

*Ewa Majewska, Jolanta Kowalska, Justyna Skiba*

## PORÓWNANIE METOD OZNACZANIA HYDROKSYMETYLOFURFURALU W MIODACH PSZCZELICH

Zakład Oceny Jakości Żywności Katedry Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności  
Wydziału Nauk o Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
Kierownik: prof. dr hab. *M. Obiedziński*

*Celem niniejszej pracy było porównanie trzech metod oznaczania hydroksymetylofurfuralu (HMF) w miodach pszczelich. Obecność tego związku jest jednym ze wskaźników jakości miodu. Za materiał badawczy posłużyły próbki pięciu miodów: akacyjowego, wielokwiatowego, lipowego, spadziowego i gryczanego. Przeprowadzone badania obejmowały oznaczenie zawartości HMF metodą Winklera, metodą White'a i metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Wyniki uzyskane metodą White'a były najniższe, jednak dla zawartości poniżej 5 mg/kg były one porównywalne z metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.*

Hasła kluczowe: miód, hydroksymetylofurfural (HMF), metody analityczne.  
Key words: honey, hydroxymethylfurfural (HMF), analytical methods.

Naturalnym składnikiem miodu jest heterocykliczny aldehyd – hydroksymetylofurfural (HMF), który powstaje przez odszczepienie cząsteczki wody najczęściej z fruktozy, zaś z glukozy – po przekształceniu cukru w postać enolową. Obecność HMF wpływa na właściwości organoleptyczne produktów oraz na wartość odżywczą, ponieważ tworzy bezpośrednie połączenia z aminokwasami (1). Jego zawartość świadczy o jakości miodu, ponieważ ilość tego związku wzrasta w miarę jego przechowywania, a także pod wpływem nadmiernego ogrzewania podczas nieprawidłowo prowadzonej dekrystalizacji. Podwyższoną zawartością tego związku charakteryzują się również miody zafałszowane cukrem inwertowym otrzymanym w wyniku kwasowej hydrolizy sacharozy. HMF jest podejrzewany o negatywne działanie na organizm człowieka, dlatego jego zawartość w miodzie jest istotna z punktu bezpieczeństwa żywności. Unia Europejska podjęła odpowiednie działania ustalając limity zawartości tego związku w miodzie. Ponadto naukowcy opracowali różnorodne metody jego oznaczania. Międzynarodowa Komisja ds. Miodu (2) zaleciła trzy metody badania jego zawartości. Tymczasem w Rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi (3) określono stosowanie w tym celu tylko jednej konkretnej metody. Dlatego też w niniejszej pracy podjęto

próbę porównania trzech metod oznaczania hydroksymetylofurfuralu w miodach pszczelich.

## MATERIAŁ I METODY

Za materiał badawczy posłużyły próbki pięciu miodów zakupionych w warszawskich sklepach detalicznych. Były to: miód akacjowy (A), miód wielokwiatowy (W), miód lipowy (L), miód spadziowy (S) i miód gryczany (G). Przeprowadzone analizy obejmowały oznaczenia HMF trzema metodami. Były to metody: wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), spektrofotometryczne *Winklera* oraz *White'a*.

### Oznaczanie zawartości hydroksymetylofurfuralu metodą HPLC z detektorem UV (2)

Do oznaczeń zastosowano wysokosprawny chromatograf cieczowy firmy Shimadzu stosując detektor UV. Rozdział prowadzono w kolumnie typu RP-18 (250x4 mm i średnicy ziaren 5 µm). Detekcji dokonywano przy długości fali 285 nm. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina: woda (1% kwasu octowego): metanol (90:10 v/v). Stosowano przepływ fazy ruchomej 1 ml/min. Ilość próbki nanoszona na kolumnę: 20 µl. Roztwór przed naniesieniem na kolumnę chromatograficzną filtrowano przez filtr o średnicy 0,45 µm. Zawartość HMF w roztworze próbki obliczano poprzez porównanie odpowiednich powierzchni pików dla roztworu próbki oraz roztworu wzorcowego, po uwzględnieniu rozcieńczenia. Wyniki wyrażano w mg/kg miodu.

### Oznaczenie zawartości hydroksymetylofurfuralu metodą *Winklera* (2)

Metoda *Winklera* opiera się na barwnej reakcji HMF zawartego w badanej próbce z kwasem barbiturowym i p-toluidyną oraz fotometrycznym pomiarze powstałego zabarwienia przy długość fali 550 nm. Zawartość HMF (mg/kg miodu) oblicza się według następującego wzoru:

$$\text{HMF} = 19,2 \times \frac{A}{d} \times 10$$

gdzie: A – średnia arytmetyczna odczytanej absorbancji

d – grubość płynu w kuwecie (w cm)

19,2 – współczynnik przeliczeniowy.

### Oznaczanie zawartości hydroksymetylofurfuralu metodą *White'a* (2)

Zasada metody *White'a* polega na pomiarze absorbancji klarownych roztworów miodu z i bez dodatku wodorosiarczanu (IV) sodu. Fotometryczne oznaczenie HMF

wykonuje się przy długości fali 284 nm i 336 nm. Zawartość HMF [mg/kg] oblicza się według wzoru:

$$\text{HMF} = (A_{284} - A_{336}) \times 14,97 \times 5 \times \frac{R}{W}$$

gdzie:

$A_{284}$  i  $A_{336}$  – odczytane wielkości absorpcji

5 – teoretyczna naważka miodu (g)

14,97 – wartość stała

R – współczynnik rozcieńczenia

W – rzeczywista naważka miodu

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

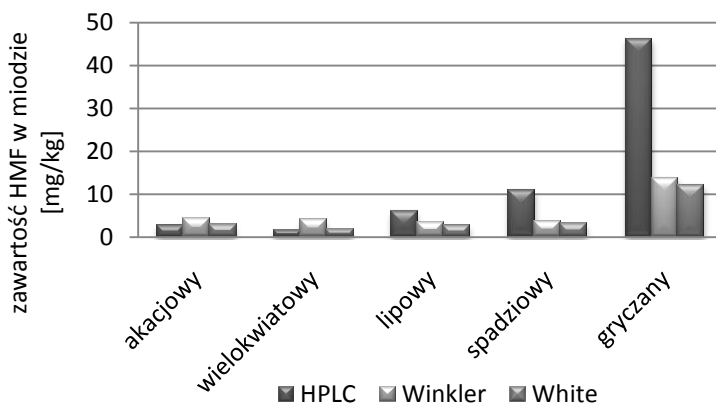
Przedmiotem badań niniejszej pracy było porównanie metod oznaczania hydroksymetylofurfuralu w naturalnych miodach pszczelich. Uzyskane wyniki zostały omówione w oparciu o dane literaturowe na ten temat, a także przy uwzględnieniu aktów prawnych związanych z miodem, które obowiązują w prawie polskim (4), europejskim (5) i międzynarodowym (6). Wymagania zawarte w tych aktach dotyczące zawartości HMF w miodach pszczelich określają dopuszczalną zawartość tego związku na poziomie 40 mg/kg.

Wyniki zawartości hydroksymetylofurfuralu dla poszczególnych miodów otrzymane za pomocą trzech metod różnią się między sobą (ryc. 1). W przypadku miodu akacjowego i wielokwiatowego zawartości oznaczone za pomocą HPLC i metody *White'a* są do siebie zbliżone, natomiast wynik dla metody *Winklera* jest dla tych miodów wyższy. Międzynarodowa Komisja ds. Miodu (2) ustaliła, że dla niskich zawartości HMF (ok. 5 mg/kg) wyniki otrzymane metodą *White'a* i HPLC są porównywalne, ale niższe od tych uzyskanych metodą z p-toluidyną.

Dla miodu lipowego, spadziowego i gryczanego zawartość HMF oznaczona metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej jest wyższa od dwóch metod spektrofotometrycznych (zdecydowanie w przypadku miodu gryczanego). Ilość hydroksymetylofurfuralu oznaczona metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej była znacznie wyższa niż oznaczona metodami *Winklera* i *White'a* dla miodu spadziowego i gryczanego.

Porównaniem metod oznaczania HMF w miodzie zajmowali się także *Zappalá* i współpr. (7). Dla miodów akacjowych otrzymali oni następujące wyniki 16,2 mg/kg i 8,4 mg/kg (HPLC), 18,4 mg/kg i 9,1 mg/kg (*White*), 17,5 mg/kg i 11,9 mg/kg (*Winkler*). Autorzy tych badań podkreślili, że nie jest możliwe dokładne wyjaśnienie dlaczego metody nie są zgodne. Sugerowali, iż mogło to być spowodowane tworzeniem się prekursorów hydroksymetylofurfuralu. Zwrócili również uwagę na przeszacowanie poziomu HMF metodą *Winklera*, gdy zawartość ta oznaczona metodami *White'a* i HPLC była prawie jednakowa. *Zappalá* i współpr. (7) potwierdzili sugestię Międzynarodowej Komisji ds. Miodu, aby nie stosować metody *Winklera* do oznaczania hydroksymetylofurfuralu w miodzie, ze

względu na użycie karcenogennego odczynnika – p-toluidyny, a także niską precyzją tej metody.



Ryc. 1. Zawartość HMF w badanych miodach.

Fig. 1. HMF content in investigated honeys.

*Anklam* (8) twierdzi, że przydatność metod oznaczania HMF jest niesatysfakcjonująca i wymaga dalszych poszukiwań. Inni autorzy rekomendują metodę HPLC, ze względu na możliwość równoczesnego oznaczenia innych związków (9). Metody spektrofotometryczne – *White'a* i *Winklera* są szybkie, ale mają niską specyficzną i czułość. Wysokosprawna chromatografia cieczowa w układzie odwróconych faz jest bardziej dokładna i precyzyjna od tych dwóch metod, jednakże jest czasochłonna. W dodatku zastosowanie jej dla oszacowania HMF w niektórych miodach wskazuje występowanie specyficznych i dużych odchyłeń (8, 10).

## WNIOSKI

Analizując uzyskane wyniki przeprowadzonych badań można sformułować następujące stwierdzenia i wnioski:

1. Metoda *White'a* oznaczania HMF w miodzie pszczelim dawała najniższe wyniki, jednak dla zawartości poniżej 5 mg/kg były one porównywalne z metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

2. Metoda HPLC jest najdokładniejsza, gdyż eliminuje wpływ substancji interferujących, jak to ma miejsce przy zastosowaniu metod spektrofotometrycznych.

E. Majewska, J. Kowalska, J. Skiba

## COMPARISON OF METHODS OF HYDROXYMETHYLFURFURAL DETERMINATION IN HONEYS

### Summary

The aim of the thesis presented was to compare the methods of hydroxymethylfurfural determination in honey. Presence of this compound in honey determines its quality. Five samples of different types of honey were used as research material: acacia, multi-floral, linden, honeydew and buckwheat. Research included the determination of water content, HMF content checked with the Winkler method, the White method and high-performance liquid chromatography (HPLC). The outcome of White's method was the lowest, but for content below 5 mg/kg it was comparable with the HPLC method. In some cases it was possible to overestimate the level of HMF while using the Winkler's method. The HPLC method seems to be the most accurate; however this cannot be unambiguously stated.

### PIŚMIENNICTWO

1. *Nollet L. M. L.*: Handbook of food analysis. Second Edition, Revised and Expanded. Methods and Instruments in Applied Food Analysis. Vol 3, 2004, Mercel Dekker, Inc. New York.- 2. IHC, 2002: Harmonised methods of the International Honey Commission.- 3. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14 stycznia 2009 r. w sprawie metod analiz związanych z dokonywaniem oceny miodu. - 4. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 3 października 2003 r. w sprawie szczegółowych wymagań w zakresie jakości handlowej miodu, Dz. U. 2003.181.1773 ze zmianami. - 5. Dyrektywa 2001/110/WE z dnia 20 grudnia 2001 r. odnosząca się do miodu. - 6. Codex Stan 12-1981: Codex Standard for Honey. 7. *Zappalá M., Fallico B., Arena E., Verzera A.*: Methods for determination of HMF in honey: a comparison. Food Control, 2005, 16, 273 – 277. - 8. *Anklam E.*: A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. Food Chem., 1998; 63: 549 – 562. - 9. *Nozal M. J., Bernal J. L., Toribio L., Jiménez J. J., Martín M. T.*: High performance liquid chromatographic determination of methyl anthranilate, hydroxymethylfurfural and related compounds in honey. J. Chrom., 2001; 917: 95 – 103. - 10. *Spano N., Ciulu M., Floris I., Panzanelii A., Pilo M.I., Piu P.C., Salis S., Samma G.*: A direct RP-HPLC method for the determination of furanic aldehydes and acids in honey. Talanta, 2009, 78, 310 – 314.

Adres: 02-776 Warszawa, ul. Nowoursynowska 159c.