

Helene Hujic

Happojen ja sokereiden määrittäminen HPLC-menetelmällä

Case: SeAMK

Opinnäytetyö

kevät 2012

Tekniikan yksikkö

Bio- ja Elintarviketekniikan koulutusohjelma



SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU

Opinnäytetyön tiivistelmä

Koulutusyksikkö: Tekniikan yksikkö

Koulutusohjelma: Bio- ja elintarviketekniikka

Tekijä: Helene Hujic

Työn nimi: Happojen ja sokereiden määrittäminen HPLC-menetelmällä, Case: SeAMK

Ohjaaja: Pasi Junell

Vuosi: 2012 Sivumäärä: 39 Liitteiden lukumäärä: 7

Tässä opinnäytetyössä keskityttiin tutkimaan happojen ja sokereiden määrittämisen mahdollisuutta HPLC-menetelmällä. Teoriaosuudessa kerrotaan yleisesti HPLC-menetelmästä ja laitteiston osista.

Varsinaisessa kokeellisessa osuudessa keskitytään testaamaan peruna- ja porkkananäytteiden sokeri- ja happopitoisuuksia. Kuivatuista näytteistä tehtiin liuoksia liuottamalla ne tislattuun veteen. Näistä liuoksista tehtiin HPLC-laitteistolla näyteajoja, joita verrattiin standardeja vastaan. Standardit on valmistettu sitruunahaposta, omenahaposta, fruktoosista, glukoosista ja sakkaroosista.

Omia näytetuloksia vertailtiin vielä lopuksi Turun yliopiston biokemian ja elintarviketekemian laitokselta saatuihin samoista näytteistä tehtyihin tuloksiin. Heidän tuloksensa on saatu käyttämällä eri menetelmää ja laitteistoa.

Avainsanat: HPLC, standardit, pitoisuus, glukoosi, sakkaroosi, fruktoosi, omenahappo, sitruunahappo

SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Thesis abstract

Faculty: School of Technology

Degree programme: Food Processing and Biotechnology

Author/s: Helene Hujic

Title of thesis: Determination of acids and sugars with HPLC-method, Case study at SUAS

Supervisor(s): Pasi Junell

Year: 2012 Number of pages: 39 Number of appendices: 7

This thesis concentrates on studying the possibility of determining acids and sugars with the HPLC (High pressure liquid chromatograph). The theoretical part deals with HPLC-method and the parts of the equipment in general.

The experimental part concentrates on testing carrot and potato samples and their sugar and acid concentrations. In the test, the dried samples were first dissolved in purified water before testing. The dissolved samples were put through the HPLC-equipment and were compared against standards. These standards were made from pure citric acid, malic acid, fructose, glucose and sucrose.

Our sample results were finally compared to the results we got from the biochemistry and food chemistry laboratory at Turku University. They had got their results with different methods and equipment.

Keywords: HPLC, dissolved, concentration, citric acid, malic acid, fructose, sucrose, glucose

SISÄLTÖ

Opinnäytetyön tiivistelmä	2
Thesis abstract.....	3
SISÄLTÖ.....	4
KUVIO- JA TAULUKKOLUETTELO.....	5
KÄYTETYT TERMIT JA LYHENTEET	6
1 JOHDANTO	7
2 HPLC	8
2.1 Yleisesti menetelmästä	8
2.2 Laitteisto.....	11
3 MENETELMÄN KEHITYS.....	14
3.1 Menetelmän tarkoitus.....	14
3.2 Kehityksen kulku	14
4 NÄYTTEEN KÄSITTELY	15
5 TULOKSET	27
5.1 Laskelma omenahapon ja fruktoosin erottamiseksi.....	31
5.2 Vertailu	31
6 JOHTOPÄÄTÖKSIÄ	35
LÄHTEET	37
LIITTEET	39
Liite 1. Perunan hapot.....	
Liite 2. Perunan sokeri	
Liite 3. Porkkanan 134C sokerit	
Liite 4. Porkkanan 134C hapot.....	
Liite 5. Porkkanan 186C sokerit	
Liite 6. Porkkanan 186C hapot.....	
Liite 7. Työohje.....	

KUVIO- JA TAULUKKOLUETTELO

Kuvio 1. HPLC-laitteiston kaaviokuva.	10
Kuvio 2. Käytössä ollut HPLC-laitteisto.....	12
Kuvio 3. Porkkananäytteet pusseissaan.	15
Kuvio 4. Valmiit porkkananäytteet mittapulloissa.	16
Kuvio 5. 500 mg/l standardin sokeripiikit RI-detektorilla.....	17
Kuvio 6. 500 mg/l standardin happopiikit 210 nm:n aallonpituudessa UV/Visible Detektorilla.....	19
Kuvio 7. 13.3 2012 tehdyn ajon sokeripiikit.....	21
Kuvio 8. 13.3 2012 tehdyn ajon standardihapot.....	22
Kuvio 9. Fruktosin kalibrintisuora	23
Kuvio 10. glukoosin kalibrintisuora.....	23
Kuvio 11. omenahapon kalibrintisuora.....	24
Kuvio 12. sakkaroosin kalibrintisuora.....	24
Kuvio 13. sitruunahapon kalibrintisuora	25
Taulukko 1. Kesquivirheet.....	26
Taulukko 2. Perunan hapot mg/l	27
Taulukko 3. Perunan näytepainot	28
Taulukko 4. Perunan mg/g arvot.....	28
Taulukko 5. Perunan sokereiden arvot mg/l.....	29
Taulukko 6. Porkkanan laimennetut sokeriarvot mg/l.....	29
Taulukko 7. Porkkanan näytepainot.....	30
Taulukko 8. Porkkanan mg/g sokeriarvot.....	30
Taulukko 9. porkkanan happoarvot mg/l.....	30
Taulukko 10. Turku, perunan sokerit ja hapot mg/g.....	32
Taulukko 11. omat perunanäytteet, sokerit ja hapot mg/g.	32
Taulukko 12. Turku, Porkkanan sokerit ja hapot mg/g.....	33
Taulukko 13. Omat porkkananäytteet sokerit ja hapot mg/g.....	33

KÄYTETYT TERMIT JA LYHENTEET

Disakkaridi	Kahdesta monosakkaridista muodostuva hiilihydraatti
Eluentti	HPLC:n ajoliuos
Glykosidisisidos	disakkaridin hiilihydraattien välinen sidostyyppi
HPLC	High pressure liquid chromatography
LC	liquid chromatography
Monosakkaridi	Yksinkertainen hiilihydraatti
RI	Refractive index
UV/VIS	Ultraviolet/visible

1 JOHDANTO

Tässä työssä suurin kysymys oli, kuinka saada aikaan toimiva sokeri-happomääritys jo olemassa olevalle laitteistolle. Vaikka laitteistolla oli jo aiemmin tehty töitä, tulokset olivat olleet epäluotettavia tai harhaanjohtavia. Seinäjoen ammattikorkeakoulu sai uuden käyttöohjelman HPLC-laitteistolle, ja tämän takia prosessin kulku ja vaiheet haluttiin tarkistaa ja mahdollisesti korjata. Tällöin haluttiin saada laitteistolle myös hyvin toimivat uudet työohjeet, jolloin laitteistolla voitaisiin tehdä luotettavia tuloksia vastaisuudessa. Työohjeet on liitetty opinnäytetyön loppuksi. Tavoitteeksi tällöin tuli prosessin kulun uudistaminen ja tarkastus

Toinen kysymys, mikä tässä työssä tulee esille ovat näytteet. Työssä käytetyt näytteet olivat osa toista projektia, josta ne olivat lähetetty Turun yliopiston biokemian ja elintarvikekemian laitokselle tutkimuksia varten. Projektin puolesta haluttiin kuitenkin tietää, pystyttääkö näytteet analysoimaan Seinäjoen ammattikorkeakoulun laboratoriotiloissa ja HPLC-menetelmällä, jolloin niitä ei enää tarvitsisi lähettää mihinkään. Näistä näytteistä oli tavoitteena analysoida niiden happo- ja sokeripitoisuudet ja lopuksi verrata niitä Turun yliopiston biokemian ja elintarvikekemian laitoksen tuloksiin. Tämä vertailu auttaa määrittämään sen, että ovatko tulokset samoista näytteistä samanlaisia.

2 HPLC

2.1 Yleisesti menetelmästä

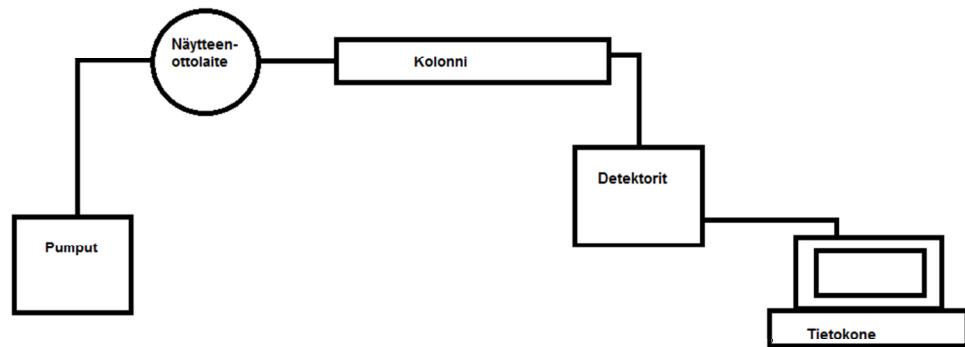
HPLC eli High-performance liquid chromatograph, suomeksi korkean erotuskyvyn nestekromatografia, on menetelmä, jolla pystytään erottamaan erilaisia yhdisteitä. Menetelmällä saadaan esille tuntemattomat yhdisteet niin sanottujen standardiliuoksien avulla. Nämä standardiliuokset sisältävät tunnetun konsentraation esimerkiksi sitruunahappoa. Prosessia varten tehdään usein monia standardiliuoksia, sillä esimerkiksi elintarvikkeissa on paljon erilaisia yhdisteitä. Kolonni erottelee standardiliuoksille eri retentioajat, ja näitä pystytään vertamaan näytteen vastaavaan retentioaikaan suoraan. Näin pystytään selvittämään, onko näytteessä esimerkiksi juuri standardiliuoksien sisältämiä sokereita. Retentioajalla tarkoitetaan aikaa, jossa yhdisteet tarvitsevat kulkeakseen kolonnin lävitse (Orgaanisen kemian kromatografiset menetelmät, [viitattu 16.8.2012].) Lämpötila vaikuttaa HPLC:ssä retentioaikaan. Matalammassa lämpötilassa piikit piirtyvät harvemmin, kuin korkeammassa, mikä vaikuttaa prosessin kestoon. (Kazakevich & LoBrutto 2006.) Kolonnissa oleva stationäärifaasi sitoo eri yhdisteitä eri tavalla, jolloin toiset läpäisevät kolonnin nopeammin kuin toiset. Suurimmalla osalla yhdisteistä on eri kolonnin läpäisy nopeus kuin muilla näytteissä olevilla yhdisteillä. Tässä on kuitenkin ongelma, sillä joillain yhdisteillä on sama läpäisy nopeus, joten ne piirtyvät samaan aikaan. Tällöin pystytään detektorien avulla näkemään yhdisteiden erot. Vaikka yhdisteet läpäisivät kolonnin samaan aikaan, on niillä muita eroja, joista ne pystytään erottamaan toisistaan. Ne voivat esimerkiksi heijastaa UV-valoa eri taajuuksissa, jolloin pystytään ne erottelemaan UV-detektorien avulla. Tällöin UV-detektoreille pystytään säätämään eri valon aallonpituudet, ja yhdisteet voidaan näin saada näkyviin erillään.

HPLC on LC:n (liquid chromatograph) alamuoto, jossa käytetään korkeaa nestepainetta kuljettamaan eluentti eli ajoliuos kolonnin lävitse. Kolonnit ovat täynnä hyvin hienojakoista jauhetta, joka on pakattu hyvin tiiviisti, näin muodostaen stationäärifaasin. Kolonnien hienojakoinen jauhe on usein silikaa, tai kuten tässä

työssä käytetyssä kolonnissa, sulfonoitujen divinyylibentseenistyreenikopolymeeriä. Yhdisteiden erottuminen tapahtuu näiden kahden faasin välillä, eli stationääri-faasin ja liikkuvan faasin (eluentti) välillä. Nestekromatografian muita muotoja ovat ohutlevykromatografia, jossa näytteet pipetoidaan ohutlevyn (joko metallia, lasia tai muovia) pintaan, ja levy upotetaan näyte rajaan asti nesteeseen, joka toimii liikkuvana faasina (Laboratorioanalyysit: Ohutlevykromatografia [16.8.2012].) Toinen nestekromatografian muoto on pylväskromatografia (Kromatografiset menetelmät, [viitattu 16.8.2012].)

HPLC-menetelmän varsin läheinen sukulainen on kaasukromatografia. Se perustuu myös liikkuvaan ja stationäärifaasiin, mutta siinä oleva liikkuva faasi on kaasu. Näiden kahden suurin ero kuitenkin on näytteessä ja sen käsittelyssä. Kaasukromatografiassa näytteen komponentit ovat joko kaasuja tai höyrystyviä yhdisteitä, jotka eivät hajoa. HPLC:ssä näytteet on ensin liuotettava esimerkiksi metanoliin tai veteen. Näyte on tällöin myös kemiallisessa vuorovaikutuksessa liikkuvan faasin kanssa, jolloin näyteaineen ja liikkuvan faasin välille voi muodostua vetysidoksia, kun taas kaasukromatografiassa näyte ei juuri reagoi kantokaasun kanssa (Laboratorioanalyysit: Kaasukromatografia, [16.8.2012].)

HPLC:n toimintaperiaate on lyhykäisyydessään seuraavanlainen. Ajoliuos imetään pumppujen avulla laitteistoon. Liuos siirtyy pumppujen läpi näytteenottolaitteelle, jossa laite nappaa näytteen mukaansa näytepullosta neulan avulla. Tämän laitteen jälkeen näyte siirtyy ajoliuoksen mukana esikolonnille ja sen läpi kolonnille. Kolonni erottelee näytteen yhdisteet ja ne siirtyvät eri nopeuksilla detektoreille. Detektorit piirtävät nämä eri yhdisteet tietokoneohjelman avulla tietokoneen näytölle. Lopuksi ajoliuos näytteen kera kerääntyy jätepulloihin. Tämän tietokoneohjelman avulla pystytään kontrolloimaan koko prosessia, niin pumppujen virtausnopeutta kuin kolonniuunin ja detektorien asetuksien valvontaa. Kuvio 1 on periaatekuva HPLC-laitteistosta ja sen osista.



Kuvio 1. HPLC-laitteiston kaaviokuva.

Detektorit ovat laitteistossa se osa, jossa eri yhdisteet tunnistetaan. Detektoreita on monenlaisia ja tässä on muutamia esimerkkejä niistä ja niiden toiminnasta:

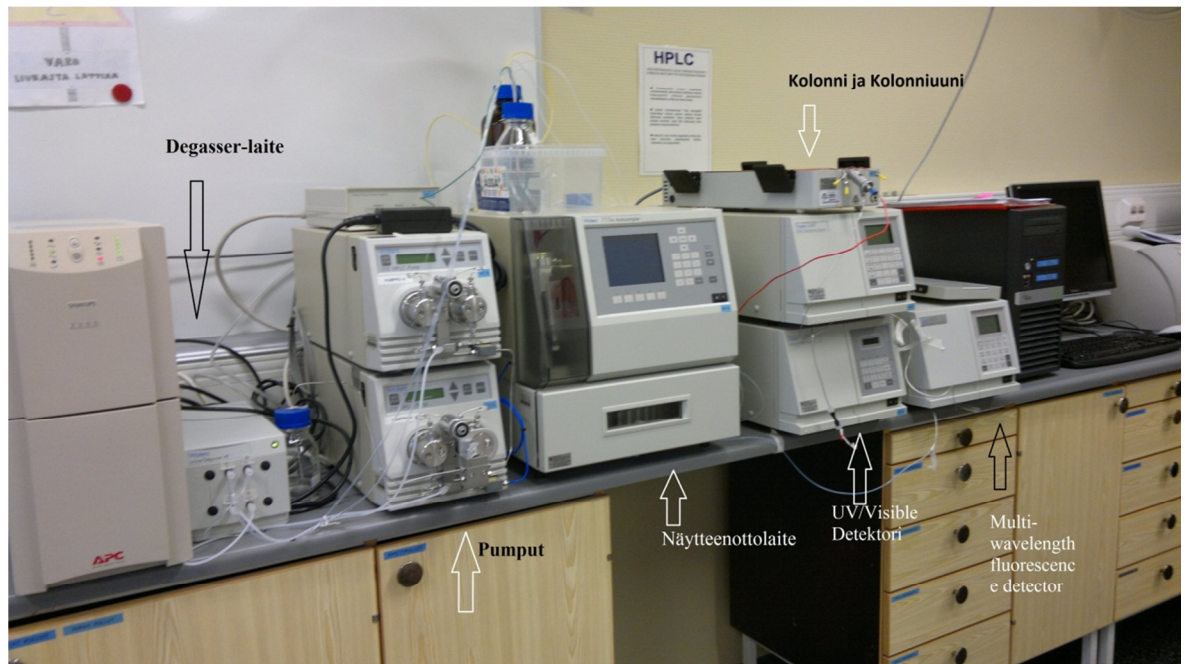
- UV/VIS eli UV/visible detector, jolla pystytään tunnistamaan happoja, UV/visible, toimii ultraviolettia valoa apunaan käyttäen säädetyllä valoalueella. Laitte tunnistaa eri yhdisteitä absorbanssin avulla, eli eri yhdisteet reagoivat ja absorboivat itseensä eri lailla valoa (2468 UV/Visible detector, [viitattu 16.8.2012].) Omien HPLC -ajojen aikana työssä käytettiin 210 nm:n aallonpituutta, mutta näitä aallonpituuksia on monia. Tätä aluetta voidaan säädellä tietokoneen avulla.
- RI, toimii refraktometriaa apunaan käyttäen. Tämä tarkoittaa, että tässä laitteessa pystytään tunnistamaan toisistaan sokeripitoiset yhdisteet, kuten sakkaridit ja sokerialkoholit. Refraktometria on yksikertaisuudessaan sitä, että yhdisteillä on eri valon taitekerroin verrattuna niiden konsentraatioon ja toisiinsa. Tämän taitekerroin eron avulla pystytään erottamaan toisistaan eri

yhdisteiden eri pitoisuudet (The refractive index detector, [viitattu 16.8.2012].)

- Multi-Wavelength Fluorescence Detektorin toiminta perustuu fluoresenssiin. Fluoresenssi perustuu reaktioon, jossa molekyylit absorboivat UV-valon vaikutuksesta fotonin, jonka ne lähettävät tietyn ajan kuluttua suuremmalla aallonpituudella, kuin sen vastaanottivat. Näin ollen, jos molekyyli vastaanottaa UV-valoa, se lähettää näkyvää valoa (Basic concepts in fluorescence, [viitattu 16.8.2012].)

2.2 Laitteisto

HPLC-laitteisto koostuu pumpuista, detektoreista, kolonnista, kolonniuunista, näytteenottolaitteesta ja tietokoneesta. HPLC-laitteistoilla on muutamia valmistajia kuten Waters ja Thermo scientific. Seinäjoen ammattikorkeakoulun kemian laboratorion laitteisto muodostuu Watersin valmistamista laitteista ja Bio-Radin valmistamista kolonnista.



Kuvio 2. Käytössä ollut HPLC-laitteisto.

Laitteistoon kuuluu myös lisäosana vikasuoja-akku, jonka tehtävä on pitää prosessi käynnissä sähkökatkon sattuessa. Suoja-akku näkyy kuviossa 2 vasemmalla.

Pumput tässä laitteessa ovat hyvin kestäviä, sillä niiden täytyy kehittää tarpeeksi suuri paine läpi koko laitteiston. Pumppujen yhteydessä saatetaan käyttää ilmakuplia poistavaa lisäosaa, sillä laitteisto on varsin herkkä ilmakuplille. Seinäjoen ammattikorkeakoulun kemian laboratorion laitteisto, jolla tämän opinnäytetyön testit tehtiin, sisältää tämän degasser-lisäosan.

Näytteenotto-laite on se osa, josta näytteet lähtevät analyysiin. Näytteet ovat pienissä lasipulloissa, joiden korkissa on membraani, jonka läpi neula työnnyty. Laitteelle on asetettu tietty määrä, kuinka paljon näytettä se ottaa. Laite voi myös esilämmittää näytteet, jos sille on tarvetta.

HPLC-laitteistossa voidaan myös käyttää esikolonnia. Sen tehtävänä on suojella varsinaista kolonnia mahdollisilta partikkeleilta, kuten liialta, näytteessä olleelta sakalta tai pölyltä. Esikolonnina käytettiin Bio-Radin 125-0129 Micro-Guard Cation H Refill Cartridge -esikolonnia. Kolonne ja kolonniuuni kuuluvat yhteen. Kolonne on

ulkonäöltään metallinen lieriö, jonka sisällä eri yhdisteet erottuvat toisistaan ja kulkevat eri nopeudella kolonnin lävitse. Kolonnin sisällä tapahtuu myös ioninvaihtoreaktioita. Työssä käytetyssä kolonnissa ioninvaihtohartsina toimi vety. (Guidelines of use and care... [viitattu 9.9.2012].) Kolonnina käytettiin Bio-Radin Aminex HPX-87H -kolonnia. Kolonni on kehitetty varta vasten happomäärityksiä varten, mutta sitä käytettiin tässä työssä myös samaan aikaan tehtyjen hiilihydraattimääritysten tekoon. Kolonniuunin tehtävänä on lähinnä lämmittää kolonnia tiettyyn lämpötilaan, jotta eri yhdisteiden erottuminen helpottuisi. Kolonnin jälkeen tulevat detektorit, joista kerrottiin jo aiemmassa luvussa. Käytössä olleessa laitteistossa on kolme detektoria, UV/VIS, RI ja fluorescence.

Tietokoneella on laitteiston ohjelma, ja sillä pystytään kontrolloimaan koko analyysiä. Ohjelmiston avulla laitteelle voidaan luoda ne asetukset, joilla tulosten halutaan tulevan. Sen avulla voidaan esimerkiksi säätää virtausnopeutta pumpuissa, näytteenottolaitteen näytteenottomäärää ja kolonniuunin lämpötilaa. Ohjelmisto piirtää jokaisesta analyysistä käyrästä, joita vertailemalla ja niistä laskemalla saadaan tulokset aikaan.

3 MENETELMÄN KEHITYS

3.1 Menetelmän tarkoitus

Menetelmän tarkoituksena oli luoda toimiva prosessi luotettavine tuloksineen. Prosessin luominen alkoi laskemalla standardien pitoisuuksia. Näitä säädeltiin pitkin prosessia, jotta saataisiin mahdollisimman optimimaaliset pitoisuudet vastaamaan näytteitä. Menetelmän suorituksen vertailukohtana oli Turun yliopiston biokemian ja elintarvikekemian laitos, vaikkakin he käyttävät kaasukromatografiaa sokereiden ja happojen mittaukseen.

3.2 Kehityksen kulku

Menetelmään haettiin esimerkkiä aiemmin tehdystä tieteellisestä artikkelista. M. Castellarin ja kumppaneiden yhteistyössä laatimassa artikkelissa tutkittiin myös orgaanisia happoja ja sokereita HPLC-menetelmän avulla ja samanlaisella kolonnilla, mutta tutkittavana materiaalina olivat viinirypäleet. Heidän artikkelistaan saatiin ideaksi kokeilla ajoliuoksena 0.005 M:n rikkihappoliuosta, jossa oli mukana 6 % asetonitriliä. (Chinnici ym., 2004). Toisena vertailukohtana oli E.O. Alexanderssonin ja kumppaneiden laatimassa tieteellisessä artikkelissa tutkittiin, jossa myös orgaanisia happoja ja sokereita HPLC-menetelmän avulla. Heidän artikkelissaan oli samankaltaisuuksia kuin Chinnicin ryhmällä, joskin he käyttivät työssään viinejä, kun taas Castellarin ryhmä tutki hedelmämehuja (Alexandersson ym., 2011.)

4 NÄYTTEEN KÄSITTELY

Prosessiin tarvittavat porkkananäytteet punnittiin siten, että jokaista näytettä punnittiin noin 1 (yksi) gramma. Punnitus suoritettiin tarkkuusvaa'alla ja näytteet punnittiin muovisille punnitusalustoille. Tässä työssä vaakana käytettiin Precisan XT220A-tarkkuusvaakaa. Punnituksen jälkeen näyte laitettiin korkillisiin muovisiin koeputkiin. Varsinaisia näytteitä oli kaksi. Näistä kahdesta näytteestä tehtiin kummastakin kaksi vertailunäytettä. Näytteet 186 C ja 134 C olivat pakkaskuivattuja ja jauhettuja jo valmiiksi, ja vaikka ne kummatkin olivat samankaltaisia, näyte 186 C oli sähköisempää kuin näyte 134 C. Kuviossa 3 nähdään näytteet pakkauksissaan.



Kuvio 3. Porkkananäytteet pusseissaan.

Näytteisiin lisättiin 25 millilitraa huoneenlämpöistä tislattua vettä, jonka jälkeen ne vortexoitiin, jolloin näytteeseen syntyi voimakas pyörre vortex-nimisellä laitteella ja näytteet laitettiin kolmeksi minuutiksi vesihauteeseen. Vesihauteen jälkeen näytteet vortexoitiin jälleen ja ne laitettiin ultraäänihauteeseen 15 minuutiksi. Tämän

jälkeen ne sentrifuugattiin. Näytteet olivat sentrifuugissa 15 minuuttia ja kierroksia oli 4000 minuutissa. Tämän vaiheen jälkeen näytteen neste otettiin talteen varovasti kaatamalla ja pipetin avulla (kuvio 4). Nämä vaiheet toistettiin kolme kertaa, mutta jokaisen kerran jälkeen lisättiin eri määrä tislattua vettä. Toista kertaa varten lisättiin 15 millilitraa vettä ja kolmatta 10 millilitraa. Näyteliuos kerättiin 50 millin mittapulloon, johon lisättiin hieman tislattua vettä pullon merkkiviivaan asti. Huomattavaa on kuitenkin, että eri vaiheissa lisättiin yhteensä 50 ml tislattua vettä, mutta jonkin verran vettä jäi näytesakan sekaan. Kuviossa 4 nähdään näyteliuokset mittapulloissaan.

Työssä mukana olleet perunanäytteet olivat myös pakkaskuivattuja ja ne olivat ulkonäöltään rakeisia. Ne käsiteltiin samalla tavalla kuin porkkananäytteet.

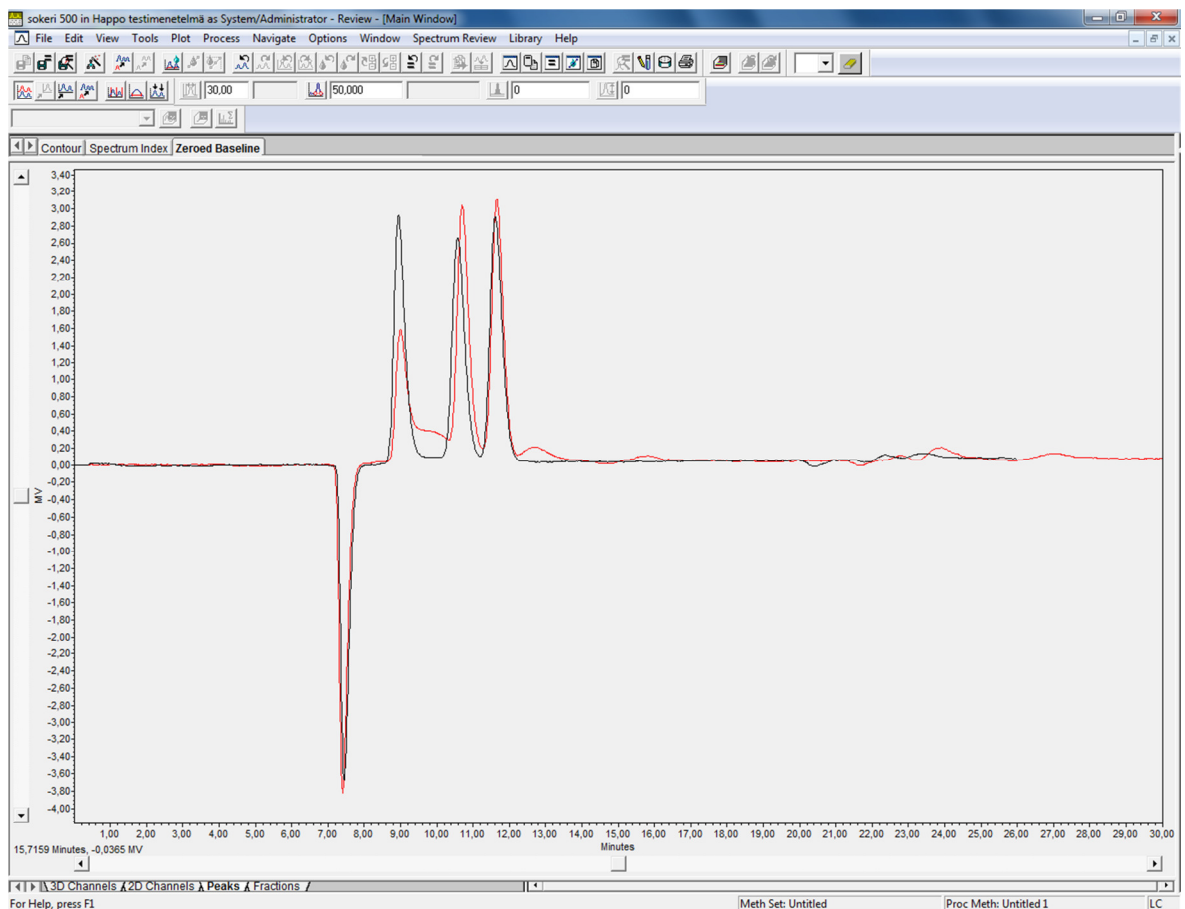


Kuvio 4. Valmiit porkkananäytteet mittapulloissa.

Ensimmäistä ajoa varten tehtiin standardiliuoksia, joiden vahvuus oli 1 g/100 ml. Sokereina olivat sakkaroosi, fruktoosi ja glukoosi, ja happoina olivat omenahappo ja sitruunahappo. Näytteet tehtiin ajopäivään nähden edellisenä päivänä ajan säästämiseksi, sillä ajoissa kuluu paljon aikaa näytettä ja standardia kohden.

HPLC-laitteisto oli laitettu lämpenemään edellisenä päivänä, jotta nähtiin, onko tällä vaikutusta tuloksiin. Näytteitä ajettiin 30 minuuttia näytettä kohden, jolloin koko ajo näytteineen ja standardeineen kesti noin 4 tuntia. Näytteet laitettiin pienissä lasipulloissa laitteeseen, ja jokaisessa pullossa oli noin 30 ml näytettä. Laite otti noin 10 millilitraa näytettä pulloa kohden prosessoitavaksi. Ajon aikana kolonniuunin lämpötilana oli 55 °C. Ajoliuksena käytettiin laimeaa rikkihappoliuosta, jossa oli asetonitriiliä.

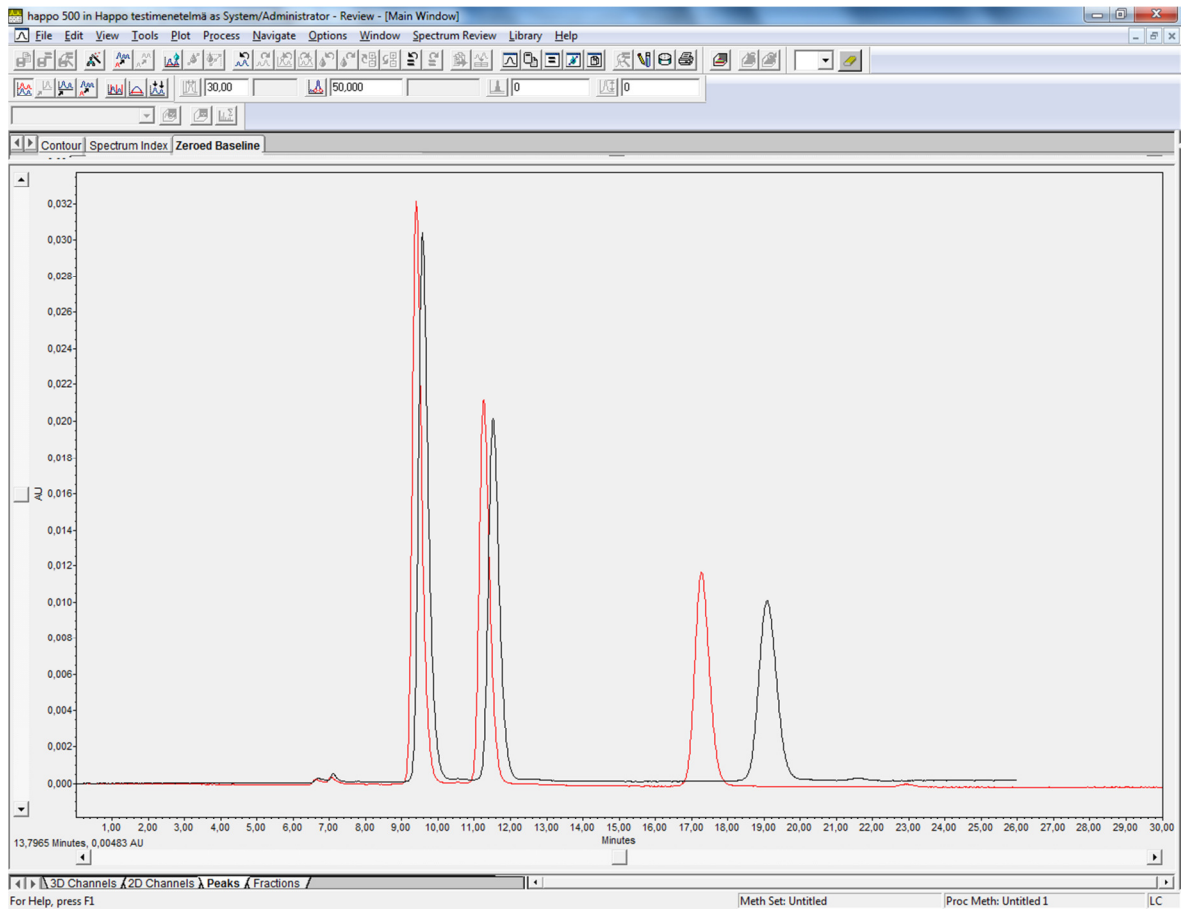
Asetonitriilin tarkoituksena oli helpottaa omenahapon ja fruktoosin erottumista piikkeissä, mutta se jätettiin pois, koska piikkien pohjaviivasta tuli sen ansiosta huono. Muilla ajokerroilla käytettiin 0,005 M rikkihappoliuosta. Ajoliuksesta on poistettu mahdolliset kaasukuplat ultraäänihauuteen avulla. Myös kolonniuunin lämpötilaa laskettiin uudemmissa ajoissa 30 °C:een, mikä näytti tuovan hyviä tuloksia ja myös ajonopeutta muutettiin erottumisen edistämiseksi.



Kuvio 5. 500 mg/l standardin sokeripiikit RI-detektorilla.

Kuviossa 5 näkyy kahden eri ajokerran RI-detektorin piirtämät 500 mg/l sokeripiikit päällekkäin eri väreinä. Punainen piikki on ajettu aikaisemmin ja musta vasta myöhemmin. Ensimmäisen ajon olosuhteet olivat seuraavat: virtausnopeutena käytettiin 0.5 ml/min, eluenttina (ajoliuoksena) käytettiin 0.005 M H₂SO₄ -liuosta ja kolonniuunin lämpötila oli 55 °C. Ainoana poikkeuksena toisella ajokerralla oli kolonniuunin lämpötila, joka muutettiin 30 °C:een. Kuvan ensimmäinen ylöspäin suuntautuva piikki on sakkaroosi, toinen glukoosi ja kolmas fruktoosi. Lämpötilan muutos vaikutti huomattavasti sakkaroosipiikin piirtymiseen ja pohjaviivan ulkonäköön.

Sakkaroosi on disakkaridi, joka muodostuu kahdesta sokerista, fruktoosista ja glukoosista, jotka ovat kiinnittyneet toisiinsa glykosididoksella. Korkeammassa lämpötilassa on saattanut käydä, että tämä glykosididos on reagoanut kolonnin hartsin kanssa ja näin ollen vaikuttanut sakkaroosipiikin piirtymiseen. (Alén, 2009)



Kuvio 6. 500 mg/l standardin happopiikit 210 nm:n aallonpituudessa UV/Visible Detektorilla

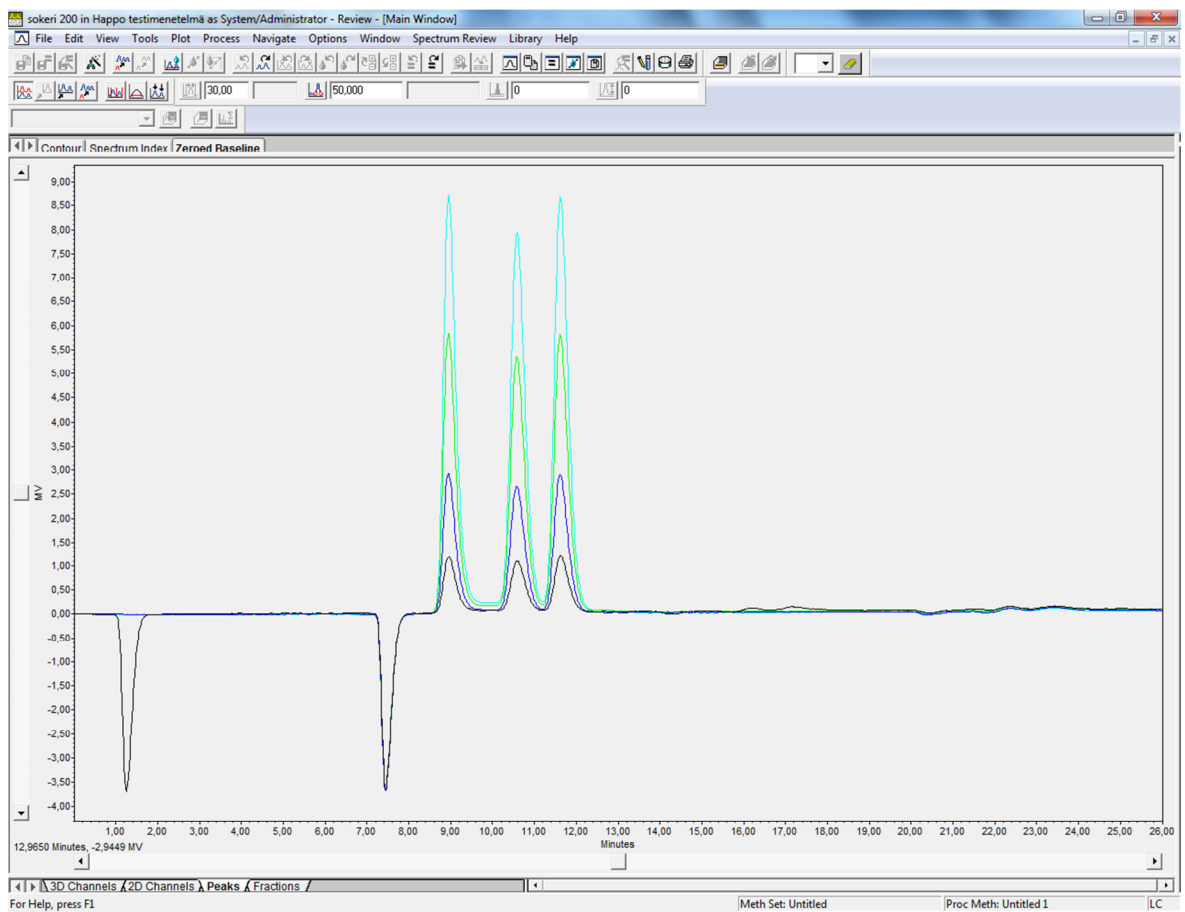
Kuviossa 6 on samojen ajokertojen happopiikit kuin edellisessä kuvassa olevat sokeripiikit. Kuvan ensimmäinen piikki on sitruunahappo ja toinen on omenahappo. Kolmatta piirtävää piikkiä ei tiedetä. Kolonniuunin lämpötilan lasku ei näennäisesti vaikuttanut happopiikkien piirtymiseen.

Ajoa varten näytteitä laimennettiin lisäämällä 1,5 millilitraan näytettä, 1,5 millilitraa tislattua vettä. Näyte jouduttiin suodattamaan, jotta siitä saatiin sakat erilleen. Suodatus suoritettiin ruiskun ja sen kärkeen laitettavan kertakäyttöisen mikro-suodattimen avulla. Laimennokset sokereille ja hapoille olivat seuraavat: 1:50, 1:20, 1:10, 1: 10/15 ja 1:5 sokereille, sokerit oli yhdistetty samaan standardiin, jotta jokaista ei tarvitsisi ajaa erikseen. Hapoille oli tehty sama, mutta niiden laimennokset olivat 1:100, 1:50, 1:20 ja 1:13,3.

Ajon jälkeen huomattiin, että standardit happojen kohdalla riittävät ainakin porkkanalle. Sokereiden kohdalla liuoksia tulisi laimentaa, sillä perunoihin nähden porkkanat sisälsivät enemmän sokereita. Näin tehtäessä ei tarvitsisi tehdä uusia standardeja.

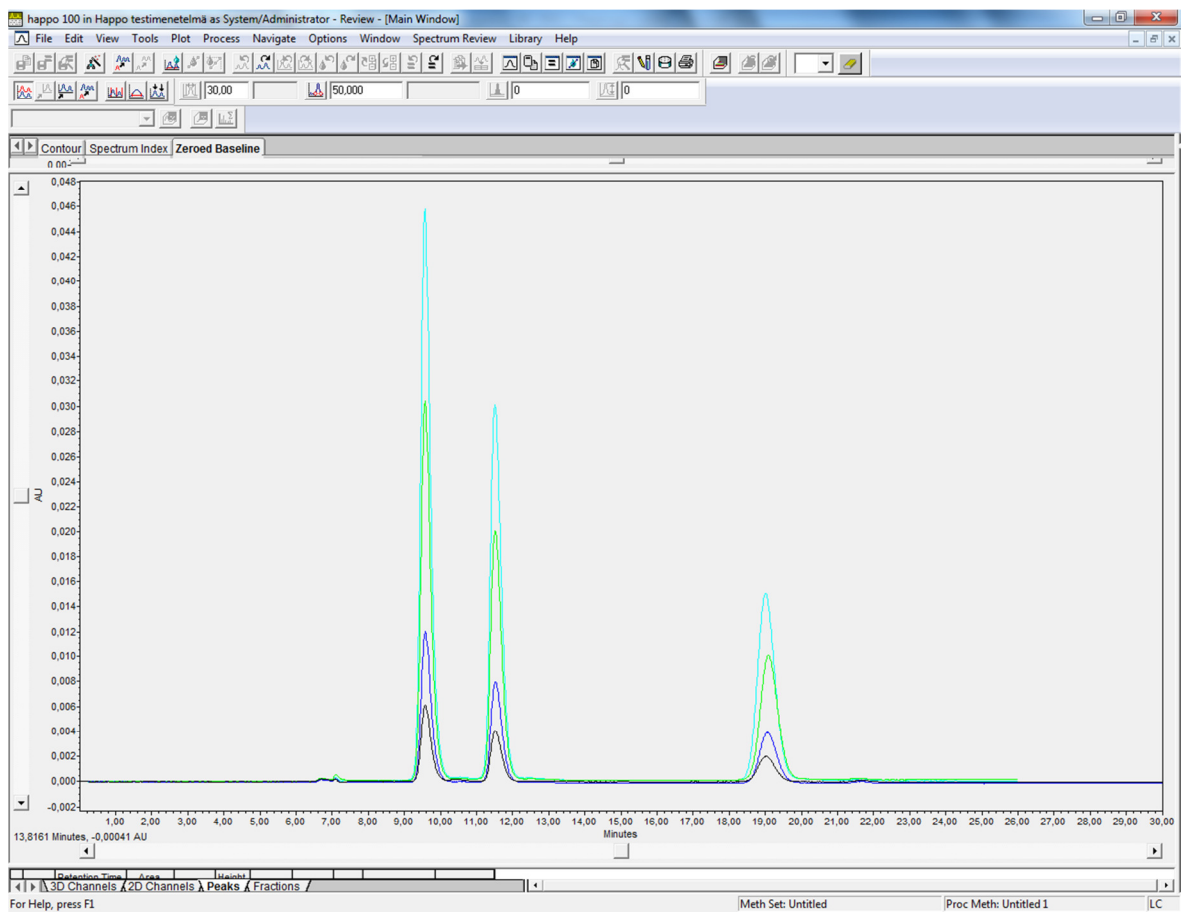
Samanlaiset käsittelyt tehtiin myös perunanäytteille, joita oli myös mukana. Niiden kohdalla sokeri- ja happostandardit olivat riittävät. Huomioitavaa oli, että perunanäytteissä oli paljon enemmän happoja kuin porkkana, mutta porkkananäytteet sisälsivät moninkertaisesti enemmän sokereita.

Näytteitä varten tehtiin uudet standardiliuokset, sillä aikaisemmat olivat riittämättömät ainakin sokereiden kohdalla. Uusissa standardiliuoksissa oli noin 1 g/100 ml jokaista sokeria ja happoa. Laimennoksina 100 mg/l, 200 mg/l, 500 mg/l, 750 mg/l hapoilla ja 200 mg/l, 500 mg/l, 1000 mg/l, 1500 mg/l ja 2000 mg/l sokereilla. Porkkanoilla nämäkään laimennokset eivät riittäneet, vaan niitä laimennettiin siten, että näytettä oli 0,5 ml ja tislattua vettä 1,5 ml. Tämä laimennos tehtiin suoraan HPLC-laitteiston näytepulloon.



Kuvio 7. 13.3 2012 tehdyn ajon sokeripiikit.

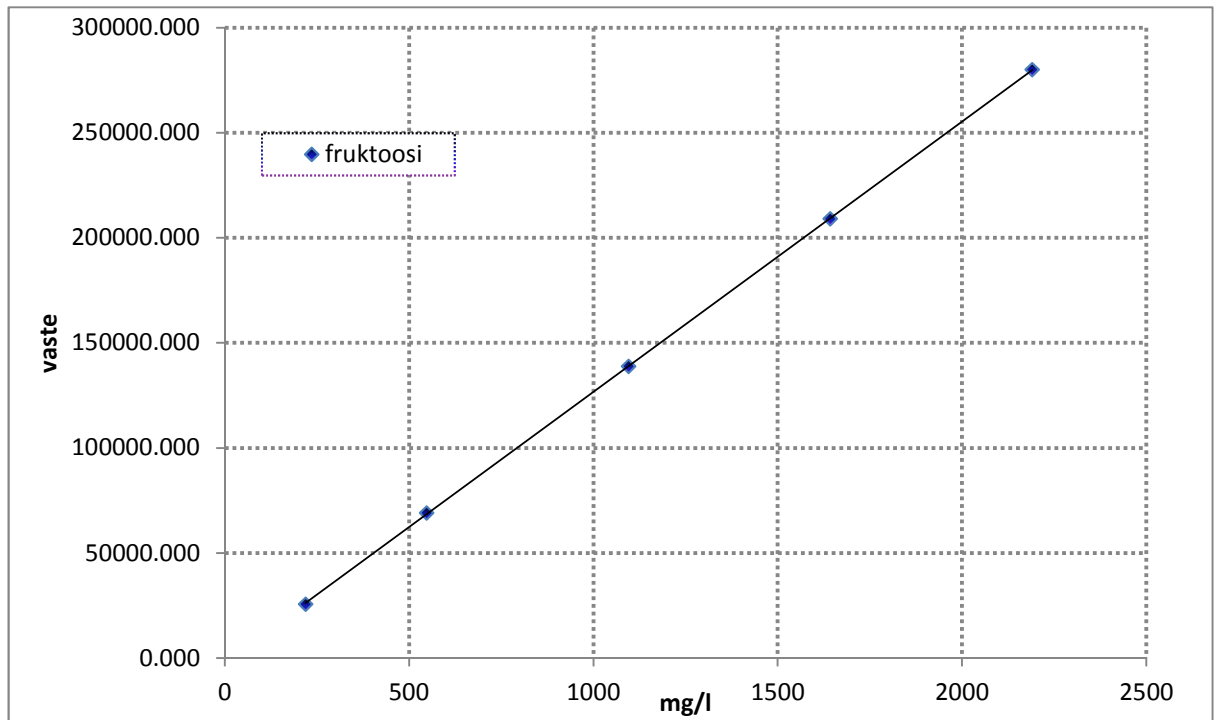
Kuvion 7 piikit ovat sakkaroosi, glukoosi ja fruktoosi mainitussa järjestyksessä. Niiden laimennokset ovat seuraavat 200, 500, 1000 ja 1500 mg/l. Ajokerralla tehtiin myös 2000 mg/l:n sokeristandardi, mutta se ei ehtinyt kyseiseen kuvaan. Ajo oli tuloin vielä kesken, kun kuva otettiin.



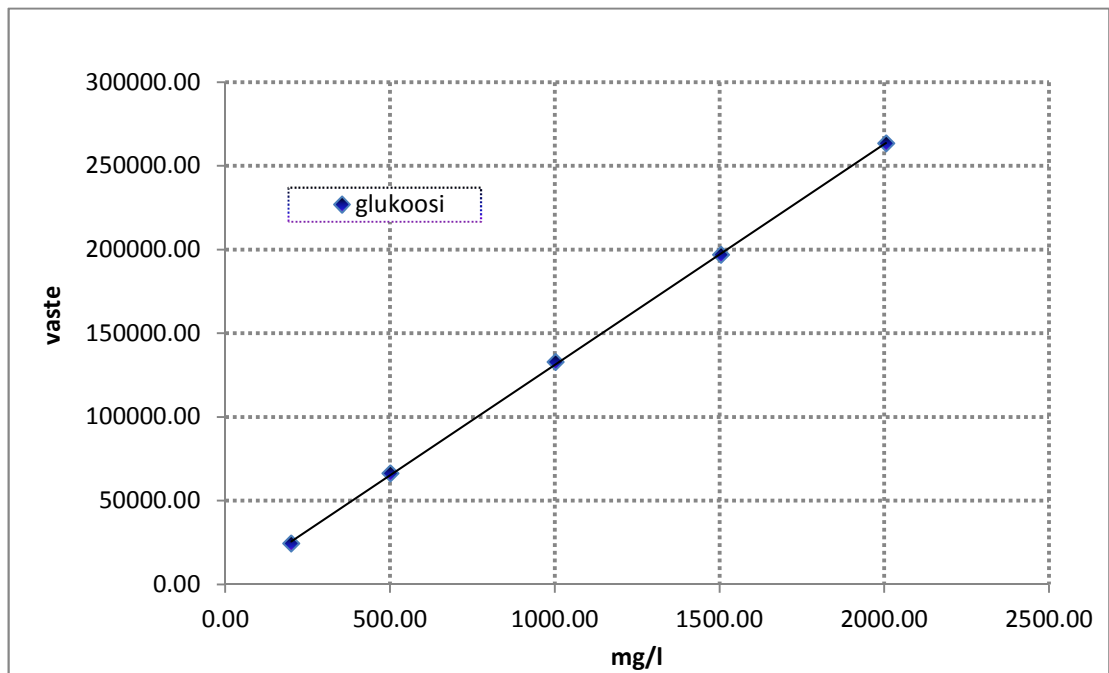
Kuvio 8. 13.3 2012 tehdyn ajon standardihapot.

Kuviossa 8 olevat hapot ovat sitruunahappo ja omenahappo. Kolmatta piikkiä ei tiedetä. Happojen laimennokset ovat 100, 200, 500 ja 750 mg/l. Kuviosta huomataan myös, kuinka hyvin hapot erkanivat toisistaan.

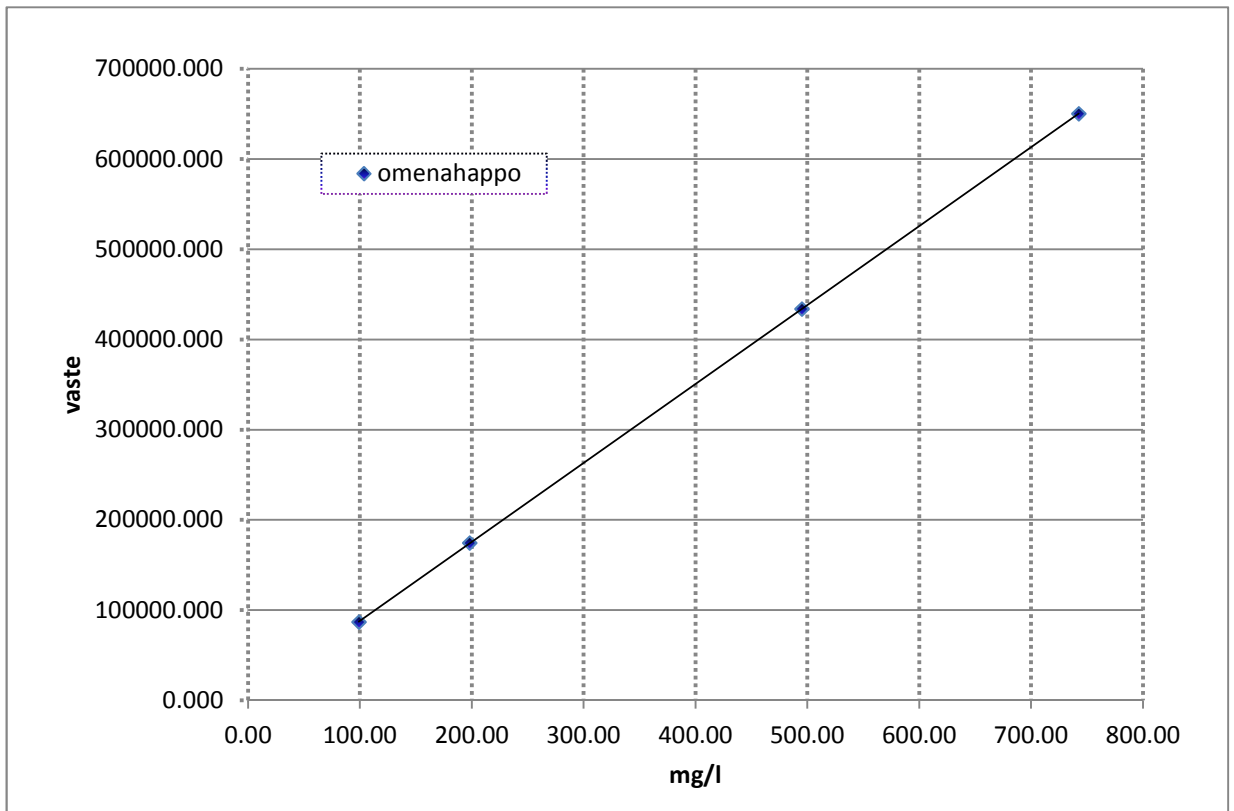
Seuraavilla sivuilla kuvioissa 9-13 nähdään kalibrintisuorat hapoille ja sokereille. Kalibrintisuorien avulla HPLC-laitteisto pystyy arvioimaan varsinaisten näytteiden happojen ja sokerien pitoisuus, vertaamalla niitä jo tiedettyjen kalibrintiliuoksien ainepitoisuuksiin. Ilman näitä kalibrointeja ei pystytä määrittämään näytteen tuntemattomia ainepitoisuuksia.



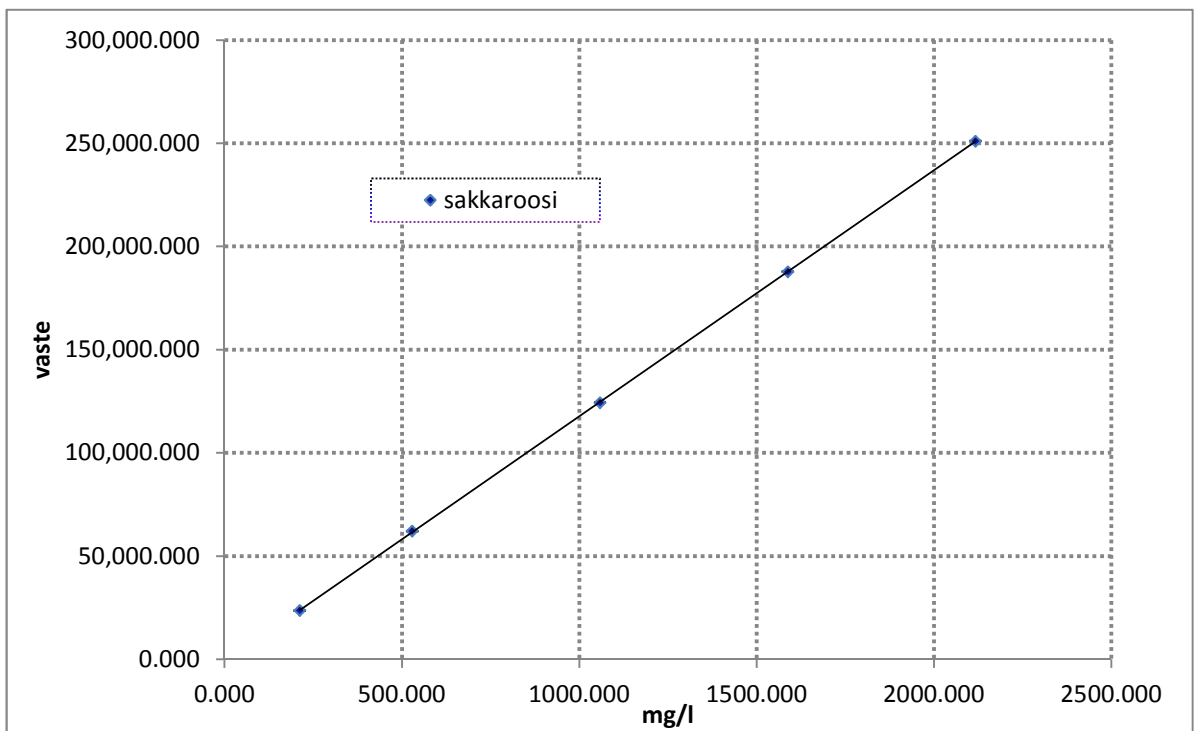
Kuvio 9. Fruktoosin kalibrintisuora



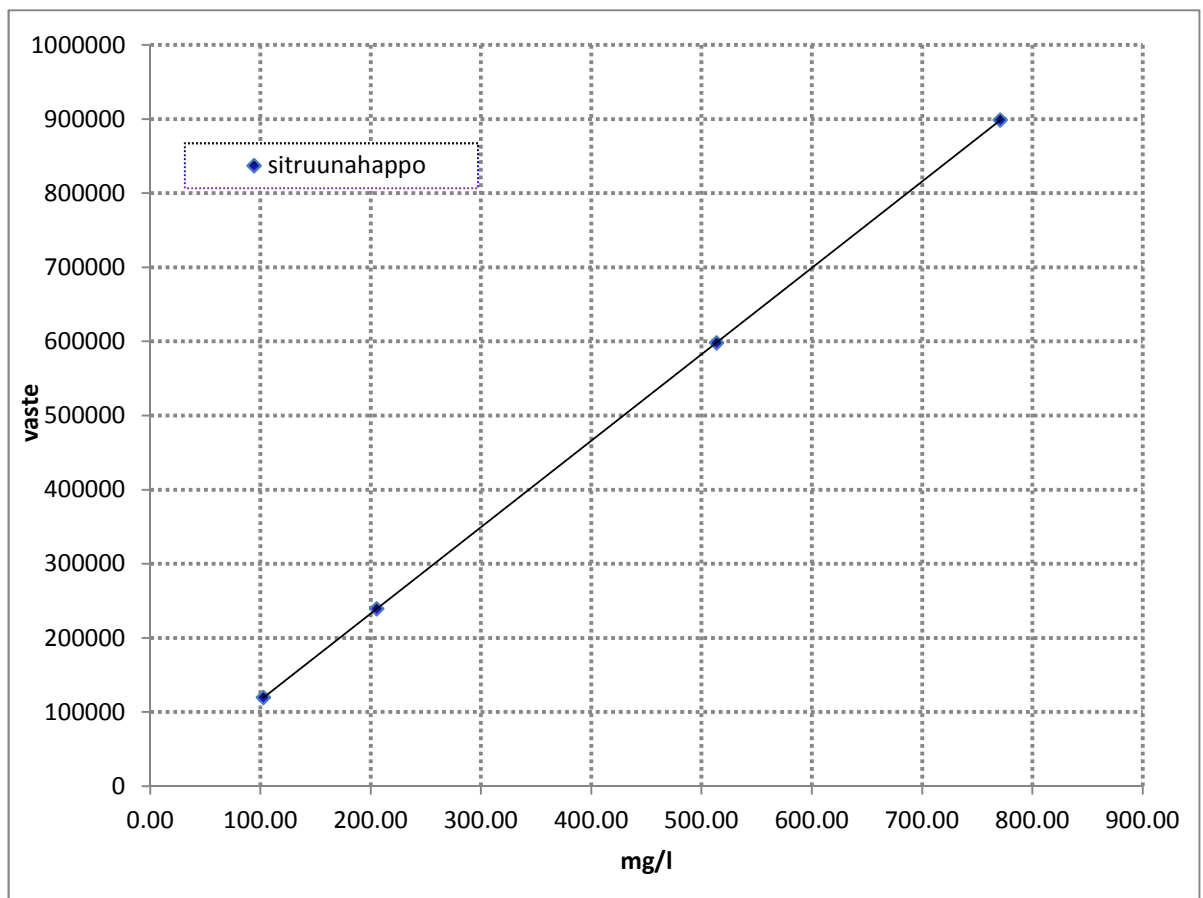
Kuvio 10. glukoosin kalibrintisuora



Kuvio 11. omenahapon kalibrintisuora



Kuvio 12. sakkaroosin kalibrintisuora



Kuvio 13. sitruunahapon kalibrintisuora

Kalibroinnin virherajoilla on tarkoitus näyttää, kuinka hyvin laitteiston antamat arvot vastaavat syötettyjä arvoja. Tässä tapauksessa kalibrintiliuksilla oli tunnetut vahvuudet: 200, 500, 1000 ja 1500 mg/l sokereilla ja 100, 200, 500 ja 750 mg/l hapoilla. Kalibrintisuorien pystyakselin vaste-arvo kertoo, kuinka suuren alan piikki on piirtänyt. Kalibrintisuorien arvoista tehtiin excel-ohjelman avulla vakiovirheen tarkastelu. Kesquivirheellä tarkoitetaan sitä, kuinka paljon viivan piste poikkeaa suoralta.

Taulukko 1. Kesquivirheet.

	kesquivirhe	R ²
Sakkaroosi	365.66	0.999988
glukoosi	1216.88	0.999880
fruktoosi	543.78	0.999979
omenahappo	510.91	0.999997
sitruunahappo	609.52	0.999998

Taulukosta 1 näkyy työssä käytettyjen standardien kesquivirheet. Siitä huomataan, että virhe on pienimmillään sakkaroosilla ja suurimmillaan glukoosilla. Tämä kuitenkin vain tarkoittaa, että suoran pisteet poikkeavat keskimäärin viivalta taulukon arvojen verran, mikä standardisuorien lukuihin verrattuna on varsin pientä ja vaikeasti huomattavaa. R²-arvo kertoo tuloksien tarkkuuden. Mitä lähempänä yhtä arvo on, sitä tarkempia tulokset ovat. Lukuina kesquivirheen arvot ovat varsin pieniä verrattuna vasteen arvoihin, ja poikkeamaan suoralta on vaikea huomata.

5 TULOKSET

Jotta HPLC-laitteesta saisi tuloksia, pitää piikit ensin integroida. Piikkien pinta-alaa pitää ensin verrata standardien pinta-aloihin, jotta laite osaisi laskea tulokset oikein. Koska näytteet haluttiin ilmoittaa g/100 g näytettä näytettä muodossa, tulokset oli laskettava itse. Alapuolisessa taulukossa on HPLC-laitteiston laskemat mg/l-arvot perunan hapoille. Jotta näistä arvoista saatiin g/100 g, jouduttiin laskemaan seuraavasti.

Taulukko 2. Perunan hapot mg/l

	1C	2C	3C	4C
Sitruunahappo	281.135	318.752	347.143	280.858
omenahappo	97.726	123.862	154.133	99.963
	mg/50ml			
Sitruunahappo	14.05675	15.9376	17.35715	14.0429
omenahappo	4.8863	6.1931	7.70665	4.99815

Ensin muunnettiin taulukon arvot mg/50 ml, sillä näyte liuotettiin 50 ml:aan tislattua vettä. Tästä saatiin arvot. Nämä arvot saatiin laskemalla seuraavasti. Taulukon 1 arvot jaettiin ensin 1000:lla ja tämän jälkeen vielä kerrottiin 50:lla. Kaavassa x merkitsee arvoa mg/l

$$Y = x \div 1000ml \times 50ml \quad (1)$$

Jokaista näytettä oli punnittu noin yksi gramma, mutta niiden tarkat arvot oli otettu ylös. Koska näytteet oli kuivattu, niiden paino oli myös pienentynyt tämän kuivauksen johdosta. Näytteet oli toimitettu työtä varten valmiiksi kuivattuina, joten tuorepainoa ei pystytty punnitsemaan näytteestä. Näytepakkauksissa oli ilmoitettu tuorepaino, minkä ansiosta pystyttiin laskemaan kuinka paljon 1 g kuivattua näytettä oli tuoreena. Alla olevassa taulukossa on laskettu perunanäytteiden tuorepainot käyttäen tarkkoja kuivapainoja.

Taulukko 3. Perunan näytepainot

	1C	2C	3C	4C
näytteen kuivapaino g	1.0029	1.005	1.0996	1.0006
1g kuiva = g tuore	4.3898	4.4072	4.5249	4.562
kuivamateriaali. %	22.78008	22.69014	22.09994	21.92021
tuorepaino g	4.40253	4.429236	4.97558	4.564737

$$Kuivamateriaali = \frac{1}{g \text{ tuore arvo}} \times 100 \quad (2)$$

$$Tuorepaino (g) = \frac{\text{Näytteen kuivapaino g}}{\text{kuivamateriaali \%}} \div 100 \quad (3)$$

Tuorepaino on saatu jakamalla näytteen kuivapaino, kuivamateriaalin määrällä ja sen jälkeen jakamalla 100:lla. Kuivamateriaalin % -osuus on saatu jakamalla 1 1g= g tuoreena arvolla, jonka jälkeen se on vielä kerrottu 100:lla. Tämä on havainnollistettu kaavassa 3

$$Y = \frac{\text{mg}/50 \text{ ml}}{\text{tuorepaino g}} \div 100g \div 1000g \quad (4)$$

Jotta tuorepainosta saadaan mg/g arvo, pitää se ensin jakaa tuorepainon arvolla. Tästä mg/g arvosta saadaan mg/100g, jakamalla se 100:lla. Jotta saataisiin haluttu g/100g arvo, pitää mg/100g arvot vielä jakaa 1000:lla. Alla olevassa taulukossa 4 nähdään perunalle saadut happojen mg/g ja g/100g arvot.

Taulukko 4. Perunan mg/g arvot

	1C	2C	3C	4C
Sitruunahappo	3.19288	3.598273	3.488468	3.076387
omenahappo	1.109884	1.398232	1.548895	1.094948
	g/100g(tuore)			
Sitruunahappo	0.319288	0.359827	0.348847	0.307639
Omenahappo	0.110988	0.139823	0.154889	0.109495

Taulukko 5. Perunan sokereiden arvot mg/l.

	1C	2C	3C	4C
Sakkaroosi	322.72	352.746	339.091	324.889
Glukoosi	296.344	337.898	480.686	246.091
Fruktoosi	314.633	399.113	555.334	316.668
	g/100g tuoreena arvot			
Sakkaroosi	0.366516	0.398202	0.340755	0.355868
Glukoosi	0.336561	0.381441	0.483045	0.269557
Fruktoosi	0.357332	0.450544	0.55806	0.346863

Samalla tavalla lasketaan myös arvot näytteiden sisältämille sokereille. Yläpuolisessa taulukossa 5 on perunan sokereiden mg/l ja g/100g arvot. Porkkanan kohdalla tehtiin samat laskelmat kuin perunan, mutta porkkana ei sisältänyt sitruunahappoa ja näytteitä piti laimentaa, jotta sokerimäärät saataisiin standardien rajoihin. Taulukossa 6 nähdään porkkanan sokereiden arvot laimennettuna ja laimentamattomina

Taulukko 6. Porkkanan laimennetut sokeriarvot mg/l.

	134C/1	186C/2
sakkaroosi	1138.215	1307.287
Glukoosi	630.427	325.344
Fruktoosi	649.901	396.217
	mg/l (laimentamaton)	
Sakkaroosi	4779.567	5321.104
Glukoosi	2611.192	1354.418
Fruktoosi	2614.062	1545.887

Laskelmat on tehty laimentamattomista arvoista, jotta näytteen sisältämä sokerin kokonaismäärä saataisiin esille. Laimennetut näytteet tulisi kertoa neljällä, jotta niitä pystyisi vertaamaan laimentamattomien näytteiden kanssa. Taulukossa 7 on laskettuna porkkananäytteiden painot. Ne on laskettu samalla tavalla kuin aikaisemmin lasketut perunan näytepainot.

Taulukko 7. Porkkanan näytepainot.

	134C/2	186C/1
näytteen kuivapaino g	0.9771	0.9606
1g kuiva = g tuore	15.150	15.801
kuivamateriaali. %	6.60066	6.328713
tuorepaino g	14.80307	15.17844

Taulukko 8. Porkkanan mg/g sokeriarvot.

	134C/2	186C/1
Sakkaroosi	16.24359	17.91263
Glukoosi	8.874262	4.559427
Fruktoosi	8.884015	5.203976
	g/100g (tuore)	
Sakkaroosi	1.624359	1.791263
Glukoosi	0.887426	0.455943
Fruktoosi	0.888402	0.520398

Taulukossa 8 nähdään porkkananäytteiden sokeriarvot mg/g ja g/100g. Porkkana-näytteille ei saatu sitruunahappopiikkiä, joten se on jätetty pois taulukoita tehtäessä. Liitteissä olevissa HPLC-laitteen antamissa näytekorteissa sitruunahappo näkyy porkkanan hapoissa, mutta sille ei piirtynyt piikkiä, eikä sille näin ollen ole arvoja. Taulukossa 9 on vielä lopuksi porkkanan happojen arvot. Sitruunahapon olisi voinut saada näkyville, muuttamalla punnittua näytemäärää suuremmaksi.

Taulukko 9. porkkanan happoarvot mg/l.

	134C/2	186C/1
Omenahappo	498.095	645.351
	g/100g (tuore)	
Omenahappo	0.16928	0.217247

5.1 Laskelma omenahapon ja fruktoosin erottamiseksi

Omenahapon ja fruktoosin erottamiseen voisi tietysti yrittää käyttää yhtälön ratkaisua, koska työssä käytettiin kahta eri detektoria samaan aikaan ja niille on kaksi eri arvoa. Tuntemattomina arvoina tässä yhtälön laskussa olisivat fruktoosi ja omenahappo, joita voisi merkitä x :llä ja y :llä. Koska kummatkin detektorit antavat eri arvot, voitaisiin näiden arvojen olettaa olevan fruktoosin ja omenahapon yhteen sulautumia. RI-detektori antaa arvon 314,633 mg/l ja UV/Visible-detektori antaa arvon 97,726 mg/l. Näin saataisiin yhtälönratkaisukaava seuraavaan muotoon.

$$\begin{cases} x + y = 97,726 \text{ mg/l} \\ x + y = 314,633 \text{ mg/l} \end{cases} \quad (5)$$

Kaavassa on kaksi tuntematonta, omenahappo, y ja fruktoosi, x . Tästä yhtälöstä ratkaistaan ylempi yhtälö y :n suhteen, josta saadaan seuraavanlainen yhtälö.

$$Y = x - 97,726 \text{ mg/l} \quad (6)$$

Yhtälössä y on kerrottu omalla itseisarvolla, jotta siitä saataisiin positiivinen luku. Tämä yhtälö liitetään aiemman yhtälöparin alempaan yhtälöön y :n paikalle, josta saadaan seuraavanlainen yhtälö.

$$x + x - 97,726 \text{ mg/l} = 314,633 \text{ mg/l} \quad (7)$$

Tästä yhtälöstä saadaan ratkaistuksi x :n arvo, joka on 206,1795 mg/l. Tuo arvo sijoitetaan y :n yhtälöön x :n paikalle ja y :lle saadaan arvo 108,4535 mg/l. Näin ollen omenahapolle on saatu arvo 108,4535 mg/l ja fruktoosille 206,1795 mg/l. Nämä arvot ovat perunan 1C arvoja. Otetut arvot on jo integroitu ja sillä saattaa olla vaikutusta tulokseen. Integroimattomia tuloksia ei ollut saatavilla näitä laskuja laskettaessa.

5.2 Vertailu

Vertailun tarkoituksena on tutkia Turun yliopiston biokemian ja elintarvikekemian laitoksella kaasukromatografialla samoista näytteistä tehdyt tulokset. Huomattavaa

kuitenkin on, että Turun yliopiston tuloksissa varsinkin porkkananäytteet on katsottu porkkanakeittonäytteinä, jossa näytteestä puolet on oletettu olevan vettä. Jotta näytteistä saatiin selville porkkanan määrä, tulokset kerrottiin kahdella. Näytteissä on myös käytetty korjauskertoimia ja poikkeuksena on, että näytteitä punnitessa niitä on punnittu 2 g.

Taulukko 10. Turku, perunan sokerit ja hapot mg/g.

	1C	2C	3C	4C
Sakkarooosi	3.5940	3.7486	3.1462	3.6138
glukoosi	2.6773	3.0564	4.2209	2.7796
fruktoosi	1.1801	1.5198	1.9108	1.3638
Sitruunahappo	4.1689	4.7466	4.7446	3.9442
omenahappo	0.9248	1.1622	1.3156	0.9793

Vertailun vuoksi otetaan samoista näytteistä tehdyt omat tulokset mg/g- arvoina.

Taulukko 11. omat perunanäytteet, sokerit ja hapot mg/g.

	1C	2C	3C	4C
sakkarooosi	3.665165	3.982019	3.407552	3.558682
glukoosi	3.36561	3.814405	4.830452	2.695566
fruktoosi	3.57332	4.505438	5.580596	3.468633
sitruunahappo	3.19288	3.598273	3.488468	3.076387
omenahappo	1.109884	1.398232	1.548895	1.094948

Taulukoista huomataan, että perunanäytteissä Turun yliopiston ja omien välillä on pienimmillään sokereilla noin 0,07 mg/g ja suurimmillaan noin 3,78 mg/g. Happojen kohdalla tuon eron vaihteluväli on pienempi sillä suurimmillaan ero on 1,25 mg/g ja pienimmillään noin 0,11 mg/g. Tuo ero on saattanut syntyä, koska tulokset on saatu eri laitteilla ja eri menetelmillä. Eron voi myös tuoda korjauskertoimien käyttö. Korjauskertoimilla korjataan laitteiston systemaattista virhettä, joka on saa-

tu selville useilla toistoilla. Vaikka omissa tuloksissa ei ole korjauskertoimia, on ensin selvitettävä, onko niille tarvetta. Tämä kuitenkin vaatisi useita toistoja ja vertailua tulosten välillä. Eroavaisuuden voi myös tuottaa fakta, että työssä käytetty kolonni on iältään varsin vanha. Kolonnilla on ikää jo noin kymmenen vuotta ja sillä on tehty monia ajoja. Tämä on saattanut kuluttaa kolonnia ja näin ollen sillä saattaa olla vaikutusta tuloksiin. Porkkananäytteitä oli hieman vaikeampi vertailla, muttei mahdotonta. Seuraavassa taulukossa 12 on Turun yliopiston tulokset.

Taulukko 12. Turku, Porkkanan sokerit ja hapot mg/g.

	134C	186C
Sakkarooosi	45.9953	46.5116
Glukoosi	14.1387	6.264
Fruktoosi	12.5051	4.7173
Sitruunahappo	0.2439	0.4698
Omenahappo	2.3505	3.1305

Vertailun vuoksi seuraava taulukko 13 näyttää omat porkkana tulokset mg/g arvoina.

Taulukko 13. Omat porkkananäytteet sokerit ja hapot mg/g.

	134C/2	186C/1
sakkarooosi	32.48718	35.8252
glukoosi	17.74852	9.1189
fruktoosi	17.76803	10.4080
Omenahappo	3.3856	4.3449

Porkkananäytteissä ero sokereiden kohdalla oli suurimmillaan noin 13,5 mg/g ja pienimmillään noin 2,8 5mg/g. Ero suurimman ja pienimmän arvon välillä näyttää olevan varsin suuri. Tuohon eroon saattaa syynä olla varsin moni asia, ja suurimmaksi osaksi ero saattaa tulla laitteistosta ja eri menetelmästä. Ero saattaa myös syntyä siitä, että näytteitä on Turun yliopistolla punnittu 2 g ja omissa punnituksissa vain 1 g. Omenahapon kohdalla ero oli vain noin 1–2 mg/g luokkaa. Sokeritu-

lokset ovat varsin suurehkoja verrattuna happoihin, mutta kuten aikaisemmin mainittiin, porkkananäytteet sisälsivät paljon enemmän sokereita kuin happoja. Turun yliopiston tuloksissa näkyi sitruunahappo, jolle omissa näytteissä saatu aikaan tulosta. Turun yliopisto oli kuitenkin punninnut enemmän näytettä, ja tämä ilmeisesti oli vaikuttanut sitruunahapon tuloksen saamiseen. Sitruunahapon tuloksia ei pystytty vertailemaan juuri tämän vuoksi.

6 JOHTOPÄÄTÖKSIÄ

Työ vastasi varsin hyvin tavoitteisiinsa, vaikka tulokset Turun yliopiston kanssa poikkesivatkin jokin verran. Laitteistolle saatiin aikaan uusi prosessin kulku, joka toimi varsin hyvin, ja työohje saatiin aikaiseksi ja toimivaksi. Työtä kuitenkin pitäisi vielä jatkaa, jotta se muuttuisi rutiinimaiseksi. Näin saataisiin virheiden osuus pienemmäksi ja toistojen määrä kasvaisi. Näistä toistoista pystyttäisiin saamaan aikaiseksi korjauskertoimia ja mahdollisesti myös nähtäisiin, mistä eroavaisuudet Turun yliopiston tuloksien kanssa tulevat.

Toisena tavoitteena tässä työssä ollut sokereiden ja happojen pitoisuuksien määrittäminen toimi varsin hyvin. Kuitenkin pitäisi vielä nähdä, kuinka omenahapon ja fruktoosin saisi eroamaan toisistaan. Työssä käytettiin asetonitriliä, mutta se sai vain aikaiseksi epäsiistin taustaviivan. Asetonitrili on myös varsin kallista ja myrkyllistä. Toisien aineiden mahdollisuutta on vielä tutkittava paremmin. Porkkanoiden kohdalla ei saatu sitruunahappoa erottumaan, mutta sen voisi saada, jos punnittua näytemäärää nostettaisiin.

Työssä olisi voinut käyttää useampiakin kolonneja, jotta esimerkiksi sakkaroosi olisi erottunut paremmin. Vaikka kolonni rakenteensa vuoksi ei soveltunut sakkaroosille huomattiin, että lämpötilaa laskemalla se saatiin erottumaan paremmin. Toisaalta yhtä kolonnia käyttämällä säästyi aikaa ja materiaaleja, koska kun pystyi tekemään kaiken kerralla. Muitakin kolonnivaihtoehtoja tarkasteltiin työtä varten, vaihtoehtona voisi olla työssä käytetty kolonni, Aminex HPX-87H, joka on happokolonni ja sen rinnalla voisi käyttää Aminex HPX-87P:a, joka on hiilihydraattikolonni. Näin pystyttäisiin saamaan tarkempia erotuksia. Tämä kuitenkin aiheuttaa sen, että ajot on tehtävä kahteen eri otteeseen, joiden välillä kolonni vaihdetaan. Vaihdaminen pidentää kokonaisprosessiaikaa, ja happo- ja hiilihydraattimääritykset tehtäisiin omina määrityksinään.

Omenahapon ja fruktoosin erottamiseksi mietitty laskukaava on vielä liian yksinkertainen ja sitä pitäisi jatkaa, jotta nähtäisiin, kuinka paljon laskukaavan avulla saadut tulokset poikkeavat, ilman sitä lasketuista tuloksista. Turun yliopiston tuloksiin verrattuna fruktoosin arvo näyttäisi hyvältä, mutta omenahappoa tulisi vielä

enemmän. Integroinnin osuutta pitäisi vielä tarkastella enemmän ja se on varmaankin aiheuttanut virhettä laskukaavaa käytettäessä. Laskukaava on kuitenkin vain esimerkkinä tavoista, kuinka omenahapon ja fruktoosin saisi tuottamaan parempia tuloksia.

LÄHTEET

- 2414 Refractive index detector. Ei päiväystä. [Verkkosivu]. Waters. [Viitattu 16.8.2012]. Saatavana: http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en_US&cid=514425
- 2468 UV/Visible detector. Ei päiväystä. [Verkkosivu]. Waters. [Viitattu 16.8.2012]. Saatavana: http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en_US&cid=515198
- 2475 Multi-Wavelength fluorescence detector. Ei päiväystä. [Verkkosivu]. Waters. [Viitattu 16.8.2010]. Saatavana: http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en_US&cid=514434
- Alén, R. 2009. Kokoelma orgaanisia yhdisteitä: ominaisuudet ja käyttökohteet. Helsinki: Gummerus
- Alexandersson, E., Eyéghé-Bickong, H., Gouws, L., Young, P., Vivier, M. 2011. Optimisation of an HPLC method for the simultaneous quantification of the major sugars and organic acids in grapevine berries. *Journal of Chromatography B* (2012). 43–49.
- Basic concepts in fluorescence. Ei päiväystä [Verkkosivu]. Michael W. Davidson. [Viitattu 16.8.2012]. Saatavana: <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html>
- Chinnici, F., Spinabelli, U., Riponi, C., Amati, A. 2004. Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis* 18 (2005). 121–130
- Guidelines of use and care of aminex resin-based columns: instruction manual. Ei päiväystä. [Verkkosivu]. Bio-rad. [Viitattu 9.9.2012]. Saatavana: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT42D.PDF>
- Kazakevich, Y. LoBrutto, R. 2006. HPLC for pharmaceutical scientists. New Jersey: Wiley&Sons
- Kromatografiset menetelmät. Ei päiväystä. [Verkkosivu]. Orgaanisen kemian verkosto. [Viitattu 16.8.2012]. Saatavana: <http://virtuaali.tkk.fi/fi/orgaaninenkemialabraopas/metodit/karakterisointi/kromatografiset.htm>
- Laboratorioanalyysit: Kaasukromatografia. Ei päiväystä. [Verkkosivu]. Opetushallitus. [Viitattu 16.8.2012]. Saatavana:

http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_2-5_kaasukromatografia.html

Laboratorioanalyysit: Ohutlevykromatografia. Ei päiväystä. [Verkkosivu]. Opetushallitus, [Viitattu 16.8.2012]. Saatavana:

http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_2-4_ohutlevykromatografia.html

Orgaanisen kemian kromatografiset menetelmät. Ei päiväystä. [Verkkosivu]. Satu Mikkola. [Viitattu 28.09.2012]. Saatavana:

<http://users.utu.fi/satkuu/KEMI5147/monistec.pdf>

LIITTEET

Liite 1. Perunan hapot

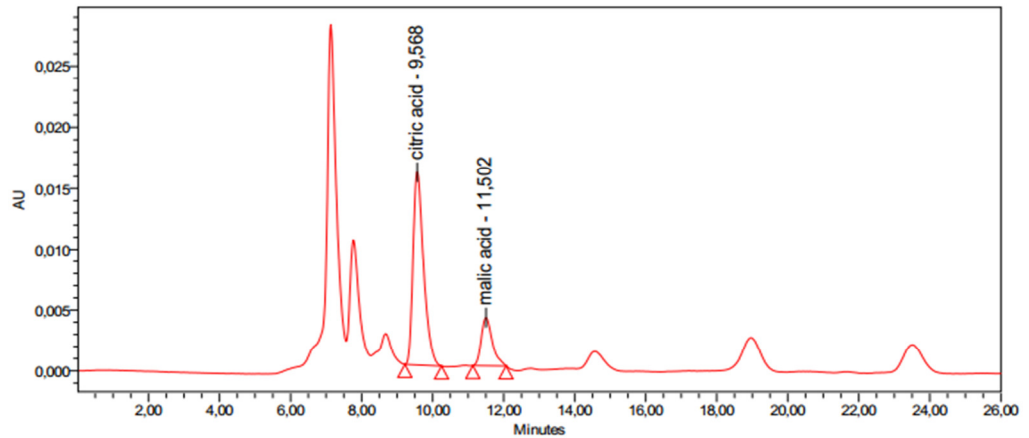
Empower[™] 3
SOFTWARE

Untitled

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	C1	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	testing 130312
Vial:	14	Acq. Method Set:	Happo_sokeritestaus 120312
Injection #:	1	Processing Method:	Prosessointi 150312 happo
Injection Volume:	10,00 ul	Channel Name:	2487Channel 1
Run Time:	26,0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2487Channel 1
Date Acquired:	13.03.2012 15:46:11 EET		
Date Processed:	15.03.2012 10:50:56 EET		

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	citric acid	9,568	327547	15880	281,135	
2	malic acid	11,502	86014	3967	97,726	

Reported by User: System
Report Method: Untitled
Report Method ID: 125
Page: 1 of 1

Project Name: Happo testimenetelmä
Date Printed:
10.05.2012
10:28:59 Europe/Helsinki

Liite 2. Perunan sokeri

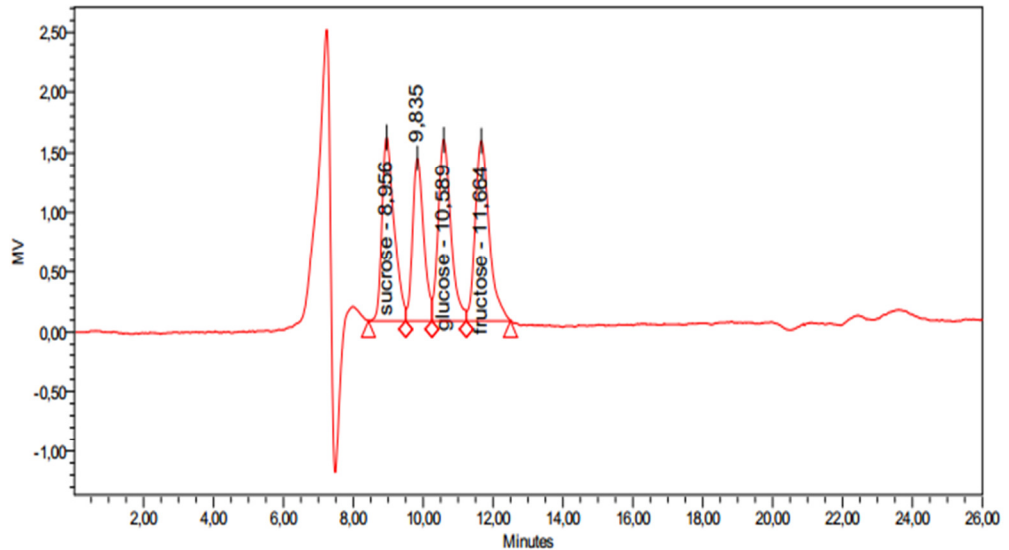
Empower[®] 3
SOFTWARE

Untitled

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	C1	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	testing 130312
Vial:	14	Acq. Method Set:	Happo_sokeritestaus 120312
Injection #:	1	Processing Method:	Prosessointi 140312_2
Injection Volume:	10,00 ul	Channel Name:	410
Run Time:	26,0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	410
Date Acquired:	13.03.2012 15:46:11 EET		
Date Processed:	14.03.2012 15:24:57 EET		

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	sucrose	8,956	37058	1539	322,720	
2		9,835	29939	1361		
3	glucose	10,589	38294	1518	296,344	
4	fructose	11,664	41908	1507	341,633	

Reported by User: System
Report Method: Untitled

Project Name: Happo testimenetelmä
Date Printed:

Liite 3. Porkkanan 134C sokerit

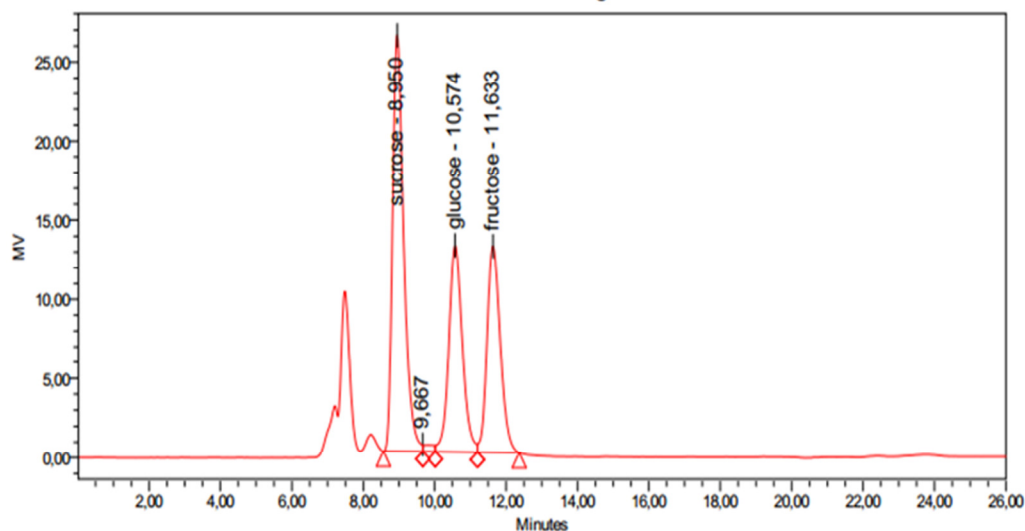
Empower³
SOFTWARE

Untitled

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	134C/2	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	testing 130312
Vial:	19	Acq. Method Set:	Happo_sokeritestaus 120312
Injection #:	1	Processing Method:	Prosessointi 140312_2
Injection Volume:	10,00 ul	Channel Name:	410
Run Time:	26,0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	410
Date Acquired:	13.03.2012 18:02:13 EET		
Date Processed:	14.03.2012 15:43:15 EET		

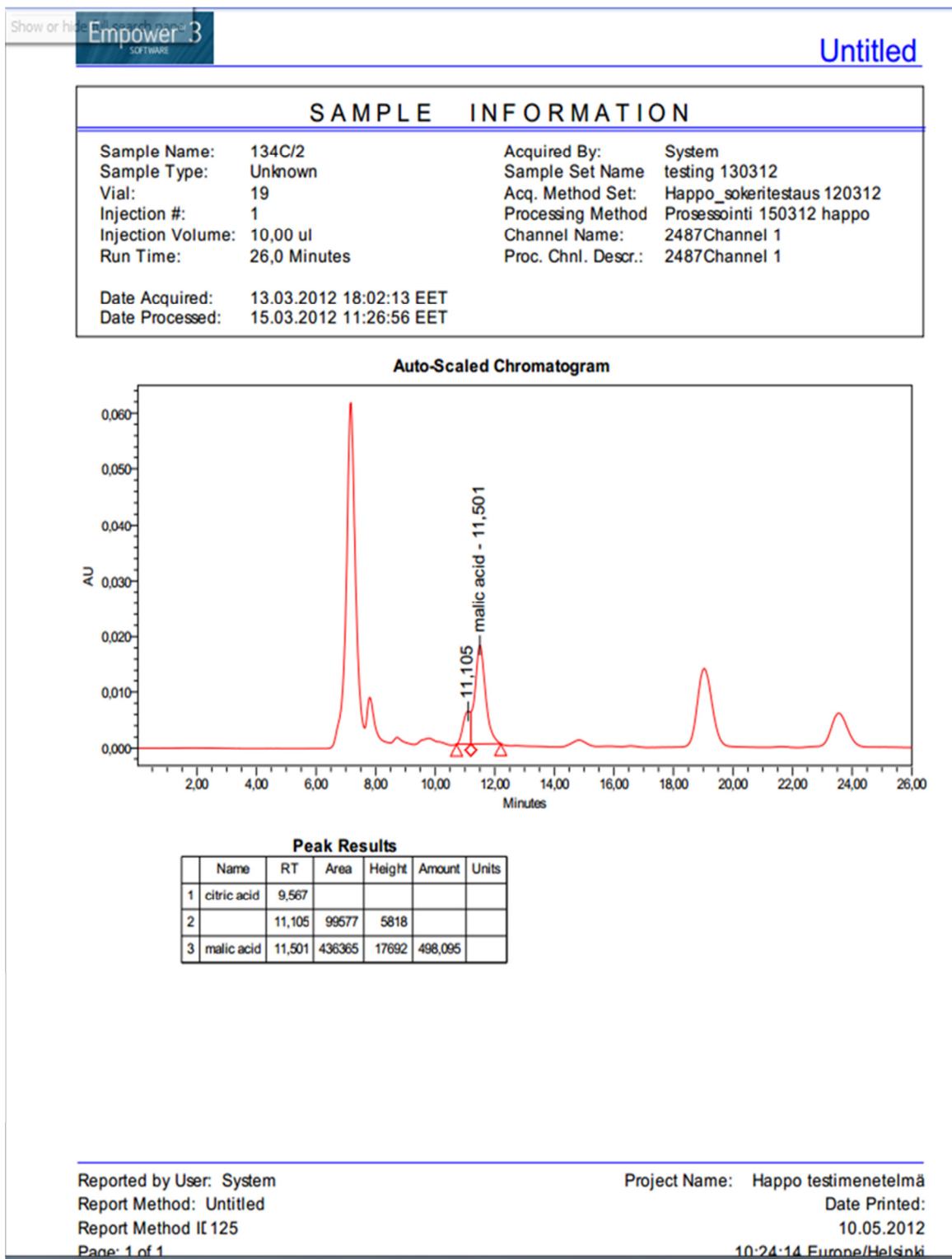
Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	sucrose	8,950	568239	26247	4779,567	
2		9,667	8793	431		
3	glucose	10,574	343507	13059	2611,192	
4	fructose	11,633	334385	13021	2614,062	

Liite 4. Porkkanan 134C hapot



Liite 5. Porkkanan 186C sokerit

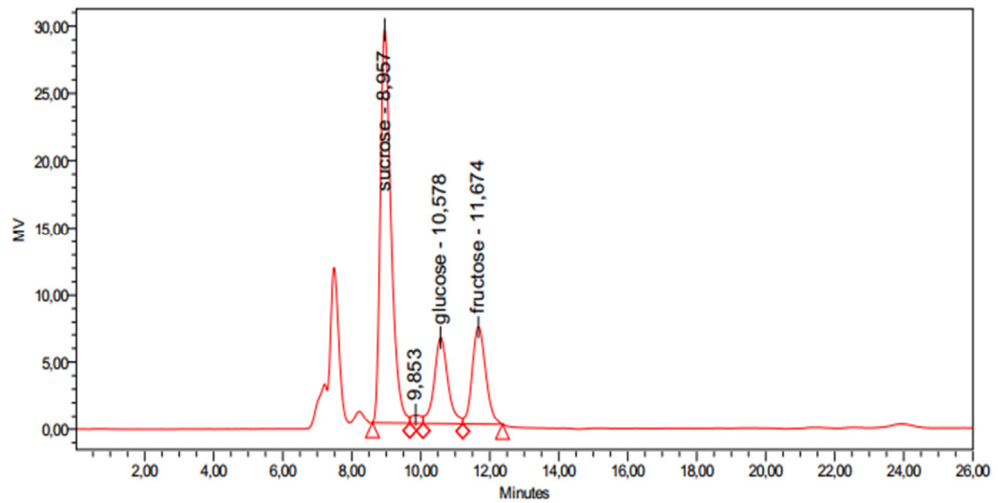
Empower³
SOFTWARE

Untitled

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	186C/1	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	testing 130312
Vial:	20	Acq. Method Set:	Happo_sokeritestaus 120312
Injection #:	1	Processing Method:	Prosessointi 140312_2
Injection Volume:	10,00 ul	Channel Name:	410
Run Time:	26,0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	410
Date Acquired:	13.03.2012 18:29:25 EET		
Date Processed:	14.03.2012 15:46:30 EET		

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1 sucrose	8,957	632781	29344	5321,104	
2	9,853	14133	660		
3 glucose	10,578	177801	6388	1354,418	
4 fructose	11,674	196904	7214	1545,887	

Reported by User: System
Report Method: Untitled
Report Method I125
Page: 1 of 1

Project Name: Happo testimenetelmä
Date Printed:
10.05.2012
10:20:26 Europe/Helsinki

Liite 6. Porkkanan 186C hapot

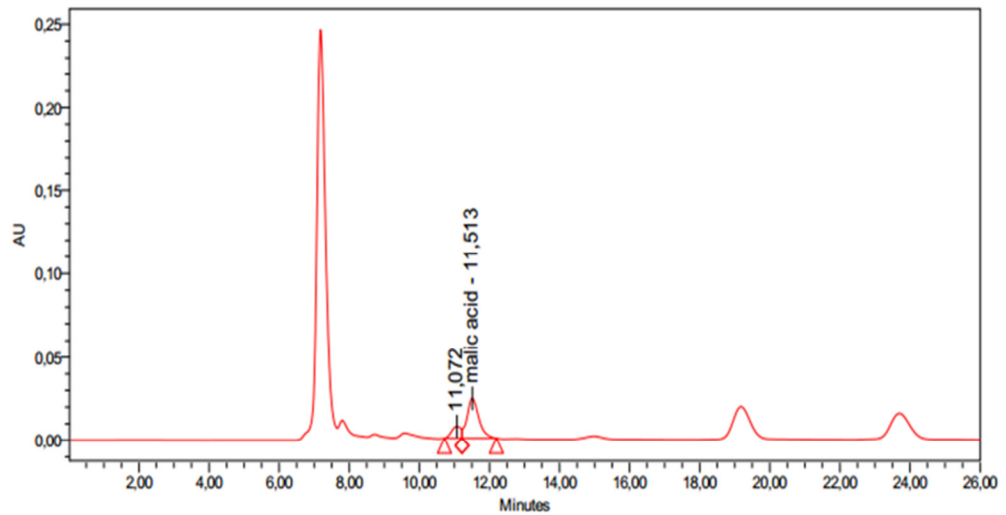
Empower³
SOFTWARE

Untitled

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	186C/1	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	testing 130312
Vial:	20	Acq. Method Set:	Happo_sokeritestaus 120312
Injection #:	1	Processing Method:	Prosessointi 150312 happo
Injection Volume:	10,00 ul	Channel Name:	2487Channel 1
Run Time:	26,0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2487Channel 1
Date Acquired:	13.03.2012 18:29:25 EET		
Date Processed:	15.03.2012 11:51:10 EET		

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	citric acid	9,567				
2		11,072	133773	7236		
3	malic acid	11,513	565224	24105	645,351	

Reported by User: System
Report Method: Untitled

Project Name: Happo testimenetelmä
Date Printed:

Liite 7. Työohje

Työohje happo ja sokerimäärityksille HPLC-laitteella

Tarvikkeet: punnitusalustoja, 50ml mittapulloja, pipettejä (pasteur), sentrifuugi, lämpöhaude, muovisia koeputkia, muoviruiskuja, ruiskusuodattimia (nylon)

Ajoliuksen valmistus

Tarvittavat aineet ovat: väkevä rikkihappo ja tislattu vesi

Valmistetaan väkevästä rikkihaposta 0,005 M- liuos

Standardien valmistus

Standardien vahvuudet

Hapoilla on: 100 mg/l, 200 mg/l, 500 mg/l, 750 mg/l

Sokereilla: 200 mg/l, 500 mg/l, 1000 mg/l, 1500 mg/l ja 2000 mg/l

Tarvittavat hapot ovat: sitruunahappo ja omenahappo

Tarvittavat sokerit ovat: Sakkarosi, fruktoosi ja glukoosi

Standardien valmistuksessa hapot ja sokerit liotetaan tislattuun veteen.

Näytteen käsittely

Punnitse näytettä 1g. Kaada näyte muoviseen koeputkeen, lisää koeputkeen 25 ml tislattua vettä. Vortexoi näyte. Laita koeputket vesihauteeseen kolmeksi minuutiksi. Vortexoi uudelleen. Laita näytteet sentrifuugin 15 minuutiksi, sentrifuugin kierrosnopeudeksi laitetaan 4000 kierrosta minuutissa. Kerää neste talteen 50 ml:n mittapulloon.

Toista kaikki vaiheet, mutta lisää tislattua vettä näytteen sekaan 15 ml, ja nesteen keräyksen jälkeen toista kaikki vaiheet kolmanteen kertaa, mutta lisää tällä kertaa tislattua vettä vain 10 ml. Jos mittapullo jää vajaaksi, lisää tislattua vettä merkkiviivaan asti. Suodata näytteet ennen kyvetteihin laittoa ruiskusuodattimien avulla.

Laitetaan näytteet ja standardit näytteenottolaitteen näytepulloihin, 3-4 ml kyvettä kohden. Laita kyvetit laitteen näytekaruselliin.

HPLC- ajon asetukset:

RI-detektori voidaan laittaa päälle edellisenä päivänä. Tarkista, että ennen tietokone-ohjelman avaamista, että detektorit ovat päällä. Tarkista, että jättepulloissa on tilaa, vaihda tarvittaessa uusiin ennen ajon aloittamista.

Aseta pumpuille ajoliuoksen virtausnopeudeksi 0.5 ml/min. Kolonniuunin lämpötilaksi laitetaan 30 °C. Aseta näytteenottolaitteelle näytteen otto määräksi 10 µl. Ajoajaksi laita 30 min näytettä/standardia kohden.

Tulosten laskenta

Integroi standardien piikkien pinta-alat, ja verrataan niitä näytteiden pinta-aloihin. Laitte antaa tulokset mg/l.