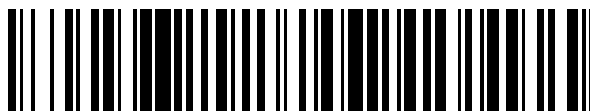


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 193**

51 Int. Cl.:

G01N 31/22 (2006.01)

C07D 231/46 (2006.01)

C12Q 1/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2005 E 05787316 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 1800118**

54 Título: **Medio y método para detectar furfurales**

30 Prioridad:

15.10.2004 DE 102004050209

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.01.2014

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
FRANKFURTER STRASSE 250
64293 DARMSTADT, DE**

72 Inventor/es:

**WAGNER, BERTHOLD y
BEIL-SEIDLER, STEFANIE**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 440 193 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Medio y método para detectar furfurales

5 La presente invención hace referencia a un medio y a un método para detectar furfurales, en particular de las sustancias químicas marcadoras 5- (hidroximetil)- furano- 2- carbaldehído (hidroximetilfurfural, HMF) y furano- 2- carbaldehído (furfural).

10 El tratamiento térmico es la vía más utilizada para conservar los alimentos y mantenerlos comestibles. Bajo condiciones controladas de forma precisa, los alimentos mantienen sus propiedades particulares, organolépticas y fisiológicamente nutritivas durante el tratamiento térmico. Un tratamiento térmico que exceda el dimensionamiento requerido puede modificar los componentes de los alimentos, influenciando con ello de forma negativa el sabor y el valor nutritivo de los mismos. Debido a esto, con frecuencia se utilizan sustancias químicas marcadoras para evaluar la calidad de los alimentos y para controlar la optimización de procesos durante la elaboración de los alimentos.

El hidroximetilfurfural (HMF) es un marcador conocido para la detección de pérdida de calidad debido a un tratamiento o almacenamiento excesivos de alimentos que contengan azúcar.

15 El contenido de HMF en zumos de fruta frescos, no tratados, es prácticamente nulo y la determinación del contenido de HMF es un método de uso común para evaluar la efectividad de un tratamiento térmico para inactivar microorganismos no deseados en confituras y preparaciones de frutas.

20 El HMF es un producto principal de la reacción de Maillard y se forma durante la reacción de azúcares reductores con aminoácidos en función de la temperatura y del valor del pH. En ensayos de diferentes alimentos se hallaron concentraciones mayores a 1g /kg de HMF en frutos secos, productos de caramelo y zumos que fueron producidos a partir de ciruelas pasas.

La "International Federation of Fruit Juice Processors" (IFFJP) recomienda una concentración máxima de 5-10 mg/l HMF en zumos de fruta y de 25 mg/kg en concentrados de zumos de fruta.

En zumos de tomate y puré de tomates, en función del contenido de azúcar y de sólidos (valor de Brix), se hallaron de 1, 3 a 186 mg/ kg de HMF.

25 En las mieles frescas, el HMF puede detectarse con contenidos menores a 1 mg/kg y la miel, a partir de un contenido de 15 mg/kg, sólo puede aprovecharse como miel industrial.

También en el procesamiento de la leche, en particular en la ultrapasteurización, el contenido de HMF se considera importante. Sin embargo, en ese caso deben observarse los contenidos fluctuantes de HMF en la leche cruda.

30 El contenido de HMF, junto con su importancia como parámetro durante el tratamiento térmico en los alimentos, ejerce una influencia directa sobre el olor y el sabor de los alimentos, a la cual debe prestarse atención.

35 La determinación del contenido de HMF en alimentos y sustancias crudas para la elaboración de alimentos forma parte de los análisis de rutina en los laboratorios donde se efectúan controles de calidad. Se emplean diferentes métodos, donde todos ellos requieren una preparación de las muestras, como por ejemplo una destilación o una extracción. Entre éstos figuran la cromatografía de gases, la cromatografía de líquidos de alto rendimiento o HPLC (por sus siglas en inglés), o detección espectrofotométrica con el método según Winkler (Winkler, 1955, Z. Lebensm.- Untersuch.- Forsch., 102, 161), así como de acuerdo con el método A.O.A.C.

Todos estos métodos requieren una gran inversión en cuanto a los aparatos o instrumentos utilizados, así como también personal capacitado para ejecutarlos de forma segura.

40 Además, estos métodos no son adecuados para realizar los análisis rápidamente in situ, lo cual garantizaría un control de los procesos de elaboración de forma rápida con respecto a los análisis.

45 El método para la determinación de HMF que se aplica con más frecuencia según Winkler (recomendado en las Directrices de la U.E y del O.I.V.) se realiza con p-toluidina tóxica (Nº de registro CAS 106-49-0), donde junto con el riesgo para la salud que implica para un usuario no experimentado y el problema del desecho de las sustancias residuales que produce, se excluye la posibilidad de utilizarla en las proximidades del lugar en donde se elaboran los alimentos. Además, en el método conforme a Winkler se presenta el problema de que la coloración formada es estable sólo durante un período breve, dificultando de este modo la evaluación.

Se le atribuye una gran importancia a la sustitución del método de determinación de HMF según Winkler y a la posibilidad de realizar pruebas más rápidas, convenientes en cuanto a los costes y más fáciles de utilizar para efectuar los análisis de HMF, en particular en los alimentos.

5 Por tanto, es objeto de la presente invención proporcionar un medio para la detección de HMF que pueda aplicarse directamente en el lugar sin grandes inversiones en cuanto a aparatos e instrumentos.

10 Se ha comprobado que una combinación de reactivos en base a un derivado de 4-aminofenazona, en particular 4-aminofenazona (4-aminoantipirina, N° de registro CAS 83- 07- 8) y a un derivado del ácido barbitúrico, en particular ácido barbitúrico (N° de registro CAS 67- 52- 7) o ácido tiobarbitúrico (N° de registro CAS 504- 17- 6) produce un coloración roja-violeta en los ácidos en presencia de HMF. Esta coloración puede evaluarse de forma visual o fotométrica. En especial, la combinación de reactivos puede presentarse también en forma de una tira de prueba, de manera que es posible realizar la detección de HMF de modo particularmente sencillo.

15 Se comprobó además que con la misma combinación de reactivos puede realizarse también la detección de otros furfurales, como por ejemplo de derivados de furfural sustituidos en la quinta posición y del mismo furfural. Asimismo, puede diferenciarse entre HMF y furfural, puesto que al utilizarse ácido 4-aminobenzoico en presencia de furfural se produce una coloración azul, mientras que el HMF, por el contrario, no produce ninguna coloración.

Por tanto, es objeto de la presente invención un medio para la detección, del modo definido en la reivindicación 1.

En una forma de ejecución preferente, el medio contiene 4-aminofenazona como derivado de 4-amino-fenazona.

En otra forma de ejecución preferente, el medio contiene ácido barbitúrico y/o ácido tiobarbitúrico como derivado del ácido barbitúrico.

20 En otra forma de ejecución preferente, el medio contiene ácido cítrico.

En una forma de ejecución especialmente preferente, el medio se compone de una tira de prueba que fue impregnada con una solución ácida que contiene al menos de 0,1 a 20% en peso de 4-aminofenazona y de 0,05 a 5% en peso de ácido barbitúrico y/o de ácido tiobarbitúrico.

25 En otra forma de ejecución, el medio se compone de una tira de prueba que adicionalmente presenta una zona que fue impregnada con una solución ácida, la cual contiene al menos ácido 4-aminobenzoico y un derivado del ácido barbitúrico.

Es objeto de la presente invención también un método para detectar furfurales, caracterizado por los siguientes pasos del método:

a) provisión de una solución acuosa de muestra

30 b) puesta en contacto del medio conforme a la invención, del modo definido en la reivindicación 1, con la solución de muestra del paso a)

c) evaluación visual y/o fotométrica de la coloración formada.

En otra forma de ejecución preferente, la evaluación se efectúa en el paso c) mediante reflectometría.

35 Además, es objeto de la presente invención la utilización del medio conforme a la invención para detectar 5-(hidroximetil)- furano- 2- carbaldehído en alimentos.

También es objeto de la presente invención un kit para detectar furfurales, el cual contiene al menos un medio conforme a la invención según la reivindicación 1.

En una forma de ejecución, el kit contiene de forma adicional una tira de prueba que fue impregnada con una solución ácida que contiene al menos ácido 4-aminobenzoico y un derivado del ácido barbitúrico.

40 El aspecto central de la invención se basa en el hecho de que una combinación de un derivado del ácido barbitúrico y un derivado de 4- amino- fenazona, en una solución ácida, en presencia de furfurales, en particular de 5-(hidroximetil)- furano- 2- carbaldehído y/o furano- 2- carbaldehído, produce una coloración intensa, por lo general de color rojo a violeta-azulada. En presencia de 5- (hidroximetil)- furano- 2- carbaldehído se produce una coloración roja-violeta, mientras que en presencia de furano- 2- carbaldehído se produce una cloración más bien azul-violeta. El

color puede variar según la clase de los derivados del ácido barbitúrico y de los derivados de 4- amino- fenazona utilizados.

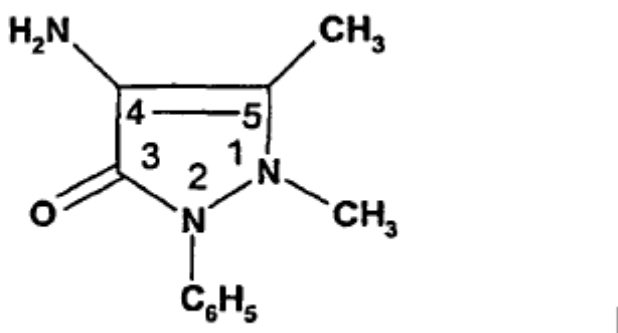
5 Una solución de muestra consiste en cualquier clase de solución acuosa o por lo menos predominantemente acuosa. Puede tratarse de una muestra no diluida, como por ejemplo en el caso de zumos u otras bebidas como cerveza o vino. Igualmente, sin embargo, la muestra puede diluirse primero con agua o con una solución tampón. Esto es necesario en el caso de muestras altamente concentradas o viscosas, como por ejemplo en confituras o en la miel.

10 En el caso de muestras que no pueden mezclarse directamente con agua puede efectuarse primero una extracción. Esto es necesario por ejemplo para detectar 5- (hidroximetil)- furano- 2- carbaldehído y/o furano- 2- carbaldehído en aceites. El experto puede realizar uno o varios pasos de extracción con agua y/o con disolventes que puedan mezclarse con agua y/o con soluciones tampón acuosas.

En todos los casos se considera ventajoso que la solución de muestra final utilizada para la detección consista en una solución clara, que no presente una coloración intensa. Se ha comprobado además que la presencia de sulfito dificulta la detección conforme a la invención.

15 En el caso de soluciones de muestra muy básicas o de soluciones de muestra tamponadas en particular básicas, antes de realizar la detección conforme a la invención puede ser necesaria una acidificación, puesto que la reacción de coloración acorde a la invención sólo se produce en los ácidos. No obstante, por lo general basta con poner en contacto las muestras con el medio acorde a la invención sin una acidificación previa.

20 Dentro del contexto de la presente invención, los derivados de 4- amino- fenazona consisten en 4- amino-fenazona, así como en los derivados de ese compuesto que en la primera y/o en la quinta posición, en lugar del grupo metilo, presentan otra sustitución, preferentemente un radical alquilo C2 a C5. Del mismo modo, el anillo fenilo puede ser mono o polisustituido por ejemplo por radicales alquilo C1 a C5. En una forma de ejecución preferente, como derivado de 4-amino-fenazona se utiliza la misma 4-amino.fenazona.



25 A modo de ejemplo, la figura 1 muestra la 4-aminofenazona preferente conforme a la invención.

Los derivados del ácido barbitúrico consisten en el ácido barbitúrico o en el ácido tiobarbitúrico, así como en derivados que en uno o en ambos anillos, independientemente el uno del otro, presentan átomos de nitrógeno, alquilo C1 a C6 y/o radicales arilo C6 a C18, como por ejemplo metilo, etilo, isopropilo, ciclohexilo o fenilo. El ácido 1, 3 dimetilbarbitúrico es un ejemplo de un derivado de ácido barbitúrico de esta clase.

30 En una forma de ejecución preferente, conforme a la invención, se utiliza ácido barbitúrico y/o ácido tiobarbitúrico.

Conforme a la invención, los términos "derivado de 4-amino-fenazona" y "derivado del ácido barbitúrico" significan que respectivamente se utilizan compuestos separados o una mezcla de compuestos de esa clase.

El medio conforme a la invención se presenta en forma de una tira de prueba.

35 Por lo general, una solución de reactivos contiene por lo menos de 0, 1 a 20% (% en peso), preferentemente de 3 a 8%, en particular aprox. 5% del derivado de 4- amino- fenazona y de 0, 05 a 5% (% en peso), preferentemente aprox. 0, 2%, del derivado del ácido barbitúrico en un disolvente acuoso ácido. El disolvente acuoso puede ser agua o un sistema tampón acuoso que puede contener hasta 75% (% en volumen) de un disolvente que puede mezclarse con agua, como por ejemplo etanol. En una forma de ejecución preferente, el disolvente se compone de las mismas

partes en volumen de etanol y de una solución acuosa ácida. En una forma de ejecución especialmente preferente, el valor del pH del disolvente se ubica entre 2 y 5, de forma especialmente preferente en aprox. 3,5. Los ácidos y bases inorgánicos u orgánicos son apropiados para regular este valor del pH. Por ejemplo, puede producirse una solución acuosa a partir de 50g/l de ácido cítrico en agua, cuyo valor del pH se regula en 3,5 con sosa cáustica.

5 El medio conforme a la invención se presenta en forma de una tira de prueba. El análisis con portadores sólidos, absorbentes, las así llamadas tiras de prueba, han cobrado cada vez mayor importancia en los últimos años. Entre las ventajas más importantes de este método químico en seco se encuentran en particular el manejo sencillo, así como la eliminación sin problemas debido a la escasa cantidad de reactivos utilizados. Todos o la mayor parte de los reactivos necesarios para la reacción de detección (reactivo que produce coloración, sistema tampón, eventualmente estabilizadores y agentes solubilizantes) se encuentran incluidos en las capas correspondientes de un portador absorbente o con capacidad de hinchamiento, sobre el cual se coloca la muestra. Después de producirse el contacto de la zona de reacción con la muestra se desarrolla la reacción de detección. La coloración formada es una unidad de medición para la cantidad de sustancias contenidas en la muestra a ser determinada, y puede ser evaluada por ejemplo de forma semicuantitativa a través de la comparación con una tarjeta colorimétrica, o de forma cuantitativa por ejemplo con un reflectómetro sencillo.

10 Como portadores absorbentes pueden utilizarse todos los materiales que se usan generalmente para pruebas de esa clase. Si bien la utilización de papel de filtro es la más difundida, pueden emplearse sin embargo también otros productos absorbentes de plástico, de celulosa o de fibra de vidrio. Los reactivos también pueden estar incluidos en capas transparentes del portador, cuyos componentes filmógenos pueden hincharse en el agua. Los componentes filmógenos pueden ser de origen natural, como por ejemplo gelatina, agarosa, alginato, o de origen sintético, como por ejemplo éster de celulosa, polivinilacetato, polietilenimina, alcohol polivinílico. Los portadores absorbentes pueden impregnarse de forma conocida con soluciones acuosas que contienen los reactivos necesarios para la determinación. Los portadores impregnados y secados, preferentemente papeles, pueden cortarse en tiras manejables o pueden diseñarse como zonas preferentemente cuadradas que a su vez pueden ser pegadas o cerradas de forma conocida con láminas plásticas, tiras de papel o de metal.

15 Por lo general, la solución acuosa para el medio conforme a la invención en forma de una tira de prueba contiene por lo menos de 0,1 a 20%, preferentemente de 3 a 8%, en particular aprox. 5% de un derivado de 4- amino- fenazona y de 0,05 a 5%, preferentemente aprox. 2% de un derivado del ácido barbitúrico en un disolvente acuoso ácido. El disolvente acuoso puede ser agua o un sistema tampón acuoso que puede contener hasta 75% (% en volumen) de un disolvente que puede mezclarse con agua, como por ejemplo etanol. En una forma de ejecución preferente, el disolvente se compone de las mismas partes en volumen de etanol y de una solución acuosa ácida. En una forma de ejecución especialmente preferente, el valor del pH del disolvente se ubica entre 2 y 5, de forma especialmente preferente en aprox. 3,5. Los ácidos y bases inorgánicos u orgánicos son apropiados para regular este valor del pH. Por ejemplo, puede producirse una solución acuosa a partir de 50g/l de ácido cítrico en agua, cuyo valor del pH se regula en 3,5 con sosa cáustica.

20 En la forma de ejecución preferente, esta solución acuosa se aplica sobre una cinta de película con una zona cerrada de papel de filtro y se seca con una corriente de aire caliente.

Después de cortarse en tiras de pruebas, éstas se encuentran disponibles para análisis cualitativos, así como también para análisis cuantitativos.

25 Es también objeto de la presente invención un método para detectar furfurales, en particular 5- (hidroximetil)- furano- 2- carbaldehído y/o furano- 2- carbaldehído, caracterizado por los siguientes pasos del método:

a) provisión de una solución acuosa de muestra

Puede ser necesario primero convertir la muestra a ser analizada en una forma apropiada, por ejemplo a través de dilución, disolución o extracción.

30 b) puesta en contacto del medio conforme a la invención, del modo definido en la reivindicación 1, con la solución de muestra del paso a)

El medio conforme a la invención es humedecido con la solución de muestra o es sumergido brevemente en la solución de muestra. En caso de ser necesario, la solución de muestra puede ser antes diluida o concentrada de forma correspondiente. Por lo general, dentro de 1 a 10 minutos, en función del contenido a analizarse en la solución de muestra, se produce una coloración, donde la coloración tiene lugar en una tira de prueba generalmente ya después de 1 a 3 minutos.

c) evaluación visual y/o fotométrica de la coloración formada.

La coloración formada puede ser evaluada a través de la comparación con una tarjeta colorimétrica y/o mediante un análisis cuantitativo con un reflectómetro.

5 El medio y el procedimiento acordes a la invención son especialmente apropiados para la detección de HMF y/o de furfural en alimentos. Los reactivos utilizados no son tóxicos y las tiras de prueba pueden ser utilizadas directamente en el lugar también por personal no especializado. Para el análisis cuantitativo, a excepción de un pequeño reflectómetro de mano, no se requieren otros aparatos/instrumentos. Con el medio y el método acordes a la invención pueden detectarse por lo general concentraciones de HMF de entre 0,3 y 100 mg/l.

10 A diferencia del método conforme a Winkler, en donde la coloración se pierde ya después de pocos minutos, con el medio acorde a la invención puede lograrse una estabilidad del color esencialmente mejorada. Generalmente, las soluciones de reactivos acordes a la invención muestran una estabilidad del color durante por lo menos 15 a 30 minutos. La tira de prueba conforme a la invención se considera especialmente preferente, puesto que en este caso el color se presenta ya después de 1 a 3 minutos y después permanece estable durante horas y hasta durante días. De forma preferente, por tanto, el medio conforme a la invención se utiliza como tira de prueba o en forma de un kit que por lo menos contiene una tira de prueba conforme a la invención. En una forma de ejecución preferente, de forma adicional, el kit contiene una carta de color, así como también disolventes para diluir o extraer las muestras según la clase de muestras.

20 Se ha demostrado también que un medio conforme a la invención, al sustituir el derivado de 4-amino-fenazona por ácido 4-aminobenzoico, ya no presenta una reacción de coloración en presencia de HMF, mientras que en presencia de furfural se produce una coloración azul. De este modo puede diferenciarse entre HMF y furfural, de manera que tanto el HMF como también el furfural pueden determinarse en una muestra de forma semicuantitativa y/o cuantitativa. Para ello, la muestra es analizada con un medio acorde a la invención, determinando de este modo el contenido de furfurales (por lo general solamente de HMF y furfural). De forma adicional se realiza otro análisis con un medio, en donde el derivado de 4-aminofenazona es sustituido por ácido 4-aminobenzoico. De esta manera puede determinarse el contenido de furfural. En base a la diferencia de ambos resultados se obtiene entonces el contenido de HMF.

25 Por tanto, es objeto de la presente invención también un método y un medio para la detección paralela de HMF y furfural en una muestra.

30 El medio consiste en una tira de prueba que en una zona contiene una combinación de reactivos a partir de por lo menos un derivado de 4-amino-fenazona y un derivado del ácido barbitúrico y, en otra zona, contiene en el ácido una combinación de reactivos que contiene al menos ácido 4-aminobenzoico y un derivado del ácido barbitúrico. De este modo, la detección puede efectuarse de forma paralela en una tira de prueba.

35 Igualmente, la detección paralela de HMF y furfural puede realizarse con la ayuda de un kit que contiene por lo menos un medio acorde a la invención, el cual en el ácido contiene al menos un derivado de 4-amino-fenazona y un derivado del ácido barbitúrico y un medio que contiene al menos ácido 4-aminobenzoico y un derivado del ácido barbitúrico. Pueden emplearse dos soluciones de reactivos o también dos tiras de prueba.

Sin otras explicaciones, se parte del supuesto de que un experto puede utilizar la descripción anterior en el alcance más amplio. Por esta razón, las formas de ejecución preferentes y los ejemplos deben considerarse solamente a los fines de una descripción, pero de ningún modo en de forma restrictiva o limitante.

40 La descripción completa de todas las solicitudes, patentes y publicaciones que figuran anteriormente y a continuación, en particular de la solicitud DE 102004050209.9 correspondiente, presentada el 15/10/2004, se encuentran incluidas en esta solicitud mediante referencias.

Ejemplos

1. Generación de una curva estándar

a) Preparación de la solución de reactivos

45 5% (% en peso) de 4-amino-fenazona y 0,2% (% en peso) de ácido barbitúrico se disuelven en un disolvente. El disolvente se compone de partes en volumen iguales de etanol y de una solución tampón compuesta por 50g/l de ácido cítrico en agua, el valor del pH del disolvente se regula en 3,5. Si la solución de reactivos es mezclada con una solución estándar de HMF en agua completamente desalinizada en una proporción de volumen 10/1, entonces a 20° C, después de 15 minutos de reacción, resultan los siguientes valores de absorptividad (1 cm de grosor de la capa, 550 nm):

ES 2 440 193 T3

(Tabla 1)

HMF en mg/l	Absortividad
0	0,006
5	0,081
10	0,157
20	0,315
50	0,795
100	1,536

Para estos valores se genera una recta con la ecuación $y = 0,0153x + 0,0077$ y un coeficiente de correlación de 0.9998.

- 5 Se analizaron muestras reales (ambas calibradas con HMF estándar), estableciendo una comparación con el método de Winkler y la solución de reactivos conforme a la invención.

Se obtuvieron los siguientes valores de medición:

(Tabla 2, PIW representa un valor en blanco)

Muestra	Método de Winkler			Método conforme a la invención		
	Absortividad		HMF	Absortividad		HMF
	PIW	Muestra	(mg/l)	PIW	Muestra	(mg/l)
Zumo de uva a nativo	0,276	0,787	14	0,022	0,282	16
Zumo de uva a dotado 20 mg/l de HMF	0,243	1,414	35	0,022	0,560	34
Zumo de uva b nativo	0,203	0,854	19	0,011	0,326	20
Zumo de uva b dotado 20 mg/l de HMF	0,179	1,469	39	0,011	0,618	38
Zumo de manzana a nativo	0,138	0,159	1	0,005	0,034	2
Zumo de manzana a dotado 20 mg/l de HMF	0,129	0,812	21	0,005	0,334	21
Zumo de manzana b nativo	0,134	0,142	0	0,001	0,022	1
Zumo de manzana b dotado 20 mg/l de HMF	0,132	0,823	21	0,001	0,330	21
20 g de miel disueltos en 80 g de agua	0,146	0,345	5	0,012	0,078	4
20 g de miel disueltos en 80 g de agua, dotado 20 mg/l de HMF	0,129	0,897	23	0,012	0,396	24
20 mg de HMF en agua	0,133	0,819	20	0,003	0,319	20

- 10 2. Determinación de HMF en zumo de manzana - evaluación mediante reflectometría del color de la reacción:

Producción de las tiras de prueba:

Sobre un papel de filtro (por ejemplo de la empresa Binzer, tipo 1588) se aplica la siguiente solución acuosa y seguidamente se seca con aire caliente.

ES 2 440 193 T3

El papel se encuentra cerrado con adhesivo disolvente (por ejemplo Dynapol 1272) sobre una película portadora blanca y se encuentra cortado en tiras, de manera que se forma una zona de reacción de aprox. 6 mm x 8 mm.

Composición de la solución acuosa:

5 250 g de solución tampón (a partir de 50 g de ácido cítrico en 1000 g de agua completamente desalinizada y NaOH regulado a un valor del pH de 3,5)

250 g de etanol

25,0 g de 4- amino- fenazona

1,0 g de ácido barbitúrico

Análisis:

10 La tira de prueba se sumerge aprox. durante 2 segundos en la muestra o en la solución estándar a ser analizada, se agita brevemente y se evalúa en el reflectómetro (RQflex®) después de dos minutos de tiempo de reacción.

En la tabla 1 se muestra la relación entre la remisión relativa medida (%) y el contenido de HMF.

(Tabla 3)

HMF en mg/l	% Remisión
0	81,4
5	71,5
10	63,5
20	52,4
50	36,8
100	25,0

15 3. Pruebas de práctica

Prueba de práctica 1:

Se analizan diferentes muestras de alimentos con el método acorde a la invención y establece una comparación con el método fotométrico de Winkler.

Preparación de las muestras:

20 para zumos claros: ninguna.

para mieles: diluir 10 g en 40 g de agua en el baño de ultrasonido.

(Tabla 4)

Muestra	Método fotométrico de Winkler	Método conforme a la invención con evaluación RQ-Flex®
Solución estándar 5 mg/l de HMF	5,0	4,2
Solución estándar 20 mg/l de HMF	21,1	18,1
Zumo de uva blanco a	0,7	0,3
Zumo de uva blanco b	2,1	2,1
Zumo de manzana a	1,4	1,6
Zumo de manzana b	0,4	0,3
Zumo de manzana c	2,4	3,0
Miel del bosque	0,3	0,3
Miel de acacia	0,4	0,3
Miel de girasol	3,6	3,1

Los ensayos de dotación con 10 mg/l, así como con 10 mg/kg de HMF, mostraron los siguientes resultados:

- 5 Las mediciones fueron efectuadas en ambos métodos con la misma muestra (nativa o dotada).

(Tabla 5, recuper. representa recuperación)

Muestra	Método fotométrico de Winkler			Método conforme a la invención con evaluación RQ-Flex®		
	nativo	dotado	recuper.	nativo	dotado	recuper.
Agua	0	12,0	120%	0	10,3	103%
Vino blanco a	0,3	11,0	107%	0,3	8,6	81%
Vino blanco b	2,4	14,0	116%	3,0	13,8	105%
Vino blanco c	6,5	17,7	112%	5,9	15,8	96%
Zumo de uva	13,7	25,9	122%	23,6	36,0	120%
Zumo de manzana	1,7	13,5	118%	2,1	13,4	110%
Miel de girasol	3,0	14,5	115%	5,0	18,3	129%

REIVINDICACIONES

- 5 1. Medio para la detección de furfurales, caracterizado porque el medio se compone de una tira de prueba que fue impregnada con una solución ácida, la cual contiene al menos 0,1 a 20% en peso de un derivado de 4-amino-fenazona y 0,05 a 5% en peso de un derivado del ácido barbitúrico en un disolvente acuoso ácido con un valor pH de entre 2 y 5.
2. Medio conforme a la reivindicación 1, caracterizado porque el medio contiene 4-aminofenazona como derivado de 4-amino-fenazona.
3. Medio conforme a la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el medio contiene ácido barbitúrico y/o ácido tiobarbitúrico como derivado del ácido barbitúrico.
- 10 4. Medio conforme a una o a varias de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el medio contiene ácido cítrico.
5. Medio conforme a una o a varias de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el medio se compone de una tira de prueba que fue impregnada con una solución ácida, la cual contiene al menos 0,1 a 20% en peso de 4-aminofenazona y 0,05 a 5% en peso de ácido barbitúrico y/o de ácido tiobarbitúrico.
- 15 6. Medio conforme a una o a varias de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el medio se compone de una tira de prueba que adicionalmente presenta una zona que fue impregnada con una solución ácida, la cual contiene al menos ácido 4-aminobenzoico y un derivado del ácido barbitúrico.
7. Método para la detección de furfurales, caracterizado por los siguientes pasos del método:
- a) provisión de una solución acuosa de muestra
- 20 b) puesta en contacto de un medio conforme a una o a varias de las reivindicaciones 1 a 6 con la solución de muestra del paso a)
- c) evaluación visual y/o fotométrica de la coloración formada.
8. Método conforme a la reivindicación 7, caracterizado porque la evaluación se efectúa en el paso c) mediante reflectometría.
- 25 9. Utilización de un medio conforme a una o a varias de las reivindicaciones 1 a 6 para detectar 5- (hidroximetil)-furan-2- carbaldehído en alimentos.
10. Kit para detectar furfurales, el cual contiene al menos un medio correspondiente a una o a varias de las reivindicaciones 1 a 6.
- 30 11. Kit conforme a la reivindicación 10, caracterizado porque el kit contiene de forma adicional una tira de prueba que fue impregnada con una solución ácida que contiene al menos ácido 4-aminobenzoico y un derivado del ácido barbitúrico.