

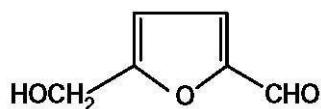
## ĆWICZENIE IV \*

### Oznaczenie 5-hydroksymetylofurfuralu (HMF) w sokach owocowych (i miodzie)

#### 1. WSTĘP

Pod wpływem nadmiernego ogrzewania lub długotrwałego przechowywania żywności zawierającej węglowodany i białka dochodzi do nieenzymatycznego brunatnienia w wyniku zachodzących reakcji Maillarda. Produktami pośrednimi powstającymi w tych reakcjach są związki furfuralowe: furfural, 5-metylofurfural i występujący w największej ilości hydroksymetylofurfural.

Hydroksymetylofurfural (HMF) – 5(hydroksymetylo)-2-furaldehyd, w postaci czystej występuje jako igielki lub płatki o zapachu kwiatów rumianku lub w postaci bezbarwnego syropu, podrażniającego oczy. HMF jest bardzo słabo lotny, rozpuszczalny bardzo dobrze w wodzie, alkoholach, acetonie, octanie metylu i DMF, rozpuszcza się także w eterze i chloroformie.



HMF w wysokich stężeniach jest cytotoksyczny, powoduje podrażnienia oczu, górnych dróg oddechowych, skóry i błon śluzowych. Związek ten jest znany również jako genotoksyczny i rakotwórczy, ale mechanizmy jego toksycznego działania nadal pozostają niejasne. Dawka doustna LD<sub>50</sub> 3,1 g·kg<sup>-1</sup> ciała została ustalona dla szczurów. Dodatkowo badania tych zwierząt wykazały, że 1% HMF w diecie spowodował wzrost komórek rakowych okrężnicy [1]. Jednoznaczne powiązanie HMF z karcynogenezą uzyskano w badaniach myszy i szczurów. W cytozolu wątroby w obecności siarczanów jest on konwertowany do estru kwasu siarkowego (5-sulfooksymetylofurfuralu) o właściwościach mutagennych [2].

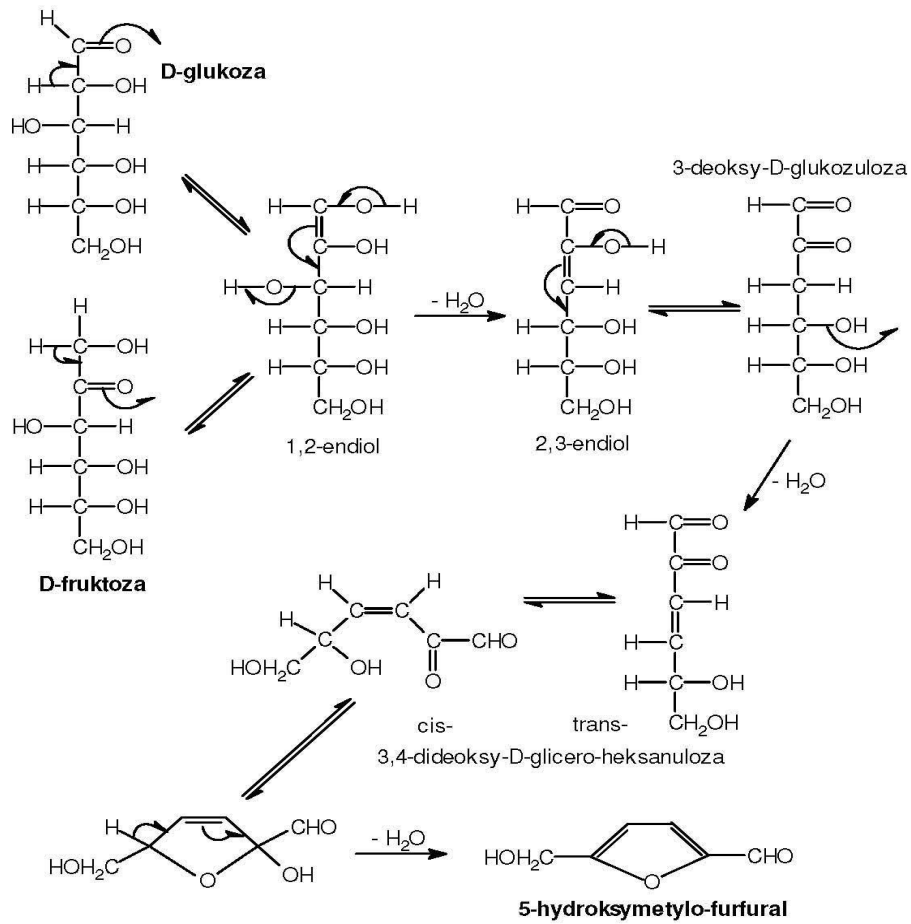
HMF tworzy się z heksoz w trakcie ogrzewania i przechowywania żywności bogatej w cukry, przy czym są znane dwie główne drogi jego powstawania. W pierwszej z nich HMF powstaje w wyniku karmelizacji cukrów w temperaturze ponad 150°C. Karmelizacji najłatwiej ulegają cukry redukujące (glukoza, fruktoza, ksyloza, ryboza), a proces ten jest katalizowany poprzez środowisko kwasowe. Rysunek 9 przedstawia schemat tworzenia HMF podczas karmelizacji.

Druga droga powstawania HMF jest związana z reakcjami nieenzymatycznego brunatnienia, jak potocznie zwane są reakcje Maillarda. Grupa aldehydowa węglowodanu reaguje z grupą aminową aminokwasu lub białka, co w wyniku daje bezbarwne produkty pośrednie, związki Amadori, z których podczas ogrzewania powstaje HMF (rys. 10). W wyniku dalszych reakcji powstaje szereg barwnych związków, pożądaných w technologii żywności wybranych produktów (np. wypieki) lub niepożądanych w pozostałych. Tworzenie produktów reakcji Maillarda obniża bowiem wartość żywnościową produktu poprzez blokowanie lub destrukcję niektórych reszt aminokwasów (lizyna, cysteina, metionina, tryptofan) oraz ograniczenie ich biodostępności.

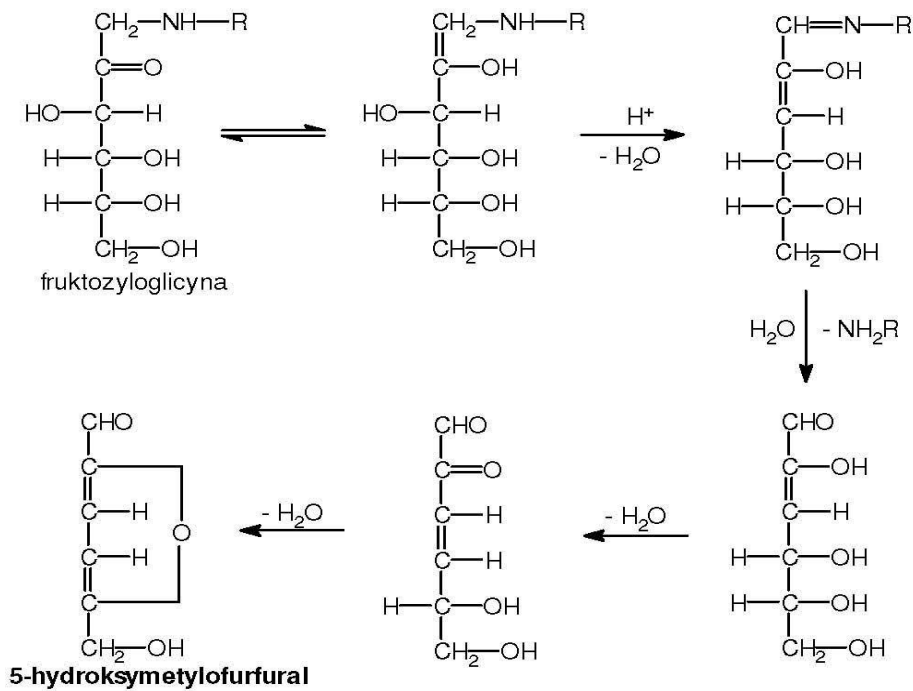
HMF jest wykorzystywany jako związek wskaźnikowy powstawania zmian nieenzymatycznych żywności podczas obróbki technologicznej (ogrzewanie) oraz w trakcie przechowywania. Jego obecność jest wskaźnikiem zachodzącego pierwszego etapu reakcji Maillarda, przed pojawieniem się niekorzystnych z punktu widzenia organoleptycznego i żywieniowego barwnych polimerów. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) rekomenduje maksymalne stężenie HMF w sokach owocowych na poziomie 5-10 mg HMF·dm<sup>-3</sup> w zależności od rodzaju owoców.

W przypadku miodów HMF może służyć także do oceny zafałszowań dodatkiem cukru inwertowanego.

\* Opracowano na podstawie: J. Jabłońska, A. Łącka, T. Jędrzejczyk, M. Słowianek, A. Bartos, I. Majak, K. Wolska, E. Sobiecka, B. Smolińska, J. Leszczyńska. Ćwiczenia laboratoryjne z analityki żywności. Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej. Łódź 2013.



Rys. 9. Schemat powstawania HMF w procesie karmelizacji cukrów



Rys. 10. Schemat powstawania HMF w reakcji Maillarda

Dopuszczalna zawartość hydroksymetylofurfuralu według Polskich Norm została ustalona tylko dla miodu i wynosi 3 mg HMF na 100 g miodu ( $30 \text{ mg HMF} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ miodu}$ ) [3].

## METODY OZNACZANIA HMF

W literaturze opisywane są metody oznaczania 5-hydroksymetylofurfuralu w dwóch postaciach: wolnej i związanej. Forma związana HMF opisywana jest jako potencjalny 5-hydroksyfurfural związany z białkami jako produkt Amadori, a uwalniana zostaje w wyniku ogrzewania z kwasem szczawiowym w temperaturze  $100^\circ\text{C}$  w ciągu 25 minut. Zawartość związanego HMF w próbce wyznacza się jako różnicę pomiędzy ilością wolnego HMF, a ilością całkowitą określoną po hydrolizie kwasem szczawiowym. Najczęściej stosowane są metody spektrofotometryczne (Winklera, TBA). Po przeprowadzeniu reakcji HMF z wybranym związkiem powstaje produkt, którego absorpcja promieniowania (w zakresie światła widzialnego lub UV) jest wprost proporcjonalna do stężenia związku w roztworze. Sam HMF absorbuje promieniowanie jedynie w zakresie UV, jednakże nie stosuje się tej właściwości do oznaczenia spektrofotometrycznego, ze względu na absorpcję w tym zakresie przez wiele innych związków obecnych w próbkach.

### Metoda Winklera (kolorymetryczna) [4]

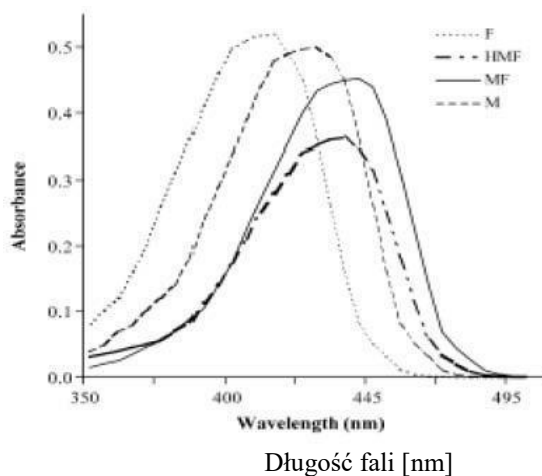
W wyniku reakcji HMF z kwasem barbiturowym i p-toluidyną w środowisku kwaśnym, najczęściej w obecności kwasu octowego, powstaje produkt o barwie czerwonej, którego stężenie jest oznaczane kolorymetrycznie przy długości fali 550 nm. Metoda jest mało selektywna, obok HMF reagują także inne pochodne furfuralu.

### Metoda TBA (kolorymetryczna) [5]

HMF reaguje z kwasem tiobarbiturowym (TBA) w środowisku kwaśnym; powstaje barwny produkt o maksimum absorpcji 443 nm, którego ilość wyznacza się kolorymetrycznie. Metoda ta nadal jest szeroko stosowana w analizie produktów mlecznych, mimo wielu wad. Do najważniejszych zaliczyć można brak specyficzności (zamiast HMF oznacza się związki furfurowe) oraz ograniczoną stabilność barwnego kompleksu w czasie analizy.

### Metoda spektrofotometrii pochodnych [6]

W metodzie tej wykorzystuje się jedną z powyższych metod kolorymetrycznych do uzyskania barwnej pochodnej. Zamiast pomiaru absorpcji przy jednej długości fali mierzy się absorbancję w szerszym zakresie, np. z TBA jest to zakres 300-550 nm.

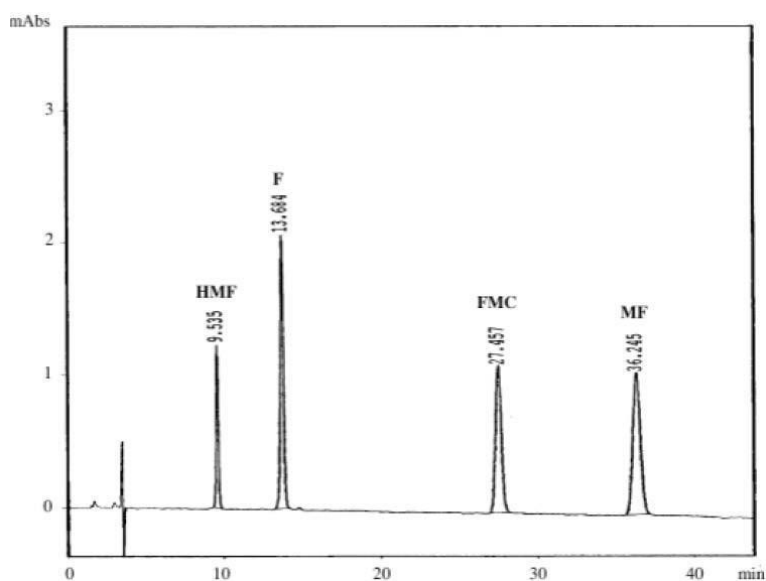


Rys. 11. Widma absorpcji produktów reakcji z TBA z furfurałem (F), 5-hydroksymetylo-furfurałem (HMF), metylofurfurałem (MF) i mieszaniną powyższych związków (M) [6]

Na podstawie widm roztworów wzorcowych i ich pierwszych pochodnych wyznacza się długości fal, dla których pochodna absorbancji jest proporcjonalna do zawartości poszczególnych składników obecnych w mieszaninie, a następnie matematycznie oznacza się zawartość poszczególnych związków z widm absorpcji próbki badanej.

#### Metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) [7]

Metoda HPLC jest metodą pozwalającą na oznaczenie HMF w obecności innych związków furfuralowych. Najczęściej stosowana jest metoda w układzie odwróconych faz (RP) na kolumnie z grupami funkcyjnymi C<sub>18</sub> w układzie stałego przepływu fazy ruchomej (metanol-woda lub acetonitryl-woda) przy spektrofotometrycznej detekcji przy długości fali 283 nm.

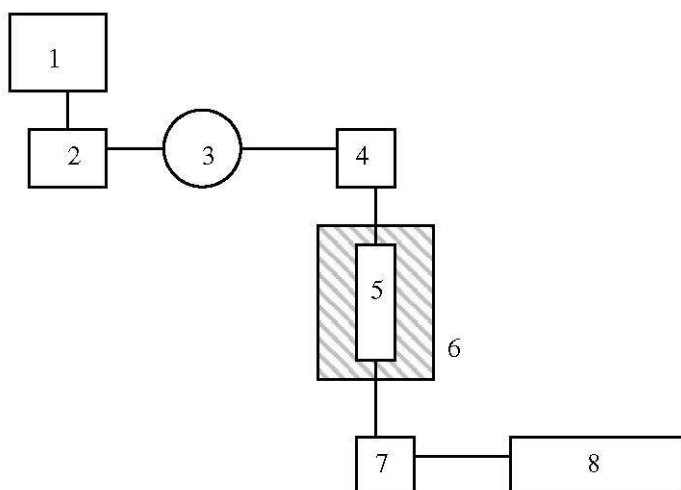


Rys. 12. Chromatogram mieszaniny standardów: 5-hydroksymetylofurfural (HMF), furfural (F), furylometyloketon (FMC) i metylofurfural (MF) [8]

Oprócz wymienionych metod zostały także opisane do oznaczania HMF inne metody: spektrofotometryczna metoda White'a (wykorzystująca rozkład grupy chromoforowej HMF przy użyciu 0,1% NaHSO<sub>4</sub>) [9], metoda analizy wstrzykowej (oparta o metodę Winklera) [10] oraz elektroforeza kapilarna [11], ale metody te nie znalazły szerokiego zastosowania.

#### WYSOKOSPRAWNA CHROMATOGRAFIA CIECZOWA (HPLC)

Metody chromatograficzne są metodami rozdzielania mieszanin, w których rozdzielane składniki ulegają podziałowi pomiędzy dwie niemieszające się fazy: fazą nieruchomą (stacjonarną) oraz fazą ruchomą. W metodzie wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (ang. *high pressure liquid chromatography* – HPLC), zwanej także wysokosprawną chromatografią cieczową (ang. *High performance liquid chromatography*) fazą nieruchomą stanowi wypełnienie kolumny chromatograficznej, a fazą ruchomą ciecz wprowadzana do kolumny pod wysokim ciśnieniem (50-100 MPa) ze stałą szybkością przepływu. Wypełnieniem kolumny są najczęściej porowate ziarna krzemionkowe o małej średnicy (3-10 μm) z chemicznie przyłączonymi związkami chemicznymi, decydującymi o rozdziale składników mieszanin. Ze względu na różnice polarności grup funkcyjnych fazy stacjonarnej rozróżnia się chromatografię: w układzie faz normalnych (NP), gdy faza stacjonarna jest bardziej polarna niż faza ruchoma oraz w układzie faz odwróconych (RP), gdy faza stacjonarna posiada jako grupy funkcyjne niepolarne grupy alkilowe, a faza ruchoma jest polarna (np. woda).



Rys. 13. Schemat chromatografu cieczonego: 1 – zbiornik fazy ruchomej, 2 – pompa, 3 – manometr, 4 – dozownik próbek, 5 – kolumna, 6 – termostat, 7 – detektor, 8 – rejestrator

Składniki mieszaniny po rozdzieleniu na kolumnie i po jej opuszczeniu są wykrywane przez detektor, który może być detektorem spektrofotometrycznym, elektrochemicznym i in. Efekt rozdziału chromatograficznego zapisywany jako zależność sygnału z detektora w funkcji czasu lub objętości fazy ruchomej nosi nazwę chromatogramu i jest podstawą analizy jakościowej i ilościowej analizowanej mieszaniny. Czas liczony od momentu wprowadzenia próbki do kolumny do pojawienia się na chromatogramie maksimum pików, to znaczy maksymalnego stężenia składnika próbki, nazywa się czasem retencji. Uzyskane czasy retencji substancji po porównaniu z czasami retencji analizowanych roztworów wzorcowych pozwalają na identyfikację związków chemicznych, natomiast powierzchnie otrzymanych na chromatogramach pików są proporcjonalne do ilości wprowadzonej do kolumny substancji.

## 2. CZĘŚĆ EKSPERYMENCYJNA

Ćwiczenie polega na oznaczaniu HMF w sokach owocowych. Oznaczenia wykonuje się metodą RP HPLC z detektorem spektrofotometrycznym.

### 2.1. APARATURA

Właściwe pomiary wykonuje się za pomocą zestawu do wysokociśnieniowej chromatografii cieczonej firmy Perkin Elmer (USA). Zestaw składa się z dwuskładnikowej pompy gradientowej, kolumny Supelcosil LC-18-DB (250 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m) firmy SUPELCO, detektora UV/VIS oraz programu komputerowego służącego do zbierania i przetwarzania uzyskiwanych danych eksperymentalnych.

### 2.2. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

Do wykonania ćwiczenia będą wykorzystane następujące odczynniki i roztwory:

- woda destylowana,
- metanol do chromatografii,
- roztwór HMF o stężeniu 10  $\mu$ g/10 ml (wzorzec),
- roztwór Carreza I (15% wodny roztwór heksacyjanożelazianu(II) potasu),
- roztwór Carreza II (30% wodny roztwór siarczanu(VI) cynku).

Materiałem do analizy będą przyniesione przez analizującego © dwa ulubione soki owocowe oraz miód (po ok. 20 ml/2g).

### 2.3. PRZYGOTOWANIE PRÓB DO OZNACZEŃ

Próbkę miodu (ok. 2 g) odważyć i rozpuścić w 20 cm<sup>3</sup> wody. Odmierzyć po 10 cm<sup>3</sup> soku, roztworu miodu i przenieść do odpowiednio oznaczonych probówek typu Falcon 50 ml, dodać po po 1 cm<sup>3</sup> roztworów Carrez I i Carrez II, 2,5 cm<sup>3</sup> metanolu i uzupełnić wodą destylowaną do objętości 25 cm<sup>3</sup>. Po dokładnym wymieszaniu i odczekaniu ok. 5 min, roztwory wirujemy przez 10 min przy 10000xg i przenosimy po 1 ml klarownego nadsącza do odpowiednio oznaczonych probówek Eppendorfa 1,5 cm<sup>3</sup>. Równolegle, w identyczny sposób przygotowujemy do analizy dwie próbki wzorcowe HMF. Dodajemy odpowiednio 10 (stężenie wyższe) i 1 ml (stężenie niższe) roztworu wzorcowego HMF o stężeniu 10 µg/10 ml (plus 9 ml wody do stężenia niższego).

## 3. WYKONANIE OZNACZENIA

### 3.1. ROZDZIAŁ CHROMATOGRAFICZNY Z POMIAREM SPEKTROFOTOMETRYCZNYM

Fazę ruchomą stanowi mieszanina wody i metanolu w proporcji 90:10 (v/v) przy szybkości przepływu 1 ml/min wg. metody HMF\_LC.MTH (z katalogu C:\TC4\GC\Metody\). Ustalić przepływ fazy ruchomej w chromatografii (patrz osobna instrukcja). Ustawić długość fali detektora spektrofotometrycznego na 283 nm.

Kolejne próbki, począwszy od fiolek zawierających roztwory wzorcowe HMF nastrzykiwać do aparatu w ilości 50 µl. Analizowane próbki oznaczamy w programie do rejestracji danych jako ZYNM, gdzie: Y – to nr grupy; N – nr zespołu (1, 2, 3 lub 4) a M - to nr próby (1, 2, 3, 4 lub 5 – jak w załączonej kontrolce). Pliki chromatogramów zapisujemy w katalogu C:\TC4\HPLC\Dane\Kurs6 lub ...\Kurs2). Czas pojedynczej analizy wynosi 10 min. Kolejną próbkę do analizy można aplikować dopiero po upływie kolejnych 5 minutach. Jest to czas potrzebny na zrównoważenie kolumny (ang. *equilibration time*).

### 3.2. ANALIZA WYNIKÓW

Czas retencji HMF ustalamy na podstawie wzorca. Na podstawie powierzchni uzyskanych pików z analizy roztworów wzorcowych (patrz instrukcja dodatkowa) wykreślić krzywą kalibracyjną  $A = f(c)$ , gdzie A – powierzchnia pików, c – stężenie HMF wyrażone jako mg HMF na 10 cm<sup>3</sup> soku. Uzyskany wynik przeliczyć na 1 dm<sup>3</sup> soku i porównać z wartościami zalecanymi zawartości 5-hydroksymetylofurfuralu w sokach owocowych. Wypełnić załączoną kontrolkę i oddać prowadzącemu.

#### Pytania kontrolne

1. W jakich warunkach tworzy się HMF w żywności?
2. Dlaczego HMF jest wykorzystywany jako związek wskaźnikowy w żywności?
3. Biologiczne działanie HMF na organizm ludzki.
4. Na czym polega różnica oznaczania HMF metodą spektrofotometryczną a metodą HPLC z detekcją spektrofotometryczną?

#### Literatura

- [1] Zhang X.M. et al.: *Carcinogenesis*, 14, 773, 1993.
- [2] Surh Y.J. et al.: *Carcinogenesis*, 15, 15510, 1994.
- [3] PN – 88/A – 77626, Miód pszczeli.
- [4] Winkler J.: *Z. Lebensmitt. Untersuch.*, 102, 161, 1955.
- [5] Keeney M., Bassette R.: *J. Dairy Sci.*, 43, 945, 1959.
- [6] Rocha S.M., Coimbra M.A., Delgadillo I.: *Carbohydr. Polym.*, 56, 287, 2004.
- [7] Albala-Hurtado S. et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2128, 1997.
- [8] Ferrer E. et al.: *J. Chromatogr. A*, 947, 85, 2002.
- [9] White J.: *J. Assoc. Anal. Chem.*, 62, 509, 1979.
- [10] Salinas F. et al.: *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 340, 250, 1991.
- [11] Morales F.J., Jimenez-Perez S.: *Food Chem.*, 72, 525, 2001.

## Ćwiczenie IV.

Data:

Godzina:

Imiona i Nazwiska		Grupa	
1.			
2.			
3.			
	Opis	Powierzchnia piku HMF	Stężenie HMF
1. Wzorzec 1	-		1 µg/10ml
2. Wzorzec 2	-		10 µg/10ml
3. Próbką 1			
4. Próbką 2			
5. Próbką 3			
Wnioski:			