

LUONNON SÄILÖNTÄAINEET



Opinnäytetyö

Bioprosessitekniikka

Hämeenlinna 13.4.2004

Seija Juuvinmaa

HÄMEEN AMMATTIKORKEAKOULU
Bioprosessitekniikka
Visamäentie 35 B
13100 HÄMEENLINNA

OPINNÄYTETYÖ

Työn nimi *Luonnon säilöntäaineet*

Tekijä *Seija Juuvinmaa*
Haapainojantie 3 G
16900 Lammi

Tilaaja *Arktiset Aromit Ry*
Kauppakatu 20
89600 SUOMUSSALMI
08- 6176 2290

Ohjaaja *Helena Kautola*

Hyväksytty _____ . _____ . 20 _____ arvosanalla _____

Hyväksyjä

Arvosana-asteikko 5 = kiitettävä, 4-3 = hyvä, 2-1 = tyydyttävä

Bioprosessitekniikka

Tekijä	Seija Juuvinmaa	Vuosi 2004
Toimeksiantaja	Arktiset Aromit Ry	
Työn nimi	Luonnon säilöntäaineet	
Työn säilytyspaikka	Hämeen ammattikorkeakoulu, Hämeenlinna	

TIIVISTELMÄ

Työn tarkoituksena oli selvittää mesiangervon ja kanervan sisältämiä luontaisia säilöntäaineita. Ne kuuluvat suomalaisiin kauppayrteihin, joten niiden saatavuus on parempi, kuin niihin kuulumattomien kasvien.

Työ aloitettiin selvittämällä luontaisiksi säilöntäaineiksi sopivia, kasveista peräisin olevia aineita. Aineiden uutto-, suodatus- ja erotusmenetelmiä tutkittiin.

Luontaisiksi säilöntäaineiksi soveltuviksi aineiksi havaittiin flavonoidien alaryhmään flavoneihin kuuluvat kemferoli, kversetiini ja myrisetiini. Näillä on todettu olevan paljon antimikrobisia vaikutuksia ja ne estävät rasvojen hapettumista.

Tutkimus tehtiin ohutlevykromatografialla, joka soveltuu yksin huonosti tähän tutkimukseen. Lisäksi olisi tarvittu kvantitatiivinen analysointimenetelmä.

Tällä menetelmällä kuivatusta kanervan kukasta löytyi selvästi kemferolia ja luultavasti myös myrisetiiniä. Tuoreesta kanervan lehdestä löytyi ainoastaan kemferolia. Kuivatusta mesiangervon lehdestä ei tällä menetelmällä löytynyt lainkaan etsittyjä flavonoleja.

Asiasanat Flavonolit, luonnon säilöntäaineet,

Sivut 27 + liitteet

Degree Programme in Bioprocess Engineering

Author	Seija Juuvinmaa	Year 2004
Commissioned by	Arktiset Aromit Ry	
Subject of thesis	Natural Preservatives	
Archives	Häme Polytechnic, Hämeenlinna	

ABSTRACT

The purpose of this study was to examine natural preservatives in meadowsweet and heather. They belong to the Finnish commodity herbs so their availability is better than that of plants which don't belong to them.

The study was carried out by finding out substances which are from plants and applicable as a natural preservative. Extraction, filtration and separation methods of these substances were studied.

Substances which are applicable as natural preservatives are flavonols. They belong to the subgroup of flavonoids and are kaempferol, quersetin and myricetin. It has been proved that they have many antimicrobial effects and they also inhibit oxygenation of fats.

The study was carried out by the thin layer chromatography which is alone a bad method for this study. Another analysis method would have been needed to obtain a quantitative result.

With the help of this method kaempferol and probably also myricetin was found in the flower of dried heather. In the leaf of fresh heather was found only kaempferol. In the leaf of dried meadowsweet no flavonols studied were found.

Keywords Flavonols, natural preservatives

Pages 27 + appendices

JOHDANTO	1
KIRJALLINEN OSUUS	2
1. KASVIEN RAKENNE	2
2. KASVIEN SISÄLTÄMÄT AINESOSAT	2
2.1 FENOLYHDISTEET	2
2.2 FLAVONOIDIT	3
2.3 FLAVONOIDIEN OMINAISUUKSIA.....	3
3. ELINTARVIKKEIDEN KEMIALLISET SÄILÖNTÄAINEET	5
3.1 SORBIINI- JA BENTSOAHAPPO.....	5
3.2 RIKKIHAPOKE JA SULFIITIT	5
3.3 NITRAATTI JA NITRIITTI	5
3.4. ADI-ARVO.....	6
4. LUONTAISET SÄILÖNTÄAINEET	6
4.1 FLAVONOLIT.....	7
4.1.1 <i>Kversetiini, kemferoli ja myrisetiini</i>	7
4.2 FLAVONIT.....	8
5. EROTUS- JA TUTKIMUSMENETELMÄT	8
5.1 NÄYTTEEN ESIKÄSITTELY	8
5.1.1 <i>Yleistä</i>	8
5.1.2 <i>Uutto</i>	8
5.1.3 <i>Uutteen väkevöinti</i>	10
5.2 KROMATOGRAFISET MENETELMÄT	11
5.2.1 YLEISTÄ.....	11
5.2.2 PAPERIKROMATOGRAFIA (PC).....	11
5.2.3 OHUTLEVYKROMATOGRAFIA (TLC).....	12
5.2.4 KAASUKROMATOGRAFIA (GC).....	12
5.2.5 PVLVÄSKROMATOGRAFIA (CC).....	12
5.2.6 NESTEKROMATOGRAFIA (HPLC)	12
5.3 SPEKTROSKOPISET MENETELMÄT	13
6. KOTIMAISIA LUONNONKASVEJA, JOISSA SÄILÖNTÄOMINAISUUKSIA	13
6.1 KASVEISTA LÖYTYNEET FENOLISET YHDISTEET:	13
6.2 KASVEILLA ESIINTYVÄT ANTIMIKROBISET VAIKUTUKSET	14
6.2.1 KANERVA	15
6.2.2 MESIANGERVO	15
6.2.3 TIMJAMI.....	15
6.2.4 PUOLUKKA	15
7. PAKKAAMINEN	15
7.1 YLEISTÄ	15
7.1.1 FLAVONOIDEJA SISÄLTÄVIEN TUOTTEIDEN PAKKAAMINEN	16
8. TUTKIMUSSUUNNITELMA	16
8.1 TUTKITTAVAT KASVIT	16
8.1.1 KANERVA	17
8.1.2 MESIANGERVO	17
9. TUTKIMUSMENETELMÄ	18
9.1 TUTKIMUSMENETELMÄN VALINTA	18
9.2 TUTKIMUSMENETELMÄN VAIHTAMINEN.....	19
10. TYÖN SUORITUS	20
11. TYÖN TULOKSET	21

12. TULOSTEN ARVIOINTI.....	22
LÄHTEET.....	24
LIITTEET.....	26

JOHDANTO

Työn tarkoituksena oli selvittää suomalaisissa kasveissa esiintyvien luontaisten säilöntäaineiden ominaisuuksia ja pitoisuuksia. Luontaisia säilöntäaineita ovat vain kasvisoluissa esiintyvät fenoliset yhdisteet, kuten flavonolit ja flavonit. Eläinkunnan tuotteissa tämänkaltaisia yhdisteitä ei esiinny. Yleisempiä flavonoleja ovat kversetiini, kemferoli ja myrisetiini. Yleisemmin esiintyviä flavoneja ovat apigeniini, luteoliini, tangeretiini sekä nobiletiini. Flavonolit sekä flavonit kuuluvat flavonoidien alaluokkaan, johon kuuluvat lisäksi mm. flavanolit, proantosyanidiinit, antosyanidiinit sekä isoflavonoidit. Flavonoideja on tunnistettu jo useita tuhansia ja tässä käsitellään tunnetuimpia yhdisteitä.

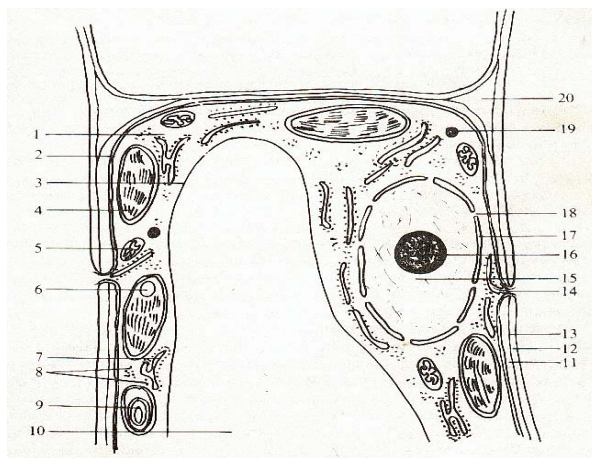
Flavonoideja pidetään yleisesti antioksidanteina, jotka ehkäisevät rasvojen hapettumista ja lisäävät esim. elintarvikkeiden säilyvyyttä ja edistävät ihmisen terveyttä. Flavonoideilla on todettu myös paljon antimikrobisia vaikutuksia eli ne estävät haitallisten bakteereiden, virusten, homeiden ja sienien kasvua.

Tutkimuksia flavonoideista on tehty ja tehdään paljon, mutta yleisimmin lääketieteelliseltä pohjalta. Elintarvikkeiden säilyvyyttä koskevaa tietoa on vielä vaikea löytää. Flavonoidien pitoisuuksia koskevissa taulukoissa ilmoitetaan yleensä ulkomailla esim. Hollannissa tutkittujen ja kasvaneiden kasvien pitoisuuksia. Kasvuolosuhteet kuitenkin vaikuttavat paljon kasvin flavonoidipitoisuuteen. Suomessa kasvuolosuhteet ovat erilaiset kuin esim. Hollannissa. Tutkimustulosten vertailua vaikeuttaa myös se, että toisissa tutkimuksissa ilmoitetaan flavonoidipitoisuudeksi agykonipitoisuus ja toisissa taas glykosidipitoisuus.

KIRJALLINEN OSUUS

1. KASVIEN RAKENNE

Kasvit ovat rakentuneet pienistä soluista, jotka rakenteensa mukaan jaetaan yleensä kahteen päätyyppiin tylppysoluihin ja suippusoluihin. Suippusolut toimivat yleensä tukirakenteina ja tylppysolut mitä erilaisimmissa muissa tehtävissä. Kasvisolujen koko on yleensä noin 0.01 –0.1 mm. Kasvisolun näkyvin osa on kiinteä soluseinä, jonka sisäpuolella on solulima ja siinä oleva tuma. /9/



KUVA 1. Osa elävää kasvisolua. Kaavakuvaan on merkitty myös eräitä vain elektronimikroskoopilla näkyviä rakenteita. 1) solulima, 2) solukelmu, 3) solunestettä rajoittava kelmu, 4) viherhiukkanen, 5) mitokondrio, 6) yhteyttämistärkkelystä viherhiukkasessa, 7) solulimakelmustoa, 8) ribosomeja, 9) valkoshiukaseen syntyvä tärkkelysjyvänen, 10) solunesteontelo, 11-13) soluseinä, siinä 11) tämän solun ja 12) naapurisolun muodostama kerros, 13) keskilevy, 14) soluseinän huokonen, 15) tuma, 16) tumajyvänen, 17) tumakelmu, 18) tumakelmun aukko, 19) öljypisara, 20) soluväli. /9/

2. KASVIEN SISÄLTÄMÄT AINESOSAT

2.1 Fenoliyhdisteet

Ravintoaineiden lisäksi kasvikunnan tuotteissa on paljon erilaisia yhdisteitä, joilla voi olla erilaisia edullisia vaikutuksia elintarvikkeissa. Tällaisia fytokeemikaaleja ovat mm. karotenoidit, glukosinolaanit, alliumyhdisteet, monoterpeenit, kasvisterolit, fytaatit, proteaasi-inhibiittorit sekä fenoliset yhdisteet. Fenoliyhdisteet ovat vesiliukoisia ja ne ovat usein liittyneinä sokereihin, kuten glukosideihin. /16/

Kasvien fenoliyhdisteisiin kuuluvat flavonoidit ovat yhdisteitä, joissa on aromaattinen rengas ja siinä yksi tai useampia hydroksyyli ryhmiä. Ne muodostavat suurimman ryhmän kaikista kasvien fenoliyhdisteistä, mutta on myös yksinkertaisia monosyklisiä fenoleja, fenyylipropanoideja ja fenolikinoneja. /16/

Muita kasvifenoleja ovat fenolihapot, lignaanit, stilbeenit, kumariinit, tanniinit, ligniinit. /16/

2.2 Flavonoidit

Flavonoidit ovat suuri ja heterogeeninen yhdisteryhmä. Kasveista on tähän mennessä tunnistettu useita tuhansia flavonoideja ja niiden johdannaisia.

Elintarvikkeissa esiintyy ainakin flavonoleihin, flavoneihin, flavanoneihin, katekiineihin, proantosyanidiineihin, antosyaaneihin ja isoflavonoideihin kuuluvia flavonoideja.

Flavonoideja muodostuu vain kasvisoluissa, eläinsolut eivät pysty syntetisoimaan niitä.

Flavonoidien synteesi tarvitsee valoa, siksi suurimmat pitoisuudet ovat lehdissä ja kasvin muissa maanpäällisissä osissa, lukuun ottamatta sipulia, jossa on runsaasti flavonoideja myös maanalaisessa osassa. Flavonoisipitoisuuteen vaikuttavat kasvuolosuhteet, lajike, hedelmän koko ja kypsyysaste. Kasvien kasvatus kasvihuoneessa vähentää niiden flavonoidipitoisuutta. /16/

2.3 Flavonoidien ominaisuuksia

Flavonoidien alkuperäinen tarkoitus on puolustaa kasvia auringon ultravioletti säteilyä, taudinaiheuttajia, hyönteisiä, kasvissyöjiä ja kilpailevia kasveja vastaan. Tämän vuoksi kasville on kehittynyt värillinen yhdiste, joka soveltuu tähän puolustustehtävään parhaiten. /1/

Flavonoidien synteesi tarvitsee valoa ja siksi suurimmat flavonoidipitoisuudet ovat lehdissä ja kasvin muissa maanpäällisissä osissa. Lisäksi flavonoidipitoisuudet ovat kasvin pintasolukoissa suuremmat kuin kasvin sisäosissa. Poikkeuksen muodostaa sipuli, jossa flavonoideja on runsaasti myös maanalaisessa osassa. Flavonoidipitoisuus korreloi lehden vihreyden eli klorofyllipitoisuuden kanssa. Tästä syystä kasvien kasvatus kasvihuoneessa vähentää niiden flavonoidipitoisuutta. /16/

Flavonoidit vaikuttavat värin lisäksi kasviperäisten elintarvikkeiden makuun, rakenteeseen ja säilyvyyteen. Uusimpien tutkimustulosten perusteella flavonoideilla saattaa olla myös myönteinen vaikutus terveyteen, mutta on olemassa myös päinvastaisia tutkimuksia, joiden mukaan flavonoideilla ei ole ihmiselle terveyttä edistävää vaikutusta. Kyseiset yhdisteet ovat voimakkaita antioksidantteja, jotka ehkäisevät mm. rasvojen hapettumista ja saattavat ehkäistä sydän- ja verisuonitauteja syöpää, tulehduksia, allergioita sekä osteoporoosia. Tietoja löytyy, jopa kasvifenolien vaikutuksista malarian sekä HIV-viruksen hoidossa.

Kasvifenoleilla on myös todettu antimikrobisia vaikutuksia. Ne ehkäisevät bakteerien kasvun lisäksi myös virusten, homeiden ja hiivojen kasvua. /14/

Kasvifenoleista steroideja käytetään niiden kolesterolia alentavan vaikutuksen vuoksi monissa elintarvikkeissa. Tunnetuin lienee kolesterolia alentava margariini, mutta myös majoneesipohjaisiin salaatteihin ja jogurtteihin kasvisteroideja lisätään.

Antosyaaneja käytetään jonkin verran elintarvikkeiden, pääasiassa mehujen, hillojen ja virvoitusjuomien väriaineina, mutta ne ovat huomattavasti kalliimpia ja vaikeampia käyttää kuin synteettiset väriaineet.

Pitkälle hapettuneet flavonoidit eli flavanolit, flavonit, flavonolit ja useimmat antosyaanit kestävät suhteellisen hyvin lämpöä, happea, kuivuutta ja happamuutta, mutta tuhoutuvat melko nopeasti valon vaikutuksesta. Ne eivät siis tuhoudu ruoan prosessoinnissa ja valmistuksessa, elleivät altistu voimakkaalle valolle. Keittämisen ja paistamisen aiheuttama hävikki on alle 20 %. Kversetiini kestää tuhoutumatta kuumennuksen 200°C:ssa 20 min ajan, mutta kun se altistettiin 15 000 luxin valolle, osa siitä tuhoutui alle neljässä tunnissa ja kahden vuorokauden kuluttua puolet siitä oli tuhoutunut. Vapaa kversetiini tuhoutuu siis helposti auringon valon vaikutuksesta. Auringonvalon valaistus voimakkuus on 40 000 luxia. Alkaalisissa olosuhteissa niillä flavonoideilla, joiden B-renkaassa on hydroksyyliiryhmä, on taipumus hapettua kinoneksi. Reaktiota katalysoivat mono- ja polyfenolioksidaasit, joita on kaikessa kasvimateriaalissa. Kinonit muodostavat kondensaatiotuotteita aminohappojen ja proteiinien kanssa. Muodostuvat katekiinit ovat herkkiä hapelle ja jo neutraalissa pH:ssa tapahtuu hapettumista ja polymeroitumista

ruskeiksi yhdisteiksi. Tällainen reaktio on mm. leikatun omenan ja päärynän ei-entsyymaattinen tummuminen. /16/

Flavonoidien mahdollista käyttöä elintarvikkeiden hapettumisen estoon on rajoittanut niille ominainen kitkerä maku, niiden heikko stabiilisuus sekä niiden vaikutus tuotteiden väriin. Flavonoidien eristäminen on myös kallista ja prosessointi vaikeaa. /6/

3. ELINTARVIKKEIDEN KEMIAALLISET SÄILÖNTÄAINEET

Erilaisia säilöntäaineita on Suomessa käytössä noin viisikymmentä. Ne vähentävät mikro-organismien kehitystä ja kasvua. Säilöntäaineiden käyttö parantaa tuotteiden säilyvyyttä sen jälkeen, kun pakkaus on avattu. Säilöntäaine ei saa aiheuttaa kuluttajalle terveydellistä vaaraa tai haittaa. /13/

3.1 Sorbiini- ja bentsoahappo

Sorbiini- ja bentsoehappo sekä niiden suolat ovat Suomessa kaikkein yleisimmin käytössä olevat säilöntäaineet. Niitä käytetään mm. hilloissa ja juomissa sekä säilykkeissä. Sorbiinihapon kaltaisia yhdisteitä esiintyy luonnossa, mm. pihlajanmarjoissa. Bentsoehappoa on puolestaan esim. karpalossa, puolukassa ja lakassa. Osa ihmisistä on kuitenkin herkistynyt bentsoehapolle ja bentsoaateille. Nämä henkilöt eivät usein voi myöskään käyttää salisylaattipohjaisia särkylääkkeitä. /13/

3.2 Rikkihapoke ja sulfiitit

Rikkihapoketta ja sen suoloja, sulfiitteja, käytetään myös säilöntäaineina estämään homeiden ja mikrobien toimintaa. Ne ovat haitallisia erityisesti astmaatikoiden. Sulfiitteja käytetään mm. kuivatuissa hedelmissä, tuoreissa viinirypäleissä, viineissä, virvoitusjuomissa, hilloissa, marmeladeissa ja soseissa sekä kuorituissa perunoissa. /13/

3.3 Nitraatti ja nitriitti

Suomalaiset saavat nitraattia eniten kasviksista (n. 80 %) ja nitriittiä lihatuotteista (n. 97 %). Kasvikset sisältävät luontaisesti nitraatteja, mutta elintarvikkeisiin lisätään

lisäaineina sekä nitraatteja että nitriittejä mm. estämään ruokamyrkytystä aiheuttavien mikrobien toimintaa. Nitriitti voi muodostaa haitallisia nitrosoamiineja joko elintarvikkeissa tai mahalaukussa ja suolistossa reagoidessaan amiinien kanssa. Nitraatit voivat puolestaan pelkistyä nitriiteiksi. Nitrosoyhdisteet ovat haitallisia, mutta niiden syntyä voidaan ehkäistä nauttimalla samanaikaisesti esim. C-vitamiinia sisältäviä elintarvikkeita. Suomen elintarvikelainsäädännössä on määrätty lihatuotteisiin, joihin on lisätty nitriitti- ja nitraattisuoloja, lisättäväksi myös tietty määrä C-vitamiinia ehkäisemään nitrosoamiinien synty itse elintarvikkeessa. /13/

3.4. ADI-arvo

Euroopan unionin maissa on asetettu lisäaineille, joihin myös säilöntäaineet kuuluvat, niin sanottu ADI-arvo (Acceptable Daily Intake), joka tarkoittaa hyväksyttävää päivittäistä saantia, jolle ihminen voi altistua periaatteessa koko ikänsä.

Erityisesti kuitenkin lasten ADI-arvot saattavat ylittyä helposti, koska lapset ovat ruumiinpainoltaan kevyempiä ja lapsille suunnatut tuotteet, kuten makeiset ja virvoitusjuomat, sisältävät paljon lisäaineita. ADI-arvon ylityksiä voi tapahtua myös noudatettaessa yksipuolista ruokavaliota. Osalla ihmisiä saattaa esiintyä yliherkkyyttä ADI-arvoja pienemmilläkin annoksilla. Lisäaineet on kuitenkin tietoisesti lisätty elintarvikkeisiin ja ne on ennen hyväksymistä tutkittu sekä niiden vaikutukset että turvallisuus tunnetaan muita aineita paremmin.

4. LUONTAISET SÄILÖNTÄAINEET

Luontaisia säilöntäaineita ei Suomen elintarviketeollisuudessa ole vielä laajemmassa käytössä. Eri puolilla Suomea toimii useita flavonoidien kemiallisia tai biologisia ominaisuuksia tutkivia tutkimusryhmiä. Tutkimukset perustuvat usein lääketieteeseen, mutta myös flavonoidien vaikutuksesta elintarvikkeiden hapettumisen estoon on käynnissä tutkimus. Kemiallisia hapettumisenestoaineita kuten, butyylihydroksitolueenia (BHT), butyylihydroksianisolia(BHA) ja propyyiligallaattia on jo korvattu luonnosta saatavilla vaihtoehtoilla, kuten alfa-, gamma- ja delta-tokoferoleilla eli E-vitamiinilla ja askorbiinihapolla eli C-vitamiinilla. /6/

Kansainvälisesti laajaan käyttöön ovat levinneet, myös muut luonnontuotteet, joista yleisimmin tunnettu on rosmariiniuute. Mausteena käytettävän rosmariiniuutteen hyviä antioksidanttiominaisuuksia voidaan hyödyntää erityisesti lihatuotteissa.

Rosmariiniuutetta käytettäessä muiden hapettumisenestoaineiden käyttöä on voitu vähentää tai jopa korvata ne kokonaan. Elintarvikkeiden sisältämät luontaiset antioksidantit ja säilöntäaineet voivat parantaa tuotteiden säilyvyyttä ja samalla olla kuluttajille hyvien ravintoaineiden lähde. /6/

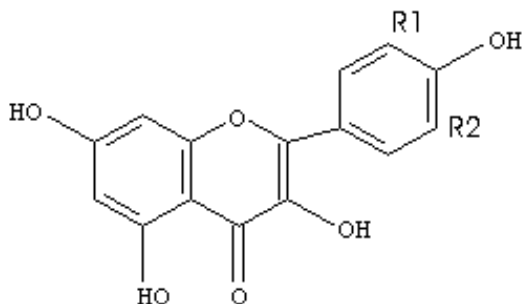
4.1 Flavonolit

Flavonolit ovat yleensä vaaleankeltaisia huonoliukoisia yhdisteitä, joiden C-renkaan C3:ssa on ei-fenolinen OH-ryhmä sekä kaksoissidos C2:n ja C3:n välissä. Flavonolit esiintyvät mono-, di- tai triglykosideina. Kasveissa on tunnistettu noin 400 erilaista flavonoliaglykolia ja noin 900 flavoniglykosidia. Flavonolit ovat yleisiä lehdissä, kukissa, hedelmissä ja marjoissa. Flavonoleja on mm. sipuleissa, lehtikaalissa, parsakaalissa, omenoissa (erityisesti kuoressa), kirsikoissa, marjoissa, vihreässä teessä ja punaviinissä. Kasveissa flavonit eivät hapetu flavonoleiksi eivätkä flavonolit pelkisty flavoneiksi. /16/

4.1.1 Kversetiini, kemferoli ja myrisetiini

Kasveissa yleisimmin esiintyvät flavonoidit ovat kversetiinin johdannaisia.

Kemferolin ja myrisetiinin pitoisuudet ovat pienempiä. Flavonoidipitoisuus on pieni, jos se on alle 10 mg/kg tai mg/l. Suuri flavonoidipitoisuus on silloin, kun se ylittää 50 mg/kg. /16/



KUVA 2.Flavonoleja. /16/ Kemferoli R1 = H R2 = H

Kversetiini R1 = OH R2 = H

Myrisetiini R1 = OH R2 = OH

4.2 Flavonit

Flavonit ovat yhdisteitä, joita on kukkien terälehdissä, lehdissä ja siemenissä. Kasveista on tunnistettu noin 300 flavoniglykolia ja lähes 500 flavoniglykosidia. Syötävissä kasveissa niitä on vähemmän kuin flavonoleja. Lehtivihanneksissa voi flavonipitoisuus olla jopa 7 % kuivapainosta. Niitä on mm. persiljassa ja timjamissa. Hedelmissä flavoneja on vähän, lukuun ottamatta sitrushedelmiä. Flavoneja ovat mm. apigeniini, luteoliini, tangeretiini ja nobiletiini. /16/

5. EROTUS- JA TUTKIMUSMENETELMÄT

5.1 Näytteen esikäsittely

5.1.1 Yleistä

Analyseissä käytettävä kasvi voi olla tuore tai eri tavoin kuivattu. Pakastekuivausta on usein käytetty kasvinäytteiden kuivausmenetelmänä. Tutkimuksessa tulisi käyttää vain terveitä kasveja, sillä kasvitauti saattaa vaikuttaa kasvin aineenvaihduntaan, jolloin voi muodostua ei-toivottuja yhdisteitä. Tuore näyte upotetaan kiehuvaan alkoholiin heti keräämisen jälkeen entsyymitoiminnan pysäyttämiseksi. Kasvin kuivaaminen tulisi tehdä mahdollisimman nopeasti matalassa lämpötilassa ja ilmanvaihdon tulisi olla riittävän tehokas, jotta välttyttäisiin kemiallisilta muutoksilta. Kuivattu näyte tulisi säilyttää kuivassa, viileässä ja valolta suojattuna. /4/

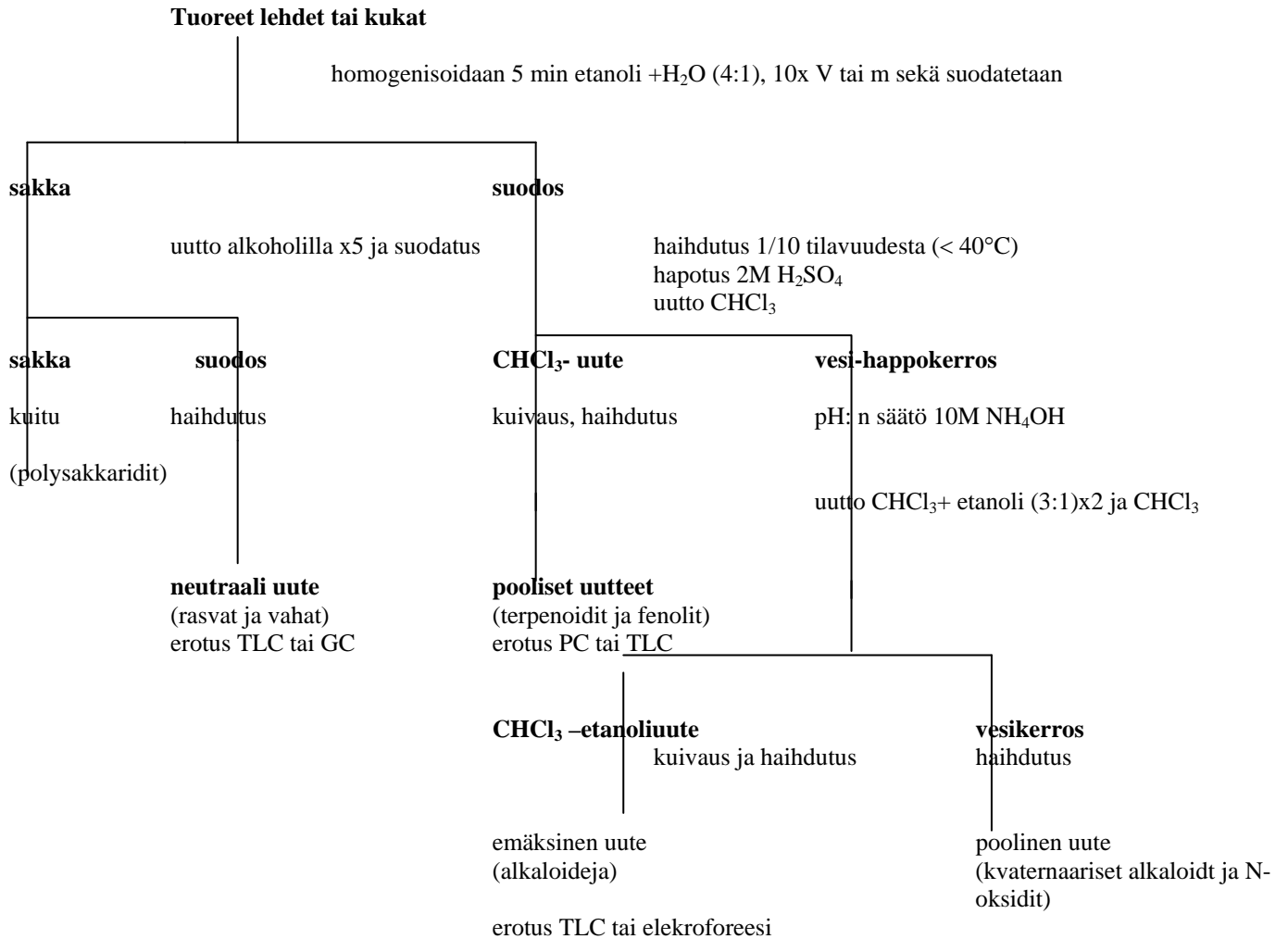
5.1.2 Uutto

Uuttotapa riippuu kasvinäytteen koostumuksesta, vesipitoisuudesta ja eristettävästä aineesta. Etanoli on hyvä yleisuutin esiuuttovaiheessa. Etanolikäsittely pysäyttää kasvin entsyymaattisen hapettumisen ja hydrolyysin. Orgaanisten aineiden eristäminen kuivatusta näytteestä tapahtuu jatkuvaan uuttoon tarkoitettulla laitteella. Jauhettu näyte uutetaan ensin eetterillä, petrolilla ja kloroformilla, jolloin lipidit ja terpenoidit erottuvat ja sen jälkeen alkoholilla ja etyyliasetaatilla poolisten yhdisteiden erottamiseksi. /4/

Glukosidisen ryhmän sisältävät flavonoidit ovat vesiliukoisia, joten niiden uuttamiseen voidaan käyttää laimeita happoliuoksia, metanolia ja etanolia. Mikäli

flavonoidit halutaan aglykoneina, glykosidinen ryhmä hydrolysoidaan kuumennuksen ja konsentroidun happoliuoksen avulla. Aglykonit eivät ole vesiliukoisia, mutta ne liukenevat hyvin metanoliin ja etanoliin.

Tuoreet lehdet tai kukat homogenisoidaan viisi minuuttia etanolin ja veden seoksessa (4:1) sekä suodatetaan. Saatu sakka voidaan uutaa alkoholilla, jolloin saadaan neutraali uute, josta voidaan erottaa rasvat ja vahat valitulla menetelmällä esimerkiksi ohutlevykromatografialla. Homogenisoinnin jälkeen saatu suodos haihdutetaan yhteen kymmenesosaan tilavuudesta alle 40°C:een lämpötilassa. Haihdutuksen jälkeen suodos hapotetaan 2M rikkihapolla (H_2SO_4) ja uutetaan kloroformilla ($CHCl_3$). Saatu seos sisältää vesi-happokerroksen ja kloroformiuutteen, josta voidaan kuivauksen ja haihdutuksen jälkeen erottaa pooliset yhdisteet kuten terpenoidit ja fenolit paperi- tai ohutlevykromatografialla. Vesi-happokerroksen pH säädetään 10 M ammoniakilla (NH_4OH) ja uutetaan kloroformin ja etanolin seokseen (3:1) kaksi kertaa ja lopuksi ainoastaan kloroformiin. Näin saadaan kloroformi-etanoliuute ja vesikerros. Kloroformi-etanoliuute kuivataan ja haihdutetaan, jolloin saadaan emäksinen uute, josta voidaan ohutlevykromatografialla tai elektroforeesilla erottaa alkaloideja. Vesikerros haihdutetaan, jolloin saadaan poolinen uute, joka sisältää kvaternaariset alkaloidit ja N- oksidit. Kaavio tuoreiden kasvien uuttamisesta ja fraktiointi eri luokkiin poolisuuden mukaan kuvassa 3. /4/



KUVA 3. Yleiskaavio tuoreiden kasvien uuttamisesta ja fraktionti eri luokkiin poolisuuden mukaan. /4/

5.1.3 Uutteen väkevöinti

Uute puhdistetaan suodattamalla ja väkevöidään haihduttamalla. Eristettäessä vesiliukoisia yhdisteitä, lipidit poistetaan ennen väkevöintiä pesemällä uute useaan kertaan petrolilla. Väkevöidystä uutteesta lähes kaikki klorofyllit ja lipidit kerrostuvat pullon reunoille, jolloin vesipitoinen konsentraatti voidaan pipetoida pois. Väkevöity uute saattaa kiteytyä säilytyksen aikana. Kiteet suodatetaan ja niiden homogeenisuus tarkastetaan kromatografialla. Kiteet sisältävät usein monia ainesosia, jolloin kiteet liuotetaan sopivaan liuottimeen ja ainesosat erotetaan kromatografialla. Väkevöidyt uutteen säilytetään jääkaapissa pienessä määrässä toluenia homeutumisen estämiseksi. /4/

5.2 Kromatografiset menetelmät

5.2.1 Yleistä

Kromatografia on kemiallinen erotusmenetelmä, jossa näytteen ainesosat erotetaan toisistaan. Menetelmä perustuu näytteen ainesosien erilaiseen jakautumiseen stationäärifaasiin, joka on paikallaan pysyvä faasi ja eluentin eli liikkuvan faasin välillä. Eluentti on neste tai kaasu, joka kulkee stationäärifaasin läpi kuljettaen näytettä. Näytteen täytyy liueta eluenttiin, jotta se pystyy kulkemaan sen mukana. Stationäärifaasiin on oltava eluenttiin liukenematon. Se voi olla kiinteä aine tai neste.

Kromatografia jakautuu adsorptiokromatografiaan ja partitiokromatografiaan. Adsorptiokromatografiassa stationäärifaasina on kiinteä aine, jonka pintaan tutkittavat näytteet tarttuvat ja erottuvat muusta näytteestä. Partitiokromatografiassa stationäärifaasina on neste, joka on sidottu tavallisesti kiinteään kantajafaasiin. Eluenttina on neste tai kaasu. Erottuminen perustuu näytteen erilaiseen liukoisuuteen stationäärifaasiin ja toisaalta eluenttiin, jolloin näytteen ainesosat kulkevat eluentin mukana eri nopeuksilla. Näytteen ainesosat voidaan tunnistaa vertaamalla näytteen ajosta saatua spektriä tunnetuilla aineilla ajettuihin spektreihin tai ajamalla näytteen mukana tunnettuja vertailuaineita.

Kasvien fenolihdisteiden erottamiseen ja puhdistamiseen käytetään useita kromatografisia menetelmiä, kuten paperikromatografiaa (PC), ohutlevykromatografiaa (TLC), kaasukromatografiaa (GC), pylväskromatografiaa (CC), tai nestekromatografiaa (HPLC) joko yksin tai niiden yhdistelminä. Nykyisin käytetään enimmäkseen nestekromatografiaa. Menetelmän valintaan vaikuttavat erotettavan aineen liukenevuus ja haihtuminen. /2/

5.2.2 Paperikromatografia (PC)

Paperikromatografia soveltuu vesiliukoisille yhdisteille, kuten hiilihydraateille, aminohapoille, nukleiinihappojen emäksille, orgaanisille hapoille ja fenolihdisteille. Paperikromatografian huono puoli on, että määritettävästä aineesta muodostuva piste saattaa hävitä paperin ulkopuolelle, jolloin tulosta ei saada. /4/

5.2.3 Ohutlevykromatografia (TLC)

Ohutlevykromatografia soveltuu rasvaliukoisten yhdisteiden, kuten lipidien, steroidien, karotenoidien, yksinkertaisten kinonien ja klorofyllien erottamiseen.

Ohutlevykromatografia on nopeampi menetelmä kuin paperikromatografia. Siinä tarvitaan vähemmän liuottimia ja määritettävää kasvimateriaalia tarvitaan vähemmän kuin paperikromatografiassa. Se on myös helpommin toistettava ja määritettävät aineet pysyvät määrityslevyllä./4/

5.2.4 Kaasukromatografia (GC)

Kaasukromatografia soveltuu haihtuville yhdisteille, rasvahapoille, mono- ja saskviterpeeneille, hiilihydraateille ja rikkiyhdisteille./4/

5.2.5 Pylväskromatografia (CC)

Pylväskromatografia soveltuu ei-poolisten yhdisteiden erottamiseen. Kasvimateriaali liuotetaan samaan pitoisuuteen metanolia ja vettä. Eristämiseen käytetään samoja adsorbentteja kuin paperikromatografiassa ja ohut levykromatografiassa eli selluloosaa, silikageeliä ja polyamidia./4/

5.2.6 Nestekromatografia (HPLC)

Nestekromatografialla voidaan erottaa vähemmän haihtuvia yhdisteitä. Se soveltuu sekä kvalitatiiviseen että kvantitatiiviseen kasvifenolien määrittämiseen.

Nestekromatografia on tällä hetkellä yleisin kromatografinen menetelmä flavonoidien tutkimuksessa, sen tulosten tarkkuuden johdosta./4/

Kaikkia menetelmiä voidaan käyttää pienessä tai suuressa mittakaavassa./4/

Joissakin tapauksissa neutraalit sokerit ja fenoleja voidaan määrittää elektroforeesilla muuttamalla ne metallikomplekseiksi natriumboraatin avulla./4/

5.3 Spektroskopiset menetelmät

Ennen kromatografisten menetelmien kehittymistä kasvien flavonoidien kvalitointiin käytettiin spektroskopisia menetelmiä. Näitä menetelmiä ovat näkyvän valon spektroskopia (VIS), ultraviolettispektroskopia (UV), infrapunaspektroskopia (IR) sekä ydinmagneettisen resonanssin spektroskopia (NMR). /2/

Kasvinäytteestä voidaan analysoitavan aineen valonläpäisykyky mitata laimeastakin liuoksesta spektrometrillä. Mittaus suoritetaan nollanäytettä apuna käyttäen. Värittömistä liuoksista mittaukset tehdään aallonpituudella 200- 400 nm ja värillisistä liuoksista aallonpituudella 400-700 nm. Liuottimena analyysissä käytetään yleensä etanolia, mutta vesi ja muutkin liuottimet ovat käyttökelpoisia. /2/

6. KOTIMAISIA LUONNONKASVEJA, JOISSA SÄILÖNTÄOMINAISUUKSIA

Tutkimuksen kirjalliseen osaan on valittu kuusi kasvia, jotka ovat puolukka (*Vaccinium vitis idaea*), mesiangervo (*Filipendula ulmaria*), kanerva (*Calluna vulgaris*), timjami (*Thymus vulgaris*), rohtorautayrtti (*Verbena officinalis*) sekä villiminttu (*Mentha arvensis*). Kuvat liitteessä 1.

Kasveista kanerva, mesiangervo ja puolukka kuuluvat suomalaisiin kauppayrteihin, joita kuka tahansa voi poimia myyntitarkoitukseen. Poimittaessa suurempia määriä toisen omistamalta maalta, poimintaan tulisi pyytää maanomistajan lupa. Jatkojalostus ja jälleenmarkkinointi edellyttävät usein, että poimijalla on poimijakortti, joka kertoo, että poimija on koulutettu tunnistamaan ja kaupallisesti käsittelemään yrtejä. Koulutusta järjestetään paljon ja kouluttajalla on yleensä opetushallituksen myöntämä neuvojakortti tai muu tarkoitukseen sopiva koulutus. Kauppayrttien poiminta on poimijalle verotonta tuloa./11/

6.1 Kasveista löytyneet fenoliset yhdisteet:

- Puolukka: flavonoleja ja antosyaaneja
- Mesiangervo: flavonoleja

- Kanerva: flavoneja, flavonoleja, flavanoneja, dihydroflavonoleja sekä antosyaaneja
- Timjami: flavoneja, flavonoleja sekä flavanoneja. /14/

Käytettävissä olevassa kirjallisuudessa rohtorautayrtin ja villimintun sisältämien fenolisten yhdisteiden laadusta tai määristä ei ollut tutkimustuloksia. Suomessa on eniten tutkittu marjojen, hedelmien, vihannesten ja juuresten flavonoidipitoisuuksia.

Puolukan flavonolipitoisuus on 130 mg/kg. Puolukan flavonolit ovat enimmäkseen kversetiiniä, mutta esim. karpalosta löytyy myös myrisetiiniä.

6.2 Kasveilla esiintyvät antimikrobiset vaikutukset

Luonnonkasvien ja yrttien tutkimus on keskittynyt lähinnä niiden antimikrobisiin vaikutuksiin. Suomessa on vuonna 2000 julkaistu Helsingin yliopistossa tehty tutkimus, jossa selvitettiin suomalaisten kasvien antimikrobisia vaikutuksia. Kasveja on ollut tutkimuksessa 29. Tähän työhön liittyvistä kasveista mukana ovat olleet puolukka, kanerva, timjami ja mesiangervo. Kasveista kanerva, timjami ja mesiangervo ovat olleet ilmakeivattuja. Puolukka on kuivattu pakastekuivaamalla. Kasvinäytteistä oli punnittu noin 500 mg näytteitä, jotka olivat uutettu 80 %:seen metanoliin. Uuton jälkeen liuos oli sekoitettu, sentrifugoitu ja väkevöity typpihöyryssä. Väkevöityä uutetta oli kuivattu kaksi päivää. Kuivaa uutetta oli punnittu noin 7 mg ja se oli liuotettu 1 ml:aan metanolia. Saatu liuos oli käytetty sylinteridiffuusiomenetelmällä suoritettuun antimikrobisten vaikutusten analysointiin. Kasveissa olevien fenolisten yhdisteiden kvantitatiivista analyysia tässä tutkimuksessa ei tehty. Tutkimukseen käytettyjä mikrobeja oli kasvatettu 35°C:ssa 24 tuntia. Tuloksia oli verrattu antibioottien mikrobien kasvua ehkäisevään vaikutukseen. /14/

Mesiangervon, kanervan ja timjamin kohdalla on niiden sisältämien fenolisten yhdisteiden todettu vähentävän bakteerien ja hiivojen kasvua. Puolukalla todettiin vain heikko antimikrobinen vaikutus yhdelle mikrobille, vaikka sen flavonolipitoisuus on yli 130 mg/kg. /14/

6.2.1 Kanerva

Kanervasta valmistetulla uutteella on todettu olevan selvä antimikrobinen vaikutus *Stafylococcus aureus* - bakteerille, sekä heikko vaikutus *Escherchia coli* - bakteerille. Kanerva sisältää monia erilaisia fenolisia yhdisteitä, joten tämän perusteella ei voitane sanoa mikä yhdisteistä aiheuttaa antimikrobiset vaikutukset. /14/

6.2.2 Mesiangervo

Mesiangervolla on todettu olevan selvä antimikrobinen vaikutus *Stafylococcus aureus*- bakteerille ja *Escherchia coli* - bakteerille sekä heikko antimikrobinen vaikutus *Candida albicans*- hiivalle./14/

6.2.3 Timjami

Timjamilla on todettu heikko antimikrobinen vaikutus *Stafylococcus aureus*- bakteerille sekä selvä antimikrobinen vaikutus *Escherchia coli*- bakteerille./14/

6.2.4 Puolukka

Puolukalla on todettu vain lievä *Micrococcus luteus* - bakteerin kasvua vähentävä vaikutus./14/

7. PAKKAAMINEN

7.1 Yleistä

Elintarvikkeiden kanssa kosketukseen tulevia materiaaleja koskeva lainsäädäntö on tarkentunut ja yhdenmukaistunut muiden Euroopan maiden säädösten kanssa.

Suomessa keskeinen säädös on kauppa- ja teollisuusministeriön päätös 400/ 96 ja sen rinnalle laaditut yksityiskohtaiset säädökset mm. muoveista, paperista ja kartongista, sellofaanista sekä keramiikasta.Liite 2. Säädös edellyttää entistä kattavampia selvityksiä sekä kotimaan että vientimaiden tarpeisiin.

Omavalvontavelvoitteiden ja tuotevastuun vuoksi elintarvikkeiden pakkaajat edellyttävät lähes poikkeuksetta, että materiaaleista ja pakkauksista on saatavissa elintarvikekelpoisuusselvitykset. Ne ovat eräänlaisia todistuksia siitä, että pakkausmateriaalit täyttävät asetetut normit ja ovat terveydellisessä mielessä riskittömiä. Monissa tapauksissa pakkauksen soveltuvuutta kyseiseen käyttöön osoittavan selvityksen puuttuminen voi olla este tietyn pakkauksen käytölle.

7.1.1 Flavonoideja sisältävien tuotteiden pakkaaminen

Flavonoidien on todettu tuhoutuvan valon vaikutuksesta. Se aiheuttaa ongelmia flavonoideja sisältävien tuotteiden pakkaamiselle. Ne pitäisi pakata valoa läpäisemättömiin pakkausmateriaaleihin. Kuluttajat kuitenkin haluavat tuotetta ostaessaan nähdä tuotteen mahdollisimman hyvin. Nykyisin kuitenkin valoa läpäisemättömät pakkausmateriaalit, kuten tumma lasi ja tummat muovimateriaalit, estävät myös kuluttajaa näkemästä pakkauksen sisältöä.

Tuotteeseen lisättynä luontainen säilyttävä ainesosa tuo tuotteelle sellaista lisäarvoa, ettei sen liiallinen pakkaaminen ole hyväksi tuotteen imagolle.

Eritettyjä flavonoideja voitaisiin tutkia myös ns. funktinaalisten tai aktiivisten pakkausten kehittämisessä. Näissä elintarvikkeen säilyvyyttä lisäävä osa tai yhdiste on itse pakkausmateriaalissa. Tällöin pakkausmateriaalissa oleva vaikuttava aine pääsee näkymättömästi vaikuttamaan suoraan elintarvikkeen pinnalla, jossa yleisimmin eri pilaantumisreaktiot vaikuttavat. Tämä vähentäisi itse tuotteeseen lisättyjen säilöntäaineiden käyttöä.

8. TUTKIMUSSUUNNITELMA

Lähempään tarkasteluun valittiin kaksi kasvia, joiden flavonoideihin kuuluvien flavonolien pitoisuuksia tutkittiin kokeellisesti. Näitä flavonoleja ovat kemferoli, kversetiini ja myrisetiini.

8.1 Tutkittavat kasvit

Tutkimukseen valitut kasvit olivat kanerva ja mesiangervo. Nämä molemmat kuuluvat suomalaisiin kauppayrteihin, jolloin raaka-aineiden saatavuus olisi parempi, jos tutkimuksen tulokset johtaisivat suuremman mittakaavan toteutukseen. Kasvien valintaan vaikutti myös se, ettei suomalaisista luonnonkasveista tai yrteistä ole aiemmin tehty flavonoidien kvantitatiivista määrittystä.

8.1.1 Kanerva

Kanerva on 20-30 cm korkea varpukasvi, jonka lehdet ovat ikivihreät, neulasmaiset, noin 2 mm pitkät ja 4-rivisesti limittäin. Kukat ovat yleensä väriltään vaaleanpunaiset, joskus myös valkoiset. Kukkien muoto on kellomainen. Ne tuoksuvat miellyttävälle ja ovat mesipitoisia. /11/

Kanerva on yleinen koko maassa, eikä tarvitse erityistä suojelua. Se kasvaa kankailla hietikoilla, kallioilla ja rämeillä.

Kanervasta käytetään yleensä kukat, jotka käsitellään kuivaamalla. Ne kerätään heinäelokuussa, kukkien puhjettua. /11/

8.1.2 Mesiangervo

Mesiangervo on 60-120 cm korkea ruohokasvi. Sen lehdet ovat parilehdykkäiset ja varren tyvässä on lehtiruusuke. Kukinto on runsas kermanvalkoinen. Yksittäiset kukat ovat pieniä ja voimakkaasti medentuoksuisia. /11/

Mesiangervo on yleinen koko maassa, eikä tarvitse erityistä suojelua. Se kasvaa jokien, järvien ja meren rantalehdoissa sekä purojen ja ojien varressa.

Mesiangervosta käytetään sekä lehdet että kukinnot. Lehdet kerätään alkukesällä ennen kukintaa ja kukinnot kerätään heti kukkien puhjettua. Säilytys tapahtuu kuivattuna. /11/

Kanervalla ja mesiangervolla on todettu olevan antimikrobisia vaikutuksia. Näiden ominaisuuksien vuoksi voidaan olettaa niiden lisäävän säilyvyyttä tuotteissa, joihin niitä on lisätty.

9. TUTKIMUSMENETELMÄ

Flavonoidien ja niiden alaryhmään kuuluvien flavanolien määrittämisessä oli neljä eri vaihtoa, jotka ovat:

1. Flavanolien uutto tai refluksointi
2. Uutteen väkevöinti eli haihdutus
3. Uutteen suodatus
4. Flavanolien erottaminen valitulla menetelmällä.

9.1 Tutkimusmenetelmän valinta

Uutto suoritettiin Dionex- korkeapaineuuttolaitteella. Kasvinäytteestä punnittiin 5 g:n näyte, joka uutetaan 50 %:seen metanoliin. Uute väkevöitiin eli haihdutettiin vesihauteessa vetokaapissa. Vesihauteen lämpömittari oli epäkunnossa, joten lämpötilan pitäminen alle 40°C erillisellä mittarilla oli vaikeaa. Lämpötila nousi ajoittain yli sallitun ja se saattaa vaikuttaa saatuihin tuloksiin. Saatu haihdutusjäännös liuotettiin 1 ml:aan 75 % metanolia. Saatu uute suodatettiin 0,45 µm polyamidisuodattimen läpi. Näin saatu näyte sisältää flavonoidiglykosideja eli rutiinia ja isokversetiiniä. Ne ovat vesiliukoisia yhdisteitä, joiden erottaminen tapahtuu Dionex-nestekromatografilla (HPLC). Erotuksessa käytetään AD 20 absorbanssidetektoria ja Dionex Carbo Pac PA 10 (4 x 250 mm) kolonnin. Ajo suoritettiin aallonpituudella 360 nm ja kolonnin virtausnopeuden ollessa 1,0 ml/min. Injektorin tilavuudeksi valittiin kolonnin valmistajan suositus 10 µl. Näytteen syöttöön käytettiin laitteistoon kuuluvaa Dionex AS 40 automaattista näytteen syöttäjää.

Tehtäessä selvitystä olemassa olevan laitteiston soveltuvuudesta flavanolien erottamiseen selvisi, ettei kyseisellä kokoonpanolla flavanoleja voitu erottaa. Dionex Carbo Pac 10 – kolonni ei kestänyt kuin hyvin pieniä määriä liuotinta. Ajoliuoskin olisi tätä määrittäystä varten pitänyt vaihtaa asetonitriiliksi, joka on sekä liuotin että voimakas myrky. Laitteistossa normaalisti käytössä oleva 200mM NaOH-liuos ei tähän määrittäykseen ajoliuokseksi olisi soveltunut. Lisäksi tässä määrittäyksessä sekä standardit että näyte liuotettiin 75 %:seen metanoliin, joka esti valitun kolonnin käytön. Uuden kolonnin hankinta tätä yhtä määrittäystä varten ei ollut

tarkoituksenmukaista eikä kannattavaa, koska samantyyppisiä määrytyksiä ei ollut tulevaisuudessa tarkoitus tehdä.

Määrytykseen sopivaa laitteistokokonaisuutta kysyttiin myös koulutuskeskus Tavastian laboratorio-osastolta, mutta sielläkään soveltuvaa kokonaisuutta ei ollut.

9.2 Tutkimusmenetelmän vaihtaminen

Uuden tutkimusmenetelmän valinta oli vaikeaa, sillä nestekromatografia olisi ollut tähän analyysiin paras vaihtoehto ja tutkimuksen tekemiseen suunniteltu aika oli rajallinen.

Uudeksi tutkimusmenetelmäksi valittiin ohutlevykromatografia (TLC). Menetelmä soveltui flavanolien erottamiseen kvalitatiivisesti, mutta kvantitatiivisen tuloksen saamiseksi tarvittaisiin rinnalle jokin toinen menetelmä esim. nestekromatografia tai massaspektrometria. Ohutlevykromatografiaa käytetään edelleen saastuneiden maa-alueiden saastumista aiheuttavien aineiden kvalitatiiviseen määrytykseen, vaikka flavonolien määrytykseen kasveista siitä on luovuttu nestekromatografian kehittymisen myötä.

TLC- menetelmää varten näyte refluksoidiin 2 h 80°C 1,2 M HCl:n ja 50 % metanolin seoksessa (1:1). Refluksoinnin jälkeen saatu uute sentrifugoitiin 3000 rpm noin 3 minuuttia ja haihdutettiin vesihauteessa 35°C. Haihdutuksen jälkeen haihdutusjäännös liuotettiin 75 %:seen metanoliin ja suodatettiin 0,45 µm polyamidisuodattimen läpi. Suodatuksen jälkeen näytettä pipetoitiin 1 µl ohutlevylle noin 1 cm välein. Standardeja pipetoitiin levylle sama määrä. Levyt kehitettiin ajokammiossa, jonka pohjalle kaadettiin ajoliuosta 100 ml. Ajoliuos koostui etikkahaposta, etyyliasetaatista, tetrahydrofuraanista sekä heksaanista. Liuosta valmistettiin 1 litra. Etikkahappoa liuokseen tuli 250 ml, etyyliasetaattia 115 ml, tetrahydrofuraania 115 ml sekä heksaania 510 ml. Jos kehityksessä ilmeni ongelmia, voitiin liuosten suhteita muuttaa tuloksen parantamiseksi.

Kehityksen ajaksi ajokammio peitettiin valosta aiheutuvan flavonolien hajoamisen vähentämiseksi. Kehitystä jatkettiin kunnes liuotinrintama on muutaman sentin päässä yläreunasta. Ohutlevy kuivattiin huoneenlämmössä vetokaapissa. Tulosta tarkasteltiin UV-valolla aallonpituudella 360 nm.

10. TYÖN SUORITUS

Näytteinä työssä käytettiin Puulan marja- ja yrttiherkuista tilattua kuivattua mesiangervon lehteä ja kuivattua kanervan kukkaa sekä Lammin Evolta marraskuussa 2003 kerättyä tuoretta kanervan lehteä. Tuore kanervan lehti säilytettiin pakastettuna. Työssä tarvittavat standardit saatiin VTT:n biotekniikan yksiköstä. Standardeina käytettiin flavonoidiglykosideihin kuuluvia rutiinia ja isokversetiiniä sekä aglykoneja katekiini, kversetiini, myrisetiini ja kemferoli. Mukana olivat myös fenoliset hapot kahvihappo, kanelihappo ja gallushappo, joita testattiin yhdelle ohutlevylle. Standardien pitoisuudet olivat 1 mg/ml.

Tuoreista, pakastettuna säilytetyistä kanervan lehdistä punnittiin 5.005 g:n näyte. Näytettä refluksoitiin 2 h 80°C:ssa liotettuna 50 ml:aan 50 % metanolia ja 50 ml:aan 1,2 M suolahappoa. Hydrolyysi pysäytettiin jäähdyttämällä astiaa kylmällä vedellä. Saatu uute sentrifugoitiin 2000 rpm kolmen minuutin ajan ja haihdutettiin vesihauteessa. Haihdutusjäännös liuotettiin 1 ml:aan 75 % metanolia. Uute piti sentrifugoida ennen suodatusta, sillä se oli liian sakkaista, eikä tullut suodattimesta läpi.

Suodatus tapahtui 0,45 µm polyamidisuodattimella. Suodatuksen jälkeen näytettä pipetoitiin ohutlevylle 1 µl ja sama määrä standardeja noin 1 cm:n välein. Levyinä käytettiin Merck Silicagel 60 F₂₅₄ – alumiinilevyjä (20 cm x 20 cm), joiden indikaattori on haponkestävä.

Levyjä kehitettiin noin 90 minuuttia ajokammiossa, jossa oli 100 ml ajoliuosta. Kehityksen jälkeen levyt kuivattiin huoneenlämmössä vetokaapissa. Kuivauksen jälkeen levyjä tarkasteltiin UV-valolla (Camag UV-cabinet II) aallonpituudella 360 nm. Tarkastelussa selvisi, että 1 µl näytettä oli liian pieni määrä, eikä näkynyt levyllä. Näytemäärää lisättiin asteittain ja vasta 5 µl:n näytteestä saattoi nähdä erottuneet aineet ja standardit selkeästi. Kuivatuista kanervan kukista ja kuivatuista mesiangervon lehdistä valmistettiin näytteet ja analysoitiin kuten tuoreet kanervan lehdet.

11. TYÖN TULOKSET

Jokaisesta kolmesta kasvinäytteestä ajettiin kuusi TLC-levyä. Ensimmäiset neljä epäonnistuivat sekä liian pienen näytemäärän että standardien laimentamisen vuoksi. Epäonnistuneet näytteet olivat tuore kanervan lehti sekä kuivattu mesiangervon lehti. Onnistuneissa levyissä näkyi UV-valolla tarkasteltaessa aineiden liikkuminen levyllä suhteellisen hyvin.

Tuloksien luotettavuuteen saattoi vaikuttaa myös standardien säilyvyyden rajallisuus. Standardien toimittajan mukaan standardit olisi pitänyt käyttää kahden viikon kuluessa niiden ottamisesta pakastesäilytyksestä. Ajot aloitettiin tutkimusmenetelmän muutoksen sekä uuteen menetelmään tarvittavien kemikaalien tilauksen vuoksi vasta, kun standardit olivat olleet jääkaappi säilytyksessä jo yli viikon.

Tulokset mitattiin senttimetreinä. Näytteiden ja standardien kulkemat matkat mitattiin lähtöviivalta täplän keskipisteeseen, lisäksi mitattiin liuotinrintaman kulkema matka. Mittaustulosten perusteella laskettiin näytteiden ja standardien Rf-arvot. Rf-arvo ilmaisee aineen kulkunopeutta, joka ei ole määrätylle systeemille vakio, vaan riippuu esimerkiksi käytettävästä ohutlevystä ja ajoliuoksen koostumuksesta.

$R_f = \frac{\text{Aineen kulkema matka}}{\text{Liuotinrintaman kulkema matka}}$

Liuotinrintaman kulkema matka

Mittaustulosten perusteella saaduista keskiarvoista lasketut Rf-arvot 5 µl olivat:

- Kemferolistandardi 0,8242
- Kversetiinistandardi 0,7333
- Myrisetiinistandardi 0,5515
- Tuore kanervan lehti 0,8240
- Kuivattu kanervan kukka 0,8240 ja 0,5492.

Kuivattu kanervan kukka sisälsi selvästi kemferolia ja oletettavasti pieniä määriä myrisetiiniä. Myrisetiinin kohdalla tulos ei ollut yhtä selkeä kuin kemferolin. Tuore kanervan lehti sisälsi kuivattua kanervan kukkaa hieman enemmän kemferolia. Tämä tukee kirjallisuudessa esitettyä väitettä, että flavonoleja esiintyy eniten tuoreissa

kasveissa.(Törrönen.R.Elintarvikkeiden flavonoidit.1997.) Myrisetiiniä tuoreista kanervan lehdistä ei löytynyt. Oletettavasti myrisetiiniä esiintyy kanervan kukissa.

Kuivatuista mesiangeron lehdistä ei tällä menetelmällä löytynyt lainkaan etsittyjä flavonoleja. Tulokset taulukossa 1.

On myös huomioitava, että mesiangeron sisältämä salisylaatti on läheistä sukua asetyylisalisyylihapolle ja sen käyttö luontaisena säilöntäaineena olisi erilaisten yliherkkyyksireaktioiden vuoksi vaikeaa. Salisylaatti pitäisi saada eristettyä kasvista pois kokonaan, sillä monet ihmiset saavat yliherkkyyksireaktioita jo todella pienistä pitoisuuksista. Salisylaattia voidaan käyttää mm. särkylääkkeenä.

TAULUKKO 1. Flavanolien esiintyminen kuivatussa ja tuoreessa kanervassa ja kuivatussa mesiangerossa.

	Kemferoli	Kversetiini	Myrisetiini
Kuivattu kanervan kukka	+	-	(+)
Tuore kanervan lehti	++	-	-
Kuivattu mesiangeron lehti	-	-	-

12. TULOSTEN ARVIOINTI

Työn tarkoituksena oli selvittää luontaisiksi säilöntäaineiksi soveltuvien flavanolien, kversetiinin, kemferolin ja myrisetiinin kvantitatiivinen analyysi mesiangerosta ja kanervasta.

Työn tuloksia ei voi pitää kovin luotettavina, vaan lähinnä suuntaa antavina samantyyppisiin tutkimuksiin. Luotettavien tulosten saamiseksi olisi pitänyt suorittaa kaksi tai kolme toistokoetta, joita nyt ei ehditty suorittaa. Flavanolien analysointimenetelmän vaihdosta aiheutunut selvitystyö vei aikaa suunniteltua enemmän. Se vähensi työn tekemiseen suunniteltua aikaa.

Ohutlevykromatografia (TLC) antaa hyvän kvalitatiivisen tuloksen, mutta kvantitatiivinen tulos on epäluotettava. Standardien liikkuvuutta osoittavien pisteiden vertaaminen näytteiden liikkuvuutta osoittaviin pisteisiin oli hankalaa, koska tuloksia tarkasteltiin UV-valolla. Ohutlevykromatografian lisäksi tarvittaisiin toinen analyysimenetelmä todellisten määrien selvittämiseksi. Sellaisia menetelmiä olisivat esimerkiksi analyysiin soveltuva nestekromatografialaitteisto, massaspektrometri tai jokin muu spektroskopinen menetelmä.

Mesiangervossa flavanolipitoisuudet näyttäisivät olevan niin pieniä, ettei niitä kannattaisi kuitenkaan suuremmassa mittakaavassa hyödyntää. Tuoreen kanervan lehden ja kuivatun kanervan kukan kohdalla tutkimuksia kannattaisi jatkaa, koska flavanolipitoisuudet saattaisivat olla keskisuuria eli 10-50 mg/kg tai jopa suuria eli yli 50 mg/kg. Tätä arviota kuitenkin haittaa standardien epästabiilisuus, sillä standardit olivat liuotettu 75 %:seen metanoliin, jonka haihtuminen vaikutti niiden todellisuudessa sisältämään ainemäärään. Täytyisi kuitenkin myös selvittää flavanoliin säilyttäviä ominaisuuksia tarkemmin ja mitkä flavanoleista sisältävät säilyttäviä ominaisuuksia eniten.

Lisäksi täytyy huomioida työn suorituksessa kerrotusta testilevystä, jossa testattiin kaikki mukana olleet standardit. Levyllä näkyi selvästi kahvihappo, jonka Rf-arvo on ainakin tällä menetelmällä hyvin lähellä kemferolin Rf-arvoa ja saattaa vaikuttaa tulosten tulkintaan.

Säilöntäaineita tarvitaan yleensä eniten helposti pilaantuvien elintarvikkeiden, kuten liha-, kala-, muna- ja maitotuotteiden valmistuksessa. Flavonolit soveltuvat huonosti värjäävien ominaisuuksiensa ja kitkerän makunsa vuoksi tuotteisiin lisättäviksi säilöntäaineiksi. Pakkausmateriaaliin lisättäessä on selvitettävä, etteivät flavanolit aiheuta tuotteeseen virhemakuja ja värivirheitä. Molemmissa tapauksissa on lisäksi huomioitava valon aiheuttama flavanoliin hajoaminen pakkausmateriaalin valintaa suunniteltaessa.

LÄHTEET

1. Anttonen, M. 2002. Mansikan flavonolit; pitoisuuksien geneettinen ja ympäristöllinen vaihtelu ja rooli indusoidussa resistenssissä. Pro-gradu tutkielma. Kuopion yliopisto.s.9-32
2. Bohm, B. 1998. Introduction to flavonoids. Harwood academic publishers.
3. Erkama, J. 1978. Biokemia II. Gaudeamus.
4. Harborne, J. 1984. Phytochemical methods. Chapman and Hall.
5. Hirvonen, T: 2001. Flavonol and flavone intake and risk of cardiovascular disease and cancer in male smokers. Väitöskirja. Helsingin yliopisto.
6. Hopia, A. 1996. Flavonoidit elintarvikkeiden antioksidanteina. Kehittyvä elintarvike. Nro.1.s.12-13
7. Hopia, A. – Heinonen, M. – Lehtonen, P. 1996. Flavonoidit luonnon oma suoja- ja säilöntäkeino. Terve Elämä. Nro. 7.s.22-23
8. Häkkinen, S. 2000. Flavonols and phenolic acids in berries and berryproducts. Väitöskirja. Kuopion yliopisto.
9. Pankakoski, A. 1990. Puutarhurin kasvioppi. Valtion painatuskeskus.
10. Mattila, P. – Piironen, V. – Ollilainen, V. 2003. Elintarvikekemian ja –analytiikka. Yliopistopaino. Helsinki.
11. Mäkinen, Y. – Hakala, P. – Vauras, J. – Vauras, R. 1996. Kauppayrtit. Edita.
12. Salo, A.- Kauppila, J. – Salminiitty, J. 1998. Elintarviketeollisuuden teknologiset menestystekijät. Teknologiakatsaus 60/98. Tekes.
13. Sundman, N. Elintarvikkeiden kemialliset riskit. 2003.
<http://www.ktl.fi/ymparisto/T52NS.htm>.15.12.2003

14. Rauha, J-P. 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compound. *International of Food Microbiology*. Nro. 56.s 3-12
15. Rauha, J-P.2001. The searc biological activity in Finnish plant extracts containing phenolic compounds. *Tutkimus*. Helsingin yliopisto.
16. Törrönen, R. 1997. *Elintarvikkeiden flavonoidit*. Edita. Tutkimuksia 5.s.2-30

LIITTEET
KASVIEN KUVAT

LIITE 1



1. Mesiangervo



2. Puolukka



3. Rohtorautayrtti



4. Timjami



5. Villiminttu



6. Kanerva

Lähdetiedot:

Kuva 1. www.mpiz-koeln.mpg.de/~stueber/lindman. 17.12.2003

Kuva 2. <http://members.lycos.nl/DKG/vakartikels/fruitencyclopediae.htm>. 17.12.2003

Kuva 3. www.personal.redestb.es/ejferre/fontroj3.htm. 17.12.2003

Kuva 4. http://www.ricolausa.com/virtual_garden/thyme.html. 17.12.2003

Kuva 5. www.goodhealth.freesevers.com/MenthUseThisOne.htm. 17.12.2003

Kuva 6. http://www.folk.de/kraeuterhexe/de/pflanzen/calluna_vulgaris.htm. 17.12.2003

N:o 400/1996

Annettu Helsingissä 7 päivänä kesäkuuta 1996

**Kauppa- ja teollisuusministeriön päätös
elintarvikkeen kanssa kosketukseen joutuvista tarvikkeista**

**Kauppa- ja teollisuusministeriö on 17 päivänä maaliskuuta 1995 annetun elintarvikelain (361/95) 48 §:n nojalla
päättänyt:**

1 §

Soveltamisala

Tämä päätös koskee tarvikkeita, jotka tarkoitukseensa käytettäessä joutuvat kosketukseen elintarvikkeen kanssa, kuten astioita, koneita, laitteita, välineitä, rakenteita, työkäsineitä, leivinpapereita, suotimia, myyntipäällyksiä ja muita pakkausmateriaaleja sekä sellaisia elintarvikkeen kuoria ja suojuksia, joita ei ole tarkoitettu syötäväksi.

Tämä päätös ei koske antiikkiesineitä eikä vesihuollon kiinteitä rakenteita tai laitteita.

2 §

Tarvikkeen ominaisuudet

Edellä 1 §:n 1 momentissa tarkoitettun tarvikkeen tulee olla sellainen, ettei se tee elintarviketta terveydelle vahingolliseksi tai ihmisravinnoksi kelpaamattomaksi taikka sopimattomaksi.

Tarvikkeesta ei saa siirtyä tavanomaisessa tai ennalta arvattavassa käytössä elintarvikkeeseen sen ainesosia siinä määrin, että ne voisivat muuttaa sopimattomalla tavalla elintarvikkeen koostumusta tai pilata sen aistinvaraisia ominaisuuksia.

3 §

Tarvikkeeseen ja sen päällykseen tehtävät merkinnät

Kuluttajille myytävien tarvikkeiden merkintöjen osalta noudatetaan mitä kulutustavarasta annettavista tiedoista annetussa asetuksessa (97/87) säädetään tai sen nojalla määrätään, kuitenkin siten, että mainitun asetuksen 3 §:n 1 momentin 2 kohdassa vaaditun valmistajan tai valmistuttajan nimen sijasta voidaan merkitä myyjän nimi, toiminimi tai aputoiminimi sekä osoite.

Elintarvikkeen kanssa kosketukseen joutuvaksi tarkoitettuun tarvikkeeseen, joka ei jo ole elintarvikkeen kanssa kosketuksessa, on liitettävä sanat 'elintarvikekäyttöön – för livsmedelsbruk' tai muu tätä tarkoittava ilmaisu taikka tunnus, jollei tarvike ole luonteeltaan sellainen, että se on selvästi tarkoitettu tulemaan kosketukseen elintarvikkeen kanssa.

Merkinnät on tehtävä riittävän isokokoisin kirjaimin siten, että ne ovat pysyviä, helposti havaittavia ja luettavia.

Muulle kuin kuluttajalle myytävien tarvikkeiden osalta voidaan 1 ja 2 momentissa tarkoitettut merkinnät tehdä pelkästään tarviketta seuraaviin asiakirjoihin.

4 §

Tarkempien määräysten antaminen

Kauppa- ja teollisuusministeriö antaa tarvittaessa tarkempia määräyksiä ja ohjeita tämän päätöksen soveltamisesta, erityisesti tässä päätöksessä tarkoitettujen tarvikkeiden valmistuksessa käytettäväksi sallituista aineista (positiiviluettelo), niiden puhtausvaatimuksista ja käytön rajoituksista, tarvikkeista elintarvikkeisiin siirtyvien aineiden enimmäismääristä sekä menettelystä määräystenmukaisuuden toteamiseksi mukaan luettuna näytteenotto ja analyysimenetelmät.

5 §**Erinäisiä määräyksiä**

Tämän päätöksen rikkomisen seuraamuksista on säädetty elintarvikelaissa (361/95).

6 §**Voimaantulo**

Tämä päätös tulee voimaan 17 päivänä kesäkuuta 1996.

Helsingissä 7 päivänä kesäkuuta 1996

**Kauppa- ja teollisuusministeri
Antti Kalliomäki**

**Ylitarkastaja
Vesa Tuomaala**

N:o 1067/2000

Annettu Helsingissä 12 päivänä joulukuuta 2000

Kauppa- ja teollisuusministeriön asetus

elintarvikkeen kanssa kosketukseen joutuvista muovisista tarvikkeista

Kauppa- ja teollisuusministeriön päätöksen mukaisesti säädetään 17 päivänä maaliskuuta 1995 annetun elintarvikelain (361/1995) 48 §:n nojalla:

1 §**Soveltamisala**

Tämä asetus koskee elintarvikkeen kanssa kosketukseen joutuvista tarvikkeista annetun kauppa- ja teollisuusministeriön päätöksen (400/1996) 1 §:n 1 momentissa tarkoitettuja tarvikkeita ja niiden osia, jotka koostuvat yksinomaan muovista, tai joissa on kaksi tai useampi ainekerros, joista kukin koostuu yksinomaan muovista, ja jotka on kiinnitetty toisiinsa sideaineilla tai jollakin muulla tavalla.

2 §**Määritelmä**

Tässä asetuksessa muovilla tarkoitetaan orgaanisia makromolekyyliyhdisteitä, jotka on saatu alhaisemman molekyylipainon omaavista molekyyleistä polymerisaation, polykondensaation, polyaddition tai muun vastaavan menetelmän avulla, tai muuttamalla kemiallisesti luontaisia makromolekyyliä. Silikonit ja muut vastaavat makromolekyyliyhdisteet on myös katsottava muoveiksi. Tällaisiin makromolekyyliyhdisteisiin voidaan lisätä muita aineita.

Tässä asetuksessa muoveja eivät ole:

- a) elintarvikkeen kanssa kosketukseen joutuvien tarvikkeiden valmistuksessa käytettävästä regeneroidusta selluloosasta valmistetusta kalvosta annetussa kauppa- ja teollisuusministeriön päätöksessä (855/1994) tarkoitettu pinnoitettu tai pinnoittamaton, regeneroitu selluloosakalvo,

- b) elastomeerit,
- c) luonnonkumi ja synteettinen kumi,
- d) paperi ja kartonki, riippumatta siitä, onko materiaalia muunnettu muovia lisäämällä,
- e) pinnoitteet, jotka on saatu paraffiinivahoista, mukaan luettuna synteettiset ja mikrokiteiset vahat sekä näiden keskinäiset seokset ja seokset muovien kanssa, sekä
- f) ioninvaihtohartsit.

3 §

Muovisten tarvikkeiden ominaisuudet

Muovisista tarvikkeista saa siirtyä niiden ainesosia elintarvikkeeseen enintään 10 milligrammaa elintarvikkeen kanssa kosketukseen joutuvan pinnan yhtä neliödesimetriä kohti (kokonaismigraatoraja, mg/dm²). Tämä raja on kuitenkin 60 milligrammaa siirtyneitä ainesosia kilogrammaa elintarviketta (mg/kg) kohti seuraavissa tapauksissa:

- a) tarvikkeet, jotka ovat astioita tai astioihin verrattavia taikka jotka voidaan täyttää, ja joiden tilavuus on vähintään 500 millilitraa (ml) ja enintään 10 litraa (l),
- b) tarvikkeet, jotka voidaan täyttää ja joille on käytännössä mahdotonta arvioida elintarvikkeen kanssa kosketukseen joutuvan pinnan alaa, sekä
- c) kannet, tiivisteet, tulpat ja vastaavat sulkemiseen tarkoitetut välineet.

4 §

Muovisten tarvikkeiden valmistuksessa käytettävät lähtöaineet ja lisäaineet

Tarkemmat määräykset muovisten tarvikkeiden valmistuksessa sallituista aineista ja niiden käyttöä koskevista rajoituksista ja muista vaatimuksista ovat tämän asetuksen liitteissä.

Muovisten tarvikkeiden valmistuksessa saa käyttää vain liitteen II luetteloissa A ja B mainittuja tai tarkoitettuja monomeereja ja muita lähtöaineita liitteissä mainituin rajoituksin.

Liitteen II luettelot A ja B eivät kuitenkaan vielä sisällä monomeereja ja muita lähtöaineita, joita käytetään yksinomaan seuraavien tarvikkeiden valmistukseen:

- a) nestemäiset, jauhemaiset ja dispersiomuodossa olevat pinnoitteet, jotka on saatu hartsimaisista tai polymeroiduista tuotteista, kuten lakat, maalit, jne.,
- b) silikonit,
- c) epoksihartsit,
- d) sideaineet ja sidospromootorit, sekä
- e) painovärit.

Muovisten (materiaalien ja) tarvikkeiden valmistamisessa saa käyttää liitteessä III mainittuja lisäaineita.

Muovisten (materiaalien ja) tarvikkeiden valmistamisessa saa käyttää liitteessä IV mainittuja bakteerikäymisen avulla saatavia tuotteita.

Liitteessä V yksilöidään vaatimukset eräiden aineiden kemiallisista ja fysikaalisista ominaisuuksista sekä puhtaudesta.

Tarkemmat määräykset sallittuja monomeerejä ja lähtöaineita, lisäaineita ja bakteerikäymisen avulla saatavia aineita koskevista rajoituksista ja muista vaatimuksista ovat liitteessä VI.

5 §

Ainekohtaiset migraatorajat

Liitteissä II–IV ilmoitetut ainekohtaiset migraatorajat on ilmaistu yksiköissä mg/kg. Nämä rajat on kuitenkin ilmaistava yksiköissä mg/dm² seuraavissa tapauksissa:

- a) **tarvikkeet, jotka ovat astioita tai astioihin verrattavia, tai jotka voidaan täyttää, ja joiden tilavuus on pienempi kuin 500 ml tai suurempi kuin 10 l, sekä**
- b) **arkit, kalvot ja muut materiaalit, joita ei voi täyttää tai joille on käytännössä mahdotonta arvioida suhdetta tarvikkeen pinnan alan ja sen kanssa kosketuksessa olevan elintarvikkeen määrän välillä.**

Edellä 1 momentissa tarkoitettut migraatorajat, jotka on ilmoitettu yksiköissä mg/kg, muunnetaan yksiköiksi mg/dm² jakamalla yksiköissä mg/kg ilmoitettu raja-arvo muuntokertoimella 6.

6 §

Migraatorajojen noudattamisen valvonta

Migraatorajojen noudattamisen valvonta tulee suorittaa elintarvikkeen kanssa kosketukseen joutuvien muovisten tarvikkeiden sisältämien ainesosien siirtymisen testaamiseen tarvittavista perussäännöistä annetun kauppaja- ja teollisuusministeriön päätöksen (487/1998), jäljempänä päätös 487/1998, ja elintarvikkeen kanssa kosketukseen joutuvien muovisten tarvikkeiden sisältämien ainesosien siirtymisen testaamiseen käytettävistä simulanteista annetun kauppaja- ja teollisuusministeriön päätöksen (262/1992), jäljempänä päätös 262/1992 sekä päätöksen liitteen määräyksiä noudattaen.

Edellä 1 momentissa tarkoitettujen ainekohtaisten migraatorajojen noudattamista ei tarvitse osoittaa, jos kokonaismigraation perusteella voidaan luotettavalla tavalla päätellä, että ainekohtaiset migraatorajat eivät ylity.

7 §

Voimaantulo

Tämä asetus tulee voimaan 31 päivänä joulukuuta 2000. Tällä asetuksella kumotaan 10 päivänä joulukuuta 1996 annettu kauppaja- ja teollisuusministeriön päätös (1071/1996) elintarvikkeen kanssa kosketukseen joutuvista muovisista tarvikkeista.

Sellaisten elintarvikkeen kanssa kosketukseen joutuvien tarvikkeiden kauppa ja käyttö, jotka eivät täytä tämän asetuksen säännöksiä on kielletty 1 päivästä tammikuuta 2003 lukien.

Komission direktiivit 90/128/ETY (31990L0128); EYVL N:o L 349, 13.12.1990, s. 26, 92/39/ETY (31992L0039); EYVL N:o L 168, 23.6.1992, s. 21, 93/9/ETY (31993L0009); EYVL N:o L 90, 14.4.1993, s. 26, 95/3/EY (31995L0003), EYVL N:o L 41, 23.2.1995, s. 44, 96/11/EY (31996L0011); EYVL N:o L 61, 12.3.1996, s. 26 ja 1999/91/EY (31999L0091); EYVL N:o L 310, 4.12.1999, s. 41

Helsingissä 12 päivänä joulukuuta 2000

**Ministeri
Kimmo Sasi**

**Ylitarkastaja
Vesa Tuomaala**

Liitteet I–VI