

Hydroxymethyl-furfurol in Honig. 1. Mitteilung, Quantitative Bestimmung und Umwandlung des Hydroxymethyl-furfurols

Autor(en): **Romann, E. / Staub, M.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und
Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **52 (1961)**

Heft 1

PDF erstellt am: **30.06.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-981750>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Hydroxymethyl-furfurol in Honig

1. Mitteilung:

Quantitative Bestimmung und Umwandlung des Hydroxymethyl-furfurols

Von *E. Romann* und *M. Staub*

(Aus dem kantonalen Laboratorium Zürich)

Veranlassung zu dieser Arbeit gab der Umstand, dass ausländische Honige aus tropischen und subtropischen Gegenden höhere Gehalte an Hydroxymethyl-furfurol (HMF) aufweisen als inländische Honige. Es stellt sich dabei die Frage, ob ein höherer Gehalt an HMF auf klimatische Verhältnisse, auf die Behandlung des Honigs oder auf einen allfälligen Zusatz von Invertzucker zurückzuführen ist.

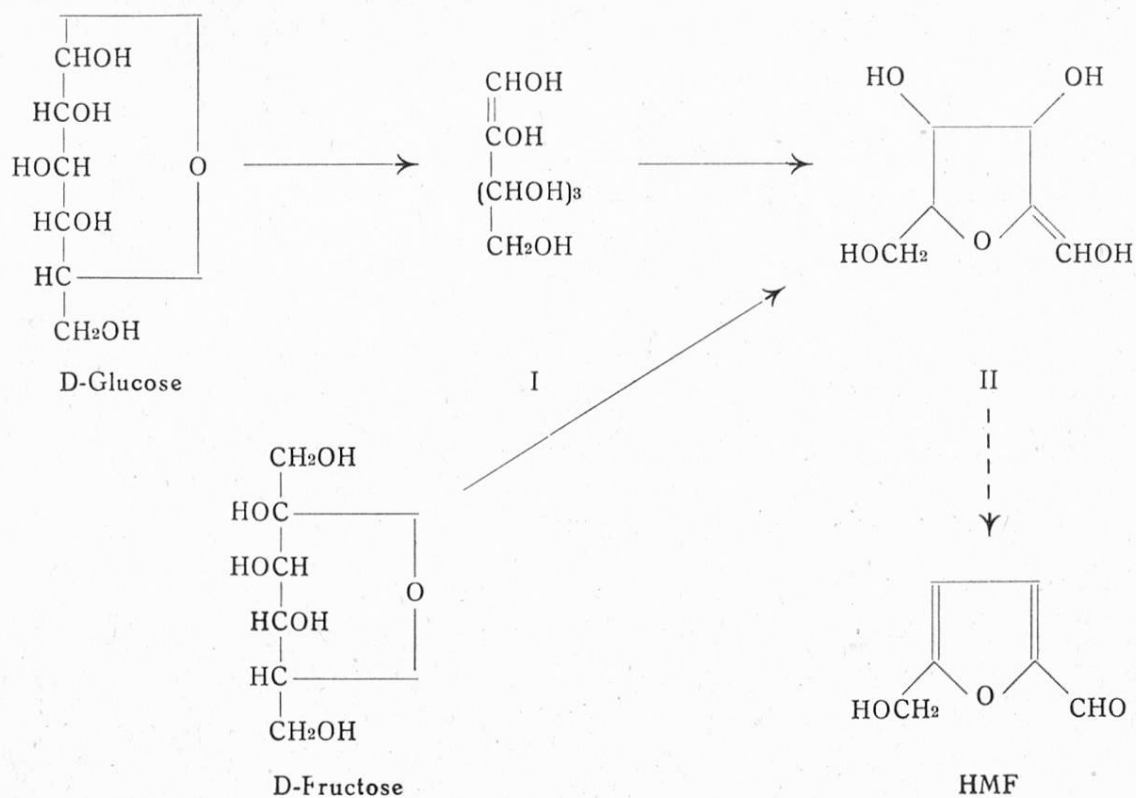
Zunächst unterzogen wir die Methode zur Bestimmung des HMF einer kritischen Prüfung, wobei einige recht interessante Beobachtungen gemacht wurden, die für die Beurteilung von Honigen berücksichtigt werden müssen.

Bildung und Vorkommen des 5-Hydroxymethyl-furfurols

HMF ist eine langsam in natürlichen und künstlichen sauren Lösungen und Konzentraten von Zuckern sich bildende Begleitsubstanz. Die Menge des dabei vorkommenden HMF ist von den entsprechenden Lagerungs- und Behandlungsbedingungen abhängig. Im besonderen sind an der Bildung von HMF Hexosen wie Glucose, Fructose, Mannose und Sorbose ¹⁾ beteiligt. Keto-hexosen wiederum zeigen dabei eine erhöhte Reaktionsfähigkeit und ergeben eine grössere Ausbeute an HMF als Aldo-hexosen ²⁾²⁷⁾. Die Bildung des HMF aus Hexosen wird als eine säurekatalysierte Enolisierungs-Dehydratisierungsreaktion angesehen, die bei der Fructose direkt unter Erhaltung des Furanoseringes ³⁾ über das Enol II (Schema I) verläuft, während bei der Glucose das Endiol I als erstes Zwischenprodukt betrachtet wird ⁴⁾. Obwohl auch andere Mechanismen diskutierbar sind ⁵⁾, bleibt die Tatsache, dass aus 2,5-Anhydro-furanosen mit verd. Mineralsäure äusserst leicht Furfurol gebildet werden ³⁾. In Invertzuckermischungen stammt das eventuell vorhandene HMF hauptsächlich von der Fructose.

Zur Wirkung der Säure mag entgegengehalten werden, dass die säurefreie, reine wässrige Lösung von Glucose in 5stündiger Behandlung bei 100 Grad ebenfalls HMF bildet ¹¹⁾²⁷⁾. Bei dieser Temperatur ist jedoch eine, die Reaktion verursachende Spur von Wasserstoffprotonen, die durch geringe Enolisierung oder Hydratisierung der Aldehydgruppe entstehen können, nicht ausgeschlossen.

Präparativ lässt sich HMF in 54prozentiger Ausbeute aus Glucose gewinnen ⁴⁾. Im folgenden seien einige uns interessierende Vorkommen des HMF in reinen Zuckerlösungen, natürlichen Konzentraten und in Bienenhonig vermerkt.



Schema I

Vollständig reine Zuckerlösungen haben ein UV-Spektrum mit sehr geringer Absorption zwischen 240 und 300 m μ . Längere Zeit gelagerte Zucker, käufliche Saccharose und natürliche Fruchtkonzentrate sind jedoch meistens mit ihren Abbauprodukten verunreinigt, die im UV erkennbar sind. Die Entstehung von HMF in schwach sauren Lösungen von reinen Zuckern lässt erkennen, dass die Menge des gebildeten HMF und die häufig damit verbundene Bräunung einerseits mit steigendem pH, andererseits mit zunehmender Temperatur wächst.^{6-9)11) 27)} Glucose und Fructose sind in Lösung bei einem pH von 3-4 relativ beständig, wobei auch die Zersetzung zu HMF ein Minimum erreicht¹⁹⁾²⁰⁾²⁴⁾²⁷⁾. Ebenso ist die Bildungsgeschwindigkeit des HMF bei der Verwendung von organischen Säuren davon abhängig, welche Säure eingesetzt wird. So ergibt die Lösung von Fructose beim Erwärmen mit Oxalsäure die grösste Anreicherung an HMF, während dies bei der Glucose mit Weinsäure der Fall ist^{9b)}. In Uebereinstimmung mit diesen Befunden an reinen Zuckern stehen auch die Untersuchungen mit natürlichen Fruchtkonzentraten²³⁾¹³⁾²⁵⁻²⁸⁾, wobei festgestellt wurde, dass anwesende Metallionen die Bildung von HMF nicht beeinflussen, wohl aber die Bräunung. Ebenso ist der Gehalt der Kunsthonige an HMF recht gross⁸⁾, sofern sie z.B. aus Saccharose durch Erwärmen mit wenig Mineralsäure hergestellt wurden. Endlich sei auf den uns besonders interessierenden Bienenhonig hingewiesen, der je nach Behandlung und je nach Alter¹⁴⁾ überhaupt kein oder nur geringe Mengen HMF enthält⁶⁻⁸⁾¹⁵⁾²⁵⁾. Darauf werden wir später eintreten.

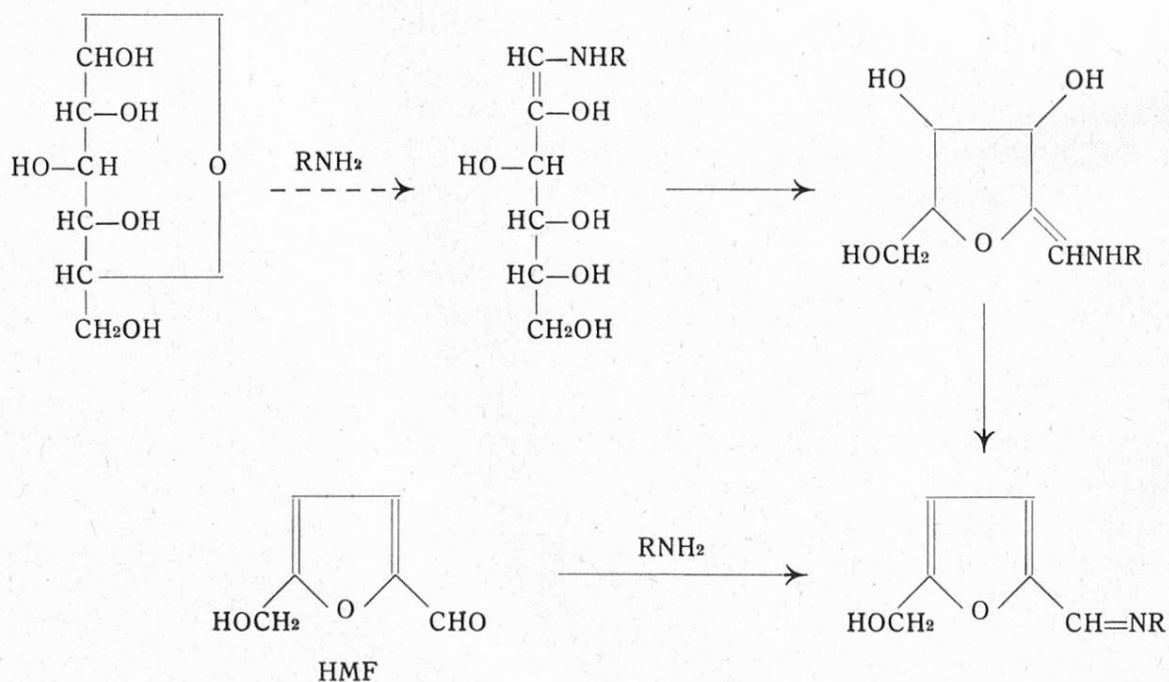
Chemische Eigenschaften des 5-Hydroxymethyl-furfurols

Gerade im Hinblick auf Honige, die normalerweise keinen oder nur einen geringen Gehalt an HMF aufweisen, scheint es unseres Erachtens durchaus wichtig, Reaktionen und Umwandlungen des HMF selbst in Betracht zu ziehen. Die Bildungsgeschwindigkeit des HMF in Honigen bei Zimmertemperatur ist sehr langsam. Die Menge des wirklich gebildeten HMF kann aber unter normalen Verhältnissen grösser als der analytisch erfassbare Anteil sein, wenn mögliche Abbaureaktionen in vergleichbarer Reaktionsgeschwindigkeit zur Entstehung ablaufen. Bei der grossen Instabilität der ungesättigten Aldehyde lassen sich folgende Reaktionen des im Honig gebildeten HMF in Erwägung ziehen.

1. Reaktionen, die zu höhermolekularen Produkten führen

a) Maillard-Reaktion

Dieser Reaktionstypus ist in ausführlicher Abhandlung von G. P. Ellis¹⁶⁾ bearbeitet worden. Man versteht darunter die Kondensationsreaktion freier Aminogruppen von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen mit den glucosidischen Zentren der Zucker. Aus dem Schema II ist die Möglichkeit ersichtlich, dass an Stelle der Zucker das reaktionsfähigere HMF treten und damit abgebaut werden kann. Die Maillardreaktion (oft auch nichtenzymatische Bräunung genannt) ist vielfach von komplexen Reaktionen unter Bildung von braunen Pigmenten und Polymeren gefolgt²⁹⁾. Deshalb steht die Braunfärbung der Honige oft in direktem Zusammenhang mit dem Gehalt an Aminosäuren und Proteinen.



Schema II

J. E. Schade, G. L. Marsh und J. E. Eckert^{15b)} fanden in ihren eingehenden Untersuchungen über die Abnahme der Diastaseaktivität und die Zunahme des HMF-Gehaltes beim Erwärmen von Honigen, dass eine wesentliche Zunahme des HMF erst dann eintrat, wenn die Diastaseaktivität schon stark abgenommen hatte. Auf Grund weiterer Ergebnisse vertreten sie die Ansicht, die Bildung des HMF beim Erwärmen sei umso grösser, je höher der ursprüngliche Gehalt an HMF gewesen sei. Wenn dieses letztere Postulat richtig ist, dann können die beiden Befunde durchaus dahin gedeutet werden, dass vor allem beim Erwärmen von Honigen ein erster Anteil des gebildeten HMF für die Absättigung der reaktivsten Zentren gewisser Inhaltsstoffe, inklusive der Diastase, verbraucht wird. Für die Diastase ist es dann wahrscheinlich gleichbedeutend mit Inaktivierung. Eine Aktivierung der HMF-Bildung durch bereits vorhandenes HMF ist aber kaum wahrscheinlich.

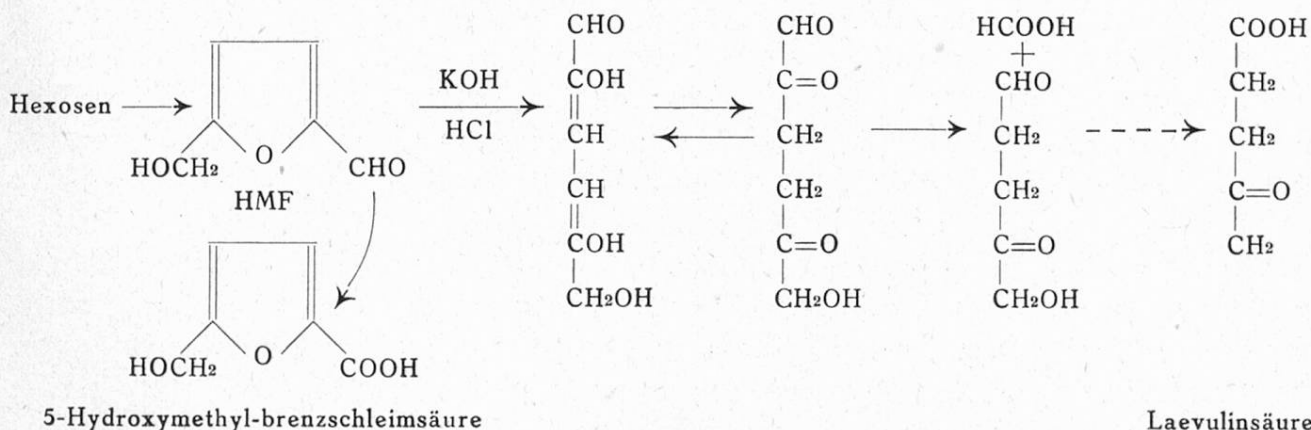
Interessanterweise sei hier noch die Darstellung von künstlichem Honigeruch erwähnt, der durch Kochen der Lösungen von Glucose, Fructose und Galactose mit Phenylalanin oder Tyrosin erhalten wird¹⁷⁾.

b) Aldol-Kondensation, Polymerisation

Entsprechend der Maillard-Reaktion kann HMF Aldolkondensationen eingehen. Lässt man andererseits reines HMF dem Lichte oder der Luft ausgesetzt, so stellt man bald Polymerisation unter Braunfärbung fest. Die Bräunung von Zuckern, (Caramelisierung, nichtenzymatische Bräunung), vorab in sauren Medien, ist in letzter Zeit häufig untersucht worden. Sie beruht meistens auf der primären Bildung von HMF, das dann in sekundärer Reaktion mit sich selbst oder mit Zuckern braune Kondensations-Polymerisationsprodukte bildet.

2. Abbau des HMF zu Laevulinsäure-Ameisensäure

Der Abbau von Hexosen zu Laevulinsäure-Ameisensäure erfolgt nur über HMF als Zwischenprodukt¹⁸⁾²¹⁾. Laevulinsäure kann aus HMF direkt in 80prozentiger Ausbeute gewonnen werden¹⁸⁾.



Schema III

In beträchtlicher Menge wird Laevulinsäure aus Hexosen mit starker Mineralsäure und in der Wärme gebildet ⁶⁾²¹⁾²²⁾. Im UV ¹²⁾ weist die Säure ein breites Maximum bei 270 m μ auf, mit einer schwachen molaren Extinktion ϵ von nur 25. Gelagerte Glucose zeigt im UV ebenfalls ein schwaches Maximum bei ca. 265 m μ . Prüft man die UV-Spektren von 2prozentigen wässrigen Honiglösungen, so stellt man ebenfalls eine schwache Absorption bei 265 bis 270 m μ fest, was ein Hinweis auf Laevulinsäure sein könnte (Abb. 1). Auf chemischem Wege haben wir jedoch bis jetzt in Honigen keine Laevulinsäure nachweisen können.

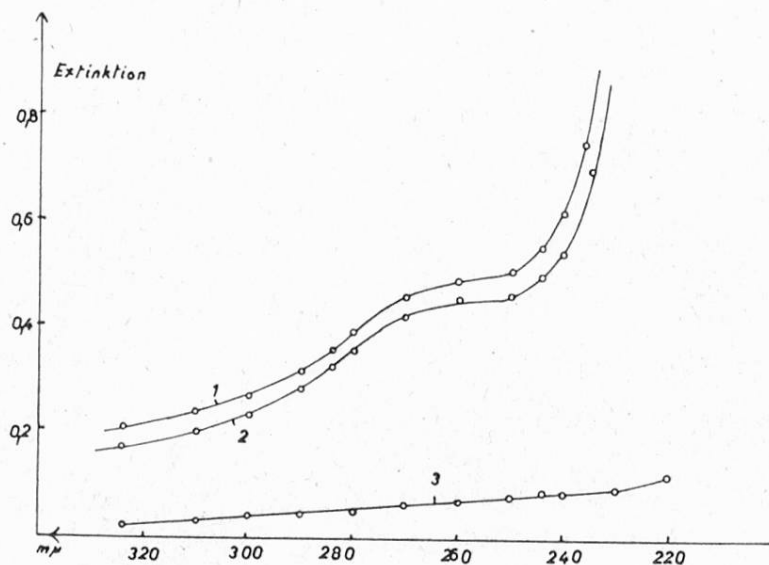


Abbildung 1

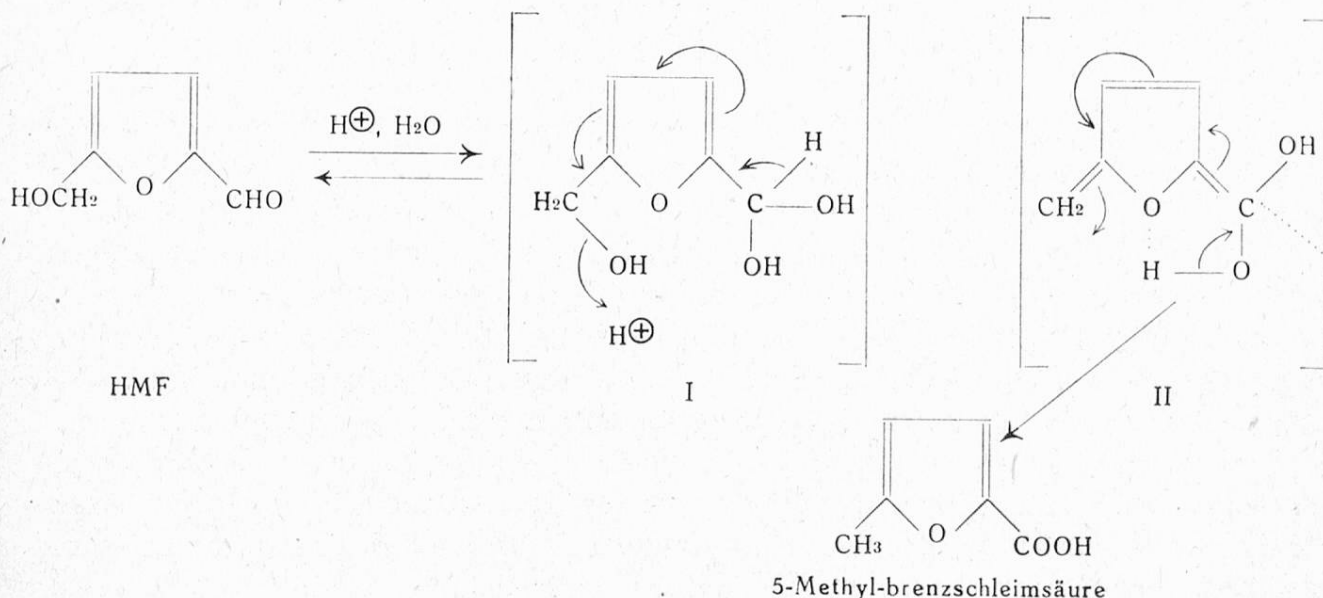
UV-Spektrum der wässrigen Analysenlösungen von Bienenhonig. Kurve 1: 2prozentige geklärte, wässrige Honiglösung. Kurve 2: Dieselbe Lösung nach 6stündiger Extraktion mit Aether. Kurve 3: Aetherextrakt nach Verdampfen des Aethers und Lösen des Rückstandes in Wasser.

3. Oxydation zu 5-Hydroxymethyl-brenzschleimsäure und-Umlagerung zu 5-Methyl-brenzschleimsäure

Aldehyde lassen sich leicht zu den entsprechenden Carbonsäuren oxydieren. Lässt man HMF in verdünnten wässrigen Lösungen an der Luft stehen, so wird die Aldehydgruppe durch die Einwirkung des gelösten Sauerstoffes und der Kohlensäure oxydiert ¹²⁾. In eigenen Versuchen liessen wir neutrale wässrige Lösungen von reinem HMF (50-100 mg HMF/1) unter Stickstoff im Dunkeln bei 20 Grad stehen. Diese Lösungen zeigten während 2 Monaten nicht die geringste Veränderung des im UV ermittelten Gehaltes an HMF (Abb. 2, Kurve 1). Lässt man dagegen Lösungen gleicher Konzentration unter gleichen Bedingungen an der Luft (offener Messkolben) stehen, so verschwindet innerhalb von 30 bis 45 Tagen (Abb. 2, Kurve 2) die gesamte Menge an HMF und man erhält in gut 90prozentiger Ausbeute die entsprechende 5-Hydroxymethylbrenzschleimsäure (Schema III). Die Oxydationsgeschwindigkeit scheint von der Konzentra-

tion des HMF und der in die Lösung hineindiffundierenden Menge Sauerstoff abhängig zu sein ¹²⁾²⁷⁾, während für die Auslösung der Reaktion eine Spur Säure, in diesem Fall Kohlensäure, nötig ist.

Des weitern liessen wir verdünnte wässrige Lösungen von HMF, die mit Citrat- oder Phosphatpuffern auf einem pH von 4-5 eingestellt worden waren, teils an der Luft, teils unter Stickstoff stehen. In denjenigen Lösungen, die mit der Luft in Kontakt standen, verschwand im UV die Extinktion bei 284 m μ innerhalb von 30 Tagen (Abb. 2, Kurve 3), und man erhielt das typische 5-Hydroxymethyl-brenzschleimsäure-Spektrum. Zu unserer grossen Ueberraschung konnte der genau gleiche Reaktionsverlauf (Abb. 2, Kurve 4) auch in solchen Lösungen festgestellt werden, die fest verschlossen unter Stickstoff aufbewahrt worden waren. Das UV-Spektrum der Endlösung wies ebenfalls ein λ_{\max} von 251 m μ auf. Dennoch hatte unter Abwesenheit von irgendwelchen oxydierenden Reagenzien keine 5-Hydroxymethyl-brenzschleimsäure gebildet werden können. Wahrscheinlich handelt es sich hier um eine säurekatalysierte, intramolekulare «Allylumlagerung», wie sie elektronentheoretisch im Schema IV dargestellt ist.



Schema IV

Darnach steht das HMF mit dem Hydrat I im Gleichgewicht, aus welchem durch einfache Wasserabspaltung die Verbindung II entsteht. Durch Wanderung des Wasserstoffprotons der einen Hydroxylgruppe zur Methylengruppe und entsprechender Verschiebung der Doppelbindungen bildet sich die 5-Methyl-brenzschleimsäure. Diese weist die gleiche Oxydationsstufe wie das ursprüngliche HMF auf.

Diese Umlagerung von Allylaldehyd zur Säure ist pH-abhängig; denn in einer entsprechenden, mit Salzsäure auf pH 2,6 eingestellten, wässrigen HMF-Lösung hatte die Extinktion bei 284 m μ nach 80 Tagen erst um 40 Prozent abgenommen (Abb. 2, Kurve 5).

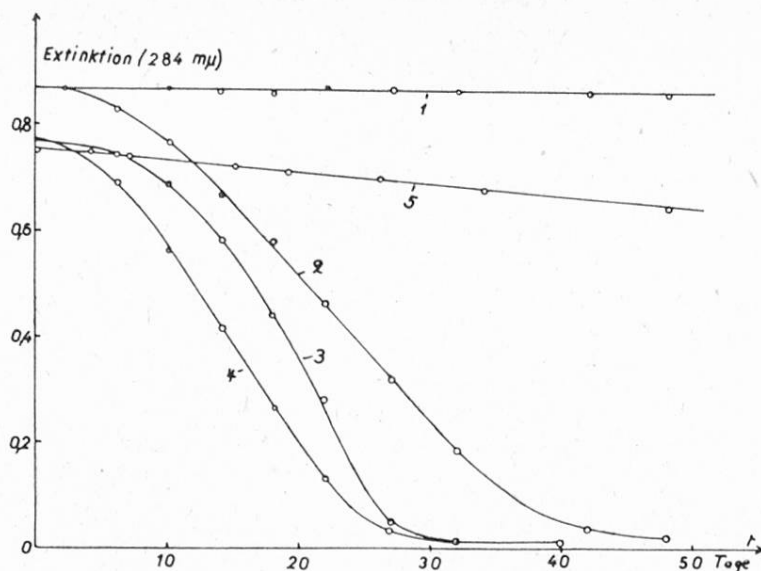


Abbildung 2

Verhalten des HMF in verdünnten, wässrigen Lösungen (Extinktion bei 284 m μ in Funktion der Zeit). Kurve 1: Neutrale Lösung unter N₂; Kurve 2: Reines Wasser in Kontakt mit der Luft; Kurve 3: Mit Citratpuffer, pH 5, unter N₂; Kurve 4: Mit Citratpuffer, pH 5, in Kontakt mit der Luft; Kurve 5: HCl, pH 2,6, unter N₂.

Die Oxydation des HMF zur 5-Hydroxymethyl-brenzschleimsäure ist deshalb eine weitere mögliche Abbaureaktion im Honig.

Das Verhalten reiner chemischer Verbindungen sowie deren Reaktionsverlauf in verdünnten Lösungen sind nicht ohne starke Vorbehalte auf das komplexe, experimentell oft schwer erfassbare Verhalten konzentrierter Zuckerlösungen übertragbar. Trotz dem ungefähr 14 bis 20 Prozent betragenden Wassergehalt im Honig ist dieses Wasser infolge der grossen Anhäufung von Hydroxylgruppen im Zucker durch Assoziation stark «gebunden» und steht damit kaum als Lösungsmittel im üblichen Sinn zur Verfügung. Noch schwieriger wird die Beurteilung, wenn bei teilweiser Kristallisation des Honigs (Kandieren) reaktive Zentren der Verbindungen im Kristallgefüge blockiert und damit wahrscheinlich jeder Reaktion entzogen sind.

Der wirkliche Verlauf der erwähnten Reaktionen im Honig selbst ist auch nur im Naturprodukt direkt richtig erkennbar. Da diese Untersuchungen einige Zeit beanspruchen, werden wir in einem späteren Zeitpunkt darüber berichten.

Qualitative und quantitative Bestimmung der HMF im Honig

a) Qualitativ

Auf die vielen Arbeiten und Hinweise in der Literatur¹⁵⁾, über den von J. Fiehe^{15d)} gefundenen Nachweis von HMF mit Resorcin-Salzsäure, wollen wir hier nicht eintreten. In eigenen Versuchen stellen wir fest, dass 5 μ g reines HMF, das in einer Porzellanschale aus aetherischer Lösung nach dem Konzentrieren auf ca. 1 cm² eingedunstet wurde, eine eindeutige kirschrote Färbung mit Resorcin-Salzsäure ergab.

Die Aetherextrakte * inländischer Honige sowie solcher Honige, denen man künstlich HMF zugesetzt hatte, ergaben erst bei einem Gehalt von mindestens 0,8 bis 1 mg HMF pro 100 g Honig einen eindeutigen *Fiehe*-Test, was auch von andern Autoren gefunden worden ist ^{15b}). Zentralamerikanische Honige zeigten jedoch selbst bei höheren Gehalten an HMF oft keine einwandfreie *Fiehe*-Reaktion, da diese durch beträchtliche Mengen mitextrahierter Wachse und Oele gestört wurde. Bei allen Honigen mit positivem *Fiehe*-Test liess sich in der quantitativen Analyse eindeutig HMF bestimmen. Entgegen andern Angaben ^{9e}) ermittelten wir beim hellroten 2,4-Dinitrophenylhydrazon des HMF nach viermaligem Umkristallisieren aus Chloroform-Aethanol einen scharfen Schmelzpunkt von 223,5 bis 224 Grad. Die Analyse dieses Produktes stimmte auf die Formel $C_{12}H_{10}O_6N_4$ **). Das in der Literatur angegebene Produkt von 197 bis 200 Grad ist wahrscheinlich ein Gemisch der syn- und anti-Form des Hydrazons, in Analogie zu den gleichen Derivaten des Furfurols.

b) *Quantitative Bestimmung des 5-Hydroxymethyl-furfurols*

Die quantitative Erfassung des HMF in Honigen, die auf der Bildung von Derivaten, auf papierchromatographischen ²⁰), oder auf kolorimetrischen Bestimmungen beruht ^{8)15b}), ziehen wir hier nicht in Betracht, da diese Methoden für die Bestimmung der uns interessierenden kleinen Anteile HMF im Honig oft ungenau sind. Wir beschränkten uns auf UV-spektroskopische Messungen, wie sie für Honig schon des öftern angewandt worden waren ^{6-8)15a}). Das UV-Spektrum des HMF ¹²) weist ein starkes Maximum bei 284 m μ ($\epsilon = 16\,700$) und ein kleineres Maximum bei 230 m μ ($\epsilon = 3100$) auf, während bei 245 m μ ($\epsilon = 1700$) ein Minimum festzustellen ist***.

Im UV-Spektrum von 2prozentigen wässrigen HMF-freien Honiglösungen (Abb. 1, Kurve 1) ist meistens eine breite schwache Absorptionsbande zwischen 260 und 275 m μ zu erkennen, während die Kurve bei 230 bis 240 m μ steil ansteigt. Die Form dieser Absorptionskurve ist für alle Honige ungefähr gleich, jedoch können die absoluten Extinktionswerte beträchtlich schwanken. Enthält nun ein Honig HMF, so ist dessen Absorptionskurve dem Grundspektrum additiv überlagert, was von verschiedenen Autoren ^{6-8)15a}) ausgewertet wurde. Bei der Ueberprüfung der Bestimmung nach *O. Winkler* ⁸) fanden wir jedoch, dass vor allem bei der Ermittlung kleiner Mengen HMF beträchtliche Unterschiede

* 10 g Honig dreimal mit je 20 ml Aether in der Reibschale während 4 Minuten verrieben. Der Aether wurde bei gelindem Erwärmen verdunstet.

** Ausgeführt von *W. Manser*, organ.-chem. Institut ETH.

*** Zu unseren eigenen Messungen wurde das rohe käufliche HMF (Fluka AG, Buchs, St.Gallen) auf einem Filterpapier von anhaftender Flüssigkeit befreit und zweimal am Hochvakuum destilliert. Wir erhielten im UV die oben angegebenen Werte.

zum effektiven Gehalt auftraten und zwar deshalb, weil bei der Berechnung aus dem Grundspektrum verschiedener HMF-freier Honige nach der Formel:

$$E_{285} - \frac{E_{245} + E_{325}}{2} = 0$$

bei unseren Befunden nicht null, sondern ein negativer Wert erhalten wurde. Dadurch erhielten wir immer zu tiefe Analysenwerte. Wir versuchten deshalb das HMF aus dem Honig zu isolieren. Versuche mit 2prozentigen Zuckerlösungen hatten ergeben, dass künstlich zugesetztes HMF quantitativ durch mehrstündiges Extrahieren mit Aether in einem Kutscher-Steudel-Apparat zurückgewonnen werden konnte.

Für die HMF-Bestimmung im Honig bewährte sich das im experimentellen Teil näher beschriebene Verfahren. Darnach filtrierte man zuerst die 2prozentige neutralisierte* Honiglösung durch einen feinen Celit- oder Glaspulverfilter, wobei eine völlig klare gelbliche Lösung erhalten wurde. Nachdem diese Lösung bei 284 m μ gemessen worden war, extrahierte man sie während 7 Stunden im Kutscher-Steudel-Apparat mit Aether. Die extrahierte Honiglösung wurde von gelöstem Aether befreit und nochmals bei 284 m μ gemessen. Diese beiden bei 284 m μ gemessenen Extinktionswerte vor und nach der Extraktion sind massgebend für die eine der beiden unten angegebenen Berechnungen des HMF-Gehaltes. Die aetherische Extraktionslösung befreite man durch Destillation von der Hauptmenge des Lösungsmittels und sog den Rest schonend am Vakuum ab. Den Rückstand löste man in einem zur ursprünglich angewandten Honiglösung äquivalenten Volumen Wasser. Die so erhaltene Lösung mass man wiederum im UV bei 244, 284 und 324 m μ (Abb. 1, Kurve 3).

Berechnung

Die Ermittlung des HMF-Gehaltes von Honigen beruht auf der genauen Berechnung der wirklichen Extinktion des HMF bei dessen λ_{\max} von 284 m μ in teilweiser Anlehnung an die Methode von O. Winkler⁸⁾ und mit Hilfe der molaren Extinktion ϵ , die für HMF 16 700 beträgt.

$$c = \frac{E_{284}^{\text{HMF}}}{\epsilon \cdot l}$$

c = Mol/Liter
 E = Optische Dichte (Extinktion)
 ϵ = Molare Extinktion
 l = Schichtdicke in cm (meist = 1)

Die wässrigen Lösungen der Aetherextrakte verschiedenster reiner neutralisierter Honige wiesen im UV keine ausgeprägte Bande, sondern eine schwach geneigte Gerade auf (Abb. 1, Kurve 3). Die Absorptionskurve des allfällig vorhandenen HMF ist dieser Geraden additiv überlagert. Für die letztere gilt die Formel

* Ohne Neutralisation wurde mit Aether eine variable Menge von im UV absorbierenden Substanzen, vorab Säuren extrahiert.

$$E_{284} - \frac{E_{324} + E_{244}^k}{2} = 0$$

Die bei 324 m μ gemessene Extinktion liegt immer auf dieser Geraden, da die Absorption des HMF bei dieser Wellenlänge praktisch null ist. Die ermittelte Extinktion bei 244 m μ setzt sich aus derjenigen der Fremdsubstanzen und aus der Absorption des HMF zusammen. Letztere beträgt hier rund 1/10 der Absorption bei 284 m μ , womit folgende Korrektur für die annähernd genaue Berechnung des E_{244}^k anzubringen ist:

$$E_{244}^k = E_{244}^g - \frac{1}{10} \left[E_{284}^g - \frac{E_{324}^g + E_{244}^g}{2} \right]$$

k = korrigiert g = gemessen

Daraus ergibt sich für die gesuchte Extinktion des HMF bei 284 m μ :

$$E_{284}^{\text{HMF}} = E_{284}^g - \frac{E_{324}^g + E_{244}^k}{2}$$

Wie wir in mehrfachen Versuchen mit künstlichem Zusatz von HMF zu Honigen ermittelten, gibt diese Methode genaue Werte bis zu Gehalten von ca. 8 mg HMF pro 100 g Honig (Tab. 1).

Tabelle 1

Nr.	mg HMF/100 g Honig zugegeben	Bestimmung aus Aetherextrakt mg HMF/100 g Honig	Bestimmung aus Differenz	
			$E_{284}^{\text{vor Extr.}}$	$E_{284}^{\text{nach Extr.}}$
1	0	0,24		1,30
2	1,08	1,13		2,20
3	1,36	1,31		3,20
4	2,04	1,84		1,82
5	3,10	2,90		3,21
6	4,08	3,82		5,1
7	4,20	4,51		4,72
8	6,80	6,35		7,40
9	8,16	6,96		8,3
10	10,8	8,5		10,4
11	13,6	12,5		14,3
12	16,4	15,4		17,4
13	15,0	14,5		16,0
14	21,6	—		21,0
15	27,2	24,2		27,1
16	32,4	29,0		33,0
17	40,8	38,4		39,9

Bei höheren Anteilen an HMF erhielten wir oft zu geringe Analysenwerte. In diesem Fall führte eine zweite Methode zum Ziele, indem die Extinktion der neutralisierten und klar filtrierte 2prozentigen Honiglösung vor und nach der Extraktion (wie oben beschrieben) bei 284 m μ gemessen wurde. Die Differenz der beiden Extinktionen ergab direkt das gesuchte E_{284}^{HMF} . Wie aus der Tab. 1 ersichtlich ist, erzielte man bei Mengen von über 7 mg HMF pro 100 g Honig eine gute Uebereinstimmung mit den wirklichen Werten. Der Vorteil der Methode liegt darin, dass der HMF-Gehalt nach erfolgter Extraktion und Messung auf die eine oder auf beide Arten berechnet werden kann.

Praktischer Teil

Arbeitsweise zur Bestimmung des 5-Hydroxymethyl-furfuols in Bienenhonig

Reagenzien:

Reiner destillierter Aether
0,1 n-NaOH
Celit- oder feinstes Glaspulver.

Durchführung:

5 g Honig * werden genau eingewogen und in einem 250 ml Messkolben mit ca. 200 ml destilliertem Wasser gelöst. Dann neutralisiert man mit 0,1 n-NaOH auf pH = 7 (neutrales Azolithminpapier) und füllt bis zur Marke auf. Mit einigen ml dieser Honiglösung wird nun auf einer Glasfilternutsche (G₄) ein kleines Celit- oder Glaspulverfilter vorbereitet und anschliessend wird filtriert, wobei die ersten 20 ml Filtrat zurückgegossen werden. Das Filtrat ergibt die *Lösung A*. 200 ml der völlig klaren Lösung A werden in einem genügend grossen Kutscher-Stuedel-Extraktionsgefäss während 7 Stunden mit Aether extrahiert, wobei man in den Destillationskolben ca. 400 ml reiner Aether vorlegt. Im Rest der Lösung A bestimmt man im UV-Spektroskop die Extinktion bei 284 m μ . (1-cm-Cuvette**, gegen Wasser). Nach beendeter Extraktion dekantiert man die im Extraktionsgefäss überstehende Aetherschicht in den Destillationskolben. Von der verbleibenden extrahierten Honiglösung werden ca. 40 ml in einem Erlenmeyerkolben mit einem Siedesteinchen versetzt und während 15 Minuten auf dem Wasserbad bei 50 Grad unter öfterem Umschütteln vom gelösten Aether befreit. Dies ergibt die *Lösung B*, von welcher nach dem Abkühlen ebenfalls die Extinktion bei 284 m μ gemessen wird (1-cm-Cuvette). Die aetherische Extraktlösung trocknet

* Es ist durchaus möglich, nur 1 g Honig zu analysieren unter sinngemässer Verminderung der übrigen Volumina.

** Da es bei den Bestimmungen oft auf geringe Extinktionsunterschiede ankommt, sind vorsichtigerweise die Blindwerte der mit Wasser gefüllten Cuvetten untereinander zu bestimmen und eventuelle Abweichungen bei den einzelnen Messungen zu berücksichtigen.

man mit ca. 40 g wasserfreiem Natriumsulfat, filtriert ab und entfernt durch Destillation die Hauptmenge des Aethers. Am Schluss sollten ca. 50 ml Aether verbleiben, die man schonend unter gelindem Erwärmen am Wasserstrahlvakuum absaugt. Sobald aller Aether verdampft ist, wird der Rückstand sofort in Wasser aufgenommen und in mehreren Portionen in einen 200 ml Messkolben übergespült. Diese Lösung C wird wiederum in der 1 cm-Cuvette* bei 244, 284 und 324 m μ gemessen.

Aus den in allen drei Lösungen ermittelten Extinktionen berechnet man nun nach den beiden im theoretischen Teil angegebenen Formeln die wirkliche, dem HMF zukommende Extinktion.

1. Aus den 3 Messungen der wässrigen Lösung C und der Extinktion (E_{284}) der Lösung A nach den Formeln auf den Seiten 52 und 53.
2. Aus der Differenz der gemessenen Extinktionswerte (E_{284}) der Lösungen A und B.

Sind die beiden E_{284}^{HMF} -Werte ermittelt, so werden die Konzentrationen der Lösungen an HMF aus der molaren Extinktion berechnet

$$c = \frac{E_{284}^{\text{HMF}}}{l \cdot \epsilon} \quad \begin{array}{l} l = 1 \text{ cm} = 1 \\ \epsilon_{\text{HMF}} = 16700 \end{array}$$

$$c = \frac{\text{Mol}}{l}$$

Aus der molaren Konzentration berechnet sich die Menge HMF pro Liter:

$$G = c \cdot 126,1 \quad \begin{array}{l} G = \text{g HMF/l} \\ \text{Mol. Gew. von HMF} = 126,1 \end{array}$$

Werden genau 5 g Honig in 250 ml Wasser gelöst, so bedeuten nach obiger Berechnung 5 G die Menge HMF in g pro 100 g Honig.

Bei Gehalten von ca. 6 bis 10 mg HMF in 100 g Honig sind beide Berechnungsmethoden zulässig. Bei geringeren Mengen HMF ist nur die Berechnung 1 aus den Messwerten der Lösung A und C, bei höheren Gehalten dagegen nur die Berechnung 2 aus den Messwerten der Lösungen A und B anwendbar.

Bei Kunsthonigen mit einem normalerweise wesentlich höheren Gehalt an HMF sollen nur 1 g bis 2 g des zu untersuchenden Produktes eingewogen werden.

Darstellung von 2,4-Dinitrophenylhydrazon des 5-Hydroxymethyl-furfurols

10 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin werden in ca. 200 ml Methanol aufgeschwemmt und mit 4,5 ml HCl conc. versetzt. Man schüttelt gut durch und lässt über Nacht stehen. Dann wird abfiltriert.

Etwa 100 mg HMF werden in 1 ml Methanol gelöst und mit ca. 8 ml des oben angegebenen Reagens versetzt. Man lässt einige Stunden bei 20 Grad stehen, filtriert ab und kristallisiert aus Chloroform-Aethanol um.

* Bei nur geringer Absorption eventuell auch in der 3-cm-Cuvette.

4 mal umkristallisiert: hellrote Nadeln
konst. Smp. von 223,5 bis 224 Grad (korr.)

Analyse: C₁₂H₁₀O₆N₄

ber. C 47,06 %, H 3,30 %, N 18,30 %

gef. C 46,80 %, H 3,64 %, N 18,37 %

UV-Spektrum: (Feinsprit)

λ max 220-221 m μ , ϵ = 16 500

λ max 301-302 m μ , ϵ = 9 900

λ max 392-393 m μ , ϵ = 29 800

Verhalten von 5-Hydroxymethyl-furfurol in verdünnten wässrigen Lösungen

1. In neutraler wässriger Lösung unter Stickstoff aufbewahrt.

17 mg reinstes HMF * löst man in 250 ml neutralem ausgekochtem Ionenaustauscherwasser und bewahrt die Lösung im Dunkeln unter Stickstoff bei Zimmertemperatur in einem gut verschlossenen Kolben auf. Nach je vier Tagen entnimmt man Proben, die nach zehnfacher Verdünnung im UV bei 284 m μ gemessen werden. Nach jeder Probeentnahme spült man den Kolben sorgfältig mit Stickstoff. Nach 60 Tagen war nicht die geringste Abnahme der bei λ max von 284 m μ gemessenen Extinktion festzustellen. Dies bedeutet, dass 5-Hydroxymethyl-furfurol in völlig neutraler wässriger Lösung unter Sauerstoffausschluss im Dunkeln kaum eine Veränderung erleidet.

(Abb. 2, Kurve 1)

2. Im offenen Gefäß aufbewahrt.

16,5 g reinstes HMF löste man in 250 ml dest. neutralem Wasser und liess diese Lösung im offenen Messkolben im Dunkeln bei Zimmertemperatur stehen. Die jeweiligen Proben wurden wiederum im UV bei 284 m μ gemessen. Nach 23 Tagen war die Extinktion auf die Hälfte abgesunken, nach ca. 50 Tagen betrug sie praktisch null (Abb. II, Kurve 2). Das Kurvenbild des UV-Spektrums der neugebildeten Substanz (λ max 251 m μ , ϵ = 10 900) war praktisch demjenigen einer wässrigen Lösung von reiner 5-Hydroxymethyl-brenzschleimsäure (λ max 251 m μ , ϵ = 12 100) gleich. Wie aus der molaren Extinktion geschlossen werden kann, war also das HMF durch die in die Lösung hineindiffundierende Kohlensäure und den Sauerstoff zu 90 Prozent zur 5-Hydroxymethyl-brenzschleimsäure oxydiert worden.

3. Einen völlig ähnlichen Verlauf nahm die Umwandlung des HMF, wenn man die Lösungen, mit einem Citratpuffer (pH ca. 5,0) versetzte und sie entweder an der Luft (Abb. II, Kurve 4) oder unter Stickstoff im Dunkeln (Abb. II, Kurve 3) aufbewahrte.

* Siehe Anmerkung Seite 9!

4. Eine Lösung von 25,3 mg HMF in 250 ml Wasser wurde mit Phosphorsäure auf einen pH von 4,6 angesäuert und verschlossen unter Stickstoff im Dunkeln aufbewahrt. Nach 15 Tagen war die Extinktion bei 284 m μ auf null gesunken.
5. Eine weitere Probe (29 mg HMF in 250 ml Wasser) säuerte man mit HCl auf pH 2,7 und bewahrte die Lösung unter Stickstoff auf. Die Extinktion bei 284 m μ war nach 30 Tagen um 10 Prozent, nach 80 Tagen um 40 Prozent des ursprünglichen Wertes gesunken (Abb. II, Kurve 5).

Zusammenfassung

Da Honige in der Regel kein oder nur wenig Hydroxymethyl-furfurol aufweisen, wurde untersucht, welchen Einfluss Umwandlungs- und Abbaureaktionen dieses Körpers auf den tatsächlichen Gehalt ausüben könnten. Dabei wurden die Maillard-Reaktion, die Aldol-Kondensation und die Polymerisation in Betracht gezogen. Der Abbau bis zur Laevulinsäure konnte noch nicht nachgewiesen werden, wird aber noch näher geprüft.

Es konnte die Oxydation des Hydroxymethyl-furfurols zu Hydroxymethyl-brenzschleimsäure und die Umlagerung zu 5-Methyl-brenzschleimsäure beobachtet werden. Dieser Reaktionsverlauf muss noch näher geprüft werden. Die Bildung von Hydroxymethyl-furfurol in Honigen ist ein recht komplizierter Vorgang.

Beschrieben wurde ferner die quantitative Extraktion von Hydroxymethyl-furfurol. Die quantitative Bestimmung mit Hilfe der Extinktion wird unter Berücksichtigung der störenden Stoffe bereinigt. Vorgesehen sind Versuche über Bildung und Abbau von Hydroxymethyl-furfurol bei verschiedenen Temperaturen und verschiedenen pH in Honigen, sowie über die Abhängigkeit der Bildungsgeschwindigkeit von der ursprünglich vorhandenen Menge.

Résumé

Les miels ne contenant, en règle générale, pas ou peu d'hydroxyméthyl-furfurol (HMF), on a examiné l'influence que peuvent exercer les réactions de transformation et de dégradation de ce corps sur sa teneur effective. La réaction de Maillard, la condensation aldolique et la polymérisation ont été examinées. La dégradation jusqu'à l'acide lévulique n'a pu encore être prouvée mais fera l'objet d'un examen plus poussé.

On a observé que HMF peut s'oxyder en acide hydroxy-méthyl-pyromucique et qu'il peut se transposer en acide 5-méthylpyromucique. Ce processus devra être encore examiné de plus près. La formation de HMF dans les miels représente un processus très complexe.

On décrit l'extraction et le dosage quantitatifs de HMF, ce dernier se faisant par la mesure du coefficient d'extinction de ses solutions, compte tenu des impuretés gênantes.

Summary

Description of a procedure for the quantitative extraction and determination of hydroxymethylfurfurol (HMF), the latter by measure of the extinction of its solutions.

The mechanism of the transformation and degradation of HMF has been studied and it has been found that HMF may give hydroxymethylpyromucic acid by oxydation and 5-methylpyromucic acid by transposition.

Literatur

- 1 *Trudy Uzesoyuz*, Nauch. sledovatel Vit. Inst. **5**, 46 (1959)
- 2 *W. Pigman*, The Carbohydrates, Academic Press Inc. New York (1957) S. 58
- 3 *Margret Cifonelli*, J. A. Cifonelli, R. Montgomery, F. Smith, J. Am. Chem. Soc. **77**, 121 (1955)
- 4 *W. N. Haworth, W. G. M. Jones*, J. Chem. Soc. (1944) 667.
- 5 a) *H. S. Isbell*, J. Research Natl. Bur. Standards, **32**, 45 (1944)
b) *M. L. Wolf from, R. D. Schuetz, L. F. Cavalieri*, J. Am. Chem. Soc. **71**, 3518 (1949)
- 6 *S. A. Schou, J. Abildgaard*, Z. Unters. Lebensmittel, **68**, 502 (1934)
- 7 *H. Mohler*, diese Zeitschrift **32**, 230 (1941)
- 8 *O. Winkler*, Z. Unters. Lebensmittel, **102**, 161 (1955)
- 9 a) *Khyoshi Aso, Hiroshi Sugisawa*, Tohoku J. Agr. Research, **5**, 143 (1954)
b) *N. S. Kapur*, Food Sci. **7**, 181 (1958)
c) *M. L. Wolf from, R. D. Schütz, Liebe F. Cavalieri*, J. Am. Chem. Soc. **70**, 514 (1948)
d) *E. Lindemann*, Die Stärke, **7**, 280 (1955)
e) *J. Kenner, G. N. Richards*, J. Chem. Soc. **1956**, 2921
- 10 *Bhagat Snigh, G. R. Dean, S. H. Cantor*, J. Am. Chem. Soc. **70**, 597 (1948)
- 11 *B. L. Scallet, J. H. Gardner* ibidem, **67**, 1934 (1945)
- 12 *J. H. Turner, P. H. Rebers, P. L. Barrick, R. H. Cotton*, Analyt. Chem. **26**, 898 (1954)
- 13 a) *G. E. Livingstone, W. B. Esselen, C. R. Fellers*, Food Technologie, **8**, 116 (1954)
b) *Hiroshi Imai et al.* Chem. Abstr. **53**, 20 598 (1959)
c) *A. Melitz, H. Drews*, Industr. Obst.-Gemüseverwert. **7**, 141 (1959)
d) *Viktorija A. Haas, E. R. Stadtman, G. Mackiney*, J. Am. Chem. Soc. **70**, 3576, 3583 (1948)
e) *F. L. Parkinson, C. J. Barker*, J. Sci. Food Agr. **8**, 639 (1957)
- 14 *H. W. de Boer*, Chem. Weekbl. **31**, 482 (1934)
- 15 a) *Cl. Franske, H. Jwainsky*, Fette, Seifen Anstrichm. **58**, 859 (1956)
b) *J. E. Schade, G. L. Marsh, J. E. Eckert*, Food Research, **23**, 446 (1958)
c) *F. Weiss*, Z. Lebensmittel Unters. Forsch. **58**, 320 (1929)
d) *J. Fiehe*, ibidem. **15**, 492 (1908)
e) *J. Fiehe*, ibidem. **57**, 468 (1929) und dort zitierte Lit.
- 16 *G. P. Ellis*, Advances Carboh Chem. **14**, 63 (1959)
- 17 USP **29**, 6382 (1959)
- 18 *R. Pummerer, W. Gump*, Ber. **56**, 999 (1923)
R. Pummerer, Olga Guyot, L. Birkofer, Ber. **68**, 480 (1935)
- 19 *W. Körner, H. Kothe*, Ind. Eng. Chem. **31**, 248 (1939)
- 20 *E. J. McDonald*, J. Research Natl. Bur. Standards **45**, 200 (1950)
- 21 *J. C. Swoden*, J. Am. Chem. Soc. **71**, 3568 (1949)
- 22 a) *W. Alberda van Eckstein, J. J. Blanksma*, Chem. Weekblad **6**, 717 (1909)
b) *Khyoshi Aso, Hiroshi Sugisawa*, Tohoku J. Agr. Research **5**, 143 (1954)
- 23 *A. Wahab*, J. Am. Chem. Soc. **70**, 3580 (1948)
- 24 *J. A. Mathews, R. F. Jackson*, Bur. Standards J. Research, **11**, 619 (1933)
- 25 *J. Carylo*, Bee World, **39**, 335 (1958)
- 26 *H. Sulser, O. Högl*, diese Z. **44**, 79 (1953)
- 27 *W. Diemair, E. Jury*, Z. Lebensmittel Unters. Forsch. **113**, 189 (1960)
- 28 *J. Koch, R. Kleesaat*, Deutsche Lebensmittel Rundsch. **10**, 246 (1959)
- 29 z.B. *E. F. L. J. Anet*, Australien, J. Chem. **12**, 491 (1959)