



Jessica Kaunisto

Aminohappojen analyysimenetelmän validointi elintarvikkeille

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

4.6.2025

Tiivistelmä

Tekijä:	Jessica Kaunisto
Otsikko:	Aminohappojen analyysimenetelmän validointi elintarvikkeille
Sivumäärä:	29 sivua + 3 liitettä
Aika:	4.6.2025
Tutkinto:	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Laboratorioanalytiikka
Ammatillinen pääaine:	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat:	Erikoistutkija Marja Raatikainen Lehtori Kari Raatikainen

Opinnäytetyö toteutettiin Ruokaviraston kemian yksikön orgaanisten jäämien jaostossa. Laboratorio on FINAS-akkreditoitu standardin ISO/IEC 17025:2017 mukaisesti, ja sen akkreditointitunnus on T014.

Työn tavoitteena oli validoida aikaisemmin rehujen aminohappopitoisuuksien määrittämiseen käytetty korkeanerotuskyvyn nestekromatografiaan perustuva analyysimenetelmä elintarvikematriiseille. Näytematriiseina käytettiin puolukkaa, sika-nautajauhelihaa, punaleimaemmentaljuustoa, perunalastuja sekä vertailututkimusnäytteenä lastenruokaa.

Aminohapot ovat elintarvikkeiden keskeisiä rakennusosia, ja niiden pitoisuudet vaikuttavat suoraan ravitsemukselliseen laatuun. Proteiinit koostuvat erilaisista aminohapoista, joista osa on ihmiselle välttämättömiä, koska keho ei pysty syntetisoimaan niitä. Tästä syystä tarkka aminohappoprofiilien määrittäminen on tärkeää sekä ravitsemustutkimuksessa että elintarvikkeiden koostumuksen arvioinnissa.

Menetelmän validoinnissa arvioitiin seuraavat parametrit: selektiivisyys, spesifisyys, oikeellisuus, toistettavuus, lineaarisuus ja mittausalue sekä mittausepävarmuus. Validointi oli onnistunut, ja menetelmä voidaan ottaa Ruokavirastossa käyttöön sellaisenaan.

Avainsanat: AQC, aminohapot, derivointi, FL, hydrolyysi, lineaarisuus, mittausalue, mittausepävarmuus, oikeellisuus, selektiivisyys, spesifisyys, toistettavuus, UHPLC, UV, validointi

Tämän opinnäytetyön alkuperä on tarkastettu Turnitin Originality Check -ohjelmalla.

Abstract

Author: Jessica Kaunisto
Title: Validation of Amino Acid Analysis Method for Food
Number of Pages: 29 pages + 3 appendices
Date: 4 June 2025

Degree: Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme: Laboratory Sciences
Professional Major: Laboratory Sciences
Supervisors: Marja Raatikainen, Senior Researcher
Kari Raatikainen, Senior Lecturer

The thesis work was carried out in the Organic Residues Section of the Chemistry Unit at the Finnish Food Authority. The laboratory is accredited by FINAS according to ISO/IEC 17025:2017, with the accreditation number T014.

The aim of the thesis work was to validate a high-performance liquid chromatography-based analytical method, previously used for determining amino acid content in feed, for application to food matrices. The sample matrices included lingonberry, pork and beef mince, emmental cheese (red label), potato chips, and a reference study sample: baby food.

Amino acids are essential building blocks of food, and their concentrations directly affect the nutritional quality of the product. Proteins consist of various amino acids, some of which are essential for humans because they cannot be synthesised by the body. Therefore, accurate analysis of amino acid profiles is important both in nutritional research and in evaluating the composition of food products.

The following parameters were assessed during method validation: selectivity, specificity, accuracy, repeatability, linearity, measurement range and measurement uncertainty. The validation was successful, and the method can be implemented at the Finnish Food Authority without modifications.

Keywords: AQC, amino acids, derivatization, FL, hydrolysis, linearity, measurement range, measurement uncertainty, accuracy, selectivity, specificity, repeatability, UHPLC, UV, validation

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Aminohapot ja niiden analysointi	2
2.1	Aminohappojen kemiallinen rakenne	2
2.2	Proteiinien hydrolyysi	4
2.3	Aminohappojen derivointi	5
3	Analyysimenetelmä	6
3.1	UHPLC:n toimintaperiaate	6
3.2	UV- ja FL-detektorit	8
3.3	Työssä käytetty laitteisto ja reagenssit	10
3.3.1	Laitteisto	10
3.3.2	Reagenssit	11
3.3.3	Muut välineet	13
4	Työn suoritus	13
4.1	Näytteiden esikäsittely	14
4.2	Tryptofaanin määrittäminen	14
4.3	Muiden aminohappojen määrittäminen	16
5	Menetelmän validointi	18
5.1	Pitoisuuksien laskeminen	19
5.2	Spesifisyys ja selektiivisyys	21
5.3	Toistettavuus	21
5.4	Oikeellisuus	22
5.5	Lineaarisuus ja mittausalue	24
5.6	Mittausepävarmuus	25
6	Yhteenveto	27
	Lähteet	28
	Liitteet	
	Liite 1: Tryptofaanin määrittäminen	

Liite 2: Aminohappojen määrityksen vuokaavio

Liite 3: Hapetetun lihanäytteen kromatogrammi

Lyhenteet

AQC	6-aminoquinolyyli-N-hydroksisuksinimidi karbamaatti.
AMQ	6-aminokinoliini.
FL	<i>Fluorescence</i> , fluoresenssi.
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , korkean erotuskyvyn nestekromatografia.
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> , korkean erotuskyvyn nestekromatografiatekniikka.
UV	<i>Ultraviolet</i> , ultraviolettivalo.

1 Johdanto

Opinnäytetyö toteutettiin Ruokavirastolla Helsingissä. Mittaukset tehtiin Kemian yksikössä orgaanisten jäämien jaostolla. Yksikössä tehdään elintarvikkeisiin, rehuihin, lannoitevalmisteisiin sekä eläinperäisiin näytteisiin liittyvää kemiallista ja biokemiallista tutkimusta. Laboratorio on akkreditoitu standardin ISO/IEC 17025:2017 mukaisesti, ja laboratorion FINAS-akkreditointitunnus on T014 [1].

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on kehittää olemassa olevaa aminohappojen analyysimenetelmää niin, että se sopii kaikille elintarvikkeille. Menetelmä myös validoidaan, jotta laboratorio voi hakea menetelmälle akkreditointia. Nykyinen menetelmä on validoitu vain rehuille. FINASin linjauksen mukaan akkreditoinnin kriteerinä on menetelmän validointi neljälle viidestä elintarvikeryhmästä. Ryhmät ovat 1) yhdistelmäelintarvikkeet, 2) kasvikset, 3) maito ja maitovalmisteet, 4) lihat ja kananmunat ja niistä tehdyt valmisteet sekä 5) kala ja äyriäiset ja niistä tehdyt valmisteet. Tässä työssä menetelmä validoitiin neljälle ensimmäiselle mainitulle elintarvikeryhmälle. Menetelmän validoinnissa käytettiin seuraavia parametreja: spesifisyys, selektiivisyys, toistettavuus, oikeellisuus, lineaarisuus, mittaosalue sekä mittausepävarmuus. Oikeellisuuden ja mittausepävarmuuden määrittämiseen käytettiin lastenruokanäytettä, mikä oli vertailututkimusnäyte.

Työssä käytettiin UPLC-UV -laitteistoa 17 aminohapon analysointiin, joita ovat kystiini, histidiini, seriini, arginiini, glysiini, aspargiinihappo, metioniini, glutamiinihappo, threoniini, alaniini, proliini, lysiini, tyrosiini, valiini, isoleusiini, leusiini ja fenyylialaniini. Lisäksi tryptofaanin analysointiin käytettiin UPLC-FL -laitteistoa. Tryptofaanille tehtiin muista aminohapoista poiketen esikäsitteilyä emäshydrolyysi, sillä se hajoaa vahvassa hapossa. Muille aminohapoille tehtiin happohydrolyysi sekä derivointi. Rikkipitoisten aminohappojen määrittämistä varten näytteet myös hapetettiin ennen hydrolyysiä.

Opinnäytetyön raportin kieliasun muotoilussa, tarkistuksessa ja otsikoinnissa on käytetty Open AI:n ChatGPT:n versiota 4o mini. Opinnäytetyöntekijä on vastuussa kaikesta opinnäytetyön sisällöstä ja muotoilusta.

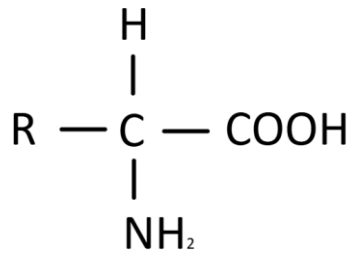
2 Aminohapot ja niiden analysointi

Aminohapot ovat proteiinien rakennuspalikoita ja kiinnittyvät toisiinsa kovalenttisilla sidoksilla. Proteiinit koostuvat yleensä 20 aminohaposta, joista ihmiselle välttämättömiä on ainakin kahdeksan: fenyylialaniini, isoleusiini, leusiini, lysiini, metioniini, treoniini, tryptofaani ja valiini. Keho ei pysty muodostamaan näitä aminohappoja itse, joten ne on saatava ravinnosta. [2, s. 23; 3, s. 45.]

Aminohapot ovat tärkeitä ihmisen yleisen terveyden ja hyvinvoinnin kannalta, sillä ne osallistuvat moniin fysiologisiin tapahtumiin. Aminohapot toimivat mm. typen lähteenä, minkä puute johtaa proteiinisynteesin häiriintymiseen ja edelleen lihaskudoksen hajoamiseen sekä heikentyneeseen elintoimintojen säätelyyn. Aminohapot osallistuvat myös entsyymien ja hormonien tuotantoon, immuunijärjestelmän toimintaan sekä hermoston toimintaan. Aminohappojen tarve on yksilöllistä ja siihen vaikuttavat mm. ikä, fyysinen aktiivisuus, terveyden tila, ravinnon laatu, kehon typpitasapaino, lihasmassa sekä muut geneettiset tekijät. [4, s.49, 53–54, 60–63, 71–72.]

2.1 Aminohappojen kemiallinen rakenne

Proteiineissa esiintyvien aminohappojen perusrakenne on samanlainen. Keskuhiilessä, eli α -hiilessä, on kiinnittyneinä aminoryhmä ($-\text{NH}_2$), karboksyyliiryhmä ($-\text{COOH}$) sekä vety ($-\text{H}$). Lisäksi hiilessä on kiinnittyneenä sivuketju ($-\text{R}$), joka määrittää aminohappojen yksilölliset eroavaisuudet. Proteiinien ominaisuuksiin vaikuttaa puolestaan muun muassa aminohappojen määrä ja järjestys sekä se, mitä aminohappoja proteiinissa on. Aminohappojen perusrakenne näkyy kuvassa 1. [2, s. 23–24.]

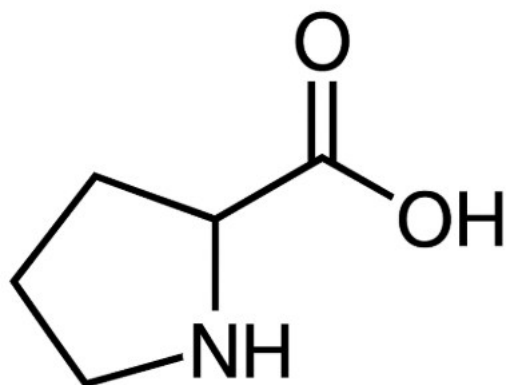


Kuva 1. Yleinen aminohapporakenne.

Aminohapot ovat proteiineissa sitoutuneet toisiinsa kovalenttisilla peptidisidoksilla. Peptidisidos muodostuu, kun yhden aminohapon karboksyyli­ryhmän hiiliatomi sitoutuu toisen aminohapon aminoryhmän typpi­atomin kanssa. Tällöin aminohappoketjuun jää toinen pää, jossa on vapaa aminoryhmä, ja vastakkai­seen päähän vapaa karboksyyli­ryhmä. Tällaisia lyhyitä ketjuja kutsutaan pepti­deiksi, ja pidempiä polypeptideiksi eli proteiineiksi. [2, s. 26–27; 3, s. 45.]

Aminohappojen kemiallisen rakenteen vuoksi suurin osa aminohapoista voi muodostaa L- ja D-enantiomeerejä. Proteiineissa esiintyvät aminohapot ovat aina L-enantiomeerejä. [2, s. 24; 3, s. 42.]

Suurimmassa osassa yleisimmistä aminohapoista on primäärinen aminoryhmä, joka on kiinnittyneenä vain yhteen hiileen, α-hiileen. Näitä kutsutaan primääri­siksi aminohapoiksi. Sekundäärisissä aminohapoissa aminoryhmä on kiinnitty­nyt myös toiseen hiiliatomiin tai on osa rengasrakennetta, jolloin puhutaan se­kundäärisestä aminoryhmästä. Esimerkiksi proliini on sekundäärinen amino­hap­po, jonka rakenne on esitetty kuvassa 2. [5;6.]



Kuva 2. Prolini. Esimerkki sekundäärisestä aminohaposta. Kuva on laadittu Open AI:n Chat GPT:n versiolla 4o mini [7].

2.2 Proteiinien hydrolyysi

Proteiinien hydrolyysi tarkoittaa proteiineihin sitoutuneiden aminohappojen vapauttamista eli proteiinin pilkkomista yksittäisiksi aminohapoiksi. Hydrolyysi on keskeinen vaihe aminohappopitoisuuksien analysoinnissa, sillä se mahdollistaa kaikkien proteiiniin sitoutuneiden aminohappojen mittaamisen. Hydrolyysi voidaan toteuttaa joko happamissa tai emäksisissä olosuhteissa, ja menetelmän valinta riippuu analysoitavista aminohapoista. [8.]

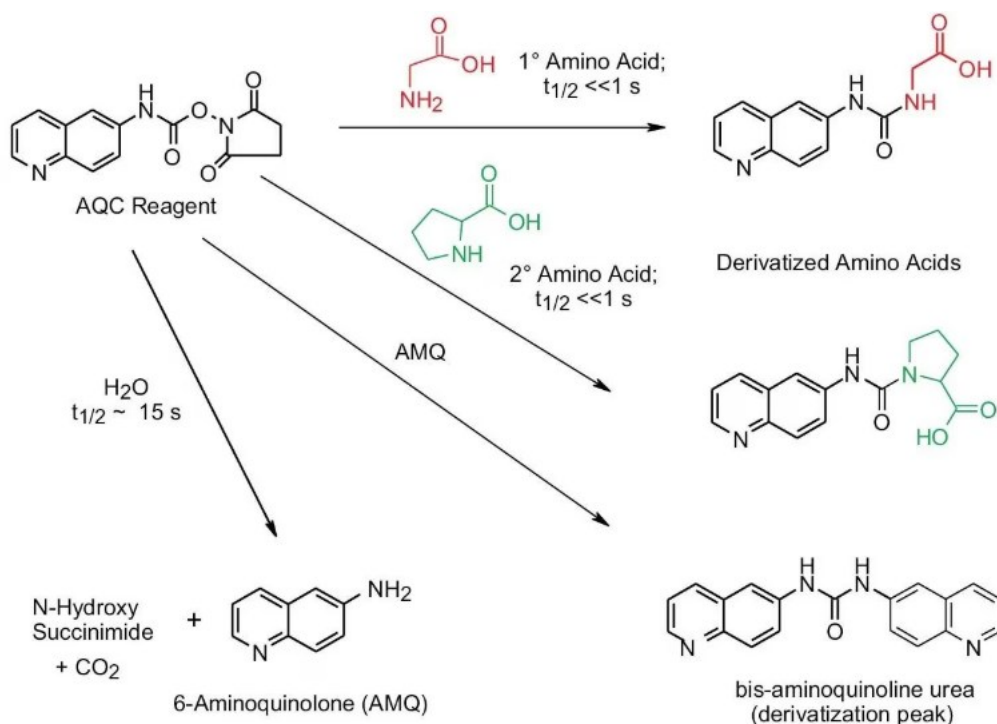
Useimmiten käytetään happohydrolyysiä, mutta tryptofaani hajoaa vahvoissa happo-olosuhteissa, minkä vuoksi sen määrittäminen edellyttää emäshydrolyysiä. Emäshydrolyysi puolestaan tuhoaa seriinin, treoniinin, arginiinin ja kysteiinin, joten kaikkien aminohappojen analysoimiseksi on käytettävä molempia menetelmiä [8]. Lisäksi hydrolyysissä on huomioitava, että asparagiini ja glutamiini muuttuvat asparagiinihapoksi ja glutamiinihapoksi, mikä vaikuttaa näiden aminohappojen lopulliseen pitoisuuteen analyysituloksissa [9].

Hydrolyysin tehokkuuteen ja aminohappojen täydelliseen vapautumiseen vaikuttavat useat tekijät, kuten lämpötila, hydrolyysiaika sekä käytetyt reagenssit. [8.]

2.3 Aminohappojen derivointi

Koska kaikki aminohapot eivät ole luonnostaan fluoresoivia tai kromoforisia – eli ne eivät absorboi valoa tietyillä aallonpituuksilla – ne on derivoitava ennen FL- tai UV-detektorilla tapahtuvaa analyysiä. Derivointi suoritetaan tarkoitukseen soveltuvilla reagensseilla, joiden valintaan vaikuttavat käytettävä detektori ja analysoitavat yhdisteet. [6.]

Tässä työssä käytettiin derivointireagenssina AQC-yhdistettä (6-aminoquinolyyli-N-hydroksisuksinimidikarbamaatti). Reaktio aminohappojen ja AQC-reagenssin välillä on esitetty kuvassa 3. Derivointi AQC-reagenssilla tapahtuu pH:ssa 8-10, joten näyte puskuroitiin boraattipuskurilla.



Kuva 3. Primääristen ja sekundääristen aminohappojen derivointi AQC-reagenssilla. [6.]

AQC reagoi tehokkaasti primääristen ja sekundääristen aminoryhmien kanssa muodostaen stabiileja, fluoresoivia johdannaisia. Menetelmän etuna on, että reaktio ei tuota häiritseviä sivutuotteita. AQC:n reagoidessa veden kanssa muodostuu aminokinoliinia, joka näkyy UHPLC-ajossa korkeana piikkinä, derivointipiikkinä, kromatogrammin alussa. Lisäksi muodostuu bis-aminokinoliiniureaa, joka näkyy toisena derivointipiikkinä myöhemmällä retentioajalla. [5;6;10.]

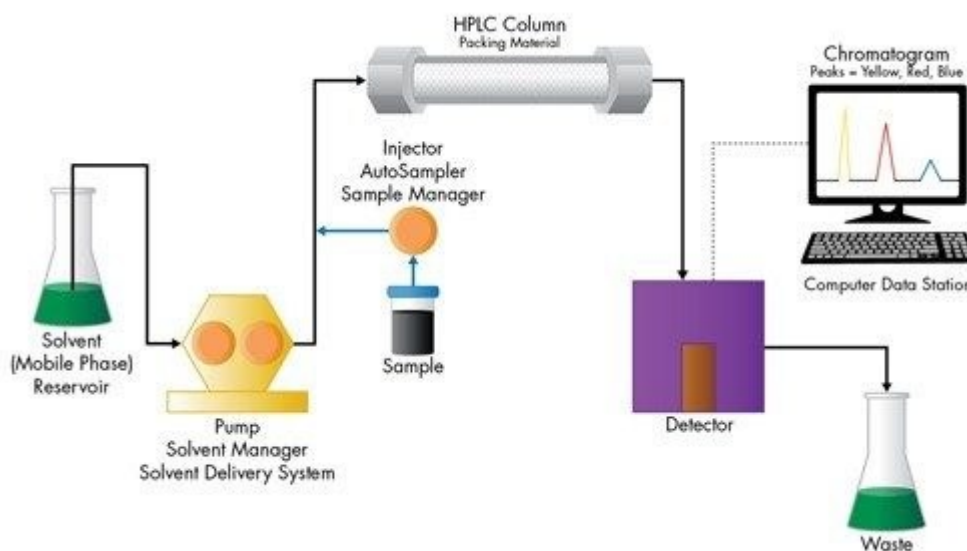
3 Analyysimenetelmä

3.1 UHPLC:n toimintaperiaate

UHPLC eli *Ultra High Performance Liquid Chromatography* on kehittyneempi versio korkean erotuskyvyn nestekromatografiasta (HPLC). Nestekromatografiaa käytettäessä näytteen täytyy liueta sopivaan liuottimeen ja olla reagoimatta tämän kanssa. Analyysissä on käytettävä soveltuvaa detektoria [11].

Nestekromatografialla voidaan analysoida orgaanisia molekyyliä, kuten proteiineja ja aminohappoja. Pieni näytemäärä syötetään injektorilla liikkuvaan faasiin, joka koostuu paineistetusta liuottimesta. Liuotin (eluentti) kulkee sykkeettömästi pumpun avulla kolonniin, jossa näytteen yhdisteet vuorotellen adsorboituvat stationäärifaasiin ja liukenevat takaisin liikkuvaan faasiin. Kullakin yhdisteellä on sille ominainen retentioaika, jonka perusteella detektori tunnistaa yhdisteen mittaamalla sen signaalin ajan funktiona. [11.]

Kuvassa 4 on esitetty yksinkertaistettu kaavio UHPLC-laitteistosta.

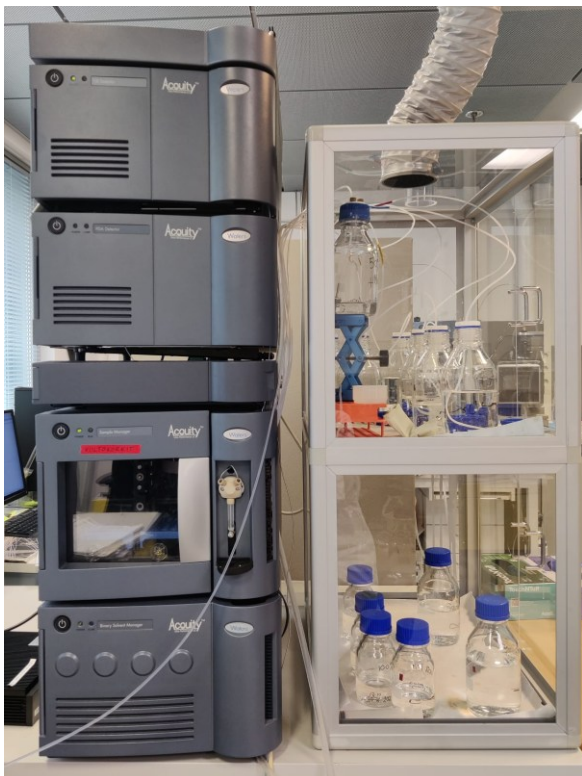


Kuva 4. UHPLC:n toimintaperiaate. [12.]

UHPLC- sekä HPLC-menetelmiä voidaan käyttää yhdisteiden erottelussa toisistaan ja niiden toimintaperiaate on samanlainen. UHPLC-menetelmä eroaa kuitenkin osittain perinteisestä HPLC-menetelmästä.

UHPLC:lla saavutetaan parempi erotuskyky ja piikkien terävyys verrattuna perinteiseen HPLC:hen. UHPLC-kolonnit ovat tyypillisesti lyhyempiä ja sisähalkaisijaltaan pienempiä kuin perinteiset HPLC-kolonnit. Tämä vähentää liuottimen kulutusta ja lyhentää analyysiaikaa.

UHPLC-kolonneissa käytetään, n. $1,5\ \mu\text{m}$ – $2\ \mu\text{m}$:n kokoisia partikkeleita. Pienempi partikkelikoko parantaa erotuskykyä ja piikkien terävyyttä. Pienet partikkelit aiheuttavat kuitenkin suuremman vastapaineen, minkä vuoksi UHPLC-kolonneja ei voida käyttää perinteisillä HPLC-laitteistoilla. UHPLC-menetelmä mahdollistaa myös pienempien näytemäärien ja alhaisempien pitoisuuksien analysoinnin suuremmalla herkkyydellä. [13, s. 706;14]. Opinnäytetyössä käytettiin kuvassa 5 näkyvää Waters'n Acquity UPLC® -laitteistoa.



Kuva 5. Waters'n Acuity UPLC-laitteisto.

3.2 UV- ja FL-detektorit

Tässä työssä käytettiin sekä ultravioletti- (UV) että fluoresenssi (FL) -detektoreita. UV-detektorina toimi Watersin Acuity UPLC PDA -detektori ja fluoresenssidetektorina Watersin Acuity UPLC fluoresenssidetektori. Tryptofaanin pitoisuuden määrittämisessä hyödynnettiin FL-detektoria, koska tryptofaani fluoresoi luonnostaan. Muiden aminohappojen analysoimisessa käytettiin UV-detektoria. Koska kaikki aminohapot eivät absorboi UV-valoa, näytteet derivoitiin ennen analyysia.

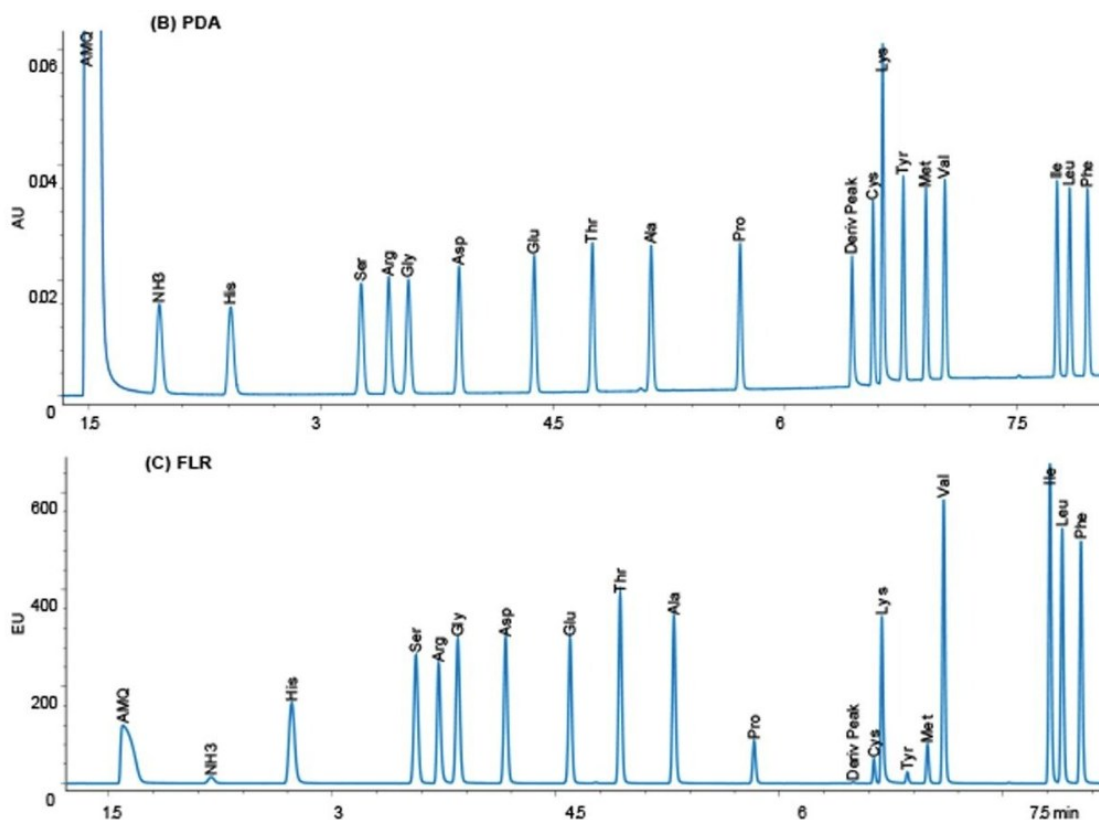
UV-detektori mittaa näytteeseen tulevan ja sen läpi kulkeneen valon intensiteettien suhdetta tietyn aallonpituuden funktiona. UV-detektorin tuottama signaali noudattaa Lambert-Beerin lakia ja mahdollistaa kvantitatiivisen analyysin. [11.]

Fluoresenssidetektorit puolestaan virittävät analyytin valonlähteellä, kuten ksenonkaarilampulla tai laserilla, ja mittaavat sen emittoimaa fluoresenssivaloa

pidemmällä aallonpituuksilla. Detektioperiaate perustuu eksitaatioon, jossa UV/Vis-säteily virittää tutkittavan näytteen molekyylit ylemmälle elektroniselle tilalle valon absorptiolla. Tähän käytetään voimakasta valonlähdettä, kuten ksenonlamppua, ja valittu aallonpituus ohjataan näytteeseen monokromaattorin avulla. Kun molekyyli palaa takaisin alempaan energiatasoon, se emittoi valoa pidemmällä aallonpituudella (emissio). Näyte emittoi fluoresenssivaloa kaikkiin suuntiin, ja tätä säteilyä kerätään linssillä, ennen kuin se ohjataan valodetektorille mittausta varten. [11.]

Fluoresenssidetektorit ovat jopa 100 kertaa herkempiä kuin UV-detektorit, mutta soveltuvat vain fluoresoiville yhdisteille. Detektion laajentamiseksi voidaan suorittaa derivointi, jossa analyttiin liitetään fluoresoiva ryhmä ennen kromatografiaa. [13, s. 724.]

Koska näytteet derivoidaan ennen analyysiä, aminohappojen määrittämisessä voidaan käyttää sekä UV- että FL-detektoria. UV-detektori on kuitenkin kyseisen työn kannalta parempi vaihtoehto, sillä sen vaste aminohapoille on tasaisempi. Kuvassa 6 on esitetty UV- ja FL-detektorien välinen ero aminohappojen analysoinnissa.



Kuva 6. Ero PDA- ja FL-detektoreissa aminohappojen analysoinnissa. Ylemmässä kromatogrammissa on PDA-detektorilla saatu kromatogrammi ja alemmassa FL-detektorilla saatu kromatogrammi. Esimerkiksi kysteiinin (Cys) ja tyrosiinin (Tyr) piikit ovat FL-detektorilla huomattavasti pienemmät. [15.]

3.3 Työssä käytetty laitteisto ja reagenssit

Alla on listattu työssä käytetyt laitteistot ja reagenssit.

3.3.1 Laitteisto

Tässä työssä käytetty laitteisto:

- UHPLC, Waters Acquity UPLC® -laitteisto
- FL-detektori, Waters Acquity UPLC Fluoresenssi detektori
- UV-detektori, Waters Acquity UPLC PDA detektori

- kolonni ja esikolonni, AccQTag Ultra C18, 1.7 μ m, 2.1 x 100 mm Waters 186003836

3.3.2 Reagenssit

Tässä työssä käytetyt reagenssit:

- asetonitrili, C₂H₃N, M= 41,05 g/mol T.J.Baker
- AccTag™ Ultra Eluent A, Waters 186003838
 - Ajoliuos A:n valmistus: AccTag Eluent A 25 ml, vettä 475 ml
- AccTag™ Ultra Eluent B, Waters 186003839
- DL-tryptofaani, C₁₁H₁₂N₂O₂, M=204,23 g/mol Fluka Chemika CAS: 54-12-6
 - Kantaliuos 100 μ m/ml: 5 mg 50 ml: mittapulloon. Täyttö merkkiin vedellä.
 - Väilaimennos 2,5 μ g/ml: 250 μ l kantaliuosta 10 ml:n mittapulloon. Täyttö merkkiin vedellä.
- DL-metioniinisulfoni, CH₃SO₂CH₂CH₂CH(NH₂)COOH, M= 181.21 g/mol Sigma Aldrich CAS: 820-10-0
 - 2,5 μ l/ml DL-metioniinisulfoni: 45,3 mg 100 ml:n mittapulloon. Täyttö merkkiin 0,1 mol/l HCl.
- L-kysteiinihappo monohydraatti, C₃H₇NO₅S · H₂O, M=187,17 g/mol Sigma Aldrich CAS:23537-25-9

- 2,5 µmol/ml L-kysteinihappo monohydraatti: 46,8 mg 100 ml:n mittapulloon. Täyttö merkkiin 0,1 mol/l HCl.
- aminohappostandardi H Protein Biology Thermo Scientific REF 20088
 - Sisältää seuraavia 2,5 µmol/ml (paitsi jos mainittu toisin) 0,1 mol/l HCl:ssa: Ammonia, L-Alaniini, L-Arginiini, L-Aspartic Acid, L-Kystiini (1,25), L-Glutamiinihappo, Glysiini, L-Histidiini, L-Isoleusiini, L-Leusiini, L-Lysiini, L-Metioniini, L-Fenyyialaniini, L-Proliini, L-Seriini, L-Threoniini, L-Tyrosiini, L-Valiini
 - Standardin valmistus: 200 µl aminohappostandardia, kysteinihappoa ja metioniinisulfonia 2 ml mittapulloon, täyttö merkkiin vedellä.
- muurahaishappo 99-100%, CH_2O_2 , M= 46,03 g/mol VWR Chemicals CAS: 64-18-6
- vetyperoksidi 30 %, H_2O_2 , M= 34,0147 g/mol Merck KGaA 1.07209.0250
- natriumdisulfiitti, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, M=190,10 g/mol T.J.Baker CAS: 7681-57-4
- suolahappo 6 mol/l, HCl, M=36,46 g/mol Oy FF-Chemicals Ab CAS: 7647-01-0
- suolahappo 0,1 mol/l, HCl, M=36,46 g/mol Oy FF-Chemicals Ab CAS: 7647-01-0
- natriumhydroksidi, NaOH, M=40,00 g/mol Merck KGaA CAS: 1310-73-2
- natriumtetraboraatti dekahydraatti $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ M= 381.37 g/mol Sigma-aldrich CAS: 1303-96-4
- 6-aminoquinolyyli-N-hydroksisuksinimidi karbamaatti, $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_4$, M=285,25 g/mol Apollo Scientific CAS: 148757-94-2.

3.3.3 Muut välineet

Tavanomaisten laboratoriotarvikkeiden lisäksi tarvittiin seuraavia välineitä:

- teflon näytepurkkeja, 100 ml
- lämpökaappi ($110^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$)
- suodatinpaperi
- vortex
- ruiskusuodattimia
- ruiskuja 1 ml
- ajopulloja, 2 ml
- säilöpulloja, 100 ml
- lämpöhaude ($55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).

4 Työn suoritus

Analyysi tehtiin Ruokaviraston valmiin validoidun menetelmän pohjalta, jolla mitataan aminohappopitoisuuksia rehuista. Kyseinen menetelmä perustuu rehujen menetelmäasetukseen 152/2009 [16]. Menetelmässä käytetty derivointi perustuu standardiin IDF 254 [17].

Aminohappojen pitoisuuksien määrittämistä varten tryptofaaniäytteet hydrolysoitiin vahvalla emäksellä, kun taas muiden aminohappojen äytteet käsiteltiin vahvassa hapossa. Jotta kaikki aminohapot saatiin analysoitua, puolet näytteistä hapetettiin ennen hydrolyysiä. Lisäksi sekä aminohaponäytteet että aminohappostandardit derivoitiin ennen UPLC-UV-analyysiä. Liitteessä 1 on

esitetty tryptofaanin määrittämisestä vuokaavio ja liitteessä 2 on muiden aminohappojen määrittämisvuokaavio.

Taulukossa 1 näkyy jokaisessa elintarvikekategoriassa käytetty näyte. Jokaisesta näytematriisista tehtiin 6 x 3 näytestarjaa: 6 hapettamatonta näytettä tryptofaanin määrittämisestä varten ja 6 hapetettua näytettä sekä 6 hapettamatonta näytettä muiden aminohappojen määrittämisestä varten. Näin saatiin reilusti rinnakkaisnäytteitä jokaisen aminohapon määrittämiseen.

Taulukko 1. Työssä käytetyt elintarvikekategoriat ja näytteet.

Kategoria	Näyte
Yhdistelmäelintarvikkeet	Lastenruoka, perunalastu
Kasvikset, juurekset, hedelmät, viljat	Puolukka
Maito ja maitovalmisteet	Punaleima emmental -juusto
Lihat, kananmunat ja niistä tehdyt valmisteet	Sika-nauta jauheliha

4.1 Näytteiden esikäsittely

Kaikki näytteet oli valmiiksi jauhettu 0,5 mm:n seulalla. Puolukka-, juusto- ja lihanäytteet oli kylmäkuivattu valmiiksi. Näytteitä säilytettiin jääkaapissa tai pakastimessa.

4.2 Tryptofaanin määrittäminen

Tryptofaanimäärittämisessä näytteitä punnittiin teflonpulloon 1 g. Hydrolyysi suoritettiin lisäämällä näytteisiin 20 ml 5 mol/l natriumhydroksidia ja inkuboimalla 110 °C:ssa 16 tunnin ajan.

Hydrolyysin jälkeen näytteiden annettiin jäähtyä huoneenlämpöön. Näyteliuokset siirrettiin 100 ml:n mittapulloihin ja laimennettiin merkkiin asti vedellä. Tämän jälkeen näytteet suodatettiin suodatinpaperilla.

Suodosta laimennettiin 10 ml:n mittapulloon. Lastenruoka-, puolukka- ja perunastunäytteiden kohdalla suodosta pipetoitiin 2 ml, koska niiden proteiinipitoisuudet olivat matalat. Lihanäytteen kohdalla puolestaan pipetoitiin 0,5 ml ja juustonäytteen suodosta 1 ml. Näytteen neutraloimiseksi mittapulloon lisättiin 1 mol/l suolahappoa samassa suhteessa näytteen kanssa, ja täytettiin merkkiin vedellä.

UHPLC-FL-analyysiä varten näytteet suodatettiin ruiskusuodattimella ajopulloon (noin 1 ml). Standardit valmistettiin välilaimennoksista taulukon 2 mukaisesti. Ajo-olosuhteet esitetään taulukossa 3.

Taulukko 2. Tryptofaani analyysin standardisuoran valmistus [18].

Standardin pitoisuus ($\mu\text{g/ml}$)	Standardia (μl)	Vettä (μl)
25,0	250 (std 100)	750
10,0	100 (std 100)	900
5,0	50 (std 100)	950
2,5	1000 (std 2,5)	-
1,0	400 (std 2,5)	600

Taulukko 3. UPLC-FL ajo-olosuhteet tryptofaanin pitoisuuksien määrittämiseksi.

Parametri	
Virtaus	0,7 ml/min
Injektio-tilavuus	1,0 µl (2,0 µl näytemuokka)
Ajo-aika	9 min
Kolonniuuni	55 °C
Aallonpituus	ex 285 nm em 340 nm
Retentioaika	2,8 min
Eluutio	Gradientti
Ajoliuokset	A1: AccQTag Eluent A A2: AccQTag Eluent B

4.3 Muiden aminohappojen määrittäminen

Kystiinin ja metioniinin määrittämistä varten näytteet hapetettiin ennen hydrolyysiä. Nämä muuttuvat hapetuksessa metioniinisulfoniksi ja kysteiinihapoksi. Hapetusreagenssi valmistettiin sekoittamalla 3 ml 30-prosenttista vetyperoksidia ja 27 ml muurahaishapon ja veden (1:9) seosta. Jokaiselle näytesarjalle valmistettiin oma reagenssi, eikä ylimääräistä liuosta jäänyt. Liuoksen annettiin reagoida huoneenlämmössä 1 tunnin ajan, minkä jälkeen se jäähdytettiin jääkaapissa 15 minuutin ajan ennen käyttöä.

Hapetusta varten punnittiin 0,5 g näytettä 100 ml:n säilöpulloon. Näytteeseen lisättiin 5 ml hapetusreagenssia niin, että se kostui täysin. Näytteseos hapetettiin jääkaapissa jäävesi-hauteessa (0 °C) 16 tunnin ajan.

Koska tyrosiini tuhoutuu hapetuksessa, sitä varten valmistettiin erilliset hapettamattomat näytteet. Niitä varten punnittiin myös 0,5 g näytettä säilöpulloon, ja näyte säilytettiin jääkaapissa muiden näytteiden hapetuksen ajan.

Hapetusreaktion pysäyttämiseksi hapetettuihin näytteisiin lisättiin noin 0,84 g natriumdisulfiittia, ja reaktion annettiin vaikuttaa 1 tunnin ajan. Tämän jälkeen näytteet hydrolysoitiin tytetetyssä, 6-molaarisessa suolahapossa (50 ml/näyte). Hydrolyysi suoritettiin 110 °C:ssa 24 tunnin ajan.

Hydrolyysin jälkeen näytteiden annettiin jäähtyä huoneenlämpöön. Liuokset siirrettiin 100 ml:n mittapulloihin ja laimennettiin vedellä merkkiin. Tämän jälkeen näytteet suodatettiin suodatinpaperilla.

Suodosta laimennettiin 10 ml:n mittapulloon. Näytteille tehtiin samanlaiset laimennokset kuin tryptofaanin määrittämisessä. Neutralointi tehtiin 3 mol/l natriumhydroksidilla, jota pipetoitiin samassa suhteessa näytteen kanssa. Standardit valmistettiin välilaimennoksista taulukon 4 mukaisesti.

Taulukko 4. Standardien valmistus välilaimennoksista [9].

Pitoisuus standardissa (nmol/ml)	Standardia (µl)	Vettä (µl)	Pitoisuus derivoitussa standardissa (nmol/ml)
250	700 (std 250)	-	25,0
175	700 (std 250)	300	17,5
100	400 (std 250)	600	10,0
50	200 (std 250)	800	5,0
10	100 (std 100)	900	1,0
5	100 (std 50)	900	0,5

Aminohappomäärittämistä varten näytteet ja standardit derivoitiin. Derivointia varten valmistettiin derivointireagenssi ja boraattipuskuri. Derivointireagenssi tehtiin liuottamalla 3–4 mg 6-aminoquinolyyli-N-hydroksisuksinimidi karbamaattia (AQC) 2 ml:n ajopulloon käyttäen 100-prosenttista asetonitriliä. Boraattipuskuri valmistettiin liuottamalla 1 g natriumtetraboraatti-dekahydraattia 20 ml:aan vettä.

Derivoinnissa lisättiin ajopulloon 10 µl ruiskusuodatettua näytettä tai standardia, 70 µl boraattipuskuria ja 20 µl derivointireagenssia. Näytteitä vorteksoitiin, annettiin seistä huoneenlämmössä 1 minuutti ja lämmitettiin tämän jälkeen 55 °C:ssa 10 minuutin ajan lämpöblokkissa.

Koska derivointireaktio tapahtuu pH-alueella 8–10, boraattipuskurin puskurointikyky tarkistettiin lisäämällä erilliseen näytepulloon 70 µl puskuria ja 10 µl näytettä. pH mitattiin pH-paperilla.

Derivoinnin jälkeen näytteet olivat valmiita analysoitavaksi UPLC-UV -laitteistolla. Ajo-olosuhteet esitetään taulukossa 5.

Taulukko 5. UPLC-UV ajo-olosuhteet aminohappopitoisuuksien määrittämisessä.

Parametri	
Virtaus	0,7 ml/min
Injektio-tilavuus	1,0 µl (2,0 µl näytesilmukka)
Ajo-aika	9 min
Kolonniuuni	55 °C
Aallonpituus	260 nm
Eluutio	Gradientti
Ajoliuokset	A1: AccQTag Eluent A A2: AccQTag Eluent B

5 Menetelmän validointi

Kemiallisen mittausmenetelmän validointi on prosessi, jolla varmistetaan, että menetelmä soveltuu tarkoitettuun käyttötarkoitukseensa [19]. Menetelmän validointiin käytettiin seuraavia parametrejä: spesifisyys, selektiivisyys, toistettavuus, oikeellisuus, lineaarisuus, mittausalue ja mittausepävarmuus.

Menetelmän havaitsemis- ja määritysrajat sekä uusittavuus oli määritetty aiemmassa validoinnissa, jossa menetelmä validoitiin rehujen aminohappopitoisuuksien määrittämiseen.

Oikeellisuutta ja mittausepävarmuutta voitiin mitata vain yhdellä näytteellä. Lastenruoka oli vertailututkimusnäyte, ja se oli näytteistä ainoa, joiden todelliset aminohappopitoisuudet olivat tiedossa.

5.1 Pitoisuuksien laskeminen

UPLC-laitteisto laski aminohappojen pitoisuudet valmiiksi kaavalla 1:

$$x = \frac{0,001 * c * M * V}{m}, \quad (1)$$

jossa x = aminohapon pitoisuus (mg/g=g/kg), c = standardisuoran avulla saatu tulos (nmol/ml), M = aminohapon moolimassa (g/mol), V = laimennoskerroin (esim. 10/1), m = näytteen paino (0,5 g) [9].

Tryptofaanin pitoisuuden laitteisto laski kaavalla 2:

$$x = \frac{c * V * l}{m}, \quad (2)$$

jossa x = tryptofaanin pitoisuus (mg/g=g/kg), c = standardisuoran avulla saatu tulos (mg/l=µg/ml), V = liuostilavuus (l), l = laimennoskerroin (esim. 10/1), m = näytteen paino (1 g) [18].

Lopullisessa tuloksessa piti vielä ottaa huomioon laimennuskertoimet, jos näytteen lisälaimennos oli muu kuin 1:10. Kylmäkuivattujen näytteiden (puolukka, liha ja juusto) osalta tuli lisäksi ottaa huomioon kuiva-ainepitoisuus, mikä huomioitiin käyttämällä kertoimena kuiva-aineen prosenttiosuutta muunnettuna desimaaliluvuksi. Tulokset muunnettiin lopulta muotoon mg/100g. Aminohappojen lopulliset pitoisuudet ovat taulukossa 6 aminohappojen eluoitusjärjestyksessä.

Taulukko 6. Näytteiden aminohappopitoisuudet yksikössä mg/100g.

Aminohappo	Lastenruoka	Puolukka	Juusto	Liha	Perunalastu
Cya	299	18,0	106	126	96,8
His	252	19,7	887	366	118
Ser	592	39,8	1910	511	290
Arg	514	60,5	984	631	264
Gly	415	27,9	487	796	235
Asp	699	81,2	2320	1150	1220
MetSO ₂	250	21,9	944	304	107
Glu	3280	163	7180	1950	1250
Thr	386	29,7	1310	521	288
Ala	460	38,8	986	737	251
Pro	995	32,7	3630	596	240
Lys	313	40,5	2980	1050	426
Tyr	342	21,6	1630	351	234
Val	564	50,6	2210	640	345
Ile	414	32,5	1670	531	269
Leu	811	60,1	3260	928	464
Phe	507	34,7	1720	453	306

Tyrosiinin tulokset laskettiin hapettamattomista näytteistä, sillä se hajoaa hapetuksessa. Muiden aminohappojen, pois lukien tryptofaanin, pitoisuudet laskettiin hapetetuista näytteistä, sillä näillä on todettu olevan parempi mittaasepävarmuus [18]. Kystiinin ja metioniin tulokset laskettiin kysteiinihapon (Cya) ja metioniinisulfonin (MetSO₂) mittaustuloksista.

Tuloksista poistettiin merkittävästi poikkeavat mittaustulokset Grubbsin testin avulla. Poikkeavuus määritettiin laskemalla mittausten keskiarvon ja mittaustuloksen välinen erotus, joka jaettiin havaintojen keskihajonnalla. Saatua arvoa verrattiin kriittiseen arvoon. Kun mittaustuloksia oli kuusi, kriittinen arvo oli

1,887. Kaikki tulokset, joiden poikkeavuusarvo ylitti tämän rajan, poistettiin aineistosta. Tällaisia mittaustuloksia oli yhteensä kolme.

5.2 Spesifisyys ja selektiivisyys

Spesifisyys kuvaa menetelmän kykyä mitata ainoastaan haluttua analyyttiä [19]. Spesifisyyttä voidaan analysoida nollamatriisin avulla, mutta koska elintarvikkeista ei ollut saatavilla nollamatriisia, spesifisyyttä tarkasteltiin analysoimalla jokaisen ajon yhteydessä derivointinollaa. Derivointinollassa on boraattipuskuria 80 µl sekä derivointireagenssia 20 µl. Glutamiinin ja valiinin retentioajoilla havaittiin pienet piikit. Muiden aminohappojen kohdalla ei havaittu piikkejä.

Selektiivisyys tarkoittaa menetelmän kykyä tunnistaa ja määrittää tarkasti tietty analyytti, vaikka näytteessä esiintyisi muita aineita määrätyissä testiolosuhteissa. Kromatografiassa selektiivisyys ilmenee esimerkiksi siten, että analyytin piikki erottuu selkeästi pohjaviivasta. [19.]

Kaikkien aminohappojen piikit erottuivat kromatografialla hyvin. Esimerkki hapeitetun lihanäytteen kromatogrammista on liitteessä 3. Arginiinin ja glysiinin sekä asparagiinin ja metioniini sulfonin piikit erottuivat heikoiten toisistaan, mutta piikit saatiin kuitenkin hyvin integroitua.

5.3 Toistettavuus

Toistettavuus kuvaa sitä, kuinka yhdenmukaisia peräkkäiset mittaustulokset ovat, kun samaa suuretta mitataan saman menetelmän samoissa testiolosuhteissa. [19.]

Toistettavuus määritettiin suhteellisen keskihajonnan (RSD%) avulla. RSD%-luvut laskettiin jakamalla keskihajonta keskiarvolla, minkä jälkeen tulos kerrottiin sadalla. Jokaisen aminohapon RSD%-luvut näkyvät taulukossa 7.

Taulukko 7. Tulosten suhteelliset keskihajonnat (%).

Aminohappo	Lasten- ruoka	Puolukka	Juusto	Liha	Perunalastu
Cya	19	22	16	4	6
His	14	17	7	5	12
Ser	9	6	3	5	5
Arg	5	7	3	4	3
Gly	6	11	8	6	3
Asp	7	7	4	3	6
MetSO ₂	12	5	6	3	4
Glu	7	3	5	5	4
Thr	7	6	4	6	5
Ala	11	6	8	5	5
Pro	7	5	4	9	7
Lys	5	12	5	6	7
Tyr	6	7	4	3	6
Val	9	5	6	5	7
Ile	3	9	4	3	7
Leu	4	5	4	3	4
Phe	12	2	3	1	3
Trp	4	2	1	2	0

5.4 Oikeellisuus

Oikeellisuus tarkoittaa sitä, kuinka hyvin useiden mittausten keskiarvo vastaa mitattavan suureen hyväksyttyä tai todellista arvoa [19]. Oikeellisuus voitiin määrittää vain lastenruokanäytteelle, sillä näyte oli vertailututkimusnäyte ja se oli näytteistä ainoa, jonka todelliset aminohappopitoisuudet olivat tiedossa.

Oikeellisuus määritettiin saantoprosenttien avulla jakamalla mittaustulos todellisella arvolla, minkä jälkeen tulos kerrottiin sadalla. Aminohappojen saantoprosentit näkyvät taulukossa 8.

Taulukko 8. Aminohappojen saantoprosentit.

Aminohappo	Todellinen arvo mg/100g	Mittaustulos mg/100g	Saantopro- sentti (%)
Cya	220	299	136
His	220	252	115
Ser	480	592	123
Arg	530	514	97
Gly	380	415	109
Asp	580	699	120
MetSO ₂	190	250	132
Glu	2670	3277	123
Thr	300	386	129
Ala	380	460	121
Pro	870	995	114
Lys	270	313	116
Tyr	320	342	107
Val	470	564	120
Ile	370	414	112
Leu	710	811	114
Phe	480	507	106
Trp	120	102	85

5.5 Lineaarisuus ja mittausalue

Menetelmän lineaarisuutta mitattiin standardien pitoisuusalueella 0,5-25 nmol/ml. Aminohappojen mittausalueet tällä pitoisuusalueella on määritetty jo aikaisemmassa validoinnissa. Lineaarisuutta arvioitiin korrelaatiokertoimien ja residuaalien avulla. Lopulliset korrelaatiokertoimet saatiin laskemalla viidestä erillisestä mittauskerrasta saatujen kalibrointisuorien korrelaatiokertoimien keskiarvo. Kaikkien aminohappojen korrelaatiokertoimet (R^2) olivat >0,98 glutamiinia lukuun ottamatta. Residuaalien sallittu vaihteluväli oli $\pm 20\%$, ja tämä toteutui kaikilla aminohapoilla. Aminohappojen korrelaatiokertoimet sekä mittausalueet on esitetty taulukossa 9.

Taulukko 9. Aminohappojen korrelaatiokertoimet sekä mittausalueet.

Aminohappo	R ²	Mittausalue g/100g laimennoksella 1:10
Cya	0,985	0,12–6,00
His	0,985	0,16–7,70
Ser	0,986	0,10–5,20
Arg	0,985	0,15–7,30
Gly	0,983	0,08–3,70
Asp	0,982	0,13–6,60
MetSO ₂	0,984	0,15–7,40
Glu	0,928	0,15–7,60
Thr	0,984	0,12–5,90
Ala	0,988	0,10–4,60
Pro	0,987	0,12–5,70
Lys	0,986	0,15–7,30
Tyr	0,986	0,19–9,00
Val	0,986	0,12–5,80
Ile	0,987	0,13–6,50
Leu	0,989	0,13–6,50
Phe	0,987	0,17–8,20
Trp	0,999	0,10–2,50

5.6 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus on ei-negatiivinen suure, joka kuvaa, paljonko mittaustulos voi poiketa todellisesta arvosta [20]. Mittausepävarmuus voitiin laskea vain lastenruoalle, sillä vain sille oli tiedossa aminohappojen todelliset pitoisuudet.

Mittausepävarmuuksien laskemiseen käytettiin saantokorjattuja mittaustuloksia. Mittausepävarmuuden määrittämiseen käytettiin MUKit-ohjelmaa. MUKit, eli *Measurement Uncertainty Kit*, on mittausepävarmuuden arviointiin luotu ohjel-
misto, joka perustuu Nordtest TR 537 -raporttiin [21]. Jokaiselle aminohapolle erikseen määritetyt mittausepävarmuudet näkyvät taulukossa 10.

Taulukko 10. Aminohappojen mittausepävarmuudet.

Aminohappo	Mittausepävarmuus (%)
Cya	41
His	32
Ser	20
Arg	13
Gly	14
Asp	16
MetSO ₂	26
Glu	16
Thr	16
Ala	24
Pro	16
Lys	12
Tyr	16
Val	22
Ile	8
Leu	8
Phe	27
Trp	9

6 Yhteenveto

Työn tavoitteena oli validoida aminohappopitoisuuksien analyysimenetelmä elintarvikenäytteille. Validoinnissa arvioitiin seuraavat parametrit: spesifisyys, selektiivisyys, toistettavuus, oikeellisuus, lineaarisuus, mittausalue ja mittausepävarmuus. Validointi onnistui hyvin, ja menetelmä voidaan ottaa käyttöön Ruokavirastossa sellaisenaan. Alkuperäiseen, rehuille validoituun menetelmään ei tarvittu tehdä muutoksia.

Saantoprosentteja ja mittausepävarmuutta voidaan arvioida tarkemmin menetelmän vakiinnuttua käytäntöön ja useamman laborantin tehtyä määrittämiä. Lastenruokanäytteelle lasketut saantoprosentit olivat pääosin hyväksyttävällä tasolla, mutta suurin osa ylitti 100 %. Erityisesti kysteiinin ja histidiinin kohdalla mittausepävarmuus oli suuri. Tämä saattaa johtua siitä, että ne eluoituvat ensimmäisinä ja ovat siksi herkempiä kontaminaatioille. Menetelmän spesifisyys, selektiivisyys, toistettavuus ja lineaarisuus todettiin hyväksi. Menetelmän mittausalue on sama kuin aiemmassa validoinnissa.

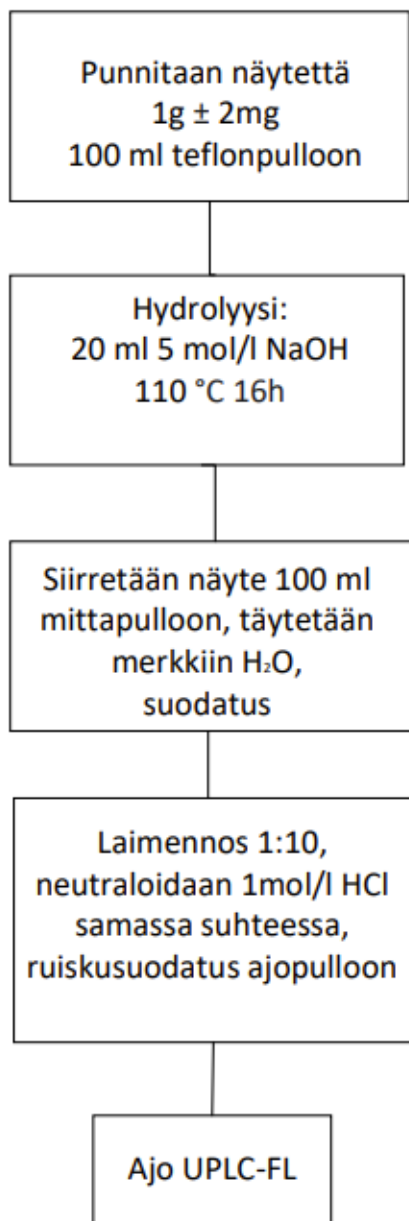
Rasvaisten elintarvikkeiden, kuten lihan, juuston ja perunalastujen, huomattiin likaavan laitteistoa. Tämä vaikuttaa laitteella tehtäviin muihin analyyseihin, kromatogrammien pohjaviivaan ja vaikeuttaa näin piikkien integrointia. Tästä syystä rasvaisten elintarvikkeiden analysoinnissa voidaan harkita rasvanpoistoa, mutta tämän vaikutuksia tuloksiin pitää vielä tutkia. Laitteiston säännöllinen pesu on ainakin tärkeää analysoitaessa rasvaisia elintarvikkeita.

Lähteet

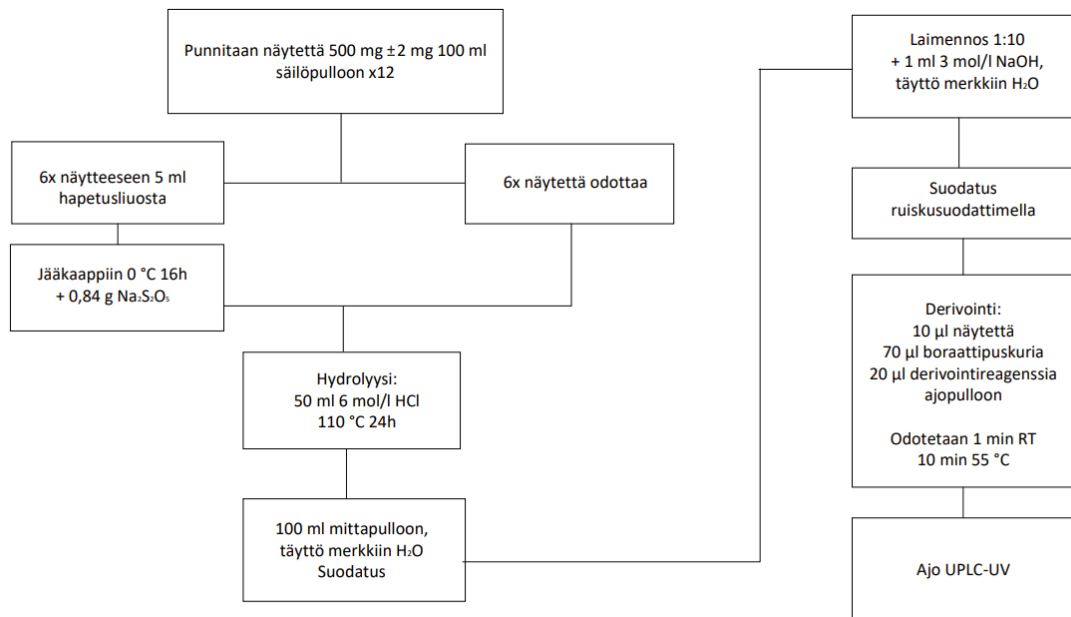
- 1 Tietoa Ruokaviraston laboratorioista. 2024. Verkkoaineisto. Ruokavirasto. <<https://www.ruokavirasto.fi/laboratoriopalvelut/ruokaviraston-laboratoriopalvelut/>> Päivitetty 15.1.2024. Luettu 16.5.2025.
- 2 Pärssinen, Raimo; Suominen, Ilari & Haajanen, Kari. 2012. Biogeeni: Ammatillista biokemiaa ja geenitekniikkaa. Opetushallitus.
- 3 Heino, Jyrki & Vuento, Matti. 2019. Biokemia ja solubiologia. Sanoma Pro Oy.
- 4 Gibney, M. J., & Nutrition Society. 2009. Introduction to human nutrition. E-kirja. Wiley-Blackwell ; Nutrition Society.
- 5 Lestari, L., Rohman, A., Riswahyuli, Purwaningsih, S., Kurniawati, F., & Irnawati. 2022. Analysis of amino acids in food using High Performance Liquid Chromatography with derivatization techniques: A review. Food Research (Online), Vol. 6(3), s. 435-442.
- 6 Derivatization of Amino Acids Using Waters AccQ•Tag Chemistry. Verkkoaineisto. Waters™ <https://www.waters.com/nextgen/us/en/education/primers/comprehensive-guide-to-hydrolysis-and-analysis-of-amino-acids/derivatization-of-amino-acids-using-waters-accqtag-chemistry.html?srsId=AfmBOoqCjzF_Z6wNtt1IKceQMmdbARms_y22E9Fw4tsXMal5PUoKJcz-> Luettu 16.5.2025.
- 7 ChatGPT. Versio 4o mini. 2025. OpenAI.
- 8 Fountoulakis, Michael & Lahm, Hans-Werner. 1998. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. Journal of Chromatography A, Vol. 826(2), s. 109-134.
- 9 Aminohappojen määrittäminen rehuista UPLC-UV -menetelmällä. 2022. Yrityksen sisäinen aineisto. Ruokavirasto.
- 10 Lovejoy, Katherine; Fabel, Susanne; Pietsch, Mirko; Hyun Park, Soo; Steiner, Frank. AN73057-EN 0819S. 2019. ThermoFisher Scientific.
- 11 Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. 5. painos. Edita.

- 12 Beginners guide to UPLC – bands, peaks and spreading. Verkkoaineisto. Waters™. <<https://www.waters.com/nextgen/au/en/education/primers/beginner-s-guide-to-uplc/bands-peaks-and-band-spreading.html>>. Luettu 24.4.2025
- 13 Harris, D. C., & Lucy, C. A. 2020. 10. painos Quantitative chemical analysis. W. H. Freeman and Company.
- 14 HPLC vs UPLC: Understanding the Key Differences. Verkkoaineisto. GMP Insiders. <<https://gmpinsiders.com/hplc-vs-uplc/>>. Luettu 24.4.2025.
- 15 Enhancement of the UPLC Amino Acid Analysis Solution with Flexible Detector Options. 2009. Verkkoaineisto. Waters™. <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2009/enhancement-uplc-amino-acid-analysis-solution-flexible-detector-options.html?srsId=AfmBOopontjgRL87wHHZ1WEdmtFv3LQcoFnlyL0a--56bll8aMxBI8Pu>> Luettu 16.5.2025
- 16 Komission asetus (EY) N:o 152/2009 näytteenotto- ja määritysmenetelmistä rehujen virallista valvontaa varten. 2009.
- 17 ISO 4214 IDF 254. 2022. Milk and milk products – Determination of amino acids in infant and adult/paediatric nutritional formulas and dairy products. International standard.
- 18 Tryptofaanin määrittäminen rehuista UPLC-FL -menetelmällä. 2023. Yrityksen sisäinen aineisto. Ruokavirasto.
- 19 Menetelmien validointi kemiallisessa analytiikassa. Yrityksen sisäinen aineisto. Ruokavirasto.
- 20 Mittausepävarmuuden määrittäminen. Yrityksen sisäinen aineisto. Ruokavirasto.
- 21 MUKit – Measurement Uncertainty Kit. Versio 3.0.12.0. Suomen ympäristökeskus.

Tryptofaanin määrittämisen vuokaavio



Aminohappojen määrittämisen vuokaavio



Hapetetun lihanäytteen kromatogrammi

