

Koivu elintarvikkeena ja koivunsilmu-uutteen analysointi

Pro gradu -tutkielma
Turun yliopisto
Biokemian laitos
Elintarvikekemian tutkinto-ohjelma (FM)
Marraskuu 2016

Vesa Puoskari

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO
Biokemian laitos

PUOSKARI, VESA: Koivu elintarvikkeena ja koivunsilmu- uutteen analysointi

Pro gradu -tutkielma, 75 s., 24 liites.

Elintarvikekemia

Marraskuu 2016

Raudus- ja hieskoivu ovat Suomen yleisimmät ja taloudellisesti merkittävimmät lehtipuut. Historiallisesti koivun merkitys niin ravinnon, rehun, kuin myös polttopuun lähteenä on ollut huomattavan suuri. Kuitenkin koivun käyttö elintarvikkeena on ajan mittaan vähentynyt ja lopulta jäänyt hyvin vähäiseksi vaikkakin koivunmahlaa käytetään yhä nykyään joissain määrin. Koivunmahlalla ja siitä valmistettavalla koivusiirapilla on kuitenkin runsaasti potentiaalista käyttöä elintarvikkeena. Mahlan lisäksi koivusta saadaan myös runsaasti erilaisia bioaktiivisia yhdisteitä joilla on käyttöä niin lääketieteessä kuin myös funktionaalisissa elintarvikkeissa. Ksylitolin eli koivusokerin rooli kariesin ehkäisyssä on tunnettu jo pitkään, kuten on myös koivusta saatavien kasvisteroleiden korkea kolesterolitasoa alentava vaikutus. Betuliinilla ja betuliinihapolla vaikuttaa olevan vielä ksylitoliakin suurempi potentiaali. Bioaktiivisia ominaisuuksia on myös koivunlehtien fenolisilla yhdisteillä.

Erikoistyössä analysoitiin koivunsilmuista (rauduskoivu, *Betula pendula*) ylikriittisellä hiilidioksidilla uutettua näytettä. Uutteessa oletettiin olevan verrattain runsaasti lipideitä, joten näytteen analysointimenetelmät valittiin lipidien analysointiin soveltuviksi. Tavoitteena oli käyttää SPE-fraktiointia ja tuottaa riittävän puhtaita näytteen jakeita, jotta niiden sisältämät rasvahapot voitaisiin analysoida rasvahappojen metyyliesterijohdannaisina käyttäen GC-FID-laitteistoa. Lisäksi tavoitteena oli analysoida koivunsilmu- uutteen haihtuvia yhdisteitä käyttäen GC-FID- ja GC-MS-laitteistoja.

Tutkimuksen alkuolettamukset osoittautuivat vääriksi, minkä takia tutkimuksen alkuperäistä päätarkoitusta, eli lipidianalyysyä, ei saatu toteutettua. Pyrittäessä analysoimaan uutteen rasvahappokoostumusta GC-FID-laitteistolla havaittiin, ettei uutteen juurikaan ollut rasvahappoja. Lisäksi, huolimatta siitä, että haihtuvia yhdisteitä löytyi hyvin lukuisa joukko, ei niiden tunnistaminen onnistunut käytössä olleen GC-MS-kirjaston tai kirjallisuuslähteiden perusteella. Useiden havaittujen yhdisteiden havaittiin muistuttavan, mutta ei vastaavan, kirjallisuudessa julkaistuja aiemmin koivusta havaittujen yhdisteiden GC-MS-spektrejä. Tutkimusten aikana kuitenkin havaittiin lipidiluokka-analyysiin tarkoitetun SPE-fraktioinnin erottaneen myös uutteen haihtuvat yhdisteet eri fraktioihin.

Asiasanat: haihtuvat orgaaniset yhdisteet, kaasukromatografia, koivu, lipidit

Sisällys

Sisällys	1
Lyhenteet	3
I KIRJALLISUUSKATSAUS – Koivu elintarvikkeena.....	5
1 Yleistä koivusta	5
1.1 Koivujen rakenne.....	6
1.2 Koivun levinneisyys	10
1.3 Koivun merkitys.....	10
1.3.1 Koivun merkitys teollisuudelle.....	11
1.3.2 Koivu ja allergiat tai muut oireet	12
1.3.3 Koivun historiallinen merkitys Suomessa	12
2 Koivun eri osat ravintona	15
2.1 Koivunmahla.....	15
2.1.1 Koivunmahlan keruu	17
2.1.2 Koivunmahlan koostumus	19
2.1.3 Koivusiirappi.....	22
2.2 Koivun kuori	25
2.3 Koivun lehdet	26
2.4 Koivun runko	28
3 Päätelmät.....	31
II KOKEELLINEN OSA - Koivunsilmujen hiilidioksidiuutteen kemiallinen karakterisointi kromatografisesti ja massaspektrometrisesti.....	33
4 Työn tarkoitus.....	33
5 Materiaalit ja menetelmät.....	34

5.1	Laitteet ja reagenssit	34
5.2	Koivunsilmu-uute ja uutto ylikriittisellä hiilidioksidilla	36
5.3	SPE ja TLC.....	38
5.3.1	TLC-analyysit	39
5.3.2	SPE-fraktioinnin optimointi.....	42
5.4	Haihtuvat yhdisteet	44
5.4.1	GC-FID	44
5.4.2	GC-MS	47
5.5	Rasvahappojen metyyliesterit.....	48
5.6	MS.....	49
6	Tulokset ja niiden tarkastelu	51
6.1	SPE ja TLC.....	51
6.2	Haihtuvat yhdisteet.....	53
6.2.1	GC-FID	53
6.2.2	GC-MS	57
6.3	Rasvahappojen metyyliesterit.....	62
6.4	HPLC ja MS.....	64
7	Päätelmät.....	66
	Lähteet	69
	Liitteet	76

Lyhenteet

Tieteellisen luokittelun lyhenteet

f.	forma (lat.), muoto
ssp.	subspeciēs (lat.), alalaji
var.	varietas (lat.), muunnos

Laitteistojen lyhenteet

EI	Electron ionization (engl.), elektroni-ionisaatio
ELSD	Evaporative light scattering detector (engl.), haihduttava valonsirontadetektori
ESI	Electrospray ionization (engl.), sähkösumutus-ionisaatio
FID	Flame ionization detector (engl.), liekki-ionisaatiodetektori
GC	Gas chromatography (engl.), kaasukromatografia
HPLC	High performance liquid chromatography (engl.), korkean erotuskyvyn nestekromatografia
HPTLC	High performance thin layer chromatography (engl.), korkean erotuskyvyn ohutkerroskromatografia
MS	Mass spectrometry (engl.), massaspektrometria
NI	Negative ion (engl.), negatiivisesti varautunut ioni
PI	Positive ion (engl.), positiivisesti varautunut ioni
SPE	Solid phase extraction (engl.), kiinteäfaasiuutto
TLC	Thin layer chromatography (engl.), ohutkerroskromatografia
UV	Ultraviolet (engl.), ultravioletti (aallonpituus)

Yhdisteiden lyhenteet

AcOH	Acetic acid (engl.), etikkahappo
C	Cholesterol (engl.), kolesteroli
CE	Cholesteryl ester (engl.), kolesteryyliesteri
CMC	Carboxy methyl cellulose (engl.), karboksimeetyyliselluloosa
DAG	Diasyyliglyseroli
Et ₂ O	Dietyylieetteri
FAME	Fatty acid methyl ester (engl.), rasvahapon metyyliesteri
FFA	Free fatty acid (engl.), vapaa rasvahappo
Hex	Hexane (engl.), n-heksaani
MAG	Monoasyyliglyseroli
MeOH	Metanoli
MQ	Milli-Q-suodatettu ja -ionivaihdedettu vesi
MTBE	Metyyli- <i>tert</i> -butyylieetteri
TAG	Triasyyliglyseroli

I KIRJALLISUUSKATSAUS – Koivu elintarvikkeena

1 Yleistä koivusta

Koivut muodostavat koivujen suvun (*Betula* L.). Koivujen sukuun kuuluvat kasvit ovat puuvartisia vain kesäisin lehteviä kasveja, joita tavataan pohjoisella pallonpuoliskolla. Ne kuuluvat koivukasvien heimoon (*Betulaceae*) leppien (*Alnus* Mill.) ohella. Koivut ovat lisäksi läheistä sukua pähkinäpensaille (*Corylus* L.) ja valkopyökeille (*Carpinus* L.). Kaiken kaikkiaan koivujen tarkkaa lajimäärää on vaikea esittää sillä lajeilla tapahtuu suurta morfologista vaihtelua ja lisäksi useat niistä voivat risteytyä keskenään. Eri koivulajeja arvioidaan olevan ainakin kolmekymmentä, joskin on mahdollista, että niiden määrä on jopa yli kuusikymmentä. Koivujen koot ja kasvutavat vaihtelevat kookkaista puista aina pensaisiin ja pieniin varpuihin saakka. (Viherä-Aarnio 2008a.)

Suomessa kasvaa useita eri koivulajeja. Näistä luonnonvaraisina esiintyvät rauduskoivu (*Betula pendula* Roth) ja hieskoivu (*Betula pubescens* Ehrh.), sekä matalakasvuinen vaivaiskoivu (*Betula nana* L.). Suomen koivulajeista taloudellisesti tärkeimpiä ovatkin rauduskoivu ja hieskoivu (Kuva 1). (Viherä-Aarnio 2008b.) Koivun merkitys Suomelle ilmenee myös siinä, että vuonna 1988 rauduskoivu valittiin Suomen kansallispuuksi hieskoivun jäädessä äänestyksessä siitä vain muutaman sijan (Velling 2008a). On myös huomattava, että koivulajeista esiintyy jo pelkästään Suomessa useita eri alalajeja (subspeciēs, ssp.), muunnoksia (varietas, var.), ja muotoja (forma, f.), kuten esimerkiksi tunturikoivu (*B. pubescens* Ehrh. ssp. *czerepanovii* (Orlova) Hämet-Ahti), visakoivu (*B. pendula* var. *carelica*), pirkkalankoivu (*B. pendula* f. *bircalensis*), loimaankoivu (*B. pendula* f. *crispa*) ja taalainkoivu (*B. pendula* f. *dalecarlica*) (Maaranen ja Maaranen 2003; Viherä-Aarnio 2008c).



Kuva 1. Koivunlehtiä, hieskoivu & rauduskoivu (Kuva: Jouko Lehmuskallio)

1.1 Koivujen rakenne

Raudus- ja hieskoivu voivat saavuttaa yli 20 metrin mitan ja niiden runkoa peittää valkoinen tuohi. Tuohen valkoinen väri johtuu tuohen korkkisolukkoihin kertyvästä valkoisesta vaha-aineesta, betuliinista. (Viherä-Aarnio 2008a.) Raudus- ja hieskoivun voi kuitenkin erottaa toisistaan tiettyjen morfologisten ominaisuuksien takia. Rauduskoivulla oksien uloimmat kärjet riippuvat usein alaspäin, mistä tulee myös puun lajinimi, *pendula* eli riippuva. Vastaavasti hieskoivun nimi tulee vuosikasvujen karvaisuudesta, *pubescens* eli karvainen. Raudus- ja hieskoivut omaavat perimän sekaantumista estävän mekanismin, joka tosin ei vaativissa pohjoisen olosuhteissa aina toimi. Diploidisella rauduskoivulla on 28 kromosomia ja tetraploidisella hieskoivulla kromosomeja on puolestaan 56. (Viherä-Aarnio 2008b.)

Rauduskoivun lehdet (Kuva 1 & Kuva 2) ovat tyypillisesti joko kolmiomaisia tai vinoneliömäisiä ja niillä on pitkä suippeneva kärki. Hieskoivulla lehdet (Kuva 1 & Kuva 3) puolestaan ovat muodoltaan soikeita tai soikeneviä eikä niillä ole pitkää suippenevaa kärkeä. Molempien koivulajien lehdissä on sahalaitainen reuna, mutta rauduskoivulla reunan sahalaitakuvio on huomattavasti voimakkaampi. Lisäksi

rauduskoivun lehtien sahalaitakuvio on niin sanotusti toissahainen, eli isommissa saharampaiden reunoissa esiintyy pienempiä saharampaita. Hieskoivulla lehden pinta ja lehtiruoti ovat lisäksi karvaisia kun taas rauduskoivulla ne ovat karvattomia. (Viherä-Aarnio 2008b.)



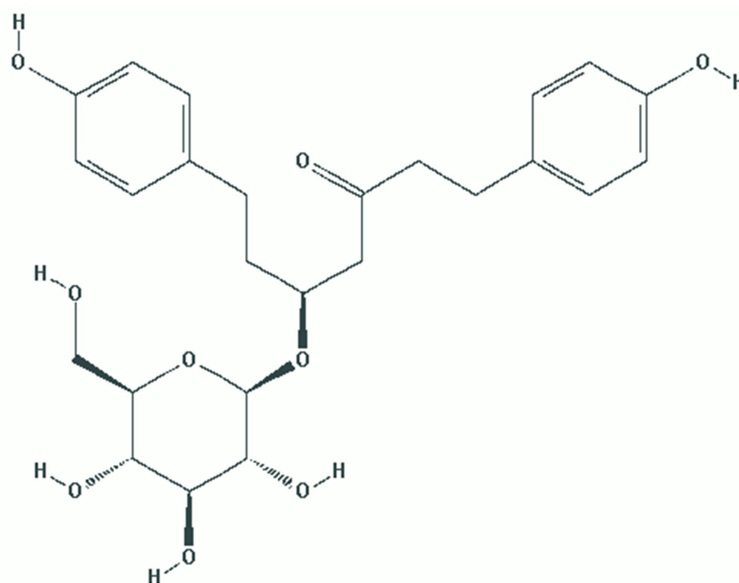
Kuva 2. Rauduskoivun lehti (Kuva: Jouko Lehmuskallio, Luontoportti)



Kuva 3. Hieskoivun lehti (Kuva: Jouko Lehmuskallio, Luontoportti)

Taimilla ja nuorilla kasveilla tunnistukseen voidaan käyttää myös vuosikasvuja. Rauduskoivulla nämä vuosikasvut ovat tyypillisesti karvattomia ja nystyjen peittämiä kun taas hieskoivulla vuosikasvut ovat nystyttömiä ja karvaisia. Puiden vanhetessa alkaa niiden tyviosa kaarnoittua. Rauduskoivulla tämä tapahtuu jo verrattain nuorilla puilla, joilla alkaa myös esiintyä kaarnan halkeilua pystysuunnassa. Kaarnoittumisen jatkuessa rungon tyviosa alkaa muuttua syväurteiseksi ja tummaksi kaarnaksi. Hieskoivulla kaarnoittuminen on huomattavasti vähäisempää jonka takia iäkkäiden hieskoivujen runko voi olla sileän ja vaalean tuohen, eikä kaarnan, peitossa. (Viherä-Aarnio 2008b.)

Raudus- ja hieskoivun erottaminen toisistaan voi olla huomattavan vaikeaa. Tunnusmerkit ovat tyypillisesti selkeitä nuorilla puilla, mutta eivät enää välttämättä iäkkäillä puilla. Perimän ja ympäristön vaikutukset ovat suuria. Ominaisuudet voivat tietyissä määrin vaihdella jopa saman puun eri osissa. Raudus- ja hieskoivu voidaan kuitenkin tunnistaa kemiallisen analyysin avulla. Näiden koivulajien välillä esiintyy selkeitä eroja fenolisten yhdisteiden pitoisuuksien yhteydessä. Rauduskoivun kuoressa esiintyy runsaasti platyfyllosidia (Kuva 4), jota puolestaan on hieskoivun kuoressa vain vähän jos lainkaan. Koska platyfyllosidi fenolisena yhdisteenä voidaan havaita värireaktion avulla, voidaan raudus- ja hieskoivu siten erottaa toisistaan. (Viherä-Aarnio 2008b.)



Kuva 4. Platyfyllosidi

Puun rungon lipidien pitoisuuksien vaihtelu kasvukauden kuluessa on tyypillistä puille, jotka varastoivat energiaa seuraava kasvukautta varten lipideinä. Tutkimuksissa koivun lipidien pitoisuuksien ei kuitenkaan ole havaittu vaihtelevan kasvukauden kuluessa, minkä takia on mahdollista, ettei koivu vanhoista olettamuksista poiketen varastoikaan energiaansa lipideinä vaan tärkkelyksenä. (Piispanen ja Saranpää 2004.) Koivun tärkkelyspitoisuuden sekä koivun liukoisten sokereiden pitoisuuksien on havaittu vaihtelevan voimakkaasti kasvukauden kuluessa (Piispanen ja Saranpää 2001).

Vaivaiskoivu (Kuva 5) eroaa huomattavasti muista Suomessa esiintyvistä koivulajeista. Se on kasvaa noin 20–80 cm korkeaksi pensaaksi tai varvuksi. Vaivaiskoivun versot ovat jäykkiä ja uudet vuosikasvut ovat hyvin karvaisia ja nystyttömiä. Sen lehdet ovat pienehköjä ja paksuja ilman karvapeitettä. Muista Suomessa esiintyvistä koivuista poiketen vaivaiskoivun lehdellä ei ole sahalaitaa vaan reuna on selkeästi pehmeämpi ollen niin sanotusti nyhälaitainen. Vaivaiskoivu risteytyy herkästi hieskoivun ja tunturikoivun (hieskoivun alalaji) kanssa vaativissa olosuhteissa. (Neuvonen 2008; Viherä-Aarnio 2008b.) Vaivaiskoivu tuottaa runsaasti yhdisteitä jotka suojaavat sitä suurilta lämpötilan vaihteluilta. Etenkin koivun silmuissa tämän niin kutsutun eteerisen öljyn osuus on verrattain korkea. Samankaltaisia yhdisteitä esiintyy myös vaivaiskoivun perimää omaavan tunturikoivun lehdissä, vaikka tunturikoivun katsotaankin olevan vain hieskoivun muunnos. (Neuvonen 2008; Niemi 2015.)



Kuva 5. Vaivaiskoivu (Kuva: Jouko Lehmuskallio, Luontoportti)

1.2 Koivun levinneisyys

Koivut ovat hyvin laajalle levinneitä. Niitä tavataan pohjoisen pallonpuoliskon viilleillä ja lauhkeilla vyöhykkeillä. Lajien moninaisuuden johdosta niitä esiintyy niin pioneerikasveina kuin myös sekametsän myöhäisempinäkin lajeina. Koivuja esiintyy aina soilta ja tulvarannoilta tuntureille saakka. Rauduskoivua esiintyy laajalti Euroopassa ja myös Suomessa. Lukuun ottamatta pohjoisinta Lappia koko Suomi kuuluu rauduskoivun kasvialueeseen. On kuitenkin huomattava, että rauduskoivu on hieskoivua harvinaisempi ankarissa olosuhteissa, kuten esimerkiksi ulkosaaristossa. Hieskoivua esiintyy alalajit (esimerkiksi tunturikoivu) huomioiden koko Suomen laajuudelta. Hieskoivu on myös pääosin rauduskoivua yleisempi lukuun ottamatta Saimaan aluetta ja eteläistä rannikkokaistaletta. Vaivaiskoivua tavataan myös lähestulkoon koko maan laajuudelta, tosin eteläisemmässä Suomessa lähinnä vain soilla ja rämeillä, mutta Lapissa myös kangasmetsissä ja tuntureilla. (Viherä-Aarnio 2008d.)

Sekä raudus- että hieskoivua esiintyy hyvin moninaisilla kasvupaikoilla aina kosteilta ja runsasravinteisilta metsämailta kuiville ja karuille kallioille. Parhaiten koivuille kuitenkin soveltuu hieta tai moreenipohjainen maaperä. Hieskoivu on usein kosteiden alueiden, kuten soiden, rämeiden, ojien ja rantojen puulaji rauduskoivun ollessa harvinaisempi kosteilla ja vähähappisilla mailla. (Viherä-Aarnio 2008d.)

1.3 Koivun merkitys

Koivulla on hyvin suuri merkitys moniin asioihin alkaen aina sen vaikutuksesta ympäröivään kasvillisuuteen ja eläimistöön, kuin myös sen suuresta merkityksestä teollisuudelle (Velling 2008a). Koivulla on myös suuri kulttuurihistoriallinen arvo ja sen monikäyttöisyys on aiemmin entisistään korostanut koivun tärkeyttä (Niemi 2015).

Puulajit vaikuttavat ympäröivään kasvillisuuteen vaikuttaviin ympäristötekijöihin. Koivun tunnetaan parantavan maan viljavuutta etenkin verrattuna havupuihin

muokkaamalla metsämaan rakennetta ja siten myös sen kemialla. Esimerkiksi kuuseen verrattuna koivu happamoittaa maata selkeästi vähemmän. (Smolander 2008.) Koivulla on suuri merkitys eläimille, sekä koivuun selkeästi liittyville eliöille kuten esimerkiksi pakurikäävälle (*Inonotus obliquus*) (Siitonen 2008).

1.3.1 Koivun merkitys teollisuudelle

Raudus- ja hieskoivu ovat Suomen teollisesti tärkeimmät lehtipuut. Kuutiometreinä mitattuna metsissä kasvavien puiden määrästä rauduskoivun osuus on yli 250 miljoonaa kuutiometriä ja hieskoivun osuus puolestaan yli 75 miljoonaa kuutiometriä. Hieskoivun osuus sellaisenaankin on likimäärin samalla tasolla kuin muiden lehtipuiden yhteenlaskettu osuus. Koivu on Suomen puulajeista kolmanneksi tärkein teollisuuden raaka-aineena ja tärkein energiapuu. Teollisuus on käyttänyt koivua vuosittain yli 10 miljoonaa kuutiometriä, josta yli 90 % on mennyt puumassateollisuuden käyttöön ja suurin osa lopusta vaneriteollisuuden tarpeisiin. Sahateollisuuden ja lastu- ja kuitulevyteollisuuden osuudet ovat muita selkeästi vähäisemmät. (Heräjärvi 2008.) On huomattava, että koivun teollinen merkitys on moninkertaistunut kuluneiden 50 vuoden aikana (Verkasalo ja muut 2008).

Visakoivu on arvoltaan korkeinta puutavaraa Suomessa, vaikka se ei käyttömäärältään yllä lähelläkään muiden koivujen määriä. Visakoivu sinänsä on rauduskoivun erikoismuoto, mutta on huomattava, että visaa esiintyy myös muilla lajeilla joskin vain harvinaislaatusesti. Visakoivua käytetään sekä koriste-esineiden raaka-aineena että myös huonekaluteollisuuden tarpeisiin. Visan muodostumisen (visautuminen) on todettu olevan periytyvää, mutta se ei periydy kaikille jälkeläisille, minkä takia visakoivun kasvatuksessa visan muodostuksen takaamiseksi käytetään jopa solukkoviljelyä. Visakoivun ja rauduskoivun jälkeläisistä vain 50 % visautuu vastaavan luvun ollessa 60–70 % kahden visakoivun tuottaessa jälkeläisiä. Bioteknisesti mikrolisäyksellä (solukkoviljely) puolestaan voidaan saavuttaa kaikkien tuotettujen kloonitaimien visautuminen. (Velling 2008b; Viherä-Aarnio ja Velling 2008.)

1.3.2 Koivu ja allergiat tai muut oireet

Koivu, tai pikemminkin koivun siitepöly, voi myös toimia allergeeninä. Kaikki kolme Suomessa esiintyvää koivulajia voivat aiheuttaa oireita. Usein koivun siitepölystä oirehtivat saavat oireita myös lepän ja pähkinäpensaalla siitepölystä. Oirehtiminen tapahtuu tyypillisesti koivun kukinta-aikaan huhtikuun lopulta toukokuun lopulle, mutta pohjoisessa Suomessa tämä jatkuu usein kesäkuun alkupuolelle saakka. (Velling 2008a.) Myös tuore koivunmahla voi sisältää allergeenejä (Lahti ja Hannuksela 1980).

Puuta työstettäessä muodostuva puupöly voi myös ärsyttää hengitysteitä, silmiä ja ihoa. Koivupöly ärsyttää lähinnä vain hengitysteitä. Koivulajien välillä ei tässä ole merkittävää eroa, mutta koivupölyn on todettu olevan vähemmän haitallista kuin männyn, tammen, pyökin tai tiettyjen trooppisten puulajien työstössä muodostuvan puupölyn. (Velling 2008a.)

1.3.3 Koivun historiallinen merkitys Suomessa

Koivu on jo historiallisestikin ollut erittäin tärkeä kasvi Suomessa. Koivun merkitys suomalaisuuteen alkoi korostua 1800-luvulla jolloin koivusta muodostui yksi suomalaisuuden symboleista. Koivusta valmistetun vihdan tai vastan merkitystä suomalaisuuteen ja etenkin suomalaiseen saunakulttuuriin voi tuskin liioitella (Kuva 6). Vihoja tai vastoja on valmistettu useista eri puu- ja koivulajeista, mutta entisaikojen ihmiset pitivät rauduskoivua tähän tarkoitukseen parhaiten soveltuvana. Koivun selkeä merkitys näkyy myös hyvin sen vaikutuksessa taiteissa ja tieteissä. Ensimmäisen koivua käsitellyt suomalainen tutkimus oli Pehr Kalmin tarkastama Johan Grundbergin väitöskirja vuodelta 1759. (Niemi 2015.) Myös maaliskuun nimen on eräänä vaihtoehtona ajateltu kehittyneen koivunmahlan keruun ajankohdasta, eli mahlakuusta. Tähän viittaisi maaliskuun nimi muilla alueen kielillä. Esimerkiksi valkovenäjäksi maaliskuun nimi onkin "сакавік" eli "mahlakuu". (Svanberg ja muut 2012.)



Kuva 6. Koivuvihta (Kuva: Vesa Puoskari)

Koivun eri osilla on ollut lukuisia eri käyttötarkoituksia. Koivun merkitystä polttopuuna, käyttöesineiden raaka-aineena ja rakennusmateriaalina etenkin historiallisessa yhteydessä ei voi unohtaa. Koivun tuohi on toiminut niin sytykkeenä, kattona, eristeenä, kirjoitusmateriaalina paperin sijasta, sekä konttien, tuokkosten ja muiden tarve-esineiden valmistusmateriaalina. Koivun tuohen ja varsinaisen rungon välistä saatavaa koivun nilaa käytettiin niin parkitsemiseen kuin myös värjäykseen. Koivuista kuten suuresta osasta muistakin lehtipuista karsituista oksista valmistettiin lehteviä nippuja (lehdes, kerppo, vihdas) eläinten talvirehuksi. Koivun tuhalla ja hiilellä on aiemmin ollut jopa merkittävä teollinen ja kaupallinen rooli Suomessa, niin lasin ja saippuan valmistuksessa käytetyn potaskan (kaliumkarbonaatti, K_2CO_3), väriaineena käytetyn kimröökkin (hiilimusta), tökötin eli koivutervan (tunnettu myös nimellä ryssänöljy), kuin myös hiilenpoltossa miiluhautoissa valmistetun koivuhiilen tuotannossa. (Niemi 2015.)

Koivunsilmuista valmistettua teetä on käytetty perinnetieteessä verenpaineen alentamiseen, missä sen käyttökelpoisuus on oletettavasti perustunut nuorten koivunlehtien verrattain voimakkaaseen diureettiseen vaikutukseen. Koivunlehtiteen vaikutuksen on havaittu olevan samaa luokkaa joidenkin kaupallisten diureettien,

kuten Lasix-lääkkeen, kanssa. Koivunlehtiä on myös käytetty perinnelääketieteessä hauteena riisitaudin ja reumatismien hoitoon. (Rautavaara 1980.)

Myös koivutervalla, mitä perinteisesti valmistettiin koivun kuoresta, on ollut suuri merkitys etenkin kansanlääketieteessä. Sillä on ollut roolinsa niin desinfioivana, diureettisena kuin myös kuumetta alentavana ja antiseptisenä aineena. Koivutervaa on käytetty myös erinäisten iho-ongelmien, reumatismien ja muiden vaivojen hoitoon. Myös kasvien lääkinnässä, niin haavojen kuin sieni-infektioiden torjunnassa, on koivutervalla ollut suuri merkitys. Koivutervaa käytetään yhä tietyillä alueilla etenkin erilaisten hoitavien voiteiden ainesosana. Puhtaan koivutervan käyttöä terapeuttisena yhdisteenä on tutkittu Venäjällä, jossa sen on havaittu olevan käyttökelpoinen iho-ongelmien hoidossa. (Rautavaara 1980; Zyryanova ja muut 2010.)

2 Koivun eri osat ravintona

2.1 Koivunmahla

Mahla on lehtipuiden johtosolukoissa keväisin virtaavaa nestettä. Puu tuottaa ja kerää mahlan komponentit kesällä vararavinnoksi seuraavaa kevättä varten ja varastoi ne juuriin ja runkoon talveksi. Keväällä varastoituneet yhdisteet muutetaan takaisin hyvin veteen liukeneviksi sokereiksi ja muiksi ravinteiksi, jotka kulkeutuvat puun maasta imemän veden mukana kasvin kaikkiin osiin, etenkin uusien silmujen energiaksi. Mahla kuljettaa siten vettä, sokereita ja ravinteita uuden kasvukauden alun tarpeisiin. (Kallio ja Kallio 1987.) Koivunmahla on hyvin juoksevaa nestettä ja vaihtelee sävyltään täysin kirkkaasta kevyesti vihertävään (Maaranen ja Maaranen 2003). Tuore koivunmahla saattaa aiheuttaa oireita koivun siitepölystä oireita saaville henkilöille, mutta allergeenejä ei enää tyypillisesti ole säilötyssä tai muutoin käsitellyssä koivunmahlassa tai siitä edelleen tuotetuissa tuotteissa (Lahti ja Hannuksela 1980).

Koivunmahlalla on pitkä historia elintarvikkeena. Ensimmäisiä mainintoja koivunmahlan käytöstä elintarvikkeena onkin jo vuodelta 921 arabialaisen Ahmad ibn Fadlānin kertoessa Volga-joen varren asukkaiden käyttämästä fermentoidusta koivunmahlasta. Koivunmahlaa on käytetty laajalti etenkin Euroopan pohjois- ja itäosissa niin lääkkeenä kuin myös elintarvikkeena. (Svanberg ja muut 2012.) Varhaisin maininta mahlankäytöstä Suomessa lienee 1600-luvulta olevasta arabialaisen matkailijan kertomuksesta, jossa kuvataan mahlakaljan valmistusta. Koivunmahlan merkitystä Suomessa kuvaa se, että mahlapuun kaatamisesta seurasi sakkorangaistus ja lisäksi kaadettu puu oli korvattava uudella mahlapuulla, ja että osa mahlapuista oli nimetty karjan tavoin. (Maaranen ja Maaranen 2003; Niemi 2015.) Paikoin koivua onkin kutsuttu köyhän miehen lehmäksi (Svanberg ja muut 2012). On kuitenkin huomattava että koivunmahlan ravintoarvo on melko vähäinen sen sisältämien yhdisteiden alhaisten pitoisuuksien takia. Kivennäisjuomana, etenkin ottaen huomioon runsaan kaliumin ja vähäisen natriumin määrät, mahla kuitenkin puoltaa paikkansa. (Kallio ja Kallio 1987.)

Koivunmahlan tuotantoa esiintyy nykyisellään Itä- ja Pohjois-Euroopassa, sekä Pohjois-Amerikassa. Itä-Euroopassa tuotetut tuotteet ovat tyypillisesti olleet koivunmahlaa, johon on lisätty sokeria ja sitruunahappoa (sitruunamehua). Useimpiin muihinkin, usein pastöroituihin, koivunmahlatuotteisiin on aiemmin lisätty sitruunahappoa säilyvyyden parantamiseksi. Eräs koivunmahlan käytön ongelmista on sen alhainen ravinnepitoisuus, sillä kuiva-aineen osuus koivunmahlasta on vain noin 1 %:n luokkaa. (Kallio ja Kallio 1987.) Koivunmahlaa voidaan konsentroida käyttämällä käänteisosmoosilaitteistoja. Tällöin saatava konsentroidu koivunmahla on käyttökelpoista etenkin valmistettaessa viiniä, olutta tai simaa koivunmahlasta. Samaa menetelmää voidaan käyttää myös helpottamaan koivusiirapin valmistusta koivunmahlasta. (Kallio ja muut 1985a.)

Koivunmahlaa on käytetty niin juomien kuin myös ruokien valmistukseen. Vaikka koivunmahlaa voi juoda myös sellaisenaan, voidaan sitä käyttää myös erinäisten juomien, kuten mahlakaljan tai mahlasiman, valmistuksessa. Mahlaa voidaan myös käyttää esimerkiksi limonadien tai kuohuviinien raaka-aineena. Leivottaessa on koivunmahlaa voitu käyttää veden sijasta taikinassa. Koivunmahlaa on käytetty myös aiemmin karjailoilla eräänlaisena keväisenä lisäravinteena karjalle ja mehiläisille. Mahlan merkitys elintarvikekäytön ulkopuolella on myös huomattava, sillä etenkin kosmetiikkateollisuus hyödyntää sitä. (Velling 2008c; Svanberg ja muut 2012; Niemi 2015.) Koivunmahlalla on jo aiemmin uskottu olevan lääkinnällisiä vaikutuksia. Sen on uskottu auttavan niin sappi- kuin munuaisvaivoihin, ähkyyän ja muihin vaivoihin, kuten esimerkiksi keripukkiin, luuvaloon, kihtiin, sekä myös toimivan matolääkkeenä. (Zyryanova ja muut 2010; Svanberg ja muut 2012; Niemi 2015.)

Koivunmahlan säilyvyys on verrattain heikko (Velling 2008c). Aiemmin koivunmahlaa on pyritty säilömään varastoimalla kerätty mahla maakellareissa tai kaatamalla pulloissa olevan mahlan päälle pieni määrä öljyä, jotta ilma ei pääsisi pilaamaan koivunmahlaa (Niemi 2015.). Tavallisesti koivunmahla säilyy jääkaapissa noin vuorokauden ja normaalikäytössä olevassa pakastimessakin vain vuoden. Tämän johdosta koivunmahlan taloudellinen hyödyntäminen onkin jäänyt verrattain vähäiseksi. Säilyvyyttä voidaan pyrkiä parantamaan lisäämällä mahlaan hedelmähappoja, kuten sitruunahappoa tai omenahappoa, tai pastöroimalla mahlaa.

Pastörinti tosin vaikuttaa koivunmahlan makuun ja myös tuhoaa arvokkaita ainesosia. (Velling 2008c.) Uudemmissa menetelmissä koivunmahlan säilyvyyttä on pystytty parantamaan huomattavasti, mikä on mahdollistanut koivunmahlan ympärivuotisen saatavuuden (Maaranen ja Maaranen 2003).

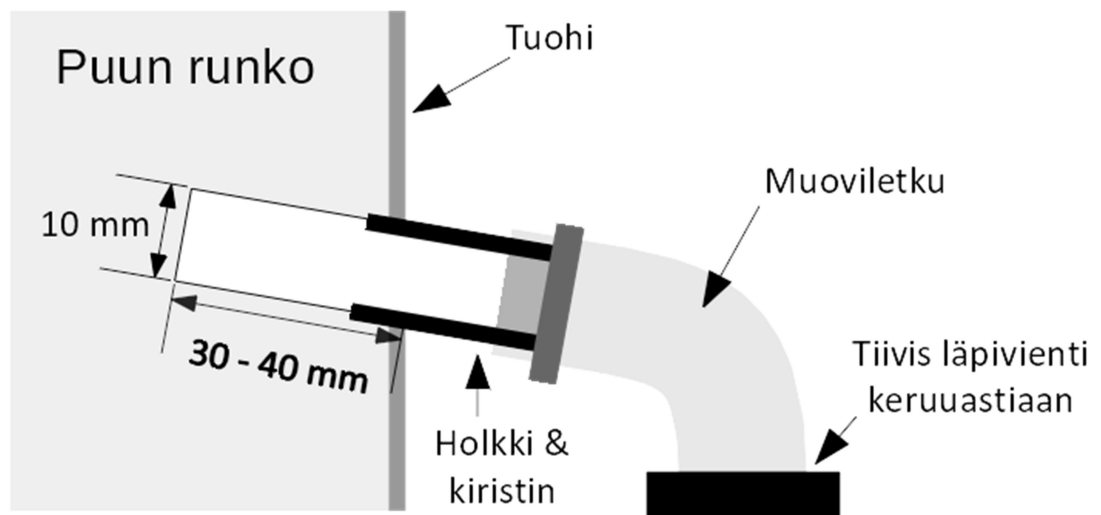
Koivunmahlassa on hyvin vähän varsinaisia arominaineita. Näin ollen puhdas koivunmahla ei käytännössä poikkea tuoksultaan vedestä. Mahlaa käsiteltäessä alkaa siihen kehittyä aromiyhdisteitä, joita ei ollut alkuperäisessä mahlassa. Etenkin mahlaa keitetäessä sen sokereiden ja vapaiden aminohappojen reaktioissa muodostuu niin väri- kuin aromiyhdisteitä. Koska puhdas mahla ei tuoksu, voidaan mahlan pilaantuminen havaita hyvinkin herkästi virrehajuista. (Kallio ja Kallio 1987.)

2.1.1 Koivunmahlan keruu

Koivunmahlaa voidaan valuttaa puista keväisin ennen puiden lehtien puhkeamista. Rauduskoivua pidetään hieskoivua parempana lähteenä koivunmahlalle sillä rauduskoivusta saatavassa mahlassa kiintoaineen osuus on suurempi kuin hieskoivusta kerättävässä mahlassa siitä huolimatta, että hieskoivut voivat tuottaa enemmän mahlaa kuin rauduskoivut. Mahlan keruu tapahtuu noin 3–5 viikon kuluessa tyypillisesti huhtikuussa ja toukokuussa. Mahlaa voidaan valuttaa siihen saakka, kunnes koivun silmut puhkeavat hiirenkorville. Suurikokoisesta koivusta voidaan valuttaa jopa kymmeniä litroja päivässä ja siten satoja litroja keruukaudessa. Mahlan virtaukseen tosin vaikuttavat hyvin monet tekijät joten mahlan saanti vaihtelee voimakkaasti vuosittain. (Kallio ja Kallio 1987; Velling 2008c.) Yleisesti ottaen kosteiden kasvupaikkojen koivuilla mahlan valumisnopeus on suurempi kuin kuivemmissä olosuhteissa kasvavilla koivuilla. Kerättävän mahlan määrä on suhteessa puun rungon halkaisijaan sekä puunlatvuksen kokoon. Hyväkuntoiset ja elinvoimaiset koivut tuottavat noin 50–300 litran mahlasadon. (Kallio ja Kallio 1987.)

Koivunmahlaa on kerätty useilla eri tavoilla, kuten alaoksia katkomalla tai itäeurooppalaisella tavalla katkaisemalla koko puu. Juoksutus koivun runkoon lievästi yläviistoon poratusta reiästä on luultavasti käyttökelpoisin menetelmä. Mahlan

keruuta varten koivun rungon halkaisijan likimain rinnankorkeudelta tulisi olla vähintään 20 cm. Runkoon porataan noin 30–100 cm korkeudelle halkaisijaltaan noin 1 cm ja syvyydeltään noin 3–4 cm syvä reikä (Kuva 7). Porattuun reikään asetetaan valutusholkki. Holkkiin liitetty elintarvikekäyttöön soveltuva, mahdollisimman lyhyt, letku puolestaan johtaa mahlan keruuastiaan. Koska mahla on hyvin herkkää pilaantumaan, on hygienian oltava korkealla tasolla. Keruuastian pitäminen kylmänä esimerkiksi lumella estää mahlan laatua heikkenemästä liian nopeasti. Mahlankeruuta voidaan myös automatisoida liittäen keruuholkeista tulevat letkut letkulinjastoihin yhtenäisissä rinnemetsissä. Tässä tapauksessa saantoa voidaan tietystä määrin parantaa linjastoon asennetuilla vakuumpumpuilla. (Kallio ja Kallio 1987.)



Kuva 7. Kaaviokuva mahlan keruusta poratun reiän avulla

Mahlan keruussa koivun runkoon porattavat reiät altistavat koivun erinäisille mikrobeille, jotka voivat heikentää puun elinvoimaisuutta, sekä sen laatua etenkin mikäli puuta pyritään käyttämään teollisuuden raaka-aineena. Ongelma korostuu etenkin, mikäli samaan koivun runkoon tehdään samana vuonna useita keruureikiä. Mahlan keruu voi heikentää puun käyttöarvoa teollisuudessa, koska se tyypillisesti aiheuttaa puunrunkoon värivirheitä keruureikien läheisyyteen. Tämän johdosta mahlan keruu olisi syytä kohdistaa puihin jotka ovat elinvoimaisia, mutta esimerkiksi vanerin tai tukkipuun tuotantoon laadultaan heikkoja. (Velling 2008c.) Mahlankeruu ei kuitenkaan vähennä valutetun puun arvoa energiapuuna eikä mahlankeruu ole vain

kertaluontoista, vaan samasta puusta voidaan kerätä mahlaa useana peräkkäisenä vuotena. Mahlaan voi kertyä raskasmetalleita, joten mahlapuita ei tule valita maanteiden varsilta, kaatopaikkojen läheisyydestä tai tehtaiden lähimaastosta. (Kallio ja Kallio 1987; Harju ja Huldén 1990.)

2.1.2 Koivunmahlan koostumus

Mahla koostuu pääosin, noin 99-prosenttisesti, vedestä. Sokereita mahlassa on yleensä parhaimmillaan noin 10 g litraa kohden (Taulukko 1). Tosin huomattavasti suurempiakin pitoisuuksia on havaittu. (Kallio ja Kallio 1987.) Koivunmahlan tärkeimmät sokerit ovat fruktoosi ja glukoosi. Sokereiden lisäksi mahlassa on hedelmähappoja, pääosin omenahappoa. (Kallio ja muut 1985b.) Lisäksi mahlassa on pieniä määriä kaliumia, kalsiumia, magnesiumia, mangaania, aminohappoja, proteiineja, sekä C-vitamiinia (Velling 2008c; Kūka ja muut 2013). On huomattava, että koivunmahlan mineraalikoostumukseen vaikuttaa voimakkaasti koivun kasvuympäristö (Huldén ja Harju 1986; Harju ja Huldén 1990). Koivunmahlan pH voi olla keruukauden alussa lähellä neutraalia, mutta mahlan happamuus lisääntyy kevään kuluessa, kunnes se silmujen puhkeamisen aikaan taas vähenee (Kallio ja Kallio 1987). Kuten muutkin mahlan ominaisuudet, vaihtelee kerätyn mahlan pH vuosittain. Mahlan happamuuden on havaittu saavuttavan keruukauden kuluessa pH arvon noin 5,5–6,0. (Kallio ja Ahtonen 1987a.)

Taulukko 1. Yhteenvedo koivunmahlan koostumuksesta ja tärkeimmistä komponenteista pitoisuuksien ollessa suurimmillaan

Vesi	n. 99 %	
Kuiva-aine	n. 1 %	(Kallio ja Kallio 1987)
Sokerit	n. 10 g/l	(Kallio ja Ahtonen 1987b)
Glukoosi	n. 4,7 g/l	(Kallio ja muut 1985b)
Fruktoosi	n. 4,5 g/l	(Kallio ja muut 1985b)
Sakkaroosi	n. 0,7 g/l	(Kallio ja muut 1985b)
Muut sokerit		
Orgaaniset hapot	n. 1 g/l	(Kallio ja Kallio 1987)
Omenahappo	n. 0,7 g/l	(Kallio ja Ahtonen 1987a)
Muut hapot		
Muut		
Vapaat aminohapot	n. 0,5 g/l	(Kallio ja Kallio 1987)
Proteiinit	< 1 g/l	(Kallio ja Kallio 1987)
Kivennäisaineet	n. 0,5 g/l	(Kallio ja Kallio 1987)
C-vitamiini	3,2 mg/l	(Küka ja muut 2013)

Koivunmahlan tärkeimpiä sokereita ovat glukoosi ja fruktoosi, vähäisemmissä määrissä myös sakkaroosi, galaktoosi ja sokerialkoholi *myo*-inositoli (Kallio ja muut 1985b; Kallio ja Ahtonen 1987b). Koivunmahlan sokeripitoisuus kasvaa hitaasti keruukauden aikana ja pysyy melko vakaana lukuun ottamatta selkeää sokeripitoisuuden laskua keruukauden loppuessa (Kallio ja Kallio 1987). Koivunmahlan sokeripitoisuuden on uskottu vaihtelevan joidenkin tutkimusten mukaan vuorokaudenaikojen mukaisesti, mutta vastaavaa korrelaatiota ei puolestaan uudemmissä tutkimuksissa ole aina havaittu (Kallio ja Ahtonen 1987b). Koivunmahlan tärkeimpien sokereiden, glukoosin ja fruktoosin, määrien on havaittu omaavan lineaarisen korrelaation pitoisuuden suhteen, joten niiden muodostumisen ja kulutuksen täytyy olla koordinoitua. Vaikka voisi tietyssä mielessä ajatella, että glukoosin ja fruktoosin pitoisuuksilla sekä sakkaroosin pitoisuudella olisi jonkin tapainen korrelaatio, ei tätä ole havaittu. (Kallio ja Ahtonen 1987b.)

Orgaanisista hapoista tärkeimpänä koivunmahlassa on omenahappo, mutta myös muita happoja on runsaasti. Näihin lukeutuvat fosforihappo, meripihkahappo, sitruunahappo, fumariinihappo ja glykolihappo. (Kallio ja muut 1985b.) Happojen yhteenlaskettu osuus koivunmahlassa on tyypillisesti korkeimmillaan noin 1 g/l (Kallio ja Kallio 1987). Mahlan orgaanisten happojen määrien ei ole havaittu olevan vuorokauden ajasta riippuvaisia, vaikka niiden pitoisuuksissa tapahtuukin runsaasti

vaihtelua. Omenahapon pitoisuus kasvaa huomattavasti nopeammin kuin koivunmahlan sisältämien sokereiden määrä, mutta myös laskee nopeasti keruukauden lopussa. Koivunmahlan happojen kokonaispitoisuuden muutokset seuraavat pitkälti omenahapon pitoisuuden muutoksia, koska omenahapon osuus koivunmahlan hapoista on suuri. (Kallio ja Ahtonen 1987a.)

Koivunmahlassa esiintyy myös huomattavan lukuisa määrä muita sokereita ja happoja tosin vähäisemmissä pitoisuuksissa. Koivunmahlan sokereiden ja happojen määrät vaihtelevat suuresti vuodenajan, vuorokauden ajan, lajin, keruukorkeuden sekä kasvupaikan lisäksi myös puittain. (Kallio ja muut 1985b.) Keruukauden alku- ja loppuvaiheilla koivunmahlan sokereiden suhde koivunmahlan hedelmähappoihin on suurempi kuin muulloin, minkä takia näinä ajankohtina kerätty koivunmahla onkin makeampaa kuin keruukauden keskivaiheilla kerätty koivunmahla (Kallio ja Kallio 1987).

Koivunmahlan vapaat aminohapot ovat käytännössä puun sisäiseen typen siirtoon tarkoitettuja yhdisteitä, minkä takia useat koivunmahlan tärkeimmistä vapaista aminohapoista omaavat useamman kuin yhden aminoryhmän. Tämänkaltaisia ovat koivunmahlassa esiintyvät glutamiini, asparagiini ja sitrulliini. Näiden aminohappojen korkea osuus myös selittää koivunmahlan herkkyyttä ruskettumaan Maillardin reaktion kautta mahlaa kuumennettaessa sen sisältäessä runsaasti vapaita pelkistäviä sokereita. Mahlan aminohappojen keskinäiset osuudet muuttuvat ja niiden kokonaispitoisuus nousee selkeästi keruukauden edetessä, mutta usein niiden osuus ei ylitä noin 0,5 g mahlalitraa kohden. (Kallio ja Kallio 1987.) On kuitenkin huomattava, että korkeampiakin mahlan aminohappojen kokonaispitoisuuksia on havaittu. Tärkeimmät koivunmahlan vapaat aminohapot ovat glutamiini, sitrulliini ja glutamiinihappo. Näiden lisäksi mahlassa on jonkin verran isoleusiinia, valiinia ja asparagiinia. Näiden kuuden aminohapon yhteenlaskettu osuus kaikista koivunmahlan vapaista aminohapoista on havaittu olevan yli 90 %. (Ahtonen ja Kallio 1989.)

Koivunmahlassa on myös hyvin pieniä määriä proteiinia. Näiden kokonaisosuus on alle 1 g mahlalitraa kohden. Mahlassa esiintyvien proteiinien uskotaan olevan pääosin entsyymeitä, jotka tuottavat mahlan varsinaisia ainesosia. Raudus- ja hieskoivun

proteiinit ovat toisistaan riittävässä määrin poikkeavat, jotta koivulajien tunnistus näiden avulla on mahdollista. Kivennäisaineiden kokonaispitoisuus mahlassa on tyypillisesti noin 0,5 g/l. Merkittävimmät mahlan kivennäisaineet ovat kalium, kalsium ja magnesium, joiden jälkeen merkittävin on mangaani. Mahlassa on vain vähän natriumia, ja sen raudan ja seleenin määrät ovat alhaiset. Raskasmetalleita (kuten elohopea, kadmium ja lyijy) voi löytyä mahlasta, mikäli mahlapuu on kasvanut alueella, jossa maaperän raskasmetallikuormitus on ollut merkittävä. (Kallio ja Kallio 1987.)

2.1.3 Koivusiirappi

Koivunmahlasta voidaan myös valmistaa koivusiirappia samankaltaisella menetelmällä millä esimerkiksi sokerivaahterasta (*Acer saccharum*) tuotetaan vaahterasiirappia. On tosin huomattava että tyypillisesti vaahterasiirapin tuottoon käytettävän mahlan sokeripitoisuus on jopa 3 % kun se koivunmahlassa on parhaimmillaankin vain hieman yli yhden prosentin. Tämän takia koivusiirapin tuottamiseen tarvitaan huomattavasti enemmän mahlaa kuin mitä vastaava määrä vaahterasiirappia vaatisi. Lisäksi pitkä keittoaika ja helposti virhemakuja aiheuttava koivunmahlan sokereiden ja aminohappojen reaktio vaikeuttaa koivusiirapin tuotantoa, etenkin kaupallisessa mittakaavassa. (Kallio ja Kallio 1987; Velling 2008c.)

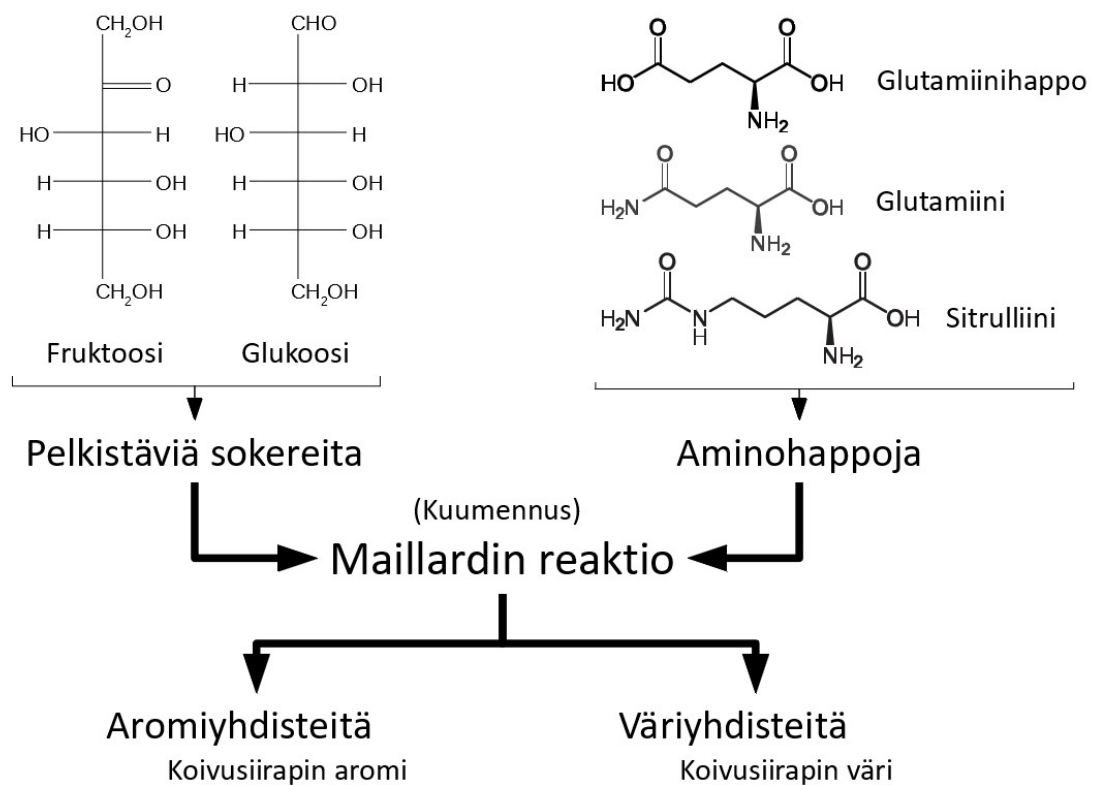
Vaikka koivusiirapin selkeimpänä etuna on sen säilyvyys, on huomattava että etenkin huoneenlämmössä säilytetty siirappi jatkaa värireaktioitaan ja tummuu ajan kuluessa rajoittaen sen käyttöikä (Kallio ja Kallio 1987). Vaikka Suomessa koivusiirappia ei ole valmistettu kaupallisesti, on sillä ollut alueittain suurikin paikallinen merkitys sokerin korvaajana alueilla ja aikakausina, jolloin muuta sokeria ei ole ollut saatavilla. Koivusiirappia tuotetaan nykyään kaupallisesti Pohjois-Amerikassa. Koivunmahla suodatetaan epäpuhtauksien poistamiseksi ja sen jälkeen joko pastöroidaan tai käsitellään ultraviolettivalolla mikro-organismien tuhoamiseksi. (Pellikka 2003.) Käsitelty mahla pyritään tämän jälkeen konsentroimaan käänteisosmoosilaitteistolla sokeripitoisuuden nostamiseksi ennen varsinaista haihdutusta (eli keittoa). Koska koivunmahlan proteiinit ja tietyt muut komponentit saostuvat valmistettaessa koivusiirappia koivunmahlasta, siirappi on suodatettava haihdutuksen jälkeen. On

huomattava, että koivunmahlassa ja siten myös koivusiirapissa glukoosin ja fruktoosin osuudet ovat korkeita, joten koivusiirapin kiteytyminen eroaa normaalin sokerin kiteytymisestä mahdollistaen hyvin korkeiden sokeripitoisuuksien saavuttamisen. (Kallio ja Kallio 1987.)

Koska koivusiirappi valmistetaan koivunmahlasta, muistuttavat sen kuiva-aineiden osuudet koivunmahlan kuiva-aineiden osuuksia. Noin 90 % koivunmahlan ja koivusiirapin kuiva-aineista ovat sokereita, pääosin fruktoosia ja glukoosia, omenahapon ja tuhkan osuuden ollessa kummallakin noin 3 %. Koivunmahlan kuumentamisella ei ole suurta vaikutusta tärkeimpien komponenttien pitoisuuksiin, vaikka pieni määrä pelkistävästä sokereista kuluukin Maillardin reaktiossa. (Kallio ja muut 1989.) Poikkeuksen tästä vastaavuudesta muodostavat aminohapot ja proteiinit, joiden osuus koivusiirapissa on huomattavasti alhaisempi kuin mitä koivunmahlan perusteella voisi olettaa. Koivunmahlan proteiinit saostuvat pois liuksesta sen väkevöityessä. (Kallio ja Kallio 1987; Ahtonen ja Kallio 1989.) Koivusiirapin pH laskee kuumennuksen jatkuessa. Koivusiirapit ovat pseudoplastisia nesteitä ja niiden viskositeetti laskee siirappia kuumennettaessa, vaikka varsinainen siirapin lämpökäsittely ei viskositeettiin vaikutakaan. Koivusiirapit ovat myös jossain määrin tiksotrooppisia, eli niiden viskositeetti laskee rasituksen (eli sekoituksen) voimistuessa. (Kallio ja muut 1989.)

Pohjois-Amerikassa koivusiirapille on kehitetty kaksi erilaista määritelmää. Näistä toinen on puhtaasta koivunmahlasta valmistettu koivusiirappi (pure birch syrup) ja toisessa (birch syrup) koivunmahlaan on lisätty fruktoosia, mutta koivunmahlasta peräisin olevien sokereiden osuuden on oltava vähintään 51 % sokereiden kokonaismäärästä. Tällä on huomattava merkitys koivusiirapin valmistuksen kustannuksiin, sillä litraa koivusiirappia kohden tarvitaan 100–150 litraa koivunmahlaa, kun taas lisätyn fruktoosin avulla tuotettuun koivusiirappilitraan tarvitaan vain noin 50 litraa koivumahlaa. Puhtaasta koivunmahlasta tuotettu koivusiirappi lieneekin liian kallis tuote normaaliin käyttöön. (Pellikka 2003.) Koivusiirapin tuottaminen on ollut kustannuksiltaan viisi kertaa kalliimpaa kuin vastaavan vaahterasiirappimäärän tuottaminen (Helfferich 2003).

Koivunmahlan keitto koivusiirapiksi ei sinänsä ole vaikeaa, mutta koivunmahlan pelkistävien sokereiden ja vapaiden aminohappojen herkkyys Maillardin reaktiolle tekee prosessista vaikean hallita. Koivusiirappia valmistettaessa ei nesteen lämpötila keitettäessä saisi nousta kovin korkeaksi tai muutoin koivunmahlan pelkistävät sokerit voivat alkaa reagoida voimakkaasti Maillardin reaktiossa. Lämpötilan noustessa alkaa myös sokereiden karamellisoituminen vaikuttaa, mutta sen merkitys on vähäisempi verrattuna Maillardin reaktioon. Tämän takia koivusiirapin valmistuksessa käytetään usein alipaineista tilaa, jolloin veden kiehumispistettä saadaan alennettua. (Kallio ja Kallio 1987.) Vaikka on mahdollista tuottaa koivusiirappia käyttäen hyvin mietoja olosuhteita, on kuitenkin tärkeää varmistaa tarpeellisten aromi- ja väriyhdisteiden muodostuminen pelkistävien sokereiden ja aminohappojen aminoryhmien välisellä Maillardin reaktiolla (Kuva 8) siirappia kuumentamalla (Kallio ja muut 1989). Koivunmahlan aminohappojen kokonaismäärän kasvu keruukauden kuluessa vaikuttaa keruukauden loppua kohden kerätystä koivunmahlasta valmistettavan koivusiirapin herkkyyteen alkaa muodostaa aromi- ja väriyhdisteitä (Ahtonen ja Kallio 1989).

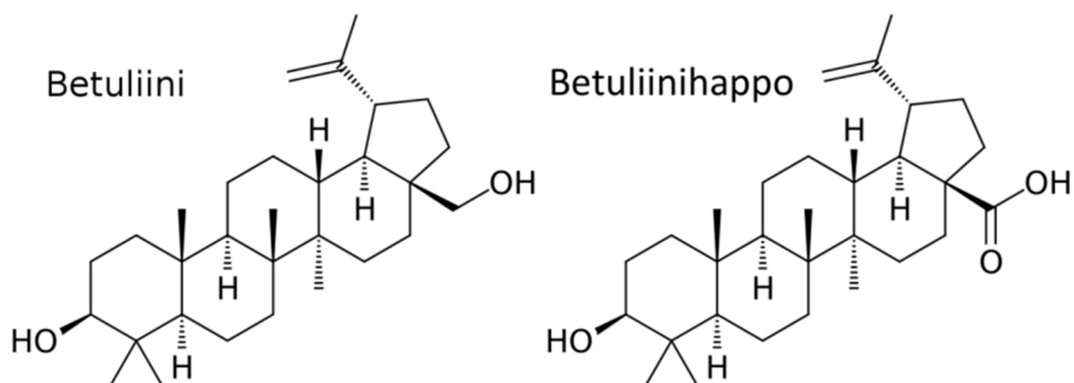


Kuva 8. Koivusiirapin aromien ja värin muodostuminen

Valmis koivusiirappi omaa pehmeän karamellimaisen tai toffeemaisen maun (Kallio ja muut 1989). Sekä siirapin maku että sen väri muodostuvat koivunmahlan sokereiden ja aminohappojen välisten reaktioiden kautta (Maillardin reaktio, eli ei-entsymaattinen ruskettuminen). Liiallisella kuumennuksella siirappi menettää makunsa muuttuen kitkeräksi. (Kallio ja muut 1987; Kallio 1989.) Verrattuna vaahterasiirappiin koivusiirappi on maultaan happamampaa ja suolaisempaa (Kallio ja Kallio 1987). Useimmat kaupalliset koivusiirapit ovat väriltään meripihkan värisiä, mutta parhaimmillaan koivusiirappi on kullankeltaista ja kirkasta (Kallio ja Kallio 1987; Maaranen ja Maaranen 2003).

2.2 Koivun kuori

On joitain mainintoja koivun nilan (sisemmän kuoren) käytöstä pettuleipää tehdessä, mutta sen käyttö oli huomattavasti männyn nilan käyttöä vähäisempää (Niemi 2015). Koivun kuoren koivukamferinakin tunnetulla betuliinilla ja betuliinihapolla (Kuva 9) on havaittu olevan terveysvaikutuksia etenkin ihosyöpää vastaan (Pisha ja muut 1995; Selzer ja muut 2000). Koivuntuohesta valmistettu terva onkin aiemmin ollut käytössä rohtona ihovaivojen hoidossa (Rautavaara 1980; Maaranen ja Maaranen 2003). Jauhetusta koivuntuohesta valmistetulla teellä ja muilla juomilla on myös ollut oma roolinsa kansanlääketieteessä vatsa- ja suolistovaivojen hoidossa (Yogeeswari ja Sriram 2005).



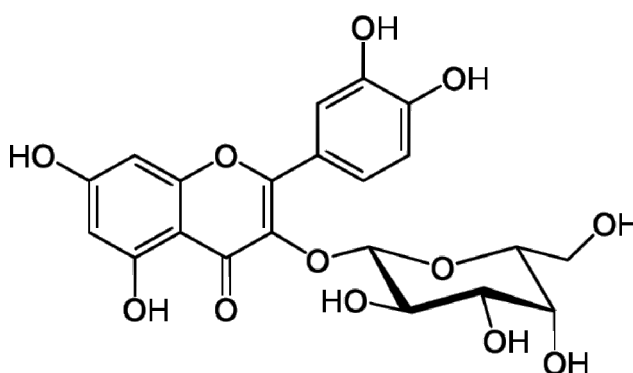
Kuva 9. Betuliini ja betuliinihappo

Betuliinihapon uskotaan omaavan monia terveyteen ja hyvinvointiin vaikuttavia ominaisuuksia. Myös betuliinilla uskotaan olevan näitä ominaisuuksia, mutta varmuutta ei ole siitä ovatko ne betuliinin ominaisuuksia vai ainoastaan osoitus betuliinin toiminnasta betuliinihapon esiasteena. Betuliinihapon ja sen johdannaisten on esitetty omaavan, niin HIV-vastaisia, syövän vastaisia, tulehduksen vastaisia, kuin myös anti-mikrobiaalisia ominaisuuksia. (Fujioka ja muut 1994; Udeani ja muut 1999; Yogeeswari ja Sriram 2005; Mullauer ja muut 2010.) Ehkä merkittävin betuliinihapon ominaisuuksista on sen kyky toimia syöpäsoluja vastaan olematta kuitenkaan toksinen normaalille solukolle *in vitro* -tutkimuksissa. Tämän uskotaan liittyvän betuliinihapon ominaisuuteen vaikuttaa mitokondrioiden toimintaan. On kuitenkin tärkeä huomata, että havaitut vaikutukset on todettu vain *in vitro* ja prekliinisissä *in vivo* -tutkimuksissa. Lisäksi yhdisteiden heikko liukenevuus vaatii niiden biosaatavuuden parantamista esimerkiksi syklodekstriinejä käyttämällä. Osoitusta betuliinin tai betuliinihapon käytännön vaikutuksesta elintarvikkeessa sellaisenaan ei ole. (Mullauer ja muut 2010.)

2.3 Koivun lehdet

Koivun lehtiä on käytetty historiallisesti ja niitä käytetään vielä nykypäivänäkin juomien ja ruokien valmistuksessa. Etenkin keväisiä lehtiä on käytetty niin salaatteihin, keittoihin, kun myös yrttijuomana ja maustesuolaseosten ainesosana. Kuivattujen lehtien tai silmujen käyttö silmuviinan valmistuksessa on ollut myös eräs koivun lehtien käyttötarkoituksista. Koivunlehtien tunnettiin toimivan diureettina ja sisältävän runsaasti niin C-vitamiinia kuin myös tiettyjä B-vitamiineja. Koivun lehtiä (ja etenkin silmuja) käytetään myös luontaistuotteissa ja yrttilääkinnässä, jossa etenkin silmujen uskotaan omaavan piristävän ja desinfioivan vaikutuksen. Koivun lehdistä ja silmuista valmistettuja luontaistuotteita on käytetty virtsateiden, maksa- ja sappivaivojen hoitoon. (Rautavaara 1980; Zyryanova ja muut 2010; Svanberg ja muut 2012; Niemi 2015.) C-vitamiinia koivunlehdissä on aiemmin havaittu olevan keskimäärin noin 425 mg / 100 g lehtiä (Rautavaara 1980). Koivun lehtiä kuvaillaan yrttinä tuoksultaan miedon aromikkaaksi, mutta maultaan jokseenkin karvaaksi (Raal 2010).

Koivunlehtien terveysvaikutuksia on liitetty niiden sisältämiin yhdisteisiin. Diureettinen vaikutus on liitetty lehtien sisältämiin flavonoideihin ja tulehduksia ehkäisevä puolestaan lehtien sisältämiin metyyllisalisylaatteihin (Maaranen ja Maaranen 2003; Raal 2010). Tarkasteltaessa koivunlehtien fenolisia yhdisteitä on syytä huomata, että raudus- ja hieskoivut poikkeavat toisistaan lehtien sisältämien fenolisten yhdisteiden osalta. Rauduskoivun lehdet sisältävät 1–3 % flavonoidien glykosideja, joista suurimman osan on todettu olevan hyperosidiä (Kuva 10, kversetiinin 3-O-galaktosidi) ja muita kversetiiniä sisältäviä flavonoidien glykosideja, erinäisten myrisetiinin glykosidien ja klorogeenihapon ollessa pitoisuudeltaan seuraavaksi tärkeimmät yhdisteet. (Keinänen ja Julkunen-Tiitto 1998.) Fenolisten yhdisteiden pitoisuuksien on todettu vaihtelevan kasvukauden kuluessa (Ossipov ja muut 1996; Raal 2010). Koivun lehtien eteerisen öljyn sisältämien yhdisteiden profiilia on myös tutkittu pitkälti koivun perinnelääketieteellisen käytön ja hyödyllisyyden selvittämiseksi sekä pyrkimyksenä pystyä erottamaan eri koivulajit toisistaan eteerisen öljyn perusteella. Lehtien eteerisen öljyn koostumus muuttuu kasvukauden aikana, kuten havainnot rauduskoivun silmujen ja lehtien eteerisen öljyn toisistaan poikkeavasta pitoisuudesta osoittavat. (Orav ja muut 2011.) Koivunlehdet sisältävät runsaasti myös sekä hydrolysoituvia että kondensoituneita tanniineita (proantosyanidiineja), joita on tutkittu runsaasti niiden hyönteisiä karkottavien ominaisuuksien takia (Kause ja muut 1999; Ossipov ja muut 2003).



Kuva 10. Hyperosidi

Koivun lehdistä suojakaasun alaisena vesiuutolla eristetyllä uutteella on osoitettu *in vitro* olevan käyttömahdollisuuksia immuunijärjestelmän häiriöiden, kuten nivelreuman hoidossa joskaan vastaavaa hyötyä ei elintarvikekäytössä uskota olevan, koska flavonoidien glykosidit hajoavat nopeasti *in vivo* (Gründemann ja muut 2011). Koivunlehtien sisältämien fenolisten yhdisteiden, kuten hyperosidin, mahdollisuuksia tyrosinaasin inhibiittoreina, kuten myös fenolisten yhdisteiden tehokkuutta antioksidantteina ja metalli-ioneita kelatoivina yhdisteinä, on myös tutkittu. Näillä yhdisteillä voisi olla sovellutuksia niin ihon pigmentti ongelmien hoidossa kuin myös hedelmien ja vihannesten ruskettumisen hidastamisessa. (Germanò ja muut 2012.) Koivunlehtiuutteella on eläinkokeissa myös havaittu olevan vaikutusta silmän sarveiskalvon tulehduksen oireiden lievittämisessä (Wacker ja muut 2012). Rauduskoivun lehtien asetoniuutteella on todettu olevan joitain antimikrobiaalisia vaikutuksia, mutta näiden on kuitenkin havaittu olevan liian heikkoja, jotta jalostamattomalla koivunlehtiuutteella olisi käytännön arvoa elintarvikkeiden säilöntäaineena (Rauha ja muut 2000).

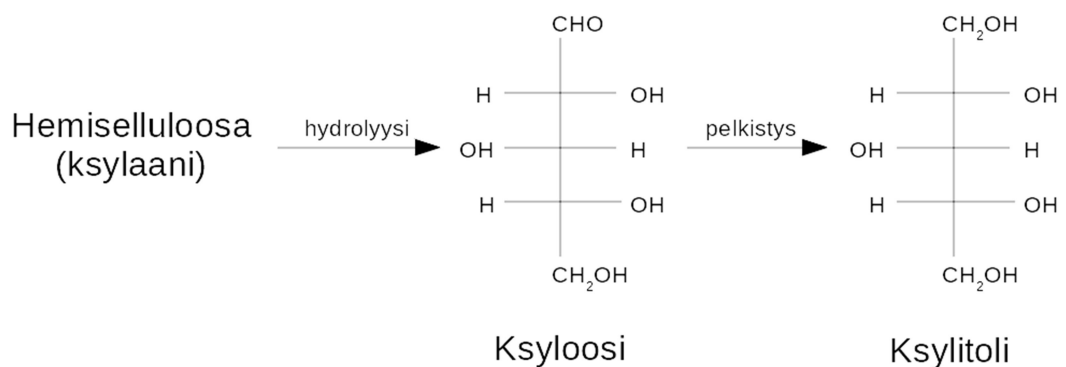
2.4 Koivun runko

Vaikka koivun runko ei sinänsä ole elintarvikkeeksi kelpaavaa, voidaan siitä valmistaa elintarviketuotannon raaka-aineita. Näistä koivun suhteen paras esimerkki on ksylitoli, eli koivusokeri ($C_5H_7(OH)_5$, d-ksylitoli), jota voidaan valmistaa usean eri puulajin (mm. koivut) hemiselluloosasta. Lisäksi koivun selluteollisuuden sivutuotteena tuotetaan jo nyt sitosterolia ja karboksimeetyliselluloosaa. (Niemistö ja muut 2008; Niemi 2015.)

Vaikka ksylitoli yhdisteenä onkin ollut tunnettu jo 1800-lopulta lähtien, ei siihen elintarvikekäytössä kiinnitetty huomiota ennen havaintoa 1900-luvun puolivälissä sen toimimisesta osana normaalia hiilihydraattimetaboliaa. Tämän jälkeen kiinnostus ksylitolia kohtaan kasvoi runsaasti niin diabeetikoille soveltuvana makeutusaineena kuin myös sen kariesta ehkäisevän vaikutuksen takia. (Hyvönen ja muut 1982.) Varsinaisesti jo pienen ksylitolimäärän hyödyllinen vaikutus kariesta ehkäisevänä osana

ruokavaliota todettiin pitkäkestoisissa Turun sokeritutkimuksissa 1970-luvulla (Scheinin ja muut 1975; Scheinin ja Mäkinen 1976).

Kemiallisesti ksylitoli ei ole sokeri, vaan sokerialkoholi. Luonnossa ksylitolia esiintyy vain hyvin vähäisissä määrissä eikä sen eristäminen ole yleisesti ottaen kaupallisesti kannattavaa. Ksylitolia voidaan kuitenkin valmistaa verrattain helposti pelkistämällä ksyloosia, jota puolestaan saadaan kasvien hemiselluloosan ksylaanista (Kuva 11). On tosin tärkeää tiedostaa, ettei koivu enää ole tärkein hemiselluloosan eikä siten myös ksylitolinkaan raaka-aineista. (Velling 2008a; Niemi 2015.)

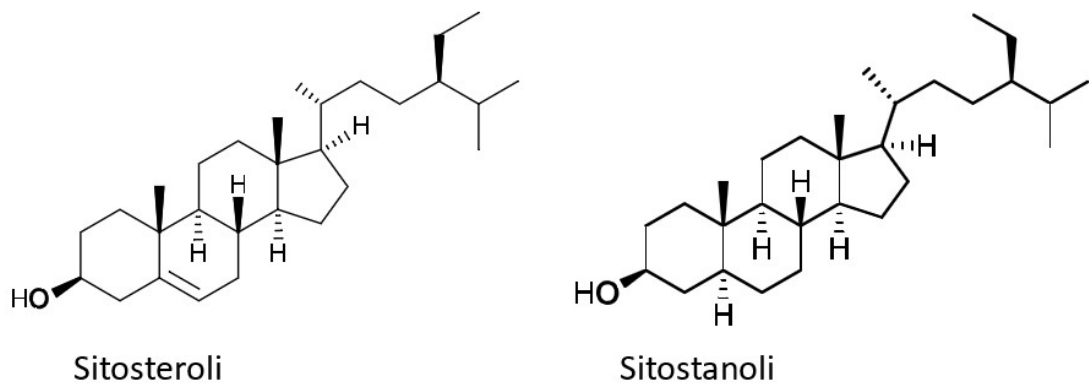


Kuva 11. Ksylitolin valmistuksen periaate

Nykypäiviin saakka jatkuneet tutkimukset tukevat aiempia päätelmiä ksylitolin kariesta ehkäisevästä vaikutuksesta, sekä myös ksylitolin turvallisuudesta. Ksylitolin jatkuvalla käytöllä on havaittu olevan selkeä kariesta ehkäisevä vaikutus, vaikka sen varsinaista vaikutustapaa ei vielä voida varmuudella esittääkään. On kuitenkin huomattava, että pääosa tutkimuksista on keskittynyt ksylitolin kariksen vastaisen vaikutuksen määrittämiseen jolloin ksylitolin muiden vaikutusten arviointi on ollut hyvin rajallista. (Fontana ja González-Cabezas 2012.) On myös alustavia tuloksia ksylitolia sisältävien fluorihammastahnojen vaikutuksista, mutta kyseisten kliinisten tutkimusten sinänsä lupaavat tulokset eivät vielä mahdollista päätelmien tekemistä tutkimusten rajoitusten takia (Fontana 2016).

Teollisesti kasvisteroleita, kuten koivusta saatavaa sitosterolia (Kuva 12), on tuotettu puuteollisuuden sivutuotteenaan tuottamasta muuhun käyttöön soveltumattomasta

puumassasta. Aiemmin tästä massasta saatujen yhdisteiden pääasiallisina kuluttajina olivat kosmetiikka- ja lääketeollisuus. (Lehenkari 2000.) Kasveista saatavia kasvisteroleita on lisätty korkeasta kolesterolitasosta kärsivien potilaitten ruokavalioon 1950-luvulta lähtien. On havaittu, että kasvisterolit vähentävät kolesterolin imeytymistä, joskin niiden vaikutus seerumin kolesterolitasoon on ollut vähäinen. (Farquhar ja muut 1956; Lees ja muut 1977.) Sitostanolin (Kuva 12), sitosterolista katalyyttisesti pelkistämällä valmistetun johdannaisen, on havaittu olevan huomattavasti kasvisteroleita tehokkaampi seerumin kolesterolipitoisuuden alentamisessa jo huomattavan pienissä pitoisuuksissa (Miettinen ja muut 1990). Tämän takia sitostanolia, tai pikemminkin sitostanolin rasvahappoestereitä, sisältävä margariini voi tehokkaasti alentaa korkean kolesterolin aiheuttamia ongelmia koko väestön osalta (Miettinen ja muut 1995).



Kuva 12. Sitosteroli ja sitostanoli

Selluloosateollisuuden puumassa, jota tuotetaan myös koivuista, koostuu pääosin selluloosasta. Selluloosasta tuotettavia yhdisteitä on huomattavan lukuisa joukko, joihin lukeutuu myös useita elintarvikkeiden lisäaineiksi hyväksytyjä yhdisteitä. Vesiliukoisista elintarvikkeiden lisäaineeksi hyväksytyistä selluloosajohdannaisista merkittävin on karboksimeetyliselluloosa (carboxymethyl cellulose, eli CMC). Sillä on useita käyttötarkoituksia aina elintarvikkeiden lisäaineesta pesuaineisiin, kosmetiikkaan ja lääketeollisuuteen. (Olaru ja muut 1998.)

3 Päätelmät

Tarkasteltaessa koivun merkitystä elintarvikkeena ei koivunmahlan ja siitä valmistettavien elintarvikkeiden roolia voi vähätellä. On kuitenkin huomattava, että koivunmahlan tuotanto on varsin vähäistä verrattuna esimerkiksi vaahterasta kerättävän mahlan tuotantoon. Vaikka koivunmahlalla on huomattavan suuri rooli koivun asemassa elintarvikkeena tai elintarvikkeiden raaka-aineena, ei muita koivun osia sovi myöskään unohtaa. Koivun lehdet ovat käyttökelpoisia niin ruokien kuin juomienkin valmistuksessa ja jopa koivun nilasta valmistettujen jauhojen käyttökelpoisuutta on selvitelty. Pohdittaessa koivun käyttökelpoisuutta elintarvikkeena on tärkeä huomata, että eri komponenttien koostumuksen vuotuinen vaihtelu on hyvin suurta, samoin kuin myös vaihtelu kasvupaikkojen välillä. Tämä on usein suurempaa kuin vaihtelu eri koivulajien (riippakoivu, hieskoivu) saatikka eri lajikkeiden (*B. pendula*, *B. pendula* var. *carelica*) välillä. Tämän takia on hyvin vaikeaa päätellä mahdollisen uuden elintarvikekäyttöön tarkoitetun koivikon käyttökelpoisuutta etukäteen.

Koivuista saatavien tai siitä tuotettavien elintarvikkeiden tuotannossa on kuitenkin ongelmansa. Ehkä selkeimpänä ongelmana on elintarvike tuotantoon käytettyjen koivujen mahdollisen muun jalostusarvon lasku. Vaikka tämä ei sinänsä vaikuta elintarvike tuotantoon, se vaikuttaa suuresti metsänomistajien innokkuuteen alkaa tai edes sallia elintarvikkeiden tuottaminen omistuksessaan olevista koivuista. Aiemmin suurena ongelmana koivunmahlan teollisessa käytössä on ollut sen huono säilyvyys, mutta nykyaikaisilla menetelmillä tätä ongelmaa on kyetty paremmin hallitsemaan. Vaikka parempien tuotantomenetelmien takia koivunmahlaa on nykyään saatavilla ympäri vuoden, ne eivät kuitenkaan pidennä koivunmahlan varsinaista tuotantokautta, joka tyypillisesti kestää vain noin kuukauden. Koska koivunmahla on hyvin herkkää pilaantumaan, on koivunmahlan ja siihen liittyvien elintarvikkeiden tuotanto hyvin kausittaista, mikä vähentää innostusta tuottaa elintarvikkeita koivusta. Koivusiirappi puolestaan olisi varsin mallikelpoinen elintarvike, mutta sen tuotantokustannukset johtuen koivunmahlan alhaisesta sokeripitoisuudesta tekevät helposti koivusiirapin tuotannosta kannattamatonta.

On myös huomattava koivun sisältämien bioaktiivisten yhdisteiden mahdollisuudet niin elintarvikkeiden, funktionaalisten elintarvikkeiden, kuin myös luontaistuotteiden osalta. Huolimatta siitä, että tiettyjen yhdisteiden hyödyntäminen suoraan elintarvikkeesta ei välttämättä ole vielä nykyään mahdollista, kuten koivun kuoren betuliinin ja betuliinihapon, ei näiden yhdisteiden mahdollisia käyttötarkoituksia voi unohtaa. Koivunlehdet ja niistä uutettavat erinäiset bioaktiiviset yhdisteet omaavat runsaasti mahdollisuuksia niin lääketieteen kuin elintarviketeollisuudenkin käyttöön.

II KOKEELLINEN OSA - Koivunsilmujen hiilidioksidiuutteen kemiallinen karakterisointi kromatografisesti ja massaspektrometrisesti

4 Työn tarkoitus

Työn tarkoituksena oli tutkia ja tarkastella ylikriittisellä hiilidioksidilla uutetusta koivunsilmusta eristettyjä yhdisteitä. Koska tiedettiin kasvien varastoivan osan tarvitsemastaan energiasta lipideinä (Kozlowski ja Pallardy 1997), oletettiin uutteen koostuvan merkittävässä määrin niistä. Tämän takia näytteen esikäsittely- ja myös analyysimenetelmät valittiin lipidianalyysien mukaisesti. Myös varsinaiset menetelmät valittiin erityisesti niin haihtuvia yhdisteitä kuin lipidejä ja niiden fraktiointia ja analysointia ajatellen. Uutto ylikriittisellä hiilidioksidilla oli mielekäs valinta, sillä ylikriittinen hiilidioksidi uuttaa jo alhaisissa paineissa ja lämpötiloissa haihtuvien yhdisteiden lisäksi myös poolittomia yhdisteitä (mm. poolittomat lipidit) varsin tehokkaasti ja se on pehmeä menetelmä verrattaessa yleisesti haihtuvilla yhdisteillä käytettyyn höyry- tai vesihöyrytislaukseen. (Illés ja muut 2000.)

5 Materiaalit ja menetelmät

5.1 Laitteet ja reagenssit

Työssä käytetyt liuottimet (Taulukko 2), SPE- ja TLC-laitteistot (Taulukko 3), haihtuvien yhdisteiden analysointiin käytetty GC-FID-laitteisto (Taulukko 4), rasvahappojen metyyliestereiden GC-FID-analysointiin käytetty laitteisto (Taulukko 5), haihtuvien yhdisteiden GC-MS-analyseissa käytetty laitteisto (Taulukko 6), HPLC- ja MS-laitteistot (Taulukko 7), sekä työssä käytetyt standardit (Taulukko 8) on taulukoittain eriteltyinä

Taulukko 2. Liuottimet

Heksaani:	Mallinckrodt HPLC Grade, M9006, lot. 0417510019
Metanoli:	J. T. Baker HPLC Analyzed, 8402, lot. 0503240012
	VWR for HPLC Gradient Grade, 20864.320, batch 04Z4069
Isopropanoli:	J. T. Baker, Baker HPCL Analyzed, lot. 0324510018
Dietyylieetteri:	Anhydrous, Bakar Analyzed, 8254, lot. 0435620001
2,7-diklorofluoreskeiini:	Merck, 9676, nro. 731L225576, käytettiin varastosta saatua
Etikkahappo:	J. T. Baker, 6052, lot. 0327910010
Kloroformi:	Mallinckrodt, M9003, lot. 0326510015
Natriummetoksidi:	Valmistettu lisäämällä ja liuottamalla natrium lastuja HPLC metanoliin
Metyyliasettaatti:	Sigma-Aldrich, for HPLC, lot. 419831/1

Taulukko 3. SPE- ja TLC-laitteisto

SPE-kolonnit:	Waters, Sep-Pak Silica Classic (690 mg), Lot. 046535082B
TLC-ajokammio:	Camag Horizontal Development Chamber
TLC-applikointi ohjuri:	Camag Nanomat III
TLC-kapillaarit:	Camag, 0,5 µl
	Camag, 1,0 µl
UV-kammio:	Camag UV cabinet (254/366 nm)
TLC-lukija:	Camag TLC Scanner 3
Kamera:	Canon Digital Ixus V2
TLC-levyt:	Merck 1.05721, 20 x 20 cm silica gel 60
HPTLC-levyt:	Merck 1.05628, 10 x 10 cm silica gel 60 & F ₂₅₄ , lot. 0B049247

Taulukko 4. GC-FID (haihtuvat yhdisteet)

GC-ruisku:	Hamilton 10 µl
GC:	Varian 3300 GC-FID
GC-kolonne:	Hewlett Packard HP-5, 30 m, id. 0,25 mm, d _f 0,25 µm

Taulukko 5. GC-FID (rasvahappojen metyyliesterit)

GC:	Perkin-Elmer Autosystem GC
GC-kolonne:	DB-23, 60 m, id 0,25 mm, d _f 0,25 µm.
Sentrifuugi	Labofuge 200, Heraeus, Sepatech

Taulukko 6. GC-MS

GC-ruisku:	Hamilton 10 µl
GC:	Shimadzu GC-17A
MS:	Shimadzu GCMS-QP5000
GC-kolonne:	Hewlett Packard HP-5, 30 m, id. 0,25 mm, d _f 0,25 µm

Taulukko 7. HPLC ja MS

HPLC-pumppu:	Hitachi L-6200A
HPLC-kolonne:	Supelco Discovery HS C18, 25 cm x 4,6 mm, 5 µm RP-HPLC
HPLC-injektiosilmukka:	20 µl
MS:	Finnigan MAT TSQ 700
ELSD:	S.E.D.E.R.E. Sedex 75, ELSD

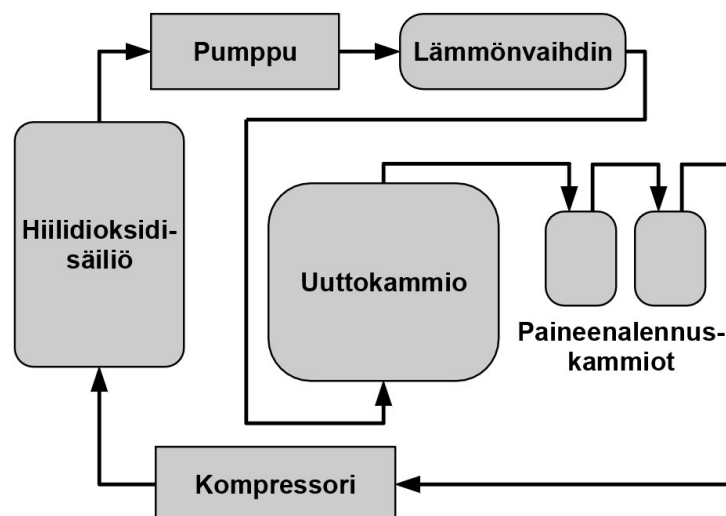
Taulukko 8. Käytetyt standardit

ASTM-P-0050	AccuStandard Inc, Stock Sim Dis Paraffin Solution
	Koostumus: Suoraketjuiset hiilivedyt hiililuvultaan 5-12, 14-18 ja 20. N-dodekaanin pitoisuus oli kaksinkertainen muihin hiilivetyihin verrattuna.
DRH-008S-R2	AccuStandard Inc, Hydrocarbon Window Defining Standard
	Koostumus: Suoraketjuiset hiilivedyt hiililuvultaan 8-40, sekä pristaania ja fytaania. Kaikkien komponenttien pitoisuus oli sama.
18-4A	Nu-Check-Prep, TLC Reference Standard
	Koostumus: Yhtä suuret pitoisuudet kolesterolia (C), kolesteryyliolettia (CE), trioleiinia (TAG), öljyhappoa (FFA) ja metyyliolettia (FAME).
19:0 TAG	Larodan AB, 33-1900-12
GLC-68D	Nu-Check-Prep, GLC Reference Standard
	Koostumus: Rasvahappojen 14:0, 14:1(n-5), 16:0, 16:1(n-7), 18:0, 18:1(n-9), 18:1(n-7), 18:2(n-6), 18:3(n-3), 20:0, 20:1(n-9), 20:2(n-6), 20:4(n-6), 20:3(n-3), 20:5(n-3), 22:0, 22:1(n-9), 22:6(n-3), 24:0 ja 24:1(n-9) metyyliesterit

5.2 Koivunsilmu-uute ja uutto ylikriittisellä hiilidioksidilla

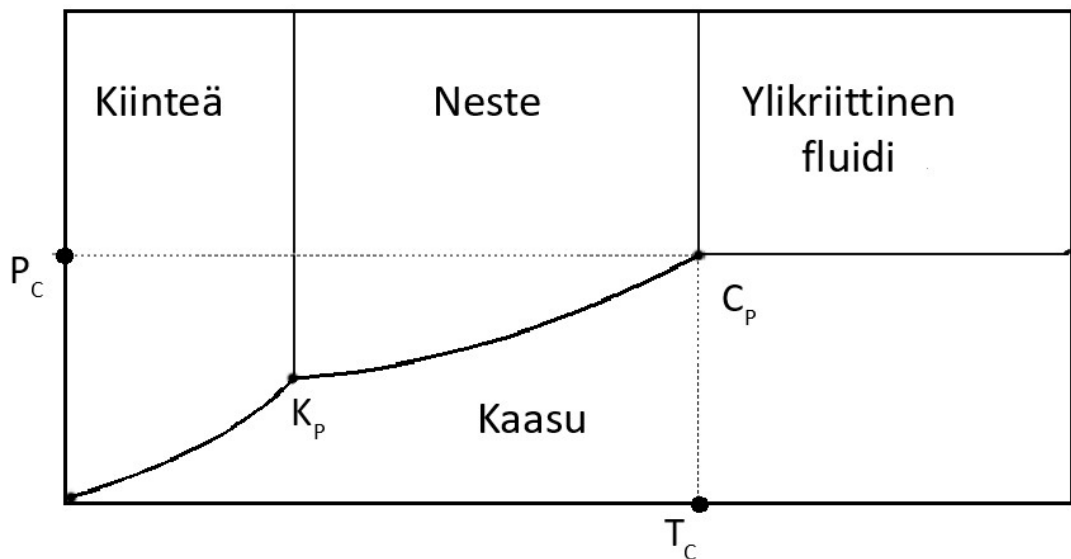
Ylikriittisessä tilassa oleva hiilidioksidi on pooliton fluidi, jolla on sekä nesteen että kaasun ominaisuuksia. Se omaa kaasun diffuusio-ominaisuudet sekä nesteen liuot ominaisuuksia. Nämä ominaisuudet tekevät siitä hyvän vaihtoehdon tai korvaajan tavanomaisesti käytetyille orgaanisille liuottimille. Ylikriittinen hiilidioksidi on huomattavasti orgaanisia liuottimia helpompi poistaa uutteesta eikä se ole toksinen toisin kuin useimmat orgaanisista liuottimista. (Fornari ja muut 2012.) Lisäksi ylikriittisen hiilidioksidin liuot ominaisuuksia voidaan muokata säätämällä sen lämpötilaa ja painetta, jolloin sillä voidaan uuttaa selektiivisesti eri fraktioita näytteestä. Ylikriittisessä tilassa olevaan hiilidioksidiin voidaan myös lisätä modifikaattoreita kuten esimerkiksi pieniä määriä orgaanista liuotinta, joilla edelleen voidaan muokata fluidin liuot ominaisuuksia. (Pourmortazavi ja Hajimirsadeghi 2007.)

Uutettaessa ylikriittisellä hiilidioksidilla näyte asetetaan paineistettuun uuttolaitteistoon. Pääpiirteissään laitteisto koostuu paineistetusta hiilidioksidin varastosäiliöstä, pumpuista, lämmönvaihtimesta, uuttokammioista sekä paineenalennuskammioista (Kuva 13). Varastosäiliössä tuleva nestemäinen hiilidioksidi pumpataan korkeassa paineessa ja johdetaan nestemäisenä lämmönvaihtimeen, jossa se saatetaan ylikriittiseen tilaan kuumentamalla paineistettua hiilidioksidia kunnes kriittinen piste saavutetaan (Kuva 14).



Kuva 13. Kaaviokuva ylikriittistä hiilidioksidia käyttävästä uuttolaitteistosta

Hiilidioksidilla kriittinen piste saavutetaan paineen ollessa 7,38 MPa ja lämpötilan 304,1 K. Tuotettu ylikriittinen fluidi johdetaan uuttokammioon, jossa se uutaa näytteestä lähinnä poolittomia ja haihtuvia yhdisteitä. Koska näytteen rakenne saattaa joko estää ylikriittistä hiilidioksidia tunkeutumasta näytteen läpi tai aiheuttaa näytteen kulkeutumisen ylikriittisen fluidin mukana, on näytteen myllytyksellä sekä muulla esikäsittelyllä suuri merkitys uuttoaantoihin. Saatu uute ja liuotin johdetaan paineenalennuskammioon, jossa paineen laskiessa ylikriittinen hiilidioksidi muuttuu taas kaasumaiseksi hiilidioksidiksi eikä enää kykene kuljettamaan uutetta mukanaan, jolloin ylikriittisessä tilassa olleen hiilidioksidin mukana kulkeutuneet uutetut yhdisteet jäävät paineenalennuskammioon. Alennettaessa laitteiston painetta vaiheittain useiden erillisten paineenalennuskammioiden kautta voidaan uutettuja yhdisteitä fraktioida eri paineenalennuskammioihin. Jäähdytynyt kaasumainen hiilidioksidi johdetaan edelleen kompressorille, josta se paineen alla nesteytettynä kulkeutuu takaisin hiilidioksidisäiliöön.



Kuva 14. Faasidiagrammi, pystyakselilla paine, vaaka-akselilla lämpötila. C_p on kriittinen piste jota vastaava lämpötila on T_c ja paine P_c . K_p on kolmoispiste, jossa aineen kaasumainen, nestemäinen ja kiinteä olomuoto ovat tasapainossa

Työssä tutkittu koivunsilmujen (*Betula pendula*) hiilidioksidiuute eristettiin Aromtech Oy:n tiloissa Torniossa. Ennen uuttoa koivunsilmut jauhettiin myllyillä uuttoa saannon

parantamiseksi. Tämän jälkeen jauhetut koivunsilmut ladattiin pilottimittakaavan ylikriittiseen uuttolaitteeseen ja uutettiin ylikriittisellä hiilidioksidilla (90 bar, 35 °C, 150–180 min). Uuton ja sitä seuranneen selkeytyksen jälkeen uute kerättiin talteen ja sitä säilytettiin kylmässä (–20 °C).

5.3 SPE ja TLC

Kiinteäfaasiuutto (Solid Phase Extraction, SPE) perustuu näytteen eluotumiseen kiinteällä faasilla täytetyn kolonnin läpi samalla tavoin kuin kolonni- tai nestekromatografiassa. Yhdisteiden retentioon kolonnissa voidaan vaikuttaa valitsemalla tutkittavien näytteiden erotukseen soveltuva kiinteän faasin ja käytettävien liuottimien yhdistelmä, jolloin kolonnista voidaan selektiivisesti eluoida haluttuja näytekomponentteja. Kiinteäfaasiuuton käyttö näytteen fraktioinnissa perustui muokattuun lipidiluokkien fraktiointimenetelmään (Hamilton 1984; Hamilton 1988). Erotuksessa käytettiin silikakolonneja (Sep-Pak, Waters). Kolonneja säilytettiin 10 kolonnin sinetöidyissä pakkauksissa, kunnes ne avattiin, jonka jälkeen avattuja pakkauksia säilytettiin eksikaattorissa. Ennen fraktiointia SPE-silikakolonne puhdistettiin ajamalla sen läpi ensin 4 ml heksaanin ja dietyylieetterin seosta (96:4) ja sen jälkeen 6 ml heksaania. Kaikki näytteet applikoitiin kolonniin heksaanissa. Näytteitä jouduttiin myös laimentamaan ennen analyysiä heksaanilla ja kolonniin applikoitiin vain pieni määrä näytettä. Menetelmää pyrittiin optimoimaan kokeilemalla erilaisia liuotinmääriä ja liuotinvahvuuksia, sillä näiden tiedetään vaikuttavan näytteen fraktiointiin ja yhdisteiden eluotumiseen käytetystä SPE-kolonnista.

Tavoitteena SPE-fraktioinnissa oli jakaa fraktioitavat yhdisteet mahdollisimman puhtaisiin fraktioihin analyysejä varten. Etenkin puhtaan triasyloglyserolifraktion erottamisen katsottiin olevan tärkeää näytteen koostumuksesta tehtyjen olettamuksien perusteella. SPE-erotuksen lopuksi fraktioiden liuottimet haihdutettiin kuiviin typpivirrassa ilman lämmitystä normaalissa huonelämpötilassa (20–25 °C) ja näyte siirrettiin uudessa liuottimessa (heksaani, metanoli tai kloroformi) näytepulloon ja sijoitettiin pakkaseen (–20 °C).

Kiinteäfaasiuutolla suoritettujen fraktioinnin onnistumista seurattiin ohutkerroskromatografian avulla. Ohutkerroskromatografiaa (Thin Layer Chromatography, TLC) käytettiin SPE-fraktioiden puhtauden tarkistukseen, sekä myös yhdisteryhmien tunnistamiseen. Ohutkerroskromatografiassa tutkittava näyte applikoidaan kiinteän faasin päälle, joka puolestaan on usein kiinnitetty tukevampaan taustamateriaaliin kuten lasilevyyn. Tämä kiinteä ja huokoinen faasi imee kapillaarivoimalla levyn eluointiin käytettyä liuotinta tai liuotinseosta levyn pintaa myöden, jolloin käytetty liuotin alkaa liikuttaa näytekomponentteja kiinteän faasin läpi. Käytetyillä faaseilla ja liuottimilla voidaan vaikuttaa näytekomponenttien retentioon levyn pinnalla, jolloin näytekomponentit saadaan erottumaan toisistaan.

5.3.1 TLC-analyysit

Alustavassa työvaiheessa käytettiin tavanomaisia silikapohjaisia TLC-levyjä (Merck, 20 x 20 cm). Varsinaisissa analyyseissä käytettiin silikapohjaisia korkean erotuskyvyn ohutkerroskromatografia (High Performance Thin Layer Chromatography) -levyjä (Merck, 10 x 10 cm), joiden kapasiteetti oli rajallinen, mutta joiden erotuskyky oli parempi kuin tavallisten TLC-levyjen. Näytteen applikoinnissa käytettiin applikointikapillaari-ohjuria (Camag Nanomat) ja näytteet applikoitiin lasikapillaarien avulla. Käytetty TLC-menetelmä perustui osittain aiemmin kirjallisuudessa julkaistuihin TLC-menetelmiin (Christie 2003). Menetelmää kuitenkin optimoitiin ja yksinkertaistettiin tutkimuksen tarkoituksiin paremmin soveltuvaksi.

Ennen analyysiä TLC-levyjä aktivoitiin noin 2 h lämpökaapissa lämpötilan ollessa hieman yli 100 °C (100–110 °C). Aktivoitujen levyjen annettiin jäähtyä, jonka jälkeen näyte ja standardi sekä ajettavat SPE-fraktioinneilla valmistetut näytefraktiot applikoitiin levyille. Näytteet applikoitiin vähintään 10 mm päähän levyn reunoista, jonka jälkeen niiden annettiin kuivua ennen ajoa. HPTLC-levyt ajettiin horisontaalisella ajokammioilla, jonka sisälle oli ennen ajoa lisätty analyyseissä käytettävää ajoliuosta, kunnes liuotinrintama alkoi lähestyä levyn reunaa, jolloin ajo pysäytettiin ja HPTLC-levy poistettiin ajokammioista. Ajon pysäytyksen jälkeen levyä kuivattiin vetokaapissa. Suuremmilla TLC-levyillä tehtyyn erotukseen käytettiin levyt pystyasennossa pitävää

TLC-kammiota, mutta muutoin menetelmä pidettiin samana. Kuivauksen jälkeen levy värjättiin 2,3-diklorofluoreskeiniin 2-prosenttisella metanoliliuoksella ja annettiin uudelleen kuivua. Levy asetettiin UV-kammioon ja siitä otettiin valokuvia digitaalisella kameralla. Levyn tarkkailua jatkettiin muutamia päiviä, sillä väriaineen vähetessä näytekomponenttien havaitseminen helpottui selkeästi.

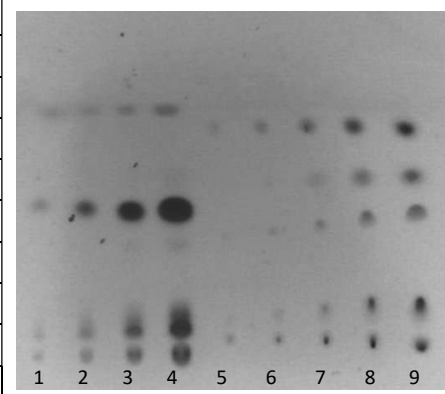
Ohutkerroskromatografia-analyseissä käytetyn ajoliuoksen koostumusta muokattiin saatujen alustavien tulosten mukaisesti. Alkuperäisen menetelmän heksaanin, dietyylieetterin ja etikkahapon seoksen (40 : 10 : 1) havaittiin olevan analysoitavien yhdisteiden kannalta liian polaarinen. Näytteessä ei sen uuttotavan takia pitänyt olla polaarisia yhdisteitä, joiden erottumisen takia alkuperäisessä seoksessa oli ollut etikkahappoa. Lisäksi ei saatu täyttä varmuutta siitä, saataisiinko tämän ajoliuoksen kanssa kaksi ensimmäisinä eluoituvaa näytteen komponenttia erotettua toisistaan riittävän selkeästi. Tätä pyrittiin kokeilemaan analysoimalla tavanomaisella TLC-levyllä sarja standardi- ja näytelaimennoksia. Standardeiksi valittiin tunnettu stanoliesterien, triasylyglyserolien ja fosfolipidien seos, kaupallinen 18-4A standardi (kolesterolin, kolesteryylioleaatin, trioleiinin, oleiininhapon ja metyylioleaatin seos) ja lisäksi näyte. Näytelaimennos valmistettiin punnitsemalla 157,5 mg alkuperäistä näytettä, joka liuotettiin 2 ml:aan heksaania, jolloin sen pitoisuudeksi saatiin 78,75 mg/ml. Saatujen tulosten takia menetelmää muokattiin sekä havaintojen että aiemmin julkaistujen tulosten mukaisesti (Christie 2003). Kokeiltaessa erilaisia liuotineseoksia ja vertailtaessa niiden koostumusta käytettyyn SPE-fraktiointimenetelmään, jossa myös käytettiin silikapohjaista erotusmenetelmää, havaittiin heksaanin ja dietyylieetterin seoksen (3:1) toimivan tutkimuksen kannalta riittävän hyvin.

Menetelmän toimivuuden varmentamiseksi valmistettiin laimennossarja TLC-analyysiä varten käyttäen näytteinä sekä koivunsilmu-uutteen että TLC-standardin (18-4A) laimennoksia, jotka applikoitiin TLC-levyn alareunaan vasemmalta alkaen. Viimeistä 40 µl:n tilavuutta lukuun ottamatta analysoitavat laimennokset applikoitiin käyttäen 0,5 µl:n kapillaareja. Näiden sijasta 40 µl tilavuuden applikointiin käytettiin Finn-pipettiä (Taulukko 9). TLC-levystä, jolla erotettiin standardi- ja näytelaimennoksia otettiin kuva värjäyksen jälkeen UV-valossa (Taulukko 9). Analysoitavaksi valittiin

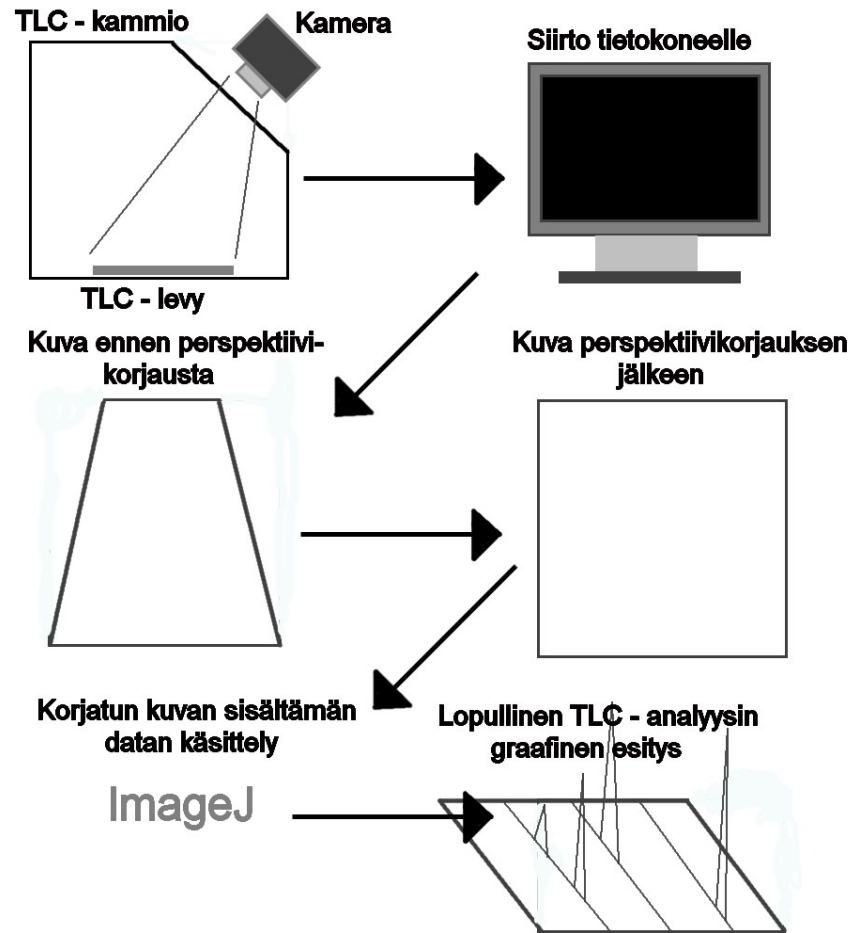
näytelaimennoksista vähiten edenneet komponentit, joista tiedettiin vertailtavien näytelaimennosten suhteelliset pitoisuudet (Taulukko 9).

Taulukko 9. TLC-analyysin laimennossarjat (Heksaani : Et₂O, 3 : 1). Kuvassa levyn ajosuunta on ylöspäin.

Paikka	Analyytti	Tilavuus	Analyytin määrä
1	Näyte	2,5 µl	13,8 µg
2	Näyte	5,0 µl	27,6 µg
3	Näyte	10 µl	55,2 µg
4	Näyte	20 µl	110 µg
5	STD (18-4A)	2,5 µl	2,5 µg
6	STD (18-4A)	5,0 µl	5,0 µg
7	STD (18-4A)	10 µl	10 µg
8	STD (18-4A)	20 µl	20 µg
9	STD (18-4A)	40 µl	40 µg



Pyrittäessä tulkitsemaan saatuja värjättyjä TLC-levyjä havaittiin tarve tarkemmalle levyn tulkintatavalle. TLC-levyjä pyrittiin kuvaamaan erillisellä TLC-levyn lukijalla (Camag TLC Scanner 3), mutta nopeasti havaittiin tavanomaisella digitaalisella kameralla otettujen kuvien olevan riittävän tarkkoja tietokoneella tehtävää jatkokäsittelyä sekä kuvan ja tulosten tulkintaa ajatellen. Digitaalisella kameralla (Canon Digital Camera, Ixus V2) otetut kuvat ladattiin tietokoneeseen jossa niitä käsiteltiin muuttamalla kuva harmaasävykuvaksi ja korjaamalla kuvaustavan takia muodostunut perspektiivivirhe kuvankäsittelyohjelmalla (Kuva 15). Käsitellyt kuvat analysoitiin ImageJ-nimisellä ohjelmalla, jotta havaittujen näyteläikkien kirkkaus ja siten myös vastaavasti pitoisuus saatiin määritettyä (Abramoff ja muut 2004). Yhdisteiden tunnistamisessa käytettiin lipidianalyysiin tarkoitettua TLC-standardia 18-4A (Nu-Chek-Prep), joka koostui massaltaan yhtä suurista osuuksista kolesterolia, kolesteryylioleaattia, trioleiinia, öljyhappoa ja metyylioleaattia. Käytetty lipidistandardi valittiin ennen näytteen analysointia, koska näytteen yhä oletettiin koostuvan merkittävässä määrin lipideistä.



Kuva 15. Kaavio perspektiivikorjauksesta ja datan käsittelystä

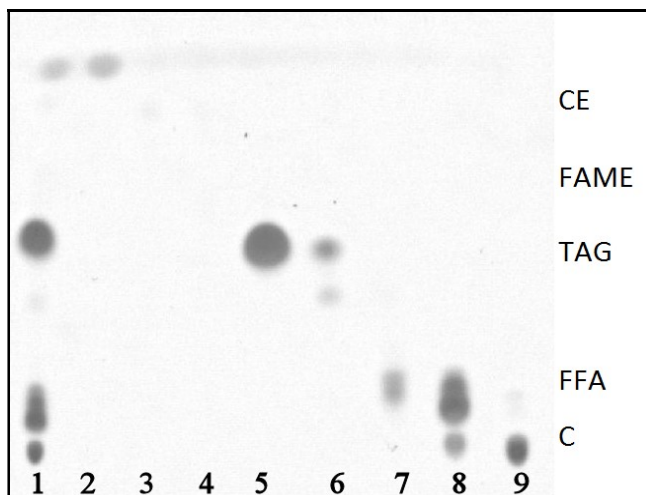
5.3.2 SPE-fraktioinnin optimointi

Fraktioinnin tavoitteena oli tuottaa myöhäisempiä analyysjä varten riittävän puhtaita mielenkiinnon kohteina olleita rasvahappoja sisältäviä jakeita. Näiksi oli valittu rasvahappojen metyyliesterit ja triasyyliglyserolit. Fraktiointeja suunniteltiin aikaisempaan fraktiointiin perustuneella menetelmällä, jota oli muokattu vaihtamalla yhtenä eluointiliuosten komponenttina olleen metyyli-*tert*-butyylietteri dietylietteriin (Christie 1992). Pieni määrä heksaaniin liuotettua näytettä lisättiin suoraan SPE-kolonniin päälle fraktioinnin alkaessa. Fraktiointimenetelmää muokattiin fraktioinnin jatkuessa soveltumaan paremmin käytetylle näytemateriaalille ja erotustavoitteille (Taulukko 10).

Taulukko 10. Fraktioiden optimointi

Fraktioiden numero (näytemäärä)	Näytefraktion tunnus Eluotiliuoksen koostumus ja komponenttien suhteet Käytetty eluotiliuoksen määrä							
	0101	0102	0103	0104	0105	0106	0107	
1.	Hex	Hex 250 Et ₂ O 1	Hex 24 Et ₂ O 1	Hex 24 Et ₂ O 1	Hex 500 Et ₂ O 10 AcOH 1	Et ₂ O 500 AcOH 1	MQ	
(48 mg)	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	
2.	Hex	Hex 200 Et ₂ O 1	Hex 24 Et ₂ O 1	Hex 500 Et ₂ O 10 AcOH 1	Et ₂ O 500 AcOH 1	MeOH	-	
(9,5 mg)	2 ml	4 ml	6 ml	3 ml	6 ml	6 ml	-	
3.	Hex 199 Et ₂ O 1	Hex 99 Et ₂ O 1	Hex 49 Et ₂ O 1	Hex 97 Et ₂ O 3	Et ₂ O 500 AcOH 1	MeOH		
(16 mg)	4 ml	3 ml	4 ml	9 ml	6 ml	9 ml		
4.	Hex 199 Et ₂ O 1	Hex 99 Et ₂ O 1	Hex 49 Et ₂ O 1	Hex 97 Et ₂ O 3	Hex 24 Et ₂ O 1	Hex 24 Et ₂ O 1	Hex 3 Et ₂ O 1	Hex 1 Et ₂ O 1
(11 mg)	4 ml	4 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	4 ml	6 ml
5.	Hex 199 Et ₂ O 1	Hex 199 Et ₂ O 1	Hex 199 Et ₂ O 1	Hex 199 Et ₂ O 1	Hex 199 Et ₂ O 1	Hex 97 Et ₂ O 3	Hex 97 Et ₂ O 3	Hex 24 Et ₂ O 1
	4 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	4 ml	4 ml	6 ml
	Hex 24 Et ₂ O 1	Hex 9 Et ₂ O 1	Hex 4 Et ₂ O 1	Hex 4 Et ₂ O 1	Hex 7 Et ₂ O 3	Hex 3 Et ₂ O 2	Hex 1 Et ₂ O 1	Et ₂ O
(5,5 mg)	6 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	6 ml
6.	Hex 199 Et ₂ O 1	Hex 199 Et ₂ O 1	Hex 199 Et ₂ O 1	Hex 97 Et ₂ O 3	Hex 24 Et ₂ O 1	Hex 3 Et ₂ O 1	Hex 1 Et ₂ O 1	Et ₂ O
(11 mg)	4 ml	6 ml	6 ml	6 ml	6 ml	4 ml	4 ml	6 ml

Tarkasteltaessa ensimmäisen fraktioiden tuloksia kävi ilmi, että käytetty näytemäärä oli liian suuri ja tämän takia näytemäärää vähennettiin. Samalla tuli selväksi ettei toivottua erottumista lipidiluokiksi otaksuttujen komponenttien välillä ollut tapahtunut. Toisessa fraktioiden havaittiin (Liite 1) eluotiliuokseen tehtyjen muutosten olleen riittämättömiä ja lisäksi huomattiin pienen määrän kolonnimateriaalia vuotaneen viimeisen fraktion joukkoon. Tämä sakka liuotettiin metanoliin ja kerättiin omaksi fraktiokseen. Menetelmän muokkaukset, joita tehtiin kolmanteen ja neljänteen fraktiointiin, eivät osoittautuneet riittäviksi, minkä takia viidennessä fraktioiden fraktioita kerättiin huomattavasti enemmän. Viidennen fraktioiden tulosten perusteella fraktiointimenetelmää muokattiin, jotta kuudennessa fraktioiden (Kuva 16) saataisiin kerättyä halutut fraktiot riittävän puhtaina yksinkertaisemmalla menettelyllä.



Kuva 16. Kuudennen fraktioinnin TLC-analyysi. Levyn ajosuunta on ylöspäin

On huomattava, että TLC-levyistä ei varsinaisia luokkatunnistuksia voi tehdä vaan ainoastaan todeta havaittujen yhdisteiden eluutuneen tiettyjen standardiseoksen yhdisteiden tavoin, jolloin havaitut yhdisteet voivat olla joko standardiseoksen yhdisteitä vastaavia yhdisteitä tai vain ainoastaan standardiseoksen yhdisteiden tavoin käytetyllä menetelmällä erottuvia yhdisteitä. Menetelmää luotaessa näytteiden oletettiin koostuvan pääosin lipideistä, joten standardi valittiin lipidiluokka-analyysjä ajatellen.

5.4 Haihtuvat yhdisteet

5.4.1 GC-FID

Haihtuvia yhdisteitä analysoitiin kaasukromatografian ja liekki-ionisaatiodektektorin avulla (GC-FID-laitteisto) (Varian 3300 GC) käyttäen HP-5 kolonnia (Hewlett Packard HP-5, 30 m, sisähalkaisija 0,25 mm, nestefaasin paksuus 0,25 μm) ja heliumia kantokaasuna. Tavoitteena oli optimoida menetelmää, jotta voitaisiin saavuttaa riittävä resoluutio kvantitatiivisia määryksiä sekä GC-MS-laitteistolla tehtäviä kvalitatiivisia määryksiä varten. Laitteistolla analysoitiin sekä SPE-menetelmällä

tuotettuja fraktioita että raakanäytettä. Näytteet injektointiin laitteistoon mahdollisimman vähäisten käsittelyjen jälkeen. Raakanäytteen yhteydessä tämä tarkoitti ainoastaan näytteen laimentamista ennen injektointia ja fraktioilla puolestaan se tarkoitti sekä injektoitavan näytteen siirtoa heksaaniin, mikäli näyte oli liuotettu muuhun liuottimeen, että näytteen laimentamista. Ajoa häiritsevien heikommin haihtuvien yhdisteiden pääsy kolonniin pyrittiin estämään alentamalla injektorin lämpötilaa. Käytetty kaasukromatografiamenetelmä pohjautui aiemmin julkaistuihin menetelmiin (Adams 2007).

Alustavana GC-laitteiston ajo-ohjelmana käytettiin ohjelmaa, jossa split-virtauksen suhteeksi kolonnivirtaukseen oli säädetty noin 20:1. Kaasukromatografian injektorin lämpötilaksi oli säädetty 150 °C ja detektorin (FID) lämpötilaksi 290 °C. Kaasukromatografian kolonniuuni lämpötilaohjelmoitiin aloittamaan ajo 50 °C:sta, jonka jälkeen lämpötilaa nostettiin 3 °C/min kunnes se saavutti 250 °C lämpötilan, jossa sitä pidettiin 15 minuuttia. Näytteen analysoinnin helpottamiseksi ja näytekomponenttien tunnistamiseksi käytettiin kahta eri hiilivetystandardia, ASTM-P-0050 ja DRH-008S-R2 (molemmat Accustandard, Inc.). Ajo-olosuhteiden havaittiin välittömästi olleen liian miedot käytettyjä standardeja ja näytteitä ajatellen, sillä suuri osa komponenteista jäi eluoitumatta. Ohjelmaan lisättiin aluksi ylimääräinen 25 minuutin odotus maksimilämpötilassa, mutta tämäkin todettiin riittämättömäksi ja kolonniuunin lämpötilaohjelma kirjoitettiin osittain uudelleen. Näytteitä analysoitaessa kaasukromatografian injektorin lämpötilaa säädettiin 150 °C lämpötilaan ja detektorin 300 °C lämpötilaan. Split-virtauksen suhteeksi asetettiin 8:1. Kolonniuunin lämpötilaohjelma aloitettiin 50 °C lämpötilasta. Sitä nostettiin 5 °C/min 225 °C lämpötilaan saakka, jonka jälkeen lämpötilan nousuksi asetettiin 3 °C/min. Lämpötilan nostoa jatkettiin kunnes kolonniuuni saavutti 285 °C lämpötilan, jota ylläpidettiin 45 minuutin ajan.

Raakanäytteestä tehtiin noin 1 mg/ml:n laimennos heksaaniin. Raakanäytteen SPE-fraktioiteja varten tehtyä näytteen pitoisuudeltaan 55 mg/ml ollutta kloroformiliuosta laimennettiin kymmenesosaan alkuperäisestä pitoisuudesta, jolloin pitoisuudeksi saatiin noin 5,5 mg/ml. Varsinainen analysoitava näyte tehtiin haihduttamalla kuiviin 0,1 ml pitoisuudeltaan 5,5 mg/ml ollutta raakanäytteen kloroformiliuosta ja lisäämällä haihdutuksen jälkeen 0,5 ml heksaania. Analyysijä varten kerätyt kuudennen SPE-

fraktioinnin (Taulukko 10) fraktiot laimennettiin samalla tavalla ajatellen koko fraktioitavan näytteen siirtyneen kuhunkin fraktioon. Tällöin kerättyjen kuudennen fraktioinnin fraktioiden pitoisuuden ajateltiin olevan nimellisesti pitoisuudeltaan 55 mg/ml sillä kukin fraktio kerättiin 0,2 ml:aan kloroformia näytteen kokonaismassan ollessa 11 mg. Näistä laimennettiin ensin 1:10 suhteessa nimellisesti 5,5 mg/ml laimennos. Varsinaiset analysoitavat fraktiot tehtiin haihduuttamalla kuiviin 0,1 ml nimellisesti pitoisuudeltaan 5,5 mg/ml ollutta kloroformiliuosta ja lisäämällä siihen haihdutuksen jälkeen 0,5 ml heksaania. Injektiotilavuutena käsiruiskulla injektoidessa pidettiin 2,0 µl. Raakanäytteen ja fraktioiden lisäksi ajettiin hiilivetystandardeja käyttäen samaa lämpötilaohjelmaa retentioindeksien määrittämistä varten. Näytesarjojen analysoinnin välillä kolonnin detektoripää kiinnitettiin kaasukromatografian injektoriin ja kolonnin puhdistamaan paahtamalla (alkulämpötila 50 °C, kuumennus 5 °C/min, loppulämpötila 300 °C, 120 min).

Havaituille yhdisteille laskettiin Kovatsin retentioindeksit (Kaava 1) sekä aritmeettiset retentioindeksit (Kaava 2), joita voitiin vertailla saatavilla olevia retentioindeksi kirjastoja vastaan (Adams 2007). Myös aritmeettiset retentioindeksit laskettiin, sillä ne voivat olla logaritmisia indeksointia tarkempia käytettäessä lämpötilaohjelmointia kaasukromatografista analyysistä suoritettaessa (Van den Dool ja Kratz 1963).

$$RI_{yhd\ddot{a}} = 100 \times \left(n + \frac{\log(RT_{yhd\ddot{a}} - v) - \log(RT_n - v)}{\log(RT_N - v) - \log(RT_n - v)} \right)$$

Kaava 1. Kovatsin retentioindeksi (RI)

$$AI_{yhd\ddot{a}} = 100 \times \left(n + \frac{RT_{yhd\ddot{a}} - RT_n}{RT_N - RT_n} \right)$$

Kaava 2. Aritmeettinen retentioindeksi (AI)

RT_N on ensimmäisenä havaitun yhdisteen jälkeen eluoituneen n-alkanin retentioaika, RT_n on viimeisenä havaittua yhdistettä ennen eluoituneen n-alkanin retentioaika, $RT_{yhd\ddot{a}}$ on yhdisteen retentioaika, v on aika joka kului kolonniin retentoitumattoman yhdisteen eluoitumiseen ja n on havaittua yhdistettä ennen eluoituneen n-alkanin

hiililuku. Havaitut yhdisteet pyrittiin alustavasti tunnistamaan molempien retentioindeksien avulla.

5.4.2 GC-MS

Sekä alkuperäisen näytteen kuin myös kuudennen fraktioinnin (Taulukko 10) jakeiden haihtuvat komponentit analysoitiin käyttäen Shimadzu GC-17A ja GCMS-QP5000 laitteista koostuvaa GC-MS-EI (elektroni ionisaatio, 70 eV) -laitteistoa. Kolonnina käytettiin Hewlett Packarding HP-5 kolonnia (pituus 30 m, sisähalkaisija 0,25 mm, faasin paksuus 0,25 μm) ja kantokaasuna heliumia. Näytteet injektointiin heksaaniin liuotettuina (Hamiltonin 10 μl injektoruiskulla). Lämpötilaohjelmanä käytettiin GC-FID-ajoista sovellettua ohjelmaa, jossa injektorin lämpötilaksi asetettiin 150 °C ja detektoriin johtavan liitoskappaleen (interface) lämpötilaksi 300 °C. Kolonniuunin lämpötilaksi asetettiin alussa 50 °C, josta sitä nostettiin tasaisesti 5 °C/min 225 °C lämpötilaan, jonka jälkeen lämpötilan muutoksen nopeudeksi asetettiin 3 °C/min kunnes lämpötila saavutti 285 °C lämpötilan. Tässä lämpötilassa uunia pidettiin 45 minuuttia. Split-suhteeksi asetettiin 1:8. Kantokaasuna käytettiin heliumia. Massaspektrometrin filamentti sammutettiin 3 minuutiksi ajon aloituksesta ja samaksi ajaksi laite asetettiin ns. 'solvent cut' tilaan, jotta liuottimena toimineen heksaanin vaikutus saataisiin mahdollisimman vähäiseksi. Tiedon keruu aloitettiin aikaisintaan 4 minuuttia ajon aloittamisesta. Injektointitilavuus käsiruiskulla injektointaessa oli 1,0 μl . Näytesarjojen analysointien välissä kolonnia pyrittiin puhdistamaan paahtamalla sitä käyttäen GC-FID-analyseissa kuvattua laitteistoa ja lämpötilaohjelmaa.

Laitteistolla analysoitiin kaikki aiempaa GC-FID-analyysiä varten heksaaniin valmistetut näytteet. Kun pitoisuuksien havaittiin olevan melko alhaisia, valmistettiin myös sarja konsentroidumpia näytteitä käyttäen sisäpulloja. Nämä valmistettiin siirtämällä 100 μl alkuperäistä kloroformiin liuotettua näytettä sisäpulloon, haihduttamalla näyte kuiviin hyvin varovaisesti ilman lämmitystä heikossa typpivirrassa. Liuottimen haihdutuksen jälkeen näyte liuotettiin 100 μl :aan heksaania. Kaikki konsentroidut näytteet analysoitiin samoissa olosuhteissa kun aiemmat laimeammat näytteet.

5.5 Rasvahappojen metyyliesterit

Valmistetuista fraktioista pyrittiin myös määrittämään rasvahappokoostumus käyttäen laitoksella aiemmin käytössä ollutta menetelmää, joka oli modifioitu kolonnin valmistajan esittelemästä rasvahappojen metyyliestereiden analyysimenetelmästä. Käytetty laitteisto koostui automaatti-injektorilla varustetusta kaasukromatografista, johon oli liitetty liekki-ionisaatiodektoori (Perkin Elmer AutoSystem Gas Chromatograph). Kantajakaasuna käytettiin heliumia ja kolonnina metyloiduille rasvahaponäytteille soveltuvaa DB-23 kolonnia (60 m, id 0,25 mm, d_f 0,25 μm). Metyloitaviksi näytteiksi valittiin viidennestä fraktioinnista (Taulukko 10) saatuja fraktioita, joissa ohutkerroskromatografian perusteella lipidiluokiksi oletetut näytekomponentit olivat puhtaimmat. Valitut fraktiot metyloitiin käyttäen natriummetoksidin avulla tapahtuvaan vaihtoesteröintiin perustavaa menetelmää (Christie 1982). Valituista fraktioista osassa (0502, 0503, 0504) oletettiin olevan rasvahappojen metyyliestereitä (FAME) ja lopuissa valituista fraktioista (0506, 0507, 0508) oletettiin olevan triasyglyseroleja (TAG).

Rasvahappojen metyyliestereiden analysointiin käytettyjen fraktioiden alkuperänä olleessa viidennessä fraktioinnissa (Taulukko 10) alkuperäistä näytettä applikoitiin 5,5 mg kiinteäfaasiuuttoa varten. Kunkin fraktio kerättiin talteen 1,5 ml:aan kloroformia, josta 100 μl otettiin rasvahappojen metylointiin, jolloin laskennallisesti huomioimatta fraktiointia näytteen määrä oli 0,367 mg. Metylointia varten erilleen siirrettyihin fraktioihin lisättiin sisäinen standardi (19:0 TAG standardi, Larodan). Fraktioihin 0502, 0503, 0504 ja 0508 lisättiin 5 μl ja fraktioihin 0506 ja 0507 puolestaan lisättiin 20 μl sisäistä standardia, jonka konsentraatio oli 1 mg/ml. Standardin lisäyksen jälkeen fraktiot haihdutettiin kuiviin. Kuivattuihin fraktioihin lisättiin 1 ml natriumlastuilla kuivattua dietyylieetteriä ja 25 μl metyyliasettaattia. Lisäysten jälkeen fraktioita sekoitettiin voimakkaasti. Reaktio käynnistettiin lisäämällä fraktioihin 25 μl natriummetoksidia ja ravistelemalla voimakkaasti. Reaktion annettiin jatkua viiden minuutin ajan, jona aikana fraktioita ravisteltiin säännöllisesti, jonka jälkeen reaktio pysäytettiin lisäämällä 6 μl väkevää etikkahappoa. Reaktion pysäytys tuotti runsaasti sakkia fraktioihin, jonka takia fraktiot sentrifugoitiin (Labofuge 200, 970 G, 5 min)

ennen supernatantin talteenottoa. Sentrifugoitujen näytteiden supernatantti otettiin varovaisesti talteen ja siirrettiin pieniin autosampler-pulloihin. Liuotin haihdutettiin pois hyvin varovaisesti heikossa typpivirrassa ilman lämmitystä ja kuiviin metyloityihin fraktioihin lisättiin 1,0 ml heksaania.

Kaasukromatografian lämpötilat säädettiin analyysille soveltuviksi. Injektorin lämpötilaksi asetettiin 270 °C ja detektorin 270 °C. Kolonniuniin tehtiin lämpötilaohjelma, jossa uunin lämpötilana ohjelman alkaessa oli 130 °C, jota ylläpidettiin yhden minuutin ajan. Tämän jälkeen lämpötilaa nostettiin 6,5 °C / min 170 °C:seen saakka, ja edelleen 2,8 °C / min 215 °C:seen, jossa lämpötila pidettiin vakaana 12 minuutin ajan. Lopuksi lämpötila nostettiin 40 °C/min 280 °C:seen kolmeksi minuutiksi. Laitteiston injektio-tilavuudeksi säädettiin 1,0 µl.

Nopeasti havaittiin osan metyloiduista fraktioista olleen havaitulta asyylilipidien pitoisuudeltaan hyvin laimeita, jolloin ne päätettiin konsentroida. Metyloidut näytteet fraktioista 0502, 0503, 0504 ja 0508 haihdutettiin varovaisesti kuiviin ja siirrettiin sisäpulloihin, jolloin niiden konsentraatio saatiin nostetuksi kymmenkertaiseksi, sillä autosampler-pulloissa heksaania oli 1 ml ja sisäpulloihin näyte siirrettiin 0,1 ml:lla heksaania. Metyloidut näytteet fraktioista 0506 ja 0507 puolestaan haihdutettiin myös kuiviin ja niihin lisättiin 0,5 ml heksaania, jolloin niiden pitoisuus saatiin kaksinkertaistettua

5.6 MS

Näytteitä pyrittiin analysoimaan käyttämällä myös HPLC-MS-tekniikkaa. Näytteeksi valittiin alkuperäisen näytteen lisäksi viidennessä fraktioinnissa (Taulukko 10) tuotettuja jakeita. Alustavasti HPLC-ohjelmaksi valittiin rasva-analyysille soveltuvaa käänteisfaasimenetelmä. Laitteistona käytettiin Hitachi L-6200A Intelligent Pump 20 HPLC-laitetta, johon oli liitetty 20 µl injektiosilmukka (kolonni: Supelco Discovery HS C18, 25 cm x 4,6 mm, 5 µm käänteisfaasi kolonni). Laitteiston detektoreiksi oli liitetty

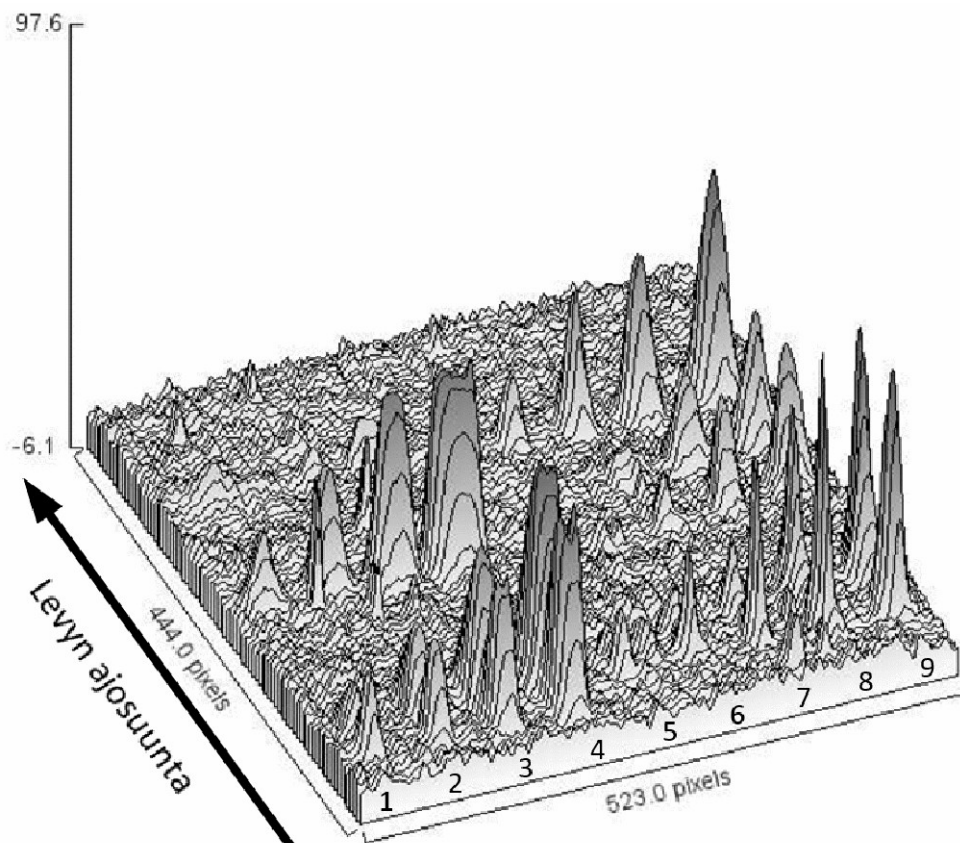
sekä MS-laitteisto (Finnigan MAT TSQ 700) että valonsirontadetektori (ELSD, S.E.D.E.R.E. Sedex 75).

Valonsirontadetektorin lämpötilaksi asetettiin 75 °C ja paineeksi 2,6 bar. Nestekromatografian ajoliuoksiksi valittiin metanoli ja isopropanoli. Injektointihetkellä metanolin osuus oli 80 % ja iso-propanolin 20 %. Tätä muutettiin tasaisesti siten että 20 minuutin jälkeen metanolin osuus oli 20 % ja iso-propanolin 80 % jota ylläpidettiin 10 minuutin ajan, jonka jälkeen liuossuhteet palautettiin alkuperäisiksi viiden minuutin kuluessa. Kolonnin annettiin tasapainottua 25 minuutin ajan ennen seuraavaa injektointia. Virtausnopeudeksi säädettiin 0,85 ml/min. Käytetyllä rasva-analyysimenetelmällä ei kuitenkaan onnistuttu joko erottamaan näytekomponentteja toisistaan tai eluoimaan näytekomponentteja kolonnista. Tästä huolimatta näyte päätettiin analysoida käytössä olleella MS-laitteistolla ja siihen liitetyllä valonsirontadetektorilla. Koska käyttöön valittu kolonni ei soveltunut toivotulla tavalla näytekomponenttien analysointiin, suoritettiin analyysi käyttäen HPLC-laitteistoa ilman kolonnia käyttäen HPLC-laitteistoa syöttämään näyte suoraan injektiosilmukasta detektoreille. Analysoitaessa näytteitä ilman kolonnia laitteiston virtausnopeudeksi säädettiin 0,85 ml/min ja olosuhteet asetettiin kolonniohjelman injektointihetkeä vastaaviksi, eli ajoliuoksen metanolin osuus asetettiin 80 % ja iso-propanolin osuus puolestaan 20 %. Näytteet analysoitiin käyttämällä sähkösumutus-ionisaatiota (ESI) sekä negatiivisilla (ESI-NI) että positiivisilla (ESI-PI) ioneilla.

6 Tulokset ja niiden tarkastelu

6.1 SPE ja TLC

Ohutkerroskromatografialevystä, jolle näyte- ja standardilaimennoksia oli applikoitu, otettiin kuva. Kuva analysoitiin käyttäen ImageJ-ohjelmistoa (Kuva 17). Signaalivahvuudet luettiin ImageJ-ohjelmistoon ladatusta kuvasta ja piirrettiin kuvaajaksi (Taulukko 11; Kuva 18). Kirjallisuudesta tiedettiin vastaavilla liuotinkoostumuksilla silikapohjaista TLC-levyä käytettäessä standardiseoksen (18-4A) komponenttien eluotumisjärjestys (Christie 2003). Vähiten retentoituneesta yhdisteestä aloittaen komponentit ovat kolesteryylioleaatti, metyylioleaatti, trioleiini, kolesteroli ja viimeisenä oleiinihappo.

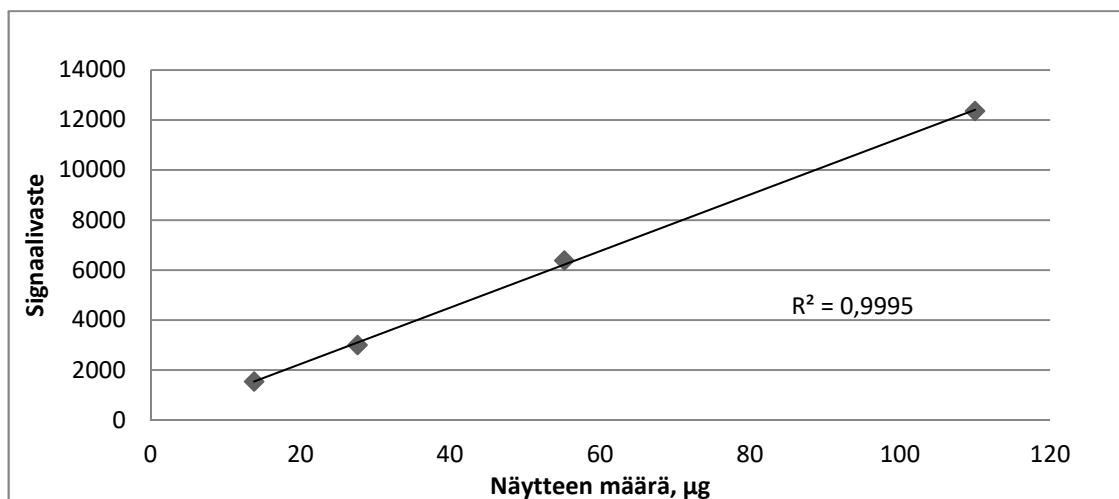


Kuva 17. 3D-representaatio TLC-levystä (ImageJ), jolla oli erotettu näytteen ja standardiseoksen (18-4A) laimennossarjoja (Taulukko 8)

Analyyseissä havaittiin käytetyn SPE-menetelmän soveltuvan hyvin näyttemateriaalin fraktiointiin ennen tarkempia analyysejä. Lisäksi voitiin havaita yksinkertaiseen kameraan ja siitä saadun digitaalisen kuvan käsittelyyn perustuvan analyysimenetelmän olleen mahdollisesti riittävän tarkka näytteen kvantitatiivista analysointia varten.

Taulukko 11. Näytteen kokonaismäärä ja sen TLC-levyllä vähiten edenneen komponentin (Taulukko 9) signaalivaste

Näytteen määrä	Signaalivaste
13,8 µg	1550
27,6 µg	3000
55,2 µg	6370
110 µg	12400



Kuva 18. Kuvaaja korrelaatiosta näytteen kokonaismäärän ja sen TLC-levyllä vähiten edenneen komponentin (Taulukko 9) signaalivasteen (Taulukko 11) välillä

6.2 Haihtuvat yhdisteet

6.2.1 GC-FID

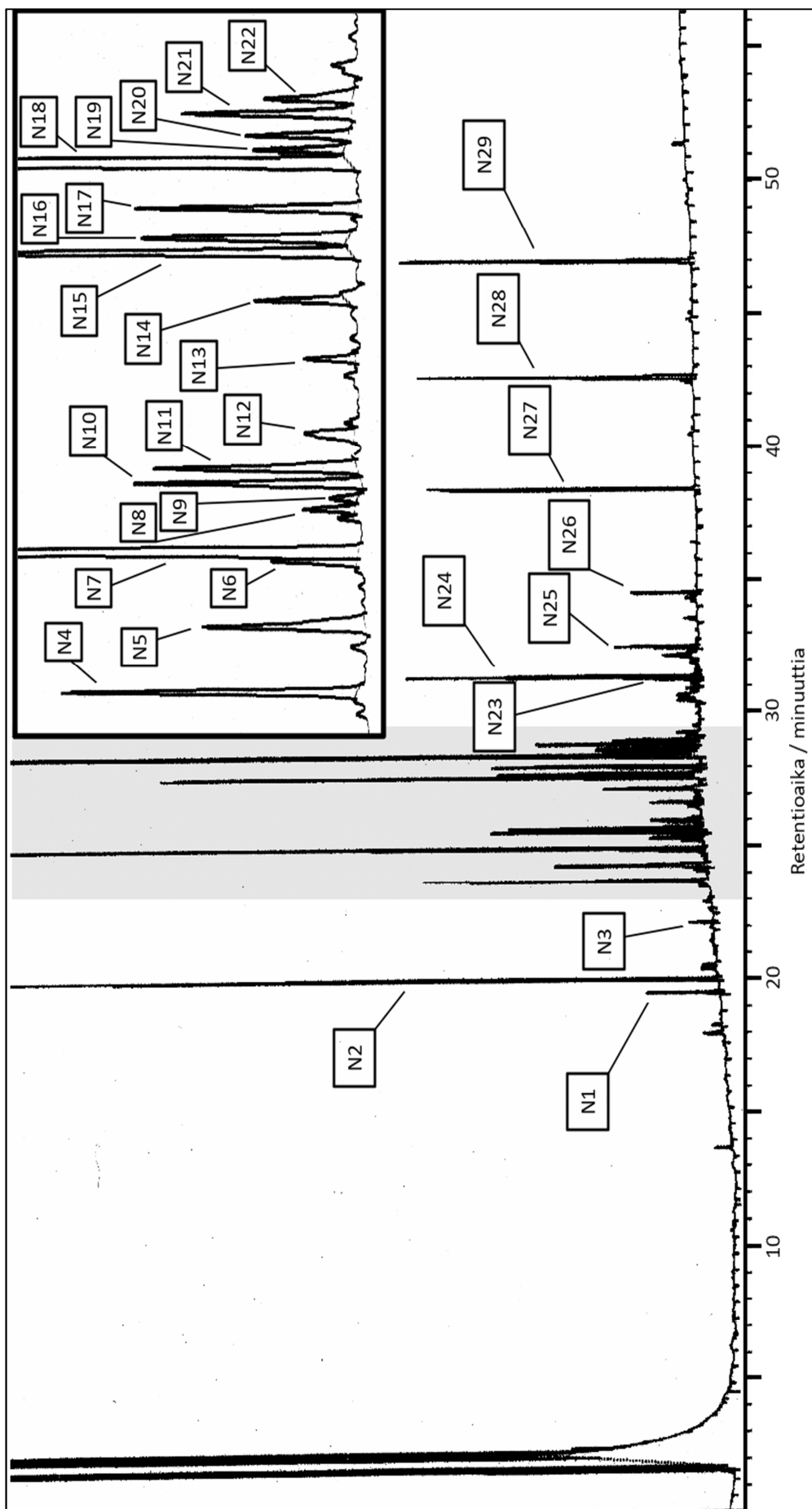
Analysoitaessa näytteen haihtuvia yhdisteitä havaittiin näytteessä huomattavan paljon erilaisia haihtuvia yhdisteitä (Taulukko 12; Kuva 19). Tutkittaessa kuudennessa fraktioinnissa kerättyjä fraktioita (Taulukko 10) havaittiin käytetyn SPE-menetelmän fraktioineen tehokkaasti myös haihtuvia yhdisteitä (Kuva 20). Koska käytetty SPE-menetelmä perustui yhdisteiden erottamiseen niiden poolisuuserojen perusteella, voidaan GC-FID-analyseissa havaittujen yhdisteiden rakenteista sekä etenkin yhdisteiden poolisuuksista tehdä joitain päätelmiä. Koska käytössä ei ollut vastaavia referenssiyhdisteitä, ei havaittujen yhdisteiden FID-vasteesta ollut tarkkaa tietoa ja siten myös niiden kvantitatiivisuus (Taulukko 12) jää arviointien varaan. Kuitenkin, kun tiedetään liekki-ionisaatiodetektorin toimivan hyvin laajalla lineaarisuusalueella ja samalla tiedettiin yhdessä fraktiossa olleiden yhdisteiden olevan poolisuudeltaan samankaltaisia, voidaan tietyissä rajoissa olettaa kustakin näytefraktiosta havaittujen yhdisteiden suhteellisten osuuksien vastaavan niiden suhteellisia liekki-ionisaatiodetektorilla havaittuja osuuksia. On tosin mahdollista, että huolimatta yhdisteiden samankaltaisesta poolisuudesta niiden muut kemialliset ominaisuudet ja rakenne poikkeavat toisistaan siinä määrin että laitteiston detektorivaste ei ole sama edes tietyn fraktion yhdisteille.

Taulukko 12. Tärkeimpien havaittujen yhdisteiden retentioindeksit ja niiden suhteelliset

FID-vasteet

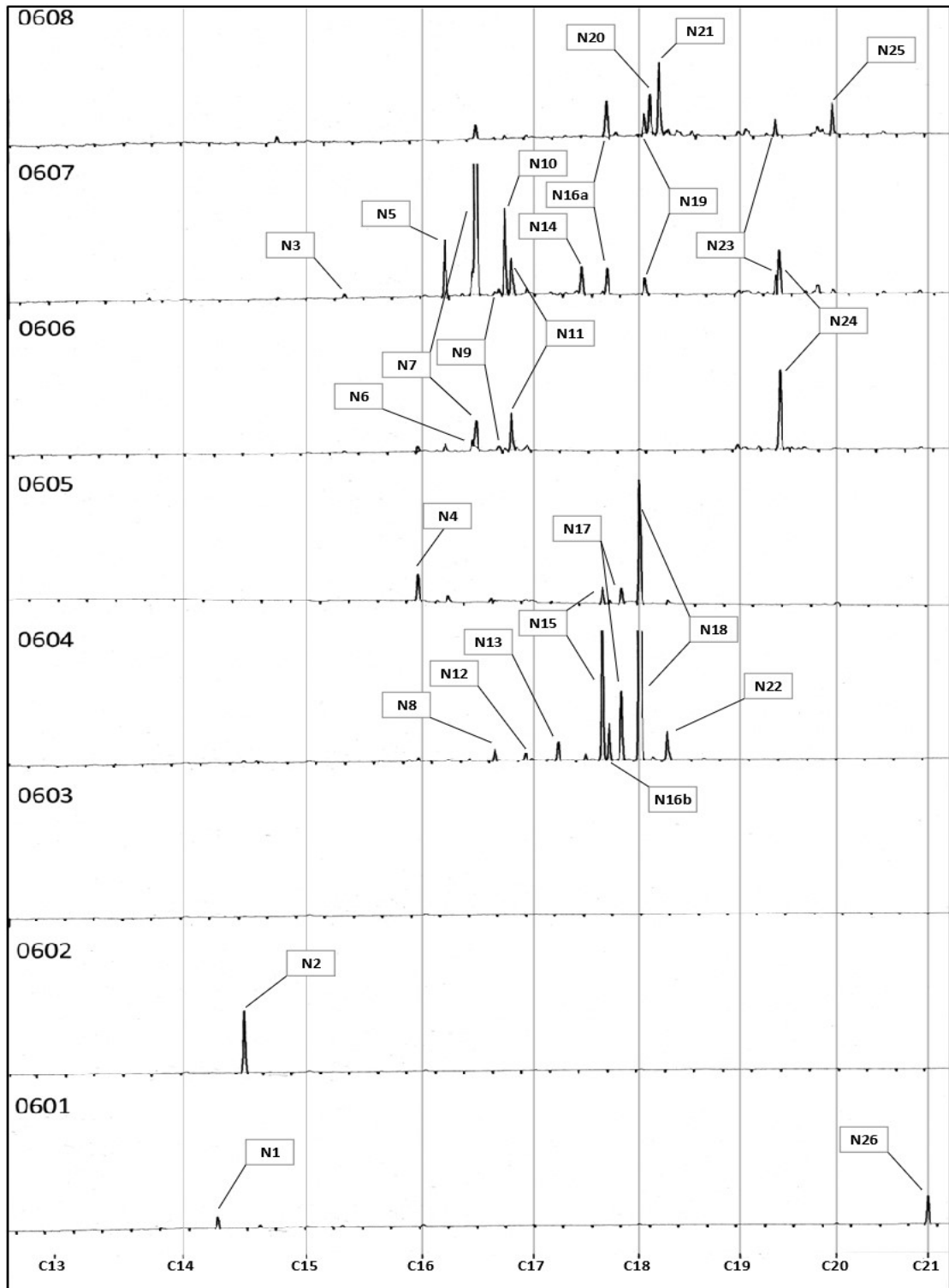
Yhdiste	RI	AI	%	Fraktioissa
N1	1430	1429	0,87	1
N2	1450	1448	9,59	2
N3	1533	1532	0,26	6 & 7
N4	1595	1595	3,05	5
N5	1621	1620	2,37	7
N6	1646	1645	0,81	6
N7	1650	1648	13,67	6 & 7
N8	1665	1664	0,5	4
N9	1670	1669	0,29	6 & 7
N10	1675	1674	2,43	7
N11	1681	1680	2,58	6 & 7
N12	1694	1693	0,81	4
N13	1723	1723	0,5	4
N14	1747	1746	0,92	7
N15	1766	1765	5,82	4 & 5

Yhdiste	RI	AI	%	Fraktioissa
N16	1771	1770	2,6	4
N17	1783	1783	2,34	4 & 5
N18	1801	1801	27,78	4 & 5
N19	1806	1806	0,9	7 & 8
N20	1813	1812	1,08	8
N21	1822	1821	1,96	8
N22	1828	1827	1,18	4
N23	1939	1938	0,78	7 & 8
N24	1942	1942	3,6	6 & 7
N25	1997	1997	1,02	8
N26	2102	2102	0,7	1
N27	2302	2302	3,33	1
N28	2503	2503	3,78	1
N29	2703	2703	4,45	1



Kuva 19. Uutteen haihtuvien yhdisteiden GC-FID-kromatogrammi. Havaittujen yhdisteiden kohdalle on merkitty niiden tunnuksset

(Taulukko 12). Harmaalla merkitty alue suurennettuna oikealla ylhäällä. Dektektorivaste y-akselilla, retentioaika x-akselilla

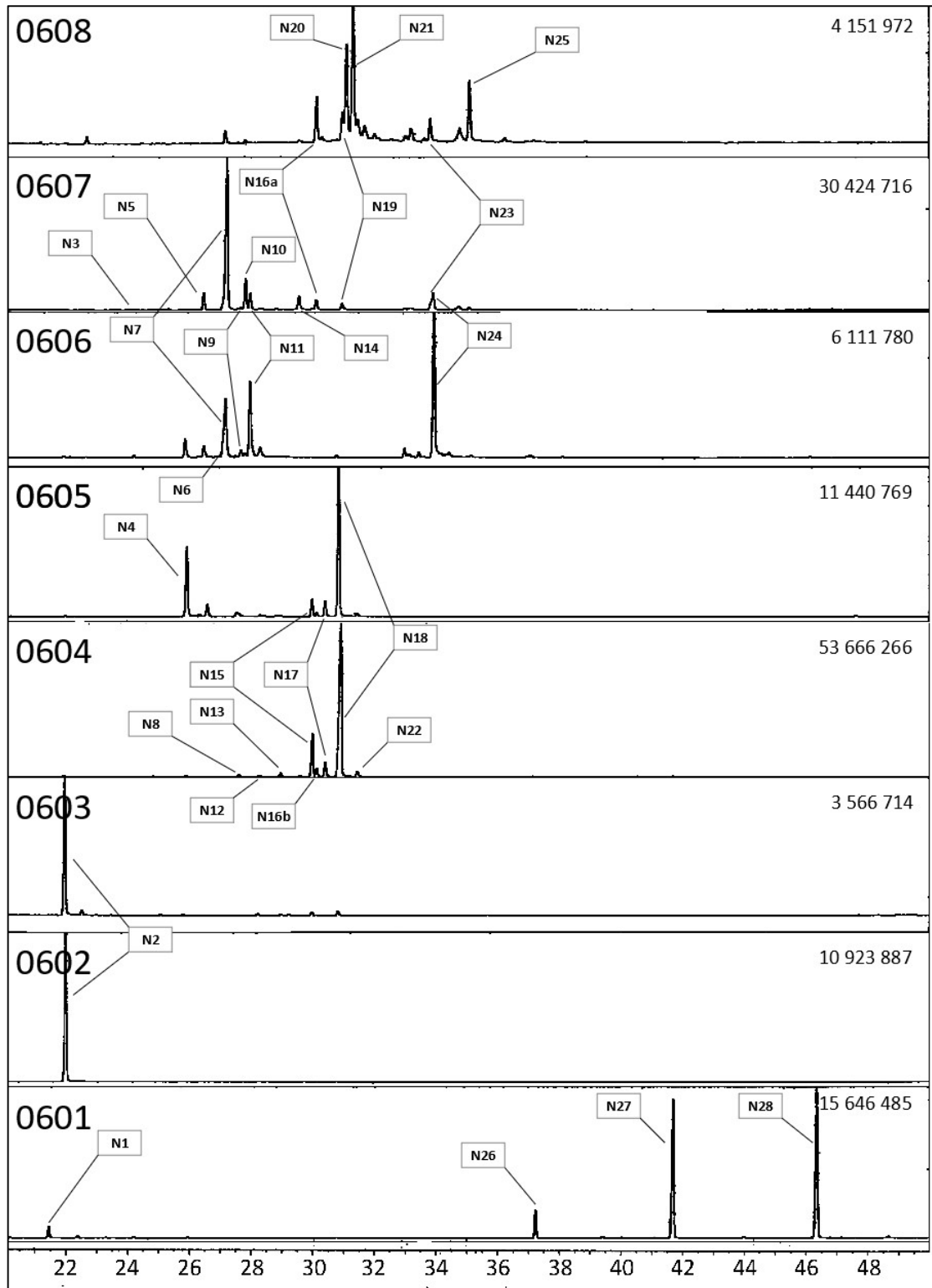


Kuva 20. Fraktioiden (Taulukko 10) GC-FID-kromatogrammit hiilivetystandardiin verrattuina (hiilinumerot kuvan alla). Kunkin kromatogrammin vasemmassa yläkulmassa on analysoidun näytEFRaktion tunnus. Havaittujen yhdisteiden kohdalle on merkitty niiden tunnuKset (Taulukko 12). Normalisoitu detektorivaste y-akselilla, retentioaika x-akselilla

6.2.2 GC-MS

Analysoitaessa tuloksia todettiin, ettei aiemmin kirjallisuudessa tunnistettuja yhdisteitä voitu käytännössä havaita (Demirci ja muut 2000a; Demirci ja muut 2000b; Demirci ja Başer 2003; Demirci ja muut 2004; Isidorov ja muut 2004). Lisäksi käytetty GC-MS-kirjasto ei kyennyt tunnistamaan havaittuja yhdisteitä, eikä vastaavuuksia havaittu vertailtaessa massaspektrejä julkaistuihin kirjastoihin (Adams 2007; Horai ja muut 2010) tai yksittäisiin tunnettujen yhdisteiden massaspektreihin (Noge ja Becerra 2009). Vertailtaessa signaaliltaan merkittävimpiä yhdisteitä kirjallisuudessa saatavilla olleisiin tunnistettujen yhdisteiden massaspektreihin todettiin niiden muistuttavan, mutta ei vastaavan kirjallisuudessa koivun silmuista uutettuja yhdisteitä. Tämä viittaa havaittujen yhdisteiden olevan rakenteeltaan melko samankaltaisia tunnistettujen yhdisteiden kanssa ja ne kuuluvat oletettavasti samaan yhdisteryhmään, joten on mahdollista että ne ovat karyofylleenin johdannaisia, kuten koivunsilmuöljyutteen pääkomponenttien on kirjallisuudessa ilmoitettu olevan (Hiltunen ja muut 1983).

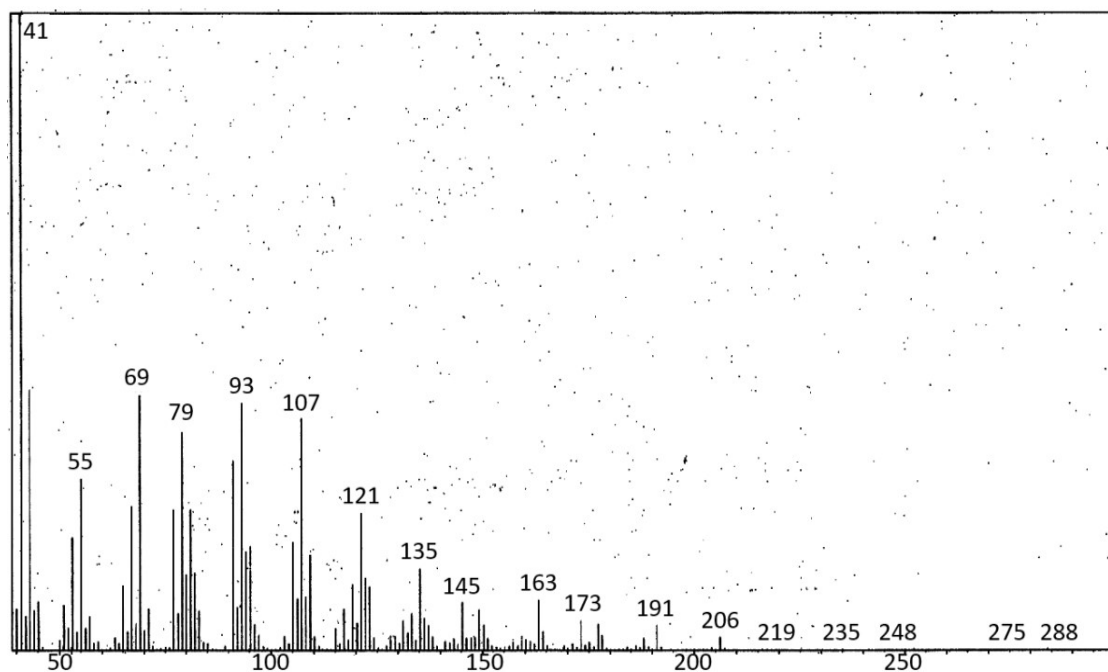
Havaituista yhdisteistä (Kuva 21) vain tietyt suoraketjuiset hiilivedyt (yhdisteet N26, N27, N28 ja N29; Taulukko 12; Liite 2) kyettiin luotettavasti identifioimaan voitaessa käyttää n-alkaani -standardia niiden referenssiyhdisteenä. Useilla havaituilla yhdisteillä (N7, N15, N18) ilmeni melko voimakkaita signaaleita massa/varaus (m/z) -luvulla 91 ja 105 (Taulukko 13; Liite 2), mikä puolestaan voi viitata joko aromaattisen renkaan (m/z 91 tyypillisesti tropylium-ioni, $C_7H_7^+$) läsnäoloon alkuperäisessä rakenteessa tai sitä vastaavan resonanssin stabiloiman rakenteen muodostumiseen yhdisteen fragmentoitua. Koska näytekomponenteista ei kuitenkaan suoritettu 1H -NMR-analyysiä, ei voida olla varmoja siitä, että aromaattinen rengas olisi läsnä näytekomponenteissa. On huomattava, että myös eräät muut koivunsukuisten puulajien silmuista uutetut haihtuvat yhdisteet ilmentävät m/z -signaaleita 91 ja 105, kuten esimerkiksi α -betulenoli ja β -betulenoli (Demirci ja muut 2000c).



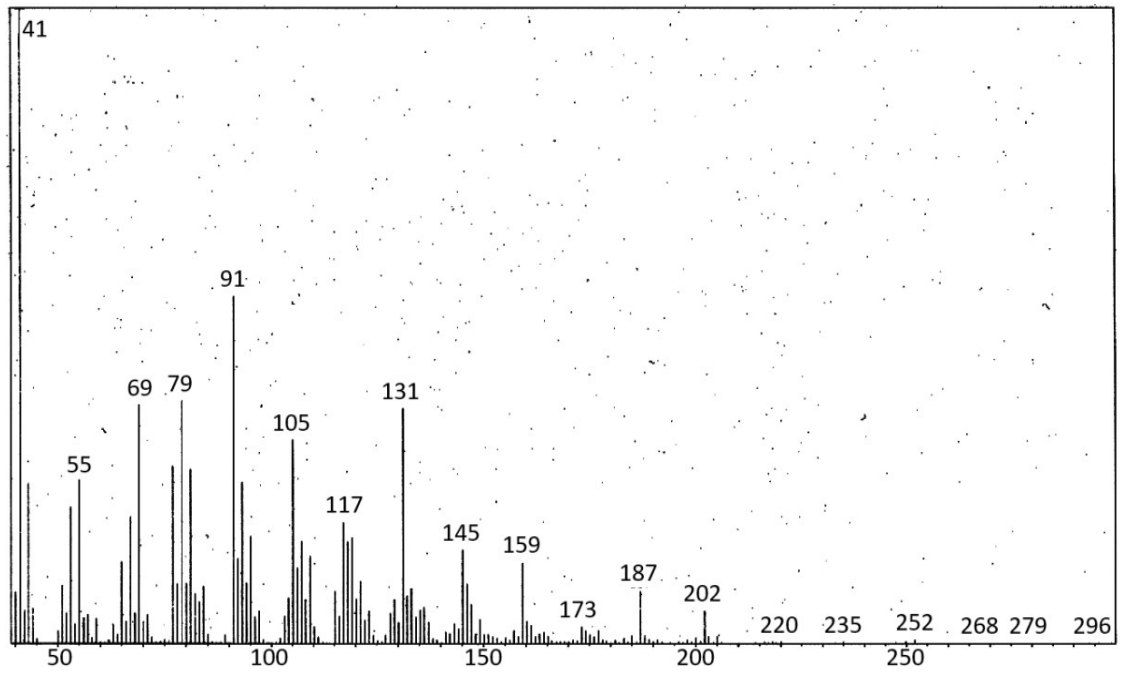
Kuva 21. Fraktioiden (Taulukko 10) GC-MS-kromatogrammit. Kunkin kromatogrammin vasemmassa yläkulmassa on analysoidun näyttefraktion tunnus ja oikeassa yläkulmassa kromatogrammin korkeimman piikin detektorivaste. Havaittujen yhdisteiden kohdalle on merkitty niiden tunnuksset (Taulukko 12). Detektorivaste y-akselilla, retentioaika minuutteina x-akselilla

Taulukko 13. Viiden tärkeimmän yhdisteen massaspektit.

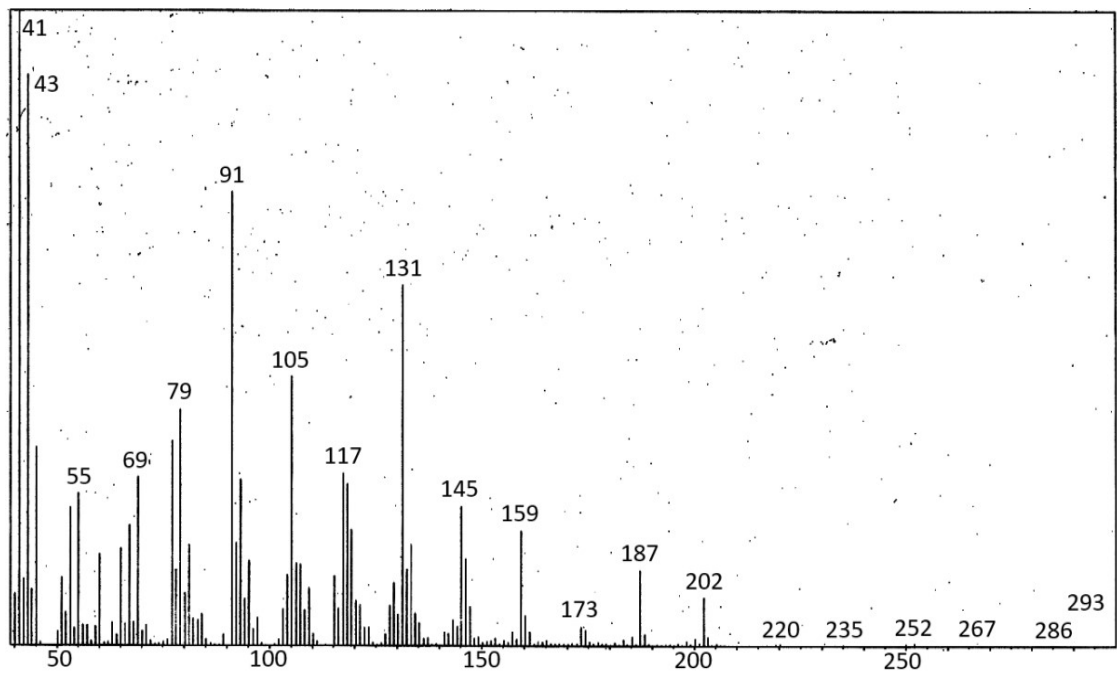
Yhdiste	m/z (suhteellinen intensiteetti) tai tunnistus
N2 (Kuva 22)	206 (2), 191 (4), 177 (4), 173 (5), 163 (8), 149 (7), 145 (7), 135 (13), 121 (21), 107 (36), 105 (16), 93 (38), 91 (29), 81 (22), 79 (34), 77 (22), 69 (39), 67 (22), 53 (18), 43 (41), 41 (100)
N7 (Kuva 23)	202 (5), 187 (8), 159 (13), 145 (14), 131 (37), 117 (19), 105 (32), 93 (25), 91 (55), 81 (28), 79 (38), 77 (28), 69 (38), 67 (20), 55 (26), 53 (21), 43 (25), 41 (100)
N15 (Kuva 24)	202 (7), 187 (12), 174 (2), 173 (3), 159 (18), 145 (22), 131 (57), 118 (25), 117 (27), 105 (42), 93 (26), 91 (71), 79 (37), 77 (32), 69 (26), 55 (24), 53 (21), 45 (31), 43 (89), 41 (100)
N18 (Kuva 25)	202 (11), 187 (14), 174 (7), 173 (7), 159 (22), 146 (14), 145 (16), 133 (22), 131 (31), 119 (24), 117 (36), 105 (40), 93 (24), 91 (75), 79 (43), 77 (28), 69 (32), 67 (23), 55 (26), 43 (91), 41 (100)
N28 (Kuva 26)	Pentakosaani (C ₂₅ H ₅₂)



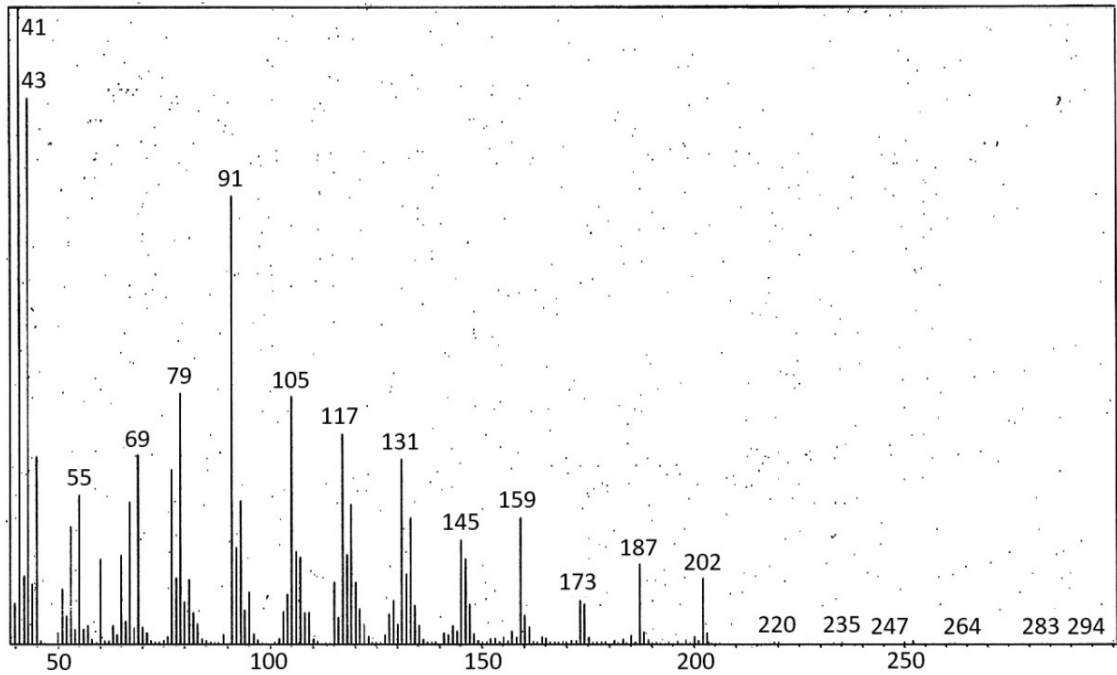
Kuva 22. Havaitun yhdisteen N2 massaspektri. Suhteellinen signaalivahvuus y-akselilla, havaitun fragmentin m/z -arvo x-akselilla



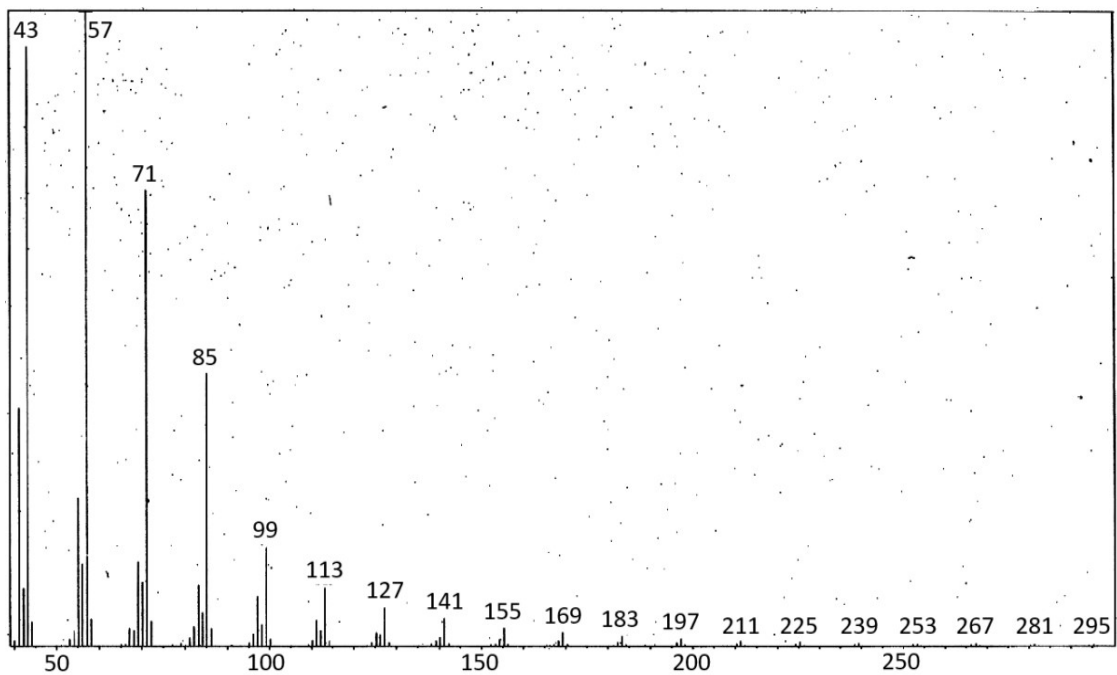
Kuva 23. Havaitun yhdisteen N7 massaspektri. Suhteellinen signaalivahvuus y-akselilla, havaitun fragmentin m/z -arvo x-akselilla



Kuva 24. Havaitun yhdisteen N15 massaspektri. Suhteellinen signaalivahvuus y-akselilla, havaitun fragmentin m/z -arvo x-akselilla



Kuva 25. Havaitun yhdisteen N18 massaspektri. Suhteellinen signaalivahvuus y-akselilla, havaitun fragmentin m/z-arvo x-akselilla



Kuva 26. Havaitun yhdisteen N28 massaspektri – pentakosaani. Suhteellinen signaalivahvuus y-akselilla, havaitun fragmentin m/z-arvo x-akselilla

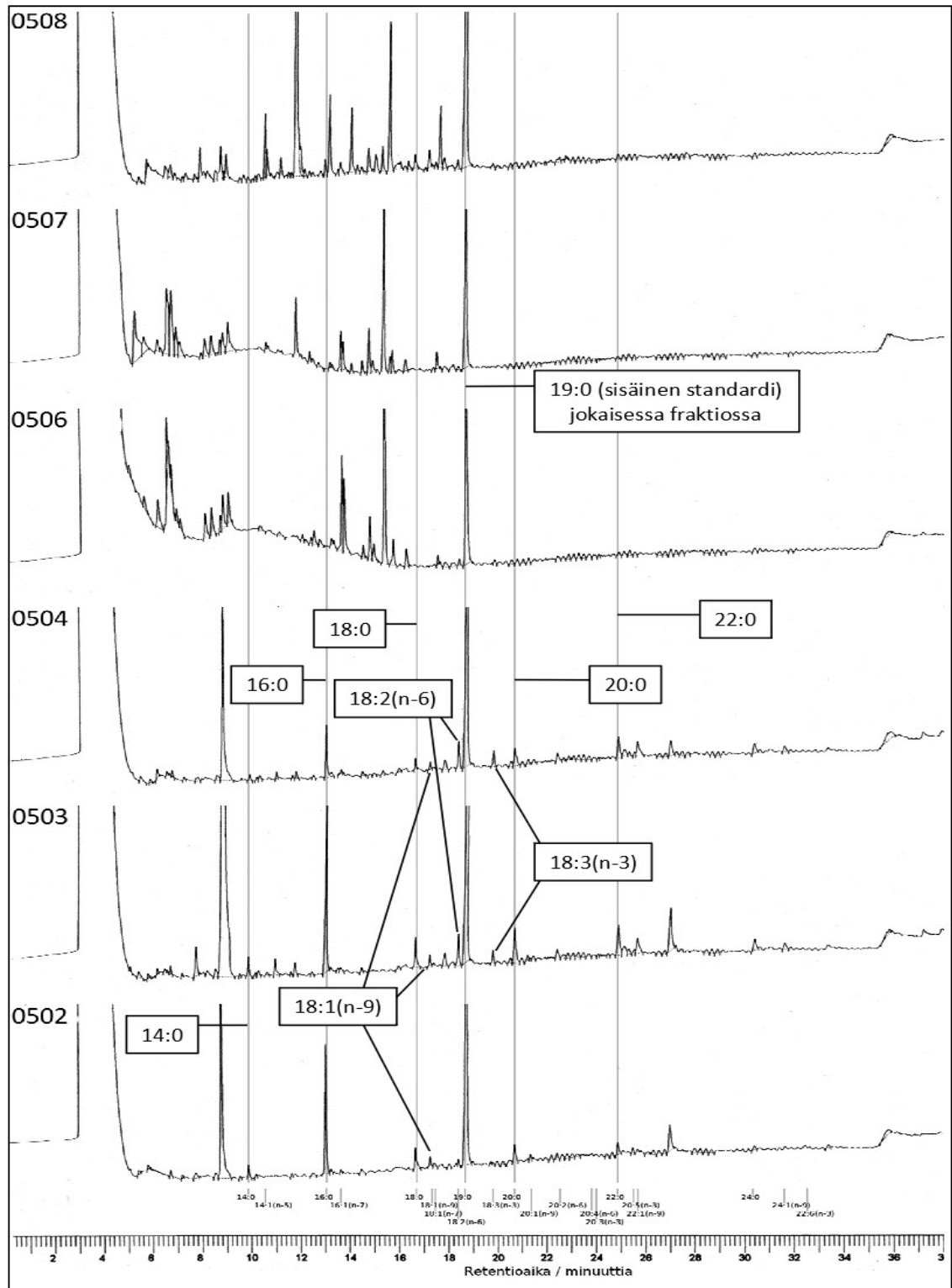
6.3 Rasvahappojen metyyliesterit

Tarkasteltaessa tuloksia havaittiin välittömästi, että joko fraktioissa ei ollut rasvahappoja tai sitten niiden pitoisuudet olivat hyvin alhaisia. Konsentroiduista näytteistä havaittiin kuitenkin vain hyvin pieniä määriä käytettyä ulkoista standardia (GLC-68D) vastaavia rasvahappoja, Kuva 27). Standardissa olleista rasvahapoista ainoastaan palmitiinihappoa (16:0) havaittiin muutamassa näytteessä. Palmitiinihappoa havaittiin fraktioissa joissa TLC-analyysin tulosten perusteella oli kolesteryyliestereiden ja metyyliestereiden tapaisesti eteneviä yhdisteitä, eli fraktioissa 0502, 0503 ja 0504. Havaitut määrät olivat kuitenkin melko vähäisiä (Kuva 27).

Rasvahappojen osuudet (Taulukko 14) laskettiin käyttämällä tunnettua sisäisen standardin pitoisuutta ja edelleen laskemalla havaitun rasvahapon osuus tunnetusta laskennallisesta näytteen määrästä. On kuitenkin tärkeä huomata että näyte sisälsi suuren määrän erilaisia yhdisteitä, joista osa oli haihtuvia yhdisteitä ja osa puolestaan hyvin luultavasti reaktiivisia metylointireaktiossa. Tämän takia ei ole varmuutta että havaitut yhdisteet olisivat olleet rasvahappojen metyyliestereitä.

Taulukko 14. Havaittujen rasvahappojen osuudet.

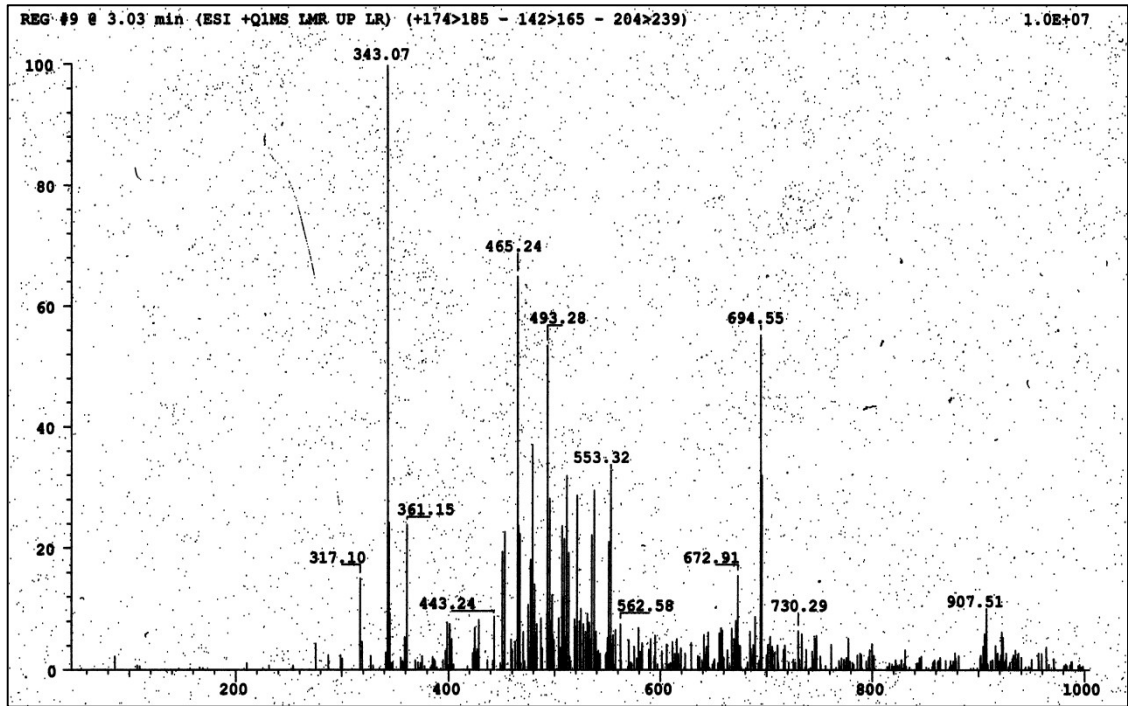
Rasvahappo	Fraktio 0502	Fraktio 0503	Fraktio 0504	Yhteensä
14:0	0,24 µg/mg	0,38 µg/mg	0,14 µg/mg	0,77 µg/mg
16:0	3,0 µg/mg	4,4 µg/mg	1,4 µg/mg	8,7 µg/mg
18:0	0,65 µg/mg	0,72 µg/mg	0,19 µg/mg	1,6 µg/mg
20:0	0,57 µg/mg	1,2 µg/mg	0,80 µg/mg	2,5 µg/mg
22:0	0,36 µg/mg	1,1 µg/mg	0,81 µg/mg	2,2 µg/mg
18:1	0,37 µg/mg	0,21 µg/mg	0,17 µg/mg	0,75 µg/mg
18:2	0,10 µg/mg	0,77 µg/mg	0,80 µg/mg	1,68 µg/mg
18:3	0 µg/mg	0,30 µg/mg	0,45 µg/mg	0,75 µg/mg



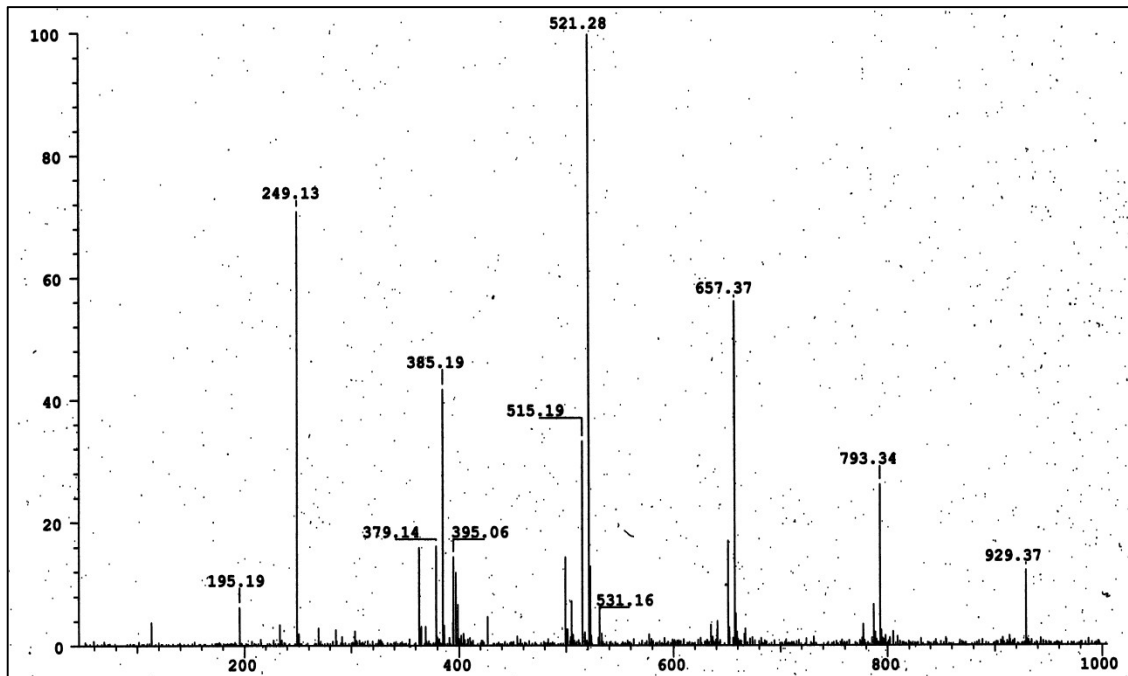
Kuva 27. Natriummetoksidi menetelmällä metyloitujen fraktioiden GC-FID-kromatogrammit GLC-68D-standardiin verrattuina. Havaittujen metyyliestereiden standardin mukaiset tunnistukset merkitty kuvaan (Taulukko 14). Kunkin kromatogrammin vasemmassa yläkulmassa on analysoidun näytefraktion tunnus. Normalisoitu detektorivaste y-akselilla, retentioaika x-akselilla

6.4 HPLC ja MS

Koska näytekomponenttien erottuminen ei onnistunut analyysia varten ajatellulla HPLC-kolonnilla, ei saaduista tuloksista voi päätellä kovinkaan paljoa. Analysoitaessa uutetta ESI-PI-menetelmällä havaittiin runsaasti signaaleita, mutta kuten muillakaan menetelmillä ei niitä voitu analysoida havaittujen signaalien runsauden takia (Kuva 28). Lisäksi ESI-tekniikalle tyypillisesti voidaan olettaa moninkertaisten varausten aiheuttaneen entisestään lisää ylimääräisiä signaaleita. ESI-PI-menetelmällä analysoitiin myös näytefraktioita (Liite 3). Analysoitaessa negatiivisia ioneita havaittiin fraktioiden 0603 ja 0605 olleen käytännössä signaalitasoltaan liian alhaisia jotta tuloksia voitaisiin pitää luotettavina. Melko mielenkiintoisia havaintoja tehtiin analysoitaessa näytettä ESI-NI-menetelmällä (Kuva 29), jolloin havaittiin noin 136 m/z -yksikön välein toistuva signaali. Koska m/z -arvo ei vaihdellut signaalien välillä, eli signaali ei ollut useiden varauksien summa, johtui tämä luultavasti näytteen jonkin komponentin rakenteessa olevista toistuvista, mahdollisesti polymeerimäisistä, rakenteista.



Kuva 28. Uutteen ESI-PI-massaspektri. Suhteellinen signaalivahvuus y-akselilla, havaitun fragmentin m/z -arvo x-akselilla



Kuva 29. Uutteen ESI-NI-massaspektri. Suhteellinen signaalivahvuus y-akselilla, havaitun fragmentin m/z -arvo x-akselilla

7 Päätelmät

Vaikka näytettä analysoidessa havaittiin suuri joukko selkeästi toisistaan poikkeavia haihtuvia yhdisteitä, ei niiden analysointi ollut mahdollista. Yhdisteiden havaitut GC-MS-spektrit poikkesivat selkeästi kirjallisuudessa aiemmin koivunsilmuista havaittujen yhdisteiden julkaistuista referenssispektreistä, kuten esimerkiksi α -betulenolista ja β -betulenolista. Myöskään spektrikirjastoista ei ollut apua yhdisteiden tunnistamisessa. Mahdolliseksi analyysimenetelmäksi olisi jäänyt joko vertailuyhdisteiden hankinta tai valmistus ja niiden vertailu havaittuja yhdisteitä vastaan. Tämä ei kuitenkaan ollut mahdollista työn yhteydessä, sillä mahdollisia vertailuyhdisteitä ei ollut saatavilla eikä omien vertailuyhdisteiden syntetisoimiseen ollut mahdollisuutta.

Tunnistuksen ongelmiin voi olla useita syitä. Mahdollisina syinä voisi pitää joko fraktioinnin aikana silikakolonnin katalysoimia rakennemuutoksia tai uuttomenetelmän vaikutuksesta muodostuneita artefakteja. Kuitenkin vertailtaessa havaittuja fragmentti-ioneita sekä fraktioiduista näytteestä että fraktioimattomasta näytteestä, todettiin, ettei tärkeimpien näytekomponenttien rakenne ollut muuttunut fraktioinnin aikana. Tämä puolestaan viittaisi yhdisteiden poikkeavan rakenteen aiheutuvan joko näytteen alkuperäisestä koostumuksesta tai mahdollisesti rakenteen muutoksista näytettä uutettaessa. Periaatteessa ylikriittisellä hiilidioksidilla tehdyn uuton tulisi olla höyrytislausta pehmeämpi ja siten aiheuttavan vähäisempää artefaktien muodostumista, mutta tämän tutkimuksen puitteissa on mahdotonta arvioida ovatko nyt havaitut yhdisteet artefakteja vai ovatko aikaisemmissa tutkimuksissa käytetyillä menetelmillä havaitut yhdisteet olleet artefakteja. On huomattava, että uutettaessa ylikriittisellä hiilidioksidilla näytettä, jossa on haihtuvia yhdisteitä voi näiden yhdisteiden moninaisten rakenteiden takia tapahtua näytteen fraktioitumista jo uuttovaiheessa (Sovová 2012), mikä osaltaan voisi selittää havaittujen tulosten poikkeamisen aiemmin julkaistuista tuloksista. Ilman referenssiyhdisteitä tai edes kirjastovastaavuuksia ei kaikkia havaittuja yhdisteitä voi tunnistaa luotettavasti tai analysoida kvantitatiivisesti käytetyillä menetelmillä.

Työn yhteydessä havaittiin mahdollisuus erottaa haihtuvien yhdisteiden fraktiot toisistaan SPE-kolonniin avulla, jolloin lopullisessa GC-MS-analyysissä havaitut yhdisteet oli huomattavasti helpompi erottaa toisistaan. Koska yhdisteiden tunnistaminen ei lopulta ollut mahdollista, ei tästä havainnosta ollut merkitystä itse tutkimuksen kannalta. Ongelmaksi SPE-fraktioinnissa muodostui näytteen koostumus, sillä ennen analyysien aloittamista oli tehty oletamus näytteen koostumuksesta ja tämä oletamus osoittautui vääräksi. Näytteessä oletettiin olevan selkeästi havaittavia määriä rasvahappojen mono-, di- ja triasyglyseroleita (MAG, DAG, TAG), sekä muita lipidejä, minkä takia fraktiointia optimoitiin pyrkimyksenä saada oletetut lipidifraktiot eristettyä. Kun menetelmää oli kehitetty riittävästi ja saatu selkeästi erottuvat fraktiot, siirryttiin muihin analyyseihin, joiden avulla todettiin varsin nopeasti, että oletamus näytteen koostumuksesta oli osunut harhaan. Kuitenkin huolimatta siitä, ettei näytekomponenttien koostumuksesta ole tarkkaa tietoa tarkisteltaessa SPE-fraktiointia muiden analyysien avulla voitiin havaita sen jakaneen uutteen selkeästi erillisiin fraktioihin näytekomponenttien poolisuuden perusteella.

HPLC-MS-laitteiston käyttöä kokeiltiin näytteen analysoimiseksi, mutta näytteen analysointia ei saatu toimivaksi käytettävissä olleen kolonniin kanssa, jolloin päätettiin kokeilla näytteen analysoimista ilman HPLC-kolonnia. Havaittujen yhdisteiden lukumäärät osoittautuivat oletetusti liian suuriksi, jotta niitä olisi voitu analysoida. Muista kuin fraktioista 0603 ja 0605 havaittiin runsaasti signaaleita, joista suuri osa oli massa per varaus (m/z) arvoltaan melko suuria. Tämä puolestaan on indikaattori sille, että kukin fraktio koostui varsinaisten haihtuvien yhdisteiden lisäksi myös muista massaltaan huomattavasti suuremmista yhdisteistä, jotka eivät mahdollisesti olleet haihtuvia komponentteja.

Työtä aloitettaessa oletettiin joihinkin fraktioihin kertyvän osittain rasvahapoista koostuvia yhdisteitä, jolloin näytefraktiot päätettiin analysoida myös rasvahappojen analyysiin soveltuvalla menetelmällä. Käytännön tuloksia ei fraktioita analysoitaessa saatu havaittujen yhdisteiden konsentraation jäätyä alhaiseksi ja havaittujen yhdisteiden pääasiallisesti poiketessa standardissa käytettyjen rasvahappojen metyyliesteristandardien retentioajoista. Retentioaikojen perusteella nämä voisivat olla standardin rasvahappojen ulkopuolisia rasvahappoja. On kuitenkin huomattava

näytteen koostuneen hyvin moninaisista yhdisteistä joten on mahdollista että havaitut yhdisteet eivät ole rasvahappoja vaan joidenkin muiden näytekomponenttien metyyliestereitä. Mikäli nämä yhdisteet olisivat olleet rasvahappoja, niiden retentioajat olisivat sopineet esimerkiksi likimain kertatydyttymättömien viidestätoista tai seitsemästätoista hiilestä koostuvien rasvahappojen metyyliestereiden arvioiduille retentioajoille. On kuitenkin tärkeä huomata, että havaitut yhdisteet ovat voineet olla muita näytekomponentteja, sillä samoja yhdisteitä ei analysoitu kahdella erilaisella kaasukromatografikolonnilla tai edes eri lämpötilaohjelmalla, joten ei ole varmuutta siitä olivatko havaitut yhdisteet rasvahappojen metyyliestereitä vai eivät. Kuitenkin TLC-analyysissä käytetyn 18-A standardin perusteella nämä tuntemattomat yhdisteet etenivät (eluoituivat) samankaltaisesti kuin standardiseoksen triasyglyserolikomponentti. On myös mahdollista, että rasvahappojen metyyliestereiksi tunnistetut yhdisteet eivät käytännössä olleet niitä, vaan joko muita näytekomponentteja tai näytekomponenttien reaktiotuotteita natriummetoksidilla suoritetun metyloinnin jälkeen.

Lähteet

- Abramoff, M.D., Magalhães, P.J. & Ram, S.J. (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics Intern* **11**:36-42.
- Adams, R.P. (2007) Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4. painos, 804 s. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois.
- Ahtonen, S. & Kallio, H. (1989) Identification and seasonal variations of amino acids in birch sap used for syrup production. *Food Chem* **33**:125-132.
- Christie, W.W. (1982) A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesteryl esters. *J Lipid Res.* **23**:1072.
- Christie, W.W. (1992) Solid-phase extraction columns in the analysis of lipids. Kirjassa: Christie, W.W. (toim.), *Advances in Lipid Methodology*, volume 1, s. 1-17. Oily Press, Ayr.
- Christie, W.W. (2003) *Lipid analysis : isolation, separation, identification and structural analysis of lipids*, 3. painos, 416 s. Oily Press, Bridgwater, UK.
- Demirci, B., Başer, K.H.C., Demirci, F. & Hamann, M.T. (2000a) New caryophyllene derivatives from *Betula litwinowii*. *J Nat Prod* **63**:902.
- Demirci, F., Demirci, B., Başer, K.H.C. & Guven, K. (2000b) The composition and antifungal bioassay of the essential oils of different *Betula* species growing in Turkey. *Chem Nat Compd* **36**:159-165.
- Demirci, B., Başer, K.H.C., Ozek, T. & Demirci, F. (2000c) Betulenols from *Betula* species. *Planta Med* **66**:490.
- Demirci, B., Paper, D.H., Demirci, F., Başer, K.H.C. & Franz, G. (2004) Essential Oil of *Betula pendula* Roth. Buds. *Evid Based Complement Alternat Med* **1**:301.
- Demirci, B. & Başer, K.H.C. (2003) Essential oils from the buds of *Betula* spp. growing in Turkey. *Flavour Fragrance J* **18**:87-90.
- Farquhar, J.W., Smith, R.E. & Dempsey, M.E. (1956) The effect of beta sitosterol on the serum lipids of young men with arteriosclerotic heart disease. *Circulation* **14**:77-82.
- Fontana, M. (2016) Enhancing Fluoride: Clinical Human Studies of Alternatives or Boosters for Caries Management. *Caries Res* **50 Suppl 1**:22-37.

- Fontana, M. & González-Cabezas, C. (2012) Are we ready for definitive clinical guidelines on xylitol/polyol use? *Adv Dent Res* **24**:123.
- Fornari, T., Vicente, G., Vázquez, E., García-Risco, M.R. & Reglero, G. (2012) Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. *J Chromatogr A* **1250**:34.
- Fujioka, T., Kashiwada, Y., Kilkuskie, R.E., Cosentino, L.M., Ballas, L.M., Jiang, J.B., Janzen, W.P., Chen, I. & Lee, K. (1994) Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzigium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. *J Nat Prod* **57**:243-247.
- Germanò, M.P., Cacciola, F., Donato, P., Dugo, P., Certo, G., D'Angelo, V., Mondello, L. & Rapisarda, A. (2012) *Betula pendula* leaves: Polyphenolic characterization and potential innovative use in skin whitening products. *Fitoterapia* **83**:877-882.
- Gründemann, C., Gruber, C.W., Hertrampf, A., Zehl, M., Kopp, B. & Huber, R. (2011) An aqueous birch leaf extract of *Betula pendula* inhibits the growth and cell division of inflammatory lymphocytes. *J Ethnopharmacol* **136**:444-451.
- Hamilton, J.G. & Comai, K. (1984) Separation of neutral lipids and free fatty acids by high-performance liquid chromatography using low wavelength ultraviolet detection. *J Lipid Res* **25**:1142.
- Hamilton, J.G. & Comai, K. (1988) Rapid separation of neutral lipids, free fatty acids and polar lipids using prepacked silica Sep-Pak columns. *Lipids* **23**:1146.
- Harju, L. & Huldén, S. (1990) Birch sap as a tool for biogeochemical prospecting. *J Geochem Explor* **37**:351-365.
- Helfferich, D. (2003) Birch: white gold in the boreal forest. *Agroborealis* **35**:4-12.
- Heräjärvi, H. (2008) Käyttömäärät käyttömuodoittain. Kirjassa: Niemistö, P., Viherä-Aarnio, A., Velling, P., Heräjärvi, H. & Verkasalo, E. (toim.), Koivun kasvatusta ja käyttöä, s. 205-206. Metsäkustannus, Helsinki.
- Hiltunen, R., Vaisanen, L., Forsen, K. & von Schantz, M. (1983) Identification of the main compounds in the bud oil of birch (*Betula pubescens* Ehrh.) by gas chromatography-mass spectrometry and chemical reactions. *Acta Pharm Fenn* **92**:137-143.
- Horai, H., Arita, M., Kanaya, S., Nihei, Y., Ikeda, T., Suwa, K., Ojima, Y., Tanaka, K., Tanaka, S., Aoshima, K., Oda, Y., Kakazu, Y., Kusano, M., Tohge, T., Matsuda, F., Sawada, Y., Hirai, M.Y., Nakanishi, H., Ikeda, K., Akimoto, N., Maoka, T., Takahashi, H., Ara, T., Sakurai, N., Suzuki, H., Shibata, D., Neumann, S., Iida, T., Tanaka, K., Funatsu, K., Matsuura, F., Soga, T., Taguchi, R., Saito, K. & Nishioka, T. (2010) MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *J Mass Spectrom* **45**:703.

- Huldén, S. & Harju, L. (1986) Chemical Analysis of Mineral Elements in Spring Sap of Birch: Daily and Seasonal Variations in the Sap Composition. *Acta Acad Abo* **46**:1-16.
- Hyvönen, L., Koivistoinen, P. & Voirol, F. (1982) Food technological evaluation of xylitol. *Adv Food Res* **28**:373-403.
- Illés, V., Daood, H.G., Perneczki, S., Szokonya, L. & Then, M. (2000) Extraction of coriander seed oil by CO₂ and propane at super- and subcritical conditions. *J Supercrit Fluids* **17**:177-186.
- Isidorov, V.A., Krajewska, U., Vinogorova, V.T., Vetchinnikova, L.V., Fuksman, I.L. & Bal, K. (2004) Gas chromatographic analysis of essential oil from buds of different birch species with preliminary partition of components. *Biochem Syst Ecol* **32**:1-13.
- Kallio, H., Karppinen, T. & Holmbom, B. (1985a) Concentration of birch sap by reverse osmosis. *J Food Sci* **50**:1330-1332.
- Kallio, H., Ahtonen, S., Raulo, J. & Linko, R.R. (1985b) Identification of the sugars and acids in birch sap. *J Food Sci* **50**:266.
- Kallio, H., Rine, S., Pangborn, R. & Jennings, W. (1987) Effect of heating on the headspace volatiles of Finnish birch syrup. *Food Chem* **24**:287-299.
- Kallio, H., Teerinen, T., Ahtonen, S., Suihko, M. & Linko, R.R. (1989) Composition and properties of birch syrup (*Betula pubescens*). *J Agric Food Chem* **37**:51-54.
- Kallio, H. (1989) Aroma of birch syrup. *J Agric Food Chem* **37**:1367-1371.
- Kallio, H. & Ahtonen, S. (1987a) Seasonal variations of the acids in birch sap. *Food Chem* **25**:285-292.
- Kallio, H. & Ahtonen, S. (1987b) Seasonal variations of the sugars in birch sap. *Food Chem* **25**:293-304.
- Kallio, H. & Kallio, S. (1987) Koivunmahla, suomalaisen innovaation perusteet, 35 s. Advisers Uotinen, Tampere.
- Kause, A., Ossipov, V., Haukioja, E., Lempa, K., Hanhimäki, S. & Ossipova, S. (1999) Multiplicity of Biochemical Factors Determining Quality of Growing Birch Leaves. *Oecologia* **120**:102-112.
- Keinänen, M. & Julkunen-Tiitto, R. (1998) High-performance liquid chromatographic determination of flavonoids in *Betula pendula* and *Betula pubescens* leaves. *J Chromatogr A* **793**:370-377.
- Kozłowski, T.T. & Pallardy, S.G. (1997) Physiology of woody plants, 2. painos, 411 s. Academic Press, San Diego, California.

- Kūka, M., Čakste, I. & Geršebeka, E. (2013) Determination of bioactive compounds and mineral substances in Latvian birch and maple saps. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences* **67**:437-441.
- Lahti, A. & Hannuksela, M. (1980) Immediate contact allergy to birch leaves and sap. *Contact Derm* **6**:464-465.
- Lees, A.M., Mok, H.Y., Lees, R.S., McCluskey, M.A. & Grundy, S.M. (1977) Plant sterols as cholesterol-lowering agents: clinical trials in patients with hypercholesterolemia and studies of sterol balance. *Atherosclerosis* **28**:325-338.
- Lehenkari, J. (2000) Studying Trajectories and Networks: The Case of Benecol Margarine. *Sci Stud* **13**:50-67.
- Maaranen, S. & Maaranen, A. (2003) Koivunmahla, malja luonnolle ja terveydelle, 191 s. Art House, Helsinki.
- Miettinen, T.A., Tilvis, R.S. & Kesaniemi, Y.A. (1990) Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population. *Am J Epidemiol* **131**:20-31.
- Miettinen, T.A., Puska, P., Gylling, H., Vanhanen, H. & Vartiainen, E. (1995) Reduction of serum cholesterol with sitostanol-ester margarine in a mildly hypercholesterolemic population. *N Engl J Med* **333**:1308-1312.
- Mullauer, F.B., Kessler, J.H. & Medema, J.P. (2010) Betulinic acid, a natural compound with potent anticancer effects. *Anticancer Drugs* **21**:215.
- Neuvonen, S. (2008) Tunturikoivu. Kirjassa: Niemistö, P., Viherä-Aarnio, A., Velling, P., Heräjärvi, H. & Verkasalo, E. (toim.), Koivun kasvatus ja käyttö, s. 26. Metsäkustannus, Helsinki.
- Niemi, S.A. (2015) Koivu, Suomen kansallispuu, 244 s. Minerva Kustannus, Helsinki.
- Niemistö, P., Viherä-Aarnio, A., Velling, P., Heräjärvi, H. & Verkasalo, E. (2008) Koivun tulevaisuus. Kirjassa: Niemistö, P., Viherä-Aarnio, A., Velling, P., Heräjärvi, H. & Verkasalo, E. (toim.), Koivun kasvatus ja käyttö, s. 245-246. Metsäkustannus, Helsinki.
- Noge, K. & Becerra, J.X. (2009) Germacrene D, A Common Sesquiterpene in the Genus *Bursera* (Burseraceae). *Molecules* **14**:5289-5297.
- Olaru, N., Olaru, L. & Stoleriu, A. (1998) Carboxymethylcellulose synthesis in organic media containing ethanol and/or acetone. *J Appl Polym Sci* **67**:481-486.
- Orav, A., Arak, E., Boikova, T. & Raal, A. (2011) Essential oil in *Betula* spp. leaves naturally growing in Estonia. *Biochem Syst Ecol* **39**:744-748.

- Ossipov, V., Nurmi, K., Loponen, J., Haukioja, E. & Pihlaja, K. (1996) High-performance liquid chromatographic separation and identification of phenolic compounds from leaves of *Betula pubescens* and *Betula pendula*. *J Chromatogr A* **721**:59-68.
- Ossipov, V., Salminen, J., Ossipova, S., Haukioja, E. & Pihlaja, K. (2003) Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway. *Biochem Syst Ecol* **31**:3-16.
- Pellikka, P. (2003) Koivunmahlasta siirappia teollisesti ja kotipolttoisesti. Kirjassa: Maaranen, S. & Maaranen, A. (toim.), Koivunmahla, malja luonnolle ja terveydelle, s. 117-126. Art House, Helsinki.
- Piispanen, R. & Saranpää, P. (2001) Variation of non-structural carbohydrates in silver birch (*Betula pendula* Roth.) wood. *Trees* **15**:444-451.
- Piispanen, R. & Saranpää, P. (2004) Seasonal and within-stem variations of neutral lipids in silver birch (*Betula pendula*) wood. *Tree Physiol* **24**:991-999.
- Pisha, E., Chai, H., Lee, I., Chagwedera, T.E., Farnsworth, N.R., Cordell, G.A., Beecher, C.W., Fong, H.H., Kinghorn, A.D. & Brown, D.M. (1995) Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat Med* **1**:1046-1051.
- Pourmortazavi, S.M. & Hajimirsadeghi, S.S. (2007) Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *J Chromatogr A* **1163**:2-24.
- Raal, A. (2010) Birch (*Betula* spp.). Kirjassa: Singh, V.K. & Govil, J.N. (toim.), Recent Progress in Medicinal Plants, 28, Volume 28 : Drug Plants II (1), s. 121. TX, IN, Studium Press.
- Rauha, J., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H. & Vuorela, P. (2000) Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol* **56**:3-12.
- Rautavaara, T. (1980) Miten luonto parantaa, kansanparannuskeinoja ja luontaislääketiedettä, 284 s. WSOY, Porvoo.
- Scheinin, A., Mäkinen, K.K., Tammissalo, E. & Rekola, M. (1975) Turku sugar studies XVIII: incidence of dental caries in relation to 1-year consumption of Xylitol chewing gum. *Acta Odontol Scand* **33**:269-278.
- Scheinin, A. & Mäkinen, K.K. (1976) Turku sugar studies: An overview. *Acta Odontol Scand* **34**:405-408.
- Selzer, E., Pimentel, E., Wacheck, V., Schlegel, W., Pehamberger, H., Jansen, B. & Kodym, R. (2000) Effects of betulinic acid alone and in combination with irradiation in human melanoma cells. *J Invest Dermatol* **114**:935-940.

- Siitonen, J. (2008) Koivun merkitys metsäluonnon monimuotoisuudelle. Kirjassa: Niemistö, P., Viherä-Aarnio, A., Velling, P., Heräjärvi, H. & Verkasalo, E. (toim.), Koivun kasvatusta ja käyttöä, s. 49-54. Metsäkustannus, Helsinki.
- Smolander, A. (2008) Koivun vaikutus kasvupaikan ominaisuuksiin. Kirjassa: Niemistö, P., Viherä-Aarnio, A., Velling, P., Heräjärvi, H. & Verkasalo, E. (toim.), Koivun kasvatusta ja käyttöä, s. 45-46. Metsäkustannus, Helsinki.
- Sovová, H. (2012) Modeling the supercritical fluid extraction of essential oils from plant materials. *J Chromatogr A* **1250**:27-33.
- Svanberg, I., Soukand, R., Luczaj, L., Kalle, R., Zyryanova, O., Denes, A., Papp, N., Nedelcheva, A., Seskauskaite, D., Kolodziejska-Degorska, I. & Kolosova, V. (2012) Uses of tree saps in northern and eastern parts of Europe. *Acta Soc Bot Pol* **81**:343-357.
- Udeani, G.O., Zhao, G.M., Geun Shin, Y., Cooke, B.P., Graham, J., Beecher, C.W., Kinghorn, A.D. & Pezzuto, J.M. (1999) Pharmacokinetics and tissue distribution of betulinic acid in CD-1 mice. *Biopharm Drug Dispos* **20**:379-383.
- Van den Dool, H. & Kratz, P.D. (1963) A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *J Chromatogr A* **11**:463-471.
- Velling, P. (2008a) Tarvekaluista taiteisiin - uhripuusta uutteisiin. Kirjassa: Niemistö, P., Viherä-Aarnio, A., Velling, P., Heräjärvi, H. & Verkasalo, E. (toim.), Koivun kasvatusta ja käyttöä, s. 13-19. Metsäkustannus, Helsinki.
- Velling, P. (2008b) Visakoivun kasvatusta ja käyttöä. Kirjassa: Niemistö, P., Viherä-Aarnio, A., Velling, P., Heräjärvi, H. & Verkasalo, E. (toim.), Koivun kasvatusta ja käyttöä, s. 216-217. Metsäkustannus, Helsinki.
- Velling, P. (2008c) Koivun mahla. Kirjassa: Niemistö, P., Viherä-Aarnio, A., Velling, P., Heräjärvi, H. & Verkasalo, E. (toim.), Koivun kasvatusta ja käyttöä, s. 16-17. Metsäkustannus, Helsinki.
- Verkasalo, E., Heräjärvi, H. & Sevola, Y. (2008) Koivun kysyntä ja sen kehittyminen. Kirjassa: Niemistö, P., Viherä-Aarnio, A., Velling, P., Heräjärvi, H. & Verkasalo, E. (toim.), Koivun kasvatusta ja käyttöä, s. 233-235. Metsäkustannus, Helsinki.
- Viherä-Aarnio, A. (2008a) Koivun suku. Kirjassa: Niemistö, P., Viherä-Aarnio, A., Velling, P., Heräjärvi, H. & Verkasalo, E. (toim.), Koivun kasvatusta ja käyttöä, s. 20. Metsäkustannus, Helsinki.
- Viherä-Aarnio, A. (2008b) Koivulajit. Kirjassa: Niemistö, P., Viherä-Aarnio, A., Velling, P., Heräjärvi, H. & Verkasalo, E. (toim.), Koivun kasvatusta ja käyttöä, s. 20-28. Metsäkustannus, Helsinki.

- Viherä-Aarnio, A. (2008c) Raudus- ja hieskoivun alalajeja, muunnoksia ja muotoja. Kirjassa: Niemistö, P., Viherä-Aarnio, A., Velling, P., Heräjärvi, H. & Verkasalo, E. (toim.), Koivun kasvatusta ja käyttö, s. 24-25. Metsäkustannus, Helsinki.
- Viherä-Aarnio, A. (2008d) Levinneisyys ja kasvupaikat. Kirjassa: Niemistö, P., Viherä-Aarnio, A., Velling, P., Heräjärvi, H. & Verkasalo, E. (toim.), Koivun kasvatusta ja käyttö, s. 29-30. Metsäkustannus, Helsinki.
- Viherä-Aarnio, A. & Velling, P. (2008) Biotekniikka koivunjalostuksessa. Kirjassa: Niemistö, P., Viherä-Aarnio, A., Velling, P., Heräjärvi, H. & Verkasalo, E. (toim.), Koivun kasvatusta ja käyttö, s. 66-67. Metsäkustannus, Helsinki.
- Wacker, K., Gründemann, C., Kern, Y., Bredow, L., Huber, R., Reinhard, T. & Schwartzkopff, J. (2012) Inhibition of corneal inflammation following keratoplasty by birch leaf extract. *Exp Eye Res* **97**:24-30.
- Yogeeswari, P. & Sriram, D. (2005) Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. *Curr Med Chem* **12**:657-666.
- Zyryanova, O.A., Terazawa, M., Koike, T. & Zyryanov, V.I. (2010) White Birch Trees as Resource Species of Russia: Their Distribution, Ecophysiological Features, Multiple Utilizations. *Eurasian J For Res* **13**:25-40.

Liitteet

- Liite 1 Fraktioidinnin optimointi
- Liite 2 Havaittujen yhdisteiden massaspektrejä (GC-MS)
- Liite 3 Kuudennen fraktioidinnin ESI-MS-massaspektrit

Liite 1A Ensimmäinen fraktiointi

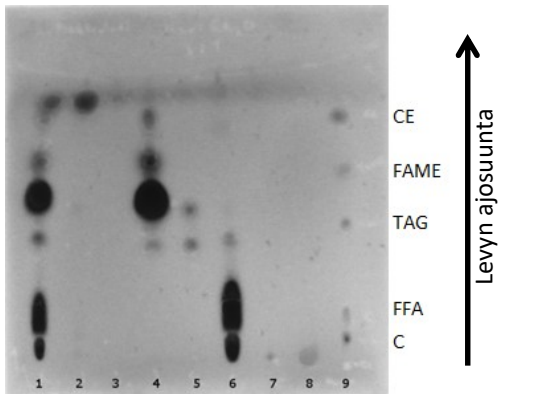
Määrä	Fraktio	Liuottimet	Osuudet
4 ml	0101	Heksaani	
4 ml	0102	Heksaani : Et ₂ O	250 : 1
4 ml	0103	Heksaani : Et ₂ O	24 : 1
4 ml	0104	Heksaani : Et ₂ O	24 : 1
4 ml	0105	Heksaani : Et ₂ O : AcOH	500 : 10 : 1
4 ml	0106	Et ₂ O : AcOH	500 : 1
4 ml	0107	MQ-H ₂ O	

Liite 1B Toinen fraktiointi

Määrä	Fraktio	Liuottimet	Osuudet
2 ml	0201	Heksaani	
4 ml	0202	Heksaani : Et ₂ O	200 : 1
6 ml	0203	Heksaani : Et ₂ O	24 : 1
3 ml	0204	Heksaani : Et ₂ O : AcOH	500 : 10 : 1
6 ml	0205	Et ₂ O : AcOH	500 : 1
6 ml	0206	MeOH	
	0207		

Liite 1C Toisen fraktioinnin TLC-analyysi

Paikka	Analyytti	Määrä
1	Näyte	5 µl
2	0201	5 µl
3	0202	5 µl
4	0203	5 µl
5	0204	5 µl
6	0205	5 µl
7	0206	5 µl
8	0207	5 µl
9	STD (18-4A)	12,5 µl

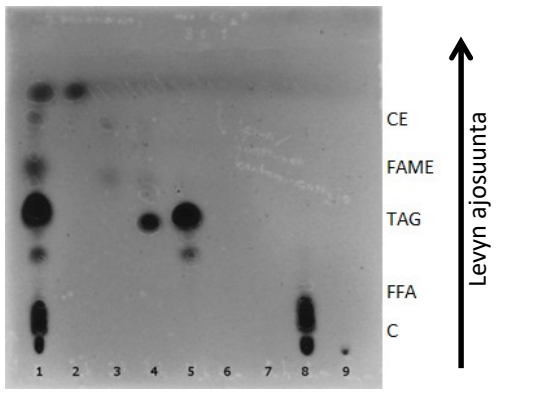


Liite 1D Kolmas fraktiointi

Määrä	Fraktio	Liuottimet	Osuudet
4 ml	0301	Heksaani : Et ₂ O	199 : 1
3 ml	0302	Heksaani : Et ₂ O	99 : 1
3 ml	0303	Heksaani : Et ₂ O	49 : 1
9 ml	0304	Heksaani : Et ₂ O	97 : 3
6 ml	0305	Et ₂ O : AcOH	500 : 1
9 ml	0306	MeOH	

Liite 1E Kolmannen fraktioinnin TLC-analyysi

Paikka	Analyytti	Määrä
1	Näyte	5 µl
2	0301	5 µl
3	0302	5 µl
4	0303	5 µl
5	0304 (heksaani)	5 µl
6	0304 (metanoli)	5 µl
7	0305 (heksaani)	5 µl
8	0305 (metanoli)	5 µl
9	0306	5 µl



Liite 1F Neljäs fraktiointi

Määrä	Fraktio	Liuottimet	Osuudet
4 ml	0401	Heksaani : Et ₂ O	199 : 1
4 ml	0402	Heksaani : Et ₂ O	99 : 1
2 ml	0403	Heksaani : Et ₂ O	49 : 1
2 ml	0404	Heksaani : Et ₂ O	97 : 3
2 ml	0405	Heksaani : Et ₂ O	24 : 1
2 ml	0406	Heksaani : Et ₂ O	24 : 1
4 ml	0407	Heksaani : Et ₂ O	3 : 1
6 ml	0408	Heksaani : Et ₂ O	1 : 1

Liite 1G Neljännen fraktioinnin TLC-analyysi

Paikka	Analyytti	Määrä
1	Näyte	2,5 µl
2	0401	5 µl
3	0402	5 µl
4	0403	5 µl
5	0404	5 µl
6	0405	5 µl
7	0406	5 µl
8	0407	5 µl
9	0408	5 µl

Liite 1H Viides fraktiointi

Määrä	Fraktio	Liuottimet	Osuudet
4 ml	0501	Heksaani : Et ₂ O	199 : 1
3 ml	0502	Heksaani : Et ₂ O	199 : 1
3 ml	0503	Heksaani : Et ₂ O	199 : 1
3 ml	0504	Heksaani : Et ₂ O	199 : 1
3 ml	0505	Heksaani : Et ₂ O	199 : 1
4 ml	0506	Heksaani : Et ₂ O	97 : 3
4 ml	0507	Heksaani : Et ₂ O	97 : 3
6 ml	0508	Heksaani : Et ₂ O	24 : 1

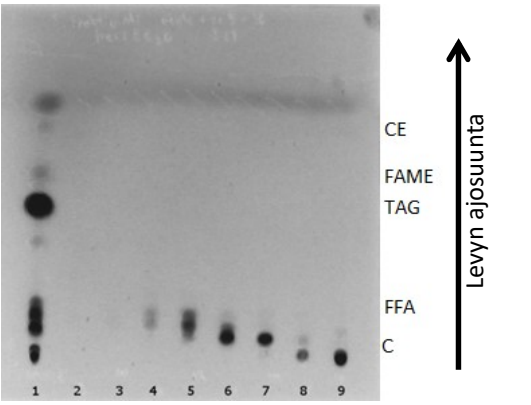
Määrä	Fraktio	Liuottimet	Osuudet
6 ml	0509	Heksaani : Et ₂ O	24 : 1
2 ml	0510	Heksaani : Et ₂ O	9 : 1
2 ml	0511	Heksaani : Et ₂ O	4 : 1
2 ml	0512	Heksaani : Et ₂ O	4 : 1
2 ml	0513	Heksaani : Et ₂ O	7 : 3
2 ml	0514	Heksaani : Et ₂ O	3 : 2
2 ml	0515	Heksaani : Et ₂ O	1 : 1
6 ml	0516	Et ₂ O	

Liite 1I Viidennen fraktioinnin ensimmäinen TLC-analyysi

Paikka	Analyytti	Määrä
1	Näyte	2,5 µl
2	0501	7,5 µl
3	0502	7,5 µl
4	0503	7,5 µl
5	0504	7,5 µl
6	0505	7,5 µl
7	0506	7,5 µl
8	0507	7,5 µl
9	0508	7,5 µl

Liite 1J Viidennen fraktioinnin toinen TLC-analyysi

Paikka	Analyytti	Määrä
1	Näyte	2,5 µl
2	0509	7,5 µl
3	0510	7,5 µl
4	0511	7,5 µl
5	0512	7,5 µl
6	0513	7,5 µl
7	0514	7,5 µl
8	0515	7,5 µl
9	0516	7,5 µl

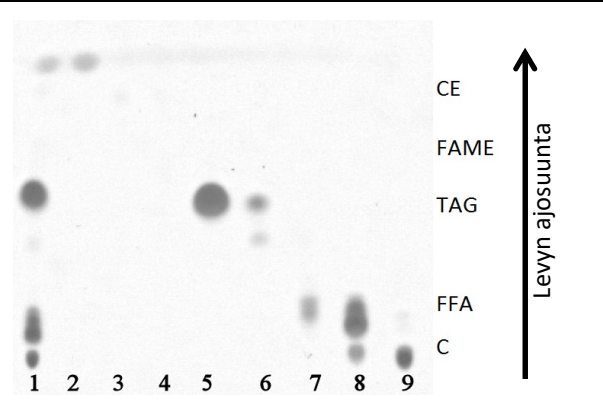


Liike 1K Kuudes fraktiointi

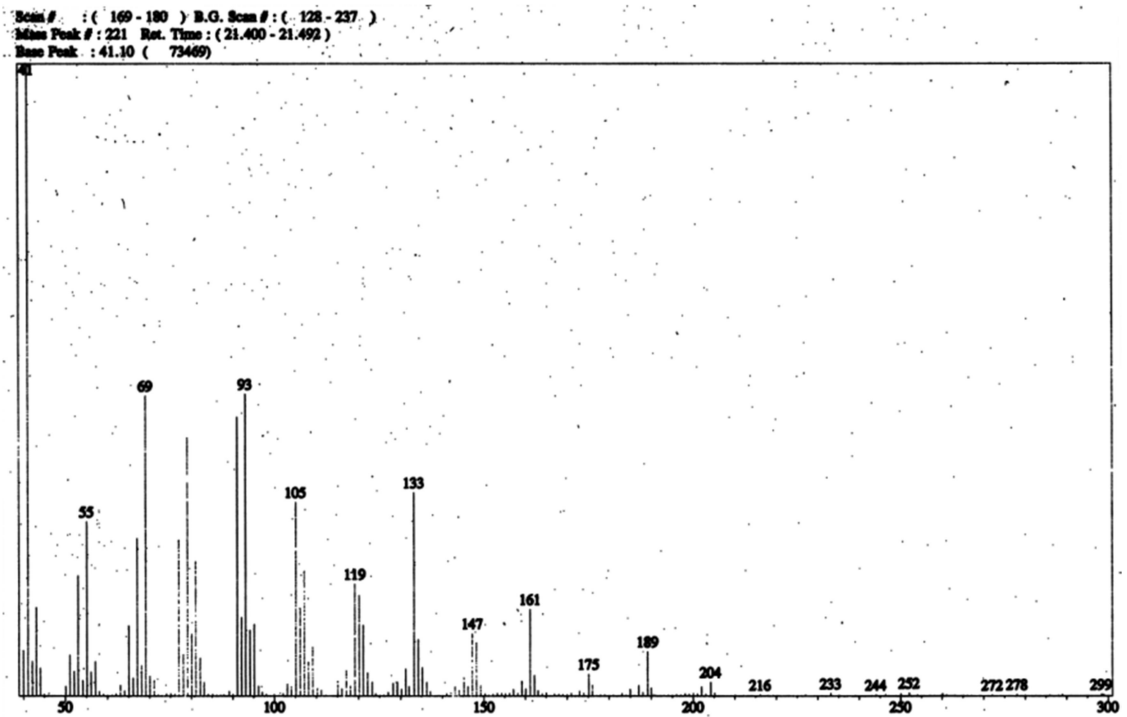
Määrä	Fraktio	Liuottimet	Osuudet
4 ml	0601	Heksaani : Et ₂ O	199 : 1
6 ml	0602	Heksaani : Et ₂ O	199 : 1
6 ml	0603	Heksaani : Et ₂ O	199 : 1
6 ml	0604	Heksaani : Et ₂ O	97 : 3
6 ml	0605	Heksaani : Et ₂ O	24 : 1
4 ml	0606	Heksaani : Et ₂ O	4 : 1
4 ml	0607	Heksaani : Et ₂ O	1 : 1
6 ml	0608	Et ₂ O	

Liite 1L Kuudennen fraktioinnin TLC-analyysi

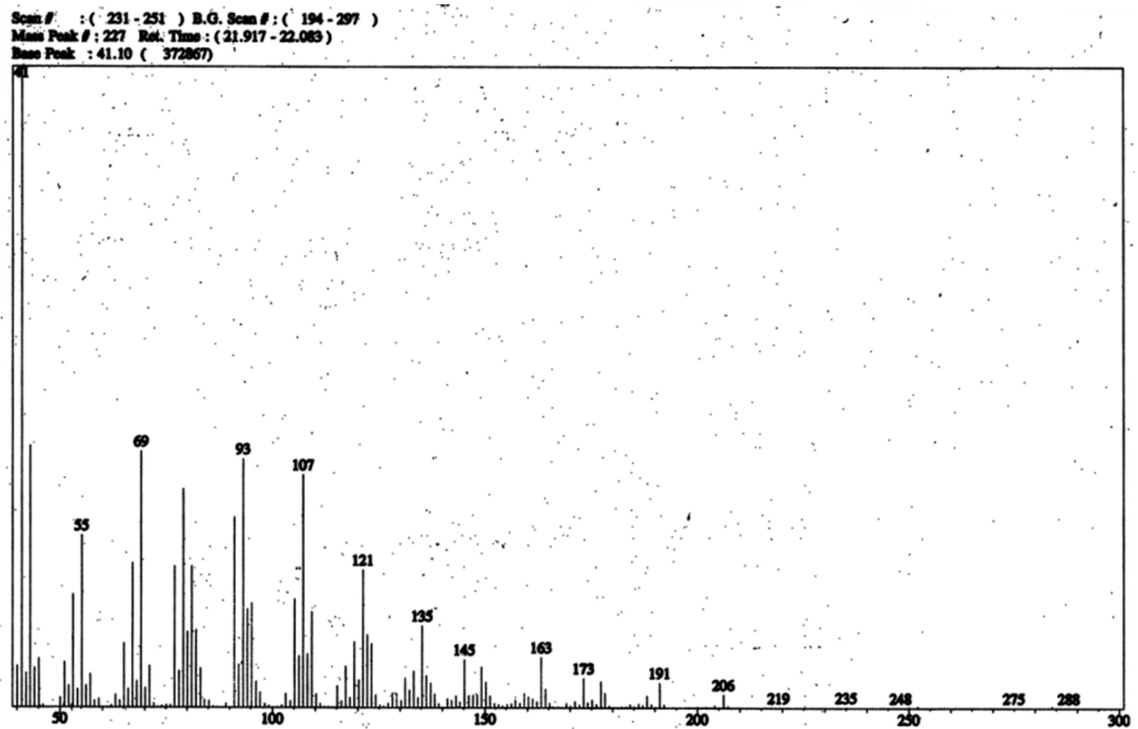
Paikka	Analyytti	Määrä
1	Näyte	2,5 µl
2	0601	5 µl
3	0602	5 µl
4	0603	5 µl
5	0604	5 µl
6	0605	5 µl
7	0606	5 µl
8	0607	5 µl
9	0608	5 µl



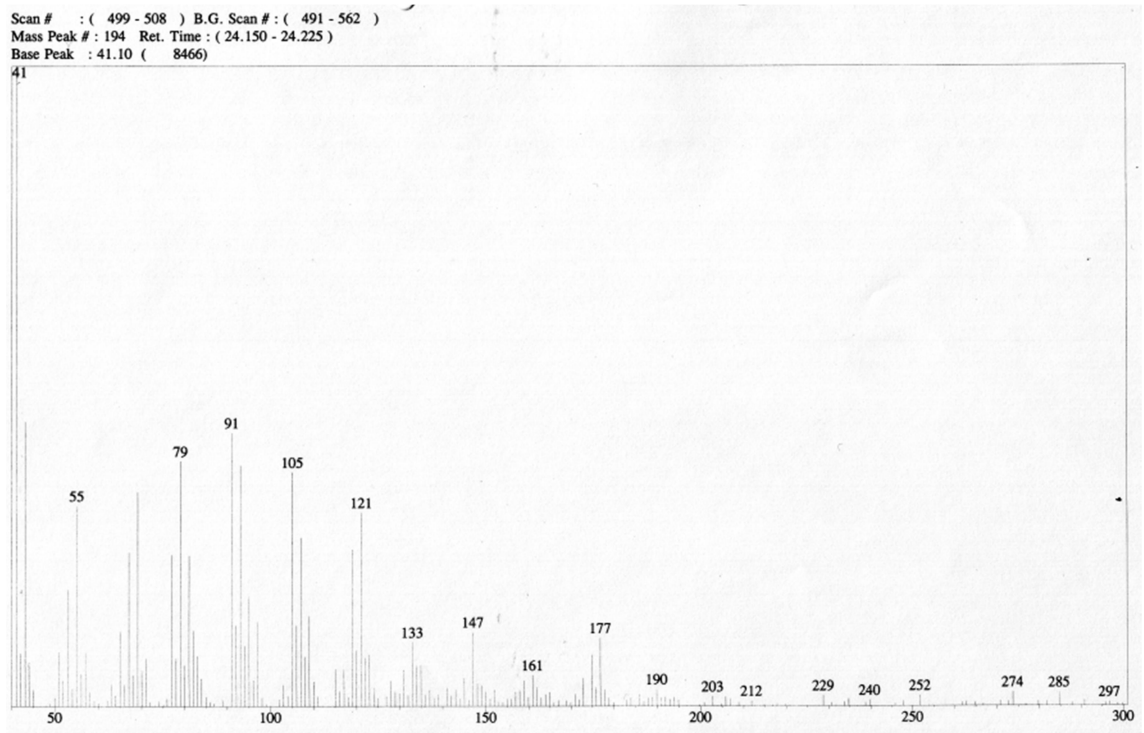
Liite 2A Havaitun yhdisteen N1 -massaspektri



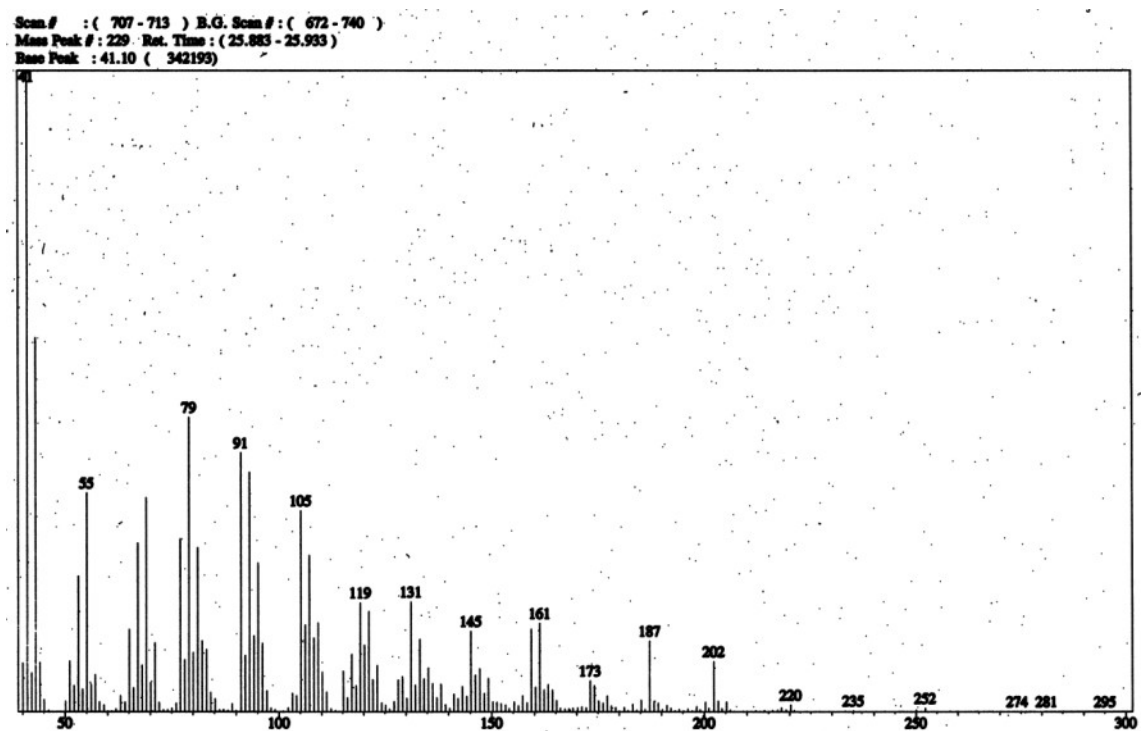
Liite 2B Havaitun yhdisteen N2 -massaspektri



Liite 2C Havaitun yhdisteen N3 -massaspektri

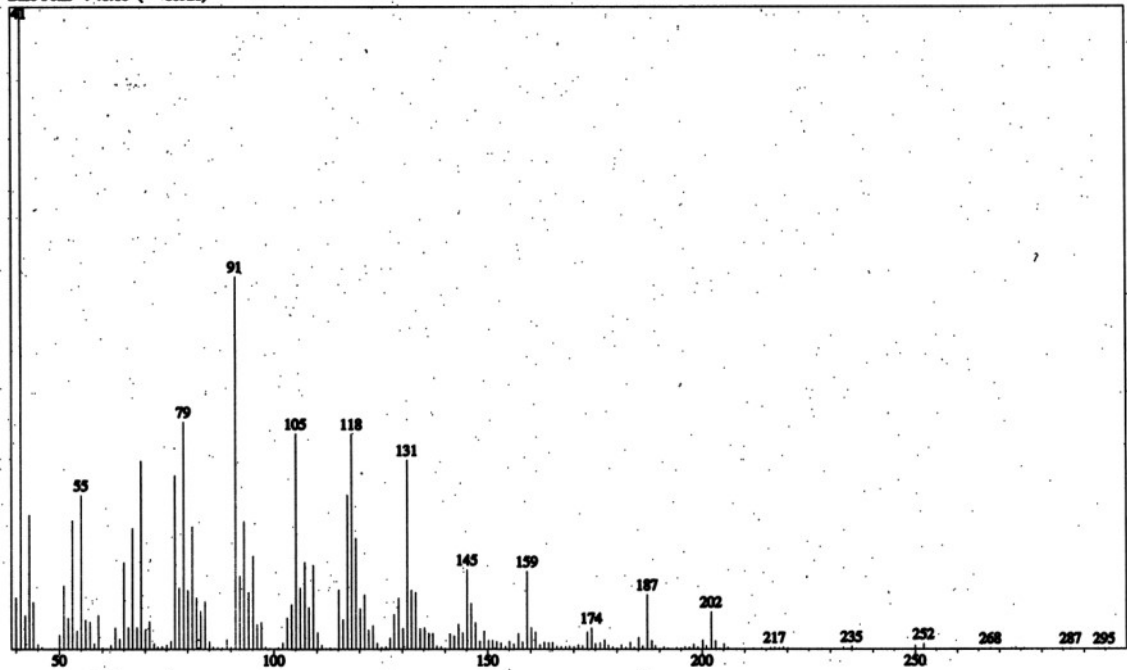


Liite 2D Havaitun yhdisteen N4 -massaspektri



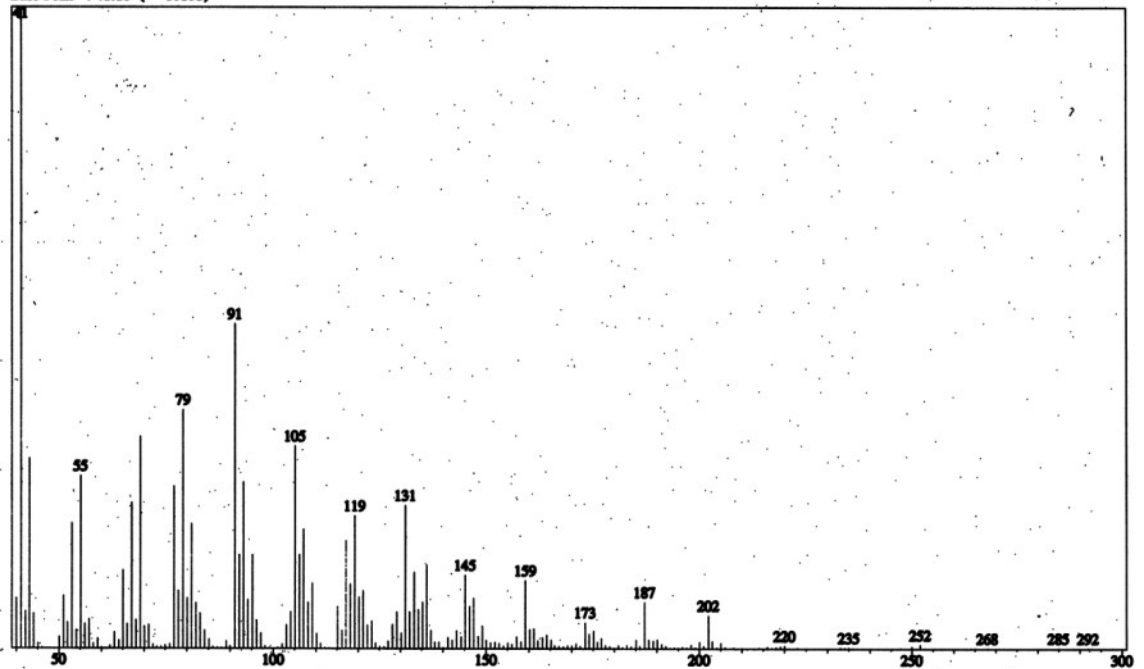
Liite 2E Havaitun yhdisteen N5 -massaspektri

Scan # : (768 - 787) B.G. Scan # : (753 - 796)
Mass Peak # : 232 Ret. Time : (26.392 - 26.590)
Base Peak : 41.10 (80921)

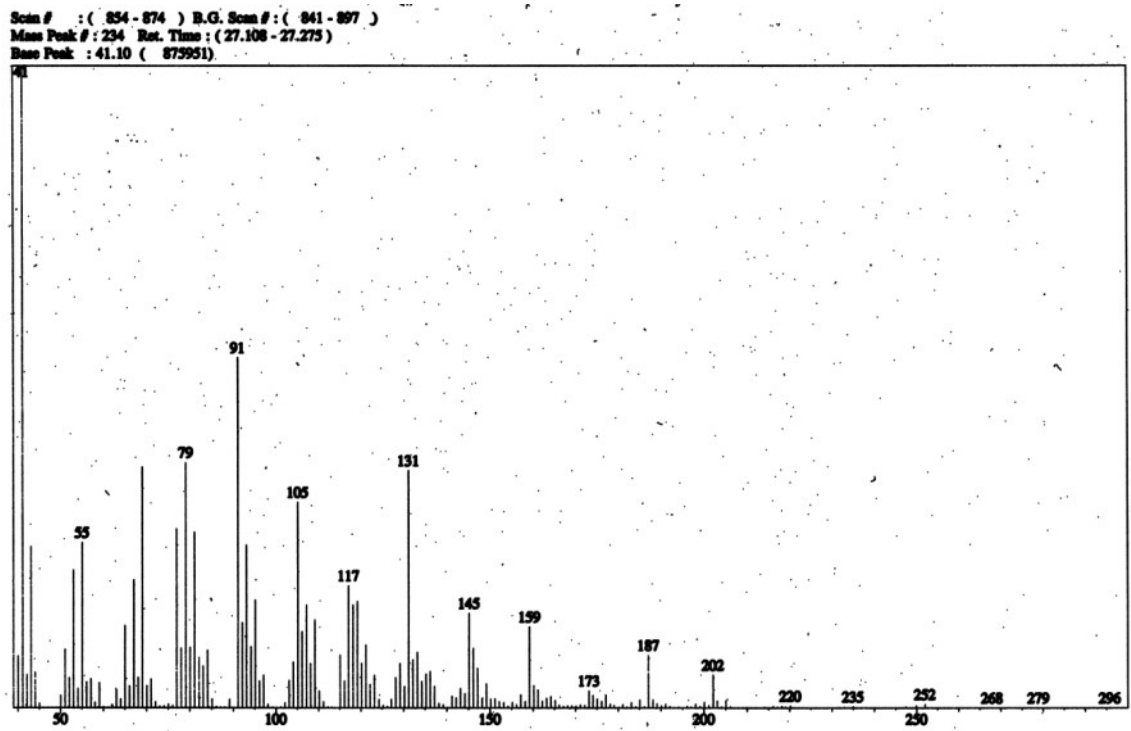


Liite 2F Havaitun yhdisteen N6 -massaspektri

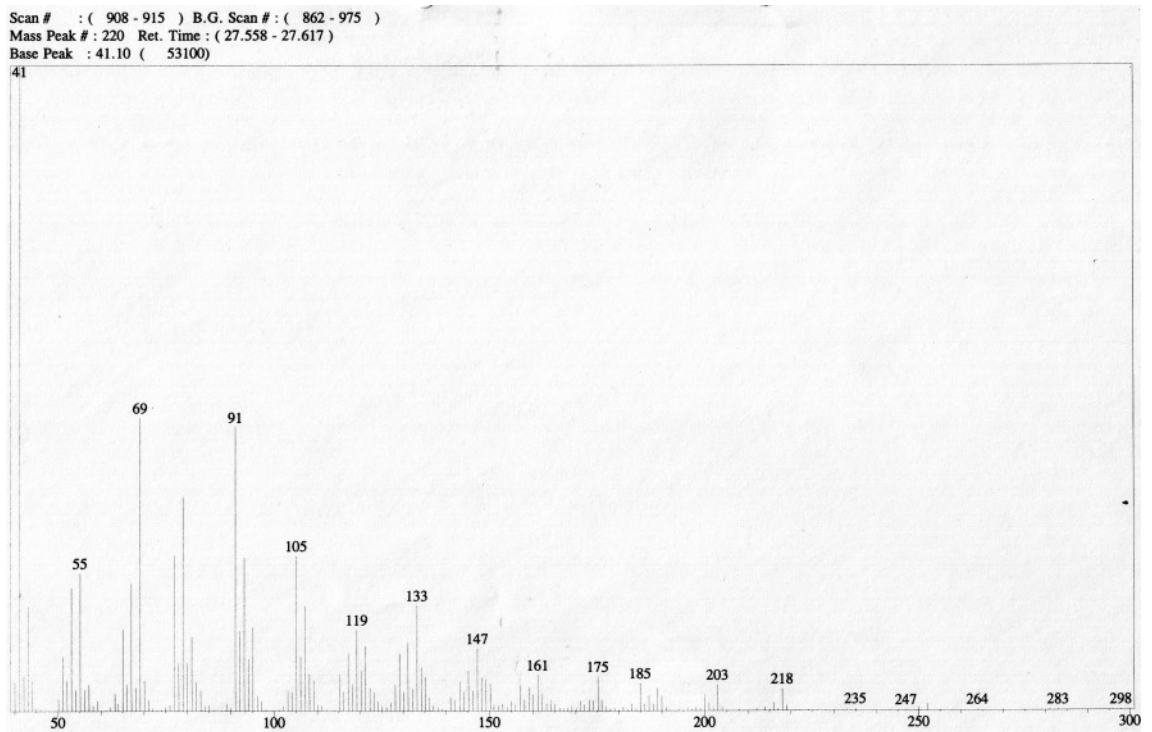
Scan # : (849 - 866) B.G. Scan # : (832 - 888)
Mass Peak # : 226 Ret. Time : (27.067 - 27.208)
Base Peak : 41.10 (99595)



Liite 2G Havaitun yhdisteen N7 -massaspektri



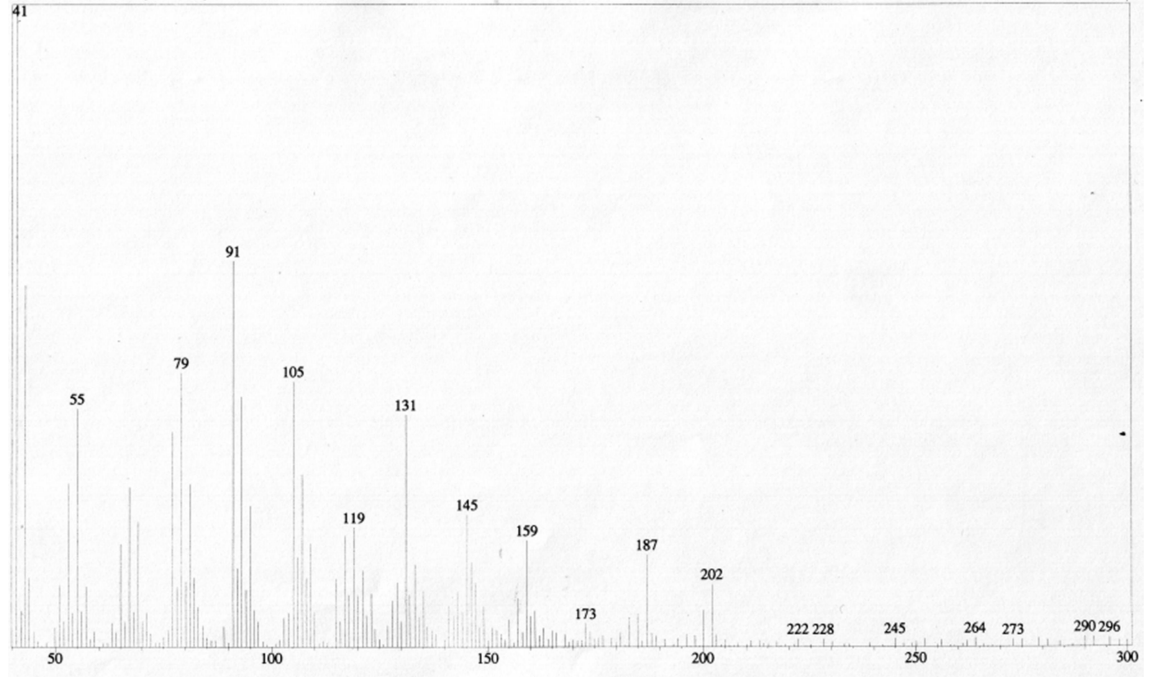
Liite 2H Havaitun yhdisteen N8 -massaspektri



Liite 2I

Havaitun yhdisteen N9 -massaspektri

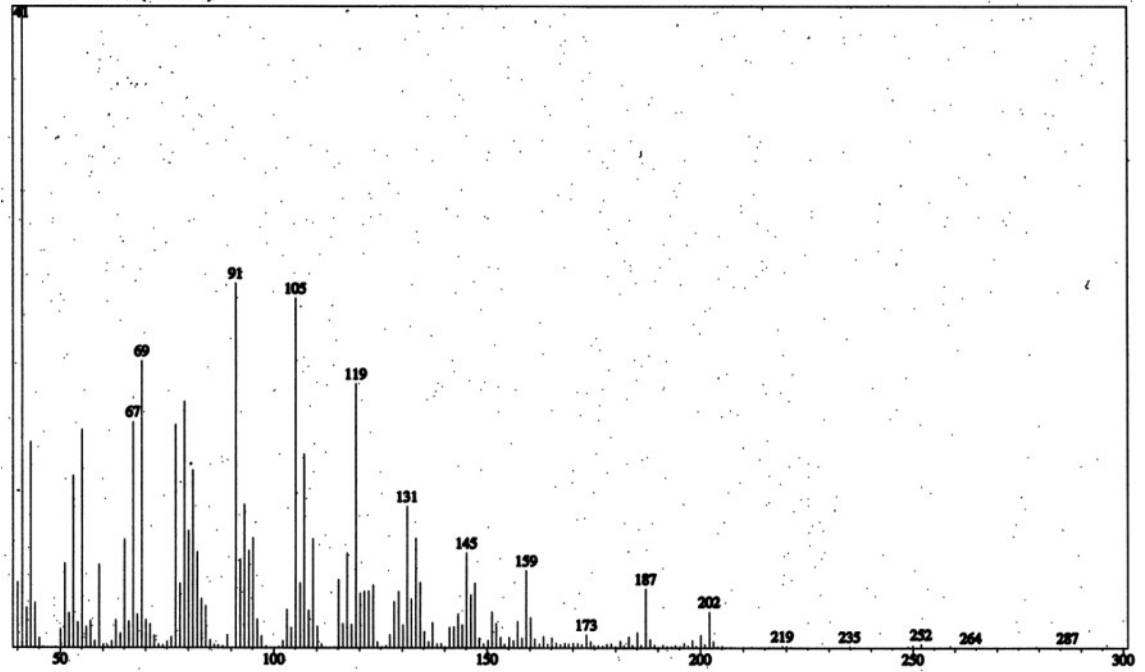
Scan # : (917 - 924) B.G. Scan # : (908 - 931)
Mass Peak # : 208 Ret. Time : (27.633 - 27.692)
Base Peak : 41.10 (8952)



Liite 2J

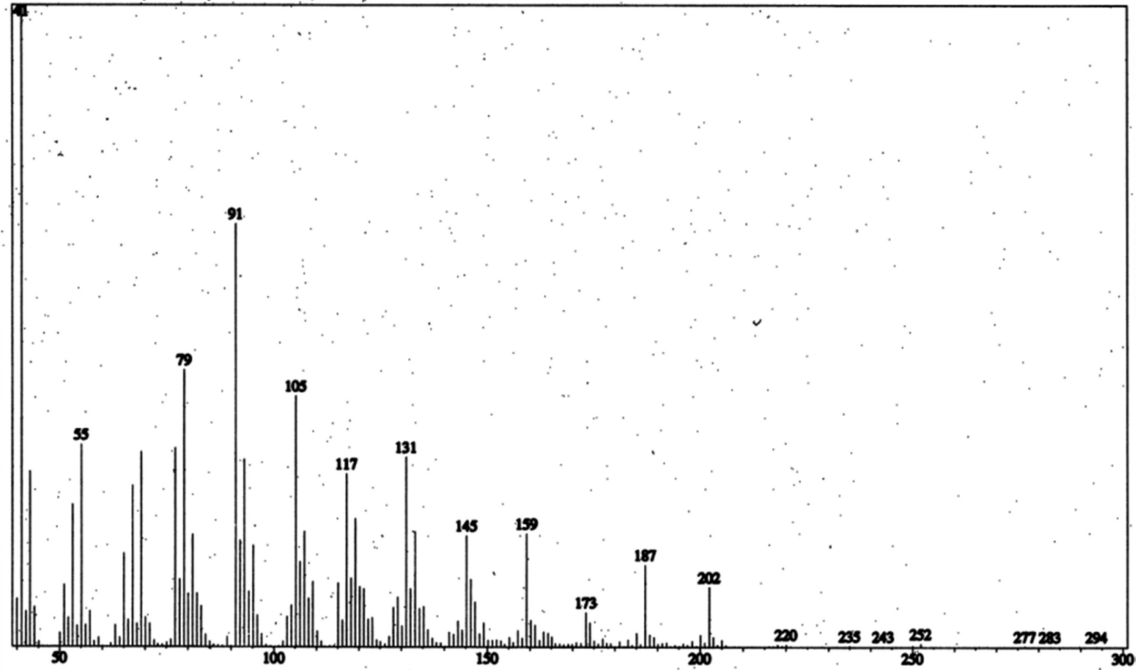
Havaitun yhdisteen N10 -massaspektri

Scan # : (935 - 945) B.G. Scan # : (930 - 950)
Mass Peak # : 225 Ret. Time : (27.783 - 27.867)
Base Peak : 41.10 (140841)



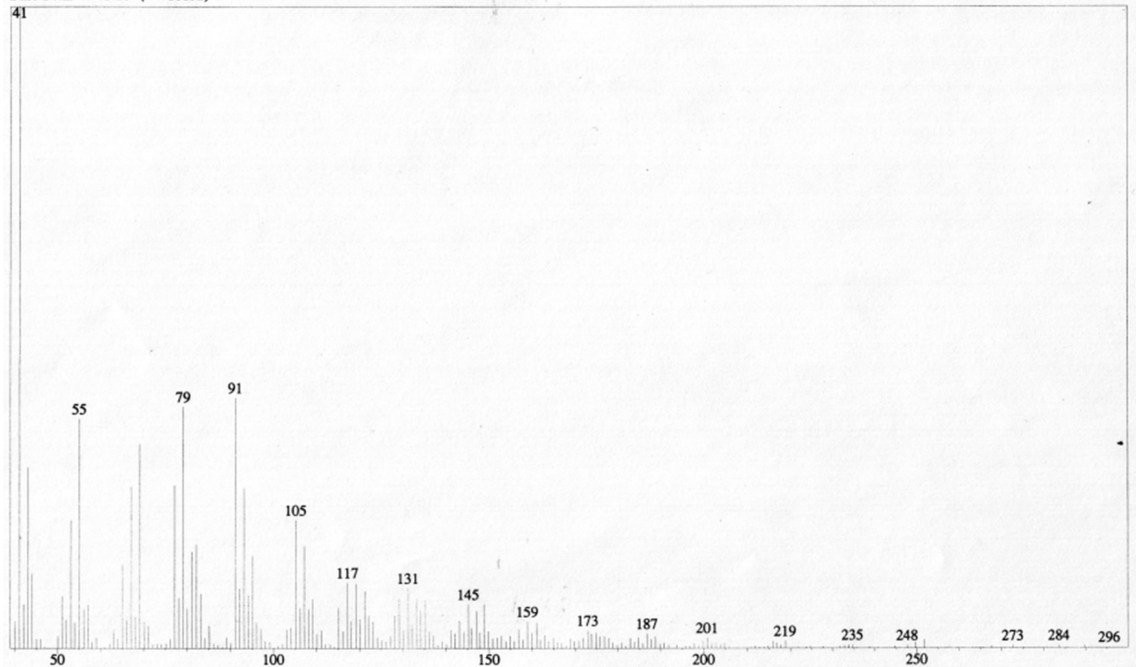
Liite 2K Havaitun yhdisteen N11 -massaspektri

Scan # : (954 - 962) B.G. Scan # : (930 - 975)
Mass Peak # : 220 Ret. Time : (27.942 - 28.008)
Base Peak : 41.10 (128305)



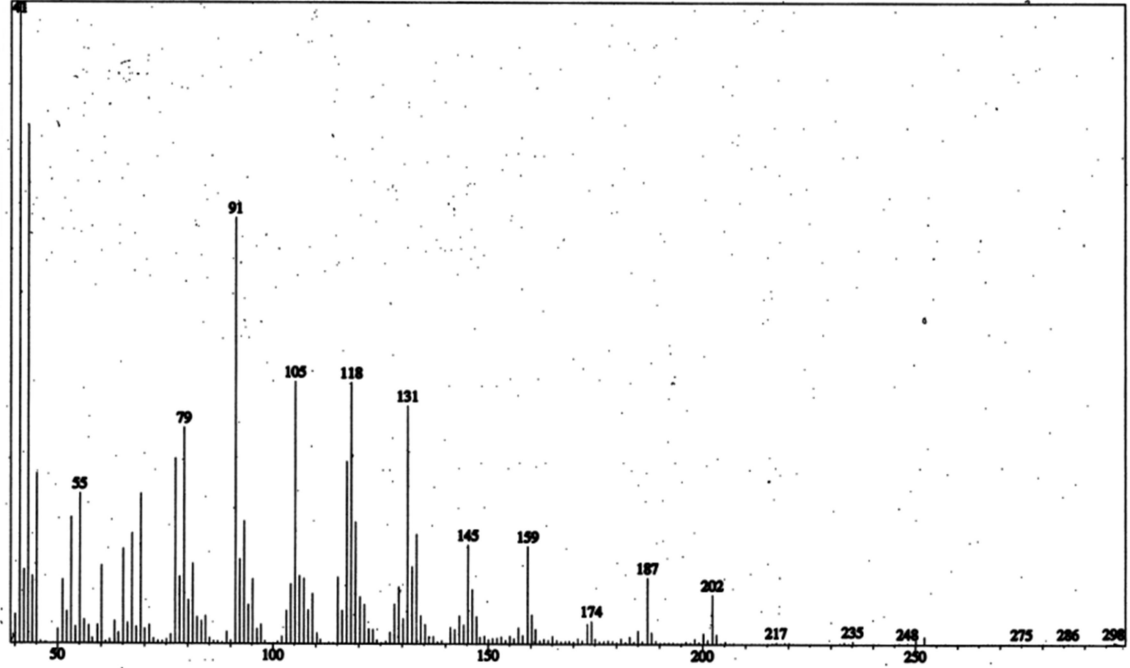
Liite 2L Havaitun yhdisteen N12 -massaspektri

Scan # : (988 - 998) B.G. Scan # : (950 - 1003)
Mass Peak # : 218 Ret. Time : (28.225 - 28.308)
Base Peak : 41.10 (18132)



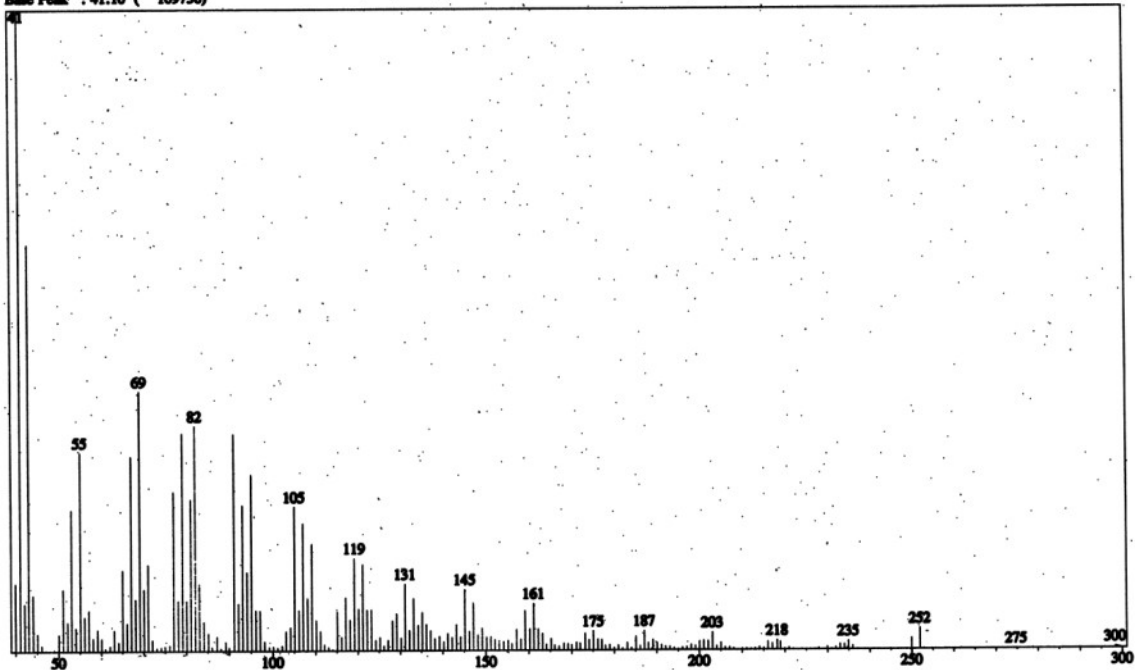
Liite 2M Havaitun yhdisteen N13 -massaspektri

Scan # : (1068 - 1083) B.G. Scan # : (1020 - 1043)
Mass Peak # : 234 Ret. Time : (28.892 - 29.017)
Base Peak : 41.10 (. 55182)

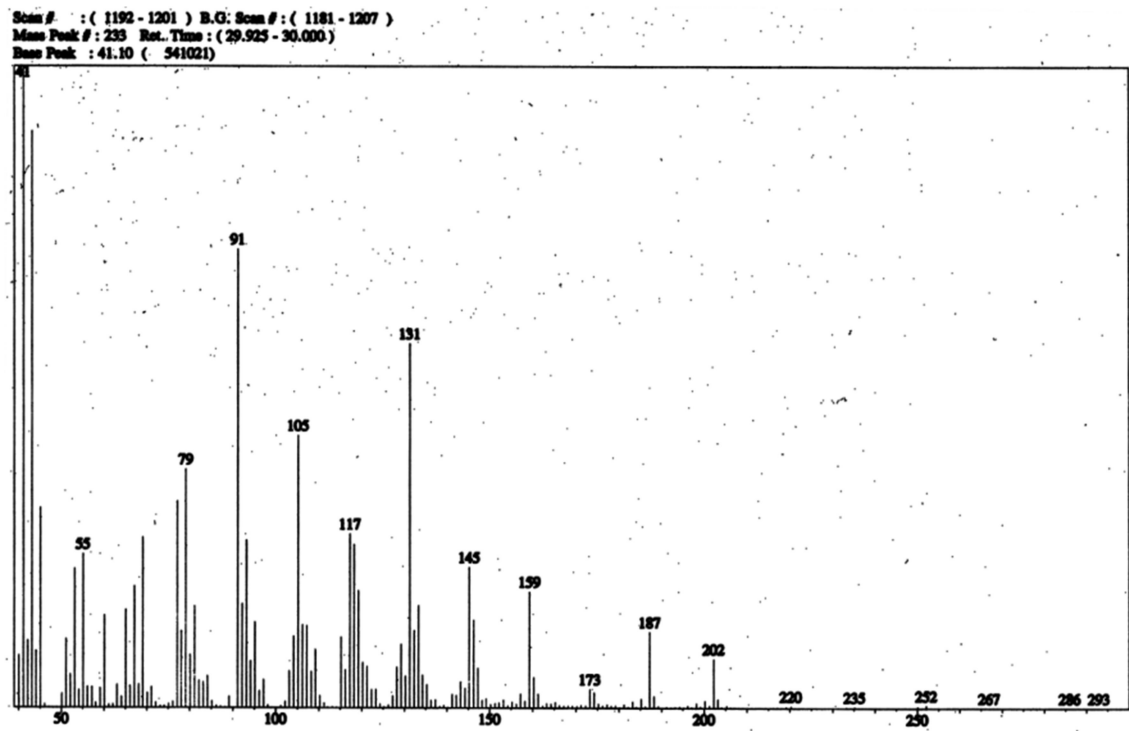


Liite2N Havaitun yhdisteen N14 -massaspektri

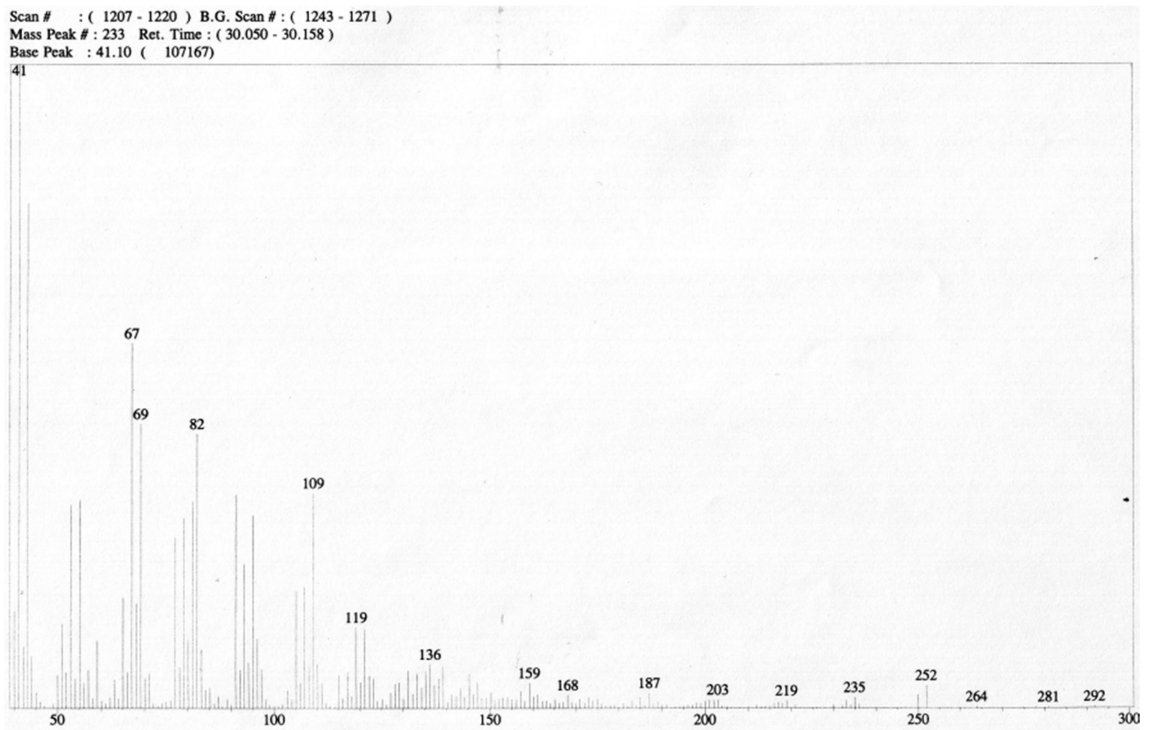
Scan # : (1141 - 1153) B.G. Scan # : (1127 - 1174)
Mass Peak # : 235 Ret. Time : (29.500 - 29.600)
Base Peak : 41.10 (109736)



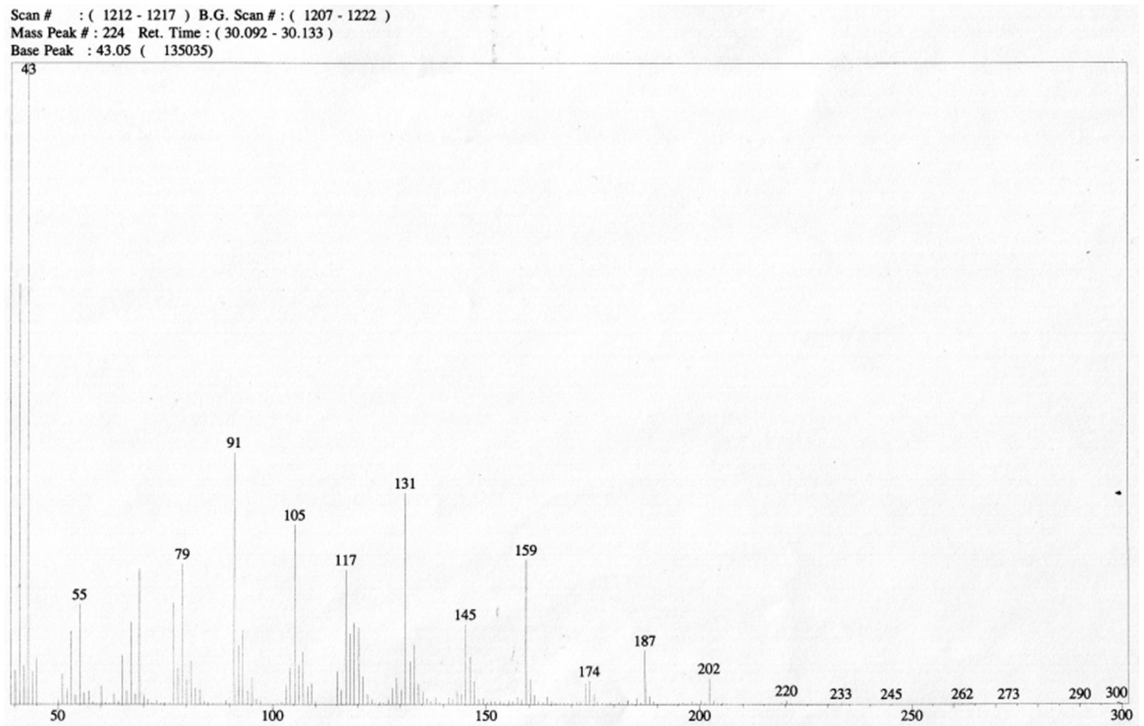
Liite 20 Havaitun yhdisteen N15 -massaspektri



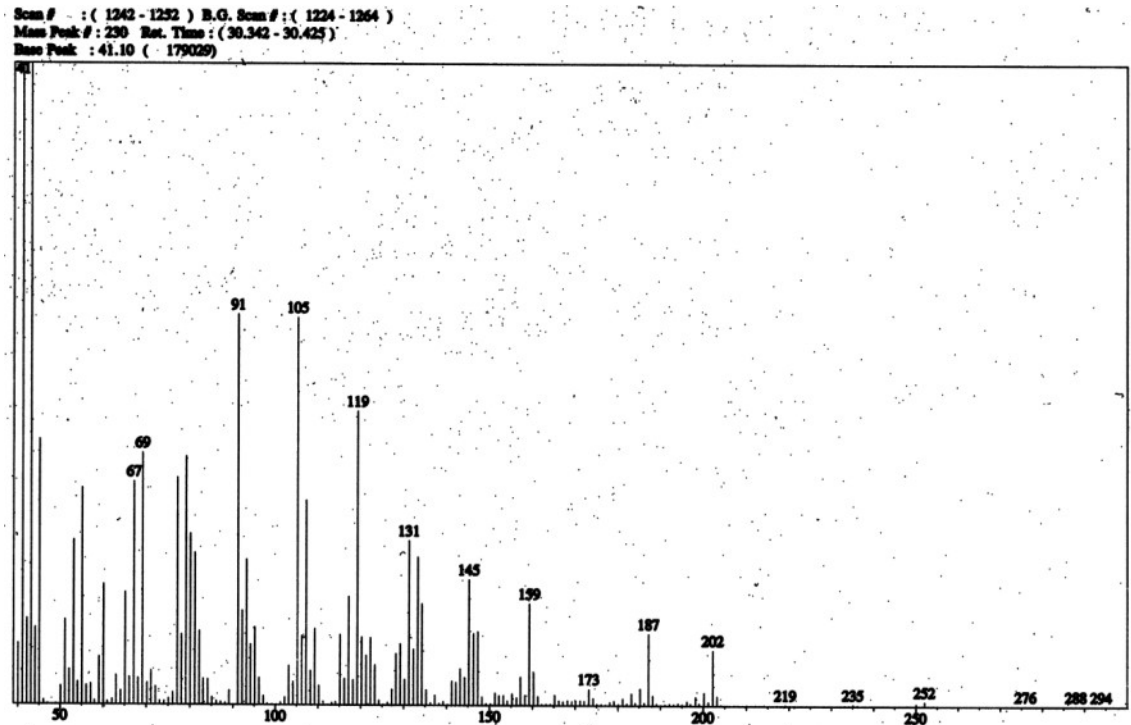
Liite 2P Havaitun yhdisteen N16a -massaspektri



Liite 2Q Havaitun yhdisteen N16b -massaspektri

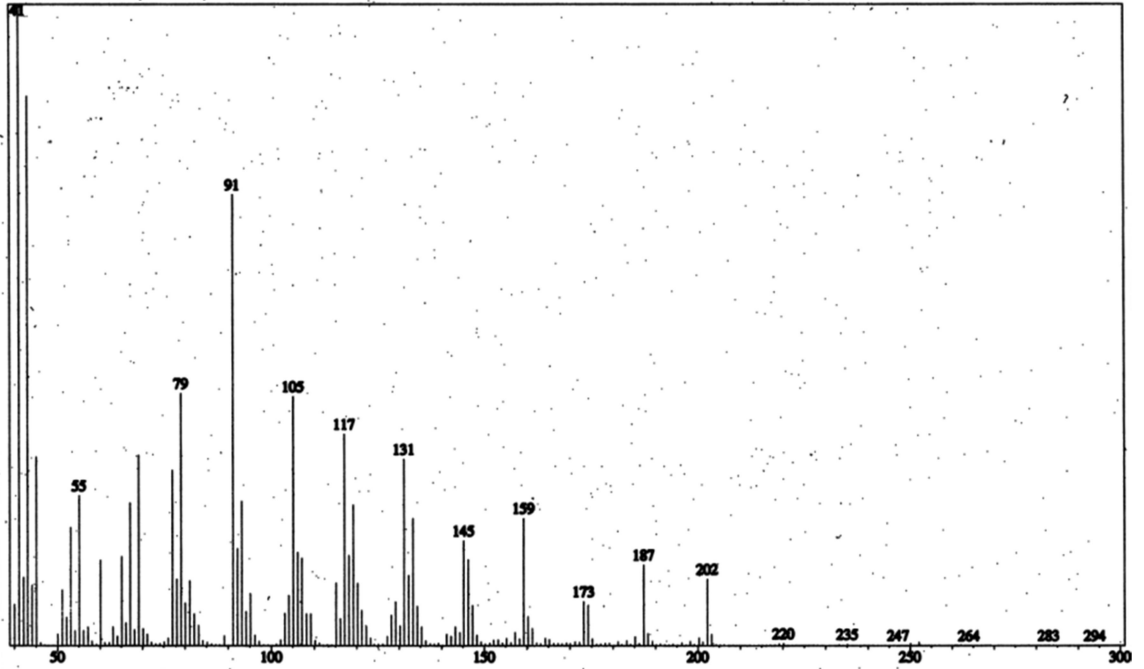


Liite 2R Havaitun yhdisteen N17 -massaspektri



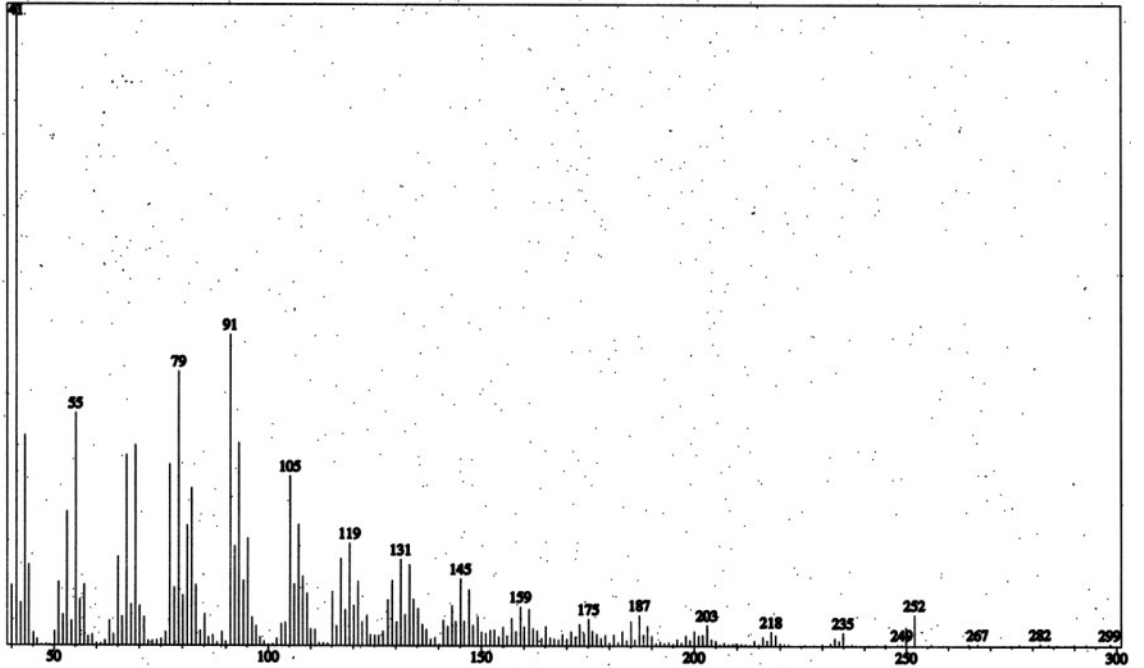
Liite 2S Havaitun yhdisteen N18 -massaspektri

Scan # : (1289 - 1310) B.G. Scan # : (1267 - 1333)
Mass Peak # : 241 Ret. Time : (30.733 - 30.908)
Base Peak : 41.10 (292041)



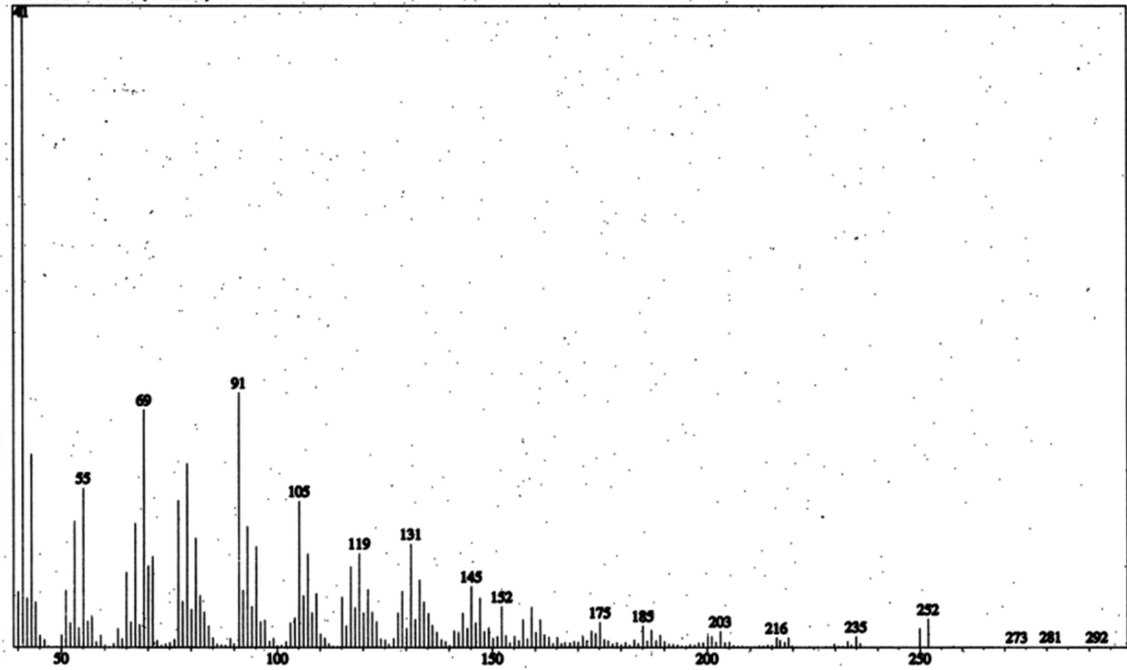
Liite 2T Havaitun yhdisteen N19 -massaspektri

Scan # : (1312 - 1318) B.G. Scan # : (1254 - 1272)
Mass Peak # : 228 Ret. Time : (30.925 - 30.975)
Base Peak : 41.10 (63016)



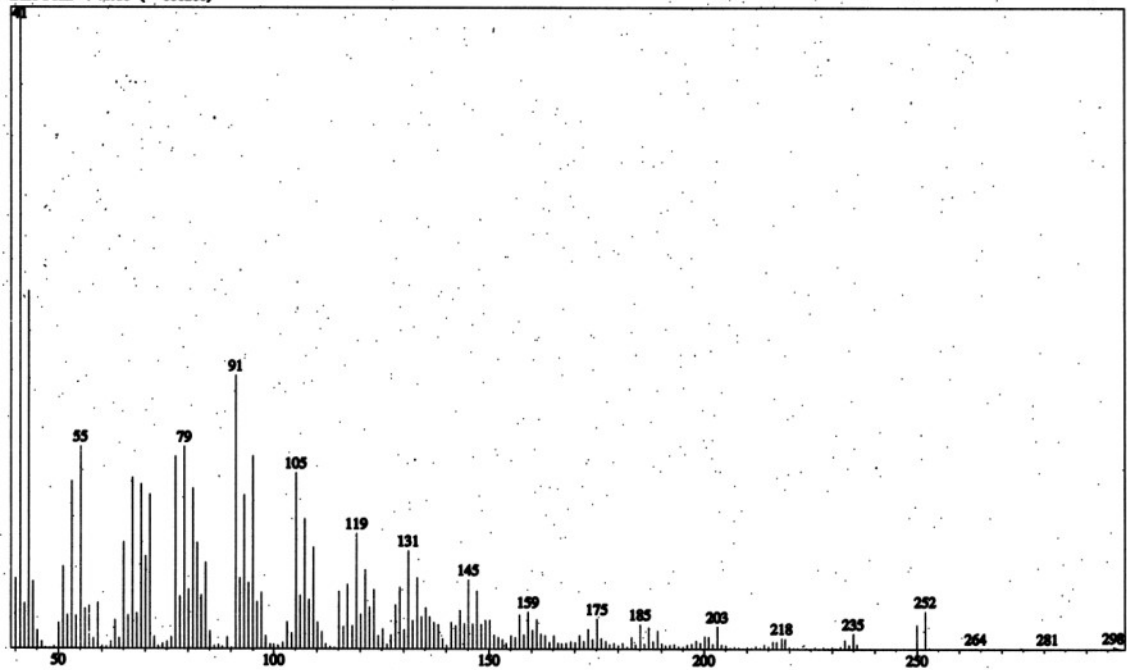
Liite 2U Havaitun yhdisteen N20 -massaspektri

Scan # : (1326 - 1336) B.G. Scan # : (1321 - 1345)
Mass Peak # : 226 Ret. Time : (31.042 - 31.125)
Base Peak : 41.10 (89800)

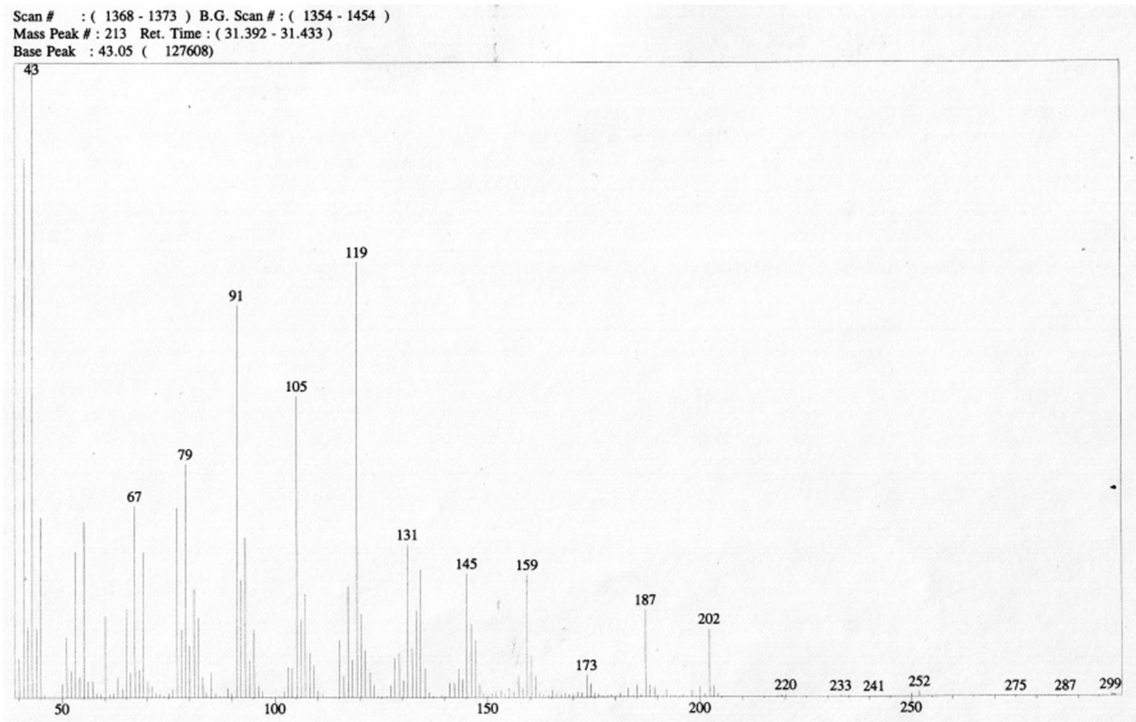


Liite 2V Havaitun yhdisteen N21 -massaspektri

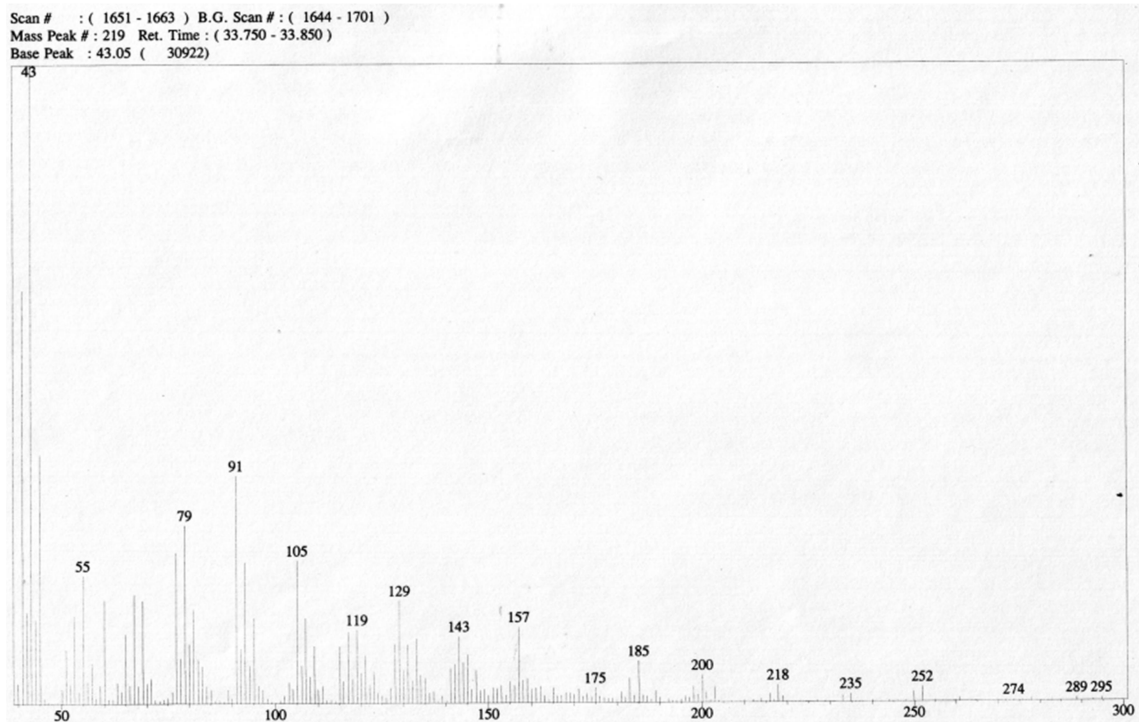
Scan # : (1352 - 1362) B.G. Scan # : (1344 - 1368)
Mass Peak # : 233 Ret. Time : (31.238 - 31.342)
Base Peak : 41.10 (106260)



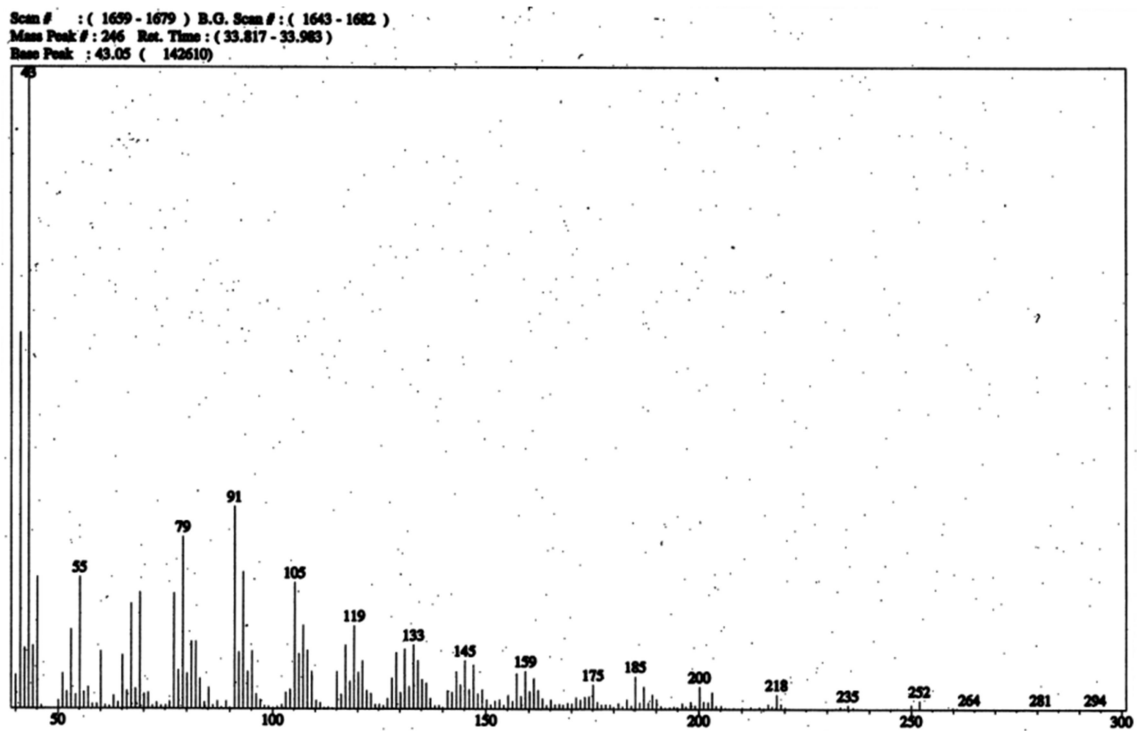
Liite 2W Havaitun yhdisteen N22 -massaspektri



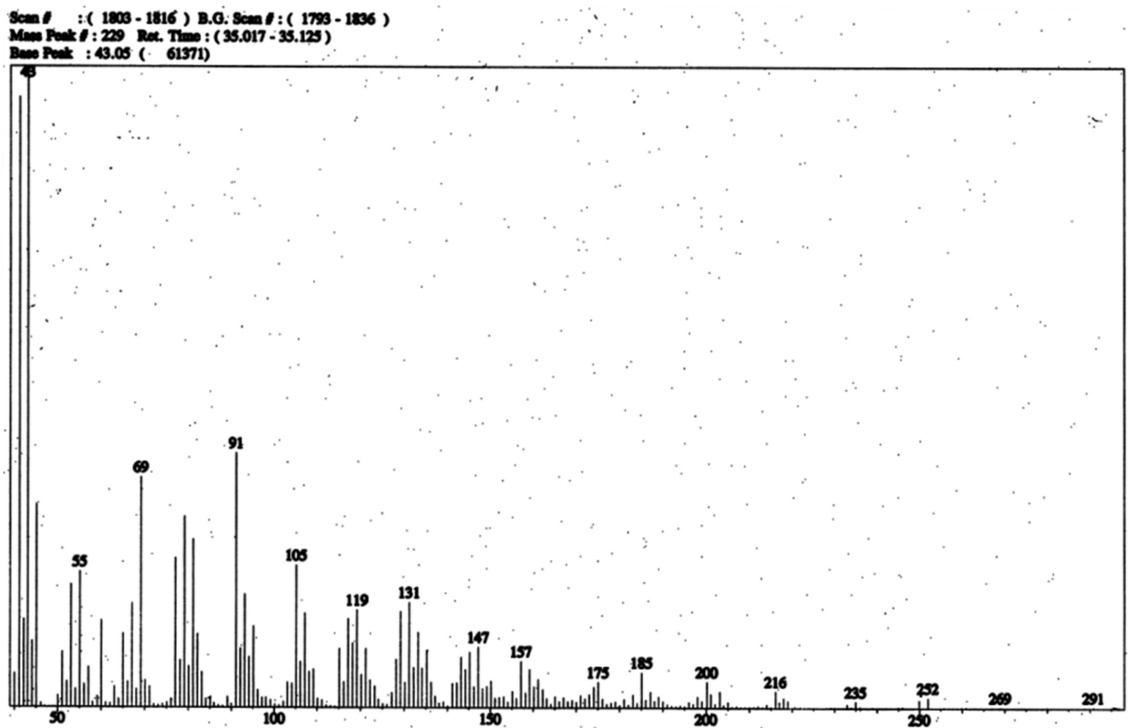
Liite 2X Havaitun yhdisteen N23 -massaspektri



Liite 2Y Havaitun yhdisteen N24 -massaspektri



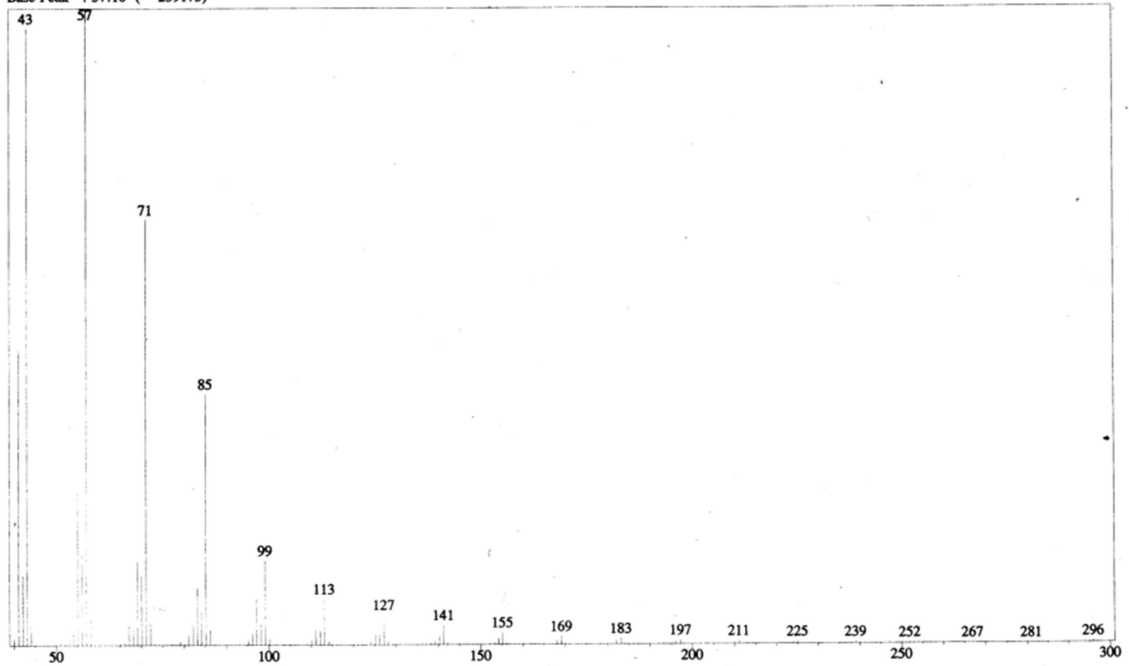
Liite 2Z Havaitun yhdisteen N25 -massaspektri



Liite2Ä

Havaitun yhdisteen N26 -massaspektri

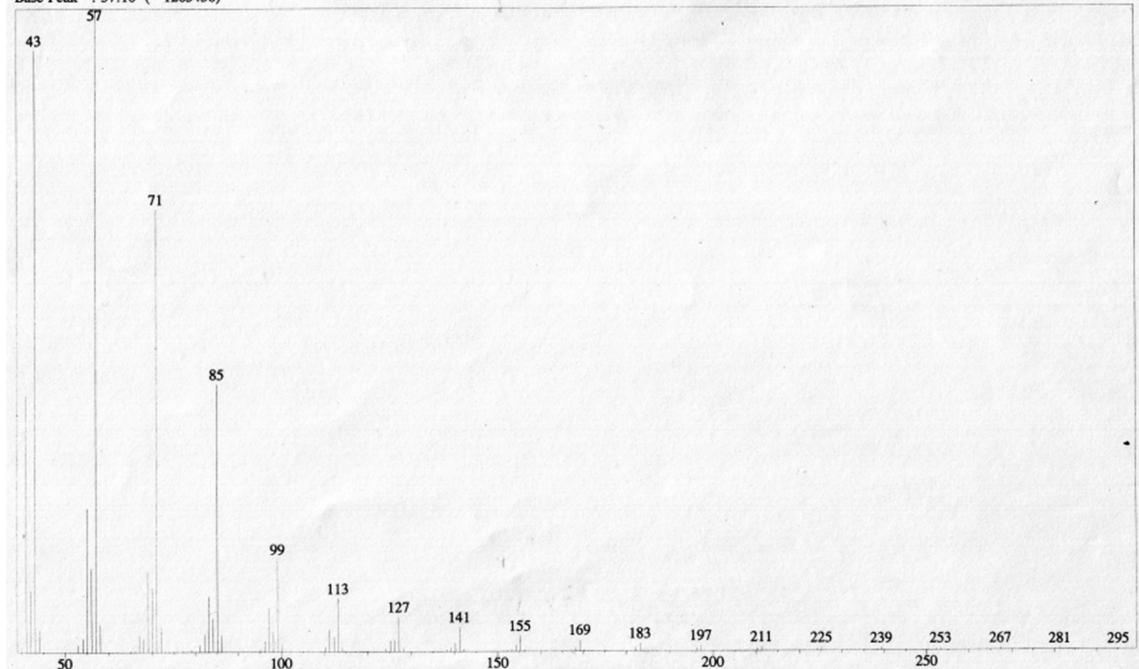
Scan # : (2061 - 2073) B.G. Scan # : (2037 - 2103)
Mass Peak # : 226 Ret. Time : (37.167 - 37.267)
Base Peak : 57.10 (239175)



Liite 2Ä

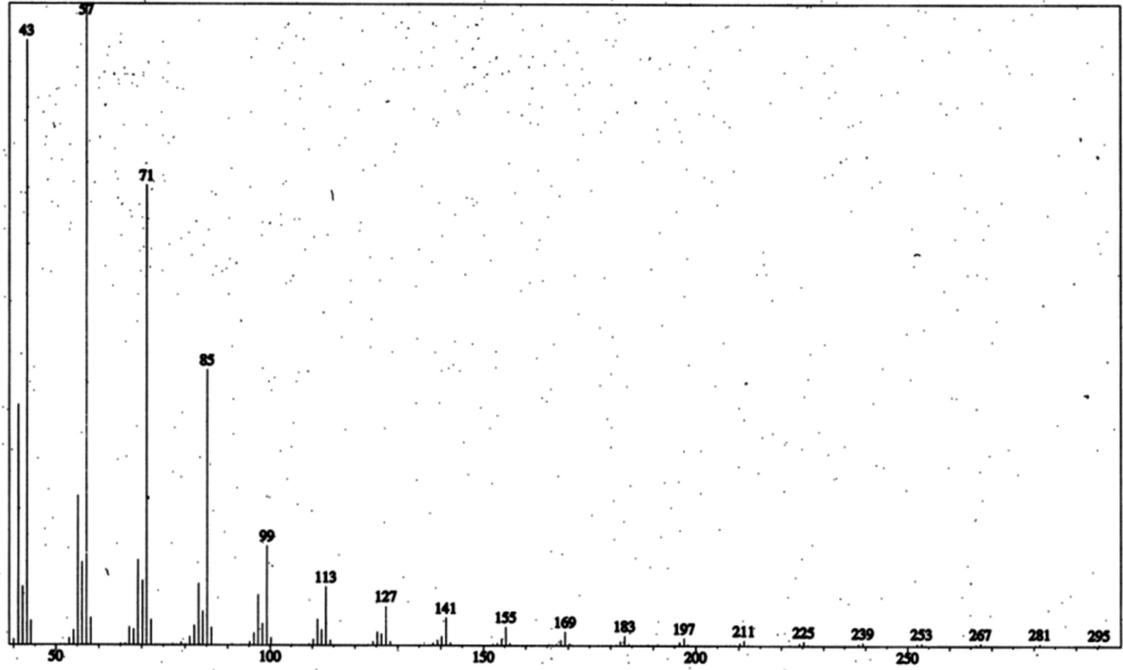
Havaitun yhdisteen N27 -massaspektri

Scan # : (2593 - 2609) B.G. Scan # : (2489 - 2716)
Mass Peak # : 232 Ret. Time : (41.600 - 41.733)
Base Peak : 57.10 (1265456)



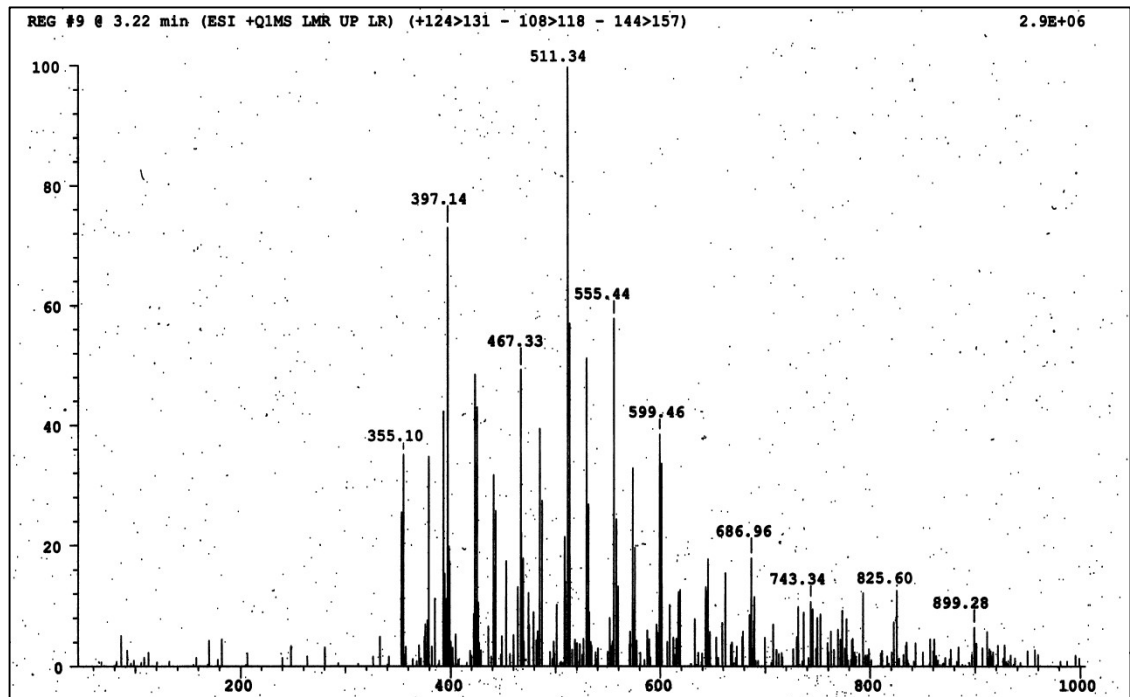
Liite 2Ö Havaitun yhdisteen N28 -massaspektri

Scan # : (3147 - 3177) B.G. Scan # : (3056 - 3281)
Mass Peak # : 237 Ret. Time : (46.217 - 46.467)
Base Peak : 57.10 (730993)



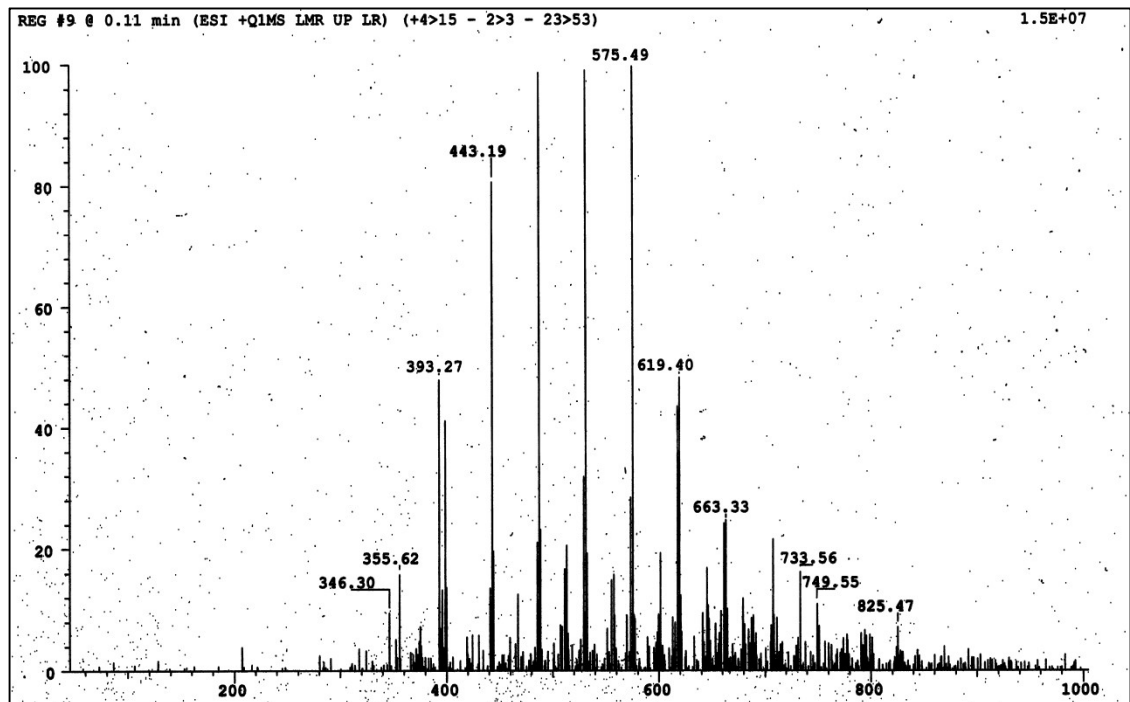
Liite 3A

Fraktion 0601 ESI-MS-massaspektri

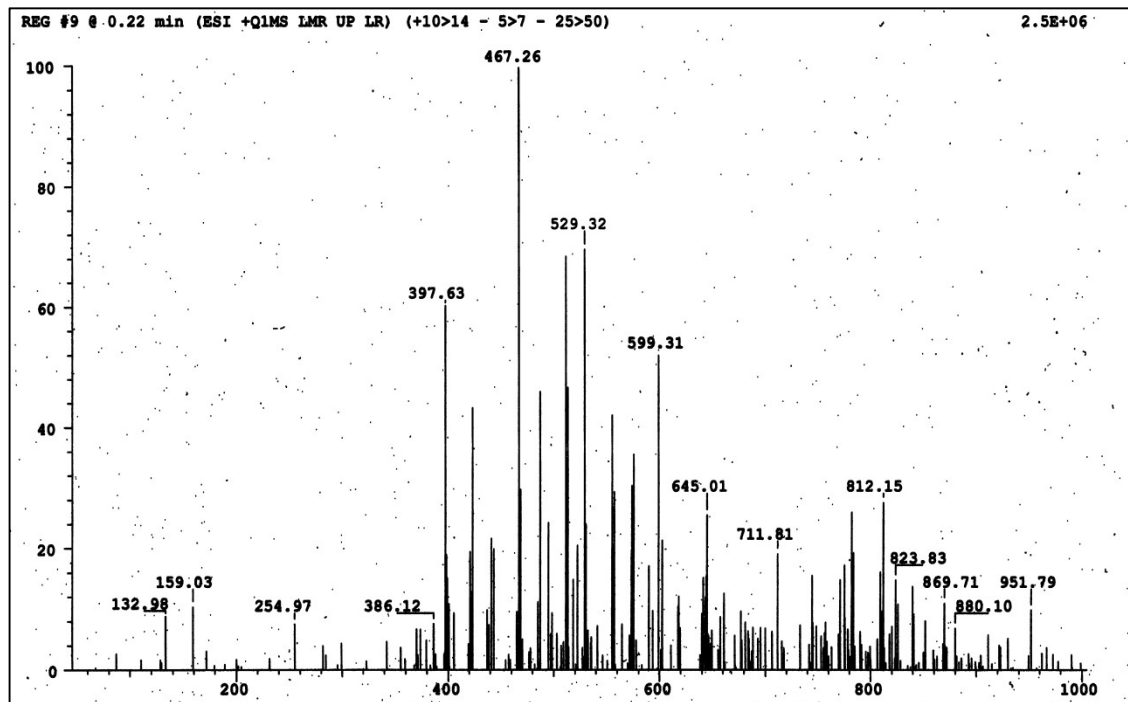


Liite 3B

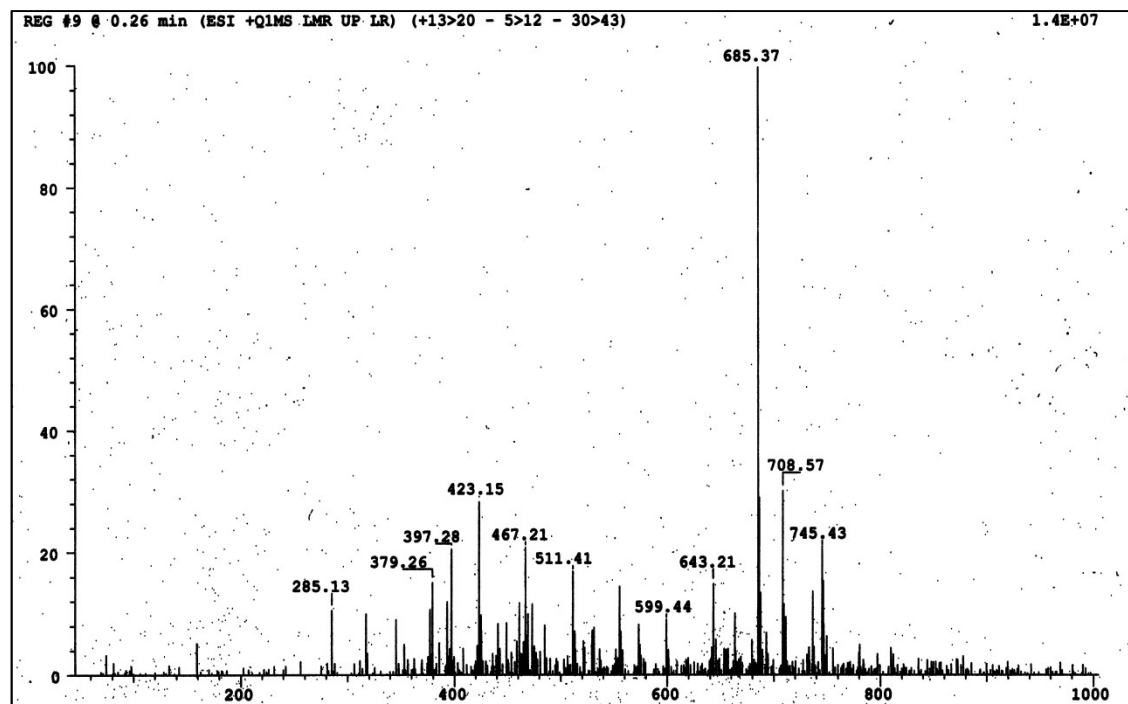
Fraktion 0602 ESI-MS-massaspektri



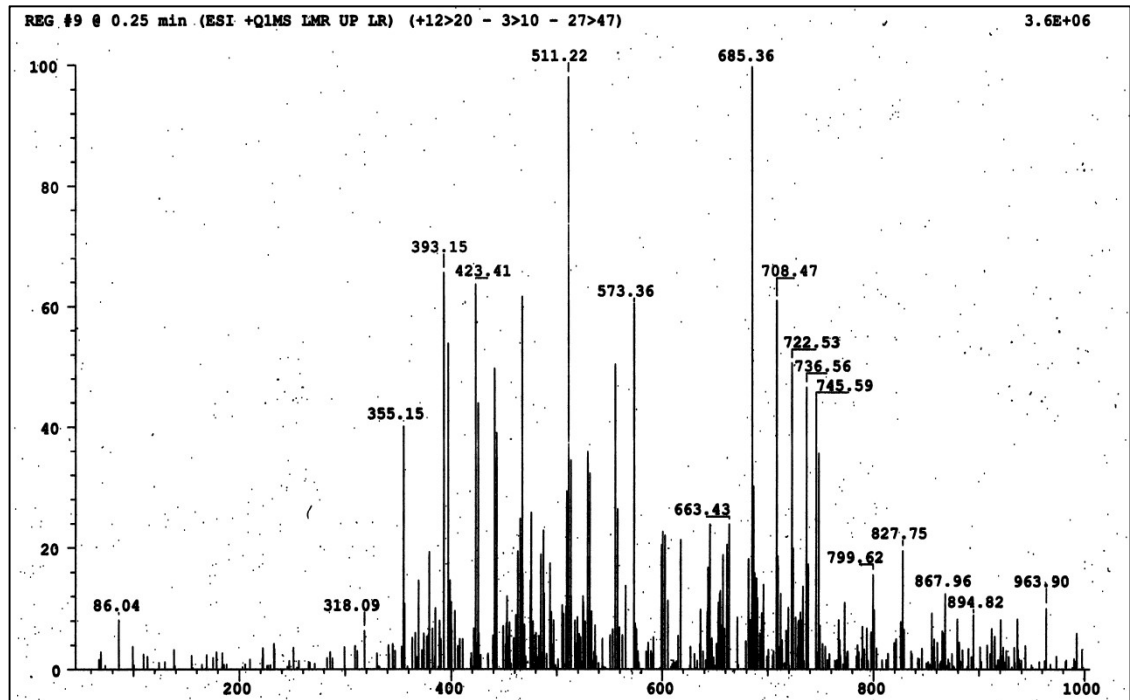
Liite 3C Fraktion 0603 ESI-MS-massaspektri



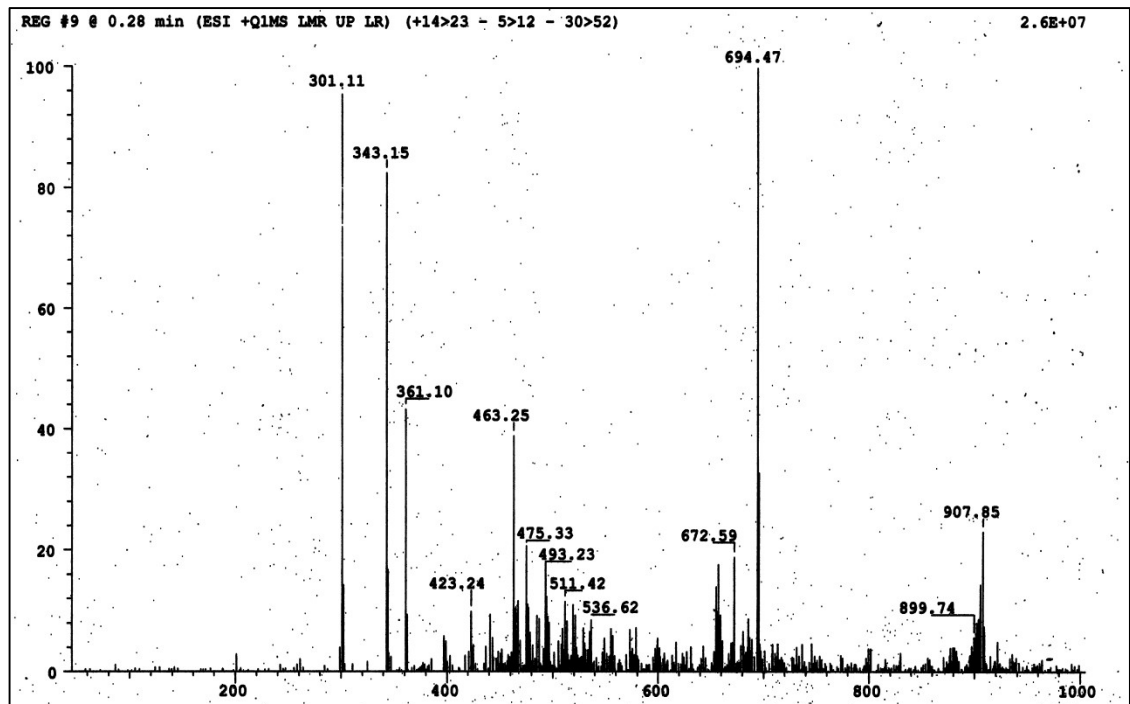
Liite 3D Fraktion 0604 ESI-MS-massaspektri



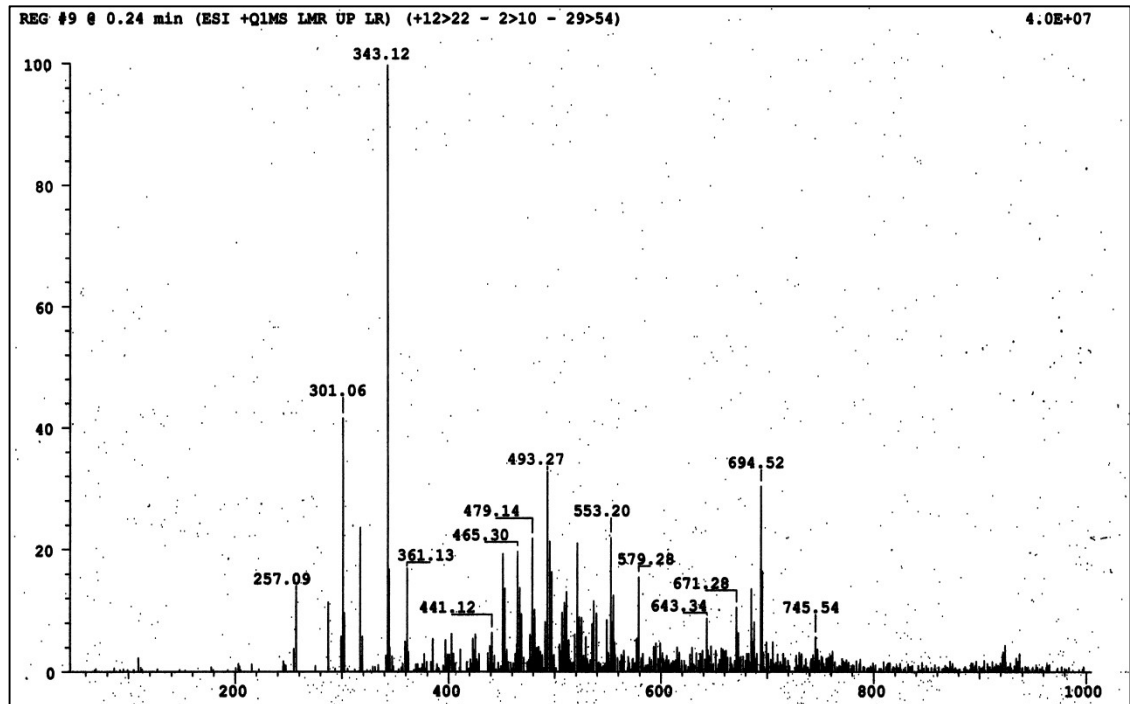
Liite 3E Fraktion 0605 ESI-MS-massaspektri



Liite 3F Fraktion 0606 ESI-MS-massaspektri



Liite 3G Fraktion 0607 ESI-MS-massaspektri



Liite 3H Fraktion 0608 ESI-MS-massaspektri

