



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI UDINE

Università degli studi di Udine

Determinazione del furfurolo e del 5- idrossimetilfurfurolo nel miele per cromatografia liquida ad alta pressione

Original

Availability:

This version is available <http://hdl.handle.net/11390/745665> since

Publisher:

Edizioni Kappa

Published

DOI:

Terms of use:

The institutional repository of the University of Udine (<http://air.uniud.it>) is provided by ARIC services. The aim is to enable open access to all the world.

Publisher copyright

(Article begins on next page)

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA «LA SAPIENZA» - ISTITUTO DI MERCEOLOGIA

LIBERA CIRCOLAZIONE E QUALITÀ DEI PRODOTTI NEL MERCATO UNICO EUROPEO

ATTI DEL XV CONGRESSO DI MERCEOLOGIA

(In collaborazione con S.I.M. e I.G.W.T.)

24, 25 e 26 Settembre 1992

volume primo

**«DETERMINAZIONE DEL FURFUROLO
E DEL 5-IDROSSIMETILFURFUROLO NEL MIELE
PER CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESSIONE*»**

F. Lo Coco¹, C. Valentini², V. Novelli¹, L. Ceccon³

¹ *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Udine,*

² *Laboratorio Chimico delle Dogane di Venezia, Mestre - VE*

³ *Dipartimento di Economia e Merceologia delle Risorse Naturali e della Produzione,
Università di Trieste*

Riassunto

La presenza di furfurolo (F) e 5-idrossimetilfurfurolo (IMF) nel miele è una indicazione di deterioramento della qualità. In particolare la quantità di IMF aumenta notevolmente in seguito a trattamenti termici o a conservazione a temperature non idonee.

In questo articolo viene descritto un metodo di determinazione che si basa sulla formazione dei 2,4-dinitrofenilidrazoni dei composti carbonilici e successiva separazione per HPLC in fase inversa. La determinazione è notevolmente specifica, dal momento che i derivati del F e del IMF si separano in maniera molto soddisfacente rispetto agli altri componenti della miscela in esame.

Il recupero per entrambi gli analiti, aggiunti al miele a livelli diversi, è quantitativo, il limite di rilevabilità è dell'ordine di 0,1 ppm. Vengono presentati dati relativi alla accuratezza e riproducibilità.

* Lavoro eseguito con il contributo finanziario del CNR.

Summary

The occurrence of 2-furaldehyde (F) and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (HMF) in honey is recognized as an indication of quality deterioration. In particular the amount of HMF increases notably owing to heat processing or storage at improper temperatures. In this paper a method of determination based on the formation of the 2,4-dinitrophenylhydrazones of carbonyl compounds and subsequent reversed-phase HPLC separation is described.

The procedure offers a high specificity, since the derivatives of F and HMF are well separated with respect of the other components of the mixture under examination. Recoveries from honey spiked at different levels are quantitative for both analytes. The detection limit is of the order of 0.1 ppm. Accuracy and reproducibility data are presented.

Introduzione

La presenza di furfurolo (F) e 5-idrossimetilfurfurolo (IMF) nel miele è un'indicazione di deterioramento della qualità. In particolare la quantità di IMF, che viene prodotto per azione della normale acidità del miele sul fruttosio a temperatura ambiente, aumenta notevolmente in seguito a trattamenti termici o a conservazione a temperature non idonee (1-7).

La legislazione di alcuni Paesi fissa un contenuto massimo di IMF per assicurare che il miele non sia stato denaturato termicamente (1-3). Valori particolarmente elevati di IMF (> 50 mg/100g) dimostrano una adulterazione con sciroppo invertito (1, 3).

I metodi classici di determinazione quantitativa di F e IMF non solo nel miele, ma anche in altri tipi di matrici alimentari, in particolare bevande alcoliche e succhi di frutta, si basano su misure colorimetriche (1-3, 8-13). Questi metodi sono lunghi, impiegano reattivi tossici o comunque pericolosi, richiedono un preciso controllo del tempo e della temperatura di reazione in quanto l'instabilità del prodotto di reazione colorato può portare a bassi recuperi e ampie variazioni statistiche nei risultati e nessuno di questi metodi è specifico (1-3, 9, 12-14).

Sono state adottate anche tecniche gascromatografiche, che sono caratterizzate da maggior specificità, sensibilità e rapidità (15, 16). Più recentemente sono stati proposti anche metodi per HPLC (2, 9, 12-14, 17-19). Questi metodi sono più rapidi, mostrano accuratezza, sensibilità e specificità migliori rispetto ai procedimenti colorimetrici e utilizzano reattivi meno pericolosi (12, 13).

In questo articolo viene descritto un metodo di determinazione che si basa sulla formazione dei 2,4-dinitrofenilidrazoni dei composti carbonilici e successiva separazione per HPLC in fase inversa.

Parte sperimentale

Reagenti e standards

Il furfurolo (Prolabo) è stato bidistillato e conservato in frigorifero a 0-4°C.

Sia il 5-idrossimetilfurfurolo che la 2,4-dinitrofenilidrazina (Prolabo) sono stati purificati per cristallizzazioni successive utilizzando metanolo per HPLC e conservati in frigorifero a 0-4°C.

Reagente di chiarificazione Carrez (C. Erba) costituito da una soluzione al 15% (p/v) di Carrez I (ferrocianuro di potassio) e da una soluzione al 30% (p/v) di Carrez II (solfato di zinco).

Acido perclorico 70% (Prolabo).

Acetonitrile per HPLC (C. Erba).

L'acqua è stata distillata, deionizzata ed ulteriormente purificata utilizzando il dispositivo della Millipore.

Soluzione di 2,4-dinitrofenilidrazina

È stata preparata in acetonitrile una soluzione madre di reattivo contenente 2.5×10^{-3} moli/l di 2,4-dinitrofenilidrazina.

Per successive diluizioni sono state preparate soluzioni di reattivo contenenti fino a 2.5×10^{-6} moli/l di 2,4-dinitrofenilidrazina.

Soluzioni standard di furfurolo e 5-idrossimetilfurfurolo

È stata preparata una soluzione madre contenente 10^{-2} moli/l di F e IMF in acqua.

Per successive diluizioni sono state preparate soluzioni standard contenenti fino a 10^{-7} moli/l sia di F che di IMF.

Sono state inoltre preparate due soluzioni acquose contenenti 10^{-4} moli/l di F e IMF rispettivamente.

Rette di taratura

5 ml di ogni soluzione standard di F e IMF sono stati trasferiti in un palloncino tarato da 10 ml insieme a 4 ml di una soluzione di 2,4-dinitrofenilidrazina cinque volte più concentrata. Sono state aggiunte alcune gocce di acido percolorico fino a pH 1 e si è portato a volume con la soluzione di 2,4-dinitrofenilidrazina. La soluzione è stata portata su agitatore magnetico a temperatura ambiente per almeno 25 minuti. 10 μ l della soluzione sono stati poi immediatamente iniettati nel sistema HPLC.

Preparazione del campione

Il campione di miele è stato omogeneizzato con una spatola e ne è stata preparata una soluzione acquosa al 40% (p/v).

Chiarificazione del campione

10 ml di soluzione acquosa del campione sono stati pipettati in una provetta da 50 ml. Sono stati aggiunti lentamente, sotto agitazione, 2 ml di soluzio-

ne Carrez I e 2 di Carrez II. Dopo aver lasciato a riposo per 5 minuti, la miscela è stata filtrata utilizzando il dispositivo della Millipore. Il filtro è stato lavato con acqua raccogliendo le acque di lavaggio e il volume è stato portato a 25 ml.

Preparazione dei derivati dei composti carbonilici

La stessa metodica descritta in *Rette di taratura* è stata applicata a 5 ml di soluzione chiarificata del campione invece che di soluzione standard.

Determinazione dei recuperi

10 ml di soluzione acquosa di miele sono stati mescolati con 2.5 ml di soluzione standard di F e IMF contenente da 1.0×10^{-2} a 1.0×10^{-6} moli/l di entrambi gli analiti e sottoposti al trattamento descritto in *Chiarificazione del campione*. 5 ml di soluzione così chiarificata sono stati sottoposti allo stesso trattamento descritto in *Preparazione dei derivati dei composti carbonilici*. Ogni determinazione è stata condotta 3 volte; ogni soluzione è stata iniettata 2 volte.

Cromatografia liquida ad alta pressione

È stato utilizzato un cromatografo liquido ad alta pressione Spectra-Physics 8700, fornito di un rivelatore spettrofotometrico a lunghezza d'onda variabile Knauer 8700 e loop da 10 μ l. È stata impiegata una colonna d'acciaio inox Supelcosil LC-18, 250 x 4.6 mm, 5 μ m. Le analisi sono state condotte isocraticamente e a temperatura ambiente utilizzando una miscela eluente acetonitrile/acqua 55:45 (v/v), con un flusso di 1 ml/min. Il rivelatore è stato posizionato a 385 nm.

Le aree dei picchi sono state determinate per mezzo di un integratore Spectra-Physics 4270.

Risultati e discussione

Recentemente la cromatografia liquida ad alta pressione è stata utilizzata per la determinazione di F e IMF in numerose matrici di interesse alimentare, in particolare bevande alcoliche e succhi di frutta (9, 12-14, 17-19), ma anche nel miele (2). Tuttavia, la maggior parte dei metodi finora proposti prevedono l'iniezione del campione senza derivatizzazione (2, 9, 12-14). Noi abbiamo ritenuto invece di sottoporre il campione a derivatizzazione per ottenere i 2,4-dinitrofenilidrazoni dei composti carbonilici presenti, in modo da migliorare la sensibilità del metodo. Del resto, questo tipo di derivatizzazione è già stato utilizzato da parecchi Autori per la determinazione di F e/o IMF in altri tipi di matrici (17-19).

La fase di derivatizzazione è stata ottimizzata rispetto al rapporto molare 2,4-dinitrofenilidrazina/analita, alla acidità del mezzo e al tempo di reazione. Per questo fine, la quantità dei derivati ottenuti è stata valutata su due soluzioni ac-

quose contenenti 10^{-4} moli/l rispettivamente di F e IMF. I risultati ottenuti sono presentati nelle figure 1, 2 e 3. Si osserva che la reazione di derivatizzazione è quantitativa quando il rapporto reagente/analita è almeno 2.5:1 per entrambi gli analiti e l'acidità del mezzo, determinata al pH-metro, è circa 1. In queste condizioni, F e IMF vengono trasformati quantitativamente nei corrispondenti 2,4-dinitrofenilidrazoni in 25 minuti. I derivati così ottenuti sono stabili a temperatura ambiente per almeno 48 ore.

Per la determinazione quantitativa sono state preparate innanzitutto le rette di taratura relative ai due analiti di interesse, utilizzando soluzioni standard di F e IMF nelle condizioni ottimali descritte in precedenza. Le rette di taratura sono riportate in Figura 4, e mostrano una buona linearità in tutto l'intervallo di concentrazioni esaminate, che rappresentano valori tipici relativi ai campioni reali.

Fig. 1 - Conversione del furfurolo (\square) e del 5 idrossimetilfurfurolo (\circ) nel corrispondente 2,4-dinitrofenilidrazione in funzione dell'acidità del mezzo. Rapporto molare 2,4-dinitrofenilidrazina/furfurolo=2,5 e 2,4-dinitrofenilidrazina/5-idrossimetilfurfurolo=2,5; tempo di reazione=30minuti

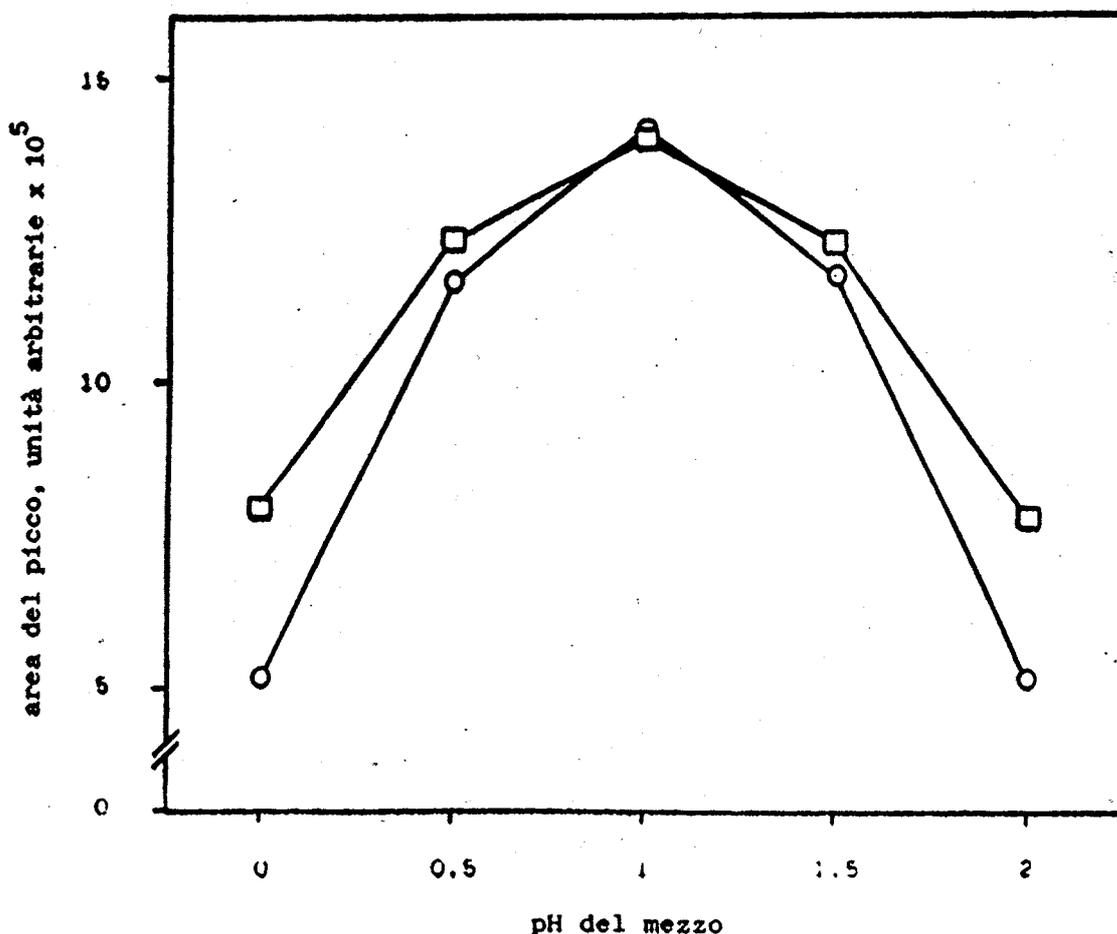


Fig. 2 - Conversione del furfurolo (\square) e del 5 idrossimetilfurfurolo (\circ) nel corrispondente 2,4-dinitrofenilidrazione in funzione del rapporto molare 2,4-dinitrofenilidrazina/furfurolo e 2,4-dinitrofenilidrazina/5-idrossimetilfurfurolo. pH del mezzo=1; tempo di reazione=30 minuti.

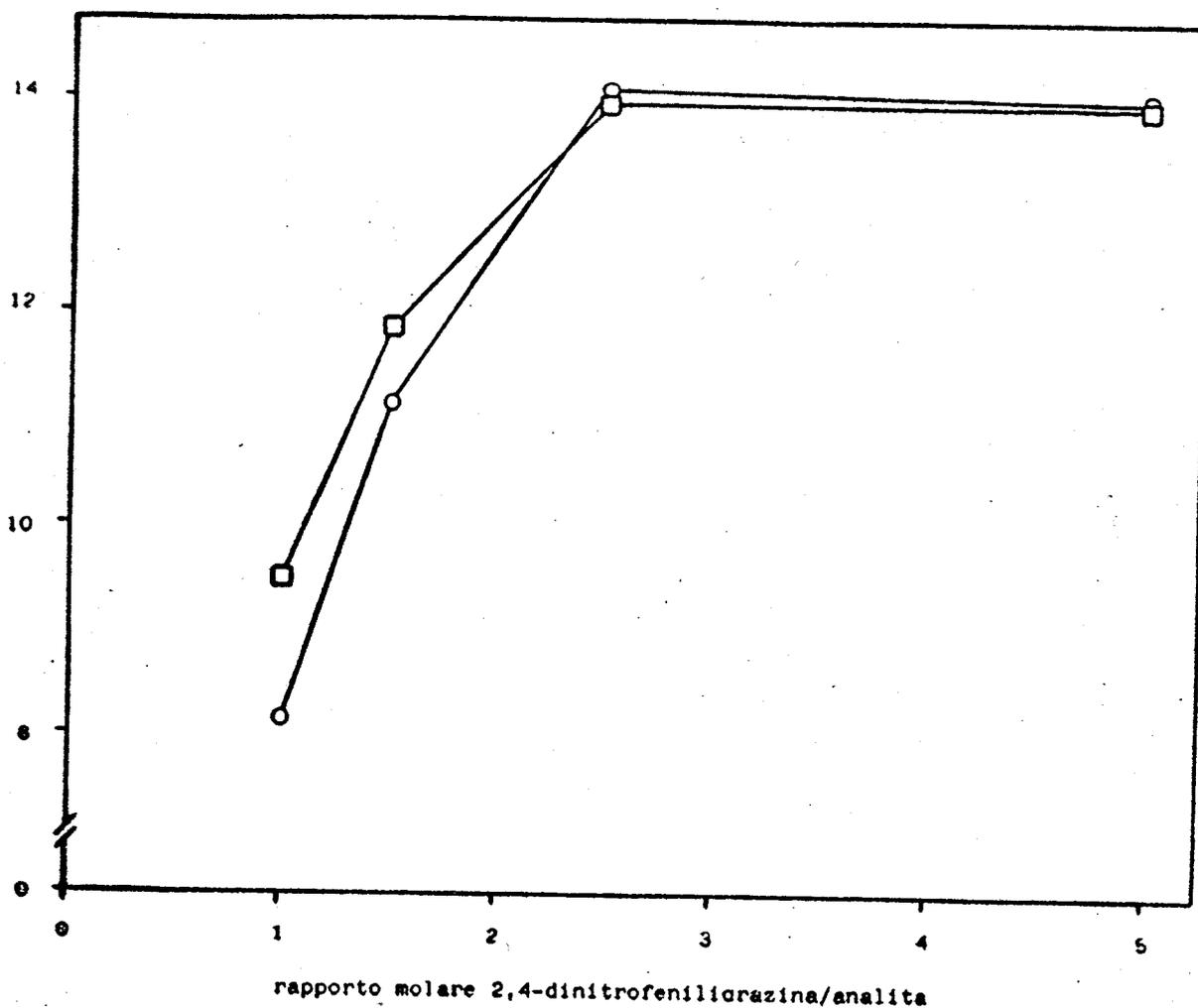


Fig. 3 - Conversione del furfurolo (\square) e del 5 idrossimetilfurfurolo (\circ) nel corrispondente 2,4-dinitrofenilidrazione in funzione del tempo di reazione. Rapporto molare 2,4-dinitrofenilidrazina/furfurolo=2,5 e 2,4-dinitrofenilidrazina/5-idrossimetilfurfurolo=2,5; pH del mezzo=1.

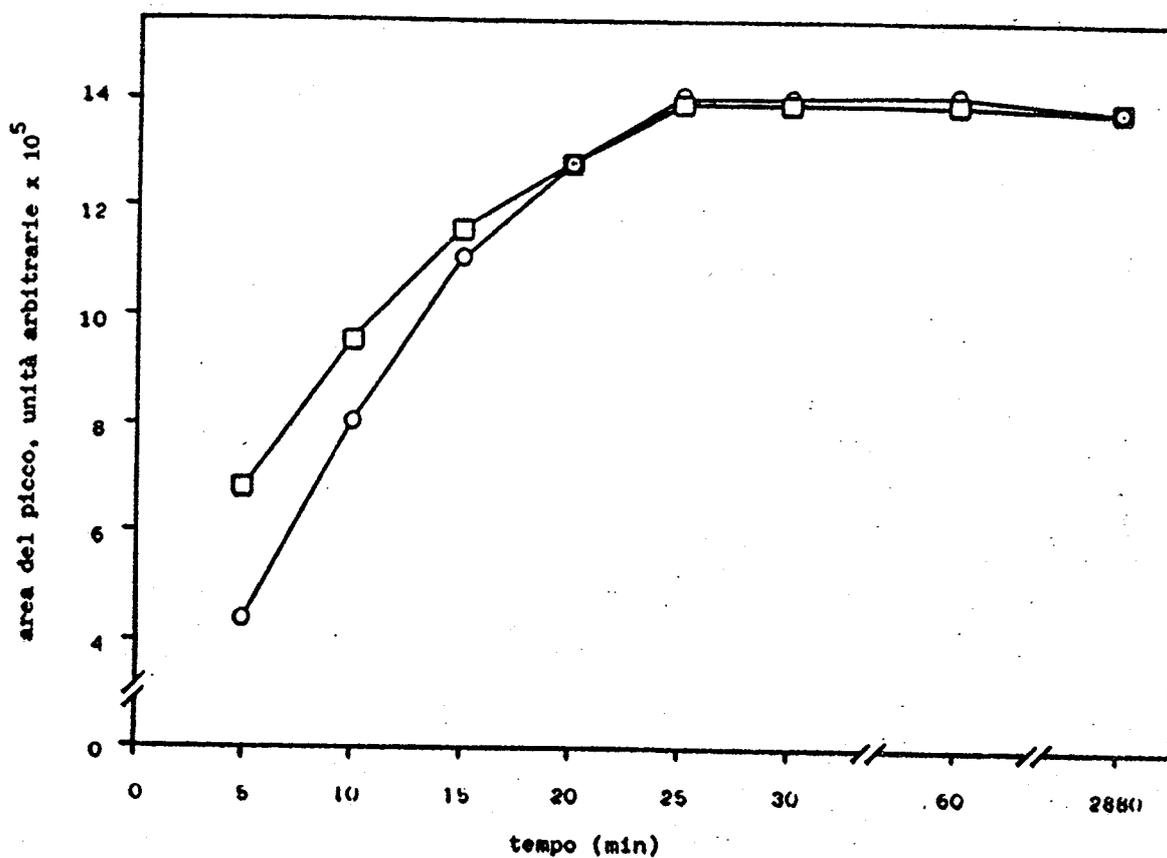
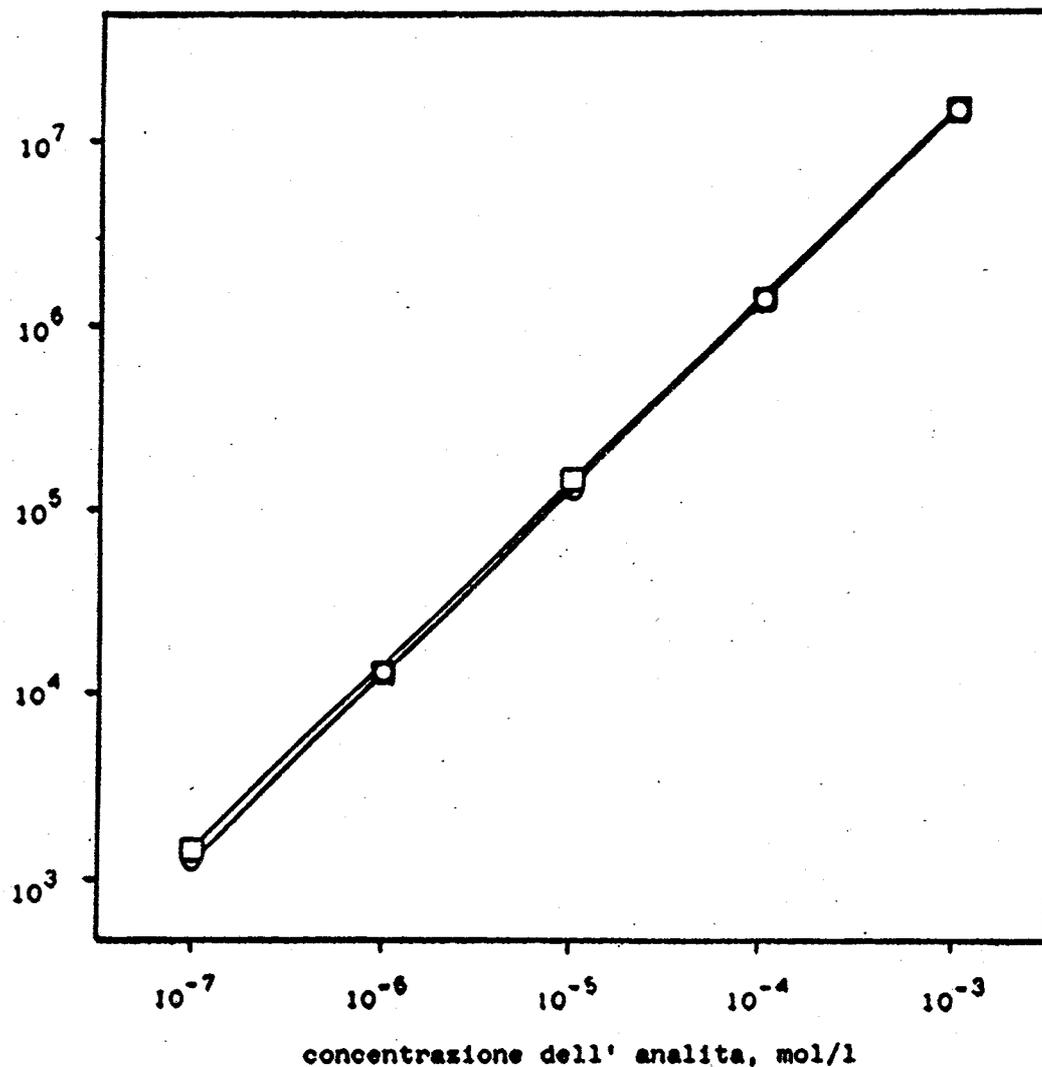


Fig. 4 - Curva di taratura dell'area del picco del 2,4-dinitrofenilidrazone del furfurolo (□) e del 5-idrossimetilfurfurolo (○) rispetto alla concentrazione dell'analita. Rapporto molare 2,4-dinitrofenilidrazina/furfurolo=2,5 e 2,4-dinitrofenilidrazina/5-idrossimetilfurfurolo=2,5; pH del mezzo=1; tempo di reazione=30 minuti.

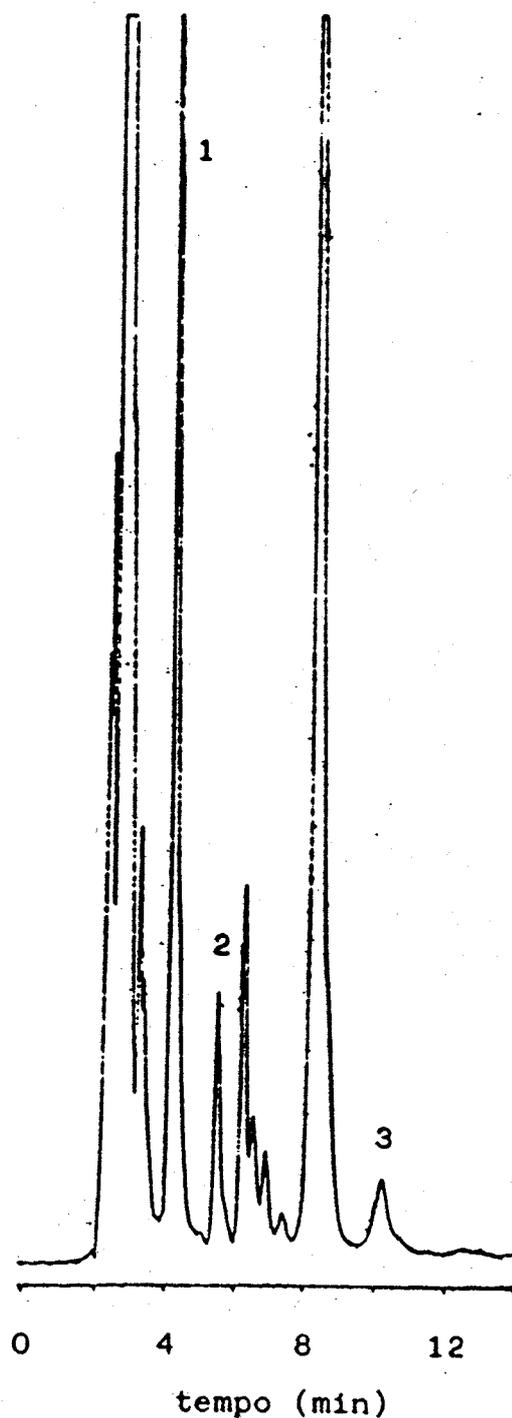


Fissando la lunghezza d'onda del rivelatore al valore corrispondente al massimo di assorbimento dei derivati sia di F che di IMF, che è risultato coincidente, è possibile determinare il limite di rivelabilità dall'espressione $3\sigma/S$ (20), dove S è la sensibilità, che può essere ottenuta dalla retta di taratura e assume il valore di 1.39×10^{10} per F e 1.26×10^{10} per IMF, e σ è il rumore di fondo dell'integratore, da noi fissato = 100. Il limite di rivelabilità risulta pertanto 2.2×10^{-8} M per F e 2.4×10^{-8} M per IMF nella soluzione acquosa del campione, valori che corrispondono rispettivamente a 5×10^{-4} e 8×10^{-4} mg/100g di miele.

Il metodo risulta notevolmente specifico dal momento che, nelle condizioni descritte, i derivati di F e IMF si separano in maniera molto soddisfacente ri-

spetto agli altri componenti della miscela in esame. A titolo di esempio, in Figura 5 è riportata una tipica separazione ottenuta su un campione commerciale.

Fig. 5 - Separazione per cromatura liquida ad alta pressione del 2,4-dinitrofenilidrazoni dei composti carbonilici di un campione di miele commerciale. Le condizioni di analisi sono descritte nella Parte Sperimentale. 1: 2,4-dinitrofenilidrazina; 2: 2,4-dinitrofenilidrazione del 5-idrossimetilfurfurolo; 3: 2,4-dinitrofenilidrazione del furfurolo



Nei campioni reali, la 2,4-dinitrofenilidrazina deve essere almeno 20 volte più concentrata rispetto agli analiti da determinare, dal momento che un'aliquota del reagente viene utilizzata nella derivazione di altri composti carbonilici presenti. In tutti i campioni finora da noi esaminati il rapporto 1:20 è risultato sufficiente, come dimostrato anche dal picco della 2,4-dinitrofenilidrazina in largo eccesso che compare nel cromatogramma e dal fatto che non si sono ottenuti incrementi di aree per i due analiti di interesse utilizzando un rapporto analita/reagente di 1:50.

I recuperi di F e IMF sono stati determinati valutando, sulle rette di taratura, le aree dei picchi ottenuti da una soluzione acquosa di miele addizionata di quantità note di entrambi gli analiti. Il campione di miele utilizzato è stato scelto in base al suo basso contenuto sia di F che di IMF (3.6×10^{-6} e 3.3×10^{-5} M rispettivamente nella soluzione acquosa del campione, corrispondenti a 0,09 e 1.04 mg/100g di miele), due dei più bassi livelli fra quelli da noi trovati nei campioni reali. I risultati ottenuti sono raccolti in Tabella 1.

Come si vede, i recuperi per entrambi gli analiti sono risultati compresi tra 95 e 100%, il che dimostra che non si hanno perdite significative durante la fase di chiarificazione.

La riproducibilità è stata valutata conducendo la determinazione 6 volte in 48 ore sullo stesso campione; ogni soluzione è stata analizzata in doppio. La concentrazione media di IMF è risultata 3.3×10^{-5} M, con una deviazione standard di $\pm 6.6 \times 10^{-7}$ M e un coefficiente di variazione di $\pm 2\%$; la concentrazione media di F è risultata 3.6×10^{-6} M, con una deviazione standard di $\pm 1.1 \times 10^{-7}$ M e un coefficiente di variazione di $\pm 3\%$.

Tab. 1 - *Recuperi di furfurolo e 5-idrossimetilfurfurolo aggiunti al miele*

PRESENTE NEL CAMPIONE	AGGIUNTO	TROVATO	RECUPERO (%)
<i>Concentrazione di 5-idrossimetilfurfurolo (moli/l)</i>			
$3,3 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-6}$	$3,31 \times 10^{-5}$	97
$3,3 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-5}$	$4,25 \times 10^{-5}$	99
$3,3 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$1,27 \times 10^{-4}$	95
$3,3 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-3}$	$9,92 \times 10^{-4}$	96
<i>Concentrazione di furfurolo (moli/l)</i>			
$3,6 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-7}$	$3,71 \times 10^{-6}$	100
$3,6 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-6}$	$4,51 \times 10^{-6}$	98
$3,6 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-5}$	$1,35 \times 10^{-5}$	99
$3,6 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$9,84 \times 10^{-5}$	95
$3,6 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-3}$	$9,73 \times 10^{-4}$	97

La metodica descritta è stata applicata alla determinazione del contenuto di F e IMF in diversi campioni di miele commerciali; ogni campione è stato analizzato in doppio. I risultati ottenuti sono riassunti in Tabella 2.

Come si vede, la quantità riscontrata di IMF è approssimativamente un ordine di grandezza più elevata della quantità di F. È interessante osservare che, con la metodica proposta, è possibile la determinazione anche di F, che invece risulta non rilevabile iniettando direttamente nel sistema HPLC una soluzione acquosa di campione senza derivatizzazione (2).

Tab. 2 - Concentrazioni di furfurolo e 5-idrossimetilfurfurolo trovate in alcuni campioni commerciali di miele

CAMPIONE	IMF (mg/100g)	F (mg/100g)
1	1,04	0,09
2	1,26	0,05
3	2,77	0,09
4	2,96	0,10
5	3,47	0,12
6	5,67	0,14
7	5,67	0,16
8	5,04	0,17
9	3,15	0,16
10	3,47	0,12

BIBLIOGRAFIA

1. WHITE J.W., JR, SICILIANO J., J. ASSOC. OFF. ANAL. CHEM. 63, 7-10 (1980).
2. JEURING H.J., KUPPERS F.J.E.M., J. ASSOC. OFF. ANAL. CHEM. 63, 1215-1218 (1980).
3. WHITE J.W., JR, J. ASSOC. OFF. ANAL. CHEM. 62, 509-514 (1979).
4. SCHADE J.W., MARSH G.L., ECKERT J.E., FOOD RES. 23, 446-463 (1958).
5. HADORN H., KOVACS A.S., MITT. GEB. LEBENSM. HYG, 51, 373-390 (1960).
6. HADORN H., ZURCHER K., MITT. GEB. LEBENSM. HYG., 53, 28-34 (1962).
7. WHITE J.W., JR. KUSHNIR I., SUBERS M.H., FOOD TECHNOL., 18, 153-156 (1969).
8. WINKLER O., Z. LEBENSM. UNTERS. FORSCH., 102, 161-167 (1955).
9. LI Z. - F., SAWAMURA M., KUSUNOSE H., AGRIC. BIOL. CHEM. 52, 2231-2234 (1988).
10. DINSMORE H.L., NAGY S., J. ASSOC. OFF. ANAL. CHEM. 57, 332-335 (1974).
11. NAGY S., RANDALL V., J. AGRIC. FOOD CHEM. 21, 272-275 (1973).
12. MARCY J.E., ROUSEFF R.L., J. AGRIC. FOOD CHEM. 32, 979-981 (1984).
13. MIJARES R.M., PARK G.L., NELSON D.B., McIVER R.C., J. FOOD SCI. 51, 843-844 (1986).
14. LEE H.S., ROUSEFF R.L., NAGY S., J. FOOD SCI. 51, 1075-1076 (1986).
15. TATUM J.H., NAGY S., BERRY R.E., J. FOOD SCI. 40, 707-709 (1975).
16. SHIMUZU J., WATANABE M., AGRIC. BIOL. CHEM. 43, 1365-1366 (1979)

17. PUPUTTI E., LEHTONEN P., J. CHROMATOGR. 353, 163-168 (1986).
18. BLOECK S., KREIS A., STANEK O., ALIMENTA 25, 23-28 (1986).
19. LO COCO F., CECCON L., VALENTINI C., NOVELLI V., J. CHROMATOGR. 590, 235-240 (1992).
20. MASSART D.L., DIJKSTRA A., KAUFMAN L., «Evaluation and Optimization of Laboratory Methods and Analytical Procedures», Elsevier, Amsterdam (1978).