

Metody nowoczesnego wykrywania zafałszowań miodu syropami cukrowymi ze skrobi

Zbigniew Lipiński¹, Katarzyna Czajkowska²

z Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie¹ oraz Corpo Sp. z o.o. w Łodzi²

Z uwagi na odżywczą oraz leczniczą wartość miodu wszelkie jego zafałszowania są przedmiotem stałej kontroli w trosce o dobro konsumentów. Metody i techniki badawcze służące tej kontroli są ciągle udoskonalane, na wszystkich etapach jego drogi, tzn. od pszczelarza aż na półki sklepowe, zarówno w wymiarze międzynarodowym, jak i krajowym.

Z chemicznego punktu widzenia głównym składnikiem miodu są cukry, które stanowią 95% jego suchej masy (1). Średnio w miodach pochodnych nektaru kwiatowego znajduje się 17,2% wody, 38,19% fruktozy, 31,29% glukozy, 1,31% sacharozy, 8,8% innych cukrów oraz 17,2% wody (2, 3). Przy czym fruktoza rozpuszcza się w wodzie dwa razy lepiej niż glukoza (4). Interesujące jest, że po enzymatycznym odłączeniu przez inwertazę (enzym gruczołów gardzielowych pszczoły) cząsteczki fruktozy od cząsteczki sacharozy powstała cząsteczka glukozy może przejściowo łączyć z innymi cząsteczkami glukozy w cząsteczki maltozy. Średnie pH miodów wynosi 3,91 (3,2–4,5; 4).

Z uwagi na dużą zawartość cukrów miód był początkowo fałszowany syropem z sacharozy, a następnie syropami glukozowo-fruktozowymi ze sztucznie inwertowanej sacharozy. W ostatnim czasie również w Polsce, między innymi na skutek podjęcia krajowej produkcji syropów cukrowych ze skrobi pszennej, zaczyna pojawiać się problem zafałszowań miodu tymi syropami, aczkolwiek zjawisko to jest ograniczone wysoką ceną tych syropów w porównaniu do ceny cukru. W większości przypadków zafałszowania te są nieumyślnym skutkiem źle skalkulowanego przez pszczelarza zapotrzebowania pszczoł na pokarm węglowodanowy w okresach bezpożytkowych lub nadmiernego karmienia tego typu pokarmem w trakcie uzupełniania zapasów zimowych.

W skali świata proceder fałszowania miodu znacznie się nasilił dopiero po wprowadzeniu do żywienia pszczoł taniych syropów cukrowych, które produkują się ze skrobi kukurydzianej, pszenicznej oraz ryżowej. Stało się to w 1959 r., kiedy Japończycy opracowali sposób na przerobienie glukozy otrzymywanej ze zbóż na fruktozę. Syropy te znane są pod potoczną

nazwą „izoglukoza” (5). Syropy te zwykle zawierają dużo fruktozy (high fructose corn syrup – HFCS). Najnowsze z nich, szczególnie przeznaczone dla pszczoł, zawierają więcej glukozy niż fruktozy, czego przykładem jest chociażby syrop ze skrobi pszenicznej o nazwie Apifortuna HF 1575, który zawiera 15% fruktozy, 22% glukozy, 42% maltozy, 8% maltotriozy oraz 15% innych cukrów złożonych, czy syrop o nazwie Royal Sirop, który zawiera 15% fruktozy, 22% glukozy, 43% maltozy i 20% maltotriozy.

Fakt pojawiania się zafałszowania miodu omawianymi syropami stanowi poważne wyzwanie dla laboratoriów badających usługowo jego jakość, bowiem do niedawna zafałszowania miodu cukrem, syropami HFCS i podobnymi wykrywano i oznaczano, posługując się analizą składu obecnych w nim pyłków, analizą sensoryczną oraz analizą składu cukrów i aminokwasów, a także aktywności enzymów, w tym szczególnie inwertazy oraz diastazy i badaniem stężenia hydroksymetylofurfuru (HMF) oraz proliny (6).

Z uwagi na niedoskonałość metod analitycznych zafałszowania miodu syropami HFCS i podobnymi były przez wiele lat trudne do wykrycia. Dopiero z chwilą odkrycia w 1977 r. przez Donera i Whitea (7), że stosunek izotopów węgla ^{13}C do ^{12}C w syropie kukurydzianym różni się od tego w miodzie naturalnym, zaczął się rozwój metod badawczych pozwalających na skuteczniejszą eliminację miodów fałszowanych cukrami, w tym pochodzącymi z tego typu syropów. Nastąpiło to w kilka lat po tym jak White i Doner (8, 9) opublikowali nowatorską metodę badania omawianego zafałszowania miodu syropami HFCS z użyciem spektrometrii masowej. Należy wyjaśnić, że wiele pierwiastków chemicznych, np. atom węgla z CO_2 , posiada dwa i więcej naturalnych izotopów o tych samych właściwościach chemicznych, aczkolwiek niewyobrażalnie różniących się masą atomową, co jednak pozwala im wchodzić w różnym stopniu w reakcje chemiczne i wykazywać niewielkie różnice w składzie izotopowym substancji, w których są one obecne (9). Powstałe w ten sposób różnice, co do ilości tych izotopów, np. izotopu węgla ^{13}C

Current methods for detection of honey adulteration with starch sugar syrups

Lipiński Z.¹, Czajkowska K., Institute of Animal Reproduction and Food Research of Polish Academy of Sciences in Olsztyn¹, Corpo Sp. z o.o. in Łódź²

In this paper the problem of the detection of honey adulteration with different sugars but mostly with those made from the fructose high corn syrup (HFCS), was presented. The consideration was conducted regarding honey composition and physicochemical principles allowing implementation of stable carbon isotope ratio analysis/mass spectrometry (SCIRA/MS) into the practical detection method mentioned above. Some other methods were also presented. Finally the authors presented general example of practical interpretation of the results of honey adulterations with C-3 and C-4 sugars, based on EA/LC-IRMS method, which is commonly used by the most technically advanced world laboratories.

Keywords: honey, adulteration, starch, sugars.

w stosunku do ^{12}C w cukrach nektaru i pochodnych skrobi, wynikają również z faktu, że wolniej reagujący $^{13}\text{CO}_2$ ulega większemu zubożeniu u roślin C-3 niż u roślin C-4. Znaczenie tych dwóch ostatnich terminów wynika z faktu, że u miododajnych roślin, tzw. C-3, dwutlenek (CO_2) łączy się z cząsteczkami, które zawierają trzy atomy węgla przed ich włączeniem się w fotosyntezę, zaś u tzw. roślin C-4 wspomniany CO_2 łączy się z cząsteczkami, które w tym czasie posiadają cztery atomy węgla. Do tych ostatnich roślin należą trzcina cukrowa, sorgo, kukurydza itp. (6).

Odkrycie, że rośliny należące do różnych szlaków metabolicznych C-3, C-4, CAM w czasie fotosyntezy wytwarzają cukry różniące się stosunkiem izotopów węgla $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ stało się szczególnie przydatne do opracowania bardziej zaawansowanych technicznie metod wykrywania zafałszowań miodu syropami skrobiowymi z wykorzystaniem spektrometrycznej analizy stosunku izotopów węgla $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (stable carbon isotope ratio analysis/mass spectrometry – SCIRA/MS). Na przykład przez porównanie różnicy wartości δ (δ values), wynikającej ze stosunku ilości izotopu węgla ^{13}C do ^{12}C w cukrach z nektaru (miodu) z tzw. roślin C-3, do wartości δ w cukrach z trzciny cukrowej oraz ze skrobi z tzw. roślin C-4, z których otrzymuje się wspomniane syropy zbożowe, kukurydziane itp. (10), mając na względzie, że udział poszczególnych izotopów w przyrodzie jest stały (11). Pomiar wartości δ ^{13}C można też porównywać z „ δ ^{13}C Vienna Pee Dee Belemnite (r V-(PDB) referent standard” (6). Materiał ten posiada wartość δ ^{13}C wyższą

niż nieomal wszystkie zbudowane na atomach węgla substancje. Nazwa tego standardu referencyjnego wiąże się z faktem, że został on opracowany przy użyciu morskiej skamieliny z okresu kredowego o nazwie *Belemnitella americana*, znalezionej w formacji skalnej o angielskiej nazwie Pee Dee. Formacja ta znajduje się w Południowej Karolinie w USA.

W praktyce wartość $\delta^{13}\text{C}$ dla syropu C-4 jest bliska 10%, zaś średnia wartość $\delta^{13}\text{C}$ dla miodów jest 24% (12). Z tej przyczyny zafałszowanie miodu syropem, otrzymanym np. z kukurydzy czy trzciny cukrowej powoduje, że stosunek izotopów $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ spada do wartości pośrednich pomiędzy powyższymi wartościami granicznymi. Niestety sprawnie wykrywania zafałszowań miodu syropami HFCS z użyciem standardów referencyjnych nie jest bardzo dokładna, bowiem pozwala z całą pewnością wykryć zafałszowanie na poziomie powyżej 7% (12).

Omówiona powyżej oryginalna metoda mierzenia stosunku izotopów ^{13}C do ^{12}C opisana przez Duisberga i Hadorna (13) oraz Brookesa i wsp. (14), została następnie udoskonalana przez White i Wintersa (15), a później przez samego White'a (6), którzy wykazali, że białko obecne w miodzie tuż przed jego zafałszowaniem omawianymi syropami może służyć jako wewnętrzny wzorzec układu izotopów $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Ostatnio Elflein i Raezke (6) zaproponowali, aby do tego celu połączyć metodę spektrometryczną z metodą chromatografii cieczowej ($\delta^{13}\text{C}$ -EA/LC-IRMS), zaś Czen i wsp. (17) przedstawili zupełnie nową metodę w oparciu o spektroskopię w podczerwieni.

Pomimo że oznaczenie zawartości wspomnianych izotopów w miodach i wyekstrahowanych białkach pozwala na wykrycie zafałszowania miodu cukrami pochodzącymi ze skrobi, to niestety nie ujawnia zafałszowania cukrami z roślin C-3, bowiem pochodzą one z tego samego szlaku metabolicznego. Aby temu sprostac, Graudon i wsp. (18) sprzęgli metodę SCIRA/MS z metodą spektroskopii magnetycznej rezonansu jądrowego (deuterium nuclear magnetic resonance spectroscopy – NIR). W metodzie NIR wykorzystuje się fizyczne zjawisko, które polega na tym, że zawartość deuteru (izotopu wodoru) w specyficznych miejscach cząsteczki cukrów nektaru jest większa niż np. w cukrach z buraków.

Należy podkreślić, że do ścisłej czołówki światowej w obszarze badań jakości miodu należą laboratoria niemieckie takich firm, jak np. Intertek Food Services GmbH czy Quality Services International GmbH.

Obecnie do wykrywania zafałszowań cukrami C-3 oraz cukrami C-4, wymienione firmy stosują wspomnianą wcześniej

metodę EA/LC-IRMS. Jak już zaznaczono, według tej metody zawartość cukrów C4<7% oznacza, że miód spełnia wymagania Unii Europejskiej co do jakości. Jeżeli zawartość cukrów C-4 jest w miodzie zbyt duża (C4>7%), to taki miód uważa się za zafałszowany syropem cukrowym ze skrobi kukurydzianej lub pszenicznej, jakkolwiek granica wykrywalności dla tego badania wynosi 0,7%.

Cukry C-3 wykrywa się na podstawie wartości $\delta^{13}\text{C}$ dla glukozy, fruktozy, dwucukrów, trójcukrów i innych oligosacharydów oraz ich różnic. Jeżeli różnice te mieszczą się w określonych wartościach F-G pomiędzy <-1; +1> oraz maksymalnie pomiędzy <-2,1; +2,1>, to wówczas miód nie jest zafałszowany cukrami C3. Jeżeli nawet jeden z dwóch parametrów nie mieści się w tych granicach, to wówczas miód uważa się za zafałszowany.

Dodatkowo ważnym wskaźnikiem zafałszowania miodu syropami cukrowymi z kukurydzy i pszenicy jest obecność oligosacharydów (12). Ich granica wykrywalności wynosi 0,7%. Jeżeli zostaną one wykryte w miodzie, w ilości powyżej tego poziomu, to świadczy to o jego zafałszowaniu. Jeżeli zaś zostanie wykryta ich obecność poniżej tego poziomu, to firmy oferują dodatkowe badanie na obecność prawdopodobnego zafałszowania syropem ryżowym. Pierwsze badania tego typu zostały zaoferowane 20 lutego 2012 r.

W pakiecie oferty badań zafałszowań miodu omawianymi syropami znajdują się również badania na aktywność enzymów: beta-fruktofuranazy oraz beta- i gamma-amylazy. Ponieważ enzymy te są stosowane w produkcji syropów cukrowych ze skrobi, to ich duża aktywność świadczy o obecności w miodzie fałszujących go cukrów C-4. Dla beta-fruktofuranazy granica wykrywalności (limit of detection) wynosi 20 j/kg. Aktywność poniżej tego poziomu jest aktywnością naturalnie występującą w miodzie. Oczywiście aktywność powyżej tego poziomu świadczy o zafałszowaniu.

Dla beta- i gammaamylazy granica wykrywalności wynosi 1j/kg, jednakże według wymienionych wcześniej laboratoriów, jeżeli dwa pozostałe badania, tzn. ^{13}C oraz beta-fruktofuranazy, nie wskazują na zafałszowanie, to poziom aktywności poniżej 5j/kg jest aktywnością naturalnie występującą w miodzie.

Pomimo że aktywność tych enzymów można w łatwy sposób zniszczyć, np. termicznie, to w celu wykluczenia wszelkich podejrzeń co do poprawności analizy i otrzymanych wyników badań zwykle wykonywane są wszystkie trzy wymienione badania.

Należy podkreślić, że w dobie powszechnego fałszowania produktów żywnościowych miód wciąż należy do

najwartościowszych i najbezpieczniejszych pokarmów człowieka. Jednocześnie jest on najczęściej badany produktem spożywczym, w tym przed dopuszczeniem go do obrotu hurtowego, w trakcie obrotu między hurtowniami, a także bardzo często tuż przed dopuszczeniem go do sprzedaży bezpośrednio w obszarze handlu wielkotowarowego. Stąd nie spotyka się w handlu detalicznym miodów zafałszowanych syropami cukrowymi, w tym ze skrobi pszenicznej oraz kukurydzianej.

Piśmiennictwo

- Bogdanov S., Ruoff K., Oddo L. P.: Physico-chemical methods for the characterization of unifloral honeys: a review. *Apidologie* 2004, **35**, Special issue, 4-17.
- White J.W., Riethof M.L., Subers M.L., Kushnir I.: Composition of American honeys. *US Department of Agriculture Technical Bulletin*. 1962, 1261.
- Doner L.W.: The sugars of honey – a review. *J. Sci. Food Agric.* 1977, **28**, 443-456.
- Morse R.A., Hooper T.: *The Illustrated Encyclopedia of Beekeeping*. Edit. by R.A. Morse and Ted Hooper. E.P. Dutton, Inc., New York 1985.
- Rybak-Chmielewska H., Konopacka Z.: Co to jest izoglucoza? *Pszczelarstwo* 2004, **5**, 6.
- Elflein L., Raezke K.P.: Improved detection of honey adulteration by measuring differences between $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ stable carbon isotope ratios of protein and sugar compounds with a combination of elemental analyzer - isotope ratio mass spectrometry and liquid chromatography - isotope ratio mass spectrometry ($\delta^{13}\text{C}$ -EA/LC-IRMS). *Apidologie*. 2008, **39**, 574-587.
- Doner L. W., White J.W. Jr.: $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio is relatively uniform among honeys. *Science* 1977, **197**, 891-892.
- White J.W., Doner L.W.: Mass spectrometric detection of high fructose corn syrup in honey by $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio. A collaborative study. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 1978, **61**, 746-750.
- White J.W., Doner L.W.: The $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio in honey. *J. Apic. Sci.* 1978, **172**, 94-99.
- Padovan G.J., de Jong D., Rodrigues L.P., Marchini J.S.: Detection of adulteration of commercial honey samples by the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio. *Food Chem.* 2003, **82**, 633-636.
- Targoński Z., Stój A.: Zafałszowania żywności i metody ich wykrywania. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 2005, **45**, supl. 30-40.
- Bogdanov S., Martin P.: Honey authenticity: a review. *Swiss Bee Research Centre*. 2002, 1-20.
- Duisberg H., Hadorn H.: Welche Anforderungen sind an handles honige zu stellen? *Mitt. Lebensm. Hyg.* 1966, **57**: 627-629.
- Brookes S.T., Barrie A., Davies J.E.: A rapid $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ test for determination of corn syrups in honey. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 2002, **61**, 746-750.
- White, J. W. and Winters, K.: Honey protein as internal standard for stable carbon isotope ratio detection of adulteration of honey. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 1989, **72**, 907-911.
- White J.W.: Internal standard stable carbon isotope ratio method for determination of C-4 plant sugars in honey: Collaborative study and evaluation of improved protein preparation procedure. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 1992, **75**, 543-548.
- Chen L., Xue X., Ye Z., Zhou J., Chen F., Zhao J.: Determination of Chinese honey adulterated with high fructose corn syrup by near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*. 2011, **128**, 1110-1114.
- Giraudon S., Danzart M., Merle M.: Deuterium nuclear magnetic resonance spectroscopy and stable carbon isotope ratio analysis mass spectrometry of certain monofloral honeys. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 2000, **83**, 1401-1409.

Dr hab. Zbigniew Lipiński, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie, ul. Tuwima 10, 10-748 Olsztyn.