

Vapaat aminohapot lisäravinteissa ja niiden vaikutukset lihaskasvuun ja palautumiseen

Diplomityö
Turun yliopisto
Bioteknologian laitos
Elintarvikekehitys
Helmikuu 2025
Jalmari Sillsten

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

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

Jalmari Sillsten

Vapaat aminohapot lisäravinteissa ja niiden vaikutukset lihaskasvuun ja palautumiseen

Diplomityö, 53 s

Biotekniikka, Elintarvikekehitys

Helmikuu 2025

TIIVISTELMÄ

Ihmisten kiinnostus terveydestä huolehtimiseen on kasvanut viime vuosina. Erilaiset motivaattorit ohjaavat terveelliseen ravintoon ja liikuntaan. Kehonkoostumuksen muokkaaminen rasvattommaksi ja lihaksikkaammaksi on suosittua ja sitä tukemaan on kehitetty erilaisia lisäravinteita. Markkinoille on tullut paljon erilaisia aminohappolisäitä, joista uskotaan olevan hyötyä muun muassa lihaskasvuun ja palautumiseen.

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää neljän Suomessa suosituksen aminohappolisän todelliset vapaiden aminohappojen pitoisuudet, verrata vapaiden ja sitoutuneiden aminohappojen määrää tuotteissa sekä analysoida aiempien tutkimuksien perusteella, onko aminohappolisistä hyötyä lihaskasvuun tai palautumiseen. Tutkituista aminohappolisistä kaksi sisälsi kaikkia välttämättömiä aminohappoja (EAA) ja kaksi ainoastaan haaraketjuisia välttämättömiä aminohappoja (BCAA).

Kirjallisuuskatsauksen perusteella pelkät haaraketjuiset aminohapot (BCAA) eivät yksinään riitä proteiinisynteesin aikaansaamiseksi, sillä proteiinisynteesi vaatii aina kaikkien aminohappojen läsnäolon. Toisaalta kaikkia välttämättömiä aminohappoja sisältävät EAA-lisät voivat lisätä proteiinisynteesiä ja olla hyödyllisiä lihaskasvulle sekä palautumiselle.

Näytemateriaaleista juomajauheet liuotettiin veteen pitoisuudeksi, joka olisi lähellä valmiiden juomien konsentraatiota. Sitoutuneiden aminohappojen mittaamiseksi osalle näytteistä tehtiin hydrolysointi proteiinien peptidisidoksien katkaisemiseksi. Tämän jälkeen näytteet derivatisoitiin fluoresoivalla leima-aineella. Näytteet analysoitiin korkean erotuskyvyn nestekromatografilla (HPLC), joka myöhemmin korvattiin erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografilla (UHPLC). Detektorina käytettiin fluoresenssidetektoria (FLD).

UHPLC-menetelmällä tehtyjen analyysien tuloksien mukaan valmistajien ilmoittamat aminohappopitoisuudet olivat lähellä todellisia keskiarvolla 97,3 %. Toisaalta HPLC-menetelmällä saadut todelliset konsentraatiot olivat ilmoitettuja matalampia keskiarvolla 88 %. Sitoutuneiden aminohappojen analyysiä ei voitu pitää luotettavana, sillä konsentraatiot olivat merkittävästi pienempiä kuin hydrolysoimattomien näytteiden. Tämä voi johtua vapaiden aminohappojen hajoamisesta hydrolyysissä.

Avainsanat: aminohapot, lisäravinteet, BCAA, EAA, proteiinisynteesi, aminohappoanalyysi, HPLC, UHPLC

Sisällysluettelo

Lyhenteet	6
1 Johdanto	7
2 Aminohapot	9
2.1 Aminohapot elimistössä	9
2.2 Suotuisat aminohappoprofiilit	10
2.3 Välttämättömät aminohapot	12
2.3.1 Leusiini	12
2.3.2 Isoleusiini	12
2.3.3 Valiini	13
2.3.4 Histidiini	13
2.3.5 Lysiini	14
2.3.6 Metioniini	14
2.3.7 Fenyyialaniini	15
2.3.8 Treoniini	16
2.3.9 Tryptofaani	16
2.4 Ei-välttämättömät aminohapot	17
3 Aminohappolisien hyödyllisyys	19
3.1 EAA-lisät	20
3.2 BCAA-lisät	21
3.3 Yhteenveto	23
4 Tutkimuksen tavoitteet	24
5 Materiaalit ja menetelmät	26
5.1 Näytemateriaalit	26
5.2 Näytteiden valmistaminen	26
5.3 Hydrolyysi	27
5.4 Derivatisointi	27
5.5 HPLC-FLD	28
5.6 UHPLC-FLD	30
5.7 Datat analysointi	30

6	Tulokset ja tulosten tarkastelu	34
6.1	Nocco	34
6.2	Pirkka	35
6.3	Leader	36
6.4	PTVLABS	38
6.5	Tulosten vertailu	39
6.6	Kasviproteiinit, aminohappolisät ja WHO:n suositukset	41
6.7	UHPLC-menetelmä aminohappoanalyysissä	44
6.8	Mahdolliset virheiden aiheuttajat	46
6.9	Tulevaisuus	47
7	Yhteenveto	48
	Lähteet	50

Lyhenteet

BCAA	engl. Branched-Chain Amino Acids, haaraketjuiset aminohapot
BMI	engl. Body Mass Index, painoindeksi
EAA	engl. Essential Amino Acids, välttämättömät aminohapot
FLD	engl. Fluorescence Detector, fluoresenssidetektor
HIV	engl. Human Immunodeficiency Virus, immuunikatovirus
HPLC	engl. High-Performance Liquid Chromatography, korkean erotuskyvyn nestekromatografi
mTOR	engl. Mammalian Target of Rapamycin, rapamysiinin nisäkäskohde (proteiinisynteesin säätelijä)
PDCAAS	engl. Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score, proteiinien imeytyvyydellä korjattu aminohappopisteytys
UHPLC	engl. Ultra-High-Performance Liquid Chromatography, erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografi
WHO	engl. World Health Organization, Maailman terveysjärjestö

1 Johdanto

Ihmisten tietoisuus terveellisten elämäntapojen tärkeydestä on lisääntynyt maailmanlaajuisesti viimeisten vuosien ja vuosikymmenien aikana. Runsaasti rasvaa tai sokeria sisältäviä tuotteita pyritään usein välttämään ja lisäämään ravintoon runsaasti vitamiineja ja kuituja sisältäviä kasviksia, hedelmiä tai marjoja. Päivittäistavarakauppoihin onkin ilmestynyt paljon tuotteita, joiden paketeissa on maininta vähennetyistä sokerin tai rasvan määrästä, kovien eli tyydyttyneiden rasvojen vähydestä tai tuotteen sisältämästä runsaasta kuidusta tai proteiinista.

Terveellisiä elämäntapoja pyritään usein edistämään myös liikunnalla ja harjoittelemalla hapenottokykyä sekä lihaskuntoa. Warburtonin ym. (2006) tutkimuksessa osoitettiin riittävän liikunnan vähentävän kuolleisuutta ryhmillä, joilla oli erilaisia riskitekijöitä, kuten diabetes, korkea BMI (Body Mass Index; Painoindeksi) tai tupakointi. Lisäksi liikunnan todettiin vähentävän riskiä sairastua erilaisiin kroonisiin sairauksiin ja joihinkin syöpiin.

Terveellisiä elämäntapoja tai motiiveja niihin on myös paljon erilaisia. Toiset pyrkivät poistamaan haitallisiksi todettuja tai epäiltyjä lisäaineita ravinnostaan ja toiset taas syömään mahdollisimman energiaharvoja tuotteita. Osalla motiivina on elimistön kokonaisvaltainen terveys ja hyvinvointi, kun taas toisilla ainoastaan kehonkoostumus. Erilaisten tavoitteiden suosio on vaikuttanut myös elintarvike- tai lisäravinnealan yritysten markkinointitapoihin ja uusien tuotteiden kehittämiseen. Trendin kehittymistä edesauttaa sosiaalinen media, jossa voi jatkuvasti törmätä ulkonäöltään poikkeuksellisen lihaksikkaisiin tai todella matalan rasvaprosentin omaaviin henkilöihin. Sosiaalisessa mediassa nähtyjen kuvien ja oman ulkonäön vertailun onkin todettu nuorilla aiheuttavan kehon kuvan vääristymiä ja tyytymättömyyttä omaan vartaloonsa (Jiotsa ym. 2021).

Trendi ravinnon ja ulkonäön suhteen on nostanut markkinoille paljon erilaisia lisäravinteita, aterian korvikkeita ja piristeitä. Osaa tuotteista markkinoidaan väittämällä niiden suoraan edistävän kehon muokkaamista kohti median luomaa ihannekuvaa ja osan taas väitetään edistävän jaksamista tässä prosessissa. Vähäkaloriset, runsasproteiiniset ja reilusti kofeiinia sisältävät tuotteet osuvat tähän markkinaan. Lisäksi erilaiset ainesosat, joiden uskotaan edistävän aineenvaihduntaa ja rasvan palamista, kuten vihreä tee ja ruusujuuri, ovat lisääntyneet lisäravinteissa.

Päivittäistavarakauppojen proteiinipatukoille ja -juomille sekä aminohappolisille voidaan varata tilaa kokonainen osasto kaupassa. Tuotteita on useilta valmistajilta – niin ulkomaisilta kuin suomalaisiltakin – useilla eri makuvaihtoehdoilla ja monilla eri vaikutusväitteillä. Aminohappolisiä on valmiina juomina ja jauheina, jotka sekoitetaan itse veteen. Pakkauksessa mainitaan yleensä selvästi näkyvällä paikalla mitä aminohappoja se sisältää, kuten BCAA (Branched-Chain Amino Acids; haaraketjuiset aminohapot) tai EAA (Essential Amino Acids; välttämättömät aminohapot). Valmiina juomina myytävät aminohappotuotteet sisältävät lähes aina myös kofeiinia, joka voi osaltaan houkutella niiden ostamiseen urheilusuorituksen, työpäivien ja koulutöiden tueksi.

Aminohappujuomien suosion voi huomata usein vain katselemalla ympärilleen arkielämässä. Työpaikoilla, koulussa, urheilutiloissa tai muualla julkisilla paikoilla näkee paljon aminohappujuomiksi tunnistettavien brändien tuotteita erityisesti nuorten ja nuorten aikuisten käsissä. Näiden juomien ja juomabrändien ostamista ja käyttämistä voisi kutsua jopa muodikkaaksi, edisti se sitten omia tavoitteita tai ei. Lisäksi etenkin kuntosaleilla voi huomata värikkäitä nesteitä sisältäviä juomapulloja. Ne sisältävät usein jauheista veteen sekoittamalla valmistettuja aminohappoja ja mahdollisia piristeitä tai muita väitetysti suoritusta parantavia aineita.

Aminohappujuomien suosioon verrattuna niitä on tutkittu todella vähän. Kysymykset ”Onko aminohappujuomista hyötyä?” tai ”Sisältävätkö juomat pakkauksen väittämät määrät aminohappoja?” ovat luultavasti mietityttäneet monia. Proteiinit ja niiden sisältämät välttämättömät aminohapot ovat kiistatta ihmiselle tärkeitä, mutta vapaiden eli sitoutumattomien aminohappojen hyötyjä terveyteen, palautumiseen tai lihaskasvuun voidaan kyseenalaistaa.

Tutkielmassa keskitytään aminohappujuomiin, niin valmiisiin kuin juomajauheisiin ja erityisesti niiden sisältämiin aminohappoihin sekä niiden hyötyihin. Alussa esitellään erilaisia välttämättömiä aminohappoja sekä niiden tehtäviä ja vaikutuksia elimistössä. Seuraavassa osassa analysoidaan aineistojen pohjalta vapaiden aminohappojen käyttämisen hyödyllisyyttä tai hyödyttömyyttä, minkä jälkeen siirrytään tutkimukseen aminohappujuomien todellisuudessa sisältämistä aminohapoista ja niiden määristä.

2 Aminohapot

Aminohapot ovat proteiinien rakennusaineita. Ravinnosta saatavien proteiinien tehtävä onkin kuljettaa ja tarjota aminohappoja elimistön eri toiminnoille. Aminohappoja tarvitaan kaikkialla elimistössä. Niitä käytetään aineiden kuljetukseen sekä varastointiin, liikkeiden muodostamiseen, erilaisten toimintojen säätelyyn sekä rakennusaineena. Kaikki proteiinit koostuvat 20:sta eri aminohaposta (proteिनogeniciset aminohapot), joista 11:tä elimistö pystyy itse tuottamaan eli ne ovat ei-välttämättömiä. Aminohapoista 9 on välttämättömiä eli ne tulee saada ravinnosta, koska elimistö ei pysty niitä itse tuottamaan. (Mutanen ym. 2021.)

Välttämättömiä aminohappoja kutsutaan usein lyhenteellä EAA (Essential Amino Acids), joista haaraketjuisia lyhenteellä BCAA (Branch Chained Amino Acids). Erilaisia aminohappoja on tunnistettu yli 500, mutta niistä vain edellä mainitut 20 toimivat proteiinien rakennusaineina eli ovat proteिनogenicisiä. Muut aminohapot toimivat erilaisissa tehtävissä kuten aineenvaihdunnan välituotteina tai vapaana luonnossa. (Ngo 2015.)

2.1 Aminohapot elimistössä

Ravinnosta saatavat proteiinit hajotetaan ruuansulatuksessa aminohapoiksi. Mahalaukussa maharauhasten parietaalisolujen erittämä suolahappo tekee mahalaukkuun happamat olosuhteet, joka aktivoi maharauhasten pääsolujen erittämän pepsinogeenin. Pepsinogeenistä muodostuu pepsiiniä, joka on proteaasi eli proteiineja hajottava entsyymi. Pepsiini yhdessä haiman proteolyyttisten entsyymien kanssa käynnistää proteiinien pilkkoutumisen oligopeptideiksi eli lyhyemmiksi aminohappoketjuiksi. Proteiinien hajotus jatkuu ohutsuolessa, jossa proteiineista pilkotut oligopeptidit hajotetaan aminohapoiksi sekä di- ja tripeptideiksi peptidaasien toimesta. Ohutsuolessa tapahtuu myös aminohappojen imeytyminen. Peptidit ja aminohapot absorboituvat epiteelisoluihin, jossa solun sisäiset peptidaasit pilkkovat loput peptidit aminohapoiksi. Solusta aminohapot kulkeutuvat verenkierron välityksellä hyödynnettäviksi eri soluille esimerkiksi maksaan ja luurankolihaksiin. (Savilahti 1998; Mutanen ym. 2021.) Proteiinien imeytymiseen vaadittu aika vaihtelee paljon, sillä esimerkiksi maidon heraproteiinin imeytymisnopeudeksi on arvioitu noin 10 g/h kun taas kananmunan proteiinin vain noin 3 g/h (Schoenfeld ja Aragon 2018).

Tutkimuksissa on osoitettu, että eläimillä noin 50 % ravinnon proteiineista saatavista aminohapoista jäävät sisäelimiin käyttöön ja loput siirtyvät verenkiertoon luurankolihasolujen käyttöön. Toisaalta samankaltaisia tuloksia on saatu ihmisillä, sillä 50–60 % ravinnon proteiineista imeytyneistä leusiinista ja fenyyialaniinista on vapautunut verenkiertoon 5–6 tunnin aikana. (Weijzen ym. 2022.)

Aminohapoilla on paljon erilaisia tehtäviä elimistössä, mutta yhteistä jokaiselle 20:lle proteinogeeniselle aminohapolle on toimiminen proteiinisynteesissä proteiinien rakennusaineena. Proteiinisynteesissä muodostetaan transkription, translaation ja loppumuokkauksen välityksellä proteiineja solun varastoimista aminohapoista geenien määrittelemän emäs- eli aminohappojärjestyksen mukaan. Näitä proteiineja valmistetaan solujen erilaisten tarpeiden mukaan lukuisiin eri käyttötarkoituksiin muun muassa kudosten rakennusaineeksi, katalyyteiksi, vasta-aineiksi, ravintoaineiden tai kaasujen kuljettajiksi sekä entsyymien ja hormonien rakennusaineiksi. (LaPelusa ja Kaushik 2022.)

Kaikki proteiinien aminohapot ovat L-isomeerejä, lukuun ottamatta glysiiniä, joka on yksinkertaisin aminohappo eikä se ole isomeerinen. Ne voidaan lisäksi jakaa ketogeenisiin, glukogeenisiin ja sekä keto- että glukogeenisiin. Ketogeeniset aminohapot eivät voi toimia substraattina glukoneogeneesissä ja niiden hajoamistuotteena muodostuu asetoasetattia, asetyylikoentsyymi-A:ta tai asetoasetyylikoentsyymi-A:ta. Glukogeeniset aminohapot taas toimivat substraattina glukoneogeneesissä muodostaen glukosia ja glykogeeniä. (Ngo 2015.)

2.2 Suotuisat aminohappoprofiilit

Ihmisen elimistö tarvitsee eri aminohappoja erilaisia määriä. Ei-välttämättömien aminohappojen määriin ei suoraan voida vaikuttaa ravinnolla. Sillä voidaan kuitenkin vaikuttaa näiden aminohappojen valmistuksen onnistumiseen elimistössä tarjoamalla kunkin ei-välttämättömän aminohapon rakennusaineita. Välttämättömät aminohapot saadaan ravinnosta, joten niiden määrä on täysin riippuvainen ravinnon proteiineista. Proteiinien laatua kuvataan yleisimmin PDCAAS-indeksillä (Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score) eli proteiinien imeytyvyydellä korjatulla aminohappopisteytyksellä. Erityisesti useiden eläinperäisten proteiinilähteiden, kuten maidon kananmunien sekä lihan PDCAAS-arvo on korkea, usein korkein mahdollinen, eli 1,0. (Phillips ja Van Loon 2011.)

Jokaisella proteiini- eli aminohappolähteellä on rajoittava aminohappo, eli se aminohappo, joka loppuu ensimmäisenä. Rajoittava aminohappo voidaan päätellä vertaamalla aminohappolähteen yksittäisten aminohappojen määriä ihmisen tarpeeseen. Se aminohappo, jota on vähiten suhteessa tarpeeseen, on rajoittava aminohappo kyseisessä aminohappolähteessä. Yhdenkin aminohapon loppuminen johtaa proteiinisynteesin keskeytymiseen, joten muita aminohappoja voi jäädä ylimäärin suuriakin määriä. Ylimääräiset aminohapot siirtyvät lähes välittömästi kataboliseen prosessiin, jossa ne hyödynnetään energian tuotantoon. Aminohapoista poistetaan deaminaatioissa maksassa aminoryhmä, joka lopulta erittyy virtsan mukana pois elimistöstä. Jäljelle jääneitä ketohappoja hyödynnetään energiaksi glukoneogeneesin tai ketogeneesin avulla. (Szwiega ym. 2022.)

Tarkkoihin aminohappomäärien ja niiden suhteiden tarpeisiin vaikuttaa ihmisen ikä, sukupuoli, aktiivisuus sekä terveydentila. Maailman terveysjärjestö WHO (World Health Organization) on kuitenkin antanut suosituksensa välttämättömien aminohappojen saannille. Suositus on esitetty taulukossa 1. Suosituksia ja PDCAAS-arvoja vertaamalla voi huomata niiden olevan linjassa toistensa kanssa. Esimerkiksi leusiini, jonka vähyys useissa kasviproteiinilähteissä laskee niiden PDCAAS-arvoa, on suosituksissa määrällisesti korkeimmalla tasolla. (WHO 2007.)

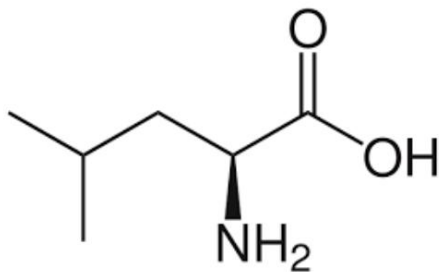
Taulukko 1. WHO:n 2007 antamat saantisuositukset välttämättömien aminohappojen osalta.

Aminohappo	mg / kg / d*	mg / g proteiinia**
Histidiini	10	15
Isoleusiini	20	30
Leusiini	39	59
Lysiini	30	45
Metioniini + kysteiini	15	22
Fenyylialaniini + tyrosiini	25	38
Treoniini	15	23
Tryptofaani	4	6
valiini	26	39
Yhteensä:	184	277
*Suositeltu aminohapon saanti määrä päivässä per kehon painokilo		
** Suositeltu aminohapon osuus (mg) per gramma proteiinia		

2.3 Välttämättömät aminohapot

2.3.1 Leusiini

Leusiini eli L-leusiini (Leu) on yksi välttämättömistä haaraketjuisista aminohapoista (EAA ja BCAA). Se on Isoleusiinin isomeerinen muoto, ja sen molekyylikaava on $C_6H_{13}NO_2$ (Kuva 1). Leusiini on ketogeeninen aminohappo ja se metabolisoituu asetyylikoentsyymi A:ksi. Leusiinilla on keskeinen rooli proteiinisynteesissä erityisesti lihassoluissa. Se toimii signaalivälittäjänä hormonien, kuten insuliinin, kanssa mTOR (mammalian target of rapamycin; rapamysiinin nisäkäskohde) -proteiinikinaasi signalointireitissä.

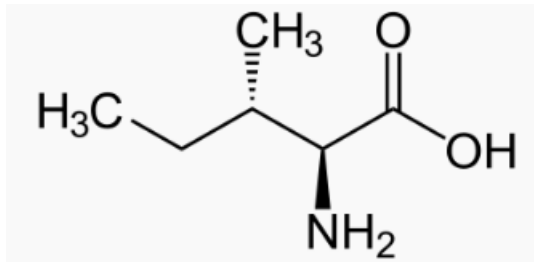


Kuva 1. L-leusiinin rakennekaava.

Nortonin ym. (2012) rotilla tehdyssä tutkimuksessa leusiinin vaikutuksista proteiinisynteesiin huomattiin korrelaatio leusiinin määrän ja proteiinisynteesin välillä. Tutkimuksen tuloksista havaittiin, että proteiini lähteiden leusiinin määrän kasvattaminen lisäsi proteiinisynteesiä lihassoluissa. Tutkimuksen huonomman proteiinisynteesivasteen proteiini lähteet olivat vehnä ja soija. Mutasen ym. (2021) mukaan leusiini ei kuitenkaan ole näiden proteiini lähteiden rajoittava aminohappo. Tämä vahvistaa väitteitä leusiinin tärkeydestä ja avainasemasta proteiinisynteesissä.

2.3.2 Isoleusiini

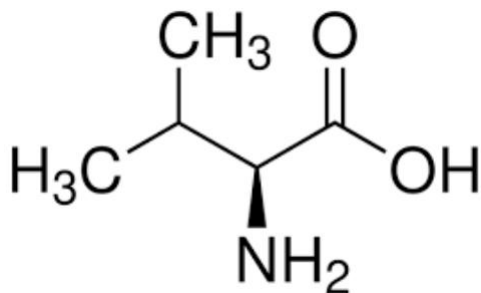
Isoleusiini (L-isoleusiini, Ile) on välttämätön haaraketjuinen aminohappo. Se on sekä gluko- että ketogeeninen. Isoleusiinin molekyylikaava on leusiinin tavoin $C_6H_{13}NO_2$ (Kuva 2). Niin isoleusiinilla, kuin muutamilla muillakin aminohapoilla, on huomattu yhteyksiä pidempään elinikään ja glukoosin tehokkaampaan imeytymiseen. (Canfield ja Bradshaw 2019.)



Kuva 2. L-isoleusiinin rakennekaava.

2.3.3 Valiini

Valiini (L-valiini, Val) on välttämätön, haaraketjuinen ja glukogeeninen aminohappo, jonka molekyylikaava on $C_5H_{11}NO_2$ (kuva 3). Valiinin hajoamistuotteet 3-hydroksiisobutyraatin on tutkimuksissa huomattu edistävän verenkierron rasvahappomolekyylien kuljetusta sekä insuliiniresistenssiä. Sen on lisäksi havaittu vähentävän väsymystä urheilusuorituksen aikana ja estävän sen jälkeistä veren glukoositasojen sekä maksan glykogeentitasojen laskua. Pidetäänkin mahdollisena, että valiini edistää mitokondriaalista biogeneesiä eli solujen mitokondrioiden itsenäistä replikoitumista. (Canfield ja Bradshaw 2019.)

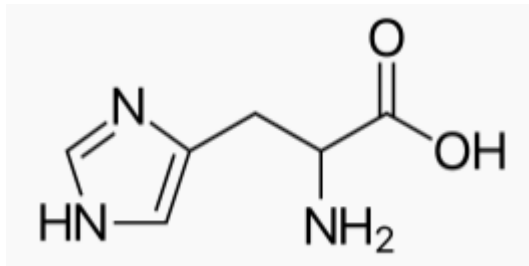


Kuva 3. L-valiinin rakennekaava.

2.3.4 Histidiini

Histidiini (L-histidiini, His) on välttämätön glukogeeninen aminohappo, jonka molekyylikaava on $C_6H_9N_3O_2$ (Kuva 4). Histidiinilisän on huomattu parantavan glykeemistä hallintaa eli veren glukoosipitoisuuden tasapainossa pitämistä, sekä lisäävän insuliinin eritystä. Plasman matala histidiinitaso on taas yhdistetty oksidatiiviseen stressiin, tulehdukseen sekä kuolleisuuteen munuaissairauksista kärsivillä. Plasman histidiinitasojen on havaittu laskevan ikääntyessä. Histidiini on lisäksi histamiinin ($C_5H_9N_3$) ja karnosiinin ($C_9H_{14}N_4O_3$) esiaste.

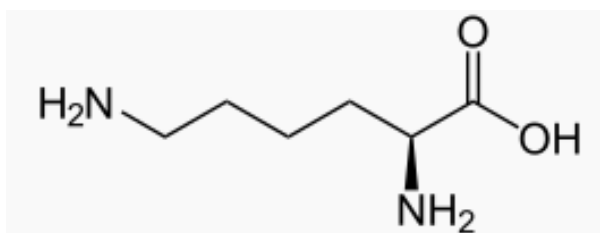
Histamiini on tärkeä signaalivälittäjä useissa solureaktioissa ja auttaa alentamaan verenpainetta verisuonia laajentavan vaikutuksen takia. Karnosiinin tehtäviä ei tunneta hyvin, mutta sitä esiintyy korkeina pitoisuuksina luurankolihasissa ja aivoissa. Tutkimuksissa on kuitenkin löydetty viitteitä sen positiivisesta vaikutuksesta ikääntymiseen liittyvien sairauksien hoidossa. (Blanco ja Blanco 2017; Canfield ja Bradshaw 2019.)



Kuva 4. L-histidiinin rakennekaava.

2.3.5 Lysiini

Lysiini (L-lysiini, Lys) on välttämätön ketogeeninen aminohappo ja sen molekyylikaava on C₆H₁₄N₂O₂ (kuva 5). Lysiini on muutamien muiden aminohappojen tavoin yhdistetty pidempään elinikään. Lysiinilisän on lisäksi huomattu nostavan plasman insuliini- ja glukagonitasoja, mikä edesauttaa verensokerin tasapainoisuutta. Lisäksi glukosin kanssa nautitun lysiniin on havaittu laskevan verensokeritasoa (Canfield ja Bradshaw 2019). Lysiini on myös karnitiinin (3-hydroksi-4-trimetyyliaminovoihappo, C₇H₁₅NO₃) esiaste. Karnitiini on aminohappo ja toimii aktiivisten rasvahappojen kuljettajana sytoplasmasta mitokondrioon (Vaz ja Wanders 2002).

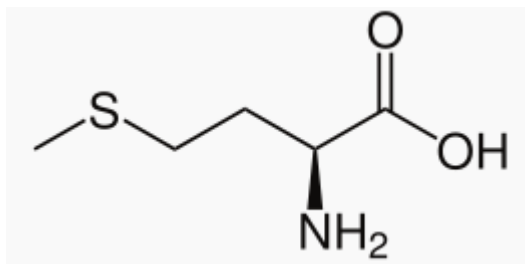


Kuva 5. L-lysiinin rakennekaava.

2.3.6 Metioniini

Metioniini (L-metioniini, Met) on välttämätön glukogeeninen aminohappo, jonka molekyylikaava on C₅H₁₁NO₂S (kuva 6). Sen kodoni RNA:ssa eli geenien kolmen emäksen jono on AUG, joka on myös geenien aloituskodoni.

Metioniini siis löytyy jokaisesta eukaryoottiproteiinista translaation aikana, mutta useimmiten se poistetaan proteiinisynteesin myöhemmässä vaiheessa. Metioniinista myös syntetisoidaan elimistössä aminohappo kysteiniä ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$). Vaikka metioniini on välttämätön aminohappo, on sen saantimäärien rajoittamisella huomattu olevan positiivisia vaikutuksia terveyteen. Metioniinin määrän rajoittamisen on huomattu alentavan glutationitasoja, mikä johtaa tiettyjen reaktioteiden kautta valkoisten rasvasolujen ruskettumiseen ja korkeampaan energiankulutukseen. Toisaalta glutationi toimii antioksidanttina eli suojaa soluja hapettumiselta. (Canfield ja Bradshaw 2019.)

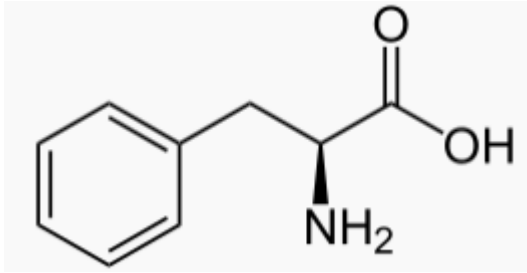


Kuva 6. L-metioniinin rakennekaava.

2.3.7 Fenyylialaniini

Fenyylialaniini (L-fenyylialaniini, Fe/Phe) on välttämätön aminohappo, joka on sekä gluko- että ketogeeninen. Sen molekyylikaava on $C_9H_{11}NO_2$ (kuva 7). Fenyylialaniinista muodostuu aminohappo tyrosiiniä ($C_9H_{11}NO_3$) fenyylialaniinihydroksylaasin avulla. Tyrosiini on dopamiinin, adrenaliinin, noradrenaliinin ja kilpirauhashormonien tyroksiinin sekä trijodityroniinin esiaste. Tutkimuksissa on huomattu terveydellisiä hyötyjä fenyylialaniinin määrän rajoittamisella, mutta toisaalta se sitoo hydroksyyliiradikaaleja, jotka voivat aiheuttaa oksidatiivista stressiä johtaen soluvaurioihin sekä erilaisiin sairauksiin. (Canfield ja Bradshaw 2019.)

Fenyyliketoniauria on sairaus, jossa fenyylialaniinia ei kyetä käsittelemään fenyylialaniinihydroksylaasin puutteen takia. Se aiheuttaa fenyylialaniinin kertymisen elimistöön, mikä voi esimerkiksi vahingoittaa aivojen kehitystä lapsilla ja johtaa kehitysvammaisuuteen. Fenyylialaniinia voi kertyä elimistöön myös muiden yhdisteiden, kuten makeutusaine aspartaamin hajoamistuotteena. (Niinikoski ym. 2009.)

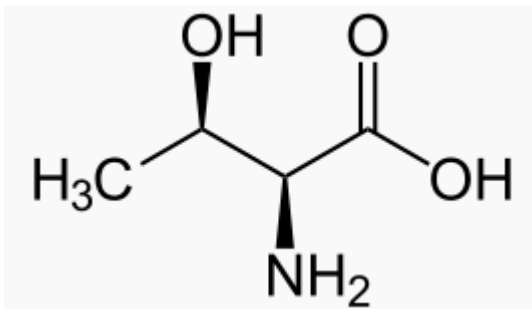


Kuva 7. L-fenyylialaniinin rakennekaava.

2.3.8 Treoniini

Treoniini (L-treoniini, Tre) on sekä gluko- että ketogeeninen välttämätön aminohappo, jonka molekyylikaava on $C_4H_9NO_3$ (kuva 8).

Treoniini toimii esiasteena aminohappo glysiinille ($C_2H_5NO_2$), joka toimii keskushermostossa inhibitorisena eli rajoittavana väliaineena. (Canfield ja Bradshaw 2019.) Treoniinin puutteen ja toisaalta myös ylimäärän on huomattu hidastavan proteiinisynteesiä sioilla (Wang ym. 2007). Lisäksi treoniinin puute on yhdistetty neurologisiin toimintahäiriöihin sekä masennukseen kissoilla (Titchenal ym. 1980). Treoniinin saannilla sopivissa määrin ravinnosta on myös huomattu lievittävän energia-aineenvaihdunnan häiriöitä ja suolistotulehduksia (Tang ym. 2021).

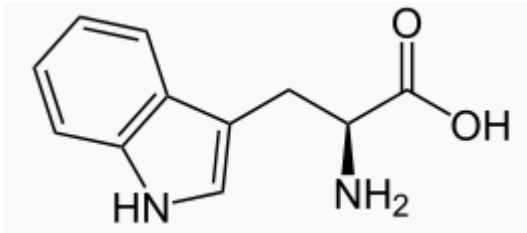


Kuva 8. L-treoniinin rakennekaava.

2.3.9 Tryptofaani

Tryptofaani (L-tryptofaani, Trp) on sekä gluko- että ketogeeninen välttämätön aminohappo, jonka molekyylikaava on $C_{11}H_{12}N_2O_2$ (kuva 9). Se toimii neuroregulaattorina eli välittäjäaine serotoniinin sekä melatoniinin esiasteena, ja se vaikuttaakin auttavan nukahtamisessa ja parantavan mielialaa (Yousef ym. 2024). Tryptofaanin yhteyttä moniin sairauksiin, kuten diabetes, masennus sekä sydän ja verisuonitaudit, on tutkittu.

Tutkimuksissa on havaittu tryptofaanitasojen olevan matalalla sairauden aktiivisessa vaiheessa ja tryptofaanilisän vähentävän sairauden ilmentymiä. Toisaalta joissakin tutkimuksissa on huomattu tryptofaanin rajoittamisella terveydellisiä hyötyjä kroonisessa munuaissairaudessa. Viitteitä on myös tryptofaanin yhteydestä tyypin 2 diabetekseen, mutta vaikutusmekanismeja ei tunneta riittävästi, ja osa tutkimuksista on ristiriidassa keskenään. (Canfield ja Bradshaw 2019.)



Kuva 9. L-tryptofaanin rakennekaava.

2.4 Ei-välttämättömät aminohapot

Ei-välttämättömiä aminohappoja on 11, mutta osassa listauksista niistä 6–8 kutsutaan ehdollisesti välttämättömiksi. Näistä aminohapoista voi siis tulla yksilölle välttämättömiä, mikäli jonkin sairauden tai muun poikkeaman takia kyseisten aminohappojen tuottaminen elimistössä estyy. Kaikki ei-välttämättömät aminohapot vaativat niiden syntetisoinnin lähtöaineista, mutta ehdollisesti välttämättömien syntetisoinnin estyminen on yleisesti havaittu ongelma. Lähtökohtaisesti kuitenkin kaikkia ehdollisesti välttämättömiä sekä ei-välttämättömiä aminohappoja elimistö pystyy tuottamaan riittävästi omiin tarpeisiinsa. Ehdollisesti välttämättömiä aminohappoja ovat arginiini (C₆H₁₄N₄O₂), kysteiini (C₆H₁₂N₂O₄S₂), glutamiini (C₅H₁₀N₂O₃), glysiini (C₂H₅NO₂), proliini (C₅H₉NO₂) ja tyrosiini (C₉H₁₁NO₃). Ei-välttämättömiä ovat alaniini (C₃H₇NO₂), asparagiini (C₄H₈N₂O₃), aspartaatti (C₄H₇NO₄), seriini (C₃H₇NO₃) sekä glutamaatti (C₅H₉NO₄). Seriin luokittelusta ehdollisesti välttämättömäksi esiintyy ristiriitaista tietoa, kuitenkin useimmissa lähteissä sitä ei ole listattu ehdollisesti välttämättömäksi. Erilaisia syitä ehdollisesti välttämättömien aminohappojen muuttumiselle välttämättömäksi on listattuna taulukossa 2. (Meyers ym. 2006.)

Taulukko 2. Ehdollisesti välttämättömät aminohapot ja niiden välttämättömyyden aiheuttajia.

Arginiini, glutamiini, glysiini ja proliini	Keskosuus, nopeasti kasvaminen, suuret kudოსvauriot ja sairaudet tai niistä toipuminen voivat aiheuttaa elimistön oman arginiinin, glutamiinin, glysiinin tai proliinin tuotannon riittämättömyyden (Mutanen ym. 2021).
Kysteiini	Kysteiinin esiasteen metioniinin puute ruokavaliassa. Keskosuus ja stressitilat, kuten vakavat fyysiset traumat, lisäävät antioksidantti glutationin kulutusta, jolloin sen esiasteena toimivan kysteiinin tuottaminen elimistössä voi olla riittämätöntä. Esimerkiksi HIV- (human immunodeficiency virus) potilailla sulfaatteja, joiden esiaste kysteiini on, erittyy runsaasti virtsaan, joka voi johtaa kysteiinin riittämättömyyteen glutationin syntetisointiin. (Grimble 2006)
Tyrosiini	Fenyyliketonuria eli sairaus, jossa fenyylialaniinihydroksylaasin puute estää fenyylialaniinin käsittelyn ja tyrosiinin muodostumisen (Niinikoski ym. 2009). Kilpirauhasen toiminnan muutokset tai kilpirauhashormonien lisääntynyt tarve voivat lisätä tyrosiinin tarvetta, sillä se toimii kilpirauhashormonien tyroksiinin (T4) ja trijodityroniinin (T3) lähtöaineena (Köhrle 2023).

3 Aminohappolisien hyödyllisyys

Solut tarvitsevat aminohappoja ja normaalisti ne saadaan ravinnon proteiineista. Proteiinit pilkotaan kappaleessa 2.1 kuvatulla tavalla ruuansulatuselimistössä, josta aminohapot imeytyvät verenkiertoon ja solujen käyttöön. Vapaita aminohappoja nautittaessa ei sen sijaan lähtökohtaisesti pilkkoutumista tarvita, sillä aminohappojen pitäisi olla jo valmiiksi sitoutumattomia eli olomuodossa, joka on proteiinien pilkkomisen tuote. Osa aminohapoista päätyy luurankolihasoluille, joissa se lisää proteiinisynteesiä eli proteiinien tuottoa. Proteiinisynteesin tärkein tavoite luurankolihasoluissa on ylläpitää tai kasvattaa lihasmassaa. Aminohappojen määrää, joka päätyy lihasoluille, voidaan mitata verenkierrosta. Proteiinien tai aminohappojen nauttimisen jälkeen voidaan tutkia kunkin aminohappolähteen imeytymisnopeutta mittaamalla veren aminohappopitoisuuksia tietyin aikavälein. (Weijzen ym. 2022.)

Vapaista aminohapoista peräisin olevien aminohappojen on epäilty pidättäytyvän vähemmän sisäelimiin, kuin kokonaisista proteiineista saatujen aminohappojen. Kappaleessa 2.1 kerrotusti proteiineista peräisin olevista aminohapoista imeytyykin vain 50–60 % verenkiertoon luurankolihasien käyttöön. Weijzenin ym. (2022) tutkimuksessa osoitettiin vapaiden aminohappojen imeytymisen olevan nopeampaa ja aminohappoja vapautuvan verenkiertoon enemmän kuin maidon proteiinista. Toisaalta merkittävää eroa lihasproteiinisynteesin määrässä proteiinin ja vapaiden aminohappojen nauttimisen välillä ei havaittu. Tutkimuksessa nautittujen aminohappojen jakauma oli samankaltainen kuin maidon proteiinin aminohappoprofiili.

Yhteistä useimmille aminohappolisille on se, että ne eivät sisällä hiilihydraatteja tai rasvaa. Aminohappolisät ovat usein lähes kalorittomia, esimerkiksi omenan makuisessa NOCCO BCAA+ssa on 6 kcal / 100 ml (k-ruoka.fi 2024). Kehonkoostumustaan tarkkaileville tai muokkaaville tämä on useimmiten houkutteleva tieto, kun pyritään kalorivajeeseen tai saamaan kaikki kalorit kiinteästä ravinnosta. Toisaalta hiilihydraattien nauttimisen jälkeen aminohapot siirtyvät enemmän lihasoluihin hiilihydraattien aktivoiman insuliinivälitteisen kuljetusmekanismin kautta (Mutanen ym. 2021). Tästä syystä on mahdollista, ettei vähäkaloristen tai kalorittomien aminohappojuomien aminohappoja hyödynnetä täydellisesti ilman hiilihydraattipitoisen ravinnon nauttimista.

3.1 EAA-lisät

Churchward-Vennen ym. (2012) tutkimuksessa vertailtiin heraproteiinin, EAA-aminohappojen ja pelkän leusiinin vaikutuksia proteiinisynteesiin ja veren aminohappopitoisuuksiin. Heraproteiiniiryhmä sai 25 g heraproteiinia, EAA-ryhmä sai 6,25 g heraproteiinia lisätyllä vapailla EAA-aminohapoilla ja leusiiniiryhmä sai 6,25 g heraproteiinia lisätyllä leusiinilla. Hera- ja leusiiniiryhmät saivat kokonaisuudessaan 3,0 g leusiinia, kun taas EAA-ryhmä vain 0,75 g. Lisäksi aminohappojen kokonaismäärä oli heraryhmällä kaksi kertaa suurempi, kuin EAA-ryhmällä, ja kolme kertaa suurempi, kuin leusiiniiryhmällä. Tuloksissa veren aminohappopitoisuuksien nousun ajankohdissa ei huomattu merkittäviä eroja, mikä on ristiriidassa oletuksen ja aiemmin läpikäydyn Weijzenin ym. (2022) tutkimuksen kanssa. Toisaalta heraryhmällä veren aminohappopitoisuus nousi korkeimmaksi ja pysyi korkealla kauiten, joka selittyy ryhmän suuremmalla aminohappojen kokonaismäärällä. Tämä saattaa osaltaan myös selittää veren aminohappopitoisuuksien nousunopeuksien tasaisuuden. Kuitenkin solunsisäiset aminohappopitoisuudet poikkesivat nautituista aminohappomääristä BCAA- ja EAA-aminohappojen osalta. Näissä arvoissa heraryhmän pitoisuudet eivät olleet missään luokassa suurimpia, vaikka ryhmä nautti eniten aminohappoja. Toisaalta eroja proteiinisynteesin tehokkuudessa havaittiin ainoastaan vastusharjoittelussa ryhmässä 3–5 tunnin kohdalla. Tällöin heraryhmän proteiinisynteesin määrä oli merkittävästi muita korkeampi.

Churchin ym. (2020) tutkimuksessa analysoitiin solun ulkoisten ja sisäisten aminohappomäärien vaikutuksia proteiinisynteesiin. Tutkimuksen mukaan eniten proteiinisynteesiin määrään ja tehokkuuteen vaikuttaa solun ulkoiset EAA-aminohappojen pitoisuudet. Tulosten perusteella kasvaneet solujen ulkoiset EAA-pitoisuudet stimuloivat proteiinisynteesiä eniten eli tärkeämpää tämän perusteella onkin kaikkien välttämättömien aminohappojen lisääminen, kuin vain haaraketjuisten tai leusiinin.

Gwinin ym. (2021) tutkimuksessa analysoitiin EAA lisän määrän vaikutuksia proteiinisynteesiin lyhytaikaisen kalorivajeen aikana. Koehenkilöt jaettiin kahteen ryhmään EAA-lisän määrän mukaan (0,3 g/kg/annos ja 0,1 g/kg/annos).

Tuloksien perusteella suuremman määrän EAA-aminohappolisiä nauttineen ryhmän proteiinien katabolia eli hajottaminen oli vähäisempää ja etenkin nettoproteiinitasapaino oli huomattavasti parempi, kuin pienemmän EAA-lisän ryhmällä. Nettoproteiinitasapaino tarkoittaa proteiinisynteesin ja proteiinien katabolian välistä suhdetta eli rakentuuko enemmän uutta vai hajotetaanko enemmän vanhaa. Tuloksien perusteella välttämättömien aminohappojen lisäämisestä on hyötyä kalorivajeen aikana ainakin kehonkoostumuksen ja palautumisen kannalta. Toisaalta tutkimuksessa ei analysoitu eroja vapaiden aminohappojen nauttimisen ja kokonaisten proteiinien nauttimisen välillä.

Antonion ym. (2000) tutkimuksessa mitattiin EAA-lisän, josta puuttui histidiini, vaikutuksia lihaskasvuun ja suorituskykyyn kuuden viikon aikana aiemmin harjoittelelattomilla naisilla. Koehenkilöt nauttivat viikon kolmena harjoittelupäivänä ennen ja jälkeen harjoituksen noin 12,8 g aminohappoja ja välipäivinä kerran 12,8 g (yhteensä noin 128 g / viikko). EAA- ja lumeryhmän välillä ei havaittu merkittäviä eroja kehonkoostumuksessa tai lihasvoimassa. Kuitenkin uupumukseen vaadittu aika juoksumatolla parani tilastollisesti merkittävästi EAA-ryhmällä

Birdin ym. (2006) tutkimuksessa EAA-lisistä tutkittiin pelkän EAA- ja lumeryhmän lisäksi hiilihydraatteja nauttinutta ryhmää (CHO) ja sekä hiilihydraatteja että aminohappoja nauttinutta ryhmää (CHO+EAA). Aminohappoja, joista puuttui tryptofaani, nautittiin harjoittelun aikana pienissä osissa noin 6 g ja hiilihydraatteja 40–54 g. 12 viikon harjoittelujakson jälkeen kehon rasvaton massa oli noussut ja rasvamassa vähentynyt kaikilla ryhmillä, mutta CHO+EAA -ryhmällä merkittävästi enemmän kuin lumeryhmällä. Toisaalta EAA- ja CHO-ryhmillä välillä muutokset olivat lähes samat jokaisella osa-alueella, kun taas lumeryhmällä rasvaton massa lisääntyi merkittävästi vähemmän, kuin muilla.

3.2 BCAA-lisät

Haaraketjuisia aminohappoja eli BCAA-aminohappoja käytetään paljon lisäravinteissa ja suurimmasta osasta aminohappujuomista löytyy ainoastaan haaraketjuisia eikä kaikkia välttämättömiä aminohappoja.

Haaraketjuisien aminohappojen tarjonta etenkin urheilijoille suunnatuissa lisäravinteissa tai aminohappujuomissa perustuu todennäköisesti uskomukseen haaraketjuisten aminohappojen tehokkaammasta vaikutuksesta luurankolihasien proteiinisynteesiin ja sen käynnistämiseen etenkin leusiinin osalta. Uskomusta tukee myös haaraketjuisten aminohappojen hapettuminen lähes yksinomaan lihaksissa. Toisaalta edellä mainittuja vaikutuksia tai sen tehokkuutta voidaan kyseenalaistaa, sillä kaikkia aminohappoja tarvitaan samanaikaisesti proteiinien syntetisoinnissa ja yhdenkin aminohapon puute voi häiritä tätä prosessia. (Mutanen ym. 2021)

Louardin ym. (1990) tutkimuksessa mitattiin BCAA-infuusion vaikutuksia paastotilassa olevilla henkilöillä. Infuusio nelinkertaisti plasman haaraketjuisten aminohappojen pitoisuuden, mutta muiden välttämättömien aminohappojen pitoisuus laski. Mielenkiintoista on, että proteiinisynteesi väheni tutkimuksen aikana.

Toisaalta fenyyialaniinin nettotasapainossa ei havaittu merkittävää muutosta, mikä viittaa myös proteiinien katabolian vähentyneen yhtä paljon kuin proteiinisynteesin. Katabolinen tila eli negatiivinen nettoproteiinitasapaino siis jatkui eikä BCAA kääntänyt tilaa anaboliseksi eli positiiviseksi nettoproteiinitasapainoksi. Lisäksi samankaltaisia tuloksia on saatu muistakin vastaavista tutkimuksista. (Wolfe 2017.)

Myöskään hiilihydraattien kanssa nautittujen BCAA-aminohappojen ei ole havaittu lisäävän lihasproteiinisynteesiä, mikä viittaa muiden välttämättömien aminohappojen puutteeseen. Toisaalta Churchward-Vennen ym. (2014) tutkimuksessa BCAA-lisä yhdessä heraproteiinin kanssa lisäsi proteiinisynteesiä merkittävästi verrattuna pelkän heraproteiinin nauttimiseen. Tämä viittaa yhden tai useamman haaraketjuisen aminohapon rajoittavan heraproteiinin aktivoimaa proteiinisynteesiä, kun muitakin välttämättömiä aminohappoja on saatavilla. (Wolfe 2017.)

Leusiinilla yksinään on havaittu olevan proteiinisynteesiä aktivoivia vaikutuksia, mutta isoleusiinin tai valiinin kohdalla vastaavia vaikutuksia ei ole havaittu. Tämä voi viitata leusiinin olevan usein rajoittava tekijä ruokavaliossa, tai se erityisesti aktivoi proteiinisynteesiä. Toisaalta leusiinilisän nauttimisen vaikutuksia rajoittaa muiden välttämättömien aminohappojen puute, kuten BCAA-lisänkin tapauksessa. Lisäksi leusiinin hapettamisen aktivoituminen aloittaa myös muiden haaraketjuisten aminohappojen hapettamisen, jolloin isoleusiinin ja valiinin pitoisuus plasmassa laskee. (Wolfe 2017.)

3.3 Yhteenveto

Aminohappolisiä tutkittaessa on usein saatu olettamuksien vastaisia tuloksia. Useimmiten aminohappojen vaikutuksia proteiinisynteesiin rajoittaa muut tekijät, kuten hiilihydraattien aktivoima insuliinivälitteinen kuljetusmekanismi tai aminohappolisään sisältyvä aminohappojen puute. Vain haaraketjuisten aminohappojen lisäämisen vaikutuksia rajoittaa etenkin muut puuttuvat aminohapot, kuten myös leusiinin lisäämisen tapauksessa, mikä vaikuttaa laskevan lisäksi muiden haaraketjuisten aminohappojen pitoisuuksiin. Toisaalta kaikkien välttämättömien aminohappojen lisäämistä rajoittaa mahdollinen hiilihydraattien puute.

Tutkimuksien perusteella muodikkaiden BCAA-juomien nauttiminen paastojaksojen aikana vaikuttaa olevan hyödyttömiä lihasproteiinisynteesin tai nettoproteiinitasapainon kannalta. Toisaalta niiden nauttiminen aterian yhteydessä voi lisätä proteiinisynteesiä ravinnon proteiineista saatavia aminohappoja täydentämällä eli rajoittavia aminohappoja lisäämällä. Etenkin kasviperäisten proteiinien rajoittava aminohappo on usein haaraketjuinen aminohappo leusiini. Toisaalta monipuolisen ruokavalion ja riittävien hyvien proteiini-lähteiden kanssa BCAA-lisien hyöty voi olla marginaalista, mutta aiheesta tarvitaan lisää tutkimusta. Kuitenkin kaikkien välttämättömien aminohappojen lisääminen eli EAA-lisän käyttö vaikuttaa yksinäänkin edistävän nettoproteiinitasapainoa. Toisaalta hiilihydraattien nauttimisen yhteydessä niistä voisi mahdollisesti olla enemmän hyötyä. Pidemmän aikavälin tutkimuksia EAA- ja BCAA-lisien käytöstä yhdistettynä erilaisiin ruokavalioihin ja/tai lihaskuntoharjoitteluun tarvitaan ehdottomasti lisää yksiselitteisten vastauksien saamiseksi.

4 Tutkimuksen tavoitteet

Lisäravinteiden vaikutuksia tutkitaan paljon, mutta itse tuotteita ja niiden ainesosien todellisia pitoisuuksia suhteellisen vähän. Tutkimuksia aminohappolisien todellisista aminohappopitoisuuksista verrattuna valmistajan ilmoittamiin tietoihin on muutamia. Martinin ym. (2023) tutkimuksessa aminohappokoostumukset tutkittiin pillereistä ja juomajauheesta. Tutkimuksessa huomattiin molempien sisältävän lähes etiketin lupaamat määrät BCAA-aminohappoja (erot: pilleri <1 %, juomajauhe \approx 2 %). Toisaalta Eley (2019) tutkimuksessa viidestä aminohappolisäravinteesta huomattiin niiden sisältävän keskiarvollisesti vain 61 % luvatuista määristä BCAA-aminohappoja. Vaihtelu vaikuttaa siis olevan suurta, joten yksittäisillä tutkimuksilla ei saada laajaa kuvaa valmistajien ilmoittamien tietojen luotettavuudesta. Tutkimusta tulisi tehdä kaikissa maanosissa suurimpien valmistajien tuotteista, mikä osaltaan ohjaa muitakin valmistajia varmistumaan tuotteidensa todellisista aminohappopitoisuuksista. Tämän tutkimuksen tuotteet ovat suosittuja Suomessa ja osaa niistä myydään muissakin maissa.

Euroopan unioni ja Suomen elintarvikelaki säätelevät elintarvikkeita koskevia säädöksiä ja asetuksia. Elintarvikkeista ilmoitavia tietoja ja niiden paikkaansa pitävyyttä valvotaan vain vähän ja päävastuu onkin valmistajalla tai maahantuojalla. Pistokokein ja tarvittaessa erilaisista syistä johtuen voidaan Suomessa Ruokaviraston ja elintarvikeviranomaisen toimesta analysoida elintarvikkeiden todellisesti sisältämät aineet ja niiden määrät. Euroopan unionin asetuksessa ja elintarvikelaissa kielletäänkin kuluttajaa harhaan johtavien tai väärin tietojen antaminen (Asetus (EU) N:o 1169/2011; Elintarvikelaki 297/2021). Lain nojalla aminohappolisien tulisi siis sisältää oikeelliset määrät aminohappoja. Toisaalta aminohappojen tai osan niistä sitoutuminen proteiineiksi voi olla kuluttajaa harhaanjohtavaa, mutta tilannetta on vaikeampi tulkita. (Ruokavirasto 2023.)

Tutkimuksen tavoitteena oli määrittää neljän Suomessa suosituksen aminohappovalmisteen todellisesti sisältämät aminohappomäärät ja niiden suhteet. Analyysillä pyrittiin määrittämään kahden haaraketjuisia aminohappoja sisältävän juoman (BCAA) ja kahden kaikkia välttämättömiä aminohappoja sisältävän juomajauheen (EAA) vapaat sekä sitoutuneet aminohapot. Analyysin tuloksia verrattiin valmistajan ilmoittamiin aminohappojen määriin ja suhteisiin. Olettamuksena oli, että aminohappolisat sisältävät valmistajan ilmoittamat määrät vapaita aminohappoja.

Tutkimuksessa pyrittiin mittaamaan myös sitoutuneet aminohapot. Toisiinsa kiinnittyneitä aminohappoja kutsutaan peptideiksi, jossa aminohapot ovat kiinnittyneet toisiinsa peptidisidoksin. Pitkiä peptidiketjuja eli polypeptidejä kutsutaan proteiineiksi. Proteiini- ja aminohappolisät voivatkin sisältää samankaltaiset aminohappokoostumukset, mutta ero löytyy juuri aminohappojen sitoutumisesta. Tällöin voidaankin ymmärrettävästi olettaa aminohappolisien sisältävän nimenomaan vapaita aminohappoja.

5 Materiaalit ja menetelmät

5.1 Näytemateriaalit

Näytemateriaaleiksi valittiin neljä suomessa suosittua aminohappolisäravinnetta. PTVLABS:n tuote tilattiin heidän omilta verkkosivuiltaan ptmlabs.com ja muut tuotteet hankittiin paikallisesta päivittäistavarakaupasta. Tutkittavat aminohappujuomat olivat Nocco BCAA Limón Del Sol 330 ml (No Carbs Company AB, valmistumaa: Alankomaat) ja Pirkka BCAA strawberry & kiwi 330 ml (Kesko Oyj, valmistusmaa: Suomi). Tutkittavat juomajauheet olivat Leader EAA + BCAA orange & mandarin 250 g (Leader Foods Oy, valmistusmaa: Suomi) ja PTVLABS Anabolic sauce dope apple 400 g (Ptmlabs Oy, valmistusmaa: -). Tuotteiden tuotetiedot sekä aminohappopitoisuudet ja -jakaumat taulukossa 3.

Taulukko 3. Näytemateriaalit ja niiden sisältämien aminohappojen pitoisuudet.

	YHT.	LEU	VAL	ILE	PHE	TRE	LYS	HIS	MET	TRP
NOCCO BCAA LIMÓN DEL SOL 330 ML (NOCCO 2025)	9,1 mg/ml	6,1	1,5	1,5						
PIRKKA BCAA STRAWBERRY & KIWI 330 ML. (K-RUOKA 2025)	7,6 mg/ml									
LEADER EAA+BCAA ORANGE & MANDARIN 250 G (LEADER 2025)	770 mg/g	250	110	50	90	80	110	40	30	10
PTVLABS ANABOLIC SAUCE DOPE APPLE 400 G (PTVLABS 2025)	532 mg/g	180	83	33	68	55	65	20	20	8

5.2 Näytteiden valmistaminen

Jauhemaiset näytteet homogenisoitiin liuottamalla 1 g jauhetta 50 ml MQ vettä. Tällä suhteella liuoksen vahvuus on lähellä valmiiden juomien vahvuutta (Leader 15,2 mg/ml, PTVLABS 10,7 mg/ml).

Valmiit hiilihapolliset juomat sonikoitiin 20 minuuttia hiilihapon poistamiseksi. PTVLABS EAA juomasekoitukseen jäi liukenematonta ainetta sonikoinnin ja lämmitettävän magneettisekoittajan jälkeen.

Kaikista näytteistä valmistettiin kolme rinnakkaisnäytettä mukaan lukien emäs- ja happohydrolysoiduista, hydrolysoimattomista HPLC-näytteistä sekä UHPLC-näytteistä.

5.3 Hydrolyysi

Aminohappojen määrittämisessä käytettiin Dain ym. (2014) käyttämää menetelmää hydrolysointiin ja derivatisointiin. Happohydrolyysissä käytettiin 6 M HCl ja emäshydrolyysissä 4,2 M NaOH. Pipetoitiin EAA-näytteistä 100 µl kuuteen ja BCAA-näytteistä kolmeen 10 ml Kimax-lasiputkeen. Valmistettiin lisäksi tyhjä näyte (blank) pipetoimalla sama määrä MQ-vettä. Lisättiin kolmeen pulloon jokaisesta näytteestä mukaan lukien tyhjästä näytteestä 5 ml 6M HCl:ää ja sekoitettiin Vortex-laitteella minuutti. Huuhdeltiin putkien ilmatila tyhjä hapen poistamiseksi, suljettiin teflonvuoratuilla korkeilla ja asetettiin putket esilämmitettyyn uuniin 110 asteeseen 24 tunniksi. Siirrettiin näytteet lasipulloihin ja täytettiin se 50 ml asti Kimax-pullojen huuhteluviedellä.

Toistettiin sama jäljelle jääneille EAA-näytteille käyttäen 4,2 M NaOH tryptofaanin määrittämistä varten. Tehtiin myös blank-näyte. Inkubointi lämpötilassa 105 astetta ja 20 tuntia. Hydrolysoidut näytteet säilytettiin -80°C pakastimessa.

Happohydrolyysin inkubaation aikana yhden näytteen kahdesta vertailunäytteestä haihtui kaikki neste. Saman inkubaation aikana uunin lämpötila oli noussut yön aikana 117 asteeseen (tavoite 110 °C). Pakastetuista hydrolysoiduista näytteistä kolmen pullo (autosampler 4 ml) halkesivat pakastimessa tai lämpimään siirrettäessä. Kaikki haljenneet pullo sisälsivät emäshydrolysoitua näytettä. Näytteet onnistuttiin kuitenkin säilyttämään siirtämällä jäinen näyte Falcon-putkeen ja sieltä pipetillä uuteen autosampler pulloon.

5.4 Derivatisointi

Derivatisointi tehtiin kaikille hydrolyysin näytteelle (ml. blankit). Lisäksi derivatisoitiin kolme rinnakkaisnäytettä jokaisesta tuotteesta ilman hydrolyysiä sekä ulkoinen standardi. Myöhemmin samalla menetelmällä derivatisoitiin vielä hydrolysoimattomat näytteet ja ulkoiset standardit UHPLC:lle.

Valmistettiin boraattipuskuri (0,4 M, pH 10,2), OPA (10 mg/ml boraattipuskurissa + 5 µl/ml 3-MPA) ja FMOC-Cl (5 mg/ml ACN:ssä).

Hydrolysoimattomat näytteet laimennettiin pipetoimalla jokaisesta näytteestä kolmeen koeputkeen 100 µl ja täytetään 55 ml asti MQ vedellä. Lisättiin kutakin näytettä 192 µl 1,5 ml Eppendorf-putkeen ja lisättiin siihen 2 µl norvaliinia (5000 µM) ja 2 µl sarkosiinia (5000 µM). Ulkoisiin standardeihin lisättiin 3 µl sisäisiä standardeja.

Fluoresenssin kesto on lyhyt, joten näytteitä ei voitu valmistaa paljon kerralla. UHPLC-menetelmällä ajoaika on lyhyempi, joten näytteitä voitiin valmistaa hieman enemmän. Valmistettiin HPLC:lle 5-8 ja UHPLC:lle 5-13 näytettä kerralla seuraavassa vaiheessa:

Pipetoitiin 1,5 ml Eppendorf-pulloihin 75 µl boraattipuskuria, 15 µl näytettä (sis. sisäiset standardit), 15 µl OPA, vorteksoitiin 10 s ja odotettiin kaksi minuuttia. Seuraavaksi lisättiin 15 µl FMOC-Cl, vorteksoitiin 10 s ja odotettiin kaksi minuuttia. Lopussa lisättiin vielä 946 µl MQ-vettä ja vorteksoitiin 10 s. Suodatettiin näytteet kertakäyttöruiskulla 0,2 µm RC-ruiskusuodattimen läpi 1,5 ml autosampler-pulloihin. Aloitettiin HPLC-FLD ajo mahdollisimman pian näytteiden valmistuksen jälkeen. Väli venyi kahdella kerralla noin tuntiin laiteongelmien takia.

Valmistettiin lisäksi ulkoiset standardiliuokset ajoihin standardisuoran luomiseksi. Laimennokset tehtiin niin, että näytteiden pitoisuudet mahtuvat suoran välille. Ulkoisista standardeista tryptofaani liuotettiin veteen ja muut 0,1 M HCl:ään. UHPLC- ja HPLC-menetelmille valmistettiin omat ulkoiset standardit standardisuorien muodostamiseksi. Standardit valmistettiin lisäämällä kaikkia analysoitavia aminohappoja (Sigma-Aldrich, L-Amino acids analytical standard, LAA21-1KT) 10 mg (\pm 2 mg) 10 ml:aan MQ-vettä. Pohjaliuoksesta valmisteltiin laimennokset, UHPLC: 1:10–1:6250, HPLC: 1:200–1:1000. Standardeille suoritettiin derivatisointi samalla tavalla, kuin näytteillekin.

5.5 HPLC-FLD

HPLC-menetelmässä käytettiin kolonnivalmistajan ohjetta (Henderson ym. 2000) ja lineaarista gradienttia. Käytössä oli Shimadzu LC-20AD -järjestelmä SIL-20AC-automaattinäytteenottajalla (autosampler) lämpötilassa +4 °C.

Kolonniumunia käytettiin CTO-20AC lämpötilassa +40°C, viestintämoduulina CBM-20A ja detektorina RF-20Axs-fluoresenssidetektor (FLD) (Taulukko 4). Liikkuvan faasin B pitoisuudessa käytettiin lineaarista gradienttia (taulukko 5).

Taulukko 4. HPLC-menetelmän asetukset.

Detektori:	Kanava 1: Ex. 340 nm, Em. 450 nm
	Kanava 2: Ex. 266 nm, Em. 305 nm
Kolonni:	Zorbax Eclipse AAA (4,6 x 150 mm; 3,5 µm).
Liikkuvat faasit:	A: 40 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7,80 ±0,01)
	B: ACN:MeOH:H ₂ O (45:45:10, V:V:V).
Virtausnopeus:	2 ml/min
Injektio-tilavuus:	5 µl

Taulukko 5. Liikkuvan faasin B pitoisuus (%) eri ajankohtina (min) HPLC-menetelmässä.

AIKA (MIN):	LIKKUVAN FAASIN B PITOISUUS (%):
0	0
1,9	0
18,1	57
18,6	100
22,3	100
23,2	0
26	0

5.6 UHPLC-FLD

Näytteet analysoitiin erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografilla (UHPLC) ajoaikojen lyhentämiseksi sekä tulosten vertailun kannalta. UHPLC-menetelmässä käytettiin Kumpulán (2023) opinnäytetyössään käyttämiä asetuksia ja lineaarista gradienttia. LC-laitteistona käytettiin samaa kuin HPLC-menetelmässä, mutta kolonni ja muita asetuksia muutettiin (taulukko 6). Liikkuvan faasin B pitoisuudessa käytettiin lineaarista gradientti (taulukko 7), jota sittemmin myös optimoitiin. Näytteinä käytettiin aiemmin hydrolysoituja ja -80 asteessa säilöttyjä näytteitä sekä hydrolysoimattomia näytteitä. Näytteiden valmistelu tapahtui samoin, kuin HPLC-analyyseissä.

Taulukko 6. UHPLC-menetelmän asetukset.

Detektori:	Kanava 1: Ex. 340 nm, Em. 450 nm Kanava 2: Ex. 266 nm, Em. 305 nm
Kolonni:	AdvanceBio AAA (3,0 x 100 mm, 2,7 µm)
Liikkuvat faasit:	A: 40 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7,80 ±0,01) B: ACN:MeOH:H ₂ O (45:45:10, V:V:V).
Virtausnopeus:	1 ml/min
Injektiotilavuus:	2 µl

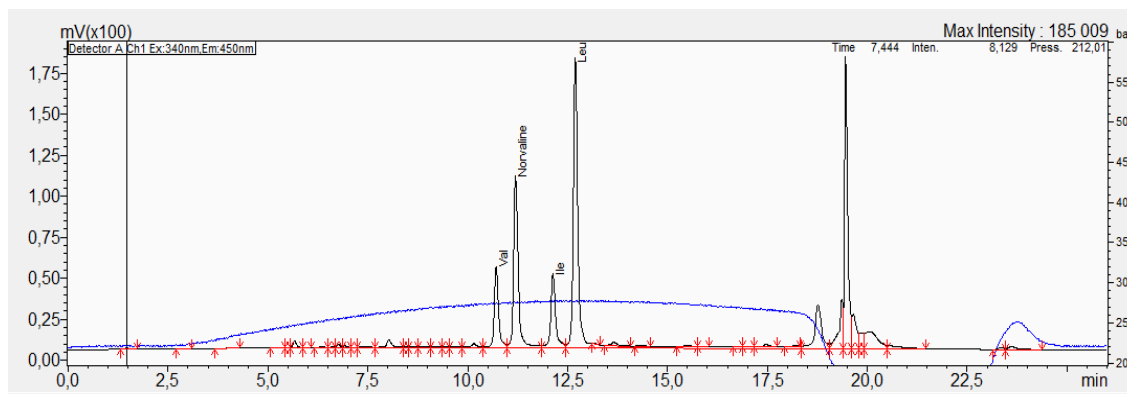
Taulukko 7. Liikkuvan faasin B pitoisuus (%) eri ajankohtina (min) UHPLC-menetelmässä.

AIKA (MIN):	LIKKUVAN FAASIN B PITOISUUS (%):
0,01	0
0,90	0
10,40	57
10,69	100
12,90	100
13,80	0
15,90	0

5.7 Datán analysointi

Käytettyjen HPLC- ja UHPLC-menetelmien käyttöjärjestelmänä tietokoneella toimi LabSolutions-ohjelma (kuva 10). Ohjelmassa käytettiin kahta detektorin kanavaa eri aallonpituuksilla primaaristen ja sekundaaristen aminohappojen tunnistamiseksi ja mittaamiseksi.

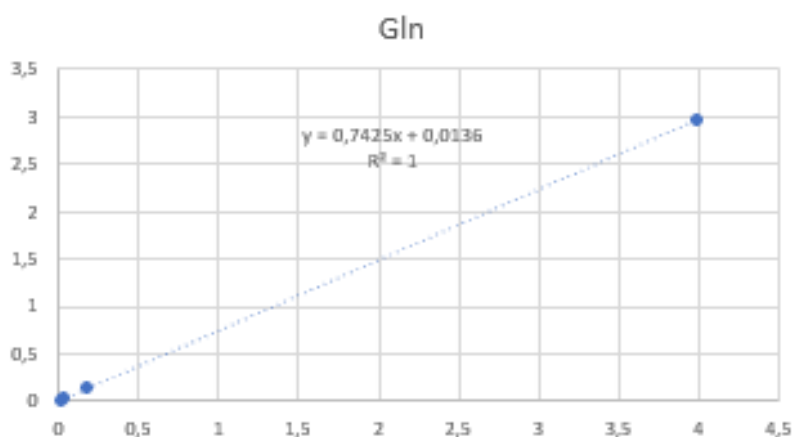
Näyttemateriaalin sisältämien aminohappojen ja työn näkökulman takia sekundaariset aminohapot jätettiin huomiotta, joten sisäinen standardin sarkosiinin, joka on sekundaarinen aminohappo, piikkiä ei analysoitu. Analyyseissä huomioitiin yhdeksän välttämätöntä aminohappoa, sisäinen standardi norvaliini sekä yhden näyttemateriaalin runsaasti sisältämä glutamiini.



Kuva 10. Nocco BCAA näytteen kromatogrammi LabSolutions-ohjelmassa. Aminohappojen piikit tunnistettuna ja nimettynä lyhenteillä Val, valiini; Ile, isoleusiini; Leu, leusiini. Retentioaika X-akselilla.

Piikkien tunnistus tehtiin retentioaikojen avulla. Aikoja ja järjestystä verrattiin aiempiin vastaavalla laitteistolla autenttisilla standardeilla tehtyihin tunnistuksiin. Tunnistuksen jälkeen ylimääräisten piikkien tunnistus ja tiedot poistettiin. Loppujen piikkien pinta-alat ja retentioajat kerättiin taulukkoon ja siirrettiin Excel-taulukko-ohjelmaan. Yhdessä kromatogrammissa oli ajon aikainen paineen heittely aiheuttanut epäselvät piikit ja tämä näyte jätettiin huomiotta. Lisäksi yhdessä ulkoisen standardin kromatogrammissa sisäisen standardin määrä poikkesi paljon muista ja se jätettiin huomioimatta standardisuoran muodostuksessa.

HPLC ja UHPLC standardeista laskettiin laimennoksien ja sisäisen standardin lisäyksen jälkeiset konsentraatiot. Standardeista lysiinin ja histidiinin sisältämät HCl ja kidevesi vähennettiin ennen konsentraatioiden laskemista. Standardisuorien muodostuksessa suhteutettiin kukin standardin aminohappo (STD) sisäiseen standardiin (ISTD) (Kuva 11).



Kuva 11. Glutamiinin standardisuora UHPLC-metodilla. Y-akseli: A(STD) / A(ISTD); X-akseli: C(STD)/C(ISTD). Suoran yhtälössä kulmakerroin 0,7425, vakiotermi 0,0136 ja selitysaste (R^2) 1.

Kunkin aminohapon standardisuorasta saatiin analyyttien pitoisuuden laskemiseen vakiotermi (B) ja kulmakerroin (K). Näytteiden jokaisen aminohapon pinta-alat kromatogrammeilla suhteutettiin kunkin näytteen sisäisen standardin pinta-alaan ($A(\text{näyte}) / A(\text{ISTD})$). Lysiinin pinta-alaan käytettiin kahden lysiini-piikin pinta-alojen summaa, mukaan lukien standardeissa. Tulokset sovitettiin standardisuoralle kaavalla:

$$\frac{\left(\frac{A(\text{Näyte})}{A(\text{ISTD})}\right) * B}{K}$$

Vastaus kerrottiin näytteen sisäisen standardin konsentraatiolla, josta vastauksena saadaan näytteen kunkin aminohapon molaarisuus. Aminohappojen moolimassojen avulla molaarisuus muutettiin yksikköön mg/ml. Hydrolysoituissa näytteissä aminohappojen moolimassasta vähennettiin hydrolyysissä aminohappoihin liittyneen veden moolimassa (18,016 g/mol).

Tuloksista (mg/ml) laskettiin alkuperäisen nestemäisen näytteen konsentraatio laskemalla kaikki näytteiden valmistelun laimennokset ja kertomalla niiden käänteisluvulla saatu tulos. Näyttemateriaaleista BCAA juomien lopullinen konsentraatio saatiin muuttamalla mg/ml yksikköön mg/330 ml, kuten valmistajakin konsentraation ilmoittaa. Juomajauheissa laskettiin alkuperäisen jauheen konsentraatio muuttamalla tulos muotoon mg/g. Lopussa vertailunäytteiden tuloksista laskettiin keskiarvot. Rinnakkaisnäytteiden tuloksista ja keskiarvosta laskettiin variaatioluku, joka kuvaa vaihtelua keskiarvoon prosentteina (taulukko 8).

Taulukko 8. Tutkittujen aminohappojen variaatiokertoimet tuotteiden rinnakkaisnäytteistä eri menetelmillä. Aminohapot ovat His, histidiini; Tre, treoniini; Val, valiini; Met, metioniini; Trp, tryptofaani; Phe, fenyyialaniini; Ile, isoleusiini; Leu, leusiini; Lys, lysiini.

	HIS	TRE	VAL	MET	TRP	PHE	ILE	LEU	LYS
PIRKKA									
HPLC HYDROLYSOITU			10,6 %				11,0 %	22,8 %	
HPLC HYDROLYSOIMATON			7,0 %				7,1 %	10,2 %	
UHPLC			1,1 %				2,8 %	0,4 %	
NOCCO									
HPLC HYDROLYSOITU			12,1 %				8,3 %	4,0 %	
HPLC HYDROLYSOIMATON			10,1 %				9,8 %	9,7 %	
UHPLC			0,8 %				1,0 %	0,5 %	
LEADER									
HPLC HYDROLYSOITU					23,2 %				
HPLC HYDROLYSOIMATON	11,2 %	11,1 %	5,6 %	3,7 %	8,3 %	4,9 %	5,9 %	5,9 %	27,8 %
UHPLC	8,3 %	0,8 %	0,6 %	5,9 %	77,7 %	0,4 %	3,7 %	0,7 %	5,4 %
PTVLABS									
HPLC HYDROLYSOITU	23,4 %	10,7 %	13,1 %	25,6 %		10,7 %	15,4 %	9,8 %	41,4 %
HPLC HYDROLYSOIMATON	6,7 %	9,9 %	7,8 %	2,6 %	0,8 %	2,5 %	4,7 %	1,4 %	10,0 %
UHPLC	3,4 %	1,6 %	0,9 %	0,8 %	54,5 %	0,9 %	1,5 %	0,6 %	6,2 %

6 Tulokset ja tulosten tarkastelu

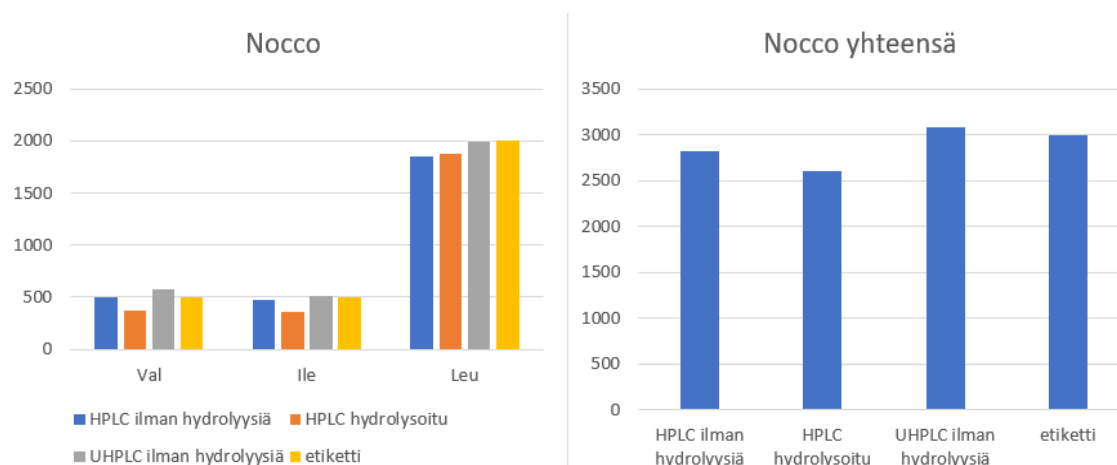
Valmistajien ilmoittamat aminohappopitoisuudet lisättiin Excel-ohjelmaan. Jokaisen aminohapon tuloksia eri analyysimenetelmillä verrattiin valmistajan ilmoittamiin tietoihin laskemalla saadun tuloksen osuus ilmoitetusta prosentteina:

$$\frac{C(\text{analyysi})}{C(\text{valmistaja})} * 100\%$$

Lisäksi laskettiin aminohappojen yhteismäärän ero prosentteina. Kunkin analyysimenetelmän eri aminohappojen prosentuaalisista eroista laskettiin myös keskiarvo.

6.1 Nocco

Noccon tuotteessa tulokset ovat kaikista lähimpänä valmistajan ilmoittamia konsentraatioita. Keskiarvallisesti tuloksissa saatujen konsentraatioiden osuus valmistajan ilmoittamista olivat UHPLC-menetelmässä 105,7 % eli enemmän kuin valmistajan ilmoittama, HPLC-menetelmässä ilman hydrolyysiä 95,2 % ja hydrolysoiduissa 79,8 % (kuva 12 ja taulukko 9). Hydrolysoitujen näytteiden aminohappokonsentraatiot olivat siis muiden tapaan matalampia kuin hydrolysoimattomissa. Aminohappojen yhteenlaskettujen konsentraatioiden osuudet valmistajan ilmoittamista olivat lähes samat, lukuun ottamatta hydrolysoituja HPLC näytteitä. Hydrolysoiduissa yhteenlaskettu konsentraatio oli 87,0 % eli yli 7 % enemmän kuin konsentraatioiden keskiarvo. Eron aiheuttaa leusiini, jonka osuus valmistajan ilmoittamasta on hydrolysoidussa näytteessä 94,1 % eli poikkeuksellisen suuri. Loppujen yhteenlaskettujen konsentraatioiden suhde valmistajan ilmoittamaan oli UHPLC:llä 102,5 % ja HPLC:llä ilman hydrolyysiä 93,9 %.



Kuva 12. Vasemmalla pylväskaaviossa Noccon tuotteen aminohappojen konsentraatiot jokaisella analyysimenetelmällä. Vertailukohtana keltaisella pohjalla valmistajan ilmoittama konsentraatio (etiketti). Kuvassa oikealla aminohappojen konsentraatiot yhteensä eri analyysimenetelmillä verrattuna valmistajan ilmoittamaan (etiketti). Kaaviossa yksikkönä mg / 330 ml. (Kaavio luotu Excel-taulukko-ohjelmassa).

Taulukko 9. Noccon eri aminohappojen konsentraatioiden prosenttiosuudet valmistajan ilmoittamasta.

	HPLC HYDROLYSOIMATON	HPLC HYDROLYSOITU	UHPLC HYDROLYSOIMATON
VALIINI:	98,6 %	73,1 %	114,4 %
ISOLEUSIINI:	94,6 %	72,4 %	103,3 %
LEUSIINI:	92,5 %	94,1 %	99,4 %
YHTEENSÄ:*	93,9 %	87,0 %	102,5 %
KESKIARVO:**	95,2 %	79,8 %	105,7 %
KESKIHAJONTA***	2,5 %	10,1 %	6,4 %

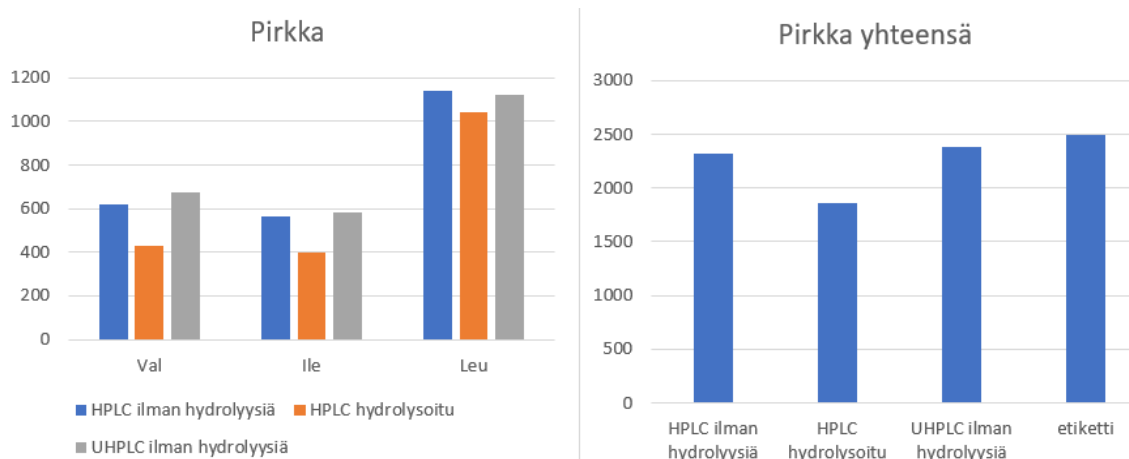
*Aminohappojen kokonaispitoisuus suhteessa valmistajan ilmoittamaan.

**Yksittäisten aminohappojen keskiarvoinen suhde valmistajan ilmoittamaan.

***Keskihajonta yksittäisten aminohappojen suhteesta valmistajan ilmoittamaan.

6.2 Pirkka

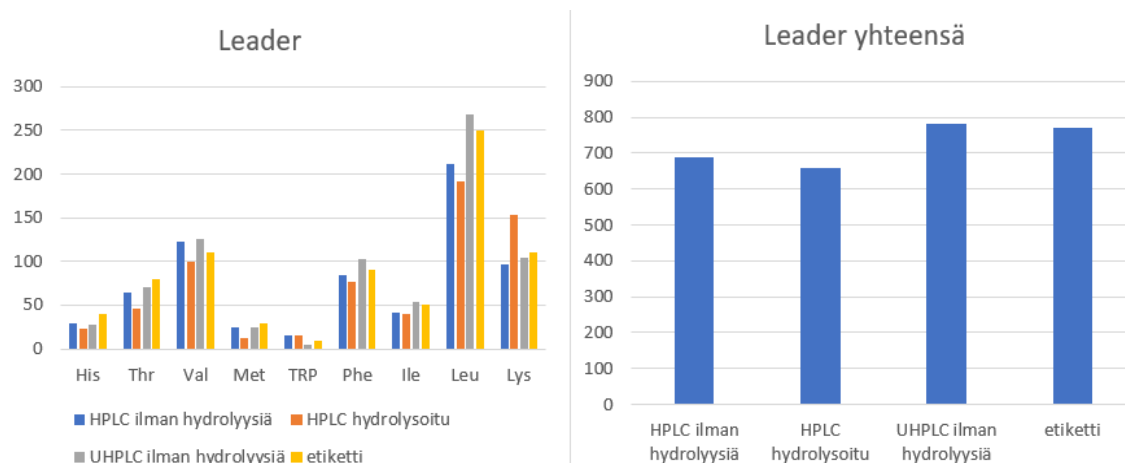
Pirkan tuotteen aminohappojakaumaa ei löytynyt valmistajan ilmoittamana, joten vertailu etikettiin on tehty vain aminohappojen kokonaismäärän suhteen. Tuloksissa aminohappojen konsentraatioiden yhteenlaskettu osuus valmistajan ilmoittamasta oli UHPLC-menetelmällä 95,1 %, HPLC-menetelmällä ilman hydrolyysiä 93,0 % ja hydrolysoidulla 74,6 % (kuva 13). Hydrolysoitujen näytteiden aminohappopitoisuudet olivat selvästi muita menetelmiä matalampia.



Kuva 13. Vasemmalla pylväskaaviossa Pirkan tuotteen aminohappojen konsentraatiot jokaisella analysimenetelmällä. Kuvassa oikealla aminohappojen konsentraatiot yhteensä eri analysimenetelmillä verrattuna valmistajan ilmoittamaan (etiketti). Kaaviossa yksikkönä mg/330 ml. (Kaavio luotu Excel-taulukko-ohjelmassa).

6.3 Leader

Leaderin juomajauheessa keskiarvoinen konsentraatio oli sekä HPLC-menetelmällä ilman hydrolyysiä että UHPLC-menetelmällä suhteellisen lähellä valmistajan ilmoittamia. Aminohappojen keskiarvoinen konsentraatio oli UHPLC-menetelmällä 92,5 %, HPLC-menetelmällä ilman hydrolyysiä 94,7 % ja hydrolysoinnilla 86,3 % (Kuva 14 ja taulukko 10). Hydrolysoitujen näytteiden konsentraatiot olivat siis muiden tuotteiden tapaan pienempiä. Toisaalta HPLC:llä ilman hydrolyysiä saatu keskiarvo on korkeampi, kuin UHPLC-menetelmällä, vaikka aminohappojen yhteenlaskettu konsentraatio suhteessa valmistajan ilmoittamaan HPLC-menetelmällä onkin noin 11 % pienempi. Poikkeuksen aiheuttaa pääosin tryptofaani, jonka konsentraatiot ovat suurempia kummallakin HPLC-menetelmällä kuin UHPLC:llä. Yhteenlaskettujen konsentraatioiden suhde valmistajan ilmoittamaan yhteiskonsentraatioon on UHPLC-menetelmällä 101,7 %, HPLC:llä ilman hydrolyysiä 89,5 % ja hydrolysoituna 85,6 %.



Kuva 14. Vasemmalla pylväskaaviossa Leaderin tuotteen aminohappojen konsentraatiot jokaisella analyysimenetelmällä. Vertailukohtana keltaisella pohjalla valmistajan ilmoittama konsentraatio (etiketti). Kuvassa oikealla aminohappojen konsentraatiot yhteensä eri analyysimenetelmillä verrattuna valmistajan ilmoittamaan (etiketti). Kaavio luotu Excel-taulukko-ohjelmassa.

Taulukko 10. Leaderin eri aminohappojen konsentraatioiden prosenttiosuudet valmistajan ilmoittamasta.

	HPLC HYDROLYSOIMATON	HPLC HYDROLYSOITU	UHPLC HYDROLYSOIMATON
HISTIDIINI:	71,4 %	59,0 %	68,1 %
TREONIINI:	79,7 %	58,4 %	88,5 %
VALIINI:	111,8 %	90,9 %	114,8 %
METIONIINI:	82,3 %	39,9 %	82,5 %
TRYPTOFAANI:	159,9 %	148,0 %	54,8 %
FENYLYLALANIINI:	93,0 %	84,9 %	113,8 %
ISOLEUSIINI:	81,7 %	79,2 %	107,6 %
LEUSIINI:	84,9 %	76,8 %	107,1 %
LYSIINI:	87,5 %	139,9 %	95,5 %
YHTEENSÄ:*	89,5 %	85,6 %	101,7 %
KESKIARVO:**	94,7 %	86,3 %	92,5 %
KESKIHAJONTA***	25,4 %	34,2 %	19,8 %

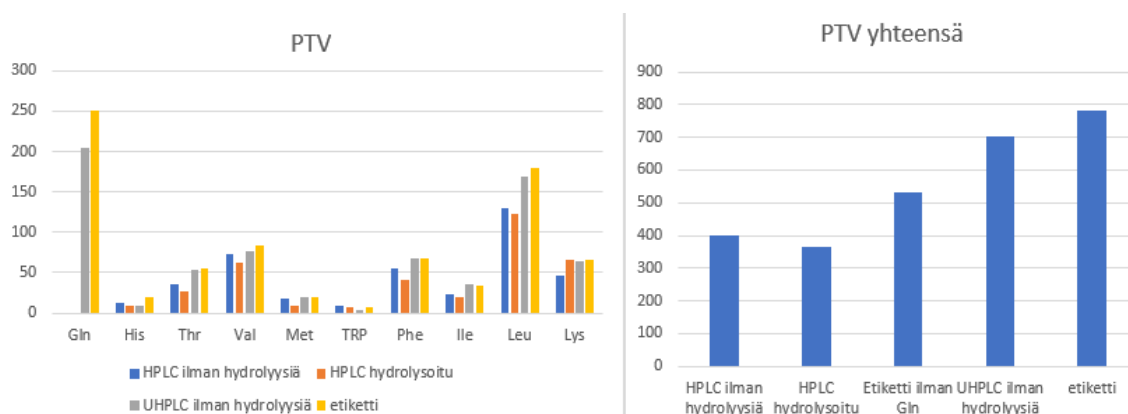
*Aminohappojen kokonaispitoisuus suhteessa valmistajan ilmoittamaan.

**Yksittäisten aminohappojen keskiarvoinen suhde valmistajan ilmoittamaan.

***Keskihajonta yksittäisten aminohappojen suhteesta valmistajan ilmoittamaan.

6.4 PTVLABS

PTVLABS:n sisältämä glutamiini päätettiin analysoida vasta HPLC-menetelmän jälkeen ja vasta UHPLC:n ulkoiseen standardiin lisättiin glutamiini, joten sen määrä on laskettu vain UHPLC-menetelmässä. Yhteistuloksissa HPLC:n vertailussa valmistajan ilmoittamista tiedoista on vähennetty glutamiini. UHPLC-menetelmällä aminohappojen keskiarvoinen konsentraatio oli 85,4 %, HPLC:llä ilman hydrolyysiä 78,4 % ja hydrolysoituna 67,6 % (Kuva 15 ja taulukko 11). Leaderin tuotteen tulosten tapaan PTVLABS:n tuloksissa tryptofaani aiheuttaa poikkeamaa, koska sen konsentraatiot ovat reilusti suurempia HPLC-menetelmillä, kuin UHPLC:llä. Aminohappojen konsentraatioiden summa PTVLABS:n juomajauheessa suhteessa valmistajan ilmoittamaan oli UHPLC-menetelmällä 90,0 %, HPLC:llä ilman hydrolyysiä 75,6 % ja hydrolysoituna 68,8 %. Näyteliuoksessa oli liukenematonta materiaalia, joka ei liennut sonikoinnilla, lämmityksellä tai sekoittamisella. Materiaalin liukenemista derivatisoinnin aikana ei tutkittu, joten on mahdollista, että aine jäi RC-suodattimeen. Mikäli liukenematon aine sisälsi aminohappoja, vaikutti se tuloksiin.



Kuva 15. Vasemmalla pylväskaaviossa PTVLABS:n tuotteen aminohappojen konsentraatiot jokaisella analyysimenetelmällä. Vertailukohtana keltaisella pohjalla valmistajan ilmoittama konsentraatio (etiketti). Kuvassa oikealla aminohappojen konsentraatiot yhteensä eri analyysimenetelmillä verrattuna valmistajan ilmoittamaan (etiketti). Valmistajan ilmoittama tieto myös glutamiini vähennettynä HPLC-menetelmien vertailtavuuden takia. Kaaviossa yksikkönä mg/g. (Kaavio luotu Excel-tilaukko-ohjelmassa).

Taulukko 11. PTVLABS:n eri aminohappojen konsentraatioiden prosenttiosuudet valmistajan ilmoittamasta.

	HPLC HYDROLYSOIMA- TON	HPLC HYDROLYSOITU	UHPLC HYDROLYSOIMATON
GLUTAMIINI:*			82,0 %
HISTIDIINI:	62,8 %	48,4 %	44,8 %
TREONIINI:	65,0 %	48,9 %	97,7 %
VALIINI:	88,0 %	75,1 %	92,6 %
METIONIINI:	90,3 %	43,3 %	102,0 %
TRYPTOFAANI:	108,7 %	99,6 %	37,1 %
FENYYLIalaniini:	82,2 %	60,7 %	99,1 %
ISOLEUSIINI:	68,7 %	60,6 %	105,5 %
LEUSIINI:	71,7 %	68,3 %	94,2 %
LYSIINI:	71,5 %	102,1 %	99,1 %
YHTEENSÄ:**	75,6 %	68,8 %	90,0 %
KESKIARVO:***	78,4 %	67,6 %	85,4 %
KESKIHAJONTA:****	14,0 %	20,2 %	23,1 %

*glutamiini ei kuulu välttämättömiin aminohappoihin, mutta PTVLABS:n näyte sisälsi myös sitä. glutamiini lisättiin ulkoiseen standardiin UHPLC-menetelmässä.

**Aminohappojen kokonaispitoisuus suhteessa valmistajan ilmoittamaan.

***Yksittäisten aminohappojen keskiarvollinen suhde valmistajan ilmoittamaan.

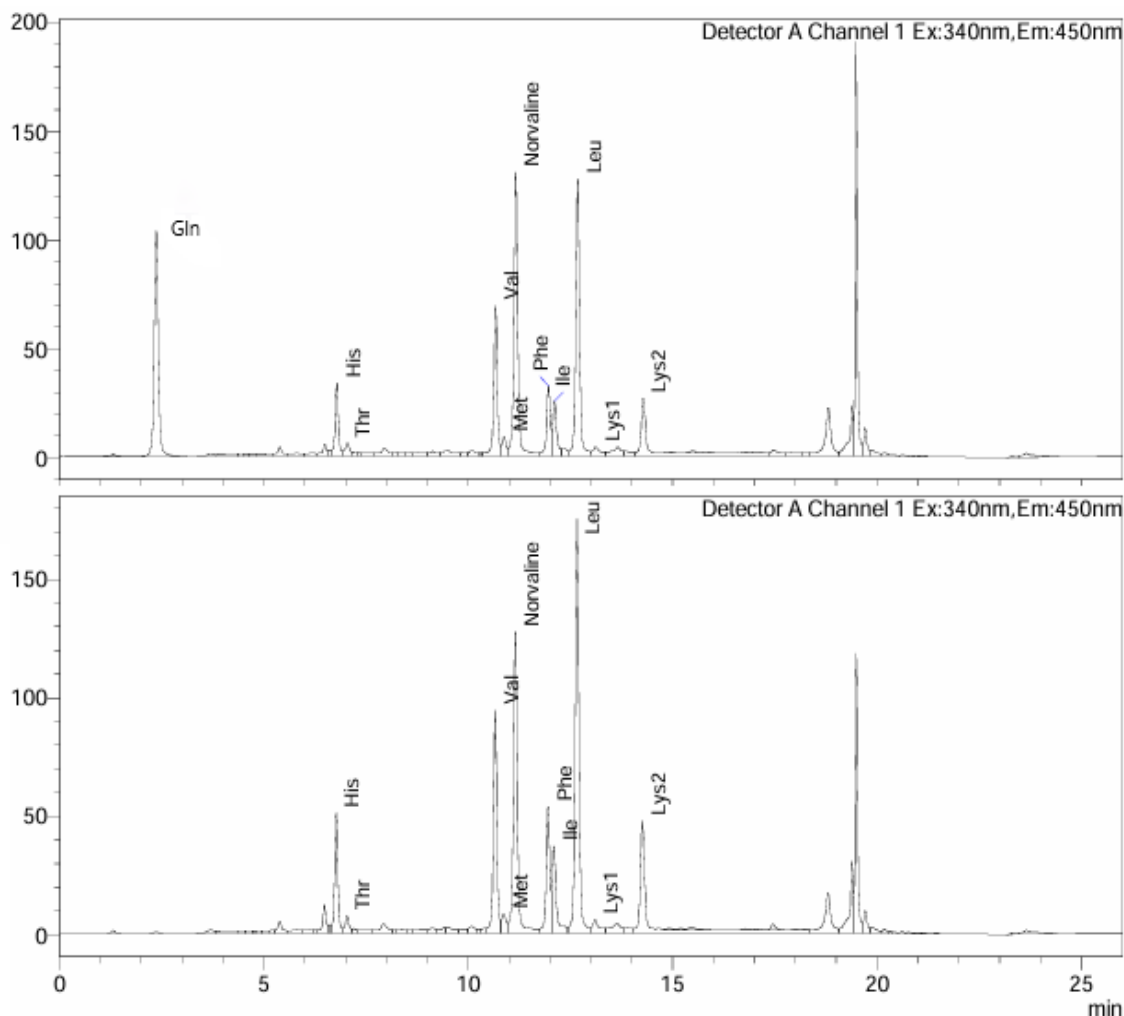
****Keskiahajonta yksittäisten aminohappojen suhteesta valmistajan ilmoittamaan.

6.5 Tulosten vertailu

Analyysimenetelmillä on yhteisiä vaikutuksia riippumatta analysoitavasta näytteestä. UHPLC-menetelmällä ilman hydrolyysia saadut tulokset eli konsentraatiot ovat pääasiassa suurempia kuin muilla menetelmillä, mikä on yllättävää, sillä tulokset on korjattu sisäisten standardien avulla. Toisaalta HPLC-menetelmällä hydrolysoitujen konsentraatiot ovat pääosin pienempiä kuin hydrolysoimattomilla. Poikkeuksia ovat tryptofaani, lysini ja histidiini. Tryptofaanin tulokset olivat korkeampia molemmilla HPLC-menetelmillä kuin UHPLC:llä, toisin kuin millään muulla aminohapolla. PTVLABS:n juomajauheen tuloksissa tryptofaania oli UHPLC-menetelmällä 37,1 % suhteessa valmistajan ilmoittamaan, mutta HPLC:llä ilman hydrolyysia 108,7 % ja hydrolysoituna 99,6 % (taulukko 11). Toisaalta myös Leaderin tuloksissa ilmenee sama vaikutus; UHPLC-menetelmällä 54,8 %, mutta HPLC:llä ilman hydrolyysia 159,9 % ja hydrolysoituna 148,0 % (taulukko 10).

Lisäksi histidiinin tulokset menevät samaan suuntaa, joskin pienemmillä eroilla. Histidiinin vastaavat osuudet valmistajan ilmoittamiin olivat PTVLABS:n näytteissä 44,8 %, 62,8 % ja 48,4 % (UHPLC, HPLC hydrolysoimaton ja HPLC hydrolysoitu) sekä Leaderin näytteissä 68,1 %, 71,4 % ja 59,0 % (UHPLC, HPLC hydrolysoimaton ja HPLC hydrolysoitu). Tuloksissa tulee huomioida lisäksi hydrolysoinnin konsentraatioita alentava vaikutus. Histidiinin ja etenkin tryptofaanin korkeammille pitoisuuksille HPLC-menetelmän tuloksissa voi vaikuttaa menetelmän korkeampi paine kuin HPLC:ssä ja vaihdetun kolonnin kiinteän faasin vuorovaikutukset, mutta varmuutta ei ole. Toisaalta UHPLC-menetelmä erosi HPLC:stä ainoastaan paineen, virtausnopeuden, injektioilavuuden ja kolonnin osalta. Paine oli UHPLC:ssä noin 100 bar korkeampi kuin HPLC-menetelmässä.

Lysiini taas poikkeaa muista, sillä sen pitoisuus on huomattavasti suurempi hydrolysoituna HPLC:llä kuin muilla menetelmillä. Muilla aminohapoilla hydrolysointi aiheuttaa selkeän konsentraation laskun, joka voi johtua hydrolysoinnin hajottavasta vaikutuksesta jo ennalta vapaisiin aminohappoihin. Hydrolysoinnin tarkoituksena on katkaista peptidisidoksia ja vapauttaa aminohapot proteiineista sitoutuneista muodoista. Lysiini jakautuu analyysissä käytetyllä nestekromatografi-menetelmällä kahteen, jotka on nimetty lysiini 1 ja lysiini 2 (kuva 16). Kahden lysiinin retentioaikojen välillä on noin 1,5 minuuttia ja jälkimmäinen (lysiini 2) on yleensä suurempi. Tuloksissa lysiinin pinta-alana kromatogrammilla käytettiin kahden piikin pinta-alojen summaa. Lysiinin jakautuminen kahteen piikkiin voi johtua protonaatiotiloista. Lysiinillä on kaksi emäksistä aminoryhmää ja yksi happoinen karboksyyli-ryhmä. Erilaisissa pH-olosuhteissa nämä ryhmät voivat protonoitua tai deprotonoitua, mikä vaikuttaa molekyylin nettovaraukseen ja siten sen vuorovaikutuksiin kromatografian faasien kanssa. Protonoituminen tarkoittaa, että ryhmä vastaanottaa uuden protonin (esim. $\text{NH}_2 \rightarrow \text{NH}_3^+$) ja deprotonoitumisessa protoni luovutetaan. Neutraalissa pH:ssa lysiini voi esiintyä zwitterionimuodossa tai osittain protonoituneessa muodossa. Zwitterionimuodossa molekyyli on tasapainotilassa, sillä sen aminoryhmä on protonoitunut ja karboksyyli-ryhmä deprotonoitunut. Osittain protonoituneessa tilassa protonoituminen tai deprotonoituminen on tapahtunut vain osalle ryhmistä, jonka johdosta molekyyli ei ole neutraali tai zwitterioni. (Stagi ym. 2022.)



Kuva 16. Kuvakaappaus LabSolutions-ohjelmasta. Yllä PTVLABS:n ja alla Leaderin yhden hydrolysoidun HPLC-näytteen kromatogrammi. Analysoitavien aminohappojen piikit nimetty lyhenteillä. Sisäisen standardin norvaliinin piikki myös nimettynä keskellä. Kummassakin kromatogrammissa näkyy lysiinin kaksi piikkiä.

6.6 Kasviproteiinit, aminohappolisät ja WHO:n suositukset

WHO on aiemmin mainitulla tavalla antanut suosituksensa ihmisille suotuisasta proteiinien aminohappoprofilista. Osuus proteiinista ja suositus päivittäisestä saannista yhdeksän välttämättömän aminohapon eli EAA aminohappojen osalta löytyvät kappaleesta 2.2 (taulukko 1).

Turun yliopiston elintarvikekemian linjalla aiemmin tehdyssä Pro gradu -tutkielmassa on analysoitu kasviproteiininlähteiden aminohappoprofileita samalla UHPLC-menetelmällä kuin tässä tutkimuksessa. Kasviproteiinit ovat kiistelty aihe kasvispainotteisen ruokavalion yleistyessä.

Etenkin niiden proteiinipitoisuus ja aminohappoprofiili verrattuna eläinperäisiin lähteisiin ovat olleet paljon esillä. Lisäravinteet ja kasvispainotteinen ruokavalio kuuluvat monen arkeen, joten aminohappolisien ja kasviproteiinien aminohappojen vertailu WHO:n suosituksiin sekä toisiinsa on mahdollisesti ajankohtainen aihe.

Kumpulan (2023) Pro gradu -tutkielmassa analysoitiin useiden kasviproteiinilähteiden aminohappoprofiilit ja niistä soijasuikaleiden sekä tofun tulokset on otettu vertailtavaksi tässä tutkimuksessa analysoitujen EAA-tuotteiden aminohappoprofiilien kanssa. BCAA-tuotteet sisältävät vain kolmea välttämätöntä aminohappoa, joten niitä ei otettu mukaan vertailuun. Vertailussa käytettyjen Leaderin ja PTVLABS:n aminohappoprofiilit perustuvat tässä tutkielmassa tehtyyn UHPLC-menetelmän aminohappoanalyysiin, jonka tulokset olivat lähimpänä valmistajan ilmoittamia.

WHO:n suositukset on tehty ihmissolujen tarpeiden mukaan. Proteiinisynteesi vaatii toimiakseen kaikkia aminohappoja, joten yhdenkin loppuminen johtaa proteiinisynteesin keskeytymiseen. Mitä matalampi aminohapon osuus on suhteessa suositukseen, sitä aiemmin se loppuu kesken. Proteiini- tai aminohappolähteen rajoittava aminohappo on se aminohappo, jonka osuus suhteessa suositukseen on pienin. Keskiarvallisesti soijan ja tofun aminohappoprofiilit ovat lähempänä WHO:n suosituksia kuin aminohappolisäravinteiden (taulukko 13). Toisaalta leusiinia, jota pidetään avaintekijänä, kasviproteiineissa on vähemmän, mutta kuitenkin yli suositusten. Histidiiniä ja metioniinia on kaikissa tuotteissa merkittävästi suosituksia vähemmän. Metioniini onkin nimetty Mutasen ym. (2021) kirjassa tofun rajoittavaksi aminohapoksi. Toisaalta tuloksien perusteella tofussa metioniinia oli vertailussa käytetyistä tuotteista eniten, joten se vaikuttaa olevan yksi rajoittavista tekijöistä myös muissa tuotteissa. Treoniini ja valiini on ainoat aminohapot, joita vaikuttaa olevan aminohappolisissä yli suositeltujen arvojen samalla kun kasviproteiineissa alle. Toisaalta isoleusiinia ja tryptofaania vaikuttaa kasviproteiineissa olevan yli suositusten samalla kun aminohappolisissä alle.

Lisäksi lysiiniä on kasviproteiineissa lähes suositusten verran, kun taas aminohappolisissä alle suositusten. Fenyylialaniinia on muissa lähes suositusten verran, mutta tofussa alle suositusten. Muissa aminohapoissa kasviproteiineilla keskenään ja aminohappolisillä keskenään on samanlaiset tulokset eli alle, yli tai suositusten verran ($\pm 5\%$).

Leaderin ja PTVLABS:n tuotteiden rajoittava aminohappo on tryptofaani, kun taas soijasuikaleiden ja tofun metioniini (taulukko 12 ja 13). Toisten aminohappojen ylimäärä ei vaikuta tutkimuksien perusteella auttavan proteiinisynteesin jatkumiseen, joten ne jäävät käyttämättä proteiinisynteesissä. Aminohappoja ei myöskään varastoida, joten ylimääräisiä aminohappoja ei voida hyödyntää myöhemminkään. Esimerkiksi Leaderin ja PTVLABS:n tuotteissa ylimäärin olevasta leusiinista ei aiempien tutkimuksien perusteella saada hyötyä, koska metioniinin puute rajoittaa proteiinisynteesiä.

Taulukko 12. Aminohappojen prosenttiosuudet kaikista välttämättömistä aminohapoista (EAA) tuotteittain.

	WHO:N SUOSITUS*	LEADER	PTVLABS	SOIJASUIKALE	TOFU
HISTIDIINI:	5,42 %	3,48 %	1,80 %	2,90 %	3,29 %
TREONIINI:	8,30 %	9,04 %	10,77 %	7,25 %	5,92 %
VALIINI:	14,08 %	16,12 %	15,40 %	13,77 %	12,50 %
METIONIINI:	7,94 %	3,16 %	4,09 %	2,90 %	4,61 %
TRYPTOFAANI:	2,17 %	0,70 %	0,59 %	2,90 %	4,61 %
FENYYLIALANIINI:	13,72 %	13,07 %	13,50 %	12,56 %	11,18 %
ISOLEUSIINI:	10,83 %	6,87 %	6,97 %	17,87 %	19,08 %
LEUSIINI:	21,30 %	34,17 %	33,98 %	24,15 %	22,37 %
LYSIINI:	16,25 %	13,40 %	12,90 %	15,70 %	16,45 %

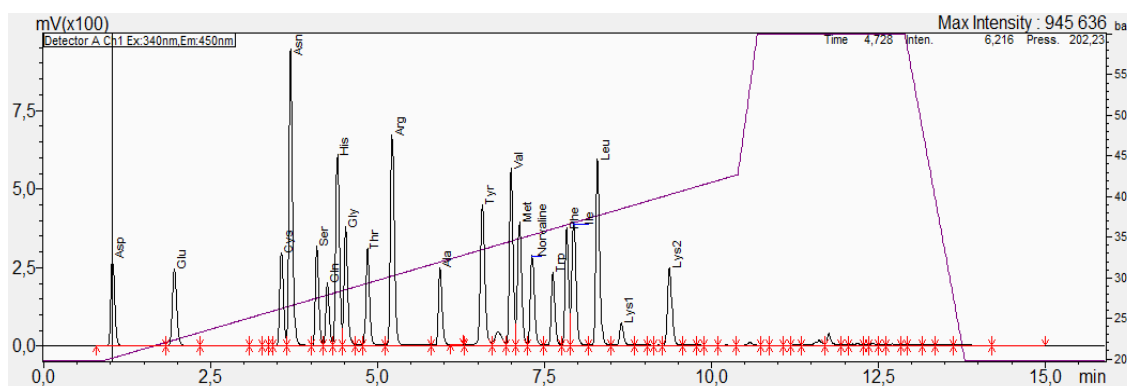
*WHO:n suosituksen mukaiset aminohappojen prosenttiosuudet kaikista välttämättömistä aminohapoista.

Taulukko 13. Taulukon 12 tuotteiden aminohappojakaumat suhteessa WHO:n suositukseen prosentteina. Rajoittavan aminohapon prosenttiosuus lihavoituna.

	LEADER	PTVLABS	SOIJASUIKALE	TOFU
HISTIDIINI:	64,25 %	33,15 %	53,53 %	60,75 %
TREONIINI:	108,84 %	129,71 %	87,27 %	71,31 %
VALIINI:	114,47 %	109,35 %	97,79 %	88,78 %
METIONIINI:	39,79 %	51,49 %	36,50 %	57,98 %
TRYPTOFAANI:	32,32 %	27,42 %	133,82 %	212,61 %
FENYYLIALANIINI:	95,27 %	98,40 %	91,56 %	81,53 %
ISOLEUSIINI:	63,40 %	64,39 %	165,04 %	176,16 %
LEUSIINI:	160,42 %	159,54 %	113,40 %	105,02 %
LYSIINI:	82,51 %	79,42 %	96,65 %	101,24 %
KESKIARVO:	84,58 %	83,65 %	97,28 %	106,15 %
KESKIHAJONTA:	37,93 %	42,02 %	36,41 %	50,29 %

6.7 UHPLC-menetelmä aminohappoanalyyseissä

Tutkimuksessa määriteltiin aminohappolisien aminohappopitoisuudet HPLC- ja UHPLC-menetelmillä. Menetelmä soveltui hyvin tutkimuksessa määritetyille aminohapoille, mutta menetelmää päätettiin pyrkiä kehittämään yleissoveltuvammaksi kaikille aminohapoille. Käytetty UHPLC-menetelmä on vähän käytetty ja testattu, joten pidettiin mahdollisena, että sen olosuhteissa voi olla vielä mahdollisuuksia optimoinnille aminohappojen määrittämistä varten. Menetelmän optimointia tehtiin muokkaamalla liikkuvan faasin B gradienttia (taulukko 7). Alkuperäinen gradientti oli lineaarinen nousun nollasta 57 prosenttiin välillä 0-11 minuuttia, jonka jälkeen 1,5 minuutiksi 100 prosenttiin ja lopuksi nolnaan kokonaisajoajalla 15,9 min (kuva 17). Näillä asetuksilla kaikki aminohappojen piikit erottuivat, mutta osa piikeistä oli hieman päällekkäin.



Kuva 17. UHPLC-kromatogrammi aminohappostandardien ajosta. Kuvassa piikit tunnistettuna ja nimettyinä kullekin aminohapolle. Violetti viiva kuvaa liikkuvan faasin B konsentraatiota välillä 0-100 % suhteessa x-akselin aikaan 0-15,9 min.

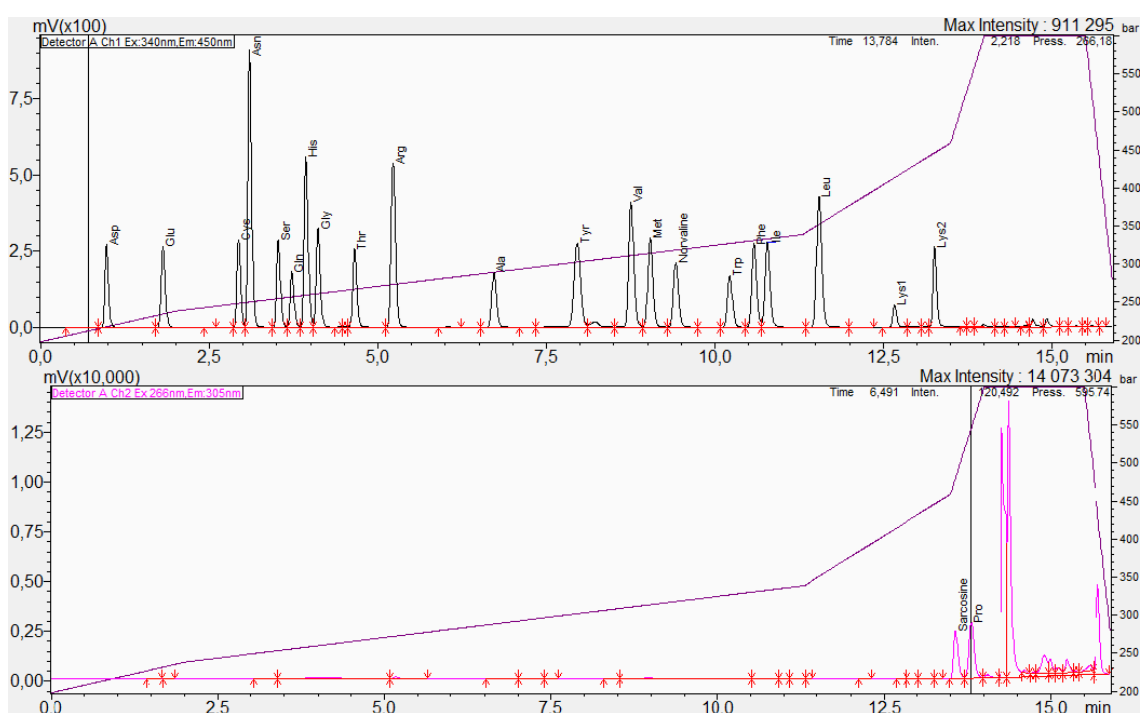
Alussa kokeiltiin konsentraation lineaarisen gradientin yläpään nostamista 70 prosenttiin, jolloin huomattiin sen vaikuttavan negatiivisesti piikkien erottumiseen ja aikaistavan aminohappojen eluoitumista. Seuraavaksi gradientin yläpäää laskettiin 35 prosenttiin, jolloin huomattiin sen parantavan piikkien erottumista, mutta hidastavan liikaa eluoitumista siirtäen viimeiset piikit 100 prosentin alueelle. Tällöin taas ajon loppuosan piikit eivät enää erottuneet, koska ne eluoituivat liian suurella liikkuvan faasin B konsentraatiolla.

Koska alhaisempi liikkuvan faasin B konsentraatio vaikutti parantavan piikkien erottumista, lähdettiin kehittämään tätä menetelmää. Lineaarisen gradientin yläpäää päätettiin pitää 35 prosentissa, mutta lisätä alkuun jyrkempi nousu 10 prosenttiin asti ajassa 2,0 min eluoitumisen aikaistamiseksi.

Lisäksi konsentraation nousu 35 prosenttiin siirrettiin aikaan 12,5 min ja 100 prosenttiin 13,5 min. Edellä mainituilla asetuksilla A detektorin piikeistä kaikki erottuivat hyvin, vaikka lysiini eluoitui 100 prosentin alueella. Kuitenkin B detektorin piikit sarkosiini ja proliini eivät erottuneet liian myöhäisen eluoitumisen takia. Täten ajoaikaa pidennettiin yhdellä minuutilla ja lisättiin gradienttiin uusi välivaihe. Välivaiheessa 35 prosentin saavutus aikaistettiin aikaan 11,3 min, lisättiin lineaarisen välivaiheen yläpää 65 prosenttiin aikaan 13,5 min ja 100 prosentin saavutus aikaan 14 min (taulukko 14). Näillä asetuksilla aiemmin hyvin erottuvaksi saadut A detektorin piikit eivät kärsineet ja niiden erottuminen pysyi hyvänä. Lisäksi B detektorin sarkosiini- ja proliinipiikit erottuivat hyvin (kuva 18).

Taulukko 14. Liikkuvan faasin B pitoisuus optimoidussa UHPLC-menetelmässä.

AIKA (MIN)	LIKKUVAN FAASIN B PITOISUUS:
0	0 %
2,0	10 %
11,3	35 %
13,5	65 %
14,0	100 %
15,5	100 %
16,0	0 %



Kuva 18. Optimoidut UHPLC kromatogrammit. Ylhäällä A detektorin ja alhaalla B detektorin kromatogrammi. Piikit tunnistettu ja nimetty kunkin aminohapon lyhenteellä. Violetilla käyrällä B liikkuvan faasin B konsentraatiot välillä 0-100 %.

6.8 Mahdolliset virheiden aiheuttajat

Tuloksissa mahdolliset vääristymät tai vihreiden aiheuttajat tulee ottaa huomioon. HPLC-analyysimenetelmä on useasti käytetty ja optimoitu proteiinien aminohappojen määrittämiseen. UHPLC-menetelmä on vähemmän käytetty, mutta konsentraatiot määritettiin sisäisten ja ulkoisten standardien avulla. Toisaalta hydrolysointi voi mahdollisesti tuhota jo ennestään vapaita aminohappoja, mihin viittaavat myös hydrolysoitujen näytteiden tulokset.

UHPLC:n ja HPLC:n tuloksien erojen selittävä tekijä on epäselvä. Molempien menetelmien ulkoisissa standardeissa käytettiin samaa pohjaliuosta, mutta eri laimennoksia. Pohjaliuos ei siis ole erojen selittävä tekijä, mutta laimennoksien avulla muodostettu standardisuora voi mahdollisesti vaikuttaa tuloksiin. UHPLC-menetelmässä laimennossuora oli laajempi 1:10–1:6250 kuin HPLC-menetelmässä 1:200–1:1000.

Toisaalta sisäisien standardien mahdolliset pipetointivirheet voivat vaikuttaa tuloksiin. UHPLC-menetelmän standardisuoran muodostuksessa ei käytettykään laimennosta 1:50, koska sen sisäisen standardin piikin pinta-ala poikkesi paljon muista. PTVLABS:n näytteessä ollut liukenematon aine voi myös vaikuttaa tuloksiin. Kiinteä aine ei välttämättä ole aminohappoja, koska hydrolysoidun näytteen tulokset eivät ole suhteessa korkeammat verrattuna muihin näytteisiin, mutta aineeseen on voinut sitoutua aminohappoja. Toisaalta vapaiden aminohappojen tuhoutuminen hydrolyysissä voi kompensoida kiinteästä aineista vapautuneet aminohapot.

6.9 Tulevaisuus

Tutkimuksen perusteella vapaiden aminohappojen analysointia ja analysoinnin optimointia tarvitaan lisää. Aminohappoja on tutkittu kirjallisuuden perusteella proteiineista paljon ja menetelmät niihin ovat muovautuneet sopiviksi. Vapaita aminohappoja vaikuttaa olevan tutkittu vähemmän, minkä takia menetelmissä voisi olla vielä parantamisen mahdollisuuksia. Etenkin tutkimuksessani tekemä vertailu vapaiden aminohappojen suhteesta sitoutuneisiin on käytetyillä menetelmillä epävarmaa. Tavoitteena oli verrata hydrolysoitujen ja hydrolysoimattomien näytteiden tuloksia ja tarkistaa löytyisikö hydrolysoiduista näytteistä suurempia määriä aminohappoja kuin hydrolysoimattomista. Kuitenkin tulokset osoittavat, että hydrolyysissä ennestään vapaita aminohappoja hajoaa tai jonkin muun reitin kautta katoaa ja konsentraatiot olivat hydrolysoiduissa pienempiä. Täten menetelmällä ei onnistuttu luotettavasti vertailemaan vapaiden ja sitoutuneiden aminohappojen määrää.

7 Yhteenveto

Kirjallisuuskatsauksen perusteella aminohappolisien vaikutukset proteiinisynteesiin ovat monimutkaisia. Erityisesti vain osaa välttämättömistä aminohapoista sisältävistä aminohappolisista saatavat hyödyt ovat kyseenalaisia ja vaativat lisää tutkimusta. Toisaalta kaikkia välttämättömiä aminohappoja sisältävistä aminohappolisista (EAA) vaikuttaa olevan hyötyä lihaskasvulle ja palautumiselle, mutta niiden vaikutuksista erilaisten ruokavalioiden yhteydessä vaaditaan lisää tutkimusta. EAA-lisien on havaittu edistävän lihaskasvua ja palautumista, mutta vertailua erilaisten proteiini lähteiden ja ruokavalioiden kanssa tarvitaan lisää. Toisaalta BCAA-lisien ei ole havaittu yksinään lisäävän proteiinisynteesiä, mutta niiden vaikutuksista ruokavaliota täydentävinä ravintolisinä tulisi tutkia lisää.

Tutkielman käytännön osuus keskittyi neljän Suomessa markkinoilla olevan aminohappovalmisteen todellisten aminohappopitoisuuksien analysointiin ja vertailuun valmistajan ilmoittamien tietojen kanssa. Toisaalta käytännön osuudessa vertailtiin myös erilaisia analyysimenetelmiä vapaiden aminohappojen mittaamiseksi. Analyyseissä käytettiin korkean ja erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa (HPLC ja UHPLC) fluoresenssidetektorilla (FLD). Näytteitä tutkittiin HPLC-menetelmällä hydrolysoituna sekä hydrolysoimattomana aminohappojen sitoutumisen arvioimiseksi.

Tulokset osoittivat, että UHPLC-menetelmällä saadut aminohappopitoisuudet olivat keskimäärin 97,3 % valmistajan ilmoittamista, kun taas HPLC-menetelmällä pitoisuudet olivat hieman alhaisempia (88 %). Näitä kahta menetelmää tulisi vertailla lisää ja selvittää, kumman antamat tulokset ovat lähempänä todellisuutta vapaita aminohappoja mitattaessa. Hydrolysoiduissa näytteissä havaittiin merkittävästi alhaisempia aminohappopitoisuuksia, mikä viittaa vapaiden aminohappojen hajoamiseen hydrolyysissä. Hydrolysointimenetelmää tulisi kehittää, jotta vapaiden ja sitoutuneiden aminohappojen määriä ja suhteita voitaisiin mitata samasta näytemateriaalista luotettavasti.

Yhdenkin välttämättömän aminohapon puuttuminen tai liian vähäinen määrä suhteessa solun tarpeisiin tekee siitä rajoittavan aminohapon, jonka loppuminen johtaa proteiinisynteesin estymiseen. Tilanteen voi aiheuttaa esimerkiksi pelkkien haaraketjuisien (BCAA) aminohappojen nauttiminen.

Toisaalta sama ongelma voidaan kohdata kaikkia välttämättömiä aminohappoja sisältävää EAA-lisää nautittaessa, sillä ihmiselle epäoptimaalinen aminohappoprofiili johtaa rajoittavan aminohapon loppumiseen ja ylimääräisten aminohappojen hajottamiseen.

Tutkimus osoitti, että joidenkin tuotteiden ilmoitetut aminohappopitoisuudet eivät täysin vastanneet laboratoriossa mitattuja arvoja. Erot voivat johtua esimerkiksi valmistusprosessien vaihteluista, aminohappojen hajoamisesta varastoinnissa tai jauhemaisten tuotteiden epätasaisesta jakautumisesta. Lisäksi analyysimenetelmät voivat aiheuttaa eroja ja virheitä, kuten tutkimuksessa havaittiin HPLC- ja UHPLC-menetelmien välillä. Kuluttajan näkökulmasta lisäravinteiden suuri suosio lisää myös tarvetta niiden valvontaan ja standardoituihin mittausmenetelmiin. Toisaalta myös elintarvikelainsäädäntöä tulee tarkastella säännöllisesti ja pitää se ajan tasalla nopeasti kehittyvien lisäravinnemarkkinoiden kanssa.

Lisäravinteita käytettäessä tulisi huomioida kokonaisravitseminen, sillä yksittäiset lisäravinteet eivät riitä korvaamaan monipuolista ja terveellistä ruokavaliota. Kirjallisuuskatsauksen tuloksien pohjalta myöskään aminohappolisät eivät välttämättä johda luvattuihin vaikutuksiin, ja aminohappolisäravinteiden käyttöä tärkeämpää on huolehtia riittävästä ravinteiden saannista ruokavaliosta. Tarvittaessa ruokavaliota voidaan tukea aminohappolisillä ja siitä voidaan tuloksien perusteella saada hyötyä oikeita aminohappoja ja oikeaan aikaan nautittuna.

Lisäravinteiden käyttäjien tulisi olla tietoisia valvonnan vähyydestä ja tutkimuksien puutteesta uusien aineiden osalta. Vähäinen valvonta voi johtaa siihen, että markkinoille saapuu tuotteita, jotka eivät sisällä valmistajan ilmoittamia määriä eri aineita. Toisaalta uusien tai uusissa muodoissa olevien aineiden saapuminen lisäravinteiden mukana markkinoille voi aiheuttaa tutkimustyön jälkeen jäämisen ja mahdollisesti haitallisten aineiden myynnin.

Lähteet

- Antonio, J., Sanders, M.S., Ehler, L.A., Uelmen, J., Raether, J.B., Stout, J.R. (2000). Effects of exercise training and amino-acid supplementation on body composition and physical performance in untrained women11Date accepted: May 11, 2000. *Nutrition*, **16**, 1043–1046.
- Asetus (EU) N:o 1169/2011, Art. 7. (2011). EUR-Lex. Saatavilla: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2011/1169/oj>
- Bird, S.P., Tarpinning, K.M., Marino, F.E. (2006). Independent and combined effects of liquid carbohydrate/essential amino acid ingestion on hormonal and muscular adaptations following resistance training in untrained men. *European journal of applied physiology*, **97**, 225–238.
- Blanco, A., Blanco, G. (2017). Chapter 16 - Amino Acid Metabolism. Teoksessa: Blanco, A., Blanco, G. (Toim.), *Medical Biochemistry. Academic Press*, ss. 367–399.
- Canfield, C.-A., Bradshaw, P.C. (2019). Amino acids in the regulation of aging and aging-related diseases. *Translational Medicine of Aging*, **3**, 70–89.
- Church, D.D., Hirsch, K.R., Park, S., Kim, I.-Y., Gwin, J.A., Pasiakos, S.M., Wolfe, R.R., Ferrando, A.A. (2020). Essential Amino Acids and Protein Synthesis: Insights into Maximizing the Muscle and Whole-Body Response to Feeding. *Nutrients*, **12**, 3717.
- Churchward-Venne, T.A., Burd, N.A., Mitchell, C.J., West, D.W.D., Philp, A., Marcotte, G.R., Baker, S.K., Baar, K., Phillips, S.M. (2012). Supplementation of a suboptimal protein dose with leucine or essential amino acids: effects on myofibrillar protein synthesis at rest and following resistance exercise in men. *The Journal of physiology*, **590**, 2751–2765.
- Churchward-Venne, T.A., Breen, L., Di Donato, D.M., Hector, A.J., Mitchell, C.J., Moore, D.R., Stellingwerff, T., Breuille, D., Offord, E.A., Baker, S.K., Phillips, S.M. (2014). Leucine supplementation of a low-protein mixed macronutrient beverage enhances myofibrillar protein synthesis in young men: a double-blind, randomized trial123. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **99**, 276–286.
- Dai, Z., Wu, Z., Jia, S., Wu, G. (2014). Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthaldialdehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **964**, 116–127.
- Eley, B. (2019). Quantitative Analysis of Branched-chain Amino Acids in Five Nutritional Supplements Using a Leucine Dehydrogenase Assay (P23-004-19). *Nutrition 2019 Abstracts*, **3**, nzz043.P23-004-19.
- Elintarvikelaki 297/2021, 6 §. (2021). Finlex. Saatavilla: <https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2021/20210297>

- Grimble, R.F. (2006). The Effects of Sulfur Amino Acid Intake on Immune Function in Humans1. *The Journal of Nutrition*, **136**, 1660S-1665S.
- Gwin, J.A., Church, D.D., Hatch-McChesney, A., Howard, E.E., Carrigan, C.T., Murphy, N.E., Wilson, M.A., Margolis, L.M., Carbone, J.W., Wolfe, R.R., Ferrando, A.A., Pasiakos, S.M. (2021). Effects of high versus standard essential amino acid intakes on whole-body protein turnover and mixed muscle protein synthesis during energy deficit: A randomized, crossover study. *Clinical Nutrition*, **40**, 767–777.
- Henderson, J.W., Ricker, R.D., Bidlingmeyer, B.A., Woodward, C. (2000). Rapid, Accurate, Sensitive, and Reproducible HPLC Analysis of Amino Acids.
- Jiotsa, B., Naccache, B., Duval, M., Rocher, B., Grall-Bronnec, M. (2021). Social Media Use and Body Image Disorders: Association between Frequency of Comparing One’s Own Physical Appearance to That of People Being Followed on Social Media and Body Dissatisfaction and Drive for Thinness. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **18**, 2880.
- K-Ruoka. Pirkka BCAA juoma strawberry & kiwi 0,33l | K-Ruoka Verkkokauppa [WWW-dokumentti]. *K-Ruoka.fi*. Saatavissa osoitteesta <https://www.k-ruoka.fi/kauppa/tuote/pirkka-bcaa-juoma-033l-strawb-kiwi-tlk-6410405304865> (viitattu 18.2.2025).
- Kumpula, K. (2023). Kasvipohjaisten elintarvikkeiden aminohappokoostumus UHPLC-menetelmällä analysoituna.
- Köhrle, J. (2023). Selenium, Iodine and Iron–Essential Trace Elements for Thyroid Hormone Synthesis and Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**.
- LaPelusa, A., Kaushik, R. (2022). Physiology, Proteins [WWW-dokumentti]. *StatPearls*. Saatavissa osoitteesta <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555990/> (viitattu 11.2.2025).
- Leader. Leader Performance EAA+BCAA Orange-mandarin 250 g [WWW-dokumentti]. *Leader.fi*. Saatavissa osoitteesta <https://leader.fi/product/leader-performance-eaabcaa-orange-mandarin-250-g/> (viitattu 18.2.2025).
- Louard, R.J., Barrett, E.J., Gelfand, R.A. (1990). Effect of Infused Branched-Chain Amino Acids on Muscle and Whole-Body Amino Acid Metabolism in Man. *Clinical Science*, **79**, 457–466.
- Meyers, L.D., Hellwig, J.P., Otten, J.J. (2006). Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements, 1. ed. *National Academies Press*, Washington, D.C.
- Mutanen, M., Niinikoski, H., Schwab, U., Uusitupa, M., Ala-Kokko, T. (2021). Ravitsemustiede, Kahdeksas [uudistettu] painos. ed. *Kustannus Oy Duodecim*, Helsinki.

- Ngo, T.D. (2015). *Biomimetic Technologies - Principles and Applications*, 1. ed, *Woodhead Publishing series in electronic and optical materials*. Elsevier, San Diego.
- Niinikoski, H., Heikkilä, J., Näntö-Salonen, K. (2009). Fenyyliketoniauria. *Duodecim (Helsinki, Finland : 1961)*, **125**, 1069–1075.
- NOCCO. TUOTTEEMME [WWW-dokumentti]. *NOCCO*. Saatavissa osoitteesta <https://nocco.com/fi/tuotteemme/> (viitattu 18.2.2025).
- Norton, L.E., Wilson, G.J., Layman, D.K., Moulton, C.J., Garlick, P.J. (2012). Leucine content of dietary proteins is a determinant of postprandial skeletal muscle protein synthesis in adult rats. *Nutrition & metabolism*, **9**, 67–67.
- Phillips, S.M., Van Loon, L.J.C. (2011). Dietary protein for athletes: From requirements to optimum adaptation. *Journal of Sports Sciences*, **29**, S29–S38.
- PTVLABS. ANABOLIC SAUCE | EAA [WWW-dokumentti]. *PTVLABS*. Saatavissa osoitteesta <https://ptvlabs.com/en/products/ea> (viitattu 18.2.2025).
- Ruokavirasto (2023). Ravintolisät [WWW-dokumentti]. *Ruokavirasto*. Saatavissa osoitteesta <https://www.ruokavirasto.fi/elintarvikkeet/elintarvikeala/tuote--jatoimialakohtaiset-vaatimukset/ravintolisat/> (viitattu 18.2.2025).
- Savilahti, E. (1998). Ohutsuolen toiminta. *Duodecim (Helsinki, Finland : 1961)*, **114**, 1131–1137.
- Schoenfeld, B.J., Aragon, A.A. (2018). How much protein can the body use in a single meal for muscle-building? Implications for daily protein distribution. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, **15**, 10–10.
- Stagi, L., Sini, M., Carboni, D., Anedda, R., Siligardi, G., Gianga, T.-M., Hussain, R., Innocenzi, P. (2022). Modulating the poly-L-lysine structure through the control of the protonation-deprotonation state of L-lysine. *Scientific Reports*, **12**, 19719.
- Szwiega, S., Pencharz, P.B., Ball, R.O., Tomlinson, C., Elango, R., Courtney-Martin, G. (2022). Amino acid oxidation methods to determine amino acid requirements: do we require lengthy adaptation periods? *The British Journal of Nutrition*, **129**, 1848–1854.
- Tang, Q., Tan, P., Ma, N., Ma, X. (2021). Physiological Functions of Threonine in Animals: Beyond Nutrition Metabolism. *Nutrients*, **13**, 2592.
- Titchenal, C.A., Rogers, Q.R., Indrieri, R.J., Morris, J.G. (1980). Threonine Imbalance, Deficiency and Neurologic Dysfunction in the Kitten. *The Journal of Nutrition*, **110**, 2444–2459.
- VAZ, F.M., WANDERS, R.J.A. (2002). Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochemical Journal*, **361**, 417–429.

- Wang, X., Qiao, S., Yin, Y., Yue, L., Wang, Z., Wu, G. (2007). A Deficiency or Excess of Dietary Threonine Reduces Protein Synthesis in Jejunum and Skeletal Muscle of Young Pigs¹². *The Journal of Nutrition*, **137**, 1442–1446.
- Warburton, D.E.R., Nicol, C.W., Bredin, S.S.D. (2006). Health benefits of physical activity: the evidence. *Canadian Medical Association Journal*, **174**, 801.
- Weijzen, M.E.G., van Gassel, R.J.J., Kouw, I.W.K., Trommelen, J., Gorissen, S.H.M., van Kranenburg, J., Goessens, J.P.B., van de Poll, M.C.G., Verdijk, L.B., van Loon, L.J.C. (2022). Ingestion of Free Amino Acids Compared with an Equivalent Amount of Intact Protein Results in More Rapid Amino Acid Absorption and Greater Postprandial Plasma Amino Acid Availability Without Affecting Muscle Protein Synthesis Rates in Young Adults in a Double-Blind Randomized Trial. *The Journal of nutrition*, **152**, 59–67.
- WHO (2007). Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition: Report of a Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation, 1. ed. *World Health Organization*, Albany.
- Wolfe, R.R. (2017). Branched-chain amino acids and muscle protein synthesis in humans: Myth or reality? *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, **14**, 30–30.
- Yousef, P., Rosen, J., Shapiro, C. (2024). Chapter 1 - Tryptophan and its role in sleep and mood. Teoksessa: Atta-Ur Rahman (Toim.), *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, ss. 1–14.