettiin uudelleen. Haihdutus suoritettiin kolmelle eri näytteelle, jonka jälkeen saadut näytteet yhdistettiin. Yhdistämisen jälkeen määritettiin näytteen laskennallinen klorogeenihappopitoisuus aikaisempien tulosten avulla ja myös analysoimalla yhdistettyä näytettä. Näytteen Brix-arvo mitattiin alussa, haihdutuksen ja yhdistämisen jälkeen.

Sumukuivaus tehtiin kryokonsentroidulle vesiutteelle (69,74 grammaa) ja haihduttamalla konsentroidulle etanoliutteelle (63,02 grammaa). Sumukuivaus suoritettiin BÜCHI Mini Spray Dryer B-290-laitteistolla (kuva 7), jolla voidaan kuivata pienimmillään 50 ml:n ja enimmillään litran annoksia tunnissa. Vesiute pastöroitiin ennen sumukuivausta, jotta mahdolliset haitalliset bakteerit saadaan vähennettyä. Kuivaaminen aloitettiin laitteiston kokoamisella, jonka jälkeen testattiin laitteiston kuntoa muuttamalla imutehoa ja seuraamalla samalla paineen muutoksia. Sumukuivauksen aikana kuivavana aineena olevan paineilman inletlämpötila oli 159 °C ja outlet lämpötila 91–95 °C,

imuteho 100 % ja pumpun nopeus 21 %. Näytteen kuivauksen jälkeen jatkettiin vielä deionisoidun veden sumuttamista, jotta laitteisto puhdistuisi



KUVA 7. Sumukuivauslaitteisto. (Kuva: R. Moilanen 2016.)

Polyvinyylipolypyrrolidonin (PVPP) testaaminen rikastuksessa aloitettiin tekemällä pylväs lasiseen pipettiin lisäämällä ensiksi pohjalle lasivillaa ja sitten vähitellen PVPP-vesi-seosta, kunnes korkeudeksi saatiin 4 cm (kuva 8). Ennen näytteen lisäystä pylvästä regeneroitiin vedellä, jonka jälkeen aloitettiin näytteenajo. Näytettä lisättiin 1 ml pylväaseen ja se kerättiin talteen tarkempaa analyysiä varten. Pylvästä pestiin näytteenajon jälkeen 70 %:lla etanolilla ja läpi kulkenut etanoli kerättiin talteen. Kahdelle viimeiselle näytteelle pesuliuksena käytettiin etanoli-suolahappoliuosta. Pesu suoritettiin kaksi kertaa, jonka jälkeen näyttefraktioille tehtiin hapan metanoli-uutto ennen klorogeenihappo-pitoisuuden määrittystä.



KUVA 8. PVPP-pylväs. (Kuva: R. Moilanen 2016.)

Näytteenä käytettiin perunankuorimassan vesiuutetta, jonka klorogeenihappopitoisuus analysoitiin ennen testauksen aloitusta. Saatujen tulosten perusteella laskettiin kuinka paljon tutkittavaa näytettä pylvääseen on sitoutunut. Etanolifraktioiden tulosten avulla saatiin selville kuinka paljon klorogeenihappoa on saatu irrotettua pylväästä. Tulosten avulla laskettiin saantoprosentti, joka kertoo sen kuinka hyvin sitoutuminen ja klorogeenihapon irrottaminen on onnistunut.

3.8 Validointi

Ensimmäisenä valmistettiin klorogeenihaposta standardiliuos pitoisuudeltaan 1 mg/ml, josta laimennettiin validoinnissa käytettävät standardit. Laimennetut standardit olivat pitoisuuksiltaan 2, 5, 10, 40, 70 ja 100 µg/ml. Standardeista ajettavan standardisuoran on tarkoitus kattaa menetelmän mittausalue. Standardin numero 3 (10 µg/ml) pitoisuus määritettiin kuusi kertaa, jotta saatiin laskettua menetelmän toistettavuus ja systemaattinen virhe. Menetelmän lineaarisuus, toteamisraja ja määrittäysraja saatiin selville kolmen standardisuoran tulosten avulla.

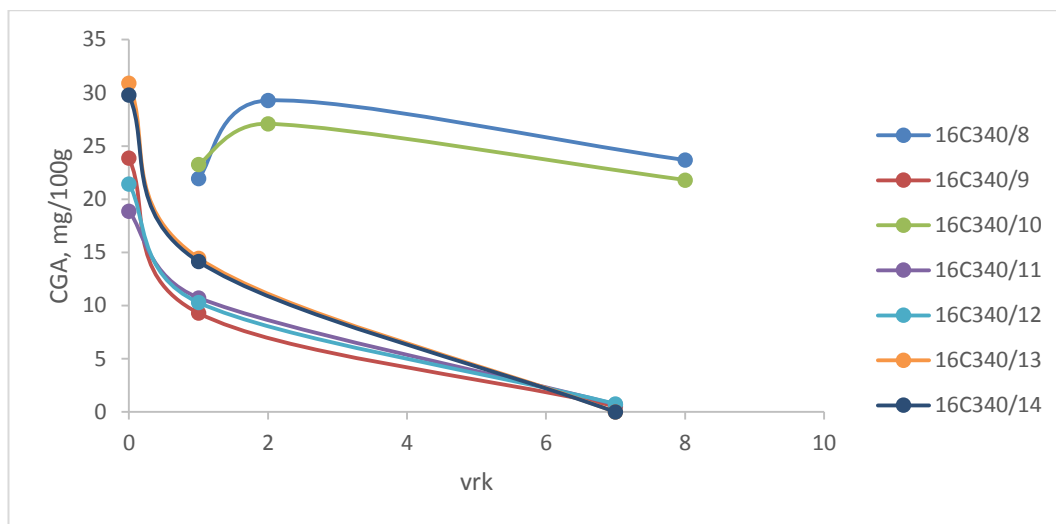
4 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELO

4.1 Sulatuskoesarja 1

Klorogeenihappo säilyi parhaiten mikroaaltouunissa sulatetuissa näytteissä (taulukko 4 ja kuvio 3). Mikroaaltouunissa sulatettujen näytteiden klorogeenihapon määrä näyttää hie- man nousevan ensimmäisen/toisen vuorokauden aikana, mutta palautuu viikon päästä lä- helle alkuperäistä pitoisuutta. Pitoisuuden nousu seuraavana mittauspäivänä saattaa joh- tua massan epähomogeenisuudesta, mutta selkeästi mikroaaltokäsittely parantaa kloro- geenihapon säilyvyyttä näytteessä. Muut tutkitut sulatusmenetelmät olivat klorogee- nihapon säilyvyyden kannalta heikkoja. Vuorokauden säilytys huoneenlämmössä aiheutti jopa puolet huonompia tuloksia kaikilla muilla tutkituilla sulatustekniikoilla verrattuna mikroaaltouunissa sulatettuihin näytteisiin. Huonoimmat tulokset saatiin näytteillä nu- mero 13 ja 14, joihin oli lisätty vettä.

TAULUKKO 4. Sulatuskoesarjan näytteiden tulokset

Näyttenumero:	Sulatus	CGA, mg/100g	CGA, mg/100g 1 vrk	CGA, mg/100g 7 vrk
16C340/8	Mikroaaltouuni	22	29 (2 vrk)	24 (8 vrk)
16C340/9	Huoneenlämpö	24	9 (2 vrk)	0,5 (8 vrk)
16C340/10	Mikroaaltouuni	23	27 (2 vrk)	22 (8 vrk)
16C340/11	Huoneenlämpö	19	11	0,72
16C340/12	Vesihaude	21	10	0,77
16C340/13	Veden lisäys	31	15	nd
16C340/14	Veden lisäys ja vesihaude	30	14	nd



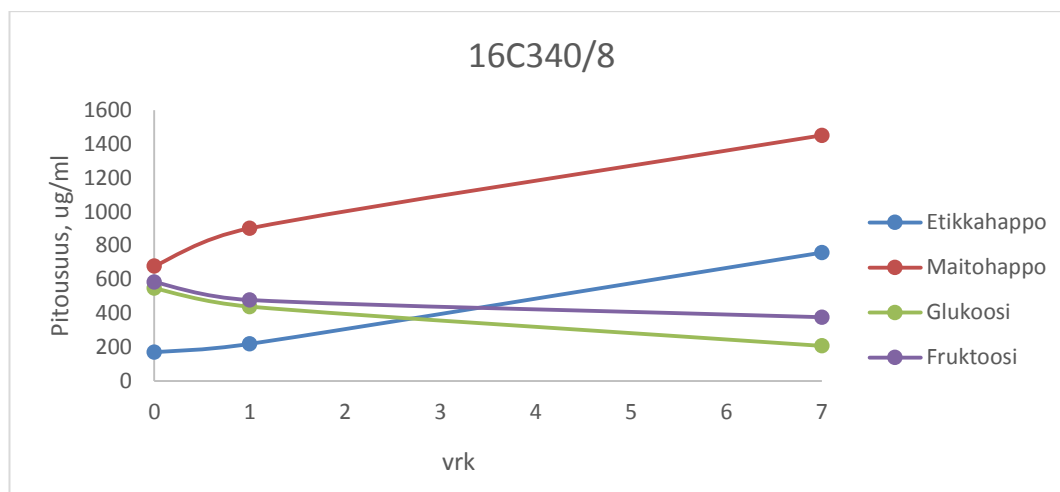
KUVIO 3. Sulatuskoesarjan tulokset

Perunankuorimassassa käynnistyy maitohappokäyminen hyvin nopeasti huoneen lämmössä. Maitohappokäymisessä perunankuoressa olevat sokerit, fruktoosi ja glukoosi käyvät hapoiksi. Tulokset kapillaarielektroforeesilta maitohapon, etikkahapon, fruktoosin ja glukoosin osalta ovat tukena analysoitaessa tuloksia. Näytteet 8 ja 10 on molemmat sulatettu mikroaaltouunissa ja näytteen 10 vähäisen määrän takia vain näyte 8 on analysoitu kapillaarielektroforeesilla. Pienimmät pitoisuudet maito- ja etikkahapon osalta on näytteen 8 osalta, joka on sulatettu mikroaaltouunissa. Maitohapon määrä on ollut huoneen lämmössä sulatetuissa näytteissä (9,11) ja vesihautteessa sulatetussa näytteessä (12) suurinta ja sen määrä on jopa viisinkertaistunut viikon aikana. Sokerien määrä kyseisissä näytteissä 9, 11 ja 12 oli viikon aikana laskenut alle määritettävän pitoisuusrajan. Näytteessä 8 glukoosin ja fruktoosin määrä on puolittunut 7 vuorokauden aikana.

Tuloksista (taulukko 5 ja kuvio 4) nähtiin, että mikroaaltokäsitellyssä näytteessä 8 etikkahapon määrä ensimmäisen vuorokauden aikana on noussut hieman ja viikon aikana määrä on nelinkertaistunut. Maitohapon määrä tuplaantuu viikon aikana ja sen lisääntyminen on ollut tasaista, mutta jäi selkeästi alhaisemmaksi kuin huoneenlämmössä sulatetuilla näytteillä. Tulosten perusteella mikroaaltokäsittely parantaa klorogeenihapon säilymistä perunankuorimassassa ja hidastaa sokereiden käymistä hapoksi.

TAULUKKO 5. Kapillaarielektroforeesin tulokset mikroaaltokäsitellylle näytteelle (8)

16C340/8	Etikkahappo	Maitohappo	Glukoosi	Fruktoosi
vrk	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
0	170	678	547	584
1	218	901	439	478
7	758	1451	207	376

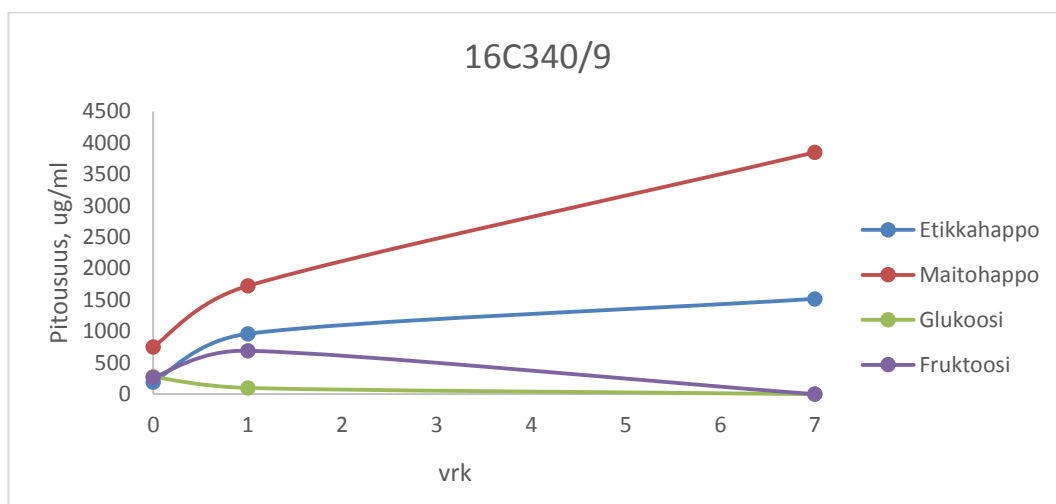


KUVIO 4. Kuvaajat kapillaarielektroforeesin tuloksista mikroaaltouunissa sulatetulle näytteelle (8)

Huoneenlämmössä sulatetussa näytteessä 9 etikkahapon määrä on jo ensimmäisen vuorokauden aikana kasvanut merkittävästi (taulukko 6 ja kuvio 5). Kasvu on jatkunut viikon aikana ja määrä on viikon jälkeen 7 kertaa isompi kuin alussa. Maitohapon määrässä on myös havaittavissa huomattavaa kasvua. Ensimmäisen vuorokauden aikana ja myös seuraavan mittapisteen kohdalla määrä on tuplaantunut. Glukoosin määrä puolittuu jo ensimmäisen vuorokauden kohdalla ja seitsemännen vuorokauden säilytyksen jälkeen pitoisuus on alle määritysrajan.

TAULUKKO 6. Kapillaarielektroforeesin tulokset huoneenlämmössä sulatetulle näytteelle (9)

16C340/9	Etikkahappo	Maitohappo	Glukoosi	Fruktoosi
vrk	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
0	193	754	276	267
1	962	1724	100	692
7	1517	3848	nd	nd

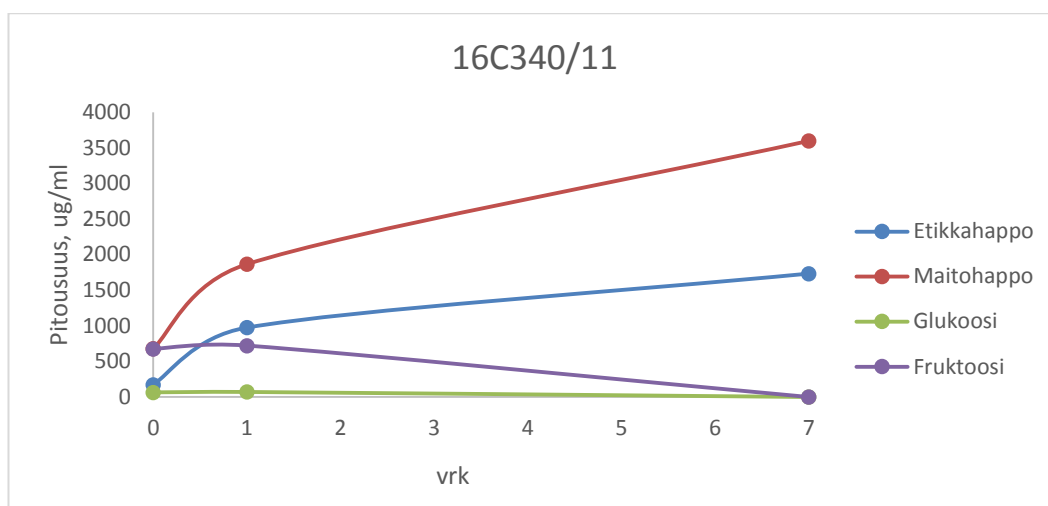


KUVIO 5. Kapillaarielektroforeesin tulokset huoneenlämmössä sulatetulle näytteelle (9)

Huoneenlämmössä sulatetun näytteen 11 kohdalla etikkahapon määrä kymmenkertaistuu viikon aikana ja tämä on jo nähtävissä ensimmäisen vuorokauden kohdalla (taulukko 7 ja kuvio 6). Maitohapon määrä lisääntyy jo ensimmäisen vuorokauden aikana melkein kolminkertaiseksi. Sokereiden määrässä huomataan pientä muutosta vuorokauden aikana, mutta seitsemännen vuorokauden kohdalla kummankin määrä on laskenut alle määrittysrajan.

TAULUKKO 7. Tulokset kapillaarielektroforeesilta huoneenlämmössä sulatetulle näytteelle (11)

16C340/11	Etikkahappo	Maitohappo	Glukoosi	Fruktuosi
vrk	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
0	174	681	65	675
1	975	1865	71	722
7	1733	3597	nd	nd

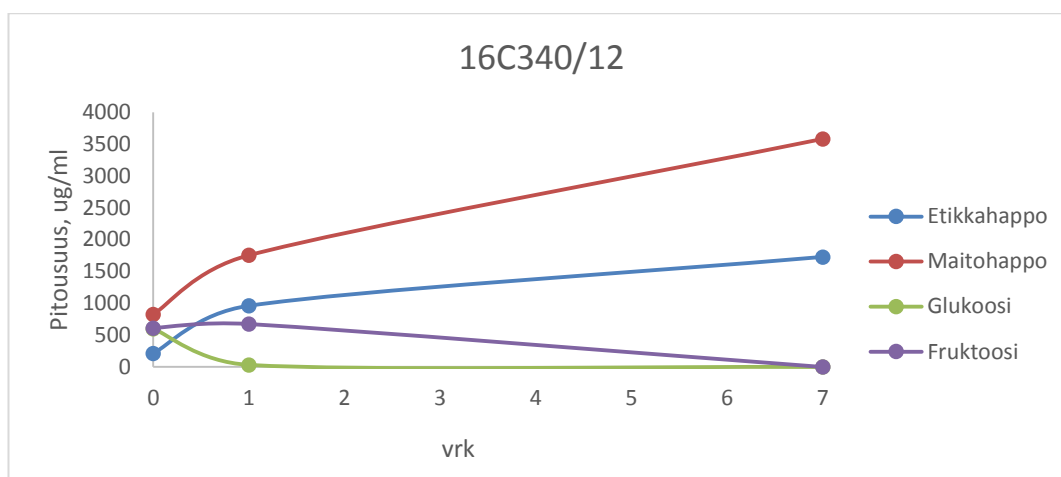


KUVIO 6. Tulokset kapillaarielektroforeesilta huoneenlämmössä sulatetulle näytteelle (11)

Näytteessä 12 etikkahapon määrän kasvu jo ensimmäisen vuorokauden aikana on suurta (taulukko 8 ja kuvio 7). Lopullinen pitoisuus on samaa luokkaa kuin edellisen näytteen kanssa. Maitohapon määrä alussa on suurin verrattuna muihin näytteisiin. Glukoosin määrä näytteessä laskee rajusti jo ensimmäisen vuorokauden aikana ja viikon sisällä määrä on laskenut alle määrittäysrajan. Fruktosin määrässä huomataan vähäistä kasvua ensimmäisen vuorokauden aikana, mutta niin kuin aikaisemmissa näytteissä, pitoisuus laskee viikon aikana alle määrittäysrajan.

TAULUKKO 8. Tulokset vesihautteessa sulatetulle näytteelle (12)

16C340/12	Etikkahappo	Maitohappo	Glukoosi	Fruktosi
vrk	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
0	214	824	602	612
1	961	1754	33	674
7	1728	3581	nd	nd



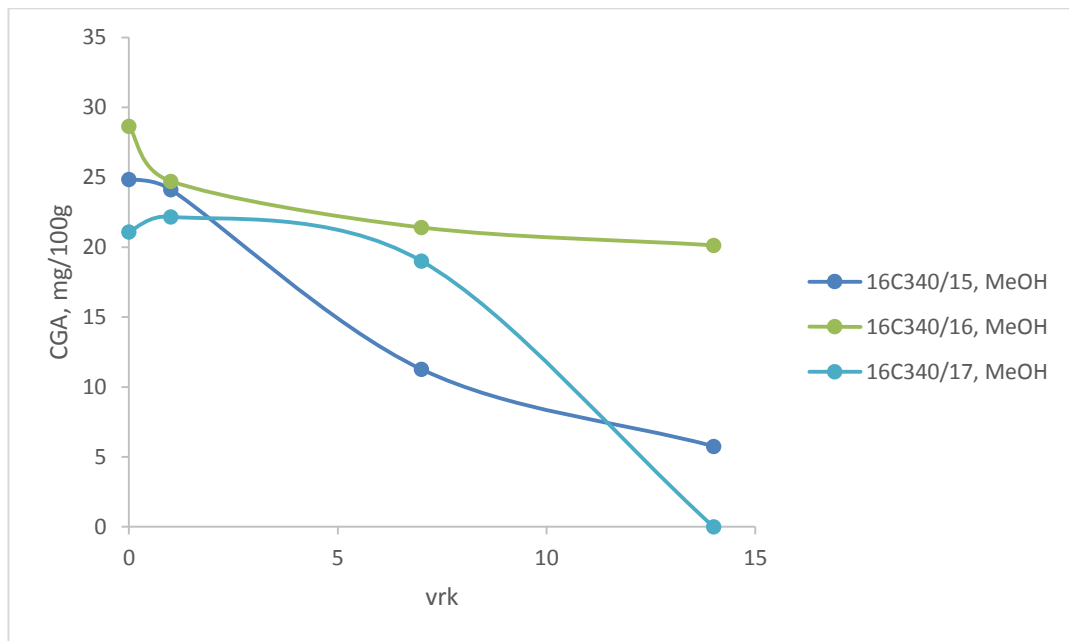
KUVIO 7. Tulokset kapillaarielektroforeesilta vesihauteessa sulatetulle näytteelle (12)

4.2 Sulatuskoesarja 2

Huoneenlämmössä pimeässä säilytetyn näytteen (15) klorogeenihapon määrässä ei ensimmäisen vuorokauden kohdalla ole muutoksia tapahtunut (taulukko 9 ja kuvio 8). Viikon säilytyksen jälkeen pitoisuus oli vähentynyt puoleen. Klorogeenihapon määrä puollittuu jälleen kahden viikon säilytyksen aikana verrattuna viikon jälkeen mitattuun tulokseen. Samankaltaista vähenemistä tapahtuu myös näytteelle 17, jota on säilytetty huoneenlämmössä valoisassa. Siinä klorogeenihappo säilyy paremmin viikon ajan, mutta kahden viikon säilytyksessä klorogeenihapon määrä on laskenut alle määritettävän pitoisuusrajan. Jääkaapissa säilytetyn näytteen (16) klorogeenihapon määrä vähenee eniten ensimmäisen vuorokauden aikana ja väheneminen sen jälkeen on hitaampaa. 7. vuorokauden ja 14. vuorokauden välillä väheneminen on vain noin 2 mg/100g luokkaa, eli hyvin vähäistä.

TAULUKKO 9. Sulatuskoesarjan tulokset

Näyte:	Säilytyspaikka	CGA, mg/100 g	CGA, mg/100g 1 vrk	CGA, mg/100g 7 vrk	CGA, mg/100g 14 vrk
16C340/15	Huoneen- lämpö, pimeä	25	24	11	6
16C340/16	Jääkaappi	29	25	21	20
16C340/17	Huoneen- lämpö, valoisa	21	22	19	nd



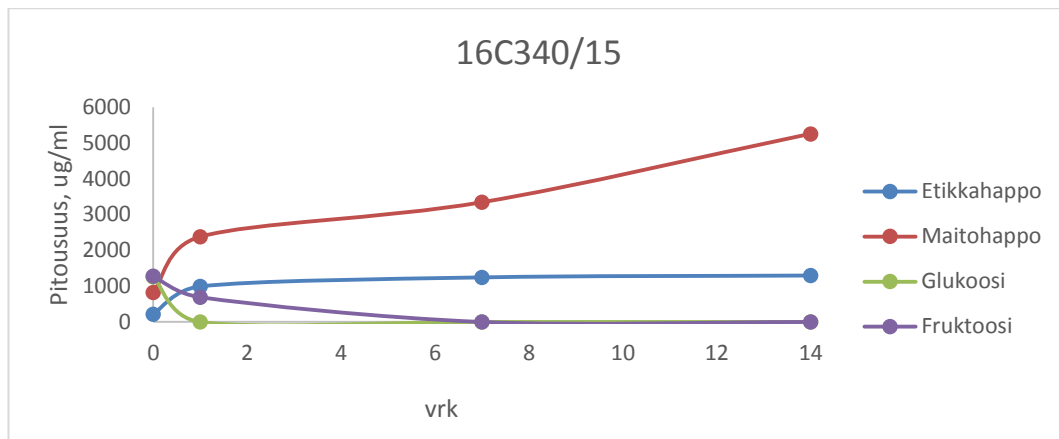
KUVIO 8. Sulatuskoesarjan tulokset

Maitohapon tuotanto on ollut suurinta huoneen lämmössä säilytetyssä näytteessä (15) ja pienintä näytteessä jääkaapissa säilytetyssä näytteessä 16 (taulukko 10 ja kuvio 9). Etikkahapon määrä on ollut pienintä näytteessä 16, kun taas huoneen lämmössä säilytetyissä näytteissä määrät ovat olleet samankaltaisia.

Huoneenlämmössä pimeässä säilytetyssä näytteessä 15 maitohapon määrä on kuusinkertaistunut kahden viikon aikana ja suurin muutos tapahtuu 1. vuorokauden aikana. Näytteen sisältämä glukoosin määrä on alle määritettävän pitoisuusrajan jo ensimmäisen vuorokauden aikana. Fruktosin määrä laskee puoleen ensimmäisen vuorokauden aikana ja vähenee alle määritettävän pitoisuusrajan viikon aikana. Etikkahappopitoisuus näytteessä kolminkertaistuu ensimmäisen vuorokauden aikana, mutta seuraavia tuloksia tarkasteltaessa muutos on vähäinen.

TAULUKKO 10. Huoneenlämmössä pimeässä säilytetyn näytteen (15) tulokset

16C340/15 vrk	Etikkahappo µg/ml	Maitohappo µg/ml	Glukoosi µg/ml	Fruktosin µg/ml
0	218	826	1266	1282
1	993	2382	nd	691
7	1245	3345	nd	nd
14	1297	5258	nd	nd

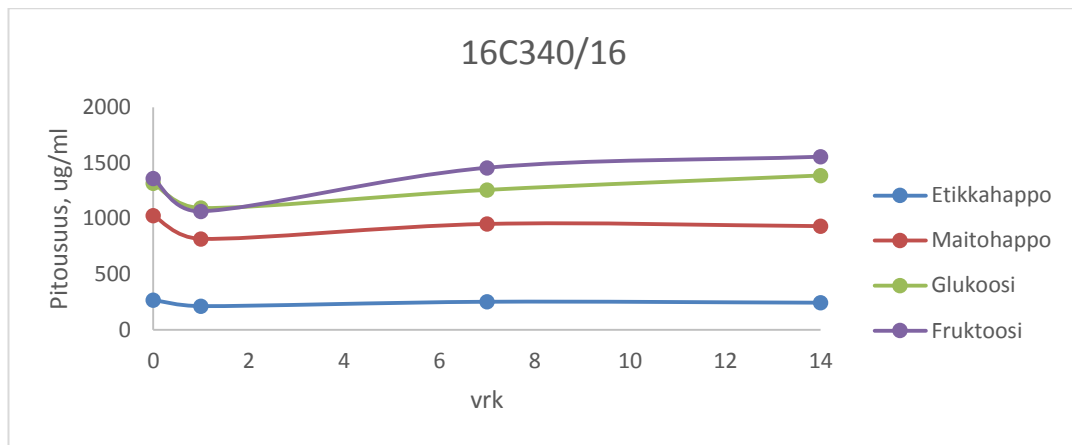


KUVIO 9. Huoneenlämmössä pimeässä säilytetyn näytteen (15) tulokset

Jääkaapissa säilytetyssä näytteessä 16 fruktoosin ja glukoosin määrä on huomattavasti suurempi kuin muissa näytteissä (taulukko 11 ja kuvio 10). Ensimmäisen vuorokauden aikana tapahtuu hieman alenemista sokeripitoisuudessa, mutta seuraavaan mittauspisteeseen mennessä pitoisuudet ovat nousseet samalle tasolle kuin alussa. Fruktoosin määrä on lisääntynyt 14 vuorokauden aikana enemmän kuin glukoosin. Maitohapon tuotannossa ei ole tapahtunut suuria muutoksia kahden viikon aikana. Etikkahapon määrä näytteessä on vähäistä verrattaessa sitä muiden näytteiden etikkahapon määrään. Jääkaapissa säilytys hidasti sokereiden happokäymistä verrattuna huoneenlämmössä säilytykseen.

TAULUKKO 11. Jääkaapissa säilytetyn näytteen (16) tulokset

16C340/16	Etikkahappo	Maitohappo	Glukoosi	Fruktoosi
vrk	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
0	270	1028	1318	1362
1	214	819	1096	1066
7	253	952	1258	1457
14	245	932	1387	1556

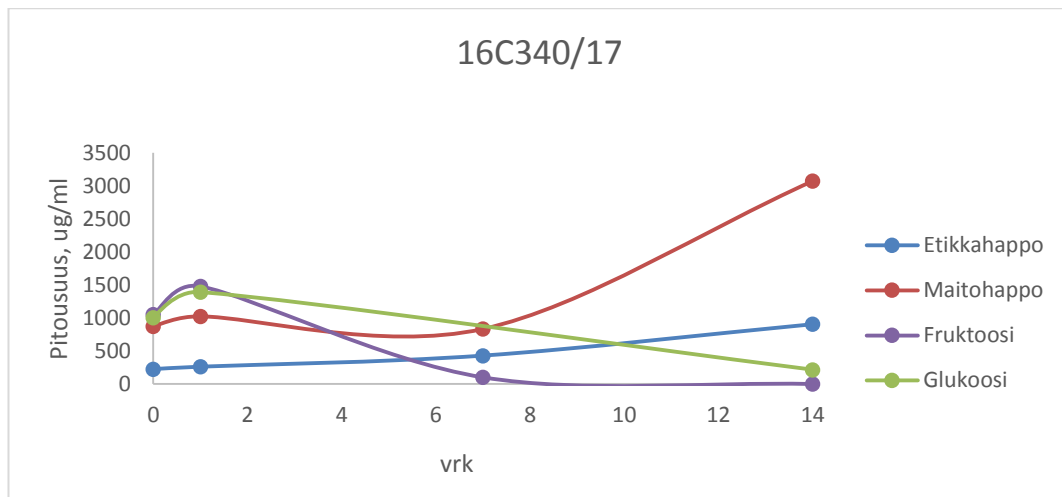


KUVIO 10. Tulokset kapillaarielektroforeesilta jääkaapissa säilytetylle näytteelle (16)

Huoneen lämmössä valossa säilytetyssä näytteessä (17) maitohapon määrä kolminkertaistuu kahden viikon aikana (taulukko 12 ja kuvio 11). Pitoisuus alenee viikon aikana, mutta kahden viikon aikana pitoisuus jälleen kasvaa. Glukoosin määrä näytteessä kasvaa hieman ensimmäisen vuorokauden kohdalla, mutta viikon jälkeen glukoosia ei enää pystytty tunnistamaan näytteestä. Fruktoosin määrä kasvaa ensimmäisen vuorokauden jälkeen, mutta se vähenee alle tunnistettavan pitoisuuden viikon aikana. Etikkahapon määrä pysyy samana ensimmäisen vuorokauden aikana, mutta kaksinkertaistuu viikon aikana ja on nelinkertainen kahden viikon jälkeen.

TAULUKKO 12. Huoneen lämmössä valoisassa säilytetyn näytteen (17) tulokset

16C340/17	Etikkahappo	Maitohappo	Glukoosi	Fruktoosi
vrk	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
0	226	875	1007	1054
1	262	1024	1392	1478
7	430	833	0	101
14	905	3072	217	0



KUVIO 11. Tulokset huoneenlämmössä säilytetylle näytteelle (17)

4.3 Kuorintakoesarja

Suurimmat klorogeenihappopitoisuudet saadaan, kun peruna on höyrytetty puolikypsäksi ja kuorinta on tehty heti (taulukko 13). Puolikypsän perunan kuorien kiehaus alentaa klorogeenihappopitoisuutta noin 10 mg/100g, kun taas kypsän perunan kuorinta antaa pitoisuudeksi alle puolet parhaimmasta pitoisuudesta. Pienin pitoisuus saatiin, kun peruna kuorittiin raakana, eikä raakan perunan kuorinta veden alla parantanut tulosta.

TAULUKKO 13. Kuorintasarjan tulokset

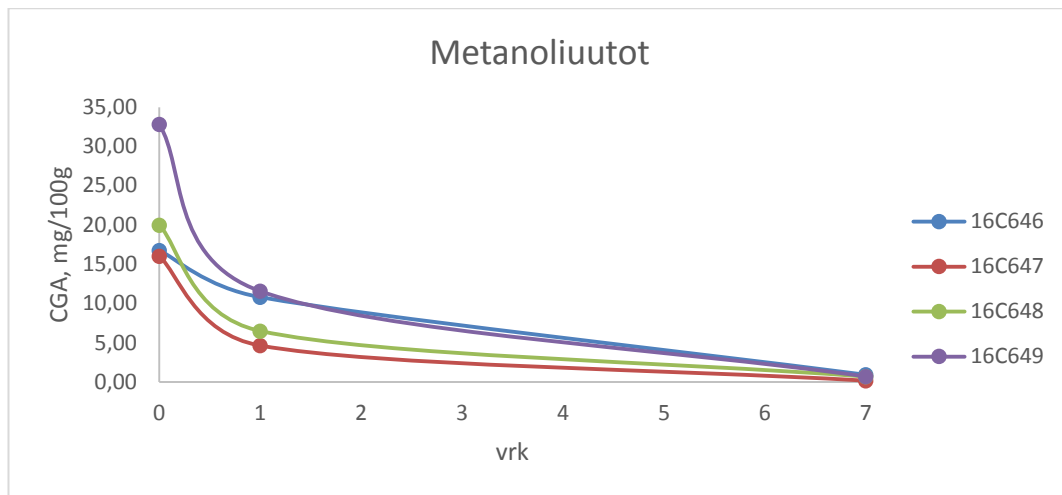
Näyte:	Käsittely	CGA, mg/100g	Höyrytysaika, min
Pkkoe 1	Raakan perunan kuorinta vedessä	1	0
Pkkoe 2	Perunan kuorinta raakana	0,8	0
Pkkoe 3	Kypsä peruna ja kuorinta heti	10	28
Pkkoe 4	Puoli kypsä peruna ja kuorinta heti	26	14
Pkkoe 5	Puoli kypsä peruna, kuorinta heti ja kuorien kiehaus	18	18

4.4 Uttoliuksen testaus

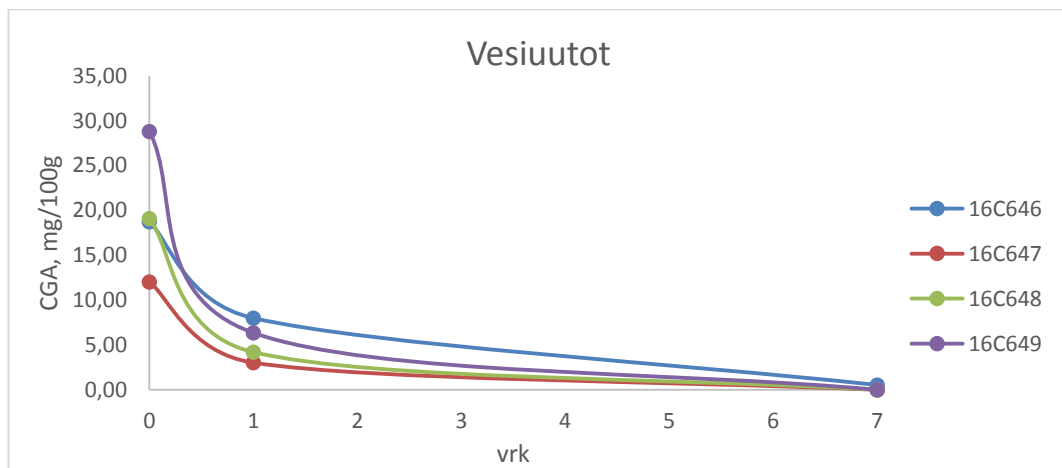
Tuloksista (taulukko 14) nähdään, että parhain klorogeenihapon-uttotulos saadaan kun uutetaan happamalla metanolilla. Vedellä uutetut näytteet antavat melkein puolet alhaisempia klorogeenihappo-tuloksia. Tulokset metanolilla ja etanolilla ovat samankaltaisia. Seitsemän vuorokauden klorogeenihapon säilyvyyden seuranta uutessa tehtiin ainoastaan metanoli- ja vesiutteille, jotka poikkesivat huomattavasti toisistaan. Molemmissa utteissa klorogeenihappo häviää säilytyksen aikana, kun näytettä säilytetään huoneenlämmössä valossa (kuvio 12 ja 13). Nopeinta klorogeenihapon tuhoutuminen on vesiutuksessa, jossa entsyymitoiminta säilyy oletettavasti parhaiten. Tämän perusteella vesiutteen on jatkoprosessoitava mahdollisimman nopeasti tai entsyymitoiminta näytteissä on estettävä. Jatkoprosessista kuitenkin riippuu mitä uttoliuotinta kannattaa käyttää: kryokonsentroitua käytetään vesiutuille, kun taas alipainehaihdutusta käytetään etanoliutuille.

TAULUKKO 14. Uttoliuosten testaamisen tulokset (NA= ei mitattu, nd=alle toteamisrajan)

Näyte:	Uttoliuos	CGA, mg/100g	CGA, mg/100g	
			1 vrk	7 vrk
16C646	Metanoli	17	11	0,92
	Etanoli	19	NA	NA
	Vesi	13	8	0,54
16C647	Metanoli	16	5	0,17
	Etanoli	12	NA	NA
	Vesi	8	3	nd
16C648	Metanoli	20	7	0,69
	Etanoli	19	NA	NA
	Vesi	11	4	nd
16C649	Metanoli	33	12	0,70
	Etanoli	29	NA	NA
	Vesi	15	6	nd



KUVIO 12. Metanoliuuttojen tulokset



KUVIO 13. Vesiuuttojen tulokset

4.5 Rikastaminen

4.5.1 Kryokonsentroidi

Alkuperäisen perunankuorimassan klorogeenihappopitoisuus oli 27 mg/100g. Kryokonsentroitava perunaneste eli vesiuute valmistettiin 300 grammasta perunankuorimassaa, joka sisälsi 80 mg klorogeenihappoa. Mehustuksessa klorogeenihappoa saadaan perunanesteeseen 81 % alkuperäisestä määrästä. Kryokonsentroidussa uutteesta oli jäljellä 36 % alkuperäisestä uutteesta (Taulukko 15).

TAULUKKO 15. Vesiuutteiden kryokonsentointi

Vesiuutto	Perunankuori- massa	Perunanve- siute	Kryokonsentroidu uute
CGA mg/100g	27	9	42
mg	80	65	29

Etanoliutteiden tuloksia tarkasteltaessa (taulukko 16) huomataan, että klorogeenihapon saantoprosentti etanoliuutossa oli vain 55 % verrattuna perunankuoressa olleeseen klorogeenihapon määrään. Tämän vuoksi klorogeenihapon saantoprosentti etanoliuutosta ja alipainekonsentroinnista on noin 55 %.

TAULUKKO 16. Etanoliutteiden tulokset

Etanoliuutto	Perunankuori- massa	Perunankuo- ren etanoli- uute	Alipainekon- sentroidu uute
CGA mg/100g	27	7	65
mg	80	44	45

4.5.2 Sumukuivaus

Sumukuivaus onnistui paremmin vesiuutteelle kuin etanoliutteelle (taulukko 17). Saadun jauheen määrä konsentroidusta vesiuutteesta on kolme kertaa isompi kuin etanoliutteesta saatu jauhemäärä. Etanoliutteen kuivauksessa muodostuva jauhe ei kuivunut kunnolla ja tarttui näytteenkeruuastiaan ja kovettui myös jauheen erottimeen lasiosien seinämiin. Jauhetta ei saatu irti kuivaimen osista ja keräysastian pohjalta, joten talteen otettu jauheen määrä jäi vähäiseksi. Todennäköisesti kantaja-aineen avulla kuivaus olisi onnistunut paremmin. Ensin haluttiin kokeilla kuivausta ilman kantajaa, koska se olisi lopputuotteen markkinoinnin kannalta paremmin. Jatkotutkimuksia kantaja-aineen kanssa ei ehditty toteuttaa tämän opinnäytetyön puitteissa.

TAULUKKO 17. Sumukuivauksen tulokset

		Vesiuutto	Etanoliuutto
Uute	Määrä, g	67	63
	CGA-pitoisuus uutteenä, mg/100g	42	65
	CGA-määrä uutteenä, mg	29	41
Jauhe	Määrä, g	3	1,05
	CGA-pitoisuus, mg/100g	0,7	1,5
	CGA-määrä, mg	20	15
	CGA saanto uutteenä, %	69	37

4.5.3 PVPP-pylväs

Testauksessa käytetyn perunankuoren vesiuutteen klorogeenihappopitoisuus oli 11 mg/100g, johon saatuja pitoisuuksia verrattiin. Käytetty näytemäärä näytteissä (1-4) oli yksi gramma, näytteessä 5: 9,8 grammaa ja näytteessä 6: 7,2 grammaa. Tuloksia tarkasteltaessa (taulukko 18) näytteiden 1-4 kohdalla, huomataan että sitoutuneen klorogeenihapon määrä vaihtelee. Klorogeenihapon sitoutuminen on ollut pääasiassa yli 90 %, jota voidaan pitää hyvänä.

TAULUKKO 18. Sitoutuminen pylvääseen

Näyte	Laskennallinen CGA sakassa, mg/100g	Suodattuneen näytteen CGA, mg/näyte-erä	Sitoutuminen pylvääseen, %
1	0,92	0,009	92
2	0,23	0,002	98
3	0	0	100
4	0,16	0,002	98
5	2,07	0,124	88
6	1,44	0,072	91

Tuloksia tarkasteltaessa (taulukko 19) pylvääseen sidotun klorogeenihapon irrottaminen on ollut hankalaa. Näytteitä 3-4 lukuun ottamatta irtoaminen ensimmäisen eluoinnin yhteydessä on ollut suurempaa kuin toisen. Saantoprosentti on keskiarvoisesti 44 %, jota

voidaan pitää alhaisena tuloksena. Kahden viimeisen näytteen kohdalla on testattu erilaista eluointiliuosta, mutta sillä ei ole ollut parantavaa vaikutusta saantoprosenttiin.

TAULUKKO 19. Etanolipesujen tulokset

Näyte	Laskennallinen CGA sakassa, mg	Eluointi1, CGA, mg/100g	Eluointi2, CGA mg/100g	Pesuissa ir- ronnut CGA, mg	Saanto% sakasta
1	0,098	1,39	0,95	0,03	30
2	0,105	4,07	1,92	0,07	72
3	0,107	1,48	2,56	0,05	47
4	0,105	1,62	1,98	0,05	43
5	0,922	1,81	0,99	0,28	30
6	0,699	1,86	1,13	0,30	43

4.6 Validointi

4.6.1 Menetelmän toistettavuus

Saadut tulokset (taulukko 20) poikkeavat lasketusta keskiarvosta $\pm 0,5$ $\mu\text{g/ml}$. Tuloksen perusteella voimme todeta, että menetelmä on täsmällinen, kun tuloksia mitataan lyhyellä aikavälillä samoissa olosuhteissa.

TAULUKKO 20. Toistettavuuden tulokset

Standardi 3	Tulos, $\mu\text{g/ml}$	Etäisyys keskiarvosta
1	8,8411	0,39
2	8,92505	0,31
3	9,00051	0,24
4	9,69468	-0,46
5	9,54519	-0,31
6	9,40704	-0,17
Keskiarvo	9,24	

4.6.2 Toteamis- ja määrittäysraja

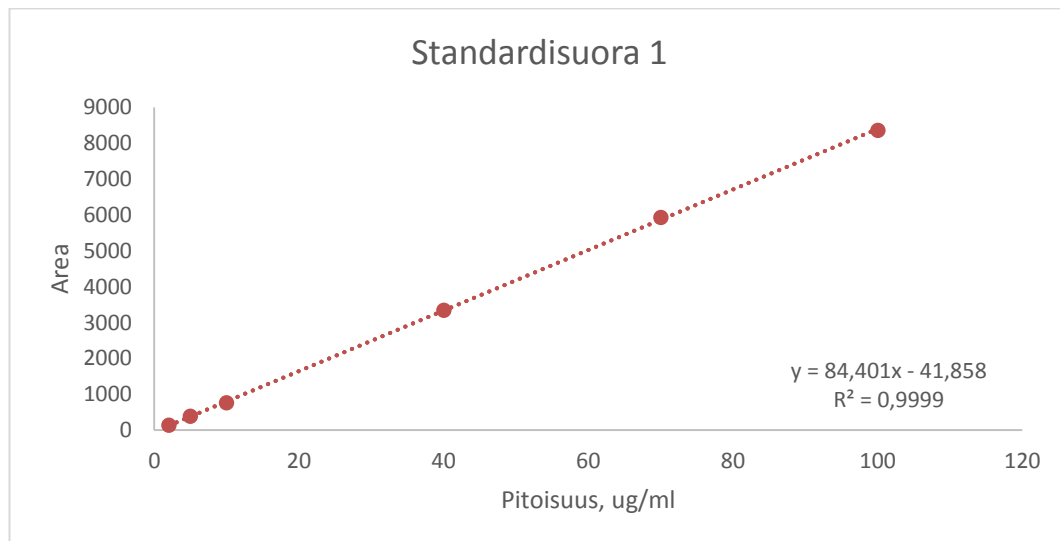
Toteamisrajojen tulosten (taulukko 21) keskiarvoksi saatiin 1,41 µg/ml, joka on pienempi kuin standardisuoran pienin pitoisuus. Määrittäysrajojen tulosten (taulukko 21) keskiarvoksi saatiin 4,70 µg/ml, joka sijoittuu standardisuoran alkupäähän.

TAULUKKO 21. Toteamis- ja määrittäysrajojen tulokset

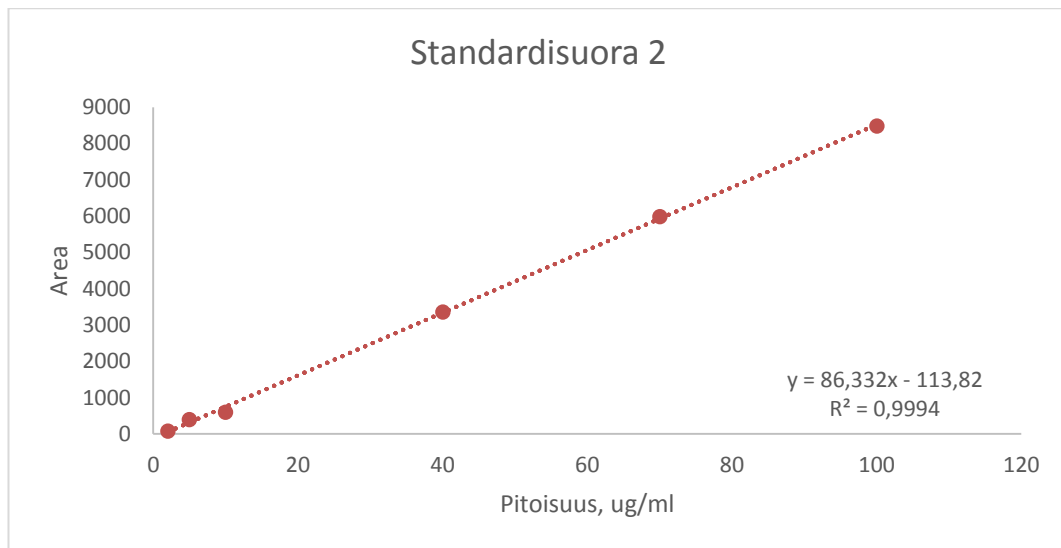
	Suora 1	Suora 2	Suora 3
Toteamisraja, µg/ml	0,91	1,87	1,45
Määrittäysraja, µg/ml	3,04	6,25	4,82

4.6.3 Lineaarisuus

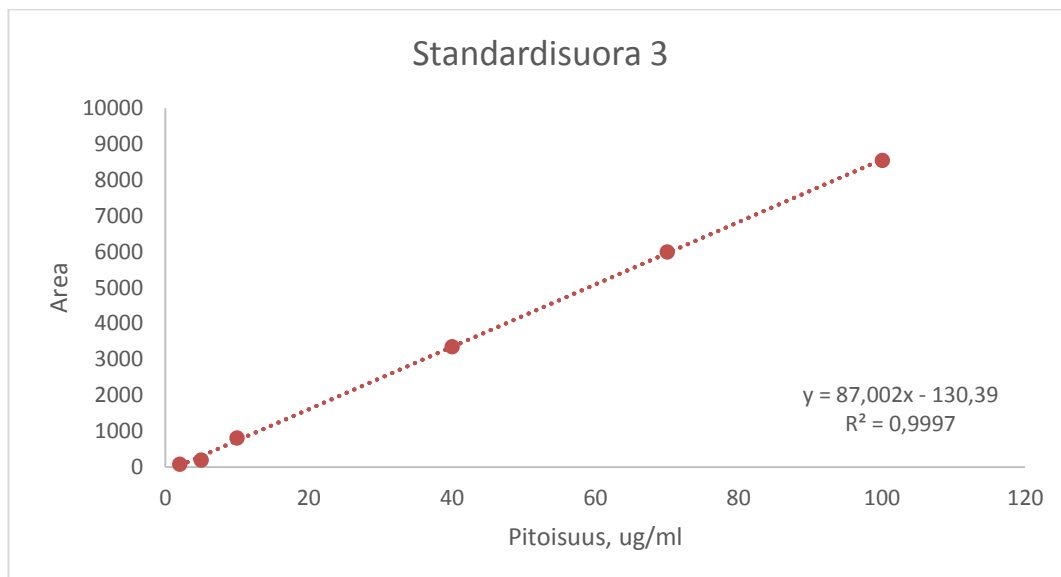
Kolmesta standardisuorasta (kuviot 14- 16) nähdään, että menetelmän antamat suorat ovat lineaarisia ja yhtenäisiä. Pienin korrelaatiokerroin on 0,9994 ja suurin 0,9999. Tulosten ja standardien pitoisuuksien välillä on lineaarinen korrelaatio eli mittalaitteen herkkyys on vakio.



KUVIO 14. Standardisuora 1



KUVIO 15. Standardisuora 2



KUVIO 16. Standardisuora 3

4.6.4 Systemaattinen virhe

Systemaattiseksi virheeksi saatiin tulosten (taulukko 22) perusteella -7,6 %. Virhe ilmenee siis aina samansuuruisena, kun näytettä mitataan muuttamatta mittaolosuhteita.

TAULUKKO 22. Standardin 3 tulokset

Standardi 3	Odotusarvo, µg/ml	Tulos, µg/ml
1	10,004	8,8411
2	10,004	8,92505
3	10,004	9,00051
4	10,004	9,69468
5	10,004	9,54519
6	10,004	9,40704
Keskiarvo	10,004	9,24

$$\begin{aligned} B\% &= \frac{(x - a)}{x} \cdot 100 \\ &= \frac{9,24 - 10,004}{10,004} \cdot 100 \\ &= -7,6\% \end{aligned}$$

5 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia klorogeenihapon rikastamista perunankuoresta. Työn tarkoituksena oli löytää parhaimmat sulatus- ja kuorintamenetelmät perunalle, jotta klorogeenihappo saadaan säilymään ja rikastumaan näytteessä. Tarkoituksena oli myös uuttoliuoksena kvantitatiivisissa määrityksissä käytetyn happaman metanolin korvaaminen vähemmän haitallisella elintarvikesovelluksiin kelpaavalla liuoksella. Opinnäytetyössä käytetty klorogeenihapon nestekromatografinen analyysimenetelmä validoitiin.

Klorogeenihapon analyysi-menetelmän validointi onnistui hyvin ja tulokset osoittivat HPLC- menetelmän sopivan klorogeenihapon määrittämiseen. Kolmea standardisuoraa tarkasteltaessa nähdään, että suorat ovat yhtäläisiä. Toteamisrajaksi saatiin 1,41 µg/l, joka on siis pienin mahdollinen pitoisuus minkä mittalaite voi havaita luotettavasti. Määritysrajaksi saatiin 4,70 µg/l, joka on pienin mahdollinen pitoisuus minkä laite voi luotettavasti mitata. Menetelmän toistettavuus on hyvä, koska standardin 3 tulokset poikkeavat toisistaan vain ±0,5 µg/ml. Systemaattiseksi virheeksi saatiin -7,6 %, jota voidaan pitää pieninä virheprosenttina.

Kuorintakoesarjalla haluttiin selvittää kuorintamenetelmän vaikutusta klorogeenihapon säilymiseen eli kuumennuksen, valon ja hapen vaikutusta. Kuorintasarjan tulosten perusteella parhain kuorintakäsittely on puolikypsäksi höyrytetyn perunan kuoriminen välittömästi höyrytyksen jälkeen. Puolikypsän perunan kuorien kiehaus heti kuorinnan jälkeen alentaa klorogeenihapon pitoisuutta noin puolella. Huonoin kuorintakäsittely klorogeenihapon säilymisen kannalta on raakan perunan kuorinta niin vedessä kuin ilmassa.

Pakastettujen perunankuorinäytteiden sulatusolosuhteiden vaikutusta klorogeenihappopitoisuuksiin tutkittiin sulatuskokeilla. Tavoitteena oli selvittää sulatusnopeuden ja toisaalta myös vesiuuton yhdistämisen vaikutusta klorogeenihapon säilymiseen. Parhain säilyvyys klorogeenihapolle perunankuorimassassa saadaan kun sulatuksessa käytetään mikroaaltouunia. Mikroaaltokäsittelyllä sulatetussa näytteessä klorogeenihappo säilyi perunankuorimassassa jopa viikon ajan huoneen lämmössä. Näissä näytteissä myös maitohappokäyminen oli vähäisempää kuin muilla tekniikoilla sulatetuissa näytteissä. Muilla tutkituilla sulatusmenetelmillä (huoneenlämpö ja vesihaude) esikäsitellyissä perunankuorinäytteissä klorogeenihappo tuhoutui suhteellisen nopeasti huoneen lämmössä säilytyksen

aikana: vuorokaudessa häviö oli merkittävä ja viikon jälkeen klorogeenihapon määrä oli alle toteamisrajan. Lisätyn veden lämpötilalla ei ole ollut merkitystä säilyvyyteen, eikä myöskään vesihauteen lämpötilalla.

Toisessa sulatuskoesarjassa mikroaaltosulatuksen jälkeen näytteitä säilytettiin eri olosuhteissa: jääkaapissa (pimeässä) sekä huoneenlämmössä pimeässä ja valoisassa. Tulosten perusteella ensimmäisen vuorokauden aikana ei säilytyspaikalla ollut merkitystä. Suurimmat muutokset seitsemän vuorokauden aikana on huoneenlämmössä säilytetyillä näytteillä, koska silloin pitoisuudet ovat laskeneet puoleen alkuperäisestä. Tulokset 14. vuorokauden kohdalla näyttivät selkeästi että, parhain säilyvyys on näytteellä, joka on ollut säilytyksessä jääkaapissa. Huonoin säilytyspaikka näytteelle on huoneenlämpö ja valoisa, koska kahden viikon säilytyksen jälkeen klorogeenihapon pitoisuus on laskenut alle toteamisrajan. Sulatuskokeiden perusteella mikroaaltouunin käyttö sulatuksessa on parhain sulatuskeino klorogeenihapon säilyvyyden kannalta. Säilytyspaikkana sulatuksen jälkeen tulisi olla jääkaappi, jossa klorogeenihappo säilyy parhaiten näytteessä.

Elintarvikekelpoinena uuttoliuksena tutkittiin etanolin ja veden käyttöä klorogeenihapon uutossa, referenssinä käytettiin hapanta metanolia. Etanolilla uuton tehokkuus oli samaa luokkaa metanoliuuton kanssa, kun taas vesiuutolla saatiin heikoin klorogeenihapon uutotehokkuus. Nopeinta klorogeenihapon tuhoutuminen on vesiuutteessa, jossa entsyymitoiminta säilyy oletettavasti parhaiten. Tämän perusteella vesiuutteet on jatkoprosessoitava mahdollisimman nopeasti tai entsyymitoiminta näytteissä on estettävä. Jatkoprosessista kuitenkin riippuu mitä uuttoliuotinta kannattaa käyttää: kryokonsentraatiota käytetään vesiuutteille, kun taas alipainehaihdutusta käytetään etanoliuutteille.

Klorogeenihapon säilyvyyden kannalta löydettiin siis optimaaliset esikäsittelymenetelmät perunankuorimassalle. Klorogeenihappo säilyy parhaiten puolikypsäksi höyrytetyn perunan kuoressa, joka teollisuusprosessissa vastaa höyrykuorittua perunaa. Mikroaaltouunin käyttö sulatuksessa todennäköisesti heikentää näytteen sisältämien entsyymien toimintaa ja siten parantaa klorogeenihapon säilyvyyttä perunankuorimassassa.

Vesi- ja etanoliuutteille tutkittiin kolmea erilaista klorogeenihapon rikastusmenetelmää: kryokonsentointi, sumukuivaus ja PVPP-pylväs. Vesiuutoille suoritettu kryokonsentraatio ei antanut toivottuja tuloksia, koska yli puolet alkuperäisen perunamehun klorogee-

nihaposta hajosi käsittelyjen aikana. Tämä ilmeisesti johtui entsyymitoiminnasta, joka todennäköisesti voitaisiin estää näytteen mikroaaltokäsittelyllä ennen uuttoa. Etanoliutteille suoritettut näytekäsittelyt olivat saantoprosentin perusteella parempia kuin vesiuutoille tehdyt käsittelyt. Vesiuutteen kuivaaminen sumukuivauksella ilman kantaja-ainetta onnistui hyvin ja saanto oli lähellä ennustettua jauhemäärää. Etanoliutteen kuivamisessa saatu jauhe tarttui kiinni lasiosiin ja keräysastiaan, joten saanto jäi hyvin pieneksi. Etanoliutteiden sumukuivauksessa mahdollisen kantaja-aineen käyttöä tulisi testata, jotta jauhemäärän saanto ja laatu parantuisi.

PVPP-pylvään testaaminen osoittautui hankalaksi, koska pylvääseen sitoutunutta klorogeenihappoa ei saatu irrotettua pylväsmateriaalista riittävän tehokkaasti. Sen sijaan klorogeenihapon sitominen pylvääseen onnistui todella hyvin. Eluointiliuoksena käytettiin etanolia, jolla saadut tulokset olivat heikkoja. Eluointiliuoksen vaihtaminen suolahappo-etanoliin ei tehostanut klorogeenihapon irrottamista PVPP-matriisista. Saatujen tulosten perusteella voidaan todeta, että PVPP-pylvään käyttö sopii klorogeenihapon sitomiseen näytteestä, mutta klorogeenihapon talteenottoa varten eluointi tulisi saada tehokkaammaksi. Toisaalta hyvin suurten eluointiliuosmäärien käyttäminen ei isossa mittakaavassa ole taloudellisesti järkevää.

LÄHTEET

Ashland. Polyclar™ Super R regeneration-grade beer stabilizer. Luettu 18.8.2016.
<http://www.ashland.com/beer-wine-stabilizer/polyclar-super-r>

CEMIS-Oulu, a. Kuivauslaitteet. Luettu 6.9.2016. http://www.cemis.fi/uploads/LaitekortitCEMIS-OULU/Kuivauslaitteet_2014.pdf

CEMIS-Oulu, b. Refraktometrit. Luettu 12.10.2016. http://www.cemis.fi/uploads/LaitekortitCEMIS-OULU/Refraktometrit_2014.pdf

Jaarinen, S & Niiranen, J. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki: Edita Prima Oy.

Khajehei Forough ja Niakousari Mehrad, Production of pomegranate juice concentrate by complete block cryoconcentration process. Journal of food process engineering. Luettu 15.9.2016. https://www.researchgate.net/publication/270911682_Production_of_Pomegranate_Juice_Concentrate_by_Complete_Block_Cryoconcentration_Process

Mittatekniikan keskus. Metrologia. Luettu 1.9.2016.
<http://www.vtt.fi/inf/pdf/MIKES/2005-J6.pdf>

Opetushallitus. Nestekromatografia. Luettu 24.8.2016. http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_2-6_nestekromatografia.html

Orgaanisen kemian verkosto. Orgaanisen kemian laboratorio-opas. Luettu 9.11.2016.
<http://virtuaali.tkk.fi/fi/orgaaninenkemia/labraopas/menetelmat/erottelu/pyorohaihdutin/pyorohaihdutin.htm>

The Journal of nutrition. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. Luettu 30.8.2016. <http://jn.nutrition.org/content/131/1/66.full.pdf+html>

Vilhunen Anna-Sofia. Kahvin kemiaa. Luettu 30.8.2016. <http://www.helsinki.fi/kemia/opettaja/ont/vilhunen-as-2010.pdf>

Zeiger Errol. National Institute of Environmental Health Science. Luettu 30.8.2016
http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem_background/exsumpdf/chlorogenicacid_508.pdf