

《蜂王浆及蜂王浆冻干粉中羟甲基糠醛含量的测定 高效液相色谱法》编制说明

(征求意见稿)

一、工作简况

1.1. 任务来源

国家标准化管理委员会于2023年3月发布了《关于下达2023年第一批推荐性国家标准计划及相关标准外文版计划的通知》(国标委发[2023]10号),其中,《蜂王浆及蜂王浆冻干粉中羟甲基糠醛含量的测定 高效液相色谱法》国家标准项目列入2023年第一批推荐性国家标准计划(项目编号:20230012-T-442)。本标准主管部门为中华全国供销合作总社,技术归口单位为全国蜂产品标准化技术委员会,由全国蜂产品标准化技术委员会委员单位杭州碧于天保健品有限公司牵头负责。

1.2. 制定背景

本文件为解决行业的重点关注的问题——蜂王浆和蜂王浆冻干粉新鲜度的判定提供适宜的检测方法。

作为以活性蛋白为主要功能的蜂王浆,控制温度和低温存储对于产品新鲜度和品质意义重大,但在如何判定问题上,多年以来一直困扰着行业的发展。本文件通过对蜂王浆和蜂王浆冻干粉进行羟甲基糠醛含量的检测,以判断蜂王浆贮存、加工过程中温度控制情况。

蜂王浆,是蜜蜂巢中培育幼虫的青年工蜂咽下腺和上腭腺的分泌物,是一种高活性成分的营养食品。蜂王浆含有62-67%的水分,14-16%的蛋白质,10-15%的糖类,2-9%的脂类,矿物质0.6-2%,还有微量的维生素。在生产实践中,蜂王浆如果贮存不当,会产生褐变、因蛋白质聚集凝固而变粘稠、受微生物污染而变酸、变臭和产生气泡,严重影响蜂王浆的品质。

在现行的GB 9697和ISO 12824蜂王浆标准中,仅规定了蜂王浆标志性成分10-HDA \geq 1.4%、蛋白质11-18%、总糖7-18%及总脂2-9%,而没有相关新鲜度指标的明确要求,这对于蜂王浆行业的良性发展是极其不利的。有志于生产优质蜂王浆的蜂业合作社或者企业,花巨资投入蜂王浆冷链贮存运输设备,生产新鲜度高的蜂王浆产品,由于现行标准并无相关新鲜度指标,体现不出其产品品质的优势,因而也体现不出产品的竞争优势,一定程度上打击其生产高品质蜂王浆的积极性。在出口市场也存在同样的问题,以蜂王浆中的特有成分10-HDA的高低为定价依据,品质的差异性无法体现,存在恶性竞争,致使我国蜂王浆出口价格几十年不变,甚至出现价格走低趋势:上世纪九十年代,蜂王浆出口价格在250元/kg,现在出口价仅140~190元/kg。蜂王浆收购价则相应地走低,2023年蜂王浆原料蜂农见面价更低,严重影响我国蜂王浆行业的进一步发展。

关于蜂王浆新鲜度,从二十世纪90年代,人们就已经开始积极探索与研究。从酶、蛋白质、维生素等热敏性成分入手,通过不同贮存条件下,对酶活性^[1,2]、蛋白活性^[3-7]、维生素含量^[8,9]、褐变成分含量^[10-14]、红外光谱指纹^[15]的变化趋势进行研究,取得了一些研究成果。由于缺少生产实践验证、检测方法灵敏度不够、研究对象在不同蜂王浆中本底差异较大,并没有合适的指标在生产实践中得到应用。作为蜂王浆的新鲜度指标,必须满足:该指标必须对温度敏感,在新鲜的蜂王浆中不存在,而且可以被定量、被准确检测。在现有研究中,我们认为羟甲基糠醛是最可能的判定蜂王浆新鲜度的指标。

羟甲基糠醛是美拉德反应的重要中间产物^[16]，在酸性条件下，己糖脱水，或是氨基酸与羰基化合物之间反应形成。裴珂晗等报道^[17]，甜葡萄酒 30℃下放置 4 个月后，羟甲基糠醛含量达到 12mg/L，高夫超等报道^[16]，蜂王浆常温下放置 12 个月，HMF 从未检出升高到 0.573mg/kg，魏月等认为^[11]，蜂王浆中羟甲基糠醛含量在 150 μ g/kg 以下，可以认为蜂王浆是新鲜的。

现行文献检测方法中^[11,12,16]，蜂王浆中羟甲基糠醛的检测限为 300 μ g/kg，定量限为 1mg/kg，然而，在我们的研究中发现，2019 年 4℃下贮存至今的蜂王浆，其羟甲基糠醛含量仅为 91 μ g/kg，要深入了解蜂王浆中的羟甲基糠醛的变化规律，有必要进一步研究蜂王浆中的羟甲基糠醛含量的测定方法。

蜂王浆在贮存和加工（冻干）过程中逐渐生成羟甲基糠醛（HMF），在现有的相关研究中，羟甲基糠醛被证实是不存在于新鲜蜂王浆中且又与贮存温度密切相关的物质，能很好地反映蜂王浆贮存加工过程中是否进过加热，是否在常温下存放过久，进而反映出产品的新鲜度和品质，而阻碍其成为蜂王浆新鲜度指标的主要问题是检测方法的灵敏度。

本文件的检测方法灵敏度为 20 μ g/kg，方法具有操作简便、快速、准确的特点。利用本项目方法可以精准测定蜂王浆贮存和加工过程中羟甲基糠醛含量的细微变化，可为将羟甲基糠醛确定为蜂王浆及其冻干粉新鲜度指标提供适宜的检测方法。为下一步蜂王浆及其冻干粉新鲜度指标的确定提供检测方法的依据。

1.3 起草过程

2023 年 3 月本文件列入 2023 年第一批推荐性国家标准计划及相关标准外文版计划。

2023 年 6 月，有关蜂王浆生产、科研、教学、经营单位对本文件的制定十分重视，积极参与。经过共同协商，本文件由杭州碧于天保健品有限公司牵头，共有浙江大学动物科学学院、中国蜂产品协会、南京天嘉检测有限公司、浙江省食品药品检验研究院、杭州天厨蜜源保健品有限公司、杭州和峰园保健品有限公司、安徽蜜之源食品集团有限公司、桐庐县检验检测中心、山东丰采健康产业有限公司、浙江江山恒亮蜂产品股份有限公司、浙江江山健康蜂业有限公司、上海冠生园蜂制品有限公司、华谱科仪(北京)科技有限公司等专家参加起草。

2023 年 8 月 21 日牵头起草单位编写本文件的文本和编制说明讨论稿。

2023 年 9 月 12 日由浙江省食品药品检验研究院完成本文件文本的英文版。

2023 年 10 月 19 日启动线上第一次会议。会议进一步明确了制定本文件的目的、意义和必要性，对参加起草的单位和起草人员进行了工作分工。讨论了文本与编制说明的讨论稿。具体分工如下：

杭州碧于天保健品有限公司负责全面工作，组织会议召开，文件文本与编制说明的编制，方法的验证，提供验证样品。

浙江大学动物科学学院负责文献查阅、技术方案、文本审核。

中国蜂产品协会负责对外联络、合规性审查、文本审核。

浙江省食品药品检验研究院、浙江大学动物科学学院、南京天嘉检测有限公司负责文本的英文翻译及英文文本的审核。

南京天嘉检测有限公司、安徽蜜之源食品集团有限公司、杭州天厨蜜源保健品有限公司、桐庐县检验检测中心、上海冠生园蜂制品有限公司、浙江江山健康蜂业有限公司、华谱科仪(北京)科技有限公司等单位负责文件方法的方法学考察、验证方案的实施。

杭州天厨蜜源保健品有限公司、安徽蜜之源食品集团有限公司、山东丰采蜂产品有限公司、浙

江山恒亮蜂产品股份有限公司、浙江江山健康蜂业有限公司等单位负责样品提供。

2023年10月20日，由浙江省食品药品检验研究院完成本文件的英文版。

2024年1月20日，召开第二次线上会议，以线上的方式开始进行本文件的起草工作

2024年3月10日，本文件从草案形成了征求意见稿初稿，又于2024年3月20日、2024年4月1日，征求了参与起草单位的5位专家的意见，共收到了2个单位5人次的10条次的反馈意见。根据反馈意见，牵头起草单位经过3次修改，取得参与起草单位的同意后，整理形成了本文件征求意见稿。

2024年4月4日~4月20日，由浙江省食品药品检验研究院、浙江大学动物科学学院共同翻译本文件文本的英文版。

二、国家标准编制原则、主要内容及其确定依据

2.1 国家标准编制原则

本文件制定的原则是：①按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和编写规则》及 GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》的要求编写的。②体现本文件比较先进的技术水平，适应当前经济发展的需要，提高蜂王浆行业在国内、国际市场上的竞争能力。③本文件的检测水平从实际出发，为蜂王浆新鲜度指标的确定提供检测技术，以适应食品品质保证的需要。④本文件的检测水平以行业的中等偏上水平为基准，体现本文件的先进性、科学性、合理性和可行性。

2.2 主要内容及其确定依据

2.2.1 范围

本文件的适用范围确定为：

本文件规定了蜂王浆及蜂王浆冻干粉中羟甲基糠醛含量的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于蜂王浆及蜂王浆冻干粉中羟甲基糠醛含量的测定。

2.2.2 原理

为了方便使用者对本文件原理的理解及实施，给出了本文件的方法原理：

样品经氨水溶解，用乙酸乙酯提取羟甲基糠醛，离心，取上清液蒸干，用6%甲醇超声溶解，过0.22 μ m滤膜，用液相色谱仪紫外检测器($\lambda=285\text{nm}$)检测，绘制空白基质标准曲线，外标法定量。

2.2.3 试样制备与保存

蜂王浆在常温下保存可以快速产生羟甲基糠醛（也可以简称 HMF），故不能在常温下久存。在0~8 $^{\circ}\text{C}$ 环境下也可以缓慢产生 HMF。为保证检测结果的准确，试样制备与保存规定如下：

冷冻样品在0~8 $^{\circ}\text{C}$ 下16小时内解冻，取适量解冻后的试样，室温下搅拌均匀。

未冷冻的试样直接取适量，室温下搅拌均匀。

蜂王浆冻干粉是蜂王浆的脱水产品。在冻干后期，随着蜂王浆中水分的减少，不可避免地需要升高温度以较为彻底地去除水分，出料前，物料温度可以达到45~55 $^{\circ}\text{C}$ 。因此，蜂王浆冻干粉中的HMF都会被检出。

1g蜂王浆冻干粉约相当于3g鲜蜂王浆，检测时，为了达到与蜂王浆一致的样液酸碱度和提取

效率，称样量应该与蜂王浆一致，以此推算，冻干粉的称样量应该是 0.66g。这样会带来一些不足：称量操作相对困难，称量小可能带来较大的误差，需要精度更高的天平，同时，对样品的均匀性要求也更高。为了更加准确地检测蜂王浆冻干粉中的 HMF，本文件采用 3 倍稀释的方法对蜂王浆冻干粉样品进行稀释，稀释后的样品按蜂王浆试样液的制备方法进行。

蜂王浆冻干粉稀释样制备。称取3.0 g样品（精确到±0.01 g）于50 mL烧杯中，加入6.0 g（精确到±0.01 g）水，用玻璃棒每隔5 min搅拌一次，直至样品呈均匀的浆状，无颗粒，得蜂王浆冻干粉稀释样。

将制备好的试样于0~8℃环境下保存，一周内进行测定。长久保存试样应在-18℃环境下。

2.2.4 操作步骤

2.2.4.1 试样溶液的制备。

称取2.00 g蜂王浆样品或者蜂王浆冻干粉稀释样，精确到±0.01 g，于50 mL塑料离心管中，加入6.0 mL 1.5%氨水溶液，振荡，充分溶解1 min，立即加入20 mL乙酸乙酯，充分手动振荡提取1 min，4500转/min离心10 min。吸取10 mL上清液于玻璃容器中，氮气吹干或旋转蒸发至干，加入1.0 mL6%甲醇溶液，超声溶解，过0.22 μm滤膜，得到测试样液。

2.2.4.2 空白基质标准曲线工作溶液的制备

经过对蜂王浆及蜂王浆冻干粉中 HMF 的检测，蜂王浆中的 HMF 值通常为 0~1000 μg/kg，蜂王浆冻干粉中的 HMF 值通常为 500~3000 μg/kg。蜂王浆冻干粉经过 3 倍稀释后进行检测，要使样液峰面积在线性范围内，标准曲线最高浓度至少为 1000 μg/kg。为兼顾蜂王浆和蜂王浆冻干粉的检测需要，设定标准曲线浓度范围为 20~2000 μg/kg。

称取 6 份绘制标准曲线用样品各 2.00 g，精确至±0.01 g，于 50 mL 塑料离心管中，各加入 0.2 mg/L 羟甲基糠醛工作液 II 0 μL、200 μL、500 μL，2 mg/L 羟甲基糠醛工作液 I 200 μL、500 μL，10 mg/L 羟甲基糠醛中间液 200 μL，从蜂王浆试样溶液的制备方法“加入 6.0 mL 1.5%氨水溶液”起依法操作，得到标准曲线工作溶液。相当于标准溶液系列浓度为 0 μg/L、20 μg/L、50 μg/L、200 μg/L、500 μg/L、2000 μg/L。

2.2.5 液相色谱参考条件

色谱柱：C18 填料色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；或等效色谱柱。

流动相：流动相 A，甲醇+0.4%磷酸溶液=6+94；流动相 B，甲醇。

梯度洗脱条件见表 1：

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%	流速/(mL/min)
0.0	100	0	1.0
12.0	100	0	1.0
12.01	0	100	1.5
15.0	0	100	1.5
15.01	100	0	1.0
23.0	100	0	1.0

流速：见表 1。

柱温：35℃。
检测波长：285 nm。
进样量：20 μL。

2.2.6 测定

用阴性基质标准曲线工作溶液（2.2.4.2）、试样溶液（2.2.4.1）分别进样，以羟甲基糠醛峰面积比值纵坐标，以标准工作溶液浓度为横坐标，绘制标准工作曲线，用标准工作曲线对样品进行定量。标准工作溶液及试样溶液中羟甲基糠醛的响应值均应在仪器检测的线性范围之内。在上述色谱条件下，羟甲基糠醛的参考保留时间为 12.0min。

2.2.7 结果计算及表述

试样中羟甲基糠醛含量（ X ）以微克每千克（μg/kg）表示，按式（1）计算：

$$X = \frac{C_S \times V \times n \times 1000}{m \times \frac{10}{20} \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

C_S — 从羟甲基糠醛标准工作曲线上计算得到的浓度，单位为微克每升（μg/L）；

V — 试样液最终稀释体积，单位为毫升（mL）；

m — 样品质量，单位为克（g）。

n — 测试样液稀释倍数。蜂王浆样品 $n=1$ ，蜂王浆冻干粉样品 $n=3$ 。

注：计算结果应扣除空白值

2.2.8 检测方法灵敏度、准确度、精密度

本方法蜂王浆检测限为 20 μg/kg，定量限 50 μg/kg；蜂王浆冻干粉检测限为 60 μg/kg，定量限 150 μg/kg。

本方法在 50 μg/kg，200 μg/kg，500 μg/kg 添加浓度水平上，蜂王浆中的羟甲基糠醛回收率在 82.0%~110.0%之间。在 500μg/kg，1000 μg/kg，2000 μg/kg 添加浓度水平上，蜂王浆冻干粉中的羟甲基糠醛回收率在 87.0%~103.7%之间。

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。

三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益

3. 1 试验验证的分析、综述报告

3.1. 1 蜂王浆中羟甲基糠醛的提取

现行羟甲基糠醛测定方法中，关于羟甲基糠醛的提取方法主要见表 2。

表. 2 不同样品中羟甲基糠醛的提取方法

样品名称	提取方法	检测器	文献出处
蜂王浆	1g 样品→水溶解→亚铁氰化钾/乙酸锌沉淀蛋白→定容至 10mL。	HPLC-UV	[11], [12], [16]
乳与乳制品	1g/10g 样品→水溶解→草酸→亚铁氰化钾/乙酸锌沉淀蛋白→甲醇定容至 50mL。	HPLC-UV	[18]
饮料	5mL 样品→水溶解→乙酸乙酯提取→碳酸钠净化→乙酸酸化→无水硫酸钠脱水→40~45℃蒸干→0.5mL 乙腈溶解→衍生化→0.1mL 丙酮溶解→GC/MS/MS。 2.5mL 样品→C18 固相萃取小柱→乙酸乙酯-乙醚洗脱→氮气吹干→0.5mL 乙酸溶液→LC/MS/MS。	LC/MS/MS 和 GC/MS/MS	[19]
出口葡萄酒	10.0mL 样品→10%甲醇水溶液定容。	HPLC-UV	[20]
蜂蜜	10.0g 样品→10mL 甲醇溶解→水定容至 100mL。	HPLC-UV	[21]
酱油	5mL 样品→5mL 乙酸乙酯提取→离心→上清液氮气吹干→1mL 流动相溶解。	HPLC-UV	[22]
知柏地黄丸	2.2g→25%乙醇 50mL 回流提取 2 次→减压蒸馏至 15mL→85mL 95%乙醇→过滤→浓缩→水定容至 25mL	HPLC-UV	[23]
黄酒	直接取样→0.45μ m 滤膜过滤	HPLC-UV	[24]

从上表 2 可知, 对于蛋白质含量低、颜色浅、可溶解物含量小的样品, 文献多采取直接过滤进样的方法。对于颜色深、可溶解物含量大的样品, 文献采用了乙酸乙酯提取和 C₁₈ 固相萃取小柱进行净化。对于蛋白质含量高的, 采用亚铁氰化钾/乙酸锌沉淀蛋白的方法对样品进行净化。

蜂王浆和蜂王浆干粉中, 蛋白质的含量高达 15% 和 39%, 还有 3% 和 10% 的脂肪酸, 以及微量的花粉色素, 需要将其去除。因此, 我们采用亚铁氰化钾/乙酸锌沉淀蛋白的方法对样品进行净化, 发现羟甲基糠醛可以被完全提取, 但是, 因为样品进行了 10 倍的稀释, 导致方法检测限降低, 经过测定, 该方法检测限为 0.3mg/kg, 不能满足蜂王浆新鲜度质量控制的要求。

3.1.2 样品 pH 对羟甲基糠醛提取的影响

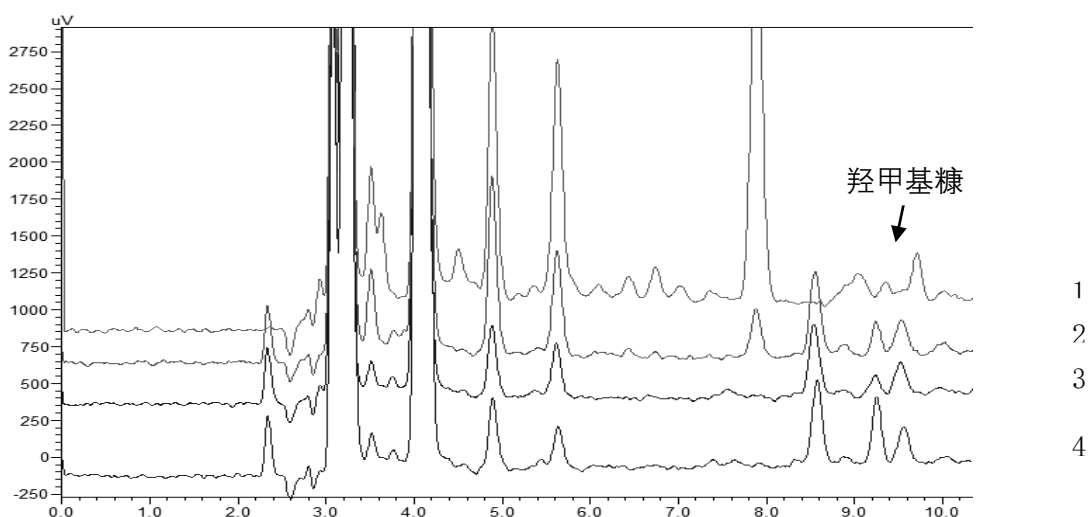
我们根据表 2 文献的方法, 将样品用水溶解, 再用有机溶剂提取, 以期对样品中的羟甲基糠醛提取后进行浓缩, 从而提高方法的检测限。在实践中, 我们发现, 该方法对羟甲基糠醛的绝对提取率仅为 20%。可能是由于蜂王浆中的蛋白质影响了提取效率。在试验过程中, 不同花种的蜂王浆还可能带来干扰。

蜂王浆可溶于碱性溶液中, 将蛋白质溶于碱性溶液, 再用乙酸乙酯提取。我们考察了不同浓度的碱性溶液条件下, 乙酸乙酯对蜂王浆中羟甲基糠醛的提取效率, 结果见表 3。

表.3 不同碱性溶液浓度下羟甲基糠醛的提取效率

样品名称及重量	氨水浓度, %	氨水加入体积, mL	样液状态	pH	峰面积
蜂王浆 1g	0	0	细颗粒浑浊液	3.8	471
	1.5	3	半透明溶液	7.7	1450
	3.0	3	半透明粘液	9.6	1068
蜂王浆干粉, 0.5g	0	0	细颗粒浑浊液	3.4	3080
	1.5	3.5	半透明溶液	7.4	12004
	3.0	3.5	半透明粘液	9.8	8158

从表 3 可知, 当 pH 呈中性时, 乙酸乙酯对蜂王浆中羟甲基糠醛的提取效率最高。这可以认为蜂王浆中的蛋白质被氨水快速溶解, 样品得以快速充分地溶解, 保证了乙酸乙酯与羟甲基糠醛充分混合, 样液呈细腻的奶状, 从而提高了提取效率。未加氨水的样液可见明显的絮状蛋白质, 乙酸乙酯与羟甲基糠醛不能充分混合, 影响了提取效率。当 pH 呈较高的碱性时, 提取效率不如中性样液, 可能由于样液在碱性条件下, 蛋白质变性, 粘稠度增加, 羟甲基糠醛与样液中的水、糖类、蛋白质结合更加牢固, 在乙酸乙酯中的分配系数较小, 影响了提取效率。因此, 选择用 3mL1.5%氨水溶解蜂王浆样品和蜂王浆冻干粉稀释液, 也可以选择 3.5mL。不同 pH 条件下, 乙酸乙酯提取蜂王浆中羟甲基糠醛色谱图, 见图 1。



1、pH=3.8, 2、pH=7.7, 3、pH=9.6, 4、pH=7.7 蜂王浆添加 100 μ g/kg 羟甲基糠醛

图 1 不同 pH 条件下, 乙酸乙酯提取蜂王浆中羟甲基糠醛色谱图

3.1.3 溶剂对蜂王浆中羟甲基糠醛提取的影响

羟甲基糠醛易溶于水、乙腈、丙酮、醇类、乙酸乙酯、二甲基甲酰胺、苯、乙醚和氯仿等溶剂。由于醇、乙腈、丙酮、二甲基甲酰胺可以溶解于水, 在提取时同时提取了蜂王浆中的糖类, 蒸干后

残渣的量较多，需要进一步净化，故不宜选用。乙醚是易制毒化学品，采购及化学品管理不便，苯与氯仿具有一定的毒性，故选择乙酸乙酯作为提取溶剂。

蜂王浆样品加氨水溶液后，总体积约 4 mL，经过试验，当乙酸乙酯的量为 4 mL 时，样液容易发生乳化现象，当乙酸乙酯的量为 8 mL 时，样液不会发生乳化现象，样品中羟甲基糠醛绝对提取率在 70%以上，当乙酸乙酯的量为 12mL 时，样液不会发生乳化现象，样品中羟甲基糠醛绝对提取率在 75%以上。考虑到试剂用量、检测灵敏度，8 mL 乙酸乙酯的用量即可满足要求。故选择乙酸乙酯的用量为 8 mL。

经过乙酸乙酯提取的样液呈乳液状，静置即可以分层，4500rpm 离心 5min 后，底部约 4 mL，上层约 8 mL，说明有机相与水相分离完全。分离后的试料状态如图 2。

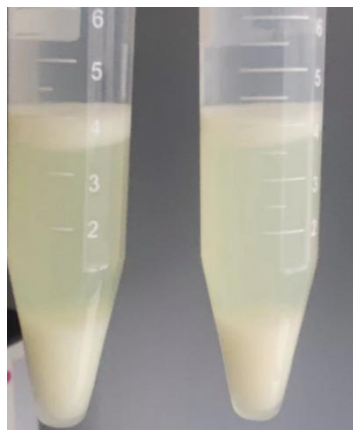
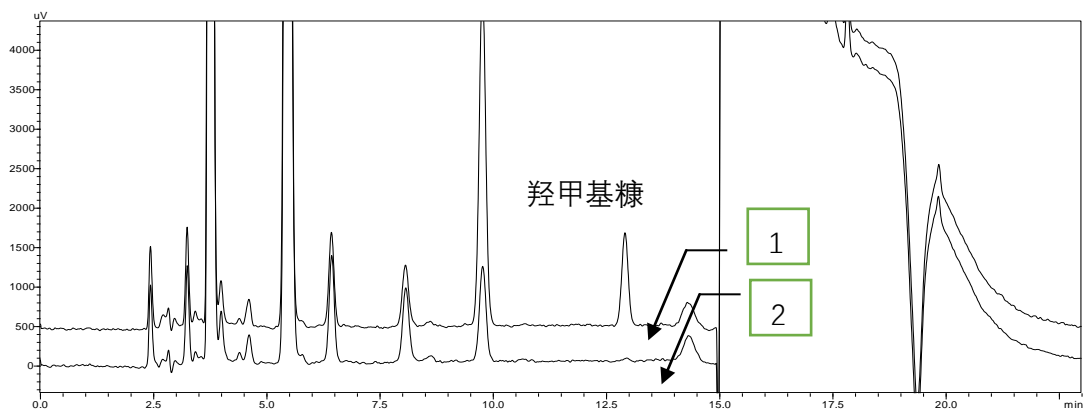


图 2 经过乙酸乙酯提取试料分离后的状态

在进行内部验证实验时，有 2 个实验室反映，有个别样液发生了乳化现象及平行不佳的情况。经过了解，是实验室使用了旋涡混合方式提取，这种方式提取时，混合较为激烈，个别蛋白质变性的样品因为粘度高容易发生乳化；有的则是样品加入氨水溶解后，过了几个小时后进行提取，可能会导致 HMF 的降解和提取不完全。因此，对上述操作进行了优化：改称样量为 2.0g，加入氨水溶解样品后，立即加入乙酸乙酯进行手动振荡提取，且增加乙酸乙酯的用量为 20 mL，吸取其中的 10 mL 用于后续检测。从而解决了上述问题。经过内部验证实验，精密度准确度达到本文件的要求。

3.1.4 流动相的选择

文献多采用甲醇与磷酸水溶液作为流动相，我们选择了甲醇+0.4%磷酸=10+90，8+92 和 6+94 为流动相，进行色谱分离试验。当甲醇+0.4%磷酸=10+90 时，羟甲基糠醛色谱峰前有一个干扰峰，当甲醇+0.4%磷酸=8+92 时，羟甲基糠醛色谱峰后有一个干扰峰，虽然 2 种比例均可实现与干扰峰的完全分离，但是杂质峰与羟甲基糠醛色谱峰靠得相对较近，当样品中羟甲基糠醛含量较高时，不能保证所有样品都能完全分离，当甲醇+0.4%磷酸=6+94 时，实测 7 种不同花期蜂王浆及杂花浆、各种冻干粉，羟甲基糠醛色谱峰附近无杂质峰干扰，但是羟甲基糠醛色谱峰的保留时间较长，为保证检测效率，羟甲基糠醛色谱峰保留时间后采用 100%甲醇洗柱 3min，再以甲醇+0.4%磷酸=6+94 稳定色谱柱 8min，总时长为 23-25min。流动相洗脱条件见表 1，经过流动相优化后的色谱图，见图 3。



1、空白样品添加 100µ g/kg, 2、空白样品

图 3 流动相优化后的样品中羟甲基糠醛色谱图

3.1.5 方法的线性范围、回收率、精密度和检测限

按 2.2 提供的方法对空白基质样品和样品进行处理和测定, 以羟甲基糠醛峰面积对其浓度 (x , $\mu\text{g/L}$) 绘制工作曲线。结果如表 4 所示, 羟甲基糠醛在 $20\mu\text{g/L}\sim 2000\mu\text{g/L}$ 范围内线性良好, 相关系数 $R^2=0.9999$, 满足定量分析要求。此方法的检测限和定量限分别为蜂王浆: $20\mu\text{g/kg}$ 和 $50\mu\text{g/kg}$ 。蜂王浆冻干粉: $60\mu\text{g/kg}$ 和 $150\mu\text{g/kg}$ 。

表 4 羟甲基糠醛的线性范围、回归方程、相关系数和检测限

线性范围 /($\mu\text{g/kg}$)	回归方程	R^2	检测限 /($\mu\text{g/kg}$)	定量限 /($\mu\text{g/kg}$)
羟甲基糠醛	$y=66.80x+346.9$	0.9999	蜂王浆 20 蜂王浆冻干粉 60	蜂王浆 50 蜂王浆冻干粉 150

在空白蜂王浆样品中分别添加 $50\mu\text{g/kg}$ 、 $200\mu\text{g/kg}$ 、 $500\mu\text{g/kg}$ 的羟甲基糠醛标准溶液, 按照“1.2”方法处理后做回收率实验, 每个添加水平重复测定 3 次。结果如表 5 所示, 添加回收率在 82.0%~110.0%之间, 相对标准偏差在 5.2%~8.0%之间。

蜂王浆冻干粉因为在干燥后期物料温度达到 $40\sim 60^\circ\text{C}$, 会较快速地产生 HMF, 在实际的样品检测中, 蜂王浆冻干粉的 HMF 基本上是大于 $200\mu\text{g/kg}$, 我们选择了 $\text{HMF}=282\mu\text{g/kg}$ 的蜂王浆冻干粉进行添加回收试验, 在 $500\mu\text{g/kg}$, $1000\mu\text{g/kg}$, $2000\mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上, 重复测定 3 次。结果如表 5 所示, 蜂王浆冻干粉中的羟甲基糠醛回收率在 87%~103.7%之间, 相对标准偏差在 2.7%~5.1%之间。

表 5 空白蜂王浆及蜂王浆冻干粉中羟甲基糠醛的加标回收率和精密度

样品名称	羟甲基糠醛添加水平 / $\mu\text{g/kg}$	回收率 ($n=3$)/%	精密度 ($n=3$)/%
蜂王浆	50	82.0, 82.3, 94.1	8.0
	200	90.1, 95.7, 100.2	5.3
	500	99.2, 110.0, 106.0	5.2
蜂王浆冻干粉	500	92.9, 90.7, 87.0	3.3
	1000	97.6, 105.2, 95.6	5.1
	2000	98.8, 103.7, 99.4	2.7

3.1.6 稳定性考察

按“1.2”的方法对蜂王浆和蜂王浆冻干粉进行处理，得到检测样液，常温下保存样液，并按本文件规定的液相条件分别在 0，2，4，8，24 小时进行分析，计算羟甲基糠醛的含量，及 5 次分析结果的 RSD 值，结果见表 6。

表 6 蜂王浆处理样液稳定性考察数据

进样时间, h	0	2	4	8	24	RSD, %
蜂王浆样液	62.4	62.0	62.8	62.3	62.7	0.5
蜂王浆冻干粉样液	898	900	902	899	912	0.6

从表 6 可知，经过本文件的方法进行分析，在 0-24 小时内，蜂王浆和蜂王浆冻干粉样液中的 HMF 检测值的 RSD 分别为 0.5%和 0.6%，样液在 24 小时内稳定性良好。

3.1.7 实际样品的测定

按本文建立的方法后对 11 个蜂王浆样品进行测定，结果见表 7。从表 7 可以看出，蜂王浆和蜂王浆干粉中羟甲基糠醛含量在未检出至 1865 μ g/kg 之间不等，可见，蜂王浆及其冻干粉中的 HMF 与储存条件和加工温度有关。

表.7 蜂王浆和蜂王浆干粉样品测定结果

样品名称	贮存温度	贮存时间	外观	羟甲基糠醛 (μ g/kg)
2017 年蜂王浆	4 $^{\circ}$ C	5 年	红色，无光泽，流动性差	280
2018 年蜂王浆	4 $^{\circ}$ C	4 年	红色，无光泽，流动性差	204
2019 年蜂王浆	4 $^{\circ}$ C	3 年	黄色，无光泽，流动性尚可	91
2020 年蜂王浆	4 $^{\circ}$ C	2 年	黄色，无光泽，流动性尚可	150
2021 年蜂王浆	4 $^{\circ}$ C	10 个月	淡黄色，有光泽、流动性好	192
2021 年蜂王浆	-18 $^{\circ}$ C	10 个月	淡黄色，有光泽、流动性好	33
2021 年蜂王浆	-18 $^{\circ}$ C	8 个月	淡黄色，有光泽、流动性好	26
2022 年蜂王浆	-18 $^{\circ}$ C	0 个月	淡黄色，有光泽、流动性好	<6
2022 年蜂王浆	-18 $^{\circ}$ C	0 个月	淡黄色，有光泽、流动性好	12
蜂王浆冻干粉 2021	常温	未知	乳白色，有光泽	898
蜂王浆冻干粉 2021	常温	未知	红色，光泽度差	1865

中国蜂产品协会团体标准《蜂王浆质量分级》，共收集 68 个不同花期（油菜、洋槐、荆条、椴树、茶花、茴香、荞麦）的蜂王浆，按本文件的方法进行 HMF 检测，结果见表 8。

表 8 不同花期蜂王浆中的羟甲基糠醛含量

花种	样本个数	HMF 含量范围/ μ g/kg
荞麦	19	6.2~49.0
槐花	10	<1~22.0
椴树	10	6.8~41.9
荆条	10	1.1~9.9
茶花	10	<1~61.6
茴香葵花、茴香葫芦花、茴香红花	7	<1~49.0
油菜	2	1.8~1.9

注：所有样品感官指标均符合 GB 9697 要求，表中小于 20μ g/kg 的值仅供参考。

从表 8 可知，油菜、槐花、荆条花期，因气温较低，蜂王浆中的 HMF 值较低，而荞麦、茶花、椴树、茴香花期，气温相对较高，蜂农如不及时将蜂王浆冷冻，就会被检出 HMF。从蜂王浆中的 HMF 含量可以直接反映蜂王浆是否经过了较高温度的保存和加工，可间接较为准确地反映产品的新鲜度。

本文件起草组还进行了蜂王浆在不同温度下贮存关于 HMF 变化的试验，发现蜂王浆在常温（ $25\sim 35^{\circ}\text{C}$ ）避光条件下贮存，HMF 在 1 天后即会被仪器检测到，3 天后 HMF 接近 20μ g/kg，25 天后接近 100μ g/kg。而在 4°C 以下保存时，HMF 的生成速度大大降低，1 年后，蜂王浆中的 HMF 在 $0\sim 71\mu$ g/kg 不等，这个结果表明，蜂王浆在 4°C 以下保存 1 年时，新鲜度变化不大。这与 FAO 于 2021 年发布的《Good beekeeping practices for sustainable apiculture》关于蜂王浆贮存的建议是一致的。本文件起草组将进一步研究不同贮存与生产条件下蜂王浆及蜂王浆冻干粉中的 HMF 变化情况，为今后制定蜂王浆及蜂王浆冻干粉新鲜度指标提供数据支持。

3.1. 8 内部验证

见附件

3.1. 9 外部验证

进行中……

3.2 技术经济论证

3.2.1 技术评估。在本章 3.1 中详述了本文件技术的特点、性能、可靠性等进行了分析。本技术已经过起草人多年的实践，其《蜂王浆及其干粉中羟甲基糠醛含量的检测方法》也获得了国家发明专利，专利号：ZL 2022 1 0477234.X。本技术具有创新性、先进性，对于蜂王浆和蜂王浆冻干粉中 HMF 的测定具有灵敏度高、准确度好的特点。

3.2.2 经济分析。本文件专门针对蜂王浆及蜂王浆冻干粉产品的特点而制定，通过多年实践验证其技术的可行性，与现有技术相比，灵敏度更高，适宜性更好。其所需要的仪器、设备均为生产企业、检测机构的基本配置，经济投入少，对于监控产品中 HMF 具有准确、高效、方便、价廉、实用的特点，本文件的应用，可以进一步提高产品品质，提高企业、蜂农的收益，经济社会效益十分明显。

3.2.3 效果评估。本文件在前人研究的基础之上而开发，并经过多年实践应用，监控蜂王浆产品质量效果显著。

3.2.4 风险评估。本文件属于专利技术的应用。未见相关的国内外标准检测方法。未见与本文件检

测原理相同的方法在蜂王浆产品中的应用，具有国际先进性。多年实践表明，本文件的检测方法稳定、准确、可靠。本文件的应用可以提升我国蜂王浆生产、加工的技术水平，进一步提升我国蜂王浆的品质，及在国际上对蜂王浆产品的信任度，提升我国蜂王浆品质的信誉度。同时，在商业竞争中，有利于差异化竞争，使得我国蜂王浆产品向高品质方向发展。对未来我国蜂王浆产品均有积极影响。本文件的实施，风险极小，回报极高。

3.2.5. 比较和选择。本文件的方法目的是监控产品是否经过高温贮存或者加工，对蜂王浆产品的鲜度具有极好的指示效果。目前相似的检测方法前文 1.2 已经阐述，相比而言，本文件的方法所检测的对象为新鲜蜂王浆中所不具有，具有极强的针对性，就目前技术水平而言，本文件是最佳选择。

3.2.6. 敏感性分析。本文件的应用会对行业产生较为深远的影响。蜂王浆的保存与加工对于产品质量至关重要，目前尚无可靠的判定指标。本文件是为蜂王浆、蜂王浆冻干粉国家标准提供一种新鲜度的检测方法，真正应用到产品还需要经过行业的应用与验证，得到广泛的数据支持，直到足以确定一个对于蜂王浆新鲜度判定的指标。尽管，本文件对于蜂王浆行业会产生一定的影响，但是，这个影响是正向的，目的是为了促进蜂王浆高品质发展，行业相关人士会对本文件的应用后，加强蜂王浆的贮存和加工的技术进步，进而提升蜂王浆及冻干粉的新鲜度。在合适的时候，提出产品中 HMF 的限量要求，HMF 的检测方法可以直接引用本文件。整个过程是平缓的，不存在行业的波动现象。

综上，本文件在技术上可行、经济上合理，并能够在项目实施过程中取得预期的效益。

3.3 预期社会效益

(1) 为蜂王浆新鲜度指标提供检测技术

科学研究表明蜂王浆具有显著的保健与药理作用，自 1988 年蜂王浆首个国家标准发布以来，几十年过去，一直未能制定一个可以较好反映蜂王浆新鲜度的质量指标，在商品贸易活动中主要以 10-HDA 为定价依据，而 10-HDA 可以通过过滤的方式提取出来，加入到低 10-HDA 的原料中，以提高成品中的 10-HDA，过滤掉 10-HDA 的过滤王浆被低价流入市场^[25]，消费者的消费权益受到损害。

事实上，比 10-HDA 更重要的是蜂王浆的新鲜度，蜂王浆中主要的生理活性物质是蜂王浆蛋白，蜂王浆中含有约 15% 的蛋白质，其中，50% 以上为水溶性蛋白质，水溶性蛋白质中，又有 50% 左右的蜂王浆主蛋白 MRJP1-9。高温下贮存的蜂王浆蛋白质变性而失去活性，中国农科院蜜蜂研究所李建科团队发现，蜂王浆主蛋白 MRJP4 对温度十分敏感，常温下保存的蜂王浆检测不到 MRJP4。活性蛋白，包括活性酶的含量与贮存和加工温度关系十分密切。

关于蜂王浆新鲜度，从二十世纪 90 年代，人们就已经开始积极探索与研究。从酶、蛋白质、维生素等热敏性成分入手，通过不同贮存条件下，对酶活性^[1,2]、蛋白活性^[3-7]、维生素含量^[8,9]、褐变成分含量^[10-14]、红外光谱指纹^[15]的变化趋势进行研究，取得了一些研究成果。由于缺少生产实践验证、检测方法灵敏度不够、研究对象在不同蜂王浆中本底差异较大，并没有合适的指标在生产实践中得到应用。行业关注度高活性蛋白，研究者众多，但是由于不同花种、不同生产季节、蜂种等因素影响，其本底值差异显著，要找到一个合适的蛋白种类作为质量指标来确定蜂王浆的新鲜度，还需要做更多研究。

本文件的起草组认为：作为蜂王浆的新鲜度指标，必须满足：该指标必须对温度敏感，在新鲜的蜂王浆中不存在，而且可以被定量、被准确检测。在现有研究中，我们认为羟甲基糠醛是最可能的判定蜂王浆新鲜度的指标。

在我们的研究中发现，2019 年 4℃ 下贮存至今的蜂王浆，其羟甲基糠醛含量仅为 91μg/kg。关于羟甲基糠醛的测定方法有很多，但是现行方法均不能满足检测灵敏度的要求。要深入了解蜂王浆中的羟甲基糠醛的变化规律，有必要进一步研究蜂王浆中的羟甲基糠醛含量的测定方法。

本文件的检测方法操作简单，使用常规的液相色谱仪，具有灵敏度高，检测结果准确度、精密

度良好的特点，一般企业和检测机构均能很快掌握方法。本文件为蜂王浆新鲜度指标的确定提供了检测技术，是蜂王浆行业的创新。

(2) 有利于蜂王浆行业向高品质方向发展

我国是蜂王浆的生产大国，因为蜂种和饲养方式的改变，蜂王浆中的特殊脂肪酸 10-HDA 的含量越来越低^[26]，这不代表着蜂王浆的总体品质的下降，蜂王浆中的活性蛋白成分并未下降，而蜂王浆国家标准的品质指标 35 年未有大的进步，仍然唯 10-HDA 论品质。有些蜂场和企业想改变这种现状，蜂王浆全程冷链直到送到消费者手中，旨在生产高新鲜度的蜂王浆，这种蜂王浆的价格最高可达每公斤上千元，是普通蜂王浆的 10 倍以上，企业在销售过程中向消费者宣传时，除了反复强调冷链保证产品活性以外，没有其他的证据来证明其产品的新鲜度情况，这是一种不足。起草单位对蜂王浆生产与收购情况非常了解，大部分情况下，蜂农将采收的蜂王浆置于常温下，一个星期左右才送交工厂或者中间商，新鲜度大打折扣。

现行蜂王浆的国标 GB 9697 或者国际标准 ISO 12824 均以 10-HDA 为主要质量指标，在贸易中，从 80 年代起，一直唯 10-HDA 论价。随着时光的流逝，蜂种、气候、养蜂方式等的改变，蜂王浆中的质量指标也在发生较大的变化，10-HDA 规定的限值 1.4%，而事实上，10-HDA 小于 1.4% 的蜂王浆的比例不断上升^[27,28]，达到 6.3% 和 9.2%，企业常常将从蜂王浆中过滤出来的浆渣返回至蜂王浆中，以达到标准要求，甚至网上已出现 10-HDA 掺假现象，这极大地损害着行业和蜂农的利益。

要解决出有关问题，一个可行的方法就是提倡蜂王浆的新鲜度。现行蜂王浆标准的质量指标均是从蜂王浆的本质特征出发而制订，缺少新鲜度指标，这也是行业多年的难题。HMF 是蜂王浆受光照、高温等作用下产生，新鲜蜂王浆中不存在的一种物质，它溶于水，有较高的沸点，无法在不破坏蜂王浆性质特征的情况下从产品中去除，因此，是一个非常好的新鲜度品质指标，可以间接表明蜂王浆中的各种活性物质是否受到损失。

本文件的实施，使得蜂王浆的新鲜度得以保证，吸引生产者和消费者更关注蜂王浆的新鲜度，而不仅限于 10-HDA，真正明白，蜂王浆除了 10-HDA 而外，还有非常多的其他生物活性成分才是更重要的。从这方面来说，新鲜度显得更重要，这也必将促使蜂王浆的生产与加工更加科学、规范与合理，故有利于我国蜂王浆行业向高品质方向发展。

(3) 促进蜂王浆市场繁荣

蜂王浆是广受世界欢迎的有利于人体健康的产品，90% 产自中国，一半用于出口，多年来，一直保持 3000-4000 吨的产量。市场上蜂王浆大部分以纯品，不加任何添加剂的产品形式在出售。因为蜂王浆“激素”论^[27]，严重影响我国蜂王浆的消费，消费量持续下降。2023 年蜂王浆收购价下跌历史低谷。由于没有关注蜂王浆的新鲜度，产品保健效果因为忽略新鲜度而不显著，这也是人们不信任蜂王浆的原因之一。本文件的实施，将为蜂王浆新鲜度指标的确立提供技术支持，无论是蜂王浆还是其冻干粉，新鲜度高的蜂王浆生理作用因为活性物质的最大保留而更有保健效果，令消费者重拾对蜂王浆的信心，提升消费量。本文件实施，蜂王浆市场上必将出现新的繁荣时代，真正实现优质优价。人们对新鲜蜂王浆需求，将促进蜂王浆的高品质生产，对蜂王浆的生产进步起到不可估量的作用。

(4) 提升我国蜂王浆行业的技术水平，保持国际领先水平

本文件的实施，为蜂王浆和蜂王浆冻干粉提供新鲜度指标的检测技术，通过大量实践，可以得出在不同贮存、加工条件下，HMF 的变化规律，以及产品中 HMF 的大量数据，可以制定出蜂王浆和蜂王浆冻干粉中的合理的 HMF 指标，来保证产品的新鲜度以及品质，以此来完善对应的国家标准。这有利于提升我国的蜂王浆行业的整体质量控制技术水平，经查阅文献，国际上并没有相关本文件

的应用技术。本文件的技术处于国际领先水平。为今后 ISO 12824 的修订提供新鲜度指标。真正将我国的蜂王浆产品做强做大。

3.4 经济和生态效益

养蜂业是一种可持续发展和环保的事业，有利于环境生态的平衡，也得到国家的大力提倡与支持。因为蜂王浆生产与运输的模式多年未曾改变，蜂王浆的品质也一直未曾有重大的提升，蜂农收入也因此受到影响，蜂农老龄化日益明显。本文件实施，必将促进养蜂业的发展，提升现有生产方式，能够按本文件实施的蜂农，生产出的蜂王浆新鲜度好，价格优，可以明显增加蜂农收入。本文件的实施，可以促进企业加工新鲜度好的产品，以满足市场的需求，与一般的产品在品质上体现出了巨大的优势，优质优价，提升产品的竞争力，最终提升整体蜂王浆的市场价格，经济效益显著。以每公斤售价保守增加 10 元计算，可以增加销售收入 3000 万元。由此可见，本文件的实施将为促进我国蜂王浆产业的繁荣发展发挥积极作用。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

本文件没有可采用的国际标准和国外相同标准进行对比，在国际上处于领先地位。

五、以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因

本文件没有可采用的国际标准和国外相同标准进行对比，在国际上处于领先地位。目前，尚无相应的国际标准。本文件经过实践检验后，将提交 ISO/TC34/SC19 提升为国际标准，提高我国蜂王浆及其冻干粉的高质量的形象。

六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系

本文件与现行的蜂王浆国家标准(GB 9697)和蜂王浆冻干粉国家标准(GB/T 21532)相对应，从技术保障角度具有配套性和目标的一致性，为将来修订国标时，提供新鲜度指标的检测技术。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

本文件在起草讨论和征求意见过程中未发生重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

本文件涉及的专利：蜂王浆及其冻干粉中羟甲基糠醛含量的检测方法，专利号：CN114878710B。该专利为本文件第一起草单位和第一起草人所有，免费许可本文件的应用者。

九、实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

1. 建议鉴于当前蜂王浆质量一直未得到提升，市场与价格双重疲软的状况，有志于提升蜂王浆产品品质的企业无技术支撑，行业协会与标准化技术委员会对蜂王浆产品进行质量分级而制定相应的国家标准、团体标准、行业标准时亟需本文件的检测技术，本文件应尽快发布实施。

2. 建议本文件应纳入蜂王浆和蜂王浆冻干粉相关技术培训教材, 使本文件尽快得到推广应用, 得到实际数据, 为下一步制定产品国家标准提供确定 HMF 指标的数据支持。

十、其他应当说明的事项

无。

参考文献:

- [1] 杨焱, 胡九菊, 李林霖等. 蜂王浆中超氧化物歧化酶的活性测定与应用[J], 食品研究与开发, 2022, 43(1):180-185
- [2] 吴粹文, 张复兴. 贮存温度和时间对蜂王浆中葡萄糖氧化酶 GOD 活性影响的研究[J], 中国养蜂, 1990, (5):4-6
- [3] 吴亚君, 刘鸣畅, 刘方圆等. 采用毛细管凝胶电泳技术检测蜂王浆新鲜度[J], 食品与发酵工业, 2013, 39(4):161-166
- [4] 李建科, 冯毛, 张兰等. 蜂王浆中蜂王浆蛋白随储存条件变化的蛋白质组研究(英文)[J], 2000—2018 中国蜂业科技前沿中国养蜂学会专题资料汇编, 2019, 138-177
- [5] 张娟, 赵利, 魏丽等. 贮藏温度和时间对蜂王浆水溶性蛋白质的影响[J], 蜜蜂饲养管理专业委员会第 13 次学术研讨会论文集, 2007, 12: 36-42
- [6] 刘红云, 童富淡, 李宜梅等. 贮存温度、时间对蜂王浆水溶性蛋白的影响[J], 食品与发酵工业, 2003, 29(6):1-4
- [7] 吉挺, 陈晶, 焦雅君. 蜂王浆中 γ -球蛋白分子质量与贮存时间相关分析[J], 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2006, 27(2):83-85
- [8] 孙小军, 杨晓慧, 李桂明等. 蜂王浆贮藏过程中品质变化研究[J], 山东农业科学, 2015, 47(5):102-104
- [9] 周才琼, 罗雪雅. 蜂王浆新鲜度指标筛选及新鲜度的评判[J], 食品与发酵工业, 2010, 36(3):129-133
- [10] 刘娟, 高铁俊, 董捷等. 蜂王浆室温储存过程中的褐变产物[J], 食品科学, 2012, 33(6):238-241
- [11] 魏月, 陈芳, 薛晓锋等. 蜂王浆贮存过程中糠醛类物质含量的变化[J], 中国食品学报, 2016, 16(10):222-227
- [12] 王露露, 董蕊, 范超等. 蜂王浆在贮藏过程中 5-羟甲基糠醛、10-羟基-2-癸烯酸及精氨酸双糖苷含量的变化[J], 食品科学, 2016, 37(2):271-275
- [13] 彭瑜, 陈坤, 徐锦忠等. 蜂王浆中糠氨酸含量测定及其对新鲜度的影响[J], 中国蜂业, 2010, 61(1):5-7
- [14] 张红城, 孙丽萍, 董捷等. 蜂王浆在常温储存条件下品质变化的研究[J], 食品科学, 2007, 28(11):159-161
- [15] 吴黎明, 周群, 赵静等. FTIR 光谱法整体评价蜂王浆新鲜度的研究[J], 光谱学与光谱分析, 2009, 29(12):3236-3240
- [16] 高夫超, 崔长日, 魏月等. 高效液相色谱法测定蜂王浆中 6 种糠醛类物质含量[J], 食品安全质量学报, 2014, 5(11):3603-3608
- [17] 裴珂晗, 欧仕益. 食品中 5-羟甲基糠醛的形成与控制[J], 食品安全质量学报, 2016, 7(1):251-254
- [18] NY/T 1332-2007, 乳与乳制品中 5-羟甲基糠醛含量的测定 高效液相色谱法[S], 2007
- [19] SN/T 1859-2007 饮料中棒曲霉素和 5-羟甲基糠醛的测定方法 液相色谱-质谱法和气相色谱-质谱法[S], 2007
- [20] SN/T 4675.8-2016 出口葡萄酒中 5-羟甲基糠醛的测定 液相色谱法[S], 2016

- [21]GB/T 18932.18-2003 蜂蜜中羟甲基糠醛含量的测定方法 液相色谱-紫外检测法[S], 2003
- [22]王妙飞, 张水华, 郭新东等. 高效液相色谱法测定酱油中的 5-羟甲基糠醛[J], 现代食品科技, 2008, 24(2):188-190
- [23]雒翠霞, 孙国祥. 反相高效液相色谱法测定知柏地黄丸中 5-羟甲基糠醛含量[J], 中南药学, 2008, 6(2):188-190
- [24]陈磊, 黄雪松. 高效液相色谱法同时检测黄酒中的 5-羟甲基糠醛和 9 种多酚[J], 分析化学研究简报, 2010, 38(1):133-137
- [25]刘进祖. 2015 年我国蜂王浆产销行情及 2016 年市场预测[C], 2016 年中国蜂业博览会(山东·济宁)暨全国蜂产品市场信息交流会论文集, 济宁, 中国蜂产品协会, 2016: 28-31
- [26]胡元强. 破解蜂王浆质量难题 优质优价是良方[J], 中国蜂业, 2014, 65: 49-50
- [27]陈明虎, 陈坤. 2012 年蜂王浆产销行情分析及 2013 年市场预测[J], 中国蜂业, 2013, 64(12): 26-28
- [28]何腾飞, 林德祥, 王粉琴. 我国蜂王浆的质量现状调查[J], 中国蜂业, 2009, 60(5): 36-37

附件：内部验证数据

一、**检测方法：**蜂王浆及其冻干粉中 HMF 测定，见《蜂王浆及蜂王浆冻干粉中 HMF 测定》国家标准征求意见稿

二、**验证样品提供：**

1、阴性样品提供单位：杭州碧于天保健品有限公司，每家验证单位 80 g。

2、验证样品提供单位：安徽蜜之源食品集团有限公司、山东丰采蜂产品有限公司、浙江江山恒亮蜂产品股份有限公司、浙江江山健康蜂业有限公司。每家提供蜂王浆及蜂王浆冻干粉样品各 2 批 (HMF 含量高和低各 1 批，可按标准文本讨论稿进行测试，并做添加回收试验，进行初步确定)，每批 200 g。样品寄送杭州碧于天保健品有限公司。

3、验证样品分样：每批分成 5 份，编号后寄内部验证单位。

4、样品分发：由杭州碧于天保健品有限公司检测，选择蜂王浆、蜂王浆冻干粉各 3 批作为正式内部验证样品，验证样品与阴性样品一同寄验证单位。

5、样品保存：收到样品后，置于 0-4 度冰箱保存，1 个月内检测。

6、羟甲基糠醛标准品：由安徽蜜之源食品集团有限公司提供。

三、**样品验证要求：**

4.1 平行试验要求：要求做三平行分析，相对标准偏差应 $\leq 10\%$ 。共 18 次进样分析。

4.2 回收率试验：选择蜂王浆、蜂王浆冻干粉各 1 批。分别按征求意见稿要求做添加回收试验（每个水平做三平行分析）。共 18 次进样分析。

4.3 稳定性考察试验：选择蜂王浆、蜂王浆冻干粉各 1 批。要求 0，2，4，6，8 小时各检测一次。

四、**参与内部验证单位：**

一共 8 家内部实验室申请参与内部验证，最后确定 5 家单位（上海冠生园蜂制品有限公司、桐庐县检验检测中心、南京天嘉检测有限公司、安徽蜜之源食品集团有限公司、浙江江山健康蜂业有限公司）实验室（编号：L-1、L-2、 L-3、L-4、L-5）实施。

五、检测数据：

5.1 蜂王浆和蜂王浆冻干粉各 3 个样品的 HMF 分析结果见表 9

表 9 蜂王浆和蜂王浆冻干粉各 3 个样品的 HMF 分析结果 单位：μg/kg

实验室编号	L-1			L-2			L-3			L-4			L-5			RSD, %
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
平行次数	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	/
蜂王浆 1#	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	/
蜂王浆 2#	49.4	49.2	52.5	52.3	51.7	52.6	56.7	52.3	54.5	51.3	51.3	57.6	54.0	53.4	55.3	4.51
蜂王浆 3#	1050	1050	1053	1020	1024	1005	978	981	900	981	1034	922	980	974	937	4.78
干粉 1#	1169	1195	1176	1154	1136	1142	1128	1156	1133	1267	1291	1128	1167	1140	1164	4.15
干粉 2#	2183	2103	2224	2078	2102	2110	2100	2181	2137	2105	2157	2101	2126	2197	2191	2.12
干粉 3#	3641	3643	3634	3566	3600	3624	3632	3707	3603	3666	3669	3657	3657	3697	3501	1.42

5.2 蜂王浆和蜂王浆冻干粉各 3 个样品的回收率试验见表 10

表 10 蜂王浆和蜂王浆冻干粉各 3 个样品的回收率试验数据

实验室编号	L-1			L-2			L-3			L-4			L-5			RSD, %
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
蜂王浆 1#+50 μ g/kg	93.7	89.9	87.7	98.2	98.7	98.2	99.3	96.7	98.2	88.9	90.2	91.5	99.7	98.3	99.0	4.59
蜂王浆 1#+200 μ g/kg	110	100	98.6	96.7	100	98.7	103	97.9	101	99.7	98.2	100	102	101	103	3.14
蜂王浆 1#+500 μ g/kg	99.6	98.4	97.0	101	99.5	102	102	101	101	102	102	99.7	103	100	103	1.69
干粉 1#+500 μ g/kg	97	95	102	98.7	99.6	98.0	94.7	95.3	96.9	98.6	101	99.2	109	107	107	4.52
干粉 1#+1000 μ g/kg	95	101	90	96.9	99.7	102	96.7	97.5	96.2	100	97.8	98.8	99.2	102	102	3.26
干粉 1#+2000 μ g/kg	90	99	97	99.4	100	97.8	92.8	93.8	91.7	96.7	97.2	99.1	103	98.5	101	3.72

5.3 稳定性试验数据见表 11

表 11 HMF 稳定性试验数据-1

样品	L-1					L-2					L-3				
	0h	2h	4h	6h	8h	0h	2h	4h	6h	8h	0h	2h	4h	6h	8h
蜂王浆 1#	18.5	18.5	18.7	18.0	18.5	18.2	17.9	18.3	18.6	17.8	17.6	17.8	17.8	17.7	17.9
干粉 1#	1169	1172	1162	1170	1190	1154	1163	1162	1145	1155	1128	1120	1123	1134	1120
空白试验	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

续表 11 HMF 稳定性试验数据-2

样品	L-4					L-5					/				
	0h	2h	4h	6h	8h	0h	2h	4h	6h	8h	/	/	/	/	/
蜂王浆 1#	17.9	18.2	17.6	17.7	18.0	16.9	17.2	17.0	16.7	17.1	/	/	/	/	/
干粉 1#	1267	1280	1260	1270	1278	1167	1172	1168	1175	1167	/	/	/	/	/
空白试验	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/	/	/	/	/

