تطوير طريقة تحليلية لمراقبة الهيدروكسي ميتيل فورفورال في العسل السوري بتقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء

ياسر الروح*، نظيرة سركيس**

*طالب دراسات عليا (دكتوراه)، قسم الكيمياء التحليلية والغذائية/مراقبة الأغذية/، كلية الصيدلة، جامعة حلب

**قسم الكيمياء التحليلية والغذائية، كلية الصيدلة، جامعة حلب

الملخص

تم في هذه الدراسة تطوير طريقة كروماتوغرافية دقيقة وسريعة وحساسة لتحديد تراكيز الهيدروكسي ميتيل فورفورال (HMF) في عينات العسل السوري المنتج طبيعيا و المغشوش بالتغذية السكرية أو بإضافة الشراب البسيط. حيث استخدم عمود كروماتوغرافي C18، طور متحرك (ميتانول: ماء مع حمض الخل 3%) (85:15)، سرعة التدفق 0.9 مل/دقيقة، كاشف UV عند طول الموجة 284 نانومتر، وكان زمن الاحتباس للطريقة المطورة 7.9 دقيقة، وتم دراسة صلاحية الطريقة من خلال تحديد الخطية والتكرارية والدقة وصحة النتائج التحليلية، حيث كان حد الكشف النوعي 0.07 ملغ/كغ وحد الكشف الكمي 0.22 ملغ/كغ ومعامل الارتباط R^2=0.9999

كما تم تطبيق هذه الطريقة المطورة لتحديد تراكيز الHMF وتبين من النتائج أن تراكيز الـHMF المحددة في العينات تراوحت بين(2.2–26) ملغ/كغ للعينات حديثة القطاف وبين (7.2-106.2) ملغ/كغ بعد عام من الحفظ.

وبنتيجة هذه الدراسة لاحظنا ارتفاع تراكيز الـHMF بشكل ملحوظ في عينات العسل المغشوش وتجاوزت الحدود الدستورية بعد عام من الحفظ، أما في عينات العسل الطبيعي النقية فكانت التراكيز موافقة للمواصفة القياسية السورية والعالمية.

الكلمات المفتاحية: الكروماتوغرافيا السائلة، HMF، مراقبة العسل، غش العسل.

ورد البحث للمجلة بتاريخ 7/5/ 2019

قبل للنشر بتاريخ 18 /6/ 2019

Development of Analytical Method to Quality control Hydroxymethylfurfural in Syrian Honey by High Performance Liquid chromatograghy Technique

Yaser Alrouh.*; Nazira Sarkis**

*Postgraduate student (PhD), Dept. of Analytical and Food Chemistry, Faculty of Pharmacy, Aleppo University

**Dept. of Analytical and Food Chemistry, Faculty of Pharmacy, Aleppo University

Abstract

An accurate, rapid and sensitive RP-HPLC method has been developed to determine HMF concentrations in pure and adulterated Syrian honey samples by beefeeding or with invert syrup.

The separation process was developed under optimized chromatographic conditions using C18 column and a mobile phase that consists of (methanol: water with acetic acid 3%) (15:85) the flow rate was 0.9 ml/min and UV detection at 284 nm; the retention time for the developed method was 7.9 minute, the linearity, repeatability, accuracy, and precision of the method were determined. The detection limit and quantification limit were 0.07 mg/kg and 0.22 mg/kg, respectively and R^2 was 0.9999.

The developed method was applied to HMF concentrations in Syrian honey samples, The study showed that HMF concentrations were (2.2-26) mg/kg in newly collected samples and (7.2-106.2) mg/kg in samples stored for one year.

As a result of this study, we notice that HMF concentrations were significantly higher in the adulterated honey samples and exceeded the international standards after one year of storage. On the other hand, HMF concentrations in pure samples were within the limits of international specification and Syrian standards in newly collected samples and those stored for one year.

Key words: Syrian Honey, adulteration, HPLC, HMF.

Received 7/5/ 2019
Accepted 17/6 /2019

1 – مقدمة:

يعتبر الهيدروكسي ميتيل فورفورال HMF مادة فورفورالية تتشكل في وسط حمضي وهو من النواتج الثانوية لتفاعل ميلارد أو نتيجة نزع الماء من السكريات [1]. ويعتمد قياس تراكيزه لتحديد جودة العسل حيث إنه لا يتواجد في العسل الطبيعي حديث القطاف وهو يتشكل نتيجة عمليات الحفظ والتخزين وبالتالي فهو بشكل عام يمكن أن يعتبر مؤشرا هاما لعمر العسل وبالتالي جودة العسل [2،3].

يمتلك الهيدروكسي ميتيل فورفورال بتراكيز عالية تأثيرات سامة للخلية وله تأثير مهيج للعين والجلد والأغشية المخاطية [4]. وبعض الدراسات أظهرت أن له تأثيرا في تشكل سرطان الكولون وتطوره في فئران التجربة [5،6].

وبسبب التأثيرات السمية للهيدروكسي ميتيل فورفورال ومشتقاته كان من الضروري تطوير طرق حديثة لمراقبة هذه المواد في الأغذية المختلفة، تعتمد الطرق المطورة على تقنيات حديثة كالكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء [7،8]، الكروماتوغرافيا الغازية [9]، الكروماتوغرافيا الغازية مع كاشف طيف الكتلة [10،11]، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة عالية الأداء [12]، والكروماتوغرافيا الشعرية بتقنية الحركية الكهربائية للمذيلات [13].

طور سابقا عدد كبير من الطرائق المعتمدة على التقنيات الطيفية للكشف عن الهيدروكسي ميتيل فورفورال في المواد الغذائية [14،15]. ومع أن هذه الطرائق الطيفية سريعة تحليليا لكن حساسيتها وانتقائيتها تعتبر ضعيفة. لذلك طورت تقنيات كروماتوغرافية لكشف وتحديد تراكيز الـHMF، وتعتبر هذه التقنيات من أكثر الطرائق استخداماً في الوقت الحالي، وهي أكثر دقة وحساسية من الطرائق الطيفية [16].

وفي دراسة قامت بها الباحثة (Spano, N) وزملاؤها عام 2005 في ايطاليا لتحديد تراكيز الهيدروكسي ميتيل فورفورال في عينات العسل قاموا بتطوير طريقة تحليلية تعتمد على الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء ضمن الشروط التالية: (عمود C18 ، طور متحرك: (ميتانول/ماء مع حمض كبريت بتركيز 0.02 مول/لتر) (90/10)% ، سرعة التدفق 1.2 مل/د ، الكاشف: طيف الأشعة فوق

البنفسجية عند طول موجة 291 نانومتر)، وكان حد الكشف 1.9 ملغ/كغ، والحد الكمي 4 ملغ/كغ، وكان زمن الاحتباس 10.4 دقيقة [3].

وفي دراسة قام بها الباحثان (Baltachi, C., Aksit, Z) عام 2006 لتحديد تركيز الهيدروكسي ميتيل فورفورال في عينات بعض أنواع المربيات والفواكه المجففة التقليدية في تركيا، حيث قاموا بالتأكد من صلاحية الطريقة الدستورية على العينات المدروسة ضمن الشروط التالية (عمود C18 ، طور متحرك: ميتانول/ماء (90/10)% ، سرعة التدفق 1 مل/د ، الكاشف: طيف الأشعة فوق البنفسجية عند طول موجة 285 نانومتر) وكان زمن الاحتباس 9.33 دقيقة، كما تم التأكد من صلاحية الطريقة المطورة فكان حد الكشف 0.01 ملغ/كغ ، والحد الكمي 0.03 ملغ/كغ [17].

في دراسة أخرى قام بها الباحث (Pappalardo, M) وزملاؤه على عينات العسل لتحديد تركيز الـHMF فيها، حيث قاموا بتطوير طريقة كروماتوغرافية ضمن الشروط التالية: (عمود C18 ، طور متحرك: اسيتونتريل/ماء (75/25)% بوجود وقاء حمض الليمون عند PH=4 ، سرعة التدفق 1.2 مل/د ، الكاشف: طيف الأشعة فوق البنفسجية عند طول موجة 263 نانومتر) وكان زمن الاحتباس 8.32 دقيقة.[18].

2 – أهمية البحث وأهدافه:

يعتبر الهيدروكسي ميتيل فورفورال من المركبات الهامة التي تدل على فترة تخزين العسل، أو تخربه نتيجة سوء التخزين، كما تدل على استخدام وسائل الغش مثل الحرارة لتحسين قوامه ومنع تجمده مع الزمن أو إضافة المحاليل السكرية.

لذلك كان من الضروري تطوير طريقة دقيقة واقتصادية وسريعة لتحديد الهيدروكسي ميتيل فورفورال في عينات العسل السوري لاستخدامها للكشف عن طرائق الغش ومطابقة العينات للمواصفات القياسية السورية.

3 – طرائق البحث ومواده:

3-1 الأجهزة المستخدمة:

جهاز كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء HPLC من نوع Chimadzu A20

ميزان حساس إنتاج شركة Sartorius نمط BP221S.

مراشح كروماتوغرافية بأبعاد 0.45 ميكروميتر.

خلاط مغناطيسي إنتاج شركة Labinko نمط L21.

كاشف مقياس الأشعة فوق البنفسجية من نوع Chimadzu 20 A.

عمود كروماتوغرافي نمط:

EMR Chrometisil, RP-18, 0.5 µm, 250*4.6 mm

جهاز حمام مائي يعمل بالأمواج فوق الصوتية:

A microprocess controlled bench-top ultrasonic cleaner (Power Sonic 405)

3-2 الكواشف والمواد:

ماء ثنائي التقطير منزوع الشوارد خاص(HPLC)، ميتانول، حمض الخل، عياري هيدروكسي ميتيل فورفورال. جميع المحلات والمواد الكيميائية المستخدمة من النوع النقي تحليليا (إنتاج شركة Merck).

3-3 طريقة العمل:

3-3-1 جمع العينات:

تم جمع 15 عينة عسل من مختلف المناطق الجغرافية السورية المنطقة الشمالية، المنطقة الجنوبية، المنطقة الساحلية، والمنطقة الوسطى (250غرام) لكل عينة وقد توزعت العينات المقتطعة بالشكل التالي:

5 عينات عسل مغشوش بالتغذية السكرية بالتعاون مع مربيي النحل بمحلول السكروز بنسبة 1:1 تم ترميزها بـ (Hb1-Hb2-Hb3-Hb4-Hb5).

5 عينات عسل طبيعي نقي من رحيق الأزهار بالتعاون مع مربيي النحل تم ترميزها بـ (Hn1-Hn2-Hn3-Hn4-Hn5).

5 عينات عسل مغشوش بإضافة الشراب البسيط مباشرة في المخبر بنسبة

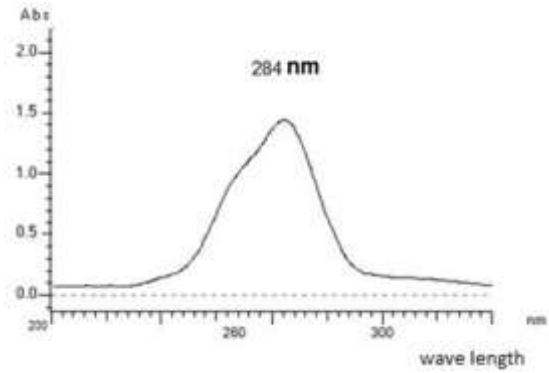
1:3(عسل: شراب بسيط) تم ترميزها بـ (Hi1-Hi2-Hi3-Hi4-Hi5).

3-3-2 تحضير العينات:

قمنا بتحضير العينات و تحليلها بعد جمعها مباشرةً دون تخزين و بدون حفظ في البراد، حيث قمنا بحل (5غرام) من العسل بعد مجانسة محتوى العبوة الرئيسة بشكل جيد في 50 مل ماء HPLC (ثنائي التقطير منزوع الشوارد) و باستخدام الحمام المائي بالأمواج فوق الصوتية (ultrasonic) للمساعدة على مجانسة العينة، كما تم ترشيح العينة باستخدام مرشحة (µm45).

3-3-3: تحديد طول الموجة الأعظمي:

تم تحضير محلول عياري من الهيدروكسي ميتيل فورفورال معلوم التركيز، ثم أجري مسح طيفي لهذا المحلول في مجال الأشعة فوق البنفسجية ابتداءً من طول الموجة 200 نانومتر حتى طول الموجة 390 نانومتر فتم الحصول على قمة ذات امتصاص أعظمي عند طول موجة 284 نانومتر كما هو موضح في (الشكل رقم 1):



الشكل رقم (1) : طيف الامتصاص لمحلول الهيدروكسي ميتيل فورفورال تركيزه (3 ملغ/لتر).

3-3-4 تحديد الشروط الكروماتوغرافية المثلى لقياس تركيز الهيدروكسي ميتيل فورفورال:

تم تحديد تحديد الشروط المثلى باستخدام عمود C18 من نمط EMR Chrometisil, RP-18, 0.5 µm, 250* 4.6 mm ، كما تم تجريب عدة

أطوار متحركة من مزيج الميتانول والماء بنسب مختلفة، فعند استخدام مزيج من طور متحرك يحتوي الميتانول بنسبة أكبر كان زمن الاحتفاظ أقل لكن عند تطبيقها على عينات العسل حدث تداخل مع مركبات أخرى أثرت على التحديد النوعي والكمي للهيدروكسي ميتيل فورفورال، وعلى سبيل المثال: عند استخدام طور متحرك (ميتانول: ماء) بنسبة (10:90) كان زمن الاحتباس 3.1 دقيقة، لكن حدث تداخل مع مركبات أخرى عند هذا الزمن، لذلك قمنا بتعديل نسب الطور المتحرك حتى الوصول إلى زمن احتباس مناسب لتحديد الـ HMF في عينات العسل بدقة وحساسية عالية وبدون ملاحظة أي تداخل مع المركبات الاخرى الموجودة في العسل السوري، كما تم تحديد سرعة التدفق للطور المتحرك تجريبيا باستخدام عدة سرعات متدرجة (0.6_1.2) مل/دقيقة وكان الأنسب لتحديد الـ HMF هو السرعة 0.9 مل/دقيقة، كما أن إضافة حمض الخل للطور المائي بنسبة 3% أدى إلى تحسين شروط الفصل والتحديد، وذلك بعد تجريب نسب مختلفة من حمض الخل تراوحت بين (0–5%)، بالإضافة لذلك قمنا بدراسة تأثير درجة الحرارة على الفصل حيث كانت درجة الحرارة المثلى 25 درجة مئوية. ونتيجة الدراسة تم التوصل إلى الشروط الكروموتوغرافية المثلى من أجل فصل وتحديد تراكيز الهيدروكسي ميتيل فورفورال في المحاليل العيارية وعينات العسل المختلفة، الموضحة في الجدول (1)

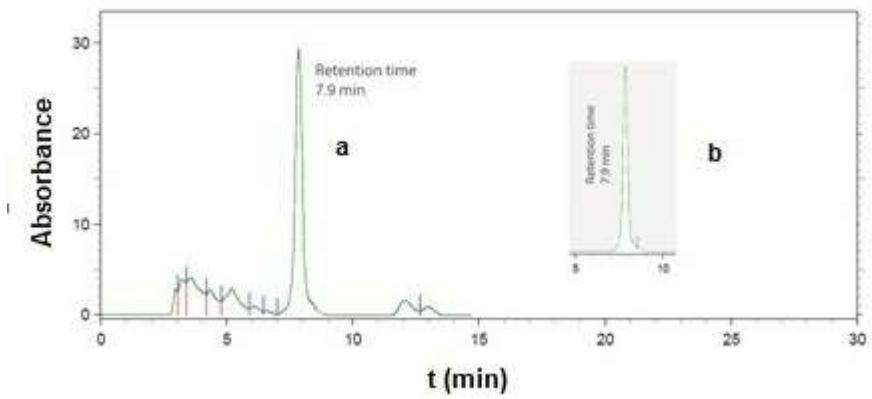
الجدول (1) الشروط التجريبية المثلى لتحديد الـHMF المحددة بطريقة HPLC المطورة

نوع العمود	EMR Chrometisil, RP-18, 0.5 µm, 250* 4.6 mm
الحامل	Silica – ODS -5µm
درجة الحرارة	درجة حرارة الغرفة (25°) مئوية
تدفق الطور المتحرك	0.9 مل / دقيقة
الطور المتحرك	(ميتانول: ماء مع حمض الخل 3%)(85:15)
الكاشف	UV detector
الكمية المحقونة	20 ميكرو لتر
طول الموجة الأعظمي λ max	284 nm

3–3–5: تحديد انتقائية الطريقة المطورة:

تم تحديد انتقائية الطريقة المطورة في الكشف عن الهيدروكسي ميتيل

فورفورال وذلك من خلال تحضير 20 عينة عسل وحقنها ومقارنة الكروماتوغرام الناتج مع الكروماتوغرام لعياري الـ HMF كما هو موضح في (الشكل 2) حيث كان زمن الاحتفاظ للعياري (7.9 دقيقة)، وتم التأكد من انتقائية الطريقة للهيدروكسي ميتيل فورفورال من خلال تطابق زمن الاحتفاظ بين قمة العياري وقمم العينات المحقونة للعسل.



الشكل رقم (2) :الكروماتوغرام الموافق لعينة العياري من الـHMF (b) مع إحدى عينات العسل (a).

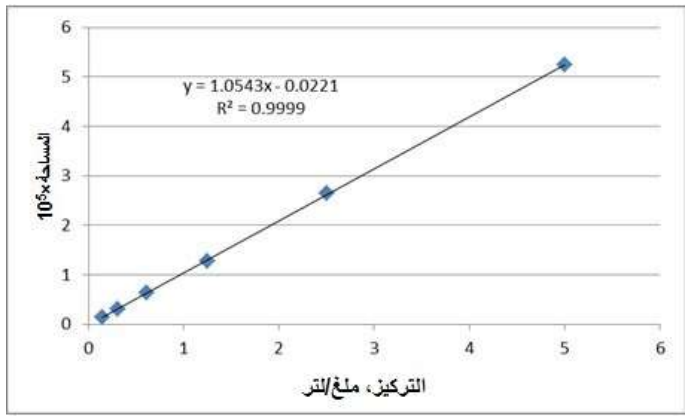
3-3-6: التحقق من صلاحية الطريقة المطورة:

من أجل التحقق من صلاحية الطريقة المطورة قمنا بتحديد المجال الخطي، الحساسية، الدقة، التكرارية، الصحة.

3-3-6-1: تحديد المجال الخطي:

تم رسم المنحني العياري وتحديد معادلة المستقيم وذلك بتحضير 6 محاليل عيارية للهيدروكسي ميتيل فورفورال HMF بالتراكيز التالية:

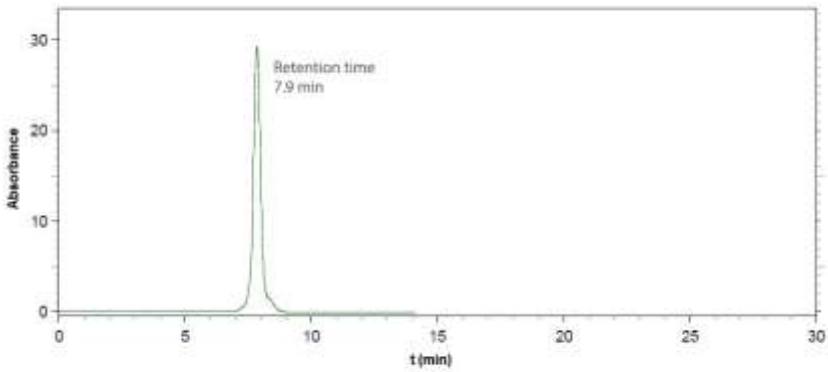
(0.15، 0.31، 0.62، 1.25، 2.5، 5) ملغ/لتر وذلك ابتداءً من محلول أم تركيزه 10 ملغ / 100 مل ثم أخذت الحجوم [0.15 – 0.31 – 0.62 – 1.25 – 2.5 –5] مل على التوالي و مددت إلى 100 مل بماء (HPLC) فتم الحصول على التراكيز المطلوبة، حقن 20 ميكرو لتر من كلٍ من المحاليل الـ6 السابقة ثلاث مرات متتالية ضمن جهاز HPLC ثم حُسبت مساحات القمم الموافقة لـ (HMF) رقمياً باستخدام مكامل الجهاز.



الشكل (3): المنحني العياري للهيدروكسي ميتيل فورفورال عند طول الموجة 284 نانومتر

استناداً إلى الخط المستقيم الذي تم الحصول عليه في الشكل (3) كانت معادلة المستقيم $\mathbf{y}= 1.0543\mathbf{x} \pm 0.0221$ حيث **y** تعبر عن مساحة القمة أما **x** فتعبر عن التراكيز ملغ/لتر أما معامل الارتباط فقد بلغت قيمته $R^2= 0.9999$.

ونعرض كمثال كروماتوغرام فصل الـHMF بتركيز 0.25 ملغ/لتر بتطبيق الشروط التجريبية المطورة باستخدام عمود Chrometisil EMR في الشكل (4):



الشكل (4): الكروماتوغرام الموافق لفصل محلول الـHMF العياري تركيزه 2 ملغ/لتر

3-3-6-2: تحديد حد الكشف والحد الكمي:

يتم التعبير عن حساسية الطريقة المطورة من خلال مصطلحين هما:

حد الكشف Limit of detection (LOD): و تُعرَّف بأنها أقل كمية من المادة

المعَايرة يمكن كشفها و لكن لا يمكن بالضرورة تحديدها كمياً. يتم التعبير عن هذه القيمة بواحدة الـ ppm، الحد الكمي Limit of quantitation (LOQ): و تُعرَّف بأنها أقل كمية من المادة المعَايرة يمكن كشفها بدقة Accuracy و تكرارية Precision مناسبتين. يتم التعبير عن هذه القيمة بواحدة الـ ppm [19].

و من خلال معادلة المستقيم السابقة تم حساب المساحات النظرية للقمم الكروماتوغرافية المقابلة لكل تركيز من التراكيز المحضرة سابقاً ثم حسب حد الكشف والحد الكمي باستخدام القوانين التالية:

$$LOD=3.3\times SD/m$$
$$LOQ=10\times SD/m$$

m= ميل المنحني العياري

SD= الانحراف المعياري عند التركيز 2 ملغ/لتر

فكانت قيمة الـ **LOD=0.07 ppm**

وقيمة **LOQ=0.22 ppm**

3-3-6-3: الدقة:

تم تحضير 6 محاليل عيارية من الـ HMF بتراكيز (0.15، 0.31، 0.62، 1.25، 2.5، 5) ملغ/لتر تم حقن 25 ميكرو لتر من كل محلول من المحاليل السابقة ثلاث مرات متتالية ضمن جهاز الـ HPLC

تم الحصول على 18 قياسا، حُسبت مساحات القمم الموافقة للهيدروكسي ميتيل فورفورال HMF رقمياً باستخدام مكامل الجهاز و أخذت القيمة الوسطية لها كما هو واضح في الجدول رقم (2)

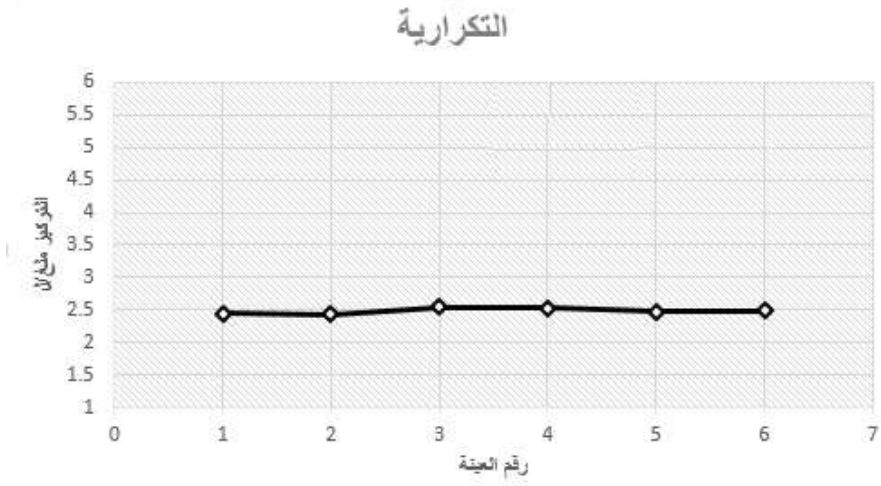
الجدول (2): نتائج تحديد متوسط تراكيز المحاليل العيارية للهيدروكسي ميتيل فورفورال

التركيز النظري المأخوذ ملغ/لتر	متوسط التركيز المحدد ملغ/لتر	الانحراف المعياري SD	الانحراف المعياري النسبي RSD%
0.15	0.153	0.003	2.0
0.31	0.319	0.009	2.8

1.6	0.010	0.630	0.62
0.8	0.010	1.240	1.25
1.2	0.030	2.530	2.50
0.4	0.020	4.980	5.00

3-3-6-4: التكرارية:

تم تحضير 6 محاليل عيارية لـ HMF بنفس التركيز وهو 2.5 ملغ/لتر و بالطريقة السابقة نفسها. تم حقن 25 ميكرولتر من كل محلول من المحاليل السابقة 3 مرات متتالية ضمن جهاز الـ HPLC و حسبت مساحات القمم الموافقة للهيدروكسي ميتيل فورفورال HMF رقمياً باستخدام مكامل الجهاز، ثم مُثلت العلاقة بين تركيز HMF والعينات المختلفة التي تم تحديدها بيانياً كما هو واضح في الشكل رقم (5):



الشكل رقم (5): العلاقة البيانية لتراكيز الـ HMF المحددة للمحاليل العيارية المحضرة بتركيز2.5ملغ/لتر.

الانحراف المعياري SD:

تم حساب الانحراف المعياري عند تركيز 2.5 ملغ/لتر وكان 0.0440 الانحراف المعياري النسبيRSD%:

تم حساب الانحراف المعياري النسبي عند تركيز2.5 ملغ/لتر وكان 1.7686

3-3-6-2: صحة النتائج التحليلية:

تم تحضير 6 محاليل عيارية من HMF بتراكيز (0.15، 0.31، 0.62، 1.25، 2.5، 5) ملغ/لتر تم حقن 25 ميكرو لتر من كل محلول من المحاليل السابقة ثلاث مرات متتالية ضمن جهاز الـ HPLC

تم الحصول على 18 قياسا، حُسبت مساحات القمم الموافقة للهيدروكسي ميتيل فورفورال HMF رقمياً باستخدام مكامل الجهاز وحسبت القيمة الوسطية للتراكيز، ثم تم حساب صحة النتائج التحليلية بتحديد نسبة الاسترداد حيث تراوحت بين (99.2-102.9%) كما هو موضح في الجدول (3):

الجدول (3): نتائج متوسط التركيز المحدد للمحاليل العيارية للـ HMF والنسب المئوية للاسترداد

التركيز النظري المأخوذ ملغ/لتر	متوسط التركيز المحدد ملغ/لتر	النسبة المئوية للاسترداد %
0.15	0.153	102.0
0.31	0.319	102.9
0.62	0.630	101.6
1.25	1.240	99.2
2.50	2.530	101.2
5.00	4.980	99.6

4- النتائج و المناقشة:

تميزت الطريقة المطورة المستخدمة في تحديد تراكيز الـ HMF في عينات العسل المدروسة بزمن احتباس قصير نسبيا 7.9 دقيقة مقارنة مع الدراسات السابقة ، جعل من هذه الطريقة طريقة سريعة وصديقة للبيئة لأننا استهلكنا محلات عضوية أقل مقارنة مع الدراسات السابقة [3،17،18]. والطريقة الدستورية المعتمدة ، كما تعتبر هذه الطريقة المطورة ذات دقة عالية وقدرة جيدة على التحديد الكمي والنوعي للـHMF في عينات العسل، حيث حصلنا على قمم حادة بدون وجود تداخل مع المواد الأخرى في العسل وبتكرارية جيدة عند نفس زمن الفصل.

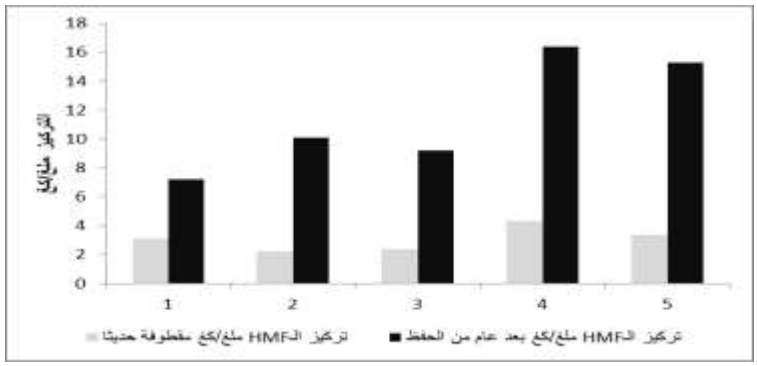
تم تطبيق هذه الطريقة المطورة على عينات العسل الطبيعي عند القطاف وبعد عام من حفظ العينات مخبرياً، و بقياس تراكيز الـHMF لكل عينة 3 مرات متتالية و حساب المتوسط الحسابي، كانت النتائج لعينات العسل المدروسة موضحة

في الجدول (4):

الجدول (4) نتائج تحديد تراكيز الهيدروكسي ميتيل فورفورال في عينات العسل النقية المقطوف حديثا وبعد عام من الحفظ:

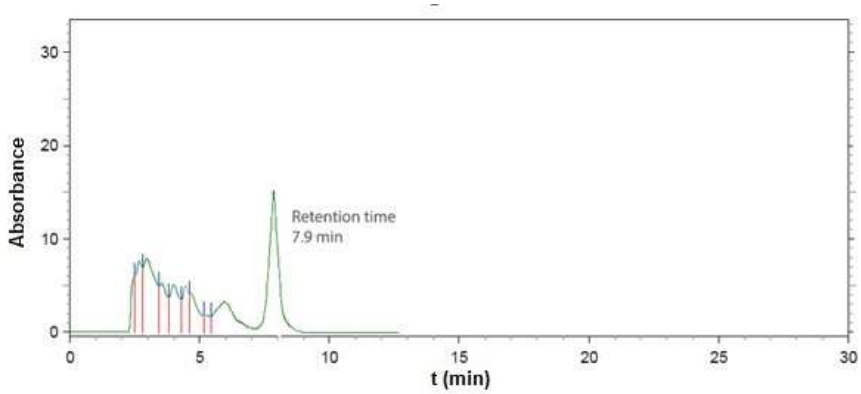
عينات العسل الطبيعي	نوع العينة	HMF (mg/kg)±SD	%RSD	HMF (mg/kg)±SD بعد الحفظ لمدة عام	%RSD
Hn1	نقية	3.1±0.043	1.4	7.2±0.14	1.9
Hn2	نقية	2.2±0.070	3.2	10.1±0.34	3.4
Hn3	نقية	2.4±0.080	3.3	9.2±0.21	2.3
Hn4	نقية	4.3±0.140	3.3	16.4±0.18	1.1
Hn5	نقية	3.4±0.090	2.6	15.3±0.22	1.4

ثم قمنا بتمثيل النتائج بيانياً لكل العينات المدروسة عند التحليل وبعد سنة من الحفظ لل HMF للمقارنة كما يبدو في الشكل رقم (6):



الشكل (6) مقارنة بين تراكيز الـHMF لعينات العسل الطبيعي المقطوفة حديثا وبعد عام من الحفظ

كما هو موضح في الجدول (4) والشكل (6) تراوحت تراكيز الـ HMF في عينات العسل الطبيعي حديثة القطاف بين (2.2 –4.3) ملغ/كغ وهذا يدل على جودة العسل السوري، وبعد عام من الحفظ ارتفعت تراكيز الـ HMF إلى (7.2 –16.4) ملغ/كغ وبقيت ضمن الحدود الدستورية التي تسمح بـ40 ملغ/كغ من الـHMF ، وكمثال عن عينة العسل (Hn1) بعد عام من الحفظ يظهر الشكل رقم (7) الكروماتوغرام الموافق لها.



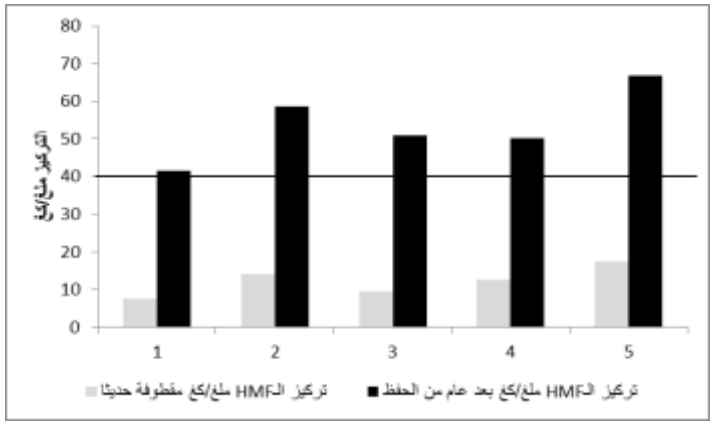
الشكل (7) الكروماتوغرام الموافق لعينة العسل النقية Hn3 بعد عام من الحفظ.

تم تحديد تراكيز الهيدروكسي ميتيل فورفورال في عينات العسل المغشوشة بالتغذية السكرية عند القطاف وبعد عام من الحفظ المخبري، حيث قمنا بقياس تراكيز الـHMF لكل عينة 3 مرات متتالية و أخذنا المتوسط الحسابي لكل قراءة وكانت النتائج لعينات العسل المدروسة كما هي موضحة في الجدول (5):

الجدول (5) نتائج تحديد تراكيز الهيدروكسي ميتيل فورفورال في عينات العسل المغشوشة بالتغذية السكرية عند القطاف وبعد عام من الحفظ:

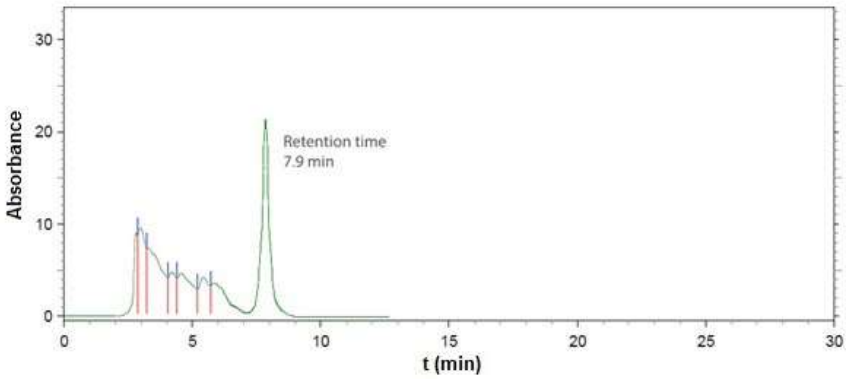
عينات العسل المغشوشة	نوع العينة	HMF (mg/kg)±SD	%RSD	HMF (mg/kg)±SD بعد عام من الحفظ	%RSD
Hb1	تغذية سكرية	7.5±0.12	1.6	41.6±0.52	1.3
Hb2	تغذية سكرية	14.1±0.23	1.6	58.5±0.83	1.4
Hb3	تغذية سكرية	9.6±0.14	1.5	51.0±1.20	2.4
Hb4	تغذية سكرية	12.7±0.22	1.7	50.3±0.64	1.3
Hb5	تغذية سكرية	17.5±0.25	1.4	66.8±0.75	1.1

ثم قمنا بتمثيل النتائج بيانياً لكل العينات المدروسة عند التحليل وبعد سنة من الحفظ للـ HMF للمقارنة كما يبدو في الشكل رقم (8):



الشكل (8) مقارنة بين تراكيز الـHMF لعينات العسل السوري المغشوش بالتغذية السكرية المقطوفة حديثا وبعد عام من الحفظ

كما هو موضح في الجدول (5) والشكل (8) تراوحت تراكيز الـ HMF في عينات العسل المغشوشة بالتغذية السكرية حديثة القطاف بين (7.5 –17.5) ملغ/كغ



الشكل (9) الكروماتوغرام الموافق لعينة العسل Hb2 المغشوشة بالتغذية السكرية حديثة القطاف.

وكانت ضمن الحدود الدستورية المسموح بها، وبعد عام من الحفظ ارتفعت تراكيز الـ HMF بشكل ملحوظ إلى (41.6 –66.8) ملغ/كغ وتجاوزت الحدود الدستورية، وكمثال عن عينة العسل (Hb2) يظهر الشكل رقم (9) الكروماتوغرام الموافق لها.

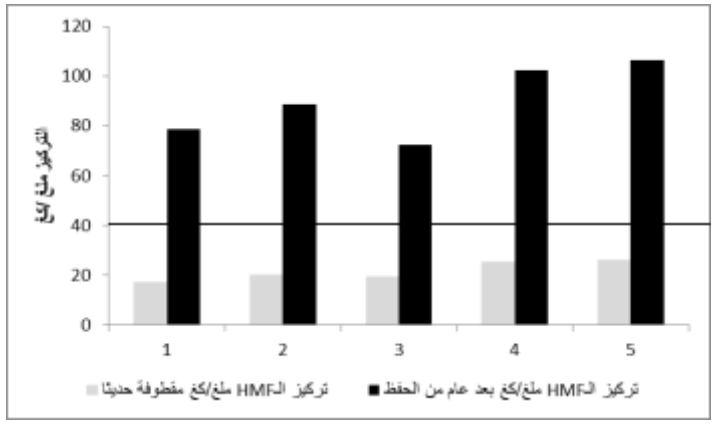
تم تحديد تراكيز الهيدروكسي ميتيل فورفورال في عينات العسل المغشوشة

بإضافة شراب بسيط عند القطاف وبعد عام من الحفظ المخبري، حيث قمنا بقياس تراكيز الـHMF لكل عينة 3 مرات متتالية و أخذنا المتوسط الحسابي وكانت النتائج لعينات العسل المدروسة كما هي في الجدول (6):

الجدول (6) نتائج تحديد تراكيز الهيدروكسي ميتيل فورفورال في عينات العسل قبل الحفظ وبعد عام من الحفظ:

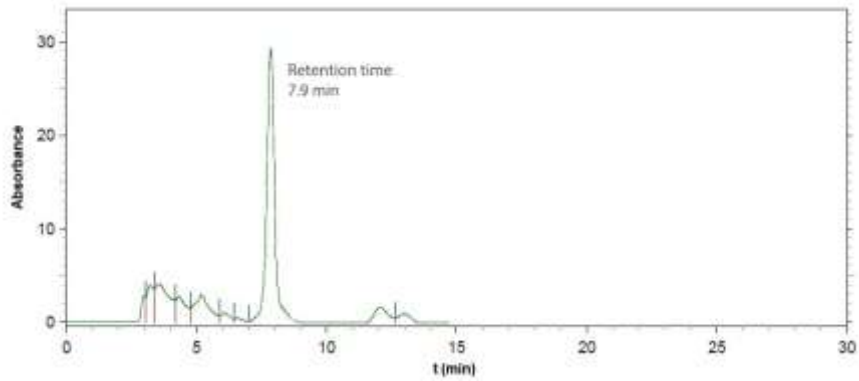
عينات المغشوشة	نوع العينة	HMF (mg/kg)±SD	%RSD	HMF (mg/kg)±SD بعد عام من الحفظ	%RSD
Hi1	إضافة شراب بسيط	17.3±0.40	2.3	78.75±0.85	1.1
Hi2	إضافة شراب بسيط	20.3±0.35	1.7	88.63±1.21	1.4
Hi3	إضافة شراب بسيط	19.4±0.20	1.0	72.3±0.55	0.8
Hi4	إضافة شراب بسيط	25.3±0.61	2.4	102.3±1.30	1.3
Hi5	إضافة شراب بسيط	26±0.56	2.2	106.2±0.95	0.9

ثم قمنا بتمثيل النتائج بيانياً لكل العينات المدروسة عند التحليل وبعد سنة من الحفظ للـ HMF للمقارنة كما يبدو في الشكل رقم (10):



الشكل (10) تركيز الـHMF لعينات العسل السوري المغشوش بإضافة الشراب البسيط المقطوفة حديثا وبعد عام من الحفظ

كما هو موضح في الجدول (6) والشكل (10) تراوحت تراكيز الـ HMF في عينات العسل المغشوشة بإضافة الشراب البسيط حديثة القطاف بين (17.3 –26) ملغ/كغ ولكنها بقيت ضمن الحدود الدستورية، وبعد عام من الحفظ ارتفعت تراكيز الـHMF بشكل ملحوظ إلى (72.3 –106.2) ملغ/كغ وتجاوزت الحدود الدستورية. وكمثال عن عينة العسل (Hi2) يظهر الشكل رقم (11) الكروماتوغرام الموافق لها.



الشكل (11) الكروماتوغرام الموافق لعينة العسل Hi2 المغشوشة بإضافة الشراب البسيط حديثة القطاف.

الاستنتاجات:

حققت الطريقة الكروماتوغرافية المطورة دقة في تحديد تراكيز الـHMF في عينات العسل المدروسة، كما كانت طريقة سريعة، اقتصادية،انتقائية لذلك يمكن اعتمادها كطريقة مرجعية لتحديد تراكيز الـ HMF في عينات العسل السوري، وتبين من نتائج هذه الدراسة أن:

1- لم تتجاوز تراكيز الهيدروكسي ميتيل فورفورال في جميع عينات العسل الطبيعي السوري حديثة القطاف وبعد عام من الحفظ الحدود الدستورية العالمية والمواصفة القياسية السورية وهذا مؤشر على جودة العسل السوري.

2- أكدت هذه الطريقة المطورة والتي درست لأول مرة على عينات عسل معتمدة على التغذية السكرية أن غش العسل بالتغذية السكرية أدى إلى ارتفاع تراكيز الهيدروكسي ميتيل فورفورال في جميع العينات المغشوشة بشكل ملحوظ، وتجاوزت الحدود الدستورية العالمية والمواصفة القياسية السورية في العينات المحفوظة لمدة عام، وهذا يدل على أن التغذية السكرية تؤدي إلى تشكيل بيئة

مناسبة لتشكل الهيدروكسي ميتيل فورفورال مع الزمن.

3- أكدت هذه الطريقة المطورة والتي درست لأول مرة على عينات عسل مغشوشة بإضافة الشراب البسيط أن هذا الغش أدى إلى ارتفاع تراكيز الهيدروكسي ميتيل فورفورال في جميع العينات المغشوشة بشكل ملحوظ، وتجاوزت الحدود الدستورية العالمية والمواصفة القياسية السورية في العينات المحفوظة لمدة عام، وهذا يدل على أن إضافة الشراب البسيط تؤدي إلى تشكيل بيئة مناسبة لتشكل الهيدروكسي ميتيل فورفورال مع الزمن نتيجة تغيير تركيب السكريات في العسل وانخفاض درجة الـPH.

المراجع:

1) Capuano E., Fogliano V., 2011- **Acrylamide and 5-hydroxymethyl-furfural (HMF), A revieew of metobolosim, toxity, occurrence in food and mitiagtion strategies**. *LWTFood Sci. Technol*, 44, 793-810.
2) Teixido E., Nunez O., Santos FJ., Galceren MT., 2011- **5-Hydroxymethylfurfural content in foodstuffs determined by micellar electrokinetic chromatography.** *Food Chem*, 126, 1192-1197.
3) Spano N., Casula L., Panzanelli A., Pilo MI., Piu PC, Scanu R., Tapparo A., Sanna G., 2006- **A RP-HPLC determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey - The case of strawberry tree honey.** *Talanta*, (68) 4:1390-1395.
4) Ulbricht RJ., Northup SJ., Thomas JA., 1984- **A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions.** *Fund App Toxicol*, 4:843–853.
5) Bruce WR., Archer MC., Corpet DE., Medline A., Minkin S., Stamp D., Yin Y., Zhang XM., 1993- **Diet, aberrant crypt foci and colorectal cancer,** *Mutat Res*. 290, 111-118.
6) Zhang XM., Chan CC., Stamp D., Minkin S., Archer MC., Bruce WR., 1993- **Initiation and promotion of colonic aberrant crypt foci in rats by 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in thermolyzed sucrose**, *J Carcinog*, 14:4, 773-775.
7) Jeuring HJ., Kuppers FJ., 1980- **High performance liquid chromatography of furfural and hydroxymethylfurfural in spirits and honey**, *J Assoc Off Anal Chem*, 63, 1215–1218.

8) Truzzi C., Annibaldi A., Illuminati S., Finale C., Rossetti M., Scarponi G., 2012- **Determination of very low levels of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde (HMF) in natural honey: comparison between the HPLC technique and the spectrophotometric white method**, *J Food Sci*,(77):7, 784-90.
9) Gaspar E., Lopes JF., 2009-**Simple gas chromatographic method for furfural analysis,** *J Chromatogr A*, (1216):14, 2762-2767.
10) Teixido E., Moyano E., Santos FJ., Galceran MT.2008- **Liquid chromatography multi-stage mass spectrometry for the analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods.** *Chromatographia A* ,(1185):1, 102-108.
11) Bahaffi SO., Al-Lihaibi SS., 2005- **Determination of volatile organic compounds in local honey by gas chromatography-mass spectrometer.** *Commun Fac Sci Univ Ank Series B*, (51):2, 1-12.
12) Chernetsova ES., Revelsky IA., Morlock GE., 2011- **Fast quantitation of 5-hydroxymethylfurfural in honey using planar chromatography.** *Anal Bioanal Chem***,** (401):1, 325-332.
13) Morales FJ., Jimenez-Perez S., 2001- **Hydroxymethylfurfural determination in infant milk based formulas by micellar electrikinetic capillary chromatography**, *Food Chem*, 72, 525-531.
14) Winkler O., 1955- **Beitrag zum Nachweis und zur Bestimmung von Oxymethylfurfural in Honigund Kunsthonig**. Z. Lebensm. *Forsch.* 102, 160-167.
15) White J., 1979- **Spectrophotometric Method for Hydroxymethylfurfural in Honey**. *J. AOAC*, 509.
16) Nozal M., Bernal J., Toribio L., Jimenez J., Martin M., 2001- **High-performanceLiquidChromato¬graphicDetermination of Methyl Anthranilate, Hydroxymethylfurfural and Related Compounds in Honey,** *J. Chromatogr A*, 917, 95–103.
17) Cemalettin Baltachi., Zeyneb Aksit.,2016-|**Validation of HPLC Method for the |Determination of 5-hydroxymethylfurfural in Pestil Kome Jam Marmalad and pekmis,** *Hittite Journal of Science and Engineering*,(3):2 ,91-97.

18) Matthew Pappalardo., Linda Pappalardo., Peter Brooks.,2016- **Rapid and Reliable HPLC Method for the Simultaneous Determination of Dihydroxyacetone Methylglyoxal and 5-Hydroxymethylfurfural in Leptospermum Honeys**, *PLoS ONE*, 11, 110-113.
19) Analytical Detection Limit Guidance & Laboratory Guide for Determining Method Detection Limits, Wisconsin Department of Natural Resources Laboratory Certification Program, April 1996.