

## 蜂蜜中C4植物糖之檢驗方法

### Method of Test for C4 Plant Sugars in Honey

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於蜂蜜中C4植物糖之鑑別參考。
2. 檢驗方法：檢體以元素分析儀(elemental analyzer, EA)在氧化鉻( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ )催化劑及脈衝式純氧存在下進行自動化線上杜馬士燃燒(Dumas combustion)，產生之二氧化碳氣體經氣相層析分離後，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. 元素分析儀串聯穩定同位素比值質譜儀(EA/IRMS)：
      - 2.1.1.1. 元素分析儀：Flash 2000 HT O/H-NC，或同級品。
      - 2.1.1.2. 連續流串聯介面(Continuous-flow interphase)：Conflo IV，或同級品。
      - 2.1.1.3. 穩定同位素比值質譜儀：Delta V Advantage，或同級品。
    - 2.1.2. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
    - 2.1.3. 離心機(Centrifuge)：可達1500  $\times g$ 以上者。
    - 2.1.4. 烘箱(Oven)：附空氣循環裝置，溫差在 $\pm 2^\circ\text{C}$ 以內者。
    - 2.1.5. 水平式振盪恆溫水浴(Horizontal shaking bath)：附有自動溫度調節，溫度至 $\pm 1^\circ\text{C}$ 以內者。
  - 2.2. 試藥及氣體：鎢酸鈉( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )及硫酸均採用試藥特級；去離子水(比電阻於 $25^\circ\text{C}$ 可達 $18\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；氮氣、氧氣及二氧化碳氣體(純度大於99.9995%)；IAEA-CH-6 ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ : -10.45‰)、USGS24 ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ : -16.05‰)、IAEA-CH-3 ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ : -24.72‰)、USGS40 ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ : -26.39‰)及NBS22 ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ : -30.03‰)參考物質。
  - 2.3. 器具及材料：
    - 2.3.1. 離心管：50 mL，PP材質。
    - 2.3.2. 錫杯：直徑5 mm  $\times$  高8 mm。
  - 2.4. 試劑之調製：
    - 2.4.1. 10%鎢酸鈉溶液：

取鎢酸鈉10 g，以去離子水溶解使成100 mL。
    - 2.4.2. 0.335 M硫酸溶液：

取硫酸1.88 mL，緩緩加入去離子水80 mL中，待冷卻後，再加去離子水使成100 mL。

2.5. 標準品之製備：

取IAEA-CH-3、IAEA-CH-6、USGS24、USGS40及NBS 22參考物質各約0.2 mg，精確稱定，分別置於錫杯中，密封後供作標準品。

2.6. 檢品之調製：

2.6.1. 蜂蜜：

取檢體約0.5 mg，精確稱定，置於錫杯中，密封後供作蜂蜜檢品，每件檢體應調製3重複。

2.6.2. 蜂蜜蛋白質：

取檢體約10~12 g，置於離心管中，加入去離子水4 mL，旋渦混合，加入已預先混合之10%鎢酸鈉溶液2 mL及0.335 M硫酸溶液2 mL，旋渦混合，於80°C水浴中水平振盪30分鐘，應有凝絮物析出，若無凝絮物出現則再加0.335 M硫酸溶液2 mL，重複前述水浴步驟。冷卻至室溫，加去離子水使成50 mL，旋渦混合，於1500 ×g離心5分鐘，棄上清液，沉澱物再加去離子水50 mL清洗並離心，重複此步驟5次，將含有沉澱物之離心管於75°C中乾燥3小時以上，取約0.5 mg，置於錫杯中，密封後供作蜂蜜蛋白質檢品。

2.7.  $\delta^{13}\text{C}$ 標準化曲線之製作：

將各標準品分別以元素分析儀串聯穩定同位素比值質譜儀依下列條件進行分析，以所測得之 $\delta^{13}\text{C}$ 值與所對應之標準品之 $\delta^{13}\text{C}$ 驗證值進行線性迴歸，製作標準化曲線。

元素分析串聯穩定同位素比值質譜測定條件<sup>(註)</sup>：

反應爐溫度：1020°C。

層析管：IRMS Separation Column，不鏽鋼管，外徑6 mm，內徑5 mm × 3 m。

層析管溫度：70°C。

載氣流速：氦氣，100 mL/min。

氧氣流速：250 mL/min。

參考氣體：氦氣，250 mL/min。

偵測離子： $m/z$  44、45、46。

註：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。

2.8. 鑑別指標[表徵C4植物糖含量(apparent C-4 sugar content)]之計算：

將蜂蜜檢品及蜂蜜蛋白質檢品分別以元素分析儀串聯穩定同位素比值質譜儀依2.7.節條件進行分析，就所測得之 $\delta^{13}\text{C}$ 值，依下列計算式

求出檢體中表徵C4植物糖之含量(%)：

$$\text{檢體中表徵C4植物糖之含量(}\%)^{(\text{註})} = \frac{\delta^{13}\text{C}_\text{P} - \delta^{13}\text{C}_\text{H}}{\delta^{13}\text{C}_\text{P} - (-9.7)} \times 100$$

$\delta^{13}\text{C}_\text{P}$ ：由標準化曲線求得蜂蜜蛋白質檢品之 $\delta^{13}\text{C}$ 值(‰)

$\delta^{13}\text{C}_\text{H}$ ：由標準化曲線求得蜂蜜檢品之 $\delta^{13}\text{C}$ 值(‰)

-9.7：玉米糖漿之平均 $\delta^{13}\text{C}$ 值(‰)

註：1. 計算結果為負值時以0計；若計算結果小於或等於7%，則不含C4植物糖。

2. 本檢驗方法之結果計算為蜂蜜及蜂蜜中蛋白質之穩定碳同位素比值( $\delta^{13}\text{C}$ )，以玉米糖漿之平均穩定碳同位素比值(-9.7‰)為基準，計算所得檢體中表徵C4植物糖(%)，僅係作為蜂蜜是否摻加C4植物糖之鑑別指標，並非蜂蜜中實際C4植物糖之定量結果。

3. 部分非典型蜂蜜之計算結果可能會稍微大於7%，惟該蜂蜜之 $\delta^{13}\text{C}$ 數值仍應小於-24‰。

附註：本檢驗方法可提供做為蜂蜜是否摻加C4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，其結果仍需併調查所見綜合研判。

參考文獻：

1. AOAC. 2013. C-4 plant sugars in honey. AOAC Official Method 998.12.
2. Paul, D., Skrzypek, G. and F6rizs, I. 2007. Normalization of measured stable isotopic compositions to isotope reference scales- a review. Rapid. Commun. Mass Spectrom. 21: 3006-3014.