

# *carbohidratos de la miel mediante tratamiento con carbón activo y levaduras para la detección de adulteraciones*

Ana I. Ruiz Matute, María L. Sanz\*, Isabel Martínez-Castro

Instituto de Química Orgánica General. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) Juan de la Cierva, 3, 28006 Madrid (España)

*A comparative study of honey carbohydrate fractionation using active charcoal and yeasts to detect honey adulteration*

*Estudi comparatiu del fraccionament dels carbohidrats de la mel mitjançant tractament amb carbó actiu i llevats per a la detecció d'adulteracions*

*Recibido: 1 de agosto de 2007; revisado: 12 de febrero de 2008; aceptado: 11 de marzo de 2008*

## RESUMEN

Recientemente se ha descrito la utilidad de los anhídridos de difructosa (DFAs) como buenos marcadores para la detección de adulteraciones de miel con jarabes de alto contenido en fructosa (HFCS) y de azúcar invertido (IS). Sin embargo, para la detección de estos compuestos es necesario realizar un fraccionamiento previo de los carbohidratos de estas muestras, dado que la alta concentración de monosacáridos (glucosa y fructosa) presentes en la miel dificulta el análisis de los compuestos minoritarios. Por tanto, el objetivo de este trabajo se basó en la comparación de un tratamiento con levaduras propuesto con anterioridad y un fraccionamiento con carbón activo para eliminar la fracción de monosacáridos, concentrando así los compuestos minoritarios de la miel y en concreto los DFAs presentes en muestras adulteradas. Se llevó a cabo la optimización de dichos métodos para conseguir el mayor enriquecimiento en DFAs comprobándose que ambos son útiles para la detección de adulteraciones de miel de hasta un 5% de HFCS e IS.

**Palabras clave:** Adulteraciones. Carbón activo. DFAs. Jarabes. Levaduras. Miel.

## SUMMARY

The utility of difructose anhydrides (DFAs) as good markers of honey adulteration with high fructose corn syrups (HFCS) and invert syrups (IS) has been recently described. However, a previous fractionation of carbohydrates in these samples needs to be carried out for the detection of DFAs considering that the high concentration of monosaccharides (glucose and fructose) makes the analysis of minor compounds difficult. Therefore, in this work two different procedures (a yeast treatment previously suggested and an activated charcoal fractionation) were compared to remove the monosaccharide fraction and

to concentrate the minor compounds of honey, specifically DFAs present in adulterated samples. The optimization of these methods was carried out to obtain the greatest enrichment of DFAs; the usefulness of both procedures to detect honey adulterations up to 5% with HFCS and IS was proved.

**Key words:** Adulteration. Activated charcoal. DFAs. Syrups. Yeast. Honey.

## RESUM

Recentment, s'ha descrit la utilitat dels anhídrids de difructosa (DFAs) com a bons marcadors per a la detecció d'adulteracions de mel amb xarops d'alt contingut en fructosa (HFCS) i de sucre invertit (IS). Tanmateix, per a la detecció d'aquests compostos és necessari realitzar un fraccionament previ dels carbohidrats d'aquestes mostres, donat que l'alta concentració de monosacàrids (glucosa i fructosa) presents a la mel dificulta l'anàlisi dels compostos minoritaris. Per tant, l'objectiu d'aquest treball és comparar un tractament amb llevats proposat amb anterioritat i un fraccionament amb carbó actiu per eliminar la fracció de monosacàrids, concentrant així els compostos minoritaris de la mel, i en concret els DFAs presents en mostres adulterades. Es porta a terme l'optimització d'aquests mètodes per aconseguir el major enriquiment en DFAs, comprovant que ambdós són útils per a la detecció d'adulteracions de mel de fins a un 5% de HFCS i IS.

**Mots clau:** Adulteracions. Carbó actiu. DFAs. Xarops. Llevats. Mel.

\* Email: [mlsanz@iqog.csic.es](mailto:mlsanz@iqog.csic.es)

## 1. INTRODUCCIÓN

La miel es un producto biológico complejo cuya composición es altamente variable dependiendo de su origen (néctar o mielada), características climatológicas y edáficas de la zona de recogida, prácticas apícolas, condiciones de procesado y almacenamiento, etc.<sup>(1)</sup> Los carbohidratos, presentes en la miel en elevada proporción (más del 95% de la materia seca), son responsables tanto del alto contenido energético de este alimento como de su característico sabor dulce. Algunos azúcares tienen su origen en el propio néctar o mielada, mientras que otros son debidos a la acción de las enzimas segregadas por las abejas. Los azúcares mayoritarios en la miel son la glucosa y la fructosa, seguidos en menor proporción por una larga serie de di- y oligosacáridos, formados por unidades de dichos monosacáridos<sup>(2,3)</sup>.

En la actualidad, los productos alimenticios tienen que satisfacer numerosos criterios de calidad y certificación, previos a su comercialización. La miel no es una excepción y su composición y procesado están regulados por Normas de Calidad<sup>(4)</sup>.

La miel es un alimento de relativo alto coste en el mercado y por ello, es susceptible de ser adulterada por adición de productos de bajo precio. Debido a la variedad que presenta en su composición, la detección de adulteraciones puede ser difícil. Además, la producción de jarabes con composiciones cada vez más parecidas a las de la miel<sup>(5)</sup>, dificulta mucho su detección y hace necesario el desarrollo de nuevas metodologías cada vez más sensibles.

La miel puede ser adulterada por la adición directa de sustancias edulcorantes de menor valor: caramelo, melazas, jarabes de glucosa (CS), jarabes de alto contenido en fructosa (HFCS), jarabes de azúcar invertido (IS), etc. o alimentando a las abejas con productos azucarados para aumentar el rendimiento<sup>(6)</sup>. Se ha demostrado que la alimentación artificial puede producir modificaciones químicas en la miel parecidas a las que se producen por adición directa de jarabes<sup>(7)</sup>; sin embargo, estas prácticas no están estrictamente controladas.

En los últimos años se han propuesto distintos métodos en la bibliografía para la detección de adulteraciones en miel, tanto mediante el empleo de técnicas espectroscópicas<sup>(8)</sup>, como isotópicas<sup>(9)</sup> o calorimétricas<sup>(10)</sup>. Sin embargo, son las técnicas cromatográficas las que permiten alcanzar los mejores resultados<sup>(11)</sup>. Recientemente, se ha propuesto un método para la detección de adulteraciones en miel con HFCS e IS empleando cromatografía de gases (GC)<sup>(12)</sup>. Gracias al estudio de los componentes minoritarios de los jarabes, se han podido detectar adulteraciones de hasta un 5% de jarabe. Para poder llevar a cabo estos análisis es necesario eliminar previamente la fracción de monosacáridos, ya que impiden el estudio de aquellos compuestos que se encuentran en menor proporción. Sin embargo, el método de fraccionamiento propuesto implica el uso de levaduras durante periodos largos de incubación. Es por tanto de gran interés la elección de un método de fraccionamiento apropiado tanto por su reproducibilidad, exactitud y precisión, como por su sencillez y rapidez de análisis para poder ser establecido como método de rutina.

En este trabajo se ha procedido a la comparación del uso de carbón activo como técnica de fraccionamiento de los carbohidratos de la miel con el tratamiento con levaduras anteriormente descrito (Ruiz-Matute *et al.*, 2007) con objeto de determinar cual ofrece las mayores ventajas a la hora de detectar adulteraciones en miel con HFCS e IS. Para ello es necesaria una optimización previa del método de fraccionamiento con carbón activo que permitiese recuperar la mayor cantidad de anhídridos de difructosa (DFAs), marcadores propuestos para la detección de dichas adulteraciones.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Patrones

Los siguientes patrones: celobiosa, erlosa, fructosa, gentiobiosa, glucosa, isomaltosa, 1-kestosa, kojibiosa, laminaribiosa, maltosa, melecitosa, nigerosa, panosa, rafinosa y sacarosa, así como fenil- $\beta$ -glucósido (patrón interno) fueron adquiridos a Sigma Chemical Co. (St. Louis, US). La maltulosa procedió de Aldrich Chem. Co (Milwaukee, WI, US) y leucrosa, melibiosa, palatinosa,  $\alpha, \alpha$ -trehalosa,  $\alpha, \beta$ -trehalosa y turanosa de Fluka (Madrid, España). Una muestra de trehalulosa fue cedida por el Dr. Wach de la compañía Südzucker (Mannheim, Alemania) y otra de theanderosa por el Dr. G.R. Côté (USDA, Peoria, US).

### 2.2. Muestras

Un jarabe de alto contenido en fructosa con un grado de isomerización de la glucosa del 80% (HFCS) y un jarabe de azúcar invertido de caña (IS) fueron cedidos por la empresa Moreno Dólera S.L.

Se emplearon también dos mieles españolas: una miel de néctar (M1) y una miel de mielato (M2) ambas obtenidas directamente de los apicultores. Dichas mieles fueron intencionadamente adulteradas con los jarabes HFCS e IS en proporciones del 5, 10 y 20%.

### 2.3. Técnicas de fraccionamiento

#### 2.3.1. Tratamiento con levaduras

Se utilizó levadura de panadería comercial (*Saccharomyces cerevisiae*) en polvo de la marca Maizena (Leioa, Vizcaya, España).

Se prepararon disoluciones al 20% de la miel, mielato, jarabes y muestras adulteradas en agua Milli-Q. A continuación, se añadieron 0,25 g de levadura a cada muestra y se incubaron a 30 °C con agitación. La toma de muestra se realizó a las 0, 24, 52 y 72 h. Las muestras se filtraron y se centrifugaron para obtener una disolución limpia de levaduras.

#### 2.3.2. Tratamiento con carbón activo

El fraccionamiento de los carbohidratos mediante tratamiento con carbón activo se llevó a cabo siguiendo dos ensayos distintos basados en el método de Morales y col.<sup>(13)</sup>.

– Ensayo 1: 0,5 g de cada una de las muestras indicadas anteriormente se disolvieron en 100 mL de una mezcla etanol:agua 10:90 (v/v) y se agitaron con 3 g de carbón activo (Darco G60, 100 mesh, Sigma) durante 30 min. Después de la agitación la muestra se filtró a vacío y el carbón activo se lavó con 25 mL de la disolución de etanol:agua 10:90 (v/v).

– Ensayo 2: similar al Ensayo 1 pero empleando una mezcla de etanol:agua 1:99 (v/v) para la eliminación de monosacáridos.

A continuación, y en ambos ensayos, se extrajeron los oligosacáridos adsorbidos en el carbón activo mediante agitación durante 30 min en 100 mL de etanol al 50% (v/v) y un posterior lavado con 25 mL de una disolución de etanol en la misma proporción. Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente. Tras la eliminación del carbón activo por filtración, la muestra se evaporó a sequedad en un rotavapor, y se reconstituyó posteriormente con 5 mL de agua Milli Q. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

#### 2.4. Análisis cromatográfico de las muestras

La determinación de los carbohidratos se realizó a través del análisis de los derivados silylados de sus oximas<sup>(9)</sup>. 1 g de muestra se disolvió en 25 mL de una mezcla de meta-

sol:agua 80:20 (v/v). Se tomó 0,5 mL de cada disolución y se le añadió 0,5 mL de una disolución de fenil- $\beta$ -D-glucósido (1 mg/mL) como patrón interno. Se evaporó hasta sequedad a vacío. A la muestra seca se le añadieron 0,35 mL de una disolución al 2,5% de cloruro de hidroxilamina en piridina y se mantuvo a 75 °C durante 30 min para la formación de las oximas. La sililación se llevó a cabo añadiendo a la mezcla anterior 0,35 mL de hexametilidisilazano y 35  $\mu$ L de ácido trifluoroacético, calentando a 45 °C durante 30 min. La mezcla obtenida se centrifugó a 7000 g durante 5 min a 5 °C, inyectándose 1  $\mu$ L del sobrenadante.

Los análisis se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases HP-5890 (Agilent, Palo Alto, CA) con detector de ionización de llama (FID) en modo split (1:20) usando nitrógeno como gas portador. Se utilizó una columna de metilsilicona (fase SPB-1 de Supelco, Bellefonte, PA) de 25 m  $\times$  0,25 mm d.i.  $\times$  0,25  $\mu$ m en las siguientes condiciones: La temperatura del inyector y el detector fue de 300 °C. La temperatura del horno se mantuvo 15 minutos a 200 °C, se incrementó hasta 270 °C a una velocidad de 5 °C/min, a continuación a 1 °C/min hasta 290 °C y siguió aumentando a 15 °C/min hasta 300 °C, donde se mantuvo 30 minutos. La adquisición y tratamiento de datos se llevó a cabo empleando el programa Chrom Card 2.20 (CE Instruments, Milan, Italia).

Con el fin de ayudar a la identificación de los compuestos, las muestras se inyectaron también en un cromatógrafo de gases (Agilent 6890 Series) acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de cuadrupolo (Agilent 5973 Network). La columna y el programa de temperatura utilizados fueron similares a los descritos en el apartado anterior, utilizando helio como gas portador. La temperatura de la cámara de ionización fue de 280 °C. La ionización tuvo lugar por impacto electrónico a 70 eV y el rango de masas detectadas fue de 60-600 u.m.a.

El análisis cuantitativo se realizó utilizando el método del patrón interno empleando los datos obtenidos por GC-FID. Se obtuvieron diferentes factores de respuesta frente al fenil- $\beta$ -D-glucósido para los monosacáridos, disacáridos y trisacáridos, calculados mediante inyecciones conjuntas de este compuesto con los patrones comerciales citados en un intervalo de concentraciones que cubre los valores esperados en las muestras. Para los anhidridos de difructosa (DFAs) se consideró un factor de respuesta igual a 1, debido a la ausencia de patrones comerciales. Los disacáridos presentan problemas de coelución entre ellos por lo que su integración se llevó a cabo utilizando un método previamente desarrollado en nuestro laboratorio<sup>(14)</sup>. La reproducibilidad de ambos tratamientos (levaduras y carbón activo) se evaluó mediante el fraccionamiento y posterior análisis de una muestra de miel por quintuplicado. Las desviaciones estándar obtenidas fueron aceptables en ambos casos, aunque ligeramente inferiores cuando se emplearon los tratamientos con carbón activo.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para poder estudiar la fracción de componentes minoritarios tanto en la miel de néctar (M1) y el mielato (M2) como en los jarabes, estas muestras fueron sometidas a un tratamiento con carbón activo empleando los dos ensayos mencionados en la sección de materiales y métodos. La figura 1 muestra los perfiles cromatográficos de los carbohidratos de la miel de mielato sin tratamiento (M2) y sometida a los ensayos 1 y 2, respectivamente.

Tras el tratamiento con carbón activo mediante el ensayo 1, la fracción de monosacáridos (glucosa + fructosa) se redujo apreciablemente, de un contenido inicial de

593,0 mg/g miel para la muestra M1 y 462,9 mg/g miel para la M2 a 7,9 y 5,2 mg/g, respectivamente (Tabla 1). Los disacáridos (Fig. 1B) también disminuyeron en gran medida su concentración, al pasar de un contenido inicial de 163,5 y 241,8 mg/g a 9,2 y 13,9 mg/g para las muestras M1 y M2 (Tabla 1). Algunos carbohidratos como la  $\alpha$ , $\beta$ -trehalosa, nigerosa y maltosa aumentaron su porcentaje con respecto a la miel original durante el tratamiento, sin embargo, otros como la isomaltosa, turanosa y trehalulosa presentaron una disminución acusada (Figura 2). Los trisacáridos, mostraron un menor descenso relativo respecto a las muestras sin tratar, llegando a constituir el 43% del total de carbohidratos de la muestra M2 (Tabla 1). La 1-kestosa fue la que se vio más afectada, disminuyendo de un 24% a un 15% del total de azúcares cuantificados en la muestra M1. La erlosa por el contrario fue la que presentó una recuperación mayor.

En el ensayo 2 (Tabla 1) la disminución del contenido en monosacáridos en ambas muestras fue bastante acusada

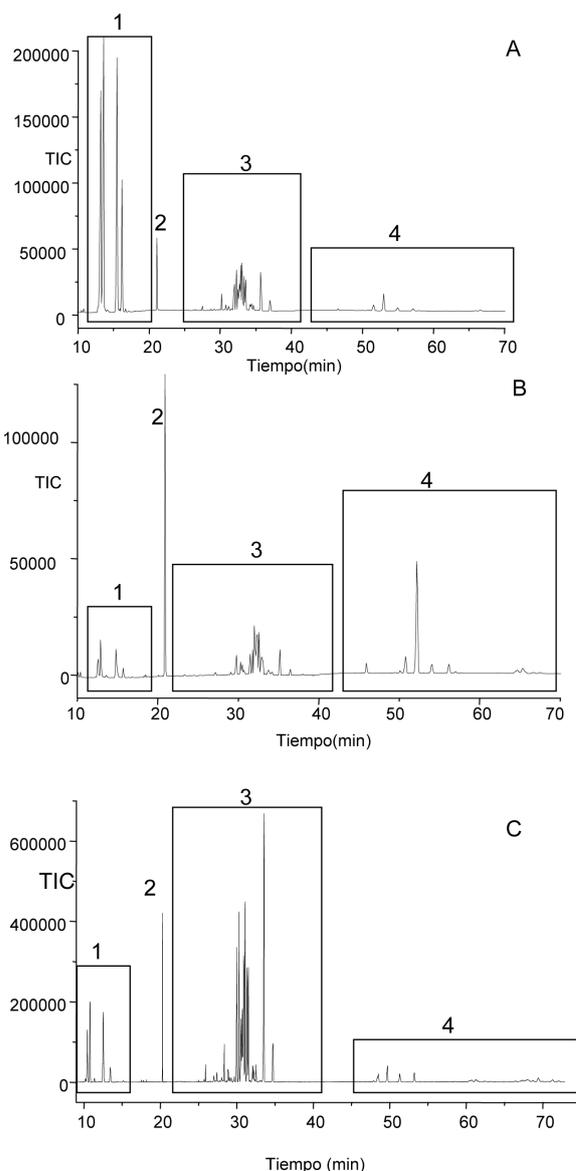
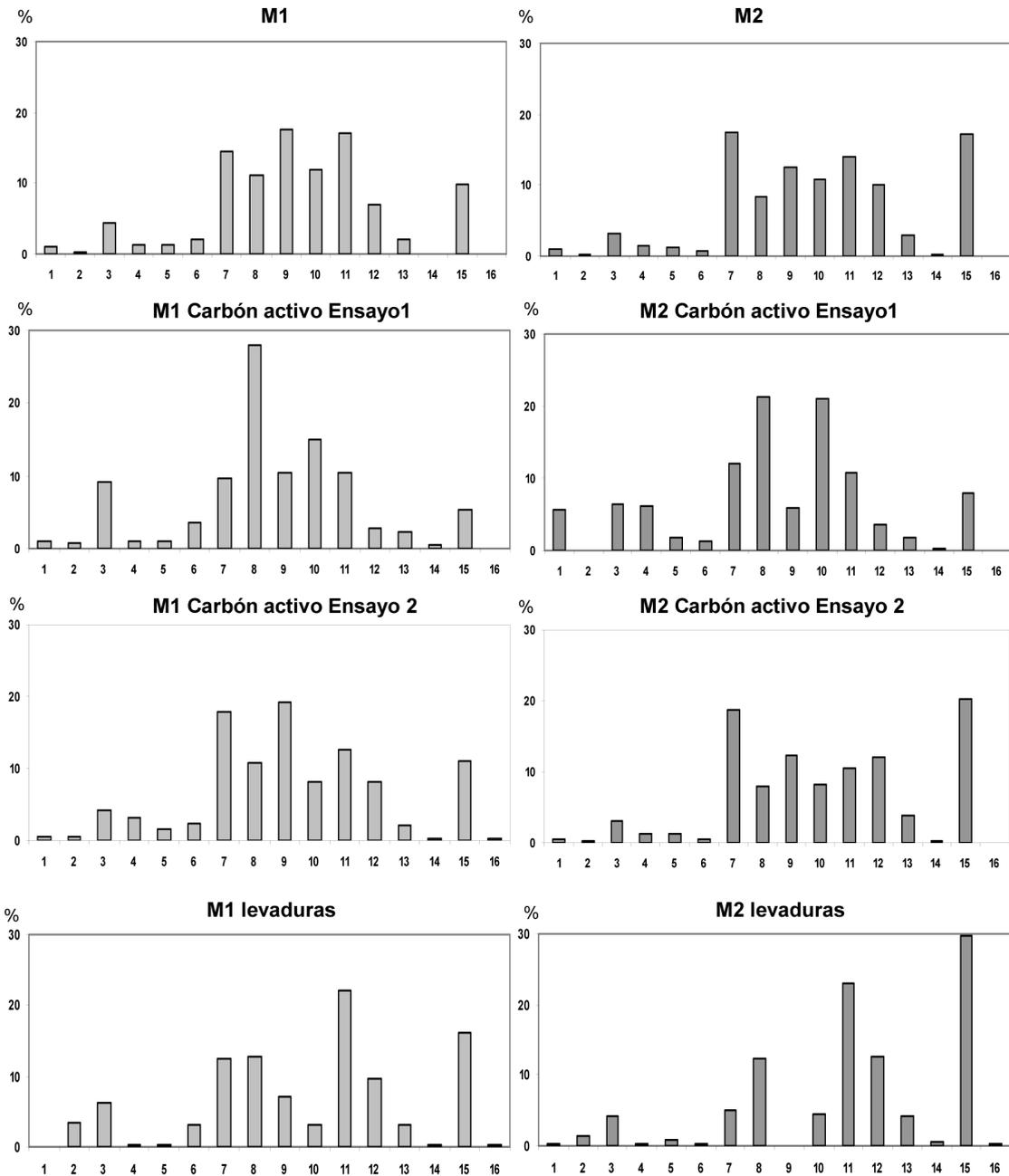


Figura 1. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC de los O-TMS de mono-, di- y trisacáridos de la miel M2 sin ningún tratamiento (A) y tratada previamente con carbón activo mediante: ensayo 1 (B) y ensayo 2 (C). 1.- monosacáridos; 2.- patrón interno; 3.- disacáridos; 4.- trisacáridos.

**TABLA I**

**Concentración (mg/g) de mono- (MS), di- (DS) y trisacáridos (TS) de las mieles M1 y M2 antes y después de los tratamientos con carbón activo y levaduras (n=2).**

	mg/g miel							
	M1				M2			
	MS	DS	TS	total	MS	DS	TS	total
Sin tratamiento	593,0	163,5	16,9	773,4	462,9	241,8	41,4	746,1
Carbón activo Ensayo 1	7,9	9,2	10,3	27,4	5,2	13,9	14,6	33,7
Carbón activo Ensayo 2	83,6	118,6	13,5	215,7	37,8	170,1	30,4	238,3
Levaduras	5,5	60,1	7,0	72,6	0,7	66,2	7,2	74,1



**Figura 2.** Estudio de la variación porcentual de disacáridos de la miel M1 y miel M2 al someterlas al tratamiento con carbón activo: ensayo 1 y ensayo 2 y al tratamiento con levaduras (52 h, 30 °C); 1-Sacarosa; 2-  $\alpha,\alpha$ -Trehalosa; 3-  $\alpha,\beta$ -Trehalosa; 4-Inulobiosa; 5-Celobiosa; 6-Laminaribiosa; 7-Maltulosa; 8-Nigerosa; 9-Turanosa; 10-Maltosa; 11-Kojibiosa; 12-Trehalulosa; 13-Palatinosa; 14-Gentiobiosa; 15-Isomaltosa; 16-Melibiosa.

alcanzando valores de 83,6 y 37,8 mg/g para la miel M1 y el mielato M2, respectivamente, aunque dicha disminución fue menor que en el ensayo 1. El tratamiento con carbón en el ensayo 2 únicamente eliminó alrededor de un 30% del contenido en disacáridos, mientras que la cantidad de trisacáridos recuperada fue ligeramente superior a la del ensayo 1. Así, las muestras obtenidas presentaron un 55% (M1) y un 71% (M2) de disacáridos con respecto al contenido total de carbohidratos, manteniéndose las proporciones de los mismos prácticamente constantes respecto a la miel original (Figura 2).

A continuación, estos tratamientos con carbón activo fueron comparados con el método de fraccionamiento con levaduras previamente descrito en la bibliografía (Ruiz-Matute *et al.*, 2007). El tratamiento con levaduras permitió la práctica eliminación de la fracción de monosacáridos de la miel (llegando a reducirse hasta 0,7 mg/g miel en la M2; Tabla 1) obteniendo una fracción en la que los disacáridos fueron los componentes mayoritarios. Sin embargo, el perfil de estos se vio bastante modificado respecto a su composición original (Figura 2) debido a la eliminación selectiva de los mismos producida por las levaduras. Los jarabes HFCS e IS fueron sometidos a ambos ensayos con carbón activo y analizados por cromatografía de gases. En las muestras tratadas con el ensayo 2 se observó la presencia de unos picos que no se encontraban en las mieles y que eluían en la zona anterior a los disacáridos (entre 28 y 32 min). Estos compuestos fueron identificados mediante GC-MS<sup>(13)</sup> como anhídridos de difructosa (DFAs), compuestos que se forman al someter alimentos ricos en azúcares reductores a tratamientos térmicos<sup>(15)</sup>. Estos compuestos no fermentables son pseudodisacáridos producidos por condensación de dos moléculas de fructosa y presentan diferentes isómeros dependiendo del tipo y localización de enlaces<sup>(16)</sup>. Los DFAs han sido descritos como buenos indicadores de reacciones de caramelización en distintos alimentos y aditivos alimentarios<sup>(17)</sup>. Estos compuestos detectados en los jarabes fueron numerados de acuerdo con Ratsimba *et al.*<sup>(18)</sup> siendo los más abundantes en HFCS el DFA 1 ( $\alpha$ -D-Fruf-1,2':2,3'- $\beta$ -D-Fruf) y DFA 10 ( $\alpha$ -D-Fruf-1,2':2,1'- $\beta$ -D-Fruf), mientras que para el IS fueron el DFA 9 ( $\alpha$ -D-Fruf-1,2':2,1'- $\beta$ -D-Frup) y el DFA 10. En las muestras enriquecidas en trisacáridos mediante el ensayo 1, únicamente se detectaron pequeñas cantidades de DFAs que no habían sido completamente eliminadas durante el tratamiento con carbón activo. En cuanto a la región de trisacáridos, no se observó la presencia de nuevos compuestos en los jarabes en relación con las mieles. Así, el ensayo 2 fue seleccionado para el estudio de las muestras de miel y mielato adulteradas con 5, 10 y 20% de los jarabes HFCS e IS. En la Figura 3 se muestran los perfiles cromatográficos de la miel de mielato (M2) así como sus adulteraciones al 20%. Aparecen numerados los DFAs mayoritarios que se identificaron en las muestras adulteradas tras el tratamiento con carbón activo en el ensayo 2, siendo sus espectros de masas los que aparecen resumidos en la Tabla 2. Los espectros de los DFAs se diferenciaron claramente de los correspondientes a disacáridos ya que estos últimos presentan mayores abundancias del ión 361 (correspondiente a la composición elemental C<sub>13</sub>H<sub>33</sub>O<sub>4</sub>Si<sub>3</sub>), de baja intensidad en los DFAs, en los que son característicos los iones 362 y 509. Mediante este método se pudieron detectar adulteraciones incluso inferiores al 5% para ambos jarabes.

A su vez, las muestras adulteradas fueron sometidas al tratamiento con levaduras que permitió también detectar los DFAs como marcadores de adulteraciones; sin embargo se observaron diferencias en la cuantificación llevada a cabo por ambos métodos (carbón activo ensayo 2 y levaduras). La Tabla 3 muestra los valores de los DFAs 1, 9 y 10, empleando ambos métodos de fraccionamiento. El

DFA 1 pudo ser correctamente cuantificado después de los dos tratamientos, aunque dicho compuesto fue solo útil para la detección de adulteraciones con HFCS. La cuan-

**TABLA II**  
Iones característicos de los trimetilsilil derivados de los DFAs observados en las muestras adulteradas con los jarabes HFCS e IS.

m/z	Abundancia (%)									
	73	103	147	204	217	230	231	361	362	509
DFA1	48	18	19	2	100	7	4	5	2	1
DFA9	50	8	28	80	100	8	5	0	4	7
DFA10	34	9	14	3	100	8	3	3	4	4

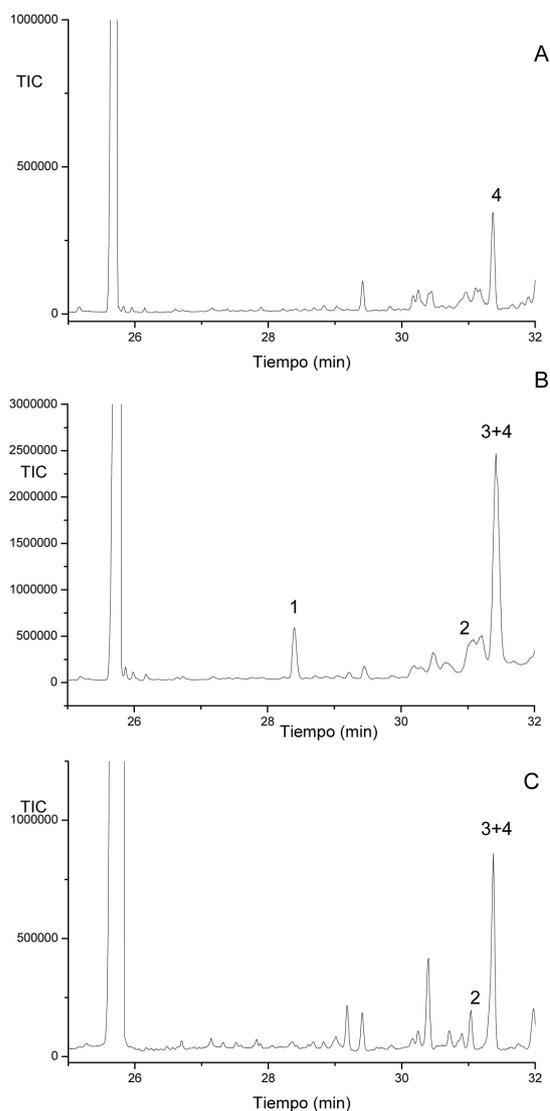


Figura 3. Perfiles cromatográficos de la zona de elución de los DFAs en: (A) miel M2, (B) miel M2 adulterada con un 20% de HFCS (C) y 20% de IS (D). Todas las muestras fueron previamente tratadas con carbón activo (ensayo 2). P.i: patrón interno; 1.- DFA1; 2.- DFA9; 3.- DFA10; 4.- sacarosa.

**TABLA III**

Concentración de DFAs (mg/g) de las mieles M1 y M2 adulteradas con 5, 10 y 20% de los jarabes HFCS y IS (n=2).

mg/g						
Muestras	Tratamiento con levaduras			Tratamiento con carbón activo (Ensayo 2)		
	DFA 1	DFA 9	DFA 10	DFA 1	DFA 9	DFA 10
M1 + 5% HFCS	0,10	0,02	0,15	0,09	0,08	0,07
M1 + 10% HFCS	0,17	0,04 <sup>a</sup>	0,19	0,15	0,11	0,12
M1 + 20% HFCS	0,38	0,09	0,31	0,29	0,20	0,23
M2 + 5% HFCS	0,08	0,00	NC	0,07	0,09	NC
M2 + 10% HFCS	0,19	0,01	0,19	0,12	0,07	0,08
M2 + 20% HFCS	0,33	0,10	0,41	0,40	0,29	0,32
M1 + 5% IS	NC*	0,04	0,05	NC	0,07	0,03
M1 + 10% IS	0,01	0,08	0,10	NC	0,21	0,05
M1 + 20% IS	0,02	0,13	0,12	0,03	0,35	0,10
M2 + 5% IS	NC	0,07	NC	NC	0,09	NC
M2 + 10% IS	NC	0,09	NC	0,01	0,13	NC
M2 + 20% IS	NC	0,17	NC	0,02	0,12	NC

NC: no cuantificable.

tificación de los DFAs 9 y 10 presentó más problemas debido a coeluciones con otros carbohidratos presentes en la miel que no habían sido completamente eliminados durante el fraccionamiento. En el caso del DFA 9 su cuantificación mediante el tratamiento con carbón activo se realizó en exceso debido a que la eliminación de los carbohidratos interferentes fue menor que en el tratamiento con levaduras. El DFA 10 coeluyó con la sacarosa, disacárido más abundante que los anteriores, principalmente en la miel de mielato (M2). Dicho DFA pudo ser por tanto únicamente cuantificado en la miel de néctar sometida a ambos métodos de fraccionamiento.

#### 4. CONCLUSIÓN

Tanto el tratamiento con carbón activo como el empleo de levaduras son métodos adecuados para la separación de los carbohidratos de la miel. Dichos métodos seguidos del análisis por GC-MS permiten la detección de DFAs en mieles adulteradas. Es necesario extender el estudio a mayor número de muestras de mieles y jarabes para poder establecer correlaciones entre cantidad de jarabe y de DFAs en las muestras que permitan estimar el porcentaje de adulteración en mieles desconocidas; sin embargo, y como ventaja frente a otros métodos, debe destacarse la sola presencia de DFAs es claramente indicativa de adulteración.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el INIA y la EU (proyecto API2003-007) y por la CICYT (proyecto CTQ2006-14993/BQU).

#### BIBLIOGRAFÍA

- (1). White, J.W. Jr. Honey en «Advances in Food Research» 1978, 24, 287-374. Academic Press Inc., New York.
- (2). Siddiqui, I.R. «The sugars of honey». *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1970, 25, 285-309.
- (3). Sanz, M.L.; Sanz, J. y Martínez-Castro, I. «Gas chromatographic-mass spectrometric method for the qualitative and quantitative determination of disaccharides and trisaccharides in honey». *J. Chromatogr. A.*, 2004, 1059, 143-148.
- (4). Real Decreto 1049/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de Calidad relativa a la Miel.
- (5). Devillers, J.; Morlot, M.; Pham-Delègue, M.H.; Doré, J.C. «Classification of monofloral honeys based on their quality control data». *Food Chem.*, 2004, 86, 305-312.
- (6). Cotte, J.F.; Casablanca, H.; Chardon, S.; Lheritier, J.L. y Grenier-Loustalot, M.F. «Application of carbohydrate analysis to verify honey authenticity». *J. Chromatogr. A.*, 2003, 1021, 145-155.
- (7). Cordella, C.; Militao, J.; Clément, M.C.; Drajnudel, P. y Carbol-Bass, D. «Detection and quantification of honey adulteration via direct incorporation of sugar syrups or bee-feeding: preliminary study using high-performance anion Exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) and chemometrics». *Anal. Chim. Acta*, 2005, 531, 239-248.
- (8). Paradkar, M.M e Irudayaraj, J. «Discrimination and classification of beet and cane inverts in honey by FT-Raman spectroscopy». *Food. Chem.*, 2002, 76, 231-239.
- (9). Padovan, G.J.; Jong, D.; de Rodriguez, L.P. y Marchini, J.S. «Detection of adulteration of commercial honey samples by the 13C/12C isotopic ratio». *Food Chem.*, 2003, 82, 633-636.
- (10). Cordella, C.; Antinelli, J.F.; Aurieres, C.; Faucon, J.P.; Cabrol-Bass, D. y Sbirrazzuoli, N. «Use of differential scanning calorimetry (DSC) as a new technique for detection of

---

adulteration in honeys. I. Study of adulteration effect on honey thermal behaviour». *J. Agric. Food. Chem.*, 2002, **50**, 203-208.

<sup>(11)</sup>. Swallow, K.W. y Low, N.H. «Determination of honey authenticity by anion-exchange liquid chromatography». *J. A.O.A.C.*, 1994, **77**, 695-702.

<sup>(12)</sup>. Ruiz-Matute, A.I.; Soria, A.C.; Martínez-Castro, I.; Sanz, M.L. «A new methodology based on gc-ms to detect honey adulteration with commercial syrups». *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 7264-7269.

<sup>(13)</sup>. Morales, V.; Sanz, M.L.; Olano, A. y Corzo N. «Rapid Separation on Activated Charcoal of High Oligosaccharides in Honey». *Chromatographia*, 2006, **64**, 233-238.

<sup>(14)</sup>. De la Fuente, E.; Sanz, M.L.; Martínez-Castro, I. y Sanz, J. «Development of a robust method for the quantitative determination of disaccharides in honey by gas chromatography». *J. Chromatogr. A*, 2006, **1135**, 212-218.

<sup>(15)</sup>. Manley-Harris, M. y Richards, G. N. «Di-D-fructose dianhydrides and related oligomers from thermal treatments of inuline and sucrose». *Carbohidr. Res.*, 1996, **287**, 183-202.

<sup>(16)</sup>. Saito, K., y Tomita, F. «Difruuctose anhydrides: their mass-production and physiological functions». *Biosc. Biotech. Biochem.*, 2000, **64**, 1321-1327.

<sup>(17)</sup>. Defaye, J.; García Fernández, J.M. y Ratsimba, V. «Les molécules de la caramélization: structure et méthodologies de détection et d'évaluation». *L'actualité chimique*, 2000, Novembre 24-27.

<sup>(18)</sup>. Ratsimba, V.; García Fernández, J.M.; Defaye, J.; Nigey, H. & Voilley A. «Qualitative and quantitative evaluation of mono- and disaccharides in D-fructose, D-glucose and sucrose caramels by gas-liquid chromatography-mass spectrometry. Di-D-fructose anhydrides as tracers of caramel authenticity.» *J. Chromatogr. A*, 1999, **844**, 283-293.