

Tuuli Kivelä

Omenahapon, maitohapon ja melatoniinin määrittäminen herajuomasta HPLC-laitteistolla

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Kemiantekniikan koulutusohjelma

Insinöörityö

19.2.2015

| | |
|---|--|
| Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika | Tuuli Kivelä Omenahapon, maitohapon ja melatoniinin määrittys herajuomasta HPLC-laitteistolla 32 sivua + 5 liitettä 19.2.2015 |
| Tutkinto | Insinööri (AMK) |
| Koulutusohjelma | Kemiantekniikka |
| Suuntautumisvaihtoehto | Prosessitekniikka |
| Ohjaajat | Laboratorioinsinööri Marja-Leena Åkerman Lehtori Carola Fortelius |
| <p>Insinööriyössä selvitettiin herajuoman omena- ja maitohappopitoisuuksia sekä sitä, sisältääkö herajuoma melatoniinia. Tiedot ovat tärkeitä juoman markkinoinnin kannalta. Happojen ja melatoniinin määrittämiseen käytettiin HPLC-laitteistoa.</p> <p>Heraproteiini on urheilijoiden suosima lisäraavinne. Heraa käytetään auttamaan lihasten kasvussa ja sitä käytetään myös äidinmaidonkorvikkeiden valmistuksessa. Sen suuren laktoosipitoisuuden takia heraa käytetään myös laktoosin valmistuksessa. Hera sisältää paljon erilaisia proteiineja, joilla on erilaisia terveysvaikutuksia.</p> <p>Omena- ja maitohapon määrittämisessä HPLC-laitteistolla kolonnina käytettiin HPX-87H Aminex ioniekskluusiokolonnia ja detektorina RI taitekerroin detektoria. Molemmilla hapoilla näytteistä tehtiin toistoja, jolloin saatiin selville, kuinka hyvä toistettavuus on määrittäksillä. HPLC-laitteiston antamien tulosten perusteella määritettiin omena- ja maitohapon pitoisuudet herajuomassa.</p> <p>Melatoniinin määrittäksessä HPLC-laitteistolla kolonnina käytettiin C18-RP kolonnia ja UV-detektoria.</p> <p>Omenahapon ja maitohapon pitoisuuksien määrittäykset onnistuivat hyvin ja mittaukset näyttävät olevan toistettavia, koska mittauksissa ei ole suurta hajontaa. Melatoniinin määrittäksen kohdalla ei saatu luotettavaa tietoa siitä, sisältääkö kyseinen herajuoma melatoniinia.</p> | |
| Avainsanat | Herajuoma, omenahappo, maitohappo, HPLC, melatoniini |

| | |
|---|---|
| Author Title | Tuuli Kivelä Determining malic acid, lactic acid and melatonin by HPLC |
| Number of Pages Date | 32 pages + 5 appendices 19 February 2015 |
| Degree | Bachelor of Engineering |
| Degree Programme | Chemical Engineering |
| Specialisation option | Process Engineering |
| Instructors | Marja-Leena Åkerman, Laboratory Engineer Carola Fortelius, Lecturer |
| <p>The aim of this thesis was to investigate malic acid and lactic acid concentrations in a whey drink and to determine whether the whey drink contains melatonin. This information is important when marketing this product. Determination of acids and melatonin was performed with an HPLC device.</p> <p>Whey protein is a popular additional nutrient for athletes. It is used to improve muscle growth, and it is also used in the production of infant formula. Whey protein has a high lactose content and that is why it has been used to produce lactose. Whey protein contains many different proteins which have good impact for health.</p> <p>In the determination of malic acid and lactic acid by HPLC, an HPX-87H Aminex ionexclusion column and a RI refractive index detector were used. Determination of malic acid and lactic acid was repeated with several samples in order to be able to investigate repeatability of concentrations. On the basis of the HPLC results, the malic acid and lactic acid concentrations were determined.</p> <p>In the determination of melatonin with the HPLC device, a C18-RP column and a UV-detector were used.</p> <p>Determining malic acid and lactic acid concentrations succeeded well, and it seemed to be repeatable because the concentrations did not vary so much. Determination of melatonin did not yield reliable results on whether the whey drink contains melatonin.</p> | |
| Keywords | Whey drink, malic acid, lactic acid, HPLC, Melatonin |

Sisällys

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Johdanto | 1 |
| 2 | Hera | 1 |
| 2.1 | Heran koostumus | 1 |
| 2.2 | Käyttötarkoitus | 2 |
| 2.2.1 | Heran käyttö bioteknisten prosessien raaka-aineena | 3 |
| 2.2.2 | Heran käyttö lisäravinteena | 8 |
| 2.3 | Heran valmistus | 9 |
| 3 | Omenahappo ja maitohappo | 12 |
| 3.1 | Omenahappo | 12 |
| 3.2 | Maitohappo | 13 |
| 4 | Melatoniini | 15 |
| 5 | Korkean paineen nestekromatografia (HPLC) | 16 |
| 5.1 | UV-detektori | 18 |
| 5.2 | RI-detektori | 18 |
| 6 | Materiaalit ja menetelmät | 18 |
| 6.1 | HPLC-menetelmä omena- ja maitohapon määrittäminen | 18 |
| 6.2 | HPLC-menetelmä melatoniinin määrittäminen | 19 |
| 6.3 | Kemikaalit ja standardit | 20 |
| 6.3.1 | Käytetyt kemikaalit | 20 |
| 6.3.2 | Standardien valmistus | 20 |
| 6.3.3 | HPLC eluenttien valmistus | 21 |
| 7 | Näytteiden valmistus ja analysointi | 21 |
| 8 | Koesuunnitelma | 21 |
| 9 | Maitohapon ja omenahapon määrittämisen tulokset | 23 |
| 10 | Melatoniini määrittämisen tulokset | 27 |
| 11 | Tulosten tarkastelu | 30 |
| 12 | Yhteenveto | 31 |

Liitteet

Liite 1. Maitohappo ja omenahappo standardi 3 g/l

Liite 2. Maitohappo ja omenahappo standardi 6 g/l

Liite 3. Maitohappo ja omenahappo standardi 7 g/l

Liite 4. Herajuoman omenahappo määritykset

Liite 5. Herajuoman maitohappo määritykset

1 Johdanto

Insinööriyössä tutkitaan HPLC-laitteiston avulla herajuoman omenahappo-, maitohappo- ja melatoniinipitoisuuksia. Tämän insinööriyön tavoitteena on selvittää, kuinka paljon kyseinen herajuoma sisältää omena- ja maitohappoa sekä sitä, sisältääkö kyseinen juoma melatoniinia. Tiedot ovat tärkeitä juoman markkinoinnin kannalta, koska joillakin mailla voi olla raja-arvoja omenahapon, maitohapon ja melatoniinin kohdalla.

Heraa syntyy juustonvalmistuksen yhteydessä ja sitä valmistetaan juoksete-entsyymin eli kymosiinientsyymin tai maitohappobakteerien avulla. Kymosiini-entsyymin avulla maidon kaseiini saostetaan, jolloin kaseiini ja rasva jäävät juustoon, mutta heran mukana poistuvat maidon muut komponentit. Maitohappobakteerien tai mineraalihapon lisäämisen avulla kaseiini saostetaan maidosta.

Hera on proteiiniseos, joka sisältää paljon hyödyllisiä proteiineja. Hera sisältää β -laktoglobuliinia, joka on tärkeä aminohappojen lähde sekä α -laktalbumiinia, glykoma-kropeptidejä, immunoglobuliineja ja albumiinia.

Urheilijat käyttävät heraa lisäravinteena ja siitä tehdään erilaisia herajuomia. Esimerkiksi Valion PROfeel tuotteet sisältävät enemmän heraproteiinia kuin tavanomaiset tuotteet, kuten valiojogurtti. Heraa tutkitaan jatkuvasti enemmän ja siitä yritetään saada kaikki mahdollinen hyöty ja tieto, että sitä voitaisiin käyttää vielä laajemmin. Valion tutkimuksissa perehdytään paljon heran terveysvaikutuksiin kaiken ikäisille ihmisille.

2 Hera

2.1 Heran koostumus

Hera sisältää paljon erilaisia proteiineja, joilla on erilaisia terveysvaikutuksia. Siitä on 35 % β -laktoglobuliinia, joka on tärkeä aminohappojen lähde. β -laktoglobuliini sitoo retinolia, pitkäketjuisia rasvahappoja ja triglyseridejä sekä parantaa niiden imeytymistä suolistossa. β -laktoglobuliinissa on peptidejä, jotka toimivat ACE-estäjinä ja eläinko-

keissa ne ovat laskeneet verenpainetta. β -laktoglobuliini on yleisin maitoallergiaa aiheuttanut maidon proteiini.

α -laktalbumiinia on 12 % heraproteiinista ja se sisältää runsaasti tryptofaania, joka muuttuu elimistössä serotiiniksi. Serotiini säätelee mielialaa, ja alustavien tutkimusten mukaan α -laktalbumiini saattaa stimuloida kehon puolustusjärjestelmää.

Heraproteiini sisältää 12 % glykomakropeptidejä, jotka eläinkokeiden mukaan saattavat vähentää mahahappojen eritystä, suojata suolistoa ja parantaa immunitaattia. Immunoglobuliineja on noin 8 % heraproteiineista, jotka parantavat vastasyntyneen vastustuskyä sekä sitoo ruoansulatuskanavassa toksiineja ja kolesterolia.

Maidon seerumissa on albumiinia, jota on heraproteiinissa 5 %. Albumiini on hyvä välttämättömien aminohappojen lähde. Muita proteiineja on alle 1 % heraproteiinissa. [1.]

Hera on neste, joka saostetaan pois juustosta juuston valmistuksen yhteydessä. Maito sisältää 85 - 95 % heraa ja hera pitää sisällään noin 55 % maidon ravintoaineista. Runsaampia ravintoaineita ovat laktoosi, liukenevat proteiinit, lipidit ja mineraalisuolat. Mineraalisuolat sisältävät yli 50 % NaCl ja KCl. Juuston valmistuksen yhteydessä saatu hera sisältää myös huomattavia määriä muita komponentteja kuten esimerkiksi maitohappoa, sitruunahappoa ja B-vitamiinia. [2.]

2.2 Käyttötarkoitus

Heraproteiinia on erotettu herasta jo 1980-luvulla heratiivisteinä, jota toimitettiin leipomoiden ja rehuteollisuuden käyttöön sekä äidinmaidon korvikkeen valmistukseen. Heran suuren ravintoainesisällön takia se sopii hyvin mikrobien kasvualustaksi, jonka perusteella on tutkittu sen soveltuvuutta etanolin valmistuksessa. Heran korkea orgaanisen aineksen pitoisuus kuormittaa ympäristöä etenkin vesistöjä, jonka takia pyritään käyttämään heraa hyödyksi mahdollisimman hyvin. [3.]

Maailman juuston valmistuksen yhteydessä saadusta herasta noin 50 % on käsitelty ja muokattu monenlaisiin ruokatuotteisiin, josta noin 45 % on ilmoitettu käytettävän suoraan nestemäisessä muodossa ja jauhemaisena herana käytetään noin 30 %. Lak-

toosina ja ei laktoosia sisältävinä sivutuotteina 15 % ja loput käytetään herakonsentraattina.

Käsittelemätön ylimääräinen nestemäinen hera sisältää kalsiumia, fosforia, sinkkiä ja vesiliukoisia vitamiineja. Ylimääräinen nestemäinen hera voidaan toimittaa maatalolle eläimille juomaveteen. Liiallinen laktoosi ja mineraaliosuus voi rajoittaa heran käyttöä eläinten ruokinnassa. Käsittelemätöntä nestemäistä heraa voidaan käyttää maatalouslannoitteena, mutta haittapuolena on se, maaperään voi muodostua suolakerrostumia. Nestemäisen heran kuljettaminen on kallista, koska sen suuren vesipitoisuuden takia hera altistuu helposti bakteerien ja sienien aiheuttamalle pilaantumiselle.

Jauhettua heraa käytetään eläinten ruokinnassa esimerkiksi melassin kanssa. Pieniä määriä jauhettua heraa voidaan käyttää ihmisten ruuissa esimerkiksi jäätelössä, kaakuissa ja kastikkeissa. Liiallinen suolan maku estää heran käyttöä sellaisenaan vauvojen ruokatuotteissa, mutta sen takia on kehitetty useita eri demineralisaatioprosesseja.

Herakonsentraatti johdetaan juustoheran käsittelystä. Käsittelyssä yleensä käytetään ultrasuodatusta, koska se on edullista, nopeaa ja mahdollistaa soveltuvuuden kaikkiin ihmisten ruokiin, jopa vauvan ruokiin. Herakonsentraatti soveltuu kaikkiin ruokiin, koska ei sisällä suolaa.

Herasta voidaan erottaa laktoosi kiteyttämällä. Laktoosia käytetään lisäravinteena äidinmaidonkorvikkeissa ja lääkkeissä. Laktoosin muokattavuus, lievä maku ja vähentynyt makeus mahdollistaa sen käytön tableteissa. [2.]

2.2.1 Heran käyttö bioteknisten prosessien raaka-aineena

Heraa käytetään bioteknisten prosessien raaka-aineena esimerkiksi maitohapon valmistuksessa, laktoosin valmistuksessa ja etanolin valmistuksessa. Tuotteen valmistusprosessista riippuen määritetään, missä muodossa heraa käytetään raaka-aineena.

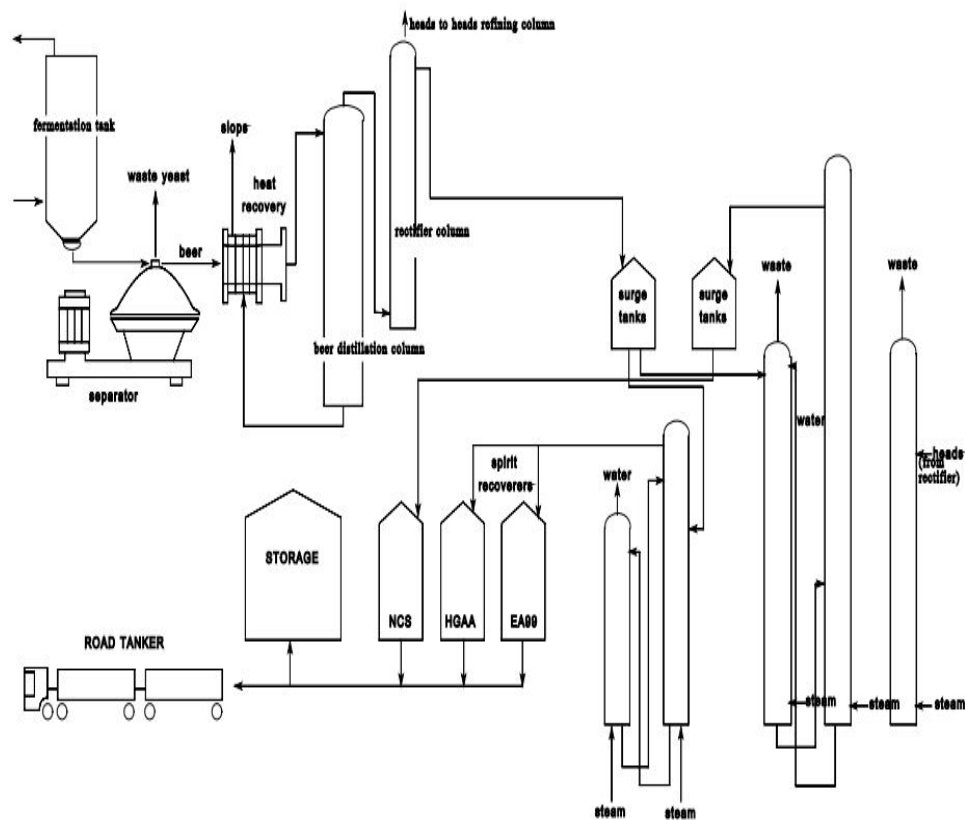
Etanolin valmistuksessa heran seerumin lämpötila tislaamossa on yli 60 °C. Tällöin herassa ei ole bakteereja, jotka aiheuttavat pilaantumista. Etanolin valmistuksen ensimmäisessä vaiheessa hera jäädytetään lämmönvaihtimella bakteereille sopivaan lämpötilaan. Hiiva lisätään heraan, jolloin neste siirretään ensimmäiseen kolmesta käymissäiliöstä. Käymisessä menee noin 24 tuntia, jonka jälkeen neste siirretään seu-

raavaan säiliöön. Säiliöissä käytetään ilmaa lisäämään bakteerien kasvua ja bakteereille optimaalisena lämpötilana käytetään noin 37 °C.

Käymisen valmistuttua hiiva poistetaan nesteestä separaattorin avulla. Hiivan poiston jälkeen neste uutetaan etanoliksi tislauksessa. Neste syötetään tislaukskolonniin, jonka jälkeen etanoli siirtyy paineen avulla väkevöimiskolonniin. Väkevöimiskolonnista etanoli siirretään vedettömään kolonniin tai uuttamiskolonniin. Tämän jälkeen etanoli palautetaan kerääjäsäiliöön.

Etanolia valmistetaan herasta useita eri laatuja ja valmistetun etanolin laatu määräytyy asiakkaan tarpeiden mukaan. Tislauksen määrä ja tyyppi määrittelee sen, minkä laatuista etanolia valmistuksessa saadaan. Kuvassa 1 lohkokaavio etanolin tislaamosta.

[4.]



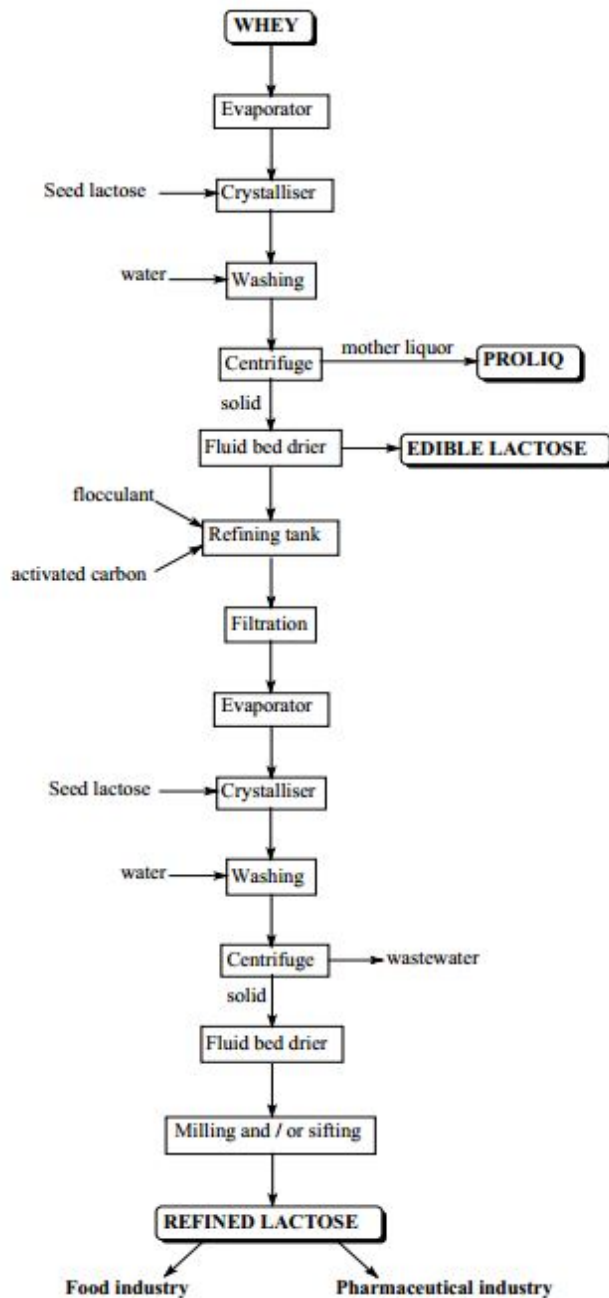
Kuva 1. Lohkokaavio etanolin tislaamosta [4]

Laktoosia käytetään paljon ruoka- ja makeisteollisuudessa. Laktoosin valmistuksessa heran pitoisuus muutetaan haihdutuksen avulla niin, että se sisältää 65 % kiintoainetta. Pitoisuuden muuttamisen jälkeen laktoosi johdatetaan kiteytykseen ja kiteytystä nopeutetaan lisäämällä laktoosikiteitä. Kiteytys voi kestää monta päivää ja se suoritetaan kiteytyssäiliössä. Kiteytyssäiliöitä jäähdytetään hitaasti koko kiteytyksen ajan.

Kiteytyksen jälkeen kiteet poistetaan emäliuoksesta sentrifugoimalla, mikä tuottaa raakaa laktoosia. Prosessissa saatu emäliuos sisältää huomattavia määriä proteiinia, mineraaleja, vitamiineja ja noin 18 % laktoosia. Emäliuos hyödynnetään myymällä nautakarjan lisäravinteeksi. Raaka laktoosi on kermaista kellertävää nestettä, koska se sisältää riboflaviinia. Sentrifugoinnin jälkeen kiteet pestään ja sentrifugoidaan uudestaan, minkä jälkeen laktoosi kuivataan leijukerros kuivaimella. Kuivattu laktoosi on tällöin syömäkelpoista.

Laktoosin jalostus on pakollista, jos halutaan saada lääkelaatuista laktoosia. Laktoosin jalostuksessa lääkelaatuiseksi laktoosi kiteet täytyy uudelleen liuottaa ja käsitellä hiilellä. Hiili imee liuoksesta riboflaviinin, polypeptidit ja suurimman osan proteiineista itseensä. Proteiineja voidaan poistaa hiilellä väliaikaisesti säätelemällä liuoksen pH:ta. Hiili poistetaan liuoksesta saostuksen ja suodatuksen avulla.

Hiilen poiston jälkeen liuos haihdutetaan ja sen jälkeen liuos johdetaan kiteytykseen. Kiteytyksen kiteet poistetaan liuoksesta sentrifugoimalla ja neste poistuu prosessista jätevetenä. Nesteen poiston jälkeen kiintoaine kuivataan ja loppu tuotteena on saatu puhtaan valkoista lääkelaatuista laktoosia. Valmis laktoosi jauhetaan tai seulotaan tarvituksi raekooksi jakelua varten. Prosessikaavio laktoosin puhdistusprosessista esitetään kuvassa 2. [5.]



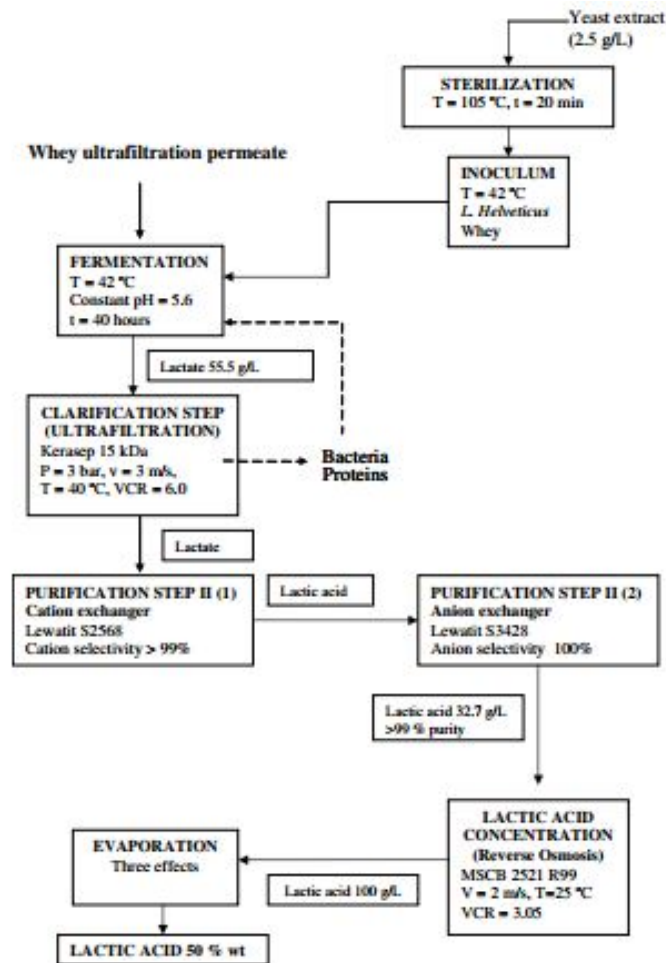
Kuva 2. Laktoosin puhdistus prosessi [5]

Maitohappoa käytetään ruoka- ja kemianteollisuudessa. Maitohappoa voidaan valmistaa herasta eri tavoilla, mutta käymisteitse valmistetun maitohapon kustannukset ovat yleensä korkeat. Tämän takia pyritään kehittämään tehokkaampia tapoja maitohapon valmistukseen. Tässä prosessissa käytetään ultrasuodatettua heraa ja prosessia on kokeiltu laboratorio mittakaavassa.

Hera johdetaan käymissäiliöön, johon lisätään hiivaa aiheuttamaan käymistä. Säiliössä on sekoituksen, lämpötilan ja pH:n säätömahdollisuus. Heran annetaan käydä tynnyrissä noin 40 tuntia 42 °C:een lämpötilassa ja pH on 5,6. Heran pH säädetään natriumhydroksidin avulla.

Käymisen jälkeen nesteen proteiinit ja biomassa poistetaan ultrasuodatuksen avulla. Ultrasuodatuksen jälkeen neste puhdistetaan kahdessa vaiheessa ioninvaihtajien avulla. Ensimmäisessä puhdistuksessa käytetään kationinvaihtajaa, joka poistaa nesteestä natriumin, kaliumin, kalsiumin ja magnesiumin. Toisessa vaiheessa puhdistusta käytetään anionin vaihtajaa, joka poistaa nesteestä ei-halutut anionit kuten kloridin ja fosfaatin.

Ioninvaihtajien jälkeen maitohappo väkevöidään kahdessa vaiheessa. Aluksi maitohappo käsitellään käänteisosmoosin avulla, jonka jälkeen maitohappo väkevöidään haihdutuksen avulla. Haihdutuksen jälkeen tuotteena saadaan elintarvikekäyttöön soveltuvaa 50 % maitohappoa ja kuvassa 3 kyseisen maitohapon valmistuksen prosessi-kaavio. [6.]



Kuva 3. Elintarvikekäyttöön soveltuvan 50 % maitohapon prosessikaavio [6]

2.2.2 Heran käyttö lisäravinteena

Maidon heraproteiini on urheilijoiden suosima lisäravinne, jota saadaan juustonvalmistuksessa. Urheilijat käyttävät heraproteiinia auttamaan lihasten kasvussa ja sitä käytetään myös äidinmaidonkorvikkeiden valmistuksessa. Suuren laktoosipitoisuuden vuoksi heraa käytetään myös laktoosin valmistuksessa.

Heraproteiini auttaa lihasten kasvussa, koska se imeytyy ja kulkeutuu nopeasti ohutsuoleen, sekä sen sisältämät aminohapot imeytyvät nopeasti verenkiertoon. Hera lisää lihastenproteiinisynteesiä ja nopeuttaa palautumista harjoittelusta. Heraproteiini ei vähennä proteiinin hajotusta, joka saattaa johtua sen nopeasta vaikutuksesta. [1.]

2.3 Heran valmistus

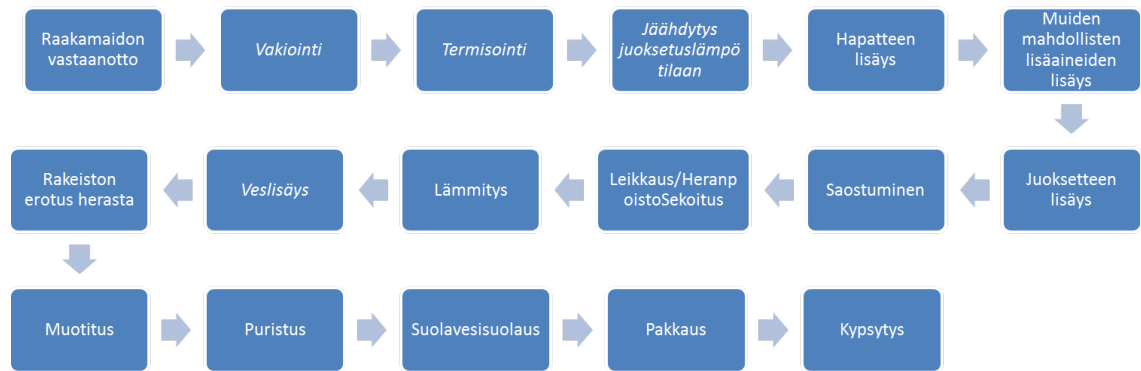
Heraa syntyy juustonvalmistuksessa, jossa maidon kaseiini saostetaan kymosiini-entsyymien avulla. Tällöin kaseiini ja rasva jäävät juustoon, mutta heran mukana poistuvat maidon muut komponentit. Juuston valmistuksen yhteydessä syntynyttä heraa kutsutaan makeaksi heraksi. Makeanheran pH on alle 5.

Juuston valmistuksessa maito pastöroidaan noin 72 °C:seen paitsi emmentaljuuston valmistuksessa maito käsitellään alemmassa lämpötilassa. Pastöroinnin jälkeen maidon rasvapitoisuus vakioidaan lisäämällä kermaa tai kuorittua maitoa. Juustolajista riippuen valitaan sopivat maitohappobakteerit ja lisätään juustokattilaan.

Maitohappobakteerien lisäyksen jälkeen maito saostetaan yleisimmin juoksettamalla, mutta juuston saostamiseen voidaan myös käyttää hapatusta. Juoksetteet ovat entsyymivalmisteita. Saostuksen jälkeen saostunut maito leikataan rakeiksi. Rakeistoa sekoitetaan ja lämmitetään, jonka aikana valmistuu juuston maun ja rakenteen perusta. Aika ja lämpötila riippuvat valmistettavan juustolajista.

Rakeistuksen ja lämmityksen jälkeen rakeisto siirretään puristusaltaaseen tai muotteihin. Kaikkia juustoja ei puristeta, vaan ne valutetaan muoteissa. Puristuksessa hera puristetaan juustosta pois. Puristusvoima vaikuttaa juuston rakenteeseen. Juustot voidaan pinta suolata tai suolata ne pitämällä tiettyä aika suolavedessä.

Suolauksen jälkeen juustot kypsytetään kellarissa, jonka lämpötila ja kosteus on säädetty juustolajin mukaan. Kypsytyksessä entsyymit, propionihappobakteerit, maitohappobakteerit ja joissakin tapauksissa homeet tai kittibakteerit hajottavat juuston ravintoaineita. Juuston ravintoaineiden hajotuksessa syntyvät juuston maun ja aromit. Kypsytyksessä proteiini hajoaa peptideiksi, aminohapoiksi ja aromiaineiksi, mutta rasvan hajoaminen on vähäistä. Laktoosi hajoaa kypsytyksessä maitohapoksi ja muiksi yhdisteiksi. Hiilidioksidi aiheuttaa juuston kolot. Juuston kypsytyisaika riippuu juustolajista, joka määrittää juuston kovuuden ja maun. Tarkemmat juuston valmistusprosessin osat kuvassa 4. [7.]

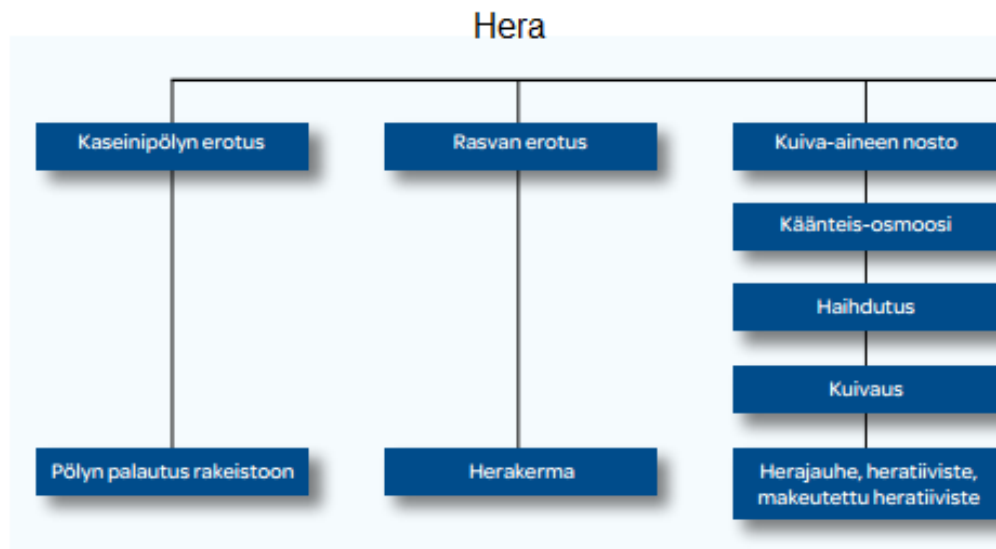


Kuva 4. Juuston valmistusprosessi [8]

Heraa voidaan valmistaa myös toisella tavalla, jolloin valmistuu happoheraa. Happoheran pH on 6 - 7. Kaseiini saostetaan hapattamalla maitoa maitohappobakteerien avulla tai lisäämällä maitoon mineraalihappoa. Tätä menetelmää käytetään yleensä rahkan valmistuksessa ja käytettävä maito on rasvatonta. Happoherassa suolapitoisuus on suurempi ja se sisältää enemmän kalsiumia kuin makeahera. [1.]

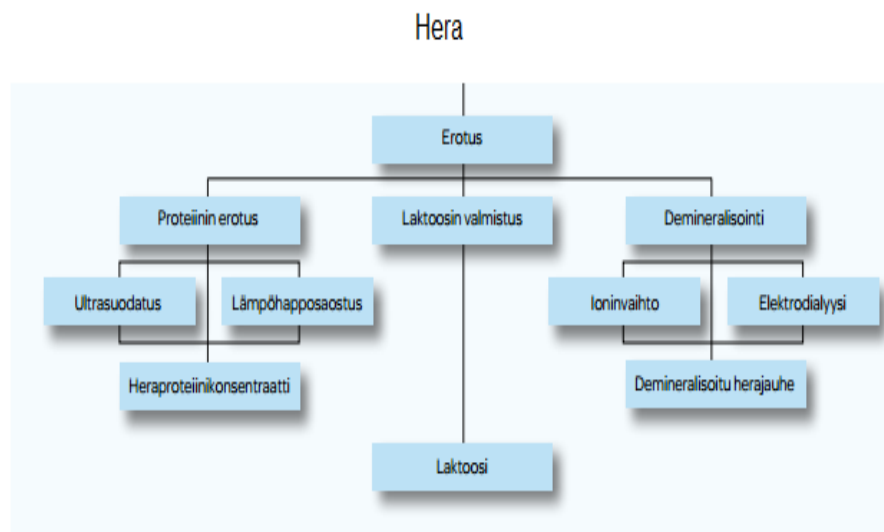
Jalostamalla heraa pystytään valmistamaan herakermaa, herajauhetta, heratiivistettä, heraproteiinikonsentraattia, laktoosia ja demineralisoitua herajauhetta. Heraa käytetään eniten heratiivisteiden, herajauheiden, laktoosin ja heraproteiini konsentraatin valmistuksessa. [1;3.]

Kuvassa 5 esitetään herajauheen, tiivisteiden ja herakerman valmistus. Esimerkiksi herajauheen ja heratiivisteiden valmistuksessa käytetään hyödyksi käänteisosmoosia, haihdutusta ja kuivausta.



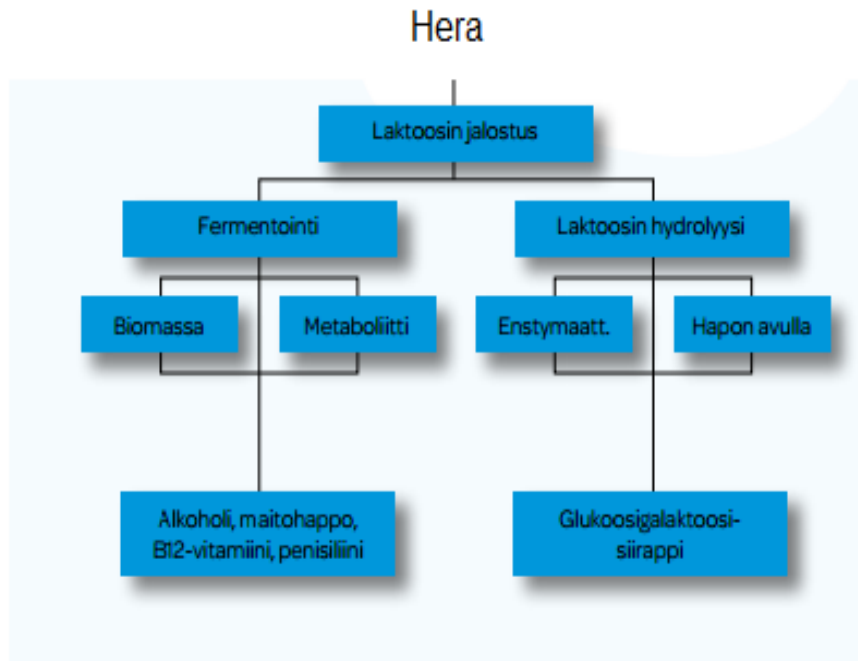
Kuva 5. Herajauheen, heratiivisteen, makeutetun heratiivisteen ja herakerman valmistus [1]

Kuvassa 6 esitetään laktoosin, heraproteiinikonsentraatin ja demineralisoidun herajauheen valmistus. Heraproteiinikonsentraatin valmistuksessa käytetään proteiinin erotusta, ultrasuodatusta ja lämpöhapposaostusta.



Kuva 6. Heraproteiinikonsentraatin, laktoosin ja demineralisoidun herajauheen valmistus [1]

Kuvassa 7 esitetään herasta valmistetun laktoosin jalostusprosessia. Laktoosia voidaan jalostaa glukoosigalaktoosisiirapiksi, alkoholiiksi ja penisiliiniksi.



Kuva 7. Laktoosin jalostus herasta [1]

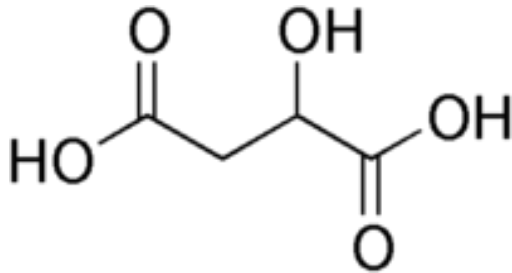
3 Omenahappo ja maitohappo

Maito- ja omenahappo kuuluvat hydroksihappoihin, joita on luonnollisesti monissa ruuissa. Hydroksihapot ovat happoja, joissa on karboksyyliyhdyntien lisäksi OH-ryhmä. Ne ovat biologisesti tärkeitä ja optisesti aktiivisia sekä ovat myöskin metabolisia happoja. [9, s.149 - 151.]

3.1 Omenahappo

Omenahappo on toiselta nimeltään 2-hydroksibutaanidihappo ja se on luonnossa esiintyvä happo, jonka rakennekaava esitetään kuvassa 8. Nykyään omenahappoa valmis-

tetaan suurimmaksi osaksi synteettisesti, mutta sitä voidaan myös eristää luonnollisista lähteistä. Omenat, luumut, kirsikat ja vesimeloni sisältävät omenahappoa ja sitä on omenoiden kokonaishappopitoisuudesta 97 %. [10.]



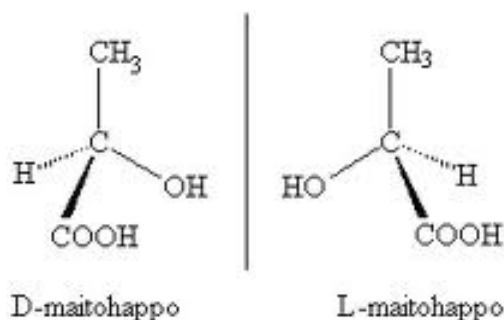
Kuva 8. Omenahapon rakennekaava [10]

Omenahappoa käytetään paljon makeisissa, juomissa, hilloissa, hedelmä- ja vihannes-säilykkeissä, makuaineena ruuissa sekä sitä käytetään myös happamuudensäätöai-neena. Sitä voidaan käyttää hajusteissa, metallien puhdistusaineena sekä kosmetii-kassa pH:n säätäjänä. Omenahappoa voidaan käyttää melkein kaikkiin elintarvikkeisiin, joihin saa käyttää lisäaineita, mutta enimmäisrajoitus vain ananasmehussa. [11.]

Omenahappo on isossa roolissa lihasten kasvussa, palautumisessa, pienentää väsy-mystä sekä kasvattaa energian tuotantoa. Omenahappo kasvattaa vastustuskykyä, ylläpitää suun hyvin vointia sekä edistää sileämpää ja vahvempaa ihoa. [12.]

3.2 Maitohappo

Maitohappo on toiselta nimeltään 2-hydroksipropaanihappo ja sitä on esimerkiksi hap-pamassa maidossa ja hapankaalissa. Maitohappoa vastaava anioni on laktaatti sekä sillä on kaksi enantiomeeria D-maitohappo ja L-maitohappo. Maitohappo on heikko happo. Maitohapon rakennekaava esitetään kuvassa 9, jossa nähdään maitohapon D- ja L-muodot. [13.]



Kuva 9. Maitohapon rakennekaava [14]

L- ja D-maitohappoa on esimerkiksi maidossa ja jogurteissa. L-maitohappoa muodostuu ihmisen kehossa aineenvaihdunnassa, mutta D-maitohappoa ei muodostu kehossa vaan se on keholle tuntematon. Ihmisen keho ei pysty ilman entsyymeitä poistamaan D-maitohappoa. L-maitohapolla on hyvä vaikutus ihmisen suolistoon, terveyteen ja edistää hyvien bakteerin olosuhteita suolistossa. [15.]

Maitohappoa voidaan valmistaa luonnollisesti ja synteettisesti. Kaupallista maitohappoa valmistetaan käymisellä hiilihydraateista, kuten glukoosista, sakkaroosista ja laktoosista. Vesi, glukoosi ja kalkki laitetaan käymistynnyriin, jossa muodostuu raakaa kalsiumlaktiaattia. Kipsi erotetaan ra'asta kalsiumlaktiaatista, jonka tuloksena saadaan maitohappoa. Maitohappo puhdistetaan ja konsentroidaan, jolloin saadaan L-maitohappoa. [16.]

Maitohappobakteerit ovat suuressa osassa maitohappokäymisessä ja niiden avulla valmistetaan esimerkiksi juustoa. Niiden tarkoituksena on parantaa tuotteen säilyvyyttä tuottamalla laktoosista ja sokereista happoja, jotka laskevat tuotteen pH:ta ja vähentävät tällöin säilyvyyttä haittaavia mikrobeja. Maitohappokäymistä käytetään paljon elintarviketeollisuudessa ja se tapahtuu hapettomissa sekä hapellisissa oloissa. [17;18.]

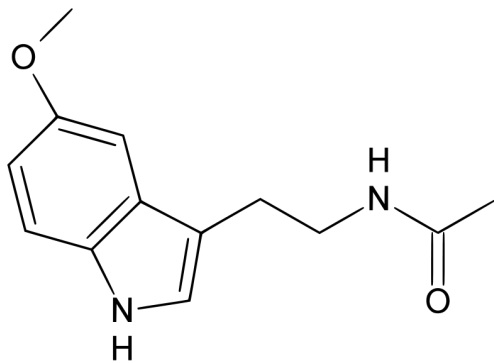
Maitohappokäymisessä saadaan energiaa, kun sokeria hajotetaan palorypälehapoksi ja palorypälehapo pelkistyy maitohapoksi. Reaktiossa ei synny hiilidioksidia ja suurin osa sokerin kemiallisesta energiasta jää maitohappoon. [19.]

Maitohappokäymisessä maitohappobakteeri määrittää kuinka paljon syntyy L- tai D-maitohappoa. L-maitohappoa muodostuu maitohappokäymisen yhteydessä maitotuotteissa ja hapatetuissa vihanneksissa sekä herassa. Elintarvikkeet, jotka sisältävät pal-

jon L-maitohappoa hyödynnetään funktionaalisina elintarvikkeina, koska ne tasapainottavat suolibakteeristoa. [13.]

4 Melatoniini

Melatoniinia eli N-asetyyli-5-metoksytryptamiiniä esiintyy elimistössä luontaisesti ja sen rakennekaava nähdään kuvassa 10. Sitä erittyy käpyrauhasesta. Melatoniinin erityis lisääntyä kehossa illalla pimeän tulon jälkeen ja vähenee yön loppupuolella. Vastasyntyneillä melatoniinia ei erity. Sen eritystä vähentää alkoholi, stressi tai tietyt lääkkeet kuten nukahtamislääkkeet. Melatoniinin uskotaan vaikuttavan uni-valverytmin säätelyyn, mutta sen fysiologiset vaikutukset tunnetaan huonosti. [20;21.]



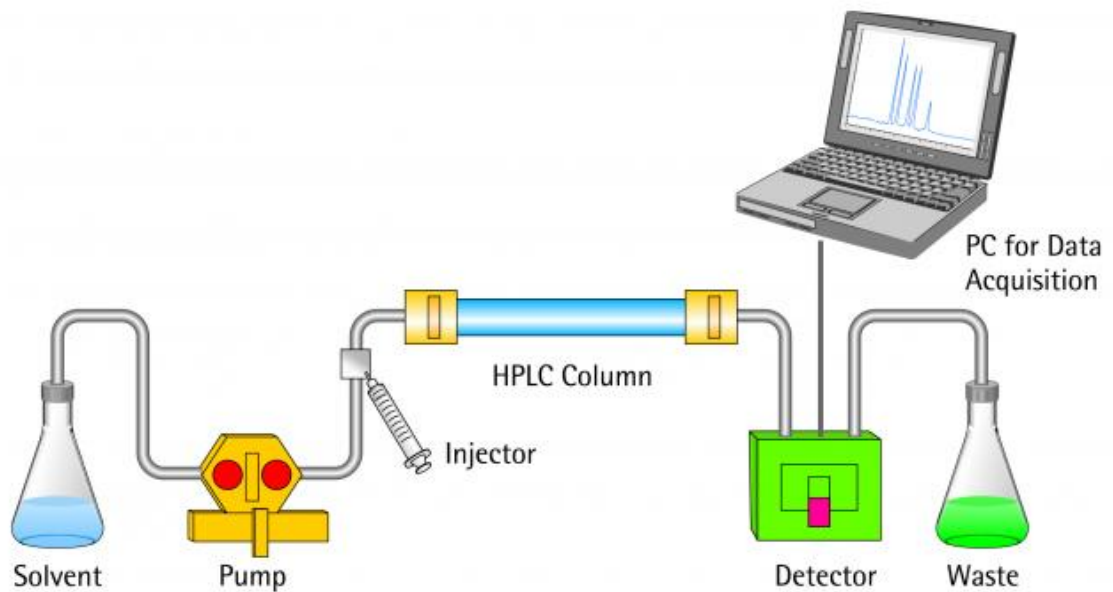
Kuva 10. Melatoniinin rakennekaava [20]

Kemialliselta rakenteeltaan melatoniini muistuttaa serotoniinia. Melatoniinin moolimassa on 232,28 g/mol. Melatoniini on luokiteltu nykyään ravintolisäksi, joten sitä saa ostettua ilman reseptiä. Se pääsee helposti solujen sisään, jonka takia toimii hyvin antioksidanttina. [20.]

Melatoniinituotteita, joita nautitaan suun kautta käytetään tilapäisen unettomuuden hoitoon ja aikaerorasiukseen. Tutkimusten mukaan melatoniini parantaa unen laatua 15 prosentilla potilaista ja nukahtaminen nopeutuu. Melatoniinin tehon on kuitenkin huomattu vähenevän pitkäaikaiskäytössä. Lyhytvaikutteisen melatoniinin tehoa on tutkittu ja sen on huomattu nopeuttavan nukahtamista. [21.]

5 Korkean paineen nestekromatografia (HPLC)

HPLC eli korkean paineen nestekromatografia. Korkean paineen nestekromatografiaa käytetään yhdisteiden erottamiseen, tunnistamiseen ja kvantitatiiseen analysointiin. Sillä on laajat käyttösovellutukset kemian aloilla. HPLC-laitteisto koostuu liuossäiliöstä, liuospumpusta, kolonnista ja detektorista, mutta nykyään laitteistossa voi olla näiden lisäksi automaattinen näytteensyöttäjä, kolonniuuni, kaasunpoistoyksikkö, seospumppu sekä tietokone. Kuvassa 11 esitetään yksinkertaisen HPLC-laitteiston osat. [22;23.]



Kuva 11. HPLC-laitteiston osat, joihin kuuluu liuossäiliö, pumppu, näytteensyöttö, kolonni, detektori, jäteastia ja tietokone [24]

Yhdisteiden erottuminen korkean paineen nestekromatografiassa perustuu yhdisteiden vuorovaikutukseen liikkuvan nestemäisen faasin ja kiinteän faasin välillä. Pumppu ylläpitää tasaista eluentivirtausta, jonka avulla yhdisteet kulkeutuvat kolonniin. Liuottimeen liuotettu näyte pakotetaan paineen avulla kulkemaan kolonnin läpi.

Erottuneet yhdisteet havaitaan detektorilla. Integraattorin avulla detektorin vaste muuttetaan kromatogrammiksi. Kromatogrammin antamat pinta-alat ovat suoraan verrannollisia yhdisteiden konsentraatioon.

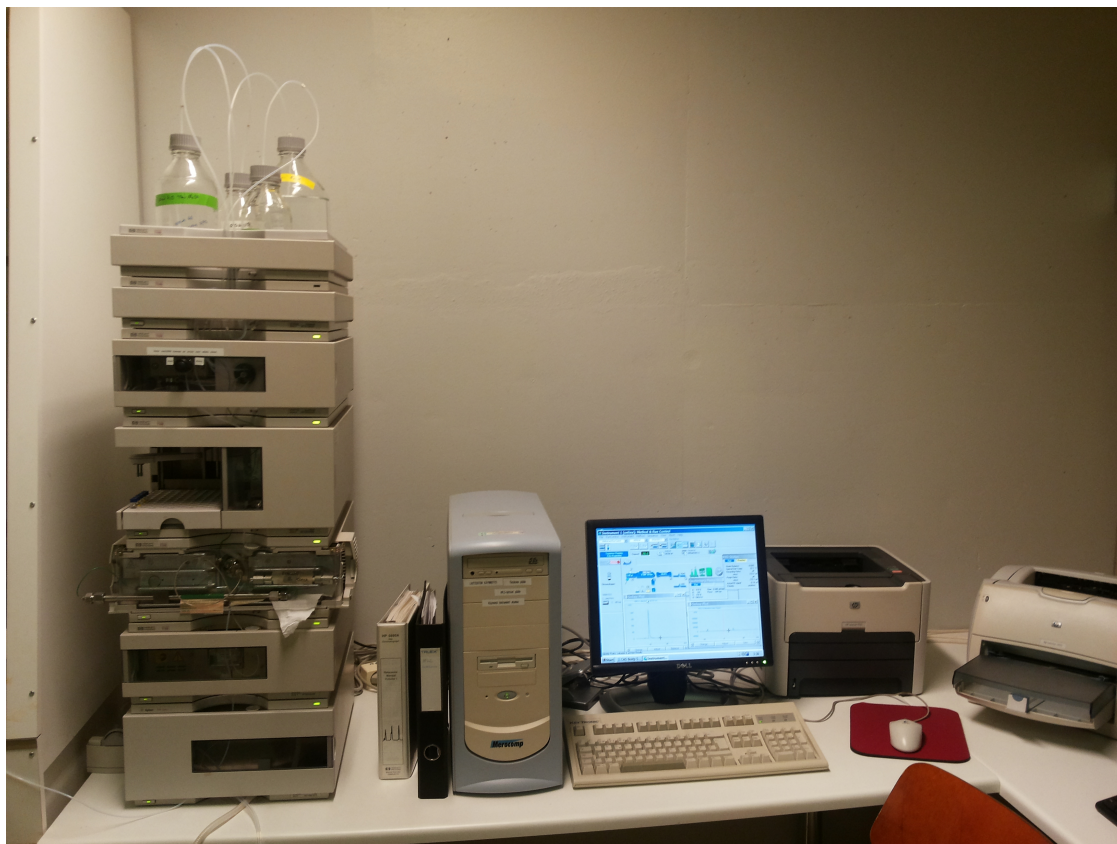
Kolonniissa tapahtuu yhdisteiden erottuminen. Kolonnit yleensä valmistetaan ruostumattomasta teräksestä. Korkean paineen nestekromatografiassa käytetään pakattuja

kolonneja. Kolonnit on pakattu hienojakoisella kiinteällä aineella, jota kutsutaan stationäärifaasiksi. Yleisin stationäärifaasin materiaali on silika. Kolonnien stationäärifaasiin kiinnitetään jokin kemiallinen ryhmä esimerkiksi C18.

HPLC-laitteiston pumppu pystyy tyypillisesti tuottamaan yli 300 bar paineen. Pumppu tarvitaan pumppaamaan liuotin kolonnin läpi ja joillakin pumpuilla voidaan tuottaa kahden tai useamman liuottimen seoksia.

Eluentti valitaan kolonnityypin mukaan ja se voi olla puskuriliuos, orgaaninen liuotin tai näiden seos. Yleensä eluenttina käytetään mahdollisimman vähän viskooseja eluenteja, kuten esimerkiksi asetonitriliä. Eluentit suodatetaan aina ennen käyttöä ja syövyttäviä liuottimia ei saa käyttää.

Kolonnissa erottuneet yhdisteet havaitaan detektorilla. Detektorit perustuu valon absorbanssin, taitekertoimen, johtokyvyn, fluoresenssin tai massaspektrin mittaamiseen. Kuvassa 12 työssä käytetty HPLC-laitteisto. [22;23.]



Kuva 12. HPLC-laitteisto koostuu liuossäiliöstä, liuospumpusta, kolonnista ja detektorista sekä siinä on automaattinen näytteensyöttäjä, kolonniuuni, seospumppu sekä tietokone.

5.1 UV-detektori

UV-detektori on tavallisin detektorityyppi ja perustuu tutkittavien yhdisteiden kykyyn adsorboida UV-säteilyä. Eluentti kulkee läpivirtauskyvetin läpi ja laite mittaa adsorboituneen säteilyn, kun UV-valo kulkee kyvetissä olevan eluentin läpi. Adsorboituneen valon määrä on verrannollinen yhdisteen konsentraatioon.

UV-detektoreita on kahta eri tyyppiä. Yhden aallonpituuden detektori mittaa yhdellä vapaasti valittavalla aallonpituudella. Toisen tyyppinen detektori on diodirividetektor, jossa voidaan valita yksi tai useampia mittausaallonpituuksia tai mitata kokonaisabsorbanssia. [23.]

5.2 RI-detektori

Taitekerroindetektor eli RI-detektori mittaa detektorin läpi virtaavan eluentin taitekerrointa. Tutkittavat yhdisteet vaikuttavat havaittuun taitekertoimeen. RI-detektori sopii kaikille yhdisteille, mutta sen haitta puolia on epäherkkyys ja häiriöalttius. [23.]

6 Materiaalit ja menetelmät

Työssä käytettiin kahta eri HPLC-menetelmää. Omenahappo ja maitohappo määrittämissä käytettiin eri kolonnia kuin melatoniinin määrittäksessä, jonka takia myös ajo-olosuhteet olivat erilaiset.

6.1 HPLC-menetelmä omena- ja maitohapon määrittäminen

Taulukossa 1 esitetään omena- ja maitohapon määrittäksessä käytetyn HPLC-menetelmän tarkemmat tiedot, esimerkiksi analyysilaitteisto ja kolonni.

Taulukko 1. Omena- ja maitohapon määrittämisessä käytetty HPLC-menetelmä.

| | |
|---------------------|---|
| Analyysilaitteisto | Hewlett Packard series 1100 |
| Kolonne | HPX-87H Aminex ioniekskluusio 300 mm x 7,8 mm |
| Injektointitilavuus | 5 µl |
| Virtausnopeus | 0,5 ml/min |
| Ajoaika | 30 min |
| Kolonnin lämpötila | 50 °C |
| Detektorit | UV 210 nm, RI |
| Eluentti | 5 mM rikkihappoliuos |
| Eluentin suodatus | Millipore white GSWR 47 mm 0,22 µm |
| Näytteen suodatus | Whatman PDVF 0,45 µm |

6.2 HPLC-menetelmä melatoniinin määrittäminen

HPLC-menetelmän tarkemmat tiedot melatoniinin määrittämisessä esitetään taulukossa 2. Taulukossa 2 esitetään esimerkiksi menetelmän analyysilaitteisto, kolonne ja eluentti.

Taulukko 2. HPLC-menetelmä melatoniinin määrittämisessä

| | |
|---------------------|---|
| Analyysilaitteisto | Hewlett Packard series 1100 |
| Kolonne | C18 – RP Reverse-Phase 125-4 |
| Injektointitilavuus | 10 µl |
| Virtausnopeus | 0,5 ml/min |
| Ajoaika | 10 min |
| Detektorit | UV 250 nm |
| Eluentti | 0,5 % etikkahappo/ asetoniiriili/ metanoli -liuos suhteessa 5:1:4 |
| Eluentin suodatus | Millipore HV 0,45 µm |
| Näytteen suodatus | Whatman PVDF 0,45 µm |

6.3 Kemikaalit ja standardit

6.3.1 Käytetyt kemikaalit

Omenahapon ja maitohapon määrittämisessä käytettyjen kemikaalien laadut ja valmistajat esitetään taulukossa 3.

Taulukko 3. Omenahapon ja maitohapon määrittämisessä käytetyt kemikaalit.

| | Laatu | Valmistaja |
|-------------------|--------------------------|------------|
| 97 % rikkihappo | p.a. | Merck |
| 99,5 % omenahappo | Biokemialliseen käyttöön | Merck |
| 88 % maitohappo | AnalR | BDH |

Taulukossa 4 esitetään melatoniinin määrittämisessä käytetyt kemikaalit, kemikaalien laadut ja valmistajat.

Taulukko 4. Melatoniinin määrittämisessä käytetyt kemikaalit

| | Laatu | Valmistaja |
|---------------|-------------|---------------|
| Melatoniini | Ravintolisä | Orion |
| Etikkahappo | Puriss | Sigma-Aldrich |
| Asetonitriili | HPLC-grade | Rathburn |
| Metanoli | HPLC-grade | BDH |

6.3.2 Standardien valmistus

Herajuomasta määritettiin kahta eri happoa, joten tehtiin omenahaposta ja maitohaposta eri konsentraatioisia standardeja. Molemmista hapoista tehtiin neljä eri standardiliuosta, jotka olivat 3, 5, 6 ja 7 g/l. Standardit tehtiin ionivaihdettuun veteen.

Kalibrointisuora kulki origon kautta ja pisteet osuivat hyvin suoralle. Ennen määrittämiä ja kalibrointia laitteiston täytyi tasapainottua, jotta tuloksista tulisi luotettavampia.

Melatoniinin määrittämistä varten jauhettiin 1 mg:n melatoniinitabletti ja se liuotettiin 10 ml:aan eluenttia, suodatettiin liuos suodatinpaperin läpi, jolloin saatiin suurimmat kiintoaineet pois liuoksesta. Ennen määrittämistä HPLC-laitteistolla liuos suodatettiin vielä PVDF 0,45 µm suodattimella.

6.3.3 HPLC eluenttien valmistus

Eluenttina omenahappo ja maitohappo määrittämissä käytettiin 5 mM rikkihappoa. Eluentti suodatettiin heti valmistuksen jälkeen imusuodatuksella, jossa kalvosuodattimena toimi Milliporen 0,22 µm white GSWR vesipohjaisille liuoksille sopiva suodatin.

Melatoniinin analysoinnissa eluenttina käytettiin 0,5 % etikkahappo, asetonitrili, metanoli-liuosta, joka oli valmistettu suhteessa 5:1:4. Eluentti suodatettiin imusuodatuksella valmistuksen jälkeen, jossa kalvosuodattimena toimi Milliporen HV 0,45 µm orgaanisille liuottimille tarkoitettu suodatin.

7 Näytteiden valmistus ja analysointi

Näytteitä päädyttiin tekemään eri heranäytepulloista nähdäksemme onko pullojen välillä merkittäviä eroavaisuuksia. Heranäytepullot saatiin yhteyshenkilön kautta ja pullot sisälsivät valmista herajuomatiivistettä. Näytteet laimennettiin ja suodatettiin määrittämistä varten.

Omenahapon määrittämistä varten herajuomasta tehtiin laimennoksia neljästä heranäytepullosta. Laimennokset sisälsivät 50 % herajuomaa ja loput vettä. Ennen laimennosten laittamista näytepulloihin näytteet suodatettiin PVDF 0,45 µm kalvosuodattimilla.

Maitohapon määrittämissä tehtiin myös laimennoksia neljästä herajuomapullosta. Laimennokset sisälsivät 20 % herajuomaa ja näytteet suodatettiin samalla tavalla kuin omenahapon määrittämissä.

8 Koesuunnitelma

Koesuunnitelman tarkoituksena on saada mahdollisimman paljon tietoa kyseisestä kokeesta etukäteen, jotta pystyttäisiin arvioimaan esimerkiksi kustannuksia ja nopeutta. Koesuunnitelma tehdään silloin, kun ei ole sopivaa simulointiohjelmia eikä pystytä

tekemään matemaattista mallia tai matemaattinen malli on kalliimpi kuin kokeiden tekeminen. Koesuunnitelmaa käytetään myös silloin, kun matemaattisessa mallissa on tuntemattomia parametrejä.

On tärkeää suunnitella tarpeelliset kokeet etukäteen, koska ne vaativat hyvin paljon työtä, analyysejä ehkä laiteinvestointeja, joten ne vaikuttavat suoraan kustannuksiin. Tulosten luotettavuuden kannalta on tärkeää selvittää kokeiden ja mittausten toistettavuus, jottei häiriötekijät pääsisivät vaikuttamaan tuloksiin. [25.]

Tämän työn koesuunnitelman tarkoituksena on ollut selvittää kuinka paljon määryksiä olisi tarpeellista tehdä. Koesuunnitelman avulla pystyttäisiin helpommin arvioimaan aikataulua sekä saadaan kokonaiskuva näytemääristä.

Koesuunnitelmassa on lueteltu kaikkien standardien määrät ja kuinka monta toistoa jokaiselle standardille tehtiin. Maitohapon, omenahapon ja melatoniinin näytemäärät sekä toistojen määrät löytyvät koesuunnitelmasta. Taulukko 5. nähdään esiteltynä kyseinen koesuunnitelma.

Toteutuneiden määrysten kohdalla nähdään mittaukset, joista saatiin kunnolliset tulokset. Yksi näyte hylättiin, koska oli eroavaisuuksia muiden näytteiden kanssa, jotka voivat vaikuttaa tuloksiin. Näyte 1 pullo oli ollut pidempään avattuna mitä muiden näytteiden pullot, joten päädyttiin hylkäämään kyseinen näyte.

Taulukko 5. Koesuunnitelma, jossa esitetään näytteiden, omenahappo standardien, maitohappo standardien ja melatoniini standardien suunnitellut sekä toteutuneet injektioiden määrät.

| Omenahappo standardit | Standardien pitoisuudet (g/l) | Injektointien määrät | Toteutuneet |
|-----------------------|-------------------------------|----------------------|-------------|
| 1 | 3 | 3 | 3 |
| 2 | 5 | 3 | 3 |
| 3 | 6 | 3 | 3 |
| 4 | 7 | 3 | 3 |
| Maitohappo standardit | | | |
| 1 | 3 | 3 | 3 |
| 2 | 5 | 3 | 3 |
| 3 | 6 | 3 | 3 |
| 4 | 7 | 3 | 3 |
| Näytteet | | | |
| 1 | | 3 | |
| 2 | | 3 | 3 |
| 3 | | 3 | 3 |
| 4 | | 3 | 3 |
| Melatoniini | | | |
| Standardi | | 3 | 3 |
| Näyte | | 3 | 3 |
| Yhteensä | | 42 | 39 |

9 Maitohapon ja omenahapon määritysten tulokset

Taulukossa 6 nähdään HPLC-laitteiston antamat pinta-alat näytteille. Kustakin näytteestä tehtiin kolme toistoa, joiden avulla laskettiin mittaustoistojen keskiarvo.

Taulukko 6. HPLC -laitteiston määrittämät omenahapon ja maitohapon pinta-alat näytteille

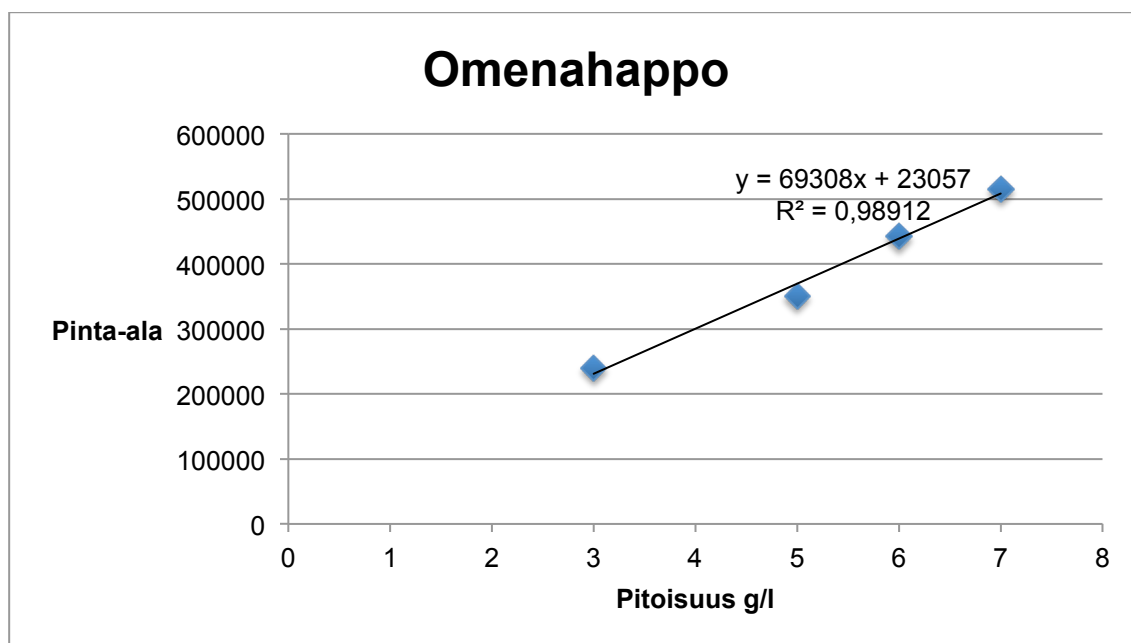
Omenahappo

| | Pinta-ala | Pinta-ala | Pinta-ala | Keskiarvo |
|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Näyte 2 | 471202 | 463342 | 436360 | 456968 |
| Näyte 3 | 462129 | 452107 | 439703 | 451313 |
| Näyte 4 | 444340 | 454376 | 440002 | 446239 |

Maitohappo

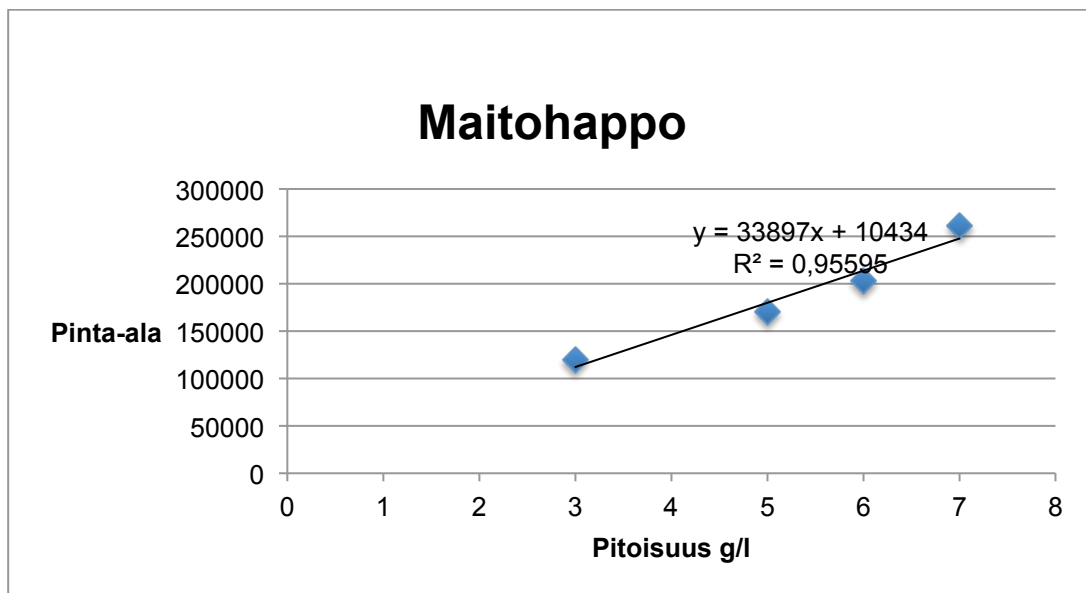
| | Pinta-ala | Pinta-ala | Pinta-ala | Keskiarvo |
|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Näyte 2 | 133629 | 137440 | 135010 | 135360 |
| Näyte 3 | 131278 | 131107 | 131917 | 131434 |
| Näyte 4 | 132953 | 131072 | 128993 | 131006 |

Kuvassa 13 on omenahappo standardien mittaustoistojen keskiarvojen perusteella piirretty standardisuora. Kustakin standardista tehtiin kolme toistoa, joiden perusteella laskettiin keskiarvo. Pinta-alojen avulla piirrettiin standardisuora. Kuvassa 13 nähtävä R^2 -arvoa kutsutaan selityssasteeksi ja se kuvaa kuinka vähän vaihtelua on muuttujien välillä. Kuvan 13 kuvaajasta voidaan R^2 mukaan katsoa, että vaihtelua muuttujien välillä on vähän. Mitä lähempänä arvo on numeroa 1 sitä vähemmän on vaihtelua.



Kuva 13. Omenahappo standardien mittaustoistojen keskiarvot

Kuvassa 14 on maitohappo standardien toistojen keskiarvojen perusteella piirretty standardisuora. Kustakin standardista tehtiin kolme toistoa, joiden perusteella laskettiin keskiarvo. Kuvassa 14 R^2 mukaan vaihtelua muuttujien välillä on vähän, mutta arvo on vähän huonompi kuin kuvassa 13 omenahappo standardien tilanteessa.



Kuva 14. Maitohappo standardien mittaustoistojen keskiarvot

Kuvassa 15 nähdään maitohappo standardin pitoisuudeltaan 5 g/l ja omenahappo standardin pitoisuudeltaan 5 g/l tulokset. Standardien keskiarvojen avulla määritettiin omena- ja maitohapon pitoisuus herajuomassa. Standardien 3, 6 ja 7 g/l HPLC-laitteiston antamat tulokset löytyvät liitteistä 1,2 ja 3.

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\ORGACIDS\40000004.D

Sample Name: Standardi 5 g/l

Standardi 5 g/l

```

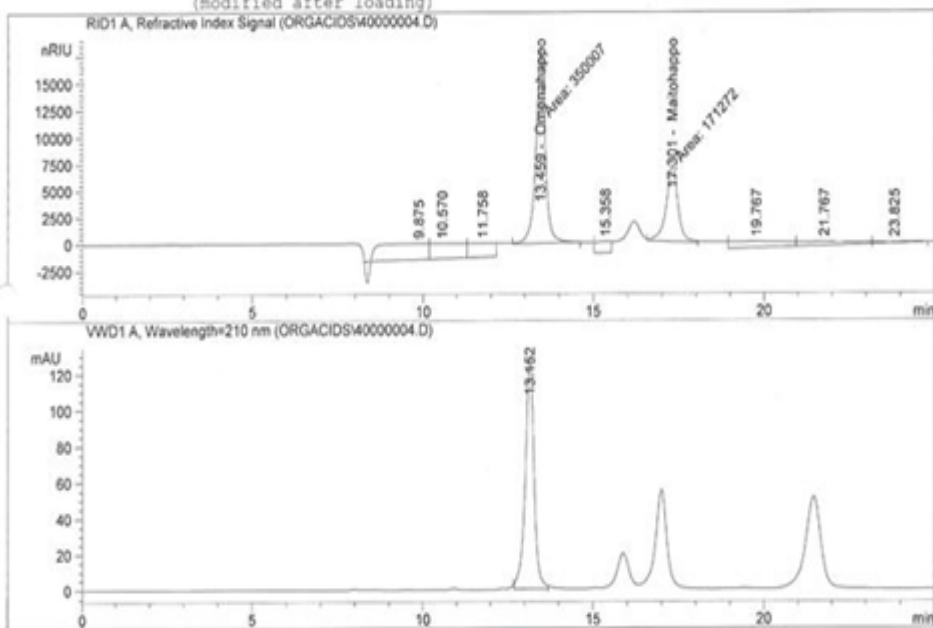
-----
Injection Date : 17.6.2014 3:12:29      Seq. Line : 1
Sample Name    : Standardi 5 g/l        Location  : Vial 1
Acq. Operator  : Tuuli Kivela          Inj      : 4
                                           Inj Volume: 5 µl

```

```

Sequence File  : C:\HPCHEM\1\SEQUENCE\HERA2.S
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\HERA.M
Last changed   : 17.6.2014 1:53:12 by Tuuli Kivela
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\HERA.M
Last changed   : 17.6.2014 5:05:55 by Tuuli Kivela
                (modified after loading)

```



```

-----
External Standard Report
-----

```

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 5.6.2014 7:24:37
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000

```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

| RetTime [min] | Type | Area [nRIU*s] | Amt/Area | Amount [g/l] | Grp | Name |
|---------------|------|---------------|------------|--------------|-----|------------|
| 13.459 | MM | 3.50007e5 | 1.19851e-5 | 4.19485 | | Omenahappo |
| 17.301 | MM | 1.71272e5 | 2.20931e-5 | 3.78393 | | Maitohappo |

Totals : 7.97879

Results obtained with enhanced integrator!

Signal 2: VWD1 A, Wavelength=210 nm

```

-----
*** End of Report ***
-----

```

Instrument 1 17.6.2014 5:06:42 Tuuli Kivela

Page 1 of 1

Kuva 15. Maitohapon ja omenahapon 5 g/l standardin tulokset

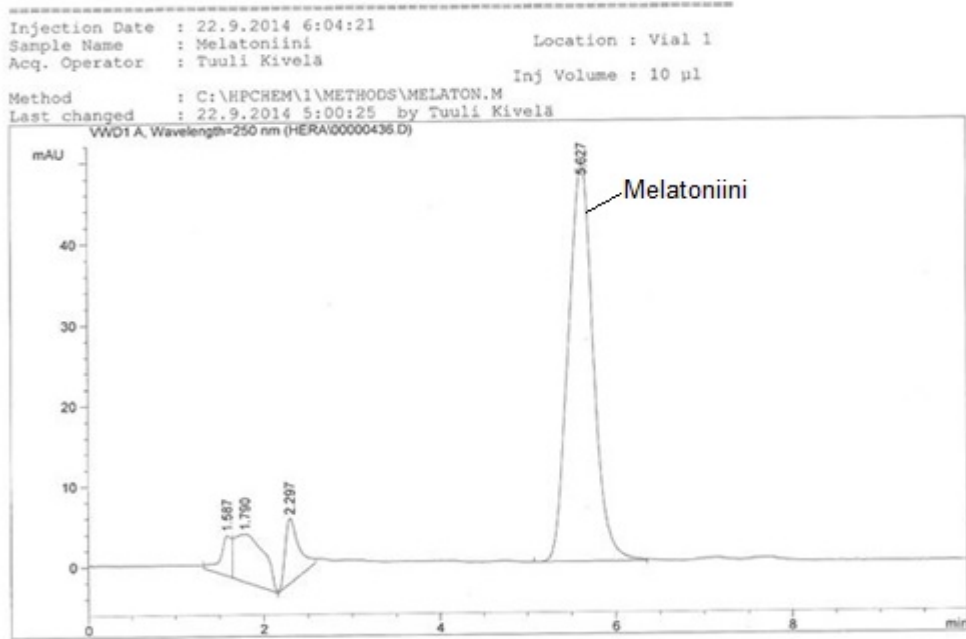
Omenahapon määrittämisessä näyte oli laimennettu siten, että se sisälsi 50 % herajuomaa. Laimennetulle näytteelle saatiin pitoisuudeksi 6,1 g/l, koska laimennos oli 50 % niin herajuoman omenahappo pitoisuus oli tällöin 12,2 g/l. Omenahapon määrittämisen tulos löytyy liitteestä 4.

Maitohappo analysoitiin 20 % herajuomasta. Laimennetulle herajuomanäytteelle saatiin pitoisuudeksi 3,7 g/l, joten herajuoman maitohappo pitoisuus oli 18,5 g/l. Maitohapon määrittämisen tulos löytyy liitteestä 5.

10 Melatoniini määrittämisen tulokset

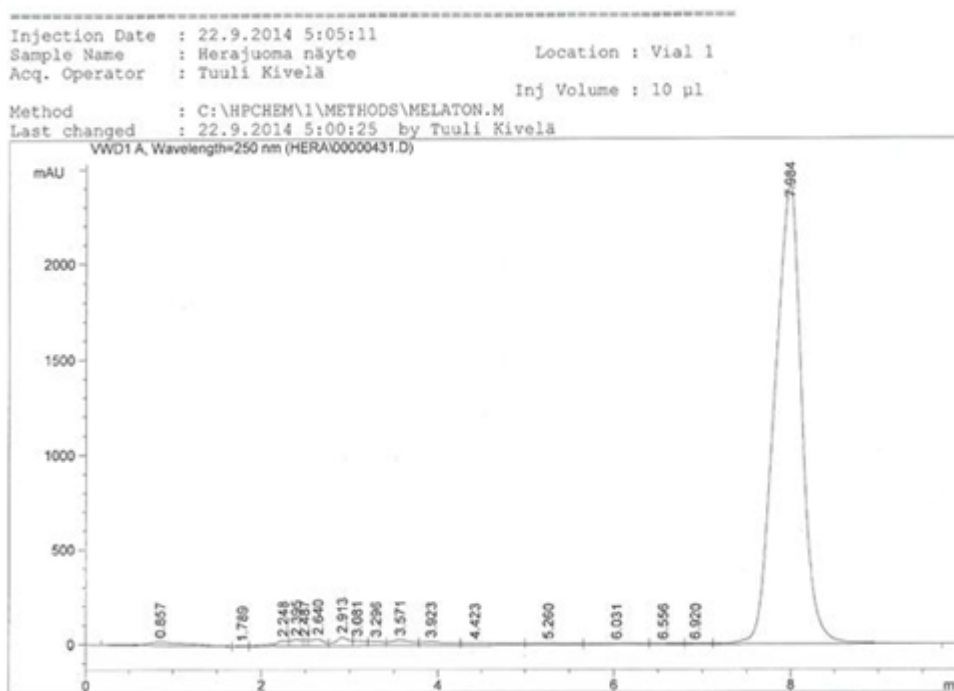
Melatoniinin määrittämisessä oli ongelmia tulosten luotettavuuden kanssa, jonka vuoksi liuotettiin melatoniinitabletti eluenttiin. Eluenttina oli 0,5 % etikkahappo/asetonitriili/metanoli-liuos suhteessa 5:4:1. Tabletti sisälsi 1 mg melatoniinia ja se liuotettiin 10 ml:aan eluenttia. Kyseisestä liuoksesta valmistettiin näyte, joka sisälsi 50 % herajuomaa ja 50 % 100 ppm:n vahvuista melatoniiniliuosta. Melatoniinin retentioajaksi saatiin noin 5,7 minuuttia. Määrittämisestä ei saatu varmaa tulosta, joten valmistettiin 10 kertaa väkevämpi melatoniininäyte.

Kuvassa 16 HPLC-laitteiston antama kuvaaja näytteelle, joka sisälsi melatoniinia liuotettuna eluenttiin. Kuvaajan perusteella pyrittiin määrittämään melatoniinin retentioaika kyseisillä ajo-olosuhteilla.



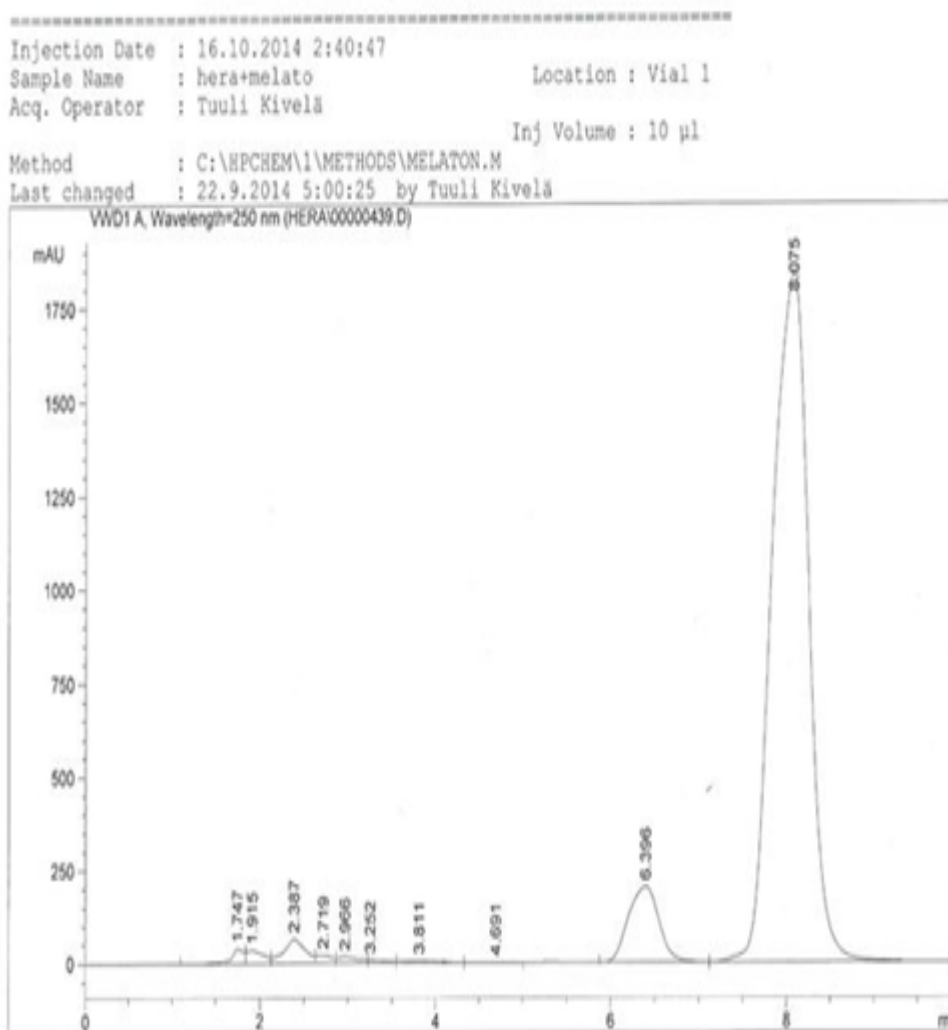
Kuva 16. Melatoniinitabletti 1 mg liuotettuna 10 ml:aan eluenttia. Eluenttina käytettiin 0,5 % etikkahappo/asetonitriili/metanoli –liuos suhteessa 5:4:1

Herajuomanäytteeseen lisättiin eluenttia suhteessa 1:1. Eluenttina käytettiin 0,5 % etikkahappo/asetonitriili/metanoli-liuosta suhteessa 5:4:1. Kyseisen herajuomanäytteen tulokset löytyvät kuvasta 17.



Kuva 17. Heranäyte, johon lisätty eluenttia suhteessa 1:1. Eluenttina 0,5 % etikkahap-
po/asetonitrili/metanoli –liuos suhteessa 5:4:1

Valmistettiin melatoniininäyteliuos siten, että 10 ml:aan eluenttia liuotettiin 10 tabletti-
tiamelatoniinia vahvuudeltaan 1 mg/tabletti ja valmistettiin näyte samalla tavalla kuin
edellämainittu. HPLC-laitteiston antama kuvaaja melatoniininäyteliuokselle näkyvät
kuvassa 18. Tuloksista ei saatu vieläkö varmuutta sisältääkö kyseinen herajuoma
melatoniinia.



Kuva 18. Heränäytteeseen lisätty melatoniinia suhteessa 1:1. Melatoniiniliuos valmistettiin liuottamalla 10 tablettiä melatoniinia vahvuudeltaan 1 mg/tabletti 10 ml:aan eluenttia.

11 Tulosten tarkastelu

Maitohapon ja omenahapon pitoisuuksien määrittämisessä käytettiin näytteinä neljää eri heränäytekäytettä. Kaikki heräjuomat olivat samasta erästä.

Tuloksissa on otettava huomioon, että heräjuoman valmistuserissä voi olla eroavaisuuksia. Mahdolliset eroavaisuudet voivat vaikuttaa maitohapon ja omenahapon pitoisuuksiin, jolloin tuloksissa saatuja pitoisuuksia voidaan pitää suuntaa antavina.

Omenahapon ja maitohapon pitoisuuksien varmistamiseksi teollisessa mittakaavassa olisi suositeltavaa suorittaa pitoisuuksien määrittämiä monista eri valmistuseristä. Tämä

mahdollistaisi tulosten luotettavuuden omenahapon ja maitohapon pitoisuuksien kohdalla.

Melatoniinin määrittämisen kohdalla ei saatu luotettavaa tietoa siitä, sisältääkö kyseinen herajuoma melatoniinia, koska melatoniinin retentioajoilla oli eroavaisuuksia. Menetelmää pitäisi kokeilla suuremmilla herajuomanäyte määrillä sekä melatoniini standardeja pitää olla enemmän. Aikataulun ja kustannusten takia emme voineet tehdä herajuomalle laajempaa melatoniinin määrittämistä. Tässä työssä melatoniinin lähteenä on käytetty melatoniini tabletteja, mutta puhtaan melatoniinin käytöllä voitaisiin saada tarkempia tuloksia. Kustannusten takia päätimme käyttää melatoniini tabletteja, koska puhdas melatoniini on hinnaltaan korkeampi.

12 Yhteenveto

Tässä insinööriyksössä määritettiin herajuoman omenahappo ja maitohappo pitoisuuksia sekä tehtiin melatoniinin kvalitatiivista määrittämistä. Maito- ja omenahapon pitoisuuksien määrittämisessä käytettiin HPLC-laitteistoa. HPLC-laitteistossa kolonnina käytettiin HPX-87H Aminex ioniekskluusio 300mm x 7,8 mm, joka soveltuu käytettäväksi tunnistettaessa orgaanisia happoja. Detektorina käytettiin RI eli refractive index detektoria.

Happojen määrittämisessä tehtiin mittaustoistoja kaikille näytteille, jotta nähtäisiin pitoisuuksien määrittämisen lisäksi kuinka toistettavia mittaukset olivat. Omenahapon pitoisuudeksi saatiin 12,2 g/l ja maitohapon pitoisuudeksi saatiin 18,5 g/l. Mittauksien variatiokertoimiksi saatiin omenahapolle 0,14 ja maitohapolle 0,2. Mittaukset näyttävät olevan hyvin toistettavia, koska pitoisuuksissa ei ole suurta hajontaa.

Omenahapolle ei ole määritetty päivittäistä suositus määrää, mutta sen päivittäinen annostus voi vaihdella välillä 1200 mg – 2800 mg. Maitohapolle ei myöskään ole määritetty päivittäistä suositusannosta. Erilaisia maitohappo bakteereita myydään paljon päivittäiseen käyttöön. Melatoniinin päivittäiselle käytölle on määritetty, että sitä voi tarvittaessa nauttia 0,5 mg - 1 mg päivässä.

Melatoniinin määrittämisessä käytettiin HPLC-laitteistoa ja kolonnina käytettiin C18 – RP ja detektorina käytettiin UV-detektoria. Herajuoman melatoniinin määrittämisessä oli ongelmia ja ei saatu luotettavia tuloksia. Tämän vuoksi ei voida varmuudella sanoa sisältääkö herajuoma melatoniinia.

Jatkokehityksenä olisi tarpeellista lisätä näytteiden määrää tuotantoeriä kohden, jotta tuloksista tulisi tällöin tarkempia ja luotettavampia. Näytteitä olisi tärkeää ottaa paljon eri tuotantoeristä, koska tuotantoerissä voi olla eroja.

Omenahapon ja maitohapon pitoisuuksien määrittämisessä käytettiin neljää eri pulloa, joiden perusteella tulokset saatiin. Herajuomapullot ovat suurella todennäköisyydellä samasta erästä, jonka takia olisi suositeltavaa tehdä määrittämiä eri tuotantoeristä. Pitoisuuksien määrittämiset eri tuotantoeristä kertoisivat, että onko eri valmistuserien välisiä eroja.

Lähteet

- 1 Nutrifocus 1/2010, Hyvinvointia herasta. Verkkodokumentti.
<http://ammattilaiset.valio.fi/portal/page/portal/ammattilaiset/ravitsemus_ja_terveys/materiaalit_ja_koulutus/ladattavat_materiaalit08032009130627/nutrifocus10032009093830/nutrifocusfinal.pdf>. Luettu 25.8.2014.
- 2 The Biotechnological utilization of cheese whey: A Review. 1996: Bioresource Technology 57 1-11. Great Britain: Elsevier science.
- 3 Bylund, Gösta. Dairy Processing Handbook. Lund, Sweden: LP Grafiska AB 1995.
- 4 The Manufacture of ethanol from whey. Verkkodokumentti.
<nzic.org.nz/ChemProcesses/dairy/3F.pdf>. Luettu 13.1.2015
- 5 The Manufacture of lactose. Verkkodokumentti.
<nzic.org.nz/ChemProcesses/dairy/3F.pdf>. Luettu 13.1.2015
- 6 Economic evaluation of an integrated process for lactic acid production from ultrafiltered whey. ScienceDirect. Elsevier.
- 7 Juuston valmistus. Verkkodokumentti.
http://ammattilaiset.valio.fi/portal/page/portal/ammattilaiset/foodservice/hyva_tietaa/juustotietoa22072009092634/juustonvalmistus22072009102906. Luettu 13.1.2015
- 8 Opas pienmeijereille. Verkkodokumentti.
<http://www.hami.fi/pienmeijerihanke/hyvien-kaytantojen-opas/Sivut/29-Kovan-juuston-valmistus.aspx>. Luettu 20.11.2014.
- 9 Napari, Pirjo 2001. Orgaaninen kemia. Oy Edita Ab, Helsinki.
- 10 Omenahappo. Verkkodokumentti. <<http://fi.wikipedia.org/wiki/Omenahappo>>. Luettu 21.4.2014
- 11 Lisäaineopas. Evira 4/2009. Verkkodokumentti.
<<http://www.evira.fi/portal/fi/tietoa+evirasta/haku/?q=4%2F2009>>. Luettu 18.8.2014.
- 12 Malic acid. Verkkodokumentti. <http://www.bartek.ca/malic_acid.html>. Luettu 18.7.2014
- 13 Maitohappo. Verkkodokumentti. <<http://fi.wikipedia.org/wiki/Maitohappo>>. Luettu 21.4.2014
- 14 Optinen isomeria. Verkkodokumentti
<<http://www02.oph.fi/etalukio/opiskelumodulit/kemia/kemia2/optinenis.html>>. Luettu 17.11.2014.

- 15 L+ maitohappo. Verkkodokumentti.
<http://www.vogel.fi/kuurit/Paasto/maitohappo.php>. Luettu 20.1.2015
- 16 Lactic acid. Verkkodokumentti. <http://www.lactic-acid.com/production_process.html>. Luettu 1.9.2014.
- 17 Kehittyvä elintarvike. Verkkodokumentti.
<<http://kehittyvaelintarvike.fi/teemajutut/mikrosuodatus-monipuolistaa-maidonjalostusta>>. Luettu 31.8.2014.
- 18 Maitohappobakteerit. Verkkodokumentti. <<http://www.arla.fi/hyvinvointi/vatsantasapaino/hyodylliset-maitohappobakteerit/>>. Luettu 19.10.2014
- 19 Käyminen. Verkkodokumentti. <[http://fi.wikipedia.org/wiki/Käyminen](http://fi.wikipedia.org/wiki/K%C3%A4yminen)>. Luettu 10.10.2014
- 20 Melatoniini. Verkkodokumentti. <<http://fi.wikipedia.org/wiki/Melatoniini>>. Luettu 21.4.2014
- 21 Unettomuuden hoito. Verkkodokumentti.
<<http://www.tietoaunettomuudesta.fi/unettomuuden-hoito/melatoniini#.VFAK6ktjhUA>>. Luettu 4.8.2014.
- 22 Nestekromatografia. Verkkodokumentti.
<http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_2-6_nestekromatografia.html>. Luettu 20.11.2014
- 23 Orgaanisen kemian kromatografiset menetelmät. Satu Mikkola 2006. Verkkodokumentti. <<http://users.utu.fi/satkuu/KEMI5147/monistec.pdf>>. Luettu 20.11.2014.
- 24 HPLC analysis. Verkkodokumentti.
<<http://www.laborator.y-journal.com/applications/analytics/hplc-analysis>>. Luettu 21.11.2014
- 25 Taavitsainen, Veli-Matti. Koesuunnittelun peruskurssin oppimateriaali. Metropolia.
- 26 Baird, Colin. Chemistry in your life, 2nd edition. New York: W.H. Freeman and company.
- 27 Bioutilization of whey for lactic acid production. ScienceDirect. Elsevier.
- 28 Campbell, Neil A. & Reece, Jane B.: Biology, 6th edition. Benjamin Cummings.
- 29 Cheese whey management: A Review. Journal of Environmental Management. Elsevier.
- 30 Malic acid dosage. Verkkodokumentti.
<http://www.livestrong.com/article/509936-recommended-doses-of-malic-acid/>. Luettu 12.12.2014

- 31 Melatoniini. Verkkodokumentti.
[http://www.yliopistonapteekki.fi/fi/apteekkipalvelut/tuotteet/pages/product.aspx?cata-log=yasalescatalog&productid=9911581\(yabasecatalog\)&category=unijamieli\(yasalescatalog\)/lievatunivaikeudet\(yasalescatalog\)](http://www.yliopistonapteekki.fi/fi/apteekkipalvelut/tuotteet/pages/product.aspx?cata-log=yasalescatalog&productid=9911581(yabasecatalog)&category=unijamieli(yasalescatalog)/lievatunivaikeudet(yasalescatalog)). Luettu 20.1.2015
- 32 Mälkönen, Pentti 1979. Orgaaninen kemia, neljäs painos. Otava, Keuruu
- 33 Official methods of analysis of AOAC international 16th edition, 3rd revision 1997
- 34 Stoker, Stephen H.: Organic and biological chemistry, 4th edition. Boston, New York: Houghton Mifflin company.
- 35 Streitwieser, Andrew & Heathcock, Clayton H. & Kosower, Edward M. 1998: Introduction to Organic Chemistry, 4th edition. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice-Hall Inc.
- 36 A validated HPLC Method for Determining Melatonin in Capsule Dosage Form. Scopemed. Spatula DD. Verkkodokumentti.
<<http://www.scopemed.org/?mno=21423>>. Luettu 5.5.2014.

Maitohappo ja omenahappo standardi 3 g/l

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\ORGACIDS\30000001.D

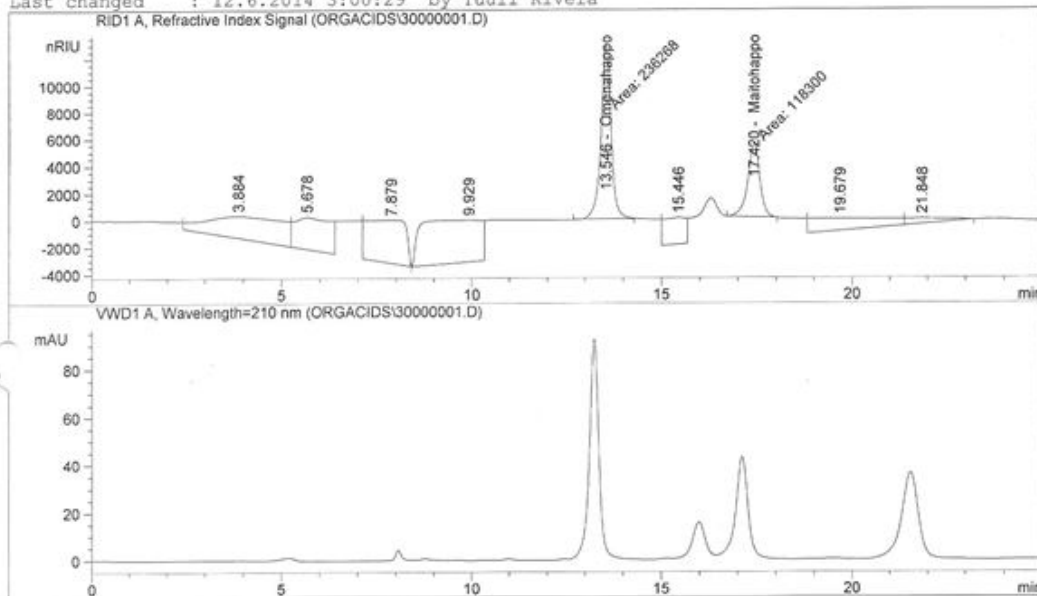
Sample Name: Standardi 3 g/l

Standardi 3 g/l

```

-----
Injection Date : 12.6.2014 6:09:40          Seq. Line : 1
Sample Name    : Standardi 3 g/l           Location  : Vial 1
Acq. Operator  : Tuuli Kivelä             Inj       : 1
                                           Inj Volume: 5 µl

Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\HERA.M
Last changed   : 12.6.2014 3:00:29 by Tuuli Kivelä
  
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 5.6.2014 7:24:37
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
  
```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

| RetTime [min] | Type | Area [nRIU*s] | Amt/Area | Amount [g/l] | Grp | Name |
|---------------|------|---------------|------------|--------------|-----|------------|
| 13.546 | MM | 2.36268e5 | 1.20249e-5 | 2.84110 | | Omenahappo |
| 17.420 | MM | 1.18300e5 | 2.22665e-5 | 2.63413 | | Maitohappo |

Totals : 5.47523

Results obtained with enhanced integrator!

Signal 2: VWD1 A, Wavelength=210 nm

*** End of Report ***

Maitohappo ja omenahappo standardi 6 g/l

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\ORGACIDS\20000005.D

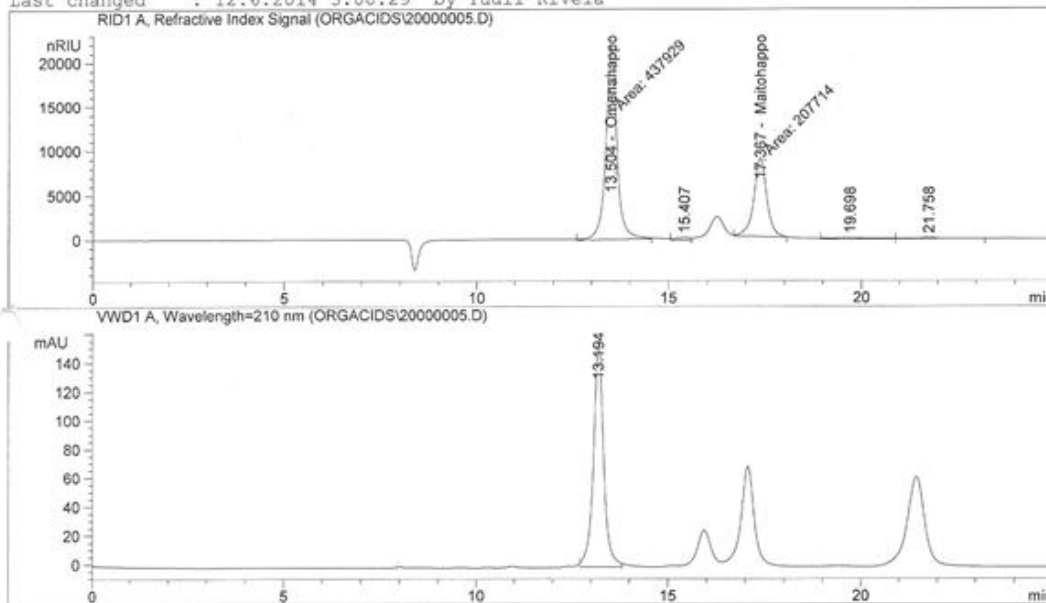
Sample Name: Standardi 6 g/l

Standardi 6 g/l

```

=====
Injection Date : 12.6.2014 4:46:29      Seq. Line : 2
Sample Name   : Standardi 6 g/l         Location  : Vial 2
Acq. Operator : Tuuli Kivela           Inj      : 1
                                           Inj Volume: 5 µl

Method        : C:\HPCHEM\1\METHODS\HERA.M
Last changed  : 12.6.2014 3:00:29 by Tuuli Kivela
=====
  
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 5.6.2014 7:24:37
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
  
```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

| RetTime [min] | Type | Area [nRIU*s] | Amt/Area | Amount [g/l] | Grp | Name |
|---------------|------|---------------|------------|--------------|-----|------------|
| 13.504 | MM | 4.37929e5 | 1.19684e-5 | 5.24133 | | Omenahappo |
| 17.367 | MM | 2.07714e5 | 2.20252e-5 | 4.57494 | | Maitohappo |

Totals : 9.81627

Results obtained with enhanced integrator!

Signal 2: VWD1 A, Wavelength=210 nm

*** End of Report ***

Maitohappo ja omenahappo standardi 7 g/l

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\ORGACIDS\30000004.D

Sample Name: Standardi 7 g/l

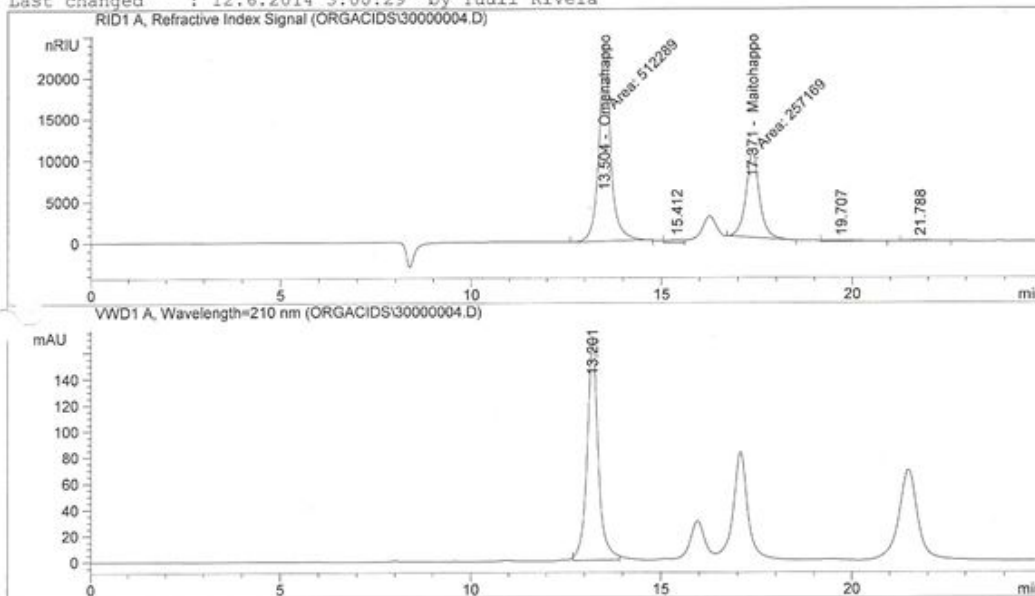
Standardi 7 g/l

```

=====
Injection Date : 12.6.2014 7:27:55      Seq. Line : 2
Sample Name    : Standardi 7 g/l        Location  : Vial 2
Acq. Operator  : Tuuli Kivela          Inj      : 1
                                           Inj Volume: 5 µl
  
```

```

Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\HERA.M
Last changed   : 12.6.2014 3:00:29 by Tuuli Kivela
  
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 5.6.2014 7:24:37
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
  
```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

| RetTime [min] | Type | Area [nRIU*s] | Amt/Area | Amount [g/l] | Grp | Name |
|---------------|------|---------------|------------|--------------|-----|------------|
| 13.504 | MM | 5.12289e5 | 1.19588e-5 | 6.12638 | | Omenahappo |
| 17.371 | MM | 2.57169e5 | 2.19637e-5 | 5.64839 | | Maitohappo |

Totals : 11.77477

Results obtained with enhanced integrator!

Signal 2: WVD1 A, Wavelength=210 nm

*** End of Report ***

Herajuoman omenahappo määrittämiset

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\ORGACIDS\1606A106.D

Sample Name: Näyte 2

Herajuoma
Laimennos 1:5

```

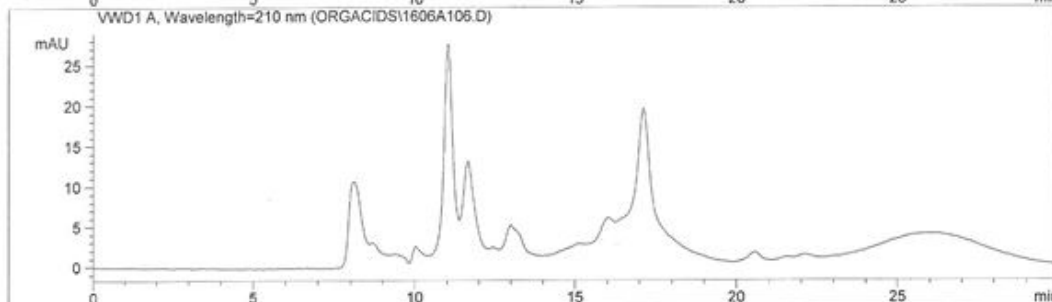
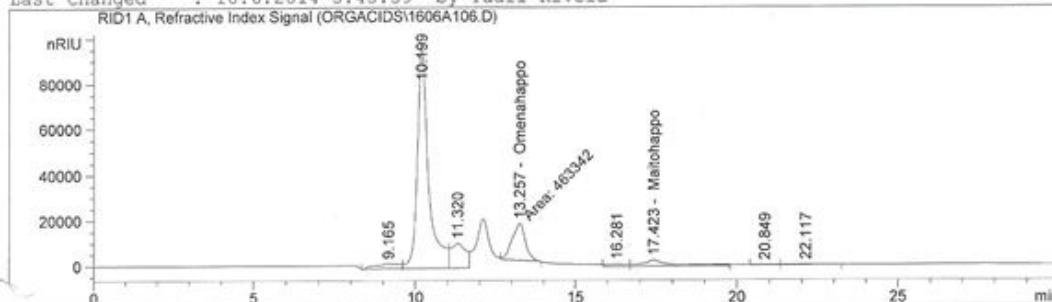
=====
Injection Date : 10.6.2014 8:22:25      Seq. Line : 2
Sample Name    : Näyte 2                Location  : Vial 2
Acq. Operator  : Tuuli Kivela           Inj      : 2
                                           Inj Volume: 5 µl
=====

```

```

Method        : C:\HPCHEM\1\METHODS\HERA.M
Last changed  : 10.6.2014 5:45:39 by Tuuli Kivela
=====

```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 5.6.2014 7:24:37
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000

```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

| RetTime [min] | Type | Area [nRIU*s] | Amt/Area | Amount [g/l] | Grp | Name |
|---------------|------|---------------|------------|--------------|-----|------------|
| 13.257 | MM | 4.63342e5 | 1.19648e-5 | 5.54379 | | Omenahappo |
| 17.423 | VB | 1.74645e5 | 2.20856e-5 | 3.85714 | | Maitohappo |

Totals : 9.40093

Results obtained with enhanced integrator!

Signal 2: VWD1 A, Wavelength=210 nm

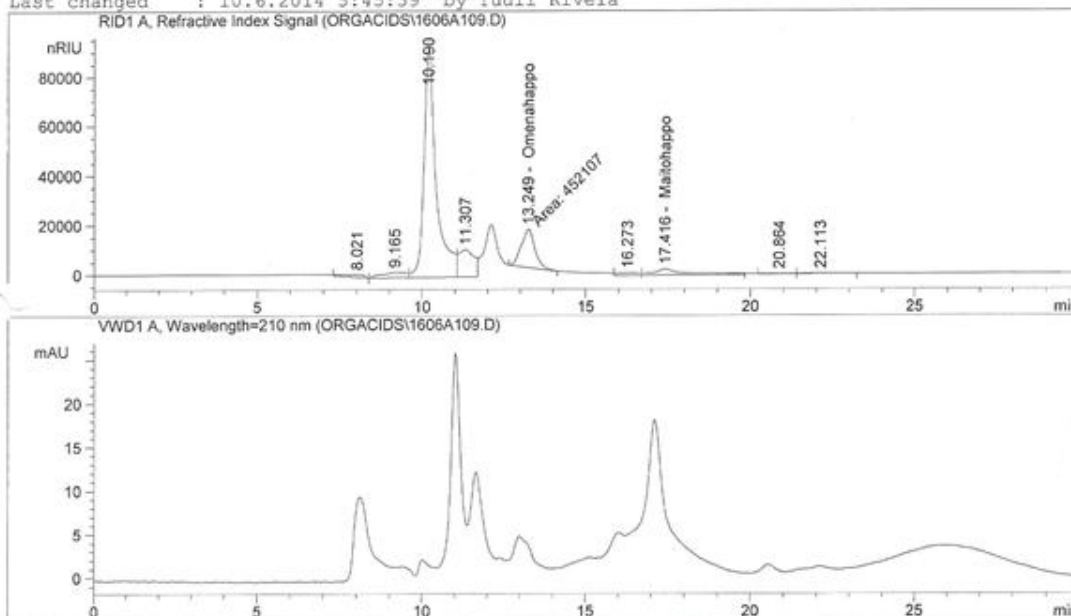
*** End of Report ***

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\ORGACIDS\1606A109.D

Sample Name: Näyte 3

Herajuoma
Laimennos 1:5

Injection Date : 10.6.2014 9:55:45 Seq. Line : 3
Sample Name : Näyte 3 Location : Vial 3
Acq. Operator : Tuuli Kivelä Inj : 2
 Inj Volume : 5 µl
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\HERA.M
Last changed : 10.6.2014 5:45:39 by Tuuli Kivelä



External Standard Report

Sorted By : Signal
lib. Data Modified : 5.6.2014 7:24:37
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

| RetTime [min] | Type | Area [nRIU*s] | Amt/Area | Amount [g/l] | Grp | Name |
|---------------|------|---------------|------------|--------------|-----|------------|
| 13.249 | MM | 4.52106e5 | 1.19664e-5 | 5.41007 | | Omenahappo |
| 17.416 | VB | 1.73714e5 | 2.20877e-5 | 3.83694 | | Maitohappo |

Totals : 9.24701

Results obtained with enhanced integrator!

Signal 2: VWD1 A, Wavelength=210 nm

*** End of Report ***

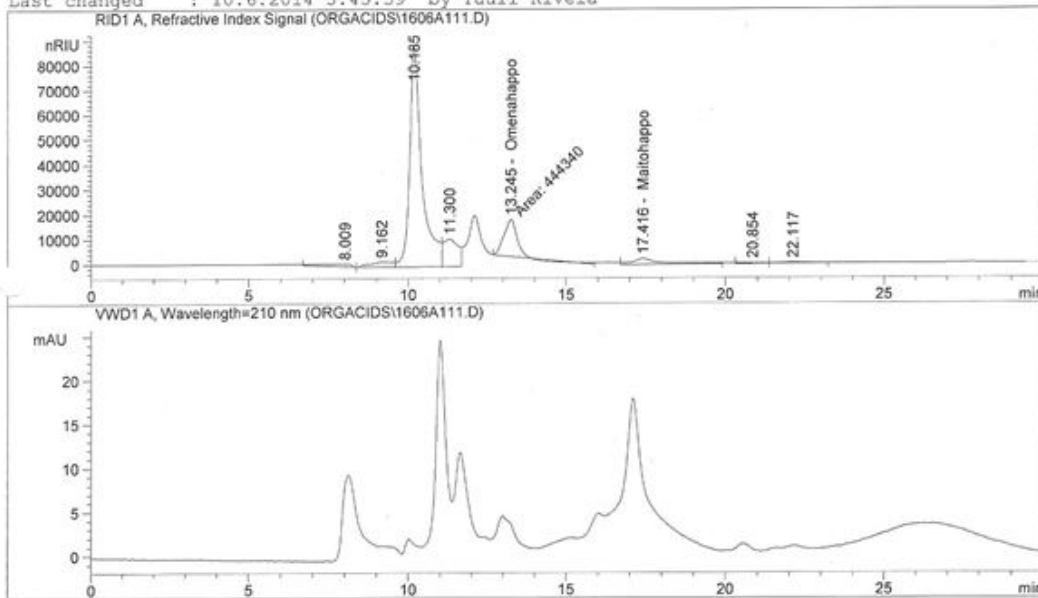
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\ORGACIDS\1606A111.D

Sample Name: Näyte 4

Herajuoma
Laimennos 1:5

Injection Date : 10.6.2014 10:57:55 Seq. Line : 4
Sample Name : Näyte 4 Location : Vial 4
Acq. Operator : Tuuli Kivelä Inj : 1
Inj Volume : 5 µl

Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\HERA.M
Last changed : 10.6.2014 5:45:39 by Tuuli Kivelä



External Standard Report

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 5.6.2014 7:24:37
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

| RetTime [min] | Type | Area [nRIU*s] | Amt/Area | Amount [g/l] | Grp | Name |
|---------------|------|---------------|------------|--------------|-----|------------|
| 13.245 | MM | 4.44340e5 | 1.19675e-5 | 5.31763 | | Omenahappo |
| 17.416 | VB | 1.68965e5 | 2.20984e-5 | 3.73386 | | Maitohappo |

Totals : 9.05149

Results obtained with enhanced integrator!

Signal 2: VWD1 A, Wavelength=210 nm

*** End of Report ***

Herajuoman maitohappo määrittymiset

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\ORGACIDS\10000007.D

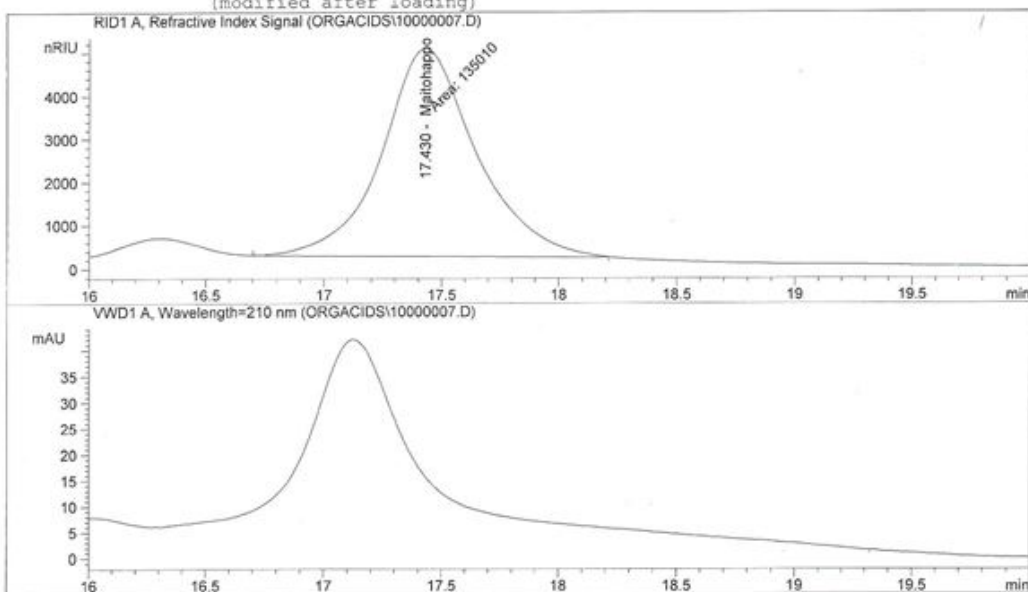
Sample Name: Näyte 2

Herajuoma
Laimennos 1:1

```

=====
Injection Date   : 11.6.2014 4:28:46           Seq. Line :    2
Sample Name     : Näyte 2                     Location  : Vial 2
Acq. Operator   : Tuuli Kivela                Inj       :    3
                                           Inj Volume: 5 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\HERA.M
Last changed   : 11.6.2014 1:13:28 by Tuuli Kivela
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\HERA.M
Last changed   : 13.6.2014 5:38:12 by Tuuli Kivela
                (modified after loading)
    
```



External Standard Report

```

=====
Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : 5.6.2014 7:24:37
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
    
```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

| RetTime (min) | Type | Area [nRIU*s] | Amt/Area | Amount [g/l] | Grp | Name |
|---------------|------|---------------|------------|--------------|-----|------------|
| 13.274 | VV | 1.62390e6 | 1.19201e-5 | 19.35714 | | Omenahappo |
| 17.430 | MM | 1.35010e5 | 2.21971e-5 | 2.99684 | | Maitohappo |

Totals : 22.35398

Results obtained with enhanced integrator!

Signal 2: VWD1 A, Wavelength=210 nm

*** End of Report ***

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\ORGACIDS\10000008.D

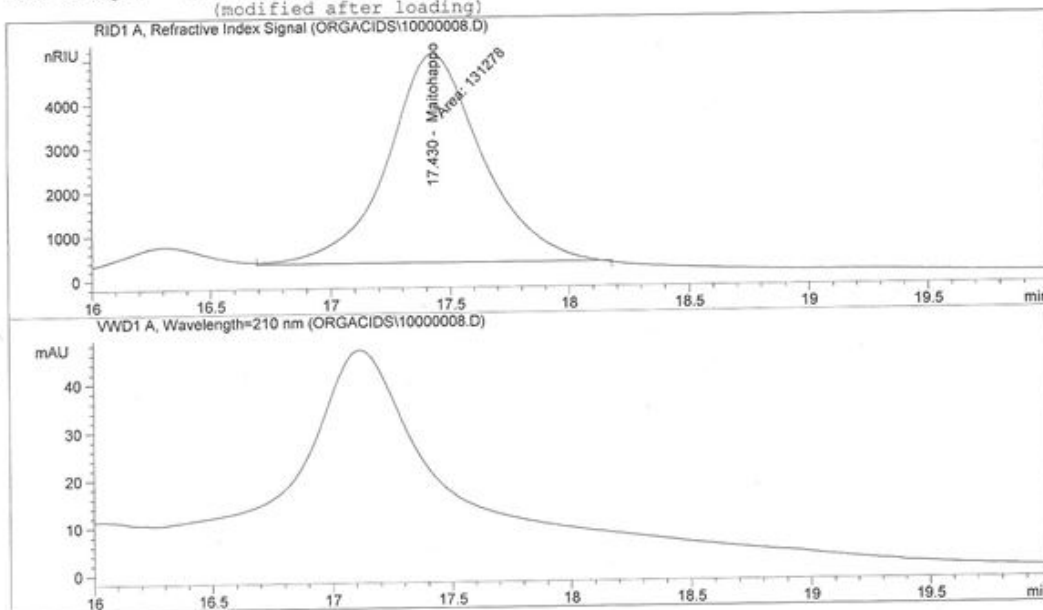
Sample Name: Näyte 3

Herajuoma
Laimennos 1:1

```

=====
Injection Date : 11.6.2014 4:59:52      Seq. Line : 3
Sample Name    : Näyte 3                Location  : Vial 3
Acq. Operator  : Tuuli Kivelä           Inj      : 1
                                           Inj Volume: 5 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\HERA.M
Last changed   : 11.6.2014 1:13:28 by Tuuli Kivelä
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\HERA.M
Last changed   : 13.6.2014 5:38:12 by Tuuli Kivelä
                                           (modified after loading)
=====
  
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 5.6.2014 7:24:37
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
  
```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

| RetTime [min] | Type | Area [nRIU*s] | Amt/Area | Amount [g/l] | Grp | Name |
|---------------|------|---------------|------------|--------------|-----|------------|
| 13.276 | VV | 1.68053e6 | 1.19195e-5 | 20.03116 | | Omenahappo |
| 17.430 | MM | 1.31278e5 | 2.22111e-5 | 2.91583 | | Maitohappo |

Totals : 22.94699

Results obtained with enhanced integrator!

Signal 2: VWD1 A, Wavelength=210 nm

*** End of Report ***

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\ORGACIDS\10000012.D

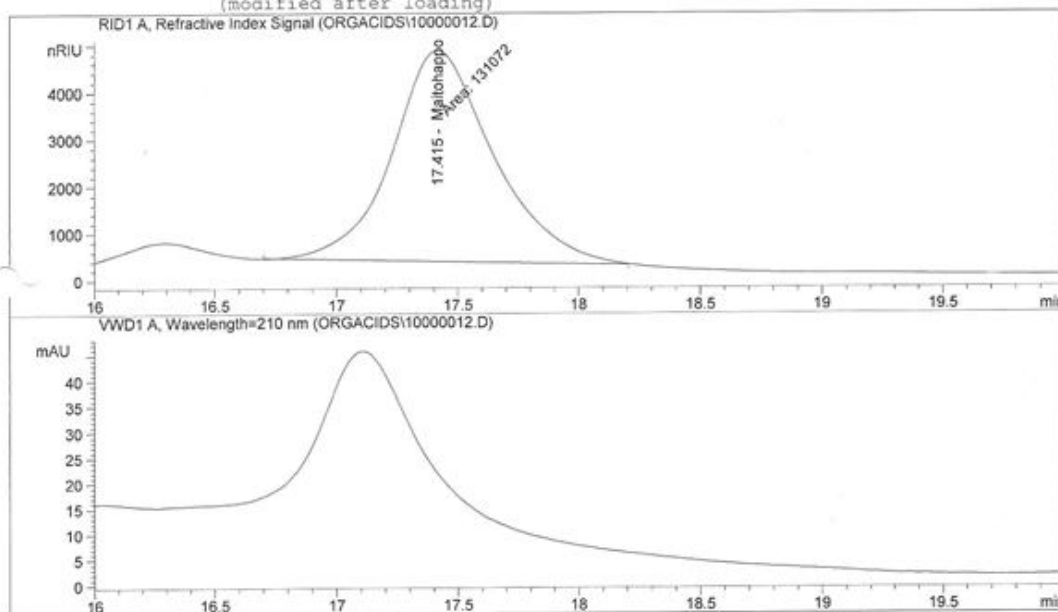
Sample Name: Näyte 4

Herajuoma
Laimennos 1:1

```

=====
Injection Date : 11.6.2014 7:04:20          Seq. Line : 4
Sample Name    : Näyte 4                    Location  : Vial 4
Acq. Operator  : Tuuli Kivelä              Inj      : 2
                                           Inj Volume : 5 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\HERA.M
Last changed   : 11.6.2014 1:13:28 by Tuuli Kivelä
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\HERA.M
Last changed   : 13.6.2014 5:38:12 by Tuuli Kivelä
                (modified after loading)
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 5.6.2014 7:24:37
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
    
```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

| RetTime [min] | Type | Area [nRIU*s] | Amt/Area | Amount [g/l] | Grp | Name |
|---------------|------|---------------|------------|--------------|-----|------------|
| 13.261 | VV | 1.68585e6 | 1.19195e-5 | 20.09448 | | Omenahappo |
| 17.415 | MM | 1.31072e5 | 2.22119e-5 | 2.91137 | | Maitohappo |

Totals : 23.00585

Results obtained with enhanced integrator!

Signal 2: VWD1 A, Wavelength=210 nm

*** End of Report ***