

碳氮稳定同位素鉴别有机奶粉

赵超敏¹, 王敏¹, 张润何¹, 邓晓军¹, 房克艳^{1,2}

(1. 上海出入境检验检疫局动植物与食品检验检疫技术中心, 上海 200135)

(2. 上海大学生命科学学院, 上海 200444)

摘要: 本文以有机奶粉和非有机奶粉为研究对象, 以有机奶粉和非有机奶粉的碳稳定同位素比值和氮稳定同位素比值为研究目标, 探索有机奶粉和非有机奶粉的碳、氮稳定同位素组成的差异性。研究结果显示, 有机奶粉的碳稳定同位素比值 ($\delta^{13}\text{C}$) 整体趋势更负于非有机奶粉的 $\delta^{13}\text{C}$ 值, 有机奶粉的氮稳定同位素比值 ($\delta^{15}\text{N}$) 稍低于非有机奶粉的 $\delta^{15}\text{N}$ 值。尽管两种样品的 $\delta^{13}\text{C}$ 值和 $\delta^{15}\text{N}$ 值的数据范围有交叉, 但是根据统计分析, 有机奶粉的 $\delta^{13}\text{C}$ 值和 $\delta^{15}\text{N}$ 值与非有机奶粉的 $\delta^{13}\text{C}$ 值和 $\delta^{15}\text{N}$ 值具有差异性 ($p < 0.05$)。有机奶粉与非有机奶粉 $\delta^{13}\text{C}$ 值和 $\delta^{15}\text{N}$ 值的差异性主要受牛奶来源的影响, 主要与动物的饲料、牧场土壤及肥料等有关。研究结果虽然经有限的样本获得, 但是该方法对监管有机食品的真实性具有一定的参考价值。

关键词: 有机奶粉; 非有机奶粉; 稳定同位素

文章编号: 1673-9078(2018)12-211-215

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.12.031

Identification of Organic Milk Powder Using Carbon and Nitrogen Natural Isotopes

ZHAO Chao-min¹, WANG Min¹, ZHANG Run-he¹, DENG Xiao-jun¹, FANG Ke-yan^{1,2}

(1. Technical Center for Animal Plant and Food Inspection and Quarantine, Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China) (2. School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

Abstract: In this study, the research objects were organic milk powder and convention milk powder. The carbon stable isotope ratio and nitrogen stable isotope ratio of organic milk powder and convention milk powder were studied. Stable isotopes of carbon and nitrogen were analyzed to record the difference between convention milk powder and organic milk powder. The results showed that the overall trend of the mean $\delta^{13}\text{C}$ value of organic milk powder was more negative than that of conventional milk powder, and the mean $\delta^{15}\text{N}$ value of organic milk powder was lower than that of conventional milk powder. Although the data range of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of samples were crossed, both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values were statistically different for the organic milk powder and conventional milk powder ($p < 0.05$). The different in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values between organic milk powder and convention milk powder could be caused by the dairy cow's diet, fertilizer types and soil characteristics used for milk production. The results of the present study, which is based on preliminary data from a limited sample size, could be highly valuable and helpful for monitoring the authenticity of organic milk powder.

Key words: organic milk powder; convention milk powder; stable isotope

近年来牛乳制品食品安全问题时有发生, 对人们健康构成威胁, 并会造成国家严重经济损失和社会恐慌, 也使消费者对牛乳制品的安全提出更高的要求, 食用纯天然、无污染、高品质的牛乳制品, 已经成为广大消费者的共识。有机乳制品这种纯天然、高品质的环保健康食品就应运而生。消费者对所购买产品的真实属性关注越来越高, 消费者愿意花高价去购买这

收稿日期: 2018-08-12

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFF0211303); 国家质检总局科技计划项目 (2016IK220); 中央引导地方科技发展专项 (YDZX20173100004528); 长三角科技合作项目 (17395810102); 上海市科委科研项目 (17DZ2293700)
作者简介: 赵超敏 (1979-), 女, 博士, 工程师, 研究方向: 食品掺假溯源

些质量得到承诺的产品 (如有机乳制品), 因此, 有机乳制品的市场需求不断增加。由于有机乳制品是一种纯天然、高品质的环保健康食品, 其价格高于普通乳制品, 国外有机乳制品的价格高出普通乳制品约 20%~40%, 国内有机乳制品价格也高出普通乳制品的 2~3 倍。在高昂利益驱使下, 市场上会有有机乳制品欺诈和不法行为风险的存在, 如标签混乱、普通乳制品贴牌冒充有机乳制品、复原乳冒充新鲜纯有机乳、以次充好、掺假等欺诈行为。目前, 对于有机产品我国虽然制定了相关规定 (GB/T 19630), 但是有机乳制品认证管理也有时存在漏洞, 有机乳制品可追溯信息不全、有机认证资料缺失或伪造等, 仅靠产品的有

机认证信息难以保证有机乳制品的真实性。目前,国内外没有明确的检测技术可以精准鉴别有机乳制品,难以采取有效的控制或防范措施。

稳定同位素比值溯源是国际上目前用于追溯不同来源食品、实施产地保护和鉴别食品中物质掺假的一种有效工具,并已成功应用于蜂蜜^[1-3]、果汁^[4-6]、葡萄酒^[7,8]、油脂^[9]等食品的鉴别,以及肉品产地溯源和肉品成分物质与饲料的关系^[10,11]。已有研究者应用稳定同位素比质谱技术于有机产品的鉴别,如鉴别有机牛肉^[12]、有机奶^[13,14]。有机放牧和普通饲养方式不同,其喂养奶牛的饲料和生长环境有明显的差异性,这种差异性使得生产的牛乳稳定同位素的丰度比(如¹³C/¹²C、¹⁵N/¹⁴N等)不同,虽然同位素比组成受动物代谢过程中同位素分馏的影响,但是主要由动物饲养的营养物和环境决定。目前研究表明,通过稳定同位素比质谱技术鉴别有机乳制品可能会成为国际趋势。本实验对有机奶粉的碳、氮稳定同位素比值进行测定研究,探索不同来源乳制品的差异性。

1 材料与方法

1.1 仪器与耗材

Delta V 同位素比质谱仪,配 Flash 2000 元素分析仪,购自美国 Thermo Fisher 公司; XPE26C 微量分析天平,购自瑞士 MettlerToledo 公司; 锡杯(9 mm×5 mm),购自美国 Thermo Fisher 公司; CHN 反应管,购自美国 Thermo Fisher 公司; 氦气(载气,纯度>99.999%),购自上海尤嘉利液氮有限公司; 氧气(纯度≥99.9992%)、二氧化碳和氮气(参考气,纯度≥99.9995%),均购自北京氮普北分气体工业有限公司; IAEA600 咖啡因($\delta^{13}\text{C}=-27.771\%$, $\delta^{15}\text{N}=1\%$),购自国际原子能机构,作为参考气校准物质和质量控制标准物。

1.2 样品

出入境法定监管样品。共收集 3 个品牌有机奶粉和非有机奶粉,编号分别为 1、2、3。根据产品信息不同,1 号品牌有机奶粉共 6 份,编号为 1A1~1A6,非有机奶粉 2 份,编号为 1B1~1B2; 2 号品牌有机奶粉和非有机奶粉各一份,编号分别为 2A1 和 2B2。3 号品牌有机奶粉和非有机奶粉各 20 份,编号分别为 3A1~3A20 和 3B1~3B20。

1.3 仪器参数

1.3.1 元素分析仪参数

氧化炉温度: 980 °C; 柱温: 50 °C; 载气(氦气)流速: 100 mL/min; 氧气流速: 175 mL/min; 吹扫气(氦气) 180 mL/min; 注氧时间: 3 s。

1.3.2 同位素比质谱仪参数

离子化方式: EI 离子源。离子源电压: 3.07 kV。真空度: 1.6×10^{-6} mBar。氦气压力: 4 bar。氧气压力: 4 bar。二氧化碳压力: 4 bar。氮气压力: 4 bar。空气压力: 8 bar。

1.4 样品制备

碳稳定同位素比值测定: 将试样混匀,称取样品 70~100 μg 于锡杯中,密封包裹成球,每个样品重复制备 6 平行,待测。

氮稳定同位素比值测定: 将试样混匀,称取样品 4000~5000 μg 于锡杯中,密封包裹成球,每个样品重复制备 6 平行,待测。

1.5 数据处理

元素分析-同位素比质谱(EA-IRMS)分析结果以 δ 表示,它反应了样品和国际标准物质之间同位素丰度比的相对差异:

$$\delta = \frac{R_{SPL} - R_{STD}}{R_{STD}} \times 10^3$$

其中: R 代表 ¹³C/¹²C 或 ¹⁵N/¹⁴N 同位素含量比, SPL 与 STD 分别代表“样品”和“标准物质”, δ 值用千分数表示(‰)。样品结果允许标准偏差为<0.3‰。

1.6 分析方法评价

分析方法的灵敏度、精密度、系统的稳定性直接决定样品 δ 值的准确性,因此,通过评价方法灵敏度、稳定性、精密度对方法的可行性进行验证。

2 结果与讨论

2.1 碳氮稳定同位素比值分析

对比分析了三种品牌有机奶粉和非有机奶粉的 $\delta^{13}\text{C}$ 值和 $\delta^{15}\text{N}$ 值(表 1),由结果可知,有机奶粉的 $\delta^{13}\text{C}$ 在 -28.55‰与 -25.76‰之间, $\delta^{15}\text{N}$ 值在 4.51‰~5.35‰之间,非有机奶粉的 $\delta^{13}\text{C}$ 在 -27.89‰与 -19.39‰之间, $\delta^{15}\text{N}$ 值在 4.04‰~6.67‰之间,虽然有机与非有机样品的数据范围有部分交叉,但是整体有机奶粉的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值与非有机奶粉的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值具有差异性(单因素方差分析 $p < 0.05$),有机奶粉 $\delta^{13}\text{C}$ 值的整体趋势比非有机奶粉的 $\delta^{13}\text{C}$ 值更偏负,这也与有关研究者结论相似^[14],有机奶粉 $\delta^{15}\text{N}$ 值的整体趋势比非有机奶粉

的 $\delta^{15}\text{N}$ 值稍低,这也被其他研究者证实^[13],有机奶粉和非有机奶粉 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值的数据范围交叉可能与样品性质有关,因为所选取样品均为配方奶粉,样品基质中存在其他含有C、N元素的物质对结果造成了影响,使得有机和非有机的数据范围界限不明确,但是从结果说明稳定同位素比值谱方法可以作为鉴别物质质量属性的一种有效工具。

$\delta^{13}\text{C}$ 值取决于动物不同植物来源营养物质中的碳稳定同位素,如C3(如干草、小麦、大豆等)植物和C4植物(如玉米、甘蔗等)。植物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值与光合作用方式相关,C3植物 $\delta^{13}\text{C}$ 值变化范围为-23‰至-35‰

之间,C4植物分布范围则为-9‰至-19‰之间^[14]。有机奶粉主要以有机奶组成,出自有机牧场,有机牧场几乎完全由C3植物组成,而非有机奶粉主要以普通奶为原料,来自圈养的养殖场,饲料多以C4植物为主,因此,这就是有机奶粉比非有机奶粉 $\delta^{13}\text{C}$ 值偏负的原因。

有机牧场禁止使用人造肥料,牛乳中氮同位素比取决于土壤中有有机氮,人造肥料一般通过大气中的氮气来生产,相比之下,有机肥料含有相对较多的重 ^{15}N 。由于受饲料组成、土壤特点和肥料类型多因素的影响,有机和非有机产品 $\delta^{15}\text{N}$ 值的区别稍小。

表1 有机奶粉和非有机奶粉 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值对比(n=6)

Table 1 The $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in organic milk powder and conventional milk powder (n=6)

品牌	编号	$\delta^{13}\text{C}/\text{‰}$	$\delta^{15}\text{N}/\text{‰}$	编号	$\delta^{13}\text{C}/\text{‰}$	$\delta^{15}\text{N}/\text{‰}$
1	1A1	-27.99	4.69	1B1	-25.07	4.41
	1A2	-27.98	4.61	1B2	-25.51	6.04
	1A3	-28.08	4.72			
	1A4	-28.30	4.99			
	1A5	-28.04	4.58			
	1A6	-28.22	5.26			
2	2A1	-28.55	4.51	2B1	-25.08	4.62
	3A1	-26.66	5.09	3B1	-20.89	4.04
	3A2	-25.76	4.80	3B2	-21.33	5.10
	3A3	-27.27	4.75	3B3	-27.76	5.75
	3A4	-26.51	5.35	3B4	-21.26	5.32
	3A5	-27.24	5.07	3B5	-22.01	5.69
	3A6	-26.63	5.32	3B6	-20.78	5.19
	3A7	-26.08	4.58	3B7	-25.85	5.72
	3A8	-26.14	4.78	3B8	-21.68	5.43
	3A9	-27.39	4.89	3B9	-21.19	5.12
	3A10	-26.45	4.92	3B10	-21.85	5.20
	3A11	-26.48	4.93	3B11	-27.59	5.57
	3A12	-28.16	5.10	3B12	-26.59	6.67
	3A13	-27.78	4.69	3B13	-27.56	5.78
	3A14	-26.70	5.05	3B14	-19.39	4.16
	3A15	-27.46	4.65	3B15	-21.37	6.05
	3A16	-25.80	4.61	3B16	-20.29	5.44
	3A17	-27.04	4.84	3B17	-21.86	6.18
	3A18	-26.73	5.16	3B18	-27.89	6.54
	3A19	-26.52	4.93	3B19	-24.19	5.51
3A20	-26.57	4.69	3B20	-21.02	4.23	

2.2 系统稳定性

系统的稳定性通过脉冲进入离子源的 CO_2 或 N_2 参考气来控制,碳同位素和氮同位素比值稳定,且

$\text{SD}<0.06$,每次测样前必须检查系统的稳定性。

样品测定值的稳定性通过每次样品序列前和序列中穿插咖啡因标准品测定来评估,每次至少测定6平行。标准值 $\delta^{13}\text{C}=-27.771\text{‰}$ 与 $\delta^{15}\text{N}=1\text{‰}$,测定值与标

准值必须 $SD < 0.3\%$, 否则系统稳定性差影响检测结果的准确性, 需重新检查仪器系统。

2.3 灵敏度

灵敏度通过样品不同进样量的测定值及其信号强度来评价分析。选择 1 号样品 1A3 作为评估样, 选择进样范围为 50~150 μg 评估, 当进样量小于 70 μg 时, $\delta^{13}\text{C}$ 测定值稳定性差, $SD > 0.5\%$, 当进样量高达 140~150 μg 时, 信号强度太大, 氧化管铜丝消耗快, 成本高, 经优化选择进样量为 70~100 μg , 此时 $\delta^{13}\text{C}$ 平均值稳定在 $-28.08\% \pm 0.15\%$ 附近, 对应的信号强度在 2500~6000 mV 之间。因为样品中氮元素含量低, 因此, 分析氮同位素比值时, 需要增加进样量, 选择进样范围为 2~7 mg, 当进样量小于 4 mg 时, 测定值稳定性差, $SD > 0.5\%$, 当进样量在 6~7 mg 时, 信号强度太大, 此时因为所分析进样中含更高碳元素, 氧

化管铜丝消耗更快, 更换更频繁, 因此, 选择进样量为 4~5 mg, 此时 $\delta^{15}\text{N}$ 平均值稳定在 $4.72\% \pm 0.11\%$ 附近, 对应的信号强度在 5000~7000 mV 之间。为进一步提高 $\delta^{15}\text{N}$ 测定灵敏度, 减少称样量, 可去除碳元素含量过高的影响, 把除水阱中高氯酸镁换为二氧化碳吸附剂, 但是这样在测定 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 时需更换相应的除水阱填充剂, 比较繁琐耗时。

2.4 精密度

日内精密度通过随机选取 2 个样品, 在同一天内平行测定 6 次, 分析其标准偏差 SD。结果如表 2 所示, $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 测定值的 SD 值均小于 0.3%, 咖啡因的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 平均值分别为 -27.79% 与 0.98% , SD 值均小于 0.3%, 说明该方法的准确性好, 日内精密度满足试验分析要求。

表 2 样品 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 平均值及标准偏差

Table 2 The average value and SD of $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ of samples (n=6)

品牌	编号	$\delta^{13}\text{C}/\%$	SD/%	$\delta^{15}\text{N}/\%$	SD/%
3	3A7	-26.08	0.05	4.58	0.06
	3A8	-26.14	0.06	4.78	0.07
	咖啡因	-27.79	0.03	0.98	0.04

日间精密度通过任意选取 2 个样品, 连续测定 5 d, 每个样平行测定 6 次, 计算平均值及 SD 值 (n=30)。如表 3 所示所有样品的 SD 值均小于 0.3%, 质控样的

测定值与标准值接近, 也显示准确性好, 因此, 该方法具有良好的日间精密度。

表 3 样品 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 平均值及标准偏差

Table 3 The average value and SD of $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ of samples (n=30)

品牌	编号	$\delta^{13}\text{C}/\%$	SD/%	$\delta^{15}\text{N}/\%$	SD/%
1	1A1	-27.91	0.22	4.72	0.11
	1A2	-27.95	0.16	4.65	0.13
	咖啡因	-27.78	0.05	0.99	0.07

3 结论

利用元素分析-同位素比质谱法对有机奶粉和非有机奶粉的碳、氮稳定同位素比值进行初步研究, 有机奶粉的碳稳定同位素比值较非有机奶粉的碳稳定同位素比值更偏负, 有机奶粉的氮稳定同位素比值比非有机奶粉的氮稳定同位素比值较接近, 但稍低。这主要是与奶粉主要成份奶源有关系, 因为有机奶粉的主要原料来自有机牧场, 有机牧场饲料主要为 C3 植物且不使用人造肥料。通过实验可知, $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 可能有助于鉴别有机产品的真实性, 同位素比质谱技术也可能是一个很好的鉴别物质真实属性的可靠技术, 因奶粉产品中成分复杂, 存在其他影响 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值精准性的碳、氮元素, 因此, 后续工作可研究纯液态

奶, 使得区别有机奶与非有机奶 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 数据范围更精准、可靠。

参考文献

- [1] Kawashima H, Suto M, Suto N. Determination of carbon isotope ratios for honey samples by means of a liquid chromatography/isotope ratio mass spectrometry system coupled with a post-column pump [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2018, 32(15): 1271-1279
- [2] Vetrova, O V, Kalashnikova, D A, Melkov, V N, et al. Detection of honey adulterations with sugar syrups by stable isotope mass spectrometry [J]. Journal of Analytical Chemistry, 2017, 72(7): 756-760

- [3] Dong H, Luo D H, Xian Y P, et al. Adulteration identification of commercial honey with the C-4 sugar content of negative values by an elemental analyzer and liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectroscopy [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(16): 3258-3265
- [4] Schmutzer G R, Dehelean A, Magdas D A, et al. Determination of stable isotopes, minerals, and volatile organic compounds in Romanian orange juice [J]. *Analytical Letters*, 2016, 49(16): 2644-2658
- [5] Bontempo L, Caruso R, Fiorillo M, et al. Stable isotope ratios of H, C, N and O in Italian citrus juices [J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2014, 49(9): 785-791
- [6] Guyon F, Auberger P, Gaillard L, et al. C-13/C-12 isotope ratios of organic acids, glucose and fructose determined by HPLC-co-IRMS for lemon juices authenticity [J]. *Food Chemistry*, 2014, 146: 36-40
- [7] Fan S X, Zhong Q D, Gao H B, et al. Elemental profile and oxygen isotope ratio ($\delta O-18$) for verifying the geographical origin of Chinese wines [J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2018, 26(3): 1033-1044
- [8] Vinciguerra V, Stevenson R, Pedneault K, et al. Strontium isotope characterization of wines from Quebec, Canada [J]. *Food Chemistry*, 2016, 210: 121-128
- [9] Spangenberg J E. Bulk C, H, O, and fatty acid C stable isotope analyses for purity assessment of vegetable oils from the southern and northern hemispheres [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2016, 30(23): 2447-2461
- [10] Osorio M T, Moloney A P, Schmidt O, et al. Beef authentication and retrospective dietary verification using stable isotope ratio analysis of bovine muscle and tail hair [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(7): 3295-3305
- [11] Bahar B, Monahan F J, Moloney A P, et al. Alteration of the carbon and nitrogen stable isotope composition of beef by substitution of grass silage with maize silage [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2005, 19(4): 1937-1942
- [12] Bahar B, Schmidt O, Moloney A P, et al. Seasonal variation in the C, N and S stable isotope composition of retail organic and conventional Irish beef [J]. *Food Chemistry*, 2008, 106(3): 1299-1305
- [13] Chung I M, Park I, Yoon J Y, et al. Determination of organic milk authenticity using carbon and nitrogen natural isotopes [J]. *Food Chemistry*, 2014, 160: 214-218
- [14] 崔琳琳,刘卫国.碳同位素在不同奶源鉴别中的应用探讨[J]. *质谱学报*,2011,32(3):164-169
CUI Lin-lin, LIU Wei-guo. The application exploration of carbon stable isotope ratio in identification of fresh milks with different of sources [J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2011, 32(3): 164-169