ISSN 2074-9414 (Print)
ISSN 2313-1748 (Online)

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-3-2523
https://elibrary.ru/SHQHRU

Оригинальная статья
https://fptt.ru

Анализ отношений стабильных изотопов легких элементов в отдельных компонентах мёда

Л. А. Оганесянц[1], А. Л. Панасюк[1], Д. А. Свиридов[1], М. Ю. Ганин[1,*], А. А. Шилкин[1], О. В. Серебрякова[2]

[1] *Всероссийский научно-исследовательский институт пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности, Москва, Россия*

[2] *Научный центр пчеловодства, Рыбное, Россия*

Поступила в редакцию: 10.04.2024
Принята после рецензирования: 13.05.2024
Принята к публикации: 04.06.2024

**М. Ю Ганин: labvin@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-0518-1181*
Л. А. Оганесянц: https://orcid.org/0000-0001-8195-4292
А. Л. Панасюк: https://orcid.org/0000-0002-5502-7951
Д. А. Свиридов: https://orcid.org/0000-0002-5595-0455
А. А. Шилкин: https://orcid.org/0000-0003-1223-0703
О. В. Серебрякова: https://orcid.org/0000-0002-8337-2322

© Л. А. Оганесянц, А. Л. Панасюк, Д. А. Свиридов, М. Ю Ганин, А. А. Шилкин, О. В. Серебрякова, 2024

Аннотация.
Мёд, благодаря своим органолептическим качествам и питательным свойствам, является ценным ингредиентом в пищевой промышленности. Однако мёд стал одним из самых фальсифицируемых продуктов. Нарушение технологии при производстве мёда является одной из главных проблем, угрожающих стабильному развитию и деятельности пчеловодческой отрасли. Разработка способов определения подлинности мёда и продуктов на его основе является востребованным направлением исследований. С целью идентификации мёда авторами проведен анализ отношений стабильных изотопов легких элементов в его отдельных компонентах.
В ходе исследования изучили 36 образцов мёда различного географического и ботанического происхождения, а также 5 образцов сахарных сиропов из различного сырья. Для установления числовых значений показателей изотопных характеристик легких элементов применяли изотопный масс-спектрометр Delta Advantage V (США – Германия), с дополнительными модулями Flash IRMS и Conflo IV.
В исследуемых образцах измерили значения показателей отношений стабильных изотопов углерода: в мёде (брутто) $\delta^{13}C$ и азота $\delta^{15}N$ в его белковой фракции, а также показатели $\delta^{13}C$, $\delta^{18}O$ и $\delta^{2}H$ этанола, выделенного из ферментированного мёда. Анализ значений показателей $\delta^{13}C$ брутто и $\delta^{13}C$ белковой части меда позволяет рассчитать количество внесенных сахаров, полученных из кукурузы и тростника. В двух образцах были обнаружены экзогенные сахара в количестве 6,5 и 18 % в пересчёте на тростниковый сахар.
Проведенные исследования показали, что использование метода изотопной масс-спектрометрии позволяет выявить образцы мёда, содержащие экзогенные сахара. На основании методики AOAC 998.12., в 2 образцах мёда из 36 было выявлено присутствие экзогенных сахаров из С4-типа растений. Однако данный метод не позволяет выявить присутствие внесенных сахаросодержащих веществ из С3-типа растений. Были проведены исследования значений показателей $\delta^{13}C$, $\delta^{18}O$ и $\delta^{2}H$ этанола, выделенного из ферментированного мёда. Установлено, что показатель $\delta^{18}O$ может выступать в качестве идентификационного критерия при установлении присутствия сахаров из С3-типа растений в меде. Изучение отношений изотопов азота в белковой части мёда может быть полезным инструментом для определения его подлинности и дополнительным критерием идентификации пчеловодческой продукции. В ходе работы был получен патент (RU2809285C1) по определению экзогенных сахаросодержащих веществ в пчелином мёде.

Ключевые слова. Мёд, продукты пчеловодства, идентификация, фальсификация, изотопная масс-спектрометрия легких элементов

Для цитирования: Анализ отношений стабильных изотопов легких элементов в отдельных компонентах меда / Л. А. Оганесянц [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 3. С. 522–531. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-3-2523

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-3-2523
https://elibrary.ru/SHQHRU

Original article
Available online at https://fptt.ru/en

Light Stable Isotopes and Their Ratios in Honey Components

Lev A. Oganesyants[1], Alexander L. Panasyuk[1], Dmitriy A. Sviridov[1], Mikhail Yu. Ganin[1,*], Alexey A. Shilkin[1], Oksana V. Serebryakova[2]

[1] *All-Russian Research Institute of Brewing Non-Alcoholic and Wine Industry, Moscow, Russia*

[2] *Scientific Center of Beekeeping, Rybnoye, Russia*

Received: 10.04.2024
Revised: 13.05.2024
Accepted: 04.06.2024

**Mikhail Yu. Ganin: labvin@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-0518-1181*
Lev A. Oganesyants: https://orcid.org/0000-0001-8195-4292
Alexander L. Panasyuk: https://orcid.org/0000-0002-5502-7951
Dmitriy A. Sviridov: https://orcid.org/0000-0002-5595-0455
Alexey A. Shilkin: https://orcid.org/0000-0003-1223-0703
Oksana V. Serebryakova: https://orcid.org/0000-0002-8337-2322

© M.Yu. Ganin, L.A. Oganesyants, A.L. Panasyuk, D.A. Sviridov, A.A. Shilkin, O.V. Serebryakova, 2024

Abstract.
Honey possesses excellent sensory and nutritional properties, which makes it a valuable food ingredient. However, the same qualities make it one of the most often adulterated products in the world. Constant violations of processing technology threaten the beekeeping industry. In this regard, new authenticity criteria are a popular area of honey studies. The article introduces a method for establishing ratios of light stable isotopes in honey.
The study featured 36 samples of honey of various geographical origins and botanical profiles, as well as five samples of sugar syrups from various raw materials. The quantitative profiles were obtained using a Delta Advantage V isotope mass spectrometer (USA – Germany) with additional Flash IRMS and Conflo IV modules.
The experiment involved the ratios of stable carbon isotopes in honey $\delta^{13}C$ (gross) and nitrogen $\delta^{15}N$ in its protein fraction, as well as the values of $\delta^{13}C$, $\delta^{18}O$, and $\delta^{2}H$ of ethanol isolated from fermented honey. The values of $\delta^{13}C$ (gross) and $\delta^{13}C$ of honey proteins made it possible to calculate the amount of added sugar of corn and cane origin. Exogenous sugars in the amounts of 6.5% and 18% cane sugar were detected in two samples.
Isotope mass spectrometry was able to identify honey samples with exogenous sugars of C4-plant origin. However, the method failed to detect sugar-containing substances from C3-type plants. The $\delta^{18}O$ index demonstrated some prospects as an identification criterion for sugars from C3-plants in honey. Nitrogen isotope ratios in honey proteins proved to be an efficient tool for determining honey authenticity and an additional criterion for identifying bee products. The research resulted in a patent (RU2809285C1) for a new method of determining exogenous sugar-containing substances in honey.

Keywords. Honey, bee products, identification, falsification, isotope mass spectrometry

For citation: Oganesyants LA, Panasyuk AL, Sviridov DA, Ganin MYu, Shilkin AA, Serebryakova OV. Light Stable Isotopes and Their Ratios in Honey Components. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(3):522–531. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-3-2523

Введение

Мёд – природный продукт, обладающий высокой физиологической ценностью. Физико-химический состав мёда представлен углеводной составляющей (в первую очередь, глюкоза и фруктоза), водой, небольшим количеством белков, минералов, витаминов, ферментов, органических кислот и аминокислот. Следует отметить, что пчелиный мёд ценен в силу его антиоксидантных и противомикробных свойств [1]. Однако мёд стал одним из самых фальсифицируемых продуктов в мире. Недавнее исследование, проведенное Объединенным исследовательским центром в Европейском Союзе, показало, что из 320 проб мёда, взятых на границах Европейского союза, 46 % образцов, вызвали серьезные сомнения в их подлинности [2]. Из-за мирового спроса и высокой цены на мёд, добавление более дешевых инвертных сиропов, производимых из тростникового сахара, кукурузы и риса, а также неправильная маркировка географического происхождения являются одними из распространенных мошеннических

практик на международных и отечественных рынках [3]. Фальсификация и неправильное указание ботанического и географического происхождения мёда будут иметь и негативные экономические последствия для производителей натурального мёда, желающих работать в честной конкуренции. Производство мёда, не отвечающего установленным требованиям, угрожает эффективной деятельности и даже выживанию пчеловодческой отрасли [4].

Необходимо отметить, что мёд используется не только в свежем виде, но также является ингредиентом при производстве выпечки, десертов, а также напитков, таких как медовуха, сбитни, медовая комбуча и др. Поэтому проведение исследований, направленных на определение критериев, подтверждающих подлинность мёда и продуктов на его основе, является ключевым для обеспечения населения качественной пищей и защиты интересов честных производителей пчеловодства.

Решение вопросов обеспечения качества и безопасности пищевой продукции является приоритетной задачей, стоящей перед контролирующими органами исполнительной власти. Из-за сложности химической структуры и большого разнообразия сортов мёда, трудно определить, является ли мёд натуральным или поддельным. С другой стороны, с увеличением количества подделок возникает необходимость внедрения новых современных методов по обнаружению различного рода фальсификаций.

Можно выделить следующие, наиболее распространенные способы подделки (фальсификации) мёда:
– фальсификация путем добавления воды в мёд с целью увеличения его количества;
– фальсификация путем добавления различных сахаросодержащих веществ в мёд с целью увеличения его количества;
– фальсификация при производстве мёда путем кормления пчел сахарными сиропами;
– фальсификация путем нагревания мёда, искусственно создавая более привлекательный вид;
– фальсификация путем производства искусственного мёда (подделки) под видом натурального;
– ассортиментная фальсификация (неверное указание ботанического и географического происхождения).

Среди указанных видов фальсификации наиболее широкое распространение получили подделки, произведенные путем внесения сахаросодержащих веществ непосредственно в продукт. Показатели физико-химического состава фальсифицированных образцов, в том числе соотношение глюкозы и фруктозы соответствует аналогичным показателям натурального мёда, что значительно усложняет процесс идентификации. Часто практикуется кормление пчёл во время основного сбора нектара с целью увеличения урожайности мёда в ульях. Сахароза расщепляется до глюкозы и фруктозы при помощи инвертазы, содержащейся в натуральном мёде. Такие сахарные вещества считаются наиболее подходящим для пчел, так как легко перерабатывается насекомыми и позволяют добиться увеличения объема выделяемого мёда пчёлами. В таком случае обнаружить данный факт подкормки становится сложнее. В России подобная практика, при которой конечный продукт не соответствует юридическому определению мёда, установленному новыми поправками в Федеральном законе № 490-ФЗ «О пчеловодстве в Российской Федерации» не редкость. Для указанных методов фальсификации обычно применяются недорогие виды сахара или промышленные сиропы. Наиболее популярные сахарные добавки это различного рода сиропы, среди которых стоит выделить такие как, кукурузный сироп CS, сироп глюкозы GS, сироп сахарозы, кукурузный сироп с высоким содержанием фруктозы HFC, инвертный сироп IS с высоким содержанием фруктозы HFIS, получаемый из сахарного тростника или сахарной свёклы [5]. Добавление данных сиропов к мёду с целью удешевления его производства приводят к изменению некоторых физико-химических и биохимических контролируемых показателей, таких как активность нативных ферментов, снижение содержания аминокислоты пролина, золы. Однако при анализе этих показателей необходимо учитывать естественную изменчивость. Некоторые химические показатели, такие как содержание оксиметилфурфуроля, ранее использовавшиеся для определения наличия инвертных сиропов в мёде, могут давать неоднозначные результаты. Дело в том, что оксиметилфурфурол и ферментативная активность могут различаться в разных типах мёда и могут изменяться в образцах при нагревании или неправильном хранении в теплой среде [6].

На сегодняшний день, при выявлении фальсификатов мёда, наибольшее распространение получили следующие методы:
– физико-химический анализ и меллисопалинологический анализ пыльцы;
– методы разделения, например, определение профиля углеводов с помощью жидкостной хроматографии или газовой хроматографии;
– спектрометрические методы, в том числе жидкостной хроматографии с последующей масс-спектрометрией высокого разрешения и газовая хромато-масс-спектрометрия для определения профиля аромата;
– спектроскопические методы, включая инфракрасное преобразование Фурье;
– спектроскопия в ближней инфракрасной области и ядерно-магнитного резонанса;
– профилирование микроэлементов с помощью масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой.

Стоит отметить, что указанные методы не позволяют дать однозначный ответ о подлинности мёда.

Одним из передовых и наиболее эффективных методов по определению как добавления экзогенных сахаросодержащих веществ, так и географического/ботанического происхождения является метод изотопной масс-спектрометрии.

Метод изотопной масс-спектрометрии имеет ключевое значение при выявлении фальсификатов и подтверждении географического происхождения продуктов питания. Числовые значения отношений стабильных изотопов компонентов мёда (углерода, кислорода, азота и водорода) могут быть использованы для проверки указанной на этикетке маркировки (страны происхождения) и подлинности продуктов, связанной с правилами производства, например, с использованием экзогенных сахаросодержащих сиропов. Ряд стран приняли метод измерения соотношения стабильных изотопов углерода AOAC для обнаружения намеренно добавленных «растительных сахаров C4 в мёд» [7]. Принцип метода основан на различиях в значениях изотопных характеристиках углерода (δ^{13}C) меда брутто (полученного из нектара растений C3) и фальсифицированного мёда (смешанного с сахаром, полученным из растений C4, например, тростниковая сахароза или инвертированный кукурузный сахарный сироп). В таких случаях разница в значениях δ^{13}C между совокупностью всех соединений мёда (брутто исследование) и его белковой части являются важным инструментом для качественного и количественного определения фальсификации мёда [8–10]. Авторы в статье утверждают, что вышеупомянутый метод не применим для обнаружения сахаросодержащих добавок, произведенных из растений типа C3 [11].

Значения показателей изотопных отношений углерода, азота, водорода и кислорода в перспективе могут быть полезны для аутентификации географического и ботанического происхождения, поскольку на значения изотопных характеристик легких элементов структурных компонентов мёда влияют условия окружающей среды и способы ведения сельского хозяйства [12].

В настоящей работе описаны результаты исследования образцов мёда разного географического и ботанического происхождения с использованием метода изотопной масс-спектрометрии. Рассмотрена возможность использования дополнительных критериев для определения подлинности мёда, таких как соотношение изотопов азота в белковой части мёда, а также изотопные характеристики углерода, кислорода и водорода в этиловом спирте, полученном путем ферментации исследуемых образцов различного происхождения. Данный метод получил широкое применение и доказал свою эффективность в идентификации винодельческой продукции и других алкогольных напитков, а также при выявлении фальсификации органической продукции [13–19]. Данная работа является продолжением исследования по идентификации пчеловодческой продукции, но с большей выборкой образцов, а также более широким географическим охватом [19].

Объекты и методы исследования

Были изучены и проанализированы 36 образцов мёда из различных регионов (РФ, США и Австралии), а также 5 различных сиропов, произведенных из кукурузы, риса, свекловичного и тростникового сахара, а также из мелассы. По ботаническому происхождению образцы мёда были заявлены как липовый, акациевый, гречишный, падевый, женьшень, манука, кориандровый, донниковый и разнотравье.

Для выделения белковой фракции мёда использовался европейский протокол AOAC 998.12. [11, 20, 21]. В случае, когда белок не выделялся в процессе пробоподготовки, то уже можно было говорить о признаке фальсификации [22]. Белки и свободные аминокислоты не играют значительной роли в повышении пищевой ценности мёда, так как они не являются основными компонентами этого продукта. Однако они необходимы для образования ароматических веществ, которые характерны только для мёда, так как ферменты, содержащие белки, формируют и поддерживают состав мёда. В натуральном мёде обычно содержится белковая составляющая, за исключением некоторых редких видов цитрусовых медов.

В целях установления значений соотношения изотопов углерода и азота использовался изотопный масс-спектрометр Delta Advantage V (США – Германия), с дополнительными вспомогательными модулями Flash IRMS и Conflo IV. Пробы вводились в элементный аналилизатор с помощью твердотельного автодозатора. Время анализа одной пробы занимало порядка 10 мин. В качестве эталонов использовали стандарты МАГАТЭ и геологической службы США (USGS), таких как кофеин IAEA 600, масла NBS22, вьетнамского мёда USGS82 и канадского мёда USGS83.

Для определения значений изотопных характеристик углерода, кислорода и водорода в этиловом спирте, пробы подготавливались следующим образом. Мёд или сахарные сиропы растворяли в соотношении 20 г на 100 мл воды. Для отгонки этилового спирта из полученного продукта использовались чистые и высушенные винные дрожжи. В круглодонную колбу объемом 50 см^3 добавляли 25 см^3 исследуемой пробы и производили экстракцию этилового спирта. Когда происходило достижение стабильной температуры паров, обычной для азеотропной смеси этанола и воды 78,2–78,5 °C, начинали сбор дистиллята, который прекращали при повышении температуры. Сбор дистиллята продолжали до полного выделения азеотропной смеси этанола и воды.

В целях установления значений изотопного состава элементов этилового спирта использовался изотопный масс-спектрометр Delta Advantage V с дополнительными модулями, описанными выше только с автосамплером для жидких проб AI-AS 1300. В качестве эталонов сравнения использовали стандарты воды МАГАТЭ-USGS и спирта: SLAP2, USGS47, VSMOW2, BCR656.

Результаты и обсуждение

В ареале обитания пчёл, как правило, произрастают растения-медоносы C3-типа фотосинтеза. Именно тип фотосинтеза растения, в первую очередь, определяет значения показателя δ^{13}C структурных составляющих продуктов, вырабатываемых из растительного сырья.

Поэтому натуральный мёд имеет диапазон значений показателя δ^{13}C (брутто) от –29 до –24 ‰. Если мёд разбавлен сиропом, который содержит кукурузный или сахарный тростниковый сироп со средними значениями показателей δ^{13}C от –13 до –11 ‰, или если пчёлы были подкормлены сахаром, полученным из растений типа С4, то изотопный состав углерода в общих углеводах мёда будет находиться в промежутке между –29 и –11 ‰. Учитывая вышеизложенное, наиболее популярные и традиционные сорта мёда, такие как акациевый, липовый, гречишный и другие, должны иметь значения показателя δ^{13}C (брутто), характерные для высших растений типа С3. Например, в некоторых научных работах отмечается, что если значения изотопных характеристик углерода в мёде (брутто) превышают –23,5 ‰, то образец становится сомнительным и требует проведения дополнительных исследований [23, 24]. Зная об этом критерии, некоторые нечестные производители мёда начали добавлять различные компоненты (содержащие сахар, искусственные подсластители, ароматизаторы, глицерин и т. д.) к мёду, чтобы значение изотопного показателя углерода в мёде (брутто) было ниже –23,5 ‰. Когда сахаросодержащие компоненты добавляются в мёд, изотопные характеристики углерода в мёде (брутто) изменяются, но изотопные характеристики углерода в белковой части (фракции) мёда остаются неизменными. Это объясняется тем, что белок является естественным (нативным) компонентом, образующимся в процессе производства мёда, и добавление внешних сахаров не влияет на значения изотопного показателя углерода в белковой составляющей.

Согласно методике, мёд считается с добавками экзогенных сахаров, если процент содержания сахаров-сиропов, произведенных из растений С4-типа в образце, больше 7 % [23]. Для расчета содержания сахаров-сиропов в %, используется формула 1:

$$\text{С4 сахара} = \left(\frac{\delta^{13}\text{C}_{б} - \delta^{13}\text{C}_{м}}{\delta^{13}\text{C}_{б} - (-9,7)} \right) \times 100 \qquad (1)$$

где, $\delta^{13}\text{C}_{м}$ –значение δ^{13}C для мёда (брутто); $\delta^{13}\text{C}_{б}$ – значение δ^{13}C для белковой части мёда; (–9,7) – среднее значение δ^{13}C для кукурузного сиропа.

Формула, разработанная Международной ассоциацией аналитической химии, была утверждена как основная методика. В качестве эталона для расчета был выбран кукурузный сироп с высоким содержанием фруктозы. Данная формула разработана для определения содержания добавок сахара мёда в странах, где есть высокое потребление сахаросодержащих веществ, произведенных из кукурузы.

В нашей стране сиропы, полученные из кукурузы, не так популярны, поскольку сахар обычно производят из сахарной свёклы и в малой степени из тростникового сахара-сырца. В предыдущей работе было предложено заменить значения показателей отношений изотопов углерода для кукурузного сиропа на значение для тростникового сахара (сиропов) в формуле [19] (1):

$$\text{С4 сахара} = \left(\frac{\delta^{13}\text{C}_{б} - \delta^{13}\text{C}_{м}}{\delta^{13}\text{C}_{б} - (-12)} \right) \times 100 \qquad (2)$$

где $\delta^{13}\text{C}_{м}$ – значение δ^{13}C для мёда (брутто); $\delta^{13}\text{C}_{б}$ – значение δ^{13}C для белковой части мёда; (–12) – среднее значение δ^{13}C для сиропа из тростникового сахара.

На основании результатов нашей статьи можно сделать вывод, что внесение всего лишь 6 % инвертного тростникового сиропа в мёд приводит к разнице в значениях δ^{13}C между мёдом (в целом) и его белковой фракцией в диапазоне 0,9–1 ‰ [19].

В ходе исследования было отобрано 36 образцов мёда разных сортов и географического происхождения. Были изучены показатели изотопных отношений углерода δ^{13}C в мёде (брутто) и показатели δ^{13}C и δ^{15}N в белковой части (фракции) мёда.

Для анализа степени добавки инвертного тростникового сиропа в образцах мёда использовалась формула (2). Итоговые значения показателей δ^{13}C и δ^{15}N представлены в таблице 1.

Данные таблицы свидетельствуют о том, что значения показателя отношений изотопов углерода мёда в целом (брутто) лежат в диапазонах от –29,17 до –24,0 ‰, а значения δ^{13}C белковой части от –29,17 до –24,22 ‰.

Таблица 1. Значения показателей δ^{13}C и δ^{15}N образцов мёда

Table 1. Values of δ^{13}C and nitrogen δ^{15}N in honey samples

№	Наименование образов мёда	Год сбора	Место происхождения	$\delta^{15}\text{N}_{Air}$, ‰, белок	$\delta^{13}\text{C}_{VPDB}$, ‰, мед (брутто)	$\delta^{13}\text{C}_{VPDB}$, ‰, белок	Степень добавки (содержание добавки тростникового инв. сиропа, %). Если менее 6 %, то «без добавления»
1	Мёд	2020	Алтайский край, пос. Березовка Усть-Коксинский район	8,72	–27,17	–27,25	без добавления
2	Мёд, Манука	2021	Австралия	4,89	–26,04	–26,16	без добавления
3	Мёд, весенний	2020	Дальний восток, Уссурийский район	5,69	–26,09	–26,05	без добавления

Продолжение таблицы 1.

№	Наименование образов мёда	Год сбора	Место происхождения	$\delta^{15}N_{Air}$, ‰, белок	$\delta^{13}C_{VPDB}$, ‰, мед (брутто)	$\delta^{13}C_{VPDB}$, ‰, белок	Степень добавки (содержание добавки тростникового инв. сиропа, %). Если менее 6 %, то «без добавления»
4	Мёд	2020	Рязанская область, Захаровский район	5,41	–27,35	–27,28	без добавления
5	Мёд	2019	Башкирия, Уфимский район, село Николаевка	7,73	–29,17	–29,17	без добавления
6	Мёд	2019	США, штат Невада	1,46	–27,30	–27,21	без добавления
7	Мёд	2020	США, штат Аризона	5,01	–26,75	–26,67	без добавления
8	Мёд	2020	Дальний восток, Хабаровск	3,78	–26,68	–26,56	без добавления
9	Мёд, липовый	2018	Дальний Восток, Уссурийский район	5,85	–25,58	–25,52	без добавления
10	Мёд, разнотравье	2019	Дальний Восток, пос. Житково	5,37	–28,08	–28,04	без добавления
11	Падевый мёд	2018	Якутия	1,94	–26,52	–26,51	без добавления
12	Мёд, диморфант	2019	Приморский край, пос. Санаторная	–0,71	–25,32	–25,60	без добавления
13	Мёд, женьшень	2020	Дальний Восток	1,54	–25,74	–25,76	без добавления
14	Мёд	2019	Дальний Восток, Леспедеция, Уссурийский район	0,69	–26,20	–26,17	без добавления
15	Мёд, падевый	2018	Якутия, г. Мирный	1,97	–27,03	–27,06	без добавления
16	Мёд, разнотравье	2019	Воронеж, пос. Алое Поле	1,85	–28,81	–28,30	без добавления
17	Мёд, лесное разнотравье	2020	Дальний Восток, Уссурийск	–0,46	–26,79	–26,70	без добавления
18	Мёд, подсолнечниковый	2018	Рязанская обл.	3,10	–25,46	–25,65	без добавления
19	Мёд, кориандровый (58 % – пыльц.зерен кориандра)	2020	Краснодарский край	1,95	–25,03	–25,16	без добавления
20	Мёд, разнотравье с кориандром (23 % – пыльц.зерен кориандра)	2019	Краснодарский край	3,20	–26,60	–26,59	без добавления
21	Мёд, акациевый	2022	Краснодарский край, Александровский хутор	9,29	–24,13	–24,22	без добавления
22	Мёд, липовый	2021	Краснодарский край	6,99	–25,65	–25,68	без добавления
23	Мёд	2021	Россия	2,39	–25,86	–26,07	без добавления
24	Мёд	2021	Россия	0,37	–26,53	–26,63	без добавления
25	Мёд	2019	Чеченская республика	2,49	–24,91	–25,31	без добавления
26	Мёд	2021	Дагестан	–0,61	–27,57	–27,71	без добавления
27	Мёд, разнотравье + падевый,	2019	Якутия	–2,78	–26,53	–26,58	без добавления
28	Мёд, акациевый	2020	Краснодарский край, г. Сочи	–2,72	–24,73	–25,02	без добавления
29	Мёд, разнотравье	2019	Смоленская область, дер. Агеевщина	3,57	–26,84	–26,76	без добавления
30	Мёд	2018	Приморский край, Уссурийская область	1,96	–26,34	–26,47	без добавления
31	Мёд, разнотравье	–	Киргизия, Джумгал	2,18	–26,04	–25,98	без добавления
32	Мёд, гречишный	2020	Рязань, г. Касимов	6,21	–27,39	–27,23	без добавления
33	Мёд, липа + подсолнечник	2017	Республика Адыгея	–1,66	–25,60	–25,64	без добавления
34	Мёд, донниковый,	2020	Рязанская область, Скопинский район	4,24	–27,61	–27,21	без добавления
35	Мёд	2021	Россия	5,09	–24,01	–26,57	18
36	Мёд	2021	Россия	4,46	–27,06	–28,10	6,5

Значения показателя отношений изотопов азота белковой части (фракции) находится в диапазоне от –2,72 до 9,29 ‰.

Согласно уравнению (2), 34 образца укладываются в нормы, поэтому можно сказать, что изученные образцы не были разбавлены сиропом, полученным из С3-типа растений. А образцы под номером 35 и 36, согласно полученным результатам, содержат 18 и 6,5 % экзогенных сахаров в пересчёте на тростниковый.

Значения показателя δ^{15}N в ряде образцов (№ 1, 5, 21, 22, 32 имеют высокие значения, превышающие + 6 ‰. Значения показателя δ^{15}N, в образцах 12, 17, 26, 27, 28, 33 находятся в области отрицательных чисел. Информации о применении данного идентификационного показателя в научных статьях крайне мало. Из публикаций [25, 26] можно получить некоторые ответы на данный вопрос. Авторы считают, что лесные массивы и количество годовых осадков существенно влияют на значение изотопных характеристик отношений изотопов азота. Изотопные отношения азота и углерода отражают воздействие землепользования и изменений климата на популяцию пчёл. Ученые утверждают, что данные отношения могут служить показателями состояния окружающей среды в местах обитания пчёл. Ученые из Германии по значениям показателя δ^{15}N в выделенном белке из мёда сделали вывод о возможности использования метода изотопной масс-спектрометрии для выявления фальсификации маточного молочка [27]. Мёд с маточным молочком, используется и в качестве лакомства, и как лекарственное средство. Однако этот продукт имеет высокую цену, его часто подделывают или заменяют другими схожими по цвету и консистенции продуктами.

Для оценки алкогольных напитков широко применяется метод измерения соотношения стабильных изотопов углерода, водорода и кислорода в этиловом спирте исследуемого образца [13–17]. В силу того, что методы анализа изотопных соотношений углерода (брутто), углерода и азота белковой составляющей меда не всегда дают полную информацию о добавлении растительных сахаров С3-типа, было решено использовать анализ изотопных соотношений углерода, кислорода и водорода этанола, предварительно выделенных из сброженных образцов мёда и сахаросодержащих веществ. За основу данного метода был взят патент (RU2809285C1) по определению экзогенных сахаросодержащих веществ в пчелином мёде на основе анализа изотопных характеристик углерода, водорода и кислорода в этиловом спирте ферментированных образцов. Данные результаты представлены в таблице 2.

Полученные данные 41 образцов выявили, что значения показателя отношений изотопов углерода в этиловом спирте ферментированных 36 образцов мёда лежат в диапазоне от –28,36 до –22,13 ‰, а пяти образцов сахаросодержащих веществ в диапазоне от –28,33 до –11,29 ‰. Значения δ^{13}C выделенного этанола после ферментации сахаросодержащих добавок из кукурузы и тростника лежат в диапазоне от –11,95 до –11,29 ‰. Внесение таких добавок в мёд приведет к существенному изменению значений в сторону большего содержания «тяжёлого» изотопа ^{13}C, значение показателя δ^{13}C будет смешаться к числовым характеристикам тростникового или кукурузного сиропа, среднее значение которого составляет –11 ‰. В случае с добавлением в мёд свекловичного сахара, свекловичной мелассы или рисового сиропа, установить присутствие таких добавок с использованием значений δ^{13}C не представляется возможным, так как диапазон значения δ^{13}C совпадает со значениями соответствующего показателя натурального мёда (брутто).

Значения показателя отношений изотопов кислорода в этиловом спирте, выделенного из исследуемых образцов мёда, лежат в диапазоне от 3,48 до 15,33 ‰. В тоже время, значения показателя отношений изотопов кислорода этилового спирта, выделенного из ферментированных образцов мёда (за исключением образцов № 16, 27 и 29) укладываются в диапазон от 7 до 15,5 ‰. Значения показателя δ^{18}O этанола, выделенного из ферментированных сахаросодержащих веществ (сахар свекловичный, меласса свекловичная, рисовый сироп), не попадают в указанный диапазон. Сахара свекловичного происхождения характеризуются высоким содержанием «лёгкого» изотопа ^{16}O, а в случае рисового сиропа, значения смешаются в сторону уменьшения «лёгкого» изотопа ^{16}O. Соответственно, показатель δ^{18}O может выступать в качестве идентификационного критерия при установлении присутствия свекловичных сахаров или рисовых сиропов в мёде.

Значения показателя отношений изотопов водорода в этиловом спирте, выделенного из исследуемых образцов мёда, лежат в диапазоне от –308,1 до –259,98 ‰. Значения показателя δ^{2}H этилового спирта, выделенного из продуктов брожения свекловичного сахара, мелассы, рисового сиропа, кукурузного сиропа и сиропа из тростникового сахара (№ 37–41), лежат в диапазоне от –283,64 до –220,31 ‰. Стоит отметить, что большая часть исследуемых образцов мёда намного «легче» по изотопным характеристикам водорода по сравнению с кукурузным и тростниковым сиропом, диапазон значений которых составляет от –226,7 до –220,31 ‰. Внесение таких добавок в мёд приведет к изменению значений δ^{2}H в сторону более «тяжёлых» значений, что может позволить выявить присутствие экзогенных сахаров такого типа в продукте.

Следует отметить, что анализ этилового спирта в ферментированных образцах мёда и сахаросодержащих веществ, согласно разработанному нами патенту, может быть более точным и быстрым методом, чем анализ образцов мёда с твердофазным автосамплером, с последующей инкапсуляцией. Перенастройка оборудования для анализа твердых образцов требует значительного времени, поэтому данный способ полезен и применим, когда оборудование настроено для анализа жидких проб. В рамках данного патента начата раз-

Таблица 2. Значения показателя $\delta^{13}C$, $\delta^{18}O$ и $\delta^{2}H$ в этиловом спирте ферментированных проб меда и сахаросодержащих веществ

Table 2. Values of $\delta^{13}C$, $\delta^{18}O$, and $\delta^{2}H$ in ethyl of fermented samples of honey and sugar syrups

№	Наименование образца с последующей ферментацией	Год сбора	Место происхождения	$\delta^{13}C_{VPDB}$, ‰	$\delta^{18}O_{VSMOW}$, ‰	$\delta^{2}H_{VSMOW}$, ‰
1	Мёд	2020	Алтайский край, пос. Березовка Усть-Коксинский район	–26,89	7,83	–278,06
2	Мёд, Манука	2021	Австралия	–26,34	14,57	–269,21
3	Мёд, весенний	2020	Дальний восток, Уссурийский район	–25,18	11,83	–278,08
4	Мёд	2020	Рязанская область, Захаровский р-н	–27,88	9,69	–287,86
5	Мёд	2019	Башкирия, Уфимский район, село Николаевка	–28,36	7,28	–297,88
6	Мёд	2019	США, штат Невада	–26,69	8,07	–263,73
7	Мёд	2020	США, штат Аризона	–25,74	15,33	–261,2
8	Мёд	2020	Дальний восток, Хабаровск	–26,03	11,7	–278,98
9	Мёд, липовый	2018	Дальний Восток, Уссурийский район	–24,85	14,37	–276,76
10	Мёд, разнотравье	2019	Дальний Восток, пос. Житково	–26,94	13,05	–290,59
11	Падевый мёд	2018	Якутия	–26,01	13,63	–308,1
12	Мёд, деморфант	2019	Приморский край, пос. Санаторная	–24,52	10,24	–268,37
13	Мёд, женьшень	2020	Дальний Восток	–24,99	14,56	–275,82
14	Мёд	2019	Дальний Восток, Леспедеция, Уссурийский район	–25,46	9,33	–280,3
15	Мёд, падевый	2018	Якутия, г. Мирный	–26,23	7,89	–281,73
16	Мёд, разнотравье	2019	Воронеж, пос. Алое Поле	–28,17	3,48	–272,98
17	Мёд, лесное разнотравье	2020	Дальний Восток, Уссурийск	–26,53	12,57	–288,33
18	Мёд, подсолнечниковый	2018	Рязанская обл.	–24,66	12	–292,7
19	Мёд, кориандровый (58 % – пыльц.зерен кориандра)	2020	Краснодарский край	–22,05	9,81	–283,01
20	Мёд, разнотравье с кориандром (23 % – пыльц.зерен кориандра)	2019	Краснодарский край	–24,97	11,18	–298,72
21	Мёд, акациевый	2022	Краснодарский край, Александровский хутор	–22,59	10,26	–261,68
22	Мёд, липовый	2021	Краснодарский край	–24,22	13,3	–278,35
23	Мёд	2021	Россия	–24,18	10,55	–272,92
24	Мёд	2021	Россия	–23,63	13,55	–264,08
25	Мёд	2019	Чеченская республика, Грозный	–22,4	8,02	–270,91
26	Мёд	2021	Дагестан	–25,78	8,13	–283,07
27	Мёд, разнотравье + падевый,	2019	Якутия	–24,29	4,96	–289,52
28	Мёд, акациевый	2020	Краснодарский край, г. Сочи	–22,13	11,35	–259,98
29	Мёд, разнотравье	2019	Смоленская область, дер. Агеевщина	–25,9	6,25	–286,17
30	Мёд	2018	Приморский край, Уссурийская обл.	–25,92	9,86	–277,71
31	Мёд, разнотравье	–	Киргизия, Джумгал	–25,83	11,07	–279,98
32	Мёд, гречишный	2020	Рязань, г. Касимов	–26,63	9,59	–281,96
33	Мёд, липа + подсолнечник	2017	Республика Адыгея	–25,27	13,18	–274,32
34	Мёд, донниковый	2020	Рязанская область, Скопинский район	–26,87	12,5	–287,98
35	Мёд	2021	Россия	–23,87	10,03	–287,62
36	Мёд	2021	Россия	–25,32	10,47	–286,73
37	Сахар свекловичный (кат. ТС2)	2020	Россия	–26,47	6,23	–270,8
38	Меласса свекловичная	2015	Россия	–26,46	3,76	–283,64
39	Рисовый сироп	2021	Европа	–28,33	15,8	–262,01
40	Кукурузный сироп	2017	Европа	–11,29	12,55	–226,7
41	Сироп из тростникового сахара	2021	Европа	–11,95	8,65	–220,31

работка методики измерений, отсутствующая на территории Российской Федерации. Внедрение данной методики с применением масс-спектрометрии позволит выявлять более сложные фальсификаты, изготовленные из сиропов имитирующих профиль сахаров мёда.

Поскольку некоторые сорта мёда из экологически чистых районов страны с защищенным географическим наименованием считаются более ценными, в будущем планируется использовать метод изотопной масс-спектрометрии для определения места происхождения мёда. Наиболее перспективными показателями являются изотопные характеристики кислорода и водорода мёда (брутто), а также качественный и количественный состав микро- и макроэлементов [28, 29].

Выводы

Проведенные исследования показали, что использование метода изотопной масс-спектрометрии позволяет выявить образцы мёда, содержащие в своем составе экзогенные сахара. На основании методики AOAC 998.12, в 2 образцах мёда из 36 было выявлено присутствие экзогенных сахаров из С4-типа растений в количестве 18 и 6.5 % в пересчете на тростниковый сахар. Однако данный метод не позволяет выявить присутствие внесенных сахаросодержащие веществ из С3-типа растений. В связи с этим были проведены исследования значений показателей δ^{13}C, δ^{18}O и δ^{2}H этанола, выделенного из ферментированного меда. Показали, что свекловичные сахар и меласса характеризуются более высоким содержанием «лёгкого» изотопа ^{16}O. Для рисового сиропа, значения δ^{18}O смешаются в сторону меньшего содержания «лёгкого» изотопа ^{16}O. Таким образом, показатель δ^{18}O может выступать в качестве идентификационного критерия при установлении присутствия сахаров в мёде из С3-типа растений. Данный способ выявления фальсифицированной продукции основан на полученном патенте РФ RU2809285C1 по определению экзогенных сахаросодержащих веществ в пчелином мёде.

Изучение отношений изотопов азота в белковой части мёда может быть полезным инструментом для определения его подлинности и дополнительным критерием идентификации пчеловодческой продукции. Стоит отметить, что, если в пробе мёда не выделяется белок в процессе ее подготовки, это может свидетельствовать о достаточно грубой фальсификации, так как в натуральном мёде всегда присутствует белковая составляющая.

Критерии авторства

Л. А. Оганесянц – идея и научное руководство. А. Л. Панасюк – обзор литературы. Д. А. Свиридов, О. В. Серебрякова – подготовка образцов к анализам, обработка результатов экспериментальных исследований. М. Ю. Ганин, А. А. Шилкин – подготовка текста, анализ образцов на изотопном масс-спектрометре.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

L.A. Oganesyants developed the research concept and provided scientific guidance. A.L. Panasyuk reviewed scientific publications. D.A. Sviridov and O.V. Serebryakova prepared the samples and processed the experimental research results. M.Yu. Ganin and A.A. Shilkin drafted the manuscript and performed the isotope mass spectrometry.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

References/Список литературы

1. Khatun MA, Yoshimura J, Yoshida M, Suzuki Y, Huque R, Kelly SD, *et al.* Isotopic characteristics (δ^{13}C, δ^{15}N, and δ18O) of honey from Bangladesh retail markets: Investigating sugar manipulation, botanical and geographical authentication. Food Chemistry. 2024;435:137612. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137612

2. Ždiniaková T, Lörchner C, De Rudder O, Dimitrova T, Kaklamanos G, Breidbach A, *et al.* EU Coordinated action to deter certain fraudulent practices in the honey sector. JRC Technical Report. 2023. https://data.europa.eu/doi/10.2760/184511

3. Kovalev AM. Beekeeper's Textbook: Textbook for rural vocational technical school. Moscow: Kolos; 1973. 432 p. (In Russ.). [Ковалев А. М. Учебник пчеловода: Учебник для сельского профессионального технического училища. Москва: Колос, 1973. 432 с.]

4. 70 percent of honey in Russia may be adulterated: how to recognize deception [Internet]. [cited 2024 Jan 15]. Available from: https://www.gastronom.ru/text/nepravilnyj-med-do-70-meda-v-rossii-mozhet-okazatsya-falsificirovannym-1017587.

5. Tosun M. Detection of adulteration in honey samples added various sugar syrups with ^{13}C/^{12}C isotope ratio analysis method. Food Chemistry. 2013;138(2–3):1629–1632. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.068.

6. Ajlouni S, Sujirapinyokul P. Hydroxymethylfurfuraldehyde and amylase contents in Australian honey. Food Chemistry. 2010;119(3):1000–1005. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.057

7. Chen C-T, Chen B-Y, Nai Y-S, *et al.* Novel inspection of sugar residue and origin in honey based on the ^{13}C/^{12}C isotopic ratio and protein content. Journal of Food and Drug Analysis. 2019;27(1):175–183. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.08.004

8. Kawashima H, Suto M, Suto N. Stable carbon isotope ratios for organic acids in commercial honey samples. Food Chemistry. 2019;289:49–55. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.053

9. Cabañero AI, Recio JL, Rupérez M. Liquid Chromatography Coupled to Isotope Ratio Mass Spectrometry: A New Perspective on Honey Adulteration Detection. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006;54(26):9719–9727. https://doi.org/10.1021/jf062067x

10. Xu JZ, Liu X, Wu B, Cao YZ. A comprehensive analysis of ^{13}C isotope ratios data of authentic honey types produced in China using the EA-IRMS and LC-IRMS. Journal Food Science Technology. 2020;57(4):1216–1232. https://doi.org/10.1007/s13197-019-04153-2

11. Vetrova OV, Melkov VN, Simonova GV, Kalashnikova DA. Detection of honey adulterations with sugar syrups by stable isotope mass spectrometry. Journal of Analytical Chemistry. 2017;72(7):756–760. https://doi.org/10.1134/S1061934817070152

12. Tsagkaris AS, Koulis GA, Danezis GP, Martakos I, Dasenaki M, Georgiouc CA, *et al.* Honey authenticity: analytical techniques, state of the art and challenges. RSC Advances. 2021;11:11273–11294. https://doi.org/10.1039/d1ra00069a

13. Oganesyants LA, Panasyuk AL, Kuzmina EI, Kharlamova LN. Determination of the carbon isotope $^{13}C/^{12}C$ in ethanol of fruit wines in order to define identification characteristics. Food and raw materials. 2016;4(1):141–147. https://doi.org/10.21179/2308-4057-2016-1-141-147

14. Oganesyants LA, Panasyuk AL, Kuzmina EI, Sviridov DA, Ganin MYu, Shilkin AA. Traditional siders and perry identification by isotope mass spectrometry. Food Industry. 2021;4:55–57. (In Russ.). https://doi.org/10.24412/0235-2486-2021-4-0036 ; https://www.elibrary.ru/XLXEAU

15. Oganesyants LA, Panasyuk AL, Kuzmina EI, Ganin MYu. Isotopes of Carbon, Oxygen, and Hydrogen Ethanol in Fruit Wines. Food Processing: Techniques and Technology. 2020;50(4):717–725. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-4-717-725; https://www.elibrary.ru/TRNZXN

16. Oganesyants LA, Panasyuk AL, Kuzmina EI, Sviridov DA. Geographical place of origin influence on isotope characteristics of ethanol elements and wine aquatic component. Food industry. 2020;(12):78–80. (In Russ.). https://doi.org/10.24411/0235-2486-2020-10152; https://www.elibrary.ru/MVIQNZ

17. Oganesyants LA, Panasyuk AL, Kuzmina EI, Peschanskaya VA. Application features of isotopic mass spectrometry when analyzing carbon ethanol in cognac and cognac distillates. Winemaking and viticulture. 2016;3:4–7. (In Russ.). https://doi.org/10.24412/0235-2486-2021-4-0036; https://www.elibrary.ru/WFSBFD

18. Talibova A, Kolesnov A. Quality and safety assessment of food products by isotope mass spectrometry. Analytics. 2011;(1):44–48. (In Russ.). [Талибова А., Колеснов А. Оценка качества и безопасности пищевой продукции методом изотопной масс-спектрометрии // Аналитика. 2011. № 1. С. 44–48.]. https://www.elibrary.ru/PIEIFJ

19. Oganesyants LA, Panasyuk AL, Kuzmina EI, Sviridov DA, Ganin MYu, Shilkin AA. Using the isotope mass spectrometry method to detect the presence of exogenous sugars in honey. Food Industry. 2023;(12):105–113. (In Russ.). https://doi.org/10.52653/PPI.2023.12.12.021; https://www.elibrary.ru/BHHQJQ

20. AOAC official methods of analysis. Method 998.12: C-4 plant sugars in honey, internal standard stable carbon isotope ratio method, AOAC Int. Gaithersburg MD USA. 1999;44:27–30.

21. Rogers KM, Cook JM, Krueger D, Beckmann K. Modification of AOAC *Official Method* SM 998.12 to Add Filtration and/or Centrifugation: Interlaboratory Comparison Exercis. Journal of AOAC International. 2013;96(3):607–614. https://doi.org/10.5740/jaoacint.12-386

22. Bocian A, Buczkowicz J, Jaromin M, Hus KK, Legáth J. An Effective Method of Isolating Honey Proteins. Molecules. 2019;24(13):2399. https://doi.org/10.3390/molecules24132399

23. White JW, Doner LW. The 13C/12C ratio in honey. Journal of Apicultural Research.1978;17:94–99. https://doi.org/10.1080/00218839.1978.11099910

24. Trifkovic J, Andric F, Ristivojevic P, Guzelmeric E, Yestilada E. Analytical Methods in Tracing Honey Authenticity. Journal of AOAC in International. 2017;100(4):827–839. https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0142

25. Kalashnikova DA, Simonova GV. Ratios of stable isotopes $^{13}C/^{12}C$ and $^{15}N/^{14}N$ in samples of dead honey bees and beekeeping products. Journal of Analytical Chemistry. 2021;76(4):359–368. (In Russ.). https://doi.org/10.31857/S004445022104006X; https://www.elibrary.ru/JHBSUQ

26. Taki H, Ikeda H, Nagamitsu T, Yasuda M, Sugiura S, Maeto K, *et al.* Stable nitrogen and carbon isotope ratios in wild native honeybees: the influence of land use and climate. Biodivers Conserv. 2017;26:3157–3166 https://doi.org/10.1007/s10531-016-1114-x

27. Stocker A, Rossmann A, Kettrup A, Bengsch E. Detection of royal jelly adulteration using carbon and nitrogen stable isotope ratio analysis. Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2005;20(2):181–184. https://doi.org/10.1002/rcm.2287

28. Dinca O-R, Ionete RE, Popescu R, Costinel D, Radu G-L. Geographical and Botanical Origin Discrimination of Romanian Honey Using Complex Stable Isotope Data and Chemometrics. Food Analitical Methods. 2015;8:401–412.https://doi.org/10.1007/s12161-014-9903-x

29. Izol E, Kaya E, Karahan D. Investigation of Some Metals in Honey Samples Produced in Different Regions of Bingöl Province by ICP-MS. Mellifera. 2021;21:1–17.