



13C/12C analysis and other adulterations tests

Tracking Honey Fraud by the use of EA/LC-IRMS and other analytical approaches
Review 2014


Dr. Caroline Indorf
Workshop "Le frodi nel miele", Bologna 19.10.2015
Intertek Food Services, Bremen, Germany



1 © Intertek 2015, All Rights Reserved. www.intertek.com

Buongiorno a tutti, sono Caroline Indorf, sono la responsabile scientifica per i test di adulterazione in particolare per quanto riguarda il rapporto isotopico 13C/12C.

Nella prima parte della presentazione parlerò dei test di adulterazione, in particolare del 13C, e poi presenterò alcuni risultati relativi agli anni 2013/2014.



How to detect Adulteration of honey?

<p>Untargeted Approach:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Isotopic Screening (mostly ¹³C) • <i>Spectroscopic Screening (FTIR, NIR, Fluorescence, Raman)</i> • <i>Nuclear Magnetic Resonance (SNIF-NMR; ¹H-NMR Profiling)</i> • <i>High Res. MS-Profiling (GC-TOF; LC-HRMS)</i> <p>Advantage:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Independent of type of adulteration <p>Disadvantages:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Authentic reference databases required (LC-IRMS approx. 20 000 samples) • LODs vary with type of adulteration • Sophisticated, high effort 	<p>Targeted Approach:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Specific Marker Methods (Marker: substance specific for the added syrup or the production process) • GC-MS, LC-MS, LC, ICP-MS, Enzymatic Tests <p>Advantage:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fast and very sensitive <p>Disadvantages:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Detects only one type of adulteration • LOD depends on compound concentration
--	---

2 © Intertek 2015, All Rights Reserved. www.intertek.com

I test di adulterazione per rilevare le adulterazioni del miele seguono due tipi di approcci:

-un approccio non mirato (untargeted), come lo screening isotopico (¹³C) o altre tecniche di screening come la spettrometria o la risonanza magnetica. In particolare lo screening isotopico è un metodo consolidato e accettato anche dalle Autorità.

-un approccio mirato (targeted), che prevede l'uso di metodo basati su marker specifici, che rilevano in modo specifico lo sciroppo aggiunto o il processo di produzione di questo; ad esempio l'SMR è un marcatore specifico per lo sciroppo di riso.

Questi metodi sono applicati con diverse tecniche come GC-M, LC-MS.

I vantaggi delle metodiche untargeted consistono nel fatto che questi metodi sono indipendenti dal tipo di adulterazione. Tuttavia gli svantaggi sono che questi metodi richiedono database che comprendano tutti i mieli di tutto il mondo. Il nostro database per l'analisi LC-IRMS contiene più di 20000 campioni. Un ulteriore svantaggio è che il limite di rilevabilità (LOD) dipende dal tipo di sciroppo utilizzato. Tuttavia non esiste un LOD prestabilito per questo metodo. Inoltre per questo metodo è richiesto un alto livello di preparazione e la capacità di sostenere alti costi.

I vantaggi dell'approccio mirato (targeted) consistono nel fatto che i metodi sono rapidi e sensibili ma rilevano un solo tipo di adulterazione quindi sono altamente specifici, cioè se decidiamo di rilevare lo sciroppo di riso possiamo rilevare solo quello e non avremo altri dati su nessun altro adulterante, inoltre i risultati dipendono dalla concentrazione del composto.

How to detect Adulteration of Honey?



Adulteration tests available at Intertek

Method	Adulterant	Method	Adulterant
1. C13 EA-IRMS 2. C13 EA-CRDS	C4 sugars (e.g. cane, corn syrup)	7. β -Fructofuranosidase	invert sugar from sucrose (e.g. beet invert sugar)
3. C13 EA/LC-IRMS	C4 sugars + C3 sugars (e.g. wheat syrup, rice syrup, beet invert sugar, tapioca syrup)	8. β - γ -Amylase	Invert sugar syrups produced from starch (e.g. rice syrup, wheat syrup)
4. SM-R	Rice syrup only	9. Heat-stable α -Amylase	Unauthorized use of heat stable alpha-amylase addition of invert sugar syrups produced from starch (e.g. rice syrup, wheat syrup)
5. TM-R	Rice syrup only	10. FAmYP (New!)	Unauthorized use of honey-foreign diastase
6. Honey foreign oligosaccharides	Polysaccharide based sugar syrups (e.g. corn syrup, wheat syrup, rice syrup, inulin syrup, dextrins syrup)	11. E 150d	Unauthorized addition of caramel color

3

© Intertek 2015
All Rights Reserved

www.intertek.com

I metodi per determinare le adulterazioni che svolgiamo ad Intertek:

-gli screening isotopici indicati nei primi due metodi elencati sono utilizzati solo per il rilevamento di zuccheri C4;

-C13 EA/LC-IRMS è la spettroscopia isotopica di massa con cromatografia liquida che viene impiegata per il rilevamento sia degli zuccheri C3 che di quelli C4, è il metodo più conosciuto, basato sul rapporto isotopico;

-SM-R e TM-R sono due metodi basati su marker specifici per lo sciroppo di riso;

-Il metodo degli oligosaccaridi estranei al miele individua i polisaccaridi presenti negli sciroppi usati per adulterare i mieli come ad esempio quelli derivanti da mais o di grano;

-Il metodo della β -fructofuranosidase è utilizzato per individuare la presenza di sciroppi prodotti dalla canna da zucchero o dalla barbabietola determinando la presenza degli zuccheri invertiti che li caratterizzano;

-Il metodo della beta/gamma amylase applicabile per l'individuazione di sciroppi che contengono amido come quelli di grano o di riso;

-il metodo E 150d permette di individuare l'aggiunta di un colorante.

Sugar sources for adulteration

Intertek

Value Quality Delivered.



Corn (C4)

Cane (C4)

Due to different photosynthesis pathways it can be distinguished between C3 and C4 plants

Plant Origin	Examples	Range of $\delta^{13}\text{C}$ values	Method
C4-Plants	Corn Sugar Cane	-8 to -13 ‰	EA-IRMS (AOAC 998.12)
C3-Plants	Beet Rice Wheat	-22 to -30 ‰	EA/LC-IRMS (inhouse)

During C3 photosynthesis the enzyme (Rubisco) prefers $^{12}\text{CO}_2$



Wheat (C3)

Beet (C3)

Rice (C3)

Cassava (C3)

4

© Intertek 2015
All Rights Reserved

www.intertek.com

Le piante a ciclo C3 e quelle a ciclo C4 si distinguono sulla base di un diverso sistema fotosintetico e questo è utile per la determinazione del rapporto isotopico.

Le piante C4 sono ad esempio mais e canna da zucchero, mentre le piante a ciclo C3 sono, ad esempio, riso, barbabietola e frumento.

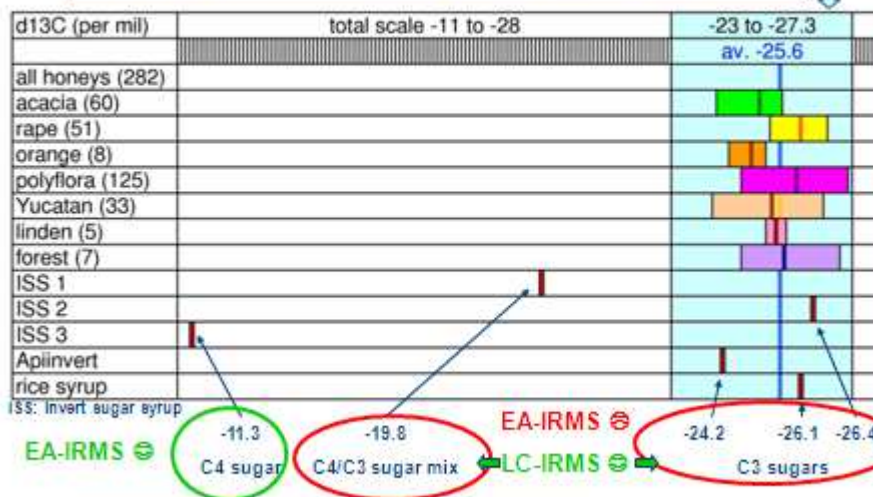
Nella tabella sono mostrati i livelli consentiti per quanto riguarda il C13, quindi da -8 a -13‰ per le piante C4 e da -22 a -30 ‰ per le piante a ciclo C3.

Natural $\delta^{13}\text{C}$ Variations of Pure Honeys

Intertek

Value Quality Delivered.

not all sugar syrups are outside the naturally occurring range of honey



5

© Intertek 2015
All Rights Reserved


www.intertek.com

Sulla destra sono rappresentate le varianti naturali delle concentrazioni di ^{13}C da -23 a 27.3 e quelle di alcuni sciroppi.

La tecnica EA-IRMS non riesce ad individuare alcune tipologie di sciroppi di zuccheri per cui si utilizza la tecnica LC-IRMS.

Una aggiunta di sciroppo di zucchero ISS 1 (una miscela di zuccheri C4 e C3) con un rapporto isotopico di -19.8 ‰ e sciroppi zuccherini C3, come quello di riso, con un rapporto isotopico, per esempio di -26.1 ‰ non sono rilevabili usando il metodo AOAC 998.12 C4. Solo usando il metodo EA/LC-IRMS si può determinare l'aggiunta di questi zuccheri nel miele.

LC-IRMS principle



Valued Quality Delivered.

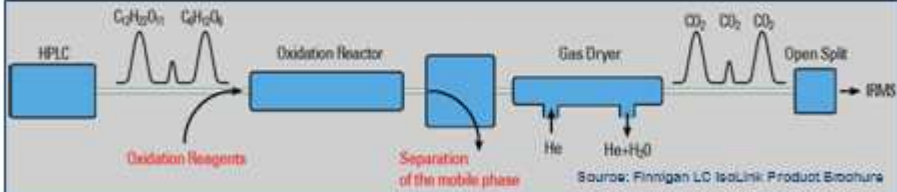
For the detection of C3 sugars in general and C4 sugars below 7% a compound specific isotope ratio detection is necessary

Step 1:
chromatographic separation of sugars

Step 2:
conversion to CO₂

Step 3:
separation from eluent and transfer to IRMS

Step 4:
13/12C isotope ratio measurement




Source: Finnigan LC IsoLink Product Brochure

© Intertek 2015. All Rights Reserved.
www.intertek.com

Il metodo 998,12 AOAC per la rilevazione di zucchero C4 è possibile solo per rilevare correttamente zuccheri C4 presenti in quantità superiori al 7%. Quantità rilevate inferiori a 7% non possono essere considerate come adulterato a causa di fattori come la distribuzione e la presenza di polline, la presenza di enzimi e polline di piante non nettarifere che fanno sì che l'incertezza della misurazione rimanga elevata, perciò questo limite deve essere così in alto. Inoltre sciroppi C3 non possono essere rilevate dal metodo AOAC.

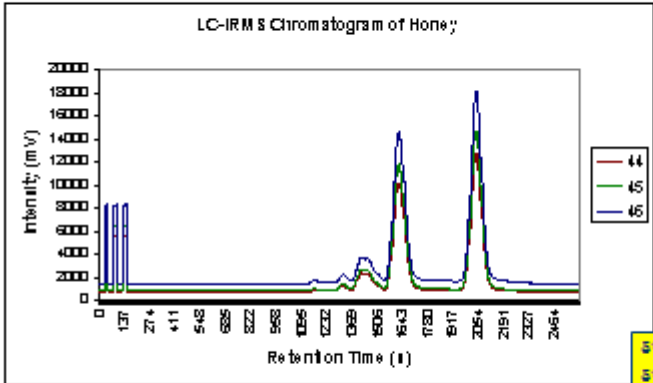
Utilizzando il metodo di EA/LC-IRMS si possono rilevare aggiunte di zuccheri C4 anche sotto il 7% così come di sciroppi C3.

LC-IRMS



Valued Quality Delivered.

LC-IRMS – pure honey



δ¹³C (F-G): -0.19 ‰
δ¹³C (max): 1.18 ‰

	RT (s)	Area (Vs)	δ ¹³ C (‰) vs. VPDB
trisaccharides	1187	81	-28.05
disaccharides	1383	263	-28.78
glucose	1478	2300	-26.88
fructose	1384	2887	-28.01

	δ ¹³ C (‰) vs. VPDB
protein	-26.8
honey	-28.0

7
© Intertek 2015. All Rights Reserved.
www.intertek.com

Questa slide mostra il cromatogramma di un miele non adulterato.

Tutti i picchi (trisaccaridi, disaccaridi, glucosio e fruttosio) hanno valori isotopici simili.

Anche la proteina e il valore isotopico del miele fornito dal metodo EA/IRMS sono simili ai valori isotopici degli zuccheri. Pertanto il valore F-G (fruttosio meno glucosio) è inferiore al limite di +/- 1,0‰ nonché il valore D-max (la più grande differenza tra tutti i componenti misurati) è inferiore al valore limite di +/- 2,1‰. Questo mostra che non sono stati rilevati zuccheri estranei al miele.

LC-IRMS Range of $\delta^{13}\text{C}$ values for authentic honeys



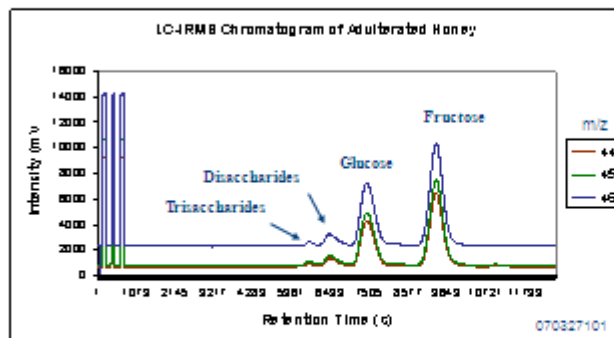
parameter	average	sd	range
$\delta^{13}\text{C}$ (‰) protein (p)	-25.3	± 1.0	-22.7 to -27.9
$\delta^{13}\text{C}$ (‰) honey (h)	-25.4	± 0.9	-22.9 to -27.9
Δ p-h (‰)	0.2	5	-1.2 to 1.8
C4 sugar (‰) ^a		5	0 to 6.9
$\delta^{13}\text{C}$ (‰) fructose (fru)			-22.6 to -28.0
$\delta^{13}\text{C}$ (‰) glucose (glu)			-23.0 to -28.0
$\delta^{13}\text{C}$ (‰) disaccharides (ds)		± 1.3	-22.5 to -29.1
$\delta^{13}\text{C}$ (‰) trisaccharides (ts)	-24.7	± 1.3	-21.9 to -28.2
fru/glu ratio	1.24	± 0.21	0.84 to 1.90
ds (area %)	5.5	± 2.1	0.7 to 12.6
ts (area %)	2.1	± 1.7	0.7 to 16.4
oligosaccharides (area %)	< 0.7		-

Action limits:
 $\delta^{13}\text{C}$ (F-G) = ± 1 ‰
 $\delta^{13}\text{C}$ (max.) = $\pm 2,1$ ‰

- Considers 20000 authentic honeys
- Based on this database the following action limits were calculated;

Nel riquadro giallo si vedono i rapporti isotopici caratteristici di un miele non adulterato

Adulterated Acacia Honey



	RT (s)	Area (Vs)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰) vs. VPDB
trisaccharides	1215	12	-24,96
disaccharides	1334	48	-25,71
glucose	1552	331	-25,96
fructose	1953	529	-23,79

$\delta^{13}\text{C}$ (F-G): 2,17 ‰
 $\delta^{13}\text{C}$ (max.): 2,17 ‰
Adulteration with fructose syrup!

	$\delta^{13}\text{C}$ (‰) vs. VPDB
protein	-25,2
honey	-24,6

EA-IRMS ok!
 C4 = 3.9%

In questa slide si vede il cromatogramma LC-IRMS di un miele di acacia adulterato con uno sciroppo di fruttosio.

I valori isotopici di glucosio e fruttosio differiscono molto. Questo miele presenta un valore di F-G di 2,17 ‰, anche se il limite è di 1,0 ‰.

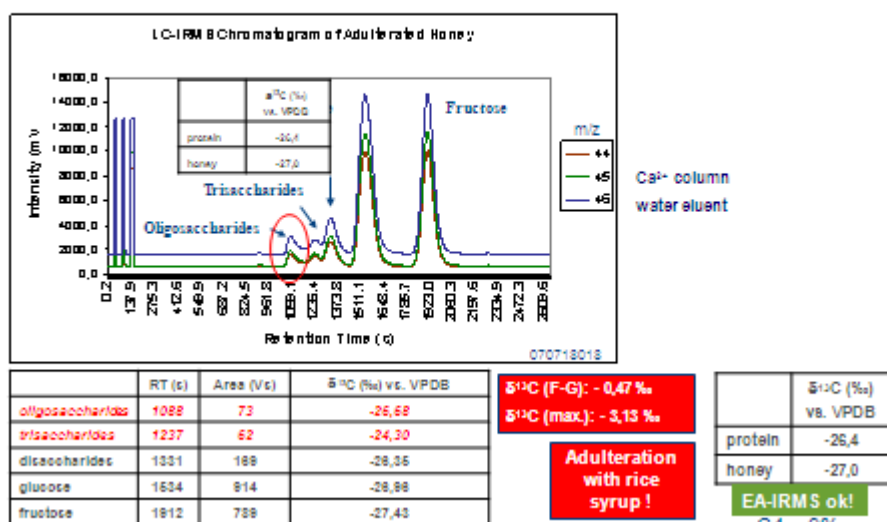
Pertanto, il miele è adulterato.

Anche il valore D-Max è 2,17 ‰ sopra al limite di D-Max = 2.1 ‰.

Il risultato del metodo AOAC (EA-IRMS) va bene.

Utilizzando solo il metodo 998,12 AOAC lo sciroppo di fruttosio aggiunto non sarebbe stato rilevato.

Adulterated Polyflora Honey



10

© Intertek 2015.
All Rights Reserved

www.intertek.com

Un altro esempio di miele adulterato, in cui si nota un picco anomalo degli oligosaccaridi. Questo miele è stato adulterato con sciroppo di riso.



The Review of 2013 and 2014 for the different methods and countries are available on request

11

© Intertek 2015.
All Rights Reserved

www.intertek.com

I risultati sulle indagini condotte nel 2013 e 2014 relativi alle varie metodiche e nazioni sono disponibili su richiesta.

Recommended analytical strategy:

In general:

- ¹³C EA/LC-IRMS (C4/C3 sugar screening)
- Honey-foreign oligosaccharides hf-OS (starch-based sugar syrups)

As necessary (risk based analysis depends on the country):

- Foreign enzymes (China: particularly heat-stable- α -amylase & F AmyP)

Monitoring:

- Methods showing decreased positives rates (e.g. SM-R, TM-R)

Le strategie analitiche che consigliamo ai nostri clienti è di utilizzare un pacchetto base che comprende lo screening di tutti gli zuccheri C4 e C3 e la presenza di oligosaccaridi estranei nonché una valutazione specifica in relazione ai Paesi di provenienza de miele.

La strategia analitica che consigliamo ai nostri clienti è di utilizzare un pacchetto base che comprende lo screening di tutti gli zuccheri C4 e C3 e la presenza di oligosaccaridi estranei, oltre ai metodi generali possono essere condotte ulteriori analisi specifiche decise sulla base del Paese di origine del miele.

Ad esempio, per un miele proveniente dalla Cina sono assolutamente consigliate indagini sulla presenza di enzimi estranei al miele enzimi termicamente stabili e F AmyP.

Inoltre i metodi con un basso positivo tasso generale come TMR e SMR possono essere utilizzati solo come monitoraggio.

