

同位素比率质谱技术对蜂蜜掺假的鉴别

李鑫, 陈小珍, 刘柱, 蒋鑫, 张东雷

(浙江省质量检测科学研究院, 国家预包装食品质量监督检验中心, 浙江杭州 310015)

摘要: 本文扩展了同位素比率质谱联用技术的应用, 完善了液相色谱联用同位素比率质谱 (LC-IRMS) 测定蜂蜜中多种糖组分 $\delta^{13}\text{C}$ 值的方法。通过对 3 种糖浆、3 种掺糖蜜和纯正蜂蜜测定结果和图谱的多重比较, 发现单纯的使用元素分析联用同位素比率质谱 (HT-IRMS) 进行测定, 无法完全鉴别出掺糖蜜, 但是结合 LC-IRMS 的测定结果则能有效的对以上 3 种方式的掺假进行鉴别。对 6 种特制蜂蜜进行测定并判定, 判定结论与实际制样情况相符。该技术手段丰富了鉴别掺假蜂蜜的方法, 具有较强的应用价值。

关键词: 同位素比率质谱; 多信息; 蜂蜜; 掺假鉴别

文章编号: 1673-9078(2013)4-867-871

Identification of Honey Adulteration by Isotope Ratio Mass Spectrometry

LI Xin, CHEN Xiao-zhen, LIU Zhu, JIANG Xin, ZHANG Dong-lei

(Zhejiang Institute of Quality Inspection Science, National Pre-packaged Food Quality Supervision and Inspection Center, Hangzhou 310015, China)

Abstract: In this research, Liquid Chromatography - Isotope Ratio Mass Spectrometry (LC-IRMS) was applied to Determination of honey adulteration by testing the value of $\delta^{13}\text{C}$ of a variety of sugar components in honey. After the multiple comparisons of the measurements and the collection of plates of 3 kinds of syrup, doped molasses and pure honey, it was found that doped molasses could not be used to identify honey adulteration by only using Elemental Analysis-Isotope Ratio Mass Spectrometry (HT-IRMS). However, the 3 kinds of doped molasses could be measured effectively by the method of HT-IRMS combined with LC-IRMS. The technology enriched the identification method for adulterated honey.

Key words: isotope ratio mass spectrometry; multi-information; honey; adulteration identification

蜂蜜是公认的具有多种生物活性的天然食品, 它的保健功效也受到了广泛的认可。但是一些不法商家为了追求更高的经济利益, 竟无良地在天然蜂蜜中掺假, 蜂蜜掺假在我国蜂蜜市场上也已不再是个别现象。蜂蜜的主要成分是果糖和葡萄糖, 因此以掺入外源性糖浆的掺假方法最为常见。由于检测方法的局限性, 常规指标的检测, 无法达到蜂蜜真实性检测的要求^[1]。现今较为有效的鉴别方法有碳-4 植物糖含量的测定^[2], 此项目已经是国家食品安全风险监测和出入境检验检疫机构日常验货检测的常规项目。但是检测水平提高的同时掺假技术也在发展, 传统的掺入碳-4 植物糖如高果玉米糖浆的掺假方式逐渐淘汰, 取而代之的是掺入与蜂蜜来源光合原理一致的碳-3 植物糖, 如大米糖浆, 麦芽糖饴等。这些新型的掺假方式, 均需要开发新型的检测技术来进行应对。本文扩展了原碳-4 植物

糖的 HT-IRMS 检测方法, 建立了 LC-IRMS 的检测方法, 通过对蜂蜜中是否存在多糖, 双糖含量与单糖含量的比例关系以及在蜂蜜、蜂蜜蛋白、果糖、葡萄糖、双糖 $\delta^{13}\text{C}$ 值的一致性等多种信息协同对蜂蜜是否存在掺假进行鉴别。以上工作国外已有该方面的研究和应用^[4-5], 国内刚开始相关研究^[6-8], 还未有相应标准的颁布。

1 材料与方法

1.1 实验原理

1.1.1 碳-4 植物含量判别蜂蜜掺假的理论基础

现已证实几乎所有的蜜源植物属 C3 植物, 其 $\delta^{13}\text{C}$ 值大约在 -28~22‰ 之间, 而高果玉米糖浆的生产植物属 C4 植物, 其 $\delta^{13}\text{C}$ 值范围为 -20~10‰。这两种糖类物质在化学结构和性质上是完全相同的, 但碳同位素比值上却不同。当它们混在一起时, 混合物的碳同位素比值就会随比例量而变化。同时研究发现蜂蜜蛋白的 $\delta^{13}\text{C}$ 的稳定性更好, 能反映出真实蜂蜜的属性, 只要通过对提取出的蜂蜜蛋白和蜂蜜溶液同时进行测定, 比较两者间的差值, 就能反应出蜂蜜中掺入 C4

收稿日期: 2012-11-19

基金项目: 浙江省分析测试科技计划项目 (2012C37034)

作者简介: 李鑫 (1983-), 男, 工程师, 从事掺假鉴别方法开发和元素形态研究

通讯作者: 张东雷, 女, 高级工程师

植物糖的含量,并指出差值在 1%以上就属于明显差别。

1.1.2 液相-稳定同位素质谱(LC-IRMS)的检测方法判别蜂蜜掺假的理论基础

研究^[9]表明高果糖浆一般含有 6~8%的寡糖和微量高寡糖,而蜂蜜样品只含有 3~4%的低聚糖,不含高寡糖。依据这一特性使用液相色谱柱分离蜂蜜中糖组分,通过对是否存在高寡糖,双糖含量与单糖含量的比例关系来进行掺假的初步判断。研究^[4-5]表明纯正蜂蜜的多种组分由于来源相同其值 $\delta^{13}\text{C}$ 具有一致相关性,特别是其中的果糖和葡萄糖 $\text{C}^{13}\delta$ 应基本接近,各组分间的 $\delta^{13}\text{C}_{\text{max}}$ 应小于 2.10‰,通过多信息的比较可以更好的鉴别蜂蜜的真假。

1.2 仪器、试剂与材料

Thermo Fisher 公司 DELTA V Plus 同位素质谱仪,通过 Isolink 接口联接 ACCELA 液相色谱和 FLASH 2000 HT 元素分析仪; Millipore 公司 Milli-Q 超纯水制备系统; Thermo Fisher 公司 Biofuge 高速离心机,配 50 mL 和 100 mL 两种适配器; 恒温水浴锅和烘箱。

钨酸钠和硫酸为分析纯购于华东医药公司; 正磷酸(纯度 $\geq 99\%$)、过二硫酸钠(纯度 $\geq 99\%$)均购于 Sigma 公司; 蔗糖标准物质, IAEA-CH6($\delta^{13}\text{C}$ 值-10.45‰)购于奥地利维也纳国际原子能机构; 实验涉及到气体均为高纯气体购于杭州市今工气体有限公司。

3 种转化糖浆: 高果葡萄糖浆(玉米); F42 果葡萄糖浆(大米,干物质 71%); 麦芽糖饴(小麦淀粉)。1 种纯正蜂蜜购于生产企业,均分 4 份,并对其中 3 份依次掺入将以上 3 种转化糖浆。

6 种特制蜂蜜: 国家蜂产品检测中心制备,用于实验方法的验证。

1.3 样品前处理

1.3.1 样品预处理

对无结晶的蜂蜜样品,将其搅拌均匀。对有结晶的样品,置于密闭容器中 60 °C 的水浴温热,待样品全部融化后搅匀。分出 0.2 kg 作为试样。称取 15~20 g 于 100 mL 离心管中,加入 60 mL 水盖盖后混匀,放入离心机以 1500 r/min 离心 5 min,观察是否有沉淀产生,沉淀为不溶性花粉或蜂巢碎屑等物,小心倒出清液,该清液为使用试样。每份蜂蜜样品需准备 2 份使用试样。

1.3.2 元素分析联用同位素比率质谱(HT-IRMS)的样品制备

蜂蜜样品: 用移液器移取 0.5 μL 使用试样至 5 mm \times 3.3 mm 锡杯中,密封备用。

蜂蜜蛋白质: 吸取 50 mL 使用试样于离心管中,加入 1.0 mL 10% 钨酸钠溶液和 1.0 mL 10% 硫酸溶液混匀,静止 2 min,如产生絮状物较少则 60 °C 水浴中 30 min,每间隔 10 min 涡旋离心管 20 s,直到有絮状物析出。以 3000 r/min 离心 5 min,倾掉上层清液,再以约 50 mL 水充分洗涤沉淀物后离心,如此反复洗涤沉淀物 3 次,最后倒干上清液,将含有沉淀蛋白质的离心管置于 80 °C 烘箱中干燥 3 h。称取上述烘干的蛋白质 1~2 mg,于 5 mm \times 3.3 mm 锡杯中,密封备用。

1.3.3 液相色谱联用同位素比率质谱(LC-IRMS)的样品制备

蜂蜜样品: 超纯水稀释使用试样 200 倍。混匀后经 0.22 μm 的水相滤膜至进样瓶中,旋盖待测。

1.4 仪器条件和测定过程

1.4.1 仪器条件

高压: 3.0 KV; 磁场强度: 11824 A/M; 辅助气压力: 0.4 MPa; 离子源类型: EI 离子源; 电流: 1.50 mA; 扫描方式: 正离子扫描; 测定质量数: 44/45/46。其余仪器条件和参数见表 1。

表 1 联用时仪器条件和参数

Table 1 Conditions and parameters of instruments during hyphenating

元素分析-同位素质谱 (HT-IRMS) 参数		液相色谱-同位素质谱 (LC-IRMS) 参数	
反应管	氧化还原一体填充反应石英管	色谱柱:	Phenomenex Rezex RCM(Ca^{2+})300 \times 8 mm
载气	300 mL/min	流动相和流速:	超纯水; 300 $\mu\text{L}/\text{min}$
氧气	175 mL/min	正磷酸浓度、流速	0.2 mol/L; 40 $\mu\text{L}/\text{min}$
参考气	150 mL/min	过二硫酸钠浓度、流速	0.2 mol/L; 40 $\mu\text{L}/\text{min}$
炉温	50 °C	柱温	85 °C
He 压力	1.2 bar	进样量	10 μL
反应管温度	960 °C	氧化炉温度	99.9 °C
提取电压	105.1 eV	提取电压	123.5 eV
真空度	1.8×10^{-6} mbar	真空度	3.2×10^{-6} mbar

注: 0.2 mol/L 正磷酸和 0.2 mol/L 过二硫酸钠溶液, 分别存于棕色瓶内。用前需使用超声波和真空过滤脱气。

1.4.2 测定过程

(1) 元素分析仪(HT): 锡杯通过自动进样器被送入氧化还原一体反应管中, 样品在过氧环境中瞬间高温分解, 形成的含碳混合气体在高纯氮气的运载通过较低温度的还原填充层, 样品中的碳转化成 CO₂. 从反应管下端排出, 经过吸水柱去除水分和分离柱分离其他气体干燥纯化后进入质谱系统。

(2) 液相色谱(LC): 进样器吸取一定量样品, 以纯水作为流动相在液相部分通过钙离子螯合柱进行分离, 分离后的不同糖组分顺次与氧化剂正磷酸和过二硫酸钠溶液在 LC 接口混合阀内充分混合后进入氧化炉, 99.9 °C 下糖组分中碳被氧化成 CO₂ 气体, 过滤水汽后进入质谱系统。同时在相同条件下对多种高纯糖标准品进行测定, 确定各种糖的出峰区间。

(3) 质谱仪(IRMS): 离子源将进入的纯净 CO₂ 气体的原子、分子电离成为离子, 质量分析器将离子按照质荷比的大小分离开, 通过不同的马特杯接收质荷比不同的离子, 并记录离子流强度, 本实验中接受对象 (m/z) 是 44/45/46。同时用已知 δ¹³C 值的蔗糖标准品标定高纯 CO₂ 参考气体的 δ¹³C 值, 进行样品测定时, 每个样品的分析起始阶段和结尾阶段通入 CO₂ 参考气作为内标, 对样品的 δ¹³C 值进行计算。

2 结果与分析

2.1 HT-IRMS 的测定结果和分析

使用 HT-IRMS 对纯正蜂蜜、3 种掺糖蜂蜜、3 种转化糖浆进行分析。结果如表 2。

表 2 7 种测试对象的 δ¹³C 值

Table 2 The δ¹³C values of 7 kinds of test objects

样品	纯正蜂蜜	高果糖浆	F42 糖浆	麦芽糖饴	掺糖蜜 1#	掺糖蜜 2#	掺糖蜜 3#
δ ¹³ C, ‰	-25.81	-11.54	-26.52	-25.93	-21.52	-26.06	-25.91

从表 2 结果可以看出, 只有属于碳-4 植物糖的玉米高果葡萄糖浆的 δ¹³C 和纯正蜂蜜的 δ¹³C 差异明显, 分属不同的区间; 同为碳-3 植物糖的大米糖浆和麦芽糖饴的值与纯正蜂蜜基本接近, 差值均小于 1‰; 自制的 3 种掺糖蜂蜜中也只有 1# 掺入高果葡萄糖浆的假蜜, 其 δ¹³C 值与纯正蜂蜜的差值大于 1‰, 差别较为明显, 可以区分, 其余两种与纯正蜂蜜的 δ¹³C 几乎无差别, 该实验结论与文献^[10-11]一致, 肯定了现行的 HT-IRMS 检测方法能有效的鉴别出碳-4 植物糖的掺入, 但是对使用碳-3 植物糖的掺假无法鉴别。使用碳-3 植物糖作为添加物的掺假方式具有一定的隐秘性, 需要有更好的检测技术进行应对。

2.2 LC-IRMS 的测定结果和分析

使用 LC-IRMS 对纯正蜂蜜和 3 种掺糖蜂蜜进行分析, 分析谱图如图 1。

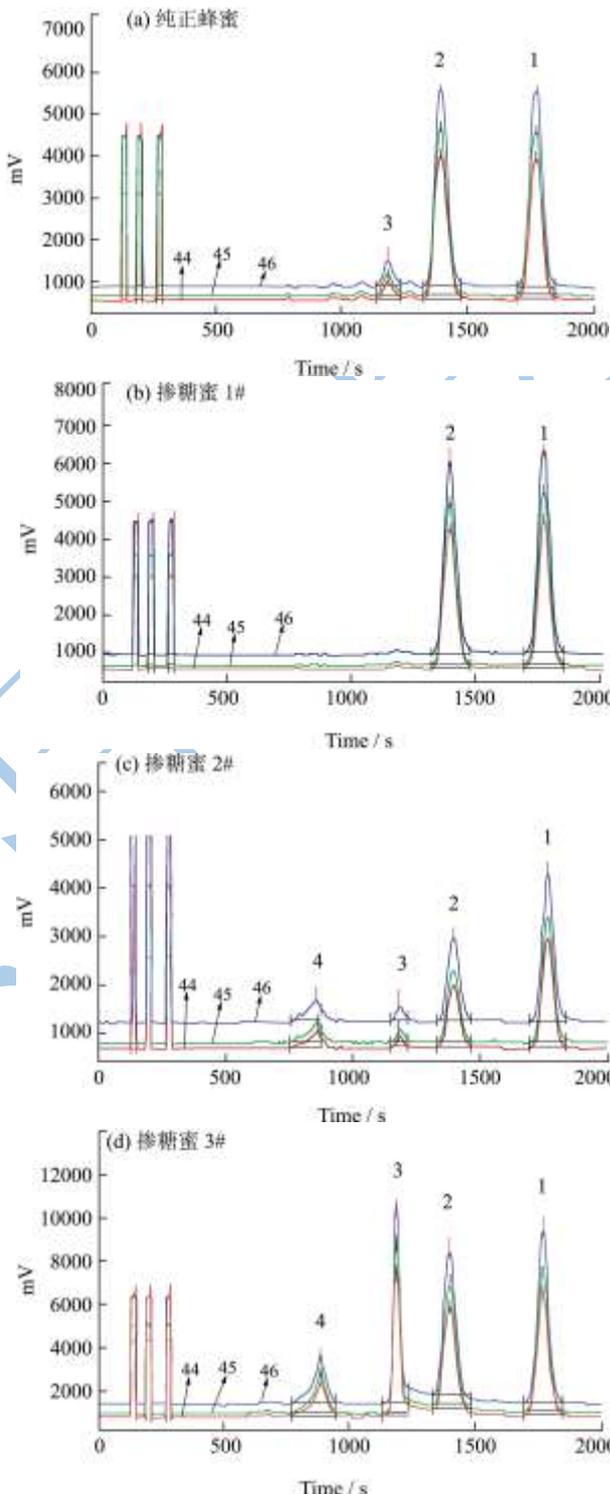


图 1 4 种测试对象的 LC-IRMS 的图谱

Fig.1 The collection of plates of LC-IRMS of 4 kinds of test objects

注: δ¹³C_p-蜂蜜中蛋白质 δ¹³C 值; δ¹³C_H-蜂蜜 δ¹³C 值; δ¹³C_{fru}-蜂蜜中果糖 δ¹³C 值; δ¹³C_{glu}-蜂蜜中葡萄糖 δ¹³C 值; δ¹³C_{ds}-蜂蜜中双糖 δ¹³C 值; δ¹³C_{ts}-蜂蜜中三糖 δ¹³C 值; δ¹³C_{os}-蜂蜜中多糖 δ¹³C 值; NA-未出峰。

表3 4种测试对象的 $\delta^{13}\text{C}$ 测定结果

Table 3 $\delta^{13}\text{C}$ testing results of 4 kinds of test objects

测定项目	纯正蜂蜜	掺糖蜜 1#	掺糖蜜 2#	掺糖蜜 3#
$\delta^{13}\text{Cfru}$, ‰	-25.74	-20.35	-25.61	-25.67
$\delta^{13}\text{Cglu}$, ‰	-25.82	-21.76	-26.43	-25.42
$\delta^{13}\text{Cds}$, ‰	-25.36	NA	-24.96	-26.46
$\delta^{13}\text{Cos}$, ‰	NA	NA	-24.85	-24.99
$\Delta\delta^{13}\text{Cfru-glu}$, ‰	0.08	1.41	0.82	-0.25

图1中1号峰为果糖、2号峰为葡萄糖、3号峰为双糖、4号峰为多糖。从图谱上我可以看出(a)纯正蜂蜜主要以果糖和葡萄糖为主,有少量双糖,而(b)掺糖蜜1#中双糖基本无出峰,可能是由于大量高果糖浆的掺入稀释了原蜂蜜中双糖含量,(c)掺糖蜜2#中出现了多糖峰型,在蜂蜜中高寡糖是不应存在的,出现了多糖峰可直接判定掺假,(d)掺糖蜜3#中不单出现了多糖峰,双糖峰强度大大超过了单糖强度和纯正蜂蜜中组分的实际含量的比例关系不符。通过直观的图谱分析就可以获得初步的是否掺假的定性结论,结合各种糖组分的 $\delta^{13}\text{C}$ 可以获取到更多的信息。各种糖组分的 $\delta^{13}\text{C}$ 值见表3。

表4 6种蜂蜜的测定结果

Table 4 Testing results of 6 kinds of honey

测定项目	蜂蜜 1#	蜂蜜 2#	蜂蜜 3#	蜂蜜 4#	蜂蜜 5#	蜂蜜 6#
$\delta^{13}\text{Cfru}$, ‰	-24.36	-25.21	-24.18	-25.14	-26.36	-25.45
$\delta^{13}\text{Cglu}$, ‰	-24.17	-25.58	-24.25	-25.34	-25.98	-27.47
$\delta^{13}\text{Cds}$, ‰	-25.79	-26.53	-25.66	-24.90	-23.77	-29.66
$\delta^{13}\text{Cts}$, ‰	NA	NA	-24.24	NA	NA	NA
$\delta^{13}\text{Cos}$, ‰	NA	NA	NA	NA	NA	NA
$\delta^{13}\text{Cp}$, ‰	-24.03	-25.28	-24.48	-24.36	-26.21	-26.63
$\delta^{13}\text{Ch}$, ‰	-24.66	-25.59	-24.99	-25.15	-26.24	-26.66
$\Delta\delta^{13}\text{Cp-h}$, ‰	0.64	0.38	0.51	0.79	0.04	0.03
$\Delta\delta^{13}\text{Cfru-glu}$, ‰	-0.19	0.12	0.07	0.200	-0.38	2.02
$\Delta\delta^{13}\text{Cmax}$, ‰	-1.76	1.32	1.48	-0.98	-2.59	4.21
判定结论	纯正蜂蜜	纯正蜂蜜	纯正蜂蜜	纯正蜂蜜	掺假蜂蜜	掺假蜂蜜

从结果可以看出该6种蜂蜜的 $\Delta\delta^{13}\text{Cp-h}$ 值均小于1‰,只采用HT-IRMS无法识别出掺假蜂蜜,特别是5#和6#蜂蜜的 $\Delta\delta^{13}\text{Cp-h}$ 是以上6种中最小的;且6种蜂蜜都没有出现多糖的峰形,不能直观从图谱上观察出掺假蜂蜜;以上样品多组分的 $\delta^{13}\text{C}$ 也均在-22‰以下,属于碳-3植物糖的区间范围,掺假方式具有一定的隐秘性,较难判断。但是通过多信息间的比较我们发现前4种蜂蜜无论是 $\Delta\delta^{13}\text{Cfru-glu}$ 、 $\Delta\delta^{13}\text{Cp-h}$ 还是 $\Delta\delta^{13}\text{Cmax}$ 均能符合判定依据,但是5#的蜂蜜 $\delta^{13}\text{Cds}$ 仅为-23.77‰,其他组分的 $\Delta\delta^{13}\text{C}$ 相互接近在-26‰左右,区别明显,其 $\Delta\delta^{13}\text{Cmax}$ 是 $\delta^{13}\text{Cds}$ 和 $\delta^{13}\text{Cfru}$ 之间

的差值为2.59‰,可以判定其为掺假蜂蜜,甚至猜测是仅添加了外源性双糖的掺假方式。6#的蜂蜜中 $\delta^{13}\text{Cfru}$ 、 $\delta^{13}\text{Cglu}$ 、 $\delta^{13}\text{Cds}$ 三值差异较大,但是 $\Delta\delta^{13}\text{Cp-h}$ 却仅为0.03‰,很可能是使用多种糖浆经过精密计算调配而成,这也是一种新的掺假方式,能迷惑原有的HT-IRMS技术但是在LC-IRMS下就无所遁形。

2.3 结合 HT-IRMS 和 LC-IRMS 方法对 6 种特制蜂蜜进行测定

对由国家蜂产品检测中心提供的6种特制蜂蜜进行检测,并依据文献^[5]中纯正蜂蜜的判定标准:果糖和葡萄糖 $\delta^{13}\text{C}$ 的差值($\Delta\delta^{13}\text{Cfru-glu}$)= $\pm 1.0\%$ 、蛋白质和蜂蜜 $\delta^{13}\text{C}$ 的差值($\Delta\delta^{13}\text{Cp-h}$)= $\pm 1.0\%$ 、各组分 $\delta^{13}\text{C}$ 的最大差值($\Delta\delta^{13}\text{Cmax}$)= $\pm 2.1\%$ 进行判定,判定结论与反馈的实际制样情况吻合,5#和6#蜂蜜是餐假蜜其余4种为纯正蜂蜜。具体测定结果见表4。

3 结论

同位素比率质谱联用技术的不断扩展,能更好的服务于食品安全检测工作,结合HT/LC-IRMS的检测方法能有效判别蜂蜜的掺假,本文通过对玉米源、大

米源及小麦源 3 种转化糖浆及其掺假蜂蜜进行了研究,对 6 种特制样品进行检测验证了判别的有效性,该技术手段丰富了鉴别掺假蜂蜜的方法,初步具有形成国家标准的基础,有推广和应用的價值。

参考文献

- [1] 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
- [2] FDA. Import Alerts, IA#36-01-11/19/08 revised "Adulteration of honey" [EB/OL]. (2008-11-19) [2009-08-28].<http://www.fda.gov/ForIndustry/ImportProgram/ImportAlerts/default.htm>
- [3] 胡福良.碳稳定同位素比值分析法(SIRA)在蜂蜜质量鉴别中的应用[J].中国蜂业,2000,51(6):21-22
- [4] Cabanero A I, Recio J L, Rupérez M. Liquid Chromatography Coupled to Isotope Ratio Mass Spectrometry: A New Perspective on Honey Adulteration Detection [S]. J Agric Food Chem, 2006, 54:9719-9727
- [5] ELFLEIN L, RAEZKE K P. Improved detection of honey adulteration by measuring differences between $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 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 ($\delta^{13}\text{C}$ -EA/LC-IRMS) [J]. Apidologie, 2008, 39 (5):574-587
- [6] 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
- [7] 李学民,曹彦忠,贾光群,等.液相色谱-同位素质谱法测定蜂蜜中糖组分 $\delta^{13}\text{C}$ 值[J].中国蜂业,2012,63(3):79-82,87
- [8] 罗东辉,罗海英,洗燕萍,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,2012,63(3):862-866
- [9] 张存洁,董伟,曾纪琰.高效液相色谱法检测蜂蜜中高果糖浆掺假[J].食品科学,1993,158(2):71-75.
- [10] PADOVAN G J, de JONG D, RODRIGUES L P, et al. Detection of adulteration of commercial honey samples by the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio [J]. Food Chemistry, 2003, 82(4): 633-636
- [11] 李沈轶,胡柳花,隋丽敏,等.利用内标碳同位素比率法研究蜂蜜中植物糖浆[J].食品工业科技,2010,31(7):365-367,370