

《蜂蜜中 17-三十五烯含量的测定 气相色谱质谱法》编制说明

（征求意见稿）

一、工作简况

1、任务来源

本标准是根据国标委发[2021] 23 号文件《国家标准化管理委员会关于下达 2021 年第二批推荐性国家标准计划的通知》下达的任务，秦皇岛海关技术中心作为牵头单位，开展该项标准研制工作，标准归口管理单位为全国蜂产品标准化工作组，标准名称为《蜂蜜中 17-三十五烯含量的测定 气相色谱质谱法》，其计划编号为 20212905-T-442。

2、主要工作过程

2021 年该标准获得立项之后，全国蜂产品标准化工作组启动了起草组征集工作，以秦皇岛海关技术中心为牵头单位，浙江大学、江苏国测检测技术有限公司、睿科集团（厦门）股份有限公司、中科标准（宁德）科技有限公司、中国农科院蜜蜂研究所、山东安谱检测科技有限公司、黑龙江省农业科学院农产品质量安全研究所等单位作为参与单位组成了标准起草组，确定了任务分工，制定了标准的技术路线和完成进度计划，通过对检测方法的不断摸索和改进，在实验室内进行了方法的灵敏度、回收率和精密度等方面的验证，并结合大量实际样品测定结果，逐步形成稳定可靠的检测方法，保证检测结果的可靠性，满足蜂蜜中 17-三十五烯含量的检测需求。

标准制定具体过程（含计划）如下：

2021 年 8 月：标准立项，国标委下达本标准项目任务；

2021 年 8 月-2021 年 12 月：标准技术内容确立、优化、完善；

2022 年 1 月-2022 年 9 月：标准室内验证，包括方法灵敏度、线性、回收率和精密度等；标准方法应用。

2022 年 8 月-2022 年 9 月：完成标准征求意见稿；

2022 年 9 月-2022 年 12 月：标准室间验证；标准征求意见并汇总处理，形成标准送审稿；标准审查；修改完善形成标准报批稿；标准报批等。（按计划进行中...）

二、标准编制原则和主要内容说明

1、编制原则

本标准的编制按照 GB/T 1.1-2020 《标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构和编写规则》和 GB/T 20001.4-2015 《标准编写规则 第 4 部分：试验方法标准》的要求进行编写制订。

2、主要内容说明

蜂蜜是蜜蜂采集植物花蜜、分泌物或蜜露，与自身分泌物混合后，经过在巢脾内转化、脱水、贮存至成熟后储存在蜂房中的天然甜物质。蜂蜜气味清香浓郁，味道纯真甜美，富含多种营养物质，主要成分是果糖和葡萄糖，可以很容易被人体吸收，另外还含有淀粉酶、氧化酶、还原酶的等活性物质，以及多种维生素，氨基酸，有机酸，蛋白质和铁、钙等多种有益人体健康的微量元素，能够起到美容养颜、润肠通便、提高机体免疫力等作用，随着我国经济快速发展以及城镇化水平不断提高，消费者健康意识有所提升，蜂蜜作为营养佳品，受到众多消费者青睐。

目前，我国蜜蜂主要由中华蜜蜂（*Apis cerana*，简称中蜂）和意大利蜜蜂（*Apis mellifera*，简称意蜂）两大种群组成。20 世纪 30 年代后，意蜂被我国大量引进和饲养，作为本土蜂种的中蜂在与意蜂的种间竞争中长期处于弱势，中蜂养殖主要在意大利蜂难以进入的山区和丘陵地区。中蜂为中国独有，个体小，具有行动敏捷、采蜜期长及适应性、抗螨抗病能力强，能够利用零星蜜源植物等优点，非常适合中国山区定点饲养，除新疆外我国各地均有分布。但由于中蜂分蜂性强，难以维持强群，性情暴躁，喜欢啃咬旧脾，蜂王产卵量少，工蜂哺育能力低，繁育很慢，蜂蜜产量较低。意大利蜜蜂原产于意大利，个体大，每群蜜蜂的产蜜量高，是蜂蜜、王浆、花粉产量均较好的理想蜂种，意蜂喜欢采集大片单一的蜜源，可以得到单花种蜂蜜，还可用于蜂胶生产，是世界范围内广泛养殖的蜜蜂品种，也是目前我国国内蜜蜂养殖的主要品种。

近年来，根据农业农村部“应保尽保”的总体要求，我国现有各地蜜蜂种质资源的保护力度逐步加大，尤其是各地中蜂种质资源的保护力度，强化各级中蜂自然保护区建设，落实保护主体责任，严禁西蜂进入中蜂保护区，加大蜜蜂防疫监控和常规化管理，从而中蜂蜂蜜等中蜂产品出现高价产品，使中蜂养殖者的积极性得到提升，中蜂数量也有所回升。2021 年，我国有蜂群 1442 万群，蜂农 30 万户。其中至少 2/3 为转场蜂农，饲养的主要是西蜂（主要是意大利蜜蜂）；另外为不转场蜂农，饲养的主要是中蜂（即中华蜜蜂）。根据华经产业研究院发布的《2022-2027 年中国蜜蜂养殖与深加工行业发展监测及投资战略咨询报告》显示，2020 年全国共计 46 家蜜蜂育种场，共出售或赠予的蜂王数量为 63.03 万只，其中西方蜜蜂出售蜂王为 38.59 万只，占比 61.23%；东方蜜蜂蜂王为 24.44 万只，占比

38.77%。

中蜂蜂蜜也称“土蜂蜜”，作为我国独有的蜂蜜种类，其营养和保健功效深受本土消费者信赖，然而因产量较低，其市场价格是普通意蜂蜂蜜的 3-5 倍。一些不法商贩用意蜂蜂蜜冒充或掺入中蜂蜂蜜中以赚取高额利润，给中蜂养殖者以及中蜂产品企业造成了较大损失，同时引发了消费者的信任危机，对中蜂蜂蜜的品牌形象造成负面影响，不利于蜂产品市场的健康发展。因此，如何鉴别中蜂蜂蜜和意蜂蜂蜜是当前蜂产品行业亟待解决的一大问题。目前还没有针对中蜂蜂蜜和意蜂蜂蜜鉴别的标准。

由现有文献可知：蜂蜜在酿造和收获过程中会带入蜂源性物质，而不同蜂种蜂蜜中的蜂源性物质存在一定的差异。蜂群中，蜜蜂把蜂蜜储存在蜡质的蜂房内，由于蜜蜂的撕咬行为和收获蜂蜜时割盖或压榨等操作，蜂蜜中不可避免的存在微小的蜂蜡碎片。蜂蜡是蜜蜂工蜂蜡腺分泌而来的，蜡腺中的蜡汁被分泌到蜡镜上，与空气接触后，就硬化成鳞片状的蜡鳞 Hepburn 等(1991)，蜜蜂用蜡鳞来建造蜂房。蜂蜡不溶于冷水、易溶于氯仿、石油醚等有机溶剂。按蜂种来源划分，可分为中蜂蜂蜡和意蜂蜂蜡。蜂蜡中酯类成分含量最高，约占蜂蜡含量的 70.4%-74.7%，烃类成分含量约为 14%，主要以 C27-C33 为主 (Jiménez 等, 2006)。不同蜂种蜂蜡在成分和理化指标存在一定差异。徐景耀等(1989)通过气相色谱法发现中蜂蜂蜡和意蜂蜂蜡的化学成分存在差异，中蜂蜂蜡的 C35 含量突出，而意蜂蜂蜡中不含有 C35。我国国家标准《GB/T 24313-2009 蜂蜡中石蜡的测定 气相色谱-质谱法》中给出了蜂蜡中石蜡烃类物质的测定方法，对中蜂蜂蜡、意蜂蜂蜡、石蜡等在烷烃成分上的差异做出了初步的说明，通过石蜡与蜂蜡烷烃成分组成上的差异建立了蜂蜡中石蜡掺假的鉴别方法。Zuccato 等(2017)使用¹HNMR 结合化学计量学方法分析了无刺蜂蜂蜜和西方蜜蜂蜂蜜的氯仿提取物，成功地鉴别了两种蜂种来源的蜂蜜，进一步的研究发现蜂蜜中的一些昆虫学标记物可能来自蜂蜡。张言政等（2019）推测中蜂和意蜂蜂蜡成分之间的差异可用于鉴定各自的蜂蜜，使用 GC 分析了中蜂蜂蜜和意蜂蜂蜜中各自的特征峰来自蜂蜡，使用 GC-MS/MS 鉴别了中蜂蜂蜜中的特征峰为三十五烯烃。

基于以上这些研究，本标准制定团队前期以目前文献报道为依据，通过实验室大量数据验证，确证 17-三十五烯为中蜂蜂蜜特征标志物，该化合物不存在于意蜂蜂蜜，可以做为靶标来鉴别两种不同蜂种来源的蜂蜜，在一定程度上遏制以低价意蜂蜂蜜冒充高价中蜂蜂蜜这一乱象。

三、主要试验情况分析

（一）方法的技术参数选择与优化

1. 前处理条件的选择和优化

①提取溶剂：烃类物质的提取一般选用液液萃取法，常用振荡提取方式，常用的提取试剂有：石油醚、二氯甲烷、正己烷等，本研究通过实验对比了石油醚（沸程 35-60 °C），石油醚（沸程 60-90 °C），二氯甲烷，正己烷，正己烷：二氯甲烷（1:1）5种试剂的提取效率，选取代表性中蜂蜂蜜进行测定，每种提取试剂做 3 平行，测定响应取平均值。结果表明，采用石油醚（沸程 35-60 °C）的提取效率略高于其他试剂，故本研究选择石油醚（沸程 35-60 °C）作为提取试剂。

②萃取时间：以石油醚（沸程 35-60 °C）作为提取试剂进行研究，选取代表性中蜂蜂蜜进行平行实验，对比了振荡时间分别为 5min、15min、30min、45min、60min、90min 的提取效率，每条件做 3 平行，测定响应取平均值。结果表明，5-30 min 提取时间范围内，随着萃取时间增加，萃取效率提高，当萃取时间超过 30 min，萃取时间增加，萃取效率不增加或增加不显著，表明 30 min 能够使得目标物提取充分，故本研究选择萃取时间为 30 min。

③萃取次数：以石油醚（沸程 35-60 °C）作为提取试剂，振荡 30min 条件进行萃取次数的研究，选取代表性中蜂蜂蜜进行平行实验，分别收集第 1 次，第 2 次，第 3 次，第 4 次提取液进行测定，每种条件做 3 平行，测定响应取平均值。结果表明，第 4 次基本没有目标物提取出来，可以以前 3 次提取目标物之和作为样品中目标物的总含量，而前 2 次提取率>99%，因而，选择萃取次数为 2 次。

④固相萃取柱：中蜂蜂蜜一般具有比较复杂的基质干扰，会对目标物的定性定量产生一定影响，需要通过前处理手段去除或降低。本标准选用固相萃取法，经过试验表明 Florisil 柱净化效果比较显著，可以去除样品中色素等干扰物质，且不影响目标物的回收率。

2. 仪器条件的选择和优化

①检测仪器：气相色谱-火焰离子化检测法（GC-FID）^[7-8]和气相色谱质谱法（GC-MS）^[9-11]为检测烃类物质最常用的方法，GC-MS 方法定性能力更强，具有较高的灵敏度和准确度等优点，本研究选择 GC-MS 法。

②色谱柱：经试验，DB-5MS（15 m×0.25 mm×0.25 μm）色谱柱具有分析时间短、灵敏度高、峰形较好等优点，可满足 17-三十五烯的检测，本实验选用 DB-5MS 毛细管柱。

3. 气相色谱-质谱条件

气相色谱条件

- a) 色谱柱：5%苯基-95%甲基聚硅氧烷（15 m×0.25 mm×0.25 μm）毛细管柱，或相当者；
- b) 色谱柱温度：60 °C保持 1.0 min，然后以 30 °C/min 升至 310 °C，保持 6 min；
- c) 载气：氦气，流速：1.5 mL/min；
- d) 进样口温度：310 °C；
- e) 进样量：1 μL；
- f) 进样方式：分流进样，分流比：10：1。

质谱条件

- a) 离子源温度：230 °C；
- b) 传输线温度：310 °C；
- c) 检测方式：选择离子扫描（SIM）；
- d) 选择离子扫描参数见表 1：

表 1 17-三十五烯选择离子扫描（SIM）参数

中文名称	英文名称	选择离子	定量离子
17-三十五烯	17-Pentatriacontene	97.1, 111.1, 125.1, 490.6	490.6

4. 定性检测

在相同实验条件下，试样溶液中 17-三十五烯的保留时间与基质匹配标准溶液中该化合物的保留时间偏差在±2.5%之内，所有离子都出现，且相对离子丰度与浓度相当的基质匹配标准溶液相对离子丰度一致，其偏差应符合表 2 的要求。

表 2 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	> 50%	> 20%~50%	> 10%~20%	≤ 10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

5. 定量检测

为了使定量结果更准确，本研究选择基质匹配标准曲线进行定量。以基质匹配标准溶液浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准工作曲线，作单点或多点校准，按外标法计算试样中目标物的含量。基质匹配标准溶液及试样溶液中的目标物响应值均应在仪器检测

的线性范围内。

（二）方法验证与应用

1. 方法室内验证

对本标准方法的线性、灵敏度、添加回收率和精密度进行了考察，以保证方法准确可靠，具体验证结果如下：

（1）方法线性和检测限

以 3 倍信噪比对应浓度为方法检出限，以 10 倍信噪比对应浓度为方法定量限（测定下限），确定方法检出限为 0.3 mg/kg，定量限为 1.0 mg/kg。

根据仪器相应线性范围，分别配制 2.5 µg/mL、5 µg/mL、10 µg/mL、20 µg/mL、50 µg/mL、100 µg/mL 浓度的基质匹配系列标准溶液，进仪器检测，然后以峰面积（Y）为纵坐标，对应的标准溶液浓度值（X）为横坐标绘制标准工作曲线，17-三十五烯的线性方程为： $Y=30.40X-65.06$ ，线性相关系数 R^2 为 0.9998，表明该化合物的线性关系良好（图 1）。

17-三十五烯标准溶液（浓度为 100 µg/mL）的定量离子（490.6）色谱图见图 2。

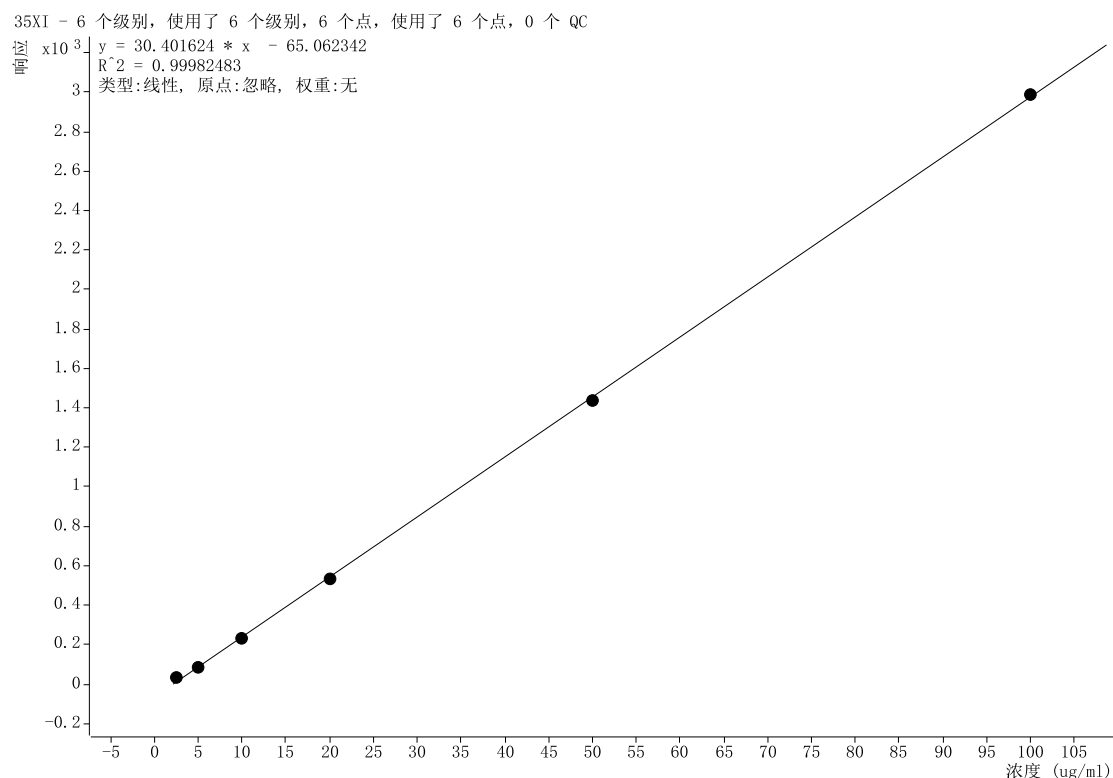


图 1 GC-MS 检测 17-三十五烯的线性曲线

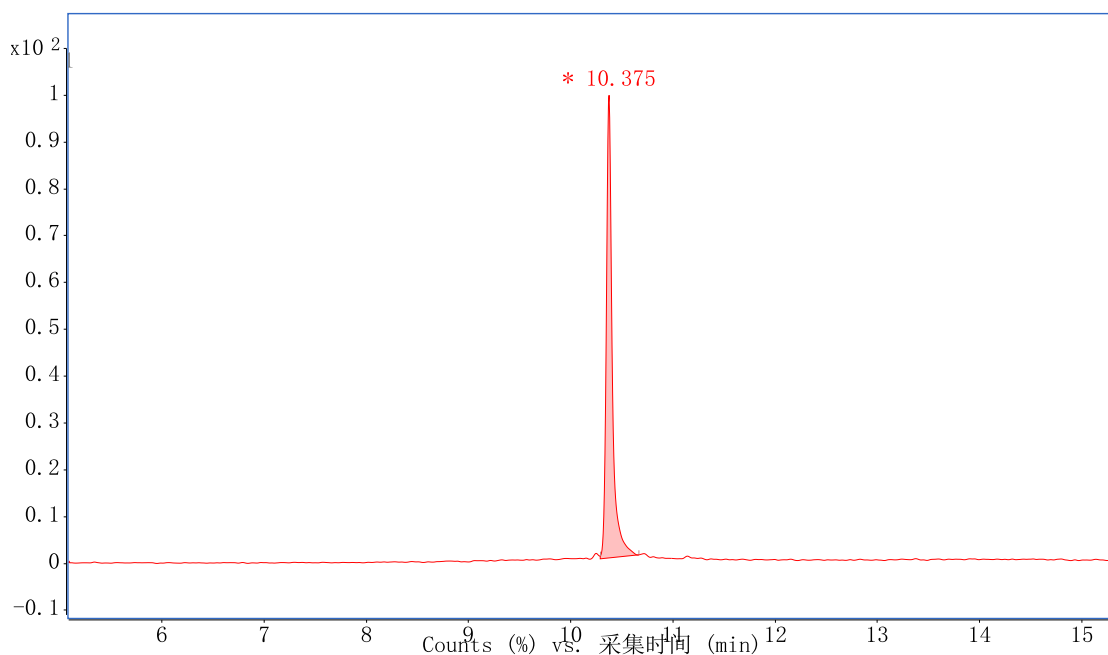


图 2 17-三十五烯标准溶液（浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ ）定量离子（490.6）色谱图

（2）方法的回收率和精密度

采用空白样品加标测试的方式，对本标准方法的回收率和精密度进行考察。本研究选取某空白意蜂蜂蜜进行测定。每个样品添加浓度分别为 1 mg/kg、2 mg/kg、10 mg/kg，每个浓度水平进行 6 次平行实验测定，与相同浓度的基质匹配标准溶液同时测定，获得方法的回收率和精密度。结果表明：平均回收率在 88.7%~99.3%之间，相对标准偏差（RSD）在 5.8%~10.0%之间，表明方法准确度和精密度良好，满足方法学要求。17-三十五烯的添加回收率和精密度见表 3。代表性空白样品和不同浓度添加样品色谱图见图 3。

表 3 17-三十五烯的添加回收率和精密度（ $n=6$ ）

添加水平 (mg/kg)	回收率 (%)						平均回 收率	RSD
	1	2	3	4	5	6	(%)	(%)
1	78.2	97.5	84.1	90.5	81.7	100.1	88.7	10.0
2	94.2	103.2	84.3	98.7	79.9	87.8	91.4	9.7
10	90.3	95.3	99.5	105.7	104.5	100.7	99.3	5.8

RSD，相对标准偏差

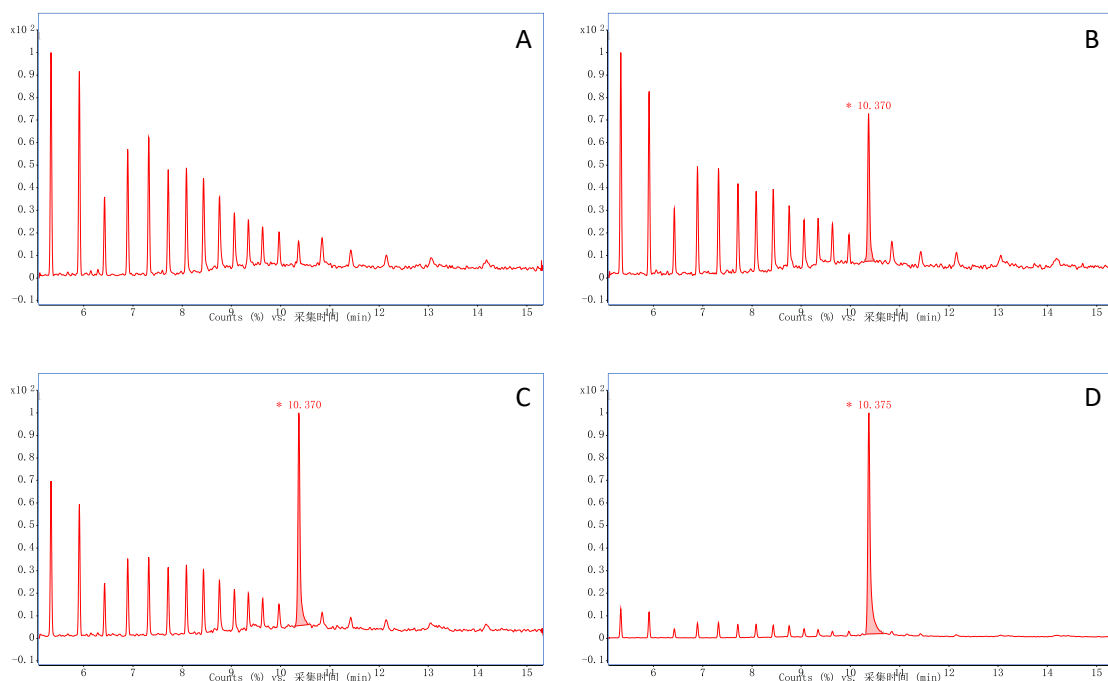


图 3 空白样品（A）和不同浓度添加样品（B，1.0 mg/kg；C，2.0 mg/kg；D，10 mg/kg）中 17-三十五烯的定量离子色谱图

2. 方法室间验证

进行中.....

3. 方法应用

采用本标准方法，对 2020 年~2021 年间采集的 78 批次中蜂蜂蜜样品（多为百花蜜）和 80 批次意蜂蜂蜜样品（包括洋槐蜜、荆条蜜、油菜蜜、枣花蜜、椴树蜜、百花蜜、荔枝蜜等）中的 17-三十五烯含量进行检测。结果表明，①80 批次意蜂蜂蜜均未检出，而 78 批次中蜂蜂蜜样品均有不同浓度检出。②中蜂蜂蜜样品的含量范围为：0.58-51.1 mg/kg，见表 4。其中，含量低于定量限 1 mg/kg 的样品数为 2 个，占比为 2.6%，1 mg/kg-5 mg/kg 的样品数为 15 个，占比为 19.2%，5 mg/kg-10 mg/kg 的样品数为 42 个，占比为 53.8%。>10 mg/kg 的样品数为 19 个，占比为 24.4%。③中蜂蜂蜜样品的平均含量为：9.1 mg/kg。结果表明，17-三十五烯为中蜂蜂蜜的特征标志物。

表 4 78 批次中蜂蜂蜜样品中 17-三十五烯的含量

序号	样品编号	含量 (mg/kg)	序号	样品编号	含量 (mg/kg)	序号	样品编号	含量 (mg/kg)
----	------	---------------	----	------	---------------	----	------	---------------

1	2020-001	4.8	27	2020-027	4.8	53	2021-021	5.4
2	2020-002	1.0	28	2020-028	2.6	54	2021-022	10.5
3	2020-003	6.8	29	2020-029	4.8	55	2021-023	10.5
4	2020-004	0.58	30	2020-030	11.0	56	2021-024	4.2
5	2020-005	6.3	31	2020-031	6.4	57	2021-025	6.7
6	2020-006	11.2	32	2020-032	5.2	58	2021-026	10.4
7	2020-007	4.9	33	2021-001	51.1	59	2021-027	9.5
8	2020-008	7.8	34	2021-002	8.7	60	2021-028	4.7
9	2020-009	7.9	35	2021-003	8.0	61	2021-029	9.4
10	2020-010	5.5	36	2021-004	4.6	62	2021-030	5.9
11	2020-011	9.0	37	2021-005	9.7	63	2021-031	16.0
12	2020-012	9.2	38	2021-006	11.7	64	2021-032	4.2
13	2020-013	12.9	39	2021-007	5.8	65	2021-033	7.4
14	2020-014	6.0	40	2021-008	30.3	66	2021-034	8.7
15	2020-015	6.3	41	2021-009	40.6	67	2021-035	12.3
16	2020-016	3.9	42	2021-010	4.6	68	2021-036	8.7
17	2020-017	7.5	43	2021-011	9.6	69	2021-037	3.8
18	2020-018	5.1	44	2021-012	19.9	70	2021-038	9.8
19	2020-019	7.3	45	2021-013	0.83	71	2021-039	4.3
20	2020-020	7.9	46	2021-014	6.0	72	2021-040	10.4
21	2020-021	8.4	47	2021-015	13.9	73	2021-041	1.9
22	2020-022	5.6	48	2021-016	5.6	74	2021-042	18.2
23	2020-023	5.7	49	2021-017	11.5	75	2021-043	5.3
24	2020-024	6.0	50	2021-018	5.7	76	2021-044	20.1
25	2020-025	8.5	51	2021-019	8.4	77	2021-045	22.7
26	2020-026	6.7	52	2021-020	9.9	78	2021-046	5.9

四、标准中涉及专利的情况

无。

五、预期达到的社会效益、对产业发展的作用等情况

本标准的实施，将提供充分的数据，为中峰蜂蜜的特异性鉴别提供参考，为中峰蜂蜜品质质量安全评价提供新的技术支撑手段，有利于促进蜂产品进出口贸易，有利于保障蜂蜜质量安全，保障人民身体健康。

六、采用国际标准和国外先进标准的程度

本标准未采用国际标准。

七、在标准体系中的位置，与现行法律、法规、规章及相关标准，特别是强制性标准的协调性

本标准属于蜂蜜标准体系中“检测方法”大类。

本标准方法的实施在一定程度上为强制性国家标准《GB 14963-2011 食品安全国家标

准 蜂蜜》和推荐性行业标准《GH/T 18796-2012 蜂蜜》中蜂蜜的定义提供其属性鉴别或真实性鉴别的技术方法支撑。

八、重大分歧意见的处理经过和依据

无。

九、标准性质的建议说明

建议本标准为推荐性行业标准。

十、贯彻标准的要求和措施建议

建议本标准批准发布 3 个月后实施。

十一、废止现行标准的建议

无。

十二、其他应予说明的事项

无。

主要参考文献:

- [1] Hepburna H.R., Bernarda R.T.F., Davidsonb B.C., et al. Synthesis and secretion of beeswax in honeybees[J]. *Apidologie*, 1991, 22(1): 21-36.
- [2] Jiménez J.J., Bernal J L , Nozal M , et al. Sample preparation methods for beeswax characterization by gas chromatography with flame ionization detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1129(2): 262-272.
- [3] 徐景耀, 周勤, 杨慧珍, 林少彬, 罗列武. 中华蜜蜂与意大利蜜蜂蜂蜡成分研究[J]. *色谱*, 1989(03): 175-176.
- [4] GB/T 24313-2009 蜂蜡中石蜡的测定 气相色谱-质谱法
- [5] Zuccato V , Finotello C , Menegazzo I , et al. Entomological authentication of stingless bee honey by ¹H NMR-based metabolomics approach[J]. *Forest Policy and Economics*, 2017, 82(145-153).
- [6] 张言政. 中蜂蜂蜜与意蜂蜂蜜蜂种来源真实性研究[D]. 浙江大学, 2019.
- [7] 卢焕福. 蜂蜡气相色谱指纹图谱的研究[D]. 大连医科大学, 2008.
- [8] 时磊, 蔡小虎, 吕爱娟, 沈小明, 胡璟珂, 沈加林. 加速溶剂萃取-气相色谱法测定沉积物中正构烷烃的含量[J]. *理化检验(化学分册)*, 2017, 53(04): 399-403.
- [9] 杜瑞雪, 刘泽龙, 王乃鑫, 刘明星. 气相色谱-质谱联用技术测定喷气燃料烃类碳数分布[J]. *石油学报(石油加工)*, 2022, 38(04): 917-928.
- [10] 刘保献, 王小菊, 常淼, 沈秀娥, 赵红帅, 张大伟. 超声提取-气相色谱质谱法测定大气PM(2.5)中正构烷烃[J]. *中国环境监测*, 2015, 31(06): 109-117.
- [11] 赵玉妍, 陈伟光. 工作场所空气中烷烃类及脂环烃类化合物的气相色谱测定法[J]. *环境与健康杂志*, 2015, 32(06): 516.