

DOI: 10.18832/kp201807

Determination of 5-Hydroxymethylfurfural and Saccharides in Mead

Stanovení 5-hydroxymethylfurfuralu a vybraných sacharidů v medovinách

Miroslava JURIČOVÁ, Soňa ŘEZKOVÁ, Kamila MORAVCOVÁ, Jan FISCHER, Lenka ČESLOVÁ

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentska 573, 523 10 Pardubice, Czech Republic

Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice

e-mail: Lenka.Ceslova@upce.cz

Reviewed paper / Recenzovaný článek

Juričová, M., Řezková, S., Moravcová, K., Fischer, J., Česlová, L., 2018: Determination of 5-hydroxymethylfurfural and saccharides in mead. Kvasny Prum. 64(2): 65–70

This work is focused on determination of 5-hydroxymethylfurfural (HMF), glucose, fructose and sucrose in meads. Reversed-phase high performance liquid chromatography with spectrophotometric detection was used for the separation of HMF. Saccharides were separated using hydrophilic interaction liquid chromatography with refractive index detector. These techniques were employed for determination of the content of HMF and saccharides in 23 samples of meads obtained from different producers. The content of these compounds is strongly dependent on the technological process of mead production and could be used as a marker of mead quality. The content of HMF is lower in samples obtained from beekeepers than in samples purchased in local stores.

Juričová, M., Řezková, S., Moravcová, K., Fischer, J., Česlová, L., 2018: Stanovení 5-hydroxymethylfurfuralu a vybraných sacharidů v medovinách. Kvasny Prum. 64(2): 65–70

Tato práce je zaměřena na stanovení 5-hydroxymethylfurfuralu (HMF), glukosy, fruktosy a sacharosy v medovinách. Pro stanovení HMF byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systémech s obrácenými fázemi se spektrofotometrickou detekcí. Sacharidy byly separovány s využitím chromatografie hydrofilních interakcí s refraktometrickou detekcí. Pomocí výše zmíněných separačních technik byl stanoven obsah HMF a sacharidů ve 23 vzorcích medovin získaných od různých výrobců. Jejich obsah se lišil v závislosti na technologickém postupu výroby medoviny a mohl by být použit jako ukazatel kvality medovin. Obsah HMF byl nižší u vzorků medovin získaných od včelařů než u vzorků medovin získaných v místní obchodní síti.

Keywords: Saccharides, 5-hydroxymethylfurfural, mead, liquid chromatography**Klíčová slova:** Sacharidy, 5-hydroxymethylfurfural, medovina, kapalinová chromatografie

1 INTRODUCTION

Mead is an alcoholic beverage produced by fermentation of honey solution using cultivated wine yeast. Further, spice, herbs, fruit juices or hop can be added to honey/water mixture (Švecová et al., 2015). The content of naturally formed alcohol is up to 15%. Currently, two technological procedures are used for production of mead, which differ by processing of honey aqueous solution before fermentation. In case of boiled meads, the boiled honey aqueous solution is used, when unwanted microorganisms are eliminated during boiling and the proteins are precipitated as foam which is removed (Kahoun et al., 2017). The cold way of production is simple mixing of honey aqueous solution with yeast and followed by controlled fermentation. High quality honeys whose taste and aroma are not destroyed by boiling are necessary for this way of production (Cibulka, 2003).

Due to insufficient legislation for quality of meads there are producers on the market that are using smaller amount of honey than it is required by regulation of the Ministry of Agriculture of Czech Republic No. 335/1997 Coll. (280 g of honey for 1 liter of mead minimal) or they are using low quality honey. Then, the consumer could obtain product with low quality, which do not correspond with high price. Therefore, the goal of this work is to find quality indicators of meads that expose the low quality meads. These indicators could be among others 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and saccharides (glucose, fructose and saccharose).

HMF and its derivatives (5-chlormethylfurfural a 5-sulfoxymethylfurfural) are cyclic aldehydes, which occurs in foods containing saccharides (Kalábová et al., 2003; Makawi et al., 2009; Spano et al., 2006). They have cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects and they are suspected from carcinogenicity. They can cause irritation of eyes, upper airways and mucosa. HMF practically does not occur in fresh foods. Its content in honey/mead is highly influenced by temperature and time of heating, condition of storage, type of saccharides and amino acids, pH, water activity and concentration of metal ions (Kahoun et al., 2017; Khalil et al., 2010; Pereira et al., 2011).

HMF arises in honey in small amount already during maturation in honeycombs. Its concentration, besides above mentioned parameters, depends also on aging, botanical origin, humidity, thermal and photochemical stress of honey. Therefore, it is significant parameters

1 ÚVOD

Medovina je alkoholický nápoj vyráběný kvašením vodného roztoku medu s využitím kulturních vinných kvasinek. Do směsi medu a vody lze přidat koření, byliny, ovocné šťávy nebo chmel (Švecová et al., 2015). Obsah přirozeně vzniklého alkoholu se pohybuje okolo 15%. V současné době se pro výrobu medoviny využívají dva technologické postupy, které se liší úpravou vodného roztoku medu před kvašením. U vařených medovin se používá převařený vodný roztok medu, kdy během varu dochází k usmrcení nežádoucích mikroorganismů a zároveň k vysrážení bílkovin do podoby pěny, která je následně odstraněna (Kahoun et al., 2017). Nevařené medoviny se připravují pouhým smícháním vodného roztoku medu s kvasinkami a následným kontrolovaným kvašením. Pro tento způsob výroby jsou používány vysoce kvalitní druhy medů, jejichž chuť a vůně není znehodnocena vařením (Cibulka, 2003).

Vzhledem k nedostatečnému legislativnímu ošetření kvality medovin, se na trhu vyskytují výrobci, kteří při výrobě medoviny používají menší množství medu, než je dáno vyhláškou Ministerstva zemědělství č. 335/1997 Sb. (min. 280g medu na 1 litr medoviny) nebo používají medy nekvalitní a spotřebitel tak za poměrně vysokou cenu nedostane požadovanou kvalitu. Cílem této práce je proto najít ukazatele jakosti medovin, které nekvalitní medoviny odhalí. Mezi tyto ukazatele by mohly patřit 5-hydroxymethylfurfural (HMF) a sacharidy (glukosa, fruktosa, sacharosa).

HMF a jeho deriváty (5-chlormethylfurfural a 5-sulfoxymethylfurfural) jsou cyklické aldehydy, vyskytující se v potravinách obsahujících sacharidy (Kalábová et al., 2003; Makawi et al., 2009; Spano et al., 2006). Mají cytotoxické, genotoxické a mutagení účinky a jsou podezřelé z karcinogenity. Mohou způsobovat podráždění očí, horních cest dýchacích, kůže a sliznic. V čerstvých potravinách se HMF téměř nevyskytuje. Velký vliv na jeho obsah má teplota a doba zahřívání, podmínky skladování, typ sacharidů a aminokyselin, pH, aktivita vody a koncentrace kovových iontů (Kahoun et al., 2017; Khalil et al., 2010; Pereira et al., 2011).

V medu vzniká HMF v malém množství již během zrání v plástech. Jeho koncentrace závisí, kromě již zmíněných parametrů, jako je teplota a pH, také na stáří medu, botanickém původu, vlhkosti a termálním a fotochemickým stresu. Z toho důvodu je významným para-

for determination of freshness and quality of honey (Kahoun et al., 2017; Kalábová et al., 2003; Makawi et al., 2009; Spano et al., 2006; Švecová et al., 2015) and, further, it could be used for verification of quality of mead.

Liquid phase separation techniques, as reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) (Coco et al., 1996; Costa et al., 1999; Kahoun et al., 2008; Kahoun et al., 2017; Makawi et al., 2009; Spano et al., 2006; Švecová et al., 2015;) or capillary electrophoresis (Wong et al., 2012), are most often used techniques for determination of HMF in honey. Spectrophotometric detection at 285 nm is commonly used, which corresponds to absorption maximum of HMF. Aqueous solutions of methanol or acetonitrile are frequently used as a mobile phase.

High content of saccharides, mainly monosaccharides as glucose and fructose, is in honey and mead, which determines most physical and nutritional properties of these products. Hydrophilic interaction chromatography is well suitable separation technique for analysis of these saccharides (Mendes et al., 1998; Švecová et al., 2015). Due to the lack of chromophore in molecule of saccharides, refractometric (RI) or evaporative light scattering detectors are commonly used for detection. Mass spectrometry, spectrophotometric or fluorescent detection can be used for detection of saccharides after their derivatization (Harvey, 2011; Lamari et al., 2003). Further, saccharides can be determined by gas chromatography, ion chromatography, gel permeation chromatography or capillary electrophoresis (Ouchemoukh et al., 2010; Slimestad and Vågen, 2006; Wang and Fang, 2004).

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Samples of meads

Analyzed samples of meads (23 in total) were obtained from beekeepers from different location of Czech Republic (samples 1-12) or purchased in local market (samples 13-23). Meads were stored in fridge (4 °C) and opened before analysis. Prior the analysis, the samples were diluted by water (HMF) or by 50% acetonitrile (saccharides) and filtrated using membrane syringe filter (nylon, 0.45 µm, 13 mm), Labcicom, Olomouc, ČR.

2.2 Chemicals and solutions

D(+)-glucose monohydrate, D(-)-fructose and saccharose in purity for biochemistry were purchased in Merck (Darmstadt, Germany). 5-hydroxymethylfurfural (99%) was from Fluka (Buchs, Switzerland). Gradient grade methanol and acetonitrile as mobile phase component were from Merck. Deionized water was prepared by Milli-Q purification system (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA).

Standard of HMF was dissolved in water ($c = 200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) and from this solution eight calibration solutions in range $0.3\text{--}15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ were prepared by dilution with water. Calibration solutions of saccharides were prepared by dilution using 50% acetonitrile from standard solutions of fructose and glucose ($c = 60 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) in concentration range $1.2\text{--}42 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ and from standard solution of saccharose ($c = 30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) in concentration range $0.3\text{--}30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, both on eight concentration levels. Standards and samples were filtrated using membrane syringe filter (nylon, 0.45 µm, 13 mm), Labcicom, Olomouc, ČR.

2.3 Determination of HMF in meads

Liquid chromatograph HP 1090 with spectrophotometric detector (Hewlett Packard, Palo Alto, California, USA) was used for analysis of HMF. Separation was performed on Supelcosil LC-18-T column (150 mm x 4.6 mm, particle size 5 µm), with corresponding guard column (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA) using mobile phase methanol:water (15:85, v/v). Flow rate was kept at $0.6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, injection volume 20 µl, temperature 25 °C and detection wavelength 285 nm. Individual samples were measured for four times.

2.4 Determination of glucose, fructose and saccharose in meads

Liquid chromatograph equipped with LC-20AD pump, CTO-20AC column thermostat and RID-10A refractometric detector (all Shimadzu, Kyoto, Japan) and six port inject valve (Ecom, Praha, ČR) was used for analysis of saccharides. Columns Supelcosil LC-NH2 (250 mm x 4.6 mm, particle size 5 µm), Supelcosil LC-NH2 (150 mm x 3 mm, particle size 5 µm), both Supelco, and LUNA NH2 100 A (150 mm x 3 mm, particle size 3 µm), Phenomenex, Torrance, California, USA, were used for optimization of separation. Final separation was performed on Supelcosil LC-NH2 column (250 mm x 4.6 mm, particle

metrem pro určování čerstvosti a kvality medu (Kahoun et al., 2017; Kalábová et al., 2003; Makawi et al., 2009; Spano et al., 2006; Švecová et al., 2015) a mohl by sloužit i k ověření kvality medoviny.

Pro stanovení HMF v čistém, filtrovaném, vodném roztoku medu se nejčastěji využívají separační techniky v kapalně fázi, jako vysokoučinná kapalinové chromatografie v systémech s obrácenými fázemi (RP-HPLC) (Coco et al., 1996; Costa et al., 1999; Kahoun et al., 2008; Kahoun et al., 2017; Makawi et al., 2009; Spano et al., 2006; Švecová et al., 2015;) nebo kapilární elektroforéza (Wong et al., 2012). K detekci se zpravidla používá spektrofotometrického detektoru. Vlnová délka, při níž se měří, je dána absorpčním maximem HMF, které je při 285 nm. Jako mobilní fáze se používají vodné roztoky methanolu nebo acetonitrilu.

V medu a potažmo v medovinách je obsaženo vysoké množství sacharidů, především monosacharidů glukosy a fruktosy, které určují většinu fyzikálních a nutričních vlastností těchto produktů. Pro separaci těchto sacharidů se nejčastěji využívá chromatografie hydrofilních interakcí (Mendes et al., 1998; Švecová et al., 2015). Z důvodu absence chromoforu se k detekci používá refraktometrického detektoru či detektoru rozptylu světla. Hmotnostní spektrometr, spektrofotometrický nebo fluorescenční detektor se pro detekci sacharidů využívají zpravidla po předchozí derivatizaci (Harvey, 2011; Lamari et al., 2003). Další možností je stanovení sacharidů s využitím plynového chromatografu nebo pomocí iontové chromatografie, gelové chromatografie či kapilární elektroforézy (Ouchemoukh et al., 2010; Slimestad a Vågen, 2006; Wang a Fang, 2004).

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Vzorky medovin

Celkem bylo analyzováno 23 vzorků medovin, které byly poskytnuty včelaři z různých oblastí ČR (vzorky 1-12) nebo zakoupeny v místní obchodní síti (vzorky 13-23). Medoviny byly uchovávány v lednici (4 °C) a otevřeny před analýzou. Vzorky byly před analýzou ředěny vodou (HMF) nebo 50% acetonitrem (sacharidy) a filtrovány pomocí střičáčkového filtru (nylon, 0.45 µm, 13 mm), Labcicom, Olomouc, ČR.

2.2 Chemikálie a roztoky

D(+)-glukosa monohydrát, D(-)-fruktosa a sacharosa v čistotě pro biochemii byly zakoupeny u firmy Merck (Darmstadt, Německo). 5-hydroxymethylfurfural (99%) dodala firma Fluka (Buchs, Švýcarsko). Jako organická složka mobilní fáze byla použita rozpouštědla methanol a acetonitril v čistotě pro gradientovou eluci (Merck). Deionizovaná voda byla upravena čisticím zařízením Milli-Q (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA).

Standardní roztok HMF ($c = 200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) byl připraven rozpuštěním HMF ve vodě. Z tohoto standardního roztoku bylo připraveno osm kalibračních roztoků v rozsahu koncentrací $0,3\text{--}15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Kalibrační roztoky sacharidů (na osmi koncentračních hladinách) byly připraveny ze standardních roztoků glukosy a fruktosy ($c = 60 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) v rozsahu koncentrací $1,2\text{--}42 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a sacharosy ($c = 30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) v koncentračním rozsahu $0,3\text{--}30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro přípravu zásobních i kalibračních roztoků byl použit 50% acetonitril. Připravené standardy a vzorky byly filtrovány přes membránový filtr (nylon, 0,45 µm, 13 mm, Labcicom, Olomouc, ČR).

2.3 Stanovení HMF v medovinách

Pro stanovení HMF v medovinách byl použit kapalinový chromatograf HP 1090 LC vybavený DAD detektorem, termostatem kolon a autosamplerem (Hewlett Packard, Palo Alto, California, USA). Pro separaci byla použita kolona Supelcosil LC-18-T; (150 x 4,6 mm, 5µm částice) s odpovídající předkolonou (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA). Průtok mobilní fáze o složení methanol: voda (15:85, v/v) byl $0,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, dávkovaný objem vzorků 20 µl, teplota 25 °C a vlnová délka 285 nm. Vzorky byly proměřeny čtyřikrát.

2.4 Stanovení glukosy, fruktosy a sacharosy v medovinách

Pro stanovení sacharidů byl použit kapalinový chromatograf sestavený z čerpadla mobilní fáze LC-20AD, termostatu CTO-20AC, diferenciálního refraktometrického detektoru RID-10A (vše Shimadzu, Kyoto, Japonsko) a šesticestného dávkovače ventilu (Ecom, Praha, ČR). Optimalizace separace byla provedena s využitím kolony Supelcosil LC-NH2 (250 x 4,6 mm, 5 µm částice) a Supelcosil LC-NH2 (150 x 3 mm, 3 µm částice), obě Supelco, a kolony LUNA NH2 100A (150 x 3 mm, 3 µm částice), Phenomenex, Torrance, California, USA. Finální separace probíhala za izokratických podmínek

Table 1 Regression parameters of calibration dependence, coefficient determination, limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) for individual compounds.

Tab. 1 Regresní parametry kalibračních závislostí, koeficient determinace, mez detekce a stanovitelnosti pro jednotlivé studované látky.

Standard	Calibration equation* Kalibrační rovnice*	R ²	LOQ (g·l ⁻¹)	LOD (g·l ⁻¹)
Fructose Fruktosa	$y = 77.29 (0.07) \cdot x$	0.9997	0.109	0.033
Glucose Glukosa	$y = 73.22 (0.05) \cdot x$	0.9999	0.156	0.047
Saccharose Sacharosa	$y = 81.31 (0.07) \cdot x$	0.9995	0.253	0.076
HMF	$y = 125.1 (0.3) \cdot x + 4.12 (1.58)$	0.9997	$0.052 \cdot 10^{-3}$	$0.015 \cdot 10^{-3}$

*Standard deviations are given in the parentheses; intercept was not significant in case of saccharides.

*V závorce jsou uvedeny směrodatné odchylky regresních parametrů jednotlivých závislostí.

size 5 μm) using mobile phase acetonitrile:water (80:20, v/v). Flow rate was kept at 2 ml·min⁻¹, injection volume 20 μl and temperature 25 °C. Individual samples were measured for four times.

2.5 Statistical evaluation of experimental data

The calibration data for quantification of HMF, glucose, fructose and saccharose in mead were measured at eight concentration levels, each level four times ($n = 4$). The calibration data were fitted by linear dependency using the least square linear regression in the QCXPERT 2.9 statistical program (TriloByte, Pardubice, Czech Republic) on the significance level 95% ($\alpha = 0.05$). Pregibon, Williams, L-R and McCulloh-Meter graphs were used to identify influential points. The linearity of calibration curves was checked by inspecting plots of residuals and the significance of intercept of regression straight-lines was tested using Student's t-test. Regression parameters together with their standard deviations are shown in Table 1. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated as the concentration yielding signal-to-noise ratio S/N = 3 and 10, respectively. The calibration data were used for that purpose. The coefficient of determination (Table 1) was for all compounds higher than 0.99, demonstrating high linearity. The accuracy and precision was checked by measuring calibration solutions at two concentration levels for ten times. For that purpose the concentration corresponding 80% of LOQ and concentration at half of calibration curve was used. The relative standard deviations (RSD) did not exceed 5%. The repeatability was checked by measuring selected sample for 15 times. The RSD was below 3%.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Optimization of separation and determination of HMF in mead

The optimization was carried out using both HMF standard and real samples. The isocratic elution with different concentration of methanol (10, 15 a 20%, v/v) or acetonitrile (15%, v/v) in water was tested. Different flow rate (0.6 – 0.8 ml·min⁻¹) and influence of acetic acid addition (1%, v/v) to the mobile phase were tested. Optimal

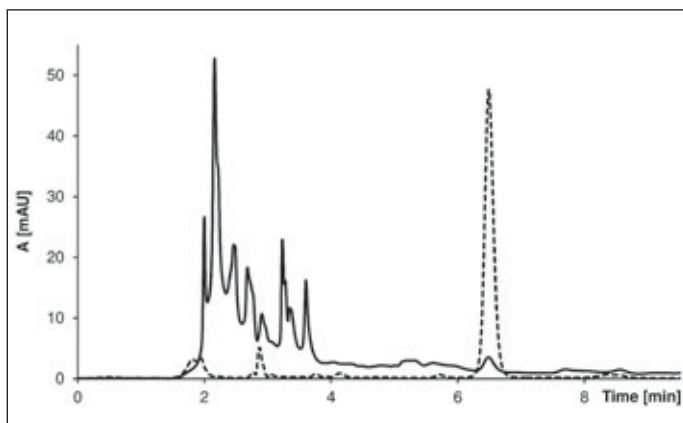


Fig. 1 Chromatographic separation of HMF in mead sample 7 (full line) and mead sample 20 (dashed line)

Obr. 1 Chromatografická separace HMF ve vzorku medoviny 7 (plná čára) a vzorku medoviny 20 (přerušovaná čára)

na koloně Supelcosil LC-NH2 (250 x 4,6 mm, 5 μm částice) s mobilní fází acetonitril:voda (80:20, v/v). Průtok mobilní fáze byl 2 ml·min⁻¹, dávkované množství 20 μl a teplota kolony 25 °C. Vzorky byly proměřeny čtyřikrát.

2.5 Statistické vyhodnocení experimentálních dat

Kalibrační závislosti byly pro kvantifikaci HMF, glukosu, fruktosu a sacharosu měřeny na osmi koncentračních hladinách s počtem opakování $n = 4$. Regresní parametry kalibračních závislostí byly vyhodnoceny statistickým programem QC Expert 2.9 (TriloByte, ČR). Ve všech případech byla experimentální data proložena lineární regresí s využitím metody nejmenších čtverců. Testování probíhalo na hladině významnosti 95% ($\alpha = 0,05$). Pomocí Pregibonova, Williamssova, L-R a McCulloh-Meterova grafu byly identifikovány vlivné body a po jejich odstranění byly určeny regresní parametry spolu s jejich směrodatnými odchylkami a koeficienty determinace (tab. 1). Dále byla testována významnost absolutního členu. V případě sacharidů byl absolutní člen nevýznamný a přímka prochází nulou. Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) byl vyhodnocen jako trojnásobek a desetinásobek odstupe signálu od šumu (tab. 1). Pro určení LOD a LOQ byla využita kalibrační data. Přesnost a správnost byla testována proměřením dvou kalibračních roztoků desetkrát. Pro tento účel byly vybrány kalibrační roztoky odpovídající koncentraci v polovině kalibrační křivky a na hladině 80% z LOQ. Relativní směrodatná odchylka (RSD) nepřekročila 5%. Opakovatelnost byla ověřena měřením vybraného vzorku celkem 15 krát. RSD byla pod 3%.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Optimalizace podmínek a stanovení HMF v medovinách

Proměřením standardů a reálných vzorků medovin byly optimalizovány podmínky separace HMF v systémech s obrácenými fázemi za izokratických podmínek s využitím methanolu (10, 15 a 20%, v/v) nebo acetonitrilu (15%, v/v) jako organického modifikátoru. Dále byl testován různý průtok mobilní fáze (0,6 – 0,8 ml·min⁻¹) a vliv přidavku kyseliny octové (1%, v/v) do mobilní fáze. Optimální separace a oddělení HMF od ostatních polárních látek obsažených v medovinách bylo dosaženo při průtoku 0,6 ml·min⁻¹ s mobilní fází 15% methanolu. Retenční čas HMF za těchto podmínek byl 6,4 min. Finální separace dvou vzorků medoviny lišící se koncentrací HMF je uveden na obr. 1.

Pro obsah HMF v medovinách prozatím neexistují normy, avšak ve vyhlášce Ministerstva zemědělství č. 335/1997 Sb. je uvedeno, že na výrobu medoviny se musí použít minimálně 280 kg medu na 1000 litrů medoviny. Jestliže národní legislativa ustanovuje maximální množství HMF na 40 mg·kg⁻¹ medu (vyhláška Ministerstva zemědělství č. 76/2003 Sb.), měl by se obsah HMF při použití minimálního množství medu v medovině pohybovat přibližně do 12 mg·l⁻¹ medoviny. U kvalitních medovin je pro výrobu 1 litru použito až 0,5 kg medu, čímž vzrůstá obsah HMF. Další nárůst může být způsoben konečnou úpravou sensorických vlastností produktu (doslazení a dobarvení). Při zohlednění těchto skutečností by mohl být maximální obsah HMF v medovinách až 30 mg·l⁻¹.

Vzhledem k tomu, že HMF vzniká při tepelné úpravě potravin obsahujících cukry, předpokládá se rozdíl v obsahu HMF u medovin připravených různými technologickými postupy. Koncentrace HMF u studovaných vzorků medovin spolu s intervaly spolehlivosti je uvedena na obr. 2. Hranice 30 mg·l⁻¹ HMF nebyla překročena u žádného ze vzorků poskytnutých včelaři (vzorky 1–12), kteří medoviny připra-

separation, where HMF was eluted far enough from other polar mead compounds, was achieved with mobile phase containing 15 % of methanol in water and at flow rate $0.6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Using these conditions, retention time of HMF was 6.4 min. The final chromatographic separation of two mead samples varying in concentration of HMF is shown on Fig. 1.

Any regulation of HMF level in meads does not exist so far. The regulation of Ministry of Agriculture No. 335/1997 Coll. concerning the mead production only informs about minimum mass 280 kg of honey which should be used for 1000 l mead. If national legislation tolerates maximum level of HMF in honey $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ honey (regulation of Ministry of Agriculture No. 76/2003), the concentration of HMF should be up to $12 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ in case of minimal content of honey used. The amount of honey for production of 1 l of high quality mead is up to 0.5 kg, therefore the content of HMF in mead can be higher. Further increasing amount of HMF can be caused by final modification of sensoric properties of product (additional sweetening and colouring). Taking into consideration all these facts, the maximal concentration of HMF in meads could reach $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Since HMF arises during heat treatment of food containing saccharides, the difference between content of HMF in meads prepared by various technological procedures is assumed. Concentration of HMF in studied samples of meads together with their confidence interval is shown in Fig. 2. The limit $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ of HMF was not overcome in case of meads produced by beekeepers (samples 1–12), who prepare meads by cold way. For so called honey wine (samples 4–8), the concentration of HMF was under $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. For sample 6, the concentration of HMF was even under the limit of detection. In these cases, the final products are not modified by additional sweetening (caramel or honey) or colouring. The samples of meads obtained in local markets (13–23), where the technological procedure is not known, show higher difference in HMF concentration. The concentrations of HMF found in the samples were under the concentration limit ($30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) for all samples except 13, 14 and 20. In case of samples 13 and 14, the concentration of HMF exceeds even $65 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. It can be caused by different technological procedure or using low quality honey. On the other hand, the determined concentration of HMF in samples 15 and 19 is below $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. It corresponds well with the cold way of technological procedure stated at the labels of these two samples. The rest of the samples, which were bought in local markets contain the HMF in the range of concentration $16.3\text{--}25.7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. The concentrations of HMF in samples studied here are many times lower than in study Švecová et al. (2015), where the lowest observed concentration is $27 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, while the highest concentration reached $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Wide range of different samples of meads were studied by Kahoun et al. (2008), where the concentration of HMF was below the limit value $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ in case of 60% of tested samples and 10% was very close to the value. The rest of the samples had the concentration of HMF in the range $40\text{--}158 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Higher amount of HMF was connected to same producer, therefore we can assume, that the technological procedure can highly affect the content of HMF in mead. The heating of the honey during preparation of mead does not cause so high increase of HMF, if the temperature does not reach $100 \text{ }^\circ\text{C}$ (Kahoun et al., 2017). In that case the increase of content of HMF could be 93%. Other factor affected the content of HMF could be the mead storage. During storage of mead at room temperature, the content of HMF could rapidly increases (Kahoun et al., 2017).

3.2 Optimization of separation and determination of glucose, fructose and saccharose

Optimization of saccharides separation was performed using three columns differing in length and producers, which were packed with the chemically bonded aminopropyl stationary phase. The sufficient resolution of separated saccharides was achieved using Supelcosil LC-NH₂ column ($250 \times 4.6 \text{ mm}$, particle size $5 \mu\text{m}$). Further optimized factors were concentration of acetonitrile in acetonitrile/water mobile phase (75, 80 and 85 %, v/v), flow rate ($1, 2$ and $3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) and temperature (25, 30, 35 and $40 \text{ }^\circ\text{C}$). All experiments were carried out under isocratic conditions due to the refractometric detection used. Optimal conditions, with resolution of all separated compounds higher than 1.5, were as follows: mobile phase 80 % acetonitrile in water, flow rate $2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ and temperature $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Retention times of fructose, glucose and saccharose were 3.9 min, 4.6 min and 5.6 min, respectively (Fig. 3).

Concentration of saccharides in meads cannot be compared with honey legislation, because saccharides are degraded during fermentation to the carbon dioxide and ethanol. Final product can stay

uvíj nevařeným způsobem. V případě tzv. medových vín (vzorky 4–8), kde u konečného produktu nedochází k úpravě chuti přísazeninám (karamel nebo med), případně k úpravě barvy, byla koncentrace HMF pod $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, u vzorku č. 6 byla koncentrace HMF pod mezí detekce. U medovin získaných v místní obchodní síti (vzorky 13–23), kde není znám technologický postup výroby, je pozorován větší rozdíl v obsahu HMF. U vzorků medovin 13, 14 a 20 byla koncentrace HMF nad hranici $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, u vzorků 13 a 14 bylo zjištěno větší množství HMF (nad $65 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), což může být způsobeno odlišným technologickým postupem nebo použitím méně kvalitního medu. Ostatní vzorky medovin zakoupených v místní obchodní síti měly koncentraci HMF v rozmezí $16,3\text{--}25,7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. U vzorků 15 a 19 byla dokonce zaznamenaná koncentrace HMF pod $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. U těchto dvou vzorků je na etiketě uveden způsob výroby medoviny za studena. Koncentrace HMF u námi studovaných vzorků jsou však stále mnohonásobně nižší než prezentovala Švecová et al. (2015), kde nejnižší pozorovaná koncentrace byla $27 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, zatímco nejvyšší koncentrace až $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Široká škála vzorků medovin byla rovněž testována ve studii Kahoun et al. (2008), kde koncentrace HMF byla pod $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ u 60% z testovaných vzorků a 10% vzorků bylo těsně nad touto hranicí. Zbýlých 30% vzorků se pohybovalo v rozmezí koncentrací $40\text{--}158 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Vyšších koncentrací HMF bylo pozorováno vždy u stejného výrobce, z čehož lze usuzovat, že použitá technologie při výrobě medoviny ovlivňuje obsah HMF. Zahřívání medu nezpůsobuje tak velký nárůst koncentrace, pokud med v průběhu přípravy medoviny není vařen při $100 \text{ }^\circ\text{C}$ (Kahoun et al., 2017). V takovém případě může být nárůst obsahu HMF až 93%. Dalším faktorem může být skladování medoviny. Během skladování medovin při pokojové teplotě může obsah HMF také rychle stoupat (Kahoun et al., 2017).

3.2 Optimalizace separace a stanovení glukosy, fruktosy a sacharosy

Optimalizace separace sacharidů byla provedena na třech různých dlouhých kolonách s chemicky vázanou aminopropylovou stacionární fází dodaných různými výrobci. Dostatečné rozlišení separovaných sacharidů bylo dosaženo na koloně Supelcosil LC-NH₂ ($250 \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ částice). Optimalizována byla rovněž koncentrace acetonitrilu ve vodě (75, 80 a 85 %, v/v), průtok mobilní fáze ($1, 2, 3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) a teplota kolony (25, 30, 35 a $40 \text{ }^\circ\text{C}$). Všechny experimenty byly provedeny za použití izokratických podmínek, což je nezbytné v případě využití refraktometrického detektoru. Optimálních podmínek separace, s rozlišením všech separovaných látek větším než 1,5, bylo dosaženo při použití mobilní fáze 80% acetonitrilu ve vodě při průtoku $2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a teplotě kolony $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Retenční časy fruktosy, glukosy a sacharosy za uvedených podmínek byly 3,9 min, 4,6 min a 5,6 min (obr. 3).

Koncentrace sacharidů v medovině se nedají porovnávat s legislativou pro med, protože při kvašení dochází k odbourávání sacharidů za vzniku oxidu uhličitého a ethanolu. Konečný výrobek nemusí být

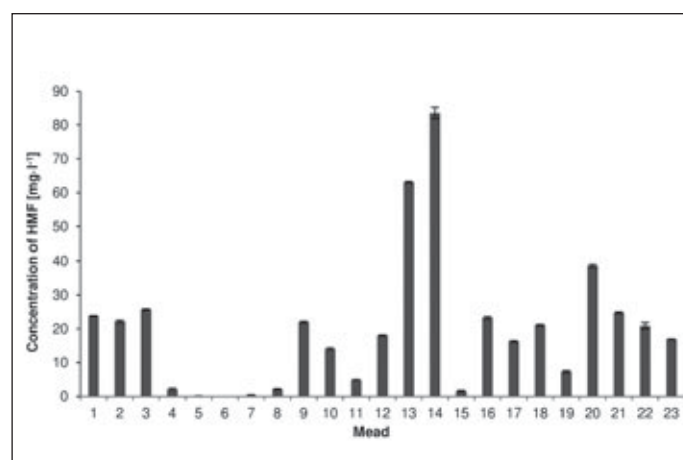


Fig. 2 Concentration of HMF found in analysed mead samples. Samples 1-12 were from beekeepers, samples 13-23 were purchased in local markets in Czech Republic. The values are presented with the confidence interval on level of significance 95%.

Obr. 2 Koncentrace HMF stanovená v analyzovaných vzorcích medovin. Vzorky 1-12 byly poskytnuty včelaři, vzorky 13-23 byly zakoupeny v místní obchodní síti. Hodnoty jsou uvedeny s intervalem spolehlivosti na hladině významnosti 95%.

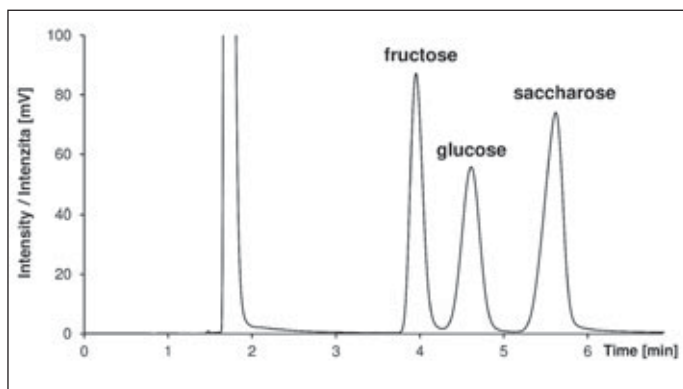


Fig. 3 Chromatographic separation of standards of saccharides
Obr. 3 Chromatografická separace standardů sacharidů

without any additional treatment or can be additionally sweetened by honey, saccharose or invert sugar, which can be used also for change of mead colour.

The concentration of saccharides determined in individual mead samples is shown in Fig. 4. Only one mead (sample 15) is additional sweetened by beet sugar. The concentration of saccharose in this sample is $52.6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. On the other hand, concentrations of fructose ($15.0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) and glucose ($15.4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) found in this sample (sample 15) were lower in comparison with rest of the samples. The concentration of saccharose in other samples was below limit of detection. Very low concentration of saccharides was determined in samples 4-7 (fructose $3.2\text{--}12.6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ and glucose $1.3\text{--}5.1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$). These meads were prepared by cold way and they were not additionally treated, so called mead wine. The concentration of glucose and fructose in the rest of samples was much higher and varied between 30.4 and $101.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ for fructose and 11.6 and $88.3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ for glucose, which is in agreement with Švecová et al. (2015). The ratio of concentrations of these two saccharides differs between the samples and can be caused by type of used honey, technological procedure and additional flavouring.

4 CONCLUSIONS

This work was focused on determination of HMF, fructose, glucose and saccharose in mead samples from different producers from Czech Republic and Slovakia. Based on the information that $280\text{--}500 \text{ g}$ of honey is necessary to produce 1 litre of mead, the concentration of HMF should not exceed $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ in case of cold way produced meads. Only three samples in our study overcame this limit value. These samples were purchased in local markets and the technological procedure of their production is not known. Since the content of HMF was higher, the significant heat treatment of original material or additional treatment of final product is assumed. The content of saccharides gives information about type of honey used for preparation of mead and about final flavouring. The content of saccharides and HMF increases with additional sweetening and colouring by honey or caramel. This study revealed the additional sweetening of mead by saccharose which is saccharides not commonly present in honey in such a high concentration. The content of these monitored compounds together with other selected parameters could be used for quality control of meads and consumer protection.

ACKNOWLEDGEMENTS

Project SGS_2018_001 of University of Pardubice (Pardubice, Czech Republic) is gratefully acknowledged.

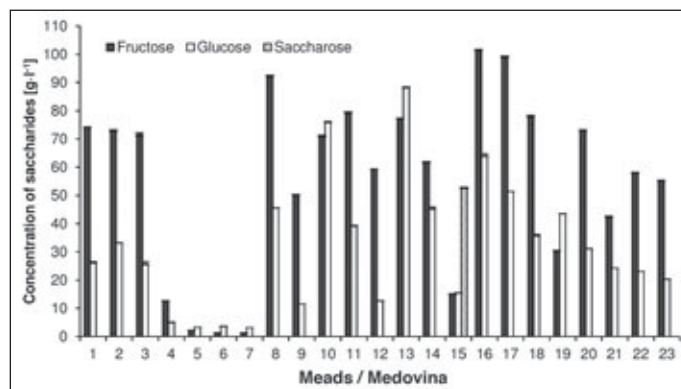


Fig. 4 Concentration of saccharides determined in studied mead samples. Samples 1–12 were from beekeepers, samples 13–23 were purchased in local markets in Czech Republic. The values are presented with the confidence interval on level of significance 95%
Obr. 4 Koncentrace sacharidů stanovená ve studovaných vzorcích medovin. Vzorky 1–12 byly poskytnuty včelaři, vzorky 13–23 byly zakoupeny v místní obchodní síti. Hodnoty jsou uvedeny s intervalem spolehlivosti na hladině významnosti 95%

dochucen nebo může být doslažen medem, sacharosou případně invertním cukrem, kterým může být upravena také barva medoviny.

Koncentrace studovaných sacharidů v jednotlivých vzorcích medovin je uvedena na obr. 4. Jedinou medovinou doslazovanou řepným cukrem (koncentrace $52,6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) byla medovina číslo 15. Tato medovina měla pak i nižší koncentrace fruktosy ($15,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) a glukosy ($15,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$). Ostatní medoviny měly koncentraci sacharosy pod mezí detekce. U vzorků medoviny 4–7 byl patrný velmi nízký obsah sacharidů (fruktosa $3,2\text{--}12,6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a glukosa $1,3\text{--}5,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$). Jde o medoviny připravované za studena bez dodatečného doslažení finálního produktu, tzv. medová vína. U ostatních vzorků je obsah glukosy a fruktosy mnohonásobně vyšší (fruktosa $30,4\text{--}101,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a glukosa $11,6\text{--}88,3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), což je v souladu s prací Švecová et al. (2015). Poměr obsahu těchto cukrů není u každého vzorku stejný, což je způsobeno typem medu, který byl pro výrobu medoviny použit a rovněž hraje roli postup výroby medoviny a dodatečné dochucení.

4 ZÁVĚR

Práce byla zaměřena na stanovení 5-hydroxymethylfurfuralu, fruktosy, glukosy a sacharosy ve vzorcích medovin získaných od různých výrobců z České Republiky a Slovenska. Vzhledem k tomu, že na výrobu 1 litru medoviny se musí použít $280\text{--}500 \text{ g}$ medu, obsah HMF u medovin vyrobených tzv. za studena bez doslažení a dobarvení by neměl být vyšší než $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Tuto hodnotu překročily v rámci naší studie tři vzorky medovin, které byly zakoupeny v místní obchodní síti. U těchto vzorků není znám technologický postup jejich výroby, ale vzhledem k vysokému obsahu HMF se dá usuzovat na značné zahřátí výchozí suroviny, či na dodatečnou finální úpravu produktu. Obsah sacharidů dává informaci o typu medu použitého k výrobě medoviny a o jejím konečném dochucení. Pokud jsou medoviny doslazovány, dobarčovány medem či karamellem, dochází ke zvýšení obsahu sacharidů, ale také HMF. V této studii bylo odhaleno dochucení medoviny sacharózou, což je sacharid běžně se v medu nevyskytující v tak vysoké koncentraci. Obsah studovaných látek spolu s dalšími vybranými parametry by mohl sloužit ke kontrole kvality medoviny a ochraně spotřebitele.

Poděkování

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu Studentské grantové soutěže Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice, projekt č. SGS_2018_001.

REFERENCES / LITERATURA

- Cibulka, J., 2003: Domáci vína, piva, likéry a medoviny. GEN, Liberec, 2003. ISBN: 80-86681-23-8.
- Coco, F. L., Valentini, C., Novelli, V., Ceccon, L., 1996: High-performance liquid chromatographic determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in honey. *J. Chromatogr. A*, 749: 95–102.
- Costa, L. S. M., Albuquerque, M. L. S., Trugo, L. C., Quinteiro, L. M. C., Barth, O. M., Ribeiro, M., De Maria, C. A. B., 1999: Determination of non-volatile compounds of different botanical origin Brazilian honeys. *Food Chem.*, 65: 347–352.
- Harvey, D. J., 2011: Derivatization of carbohydrates for analysis by chromatography; electrophoresis and mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 879: 1196–1225.
- Kahoun, D., Řezková, S., Královský, J., 2017: Effect of heat treatment and storage conditions on mead composition. *Food Chem.*, 219: 357–363.
- Kahoun, D., Řezková, S., Veškrnová, K., Královský, J., Holčapek, M., 2008: Determination of phenolic compounds and hydroxymethylfurfural in meads using high performance liquid chromatography with coulometric-array and UV detection. *J. Chromatogr. A*, 1202: 19–33.
- Kalábová, K., Vorlová, L., Borkovcová, I., Smutná, M., Večerek, V., 2003: Hydroxymethylfurfural in Czech honeys. *Czech J. Anim. Sci.*, 48: 551–557.
- Khalil, M. I., Sulaiman, S. A., Gan, S. H., 2010: High 5-hydroxymethylfurfural concentrations are found in Malaysian honey samples stored for more than one year. *Food Chem. Toxicol.*, 48: 2388–2392.
- Lamari, F. N., Kuhn, R., Karamanos, N. K., 2003: Derivatization of carbohydrates for chromatographic, electrophoretic and mass spectrometric structure analysis. *J. Chromatogr. B*, 793: 15–36.
- Makawi, S. Z. A., Taha, M. I., Zakaria, B. A., Siddig, B., Mahmod, H., Elhussein, A. R. M., Gadkariem, E. A., 2009: Identification and quantification of 5-hydroxymethyl furfural HMF in some sugar-containing food products by HPLC. *Pak. J. Nutr.*, 8: 1391–1396.
- Mendes, E., Proenc, E. B., Ferreira, I., Ferreira M. A., 1998: Quality evaluation of Portuguese honey. *Carbohydr. Polym.*, 37: 219–223.
- Ouchemoukh, S., Schweitzer, P., Bachir Bey, M., Djoudad-Kadji, H., Louaileche, H., 2010: HPLC sugar profiles of Algerian honeys. *Food Chem.*, 121: 561–568.
- Pereira, V., Albuquerque, F. M., Ferreira, A. C., Cacho, J., Marques, J. C., 2011: Evolution of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural (F) in fortified wines submitted to overheating conditions. *Food Res. Int.*, 44: 71–76.
- Slimestad, R., Vågen, I. M., 2006: Thermal stability of glucose and other sugar aldoses in normal phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1118: 281–284.
- Spano, N., Casula, L., Panzanelli, A., Pilo, M. I., Piu, P. C., Scanu, R., Tapparo, A., Sanna, G., 2006: An RP-HPLC determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey - The case of the strawberry tree honey. *Talanta*, 68: 1390–1395.
- Švecová, B., Bordovská, M., Kalvachová, D., Hájek, T., 2015: Analysis of Czech meads: Sugar content, organic acids content and selected phenolic compounds content. *Journal of Food Compos. Anal.*, 38: 80–88.
- Wang, Q., Fang, Y., 2004: Analysis of sugars in traditional Chinese drugs. *J. Chromatogr. B*, 812: 309–324.
- Wong, Y. F., Makahleh, A., Al Azzam, K. M., Yahaya, N., Saad, B., Sulaiman, S. A., 2012: Micellar electrokinetic chromatography method for the simultaneous determination of furanic compounds in honey and vegetable oils. *Talanta*, 97: 23–31.

Manuscript received / Do redakce došlo: 09/01/2018
Accepted for publication / Přejato k publikování: 11/02/2018