

Ville Holappa

FLAVONOIDIEN MÄÄRITYS TYRNIN LEHDISTÄ HPLC:LLÄ

FLAVONOIDIEN MÄÄRITYS TYRNIN LEHDISTÄ HPLC:LLÄ

Ville Holappa
Opinnäytetyö
Syksy 2015
Laboratorioala
Oulun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun ammattikorkeakoulu
Laboratorioala, bioteknologian sv

Tekijä: Ville Holappa

Opinnäytetyön nimi: Flavonoidien määrittäminen tyrnin lehdistä HPLC:llä

Työn ohjaaja: Eija Hakala

Työn valmistusluku- ja vuosi: Syksy 2015

Sivumäärä: 28

Tämän opinnäytetyön aiheena oli tutkia tyrnin lehtien flavonoidipitoisuuksia. Työssä keskityttiin vain kahteen tiettyyn flavonoidiin, katekiiniin ja kversetiiniin. Työn vastaanottajana toimi kotimainen yritys, Fingredient Oy, jolta saatiin työssä näytteinä käytetyt tyrnin lehdet. Fingredient Oy on perustettu 2013, ja se on erikoistunut valmistamaan luonnontuotteista kosmetiikka- ja elintarvike-teollisuudelle raaka-aineita, esimerkiksi marjauutteita. Työ tehtiin Oulun ammattikorkeakoulun laboratoriossa ja mittauksiin käytettiin koululla olevaa HPLC-laitteistoa.

Tyrnin lehtien esikäsittelyyn ja HPLC-ajoihin katsottiin mallia useammasta samankaltaisesta työstä, joiden soveltuvuudesta tai toimivuudesta juuri tähän työhön ei ollut takeita. Lisäksi ei ollut varmuutta, paljonko tyrnin lehdissä on katekiinia ja kversetiiniä. Tämän takia työ oli osittain kokeiluluonteinen. Työn edetessä ilmeni jonkin verran ongelmia, koska flavonoidit saattavat esiintyä glukosideina eli sokerijohdannaisina, mikä hankaloittaa tunnistamista ja pitoisuuksien määrittämistä. Lisäksi HPLC:llä ei ollut mahdollista käyttää samoja eluenteita kuin vastaavissa töissä, joten metodien suora kopioiminen ei onnistunut vaan sopivat ajo-olosuhteet piti hakea kokeilemalla, mikä taas vaati paljon työtä ja aikaa.

Lehdistä valmistetut näytteistä saatiin tunnistettua katekiini ja kversetiini, eli kvalitatiivinen analyysi onnistui, mutta pitoisuuksien määrittämistä eli kvantitatiivista analyysia varten menetelmää tulisi kehittää vielä eteenpäin.

Asiasanat: Tyrni, Flavonoidit, Katekiini, Kversetiini, HPLC

SISÄLLYS

TIIVISTELMÄ.....	3
SISÄLLYS.....	4
1 JOHDANTO.....	5
2 TYRNI.....	6
2.1 Terveysvaikutukset.....	7
2.2 Tyrnin lehdet.....	7
3 FLAVONOIDIT.....	8
3.1 Katekiini.....	10
3.2 Kversetiini.....	11
3.3 HPLC.....	12
TYÖN KOKEELLINEN OSUUS	14
3.4 Uuttosuunnitelma	14
3.5 Happohydrolyysi.....	15
3.6 Standardit.....	15
3.7 Työssä käytetyt reagenssit.....	18
3.8 HPLC-ajot.....	18
3.9 Työohjeet.....	21
4 TULOKSET JA TULKINTA.....	22
5 YHTEENVETO	23
LÄHTEET.....	26

1 JOHDANTO

Tämän opinnäytetyön aiheena oli määrittää kahta flavonoidia kotimaisista tyrnin lehdistä. Määritettävät flavonoidit olivat (+)-katekiini ja kversetiini. Työ oli kokeiluluontoinen, eli varmuutta siitä, paljonko tyrnin lehdistä on flavonoideja, ei ollut. Työ tehtiin Oulun ammattikorkeakoulun laboratoriossa ja määrittämiseen käytettiin HPLC-laitteistoa. Tutkimukseen katsottiin apua muutamista vastaavista töistä, joiden menetelmiä muokattiin tämän työn tarkoitukseen sopivaksi. Työssä näytteinä käytetyt tyrnin lehdet saatiin tamperelaiselta Fingredient Oy:ltä, joka toimi myös työn vastaanottajana.

2 TYRNI

Tyrni (*Hippophaë rhamnoides*) on marjoja tuottava piikikäs pensas, joka on kotoisin Aasiasta. Tyrniä on käytetty jo pitkään lääkekasvina Aasiassa. Erityisesti Kiinassa ja Venäjällä tyrnillä on pitkät perinteet lääkekasvina. Aasiassa ja Euroopassa tyrni kasvaa vuoristoseutujen lisäksi rannikoilla. Aasiassa sitä tavataan Himalajan vuoristossa ja Euroopassa rannikkojen lisäksi Alpeilla ja Karpaa-teilla. Suomessa tyrniä esiintyy luonnonvaraisena kivisillä Pohjanlahden rannikkoseuduilla. Ajan myötä tyrni on sopeutunut karuihin olosuhteisiin. Se selviytyy hyvin esimerkiksi kuivista ja kosteista ajanjaksoista ja pystyy kasvamaan myös suolaisessa maaperässä mutta varjostusta se ei siedä lainkaan. Tyrni selviytyy niukkaravinteisessa maaperässä Frankia-suvun bakteerien avulla. Bakteerit sitovat ilmasta typpeä, josta tyrni saa osansa. Tyrni on hidaskasvuinen kasvi, ja se tuottaa satoa aikaisintaan kolmevuotiaana. Tyrni kasvaa yleensä 0,5–3 metriä korkeaksi pensaaksi tai puumaiseksi pensaaksi, ja sen oksat ovat piikikkäitä. (1)

Tyrni tunnetaan yleisesti sen marjojen takia. Tyrnin tuottamat marjat sisältävät erittäin paljon vitamiineja. Marjat ovat väriltään keltaisia tai oransseja, halkaisijaltaan noin 1 cm ja muodoltaan pyöreitä. Tyrnin tuottamia marjoja on esitetty kuvassa 1. Tyrni tuottaa myös kukkia, jotka ovat tosin hyvin vaatimattomia. Kukat ovat suuruudeltaan noin 3 mm ja väriltään keltaisen vihreitä. Tyrni on kaksikotinen kasvi, eli sen hede- ja emikukinnot ovat eri kasveissa. Suomessa tyrni kukkii keväällä toukokuussa, ennen kuin lehdet ovat puhjenneet, mutta marjat valmistuvat vasta syksyllä loka-kuussa. (2; 3)

Tyrniä viljellään Suomessa lähinnä sen ravinnerikkaiden marjojen takia mutta jonkin verran myös koristekasvina. Suomessa on jalostettu tyrnistä uusia lajikkeita, jotka sopivat suomalaiseen luontoon. Jalostetut lajikkeet menestyvät hyvin Suomen olosuhteissa. Jalostettuja kotimaisia lajikkeita ovat Raisa, Rudolf, Tytti, Terho ja Tarmo. Tunnetuimpia niistä ovat Raisa ja Rudolf. (1; 3.)



KUVA 1 Tyrni (4)

2.1 Terveysvaikutukset

Tyrni on tunnettu jo vuosisatojen ajan tehokkaana lääkekasvina Aasiassa muun muassa sen sisältämien suurien vitamiinipitoisuuksien takia. Sen marjat sisältävät kaikkia muita vitamiineja paitsi D-vitamiinia. Suurina pitoisuuksina tyrnissä esiintyy C- ja E-vitamiineja. Muita vitamiineja ovat A-vitamiini sekä sen esiaste betakarotenoidi, B1-, B2-, B3-, B5-, B6-, B7-, B9-, B12- ja K-vitamiinit. Tyrnissä on myös paljon vitamiinien lisäksi fenoliyhdisteitä, kuten flavonoideja, antioksidantteja, kuituja ja rasvahappoja. Tunnetuimpia tyrnin marjoista löydettyjä flavonoideja ovat isoramnetiini, kverse-tiini ja myrisetiini. (2; 5)

Tyrnin marjoista ja siemenistä valmistettava öljy on terveellistä niiden sisältämien rasvahappojen vuoksi. Näitä rasvahappoja ovat mm. palmitoleiinihappo, steariinihappo ja ihmiselle välttämättömät alfa-linoleenihappo ja linolihappo. Rasvahapot estävät elimistössä limakalvojen kuivumista ja edistävät solujen uusiutumista. Tästä syystä tyrniöljyä käytetään kosmetiikkatuotteissa. Tutkimusten mukaan tyrnin vitamiinit yhdessä muiden aineiden kanssa vaikuttavat myönteisesti mm. sydän- ja verisuonisairauksiin, maksan toimintaan, eri syöpiin, vilustumistauteihin, väsymystiloihin, ruoansulatusvaivoihin, tulehduksiin ja ihosairauksiin. Tyrnistä voidaan valmistaa mehua, hilloa, marjajauheita, teetä ja öljyä mutta marjoja voidaan myös syödä sellaisenaan. (6; 7; 8.)

2.2 Tyrnin lehdet

Tyrnin lehdet ovat 1–5 cm:n pituisia ja muodoltaan tasasoukkaisia. Kuvassa 2 on esitetty tyrnin lehtiä. Lehtien väri on päältä vihertävänharmaa ja alapuolelta hopeanharmaa tai ruosteensuskea. Tyrnin lehdet sisältävät käytännössä samoja aineita kuin marjat ja siemenet, pitoisuudet tosin vaihtelevat. Uusimpien tutkimuksien mukaan lehdet ovat tyrnin flavonoidirikkein osa. Ihmiset saavat tyrnin lehtien hyödylliset yhdisteet käyttöön valmistamalla lehdistä esimerkiksi teetä. Itä-Euroopassa tyrnin lehdistä valmistettua teetä on käytetty influenssan ja erilaisten ihottumien hoitoon. (1; 8.)



KUVA 2 Tyrnin lehtiä (9)

3 FLAVONOIDIT

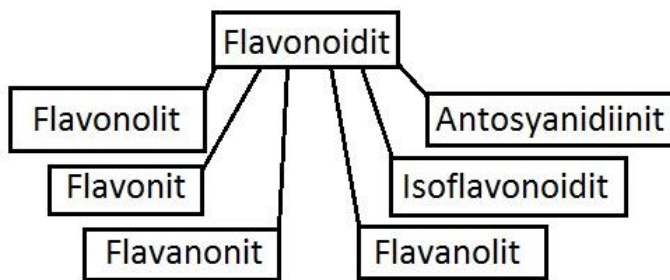
Flavonoidit ovat fenolirakenteisia yhdisteitä, joita esiintyy yleisesti lähes kaikissa kasveissa. Flavonoidien synty on varsin monimutkainen ja haarainen reaktio, jonka kaikkia vaiheita ei vielä tunneta. Flavonoidit syntyvät kasvisoluissa osana fenolien biosynteesireaktioita, kun fenyylialaniinista muodostuu ensin entsyymien avulla fenyylipropanoideja, joista sitten spesifisten reaktioiden kautta syntyy mm. flavonoideja ja lignaaneja. Nämä reaktiot tarvitsevat auringon valoa toimiakseen, ja näin ollen flavonoidit sijaitsevat usein kasvien maanpäällisissä osissa, kuten lehdissä, marjoissa ja hedelmissä. Poikkeuksen tekevät kuitenkin sipulit, jotka kasvavat maan alla. Suurimmat flavonoidipitoisuudet sijaitsevat yleensä lehdissä, marjan ja hedelmän kuoriosassa tai välittömästi sen alla. Kuoriosan poistaminen vähentää siis flavonoidipitoisuutta. (10; 11)

Flavonoidit ovat kasvien sekundaarisen aineenvaihdunnan tuotteita, eli ne eivät vaikuta suoraan kasvin kasvuun, kehitykseen tai lisääntymiseen. Sen sijaan flavonoidit vaikuttavat kasvin hedelmien, kukkien ja marjojen väriin, säilyvyyteen, makuun ja koostumukseen. Niiden tehtäviin kuuluu mm. suojaaminen auringon UV-säteilyltä, tuholaisilta, bakteereilta ja sieniltä. Flavonoidella on todettu olevan antioksidanttisia ominaisuuksia, eli ne ehkäiset hapettumisreaktioiden kautta syntyviä vapaita radikaaleja toimimasta ihmisen elimistössä. Vapaat radikaalit taas saattavat aiheuttaa esimerkiksi syöpää. Lisäksi flavonoidit ehkäisevät erilaisten tulehdusreaktioiden syntyä. Flavonoidit ovat nykyään terveyttä edistävien ominaisuuksien takia kiivaan tutkimuksen kohteena. (11; 12; 14)

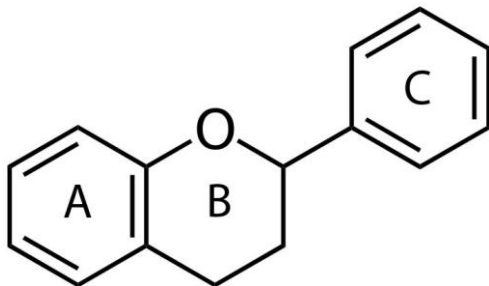
Hyviä flavonoidien lähteitä suomalaisessa ruokavaliossa ovat muun muassa omenat, sipulit, kotimaiset marjat, musta ja vihreä tee, punaviini ja suklaa. 1930–1950-luvuilla flavonoidit tunnettiin yleisesti P-vitamiinina, koska tutkimusten mukaan ne kasvattavat hiusverisuonten läpäisykykyä eli permeabiliteettia. Nykyään flavonoideja tunnetaan yli 5000, mutta määrä vaihtelee, koska flavonoidit voivat esiintyä mm. estereinä ja glukosideina, eli flavonoidiosaan on kiinnittynyt sokeriryhmä. Sokeri voi olla glukoosi, galaktoosi, arabinoosi, ramnoosi tai rutinoosi. Flavonoidien runkoa, johon mahdollinen sokeriosa voi liittyä, kutsutaan aglykoniksi. Näiden esiintyminen on vähäistä verrattuna glukosideina esiintyviin flavonoideihin. Sokeriosasta johtuen useimmat flavonoidit ovat vesiliukoisia. Flavonoidit voivat olla vesi- ja rasvaliukoisia rakenteesta riippuen. (10; 14)

Flavonoidit voidaan jakaa kemiallisen rakenteen mukaan 6 eri ryhmään kuvan 3 mukaisesti. Ryhmät ovat flavonolit, flavonit, flavanolit, flavanonit, isoflavonoidit ja antosyanidiinit. Flavonoidi on siis

vain yleisnimi kemiallisille yhdisteille, jotka sisältävät saman perusrakenteen, $C_6C_3C_6$. Flavonoidien perusrakenteessa yhteensä 15 hiiliatomia, kaksi aromaattista rengasta ja yksi heterosyklinen rengas. Funktionaaliset ryhmät, niiden paikat ja avaruudellinen suuntautuminen eli isomeria vaihtelevat eri flavonoidien välillä. Funktionaalisia ryhmiä ovat esimerkiksi hydroksyyliit ja ketonit. Flavonoidilla voi olla siis sama molekyylikaava, mutta kyseessä on eri yhdiste johtuen isomeriasta. Kuvassa 4 on esitetty flavonoidien perusrakenne. (12; 14.)



KUVA 3 Flavonoidien jaottelu



KUVA 4 Flavonoidien perusrakenne $C_6C_3C_6$

A = Aromaattinen rengas

B = Hetosyklinen rengas

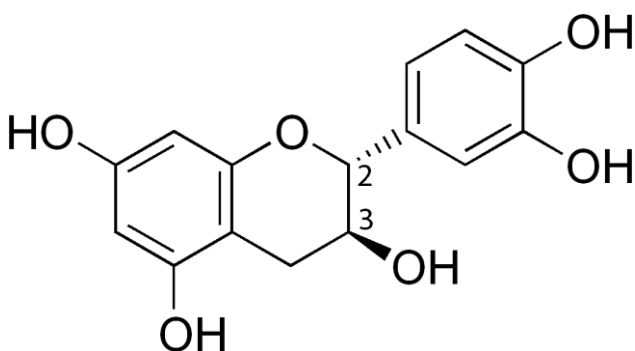
C = Aromaattinen rengas

3.1 Katekiini

Katekiini kuuluu rakenteensa vuoksi flavanoleihin. Katekiinin rakenteessa heterosykliseen renkaaseen on liittynyt hydroksyyli-ryhmä. Katekiinin molekyylikaava on $C_{15}H_{14}O_6$. Katekiinin rakenteessa on kaksi kiraalista keskusta, ja tästä syystä katekiinilla esiintyy stereoisomeriaa. Kiraaliset keskukset sijaitsevat heterosyklisen renkaan 2 ja 3 hiilissä. Kiraaliset keskukset ovat esitettynä kuvassa 5. Yhdisteillä on sama molekyylikaava mutta heterosykliseen renkaaseen liittyneiden hydroksyyli-ryhmän ja toisen bentseenirenkaan avaruudellinen suuntaaminen on eri. Trans-muodossa olevia kutsutaan katekiineiksi ja cis-muodossa olevia epikatekiineiksi. Molemmista muodoista esiintyy vielä (+)- ja (-)-muodot. Trans-muodossa olevien katekiinien ryhmät ovat suuntautuneet eri suuntiin ja cis-muodossa samaan suuntaan. Kuvassa 5 on esitetty (+)-katekiinin rakenne. (15)

Kaikkia flavanoleita kutsutaan yleisesti katekiineiksi. Flavanolit esiintyvät yleensä vapaina, mutta jonkin verran myös glukosideina. Flavanolit voivat myös esteröityä gallihapon kanssa. Flavanolit ovat värittömiä ja vesiliukoisia. (15; 16; 17)

Katekiinillä on todettu olevan antioksidanttisia ja aineenvaihduntaa kiihdyttäviä ominaisuuksia. Katekiinia esiintyy erityisesti vihreissä kasveissa mutta myös jonkin verran punaviinissä, suklaassa, marjoissa ja hedelmissä, kuten omenoissa. (16; 17.)



KUVA 5 (+)-katekiini ja kiraaliset keskukset

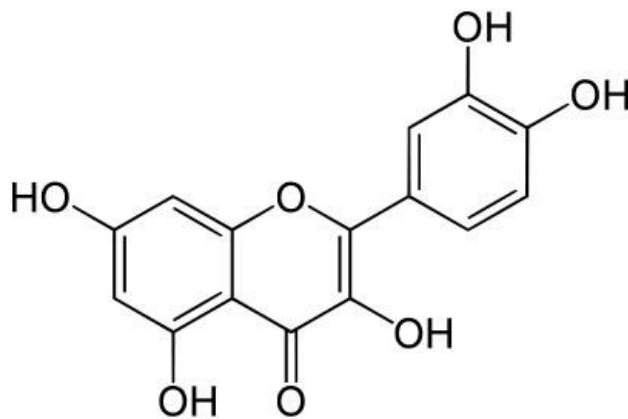
Paksu viiva = Suuntautuminen ylöspäin

Katkoviiva = Suuntautuminen alaspäin

2 ja 3 = Kiraaliset keskukset

3.2 Kversetiini

Kversetiini kuuluu rakenteensa vuoksi flavonoleihin. Kversetiinin rakennekaava on $C_{15}H_{10}O_7$, ja se on esitetty kuvassa 6. Kversetiinin heterosykliseen renkaaseen on liittynyt hydroksyyli ryhmän lisäksi ketoniryhmä. Kversetiini voi myös toimia runkona eli aglykonina muille yhdisteille. Heterosykliseen renkaaseen liittyneeseen hydroksyyli ryhmään voi liittyä sokeriosa, esimerkiksi disakkaridi rutiinooosi, jolloin syntyvä yhdiste on nimeltään rutiini. Muita rutiinin lisäksi yleisesti tavattavia kversetiini johdannaisia ovat isoramnetiini ja kversitriini. Isoramnetiini on kversetiinin metyylietteri. Kversetiini ei ole vesiliukoinen. (18; 19; 20)

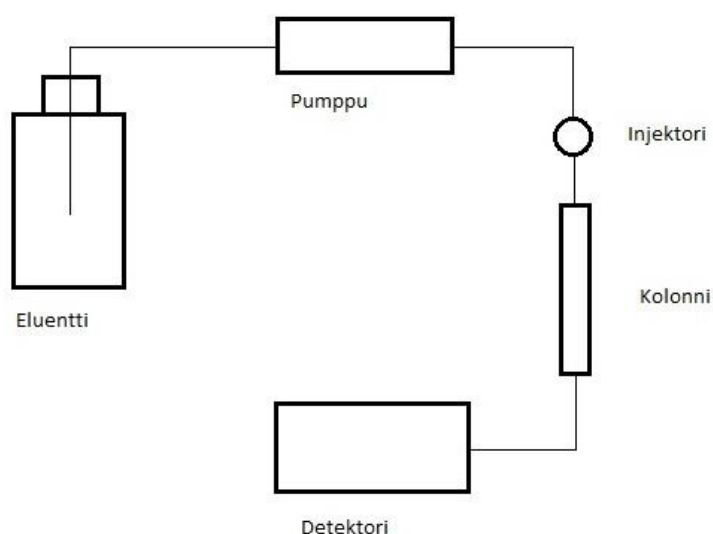


KUVA 6 Kversetiini

Kversetiinin on todettu olevan antihistamiini ja antioksidantti. Se siis ehkäisee histamiinin eritystä elimistössä ja näin ollen lievittää allergisia oireita, esimerkiksi siitepölystä johtuvaa nenän tukkoisuutta ja silmien vuotamista. Antioksidanttisten ominaisuuksien vuoksi kversetiini ehkäisee hapetusreaktioiden kautta syntyviä vapaita radikaaleja toimimasta elimistössä. Kversetiini hillitsee myös joidenkin bakteerien ja virusten kasvua. Tosin suurina määrinä kversetiini on myrkyllinen. Eläinkokeissa on havaittu, että puolet hiiristä ja rotista kuolee, kun kversetiiniannos suun kautta annettuna on 160 mg/kg. Kversetiini on aiheuttanut eläinkokeissa eläimille erilaisia syöpiä, lisääntymishäiriöitä ja mutageenisuutta soluissa. Ruuasta peräisin oleva kversetiini ei ylitä haitallisia pitoisuuksia. Hyviä kversetiinin lähteitä ovat parsakaali, omenat, sipulit, kotimaiset marjat, kuten juulukka, tyrni ja mustikka. (18; 20; 21; 22.)

3.3 HPLC

HPLC on lyhenne sanoista high performance liquid chromatography ja tarkoittaa korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa. HPLC on yleisesti käytetty menetelmä orgaanisten ja epäorgaanisten yhdisteiden tunnistamiseen, erottamiseen ja kvantitatiivisiin analyysiin. HPLC:llä on laajat soveltuvuusalueet kemian aloilla yhdisteiden analysoinnissa. Sitä voidaan käyttää esimerkiksi lääkeaineiden, proteiinien, ympäristön haitta-aineiden ja huonosti höyrystyvien aineiden analysoinnissa. HPLC:n ehtona on tutkittavien yhdisteiden liukeneminen liuottimeen tai liuotinseokseen, jota laite käyttää. Ongelmana voi olla tutkittavien yhdisteiden sakkautuminen ajon aikana. Yksinkertaisimmillaan HPLC-laitteistossa on liuotinsäiliö, korkea paineen tuottava pumppu, injektori, kolonni ja detektori. Kuvassa 7 on esitetty yksinkertainen HPLC-laitteiston kaavakuva. Usein laitteistoon on liitetty tietokone, jolla tuloksia voidaan tarkastella ja tulkita. Nykyaikaisissa HPLC-laitteistoissa voidaan myös kontrolloida eluentin ja kolonnin lämpötilaa. (24; 25)



KUVA 7 HPLC-laitteisto

Nestekromatografiassa on kaksi faasia: liikkuva faasi ja kiinteä stationaarifaasi. Liikkuva faasi on nestettä, ja sitä kutsutaan eluentiksi. Eluentti voi olla vettä, puskuriliuosta, orgaanista liuotinta tai näiden sekoituksia. Kiinteä eli stationaarifaasi on kolonniin pakattua erittäin hienojakoista materiaalia, yleensä silikaa tai modifioitua silikaa. HPLC:ssä eluentti pakotetaan kulkemaan kolonnin läpi korkean paineen avulla. Näytteen eri yhdisteiden erottuminen tapahtuu kolonnissa. Erottuminen

perustuu yhdisteiden vuorovaikutukseen eluentin ja stationaarifaasin kanssa. Erottuneet yhdisteet havaitaan detektorilla. Tietokone piirtää kuvaajan detektorilla havaituista yhdisteistä. Yleisimmin HPLC:ssä käytettyjä detektoreja ovat UV/Vis-, johtokyky- ja massaspektrometridetektorit, joista käytetyin on UV/Vis-detektori. Nykyaikainen UV/Vis-detektori voidaan laittaa mittamaan usealla aallonpituudella samaan aikaan jolloin puhutaan diodirividetektorista, DAD. Diodirividetektorilla on myös mahdollista mitata tiettyä aallonpituus väliä. (24; 25)

Nestekromatografia voidaan jakaa kahteen ryhmään: normaali- ja käänteisfaasinekromatografia. Normaalifaasikromatografiassa (NP-HPLC, normal phase high performance liquid chromatography) stationaarifaasi on poolisempi kuin eluentti. Vastaavasti käänteisfaasikromatografiassa (RP-HPLC, reverse phase high performance liquid chromatography) eluentti on poolisempi kuin stationaarifaasi. Käänteisfaasinekromatografia on nykyään käytetympi kuin normaalifaasinekromatografia. Tutkittavat yhdisteet vaikuttavat eluentin ja kolonnin valintaan. HPLC:llä pystytään tekemään analyyseja μg - ja ng -tasolla. (23; 24; 25.)

TYÖN KOKEELLINEN OSUUS

Työn suoritusta varten tehtiin suunnitelma, jonka mukaan tyrnin lehdistä valmistettiin näytteet, jotka mitattiin HPLC:llä. Suunnitelmaan katsottiin mallia muista vastaavista töistä, joissa oli määritetty samoja flavonoideja. Erityisesti mallia katsottiin Kaisu Riihisen väitöskirjasta, joka käsitteli marjojen fenolihdisteitä, joihin flavonoiditkin kuuluvat. Tarkoitus oli saada uutettua, tunnistettua ja määritettyä pitoisuus tyrnin lehdistä kahdelle tietylle flavonoidille, (+)-katekiinille ja kversetiinille. Näytteiden analysointiin käytettiin Oulun ammattikorkeakoululla olevaa HPLC-laisteistoa. Näytteinä käytetyt tyrnin lehdet saatiin tamperaiselta Fingredient Oy:ltä.

Flavonoidien pitoisuuden määrittämiseksi tehtiin standardisuorat kummastakin tutkittavasta flavonoidista ennen varsinaiden näytteiden valmistamista ja mittaamista. Standardeilla myös haettiin sopivat ajo-olosuhteet. Mallia standardien ja näytteiden valmistamiseen katsottiin muista työohjeista, joita muokattiin sopivaksi tämän työn tarkoitukseen. (26.)

3.4 Uuttosuunnitelma

Tutkittavia näytteitä oli kolme: Lindfors 1, Lindfors 2 ja Haveri. Näytteet valmistettiin yksinkertaisen etyyliasetaattiuuton ja happohydrolyysin avulla. Fingredientiltä saadut lehdet olivat jo valmiiksi murskattuja ja kuivia. Jotta uuttopinta-ala olisi mahdollisimman suuri, koitettiin lehtiä vielä murskata ja saksia pienemmiksi. Uuttoliuokseksi valittiin etyyliasetaatti Kaisu Riihisen väitöskirjan perusteella. Aluksi varmistettiin, että (+)-katekiini ja kversetiini liukenevat etyyliasetaattiin.

- Lehtiä punnittiin noin 2,5 g 50 ml Falcon-putkeen.
- Lisättiin etyyliasetaattia aluksi 20 ml (10 ml jäi kuiviin lehtiin).
- Liuosta lämmitettiin 5 min 60 °C:ssa vesihauteessa.
- Lämmitykseen jälkeen näytettä sekoitettiin (vortexoitii)10 min.
- Sekoituksen jälkeen näyte laitettiin sentrifugiin 3 min ajaksi pyörimisteholla 3000 RPM.
- Supernatantti kerättiin talteen uuteen 50 ml:n Falcon-putkeen.

Uutto toistettiin kolme kertaa mutta vain 10 ml:llä etyyliasetaatia, jolloin supernatanttia saatiin kerättyä yhteensä noin 40 ml:aa. Uuttoliuokselle tehtiin vielä happohydrolyysi, jotta flavonoideissa mahdollisesti olevat sokeriosat saataisiin katkeamaan pois.

3.5 Happohydrolyysi

Ohje happohydrolyysin katsottiin Kaisu Riihisen väitöskirjasta. Tässä työssä happohydrolyysi tehtiin käyttämällä 6M suolahappoa.

- Etyyliasetatti-uuttoliuosta otettiin 9,0 ml.
- Uuttoliuos tehtiin 0,6 M:ksi lisäämällä 1 ml 6 M suolahappoa.
- Liuosta pidettiin 75 °C:ssa vesihautessa 5 min.
- Happohydrolyysin jälkeen näytteet evaporoitiin lähes kuiviksi ja liuotettiin 2 ml:aan metanolia.

Lisättävän suolahapon määrä laskettiin kaavan 1 mukaisesti.

Lisättävän suolahapon määrä

KAAVA 1

$$V_1 = \frac{C_2 \times V_2}{C_1}$$

V_1 = pipetoitavan suolahapon tilavuus (l)

V_2 = valmistettavan näytteen tilavuus (l)

C_1 = väkevän suolahapon pitoisuus (mol/l)

C_2 = valmistettavan näytteen pitoisuus (mol/l)

Lasku:

$$V_1 = \frac{0,6 \text{ mol/l} \times 0,01 \text{ l}}{6 \text{ mol/l}} = 0,001 \text{ l} = \underline{1 \text{ ml}}$$

3.6 Standardit

Työssä käytettyjä standardeja varten valmistettiin ensin katekiinista ja kversetiinistä 500 ppm:n (500 mg/l) kantaliuokset, joista sitten pipetoitiin varsinaiset standardit. Standardien pitoisuuksiksi valittiin 1–75ppm. Kantaliuoksia varten punnittiin molempia aineita 0,1 g ja liuotettiin puhtaaseen

metanoliin 200 ml:n mittapulloihin. Taulukossa 1 on esitetty kantaliuoksien punnitusmäärät ja taulukossa 2 standardien pipetointimäärät. Varsinaiset standardit laimennettiin 70-prosenttisella metanolilla samoihin 10 ml:n mittapulloihin.

500 ppm:n (500 mg/l) kantaliuoksia varten laskettiin katekiinin ja kversetiinin punnitusmäärät verrannolla kaavan 2 mukaisesti.

Punnittava määrä

KAAVA 2

$$c = \frac{ad}{b}$$

a = 500 ppm:n kantaliuoksen massa

b = 500 ppm:n kantaliuoksen tilavuus

c = katekiinia/kversetiiniä punnittava määrä

d = kantaliuoksen tilavuus

$$c = \frac{500 \text{ mg} \times 0,2 \text{ l}}{1 \text{ l}} = 100 \text{ mg} = 0,1 \text{ g}$$

Pipetointimäärät laskettiin kaavan 3 mukaisesti.

Pipetoitava tilavuus

KAAVA 3

$$V_1 = \frac{C_2 \times V_2}{C_1}$$

V_1 = pipetoitavan kantaliuoksen tilavuus (l)

V_2 = valmistettavan standardin tilavuus (l)

C_1 = kantaliuoksen pitoisuus (mg/l)

C_2 = valmistettavan standardin pitoisuus (mg/l)

Esimerkkinä standardin 1 mg/l lasku:

$$V_1 = \frac{1 \text{ mg/l} \times 0,01 \text{ l}}{500 \text{ mg/l}} = 0,00002 \text{ l} = \underline{\underline{0,02 \text{ ml}}}$$

TAULUKKO 1. Kantaliuosten punnitusmäärät

Kantaliuos	Pitoisuus (ppm)	Punnitus (g)	Kokonaistilavuus (ml)
(+)-Katekiini	500	0,1003	200
Kversetiini	500	0,1002	200

TAULUKKO 2. Standardien pipetointimäärät

Standardi	Pitoisuus (ppm)	V 500ppm (ml)	V 70%-MeOH (ml)	Kokonaistilavuus (ml)
STD 1	1	0,02	9,98	10
STD 2	10	0,2	9,8	10
STD 3	25	0,5	9,5	10
STD 4	50	1	9	10
STD 5	75	1,5	8,5	10

3.7 Työssä käytetyt reagenssit

Taulukossa 3 on esitetty työssä käytetyt reagenssit.

TAULUKKO 3. Käytetyt reagenssit

Reagenssi	Molekyylikaava	Moolimassa (g/mol)	Puhtaus	Valmistaja	Erä
(+)-Katekiini hydraatti	$C_{15}H_{14}O_6 \cdot xH_2O$	290,27	≥98%HPLC	Sigma-Al- drich	WXBB4541V
Kversetiini dihydraatti	$C_{15}H_{10}O_7 \cdot 2H_2O$	338,26	≥98%	Lancaster	J5969A
Metanoli (MeoH)	CH_4O	32,04	99,9% GC – capillary grade	VWR Prolabo	12Z4264
Etyyliasettaatti	$C_4H_8O_2$	88,11	HPLC	VWR Prolabo	11E090505
Suolahappo (HCl)	HCl	36,46	37%	Merck KGaA	K43717386233
Muurahaishappo	CH_2O_2	46,02	99,9%	Acros Organics	A0206178001
Ultrapuhdas vesi	H_2O	18,02			

3.8 HPLC-ajot

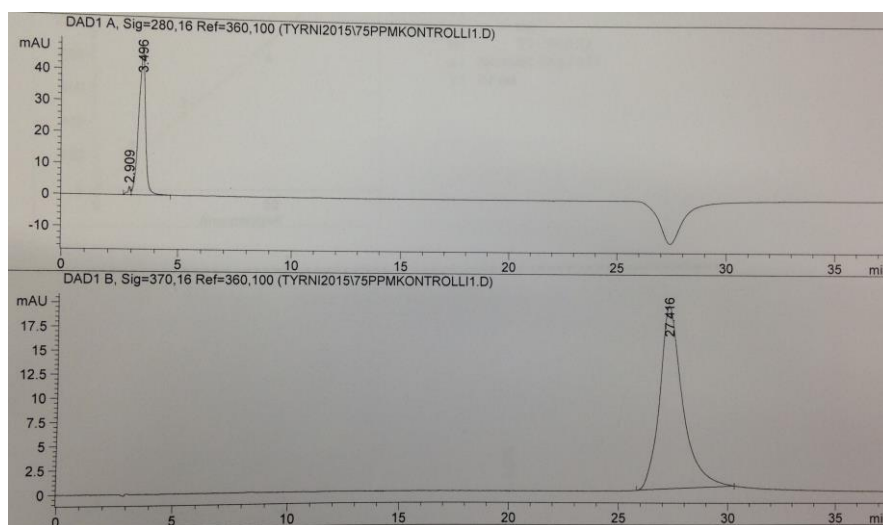
Ennen ajoja standardit ja näytteet siirrettiin HPLC-näytepulloihin. Näytteet suodatettiin vielä Chromafil GF/PET-45/25 1,0/0,45µm -membraanisudattimen läpi näytepulloihin.

HPLC:n annettiin tasapainottua noin tunti ennen ensimmäistä ajoa. Sopivat ajo-olosuhteet haettiin ajamalla vahvinta standardia, 75 ppm. Hyväksi havaitut ajo-olosuhteet tallennettiin laitteelle Tyrni-

metodiksi. Taulukossa 4 on esitetty mittauksissa käytetty Tyrni-metodi. Kuvassa 8 on 75 ppm standardin kromatogrammi (pohjaviivaa ei ole asetettu kuntoon).

TAULUKKO 4. Mittauksissa käytetty Tyrni-metodi

Parametri	Arvo
Injektioilavuus (µl)	10
Virtausnopeus (ml/min)	0,5
Ajoaika (min)	40
Eluentisuhde (%)	40/60 (MeOH/0,1 M muurahaishappo)
Aallonpituudet (nm)	280±8 (Katekiini) 370±8 (Kversetiini)
Paine (bar)	~80
Kolonnin lämpötila (°C)	25



KUVA 8 75 ppm standardi

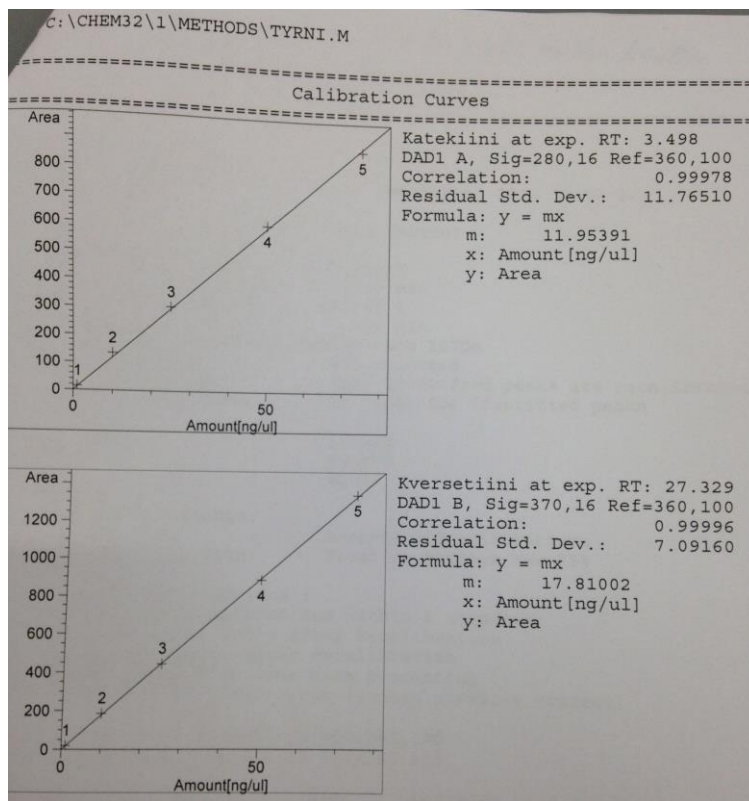
Mittauksissa käytettiin Zorbax Eclipse XDB-C8 -käänteisfaasikolonnia ja diodirividetektoria, DAD. Taulukossa 5 on esitetty katekiinin ja kversetiinin retentioajat ja korrelaatiokertoimet. Tyrni metodilla mitatuista standardeista saatiin tehtyä standardisuorat, jotka on pakotettu kulkemaan nollan kautta. Suorat on esitetty kuvassa 9. Kuvassa 10 on mittauksissa käytetty Oamkin HPLC-DAD-laitteisto.

Näytteiden välissä kolonnia puhdistettiin 15 min ajan 98-prosenttisellä metanolilla. Uuttoliuottimena käytetty etyyliasettaatti ei ollut selektiivinen pelkästään katekiinille ja kversetiinille vaan uuttamisen

aikana uuttui myös muita yhdisteitä. Nämä muut yhdisteet jäivät mittauksen aikana kolonniin, ja näin ollen kolonnin puhdistus oli välttämätön toimenpide mittausten välissä.

TAULUKKO 5. Retentioajat ja korrelaatiokerroimet

Yhdiste	Retentioaika (min)	Korrelaatiokerroin
(+)-Katekiini	3,498	0,99978
Kversetiini	27,329	0,99996



KUVA 9 Standardisuorat pitoisuuksilla 1-75 ppm



KUVA 9 HPLC-DAD-laitteisto

3.9 Työohjeet

Työ oli kokeiluluontoinen eikä käytössä ollut pelkkää yhtä työohjetta, vaan mallia katsottiin useammasta saman tyyppisistä töistä. Alla on lueteltuna työohjeita, joista on katsottu mallia tähän työhön. Eniten mallia katsottiin Kaisu Riihisen marjojen fenolihdisteitä käsittelevästä väitöskirjasta.

- Kaisu Riihinen: Phenolic Compounds in Berries. Kuopion Yliopisto 2005.
- Simultaneous determination of catechin and quercetin in extract of sea buckthorn leaves by RP-HPLC with DAD. NCBI (The National Center of Biotechnology Information) 2006.
- Maria Hakala: Mustikkamehun Valmistusprosessit. Lappeenrannan teknillinen yliopisto 2013.

4 TULOKSET JA TULKINTA

Tällä menetelmällä valmistetuista näytteistä saatiin seuraavanlaiset tulokset, jotka on ilmoitettu taulukossa 6. Tulokset on laskettu standardisuorien avulla.

TAULUKKO 6. Tulokset

	Lindfors 1	Lindfors 2	Haveri
Massa (g)	2,5212	2,5033	2,0133
Katekiini (mg)	4,7300	1,4160	2,5988
%	0,1876	0,0565	0,1290
Kversetiini (mg)	0,0568	0,1217	0,0624
%	0,0023	0,0049	0,0031

Tuloksien analysointi oli sinänsä haastavaa, koska mitään selkeää viitearvoa ei löytynyt, paljonko katekiiniä ja kversetiiniä tyrnin lehdistä on. Työn vastaanottajana toimivalta Fingredient Oy:ltä saatiin flavonoidien kokonaispitoisuuden viitearvoksi 0,1–0,2 %. Flavonoideja tunnetaan nykyään yli 5000, joten kahden tietyn flavonoidin pitoisuudet voivat hyvinkin olla todella pieniä. Katekiiniä näyttäisi näytteissä olevan reilusti enemmän kuin kversetiiniä. Katekiinin tulokset ovat välillä 1,4–4,7 mg ja kversetiini 0,06–0,12 mg. Tietoa siitä, mistä näytteet tulivat, ovatko ne eri lajikkeita vai eri satoa, ei ollut. Kasvupaikka vaikuttaa kasvin aineenvaihduntaan ja näin ollen flavonoidien pitoisuuksiin. Joka tapauksessa tämän työn perusteella voidaan todeta, että tyrnin lehdistä on katekiiniä ja kversetiiniä, mutta pitoisuudet eivät välttämättä ole kovin luotettavia. Kvalitatiivinen analyysi onnistui mutta kvantitatiivinen ei ole omasta mielestäni kovinkaan luotettava.

Työssä käytetty menetelmä ei ehkä ollut paras mahdollinen, tai sitä kannattaisi kehittää vielä eteenpäin. Erityisesti happohydrolyysiä olisi syytä muokata; kenties laimeampi happo ja pitempi reaktioaika toimisivat paremmin.

5 YHTEENVETO

Työn tavoitteena oli tutkia tyrnin lehtien flavonoidipitoisuuksia. Tutkittaviksi flavonoideiksi valittiin katekiini ja kversetiini. Tyrnin lehdet esikäsiteltiin ja varsinainen mittausta suoritettiin HPLC-laitteistolla. Työ oli osittain kokeiluluontoinen, sillä ei tiedetty onko lehdissä juuri näitä kahta flavonoidia. Analyysi oli kaksiosainen; ensin suoritettiin tunnistus ja sen jälkeen määritettiin katekiinin ja kversetiinin pitoisuudet.

Työn edetessä ilmeni muutamia ongelmia, joiden ratkaisemiseen meni aikaa. Tässä työssä ei käytetty pelkästään yhtä työohjetta vaan mallia katsottiin useammista vastaavista töistä. Näiden töiden kelpoisuus ei ollut paras mahdollinen tähän työhön, koska näytteet, kemikaalit, tutkittavat yhdisteet ja laitteet vaihtelivat suuresti töiden välillä. Ensimmäinen ongelma oli standardien valmistaminen, sillä kversetiini osoittautui niukkaliukoiseksi veden suhteen. Aluksi standardien kantaliuokset koitettiin valmistaa 50-prosenttiseen ja 70-prosenttiseen metanoliin, mutta kversetiini ei liennut niihin. Kantaliuokset tehtiin lopuksi puhtaaseen metanoliin, joista laimennettiin varsinaiset standardit 70-prosenttiseen metanoliin. Tämä osoittautui toimivaksi ratkaisuksi.

Seuraava ongelma oli standardisuoran tekeminen HPLC:llä. Ensimmäisissä ajoissa käytettiin eluenteina vain metanolia ja ultrapuhdasta vettä. Standardien pitoisuudet olivat 100-500 ppm. Standardien piikit vaelsivat tosi paljon, kun pitoisuus kasvoi. Oli syytä miettiä standardien pitoisuusaluetta uudestaan, ja standardeja päätettiin laimentaa 1-75 ppm:n alueelle. Piikit eivät vielä kukaan pysyneet paikallaan. Muista töistä huomattiin, että yhtenä eluenteina on syytä käyttää jotakin happoa, jotta piikit pysyvät paikallaan. Hapoksi päätettiin valita 0,1 M muurahaishappo. Muurahaishapon lisäyksen jälkeen saatiin tehtyä standardisuorat. Muissa töissä oli oikeastaan aina eluenteina käytetty jotakin happoa, metanolia ja asetonitriiliä. Koululla ei ollut mahdollista käyttää asetonitriiliä, joten ajo-olosuhteita ei voinut kopioida suoraan vaan niitä piti kokeilla. Standardisuorat saatiin tehtyä ja molempien korrelaatiokertoimistakin tuli hyviä.

Standardisuorien jälkeen voitiin keskittyä valmistamaan ja mittaamaan näytteitä. Näytteet valmistettiin yksinkertaisella etyyliasetattiutolla ja uutolle tehdyllä happohydrolyysillä. Mallia uuttamiseen katsottiin Kaisu Riihisen väitöskirjasta. Uutto pidettiin alussa yksinkertaisina, jotta nähtiin uutuko lehdistä mitään. Uuttonesteet evaporoitettiin ja suodatettiin ennen mittausta HPLC:llä. Havaittiin ettei näytteistä saatu piikkejä samoille kohdille kuin standardeista. Lisäämällä standardeja osaan

näytteistä saatiin piikkejä samoille kohdille kuin standardeista ja voitiin varmistua siitä, että näytteiden esikäsittelyä piti kehittää eteenpäin. Niinpä uuttovaiheessa näytteitä päätettiin lämmittää hetki 60 °C:ssa vesihauteessa ja vortexoida pitempään. Näin näytteistä saatiin tutkittavia yhdisteitä uuttamaan enemmän etyyliasetaattiin mutta tunnistus ei onnistunut vielääkään HPLC:llä.

Valmistetuille näytteille päätettiin tehdä vielä happohydrolyysi, koska katekiini ja kversetiini voivat esiintyä sokerijohdannaisina. Happohydrolyysillä saatiin mahdolliset sokeriosat katkeamaan pois. Happohydrolyysin ja suodatuksen jälkeen näytteet mitattiin HPLC:llä. Nyt näytteistä saatiin piikkejä samoille kohdille kuin standardeista. Tunnistus varmistettiin vielä lisäämällä standardeja valmistetuihin näytteisiin, jolloin piikkien pinta-alat kasvoivat. Tässä vaiheessa voitiin todeta, että tunnistus on onnistunut ja näytteissä on katekiinia ja kversetiinia. Happohydrolyysi oli siis välttämätön tunnistuksen kannalta.

Seuraavaksi koitettiin saada piikkejä erottamaan vielä paremmin eli siirryttiin tutkimaan gradienttiajoa. Gradienttiajoihin katsottiin mallia muista töistä mutta, koska käytössä ei ollut samoja eluenteja ja kolonnia, gradienttiajo ei onnistunut. Niinpä näytteiden kvantitatiivinen analyysi suoritettiin isokraattisella ajolla, mikä ei ole paras mahdollinen siihen tarkoitukseen.

Isokraattisella ajolla mitatuista näytteistä saatiin kuitenkin tuloksia, jotka ovat suhteellisen järkeviä. Selkeitä viitearvoja paljonko tyrnin lehdissä pitäisi olla katekiinia ja kversetiinia, ei ollut. Tästä syystä tuloksien arviointi osoittautui haastavaksi. Työn vastaanottajana toimivalta Fingredient Oy:ltä saatiin flavonoidien kokonaispitoisuus viitearvoksi 0,1–0,2 %. Tulokset jäivät kuitenkin kokonaisflavonoidipitoisuuksien alle, mitä voidaan pitää hyvänä merkinä.

Tässä vaiheessa työtunteja oli jo kertynyt yli 200 ja näytteetkin alkoivat olla lopussa, joten työtä oli vaikea jatkaa eteenpäin. Tällä menetelmällä valmistetut ja mitatut näytteet antoivat jonkinlaista suuntaa siitä, kuinka paljon tyrnin lehdissä on katekiinia ja kversetiinia. Menetelmää ja erityisesti happohydrolyysia olisi syytä kehittää vielä eteenpäin. Happohydrolyysi kannattaisi kenties tehdä laimeammalla kuin 6M suolahapolla ja hydrolyysiin käytettävä aika tulisi olla pitempi kuin 5 min. Lisäksi refluksionnin käyttöä hydrolyysin yhteydessä kannattaisi harkita. Näytemäärä ja lämpötilan sijaan ovat järkeviä. Mahdollisesti muita parannusehdotuksia ovat uuttoliuottimena käytetyn etyyliasetaatin vaihtaminen metanoliin. Lisäksi muissa töissä oli käytössä aina eluettina asetonitriili, joten senkin käyttöä kannattaa miettiä mahdollisuuksien mukaan. Kirjoitusvaiheessa löytyi vielä

eräs suomenkielinen ohje flavonoidien analyyseihin, jossa on ohjeistettu happohydrolyysi tekemään 2M HCl:llä ja refluksoinnilla 2h ajan. Linkki suomenkieliseen työohjeeseen löytyy lähdeluettelosta, lähde numero 14.

Kaiken kaikkiaan työstä saatuihin tuloksiin ja työn sujumiseen ongelmista huolimatta voidaan olla tyytyväisiä. Voidaan todeta, että tavoite, suorittaa kvalitatiivinen ja kvantitatiivinen analyysi tyrnin lehdistille onnistui osittain. Työn kuluessa huomattiin, että nestekromatografia on toimiva menetelmä tämän tyyppisiin analyyseihin.

LÄHTEET

1. Tyrni. 2015. Wikipedia. Saatavissa: <https://fi.wikipedia.org/wiki/Tyrni> Hakupäivä: 12.3.2015.
2. Tyrni. 2015. Vinkkilän Luomutuote. Saatavissa: <http://www.vinkkilanluomutuote.fi/tasmaravinto/marjat/> Hakupäivä 12.3.2015.
3. Tyrni, vitamiinipommi. 2013. Puutarha.net. Saatavissa: http://puutarha.net/artikkelit/266/tyrni_vitamiinipommi.htm Hakupäivä 12.3.2015.
4. Tyrni. 2015. Geocaching. Saatavissa: http://www.geocaching.com/geocache/GC5QW4B_nurmeksen-marjat-tyrni?guid=48448a66-6add-4775-8b13-8d2a0246fa32 Hakupäivä 29.8.2015.
5. Vitamiinit. 2015. Vinkkilän Luomutuote. Saatavissa: <http://www.vinkkilanluomutuote.fi/terveystieto/vitamiinit/> Hakupäivä 12.3.2015.
6. Flavonoidit. 2015. Vinkkilän Luomutuote. Saatavissa: <http://www.vinkkilanluomutuote.fi/terveystieto/flavonoidit/> Hakupäivä: 12.3.2015.
7. Tyrni. 2015. Arktiset aromit. Saatavissa: <http://www.arctic-flavours.fi/fi/arktiset+aromit/marjat/luonnonmarjat/tyrni/> Hakupäivä 13.3.2015.
8. Tyrni luonnon oma monivitamiinivalmiste. 2003. Kehittyvä elintarvike. Saatavissa: <http://kehittyvaelintarvike.fi/teemajutut/26-tyrni-luonnon-oma-monivitamiinivalmiste> Hakupäivä 12.3.2015.
9. Sea buckthorn leaves. 2014. Agriculture and agri-food Canada. Saatavissa: <http://www.agr.gc.ca/eng/science-and-innovation/agricultural-practices/agroforestry/shelterbelt-planning-and-establishment/selecting-trees-and-shrubs-species/sea-buckthorn/?id=1345846726859> Hakupäivä 12.3.2015.
10. Flavonoidi. 2013. Terveyskirjasto. Saatavissa: http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=skr00040 Hakupäivä 18.3.2015.
11. Fenoliset yhdisteet suojaavat kasvia. 2008. Tohtori.fi. Saatavissa: <http://www.tohtori.fi/?page=6096333&id=2981881> Hakupäivä 18.3.2015.
12. Flavonoids. 2015. Wikipedia. Saatavissa: <http://en.wikipedia.org/wiki/Flavonoid> Hakupäivä 19.3.2015.
13. Anttila, Pia. 2010. Flavonoidit. Punaviinin flavonoidien tunnistaminen. Lappeenrannan teknillinen yliopisto. Saatavissa: <https://www.doria.fi/bitstream/handle/10024/66670/nbnfi-fe201012213150.pdf?sequence=3> Hakupäivä 19.3.2015.

14. Hyvärinen, Helena. 2001. 2. Fenolisten yhdisteiden biokemia ja esiintyminen. Kasvipäriset biomolekyylit - Fenoliset yhdisteet ja terpeenit. MTT.. Saatavissa <http://www.mtt.fi/asarja/pdf/asarja100.pdf> Hakupäivä 10.4.2015.
15. Katekiinit ja terveys. 2010. Terveesti.blogspot.fi. Saatavissa: <http://terveesti.blogspot.fi/2010/02/07/katekiinit-ja-terveys-7965312/> Hakupäivä 19.3.2015.
16. Riihinen, Kaisu. 2005. Flavan-3-ols and proanthocyanidins. Phenolic compounds in berries. Saatavissa: http://epublications.uef.fi/pub/urn_isbn_951-27-0440-4/urn_isbn_951-27-0440-4.pdf Hakupäivä 30.3.2015.
17. Anttila, Pia. 2010. Katekiinit .Punaviinin flavonoidien tunnistaminen. Lappeenrannan teknillinen yliopisto. Saatavissa: <https://www.doria.fi/bitstream/handle/10024/66670/nbnfi-fe201012213150.pdf?sequence=3> Hakupäivä 30.3.2015.
18. Kversetiini. 2014. Wikipedia. Saatavissa: <http://fi.wikipedia.org/wiki/Kversetiini> Hakupäivä 19.3.2015.
19. Kversetiini. 2015. Flavonoidi.com. Saatavissa: <http://www.flavonoidi.com/kversetiini> Hakupäivä 19.3.2015.
20. Quercetin. 2015. Wikipedia. Saatavissa: <http://en.wikipedia.org/wiki/Quercetin> Hakupäivä 20.3.2015.
21. Riihinen, Kaisu. 2005. Flavonols. Phenolic compounds in berries. Saatavissa: http://epublications.uef.fi/pub/urn_isbn_951-27-0440-4/urn_isbn_951-27-0440-4.pdf Hakupäivä 30.3.2015.
22. Anttila, Pia. 2010. Flavonolit. Punaviinin flavonoidien tunnistaminen. Lappeenrannan teknillinen yliopisto. Saatavissa: <https://www.doria.fi/bitstream/handle/10024/66670/nbnfi-fe201012213150.pdf?sequence=3> Hakupäivä 30.3.2015.
23. HPLC. 2015. Wikipedia. Saatavissa: http://en.wikipedia.org/wiki/High-performance_liquid_chromatography Hakupäivä 20.3.2015.
24. Nestekromatografia. 2015. Laboratorioanalyysit Opetushallitus. Saatavissa: http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_2-6_nestekromatografia.html Hakupäivä 20.3.2015.
25. Anttila, Pia. 2010. Korkean erotuskyvyn nestekromatografia. Punaviinin flavonoidit kandidaatintyö. Lappeenrannan teknillinen yliopisto. Saatavissa: <https://www.doria.fi/bitstream/handle/10024/66670/nbnfi-fe201012213150.pdf?sequence=3> Hakupäivä 23.3.2015.

26. Riihinen, Kaisu. 2005. Sequential extraction. Phenolic compounds in berries. Saatavissa: http://epublications.uef.fi/pub/urn_isbn_951-27-0440-4/urn_isbn_951-27-0440-4.pdf Hakupäivä 25.3.2015.