

ĐỊNH LƯỢNG 5-HYDROXYMETHYLFURFURAL TRONG MẬT ONG BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC-DAD)

Dương Đình Chung^{1*}, Nguyễn Thị Ngọc Yến¹, Nguyễn Hữu Khánh Quan¹,
Trần Nguyễn An Sa², Nguyễn Văn Hòa²

¹Trường Đại học Nguyễn Tất Thành TP.HCM

²Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

*Email: ddchung@ntt.edu.vn

Ngày nhận bài: 20/4/2018; Ngày chấp nhận đăng: 04/6/2018

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, 5-hydroxymethylfurfural (HMF) được định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò diod array (HPLC-DAD). Phương pháp định lượng được xác định theo hướng dẫn của Hiệp hội các nhà hóa phân tích chính thống (AOAC) và Hội đồng quốc tế về sự phù hợp các yêu cầu kỹ thuật của dược phẩm dùng cho người (ICH) thể hiện được tính đặc hiệu, độ chính xác, độ đúng, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng dưới (LOQ). Sự phân tách được thực hiện với cột Gemini NX RP-C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm) làm pha tĩnh; 2 dung môi là acetonitril:H₂O = 85:15 (v/v) làm pha động; tốc độ dòng duy trì 1 mL/phút ở nhiệt độ phòng trong suốt thí nghiệm; thể tích tiêm mẫu 50 μL. Phát hiện bằng đầu dò diod array (DAD) ở bước sóng 284 nm. Khoảng tuyến tính nằm trong khoảng nồng độ 2-100 μg/mL với hệ số xác định $R^2 = 0,9996$. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) lần lượt là 0,25 μg/mL, 0,75 μg/mL và tương ứng với độ phục hồi từ 87,3% đến 105,8%. Kết quả phân tích hàm lượng HMF trong 12 mẫu mật ong đang lưu hành trên thị trường có giá trị từ 47,8 đến 522,5 mg/kg. Tuy nhiên, kết quả kiểm tra có 75% trong 12 mẫu có hàm lượng HMF vượt mức cho phép theo tiêu chuẩn Codex Alimentarius (80 mg/kg).

Từ khóa: Hydroxymethylfurfural (HMF), mật ong, sắc ký lỏng (HPLC), định lượng, thẩm định quy trình.

1. MỞ ĐẦU

Mật ong là một sản phẩm tự nhiên do con ong (*Apis mellifera*) thu thập được trong các loài hoa, lá non. Thành phần chủ yếu của mật ong gồm nước (15-20%) và 2 loại đường (fructose, glucose) cùng với sự hiện diện của một lượng nhỏ ít nhất 22 loại đường phức tạp khác (80-85%) [1, 2]. Ngoài ra, mật ong còn chứa một lượng nhỏ khoáng chất, protein, enzym, acid amin, vitamin, acid hữu cơ và các hợp chất phenolic, flavonoid, carotenoid [3, 4]. Trong quá trình chế biến, mật ong thường được cô đặc (dưới 40 °C) để loại nước và ngăn ngừa sự lên men mà không làm ảnh hưởng đến chất lượng mật ong. Tuy nhiên, việc sử dụng nhiệt độ cao dẫn đến sự hình thành một sản phẩm chuyển hóa của các loại đường là 5-hydroxymethylfurfural (HMF) [5]. Hàm lượng HMF tăng theo nhiệt độ và thời gian bảo quản, được coi là chỉ số biểu hiện sự giảm chất lượng của các sản phẩm chứa carbohydrat [6, 7].

Các nghiên cứu và độc tính của HMF đã chứng minh nguy cơ gây đột biến gen và ung thư đường ruột trên chuột thử nghiệm [8-13]. Vì vậy, các tổ chức quốc tế quy định về giới hạn cho phép của HMF trong mật ong không được cao hơn 40 mg/kg và không được cao hơn

80 mg/kg nếu là mật ong có nguồn gốc các nước nhiệt đới [14, 15]. Trên thế giới, HMF được định lượng bằng nhiều phương pháp khác nhau như phương pháp quang phổ, phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, sắc ký lỏng khối phổ, sắc ký khí khối phổ hay phương pháp điện di mao quản [16-25]. Tuy nhiên, ở Việt Nam vẫn còn áp dụng phương pháp quang phổ [26]. Trong nghiên cứu này, HMF được nghiên cứu định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, một kỹ thuật đã được xem là phổ biến tại các cơ sở kiểm tra chất lượng ở Việt Nam hiện nay.

2. NGUYÊN LIỆU, THIẾT BỊ VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu và thiết bị

2.1.1. Hóa chất

Methanol, acetonitril, nước loại dùng cho sắc ký lỏng (Merck, Đức), acid acetic, kali ferocyanid, kali dihydrophosphat, kẽm acetat, acid phosphoric (Merck, Đức) và 5-hydroxymethylfurfural (99% - Sigma, Singapore).

2.1.2. Thiết bị

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao 1260 Infinity (Agilent, Mỹ), đầu dò diod array (DAD), máy vortex (Mỹ), máy ly tâm Hermle Z336 (Đức), cân phân tích MS105DU, máy đo pH S220K (Metler Toledo - Thụy Sĩ).

2.1.3. Mẫu thử

Các sản phẩm mật ong đang lưu hành tại thị trường Việt Nam (Bảng 1), được mã hóa bằng ký hiệu là “NC”, số thứ tự 1-12.

Bảng 1. Đối tượng nghiên cứu

STT	Mã số mẫu	Nhà sản xuất/ phân phối
1	NC1	Mật ong Viethoney (Công ty Ong Mật VIETHONEY)
2	NC2	Mật ong Tây Nguyên Dakhoney (Công ty CP Ong Mật Đắk Lắk)
3	NC3	Mật ong Khánh Nga (Công ty TNHH Khánh Nga)
4	NC4	Mật ong Hoa Cà Phê (Công ty Cổ phần tập đoàn Xuân Nguyên)
5	NC5	Mật ong Thanh hảo (Công ty Ong Mật Thanh Hảo)
6	NC6	Mật ong Mariebee (Công ty TNHH MTV Đức Mai Khôi)
7	NC7	Mật ong nguyên chất (Công ty TNHH Mật ong Phúc Tùng)
8	NC8	Mật ong thiên nhiên (Công ty Cổ phần Ong Mật Bình Phước)
9	NC9	Mật ong thiên nhiên (Công ty Cổ phần HONEYBOY)
10	NC10	Bee Honey (Công ty Cổ phần Ong Mật Thành phố Hồ Chí Minh)
11	NC11	Highland Bee (Công ty TNHH Ong Mật Cao nguyên)
12	NC12	Mật ong rừng (Công ty CP Thực phẩm dinh dưỡng Trường Thọ)

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chuẩn bị dung dịch chuẩn và mẫu

Mẫu trắng: dung dịch acetonitril:H₂O = 85:15 (v/v).

Dung dịch chuẩn gốc: Hòa tan 5 mg HMF trong 5 mL methanol để có được nồng độ HMF 1000 µg/mL.

Dung dịch chuẩn: Pha loãng dung dịch chuẩn gốc thành các dung dịch chuẩn có nồng độ 100 µg/mL, 80 µg/mL, 60 µg/mL, 40 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL và 2 µg/mL với pha động acetonitril:H₂O = 85:15 (v/v).

Mẫu thử nghiên cứu, mẫu thử thêm chuẩn (thêm chuẩn vào mẫu thực NC1 tại 3 mức nồng độ, gồm: 10, 25 và 50 µg/mL), xử lý mẫu theo quy trình phân tích mục 2.2.2.

2.2.2. Phương pháp phân tích

Quá trình xử lý loại đường và làm sạch mẫu được thực hiện như sau: Tiến hành cân 10 gam mẫu hòa tan trong 50 mL nước, thêm 1 mL dung dịch Carrez I (kali ferocyanid 15 g/L) và 1 mL dung dịch Carrez II (kẽm acetat 30 g/L), thêm nước cất vừa đủ 100 mL, trộn đều. Ly tâm 30 phút ở tốc độ 4000 vòng/phút, lọc qua màng lọc cellulose acetat 0,45 µm làm dịch tiêm sắc ký. Tiêm 50 µL vào hệ thống sắc ký lỏng để phân tích HMF. Hệ thống HPLC (Agilent 1260 Infinity, USA) với đầu dò diod array (DAD) ghi ở bước sóng 284 nm, cột sắc ký Gemini-C18 (5 µm, 250 mm × 4,6 mm), cột bảo vệ Zorbax SB-C18 (4,6 mm × 15 mm, 5 µm), pha động acetonitril:H₂O = 85:15 (v/v), tốc độ dòng 1 mL/phút, phân tích ở nhiệt độ phòng. Hàm lượng (mg/kg) của HMF được tính dựa trên diện tích pic của chất đối chiếu 5-hydroxymethylfurfural. Giá trị HMF của tất cả các mẫu được trình bày là trung bình ± SD [16, 18].

2.2.3. Thẩm định phương pháp

Các chỉ tiêu thẩm định: độ đặc hiệu, tính phù hợp hệ thống, khoảng tuyến tính, độ đúng, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp theo sự hướng dẫn của AOAC và ICH [27, 28].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thẩm định quy trình phân tích

3.1.1. Độ đặc hiệu

Tiến hành phân tích các mẫu trắng, mẫu nền, mẫu chuẩn, mẫu thử, kết quả ở Hình 1 cho thấy sắc ký đồ (SKĐ) của mẫu trắng, mẫu nền không xuất hiện pic tại thời gian lưu của HMF (8,9 phút) trong mẫu chuẩn, mẫu thử. SKĐ của mẫu thử có rất nhiều pic. Tuy nhiên, pic HMF gọn, tách hoàn toàn khỏi nền mẫu với độ phân giải cao và độ tinh khiết pic kiểm tra bằng đầu dò DAD trên 99,98% (Hình 1f, h). Phổ hấp thụ UV tại thời gian lưu của pic HMF trong mẫu thử giống phổ UV tại thời gian lưu của mẫu chuẩn (Hình 1e, f). Như vậy, quy trình có tính đặc hiệu.

3.1.2. Tính phù hợp hệ thống

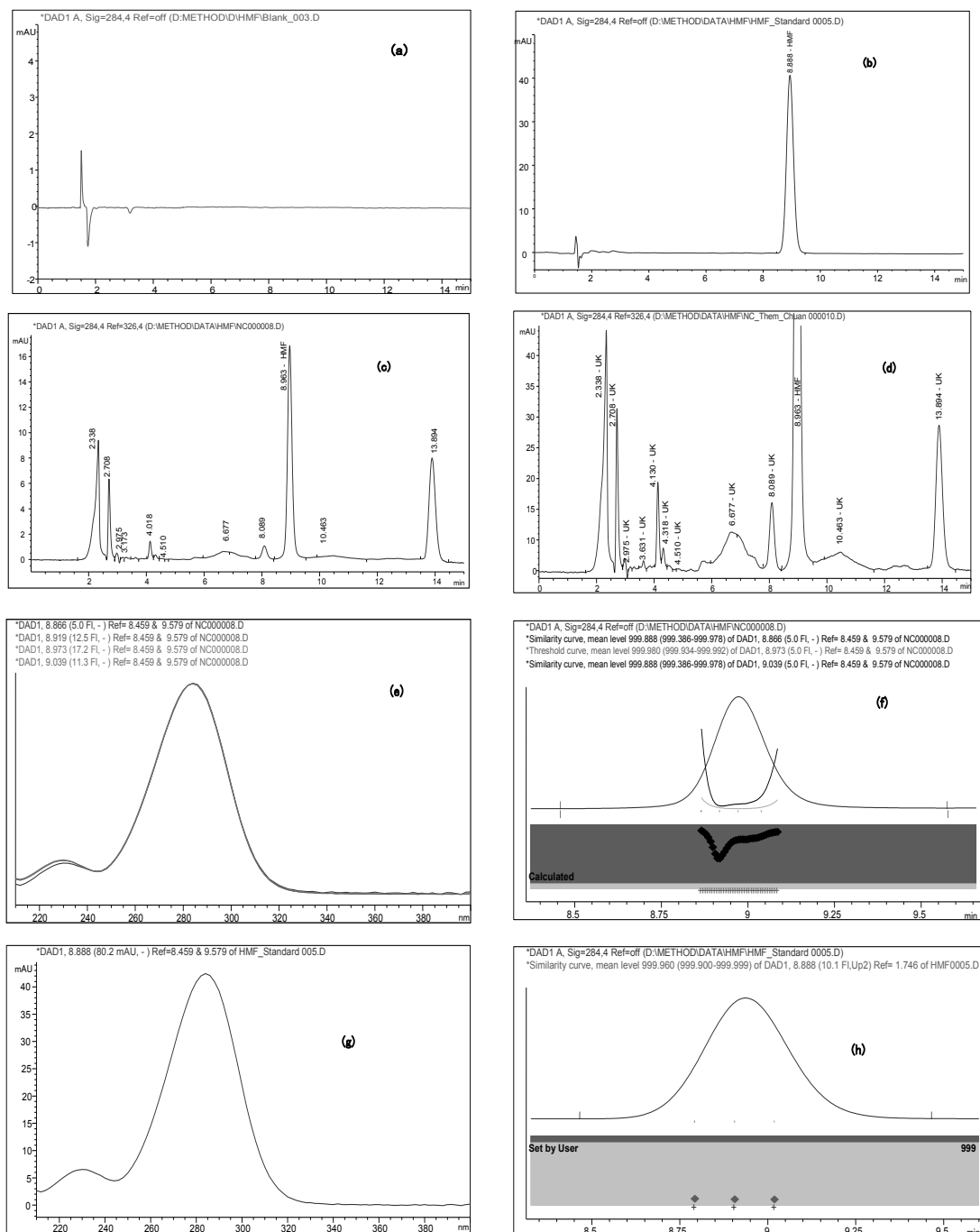
Tiêm lặp lại 6 lần cùng trên một mẫu thử thêm chuẩn có nồng độ khoảng 20 µg/mL. Kết quả độ lệch chuẩn (RSD - Relative Standard Deviation) thu được của thời gian lưu là 0,14%, diện tích pic 0,29%, độ phân giải (Rs - Resolution) 0,34%, hệ số kéo đuôi (T - Tailing factor) 1,12-1,17, số đĩa lý thuyết (N - Theoretical plates) bằng 10600, đạt yêu cầu (T: 0,8-2,0; N > 2000, RSD < 2%). Hệ thống sắc ký phù hợp để tiến hành định lượng.

3.1.3. Đường chuẩn và khoảng xác định

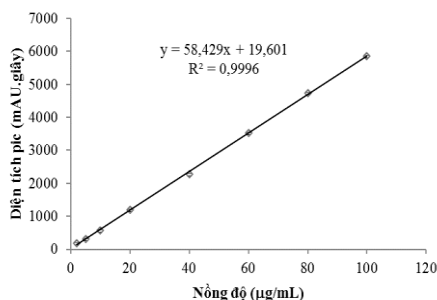
Kết quả phân tích các dung dịch chuẩn HMF ở 8 nồng độ khác nhau trong khoảng 2-100 µg/mL cho thấy tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic của HMF trong khoảng khảo sát, với hệ số xác định $R^2 = 0,9996$ (phương trình hồi quy $y = 58,429x + 19,601$). Kết quả được trình bày trong Bảng 2 và Hình 2.

Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$); x	2,0	5,0	10,0	20,0	40,0	60,0	80,0	100,0
Diện tích pic ($\text{mAU} \cdot \text{giây}$); y	244,19	312,53	530,03	1099,90	2245,10	3525,31	4737,30	5862,50



Hình 1. Sắc ký đồ: (a) mẫu trắng, (b) mẫu chuẩn, (c) mẫu thử, (d) mẫu thêm chuẩn, (e, f) phổ UV và độ tinh khiết pic HMF trong mẫu thử, (g, h) phổ UV và độ tinh khiết pic HMF trong mẫu chuẩn.



Hình 2. Đồ thị thể hiện tương quan giữa diện tích pic với nồng độ của HMF

3.1.4. Độ lặp lại

Chuẩn bị 6 mẫu thử, tiến hành sắc ký 6 mẫu thử, mỗi mẫu 1 lần. Kết quả được trình bày tóm tắt trong Bảng 3 cho thấy phương pháp phân tích có kết quả lặp lại tốt với RSD 0,84%.

Bảng 3. Kết quả xác định độ lặp lại

STT	Khối lượng mẫu (g)	Diện tích pic (mAU*s)	Hàm lượng (mg/kg)
1	10,044	1082,48547	101,30
2	10,068	1076,47266	101,09
3	10,041	1074,09814	99,13
4	10,067	1077,98464	100,62
5	10,065	1074,17517	100,94
6	10,078	1080,35315	101,43
TB ± SD			100,75 ± 0,84
RSD %			0,84%

3.1.5. Độ đúng

Thêm chuẩn vào mẫu thực NC1 ở các mức 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, ở mỗi mức thực hiện 3 lần. Phân tích thấy độ phục hồi của HMF là 87,3-106,6%, đều nằm trong giới hạn cho phép của AOAC (80-110%), RSD < 5% [4]. Kết quả được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả xác định độ đúng

Mẫu	Nồng độ thêm vào (10 µg/mL)		Nồng độ thêm vào (25 µg/mL)		Nồng độ thêm vào (50 µg/mL)	
	Nồng độ tìm lại (µg/mL)	Độ đúng (%)	Nồng độ tìm lại (µg/mL)	Độ đúng (%)	Nồng độ tìm lại (µg/mL)	Độ đúng (%)
1	9,62	96,2	24,80	99,2	52,90	105,8
2	9,38	93,8	26,68	106,7	50,65	101,3
3	8,73	87,3	25,98	103,9	48,85	97,7
TB ± SD		92,4 ± 4,6	103,2 ± 3,8		101,6 ± 4,1	
RSD %		4,6%	3,6%		4,0%	

3.1.6. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Tiến hành phân tích các mẫu có nồng độ HMF giảm dần, xác định độ đáp ứng (S - Signal) của tín hiệu HMF và độ nhiễu đường nền (N - Noise), xác định tỷ lệ tín hiệu chia cho nhiễu

đường nền (S/N). Kết quả thu được LOD và LOD lần lượt là 0,25 µg/mL và 0,75 µg/mL. Kết quả nghiên cứu trên cho thấy, việc xác định hàm lượng HMF trong mật ong bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao đã được xây dựng và thẩm định theo hướng dẫn của AOAC, ICH đạt yêu cầu phân tích về độ đúng, độ chính xác, độ tin cậy và độ nhạy cao.

3.2. Hàm lượng HMF trong các mẫu nghiên cứu

Kết quả phân tích hàm lượng HMF trong 12 mẫu mật ong đang lưu hành trên thị trường (Bảng 5) có giá trị từ 47,8 đến 522,5 mg/kg. Trong các mẫu “NC3, 5, 6, 9” có hàm lượng HMF rất cao, tương ứng với thời gian lưu trữ mẫu dài hơn các mẫu nghiên cứu khác. Mặc dù, ngưỡng an toàn (TDI - tolerate daily intake) riêng cho HMF trong mật ong ở Việt Nam vẫn chưa được thiết lập. Tuy nhiên, theo tiêu chuẩn Codex Alimentarius, 75% các mẫu này có hàm lượng HMF vượt mức cho phép là 80 mg/kg [14]. Hàm lượng HMF cao có thể do sự tích lũy các sản phẩm phân hủy của các gốc đường tăng theo thời gian và điều kiện bảo quản. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu ở Malaysia cho thấy rằng nồng độ HMF trong các mẫu mật ong bảo quản dưới 6 tháng nằm trong giới hạn đề nghị (2,80–24,87 mg/kg). Trong khi đó, các mẫu lưu trữ từ 12 đến 24 tháng có nồng độ HMF cao hơn nhiều (118,47–1139,95 mg/kg) [29].

Bảng 5. Kết quả phân tích hàm lượng HMF trong các mẫu nghiên cứu

STT	Mẫu	Hàm lượng HMF (mg/kg)	Thời gian lưu trữ mẫu (tháng)*
1	NC1	100,7 ± 0,8	9
2	NC2	128,9 ± 1,6	11
3	NC3	318,2 ± 2,4	11
4	NC4	97,5 ± 1,1	11
5	NC5	233,8 ± 1,5	19
6	NC6	227,4 ± 2,7	13
7	NC7	152,7 ± 1,4	11
8	NC8	58,3 ± 0,18	12
9	NC9	522,5 ± 44	21
10	NC10	47,8 ± 0,18	12
11	NC11	57,31 ± 0,45	21
12	NC12	177,1 ± 3,5	11

* Thời gian tính từ tháng sản xuất cho tới khi lấy mẫu phân tích.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thành công trong việc định lượng HMF trong mật ong bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng đầu dò diod array (HPLC-DAD) ở bước sóng 284 nm. Phương pháp định lượng được thẩm định cho khoảng nồng độ tuyến tính 2-100 µg/mL với hệ số xác định $R^2 = 0,9996$. Từ 12 mẫu mật ong được khảo sát ở các vùng trong nước, có đến 10 mẫu không đáp ứng giới hạn HMF nghiêm ngặt theo tiêu chuẩn Codex Alimentarius (80 mg/kg). Kết quả cho thấy, để mật ong trong nước có khả năng xuất khẩu sang thị trường nước ngoài, các công ty kinh doanh mật ong cần xem xét cải tiến kỹ thuật và quy trình sản xuất, thu hoạch và bảo quản mật ong nhằm giảm thiểu tối đa sự hình thành HMF trong mật ong. Đồng thời, cần có những nghiên cứu sâu hơn nhằm tìm hiểu thành phần trong mật ong cũng như sự ảnh hưởng của các yếu tố môi trường, khí hậu, thực vật cung cấp mật và quy trình sản xuất đến sản lượng và chất lượng mật ong.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Doner L. W. - The sugars of honey - a review, *Journal of the Science of Food and Agriculture* **28** (5) (1977) 443–456.
2. Flink J., Karel M. - Retention of organic volatiles in freeze-dried solutions of carbohydrates, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **18** (2) (1970) 295–297.
3. Anklam E. - A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey, *Food Chemistry* **63** (4) (1998) 549–562.
4. Ball D. W. - The chemical composition of honey, *Journal of Chemical Education* **84** (10) (2007) 1642–1646.
5. Islam M. N. *et al.* - Toxic compounds in honey, *Journal of Applied Toxicology* **34** (7) (2014) 733–742.
6. Fallico B. *et al.* - Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys, *Food Chemistry* **85** (2) (2004) 305–313.
7. Singh R. R., Patil G. R. - Formation kinetics of total hydroxymethylfurfural during UHT processing of buffalo milk, *Lait* **69** (2) (1989) 131–136.
8. Abraham K. *et al.* - Toxicology and risk assessment of 5-Hydroxymethylfurfural in food, *Molecular Nutrition & Food Research* **55** (5) (2011) 667–678.
9. Capuano E., Fogliano V. - Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies, *LWT - Food Science and Technology* **44** (4) (2011) 793–810.
10. Durling L. J. K., L. Busk, and Hellman B. E. - Evaluation of the DNA damaging effect of the heat-induced food toxicant 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in various cell lines with different activities of sulfotransferases, *Food and Chemical Toxicology* **47** (4) (2009) 880–884.
11. Program N. T. - NTP toxicology and carcinogenesis studies of 5-(Hydroxymethyl)-2-furfural (CAS No. 67-47-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies), National Toxicology Program Technical Report Series **554** (2010) 7–13.
12. Svendsen C. *et al.* - 5-Hydroxymethylfurfural and 5-Sulfooxymethylfurfural increase adenoma and flat ACF number in the intestine of min/+ mice, *Anticancer Research* **29** (6) (2009) 1921–1926.
13. Ulbricht R. J., Northup S. J. and Thomas J. A. - A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions, *Fundamental and Applied Toxicology* **4** (5) (1984) 843–853.
14. Codex Alimentarius Commission, Revised Codex Standard for Honey Codex Stan 12-1981, Rev. 1 (1987), Rev. 2 (2001), Codex Standard **12** (1981) 1–7.
15. Codex Alimentarius, Alinorm 01/25, Draft revised standard for honey at Step 8 of the Codex Procedure, EU Directive /1/110/2001 of 02/12/2001 (L 10/47) (2000).
16. AOAC: Official Methods of Analysis (13th ed.), Association of Official Analytical Chemists, Method 31.111 (1980) p.521.
17. White J. W. - Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey, *Journal of Association of Official Analytical Chemists* **62** (3) (1979) 509–514.
18. DIN-10751-3: Analysis of honey - Determination of the content of hydroxymethylfurfural - Part 3: High performance liquid chromatographic method, 2002, 9p.
19. Gaspar E. M. S. M. and Lucena A. F. F. - Improved HPLC methodology for food control - furfurals and patulin as markers of quality, *Food Chemistry* **114** (4) (2009) 1576–1582.
20. Michail K. *et al.* - Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of hydroxymethylfurfural and alpha-ketoglutaric acid in human plasma, *Analytica Chimica Acta* **581** (2007) 287–297.

21. Spano N. *et al.* - A direct RP-HPLC method for the determination of furanic aldehydes and acids in honey, *Talanta* **78** (2009) 310–314.
22. Xu H., Templeton A. C., Reed R. A. - Quantification of 5-HMF and dextrose in commercial aqueous dextrose solutions, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **32** (3) (2003) 451–459.
23. Teixidó E. *et al.* - Liquid chromatography multi-stage mass spectrometry for the analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods, *Journal of Chromatography A* **1185** (1) (2008) 102–108.
24. Teixidó E., *et al.* - Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods by gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* **1135** (1) (2006) 85–90.
25. Rizelio V.M. *et al.* - Development of a fast MECK method for determination of 5-HMF in honey samples, *Food Chemistry* **133** (4) (2012) 1640–1645.
26. TCVN 5270:2008. Mật ong - xác định hydroxymethylfurfural bằng phương pháp quang phổ.
27. AOAC - Guidelines for standard method performance requirements, 2012.
28. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) - Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R), 2005.
29. Khalil M. I., Sulaiman S. A., Gan S. H. - High 5-hydroxymethylfurfural concentrations are found in Malaysian honey samples stored for more than one year, *Food and Chemical Toxicology* **48** (8) (2010) 2388–2392.

ABSTRACT

DETERMINATION OF 5-HYDROXYMETHYLFURFURAL IN HONEY BY HIGH PERFORMANCE CHROMATOGRAPHY METHOD (HPLC-DAD)

Dinh Chung Duong^{1*}, Ngoc Yen Nguyen Thi¹, Khanh Quan Nguyen Huu¹,
An Sa Tran Nguyen², Hoa Nguyen Van²

¹Nguyen Tat Thanh University

²Ho Chi Minh City University of Food Industry

*Email: ddchung@ntt.edu.vn

In this research, high performance liquid chromatography coupled with photodiode array detector (HPLC-DAD) has been reported to quantify 5-hydroxymethylfurfural (HMF) compounds in honey. This method has been validated according to the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) and the International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) guidelines and shown to be specificity, precise, accurate, lower limit of detection (LOD) and lower limit of quantitation (LOQ). The separation was developed by selecting Gemini NX C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column as stationary phase and acetonitril:H₂O = 85:15 (v/v) as mobile phase, flow rate of mobile phase was maintained at 1 mL/min at room temperature throughout the experiment, injection volume 50 μL. Quantification was achieved with photodiode arrays (DAD) detection at 284 nm. A good linearity was observed in the concentration range of 2-100 μg/mL with a correlation coefficient ($R^2 = 0.9996$). LOD and LOQ on the sample were 0.25 mg/mL and 0.75 mg/mL, respectively and the recovery of method from 87.3 to 105.8%. Results of analysis of HMF content in 12 samples of honey in the market valued from 47.8 to 522.5 mg/kg. However, the results revealed that 75% of the samples were failing to meet the Codex Alimentarius standards because HMF content in most of samples was above the limit of 80 mg/kg.

Keywords: Hydroxymethylfurfural (HMF), honey, liquid chromatography (HPLC), determination, process validation.