

MAGYAR ÉLELMISZERKÖNYV (Codex Alimentarius Hungaricus)

3-2-2009/1 számú irányelv Méz mintavételi és vizsgálati módszerei

1. kiadás, 2009

1. §.

1. Ezen irányelv az élelmiszerláncról és hatósági felügyeletéről szóló 2008. évi XLVI. törvény 66. § (1) bekezdése alapján a méz mintavételére és vizsgálatára ajánlott módszereket tartalmazza. Célja, hogy a gazdaság szereplői és az ellenőrzés egységes elvek és módszerek alapján határozza meg az MÉ 1-3-2001/110 számú Méz című előírásban előírt követelményeknek való megfelelést.

2. A módszerek a méz alábbi jellemzőinek vizsgálatára vonatkoznak:

- mintavétel, mintaelőkészítés,
- cukortartalom,
- nedvességtartalom,
- vízben oldhatatlan szilárdanyag-tartalom,
- savfok és pH
- szabad sav-tartalom,
- diasztázaktivitás,
- HMF tartalom,
- pollentartalom,
- invertáz-tartalom,
- elektromos vezetőképesség,
- prolin-tartalom,
- C-4-es növényekből származó cukrok kimutatása,
- glicerin-tartalom.

2. §

1. Az 1. melléklet felsorolja azokat a szabványos módszereket, amelyek alkalmazhatóak, a mintavételre és a meghatározott vizsgálatokra.

2. Az 1. mellékletben fel nem sorolt, illetve alternatív vizsgálati módszerek részletes szabályait a 2.-10. melléklet tartalmazza.

3. §.

Ez az irányelv az FVM Értesítőben történő közzététel időpontjától alkalmazható.

Méz mintavételére és vizsgálatára alkalmas Magyar Szabványok

Mintavétel	MSZ 6926:1981	Méz mintavételi módszerei fizikai kémia érzékszervi és mikroszkópos vizsgálat céljára
Cukortartalom	MSZ 6943-4:1982	Méz fizikai és kémiai vizsgálata. Cukortartalom meghatározása
Nedvességtartalom	MSZ 6943-1:1979	Méz fizikai és kémiai vizsgálata. Víz-, illetve szárazanyag-tartalom meghatározása
Vízben oldhatatlan szilárdanyag-tartalom	MSZ 6943-2:1980	Méz fizikai és kémiai vizsgálata. Vízben oldhatatlan szilárd anyagok és hamutartalom meghatározása
Savfok és pH érték	MSZ 6943-3:1980	Méz fizikai és kémiai vizsgálata. Savfok és pH meghatározása
Diasztáz-aktivitás	MSZ 6943-6:1981	Méz fizikai és kémiai vizsgálata. Diasztáz-aktivitás meghatározása
Hidroximetil-furfurol-tartalom (HMF)	MSZ 6943-5:1989	Méz fizikai és kémiai vizsgálata. Hidroximetil-furfurol tartalom (HMF) meghatározása
Pollentartalom	MSZ 6950-3:1977	Méz. Mikroszkópos vizsgálat
	MSZ 6950-3:1977/1 M:1989	Méz. Mikroszkópos vizsgálat
Invertáz-enzim	MSZ 6943-7:1982	Méz fizikai és kémiai vizsgálata. Invertáz-aktivitás meghatározása

Minta előkészítése vizsgálatához

A módszer az AOAC 920.180 számú *Honey. Preparation of Sample* című módszerének átvételével készült

A módszer a folyékony, szűrt vagy lépes méz mintaelőkészítését határozza meg.

1. Folyékony vagy szűrt méz előkészítése vizsgálatához

Ha minta nem tartalmaz kristályokat, alaposan keverjük, vagy rázzuk össze, mielőtt lemérjük a vizsgálatához szükséges mennyiséget.

Ha kivált kristályokat tartalmaz, tegyük egy zárt edényben vízfürdőbe, anélkül, hogy teljesen a vízbe merülne, és melegítsük 30 percig 60°C-on, vagy, ha szükséges, 65°C-on, amíg folyékony nem lesz. Időnként rázzuk össze. Keverjük össze, majd a mintát gyorsan hűtsük le annyira, hogy még folyékony maradjon. Ezt követően mérjük le a meghatározáshoz szükséges mennyiséget.

Diasztáz aktivitás vizsgálatához nem szabad melegíteni a mézet.

Ha idegen anyag, mint például viasz, fadarab, lépdarabka stb. van a mézben, vízfürdőben melegítsük a mintát 40°C-ra, és szűrjük át szűrővászonon vagy gézen, melegíthető tölcséren, mielőtt lemérjük a vizsgálatához szükséges mennyiséget.

2. Lépes méz előkészítése vizsgálatához

Vágjuk át a lép tetejét ha zárt, és teljesen válasszuk el a léptől a mézet 0,425 mm lyukméretű szitán. Ha lép, vagy a viaszdarabkák átesnek a szűrőn, melegítsük a mintát az 1. pont szerint, majd szűrjük át szűrővászonon vagy gézen. Ha a méz a lépben kikristályosodott, melegítsük fel, amíg a viasz folyékony nem lesz; keverjük össze, hűtsük le, majd távolítsuk el a viaszt.

Mézek elektromos vezetőképességének meghatározása

A módszer Bogdanov S., Lüllman C., Martin P. (1997): *Harmonized methods of the European Honey Commission (Apidologie extra issue, pp. 1–59.)* c. cikke alapján készült

1. Alkalmazási terület

Ez a módszer a mézek elektromos vezetőképességének meghatározására alkalmas 0,1 - 3 mS/cm tartományban.

2. Fogalommeghatározás

A méz elektromos vezetőképessége a méz-oldat 20 °C-on mért vezetőképességét jelenti, olyan oldatban mérve, amely méz-száranyagra nézve 20 %-os. Az eredményeket milli-Siemens per centiméter egységben kell kifejezni (mS/cm).

3. A módszer elve

A 20 % méz-száranyagot tartalmazó desztillált vizes méz-oldat vezetőképességét vezetőképesség-mérő cellában mérjük. A vezetőképesség meghatározása az elektromos ellenállás mérésén alapul, ami a vezetőképesség reciproka.

4. Vegyszerek

- 4.1. Ahol külön jelzés nincs, ott a reagenseknek analitikai tisztaságúaknak kell lenniük.
- 4.2. A víz legyen frissen desztillált, vagy ezzel egyenértékű minőségű.
- 4.3. 0,1 M-os KCl oldat: oldjon fel 7,4557 g, 130 °C-on szárított kálium-kloridot, egy 1000 ml-es lombikban frissen desztillált vízben és töltsse felig. A felhasználás napján frissen készítendő.

5. Berendezések és eszközök:

- 5.1. Vezetőképesség mérő műszer, alsó méréshatára 10^{-7} S.
- 5.2. Vezetőképesség mérő cella, platinázott kettős elektróddal (merülő harangelektrod).
- 5.3. Hőmérő, 0,1 °C fokbeosztással.
- 5.4. Vízfürdő, termosztáttal 20 °C+0,5 °C-ra állítva.
- 5.5. Mérőlombikok, 100 és 1000 ml térfogatú.
- 5.6. Főzőpohár, magas falú.

6. A vizsgálat menete

6.1. A cellakonstans megállapítása:

Ha a vezetőképesség mérő cella cella-állandója nem ismert, a következőképpen kell megállapítani:

A kálium-klorid oldatból tegyen 40 ml-t a főzőpohárba. Kapcsolja a cellát a mérőeszközhöz, öblítse át a káliumklorid oldattal, majd merítse bele teljesen az oldatba. Helyezze mellé a hőmérőt. Olvassa le az oldat vezetőképességét mS egységben, miután a hőmérséklet beállt 20 °C-ra.

Megjegyzés:

Ha a vezetőképesség mérő műszer egyenáramú, a polarizáció miatti hamis eredmények elkerülése érdekében a mérési időnek a lehető legrövidebbnek kell lennie.

6.2. A cellakonstans (K) kiszámítása a következő:

$$K=11,691 \times 1/G$$

ahol

K = a cellakonstans 1/cm-ben

G = a cellában mért elektromos vezetőképesség mS-ben, 0,01 mS leolvasási pontossággal

11,691 = a frissen desztillált víz és a 0,1 M-os KCl oldat együttes vezetőképessége 20 °C-on, mS/cm-ben

Öblítse át az elektródot alaposan desztillált vízzel a cellakonstans mérése után.
Mérésen kívül tárolja az elektródot desztillált vízben, hogy elkerülje a platina öregedését.

6.3. Mintaelőkészítés:

Oldjon fel desztillált vízben annyi mézet, amennyinek a szárazanyag tartalma 20,0 g. Az oldatot kvantitatíve vigye át egy 100 ml-es mérőlombikba és töltsé jelig desztillált vízzel.

Megjegyzés:

Ha szükséges, 1:5 m/V (tömeg/térfogat) arányú hígításban kisebb mennyiség is használható.

6.4. Vizsgálat

Öntsön 40 ml mintaoldatot a főzőpohárba és helyezze a főzőpoharat 20 °C -ra termosztált vízfürdőbe. Öblítse át a vezetőképesség mérő cellát a mintaoldat maradékával. Merítse a cellát a mintaoldatba. Olvassa le a vezetőképességet mS-ben, amint beállt az egyensúlyi hőmérséklet.

Megjegyzés:

1. Ha a vezetőképességmérő készülék egyenáramú, a polarizáció miatti hamis eredmények elkerülése végett a mérési időnek a lehető legrövidebbnek kell lennie.

2. Ha a meghatározást termosztálható cella hiányában más hőmérsékleten végezte, akkor az eredményeket át kell számítani 20 °C-ra a következőképpen:

- 20 °C feletti hőmérséklet esetén: celsius fokonként a mért érték 3,2 %-át vonja le az eredményből.
- 20 °C alatti hőmérséklet esetén: celsius fokonként a mért érték 3,2 %-át adja hozzá az eredményhez.

A fenti módon számított, korrigált értékek nem vonhatók be validálási körmérésekbe. Mindazonáltal nem tapasztaltak szignifikáns különbséget 20 és 26 °C között 50 mért méz minta esetében.

7. Az eredmény kiszámítása

A méz-oldat vezetőképességét a következő képlet segítségével számoljuk ki:

$$S_M = K \times G$$

ahol

S_M = a méz-oldat vezetőképessége mS/cm-ben

K = a cellakonstans l/cm-ben

G = a mézre mért vezetőképesség mS-ben

Az eredményeket 0,01 mS/cm pontossággal kell megadni.

8. Ismételhetőség és reprodukálhatóság:

Ismételhetőségi (r) és reprodukálhatósági (R) adatok 95 %-os valószínűségi szinten a 0,1 - 3 mS/cm tartományba eső adatoknál:

1,52 mS/cm-nél	r =0,020	R =0,120
0,44 mS/cm-nél	r =0,005	R =0,045
0,22 mS/cm-nél	r =0,002	R =0,020

Méz cukortartalmának meghatározása folyadékkromatográfias (HPLC) módszerrel

A módszer az AOAC 977.20 számú *Separation of Sugars in Honey Liquid Chromatographic Method* című vizsgálati módszerének átvételével készült

1. Alkalmazási terület

A módszer alkalmas a mézben lévő cukorkomponensek – glükóz, fruktóz, szacharóz – szétválasztására és mennyiségi meghatározására.

2. A módszer elve

A cukorkomponenseket – mono-, di- és triszacharidokat – nagyteljesítményű folyadékkromatográfias készülékkel (HPLC) választjuk szét, refraktív index detektorral¹ érzékeljük, mennyiségüket a mérendő cukrok és az azonos modelloldatok csúcs alatti területeinek arányából számítjuk.

3. Vegyszerek

3.1. Mozgó fázis, acetonitril (Burdick & Jackson Laboratories, Inc., vagy ezzel egyenértékű) vízzel hígítva (83 + 17). A mozgó fázist naponta gázmentesíteni kell mágneses keverővel², 15 percig, vákuum alatt.

3.2. Cukor standard oldat: mérjük be 100 ml-es mérőlombikba 3,804 g fruktózt (Mallinckrodt Chemical Works, vagy ezzel egyenértékű), 3,010 g glükózt (Mallinckrodt Chemical Works, vagy ezzel egyenértékű) és 0,602 g szacharózt oldjuk fel 50 ml vízben, és acetonitrilrel töltjük jelig. A standard összetétele közel azonos 5 g mézével, 50 ml vizes acetonitrilben oldva (1 + 1)

4. Berendezések és eszközök

4.1. Kromatográf, Waters Associates ALC/GPC modell, vagy ezzel egyenértékű

4.2. Detektor, Waters Associates R-401 refraktív index detector, vagy ezzel egyenértékű

4.3. Recorder, Varian Aerograph kétsatornás detektor, A-25 modell, vagy ezzel egyenértékű

4.4. Oszlop, 300 x 4 (belső átmérő) mm, μ -Bondapak/Carbohydrate (Waters Associates, No. 84038, vagy ezzel egyenértékű)

4.5. Mintatisztító készlet, Waters Associates (No.26865), vagy ezzel egyenértékű; 0,45 μ m-es – szerves oldószerben stabil – szűrők

4.6. Fecskendő, 10 μ l-es, Hamilton, No.701-N, 25 beosztással, 1,2 x 0,020" külső átmérő

5. Mérési körülmények

A fruktózt, glükózt és szacharózt 20 perc alatt választjuk szét és azonosítjuk a következő mérési körülmények között:

- áramlási sebesség: 1,0 ml/perc (ca 500 psig; 3,45 Mpa)
- hőmérséklet kb. 23°C, állandó
- detektor (R-401): 8x (fruktóz és glükóz), 2x (szacharóz)
- érzékenység: 10 mV a rekorderen, a detektoron úgy beállítva, hogy 380 μ g fruktóz a toll teljes mértékű kitérését eredményezze

¹ ELS (Evaporative Light Scattering) detektorral is érzékelhető

² A gázmentesítés ultrahangos vízfürdővel is elvégezhető

- papírsebesség: 0,1 "/perc

A mono-, di- és triszacharidok a molekulásúlyuk sorrendjében eluálódnak az oszlopról.

6. *A minta előkészítése*

Mérjük be 5,000 g mintát egy kis főzőpohárba, majd mossuk be 25 ml vízzel egy 50 ml-es mérőlombikba. Azonnal töltsük felig acetonitril, majd szűrjük át 0,45 µm-es szűrőn, a mintatisztító készletet használva.

7. *Kromatografálás*

Injektáljunk 10 µl standard oldatot a kromatográfba. Rögzítsük a retenciós időket, mérjük a csúcsmagasságot és állapítsuk meg az ismételhetséget. Ismételjük meg a műveletet a minta oldattal.

8. *Az eredmény kiszámítása*

A glükóz, a fruktóz és a szacharóz mennyiségét az integrátorral mért értékből, vagy a csúcsmagasságból a következő képlettel számítjuk ki:

$$\text{Cukor, \% (m/m)} = 100 \times (PH/PH') \times (V/V') \times (W'/W)$$

ahol

<i>PH</i>	a minta csúcs magassága (vagy az integrátorral mért érték),
<i>PH'</i>	a standard csúcs magassága (vagy az integrátorral mért érték),
<i>V</i>	a minta oldat mennyisége, ml (50)
<i>V'</i>	a standard oldat mennyisége, ml (100)
<i>W</i>	a minta mennyisége, g (5,000)
<i>W'</i>	a standard mennyisége, g

9. *Teljes mérési bizonytalanság* ± 10 relatív%

Méz prolin-tartalmának meghatározása

A módszer az AOAC 979.20 számú *Proline in Honey* című vizsgálati módszerének átvételével készült

1. Alkalmazási terület

A módszer a mézben lévő prolin – amely a mézben a szabad aminosavak közül a legnagyobb mennyiségben fordul elő – mennyiségi meghatározására alkalmas.

2. A módszer elve

A prolin ninhidrinnel reagálva színes vegyületet képez. A színerősséget 520 nm-nél mérjük. Az abszorbanciának megfelelő koncentrációt kalibrációs görbéből határozzuk meg. Más aminosavakkal való interferencia elhanyagolható, $\leq 5\%$.

3. Vegyszerek

3.1. Ninhidrin oldat, 3 %-os: oldjunk fel 3,0 g ninhidrint 100 ml peroxid-mentes etilén-glikol-monometil-éterben. Az oldatot, hogy ne reagáljon, Zn fém felett sárga palackban kell tárolni.

3.2. L-(-)-prolin, Eastman No. 2488 (vagy ezzel egyenértékű), szárítószekrényben szárítva, eszkikkátorban tárolva. Standard oldat készítése:

- Törzsoldat, 0,5 mg/ml víz. Oldjunk fel 25 mg prolint 50 ml vízben. Hűtsük le.
- Munkaoldat, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Hígítsunk 10 ml törzsoldatot vízzel 100 ml-re. Naponta frissen kell készíteni.

3.3. Hangyasav

3.4. Izopropanol

4. Berendezések és eszközök

4.1. Fotométer, látható tartományban mérő

4.2. Küvetták, 10 mm-es

4.3. Kémcsövek, 18 x 130 mm hőálló, teflon kupakkal

4.4. Vízfürdő

5. A vizsgálat menete

Mérjük be 2,5 g mézet analitikai pontossággal, vigyük át 50 ml-es mérőlombikba, majd vízzel töltsük fel jelig. Három kémcsöbe mérjük egyenként 0,5 ml minta oldatot, adjunk hozzá 0,25 ml hangyasavat és 1,00 ml ninhidrin oldatot. Zárjuk le a kémcsöveket szorosán, jól rázzuk össze, majd 15 percre helyezzük forrásban lévő vízbe. Ezután 5 perc alatt hűtsük le a kémcsöveket folyóvízzel 22 °C-ra, vegyük le a kémcsövek fedelét, és pipetázzunk a kémcsövekbe 5 ml vizes izopropanol (1+1) oldatot. Jól rázzuk össze, majd mérjük meg az abszorbanciát (A) 520 nm-en vakoldattal szemben. A vakoldat készítésekor méz helyett vizet mérünk be, majd elvégezzük a meghatározást. A leolvasást a forralástól számított 35 percen belül el kell végezni.

A méz abszorbancia értékét a következő oldat abszorbancia értékével kell korigálni: 0,5 ml mézoldat, 1,25 ml víz és 5,00 ml vizes izopropanol (1+1). Számítás előtt vonjuk le az így nyert oldat abszorbancia értékét a ninhidrines oldat abszorbancia értékéből.

6. Az eredmény kiszámítása

A méz prolin tartalmának a meghatározásához kalibrációs görbét kell készíteni úgy, hogy a meghatározás során méz helyett prolin standard oldatot használunk. 0,5 ml 50 µg/ml-es prolin oldat abszorbanciája 10 mm-es küvettában kb. 0,35.

Kiszámítjuk a méz prolin tartalmát mg prolin/100 g méz értékben.

7. *Teljes mérési bizonytalanság*
± 10 relatív %

A méz savtartalmának (szabad sav, lakton-sav és összes savtartalom) meghatározása titrálással.

Az módszer az AOAC 962.19 módszere és az IHC ajánlása alapján készült.

1. Alkalmazási terület

A módszer alkalmas a mézben található szabad, ill. lakton formában előforduló sav mennyiségi meghatározására.

2. Fogalommeghatározások

Szabad savnak a mézben található, annak vizes oldatában közvetlenül megtitrálható savakat nevezzük. A szabad sav mennyiségét milliekvivalens/kg-ban fejezzük ki.

A lakton-savasság a méz glükóz tartalmából származó glükonsav mennyiségét jelenti. A mézben a glükonsav a glükono-laktonnal van egyensúlyban, lúgos közegben azonban teljes mértékben glükonsavvá alakul. Mennyiségét milliekvivalens/kg-ban fejezzük ki.

Összes savtartalom= szabad savtartalom+lakton-savasság

3. A módszer elve

A méz vizes oldatát lúgoldattal végpont értékig titráljuk. Az végpont értéke a mézben található gyenge savak kismértékű disszociációja miatt az enyhén lúgos tartományban van (pH 8,5).

A laktonok hidrolízisét lúg hozzáadásával teljessé tesszük és savoldattal végpontig visszatitrálunk (pH 8,3).

4. Vegyszerek

1.1. Pufferoldatok a pH-mérő kalibrálásához pH 4,0 és pH 9,0 értéknél.

1.2. Ismert faktorú 0,05 N NaOH oldat. Az oldat készítéséhez felhasznált kristályos NaOH a. lt. minőségű legyen. Az oldatot naponta frissen kell faktorozni. Standardizált oldat is használható, pl. Titrisol.

1.3. Ismert titerű 0,05 N HCl oldat.

1.4. Az oldatok készítéséhez kiforralt, vagy frissen készült desztillált vizet kell használni.

5. Berendezések és eszközök:

1.5. pH mérő elektród.

1.6. Automata titrátor (pH-mérő készülék automata bürettával ellátva), titrálási végpont beállítással, vagy pH-mérő és buretta. Mérési pontosság: 0,01 pH egység.

1.7. Mágneses keverő.

1.8. Analitikai mérleg.

1.9. Táramérleg.

1.10. Főzőpohár.

6. A vizsgálat menete

1.11. A pH mérő kalibrálása:

Kalibrálja a pH-mérőt 4-es és 9-es pH értéknél a puffer oldatokkal. A kalibrációt naponta el kell végezni a mérések megkezdése előtt.

1.12. Mérés

Oldjon fel analitikai pontossággal mért 10 g körüli mintát 75 ml széndioxid-mentes desztillált vízben, egy 250 ml-es főzőpohárban. Keverje mágneses keverővel, merítse az oldatba a pH mérő elektródját. Állítsa a titrálási végpont értéket pH 8,50-re.

Titrálja meg az oldatot 0,05 N NaOH-val, 5,0 ml/perc sebességű adagolással. Állítsa le a titrálást 8,50-es pH értéknél és jegyezze fel a fogyott NaOH millilitereinek számát 0,1 ml pontossággal. Azonnal adjon hozzá 10,0 ml 0,05 N NaOH oldatot és késelem nélkül titrálja vissza 0,05 N HCl oldattal 8,30 pH értékig. Olvassa le a fogyott HCl millilitereinek számát 0,1 ml pontossággal.

A meghatározáshoz nagy adagolási sebességet válasszon, mert a laktonok hidrolízise miatt a végpontban eltolódás tapasztalható. Pontos érték akkor kapható, ha a titrálási folyamat max. két perc alatt végbemegy.

7. Az eredmény kiszámítása

Szabad savtartalom meq/kg-ban = (fogyott 0,05N NaOH ml-ek száma x 50)/bemért minta mennyisége g-ban

Lakton-savasság meq/kg-ban = (10,00 – fogyott 0,05 N HCl ml-ek száma) x 50/bemért minta mennyisége g-ban

Összes savtartalom = szabad sav tartalom+laktonsavasság

8. Ismételhetőség és reprodukálhatóság

Ismételhetőségi (r) és reprodukálhatósági (R) adatok 95 %-os valószínűségi szinten:

összes savtartalom meq/kg	r	R
7,0	4,7	8,5
6,5	2,9	6,2
13,5	2,6	7,1

Méz glicerintartalmának meghatározása

Enzimes módszer

a Megazyme International Ireland Limited *Glycerol Assay Procedure (K-GCROL)* módszerének átvételével készült*.

1. Alkalmazási terület

A módszer alkalmas a mézhez hozzáadott glicerintartalmának a meghatározására

2. A módszer elve

A vizsgálni kívánt mintából vizes oldatot készítünk. Ebből az oldatból enzimreakciók segítségével határozzuk meg a glicerintartalmát. A reakciók során sztöchiometrikus mennyiségben fogyott NADH (redukált nikotin-amid-dinukleotid-hidrát) mennyiségének csökkenését spektrofotométerrel mérjük. Az abszorbanciák változásából számolunk vissza a glicerintartalmára.

3. Vegyszerek:

3.1. Ioncserélt víz

3.2. Enzim teszt készlet: Megazyme K-GCROL A vizsgálathoz szükséges összes vegyszert, enzimet, standardot a készlet tartalmazza. Ezek:

1. üveg: Tris/HCl puffer + MgCl₂ + NaN₃ 4°C-on tárolva több, mint 2 évig stabil

2. doboz: 14 db tablettát, NADH + ATP + PEP, - 20°C-on tárolva több, mint 2 évig stabil

3. üveg: piruvát kináz + L-laktát-dehidrogenáz szuszpenzió (PK/L-LDH), 4°C-on tárolva több, mint 2 évig stabil

4. üveg: glicerokináz szuszpenzió (GK), 4°C-on tárolva több, mint 2 évig stabil

5. üveg: glicerintartalom standard oldat, 0,2mg/ml, szobahőmérsékleten tárolva több, mint 2 évig stabil

3.3. Munkaoldatok: A 2. dobozból 5 vizsgálatonként (vakot és standardot is beleszámítva) 1 tablettát oldjunk fel 1,1 ml Tris/HCl pufferben (1. üveg) (ez a 2. oldat). Feloldás után a NADH abszorbanciája folyamatosan csökken az idő teltével, de 4°C-on tárolva 4 napig, - 20°C-on tárolva 4 hétig használható. (Ha nem használjuk fel mindet, célszerűen fagyasztoóban tároljuk.)

FONTOS! Az enzim készlet tartalmát saját dobozában, hűtőszekrényben tároljuk, kivéve a feloldott 2. oldatot, amit fagyasztoóban, -20°C-on tárolunk!

4. Berendezések és eszközök:

4.1. Táramérleg, 0,01g pontossággal

4.2. Kémcsőkeverő (pl. Vortex), lombikhoz való feltéttel

4.3. Pipetták, 20, 200 és 5000 µl térfogatú

4.4. 25 ml-nél jelölt 40ml-es fiolák

4.5. Főzőpoharak

4.6. Spatulák

4.7. Egyszer használatos műanyag küvetták, 1cm fényűt, 3 ml

4.8. Egyszer használatos műanyag spatulák küvettákhoz

4.9. Küvettatartó

4.10. Stopperóra

4.11. UV Spektrofotométer, 340nm

* A glicerintartalom meghatározás más gyártó tesztkészletével is elvégezhető az ahhoz tartozó leírás alapján.

5. A vizsgálat menete:

5.1. Mintavétel:

A mintát alaposan homogenizáljuk. A mézet, ha kristályos, 60°C-os vízfürdőn olvasszuk fel.

Fontos! Ha a mézmintából egyéb vizsgálatokat is (diasztáz aktivitás, HMF) végzünk, akkor max. 40°C-on szabad kiolvasztani a mézet!

Táramérleggen 0,01g pontossággal mérjük be a mintából kb. 2,5g-ot 25 ml-nél jelölt 40 ml-es fiolába.

5.2. Minta előkészítése:

A bemért mintát oldjuk fel ioncserélt vízben kémcsőrázó segítségével, és töltjük jelig 25 ml-re.

Az enzim készlet tartalmát és a 2. oldatot hagyjuk szobahőmérsékletre melegedni. A 3. és 4. üvegben lévő szuszpenziókat kémcsőkeverőn 2500 1/perc (rpm) fordulaton keverjük 1 percen keresztül. Ezután helyezzük őket kilendülő fejes centrifugába, és 1000 g gyorsulással centrifugáljuk 5 percig (a 25ml centrifugacső tartók alkalmasak erre a célra). Erre azért van szükség, mert a két üvegben lévő szuszpenzió mennyisége nagyon pontosan van kimérve a 70 vizsgálathoz, és az üvegek dugójára tapadó szuszpenzió elvesztése azt eredményezi, hogy nem tudjuk elvégezni a kellő számú vizsgálatot. Centrifugálás után az üvegeket függőleges helyzetben tároljuk. (a centrifugacső tartóból célszerűen csipesszel vegyük ki az üvegeket).

5.3. Mérés:

A küvetatartóba helyezzünk annyi küvettát, amennyi mintát vizsgálni akarunk, plusz kettőt, a vak és a kalibráló oldatoknak.

FONTOS! A küvettának csak a matt/barázdált részét fogjuk meg!

Ezután az alábbi táblázat szerint pipetázzuk össze az oldatokat, és olvassuk le az abszorbanciákat 340 nm-en levegővel szemben (egy fényutas fotométer esetén a levegőre zérózunk, küvetta nélkül):

Pipetázzunk a küvettába	vakminta	Standard	Minta
Desztillált víz	2,10 ml	2,00 ml	1,60 ml
Minta oldat	-	0,10 ml	0,50 ml
2.oldat (NADH+ATP+PEP/Tris+HCl)	0,20 ml	0,20 ml	0,20 ml
3. szuszpenzió (PK/L-LDH)	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml
Keverjük össze*, kb. 6perc múlva olvassuk le, és jegyezzük fel az abszorbanciákat, (A_1) majd indítsuk a reakciót az alábbi hozzáadásával:			
4-es szuszpenzió (GK)	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml
Keverjük össze*, kb. 5 perc múlva olvassuk le és jegyezzük fel az abszorbanciákat, (A_2) Ha a reakció nem áll le 5 perc után, folytassuk a leolvasást 2 percenként, amíg egymás után két azonos értéket kapunk.			

*például műanyag spatulával

6. Az eredmény kiszámítása

Határozzuk meg a vakminta esetében is és a minta esetében is az abszorbancia-különbséget ($A_1 - A_2$). Vonjuk ki a vakminta abszorbancia-különbségét a minta abszorbancia-különbségéből, az így nyert érték a $\Delta A_{\text{glicerin}}$.

A $\Delta A_{\text{glicerin}}$ értéknek legalább 0,100 abszorbancia egységnek kell lenni, hogy pontos eredményt kapjunk.

A glicerin koncentrációját (C) g/l-ben a következő képlettel számítjuk ki:

$$C = \frac{V \times MW}{E \times d \times v} \times \Delta A_{\text{glicerin}}$$

ahol

V	a végső térfogat, ml
MW	a glicerin molekulásúlya, 92,1 g/mol
E	a NADH extinkciós koefficiense 340 nm-en, 6300 ($l \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)
d	fényút, cm
v	a minta térfogata, ml

A módszerben megadott bemérésekkel:

$$C = \frac{2,34 \times 92,1}{6300 \times 1 \times 0,5} \times \Delta A_{\text{glicerin}}$$

$$C = 0,068 \times \Delta A_{\text{glicerin}}$$

Ha az előkészítés során a mintát hígítottuk, az eredményt meg kell szorozni a hígítási faktoral (F).

A standard oldatra mért koncentráció felhasználásával számoljuk ki a visszanyerést az alábbi képlet szerint:

$$\eta = \frac{c_a}{c_{elm}}$$

ahol:

η :	visszanyerés
c_a :	a glicerin mért koncentrációja a standard oldatban (mg/l)
c_{elm} :	a glicerin elméleti koncentrációja a standard oldatban (0,2 mg/l)

A mintákban mért glicerin koncentrációját minden esetben korrigáljuk a számított visszanyeréssel. Ha a visszanyerés kívül esik a 0,90 – 1,10 tartományon, akkor a vizsgálatot meg kell ismételni.

7. A mérés pontossága

Két párhuzamos mérés eredménye között az eltérés nem lehet nagyobb 5%-nál.

8. számú melléklet a 3-2-2009/1 számú irányelvhez

Méz glicerín tartalmának meghatározása Nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) módszer

1. Alkalmazási terület

A módszer alkalmas a mézhez hozzáadott glicerín kimutatására és mennyiségi meghatározására. A kimutatási határ 20 mg/kg, a mennyiségi meghatározás határa 100 mg/kg.

2. A módszer elve

A vizsgálati mintát híg vizes kénsav oldattal extraháljuk. Az extraktum glicerintartalmát HPLC-s módszerrel, ion-visszaszorításos kromatográfiával, törésmutató detektálással határozzuk meg.

3. Vegyszerek

3.1. Kénsav, 95- 98%- os (1,84 g/ml), a.l.

3.2. Víz, HPLC minőségű

3.3. Extraháló oldat, 0,05 mólos kénsav oldat: 2,7 ml tömény kénsavat hígítsunk 1000 ml-re HPLC minőségű vízzel

3.4. Eluens, 0,005 mólos kénsav oldat: 100 ml extraháló oldatot hígítsunk 1000 ml- re HPLC minőségű vízzel.

3.5. Glicerín standard oldatok

3.5.1. Glicerín törzsoldat, 10 mg/ml: mérjük be 0,1 mg pontossággal 1 ml glicerint, majd hígítsuk 100 ml-re 0,05 mólos kénsav oldattal. Az oldat pontos koncentrációját a tisztasági adatokból számítjuk.

3.5.2. Glicerín munka oldatok, 0,05 - 0,1 - 0,5 - 1,0 - 2,0 mg/ml.

Készítése:

a) 0,5 ml törzsoldat extraháló oldattal 100 ml-re töltve

b) 0,5 ml törzsoldat extraháló oldattal 50 ml-re töltve

c) 5 ml törzsoldat extraháló oldattal 100 ml-re töltve

d) 5 ml törzsoldat extraháló oldattal 50 ml-re töltve

e) 5 ml törzsoldat extraháló oldattal 25 ml-re töltve

4. Berendezések és eszközök

4.1. Kromatográf, Waters ALLIANCE 2690 folyadék és mintaadagoló rendszer, vagy ezzel egyenértékű

4.2. Detektor, Waters 2410 törésmutató detektor, vagy ezzel egyenértékű

4.3. Kiértékelő, Millennium 2010 kromatográfiás vezérlő és feldolgozó szoftver, vagy ezzel egyenértékű

4.4. Oszlop, H⁺ formájú kation cserélő oszlop (pl. Aminex HPX-87C 300 x 7,8 mm), vagy ezzel egyenértékű

4.5. Analitikai mérleg, 0,1 mg pontosságú

4.6. Táramérleg, 0,1 g pontosságú

4.7. Mérőlombik, 50, 100, 1000 ml- es

4.8. Főzőpohár, 100 ml- es

4.9. Pipetták

5. *Minta előkészítés*

A mintából a várható glicerin tartalomnak megfelelően annyit mérünk be, hogy 100 ml extraháló oldat hozzáadása után az oldat glicerin koncentrációja 0,05 és 2,0 mg/ml között legyen.

20 percig ultrahangos vízfürdőben kezeljük, majd szűrjük.

Az oldatot kromatografáljuk.

6. *Mérési körülmények:*

- eluens, 0,005 mólos kénsav oldat, izokratikus elúció
- áramlási sebesség: 0,9 ml/perc
- injektált térfogat: 100 µl
- oszlop: Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 (Bio Rad)
- detektor: RI detektálás

7. *Az eredmény kiszámítása:*

A kiértékelés ESTD kalibrációval történik, az összetartozó koncentráció (y) - csúcsterület(x) pontokra nullán átmenő egyenest illesztünk ($y=m*x$). A minta mért csúcsterületét az illesztett egyenes iránytangensével (m) szorozva kapjuk C_{oldat} értékét.

A glicerin mennyiségét az alábbi képlettel számítjuk ki:

$$C_{\text{komponens}} = C_{\text{oldat}} \times \frac{V}{G}$$

ahol

$C_{\text{komponens}}$ a glicerin koncentrációja a mintában, mg/kg

C_{oldat} a glicerin koncentrációja a kromatografált minta oldatban, µg/ml

V a véghígítás értéke, ml

G bemért minta mennyisége, g

8. *Ismételhetőség és reprodukálhatóság:*

Ismételhetőség: RSD%: 6,0

Reprodukálhatóság: RSD%: 10,0

C-4-es növényekből származó cukrok kimutatása mézből

A módszer az AOAC 998.12 számú, *C-4 Plant sugars in honey* című vizsgálati módszerének átvételével készült.

1. Alkalmazási terület

Belső standardot alkalmazó stabilizotóp-arány módszer.

A módszer a C-4-es növényekből származó, (kukorica- vagy nád-) 7%-nál nagyobb koncentrációban jelen lévő cukrok kimutatására alkalmas.

2. A módszer elve

A mézből izolált fehérjék stabil szénizotóp aránya standardként szolgál, ehhez kell hasonlítani a teljes méz stabil szénizotóp arányát. A két érték különbsége (az ISCIRA index) a méz C-4-es cukor tartalmának mértéke.

A mérés két lépésből áll:

Az egyik lépésben meg kell határozni a mézminta Pee Dee Belemnite-hez viszonyított $\delta^{13}\text{C}$ értékét.

A másik lépésben izolálni kell a mézmintában található virágport és meghatározni az abban található fehérje $\delta^{13}\text{C}$ értékét.

Mind a mézet, mind pedig a fehérjét ugyanazzal a berendezéssel kell mérni.

A vizsgálatokhoz folyamatos és szakaszos üzemű készülék is felhasználható.

3. A mézminta vizsgálata

3.1. Első változat – szakaszos módszer

3.1.1. Készülék a szakaszos módszerhez

A szakaszos eljárásnál a mintát Craig vagy Sofer berendezésben el kell égetni, a keletkező széndioxidot tisztítás után átvinni a megfelelő tömegspektrométerbe, és azzal meghatározni a stabil izotópok mennyiségét. A készülék égetőrendszerből, tisztítórendszerből és a tömegspektrométerből áll.

3.1.1.1. Égetőrendszer

A következők valamelyikét kell használni:

(a) Craig eljárás.

Vákuumtömör üvegcső rendszer, részei: csökemence, benne kvarc égetőcső, félig töltve CuO-dal, folyékony N_2 -csapda, automata Toepler szivattyú, nagyvákuum-forrás.

Craig eljáráshoz a CuO előkészítése: Tisztítsa meg a (huzal állapotú) CuO-ot elektromos kemencében kb. 1 órai, 900 °C -on történő égetéssel. Kihűlés után zárt palackban tárolandó.

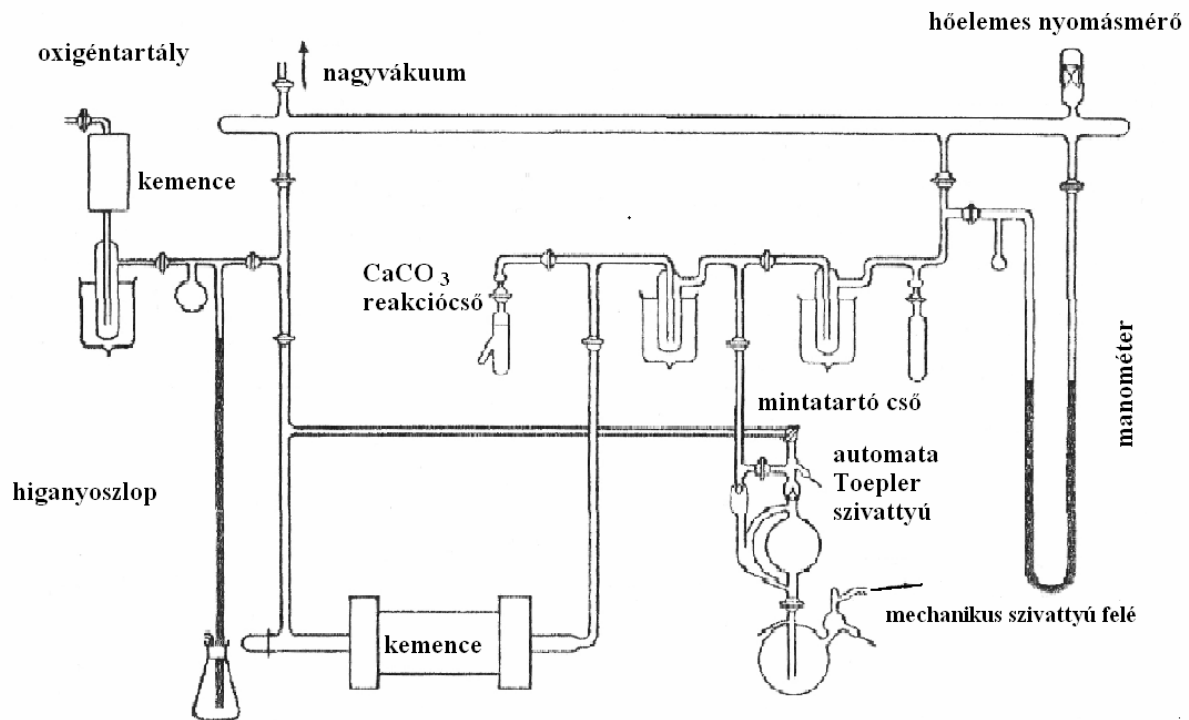
(b) Sofer eljárás.

Égetőcső: standard falvastagságú boroszilikát üveg (20 cm x 9 mm), egyik végén leforrasztva. Használat előtt tisztítsa meg kb. 1 órai, 550 °C-on történő hevítéssel.

A Sofer eljáráshoz a CuO előkészítése: a (huzal állapotú) CuO-ot törje porrá, hogy átmenjen a kb. 1,5 mm-es lyukméretű szitán és használat előtt kályházza 2 óra 750 °C-on.

3.1.1.2. Tisztítórendszer (Craig)

Üveg csőrendszer égetőrendszerrel összekapcsolva, ami tartalmazza a csapdát, a mintagyűjtő csövet és a manométert. [Lásd az 1. ábrát és a *Geochimica et Cosmochimica Acta* (1953), **3**, 54-55 oldalait.]



1. ábra: Szén égető- és tisztító rendszer a Craig eljáráshoz

3.1.1.3. Tömegspektrométer

Olyan berendezés, amelyet természetes izotóparányok mérésére terveztek vagy ilyen célra átalakítottak, és amely képes 0,01% pontossággal mérni 45-ös tömegszám értékénél természetes előfordulási arány esetén.

3.1.2. Vegyszerek

3.1.2.1. Standardok az izotóparány méréshez:

A következő kalibrációs standardok valamelyikét kell használni:

- (1) NIST 19 Mészke
 - $\delta^{13}\text{C} = -1,95 \text{ ‰}$ a Pee Dee Belemnite-hez viszonyítva
- (2) NIST 22 Nyersolaj
 - $\delta^{13}\text{C} = -29,73 \pm 0,09 \text{ ‰}$
- (3) ANU Szaharóz
 - $\delta^{13}\text{C} = -10,47 \pm 0,13 \text{ ‰}$
- (4) USGS 24 Grafit
 - $\delta^{13}\text{C} = -15,9 \pm 0,13 \text{ ‰}$
- (5) PEFI Polietilén fólia
 - $\delta^{13}\text{C} = -31,77 \pm 0,08 \text{ ‰}$

Kalibrációs célra az Office Standard Reference Materials-tól kapható 3 évente 400 mg mennyiség, illetve olajból 1 ml, grafitból 0,8 g, szacharózból 1 g. [National Institute of Standards and Technology, MD 20899, Gaithersburg, USA]

3.1.2.2. Egyéb vegyszerek:

CuO huzal a Craig vagy Sofer eljárásnál leírtak szerint kiizzítva.
Aceton, szénsavhó és folyékony nitrogén hűtőközegként.
Nagytisztaságú gázok a tömegspektrométer működtetéséhez.

Nagy tisztaságú gáz az égetőberendezés működtetéséhez.

3.1.3. A méz minta előkészítése a szakaszos módszerhez

3.1.3.1. Craig módszer

Tegyen 0,1 mg pontossággal bemért 20-50 mg mintát kerámia csónakba, helyezze el a csónakot a csőben és helyezze a rendszert vákuum alá. Engedjen be az oxigénpalackból 600 Hgmm-nyi oxigént, melyet CuO-n 700 °C-on tisztított és utána folyékony nitrogén-csapdán átengedett. Melegítse fel a mintát 850 °C-ra a csőrendszer csökemencéjében, fagyassza ki a keletkező CO₂-t a folyékony nitrogénnel hűtött csapdában. Keringesse a gázokat a CuO-on 10-30 percen keresztül 850 °C-on. Válassza le a szelepek segítségével a gyűjtőcsapdát és a tisztítórendszert az égetőrendszertől és a Toepler szivattyútól, és szivattyúzza le az oxigént. Hűtse le a tisztítócsapdát szárazjég és acetonelegyével; hűtse le a mintatartó csövet folyékony nitrogénnel. Engedje felmelegedni a gyűjtőcsapdát, kondenzáltatva a szennyezéseket a szilárd CO₂-os csapdában, és a CO₂-t a mintatartó csőben.

3.1.3.2. Sofer módszer

9 inch-es (22,9 cm) Pasteur pipetta segítségével helyezzen 3-5 mg mintát az előkészített izzítócső oldalfalára, a cső hossz tengelyében csíkban, vékony filmként szétkenve. A cső nyitott végéhez 3-4 cm-nél közelebb ne kerüljön minta. Borítsa be a mintát 3-5 g CuO-dal és tartsa a csövet vízszintesen legalább 5 percig. Tartsa a csövet szárítószekrényben 60-65 °C-on, 8 órán át. Vegye ki a csövet a szárítószekrényből, állítsa függőlegesre és erősen ütögesse meg, hogy a CuO részecskéket eltávolítsa a falnak arról a részéről, ahol majd a lezárás lesz.

Amíg a mintatartó csövek még melegek, helyezzen 1-6 csövet a vákuum csőrendszerbe és evakuálja rotációs szivattyúval 3-4 percen keresztül, aztán forrassa le a csöveket hegesztőpisztollyal. Helyezze a csöveket vízszintesen a kemencébe úgy, hogy a CuO lazán fedje be a mintát és a cső alját teljes hosszában. Kályházza a mintákat 585-590 °C-on 1 óra hosszat. Engedje a mintákat hűlni a kemencében legalább 1 óra hosszat, 400 °C alá. Csatlakoztassa a csöveket a vákuum-tisztító rendszerbe és törje fel a lezárást vagy nyissa fel a csövet csőzúzóval [L. Anal. Chem. **48**, 1651 (1976)]. Tisztítsa meg és mérje meg a CO₂-t a Craig módszernél leírtak szerint.

3.1.4. Meghatározás szakaszos módszerrel

A tömegspektrométert a gyártó utasításainak megfelelően működtesse. Kalibráljon legalább két standardra, a 3.1.2. fejezetben felsoroltak közül. A nyert adatokat korrigálja kalibrált nullpontra a beeresztő rendszerben, a minta- és standard szelepek közti keveredés értékére, a nagy csúcsok kis csúcsokkal való átlapolására, és az ¹⁷O-nek a 45-ös értéket zavaró hatására.

A méz $\delta^{13}C$ értékének kiszámítása ezrelékben:

$$\delta^{13}C_m \text{ ‰} = \left(\frac{{}^{13}C/{}^{12}C_{\text{minta}}}{{}^{13}C/{}^{12}C_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000$$

Az eredményeket, bármilyen standardot használtak is, a PDB-re (Pee Dee Belemnite standard) kell vonatkoztatni a következőképpen:

$$\delta_{(X-PDB)} = \delta_{(X-B)} + \delta_{(B-PDB)} + 10^{-3} \delta_{(X-B)} \times \delta_{(B-PDB)}$$

ahol:

$\delta_{(X-B)}$ és $\delta_{(X-PDB)}$ a mintának (X) a standardra (B) és a PDB-re vonatkoztatott δ értékei, (B-PDB) pedig a standardnak (B) a PDB-re vonatkoztatott δ értéke. Valamennyi δ érték ezrelékben van megadva.

3.2. Második változat – folyamatos módszer

3.2.1. A mérés elve

A mintát elégetjük egy sorba kötött automatizált Dumas égetővel Cr_2O_3 katalizátor mellett és a software által kiválasztott O_3 -fröccsel, tisztítjuk, majd He árammal a tömegspektrométer ionforrásába vezetjük. A folyamatos áramlású (continuous-flow) égető- és tisztító eljárás, egyszeres beeresztésű asztali tömegspektrométerrel on-line kötve teljesen automatikus, software-irányítás alatt áll, a minta $\delta^{13}\text{C}$ értéke közvetlenül a computer-kimeneten olvasható le.

3.2.2. Vegyszerek a folyamatos módszerhez

3.2.2.1. Standardok az izotóparány méréshez:

A 3.1.2. fejezetben leírt kalibrációs standardok valamelyikét kell használni.

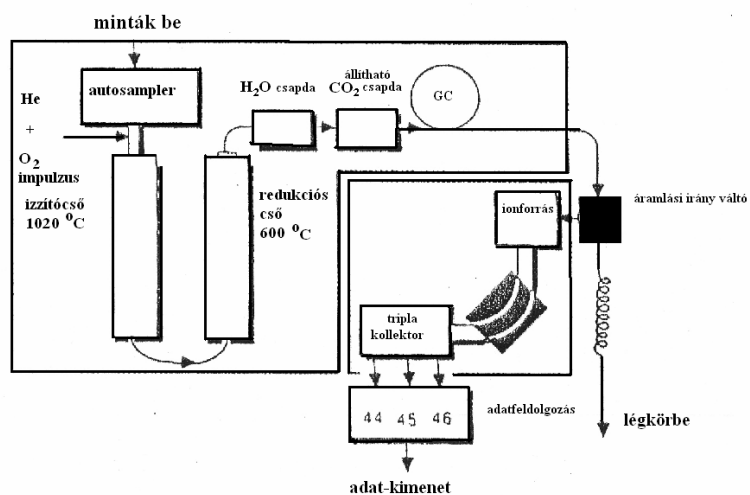
3.2.2.2. Egyéb vegyszerek:

Cr_2O_3 katalizátor.

Nagytisztaságú gázok az integrált készülék működtetéséhez.

3.2.3. Berendezés a folyamatos módszerhez

Automatizált Dumas égetőrendszerrel ellátott integrált rendszer, GC gáz-tisztító rendszerrel, tömegspektrométerrel amely természetes izotóparányok mérésére alkalmasra terveztek vagy módosítottak, és IBM-kompatibilis software-rel rendelkezik az égetési paraméterek szabályozására és az eredmények számítására. (PDZ Europa Service Centre, Europa House, Electra Way, Crewe, Cheshire CW1 62A, UK.) (lásd. 2. ábra)



2. ábra: Integrált rendszer a folyamatos módszerhez

3.2.4. Mintaelőkészítés a folyamatos módszerhez

Három párhuzamosban mérjen ki 0,1 mg pontossággal 3 mg hígítatlan mézet egy 6x4 mm-es önkapszulába, zárja le és helyezze az égető egység automata mintaadagolójára. Helyezzen munkastandard mintát [amelyet legalább 2 referencia standarddal szemben kalibrált a 3.1.2 fejezetben leírtak közül] legalább minden 8. méz minta után.

3.2.5. Meghatározás a folyamatos módszerrel

A készüléket a gyártó utasításainak megfelelően működtesse. A vivőgáz áramlási sebessége 60 ml/perc. Az oxidációs csőbe juttatott nagy tisztaságú (99,999 %) 1000 °C -os oxigén 15 ml-es impulzusai computer-irányítás alatt állnak. Állítsa a redukciós szakasz hőmérsékletét 600 °C-ra, a GC kolonnáét pedig 150 °C-ra. A 45, 46 és 47 *m/z* értéknél felvett ionáramokat a készülék egyidejűleg integrálja, háttérkorrekciót alkalmaz, a 45-ös értéknél ¹⁷O-ra korrigál, valamint a referencia-minták közötti esetleges driftet kompenzálja. Mivel minden mintára csak 1 mérést lehet végezni, a mérések precizitásának számolásához 5 párhuzamost kell vizsgálni a *NIST 22 Nyersolaj* mintából, önmagához, mint referenciához képest.

A méz $\delta^{13}\text{C}$ értékének meghatározása:

A számítógép kimeneti eredménye közvetlenül $\delta^{13}\text{C}$ egységekben kérhető.

4. *A mézben található pollen fehérje tartalmának vizsgálata (belső standard a mézminta $\delta^{13}\text{C}$ értékéhez).*

4.1 Készülékek

4.1.1. Mintaelőkészítéshez használt eszközök:

Centrifuga: Vízszintes 4-fejes rotorral 50 ml-es csövek számára, 1500 g minta elhelyezésére alkalmas legyen.

Dializáló cső: 25 mm x 30 cm-es lapos Sigma 250-9U cellulóz dialízis cső, vagy más olyan dializáló cső, amely a 12.000 daltonnál nagyobb molekulatömegű fehérjéket visszatartja

Szűrő: 0,10-0,15 mm lyukméretű szűrő (nylon harisnya).

4.1.2. Izotóparány méréshez használt készülék:

A mézminta méréséhez használt szakaszos vagy folyamatos működésű rendszer, mely égető és tisztítórendszerből valamint tömegspektrométerből áll.

4.2. Vegyszerek

4.2.1. Mintaelőkészítéshez használt vegyszerek:

volfrámsav nátrium-sója, ($\text{Na}_3\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) – 10 %-os vizes oldatban (nátrium-volframát).
0,335 M kénsav – hígítson 1,88 ml tömény kénsavat 100 ml-re.

4.2.3. Izotóparány méréshez használt vegyszerek:

A használt folyamatos vagy szakaszos működésű rendszer működtetéséhez szükséges, a 3.1.2. vagy 3.2.2. fejezetben leírt egyéb vegyszerek.

4.3 Meghatározás

4.3.1. Pollen izolálás

4.3.1.1 Mintaelőkészítés a pollen izoláláshoz

Ha észlelhető mennyiségű szilárd anyag van jelen a mintában, szűrje át a mézet 0,10-0,15 mm (100-150 mesh) lyukméretű szűrőn (a nylonharisnya anyaga kiváló ilyen célra); minden, a víznél nehezebb oldhatatlan anyag szennyezi a fehérje-csapadékot.

A következő lehetőségek valamelyikét használja a fehérje izolálására és tisztítására:

Ismételt mosási módszer:

Adjon 4 ml vizet 10-12 g mézhez egy tiszta, 50 ml-es centrifugacsőben. Jól keverje össze, az üledéket minden esetben teljesen diszpergálja. Tegyen 2,0 ml 10%-os nátrium-volframát oldatot és 2,0 ml 0,335 M-os kénsavat egy kis kémcsőbe, keverje össze, és azonnal adja hozzá a méz-oldathoz. Keverje jól össze. Kb. 80 °C-os vízfürdőben mozgassa, amíg látható csapadék nem képződik, tiszta felülúszóval. Ha nem keletkezik látható csapadék, vagy ha a felülúszó zavaros marad, adjon hozzá 2 ml-es részletekben még 0,335 M-os kénsavat, az egyes adagok közt ismétlje meg a melegítést.

Töltse meg a csövet vízzel, keverje össze a tartalmát és centrifugálja 5 percig 1500 g-vel, majd dekantálja a felülúszót. Ismétlje meg a mosási, keverési és centrifugálási lépéseket ötször, kb. 50 ml-es vízadagokkal, az üledéket mindannyiszor teljesen diszpergálva.

Dialízis:

Használjon olyan 25 mm x 30 cm-es lapos cellulóz dialízis csövet, amely a 12.000 daltonnál nagyobb molekulatömegű fehérjéket visszatartja (a Sigma 250-9U megfelelő). Áztassa a csövet vízben, egyik végére két csomót kötve egymás mellé. Melegítsen 5-7 g mézet kezdődő forrásig (mikrohullámú sütő használható), és adjon kb. 3-5 ml vizet hozzá, keverje össze, tegye a csőbe, kössön két csomót a végére és dializálja folyó csapvízzel szemben legalább 16 órán keresztül. A cső tartalmát vigye át 50 ml-es centrifugacsőbe, és centrifugálja 5 percig 1500 g-vel. A felülúszót dekantálja 100 ml-es főzőpohárba, az üledéket dobja el. Keverjen össze 6,0 ml 10 %-os nátrium-volframátot és 6,0 ml 0,335 M-os kénsavat és adja a dializátumhoz. Melegítse főzőlapon keverés közben, amíg látható csapadék nem képződik, tiszta felülúszóval. Ehhez esetleg további sav-adagok hozzáadására lesz szükség. Vigye át 50 ml-es centrifugacsőbe és centrifugálja 5 percig 1500 g-vel. Távolítsa el a felülúszót, diszpergálja alaposan az üledéket, töltse fel a csövet vízzel, keverje jól fel és centrifugálja.

4.3.2. Izotóparány mérés

Helyezze az alkalmazott módszer (szakaszos Craig v. Sofer, ill. folyamatos) által megkívánt mennyiségű fehérjét a mézmintákhoz használthoz hasonló kerámia izzítócsónakba. Égesse el a fehérjét a mézhez használt módszerrel. Ha későbbi izotóparány méréshez szüksége lesz a csapadéokra, akkor vagy vigye át Pasteur pipettával a mosott csapadékot a lehető legkisebb mennyiségű vízzel egy kis kémcsőbe, zárja le és tegye forrásban lévő vízbe 2 órára, vagy szárítsa a fehérjét legalább 3 óra hosszat kb. 75 °C-os szárítószekrényben.

A pollenben található fehérje $\delta^{13}C$ értékének kiszámítása ezrelékben:

$$\delta^{13}C_f \text{ ‰} = \left(\frac{^{13}C/^{12}C_{\text{minta}}}{^{13}C/^{12}C_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000$$

Az eredményeket a PDB-re (Pee Dee Belemnite standard) kell vonatkoztatni a mézmintánál leírtak szerint.

5. Az eredmény kiszámítása

A C - 4-es cukor tartalom számítása a következő:

$$C - 4 \text{ cukor } \% = \frac{\delta^{13}C_f - \delta^{13}C_m}{\delta^{13}C_f - (-9,7)} \times 100$$

ahol $\delta^{13}C_f$ és $\delta^{13}C_m$ a $\delta^{13}C$ értékek ezrelékben (‰) a fehérjére illetve a mézre; a 9,7 pedig a kukoricaszirup átlagos $\delta^{13}C$ értéke ezrelékben.

A számítás alapján adódó negatív értékeket 0 %-ként kell értelmezni.

A mintát csak akkor kell jelentős C-4-es cukortartalmúnak (elsősorban kukorica- vagy nádcukor) tekinteni, ha a számított érték 7%, vagy afölötti.

6. Ismételhetőség és reprodukálhatóság:

Mérési tartomány: $-0,30\text{‰}$ (2,1%)-tól $-1,9\text{‰}$ (13,6%)-ig

$s_f = 1,25-2,69$;

$s_R = 11,25-2,69$;

$RSD_f = 9.22-90.0\%$;

$RSD_R = 14.5-92.0\%$

7. *Irodalomjegyzék:*

JAOAC **61**, 746(1978), **71**, 88(1988), **72**, 902 (1989), **74**, 627(1991)

J. AOAC Int. **75**, 543 (1992), **76**, 140 (1993)

Geochim et Cosmochim Acta **12**, 133(1957)

Spectroscopy **4**, 42 (1989)

Anal. Chem. **48**, 1651 (1976), **52**, 1389 (1980)

Egy hozzáadott (nem méh-eredetű) invertáz enzim kimutatása

1. Alkalmazási terület

HPLC-FLD módszer alkalmas mézek 270 kDa molekulatömegű hozzáadott invertáz enzim tartalmának mennyiségi meghatározására.

Kimutatási határ 2 mg/kg, a mennyiségi mérés alsó határa 10 mg/kg.

2. Fogalommeghatározások

2.1. Invertáz (Invertase): Számos mikroorganizmus termel invertázt, amivel a szaharózt bontja egyszerű cukrokká. A kereskedelemben a *Saccharomyces cerevisiae* vagy *Saccharomyces carlsbergensis* élesztőfajok által termelt invertáz kapható. Egy fajton belül többféle invertáz is megtalálható pl az intracelluláris (135 kDa) és az extracelluláris (270 kDa).

2.2. GPC (gel permeation chromatography): molekulaméret (molekulatér fogat) szerinti kromatográfiás elválasztási módszer. (Más néven :SEC, Size Exclusion Chromatography)

2.3. FLD (Fluorescence detection) : Fluoreszcencia mérésén alapuló kromatográfiás detektor

3. A módszer elve

A mintát vizes extraháló oldatban oldjuk. Az oldatot szűrjük, fehérje tartalmát etanollal kicsapjuk. A kicsapódott fehérjét extraháló oldattal ismét oldatba visszük, majd dializáljuk.

A dializátumot molekulaméret szerinti kromatográfiás elválasztási módszerrel / GPC= SEC/ kromatografáljuk és fluoreszcens detektálással mérjük a hozzáadott, nem méh-eredetű invertáz enzimet.

4. Vegyszerek

4.1. Bizonylatolt invertáz standard, 270 kDa molekulatömeggel

4.2. Víz, fluorescent grade

4.3. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, analitikai tisztaságú

4.4. Etanol, analitikai tisztaságú

4.5. Cellulózacetát dializáló cső

4.6. Oldatok

4.6.1. Invertáz törzsoldat

Mérjük analitikai pontossággal 25 mg invertázt főzőpohárba és oldjuk megfelelő mennyiségű 4.6.4. extraháló oldatban. Az oldatot mossuk 25,0 ml-es mérőlombikba és töltjük jelre ugyanazzal az extraháló oldattal, elegyítsük (1,0 mg/ml).

A törzsoldat 2-8 °C-on hűtőben tárolható egy hétig.

4.6.2. Közbenső/Spike oldat

Hígítsunk 10,0 ml törzsoldatot 100 ml-re a 4.6.4. extraháló oldattal. (0,1 mg/ml)

4.6.3. Kalibráló sor

A 4.6.2. Közbenső/Spike oldat-ból 100 ml-es mérőlombikokba pipetázzunk 5,0;10,0; 20,0 ml-t. A lombikokat töltjük jelre a 4.6.4. extraháló oldattal. és homogenizáljuk.

Az oldatok névlegesen 5,0; 10,0; 20,0 µg/ml invertázt tartalmaznak.

4.6.4. Extraháló oldat

Oldjunk 6,0 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ -t 500 ml vízben, töltjük 1 l-re vízzel, elegyítsük.

5. Berendezések és eszközök:

- 5.1. Laboratóriumi üvegeszközök
- 5.2. Redős szűrőpapír
- 5.3. PTFE membrán szűrő, 0,22 μm pórusméret
- 5.4. Analitikai mérleg (0,1 mg pontosságú)
- 5.5. Kémcsőkeverő (pl. Vortex)
- 5.6. HPLC rendszer, FLD detektor
- 5.7. Oszlop: Biosep S-3000, 300x7,8 mm 5 μm vagy egyenértékű

6. A vizsgálat menete

6.1. Minta előkészítés

Ha a minta kiválást tartalmaz, akkor 1 órára állítsuk 40°C-os vízfürdőbe. Alaposan átkeverve homogenizáljuk a mézmintát.

6.2. Extrakció

Mérjünk 2,5 g mintát üres centrifugacsőbe. Adjunk hozzá 5 ml 4.6.4. extraháló oldatot. Kevertetjük a kémcsövet 1 percig. Redős szűrőn szűrjük alkalmas erlenmeyer-lombikba. Mérjünk hozzá 50 ml 95v/v% etanolt, keverjük intenzíven.

A kivált csapadékot szűrjük 0,22 μm PTFE membrán szűrőn. Szűrés után a membránt a csapadékkal együtt helyezzük egy üres lombikba és oldjuk a fehérjét 10 ml 4.6.4. extraháló oldattal.

6.3. Tisztítás

Az oldatot dializáljuk 24 órán át, folyó vízzel szemben, a rendelkezésre álló dializáló rendszer előírásai szerint. A kereskedelemben sokféle dializáló készlet kapható, így a síkmembrános, többféle csöves kivittel. Bármelyik alkalmazható, a hozzá alkalmas membránnal. Vágjunk le 10 ml oldat befogadására elegendő dialízis csövet, leírás szerint mossuk ki a konzerváló adalékot. Zárjuk le a cső végét megfelelő clippel, töltjük bele a dializáló oldatot. A membrán másik végének lezárása után helyezzük állandó friss víz átfolyást biztosító tartályba. A dializált oldatot vigyük át egy 25 ml-es mérőlombikba, töltjük jelre a 4.6.4. extraháló oldattal, elegyítsük.

Ez az oldat kerül HPLC-s elválasztásra.

6.4. Kalibráció

Külső standard (ESTD) kalibráció, csúcsterület alapján

6.5. Mérés

A vizsgálatot HPLC-FLD módszerrel végezzük a következő kromatográfias paraméterek alkalmazásával:

Oszlop (5.7.)

Mozgó fázis

Eluens: 4.6.4 extraháló oldat

Áramlási sebesség: 1,0 cm^3/min

Oszloptermosztát: szobahőmérséklet

Injektált térfogat: 10 μl

Futtatási idő: 30 perc

FLD paraméterek: $E_x=280\text{ nm}$, $E_m=330\text{ nm}$

Várható retenciós idő: 7,8 perc

7. Az eredmény kiszámítása

Ábrázoljuk a kalibrációs oldatokkal mért csúcsterületeket a koncentrációk függvényében. A pontokra fektessünk regressziós egyenest és számítsuk ki az egyenes meredekségét (m) és tengelymetszetét (b)

A minta koncentrációját az alábbi képlettel számítsuk:

$$c_{\text{old}} (\mu\text{g/ml}) = \frac{(A_{\text{ism}} - b)}{m}$$

$c_{\text{ism}} (\text{mg/kg}) = c_{\text{old}} (\mu\text{g/ml}) / 1000 \times V_{\text{old}} (\text{ml}) / M (\text{g}) \times 1000$, azaz

$$c_{\text{ism}} (\text{mg/kg}) = \frac{(A_{\text{ism}} - b)}{m} \times \frac{V_{\text{old}}}{M}$$

ahol:

c_{old} : az oldatban mért koncentráció, ($\mu\text{g/ml}$)

c_{ism} : a mintában mért koncentráció, (mg/kg)

A_{ism} : a mintában mért csúcsterület,

m, b: az illesztett egyenes meredeksége ill. tengelymetszete

M: bemérés (g)

V_{old} : az oldattérfogat (25,0 ml)

Az eredményeket mg/kg -ban adjuk meg, 1 tizedes pontossággal.

Megjegyzés:

A kalibrációt és értékelést végezheti a vezérlő-adatgyűjtő szoftver!

8. Ismételhetőség

A relatív tapasztalati szórás alapján: $\text{RSD}\% = 8,83$

9. Irodalomjegyzék

A módszer a Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Központ, Élelmiszer- és Takarmánybiztonsági Igazgatóság Takarmányvizsgáló Nemzeti Referencia Laboratóriumban, önálló módszer fejlesztő tevékenysége eredményeként készült, amelyet a Német Akkreditáló Testület / DAP/, mint az DIN-EN-ISO 17025: 2005 minőségirányítási szabvány előírásainak megfelelő akkreditált módszert elismerte (2008.).