

以元素分析儀串聯同位素比值質譜儀進行蜂蜜C4糖之檢驗

尤心正 黃子凌 方俊仁 許哲綸 蔡佳芬 高雅敏 王德原 陳惠芳

食品藥物管理署研究檢驗組

摘要

蜜蜂採蜜以C3植物為主，因此利用C3和C4植物糖之碳同位素比值不同的特性，可分析蜂蜜所含C4植物糖之含量來區別摻偽。本研究利用元素分析/同位素比值質譜儀(elemental analyzer/isotope ratio mass spectrometer, EA-IRMS)分析蜂蜜之碳同位素，以協助釐清是否有混摻C4植物糖之行為。分析中以參考物質(USGS-40)及fructose、maltotriose、melezitose、turanose、raffinose、maltose、glucose及sucrose等糖類確認數據之品質，同日內或異日間精密度及準確度測試之標準偏差均小於0.3%，準確度達99.93%以上。蜂蜜於室溫下貯放1、7、14及30天進行穩定性試驗，結果 $\delta^{13}\text{C}$ 值在-25.83 - -25.89‰之間，並無明顯差異。將不同比例果糖添加於蜂蜜後進行碳同位素分析，結果當C4果糖添加量為10%時，其C4糖含量分析值為12.92% (大於7%)，可判定為摻混。添加C3果糖者則無法藉此方法看出差異。以上述方法進行台灣養蜂協會提供蜂蜜檢體211件及食藥署北區管理中心抽驗市售蜂蜜檢體83件之碳同位素分析，檢驗結果養蜂協會211件蜂蜜檢體之 $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ 值分布於-29.53 - -18.18‰，平均值為-25.66‰，其中9件檢體 $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ 值大於-24‰，且C4糖含量大於7%。北區管理中心83件蜂蜜檢體之 $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ 值分布於-26.80 - -12.04‰，平均值為-24.23‰，其中19件檢體 $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ 值大於-24‰，且C4糖含量大於7%。以台灣地區取得之蜂蜜檢驗結果進行分析， $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ 值大於-24.00‰者與C4糖含量之相關性迴歸分析，所得線性迴歸係數 R^2 為0.8263，顯示兩者具有顯著相關性。本研究將持續累積蜂蜜檢測資料庫，俾憑評估建立本土蜂蜜摻偽判定模式之可行性。

關鍵詞：蜂蜜、摻偽、元素分析、同位素比值質譜儀

前言

根據中華民國國家標準CNS 1305 N5024，蜂蜜係指蜜蜂採集植物之花蜜(nectar)或蜜露(honeydew)，經蜜蜂收集、混合自身特殊物質進行轉化、儲存、脫水到熟成之天然甜味物質。主要成分是果糖和葡萄糖，另含有有機酸、酵素及來自於蜜蜂採集的固體顆粒物如植物花

粉等，其色澤隨蜜源的不同而由無色到深棕色，一般呈粘稠流體狀，貯存時間越長或溫度較低時可能形成部分或全部結晶，其風味及氣味隨蜜源植物不同而異⁽¹⁾。臺灣主要蜜源為龍眼(4 - 5月)、荔枝(3 - 4月)、大花咸豐草(6 - 11月)、油菜(12月至次年2月)等⁽²⁾，民國103年所生產的蜂蜜量為12,758公噸⁽³⁾，龍眼蜜、荔枝蜜與百花蜜等為市場主流商品。由於國內產

量不足供應內需，因而出現不肖廠商利用高果糖糖漿、焦糖色素及香料等混充成低價「合成蜜」，佯稱純天然蜂蜜販售，損害消費者的權益並嚴重打擊國產蜂蜜市場。

CNS 1305 N5024同時定有蜂蜜品質相關要求及檢驗方法，其內容包括水分含量、蔗糖含量、糖類含量(果糖與葡萄糖之總和)、水不溶物含量、酸度、澱粉酶活性及羥甲基糠醛(hydroxy methyl furfural, HMF)等⁽¹⁾；陳與區(2006)所開發檢測非天然蜂蜜物質方法，主要以檢測羥甲基糠醛、果糖與葡萄糖之比值(F/G)、麥芽糖及澱粉酶活性等5項來作為判定真假蜂蜜的參考，但經過市售品及調配品實測後，仍有約10%的誤判率，如再搭配近紅外線光譜檢測技術，則仍有7%的誤判率⁽⁴⁾，且難以分辨刻意添加蜂蜜特定比例的果糖、葡萄糖與澱粉酶等行為。因此亟需開發一套蜂蜜摻偽檢驗技術，以保護消費者權益並維護國內蜂產業競爭力。

自然環境中氫、氮、氧、碳、硫等元素之同位素比值穩定存在，藉由此特性，近年來利用同位素比值質譜儀分析，可觀察到生物體因環境、代謝等因素所造成的元素穩定同位素比值的微小差異⁽⁵⁾，並應用於農業及環境之溯源分析，以同位素比值質譜儀鑑定蜂蜜之C4糖即是一例。植物界糖生合成會因植物光合作用所進行路徑的不同而異，區分為C3、C4及景天科酸代謝(crassulacean acid metabolism, CAM)等3型，C3型植物存在較多之¹²C同位素，C4型相較之下存在較多之¹³C同位素，因此C4植物中¹³C/¹²C比值高於C3植物。鑒於C3型植物擁有較多花蜜，蜜蜂可從其獲得絕大多數的蜜汁，因此蜂蜜之碳同位素比值趨近C3型植物糖。而甘蔗或玉米均屬C4型植物，因此甘蔗糖、玉米糖漿之碳同位素比值明顯與C3型植物糖不同，添加來自甘蔗糖或玉米糖漿會提高蜂蜜中穩定碳同位素¹³C/¹²C的比例，藉由同位素比值質譜儀分析，測得及比較其

$\delta^{13}\text{C}$ 數值，可分辨出蜂蜜是否混摻C4型植物來源的糖^(6,7)，依據AOAC 978.17建議， $\delta^{13}\text{C}$ 低於-23.5‰判定為純蜂蜜，高於-21.5‰判定為摻偽蜜，介於-23.5及-21.5‰間則為可疑摻偽蜜⁽⁸⁾。此外，蜂蜜所含蛋白質不受加糖摻偽影響，因此其穩定碳同位素可作為分析時之內部標準，經由計算可得蜂蜜中所含C4植物糖含量。而AOAC 998.12根據上述原理，分別分析蜂蜜及自蜂蜜中萃取所得蛋白質之穩定碳同位素比值，再加上一般玉米糖漿之 $\delta^{13}\text{C}$ 為-9.7‰的常數，經由計算可得C4植物糖含量百分比，並建議大於7%視為含C4糖⁽⁹⁾。然而對於低蛋白質含量的蜂蜜，如金合歡蜜與薰衣草蜜，在判定上較為困難。此外，該方法無法分辨蜂蜜是否摻入C3植物來源之糖漿，如甜菜糖、菊苣糖或米轉化糖漿⁽¹⁰⁾等。

本研究已於103年建立以EA/IRMS分析蜂蜜及其蛋白質之穩定碳同位素比值之檢驗方法，並完成22件市售蜂蜜產品之檢驗。104及105年度進一步以該方法檢測台灣養蜂協會(下稱養蜂協會)提供之蜂蜜檢體211件，及食藥署北區管理中心(下稱北區管)提供之市售蜂蜜檢體83件。

材料與方法

一、檢體來源

- (一)由北區管提供市售蜂蜜檢體83件，為避免檢體結晶，所有檢體置於室溫暗處貯存。
- (二)由各地蜂農提供，並由養蜂協會彙整後寄至食藥署，共211件蜂蜜檢體，依其產地及蜜源分類，檢體來自台中、台南、花蓮、南投、高雄、嘉義、彰化、桃園、苗栗、雲林等10個縣市，主要蜜源有龍眼、荔枝、咸豐草及百花蜜等，為避免檢體結晶，所有檢體置於室溫暗處貯存。

二、試藥

- (一)試藥：鎢酸鈉(鎢酸鈉二水，sodium tungstate dihydrate，99%)及硫酸(sulfuric acid，97%) (Merck, Darmstadt, Germany)。
- (二)對照用參考物質
IAEA-CH-6、RM 8542、USGS-40、(RM 8573；RMA) (IAEA, Vienna, Austria)。
- (三)sucrose、maltose、glucose、turanose、fructose、maltotriose、melezitose、raffinose、trehalose dihydrate (Sigma-Aldrich, Munich, Germany)。

三、器具

離心管(50 mL，PP材質)、同位素比值質譜分析盛裝檢體用錫杯、檢體盒及藥勺。

四、設備

- (一)離心機(centrifuge 5804R, KN-70, Kubota, Japan)
- (二)旋轉振盪器(Thermolyne Maxi Mix II，Dogger, USA)
- (三)烘箱(DENG TNG DOV-40 ONDA, 國華, Taiwan)
- (四)恆溫水槽(WBS-S, Wah-fu, Taiwan)
- (五)元素分析串聯同位素比值質譜儀(elemental-analyzer/isotopic reference mass spectrometry, EA-IRMS)：含元素分析儀：Flash EA 2000、介面：Conflo III、質譜儀(Delta vadvantage, Thermo, Germany)

五、查核或對照用參考物質檢體之配製

以藥勺取對照用參考物質0.2 - 0.4 mg至錫杯中，精確稱定，將錫杯摺疊成約2 mm之立方體並置於檢體盒中，供作查核或對照用參考物質檢體。

六、試劑之調製

- (一)10%鎢酸鈉溶液：稱取鎢酸鈉二水11.2 g，以去離子水溶解使成100 mL。
- (二)0.335 M硫酸溶液：取98%濃硫酸1.82 mL，緩緩加入去離子水80 mL中，再加去離子水使成100 mL。

七、檢液之調製

- (一)蜂蜜
以藥勺取檢體 0.5 ± 0.2 mg至錫杯中，精確稱定，將錫杯摺疊成約2 mm之立方體並置於檢體盒中，供作檢品。
- (二)蜂蜜中蛋白質
取蜂蜜檢體10 - 12 g置於50 mL離心管中，加入去離子水4 mL，混合均勻，另取10%鎢酸鈉溶液2 mL及0.335 M硫酸溶液2 mL混合後，加入蜂蜜水中混合均勻。將離心管置於80°C水浴中加熱直至絮凝狀物出現，如無絮凝物，再加0.335 M硫酸溶液2 mL，持續加熱至絮凝物出現。以去離子水定容至40 mL，以1500 xg離心5分鐘，並丟棄上清液，沉澱物重複上述清洗步驟(水洗、離心、丟棄上清液)，並確保每次清洗皆未遺失。將蛋白質沉澱物全數移入小檢體瓶，以75°C烘乾3小時以上。以藥勺取烘乾之蛋白質沉澱物約 0.5 ± 0.2 mg至錫杯中，精確稱定，將錫杯摺疊成約2 mm之立方體並置於檢體盒中，供作蛋白質檢品。

八、EA-IRMS之測定條件

EA-IRMS儀器之各項儀器參數設定：載流氣體(氮氣)：250 mL/min，氧氣：250 mL/min，參考氣體：100 mL/min，爐溫：70°C，氮氣壓力：1.2 bar，反應管溫度：1020°C，真空度： 1.8×10^{-6} bar。

分析前EA-IRMS均需以對照用參考物質

USGS-40進行系統性測試，通過後才能展開分析。且每批次分析前以USGS-40為品管查核檢體再次確認，三重複分析。此外，每分析4件檢體需加入品管查核檢體，每批分析最後也需再次分析品管查核檢體，以確認儀器同位素比值分析結果的精密度與準確度符合規範(每批次品管查核檢體之標準偏差需小於0.3%)。

九、精密度

以maltose、maltotriose、melezitose、raffinose、sucrose及turanose為檢體，探討不同糖類在同日內(intra day)與異日間(inter day)碳同位素比值檢測值之差異性。每個樣品稱取0.25 mg，三重複分析，得到碳同位素比值($\delta^{13}\text{C}$)與標準偏差之平均值(SD)。同日內及異日間之 $\delta^{13}\text{C}$ 標準偏差應小於0.3‰。

十、錫杯對EA-IRMS分析之影響

為確認錫杯本身是否影響碳同位素比值分析結果，將錫杯於丙酮浸泡3小時後，100°C加熱烘乾5小時，取出於室溫冷卻後，與未經丙酮處理者進行分析結果之比較。

十一、品質管制分析

每批次(少於10個檢體)分析均進行空白、查核及重複品管分析。

十二、儲藏試驗

為探討蜂蜜於室溫下儲藏之碳同位素比值經時變化情形，將蜂蜜樣品室溫放置，分別於1、7、14及30天取樣分析。

十三、定量極限之探討

選擇 $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ 小於-24‰之蜂蜜檢體分別添加C4果糖及C3果糖，使其添加濃度為5、10、15、20、40及50%，再將混合後之蜂蜜進行碳同位素比值分析。

結果與討論

一、分析前EA-IRMS之測試

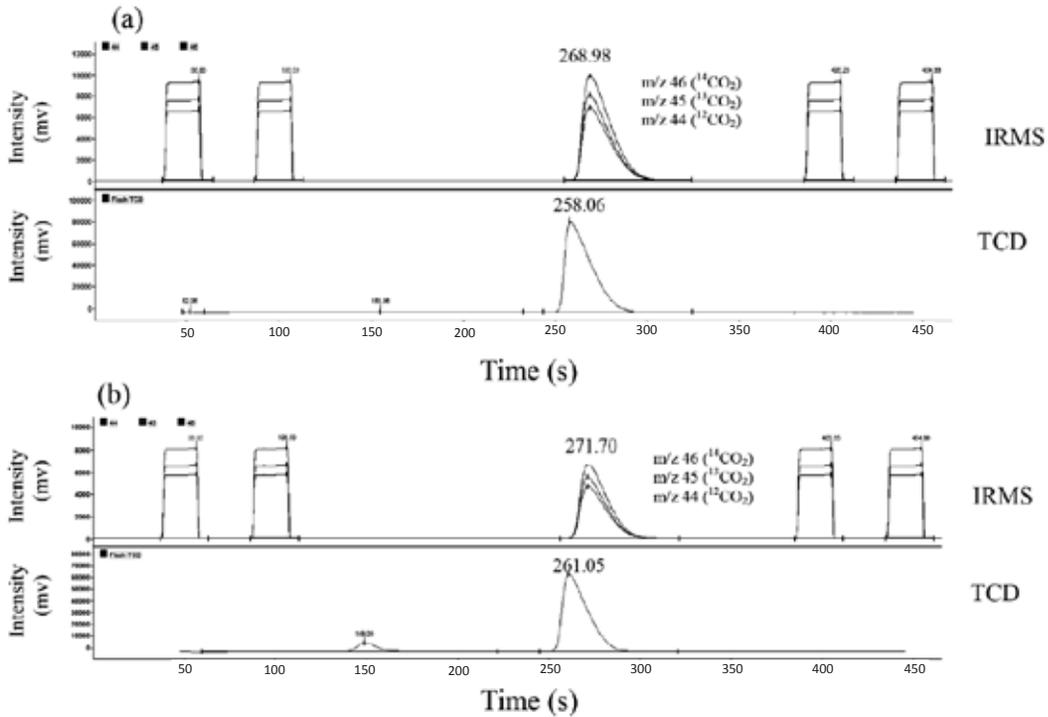
取對照用參考物質USGS-40及蜂蜜檢體置於錫杯中，以EA-IRMS進行分析，結果顯示經燃燒後檢體之 m/z 44 ($^{12}\text{CO}_2$)、 m/z 45 ($^{13}\text{CO}_2$)及 m/z 46 ($^{14}\text{CO}_2$)碳峰均可明顯分開，且無干擾峰出現(如圖一)。對照用參考物質USGS-40之滯留時間為258.06秒，蜂蜜檢體之滯留時間為261.05秒，參考物質與檢體滯留時間趨於一致，顯示以此分析條件能有效檢測蜂蜜之碳同位素比值。

二、錫杯對EA-IRMS分析之影響

鑑於檢體分析時均需以錫杯包覆後，再以EA-IRMS進行分析，錫杯本身是否造成碳同位素比值差異值得關注，本研究分別以(1)錫杯及(2)錫杯經由丙酮浸泡3小時後，100°C加熱烘乾5小時，取出後置於室溫冷卻兩種方式，分別檢測fructose、maltotriose、melezitose、turanose、raffinose、maltose、glucose、sucrose等標準品，其 $\delta^{13}\text{C}$ 在-11.85與-27.41‰之間，且兩種方式差異不大；另檢測fructose、maltotriose、melezitose、turanose、raffinose、maltose、glucose及sucrose 8種糖類標準品之同日內與異日間之精密度及準確度($n = 3$)，結果顯示碳同位素比值($\delta^{13}\text{C}$)於同日內及異日間之標準偏差均小於0.3‰(表一)。

三、精密度測試

取品管查核檢體USGS-40 (RM 8573)及IAEA-CH-6 (RM 8542, sucrose)，進行同日內及異日間之分析($n=3$)，結果同日內之 $\delta^{13}\text{C}$ 分別為 -26.37 ± 0.02 及 -10.92 ± 0.19 ‰，異日間之 $\delta^{13}\text{C}$ 分別為 -26.37 ± 0.05 及 -10.86 ± 0.10 ‰，顯示同日及異日間檢測值無顯著性差異，且再現性均佳(表二)。



圖一、以EA-IRMS分析對照用參考物質USGS-40 (a)及蜂蜜檢體(b)之碳同位素比值圖譜

表一、錫杯經丙酮清洗前後之碳同位素比值差異分析

醣	Fructose	Maltotriose	Melezitose	Turanose	Raffinose	Maltose	Glucose	Sucrose
	$\delta^{13}C_H$ (‰)	$\delta^{13}C_H$ (‰)	$\delta^{13}C_H$ (‰)	$\delta^{13}C_H$ (‰)	$\delta^{13}C_H$ (‰)	$\delta^{13}C_H$ (‰)	$\delta^{13}C_H$ (‰)	$\delta^{13}C_H$ (‰)
錫杯未經丙酮處理								
同日間	-11.88 ± 0.07 ^a	-22.54 ± 0.00	-25.15 ± 0.01	-25.57 ± 0.04	-26.36 ± 0.03	-27.06 ± 0.04	-27.37 ± 0.05	-27.11 ± 0.09
異日間	-11.91 ± 0.03	-22.55 ± 0.05	-25.14 ± 0.02	-25.53 ± 0.04	-26.40 ± 0.07	-27.08 ± 0.01	-27.41 ± 0.01	-27.18 ± 0.11
錫杯經丙酮處理								
同日間	-11.85 ± 0.04	-22.52 ± 0.04	-25.04 ± 0.10	-25.53 ± 0.07	-26.35 ± 0.02	-26.95 ± 0.11	-27.18 ± 0.15	-27.17 ± 0.06
異日間	-11.91 ± 0.16	-22.48 ± 0.04	-24.92 ± 0.07	-25.52 ± 0.01	-26.22 ± 0.06	-26.97 ± 0.04	-27.24 ± 0.02	-26.92 ± 0.18

^a Mean ± SD (n=3)

四、品質管制分析

每批次(少於10個檢體)碳同位素分析時，至少執行一次空白分析、查核分析及重複分析。本調查以USGS-40 (RM8573)參考物質為查核及重複分析檢體，其查核分析之檢測值均在管制上限(upper control limit, UCL)及管制下

限(lower control limit, LCL)之內；重複分析之相對差異百分比皆低於警告上限(upper warning limit, UCL)，檢測結果均符合品管要求。

五、蜂蜜儲藏之碳同位素比值分析

為了解蜂蜜於室溫下儲藏之碳同位素比值

表二、參考物質之同日內及異日間碳同位素比值分析結果

參考物質		檢測值 $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ (‰)	規範值 $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ (‰)
USGS-40 (RM8573)	同日間	-26.37 ± 0.02^a	-26.39 ± 0.04
	異日間	-26.37 ± 0.05	
IAEA-CH-6 (RM 8542, Sucrose)	同日間	-10.92 ± 0.19	-10.45 ± 0.07
	異日間	-10.86 ± 0.10	

^a Mean \pm SD

經時變化情形，本研究分別取於室溫下經過1、7、14及30天後之蜂蜜進行碳同位素分析，結果顯示， $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ (‰)值分別為 -25.86 ± 0.02 、 -25.86 ± 0.03 、 -25.89 ± 0.04 及 -25.83 ± 0.00 (表三)，顯示蜂蜜檢體於貯藏時之碳同位素比值並無明顯變化。

表三、蜂蜜檢體於室溫儲藏之碳同位素比值分析結果

貯存時間(day)	$\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ (‰) ^a
1	-25.86 ± 0.02
7	-25.86 ± 0.03
14	-25.89 ± 0.04
30	-25.83 ± 0.00

^a Mean \pm SD (n=3)

六、定量極限之探討

選擇 $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ 小於 -24‰ 之蜂蜜檢體分別添加C4果糖及C3果糖，使其添加濃度為5、10、15、20、40及50%，再將混合後之蜂蜜進行碳同位素比值分析。結果顯示，添加5、10、15及20% C4果糖於蜂蜜中，其 $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ 值均小於 -23.5‰ ；添加40及50%時 $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ 值大於 -21.5‰ 。將混合蜂蜜與C4果糖之蛋白質進行碳同位素比值分析，並計算其C4糖含量，結果分別為4.89、12.92、21.12、24.54、40.61及52.28%，顯示添加10% C4果糖時，其C4糖測值已大於7%，依AOAC 998.12可判定其含有C4植物糖。而添加C3果糖於蜂蜜之試驗結果，其 $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ 值皆小於 -24‰ ，而其C4糖測值亦

均小於7%，故無法由此檢驗方式查知是否摻加C3果糖(表四)。

在Elflein等⁽¹⁰⁾之研究指出，添加5、10、20、50%高果糖糖漿(high fructose syrup)於蜂蜜中，分析結果顯示於添加5及10%時其 $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ 值均小於 -23.5‰ ；添加50%時 $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ 值呈現大於 -21.5‰ ；添加40%時 $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ 值則會介於 -23.5‰ 與 -21.5‰ 之間。自混合蜂蜜分離出蛋白質所得之碳同位素比值分析結果，計算之C4糖測值分別為0、1.4、5.5及13.7%，在添加50%組才能判定出摻加C4植物糖，本研究之蜂蜜摻偽分辨效果優於Elflein等之研究。

七、104年度養蜂協會提供蜂蜜檢體211件之碳同位素比值分析結果

蜂農自蜂箱取樣之檢體依其蜜源區分，主要為龍眼、荔枝與咸豐草蜜，混蜜為未知蜜源或混合多種蜜源者，百花蜜則是蜜蜂自群花採蜜所得者，共計211件。依AOAC 978.17方法⁽⁸⁾之蜂蜜判定真偽建議值 $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ 值小於 -24.00‰ 判定為純蜂蜜，落於 -24.00 及 -22.00‰ 間為可能是純蜂蜜，大於 -22.00‰ 則判定為含C4糖。並依AOAC 998.12方法⁽⁹⁾計算其C4糖%， $\leq 7\%$ 為真品，並以 $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ 及C4糖%兩結果來作綜合判定。211件蜂蜜檢體檢體之碳同位素比值分析結果(表五)，211件檢體之 $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ 值分布於 -29.53 - -18.18‰ 之間，C4糖含量範圍為0.00 - 38.62%。其中龍眼蜜(97件)之 $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ 值為 -27.32 - -22.04‰ ，有92件之 $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ 值小於 -24‰ ，5件之 $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ 值落於 -24.00 及 -22.00‰ 之間，另

表四、以EA-IRMS檢測蜂蜜摻果糖之碳同位素比值

	0%	5%	10%	15%	20%	40%	50%	100%
C4 果糖	$\delta^{13}C_p$ (‰)	-28.85 ± 0.03^c	-28.72 ± 0.03	-28.63 ± 0.01	-28.59 ± 0.00	-28.42 ± 0.02	-28.78 ± 0.05	- ^a
	$\delta^{13}C_H$ (‰)	-28.74 ± 0.14	-27.79 ± 0.08	-26.19 ± 0.09	-24.60 ± 0.06	-20.82 ± 0.21	-18.81 ± 0.05	-11.88 ± 0.11
	C4 suger (%) ^b	0	4.89	12.92	21.12	40.61	52.28	- ^a
C3 果糖	$\delta^{13}C_p$ (‰)	-28.85 ± 0.03	-28.83 ± 0.08	-28.81 ± 0.07	-28.76 ± 0.12	-28.73 ± 0.10	-28.73 ± 0.10	- ^a
	$\delta^{13}C_H$ (‰)	-28.74 ± 0.14	-28.69 ± 0.04	-28.74 ± 0.02	-28.73 ± 0.05	-28.59 ± 0.02	-28.23 ± 0.03	-25.70 ± 0.06
	C4 suger (%)	0	0.71	0.50	0.19	0.74	2.61	-

^a not analyzable^b C4 suger (%) = $\frac{\delta^{13}C_p - \delta^{13}C_H}{\delta^{13}C_p - (-9.7)} \times 100$ ^c Mean \pm SD (n=3)

C4糖含量大於7%者有1件。荔枝蜜(50件)之 $\delta^{13}C_H$ 值為-26.30 - -18.18‰，其中43件之 $\delta^{13}C_H$ 值小於-24.00‰，5件之 $\delta^{13}C_H$ 值落於-24.00及-22.00‰之間，2件之 $\delta^{13}C_H$ 值大於-22.00‰，C4糖含量大於7%者7件。混蜜(32件，包含：1.龍眼及荔枝。2.荔枝及百花。3.龍眼、荔枝、百花及柳丁。4.龍眼、荔枝及柳丁等組合)及其他蜜(共11件，包含：文旦1件、柳丁2件、烏 4件、酸籐2件、柑橘1件、厚皮香1件)之 $\delta^{13}C_H$ 值為-29.50 - -22.76‰，其中38件之 $\delta^{13}C_H$ 值小於-24.00‰，5件之 $\delta^{13}C_H$ 值落於-24.00及-22.00‰之間，C4糖含量大於7%者有1件。百花蜜(16件)之 $\delta^{13}C_H$ 值為-29.10 - -24.89‰，皆小於-24.00‰。咸豐草蜜(5件)之 $\delta^{13}C_H$ 值為-29.53 - -24.79‰，皆小於-24.00‰。綜上，211件蜂蜜檢體中，有194件(佔91.9%)初步判定為純蜂蜜，2件(佔0.9%)為含C4糖之蜂蜜，其餘尚無法直接排除摻偽之可能。

在C4糖含量部分，大於7%者有9件(佔4.3%)。將其與 $\delta^{13}C_H$ 值比對，211件蜂蜜檢體中有194件 $\delta^{13}C_H$ 值小於-24.00‰，且C4糖含量小於7%。將大於-24.00‰者與C4糖含量進行相關性之迴歸分析，所得線性迴歸係數 R^2 為0.8263(圖二)，結果顯示兩者具有顯著相關性。若以產地區分(表六)，C4糖含量>7%者分別有高雄地區4件，台中地區為4件及彰化雲林地區各1件，此10件檢體之 $\delta^{13}C_H$ 值亦皆大於-24‰，但結果應與地域無關。

八、食藥署北區管送驗市售蜂蜜檢體之碳同位素分析結果

食藥署北區管送驗市售蜂蜜檢體83件，依標示之蜜源區分，主要為龍眼、混蜜與百花蜜(表七)。依AOAC 978.17方法⁽⁸⁾及AOAC 998.12方法⁽⁹⁾分析，其中龍眼蜜(41件)之 $\delta^{13}C_H$ 值為-26.36 - -19.18‰，其中33件之 $\delta^{13}C_H$ 值皆小於-24‰，5件之 $\delta^{13}C_H$ 值落於-24.00及-22.00‰之間，另C4糖含量大於7%者有7件，且其

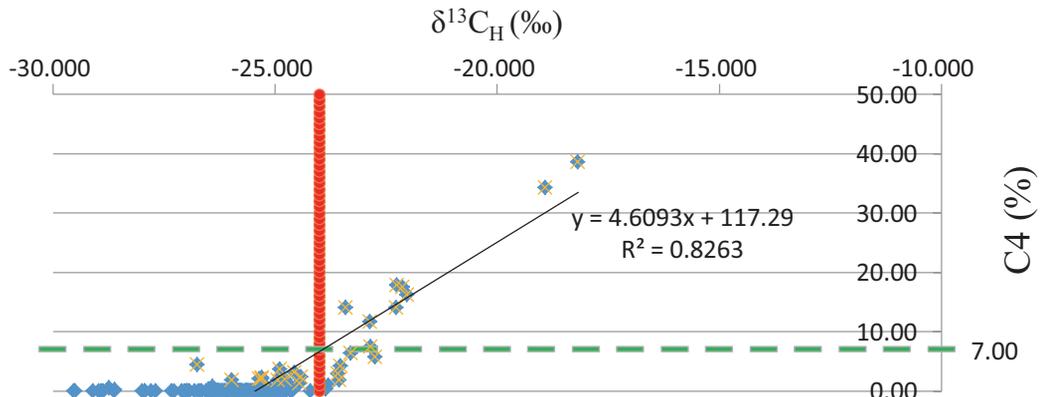
表五、養蜂協會提供蜂蜜檢體依蜜源分類之碳同位素比值及C4糖含量分析結果[平均(範圍)]

蜜源	件數	$\delta^{13}C_H$ (%)	$\delta^{13}C_p$ (%)	C4 sugar ^a	
				%	≥ 7件數
龍眼	97	-25.76 ± 0.8 ^b (-27.32 - -22.04)	-25.08 ± 0.5 (-26.51 - -23.94)	0.27 (0 - 16.29)	1
荔枝	50	-24.90 ± 1.7 (-26.30 - -18.18)	-24.87 ± 0.5 (-25.52 - -23.51)	3.13 (0 - 38.62)	7
混蜜 ^c	43	-25.37 ± 1.1 (-29.50 - -22.76)	-25.06 ± 0.8 (-27.74 - -23.55)	0.98 (0 - 14.13)	1
百花	16	-27.70 ± 1.4 (-29.10 - -24.89)	-26.87 ± 1.5 (-28.85 - -24.22)	0.84 (0 - 10.37)	0
咸豐草	5	-26.92 ± 1.7 (-29.53 - -24.79)	-26.05 ± 1.3 (-27.55 - -24.19)	0.89 (0 - 4.47)	0
總計	211	-25.66 ± 1.4 (-29.53 - -18.18)	-25.19 ± 0.9 (-28.85 - -23.51)	1.07 (0 - 38.62)	9

$$^a \text{C4 sugar (\%)} = \frac{\delta^{13}C_p - \delta^{13}C_H}{\delta^{13}C_p - (-9.7)} \times 100$$

^b Mean ± SD (n=3)

^c 混蜜之組合包含：1.龍眼及荔枝。2.荔枝及百花。3.龍眼、荔枝、柳丁。4.龍眼、荔枝、柳丁。其他包含：文旦、柳丁、烏、酸籐、柑橘及厚皮香

圖二、養蜂協會提供蜂蜜檢體中 $\delta^{13}C_H$ 大於 -24‰ 者與 C4 糖含量小於 7% 者之相關性迴歸分析

$\delta^{13}C_H$ 值皆大於 -24‰。荔枝蜜(3件)之 $\delta^{13}C_H$ 值為 -24.86 - -24.19‰，皆小於 -24.00‰，C4 糖含量亦均小於 7%。混蜜(26件，包含：1.蜂蜜。2.綜合花蜜。3.龍眼、荔枝、百花。4.龍眼、柑橘。5.純天然蜂蜜等組合)之 $\delta^{13}C_H$ 值為 -26.80 - -20.99‰，其中 18 件之 $\delta^{13}C_H$ 值皆小於 -24.00‰，6 件之 $\delta^{13}C_H$ 值落於 -24.00 及 -22.00‰ 之間，C4 糖含量大於 7% 者有 5 件。百花蜜(9件)之 $\delta^{13}C_H$ 值為 -26.34 - -21.42‰，其中 4 件之 $\delta^{13}C_H$ 值小於 -24.00‰，4 件之 $\delta^{13}C_H$ 值落於 -24.00 及 -22.00‰ 之間，C4 糖含量大於 7% 者有 3 件。調和蜜(4件)之 $\delta^{13}C_H$ 值為 -24.08 - -12.04‰，

其中 1 件之 $\delta^{13}C_H$ 值小於 -24.00‰，由此推測其添加的果糖應屬於 C3 糖，另 1 件之 $\delta^{13}C_H$ 值落於 -24.00 及 -22.00‰ 之間，C4 糖含量皆大於 7%。綜上，83 件蜂蜜檢體中，有 59 件(佔 71.1%)為純蜂蜜，8 件(佔 9.6%)為含 C4 糖之蜂蜜。

$\delta^{13}C_H$ 值與 C4 糖含量之相關性，以產地為台灣者為例，65 件蜂蜜檢體中有 46 件之 $\delta^{13}C_H$ 值小於 -24.00‰，且 C4 糖小於 7%。若以產地區分(表八)，各地均有 C4 糖含量 > 7% 者，顯示結果應與地域無關。

表六、養蜂協會提供蜂蜜檢體之產地與碳同位素比值及C4糖含量分布

產地	件數	$\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ (‰)				C4 sugar (%)
		≤ -24.00	$-24.00 - -22.00$	≥ -22.00	≥ 7	
台中	24	20	4	1	4	
台南	46	45	1	0	0	
花蓮	1	1	0	0	0	
南投	13	12	1	0	0	
苗栗	6	6	0	0	0	
桃園	7	7	0	0	0	
高雄	60	53	6	1	4	
雲林	11	10	1	0	1	
嘉義	14	14	0	0	0	
彰化	29	27	1	1	1	
合計	211	194	14	3	10	

結 論

以EA-IRMS分析蜂蜜之碳同位素比值($\delta^{13}\text{C}_\text{H}$)，以品管檢體USGS-40 (RM 8573)、fructose、maltotriose、melezitose、turanose、raffinose、maltose、glucose及sucrose標準品所進行同日內或異日間精密度之測試結果顯示，其標準偏差均小於0.3‰，檢測值與規範值亦相符。在品質管制分析上，其查核分析及重複分析結果分別於管制上、下限之內，相對差異百分比皆低於警告上限，檢測結果均符合品管要求。錫杯使用前是否經過丙酮清洗、檢體之儲藏時間，對EA-IRMS所進行碳同位素比值分析結果均無明顯差異。以添加C4植物果糖所進行之定量極限測試結果顯示，C4植物果糖之混合比例達10%時，可依AOAC 998.12之判定原則判知含C4糖，但添加C3糖時，則無法以本方法看出其混摻行為。因此本研究將繼

表七、北區管送驗蜂蜜檢體依蜜源分類之碳同位素比值及C4糖含量分析結果[平均 (範圍)]

產地	蜜源	件數	$\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}_\text{p}$ (‰)	C4 sugar ^a	
					%	≥ 7 件數
臺灣	龍眼	36	-24.81 ± 1.9^b (-26.36 - -19.18)	24.93 ± 0.6 (-25.53 - -22.25)	3.52 (0 - 34.52)	6
	荔枝	2	-24.79 ± 0.1 (-24.86 - -24.71)	-25.02 ± 0.4 (-25.32 - -24.72)	1.95 (0 - 3.90)	0
	百花	9	-24.07 ± 1.6 (-26.34 - -21.42)	-24.88 ± 0.9 (-25.91 - -22.99)	7.83 (0 - 27.71)	3
	混蜜 ^c	16	-24.54 ± 1.9 (-26.80 - -20.99)	-25.14 ± 1.0 (-26.24 - -22.91)	6.03 (0 - 31.50)	4
	調和蜜	2	-12.15 ± 0.2 (-12.27 - -12.04)	-	-	2
泰國	龍眼	4	-23.03 ± 2.5 (-24.61 - -19.61)	-24.74 ± 0.3 (-25.02 - -24.47)	11.19 (0.38 - 36.63)	1
	混蜜	4	-24.79 ± 1.6 (-26.35 - -22.98)	-24.58 ± 0.6 (-25.07 - -23.79)	2.44 (0 - 5.76)	0
泰國、越南	混蜜	6	-24.57 ± 0.7 (-25.31 - -23.26)	-25.15 ± 0.2 (-25.43 - -24.83)	3.96 (0 - 11.09)	1
未標示	龍眼	1	-24.16 ± 0.0 (-24.16)	-25.06 ± 0.0 (-25.06)	5.84	0
	荔枝	1	-24.19 ± 0.0 (-24.19)	-24.86 ± 0.0 (-24.86)	4.36	0
	調和蜜	2	-23.74 ± 0.5 (-24.08 - -23.41)	-	-	2
總計		83	-24.23 ± 2.6 (-26.80 - -12.04)	-23.76 ± 5.4 (-26.24 - 0.00)	5.11 (0 - 36.63)	19

$$^a \text{C4 sugar (\%)} = \frac{\delta^{13}\text{C}_\text{p} - \delta^{13}\text{C}_\text{H}}{\delta^{13}\text{C}_\text{p} - (-9.7)}$$

^b Mean \pm SD (n=3)

^c 混蜜之組合包含：1.蜂蜜。2.綜合花蜜。3.龍眼、荔枝、百花。4.龍眼、柑橘。5.純天然蜂蜜

表八、北區管送驗蜂蜜檢體之產地與碳同位素比值及C4糖含量分布

產地	件數	$\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ (‰)				C4 sugar (%)
		≤ -24.00	$-24.00 - -22.00$	≥ -22.00	$\geq 7\%$	
臺灣	65	46	12	7	15	
泰國	8	5	2	1	1	
泰國 越南	6	5	1	0	1	
未標示	4	3	1	0	2	
合計	83	59	16	8	19	

續利用LC/IRMS檢測蜂蜜中個別之果糖、葡萄糖、二糖或三糖之 $\Delta\delta^{13}\text{C}$ 值，藉由各個差值之比較分析，找出蜂蜜摻偽之判定之依據，以為日後行政處理及判定之參考依據。

由養蜂協會提供之211件蜂蜜檢體或北區管送驗之83件蜂蜜檢體，若分析結果顯示 $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ 值大於-24.00‰或C4糖含量大於7%，均為檢體疑似含C4糖，已分別進一步以行政稽查方式釐清C4糖含量偏高之可能原因。

參考文獻

1. 經濟部標準檢驗局。2012。蜂蜜。中華民國國家標準，CNS 1305 N5024。
2. 吳輝虎。2013。臺灣養蜂業及其營運現況介紹。苗栗區農業專訊，63: 19-21。
3. 台灣養蜂協會。2016。95年-104年蜂蜜/蜂王漿年產量。[<http://www.bee.org.tw/p17.html>]。
4. 陳宜君、區少梅。2006。真假蜂蜜的檢測。台灣昆蟲特刊，8: 91-102。
5. 彭宗仁、劉滄琴、林幸助。2006。穩定同位素在農業及生態環境研究上之應用。台灣農業研究，55(2): 79-90。
6. 蔡沛宜。2007。同位素比質譜素於蜂蜜中摻偽之判定及甲基安非他命來源追蹤之研究。清華大學化學系碩士論文。
7. Murat, T. 2013. Detection of adulteration in honey samples added various sugar syrups with $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio analysis method. Food Chem. 138: 1629-1632.
8. AOAC. 2010. Corn and cane sugar products in honey carbon isotope ratio mass spectrometric method. AOAC official method 978.17.
9. AOAC. 2013. C-4 plant sugars in honey internal standard stable carbon isotope ratio method. AOAC official method 998.12.
10. 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.

Detection of Honey Adulteration by Measuring C4 Sugar via Elemental Analysis-Isotope Ratio Mass Spectrometry

HSIN-CHENG YOU, ZIH-LING HUANG, CHUN-JEN FANG,
CHE-LUN HSU, CHIA-FEN TSAI, YA-MIN KAO, DER-YUAN WANG
AND HWEI-FANG CHENG

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

In this study, the elemental analysis-isotope ratio mass spectrometry (EA-IRMS) was employed for the stable carbon isotopes ratio analysis in honey samples. The data quality was validated by reference material USGS-40 and standard compounds including fructose, maltotriose, melezitose, turanose, raffinose, maltose, glucose and sucrose. The intra- and inter-day precision test gave a standard deviation less than 0.3‰. The accuracy was tested to be 99.93%. A honey sample was stored at room temperature for 1, 7, 14 and 30 days for the stability test. The $\delta^{13}\text{C}$ value was analyzed after storages. The results ranged between -25.83 and -25.89‰ with no significant difference. The adulteration test was carried out by spiking different proportions of fructose from C4 source into pure honey. The preliminary testing indicated that the adulterated sample could be detected if more than 10% exogenous C4 fructose was added. In this case the test value of C4 sugar was 12.92% (more than 7%). Two hundred and eleven honey samples from Taiwan Beekeeping Association and 83 commercial honey samples from Northern Center of TFDA were surveyed for $\delta^{13}\text{C}$. The results showed that $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ values of 211 honey samples from Taiwan Beekeeping Association ranged from -29.53 to -18.18‰ with an average value of -25.66‰. Among them, the $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ values of 9 samples were greater than -24‰, which indicated the content of C4 sugar was more than 7%. The $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ values of 83 samples of honey from Northern Center of TFDA ranged between -26.80 and -12.04‰ with an average of -24.23‰. The $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ values of 19 samples were greater than -24‰. The correlation between honey specimens with $\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ greater than -24.00‰ and their C4 sugar content was calculated, with a linear regression coefficient R^2 of 0.8263, indicating a significant correlation. This study will keep accumulating the testing database of honey in order to assess the feasibility of establishing a decision mode for local honey adulteration.

Key words: honey, adulteration, elemental analysis-isotope ratio mass spectrometry