

OLUEN HIVENAINEPITOISUUKSIEN ANALYSOINTI

Pro gradu -tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Kemian laitos

26.11.2014

Juho Leikas

Tiivistelmä

Tämän Pro gradu -tutkielman kirjallisessa osassa käsiteltiin hivenaineiden tarvetta palautumisen kannalta ja alkoholin tuottamia vaikutuksia palautumiseen. Lisäksi selvitettiin orgaanista ainesta sisältävien näytteiden esikäsittelymenetelmiä ja induktiivisesti kytketyn plasma-optisen emissiospektrometrin (ICP-OES) käyttöä hivenaineiden analysoinnissa. Ultraääni, mikroaalto, tuhkistus ja muita esikäsittelymenetelmiä ja niiden eroavaisuuksia ja eroja esiteltiin, koska oluen hivenaineanalyysien onnistumiseksi on erityisen tärkeää saada hiilidioksidi poistumaan näytetaustasta ja nämä menetelmät olivat hyväksi havaittuja kyseiseen toimintaan.

Oluesta löytyy kirjallisuudesta hyvin vähän tutkimuksia etenkin hivenaineiden pitoisuuksista. Myöskään alkoholin vaikutuksia urheilusta palautumiseen ei ole juurikaan tutkittu ja alkoholia on useimmissa alkoholin terveysvaikutuksia käsittelevissä tutkimuksissa käytetty suuria määriä.

Työn kokeellisessa osassa paneuduttiin oluen ja kaupallisten palautusjuomien esikäsittelymenetelmien kehittämiseen ja mittausmenetelmien tuottamiseen ICP-OES:lle. Oluille kehitettiin ultraääniavusteinen typpihappoa hyödyntävä näytteenkäsittelymenetelmä ja palautusjuomille näiden lisäksi tuhkistus. Painotus esikäsittelymenetelmissä oli orgaanisen taustan poistaminen ICP-OES analyysien onnistumiseksi. Oluiden ja palautusjuomien hivenainepitoisuuksien vertailu on myös tehty.

Esipuhe

Tämä pro gradu -tutkielma on tehty Jyväskylän yliopiston orgaanisen kemian osastolle vuoden 2014 loppupuoliskolla. Kaikki gradua koskevan ohjauksen on antanut Jyväskylän yliopiston epäorgaanisen ja analyyttisen kemian dosentti Ari Väisänen.

Kirjallisuudessa on käytetty liikuntatieteiden, analyyttisen kemian ja olueen liittyvien teosten lisäksi internetpohjaisten hakukoneiden ja tietokantojen tieteellisiä julkaisuja.

Kokeellinen osa suoritettiin Jyväskylän yliopiston epäorgaanisen ja analyyttisen kemian osastolla kesällä 2014.

Haluan erityisesti kiittää ohjaajaani Ari Väisästä menetelmätietouden tiedonjaosta, mahtavasta ohjauksesta ja tuesta koko gradun ajanjaksolta ja Suomen Panimoliittoa ja sen jäsenyrityksiä tutkimuksen mahdollistamisesta.

Lisäksi kiitos kuuluu myös Jyväskylän kemianlaitoksen henkilökunnalle laadukkaasta opetuksesta ja opinto-ohjauksesta ja opiskelijoille opintoja miellyttäväksi tekevästä ja vauhdittaneesta naljailusta.

Sisällysluettelo

Tiivistelmä.....	i
Esipuhe.....	ii
Sisällysluettelo.....	iii
Käyteyt lyhenteet.....	v
1. JOHDANTO	1
2. KUNTOILUSSA TARVITTAVISTA AINEISTA.....	2
2.1. Glykogeeni.....	4
2.2. Vesi.....	5
2.3. Urheilussa tarvittavista mineraaleista	6
3. OLUEN PALAUTUSJUOMANA.....	12
3.1. Oluen hiivenainepitoisuuksien tutkimuksista	18
3.2. Oluen ja palautusjuoman vertailu	19
3.3. Oluen ja ruoka-aineiden vertailu.....	20
4. ALKOHOLIN VAIKUTUS KEHOON JA PALAUTUMISEEN.....	22
5. OLUEN JA VASTAAVIEN NÄYTTEIDEN ESIKÄSITTELYMENETELMISTÄ	25
5.1. Virvoitusjuomanäytteiden käsittelystä yleisesti.....	25
5.2. Hiilidioksidin poisto.....	26
5.3. Happokäsittely.....	26
5.4. Mikroaaltokäsittely.....	27
5.5. Ultraäänikäsittely	29
5.6. Muut hajotus- ja erotusmenetelmät.....	30
6. ICP-OES HIVENAINEPITOISUUKSIEN MITTAAMISESSA	32
6.1. ICP yleisesti	32

6.2. ICP-OES:n rakenteesta.....	35
6.2.1. Signaalin tuotto	35
6.2.2. Signaalin käsittely.....	37
6.3. ICP käytöstä ja analyysien käytännöistä.....	37
6.3.1. Plasman mittauskohdan kohdistus	37
6.3.2. Mittausten varmuus ja testaaminen.....	38
7. KOKEELLINEN OSA.....	41
7.1. Laitteet.....	41
7.2. Näytteet ja reagenssit	41
7.3. Näytteenkäsittely.....	45
8. OLUTNÄYTTEIDEN ANALYSOINTI	47
8.1. Kalibrointi.....	47
8.2. Menetelmäkehitys näytteiden käsittelemiseksi.....	48
8.2.1. Ultraäänikäsittely oluelle	48
8.2.2 Palautusjuomien käsittely.....	51
8.3. Saantokokeet	52
8.4. Menetelmäkehitys ICP-OES:llä.....	54
8.5. Näytteiden mittaus	56
8.6. Olutnäytteiden hivenainepitoisuudet.....	56
9. OLUTNÄYTTEIDEN VERTAILU.....	63
10. OLUEN JA PALAUTUSJUOMIEN VERTAILU.....	68
11. YHTEENVETO.....	70
KIRJALLISUUSVIITTEET	71

KÄYTETYT LYHENTEET

ATP = Adenosine triphosphate = Adenosiinitrifosfaatti

BCAA = Branched Chain Amino Acid = Haaraketjuinen aminohappo

DNA = Deoxyribonucleic acid = Deoksiribonukleiinihappo

FAAS = Flame atomic absorption spectrometry = Liekkiatomiabsorptiospektrometri

GFAAS = Graphite furnace atomic absorption spectrometry = Grafiittiuuni
atomiabsorptiospektrometri

ICP = Inductively coupled plasma = Induktiivisesti kytketty plasma

MS = Mass spectrometry = Massaspektrometri

OES = Optical emission spectrometry = Optinen emissio spektrometri

AES = Atomic emission spectrometry = Atomi emissio spektrometri

LOD = Limit of detection = Havaitsemisraja

RNA = Ribonucleic acid = Ribonukleiinihappo

1. JOHDANTO

Olut on tällä hetkellä ollut kansan huulilla monilla eri tavoilla, esimerkiksi alkoholiin liittyvien lakiuudistusten ja erilaisista oluen nauttimisella saatavista hyödyistä kertovien julkaisujen vuoksi. Tämän ja käsillä olevan fitness-buumin yhdistävä palautusjuomatutkimus onkin hyvin ajankohtainen.

Palautumisen unohtaminen kuntoilussa voi viedä urheilijan helposti huonoon kuntoon, joten oluen palautusjuomakkyä tutkittiin kirjallisessa osassa alkoholin vaikutusten kautta useammalta kantilta. Oluen ravintosisältöä pyrittiin myös käsittelemään, pääpainoalueena hivenaineet.

Induktiivisesti kytketty plasma-optinen emissiospektrometri (ICP-OES) on erittäin soveltuva menetelmä hivenaineiden pitoisuuksien analysointiin. Se on luotettava, nopea ja erittäin herkkä menetelmä, jolla oluen ja palautusjuomien hivenainepitoisuudet mitattiin. Ennen mittauksia näytteiden orgaaniset taustat on saatava analysoitavaan muotoon, jonka takia erilaisia esikäsittelymenetelmiä on myös työssä käsitelty. Sopivimmat näytteenkäsittelymenetelmät löydettiin kokeilujen ja erehdysten kautta.

2. KUNTOILUSSA TARVITTAVISTA AINEISTA

Urheilija tarvitsee monia eri ravintoaineita pystyäkseen parhaaseen mahdolliseen urheilusuoritukseen.^{1,2} Normaaleilla ruokatottumuksilla päästään kuitenkin useimmiten jo kuntoilijoiden kehon tarvitsemiin määriin. Tällä hetkellä puhutaan paljon proteiinien ja hiilihydraattien tärkeydestä, ja etenkin proteiinia on alkanut ilmaantua lähes jokaiseen ”fitnesstuotteeseen” ”parantamaan tuotetta”. Suurempana ongelmana on jaottaa saanti tasaisesti kaikille aterioille. Tarvittava määrä proteiinia on hyväkuntoisella noin 1,4 g painokiloa kohden ja hiilihydraatteja vähintään 6 - 8 g painokiloa kohden vuorokaudessa. Suositellut määrät vaihtelevat hyvin paljon lähteestä riippuen ja lihasmassaa kasvatettaessa näitä määriä on kasvatettava.



Kuva 1: Proteiinia ja hiilihydraatteja sisältäviä lisäravinteita.

Usein unohdetaan vitamiinien ja rasvojen tärkeys kehon toiminnassa, paitsi flunssauskausiin lähestyessä ja ”pahojen” rasvojen sulattamisessa, kun pyritään lämpöaallon iskiessä pikaisesti rantakuntoon. Rasvaa tulisikin olla kehossa, koska etenkin pitkäkestoisissa urheilusuorituksissa hyvässä aerobisessa kunnossa olevat henkilöt käyttävät hiilihydraattien ja proteiinien lisäksi myös rasvoja energialähteenä.

Hivenaineet eivät juurikaan aiheuta keskustelua, paitsi kuumilla keleillä ja pitkissä urheilusuorituksissa. Hivenaineet ohjaavat todella monia urheilussa tarvittavia tapahtumia ja ne pitävät vitamiinien kanssa kehon tasapainoa yllä. Hivenaineita kuluu urheilijoilla 2 - 3 kertaa enemmän urheilemattomaan henkilöön verrattuna. Nämä kulutetut määrät saadaan useimmiten korvattua normaalilla syömisellä, koska keho ohjaa ihmistä syömään enemmän. Ongelmia tulee siinä vaiheessa, kun ruokavalio pääsee yksipuolistumaan. Esimerkiksi raudan pitoisuuksissa puutostilat huomataan nopeasti.

Monet käyttävät myös hivenaineita sisältäviä lisäravinteita, kuten magnesiumia suonenvetoihin.³ Tällainen korvaaminen on usein turhaa, koska esimerkiksi suomalaisessa ruokavaliossa harvemmin on puutetta magnesiumista ja krampit useimmiten johtuvat nestetasapainonhäiriöstä. Tällaiset nesteetyksen vajeesta johtuvat häiriöt pystytään usein korjaamaan ruokailujen yhteydessä, mutta liikunnallisesti aktiivisten ihmisten on hyvä muistaa painottaa nesteiden määrää, koska ruokaileminen on myös yhteydessä nesteenkulutukseen.² Nestevajeet aiheuttavat myös aerobisen suorituksen aikana maksimitehojen epäsuhteellista, mutta selkeää vähenemistä. Toinen huono ominaisuus tässä yksittäisten hivenaineiden tankkaamisessa on se, että hivenaineiden molekyyylimassat ovat hyvin lähellä toisiaan ja tällöin ne alkavat kilpailemaan imeytymisessä. Kun pyritään saamaan mineraalit imeytymään mahdollisimman hyvin, olisi myös hyvä ottaa huomioon muitakin seikkoja, kuten kuidun mineraalien imeytymistä heikentävä vaikutus (sitoo kalsiumia, rautaa, magnesiumia ja fosforia) ja vitamiinien imeytymistä parantavat vaikutukset (D-vitamiini kalsiumille ja C-vitamiini raudalle).¹ Kirjallisuudessa mainitaan myös tietyille aineille suhteita, joiden mukaan imeytymisestä tulee tehokkaampaa tai heikompaa. Tällaisia ovat esimerkiksi fosfori ja kalsium (tehokas 1:1) ja raudan ja sinkin (huonontaa sinkin imeytymistä 1:1 - 22:1).⁴

Kirjallisuudessa mainitaan, että raudan ja kalsiumin puutokset ovat todennäköisimmät puutostilat urheilijoilla.⁵ Kehon kivennäisaineiden varastointikyky on erittäin hyvä, kun verrataan esimerkiksi energiaravintoaineisiin. Joillakin kivennäisaineilla elimistö pystyy kuukausien tai jopa vuosien varastointeihin.³



Kuva 2: Erilaisia hivenaineita sisältäviä lisäravinteita.

2.1. Glykogeeni

Glykogeeni on ihmisten ja eläinten käyttämä glukoosista syntetisoitu pitkäketjuinen varastohiilihydraatti.² Urheilun aikana keho kuluttaa sen glykogenivarastoja, etenkin suorituksessa käytetyistä lihaksista ja maksasta. Näiden varastojen täyttäminen on palautumisen kannalta erittäin tärkeää, jotta seuraava harjoitus pystytään suorittamaan halutulla intensiteetillä. Adenosiinitrifosfaattia (ATP), jota tuotetaan anaerobisesti esimerkiksi glykogenista, käytetään energiana lihasten supistumisissa ja sen takia suorituksen jälkeisen väsymyksen tunteen yksi suurimmista tekijöistä on näiden varastojen tyhjeneminen. Riippuen harjoituksen tehokkuudesta, nämä varastot voivat tyhjentyä jopa kokonaan. Vajauksen pystyy selkeästi havaitsemaan liikuntasuorituksen tehokkuudesta, riippumatta siitä onko kyseessä pitkäkestoinen kuntoharjoitus taikka nopea korkean intensiteetin harjoitus. Lihasten glykogenivarastojen täyttöön tehokas tuote on perinteinen glukoosi, jota tulisi nauttia urheilusuorituksen jälkeen 4 - 6 tunnin kuluessa noin 50 g kahden tunnin aikana. Sillä onko glukoosi kiinteänä vai nesteinä ei ole merkitystä. Maksan varastojen täyttämiseen paremmaksi on todettu fruktoosi.

2.2. Vesi

Nuorilla aikuisilla vettä kehonpainosta on noin 60 %. Tämä osuus pienenee iän ja painon kertyessä.⁶ Vedestä noin 40 % on solujen sisällä ja loput on solujen ulkopuolisissa tiloissa ja veressä. Munuaiset hoitavat hormonien avulla veden ja suolojen erityksen säätelyä. Kun kehossa on ylimäärä vettä, se eritetään laimeampana virtsana. Jos taas nestettä on liian vähän ja kehon suolapitoisuus on korkealla, aivoissa oleva janokeskus aktivoituu. Tästä johtuu janoisuuden tunne ja munuaisten kautta vähentynyt veden erityminen. Jo 1 - 2 % vedenhukka aiheuttaa päänsärkyä, väsymystä, huimausta ja ruokahalun puutetta. 15 - 20 % hukka tarkoittaa kuolemaa.

Kehon lämpötilan säätely urheilusuorituksen aikana aiheuttaa veden vajausta, jos nesteytystä ei suoriteta kulutettujen määrien korvaamiseksi.² Hikoileminen yleensä alkaa, kun kehossa havaitaan tarvetta viilentää lihasten supistumisessa vapautuvaa hukkalämmön määrää. Ihmisen lihasten hyötysuhteen tiedetään olevan huono, joten urheilusuorituksessa tuotetaan suhteessa paljon lämpöä liikkeeseen nähden. Urheilusuorituksen nestevajeeseen voidaan vielä lihasten supistumisten lisäksi laskea hengityselimistön ja ruuansulatuselimistön (energiantuotannon) hukkaama nestemäärä. Tämä on kuitenkin hyvin pientä verrattuna hikenä eritettyyn määrään. Nestetasapaino tulisi palauttaa aina tasapainoonsa, koska nestehukassa aloitettu urheilu altistaa erityisen vahvasti lämpöhalvaukselle ja urheilusuorituksen tehot jäävät muutenkin alhaisiksi. Vesi yksinään on huono korvaamaan nestevajausta harjoituksen jälkeen, koska se lisää virtsan eritystä. Kun nesteessä on hiilihydraatteja ja suoloja imeytyminen on todistettavasti tehokkaampaa. Tutkimuksien mukaan pitempiäaikaisessa (6 h) nesteytyksessä ei ole juurikaan väliä onko elektrolyytit natriumia vai kaliumia, kunhan niitä on tarpeeksi (~60 mmol / l) ja nestettä nautitaan 150 % hikoiltuun määrään nähden. Ruokailun yhteydessä nautittuna nesteiden imeytyminen tehostuu lievästi, joka saattaa johtua suuremmista elektrolyyttimääristä. Imeytyminen tapahtuu passiivisesti osmoosilla.

2.3. Urheilussa tarvittavista mineraaleista

Ihminen tarvitsee arviolta paria kymmentä eri ravinnetta ja hivenainetta, jotta keho pystyisi toimimaan halutulla tavalla. Näiden aineiden osuus kehon massasta on noin 4 %.¹ Erityisesti urheilua harrastavien ihmisten tulisi sisällyttää kaikkia ravinne- ja hivenaineita ravintoonsa, koska näiden vajeet voivat vaikuttaa terveyteen ja kehon suorituksiin esimerkiksi urheilussa.⁵ Jo yhden tai useamman hivenaineen puutostilan tiedetään vaikuttavan kataboliaan ja anaboliaan.¹ Ravinne- ja hivenaineet vaikuttavat ionimuodoissaan esimerkiksi sydämen ja lihasten supistumisiin, energian tuotantoon (oksidatiivinen fosforylaatio), kehon happo-emäs- ja nestetasapainoon ja entsyymaattisten järjestelmien synteeseihin ja aktivointiin.⁷

Ravinteet:

Ravinteiksi on yleisesti määritelty epäorgaaniset alkuaineet, joita keho tarvitsee yli 100 mg päivässä.¹ Näitä ovat kalsium, magnesium, kalium, fosfori ja natrium. Nämä ovat yleensä integroituneet kehon anatomisiin rakenteisiin, kuten luustoon, nukleiinihappoihin, solukalvoihin, proteiineihin ja entsyymeihin. Mutta aktiivisemmissä muodoissa ne ovat erittäin tärkeitä, etenkin urheilusuorituksissa pitämällä metaboliaa tasapainossa.^{5,7}

Natrium on päätekijänä mukana ylläpitämässä kehon osmoottista painetta, veden säätelyä ja happo-emäs-tasapainoa.⁷ Se on monen muun asian lisäksi myös osana urheilussa tarvittavien hermoimpulssien kulkemisessa ja lihassupistuksissa (myös sydämen). Palautusjuoman tulisi erityisesti sisältää natriumia, koska se lisää muiden hyötyjen lisäksi myös glukoosin imeytymistä.² Natriumia saadaan tosin normaalilla ruokavaliolla tarpeeksi, jos harjoitusvälit eivät ole erityisen lyhyitä kuten turnauksissa. Suomalaisessa kulttuurissa ”suolaa” saadaan jopa liikaakin, joka vaikuttaa esimerkiksi verenpaineisiin kohottamalla sitä. Ruokasuolan eli natriumkloridin saantisuositus on enintään 5 grammaa päivässä (natriumin tarve 1,3g/päivä), mutta kuntoillessa tarve on hieman korkeampi, joka kuitenkin yleensä kompensoituu lisääntyneen nautitun ruokamäärän mukana.⁸

Kehon **kalsiumista** 99 % on varastoitunut luustoon ja loput on muissa soluissa, esimerkiksi lihaksissa.⁵ Näissä muissa se on esimerkiksi mukana huolehtimassa lihasten stimuloinnista, veren hyytymisestä, hermoimpulssien kuljettamisesta ja entsyymien aktivoimisesta.¹ Jos lihaksistossa tulee puutosta kalsiumista esimerkiksi energiatuotannon tai lihassupistusten puolella, voi se ottaa sitä tarvittaessaan luusta. Tällainen tilanne voi johtaa kuitenkin huonon kalsiumin saannin kanssa suurempiin puutostiloihin. Suuremmat kalsiumin puutokset taas altistavat osteoporoosille eli luuston heikentymiselle.

Magnesiumia on noin 400 entsyymissä rakennusaineena. Se säätelee Deoksiribonukleiinihapon (DNA) ja ribonukleiinihapon (RNA) synteesejä ja rakenteita, jonka kautta se edistää esimerkiksi solujen kasvua ja tuotantoa.¹ Osa näistä entsyymeistä on mukana lihassupistuksissa, hapen kuljetuksessa, proteiinisynteseissä ja energiantuotannossa. Energiantuotannossa se on mukana pilkkomassa glukoosia, rasvahappoja ja aminohappoja. Se muuttaa esimerkiksi veren kuljettamaa glukoosia lihasten ja maksan glykokeeniksi. Kuten aiemmin on mainittu, suomalaisessa ruokavaliassa ei ole magnesiumin puutosta, mutta tutkimuksien mukaan urheilussa sen poistuminen kehosta lisääntyy hien erityksen myötä.⁷ Tutkimuksissa on havaittu positiivisia vaikutuksia magnesiumin käytössä lisäravinteena urheilijan lihasten voimantuotannossa ja hengitys- ja verenkiertoelimistössä. Näiden vaikutusten syitä ei ole kuitenkaan vielä täysin pystytty selvittämään.⁵ Joissakin tutkimuksissa ei ole nähty minkäänlaista hyötyä lisäravinnekäytöstä ja joidenkin lisäravinne magnesiumien (dolomiitti $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_3$ pohjaiset) tiedetään sisältävän elohopeaa ja lyijyä, jotka ovat keholle myrkyllisiä.¹

Kalium osallistuu natriumin kanssa useisiin toimenpiteisiin, kuten esimerkiksi kehon neste- ja happo-emästasapainon ylläpitoon.¹ Kalium onkin tärkein solunsisäinen mineraali. Muiden ravinteisiin kuuluvien alkuaineiden kanssa se tuottaa lihasten supistumisen, mutta kaliumilla on erityinen osa sydänlihaksen supistumisessa.⁹ Solun sisäisesti se osallistuu proteiinisynteesiin ja säätelee entsyymien aktiivisuutta. Runsaalla kaliumin saannolla pystytään myös tasoittamaan runsaan natriumin nauttimisen aiheuttamia ongelmia, kuten verenpaineen kohoamista ja sisäelimestä munuaisten kuormittumista.¹⁰

Fosfori on kehossa useimmiten fosfaatteina ja sen käyttö liittyy suurimmalta osalta kalsiumin kanssa luuston jäykkyyden tuottamiseen ja energiatuotannon ATP:ssa (adenosiinitrifosfaatti) osana.¹ Lisäksi se toimii kehossa vitamiinien kofaktorina, nesteiden happo-emäs-puskurina ja se vaikuttaa 2,3-bisfosfoglyseriinihapon (2,3-DPG) kautta veren punasoluissa olevan hemoglobiinin hapen luovutuskykyyn. Tehostunut hapen luovutuskyky auttaa aerobisen kestävyuden suorituksissa.⁵ Se myös estää kalsiumin vapautumista luista muualle kehoon.¹

Hivenaineet:

Hivenaineet ovat ravinteiden tavoin määritelty päivittäisen tarpeen mukaan.¹ Hivenaineelle tarve on pienempi, eli alle 100 mg päivässä ja hivenaineiden osuus koko kehon massasta onkin noin 0,02 %. Seuraavaksi esitellään erityisesti urheilussa tarvittavia ja tärkeitä hivenaineita.

Rauta on yksi tärkeimmistä urheilusuorituksiin vaikuttavista hivenaineista.⁷ Rautaa on miehen kehossa noin 4 gramma ja naisilla 2,5 grammaa ja se uusiutuu jatkuvasti. Sitä on veren hemoglobiinissa (85 % toiminnallisesta raudasta¹), lihaksen myoglobiinissa (12 %, lihasten hapen kuljetus ja varastointi), energiatuotannossa sytokromeissa ja monissa lihassolun entsyymeissä. Nämä kaikki vaikuttavat hapen kuljettamiseen ja käyttöön aerobisen suorituksen aikana. Hapen tärkeyttä elämisen kannalta on turha edes korostaa. Rauta toimii myös osana kehon hapetus-pelkistysreaktioissa, jossa se toimii elektronien kuljettajana. Raudanpuutos anemiatasolle päästessään vaikuttaa selkeästi kyvyttömyyteen lihasten suorituksissa (suonenvetoja⁷). Hemoglobiinin vähentyessä keho myös kuljettaa vähemmän happea, koska hemoglobiini 65-kertaistaa veressä kuljetettavan hapen määrän.¹ Puutoksia on todettu olevan enemmän urheilijoilla ja etenkin nuoremmilla naisilla, kuin urheilua harrastamattomilla ihmisillä. Puutostilan voi havaita ”helppona väsymisenä”, ruokahalun katoamisena, otsalohkon päänsärkyinä, huimauksina ja hauraina kynsiä.^{1,7}

Sinkkiä keho tarvitsee monissa asioissa, mutta liikunnan kannalta sen osa energia-metaboliassa, solujen kasvamisessa ja korjaamisessa ja testosteronin erittämisessä ovat erityisen tärkeitä.^{1,5,7} Sinkillä on myös monta kehon suojelemiseen liittyvää tehtävää kudosis- ja solutasoilla. Se toimii muun muassa noin 200 entsyymattisessa systeemissä, kuten proteiinien ja nukleiinihappojen synteessissä. Korkea hiilihydraattinen, mutta vähäproteiininen ja vähärasvainen ruokavalio voi alentaa sinkin saantia, joka vaikuttaa etenkin kestävyysurheilussa jaksamiseen.⁵

Kupari on tärkeä osa monia kehon toimintoja, mutta urheilijalle tärkeimmät ovat energia-aineenvaihdunnan ja useiden synteessien (hemoglobiini, myoglobiini, sytokromit ja eri hormoonit) osana toimiminen.² Kupari toimii antioksidanttina kehoa hapettavien radikaalien muuttamisessa vähemmän vaaralliseen muotoon. Sitä tarvitaan kehossa raudan käyttöönnotossa ja puutos kuparitasapainossa voikin johtaa raudanpuutostilaan. Kehon kuparitasapainon tiedetäänkin olevan tärkeä fyysisiä suorituksia tehtäessä. Sinkin liiallisen nauttimisen on todettu vähentävän kuparin imeytymistä kehoon.⁷

Mangaani on mukana entsyymeissä, jotka ovat tärkeitä luuston kasvun sekä useiden synteessien, rasva- ja hiilihydraattiaineenvaihdunnan säätelyissä.⁷ Hyvä esimerkki tällaisesta on glutamiinin synteesi, joka on siis lihasten runsaimpia aminohappoja. Mangaani on myös mukana elimistön antioksidanttipuolustuksessa.¹

Seleenillä voi olla vaikutusta syövän estämisessä ja ikääntymisen hidastamisessa, sitä sisältävien entsyymien antioksidanttisten olemuksien takia.⁷ Seleenin sekä suojelee lihaksia, sydäntä ja verisuonia, että taistelee tulehduksia ja allergioita vastaan. Tämä on tärkeä myös liikuntasuorituksen aikana, koska hapenkulutus kasvaa ja alkaa muodostua vapaita radikaaleja. Tämä aiheuttaa entsyymien aktivoitumisen, joka varjelee lipidien, DNA:n ja proteiinien rakennetta ja toimintaa. Tästä syystä seleenitasojen tulisi olla hyvät, koska se auttaa kehoa palautumaan urheilusuorituksista.² Etenkin glutationiperoksidaasin-entsyymi (GPx) on keholle tärkeä antioksidantti.⁵ Seleenin toimii läheisessä yhteydessä E-vitamiinin kanssa, joka pitää esimerkiksi solun rakennetta koossa ja toimii antioksidanttina.^{1,11}

Kromin tärkein tehtävä on parantaa insuliinin toimintaa solujen glukoosin, aminohappojen ja triglyseridien käyttöönotossa. Se auttaa sekä insuliinia tarttumaan sen reseptoreihin että kuljettamaan BCAA:n (Branched Chain Amino Acid= haaraketjuinen aminohappo) lihaksiin.^{2,7} Se on myös mukana monissa entsyymaattisissa prosesseissa. Nykyaikaisten jalostettujen ruokien takia kehossa voi olla kromin puutetta, mutta myöskään ylimäärin syötynä siitä ei ole etua urheilusuorituksen kannalta.⁷

Koboltti säätelee sympaattista hermostoa laskemalla verenpainetta. Lisäravinteena siitä ei ole havaittu olevan kuitenkaan hyötyä urheilusuorituksen kannalta.⁷

Pii on hyväksi luustolle ja se estää alumiinin kertymistä aivoihin.¹² Rustokudosten ja jänteiden kimmoisuuden säilyminen ja muutenkin luuston normaalirakenteen kehittyminen ovat tärkeimpiä piin vaikutusalueita ihmiskehossa.¹³

Taulukko 1: Ruoka-aineet, jotka sisältävät paljon hivenaineita

Hivenaine	Mistä ruuasta saa	Viite
Na	Ruokasuola, eläinperäiset tuotteet (lihatuotteet)	14
K	Liha, maito ja hedelmät	15
Mg	kokonaiset viljanjyvät, vihreät vihannekset, liha	14, 15
Ca	Juusto, maito, tummanvihreät vihannekset	14
Zn	Muna ja pieninä pitoisuuksina monissa ruoka-aineissa	14, 15
Fe	Kananmuna, liha ja palkokasvit	14, 15
Cr	Äyriäisistä, lihasta, täysjyvätuotteista ja perunasta	16
Ni	Kasvikset, soija tuotteet ja jyvät	17
Cu	Sisäelimet	18
S	Pähkinät ja sardiinit	12
Se	Pähkinät, vehnä ja munuainen	19
Mo	Palkokasvit, meijerituotteet ja liha	20
P	Korkea proteiiniset: liha, maito, munat. Myös siemenet ja vilja.	21
Co	Munuaiset, maksa ja vihannekset]	22
Mn	Kananmuna, kokonaiset viljanjyvät ja vihreät vihannekset	14
Ba	Pähkinät	18
Si	Vihannesten silikaatit	12

3. OLU PALAUTUSJUOMANA

”Olut on todiste siitä, että Jumala rakastaa meitä ja haluaa meidän olevan onnellisia”

-Benjamin Franklin

Oluen lyhyt historia:

Olut on yksi maailman monimuotoisimmista juomista.²³ Sen juuret vievät kauas historiaan. Ensimmäiset historialliset jäänteet oluen olemassaolosta ovat peräisin Kaksoisvirranmaasta, tarkemmin Sumerista. Oluen panemisesta onkin kirjoitettu tarkat ohjeet jo yli 5000 eKr. Sumerilaisten savitauluista on löytynyt mainintoja ”sikarusta”, joka oli viljasta valmistettua käynnyttä juomaa. Oluen valmistusta kannatettiin myös osalta sen takia, että vettä ei useimmiten ollut turvallista juoda ilman jonkinlaista käsittelyä, esimerkiksi kiehautusta. Olut oli siinä mielessä turvallisempi vaihtoehto, koska se oli aina kiehautettua.²⁴

Jo sumerilaisten kirjoituksissa on mainintoja ainakin 20 erilaisesta oluesta, joilla jokaisella oli oma käyttötarkoituksensa aina lääkitsemisestä uskonnollisiin seremonioihin.²³ Nykyisin erilaisia ”laajempia” laatuja on noin 25, jotka poikivat lagerista, alesta ja sekoituksista. Alayksikköjä tästä eteenpäin löytyykin satoja erilaisia. Jos lähdetään hakemaan pienempienkin erojen mukaan, niin oluita löytyy ainakin kymmeniä, ehkä jopa satojatuhansia erilaisia, panimoidenkin lukumäärän ollessa kymmeniätuhansia.^{25,26} Monimuotoisuutta kuvaa ehkä parhaiten kuvassa 3 esitetty kaavio.



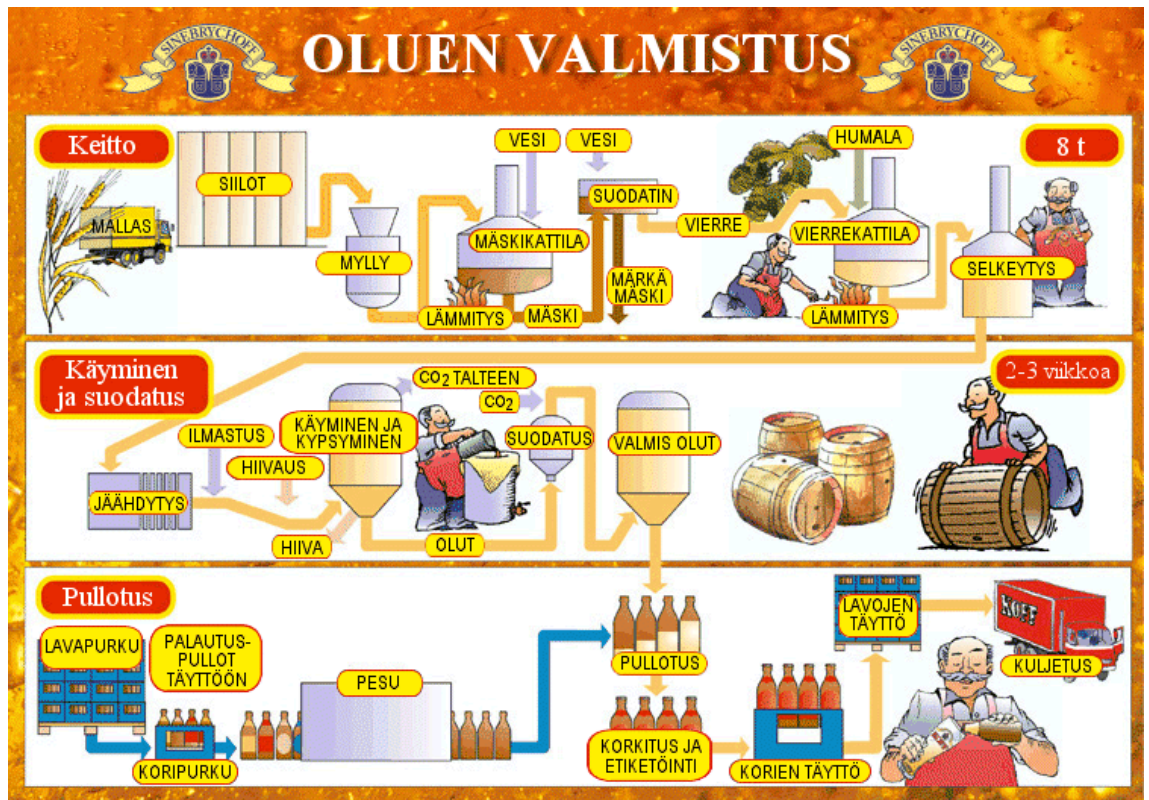
Kuva 3: Oluiden eri laatuja.²⁷

Mallastus ja oluenpano:

Oluen valmistukseen sisältyy viisi eri vaihetta.

- 1) Sopivan tärkkelyslähteen hankkiminen
- 2) Tärkkelysjuvästen hajotus tärkkelyksen vapauttamiseksi
- 3) Tärkkelyksen muuntaminen sokereiksi (maltoosi, glukoosi, jne)
- 4) Käyteaineen lisäys (muuttaa sokereita alkoholiksi)
- 5) Mahdollinen suodatus

Tämä on siis hyvin yksinkertaistettu malli ja todellisuudessa laadukkaan oluen valmistaminen vaatii huomattavasti enemmän.²⁸



Kuva 4: Sinebrychoffin oluen valmistuksen vaiheita esittelevä kuva, joka antaa todellisuutta lähempänä olevan kuvan verrattuna yllä esitettyyn viiteen vaiheeseen.²⁹

Ale:

Englannin sana ”Ale” tulee muinaisnorjan ”öl” sanasta.²⁴ Ale on yleisnimitys joukolle oluttyyppejä, joissa valmistuksen pääkäyminen on suoritettu pintahiivaa käyttäen noin 15 - 25 -celsiusasteen lämmössä. Hiivat kerääntyvät pääkäymisen jälkeen oluen pinnalle, toisin kuin lagereissa, joissa hiiva painuu pohjalle. Jälkikäyminen taas aloitetaan viileämmässä lämpötilassa, jolloin maut tasoittuvat ja väri kirkastuu. Alejen valmistuminen kestää noin 1 - 4 viikkoa. Britteinsaarilla kypsytyks kestää kellarilämpötilassa vain viikon verran, kun muualla kypsytyks tehdään viileämmässä ja kestää pitempää. Alejen hiivat tuottavat sivutuotteina estereitä, joista olueen tulee hedelmällinen vivahde.^{30,31}

Lager:

Lager on maailman suosituin oluttyyppi ja niitä nautitaankin lähes maailman jokaisessa kolkassa.^{30, 31, 24} Sen nimi tulee saksan sanasta lagern, ”varastoida, säilyttää”, joka viittaa oluttyypille ominaiseen valmistukseen, jossa olut valmistetaan hitaasti pohjahiivaa käyttäen ja varastoidaan kylmään tilaan kypsymään (yleensä kolme kuukautta, kuukausikin riittää). Kun lager on valmis, eli mahdollisesti suodatettu ja pulloitettu, se ei enää kuitenkaan sovi varastoitavaksi. Valmistuksessa ei lämpötilan viileydestä johtuen muodostu juurikaan estereitä, jolloin makuun ei tule hedelmällisyyttä. Viileys (5 - 10 celsiusastetta käymisessä) auttaa lagereita myös säilymään paremmin, kun bakteerit jäävät hiivalle alakynteen.

Vahva Lager:

Vahvat lagerit tunnetaan myös Bock-nimellä. Ero normaaliin lageriin tulee tarkkojen saksalaisten määritelmien pohjalta.^{30,32} Alkoholitilavuuden tulee näiden määritelmien mukaan olla yli 6,7 prosenttia ja kantavierreväkevyyden oltava yli 16 prosenttia (=vierteen sokeripitoisuus). Vierre on siis mallassokeria sisältävä nestemäinen suodos, jossa on käymiskelpoiset hiilihydraatit. Vierre on siis oluenpanon perusta ja kantavierre on käymisen alussa oleva sokeripitoisuus. Joitakin vahvoja lagereita saatetaan kypsyttää jopa yhdeksän kuukautta.²⁴

Vehnäolut:

Vehnäoluissa on normaalin ohran lisäksi lisätty vehnää. Yksi syy ohran lisäämiselle on vehnän vaikeampi käsiteltävyys viljana, koska vehnän akanattomat jyvät tukkivat mäsikäysastian siivilät.²⁴ Vehnäoluet ovat pintahiivalla käytettyjä oluita, jotka valmistetaan melko korkeassa lämpötilassa. Ne myös jatkavat kehittymistään pulloissa jälkikäymisellä runsaassa hiilidioksidissa, jonka aiheuttavat hiiva ja vierre. Vehnän proteiinit aiheuttavat olueen runsaan vaahdon ja samean värin.³⁰

Pils:

Pilssit ovat lager-tyylisiä täysmallasoluita, jotka sisältävät tärkkelyksen lähteenä vain vaaleaa mallasta.³⁰ 1700-luvulla tsekkiläinen oluenvalmistaja František Ondřej Poupêlle uudenaikaisti panimoiden toimintaa, jolloin myös valvontamenetelmät, kuten lämpömittari yleistyivät tuotannossa. Oluen paneminen muuttui silloin selkeästi tieteellisempään suuntaan ja päästiin lähemmäksi pilssien valmistuksessa vaatimia olosuhteita.

Viimeisen sykäyksen pilssien valmistus sai, kun böömiläisen Pilsenin kaupungin oluenvalmistajat anoivat vuonna 1839 lupaa uudelle panimolle. Heidän kiinnostuksensa pohjahiivakäymismenetelmää kohtaan sai heidät aloittamaan pils-oluiden tuotannon.²⁴ Se kehitettiin yhdistämällä baijerilainen kylmään sopeutunut pohjahiiva, määriläinen ohramallas, Saazin alueen humala ja Pilsenin pehmeä vesi.³⁰

Nykyään pils termiä käytetään mistä tahansa kirkkaasta ja katkeran makuisesta oluesta.

Tumma Lager:

Ennen vaaleampien, kullankeltaisten lagereiden syntyä, lagerit olivat jo olemassa tummemmalla värityksellä.^{24,30} Oluen väri saadaan tummaksi käyttämällä yli 200 celsiusasteessa paahdettuja erikoismaltaita.

Porter ja Stout:

Porter on Englannissa 1700-luvulla keksitty pintahiivaolutyyppi, jossa pyrittiin yhdistämään siihen aikaan suosittu yhdistelmä oluen ominaisuudet.³¹ Alkuperäisessä kolmen oluen yhdistelmässä oli old alea, new alea ja miedompaa alea. Stout taas syntyi kun portteri vietiin Irlantiin. Se on siis irlantilaisten tuottama tukevampi versio tästä mustasta oluesta.

Porterit ja stoutit käytetään siis samankaltaisella hiivalla kuin ale-oluet. Tumma väri tulee tummien lagereiden tapaan paahdetuista maltaista.³⁰

Maustetut oluet:

Maustettuihin oluisiin kuuluu oluet, joihin on lisätty normaalin valmistuksen yhteydessä esimerkiksi hedelmien tai savun aromia.³⁰ Hedelmän makua saadaan myös tiivistettä tai hedelmän osia lisäämällä. Myös erikoisempia viljoja, kuten ruista sisältävät oluet ovat maustettujen oluiden kanssa sen verran erikoisempia, että on vaikeaa sanoa mihin kategorioihin ne oikein kuuluvat. Näiden oluiden valmistusmenetelmät ovat muuten samankaltaisia muiden oluiden kanssa ja esimerkiksi ruisoluet ovat vehnäoluen muunnelmia. Erikoisempia makuja tuleeekin koko ajan enemmän ja enemmän, kun panimomestarit antavat mielikuvitustensa lentää.²⁴

3.1. Oluen hivenainepitoisuuksien tutkimuksista

Oluen hivenaineista löytyy hyvin vähän tutkimustietoutta, mutta näissä tutkimuksissa on kuitenkin tutkittu useita erilaisia oluita vaaleista tummiin ja alkoholittomista vahvoihin. Eri laatujakin on hyvin edustettuina, esimerkiksi Wyrzykowska *et. al.*³³ tutkimuksessa on tutkittu puolalaisia oluita aina lagereista portereihin. Asfawin ja Bosnakin³⁴ tutkimus sisälsi taas paremmin kansainvälisestikin tunnettuja olutbrändejä.

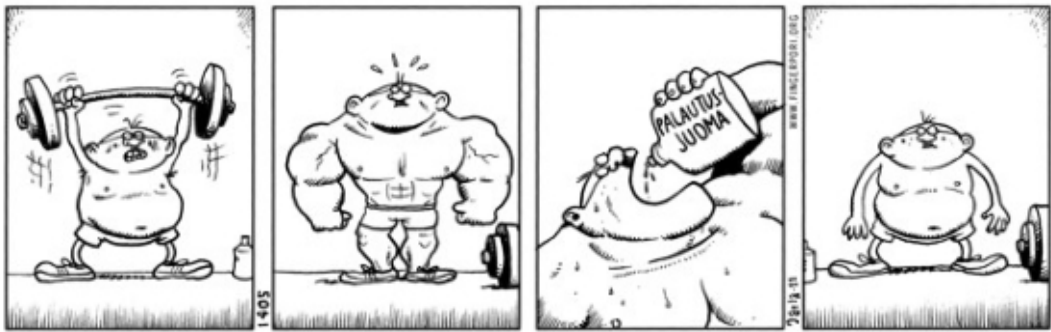
Wyrzykowska *et. al.*³³ tutkimuksessa selvitettiin laajemmin hivenaineita (23 eri ainetta, 35 eri olutta). Urheilulle tärkeimpinä näistä olutnäytteet sisälsivät keskimäärin rautaa 180 µg / l, kuparia 64 µg / l, nikkeliä ja kromia 14 µg / l.

Asfaw ja Bosnak³⁴ taas painottivat tutkimuksessaan vain muutamaa ainetta (Cu, Mn ja Fe). Kuparia oli 7 - 49 µg / l, mangaania 32 - 142 µg / l ja rautaa 35 - 175 µg / l.

Vaikka tutkimuksia on tehty vähän, kemian analyysilaitteiden laitevalmistaja Perkin Elmeriltä löytyy ohjeistusta oluen hivenainepitoisuuksien mittaamiseen, joka on hyvin samankaltainen Amerikan panimokemistien yhdistyksen (American Society of Brewing Chemist, Inc.) menetelmän kanssa.³⁵ Haasteina ovat esimerkiksi muutamien hivenaineiden hyvin pienet pitoisuudet, alkoholi taustassa ja näytteen syötön ongelmat.

3.2. Oluen ja palautusjuoman vertailu

Keskimääräisesti olut sisältää noin 0,4 g proteiinia ja 4,1 g imeytyviä hiilihydraatteja per 100 g olutta.³⁶ Tämä on proteiinin osalta selkeästi vähemmän, kuin esimerkiksi Tehon Sport palautusjuomassa kestävyysharjoitteluun³⁷, jossa on 5 g proteiinia ja 7 g sokereita 100 ml:ssa. Proteiinia siis ei juurikaan saada oluesta, mutta hiilihydraatit ovat hyvin lähellä palautusjuomien tasoja. Kuten jo aiemmin on mainittu, proteiinia saadaan yleensä ravinnosta tarpeeksi, jos ruokavaliota on edes vähän mietitty, eikä urheilun tavoitteellisuus ole asetettu korkeaksi (lihassmassan kasvatus ja tehokas kiinteytyminen).



Kuva 5: Fingerpori-sarjakuvan palautusjuoman toimintaa³⁸

Hivenaineissa palautusjuomat jäävät oluiden taakse Terveystieteen ja hyvinvoinninlaitoksen ravitsemusyksikön tietokantojen mukaan, kuten voidaan havaita taulukosta 2. Natrium on ainoa hivenaine, jonka pitoisuus on korkeampi kuin oluella. Tämä on tosin urheilujuomille ominaista, koska natriumia on paljon urheilussa kehosta poistuvassa hiessä. Taulukon 2 urheilujuoma on Leader recovery -proteiini-hiilihydraattijuoma³⁹ ja olut on keskiarvoistettu keskiolut³⁶.

On hyvä tässäkin vaiheessa muistaa, että palautuminen on monien asioiden summa, eikä pelkästään proteiinin tai hivenaineiden maksimaalisen saannon takaama tapahtuma.

Taulukko 2: Urheilujuomana käytettävän proteiini-hiilihydraattijuoman³⁹ ja oluen³⁶ hivenainepitoisuudet:

Hivenaine	Urheilujuoma [mg/ 100g]	Olut [mg/ 100g]
Kalsium	2,0	4,0
Rauta	<0,1	<0,1
Kalium	12,0	40,0
Magnesium	5,0	10,0
Natrium	51,0	3,3
Fosfori	2,0	22,0
Sinkki	<0,1	<0,1

3.3. Oluen ja ruoka-aineiden vertailu

Seuraavalla sivulla on esitetty (taulukko 3) erilaisten palautumisessa käytettävien ruoka-aineiden hivenainepitoisuuksia ja ravinnetietoja. Taulukosta 2 poiketen, tässä taulukossa on käytetty eri kirjallisuudesta¹³ löytyneitä arvoja hivenaineille. Poikkeuksena proteiinin ja hiilihydraatin pitoisuudet, jotka ovat Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitoksen tiedoista⁴⁰⁻⁴². On helppo havaita, että olut jää valmistusprosessin käsittelyjensä takia joissakin hivenainepitoisuuksissaan hiukan alhaisemmiksi kuin ruoka-aineiden pitoisuudet. On myös hyvä huomioida, että rahka ja banaani ovat kiinteinä, jolloin niiden imeyttäminen kehoon ei ole niin tehokasta kuin nesteillä. Niitä nautittaessa annoskoot ovat yleensä myös pienempiä, tällöin annoskoosta saatava hivenainemäärä on oluella suurempi.



Kuva 6: Ruoka-aine vertailussa käytettiin yleisesti palautumisessa hyväksi havaittuja ruoka-aineita: appelsiinimehua, banaania ja rahkaa. Tuotteet ovat vain malleina, eivätkä muuten liity kirjallisuuden¹³ tuloksiin.

Taulukko 3: Ruoka-aineiden sisältämät hivenainepitoisuudet ja ravinteet^{13,36,40–42}

Hivenaine	Olut [mg/ 100g]	Rahka [mg/ 100g]	Appelsiinimehu [mg/ 100g]	Banaani [mg/ 100g]
Kalium	40	170	190	360
Kalsium	3,7	120	9,9	7,0
Magnesium	9,9	12	10	33
Fosfori	22	180	16	26
Rikki	10	110	8,0	10
Pii	3,0	0,4	1	8
Rauta	0,03	0,05	0,13	0,44
Mangaani	0,03	0,01	0,03	0,24
Sinkki	0,01	0,55	0,04	0,21
Kupari	0,0052	0,026	0,022	0,12
Nikkeli	0,001	0,001	0,001	0,002
Kromi	0,0009	0,001	0,001	0,003
Proteiini	0,4	9,8	0,3	1,1
Hiilihydraatti	4,1	3,0	10	18,3

4. ALKOHOLIN VAIKUTUS KEHOON JA PALAUTUMISEEN

Alkoholilla tiedetään olevan paljon huonoja vaikutuksia liikuntakykyyn. Koordinaatiokyvyn menetys ja energiatasojen huonontuminen ovat selviä esimerkkejä todistetuista vaikutuksista. Alkoholilla nähdään usein myös pilaavan urheilusuorituksen jälkeisen palautumisprosessin täydellisesti. Tämä ei ole kuitenkaan totta, vaan palautuminen ei tiedettävästi ole yhtä tehokasta ja se myös viivästyy, koska alkoholi joudutaan ensin poistamaan kehosta. Tutkimukset tukevat tätä, mutta tutkimuksissa on usein nautittu todella paljon alkoholia ja niin sanotusta ”yhden / kahden”-annoksen vaikutuksista ei ole juurikaan ollut tutkimuksia. Professori Manuel J. Castillo teki Espanjassa Granadan yliopistossa tutkimuksen⁴³ oluen ja veden vaikutuksista palautumiseen. Tutkimuksessa päädyttiin tulokseen, jonka mukaan oluella ei pienissä määrin nautittuna ollut negatiivisia vaikutuksia ja se toimii jopa vettä paremmin urheilusuorituksen jälkeisessä kehon nesteytyksessä.

Usein luullaan, että alkoholi sekoittaa nestetasapainoa sen diureettisuuden takia, mutta alkoholilla ei kuitenkaan ole juurikaan vaikutusta tähän.⁴⁴ Etenkin palautumisen kannalta alkoholista ei ole niin paljon haittaa, koska nestehukan aikana alkoholilla diureettisen vaikutuksen teho heikkenee todella pieneksi.² Puhuttaessa oluttuotteista, voidaan jopa todeta, että ne auttavat vettä imeytymään, koska ne sisältävät imeytymistä tehostavia hivenaineita.



Kuva 7: Olut on yleisesti tunnettu palauttavista ominaisuuksistaan, vaikka se sisältääkin vähäisiä määriä alkoholia.⁴⁵

Kehon alkoholin poistaminen toimii kahdessa osassa: toinen alkaa toimia heti kun keho altistuu alkoholille ja toinen kun alkoholia on kehossa paljon.⁴⁶ Tämä toinen ”varajärjestelmä” osallistuu myös lääkkeiden aineenvaihduntaan, joka aiheuttaa väärinkäytön ongelmat. Tästä ei ole haittaa kun puhutaan oluen käytöstä urheilun jälkeen palauttavana juomana. Molemmat järjestelmät muuttavat alkoholia samalla tavalla ensin asetaldehydiksi, joka muuntuu aineenvaihdunnassa asetoniksi ja asetyyli-koentsyymi A:ksi. Asetyyli koentsyymi A:ta pystytään käyttämään ATP:n energiatuotannossa (sitruunahappokierron osana) tai rasvahappojen muodostamisessa. Usein nähdään alkoholin haittaavan energia-aineenvaihduntaa juomista seuraavana päivänä, mutta näin tapahtuu vain palautumiskäyttöä selvästi suuremmilla määrillä.

Testosteronitasojen mainitaan usein laskevan ja proteiinisynteesin käytännössä loppuvan, kun nautitaan alkoholia.⁴⁷ Alkoholin tiedetään vaikuttavan proteiinisynteesiin kroonista alkoholismia sairastavilla ihmisillä, mutta tutkimukset eivät osoita muutaman (1 - 2) annoksen haittaavan tai muuttavan synteesin toimintaa. Testosteronitasoissa taas on havaittu kolme viikkoa kestävässä testeissä miehillä 6,8 % putoaminen, kun nautitaan 30 - 40 g alkoholia päivittäin.⁴⁸ Välimäki *et. al.*⁴⁹ tutkimuksessa havaittiin 23 % pudotus testosteronitasoissa 10 - 16 tuntia alkoholin nauttimisen jälkeen, kun nautittiin 1,5 g etanolia painokiloa kohden kolmen tunnin aikana. Etenkin jälkimmäisessä tutkimuksessa olleet alkoholimäärät ovat jälleen hyvin suuria (80 kg massaiselle 120g alkoholia), kun otetaan huomioon, että 100 millilitrassa 4,5 % alkoholia sisältävää olutta on 3,5 g alkoholia eli yksi annos sisältää alkoholia noin 12 g.³⁶

Palautumisen tiedetään tapahtuvan levossa ja nukkuessa palautuminen on siten tehokkainta. Alkoholin vaikutukset uneen ja sen laatuun ovat hyvin tiedossa. Pienet määrät (1 - 2 annosta) yleisesti aiheuttavat väsymystä ja voivat auttaa nukahtamisessa. Tämä on kuitenkin jokseenkin yksilöllistä ja unilääkkeenä alkoholia ei tulisi käyttää. Useampi ”yömyssy” (4 - 7) saakin unenlaadun huononemaan, mm. heräilyä, painajaisia ja hikoilua alkaa ilmaantua. Suuremmilla annosmäärillä stressihormonit, melatoniini- ja kasvuhormonitasot madaltuvat, jolloin etenkin lihasten palautuminen kärsii. Syvään uneen tulevat häiriöt ovat erityisesti palautumista haittaavia.^{50,51}

On myös hyvä havaita, että tunnissa ihminen polttaa noin 0,1 g alkoholia painokiloa kohden eli massaltaan 120 kg ihminen polttaa annoksen tunnissa.^{52,44} Tämä toki vaihtelee yksilöllisesti muun muassa kehonkoostumuksen ja sukupuolen mukaan. Pääsääntöisesti voidaan olettaa, että alkoholi on kuitenkin ehditty poistamaan kehosta ennen kuin päästään syvään uneen, jos palautusjuomaolut nautitaan esimerkiksi ruuan yhteydessä. Ruokahan olisi hyvä nauttia noin tunnin sisään urheilusuorituksesta, jotta saataisiin suurin mahdollinen hyöty ravintoaineiden imeytymisestä. Litraa olutta löytyy lisäksi 50 % päivittäisestä niasiinin tarpeesta.⁵³ Niasiinin, eli B-3 vitamiinin puutos voi aiheuttaa päänsärkyä, hermostuneisuutta ja unettomuutta, joten se voi helposti vaikuttaa myös unen laatuun.⁴⁶

Alkoholijuomien puhutaan yleensä sisältävän paljon kaloreita, mutta tutkimustulokset alkoholin kulutuksen ja lihavuuden välisistä yhteyksistä ovat olleet ristiriitaisia. 0,33 litran tölkki keskialut sisältää noin 130 kcal⁶, mikä määrä kaloreita kulutetaan esimerkiksi alle puolen tunnin jalkapalloilulla tai 70 kiloisen naisen kahden tunnin levolla. Energiamäärät eivät siis ole mitenkään kohtuuttomia, jos harrastetaan vähänkin liikuntaa.⁵⁴ Muutamana esimerkkinä voidaan esittää suklaa⁵⁵, joka sisältää keskimääräisesti 521 kcal / 100 g, saksanpähkinät⁵⁶ 660 kcal / 100 g, kolajuomassa⁵⁷ on keskimääräisesti 45 kcal / 100 g ja mustaherukka-puolukkamehijuomassa⁵⁸ 73 kcal / 100 g.

5. OLUEN JA VASTAAVIEN NÄYTTEIDEN ESIKÄSITTELYMENETELMISTÄ

5.1. Virvoitusjuomanäytteiden käsittelystä yleisesti

Tuotteiden sisältäneet hivenaineet tulevat raaka-aineista, kuten vedestä, hiivasta ja käytetystä viljasta. Tällöin myös ilmasto-olot, viljan lannoittaminen, kerääminen ja muut käsittelyt vaikuttavat omalta osaltaan tuotteiden pitoisuuksiin.^{33,59} Myös itse oluen panemisessa tapahtuu muutoksia hivenainepitoisuuksissa.

Kirjallisuudesta löytyy paljon erilaisia käsittelytapoja oluille ja muille alkoholia ja muita orgaanisia taustoja sisältäville näytteille.⁵⁹ ICP (Inductively coupled plasma, Induktiivisesti kytketty plasma) menetelmillä tutkitut näytteet olivat usein käsitelty ennen varsinaista ajoa. Käsittelyt olivat kutakuinkin hyvin yksinkertaisia, sisältäen hiilidioksidin poistoa, happokäsittelyjä ja laimennoksia. Näytteiden käsittelyn helppous johtuu siitä, että ICP:ssä plasman lämpötila on niin korkea, ettei orgaaninen aines pääse juurikaan häiritsemään. Joissakin tutkimuksissa oli alkoholi poistettu näytteistä kokonaan lämpökäsittelyllä vertailun vuoksi, mutta alkoholillisen ja alkoholittoman analyysituloksien välillä ei havaittu juurikaan eroja. Alkoholin poistoa haihduttamalla sisältäneet tutkimukset vaativat kuitenkin selkeästi enemmän käsittelyä, työläimmillään lämmittämisiä ja suodattamista.⁶⁰ ICP-MS (mass spektrometry, massaspektrometri), ICP-OES (optical emission spectrometry, optinen emissio spektrometri) tai ICP-AES- laitteista (atomic emission spectrometry, atomi emissio spektrometri) MS:n mitta-alueet ovat matalammilla pitoisuuksilla, joten sitä käytettäessä näytteitä laimennettiin suhteessa enemmän kuin muita laitteita käytettäessä.

5.2. Hiilidioksidin poisto

Energiajuomissa hiilidioksidi poistettiin jättämällä juomatölkit aukinaiseksi vuorokaudeksi.⁶¹ Haihdutuksen ja happokäsittelyn yhdistelmää hiilidioksidin poistamiseksi oli myös käytetty olutnäytteille.⁶² Myös mikroaalto- ja ultraääni-käsittelyjä on käytetty, etenkin olutnäytteiden kohdalla. Menetelmien käyttö johtui oluiden runsaasta hiilidioksidimäärästä, joka oli saatava pois, jotta plasma ei sammuisi. Yksinkertaisimmilleen käsittely saatiin tutkimuksessa, jossa ainoa käsittely oli hiilidioksidin poisto argon-kaasun alla. Kyseisessä tutkimuksessa oli käytössä V-groove sumutin, joka sopi hyvin olutnäytteissä oleville taustoille.³⁴

5.3. Happokäsittely

Kirjallisuudessa esitellyissä käsittelymenetelmissä käytettiin liuotuksessa ja laimentamisessa veden lisäksi typpihappoa^{59-61,63}, vetykloridia⁶¹ ja vetyperoksidia⁶¹, mutta myös perkloorihappoa⁶⁰ ja rikkihappoa⁵⁹ käytettiin. Joissain tutkimuksissa oli käytetty edellä mainittujen happojen seoksia esimerkiksi typpihapon ja vetykloridin seosta.^{64,65} Happotaustaa käytettiin useimmissa tutkimuksissa, jotta myös hivenaineiden stabiilisuus parantuisi. Laimennukset olivat usein noin 1:2- 1:5, suurempiakin käytettiin esimerkiksi 1:50.³³

Happokäsittelymenetelmä voidaan yleistää seuraavanlaiseen malliin:

- 1) Pienen määrän näytettä lisäys näyteastiaan esimerkiksi sentrifugiputkeen.
- 2) Hapon (usein typpihappo) tai hapettavan yhdistelmän lisäys.
- 3) Näytteen käsittely sekoittamalla, ultraamalla, mikroalloilla tai lämmittämällä.
- 4) Toinen reagenssi lisäys, esimerkiksi happo, vetyperoksidi tai vesi.
- 5) Näytteen uudelleen käsittely, mahdollisesti eri menetelmällä kuin 3) kohdassa.
- 6) Liukenemattomien näytteenosien suodatus (voi olla myös viimeisenä).
- 7) Standardien lisäys ja haluttuun tilavuuteen laimennus vedellä tai laimealla hapolla.

5.4. Mikroaaltokäsittely

Mikroaaltokäsittelyä käytetään orgaanisessa kemiassa usein synteesien osana, mutta analytiikassa käsittelyllä saadaan aikaan hajotusmenetelmä, joka sopii vaikeammillekin näytteille. Menetelmässä eduksi analyttiselle puolelle muodostuu hyvä toistettavuus ja reagenssien pienentynyt kulutus.⁶⁶ Erittäin vaikeasti hajoavilla näytteillä se myös lyhentää hajotukseen käytettävää aikaa huomattavasti. Kirjallisuudesta löytyneissä tutkimuksissa käytettiin virvoitusjuomille useammin suljettuja mikroaaltosysteemejä ja tehot olivat lähellä 600 W. Käsittelyajoissa oli eroja sen mukaan, millaisia näytteitä oli kyseessä. Haastavammilla näytteillä kului enemmän aikaa hajotuksissa ja niissä käytettiin myös suurempia lämpötiloja.^{33,67} Esimerkiksi viinien alkuperän tunnistamisessa maaperän kautta, maaperänäytteiden hajotus tehtiin näytteen haastavuuden takia mikroaalto- ja happokäsittelyllä.⁶⁸ Mikroaaltokäsittelyä pidetään niin varmana menetelmänä, että sillä tehtiin esimerkiksi Asfawin ja Wibetoen³⁴ julkaisussa vertailu pohjat.

Wyrzykowska *et. al.*³³ tutkimuksessa käytetty mikroaalto ohjelma oluelle :

- 1) Näytettä on 1 ml 5 ml:ssä typpihappoa suljetussa PTFE-astiassa.
- 2) 30 min mikroaaltokäsittely 300 W.
- 3) 30 min tauko.
- 4) 60 min mikroaaltokäsittely 600 W.
- 5) Jäähdytys huoneenlämpöön.
- 6) Laimennus oikeaan tilavuuteen vedellä.



Kuva 8: Näyteliuotukseen käytettävä mikroaaltouuni Milestone Ethos Plus



Kuva 9: Mikroaaltouunin näyteastia valmiina siirrettäväksi mikroaaltouuniin

5.5. Ultraäänikäsittely

Ultraäänikäsittely voidaan suorittaa käyttämällä ultraäänisauvaa tai useampia näytteitä sisältäville tutkimuksille ultraäänihaudetta. Se on analytiikassa usein käytetty menetelmä, koska se on halpa, hyvin yksinkertainen ja turvallinen. Se on happohajotukseen yhdistettynä hyvin tehokas hajotusmenetelmä, kuten Väisänen *et al.*⁶⁹ todistivat.



Kuva 10: Ultraäänihaude ja ultraäänikäsittelyä odottavia näytteitä

Ultraääni nopeuttaa näytteiden käsittelyssä haluttuja reaktioita aiheuttamalla häiriöitä, joissa reaktioon tarvittavat pinta-alat kasvavat. Ultraäänellä aikaansaadaan kavitaatio, jolla saadaan poistettua nesteistä tehokkaasti kaasuja. Hivenaineet voivat myös olla kiinnittyneinä orgaanisen matriisin soluihin, jolloin ultraaminen auttaa niiden liukenemisessä. Ultraäänikäsittely on erään julkaisun mukaan nopeampi ja helpompi tehdä kuin mikroaaltokäsittely, koska työvaiheita on vähemmän ja kontaminaatoriskikin on pienempi.⁷⁰ Ultraääntä käytettiin esimerkiksi energiajuomien tutkimuksissa yhtenä osana käsittelyä.⁶¹

Malliksi Filgueiras *et. al.*⁷⁰ tutkimuksen mukainen hyvin yksinkertaistettu ultraäänikäsittely jauhetuille vihanneksille Sonics and Materials Inc:in 100 W ja 20 kHz VC-100-ultraäänihauteella:

- 1) 0,1 g näytettä 5 ml:ssä 0,3 % vetykloridia sentrifugiputkessa.
- 2) 3 min ultraus 30 %:sella ultraääni amplitudilla.
- 3) Kiinteiden aineiden erottaminen sentrifugoimalla.

5.6. Muut hajotus- ja erotusmenetelmät

Suurempia orgaanisia pitoisuuksia sisältäviä näytetaustoja, kuten vertailussa olleet urheilujuomapirtelöt, joudutaan häiriöiden ehkäisemiseksi käsittelemään enemmän. Tällaisiin näytteisiin löytyy kirjallisuudesta aiemmin mainittujen happoa ja mikroaaltoa hyväksikäyttävien menetelmien^{33,67} lisäksi muitakin menetelmiä, kuten kaksiosainen menetelmä, jossa näyte tuhkistetaan ja sen jälkeen suoritetaan liuotus (hapoilla). Tämä on menetelmistä huomattavasti helpompi toteuttaa. Tuhkistus jakaa mielipiteitä tieteellisissä piireissä sen virhemahdollisuuksien takia, mutta useat laboratoriot käyttävät sitä hyvillä ja luotettavilla tuloksilla. Tuhkistuksella saadaankin koko orgaaninen tausta poltettua, jolloin se ei jää häiritsemään analyysia.⁷¹ Tuhkistamiseen verrattava samantapainen menetelmä oli myös näytteen haihduttaminen uunissa ja sitä seuraava typpihappo- ja vetyperoksidikäsittely.⁶² Muissakin käsittelyissä käytettiin miedompia lämpökäsittelyjä esimerkiksi 85 °C-asteessa.⁶¹

Erilaisista liuosten taustoista ja käsittelyistä johtuen joissakin kirjallisuudesta löytyvistä näytteenkäsittelymenetelmissä jouduttiin turvautumaan myös perinteiseen erotusmenetelmään, suodattamiseen.^{59,60,67} Sentrifugia käytettiin myös kiinteiden aineiden erotukseen.⁶⁷

Kuten aiemmin on mainittu, Perkin Elmeriltä³⁵ löytyy oluiden käsittelylle ohjeistusta, joiden avulla päästään oluen haasteellisesta näytetaustasta eroon.

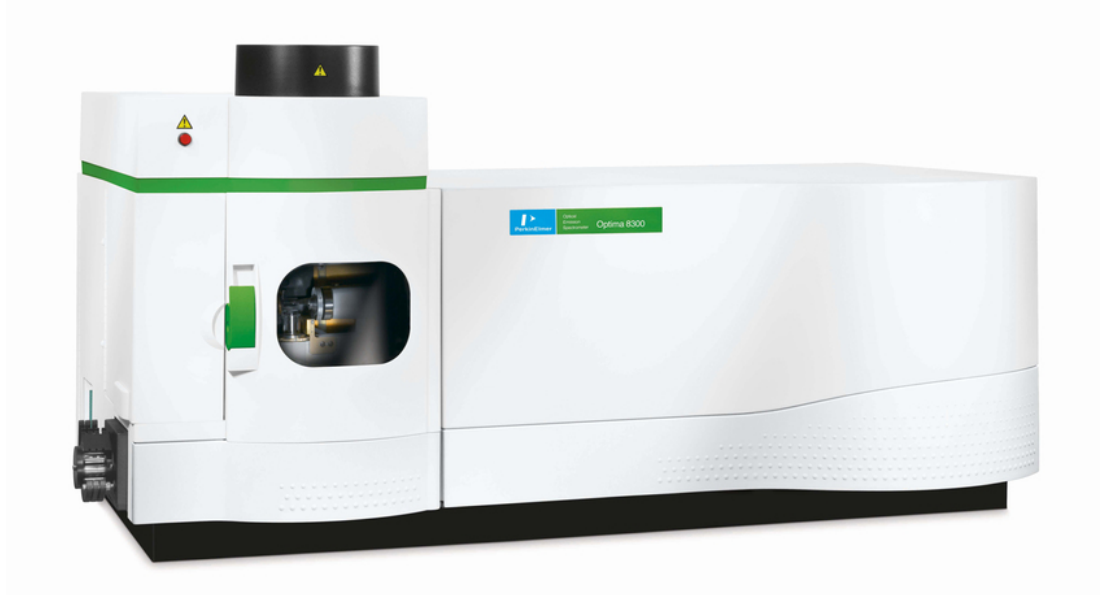
Perkin Elmerin mukainen oluen käsittely:

- 1) Oluen rauhallinen ravistelu.
- 2) Ultraäänikäsittely 15 min.
- 3) Sisäisen standardin lisäys.
- 4) Typpihapon lisäys → 7 % -tilavuusprosenttiin.
- 5) Hivenainepitoisuuksien mittaaminen.

6. ICP-OES HIVENAINEPITOISUUKSIEN MITTAAMISESSA

6.1. ICP-OES yleisesti

ICP-OES (inductively coupled plasma optical emission spectrometry = induktiivisesti kytketty plasma-optinen emissiospektrometri) on yleisesti hivenaineiden analytiikassa käytetty laite, GFAAS (graphite furnace atomic absorption spectrometry = grafiittiuuni atomiabsorptiospektrometri) ja FAAS (flame atomic absorption spectrometry = liekkiatomiabsorptiospektrometri) menetelmien ohella.⁷² ICP-OES on nopeampi kuin edellä mainitut menetelmät, koska siihen ei tarvitse vaihtaa eri alkuaineille ominaisia lampuja kesken mittauksen, jotta eri alkuaineita saataisiin mitattua.



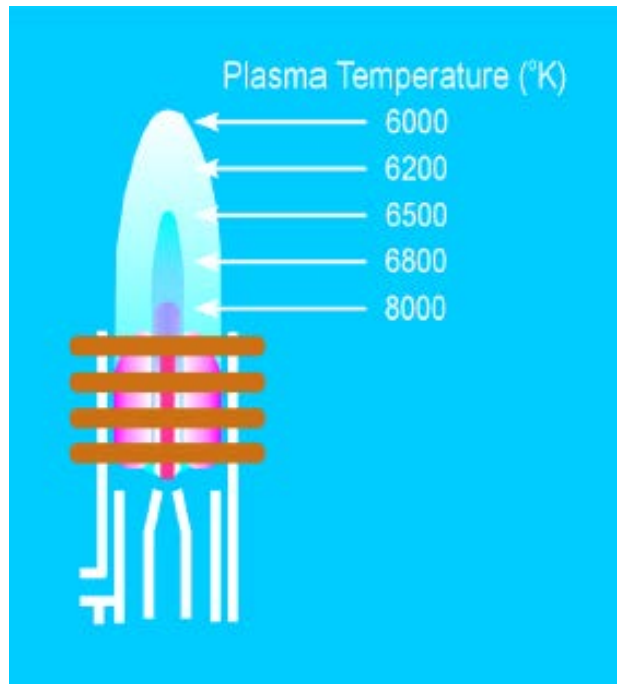
Kuva 11: Perkin Elmer Optima 8300 ICP-OES⁷³

Induktiivinen plasma tuotetaan soihdussa inerttiä Argon kaasua ionisoimalla.⁷⁴ Se tehdään sähköjohtavaksi Tesla-purkauksella, josta syntyneet ionit ja elektronit törmäilevät ja aiheuttavat lämpötilan kohoamisen erityisen korkeaksi. Korkea lämpötila saa ionisaation lisääntymään ja plasman syttymään. Plasmaa ylläpidetään käyttämällä magneettikenttää (4-50 Mhz ja 0,5-1,6 kW).

Näyte viipyy plasmassa noin 2 ms, joka on selkeä etu.⁷⁴ 2 ms on pitkä aika verrattuna muihin menetelmiin, esimerkiksi liekkiatomiabsorptiospektrometrin typpioksiduuli-asetyleeniliekissä aika on lyhyempi. Vapaana olevien atomien ja ionien ympäristö plasmassa on hyvin inertti, kun vertaillaan esimerkiksi liekkiä käyttäviin menetelmiin (FAAS).



Kuva 12: Induktiivisesti kytketty plasma.⁷⁴



Kuva 13: Plasman lämpötila-alueet kelvineinä.⁷⁴

ICP-tekniikassa näyte ionisoidaan korkealämpöisen plasman avulla. Plasman lämpötila on tuhansia celsiusasteita (kohdasta ja lähteestä riippuen 5000 - 10 000, katso kuva 13) ja tehoa plasmalla analytiikassa usein on 800 - 1600 W, joten tutkittavien aineiden virittyminen on erittäin tehokasta.⁷⁴ Plasma on hyvin stabiili ja se tuo mittaukseen hyvän herkkyyden.^{72,75} Tutkimusympäristö muodostuu kuumuuden ja jalokaasuatmosfäärin myötä hyvin inertiksi ja se sopii vaikka tarkkoihin biosovellusten kvalitatiiviseen ja kvantitatiiviseen tutkimiseen.⁷⁶ Monissa tutkimuksissa käytettiin pienempiä tehoja kuin mitä tässä tutkimuksessa. Oluelle käytettiin 1200 W tehoja^{33,34} ja viineillä^{59,60,63,68} tehot olivat 1000 - 1400 W välillä. Viskejä^{64,65} tutkittiin 1550 W tehoilla, joka on lähimpänä tämän tutkimuksen tehoja. Perkin Elmerin 5300 DV ja Optima 2100 DV ICP-laitteistoissa käytettiin olut analyysien ajoissa 1400 W:ia plasman tehona.³⁵ Tällä varmistetaan tehokas energiasiirto plasmasta näytteeseen ja siten luotettava mittaus. Suuren tehon lisäksi oluen analysoinnissa suositellaan käytettäväksi sisäisenä standardina joko yttriumia tai galliumia.

Fotospektrometrisissä menetelmissä (OES = AES) virittynyt elektroni emittoi fotonin palautuessaan viritystilalta perustilalleen. Tämä fotoni havaitaan detektorilla, ja jokainen detektorin havaitsema fotoni kasvattaa sen aallonpituuden omaavan tuotteen mitattua intensiteettiä. Intensiteettien mukaan pystytään tulkitsemaan syötettyjen näytteiden hivenainepitoisuudet.

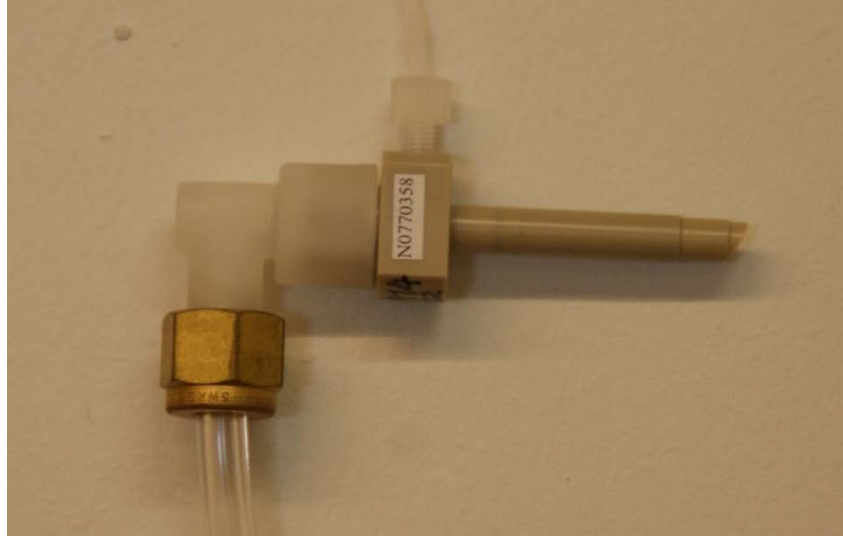
6.2. ICP-OES:n rakenteesta

ICP-OES on periaatteessa kahteen kategoriaan jakautuva laitteisto, joista toinen osa tuottaa signaalin ja toinen käsittelee signaalin ja sen tuottaman datan.

6.2.1. Signaalin tuotto

Signaalia tuottaviksi rakenteiksi lasketaan kaikki plasmaan ja näytesyöttöön liittyvät laitteet.^{74,75} Näytteensyöttö on yleisesti analyyseissä systeemin heikoin ja epätarkin osa näytteen itsensä jälkeen⁷⁷, kuitenkin se on ICP-OES laitteistossa saatu hyvin tasaiseksi ja tarkaksi. Näytteet ovat nestemäisinä, joten ne on säädettävän peristalttisen pumpun avulla kuljetettava plasmalle. Matkalla neste on kuitenkin muutettava nebulisaattorin eli sumuttimen (kuva 14) avulla hienojakoiseksi aerosoliksi. Sumutuskammion (kuva 15) tehtävä on erottaa liian suuret pisarat plasmaan päätyvästä aerosolista, ennen näytteen siirtämistä plasmaan. Paineilmasumuttimia on erilaisia, joista konsentroiva ja ristivirtaus ovat yleisimpiä. Babington ja v-ura ovat korkeille suolapitoisuuksille ja viskooseille liuoksille soveltuvia. Aerosoli sumutetaan plasmaan, jolloin tapahtuu höyrystyminen, atomisoituminen, ionisoituminen ja lopulta näytteen virittyminen.

Oluelle Perkin Elmer³⁵ käytti syklonista sumutinkammiota (kuva 15), ”Burgener Mira Mist”-sumutinta, 1,2 mm injektoria ja yksilovista plasmasoihhtua.



Kuva 14: GemCone mallinen sumutin.



Kuva 15: GemGone sumutin kiinnitettynä sykloniseen sumutinkammioon ja soihdun ohjausrunkoon.⁷⁴

6.2.2. Signaalin käsittely

Signaalia käsitteleviin laitteisiin lasketaan käytössä oleva optiikka ja elektroniset laitteet, kuten detektori ja tulostenkäsittelylaitteet.⁷⁴

Spektrometreissä käytetään useimmiten mono- tai polykromaattoria (=hila). Joissakin laitteissa on hilan lisäksi prisma, suuremman erotuskyvyn aikaansaamiseksi.⁷⁴ Polykromaattori pystyy mittaamaan useamman aallonpituuden samanaikaisesti, koska valo hajotetaan hilalla menemään useammalle keräimelle. Valo jaetaan siis eri aallonpituuksiin. Monokromaattori taas ei pysty tähän, vaan siinä valo kulkee yhden poistumisraon läpi. Jos halutaan mitata eri aallonpituuksilla pitää joko hilaa tai poistumisrakoa siirtää. Monokromaattorin etuna on kuitenkin se, että sen spektraalisten häiriöiden vähyyden takia myös tulokset ovat parempia ja taustankorjaaminen on helpompaa.

Detektorimalleja on useita erilaisia, mutta yleisin on valoherkkiin Si-kiteisiin perustuva CTD-ilmaisoin (charge transfer device).⁷⁴ Tästä kehittyneempi on SCD-detektori eli segmentoitu varauksenkytkentädetektori. Se sisältää tuhansien vierekkäisten pikselien sijasta 20 - 80 pikseliä sisältäviä yksittäisiä alaryhmiä. Näitä alaryhmiä voidaan tutkia yksitellen, jolloin koko detektorin dataa ei tarvitse lukea.

6.3. ICP käytöstä ja analyysien käytännöistä

6.3.1. Plasman mittauskohdan kohdistus

Herkkyuden varmistamiseksi ICP-OES laitteiston plasman mittauskohta varmistetaan, kun soihtu vaihdetaan uuteen tai puhdistettuun.⁷⁸ Kohdistus suoritetaan syöttämällä mangaaniliuosta ja etsimällä plasman alue, missä herkkyys mangaanille on suurin sekä radiaalisesti että aksiaalisesti. Aksiaalisen intensiteetin tulee olla noin kymmenkertainen verrattuna radiaaliseen ja tietysti oikealla pitoisuudella suhteessa syötettyyn standardiin.

6.3.2. Mittausten varmuus ja testaaminen

Mittauksissa tulee käyttää standardeja kaikille tutkittaville aineille, näiden eri pitoisuuksia olisi hyvä olla vähintään kolme ja näistä saadun standardisuoran pitää olla uskottavalla tarkkuudella.⁷⁴ Kirjallisuudessa esitettyjen mittaustuloksien uskottavuutta pidettiin yllä mittaamalla tutkittaville pitoisuuksille sopivat standardisuorat jokaiselle tutkittavalla hivenaineelle.

Mittauksiin käytettiin kirjallisuudessa usein itse tehtyjä ja laimennettuja tutkittavia tuotteita sisältäviä multistandardeja³⁴, mutta myös kaupallisia standardeja käytettiin esimerkiksi varmistettaessa toistettavuutta. Toistettavuus onkin tärkeää mm. viinien raskasmetallipitoisuuksia tutkittaessa⁶³, koska niille on asetettu turvallisuusrajat, joiden sisään määrät on saatava.

Alkoholin pitoisuuksien standardoimisen kanssa oltiin tutkimuksissa erityisen tarkkoja, koska sen tiedettiin vaikuttavan näytteiden kulkemiseen laitteessa ja haihtumiseen. Tämä varmistettiin lisäämällä alkoholia oikeassa suhteessa kaikkiin tehtyihin standardeihin. Esimerkiksi viskien tutkimuksessa lisättiin alkoholia, jotta alkoholiprosentti saatiin samaksi kuin laimennoksilla käsitellyillä viskeillä oli.⁶⁴

Näytteisiin on lisättävä sisäistä standardia, jotta näytteen mitattavia pitoisuuksia voidaan verrata johonkin muuttumattomaan pitoisuuteen.⁶³ Sisäisenä standardina on kannattavaa käyttää ainetta, jota tuote ei sisällä, esimerkiksi oluille sopii yttrium ja gallium.³⁵

Näiden seikkojen lisäksi on olutnäytteillä syytä käyttää suurta plasman tehoa ja pientä näytteensyöttönopeutta. Tämä johtuu siitä, että olut sisältää paljon liuennutta epäorgaanista ja orgaanista ainetta. Taulukosta 4 nähdään ohjeistus olutnäytteiden mittaamiseksi ICP-OES menetelmällä.

Taulukko 4: Laitevalmistaja Perkin Elmerin suosittelemat plasman parametrit ICP-OES menetelmälle oluen mittaamiseksi.³⁵

ICP-OES laitteen parametrit	
RF-Teho	1400 W
Plasman kaasuvirtaus	17 l / min
Aux apukaasuvirtaus	1,0 l / min
Sumuttimen kaasuvirtaus	0,5 l / min
Näytteen pumppausnopeus	2,0 ml / min
Soihdu kasetin asema	-3,0 mm
Integrointi aika	5 s. 20 Max.
Radiaalinen seuranta etäisyys	15 mm

Alkuaineista olutnäytteissä suurimpina pitoisuuksina esiintyvät natrium, kalium, magnesium ja kalsium mitataan radiaalisesti ja hivenaineet tyypillisesti aksiaalisesti. Näin tehtiin myös Perkin Elmerin ohjeistuksessa.³⁵

Mitä useampia samasta näytteestä tehtyjä näytteitä on, sen uskottavampia saadut tulokset yleisesti ovat.⁷⁹ Rinnakkaisnäytteitä tulee olla vähintään neljä, toisin kuin Perkin Elmerin oluiden analyysissä, jossa rinnakkaisia oli vain kolme.³⁵ Neljäs näyte antaa jo mahdollisuuden poistaa yksittäisen huonon tuloksen, niin sanotun Outlier-testin perusteella, joten neljää rinnakkaisnäytettä suositetaan enemmän analytiikassa. Tuloksien keskiarvot, hajonnat ja havaitsemisrajat lasketaan ja ilmoitetaan. Jos tuloksista löytyy tilastollisten testien perusteella selkeästi huonoja mittaustuloksia, on ne kannattavaa ilmoittaa ja poistaa tuloksista.

Havaitsemisrajat ovat kirjallisuudessa esitetyissä menetelmissä saatu hyvinkin mataliksi, esimerkiksi oluen kuparille ja raudalle raja oli 1,1 µg / l ja mangaanille 0,3 µg / l.³⁴

Saantokokeita käytettiin kirjallisuudessa paljon ja se oli selkeästi havaittu sopivaksi hivenainepitoisuuksien menetelmänkehityksen tutkimiseen. Tiedettyjä määriä standardiaineita lisättiin siis määrättyihin näytteisiin ja ne tutkittiin normaalien näytteiden joukossa. Näiden lisäysten tulee näkyä mitattujen normaalien näytteiden ja ”lisäys”-näytteiden pitoisuuksissa erona, joka on sama kuin lisätyn standardin pitoisuus. Energiajuomille tehdyssä tutkimuksessa on esimerkiksi tehty kaikille tutkituille hivenaineille kaksi erilaista lisäystä: 0,5 ja 1,0 mg / l. Näiden saantojen virheet pysyivät suurimmalta osalta 5 % sisällä ja suuremmissakin vaihteluissa saantoprosentit olivat 90 - 118 % välillä.⁶¹

7. KOKEELLINEN OSA

7.1. Laitteet

ICP-OES laitteena oli käytössä Perkin Elmerin Optima 8300. Sumuttimena käytettiin CemCone low flow -sumutinta, sumutinkammio oli sykloninen ja käytössä oli yksilovinen kvartsisoihtu. Näytteiden välissä pesuliuksena käytettiin 5 % typpihappoa.

Ultraäänihauteena oli Elman Transsonic T820/H ja Bandelinin Sonorex. Molemmissa laitteissa ultraäänen taajuus on 35 kHz.

Ultrapuhdasta vettä tuotettiin ELGA Purelab Ultra -laitteella. Se puhdistaa ionivaihdetun veden käyttäen käänteistä osmoosia ja ultravioletti valoa.

7.2. Näytteet ja reagenssit

Näytteinä oli useita eri laatuksia ja eri alkoholipitoisuuksilla olevia oluita eli eri viljaan tai valmistusmalliin pohjautuvia. Tutkimuksessa analysoidut oluet voitaisiin jakaa vaaleisiin ja tummiin lagereihin, vehnäoluisiin, aleihin, portereihin ja stoutteihin. Tutkimuksessa olleet oluet on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5: Hivenainepitoisuuksien tutkimuksessa analysoidut oluet ja niiden alkoholipitoisuus.

Oluet: [Tölkki = t, pullo = p]
Keisari 66 American Pale Ale 4,2 % t
Keisari Elovehnä suodattamaton 4,7 % t
Keisari kellari suodattamaton 4,6 % t
Keisari Münchener 4,5 % t
Koff 1 2,5 % t
Koff 3 4,5 % t
Koff 4 5,2 % t
Kuohu Pale Ale 3 4,7 % t
Kuohu Stout 3 4,7 % t
Lapinkulta 4,5 % t
Lapinkulta 5,2 % t
Lapinkulta Arctic Malt 0 % t
Lapinkulta Arctic Malt Dark Lager 4,6 % p
Marsalkka luomuvehnä 4,6 % p
Marsalkka luomuvehnä 4,6 % t
Marsalkka tumma 4,6 % t
Marsalkka tumma suodattamaton luomu 4,6 % p
Marsalkka vaalea luomu 4,6 % p
Nikolai vaalea lager 0 % t
Nikolai vaalea lager luomu 4,7 % t
Olvi 1 2,7 % t
Olvi 3 4,5 % t
Olvi 4 5,2 % t
Porter 4 7,2 % p
Sandels tumma 4,0 % t



Kuva 16: Tutkittuja oluita ja niiden yksilöidyt näyteputket odottamassa näytteen ottoa.

Työssä tarkasteltiin vertailuryhmänä myös kolmea erilaista kaupallista palautusjuomatuotetta:

1. Star Nutrition Recovery-Pro palautumisjauhe.
2. TEHO Sport palautusjuoma voimaharjoitteluun.
3. TEHO Sport palautusjuoma kestävyysharjoitteluun.

Näiden käsittelyssä jouduttiin kuitenkin tekemään radikaaleja muutoksia, koska niiden proteiini- ja hiilihydraattipitoisuudet olivat hyvin suuria ja olomuoto oli pirtelömäinen verrattuna oluisiin. Tuotteita ei siis saatu liuotettua homogeeniseksi liuokseksi ja siten päätettiin käyttää ensin tuhkestusta ja sitten happoliuotusta, jotta tuloksista saataisiin laadukkaat. Näiden näytteiden käsittelystä kerrotaan enemmän kohdissa 7.3.2 ja 8.2.2.

Olutnäytteiden käsittelyssä käytettiin typpihappoa (Sigma-Aldrich 65 %), 20 mg / l vahvuista Scandium-standardia (Perkin Elmer) ja Elga puhdistettua vettä. Standardien tekemiseen käytettiin Etaxin 99,5 % etanolia ja lähes kaikki tutkimuksissa käytetyt standardit olivat Perkin Elmerin (Atomic spectroscopy standards, 2 % HNO₃:ssa), muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta. Standardit on esitetty taulukossa 6.

Taulukko 6: Standardeihin käytettyjä reagensseja ja niiden pitoisuuksia.

Reagenssi	Pitoisuus [mg / l]	valmistaja (pvm, tekijä, suhteet)
Kalium	10 000	8.4-14 SP: 19,0726 g KCl / 1 l, 1 % HNO ₃
Natrium	10 000	8.4-14 SP: 25,4260 g NaCl / 1 l, 1 % HNO ₃
Kalsium	3000	28.2-12 VS: 8,828 g Ca(NO ₃) ₂ / 500 ml, 0,5 M HNO ₃)
Barium, Fosfori, Koboltti, Kromi, Kupari, Magnesium, Mangaani, Nikkeli, Pii, Rauta, Rikki, Sinkki, Strontium	1000	Perkin Elmer

7.3. Näytteenkäsittely

7.3.1. Ultraäänikäsittely

Olutnäytteiden käsittely hivenainepitoisuuksien määrittämistä varten tehtiin seuraavasti:

- 1) Olutta pipetoitiin 3 ml:aa 15 ml:an sentrifugiputkeen, ravisteltiin ja päästettiin kaasuja pois.
- 2) Näytettä käsiteltiin ultraäänihauteessa 5 min.
- 3) Näytteeseen lisättiin väkevää (Sigma-Aldrich 65 %) typpihappoa viisi pisaraa, jonka jälkeen näyte ravisteltiin homogeeniseksi.
- 4) Olutnäyte ultrattiin 2 x 5 min ajan välissä ravistellen ja korkki avattiin, jotta kaasut pääsevät vapaaksi.
- 5) Näytteeseen lisättiin 20 mg / l vahvuista Sc-standardia 500 µl, jonka jälkeen lisättiin vettä 8 ml:n merkkiin saakka.
- 6) Näyte ravisteltiin ja ultrattiin 5 min ajan.
- 7) Vaahdon annettiin laskeutua noin 30 min ajan (näytteestä korkit auki huoneenlämmössä).
- 8) Näytteeseen lisättiin vettä 10 ml:n merkkiin asti.
- 9) Näyte ravisteltiin ja ultrattiin 5 min ajan vielä kerran.
- 10) ICP-OES analyysi.

Vaihtoehtoisesti voitaisiin vaaleilla lageroluilla käyttää myös konsentroidumpaa näytettä ”käsittely III” -tapaan, jossa pipetoidaan olutta 3 ml:n sijaan 5 ml:aa.

7.3.2. Tuhkistus

Näytteenkäsittelynä tuhkistusta käytettiin kestävyys- ja palautusjuomien käsittelemiseksi. Näytteenkäsittely tapahtui seuraavasti:

- 1) TEHO Sportin palautusjuomia kestävyys- ja voimaharjoitteluun pipetoitiin 5 ml ja jauhemaista Star nutritionin recovery-pro:ta punnittiin noin 1 gramma posliiniupokkasiin.
- 2) Upokkaat siirrettiin uuniin.

Uunin lämpötilaohjelma Star nutritionin jauhoille

- 1) 8 tuntia 120-asteessa.
- 2) 1½ tuntia 300-asteessa.
- 3) 2 tuntia 500-asteessa.
- 4) 2 tuntia 1000-asteessa

Uunin lämpötilaohjelma Tehon palautusjuomille

- 1) 6 tuntia 120-asteessa.
- 2) 1½ tuntia 300-asteessa.
- 3) 1½ tuntia 500-asteessa.
- 4) 3 tuntia 1000-asteessa

- 3) Näytteiden annettiin jäähtyä (yön yli).
- 4) Tuhkat siirrettiin 15 ml:an sentrifugiputkeen ja liuotettiin 2 ml:aan väkevää typpihappoa.
- 5) Näytteitä ultrattiin 5 min.
- 6) Ravistelun jälkeen lisättiin 20 mg / l Sc-standardia 500 µl.
- 7) Täytettiin 10 ml:n merkkiin vedellä.
- 8) Näyte ravisteltiin ja ultrattiin 10 min ajan.

8. OLUTNÄYTTEIDEN ANALYSOINTI

8.1. Kalibrointi

Tutkimuksen aluksi analysoitiin **semikvantitatiivisesti** joitakin vaaleita lageroluita, jotta saatiin pohjatiedot oluiden hivenainemääristä. Tulosten pohjalta tehtiin 0, 1 ja 2 standardiliuokset hivenaineille. Kalibroinnin tarkemmat tiedot löytyvät taulukosta 7.

Olutnäytteissä käytettiin sisäisenä standardina scandiumia, koska sitä olutnäytteet eivät sisällä luonnostaan. Sisäisen standardin pitoisuus oli kaikissa näytteissä 1 mg/l.

Taulukko 7: Tutkimuksessa analysoidut hivenaineet, mittauksien tarkemmat tiedot, havaitsemisrajat (LOD) ja kalibraation tiedot.

Hivenaineet	LOD (mg / l)	Aallonpituus (nm)	Mittaussuunta	Kalibrointialue (mg / l)	R-arvo
Na	2	589,592	Radiaalinen	1-100	0,99994
K	9	766,490	Radiaalinen	5-500	0,999931
Mg	0,7	285,213	Radiaalinen	1-100	0,999985
Ca	0,9	317,993	Radiaalinen	0,9-90	0,999979
Zn	0,037	213,857	Aksiaalinen	0,02-2	0,999987
Fe	0,027	238,204	Aksiaalinen	0,02-2	0,999984
Cr	0,016	267,716	Aksiaalinen	0,02-2	0,999992
Ni	0,035	221,648	Aksiaalinen	0,02-2	0,999931
Cu	0,01	324,752	Aksiaalinen	0,02-2	0,99997
Sr	0,04	407,771	Aksiaalinen	0,02-2	0,99991
Si	1,2	251,611	Aksiaalinen	1-100	0,999978
S	2,0	180,669	Radiaalinen	1-100	0,999862
P	13	213,617	Radiaalinen	0,02-2	0,999815
Co	0,013	238,892	Aksiaalinen	0,02-2	0,999995
Mn	0,014	257,610	Aksiaalinen	0,02-2	0,999996
Ba	0,01	233,527	Aksiaalinen	0,02-2	0,999999

Taulukosta 7 on helppo havaita, että havaitsemisrajat olivat hyvin matalia, mikä ei sinänsä yllätä kun puhutaan ICP-OES menetelmästä. Joidenkin hivenaineiden mittauksessa käytettiin useampaa aallonpituutta, joten taulukkoon ilmoitettiin aallonpituudeksi se aallonpituus, joka havaittiin saantokokeiden perusteella käyttökelpoisemmaksi. Kalibroitalueet valittiin, ja siten myös tehtiin, ensimmäisenä tehdyn semikvantitatiivisen analyysin ja kirjallisuudesta löytyneiden pitoisuuksien mukaan. Kalibraatiosuorien R-arvoista voidaan todeta, että standardit oli onnistuneesti valmistettu, kun analyttisen vaatimuksen tiedetään olevan 0,999.

8.2. Menetelmäkehitys näytteiden käsittelemiseksi

8.2.1. Ultraäänikäsitteily oluelle

Olutnäytteiden testiajossa havaittiin, ettei plasma pysy kaikilla olutlaaduilla päällä, joten näytteille suunniteltiin käsittely laitevalmistajan ohjetta³⁵ muuttaen. Tärkeimpänä tavoitteena oli saada hiilidioksidi poistettua, jotta plasma saataisiin pysymään paremmin päällä. Näiden pohjalta muodostui käsittely I.

Käsittely I suoritettiin seuraavalla tavalla:

- 1) Olutta Pipetoitiin 5 ml:aa 15 ml:an sentrifugiputkeen, ravisteltiin ja päästettiin kaasuja pois.
- 2) Näytteen käsittely ultraäänihauteessa 3 min.
- 3) Näytteeseen lisättiin väkevää typpihappoa (Sigma-Aldrich 65 %) viisi pisaraa, jonka jälkeen näyte ravisteltiin homogeeniseksi.
- 4) Olutnäyte ultrattiin 2 x 3 min ajan välissä ravistellen ja korkki avattiin, jotta kaasut pääsevät vapaaksi.
- 5) Näytettä jäähdytettiin, jotta pipetointia vaikeuttava vaahdon määrä saataisiin mahdollisimman pieneksi.
- 6) Näytteeseen lisättiin 20 mg / l vahvuista Sc-standardia 300 µl ja lisättiin sitten vettä 6 ml:an merkkiin saakka.
- 7) Näytteet analysoitiin ICP-OES:llä. Ajon parametrit löytyy taulukko 9:sta (8.4 ICP-OES menetelmän kehitys).

Plasma ei vieläkään pysynyt laimennuksesta ja hiilidioksidin poistosta huolimatta päällä, joten näytteen käsittelyyn tehtiin muutoksia. Tästä muodostui käsittely II.

Käsittely II eroaa käsittely I seuraavasti:

- 1) Näytteeseen lisättiin 20 mg / l vahvuista Sc-standardia 500 µl 300 µl sijaan veden lisäyksen ohessa.
- 2) Veden lisäys oli 6 ml:an sijaan 8 ml:aa.
- 3) Näyte ravisteltiin ja ultrattiin vielä lisäyksien jälkeen 3 min ajan.
- 4) Vaahdon annettiin laskeutua noin 30 min ajan (näytteestä korkit auki huoneenlämmössä),
- 5) Vettä lisättiin lopuksi 10 ml:n merkkiin asti.
- 6) Näyte ravisteltiin ja ultrattiin 3 min ajan vielä kerran.
- 7) ICP-OES analyysin asetukset pidettiin samana, kuin käsittely I-ajossa. Kaikki ajot onnistuivat, joten käsittely todettiin senhetkisille näytteille sopivaksi.

Mittauksia jatkettiin uusilla näytteillä, ICP-OES:n mittauksen parametrien ollessa samat kuin käsittely I:ssä. Standardien pitoisuudet todettiin sopiviksi, mutta uusilla tummilla oluilla plasma ei pysynyt kunnolla päällä. Ajatuksena oli vaihtaa 5 % - typpihappo 20 %:ksi kuningasvedeksi pesussa, mutta tummille oluille päätettiin kuitenkin tehdä muutos näytteenkäsittelyssä. Tummilla oluilla pipetoitaisiin 5 ml:n sijaan 4 ml:aa näytettä. Kaikille näytteille päätettiin pidentää ultrauksen aikaa 3 minuutista 5:teen minuuttiin. Käsittelyjen nimeksi tuli siis ”käsittely III” ja tummille oluille ”TK”.

Mittauksia jatkettiin käsittely III mukaan, mutta muutamilla tummimmista oluista plasma ei pysynyt vieläkään päällä, joten muutos päätettiin tehdä kaikkien oluiden käsittelyssä. Olutta pipetoitaisiin siis 3 ml, riippumatta siitä oliko olut vaalea vai tumma. Tätä käsittelyä käytettiin siis lopullisissa analyyseissä ja nimi oli kaavan mukaisesti käsittely IV.

Lopullinen eli käsittely IV:

- 1) Olutta pipetoitiin 3 ml:aa 15 ml:an sentrifugiputkeen, ravisteltiin ja päästettiin kaasuja pois.
- 2) Käsiteltiin näytettä ultraäänihauteessa 5 min.
- 3) Näytteeseen lisättiin väkevää (Sigma-Aldrich 65 %) typpihappoa viisi tippaa, jonka jälkeen näyte ravisteltiin homogeeniseksi.
- 4) Olutnäyte ultrattiin 2 x 5 minuutin ajan välissä ravistellen ja paineet tasailten.
- 5) Näytteeseen lisättiin 20 mg / l vahvuista Sc-standardia 500 µl ja lisättiin sitten vettä 8 ml:n merkkiin saakka.
- 6) Näyte ravisteltiin ja ultrattiin 5 min ajan.
- 7) Vaahdon annettiin laskeutua noin 30 min ajan (näytteestä korkit auki huoneenlämmössä).
- 8) Lisättiin vettä 10 ml:n merkkiin asti.
- 9) Näyte ravisteltiin ja ultrattiin 5 min ajan vielä kerran.
- 10) ICP-OES -analyysi ajolla Käsittely IV mukaan, taulukko 9 (8.4 kohdassa).

8.2.2. Palautusjuomien käsittely

Alussa palautusjuomia yritettiin käsitellä samalla tavalla kuin olutnäytteitäkin, mutta menetelmä ei ollut toimiva, koska näytteen orgaaninen tausta oli paljon vaikeampi. Näytteet vaativat siis tuhkimista.

Ensimmäinen testituhkimus

- 1) TEHO Sportin palautusjuomia kestävyys- ja voimaharjoitteluun pipetoitiin 25 ml ja jauhemaista Star Nutritionin Recovery-prota punnittiin noin 1 gramma posliiniupokkaisiin.
- 2) Upokkaat laitettiin 500 -celsiusasteiseen uuniin, mutta liuosmäärän todettiin olevan liian suuria Tehon tuotteille ja aloituslämpötila oli myös liian korkea ottaen huomioon näytteissä olevan veden kiehumisen.

Toinen testituhkimus

- 1) Teho Sportin kestävyys ja voima palautusjuomia pipetoitiin 5ml ja punnittiin noin 1000 mg:aa jauhemaista Star Nutritionin Recovery-pro:ta posliini upokkaisiin.
- 2) Upokkaat siirrettiin uuniin, joka lämmitettiin 125 -asteeseen. Tässä lämpötilassa pidettiin näytteitä 8 tuntia
- 3) Lämpötila nostettiin 300-asteeseen 3 tunniksi, 500 -asteeseen 3 tunniksi ja lopuksi 1000-asteeseen 2 tunniksi.
- 4) Näytteiden annettiin jäähtyä rauhassa
- 5) Tuhkat liuotettiin 2 ml:aan väkevää typpihappoa 15 ml:an sentrifugiputkessa.
- 6) Näytteitä ultrattiin 5 minuuttia
- 7) Ravistelun jälkeen lisättiin 20 mg / l Sc-standardia 500 µl.
- 8) Täytettiin 10 ml:n merkkiin vedellä
- 9) Näyte ravisteltiin ja ultrattiin 10 minuutin ajan.

Näytteet ajettiin ICP-OES:llä samalla kun olutnäytteetkin, mutta Star nutritionin jauheessa tulokset otettiin mg / kg, mg / l sijaan. Menetelmä tiedettiin toimivaksi, joten kaikista näytteistä valmistettiin neljä rinnakkaisnäytettä.

Uunissa jauhe-näytteet olivat seuraavasti:

1. 8 tuntia 120-asteessa.
2. 1½ tuntia 300-asteessa.
3. 2 tuntia 500-asteessa.
4. 2 tuntia 1000-asteessa.

Tehon näytteet olivat uunissa seuraavasti:

1. 6 tuntia 120-asteessa.
2. 1½ tuntia 300-asteessa.
3. 1½ tuntia 500-asteessa.
4. 3 tuntia 1000-asteessa.

Näiden liuotukset tehtiin ”toinen testituhkistus” kohdassa selitetyllä tavalla.

Näytteet analysoitiin muiden käsittely IV:n saaneiden näytteiden kanssa.

8.3. Saantokokeet

Analyysin tarkkuutta päätettiin työn edetessä testata, kun siirryttiin käyttämään ”III” ja ”TK”-käsittelyjä olutnäytteille. Kirjallisuudessa ja muutenkin hyväksi havaitut saantokokeet tehtiin arvotulle näytteelle.

Saantokokeita varten valmistettiin siis kymmenen uutta näytettä. Näistä näytteistä kahdessa ei ollut lisäystä (=vertailu), kahdessa oli ”Ravinteet pieni”-lisäys, kaksi joissa oli ”Ravinteet suuri”-lisäys, kahdessa oli ”Hivenaineet pieni”-lisäys, kaksi joissa oli ”Hivenaineet suuri”-lisäys.

Saantokokeen näytteet käsiteltiin normaalilla tavalla, paitsi scandium lisäyksen ohessa lisättiin oikeat määrät haluttuja standardeja. Nämä näytteet ajettiin ICP-OES:llä uusilla parametreilla ja pesussa käytettiin vettä. Tulokset olivat hyviä, paitsi

piillä, seleenillä ja molybdeenillä. Näille jouduttiin tekemään omat standardit, jottei ilmenisi mahdollista alkuaineiden välistä häiriötä.

Seleenin, molybdeenin ja piin saantokokeeseen tehtiin myös uudet olutnäytteet, jossa oli lisäyksenä vain seleeniä, molybdeeniä ja piitä. Lisäykset tehtiin Elga-veden täytön ohessa, mutta muuten käsittely oli kuten käsittelyssä IV, jonka käyttöön oltiin jo edetty. Lopulliset saantokokeiden tulokset on esitetty taulukossa 8.

Taulukko 8: Saantokokeiden lisäykset ja tulokset hivenaineittain

Hivenaine	Lisäys Pieni [mg / l]	Saanto Pieni	Lisäys Suuri [mg / l]	Saanto Suuri
Na	5	94 %	10	94 %
K	120	85 %	240	86 %
Mg	20	103 %	40	101 %
Ca	4	99 %	8	97 %
Zn	0,02	109 %	0,1	111 %
Fe	0,02	104 %	0,1	112 %
Cr	0,02	125 %	0,1	120 %
Ni	0,02	108 %	0,1	106 %
Cu	0,02	109 %	0,1	102 %
Sr	0,02	106 %	0,1	105 %
Si	2,5	93 %	5	93 %
S	0,02	121 %	0,1	100 %
P	0,02	112 %	0,1	118 %
Co	0,02	109 %	0,1	111 %
Mn	0,02	111 %	0,1	101 %
Ba	0,02	110 %	0,1	111 %

Yleisesti katsotaan 95 - 105 saantoprosentin tuloksen olevan erinomainen, joten saatujen tulosten saantoprosentit ovat hyviä, osittain jopa erinomaisia. Matalamman pitoisuuden lisäyksellä saatiin 85 - 121 % saannot ja korkeamman pitoisuuden lisäyksellä 86 - 120 % saannot. Tulokset ovat hyviä verrattuna ICP-MS laitteistoa käyttäneeseen Mahmood *et. al.*⁶² tieteelliseen julkaisuun, jossa matalamman pitoisuuden lisäyksen sisältäneiden näytteiden saannot olivat 83 - 152 % ja korkeamman saannot olivat 82 - 116 %.

8.4. Menetelmäkehitys ICP-OES:llä

ICP-OES laitteiston osia ja asetuksia säädettiin tutkimuksen aikana hyvin vähän. Semikvantitatiivinen mittaus tehtiin kolmilovisella plamasoihdulla yksilovisen sijaan, koska kirjallisuuden perusteella sen tiedettiin toimivan orgaanisten näytetaustojen kanssa. Käytössä oli muuten samat laitteet kuin 7.1 kohdassa on esitelty.

Plasma ei kuitenkaan pysynyt kaikilla olutnäytteillä päällä, joten ”Käsittely I”-mittauksessa kokeiltiin kolmilovisen soihdun sijaan käyttää yksilovista. Injektorin halkaisija pidettiin kuitenkin 2 mm:ssä (käsittelytesti I-nimellä).

Tässä vaiheessa havaittiin kuitenkin, ettei soihdulla ole väliä ja jo hyvin aikaisessa vaiheessa siirryttiin käyttämään yksilovista soitua ja keskityttiin oikeanlaisen oluen käsittelyn etsimiseen.

Seleenin epäherkän mittauksen takia jouduttiin kuitenkin ottamaan käyttöön Perkin Elmerin FIAS-400 näytteenäytötyttöön liittyvä laite. Tämäkään ei tuottanut toivottua tulosta. Näytteenäytötyttöä yritettiin vielä muuttaa (kuvat 17 ja 18) ja näytteenkäsittelyyn lisättiin vielä suodatuskin, mutta plasmaa ei saatu pysymään päällä. Tästä lisää tietoa kohdassa 8.4.1 Tästä syystä seleenipitoisuuksien mittaaminen vaatisikin lisää tutkimusta.

Taulukko 9: Olutnäytteiden hivenainepitoisuuksien mittaamisessa käytetyt mittauseräparametrit

	Plasmakaasun virtaus (Ar l / min)	Apukaasun virtaus (l / min)	Sumutinkaasun virtaus (Ar l / min)	Plasman teho (W)
Semikvantti	17	0,5	0,6	1500
Käsittely I	18	1,0	0,5	1500
Palautustesti	18	1,0	0,45	1500
Käsittely IV	18	1,0	0,45	1500

8.4.1. Oluen näytteenkäsittely seleenin mittaamiseksi

Seleenin pitoisuuksia yritettiin siis vielä varmistaa hydridimenetelmällä, mutta se ei kuitenkaan onnistunut suuren vetykaasun muodostumisen takia. Näytteet valmistettiin kirjallisuudesta löytyvän menetelmän⁸⁰ mukaan ja käytössä oli Perkin Elmerin FIAS-400 hydridin muodostuksen mahdollistava näytteesyötön osa. Näytteesyöttöä yritettiin vielä muuttaa (kuvat 17 ja 18) ja näytteenkäsittelyyn lisättiin vielä suodatus HCl:n lisäyksen takia muodostuneen kiinteän aineksen poistamiseksi, mutta plasmaa ei saatu pysymään päällä ja seleenin varmistaminen oli jätettävä pois.



Kuva 17 ja 18: Hydridimenetelmän näytteesyöttö

8.5. Näytteiden mittaus

Kun näytteiden käsittely oli todettu toimivaksi ja ICP-OES mittausmenetelmä oli validoitu, kaikista olutnäytteistä tehtiin neljä rinnakkaista analyysinäytettä käsittely IV:llä ja ne kaikki analysoitiin ICP-OES:llä. ICP-OES:llä analyyseissä käytetyt parametrit löytyvät taulukosta 9.

8.6. Olutnäytteiden hivenainepitoisuudet

Olutnäytteiden hivenainepitoisuudet olivat osittain jopa yllättävän korkeita. Hivenaineiden pitoisuuksien voidaan sanoa kasvavan oluen alkoholiprosentin noustessa. Nautittaessa pari olutta päivässä, voidaan hivenainepitoisuuksista todeta seuraavaa. Piitä löytyi esimerkiksi yli päivittäisen tarpeen, kupari ja kromi pitoisuudet olivat yli 50 % päivittäisestä tarpeesta ja magnesiumia, fosforia ja kaliumiakin on mainittavan hyvin. Päivittäisen hivenainetarpeen saavuttamiseen oluella ei tosin kannata pyrkiä, mutta hivenaineidensa takia sen vaikutus nesteytykseen on selkeästi havaittavissa. Oluella ei tietystikään pidä yrittää korvata terveellistä ja laaja-alaista ruokavaliota, sama neuvo pätee kyllä myös myynnissä oleviin lisäravinteisiin. Tuloksia on esitetty taulukoissa 10 - 15, joissa rinnakkaisnäytteiden keskiarvo ja keskihajonnat.

Taulukko 10: Saimaan panimon tuotteiden hivenainepitoisuudet

Saimaan panimo	Marsalkka vaalea Luomu 4,6% p	Marsalkka luomuvehnä 4,6% p	Marsalkka luomuvehnä 4,6% t	Marsalkka Tumma Luomu suodattamaton 4,6% p	Marsalkka tumma 4,6% t
Hivenaine	Tulosten pitoisuudet ilmoitettu mg / l:ssa. Tölkki=t, Pullo=p.				
Na	18,4± 0,8	10,12± 0,09	19,2± 0,2	12,5± 1,2	16,6± 0,6
K	520± 30	512± 4	498± 6	540± 20	580± 20
Mg	89± 7	88,6± 0,6	81,4± 1,0	113± 10	119± 5
Ca	16,6± 0,6	6,7± 0,2	7,6± 0,5	26,5± 1,3	22,1± 0,8
Zn	0,049± 0,006	0,08± 0,006	0,104± 0,005	0,09± 0,01	0,05± 0,01
Fe	0,18± 0,03	0,12± 0,02	0,093± 0,005	0,24± 0,09	0,22± 0,03
Cr	0,0267± 0,0013	0,0223± 0,0015	0,0223± 0,0009	0,026± 0,003	0,0288± 0,0013
Ni	0,14± 0,03	0,104± 0,002	0,112± 0,004	0,123± 0,008	0,137± 0,006
Cu	0,3± 0,4	0,06± 0,008	0,048± 0,007	0,03± 0,02	0,049± 0,006
Sr	Alle LOD:n	Alle LOD:n	Alle LOD:n	0,09± 0,003	0,081± 0,004
Si	45± 13	28,6± 0,2	28,5± 0,4	38,10± 0,15	37,7± 1,4
S	94± 3	85,7± 0,6	80,4± 1,3	90± 5	99± 4
P	340± 15	320± 4	316± 5	320± 30	372± 13
Co	0,015± 0,002	0,017± 0,002	0,015± 0,003	0,015± 0,001	0,0135± 0,0012
Mn	0,076± 0,004	0,156± 0,001	0,1253± 0,0013	0,18± 0,02	0,234± 0,007
Ba	0,0193± 0,0015	0,0045± 0,0005	0,0015± 0,0005	0,017± 0,006	0,052± 0,003

Taulukko 11: Hartwallin panimon tuotteiden hivenainepitoisuudet

Hartwall	Lapinkulta 4,5 % t	Lapinkulta 5,2% t	Lapinkulta Arctic Malt 0% t	Lapinkulta Arctic Malt Dark Lager 4,6% p
Hivenaine	Tulosten pitoisuudet ilmoitettu mg / l:ssa. Tölkki=t, Pullo=p. LOD=havaitsemisraja			
Na	17,2± 0,9	20,2± 0,2	13,17± 0,12	16,4± 0,6
K	490± 20	619± 7	219,0± 1,1	477± 13
Mg	123± 5	155,0± 0,4	70,3± 0,4	121± 4
Ca	74± 3	91,3± 0,5	54,6± 0,5	91± 3
Zn	Alle LOD:n	Alle LOD:n	0,0600± 0,0009	0,068± 0,003
Fe	0,055± 0,003	0,075± 0,005	0,247± 0,001	0,09± 0,02
Cr	0,0228± 0,0013	0,030± 0,009	0,027± 0,002	0,030± 0,0013
Ni	0,0960± 0,0013	0,1217± 0,0005	0,040± 0,002	0,0880± 0,0007
Cu	0,074± 0,008	0,2± 0,1	0,01± 0,03	0,06± 0,02
Sr	0,129± 0,009	0,152± 0,002	0,0937± 0,0013	0,138± 0,006
Si	23,9± 0,9	30,05± 0,06	12,81± 0,11	24,5± 0,8
S	110± 5	137,80± 0,05	47,09± 0,11	92,5± 1,5
P	328± 13	423,3± 1,6	205± 2	334± 8
Co	0,008± 0,003	0,0050± 0,0009	0,014± 0,002	0,0155± 0,0015
Mn	0,15± 0,03	0,1717± 0,0013	0,156± 0,002	0,172± 0,005
Ba	0,020± 0,004	0,028± 0,003	0,15± 0,08	0,15± 0,08

Taulukko 12: Sinebrychoffin panimon tuotteiden hivenainepitoisuudet

Sinebrychoff	Nikolai vaalea lager 0% t	Nikolai vaalea lager luomu 4,7% t	Koff 1 2,5% t	Koff 3 4,5% t	Koff 4 5,2% t	Porter 4 7,2% p
Hivenaine	Tulosten pitoisuudet ilmoitettu mg / l:ssa. Tölkki=t, Pullo=p. LOD=havaitsemisraja					
Na	12,8± 0,3	23,4± 1,5	14,8± 0,3	7,6± 0,3	13,4± 0,9	24,9± 0,7
K	224± 4	730± 40	291± 6	355± 7	460± 30	845± 8
Mg	37,9± 0,7	107± 6	51± 1	78,9± 1,4	102± 6	162± 5
Ca	30,5± 0,5	29,5± 1,6	22,1± 0,5	23,1± 0,5	27,4± 1,5	31± 1
Zn	0,045± 0,002	0,0447± 0,0013	Alle LOD:n	0,06± 0,003	Alle LOD:n	0,055± 0,002
Fe	0,0313± 0,0005	0,116± 0,007	0,0553± 0,0016	Alle LOD:n	Alle LOD:n	0,537± 0,003
Cr	0,018± 0,003	0,032± 0,002	0,0078± 0,0011	0,018± 0,002	0,0147± 0,0013	0,0258± 0,0015
Ni	0,0437± 0,0005	0,152± 0,012	0,064± 0,004	0,078± 0,003	0,091± 0,008	0,102± 0,003
Cu	0,05± 0,03	0,155± 0,005	0,021± 0,012	0,0258± 0,0015	0,053± 0,005	0,049± 0,005
Sr	0,0700± 0,0009	0,052± 0,006	Alle LOD:n	0,042± 0,002	0,070± 0,005	0,108± 0,004
Si	11,3± 0,2	40± 3	19,8± 0,4	20,2± 0,5	22,2± 1,3	23,8± 0,5
S	60,4± 1,3	121± 7	121± 4	139± 5	187± 13	267± 4
P	95,6± 1,5	470± 30	135± 3	235± 6	300± 20	539± 12
Co	0,0137± 0,0005	0,01300± 0,0015	0,0085± 0,0012	0,0158± 0,0015	0,009± 0,002	Alle LOD:n
Mn	0,046± 0,001	0,100± 0,006	0,082± 0,002	0,107± 0,003	0,147± 0,008	0,249± 0,005
Ba	0,001± 0,003	0,0160± 0,0015	0,0103± 0,0009	0,0073± 0,0008	0,023± 0,016	0,034± 0,002

Taulukko 13: Nokian panimon tuotteiden hivenainepitoisuudet

Nokian panimo	Keisari kellari suodattamaton 4,6% t	Keisari Münchener 4,5% t	Keisari Elovehna suodattamaton 4,7% t	Keisari 66 American Pale Ale 4,2% t
Hivenaine	Tulosten pitoisuudet ilmoitettu mg / l:ssa. Tölkki=t, Pullo=p. LOD=havaitsemisraja			
Na	44± 2	43± 1	38,1± 0,7	39,1± 0,7
K	480± 20	452± 11	465± 8	472± 8
Mg	110± 5	103± 3	84± 2	99,3± 1,2
Ca	12± 2	41± 1	19,0± 0,5	27,5± 0,3
Zn	0,0418± 0,0015	0,0415± 0,0009	0,0573± 0,0009	0,043± 0,005
Fe	0,06± 0,06	0,101± 0,008	0,036± 0,002	Alle LOD:n
Cr	0,04± 0,02	0,0248± 0,0005	0,0210± 0,0007	0,0215± 0,0015
Ni	0,183± 0,009	0,166± 0,006	0,125± 0,002	0,158± 0,004
Cu	0,08± 0,03	0,14± 0,07	0,013± 0,003	0,028± 0,006
Sr	0,069± 0,004	0,066± 0,002	0,0548± 0,0015	0,116± 0,002
Si	66± 3	62± 1,3	42,2± 1,1	62,9± 0,7
S	94± 4	87± 2	72,8± 1,5	79,6± 1,5
P	322± 15	301± 8	269± 8	260± 2
Co	Alle LOD:n	0,0138± 0,0013	0,0158± 0,0009	0,0148± 0,0009
Mn	0,142± 0,005	0,136± 0,002	0,178± 0,003	0,135± 0,003
Ba	0,044± 0,004	0,0485± 0,0005	0,017± 0,001	0,0223± 0,0013

Taulukko 14: Olvin panimon tuotteiden hivenainepitoisuudet

Olvi	Olvi 1 2,7% t	Olvi 3 4,5% t	Olvi 4 5,2% t	Sandels tumma 4,0% t
Hivenaine	Tulosten pitoisuudet ilmoitettu mg / l:ssa. Tölkki=t, Pullo=p. LOD=havaitsemisraja			
Na	5,2± 0,3	8,3± 0,3	9,12± 0,16	12± 1
K	212± 7	271± 7	344± 5	510± 40
Mg	58± 2	79± 2	93,6± 1,3	114± 8
Ca	36± 1	45,6± 1,1	48,4± 0,6	39± 3
Zn	0,045± 0,004	Alle LOD:n	0,0148± 0,0013	0,038± 0,002
Fe	0,032± 0,004	Alle LOD:n	Alle LOD:n	0,156± 0,011
Cr	0,0160± 0,0013	0,0188± 0,0013	0,0110± 0,0013	0,016± 0,001
Ni	0,070± 0,003	0,086± 0,004	0,1053± 0,0013	0,119± 0,007
Cu	0,06± 0,03	0,06± 0,05	0,040± 0,015	0,06± 0,02
Sr	0,051± 0,003	0,0800± 0,0013	0,0780± 0,0015	0,083± 0,007
Si	22,5± 0,7	24,8± 0,5	34,2± 0,4	34± 3
S	30,6± 0,8	50,2± 1,1	54,4± 1,1	68± 5
P	129± 4	192± 5	238± 3	310± 20
Co	0,0150± 0,0007	0,0165± 0,0005	0,0085± 0,0012	0,0053± 0,0013
Mn	0,091± 0,003	0,122± 0,002	0,1210± 0,0016	0,180± 0,011
Ba	0,0188± 0,0009	0,0305± 0,0012	0,0235± 0,0005	0,022± 0,003

Taulukko 15: Mallaskosken panimon tuotteiden hivenainepitoisuudet

Mallaskosken panimo	Kuohu Stout 3 4,7% t	Kuohu Pale Ale 3 4,7% t
Hivenaine	Tulosten pitoisuudet ilmoitettu mg / l:ssa. Tölkki=t, Pullo=p. LOD=havaitsemisraja	
Na	16,9± 0,4	21± 0,7
K	475± 9	459± 13
Mg	120± 3	114± 3
Ca	32,6± 0,6	20± 0,5
Zn	0,0795± 0,0009	0,066± 0,008
Fe	0,60± 0,01	0,079± 0,004
Cr	0,0265± 0,0005	0,0225± 0,0009
Ni	0,084± 0,003	0,115± 0,005
Cu	0,069± 0,04	0,06± 0,02
Sr	0,106± 0,002	0,060± 0,003
Si	21,5± 0,4	35,3± 0,9
S	65,3± 1,3	78± 3
P	346± 8	299± 8
Co	0,0173± 0,0013	0,0168± 0,0005
Mn	0,407± 0,007	0,160± 0,005
Ba	0,043± 0,002	0,0198± 0,0011

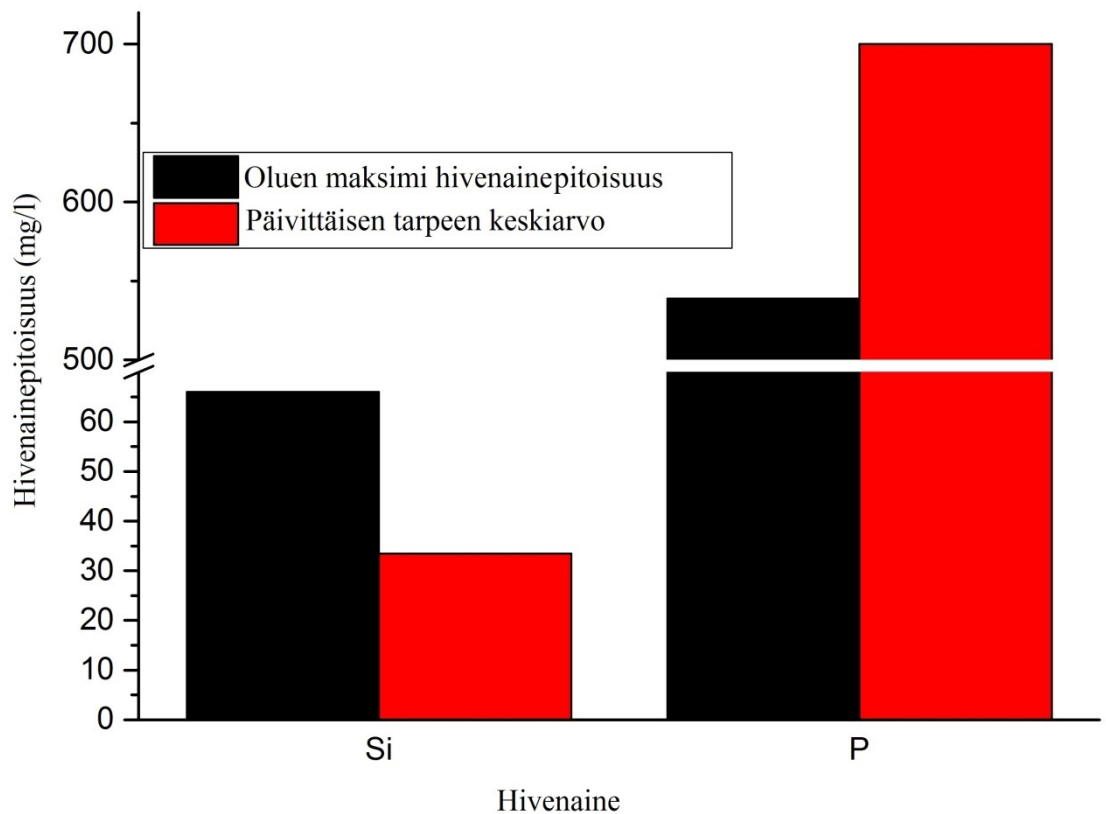
9. OLUTNÄYTTEIDEN VERTAILU

Eri olutlaatujen välillä oli suuriakin eroja. Nämä johtuvat todennäköisimmin viljan kasvualustan, viljan alku- ja loppuvaiheen käsittelyn ja oluen panemisen eroista. Tällaisista hivenaine yhtäläisyyksistä voi huomata viitteitä, kun tarkastelee panimokohtaisia tuloksia taulukoista 10 - 15, mutta nämäkin havaitaan yleensä vain muutamilla hivenaineilla. Tummiin ja vaaleiden oluiden suuret erot eivät sinänsä yllättäneet, mutta myös vaaleiden lagereidenkin välillä oli selkeitä eroja. Vaaleilla oluilla on kuitenkin muutamaa poikkeusta lukuunottamatta selkeitä yhtäläisyyksiä, jos seurataan hivenaineiden keskiarvopitoisuuksia. Tulokset ale, vehnä ja perus lagereille löytyvät taulukoista 16 ja 17.

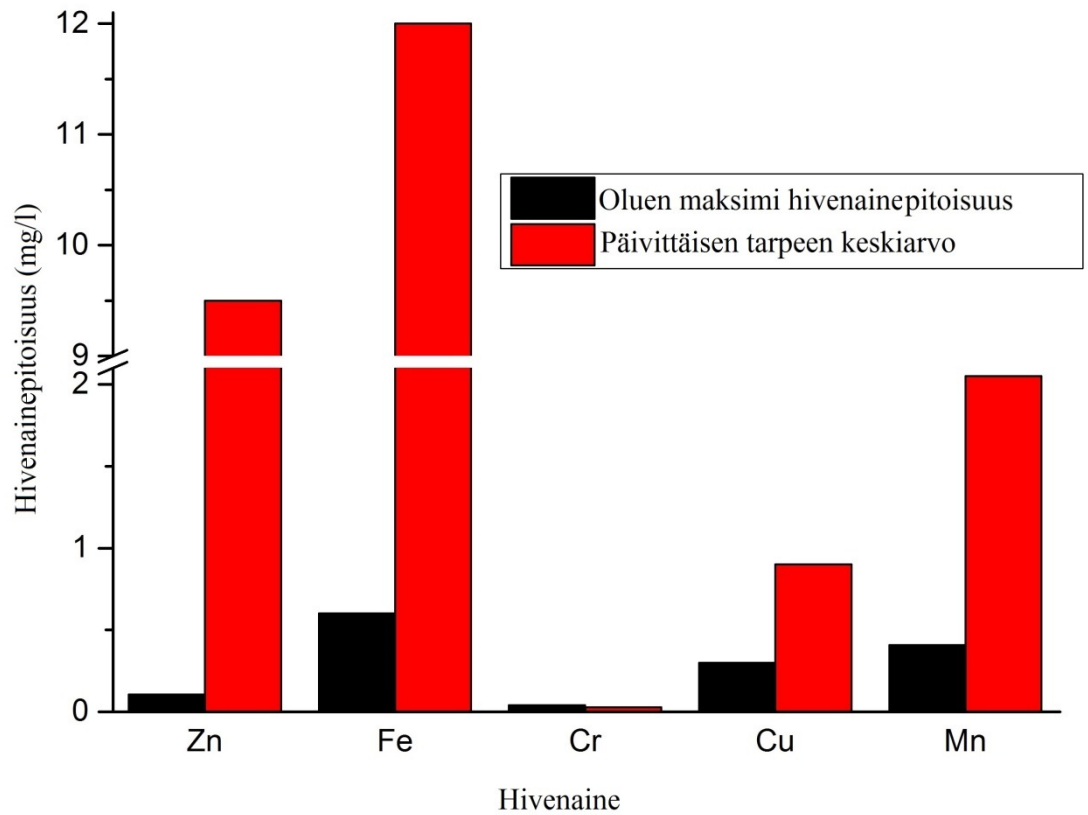
Suurinta hämmennystä herätti III- ja IV-lagereiden välillä tapahtuneet muutamien hivenaineiden pitoisuuksien tipahtamiset. Alkoholiprosentin vaikutuksen tarkastelut samalla merkillä, eli eroja tarkasteltiin Lapin kullan III:sen ja IV:sen, Olvin I, III ja IV:n ja Koffin I, III ja IV:n välillä. Taulukkoon 16 on kuitenkin kerätty alkoholiprosenteittain kaikkien lageroluiden keskiarvot, joten on suositeltavaa tarkastella 11, 12 ja 14 taulukoita tämän vertailun kannalta. Yleisesti voidaan kuitenkin sanoa, että hivenaineiden pitoisuudet kasvoivat samalla kun alkoholin prosentuaalinen osuus kasvoi. Rauta oli alkoholin ja pitoisuuden suhteen poikkeus ja joillakin merkeillä oli todennäköisesti käsittelystä johtuvia eroja, jotka eivät välttämättä riippuneet alkoholipitoisuudesta.

Magnesiumin, nikkelin ja koboltin pitoisuudet olivat hyvin lähekkäin kaikilla laaduilla. Porter sisälsi selkeästi enemmän kaliumia, rikkiä ja fosforia, kuin kaikki muut oluet. Porter ja stout sisälsivät lisäksi rautaa ja mangaania paljon. Yleisesti tummissa oluissa (lagerit, stout, porter) oli enemmän strontiumia ja bariumia, mutta taas vähemmän natriumia. Vehnäoluet sisälsivät vähemmän bariumia ja kalsiumia, mutta sinkkiä ne taas sisälsivät tummiin oluiden kanssa enemmän. Vaaleat lagerit sisälsivät hyvin kuparia. Pale alejen ja vaaleiden lagerien piipitoisuudet olivat myös korkeita. Kromin kohdalla I ja IV oluiden pitoisuudet olivat jostain syystä selkeästi alempana kuin muilla.

Ihmisen päivittäiseen hivenainetarpeeseen päästäisiin kuitenkin vain ihan muutamilla hivenaineilla, mutta päivittäisen tarpeen saavuttaminen ei olekaan oluiden tarkoitus, vaan kyse on kokonaisuudesta. Piitä ja kromia kuitenkin saadaan oluesta helposti riittämiin, kun nautitaan pari olutta. Kuten jo mainittiin, ”perus” lagereiden ja alejen piipitoisuudet riittävätkin koko päivittäisen tarpeen korvaamiseen. Porter-oluella päästään myös erittäin lähelle fosforin päivittäistä tarvetta. Kaliumin ja magnesiumin pitoisuudetkin ovat korkeat, kun verrataan muihin oluisiin. Raudan puutteesta kärsivillä voisi löytyä apua esimerkiksi Stout ja Porter oluisiin siirtymisestä, sillä vaikka pitoisuudet ovat murto-osa päivittäisestä tarpeesta, pienetkin muutokset auttavat. Kuvista 19 ja 20 saadaan helposti ymmärrettävä mielikuva oluiden hivenainepitoisuuden suhteesta päivittäiseen tarpeeseen.



Kuva 19: Oluen hivenainepitoisuuden ja päivittäisen hivenainetarpeen suhteiden visuaalisointi piille ja fosforille



Kuva 20: Oluen hivenainepitoisuuden ja päivittäisen hivenainetarpeen suhteiden visuaalisointi sinkille, raudalle, kromille, kuparille ja mangaanille.

Muiden laatuojen, joiden hivenainepitoisuuksista ei erikseen mainittu, keskimääräiset hivenainepitoisuudet olivat hyvinkin samoilla hivenainepitoisuuksien alueilla. Tietysti joillakin yksittäisillä olutmerkkinäytteillä löytyi suuriakin pitoisuuseroja verrattuna muihin olutlaatunsa merkkeihin. Yksilöllisten tulosten rinnakkain vertailu onkin kohdallaan, jos halutaan löytää tietyn hivenaineen maksimaalinen pitoisuus oluesta.

Taulukko 16: Eri alkoholiprosenttisten lageroluiden keskimääräiset hivenainepitoisuudet ja hivenaineiden päivittäinen tarve.^{1,81-83}

Hivenaine	Tarve / päivä	Lagerit			
	mg (mies/ nainen)	I (0%)	I	III	IV
		Keskiarvo [mg / l]	Keskiarvo [mg / l]	Keskiarvo [mg / l]	Keskiarvo [mg / l]
Na	5000	13	10	23	11
K	3500/ 3100	222	252	471	402
Mg	400-420/ 310-320	54	55	99	98
Ca	1000- 1200	43	29	35	38
Zn	11 / 8	0,05	0,033	0,04	0,015
Fe	8-11/ 8- 18	0,14	0,044	0,08	0,016
Cr	0,0325/ 0,0225	0,02	0,012	0,03	0,013
Ni	<1	0,04	0,067	0,13	0,098
Cu	0,9	0,03	0,041	0,12	0,05
Sr	Ei määritetty	0,08	0,042	0,07	0,07
Si	21-46	12	21	40	28
S	Ei määritetty	54	76	99	121
P	700	150	132	313	269
Co	Ei määritetty	0,01	0,012	0,01	0,009
Mn	2,3/1,8	0,10	0,087	0,12	0,13
Ba	Ei määritetty	0,08	0,015	0,03	0,02

Taulukko 17: Vehnäoluiden, alejen, stoutin, porterin ja tummien lagereiden keskimääräiset hivenainepitoisuudet ja päivittäinen tarve.^{1,81-83}

Hivenaine	Tarve / päivä	Vehnä	ALE	Kuohu Stout 3 4,7% t	Porter 4 7,2% p	TUMMA
	mg (mies/nainen)	Keskiarvo [mg / l]	Keskiarvo [mg / l]	[mg / l]	[mg / l]	Keskiarvo [mg / l]
Na	5000	22,5	30	16,9	24,9	14
K	3500/3100	492	466	475	845	527
Mg	400-420/310-320	84,7	107	120	162	117
Ca	1000-1200	11,1	24	32,6	31	45
Zn	11 / 8	0,080	0,05	0,080	0,055	0,06
Fe	8-11/ 8-18	0,083	0,05	0,6	0,54	0,18
Cr	0,0325/0,0225	0,022	0,02	0,03	0,03	0,03
Ni	<1	0,114	0,14	0,08	0,10	0,12
Cu	0,9	0,040	0,04	0,07	0,05	0,05
Sr	Ei määritetty	0,026	0,09	0,11	0,11	0,10
Si	21- 46	33	49	22	24	34
S	Ei määritetty	80	79	65	267	87
P	700	302	280	346	539	334
Co	Ei määritetty	0,02	0,02	0,02	0,01	0,012
Mn	2,3/1,8	0,15	0,15	0,41	0,25	0,19
Ba	Ei määritetty	0,01	0,02	0,04	0,03	0,06

10. OLUEN JA PALAUTUSJUOMIEN VERTAILU

Kaikkien tutkittujen oluiden hivenainepitoisuuksien keskiarvot löytyvät taulukosta 18 ja vertailuksi siihen on lisätty proteiinijuomia mukaan. Taulukosta 18 on myös helppo havaita, että olut pärjää urheilupalautusjuomiksi valmistetuille tuotteillekin alkuperäistä oletusta paremmin. Tehon sportin kestävyysarjoittelu, Tehon sportin voimaharjoittelu ja Star nutritionin recovery palautusjuomien ja oluiden erot olivatkin yllättävän vähäisiä, kun vertailu tehtiin seuraavien nautintomäärien pohjalta: olutta nautittaisiin 1 - 2 olutta, Star nutritionia nautittaisiin ohjeen mukaan (jauhetta 60 g / 300 ml vettä) ja Tehon sportin palautusjuomia yksi purkillinen (330 ml).

Oluet sisälsivät seuraavia hivenaineita palautusjuomia enemmän: kalium, magnesium, mangaani ja pii. Vähemmän hivenaineita oluessa taas oli natriumin, kalsiumin, sinkin, raudan, nikkelin, kuparin, bariumin ja strontiumin kohdalla. Muissa hivenaineissa pitoisuudet olivat hyvinkin samoilla tasoilla. On kuitenkin muistettava, että eri laatuja ja näytteiden välillä on eroja.

Proteiinijuomien annoskoot löytyvät siis vielä taulukosta 18 ja oluen hivenainemäärät ovat milligrammoina yhtä keskiarvostettua olutlitraa kohden. Yleisten suositusten mukainen annos on 1 - 2 pientä (330 ml) olutta. On kuitenkin muistettava, että myös alkoholiton olut sisältää huomattavia määriä hivenaineita. Erilaisten käsittelymenetelmien takia proteiinijuomilla 330 ml annoksen hivenainemäärä on laskettu laboratorioissa mitattujen tilavuus- ja punnitustulosten kautta saadun tiheyden (1,08 g / ml) mukaan, koska pelkän tilavuuden mukaan laskettuna olisi tulos ollut virheellinen. Tehon proteiinijuomien oletettiin lisäksi olevan saman tiheyksisiä. Star Nutritionin 60 gramman annostus on pussin kyljessä olevan suosituksen mukainen annoskoko.

Taulukko 18: Kaikkien oluiden keskiarvon ja proteiinijuomien hivenainepitoisuudet.^{1,81-83}

Hivenaineet	Tarve / päivä	Star Nutrition Recovery-Pro	Teho voima	Teho kestävyys	Olut
	<i>mg (mies/nainen)</i>	<i>mg / 60 g annos</i>	<i>mg / 330 ml annos</i>	<i>mg / 330 ml annos</i>	<i>Keskiarvo mg / l</i>
Na	5000	56±6	181±20	166±9	20
K	3500/ 3100	53±7	226±13	190±20	490
Mg	400-420/ 310-320	86±7	50,7±1,5	68±1	105
Ca	1000- 1200	132±14	656±20	517±16	32
Zn	11 / 8	0,11± 0,03	1,07±0,10	0,31±0,05	0,06
Fe	8-11/ 8- 18	0,50± 0,08	0,75±0,06	1,39±0,08	0,2
Cr	0,0325/ 0,0225	0,047± 0,011	0,047± 0,013	0,065± 0,010	0,023
Ni	<1	0,037± 0,005	0,08± 0,03	0,15± 0,03	0,1
Cu	0,9	0,121± 0,007	1,2±0,5	1,6±0,3	0,06
Sr	Ei määritetty	1,0±0,2	0,58±0,09	0,7±0,2	0,08
Si	21-46	28,7±1,2	2,1±0,2	4,73±0,17	30
S	Ei määritetty	22,8±0,9	31±4	25±2	107
P	700	64±3	429±15	365±9	320
Co	Ei määritetty	0,0027± 0,0009	0,0038± 0,0003	0,0065± 0,0006	0,014
Mn	2,3/1,8	0,032± 0,007	0,117± 0,004	0,238± 0,009	0,19
Ba	Ei määritetty	0,07± 0,03	0,39±0,12	0,7±0,2	0,04

11. YHTEENVETO

Oluessa on suhteellisen hyvin urheilussa tarvittavia hivenainepitoisuuksia, joten se toimii urheilusta palauttavana juomana korjaamalla hien erityksestä johtuvaa hivenainetasapainon muutosta. On kuitenkin muistettava, että jos tavoitteena on mahdollisesti kasvattaa lihasta tai hakea todella tiukkaa kesäkuntoa, niin proteiinia ja hiilihydraatteja on lisäksi nautittava tarpeeksi ruokailujen yhteydessä. Hikiurheiluun olut on hivenainekoostumuksensa puolesta mainio vaihtoehto.

Kokeellisen osan pohjalta voidaan todeta, että ICP-OES on oluen hivenainepitoisuuksien mittaamiseen erinomainen väline herkkyytensä, varmuuden ja hyvän toistettavuuden takia. Esikäsittelynä ultraääni- ja happokäsittelyn yhdistelmä on erinomainen poistamaan analyysejä häiritsevän haasteellisen orgaanisen taustan. Tässä työssä kehitetyn menetelmän saantokokeiden tulokset olivat 85 - 121 % välillä, jotka ovat vertailtavissa kirjallisuudessa esitettyihin saantoihin. Kaupallisille palautusjuomille on suositeltavaa tehdä tuhkistus ennen ultraääni- ja happokäsittelyn suorittamista.

KIRJALLISUUSVIITTEET

- [1] W. D. McArdle, F. I. Katch, and V. L. Katch, *Exercise Physiology: Energy, Nutrition, and Human Performance*, 6th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
- [2] R. J. Maughan, *The Encyclopaedia of Sports Medicine: Nutrition in Sport*, 7th ed. UK: Blackwell Science, 2000.
- [3] S. Nurminen, "Maratoonarin ruokavalio" Helsingin Diakoniammattikorkeakoulu, 2003.
- [4] D. Wang, H. Lin, J. Kan, L. Liu, X. Zeng, and S. Shen, *Food Science and Technology: Food Chemistry*. Hauppauge, NY, USA: Nova Science Publishers, Inc., 2012.
- [5] M. H. Williams and D. Ph, "Dietary Supplements and Sports Performance : Minerals", *Journal of the International Society of Sports Nutrition* **2005**,2 (1), 43–49.
- [6] L. Valsta, P. Borg, S. Heiskanen, H. Keskinen, S. Männistö, T. Rautio, S. Sarlio-Lähteenkorva, and R. Kara, "Juomat ravitsemuksessa" Helsinki, 2008.
- [7] M. Speich and A. Pineau, "Minerals , trace elements and related biological variables in athletes and during physical activity" , **2001**, *Clin. Chim. Acta*, 312, 1–11.
- [8] Suomen Sydänliitto, "Suola ja verenpaine" 2012.
http://www.sydanliitto.fi/suola-ja-verenpaine#.U_SQLhCTLgc. [20.8.2014].
- [9] Elson M. and M. D. Haas, "Role of Potassium in Maintaining Health" 2000.
<http://hkpp.org/patients/potassium-health>. [21.8.2014].
- [10] Terve Media Oy, "Kivennäis- ja hivenaineet: Kalium" 2008.
<http://www.tohtori.fi/?page=5530281&id=5500508>. [26.9.2014].
- [11] Terveystieteen ja hyvinvoinnin laitos, "E-vitamiini" 2013.
<http://www.fineli.fi/component.php?compid=2299&lang=fi> . [08.9.2014].
- [12] J. Kroschwitz and M. Howe-Grant, *Encyclopedia of chemical technology*, 4th ed., New York: Wiley & Sons Inc., 1991, 746–779.
- [13] P. Varo, *Kivennäisaine- taulukko*. Otava, Keuruu 1980.
- [14] N. Campbell, "Biology," 3rd ed., Redwood City: The Benjamin Cumming Publishing Company Inc., 1993, 812–815.
- [15] Terve Media Oy, "Kivennäis- ja hivenaineet" 2008.
<http://www.tohtori.fi/?page=5530281&id=9009153>. [08.9.2014].
- [16] "Kromi." <http://www.vitaelab.fi/Terveystietoa/Kromi>. [28.8.2014].

- [17] M.-A. Flyvholm, G. D. Nielsen, and A. Andersen, "Nickel content of food and estimation of dietary intake", **1984** *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 179(6), 427–431.
- [18] G. Ysart, P. Miller, H. Crews, P. Robb, M. Baxter, C. De L'Argy, S. Lofthouse, C. Sargent, and N. Harrison, "Dietary exposure estimates of 30 elements from the UK Total Diet Study.", **1999**, *Food Addit. Contam.*, 16 (9), 391–403.
- [19] World Health Organization, "Trace elements in human nutrition and health" Geneva, 1996.
- [20] V. Sardesai, "Molybdenum: an essential trace element", **1993** *Nutr. Clin. Pract.*, 8 (6), 277–281.
- [21] J. Uribarri and M. S. Calvo, "Hidden Sources of Phosphorus in the Typical American Diet: Does it Matter in Nephrology?", **2003** *Semin. Dial.*, 16(3), 186–188.
- [22] A.-I. Stoica, M. Peltea, G.-E. Baiulescu, and M. Ionica, "Determination of cobalt in pharmaceutical products.", **2004**, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 36(3), 653–656.
- [23] D. Kenning and R. Jackson, *Olutmaailma: yli 350 perinteistä olutmerkkiä*. UK: Parragon Books Ltd, 2007.
- [24] M. Jackson, *Michael Jackson's Beer Companion*. UK: Duncan Barid Publisher, 1993.
- [25] G. Brewers, "Beer Styles Overview" 2012. <http://greatbrewers.com/beer-styles-overview>. [08.9.2014].
- [26] Beer Me!, "Brewer information." <http://beerme.com/index.php>. [08.9.2014].
- [27] "Beer's Family Tree" 2010. <http://beerandwhiskeybros.com/2010/09/21/cool-graphic-beers-family-tree/>. [08.9.2014].
- [28] C. Berger and P. Duboë-Lawrence, *Oluen ystävän opas*. Otava, Keuruu, 1988.
- [29] Sinebrychoff, "Oluen valmistus" [http://www.sinebrychoff.fi/SiteCollectionImages/Olut ja sen tarjoilu - kuvat/oluenvalmistuskavaavio.gif](http://www.sinebrychoff.fi/SiteCollectionImages/Olut%20ja%20sen%20tarjoilu%20kuvat/oluenvalmistuskavaavio.gif). [28.10.2014].
- [30] M. Salmi, "Oluttyypit" 2011. www.alko.fi. [08.10.2014].
- [31] Beeradvocate, "Beer Styles." <http://www.beeradvocate.com/beer/style/>. [08.10.2014].
- [32] Suupohjan olutseura, "Oluen ystävien olutkoulu." http://www.olutseura.fi/site?node_id=43. [08.10.2014].
- [33] B. Wyrzykowska, K. Szymczyk, H. Ichichashi, and J. Falandysz "Application of ICP Sector Field MS and Principal Component Analysis for Studying

- Interdependences among 23 Trace Elements in Polish Beers”, **2001**, *J. Agric. Food Chem.*, *49*, 3425–3431.
- [34] A. Asfaw and G. Wibetoe, “Direct Analysis of Beer by ICP-AES: A Very Simple Method for the Determination of Cu, Mn and Fe”, **2005** *Microchim. Acta*, *152*, (1–2), 61–68.
- [35] R. Hergenreder and C. p. Bosnak, “Beer Analysis Using the Optima ICP” Shelton, 2006.
- [36] Terveyden ja hyvinvoinnin laitos, “Keskiolut” 2013.
<http://www.finel.fi/food.php?foodid=902&lang=fi>. [10.10.2014].
- [37] Olvi, “TEHO.” <http://www.olvi.fi/web/fi/471>. [10.10.2014].
- [38] P. Jarla, “Fingerpori.” Julkaistu tekijän luvalla.
- [39] Terveyden ja hyvinvoinnin laitos, “Leader recovery” 2013.
<http://www.finel.fi/food.php?foodid=33367&lang=fi>. [10.10.2014].
- [40] Terveyden ja hyvinvoinnin laitos, “Rahka” 2013.
<http://www.finel.fi/food.php?foodid=622&lang=fi>. [03.9.2014].
- [41] Terveyden ja hyvinvoinnin laitos, “Appelsiinitäysmehu” 2013.
<http://www.finel.fi/food.php?foodid=434&lang=fi>. [03.9.2014].
- [42] Terveyden ja hyvinvoinnin laitos, “Banaani” 2013.
<http://www.finel.fi/food.php?foodid=11049&lang=fi>. [03.9.2014].
- [43] M. J. Castillo, “BEER AFTER EXERCISE: Yes or No?”, *Conf. Proc. 6th Beer and Health Symposium*, Brysseli, 2014.
- [44] Terveyden ja hyvinvoinnin laitos, “Miten alkoholi vaikuttaa elimistössä?” 2013.
<http://www.thl.fi/fi/web/alkoholi-tupakka-ja-riippuvuudet/alkoholi/tietoa-alkoholista/alkoholi-ja-terveys/miten-alkoholi-vaikuttaa-elimistossa->. [14.8.2014].
- [45] Juba Production, “Viivi ja wagner.” PIB Features. Julkaistu tekijän luvalla.
- [46] M. Ahola, “Alkoholi” 2009.
http://ravitsemustiede.hpage.co.in/alkoholi_5107804.html. [14.8.2014].
- [47] M. Berkhan, “Truth about about alcohol, fat loss and muscle,” 2010.
<http://www.leangains.com/2010/07/truth-about-alcohol-fat-loss-and-muscle.html>. [15.8.2014].
- [48] A. Sierksma, T. Sarkola, C.J. Eriksson, M.S. van der Gaag, D.E. Grobbee, H.F. Hendriks, "Effect of moderate alcohol consumption on plasma dehydroepiandrosterone sulfate, testosterone, and estradiol levels in middle-aged men and postmenopausal women: a diet-controlled intervention study." **2004**, *Alcohol Clin. Exp. Res.*, *28*(5), 780-785.

- [49] M. Välimäki, J.A. Tuominen, I. Huhtaniemi, R. Ylikahri, The Pulsatile Secretion of Gonadotropins and Growth Hormone, and the Biological Activity of Luteinizing Hormone in Men Acutely Intoxicated with Ethanol, **1990**, *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 14(6), 928-931.
- [50] Suomen Terveysliikuntainstituutti Oy, "Uni" 2014.
<http://www.terveysverkko.fi/tietopankki/senioreille/uni-senioreille/> [14.8.2014].
- [51] M. Härmä and M. Sallinen, "Hyvä uni- hyvä työ" 2008.
http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=onn00046. [15.8.2014].
- [52] Terve Urheilija -ohjelma, "Palautuminen"
<http://www.terveurheilija.fi/kymppiympyra/urheilijanravitsemus/palautuminen>. [15.8.2014].
- [53] S. Home, "Terveydeksi-olutta!", **2003**, *Mallas & Olut*, 1 .
- [54] Terve Media Oy, "Paljonko eri liikuntamuodot kuluttavat kaloreita" 2012.
<http://www.tohtori.fi/?page=3669620&id=1884695>. [03.9.2014].
- [55] Terveyden ja hyvinvoinnin laitos, "Suklaan laskennallinen energia" 2013.
<http://www.fineli.fi/topfoods.php?compid=2331&fuclass=chocol&specdiet=none&items=100&from=top&portion=100g&lang=fi>. [03.9.2014].
- [56] Terveyden ja hyvinvoinnin laitos, "Saksanpähkinä" 2013.
<http://www.fineli.fi/food.php?foodid=376&lang=fi>. [03.9.2014].
- [57] Terveyden ja hyvinvoinnin laitos, "Kolajuoma" 2013.
<http://www.fineli.fi/food.php?foodid=928&lang=fi>. [03.9.2014].
- [58] Terveyden ja hyvinvoinnin laitos, "Mustaherukka-puolukkamehujuoma" 2013.
<http://www.fineli.fi/food.php?foodid=458&lang=fi>. [03.9.2014].
- [59] R. Kunno, C. Ruangviriyachai, and S. Chanthai, "Sample Preparation for Trace Analysis of Iron , Copper and Zinc in Thai Fruit Wines by ICP-AES", **2009** *Walailak J Sci Tech*, 6(2), 243–254.
- [60] B. Du, F. Zhu, and F. Li, "Measurement and Analysis of Mineral Components in Grape Wine by Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer", **2012**, *Adv. J. Food Sci. Technol.*, 4(5), 277–280.
- [61] A. Szymczycha-Madeja, M. Welna, and P. Pohl, "Determination of Elements in Energy Drinks by ICP OES with Minimal Sample Preparation", **2013**, *J. Braz. Chem. Soc.*, 24 (10), 1606–1612.

- [62] N. Mahmood, N. Petraco, and Y. He, “Elemental fingerprint profile of beer samples constructed using 14 elements determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS): multivariation analysis and potential application to forensic sample comparison.”, **2012**, *Anal. Bioanal. Chem.*, *402* (2), 861–869.
- [63] C. Voica, A. Dehelean, and a Pamula, “Method validation for determination of heavy metals in wine and slightly alcoholic beverages by ICP-MS”, **2009**, *J. Phys. Conf. Ser.*, *182*, 012036.
- [64] G. Woods, “Measurement of Trace Elements in Malt Spirit Beverages (Whisky) by 7500cx Application” Cheadle Royal, **2007**.
- [65] G. Woods and C. Royal, “Trace elemental analysis of distilled alcoholic beverages using the Agilent 7700x ICP-MS with octopole collision / reaction cell” Cheadle Royal, 2012.
- [66] M. Rahikainen, “Ravinteet ja hivenaineet biokaasun tuotannossa ja bioreaktorilietteen ICP-OES-hivenaineanalytiikka” Jyväskylä, 2012.
- [67] L. J. Melnyk, J. N. Morgan, R. Fernando, E. D. Pellizzari, and O. Akinbo, “Determination of Metals in Composite Diet Samples by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry”, **2003**, *J. AOAC Int.*, *86* (2), 439–448.
- [68] G. Van Der Linde, J. L. Fischer, and P. P. C, “Multi-element Analysis of South African Wines and their Provenance Soils by ICP-MS and their Classification according to Geographical Origin using Multivariate Statistics”, **2010**, *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, *31* (2), 143–153.
- [69] A. Väisänen, R. Suontamo, J. Silvonen, and J. Rintala, “Ultrasound-assisted extraction in the determination of arsenic, cadmium, copper, lead, and silver in contaminated soil samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry.”, **2002**, *Anal. Bioanal. Chem.*, *373*(1–2), 93–97.
- [70] A. V Filgueiras, J. L. Capelo, I. Lavilla, and C. Bendicho, “Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium , manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry”, **2000**, *Talanta*, *53*, 433–441.
- [71] Z. Mester and R. Sturgeon, *Wilson and Wilson’s Comprehensive Analytical Chemistry Volume XLI: Sample Preparation For Trace Element Analysis*, 1st ed. Canada: Elsevier, 2003.
- [72] C. Boss and K. Fredeen, *Concepts, Instrumentation, and Techniques in Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry*. USA: Perkin-Elmer Corporation, 1989.
- [73] Perkin Elmer, “Optima 8300.”
<http://www.perkinelmer.com/catalog/product/id/optima8300>. [15.10.2014].

- [72] A. Väisänen, "ICP-OES Workshop luentomateriaali." Jyväskylän yliopiston kemian laitos, Jyväskylä, 2013.
- [73] J. Nölte, *ICP Emission Spectrometry: A Practical Guide*. Wiley - VCH, 2003.
- [74] A. Scheffer, C. Engelhard, M. Sperling, and W. Buscher, "ICP-MS as a new tool for the determination of gold nanoparticles in bioanalytical applications.", **2008**, *Anal. Bioanal. Chem.*, 390 (1), 249–52.
- [75] R. . Browner and A. . Boorn, "The Achilles' Heel of Atomic Spectroscopy" **1984**, *Anal. Chem.*, 56 (7).
- [76] Perkin Elmer, "WinLab 32 TM Instrument Control Software" Perkin Elmer, 2000, 250–256.
- [77] P. Vilpas, "Ohjeita kvantitatiiviseen tutkimukseen", 1–12.
- [78] C.P. Bosnak, L. Davidowski, "Continuous Flow Hydride Generation Using the Optima ICP", **2004**, Perkin Elmer Life and Analytical Sciences
- [79] Valtion ravitsemusneuvottelukunta, "Suomalaiset ravitsemussuositukset 2014" Tampere, 2014.
- [80] "Kivennäisaineet" 2012.
http://www.ihanaterveys.fi/index.php?document=kivennaisaineet_yleista.
[08.9.2014].
- [81] Terveyden ja hyvinvoinnin laitos, "Hivenaineet" 2012.
http://www.ihanaterveys.fi/index.php?document=hivenaineet_yleista.
[08.9.2014].