

БЫСТРЫЙ СКРИНИНГ ОКСИМЕТИЛФУРФУРОЛА В МЕДЕ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Е.С. Чернецова^{1,2}, И.А. Ревельский³, Г.Е. Морлок⁴

¹ *Российский научный центр «Курчатовский институт», Курчатовский НБИК-центр
Россия, 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 1*

² *Государственное образовательное учреждение высшего профессионального
образования «Российский университет дружбы народов»
Россия, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6*

³ *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Химический факультет
Россия, 119991 Москва, ГСП-2, Ленинские горы, 1, стр. 3.*

⁴ *Университет Хоэнхайм, Институт пищевой химии
Гарбенштрассе, 28, 70599 Штутгарт, Германия
chern_es@mail.ru*

Поступила в редакцию 5 февраля 2011 г.

Впервые представлен способ быстрого определения (скрининга) оксиметилфурфурола в меде методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии. Детектирование осуществляли методом денситометрического сканирования при измерении поглощения на длине волны 290 нм. При использовании предлагаемого подхода возможен одновременный анализ до 20 образцов, при этом длительность хроматографирования составляет около 5 минут.

Ключевые слова: высокоэффективная тонкослойная хроматография, ВЭТСХ, оксиметилфурфурол, мед, скрининг

Елена Сергеевна Чернецова - кандидат химических наук, старший научный сотрудник ГОУ ВПО «Российский университет дружбы народов», ведущий специалист Российского научного центра «Курчатовский институт».

Область научных интересов: высокоэффективная тонкослойная хроматография, масс-спектрометрия, хромато-масс-спектрометрия, быстрый скрининг, органический анализ.

Опубликовано более 50 печатных работ.

Игорь Александрович Ревельский - доктор химических наук, профессор Химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Область научных интересов: хромато-масс-спектрометрия, анализ сложных многокомпонентных смесей, определение следовых концентраций.

Опубликовано более 360 печатных работ, в том числе 1 монография и 35 авторских свидетельств и патентов.

Гертруд Елизабет Морлок – доктор естественных наук, профессор Института пищевой химии, Университет Хоэнхайм (Штутгарт, Германия).

Область научных интересов: плоскостная хроматография, масс-спектрометрия, химический анализ пищевых продуктов.

Опубликовано более 80 печатных работ.

Введение

Важным параметром, отражающим качество пчелиного меда, является содержание оксиметилфурфурола (ОМФ, 5-гидроксиметилфуран-2-карбальдегид), который может образовываться в результате длительного хранения или высокотемпературной переработки меда при разложении моносахаридов. В разных странах нормы по

содержанию ОМФ в меде различаются. Согласно самым строгим требованиям, допустимо содержание ОМФ в меде не более 15 мг/кг [1]. В России разрешено содержание ОМФ в меде на уровне не более 25 мг/кг [2].

В настоящее время определение ОМФ в пчелином меде часто проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектированием [3-6]. При этом

длительность одного анализа, включая пробоподготовку и хроматографирование, как правило, составляет 30 мин и более. Вместе с тем, на наш взгляд, перспективным методом определения оксиметилфурфурола в меде может стать высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ), которая, в отличие от ВЭЖХ, позволяет проводить одновременный анализ серии образцов в идентичных условиях. Ни одной публикации об определении ОМФ в меде методом ВЭТСХ нами обнаружено не было.

В связи с этим, целью настоящей работы являлась разработка способа определения ОМФ в меде методом ВЭТСХ.

Экспериментальная часть

Растворы, реагенты и вспомогательные материалы

5-Оксиметилфурфурол (степень чистоты $\geq 97\%$) был получен из компании Fluka (Германия). Этилацетат и метанол марки «Chromasolv®» (степень чистоты $\geq 99.7\%$) были получены из компании Sigma-Aldrich (США).

В работе использовали пластины для ВЭТСХ фирмы «Merck» (Германия) «Silica gel 60» и «Silica gel 60 F₂₅₄» с диаметром пор 60А и толщиной слоя неподвижной фазы (силикагель) 200 мкм на стеклянной подложке размером 20 x 10 см. Предварительную очистку пластин для ВЭТСХ осуществляли путем пропускания по ним метанола для градиентного элюирования компании Fisher Scientific (Великобритания), с добавлением деионизованной воды в соотношении метанол:вода 7:1, и затем высушивали пластины при 110 °С в течение 15 мин.

В работе использовали деионизованную воду сопротивлением 18 МОм, очищенную системой Millipore (Германия). Подготовка проб образцов меда заключалась в перемешивании и последующем растворении навесок массой 0,5-1 г в воде при соблюдении пропорции 1 г меда / 10 мл воды.

Техника эксперимента

Оптимизацию условий разделения проводили с помощью камеры для тонкослойной хроматографии НРТLC Vario Chamber (CAMAG, Швейцария).

Нанесение модельных растворов и растворов меда на пластины для ВЭТСХ осуществляли с помощью автоматизированного автодозатора АТS4 (CAMAG, Швейцария). Растворы наносили на ВЭТСХ-пластины в виде полос длиной 6,5 мм с расстоянием между полосами 1 мм, при этом на одну ВЭТСХ-пластину наносили до 24 полос. Объем наносимого на одну полосу раствора составлял 1-12 мкл. Для изучения влияния матричных эффектов на полосы с предварительно нанесенными стандартными растворами наносили рас-

творы образцов меда. После высушивания пластины в течение 1 мин проводили элюирование компонентов нанесенных растворов этилацетатом до высоты прохождения элюента, равной 50 мм, в автоматизированной камере для элюирования АDС2 (CAMAG, Швейцария). После высушивания в течение 3 мин проводили денситометрическое измерение абсорбции при длине волны 290 нм с помощью сканера для тонкослойной хроматографии TLC Scanner 3 (CAMAG, Швейцария). При необходимости, перед проведением сканирования проводили дериватизацию пластин водным раствором пара-аминобензойной кислоты. Затем для дериватизированных пластин проводили денситометрическое измерение флуоресценции при длине волны 366 нм. Количественные расчеты проводили с использованием высот или площадей хроматографических пиков. Для цифровой фотодокументации использовали систему «DigiStore 2 Documentation System» (CAMAG, Швейцария), состоящую из иллюминатора «Reprostar 3» и цифровой камеры «Baumer optronic DXA252», в режиме отражения при 254 нм или в режиме флуоресценции при 366 нм. Экспериментальные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения «winCATS», версия 1.4.1 (CAMAG, Швейцария).

Данные определения ОМФ в образцах меда методом ВЭЖХ были получены из независимой лаборатории Университета Хоэнхайм (Германия).

Результаты и их обсуждение

Разработка условий отделения 5-оксиметилфурфурола от сахаров методом ВЭТСХ

Поскольку основными компонентами матрицы меда являются сахара, необходимо было разработать условия, обеспечивающие хроматографическое отделение ОМФ от сахаров. Для разработки условий хроматографирования использовали модельные водные растворы 5-оксиметилфурфурола, глюкозы и мальтозы, которые наносили на ВЭТСХ-пластину таким образом, чтобы на каждую полосу было нанесено 2 мкг глюкозы и 2 мкг мальтозы, а также следующие количества 5-оксиметилфурфурола: 30, 70, 100, 300, 700, 1000, 3000 и 7000 нг. При оптимизации условий разделения в качестве подвижной фазы использовали смеси метанол:этилацетат в соотношениях 4:1 и 2:3, а также чистый этилацетат. При использовании последнего обеспечивалось наиболее экспрессное отделение ОМФ от сахаров. Детектирование аналитов проводили после их предварительной дериватизации пара-аминобензойной кислотой, для чего ВЭТСХ-пластину после проведения разделения и высушивания помещали на 10 с в раствор пара-аминобензойной кислоты, а за-

тем снова высушивали и нагревали в течение 10 минут при 110°C. Проводили визуализацию ВЭТСХ-хроматограммы методом регистрации флуоресценции при 366 нм. Время разделения составляло около 5 мин, величина Rf для ОМФ составляла около 0.72.

После выбора условий разделения было проведено сканирование соответствующих ОМФ зон на недериватизированной ВЭТСХ-пластине при измерении абсорбции в диапазоне 200-800 нм и найден максимум абсорбции ОМФ при 290 нм. В результате сравнения интенсивности сигналов ОМФ, измеряемых при регистрации абсорбции при 290 нм для недериватизированной пластины и при регистрации флуоресценции при 366 нм для пластины, дериватизированной пара-аминобензойной кислотой, было обнаружено, что дериватизация с последующей регистрацией флуоресценции не обеспечивает более высокой чувствительности определения по сравнению с регистрацией абсорбции в максимуме поглощения недериватизированного ОМФ (290 нм). В связи с этим, последующие исследования проводили без дериватизации, при прямой регистрации сигналов ОМФ при измерении поглощения на длине волны 290 нм.

Оценка возможности определения 5-оксиметилфурфурола в меде методом ВЭТСХ

Для оценки пределов детектирования 5-оксиметилфурфурола проводили последовательное нанесение на ВЭТСХ-пластину модельных растворов ОМФ в воде, а также растворов высококачественного меда, таким образом, чтобы каждая полоса содержала одинаковое количество матрицы меда и следующие количества ОМФ: 0.00, 0.79, 1.84, 2.63, 7.89, 18.41, 26.30, 78.90 нг.

Производили пропускание по пластине элюента, сушку пластины и последующее детектирование для определения количественных характеристик методики. Наблюдалась линейность сигнала в диапазоне 1-26,3 нг, нанесенных в виде полосы на пластину для ВЭЖХ. Предел детектирования составлял около 0,7 нг ОМФ. В пересчете на содержание ОМФ в меде при растворении 1 г меда в 10 мл воды, при нанесении на ВЭТСХ-пластину объеме раствора меда, равном 1 мкл, такой диапазон соответствовал определению ОМФ в меде на уровне 7-263 мг кг⁻¹, т.е. на уровне, требуемом в РФ и за рубежом. Из предварительных экспериментов по оценке точности нанесения объемов жидкостей с помощью используемого оборудования было также известно, что для проведения количественного анализа возможно нанесение образцов на ВЭТСХ-пластину в диапазоне объемов от 1 до 12 мкл.

Предложенный способ определения ОМФ использовали для анализа реальных образцов меда.

Оценка возможности определения 5-оксиметилфурфурола в меде

Для оценки возможности определения 5-оксиметилфурфурола использовали 3 образца меда, содержание ОМФ в которых было предварительно определено методом ВЭЖХ. Подготовка проб образцов меда для определения ОМФ методом ВЭТСХ заключалась в их растворении в воде в пропорции 1 г меда – 10 мл воды. Аликвоты растворов меда объемом 3 мкл двукратно наносили на ВЭТСХ-пластину. На ту же пластину однократно наносили модельные растворы ОМФ для построения градуировочной зависимости таким образом, чтобы содержание ОМФ на полосу составляло 3,0, 12,0, 20,0 и 30,0 нг. Соответствующие площади хромато-

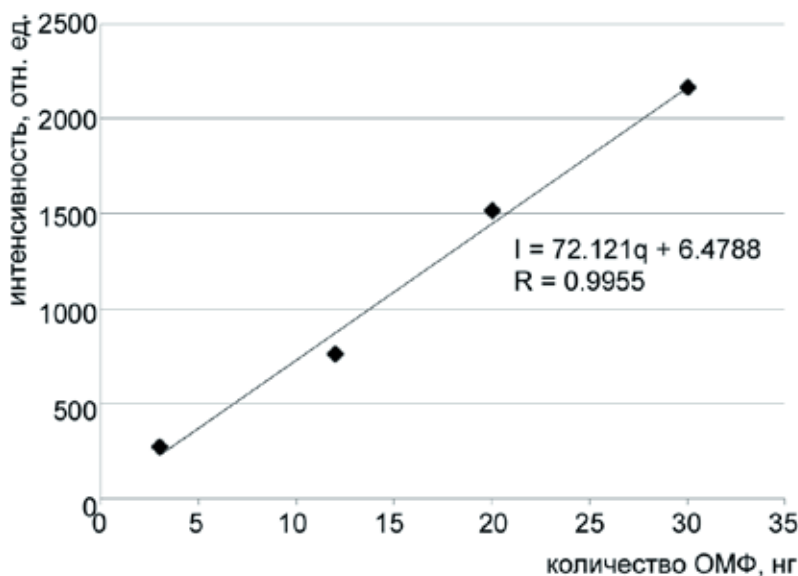


Рис. 1. Градуировочная зависимость интенсивности абсорбции при 290 нм (I) от количества ОМФ (q), нанесенного на ВЭТСХ-пластину (R – коэффициент корреляции)

Результаты определения ОМФ в образцах меда методами ВЭЖХ и ВЭТСХ

Образец меда №	Содержание ОМФ в образце, мг кг ⁻¹	
	ВЭЖХ	ВЭТСХ*
1	38.5	37.4
2	18.1	17.3
3	30.4	29.1

Примечание: * - $s_r = 6 \pm 20\%$ ($n = 2$)

графических пиков использовали для построения градуировочной зависимости, приведенной на рисунке. При нанесении растворов меда на пластину в объеме 3 мкл такая градуировочная зависимость обеспечивала возможность определения ОМФ в диапазоне содержаний в меде на уровне 10-100 мг кг⁻¹.

Результаты определения ОМФ в меде, а также их сравнение с результатом определения ОМФ, полученным методом ВЭЖХ, приведены в таблице. Полученные методом ВЭТСХ результаты определения ОМФ в меде и результаты, полученные независимым методом (ВЭЖХ), близки между собой, что позволяет сделать заключение о возможности определения ОМФ в меде методом ВЭТСХ. Снижение временных затрат на один анализ при использовании предлагаемого подхода по сравнению с использованием метода ВЭЖХ обеспечивается отсутствием необходимости предварительной фильтрации растворов меда и быстрым одновременным хроматографированием нескольких (до 20) образцов на одной ВЭТСХ-пластине.

Заключение

Предложен способ быстрого определения (скрининга) ОМФ в меде методом ВЭТСХ. Предел обнаружения составляет 7 мг кг⁻¹, что отвечает требованиям к чувствительности методов определения ОМФ в меде в РФ и за рубежом. При использовании предлагаемого подхода возможен одновременный анализ до 20 образцов, при этом длительность хроматографирования

составляет 5 минут. Достоинствами предлагаемого подхода являются снижение временных затрат и стоимости одного анализа.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации (грант МК-594.2010.3) и НИОКР №2.2.2.3/9055 (рег. №01201058913) аналитической ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы (2009-2010)».

ЛИТЕРАТУРА

1. Bogdanov S., Ruoff K., Persano Oddo L. Physico-chemical methods for the characterization of unifloral honeys: a review // *Apidologie*. 2004. V. 35, № S1. S4-S17.
2. ГОСТ 19792-2001 «Мед натуральный. Технические условия». М.: Изд-во стандартов, 2000.
3. Руководство Р 4.1.1672-03 Минздрава России.
4. Kukurova K., Karovičová J., Greif G., Kohajdová Z., Lehkoživová J. Determination of 5-hydroxymethylfurfural after Winkler and by the HPLC method for authentication of honey // *Chem. Pap.* 2006. V. 60, № 3. P. 186-191.
5. Sanz M.L., del Castillo M.D., Corzo N., Olano A. 2-Furoylmethyl amino acids and hydroxymethylfurfural as indicators of honey quality // *J. Agric. Food Chem.* 2003. V. 51, № 15. P. 4278-4283.
6. Zappala M., Fallico B., Arena E., Verzera A. Methods for the determination of HMF in honey: a comparison // *Food Control*. 2005. V. 16, № 13. P. 273-277.

FAST SCREENING OF HYDROXYMETHYLFURFURAL IN HONEY USING HIGH-PERFORMANCE THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY

E.S. Chernetsova, I.A. Revelsky, G.E. Morlock

An approach for fast screening of hydroxymethylfurfural in honey by high-performance thin-layer chromatography is suggested for the first time. The detection was performed by densitometric scanning at 290 nm. Using this approach, it is possible to screen up to 20 samples simultaneously, and the separation takes just about 5 minutes.

Key words: high-performance thin-layer chromatography, HPLC, hydroxymethylfurfural, honey, screening.