



Определение 5-гидроксиметилфурфурала в меде методом ВЭЖХ

©А.В.Романов, О.Г.Ларионов

Институт физической химии и электрохимии им А.Н.Фrumкина РАН

119991, Москва, Ленинский пр.31, стр.4

Е.Ю. Балашова, П.Б. Коржов, А.Г. Дубичев

ООО «Аналитический центр Апис», 140150, Московская область, Раменский район, пос.
Быково, ул. Верхняя д. 18 А

Разработана методика определения 5-гидроксиметил-2-фуральдегида (5-ГМФ) в меде. Диапазон измерений составляет 1,0 – 100 мг на 1 кг меда. Методика может применяться для анализа различных типов меда-сырца и на всех стадиях производственного процесса переработки меда.

ВВЕДЕНИЕ

Основную часть пчелиного меда составляют углеводы (глюкоза, фруктоза, сахароза, мальтоза и др.), общее содержание которых достигает 80%. Глюкоза и фруктоза составляют 80-90% от суммы всех сахаридов в созревшем меде, сахароза – до 5% [1, 2]. Оставшиеся 20% приходятся на долю воды. В меде также обнаружены микроэлементы, витамины, ферменты, флавоноиды и другие биологически активные компоненты [1].

Мед имеет, как правило, кислую среду, т.к. содержит органические (около 0,3%) и неорганические (0,03%) кислоты [1]. Кислоты находятся в меде в свободном и связанном состоянии и попадают в него из нектара, пади, пыльцы, а также образуются в процессе ферментативных процессов и окисления углеводов. При длительном хранении меда углеводы превращаются в побочные продукты, одним из которых является 5-ГМФ. Он относится к нежелательным для человеческого организма компонентам меда [3, 4].

5-ГМФ образуется из гексоз в кислых растворах сахаров. Кетогексозы (например, фруктоза) проявляют повышенную реакционную способность и дают больший выход 5-ГМФ по сравнению с альдогексозами, представителем которых является глюкоза. В первые месяцы хранения меда накапливающийся 5-ГМФ разрушается ферментами до нетоксичных веществ. При длительном хранении активность ферментов резко снижается, и 5-ГМФ накапливается в значительном количестве. В свежееоткачанном меде содержание 5-ГМФ составляет 1-5 мг/кг продукта, а после нескольких лет хранения его количество увеличивается до 150-200 мг/кг. При нагревании меда содержание 5-ГМФ также резко увеличивается, что служит индикатором нарушения технологического процесса. Эти закономерности необходимо учитывать при промышленной переработке меда.

Согласно российскому стандарту на качество меда предельно допустимое содержание 5-ГМФ равно 25 мг/кг [2]. Европейские нормы ограничивают ПДК 5-ГМФ концентрацией 40 мг/кг [5]. Методика количественного определения содержания 5-ГМФ, указанная в ГОСТ 19792-01 «Мед натуральный», основана на колориметрическом определении 5-ГМФ в присутствии барбитуровой кислоты и пара-толуидина [2]. При этом не указывается, с какими именно соединениями реагируют эти вещества. Регистрируется суммарный спектр всех продуктов реакции. При анализе методом ВЭЖХ обнаруживается именно 5-ГМФ.

Цель данного исследования – разработка методики определения 5-ГМФ в меде с помощью ВЭЖХ, как более быстрой и точной, сравнение полученных данных с результатами, полученными по методике ГОСТа 19792-01.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и оборудование:

- Жидкостный хроматограф Agilent 1100, укомплектованный дегазатором Degasser G1379A, насосом QuatPump G1311A, автосемплером ALS G1313A, термостатом колонок Colcom G1316A, спектрофотометрическим детектором DAD G1315B и системой обработки данных Agilent ChemStation Rev. B.01.03.
- Колонка Zorbax Eclipse XDB C-18 5micron 4.6x150 mm, “Agilent”, USA.
- Объем вводимой пробы 20мкл.
- Микропипетки объемом 100 и 1000 мкл, “VWR”, Poland .
- Пипетка объемом 5 мл, “Biohit”, Finland.
- Весы аналитические AnD GR-202 (точность 0,00001 г), “AnD”, Japan.
- Деионизатор воды Millipore Simplicity, “Millipore”, France.
- Ультразвуковая баня S 30 H Elmasonic, “Elma”, Germany
- Фильтр Nylon 0.45 micron 13 mm.
- Стандарт 5-гидроксиметилфурфурала (99%) Aldrich.
- Ацетонитрил УФ – 200 нм для ВЭЖХ “Lecbiopharm”, Россия.

Методика эксперимента.

При разработке методики стандартный раствор готовили по точной навеске. Рабочие - разбавлением стандартного раствора непосредственно перед анализом.

При анализе образцов меда растворы готовили следующим образом: 1г исследуемого меда (точная навеска) растворяли в 50 мл деионизованной воды. Раствор перемешивали до полного растворения меда в УЗ – ванне при комнатной температуре в режиме «перемешивание». Затем раствор фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 микрон. Фильтрат анализировали методом ВЭЖХ.

В процессе отработки методики были определены условия анализа:

- по УФ-спектру 5-ГМФ была выбрана рабочая длина волны 283 нм;
- режим элюирования градиентный для сокращения времени анализа и эффективной регенерации колонки:

0 – 7 мин. – вода : ацетонитрил (97 : 3 об.);

7 – 12 мин. – вода : ацетонитрил (0 : 100 об.);

12 – 17 мин. - вода : ацетонитрил (97 : 3 об.);

- объемная скорость элюирования 1,0 мл/мин.;

- объем инъекции 20 мкл;

- температура термостата колонки 30°C;

- время удерживания 5-ГМФ – 7,0±0,3 мин.

Калибровочная зависимость сигнала детектора от содержания 5-ГМФ была определена в диапазоне концентраций 0,1 – 1,0 мкг/мл (соответствует 5,0 – 50 мг/кг меда или 0,2 – 2,0 ПДК) по 5 точкам, для каждой точки было выполнено по 3 измерения. Результаты представлены в таблице 1, график линейной зависимости - на рис. 1. В указанном диапазоне зависимость линейная с коэффициентом корреляции 0,99995.

Таблица 1.
Определение линейности метода.

№ инъекции	Образец	% от ПДК	Концентрация мкг/мл	Площадь пика (mAU*s)	Время удерживания (мин)
1.1	PCO ГМФ	20.00	0.10	14.56279	6.890
1.2	PCO ГМФ	20.00	0.10	14.46527	6.887
1.3	PCO ГМФ	20.00	0.10	14.57274	6.895
Среднее				14.53360	6.891
S(x) Среднеквадратичное отклонение				0.059	0.004
Sr(x) Относительное среднеквадратичное отклонение %				0.409	0.059
2.1	PCO ГМФ	50.00	0.25	34.73120	6.909
2.2	PCO ГМФ	50.00	0.25	34.71292	6.918
2.3	PCO ГМФ	50.00	0.25	34.77498	6.946
Среднее				34.73970	6.924
S(x) Среднеквадратичное отклонение				0.032	0.019
Sr(x) Относительное среднеквадратичное отклонение %				0.092	0.279
3.1	PCO ГМФ	100.00	0.50	69.17094	6.954
3.2	PCO ГМФ	100.00	0.50	68.99419	6.941
3.3	PCO ГМФ	100.00	0.50	69.30728	6.957
3.4	PCO ГМФ	100.00	0.50	69.15369	6.948
3.5	PCO ГМФ	100.00	0.50	68.91925	6.944
Среднее				69.10907	6.946
S(x) Среднеквадратичное отклонение				0.276	0.007
Sr(x) Относительное среднеквадратичное отклонение %				0.314	0.098
4.1	PCO ГМФ	150.00	0.75	103.53287	6.926
4.2	PCO ГМФ	150.00	0.75	103.66136	6.925
4.3	PCO ГМФ	150.00	0.75	103.54491	6.925
Среднее				103.57971	6.925
S(x) Среднеквадратичное отклонение				0.071	0.001
Sr(x) Относительное среднеквадратичное отклонение %				0.069	0.008
1.1	PCO ГМФ	200.00	1.00	138.81870	6.927
1.2	PCO ГМФ	200.00	1.00	138.81181	6.911
1.3	PCO ГМФ	200.00	1.00	138.91165	6.907
Среднее				138.84739	6.915
S(x) Среднеквадратичное отклонение				0.056	0.011
Sr(x) Относительное среднеквадратичное отклонение %				0.040	0.153

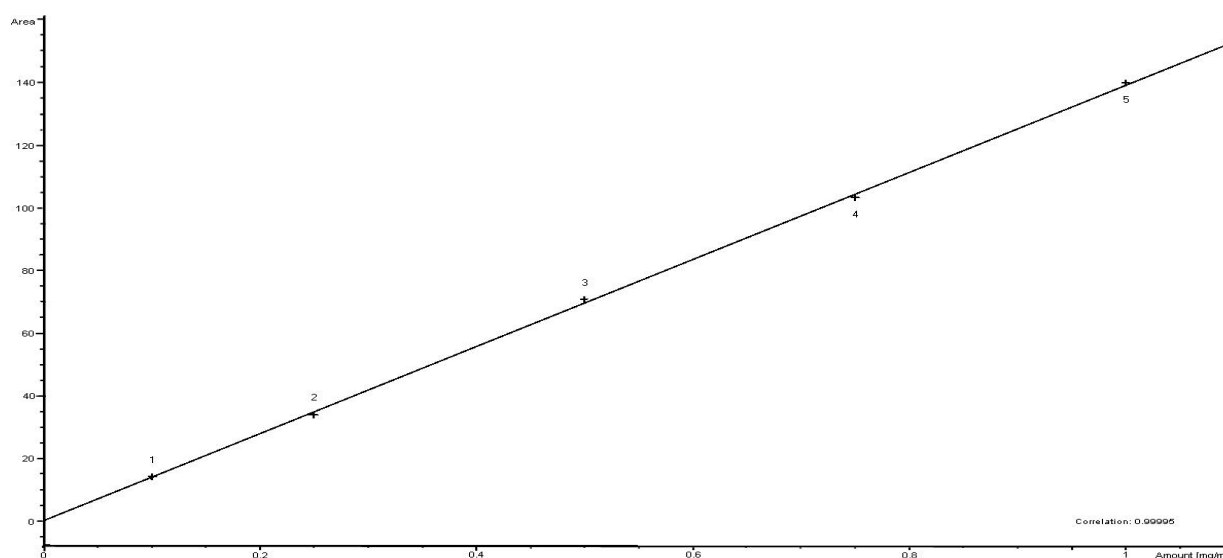


Рис 1. Линейность для концентраций 0,1-1 мкг/мл.
Коэффициент корреляции 0,99995, Sr(x)=1.93%; C= k*S мкг/г, k=7.178*10⁻³

Для оценки воспроизводимости результатов были приготовлены и проанализированы 5 растворов с концентрацией 0,5 мкг/мл. Результаты представлены в таблице 2. Относительное стандартное отклонение площадей пиков 5-ти инъекций из разных виал составило 0,314 % .

Таблица 2.
Воспроизводимость результатов

Образец № пробы	PCO ГМФ	Концентрация пробы мкг/мл	Площадь пика (mAU*s)	Время удержи- вания (мин)
1		0.50	69.17094	6.954
2		0.50	68.99419	6.941
3		0.50	69.30728	6.957
4		0.50	69.15369	6.948
5		0.50	68.91925	6.944
Среднее			69.10907	6.946
S(x) Среднеквадратичное отклонение			0.276	0.007
St(x) Относительное среднеквадратичное отклонение %			0.314	0.098

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Один из возможных механизмов образования 5-ГМФ представлен на рис. 2.

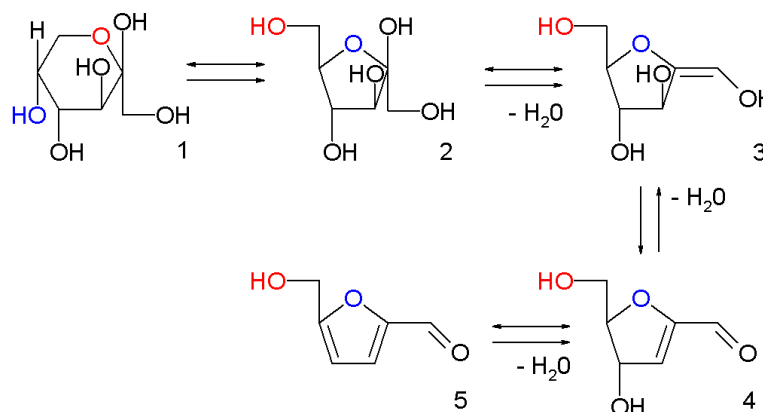


Рис 2. Реакция образования 5-ГМФ из глюкозы [3]

Рассматривая возможные механизмы образования 5-ГМФ (один из которых представлен на рисунке) из ди- и моносахаридов, можно предположить, что наряду с 5-ГМФ могут образовываться 2-фуральдегид, 3-фуральдегид, 2- и 3-фуранкарбоновые кислоты и другие аналогичные соединения.

Описанной выше методикой были проведены анализы четырех видов меда: подсолнечникового, липового, гречишного и каштанового. Типичная хроматограмма подсолнечникового меда представлена на рис. 3.

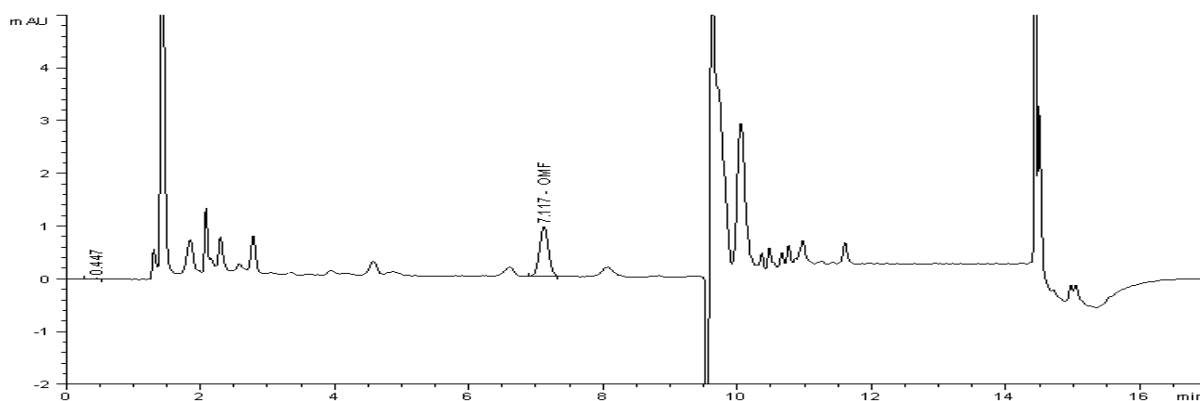


Рис 3. Хроматограмма подсолнечникового меда

Разрешение (R_s) между соседним с ОМФ пиком составляет 1,2 (практически до базовой линии). Расчет проводили по формуле:

$$R_s = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{w_2 + w_1}, \text{ где } t_R - \text{времена выхода пиков, } w - \text{ширина пиков у основания.}$$

УФ- спектры пика 5-ГМФ в начале, конце и максимуме пика идентичны, что свидетельствует о чистоте пика (рис 4).

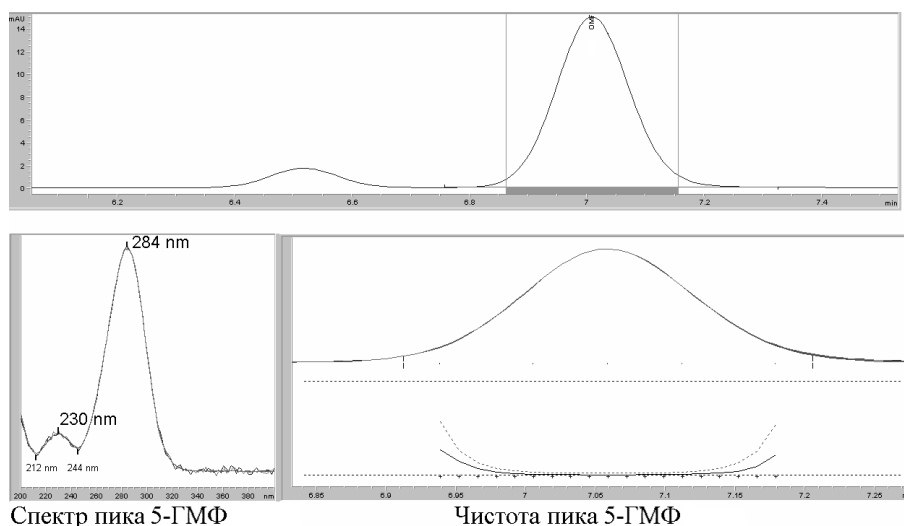


Рис 4. Спектральные характеристики пика 5-ГМФ в образце меда.

Для оценки воспроизводимости результатов были проведены 3 параллельных опыта с растворами одного и того же меда. Результаты представлены в таблице 3. Относительное стандартное отклонение площадей пиков 3-х инъекций из разных виал составило 0,358 % .

Таблица 3.

Результаты анализа трех одинаковых навесок меда.

Образец	ОМФ мг/кг	t_R , МИН
1	3,45	7,01
2	3,64	7,06
3	3,55	7,04
Среднее	3,55	7,04
Sr(x),%	2,68	0,358

Для оценки извлекаемости 5-ГМФ из меда были проведены опыты с добавками по методу «введено/найдено»: к образцам различных медов с известным содержанием ОМФ

(определено по калибровочному графику) были добавлены 1/10, 1/4, 1/2, 1 и 3/2 ПДК. Для каждой добавки готовили по 3 навески исследуемого меда, в каждую из которых вносили добавку непосредственно перед анализом, что обусловлено лабильностью 5-ГМФ в водных растворах меда. Результаты представлены в таблице 4 и на рис. 3 и 5.

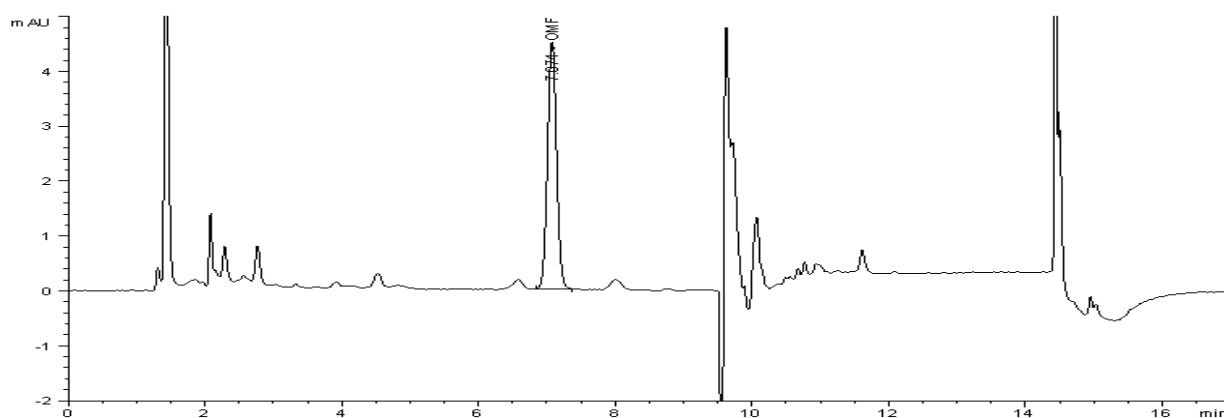


Рис 5. Хроматограмма меда (подсолнечник) с добавкой 0,5 ПДК 5-ГМФ.

Таблица 4.

Сводная таблица результатов анализа извлекаемости 5-ГМФ из растворов различных видов меда.

Гречишный мед. Исходное содержание 5-ГМФ 10,91 мкг/мл		
Добавка, ПДК	% извлечения	Sr(x), %
0,10	101,7	10,61
0,25	98,6	6,9
0,50	100,2	5,9
0,75	97,5	3,5
1,00	98,8	2,35
Липовый мед. Исходное содержание 5-ГМФ 1,07 мкг/мл		
Добавка, ПДК	% извлечения	Sr(x), %
0,10	96,5	4,3
0,25	98,7	1,69
0,50	99,89	0,67
0,75	98,91	1,67
1,00	101,1	2,23

Таблица 4 (продолжение).

Сводная таблица результатов анализа извлекаемости 5-ГМФ из растворов различных видов меда.

Подсолнечниковый мед. Исходное содержание 5-ГМФ 3,14 мкг/мл		
Добавка, ПДК	% извлечения	Sr(x), %
0,10	98,8	2,48
0,25	95,2	1,2
0,50	94,5	1,55
0,75	94,4	1,25
1,00	94,2	0,89
Каштановый мед. Исходное содержание 5-ГМФ 10,49 мкг/мл		
Добавка, ПДК	% извлечения	Sr(x), %
0,10	81,7	9,5
0,25	98,4	6,97
0,50	101,2	1,2
0,75	98,0	0,73
1,00	98,3	1,39

Как видно из результатов, приведенных в таблице 4, метод ВЭЖХ показывает хорошее соответствие между введенным и найденным количеством 5-ГМФ.

Для исследуемых видов меда было проведено сравнение результатов определения содержания 5-ГМФ по разработанной ВЭЖХ - методике и колориметрическим методом по ГОСТ. Результаты исследования представлены в таблице 5.

Таблица 5.

Сравнение содержания 5-ГМФ в различных видах меда по методу ВЭЖХ и химическому методу.

Образец	$C_{хим}$, мг\кг	$C_{ВЭЖХ}$, мг\кг	$\frac{C_{хим}}{C_{ВЭЖХ}}$	$S_{ГМФ}$
Липа	2,8	1,6	1,75	4,37
Подсолнечник	4,6	4,0	1,15	11,12
Каштан	11,5	11,1	1,04	30,96
Гречка	23,2	13,1	1,77	36,69

Как видно из результатов, приведенных в таблице, при колориметрическом определении 5-ГМФ для отдельных сортов меда (липового и гречишного) результаты существенно выше, чем при определении 5-ГМФ методом ВЭЖХ. Можно предположить, что на точность определения влияет присутствие примесей других фурановых производных, которые могут вступать в реакции с барбируровой кислотой и п-толуидином и, тем самым, увеличивать оптическую плотность, а, следовательно, расчетное содержание 5-ГМФ.

Также была изучена стабильность РСО 5-ГМФ и водных растворов меда. Результаты, приведенные на рис. 6, 7, показали, что РСО 5-ГМФ стабилен при комнатной температуре в течение 8 часов (за это время содержание 5-ГМФ снижается на 5% от исходного). Водные растворы меда стабильны не более 60 минут (за это время содержание 5-ГМФ снижается на 10 % от исходного).

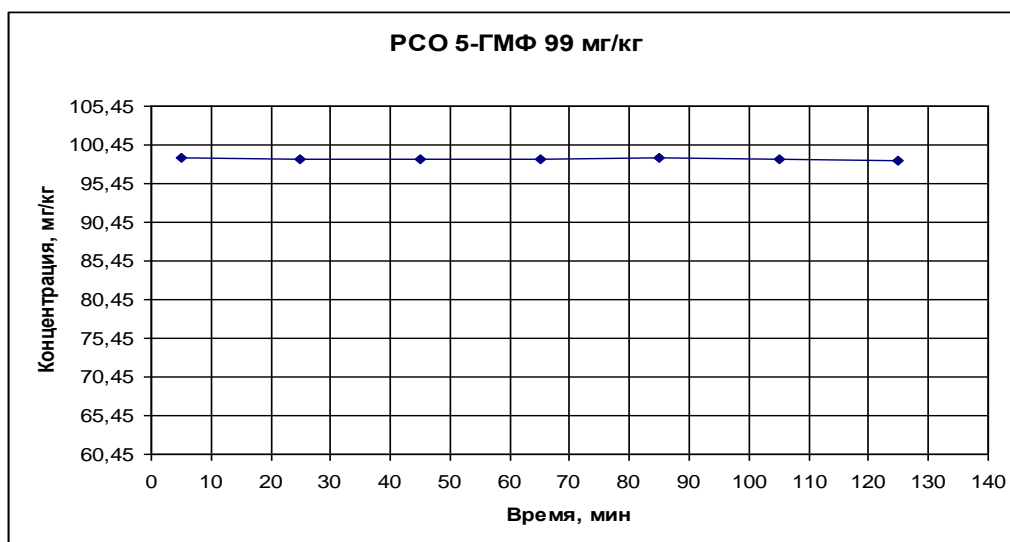


Рис 6. Стабильность РСО 5-ГМФ при комнатной температуре

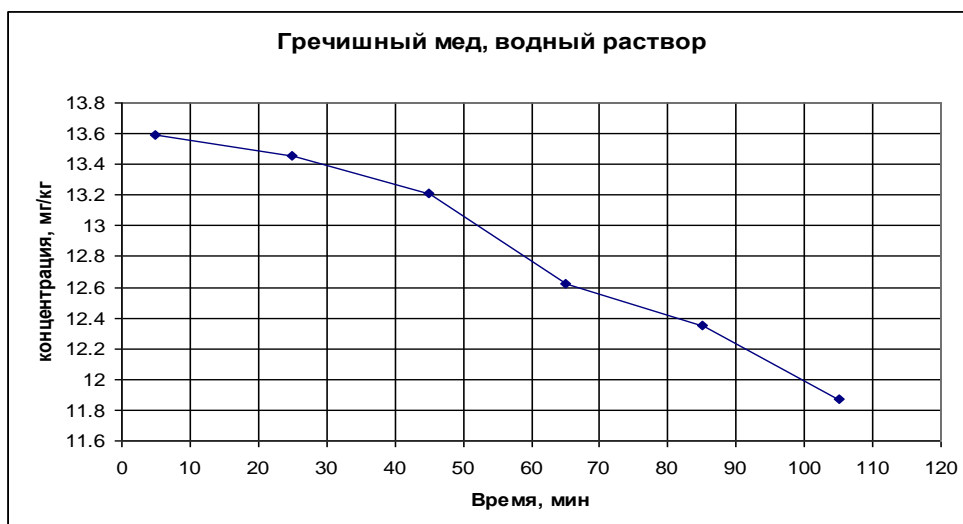


Рис 7. Стабильность водного раствора гречишного меда при комнатной температуре.

Основные характеристики метода

Предел обнаружения метода, мг/кг	0,5
Диапазон определяемых концентраций мг/кг	1,0-100,0
Среднее значение открываемости ГМФ при концентрациях от 12,5 мг/кг до 50 мг/кг, %	94-101
Максимально допустимое расхождение между результатами двух параллельных внутрилабораторных определений (сходимость), при $p=0,95$, %	7

ВЫВОДЫ

Разработана методика определения 5-ГМФ в меде. Она пригодна во всем необходимом диапазоне концентраций и предназначена для анализа меда-сырца и контроля качества меда на всех стадиях промышленной переработки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Crane, E.// A book of honey. Oxford University Press, Oxford, New York, Toronto, Melbourne 1975
2. ГОСТ 19792-2001 Мед натуральный. Технические условия
3. Román-Leshkov, Y., Chheda, J., Dumesic, J.// Science 30 June 2006: Vol. 312. no. 5782, pp. 1933 - 1937 10.1126/science.1126337
4. Bogdanov, S., Lullmann, C., Martin, P., von der Ohe, W., Russmann, H., Vorwohl, G., Persano Oddo, L., Sabatini, A. G., Marcazzan, G. L., Piro, R., Flamini, C., Moriot, M., Lhereiter, J., Bornack, R., Marioleas, P., Tsigouri, A., Kerkvliet, J., Ortiz, A., Ivanov, T., D'Arcy, B., Mossel, B. and Vit, P.//Honey quality, methods of analysis and international regulatory standards: review of the work of the International Honey Commission. Mitt. Lebensm. Hyg. 90, 108-125. 1999
5. EU Council// Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey. Official Journal of the European Communities L10, 47-52 (2002)