

元素分析-同位素比质谱法测定食醋总碳同位素比值

王修宁¹, 赵超敏², 韩丽², 丁卓平¹, 邓晓军², 郭德华², 韩芳³

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306) (2. 上海出入境检验检疫局, 上海 200135)

(3. 安徽出入境检验检疫局, 安徽合肥 230022)

摘要: 本文建立了一种利用元素分析-同位素比质谱法 (Elemental analyzer-Isotope ratio mass spectrometry, EA-IRMS) 测定食醋总碳同位素比值的方法, 并对食醋进行聚类分析。优化了样品稀释倍数及进样量。2 g 芳香醋用 4 mL 超纯水进行稀释, 2 g 糯米酿造食醋用 2 mL 超纯水进行稀释, 苹果醋、配制白醋不稀释, 进样量均为 1 μ L, 样品分析时间为 670 s。结果显示: 芳香醋、糯米酿造食醋、苹果醋及配制白醋的 $\delta^{13}\text{C}$ 值范围分别为 -26.94‰~-23.46‰、-25.06‰~-22.40‰、-27.99‰~-22.76‰、-19.06‰~-13.74‰, 聚类分析可将不同产地、不同原料、不同生产方式的食醋进行初步归类, 并且该方法可鉴别出芳香醋和掺入 $\geq 4\%$ 糯米酿造食醋、 $\geq 6\%$ 苹果醋、 $\geq 2\%$ 配制白醋的芳香醋混合样品。食醋及质控样品 (咖啡因) 的测试精度 (SD) 在 0.02‰~0.25‰ ($n=6$) 之间, 均小于 0.3‰, 满足方法检测分析要求。结果表明, 所建 EA-IRMS 方法结合聚类分析可用于食醋分类及掺假鉴别。

关键词: 元素分析-同位素比质谱法; 聚类分析; 食醋; 掺假

文章篇号: 1673-9078(2016)6-310-314

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.6.047

Detection of Vinegar Total Carbon Isotope Ratio by Elemental Analysis-Isotope Ratio Mass Spectrometry

WANG Xiu-ning¹, ZHAO Chao-min², HAN Li², DING Zhuo-ping¹, DENG Xiao-jun², GUO De-hua², HAN Fang³

(1. College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

(2. Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China)

(3. Anhui Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hefei 230022, China)

Abstract: A method was established for determining the carbon isotope ratio of vinegars by elemental analysis-isotope ratio mass spectrometry (EA-IRMS), and cluster analysis was conducted on the vinegar samples. The sample dilution factor and injection volume were optimized; 2 g of balsamic vinegar was diluted in 4 mL of ultrapure water, 2 g of vinegar made from sticky rice was diluted with 2 mL of ultrapure water, and apple vinegar and blended white vinegar were not diluted. The sample injection volume was 1 μ L and the sample analysis time was 670 s. The results indicated that the $\delta^{13}\text{C}$ values of the balsamic vinegar, sticky rice vinegar, apple vinegar, and blended white vinegar were in the ranges of -26.94 ~ -23.46% , -25.06 ~ -22.40% , -27.99 ~ -22.76% and -19.06 ~ -13.74% , respectively. The vinegars produced from different regions, with different raw materials, and different modes were preliminarily classified by cluster analysis, and this method could distinguish between pure balsamic vinegar samples and balsamic vinegar samples blended with $\geq 4\%$ sticky rice fermented vinegar, $\geq 6\%$ apple vinegar, and $\geq 2\%$ blended white vinegar. The precision (standard deviation, SD) of vinegars and caffeine (quality control sample) were between 0.02% and 0.25% ($n = 6$), and were all less than 0.3%. This method can meet the requirements for determination. The results show that the established EA-IRMS method combined with cluster analysis can be applied for classification of vinegars and detection of adulterations in vinegar.

Key words: elemental analysis-isotope ratio mass spectrometry; cluster analysis; vinegar; adulteration

收稿日期: 2015-08-12

基金项目: 上海出入境检验检疫局科技专项基金 (HK007-2015); 上海出入境检验检疫局科技专项基金 (HK004-2016); 上海市科委科技专项基金 (15395810100); 安徽省科技专项基金 (1604b0602028)

作者简介: 王修宁 (1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养与安全

通讯作者: 丁卓平 (1957-), 女, 教授; 韩丽 (1974-), 女, 高级工程师

食醋是人们日常生活中不可缺少的传统酸性调味品, 根据生产工艺不同可分为酿造食醋和配制食醋, 其中酿造食醋由于发酵来源不同又可分为酒精醋、糖醋、粮谷醋、果醋等。过去食醋掺假手段主要为添加工业醋酸, 但近年来, 随着监管和检测力度的加大, 这种易被识别的掺假手段逐渐被产地、年份造假等方式取代, 达到以次充好的目的。这些新型掺假手段具

有隐蔽性高、检测难度大的特点,给分析工作者带来巨大的挑战。

目前,关于食醋研究方法主要有红外光谱法^[1-2]、气相色谱-质谱法^[3]、核磁共振技术^[4-5]、固相萃取-高效液相色谱/串联质谱法^[6]等,但是这些方法单独使用时难以有效溯源掺假来源。不同来源的化合物,其¹³C与¹²C的含量比不同,利用同位素质谱技术测定同位素比值可鉴定化合物的来源。在化合物自然合成过程中,化合物的同位素自然丰度易受土壤、空气、水、纬度、气候、温度、湿度、降雨等因素的影响,导致同位素比例发生变异^[7],利用同位素丰度的不同可鉴别物质的不同来源。目前,已有关于采用²H核磁共振、¹³C-稳定同位素质谱法共同测定醋中醋酸、¹⁸O-稳定同位素质谱法分析醋中水的报道^[8],但尚未有关于应用元素分析-同位素质谱法对不同种类食醋进行归类分析及对价格昂贵的食醋中掺入廉价食醋进行鉴别的研究。

本研究拟采用元素分析-同位素质谱法(EA-IRMS)结合聚类分析(Cluster analysis, CA)对芳香醋(意大利葡萄醋)、糯米酿造食醋、苹果醋、配制白醋进行分析,并对价格昂贵的芳香醋中掺入廉价食醋的鉴别进行初步研究,以期为我国有关监管部门进一步开展食醋的品质、真实性的监管工作提供科学依据和技术支持。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

EA-IRMS: DELTA V Advantage 同位素质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),配备 Flash 2000 元素分析仪;电子分析天平(精度为 0.0001 g,德国 Sartorius ME 公司);锡杯(9 mm×5 mm,美国 Thermo Fisher Scientific 公司);XW-80A 涡旋混合器(上海医科大学仪器厂);Milli-Q 超纯水一体机(Millipore 公司);移液枪(10 μL,德国 BRAND 公司);氦气(载气,高纯氦>99.999%,上海尤嘉利液氮有限公司);氧气(≥99.9992%,北京氮普北分气体工业有限公司);CO₂(参考气,≥99.995%,北京氮普北分气体工业有限公司)。

本研究以咖啡因作为稳定同位素值的质量控制标准,δ¹³C 值为-27.77‰(国际原子能机构,IAEA)。实验用水为经 Millipore 系统处理的超纯水。

1.2 样品来源

食醋样品购自意大利及上海本地超市。其中芳香

醋 18 种、以糯米为主要原料的粮食酿造食醋 4 种、苹果醋 6 种、配制白醋 3 种,共 31 个样品。所有食醋样品摇匀后开瓶,取 40 mL 至 50 mL 棕色样品瓶中,依次编为 1~31 号样品,4 °C 冰箱储存,待测。

1.3 样品制备

称取 2 g 样品于 50 mL 离心管中,芳香醋用 4 mL 超纯水进行稀释,糯米酿造食醋用 2 mL 超纯水进行稀释,苹果醋及配制白醋不进行稀释,用涡旋混合器均质 3 min,移取 1 μL 试样至锡杯中,包样,待测。

1.4 仪器条件

1.4.1 元素分析仪条件

氧化炉温度: 980 °C;柱温: 50 °C;载气(He)流速: 100 mL/min;O₂流速: 175 mL/min;吹扫气(He)流速: 180 mL/min;注氧时间: 4 s。

1.4.2 同位素质谱仪条件

离子化方式:电子轰击离子化;离子源电压: 2.97 kV;氦气压力: 100 kPa;二氧化碳压力: 100 kPa;真空度: 1.7 × 10⁻⁶ Pa。

1.5 数据处理

EA-IRMS 分析结果以 δ 表示,它反映了样品和碳元素国际标准物质之间同位素比的相对差异:

$$\delta^{13}C = \left[\frac{(R_{\text{sample}} - R_{\text{VPDB}})}{R_{\text{VPDB}}} \right] \times 1000 \quad (1)$$

其中,δ 值用千分数表示(‰),R_{sample}和 R_{VPDB}分别为样品及国际标准物质 Vienna peedee belemnite standard (VPDB)的¹³C/¹²C 的值,R_{VPDB}=0.0112372^[9]。聚类分析采用 SPSS21(美国,IBM)进行分析。

2 结果与讨论

2.1 样品稀释倍数优化

由于 IRMS 测定同位素值主要是样品与参考气 CO₂ 的质谱信号进行比较,因此测定值受到样品与参考气信号强度比值的影响^[10]。为评估样品浓度对测定结果的影响,对样品稀释倍数进行了优化。称取 2 g 样品(芳香醋、糯米酿造食醋、苹果醋、配制白醋),分别用 0~10 mL 超纯水进行稀释,超纯水添加量以 2 mL 递增。进样量均为 1 μL,每种处理方法平行测定 6 次,获得样品的 δ¹³C 值。以每组平行测定值的标准偏差(SD)小于 0.3‰判定方法的精密性。其中糯米酿造食醋样品稀释与 δ¹³C 值和信号强度的关系如图 1 所示。由图可知,当添加 0 mL 超纯水时,信号强度

为 5~6 V, 其 $\delta^{13}\text{C}$ 值在 -23.10‰~-22.33‰ 之间, SD 为 0.32‰ (n=6), 这可能是由于试样进样量大, 燃烧不完全导致精密度差; 当添加超纯水量为 2~10 mL 时, 其 $\delta^{13}\text{C}$ 值为 -23.44‰~-22.90‰, SD 为 0.09‰~0.15‰ (n=6), 均小于 0.3‰, 满足方法分析要求, 但是由于添加超纯水量越大, 除水阱消耗越多, 更换越频繁, 因此, 经优化 2 g 糯米酿造食醋用 2 mL 超纯水进行稀释。2 g 芳香醋用 4 mL 超纯水进行稀释, 苹果醋及配制白醋不进行稀释。

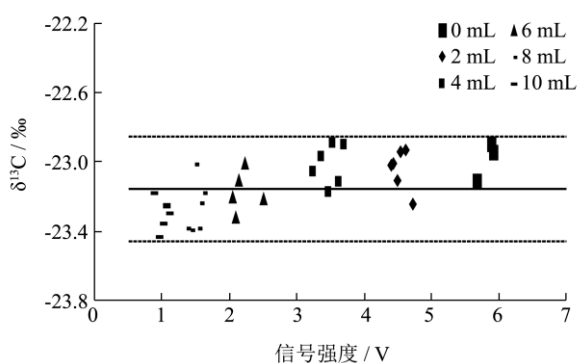


图1 糯米酿造食醋样品稀释与 $\delta^{13}\text{C}$ 值和信号强度的关系

Fig.1 Relationship between the dilution of sticky rice-fermented vinegar with $\delta^{13}\text{C}$ values and peak intensities

注: 实线: $\delta^{13}\text{C}$ 平均值-23.16‰; 虚线: -23.16‰±0.3‰。

2.2 样品进样量优化

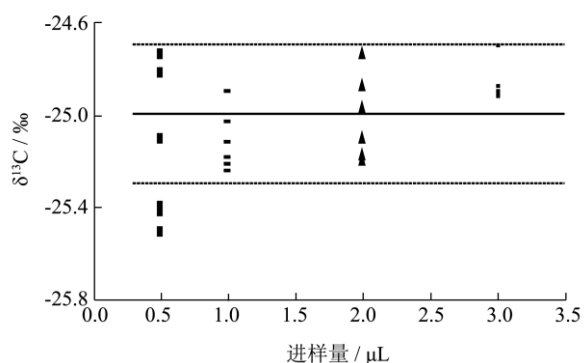


图2 $\delta^{13}\text{C}$ 值与样品进样量的关系

Fig.2 Relationship between $\delta^{13}\text{C}$ value and sample injection volume

注: 实线: $\delta^{13}\text{C}$ 平均值-25.00‰; 虚线: -25.00‰±0.3‰。

选取 1 个芳香醋样品, 按照 1.3 进行样品前处理, 进样量分别为 0.5 μL 、1 μL 、2 μL 、3 μL , 每个进样量平行测定 6 次, 结果如图 2 所示。由图可知, 当进样量为 0.5 μL 时, $\delta^{13}\text{C}$ 值为 -25.51‰~-24.74‰, SD 值为 0.33‰ (n=6), 大于 0.3‰, $\delta^{13}\text{C}$ 值稳定性差; 当进样量为 1~3 μL 时, $\delta^{13}\text{C}$ 值为 -25.25‰~-24.70‰, SD 值为 0.08‰~0.18‰ (n=6), 均小于 0.3‰。但是, 若进样量过大, 在包裹锡杯时易发生漏液现象, 污染仪

器, 造成记忆性效应, 影响样品测定的准确性和稳定性, 进而影响测定的有效性, 进样 1 μL 时为最佳。经优化, 芳香醋、糯米酿造食醋、苹果醋、配制白醋的进样量均为 1 μL 。

2.3 精密度

2.3.1 日内精密度

随机选取 8 个样品 (芳香醋、糯米酿造食醋、苹果醋、配制白醋各 2 种) 按 1.3 进行处理, 并称取 90~120 μg 质控标准 (咖啡因), 测定 $\delta^{13}\text{C}$ 值, 每种样品平行测定 6 次。结果如表 1 所示, 由表可知, 所选食醋样品 SD 值均小于 0.3‰ (n=6), 咖啡因的平均值为 -27.71‰, SD 值为 0.05‰ (n=6), 说明该方法准确度及日内精密度满足实验分析要求。

表 1 食醋及咖啡因碳同位素比值平均值及标准偏差 (n=6)

Table 1 Average value and SD of $\delta^{13}\text{C}$ values of vinegar samples and caffeine

样品种类	样品编号	平均值/‰	SD 值/‰
芳香醋	样品 9	-25.84	0.09
	样品 11	-25.14	0.14
糯米酿造食醋	样品 20	-23.08	0.11
	样品 22	-22.89	0.20
苹果醋	样品 23	-26.63	0.06
	样品 25	-25.97	0.12
配制白醋	样品 29	-13.74	0.22
	样品 30	-19.06	0.08
质控标准品	咖啡因	-27.71	0.05

2.3.2 日间精密度

任意取 4 个样品 (芳香醋、糯米酿造食醋、苹果醋、配制白醋各 1 种) 及咖啡因, 连续测定 6 d, 每天每个样品平行测定 6 次, 计算其平均值及 SD 值 (n=36)。结果表明 (如表 2 所示), 所有样品 SD 值均优于 0.3‰ (n=36)。因此, 该方法具有良好的日间精密度。

表 2 食醋及咖啡因碳同位素比值平均值及标准偏差 (n=36)

Table 2 Average value and SD of $\delta^{13}\text{C}$ values of vinegar samples and caffeine

样品种类	样品编号	平均值/‰	SD/‰
芳香醋	样品 5	-24.74	0.22
糯米酿造食醋	样品 19	-24.99	0.16
苹果醋	样品 27	-25.08	0.18
配制白醋	样品 30	-18.90	0.17
质控标准品	咖啡因	-27.72	0.09

2.4 稳定性

稳定同位素质谱仪的灵敏度极高, 易受外界条件及仪器本身状态的影响, 因此, 确保仪器的稳定是进行样品分析的前提^[10]。在实验过程中保持室温恒定(21 °C)。为了检验系统的稳定性, 样品测试前需进行 CO₂ 参考气稳定性、线性测试, 参考气稳定性的标准偏差小于 0.06‰, 线性斜率小于 0.066‰。在进行样品测试过程中, 每序列样品间测定一次咖啡因, 从而对系统稳定性进行评价, 以确保试验结果的准确性和有效性。

为评价方法的稳定性, 将样品 5、样品 19、样品 27、样品 30 及咖啡因每天各测 6 次平行, 并计算出每种样品的 δ¹³C 平均值, 连续测定 6 d, 将 6 次平均值取平均并计算其 SD 值 (n=6), 结果如表 3 所示。结果表明: 所有样品 SD 值均优于 0.3‰ (n=6)。因此, 本方法的稳定性好, 从而确保测定值的准确性和有效性。

表 3 食醋及咖啡因碳同位素比值平均值及标准偏差 (n=6)

Table 3 Average value and SD of δ¹³C values of vinegar samples and caffeine

样品种类	样品编号	平均值/‰	SD/‰
芳香醋	样品 5	-24.74	0.19
糯米酿造食醋	样品 19	-24.99	0.11
苹果醋	样品 27	-25.08	0.16
配制白醋	样品 30	-18.90	0.13
质控标准品	咖啡因	-27.72	0.05

2.5 样品分析

采用本方法对芳香醋、糯米酿造食醋、苹果醋、配制白醋共 31 种样品进行测定, 结果表明: 芳香醋 δ¹³C 值为-26.94‰~-23.46‰, 糯米酿造食醋 δ¹³C 值为-25.06‰~-22.40‰, 苹果醋 δ¹³C 值为-27.99‰~-22.76‰, 配制白醋 δ¹³C 值为-19.06‰~-13.74‰, SD 值在 0.02‰~0.25‰ (n=6) 之间。利用 SPSS 绘制树状图, 结果如图 3 所示。由图可知, 31 种样品分为两大类, 其中 29~31 号样品聚为一类, 其余样品聚为一类。这可能是由于这 3 种样品为配制白醋。在第一大类中, 分为两亚类。1~18 号芳香醋中除 2、10、12、16 号样品外均聚为一类, 芳香醋样品原料、产地均相同, 这可能是由于原料配比不同造成的 δ¹³C 值存在差异; 19~22 号样品为我国糯米酿造食醋, 样品聚类结果显示除 19 号样品外均聚为一类, 这可能与添加了生姜提取物, δ¹³C 值更偏负性有关; 23~28 号样品为苹果醋, 其中 25 号样品配料中含有苹果醋, 其余样品均为苹果汁发酵, 26 号样品为来自我国的醴官醋, 在树状图中与我国糯米酿造食醋

聚为一类, 27、28 号样品来自意大利, 与芳香醋聚为一类。所以, EA-IRMS 结合聚类分析, 可以将不同产地、不同原料、不同生产方式的食醋进行初步归类。

针对昂贵食醋中掺入价格低廉食醋的掺假方式, 制备糯米酿造食醋、苹果醋、配制白醋三种食醋分别与芳香醋以不同比例组成混合食醋, 掺入此三种食醋比例分别为 2%~16%, 以 2% 的比例递增, 测定混合食醋 δ¹³C 值, 每个样品平行测定 6 次。经单因素方差分析可知, 掺入 4% 糯米酿造食醋、6% 苹果醋、2% 配制白醋的芳香醋混合样品的 δ¹³C 值 (分别为-26.72‰、-26.70‰、-26.81‰) 与原芳香醋样品 δ¹³C 值 (-26.94‰) 存在显著性差异 (P<0.05)。这表明, 此方法可有效鉴别芳香醋中掺入 ≥4% 糯米酿造食醋、≥6% 苹果醋、≥2% 配制白醋的低廉食醋。

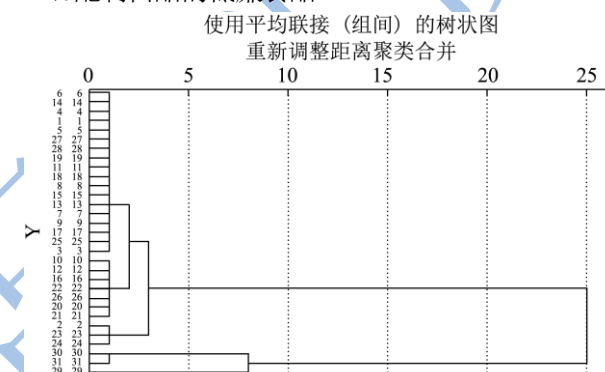


图 3 食醋聚类分析结果

Fig.3 CA results of vinegars

3 结论

选择 4 类共 31 种食醋样品, 采用 EA-IRMS 测定食醋总碳同位素比值。研究表明, EA-IRMS 能够快速测定食醋总碳同位素比值, 前处理简单, 测定结果可靠, 准确性、精密度、稳定性均满足检测分析要求。对食醋进行聚类分析, 结果表明, 该方法可将不同产地、不同原料、不同生产方式的食醋进行初步归类。制备掺入不同比例廉价食醋 (糯米酿造食醋、苹果醋及配制白醋) 的芳香醋混合样品, 测定 δ¹³C 值, 结果显示本方法可对掺入 ≥4% 糯米酿造食醋、≥6% 苹果醋及 ≥2% 配制白醋的芳香醋样品进行有效鉴别, 该方法可用于昂贵食醋中掺入廉价食醋的鉴别。但是, 当掺入廉价食醋的 δ¹³C 值与昂贵食醋的 δ¹³C 值相近时, 其 δ¹³C 值间的差异性不显著, 有待结合食醋中有机酸的稳定同位素比值进行进一步的研究。

参考文献

[1] Versari A, Parpinello G P, Chinnici F, et al. Prediction of sensory score of Italian traditional balsamic vinegars of

- Reggio-Emilia by mid-infrared spectroscopy [J]. Food Chemistry, 2011, 125(4): 1345-1350
- [2] Del Signore A. Infrared spectra (MID-IR) classification of Balsamic vinegars [J]. Journal of Commodity Science, 2000, 39: 159-172
- [3] Cirlini M, Caligiani A, Palla L, et al. HS-SPME/GC-MS and chemometrics for the classification of Balsamic Vinegars of Modena of different maturation and ageing [J]. Food Chemistry, 2011, 124(4): 1678-1683
- [4] Papotti G, Bertelli D, Graziosi R, et al. Traditional balsamic vinegar and balsamic vinegar of Modena analyzed by nuclear magnetic resonance spectroscopy coupled with multivariate data analysis [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 60(2): 1017-1024
- [5] Consonni R, Cagliani L R, Rinaldini S, et al. Analytical method for authentication of Traditional Balsamic Vinegar of Modena [J]. Talanta, 2008, 75(3): 765-769
- [6] 尹峰,丁召伟,曹雪,等.固相萃取-高效液相色谱/串联质谱法测定食醋中的3种甜味剂[J].色谱,2011,29(6):554-557
YIN Feng, DING Zhao-wei, CAO Xue, et al. Determination of three sweeteners in vinegars by solid phase extraction-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2011, 29(6): 554-557
- [7] 傅小伟.IRMS 和 SNIF-NMR 化学方法在葡萄酒质量鉴别中的应用[J].食品科学,2010(24):338-339
FU Xiao-wei. Applications of Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS) and Site-specific-Natural Isotope Fractionation Nuclear Magnetic Resonance (SNIF-NMR) in Grape Wine Quality Identification [J]. Food Science, 2010(24): 338-339
- [8] Thomas F, Jamin E. ^2H NMR and ^{13}C -IRMS analyses of acetic acid from vinegar, ^{18}O -IRMS analysis of water in vinegar: International collaborative study report [J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 649(1): 98-105
- [9] 谭梦茹,林宏,沈崇钰,等.元素分析-碳同位素比值质谱法在酿造酱油掺假鉴别中的应用[J].质谱学报, 2015, 36(4): 334-340
TAN Meng-ru, LIN Hong, SHEN Chong-yu, et al. Detection of fermented soy sauce adulteration using elemental analyzer-carbon isotope ratio mass spectrometry [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2015, 36(4): 334-340
- [10] 吴浩,谢丽琪,靳保辉,等.气相色谱-燃烧-同位素比率质谱法测定葡萄酒中5种挥发性组分的碳同位素比值及其在产地溯源中的应用[J].分析化学研究报告, 2015, 43(3): 344-349
WU Hao, XIE Li-qi, JIN Bao-hui, et al. Gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry for determination of five volatile components in wine and its application in geographical origin traceability [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2015, 43(3): 344-349