

PC-41

以磁轉子吸附萃取與熱脫附裝置搭配氣相層析質譜儀進行蜂蜜中香料之檢驗方法研究

李宛靜 蔡長興 林燕萍 李盈霖 陳怡
臺南市政府衛生局

蜂蜜一直深受國人喜愛的食品之一，且因其對健康有許多益處而聞名；但蜜蜂數量受到耕作方式、氣候變化及農藥使用所造成的生態破壞而減少中。這些因素導致蜂蜜摻假增加，其中方法以高果糖糖漿添加香料來混充，使其具類似純蜂蜜的風味；而調和蜂蜜的外觀性狀及口感與純蜂蜜相同，因此無法以外觀及口感分辨其真實性。本研究目的主要建立磁轉子吸附萃取與熱脫附裝置(Stir bar sorptive extraction+thermal desorption unit, SBSE+TDU)之前處理技術，搭配氣相層析質譜儀(GC-MS)，針對台灣龍眼蜜的揮發性化合物及可能摻假之香料進行分析，其香料之氣相揮發物包含人工單體-乙基麥芽醇(Ethyl maltol)和乙基香草醛(Ethyl vanillin)、蜂蜜中常用之單體-芳樟醇(Linalool)和茶酮(Tea ketone)及香料溶劑-三乙酸甘油酯(Triacetin)，藉由判斷蜂蜜樣品的氣相揮發物是否含有以上所述之物質，以作為蜂蜜摻假之依據。本檢驗方法偵測極限(LOD)分別為 Ethyl maltol 1ppm、Ethyl vanillin 30ppm、Linalool 0.3ppm 和 Tea ketone 0.3ppm、Triacetin 10 ppm，並確認鑑別離子及滯留時間；以此方法檢測市售蜂蜜 11 件，並與本市農會所舉辦之蜂蜜評鑑大會合作，檢測所有參賽蜂蜜 47 件，共計 58 件，結果顯示市售蜂蜜有 4 件檢出 Triacetin 及 Linalool，且該 4 件均為調和蜂蜜；其餘 54 件均未檢出。綜合上述結果得知，以磁轉子吸附萃取與熱脫附裝置搭配氣相層析質譜儀檢驗蜂蜜中添加之香料可判斷蜂蜜是否摻假及標示不實。

前言

蜂蜜是蜜蜂從開花植物的花中採得的花蜜在蜂巢中釀製的蜜。我國養蜂取蜜為人所用已有三千多年的歷史。蜂蜜因其一定的營養價值和保健作用而深受消費者的青睞。近些年來，蜜蜂數量卻受到耕作方式、農藥的使用及氣候變化引起的生態系統破壞而減少中，導致蜂蜜摻假現象愈加嚴重。其中主要的方法就是會以高果糖糖漿添加香料的方式來混充為真蜂蜜，使其具有類似純蜂蜜的風味，或者以香料修飾且穩定蜂蜜的風味，降低了蜂蜜的品質，因而損害了消費者的權益。這種調和蜂蜜的外觀性狀及口感與真實的蜂蜜相同，因此，無法單純以外觀及口感分辨其真實性。

由於蜂蜜真偽辨別，國內尚無公告之檢驗方法，衛生局以國際分析化學家協會(AOAC)公認之穩定碳同位素比值分析法(SCIRA)及中華民國國家標準 CNS1305 進行檢驗調查，然而，CNS 標準凸顯的是製造過程、含量比例的狀態，檢驗項目為水份<20%、蔗糖<2%、醣類(葡萄糖+果糖)>70%、水不溶物<0.1%、酸度<30(meq H⁺/1000 g)、澱粉酶活性>8 schade unit、羥甲基糠醛(Hydroxymethyl furfural, HMF)<30 mg/kg 及不可驗出抗生素，其中，高果糖糖漿可以符合水分、蔗糖、醣類(葡萄糖+果糖)、水不溶物、酸度

及羥甲基糠醛之標準，並藉由添加酵素來達到澱粉酶活性之標準，非常趨近真實的蜂蜜，因此 CNS 標準主要是管控蜂蜜的「品質」，並不是用來檢定真偽，假蜜也能符合此國家標準。而穩定碳同位素比值分析法是利用元素分析儀串聯穩定同位素比值質譜儀 (Elemental analysis isotope ratio mass spectrometry, EA-IRMS) 進行分析，其原理為植物行光合作用時，因途徑不同而有 C3、C4 及 Crassulacean acid metabolism(CAM)三種型態。此三種型態由於途徑不同而導致不同的探同位素分化作用，因此其穩定碳同位素亦有差異。相較來說，C4 植物具有相對較多的 ^{13}C 同位素，而 C3 植物則具有相對較多的 ^{12}C 同位素，因此常利用碳同位素組成的特徵差異去鑑定植物行光合作用的途徑，而幾乎所有的蜜源植物屬 C3 植物，而製作高果糖玉米糖漿的植物屬 C4 植物。然而，如果高果糖糖漿是以樹薯澱粉轉化而成，由於樹薯與蜜源植物同屬 C3 植物，此時便無法分辨出蜂蜜的真偽。

因真蜂蜜帶有淡淡的花果香味，所以使用高果糖糖漿所調合之蜂蜜需額外添加香料，使其具有近似真蜂蜜汁香味。蜂蜜的性狀為黏稠狀，在添加香料時需考慮到溶解性及均勻性，因此香料的選擇上只能使用液態香料才容易與調和蜂蜜均勻混合，而固態香料(如粉狀或膏狀香料)除了無法與調和蜂蜜均勻混合外，外觀上也容易被發現。目前常使用在蜂蜜中的香料為人工單體-乙基麥芽醇(Ethyl maltol)和乙基香草醛(Ethyl vanillin)、常用之單體-芳樟醇(Linalool)和茶酮(Tea ketone)。此外，液態香料在使用上需先將香料單體溶解在溶劑中，一般香料溶劑以丙二醇(Propylene glycol)和三乙酸甘油酯(triacetin)為主，而這些溶劑並不存在於自然界中，因此可做為判斷蜂蜜是否添加液態香料之分析依據之一。

材料與方法

一、標準品及檢體來源

(一) 香料及香料溶劑對照用標準品：香料溶劑為 100% Triacetin，4 支香料單體標準品則向統一企業股份有限公司中央研究所技術開發部之材料分析小組購買，分別為以下 4 支：

0.1% Ethyl maltol 15mL

0.1% Ethyl vanillin 15mL

0.1% Linalool 15mL

0.1% Tea ketone 15mL

(二) 檢體

本局針對轄內超市、食品材料行、烘焙坊等販售之蜂蜜產品進行抽驗，共計 11 件，並與本市東山農會所舉辦之蜂蜜評鑑大會合作，檢測所有參賽蜂蜜 47 件，共計 58 件。

二、器具及材料

- (一) 層析管柱：DB-5MS 30m*0.25mm*0.25 μ m。
- (二) 分析天平：METTER PJ300。
- (三) 加熱攪拌器：Thermo 數位式加熱攪拌器 CIMAREC digital。
- (四) 溫度計。
- (五) 磁轉子吸附萃取(SBSE)：GERSTEL Twister®，材質為 PDMS。

三、儀器設備 (如圖一)

- (一) 熱脫附裝置(TDU)
- (二) 氣相層析質譜儀(GC-MS)：Agilent 7890B GC & 5977A Series GC/MSD。

四、標準溶液配置：取對照用標準品各約 1mL，溶解至 10g 純蜂蜜中，供作標準溶液。

五、檢驗方法

- (一) 檢體前處理：將蜂蜜與磁轉子於加熱攪拌器上進行加熱，並且在一吸附溫度及一吸附時間下進行吸附蜂蜜之氣相揮發物。
- (二) 熱脫附(TDU)條件：

TDU		CIS	
Initial Temperature	50 °C	Initial Temperature	-30 °C
Initial Time	1 min	Initial Time	0.5 min
TDU Ramp	280 °C/min	Equilibration Time	1 min
End Temp	280 °C	CIS Ramp	12 °C/s
Hold Time	5 min	End Temp	280 °C
Transfer Temp	290 °C	Hold Time	10 min

- (三) 氣相層析質譜儀(GC-MS)條件：

Agilent 7890B GC parameter			
Inlet Temp.	50 °C		
He Flow	1 mL/min		
Oven temp. program	Initial 50°C		
Oven ramp (°C/min)	Next °C	Hold time (min)	Run time (min)
Initial	50	1	1
5	180	3	26
10	280	3	10

Agilent 5977A MSD parameter	
Solvent delay time	0 min
Interface Temp.	280 °C
Start Mass (Amu)	35
End Mass (Amu)	400

(四) 偵測極限(Limit of detection, LOD)評估

1. 建立香料及香料溶劑標準品鑑別離子及滯留時間之方法：香料標準品以 0.1ppm 為最低濃度，無訊號者再增加濃度，分別為 0.5ppm、1ppm、10ppm、20ppm 及 30ppm，確認鑑別離子及滯留時間；香料溶劑標準品以 1ppm 為最低濃度，無訊號者再增加濃度，分別為 5ppm 及 10ppm，確認鑑別離子及滯留時間。

建立偵測極限(LOD):依五、(一)檢體前處理步驟，以 TDU 搭配氣相層析質譜儀(GC-MS)分析，3 次訊噪比 (S/N) 均大於 10，則以該濃度為偵測極限 (LOD)；若 3 次訊噪比 (S/N) 均未大於 10 時，則提高添加香料及香料溶劑標準品濃度，重複上述之步驟，確認 3 次訊噪比 (S/N) 均大於 10，最後以該濃度為偵測極限 (LOD)。

(五) 精密度(Precision)評估

精密度是用來表現從同一均質樣品多重取樣，於規定條件下所得到的一系列量測值之間的接近程度；可用來評估分析方法重複試驗後，所得到的數據之再現性。

1. 重複性(Repeatability)：係指同一實驗室將重複樣品依相同前處理及分析步驟同時執行檢測，計算滯留時間及波峰面積之相對標準偏差(RSD%)。
2. 中間精密度(Intermediate precision)：係指同一實驗室執行該檢驗方法，於不同分析日期、分析人員或分析設備的情況下所產生之差異性。以不同分析人員在不同分析日期之結果計算滯留時間及波峰面積之相對標準偏差(RSD%)，比較不同日期分析結果之差異。

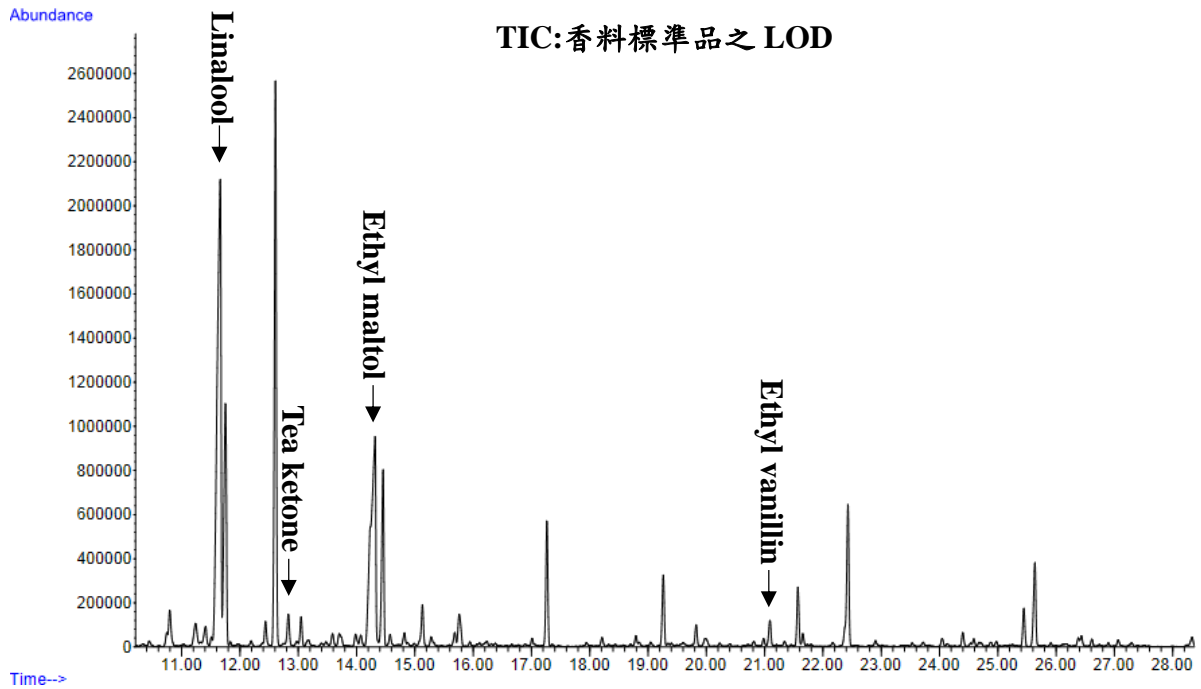
結果

一、偵測極限(LOD)

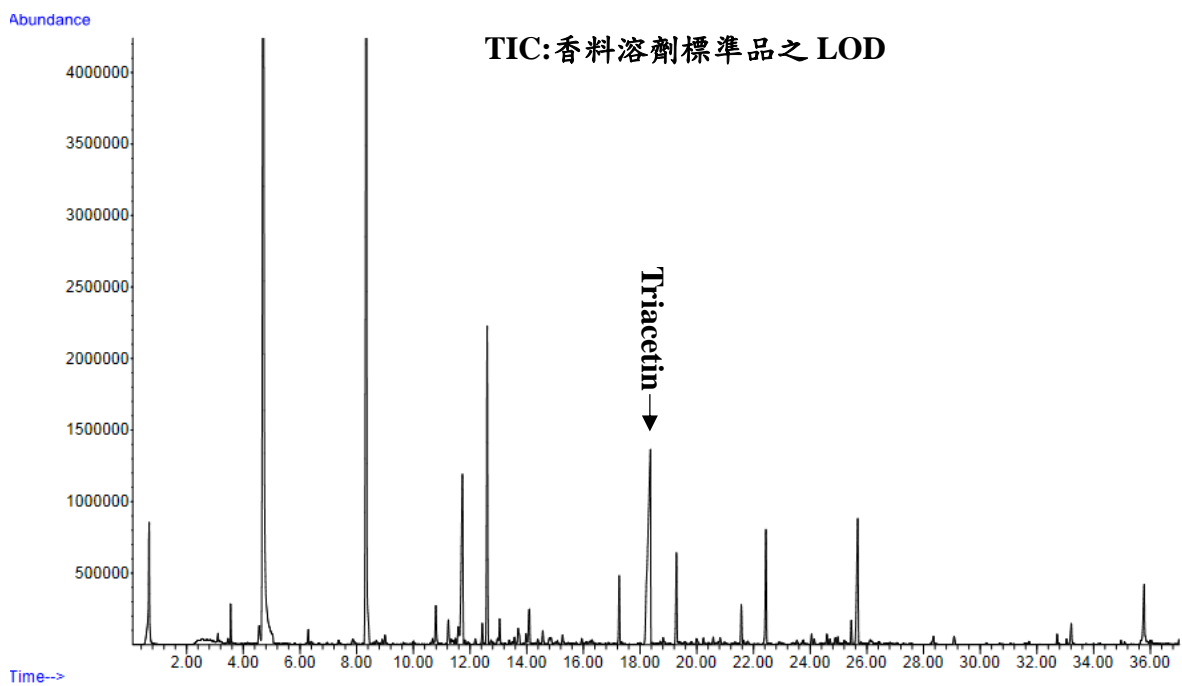
本檢驗方法之確效為 Ethyl maltol 之 LOD 為 1ppm、Ethyl vanillin 之 LOD 為 30 ppm、Linalool 和 Tea ketone 之 LOD 為 0.3 ppm(如圖一)、Triacetin 之 LOD 為 10 ppm(如圖二)，並確認鑑別離子及滯留時間(如表一)。

表一、偵測極限 (LOD)、RT、鑑別離子

名稱	RT (min)	LOD (ppm)	鑑別離子
Ethyl maltol	14.3	1	140, 139, 97
Ethyl vanillin	21.1	30	137, 166, 109
Linalool	11.7	0.3	71, 93, 136
Tea ketone	12.8	0.3	68, 96, 152
Triacetin	18.4	10	43, 103, 145



圖一、香料標準品 LOD 之 TIC



圖二、香料溶劑標準品 LOD 之 TIC

二、精密度(Precision)評估

以重複性及中間精密度來評估此分析方法所得到的數據之再現性。重複性為將此分析方法重複試驗 5 次，香料標準品滯留時間之 RSD 約為 0.01~0.04%，波峰面積之 RSD 約為 1.98~8.96%；香料溶劑標準品滯留時間之 RSD 約為 0.05%，波峰面積之 RSD 約為 5.54%(如表二)。中間精密度則以不同分析人員在不同分析日期之結果來呈現，香料標準

品滯留時間之 RSD 約為 0.01~0.12%，波峰面積之 RSD 約為 1.34~7.71%；香料溶劑標準品滯留時間之 RSD 約為 0.04~0.08%，波峰面積之 RSD 約為 2.76~4.41%(如表三)。

表二、重複性(Repeatability)

重複性	相對標準偏差(RSD%)	
	Retention time	Area
n=5		
Ethyl maltol	0.04	3.29
Ethyl vanillin	0.01	8.66
Linalool	0.03	1.98
Tea ketone	0.01	8.96
Triacetin	0.05	5.54

表三、中間精密度(Intermediate precision)

中間精密度	相對標準偏差(RSD%)			
	Retention time		Area	
n=3				
不同分析日期	107/5/28	107/10/11	107/5/28	107/10/11
Ethyl maltol	0.12	0.08	1.34	2.65
Ethyl vanillin	0.03	0.01	3.34	7.33
Linalool	0.07	0.02	3.31	2.38
Tea ketone	0.03	0.03	7.71	3.52
Triacetin	0.08	0.04	2.76	4.41

三、市售產品及農會蜂蜜評鑑大會之檢驗結果

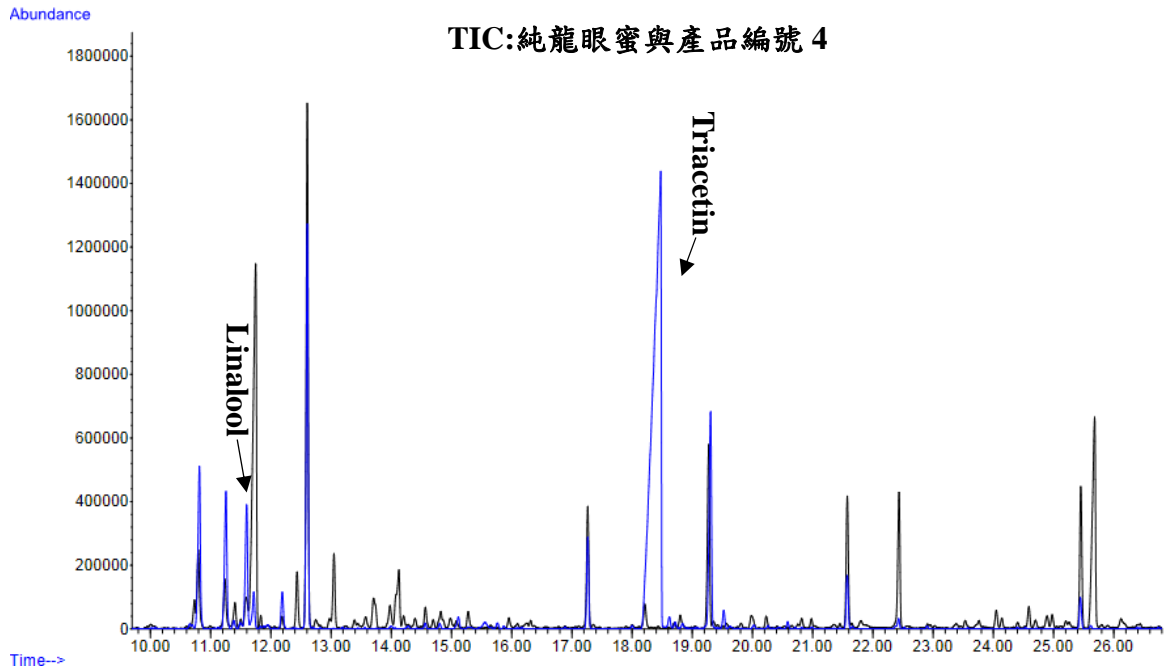
(一) 市售產品 11 件

於市面上收集蜂蜜產品共 11 件，以 SBSE+TDU 之前處理技術，搭配 GC-MS 進行分析，其中 7 件未檢出、4 件檢出，檢出成分均為 Linalool 及 Triacetin，且該 4 件均為調和蜂蜜(如表四)，另圖三為產品編號 4 與純龍眼蜜之 TIC 疊圖，由圖三可得知產品編號 4 有額外添加香料-Linalool 及使用香料溶劑-Triacetin。

表四、市售產品 11 件之蜂蜜香料檢驗結果

產品編號	測試結果	檢出成分
1	檢出	Linalool、Triacetin
2	未檢出	-
3	檢出	Linalool、Triacetin
4	檢出	Linalool、Triacetin
5	檢出	Linalool、Triacetin
6	未檢出	-
7	未檢出	-
8	未檢出	-
9	未檢出	-

10	未檢出	-
11	未檢出	-

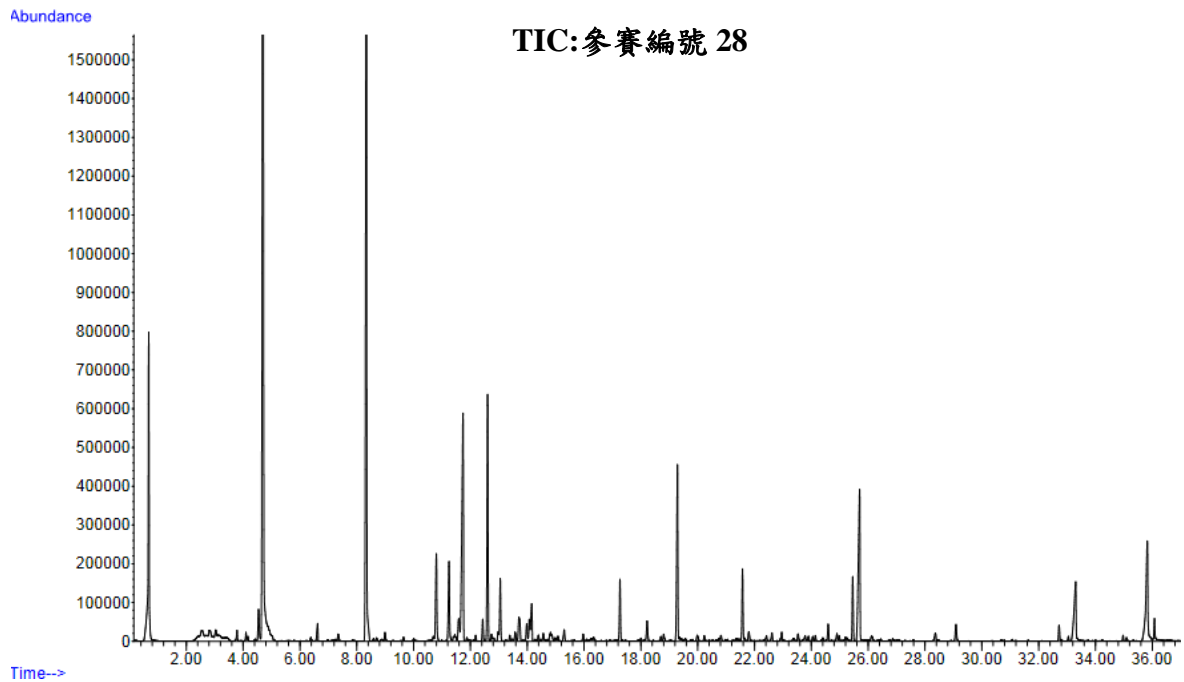


圖三、純龍眼蜜(黑)與產品編號 4(藍)之 TIC 疊圖

(二) 農會蜂蜜評鑑大會 47 件

本局與本市東山農會舉辦之蜂蜜評鑑大會合作，共檢測參賽蜂蜜 47 件，編號為 1~53 號，缺編號 4、5、22、40、45 及 47，檢測結果皆為未檢出，圖四為參賽編號 28 之 TIC。

綜合上述結果得知，以磁轉子吸附萃取與熱脫附裝置搭配氣相層析質譜儀檢驗蜂蜜中添加之香料及香料溶劑可判斷蜂蜜是否摻假及標示不實。



圖四、農會蜂蜜評鑑大會參賽編號 28 之 TIC

討論

風味由香氣(嗅覺)及滋味(味覺)所組成，而風味分析可用固相微萃取法 (solid phase microextraction, SPME)、磁轉子吸附萃取法(Stir bar sorptive extraction, SBSE)及動態頂空萃取法(Dynamic Headspace, DHS)進行分析，三種方法各有所長。SPME 是樣品經過加熱後氣／液相達分配平衡，所以低沸點高揮發性的分析物自然集中在樣品瓶上方的空氣中，使用具複合型的吸附纖維可吸附氣相揮發物並注入至 GC-MS 進行分析，較適合分析易揮發性之物質，而 DHS 則是可將樣品之揮發性成分以惰性氣體吹入，並將其捕捉於固體吸附劑中，亦具有高靈敏度，但含水量高之樣品不適合，因伴有水蒸氣之吹出而影響吸附劑之吸附效率及層析管柱之分離效率，較適合固體、粉類或含水量低之樣品；SBSE 是使用磁轉子，為一內封磁石之玻璃管，表面塗覆高分子纖維-聚二甲基矽氧烷 (Polydimethylsiloxane, PDMS)之吸附材質，將所需分析物質與磁轉子一起攪拌，可同時吸附揮發性及半揮發性物質，且靈敏度較 SPME 高，適合較黏稠且不易揮發之物質，例如蜂蜜，因此本篇研究選擇以 SBSE 來進行蜂蜜中香料之檢驗方法研究。

由市售產品結果可得知以磁轉子吸附萃取與熱脫附裝置搭配氣相層析質譜儀檢驗蜂蜜中添加之香料及香料溶劑可檢出成分 Linalool 及 Triacetin，而 Linalool 為天然蜂蜜中所存在，部分廠商會於調和蜂蜜中添加香料單體-Linalool 增加或修飾風味，檢出之 4 支市售產品之 Linalool 均高於純蜂蜜之 Linalool，另外，液態香料在使用上需先將香料單體溶解在溶劑中，一般香料溶劑以丙二醇(Propylene glycol)及三乙酸甘油酯(triacetin)為主，因這些溶劑並不存在於自然界中，因此可做為判斷蜂蜜是否添加液態香料之分析依據之一。總而言之，如有檢驗出香料人工單體-乙基麥芽醇(Ethyl maltol)和乙基香草醛(Ethyl vanillin)及香料溶劑即代表為摻假蜂蜜，而產品的標示上如沒標示有添加香料即為

標示不實；如有檢驗出常用之單體-芳樟醇(Linalool)和茶酮(Tea ketone)，與純蜂蜜做比較，並確認是否有添加香料溶劑，即可得知是否有額外添加香料單體來修飾或增加蜂蜜的風味。

此外，摻假可分為兩種情況，一種為惡意添加，使用高果糖糖漿添加香料來混充真蜂蜜，蓄意欺騙消費者；另一種情況則為交叉汙染，蜂蜜在加工過程中需先濃縮使含水量<20%，以符合 CNS 標準，通常會在濃縮過程中加入香料，如加工工廠沒有將管線或器具清洗乾淨，極有可能會殘留於管線或器具上，因而交叉汙染到下一批要加工之蜂蜜。本次檢驗有添加香料及香料溶劑之產品，皆為調和蜂蜜，無惡意添加及交叉汙染之情形。

結論

本研究建立磁轉子吸附萃取與熱脫附裝置(Stir bar sorptive extraction+thermal desorption unit, SBSE+TDU)之前處理技術，搭配氣相層析質譜儀(GC-MS)，針對台灣龍眼蜜的揮發性化合物及可能摻假之香料進行分析，其香料之氣相揮發物包含人工單體-乙基麥芽醇(Ethyl maltol)和乙基香草醛(Ethyl vanillin)、蜂蜜中常用之單體-芳樟醇(Linalool)和茶酮(Tea ketone)及香料溶劑-三乙酸甘油酯(Triacetin)，藉由判斷蜂蜜樣品的氣相揮發物是否含有以上所述之物質，以作為蜂蜜摻假及標示不實之依據。

參考資料

1. 陳立偉、曾俊茂、王威基、陳克廉。2015。分析蜂蜜中之液態香料之方法。專利公報。
2. Andreas, H., Arnd, H., Edward, P. Flavor Profiling of Beverages by Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) and Thermal Desorption GC/MS/PFPD. Gerstel Analytical Solutions. 2000, AppNote 4/2000.
3. Kevin, L. G. and Jinhe, B. The use of stir bar sorptive extraction(SBSE) for analytical food analysis. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* **2006**, 119, 379-382.
4. Cacho, J. I., Campillo, N., Viñas, P., Hernández-Córdoba, M. Evaluation of three headspace sorptive extraction coatings for the determination of volatile terpenes in honey using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **2015**, 1399, 18-24.