

Polyfenolien ja niitä kompleksoivien makromolekyylien välisten vuorovaikutusten mittausmenetelmät

Eerik-Mikael Piirtola
Pro gradu -tutkielma
Luonnonyhdisteiden ja ympäristön kemia
Kemian laitos
Turun yliopisto
Toukokuu 2019

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

TURUN YLIOPISTO

Kemian laitos

PIIRTOLA, EERIK-MIKAEL: Polyfenolien ja niitä kompleksoivien makromolekyylien välisten vuorovaikutusten mittaamenetelmät

Pro gradu -tutkielma, 66s., liitteet 7s.

Kemia

Toukokuu 2019

Polyfenoleihin lukeutuvat tanniinit ovat kasvien erikoistuneita metaboliitteja, joiden yhtenä perusominaisuutena pidetään kykyä muodostaa komplekseja makromolekyylien kanssa. Klassisimpana esimerkkinä tästä ominaisuudesta voidaan pitää tanniinien kykyä saostaa proteiineja. Tutkielman kirjallisessa osiossa käsitellään polyfenolien ja niitä kompleksoivien ei-proteiinisten makromolekyylien välisten vuorovaikutusten tutkimukseen käytettyjä mittaamenetelmiä, ja vertaillaan eri makromolekyylien soveltuvuutta polyfenolitutkimukseen. Tällaisia makromolekyylijä ovat muun muassa polyetyleeniglykoli (PEG), polyvinyylipyrrolidoni (PVP) ja sen ristositoutunut muoto polyvinyylipolypyrrolidoni (PVPP). Nämä yhdisteet pystyvät muodostamaan polyfenolisten yhdisteiden kanssa liukenemattomia komplekseja, joiden myötä polyfenolit menettävät kykynsä sitoutua muihin makromolekyyliin, kuten proteiineihin. Tutkielmassa käsiteltävänä makromolekyylinä on myös Coomassie Brilliant Blue G 250 (CBB), joka kykenee muodostamaan polyfenolien kanssa värillisiä komplekseja.

Tutkielman kokeellisessa osiossa kehitettiin kuoppalevylukijalla mittaamenetelmä polyfenolien ja makromolekyylien välisten vuorovaikutusten tutkimiseen. Käyttökelpoisimmaksi yhdisteeksi vuorovaikutusten tutkimiseen osoittautui PEG, jonka avulla voitiin mitata samanaikaisesti kompleksoitumisen kinetiikkaa ja intensiteettiä. Mittaamenetelmä perustuu kompleksoivan makromolekyylin ja polyfenolinäytteen muodostamien liukenemattomien kompleksien mittaamiseen turbidimetrisesti kuoppalevylukijalla. Vuorovaikutuksen maksimaalisen intensiteetin lisäksi kuoppalevylukijalla pystytään mittaamaan eri aallonpituuksilla reaktion kinetiikkaa, eli liukenemattomien kompleksien tuottaman absorbanssin kehitystä ajan funktiona. Menetelmänkehitysvaiheessa optimoitiin mittauksissa käytettävien reagenssien pitoisuudet, mittauksessa käytettävät aallonpituudet sekä reaktion kinetiikan mittaamiseen käytettävät parametrit. Kehitetyllä menetelmällä oli mahdollista erilaisten polyfenolirakenteiden ja makromolekyylin välisen kompleksoitumireaktion intensiteetin ja kinetiikan vertailun perusteella tehdä johtopäätöksiä siitä, millaiset erilaiset polyfenolirakenteet ovat alttiita muodostamaan vuorovaikutuksia makromolekyylien kanssa.

Asiasanat: *Makromolekyyli, tanniini, kuoppalevylukija, PEG, PVP, PVPP, CBB*

Sisällys

Lyhenteet.....	i
1. Johdanto.....	1

KIRJALLINEN OSA

2. Polyetyleeniglykoli (PEG).....	4
2.1. Molekyylimassan ja pH:n vaikutus kompleksinmuodostukseen	5
2.2. ¹⁴ C-leimatun PEG:n vuorovaikutusten tutkiminen eri pH-arvoissa.....	5
3. Polyvinyylipyrrolidoni (PVP).....	6
3.1. Molekyylimassan ja pH:n vaikutus kompleksinmuodostukseen	7
4. Polyvinyylipolypyrrolidoni (PVPP).....	8
4.1. pH:n vaikutus kompleksinmuodostukseen.....	8
4.2. Gravimetrinen PVPP-menetelmä	10
4.3. PVPP:n ja polyfenolien välisen sitoutumisen spesifisyys.....	11
5. Coomassie Brilliant Blue G 250 (CBB)	12
5.1. CBB:n ja polyfenolien välinen vuorovaikutus	13
6. Johtopäätökset.....	14

KOKEELLINEN OSA

7. Materiaalit ja menetelmät	17
7.1. Käytetyt reagenssit ja liuottimet.....	17
7.2. Polyfenolinäytteet	17
7.3. Menetelmät.....	19
7.3.1. Kasvinäytteiden uuttaminen.....	19
7.3.2. Kuoppalevylukija	20
7.3.3. Kuoppalevymenetelmä.....	20
7.3.4. UPLC–MS/MS analyysit	21
8. Kuoppalevymenetelmän kehittäminen	23
8.1. Esitestit.....	23
8.2. PEG:n stabiilisuusmittaukset	25
8.3. PEG-polymeerien vertailu.....	26
8.4. Mittausaallonpituuksien vertailu	34
8.5. Kinetiikkamittauksen parametrien optimointi.....	37
8.6. Optimoitujen mittausparametrien testaaminen	43
8.7. Optimoitu kuoppalevymenetelmä	48
9. Tulosten tarkastelu	49
9.1. Esitestien tulokset	49
9.2. PEG:n stabiilisuustestien tulokset.....	50
9.3. PEG-polymeerien vertailun tulokset.....	51
9.4. Mittausaallonpituuksien vertailun tulokset	54
9.5. Kinetiikkamittauksen parametrien optimoinnin tulokset.....	55
9.6. Optimaalisten mittausparametrien testaamisen tulokset.....	57
10. Loppupäätelmät	60
Viitteet	62
Liitteet	iii

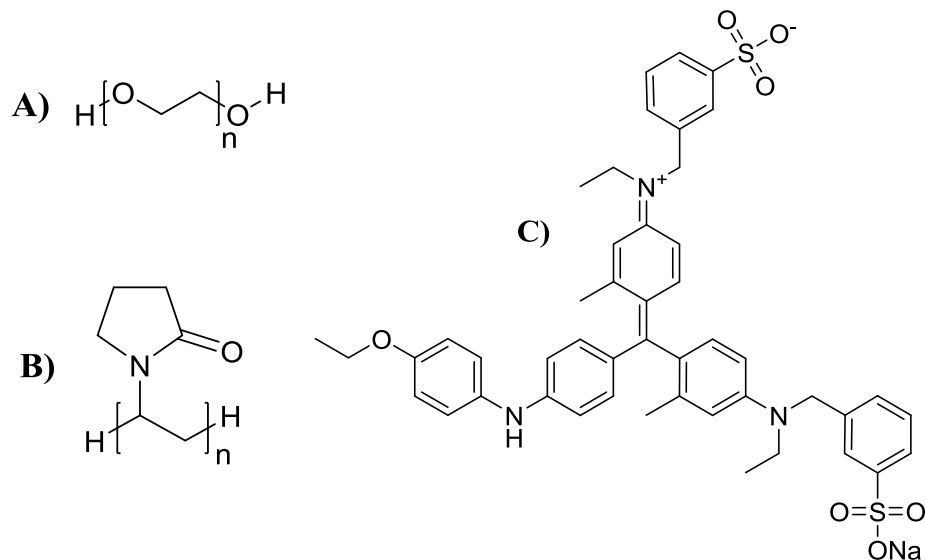
Lyhenteet

CBB	Coomassie Brilliant Blue G 250
HHDP	heksahydroksidifenoyyli hexahydroxydiphenoyl
HPLC	korkean erotuskyvyn nestekromatografia high performance liquid chromatography
HT	hydrolysoituva tanniini hydrolysable tannin
LC-MS	nestekromatografia-massaspektrometria liquid chromatography-mass spectrometry
PA	proantosyanidiini proanthocyanidin
PDA	fotodiodirividetektori photo diode array
PEG	polyetyleeniglykoli polyethyleneglycol
PGG	pentagalloyyylglukoosi pentagalloylglucose
PPC	proteiininsaostuskyky protein precipitation capacity
PVP	polyvinyylipyrrolidoni polyvinylpyrrolidone
PVPP	polyvinyylipolypyrrolidoni polyvinylpolypyrrolidone
RDA	säteittäinen diffuusiomenetelmä radial diffusion assay
DAD	diodirividetektori diode array detector
F-C	Folin-Ciocalteu reagenssi Folin-Ciocalteu reagent
mDP	keskimääräinen polymerisaatioaste mean degree of polymerization

MS	massaspektrometria mass spectrometry
OB	oenotheiini B oenothain B
PF	polyfenoli polyphenol
PGG	1,2,3,4,6-penta- <i>O</i> -galloyyilglukoosi 1,2,3,4,6-penta- <i>O</i> -galloyyilglucose
UPLC	ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografia ultra performance liquid chromatography
V	veskalagiini vescalagin

1. Johdanto

Polyfenoleja (PF) kompleksoivat makromolekyylit ovat polymeerisiä yhdisteitä, jotka kykenevät muodostamaan komplekseja kasvien erikoistuneiden metaboliittien kanssa. Tällaisia makromolekyylejä ovat muun muassa polyetyleeniglykoli (PEG, kuva 1A), polyvinyylipyrrolidoni (PVP, kuva 1B) ja PVP:n ristositoutunut muoto, polyvinyylipolypyrrolidoni. Kompleksien muodostumisen myötä polyfenoliset rakenteet menettävät kykynsä sitoutua muihin makromolekyyleihin, kuten proteiineihin (Jones & Mangan 1977). Polyfenoleja kompleksoivia ei-proteiinisia makromolekyylejä on mahdollista käyttää biologisissa sovelluksissa. Niitä käyttämällä voidaan esimerkiksi parantaa märehitjoiden rehussa hyödynnettävissä olevan proteiinin ravinto-osuutta rehun kuivapainosta (Silanikove *et al.* 1994; Tiemann *et al.* 2007). Liukenemattomia komplekseja polyfenolien kanssa muodostavia makromolekyylejä on mahdollista käyttää myös menetelmissä, joilla voidaan poistaa liuoksista polyfenolisia komponentteja (Makkar *et al.* 1993). Coomassie Brilliant Blue G 250 (CBB) (kuva 1C) on esimerkki makromolekyylistä, jonka kompleksoituminen polyfenolisten yhdisteiden kanssa tuottaa värinmuutosreaktion, jonka intensiteettiä voidaan mitata spektrofotometrisesti (Kilkowski & Gross 1999).



Kuva 1. A) Polyetyleeniglykoli (PEG), B) polyvinyylipyrrolidoni (PVP) ja C) Coomassie Brilliant Blue G 250 (CBB).

Kasvit tuottavat erikoistuneina metaboliitteina laajan kirjon polyfenolisia yhdisteitä (Haslam 1989). Polyfenolisiin yhdisteisiin lukeutuvat tanniinit, joiden

perustavana biologisena ominaisuutena on niiden kyky muodostaa vesiliuksissa komplekseja makromolekyylien, kuten proteiinien kanssa (Bate-Smith & Swain 1962). Kompleksinmuodotuskyky erottaa olennaisesti tanniinit muista luonnollisista polyfenoleista (Hagerman 2012). Tanniinit luokitellaan yhdisteiden rakenteen ja biosynteesireitin perusteella pääluokittain proantosyanidiineihin (PA) ja hydrolysoituviin tanniineihin (HT), jotka voidaan edelleen jakaa ellagitanniineihin, gallotanniineihin ja yksinkertaisiin gallushappojohdannaisiin niiden hydrolyysituotteiden perusteella (Waterman & Mole 1994). Tanniinit ovat rakenteellisesti monimuotoinen ja laaja yhdisteryhmä, minkä vuoksi yksittäisten tanniinirakenteiden sitoutumisaffiniteetti erilaisiin makromolekyyliin ja proteiinsaostuskyky (PPC) eroavat toisistaan (Hagerman *et al.* 1981, 2012). Tanniinien ja erilaisten ei-proteiinisten makromolekyylien muodostamista komplekseista on saatavilla huomattavasti vähemmän ajantasaisia tutkimuksia kuin yleisten malliproteiinin, kuten naudan seerumin albumiinin (BSA) ja polyfenolien välisistä vuorovaikutuksista (Kurzbaum *et al.* 2019; Shi *et al.* 2017).

Suurin polyfenoleja kompleksoivien yhdisteiden tutkimusta koskeva ongelma on, että moni aihetta käsittelevä tutkimus käsittelee tanniineihin lukeutuvia polyfenoleja homogeenisenä yhdisteryhmänä. Toisinaan tanniininäytteiksi nimitetään kaikkia kasvipärisiä näytteitä, joiden todellisesta polyfenolikoostumuksesta ei ole varmaa tutkimustietoa. Epätarkan luokittelun vuoksi tutkimuksissa ei usein onnistuta ottamaan kattavasti kantaa siihen, millaiset erinäiset tekijät ovat aktiivisessa roolissa polyfenolien ja kompleksoivien makromolekyylien välisten vuorovaikutusten muodostumisessa. Yksittäisten rakenteiden vaikutusta polyfenolisten yhdisteiden ja makromolekyylien väliseen sitoutumiseen usein ylenkatsotaan, vaikka todellisuudessa osa laajasta polyfenolikirjosta vaikuttaa vuorovaikutusten muodostumiseen toisia voimakkaammin. Puhdasaineita käytetään tutkimuksissa suhteellisen harvoin, minkä vuoksi monissa tutkimuksissa saadaan tietoa vain useista erilaisista, usein tuntemattomista, yhdisteistä koostuvien polyfenolisten seosten komponenttien kokonaisvaikutuksesta polyfenoli–makromolekyyli -vuorovaikutukseen. Erilaisten makromolekyylien kyky tuottaa komplekseja polyfenolisten yhdisteiden kanssa on polyfenolien rakenteellisten ominaisuuksien lisäksi riippuvainen reaktio-olosuhteista, kuten pH:sta (Makkar *et al.* 1995; Verza *et al.* 2008). Useissa tutkimuksissa käytetään erilaisia reaktio-olosuhteita, eikä täten ei ole olemassa yhtä kattavaa tutkimusta, joka vertailisi laajaa joukkoa polyfenolisia puhdasaineita standardoidusti keskenään.

Vuorovaikutusta tutkivat menetelmät mittaavat useimmiten turbidimetrisesti kompleksoivien makromolekyylien ja polyfenolien muodostamia

liukenemattomia komplekseja (Makkar *et al.* 1993, 1995; Silanikove *et al.* 1996). Nestekromatografiaa ja massaspektrometriaa (LC-MS) soveltavia kvantitatiivisia tutkimuksia tanniineja kompleksoivien yhdisteiden ja erilaisten tanniinien välisestä sitoutumisesta on saatavilla niukasti.

Pro gradu -tutkielman kokeellinen osuus keskittyy uudenlaisen standardoidun mittaamenetelmän kehittämiseen polyfenoli-makromolekyyli-vuorovaikutusten tutkimukseen. Tutkimuksen kohteena olivat PEG-polymeerit, joilla on kirjallisuuslähteisiin perustuen havaittu kyky muodostaa komplekseja kasvien polyfenolisten erikoistuneiden metaboliittien kanssa (Jones 1965; Makkar *et al.* 1993, 1995; Silanikove *et al.* 1994, 1996). PEG:tä on kaupallisesti saatavilla eri molekyylimassaisina yhdisteinä polymeerin pituudesta riippuen. Polymeerin nimen yhteydessä esiintyvä numero ilmaisee polymeeriketjujen keskimääräisen molekyylimassan. Tutkittaviksi polymeereiksi valittiin PEG 400, PEG 6000, PEG 12000 ja PEG 20000. Makromolekyylien kykyä muodostaa liukenemattomia komplekseja näytteiden kanssa mitattiin kuoppalevylukijalla, ja työssä kehitettiin mittaamenetelmä, jonka avulla mitattiin erilaisten polyfenolisten näytteiden affiniteettia sitoutua niitä kompleksoiviin yhdisteisiin. Tietynlaisia polyfenolisia komponentteja sisältävät näytteet reagoivat kuoppalevyllä makromolekyylien kanssa tuottaen liukenemattomia komplekseja, joiden tuottamaa absorbanssia mitattiin turbidimetrisesti eri aallonpituuksilla. Näytteiden maksimiabsorbanssin lisäksi kuoppalevylukijalla pystyttiin mittaamaan reaktion kinetiikkaa, eli muodostuvien liukenemattomien kompleksien tuottaman absorbanssin muutosta ajan funktiona. Mittaamenetelmien kehitysvaiheessa optimoitiin mittauksissa käytettävien makromolekyylien pitoisuudet, mitattavat aallonpituudet sekä reaktion kinetiikan mittaamiseen käytettävät parametrit. Liukenemattomien kompleksien absorbanssin ja reaktion kinetiikan perusteella tehtiin johtopäätöksiä siitä, millaiset näytteiden sisältämät yhdisteet ja rakenteet osoittivat affiniteettia tutkittavia makromolekyylejä kohtaan.

KIRJALLINEN OSA

2. Polyetyleeniglykoli (PEG)

Polyetyleeniglykoli (PEG) on vesiliukoinen, polymeerinen makromolekyyli, joka kykenee kompleksoimaan tanniineja pH-alueella 2,0–8,5 (Jones 1965; Makkar *et al.* 1995). PEG:n yleinen molekyylikaava on $H(OCH_2CH_2)_nOH$, jossa n ilmaisee etyleenioksidisyklojen lukumäärän. PEG:llä on monien kaupallisten sovelluksien ohessa havaittu myös potentiaalia biologisissa käyttösovelluksissa (Zalipsky & Harris 1997), ja PEG-käsittelyn vaikutusta on tutkittu märehitijöillä (Silanikove *et al.* 1994; Tiemann *et al.* 2007; DeGabriel *et al.* 2008; Windley *et al.* 2016). PEG:n polyfenoleja kompleksoivat vuorovaikutukset perustuvat PEG-polymeerin happiatomien ja polyfenolien hydroksyyliyhymien väliseen vetysitoutumiseen, joka on pitkälti analoginen polyfenolien ja proteiinien välisen vuorovaikutuksen kanssa (Jones 1965; Silanikove *et al.* 1996). PEG kykenee lisäksi sitoutumaan proteiineihin (Atha & Ingham 1981) vapauttamaan proteiineja muodostuneista proteiini–polyfenoli -komplekseista (Barry & Forss 1983; Jones & Mangan 1977). PEG kykenee muodostamaan komplekseja niin proantosyanidiinien kuin hydrolysoituvien tanniinien kanssa (Makkar *et al.* 1995). PEG:n affiniteetti yksittäisiin polyfenolirakenteisiin tunnetaan heikosti, eikä sitä ole tutkittu kattavasti puhtasaineilla.

PEG:n ja polyfenolirakenteiden välisten vuorovaikutusten tutkiminen perustuu usein spektrofotometriin menetelmiin, joissa tutkitaan turbidimetrisesti liukenemattomien kompleksien muodostumista (Makkar *et al.* 1995). Toinen mahdollinen lähestymistapa PEG:n sitoutumisen tutkimiseen perustuu ^{14}C -leimatun PEG:n tuottaman radioaktiivisen vasteen mittaamiseen (Silanikove *et al.* 1996). PEG:tä sisältäviä näytteiden tutkiminen LC-MS -menetelmillä on haastavaa, sillä polymeerisen kemiallisen luonteensa vuoksi PEG häiritsee tarkkaa kromatografiaa, ja sen poistaminen LC-MS -laitteiston kolonnista on usein työlästä (Keller *et al.* 2008). Kromatografisten tutkimusmenetelmien puutteen vuoksi PEG:n ja erilaisten polyfenolirakenteiden muodostamien kompleksien tarkka rakenne tunnetaan heikosti.

2.1. Molekyyli­massan ja pH:n vaikutus kompleksinmuodostukseen

PEG:n kykyä muodostaa komplekseja polyfenolien kanssa on tutkittu mittaamalla eri molekyyli­massaisten PEG-polymeerien ja polyfenolinäytteiden muodostamien liukenemattomien kompleksien tuottamaa absor­banssia turbidimetrisesti (Makkar *et al.* 1995). Tutkittavien PEG-polymeerien molekyyli­massat olivat välillä 2000–35000 Da. Käytetyt polyfenolinäytteet olivat parkkihappo, quebracho-tanniini ja erilaiset kasvinuut­teet (*Acioa barteri*, *Dischostachys cinerea*, *Piliostigma reticulatum*, *Guiera senegalensis*), joiden polyfenolikoostumusta ei eritelty tutkimuksessa. Näytteiden ja makromolekyylien vuorovaikutuksen tuottamaa vastetta vertailtiin eri reaktio­olosuhteissa pH-välillä 3,0–7,0. Mittausmenetelmässä eri pH-arvoihin puskuriliuoksella säädettyjen näytteiden vesiliuoksiin lisättiin PEG:n vesiliuoksia, minkä jälkeen näytteiden absor­banssia seurattiin turbidimetrisesti aallon­pituudella 500 nm. Eri molekyyli­massaisten PEG-polymeerien ja näytteiden vuorovaikutusta seurattiin pH:n funktiona. (Makkar *et al.* 1995).

Tutkimustulosten perusteella PEG 6000:n ja sitä suurempien polymeerien kyky muodostaa liukenemattomia komplekseja näytteiden kanssa säilyi tasaisena pH-välillä 4,7–7,0 lukuun ottamatta quebracho-tanniinia, jonka affiniteetti muodostaa PEG:n kanssa liukenemattomia komplekseja kasvoi pH:n lähestyessä arvoa 7,0. PEG 6000:n, 10000:n, 20000:n ja 35000:n tuottamat vasteet olivat kaikissa pH-arvoissa keskenään samankaltaiset. PEG 2000:n tuottama absor­banssi oli suurempiin polymeereihin verrattuna heikompi, ja sen näytteiden kanssa tuottama absor­banssi laski pH:n noustessa. Liuoksen pH:n nostaminen alensi myös PEG 4000:n sitoutumiskykyä, muttei yhtä voimakkaasti kuin PEG 2000:n. Tutkimustulosten perusteella PEG-polymeerin koko vaikuttaa niiden kykyyn muodostaa komplekseja polyfenolien kanssa. Yleisesti ottaen pienet PEG-polymeerit tuottivat suurempia PEG-polymeerejä heikomman vuorovaikutuksen tukittujen polyfenolinäytteiden kanssa (Makkar *et al.* 1995).

2.2. ¹⁴C-leimatun PEG:n vuorovaikutusten tutkiminen eri pH-arvoissa

PEG:n sitoutumista erilaisiin kasvinuut­teisiin on tutkittu ¹⁴C-leimatulla PEG:llä (Silanikove *et al.* 1996). Tutkimuksessa leimausmenetelmällä vertailtiin kahta eri kasvinäytettä (*Quercus calliprinos* ja *Pistacia lentiscus*) erilaisissa mitta­olosuhteissa. Vertailtavia muuttujia olivat kiinteiden kasvinäytteiden massa, liuoksen pH ja inkubointilämpötila. Näytteet käsiteltiin ¹⁴C-leimatulla PEG:llä sekoittamalla tunnettuun

massaan jauhattua kasvinäytettä leimatun PEG:n vesiliuokseen. Käsittely tehtiin kolmelle eri massalle (0,1; 1,0 ja 2,0 g) kumpaakin kasvinäytettä. Vertailun perusteella voitiin tehdä johtopäätöksiä siitä, miten näytteiden massa vaikutti PEG:n sitoutumiskapasiteettiin. PEG-liuoksen pH:n vaikutusta sitoutumiseen vertailtiin säätämällä liuoksen pH arvoihin 5,0; 7,0 ja 9,0. Näyteitä inkuboitiin 24 tuntia vertailuksi kolmessa eri lämpötilassa (4, 20, ja 40 °C). Käsittelyn jälkeen näyte sentrifugoitiin ja ¹⁴C-leimatun PEG:n radioaktiivista vastetta mitattiin näyteliuosten supernatantista. Leimatun PEG:n avulla voitiin mitata kasvinäytteisiin sitoutuneen leimatun PEG:n määrä. (Silanikove *et al.* 1996).

Mittaustulosten perusteella sitoutuneen leimatun PEG:n määrä ei ollut riippuvainen kasvinäytteiden massasta massavälillä 0,1–2,0 g. Vertailun perusteella pH:n nostaminen heikensi PEG:n kykyä muodostaa komplekseja. Sitoutuneen leimatun PEG:n osuus oli suurin neutraaleissa olosuhteissa pH:ssa 7,0 ja pienin pH:ssa 9,0. Inkubointilämpötilan vaikutusta tutkiessa havaittiin PEG-polymeerin ja kasvinäytteiden välisen vuorovaikutuksen olevan lämpötilariippuvainen. Mittaustulokset indikoivat, että inkubointilämpötilan nostaminen paransi PEG:n kykyä muodostaa komplekseja tutkittujen kasvinäytteiden kanssa, ja suuremmalla inkubointilämpötilalla sitoutuneen PEG:n osuus kasvoi (Silanikove *et al.* 1996). Menetelmää on myöhemmin sovellettu kasvinäytteiden tanniinipitoisuuden tutkimiseen (DeGabriel *et al.* 2008).

3. Polyvinyylipyrrolidoni (PVP)

Polyvinyylipyrrolidoni (PVP) on vesiliukoinen yhdiste, joka kykenee muodostamaan polyfenolisten yhdisteiden kanssa komplekseja vetysidosten välityksellä (Jones 1965). PVP:llä on sovelluksia esimerkiksi lääketieteellisyydessä, jossa sitä käytetään alhaisen toksisuutensa vuoksi esimerkiksi tablettien sidosaineena (Adeyeye & Barabas 1993). PVP:n yleinen molekyylikaava on $(C_6H_9NO)_n$, ja sitä on kaupallisesti saatavilla eri molekyyli-massaisina polymeereinä. PVP:n nimen yhteydessä ilmoitettu numeroarvo ilmaisee PVP-polymeerin keskimääräisen molekyyli-massan. PVP:n sitoutumista kasvien tuottamiin polyfenolisiin yhdisteisiin ja erilaisiin kasviperäisiin näytteisiin on tutkittu (Anderson & Sowers 1968; Garrido *et al.* 1991; Makkar *et al.* 1995). PVP-polymeerien kykyä muodostaa komplekseja erilaisten polyfenolinäytteiden kanssa on vertailtu PEG:n kanssa (Makkar *et al.* 1995). PVP:n kykyä sitoa polyfenolisia yhdisteitä on vertailtu myös PVP:n ristositoutuneen muodon, PVPP:n, kanssa (Mitchell *et al.* 2005).

3.1. Molekyylimassan ja pH:n vaikutus kompleksinmuodostukseen

PVP-polymeerin molekyylimassan vaikutusta sen sitoutumiskykyyn on vertailtu eri pH-arvoihin säädetyissä puskuriliuoksissa (Makkar *et al.* 1995). Tutkitut PVP-polymeerit olivat PVP 10000, PVP 40000 ja PVP 360000. Tutkimuksessa käytetyt näytteet olivat parkkihappo, quebracho-tanniini ja erilaiset kasviuutteet (*Acioa barteri*, *Dischostachys cinerea*, *Piliostigma reticulatum* ja *Guiera senegalensis*), joiden polyfenolikoostumusta ei tutkimuksessa eritelty. Polyfenolinäytteisiin lisättiin eri molekyylimassaisten PVP-polymeerien vesiliuosta, ja PVP:n sitoutumista polyfenolinäytteisiin mitattiin turbidimetrisesti aallonpituudella 500 nm seuraamalla makromolekyylien ja polyfenolinäytteiden muodostamien liukenemattomien kompleksien muodostumista. PVP:n ja näytteiden vuorovaikutuksen riippuvuutta pH-olosuhteista tutkittiin pH-välillä 3,0–7,0. Tutkimuksessa vertailtiin lisäksi rinnakkain PEG:llä (kappale 2.1.) ja PVP:llä tehtyjen mittausten tuloksia. (Makkar *et al.* 1995).

Kaikki kolme PVP-polymeeriä tuottivat parkkihapon ja quebracho-tanniinin kanssa vastaavanlaiset vasteet. Parkkihapon tuottama vaste oli kaikilla polymeereillä matalin pH:ssa 7,0 ja suurin pH:ssa 3,0. Quebracho-tanniinilla suurin vaste mitattiin puolestaan pH-arvossa 7,0. PVP:llä mitatut absorbanssit olivat PEG:llä mitattuja arvoja pienempiä, vaikka käytetyn PVP:n pitoisuus oli viisinkertainen verrattuna tutkimuksessa käytettyihin PEG-liuosten pitoisuuksiin, minkä perusteella PEG kykeni tuottamaan liukenemattomia komplekseja polyfenolinäytteiden kanssa PVP:tä tehokkaammin. (Makkar *et al.* 1995). Tutkimuksessa käytettyjen näytteiden, quebracho-tanniinin ja parkkihapon, heikkoutena on se, että ne ovat kumpikin tanniiniseoksia, joiden koostumus ei ole standardoitu. Parkkihapon rakennetta kuvataan usein yleisesti dekalloyyyliglukoosina, mutta se on todellisuudessa seos, joka sisältää eriasteisesti galloyloituneita galloyyyliglukooseja. Quebracho-tanniini on myös puolestaan nimestään poiketen uute, joka todellista koostumusta ei ole eritelty. Koska näytteiden koostumus ei ole standardoitu, voi niiden koostumus vaihdella eri näyte-erien välillä, minkä vuoksi mittaustulokset eivät välttämättä ole toistettavia. Heikon toistettavuuden vuoksi parkkihappo ja quebracho-tanniini soveltuvat huonosti PEG:n ja polyfenolinäytteiden välisten vuorovaikutusten tutkimiseen.

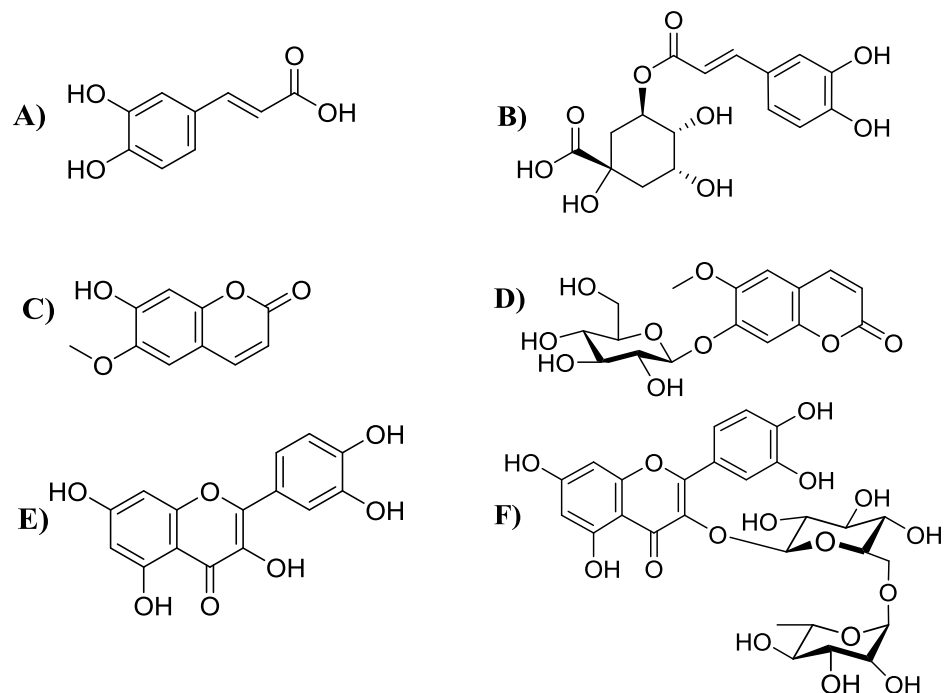
4. Polyvinyylipolypyrrolidoni (PVPP)

Polyvinyylipolypyrrolidoni (PVPP) on makromolekyyli, joka koostuu rakenteeltaan ristisitoutuneista PVP-molekyyleistä. Ristisitoutunut rakenne tekee PVPP:stä veteen liukenemattoman yhdisteen. PVPP:n ja polyfenolien väliset vuorovaikutukset ja kompleksien muodostuminen tapahtuvat vetysitoutumisen välityksellä (Andersen & Sowers 1967; Doner *et al.* 1993). PVPP:n kyky sitoa polyfenolisia yhdisteitä eroaa PVP:stä, niitä on vertailtu keskenään käyttämällä näytteinä esimerkiksi mallasjuomista eristettyjä polyfenolipitoisia näytteitä (Mitchell *et al.* 2005). Mallasjuomat sisältävät useita erilaisia polyfenolisia komponentteja, joista proantosyanidiinien tuottamat polyfenoli–proteiini -kompleksit ovat vastuussa esimerkiksi mallasjuomien värin samentumisesta (Siebert *et al.* 1996; Whittle *et al.* 1999). PVPP:n on havaittu sitovan proantosyanidiineja PVP:tä tehokkaammin (Mitchell *et al.* 2005). Makromolekyylin sitoutumisaffiniteetin polyfenolisiin yhdisteisiin on havaittu kasvavan fenolisten hydroksyyliyhdyntien lukumäärän kasvaessa (Loomis & Battaile 1966). PVPP:n kyky muodostaa polyfenolirakenteiden kanssa komplekseja on pH-olosuhteiden lisäksi riippuvainen käytetystä liuottimesta. Polyfenolien ja PVPP:n välinen vetysitoutuminen tapahtuu todennäköisemmin vesiliuoksissa kuin orgaanisten liuottimien, kuten metanolin, läsnä ollessa (Andersen & Sowers 1968).

4.1. pH:n vaikutus kompleksinmuodostukseen

PVPP:n ja fenolisten näytteiden välisen vuorovaikutuksen pH-riippuvuutta on tutkittu turbidimetrisesti (Makkar *et al.* 1995; Andersen & Sowers 1968). Andersenin ja Sowersin tutkimuksessa vertailtiin spektrofotometrisesti makromolekyylin ja näytteiden välisen vuorovaikutuksen tuottamaa absorbanssia aallonpituusvälillä 220–420 nm eri pH-olosuhteissa. Tutkittuina yhdisteinä käytetyt yhdisteet olivat kahvihappo (kuva 2A), klorogeenihappo (kuva 2B), skopoletiini (kuva 2C), skopoliini (kuva 2D), kversetiini (kuva 2E) ja rutiini (kuva 2F). PVPP:n sitoutumista mitattiin vertailemalla PVPP:llä käsiteltyjen näytteiden ja käsittelemättömien näytteiden absorbansseja keskenään. Absorbanssien erotuksena saatiin selvitettyä PVPP:n sitomien komponenttien suhteellinen määrä, josta pyrittiin päättämään, millaiset vertailtavien näytteiden rakenteelliset tekijät vaikuttivat kompleksien muodostumiseen (Andersen & Sowers 1968).

Tulosten perusteella PVPP sitoutui kaikkiin referenssiyhdisteisiin, joilla oli rakenteessaan vapaita fenolisia hydroksyyliiryhmiä. PVPP-käsittely ei tuottanut muutosta käsitellyn ja käsittelemättömän näytteiden tuottamien vasteiden välille esimerkiksi skopoliinin kanssa, sillä sen rakenteessa ei ole vapaita fenolista hydroksyyliiryhmää. PVPP:n sitoutuminen näytteisiin oli heikointa pH:ssa 5,5 ja vahvinta happamissa pH-arvoissa, mikä tukee hypoteesia, jonka mukaan makromolekyylien ja polyfenolinäytteiden välinen vuorovaikutus tapahtuu vetysitoutumisen välityksellä. Happaman pH:n vaikutusta tutkittiin tarkemmin klorogeenihapolla, kversetiinillä ja skopoletiinillä pH-välillä 2,5–5,5 ja mittausaallonpituudella 322 nm. Mittausten perusteella PVPP sitoutui kaikkiin kolmeen näytteeseen kvantitatiivisimmin pH:ssa 3,0. PVPP:n ja fenolisten näytteiden väliset vuorovaikutukset olivat voimakkaampia matalissa pH-olosuhteissa kuin korkeilla pH-arvoilla. Tutkimustulokset indikoivat lisäksi, että PVPP-käsittelyllä olisi mahdollista poistaa tutkittavista näytteistä fenolisia komponentteja lähes kvantitatiivisesti. Peräkkäisillä PVPP-käsittelyillä saavutettiin paras tulos, jolloin PVPP:llä onnituttiin sitomaan käsiteltyjen näytteiden komponentit lähes täydellisesti (Andersen & Sowers 1968).



Kuva 2. A) Kahvihappo, B) klorogeenihappo, C) skopoletiini, D) skopoliini, E) kversetiini ja F) rutiini.

Andersenin ja Sowersin (1968) tutkimuksen tulokset ovat samansuuntaisia myöhempien havaintojen kanssa (Makkar *et al.* 1995). PVPP:n sitoutumista erilaisiin näytteisiin on tutkittu turbidimetrisesti pH-välillä 3,0–7,0. Tutkimuksessa käytetyt

näytteet olivat parkkihappo, quebracho-tanniini ja erilaiset kasviuutteet (*Acioa barteri*, *Dischostachys cinerea*, *Piliostigma reticulatum* ja *Guiera senegalensis*). Käsittlemättömien näytteiden absorbanssi mitattiin aallonpituudella 280 nm, minkä jälkeen niiden vesiliuoksiin lisättiin PVPP:tä ja niiden annettiin reagoida PVPP:n kanssa 30 minuuttia. Käsittelyn jälkeen näytteet sentrifugoitiin, ja niiden vesiliuoksien supernatantista mitattuja absorbanseja verrattiin käsittlemättömistä näytteistä mitattuihin vasteisiin. Tutkimuksen mukaan PVPP:n sitoutuminen oli vahvimillaan pH-arvossa 3,0; minkä jälkeen PVPP:n sitomien komponenttien osuus laski näytteen pH:n lähestyessä arvoa 7,0 (Makkar *et al.* 1995). Tulokset tukivat Andersenin ja Sowersin (1968) tekemiä havaintoja.

4.2. Gravimetrinen PVPP-menetelmä

PVPP:tä on hyödynnetty tanniinien kvantitointiin gravimetrisellä menetelmällä (Makkar *et al.* 1993). Polyfenolinäyte punnittiin ennen ja jälkeen PVPP-käsittelyn, jolloin punnitusten erotuksena saatiin määritettyä PVPP:n sitomien komponenttien massa. Tutkimuksessa käytettiin näytteinä erilaisia kasviuutteita (*Panicum maximum*, *Dialium guineense*, *Acioa barterii*, *Quercus incana*, *Cassia sieberiana*, *Pillostigma reticulatum*, *Guiera senegalensis*, *Cajanus cajan* ja *Dichonstachys cinerea*). Kiinteän PVPP:n annettiin vuorovaikuttaa näytteiden kanssa vesiliuoksessa, minkä jälkeen PVPP:n muodostamat liukenemattomat komponentit poistettiin liuksesta erottamalla liukoinen faasi liukenemattomasta PVPP:stä sentrifugoimalla. PVPP-käsittelyllä pyrittiin saamaan näytteen polyfenoliset yhdisteet sitoutumaan kvantitatiivisesti PVPP:hen. PVPP-käsittelyn jälkeen näyte kuivattiin ja punnittiin uudestaan. Punnitustulosta verrattiin ennen PVPP-käsittelyä punnittuun massaun, ja näytteiden massojen erotuksena saatiin määritettyä PVPP:n sitomien polyfenolien massan myötä myös näytteen polyfenolipitoisuus. Tutkimuksessa verrattiin gravimetrisellä menetelmällä saatuja tuloksia Folin-Ciocalteu -menetelmällä mitattuihin kokonaisfenolipitoisuuksiin. Gravimetrinen menetelmän sensitiivisyys oli yleisesti matalampi kuin kolorimetrinen Folin-Ciocalteu -menetelmän, mutta eri menetelmien tulosten välillä oli havaittavissa korrelaatio. Gravimetrinen menetelmän etuna oli lisäksi se, että siinä ei tarvittu ulkoisia standardeja, vaan sitoutuneiden tanniinien massa saatiin mitattua absoluuttisesti (Makkar *et al.* 1993).

Menetelmän heikkoutena on se, että se on käytännöllinen vain näytteiden kokonaispolyfenolikoostumuksen kvantitatiiviseen arviointiin. Siinä ei saada

minkäänlaista informaatiota siitä, minkälaisia komponentteja PVPP todellisuudessa sitoo, eikä käsittelyn kvantitatiivisuudesta voi olla täysin varma ilman lisätestejä. Gravimetrinen määrittämisen heikkoutena on, että mittaukset joudutaan tekemään olettaen, että kaikki PVPP:n sitomat yhdisteet ovat polyfenoleja ja että kaikki polyfenolit muodostavat PVPP:n kanssa liukenemattomia komplekseja pitoisuudesta riippumatta. Nämä oletukset saattavat johtaa menetelmän kannalta polyfenolipitoisuuden virhearviointiin.

4.3. PVPP:n ja polyfenolien välisen sitoutumisen spesifisyys

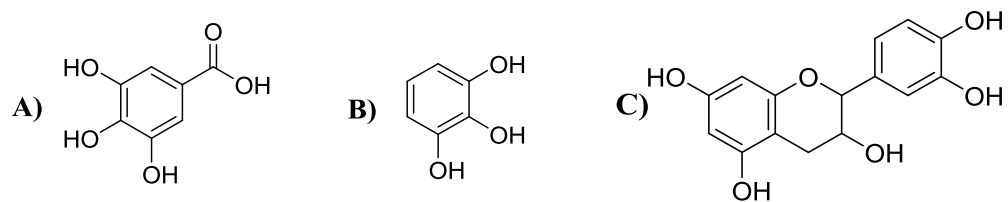
PVPP:n sitoutumisen spesifisyyttä erilaisiin polyfenolirakenteisiin on tutkittu sekä spektrofotometrisesti, että korkean erotuskyvyn nestekromatografialaitteistolla (HPLC), johon oli liitetty fotodirividetkto (PDA) (Verza *et al.* 2008). Tutkimuksessa mitattiin PVPP:n sitomien polyfenolisten komponenttien osuutta PVPP-pitoisuuden kasvattaessa. Tutkimuksessa käytettiin malliyhdisteinä gallushappoa (kuva 3A), pyrogallushappoa (kuva 3B), katekiinia (kuva 3C), rutiinia (kuva 2F), parkkihappoa ja guavapuun lehdistä (*Psidium guajava*) uutettua näytettä, jonka tiedettiin sisältävän runsaasti gallushappoa ja katekiinia. Polyfenolinäytteet käsiteltiin PVPP:llä, minkä jälkeen niiden supernatantista kerättyjen näytteiden sitoutumattomat yhdisteet kvantitoitiin turbidimetrisesti, ja tuloksia verrattiin käsittelemättömien referenssinäytteiden absorbansseihin. Mittaustulosten erotuksena saatiin selvitettyä PVPP:n sitomien komponenttien määrä. Yhdisteiden absorbanssit mitattiin aallonpituuksilla 270 nm (gallushappo ja parkkihappo), 280 nm (katekiini), 352 nm (rutiini) ja 267 nm (pyrogallushappo). Mittaustulosten perusteella vertailtiin PVPP:n affiniteettia muodostaa liukenemattomia komplekseja erilaisten polyfenolirakenteiden kanssa (Verza *et al.* 2008).

PVPP sitoutui huomattavasti suuremmissa määrin gallushappoon kuin pyrogallushappoon, mikä johtuu oletettavasti gallushapon rakenteen karboksyyliiryhmästä. PVPP sitoutui katekiiniin gallushappoa paremmin, minkä perusteella katekiinin rakenteen viidellä hydroksyyliiryhmällä on suurempi yhteisvaikutus kompleksoitumiseen kuin gallushapon kolmella hydroksyyliiryhmällä ja yhdellä karboksyyliiryhmällä. Myös parkkihappo, jonka rakenteessa on runsaasti hydroksyyliiryhmiä, sitoutui PVPP:hen katekiinin tavoin huomattavasti gallushappoa ja pyrogallushappoa suuremmissa määrin. (Verza *et al.* 2008).

Tutkimuksessa selvitettiin lisäksi PVPP:n kompleksoitumisen spesifisyyttä liuoksissa, joissa oli kahta erilaista komponenttia, joiden kanssa PVPP kykeni

muodostamaan komplekseja. Katekiini- ja pyrogallushappoliuoksiin lisättiin rutiinia, minkä jälkeen näytteet käsiteltiin PVPP:llä. PVPP-käsittelyn jälkeen näytteiden sitoutumattomat komponentit kvantitoitiin. Katekiini kvantitoitiin aallonpituudella 280 nm, pyrogallushappo aallonpituudella 267 nm ja rutiini aallonpituudella 352 nm. Mittaustulosten perusteella PVPP sitoi katekiinia hieman suuremmissa määrin kuin rutiinia, mutta reaktio ei osoittanut merkittävää spesifisyyttä, vaan PVPP pystyi sitomaan liuoksessa kumpaakin komponenttia. PVPP muodosti seoksessa myös pyrogallushapon ja rutiinin kanssa liukenemattomia komplekseja lähes samoissa määrin (Verza *et al.* 2008).

PVPP:n vaikutusta tutkittiin vielä HPLC-PDA -menetelmällä, jossa mitattiin PVPP-käsittelyn vaikutusta kasviuutteen kromatografiseen sormenjälkiprofiiliin. *Psidium guajava* -näytteen kromatogrammista valittiin gallushapon ja katekiinin lisäksi kuusi yhdistettä, jotka tunnistettiin UV-spektrien perusteella flavoneiksi. PVPP:n lisääminen vaikutti kaikkiin eri polyfenolisiin yhdisteisiin laskien niiden tuottamien piikkien pinta-alaa. PVPP sitoutui kaikista näytteen tutkituista yhdisteistä selkeästi heikoiten gallushappoon, kun taas katekiini sitoutui täysin (Verza *et al.* 2008). Tutkimuksen tulosten perusteella PVPP:n sitoutuminen riippuu polyfenolisten yhdisteiden rakenteellisista tekijöistä. Näitä eroja olisi tarkkaan tutkittuna mahdollista soveltaa menetelmiin, joilla pystyttäisiin poistamaan tukittavista näytteistä tietynlaisia polyfenolisia komponentteja.



Kuva 3. A) Gallushappo, B) pyrogallushappo ja C) katekiini.

5. Coomassie Brilliant Blue G 250 (CBB)

Myös Bradfordin reagenssina tunnettu Coomassie Brilliant Blue G 250 on makromolekyyli, joka kykenee sitoutuessaan muodostamaan värillisiä komplekseja. Alun perin Bradfordin reagenssia on käytetty proteiinien määrittämiseen ja kvantitointiin näyteliuoksista (Bradford 1976). CBB on vesiliuoksessa neutraalissa muodossaan

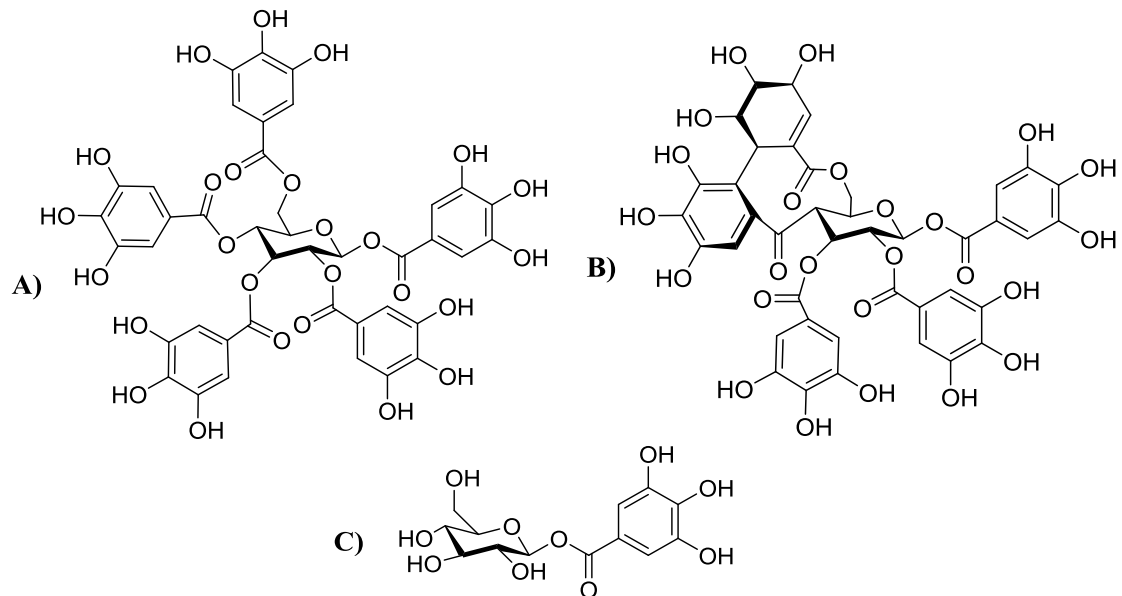
vihreää, kationisessa muodossaan punaista ja kompleksoituessaan anionisessa muodossaan esimerkiksi polyfenoleihin, se muuttaa väriään siniseksi (Compton & Jones 1985). Kompleksoitumisen tuottamaa värireaktiota on mahdollista hyödyntää polyfenoleja sisältävien näytteiden tutkimukseen, sillä reagenssin ja polyfenolien välisten sinisten kompleksien muodostumista pystytään seuraamaan spektrofotometrisesti (Kilkowski & Gross 1999). CBB:n ja polyfenolien välisen vuorovaikutuksen tutkimiseen kehitettyjen tutkimusmenetelmien etuja ovat menetelmien sensitiivisyys ja analyysien nopeus, sillä värireaktio saavuttaa absorbanssimaksiminsa jo noin kahden minuutin jälkeen ja reaktio pysyy stabiilina ainakin 30 minuuttia (Kilkowski & Gross 1999). CBB kykenee muodostamaan komplekseja niin polyfenolien kuin proteiinien kanssa, minkä vuoksi yhdisteiden ristivaikutus saattaa johtaa komponenttien määrän virhearviointiin.

5.1. CBB:n ja polyfenolien välinen vuorovaikutus

CBB tuottaa vesiliuoksessa hydrolysoituvien tanniinien kanssa värireaktion, jonka on riippuvainen polyfenolisten komponenttien rakenteellisista ominaisuuksista. CBB kykenee muodostamaan värillisiä komplekseja vain sellaisten hydrolysoituvien tanniinien kanssa, joiden molekyylimassa on suurempi kuin 750 Da (Kilkowski & Gross 1999). Tästä raja-arvosta johtuen esimerkiksi gallushappo, digalloyyyliglukoosi sekä monomeeriset ja dimeeriset flavan-3-olit eivät tuota CBB:n kanssa merkittävää värireaktiota. Kompleksinmuodostuksen vaatimuksena on lisäksi, että kompleksoitavan yhdisteen rakenne sisältää aromaattisia ryhmiä, joihin CBB:n sitoutuminen voi tapahtua, minkä seurauksena polyfenolit ovat rakenteensa puolesta teoreettisesti alttiita muodostamaan värillisiä komplekseja. CBB:n reaktiivisuutta hydrolysoituvien tanniinien kanssa on vertailtu käyttäen näytteinä tetra–nonagalloyyyliglukoosia, gallushappoa (kuva 3A), glukogalliinia (kuva 4C) ja tellimagrandin II:a (kuva 4B). Kompleksoituessaan CBB saa aikaan sinisen värireaktion, joka tuottaa maksimin aallonpituudella 700 nm ja olkapään aallonpituudella 620 nm. Aallonpituuden 660 nm todettiin olevan käytännöllinen tanniinien kompleksoitumisen mittaamiseen, sillä näytteen pitoisuus ei vaikuttanut siitä mitattuun tausta-absorbanssiin (Kilkowski & Gross 1999).

Yhdisteiden välisessä vertailussa huomattava havainto oli lisäksi se, että pentagalloyyyliglukoosiin (PGG) (kuva 4A) verrattuna tellimagrandiini II tuotti merkittävästi pienemmän vasteen. Tämä johtuu oletettavasti tellimagrandiini II:n rakenteen HHDP-ryhmästä, joka tekee siitä PGG:tä steerisesti jäykemmän rakenteen, mikä alentaa huomattavasti tellimagrandiini II:n kykyä kompleksoitua CBB:n kanssa.

Polyfenolinäytteiden pitoisuuden ja värireaktion tuottaman absorbanssin välillä on lievä epälineaarisuus (Bradford 1976; Kilkowski & Gross 1999). Epälineaarisuus johtuu siitä, että CBB:lle ei ole havaittu tutkitulla aallonpituusalueella 190–750 nm isobestistä pistettä, minkä seurauksena reagenssin eri värimuotojen spektrit osuvat osittain päällekkäin (Compton & Jones 1985). Lievästä epälineaarisuudesta huolimatta menetelmä sopii hydrolysoituvien tanniinien kvalitatiiviseen ja kvantitatiiviseen analyysiin, olettaen että tuntemattomien näytteiden analyysit tehdään käyttäen kalibroitisuoraa (Bradford 1976). Monet orgaaniset liuottimet, kuten metanoli, etanoli ja asetoni häiritsevät värireaktiota, mistä syystä polyfenolinäytteet on optimaalisinta liuottaa veteen (Kilkowski & Gross 1999).



Kuva 4. A) Pentagalloyyyliglukoosi, B) tellimagrandin II ja C) glukogalliini.

6. Johtopäätökset

Polyfenoleja kompleksoivien makromolekyylien tutkimus on onnistunut tuottamaan mittausmenetelmiä, joita voidaan soveltaa makromolekyyli–polyfenoli-vuorovaikutusten tutkimukseen. Suurin osa viimeaikaisesta polyfenoleja kompleksoivien makromolekyylien tutkimuksesta on keskittynyt tutkimaan tanniinien vaikutusta märehäijöihin *in vivo* -menetelmillä. Erilaisten käsittelyjen välinen vertailu toteutetaan usein esimerkiksi vertailemalla märehäijöiden metaboliasta peräisin olevaa kaasuntuottoa (Khosravi *et al.* 2015; Windley *et al.* 2016; Giridhar *et al.* 2018). Tämän

kaltaisilla tutkimuksilla saadaan tietoa polyfenolien ja makromolekyylien muodostamien kompleksien muodostumisesta märehitjoiden metabolian välityksellä. Vastaavilla tutkimuksilla on kuitenkin haastavaa tuottaa standardoitua dataa muodostuvien kompleksien todellisesta luonteesta ja siitä, millaiset polyfenoliset komponentit märehitjölle syötetyssä rehussa ovat aidosti niitä, jotka muodostavat polyfenolien ja makromolekyylien välisen kompleksoitumisreaktion. Polyfenoli–makromolekyyli-kompleksien tutkimukseen olisi tärkeää kehittää *in vitro* -menetelmiä, joilla polyfenolitutkimusta voitaisiin suorittaa tunnetuilla ja standardoiduilla näytteillä.

Tutkielmassa käsitellyistä makromolekyyleistä vain PVPP:llä ja CBB:llä oli puhtasaineita näytteinä käyttämällä onnistuttu tuottamaan tutkimusdataa erilaisten polyfenolien rakenteiden ja kompleksien muodostumisen välisestä riippuvuudesta. CBB:n heikkoutena PVPP:hen verrattuna oli sen taipumus muodostaa värillisiä komplekseja myös proteiinien kanssa, minkä vuoksi se ei sovellu yhtä hyvin erilaisten tuntemattomien näytteseosten tutkimukseen. PEG oli makromolekyyleistä selvästi laajimmin tutkittu, mutta erilaisia PEG:n ja polyfenolien välisiä vuorovaikutuksia mittaavia menetelmiä käsittelevät tutkimukset eivät myöskään kyenneet nykyisillä menetelmillä ottamaan kantaa siihen, millaiset erilaiset rakenteelliset tekijät vaikuttavat vuorovaikutuksen muodostumiseen. PEG:n tutkimusta tulisi laajentaa käyttäen polyfenolinäytteinä joko puhtasaineita, tai tunnetun polyfenolikoostumuksen sisältäviä näytteitä, jolloin mitatun makromolekyyli–polyfenoli -vuorovaikutuksen komponenttien rakenne ja voimakkuus voitaisiin linkittää toisiinsa. PVP:llä tehdyt tutkimukset kärsivät samasta ongelmasta kuin PEG, ja PVP:llä on yleisesti ottaen tehty PEG:tä vähemmän tutkimusta. PEG:n ja PVP:n välisten vertailujen perusteella PEG soveltuu yleisesti PVP:tä paremmin polyfenolien tutkimukseen, sillä merkittävän kompleksoitumisreaktion aikaansaamiseksi tarvittavan PEG:n määrä on huomattavasti vaadittavaa PVP-pitoisuutta alhaisempi. Tämän perusteella PEG:n affiniteetti polyfenolisia rakenteita kohtaan on PVP:tä voimakkaampi, ja se on herkempi muodostamaan vuorovaikutuksia polyfenolisten komponenttien kanssa (Makkar *et al.* 1995). Tämän lisäksi PEG:llä tehtyjen alustavien rakenne–aktiivisuus -vertailujen perusteella se kykenee muodostamaan komplekseja sellaisten polyfenolisten komponenttien kanssa, jotka osoittavat aktiivisuutta myös perinteisissä proteiininsaostuskykyä mittaavissa testeissä, joissa käytetään kompleksoivana makromolekyylinä BSA:ta (Piirtola *et al.*, julkaisematon havainto). PEG:tä olisi siis mahdollista hyödyntää menetelmissä, joissa pyritään sekä mallintamaan näytteiden proteiininsaostuskykyä että selvittämään erilaisten polyfenolisten rakenteiden affiniteettia muodostaa komplekseja polymeeristen

makromolekyylien kanssa, mikä tekee PEG:stä hyvin potentiaalisen makromolekyylin polyfenolitutkimuksessa käytettäväksi työkaluksi.

Tutkielman kirjallisessa osassa käsitellyt mittausmenetelmät pyrkivät usein kvantitoimaan makromolekyylien sitomien komponenttien määrää ottamatta kantaa sitoutuneiden komponenttien laatuun ja rakenteellisiin tekijöihin. Pro gradu -tutkielman kokeellisen osuuden tavoitteena oli luoda kuoppalevylukijaa hyödyntävä mittausmenetelmä, jossa polyfenoleja kompleksoivien makromolekyylien ja polyfenolinäytteiden välisten vuorovaikutusten tutkimukseen hyödynnettäisiin makromolekyylien ja polyfenolien kykyä muodostaa liukenemattomia komplekseja. Mittauksissa käytettyjen polyfenolinäytteiden koostumus ja pitoisuudet selvitettiin hyödyntämällä LC-MS -tekniikoita, mikä mahdollisti mittausmenetelmällä tuotetun datan linkittämisen näytteiden yhdistekoostumukseen. Tunnetun yhdistekoostumuksen sisältävillä näytteillä oli mahdollista selvittää kompleksoivien yhdisteiden spesifinen affiniteetti erilaisiin polyfenolirakenteisiin, ja lisäksi vertailla erilaisten polyfenolirakenteiden rakenteellisten tekijöiden vaikutusta vuorovaikutusten muodostumisen voimakkuuteen. Makromolekyylien ja polyfenolien välisen vuorovaikutuksen analogisuutta polyfenolien ja proteiinien muodostamien vuorovaikutusten kanssa hyödynnettiin mittausmenetelmässä polyfenolinäytteiden proteiininsaostuskyvyn arvioimiseen. Kehitetyn mittausmenetelmän avulla oli mahdollista seuloa useita polyfenolinäytteitä samanaikaisesti, ja sillä voitiin tehdä nopeasti arvioita siitä, sisältävätkö näytteet yhdisteitä, jotka osoittivat kykyä muodostaa polyfenoleja kompleksoivien makromolekyylien, kuten proteiinien kanssa liukenemattomia komplekseja. Koska liukenemattomien kompleksien muodostumisen mittaamiseen riitti yksinkertainen spektrofotometrinen laitteisto, tarjoaisi tutkimuksessa kehitetyn kaltainen mittausmenetelmä monille polyfenolitutkimuksesta kiinnostuneille tutkimusryhmille edullisen ja tehokkaan työkalun polyfenolien ja makromolekyylien vuorovaikutusten tutkimukseen.

KOKEELLINEN OSA

7. Materiaalit ja menetelmät

7.1. Käytetyt reagenssit ja liuottimet

Menetelmänkehityksessä käytettyjä makromolekyyleja olivat eri molekyyli­massaiset PEG-polymeerit. Käytettyjä liuottimia olivat asetoni, etanoli ja ultrapuhdas MilliQ vesi (Synergy Water Purification System, Merck KGaA, Saksa). UPLC–MS -analyysissä käytettiin eluenteina asetonitriiliä (ACN) ja 0,1 % muurahaishapon vesiliuosta (v:v).

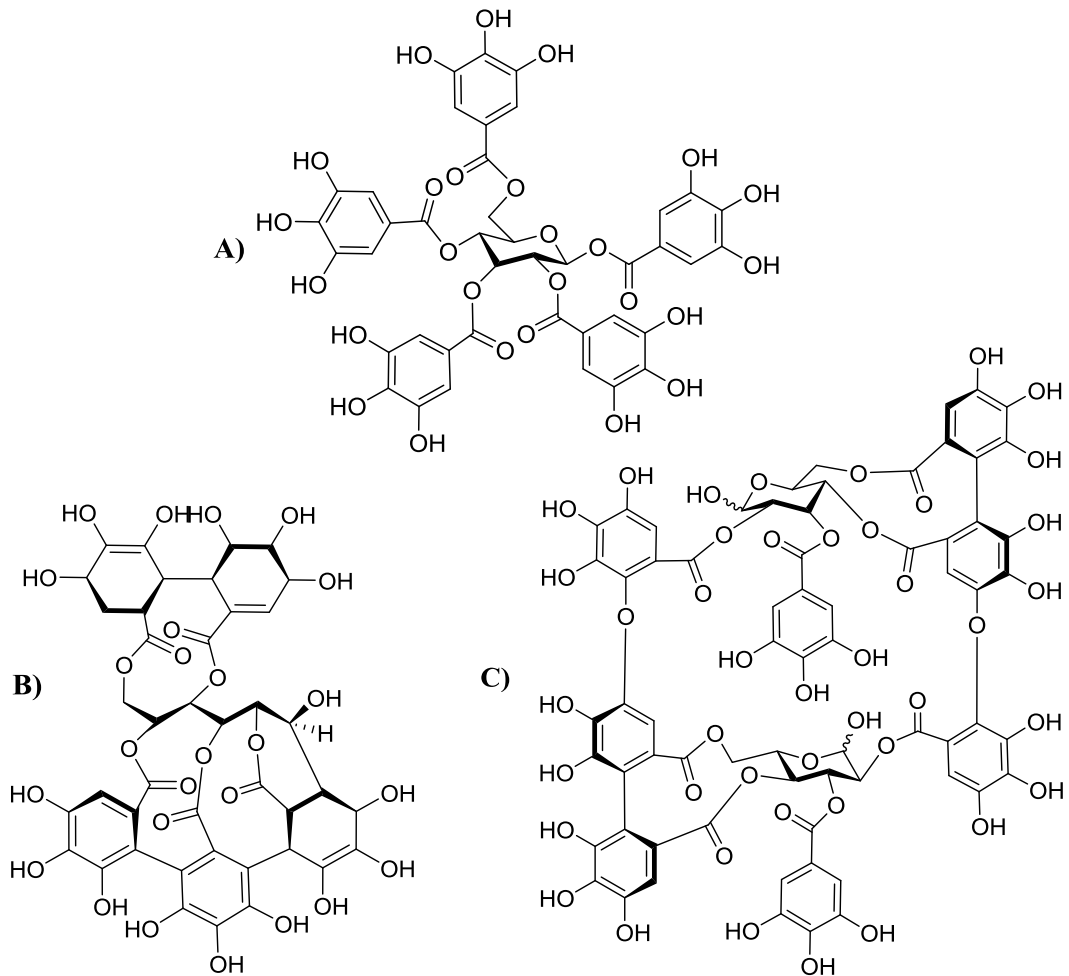
Taulukko 1. Analyyseissä käytetyt reagenssit.

Reagenssi	Valmistaja	Laatu	Puhtaus
Asetoni	VWR BDH prolabo chemicals, Ranska	Analyysi	≥ 99,8 %
Etanoli	Altia Oyj, Suomi	Aa	≥ 99,5 %
Asetonitriili	VWR BDH prolabo chemicals, USA	LC-MS	≥ 99,9 %
Muurahaishappo	Sigma-Aldrich, Saksa	LC-MS	100 %
Muurahaishappo	Sigma-Aldrich, Saksa	HPLC	≥ 98 %
PEG 400	Sigma-Aldrich, Belgia		
PEG 6 000	Sigma-Aldrich, Saksa		
PEG 12 000	Sigma-Aldrich, Saksa		
PEG 20 000	Sigma-Aldrich, Saksa	BioUltra	

7.2. Polyfenolinäytteet

Työssä käytettiin näytteinä eri kasvilajeista valmistettuja kasviuutteita, fraktioita ja puhdasaineita. Kasvilajeiksi valittiin ranta-alpi (kukinto), maitohorsma (kukinto), hieskoivu (lehdet), vaahtera (vihreät lehdet), vaahtera (punaiset lehdet), paju (punaiset lehdet), rantakukka (kukinto), metsätammi (lehdet), kyläkellukka (kukinto), ukkomansikka (lehdet), lehtokuusama lehdet), peltotaskuruoho (lehdet), käärmeenpistoyrtti (lehdet), jalava (lehdet) ja haapa (lehdet), jotka uutettiin kvantitatiivisesti kylmäkuivatuista kasvijauheista kappaleessa 7.3.1. esitetyn uuttoprotokollan mukaisesti. Kasviuutteiden UPLC-MS -kromatogrammit on esitetty liitteissä 1–5. Kasvien raakauutteiden lisäksi näytteinä käytettiin maitohorsman (kukinto), kiiltolehtipajun (lehdet) ja kuningasatsalean (lehdet) raakauutteista tuotettuja Sephadex LH-20 -fraktioita. Tutkimuksessa käytettävät kasviuutteet valittiin siten, että

ne edustivat yhdistekoostumukseltaan mahdollisimman monimuotoisesti erilaisia luonnollisia polyfenolikoostumuksia. Tutkittavat puhtasaineet olivat 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyyli- β -D-glukoosi (PGG, kuva 5A), veskalagiini (V, kuva 5B) ja oenotheiini B (OB, kuva 5C). Tutkimuksessa käytetyt puhtasaineet valittiin siten, että niiden rakenne tunnettiin hyvin, ja niiden rakenteet erosivat toisistaan yhdisteiden rakenteellisten tekijöiden välisen vertailun toteuttamiseksi. Työssä käytetyt näytteet ja niistä käytetyt lyhenteet on listattu taulukossa 2.



Kuva 5. Työssä käytetyt puhtasaineet ja niiden lyhenteet. **A)** Pentagalloyyyliglukoosi (PGG), **B)** veskalagiini (V) ja **C)** oenotheiini B (OB).

Taulukko 2. Menetelmänkehityksessä käytetyt polyfenolinäytteet ja niistä käytetyt lyhenteet.

Polyfenolinäyte	Lyhenne
Ranta-alpi (kukinto)	RA
Maitohorsma (kukinto)	MH
Hieskoivu (lehdet)	HK
Vaahtera (vihreät lehdet)	VV
Vaahtera (punaiset lehdet)	VP
Paju (punaiset lehdet)	PP
Rantakukka (kukinto)	RK
Metsätammi (lehdet)	MT
Kyläkellukka (kukinto)	KK
Ukkomansikka (lehdet)	UM
Lehtokuusama (lehdet)	LK
Peltotaskuruoho (lehdet)	PT
Käärmeenpistoyrtti (lehdet)	KP
Jalava (lehdet)	JA
Maitohorsman fraktio (kukinto)	MH F2
Kiiltolehtipajun fraktio (lehdet)	PAA3
Kuningasatsalean fraktio (lehdet)	PAA17
1,2,3,4,6-penta- <i>O</i> -galloyyyliglukoosi	PGG
Veskalagiini	V
Oenotheiini B	OB

7.3. Menetelmät

7.3.1. Kasvinäytteiden uutaminen

Kasvinäytteet uutettiin punnitsemalla 0,1 mg tarkkuudella 19,5–20,5 mg kylmäkuivattua kasvijauhetta 2 ml eppendorffputkeen ja lisäämällä näytteeseen ensimmäinen 1400 µl erä 80:20 asetoni/vettä (v:v). Näytettä ravisteltiin 5 min Vortexissa ja varmistettiin, että näyte oli täysin liennut. Tämän jälkeen näytettä maseroitiin vuorokausi kylmähuoneessa (4 °C). Maseroinnin jälkeen eppendorffputkea ravisteltiin tasoravistelijassa 3 tuntia nopeudella 280 rpm, minkä jälkeen näyte sentrifugoitiin 10 minuuttia nopeudella 14000 rpm (21913 × g). Kasviuute dekantoiitiin varovasti uuteen 2 ml eppendorffputkeen, joka suljettiin reikäkorkilla ja näytteestä haihdutettiin asetoni eppendorffkonsentraattorilla (Eppendorf AG, Hampuri, Saksa). Alkuperäiseen eppendorffputkeen jääneeseen kasvimateriaaliin lisättiin toinen 1400 µl erä 80:20 asetoni/vettä (v:v) ja näytettä ravisteltiin Vortexissa 5 min. Tämän jälkeen eppendorffputkea ravisteltiin jälleen

tasoravistelijassa 3 tuntia nopeudella 280 rpm 3 tuntia ja sentrifugoitiin 10 minuuttia nopeudella 14 000 rpm ($21913 \times g$). Uuton toinen erä yhdistettiin ensimmäisen uuttokierroksen haihdutettuun näytteeseen dekantoimalla, minkä jälkeen yhdistetystä näytteestä haihdutettiin uudestaan asetoni eppendorfkonsentraattorilla. Haihdutuksen jälkeen näyte jäädytettiin pakastamisessa ja kylmäkuivattiin. Kylmäkuivattu näyte liuotettiin 1 ml:aan ultrapuhdasta vettä, ravisteltiin noin 10 minuuttia Vortexissa ja suodatettiin uuteen 1,5 ml eppendorffputkeen käyttäen 1 ml muoviruiskua ja 0,20 μm PTFE-suodatinta.

7.3.2. Kuoppalevylukija

Työssä käytetty kuoppalevylukija oli Multiscan Ascent (Labsystems), johon oli asennettu käytettäviksi aallonpituuksiksi 340 nm, 405 nm, 415 nm, 492 nm, 520 nm, 550 nm, 650 nm ja 742 nm. Kuoppalevylukijan operointiin käytetty ohjelmisto oli Ascent Software Version 2.6. Käytetyt 96-paikkaiset kuoppalevyt olivat malliltaan SpectroPlate™ - 96 MB.

7.3.3. Kuoppalevymenetelmä

Polyfenolinäytteistä valmistettiin kuoppalevylukijalle vesiliuokset liuottamalla tunnettu massa kylmäkuivattua näytettä tunnettuun tilavuuteen vettä. PGG liukeni heikosti puhtaaseen veteen, joten sen liuottamiseen käytettiin 10:90 etanoli/vettä (v:v).

PEG:n vuorovaikutusta näytteiden kanssa tutkittiin kuoppalevylukijalla turbidimetrisesti eri aallonpituuksilla mittaamalla vesiliuoksessa makromolekyylien ja näytteiden liukenemattomien kompleksien muodostumista. PEG:stä valmistettiin vesiliuokset liuottamalla tunnettu massa makromolekyyliä veteen mittapullossa, sekoittamalla liuos homogeeniseksi ja täyttämällä mittapullo lopulliseen tilavuuteen. Kustakin makromolekyylistä valmistettiin 5 mg/ml kantaliuos liuottamalla mittapullossa 500 mg materiaalia 100 ml:aan ultrapuhdasta vettä. Kantaliuoksia käytettiin mittauksissa käytettävien laimennosten valmistamiseen. Kuoppalevyanalyytit tehtiin pipetoimalla 100 μl polyfenolinäytettä kuoppalevylle, minkä jälkeen näytteeseen lisättiin 100 μl PEG-liuosta. Mittaus kuoppalevylukijalla aloitettiin välittömästi makromolekyylin lisäämisen jälkeen, jotta reaktion kinetiikkaa kyettiin mittaamaan mahdollisimman tarkasti vuorovaikutuksen alusta lähtien. Näytteiden tausta-absorbanssit mitattiin lisäämällä erillisiin näytteisiin PEG-liuoksen sijaan vastaava tilavuus ultrapuhdasta vettä.

Mittauksissa optimoitavia parametreja olivat käytettävien näytteiden ja makromolekyylien pitoisuudet, mittausaallonpituudet ja kinetiikkamittauksen

maksimaalisen kulmakertoimen määrittäminen. Tuloksissa esitetyt absorbanssit ovat mittausten maksimiabsorbansseja. Kinetiikkamittausten tulokset on esitetty maksimaalisena kulmakertoimena, joka on määritetty laskemalla peräkkäisten mittauspisteiden kautta kulkevien suorien kulmakertoimia. Optimoitujen mittauseräparametrien perusteella kehitettiin lopullinen mittauserämenetelmä.

Kuoppalevy menetelmän kehittäminen aloitettiin esitesteillä, joissa kartoitettiin eri molekyyli massaisten PEG-polymeerien vuorovaikutuksia erilaisia näytetyyppejä edustavien polyfenolinäytteiden kanssa, ja niiden vaikutusta mitattuun absorbanssiin. Näytteiksi valittiin maitohorsman raakauute (MH), maitohorsman Sephadex LH-20 -fraktio (MH F2) ja oenothiini B (OB). Valitut näytteet edustivat raakauute-, fraktio- ja puhdasainetasoilla näytteitä, joissa kaikissa oli yhteinen tunnettu komponentti. Esitesteissä käytettyjen näytteiden molaariset pitoisuudet laskettiin käyttämällä OB:n molekyyli massa (1569,08 g/mol), jota esiintyi yhteisenä komponenttina kaikissa kolmessa näytetyypissä. Jotta kaikkia kolmea tutkittavaa näytettä olisi mahdollisimman yksinkertaista vertailla keskenään, käytettiin raakauutetta ja Sephadex LH-20 -fraktiota yhtä suurina pitoisuuksina kuin puhdasainetta, jonka pitoisuus tunnettiin tarkasti. Raakauutteesta, fraktiosta ja puhdasaineesta valmistettiin 10 mg/ml kantaliuokset liuottamalla 20 mg kutakin näytettä 2 ml:aan ultrapuhdasta vettä 2 ml:n eppendorffputkissa.

Menetelmän kehityksen esitesteissä kartoitettiin näytteiden ja PEG-liuosten pitoisuuksien välisen suhteen vaikutusta kuoppalevy lukijalla mitattavaan maksimiabsorbanssiin. Testissä selvitettiin, millaisilla PEG- ja polyfenolinäytteiden molaarisilla suhteilla saavutettiin riittävän suuri turbidimetrisen vaste makromolekyylin ja näytteiden välisen vuorovaikutusten tuottaman vasteen lineaarisen alueen selvittämiseksi. Näytteiden tuottamia maksimiabsorbansseja tutkittiin erilaisilla näytteiden ja PEG-polymeerien pitoisuussuhteilla kiinnittämällä joko PEG- tai PF-pitoisuus vakioarvoon. Eri PEG-polymeerien pitoisuudet laskettiin niiden keskimääräisen molekyyli massan avulla, minkä jälkeen niiden pitoisuus suhteutettiin näytteiden pitoisuuksiin laskettujen ainemäärien perusteella.

7.3.4. UPLC–MS/MS analyysit

Kasviuutteet analysoitiin Xevo kolmoiskvadrupolimassaspektrometriin (TQ, Waters Corp., Milford, MA, USA) sähkösumutus-ionisaatiolähteellä (ESI) yhdistetyllä ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografialaitteistolla (UPLC, Waters Corp., Milford,

MA, USA). UPLC koostui pumpusta, näytteensyöttäjästä, kolonnista ja diodirividetektorista. Käytetty kolonni oli Acquity UPLC BEH Phenyl 1,7 μm , 100 mm \times 2,1 mm (Waters Corp., Wexford, Ireland). Käytetty injektioilavuus oli 5 μm ja virtausnopeus oli 0,5 ml/min. Gradienttiohjelman parametrit on esitetty taulukossa 3. UV-detektorin aallonpituusalue oli 190–500 nm. UV-data kerättiin aikaväliltä 0–9,5 min ja MS-data aikavälillä 0–6,0 min. Full scan MS-analyysi tehtiin negatiivisella ionisaatiolla massavälillä 150–1200 m/z . Näytteet analysoitiin useilla SRM- ja MRM-menetelmillä, jotka detektoivat näytteiden komponentteja yhdiste- ja yhdisteryhmäspesifisesti (Engström *et al.* 2014, 2015). Kasviuutteiden UPLC-analyyseissä käytetyn MS-laitteiston parametrit on esitetty taulukossa 4. Näytteet suodatettiin ennen analyysiä 0,20 μm PTFE-suodattimilla.

Taulukko 3. UPLC–MS/MS analyyseissä käytetty eluointigradientti.

A = asetonitriili, B = 0,1 % muurahaishapon vesiliuos (v:v).

Aika (min)	A %	B %
alku	0,10	99,9
0,5	0,10	99,9
5,0	30,0	70,0
6,0	35,0	65,0
6,1	90,0	10,0
8,1	90,0	10,0
8,2	0,10	99,9
9,5	0,10	99,9

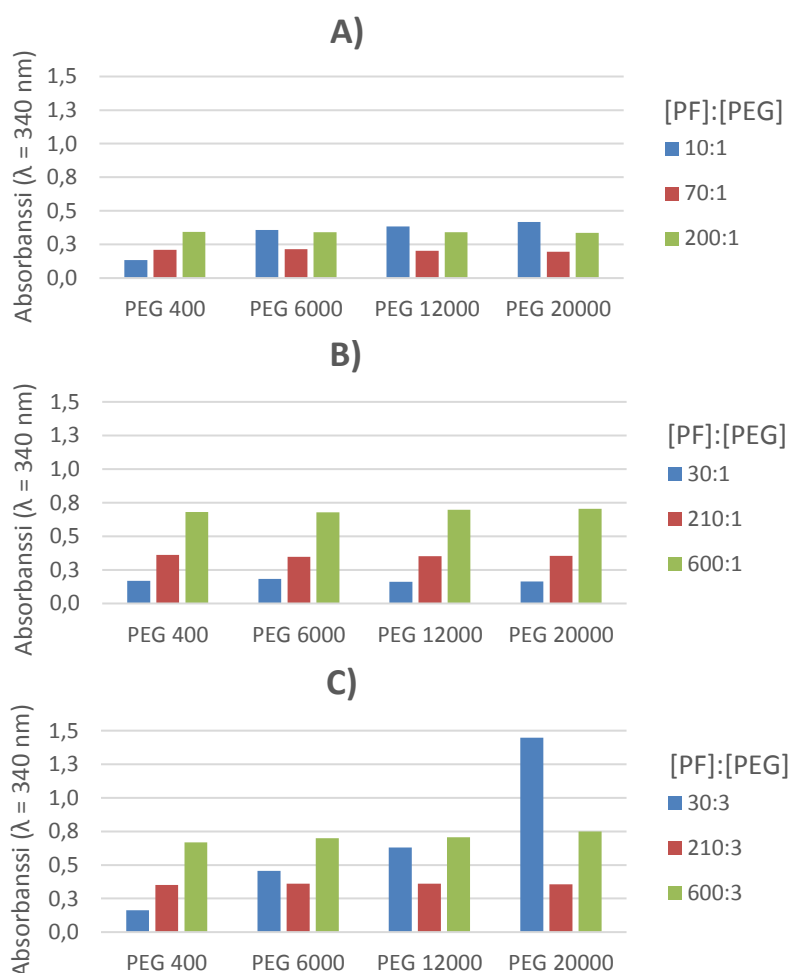
Taulukko 4. UPLC–MS/MS analyyseissä käytetyt MS-parametrit.

Kapillaarijännite	3,4 kV
Ohjausjännite	3 V
Ionilähteen lämpötila	150 °C
Desolvaatiolämpötila	650 °C
Desolvaatiokaasun virtaus	1000 l/h
Kartiokaasun virtaus	100 l/h
Törmäyskaasun virtaus	0,15 ml/min

8. Kuoppalevymenetelmän kehittäminen

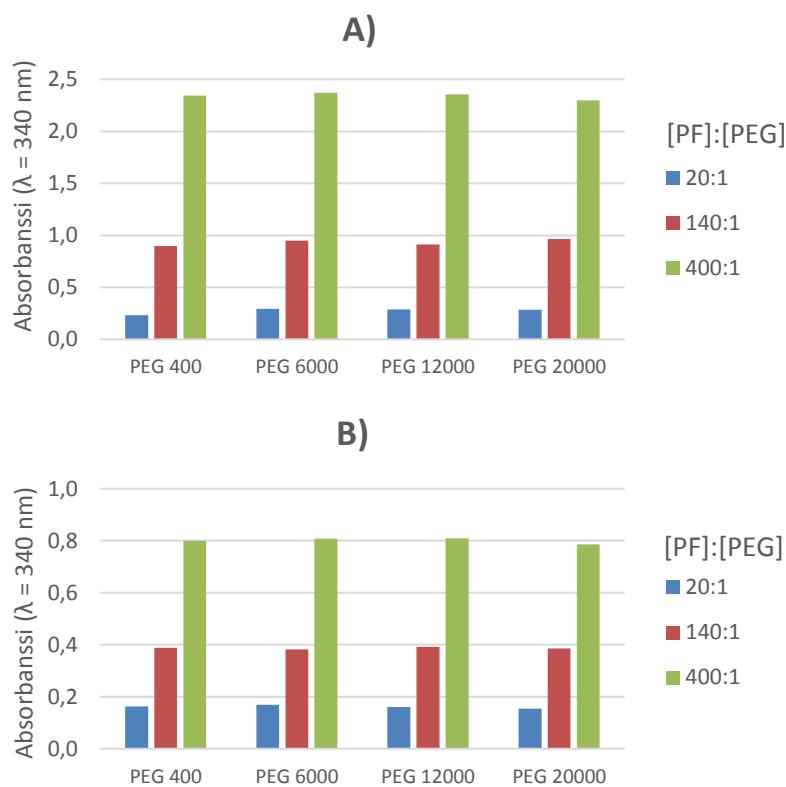
8.1. Esitestit

Esitestit aloitettiin kolmiosaisella kokeella, joissa käytettiin näytteenä OB:ta. Testin ensimmäisessä osassa testattaviksi [PF]:[PEG] -suhteiksi valittiin 10:1, 70:1 ja 200:1. Kokeen toisessa osassa OB:n pitoisuus kolminkertaistettiin, ja PEG:n vaikutusta absorbanssiin tutkittiin pitoisuussuhteilla 30:1, 210:1 ja 600:1. Kolmannessa osassa molempien testattavien yhdisteiden pitoisuudet kolminkertaistettiin, jolloin pitoisuussuhteiksi määräytyivät 30:3, 210:3 ja 600:3. Testeissä käytettyjen PF- ja PEG-näytteiden pitoisuudet on esitetty liitteessä 6. Absorbanssit mitattiin aallonpituudella 340 nm, ja mittausten tulokset on esitetty mittausten maksimiabsorbansseina. Testien tulokset on esitetty kuvassa 6.



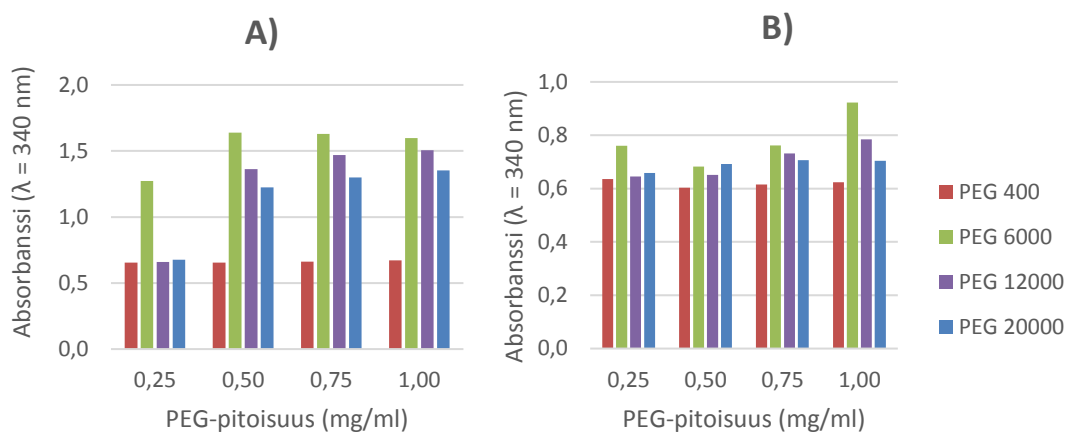
Kuva 6. Polyfenolinäytteiden maksimiabsorbanssit kolmella eri [PF]:[PEG] -suhteella [PEG]:n ollessa vakio. **A)** Alkuperäiset PF- ja PEG-pitoisuudet, **B)** kolminkertaistettu PF-pitoisuus ja **C)** kolminkertaistetut PF- ja PEG-pitoisuudet Käytetty näyte oli oenothiini B (OB). Absorbanssit mitattiin aallonpituudella 340 nm.

Puhdasainetta edustavan OB -näytteen testaamisen jälkeen tehtiin vastaava testi, jossa näytteinä olivat MH ja MH F2. Testissä tutkittiin edellisten testien tapaan näytteiden tuottamaa maksimiabsorbanssia erilaisilla [PF]:[PEG] pitoisuussuhteilla. Kasviuutteiden PF-pitoisuudet rinnastettiin edellisessä testissä käytettyihin OB-pitoisuuksiin. Alustavien tulosten perusteella MH ja MH F2 tuottivat yleisesti OB:ta alhaisempia absorbansseja vastaavissa pitoisuuksissa, joten vahvemman absorbanssin tuottamiseksi testissä käytetyt MH- ja MH F2 -pitoisuudet olivat kaksi kertaa väkevämmät kuin puhdasaineella tehdyissä testeissä käytetyt OB-pitoisuudet. Testattaviksi [PF]:[PEG] -pitoisuussuhteiksi valittiin 20:1, 140:1 ja 400:1. Näytteiden ja käytettyjen PEG-liuosten pitoisuudet on esitetty liitteessä 7. Näytteiden absorbanssit mitattiin aallonpituudella 340 nm ja tulokset on esitetty mittausten maksimiabsorbansseina. Mittausten tulokset on esitetty kuvassa 7.



Kuva 7. Polyfenolinäytteiden maksimiabsorbanssit mitattuna kolmella eri [PF]:[PEG] -suhteella aallonpituudella 340 nm. **A)** Maitohorsman raakauute (MH) ja **B)** maitohorsman Sephadex LH-20 -fraktio (MH F2).

PEG-pitoisuuden vaikutuksen testaamista näytteiden tuottamaan maksimiabsorbanssiin jatkettiin käyttämällä näytteinä MH:ta ja MH F2:ta. PEG-pitoisuuden sijaan PF-pitoisuus kiinnitettiin vakioarvoon ja PEG:n vaikutusta absorbanssiin testattiin neljällä eri PEG-pitoisuudella. Testattaviksi PEG-pitoisuuksiksi valittiin 0,25; 0,50; 0,75 ja 1,00 mg/ml. MH:n pitoisuus oli 1 mg/ml ja MH F2:n pitoisuus oli 3 mg/ml. Absorbanssit mitattiin aallonpituudella 340 nm ja mittausten tulokset on esitetty mittausten maksimiabsorbansseina kuvassa 8.

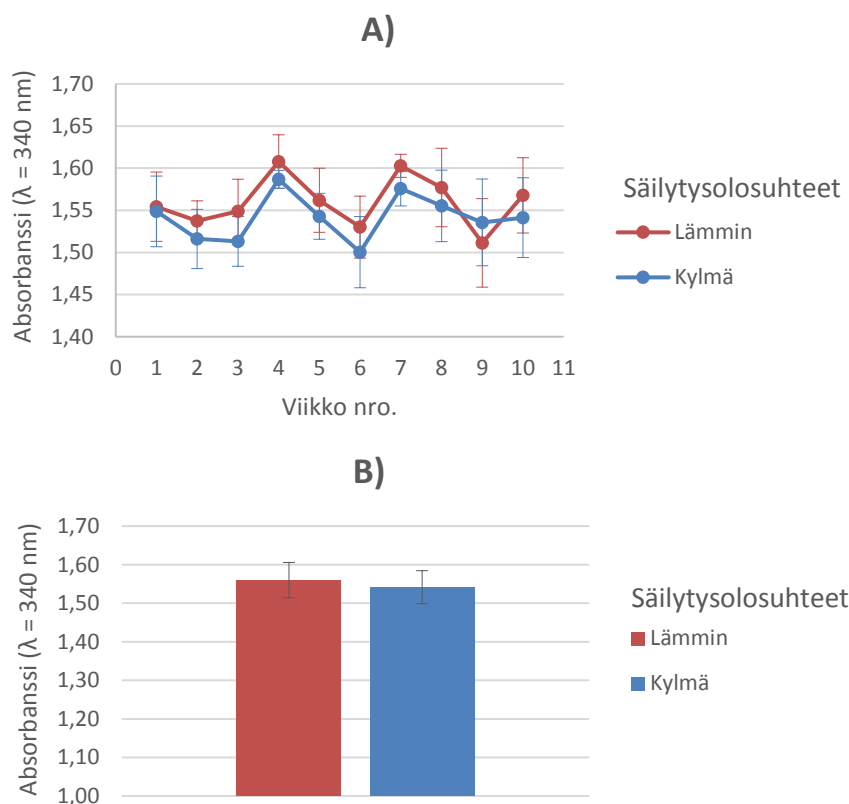


Kuva 8. Polyfenolinäytteiden maksimiabsorbanssit eri PEG-pitoisuuksilla mitattuna polyfenolinäytteiden pitoisuuden ollessa vakio. **A)** Maitohorsman raakauute (MH) ja **B)** maitohorsman Sephadex LH-20 -fraktio (MH F2). Absorbanssit mitattiin aallonpituudella 340 nm.

8.2. PEG:n stabiilisuusmittaukset

PEG-liuosten stabiilisuutta testattiin mittaamalla valikoidun PEG-polymeerin ja polyfenolinäytteen tuottamaa vastetta kymmenen viikon ajan. PEG-polymeerejä edustamaan valittiin PEG 12000. PEG:stä valmistettiin 1 mg/ml kantaliuos, joka jaettiin kahteen osaan. Liuosten stabiilisuutta vertailtiin säilyttämällä yhtä PEG-liuosta huoneenlämmössä (20 °C) ja toista liuosta kylmähuoneessa (4 °C). Kylmähuoneessa säilytetyn kantaliuoksen annettiin lämmetä huoneenlämpöön ennen mittausten suorittamista. Käytettäväksi näytteeksi valittiin MH, jonka havaittiin tuottavan PEG:n kanssa vahvan mittaussvasteen, joka erosi selvästi näytteen tausta-absorbanssista. Näytteestä valmistettiin 1 mg/ml kantaliuos, joka jaettiin kymmeneen osaan. Polyfenolinäytteet säilytettiin mittauksien välillä pakastimessa. Mittaukset tehtiin

aallonpituudella 340 nm käyttäen kuutta rinnakkaisnäytettä. Mittaustuloksena käytettiin tunnin kestäneen mittauksen maksimiabsorbanssia. Stabiilisuusmittausten tulokset on esitetty kuvassa 9.

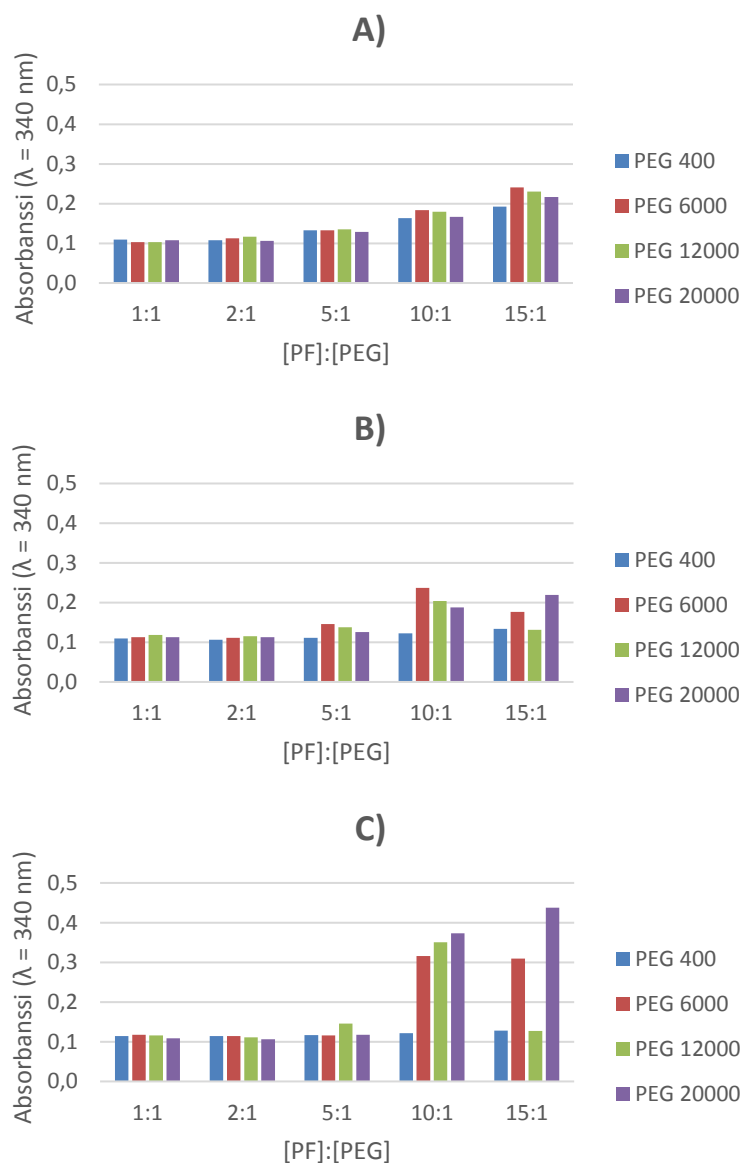


Kuva 9. Lämpimissä (20 °C) ja kylmissä (4 °C) olosuhteissa säilyttyjen PEG 12000 vesiliuosten aallonpituudella 340 nm mitattu vaste. Polyfenolinäytteenä käytettiin maitohorsman raakauutetta (MH). **A)** Viikoittaisten stabiilisuusmittausten tulokset ja **B)** kymmenen viikon mittauksen keskiarvot.

8.3. PEG-polymeerien vertailu

PEG-polymeerien välisen vertailun tavoitteena oli tutkia eri molekyyli massaisten PEG-polymeerien ja niiden pitoisuuksien vaikutusta liukenemattomien kompleksien muodostumiseen. Käytettävien näytteiden pitoisuudet pyrittiin valitsemaan kuoppalevymittauksissa siten, että mitattu vaste pysyisi mahdollisimman hyvin kuoppalevylukijan lineaarisella mitta-alueella luotettavien mittaustulosten tuottamiseksi. [PF]:[PEG] -suhteen vaikutusta mitattavaan vasteeseen tutkittiin erilaisilla [PF]:[PEG] -suhteilla pitämällä PEG-pitoisuus vakiona. Testattaviksi [PF]:[PEG] -pitoisuussuhteiksi valittiin 1:1, 2:1, 5:1, 10:1 ja 15:1. Näytteinä käytettyjen MH-,

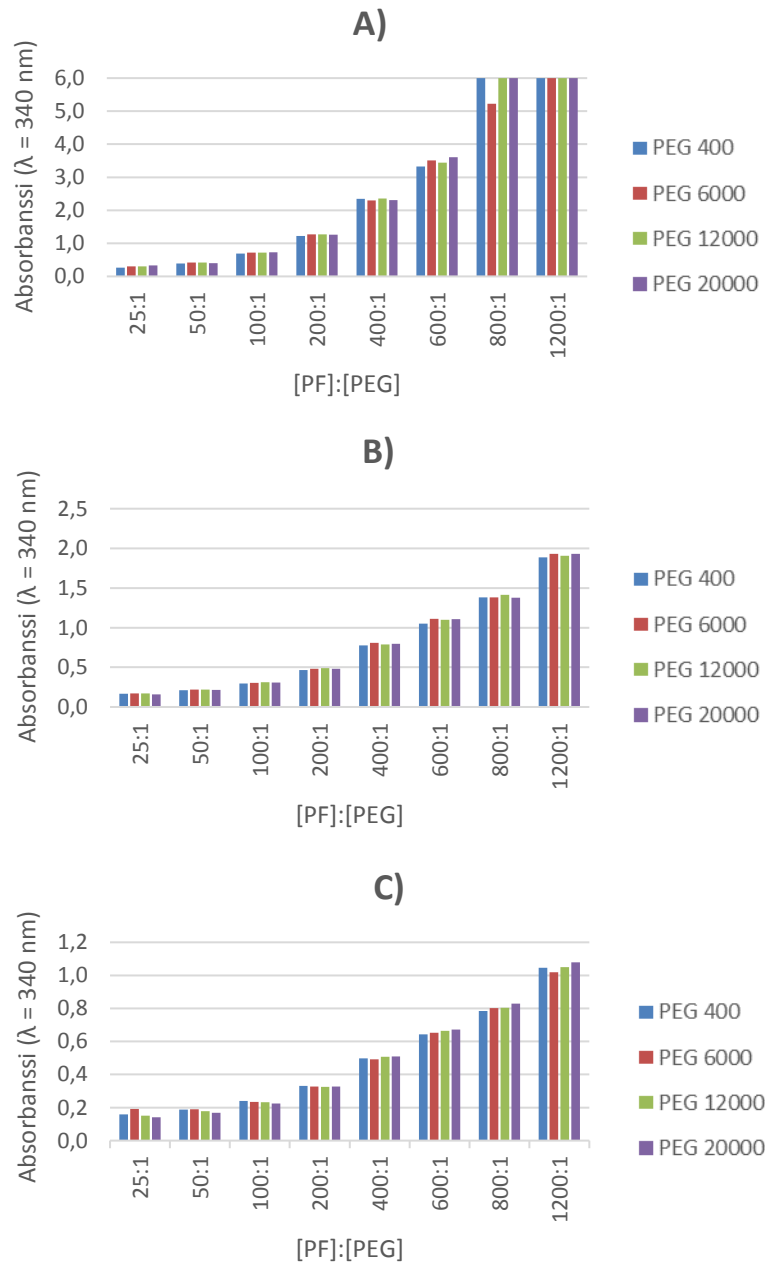
MH F2- ja OB-näytteiden pitoisuudet ja PEG-polymeerien pitoisuudet on esitetty liitteessä 8. Absorbanssit mitattiin aallonpituudella 340 nm ja mittausten tulokset on esitetty maksimiabsorbansseina. Mittaustulokset on esitetty kuvassa 10.



Kuva 10. Polyfenolinäytteiden eri [PF]:[PEG]-suhteilla aallonpituudella 340 nm mitatut maksimiabsorbanssit PEG-pitoisuuden ollessa vakio. **A)** Maitohorsman raakauute (MH), **B)** maitohorsman Sephadex LH-20 -fraktio (MH F2) ja **C)** oenothiini B (OB).

Edellistä pitoisuusvertailua täydennettiin tutkimalla absorbanssin käyttäytymistä suurilla [PF]:[PEG] -suhteilla säilyttämällä PEG-pitoisuus vakiona. Testattaviksi pitoisuussuhteiksi valittiin 25:1, 50:1, 100:1, 200:1, 600:1, 800:1 ja 1200:1. Näytteiden pitoisuudet on esitetty liitteessä 9. Kuoppalevymittauksessa käytetty mittausaallonpituus

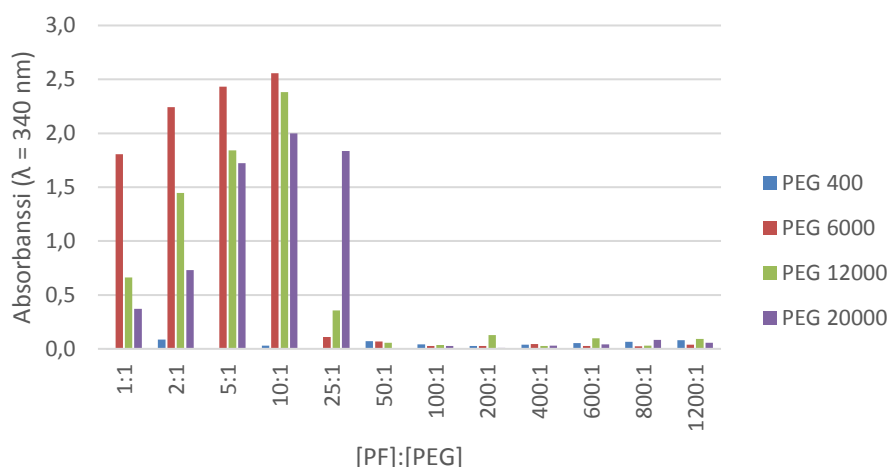
oli 340 nm ja mittausten tulokset on esitetty mittausten maksimiabsorbansseina. Mittaustulokset on esitetty kuvassa 11.



Kuva 11. Polyfenolinäytteiden tuottamat maksimiabsorbanssit suurilla [PF]:[PEG]-suhteilla PEG-pitoisuuden ollessa vakio. **A)** Maitohorsman raakauute (MH), **B)** maitohorsman Sephadex LH-20 -fraktio (MH F2) ja **C)** oenothiini B (OB). Absorbanssit mitattiin aallonpituudella 340 nm.

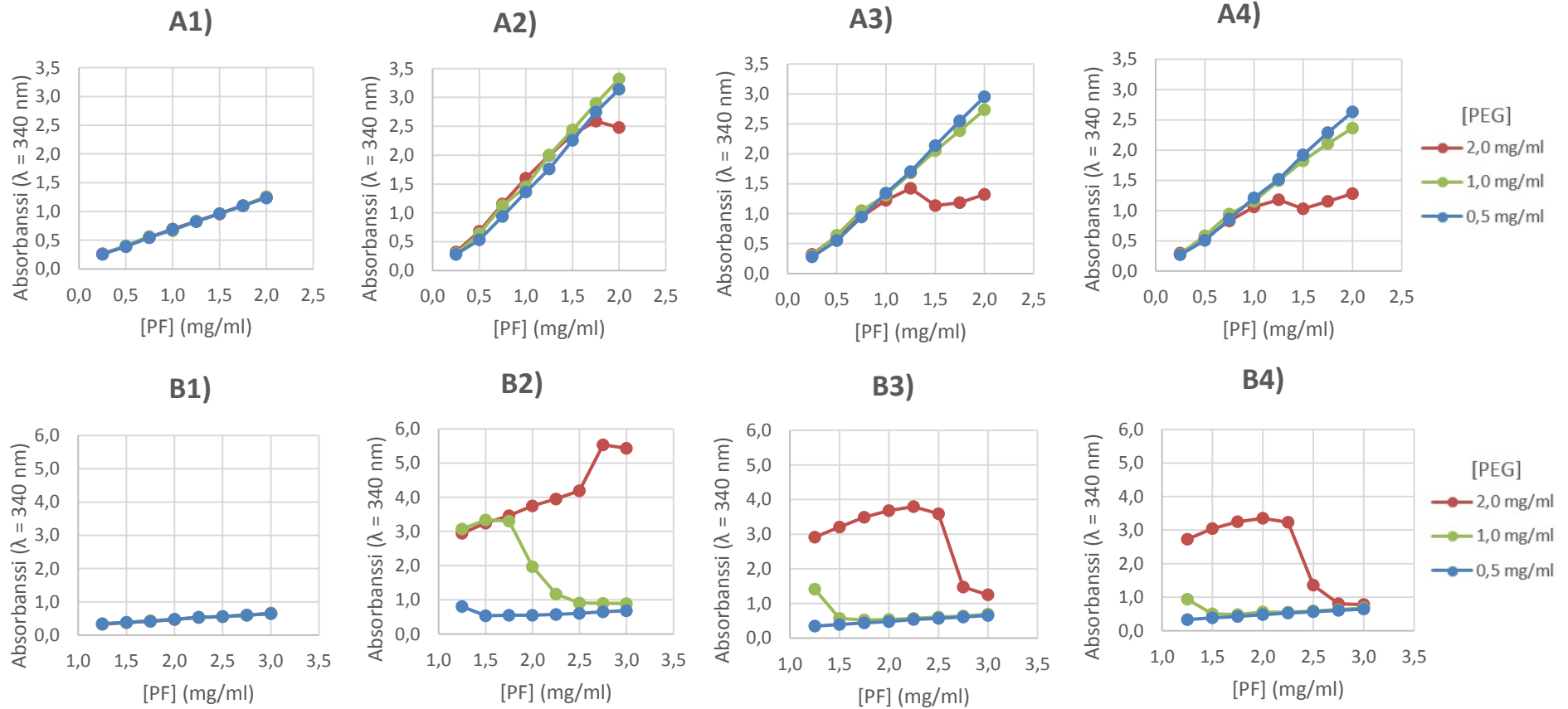
PEG-pitoisuuden vaikutusta polyfenolinäytteen kanssa mitattuun vasteeseen testattiin kiinnittämällä PF-pitoisuus tunnettuun vakioarvoon ja testaamalla eri [PF]:[PEG]-suhteita PEG-pitoisuutta muuttamalla. Tavoitteena oli löytää PEG-pitoisuus,

jolloin sitoutuminen tutkittavan näytteen kanssa olisi maksimissaan. Polyfenolinäytteeksi valittiin MH:n raakauute. Testattaviksi pitoisuussuhteiksi valittiin 1:1, 2:1, 5:1, 25:1, 50:1, 100:1, 200:1, 400:1, 600:1, 800:1 ja 1200:1. MH:n pitoisuus oli 2,00 mg/ml. Eri [PF]:[PEG] -suhteita vastaavat PEG-pitoisuudet on esitetty taulukossa 9. Absorbanssit mitattiin aallonpituudella 340 nm, ja mittaustuloksista vähennettiin näytteen tuottama tausta-absorbanssi. Mittaustulokset on esitetty mitattuina maksimiabsorbansseina kuvassa 12.

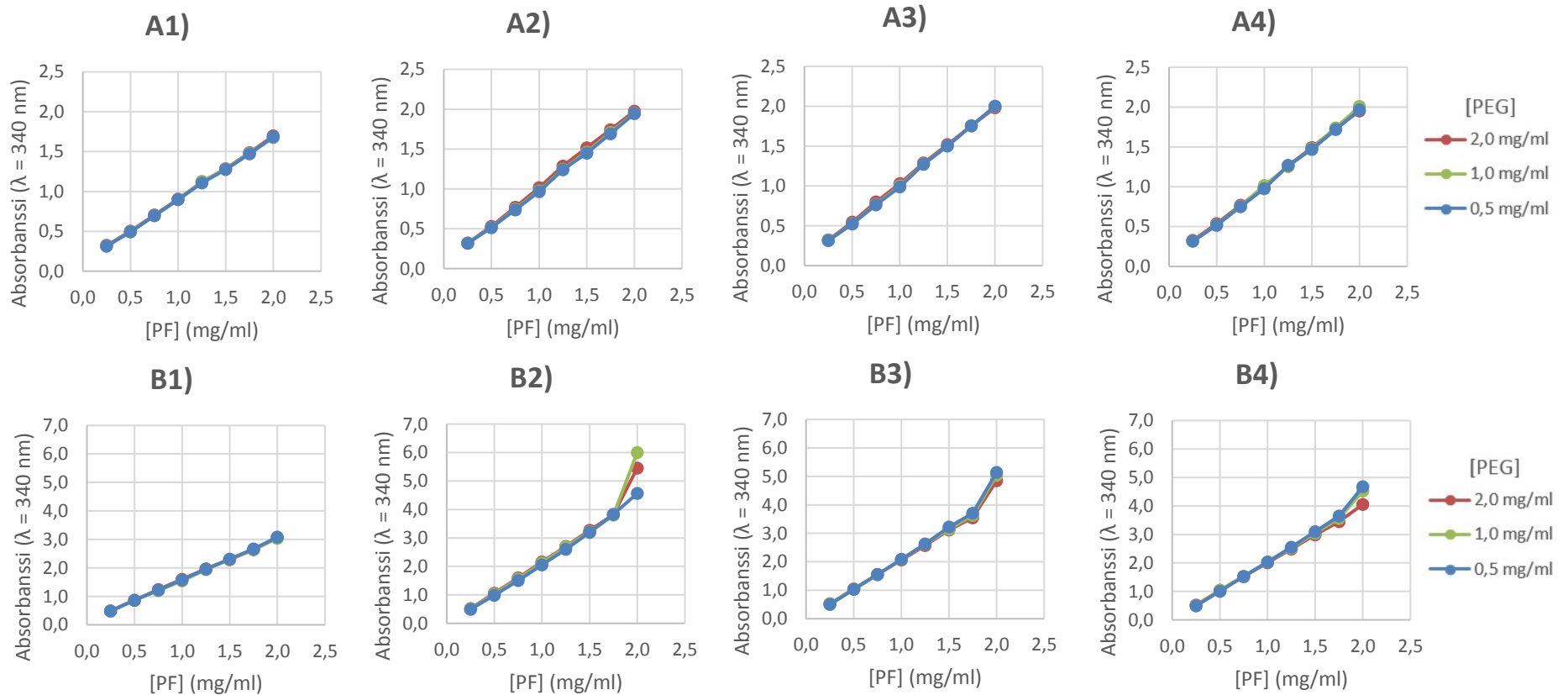


Kuva 12. Eri [PF]:[PEG] -suhteilla mitatut maksimiabsorbanssit PF-pitoisuuden ollessa vakio. Näytteenä käytettiin maitohorsman raakauutetta (MH). Absorbanssit mitattiin aallonpituudella 340 nm.

PEG-polymeerien välistä vertailua jatkettiin PEG-pitoisuuksilla 0,5; 1,0; ja 2,0 mg/ml, joiden välillä edellisen testin perusteella arvioitiin PEG:n saavutettavan maksimaalisen sitoutumiskapasiteettinsa. Näytteiksi valittiin MH, MH F2, PAA3 ja PAA17. Näytteiden pitoisuudet on esitetty liitteessä 10. Mittauksessa näytteiden absorbanssia seurattiin kuoppalevylukijalla tunnin ajan, minkä jälkeen mittausten maksimiabsorbanssit sovitettiin kuvaajaan niitä vastaavien PF-pitoisuuksien funktiona. Absorbanssit mitattiin aallonpituudella 340 nm. Mittausten tulokset on esitetty kuvissa 13 ja 14.



Kuva 13. Polyfenolinäytteiden ja PEG-polymeerien välisen vuorovaikutuksen maksimiabsorbanssit mitattuna kolmella eri PEG-pitoisuudella. **A)** Maitohorsma (MH) ja **B)** maitohorsman Sephadex LH-20 -fraktio (MH F2). **1)** PEG 400, **2)** PEG 6000, **3)** PEG 12000 ja **4)** PEG 20000. PF = polyfenoli.

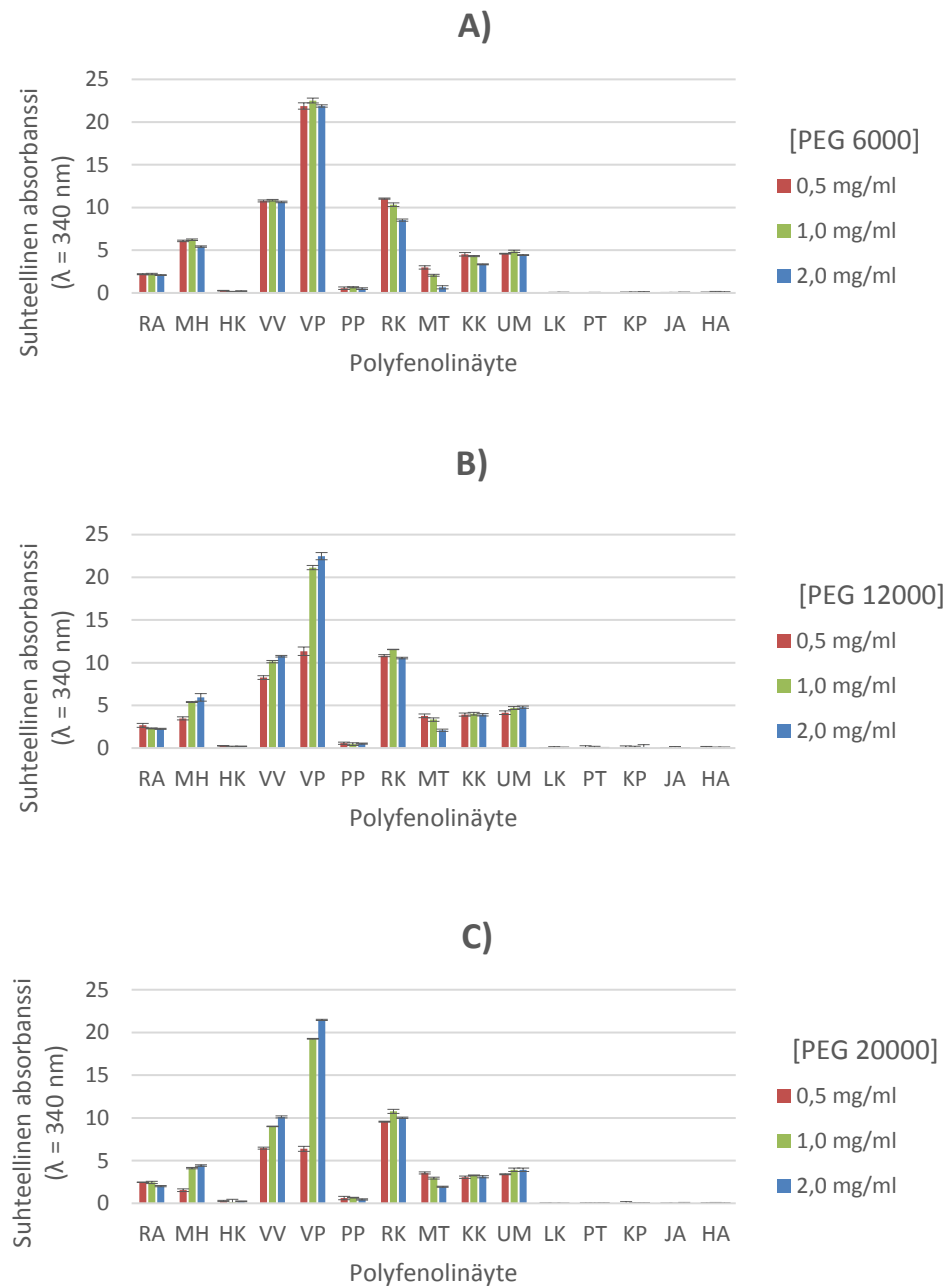


Kuva 14. Polyfenolinäytteiden ja PEG-polymeerien välisen vuorovaikutuksen maksimiabsorbanssit mitattuna kolmella eri PEG-pitoisuudella. **A)** Kiiltolehtipajun (PAA3) ja **B)** kuningasatsalean (PAA17) Sephadex LH-20 -fraktiot. **1)** PEG 400, **2)** PEG 6000, **3)** PEG 12000 ja **4)** PEG 20000. PF = polyfenoli.

Edellistä testiä laajennettiin vertailemalla PEG-polymeerejä käyttämällä näytteinä 15 kasvilajin kvantitatiivisesti uutettuja raakauutteita. Vertailtaviksi PEG-polymeereiksi valittiin PEG 6000, PEG 120000 ja PEG 20000. Testissä vertailut PEG-pitoisuudet olivat 0,5; 1,0 ja 2,0 mg/ml. Kasviuutteet laimennettiin ultrapuhtaalla vedellä alkuperäisistä kvantitatiivisesti uutetuista näytteistä (7.3.1) siten, että niistä mitattu absorbanssi ei ylittänyt kuoppalevylukijan luotettavuusrajaa. Kasviuutekohtaiset laimennoskertoimet on esitetty taulukossa 11. Mitatusta maksimiabsorbanssista vähennettiin kasviuutteiden tuottama tausta-absorbanssi, minkä jälkeen absorbanssit kerrottiin näytekohtaisella laimennoskertoimella, jotta eri kasviuutteiden mittaustulokset olivat vertailukelpoisia keskenään. Mittaustulos ilmoitettiin suhteellisena absorbanssina, joka on esitetty kolmen rinnakkaisnäytteen keskiarvona. Mittaukset tehtiin aallonpituudella 340 nm ja mittausten tulokset on esitetty kuvassa 15.

Taulukko 5. Polyfenolinäytteinä käytetyt kasviuutteet ja niiden alkuperäisistä uutteista (7.3.1) valmistettujen näytteiden laimennoskertoimet.

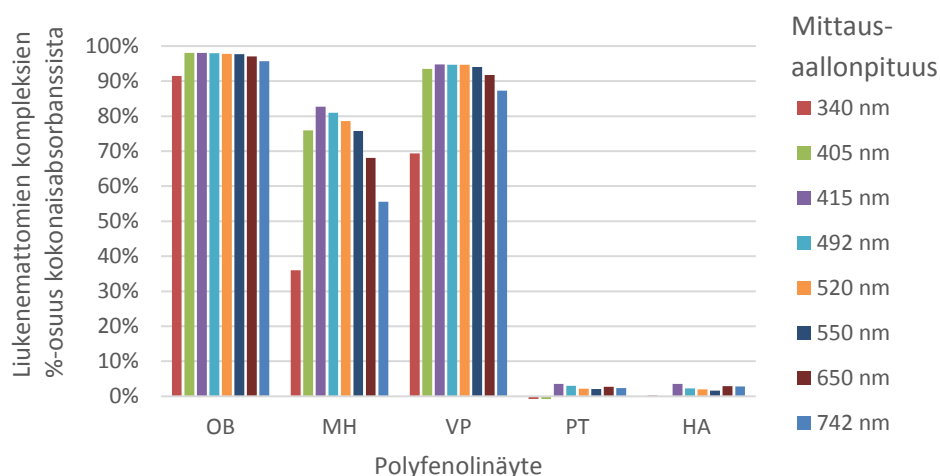
Polyfenolinäyte	Laimennos- kerroin
Ranta-alpi (RA)	5
Maitohorsma (MH)	5
Hieskoivu (HK)	5
Vaahtera (vihreä, VV)	5
Vaahtera (punainen, VP)	10
Paju (PP)	10
Rantakukka (RK)	5
Metsätammi (MT)	5
Kyläkellukka (KK)	5
Ukkomansikka (UM)	5
Lehtokuusama (LK)	5
Peltotaskuruoho (PT)	5
Käärmeenpistoyrtti (KP)	5
Jalava (JA)	5
Haapa (HA)	5



Kuva 15. Testeissä käytettyjen polyfenolinäytteiden lyhenteet ja niiden suhteellinen absorbanssi mitattuna aallonpituudella 340 nm. PEG-polymeerit **A)** PEG 6000, **B)** PEG 12000 ja **C)** PEG 20000.

8.4. Mittausaallonpituuksien vertailu

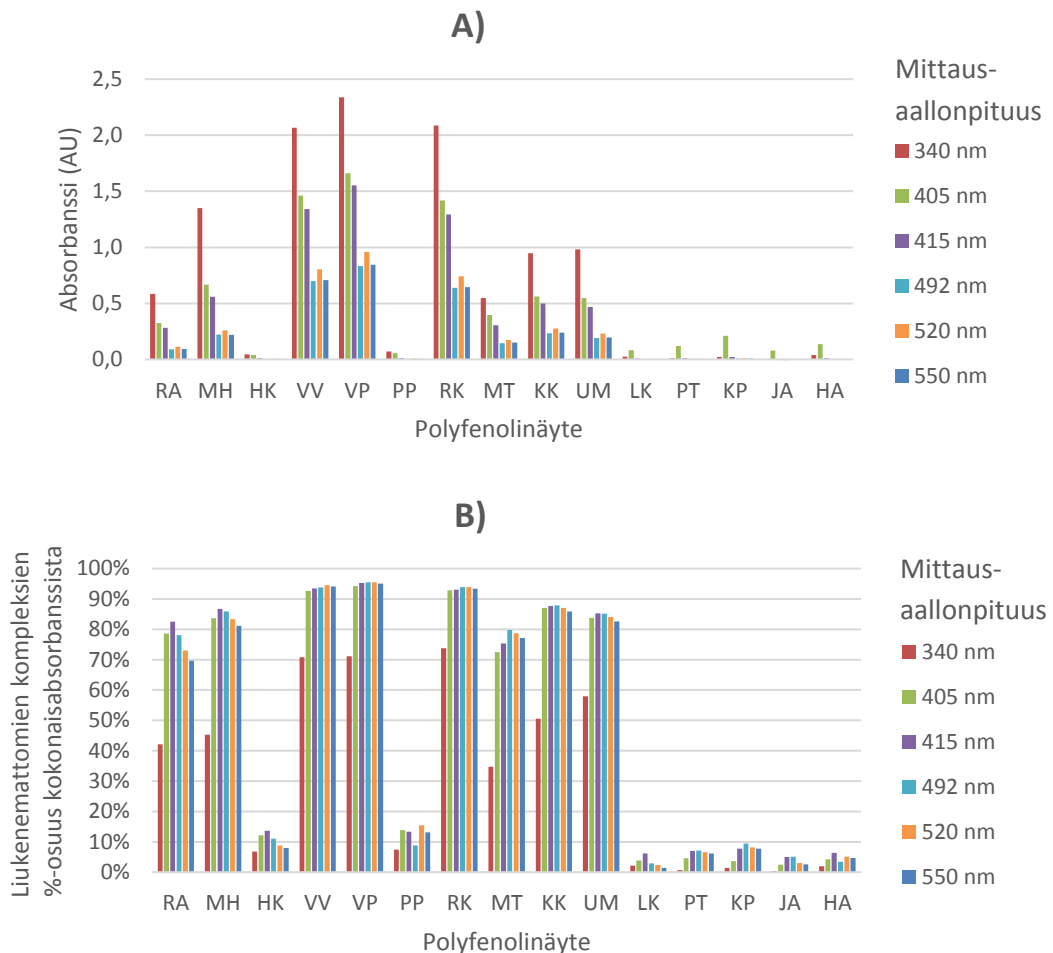
Lopullisessa menetelmässä käytettävien mittausaallonpituuksien vertailu aloitettiin tutkimalla viiden valikoidun näytteen tuottamaa absorbanssia kaikilla kahdeksalla kuoppalevylukijaan asennetuilla mittausaallonpituuksilla käyttäen makromolekyylinä PEG 6000:ta. Tarkoituksena oli kartoittaa, miten eri mittausaallonpituudet vaikuttivat muodostuvista liukenemattomista komplekseista mitattuun vasteeseen, ja löytää eri vaihtoehdoista se, joka soveltuisi parhaiten polyfenolisten näytteiden vasteen mittaamiseen. Tutkitut mittausaallonpituudet olivat 340 nm, 405 nm, 415 nm, 492 nm, 520 nm, 550 nm, 650 nm ja 742 nm. Käytetty PEG-pitoisuus oli 1 mg/ml. Näytteiksi valittiin OB, MH, VP, PT ja HA edustamaan erilaisia näytteiden yhdistekoostumuksia. OB-pitoisuus oli 1 mg/ml. Kvantitatiivisesti uutetuista MH-, VP-, PT- ja HA-uutteista valmistettiin testiin taulukon 5. mukaiset vesilaimennokset. Näytteiden tuottama taustaabsorbanssi mitattiin ennen PEG:n lisäystä erikseen, jotta saatiin selvitettyä liukenemattomien kompleksien osuus mitatusta vasteesta. Testin tulokset ilmoitettiin makromolekyylin ja eri näytteiden muodostamien liukenemattomien kompleksien prosentuaalisena osuutena kokonaisabsorbanssista kaikilla eri mittausaallonpituuksilla. Testin tulokset on esitetty kuvassa 16.



Kuva 16. Polyfenolinäytteiden ja PEG 6000:n muodostamien liukenemattomien kompleksien prosentuaalinen osuus mitatusta kokonaisabsorbanssista eri mittausaallonpituuksilla.

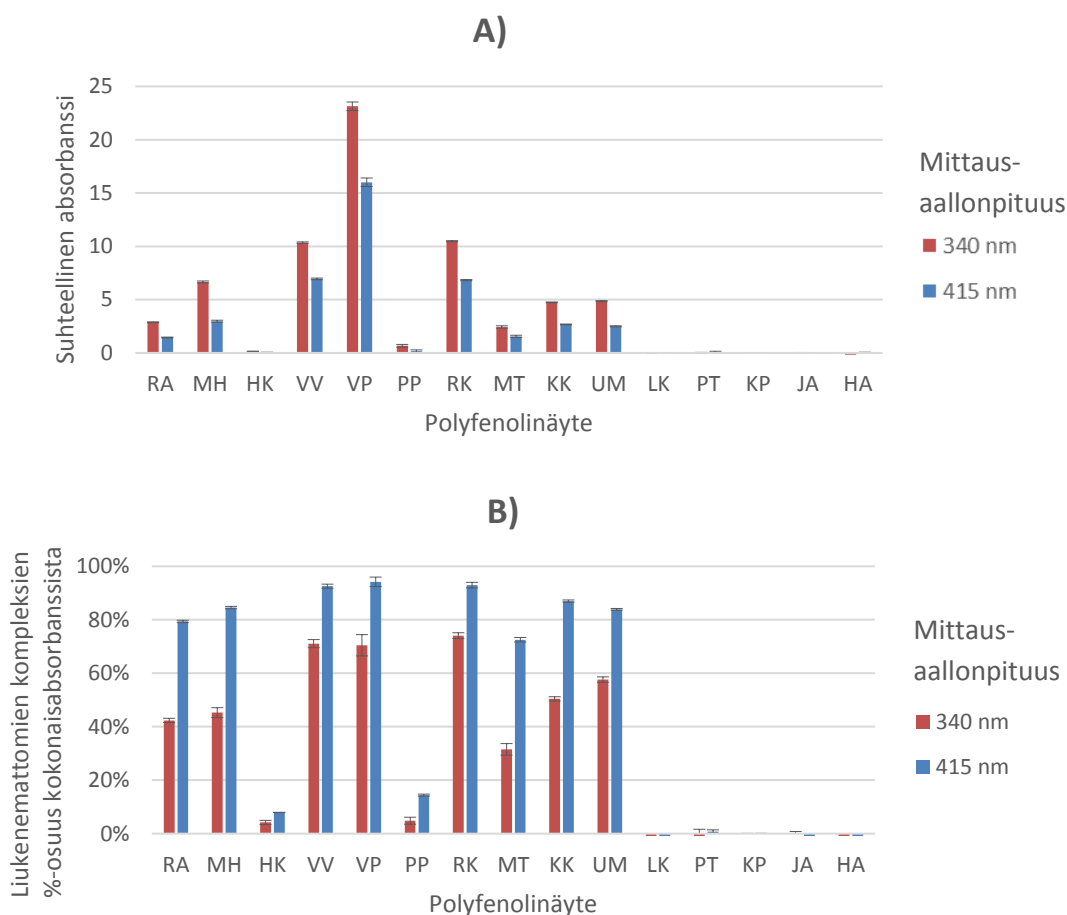
Mittausaallonpituuden optimointia jatkettiin laajentamalla tutkittavaa näytekirjoa ja rajaamalla testistä pois selvästi käyttökelvottomimmat mittausaallonpituudet. Näytteinä käytettiin 15 kasviuutetta, jotka laimennettiin taulukon 5. mukaisesti. Näytteiden maksimiabsorbanssia ja muodostuneiden liukenemattomien kompleksien prosentuaalista osuutta kokonaisabsorbanssista mitattiin kuudella eri aallonpituudella käyttämällä kompleksoivana makromolekyylinä PEG 6000:a. Käytetty PEG-pitoisuus oli 1 mg/ml. Mitattavat aallonpituudet olivat 340 nm, 405 nm, 415 nm, 492 nm, 520 nm ja 550 nm. Mittauksissa käytettiin kolmea rinnakkaisnäytettä ja tulokset on esitetty niiden keskiarvona. Mitatuista maksimiabsorbansseista on vähennetty kasviuutteiden värin tuottama tausta-absorbanssi. Testin tulokset on esitetty kuvassa 17.

Kuva 17. Testissä käytettyjen näytteiden lyhenteet ja niiden PEG 6000:n kanssa



tuottamat vasteet eri aallonpituuksilla mitattuina. **A)** Mitattu maksimiabsorbanssi ja **B)** muodostuneiden liukenemattomien kompleksien prosentuaalinen osuus mitatusta kokonaisabsorbanssista.

Lopulliseen vertailuun valittiin aallonpituudet 340 nm ja 415 nm. Vertailussa tutkittiin rinnakkain näiden kahden aallonpituuden tuloksia. Vertailtavat mittaustulokset olivat muodostuvien liukenemattomien kompleksien absorbanssin osuus kokonaisabsorbanssista ja lisäksi näytteiden tuottama suhteellinen absorbanssi, joka saatiin kertomalla mitattu maksimiabsorbanssi näytekohtaisella laimennoskertoimella. Käytetty PEG 6000 -pitoisuus oli 1 mg/ml. Mittauksissa käytetyt näytteet ja niiden laimennoskertoimet on esitetty edellä taulukossa 5. Mittausten tulokset on esitetty kolmen rinnakkaisnäytteen keskiarvona. Tulokset on esitetty kuvissa 18.

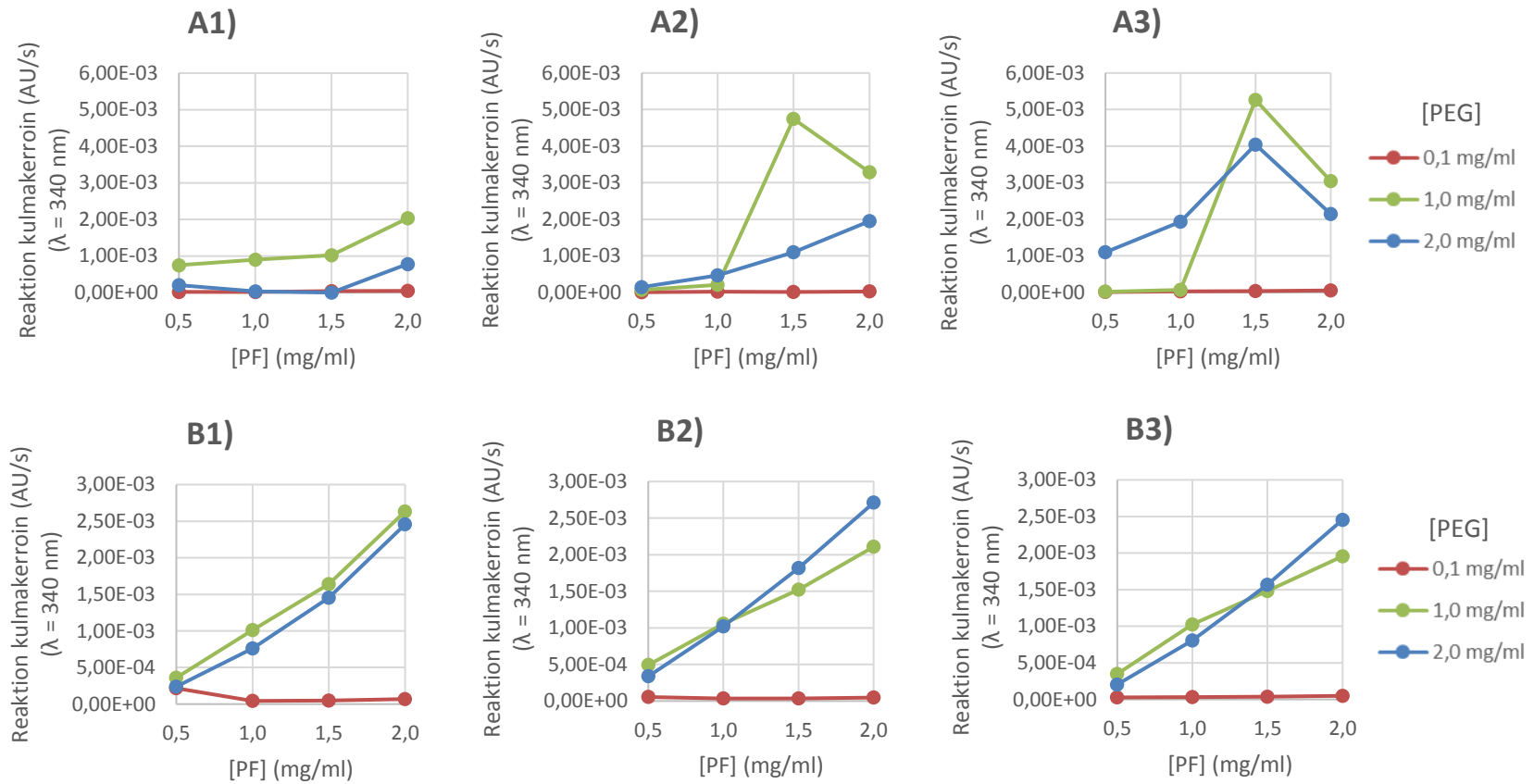


Kuva 18. Testissä käytetyt polyfenolinäytteet, niiden **A)** mitatut suhteelliset absorbanssit ja **B)** muodostuneiden liukenemattomien kompleksien prosentuaalinen osuus mitatusta kokonaisabsorbanssista. Mittaustulokset mitattiin aallonpituuksilla 340 nm ja 415 nm.

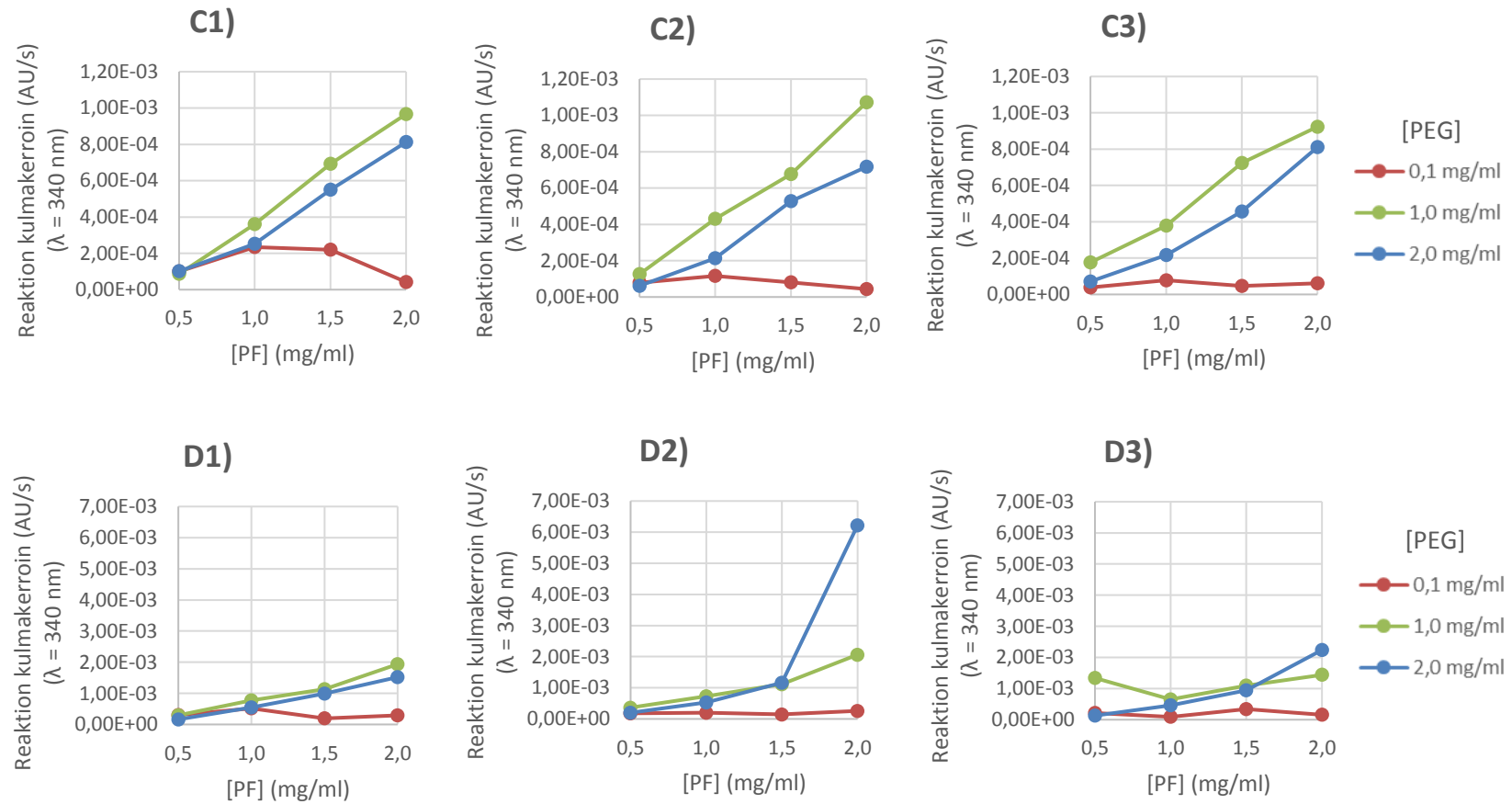
8.5. Kinetiikkamittauksen parametrien optimointi

Kinetiikkamittauksen optimoinnissa tarkasteltiin maksimiabsorbanssin sijaan näytteiden absorbanssin muutosta ajan funktiona. Kinetiikkamittausten parametrien optimoinnin aluksi tutkittiin maksimiabsorbanssin mittaamiseen optimoitujen parametrien soveltuvuus kinetiikkamittauksiin, jotta parametreilla olisi käytännöllisistä syistä mahdollista suorittaa samanaikaisesti kinetiikkamittauksia samanaikaisesti maksimiabsorbanssin mittaamisen kanssa. Tämän vuoksi mittauksissa vertailtiin aluksi uudestaan PEG-polymeerejä 6000, 12000 ja 20000.

Kinetiikkamittausten näytteiksi valittiin OB, MH, PAA3 ja PAA17 edustamaan erilaisia näytteitä puhtasaine-, raakauute- ja fraktiotasolla. Näytteiden pitoisuudet olivat 0,5; 1,0; 1,5 ja 2,0 mg/ml. Käytetyt PEG-pitoisuudet olivat 0,1; 1,0 ja 2,0 mg/ml. Kinetiikkamittaukset tehtiin mittaamalla reaktion absorbanssi aluksi aallonpituudella 340 nm minuutin välein tunnin ajan, ja reaktiolle laskettiin eri pitoisuuksissa maksimikulmakerroin. Maksimikulmakerroin laskettiin käyttäen kolmea peräkkäistä mittauspistettä. Testien tulokset on esitetty kuvissa 19 ja 20 eri PEG-pitoisuuksien välisenä vertailuna.

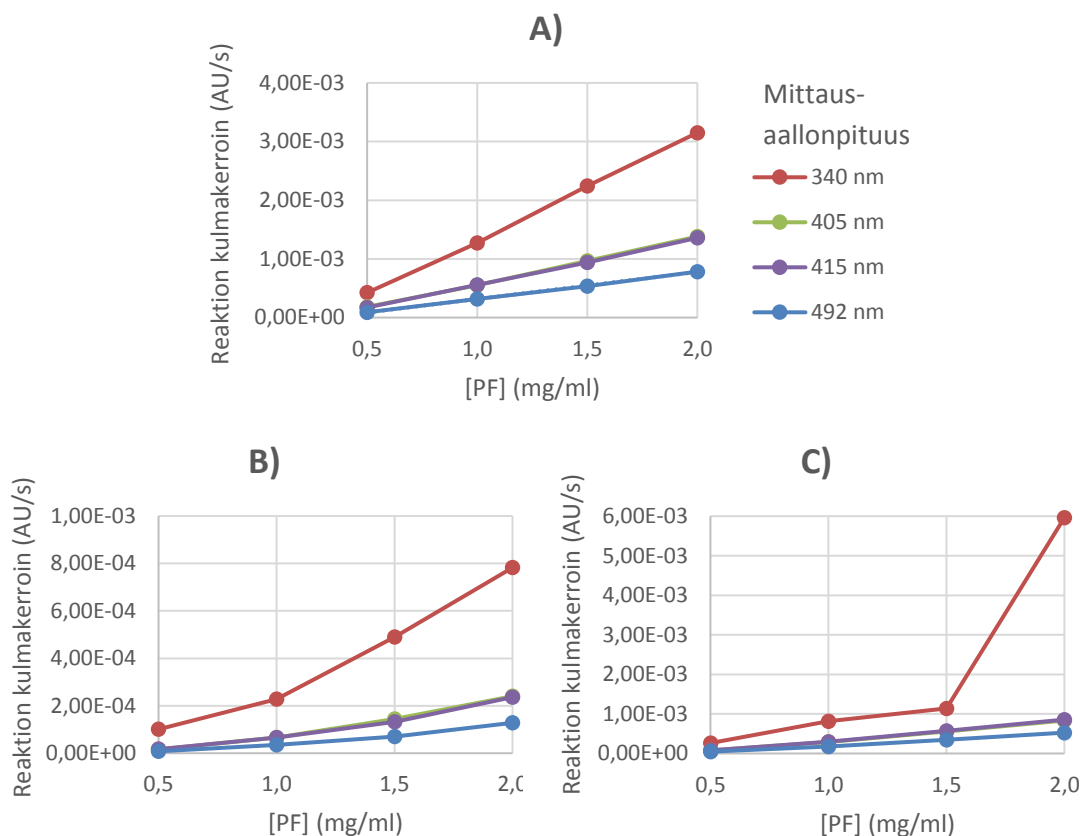


Kuva 19. Polyfenolinäytteiden reaktion kulmakertoimet mitattuna eri PEG-polymeerillä kolmessa eri PEG-pitoisuudessa aallonpituudella 340 nm. **A)** Oenotheini B (OB) ja **B)** maitohorsman raakauute (MH). **1)** PEG 6000, **2)** PEG 12000 ja **3)** PEG 20000. PF = polyfenoli.

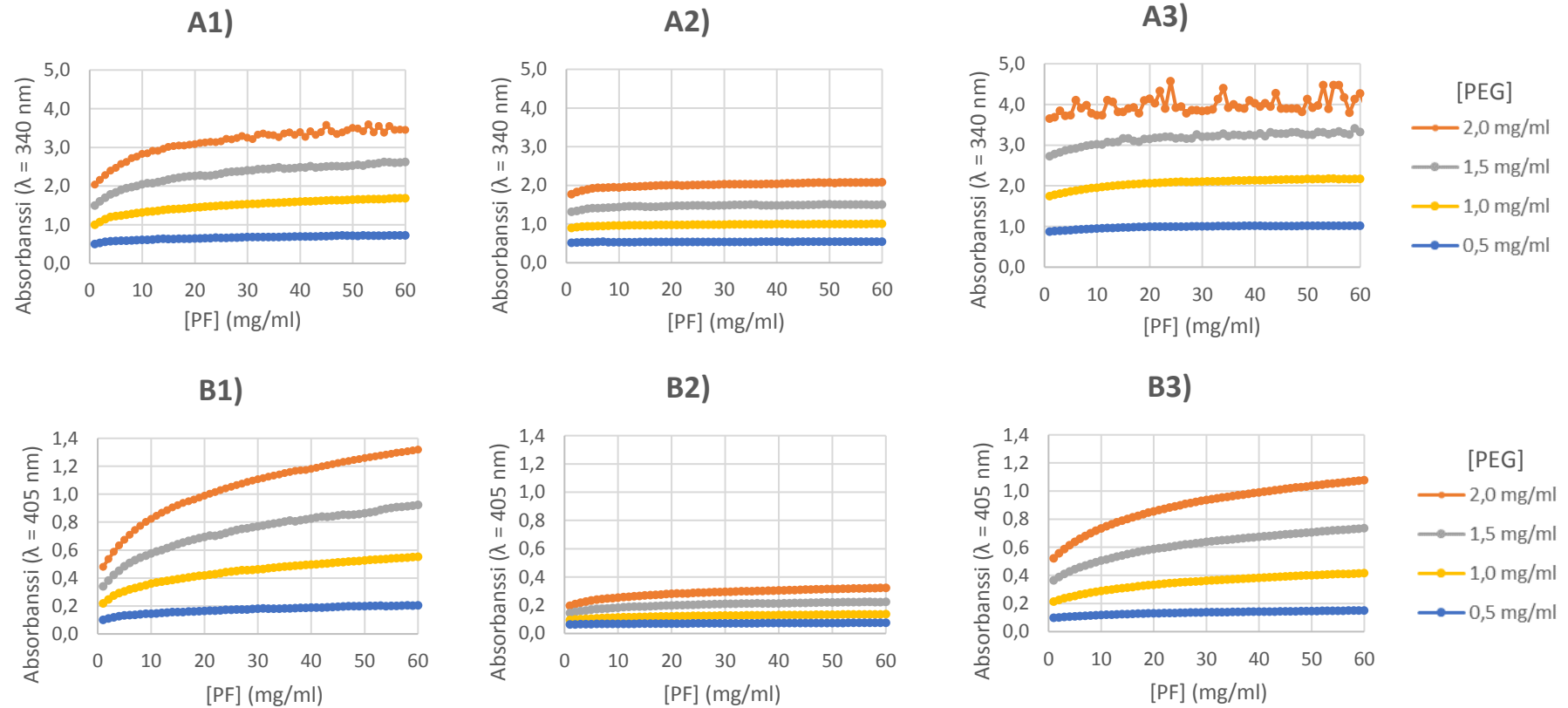


Kuva 20. Polyfenolinäytteiden reaktion kulmakertoimet mitattuna eri PEG-polymeerillä kolmessa eri PEG-pitoisuudessa aallonpituudella 340 nm. **C)** Kiiltolehtipajun (PAA3) ja **D)** kuningasatsalean (PAA17) Sephadex LH-20 -fraktio. **1)** PEG 6000, **2)** PEG 12000 ja **3)** PEG 20000. PF = polyfenoli.

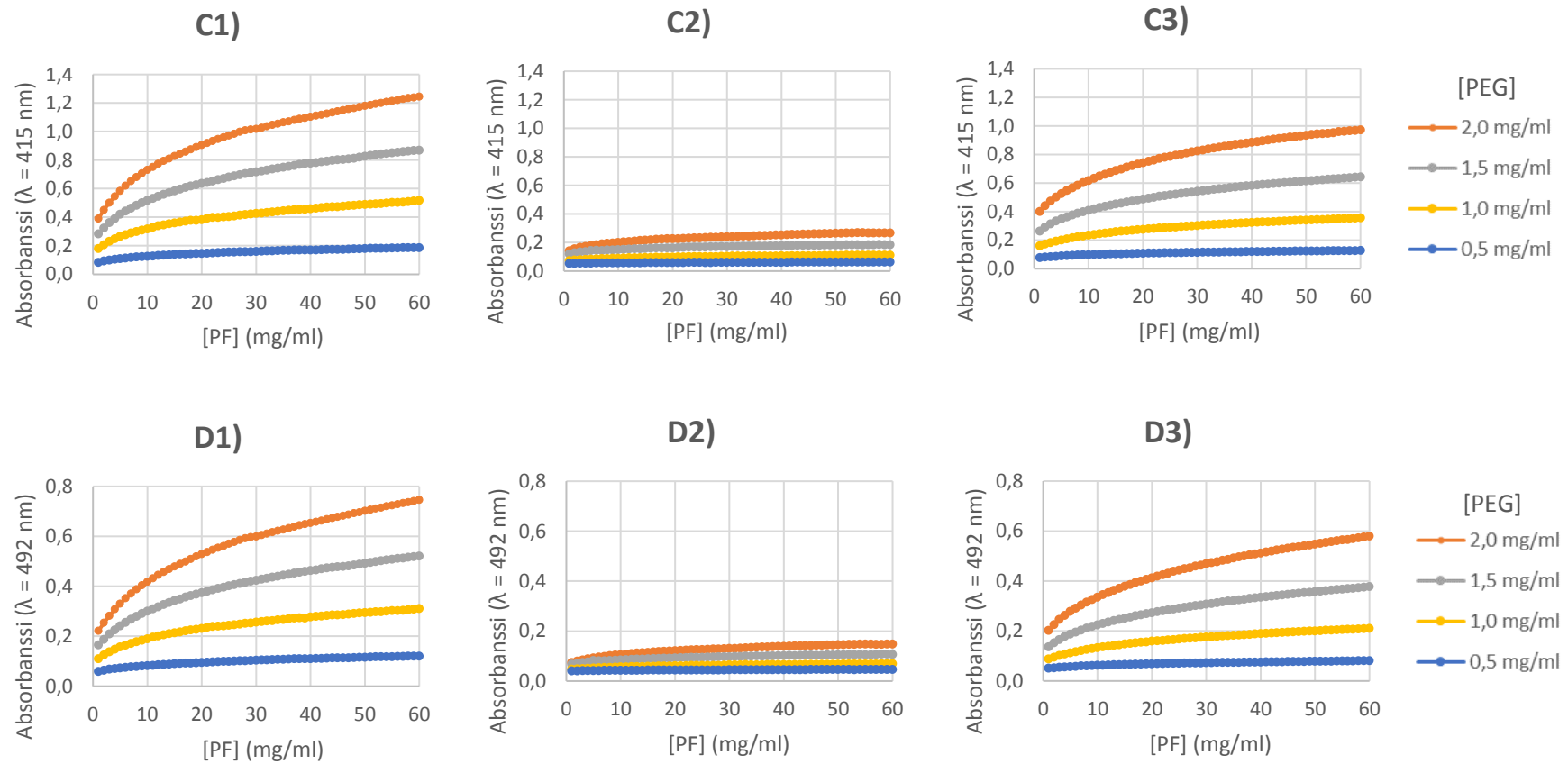
Edeltävää testiä täydennettiin tutkimalla näytteiden kinetiikkaprofiileja tarkemmin neljällä eri aallonpituudella käyttäen kompleksoivana makromolekyylinä PEG 6000:ta kahdessa eri pitoisuudessa. Mitattaviksi aallonpituuksiksi valittiin 340, 405, 415 ja 492 nm. Tutkittaviksi näytteiksi valittiin MH, PAA3 ja PAA17. Näytteiden pitoisuudet olivat 0,5; 1,0; 1,5 ja 2,0 mg/ml. Käytetty PEG-pitoisuus oli 1,0 mg/ml. Testissä oli tarkoituksena havainnollistaa absorbanssin käyttäytymistä koko mittausvälillä mittaamalla näytteiden absorbanssia minuutin välein tunnin ajan. Muodostuvista kinetiikkakäyristä pystyttiin visuaalisesti havainnollistamaan liukenemattomien kompleksien muodostumisen nopeutta eri PF-pitoisuuksissa. Kinetiikkakuvaajien lisäksi kaikille neljälle eri PF-pitoisuudelle laskettiin reaktion maksimaalinen kulmakerroin eri pitoisuuksissa kolmen peräkkäisen pisteen avulla. Mittaustulokset on esitetty kuvassa 21 reaktion kulmakertoimen ja näytteiden pitoisuuden välisenä funktiona neljällä eri aallonpituudella mitattuna. Kuvissa 22 ja 23 on esitetty kinetiikkamittausten mittausprofiilit eri aallonpituuksilla neljällä eri PEG-pitoisuudella mitattuna.



Kuva 21. Polyfenolinäytteiden kinetiikan kulmakertoimia vertailtiin eri pitoisuuksissa neljällä eri aallonpituudella [PEG 6000] ollessa vakio. **A)** Maitohorsman raakauute (MH), **B)** kiiltolehtipajun (PAA3) ja **C)** kuningasatsalean (PAA17) Sephadex LH-20 -fraktiot. PF = polyfenoli.



Kuva 22. Polyfenolinäytteiden kinetiikkaprofiilin vertailu PEG 6000:lla, kahdella eri mittausaallonpituudella neljässä eri pitoisuudessa. **A)** 340 nm ja **B)** 405 nm. **1)** Maitohorsman raakauute (MH), **2)** kiiltolehtipajun (PAA3) ja **3)** kuningasatsalean (PAA17) Sephadex LH-20 -fraktiot.



Kuva 23. Polyfenolinäytteiden kinetiikkaprofilin vertailu PEG 6000:lla, kahdella eri mittausaallonpituudella neljässä eri pitoisuudessa. **A)** 415 nm ja **B)** 492 nm. **1)** Maitohorsman raakauute (MH), **2)** kiiltolehtipajun (PAA3) ja **3)** kuningasatsalean (PAA17) Sephadex LH-20 -fraktiot.

8.6. Optimoitujen mittausparametrien testaaminen

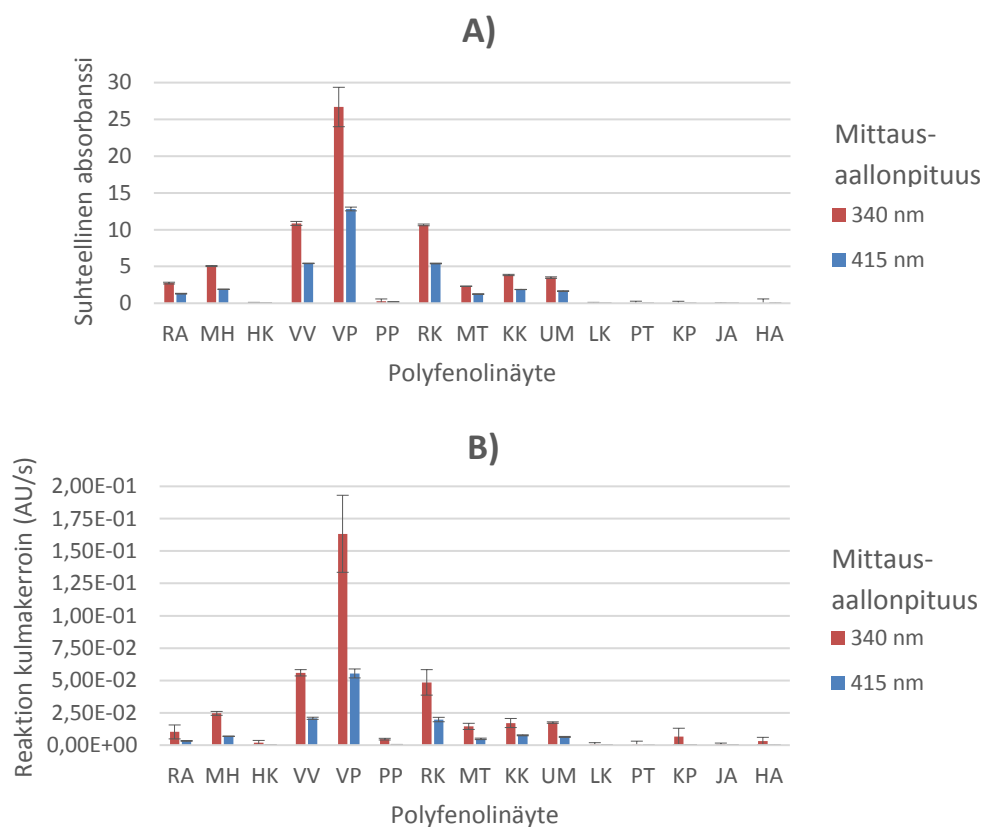
Kuoppalevymenetelmän lopullisia parametreja testattiin kvantitatiivisesti uutetuilla kasviuutteilla, joista valmistettujen laimennosten laimennoskertoimet on esitetty taulukossa 5. Menetelmässä käytetyn PEG 6000:n pitoisuus oli 1 mg/ml ja mitattavat aallonpituudet olivat 340 nm ja 415 nm. Eri aallonpituuksilla saatuja tuloksia vertailtiin keskenään. Mittaukset tehtiin 20 sekunnin välein tunnin ajan. Kinetiikkamittauksissa reaktionopeuden maksimaalinen kulmakerroin laskettiin kolmen peräkkäisen pisteen avulla. PEG-mittausten tulokset on esitetty kolmen rinnakkaisnäytteen keskiarvona taulukossa 6. Eri aallonpituuksien välisen vertailun tulokset on esitetty kuvassa 24. Mittausten tuloksia verrattiin UPLC-MS/MS:llä tehtyihin kasviuutteiden polyfenolisten komponenttien kvantitointituloksiin, joiden perusteella pyrittiin tekemään johtopäätöksiä siitä, minkälaisia polyfenolisia komponentteja sisältävät näytteet aiheuttivat PEG:llä suurimman vasteen. Kasviuutteiden polyfenolisten komponenttien kvantitointitulokset on esitetty taulukossa 7.

Taulukko 6. Lopullisilla mittausparametreilla mitatut suhteelliset absorbanssit (suht abs.) ja kinetiikkamittauksen maksimaaliset kulmakertoimet (max kk.) aallonpituuksilla 340 nm ja 415 nm. Vihreä väri merkitsee muihin tuloksiin verrattuna suurta arvoa ja punainen väri pientä arvoa.

	PEG 6000 340 nm suht abs.	PEG 6000 340 nm max kk.	PEG 6000 415 nm suht abs.	PEG 6000 415 nm max kk.
RA	2,74	1,02E-02	1,30	3,27E-03
MH	5,06	2,46E-02	1,90	6,88E-03
HK	0,08	1,93E-03	0,02	2,36E-04
VV	10,86	5,59E-02	5,42	2,08E-02
VP	26,68	1,63E-01	12,82	5,54E-02
PP	0,27	4,62E-03	0,16	3,34E-04
RK	10,65	4,85E-02	5,40	1,98E-02
MT	2,31	1,45E-02	1,25	4,86E-03
KK	3,84	1,71E-02	1,87	7,61E-03
UM	3,49	1,74E-02	1,65	6,34E-03
LK	0,00	6,60E-04	0,00	1,76E-04
PT	0,00	4,82E-04	0,00	0,00E+00
KP	0,00	6,72E-03	0,00	3,71E-04
JA	0,00	7,60E-04	0,00	1,45E-04
HA	0,00	3,19E-03	0,00	3,63E-05

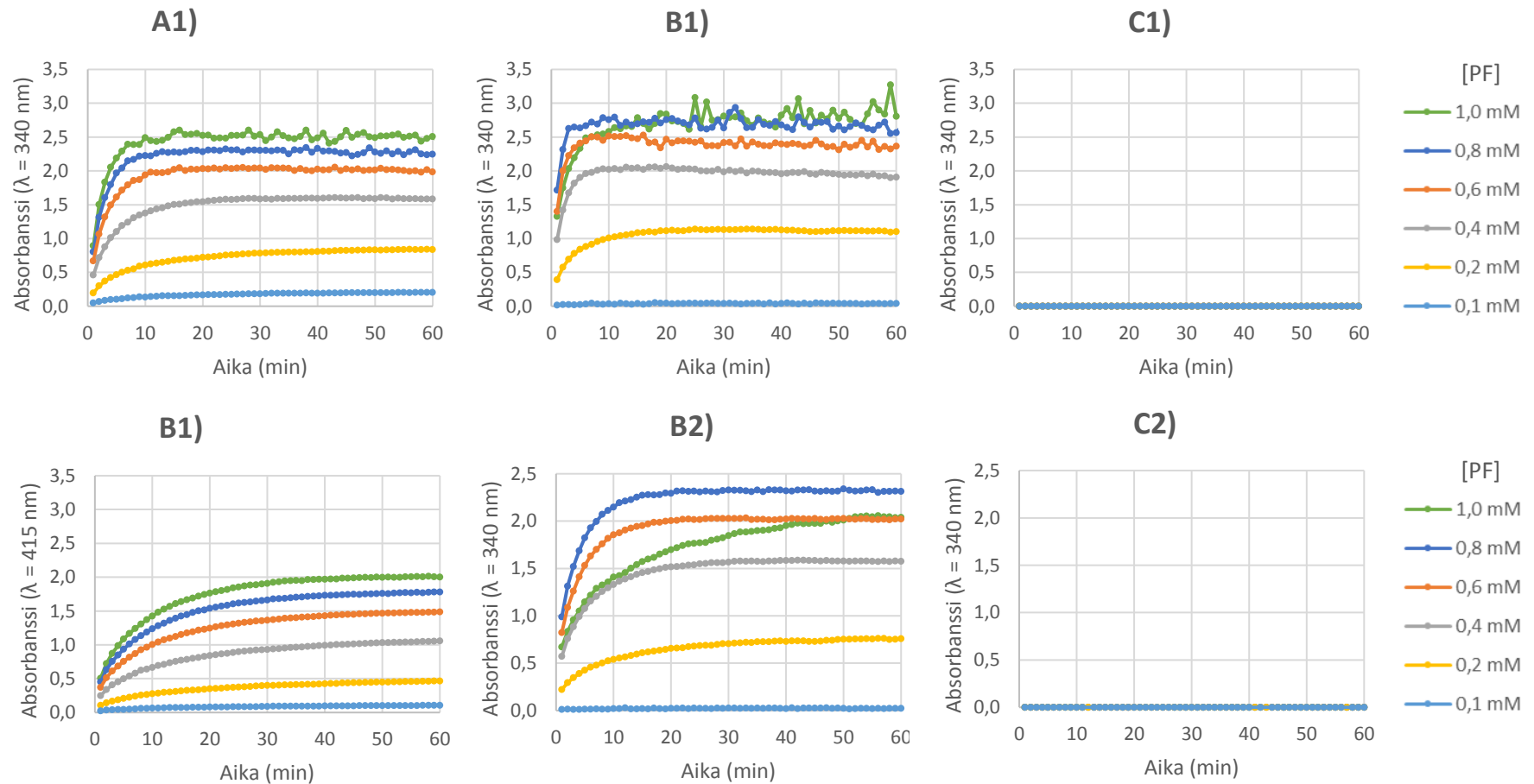
Taulukko 7. Kasviuutteiden polyfenolisten komponenttien kvantitoinnin tulokset. Vihreä väri merkitsee kasviuutteen muihin komponentteihin suhteessa suurta ja punainen väri pientä arvoa. Kokonaispitoisuudessa polyfenolisten komponenttien summa on esitetty vertailuna eri kasviuutteiden välillä. Vihreä väri merkitsee muihin kasviuutteisiin verrattuna suurta ja punainen väri pientä arvoa.

	Galloyyli (mg/g)	HHDP (mg/g)	Kviini- happo (mg/g)	Kemferoli (mg/g)	Kversetiini (mg/g)	Myrisetiini (mg/g)	Katekiini (mg/g)	Gallo- katekiini (mg/g)	mDP	Kokonais- pitoisuus (mg/g)
HK	1,10	1,58	2,04	2,82	2,93	0,24	3,34	6,98	8,89	21,03
VV	26,56	1,64	0,34	1,08	0,52	1,01	0,00	0,00	0,00	31,15
VP	47,14	2,10	0,65	0,85	1,22	1,01	0,00	0,00	0,00	52,97
PP	0,30	1,77	0,21	0,00	0,48	3,59	3,37	15,14	25,49	24,86
RK	1,61	32,65	0,00	0,00	0,00	0,63	0,00	0,00	0,00	34,89
MT	4,56	33,74	0,80	7,63	3,38	0,25	0,00	0,00	1,23	50,36
KK	0,79	21,26	0,76	0,00	0,00	0,58	0,00	0,00	0,00	23,39
UM	1,10	38,14	1,05	0,29	0,69	0,49	16,70	0,00	1,66	58,46
LK	0,00	0,13	12,85	0,18	0,51	0,00	0,00	0,00	0,00	13,67
PT	0,00	0,00	0,00	0,37	0,10	0,00	1,21	0,00	3,42	1,68
KP	0,00	0,00	4,37	4,61	7,44	0,00	0,00	0,00	0,00	16,42
JA	0,00	0,00	5,10	0,31	2,56	0,00	0,00	0,00	0,00	7,97
HA	0,00	0,00	3,41	2,29	8,85	0,17	0,51	0,00	3,45	15,23

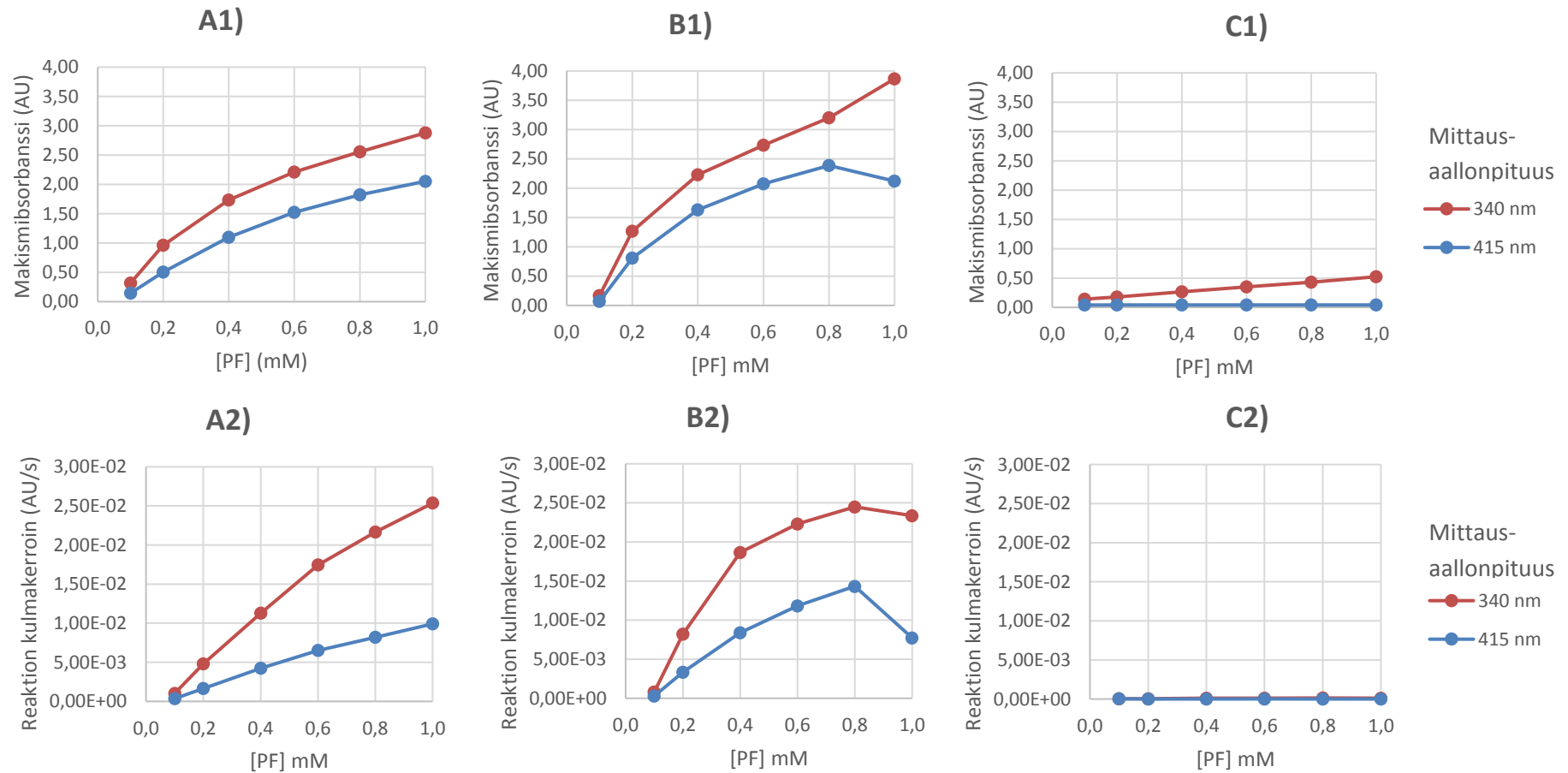


Kuva 24. Kasviuutteiden suhteellinen absorbanssi ja reaktion kulmakerroin aallonpituuksilla 340 nm ja 415 nm käyttäen kompleksoivana makromolekyylinä PEG 6000:ta. **A)** Suhteellinen absorbanssi ja **B)** reaktion maksimaalinen kulmakerroin.

Kasviuutteiden jälkeen lopullisen mittausten menetelmän optimoituja parametreja testattiin kolmella puhtasaineella, olisi mahdollista vertailla eri tyyppisten polyfenolirakenteiden affiniteettia PEG:hen. Testattaviksi puhtasaineiksi valittiin oenoteiini B (OB), pentagalloyyyliglukoosi (PGG) ja veskalagiini (V). Testissä käytettiin kompleksoivana makromolekyylinä PEG 6000:a, jonka affiniteettia erilaisiin polyfenolisiin rakenteisiin tutkittiin mittaamalla näytteiden maksimiabsorbanssit ja reaktion kulmakertoimet aallonpituuksilla 340 nm ja 415 nm. Puhtasaineista valmistettiin 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 ja 1,0 mM laimennokset käyttämällä liuottimena 10:90 etanoli/vettä, mikä paransi esimerkiksi PGG:n liukoisuutta huomattavasti vaikuttamatta kuitenkaan merkittävästi mittaustuloksiin. Käytetty PEG:n pitoisuus oli 1 mg/ml ja puhtasaineiden absorbanssi mitattiin tunnin ajan 20 sekunnin välein. Mittaustuloksista vähennettiin erikseen ennen PEG:n lisäystä mitatut näytteiden tausta-absorbanssit. Näytteiden kinetiikkaprofiilit eri pitoisuuksissa on esitetty kuvissa 25 ja mittaustulokset kuvassa 26.



Kuva 25. Puhdasaineytteiden kinetiikkaprofilien vertailu kuudessa eri pitoisuudessa aallonpituuksilla **1)** 340 nm ja **2)** 415 nm vakio PEG-pitoisuudella. **A)** Pentagalloyyliglukoosi (PGG), **B)** oenothiini B (OB) ja **C)** veskalagiini (V). PF = polyfenoli.



Kuva 26. Puhdasaineytteiden maksimiabsorbanssien ja reaktion kulmakerrointen vertailu aallonpituuksilla 340 nm ja 415 nm vakio PEG-pitoisuudella. **1)** Maksimiabsorbanssi ja **2)** reaktion kulmakerroin **A)** Pentagalloyyyliglukoosi (PGG), **B)** oenotheiini B (OB) ja **C)** veskalagiini (V). PF = polyfenoli.

8.7. Optimoitu kuoppalevymenetelmä

Lopulliseen mittausmenetelmään koottiin kaikki optimoidut mittausparametrit, joiden perusteella luotiin kuoppalevymenetelmä polyfenolinäytteiden ja PEG:n välisten vuorovaikutusten tutkimiseksi. Alkuperäisistä neljästä PEG-polymeeristä kuoppalevymenetelmän käyttöön valikoitui PEG 6000, josta valmistettiin 1 mg/ml vesiliuos. Mittaukset tehtiin aallonpituuksilla 340 nm ja 415 nm. Aallonpituus 415 nm oli varsinainen mittausaallonpituus, kun taas aallonpituus 340 nm toimi lähinnä mittausten referenssinä, jolla tarkasteltiin näytteen värin vaikutusta mittaustuloksiin.

Menetelmällä mitattavasta näytteestä valmistettiin laimennokset (0,1; 0,2, 0,4; 0,6; 0,8 ja 1,0 mg/ml), jotka valmistettiin samasta kantaliuoksesta käyttämällä liuottimena 10:90 etanoli/vettä. Mittausmenetelmän aluksi tutkittavien näytteiden tausta-absorbanssi mitattiin kaikissa kuudessa eri pitoisuuksissa ennen PEG:n lisäystä lisäämällä kuoppalevyllä 100 µl:aan näytettä 100 µl 10:90 etanoli/vettä. Mittauksissa tausta-absorbanssi mitattiin käyttäen kahta rinnakkaisnäytettä, mikä mahdollisti sen, että kaikki mitattavat pitoisuudet voitiin pipetoida kuoppalevyn samalle mittausriville. Tämän jälkeen varsinaisen näytteen vaste mitattiin samoilla kuudella pitoisuudella lisäämällä 100 µl PEG-liuosta 12-kanavaisella pipetillä 100 µl:aan näytteitä. PEG-liuos lisättiin kuoppalevyllä riveittäin mittaus kerrallaan vasta juuri ennen mittauksen aloittamista ja mittaus käynnistettiin välittömästi PEG:n lisäyksen jälkeen. Varsinaisten näytteiden tuottama vaste PEG:n kanssa mitattiin kahdella rinnakkaisnäytteellä kolmella eri mittausrivillä, jolloin näytteen jokainen pitoisuus mitattiin yhteensä kuusi kertaa. Tulosten käsittelyssä ensimmäisellä rivillä mitattu näytteen tausta-absorbanssi vähennettiin PEG:n lisäyksen jälkeen mitatusta absorbanssista, jolloin minimoitiin näytteiden värin vaikutus mittaustulokseen.

Lopullista menetelmää nopeutettiin huomattavasti testivaiheeseen verrattuna. Näytteiden absorbanssia mitattiin yhdellä kuoppalevyn rivillä 10 minuutin ajan 20 sekunnin välein. Tässä ajassa onnistuttiin keräämään oleellinen informaatio tukittavan näytteen ja PEG:n muodostamien liukenemattomien kompleksien muodostumisnopeudesta ja intensiteetistä. Mittaustulokset esitettiin näytteiden tuottamana maksimiabsorbanssia ja liukenemattomien kompleksien muodostumisen kinetiikan maksimaalisena kulmakertoimena. Maksimaalinen kulmakerroin määritettiin kolmen peräkkäisen mittauspisteen kautta laskettujen suorien kulmakertoimista. Kuoppalevymittausten tuloksien käsittelyyn luotiin tulos pohja, jota käytettiin

mittaustulosten graafiseen havainnollistamiseen ja mittaustulosten automatisoituun prosessointiin. Tulospohjassa maksimiabsorbanssin ja maksimikulmakertoimet esitettiin erikseen molemmilla aallonpituuksilla tehdyille mittauksille näytteiden pitoisuuden funktiona. Tuloksissa on myös laskettu korrelaatiokerroin laimennossarjan mittauspisteiden välille, minkä ansiosta voitiin tarkastella mittaustulosten lineaarisuutta.

9. Tulosten tarkastelu

9.1. Esitestien tulokset

PEG:llä tehtyjen esitestien tarkoituksena oli pohjustaa varsinaista menetelmänkehitysprosessia. Alkustestien keskeisenä tuloksena kartoitettiin minkälaisia pitoisuuksia erityyppisiä näytteitä (OB, MH ja MH F2) tulisi käyttää tarvittavan suuren absorbanssin aikaansaamiseksi, jotta mittaustuloksista olisi mahdollista tehdä johtopäätöksiä erilaisten PF- ja PEG-pitoisuuksien vaikutuksesta absorbanssin käyttäytymiseen. Käytetyn kuoppalevyliukijan mittaaman absorbanssin alarajana pidettiin absorbanssiarvoa 0,1 ja ylärajana arvoa 3,0. Mikäli mitattu absorbanssi ei pysynyt määritettyjen raja-arvojen välissä, ei tulosta pidetty täysin luotettavana, vaan ainoastaan suuntaa antavana. Esitestien näytteet valittiin siten, että ne edustivat polyfenolinäytteitä raakauute-, fraktio- ja puhdasainetasolla. MH, MH F2 ja OB sisälsivät kaikki yhteisenä merkittävänä polyfenolisena komponenttina oenotheiini B:tä minkä vuoksi niitä pidettiin vertailtuun soveltuvina näytteinä. Raakauutteessa ja Sephadex LH-20 fraktiossa oli OB-näytteeseen verrattuna myös muita polyfenolisia komponentteja, joilla oli potentiaalinen vaikutus liukenemattomien kompleksien muodostumiseen.

OB-näytteellä vakio PEG-pitoisuuksilla tehdyissä testeissä [PF]:[PEG] -suhteiden muuttamisen havaittiin tuottavan eroja eri molekyyli massaisten PEG-polymeerien tuottamaan maksimiabsorbanssiin. Mitattu absorbanssi oli [PF]:[PEG] -suhteen lisäksi luonnollisesti riippuvainen käytettävästä PF-pitoisuudesta, joka vaikutti vahvasti näytteiden tausta-absorbanssiin. Kuvassa 6 PEG 400:n havaittiin tuottavan systemaattisen absorbanssin nousun PF-pitoisuuden noustessa, mikä johtui näytteen tausta-absorbanssin noususta pitoisuuden kasvaessa. Muilla PEG-polymeereillä [PF]:[PEG] -suhteella 10:1 saavutettiin suuremmat vasteet kuin suuremmilla PF-pitoisuuksilla, mistä päätellen pienellä [PF]:[PEG] -suhteella makromolekyylien affiniteetti sitoutua näytteisiin ja tuottaa liukenemattomia komplekseja oli suurempi kuin suuremmilla pitoisuussuhteilla. PF-pitoisuuden merkitys korostuu kuvassa 6B, jossa OB-

pitoisuuden kolminkertaistaminen johti tilanteeseen, jossa kaikilla neljällä PEG-polymeerillä mitattava vaste nousi identtisesti ja systemaattisesti pelkästään OB-pitoisuuden ja sen aiheuttaman tausta-absorbanssin kasvaessa. Ilmiö toistui kuvassa 7 samanlainen MH ja MH F2 -näytteillä. Suurella PF-pitoisuudella kaikki PEG-polymeerit muodostivat liukenemattomia komplekseja samankaltaisesti, ja mitattu absorbanssi oli peräisin näytteiden tausta-absorbanssista.

Testeissä, joissa PF-pitoisuus pidettiin vakiona, saatiin tehtyä tarkempia alustavia havaintoja eri molekyyli massaisten PEG-polymeerien vaikutuksesta mitattuun vasteeseen. PEG-pitoisuuden nostaminen ei vaikuttanut PEG 400:n tuottamaan vasteeseen kummallakaan näytteellä, kun taas muilla molekyyli massailla PEG-pitoisuuden nostaminen pääasiassa nosti myös mitattua maksimiabsorbanssia. PEG-pitoisuuden nostamisella vaikutti toisaalta olevan myös jonkinlainen yläraja, jonka jälkeen liukenemattomien kompleksien muodostuminen heikentyi, eikä pitoisuuden nostaminen enää tuottanut lisää liukenemattomia komplekseja tai merkittävää mitattavan absorbanssin nousua. Esimerkiksi kuvassa 8A MH-näytteellä PEG 6000:n tuottama vaste kasvoi selvästi 0,25–0,50 mg/ml välillä, mutta 0,50–1,00 mg/ml välillä absorbanssi ei enää kasvanut. Kuvassa 8B puolestaan MH F2 -näytteellä samankaltainen absorbanssin nousu PEG 6000:lla havaittiin 0,75–1,00 mg/ml välillä, kun taas alemmissa pitoisuuksissa absorbanssi pysyi muilla molekyyli massailla lähes muuttumattomana.

Esitesteissä, joissa PF- ja PEG-pitoisuudet pidettiin vakiona, havaittiin, että niin PF- kuin PEG-pitoisuudella vaikutti siis olevan jonkinlainen yläraja, minkä ylityttyä makromolekyylien ja näytteiden muodostumien liukenemattomien kompleksien muodostuminen hidastui merkittävästi, tai sitä ei tapahtunut ollenkaan.

9.2. PEG:n stabiilisuustestien tulokset

PEG:n stabiilisuutta vesiliuoksessa tutkittiin stabiilisuustestillä, jossa valitun PEG:n vastetta polyfenolinäytteen kanssa mitattiin viikoittain 10 viikon ajan. Testissä kaksi samasta kantaliuoksesta valmistettua PEG-liuosta säilytettiin joko lämpimissä tai kylmissä olosuhteissa, ja säilytysolosuhteiden vaikutusta tutkittiin mittaamalla näytteiden vaste MH-näytteen kanssa käyttäen kuutta rinnakkaisnäytettä. Kuvassa 9A kylmissä olosuhteissa säilytetty PEG-liuos tuotti lähes systemaattisesti marginaalisesti pienemmän mittaustulokset kuin lämpimissä olosuhteissa säilytetty PEG-liuos. Kummastakin PEG-liuoksesta mitattu absorbanssi noudatti säilytysolosuhteista riippumatta samanlaista trendiä. Havainto viittasi siihen, että mittaustulosten viikoittainen variaatio oli

todennäköisemmin peräisin kuoppalevyliukijan suorituskyvystä kuin PEG-liuoksen säilytysolosuhteista. Kuvassa 9B, jossa on esitetty kaikkien yhteensä 60 mittauksen keskiarvo ja keskihajonta, huomattiin, että säilytysolosuhteiden mittaustulosten keskiarvojen välinen ero oli marginaalinen. Tulosten keskihajonnan perusteella PEG:n todettiin pysyvän stabiilina vesiliuoksessa säilytysolosuhteista riippumatta vähintään 10 viikkoa. PEG:stä valmistettuja kantaliuoksia päädyttiin säilyttämään kylmähuoneessa.

9.3. PEG-polymeerien vertailun tulokset

Eri PEG-polymeerien vertailun tarkoituksena oli löytää eri molekyyli­massaisista PEG-polymeereistä se, joka soveltuisi parhaiten polyfenolisia komponentteja sisältävien näytteiden ja makromolekyylien välisten vuorovaikutusten tutkimiseen. Optimaalisesti PEG:n tulisi pystyä tuottamaan käytettyjen näytteiden kanssa liukenemattomia komplekseja ja mahdollisimman vahva vaste mitatulla pitoisuusvälillä. Kuoppalevymenetelmässä käytettävien pitoisuuksien optimoinnissa laajennettiin esitesteissä tutkittua pitoisuusväliä, ja tutkittiin esitestejä kattavammin PEG-pitoisuuksien vaikutusta mitattavaan vasteeseen. Tavoitteena oli löytää optimaalinen PEG-polymeerin lisäksi PEG-pitoisuus, jota käytettäisiin lopullisessa menetelmässä. Käyttökelpoisen PEG-pitoisuuden tulisi olla riittävän suuri, jotta liukenemattomia komplekseja kykenisi muodostumaan, muttei niin suuri, että liukenemattomien kompleksien muodostuminen häiriintyisi.

Kun vakio PEG-pitoisuudella tehtyjä testejä laajennettiin käyttämällä matalia [PF]:[PEG] -suhteita, eri molekyyli­massaisten PEG-polymeerien välillä havaittiin eroja. Kuvassa 10 [PF]:[PEG] -suhteilla 10:1 ja 15:1 kolme suurinta PEG-polymeeriä tuottivat suuremman vasteen kuin PEG 400 vastaavalla pitoisuussuhteella. Erityisesti kuvassa 10C PEG 6000:n, 12000:n ja 20000:n tuottamat vasteet poikkesivat huomattavasti PEG 400:n tuottamasta vasteesta vastaavissa pitoisuuksissa, mikä tarkoitti sitä, että ne kykenivät muodostamaan enemmän liukenemattomia komplekseja kuin PEG 400. Kuvissa 10B ja 10C PEG 12000 tuotti pitoisuussuhteella 10:1 poikkeavan suuren vasteen, minkä jälkeen [PF]:[PEG] -suhteella 15:1 vaste on jälleen huomattavasti pienempi. Kuvassa 10B myös PEG 6000:lla on havaittavissa samankaltainen ilmiö. Kyseinen ilmiö saattaa johtua siitä, että matalilla PF-pitoisuuksilla muodostuvat liukenemattomat kompleksit ovat epästabiileja, ja ne voivat vapautua takaisin liuokseen PF-pitoisuuden noustessa. Kuvassa 10C puolestaan PEG 6000:n mitattu vaste pysyi suurena suhteen 10:1 lisäksi myös suhteella 15:1 ja PEG 20000:n vaste puolestaan jatkoi

nousuaan edelleen. Suurempi absorbanssi merkitsi siitä, että PF-pitoisuus näytteissä nousi tarpeeksi suureksi, minkä jälkeen stabiileja liukenemattomia komplekseja kykeni muodostumaan. Kolmesta tutkitusta näytteestä puhdasaineena käytetty OB tuotti suurimmat vasteet ja suurimmat erot eri molekyyliainemassojen välille.

Kuvassa 11 vakio PEG-pitoisuudella tehdyissä testeissä havaittiin, että suurilla [PF]:[PEG] -suhteilla näytteen pitoisuuden nostaminen vaikutti lähinnä sen tuottamaan tausta-absorbanssiin, ja kaikki neljä PEG-polymeeriä tuottivat toisiaan vastaavia mittaustuloksia. Kuvassa 11A kahden suurimman [PF]:[PEG] -suhteen tuottamat vasteet ylittävät kuoppalevylukijan luotettavuusrajan, mistä syystä niiden tuloksia ei voitu pitää täysin luotettavina.

Eri [PF]:[PEG] -suhteita testattiin myös kiinnittämällä PF-pitoisuus tunnettuun arvoon. Kuvassa 12 havaittiin jälleen, että PEG 400 ei tuottanut erilaisilla pitoisuussuhteilla toisistaan eroavia tuloksia, vaan mitattu absorbanssi pysyi näytteen tuottaman tausta-absorbanssin tasolla. Kolmella suurimmalla makromolekyyllillä huomattavimmat vaikutukset absorbanssiin havaittiin alhaisissa pitoisuussuhteissa. Suurilla pitoisuussuhteilla mitattu absorbanssi ei eronnut näytteen tausta-absorbanssista. Absorbanssit saavuttavat maksimiarvonsa suhteella 10:1, minkä perusteella liukenemattomien kompleksien muodostuminen olisi siis maksimissaan pitoisuussuhteiden 25:1 ja 5:1 välillä. Tulosten perusteella optimaalinen PEG-pitoisuus olisi välillä 0,306–1,530 mg/ml. Maksimiarvon saavuttamisen jälkeen PEG:n lisääminen laski absorbanssia, mikä tarkoitti sitä, että PEG:n lisääminen ylimäärin suhteessa näytteen pitoisuuteen aiheuttaa muodostuneiden liukenemattomien kompleksien takaisinliukenemisen tai polyfenolisten komponenttien vapautumisen takaisin liuokseen. Käytettävän PEG-pitoisuuden tulisi siis olla tarpeeksi suuri pitoisuus, jotta liukenemattomia komplekseja saatiin muodostumaan, mutta toisaalta tarpeeksi pieni, että PEG:n sitoutumiskapasiteetti ei ylittyisin, jolloin liukenemattomien kompleksien muodostuminen ei häiriintyy.

Kuvien 13 ja 14 tuloksista havaittiin, että PEG 400 tuotti jälleen kaikista PEG-polymeereistä heikoimman vasteen kaikilla näytteillä ja PEG-pitoisuuksilla. PEG 400 ei siis selvästikään kyennyt muodostamaan liukenemattomia komplekseja näytteiden kanssa toivotulla tavalla, mutta sitä hyödynnettiin testissä käyttämällä sitä vertailukohtana muille PEG-polymeereille. Kuvissa 13A2–4 havaittiin kaikkien kolmen suurimman PEG-polymeerin tuottavan huomattavasti vahvemman vasteen kuin PEG 400:n kuvassa 13A1. Kolme suurinta molekyyliainemassaa kykeni siis selvästi muodostamaan merkittävän määrän liukenemattomia komplekseja. Kuvissa 13A2–4

PEG 6000 erottui kahdesta muusta polymeeristä edukseen siten, että se tuotti kaikilla kolmella PEG-pitoisuudella hyvin samankaltaisen ja suhteellisen lineaarisen tuloksen. Kaikilla kolmella suurimmalla PEG-polymeerillä havaittiin absorbanssin laskevan suurimmalla PEG-pitoisuudella PF-pitoisuuden noustessa. Tämä toistuva havainto johtui siitä, että liukenemattomien kompleksien muodostumiseen vaikuttaa jonkinlainen kompleksien pysyvyyteen vaikuttava tasapaino, ja PF-pitoisuuden nostaminen liian suureksi aiheuttaa liukenemattomien kompleksien takaisinliukenemisen. Samankaltainen ilmiö havaittiin myös kuvissa 13B2–4, joissa PEG 6000:n vaste erosi muista polymeereistä, sillä sen kohdalla sekä 1,0 että 2,0 mg/ml kykenevät tuottamaan selvästi mitattavan vasteen, vaikka se ei olekaan koko mittausvälillä lineaarinen. Kuvassa 13B2 suurimmalla PEG-pitoisuudella kahden viimeisen mittauspisteen kohdalla tapahtuva lineaarisuuden katkeaminen johtuu siitä, että mitatut vasteet ylittivät osin kuoppalevylukijan lineaarisen alueen, eikä niiden tuloksia voida pitää täysin luotettavina. Kuvassa 14 havaittiin, että PAA17 tuotti PEG:n kanssa huomattavasti vahvemman vasteen kuin PAA3. Molemmat näytteet ovat proantosyanidiinipitoisia Sephadex LH-20 -fraktioita, joiden merkittävimpana erona on se, että PAA17 oli yhdistekoostumukseltaan prosyaniidiinipitoinen, kun taas PAA3 sisälsi komponentteinaan runsaasti prodelfinidiinejä. Kaikilla kolmella suurimmalla PEG:llä viimeinen mittauspiste selvästi ylittää kuoppalevylukijan luotettavuusrajan, eikä niiden antamaa tulosta voida pitää luotettavana. PEG 6000 antoi molemmilla näytteillä hieman vahvemman vasteen kuin kaksi suurempaa PEG-polymeeriä.

PEG-polymeerien vertailua jatkettiin tutkimalla 15 kasvin raakauutteita. PEG 400:n tuottamien heikkojen tuloksien vuoksi se jätettiin jatkossa pois PEG-polymeerien välisestä vertailusta. Kuvassa 15 on esitetty PEG 6000:n, PEG 12000:n ja PEG 20000:n kasviuutteiden kanssa tuottama vaste, josta on vähennetty näytteiden tuottama tausta-absorbanssi, ja mitatut vasteet on tehty vertailukelpoisiksi keskenään kertomalla mitattu maksimiabsorbanssi näytekohtaisilla laimennoskertoimilla. Kuvassa 15A PEG 6000:lla kaikki kolme pitoisuutta tuottivat useimmilla näytteillä hyvin samankaltaisen absorbanssin, minkä lisäksi mitatut absorbanssit olivat yleisesti ottaen suurempia kuin PEG 12000:lla ja PEG 20000:lla mitatut vasteet. Esimerkiksi Kuvassa 15B ja 15C PEG 12000:lla ja PEG 20000:lla VP-näyte tuotti pitoisuudella 0,5 mg/ml huomattavasti heikomman vasteen kuin vahvemmillä pitoisuuksilla. Kaikilla PEG-polymeereillä MT-näytteen tuottama vaste laski PEG-pitoisuuden noustessa. Testien perusteella kolmesta PEG-polymeeristä PEG 6000 tuotti samankaltaisimmat tulokset kaikilla kolmella pitoisuudella, minkä perusteella se valittiin optimaaliseksi PEG-

polymeeriksi kasviuutteilla tehtäviin mittauksiin. Tutkituista pitoisuuksista käyttökelpoisimmaksi valittiin 1 mg/ml, sillä se oli tarpeeksi suuri pitoisuus tuottamaan selkeästi kasviuutteiden tausta-absorbanssista eroava vaste, mutta se ei ollut liian väkevä aiheuttamaan merkittävässä määrin liukenemattomien kompleksien vapautumista takaisin liuokseen.

9.4. Mittausaallonpituuksien vertailun tulokset

Lopullisessa menetelmässä käytettävän mittausaallonpituuden optimointi aloitettiin testaamalla kaikki kuoppalevylukijaan asennetut aallonpituudet valitulla joukolla näytteitä, jotka edustivat yhdistekoostumukseltaan erilaisia näytteitä. Tavoitteena oli löytää aallonpituus, jolla muodostuneet liukenemattomat kompleksit voitaisiin mitata parhaiten ilman näytteiden tausta-absorbanssin tuottamaan häiriötä. Testien tulokset esitettiin liukenemattomien kompleksien aiheuttaman absorbanssin prosentuaalisena osuutena näytteiden tuottamasta kokonaisabsorbanssista, minkä avulla saatiin vertailtua, kuinka suuri vaikutus näytteiden värin aiheuttamalla tausta-absorbanssilla oli mitattuun absorbanssiin. Kuvassa 16 esitetyistä tuloksista huomattiin, että verrattuna muihin mitattuihin aallonpituuksiin aallonpituudella 340 nm mitattu vaste korosti selvästi eniten näytteiden tausta-absorbanssia, mikä näkyi mittaustuloksissa siten, että muodostuneiden liukenemattomien kompleksien prosentuaalinen osuus kokonaisabsorbanssista oli kaikilla näytteillä alhaisin. Aallonpituutta 340 nm käytettiin vertailukohtana muille mittausaallonpituuksille arvioimaan, kuinka paljon näytteen oma väri vaikutti mittaustuloksiin. Muista mittausaallonpituuksista 650 ja 742 nm tuottivat muita aallonpituuksia alhaisemman mittaustuloksen, minkä vuoksi ne todettiin käyttökelvottomiksi ja jätettiin pois jatkotesteistä.

Kun käytettävissä olevista aallonpituuksista oli karsittu pois selkeästi hyödyttömät aallonpituudet, jäljelle jääneitä aallonpituuksia vertailtiin käyttämällä näytteinä 15 kasviuutetta. Vertailtaviksi aallonpituuksiksi jäivät 340 nm, 405 nm, 415 nm, 492 nm, 520 nm ja 550 nm. Vaikka 340 nm aallonpituus ei alustavien mittausten perusteella antanut informaatiota niinkään liukenemattomien kompleksien muodostumisesta, sitä käytettiin edelleen muilla aallonpituuksilla tehtyjen mittausten vertailukohtana. Kuvassa 17A havaittiin aallonpituuksien 405 nm, 415 nm, 492 nm, 520 nm ja 550 nm tuottavan hyvin samankaltaisia tuloksia, kun mitattiin muodostuvien kompleksien osuutta kokonaisabsorbanssista. Kuvassa 17B kuitenkin nähtiin selkeitä eroja eri aallonpituuksilla mitattujen maksimiabsorbanssien väillä. Selvästi suurimman

mittaustuloksen tuotti vertailtuaallonpituus 340 nm, jota seurasivat aallonpituudet 405 ja 415 nm. Aallonpituudet 492, 520 ja 550 nm tuottivat kaikilla näytteillä huomattavasti pienemmän maksimiabsorbanssin. Aallonpituuksien 405 ja 415 nm suurimpana erona huomattiin 405 nm tuottavan vasteen myös LK, PT, KP, JA ja HA-näytteiden kanssa, jotka olivat kontrollinäytteinä. Kontrollinäytteiden kanssa liukenemattomia komplekseja ei odotettu muodostuvan, joten mitattujen vasteiden oletettiin olevan vääriä positiivisia tuloksia, joiden absorbanssi oli peräisin jostain musta lähteestä kuin muodostuneista liukenemattomista komplekseista. Tästä tuloksesta johtuen 415 nm arvioitiin 405 nm:aa luotettavammaksi mittausaallonpituudeksi.

Kuvassa 18 on esitetty vielä tarkempi vertailu aallonpituuksien 340 ja 415 nm välillä. Vertailussa toistuu havainto, jonka mukaan 340 nm tuottaa suuremmat suhteelliset absorbanssit, mutta aallonpituudella 415 nm muodostuneiden liukenemattomien kompleksien osuus mittaustuloksesta on selvästi suurempi. Koska kuoppalevykijalla pystyttiin sisällyttämään samaan mittaukseen kaksi eri mitattavaa aallonpituutta, sisällytettiin mittausmenetelmään molemmat aallonpituudet 340 ja 415 nm. 340 nm tuotti informaatiota näytteen värin vaikutuksesta mittaustuloksiin, kun taas 415 nm puolestaan tuotti informaatiota itse liukenemattomien kompleksien muodostumisesta.

9.5. Kinetiikkamittauksen parametrien optimoinnin tulokset

Kinetiikkamittausten tuloksiin merkittävimmin vaikuttavia parametreja olivat mittaussintervalli ja absorbanssin kulmakertoimen laskemiseen käytettävien peräkkäisten mittauspisteiden lukumäärä. Kinetiikkamittausten parametrien optimoinnin tavoitteena oli tutkia mahdollisimman tarkasti ja viiveettömästi makromolekyyliden ja näytteiden välisten liukenemattomien kompleksien muodostumista. Seuraamalla absorbanssin kehittymistä ajan funktiona voitiin tarkastella näytekohtaisia kinetiikkaprofiileja, joita vertailemalla voitiin tehdä alustavia johtopäätöksiä siitä, mitkä näytteet osoittivat affiniteettia tutkittuja makromolekyylejä kohtaan. Kinetiikkamittauksissa pyrittiin määrittämään reaktion maksimaalinen kulmakerroin, joka antaisi tietoa liukenemattomien kompleksien muodostumisen nopeudesta. Ilmoitetut kulmakertoimet ovat kolmen peräkkäisen mittapisteen avulla laskettujen kulmakerrointen maksimiarvo. Näytteen ja makromolekyylin välisten vuorovaikutusten ja mittauksen alkamisen välisen viiveen minimoimiseksi kuoppalevymittaus aloitettiin välittömästi makromolekyylin lisäyksen jälkeen.

Kuvissa 19 ja 20 on esitetty näytteiden ja PEG-polymeerien välisen reaktion absorbanssin kulmakerroin kolmen eri PEG-pitoisuuden vertailuna neljässä eri PF-pitoisuudessa. Testissä selvitettiin samalla, soveltuivatko maksimiabsorbanssin mittaamiseen käytetyt parametrit myös kinetiikan mittaamiseen. Kuvista 19 ja 20 huomattiin, että 0,1 mg/ml pitoisuus antaa kaikilla PEG-polymeereillä hyvin heikon vasteen. Pitoisuudet 1,0 ja 2,0 mg/ml tuottavat samankaltaisia tuloksia. Varsinkin MH- ja PAA 3 -näytteillä reaktion kulmakertoimen nousu korreloi lähes lineaarisesti näytteen pitoisuuden nousun kanssa. PEG 6000:lla 1 mg/ml pitoisuus tuotti kaikilla näytteillä suurimmat vasteet. MH-näytteellä PEG 12000 ja 20000 tuottivat 1 mg/ml pitoisuudella epälineaarisia tuloksia, mikä johtui todennäköisesti siitä, että suurimmalla PF-pitoisuudella PEG:n sitoutumiskapasiteetti ylittyi ja liukenemattomien kompleksien polyfenolisia komponentteja vapautui takaisin liuokseen, mistä johtuen mitattavien kompleksien muodostumisnopeus hidastui huomattavasti.

Edellisen testin perusteella 1 mg/ml pitoisuus PEG 6000:ta todettiin soveltuvan maksimiabsorbanssin mittaamisen lisäksi kinetiikan mittaamiseen, minkä johdosta se valittiin käytettäväksi pitoisuudeksi liukenemattomien kompleksien kinetiikan tarkempaan tarkasteluun. Kinetiikkamittausten parametrien optimointia jatkettiin mittaamalla näytteiden kinetiikkaa aallonpituuksilla 340, 405, 415 ja 492 nm. Edellisen testin tapaan polyfenolinäytteitä testattiin neljässä eri pitoisuudella vakio-pitoisuudella PEG:tä. Kuvassa 21 esitetyistä kuvaajista havaittiin mittausaallonpituuden selkeä vaikutus mitattuihin maksimikulmakertoimiin. Aallonpituudella 340 nm mitatut maksimikulmakertoimet olivat selvästi suurempia kuin suuremmilla aallonpituuksilla mitatut tulokset. Aallonpituuksilla 405 ja 415 nm mitatut tulokset olivat keskenään odotetusti lähes identtiset, kun taas 492 nm tuotti kaikilla näytteillä matalimmat tulokset. Suurimmista vasteista huolimatta aallonpituuden 340 nm ei kuitenkaan todettu olevan kinetiikkamittausten kannalta alustavasti oleellisin vaihtoehto, sillä se vaikutti kuvassa 21C havaittavan epälineaarisuuden perusteella olevan altis kuoppalevylukijan detektorin saturoitumiselle suurissa PF-pitoisuuksissa. Kuvissa 22A ja 22C esitetyissä kuvaajissa havaittiin samanlainen ilmiö, jossa mittaustulos ylittää kuoppalevylukijan luotettavuusalueen, ja mittaustulos heittelee. Mitattujen näytteiden kinetiikkaprofiileista havainnollistuu myös selkeästi erot näytteiden affiniteetissa PEG:tä kohtaan. MH ja PAA17 -näytteet tuottavat kaikilla pitoisuuksilla huomattavasti PAA3:ta suuremmat absorbanssit ja suuremmat reaktion kulmakertoimet. Tästä päätellen MH:n ja prosyanidiinipitoisen PAA17:n sisältämät polyfenoliset komponentit olivat mitatuissa pitoisuuksissa huomattavasti alttiimpia tuottamaan liukenemattomia komplekseja PEG:n

kanssa kuin prodelfinidiinipitoinen PAA3. Neljällä eri aallonpituudella tehdyn vertailun perusteella aallonpituudet 405 ja 415 nm osoittautuivat kinetiikkamittausten kannalta käyttökelpoisimmiksi. Lopulliseen menetelmään valittiin maksimiabsorbanssimittauksen tavoin aallonpituudet 340 ja 415 nm.

9.6. Optimaalisten mittausero- ja mittaustulosten testaamisen tulokset

Lopullisessa mittausero- ja mittaustulosten testauksessa käytettäväksi makromolekyyliseksi valittiin PEG 6000, joka oli osoittanut soveltuvan muita PEG-polymeerejä paremmin näytteiden maksimiabsorbanssin ja kinetiikan mittaamiseen. Kuoppalevy-mittauksessa mitattavat aallonpituudet olivat 340 nm ja 415 nm, jotka pystyttiin mittaamaan samanaikaisesti yhdellä mittauksella. Aallonpituus 340 nm toimi mittauksissa referenssiaallonpituutena, jolla mitattiin näytteen värin vaikutusta mittaustulokseen. Varsinaiset mittaustulokset saatiin aallonpituudella 415 nm, joka oli aallonpituutta 340 nm huomattavasti vähemmän altis näytteiden tausta-absorbanssin vaikutukselle, mikä mahdollisti sen, että näytteitä oli mahdollista mitata luotettavammin myös suurissa pitoisuuksissa ilman, että tutkittavan näytteen tausta-absorbanssi saturoi kuoppalevy-lukijan detektorin.

Valmiilla mittausero- ja mittaustulosten testauksella vertailtiin 15 yhdistekoostumukseltaan toisistaan eroavaa kasviuutetta, joiden polyfenoliset komponentit kvantitoitiin UPLC-MS/MS -menetelmillä. Kasviuutteiden mitattuja suhteellisia absorbansseja ja kinetiikkamittausten maksimikulmakertoimia verrattiin taulukoon 7., jossa on esitetty kunkin kasviuutteen polyfenolisten komponenttien kvantitoinnin tulokset. Taulukoissa on käytetty värikoodausta, jolla on taulukossa 6. eritelty mittauksissa suuret ja pienet vasteet tuottaneet näytteet. Taulukossa 7. puolestaan värikoodilla on ilmaistu mitä polyfenolisia komponentteja esiintyi kussakin eri kasviuutteessa runsaimmin. Samassa taulukossa on esitetty lisäksi kaikkien komponenttien summa, jonka vertailua eri kasviuutteiden välillä on korostettu värikoodauksella. Kvantitoinnissa on otettu huomioon ainoastaan eri yhdisteryhmiä edustavien komponenttien määrä, eikä yksittäisten rakenteiden vaikutusta liukenemattomien kompleksien muodostumiseen ole analysoitu kattavasti tutkimuksen tässä vaiheessa. Ensimmäiseksi kvantitointitulosten ja kuoppalevy-menetelmällä mitattujen kasviuutteiden välisestä vertailusta huomattiin, että PF-komponenttien kokonaismäärällä ja mitatulla vasteella ei ole täysin suoraa korrelaatiota. Niukasti polyfenolisia komponentteja sisältävät näytteet tuottivat usein pienemmän vasteen, kuin runsaasti polyfenoleja sisältävät näytteet, mutta tuloksista on

selkeästi havaittavissa, että eri komponentit vaikuttivat mitattuun vasteeseen eri vahvuisesti. Kuvassa 24 esitetyissä tuloksissa ylivoimaisesti suurimman vasteen sekä maksimiabsorbanssia että kinetiikkaa mitatessa sai VP-näyte, joka sisälsi kvantitoinnin perusteella runsaasti gallushappojohdannaisia. Tulos on johdonmukainen, sillä vapaiden galloyyliryhmien lukumäärän on havaittu olevan yhteydessä polyfenolirakenteiden proteiininsaostuskykyyn (Salminen *et al.* 2011). Seuraavaksi suurimmat vasteet saivat VV- ja RK-näytteet. VV oli kromatografiselta profiililtaan VP-näytteeseen verrattuna identtinen, mutta sen galloyylipitoisuus oli VP-näytettä alhaisempi. RK-näyte puolestaan sisälsi puolestaan runsaasti heksahydroksidifenoyylijohtannaisia (HHDP), joissa kaksi vierekkäistä galloyyliryhmää on liittynyt yhteen C–C -sidoksella muodostaen HHDP-ryhmän. HHDP-johdannaisten yhdisteiden on gallushappojohdannaisten tapaan osoitettu kykenevän muodostaa vuorovaikutuksia makromolekyylien kanssa (Bacon & Rhodes 2000). Mittausmenetelmällä heikoimmat vasteet saivat kasviuutteet, jotka sisälsivät heikosti, tai eivät lainkaan galloyyli- tai HHDP-johdannaisia. Tutkimuksessa käytetyt ns. nollanäytteet LK, PT, KP, JA ja HA eivät tuottaneet mittauksessa makromolekyylin kanssa merkittävää vastetta, mistä päätellen niiden sisältämät komponentit, kviinihappo-, kemferoli- sekä kversetiinijohtannaiset yhdisteet, eivät kyenneet muodostamaan PEG-polymeerin kanssa liukenemattomia komplekseja. Proantotsyanidiinipitoiset näytteet, HK ja PP, eivät tuottaneet mittausmenetelmällä merkittävää vastetta, vaikka myös proantotsyanidiinipitoinen RA-näyte puolestaan tuotti PEG:n kanssa menetelmällä mitattavan vasteen. Yleisesti proantotsyanidiineilla on tutkitusti kyky muodostaa komplekseja makromolekyylien kanssa (Hagerman *et al.* 1981, 1998), minkä vuoksi tulos, jonka mukaan HK ja PP-näytteet eivät tuottaneet mitattavaa vastetta vaati syvällisempää vertailua näytteiden näytekoostumuksien välillä. Syy, minkä vuoksi RA-näyte muodosti polyfenoli–makromolekyyli -vuorovaikutuksia HK- ja PP-näytteitä voimakkaammin johtuu todennäköisimmin näytteiden komponenttien luonteesta, tai niiden yhteisvaikutuksesta. RA-näytteen keskimääräinen polymerisoitumisaste oli HK- ja PP-näytteitä suurempi, eli se sisälsi keskimäärin pidempiä proantotsyanidiinipolymeerejä. Pidempien PD-pitoisten polymeeriketjujen ansiosta RA-näytteen komponenttien on mahdollista muodostaa makromolekyylien kanssa HK- ja PP-näytteitä enemmän heikkoja vuorovaikutuksia, joiden yhteisvaikutus tuottaa mitattavan ilmiön, joka oli intensiteetiltään samaa luokkaa runsaasti HHDP-johdannaisia sisältävän MT-näytteen kanssa. MT-näyte sisältää määrällisesti paljon HHDP-johdannaisia, mutta sen sisältämät komponentit ovat jäykkärakenteisia ellagitanniineja, joissa ei ole rakenteessaan vapaita galloyyliryhmiä, jotka olisivat alttiita

vuorovaikuttamaan makromolekyylin kanssa muodostaen niiden kanssa komplekseja galloyyliryhmien OH-ryhmien vetysitoutumisen välityksellä. MT-näytteen yksittäisten rakenteiden luonne johtaa siihen, etteivät ne kykene muodostamaan merkittävässä määrin liukenemattomia komplekseja ja tuottamaan mittausten menetelmällä suurempaa vastetta. HHDP-johdannaisista yhdisteistä koostuvat MH, KK ja UM-näytteet tuottivat MT-näytettä hieman suuremmat vasteet, joten niiden sisältämät rakenteet osoittivat suurempaa affiniteettia kompleksoivaa makromolekyyliä kohtaan kuin MT-näytteen HHDP-johdannaiset. Kasviuutteet ovat haastavia näytteitä tutkia, sillä ne sisältävät usein runsaasti erilaisia polyfenolisia komponentteja, joiden yhteisvaikutusta liukenemattomien kompleksien muodostumiseen on vaikea eritellä. Erilaisten yksittäisten rakenteiden ja PEG:n välisen vuorovaikutuksen luonnetta olisi yksiselitteisempää tarkastella tutkimalla yhdisteiden rakenteiden ja niiden tuottaman aktiivisuuden korrelaatiota laajalla otannalla puhtasaineita. Tutkimuksen tavoite keskittyi resurssien puitteissa mittausten menetelmän kehittämiseen, ja mahdollisen laajamittainen rakenne-aktiivisuustutkimuksen pohjustamiseen.

Kasviuutteiden lisäksi lopullisia mittaustuloksia testattiin kolmella toisistaan rakenteeltaan eroavalla puhtasaineella. Kuvissa 25 ja 26 esitetyistä tuloksista huomattiin, että kolmesta puhtasaineesta PGG ja OB kykenevät tuottamaan tutkitavan makromolekyylin kanssa liukenemattomia komplekseja, joiden muodostumista voitiin tutkia seuraamalla absorbanssin nousua. Näyte V ei puolestaan tuottanut millään pitoisuudella PEG:n kanssa vastetta, joka olisi eronnut ennen PEG:n lisäystä mitatusta tausta-absorbanssista. Tästä päätellen se ei ole rakenteeltaan altis muodostamaan liukenemattomia komplekseja PEG:n kanssa. Se eroaa kahdesta muusta tutkitusta puhtasaineesta merkittävästi rakenteeltaan siten, että rakenteen keskiössä sijaitseva polyoli on avoketjuinen, toisin kuin kahdessa muussa rakenteessa. Se sisältää lisäksi NHTP-ryhmän, jota ei esiinny muissa rakenteissa. OB puolestaan osoitti suurempaa affiniteettia liukenemattomien kompleksien muodostamiseen kuin PGG. Tämä ilmenee mittauksen alkupäästä, jossa absorbanssin muutokset ovat jyrkempiä kuin PGG:n mittauksen alussa. Affiniteetin voimakkuudesta kielii myös se, että vaikka kuoppalevy-mittaus käynnistettiin välittömästi makromolekyylin lisäyksen jälkeen, ovat OB:n eri pitoisuuksien absorbanssit selvästi nollan yläpuolella. Liukenemattomien kompleksien muodostuminen oli siis niin vahvaa, että niitä alkoi muodostua välittömästi näytteen ja makromolekyylin päästessä vuorovaikuttamaan keskenään, eikä reaktiota onnistuttu tutkimaan sen absoluuttisesta alkupisteestä lähtien, jolloin mittauksen aloituspisteen absorbanssi olisi tausta-absorbanssin vähentämisen jälkeen ollut nolla.

PGG:stä poiketen OB:n suurin pitoisuus antaa pienemmän maksimiabsorbanssin ja loivemman kulmakertoimen, kuin sen toiseksi vahvin mitattu pitoisuus. Tämä testeissä aikaisemminkin havaittu ilmiö tukee teoriaa, jonka mukaan näytteen ja makromolekyylien muodostamat liukenemattomat kompleksit alkavat liukoistua uudelleen, kun PF-pitoisuus ylittää jonkin toistaiseksi määrittelemättömän PF-kohtaisen raja-arvon suhteessa käytetyn makromolekyylin pitoisuuteen. Kahdesta rinnakkaisesta mittausaallonpituudesta oheinen ilmiö erottuu huomattavasti selvemmin varsinaisella mittausaallonpituudella 415 nm. Aallonpituudella 340 nm 1,0 mM OB-näyte saturoi kuoppalevylukijan detektorin, mikä vääristää viimeisen mittapisteen tuloksen. Aallonpituudella 415 nm takaisinliukenemisen alkaminen ja sen tuottama vaikutus sekä maksimiabsorbanssiin, että kinetiikkamittauksen kulmakertoimeen havaittiin selkeästi. PGG-näytteellä kompleksien takaisinliukenemistä ei havaita vielä mitatuilla pitoisuuksilla, minkä perusteella PEG:n kapasiteetti sitoa erilaisia polyfenolisia rakenteita on yhdistekohtainen.

10. Loppupäätelmät

Pro gradu -työn kokeellisessa osassa tehdyssä menetelmänkehityksessä onnistuttiin kehittämään nopea, toistettava ja helppokäyttöinen mittaamenetelmä kasvien erikoistuneiden metaboliittien ja makromolekyylien välisten vuorovaikutusten tutkimukseen. Kuoppalevymenetelmällä onnistuttiin mittaamaan samanaikaisesti polyfenoli–makromolekyyli -vuorovaikutusten intensiteettiä ja kinetiikkaa, joiden perusteella voitiin tehdä johtopäätöksiä erilaisia yhdistekoostumuksia edustavien näytteiden affiniteetista tutkittavia makromolekyyliä kohtaan. Optimoitu mittaamenetelmä ei vaadi kalliita kromatografisia laitteistoja, vaan kaikki menetelmässä käytetyt laitteistot ja reagenssit ovat perustutkimusvälineistöä, mikä tekee mittaamenetelmästä helposti lähestyttävän.

Kasviuutteiden lisäksi kehitettyä menetelmää oli mahdollista hyödyntää niin kasviuutteiden kuin polyfenolisten puhdasaineiden tutkimukseen. Puhdasaineilla tehtyjen testien perusteella onnistuttiin rajallisesta näytemäärästä huolimatta tuottamaan alustavia johtopäätöksiä polyfenolien rakenteen ja aktiivisuuden välisistä yhteyksistä, polyfenolien ja niitä kompleksoivien ei-proteiinisten makromolekyylien välisistä vuorovaikutuksista, ja siitä millaiset polyfenolisten rakenteiden komponentit olivat merkittäviä tekijöitä polyfenoli–makromolekyyli -vuorovaikutusten muodostumiseen.

Menetelmää soveltamalla voitiin myös tehdä johtopäätöksiä yhdistekoostumuksen tuntemattomien näytteiden polyfenolisten komponenttien luoteesta sen perusteella, tuottivatko ne PEG:n kanssa vasteen.

Uudenkaltaisella kuoppalevymenetelmällä tehdyn tutkimuksen etuna verrattuna kirjallisuusosiossa käsiteltyihin turbidimetrisiin mittausmenetelmiin perustuvien tutkimuksiin oli se, että tutkimuksessa käytetyt puhtasaineet olivat standardoituja puhtasaineita, eivätkä quebracho-tanniinin ja parkkihapon kaltaisia seoksia, minkä vuoksi tutkimustulokset ovat erittäin toistettavia. Tämän lisäksi näytteinä käytetyt kasviuutteet kvantitoitiin hyödyntämällä hienostuneita LC-MS -tekniikoita, minkä ansiosta yksittäisten näytteiden kemiallinen yhdisteprofiili tunnettiin tarkasti jo ennen kuoppalevymittausta. Tämä mahdollisti näytteiden välisten polyfenolikoostumusten välisten vertailun, jossa havaittiin merkittäviä eroja erilaisten polyfenolisten yhdisteiden kyvyssä muodostaa liukenemattomia komplekseja tutkittujen makromolekyylien kanssa. Havainnot korostivat polyfenolisten erikoistuneiden metaboliittien rakenteellisen monimuotoisuuden keskeistä roolia makromolekyyli-polyfenoli -vuorovaikutusten muodostumiseen. Menetelmän tuloksilla havaittiin lisäksi yhtäläisyyksiä perinteisillä proteiinsaostuskykyä mittaavilla menetelmillä saatuihin tuloksiin (Piirtola *et al.*, julkaisematon havainto), sillä polyfenolinäytteet, jotka tuottivat mittausmenetelmällä vasteen, sisälsivät polyfenolisia komponentteja, joiden on havaittu osoittavan kompleksinmuodostuskykyä myös proteiinien, kuten BSA:n kanssa. Havainnon perusteella mittausmenetelmää olisi mahdollista hyödyntää suuren näytemäärän kvalitatiiviseen seulomiseen proteiinsaostuskykyä ilmentävien näytteiden löytämiseksi. Menetelmää olisi lisäksi mahdollista hyödyntää polyfenolisten erikoistuneiden metaboliittien rakenne-aktiivisuustutkimuksiin, joilla voitaisiin syventää ymmärrystä kasvien erikoistuneiden metaboliittien rakenteellisista ominaisuuksista.

Viitteet

Adeyeye, C. M.; Barabas, E. *Analytical profiles of drug substances and excipients*. 22. painos; Academic Press, **1993**, 555–685

Andersen, R. A.; Sowers, J. A. Optimum conditions for bonding of plant phenols to insoluble polyvinylpyrrolidone. *Phytochemistry* **1968**, *7*, 293–301.

Atha, D. H.; Ingham, K. C. Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analysis in terms of excluded volume. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 12108–12117.

Bacon, J. R.; Rhodes, M. J. Binding affinity of hydrolyzable tannins to parotid saliva and to proline-rich proteins derived from it. *J. Agric. Food Chem.*; **2000**, *48*, 838–843.

Barry, T. N.; Forss, D. A. The condensed tannin content of vegetative *Lotus pedunculatus*, its regulation by fertiliser application, and effect upon protein solubility. *J. Sci. Food Agr.* **1983**, *34*, 1047–1056.

Bate-Smith, E. C.; Swain, T. Flavonoid compounds. *Comparative Biochemistry*, 3. painos; Academic Press, **1962**, s. 755–809.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.

Compton, S. J.; Jones, C. G. Mechanism of dye response and Interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.* **1985**, *151*, 369–374.

DeGabriel, J. L.; Wallis, I. R.; Moore, B. D.; Foley, W. J. A simple, integrative assay to quantify nutritional quality of browses for herbivores. *Oecologia* **2008**, *156*, 107–116.

Doner, L. W.; Bécard, G.; Irwin, P. L. Binding of flavonoids by polyvinylpyrrolidone. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 753–757.

Engström, M. T.; Päljjarvi, M.; Fryganas, C.; Grabber, J. H.; Mueller-Harvey, I.; Salminen, J.-P. Rapid qualitative and quantitative analyses of proanthocyanidin oligomers and polymers by UPLC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 3390–3399.

Engström, M. T.; Päljjarvi, M.; Salminen, J.-P. Rapid fingerprint analysis of plant extracts for ellagitannins, gallic acid and quinic acid derivatives, and quercetin-, kaempferol- and myricetin-based flavonol glycosides by UPLC-QqQ-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 4068–4079.

Garrido, A.; Gomez-Cabrera, A.; Guerrero, J. E.; Van der Meer, J. M. Effects of treatment with polyvinylpyrrolidone and polyethylene glycol on faba bean tannins. *Anim. Feed. Sci. Tech.* **1991**, *35*, 199–203.

Giridhar, K. S.; Prabhu, T. M.; Singh, K. C.; Nagabhushan, V.; Thirumalesh, T.; Rajeshwari, Y. B.; Umashankar, B. C. Nutritional potentialities of some tree leaves based on polyphenols and rumen in vitro gas production. *Vet. World* **2018**, *11*, 1479.

Hagerman, A. E.; Butler, L. G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 4494–4497.

Hagerman, A. E.; Rice, M. E.; Ritchard, N. T. Mechanisms of Protein Precipitation for Two Tannins, Pentagalloyl Glucose and Epicatechin₁₆ (4→8) Catechin (Procyanidin). *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2590–2595.

Hagerman, A. Tannin Chemistry Handbook. *Livro* **2002**, 116.

Hagerman, A. E. Chapter 3 Fifty Years of Polyphenol-Protein Complexes. kirjassa *Recent Advances in Polyphenol Research*, 1. painos; Cheynier, V.; Sarni-Manchado, P.; Quideau, S.; John Wiley & Sons, USA, **2012**, s. 71–97.

Haslam, E. Chemistry & Pharmacology of Natural Products: Plant Polyphenols - Vegetable Tannin Revisited, Cambridge University Press, USA, **1989**, s. 1–13.

Jones, D. E. Banana tannin and its reaction with polyethylene glycol. *Nature* **1965**, *206*, 299–300.

Jones, W. T.; Mangan, J. L. Complexes of the condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) with fraction 1 leaf protein and with submaxillary mucoprotein, and their reversal by polyethylene glycol and pH. *J. Agric. Food Chem.* **1977**, *28*, 126–136.

Keller, B. O.; Sui, J.; Young, A. B.; Whittall, R. M. Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* **2008**, *627*, 71–81.

Khosravi, F.; Nasri, M. F.; Farhangfar, H.; Modaresi, J.; Nutritive value and polyphenol content of pomegranate seed pulp ensiled with different tannin-inactivating agents. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2015**, *207*, 262–266.

Kilkowski, W. J. & Gross, G. G. Color reaction of hydrolyzable tannins with Bradford reagent, Coomassie brilliant blue. *Phytochemistry.* **1999**, *51*, 363–366.

Kurzbaum, E.; Iliasafon, L.; Kolik, L.; Starosvetsky, J.; Bilanovic, D.; Butnariu, M.; Armon, R. From the Titanic and other shipwrecks to biofilm prevention: The interesting role of polyphenol-protein complexes in biofilm inhibition. *Sci. Total. Environ.* **2019**, *658*, 1098–1105.

Loomis, W. D.; Battaile, J. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry.* **1966**, *5*, 423–438.

Makkar, H. P. S.; Blümmel, M.; Becker, K. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidone and polyethylene glycol with tannins and their implications in gas production and true digestibility in in vitro techniques. *Br. J. Nutr.* **1995**, *73*, 897–913.

Makkar, H. P. S.; Blümmel, M.; Borowy, N. K.; Becker, K. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J. Sci. Food Agric.* **1993**, *61*, 161–165.

Mitchell, A. E.; Hong, Y. J.; May, J. C.; Wright, C. A.; Bamforth, C. W. A Comparison of Polyvinylpyrrolidone (PVPP), Silica Xerogel and a Polyvinylpyrrolidone (PVP)–Silica Co-Product for Their Ability to Remove Polyphenols from Beer. *J. Inst. Brew.* **2005**, *111*, 20–25.

Salminen, J.-P.; Karonen, M. Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. *Funct. Ecol.* **2011**, *25*, 325–338.

Salminen, J.-P.; Karonen, M.; Sinkkonen, J. Chemical ecology of tannins: recent developments in tannin chemistry reveal new structures and structure–activity patterns. *Chem.: Eur. J.* **2011**, *17*, 2806–2816.

Shi, C.; Tang, H.; Xiao, J.; Cui, F.; Yang, K.; Li, J.; Zhao, Q.; Huang, Q.; Li, Y. Small-angle X-ray scattering study of protein complexes with tea polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 656–665.

Siebert, K.J.; Troukhanova, N.V.; Lynn, P.Y. Nature of polyphenol -protein interactions. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 80–85.

Silanikove, N.; Nitsan, Z.; Perevolotsky, A. Effect of polyethylene glycol supplementation on intake and digestion of tannin-containing leaves (*Ceratonia siliqua*) by sheep. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 2844–2847.

Silanikove, N.; Shinder, D.; Gilboa, N.; Eyal, M.; Nitsan Z. Binding of poly(ethylene glycol) to samples of forage plants as an assay of tannins and their negative effects on ruminal degradation. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 199–205.

Tiemann, T. T.; Avila, P.; Ramírez, G.; Lascano, C. E.; Krauzer, M.; Hess, H. D. *In vitro* ruminal fermentation of tanniniferous tropical plants: Plant specific tannin effects and counteracting efficiency of PEG. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2008**, *146*, 222–241.

Verza, G. S.; Pavei, C.; Ortega G. G. Study of the specificity of cross-povidone (PVPP) as binding agent in the quantification of polyphenolic compounds. *J. Braz. Chem. Soc.* **2008**, *19*, 1627–1633.

Waterman, P. G.; Mole, S. *Methods in Ecology: Analysis of Phenolic Plant Metabolites*, Blackwell Scientific Publications, USA, **1994**, s. 12-16.

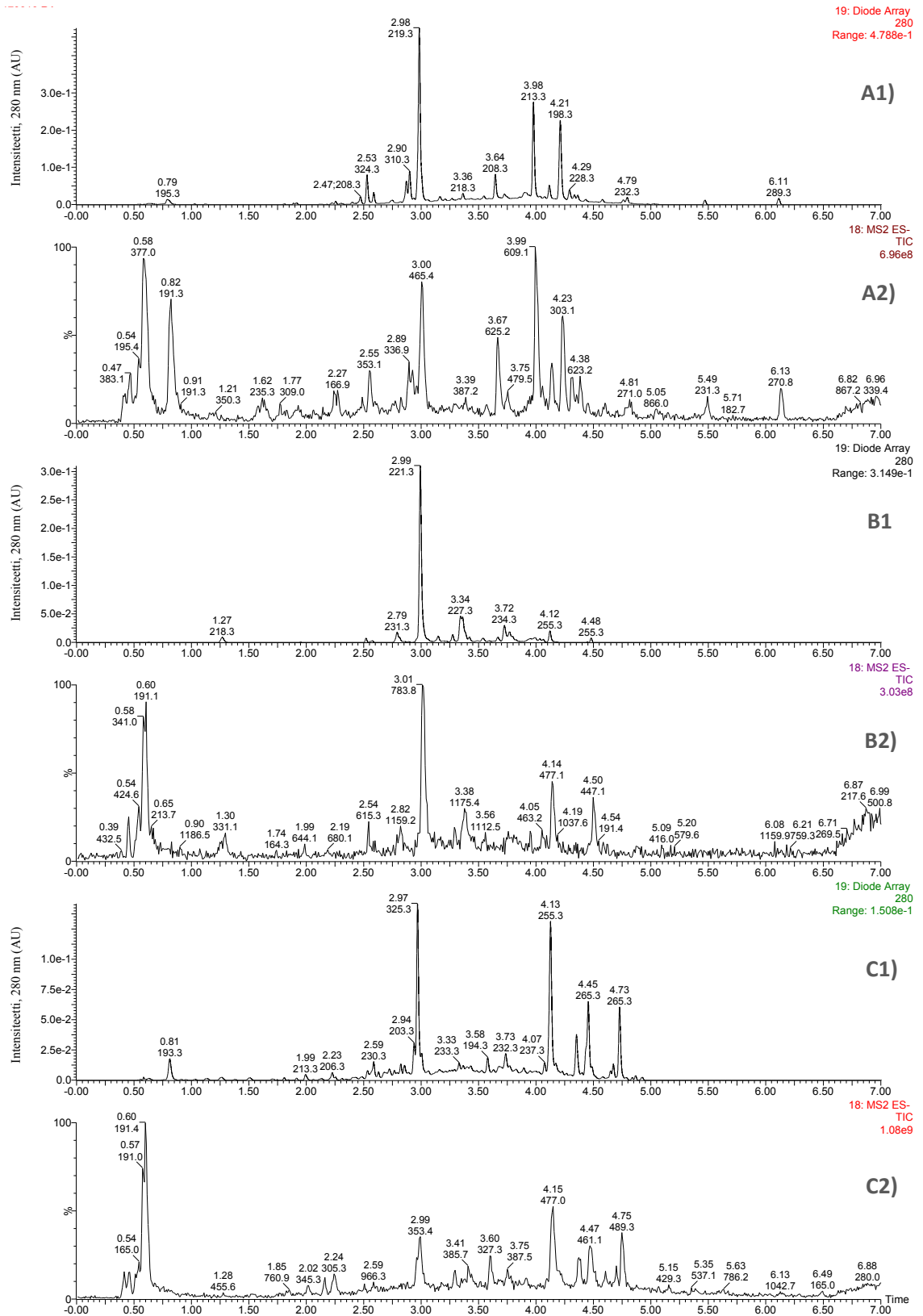
Whittle, N.; Eldridge, H.; Bartley, J; Organ, G. Identification of the polyphenols in barley and beer by HPLC/MS and HPLC/electrochemical detection. *J. Inst. Brew.* **1999**, *105*, 89–99.

Windley, H. R.; Wigley, H. J.; Ruscoe, W. A.; Foley, W. J.; Marsh, K. J. The Use of Polyethylene Glycol in Mammalian Herbivore Diet Studies: What Are We Measuring? *J. Chem. Ecol.* **2016**, *42*, 523–532.

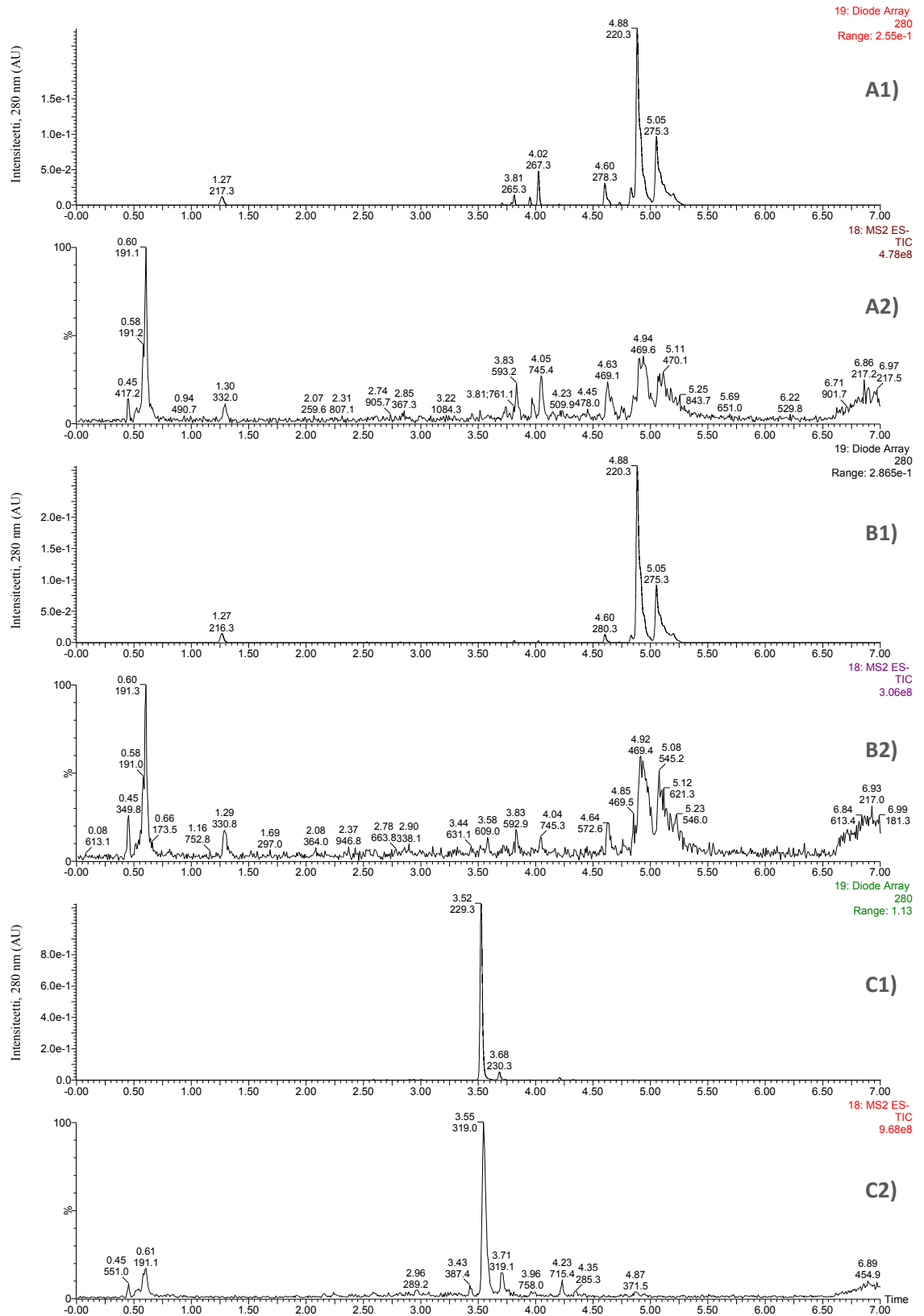
Zalipsky, S.; Harris, J. M. Poly(ethylene glycol) chemistry and biological applications. *ACS symposium series* **1997**, *680*, 1–13.

Liitteet

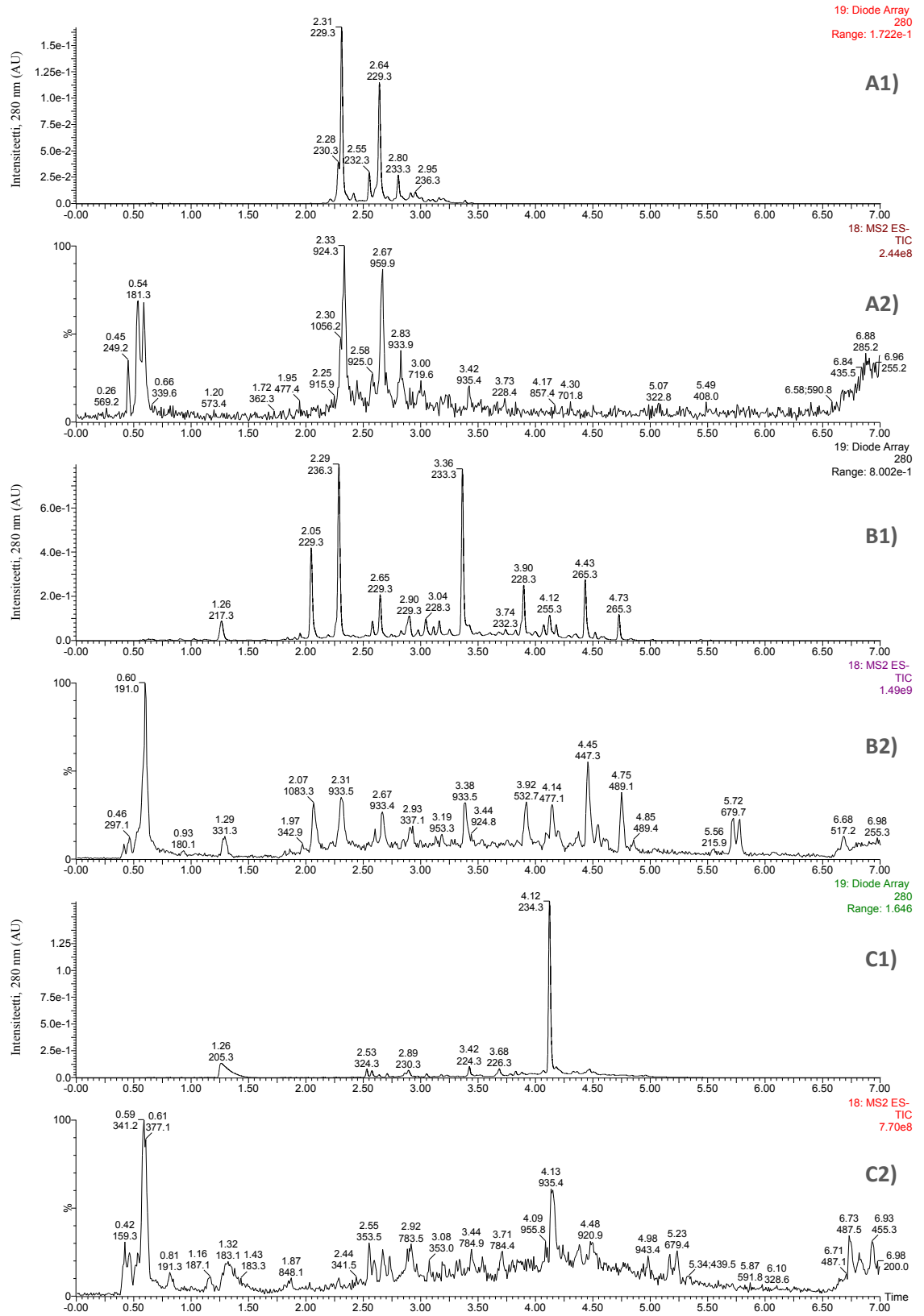
Liite 1. Kasviuutteiden UPLC-MS -kromatogrammit. **A)** Ranta-alpi, **B)** maitohorsma ja **C)** hieskoivu. **1)** UV-kromatogrammi (280 nm) ja **2)** kokonaisionikromatogrammi.



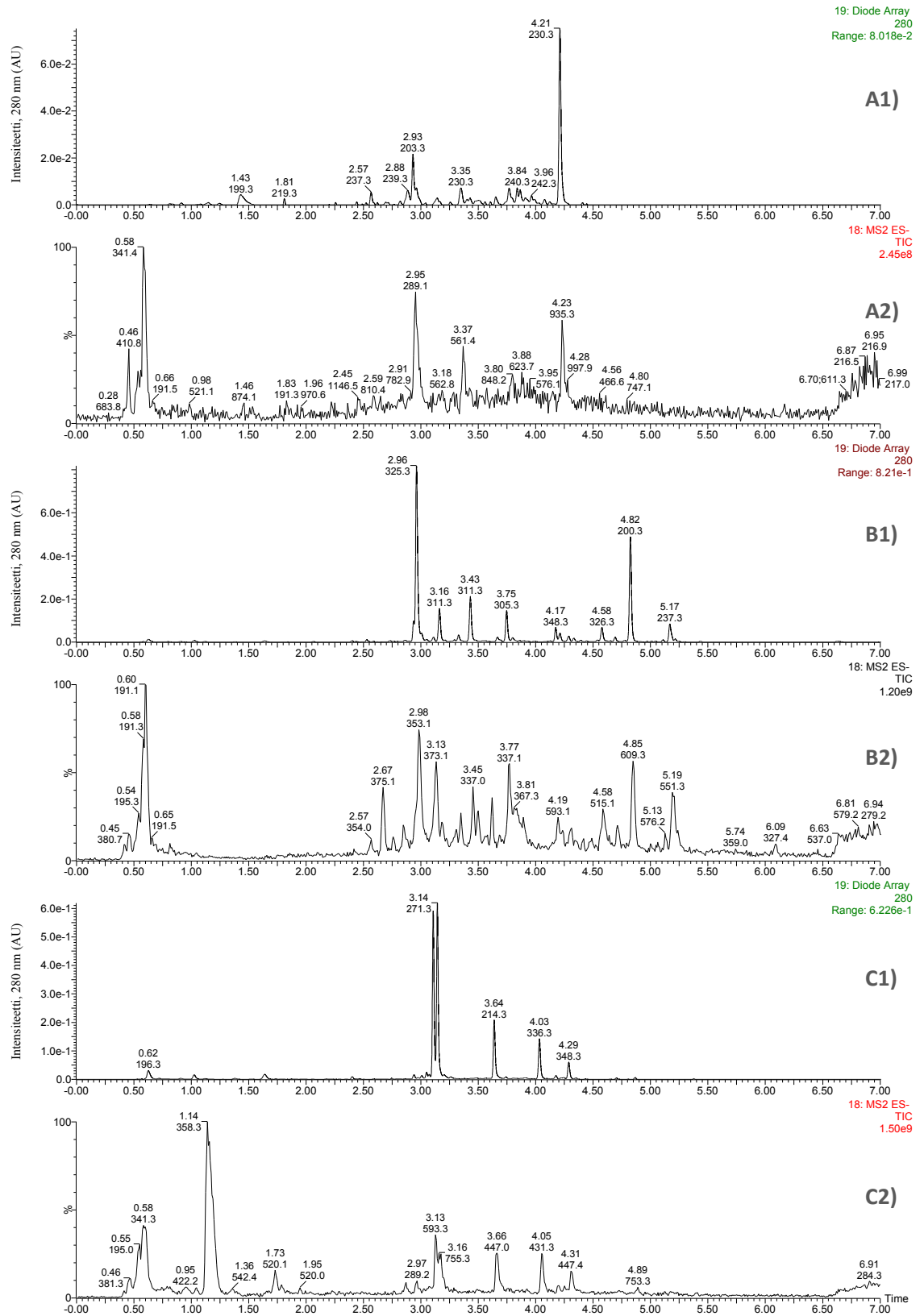
Liite 2. Kasviuutteiden UPLC-MS -kromatogrammit. **A)** Vaahtera (vihreät lehdet), **B)** vaahtera (punaiset lehdet) ja **C)** paju (punaiset lehdet). **1)** UV-kromatogrammi (280 nm) ja **2)** kokonaisionikromatogrammi.



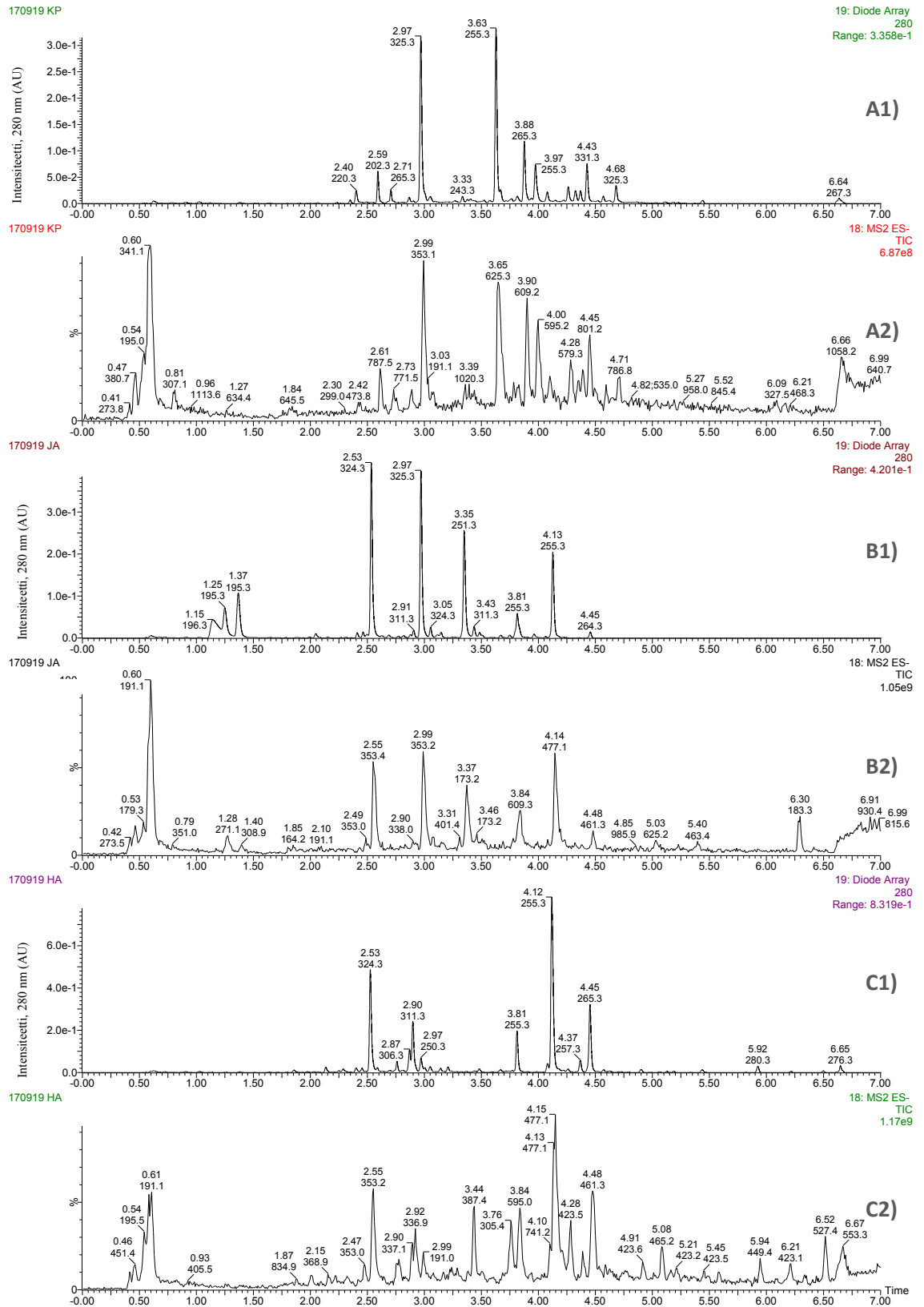
Liite 3. Kasviuutteiden UPLC-MS -kromatogrammit. A) Rantakukka, B) metsätammi ja C) kyläkellukka. 1) UV-kromatogrammi (280 nm) ja 2) kokonaisionikromatogrammi.



Liite 4. Kasviuutteiden UPLC-MS -kromatogrammit. A) Ukkomansikka, B) lehtikuusi ja C) peltotaskuruoho. 1) UV-kromatogrammi (280 nm) ja 2) kokonaisionikromatogrammi.



Liite 5. Kasviuutteiden UPLC-MS -kromatogrammit. A) Käärmeenpistoyrtti, B) jalava ja C) haapa. 1) UV-kromatogrammi (280 nm) ja 2) kokonaisionikromatogrammi.



Liite 6. Testissä käytetyt [PF]:[PEG] -suhteet ja näytteiden pitoisuudet.

[PF]:[PEG]	OB (mg/ml)	PEG 400 (mg/ml)	PEG 6000 (mg/ml)	PEG 12000 (mg/ml)	PEG 20000 (mg/ml)
10:1	0,10	0,0025	0,0382	0,0765	0,1275
70:1	0,70	0,0025	0,0382	0,0765	0,1275
200:1	2,00	0,0025	0,0382	0,0765	0,1275
30:1	0,30	0,0025	0,0382	0,0765	0,1275
210:1	2,10	0,0025	0,0382	0,0765	0,1275
600:1	6,00	0,0025	0,0382	0,0765	0,1275
30:3	0,30	0,0076	0,1147	0,2294	0,3824
210:3	2,10	0,0076	0,1147	0,2294	0,3824
600:3	6,00	0,0076	0,1147	0,2294	0,3824

Taulukko 7. Testissä käytetyt [PF]:[PEG] -suhteet ja näytteiden pitoisuudet.

[PF]:[PEG]	PF (mg/ml)	PEG 400 (mg/ml)	PEG 6000 (mg/ml)	PEG 12000 (mg/ml)	PEG 20000 (mg/ml)
20:1	0,20	0,0025	0,0382	0,0765	0,1275
140:1	1,40	0,0025	0,0382	0,0765	0,1275
400:1	4,00	0,0025	0,0382	0,0765	0,1275

Taulukko 8. Testissä käytetyt [PF]:[PEG] -suhteet ja näytteiden pitoisuudet.

[PF]:[PEG]	PF (mg/ml)	PEG 400 (mg/ml)	PEG 6000 (mg/ml)	PEG 12000 (mg/ml)	PEG 20000 (mg/ml)
1:1	0,01	0,0025	0,0382	0,0765	0,1275
2:1	0,02	0,0025	0,0382	0,0765	0,1275
5:1	0,05	0,0025	0,0382	0,0765	0,1275
10:1	0,10	0,0025	0,0382	0,0765	0,1275
15:1	0,15	0,0025	0,0382	0,0765	0,1275
25:1	0,25	0,0025	0,0382	0,0765	0,1275
50:1	0,50	0,0025	0,0382	0,0765	0,1275
100:1	1,00	0,0025	0,0382	0,0765	0,1275
200:1	2,00	0,0025	0,0382	0,0765	0,1275
400:1	4,00	0,0025	0,0382	0,0765	0,1275
600:1	6,00	0,0025	0,0382	0,0765	0,1275
800:1	8,00	0,0025	0,0382	0,0765	0,1275
1200:1	12,00	0,0025	0,0382	0,0765	0,1275

Taulukko 9. Testeissä käytettyjen PEG-liuosten pitoisuudet.

[PF]:[PEG]	PF (mg/ml)	PEG 400 (mg/ml)	PEG 6000 (mg/ml)	PEG 12000 (mg/ml)	PEG 20000 (mg/ml)
1:1	2,00	0,5100	7,6500	15,3000	25,5000
2:1	2,00	0,2550	3,8200	7,6500	12,7000
5:1	2,00	0,1020	1,5300	3,0600	5,1000
10:1	2,00	0,0510	0,7650	1,5300	2,5500
25:1	2,00	0,0204	0,3060	0,6120	1,0200
50:1	2,00	0,0102	0,1530	0,3060	0,5100
100:1	2,00	0,0051	0,0765	0,1530	0,2550
200:1	2,00	0,0026	0,0382	0,0765	0,1270
400:1	2,00	0,0013	0,0191	0,0382	0,0637
600:1	2,00	0,0009	0,0127	0,0255	0,0425
800:1	2,00	0,0006	0,0096	0,0191	0,0319
1200:1	2,00	0,0004	0,0064	0,0127	0,0212

Taulukko 10. Testeissä käytettyjen näytteiden pitoisuudet

MH (mg/ml)	MH F2 (mg/ml)	PAA 3 (mg/ml)	PAA 17 (mg/ml)
2,00	3,00	2,00	2,00
1,75	2,75	1,75	1,75
1,50	2,50	1,50	1,50
1,25	2,25	1,25	1,25
1,00	2,00	1,00	1,00
0,75	1,75	0,75	0,75
0,50	1,50	0,50	0,50
0,25	1,25	0,25	0,25