



Euroopan unionin
osarahoittama



Pohjois-Savon liitto



UNIVERSITY OF
EASTERN FINLAND

SAVON GROW
KEHITYSYHTIÖ

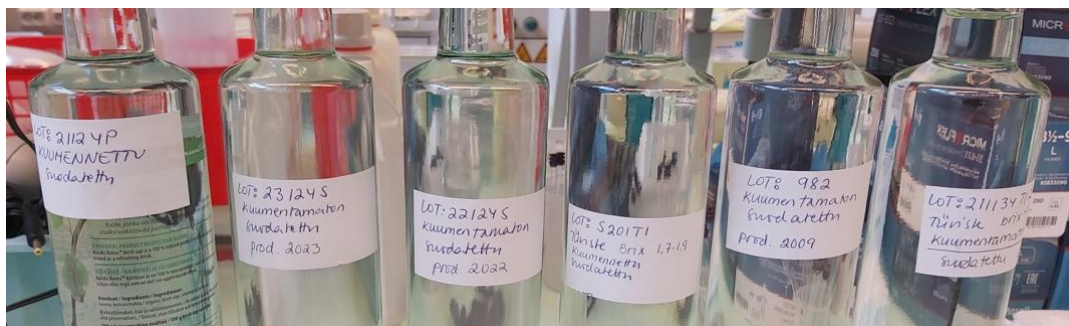


Eltuva hanke

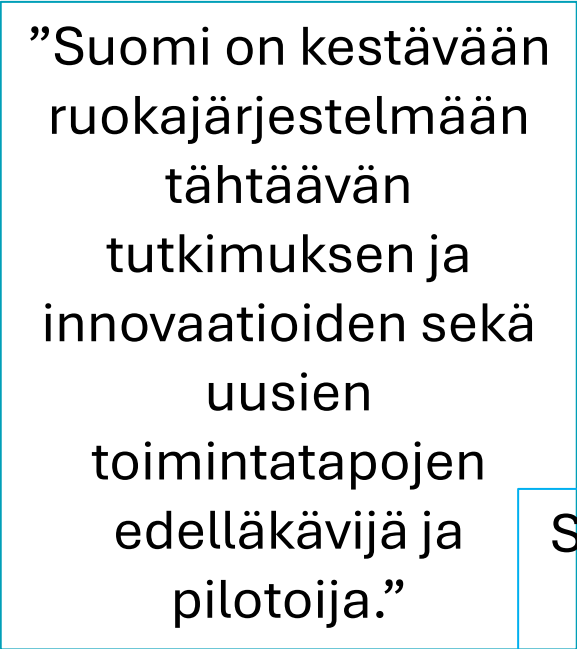
Jäljitettävyys: hunajat ja mahlit

TXRF ja ^1H NMR menetelmät

Professori Jouko Vepsäläinen ja varttunut tutkija Sirpa Peräniemi
Farmasian laitos



Finnish Food Research & Innovation



Suomen vahvuuksiin
kuuluvat ---
läpinäkyvä
ruokaketju, jota
uudistetaan korkean
teknologian
osaamisella.”

Työpaketit, TP1

Johdanto

Kokonaisuudessaan EU:ssa arvioidaan aiheutuvan vuosittain 8-12 miljardin euron haitta elintarvikeväärennöksistä (European Commission, 2020).

Pitkät tuotantoketjut mahdollistavat osaltaan väärennökset elintarvikeketjussa.

Yleisimpien väärennettyjen elintarvikkeiden joukkoon kuuluvat mm. hunaja sekä mehut ja marjat.

Elintarvikealan yritysten tulee voida varmistaa, että käytettyjen raaka-aineiden maantieteellinen alkuperä on oikein ilmoitettu, mutta millä menetelmillä ja kuinka nopeasti analyysijä voidaan tehdä?

4.2. Toteutus ja tulokset

Hankkeessa kartoitetaan jatkuvasti päivittyviä laboratoriomenetelmiä elintarvikkeille (esim. NMR ja GC-MS) sekä selvitetään lisäksi erityisesti hunajan ja mahlan maantieteellistä alkuperää sekä laimentamisen tai sokerin lisäämisen havaitsemista.

Konkreettiset tulokset hankkeessa:

TP1.1:

Hunajan ja mahlan maantieteellisen alkuperän selvittäminen NMR-tekniikalla, menetelmäkehitys ja tulosraportti (lisäksi myös TXRF)

TP3.1:

Kylmäkuivauksen soveltuvuus uusille elintarvikkeille ja niiden komponenteille, kuten marjavalmistetuille, valmisruoalle ja kasviksille: säilyvyystestit ja raportit



Euroopan unioni
Euroopan aluekehitysrahasto

Vipuvoimaa
EU:lta
2014–2020

Pohjois-Savon liitto tukee
maakunnan
menestystä

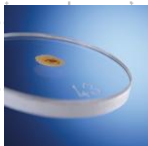


Alkuaineet litiumista uraaniin

TXRF >Si



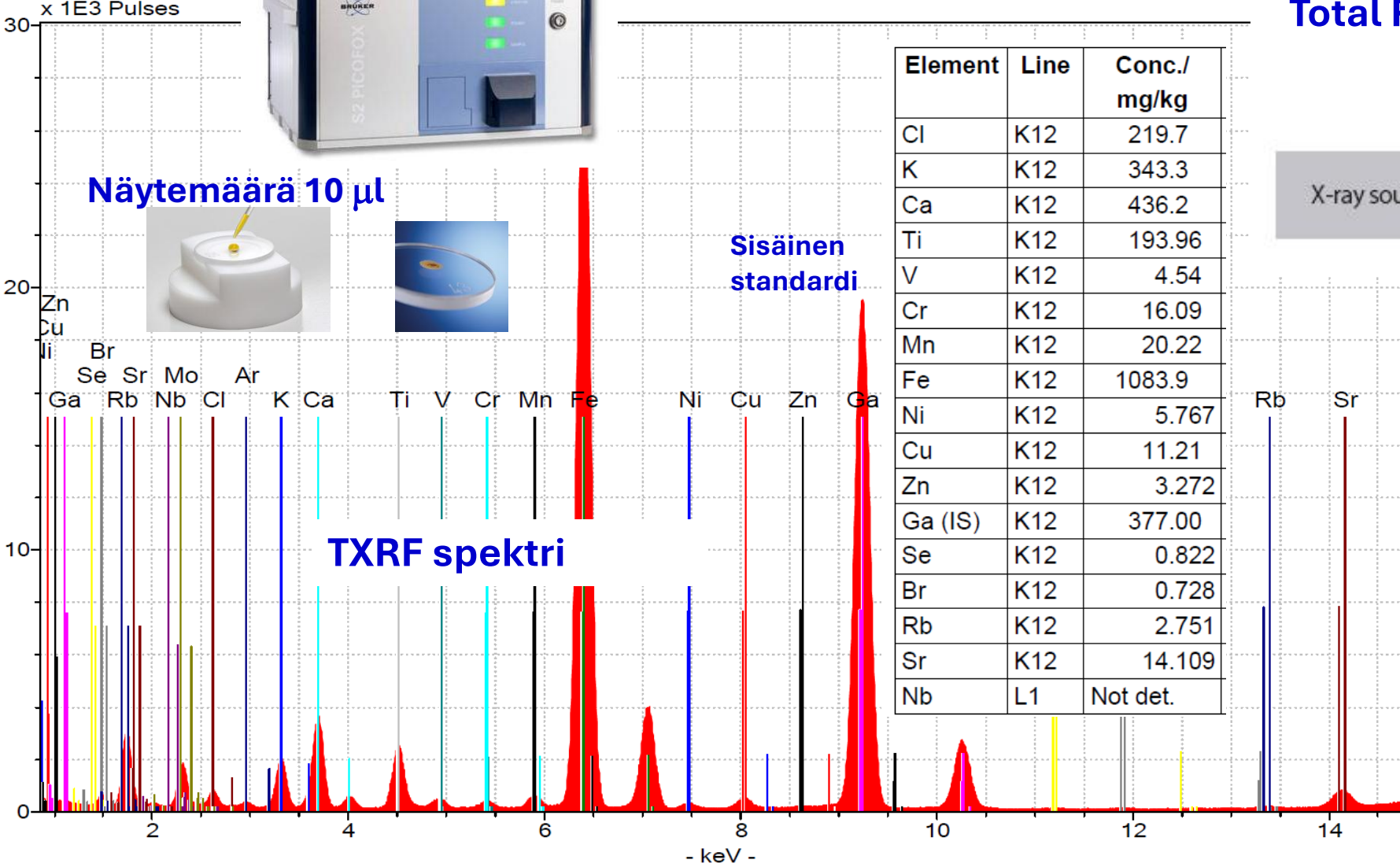
Näyttemäärä 10 µl



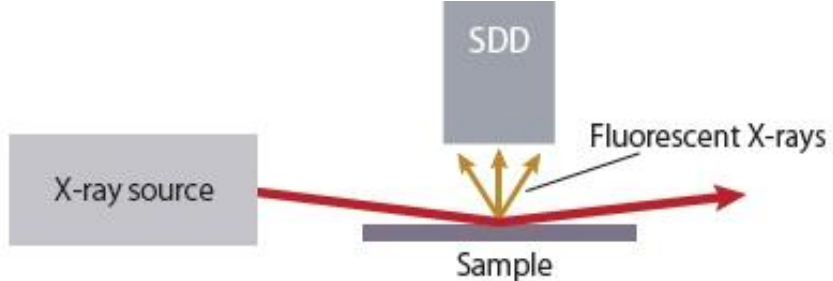
Sisäinen standardi

Element	Line	Conc./ mg/kg
Cl	K12	219.7
K	K12	343.3
Ca	K12	436.2
Ti	K12	193.96
V	K12	4.54
Cr	K12	16.09
Mn	K12	20.22
Fe	K12	1083.9
Ni	K12	5.767
Cu	K12	11.21
Zn	K12	3.272
Ga (IS)	K12	377.00
Se	K12	0.822
Br	K12	0.728
Rb	K12	2.751
Sr	K12	14.109
Nb	L1	Not det.

TXRF spektri



Total Reflection X-ray fluorescence



MP AES – Li - U



ICP MS



Suomalaiset hunajat kesä2023



Taulukko 1: Kesän 2023 hunajanäytteiden alkuainepitoisuudet (TXRF)

	(mg/kg)																			
	P	S	Cl	K	Ca	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Br	Rb	Sr	Ba	Pb
Keskiarvo	43	12	136	850	56	0,2	0,2	0,2	2,1	0,7	0,0	0,0	0,0	0,5	0,1	0,5	4,7	2,6	0,8	0,1
min	22	0	27	250	26	0	0	0,1	0,2	0,1	0	0	0	0	0	0	1,6	2,0	0,3	0,0
max	71	33	476	2024	153	0,4	0,4	0,4	5,0	1,9	0,1	0,0	0,5	2,3	0,1	3,3	20,0	4,3	1,4	0,2

Alkuainesuhteet Maakunnittain

Maakunta	Ca/K	Rb/Sr	Mn/Fe	S/P	Cl/P	K/P	Ca/P	Sr/Ba	Br/Sr	Zn/Fe	Cr/Sr	Ca/Sr	K/Sr	Cl/Sr	P/Sr																																																																																												
Lappi	0,023	7,26	7,6	0,00	12,1	54	1,2	2,2	0,22	0,75	0,10	18,9	811	182	15																																																																																												
Kainuu	0,082	1,62	3,3	0,36	1,7	11	0,9	2,7	0,07	2,03	0,09	18,0	220	35	21																																																																																												
Pohjois-Pohjanmaa	0,077	1,30	1,5	0,33	2,2	15	1,1	3,8	0,41	0,28	0,10	20,1	261	39	18																																																																																												
Pohjanmaa	0,106	1,25	3,7	0,27	1,7	14	1,5	3,9	0,94	0,57	0,11	18,8	177	22	13																																																																																												
Keski-Pohjanmaa	0,046	2,65	10,4	0,13	7,0	42	1,9	2,5	0,10	0,39	0,10	23,4	513	86	12																																																																																												
Etelä-Pohjanmaa	0,083	1,98	1,1	0,39	3,2	18	<table><tr><th>Näyte</th><th>Ca/K</th><th>Rb/Sr</th><th>Mn/Fe</th><th>S/P</th><th>Cl/P</th><th>K/P</th><th>Ca/P</th><th>Sr/Ba</th><th>Br/Sr</th><th>Zn/Fe</th></tr><tr><td>Airborne Honey</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>Guardians</td><td>0,037</td><td>1,5</td><td>22,3</td><td>0,11</td><td>1,3</td><td>17</td><td>0,6</td><td>4,8</td><td>0,24</td><td>8,12</td></tr><tr><td>Australian Honey</td><td>0,127</td><td>0,7</td><td>3,7</td><td>0,65</td><td>6,4</td><td>20</td><td>2,6</td><td>2,3</td><td>0,34</td><td>0,54</td></tr><tr><td>Acacia Flower Honey</td><td>0,176</td><td>0,5</td><td>0,01</td><td>4,64</td><td>2,9</td><td>13</td><td>2,4</td><td>3,3</td><td>0,03</td><td>0,13</td></tr><tr><td>Latvia</td><td>0,058</td><td>1,0</td><td>0,8</td><td>0,31</td><td>2,7</td><td>26</td><td>1,5</td><td>5,2</td><td>0,07</td><td>0,62</td></tr><tr><td>Kreeta</td><td>0,073</td><td>0,6</td><td>0,1</td><td>0,74</td><td>3,5</td><td>19</td><td>1,4</td><td>3,5</td><td>0,12</td><td>0,55</td></tr><tr><td>Chile</td><td>0,028</td><td>0,9</td><td>1,5</td><td>0,00</td><td>2,3</td><td>54</td><td>1,5</td><td>3,2</td><td>0,04</td><td>0,25</td></tr></table>									Näyte	Ca/K	Rb/Sr	Mn/Fe	S/P	Cl/P	K/P	Ca/P	Sr/Ba	Br/Sr	Zn/Fe	Airborne Honey											Guardians	0,037	1,5	22,3	0,11	1,3	17	0,6	4,8	0,24	8,12	Australian Honey	0,127	0,7	3,7	0,65	6,4	20	2,6	2,3	0,34	0,54	Acacia Flower Honey	0,176	0,5	0,01	4,64	2,9	13	2,4	3,3	0,03	0,13	Latvia	0,058	1,0	0,8	0,31	2,7	26	1,5	5,2	0,07	0,62	Kreeta	0,073	0,6	0,1	0,74	3,5	19	1,4	3,5	0,12	0,55	Chile	0,028	0,9	1,5	0,00	2,3	54	1,5	3,2	0,04	0,25				
Näyte	Ca/K	Rb/Sr	Mn/Fe	S/P	Cl/P	K/P	Ca/P	Sr/Ba	Br/Sr	Zn/Fe																																																																																																	
Airborne Honey																																																																																																											
Guardians	0,037	1,5	22,3	0,11	1,3	17	0,6	4,8	0,24	8,12																																																																																																	
Australian Honey	0,127	0,7	3,7	0,65	6,4	20	2,6	2,3	0,34	0,54																																																																																																	
Acacia Flower Honey	0,176	0,5	0,01	4,64	2,9	13	2,4	3,3	0,03	0,13																																																																																																	
Latvia	0,058	1,0	0,8	0,31	2,7	26	1,5	5,2	0,07	0,62																																																																																																	
Kreeta	0,073	0,6	0,1	0,74	3,5	19	1,4	3,5	0,12	0,55																																																																																																	
Chile	0,028	0,9	1,5	0,00	2,3	54	1,5	3,2	0,04	0,25																																																																																																	
Keski-Suomi	0,063	1,90	4,4	0,24	2,7	17																																																																																																					
Pohjois-Savo	0,089	1,02	3,6	0,32	2,1	11																																																																																																					
Pohjois-Karjala	0,110	0,80	3,9	0,14	1,4	8																																																																																																					
Satakunta	0,083	1,31	7,8	0,20	1,9	12																																																																																																					
Pirkanmaa	0,092	1,43	2,5	0,20	3,0	19																																																																																																					
Päijät-Häme	0,087	1,47	5,3	0,29	2,1	13	1,1	4,1	0,04	0,71	0,08	18,6	215	34	16																																																																																												
Etelä-Savo	0,070	1,57	6,7	0,36	2,3	19	1,3	3,8	0,04	1,05	0,09	18,6	265	32	14																																																																																												
Saaristo	0,042	2,55	2,5	0,24	4,4	25	1,1	2,5	0,32	1,18	0,09	23,7	559	97	22																																																																																												
Varsinais-Suomi	0,073	2,65	3,0	0,45	3,3	26	1,9	3,0	0,53	0,91	0,08	28,1	385	49	15																																																																																												
Kanta-Häme	0,112	0,82	2,8	0,30	2,1	12	1,3	3,6	0,07	0,56	0,08	21,1	189	34	16																																																																																												
Uusimaa	0,075	1,39	2,0	0,31	3,1	20	1,5	2,8	0,17	0,49	0,08	28,3	376	56	18																																																																																												
Kymenlaakso	0,095	1,01	1,8	0,40	1,6	14	1,4	3,3	0,16	0,96	0,07	23,5	248	28	17																																																																																												
Etelä-Karjala	0,108	0,96	15,2	0,20	1,2	8	0,9	2,8	0,05	1,06	0,09	12,4	114	16	14																																																																																												



Euroopan unioni
Euroopan aluekehitysrahasto

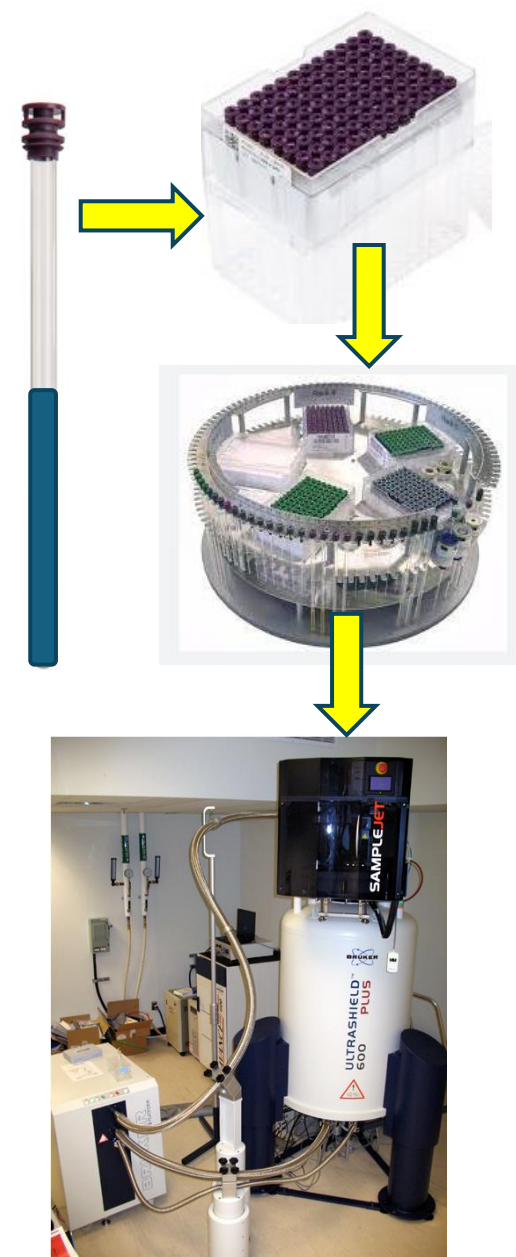
Pohjois-Savon liitto tukee
maakunnan
menestystä



Vipuvoimaa
EU:lta
2014–2020

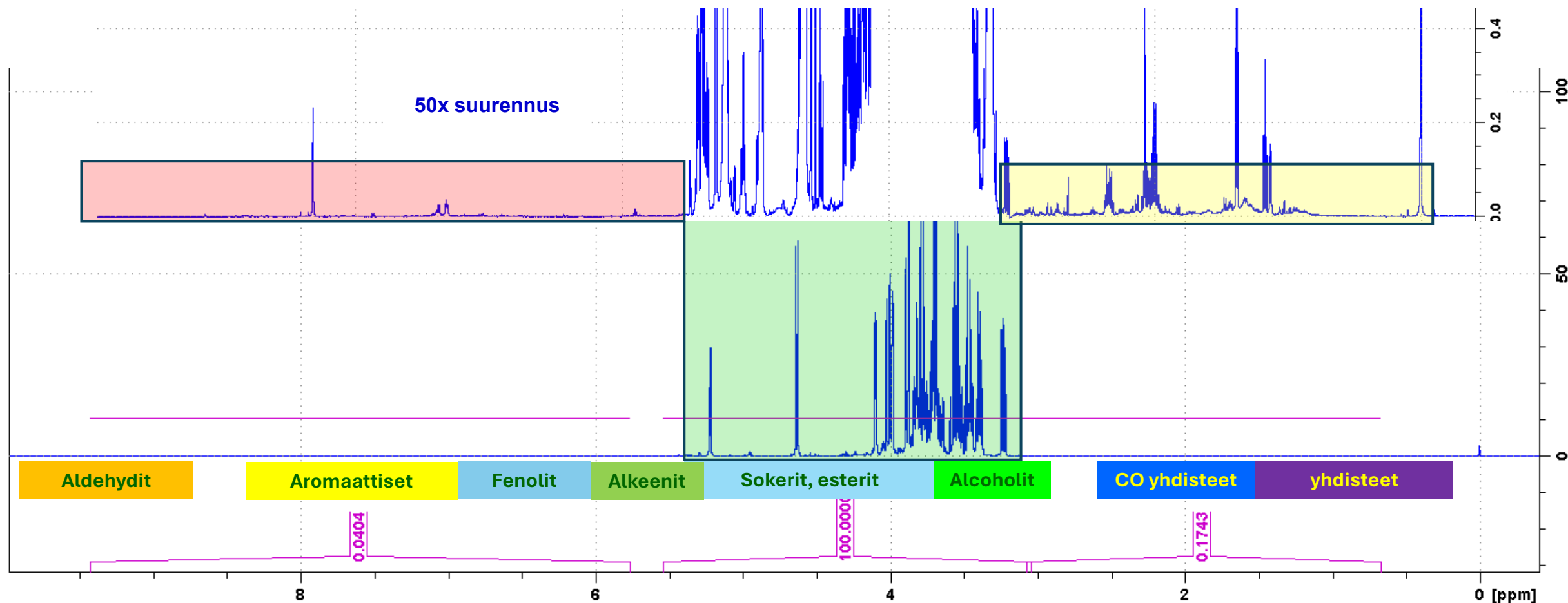
NMR spektroskopia

- * NMR I. nuclear magnetic resonance on yleispätevin menetelmä analysoimaan tuntemattoman näytteen sisältämät orgaanisen yhdisteet ja niiden pitoisuudet
- * NMR spektroskopiolla ei voi analysoida hyvin pieniä pitoisuuksia ($< 10 \mu\text{M}$), monimutkaisia seoksia (> 200 yhdistettä), polymeerisiä rakenteita tai paljon metalleja (Fe, Cu, Ni > 200 ppm) sisältäviä näytteitä
- * tavallisia NMR aktiivisia ytimiä ovat protoni (^1H), ^{13}C , ^{19}F ja ^{31}P
- * NMR spektri mittaa kolmea asiaa: 1) kemiallista siirtymää, 2) piikkien integraaleja ja 3) piikkien hienorakennetta
- * yleensä näiden perusteella voidaan päätellä, minkä tyyppisiä yhdisteitä näyte sisältää, kuinka paljon eri tyyppisiä aineita on, yleensä myös pääkomponenttien rakenne ja useimpien yhdisteiden pitoisuus
- * ^1H NMR spektrin mittausta varten tarvitaan näyteliuosta $10\text{--}425 \mu\text{L}$ tai $1\text{--}20$ mg kiinteää ainetta (liuettava täysin käytettyyn NMR liuottimeen), deuterioitua liuotinta ja standardia s.e. lopputilavuus on n. $525 \mu\text{L}$
- * mittaus kestää < 10 min ja automaatiolla n. 100 näytettä/päivä



Hunaja on glukoosia ja fruktoosia

- ^1H NMR:n mukaan hunajan orgaaniset yhdisteet ovat sokereita 99.8%, amino-happoja 0.17% ja aromaattisia yhdisteitä 0.03%



Kirjallisuudessa analysoitu

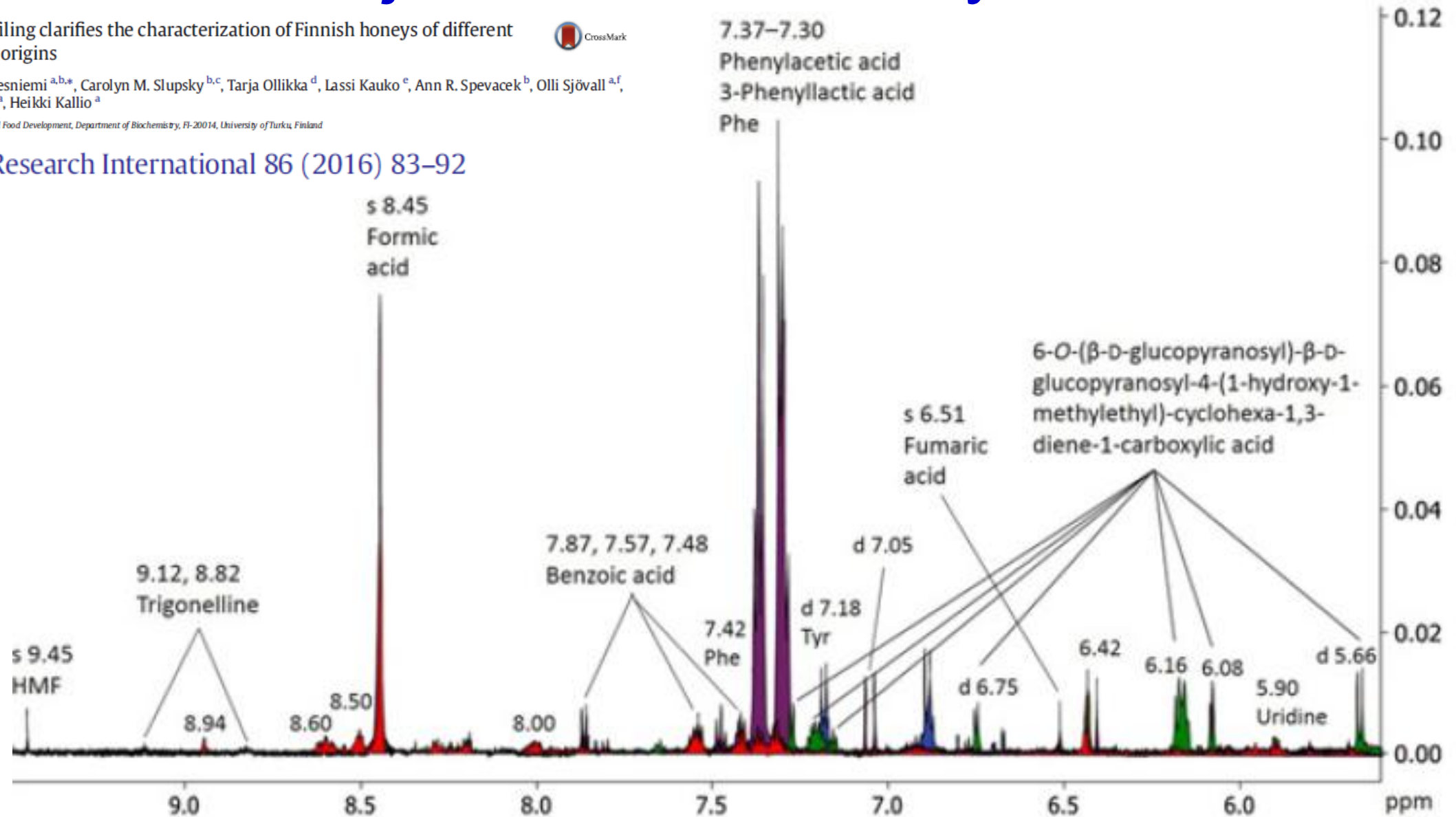
NMR profiling clarifies the characterization of Finnish honeys of different botanical origins



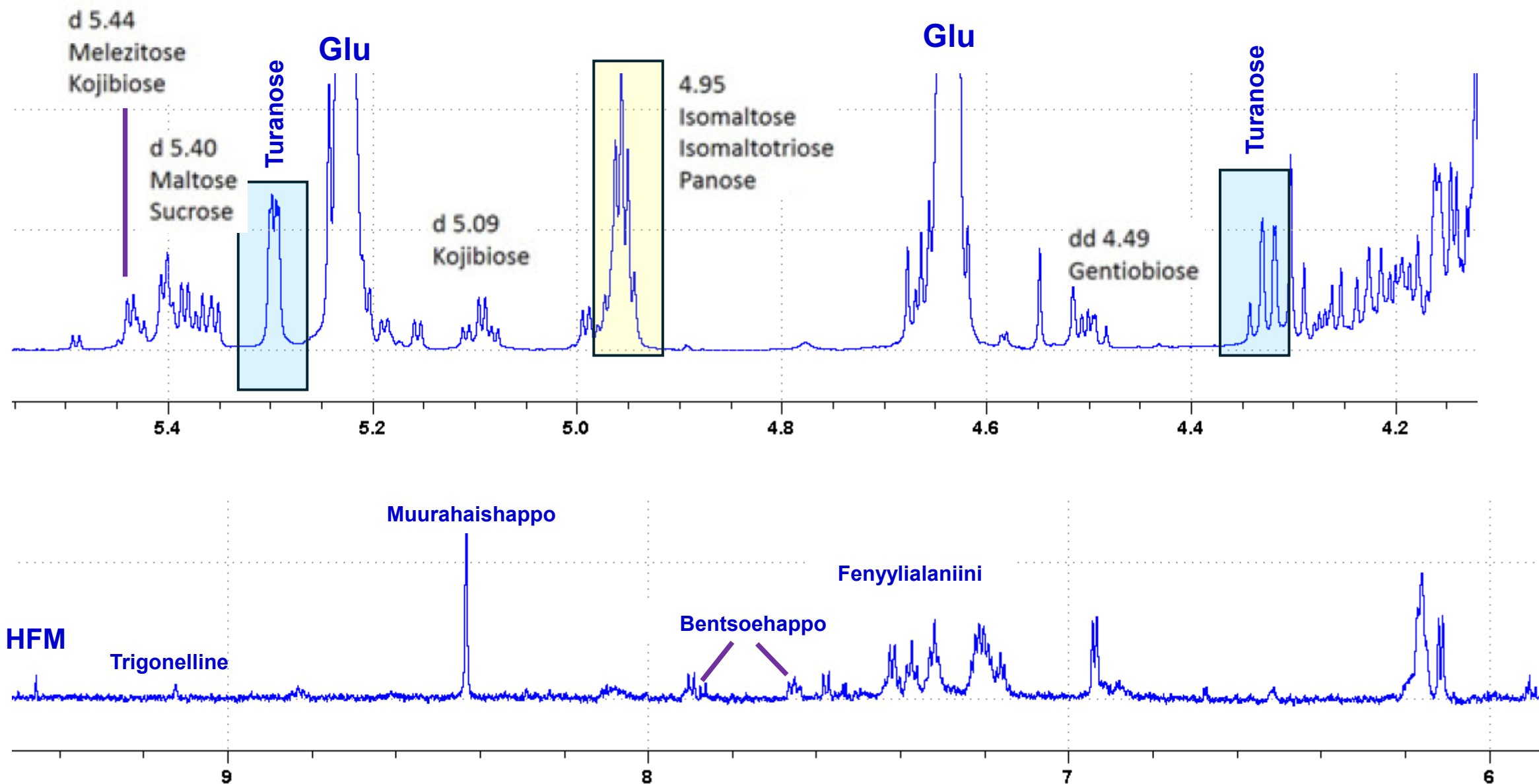
Maaria Korttinen^{a,b,*}, Carolyn M. Slupsky^{b,c}, Tarja Ollikka^d, Lassi Kauko^e, Ann R. Spevacek^b, Olli Sjövall^{a,f}, Baoru Yang^a, Heikki Kallio^a

^a Food Chemistry and Food Development, Department of Biochemistry, FI-20014, University of Turku, Finland

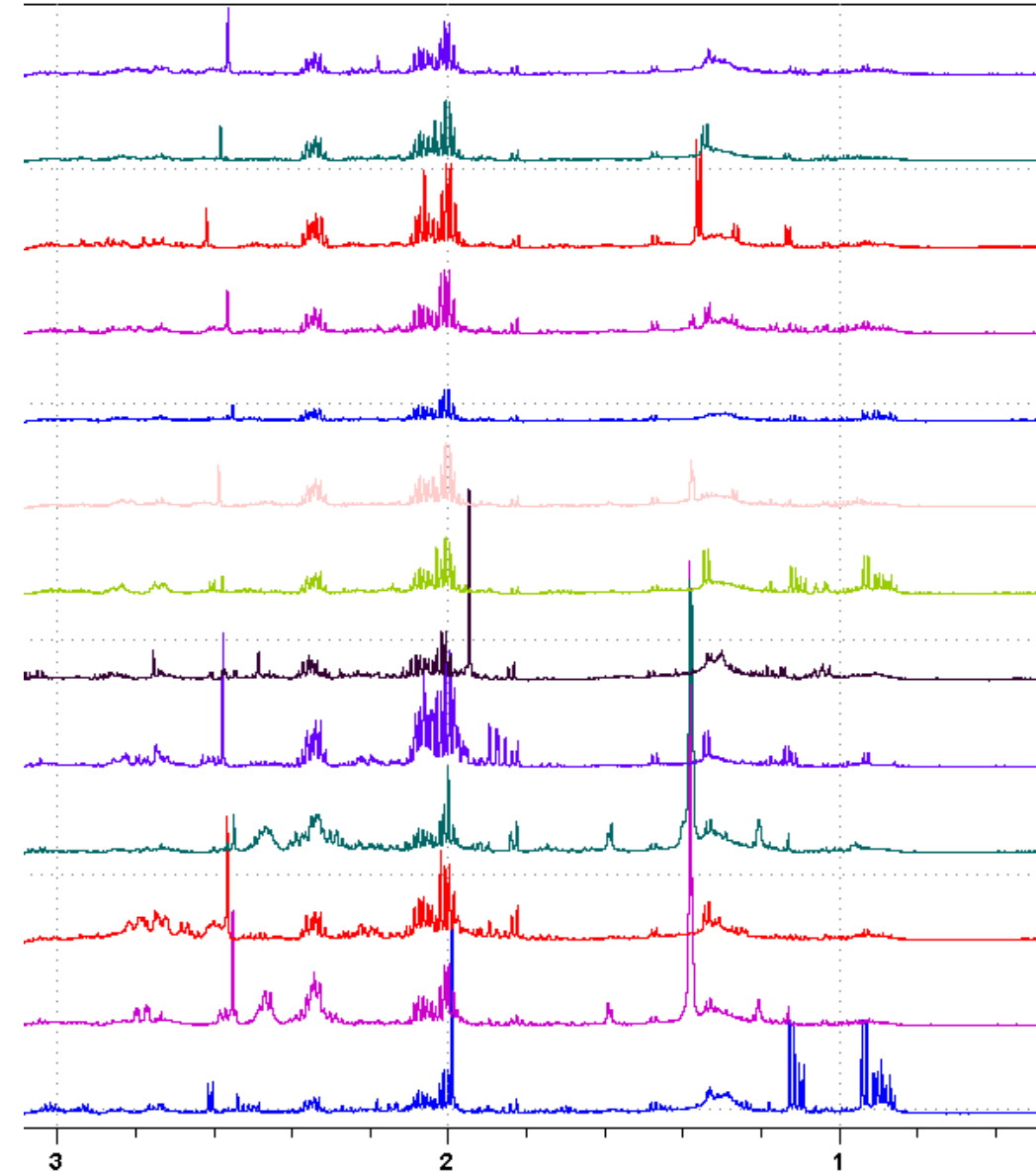
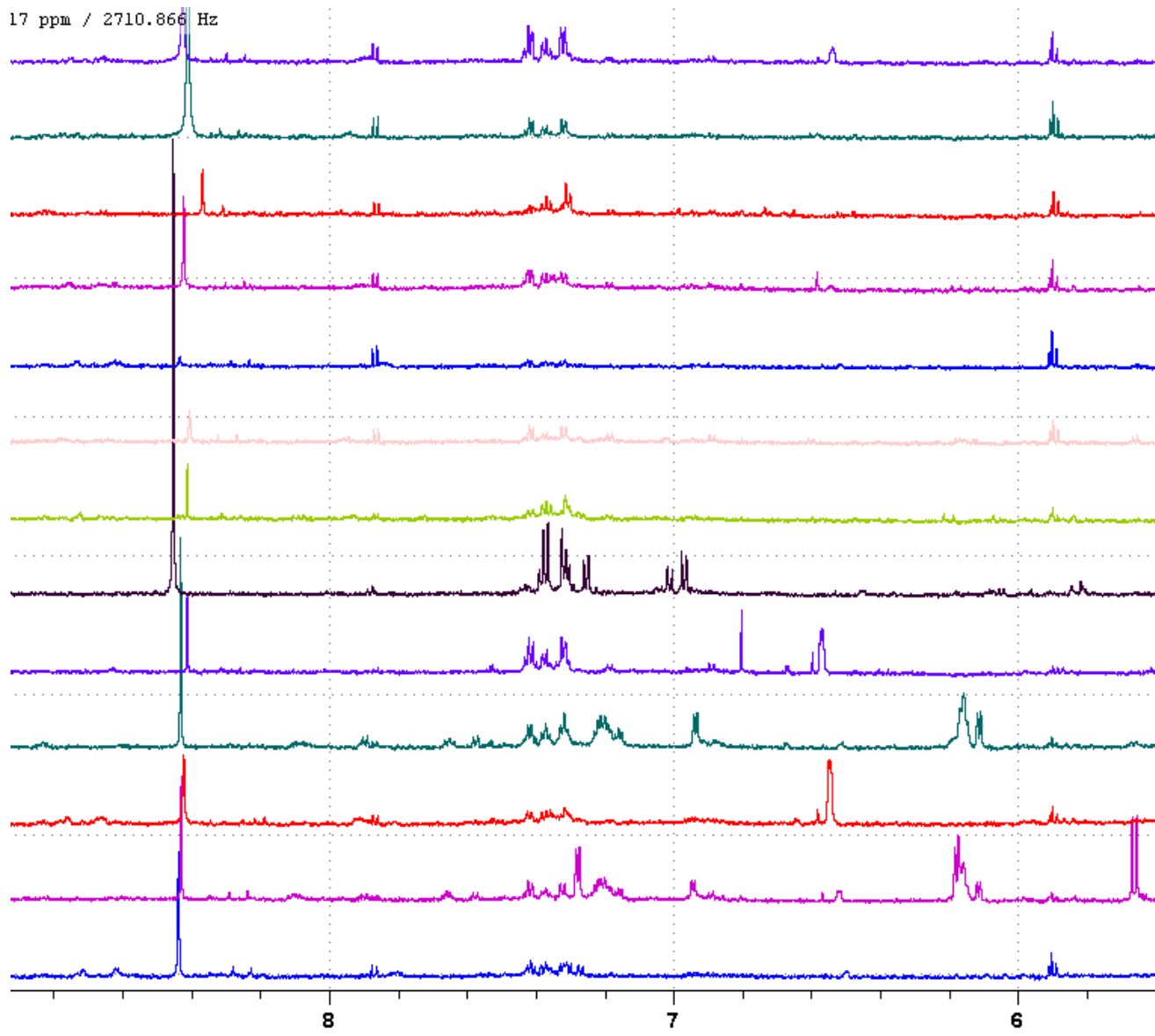
Food Research International 86 (2016) 83–92



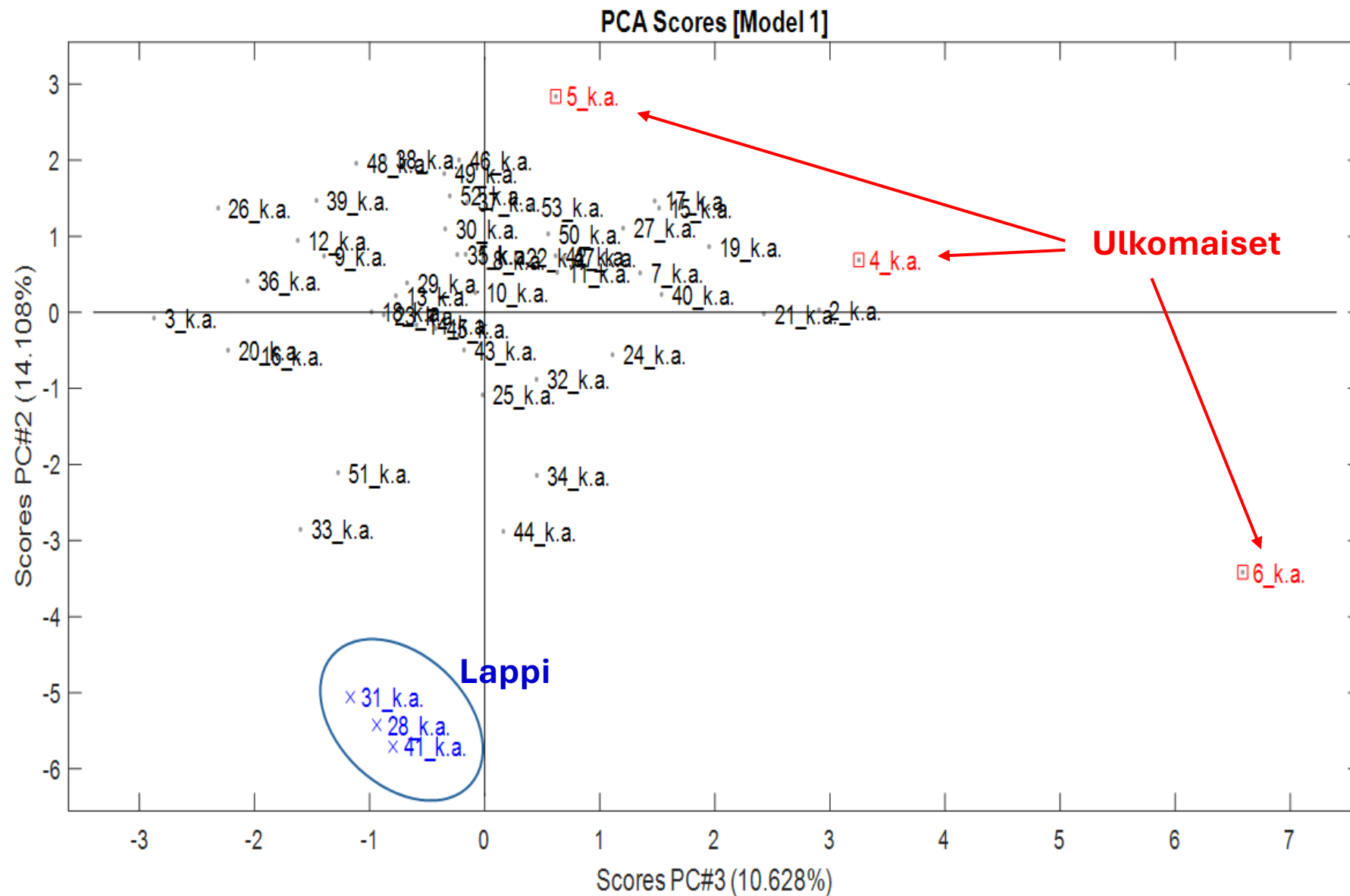
Muut sokerit ja aromaattiset yhdisteet



^1H NMR orgaaniset yhdisteet



Pääkomponenttiansalyysi (PCA)



Hunajat yhteenveto

Alkuaineanalyysit

- alkuainepitoisuudet vaihtelivat merkittävästi tuottajalta toiselle – vaihtelua oli havaittavissa myös saman tuottajan eri vuosien hunajassa
- eniten vaihtelua oli rikin, kloorin, kaliumin ja rubidiumin pitoisuuksissa
- Lapin näytteissä ei ollut rikkiä, mutta muita selkeitä johtopäätöksiä ei ollut tehtävissä

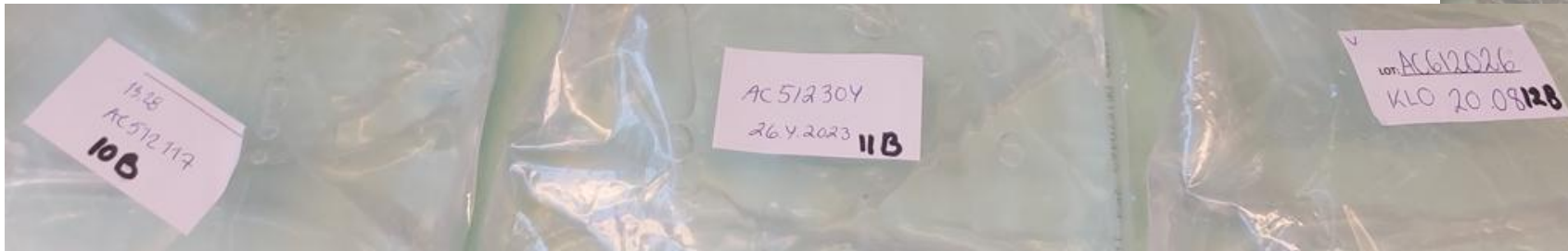
NMR spektroskopia

- spektreissä sokerien osuus oli 99.8% ja muita yhdisteitä oli vain 0.2 %
- jokainen tutkittu hunajaerä oli muiden orgaanisten yhdisteiden osalta ainutkertainen
- tämä mahdollistaa jäljittää tuottajan ja vuoden mikäli olisi käytössä vertailuaineisto
- päättely onnistuu jopa vertaamalla visuaalisesti spektrejä keskenään

Maantieteellinen alkuperä

- veden isotooppianalyysin ($^2\text{H}/^{18}\text{O}$) perusteella voidaan päätellä näytteen leveysaste, mutta sen perusteella ei voi päätellä esim. hunajan tuottajaa

Mahlanäytteet



Kotimaiset mahlat TXRF

Mahlanäytteet 18 kpl, saap. 22.5.23

TXRF																					
Nro	Näyte	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(µg/l)	(µg/l)	(µg/l)	(µg/l)	(µg/l)	(µg/l)	(µg/l)	(µg/l)	(µg/l)	(µg/l)	(µg/l)	(µg/l)	(µg/l)	(µg/l)	(µg/l)
		P	S	Cl	K	Ca	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Br	Rb	Sr	Ba	Pb
1	982	6,1	2,0	1,4	83,6	56,0	9	<5	13	5902	164	<6	21	9	1185	<6	<5	288	244	367	<10
2	1061	6,3	1,3	2,0	83,8	46,9	6	<5	29	3760	187	<6	24	8	994	<6	<5	279	225	324	<10
3	1123	6,5	1,2	1,2	119,3	56,5	19	9	15	3097	93	<6	19	6	1060	<6	<5	369	292	409	<10
4	17111	10,2	2,8	1,3	124,2	56,2	12	<5	12	3422	104	<6	18	15	1464	<6	<5	548	334	351	<10
5	1974	9,0	2,9	4,4	106,3	54,4	7	<5	9	2972	81	<6	23	12	968	<6	7	437	457	354	<10
6	20114	5,6	0,8	2,0	73,3	40,9	<5	<5	10	2087	79	<6	7	14	679	<6	<5	294	351	253	<10
7	21114S	6,1	0,7	2,0	71,6	46,4	<5	<5	6	4287	112	<6	11	10	809	<6	<5	290	400	294	<10
8	22124S	8,2	1,4	1,9	98,6	71,5	7	<5	16	4301	130	<6	23	9	1443	<6	<5	418	635	502	<10
9	231245S	12,2	4,4	0,6	127,9	74,2	10	<5	16	8778	181	9	28	23	1791	<6	<5	1264	431	537	<10
10	21124P	3,5	0,7	0,6	72,4	41,4	9	<5	14	3174	41	<6	15	6	275	<6	<5	482	355	297	<10
11	S201TI	17,7	1,6	2,4	197,5	104,6	21	12	10	4930	106	<6	51	25	1194	<6	<5	715	653	800	<10
12	211134TI2	14,3	2,7	0,1	149,1	94,0	18	13	18	7323	250	9	61	25	2671	<6	<5	1168	764	915	<10
13	AC512304	6,1	2,4	0,6	102,4	66,3	19	8	17	6201	71	8	22	16	422	<6	<5	1008	374	436	<10
14	AC412307	12,0	4,2	0,5	123,6	64,7	12	9	17	7668	159	8	28	24	1609	<6	<5	1170	355	471	<10
15	AC012201	7,1	1,7	1,2	110,0	56,2	15	12	15	3573	44	<6	20	6	405	<6	<5	529	411	425	<10
16	AC612112	8,2	1,6	1,2	94,6	49,3	5	8	11	2687	45	<6	19	9	437	<6	<5	387	413	272	<10
17	AC611910	6,9	1,3	2,0	106,6	47,5	10	14	10	1472	20	<6	20	6	187	<6	<5	155	240	312	<10
18	TI6122119	24,4	6,2	1,0	268,9	136,1	42	32	27	9206	238	9	79	18	3045	<6	<5	1592	927	1207	<10

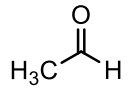
TXRF – kotimaiset vs. kilpailijat

Nro	Rb/Sr	K/Ca	Mn/Fe	Mn/Zn
1	2,0	2,1	65,2	9,4
2	2,0	1,9	73,3	15,3
3	1,6	3,4	38,1	8,8
4	0,4	0,5	30,1	4,2
5	0,7	1,6	54,0	7,0
6	0,6	1,2	5,3	7,7
7	3,1	1,7	20,6	4,8
8	0,6	1,1	6,0	3,9
9	1,4	2,1	59,6	2,2
10	1,7	1,8	58,1	11,5
11	2,7	1,5	88,8	15,4
12	2,4	2,3	52,1	5,4
13	3,3	1,8	82,2	10,5
14	2,4	1,9	67,3	9,2
15	0,6	2,2	72,5	10,5
16	2,4	2,1	63,2	9,3

- saimme mitattavaksi 9 näytettä ”kilpailijoilta”
- näytteet 4, 6, 8 ja 9 käyttäytyivät poikkeuksellisesti ja supressoivat sisäisen Ga standardin
- näytteiden alkuaineiden pitoisuudet vaihtelivat tyypillisesti 2-10x pitoisuuksissa
- pitoisuuksia verratessa näytteet 4 (Cl), 5 (Mn), 6 (Fe), 8 (K, Ca, Ti, V, Cr, Cu) ja 9 (Ni, Zn) poikkesivat muista näytteistä
- viereisessä taulukossa on verrattu kahden alkuaineen keskinäisiä pitoisuuksia
- kotimaisissa näytteissä vaihtelu oli selvästi pienempää verrattuna kilpailijoiden näytteisiin
- Kilpailevien pitoisuudet olivat selvästi erilaiset muilla paitsi näytteillä 1 ja 2

^1H NMR kotimaiset mahlalat

Suurennettu 20x



HCOOH

Vesi

Mahla sisältää vettä, glukoosia ja fruktoosia >99%

Aldehydes

Aromatic compounds

Phenols

Alkene

Carbohydrates, esters

Alcohols

CO
compounds

C-H-compounds

8

6

4

2

0 [ppm]

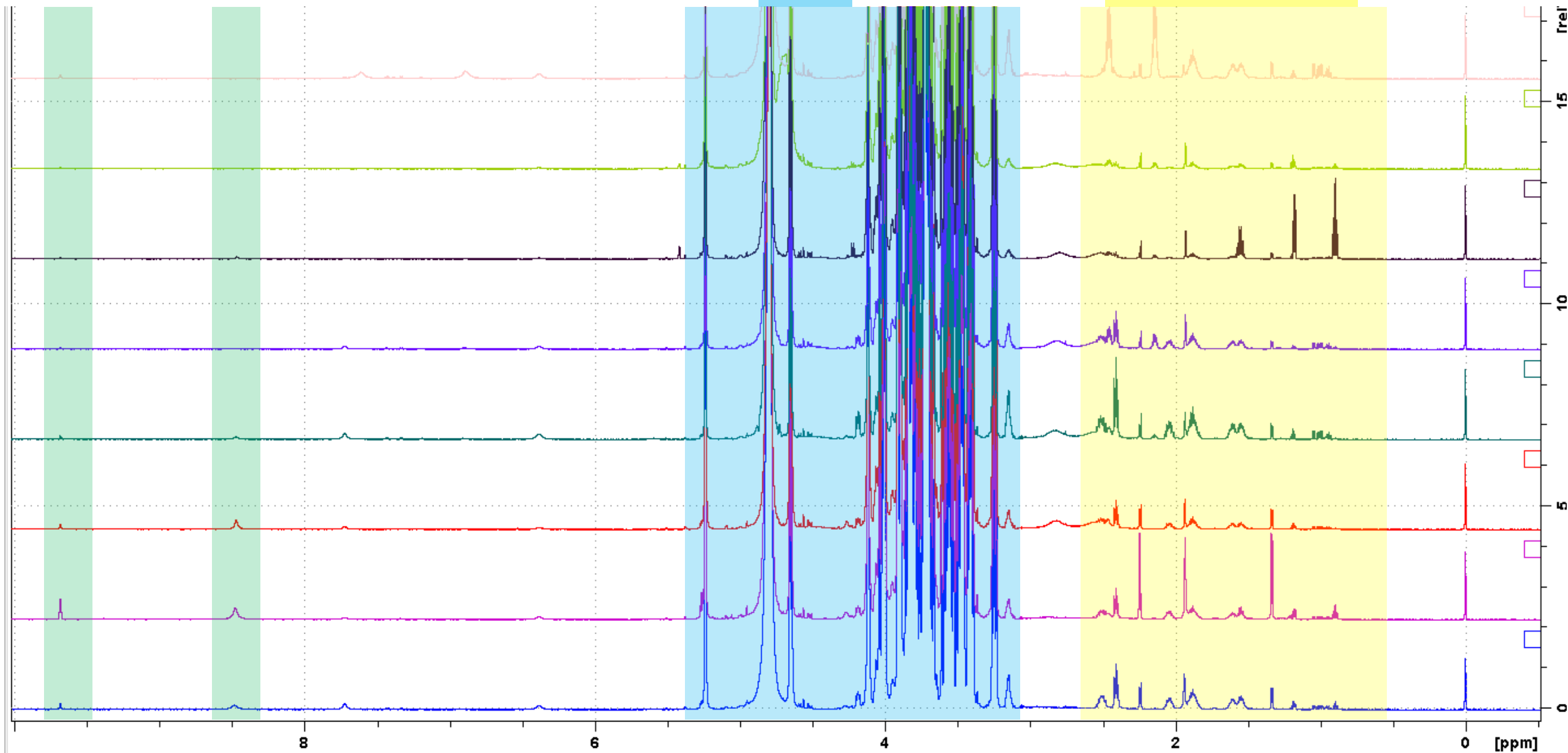
kotimaiset mahlanäytteet 1-9

Asetaldehydi

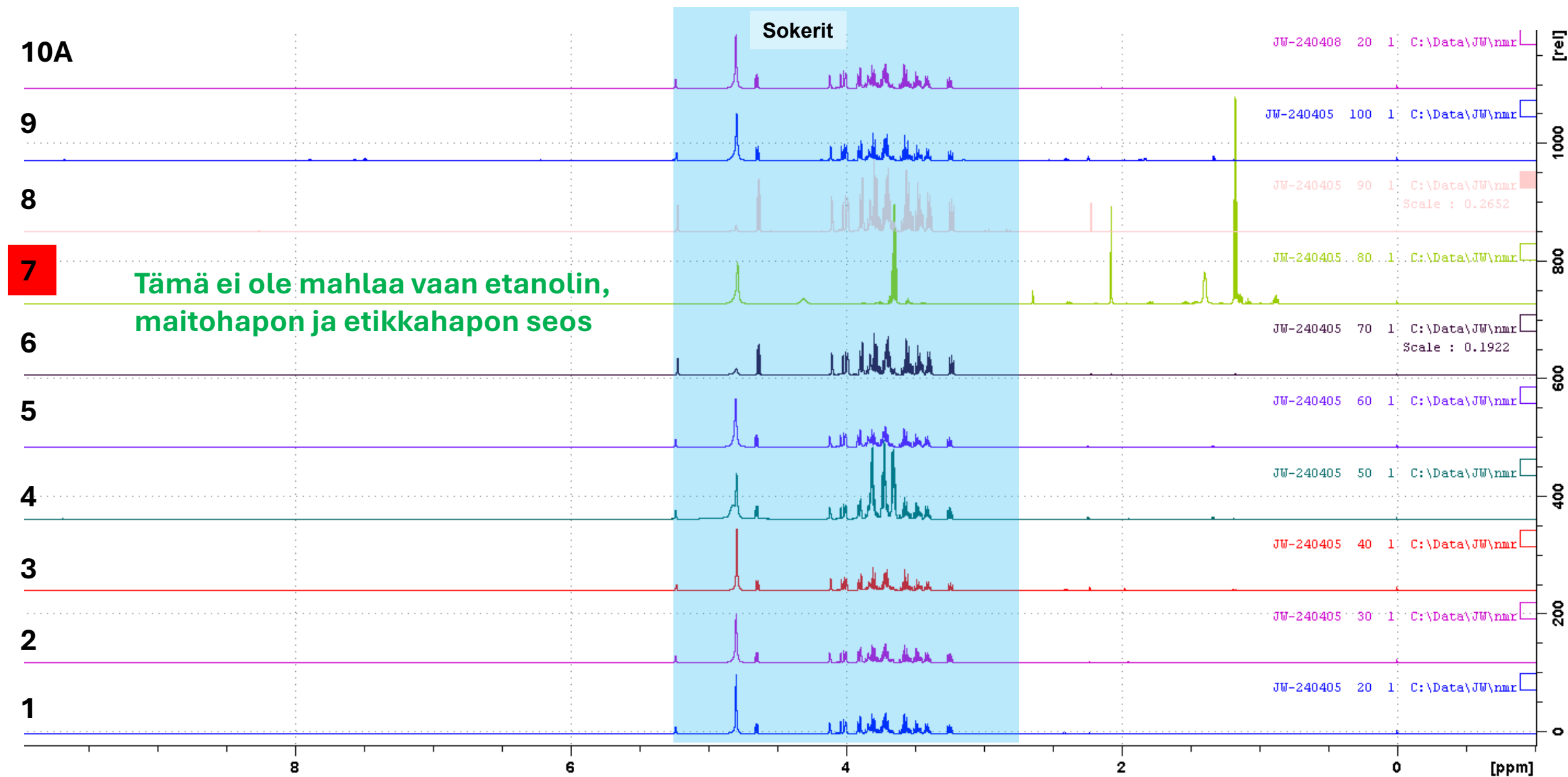
Muurahaishappo

Sokerit

Karbonyylit ja hiilivedyt

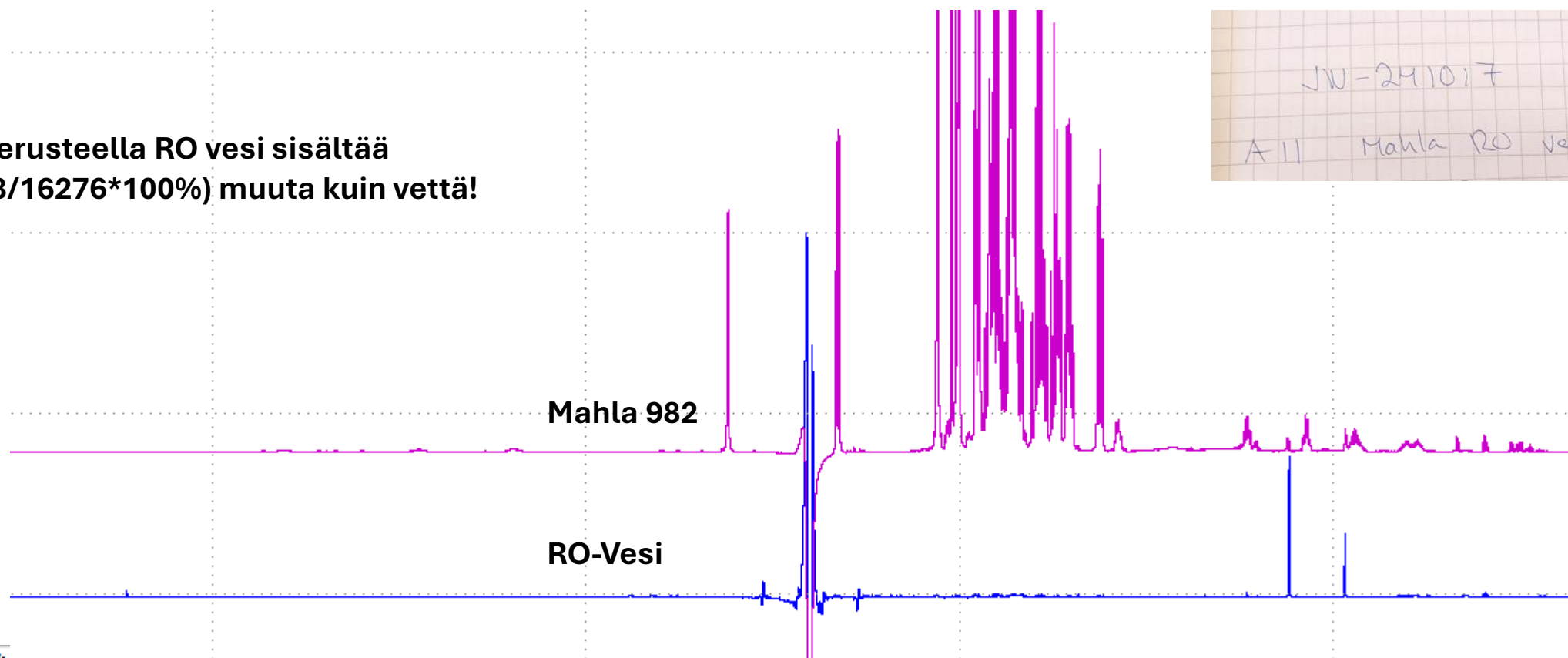
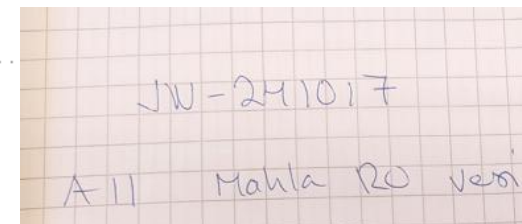


NMR kilpailijat



Mahlat RO-vesi ^1H NMR

Tulosten perusteella RO vesi sisältää
n. 0.3 % (48/16276*100%) muuta kuin vettä!



Concentrations as mg/L																		
Sample	MeCHO	HCO2H	PheAla	Tyr	Glucose	Fructose	Tunt A	Tunt B	Tunt C	Tunt D	AcOH	Tunt E	Val	IsoLeu	Tunt E	2-Propanol	Yht mg/L	
JW-241017 RO-vesi		2,04				12,09		1,86	28,60		1,34	1,42			1,02		48,38	
Mahla 982	22,58	40,62	4,95	3,07	7703,47	7052,58	156,53	195,29	135,79	151,22	783,62	2,45	7,40	7,60	2,45	6,80	16276,41	

Concentrations as mM																		
NMR file	Sample	Sample	MeCHO	HCO2H	PheAla	Tyr	Glucose	Fructose	Tunt A	Tunt B	Tunt C	Tunt D	AcOH	EtOH	IsoLeu	1-Propano	Tunt E	
10 A1	JW-241017 RO-vesi		9.28	8.46	7.33	6.90	5.24	4.00	3.15	2.50	2.40	2.04	1.94	1.18	0.031		0.89	1.177
				0,044				0,067		0,019	0,286		0,022				0,017	2-Propanol

Mahlat yhteenveto

Alkuaineanalyysit

- alkuainepitoisuudet vaihtelivat eri tuotantoeristä – vaihtelua oli havaittavissa myös saman tuottajan eri vuosien mahloissa
- eniten vaihtelua mangaanin, raudan, sinkin ja rubidiumin pitoisuuksissa
- kotimaiset näytteet kilpailijoiden näytteistä erotettavissa vertaamalla kahta alkuainetta

NMR spektroskopia

- spektreissä sokerien osuus oli 99.9% ja muita yhdisteitä oli vain 0.1 %
- jokainen tutkittu mahlaerä oli muiden orgaanisten yhdisteiden osalta ainutkertainen
- tämä mahdollistaa jäljittää tuottajan ja vuoden mikäli olisi käytössä vertailuaineisto
- kylmäkuivauksen yhteydessä mahlasta poistuu käytännössä ainoastaan vettä

Maantieteellinen alkuperä

- veden isotooppianalyysin ($^2\text{H}/^{18}\text{O}$) perusteella voisi päätellä näytteen leveysaste

A photograph of a forest floor covered in green moss and fallen brown leaves. Several mushrooms with reddish-brown caps and light-colored stems are scattered across the scene. The text "Kiitokset kuulijoille!" is overlaid in yellow, slanted font across the middle-right portion of the image.

Kiitokset kuulijoille!