

蜂蜜中醣類之穩定碳同位素比值檢驗方法

Method of Test for $\delta^{13}\text{C}$ of Saccharides in Honey

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於蜂蜜中醣類之穩定碳同位素($\delta^{13}\text{C}$)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體以液相層析儀(liquid chromatograph, LC)分離醣類成分後，經過硫酸鈉溶液及磷酸溶液於高溫氧化產生之二氧化碳氣體，以穩定同位素比值質譜儀(stable isotope ratio mass spectrometer, IRMS)分析之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 液相層析串聯穩定同位素比值質譜儀(LC/IRMS)：
 - 2.1.1.1. 液相層析儀：Ultimate 3000，或同級品。
 - 2.1.1.2. 層析管：Rezex™ RCM-Monosaccharide Ca^{2+} ，8 μm ，內徑7.8 mm × 30 cm，或同級品。
 - 2.1.1.3. 連續流串聯介面(continuous flow interface)：Conflo IV，或同級品。
 - 2.1.1.4. 液相層析儀用連續流串聯介面：LC IsoLink，含流動注入分析(flow injection analysis, FIA)及管柱分析(on-column)模式，或同級品。
 - 2.1.1.5. 穩定同位素比值質譜儀：Delta V Advantage，或同級品。
 - 2.2. 試藥及氣體：果糖(fructose)^(註)、麥芽糖(maltose)^(註)、海藻糖(trehalose)^(註)、松二糖(turanose)^(註)、棉子糖(raffinose pentahydrate)^(註)、過硫酸鈉(sodium persulfate)及磷酸(85%)均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25°C可達18 M Ω ·cm以上)；氮氣及二氧化碳氣體(純度大於99.9995%)。

註：果糖、麥芽糖、海藻糖、松二糖及棉子糖均須取約0.2 mg，精確稱定，依「蜂蜜中C4植物糖之檢驗方法」，先以元素分析儀串聯穩定同位素比值質譜儀(EA-IRMS)標定其穩定碳同位素比值($\delta^{13}\text{C}$)，標定後供作標準品，亦可視檢體 $\delta^{13}\text{C}$ 範圍使用具合適驗證值(certified value)之市售參考物質(reference material)作為標準品。
 - 2.3. 器具及器材：
 - 2.3.1. 離心管：50 mL，PP材質。
 - 2.3.2. 樣品瓶：2 mL。
 - 2.4. 試劑之調製：

2.4.1. 0.16 M過硫酸鈉溶液：

取過硫酸鈉19 g，加去離子水溶解使成500 mL。

2.4.2. 2.0 M磷酸溶液：

取磷酸61.3 mL，加去離子水使成500 mL。

2.5. 標準溶液之配製：

分別取已標定 $\delta^{13}\text{C}$ 之果糖、麥芽糖、海藻糖、松二糖及棉子糖各約10 mg，精確稱定，以去離子水溶解並定容至10 mL；臨用時取1 mL置入樣品瓶中，通入氬氣30秒後旋蓋，供作標準溶液。

2.6. 檢液之調製：

取檢體約80 mg，精確稱定，以去離子水溶解並定容至10 mL；臨用時取1 mL置入樣品瓶中，通入氬氣30秒後旋蓋，供作檢液。

2.7. $\delta^{13}\text{C}$ 標準化曲線之製作：

將各標準溶液分別以液相層析串聯穩定同位素比值質譜儀於流動注入分析模式，依下列條件進行分析。就所測得之 $\delta^{13}\text{C}$ 值與所對應之 $\delta^{13}\text{C}$ 標定值(若使用市售參考物質則為驗證值)進行線性迴歸，製作標準化曲線。

液相層析串聯穩定同位素比值質譜測定條件^(註1)：

層析管：RezexTM RCM-Monosaccharide Ca^{2+} ，8 μm ，內徑7.8 mm \times 30 cm。

層析管溫度：70°C。

移動相：去離子水，需持續通入氬氣。

移動相流速：0.3 mL/min。

分析時間：60 min。

進樣體積：(1)流動注入分析模式：2 μL 。

(2)管柱分析模式：

a.分析單醣(果糖及葡萄糖)：1 μL 。

b.分析雙醣及三醣：5 μL 。

參考氣體(Reference gas, CO_2)壓力：2.0 bar。

載氣(Carrier gas, He)壓力：1.0 bar。

沖洗氣體(Purge gas, He)壓力：1.5 bar。

反應爐溫度：99.9°C。

反應及催化試劑：0.16 M過硫酸鈉溶液及2.0 M磷酸溶液，需持續通入氬氣。

反應及催化試劑流速：0.05 mL/min。

氧氣(m/z 32)之背景值(訊號放大比率 3×10^8)：10~15 V^(註2)。

偵測離子： m/z 44、45、46。

註：1. 上述測定條件分析不適時，依所使用之儀器，設定適合之測定參數。

2. 氧氣之背景值代表氧化能力(oxidation potential)，主要取決於0.16 M過硫酸鈉溶液之流速，可依實際情況將試劑流速調整至最適值。

2.8. 檢體中醣類之 $\delta^{13}\text{C}$ 分析：

將檢液以液相層析串聯穩定同位素比值質譜儀於管柱分析模式下，依2.7.節條件進行分析。就所得單醣(果糖及葡萄糖)、雙醣及三醣之 $\delta^{13}\text{C}$ 測定值，由標準化曲線求得檢體中各醣類之 $\delta^{13}\text{C}$ 校正值。

2.9. 檢體中蛋白質之 $\delta^{13}\text{C}$ 分析：

依「蜂蜜中C4植物糖之檢驗方法」進行分析，求得檢體中蛋白質之 $\delta^{13}\text{C}$ 校正值。

2.10. 檢體疑似摻加C3植物糖之判定閾值：

依2.8節及2.9節之分析結果，計算檢體中各醣類及蛋白質間 $\delta^{13}\text{C}$ 差異值($\Delta\delta^{13}\text{C}$)，並參考附表進行研判。

附註：本檢驗方法可提供做為蜂蜜是否摻加C3植物糖之參考，然鑑於蜂蜜可能受餵食蜜蜂糖水、蜂蜜之產地、蜜源、氣候及環境等因素影響，其結果仍需併調查結果所見綜合研判。

參考文獻：

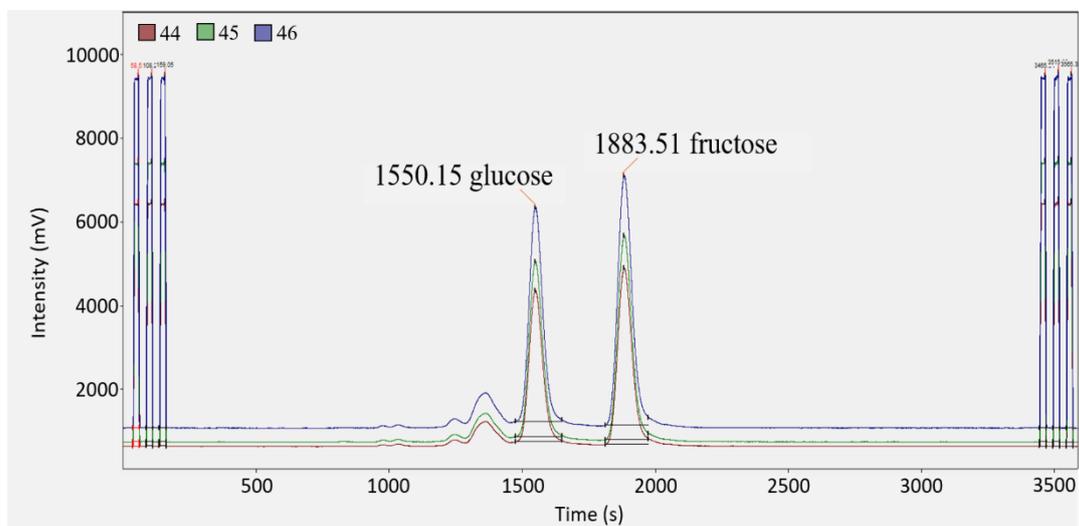
1. Elflein, L. and Raetzke, K. P. 2008. Improved detection of honey adulteration by measuring differences between $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ stable carbon isotope ratios of protein and sugar compounds with a combination of elemental analyzer – isotope ratio mass spectrometry and liquid chromatography – isotope ratio mass spectrometry ($\delta^{13}\text{C}$ -EA/LC-IRMS). *Apidologie* 39: 574-587.
2. Aries, E., Burton, J., Carrasco, L., De Rudder, O. and Maquet, A. 2016. Scientific support to the implementation of a Coordinated Control Plan with a view to establishing the prevalence of fraudulent practices in the marketing of honey. Results of honey authenticity testing by liquid chromatography-isotope ratio mass spectrometry.

JRC technical reports: JRC104749.

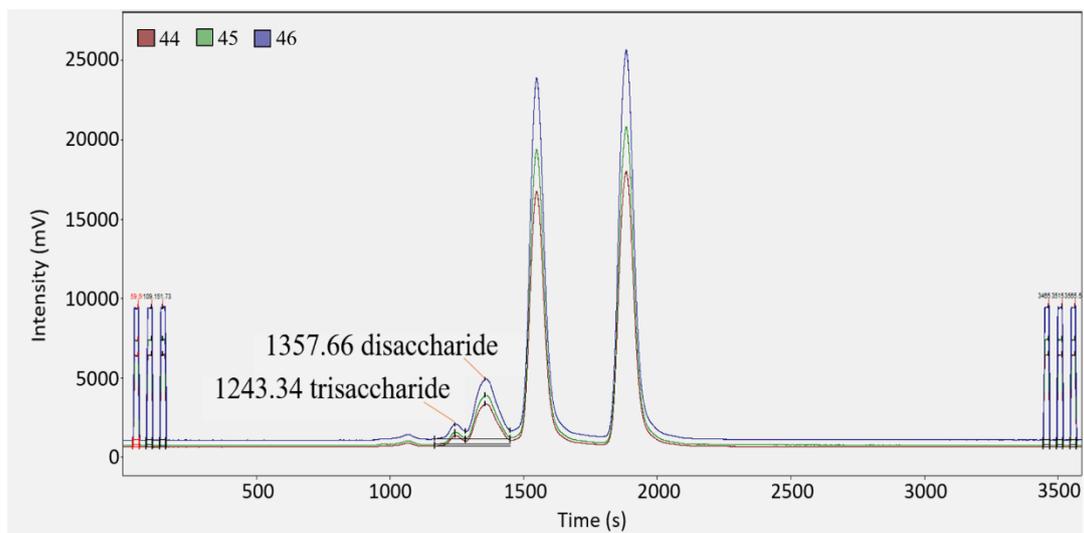
3. Ždiniaková, T., Lörchner, C., De Rudder, O., Dimitrova, T., Kaklamanos, G., Breidbach, A., Respaldiza, A., Vas Silva, I. M., Paiano, V., Ulberth, F. and Maquet, A. 2023. EU Coordinated action to deter certain fraudulent practices in the honey sector. Analytical testing results of imported honey. JRC technical reports: JRC130227.
4. 衛生福利部食品藥物管理署。2023。蜂蜜中C4植物糖之檢驗方法(TFDAF0030.01)。112年10月13日公布。

參考層析圖譜

(a)



(b)



圖、蜂蜜中葡萄糖與果糖(a)及雙糖與三糖(b)之 LC-IRMS 圖譜

附表、歐盟 JRC 技術報告對蜂蜜純度採用之基準及判定閾值

| 參數* (Parameter) | 基準 (Benchmark) | 考慮量測不確定度之判定閾值 (Decision threshold taking account of measurement uncertainty) |
|----------------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{fru-glu}}$ | $\pm 1\text{‰}$ | $\pm 1.33\text{‰}$ |
| $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{fru-ds}}$ | $\pm 2.1\text{‰}$ | $\pm 2.52\text{‰}$ |
| $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{fru-ts}}$ | $\pm 2.1\text{‰}$ | $\pm 2.61\text{‰}$ |
| $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{fru-p}}$ | $\pm 2.1\text{‰}$ | $\pm 2.49\text{‰}$ |
| $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{glu-ds}}$ | $\pm 2.1\text{‰}$ | $\pm 2.53\text{‰}$ |
| $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{glu-ts}}$ | $\pm 2.1\text{‰}$ | $\pm 2.62\text{‰}$ |
| $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{glu-p}}$ | $\pm 2.1\text{‰}$ | $\pm 2.50\text{‰}$ |
| $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{ds-ts}}$ | $\pm 2.1\text{‰}$ | $\pm 2.68\text{‰}$ |
| $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{ds-p}}$ | $\pm 2.1\text{‰}$ | $\pm 2.58\text{‰}$ |
| $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{ts-p}}$ | $\pm 2.1\text{‰}$ | $\pm 2.66\text{‰}$ |

*fru為果糖；glu為葡萄糖；ds為雙糖；ts為三糖；p為蛋白質
(Ždiniaková, T. *et al.*, 2023)