

STANOVENÍ 5-HYDROXYMETHYLFURFURALU, GLUKÓZY A FRUKTÓZY V MEDOVINÁCH

Aneta Farková, Soňa Řezková, Martin Adam, Josef Královský

Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice,

Nám. Čs. legií 565, 532 10 Pardubice

E-mail: faranet@seznam.cz

Úvod

Tato práce se zabývá optimalizací podmínek a stanovením 5-hydroxymethylfurfuralu (HMF), glukózy a fruktózy v medovinách pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Byly zkoumány také závislosti obsahu HMF na teplotě a délce zahřívání.

5-hydroxymethylfurfural je cyklický aldehyd vyskytující se v potravinách, které obsahují sacharidy. HMF a jeho deriváty (5-chlormethylfurfural a 5-sulfoxymethylfurfural) jsou cytotoxické, genotoxické, mutagenní a jsou podezřelé z karcinogenity (rakovina tlustého střeva, jater a kůže). Dále způsobuje podráždění očí, horních cest dýchacích, kůže a sliznic.^{1, 2, 3}

V čerstvých potravinách se 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 (zejména Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , Fe^{2+} a Fe^{3+}). Některé organické kyseliny vykazují katalytický efekt na hromadění HMF, protože mají destruktivní vliv na sacharidy.^{1, 2, 3, 4}

Medovina je alkoholický nápoj vyráběný kvašením medu ve vodě za pomoci vinných kvasinek. Do směsi medu a vody se může přidávat chmel, koření, byliny a ovocné šťávy. Obsah alkoholu se pohybuje kolem 15 %. Podle způsobu výroby se rozlišují dva typy medovin: vařené a nevařené. Vařené se vyrábí vařením medu s vodou a přísadami. Varem se vysráží bílkoviny, které v podobě pěny odstraníme. Tyto bílkoviny by se v případě problémového kvašení mohly začít kazit a tím medovinu znehodnotit. Během varu dojde ke zničení mikroorganismů a kvašení musí být iniciováno čistou kvasinkovou kulturou. Nevařené medoviny se získávají smícháním panenského medu s vodou za chladu. Tento způsob využívá vysoce kvalitní druhy medů, jejichž chuť a vůně by se zahříváním roztoku odstranila.^{5, 6}

Experimentální část

HMF v medovinách byl analyzován pomocí kapalinového chromatografu HP 1090M (Hewlett-Packard, Avondale, PA, USA) s diode array detektorem (DAD). Na separaci byla použita kolona LiChrospher[®] 60 RP-select B, 5 μm , 4 mm \times 250 mm (Merck, Darmstadt, Německo) s předkolumnou LiChrospher[®] 100 RP-18e, 5 μm (Merck, Darmstadt, Německo).

Glukóza a fruktóza byly analyzovány na kapalinovém chromatografu ve složení HPLC pumpa Spektra-Physics SP 8800 (Spectra-Physic, San Jose, CA, USA), degasser Shodex Pegas KT-35M (Showa Denko KK, Tokyo, Japonsko) a evaporative light scattering detektor (ELSD) Chromachem[®] 6100 (ESA Inc., Chelmsford, MA, USA). Sacharidy byly separovány na koloně Purospher[®] Star NH₂ (4 mm \times 250 mm, Merck, Darmstadt, Německo) s předkolumnou Purospher[®] Star NH₂, 5 μm (Merck, Darmstadt, Německo). Kolona byla temperována na teplotu 35 °C pomocí kolonového termostatu LCO 101 (ECOM, Praha, ČR).

Mobilní fáze byly filtrovány přes membránový filtr (0,45 μm , 47 mm, Merck, Darmstadt, Německo) a odvzdušněny v ultrazvukové lázni SONOREX RK 52 H (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Německo).

Na přípravu kalibračních řad byly použity standardy HMF 95 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), D(+)-glukóza monohydrát pro biochemii (Merck, Darmstadt, Německo), D(-)-fruktóza 99 % (Merck, Darmstadt, Německo). Kalibrační řady byly připraveny v rozsahu 0,5 – 50 mg.l⁻¹ HMF, 0,5 – 10 g.l⁻¹ glukózy a 0,3 – 6 g.l⁻¹ fruktózy. Strukturální vzorce analyzovaných látek jsou na obr. 1-3.

Vzorky medovin byly před chromatografickým stanovením filtrovány přes membránový filtr (PTEE, 0,45 μm , 13 mm, Merck, Darmstadt, Německo). Pro stanovení HMF i sacharidů byly vzorky podle potřeby zředěny, aby koncentrace látek odpovídaly rozsahu kalibrační řady.

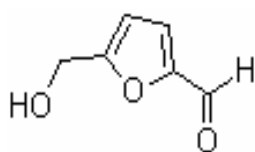
Podmínky separace jsou uvedeny v tabulce I pro HMF a v tabulce II pro separaci glukózy a fruktózy.

Tabulka I: Optimální podmínky pro stanovení HMF

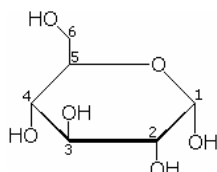
mobilní fáze	methanol-voda (10:90)
eluce	isokratická
průtok MF	1 ml/min
analyzované objemy	10 μl
detekce	UV ($\lambda = 285 \text{ nm}$)

Tabulka II: Optimální podmínky ke stanovení glukózy a fruktózy

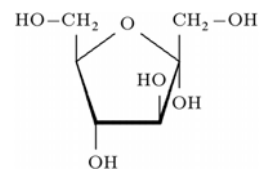
mobilní fáze	acetonitril-voda (80:20)
eluce	isokratická
průtok MF	0,7 ml/min
analyzované objemy	10 μ l
vyhřívání kolony	35 °C
teplota nebulizace	30 °C
teplota evaporace	45 °C
tlak dusíku na vstupu	0,18 MPa



Obr. 1: 5-hydroxymethylfurfural



Obr. 2: α -D-glukopyranóza



Obr. 3: α -D-fruktofuranóza

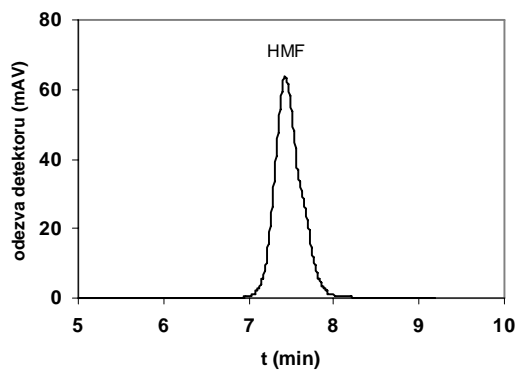
Výsledky a diskuse

Pro stanovení HMF v medovinách nejsou stanoveny normy, proto jsme vycházeli z metod pro stanovení HMF v medu doporučených The International Honey Commission.

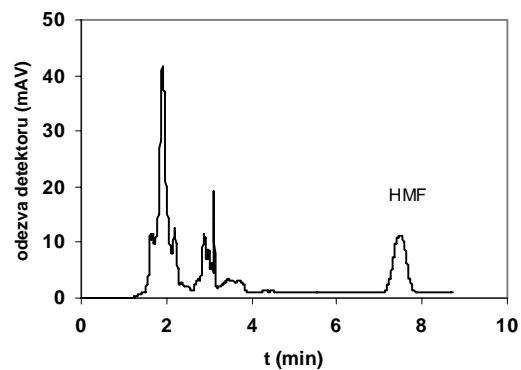
Vhodné chromatografické podmínky pro stanovení HMF byly zvoleny po proměření standardu HMF za různých podmínek. Byla zkoušena isokratická i gradientová eluce s různými mobilními fázemi o různých průtocích.^{2, 7, 8} Vybraná mobilní fáze měla dostatečnou dělicí schopnost HMF a přijatelný retenční čas této látky. Absorpční maximum HMF bylo zjištěno UV spektrometrií a na základě spekter byla vybrána vlnová délka. Zvolené podmínky jsou uvedeny v tabulce I.

Při optimalizaci chromatografické separace glukózy a fruktózy se vycházelo z postupu⁹ uvedeného výrobcem detektoru (firma ESA Inc). Byly zkoušeny různé teploty ohřevů kolony a různé mobilní fáze a průtoky. Podmínky doporučené výrobcem detektoru ELS byly upraveny pro analyzované vzorky medovin. Vybrané podmínky jsou uvedeny v tabulce II.

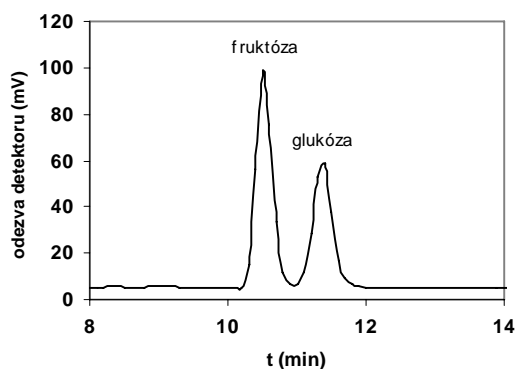
Na obr. 4 a 6 jsou chromatogramy standardů, na obr. 5 a 7 chromatografické záznamy vzorku medoviny. Obsah jednotlivých látek v medovinách byl stanoven metodou kalibrační přímky. Rovnice lineární regrese jsou včetně příslušných detekčních limitů a mezí stanovitelnosti uvedeny v tabulce III.



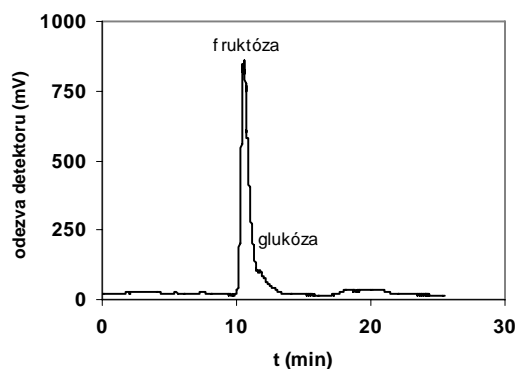
Obr. 4: Chromatogram standardu HMF



Obr. 5: Chromatogram vzorku medoviny



Obr. 6: Chromatogram standardů glukózy a fruktózy



Obr. 7: Chromatogram vzorku medoviny

Málo výrazný pík glukózy v chromatogramu medoviny na obr. 7 je patrně způsoben tím, že glukóza byla během kvasného procesu přeměněna na ethanol a CO₂.

Tabulka III: Meze stanovitelnosti, meze detekce

standarty	kalibrační přímka	R ²	mez stanovitelnosti [mg/l]	mez detekce [mg/l]
HMF	$y = 45,232 x - 1,7011$	0,9999	0,41	0,12
fruktóza	$y = 1266,7 x - 309,29$	0,9994	43,8	17,5
glukóza	$y = 1100,4 x - 444,16$	0,9991	60,7	25,7

Závěr

Z dosud proměřených vzorků vyplývá, že ve vařených medovinách je obsah HMF vysoký, což může souviset s technologickými postupy během přípravy. Na výrobu nevařených medovin se používají kvalitní druhy medů, proto je v nich malé množství HMF. K potvrzení těchto závěrů je třeba proměřit více vzorků medovin. V současné době probíhá měření obsahů HMF, glukózy a fruktózy v závislosti na teplotě a době záhřevu medoviny.

Poděkování

Práce byla provedena s finanční podporou projektů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (MSM0021627502) a Grantové Agentury ČR (203/05/2106).

Literatura

1. Teixidó E., Santos F. J., Puignou L., Galceran M. T.: *J.Chromatogr.* *1135*, 85-90 (2006).
2. Spano N., Casula L., Panzanelli A., Pilo M. I., Piu P. C., Scanu R., Tapparo A., Sanna G.: *Talanta*, *68*, 1390-1395 (2006).
3. Kukurová K., Karovičová J., Greif G., Kohajdová Z., Lehkoživová J.: *Chem.Pap.*, *60*, 186-191 (2006).
4. Simsek A., Poyrazoglu E. S., Karacan S., Velioglu I. S.: *Food.Chem.* *101*, 987-994 (2007).
5. Přidal A.: *Včelí produkty*. MZLU, Brno 2003.
6. <http://www.muweb.cz/veda/gy-chemie/medovina.htm>, staženo 13.listopadu 2006.
7. Kalábová K., Vorlová L., Borkovcová I., Smutná M., Večerek V.: *Czech J. Anim. Sci.*, *48*, 551-557 (2003).
8. Nozal M. J., Bernal J. L., Toribio L., Jiménez J. J., Martín M. T. : *J.Chromatogr. A*, *917*, 95-103 (2001).
9. Chromachem® Instruction Manual, Chelmsford, MA, U.S.A (2003).