碳同位素比率法检测分析市售蜂蜜碳-4 糖浆的掺假情况

刘 涛, 邱险辉, 贾艳艳, 林兆盛, 张秀芹*

(华测检测认证集团股份有限公司, 深圳 518101)

摘 要: 目的 优化稳定碳同位素比率法, 分析蜂蜜市场质量状况。**方法** 蜂蜜用水混匀后, 利用钨酸钠溶液和硫酸溶液沉淀蛋白, 多次洗涤后冷冻干燥获得蜜蛋白, 利用同位素质谱仪同时检测蜜蛋白和蜂蜜 $\delta^{13}C$ 值, 用两点标准漂移校准进行数据处理分析, 测得碳-4 植物糖浆含量。**结果** 对来自 19 个省的 137 批样品进行检测, 有 15 批蜂蜜不符合我国蜂蜜产品行业标准的真实性要求, 检出碳-4 植物糖浆掺假情况, 不合格率 10.95%。**结论** 检测方法优化后, 检测时间缩短, 蛋白提取成功率提高。通过对实际样品的分析, 发现目前市售蜂蜜质量不容乐观。

关键词: 蜂蜜掺假; 同位素质谱法; 检测

Detection and analysis of adulteration of carbon-4 syrup in honey by carbon isotope ratio method

LIU Tao, QIU Xian-Hui, JIA Yan-Yan, LIN Zhao-Sheng, ZHANG Xiu-Qin*

(*Centre Testing International Group Co*., *LT*, *Shenzhen* 518101, *China*)

ABSTRACT: Objective To optimize the stable carbon isotope ratio method, and analyze the quality of honey market. **Methods** After the honey was mixed with water, the protein was precipitated by sodium tungstate solution and sulfuric acid solution. After repeated washing, the protein was obtained by freeze drying. Isotope mass spectrometer was used to detect the $\delta^{13}C$ value of honey protein and honey simultaneously. Data processing and analysis were performed by two-point standard drift calibration, and the content of C-4 plant syrup was measured. **Results** Totally 137 batches of samples from 19 provinces were tested, 15 batches of honey did not meet the authenticity requirement of Chinese honey product industry standard, and the adulteration of carbon-4 plant syrup was detected, the unqualified rate was 10.95%. **Conclusion** The optimized detection method can shorten the detection time and improve the success rate of protein extraction. Through the analysis of actual samples, it is found that the quality of honey on the market is not optimistic.

KEY WORDS: adulterated honey; isotope mass spectrometry; test

1 引 言

蜂蜜, 是蜜蜂采集植物的花蜜、分泌物或蜜露, 与自身分泌物结合以后, 经充分酝酿而成的天然甜物质[1]。蜂蜜作为一种天然物质, 具有极高的营养价值和药用价值, 自古以来倍受欢迎。科学研究发现, 蜂蜜主要成分是碳水

***通讯作者:** 张秀芹, 博士, 正高级兽医师, 主要研究方向为食品及食用农产品质量安全检测研究。E-mail: 13609839503@163.com

***Corresponding author:** ZHANG Xiu-Qin, Ph.D, Senior Veterinarian, Center Testing International Group Co., LTD, CTI Building, No.4, Liuxian 3rd Road, Xin'an Street, Baoa District, Shenzhen 518100, China. E-mail: 13609839503@163.com

化合物、蛋白质、维生素类、矿物质、酚类等[2]。蜂蜜中同时还含有的氧化酶、酚酸、转化酶、黄酮类化合物、淀粉酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶等[3,4]生物活性物质, 具有抗菌消炎、抗氧化、抗癌、降血糖、护肤美容、促进消化、促进伤口愈合等功能, 对治疗烧伤也具有一定的疗效[5−11]。

随着人们生活水平的提高, 蜂蜜的需求量逐年增加, 受利益趋使, 一些不法商贩对蜂蜜的掺杂使假已成为目前蜂蜜生产中不容忽视的问题。不同的植物中, 碳的 2 种同位素 ^{12}C 和 ^{13}C 的比值($\delta^{13}C$)是不同的[12], 根据植物不同的碳转化途径, 可将现有植物分为 3 类, 一类是碳-3 植物, 其 $\delta^{13}C$ 值范围在-22‰~-33‰之间, 几乎所有的蜜源植物均为该类[13]; 一类是碳-4 植物, 其 $\delta^{13}C$ 值范围在-10‰~-20‰之间, 如玉米、高粱和甘蔗等; 还有一类是景天酸代谢植物(crassulacean acid metabolism, CAM), 其 $\delta^{13}C$ 值范围相对更宽。鉴于蜂蜜中如果加入碳-4 植物糖会导致蜂蜜 $\delta^{13}C$ 值增大, 同时蜂蜜中糖的 $\delta^{13}C$ 和蛋白的 $\delta^{13}C$ 非常接近, 用蜂蜜中蛋白 $\delta^{13}C$ 值作为内标, 即可准确计算出蜂蜜中碳-4 糖的含量, 所以碳同位素检测技术可作为蜂蜜真实性与否的判断依据。

GH/T 18796-2012《蜂蜜》[1]产品行业标准中, 对蜂蜜的真实性作了规定: 蜂蜜中不得添加任何当前明确或不明确的添加物, 产品中碳-4 植物糖百分含量不得大于 7。

为了解市售蜂蜜碳-4 糖的掺假状况, 本研究对 137 份蜂蜜样品, 应用本实验室优化的碳同位素比率法, 对其真实性进行了检测。优化稳定碳同位素比率法, 缩短检测时间, 提高蛋白的提取成功率, 从而提高方法的适用范围。利用优化后的方法对市售蜂蜜碳-4 植物糖浆掺假情况进行检测, 以期为蜂蜜市场质量监控提供依据。

2　材料与方法

2.1　样品来源

137 份样品均是市场上随机购买, 每份 1 个包装, 约 500 g 左右。产地分别为海南、上海、广东、黑龙江、甘肃、江苏、云南等 19 个省, 基本包括了我国蜂蜜主产区, 具有一定的代表性。

2.2　仪器和试剂

20-22 元素分析-稳定同位素质谱仪(用于测定蜂蜜的 $\delta^{13}C$ 值和蜂蜜中蛋白质的 $\delta^{13}C$ 值, 英国 Sercon 公司); TGL-20M 高速台式冷冻离心机(用于分离提取的蜂蜜蛋白质, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); ALPHAL-4LD plus 冷冻干燥机(用于提取后蜂蜜蛋白的干燥, 德国 Martin Christ GmbH); 8 mm×5 mm 锡杯(英国 Sercon 公司)。

标准品 EMA-P2(PART No.B2205)、质控样 Sorghum Flour Standard OAS(Cat No.B2159)(英国 Elemental Microanalysis 公司); 元素分析-稳定同位素质谱仪所用水均为一级水。

钨酸钠和硫酸(优级纯, 国药集团化学试剂有限公司): 分别配制成 10%的钨酸钠溶液和 0.335 moL/L 的硫酸溶液, 作为蛋白沉淀剂。

2.3　实验方法

2.3.1　样品前处理

洁净的蜂蜜直接取样。如蜂蜜中有蜂蜡、蜜蜂残肢等杂质, 需用 0.10~0.14 mm 孔径的尼龙布过滤后取样; 如蜂蜜粘稠或有结晶时, 先 60 ℃水浴加热 10 min, 搅拌均匀再取样。

称取约 25 g 蜂蜜于 50 mL 离心管中, 加入 8 mL 水混匀, 加入 4 mL 10%的钨酸钠溶液和 2 mL 0.335 mol/L 硫酸溶液, 混匀。置于 80 ℃的振荡水浴中加热 1~2 h, 直到有絮状物析出, 并且最终絮状物成块聚集于底部或部分漂浮于上层, 提取的蜂蜜颜色变深。

冷却至室温, 加水至 45 mL, 在 6000 r/min 下离心 3 min, 倾倒上层清液, 再加水至 45 mL 充分洗涤沉淀物, 并离心, 如此重复 5 次, 最后 1 次洗涤时, 用一次性吸管将上清液尽量吸干, 敲打离心管将沉淀物均匀分布在离心壁上, 马上置于–15 ℃以下的冰箱中速冻约 10 min 使沉淀物成固态。将离心管的盖旋松, 置于冷冻干燥机, 设置干燥条件为–45 ℃, 0.3 mbar, 干燥 2 h 左右, 然后称取上述干燥的蛋白质 3.0 mg, 于 8 mm×5 mm 的锡杯中, 密封备用。每个样品同时做平行样。称取 3.0 mg 的蜂蜜, 备用。称取 1.0 mg EMA-P2 和 2.0 mg Sorghum Flour Standard OAS 分别作为标准品和质控样品。

2.3.2　测试条件

确认同位素质谱仪的工作条件: 载气流量: 60 mL/min, 离子源的真空度:小于 2.0×10^{-6} mBar, 离子源条件: HT: 1958 V、HP: -4 V、Focus: 86 V、Trap: 150 μA、EV: -85 V、IR: 4.5 V、E MAGE: 13500 T。设置氧化炉为 1000 ℃、还原炉为 600 ℃, 分离气相色谱(gas chromatography, GC)为 100 ℃。在碳同位素测定条件下测试, 用两点标准漂移校准进行数据处理分析。

3　结果与分析

3.1　测定方法优化

本研究对“GB/T 18932.1-2002《蜂蜜中碳-4 植物糖含量测定方法　稳定碳同位素比率法》[14]进行 2 处优化: (1)以冷冻干燥代替烘干干燥, 检测时间缩短 1 h 以上, 提高了检测效率, 且干燥后的蛋白不再结块, 便于小剂量的取样操作; (2)优化取样量: 如果蛋白获得量少, 需多次取样进行提取, 直到蛋白量可以满足检测要求, 使得蜂蜜蛋白提取成功率大大提高, 最大限度避免了因蜂蜜蛋白含量低

而无法获得所需蛋白量，导致无法应用该方法检测碳-4 糖浆掺假的情况。

3.2 实际样品测定分析

应用本研究优化的稳定碳同位素比率法，发现 137 份样品中有 15 份检出碳-4 糖浆含量大于 7%，根据 GH/T 18796-2012《蜂蜜》产品的行业标准规定，不符合蜂蜜产品真实性要求，系为掺假蜜，不合格率 10.95%。不合格样品中有 1 份样品未提出蛋白，其 $\delta^{13}C_H$ 值为–12.23‰，属纯碳-4 植物糖浆，不含蜂蜜成分。不合格产品检测数据见下表 1。

表 1 碳-4 糖掺假蜂蜜检测情况

Table 1 Carbon-4 detection of adulterated honeys

样品编号	$\delta^{13}C_H$/‰	$\delta^{13}C_P$/‰	$\Delta\delta^{13}C_{P-H}$/‰	碳-4 糖含量/%
1	–21.36	–23.92	–2.56	18.00
2	–21.82	–24.01	–2.19	15.30
3	–21.81	–23.86	–2.05	14.48
4	–22.54	–24.64	–2.10	14.06
5	–19.39	–22.09	–2.70	21.79
6	–12.23	0	12.23	100.00
7	–22.84	–24.66	–1.82	12.17
8	–25.15	–26.65	–1.50	8.53
9	–17.63	–21.50	–3.87	32.80
10	–17.06	–26.13	–9.07	55.20
11	–16.26	–22.38	–6.12	48.26
12	–24.23	–25.42	–1.19	7.57
13	–21.68	–25.64	–3.96	24.84
14	–20.55	–25.67	–5.12	32.06
15	–22.72	–24.20	–1.48	10.21

根据费晓庆等[15]报道，纯蜂蜜需满足其 $\Delta\delta^{13}C_{P-H}\geqq$–0.95‰的条件，本研究中所检出的 15 份不合格样品，$\Delta\delta^{13}C_{P-H}$ 均<–0.95‰，和上述研究完全吻合。

未检出碳-4 糖掺假的 122 份样品，$\delta^{13}C_H$ 值范围为–21.85‰~-28.85‰，与罗东辉等[13]报道的碳-3 途径相关植物其 $\delta^{13}C$ 范围-22‰~-33‰不完全吻合，提示 $\delta^{13}C$ 为–21.85‰的样品可能含有低量的碳-4 糖，和其碳-4 糖检测含量 6.32%相吻合。

4 结论与讨论

本研究中，利用优化后的国标方法只针对碳-4 糖掺假检测，137 份样品不合格率即达 10.95%，另据相关报道[16]，2014~2018 年，我国蜂蜜中兽药残留和微生物超标情况约占蜂蜜不合格样品的 24%，这些可能对人体造成伤害的因素更是不能忽视。对蜂蜜真实性检验的国家相关标准具有一定局限性，不能检测碳-3 糖掺假，不排除本研究未检出碳-4 糖的 122 份样品含碳-3 糖浆的可能，即掺假的比率可能会高于 10.95%。可见，我国市售蜂蜜质量状况不容乐观，建议国家相关部门对检测标准和产品标准能够及时更新，同时加强监管力度，促进蜂产业健康发展，也让消费者吃上放心蜂蜜。

参考文献

[1] GH/T 18796-2012 蜂蜜[S].
GH/T 18796-2012 Honey [S].

[2] 谭洪波，王光新，张红城，等. 蜂蜜的营养成分及其功能活性研究进展[J]. 蜜蜂杂志, 2016, (7): 12–15.
Tan HB, Wang GX, Zhang HC, *et al*. Progress in studies on the nutritional components and functional activities of honey [J]. J Bee, 2016, (7): 12–15.

[3] Eteraf-Oskouei T, Najafi M. Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: A review [J]. Iran J Basic Med Sci, 2013, 16(6): 731–742.

[4] Bansal V, Medhi B, Pandhi P. Honey-A remedy rediscovered and its therapeutic utility [J]. Kathmndu Univ Med J, 2005, 3(3): 305–309.

[5] Kanae M, Miki K, Saki N, *et al*. Evaluation of the effects of a combination of Japanese honey and hydrocolloid dressing on cutaneous wound healing in male mice [J]. Evid-Base Compl Altern Med, 2015, 91: 1–9.

[6] Hamzaoglu I, Saribeyoglu K, Durak H, *et al*. Protective covering of surgical wounds with honey impedes tumor implantation [J]. Archi Surg,

2000, 135(12): 1414–1417.

[7] Sahhugi Z, Hasenan SM, Jubri Z. Protective effects of gelam honey against oxidative damage in young and aged rats [J]. Oxid Med Cell Longev, 2014, (67): 3628.

[8] Fauzi AN, Norazmi MN, Yaacob NS. Tualang honey induces apoptosis and disrupts the mitochondrial membrance potential of human breast and cervical cancer cell lines [J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49(4): 871–878.

[9] Swellam T, Miyanaga N, Onozawa M, *et al*. Antineopastic activity of honey in an experimental bladder cancer implantation model: *In vivo*, and *in vitro*, studies [J]. Int J Urol Off J Jpn Urol Assoc, 2003, 10(4): 213.

[10] Vanden BAJ. An *in vitro* examination of the antioxidant and anti-inflammatory properties of buckwheat honey [J]. J Wound Care, 2008, 17(4): 172, 176.

[11] El-Arab AME, Girgis SM, Hegazy EM, *et al*. Effect of dietary honey on intestinal microflora and toxicity of mycotoxins in mice [J]. BMC Compl Alter Med, 2006, 6(1): 1–13.

[12] 何仁, 李军生, 侯革非. 现行国家标准在鉴别蜂蜜掺假方面存在的缺陷[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(2): 115–117.
He R, Li JS, Hou GF. Defects in identifying adulterated honey in current national standards [J]. Food Ferment Ind, 2004, 30(2): 115–117.

[13] 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.
Luo DH, Luo HY, Xian YP, *et al*. Identification of the authenticity of protein-free honey by isotope mass spectrometry [J]. Mod Food Sci Technol, 2012, 28(7): 862–866.

[14] GB/T 18932-2002 蜂蜜中碳-4 植物糖含量测定方法 稳定碳同位素比率法[S].
GB/T 18932-2002 Determination of carbon-4 plant sugars in honey-Stable carbon isotope ratio method [S].

[15] 费晓庆, 吴斌, 沈崇钰, 等. 液要色谱/元素分析-同位素比值质谱法鉴定蜂蜜掺假[J]. 色谱, 2011, 29(1): 15–19.
Fei XQ, Wu B, Shen CY, *et al*. Liquid chromatography/elemental analysis-isotope ratio mass spectrometry for identification of adulterated honey [J]. Chin J Chromatogr, 2011, 29(1): 15–19.

[16] 赵洪静, 李恒, 蒋慧, 等. 我国蜂产品生产监管现状、问题及建议[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(20): 7048–7056.
Zhao HJ, LI H, Jiang H, *et al*. Current situation, problems and suggestions of bee production supervision in China [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(20): 7048–7056.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介

刘　涛, 硕士, 中级工程师, 主要研究方向为食品、药品、农产品及日化产品检测研究。
E-mail: tony.liu@cti.com

张秀芹, 博士, 正高级兽医师, 主要研究方向为食品及食用农产品质量安全检测研究。
E-mail: 13609839503@163.com