



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Juulia Nurminen

Triasyyliglyserolin *sn*-2-position rasvahapon määritysmenetelmän käyttöönotto ja kehitys

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Laboratorioanalyttikko

Opinnäytetyö

13.11.2019

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Juulia Nurminen Triasyyliglyserolin <i>sn</i> -2-position rasvahapon määritysmenetelmän käyttöönotto ja kehitys 32 sivua + 2 liitettä 13.11.2019
Tutkinto-ohjelma	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat	Yliopettaja Jukka Niiranen Tutkija Klaus Muuronen Tutkijatohtori Sanna Hokkanen Teknologiapäällikkö Riitta Partanen
<p>Opinnäytetyö suoritettiin Valio oy:n tutkimus- ja tuotekehityksen laboratoriossa Pitäjänmäen toimipisteessä. Työn tavoitteena oli ottaa käyttöön analyysimenetelmä, jonka avulla erityisesti maitorasvasta voitaisiin määrittää triasyyliglyserolin <i>sn</i>-2-positiossa sijaitseva rasvahappoketju. Erityisen kiinnostuksen kohteena oli selvittää <i>sn</i>-2-palmitiinihapon osuus, suhteessa triasyyliglyserolin kokonaispalmitiinihappo-osuuteen.</p> <p>Opinnäytetyössä käytetty menetelmä perustui useimpien elävissä organismeissa tapahtuvien lipaasireaktioiden <i>sn</i>-1,3-spesifisyyteen, jota voitiin hyödyntää <i>sn</i>-2-position rasvahappojen määrittämisessä. Suoritettussa työssä tutkittiin hydrolyysiajan vaikutusta rasvan triasyyliglyserolien hydrolyysiasteeseen. Tulosten perusteella valittiin optimaalisin hydrolyysi aika mahdollisimman luotettavien tulosten saavuttamiseksi. Maitorasvan lisäksi menetelmällä tutkittiin myös kahden kasviöljyn sekä kahden äidinmaitokorvikkeissa käytetyn kasvirasvasekoitteen rasvahappojen positiojakaumaa triasyyliglyseroleissa.</p> <p>Kermasta uutetulle rasvalle suoritettiin hydrolyysireaktio <i>sn</i>-1,3-spesifisellä haiman lipaasilla, jonka seurauksena triasyyliglyserolit pilkkoutuivat vapaiksi rasvahapoiksi, diasyyli glyseroleiksi sekä 2-monoasyyli glyserideiksi. Hydrolysoidun rasvanäytteen sisältämät lipidiluokat eroteltiin ohutlevykromatografisella menetelmällä. Lipidiluokkien sisältämät rasvat metyloitiin rasvahappojen metyyliestereiksi, minkä jälkeen lipidiluokkien rasvahappokoostumukset voitiin määrittää kaasukromatografisella analyysillä. Lopuksi rasvahappojen osuuksia triasyyliglyserolin <i>sn</i>-2-positiossa verrattiin rasvahapon yhteen laskettuun osuuteen triasyyliglyserolissa.</p> <p>Hydrolyysikokeista saatujen tulosten perusteella, 6 minuutin hydrolyysin jälkeen saavutettiin optimaalinen hydrolyysiaste maitorasvanäytteille. Menetelmän huomattiin sopivan erityisesti yksittäisten rasvahappojen jakaumien tutkimiseen maitorasvanäytteissä. Maitorasvan lisäksi menetelmä antoi hyviä tuloksia, myös muille työssä tutkituille rasvanäytteille. Menetelmän toistettavuutta arvioitiin F- ja t-testien avulla, joiden perusteella kahtena päivänä suoritettujen kokeiden varianssit ja keskiarvot eivät poikenneet tilastollisesti merkittävästi 95 prosentin luottamustasolla.</p>	
Avainsanat	positiomääritys, <i>sn</i> -2-palmitiinihappo, triasyyliglyseroli, haiman lipaasi, maitorasva.

Author	Juulia Nurminen
Title	Introduction and Development of a Method for Determining the Distribution of Fatty Acids in Triacylglycerols of Fats
Number of Pages	32 pages + 2 appendices
Date	13 November 2019
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Jukka Niiranen, Senior Lecturer (Metropolia UAS) Klaus Muuronen, Researcher (Valio Ltd.) Sanna Hokkanen, Postdoctoral Researcher (Aalto University) Riitta Partanen, Technology Manager (Valio Ltd.)
<p>This thesis was implemented for Valio Ltd, which is a leading manufacturer of dairy products in Finland. Study was performed at Valio's research and development laboratory located in Helsinki, Pitäjänmäki. The aim of the study was to develop and introduce an analysis method, by which a positional distribution of fatty acids in triacylglycerols could be investigated. The primary interest of the study was to examine the distribution of palmitate acid in the <i>sn</i>-2 position relative to the total amount of palmitic acid in the triacylglycerols of the bovine milk fat.</p> <p>The method used was based on the <i>sn</i>-1,3 selectivity of the most common lipases found in living organisms. In the study carried out, the effect of hydrolysis time to the degree of hydrolysis of triacylglycerols was examined. On basis of the results obtained, an optimal time for a hydrolysis reaction was selected. After the optimal reaction conditions were achieved, a method was also applied to a few plant-based oil samples and their mixtures which are usually added to the most common infant formulas. A pancreatic lipase isolated from the pancreas of a porcine, which has shown a high <i>sn</i>-1,3 selectivity, was used to hydrolyze triacylglycerols of the samples extracted. Free fatty acids, 2-monoacylglycerols and triacylglycerols obtained from the hydrolysis were separated by use of thin-layer chromatography. After that, the methanolysis of the lipids and free fatty acids was performed to gain fatty acid methyl esters, which could be measured by a use of gas chromatography.</p> <p>Based on the results of hydrolysis experiments, after six minutes of hydrolysis, an optimum degree of hydrolysis was obtained for milk fat samples. Most of the samples gave good results when the distribution of palmitic acid was examined. Results obtained from bovine milk fat were evaluated by use of F and t test, which showed no statistically significant difference in 95% confidence level between two sets of test runs.</p>	
Keywords	<i>sn</i> -2-palmitate, fatty acid distribution, Triacylglycerol, milk fat, pancreatic lipase.

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Kirjallisuus	2
2.1	Rasvahapot	2
2.2	Asyyli glyserolit	3
2.3	Äidinmaidon ja lehmänmaidon rasvakoostumuksen vertailu	4
2.4	OPO-triasyyli glyserolit ja kasvirasvat äidinmaitokorvikkeissa	5
2.5	Rasva-aineenvaihdunta	6
2.6	Triasyyli glyserolin positio jakauman merkitys imeväisten ruuansulatuksessa	7
3	Työssä käytettävien analyysimenetelmien teoria	8
3.1	Hydrolyysi haiman lipaasilla	8
3.2	Ohutlevykromatografia	9
3.3	Suorasaippuointi ja metylointi	9
4	Työn suoritus ja laskut	10
4.1	Rasvan uutto kermasta	10
4.2	Uutetun rasvan hydrolyysi haiman lipaasilla	11
4.3	Hydrolysoitujen rasvanäytteiden lipidiluokkien erottelu ohutlevykromatografisesti	12
4.4	Lipidiluokkien metylointi	13
4.5	Kaasukromatografinen mittaus (GC-FID) ja rasvahappokoostumuksen laskeminen	13
4.6	<i>sn</i> -2-position rasvahappojen suhteelliset osuudet rasvahapon kokonaismäärästä	15
5	Menetelmän kehitys	15
5.1	Rasvanäyttemäärän valinta	15
5.2	Hydrolyysireaktion optimointi	17
6	Tulokset ja menetelmän luotettavuuden arviointi	19

6.1	Kokonaisrasvahappopitoisuus	20
6.2	Lehmänmaidon rasvahappojen positio jakauma triasyyliglyserolissa	23
6.3	Palmitiinihapon jakautuminen <i>sn</i> -2 positioon tutkituissa rasvanäytteissä	25
6.4	Työn toistettavuuden arviointi maitorasvanäytteillä	28
7	Yhteenveto ja johtopäätökset	30
	Lähteet	32
	Liitteet	
	Liite 1. Rasvahappojen moolimassat	
	Liite 2. Maitorasvan rasvahappokoostumus ja positiojakauma triasyyliglyserolissa	

Lyhenteet

GC	Kaasukromatografi (gas chromatography)
DAG	Diasyyliglyseroli
FA	Rasvahappo
FFA	Vapaa rasvahappo
FID	Liekki-ionisaatiodetektor (flame ionization detector)
MAG	Monoasyyliglyseroli
OPL	Oleiinihappo-palmitiinihappo-linolihappo
OPO	Oleiinihappo-palmitiinihappo-oleiinihappo
TAG	Triasyyliglyseroli

1 Johdanto

Suurin osa lehmänmaidon rasvasta koostuu triasyyliglyseroleista, joka on myös yleisin ruokavaliossa esiintyvä lipidiluokka. Triasyyliglyserolit koostuvat glyserolirungon kolmen hydroksyyliiryhmän ja rasvahappojen karboksyylihapporyhmien välisistä estereistä, joita kutsutaan positioiksi. Myös äidinmaidossa suurin osa rasvasta koostuu triasyyliglyseroleista, jonka glyserolirunkoon tyypillisimmin kiinnittyneitä rasvahappoja ovat palmitiinihappo ja oleiinihappo. Erityisesti merkittävässä asemassa on *sn-2*-positiossa sijaitsevan palmitiinihapon osuus suhteessa rasvan kokonaispalmitiinihappoon. Äidinmaidossa tyydyttynyt palmitiinihappo sijaitsee pääosin triasyyliglyserolin *sn-2*-positiossa. Puolestaan lehmänmaidossa palmitiinihappo on esteröityneenä *sn-1*- ja *sn-2*-positioihin [1, s. 40.]

Jopa 50 % imeväisikäisten lapsien energiansaannista koostuu äidinmaidon rasvoista, josta pelkän palmitiinihapon tarjoama energia käsittää jopa 12 % imeväisen kokonaisenergian saannista [2, s. 276; 3, s. 1; 4, s. 1]. Useiden tutkimusten mukaan erityisesti rasvahappojen positionaalisella jakaumalla on suuri merkitys rasvojen sekä mineraalien, kuten kalsiumin ja magnesiumin imeytymisen kannalta [5, s. 34–35]. Tästä syystä kaikista kehittyneimpiin äidinmaitokorvikkeisiin on lisätty synteettisesti vaihtoesteroimällä valmistettuja OPO-triasyyliiseroleja, jotta rasvahappokoostumuksen lisäksi myös rasvahappojen positionaalinen jakauma vastaisi äidinmaidossa luontaisesti esiintyvää rasva-koostumusta. Synteettiset OPO-rasvat ovat triasyyliglyseroleja, joiden *sn-1*- ja *sn-3*-positioissa, sijaitsee tyydyttymätön oleiinihappo sekä *sn-2*-positiossa tyydyttynyt palmitiinihappo [4, s. 1156–1157.]

Opinnäytetyö suoritettiin Valio Oy:n tutkimus- ja tuotekehityslaboratoriossa Pitäjänmäen toimipisteessä. Työn tavoitteena oli kehittää ja ottaa käyttöön menetelmä, jonka avulla voitaisiin selvittää regiospesifisesti *sn-2*-position rasvahappojen osuuksia sekä verrata näiden suhdetta *sn-1,3*-positioiden sisältämien rasvahappojen osuuksiin. Käyttöön otetulla menetelmällä ei kuitenkaan voitu määrittää stereospesifisesti *sn-1,3*-positioiden rasvahappoja toisistaan. Suoritetussa työssä oltiin erityisesti kiinnostuneita palmitiinihapon jakaumasta triasyyliglyseroleihin, mutta menetelmä mahdollisti myös muiden rasvahappojen positionaalisen jakauman tarkastelun rasvanäytteiden sisältämistä triasyyliglyseroleista.

2 Kirjallisuus

2.1 Rasvahapot

Lipidien pääkomponentteja ovat rasvahapot, jotka ovat alifaattisia hiilivetyketjuja [6, s. 1]. Rasvahappojen yleisiä piirteitä on usein pitkä alkyyliketju, jonka päissä sijaitsevat funktionaaliset ryhmät ovat karboksyylihappo- ja metyyliiryhmä [7, s. 320–321]. Rasvahapon alkyyliketju voi olla joko tyydyttynyt tai tyydyttymätön, ja niiden ominaisuudet vaihtelevat ketjun pituuden ja kaksoissidosten määrän mukaan. Tyydyttymättömillä rasvahapoilla on yksi -tai useampi kaksoissidos, joiden määrä vaikuttaa rasvojen sulamispisteeseen. Monityydyttymättömiksi kutsutaan rasvahappoja, joissa on kaksi tai useampia kaksoissidoksia [7, s. 321.]

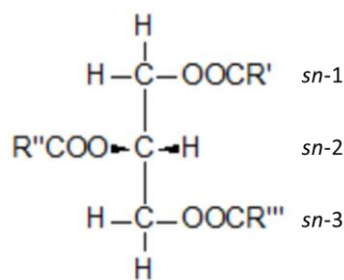
Luonnossa esiintyvät rasvahappoketjut ovat yleensä 4–22 hiiliatomin pituisia. Biologisissa järjestelmissä, kuten soluissa ja organelleissa, rasvahapot esiintyvät useimmiten 14–24 hiilen pituisina ketjuina. Näistä yleisimpiä rasvahappoja, ovat 16 ja 18 hiilen pituiset hiilivetyketjut [7, s. 321.] Rasvahapot sisältävät yleensä parillisen määrän hiiliatomeita, sillä niiden biosynteesissä tyydyttyneet rasvahappoketjut muodostuvat asetaatti-ioneista peräisin olevista, kahden hiiliatomin yksiköistä. Rasvahapposynteesissä asetaatti-ioneja lisätään molekyylien karboksyylipäähän, yleensä siihen asti, kunnes rasvahappoketjut ovat 18 hiiliatomin pituisia. Tyydyttymättömät rasvahapot muodostuvat desaturuimalla tyydyttyneet rasvahapot desaturaasientsyymin avulla, joka liittyy kaksoissidokset niille spesifeihin positioihin suhteessa rasvahapon karboksyylipäähän [6, s. 2.]

Kirjallisuudessa rasvahapoista käytetään useimmiten näiden triviaalinimiä tai lyhenteitä. Systemaattisesti IUPAC:n mukaan nimettyjen rasvahappojen numerointi aloitetaan tämän karboksyylihiilestä karboksyylihappojohdannaisina. Systemaattisessa nimeämisessä rasvahapon alkuosa määräytyy hiilien lukumäärän mukaan. Tyydyttyneet rasvahapot saavat aina alkaanin -aani-päätteen. Tyydyttymättömät rasvahapot, voivat sisältää 1–6 hiilten välistä kaksoissidosta, joiden konfiguraatiota kuvataan kirjaimin Z ja E (tai *cis* ja *trans*). Tällaiset rasvahapot saavat päätteen -eeni ja etuliitteen, joka kuvaa kaksoissidosten määrää hiilivetyketjussa. Esimerkiksi heksadekaanihaposta käytetään usein tämän tunnetumpaa triviaalinimeä palmitiinihapo sekä lyhennettä C16:0. Lyhenteessä

ensimmäinen luku kuvaa hiilten lukumäärän ketjussa karboksyylihiili mukaan lukien ja toinen luku ilmoittaa hiilten välisten kaksoissidosten määrän ketjussa [6, s. 1.]

2.2 Asyyliglyserolit

Asyyliglyserolit ovat glyserolin kolmen hydroksyyliiryhmän ja rasvahappojen karboksyyli-happoryhmän välisiä neutraaleja estereitä. Asyyliglyserolit kuvataan usein pystysuorana runkona, jonka stereospesifinen numerointi lähtee ylhäältä alaspäin ja saa aina etuliitteen ”*sn*” (stereospecific numbering). Asyyliglyserolit saavat etuliitteeksi mono-, di- tai triasyyliglyseroli riippuen siitä, kuinka monta rasvahappoa glyserolirunkoon on esteröityneenä (kuva 1) [6, s. 16]. Suurin osa ruokavaliossa esiintyvistä rasvoista koostuu neutraaleista triasyyliglyseroleista, joka on myös yleisimmin rasvoissa esiintyvä lipidiluokka. Mono- ja diasyyliglyseroleja muodostuu usein ruuansulatuksessa, esimerkiksi lipolyysi-reaktion vaikutuksesta [8, s. 154.]



Kuva 1. Fisherin projektio asyyliglyserolista ja tämän positiot.

Fisherin projektiossa glyserolin sekundäärinen, *sn-2*-position hydroksyyliiryhmä, kuvataan keskimmäisen prokiraalisen hiilen vasemmalle puolelle. Prokiraalisesta hiilestä tulee kiraalinen, kun *sn-1*- ja *sn-3*-positioiden hydroksyyliiryhmään on esteröityneenä eri rasvahapot [6, s. 16]. Rasvahappojen sitoutuminen glyseridirunkoon ei ole kuitenkaan täysin sattumanvaraista. Esimerkiksi *sn-3*-positioon esteröityvät pääosin lyhytketjuiset rasvahapot. Rasvahappojen stereospesifinen positio triasyyliglyserolissa vaikuttaa siihen, mitkä rasvahapot vapautuvat lipolyysireaktiossa ruuansulatuksen aikana [9, s.77.]

2.3 Äidinmaidon ja lehmänmaidon rasvakoostumuksen vertailu

Äidinmaito, kuten myös lehmänmaito, sisältää 3–5 % rasvaa, joka esiintyy maidossa halkaisijaltaan 2–4 µm:n kokoisina rasvapalloina [10, s. 223; 1, s. 38; 4, s. 1]. Kummankin maidon lipideistä ~98 % esiintyy triasyyliglyseroleina, joista valtaosa sijaitsee rasvapallojen sisällä [10, s. 224]. Muita maidon lipidejä ovat fosfolipidit (0,5–1 %) ja sterolit (2–5 %), joista suurin osa sijaitsee rasvapallojen membraaneissa [10, s. 223].

Merkittävä osuus äidinmaidon rasvahapoista (98 %), on pitkäketjuisia, eli yli 14 hiilivedyn pituisia rasvahappoketjuja. Näistä 40 % on tyydyttyneitä rasvahappoja, joista noin puolet on palmitiinihappoa C16:0 [1, s. 38]. Tämän osuus äidinmaidon kokonaisrasvahappokoostumuksesta on 20–25 % [4, s. 1]. Palmitiinihapon positionaalisella jakautumisella triasyyliglyserolissa on kuitenkin suuri merkitys tämän imeytymisen kannalta ohutsuolessa. Äidinmaidon palmitiinihappopitoisuudesta ~70 % sijaitseekin triasyyliglyserolin *sn-2* positiossa. Tyydyttymättömät rasvahapot, kuten oleiinihappo 18:1 (30 %) ja linolihappo 18:2 (13 %), sijaitsevat puolestaan ensisijaisesti triasyyliglyserolin *sn-1,3*-positioissa [4, s. 1, 2, s. 276.] Tällaiset triasyyliglyserolit, kuten OPO ja OPL, ovat useimmin esiintyviä triasyyliglyseroleja äidinmaidossa [5, s. 31].

Lehmänmaito sisältää noin 400 eri rasvahappoa, ja se on lukumääräisesti ~2 kertaa enemmän kuin äidinmaidossa [10, s. 228]. Lehmänmaito sisältää myös merkittävän osuuden lyhytketjuisia, 4 hiilen pituisia rasvahappoja, joita useimmissa tutkimuksissa ei ole havaittu esiintyvän lainkaan äidinmaidossa. Nämä sekä muut lyhytketjuiset rasvahapot ovat yleisimmin esteröityneenä triasyyliglyserolien *sn-3*-positioon [10, s. 223; 1, s. 38.] Kuten äidinmaidossa, myös lehmänmaidossa yleisimmin esiintyvä tyydyttynyt rasvahappo on palmitiinihappo C16:0. Tämän osuus verrattuna kokonaisrasvahappokoostumukseen on 25–30 % [1, s. 39.] Lehmänmaidossa palmitiinihappo on useimmiten sitoutuneena triasyyliglyserolin *sn-1,2*-positioihin. Suuri osa palmitiinihaposta (45 %) sijaitsee myös triasyyliglyserolin *sn-2*-positiossa. Tämä osuus on kuitenkin alhaisempi, verrattuna äidinmaidon *sn-2*-palmitiinihapon osuuteen. Loput lehmänmaidon kokonaispalmitiinihaposta sijaitsee *sn-1*-positiossa osuudella 47 % sekä *sn-3*-positiossa osuudella 7,5 % [2, s. 277.] Toiseksi yleisimmin esiintyvä rasvahappo on tyydyttymätön oleiinihappo C18:1, jota esiintyy noin 20 - 25 % lehmänmaidon kokonaisrasvahappokoostumuksesta. Kuten äidinmaidossa, myös lehmänmaidossa valtaosa oleiinihaposta on

esteröityneenä triasyyliglyserolin *sn*-1,3-positiioihin [11, s. 2; 2, s. 276.] Yksi suurimmista eroista äidinmaidon rasvahappokoostumuksessa, verrattuna lehmänmaidon rasvahappokoostumukseen, on äidinmaidon sisältämät monitydyttymättömät rasvahapot. Esimerkiksi monitydyttymättömän linolihapon C18:2-osuus lehmänmaidossa on vain ~2 %, kun taas äidinmaidossa tämän osuus voi olla jopa 15 % [1, s. 39.]

2.4 OPO-triasyyliglyserolit ja kasvirasvat äidinmaitokorvikkeissa

Kuten useimmat ruokavaliossa esiintyvät rasvat, myös suurin osa kasvirasvojen lipideistä koostuu triasyyliglyseroleista. Kuitenkin niiden variaatio rasvahappojen määrän suhteen on huomattavasti pienempi verrattuna maidossa esiintyviin rasvahappoihin. Kookosrasvaa lukuun ottamatta kasvirasvat eivät sisällä lainkaan 4–12 hiilen pituisia rasvahappoketjuja. Toisin kuin maidon rasvassa kasvirasvoissa ei myöskään esiinny lainkaan parittoman luvun omaavia hiilivetyketjuja. Tästä huolimatta kasvirasvoja sekoittamalla voidaan päästä erittäin lähelle äidinmaidon luontaista rasvahappokoostumusta [1, s. 38.]

Palmitiinihapon lähteenä kasvirasvasekoituksissa toimii palmuöljy. Ilman palmuöljyn lisäystä kasvirasvasekoitukset sisältäisivät vain ~8 % palmitiinihappoa sekä huomattavasti suuremman määrän tyydyttymätöntä oleiini- ja linolihappoa. Suurin ero perinteisissä kasvirasvasekoitusta sisältävissä korvikkeissa on kuitenkin palmitiinihapon positiionaalinen jakautuminen triasyyliglyserolissa. Kasvirasvasekoituksissa palmitiinihappo on järjestäytynyt triasyyliglyserolin *sn*-1,3-positiioihin, joten sen suhde *sn*-2-positiiossa on vain 10–20 % palmitiinihapon kokonaismäärästä [1, s. 39–40.]

Useimmissa tutkimuksissa viime aikoina on oltu kiinnostuneita kasvirasvasekoitteista vaihtoesteröimällä valmistetuista triasyyliglyseroleista. Nämä äidinmaitokorvikkeissa käytetyt synteettiset rasvat ovat *sn*-2-palmitiini triasyyliglyseroleja, joiden *sn*-1,3-positiioihin on useimmiten esteröityneenä tyydyttymätön oleiinihappo (OPO). Nykyisillä menetelmillä kasvirasvasekoitteiden *sn*-2-palmitiinihappo-osuutta voidaan kasvattaa jopa 50 prosenttiin asti. Tällä tavoin korvikkeissa käytettyjen kasvirasvasekoitteiden triasyyliglyserolikoostumus saadaan lähemmäs äidinmaidon rasvan luontaista triasyyliglyserolikoostumusta [1, s. 40.]

Vaihtoesteröimällä valmistetut rasvat, kuten OPO-rasvat, valmistetaan kasvirasvasekoitteista joko entsyymaattisilla tai kemiallisilla vaihtoesteröinneillä. Useimmat suosivat kuitenkin entsyymaattista vaihtoesteröintiä, joka vaatii alhaisemman lämpötilan reaktion aikaansaamiseksi. Alhaisempi reaktiolämpötila vähentää vaihtoesteröinnin aikana tapahtuvia ei-toivottuja reaktioita, kuten rasvahappojen satunnaista asyylimigraatiota triasyyliglyseroli positioiden välillä, sekä trans-rasvahappojen muodostumista. Kemiallisen vaihtoesteröinnin etuna on reagenssien halpa hinta ja tämän nopea reaktioaika entsyymaattiseen menetelmään verrattuna. Yleisimmin reaktiossa käytetään natriummetoksidiä ja natriumalkylaatti-katalyyttiä. Reaktiossa käytettävä natriummetoksidi inaktivoituu kuitenkin herkästi veden läsnä ollessa, muodostaen natriumhydroksidia ja metanolia [4, s. 1157.]

2.5 Rasva-aineenvaihdunta

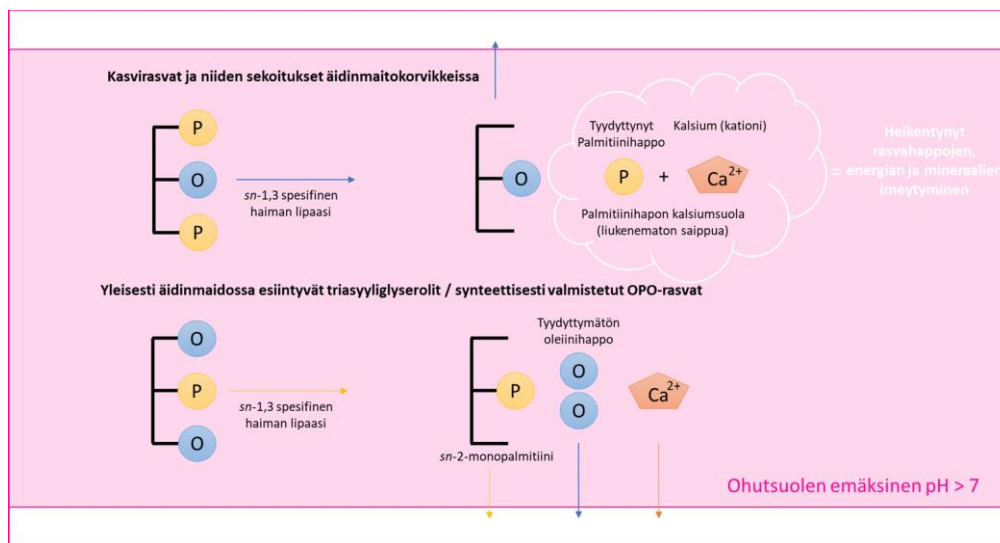
Rasva-aineenvaihdunnalla on tärkeä rooli energian säätelyssä ja vapautumisessa. Ylimääräinen ravinnosta saatu energia varastoituu elimistössä triasyyliglyseroleina, joiden täydellisen hapettumisen energiasaanto on lähes kaksinkertainen verrattuna hiilihydraatteihin ja proteiineihin. Tämä johtuu siitä, että rasvahapot ovat hyvin pelkistettyjä ja vedettömästi pakattuja energianlähteitä, toisin kuin hiilihydraatit ja proteiinit, jotka ovat huomattavasti polaarisempia, minkä vuoksi ne ovat liukoisempia veteen [7, s. 603.]

Koska triasyyliglyserolit ovat poolittomia veteen liukenemattomia yhdisteitä, ruuansulatuksessa ne on pilkottava lipaasien avulla helpommin sulavaan muotoon vapaiksi rasvahapoiksi sekä 2-monoasyyliglyseroleiksi. Suoliston sappisuolat edistävät reaktiota muodostamalla rasvapalloista ja triasyyliglyseroleista pienempiä pisaroita, jonka seurauksena rajapinnan pinta-ala kasvaa. Sappisuolan amfifiilisen ominaisuuden seurauksena triasyyliglyserolin primääriset *sn*-1,3-esterisidokset kohdistuvat rasvapisaroiden rajapinnalle. Tällöin triasyyliglyserolit ovat helpommin saatavilla lipaaseille, jotka ovat vesiliukoisia ja toimivat faasien rajapinnalla [7, s. 603–604.] Hydrolyysin seurauksena *sn*-1,3-positioiden rasvahapot pilkkoutuvat vapaiksi rasvahapoiksi ja 2-monoasyyliglyseroleiksi, minkä ansiosta ne imeytyvät tehokkaasti ohutsuolesta. Imeytyneet vapaat rasvahapot sekä monoasyyliglyserolit järjestäytyvät uudelleen triasyyliglyseroleiksi ohutsuolen limakalvon soluissa. Tämän jälkeen triasyyliglyserolit pakkautuvat kylomikroneiksi, jotka kuljettavat triasyyliglyserolit imukudoksen kautta verenkiertoon. Verenkierron mukana

triasyyliglyserolit kulkeutuvat rasva- ja lihaskudoksiin, jossa ne hajoavat edelleen lipoproteiinilipaasin vaikutuksesta vapaiksi rasvahapoiksi sekä 2-MAG:ksi. Näin rasvahapot pääsevät kulkeutumaan solujen sisälle, jossa ne edelleen järjestäytyvät triasyyliglyseroleiksi. Täten *sn*-2-position rasvahappo säilyttää positionsa koko imeytymisprosessin ajan [7, s. 604; 12, s. 754.]

2.6 Triasyyliglyserolin positiojakauman merkitys imeväisten ruuansulatuksessa

Äidinmaidon rasva tarjoaa jopa yli 50 % imeväisen energiasta, minkä lisäksi se on myös muiden tärkeiden ravintoaineiden lähde imeväisille [2, s. 276; 3, s. 1; 4, s. 1]. Äidinmaidon rasvan sisältämä palmitiinihappo tarjoaa itsessään 10–12 % imeväisen kokonaisenergian saannista [2, s. 276; 1, s. 39]. Palmitiinihapon positiojakaumalla triasyyliglyserolissa on kuitenkin vaikutus sen imeytymisen kannalta ohutsuolessa. Alla näkyvässä kuvassa 2 on esitettyä kasvirasvoista sekä äidinmaidosta peräisin olevan triasyyliglyserolin pilkkoutuminen haiman lipaasilla sekä rasvahappojen imeytyminen ohutsuolessa.



Kuva 2. Palmitiinihapon position merkitys imeväisikäisten ruuansulatuksen kannalta [5, s. 34].

Erityisesti keskipitkät tyydyttyneet rasvahapot sekä palmitiinihappo ovat nopeasti ja helposti saatavilla olevia energianlähteitä imeväisille triasyyliglyserolin *sn*-2-positiossa. Puolestaan jos palmitiinihappo sijaitsee triasyyliglyserolin *sn*-1- tai *sn*-3-positioissa, se irtoaa lipolyysissä triasyyliglyserolista vapaina rasvahappoina. Ohutsuolen emäksisessä ympäristössä vapaat tyydyttyneet rasvahapot reagoivat herkästi kationien kanssa muodostaen liukenemattomia saippuuita. Tämän seurauksena tärkeät mineraalit esimerkiksi kalsium ja magnesium eivät pääse imeytymään ohutsuolessa [5, s. 34–35.]

3 Työssä käytettävien analyysimenetelmien teoria

Rasvahappojen positionaalisen jakauman määrittäminen triasyyliglyseroleista voi olla haastavaa, sillä glyserolin ja rasvahappojen välisten esterisidosten kemiallinen reaktiivisuus ei poikkea juurikaan positioiden välillä. Kuitenkin joillain yksinkertaisilla entsymaattisilla hydrolyyseillä voidaan määrittää esimerkiksi tietyssä positiossa sijaitsevia rasvahappoja. Elävät organismit pystyvät tuottamaan tällaisia entsyymejä, jotka kykenevät spesifisesti tunnistamaan ja näin ollen hydrolysoimaan tietyissä positioissa sijaitsevat rasvahapot tai tietyn spesifisen sidoksen omaavat spesifiset lipidit. Myös joitakin massaspektroskopian (MS) ja ydinmagneettisen resonanssin (NMR) positionaalisia määrittämenetelmiä on pystytty kehittämään [13, s. 261.]

3.1 Hydrolyysi haiman lipaasilla

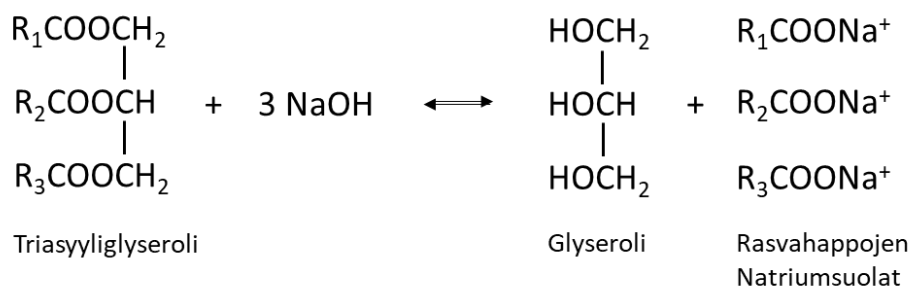
Kuten useimmat lipaasit, myös haiman lipaasi hydrolysoi spesifisesti triasyyliglyserolin *sn*-1,3-position rasvahappojen primääriset esterisidokset. Haiman lipaasilla suoritettu määrittäminen on ainoastaan *sn*-2-regiospesifinen, eikä tämä kykene erottamaan selektiivisesti *sn*-1- ja *sn*-3-positioiden rasvahappoja toisistaan, vaan hydrolyysin uskotaan olevan täysin sattumanvaraista näiden kahden esterisidoksen välillä. Tyydyttyneet suora- ketjuiset rasvahapot hydrolysoituvat lähes samalla nopeudella triasyyliglyserolin *sn*-1- ja *sn*-3-positioista rasvahappoketjujen pituudesta riippumatta. Esimerkiksi sekä lyhyitä että pitkiä rasvahappoketjuja *sn*-1- ja -3-positioissa sisältävät triasyyliglyserolit hydrolysoituvat samalla nopeudella kummastakin positioista. Ne hydrolysoituvat kuitenkin nopeammin verrattuna triasyyliglyseroleihin, jotka sisältävät ainoastaan pitkäketjuisia rasvahappoja [13, s. 262.]

3.2 Ohutlevykromatografia

Ohutlevykromatografia (Thin Layer Chromatography, TLC) perustuu pääosin yhdisteiden erilaisiin polaarisiin. Lipidiluokkien erotteluun käytetyssä ohutlevykromatografiassa yleisimmin stationäärifaasina toimii silikageelillä päällystetty lasilevy. Silikan adsorptiiviset ominaisuudet perustuvat geelin pinnalla oleviin silanoliryhmiin (R_3SiOH), jotka ovat erittäin polaarisia veteen liukenevia yhdisteitä. Liikkuvana faasina toimii ajokammion pohjalle kaadettava liuotin, joka kulkee silikalla kapillaari-ilmiön vaikutuksesta. Polaarisia funktionaalisia ryhmiä, kuten fosfaatti-, hydroksyyli- ja amiiniryhmiä sekä esterisidoksia sisältävät lipidiluokat, pysähtelevät useammin polaarisisessa stationäärifaasissa näiden lukumäärästä ja luonteesta riippuen. Tästä syystä erilaisia funktionaalisia ryhmiä sisältävät lipidit kulkevat silikageelillä eri nopeuksilla, minkä ansiosta lipidiluokat voidaan erotella toisistaan [13, s. 24.]

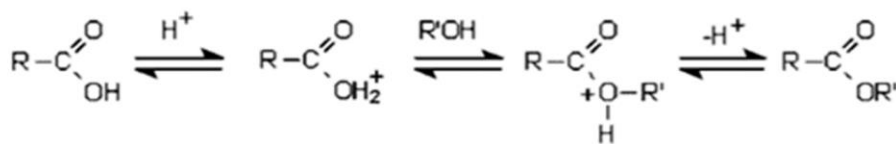
3.3 Suorasaippuointi ja metylointi

Työssä käytettiin metylointimenetelmää, jonka ensimmäinen askel oli suorittaa triasyyliglyserolin kemiallinen hydrolyysi emäksisellä katalyytillä metanolin läsnä ollessa. Tästä reaktiosta käytetään myös nimitystä saippuointi. Reaktiossa Na^+ -ionit reagoivat rasvahappojen kanssa muodostaen rasvahappojen natriumsuoloja eli saippuaa, OH-ryhmät puolestaan muodostavat glyserolia asyyliglyserolista irtoavan glyseroliketjun kanssa (kuva 3) [14.]



Kuva 3. Saippuointireaktio.

Saippuoinnissa vapautuneille rasvahapoille suoritettiin happokatalysoitu metylointi eli rasvahappojen esteröinti näiden metyyliestereiksi. Reaktiossa happokatalyytti (HCl) luovuttaa protonin (H^+) karboksyylihapolle, jolloin muodostuu dikarboksyylihapoa. Reaktiossa käytetty metanoli reagoi dikarboksyylihapon kanssa muodostaen rasvahappojen metyyliestereitä ja vettä (kuva 4). Reaktiossa muodostuneet rasvahapon esterit ovat haihtuvia yhdisteitä, minkä ansiosta nämä voidaan mitata kaasukromatografisella menetelmällä [15, s.1075].



Kuva 4. Vapaiden rasvahappojen metylointi [15, s. 1075].

4 Työn suoritus ja laskut

4.1 Rasvan uutto kermasta

Ennen triasyyliglyserolien hydrolyysiä haiman lipaasilla suoritettiin lipidien uutto 40-rasvaprosenttisesta kermasta. Kerma punnittiin analyysiväällä kimax-koeputkiin ja näytteiden tarkat punnitustulokset sekä tyhjien putkien painot kirjattiin ylös laboratoriovihkoon. Lopulliseksi näytemääräksi valikoitui 25 mg 40-prosenttista kermaa rasvan suhteen, jotta uuttosaannoksi saatiin arvioidusti 10 mg puhdasta rasvaa. Näytteet täydennettiin 1 ml:ksi 0,9-prosenttisellä NaCl-liuoksella ja vorteksoitiin homogeeniseksi. Putkiin lisättiin 4 ml dikloorimetaani-metanolia (1:2), minkä jälkeen näytteet tyytettiin. Näytteisiin muodostunut emulsio hajotettiin vorteksoimalla ja inkuboitiin ravistelijassa (300 rpm) 30 minuutin ajan. Tämän jälkeen näytteitä sentrifugoitiin 3 000 rpm (1 500 g) kierrosnopeudella 5 minuutin ajan, jotta näytteisiin muodostui selkeä faasiraja vesifaasin ja orgaanisenfaasin välille. Alempi orgaaninen faasi siirrettiin uusiin punnittuihin kimax-koeputkiin lasisen pasteuripipetin avulla ja haihdutettiin typpihaihduttimessa 30 °C:n lämpötilassa 30 minuutin ajan. Ylempää vesifaasia uutettiin vielä edellä mainitulla tavalla 2 ml:lla dikloorimetaania. Lopuksi uutteen yhdistettiin ja haihdutettiin typpihaihduttimessa,

kunnes orgaaninen liuotin oli haihtunut jäljellä olevasta rasvasta. Tässä vaiheessa rasvanäytteet voitiin typettää ja pakastaa. Kerman rasvapitoisuudet massaprosentteina laskettiin alla näkyvällä kaavalla 1.

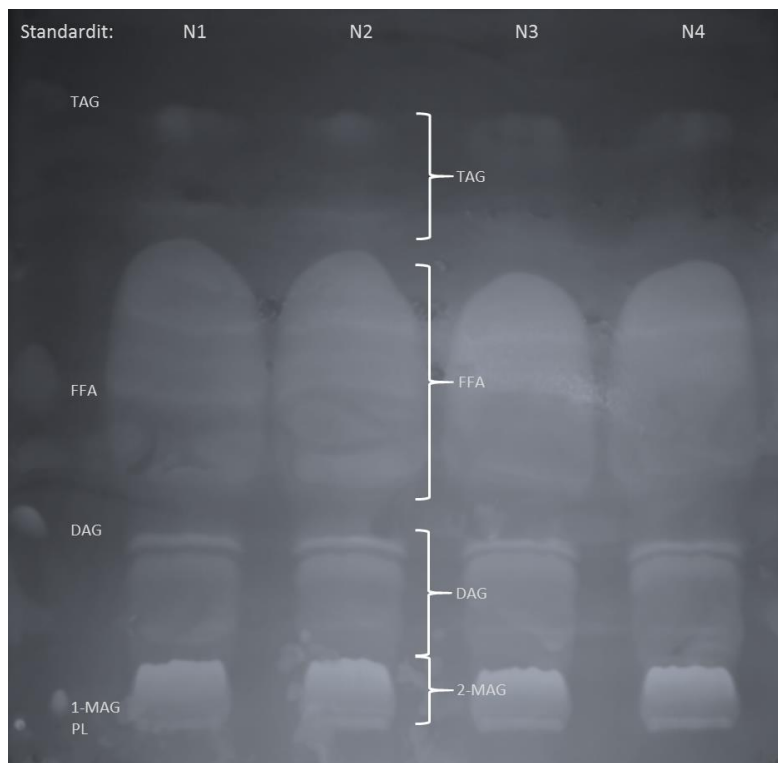
$$\frac{\text{Uuttosaannos (mg)}}{\text{Kermanäytteen massa (mg)}} * 100 \quad (1)$$

4.2 Uutetun rasvan hydrolyysi haiman lipaasilla

Hydrolyysi suoritettiin kohdassa 4.1 uutetuilla puhtailla rasvanäytteillä. Yhtä reaktiota varten suspensoitiin 20 mg haiman lipaasia 2 ml:aan 1 M:sta Tris-HCl-puskuria (pH 8). Tarvittava määrä puskuri-lipaasi-liuosta valmistettiin juuri ennen reaktion aloittamista. Näytteet sekä puskuri-lipaasi-liuos stabiloitiin vesihauteessa 37 °C:seen ennen hydrolyysireaktion käynnistämistä. Rasvanäytettä sisältäviin kimax-koeputkiin pipetoitiin 2 ml lipaasia puskurissa sekä 0,2 ml 4,4 prosenttista CaCl₂-liuosta. Hydrolyysi käynnistettiin pipetoimalla näytteisiin 0,5 ml natriumkoolaattiliuosta (sappisuolaliuos) (1 g/l), minkä jälkeen näytteitä sekoitettiin magneettisekoittimen päällä 1 200 rpm:n kierrosnopeudella 37 °C:ssa vesihauteessa. Hydrolyysireaktio lopetettiin tasan kahden minuutin jälkeen pipetoimalla näytteisiin 1 ml 6 M:sta vahvaa suolahappoa, jonka jälkeen näytteet sekoitettiin vorteksoimalla. Hydrolysoitu rasva uutettiin edelleen näytteistä pipetoimalla 2 ml dietyylieetteriä, tässä vaiheessa lisättiin myös 20 µl lipidiluokkia sisältävää standardiliuossekoitusta sekä 20 µl 1-MAG-standardiliuosta. Näytteet typetettiin, vorteksoitiin 10 sekunnin ajan sekä inkuboitiin 5 minuutin ajan koeputkiravistelijassa 300 rpm:n kierrosnopeudella. Tämän jälkeen näytteitä fuugattiin 3 000 rpm 5 minuutin ajan, jotta ylempi orgaaninen faasi saatiin siirrettyä uusiin kimax-koeputkiin lasisilla pasteur-pipeteillä. Alempaa vesifaasia uutettiin edelleen 2 ml:lla dietyylieetteriä edellä mainitulla protokollalla. Lopuksi utteet yhdistettiin ja haihdutettiin typpihaihduttimessa, kunnes orgaaninen liuotin oli haihtunut jäljellä olevasta rasvasta. Tässä vaiheessa rasvanäytteet voitiin typettää ja pakastaa.

4.3 Hydrolysoitujen rasvanäytteiden lipidiluokkien erottelu ohutlevykromatografisesti

Asetettiin petroolieetteri-dietyylieetteri-jäätikkahappo-ajoliuos (80:30:1) ajokammioon kehittymään näytteiden valmistuksen ajaksi. Hydrolysoidut rasvanäytteet liotettiin 200 µl:aan dikloorimetaani-metanoli-liuosta (1:100) ja applikoitiin silikalla päällystetylle lasiselle ohutlevylle (Merck TLC silicagel 60, 20 cm x 20 cm). Tämän jälkeen ohutlevyä ajettiin ajokammiossa 1 tunnin ajan, kunnes liotinraja oli liikkunut lasilevyn yläreunaan asti. Annettiin liuottimen haihtua ohutlevyltä ja värjättiin rasvatäplät rhodamiini 6G:n vesiliuksella (0,001 %), jonka jälkeen lipidiluokat voitiin visualisoida suoraan sekä UV-valon avulla. Alla olevassa kuvassa 5 voidaan nähdä lipidiluokkien erottuminen ohutlevyllä. Ohutlevyllä erotetut lipidiluokat raaputettiin spaattelilla omiin puhtaisiin Kimax-koeputkiin ja tyytettiin. Tämän jälkeen näytteet voitiin halutessa pakastaa metylointia varten.



Kuva 5. TLC-levyllä erottuneet lipidiluokat hydrolysoituneista maitorasvanäytteistä, jossa 2-MAG= reaktiossa vapautuneet *sn*-2-position rasvahapon sisältävät monoasyyloglyserolit, DAG= reaktiossa epätäydellisesti hydrolysoituneet 1,2- ja 2,3-diasyyloglyserolit, FFA= reaktiossa vapautuneet 1,3-positioiden vapaat rasvahapot, TAG= reagoimatta jääneet triasyyloglyserolit.

4.4 Lipidiluokkien metylointi

Lipidiluokille suorasäilyintireaktio suoritettiin lisäämällä näytteisiin 1 ml 3,7 mol/l NaOH:ta 49-prosenttisessa metanolissa, tyytettiin ja inkuboitiin 30 minuutin ajan kiehu- vassa vedessä. Inkuboinnin aikana näyteputkia sekoitettiin vorteksoimalla 5 minuutin jäl- keen keittämisestä, jotta pohjalle pakkautunut silika saatiin sekoittumaan paremmin näytteeseen. Rasvahappojen metyyliesterit valmistettiin lisäämällä jäähtyneisiin näyttei- siin 4 ml 3,3 mol/l HCl 48-prosenttisessa metanolissa, tyyttämällä ja inkuboimalla näyt- teitä 30 minuutin ajan 80 °C:ssa vesihauteessa. Metyyliesterit saatiin uutettua jäähty- neistä näytteistä lisäämällä 1 ml heksaani-metyylitertbutyylietteriä (1:1) ja ravistele- malla näytteitä koeputkiravistelijassa 10 minuutin ajan 300 rpm:n kierrosnopeudella, jonka jälkeen faasien annettiin erottua huoneen lämmössä. Tämän jälkeen alempi vesi- faasi pipetoitiin näytteistä muovisella pasteur-pipetillä. Metyyliesterit sisältävää orgaa- nista faasia pestiin 1-prosenttisellä NaOH-vesiliuoksella ravistelemalla näytteitä koepu- tiravistelijassa 5 minuutin ajan 300 rpm:n kierrosnopeudella. Näytteitä sentrifugoitii- n vielä 20 minuutin ajan 3 000 rpm:n kierrosnopeudella, jonka jälkeen ylempi orgaaninen faasi kuivattiin vedettömällä natriumsulfaatilla ja siirrettiin kaasukromatografivialeihin.

4.5 Kaasukromatografinen mittaus (GC-FID) ja rasvahappokoostumuksen laskeminen

Laitteisto:

Agilent 7890A GC-system; kolonni: Zebron ZB-FAME (60 m x 259 µm x 0,2 µm); uunin lämpötilaohjelma: 70 °C 4 min, 70–110 °C (8 C/min), 110–190 °C (3 C/min), pito 190 °C 5 min, 190–280 °C (6 C/min), pito 280 °C 3 min; H₂ virtaus (FID) detektoriin 30 ml/min, ilma 350 ml/min ja N₂ 35 ml/min. Splitsuhde 20:1.

Lipidiluokkien kokonaisrasvahappokoostumukset mitattiin yllä näkyvällä laitteistolla ja ajoparametreilla. Rasvahappopiikit tunnistettiin käyttämällä valmista ajo- ja integrointioh- jelmaa, jonka lisäksi näytteistä saatu kromatogrammi käytiin läpi manuaalisesti integroin- tivirheiden varalta. Rasvahapoille laskettiin niiden pitoisuudet mg/g:ssa puhdasta maito- rasvaa, kromatogrammista saatujen piikkien pinta-alojen avulla. Rasvahappojen

pitoisuudet (mg/g) laskettiin verrannon avulla, sisäisen standardin menetelmää käyttäen (kaava 2).

$$\frac{FA_A * S_v * S_c}{S_A * N_m} \quad (2)$$

Kaavassa:

- FA_A = rasvahapon pinta-ala
- S_v = pipetoitu määrä standardia (ml)
- S_c = standardin konsentraatio (mg/g)
- S_A = standardipiikin pinta-ala.
- N_m = Rasvanäytteen massa (g)

Tämän jälkeen rasvahappojen massaprosentti osuudet lipidiluokissa, laskettiin alla olevalla kaavalla 3:

$$\frac{\text{Rasvahapon massa } \left(\frac{mg}{g}\right)}{\text{Rasvahappojen yhteenlaskettu massa } \left(\frac{mg}{g}\right)} * 100 \% \quad (3)$$

Rasvahappojen massaprosentti muunnettiin mooleiksi, jakamalla rasvahapon massaprosentti (g/100 g) rasvahapon moolimassalla (kaava 4). Rasvahappojen tarkat moolimassat ovat esitettyinä liitteessä 1. Kun rasvahappojen molaarisuudet oli saatu selville, niiden mooliprosentti laskettiin seuraavasti (kaava 5):

$$\frac{\frac{\text{Rasvahapon } m\text{-\% osuus lipidiluokassa}}{\text{Rasvahapon moolimassa } \left(\frac{g}{mol}\right)}}{100 g} \quad (4)$$

$$\frac{\text{Rasvahapon ainemäärä } (mol)}{\text{Rasvahappojen yhteenlaskettu ainemäärä } (mol)} * 100 \% \quad (5)$$

4.6 *sn*-2-position rasvahappojen suhteelliset osuudet rasvahapon kokonaismäärästä

Koska hydrolyysi ei ollut täydellinen, haluttiin rasvahappojen massat lipidiluokissa suhteuttaa rasvahapon yhteenlaskettuun massaan näytteessä. Rasvahappojen suhteelliset osuudet lipidiluokissa laskettiin alla olevalla kaavalla 6:

$$\frac{\text{Rasvahapon massa lipidiluokassa } \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}}\right)}{\text{Rasvahapon yhteenlaskettu massa näytteessä } \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}}\right)} * 100 \% \quad (6)$$

Tuloksena saatujen osuuksien avulla näytteistä voitiin laskea yksittäisen rasvahapon osuudet *sn*-2-positiossa suhteessa rasvahapon kokonaismäärään triasyyliglyserolissa. Tässä tapauksessa oletettiin, että hydrolyysissä vapautuneet rasvahapot (FFA) edustivat triasyyliglyserolin *sn*-1,3-positioita ja 2-monoasyyliglyserolit *sn*-2 position rasvahappoja. Palmitiinihapon suhteelliset osuudet *sn*-2 positiossa suhteessa rasvahapon kokonaismassaan laskettiin alla olevalla kaavalla 7:

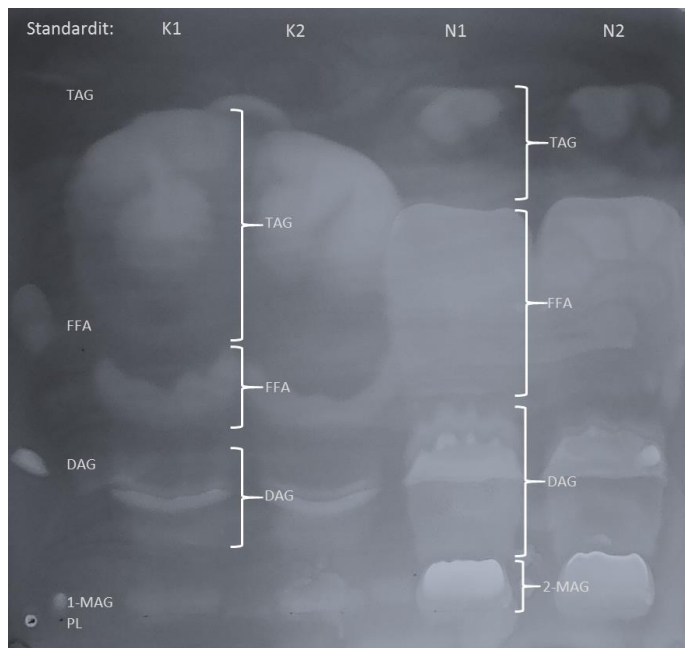
$$\frac{\text{sn-2 rasvahappo (MAG)}}{\text{sn-1,3 rasvahappo (FFA)+sn-2 rasvahappo (MAG)}} * 100 \% \quad (7)$$

5 Menetelmän kehitys

5.1 Rasvanäyttemäärän valinta

Näyttemäärä valittiin kirjallisuudessa aikaisemmin esiintyneiden näyttemäärien perusteella. Artikkeleissa [16, 17] ja AOCS Ch 3–91 -standardissa käytettyjä näyttemääriä vertailtiin toisiinsa ja tämän perusteella arvioitiin omaan menetelmään parhaiten soveltuva näyttemäärä rasvan hydrolyysiä varten. Näyttemäärän valintaan vaikutti TLC:n erottelukyky lipidiluokkien suhteen sekä rasvan adsorptio TLC-levylle. Alustavaksi näyttemääräksi valittiin 50 µg kermaa, jotta uuttoaannoksi saataisiin 20 mg puhdasta rasvaa. Tämän näyttemäärän uskottiin myös olevan suurin mahdollinen määrä rasvaa, mikä saataisiin adsorboitua silikalle ja eroteltua TLC-levyllä. Alla olevassa kuvassa 6 nähdään lipidiluokkien erottelu TLC-levyllä valitulla näyttemäärällä (20 mg). Vaikka lipidiluokat olivat

erottuneet oletetulla tavalla, huomattiin näytteiden ajautuneen lomittain. Tämä hankaloitti lipidiluokkien raaputtamista TLC-levyltä, sekä aiheutti mahdollisesti virhettä tuloksissa.



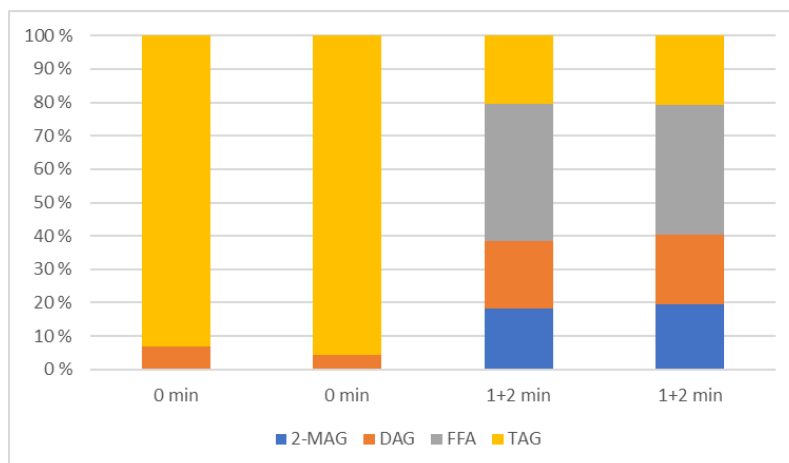
Kuva 6. TLC-levyllä standardin Ch 3–91 mukaisesti valmistetut hydrolyysit oikealla, sekä saman rasvanäytteen hydrolysoimattomat kontrollinäytteet vasemmalla. Kuvassa 2-MAG= sn-2-monoasyyli glyseroli DAG= diasyyli glyseroli FFA= vapaat rasvahapot TAG= triasyyli glyseroli.

Seuraavaa hydrolyysikoetta varten näytemäärä pidettiin samana, mutta TLC-levylle applikoitiin ainoastaan 3 näytettä 4 näytteen sijaan. Tällä tavoin lipidiluokat saatiin eroteltua TLC-levyllä ilman näytteiden päällekkäisyyttä. Ongelmaksi muodostui kuitenkin silikan suuri määrä erotelluissa lipidiluokissa, mikä aiheutti haasteita näytteiden metyloinnissa sekä virhettä lipidiluokkien rasvahappokoostumuksissa. Esimerkiksi palmitiinihapon pitoisuuden *sn*-2-positiossa suhteessa sen kokonaispitoisuuteen triasyyli glyserolissa havaittiin olevan huomattavasti pienempi (15 %), kuin ensimmäisessä koesarjassa (35 %). Tästä syystä näytemäärä laskettiin 10 mg:aan. Tämän näytemäärän havaittiin erottuvan selkeästi TLC-levyllä ja antavan parempia tuloksia näytteistä. Esimerkki TLC-ajosta lopullisella näytemäärällä voidaan nähdä kuvassa 5 luvussa 4.3. Lipidiluokkien paremman erottuvuuden ja luotettavimpien rasvahappokoostumusten lisäksi pienemmän näytemäärän ansiosta yhdellä TLC-levyllä pystyttiin erottelemaan useampi näyte kerrallaan.

5.2 Hydrolyysireaktion optimointi

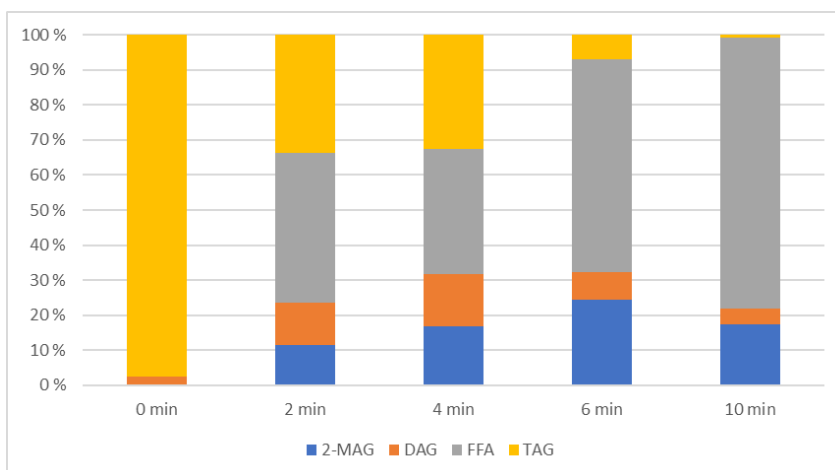
Hydrolyysireaktion optimoimiseksi suoritettiin koesarjoja, joiden avulla pyrittiin löytämään optimaaliset olosuhteet hydrolyysireaktion suorittamiseksi. Hydrolyysireaktiossa tutkittiin sekoituksen ja reaktioajan vaikutusta rasvan hydrolyysiasteeseen, jota arvioitiin hydrolysoitujen näytteiden lipidiluokkien suhteellisten osuuksien avulla.

Hydrolyysikokeet aloitettiin suorittamalla testikoe, joka noudatti pitkälti AOCS Ch 3–91 -standardin protokollaa. Hydrolyysireaktion reagenssien konsentraatiot suhteutettiin menetelmään valitulle näytemäärälle sopivaksi, vertailemalla standardissa käytettyjä konsentraatioita aiemmin kirjallisuudessa esiintyviin näytemääriin ja reaktioissa käytettyihin konsentraatioihin [16, 17]. Testikokeessa näytemääräksi valikoitui 20 mg uutettua rasvaa, jonka hydrolyysi suoritettiin AOCS Ch 3–91 -standardin mukaisesti, inkuboimalla reaktioputkia samanaikaisesti käsin ravistaen 1 minuutin ajan 40 °C:ssa vesihauteessa. Tämän jälkeen putket siirrettiin 2 minuutin ajaksi koeputkiravistelijaan. Alla olevassa kuvassa 7 nähdään standardin mukaisilla hydrolyysiajoilla saavutetut hydrolyysiasteet. Aiemmin esiintyvässä kuvassa 6 nähdään kyseisen koesarjan lipidiluokkien erottuminen TLC-levyllä.



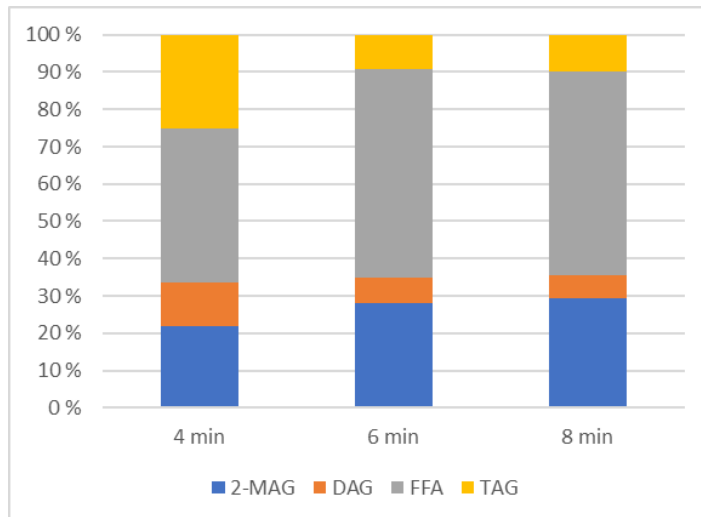
Kuva 7. AOCS Ch 3–91 -standardin mukaisesti suoritettu rasvan hydrolyysi (oikealla) ja hydrolysoimattoman rasvan lipidiluokkien jakautuminen (vasemmalla).

Hydrolyysin tulosten perusteella havaittiin, että 20 prosenttia rasvan triasyyliglyseroleista ei reagoanut, sekä toiset 20 prosenttia hydrolysoituivat vain osittain muodostaen diasyyli glyseroleja. Koesarjasta saatujen tulosten perusteella haluttiin tutkia reaktioajan vaikutusta hydrolyysiasteeseen, valitsemalla koesarjaan 2 muutamia eri hydrolyysi-aikoja 2–10 minuutin välillä. Kyseisessä koesarjassa ravistelu tapahtui käsin 37 °C:ssa vesihauteessa, jotta lämpötila pysyisi mahdollisimman stabiilina koko reaktion ajan. Alla olevassa kuvassa 8 voidaan nähdä reaktioajan vaikutus triasyyliglyserolin hydrolyysiasteeseen. Tulosten perusteella voidaan todeta standardin mukaisen reaktioajan olleen mahdollisesti liian lyhyt. Erityisesti 4 ja 6 minuutin näytteiden välillä voidaan havaita selkeä nousu hydrolyysiasteiden välillä. Asyylimigraation vaikutusta näytteissä on todellisuudessa vaikeaa perustella saatujen tulosten avulla. Tämä voitaisiin kuitenkin havaita näytteessä 2-monoasyyli glyseridiosuuden pienenemisenä, jota voidaan nähdä 6 ja 10 minuutin näytteiden välillä.



Kuva 8. Triasyyliglyserolin sn-1,3-positioiden hydrolyysiasteen eteneminen, kuvattuna näytteen 2-MAG, DAG, FFA ja TAG osuuksina, 0–10 minuutin hydrolyysin jälkeen.

Kolmannessa koesarjassa näytemäärä laskettiin 10 mg:aan, minkä lisäksi reaktion sekoitus vesihauteessa pyrittiin saamaan stabiloitua käyttämällä magneettisekoitusta käsin ravistelun sijaan. Magneettisekoitus helpotti myös huomattavasti hydrolyysin suorittamista suuremmilla näytemäärillä. Hydrolyysiajoiksi koesarjaan valittiin aiempien tulosten perusteella 4, 6 ja 8 minuutin näytteet (kuva 9).



Kuva 9. Triasyyliglyserolin sn-1,3-positioiden hydrolyysiasteen eteneminen, kuvattuna näytteen 2-MAG-, DAG-, FFA- ja TAG-osuuksina, 4, 6, ja 8 minuutin hydrolyysin jälkeen.

Koesarjan 3 tuloksista havaittiin, että hydrolyysi eteni noususuhdanteisesti 6 minuuttiin asti, jonka jälkeen hydrolyysisteen kasvu hidastui ja pysyi näin ollen lähes samana 8 minuutin näytteen kohdalla. Koesarjassa 2 mitatusta 10 minuutin näytteestä puolestaan havaittiin 2-monoasyyliglyserolisuhteen lasku, mahdollisen asyylimigraation vaikutuksesta. Edellä mainittujen tulosten perusteella lopulliseksi hydrolyysiasteeksi valittiin 6 minuuttia.

6 Tulokset ja menetelmän luotettavuuden arviointi

Työn päätavoitteena oli kehittää menetelmä, joka sopii erityisesti maitorasvan positionaaliseen määrittämiseen. Tästä syystä tulokset ja mittaukset keskittyivät suurimmaksi osaksi maitorasvan ympärille. Kehitettyä hydrolyysimenetelmää haluttiin kuitenkin myös soveltaa äidinmaitokorvikkeissa yleisesti esiintyviin kasvirasvoihin ja niiden sekoituksiin. Maitorasvan lisäksi lopullisiksi näytteiksi valikoitui auringonkukkaöljy, rapsiöljy, synteetisestisesti kasvirasvasekoitteesta valmistettu OPO-rasva sekä äidinmaitokorvikkeissa käytetty kasvirasvasekoite. Tuloksissa lähdettiin liikkeelle hydrolysoimattomien rasvanäytteiden mitatuista kokonaisrasvahappokoostumuksista. Kokonaisrasvahappokoostumusten avulla voitiin tarkastella Valiolla ennestään käytetyn kokonaisrasvahappokoostumusmenetelmän toimivuutta opinnäytetyössä käytetyillä rasvanäytteillä. Tuloksissa edettiin maitorasvan positionaalisen kokonaisrasvahappojakauman tarkasteluun sekä yksittäisten

rasvahappojen jakautumiseen triasyyliglyserolin sn-2- ja sn-1,3-posiioihin. Tämän jälkeen tarkasteltiin sn-2-palmitiinihappo-osuuksia tutkituista rasvanäytteistä, minkä jälkeen menetelmää tarkasteltiin tilastollisesti F- ja t-testien avulla.

6.1 Kokonaisrasvahappopitoisuus

Rasvanäytteiden kokonaisrasvahappokoostumukset mitattiin suoraan puhtaasta rasvasta metyloiduilla näytteillä, ilman lipidiluokkien erottelua TLC-levyllä. Näin ollen oletettiin, että suurin osa rasvan sisältämistä lipideistä oli triasyyliglyseroleja. Kokonaisrasvahappokoostumukset laskettiin luvussa 4.5 kuvatulla tavalla, kaavoilla 2 ja 3. Rasvahappojen moolimassat vaihtelevat hiilivetyketjun ja hiilien välisten kaksoissidosten määrän mukaan, minkä takia rasvahappoanalytiikassa tulokset suositellaan esitettävän myös rasvahappojen mooliosuuksina näytteessä. Tästä syystä mittauksista ja kirjallisuudesta saadut arvot muunnettiin myös mooliprosenteiksi käyttäen kaavoja 4 ja 5.

Kermasta uutetusta rasvanäytteestä saadut rasvahappokoostumukset, ovat esitettynä tämän massa prosentteina alla näkyvässä taulukossa 1. Kaasukromatografisesti mitatut kokonaisrasvahappokoostumukset ovat kahdeksan uutetun rasvanäytteen keskiarvoja ja kirjallisuusarvot ovat Ruotsissa vuonna 2001, eri vuodenaikoina mitattuja arvoja [11, s. 2]. Maidon rasvahappokoostumukset muunnettuina mooliprosenteiksi ovat esitettynä liitteessä 2.

Taulukko 1. Maitorasvan mitattu kokonaisrasvahappokoostumus, tämän massa prosentteina, vertailtuna kirjallisuusarvoihin. Rasvahappojen alin ja ylin arvo kuvaa eri vuodenaikoina mitattujen rasvahappokoostumuksen vaihtelua [11, s. 2.]

Rasvahappo	Menetelmä (m-%): Kirjallisuus (m-%):			
	Keskiarvo	Alin arvo	Ylin arvo	
Tyydyttyneet				
C4:0	0,8	4,4	4,0	5,1
C6:0	1,4	2,4	2,1	2,9
C8:0	1,1	1,4	1,2	1,9
C10:0	3,0	2,7	2,4	3,5
C12:0	3,8	3,3	3,0	4,1
C14:0	12,8	10,9	10,0	12,1
C16:0	33,5	30,6	28,7	34,1
C18:0	9,5	12,2	10,3	13,3
C20:0	0,6	0,2	0,2	0,2
Tyydyttymättömät				
C14:1	0,9	0,8	0,4	1,3
C16:1	1,6	1,0	0,9	1,8
C17:1	0,2	0,1	<0,1	0,3
C18:1	24,8	22,8	19,7	24,7
Monitydyttymättömät				
C18:2t	0,2	0,2	0,1	0,5
C18:2c	2,0	1,6	1,4	1,8
C18:3	0,6	0,7	0,6	0,9
yhteensä:	97	95		

Rasvanäytteistä saadut tulokset vastasivat kokonaisuudessaan hyvin kirjallisuudessa esiintyviä kokonaisrasvahappopitoisuuksia. Näiden tulosten perusteella voitiin todeta valmiin kaasukromatografisen metylointi- ja mittaussuomen toimivan hyvin lehmän maitorasvasta mitatuille näytteille. Maidon rasvahappokoostumus saattaa vaihdella, esimerkiksi ympäristötekijöistä ja lehmän ruokavaliosta riippuen. Tämä voi aiheuttaa osakseen vaihtelua eri maitonäytteissä sekä kirjallisuudessa esiintyvissä arvoissa [9, s. 68.] Lehmän maitorasvassa esiintyvät lyhytketjuiset (C4:0–C8:0) rasvahapot aiheuttivat haastetta mittauksissa, sillä niiden metyyliesterit, haihtuvat herkästi näytteen käsittelyvaiheessa.

Menetelmää kokeiltiin maitorasvan lisäksi myös kahdelle puhtaalle kasviraalle. Auringonkukkaöljyn ja rapsiöljyn mitatut kokonaisrasvahappopitoisuudet ovat esitettyinä taulukossa 2. Menetelmällä mitatut kokonaisrasvahappokoostumukset ovat kahden rinnakkaisen mittauksen keskiarvoja. Auringonkukkaöljystä mitatut tulokset vastasivat hyvin kirjallisuudessa esiintyviä rasvahappojen osuuksia, joiden pienet erot johtuvat luultavasti eri öljynäytteissä olevista eroista. Rapsiöljyssä esiintyy kirjallisuuden mukaan huomattava määrä pitkiä tyydyttymättömiä rasvahappoketjuja (C20:1 ja C22:1), joita ei

kuitenkaan havaittu mitatuista rapsiöljynäytteistä juuri lainkaan [18, s. 263]. Mahdollisesti kyseinen metylointi ja kaasukromatografinen mittaussuunnitelma ei sovellu pitkäketjuisille rasvahapoille. Lisäksi oleiinihapon C18:1 osuus oli huomattavasti suurempi kirjallisuudessa esiintyvään arvoon verrattuna.

Taulukko 2. Auringonkukkaöljyn ja rapsiöljyn kokonaisrasvahappokoostumus, jossa rasvahappojen osuudet ovat esitettyinä mooli- ja massaprosentteina [18, s. 263].

Rasvahappo	Auringonkukkaöljy:				Rapsiöljy:			
	Kirjallisuus:		Menetelmä:		Kirjallisuus:		Menetelmä:	
	m-%	mol-%	m-%	mol-%	m-%	mol-%	m-%	mol-%
Tyydyttyneet								
C16:0	6,2	6,8	6,0	6,5	4,9	5,6	4,1	4,5
C18:0	3,7	3,7	2,6	2,5	1,6	1,7	1,3	1,2
C20:0	0,3	0,3	0,2	0,2	0,0	0,0	0,1	0,1
Tyydyttymättömät								
C16:1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:1	25,2	25,2	31,1	30,8	33,0	34,3	59,3	58,9
C20:1	0,2	0,2	0,1	0,1	9,3	8,8	0,8	0,8
C22:1	0,1	0,1	0,2	0,2	23,0	19,9	0,1	0,1
Monitydyttymättömät								
C18:2	63,1	63,5	59,1	59,0	20,4	21,4	22,6	22,6
C18:3	0,2	0,2	0,2	0,2	7,9	8,3	11,3	11,4
Yhteensä:	99	100	100	100	100	100	100	100

Puhtaiden kasvirasvojen lisäksi menetelmää testattiin myös kahteen äidinmaitokorvikkeissa esiintyvään kasvirasvasekoitukseen. Valmistajan ilmoittamat vertailutulokset ja mitatut kokonaisrasvahappokoostumukset ovat esitettyinä taulukossa 3. Taulukossa näkyvien tuloksien perusteella havaittiin, että samoista rasvanäytteistä mitatut tulokset vastasivat erinomaisesti työssä mitattuja tuloksia.

Taulukko 3. Äidinmaitokorvikkeissa käytettyjen kasvirasvasekoitusten rasvahappo-osuudet, jossa Rasvaseos 1= äidinmaitokorvikkeissa käytetty synteettisesti valmistettu OPO-rasva ja Rasvaseos 2= äidinmaitokorvikkeissa käytetty kasvirasvasekoitus ilman vaihtoesteröintiä. Vertailuna taulukossa toimii valmistajan suorittamat rasvahappokoostumusmääritykset.

Rasvahappo	Rasvaseos 1:				Rasvaseos 2:			
	Vertailutulokset:		Menetelmä:		Vertailutulokset:		Menetelmä:	
	m-%	mol-%	m-%	mol-%	m-%	mol-%	m-%	mol-%
C12:0	3,5	4,7	3,7	5,0	8,5	11,4	8,5	11,3
C14:0	1,6	1,9	1,7	2,0	3,5	4,1	3,5	4,1
C16:0	18,7	19,8	18,6	19,7	6,2	6,5	6,4	6,7
C18:0	3,5	3,3	2,6	2,5	2,6	2,4	2,0	1,9
C18:1	46,2	44,5	44,9	43,1	39,3	37,3	38,3	36,3
C18:2	21,7	21,0	22,5	21,8	31,7	30,3	33,3	31,8
C18:3	2,3	2,2	2,4	2,4	3,0	2,9	3,1	3,0
C22:1	0,2	0,2	0,1	0,0	*	*	0,1	0,1
Yhteensä:	98	98	97	97	95	95	95	95

6.2 Lehmänmaidon rasvahappojen positiojakauma triasyyliglyserolissa

Haluttiin tarkastella, miten hyvin saatuja tuloksia voitaisiin soveltaa positoiden rasvahappo jakauman määritykseen maitorasvan triasyyliglyserolissa. Tuloksissa oletettiin, että rasvan hydrolyysissä vapautuneet rasvahapot (FFA) kuvaavat triasyyliglyserolin sn-1,3-positioita. Täydellisesti 2-monoasyyliglyseroleiksi hydrolysoituneet (2-MAG) rasvahapot kuvaavat puolestaan sn-2-position rasvahappokoostumusta. Tuloksissa ei huomioitu reaktiossa epätäydellisesti hydrolysoituneita diasyylliglyseroleja ja reagoimattomia triasyyliglyseroleja. Hydrolyysin jälkeen kumpaakin näistä lipidiluokista (TAG ja DAG) jäi jäljelle 5–10 %. Kirjallisuudessa positionaaliset jakaumat lehmänmaidossa olivat esitettyinä rasvahappojen mooliprosentteina. Tästä syystä myös hydrolyysimenetelmällä mitatut rasvahappokoostumukset lipidiluokissa (FFA ja 2-MAG) laskettiin niiden mooliprosenteiksi kaavoilla 2–5. Lehmänmaidon rasvan triasyyliglyserolien positionaalinen jakauma on esitettyinä taulukossa 4. Lisäksi taulukossa esiintyvät kirjallisuusarvot muunnettuna rasvahappojen massaprosenteiksi nähdään liitteessä 3.

Taulukko 4. Lehmänmaidon rasvahappojen jakautuminen mooliprosentteina triasyyliglyserolin sn-2- ja sn-1,3-posiitioihin. Mitatut osuudet ovat viidestä rasvanäytteestä saatuja keskiarvoja vertailtuna kirjallisuusarvoihin [6, s. 95.] Taulukossa esiintyvä keskihajonta kuvaa näytteiden välistä hajontaa ja "±" eroa kirjallisuusarvoihin.

Lehmänmaidon Rasvahapot	Kirjallisuus mol-%:		Menetelmä mol-%:			Menetelmä mol-%:		
	sn-2	sn-1,3	sn-2	Keskihajonta ±	±	sn-1,3	Keskihajonta ±	±
C4:0	-	18,7	-	-	-	0,3	0,6	18,5
C6:0	0,9	6,8	0,2	0,3	0,8	4,5	0,8	2,3
C8:0	0,7	2,6	1,1	0,3	-0,4	3,6	0,4	-0,9
C10:0	3,1	4,3	6,0	1,3	-2,9	7,7	0,8	-3,4
C12:0	6,5	2,9	7,6	1,1	-1,1	5,3	0,3	-2,4
C14:0	18,2	5,3	23,8	0,8	-5,6	10,5	0,4	-5,2
C16:0	33,6	20,8	37,4	1,6	-3,8	29,2	1,3	-8,4
C16:1	3,7	2,2	2,0	0,0	1,7	1,3	0,0	0,9
C18:0	9,9	6,1	1,9	2,2	8,0	9,9	0,7	-3,8
C18:1	19,7	28,1	15,0	0,5	4,7	21,2	1,5	6,8
C18:2	3,6	2,1	1,7	0,1	2,0	3,6	0,1	-1,5
Yhteensä:	100	100	97			97		

Taulukoitujen tulosten perusteella voidaan todeta mitattujen arvojen eroavan suhteellisen paljon kirjallisuudessa esitetyistä tuloksista. Kuitenkin rasvahappokoostumus ja niiden positionaalinen jakauma vaihtelee lehmänmaidossa luontaisesti ruokavalion sekä muiden elinolosuhteiden mukaan. Erityisesti lyhytketjuisten C4:0 rasvahappojen mooliprosenttiosuus eroaa huomattavasti kirjallisuudessa esitetystä arvosta. Mittausten välinen keskihajonta on myös suurinta lyhytketjuisten rasvahappojen osalta, suhteessa niiden osuuksiin positiioissa.

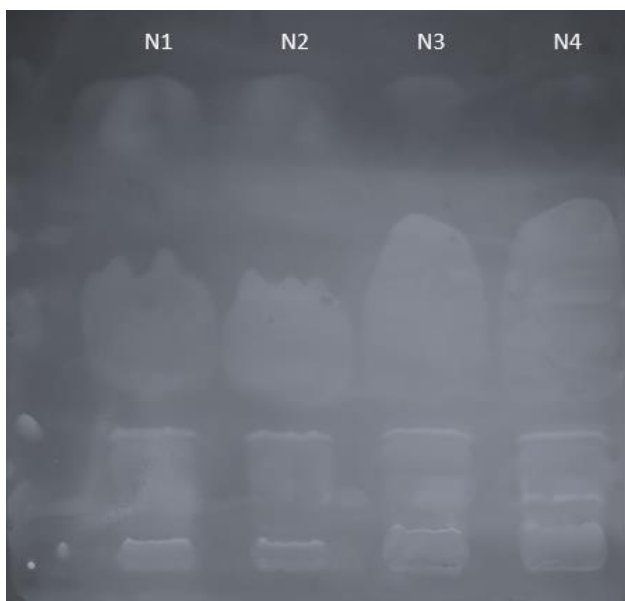
Yksittäisten rasvahappojen jakautuminen triasyyliglyserolin sn-2-positiiossa suhteessa rasvan kokonaisuuteen triasyyliglyserolissa laskettiin kaavalla 7. Taulukossa 5 nähdään rasvahappojen lasketut osuudet sn-2 positiiossa. Tuloksissa ei otettu huomioon hydrolyysiasteesta johtuvaa virhettä, vaan nämä laskettiin suoraan taulukossa 4 näkyvien arvojen perusteella. Tarkasteltaessa yksittäisten rasvahappojen jakaumaa positiioihin voidaan todeta, että mitatut tulokset vastasivat kirjallisuusarvoilla laskettuja tuloksia.

Taulukko 5. *sn*-2-rasvahapon osuus suhteessa hydrolysoituneiden triasyyliglyserolien yhteenlaskettuun rasvahapon osuuteen näytteessä.

Lehmänmaidon Rasvahapot	Kirjallisuus m-%: Menetelmä m-%:		Kirjallisuus mol-%: Menetelmä mol-%:	
	<i>sn</i> -2 osuus	<i>sn</i> -2 osuus	<i>sn</i> -2 osuus	<i>sn</i> -2 osuus
C4:0	0	0	0	0
C6:0	10,5	1,8	12,1	3,7
C8:0	19,1	24,0	21,6	23,3
C10:0	38,4	45,4	42,2	43,8
C12:0	65,5	59,7	68,9	59,0
C14:0	74,5	69,5	77,3	69,4
C16:0	58,0	55,7	61,7	56,1
C16:1	59,1	60,9	62,8	61,3
C18:0	58,2	21,2	61,9	15,8
C18:1	37,5	39,9	41,2	41,3
C18:2	59,6	30,8	63,3	31,5

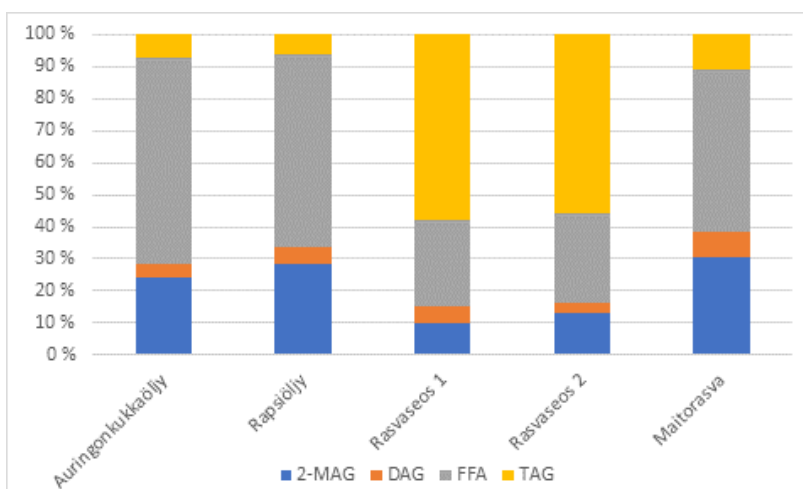
6.3 Palmitiinihapon jakautuminen *sn*-2 positioon tutkituissa rasvanäytteissä

Valmistettiin koesarja, jonka tavoitteena oli tutkia valmiin hydrolyysimenetelmän toimivuutta maitorasvan lisäksi myös kasvirasvoihin ja äidinmaitokorvikkeissa käytettyihin kasvirasvasekoitteisiin. Kasvirasvojen *sn*-2-palmitiinihappo-osuuden määrittäminen suoritettiin luvun 4 mukaisesti. Kasvirasvoille ja niiden sekoituksille ei kuitenkaan suoritettu rasvan uuttovaihetta, sillä oletettiin rasvojen olevan puhtaita ja vapaita hydrolyysiä inhiboivista tekijöistä. Hydrolyysin jälkeinen lipidiluokkien erottelu TLC-levyllä nähdään kuvassa 10. Kasvirasvasekoitteille valmistetun hydrolyysin havaittiin edistyneen hitaammin, kun taas yksittäiset kasvirasvat vaikuttivat hydrolysoituvan samalla tasolla maitorasvan kanssa.



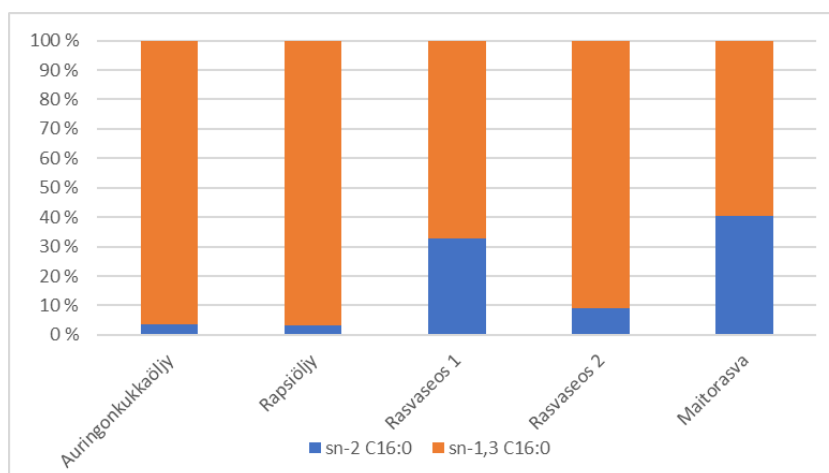
Kuva 10. Hydrolysoitujen kasvirasvojen erottelu TLC-levyllä, jossa N1= synteettisesti valmistettu OPO-kasvirasva, N2= kasvirasvasekoitus, N3= Auringonkukkaöljy ja N4= Rapsiöljy.

Hydrolyysiasteita arvioitiin laskemalla jokaisen lipidiluokan rasvahappojen yhteenlasketut massat. Lasketut lipidiluokkien osuudet rasvanäytteissä skaalattuna 100-prosenttiin nähdään alla olevassa kuvassa 11. Kuvaajasta voitiin todeta hydrolyysiasteen olleen huomattavasti matalampi äidinmaitokorvikkeissa käytetyissä kasvirasvasekoitteissa verrattaessa näitä maitorasvan hydrolyysiasteeseen. Auringonkukka- sekä rapsiöljystä suoritettavat hydrolyysit olivat kuitenkin edenneet odotetusti.



Kuva 11. Rasvanäytteiden lipidiluokkien jakautuminen 6 minuutin hydrolyysin jälkeen.

Tämän jälkeen laskettiin sn-2-position palmitiinihapon osuus suhteessa triasyyliglyserolin kokonaisrasvahappo-osuuteen luvun 4.6 mukaisesti. Palmitiinihapon massat lipidiluokissa, suhteutettiin palmitiinihapon yhteenlaskettuun määrään näytteessä kaavalla 6. Lopullinen sn-2-position osuus laskettiin saatujen palmitiinihapposuhteiden avulla käyttäen kaavaa 7. Kuvassa 12 visualisoituna palmitiinihapon jakautuminen triasyyliglyserolin positiioihin.



Kuva 12. Rasvanäytteiden sn-2-palmitiiniosuudet suhteessa triasyyliglyserolin kokonaispalmitiinihappo-osuuteen.

Taulukossa 6 esitettynä osuudet, joiden mukaan palmitiinihapon osuudet triasyyliglyserolissa on laskettu. Arvot kuvaavat palmitiinihapon osuuksia suhteessa kaikista lipidiluokista yhteenlaskettuun määrään.

Taulukko 6. Palmitiinihapon osuus rasvanäytteiden sn-2-positiossa. Tuloksissa huomiottiin hydrolyysistä johtuva virhe, jonka vuoksi positioiden palmitiinihappo osuudet kuvaavat osuuksia positioissa skaalattuna 100-prosenttiin.

C16:0	Auringonkukkaöljy	Rapsiöljy	Rasvaseos 1	Rasvaseos 2	Maitorasva
sn-2	3,1	2,8	11,6	4,1	33,2
sn-1,3	83,1	85,3	23,7	41,3	49,1
sn-1,2,3	86,2	88,2	35,4	45,4	82,3
sn-2 osuus	3,6	3,2	33,0	9,0	40,3

Kirjallisuusarvoa ei löydetty auringonkukka- ja rapsiöljyn sn-2-palmitiinihappolle, molemmista kasvirasvoista kuitenkin saatiin sn-2-palmitiinihappo-osuudeksi ~3 %. Kummankin kasvirasvan hydrolyysi eteni oletetulla tavalla, näin ollen tuloksia pidettiin luotettavina. Äidinmaitokorvikkeissa käytetyille rasvaseoksille vertailuarvoina käytettiin valmistajan ilmoittamia tuloksia. Valmistajan mittausten mukaan rasvaseos 1 sisälsi 38,7 prosenttia sn-2-palmitiinihappoa. Menetelmällä osuudeksi saatiin 33 prosenttia sn-2-palmitiinihappoa. Saatu tulos oli suhteellisen lähellä valmistajan mittaamaa osuutta, siitä huolimatta, että rasvan hydrolyysi ei edennyt odotetusti. Valmistaja ei ollut ilmoittanut sn-2-palmitiinihappo-osuutta rasvaseos 2:lle. Kirjallisuuden mukaan tavanomaisimmat äidinmaitokorvikkeisiin lisätyt kasvirasvasekoitteet sisältävät 10–20 prosenttia sn-2-palmitiinihappoa [1, s. 40.] Menetelmällä sn-2-palmitiinihapon osuudeksi saatiin 9 %. Rasvan epätavallinen hydrolyysi aiheutti kuitenkin mahdollisesti virhettä tuloksessa. Maitorasvan sn-2-palmitiinihappo-osuudeksi mitattiin 40,3 prosenttia; kirjallisuudessa vastaavaksi osuudeksi ilmoitettiin 40–45 prosenttia [1, s. 40].

6.4 Työn toistettavuuden arviointi maitorasvanäytteillä

Suoritettiin 2 erillistä koesarjaa, jossa oli 3 rinnakkaista näytettä. Saatuja sn-2-palmitiinihappo-osuuksia ja kokeiden välisiä variansseja vertailtiin F-testin avulla, 95 prosentin luottamustasolla (taulukko 7).

Taulukko 7. F-testin tulokset kahdesta eri päivinä suoritetuista koesarjoista.

Kahden otoksen F-testi variansseille		
Hypoteesit:	H ₀ : $(\sigma_{\text{koe 1}})^2 = (\sigma_{\text{koe 2}})^2$	
	H ₁ : $(\sigma_{\text{koe 1}})^2 \neq (\sigma_{\text{koe 2}})^2$	
	41,37	40,49
Keskiarvo	41,58	40,22
Varianssi	3,35	0,17
Havainnot	2	2
va	1	1
F (F-laskettu)	20,09	
P(F<=f) yksisuuntainen	0,14	
P kaksisuuntainen=P yksisuuntainen*2	0,28	
F-kriittinen yksisuuntainen	161,45	

F-testin tulosten avulla voitiin todeta, että P-arvo 0,28 > alfa 0,05, eli 0-hypoteesia ei hylätä. Varianssit eivät eroa tilastollisesti merkitsevästi kahden kokeen välillä, 95 prosentin luottamustasolla. Näiden tietojen perusteella suoritettiin t-testi olettaen varianssit yhtäsuuriksi (taulukko 8)

Taulukko 8. t-testi tulokset kahdesta eri päivinä suoritetuista koesarjoista.

Kahden otoksen t-testi olettaen varianssit yhtäsuuriksi		
Hypoteesit:	H ₀ : $\mu_{\text{koe 1}} = \mu_{\text{koe 2}}$	
	H ₁ : $\mu_{\text{koe 1}} \neq \mu_{\text{koe 2}}$	
	41,37	40,49
Keskiarvo	41,58	40,22
Varianssi	3,35	0,17
Havainnot	2	2
Yhdistetty varianssi	1,76	
Arvioitu keskiarvojen ero	0	
va	2	
t Tunnusluvut (t-laskettu)	1,02	
P(T<=t) yksisuuntainen	0,21	
t-kriittinen yksisuuntainen	2,92	
P(T<=t) kaksisuuntainen	0,41	
t-kriittinen kaksisuuntainen	4,30	

Tuloksista nähtiin, että P-arvo 0,41 > alfa 0,05 sekä t-laskettu 1,02 < t-kriittinen 4,30, joten 0-hypoteesia ei hylätä. Kaksi eri päivinä tehtyä koesarjaa eivät eroa tilastollisesti merkitsevästi 95 prosentin luottamustasolla.

7 Yhteenveto ja johtopäätökset

Opinnäytetyön päätavoitteena oli kehittää ja ottaa käyttöön menetelmä, jonka avulla maitorasvasta voitaisiin tutkia palmitiinihapon jakautumista triasyyliglyserolin sn-2-positioon, suhteessa tämän kokonaismäärään näytteessä. Työssä tutkittiin erityisesti hydrolyysiajan vaikutusta triasyyliglyserolin hydrolyysiasteeseen, jonka avulla hydrolyysireaktio optimoitiin mahdollisimman luotettavien tulosten saavuttamiseksi. Hydrolyysi suoritettiin sn-1,3-spesifisellä haiman lipaasilla. Optimaalinen hydrolyysiaste valituilla reaktio-olosuhteilla saavutettiin 6 minuutin hydrolyysin jälkeen.

Kokonaisrasvahappomääritysten avulla todettiin metylointi- ja mittausmenetelmän sopivan työssä käytetyille rasvanäytteille. Maitorasvan määrittämisessä havaittiin lyhytketjuisten rasvahappojen antavan matalampia rasvahapposuuskuksia verrattuna kirjallisuuteen. Saadut tulokset lyhytketjuisista rasvahapoista olivat kuitenkin odotettavissa, sillä tiedettiin näiden metyyliestereiden haihtuvan herkästi näytteenkäsittelyvaiheessa. Lisäksi liuottimen sekä lyhytketjuisten rasvahappojen metyyliestereiden retentioajat kolonnissa olivat hyvin lähellä toisiaan ja näin ollen piikkien päällekkäisyys saattoi vaikuttaa näiden osuuksiin alentavasti. Rapsiöljyn rasvahappokoostumusmittauksissa havaittiin pitkäketjuisten (C20:1 ja C22:1) rasvahappojen antavan mittauksilla kirjallisuudesta poikkeavia tuloksia. Tämä on voinut johtua pitkäketjuisten rasvahappojen korkeasta kiehumispisteestä, jonka vuoksi kyseiset rasvahapot eivät ole ajautuneet kolonnista ulos niin tehokkaasti. Työ kuitenkin rajoitettiin pääsääntöisesti hydrolyysireaktion optimointiin, minkä vuoksi todellisen syyn tutkiminen, päätettiin jättää myöhemmin ratkaistavaksi.

Maitorasvojen rasvahappokoostumuksista triasyyliglyserolin sn-2- ja sn-1,3-positioissa todettiin menetelmän antavan kirjallisuudesta poikkeavia tuloksia. Menetelmä antoi kuitenkin kirjallisuutta paremmin vastaavia tuloksia, kun yksittäisten rasvahappojen positiionaalista jakaumaa sn-2-positiossa tutkittiin suhteutettuna rasvahapon yhteenlaskettuun kokonaisosuuteen hydrolysoituneissa triasyyliglyseroleissa. Epäiltiin eri pituisten rasvahappoketjujen irtoavan silikageeliltä eri nopeuksilla lipidiluokkien metylointivaiheessa. Näin ollen, esimerkiksi pidemmät rasvahappoketjut olisivat mahdollisesti metyloituneet lyhyempiä rasvahappoketjuja hitaammin. Tämä olisi voinut vaikuttaa rasvahappojen osuuksiin positiioissa, mutta vaikutus ei olisi ollut niin vahva tutkittaessa yksittäisen rasvahapon jakautumista sn-2-positioon suhteessa rasvahapon kokonaisosuuteen.

Menetelmää sovellettiin maitorasvan lisäksi kahdelle kasvivasvalle sekä kahdelle äidinmaitokorvikkeissa käytetyille kasvivasvasekoitteille. Kasvivasvoille ei suoritettu erillistä rasvan uuttoa, sillä oletettiin, että rasvanäytteet eivät sisältäisi hydrolyysiä inhiboivia tekijöitä. Yksittäiset kasvivasvat hydrolysoituivat odotetulla tavalla, antaen vastaavia hydrolyysiasteita, kun maitorasvalla suoritettua hydrolyysia. Kasvivasvasekoitteissa hydrolyysiaste jäi huomattavasti matalammaksi, kun maitorasvasta suoritettua hydrolyysia, mikä vuoksi epäiltiin seosten sisältävän hydrolyysiä inhiboivia tekijöitä. Muita mahdollisia hydrolyysia hidastavia tekijöitä voisi olla, esimerkiksi rasvanäytteen kiteytyminen tai suurempi rasvapisaroiden koko hydrolyysireaktion aikana. Rasvan uuttoa suositellaan jatkossa näytteille, joiden epäillänsä sisältävän hydrolyysiä hidastavia tekijöitä. Kiteytyneille rasvanäytteille suositellaan kuumennuskäsittelyä, ennen hydrolyysin suorittamista.

Hydrolyysimenetelmän toistettavuutta arvioitiin 2 erillisen koesarjan arvoilla suoritetuilla F- ja t-testillä. Testitulosten perusteella koesarjojen varianssit ja keskiarvot eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi 95 prosentin luottamustasolla.

Lähteet

- 1 Hageman, Jeske; Danielsen, Marianne; Nieuwenhuizen, Arie; Feitsma, Anouk & Dalsgaard, Triene. 2019. Comparison of Bovine Milk Fat and Vegetable Fat for Infant Formula. *International Dairy Journal* Vol. 92, s. 37–49.
- 2 Innis, Sheila. 2011. Triacylglycerol Structure and Its Role in Infant Nutrition. *Advances in Nutrition*, Vol 2, s. 275–283.
- 3 Bar-Yoseph, Fabiana; Lifshitz, Yael & Cohen, Tzafra. 2013. Review of *sn*-2 Palmitate Oil Implications for Infant Health. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, Vol 89, s. 139–143.
- 4 Wanga, Zhiyu; Liub, Lihua; Liua, Libo; Liua, Tingting; Lia, Chun & Su, Lihua. 2019. 1,3-Dioleoyl-2-palmitoylglycerol-rich Triacylglycerol Characterization by Three Processing Methods. *International Journal of Food Properties*, Vol 22, NO 1, s. 1156–1171.
- 5 Xiaoqiang, Zou; Abdelmoneim, Ali; Sherif, Abed & Zheng, Guo. 2017. Current Knowledge of Lipids in Human Milk and Recent Innovations in Infant Formulas. *Current Opinion in Food Science*, Vol 16, s. 28–39.
- 6 Gunstone, Frank; Harwood, John & Dijkstra, Albert. 2007. *The Lipid Handbook*. 3, painos. CRC Press, Taylor & Francis Group.
- 7 Berg, Jeremy; Tymoczko, John & Stryer, Lubert. 2002. *Biochemistry*. 5, Painos. W.H. Freeman and Company.
- 8 Mehrotraa, Vipul; Sehgalb, Sunil Kumar & Bangale, Nikhil Rajeev. 2019. Fat Structure and Composition in Human Milk and Infant Formulas: Implications in Infant Health. *Clinical Epidemiology and Global Health*, Vol 7, s. 153–159.
- 9 Rossel, Barry. 2003. *Oils and Fats: Dairy Fats*. 3. Painos. Leatherhead Food International.
- 10 Jensen, Robert; Ferris, Ann; Lammi-Keefe, Carol & Henderson, Robin. 1990. Lipids of Bovine and Human Milks: A Comparison. *Dairy Foods*, s. 223–240. Connecticut: Department of Nutritional Sciences.
- 11 Lindmark Månsson, Helena. 2008. *Fatty Acids in Bovine Milk Fat*. Food and Nutrition Research.

- 12 Mead JR, Irvine SA & Ramji DP. 2002. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation and role in disease. Wales: Cardiff School of Biosciences, Cardiff University.
- 13 Christie, William & Han, Xianlin. 2012. The Lipid Analyses. 4, Painos. Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- 14 Yli-Hietanen, Wilhelmina. 2016. Saippuan valmistus. <<https://peda.net/p/Wilhelmina%20Yli-Hietanen/portfolio-ke7/saippuanvalmistus/teoria>>. Luettu 03.11.2019.
- 15 Aldai, Noelia; Murray, Brendan; Nájera, Ana; Troy, Declan & Osoro, Koldo. 2005. Derivatization of fatty acids and its application for conjugated linoleic acid studies in ruminant meat lipids. Science of Food and Agriculture, Vol 85, s. 1073–1083.
- 16 Cao, Xi; Mangas-Sanchez Juan; Feng, Fengqin & Adlercreutz, Patrick. 2016. Acyl Migration in Enzymatic Iteresterification of Triacylglycerols: Effects of Lipases from *Thermomyces lanuginous* and *Rhizopus oryzae*, Support Material, and Water Activity. European Journal of Lipid Science and Technology, Vol 118, s.1579–1587.
- 17 Korma, Sameh; Zou, Xiaoqiang & Wang, Xingguo. 2018. Preparation of Structured Lipids Enriched with Medium and Long-chain Triacylglycerols by Enzymatic Iter-esterification for Infant Formula. Food and Bioproducts Processing.
- 18 Ramos, María Jesús; C.M. Fernandez-Marchante; Casas Abraham; Rodriguez, Lourdes & Pérez, Angel. 2008. Influence of Fatty Acid Composition of Raw Materials on Biodiesel Properties. Bioresource Technology.

Rasvahappojen moolimassat

Rasvahappo	Moolimassa g/mol
C4:0	88,1
C6:0	116,2
C8:0	144,2
C10:0	172,3
C11:0	186,3
C12:0	200,3
C13:0	214,4
C14:0	228,4
C14:1	226,4
C15:1	240,4
C16:0	256,4
C16:1	254,4
C17:1	268,5
C18:0	284,5
C18:1	282,5
C18:2	280,5
C18:3	278,5
C20:0	312,5
C20:1	310,5
C21:0	326,6
C20:2	308,5
C20:4	304,5
C20:3	306,5
C22:1	338,6
C22:0	340,6
C20:5	302,5
C20:3	306,5
C23:0	354,6
C22:2	336,6
C22:4	332,6
C24:0	368,6
C24:1	366,6
C22:5	330,6
C22:6	328,6

Maitorasvan rasvahappokoostumus ja positiojakauma triasyyliglyserolissa

Maitorasvan mitattu rasvahappokoostumus, tämän mooli prosentteina, vertailtuna kirjallisuusarvoihin. Rasvahappojen alin ja ylin arvo kuvaa eri vuodenaikoina mitattujen rasvahappokoostumuksen vaihtelua [11, s. 2.]

Rasvahappo	Menetelmä mol-%: Kirjallisuus mol-%:		
	Keskiarvo	Alin arvo	Ylin arvo
Tyydyttyneet			
C4:0	2,2	11,9	10,3
C6:0	3,1	4,9	4,1
C8:0	2,0	2,3	1,9
C10:0	4,4	3,7	3,2
C12:0	4,7	3,9	3,4
C14:0	14,2	11,3	9,9
C16:0	33,0	28,4	25,3
C18:0	8,4	10,2	8,2
C20:0	0,5	0,2	0,1
Tyydyttymättömät			0,0
C14:1	1,0	0,8	0,4
C16:1	1,6	0,9	0,8
C17:1	0,2	0,1	0,0
C18:1	22,2	19,2	15,8
Monitydyttymättömät			0,0
C18:2t	0,2	0,2	0,1
C18:2c	1,8	1,4	1,1
C18:3	0,5	0,6	0,5
yhteensä:	100	100	

Maitorasvan rasvahappojen jakautuminen massaprosentteina triasyyliglyserolin *sn*-2-(2-MAG) ja *sn*-1,3 (FFA) -positioihin [6, s. 95.]

Lehmänmaidon Rasvahapot	Kirjallisuus m-%:		Menetelmä m-%:		Menetelmä m-%:	
	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -1,3	<i>sn</i> -2	Keskihajonta ±	<i>sn</i> -1,3	Keskihajonta ±
C4:0	-	7,7	-	-	0,1	0,2
C6:0	0,4	3,7	<0,1	0,0	2,2	0,4
C8:0	0,4	1,8	0,7	0,2	2,1	0,3
C10:0	2,1	3,4	4,6	1,1	5,5	0,6
C12:0	5,1	2,7	6,5	1,0	4,4	0,3
C14:0	16,5	5,7	22,6	1,0	9,9	0,5
C16:0	34,3	24,8	38,9	1,9	31,0	1,2
C16:1	3,8	2,6	2,1	0,1	1,4	0,0
C18:0	11,2	8,0	3,1	2,2	11,6	0,7
C18:1	22,1	36,8	16,5	2,2	24,8	1,6
C18:2	4,1	2,8	1,9	0,1	4,2	0,1
Yhteensä:	100	100	97		97	