

## Töövõtulepingu PR 6-3.2-2 aruanne 2010

### Töö täitja: Ülis Sõukand

Selles töös kirjeldatakse ja analüüsitakse ning antakse soovitusi kolme kõige olulisema mee füüsikalise-keemilise kvaliteedinäitaja määramise kohta. Määramismetoodikad on ülemaailmselt, üleeuroopaliselt või Eesti siseselt ametlikult määramiseks kinnitatud meetodikad.

#### Tööülesanne

Lepingu järgi püstitatud tööülesanne oli järgmine. Mee kvaliteedi hindamise ja kvaliteedinäitajate määramise uute meetodite ja vastavate seadmete ning meetodika kohta informatsiooni kogumine ja süstematiseerimine. Aruande koostamine ja esitamine 1 eks. paber kandjal ja elektroonselt. Tööülesanne täideti täies mahus.

#### Niiskusesisalduse määramine

Niiskusesisaldus on füüsikalise-keemilistest meekvaliteedi hindamise meetoditest maailmas kõige rohkem kasutatav. Peaaegu kõik laborid kasutavad mee murdumisnäitaja määramist ehk refraktomeetrilist meetodit.

#### Määramismetodid

1. Kristallilise mee puhul toimub kõigepealt kuumutamine temperatuuril 50 ° C kuni mesi on vedel (ligikaudu 20 min). Seejärel määratakse 20 ° C juures Abbe refraktomeetri abil mee murdumisnäitaja. Vee sisaldus leitakse kasutades vastavaid tabeleid murdumisnäitaja ja kindlale murdumisnäitajale vastava niiskusesisalduse kohta. Niiskusesisaldus tabeli jaoks on määratud kuivatamisel vaakumis [1, 2]
2. Kuumutamine toimub nagu eelmise meetodi puhul. Seejärel määratakse 40 ° C juures Abbe refraktomeetri abil mee murdumisnäitaja. Mee kuivaine arvutatakse välja kasutades empiirilist (katsete tulemusel saadud) valemit. Seejärel lahutatakse 100 protsendist kuivaine sisaldus ja saadakse niiskusesisaldus [3]
3. Sarnaselt eelmistele meetoditele kuumutatakse kõik meed (mitte ainult kristalliseerunud) temperatuuril 40 ° C 30 min jooksul. Seejärel määratakse 20 ° C juures Abbe refraktomeetri abil mee murdumisnäitaja. Vee sisaldus leitakse kasutades vastavaid tabeleid murdumisnäitaja ja kindlale murdumisnäitajale vastava niiskusesisalduse kohta [3]
4. Proov kuivatatakse alarõhul liivaga segatuna ahjus alla 70 ° C (soovitavalt 60 ° C) ja seejärel kaalutakse [3]
5. Karl Fisheri tiitrimisel kasutatakse automaattitraatoriga potentsiomeetrilist tiitrimist. Vee määramine põhineb selektiivsel keemilisel reaktsioonil: vääveldioksiidi redutseerimisel joodiga vee juuresolekul ja metanooli keskkonnas või teise variandina formamiidi ja metanooli segus [4].

## *Tulevikuvõimalused*

Niiskusesisalduse määramise meetodeid on palju, siinkohal on välja toodud mõned enam kasutatavad ja neile lisaks ainukene keemiline meetod: Karl Fisheri tiitrimine. Eestis kasutatakse neist loetletud meetoditest esimest. Refraktomeetriliste meetodite puhul on kaks põhilist probleemi: Esiteks tuleb kristalliseerunud mett soojendada ja soojendamise ajal võib osa niiskusest lenduda. Teiseks ei arvesta tabelid erinevate mete koostise omapäraga [4]. Rahvusvaheline meekomisjon (IHC) nendib, et refraktomeetrilised tulemused ei anna päris õiget niiskusesisaldust ja on väiksemad kui Karl Fisheri tiitrimisel saadud [3]. Kui vaadata teadusartiklites erinevate meetoditega saadud niiskusesisaldusi, siis on vahed küllalt suured, maksimaalselt kuni 5%, olenevalt mee tüübist, enamasti on see protsent palju väiksem [3, 4].

Refraktomeetriselt mõõdetud niiskusesisaldus mida me kasutame mee kvaliteedi hindamiseks on seega metoodikast sõltuv. Teisiti öeldes kui mõni riik üritaks määrata mee niiskusesisaldust mingi muu meetodiga, kui refraktomeetriselt (näiteks Karl Fisheri tiitrimisega) tuleks ka selles riigis kehtivat seadusandlust muuta, kuna tulemused muutuksid. Refraktomeetiline meetod on kasutusel olnud juba möödunud sajandi algusest (1908 .a.) [5] ja tuntud kui odav meetod niiskusesisalduse hindamiseks [2]. See meetod jääb kasutusse ka edaspidi, kuid tuleb arvestada, et see ei pruugi anda tõelist niiskusesisaldust ja tulemust võib mõjutada ka meeproovi koostis. Teoreetiliselt on ka võimalik, et mesinik keda ei rahulda mee normi ületav niiskusesisaldus, valib analüüsiks teise meetodi ja saab sellega madalamad tulemused ning mee niiskusesisaldusega on kõik korras.

Tegelik näitaja mis määrab ära mikroorganismide kasvu pole mitte veesisaldus, vaid vee aktiivsus. Vee aktiivsuse teadmine on vajalik ka selleks, et iseloomustada mee niiskusevahetust keskkonnaga [6]. Tänapäeval on vee aktiivsuse mõõtmine küllalt sagedane. Seega võiks tulevikus mõõta vee aktiivsusi ja vaadata kuidas need on seotud mee teiste kvaliteedinäitajatega nagu näiteks niiskusesisaldusega. Vee aktiivsust mõõdetakse aktiivsusmõõtjaga.

## **Diastaasarvu määramine**

Diastaasarv on üks sagedamini määratavaid meekvaliteedi näitajaid. Diastaas ehk amülaas katalüüsib tärklise muundumist maltoosiks. Väga laialdaselt kasutatakse nii Phadebas kui ka Schade meetodit.

### *Määramismeetodid*

1. Diastaasi aktiivsuse määramine Schade meetodil. Diastaasarv selle meetodi kohaselt näitab 1 g mee amülaaside aktiivsust, mis lõhustab teatud kindla koguse tärklise (0.01g) 1 tunni jooksul määratud lõpp-punktini 40 ° C juures meetodis määratud tingimustel. Mesi lahustatakse atsetaathapet ja naatriumkloriidi sisaldavas vees ja pannakse 40 ° C vesivannil reageerima tärklise-joodi lahusega. Lainepikkusel 660 nm mõõdetakse fotomeetriga värvuse vähenemine ajas ja leitakse aeg mille jooksul neelduvus jõuab näitajani 0,301 [1, 2]
2. Diastaasi aktiivsuse määramine Phadebas meetodil. Diastaasarv selle meetodi kohaselt näitab 1 g mee amülaaside aktiivsust, mis lõhustab teatud kindla koguse

tärklis (0.01g) 1 tunni jooksul määratud lõpp-punktini 40 ° C juures meetodis määratud tingimustel. Mesi lahustatakse atsetaatpuhvrit sisaldavas vees ja pannakse 40 ° C vesivannil reageerima sinise värvainega modifitseeritud tärklisega (Phadebase tablett). 15 min (või 30 min) pärast reaktsioon katkestatakse naatrium hüdroksiidi lahuse abil. Lahus filtreeritakse ja mõõdetakse neelduvus fotomeetriga lainepikkusel 620 nm. [2]

3. Diastaasarv antud meetodi kohaselt näitab 1g mee kuivaines sisalduvate amülaaside poolt 1 tunni jooksul lõhustatava 1% tärkliselahuse milliliitrite hulka. Meelahus pandi veevannil 40 °C juures reageerima tärkliselahusega, mis sisaldas 2,4-dinitrofenooli, atsetaatpuhvrit ja naatriumkloriidi. 15 minuti pärast lisati joodilahust ja mõõdeti lahuse optiline tihedus fotokolorimeetriga lainepikkusel 582 või 590 nm. Tulemus arvutati mee niiskusesisalduse kaudu ümber kuivainele [1].

### *Tulevikuvõimalused*

Rahvusvaheliselt kasutatakse kahte esimest meetodit. Neist kauemat aega on kasutatud esimest meetodit. Teise meetodi puhul võivad tablettidel olla erinevad tootjad ja sellest lähtuvalt võib olla meetodikas muutusi. Näiteks firma Magle AB Phadebase tablettide puhul kasutatakse reaktsiooniga 30 min. Phadebase meetodi korratavus on parem kuna kasutatakse kindla koostisega substraati. Eesti Standard lubab kasutada esimest ja kolmandat meetodit. Veterinaar- ja Toidulabor kasutab esimest ja teist meetodit. Meetodikate rakendamisel tuleb arvestada, et kasutades kolmandat meetodit saadakse kuivainele ümber arvatud niiskusesisaldus, nii Eesti- kui Euroopa Liidu seadusandluses esitatavad normid arvestavad kõik lihtsalt diastaasarvu, mida ei ole niiskuse suhtes korrigeeritud. Kuivainele ümberarvutatud diastaasarv on ligikaudu 16% kõrgem kui tavaline diastaasarv.

## **HMF määramine**

Hüdroksümetüülfurfuraal ehk hüdroksümetüülfuraldehüüd (HMF) on üks kõige olulisemaid mee kvaliteedi indikaatoreid. Värskes kuumutamata mees see aine peaaegu puudub, kuid sisaldus kasvab mee hoidmisel, sõltudes kõige enam mee pH-st ja hoidmise või töötlemise temperatuurist

### *Määramismeetodid*

1. HMF fotomeetiline määramine Winkleri meetodil. Mesi lahustati veega. Hägu ilmnemisel lisati kahte sadestusreaktiivi, selge lahuse korral pole seda vaja teha. Lahusele lisati p-toluidiini ja barbituurhapet, mis annavad HMF-ga reageerides värvilise ühendi. Proovi analüüsiti fotomeetriga lainepikkusel 550 nm [1, 2]
2. HMF fotomeetiline määramine White meetodil, mõõdetakse HMF UV kiirguse neelamisvõimet lainepikkusel 284 nm. Mesi lahustati veega ja lisati kahte sadestusreaktiivi ning filtreeriti. Selge lahus jaotati kaheks, üks osa võeti võrdluslahuseks ja sellele lisati naatriumvesiniksulfiti lahust ja teisele lisati destilleeritud vett. Lahuste neelduvus mõõdeti lainepikkustel 284nm ja 336 nm. Naatriumvesiniksulfitit lisatakse, et vältida teistest ühenditest tulenevaid segavaid mõjusid. Lainepikkusel 336 nm mõõtmine toimub selleks, et spektraalset fooni maha lahutada [ 2]

3. Vedelikkromatograafiline meetod (HPLC). HMF määratakse selgest, filtreeritud ja sadestamise läbinud proovist pöördfaasi vedelikkromatograafi abil, mis on varustatud UV detektoriga. Detektori signaali võrreldakse teada oleva kontsentratsiooniga standardlahuse omaga [ 2].
4. Firma Merck Reflectoquant kiirtest. HMF reageerib testiribal barbituurhappe derivaadiga ja aminofenasooni derivaadiga ning moodustub punakaslilla ühend, mida määratakse fotomeetriliselt portatiivse spektromeetriga RQflex 10, mis mahub taskusse. Mesi kaalutakse ja lahjendatakse 1:4 destilleeritud veega. Loksutatakse 1-2 min katseklaasis. Testriba pannakse 1 sekundiks proovi sisse ja 120 sekundit hiljem määratakse fotomeetriliselt [ 7].

### *Tulevikuvõimalused*

Rahvusvaheline meekomisjon (IHC) soovib mee HMF sisalduse määramiseks kõike kolme meetodit. Neist uusima meetodina on neist kasutusel pöördfaasi kõrgsurve vedelikkromatograafia (RP-HPLC), koos UV detektoriga [2, 8]. Uudse lähenemisena soovivad mõned teadlased proovi enne RP-HPLC analüüsi puhastada tahkefaasi ekstraktsiooni (SPE) abil [9].

Lisaks kolmele enam tuntud meetodile on hiljuti katsetatud gaaskromatograafiat koos massispektromeetriselise detektoriga (GC-MS) koos SPE või vedelik-vedelik ekstraktsiooniga [10], elektrokeemilist meetodit [11] ja biosensoreid [12]. Kaks viimati nimetatud meetodid ei hakka suure tõenäosusega kolmele enamkasutatavale konkurentsi pakkuma.

Kirjanduse andmed näitavad, et kolme enamkasutatavat meetodit võrreldakse omavahel [13] ja täiustatakse vedelikkromatograafilist meetodit. Samuti pööratakse tähelepanu HPLC meetodi kasutamise käigus tekkida võivatele vigadele, näiteks segavatele piikidele mõne taime monofloorses mees. HPLC määramise puhul on kõige olulisemaks eeliseks teiste meetodite ees meetodi spetsiifilisus. Kui kolorimeetriseliste meetodite puhul võib analüütilist signaali anda ka mõni teine mees sisalduv aine, siis HPLC puhul seda probleemi ei ole. Vaatamata analüüsi kõrgemale hinnale levib kõrgsurve vedelikkromatograafia järjest rohkem. Seda meetodit kasutab ka Veterinaar- ja Toidulabor.

Winkleri meetodit ei soovitata, kuna p-toluidiin on kantserogeenne. Selle meetodi puhul on ka (laiend)määramatus kõige suurem ja tulemused kõrgemad kui kahe teise põhilise meetodi puhul. [14, 15] Samas soovib Eesti Standard EVS 738:1997, mee jaoks just Winkleri meetodit [1] ja see on kasutusel mitmes Eesti laboris. Ka on see meetod laialdaselt kasutusel kogu maailmas.

2009 aastal on firma Merck hakanud pakkuma HMF kiirtesti võimalust. Analüüsiks kulub mõni minut ja tulemused on tootjate andmetel heas korrelatsioonis HPLC ja Winkleri meetodiga. Kokku testiti 150 erinevat meeproovi [16]. See test tuleks Eestisse muretseda, kuna pakub mesinikele võimalust ilma labori abita oma meekvaliteeti analüüsida. Näiteks kohalikel mesinike organisatsioonidel võiks selline aparaat olemas olla. Erilist huvi tekitab ka hind: aparaat 7000 krooni ja 50 testiribast koosnev komplekt 1000 krooni, hinnad on esitatud käibemaksuta. Selline hind on analüüsiaparatuuri jaoks madal. Lisavõimalusena on aparaadiga kokku võimalik analüüsida 50 erinevat toiduainete näitajat, kui omada vastavaid testikomplekte. Paljud neist mee puhul rakendatavad ja vajalikud on ei ole võimalik katsetamata öelda. Huvi võiksid pakkuda suhkrute, näiteks sahharoosi analüüsi komplektid.

## Kasutatud kirjandus

1. Eesti Standard EVS 738:1997. Mesi. Tehnilised nõuded ja katsetamine
2. Bogdanov S, CA: International Honey Commission. Honey quality and international regulatory standards. Review by the International honey commission. *Bee-World* 1999, 80:2, 61-69
3. Isengard H-D, Schultheiß D, Radovic B, Anklam E. Alternatives to official analytical methods used for the water determination in honey. *Food control*, 2001, 12, 459-466
4. Gallina, A, Stocco N, Mutinelli F. Karl Fisher titration to determine moisture in honey: A new simplified approach. *Food control*, 2010, 21, 942-944
5. White JW. Moisture in honey: Review of chemical and physical methods. *Journal of the AOAC*, 1969, 52, 729-737
6. Zamora MC, Chirife J, Roldan D. On the nature of relationship between water activity and % moisture in honey. *Food control*, 2006, 17, 642-647
7. kkkk
8. Kubis I, Ingr I. Effects inducing changes in hydroxymethylfurfural content in honey. *Czech Journal of Animal Science* 1998, 43:8. 379-383
9. R Wood, S MacDonald, B Brereton, D Chan, R Macarthur, M Driffield. Single Laboratory Validation of a Method of Determination of Hydroxymethylfurfural in Honey by using Solid-Phase Extraction Cleanup and Liquid Chromatography, *J AOAC International*, 2005, 88, 121-127
10. E Teixido, F J Santos, L Puignou, M T Galceran. Analysis of 5 hydroxymethylfurfural in foods by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of chromatography A*, 2006, 1135, 85-90
11. E O Reyes-Salas, J a Manzanilla-Cano, M H Barceló-Quintal, D Juarez-Mendoza, M Reyes-Salas Direct Electrochemical Determination of Hydroxymethylfurfural (HMF) and its Application to Honey Samples, *Analytical Letters*, 2006, 39, 161-171
12. E A A Lomillo, F J del Campo, F J M Pascual. Preliminary Contribution to the Quantification of HMF in Honey by Electrochemical Biosensor Chips, 2006, 18, 2235-2440
13. Karabournioti S, Zervalaki P. The effect of heating on honey HMF and invertase. *Apiacta*, 2001, 36:4, 177-181
14. K Kalabova, L Vorlova, I Borkovcova, M Smutna, V Vecerek. Hydroxymethylfurfural in Czech honeys, *Czech J Anim Sci*, 2003, 48, 551-557
15. M Zappala, B Fallico, E Arena, A Verzera. Methods for the determination of HMF in honey: a comparison, *Food Control*, 2005, 273-277
16. Merck, Merck offers the first rapid test for HMF determination in honey, Merck Press Release, March 5, 2009