

ANNA STÓJ, ZDZISŁAW TARGOŃSKI, AGNIESZKA MALIK

METODY WYKRYWANIA ZAFALSZOWAŃ SOKÓW Z OWOCÓW JAGODOWYCH

Streszczenie

W artykule przedstawiono metody określania autentyczności soków z owoców jagodowych. Soki owocowe mają charakterystyczny skład chemiczny pozwalający na ich identyfikację. Do oznaczania składu chemicznego soków stosuje się metody chromatograficzne, enzymatyczne, SIRA-MS, SNIF-NMR. Podstawowym sposobem wykrywania zafalszowań soków jest porównywanie ich składu chemicznego z ustalonymi wartościami standardowymi.

Wstęp

Zafalszowania żywności mają swoją wielowiekową tradycję. Klasycznym tego przykładem jest dodawanie wody do wina. Z problematyką fałszowania żywności można się spotkać przy ocenie takich środków spożywczych, jak: napoje bezalkoholowe, wina, napoje wysokoalkoholowe, ocet, środki aromatyzujące, mięso, wyroby wędliniarskie, oleje i inne.

Zafalszowania soków owocowych stanowią poważny problem ekonomiczny. Dochody z tego rodzaju działalności mogą sięgać milionów dolarów. Natomiast konsument ponosi straty, gdyż oczekuje produktu pełnowartościowego, autentycznego, o określonych cechach żywieniowych.

Sposoby zafalszowania soków owocowych rozwijały się stopniowo, od prostego rozcieńczania wodą i wprowadzania tańszych dodatków takich, jak: cukier, kwasy organiczne, barwniki, innego typu soki owocowe, do bardziej wyrafinowanych metod wykorzystujących tzw. koktajle chemiczne, zaprojektowane tak, aby odpowiednio zamaskować proces fałszowania [13, 14, 18].

Postęp techniczny sprzyja postępowi w sposobach fałszowania, co z kolei wymaga stosowania coraz bardziej wysublimowanych technik analitycznych [15].

W krajach wysokoprzemysłowionych funkcjonują organizacje zajmujące się badaniem autentyczności soków owocowych. W oparciu o nowoczesne techniki analizy instrumentalnej i statystycznej ustalają one zawartości standardowe poszczególnych składników soków owocowych, uwzględniając fakt, że skład soków owocowych podlega wpływom wielu czynników takich, jak: odmiana owoców, stopień ich dojrzałości, rodzaj uprawy, stan pogody oraz przebieg procesu technologicznego. Association of the Industry of Juices and Nectars opracowała kodeks postępowania – Code of Practice przy ocenie soków owocowych [2].

Podstawowym sposobem wykrywania zafałszowań soków owocowych jest porównywanie ich składu chemicznego z ustalonymi wartościami standardowymi [15].

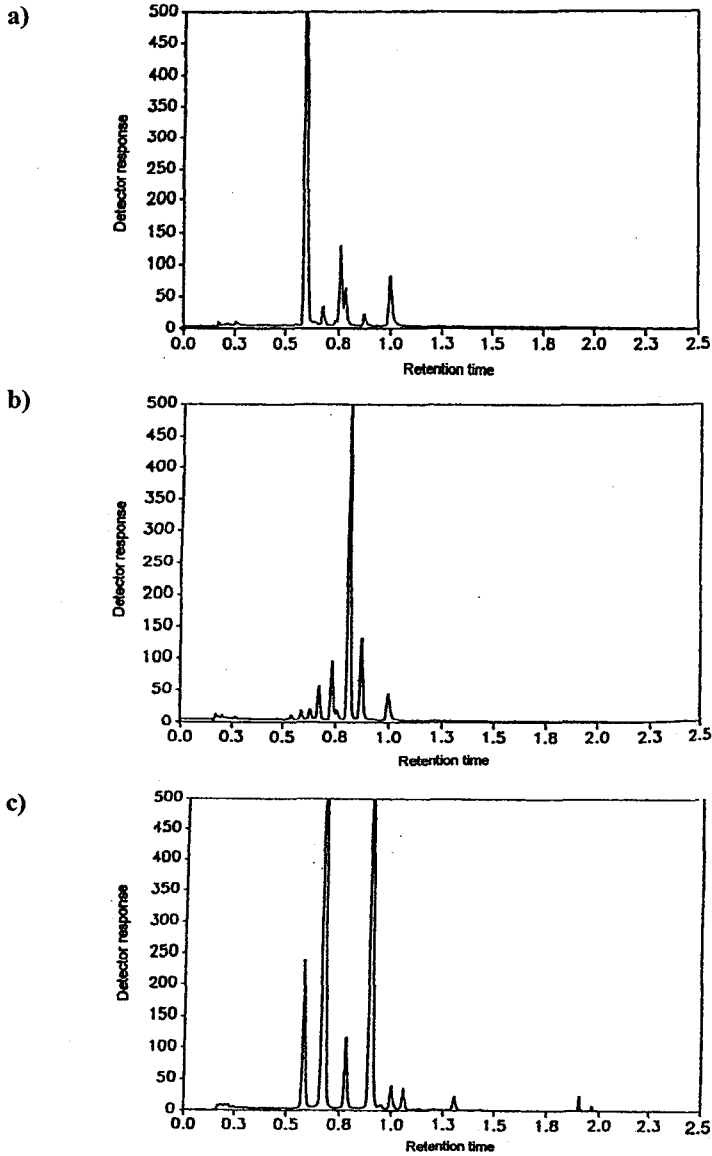
Analiza antocyjanów w sokach owocowych

Analiza antocyjanów służy do oceny autentyczności soków z owoców jagodowych, gdyż poszczególne soki różnią się ilością i rodzajem antocyjanów. Według Skrede i wsp. [16], w soku truskawkowym, w największej ilości występuje pelargonidyno-3-glukozyd. Sok z czarnej porzeczki zawiera głównie delfinidyno-3-rutynozyd i cyjanidyno-3-rutynozyd oraz mniejsze ilości delfinidyno-3-glukozydu i cyjanidyno-3-glukozydu. Natomiast charakterystycznym antocyjanem soku malinowego jest cyjanidyno-3-soforozyd [1].

Znanych jest wiele metod pozwalających oznaczyć antocyjany takich, jak: chromatografia bibułowa, chromatografia cienkowarstwowa i wysokosprawna chromatografia cieczowa. Nie ma wątpliwości, że technika HPLC jest najbardziej odpowiednia do oznaczania antocyjanów, spotyka się jednak wiele wariantów wykorzystania tej metody [8]. Przykład warunków rozdzielania antocyjanów podają Koswig i Hofsommer [10]:

- kolumna: Hypersil ODS, 250 x 4,6 mm, 5 μ m,
- temperatura: 40°C,
- wielkość przepływu: 1,0 ml / min,
- detekcja: detektor UV, 518 nm,
- eluenty: A – woda/ kwas mrówkowy (90:10); (v:v),
B – woda/ kwas mrówkowy/acetonitryl (40:10:50); (v:v:v),
- gradient:

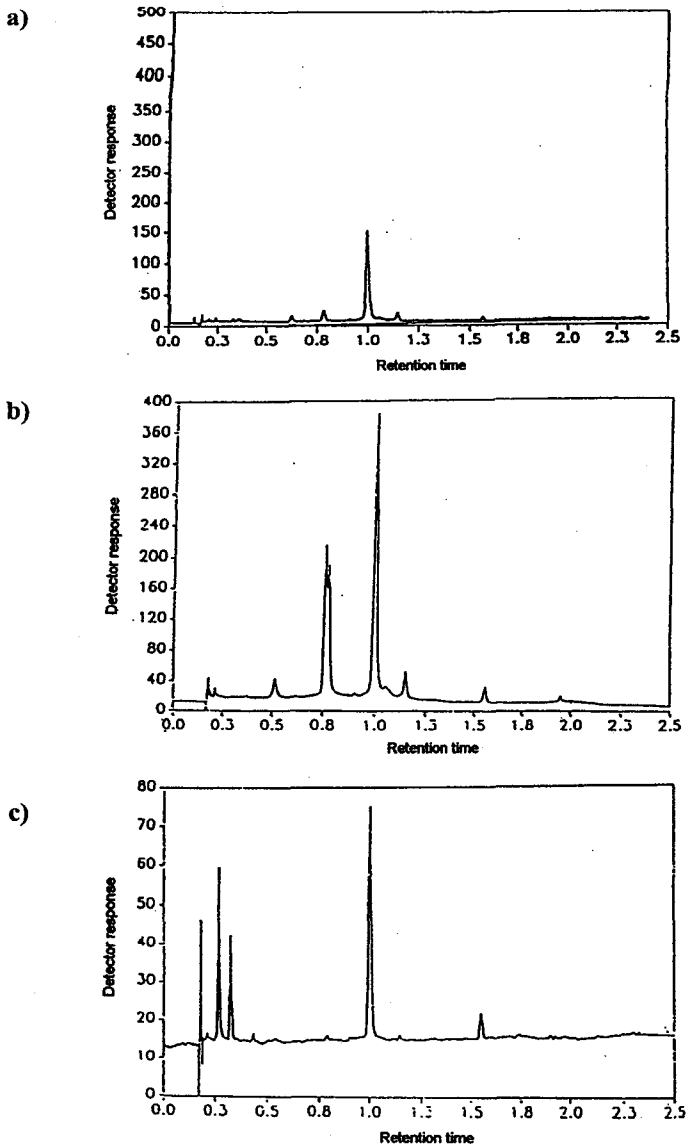
Czas [min]	%A	%B
0	88	12
26	70	30
35	0	100
38	0	100
43	88	12
45	88	12



Rys. 1. Chromatogramy antocyjanów soków [10].

Fig. 1. Chromatograms of anthocyanins in juices [10].

- a. z maliny
- a. from raspberry
- b. z czerwonej porzeczki
- b. from redcurrant
- c. z czarnej porzeczki
- c. from blackcurrant



Rys. 2. Chromatogramy antocyjanów soków [9].

Fig. 2. Chromatograms of anthocyanins in juices [9].

a. truskawkowego

a. strawberry

b. truskawkowego z dodatkiem soku z czarnego bzu

b. strawberry with addition of elderberry juice

c. truskawkowego z dodatkiem soku z buraka czerwonego

c. strawberry with addition of red beet juice

Każdy sok owocowy ma charakterystyczny profil chromatograficzny antocyjanów, tak zwany fingerprint, który pozwala na jego identyfikację (rys. 1). Poprzez porównanie wykresu nieznaney próbki z charakterystycznym wykresem autentycznego soku można stwierdzić czy analizowana próbka jest autentyczna czy zafałszowana (rys. 2). O skuteczności proponowanej metody świadczy zestawienie analiz autentycznych i zafałszowanych soków owocowych, podane w tab. 1. Istnieje możliwość popełniania błędów i nie rozpoznania soku zafałszowanego. Jednak należy podkreślić, że wszystkie próbki, które zostały określone jako autentyczne rzeczywiście nimi były [7, 8, 9, 10, 17].

Tabela 1

Zestawienie skuteczności analizy próbek autentycznych i zafałszowanych [8].
Evaluation of usability of HPLC method for juices adulteration analyses [8].

Liczba próbek Number of samples	Próbki soków Samples of juices	Ocena / Evaluation			
		prawidłowa correct	zła wrong	wątpliwa suspicious	niemożliwa impossible
5	z czerwonych winogron /red grape/	3	-	1	1
9	z czarnej porzeczki /black currant/	6	1	1	1
5	z wiśni /cherry/	5	-	-	-
10	autentyczne /authentic/	7	-	1	2
9	zafałszowane /adulterated/	7	2	-	-

Analizując antocyjany należy zwrócić uwagę na fakt, że są one związkami mało stabilnymi i ich zawartość zmienia się w czasie procesu technologicznego i przechowywania. Największe zmniejszenia zawartości antocyjanów (o 50%) obserwowano podczas obróbki termicznej, ale miało to niewielki wpływ na obraz chromatograficzny. Typowy chromatogram otrzymano po wszystkich etapach procesu technologicznego. Natomiast dłuższe przechowywanie powodowało znaczne obniżenie wysokości pików. Piki stopniowo obniżały się, a następnie zanikały, co świadczyło o polimeryzacji antocyjanów [8].

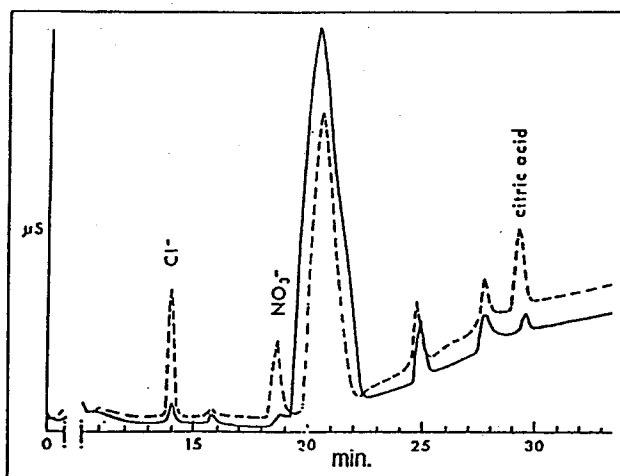
Analiza zawartości kwasów organicznych w ocenie zafałszowań soków owocowych

Podstawowymi kwasami organicznymi występującymi w sokach owocowych są kwasy: cytrynowy, jabłkowy i izocytrynowy. Durst i Wrolstad [5] określili średnie ich zawartości w sokach malinowych z różnych odmian malin. Wynosiły one odpowiednio 1,7 g/100 ml, 66,1 mg/100 ml i 44,0 mg/100 ml. Zawartość wymienionych kwasów

organicznych oraz stosunek kwasu cytrynowego do kwasu izocytrynowego są różne dla różnych soków owocowych, stąd ich przydatność w ocenie zafałszowań tych soków.

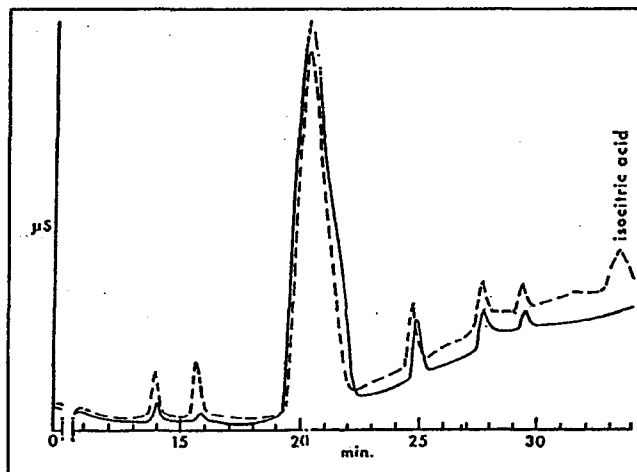
Obecnie do oznaczania składu kwasów organicznych wykorzystuje się wysoko-sprawną chromatografię cieczową i metody enzymatyczne. Zaletą HPLC jest możliwość równoczesnego oznaczania i identyfikacji różnych kwasów organicznych, co pozwala na uzyskanie informacji zarówno o autentyczności produktu, jak i o jego zmianach mikrobiologicznych. W metodach HPLC jako detektory wykorzystuje się najczęściej detektor refraktometryczny lub detektor UV. Zastosowanie tych detektorów wymaga procedur oczyszczających w celu eliminacji interferujących cukrów i związków fenolowych, co negatywnie wpływa na szybkość i prostotę oznaczeń. Ten problem może być wyeliminowany poprzez użycie detektora konduktometrycznego w połączeniu z chemicznym supresorem chromatografii jonowej. Na rys. 3. i rys. 4. przedstawiono chromatogramy autentycznych soków wiśniowych oraz soków wiśniowych z dodatkiem 10% soku z buraka czerwonego i 10% soku z czarnej jagody. Warto podkreślić, że ta metoda pozwala na równoczesną identyfikację i oznaczanie jonów nieorganicznych, w szczególności jonów chlorkowych i azotanowych [6].

Do oznaczania kwasów organicznych częściej wykorzystuje się metody enzymatyczne, charakteryzujące się wysoką specyficznością i dokładnością [12].



Rys. 3. Chromatogramy autentycznego soku wiśniowego (—) i soku wiśniowego z 10% dodatkiem soku z buraka czerwonego (---). Wzrost stężenia kwasu cytrynowego, chlorków i azotanów spowodowany jest dodatkiem soku z czerwonego buraka [6].

Fig.3. Chromatograms of authentic cherry juice (—) and cherry juice with 10% of red beet juice (---). Citric acid, chlorides and nitrates increase due to the addition of red beet juice [6].



Rys. 4. Chromatogramy autentycznego soku wiśniowego (–) i soku wiśniowego z 10% dodatkiem soku z czarnej jagody (---). Obserwowany jest wzrost stężenia kwasu izocytrynowego pochodzącego z czarnej jagody [6].

Fig. 4. Chromatograms of authentic cherry juice (–) and cherry juice with 10% of blackberry juice (---). Isocitric acid increases due to the addition of blackberry juice [6].

Wykrywanie dodatku cukru do soków owocowych

Soki znajdujące się w handlu często są otrzymywane przez rozcieńczenie koncentratów soków owocowych do naturalnych stężeń. W pewnych przypadkach producenci dodają więcej wody niż to wynika z przyjętych norm.

W celu maskowania rozcieńczenia wodą, do soku dodają cukry pochodzenia przemysłowego i kwasy organiczne. W większości soków owocowych zawartość naturalnych cukrów jest ograniczona do glukozy, fruktozy i sacharozy. W celu odróżnienia cukru naturalnego od cukru dodanego stosuje się spektrometrię masową (SIRA-MS – Stable Isotope Ratio Analysis by Mass Spectrometry), pozwalającą określić stosunki izotopów: $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ i $^2\text{H}/^1\text{H}$. Udział izotopów porównuje się ze standardami, którym jest w przypadku tlenu i wodoru woda morska (SMOW – Standard Medium Ocean Water), a w przypadku węgla – belemnit (PDB – Pee Dee Belemnite). Metody izotopowe określają dokładnie odchylenie od przyjętych standardów:

$$\delta^{18}\text{O} = (R_{\text{próbka}} - R_{\text{SMOW}} / R_{\text{SMOW}}) 1000 \quad [13]$$

$$R_{\text{SMOW}} = 0,0039948$$

$$\delta\text{D} = (R_{\text{próbka}} - R_{\text{SMOW}} / R_{\text{SMOW}}) 1000 \quad [13]$$

$$R_{\text{SMOW}} = 0,000316$$

$$\delta^{13}\text{C} = (R_{\text{próbkka}} - R_{\text{PDB}}/R_{\text{PDB}}) 1000 \quad [13]$$
$$R_{\text{PDB}} = 0,011237$$

$R_{\text{próbkka}}$ – stosunek izotopów w próbce,

$R_{\text{SMOW}}, R_{\text{PDB}}$ – stosunek izotopów w standardach.

W roślinach udział poszczególnych izotopów jest charakterystyczny dla danego gatunku, a odchylenia mogą być spowodowane różnymi czynnikami jak:

- różnice w metabolizmie,
- pochodzenie,
- niektóre procesy fizyczne np. parowanie.

Owoce jagodowe, z których otrzymuje się soki, należą do szlaku metabolicznego C_3 . W takich sokach można wykryć dodatek cukrów pochodzących z roślin szlaku C_4 (trzcina cukrowa, kukurydza), gdyż stosunek izotopów węgla w roślinach szlaku C_3 jest mniejszy o około 29 promili niż w roślinach szlaku C_4 . Nie można natomiast tą metodą wykryć zafałszowania soków z owoców jagodowych, polegającego na dodatku cukru buraczanego, gdyż burak cukrowy należy również do roślin C_3 . W tym przypadku, jak również do wykrywania soków otrzymanych przez rozcieńczenie koncentratów, stosuje się metodę pomiaru stosunku izotopów tlenu $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ i wodoru $^2\text{H}/^1\text{H}$. Wówczas należy skorzystać z faktu, że woda w owocach zawiera więcej izotopu tlenu ^{18}O i deuteru w porównaniu z wodami gruntowymi [4, 13].

Dodatek cukru buraczanego do soków z owoców jagodowych można wykryć stosując metodę SNIF-NMR (Site-Specific Natural Isotope Fractionation Nuclear Magnetic Resonance), czyli metodę wyznaczania względnego obsadzenia frakcji izotopów przy wykorzystaniu jądrowego rezonansu magnetycznego. Opiera się ona na fakcie, że zawartość deuteru w specyficznych miejscach cząsteczki cukru jest większa w cukrach naturalnie występujących, aniżeli w cukrze buraczanym.

Soki owocowe poddaje się fermentacji, a otrzymany alkohol destyluje się ilościowo i analizuje za pomocą spektrometru NMR. Rejestrowane są ilości deuteru związanego z węglem w grupach metylowych etanolu. Ilości te są mniejsze w przypadku dodania cukru buraczanego [11].

Metody izotopowe są dość zawiłe i niełatwe w rutynowej analizie, chociaż w pewnych przypadkach niezbędne. Dlatego nadal ważnymi pozostają inne metody kontroli autentyczności cukrów w sokach owocowych, które są łatwiejsze w użyciu i tańsze. Wśród metod chromatograficznych jedną z najlepszych jest analiza cukrów wykorzystująca pulsacyjny detektor amperometryczny i ulepszone kolumny anionowymienne. Pozwala ona na detekcje oligosacharydów występujących w sokach owocowych i buraku cukrowym, nawet w stężeniu 40 ppm [3].

Zawartość cukrów można też oznaczyć metodami enzymatycznymi. Wskaźnikiem zafałszowań jest stosunek glukozy do fruktozy, który wg Kodeksu Postępowania

AIJN [2] powinien wynosić dla autentycznego soku truskawkowego 0,75–1, soku malinowego 0,6–0,95, z czarnej porzeczki 0,6–0,9.

Oznaczanie składu aminokwasowego soków jako kryterium oceny ich autentyczności

Połączenie soku z obcym, często tańszym rodzajem soku owocowego może być rozpoznane poprzez analizę spektrum wolnych aminokwasów. Stosunkowo łatwo jest wykryć dodatek obcych aminokwasów do takiej mieszaniny. Nadmierne rozcieńczenie soków powoduje obniżenie stężenia aminokwasów, co pozwala wykryć ten rodzaj zafałszowania.

Spośród 21 wolnych aminokwasów wyróżniono 8, które stanowią podstawę do rozróżniania soków owocowych; są to: prolina, kwas asparaginowy, seryna, asparagina, kwas glutaminowy, alanina, kwas γ -aminobutyrowy i arginina. Reprezentują one około 90 do 95% wolnych aminokwasów w większości soków owocowych i odpowiadają za charakterystyczne spektrum aminokwasów.

Analizę składu aminokwasowego wykonuje się z wykorzystaniem automatycznego analizatora aminokwasów metodą chromatografii cieczowej. Wybrane pojedyncze aminokwasy można oznaczyć także prostszymi metodami chemicznymi lub enzymatycznymi. Opierając się na analizie proliny można wykryć zafałszowania tanim koncentratem winogronowym soków z czarnej porzeczki, czerwonej porzeczki, truskawki, maliny, jeżyny, czarnej borówki. Wzrastające zawartości proliny we względnie deficytowych sokach z czarnej i czerwonej porzeczki oraz maliny wskazują na manipulacje tymi sokami. Inna jest sytuacja w przypadku soku wiśniowego, w którym prolina występuje w sposób naturalny w stężeniu podobnym jak w soku winogronowym. Jednakże wykorzystanie całego spektrum aminokwasowego pozwala na weryfikację soku wiśniowego – przez dodanie soku winogronowego do soku wiśniowego zawartość asparaginy znacznie spada, podczas gdy zawartość argininy znacznie wzrasta.

Charakterystyczną wartością pozwalającą udowodnić rozcieńczenie soku jest liczba formolowa. Odzwierciedla ona zawartość wolnych aminokwasów w soku i jest pośrednią miarą sumy wolnych aminokwasów [13]. Oznaczanie liczby formolowej polega na doprowadzeniu soku do pH 8,0, dodaniu roztworu formaldehydu i ponownym doprowadzeniu roztworu do pH 8,0 za pomocą 0,1N NaOH. Liczba formolowa jest więc ilością ml 0,1N NaOH potrzebnego na doprowadzenie 100 ml soku do pH 8,0. Wartość współczynnika jest zmienna dla różnych soków owocowych. W przypadku soku z czarnej porzeczki wynosi 7–30 ml NaOH/100ml, soku z maliny 10–50, a z truskawki 5–26 [2].

Podsumowanie

Analizując soki z owoców jagodowych pod względem zafałszowań, należy oznaczyć zawartość wielu składników chemicznych i porównać je z wartościami standardowymi. Osąd o autentyczności nie może ograniczać się do pojedynczego parametru. Należy również pamiętać, że skład soków owocowych podlega wpływom wielu czynników i nie można wykluczyć wyjątkowych odchyień powstałych w ekstremalnych warunkach lub podczas procesu technologicznego. W tym przypadku sok nie musi być zafałszowany. Dlatego powinny być wykonane dalsze analizy, aby potwierdzić czy odchylenia są specyficzne dla surowca lub związane z procesem produkcyjnym, czy niedeklarowanymi dodatkami.

LITERATURA

- [1] Boyles M.J., Wrolstad R.E.: Anthocyanin composition of red raspberry juice: influences of cultivar, processing and environmental factors, *J. Food Sci.*, **58** (5), 1993, 1135.
- [2] Code of practice for evaluation of fruit and vegetable juices. A.I.J.N., Brussels, 1996, 6, 5.
- [3] Corradini C., Cristalli A., Corradini D.: Determination of carbohydrates in fruit-based beverages by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD), *Fruit Processing*, **8**, 1995, 261.
- [4] Czapski J., Tyma P.: Metody wykrywania zafałszowań przetworów owocowych, *Przem. Ferm. i Owoc.-Warz.*, **10**, 1996, 22.
- [5] Durst R.W., Wrolstad R.E.: Sugar, nonvolatile acid, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio and mineral analysis for determination of the authenticity and quality of red raspberry juice composition, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **78** (5), 1995, 1195.
- [6] Gherardi S., Saccani G., Trifir A., Calza M.: Use of ion chromatography for organic acid determination in fruit juices, *Fruit Processing*, **7**, 1995, 206.
- [7] Goiffon J.P., Brun M., Bourrier M.J.: High performance liquid chromatography of red fruit anthocyanin, *J. Chromatogr.*, **537**, 1991, 101.
- [8] Hofsommer H.J.: Determination of anthocyanins and carotinoids in fruit juices, *Fruit Processing*, **4**, 1995, 90.
- [9] Hofsommer H.J.: Progress in the authenticity-assurance for fruit juices. Raport on SCF-Symposium, Parma, Italy, 1994.
- [10] Koswig S., Hofsommer H.J.: HPLC-Methode zur Untersuchung von Anthocyanen in Buntsäften und anderen gefärbten Lebensmitteln, *Flüssiges Obst.*, **62** (4), 1995, 125.
- [11] Martin G.G., Wood R., Martin G.J.: Detection of added beet sugar in concentrated and single strength fruit juices by deuterium nuclear magnetic resonance (SNIF-NMR): collaborative study, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **79** (4), 1996, 917.
- [12] *Methods of enzymatic bioanalysis and food analysis.* Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, Mannheim.
- [13] Nagy S., Attaway J.A., Rhodes M.E.: *Adulteration of fruit juice beverages.* Marcel Dekker Inc., New York, 1988, 3, 21, 109, 125.
- [14] Nagy S.: Economic adulteration of fruit beverages. *Fruit Processing*, **4**, 1997, 125.

- [15] Obiedziński M.: Urzędowa kontrola żywności w Unii Europejskiej, *Przem. Spoż.*, 12, 1998, 37.
- [16] Skrede G., Wrolstad R.E., Lea P., Enersen G.: Color stability of strawberry and blackcurrant syrups, *J. Food Sci.*, 57 (1), 1992, 172.
- [17] Versari A., Barbanti D., Biesenbruch S., Farnell P.J.: Analysis of anthocyanins in red fruits by use of HPLC/spectral array detection, *Ital. J. Food Sci.*, 9 (2), 1997, 141.
- [18] Wrolstad R.E.: Ethical issues concerning food adulteration, *Food Technol.*, 5, 1991, 108.

DETECTION OF ADULTERATIONS IN JUICES FROM BERRY FRUITS

S u m m a r y

Methods of analysis of authenticity juices from berry fruits were presented in the paper. Characteristic compounds present in fruit juices enable their identification. To assay chemical composition of fruit juices chromatographic, enzymatic, SIRA-MS, SNIF-NMR methods are employed. Comparison of chemical composition with determined standards is a basic way of detection adulterations of juices. ☒