

Применение изотопной масс-спектрометрии для выявления фактов фальсификации и определения места происхождения продуктов пчеловодства

А. Г. Талибова^{1,2}, В. С. Файнберг к. т. н.¹, М. Г. Ганин¹,
О. В. Федосеенко³, С. С. Мозговая³, С. В. Овчинников¹

УДК 543.51

Приведены результаты исследования изотопного состава различных сортов меда согласно Протоколу анализа АОАС 998.12, который широко применяется в ЕС, США, Канаде, Австралии и других странах в течение многих лет. Обсуждается основанная на оценке изотопных отношений ряда легких элементов методика выявления фальсифицированной продукции пчеловодства и подтверждения региона их происхождения. Для измерений рекомендуется применение ВЭЖХ–IRMS – изотопного масс-спектрометра Elementar (Англия). Показаны преимущества предложенного метода по сравнению с другими способами оценки качества и подлинности происхождения меда.

Ключевые слова: изотопный состав, мед, продукты пчеловодства, С3-растения, С4-растения, ВЭЖХ-изотопный масс-спектрометр

Статья получена 15.05.2021

Принята к публикации 03.06.2021

Пчелиный мед – это естественный продукт жизнедеятельности растений и пчел, содержащий широкий спектр химических соединений, таких как углеводы, белки, аминокислоты, макро- и микроэлементы в виде минеральных солей.

Сегодня в условиях возросшего потребления продуктов пчеловодства их получают в промышленных масштабах с применением различных технологических схем. Поэтому большое значение имеет контроль качества продуктов пчеловодства, и, в особенности, меда, на тех или иных стадиях производства по целому комплексу показателей. Поскольку

достаточно просто фальсифицировать мед всевозможными посторонними примесями: мелом, крахмалом, сахарным сиропом, различными патоками или же путем подкормки пчел сахаром, то первоочередная задача при оценке качества состоит в подтверждении натуральности продукта и его естественного происхождения.

Известны различные методы оценки качества меда, ни один из которых в индивидуальном применении не может однозначно выявить подлинность и натуральность происхождения продукта. На сегодняшний день внимание разработчиков аналитических экспертных методик приковано к более широкому применению данных о стабильных изотопах при проверке натуральности продуктов пчеловодства, определении региона происхождения меда, а также решении задач по выявлению сортовой фальсификации.

¹ ГК «МС-АНАЛИТИКА», Москва.

² angelika.talibova@textronica.com.

³ Qlab «Азбука Вкуса», Москва.

Возможность использования информации об изотопном составе углерода, азота, водорода и кислорода связана с уникальной способностью многих растений к фракционированию.

Изотопный состав углерода обычно численно характеризуется параметром под названием «дельта изотопного состава» – $\delta^{13}\text{C}$, который рассчитывается в ‰ по формуле:

$$\delta^{13}\text{C} = 1000 (R1 - R2) / R2,$$

где R1 – отношение $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в исследуемом образце, R2 – отношение $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в стандартном образце.

Аналогичные соотношения используют для определения изотопного состава N, O, H и т. д.

Все публикуемые значения $\delta^{13}\text{C}$ обычно приведены к международному образцу VPDB, представляющему собой кальцит окаменелости *Belemnite* Americana мелового возраста, а δD и $\delta^{18}\text{O}$ к VSMOW – международному стандарту океанической воды.

Для фотосинтезирующих растений различают циклы: Кальвина с образованием в качестве первичного продукта трехуглеродной фосфоглицериновой кислоты (наиболее распространенные растения С3-типа) и Хетч-Слека, при котором первичными продуктами оказываются четырехуглеродные соединения малат и аспартат, как пути ассимиляции CO_2 (в основном высшие покрытосеменные С4-растения, такие как кукуруза, сорго, сахарный тростник) [2].

Диапазоны колебаний изотопного состава растений этих двух типов различны и даже не перекрываются. В наземных С3-растениях $\delta^{13}\text{C}$ варьирует от -21 до -33‰, углерод С4-растений значительно тяжелее, $\delta^{13}\text{C}$ в них колеблется от -10 до -18‰. Различие в изотопных эффектах углерода растений С3 и С4 позволяет однозначно идентифицировать не только сами растения и их плоды, но и продукты их переработки [1, 2].

Пчелы собирают пыльцу и нектар, как правило, с растений С3-типа. Поэтому натуральный мед характеризуется средней величиной $\delta^{13}\text{C}$ порядка -26‰ (табл. 1). Если мед разбавлен сиропом (кукурузным или из сахарного тростника, для которых $\delta^{13}\text{C}$ составляет порядка -13 ÷ -11‰), или же производилась подкормка пчел полученным из растений С4-типа сахаром, а также при сборе пчелами нектара преимущественно с таких растений, то изотопный состав углерода меда будет промежуточным – между -26‰ и -11‰. При этом, очевидно, известные в России традиционные сорта меда: липовый, гречишный, акациевый – должны иметь изотопный состав углерода, характерный для высших растений С3-типа [1, 3, 5, 6].

Таблица 1. Изотопный состав углерода некоторых высших растений и пчелиных продуктов

Образец	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$, ‰
Gramenea (порей обыкновенный)	-25,54
Betuleverrucosa (береза повислая)	-31,22
Filipendulahexapetala (лабазник)	-26,81
Aegopodiumpodagraria (сныть обыкновенная)	-29,13
Saocharumofficinatum (сахарный тростник)	-12,30
Zea mays (кукуруза)	-11,32
Сахар тростниковый	-11,99
Мед, Бишкек	-22,93
Мед, Алтай	-27,08
Мед сотовый, запечатанный, Алтай	-26,93
Пчелиный воск	-28,74

В натуральном меде белковая и углеводная составляющие образовались одновременно и из одного источника, поэтому изотопное распределение углерода в них должно быть одинаковое. Отличие в данных изотопного состава будет говорить о фальсификации меда сахаром или сиропом. Согласно принятому в ЕС регламенту изотопный состав меда на выявление фальсификации с добавлением сахаров по методике AOAC 998.12 предполагает измерение и сравнение данных изотопного состава меда (преобладает углеводная составляющая) и его белковой фракции (рис. 1). При различии данных более,



Рис. 1. Протокол выявления фальсификации меда путем добавления сахаров по методике AOAC 998.12

чем в 1%, делается однозначный вывод о фальсификации. Также мед считается фальсифицированным, если процент содержания С4-сахара ($C_{C4\text{сахар}}$) в образце меда больше 7% или меньше -7%, согласно следующей формуле:

$$C_{C4\text{сахар}} = 100(\delta^{13}C_{\text{белок}} - \delta^{13}C_{\text{мед}}) / (\delta^{13}C_{\text{белок}} - (-9,7)), \%$$

где $\delta^{13}C_{\text{белок}}$ - значение $\delta^{13}C$ для белковой части меда, $\delta^{13}C_{\text{мед}}$ - значение $\delta^{13}C$ для меда, а -9,7 - среднее значение $\delta^{13}C$ для кукурузного сиропа.

Протокол анализа АОАС 998.12 широко применяется в ЕС, США, Канаде, Австралии и других странах в течение многих лет. Для различных сортов меда созданы базы изотопных данных, которые защищают производителя и конечного потребителя от вероятных подделок, связанных с регионом происхождения или сортом меда [4, 7, 8, 10].

К сожалению, в России и странах ТС на сегодняшний день не существует подобного регламента. В работе представлены результаты проверки согласно АОАС 998.12 различных российских и импортных образцов меда, представленных в розничной продаже в Москве (табл. 2).

Методика анализа

Белковую составляющую меда выделяли в соответствии с европейским протоколом АОАС 998.12. Для этого образец меда массой навески 10–12 г помещали в специальную пробирку (50 мл) для центрифуги, смешивали с 4 мл воды и затем добавляли 2 мл 0,335 моль/л H_2SO_4 и 2 мл 10% Na_2WO_4 . Полученную смесь гомогенизировали, нагревали до 80 °С на водяной бане до флокуляции белков. В результате получали белковые частицы, достаточные для осаждения

Таблица 2. Изотопный состав углерода различных образцов меда и белковой фракции

№	Название меда	Год сбора	Заявленное место сбора меда	$\delta^{13}C_{VPDB}$, ‰, мед, N=4	$\delta^{13}C_{VPDB}$, ‰, белок	Δ , ‰ мед-белок	C4-сахар, %	Фальсификат, если Δ , ‰ мед-белок >1‰
1	Натуральный цветочный	2020	Россия, МО, Коломна	-21,14 ± 0,07	-25,93 ± 0,14	4,79	29,51	Фальсификат
2	Мед липовый натуральный	2020		-21,78 ± 0,13	-26,13 ± 0,12	4,34	26,48	Фальсификат
3	Мед каштановый натуральный	2020		-22,43 ± 0,11	-25,19 ± 0,07	2,76	17,82	Фальсификат
4	Мед цветочный натуральный	2020		-24,30 ± 0,03	-25,13 ± 0,17	0,83	5,38	
5	Мед акациевый натуральный	2020		-22,82 ± 0,07	-24,94 ± 0,07	2,12	13,91	Фальсификат
6	Живой мед, липа	2020	Россия, Алтайский край, село	-26,97 ± 0,11	-26,27 ± 0,12	-0,71	0,00	
7	Живой мед, горный	2020	Усть-Козлуха	-27,35 ± 0,17	-26,14 ± 0,16	-1,21	0,00	Фальсификат
8	Живой мед, разноцветье	2020		-25,80 ± 0,06	-25,53 ± 0,20	-0,27	0,00	
9	Живой мед, акация	2020		-26,32 ± 0,12	-26,06 ± 0,10	-0,27	0,00	
10	Живой мед, дягиль	2020		-26,81 ± 0,03	-26,76 ± 0,04	-0,04	0,00	
11	Живой мед, гречиха	2020		-27,52 ± 0,11	-26,81 ± 0,20	-0,72	0,00	
12	Мед натуральный, цветочный	2019	Австрия	-25,59 ± 0,03	-25,36 ± 0,07	-0,24	0,00	
13	Мягкий свежий мед, цветочный	2019	Франция	-25,55 ± 0,04	-25,76 ± 0,05	0,22	1,31	
14	Мед натуральный, акация	2020	Австрия	-24,75 ± 0,06	-24,54 ± 0,04	-0,21	0,00	
15	Мед натуральный цветочный. Горный светлый серия «Дикий мед»	2019	Россия, МО, Пушкинский р-н, Пушкино	-26,57 ± 0,02	-26,87 ± 0,09	0,30	1,75	

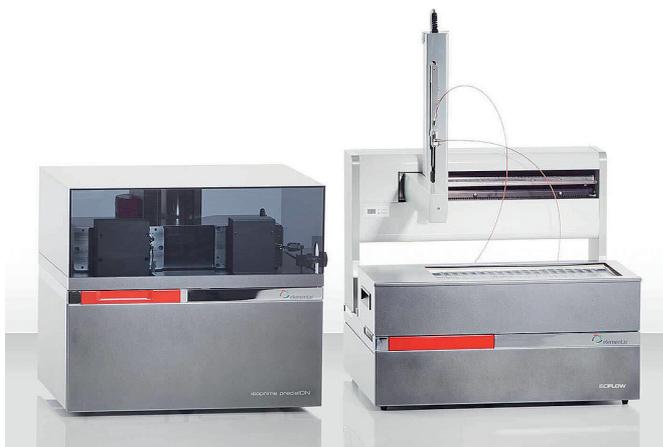


Рис. 2. IRMS – масс-спектрометр для анализа изотопов легких элементов в газовой фазе с опцией онлайн-пробоподготовки

в прозрачной жидкости. Процесс контролировали визуально. Затем раствор доводили водой до метки 50 мл, тщательно перемешивали, а затем помещали в центрифугу. Процесс разделения проводили при скорости вращения барабана 1500 об/мин в течение 5 мин. В тех случаях, когда белок не осаждался, увеличивали скорость вращения до 10 000 об/мин. Разница в изотопном составе углерода белков C13, полученных из одного и того же меда при скоростях вращения центрифуги 1500 и 10 000 об/мин, не превышала 0,2‰.

В результате получали белковый осадок. Процедуру повторяли не менее пяти раз, пока жидкость не становилась прозрачной, после чего ее удаляли. Осажденный белок сушили в сушильном шкафу до полного высыхания при температуре 75 °С не менее 8 ч.

Определение изотопного состава углерода в образцах проводили на специализированном масс-спектрометре для анализа изотопов легких элементов в газовой фазе в режиме онлайн с линией пробоподготовки (перевод образца в газ CO₂ путем окисления) – элементный анализатор, в постоянном потоке газа-носителя (рис. 2). В качестве образца сравнения использовали стандартные образцы: целлюлоза IAEA-CH-3 и сахароза IAEA-CH-6 с известным изотопным составом

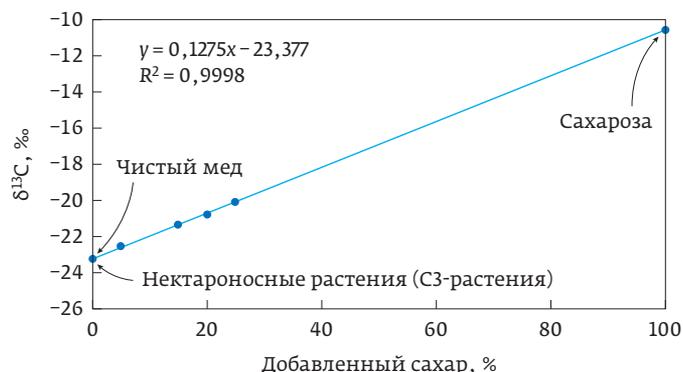


Рис. 3. Влияние C4-сахара, добавленного в мед

(МАГАТЭ, Австрия). Масса навески пробы, помещаемой в барабан автодозатора, лежала в диапазоне 450–550 мкг. В ходе предварительных исследований оптимизирован режим работы аналитического комплекса для определения изотопного состава. Расчеты проводили автоматически на компьютерной рабочей станции в специализированном программном обеспечении. Результаты измерений регистрировались в графической и цифровой формах. Полученный результат выражался в промилле (‰) в виде показателя изотопного состава δ¹³C относительно мирового эталона – стандарта углерода VPDB. Полученные данные представлены в табл. 2.

Таблица 3. Вариации валового изотопного состава углерода Сибирского меда различного происхождения

Место отбора меда	δ ¹³ C _{РДВ} , ‰
Алт. Край, Тогульский р-н, предгорье Салаира	-25,75
Алт. Край, Тогульский р-н, предгорье Салаира	-27,79
Республика Алтай, Усть-Кумир, высокогорная тайга	-25,57
Алт. Край, Бийский р-н, предгорье	-27,52
Алт. Край, Солтонский р-н, начало Прителецкой тайги	-27,43
Алт. Край, Солтонский р-н, предгорье	-26,83
Алт. Край, Алексеевский р-н, тайга	-27,10
Алт. Край, село Новичиха, 4 образца	от -26,00 до -27,34
Алт. Край из разных районов, диапазон, 5 образцов	от -26,33 до -28,02
Новосибирская область, Колыванский р-н, тайга	-27,01
Новосибирская область, Болотнинский р-н	-27,64
Новосибирская область, Тогучинский р-н, донник	-26,95
Новосибирская область, Чулымский р-н	-26,43
Читинская область, горная тайга	-26,22

Таблица 4. Вариации δD и $\delta^{18}O$ в природных водах

Происхождение образца	$\delta^2H_{SMOW}, \text{‰}$	$\delta^{18}O_{SMOW}, \text{‰}$
Каракан, Обское водохранилище	-108	-14,55
Искитим	-133	-17,78
Иссык-Куль	1,5-7	-0,70
Байкал	-118	-15,84
Иссык-Ата, родоновые воды	-55	-11,48
Москва	-82	-8,65
Краснодарский край	-61	-7,73

В ходе исследований была успешно отработана методика, получены данные изотопного состава различных образцов меда. Среди исследованных проб выявлены фальсификаты, наличие которых невозможно обнаружить применяемыми и утвержденными на сегодняшний день в России и ТС для контроля качества меда методами [4, 5, 9, 10].

Применение данных изотопного состава легких элементов в меде и продуктах пчеловодства дает широкие возможности для исследований и создания новых регламентов контроля качества и происхождения продукции – сортовое разнообразие и регион происхождения (табл. 3).

Например, для быстрой сортовой идентификации скрининга (мед с источником происхождения нектара с С3-растений) анализ изотопного состава углерода можно проводить, не разделяя мед на белки и углеводы, так как даже незначительная примесь внесенного сахара С4 (тростниковый, кукурузный) в результате непосредственного добавления в мед заявленного происхождения, либо в виде кормовой прикормки для пчел будет отражаться на валовом изотопном составе углерода (рис. 3). Поэтому, образцы меда, имеющие $\delta^{13}C$ со значениями выше, чем -23‰ , будут считаться подозрительными. Кроме того, отсутствие манипуляций по разделению меда на белковую и углеводную фракции существенно снижает стоимость анализа на возможную фальсификацию [3, 4, 5].

В табл. 3 представлены измеренные величины $\delta^{13}C$ для образцов меда, отобранных в различных районах Алтайского края, Новосибирской области и др.

Диапазон данных изотопного состава углерода исследуемых образцов меда составил от $-25,57$ до $-28,02\text{‰}$, что может свидетельствовать об их натуральном происхождении. Выявлены различия между сотовым медом ($\delta^{13}C = -26,93\text{‰}$) и пчелиным воском тех же сот ($\delta^{13}C = -28,74\text{‰}$), которые, вероятно, могут быть следствием фракционирования

углерода на стадиях пчелиного метаболизма (табл. 1). Этот результат может заинтересовать специализирующиеся на изучении пчел, их метаболизма и продуктах пчеловодства организации, например Институт Пчеловодства.

Мед из Бишкека ($\delta^{13}C = -22,93\text{‰}$) либо фальсифицирован добавлением сахара, либо имеет типичный для региона изотопный состав углерода, так как доля С4-растений и растений смешанного типа фотосинтеза САМ

(Crassulacean Acid Metabolism) в засушливых жарких районах выше. В данном случае необходимо провести дополнительное исследование с выделением белковой части [1, 2, 5, 6].

Для четкой дифференциации места происхождения меда перспективно использование изотопной системы дейтерий – кислород 18 (δD и $\delta^{18}O$). Питающие растительность определенного региона природные воды имеют индивидуальные изотопные составы водорода и кислорода, отражающие генезис и происхождение водной системы (табл. 4). Такая уникальная метка находит отражение в растениях [2].

Для более широкого применения данных изотопного состава углерода, кислорода, водорода и азота в меде в качестве метки, отражающей географическое происхождение и сорт, необходимо составление и сопоставление информационной базы данных изотопного состава перечисленных элементов в меде, воде и растительности, типичной для территории Российской Федерации и стран ТС. Подобная информационная база поможет идентифицировать мед по месту происхождения и установить

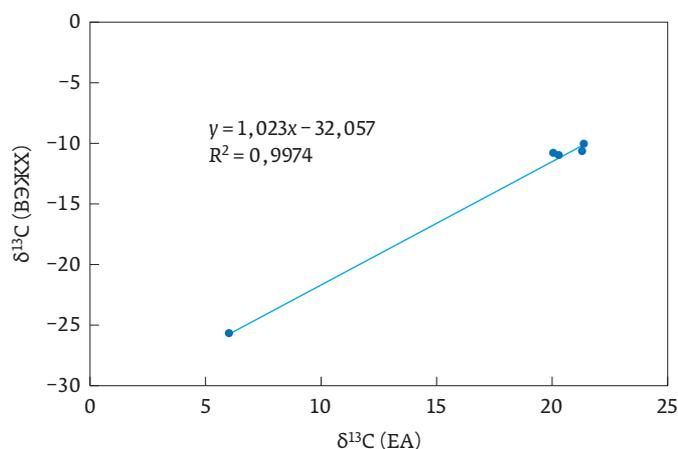


Рис. 4. Корреляция между $\delta^{13}C$ (ЕА) и $\delta^{13}C$ (ВЭЖХ)

региональный диапазон колебаний изотопного состава, что даст возможность экспертно выявлять фальсификацию продуктов пчеловодства.

На сегодняшний день компания «МС-АНАЛИТИКА» предлагает законченное приборное решение на базе оборудования Elementar (Англия) для изучения и рутинного применения в лабораториях по контролю качества меда с методической поддержкой и сервисным сопровождением. Elementar – единственная компания, которая производит специализированный для исследований меда комплекс ВЭЖХ – изотопный масс-спектрометр, включающий программное обеспечение для обработки и базу изотопных данных по меду различного региона происхождения.

Сопряжение изотопного масс-спектрометра с ВЭЖХ позволяет определять изотопный состав в индивидуальных сахарах меда (трисахариды, дисахариды, глюкоза, фруктоза), с предварительным разделением на хроматографической колонке (табл. 5, рис. 4) [8, 11]. Все оборудование внесено в Реестр средств измерений РФ.

Литература

1. Галимов Э.М. Природа биологического фракционирования изотопов. М.: Наука, 1981.
2. Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимических адаптаций. М.: Мир, 1988.
3. Колеснов А.Ю., Мойсеяк М.Б., Талибова А.Г. Масс-спектрометрические исследования состава стабильных изотопов углерода 13C и 12C в сахарах различного происхождения. Сахар. 2011;(8):39–45.
4. Талибова А.Г., Колеснов А.Ю. Исследование стабильных изотопов для оценки качества и безопасности пищевых продуктов. Ч. 2. Углерод. Хранение и переработка сельхозсырья. 2010;(12):51–54.
5. Ветрова О.В., Калашникова Д.А., Мелков В.Н., Симонова Г.В. Выявление фальсификации меда сахарными сиропами методом масс-спектрометрии стабильных изотопов. Журн. аналит. химии. 2017;72(7):645.
6. Калашникова Д.А., Симонова Г.В. Отношения стабильных изотопов 13C/12C и 15N/14N в образцах подмора медоносных пчел и в продуктах их жизнедеятельности. Журн. аналит. химии. 2021;76(4):359–368.
7. Ruoff K., Bogdanov S. (2004) Authenticity of honey and other bee products. *Apiacta*. 2004;38:317–327.
8. JRC Technical Reports Results of honey authenticity testing by liquid chromatography-isotope ratio mass spectrometry. Ref. Ares (2016)6932951-13/12/2016, https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/oc_control-progs_honey_jrc-tech-report_2016.pdf, last accessed Mar 24, 2017.
9. Tosun M. Detection of adulteration in honey samples added various sugar syrups with 13C/12C isotope ratio analysis method.

Таблица 5. Измерения различных сахаров на элементном анализаторе (EA) и ВЭЖХ (LC) в сопряжении с IRMS. Выполнено на оборудовании precisiON (Elementar, UK)

Образец	$\delta^{13}\text{C}$ (EA), ‰	Ст. отклонение, ‰ (n = 10)	$\delta^{13}\text{C}$ (LC), ‰	Ст. отклонение ‰ (n = 10)
ANU Sucrose	-10,80	0,04	–	–
IAEA-CH7	-32,15	0,03	–	–
Свекловичный сахар	-25,86	0,08	-24,90	0,10
Тростниковый сахар	-10,71	0,19	-9,62	0,11
Сахароза (Lab Std)	-11,01	0,15	-10,64	0,08
Глюкоза (Lab Std)	-10,99	0,23	-10,79	0,28
Фруктоза (Lab Std)	-10,16	0,07	-9,54	0,06

Food Chem. 2013;138(2-3):1629–1632. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.11.068. Epub 2012 Nov 24. PMID: 23411291.

10. AOAC. Official methods of analysis method 998.12: C-4 plant sugars in honey. Internal standard stable carbon isotope ratio method. AOAC International, 1998.
11. Cabanero A. I., Recio J. L., Rupérez M. Liquid Chromatography Couples to Isotope Ratio Mass Spectrometry: A New Perspective on Honey Adulteration Detection. *J. Agric. Food Chem.* 2006;54:9719–9727.

References

1. Galimov E. M. The nature of biological isotope fractionation. М.: Nauka publ., 1981.
2. Khochachka P., Somero Dzh. Biochemical adaptation strategy. М.: Mir publ., 1988.
3. Kolesnov A. Yu., Moiseyev M. B., Talibova A. G. Mass spectrometric studies of the composition of stable carbon isotopes 13C and 12C in sugars of various origins. *Sakhar – Sugar*. 2011;(8):39–45.
4. Talibova A. G., Kolesnov A. Yu. Study of stable isotopes for the assessment of food quality and safety. Part 2. Carbon. *Khramenie i pere-rabotka sel.khozsyrya – Storage and processing of agricultural raw materials*. 2010;(12):51–54.
5. Vetrova O. V., Kalashnikova D. A., Melkov V. N., Simonova G. V. Detection of falsification of honey with sugar syrups by stable isotope mass spectrometry. *Zhurn. analit. Khimii – Journal of Analytical Chemistry*. 2017;72(7):645.
6. Kalashnikova D. A., Simonova G. V. Ratios of stable isotopes 13C/12C and 15N/14N in samples of dead honey bees and in products of their vital activity. *Zhurn. analit. Khimii – Journal of Analytical Chemistry*. 2021;76(4):359–368.
7. Ruoff K., Bogdanov S. (2004) Authenticity of honey and other bee products. *Apiacta*. 2004;38:317–327.
8. JRC Technical Reports Results of honey authenticity testing by liquid chromatography-isotope ratio mass spectrometry. Ref. Ares(2016)6932951-13/12/2016, https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/oc_control-progs_honey_jrc-tech-report_2016.pdf, last accessed Mar 24, 2017.
9. Tosun M. Detection of adulteration in honey samples added various sugar syrups with 13C/12C isotope ratio analysis method. *Food Chem.* 2013;138(2-3):1629–1632. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.11.068. Epub 2012 Nov 24. PMID: 23411291.
10. AOAC. Official methods of analysis method 998.12: C-4 plant sugars in honey. Internal standard stable carbon isotope ratio method. AOAC International, 1998.
11. Cabanero A. I., Recio J. L., Rupérez M. Liquid Chromatography Couples to Isotope Ratio Mass Spectrometry: A New Perspective on Honey Adulteration Detection. *J. Agric. Food Chem.* 2006;54:9719–9727.