

Noora Ahola

# **Akryyliamidin tutkiminen ja akryyliamidiasetus**

Opinnäytetyö

Kevät 2018

SeAMK Ruoka

Bio-ja elintarviketekniikan tutkinto-ohjelma

SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU

## Opinnäytetyön tiivistelmä

Koulutusyksikkö: Elintarvike ja maatalous

Tutkinto-ohjelma: Bio- ja elintarviketekniikka

Suuntautumisvaihtoehto: Yleiset elintarvikkeet

Tekijä: Noora Ahola

Työn nimi: Akryyliamidin tutkiminen ja akryyliamidi leivässä

Ohjaaja: Merja Kyntäjä ja Sarita Ventelä

Vuosi: 2017-2018

Sivumäärä: 32

Liitteiden lukumäärä:1

---

Tässä työssä käydään läpi uutta akryyliamidiasetusta, sekä keinoja tutkia akryyliamidia. Tavoitteena oli etsiä tietoa akryyliamidista ja sen analysointimenetelmistä kirjallisesti. Lisäksi tarkasteltiin uutta akryyliamidiasetusta Seinäjoen Pirjon Pakarin kannalta. Akryyliamidi on yhdiste, jota syntyy elintarvikkeisiin niitä paistaessa yli 120 asteessa. Akryyliamidin uskotaan aiheuttavan syöpää, mutta varsinaista näyttöä ei vielä ole. Akryyliamidille on asetus, jossa on määritetty vertailuarvot ja pakolliset keinot sen vähentämiseksi. Analyysit akryyliamidipitoisuuksien määrittämiseen elintarvikkeista ovat vielä kalliita. Määrittämiseen voidaan käyttää ainakin korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa eli HPLC:tä tai kaasukromatografiaa. Suomessa on muutamia laboratorioita jotka tekevät määrittystä alihankintana ulkomailta.

Leivässä akryyliamidin muodostumiseen vaikuttavat monet tekijät, näistä ovat esimerkiksi jauhun laatu, paisto aika ja lämpötila, hiivan määrä ja asparagiinin määrä. Näiden määriä muuttamalla voidaan vähentää akryyliamidia leivässä.

Avainsanat: akryyliamidi, HPLC, korkean erotuskyvyn nestekromatografia, kaasukromatografia, asparginaasi, stationäärifaasi, eluentti, kolonni, leipä

SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

## **Thesis abstract**

Faculty: Food and Agriculture

Degree programme: Food Processing and Biotechnology

Specialisation: Food

Author/s: Noora Ahola

Title of thesis: Study on Acrylamide and Acrylamide in Bread

Supervisor(s): Merja Kyntäjä and Sarita Ventelä

Year:2017-2018      Number of pages: 32      Number of appendices:1

---

This thesis covers the new acrylamide enactment and different ways to research acrylamide. The objective was to search information about acrylamide and its analysing methods. The new enactment and its impact on the production of Pirjon Pakari bakery in Seinäjoki were studied, too.

Acrylamide is a chemical compound that forms in some foods during high temperature (over 120 degrees) cooking. It is believed that acrylamide causes cancer but based on the earlier studies, it is not yet clear if acrylamide affects the cancer risk. There is a new EU enactment which gives measures to reduce and determine acrylamide from foods that most likely have high acrylamide content. The analysing methods for acrylamide in food products are still expensive. There are at least two research methods for acrylamide in food products; high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography.

In bread, many factors affect the forming of acrylamide: the cooking time and temperature, the amount of yeast and the amount of asparagine. By changing these amounts, the amount of acrylamide in bread can be reduced.

Keywords: acrylamide, HPLC, gas chromatography

## SISÄLTÖ

Opinnäytetyön tiivistelmä.....	2
Thesis abstract.....	3
SISÄLTÖ .....	4
Kuva-, kuvio- ja taulukkoluettelo .....	6
Käytetyt termit ja lyhenteet .....	7
1 JOHDANTO .....	8
1.1 Tausta .....	8
1.2 Tavoite .....	8
2 AKRYYLIAMIDI.....	9
2.1 Akryyliamidi yleisesti .....	9
2.2 Akryyliamidin muodostuminen.....	9
2.3 Akryyliamidisäädökset.....	10
3 AKRYYLIAMIDI LEIVÄSSÄ.....	13
3.1 Muodostuminen.....	13
3.1.1 Paistoaika ja lämpötila .....	13
3.1.2 Asparaginaasi .....	14
3.1.3 Jauhon laatu .....	14
3.1.4 Hiiva .....	15
3.2 Akryyliamidia tutkivat laboratoriot.....	15
4 ARYYLIAMIDIANALYYSIT .....	16
4.1 HPLC .....	16
4.1.1 HPLC laitteiso .....	17
4.1.2 Näytteet ja niille asetetut vaatimukset .....	19
4.1.3 Akryyliamidin tutkiminen leivästä HPLC:llä .....	20
4.2 Kaasukromatografi .....	21
4.2.1 Kaasukromatografi laitteisto .....	22
4.2.2 Akryyliamidin tutkiminen leivästä kaasukromatografilla .....	24
5 SÄÄDÖSTEN TOTEUTTAMINEN PIRJON PAKARILLA.....	25
5.1 Pirjon Pakari.....	25
5.2 Raaka-aineet.....	25

5.3 Leivontaprosessi .....	26
5.4 Akryyliamidiasetuksen toimenpiteet .....	26
6 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET .....	29
LÄHTEET .....	30
LIITTEET .....	32

## Kuva-, kuvio- ja taulukkoluetelo

Taulukko 1. Akryyliamidin vertailuarvot.....	11
Kuvio 1. HPLC laitteisto . ....	17
Kuvio 2. Kaasugromatografi laitteisto.....	22

## Käytetyt termit ja lyhenteet

<b>Akryyliamidi</b>	Akryyliamidi on kemiallinen yhdiste, jota syntyy elintarvikkeisiin niitä paistaessa yli 120 asteessa
<b>AA</b>	Lyhenne akryyliamidista
<b>HPLC</b>	Eli korkean erotuskyvyn nestekromatografia on analyysi menetelmä, jolla voidaan erottaa yhdisteitä toisistaan
<b>Kaasukromatografia</b>	Analyysimenetelmä, jolla erotetaan yhdisteitä toisistaan
<b>Kolonni</b>	HPLC:n ja kaasukromatografian osa, jossa aineet erottuvat toisistaan
<b>Sationäärifaasi</b>	Kolonnin täytemateriaali
<b>Eluentti</b>	Nestekromatografian läpi kulkeva ajoliuos, johon aineet erottuvat
<b>Eluoitumien</b>	Aineiden liukeneminen eluenttiin

# 1 JOHDANTO

## 1.1 Tausta

Tässä opinnäytetyössä käsitellään akryyliamidia leivässä, miten sen määrään voidaan vaikuttaa ja miten sitä tutkitaan. Lisäksi tarkastellaan uutta akryyliamidiasetusta. Työn tarkoitus on selvittää asetuksia ja määräyksiä akryyliamidin määrässä, sekä analyysitapoja ja -laitteita sen tutkimiseen. Tavoitteena on myös antaa ohjeita Pirjon Pakarin Seinäjoen leipomolle akryyliamidiasetukseen liittyen. Tietoa työhön on etsitty kirjallisuudesta sekä tiedustelemalla eri tahoilta.

Aihe sai alkunsa Pirjon Pakarilta, joka oli saanut Leipuriliitolta tietoa muuttuvasta akryyliamidiasetuksesta. Akryyliamidille oli annettu ohjearvot, mutta niiden määrittämiseen ei vielä ollut ohjeita. Tämän vuoksi tiedustelut ja selvitykset akryyliamidipitoisuuksien määrittämisestä olivat paikallaan, jotta osattaisiin varautua, jos leivistä täytyisi tulevaisuudessa selvittää akryyliamidiarvot. Alkuperäisenä ajatuksena oli myös tehdä määräyksiä, mutta analyysien arvokuuden vuoksi määräyksestä luovuttiin. Säädös on asettanut akryyliamidille vertailuarvot sekä pakolliset menettelyt sen vähentämiseksi. Työssä selvitettiin mitä nämä menettelyt ovat ja tarvitaanko näyteen ottoa.

## 1.2 Tavoite

Työn tavoitteena oli löytää tietoa akryyliamidista ja sen tutkimisesta mahdollisimman monesta lähteestä. Erityisen tärkeää oli tieto siitä, miten leipomoiden tulee menettellä jatkossa akryyliamidin suhteen ja mitä uusi säädös Pirjon Pakarin Seinäjoen leipomolta vaatii. Tieto uudesta asetuksesta tuli vasta hiljattain ja sen tulevia vaatimuksia tuli selvittää. Analyysien ja analyysitapojen selvittäminen oli paikallaan, jotta tutkimusten tekeminen olisi jatkossa helpompaa.

## 2 AKRYYLIAMIDI

### 2.1 Akryyliamidi yleisesti

Akryyliamidi on väritön sekä hajuton kemiallinen yhdiste ja se on todettu mahdollisesti syöpää aiheuttavaksi (PubChem [Viitattu: 14.11.2017]). Pitkäaikainen altistuminen voi aiheuttaa keskus- ja ääreishermostossa toiminnallisia ja mahdollisesti parantumattomia häiriöitä. Lyhytaikainen altistuminen voi aiheuttaa hengitys-, silmä-, sekä ihovaurioita (Käyttöturvallisuustiedote [Viitattu 14.11.2017]). Akryyliamidin kemiallinen kaava on  $C_3H_5NO$  ja sitä voidaan kutsua myös nimillä akryylihapoamidi, prop-2-eeniamidi ja vinyyliamidi. Akryyliamidia on kaupallisesti saatavana jauheena tai kiteenä tai 40-50 prosenttisena vesiliuoksena. Akryyliamidia käytetään mineraalien vaahdotukseen, vedenpuhdistamiseen, paperin ja tekstiilien valmistukseen sekä laboratorioreagenssina. (PubChem [Viitattu: 14.11.2017].)

Akryyliamidia syntyy hiilihydraattipitoisten elintarvikkeiden pintaan niitä paistaessa tai uppopaistaessa yli 120 asteessa. Vaikka akryyliamidin uskotaan aiheuttavan syöpää ei ravinnosta saatavan akryyliamidin ja syöpään sairastumisen suoraa yhteyttä ole vielä todettu. (Evira [Viitattu 31.5.2017].)

### 2.2 Akryyliamidin muodostuminen

Akryyliamidin uskotaan mahdollisesti syntyvän Maillardin-reaktioiden yhteydessä, kun pelkistävä sokeri ja aminohappo reagoivat keskenään. Kahvi, ranskanperunat, perunalastut ja laatikkoruoat ovat suurimpia suomalaisten akryyliamidin lähteitä, mutta heti näiden jälkeen tulee ruisleipä. Leivässä tärkein reitti akryyliamidin muodostumiseen on asparagiini. (Kanerva & Salovaara 2015, 30-31.)

Akryyliamidin muodostumisessa asparaganiinin dekarboksylaatio on yleisin reitti, mutta myös arkoleiinia ja akryylihapoa on kuvattu akryyliamidin lähtöaineiksi. Vaihtoehtoinen tapa on myös akryyliamidin termolyyttinen vapautuminen leipien gluteiinista. Nämä tavat ovat kuitenkin vain osasyitä akryyliamidin muodostumiseen. Lämpöteho eli lämpötilan ja lämmitysajan yhdistelmä jolle tuote altistuu, on akryyliamidin

muodostumisessa ratkaiseva tekijä. Kypsennysprosessilla eli paistamistavalla ja lämpötilalla on vain vähän merkitystä lämpötehoon verrattuna. Asparagiinia ja sokereita esiintyy elintarvikkeissa luontaisesti ja useissa elintarvikkeissa niitä ei edes pystytä tutkimaan erikseen, sillä ne ovat osa monimutkaista kemiallista kaavaa. Elintarvikkeiden monimutkaisen koostumuksen takia akryyliamidin muodostumisen erottaminen Maillardin-reaktiosta on vaikeaa. Monet Maillardin-reaktiossa syntyvät aineet ovat toivottavia ja jopa terveydelle hyödyllisiä ja tämä tulisi huomioida, kun akryyliamidipitoisuutta pyritään vähentämään. (Elintarviketeollisuusliitto 2014, 7.)

### **2.3 Akryyliamidisäädökset**

Akryyliamidista ja siihen kuuluvasta lainsäädännöstä on EU:ssa keskusteltu pitkään. Tutkimuksia akryyliamidin muodostumistavoista ja elintarvikejalosteiden akryyliamidipitoisuuksista ollaan tehty jo vuodesta 2002. Vuonna 2011 tuli EU:n komission suositus elintarvikkeiden akryyliamidipitoisuuksien tutkimuksista, jossa oli ohjearvot akryyliamidipitoisuuksille tietyissä tuotteissa. Akryyliamidipitoisuuksia tutkittiin lähinnä tuotteista, joissa akryyliamidipitoisuuden tiedettiin olevan korkea tai ne vaikuttavat suuresti akryyliamidin määrään ihmisten ravinnossa. 2013 ohjearvoja muutettiin, sillä tutkimustuloksissa oltiin huomattu, että akryyliamidipitoisuus oli laskenut vain pienessä osassa tuotteita ja noussut muissa. (Euroopan komissio 2013, L 301/15.)

Lainsäädännöstä akryyliamidin suhteen on keskusteltu ja jäsen maat ovat olleet sitä mieltä, että akryyliamidille tulisi asettaa enimmäispitoisuusraja. Rajan asettaminen vaatisi elintarvikeyrityksiltä kuitenkin jatkuvaa pitoisuusanalytiikkaa eikä johtaisi akryyliamidin merkittävään vähenemiseen. Tämän takia on lanseerattu hyvien käytäntöjen lainsäädäntö, jonka seurauksena akryyliamidille asetettiin vertailuarvot sekä pakolliset menettelyt sen vähentämiseksi. (Lukkariniemi 2017.)

Taulukko 1. Akryyliamidin vertailuarvot (Lukkariniemi 2017).

<b>Pehmeälle leivälle ehdotettu vertailuarvo AA-pitoisuuteen</b>	<b>Vehnäpohjainen leipä</b>	<b>50 µg/kg</b>
	<b>Muu kuin vehnähäpohjainen leipä</b>	<b>100 µg/kg</b>
<b>Kuivat leivät ja pikkuleivät</b>	<b>Pikkuleivät ja vohvelit</b>	<b>350 µg/kg</b>
	<b>Crackerit (pl. Perunapohjaiset)</b>	<b>400 µg/kg</b>
	<b>Näkkileipä</b>	<b>350 µg/kg</b>
	<b>Joulupipari (ginger-bread)</b>	<b>800 µg/kg</b>
	<b>Muut vastaavat tuotteet</b>	<b>300 µg/kg</b>
<b>Lapsille tarkoitettut pikkuleivät ja rouskuvat (rusks)</b>		<b>150 µg/kg</b>

Annetut vertailuarvot voivat ylittyä tuotteen mikrobiologinen turvallisuus, erityiset tuotannolliset ja maantieteelliset olosuhteet tai tuotteen yksilölliset ominaisuudet huomioiden. Uusi akryyliamidiasetus tulee sovellettavaksi 11. huhtikuuta 2018. Akryyliamidin vähentämistoimenpiteet tulee kirjata toimijoiden omavalvontaan. Asetuksen tarkoituksena on vähentää kuluttajien ravinnosta saatavan akryyliamidin määrää. Vaatimukset tulevat koskemaan kaikkia leipomoalantoimijoita aina teollisuusleipomoista kahvila-konditorioihin. Toiminnan laajuus ja vaikuttavuus kuitenkin vaikuttavat asetuksen vaatimuksiin. Tuottajat joiden tuotanto on laajaa kansallisesti tai kansainvälisesti tai osa laajempaa ketjutoimintaa tulee koskemaan erittäin yksityiskohtaiset vaatimukset, joihin sisältyy pakollinen tutkimus- ja näytteenottosuunni-

telma sekä pakollisesti sovellettavat vähentämistoimenpiteet. Jos tuotanto on yksinomaan paikallista ei akryyliamiditutkimuksia edellytetä sekä vähentämistoimenpidevaatimukset ovat huomattavasti yleistasoisemmat. Tärkeimpiä tuotteita ovat tuotteet joiden kulutus on suurta. Marginaalisesti suuremman menekin omaavat tuotteet ovat marginaalisesti pienemmän menekin omaavia tuotteita tärkeämpiä asetuksen kannalta, koska asetuksen tarkoituksena on vähentää kuluttajien akryyliamidin saantia. (Lukkariniemi & Jestoi 2018, 26-28.)

Vähentämiskeinoihin kuuluvia keinoja ovat reseptiikan muuttaminen, tuotesuunnittelu sekä tuotantoprosessin muuttaminen. Reseptiikkaan tehtäviä muutoksia voivat olla esimerkiksi nostatusaineen vaihtaminen natriumkarbonaattiin, raaka-aineiden korvaaminen vähemmän fruktoosia sisältäviin sekä asparagiinientsyymin käyttö. Paistopinnan asteittainen vaalentaminen, uunin lämpötilan madaltaminen ja paistoaajan lisääminen, liiallisen kuivumisen estäminen sekä hiivataikinoissa nostatusajan pidentäminen ovat keinoja, joilla voidaan muuttaa tuotantoprosessia ja vaikuttaa akryyliamidipitoisuuksiin leipomo tuotteissa. Jos vaadittuja toimenpiteitä ei ole mahdollista toteuttaa on kirjallisesti perusteltava miksi. (Lukkariniemi & Jestoi 2018, 29.)

## 3 AKRYYLIAMIDI LEIVÄSSÄ

### 3.1 Muodostuminen

Akryyliamidin muodostuminen elintarvikkeisiin vaatii yli 120°C lämpötilan. Akryyliamidia muodostuu tuotteisiin luonnollisesti niitä paistaessa, grillatessa tai uppo-paistettaessa (Evira [Viitattu 31.5.2017]). Leivän pintaan akryyliamidi muodostuu pelkistävien sokereiden reaktiossa asparagiinin kanssa, Maillardin reaktion yhteydessä. Tämän vuoksi myös tuotteen asparagiinipitoisuus vaikuttaa akryyliamidin määrään lopputuotteessa. On myös esitetty, että akryyliamidia voisi vapautua termolyttisesti vehnäleipien gluteenista. Akryyliamidin muodostumisen erottaminen Maillardin-reaktiosta on erittäin haastavaa, sillä elintarvikkeiden kemiallinen koostumus on erittäin monimutkainen. Akryyliamidin kokonaisvaltainen poistaminen elintarvikkeista on lähes mahdotonta ja tämän takia akryyliamidipitoisuuksia elintarvikkeissa pyritään ensisijaisesti vähentämään. (Elintarviketeollisuusliitto 2013, 7-8.)

#### 3.1.1 Paistoaika ja lämpötila

Leivän akryyliamidipitoisuus kasvaa mitä korkeammassa lämpötilassa ja mitä kauemmin sitä paistetaan. Leipiiin halutaan saada maukas ja näyttävä kuori. Kuori alkaa muodostua paistossa jo varhain, jotta väriä saataisiin riittävästi, tarvitsee se kuitenkin kaksi kolmasosaa paistoaikasta. Akryyliamidin muodostumiselle pitkä ja kuuma paistoaika luo hyvät olot. Jotta leipään saataisiin kaunis kuori ja akryyliamiditasot pysyisivät alhaisina, voidaan leipää höyryttää runsaasti ennen paistoa. Höyrytys mahdollistaa kuoren muodostumisen niin, että akryyliamiditasot pysyvät alhaisina. Lisäksi paistolämpötilan lasku ehkäisee akryyliamidin muodostumista. Varsinkin lämpötilan laskeminen paiston loppua kohti vähentää akryyliamidin muodostumista. (Kanerva & Salovaara 2015, 30-31.)

Joissain leipomoissa voi kuitenkin olla vaikeaa toteuttaa lämpötilan laskua loppuvaiheessa, sillä uuneilla paistetaan useita eriä leipää lyhyessä ajassa jolloin uunien jäähdyttäminen välissä ei ole mahdollista.

Myös leivän koolla ja muodolla on vaikutusta akryyliamidipitoisuuteen. Akryyliamidi muodostuu leivän kuoreen Maillard-reaktion yhteydessä. Suuremmassa leivässä kuoren osuus on pienempi, jolloin se sisältää prosentuaalisesti vähemmän akryyliamidia kuin pienempi leipä. (Kanerva & Salovaara 2015, 30-31.)

### **3.1.2 Asparaginaasi**

Asparagiini on aine, joka toimii akryyliamidin muodostumisen lähtöaineena. Asparaginaasi on entsyymi, joka pilkkoo asparagiinia ja näin ollen vähentää akryyliamidin muodostumista. Asparaginaasia voitaisiin lisätä leipätaikinaan estämään akryyliamidin muodostumista lopputuotteeseen. Joitakin kaupallisia preparaatteja on saatavilla. (Kanerva & Salovaara 2015, 30-31.)

### **3.1.3 Jauhon laatu**

Akryyliamidin lähtöaineena toimivaa asparagiinia on enemmän viljan jyvän kuorikerroksessa, joten valkoista jauhoa täysjyvän sijaan käyttämällä voidaan madaltaa akryyliamidipitoisuutta (Kanerva & Salovaara 2015, 30-31). Täysjyväjauhon muut terveyshyödyt ovat kuitenkin vehnän jyvän ytimeistä valmistetusta valkoista jauhoa paremmat. Kuitua on täysjyväjauhossa kolme kertaa enemmän kuin valkoisessa jauhossa. Prosentteina jauhun kuiva-aineesta valkoisessa jauhossa ravintokuitua on 3% kun taas täysjyvä vehnäjauhossa ravintokuitua on 10-13%. Valkoinen jauho on jauhettu jyvän ytimeistä, jolloin siitä on poistettu jyvän kuorikerros sekä alkio. Tämän takia se sisältää huomattavasti vähemmän kivennäisaineita, vitamiineja sekä muita hyödyllisiä yhdisteitä. (Salovaara, Ignatius, Jussila & Hurri-Martikainen 2017, 40-41.)

### **3.1.4 Hiiva**

Hiiva on elävä raaka-aine ja sitä lisätään leipätaikinaan, jotta leipä kohoaisi. Hiiva tarvitsee toimiakseen ravintoaineita etupäässä sokeria, lisäksi se tarvitsee vettä sekä lämpöä (Leipomoalan edistämissäätiö 1999, 29). Hiiva alkaa käydä sokerin, proteiinien sekä rikkiä sisältävien aineiden kanssa ja synnyttää kaasua, josta syntyvät kuplat saavat taikinan kohoamaan (Held 2005, 26-27).

Hiiva antaa leivälle toivottuja ominaisuuksia ja lisäksi se käyttää pois myös akryyliamidin muodostumiseen tarvittavaa asparagiinia. Näin ollen hiivan lisääminen taikinaan voi vähentää lopputuotteen akryyliamidipitoisuutta. (Kanerva & Salovaara 2015, 30-31.)

### **3.2 Akryyliamidia tutkivat laboratoriot**

Akryyliamidianalyysyjä tekevät vain harvat laboratoriot, koska laissa ei vielä määrätä akryyliamidipitoisuuksien tutkimista elintarvikkeista. Metropolilab tekee Suomessa akryyliamidin määritystä vedestä ja elintarvikkeista alihankintana ulkomailta. Myös Eurofins tekee määritystä alihankintana. Akryyliamidin määritys on vielä kallista, sillä määritykset ovat aikaa vieviä ja tarvittavat komponentit kalliita. Yhden akryyliamidi näytteen tutkimisen hinta on noin 170-218€. (Liite 1: Sähköpostikeskustelut.)

## 4 ARYYLIAMIDIANALYYSIT

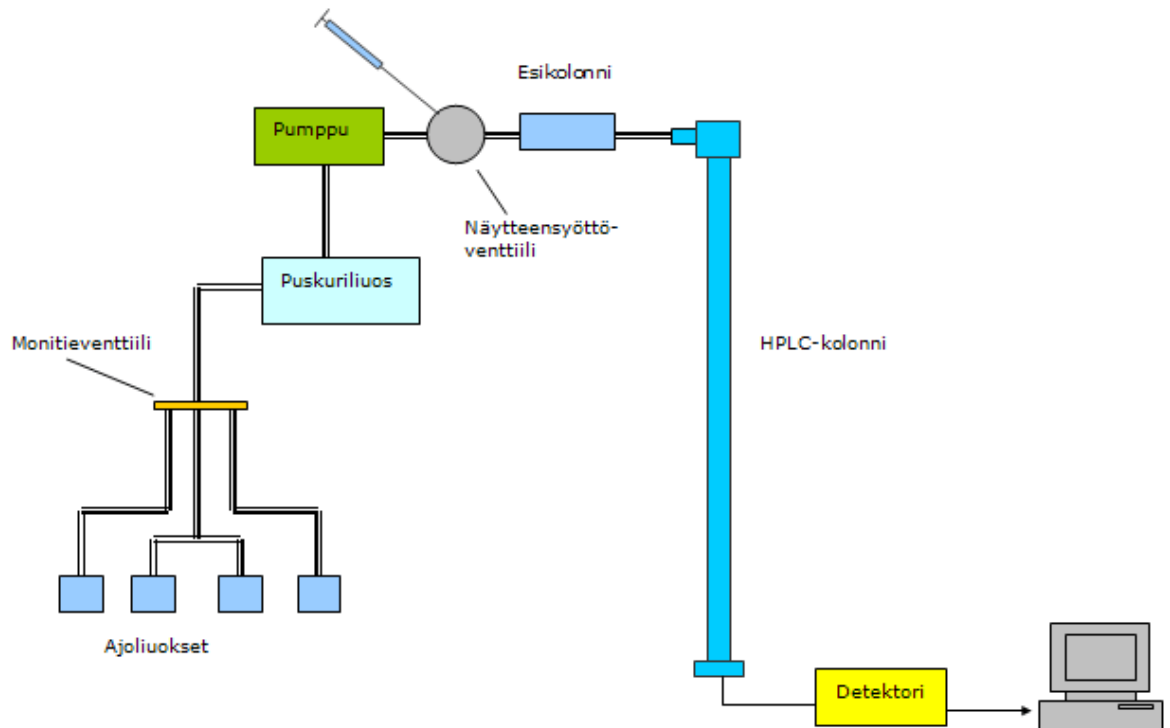
Akryyliamidin tutkimiseen on ainakin kaksi tapaa, joista toinen on HPLC eli korkean erotuskyvyn nestekromatografia ja toinen on kaasukromatografia. HPLC:llä näytettä tutkitaan nesteestä ja kaasukromatografian edellytyksenä on näytteen höyrystyminen. (Jaarinen & Niiranen 2005, 153-170.)

### 4.1 HPLC

HPLC (high performance liquid chromatography) eli korkean erotuskyvyn nestekromatografia on analyysitekniikka, jota on laajalti käytetty epäorgaanisten sekä orgaanisten yhdisteiden tutkimisessa. HPLC:n soveltamisen edellytys on, että tutkittava näyte saadaan liukenemaan johonkin liuottimeen tai liuotinseokseen (Opetushallitus [Viitattu: 15.5.2017.]) HPLC laitteistoon kuuluu injektor, pumppu, kolonni, detektor ja kapillaarit ja tulostuslaitteisto. (Jaarinen & Niiranen 2005, 153).

Ainetta tutkittaessa tilavuudeltaan pieni näytemäärä syötetään injektorin kautta nestefaasiin, joka liikkuu korkean paineen alaisena kapillaareissa. Eluentin eli ajoliuoksen (Opetushallitus [Viitattu 15.5.2017]). mukana näyte kulkee kolonniin, joka on täytetty pienikokoisilla partikkeleilla eli stationäärifaasilla. Pumpun tulee pystyä pumppaamaan eluenttia tiiviisti pakatun kolonnin läpi sykkeettömästi. Kolonnin läpi kuljettuaan näyte jakautuu komponenteikseen eluenttiin ja kulkeutuu detektorille. Mitä enemmän yhdisteiden tasapaino on kolonnissa stationäärifaasin puolella sitä myöhemmin ne kulkeutuvat detektoriin. Detektor mittaa jokaisen vuorollaan tulevan yhdisteen antamaa signaalia ajan funktiona ja näin saatu kuvaaja on kromatogrammi. (Jaarinen & Niiranen 2005, 153.)

#### 4.1.1 HPLC laitteisto



Kuvio 1. HPLC laitteisto (Opetushallitus [Viitattu 15.5.2017]).

HPLC laitteistoon kuuluu injektori, pumppu, kolonne, detektori sekä kapillaarit ja tu-  
lostuslaitteisto (Jaarinen & Niiranen 2005, 153). HPLC laitteiston kolonnit ovat  
yleensä n. 3-30cm pitkiä teräsputkia joiden molemmissa päissä on huokoiset levyt  
jotka pitävät kolonnin täytemateriaalia eli stationäärifaasia paikallaan. Ennen ana-  
lyyttistä kolonnia voidaan käyttää samaa täytemateriaalia sisältävää esikolonnia.  
Esikolonne kerää eluoitumattomat ja liukenemattomat komponentit jotka jäisivät  
muuten kolonnin alkupäähän. Esikolonne lisää analyttisen kolonnin käyttöikää ja se  
vaihdetaan tarpeen mukaan. (Jaarinen & Niiranen 2005, 154-155.)

Yleisimmin stationäärifaasit ovat kemiallisesti sidottuja-, ioninvaihto-, tai absorptio-  
faaseja. Tämän takia nestekromatografia jaetaan ionikromatografiaan ja käänteis-  
ja normaalifaasikromatografiaan. Normaalifaasikromatografiassa käytetään kolon-  
neja, joiden sisällä on absorptio- eli normaalifaaseja. Näistä perinteisimmät ovat alu-  
mina ja silika. Aluminalla on Al-O-Al-sidoksia ja silikalla vapaita OH- ryhmiä. Nor-  
maalifaasin pinta on voimakkaasti poolinen ja eluenttinä käytetään vedettömiä ja

poolittomia liuottimia. Tällöin poolisemmat näytemolekyylit tarttuvat pidemmäksi aikaa pooliseen stationäärifaasiin. Erotukseen ja retentioaikoihin voidaan vaikuttaa eluentin poolisuutta säätelemällä. (Jaarinen & Niiranen 2005, 155.)

Käänteisfaasikromatografiassa käytetään kemiallisesti sidottuja faaseja sisältäviä kolonneja. Ne ovat yleensä silikapohjaisia faaseja, joissa silikan hydroksyyli-ryhmistä suurin osa on korvattu poolisia substituutiryhmiä sisältävillä suoraketjuisilla hiilivedyillä tai hiilivetyketjuilla. Yhdisteen retentio kolonnissa riippuu kolonnin hiilikuormasta eli hiilen prosentuaalisesta määrästä koko täyteaineen painosta. Koska menetelmässä eluentin ja stationäärifaasin poolisuudet ovat vastakkaiset normaalifaasikromatografiaan verrattuna, kutsutaan sitä käänteisfaasikromatografiaksi. Käänteisfaasikromatografian etuina ovat halvemmat eluentit ja stabiilimmat olosuhteet normaalifaasikromatografiaan verrattuna. (Jaarinen & Niiranen 2005, 156.)

Ioninvaihtokromatografiaa sovelletaan, kun erotellaan kationeja tai anioneita. Ioninvaihtokolonneissa stationäärifaasiin on sidottu ionisia ryhmiä jotka pidättävät näytteessä olevia vastakkaisenmerkkisiä ioneja. Eluenttina käytetään puskuriliuosta, jonka pH:ta säätelemällä voidaan vaikuttaa yhdisteiden retentioon. (Jaarinen & Niiranen 2005, 157-159.)

Eluentti on nestekromatografian läpi kulkeva nestefaasi, johon näyte injektoidaan. Yleensä eluentit koostuvat vähintään kahdesta komponentista. Eluentti komponenttien välistä suhdetta muunnellen etsitään analyysiolosuhteet näytteen komponenttien erottelemiseksi. Viskositeetti vaikuttaa eluentin virtausnopeuteen. Kun viskositeetti on pieni, vastapaine jonka kolonnin stationäärifaasi aiheuttaa on myös pieni. (Jaarinen & Niiranen 2005, 160.)

Detektorien tehtävä on havaita näytteen ainesosat eluenttitaustasta. Nestekromatografiassa on käytetty monenlaisia eri detektoreita kuten taitekerroin-, elektrokemiallisia-, fluoresenssi-, sekä spektrofotometrisia UV/Vis detektoreita. Yleisherkkiä detektoreita ei nestekromatografiassa käytetä, joten detektori tulee valita tutkittavan näytteen mukaan tai sitten voidaan käyttää useampaa detektoria samanaikaisesti. Edellä mainituista detektoreista taitekerroindetektori on muita epäherkempi ja se on nestekromatografian yleisdetektori. Taitekerroin detektori mittaa koko sen läpi menevän liuoksen taitekerrointa, eikä tunnista tutkittavia yhdisteitä eluenttitaustasta.

Näin ollen lämpötila ja tiheys vaikuttavat suuresti taitekertoimeen. (Jaarinen & Niiranen 2005, 165-166.)

Jos tutkittavalla yhdisteellä on absorptio näkyvän valon tai UV-säteilyn alueella, käytetään UV/Vis-detektoria. Kun valitaan mittausaallonpituutta, tulee varmistaa, ettei eluentti absorboi valoa, sillä pituudella. Valtaosa epäpuhtauksista, orgaanisista-, ja aromaattisista yhdisteistä absorboi selektiivisen aallonpituuden (yli 260nm) alapuolella ja sitä käytetään, kun se on mahdollista. Jos olosuhteet ovat suotuisat UV/Vis-detektorilla voidaan määrittää nanogrammatason ainemääriä. (Jaarinen & Niiranen 2005, 166-167.)

UV/Vis-detektoria herkempi on fluoresenssidetektor, mutta sen käyttö edellyttää fluoresoivan johdoksen valmistamista tai fluoresoivaa näytettä. Sillä voidaan tutkia ympäristöanalytiikassa tärkeiden polyaromaattisten yhdisteiden pikogrammatason analysointiin. Aminohappojen, karboksyyliyhdisteiden ja amiinien analysointi voidaan mahdollistaa tutkittavaksi fluoresenssidetektorilla johdosten teolla. (Jaarinen & Niiranen 2005, 166-167.)

Hapettavia ja pelkistäviä yhdisteitä tutkittaessa käytetään sähkökemiallista detektointia. Tutkittavaan näytteeseen aiheutuu sähkökemiallinen muutos, kun detektorissa eluenttiin johdetaan jännite. Tämä edellyttää eluentila sähkönjohtavuutta. Signaali on voimakkaampi mitä enemmän hapettuvia ja pelkistyviä yhdisteitä liuoksessa on. Lääke- ja bioanalytiikassa käytetään tavallisesti sähkökemiallisia detektoreita. Johtokykydetektorissa on elektrodit joiden välisessä sähkökentässä ionit liikkuvat ja siksi sitä käytetään ionikromatografiassa. Ionien liikkuvuus vaikuttaa liuoksen sähkönjohtokykyyn ja tätä detektorilla mitataan. (Jaarinen & Niiranen 2005, 168-169.)

#### **4.1.2 Näytteet ja niille asetetut vaatimukset**

Suodatus ja sentrifugointi suoritetaan näytteille yleensä ennen injektointia, sillä näytteen tulee olla kokonaan liuenneena, jotta liukenemattomat hiukkaset eivät tukkeuta nestekromatografian osia. Tukosten välttämiseksi tulee myös tarkistaa, ettei näyte

muodosta sakkaa eluentin kanssa. Näyte liuotetaan eluenttiliuokseen tai sitä heikompaan liuottimeen saostumisen estämiseksi, jos liuotin on liian voimakas se voi huonontaa kromatografista erottumista. (Jaarinen & Niiranen 2005, 170.)

Kiinteät näytteet tulee käsitellä niin, että ne saadaan nestemäiseen muotoon. Yleensä ne liuotetaan huolellisesti neste-nesteuutto menetelmällä, jossa näyte puhdistetaan, konsentroidaan ja liuotin vaihdetaan. Lämmitystä ja ultraääntä voidaan käyttää liuottamisen apuna, tämän jälkeen näyte suodatetaan. (Jaarinen & Niiranen 2005, 170.)

#### **4.1.3 Akryyliamidin tutkiminen leivästä HPLC:llä**

Jotta leivässä oleva akryyliamidi pitoisuus voitaisiin määrittää HPLC:llä, täytyy sen olla kokonaan liuenneena ja nestemäisessä muodossa. Leivästä täytyy valmistella näyte kiinteäfaasiuuton avulla. Kiinteäfaasiuutossa näyte puhdistetaan ja konsentroidaan käyttämällä pieniä kertakäyttöisiä kolonneja. Kolonneissa on täytteenä samankaltaisia materiaaleja kuin HPLC:ssä. (Jaarinen & Niiranen 2005, 170.) Kiinteäfaasiuutossa on neljä vaihetta, joista ensimmäinen on pylvään aktivointi. Kolonnissa oleva erotusmateriaalin eli faasin partikkelit kostutetaan tasaisesti liuottimella, jotta sen vuorovaikutus olisi mahdollisimman samanlainen näytteen molekyylin kanssa. Faasista riippuen se tasapainotetaan poolisella tai poolittomalla liuottimella 2-3 kertaa ja tämän jälkeen vielä liuottimella johon näyte on liuotettu. Seuraavana vaiheena on näytteen lisäys. Näytettä lisätään kolonniin sen kapasiteettia vastaava määrä ja se applikoidaan negatiivista tai positiivista painetta käyttämällä. Kolmantena vaiheena suoritetaan pesu, joka ei kuitenkaan ole välttämätön vaihe. Siinä kolonnista poistetaan mahdollisimman paljon heikosti uuttomateriaaliin kiinnittyneitä tai kiinnittymättömiä matriisin aineita. Viimeisenä näyte eluoidaan liuotinseoksella tai liuottimella ulos kolonnista. (Wikipedia [Viitattu 19.9.2017].)

Ennen näytteen ajoa HPLC:llä täytyy ajaa läpi standardit, jotta näytteen pitoisuus voidaan määrittää. Standardiliuokset valmistetaan laittamalla 0,05g akryyliamidia mittapulloon ja täyttämällä merkkiin asti metanolilla. Tämän jälkeen lasketaan liuoksen konsentraatio akryyliamidia millilitrassa liuosta. Tämän jälkeen liuosta otetaan 1ml ja laitetaan 50ml mittapulloon, joka täytetään metanolilla merkkiin asti. Tässä

liuoksessa on nimellisesti n. 10mg/ml akryyliamidia. Tästä liuoksesta otetaan 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 ja 4.0 ml liuosta ja laitetaan 10ml mittapulloihin, jotka täytetään merkkiin asti metanolilla. Nämä liuokset sisältävät siis 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 ja 4.0mg/ml akryyliamidia. (Determination of acrylamide [Viitattu: 19.9.17].)

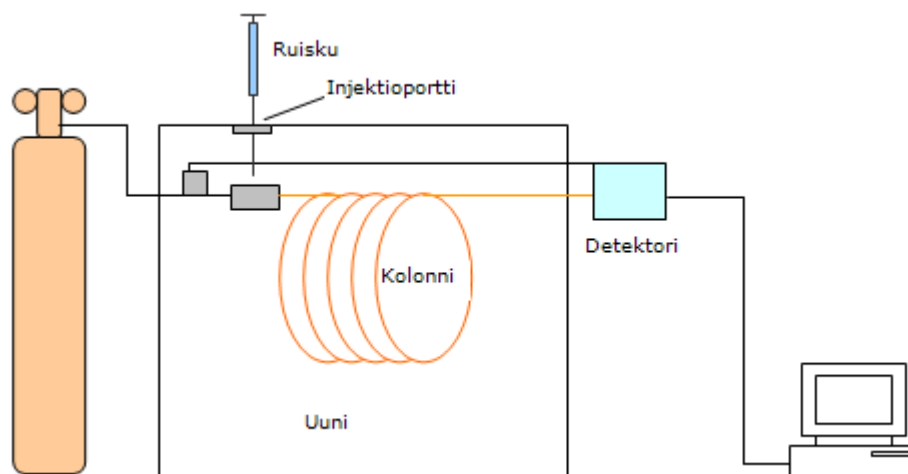
Eluentti valmistetaan laittamalla 70ml 0,05mol/l rikkihappoa litran mittapulloon ja jota laimennetaan 500ml vettä. Tämän jälkeen lisätään 70ml asetonitriliä ja täytetään vedellä merkkiin asti. Tämä ratkaisu voi vaatia kaasun poistamista ennen käyttöä. (Determination of acrylamide [Viitattu: 19.9.17].)

Detektorina käytetään UV-detektoria ja kolonnia, jossa on stationäärifaasina ioninvaihtofaasi. Ensin standardit ajetaan HPLC laitteiston läpi, jolloin detektori piirtää havaitsemansa piikit. Tämän jälkeen ajetaan läpi näyte. Detektori piirtää näytteen piikin ja standardi piikkien avulla voidaan laskea näytteen akryyliamidi pitoisuus. (Determination of acrylamide [Viitattu: 19.9.17].)

## 4.2 Kaasukromatografi

Kaasukromatografiaa käytetään hajoamatta höyrystyvien yhdisteiden tunnistamiseen ja erotteluun (Opetushallitus [Viitattu: 18.9.17]). Stationäärifaasina käytetään yleensä nestettä ja liikkuva faasi on jokin kaasu kuten typpi, helium tai vety (Jaarinen & Niiranen 2005, 183). Erottuminen perustuu yhdisteiden erilaisiin liukoisuuksiin stationäärifaasiin sekä erilaisiin höyrönpaineisiin ja näin ollen kyseessä on jakaantumiskromatografia. Näyte liuotetaan sopivaan liuottimeen ja syötetään kaasukromatografian injektioammioon. Injektioammiossa näyte höyrystyy 200-300 asteen lämpötilassa (Opetushallitus [Viitattu: 18.9.17]). Yhdisteet eluoituvat kiehumispistejärjestyksessä, sillä mitä herkemmin yhdisteet höyrystyvät sitä nopeammin ne kolonnissa kulkevat (Jaarinen & Niiranen 2005, 183). Kolonnista yhdisteet kulkeutuvat detektorille, joka tuottaa signaalin jonka voi havaita piikkeinä kromatogrammissa (Opetushallitus [Viitattu: 18.9.17]). Nestekromatografiaan verrattuna kaasukromatografian etuna voidaan pitää herkkiä yleisdetektoreita (Jaarinen & Niiranen 2005, 184).

#### 4.2.1 Kaasukromatografi laitteisto



Kuvio 2. Kaasugromatografi laitteisto (Opetushallitus [Viitattu: 18.9.17]).

Kaasukromatografiassa käytetään erilaisia injektiotekniikoita ja näistä keskeisimmät ovat jako- ja suorainjektio sekä kolonniin injektio. Jakoinjektiossa näytteestä vain pieni osa menee kolonniin. Näytteen komponenttien tulee jakoinjektiossa höyrystyä nopeasti kaasufaasiin ja tämän vuoksi lämpötilan tulee olla lähellä näytteessä olevan korkeimman kiehumispisteen omaavan komponentin kiehumispistettä. Jakoinjektiota tulee käyttää yhdisteiden kanssa jotka ovat termisesti kestäviä ja niillä on tarpeeksi suuret pitoisuudet. Jos tutkittavat yhdisteet täyttävät nämä vaatimukset kannattaa käyttää jakoinjektiota, sillä se on helppo suorittaa (Jaarinen & Niiranen 2005, 186-188.)

Suorainjektiossa lähes koko näyte menee kolonniin. Alkulämpötilana käytetään vähintään 20-30 astetta. Nestehöyry joka tulee injektorista, tiivistyy kolonnin sisäpintaan ohueksi nestekerrokseksi. Liuotinmolekyylejä mukanaan kantava kantaja-kaasu kuivattaa ja konsentroi näytteen. Liottimen haihduttua näyte muodostaa kolonniin kapean vyöhykkeen ja jakoventtiili avataan ja kolonnin lämpötilaa nostetaan ohjelman mukaisesti. Näytteen höyrystyminen kestää jakoinjektiota kauemmin ja siksi suorainjektio on hyvä pienille ainemääriille. Injektorin ei tarvitse myöskään olla yhtä korkeassa lämpötilassa. (Jaarinen & Niiranen 2005, 189.)

Kolonnein injektio sopii huonosti lämpöä kestävien yhdisteiden analyysiin. Siinä näyte injektoidaan suoraan kolonnein hyvin kapeakärkisellä neulalla. Kolonnein injektiossa kolonni kuitenkin kuluu ja likaantuu nopeammin kuin muissa injektiotekniikoissa. (Jaarinen & Niiranen 2005, 189.)

Uuni pitää kolonnin asetetussa lämpötilassa. Lämpötila-alue vaihtelee huoneen lämpötilasta noin 400 C asteeseen, tutkittavasta näytteestä riippuen. Uunin lämpötila voidaan laskea myös huoneen lämmön alapuolelle, jos kaasukromatografi varustetaan jäähdytys-elementillä. Lämpötilan alarajan määrää stationäärifaasin jäätymisspiste. Stationäärifaasin tulee pysyä nestemäisenä. Aina ennen seuraavaa ajoa uuni on jäähdytettävä lämpötilaohjelman mukaiseen alkulämpötilaan. Uunin tulee asettua nopeasti haluttuun arvoon, joten sen lämpötila kapasiteetin tulee olla pieni. Uunin sisällä oleva ilmankierto pitää kolonnin ja uunin tasaisessa lämpötilassa. Lämpötilalla on suuri vaikutus retentioaikoihin ja pienikin lämpötilan nosto vaikuttaa analyysiaikaan. Analyysin lopuksi uunin lämpötila nostetaan lähelle kolonnin maksimilämpötilaa, jotta se puhdistuisi vaikeammin haihtuvista yhdisteistä. (Jaarinen & Niiranen 2005, 190.)

Kaasukromatografien kolonnit ovat yleisimmin lasikapillaarikolonneja. Kolonnin lämpötilaa joko nostetaan tai se pidetään vakiona näytettä tutkiessa. (Opetushallitus [Viitattu: 18.9.17].) Stationäärifaasien tulee olla inerttejä nesteitä. Niiden tulee kestää korkeita lämpötiloja, eivätkä ne saa hajota tai höyrystyä tai siirtyä kantajakaasun mukana. Kun kolonni asennetaan kaasukromatografiin, sen toinen pää työnnetään detektoriin ja toinen injektoriin. Kantajakaasun virtaus säädetään, kun kolonnin on kiinnitetty injektoriin ja sen virtaus tarkistetaan laittamalla kolonnin pää liuottimeen johon virtaus synnyttää kuplia. Tämän jälkeen kolonnin kiinnitetään detektoriin ja kolonnia stabiloidaan puoli tuntia nostamalla uunin lämpötila maksimiin. (Jaarinen & Niiranen 2005, 192.)

Kuten nestekromatografien detektorin on myös kaasukromatografien kolonnin tehtävä havaita kolonnista tulevat yhdisteet. Yleisimmin käytettyjä ovat liekki-ionisaatiodektektorit eli FID ja elektronin sieppausdetektorit eli ECD. (Opetushallitus [Viitattu: 18.9.17].) FID havaitsee yhdisteet jotka palaessaan happirikkaassa vetyliekissä muodostavat sähköisesti varautuneita hiukkasia. Jos molekyylissä on fosfori-, happi-, typpi-, halogeeni-, tai rikkiatomeja, heikkenee FID:n herkkyys. Hiilidioksidia,

jalokaasuja tai vettä ei voi FID:illä havaita. ECD pystyy havaitsemaan hyvin pieniä aine määriä (Opetushallitus [Viitattu: 18.9.17].) ECD on herkkä molekyyleille jotka voivat ottaa itselleen ylimääräisen elektronin (Jaarinen & Niiranen 2005, 193). Molemmat detektorit ovat hyvin valikoivia ja selektiivisiä (Opetushallitus [Viitattu: 18.9.17]). Muita kaasukromatografiassa käytettäviä detektoreita ovat mm. typpi-fosforidetektori, liekki-johtometrinen detektori, fotonisaatidetektori sekä lämmönjohtokykydetektori (Jaarinen & Niiranen 2005, 193).

#### 4.2.2 Akryyliamidin tutkiminen leivästä kaasukromatografilla

Akryyliamidia kaasukromatografilla tutkittaessa tehdään ensin standardinäytteet. Standardit tehdään vähintään 99% puhtaasta akryyliamidista, josta tehdään liuos metanolin kanssa niin, että liuoksen konsentraatio on 1000µg/ml. Tästä liuoksesta tehdään standardit 1,2 ja 3 samaan tapaan kuin HPLC:llä määrittäessä (Univesrity of Bucharest 2014, kohta 2.)

Leivästä valmistetaan näyte käyttämällä tandem-massaspektrometriaa. Massaspektrometri havaitsee vain ionisoituneita molekyylejä, jolloin molekyyleillä on ylimääräistä energiaa. Massaspektrometrissä molekyylin sidokset katkeavat energian vaikutuksesta pienemmiksi kappaleiksi eli massafragmenteiksi ja ne erotellaan toisistaan niiden massa-varaussuhteen mukaan (Jaarinen & Niiranen 2005, 122.) Ensin leipä kuivataan, jauhetaan ja homogenisoidaan. Tämän jälkeen näytteeseen lisätään vettä, etikkahappoa, trihydraattia sekä sinkkisulfaattiheptahydraattia, jonka jälkeen akryyliamidi voidaan uutaa näytteestä. Tämän jälkeen näyte puhdistetaan ja se on valmis tutkittavaksi kaasukromatografilla. (Univesrity of Bucharest 2014, kohta 2.3.)

Kantajakaasuna käytetään 99,9995% puhdasta heliumia ja injektiotekniikkana on jakoinjektio. Detektorina toimii ECD. Uuniin asennetaan seuraavanlainen ohjelma: 65 °C:seen 1 minuutiksi, jonka jälkeen lämpötila nousee 15°C:tta minuutissa 170°C:een ja sen jälkeen 5 °C:tta minuutissa 200 °C:een ja lopuksi 40 °C:tta minuutissa 240 °C:een, ja pidetään 5 minuuttia 240 °C:ssa. Ensin ajetaan standardit, jonka jälkeen ajetaan näyte. Detektori piirtää piikit joista akryyliamidin määrä leivässä voidaan laskea. (Univesrity of Bucharest 2014, kohta 2.4.)

## 5 SÄÄDÖSTEN TOTEUTTAMINEN PIRJON PAKARILLA

### 5.1 Pirjon Pakari

Pirjon Pakari on vuonna 1985 perustettu leipomoalan yritys, joka valmistaa pääasiassa leipätuotteita. Tuotteisiin kuuluu erilaisia leipiä sekä laajasti gluteenittomia leipätuotteita. Leipomoja on kolmella paikkakunnalla, Seinäjoella, Ylöjärvellä sekä Nurmijärvellä. Lisäksi Kauhajoella sijaitsee gluteeniton leipomo, jossa valmistetaan vain ja ainoastaan gluteenittomia tuotteita. (Pirjon Pakari [Viitattu 27.3.2018].)

Pirjon Pakarin Seinäjoen leipomolla leivotaan tuotteita päivittäin, jotta leipä olisi mahdollisimman tuoretta asiakkaan sen ostaessa. Leivottavia tuotteita on noin 23 erilaista ja 15:tä näistä leivotaan päivittäin, myös pieniä eriä kahvileipiä kuten pullaa valmistetaan tilausten mukaan. Valikoimassa on erilaisia sekaleipiä, ruisleipiä ja vehnäleipiä. Leipominen tapahtuu yöllä, jotta leipä saataisiin seuraavana päivänä kauppaan tuoreena. Työ tehdään vielä suurilta osin käsin koneiden avustuksella. Pirjon Pakarin Seinäjoen leipomon laitteistoon kuuluu kaksi taikinakonetta ja useampi taikinapata, kaksi ylöslyöntilinjastoa, kaksi nostatuskaappia, kuusi uunia, jäähdytyskaappi sekä neljä puoliautomaattista pakkauskonetta. Jokaisessa vaiheessa on henkilökuntaa tekemässä taikinaa, muotoilemassa leipiä, paistamassa tai pakkaamassa.

Leipiä jaetaan Seinäjoen leipomolta päivittäin laajasti ympäri maakuntaa ja edemmäskin. Vehnä-, ruis-, ja sekaleipiä jaetaan päivittäin ja gluteenittomia tuotteita maanataisin, keskiviikkoisin ja perjantaisin.

### 5.2 Raaka-aineet

Pirjon Pakarin leivissä ei käytetä lainkaan lisäaineita mikä on yritykselle hyvä markkinointikikka. Raaka-aineet ovat kotimaisia ja leipomo suosii lähituottajien raaka-aineita. Suurin osa leivistä on vettä ja jauhoa, mm. vehnäjauhoa ja/tai ruisjauhoa. Kohotusaineena käytetään D-vitaminisoitua hiivaa ja leivät maustetaan jodidulla suolalla. Muita raaka-aineita ovat rypsiöljy, kaurahiutaleet ja -litisteet, sokeri ja etikka.

Joihinkin leipiin lisätään kyseiselle leivälle ominaisia raaka-aineita kuten porkkanaraastetta tai sipulirouhetta. (Pirjon Pakari [Viitattu 27.3.2018].)

### 5.3 Leivontaprosessi

Leipomisen valmistelu alkaa jo edellisenä päivänä, jolloin raaka-aineet seuraavana yönä valmistettaviin leipiin punnitaan ja mitataan. Leivän tekoprosessi alkaa leipätaikinat valmistamisesta jonka jälkeen se paloittelaa, muotoillaan, nostatetaan, paistetaan, jäähdytetään ja pakataan ja lähetetään jakeluun kauppoille. Taikina valmistetaan suurissa taikinapadoissa ja vaivataan taikinakoneilla. Kun taikina on valmis se ylöslyödään ylöslyöntilaitteistolla, joka paloittelee taikinan oikean kokoisiksi paloiksi. Palat kulkevat linjaston läpi ja lopulta kone litistää ne litteiksi pyöreiksi leiviksi. Linjaston päässä työntekijä muotoilee leipään reiän ja nostaa ne pellille. Pellit nostetaan pinnavaunuun, johon menee useampi pellillinen. Seuraavaksi leivät nostatetaan nostatuskaapeissa. Nostatusaika arvioidaan aistinvaraisesti. Kun leivät ovat tarpeeksi nousseet ne otetaan pois kaapista. Lievästä riippuen nostatusaika on n. 30-50 minuuttia. Leivät paistetaan uuneissa 200-270 asteessa ja isossa tai pienessä höyryssä noin 15-25 minuuttia leivästä riippuen. Kun leivät ovat kypsiä ne jäähdytetään jäähdytys kaapissa alle 16 asteisiksi, jotta ne voidaan pakata pusseihin pakkauskoneilla. Leivät ovat valmiita jaettavaksi ja ne jaetaan kauppoille. (Pihlaja 2018.)

### 5.4 Akryyliamidiasetuksen toimenpiteet

Akryyliamidista on EU:ssa tehty säädös, joka astuu voimaan huhtikuussa 2018. Säädöksen 1 artiklan 2 kohdan mukaan leipä kuuluu säädöstä koskeviin tuotteisiin. Säädöksellä pyritään vähentämään kuluttajan saamaa akryyliamidin määrää elintarvikkeissa. Säädöksessä on kerrottu vähentämistoimenpiteet ja vertailuarvot akryyliamidille. Elintarvikkeiden akryyliamidi pitoisuus pitäisi saada vähentämistoimenpiteillä alle vertailuarvojen, jos pitoisuudet kuitenkin ylittävät toimenpiteistä huolimatta ei tämä kuitenkaan ole syy hylkäämiselle. Vähentämistoimenpiteiden suorittamisesta täytyy olla jonkin kaltaista dokumentointia. (Akryyliamidikoulutus 2018.)

Vähentämistoimenpiteiden suorittaminen vaatii Pirjon Pakarilta tuotekehitystä. On hyvin mahdollista, että valmiin tuotteen ominaisuudet muuttuvat, jos raaka-aineita tai leivonta prosessia muutetaan vähentämistoimenpiteiden mukaisesti. Tuotteiden reseptiikkaan voisi tehdä muutoksia esimerkiksi lisäämällä taikinoihin asparaginaa-sia. Tämä vaatisi kokeilua siitä, että mikä asparagiinin määrä taikinassa olisi hyvä ja tuottaisi halutun lopputuloksen. Jos Pirjon Pakari kuitenkin haluaa olla lisäämättä tuotteisiinsa mitään lisäaineita ei asparaginaasi ole tällöin vaihtoehto, lisäksi se toisi jonkin verran lisäkustannuksia. Erilaisten jauhojen käyttäminen voisi myös vähentää akryyliamidin määrää lopputuotteessa. Kuten aiemmin tässä työssä on todettu, akryyliamidin lähtöainetta asparagiinia on enemmän esimerkiksi täysjyväjauhoissa. Jos täysjyväjauhoa aletaan korvaamaan jollain muulla tulisi tällöin kuitenkin ottaa huomioon myös valmiin tuotteen ravinnollinen arvo. (Akryyliamidikoulutus 2018.)

Leivontaprosessia tulisi myös muuttaa säädösten mukaisiksi. Kuten jo aiemmin kappaleessa 3.1.1 on mainittu akryyliamidin muodostumiseen vaikuttaa paistoteho ja nostatusaika. Nyt leivät paistetaan 200-270 asteessa noin 15-20min, jolloin lämpötila on korkea ja aika suhteellisen lyhyt. Lämpötilaa voisi lähteä laskemaan pikkuhiljaa ja katsoa mikä antaa vaaleamman paistotuloksen ilman mikrobiologisen turvallisuuden vaarantumista. Mitä vaaleammaksi leipä saadaan, sitä vähemmän siinä todennäköisesti on akryyliamidia. Kun leivän väri on saatu halutunlaiseksi, olisi hyvä tehdä leivistä, jonkinlainen värikartta, jotta paistajat osaisivat paistaa leivät oikeanlaisiksi. Kuvat liian tummasta ja vaaleasta leivästä ja kuva sopivasta leivästä, näin leipien paistopintaa olisi helppo seurata ja se helpottaisi myös uusia paistajia. Leipien nostatusaikaa voisi kokeilla myös pidentää. Sillä niin kuin kappaleessa 3.1.4 on todettu, hiiva käyttää taikinasta asparagiinia, joten pidemmällä nostatus ajalla hiivalla olisi enemmän aikaa kuluttaa asparagiinia. Kuten aiemmin todettiin kappaleessa 5.3 nostatusajat ovat Pirjon Pakarilla aistinvaraisia, joten aikojen ylös kirjaaminen olisi aloitettava ensin. (Akryyliamidikoulutus 2018.)

Pirjon Pakarilta leipää myydään muuallekin kuin vain Seinäjoelle, jossa leipomo sijaitsee, tämän takia vähentämistoimenpiteiden lisäksi on tehtävä näytteenottosuunnitelma. Näytteitä tulee ottaa kustakin tuotetyypistä oma edustava näytteensä. Tuotetyypillä tarkoitetaan tuoteryhmiä, joissa on sama tai samankaltainen resepti, val-

mistusprosessi ja ainesosat. Näytteen otossa etusijalla ovat ne tuotteet, jotka saatavat ylittää vertailuarvot. Näytteenottotiheys on kerran vuodessa ja akryyliamidinäytteitä tutkivat ainakin kappaleessa 3.2 mainitut laboratoriot. (Akryyliamidi koulutus 2018.)

Kaikki käyttöön otetut ja/tai testatut vähentämistoimenpiteet tulee kirjata Pirjon Parkarin omaavalvontasuunnitelmaan. Mikäli akryyliamidipitoisuus ei vähene toimenpiteistä huolimatta on kuitenkin pystyttävä todentamaan tarkastusviranomaisille, että toimenpiteet on suoritettu. Jos kaikki mahdolliset toimenpiteet akryyliamidin vähentämiseksi on suoritettu, mutta akryyliamidipitoisuus ei syystä tai toisesta laske ei tämä ole kuitenkaan hylkäysperuste. Lisäksi henkilöstöä pitäisi opastaa ja neuvoa asetuksesta. (Akryyliamidi koulutus 2018.)

## 6 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Akryyliamidia syntyy leipään sitä paistettaessa yli 120 asteessa. Akryyliamidille on asetettu raja-arvot sekä pakolliset menettelyt sen vähentämiseksi elintarvikkeissa. Neste- ja kaasukromatografialla voidaan selvittää akryyliamidin määrää leivässä. Paistoaika, lämpötila ja monet muut asiat vaikuttavat akryyliamidin muodostumiseen leivässä.

Työn tavoitteena oli selvittää akryyliamidin määrittystä leivässä, sekä akryyliamidia koskevia säädöksiä. Analyyseista ja analyysilaitteista tietoa löytyi niukasti, sillä akryyliamidin määrittäminen elintarvikkeista on vielä uutta. Koko aihe on vielä uusi ja ajankohtainen, joten lähteitä oli hankala etsiä. Tavoite kuitenkin saatiin toteutettua ja löydettiin tietoa, miten akryyliamidin kanssa täytyy leipomoissa toimia jatkossa, sekä tietoa miten sitä voidaan mahdollisesti tutkia. Lisäksi uuteen asetukseen tutustuminen onnistui ja saatiin tietoa siitä mitä säädös leipomolta vaatii. Näytteenotosta ja sen arvokuudesta onnistuttiin saaman tietoa kysymällä sitä näytteitä tekeviltä laboratorioilta.

Kirjallisuuspohjaisen työn tekeminen oli haastavaa. Elintarvikeasioissa akryyliamidi ja sen mahdolliset vaarat ovat kuitenkin vielä todella uusi käsite. Lähdekriittisyys oli myös tärkeää, sillä tietoa akryyliamidista löytyi, mutta todella monet lähteet eivät antaneet itsestään kovin luotettavaa kuvaa, sillä tiedon lähteet puutuivat. Monien lähteiden tiedot tulivat myös yhdestä samasta lähteestä, mikä kertoo hyvin siitä, kuinka niukasti tietoa aiheesta on vielä saatavana. Työhön saatiin koottua hyvin tietoa akryyliamidista ja sen tutkimisesta. Menettelystä uuden säädöksen kanssa sai hyvin tietoa Eviran järjestämästä akryyliamidi koulutuskierroksesta, jossa käytiin läpi mitä asioita tulee ottaa huomioon säädöksen kirjaamisessa yritysten omavalvontasuunnitelmaan.

## LÄHTEET

Akryyliamidikoulutuskierrös 2018. Evira. Luentomuistiinpanot 12.3.2018

Determination of Acrylamide in Food Simulants. [Verkkosivu]. [Viitattu 19.9.2017]  
 Saatavana: [http://www.bfr.bund.de/cm/343/migration\\_von\\_acrylamid\\_aus\\_verpackungen\\_nachweismethode\\_en.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/343/migration_von_acrylamid_aus_verpackungen_nachweismethode_en.pdf)

Elintarviketeollisuusliitto ry 26.3.2014. FoodDrinkEurope Akryyliamidi opas 2013 [Verkkojulkaisu]. [Viitattu 31.5.2017] Saatavana: <http://www.etl.fi/media/aineis-tot/suositukset-ja-ohjeet/akryyliamidiopas2013.pdf>

Euroopan Komissio 2013. Komission suositus elintarvikkeiden akryyliamidipitoisuuksien tutkimuksista 2013/647/EU [Verkkoteksti]. [Viitattu 9.1.2018] Saatavana: [http://publications.europa.eu/resource/cellar/d4f039d5-4b8a-11e3-ae03-01aa75ed71a1.0009.01/DOC\\_1](http://publications.europa.eu/resource/cellar/d4f039d5-4b8a-11e3-ae03-01aa75ed71a1.0009.01/DOC_1)

Evira 19.8.2016. Akryyliamidi [Verkkosivu]. [Viitattu 31.5.2017] Saatavana: <https://www.evira.fi/yhteiset/vierasaineet/tietoa-vierasaineista/akryyliamidi/>

Held J.2005. Mestarileipurin leipäkirja. Hämeenlinna: Karisto Oy

Jaarien, S., Niiranen, J. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. 5. uud. p. Helsinki: Edita Prima Oy

Kanerva, P., Salovaara, H. 2005. Leivänpaistaminen: paistovaiheet, kuoren muodostuminen ja akryyliamidi. Leipurilehti 1/15 28-33

Käyttöturvallisuustiedote 18.11.2017. Akryyliamidi. [Verkkojulkaisu] [Viitattu 14.11.2017] Saatavana: [https://www.carlroth.com/downloads/sdb/fi/7/SDB\\_7871\\_FI\\_FI.pdf](https://www.carlroth.com/downloads/sdb/fi/7/SDB_7871_FI_FI.pdf)

Leipomoalan Edistämisseätiö 1999. Kahvileipää, käsikirja leipureille Neljäs painos. Helsinki: Vesanpaino Oy

Lukkariniemi, M., Jestoi, M. 2018. Akryyliamidin vähentämistoimenpiteiden soveltaminen pakolliseksi osaksi omavalvontaa. Leipurilehti (1) 26-29

Lukkariniemi, M. 2017. Toimialapäällikkö. Elintarviketeollisuusliitto ry. PowerPoint esitys 19.6.2017

Mattila, P., Piironen, V., Ollilainen., V. 2001. Elintarvikekemian ja -analytiikka. Helsinki: Yliopistopaino

- Opetushallitus. Laboratorioanalyysit: 2.6. Nestekromatografia [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 15.5.2017] Saatavana: [http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat\\_2-6\\_nestekromatografia.html](http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_2-6_nestekromatografia.html)
- Opetushallitus. Laboratorioanalyysit: 2.5. Kaasukromatografia [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 18.9.2017] Saatavana: [http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat\\_2-5\\_kaasukromatografia.html](http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_2-5_kaasukromatografia.html)
- Pihlaja, L. 2018. Osastopäällikkö. Pirjon Pakari Seinäjoki. Tekstiviestikeskustelu 5.3.2018
- Pirjon Pakari. [Verkkosivu]. [Viitattu 13.3.2017] Saatavana: <http://pirjonpakari.fi/tuote-osasto/pirjon/>
- PubChem Open Chemistry Database 11.11.2017. Acrylamide [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 14.11.2017] Saatavana: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6579#section=GC-MS>
- Salovaara H, Ignatius A , Jussila A, Hurri-Martikainen M. 2017. Leivonnin teknologia Ruokaleipä. Suomen Leipuri liitto ry. Helsinki
- Wikipedia 5.1.2017. Kiinteäfaasiuutto. [Verkkosivu]. [Viitattu 19.9.2017] Saatavana: <https://fi.wikipedia.org/wiki/Kiinte%C3%A4faasiuutto>
- University of Bucharest 4.2014. Determination of Acrylamide in Bread by Gas Chromatography – Tandem Mass Spectrometry. [Verkkosivu]. [Viitattu 20.9.2017] Saatavana: [http://www.rombio.eu/vol19nr4/lucr%2014\\_Negoita\\_correctat\\_rec%2022\\_05\\_2014\\_ac20.06.2014.pdf](http://www.rombio.eu/vol19nr4/lucr%2014_Negoita_correctat_rec%2022_05_2014_ac20.06.2014.pdf)

## LIITTEET

Liite 1. Sähköpostikeskustelut

## LIITE 1 Sähköposti keskustelut

Hei!

Olen bio-ja elintarviketekniikan opiskelija seinäjoelta ja teen opinnäytetyötäni akryyliamidiin ja sen määrittämiseen liittyen. Olisin tahtonut tiedustella teettekö laboratorioissanne akryyliamidin määrittystä elintarvikkeissa? (Tässä tapauksessa leivästä) Ja jos teette minkä hintaisia tutkimuksenne ovat?

Ystävällisin terveisin

Noora Ahola

Hei,

Kiitos viestistäsi. Teemme kyllä akryyliamidin määrittäksi elintarvikkeista ja meillä on kaksi vaihtoehtoista testiä käytössä.

Testeissä erona on määrittäysraja (tiedot liitteenä). Testin JCAA1 hinta on 162 € ja testin JCAA2 260 €.

Ystävällisin terveisin

Jenni Lehtonen  
Account Manager

Eurofins Scientific Finland Oy  
...

Saapuneet

11. toukokuuta 2017 21:02

Hei,

Kiitos yhteydenotostasi. Kyllä, akryyliamidin määrittäminen onnistuu kauttamme. Liitteenä on tekniset tiedot konsernimme Ruotsin laboratorion tekemästä akkreditoidusta akryyliamidimäärittäyksestä. Analyysin hinta on 218 € (alv 0%) per näyte. Liitteenä myyntiehtomme sekä näytelähete, jonka kanssa voitte toimittaa näytteet haluamaanne näytelähteessä mainittuun toimipisteeseemme.

Ystävällisin terveisin,  
Leena Maanpää-Pohjonen

Saapuneet

21. huhtikuuta 2017 13:48

Hei,

Tullilaboratoriolla on menetelmä akryyliamidille, mutta sitä ei ole käytetty vähään aikaan, koska akryyliamidille ei ole vielä lainsäädännössä raja-arvoa. Tullissa pyrimme keskittymään sellaiseen valvonta-analytiikkaan, jolle on selkeät lakisääteiset perusteet. Koska menetelmä ei ole tällä hetkellä rutiinikäytössä, emme myöskään mielellämme myy analyysia ulkopuolisille tahoille.

Suomessa akryyliamidianalyysia voi ostaa ainakin MetropoliLabin ja Eurofinsin kautta. Nämä lähettävät näytteet todennäköisesti jonnekin puolelle Eurooppaa analysoitavaksi. Jos pystyy suoraan asioimaan ulkomaisen laboratorion kanssa, saattaa päästä hieman halvemmalla. Saksassa analyysia tekee ainakin GBA (yhteyshenkilö Burger Voss) ja Galab (yhteyshenkilö Carsten Saal). GBA taitaa olla näistä edullisempi.

Ystävällisin terveisin

Suvi Ojanperä

Tullilaboratorio

Hei

Valitettavasti emme tee itse, vaan ostimme analyysin alihankintana SGS:n Hampurin laboratoriosta. Veroton hinta on tällöin 177 €/näyte.

Ystävällisin terveisin,

Anu Johansson  
avainasiakas- ja laatupäällikkö  
Net-Foodlab Oy

Hei,

meillä tehdään akryyliamidia vain vedestä. Tarvittaessa voimme järjestää akryyliamidin elintarvikkeista alihankintana. Olisitteko kiinnostuneita tästä alihankintamahdollisuudesta?

Ystävällisin terveisin,  
Eeva-Maria Rintala  
Orgaanisen kemian esimies, ETM  
MetropoliLab Oy

