液相色谱 – 同位素质谱法鉴定蜂蜜掺假

陈亚成^{1,2},张业鹏^{1,2},范志勇^{2,3} (1. 湖北工业大学机械工程学院,湖北武汉 430068;2. 湖北省现代制造质量工程重点实验室,湖北 武汉 430068;3. 湖北省食品质量安全监督检验研究院,湖北武汉 430068)

摘要 [目的] 探讨液相色谱 - 同位素质谱法(LC - IRMS) 技术在蜂蜜掺假鉴定中的应用效果。[方法] 采用 LC - IRMS 法检测随机抽样的 62 个蜂蜜样品,对蜂蜜中果糖(Fru)、葡萄糖(Glu)、二糖和三糖 δ^{13} C 值进行测定。[结果] 由于真实蜂蜜中果糖、葡萄糖、二糖和三糖 的 δ^{13} C 的最大值与最小值的差值小于 2.1‰,果糖、葡萄糖的 δ^{13} C 差值(δ^{13} C_{Fu} - δ^{13} C_{Gu})为 - 1‰ ~ 1‰,且不得含有寡糖,所以该次检测样品中有 48.38% 的蜂蜜不合格,掺假掺杂以添加 C - 3 植物源转化产物和淀粉糖浆为主,应加强对这类掺假的监控管理。[结论] LC - IRMS实现了蜂蜜中各种糖组分如果糖、葡萄糖、二糖和三糖等 δ^{13} C 的分离与分析,可进行添加了 C - 3 糖浆的掺假鉴定,大大提高了蜂蜜掺假的检测能力。

关键词 液相色谱 - 同位素质谱;蜂蜜;掺假; 8¹³C值 中图分类号 S896.1; TS207.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)07-0009-02

Identification of Honey Adulteration by Liquid Chromatography-isotope Mass Spectrometry (LC-IRMS)

CHEN Ya-wei^{1,2}, **ZHANG Ye-peng^{1,2}**, **FAN Zhi-yong^{2,3}** (1. School of Mechanical Engineering, Hubei University of Technology, Wuhan, Hubei 430068;2. Key Lab of Modern Manufacture Quality Engineering, Wuhan, Hubei 430068;3. Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Wuhan, Hubei 430068)

Abstract [Objective] The aim was to explore application of LC-IRMS technique in identification of honey adulteration. [Method] We detected 62 honey samples by LC-IRMS, and determined δ^{13} C value of fructose, glucose, disaccharide and trisaccharide of honey. [Result] The difference of maximum and minimum δ^{13} C of fructose, glucose, disaccharide and trisaccharide of true honey was less than 2.1‰, and $\delta^{13}C_{Fm}$ - $\delta^{13}C_{Glu}$ was from -1% to 1‰, and there was no oligosaccharides, so 48.38% of samples was no qualified. The adulteration was mainly C-3 plant products and starch syrup, so the monitoring management of adulteration should be strengthened. [Conclusion] LC-IRMS realizes the δ^{13} C isolation and analysis of fructose, glucose, disaccharide and trisaccharide of honey, so it can be used in the adulteration identification of C-3 syrup and can improve the detection capability of honey adulteration.

Key words Liquid chromatography-isotope mass spectrometry (LC-IRMS); Honey; Adulteration; δ^{13} C value

蜂蜜是一种高品质的天然甜味剂,是由蜜蜂从花蜜或蜜 露中生产出来的。蜂蜜主要含葡萄糖、果糖和蔗糖,还含有 丰富的蛋白质、氨基酸、有机酸及多种维生素和矿物质等,特 别含有多种活性酶类,如淀粉酶、蔗糖转化酶、过氧化氢酶和 脂酶等。因此,蜂蜜是一种富有营养价值的天然食品^[1]。近 年来随着人民生活品质的提高,蜂蜜在国内外需求量不断增 大。据统计,我国蜂蜜每年的销量远大于产量,蜂蜜掺假掺 杂行为确实存在,尤以内销蜂蜜更为严重,且呈不断加重趋 势。蜂蜜真实性鉴别成为当前急需解决的技术问题。

目前,测定蜂蜜掺假的主要方法有液相色谱示差折光检 测法、薄层色谱法(TLC法)、糖类指纹图谱法、元素分析同位 素比值质谱法和离子色谱法等^[2]。对于目前市面上的掺假 手段,如在蜂蜜中加入C-3或C-4植物糖浆,上述方法总 有些局限性,耗时长、干扰多、灵敏度不高。利用稳定同位素 技术鉴定蜂蜜掺假问题越来越得到商检质检等检测机构的 关注。随着稳定同位素比质谱技术的发展,以及连续流在线 装置的集成化、多功能化和多样化,稳定同位素分析结果成 为快速评鉴蜂蜜是否掺假的有力证据。液相色谱 - 同位素 质谱法(LC-IRMS)采用液相色谱分离蜂蜜中的糖,测定蜂 蜜中各种糖组分的δ¹³C值,测定结果与纯正蜂蜜中各糖组分 的δ¹³C值做对比,用来鉴别蜂蜜的真假,提高了试验效率和 灵敏度。笔者采用 LC - IRMS 对 62 个蜂蜜样品进行了检 测,旨在为蜂蜜掺假监控与管理提供参考。

作者简介 陈亚威(1991—),男,湖北嘉鱼人,硕士研究生,研究方向: 食品质量控制与检测。
收稿日期 2016-12-23

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器。DELTA V Advantage 同位素质谱仪(Thermo Fisher 公司); UltiMate3000 高效液相色谱仪(Thermo Fisher 公司)与 Isolink 接口; Phenomenex Rezek RCM(Ca²⁺)色谱柱(300 mm × 8 mm, Thermo Fisher 公司); 0.45 μm 水相滤膜。
1.1.2 试剂。4% Na₂S₂O₈ 溶液和 4% H₃PO₄ 溶液; 超纯水(Millipore 公司); He(高纯 99.999%, 载气); CO₂(工作标准 参考气); 蔗糖标准品; δ¹³C 标准品(Caffeine)水溶液。

1.1.3 样品。蜂蜜样品:来自日常抽检样品(共62个样)。

1.2 样品处理称取 0.5 g 蜂蜜样品,用超纯水溶解,定容至 50 mL,过 0.45 μm 水相滤膜到进样瓶中供液相色谱 - 同位素质谱仪测定。同一蜂蜜样品分别配制成 1、10 g/L 蜂蜜稀释液,用于蜂蜜中果糖/葡萄糖 δ¹³C 和二糖/三糖 δ¹³C 的测定。

1.3 色谱和质谱条件

1.3.1 色谱条件。色谱柱为 Phenomenex Rezek RCM(Ca²⁺), 洗脱剂为100% 超纯水,流速为30 μL/min,样品溶液进样体 积为10 μL,柱箱温度为70 ℃。Acid Pump(H₃PO₄)和Ox. – Pump(Na₂S₂O₈)流速均控制在40 μL/min。

1.3.2 质谱条件。氧化炉温度 99.9℃;离子源:电子轰击 离子源;轰击电压 120.8 eV;扫描方式:正离子扫描;辅助气 压力 0.4 MPa;离子源电压 2.97 kV;真空度 2.0×10⁻⁴ Pa。 进样品测定时,每个样品的分析起始阶段和尾气阶段通人 CO₂ 参考气进行系统稳定性评价。如果 m/z 44 信号在 1 ~ 2 V或更低,则 CO₂ 的本底测试通过^[3]。如果 m/z 32 信号在 8~12 V,则 O,的本底测试通过。

%

2 结果与分析

2.1 液相色谱 – 同位素质谱法分析蜂蜜样品中各类糖组分的 δ^{13} C值 如果蜂蜜是单一花种的纯正蜂蜜,其中含有果糖、葡萄糖、二糖和三糖的碳同位素值应十分接近。根据 Elflein 等^[4]和 Simsek 等^[5]的研究报道,真实纯蜂蜜样品各类糖 组分的 δ^{13} C值在 – 28.2‰ ~ – 22.5‰,葡糖糖和果糖的 δ^{13} C 值的差值为 ± 1‰,果糖、葡萄糖、二糖和三糖的 δ^{13} C 的最大 值与最小值的差值小于 2.1‰,果糖葡萄糖的 δ^{13} C 差值 (δ^{13} C_{Fm} – δ^{13} C_{Gu})为 – 1‰ ~ 1‰。

由表1可知,果糖葡萄糖的 $\delta^{13}C
ext{ }
ext{ }$

蜜。而蜂蜜中各种糖组分最大值与最小值的差值($\delta^{13}C_{Max}$ - $\delta^{13}C_{Min}$) < 2.1% 的有 12、14、17、44、56 等 22 个样品,也属于 掺假样品,其中差值最大的达 7.99% ,在这些样品中,还有 15、17、18、44 这4 个样品检测出寡糖,而真实蜂蜜中是不得 检出寡糖的^[6],所以这些样品都存在掺假掺杂。结果显示,检测样品中共有 30 个掺假样品,占 62 份蜂蜜样品总数的 48.38%,并且凡是样品蜂蜜中果糖、葡萄糖的 $\delta^{13}C$ 差值 ($\delta^{13}C_{Fru} - \delta^{13}C_{Glu}$)不合格的,各种糖组分的差值($\delta^{13}C_{Max} - \delta^{13}C_{Min}$)也不合格;但蜂蜜中各种糖组分的差值($\delta^{13}C_{Max} - \delta^{13}C_{Min}$)可能合格,也可能不合格^[7]。说明目前的掺假手段 大多是针对二糖、三糖甚至寡糖的掺假,也就是直接加入了 C-3 植物源糖浆来掺假。

表1 LC – IRMS 测定不同蜂蜜样品的定碳同位素比值

Table 1 The carbon isotope ratio of different sa	amples of honey determined by LC-IRMS
--	---------------------------------------

样品 Samples	$\delta^{^{13}}C_{_{Fru}}$	$\delta^{^{13}}C_{_{Glu}}$	$\delta^{^{13}}C_{_D}$	$\delta^{^{13}}C_{_T}$	$\delta^{^{13}}C_{_{F-G}}$	$\delta^{13} C_{Max-Min}$	样品 Samples	$\delta^{^{13}}C_{_{Fru}}$	$\delta^{^{13}}C_{_{Glu}}$	$\delta^{^{13}}C_{_D}$	$\delta^{^{13}}C_{_T}$	$\delta^{^{13}}C_{_{F-G}}$	$\delta^{13}C_{Max-Min}$
1	-27.44	-28.08	- 29.91	-28.95	0.60	2.47	32	-28.35	-28.59	- 30. 16	_	0.20	1.81
2	-26.24	-26.27	-27.52	-26.15	-0.10	1.69	33	-28.72	-28.62	-31.12		-0.10	2.51
3	-27.18	-28.73	-29.95	- 30. 11	1.50	2.37	34	-28.91	-28.65	- 30. 57	—	-0.30	1.92
4	-27.43	-27.79	-29.92	-29.12	0.40	2.50	35	-26.50	-26.34	-27.37	-27.87	-0.20	1.53
5	-23.21	-28.79	-27.74	_	5.60	5.58	36	-28.58	-28.31	-26.74	-22.22	-0.30	6.35
6	-25.96	-28.75	-29.32	_	2.80	3.36	37	-25.59	-25.48	-27.53	-28.64	-0.10	3.16
7	-26.96	-29.37	-28.94	_	2.40	2.41	38	-27.90	-28.06	-29.89	_	0.20	1.99
8	-26.35	-28.83	-29.75	_	2.50	3.40	39	-26.03	-25.80	-26.25	-24.56	-0.20	1.69
9	-26.80	-29.58	- 30.03	_	2.80	3.32	40	-24.78	-24.41	-26.24	-24.81	-0.40	1.83
10	-29.97	-28.26	-29.47	-27.82	-1.70	2.15	41	-24.85	-24.53	-26.11	-25.25	-0.30	1.58
11	-26.37	-29.03	-28.47	_	2.70	2.66	42	-24.71	-24.31	-26.33	-24.65	-0.40	2.07
12	-26.30	-26.38	- 30.25	-26.53	0.10	3.95	43	-28.26	-27.49	-26.79		-0.80	1.47
13	-27.83	-28.07	-27.48	-26.02	0.20	2.05	44	-26.32	-26.42	-28.28	-28.86	0.10	2.54
14	-27.81	-27.68	-28.50	-26.15	-0.10	2.35	45	-25.79	-25.46	-26.93		-0.30	1.46
15	-26.64	-26.50	-27.76	-25.93	-0.10	1.83	46	-29.45	-28.48	-21.46	_	-1.00	7.99
16	-29.10	-29.27	-29.87	_	0.20	0.77	47	-25.55	-28.93	-27.96	_	3.40	3.78
17	-27.28	-27.81	-28.49	-25.74	0.50	2.76	48	-25.53	-29.04	28.98	_	3.50	3.51
18	-28.88	-28.74	- 30.31	-27.99	-0.10	2.33	49	-27.18	-27.29	-28.73	-27.02	0.10	1.72
19	-25.60	-25.90	-27.42	_	0.30	1.82	50	-28.71	-28.48	- 30.09	_	-0.20	1.61
20	-26.52	-25.97	-31.17	-28.44	-0.60	5.21	51	-28.81	-29.16	-30.45	-28.23	0.30	2.22
21	-29.03	-28.82	- 30.62	_	-0.20	1.80	52	-28.89	-28.57	- 30.07	_	-0.30	1.50
22	-28.57	-28.82	-29.96	—	0.30	1.39	53	-28.08	-28.38	-29.50	- 30.03	0.30	1.95
23	-29.06	-28.98	- 30.82	_	-0.10	2.04	54	-28.77	-28.34	- 30.04	-28.64	-0.40	1.71
24	-28.72	-28.78	- 30.04	_	0.10	1.32	55	-29.01	-28.74	- 30. 01	-28.90	-0.30	1.27
25	-28.63	-28.63	- 30.09	_	0.30	1.46	56	-24.99	-24.61	-29.52	-25.97	-0.40	3.55
26	-29.25	-28.90	-31.13	_	-0.40	2.23	57	-27.60	-27.48	-28.49	-24.86	-0.10	3.63
27	-28.70	-28.97	- 30.07	_	0.30	1.37	58	-28.58	-28.22	-29.87	_	-0.40	1.65
28	-28.54	-28.80	- 30.26	_	0.30	1.71	59	-27.84	-27.53	-28.79	-25.98	-0.30	2.81
29	-28.33	-28.39	- 30.98	_	0.10	2.65	60	-27.16	-26.88	-28.08	-24.58	-0.30	3.50
30	-28.50	-28.22	- 30.71	_	-0.30	2.49	61	-26.98	-26.67	-27.42	-24.25	-0.30	3.17
31	-28.98	-28.82	- 30.93		-0.20	2.11	62	-26.31	-26.40	-26.51	-24.13	0.10	2.37

注"一"为未检出

Note:"-"indicated no detection

2.2 LC – IRMS 法在蜂蜜掺假中的检测应用图1为使用 LC – IRMS 方法测定蜂蜜中各种糖组分的 δ¹³C 的离子流强 度 – 时间图谱。蜂蜜试样中的各种糖组分经过 HPLC 在线 分离和LC IsoLink 湿化学氧化,转化为CO₂,分别进行同位素 比质谱分析,在谱图上均显示为尖峰。谱图上显示纯正蜂蜜 (下转第95页) on, Maryland: Wildlife International Ltd, 2001.

- [27] LI M H. Toxicity of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid to plants and aquatic invertebrates [J]. Environmental toxicology, 2009, 24 (1):95-101.
- [28] SAKURAI T, SERIZAWA S, ISOBE T, et al. Spatial, phase, and temporal distributions of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in Tokyo Bay, Japan [J]. Environmental science & technology, 2010,44(11);4110-4115.
- [29] GULKOWSKA A, JIANG Q T, SO M K, et al. Persistent perfluotinated acids in seafood collected from two cities of China [J]. Environ Sci Technol,2006,40(12):3736 – 3741.
- [30] LAU C, THIBODEAUX J R, HANSON R G, et al. Effects of perfluorooctanoic acid exposure during pregnancy in the mouse[J]. Toxicological sciences an official journal of the society of toxicology, 2006, 90 (2): 510-518.
- [31] DONG G H, ZHANG Y H, ZHENG L, et al. Chronic effects of perfluorooctanesulfonate exposure on immunotoxicity in adult male C57BL/6

(上接第10页)

中三糖在1000 s 附近出峰, 二糖在1100 s 附近出峰, 葡萄糖 在1300 s 附近出峰, 果糖在1700 s 附近出峰。

应用该方法检测来自7个不同企业共计62个抽检样品 (生产日期在2015年12月至2016年6月)中,共有30个样 品不合格,掺假占总数的48.38%;而利用已有的高效液相示 差法分析蜂蜜中还原糖及蔗糖含量,结果显示只有3个样品 不合格,占样品总数的4.84%;利用薄层色谱法(TLC法)测 定蜂蜜中的高果淀粉糖浆,结果显示有16个样品不合格,占 样品总数的25.81%。说明应用LC-IRMS法在蜂蜜中的掺 假检出率远高于原有的方法。且这些企业对检测结果没有 提出申诉异议,说明该方法准确有效。





Fig.1 The intensity-time chromatogram of pure honey determined by LC-IRMS

2.3 LC-IRMS 法测定精度 在每次检测蜂蜜样品同时测 定蜂蜜平行样品,测定 62 个蜂蜜平行样品各种糖组分的 δ¹³C值,计算标准偏差。由表 2 可知,LC-IRMS 方法测定蜂 蜜中各种糖组分δ¹³C值标准偏差为0.1% ~0.4%。二糖和 三糖标准偏差比果糖、葡萄糖高些,是由于二糖和三糖在蜂 蜜中含量相当低,所以要用 10 g/L 蜂蜜稀释液进行测定,而 果糖、葡萄糖的含量相对高些,所以用1 g/L 蜂蜜稀释液进行 测定,同时温度、湿度、色谱分离效果、系统不稳定等因素也 存在造成偏差增大的可能性^[8]。对于日常蜂蜜分析,LC-IRMS 法完全可以满足蜂蜜中果糖、葡萄糖、二糖和三糖δ¹³C mice. [J]. Archives of toxicology, 2009, 83(9):805-815.

- [32] OAKES K D, SIBLEY P K, SOLOMON K R, et al. Impact of perfluorooctanoic acid on fathead minnow(*Pimephales promelas*) fatty acyl – coa oxidase activity, circulating steroids, and reproduction in outdoor microcosms[J]. Environmental toxicology & chemistry, 2004, 23 (8): 1912 – 1919.
- [33] 刘冰,于麒麟,金一和,等.全氟辛烷磺酸对大鼠海马神经细胞内钙离 子浓度的影响[J]. 毒理学杂志,2005,19(S3):225-226.
- [34] 姚晓峰,仲来福.全氟辛酸对 HepC2 细胞的遗传毒性及氧化性 DNA 损伤[C]//中国毒理学会.中国毒理学会第四届全国学术会议论文(摘要)集.北京:北京市预防医学研究中心,2005:216-217.
- [35] 胡芹.全氟辛烷磺酸(PFOS)对斑马鱼胚胎发育及成鱼的毒性效应研究[D].华中农业大学,2009.
- [36] NAKAYAMA S, STRYNAR M J, HELFANT L, et al. Perfluorinated compounds in the cape fear drainage basin in North Carolina [J]. Environmental science & technology, 2007, 41(15):5271-5276.

值的测定。

表 2 LC - IRMS 法测定平行样品重现性数据

 Table 2
 Repeatability data of parallel samples determined by LC

IRMS		%				
指标 Index	平均值 Average	标准偏差 Standard deviation				
$\delta^{13}C_{Fru}$	-27.43	0.11				
$\delta^{^{13}}C_{_{Glu}}$	-27.76	0.10				
$\delta^{13}C_{_D}$	-27.98	0.25				
$\delta^{13}C_T$	- 24. 87	0.42				

3 结论

利用 LC - IRMS 法来检测随机抽样的 62 个蜂蜜样品, 对蜂蜜中果糖、葡萄糖、二糖和三糖 δ¹³C 值进行测定,结果发 现 30 份存在掺假掺杂,占总数的 48.38%。掺假手段大多是 针对 C-3 植物源的葡萄糖、果葡萄糖浆甚至多种物质混合 掺假,更具隐蔽性,同时突出该方法的优越性和准确性。掺 假蜂蜜在市场上大量存在,形式多样,应加强监控和管理。

参考文献

- [1] 费晓庆,吴斌,沈崇钰,等. 液相色谱/元素分析 同位素比值质谱联用法 鉴定蜂蜜掺假[J]. 色谱,2011,29(1):15-19.
- [2] 中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局. 蜂蜜中碳-4 植物糖含量 测定方法稳定碳同位素比率法:GB/T 18932.1—2002[S].北京:中国 标准出版社,2003.
- [3] 丁涛.液相色谱 -同位素质谱联用法在蜂蜜掺假鉴定方面的应用 [C]//第四届华东地区色谱、质谱学术报告会论文集.无锡:江苏省分 析测试协会,2010.
- [4] ELFLEIN L, RAEZKE K P. Improved detection of honey adulteration by measuring differences between ¹³C/¹²C stable carbon isotope ratios of protein and sugar compounds with a combination of elemental analyzer-isotope ratio mass spectrometry and liquid chromatography-isotope ratio mass spectrometry (δ13C-EA/LC-IRMS)[J]. Apidologie,2008,39(5);574-587.
- [5] SIMSEK A, BILSEL M, GÖREN A C. ¹³C/12C pattern of honey from Turkey and determination of adulteration in commercially available honey samples using EA-IRMS[J]. Food chemistry, 2012, 130(4):1115-1121.
- [6] PADOVAN G J, DE JONG D, RODRIGUES L P, et al. Detection of adulteration of commercial honey samples by the ¹³C/¹²C isotopic ratio[J]. Food chemistry,2003,82(4):633-636.
- [7] 黄文诚. 用不同的方法检测高果糖玉米糖浆掺假的蜂蜜[J]. 中国蜂 业,2009,60(9):51-52.
- [8] 罗东辉,罗海英,冼燕萍,等.同位素质谱联用技术鉴别无蛋白蜂蜜的 真实性[J].现代食品科技,2012,28(7):862-866.