

**ТОМСКИЙ
ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ**



На правах рукописи

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Da' followed by a horizontal line.

Калашникова Дарья Андреевна

**МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ИЗОТОПНОГО СОСТАВА ВОДОРОДА, КИСЛОРОДА,
УГЛЕРОДА И АЗОТА В ПРОДУКТАХ ПЧЕЛОВОДСТВА**

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

1.4.2 – Аналитическая химия

Томск – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт мониторинга климатических и экологических систем Сибирского отделения Российской академии наук»

Научный руководитель: **Симонова Галина Владимировна**

кандидат технических наук, доцент,
ведущий научный сотрудник ЛБИТ
ИМКЭС СО РАН, г. Томск

Официальные оппоненты: **Папина Татьяна Савельевна**

доктор химических наук, доцент,
начальник Химико-аналитического центра
ФГБУН «Институт водных и
экологических проблем Сибирского
Отделения Российской Академии Наук»,
г. Барнаул

Отмахов Владимир Ильич

доктор технических наук, профессор,
профессор кафедры аналитической химии
химического факультета ФГБОУ ВО
«Томский государственный университет»,
г. Томск

Защита состоится «16» марта 2023 г. в 12.00 часов на заседании Диссертационного совета ДС.ТПУ.08 Национального исследовательского Томского политехнического университета по адресу: 634050, Томск, пр. Ленина, 43а, 2-й корпус ТПУ, 225 аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» и на сайте: dis.tpu.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета ДС.ТПУ.08



Дорожко Е.В

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность выбранной темы исследования. Перед аналитической химией стоит задача совершенствования методов и методик контроля качества продуктов питания с учетом современного и постоянно совершенствуемого аналитического оборудования. Сочетание метода изотопной масс-спектрометрии с использованием биоиндикаторов позволяет количественно выявлять тонкие градации изменений состояния и выводит исследования на новый уровень, поскольку изотопный анализ конкретных индикаторов предоставляет новые возможности в области аналитического контроля качества пищевой продукции растительного происхождения.

Стабильные изотопы обладают способностью к фракционированию в различных физико-химических процессах, что определяет их уникальность как объекта исследований и позволяет использовать в качестве природных индикаторов при изучении факторов, влияющих на качество растительного сырья и продуктов питания. Кроме того метод изотопной масс-спектрометрии позволяет доказать фальсификацию пищевых продуктов, так как стабильные изотопы в составе пищевой продукции выступают в качестве средства регистрации критериев качества. Согласно Доктрине продовольственной безопасности Российской Федерации одним из положений Стратегии национальной безопасности является обеспечение населения качественной и безопасной пищевой продукцией. Возможность отслеживать происхождение пищевых продуктов с помощью надежных аналитических методов является важной составляющей комплексного подхода к безопасности пищевых продуктов. Отслеживание происхождения пищевых продуктов и подтверждение их подлинности с использованием метода изотопной масс-спектрометрии легких элементов является актуальным направлением развития сферы обеспечения безопасности продуктов питания, так как изотопные сигнатуры в глобальном масштабе имеют значительные естественные вариации и совпадения. Поэтому для анализа пищевых продуктов необходимо развивать методику исследования изотопных сигнатур и соответствующих референсных баз данных с показателями, соответствующими аутентичным продуктам питания.

Для развития таких референсных баз данных по продуктам питания в рамках данного исследования выбраны мед и другие продукты пчеловодства: воск, прополис, подмор пчел и пыльцевая обножка. Мед является одним из самых чистых продуктов нашей планеты и одновременно наиболее часто фальсифицируемым. Пчелиный мед является очень популярным продуктом, поскольку используется не только как пищевой продукт, но и как лекарственное средство.

Ввиду того, что на территории Российской Федерации подобные работы не проводились, для решения задач комплексного исследования изотопного состава продуктов пчеловодства необходима разработка новой

методологии, обеспечивающей понимание механизмов фракционирования изотопов, включающей стадии пробоподготовки и методики исследования, которая гарантирует достоверность и объективность полученных результатов, а также способы интерпретации полученных новых данных.

Степень разработанности выбранной темы исследования. Изучение изотопного состава меда проводилось во многих зарубежных странах: Италия, Словения, Польша, Турция, Африка, Бразилия, Новая Зеландия, Корея. Множество работ посвящено вопросам исследования аутентичности меда. Работы по исследованию изотопного состава пчел проводились во Франции и Японии. Ряд работ рассматривает пчел в контексте изучения трофических цепей. Данные по изотопному составу водорода воска представлены в работе. Работ по изучению изотопного состава пыльцевой обножки не найдено, однако существует множество работ по исследованию изотопного состава пыльцы растений. Исследования факта фальсификации российских образцов меда единичны, работы по исследованию других продуктов пчеловодства в России не проводились, поэтому получение оригинальных данных по изотопному составу меда и других продуктов пчеловодства актуально.

Цель исследования: разработка методических подходов к определению подлинности и выявлению фальсификации продуктов пчеловодства на основе метода масс-спектрометрического анализа стабильных изотопов водорода, кислорода, углерода и азота.

Для достижения цели решены следующие задачи:

1. Получить оригинальные данные по изотопному составу кислорода, водорода, азота и углерода продуктов пчеловодства российского рынка.
2. Исследовать зависимость изотопного состава водорода и кислорода образцов меда, подмора пчел, пыльцевой обножки и воска от изотопного состава метеорных вод регионов производства продукции пчеловодства для выявления географической принадлежности на основе корреляционного анализа.
3. Экспериментально исследовать изменение величины изотопного состава углерода на модельных образцах при разбавлении натурального меда инвертными тростниковым и свекловичным сахарными сиропами.
4. Разработать критерии выявления фальсифицированных образцов российского меда на основе сравнения изотопного состава углерода меда и его белковой фракции и провести анализ аутентичности образцов меда на основе разработанных критериев.
5. Разработать, апробировать и аттестовать методику измерений отношений стабильных изотопов углерода, водорода и кислорода в меде.

Научная новизна исследования. Исследование вносит вклад в развитие метода изотопной масс-спектрометрии и демонстрирует потенциал использования стабильных изотопов легких элементов (O, H, C и N) в

области анализа продуктов пчеловодства. Работа основана на большом количестве новых изотопных данных, полученных с применением современного метода изотопной масс-спектрометрии, интерпретация которых впервые проведена с использованием разработанных оригинальных подходов, что обусловило получение новых научных результатов:

1. Впервые проведены исследования изотопного состава легких элементов (Н, О, С и N) для продукции пчеловодства российских производителей и выявлена зависимость изотопного состава водорода и кислорода образцов меда, подмора пчел и пыльцевой обножки от изотопного состава метеорных вод регионов производства для выявления географической принадлежности.
2. Впервые предложено использовать значение изотопного состава тростникового сахара в формуле для расчета содержания сахара, полученного из растений с С4 типом фотосинтеза, при выявлении фальсификации меда.
3. Разработаны критерии оценки натуральности состава российского меда по изотопному составу углерода для выявления разбавления образцов натурального меда инвертными сахарными тростниковыми сиропами. Мед считается сфальсифицированным, если: 1) величина $\delta^{13}\text{C}$ меда больше $-24,0\text{‰}$; 2) разница между величиной $\delta^{13}\text{C}$ белковой фракции меда и величиной $\delta^{13}\text{C}$ меда составляет более $+1,3\text{‰}$ или менее $-1,3\text{‰}$; 3) процент содержания сахара, полученного из растений с С4 типом фотосинтеза, более $9,1\%$ или менее $-9,1\%$.
4. Разработан алгоритм определения изотопного состава водорода, углерода, кислорода и азота в продуктах пчеловодства, воплощенный в аттестуемую методику «Методика измерений отношений стабильных изотопов углерода, водорода и кислорода в меде».

Теоретическая и практическая значимость диссертации. Работа выполнена в рамках гранта РФФИ 19-34-90016-а «Апимониторинг для пространственно-временного анализа состояния окружающей среды».

Разработанная методика исследования изотопного состава легких элементов продукции пчеловодства позволяет провести идентификацию медовой продукции, используя соотношения $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, с оценкой ее географического происхождения и для проверки подлинности на факт фальсификации. Стабильные изотопы азота более действенны в качестве экологических индикаторов (маркеров) азотсодержащих соединений и могут быть использованы для анализа степени обогащения почвенного покрова и произрастающих на нем растений тяжелым изотопом азота (^{15}N).

Поскольку имеются значительные естественные вариации и совпадения изотопных сигнатур в глобальном масштабе, база данных значений изотопного состава продуктов пчеловодства российских производителей

внесет вклад в создание глобальных референсных баз данных по пищевым продуктам, подобных Глобальной сети «Изотопы в осадках», с показателями, соответствующими аутентичным продуктам.

Практическая значимость подтверждена актами внедрения результатов диссертационной работы, полученными от ООО «МС-Аналитика» и ООО «Городской супермаркет» (Азбука вкуса). На стадии аттестации находится разработанная на основе исследуемых образцов меда методика «Методика измерений отношений стабильных изотопов углерода, водорода и кислорода в меде». Аттестацию проводит Федеральное государственное унитарное предприятие «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологии им. Д.И. Менделеева» (ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева»).

Методология и методы исследования. Методологической основой интерпретации данных выступили работы отечественных и зарубежных ученых в области изотопной масс-спектрометрии и основ фракционирования стабильных изотопов. При выполнении работы применялись аттестованные стандартные образцы МАГАТЭ и Геологической службы США, руководства и рекомендации к измерениям, установленные за рубежом.

Исходные данные о величинах изотопного состава образцов продуктов пчеловодства получены с применением современного метода изотопной масс-спектрометрии. Обработка и анализ данных проводились с использованием статистических и графических программ.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты анализа изотопного состава углерода меда, его белковой фракции и продуктов пчеловодства, способы подготовки проб, условия проведения измерений и интерпретация результатов.

2. Закономерность изменений изотопного состава водорода, кислорода продуктов пчеловодства от изотопного состава водорода и кислорода метеорных вод, характерных региону происхождения.

3. Рекомендации к масс-спектрометрическому исследованию изотопного состава водорода $^2\text{H}/^1\text{H}$, углерода $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, кислорода $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ и азота $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ в продуктах пчеловодства (воск, прополис, подмор пчел, пыльцевая обножка, мед и его белковая фракция), включающие предварительную метрологическую оценку точности измерений, критерии выявления фальсификации образцов российского меда.

4. Методика «Методика измерений отношений стабильных изотопов углерода, водорода и кислорода в меде», аттестуемая в ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева».

Степень достоверности и апробация работы. Работа основана на фактическом материале (более 2000 анализов), полученном современными методами с применением сертифицированного оборудования с высокой точностью определения, а также анализе и обобщении исследовательского материала с помощью статистической обработки при помощи языка R в

программе RStudio. Основные результаты работы представлены на научных конференциях различного уровня: XI Сибирское совещание по климатологическому мониторингу (Томск, 2015), XXI Всероссийская студенческая научно-практическая конференция с международным участием «Проблемы безопасности современного мира» (Иркутск, 2016), Международная конференция и школа молодых ученых по измерениям, моделированию и информационным системам для изучения окружающей среды ENVIROMIS-2018 (Томск, 2018), IX Сибирская конференция молодых ученых по наукам о Земле (Новосибирск, 2018), III Всероссийская конференция по аналитической спектроскопии с международным участием (Краснодар, 2019), XI Всероссийская научная конференция и школа «Аналитика Сибири и Дальнего Востока» (Новосибирск, 2021).

Личный вклад соискателя. Автором проведен поиск и анализ научных данных по тематике исследования, проведены научные эксперименты с использованием разработанных методологий масс-спектрометрических исследований изотопного состава углерода, водорода, кислорода и азота в образцах меда и продуктов пчеловодства, осуществлена обработка и оценка полученных результатов, подготовлены публикации по результатам исследований, а также принято участие в разработке и аттестации методики измерений изотопного состава углерода, кислорода и водорода в меде методом масс-спектрометрии стабильных изотопов.

Публикации. По тематике диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 2 статьи в научных журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени кандидата наук, 2 статьи в зарубежных научных журналах, входящих в Web of Science и Scopus), 6 статей в сборниках материалов международных и всероссийских (в том числе с международным участием) научных конференций, совещаний.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора научно-технической литературы, четырех глав, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Работа изложена на 141 странице основного текста, включает 37 таблицы и 44 рисунка, список литературных источников содержит 206 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность выбранной темы исследования, обозначены цель и задачи, указана научная новизна, теоретическая и прикладная значимость исследования.

Первая глава содержит анализ литературных данных, который состоит из описания состояния рынка медовой продукции, типов и способов фальсификации меда, обзора современных аналитических методов

исследования меда. Описаны теоретические основы метода изотопной масс-спектрометрии и фракционирования стабильных изотопов водорода, кислорода, углерода и азота в биологических объектах. Также рассмотрено применение изотопной масс-спектрометрии для анализа продуктов пчеловодства.

Вторая глава посвящена экспериментальным методам и подходам, используемым в исследовании, приводятся сведения о предмете и объекте исследования, описаны этапы пробоподготовки.

Объектами исследования являлись продукты пчеловодства (мед, подмор пчел, пыльцевая обножка, воск, прополис) и белковая фракция меда. Всего собрано 120 образцов меда, 35 образцов пыльцевой обножки и 36 образцов подмора пчел, 33 образца воска и 33 образца прополиса. Принятая схема исследования приведена на рисунке 1.

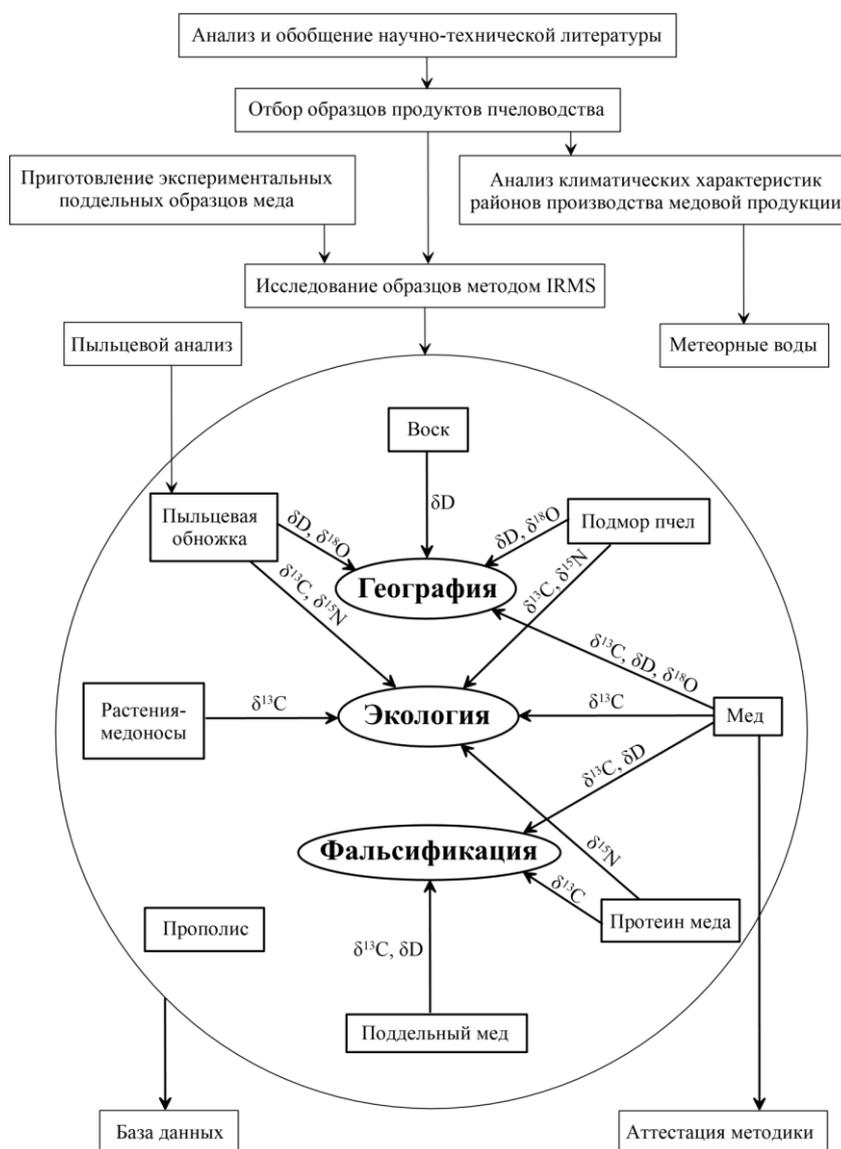


Рисунок 1 – Структурная схема исследования

Образцы подмора пчел очищали от мусора и пыли, высушивали при 60°C в течение 48 ч. Пробы воска, прополиса и пыльцевой обножки выдерживали в эксикаторе 48 ч, в качестве осушителя использовали пентаоксид фосфора. Экспериментально установили, что на фракционирование изотопов углерода в меде его влажность не влияет. Все образцы гомогенизировали, после чего навеску образца необходимой массы помещали в оловянные или серебряные капсулы (олово и серебро высокой степени чистоты). Необходимые массы навесок подбирались экспериментально. Аналитическим сигналом в IRMS является интенсивность ионного тока (I). Изотопный масс-спектр представлен на рисунке 2 – по оси X указано время в секундах, по оси Y – интенсивность сигнала в mV.

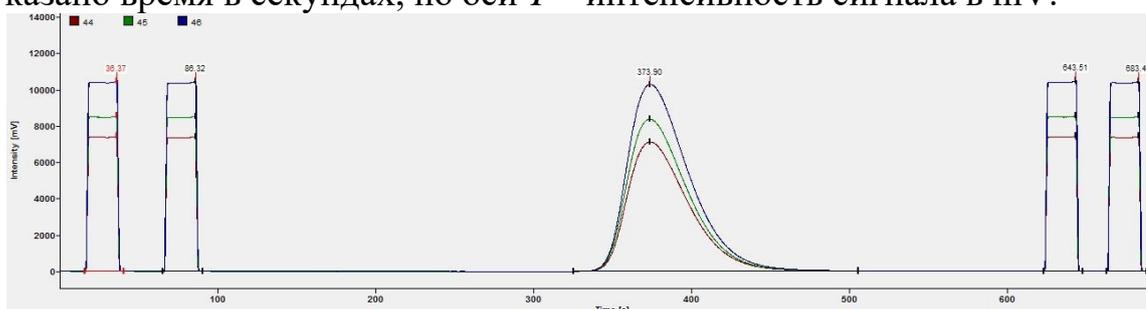


Рисунок 2 – Изотопный масс-спектр

Интенсивность сигнала (высота пика) и площадь пика пропорциональны между собой (рисунок 3 а). Также установлено, что высота и площадь пика зависят от массы навески (рисунок 3 б, в).

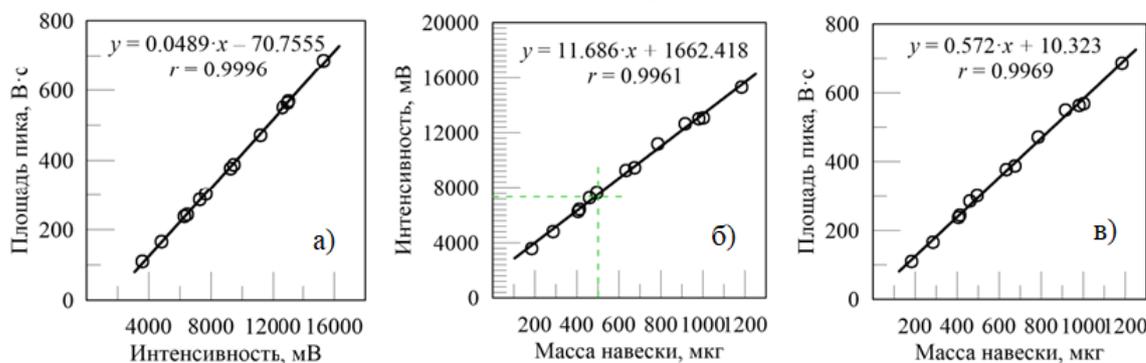


Рисунок 3 – Зависимость а) площади пика от высоты пика; б) интенсивности сигнала от массы навески; в) площади пика от массы. Горизонтальная линия соответствует среднему значению I сигнала газа-стандарта, вертикальная линия указывает на массу навески, соответствующую среднему значению I сигнала газа-стандарта – 500 мкг

Для подбора оптимальной массы навески для анализа изотопного состава углерода исследована зависимость величины $\delta^{13}\text{C}$ стандарта меда от массы навески в диапазоне от 150 до 1200 мкг. График зависимости измеренной величины $\delta^{13}\text{C}$ стандарта от массы навески представлен на рисунке 4. В области масс менее 500 мкг масс-спектрометр измеряет величину $\delta^{13}\text{C}$ стандарта близко к паспортному значению, а в области масс более 500 мкг величина $\delta^{13}\text{C}$ имеет линейную зависимость от массы навески

и показывает тенденцию на увеличение. Следовательно, для верного определения величины $\delta^{13}\text{C}$ для образцов меда подходит навеска в диапазоне до 500 мкг. Однако при проведении изотопного анализа необходимо стремиться к равенству аналитических сигналов образца и газа-стандарта, поэтому при подборе оптимальной массы навески нужно учесть интенсивность сигнала газа-стандарта. Интенсивность сигнала газа-стандарта варьируется в пределах от 6000 до 7400 mV, что соответствует массе навески от 450 до 500 мкг. Таким образом, оптимальная масса навески образца меда для анализа величины $\delta^{13}\text{C}$ составляет 450-500 мкг. Подобным образом подбирались массы навесок для каждого продукта пчеловодства и для каждого вида анализа ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{18}\text{O}$ и δD).

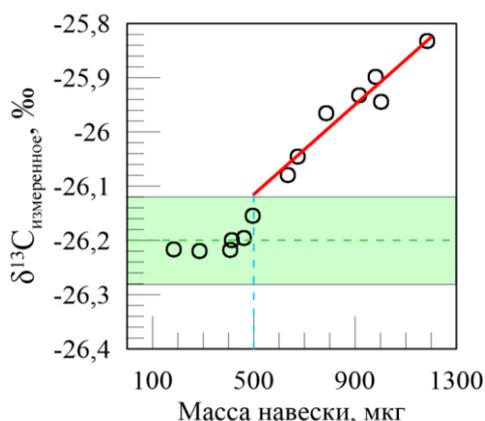


Рисунок 4 – Зависимость измеренной величины $\delta^{13}\text{C}$ стандарта меда USGS83 от массы навески: горизонтальная зеленая линия соответствует значению величины $\delta^{13}\text{C}$ стандарта, зеленый прямоугольник указывает границы абсолютной расширенной неопределенности измерений величины $\delta^{13}\text{C}$ для стандарта, вертикальная голубая линия указывает на массу навески, которая соответствует среднему значению I сигнала газа-стандарта – 500 мкг

Определение изотопного состава в образцах подмора медоносных пчел и продуктов их жизнедеятельности проводили с использованием изотопного масс-спектрометра DELTA V Advantage (Thermo Fisher Scientific, Германия), оснащенного элементным анализатором Flash 2000. Измеренные величины изотопного состава углерода, азота, кислорода и водорода пересчитывали с использованием градуировочных графиков (рисунок 5) для определения истинного значения изотопного состава.

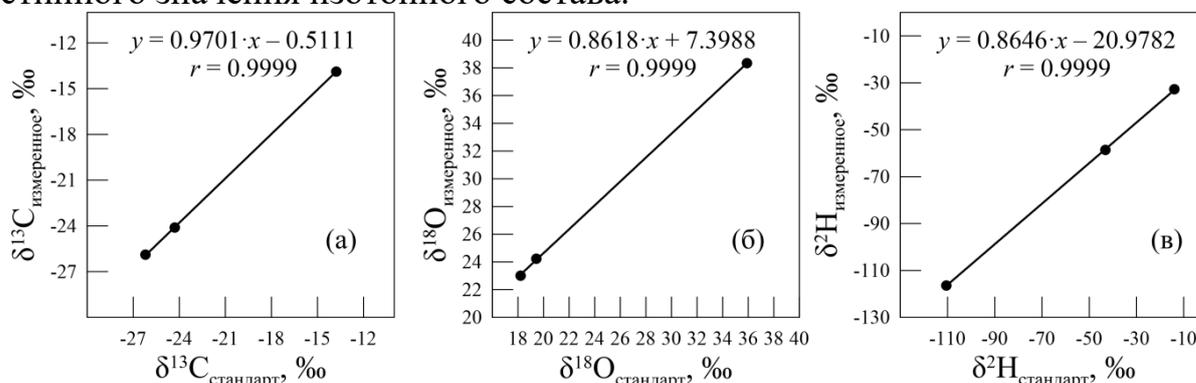


Рисунок 5 – Градуировочные графики а) для углерода, б) для кислорода, в) для водорода

В соответствии с нормативным документом РМГ 61-2010 проведена оценка показателей повторяемости, промежуточной прецизионности и правильности методики анализа (таблица 1).

Таблица 1 – Показатели повторяемости методики анализа, промежуточной прецизионности, правильности и точности методики анализа

Измеряемая величина	Диапазон измерений, ‰	Показатель повторяемости методики анализа $\sigma_{r,m}$, ‰	Показатель промежуточной прецизионности $\sigma_{RЛ,m}$, ‰	Показатель правильности методики $\Delta_{с,m}$, ‰	Показатель точности методики Δ_m , ‰
$\delta^{13}C_{VPDB}$	от -30.00 до -20.00	0.05	0.03	0.09	0.10
$\delta^{15}N_{Air}$	от -10.0 до 20.0	0.08	0.09	0.21	0.27
$\delta^{18}O_{VSMOW}$	от 10.0 до 30.0	0.12	0.14	0.14	0.46
δD_{VSMOW}	от -130 до +10	0.47	0.60	3.67	3.89

Проведена предварительная метрологическая аттестация методики. При соблюдении всех регламентированных условий значение неопределенности (погрешности и её составляющих) результатов измерений не превышают значений, приведенных в таблице 2.

Таблица 2 – Требования к показателям точности измерений

Измеряемая величина	Диапазон измерений, ‰	Стандартная неопределенность, оцененная по типу А, ‰	Стандартная неопределенность, оцененная по типу В, ‰	Абсолютная расширенная неопределенность* (при коэффициенте охвата $k = 2$), U, ‰
$\delta^{13}C_{VPDB}$	от -30.00 до -20.00	0.09	0.04	0.2
$\delta^{15}N_{Air}$	от -10.0 до 20.0	0.20	0.08	0.4
$\delta^{18}O_{VSMOW}$	от 10.0 до 30.0	0.6	0.2	1.3
δD_{VSMOW}	от -130 до +10	3.3	1.9	8.0

Примечания:

- 1) Результат измерений ($\delta^{13}C_{VPDB}$, $\delta^{15}N_{Air}$, $\delta^{18}O_{VSMOW}$, δD_{VSMOW} , ‰) формируется на основе усреднения пяти аналитических сигналов, полученных для одной пробы меда.
- 2) *Соответствует границам суммарной абсолютной погрешности при доверительной вероятности $P=0.95$.

Третья глава содержит результаты исследования изотопного состава водорода, кислорода, углерода и азота в продуктах пчеловодства. Изучена

закономерность распределения изотопного состава углерода, водорода и кислорода образцов меда согласно их географическому происхождению и исследована зависимость изотопного состава водорода и кислорода образцов меда, подмора пчел и пыльцевой обножки от изотопного состава метеорных вод регионов производства для выявления географической принадлежности.

В таблице 3 собрана основная описательная статистика для всех изотопных составов по всем продуктам пчеловодства.

Таблица 3 – Основная описательная статистика величин $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, δD и $\delta^{18}\text{O}$ всех собранных образцов (‰)

Объект исследования	<i>n</i>	среднее	СКО	мин.	макс.	интервал
$\delta^{13}\text{C}$						
Мед	117	-26.8	1.2	-29.5	-22.3	7.2
Пыльцевая обножка	35	-27.2	1.3	-31.2	-24.3	6.9
Подмор пчел	36	-26.3	0.6	-28.1	-25.1	3.0
Воск	33	-28.6	0.6	-30.3	-27.4	2.9
Прополис	33	-27.4	0.7	-28.5	-24.4	4.1
$\delta^{15}\text{N}$						
Мед	97	4.5	1.8	-1.0	12.0	13.0
Пыльцевая обножка	35	4.0	2.4	-2.8	8.5	11.3
Подмор пчел	36	6.1	1.7	2.7	9.8	7.1
Прополис	33	4.2	2.6	0.4	11.2	10.8
δD						
Мед	74	-70.8	26.7	-126.2	4.2	130.4
Пыльцевая обножка	22	-91.0	21.6	-124.9	-47.2	77.7
Подмор пчел	19	-97.7	16.4	-140.4	-75.8	64.6
Воск	21	-282.0	24.2	-308.6	-202.3	106.3
$\delta^{18}\text{O}$						
Мед	60	20.3	3.4	12.7	26.0	13.3
Пыльцевая обножка	22	17.0	3.4	11.1	26.6	15.5
Подмор пчел	19	5.3	3.8	-3.2	12.5	15.7
Воск	17	-47.5	13.2	-70.8	-24.0	46.8

Исследование вопроса географического происхождения меда ориентировано на гипотезу о взаимосвязи природного фракционирования изотопов водорода, углерода и кислорода с климатическими условиями географического региона происхождения. Согласно данной гипотезе образцы меда, произведенные в регионах с высокой солнечной активностью и более высокими температурами, будут характеризоваться более высоким содержанием тяжелых изотопов углерода (^{13}C), водорода (^2H) и кислорода (^{18}O), а для образцов меда из регионов с более холодным климатом наоборот будет характерно содержание легких изотопов углерода (^{12}C), водорода (^1H) и кислорода (^{16}O).

Диапазоны вариаций величины $\delta^{13}\text{C}$ образцов меда, описанных в литературе, и образцов меда, проанализированных в рамках данного исследования, представлены на рисунке 6. Высокие значения величины $\delta^{13}\text{C}$ характерны для образцов меда из регионов с теплым климатом. Низкие значения $\delta^{13}\text{C}$ имеют образцы меда из регионов Сибири с более низкой средней температурой и более высокой влажностью воздуха.

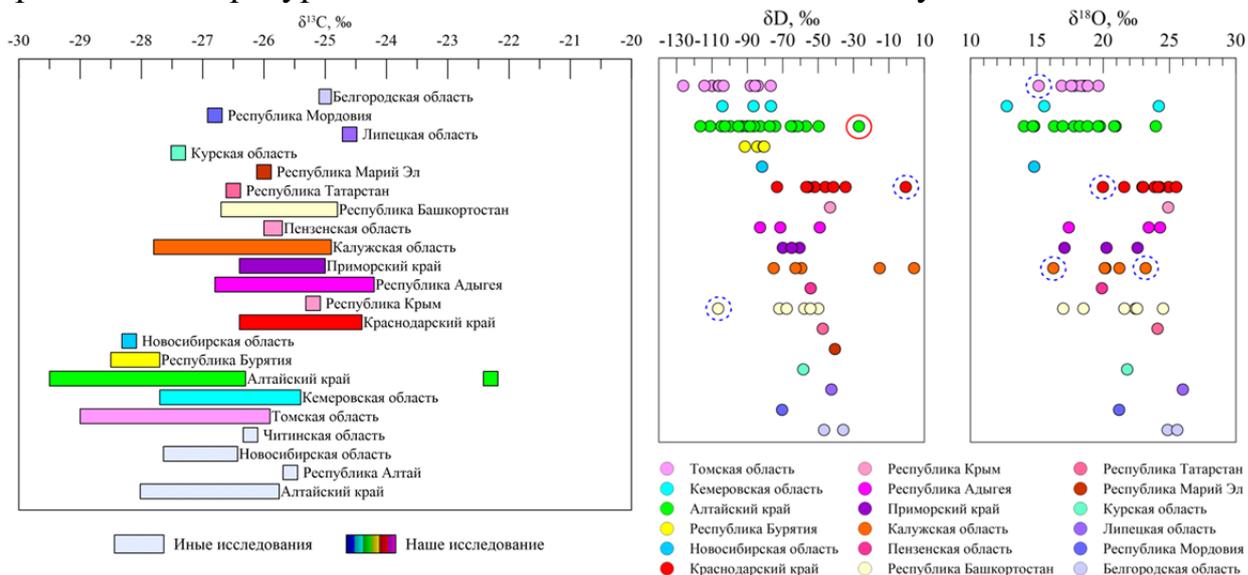


Рисунок 6 – Диапазоны величин $\delta^{13}\text{C}$, δD и $\delta^{18}\text{O}$ образцов меда из разных регионов России; синими пунктирными кругами обозначены экстремальные значения; красным сплошным кругом обозначен сфальсифицированный образец

На рисунке 6 представлены результаты анализа изотопного состава водорода и кислорода в меде из разных регионов России. Самые высокие значения величины δD обнаружены для образцов из Черноморского региона с теплым климатом. Образцы меда из регионов с умеренными климатическими условиями, например, Калужская область, показали промежуточные средние значения. Мед из Приморского края (с умеренным муссонным климатом) показал среднее значение величины δD . Самые низкие значения зафиксированы для образцов из Сибирского региона. Картина распределения значений величины $\delta^{18}\text{O}$ в меде аналогична распределению значений изотопного состава водорода по климатическим зонам.

Для исследования зависимости изотопного состава водорода и кислорода продуктов пчеловодства от изотопного состава метеорных вод регионов производства измеренные значения величин δD и $\delta^{18}\text{O}$ образцов продуктов пчеловодства сравнивали со значениями величин δD и $\delta^{18}\text{O}$ атмосферных осадков (метеорных вод), выпадающих в регионах отбора. Величины δD и $\delta^{18}\text{O}$ метеорных вод рассчитывалась посредством изотопного онлайн-калькулятора, размещенного на портале Waterisotopes Database. В таблице 4 приведены коэффициенты корреляции между величинами δD и

$\delta^{18}\text{O}$ образцов продуктов пчеловодства и величинами δD и $\delta^{18}\text{O}$ метеорных вод.

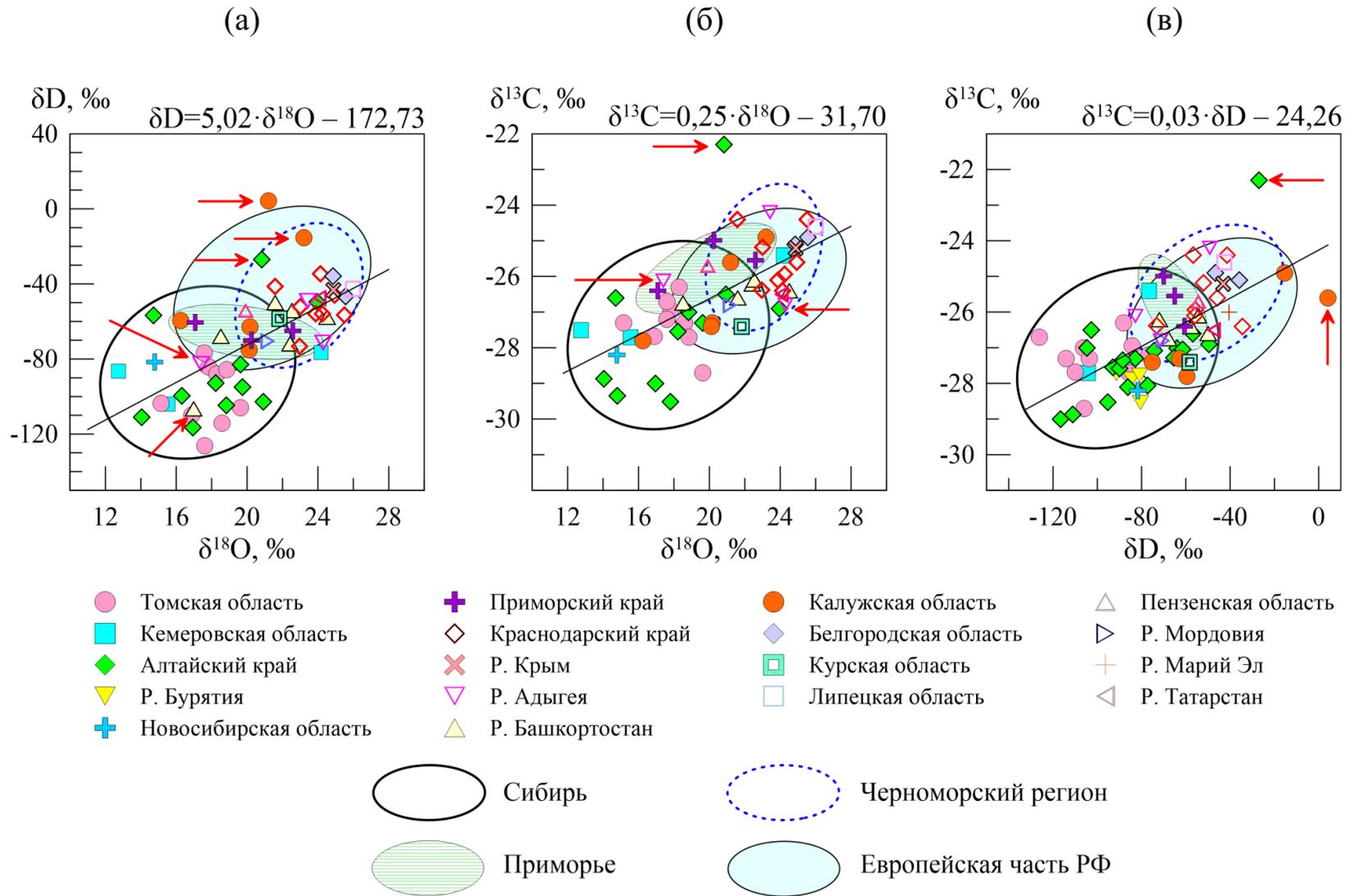
Таблица 4 – Значения коэффициентов корреляции между средними величинами δD и $\delta^{18}\text{O}$ образцов продуктов пчеловодства по регионам и величинами δD и $\delta^{18}\text{O}$ метеорных вод за период апрель–октябрь

Продукты пчеловодства	Метеорные воды	
	δD	$\delta^{18}\text{O}$
мед	0.93	0.85
пыльцевая обножка	0.91	0.68
подмор пчел	0.81	0.29
воск	0.46	-0.40

Как и предполагалось, пыльцевая обножка и подмор пчел фиксируют соотношение изотопов водорода местных атмосферных осадков, и эта «запись» сохраняется в меде, хотя и с некоторой трансформацией из-за процессов фракционирования, когда нектар превращается в мед. В воске такая закономерность прослеживается слабо. Сильную и среднюю корреляционную связь с изотопами кислорода локальных осадков показали образцы меда и пыльцевой обножки соответственно.

На рисунке 7 представлены графики зависимости между изотопными составами углерода, водорода и кислорода в 74 образцах меда. Для всех парных измерений между изотопами водорода и углерода в образцах меда наблюдается корреляционная связь с коэффициентом корреляции 0.68 (является статистически значимым при уровне значимости 0.05). Коэффициент корреляции для изотопов водорода и кислорода составляет 0.63 (является статистически значимым при уровне значимости 0.05). Между изотопами кислорода и углерода коэффициент корреляции равен 0.64 (является статистически значимым при уровне значимости 0.05). Несмотря на среднюю корреляционную связь (коэффициенты корреляции удовлетворяю условию $0.50 < r < 0.69$), на графиках хорошо прослеживается «изотопный ландшафт», соответствующий определенному географическому региону происхождения меда:

- 1 зона – юг России, Черноморский регион с теплым морским климатом – $\delta^{13}\text{C}$: от -27 до -24‰ , δD : от -80 до 0‰ и $\delta^{18}\text{O}$: от $+20$ до $+28\text{‰}$;
- 2 зона – Европейская часть России с умеренно континентальным климатом – $\delta^{13}\text{C}$: от -28 до -24‰ , δD : от -80 до -40‰ и $\delta^{18}\text{O}$: от $+16$ до $+28\text{‰}$ перекрывается с Приморьем (характерен муссонный климат) – $\delta^{13}\text{C}$: от -27 до -24‰ , δD : от -80 до -50‰ и $\delta^{18}\text{O}$: от $+16$ до $+24\text{‰}$;
- 3 зона – Сибирь с континентальным климатом – $\delta^{13}\text{C}$: от -30 до -25‰ , δD : от -130 до -40‰ и $\delta^{18}\text{O}$: от $+12$ до $+22\text{‰}$.



Красные стрелки указывают на образцы, выпадающие из выделенных областей

Рисунок 7 – Графики зависимостей величины δD от величины $\delta^{18}O$ (а), величины $\delta^{13}C$ от величины $\delta^{18}O$ (б), величины $\delta^{13}C$ от величины δD (в) образцах меда, отобранных в разных климатических регионах России

Четвертая глава посвящена проверке подлинности меда на предмет фальсификации сахарными сиропами. Для экспериментального исследования изменения изотопного состава меда при разбавлении меда инвертным сахарным сиропом (самая распространенная добавка) выбраны четыре образца меда и два образца сахара – свекловичный и тростниковый. Модельные смеси инвертных сахарных сиропов приготовлены из свекловичного и тростникового сахаров путем гидролиза сахарозы в присутствии кислоты по следующей методике: 300 г сахара смешивали со 130 мл воды и 2 г лимонной кислоты, а затем после растворения сахара смесь нагревали в течение часа при 108°C. На основе приготовленных инвертных сиропов и четырех образцов натурального меда приготовлены модельные смеси с разным содержанием инвертных сиропов (5, 10, 25 и 50% сиропа). Результаты определения их изотопных составов углерода и водорода представлены в таблице 5.

Разница между величиной $\delta^{13}\text{C}$ белковой фракции образцов натурального меда и величиной $\delta^{13}\text{C}$ сиропа из свекловичного сахара составляет от -1.8 до $+1\%$. Поэтому при разбавлении натурального меда, величина $\delta^{13}\text{C}$ которого близка к величине $\delta^{13}\text{C}$ сиропа из свекловичного сахара, даже большим количеством (50%) инвертного сиропа из свекловичного сахара или при добавлении чистого свекловичного сахара изотопный состав будет меняться незначительно (до $0,5\%$). Разницу (до 1%) можно увидеть для образцов меда, величина $\delta^{13}\text{C}$ которых ниже величины $\delta^{13}\text{C}$ свекловичного сахара на 2 и более промилле (образец №1 в таблице 5).

Другую картину можно наблюдать при разбавлении меда инвертным сиропом из тростникового сахара. Разница между величиной $\delta^{13}\text{C}$ белковой фракции образцов меда и величиной $\delta^{13}\text{C}$ сиропа из тростникового сахара существенна – до 15% . При добавлении даже 5% тростникового сиропа изотопный состав углерода меда меняется более чем на 1% и разница между $\delta^{13}\text{C}$ белковой фракцией меда и величиной $\delta^{13}\text{C}$ модельной смеси может достигать 2% , а при разбавлении меда в два раза (50%) – на 7 и более промилле.

Таким образом, если натуральным мед разбавить любым количеством свекловичного сахара, то изотопный состав углерода изменится незначительно. Однако если натуральный мед разбавить инвертным сиропом, приготовленным из тростникового сахара, то заметная разница изотопных отношений (до 2%) появится при добавлении даже незначительного количества сиропа (5%). Среднее значение разницы между величиной $\delta^{13}\text{C}$ белковой фракции меда и величиной $\delta^{13}\text{C}$ модельной смеси с 5% инвертного тростникового сиропа составило -1.3% . Данное значение можно рекомендовать использовать при оценке образцов меда на подозрение в фальсификации.

Таблица 5 – Изотопный состав углерода модельных смесей меда, разбавленных инвертными сиропами (‰)

Мед	Протеин	$\delta^{13}\text{C}_{\text{мед+сироп}}$					$\delta^{13}\text{C}_{\text{протеин}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{мед+сироп}}$				
		% содержания сиропа ($\delta^{13}\text{C} = -12,6 \pm 0,2\%$) из тростникового сахара*									
		0	5	10	25	50	5	10	25	50	
№1	-27,2±0,1	-27,0±0,1	-26,0±0,2	-25,3±0,2	-23,6±0,2	-19,9±0,2	-1,2	-1,9	-3,6	-7,3	
№2	-26,0±0,2	-26,4±0,2	-25,2±0,2	-23,8±0,2	-22,7±0,2	-19,3±0,2	-0,8	-2,2	-3,3	-6,7	
№3	-26,8±0,1	-27,7±0,2	-25,4±0,2	-23,6±0,2	-22,5±0,2	-19,1±0,2	-1,4	-3,2	-4,3	-7,7	
№4	-24,4±0,1	-24,0±0,2	-22,5±0,2	-21,7±0,2	-20,3±0,2	-17,4±0,2	-1,9	-2,7	-4,1	-7,0	
Мед	Протеин	$\delta^{13}\text{C}_{\text{мед+сироп}}$					$\delta^{13}\text{C}_{\text{протеин}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{мед+сироп}}$				
		% содержания сиропа ($\delta^{13}\text{C} = -25,4 \pm 0,1\%$) из свекловичного сахара**									
		0	5	10	25	50	5	10	25	50	
№1	-27,2±0,1	-27,0±0,1	-26,9±0,2	-26,8±0,2	-26,6±0,2	-26,3±0,2	-0,3	-0,4	-0,6	-0,9	
№2	-26,0±0,2	-26,4±0,2	-26,2±0,2	-26,2±0,2	-26,1±0,2	-26,0±0,2	0,2	0,2	0,1	0,0	
№3	-26,8±0,1	-27,7±0,2	-26,9±0,2	-26,7±0,2	-26,6±0,2	-26,3±0,2	0,1	-0,1	-0,2	-0,5	
№4	-24,4±0,1	-24,0±0,2	-23,9±0,2	-24,0±0,2	-24,2±0,2	-24,7±0,2	-0,5	-0,4	-0,2	0,3	
* – величина $\delta^{13}\text{C}$ тростникового сахара равна $-12,9 \pm 0,2\%$											
** – величина $\delta^{13}\text{C}$ свекловичного сахара равна $-25,4 \pm 0,1\%$											

Пчелы обычно собирают нектар с растений С3 типа, поэтому натуральный мед имеет значение изотопного состава углерода примерно от -28‰ до -23‰ . Поэтому в общемировой практике образцы меда, имеющие величину $\delta^{13}\text{C}$ выше, чем -23‰ , принято считать подозрительными. Для российского рынка меда таким пороговым значением величины $\delta^{13}\text{C}$ можно принять значение -24‰ , основываясь на большом наборе достоверных данных. Это значение можно принять за критерий фальсификации меда.

За рубежом для обнаружения фальсификации меда принято использовать утвержденную Ассоциацией аналитической химии официальную методику с анализом изотопного состава углерода белковой фракции меда (протеин) – АОАС 998.12-1998. Данная методика основывается на том, что изотопный состав углерода углеводной и белковой фракции должен иметь одинаковые значения, так как обе эти фракции в натуральном меде формируются из одного источника одновременно. Следовательно, изотопный состав белковой фракции меда не изменится при добавлении сахарного сиропа в мед, поэтому изотопный состав белковой фракции меда является «внутренним стандартом». Согласно методике АОАС 998.12-1998 если разница величины $\delta^{13}\text{C}$ между медом и экстрагированной из него белковой фракцией составляет более чем $+1\text{‰}$ или менее чем -1‰ , то принято считать данный образец меда фальсифицированным. Также мед считается фальсифицированным, если процент содержания С-4-сахара (СС-4 сахар) в образце меда $> 7\%$, согласно следующему уравнению:

$$C_{\text{C-4 сахар}} = \frac{\delta^{13}\text{C}_{\text{протеин}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{мед}}}{\delta^{13}\text{C}_{\text{протеин}} - (-9.7)} \times 100, \quad (1)$$

где $\delta^{13}\text{C}_{\text{протеин}}$ – значение величины $\delta^{13}\text{C}$ для белковой части меда, $\delta^{13}\text{C}_{\text{мед}}$ – величина $\delta^{13}\text{C}$ для меда, -9.7 – среднее значение величины $\delta^{13}\text{C}$ для кукурузного сиропа (‰). Кроме того, в 2016 году проведено исследование, в котором доказано, что мед с содержанием С-4 сахара $< -7\%$ также может быть классифицирован как фальсифицированный.

Для расширения возможности использования методики расчета предложено заменить эталон (кукурузный сироп) на широко распространенный тростниковый сахар. В связи с этим в формулу (1) при расчете процента содержания сахара, полученного из растений с С4 типом фотосинтеза, в образцах меда российского рынка целесообразно внести изменение: заменить значение -9.7‰ на -12.6‰ , что соответствует величине $\delta^{13}\text{C}$ сиропа, приготовленного из тростникового сахара. Ввиду введения нового значения формула 1 примет новый вид:

$$C_{\text{C-4 сахар}}^* = \frac{\delta^{13}\text{C}_{\text{протеин}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{мед}}}{\delta^{13}\text{C}_{\text{протеин}} - (-12,6)} \times 100, \quad (2)$$

где $C_{C-4\text{сахар}}^*$ – процент содержания сахара, полученного из растений с C4 типом фотосинтеза, для российского рынка.

С целью выявления поддельного меда, фальсифицируемого сахарами, проведен сравнительный анализ изотопного состава углерода в образцах натурального меда и выделенной из него белковой фракции (протеине). Величина $\delta^{13}\text{C}$ образцов меда за весь период исследования изменяется в диапазоне от -29.5‰ до -22.3‰ ($n=117$), а величина $\delta^{13}\text{C}$ протеина – от -31‰ до -24‰ ($n=115$).

На рисунке 8 представлен график зависимости рассчитанного по формуле 2 процента содержания сахара, полученного из растений с C4 типом фотосинтеза, от разницы между величиной $\delta^{13}\text{C}$ протеина и величиной $\delta^{13}\text{C}$ меда. Таким образом, разнице между величиной $\delta^{13}\text{C}$ протеина и величиной $\delta^{13}\text{C}$ меда, равной 1.3‰ , по полученному уравнению соответствует 9.1 процент содержания C-4 сахара. Соответственно, образец меда, для которого разница $\delta^{13}\text{C}_{\text{п}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{м}}$ более 1.3‰ и процент содержания C-4 сахара $< -9.1\%$ или $>9.1\%$, можно классифицировать как фальсифицированный.

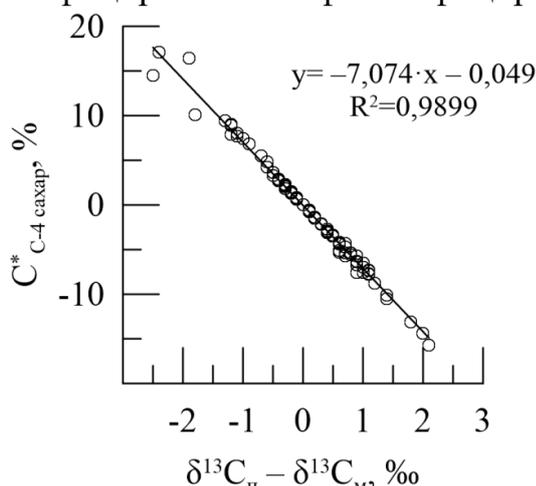


Рисунок 8 – Зависимость процента содержания C4-сахара ($C_{C-4\text{сахар}}^*$, %) от разницы между величиной $\delta^{13}\text{C}$ протеина и величиной $\delta^{13}\text{C}$ меда для российского рынка меда

Таким образом, критерии сфальсифицированных образцов меда выглядят следующим образом:

- 1) величина $\delta^{13}\text{C}$ меда больше $-24,0\text{‰}$;
- 2) разница между величиной $\delta^{13}\text{C}$ белковой фракции меда и величиной $\delta^{13}\text{C}$ меда составляет более $+1,3\text{‰}$ или менее $-1,3\text{‰}$;
- 3) процент содержания сахара, полученного из растений с C4 типом фотосинтеза, более $9,1\%$ или менее $-9,1\%$.

Во всей выборке образцов меда ($n=115$) согласно критериям фальсификации меда для российского рынка обнаружено 10 фальсифицированных образцов. Среди всех образцов меда выделяется один, который приобретен в медовой лавке г. Москва. Данный образец меда удовлетворяет всем трем критериям фальсификации.

Если из расчета исключить данные по фальсифицированным образцам меда, то линейная зависимость между изотопным составом углерода меда и изотопным составом углерода выделенной из меда белковой фракции имеет следующий вид: $\delta^{13}\text{C}_{\text{протеин}} = 0,73 \cdot \delta^{13}\text{C}_{\text{мед}} - 7,19$ ($R^2 = 0,74$) с коэффициентом корреляции 0,86 (рисунок 9).

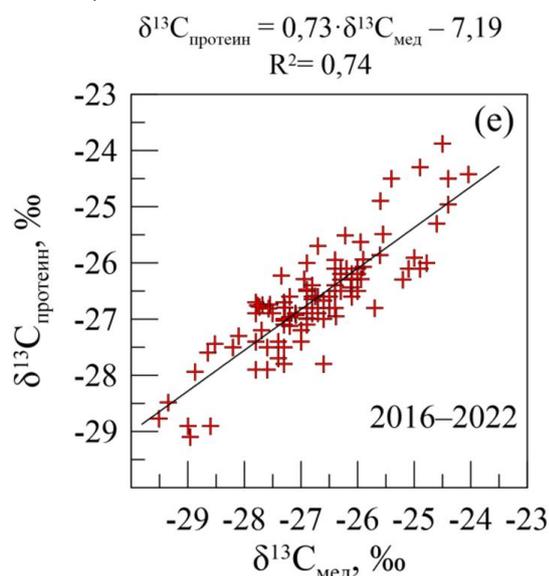


Рисунок 9 – Зависимость изотопного состава углерода в образцах меда от изотопного состава углерода экстрагированного из меда протеина

Таким образом, введены новые критерии фальсификации меда, адаптированные для российского рынка, модифицирована официально утвержденная формула расчета процента содержания сахара, полученного из растений с C4 типом фотосинтеза. Данное изменение в формуле позволило более точно устанавливать факт фальсификации меда: использование измененной формулы позволило определить контрафактность для тех образцов меда, которые по официальной методике считались неподдельными. Если сравнивать между собой величины процента содержания C4 сахара, посчитанные по формулам 1 (по методике АОАС 998.12-1998) и 2 (наше исследование), то величина процента содержания C4 сахара в нашем случае показывает больший процент содержания сахара.

Практическая значимость предложенных рекомендаций подтверждена актами внедрения результатов диссертационной работы, полученными от ООО «МС-Аналитика» и ООО «Городской супермаркет».

ВЫВОДЫ

1. Метод масс-спектрометрического исследования позволил определить изотопные сигнатуры продуктов пчеловодства в диапазонах: для воска $\delta^{13}\text{C}$ от $-30,3$ до $-27,4$ ‰, δD от $-308,6$ до $-202,3$ ‰, $\delta^{18}\text{O}$ от $-70,8$ до $-24,0$ ‰; для прополиса $\delta^{13}\text{C}$ от $-28,5$ до $-24,4$ ‰, $\delta^{15}\text{N}$ от $+0,4$ до $+11,2$ ‰; для подмора

пчел δD от -140.4 до -75.8‰ , $\delta^{18}O$ от -3.2 до $+12.5\text{‰}$, $\delta^{13}C$ от -28.1 до -25.1‰ , $\delta^{15}N$ от $+2.7$ до $+9.8\text{‰}$; для пыльцевой обножки $\delta^{13}C$ от -31.2 до -24.3‰ , $\delta^{15}N$ от -2.8 до $+8.5\text{‰}$, δD от -124.9 до -47.2‰ , $\delta^{18}O$ от $+11.1$ до $+26.6\text{‰}$; для меда $\delta^{13}C$ от -29.5 до -22.3‰ , $\delta^{15}N$ от -1.0 до $+12.0\text{‰}$, δD от -126.2 до $+4.2\text{‰}$, $\delta^{18}O$ от $+12.7$ до $+26.0\text{‰}$.

2. Пространственное распределение изотопных сигнатур O, N и C в меде показало, что: низкие значения величин изотопного состава меда характерны для регионов Сибири ($\delta^{13}C$: от -30 до -25‰ , δD : от -130 до -40‰ и $\delta^{18}O$: от $+12$ до $+22\text{‰}$), средние значения для образцов меда европейской части России ($\delta^{13}C$: от -28 до -24‰ , δD : от -80 до -40‰ и $\delta^{18}O$: от $+16$ до $+28\text{‰}$), высокие для черноморского региона ($\delta^{13}C$: от -27 до -24‰ , δD : от -80 до 0‰ и $\delta^{18}O$: от $+20$ до $+28\text{‰}$). Подтвержден высокий уровень корреляции между величинами δD и $\delta^{18}O$ меда и метеорных вод (0.93 и 0.86 соответственно). Выявлена зависимость содержания величины $\delta^{15}N$ от локальных условий мест производства меда.

3. Экспериментально установлено, что для натурального российского меда величина $\delta^{13}C$ не превышает -24‰ . Предложена формула расчета содержания С4-сахара на основании сравнения величин $\delta^{13}C$ меда и его белковой фракции. Граничным значением принята разница $\delta^{13}C > 1.3\text{‰}$ при содержании С4-сахара $> 9.1\%$, выше которого образец меда можно считать разбавленным.

4. Разработаны рекомендации к масс-спектрометрическому исследованию изотопного состава водорода $^2H/^1H$, углерода $^{13}C/^12C$, кислорода $^{18}O/^16O$ и азота $^{15}N/^14N$ в продуктах пчеловодства (воск, прополис, подмор пчел, пыльцевая обножка, мед и его белковая фракция), включающие предварительную метрологическую оценку точности измерений, способы подготовки проб, условия проведения измерений и интерпретацию результатов.

Основные публикации по теме диссертации

Статьи в журналах, рекомендуемых ВАК РФ и в изданиях, входящих в международную систему Web of Science и Scopus:

1. Ветрова О. В., Калашникова Д.А., Мелков В. Н., Симонова Г. В. Выявление фальсификации меда сахарными сиропами методом масс-спектрометрии стабильных изотопов // Журнал аналитической химии. – 2017. – Том 72, № 7. – С. 645-649. Переводная версия: Vetrova O.V., Kalashnikova D.A., Melkov V.N., Simonova G.V. Detection of honey adulterations with sugar syrups by stable isotope mass spectrometry // Journal of Analytical Chemistry. – 2017. – Vol. 72, Issue 7. – P. 756–760. DOI: 10.1134/S1061934817070152.

2. Калашникова Д.А., Симонова Г. В. Отношения стабильных изотопов $^{13}C/^12C$ и $^{15}N/^14N$ в образцах подмора медоносных пчел и в продуктах их жизнедеятельности // Журнал аналитической химии. – 2021. –

Том 76, № 4. – С. 359-368. Переводная версия: **Kalashnikova D.A., Simonova G.V.** Ratios of stable isotopes $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ in samples of dead honey bees and beekeeping products // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2021. – Vol. 76. № 4. – С. 526-534. – DOI: 10.1134/S1061934821040067.

3. Симонова Г.В., **Калашникова Д.А.** ^{13}C изотопный анализ медоносных пчел и продуктов пчеловодства: применение и значимость // *Химия в интересах устойчивого развития*. – 2022. – №2. – С. 208-221. – DOI: 10.15372/KhUR2022375. Переводная версия: Simonova G.V., **Kalashnikova D.A.** ^{13}C isotope analysis of honey bees and beekeeping products: application and significance // *Chemistry For Sustainable Development*. – 2022. – Vol. 30. № 2. – С. 203-216. – DOI: 10.15372/CSD2022375.

4. Волков Ю. В., **Калашникова Д. А.**, Коновалова О. В., Маркелова А. Н., Симонова Г. В. Изотопная масс-спектрометрия: применение и значимость в исследованиях объектов окружающей среды. // *Оптика атмосферы и океана*. – 2022. – Т. 35. № 02. – С. 168–171. – DOI: 10.15372/AOO20220214.

Материалы конференций

1. Ветрова О.В., **Калашникова Д.А.**, Мелков В.Н., Симонова Г.В. Измерение изотопного состава образцов меда для российского рынка // XI Сибирское совещание по климато-экологическому мониторингу, 21-23 сентября 2015, Томск. – 2015. – С. 101-102.

2. **Калашникова Д.А.**, Мелков В.Н., Симонова Г.В. Установление аутентичности продуктов питания методом изотопной масс-спектрометрии // *Безопасность – 2016: материалы докладов XXI Всерос. студенческой науч.-практ. конф. с междунар. участием «Проблемы безопасности современного мира»* (г. Иркутск, 19–22 апреля, 2016 г.). – Иркутск : Изд-во ИРНИТУ, 2016. – С. 79–81.

3. **Калашникова Д.А.**, Кабанов М.В., Мелков В.Н., Г.В. Симонова Приборная база и возможности аналитического центра изотопных исследований ИМКЭС СО РАН // *Международная конференция и школа молодых ученых по измерениям, моделированию и информационным системам для изучения окружающей среды: ENVIROMIS-2018*, 5 июня – 11 июля 2018, Томск, Россия. – 2018. – С. 460–463.

4. **Калашникова Д.А.**, Симонова Г.В., Маркелов А.Н., Крайнюков А.А. Изотопы легких элементов в исследовании объектов окружающей среды // IX Сибирская конференция молодых ученых по наукам о Земле: материалы конференции, Новосибирск 19–23 ноября 2018 / Ин-т геологии и минералогии им. В. С. Соболева СО РАН, Ин-т нефтегазовой геологии и геофизики им. А. А. Трофимука СО РАН, Новосиб. гос. ун-т. – Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2018. – С. 236–238.

5. Симонова Г.В., **Калашникова Д.А.** Стабильные изотопы углерода и кислорода в меде: фальсификация и географический аспект // III

Всероссийская конференция по аналитической спектроскопии с международным участием / г. Краснодар, (29 сентября – 5 октября 2019). – ООО «Мегастронг», 2019. – С. 200.

6. **Калашникова Д.А.**, Симонова Г.В., Гераскевич А.В. Изотопный состав углерода пчел и продуктов их жизнедеятельности // XI Всероссийская научная конференция и школа «Аналитика Сибири и Дальнего Востока», посвященная 100-летию со дня рождения И.Г. Юделевича (АСиДВ-11) (16-20 августа, 2021 г., Новосибирск) [Электронный ресурс]: Сборник тезисов докладов / Институт неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН; под ред.: Цыганковой А.Р., Сапрыкина А.И. – Новосибирск: ИНХ СО РАН, 2021. – С. 103. – DOI: 10.26902/ASFE-11_83.