

牛奶中矿物元素和稳定同位素比的测定及在产地分析中的应用

侯建波^{1,2}, 张晓峰^{1,2}, 洪灯^{1,2}, 谢文^{1,2}, 张明哲^{1,2}, 韩芳³, 史颖珠¹, 陆顺¹, 裘慧^{1,2}

(1. 浙江省检验检疫科学技术研究院, 浙江杭州 310016) (2. 杭州海关技术中心, 浙江杭州 310016)

(3. 合肥海关技术中心, 安徽合肥 230032)

摘要: 本文应用电感耦合等离子质谱仪 (ICP-MS), 同位素质谱仪 (IRMS) 对牛奶中 Li、Na 等 40 种元素含量和碳、氮、氢、氧稳定同位素比值进行测定, 并应用于牛奶产地分析中。牛奶样品经冷冻干燥成粉末后, 通过 ICP-MS 对元素含量进行测定, EA-IRMS 测定氮稳定同位素比值 ($\delta^{15}\text{N}$), 通过 EA-IRMS 直接测定牛奶中碳稳定同位素比值 ($\delta^{13}\text{C}$), GasBench-IRMS 测定牛奶水中的氢和氧稳定同位素比值 ($\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$)。应用上述方法对德国、西班牙、意大利、澳大利亚、新西兰、中国和奥地利的牛奶样品进行检测, 并对测定结果进行多元统计分析 (方差分析、主成分分析、聚类分析和判别分析), 对牛奶产地的归属进行研究。研究表明, 有 10 种元素 (As、Se、Rb、Sr、Mo、Cd、Cs、Ba、Tl、Bi) 和 4 种稳定同位素比 ($\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 、 $\delta^2\text{H}$ 、 $\delta^{18}\text{O}$) 在不同国家和地区的牛奶中存在显著性差异 ($p < 0.05$), 德国和意大利, 中国, 奥地利, 澳大利亚和新西兰的牛奶可进行一定的聚类区分, 应用 As、Se、Rb、Sr、Mo、Cs、Ba、Tl、 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 和 $\delta^2\text{H}$ 指标的组合分析, 对 7 个国家牛奶产地的整体判别准确率为 92.4%。

关键词: 牛奶; 多元素; 稳定同位素比值; 产地

文章编号: 1673-9078(2020)12-259-266

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.12.0593

Determination of Multi-elements and Stable Isotope Ratios in Milk and Discrimination Their Geographical Origin

HOU Jian-bo^{1,2}, ZHANG Xiao-feng^{1,2}, HONG Deng^{1,2}, XIE Wen^{1,2}, ZHANG Ming-zhe^{1,2}, HAN Fang³,
SHI Ying-zhu¹, LU Shun¹, QIU Hui^{1,2}

(1. Zhejiang Academy of Science and Technology for Inspection and Quarantine, Hangzhou 310016, China)

(2. The Technic Center of Hangzhou Customs, Hangzhou 310016, China)

(3. The Technic Center of Hefei Customs, Hefei 230032, China)

Abstract: In this paper, the inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was used for the determination of Li, Na and other 38 elements, the elemental analysis-isotope ratio mass spectrometry (EA-IRMS) and GasBench-IRMS were used for the determination of the stable isotope ratios of carbon, nitrogen, hydrogen and oxygen in milk, and for the feasibility assessment of milk geographical origin in different country. The milk sample was freeze-dried into a powder, and then determined by EA-IRMS or ICP-MS to obtain stable isotope ratios of nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) and mineral elements. The milk sample was detected by EA-IRMS or GasBench-IRMS to obtain stable isotope ratios of carbon, hydrogen and oxygen ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$). The milk samples were collected from Germany, Spain, Italy, Australia, New Zealand, China and Austria, and then the stable isotope ratios of carbon, nitrogen, hydrogen, oxygen and multi-elements were detected. The values of $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^2\text{H}$, $\delta^{18}\text{O}$ and multi-elements were distinguished by multivariate statistical analysis (including ANOVA, Duncan's multiple comparison,

引文格式:

侯建波, 张晓峰, 洪灯, 等. 牛奶中矿物元素和稳定同位素比的测定及在产地分析中的应用[J]. 现代食品科技, 2020, 36(12): 259-266

HOU Jian-bo, ZHANG Xiao-feng, HONG Deng, et al. Determination of multi-elements and stable isotope ratios in milk and discrimination their geographical origin [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(12): 259-266

收稿日期: 2020-06-28

基金项目: 浙江省重点研发计划项目 (2018C02041); 安徽省重点研究和开发计划专项 (1804b06020349); 浙江省科技厅软科学计划项目 (2018C25018)

作者简介: 侯建波 (1983-), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 食品中药物残留和产地溯源研究

通讯作者: 张晓峰 (1975-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品质量安全检测研究

correlation analysis, principal component analysis, cluster analysis and discriminant analysis) using the SPSS software package for windows. The results showed that the As, Se, Rb, Sr, Mo, Cd, Cs, Ba, Tl, Bi, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ were significantly different ($p < 0.05$), different clusters were observed in Germany and Italy, China, Austria Australia and New Zealand, and the accuracy of discrimination for milk geographical origin was 92.4% by the combined indicators of As, Se, Rb, Sr, Mo, Cs, Ba, Tl, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^2\text{H}$.

Key words: milk; multi-elements; stable isotope ratios; geographical origin

牛奶营养价值丰富、食用方便, 备受消费者喜爱。随着人民生活水平的提高, 消费量不断增加, 对牛奶质量的要求也越来越高。伴随全球经济一体化和贸易便利化的发展, 进口牛奶陆续成为国内消费者日常选择的对象。然而相同类型和规格的牛奶, 由于产地的不同会带来几倍甚至几十倍的价格差异, 因此牛奶产地属性对确定其价值具有非常重要的意义。

欧盟在 1992 年已提食品产地的概念, 并在 2000 年要求食品的生产、加工和流通等环节建立溯源制度, 明确产品来源^[1-3], 我国《食品安全法》也对依法建立食品安全追溯体系, 保证食品的可追溯性进行了明确说明^[4]。研究表明生物自身携带的矿物元素指纹和稳定同位素比信息与其生存环境(土壤、水等)和生长方式密切相关^[1], 因此稳定同位素溯源技术、元素分析技术成为食品溯源和产地属性保护的重要工具。目前已成功应用于肉制品^[5-8]、葡萄酒^[9-11]、蔬菜谷物^[12-14]、茶叶^[15]、蜂蜜^[16]、果汁^[17]、乳制品^[18-22]等食用农产品和食品的产地溯源研究中。关于牛奶产地研究已有人员通过测定牛奶样品中部分元素^[23-25], 牛奶或其蛋白质、氨基酸中的 C、N、H、O、S 等稳定同位素比值测定^[26-29], 对其产地归属情况进行研究。

本文通过电感耦合等离子质谱仪(ICP-MS)测定牛奶冻干粉中的 Li、Na、Mg、Al、K、Ca、Sc、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Ga、As、Se、Rb、Sr、Mo、Ru、Ag、Cd、In、Sn、Sb、Cs、Ba、La、Pr、Nd、Sm、Re、Tl、Pb、Bi、Th、U 总计 40 种元素含量, 通过同位素比质谱仪(IRMS)测定牛奶的碳、氮稳定同位素比值($\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$)和牛奶中水的氢、氧稳定同位素比值($\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$)。并对德国、西班牙、意大利、澳大利亚、新西兰、中国和奥地利牛奶样品的检测结果进行多元统计分析, 对其判别牛奶产地溯源的可行性进行分析, 提出判别模型。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 主要仪器设备

7900 型电感耦合等离子质谱仪, 美国 Agilent 公司; CEM MARS 6 型微波消解仪, 美国 CEM 公司;

Flash 2000 型元素分析仪, Thermo Fisher 公司; Delta/Mat 252 GasBench II 多用途气体制备仪, Thermo Fisher 公司; Delta V Advantage 型稳定同位素质谱仪, Thermo Fisher 公司; 2.5 Triad 型冷冻干燥机, LabConco 公司; CPA225D 型分析天平(精确至 0.01 mg), 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司。

1.1.2 主要耗材和试剂

锡杯(9 mm×5 mm), Thermo Fisher 公司; 铂(Pt) 催化剂, Thermo Fisher 公司; He 气体和 CO₂ 气体(纯度≥99.999%), 比欧西气体(苏州)有限公司; O₂ 气体(纯度≥99.999%), 杭州德清成功气体有限公司; N₂ 气体(纯度≥99.999%), 上海比欧西气体工业有限公司; H₂ 气体(纯度≥99.999%), 上海宝氢气体工业有限公司。H₂/He 混合气(H₂ 含量 1.99%)和 CO₂/He 混合气(CO₂ 含量 0.301%), 杭州新世纪混合气体有限公司。标准物质: 咖啡因(IAEA-600): $\delta^{13}\text{C} = -27.771\text{‰} \pm 0.043\text{‰}$ (VPDB), 国际原子能机构; L-谷氨酸(USGS40): $\delta^{15}\text{N} = -4.52 \pm 0.06\text{‰}$ (Air N₂); 甘氨酸(USGS65): $\delta^{13}\text{C} = -20.29 \pm 0.04\text{‰}$ (VPDB-LSVEC), $\delta^{15}\text{N} = 20.68 \pm 0.06\text{‰}$ (Air N₂); 水(USGS45): $\delta^2\text{H} = -10.3 \pm 0.4\text{‰}$ (VSMOW-SLAP), $\delta^{18}\text{O} = -2.238 \pm 0.011\text{‰}$ (VSMOW-SLAP), USGS47: $\delta^2\text{H} = -150.2 \pm 0.5\text{‰}$ (VSMOW-SLAP), $\delta^{18}\text{O} = -19.80 \pm 0.02\text{‰}$ (VSMOW-SLAP), USGS50: $\delta^2\text{H} = 32.8 \pm 0.4\text{‰}$ (VSMOW-SLAP), $\delta^{18}\text{O} = 4.95 \pm 0.02\text{‰}$ (VSMOW-SLAP), 美国地质勘探局; 作为参考气校准物质和质量控制标准物。元素标准品: 国家有色金属及电子材料分析测试中心产品。元素质控样品: Se(特性值 25.93 μg/100g, 标准差 2.70 μg/100g)和 Mn(特性值 262.7 μg/100g, 标准差 21.6 μg/100g), 中国检验检疫科学研究院测试评价中心产品; Cr(0.064±0.008 mg/kg), Cd(0.24±0.01 mg/kg), Pb(0.12±0.02 mg/kg)和 As(0.23±0.03 mg/kg), 钢铁研究总院分析测试研究所产品。硝酸(≥65%, 优级纯), 德国 Merck 公司产品; 水为 GB/T 6682 规定的一级水。牛奶样品: 澳大利亚 35 个, 奥地利 5 个, 德国 9 个, 西班牙 4 个, 新西兰 12 个, 意大利 7 个, 中国 7 个。

1.1.3 仪器工作条件

元素测定的电感耦合等离子质谱仪参数: 射频功

率: 1550 w; 采样深度: 8.0 mm; 氦气载气流量: 0.8 L/min; 雾化室温度: 4 °C; 氦气稀释气体流量: 0.3 L/min; 提取透镜1电压: 0 V; 提取透镜2电压: -160 V; Omega偏转电压: -85 V; Omega透镜电压: 8.7 V; 碰撞池入口电压: -40 V; 碰撞池出口电压: -60 V, 碰撞池气体: 氦气, 流量: 4.3 mL/min。分析过程中各样品进行平行测试取平均值, 每5个样品穿插一个标准样品。

稳定同位素比测定的元素分析仪参数(碳、氮稳定同位素比的测定): He载气流速200 mL/min, CO₂参考气流速90 mL/min, 氧气流速180 mL/min, 氧化炉温度: 960 °C, 还原炉温度640 °C, 水阱温度50 °C。GasBench参数(氢、氧稳定同位素比的测定): H₂/He或CO₂/He混合气流速100 mL/min, 每个样品吹扫5 min, He载气流速0.5 mL/min, GC色谱柱恒温: 50 °C, 进样盘温度25 °C。同位素比质谱仪参数: 离子化方式: EI离子源, 离子源电压: 3.06 kV, 真空度: 1.2×10⁻⁶ mBar, 电流: 1.5 mA。测试仪器δ¹³C、δ¹⁵N和δ¹⁸O的连续测定精度<0.06‰ (n=10); δ²H的连续测定精度<0.4‰ (n=10)。分析过程中各样品进行平行测试取平均值, 每5个样品穿插一个标准样品。

稳定同位素比计算公式:

$$\delta (\text{‰}) = (R_{\text{样品}}/R_{\text{标准}} - 1) \times 1000$$

其中R为重同位素与轻同位素丰度比, 即¹³C/¹²C, ¹⁵N/¹⁴N, ²H/¹H, ¹⁸O/¹⁶O。其中δ¹³C的相对标准为V-PDB和VPDB-LSVEC, δ¹⁵N的相对标准为空气中的氮气, δ²H和δ¹⁸O的相对标准为VSMOW-SLAP。

1.1.4 试验方法

1.1.4.1 元素含量的测定

将牛奶进行冷冻干燥成粉末, 研磨均匀, 取干粉0.50 g至微波消解罐中, 加入硝酸8 mL, 进行微波消解, 赶酸至硝酸2 mL左右, 加水定容至25 mL, 混匀, ICP-MS测定^[30]。

1.1.4.2 碳、氮稳定同位素比值的测定

取2 μL牛奶样品置于锡杯中, 密封, 通过自动进样器进入元素分析仪, 测定碳稳定同位素比值。牛奶进行冷冻干燥成粉末, 研磨均匀, 取干粉0.8 mg置于锡杯中, 密封, 通过自动进样器进入元素分析仪, 测定氮稳定同位素比值。

1.1.4.3 氢稳定同位素比值的测定

取混匀的牛奶500 μL至12 mL样品瓶中, 加入铂(Pt)催化剂, 密封, 样品瓶放入自动进样器, 将H₂/He混合气通过吹扫模式充满样品瓶, 赶出瓶内空气。样品瓶密封静止平衡60 min, 使得样品瓶中混合气的²H/¹H与牛奶水中的²H/¹H达到同位素平衡。顶

空进样, 通过GasBench-IRMS进行测试。

1.1.4.4 氧稳定同位素比值的测定

取混匀的牛奶500 μL至12 mL样品瓶中, 密封后将样品瓶置于自动进样器, 将CO₂/He混合气通过吹扫模式充入样品瓶赶走瓶内空气。样品瓶密封静止平衡18 h, 使混合气CO₂的¹⁸O/¹⁶O与牛奶水中的¹⁸O/¹⁶O达到同位素平衡状态。顶空进样, 通过GasBench-IRMS进行测试。

1.1.5 数据处理

数据处理采用SPSS 20.0进行单因素方差分析, Duncan多重比较分析, 主成分分析(R型: 对数据进行中心化和标准化处理), 聚类分析(系统聚类, 其中聚类距离为欧式距离, 聚类方法采用Ward聚类法)和判别分析(逐步判别法, Fisher线性判别分析)。

2 结果与讨论

2.1 牛奶中元素含量和稳定同位素比值差异

分析

研究表明, 矿物元素和稳定同位素比值的指纹信息与动植物生长环境和动物食物来源的元素含量密切相关, 其中δ¹³C可反映动物饲养中所使用的植物类型(C₃植物或C₄植物等)和饲养方式, δ¹⁵N与动物饲养所用饲料、生存地域环境、气候、土壤状况有关, δ²H和δ¹⁸O则与当地饮用水环境密切相关^[1,31]。因此本实验采用矿物元素信息和稳定同位素比值的差异对牛奶的产地进行分析。实验对牛奶样品40种矿物元素(Li、Na、Mg、Al、K、Ca、Sc、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Ga、As、Se、Rb、Sr、Mo、Ru、Ag、Cd、In、Sn、Sb、Cs、Ba、La、Pr、Nd、Sm、Re、Tl、Pb、Bi、Th、U)和4种稳定同位素比值(δ¹³C、δ¹⁵N、δ²H、δ¹⁸O)进行检测。测定结果如表1所示, 有27种元素(Na、Mg、Al、K、Ca、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、As、Se、Rb、Sr、Mo、Ag、Cd、Sb、Cs、Ba、Sm、Tl、Bi)和4种稳定同位素比值(δ¹³C、δ¹⁵N、δ²H、δ¹⁸O)在牛奶中可以被检测。

对27种元素和4种稳定同位素比值测定结果进行方差分析和Duncan多重比较分析, 结果如表1所示, 有10种元素(As、Se、Rb、Sr、Mo、Cd、Cs、Ba、Tl、Bi)和4种稳定同位素比(δ¹³C、δ¹⁵N、δ²H、δ¹⁸O)存在显著性差异(p<0.05)。对比分析奥地利牛奶冻干粉中Cd含量(平均值2.59 μg/kg)高于其他国家牛奶冻干粉中Cd含量。新西兰牛奶冻干粉中Cs含量(平

均值 0.26 mg/kg) 和 Ba 含量 (平均值 1.72 mg/kg) 高于其他国家牛奶冻干粉中 Cs 和 Ba 含量。同位素比值对比发现, 不同地域 $\delta^{13}\text{C}$ 值从大到小依次为中国和意大利>西班牙>德国>澳大利亚, 奥地利和新西兰, 由于不同类型的饲养方式对牛肉等产品的 $\delta^{13}\text{C}$ 有所影响^[32], 因此推测澳大利亚, 奥地利和新西兰的奶牛饲养以 C₃ 植物类牧草为主, 中国、意大利和西班牙偏向于

C₄ 植物类牧草为主。 $\delta^{15}\text{N}$ 的测试结果表明澳大利亚>新西兰, 德国>意大利, 奥地利和西班牙>中国, $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 的测试结果大小趋势具有一致性, 顺序依次为澳大利亚>新西兰>西班牙>德国>意大利>奥地利>中国, 即 $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 进口牛奶存在高于国产牛奶的现象, 该结果也反映出不同奶牛的饲料成分, 生长的地域和水源环境存在一定差异。

表 1 不同国家牛奶中稳定同位素比值和矿物元素测定结果

Table 1 The results of $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^2\text{H}$, $\delta^{18}\text{O}$ and multi-elemental concentrations in milk from different country

参数	德国	西班牙	意大利	澳大利亚	新西兰	中国	奥地利	p-值
Na/(g/kg)	3.54±0.49 ^{ab}	4.05±0.63 ^a	3.55±0.36 ^{ab}	3.67±0.68 ^{ab}	3.42±0.51 ^{ab}	3.39±0.47 ^b	3.58±0.58 ^{ab}	0.39
Mg/(g/kg)	0.98±0.11 ^a	0.96±0.20 ^a	0.88±0.13 ^a	1.01±0.16 ^a	0.92±0.15 ^a	0.87±0.07 ^a	0.93±0.15 ^a	0.17
Al/(mg/kg)	1.71±1.15 ^a	1.79±0.99 ^a	1.47±0.78 ^a	1.92±0.59 ^a	2.18±0.88 ^a	1.38±0.24 ^a	1.31±0.52 ^a	0.13
K/(g/kg)	14.02±2.06 ^a	14.58±2.57 ^a	13.65±2.55 ^a	14.03±2.16 ^a	13.81±2.27 ^a	12.57±1.08 ^a	13.71±1.58 ^a	0.75
Ca/(g/kg)	9.99±1.40 ^a	9.86±2.04 ^a	9.34±1.59 ^a	11.21±3.58 ^a	10.72±1.92 ^a	8.58±0.56 ^a	10.60±1.20 ^a	0.27
Ti/(mg/kg)	0.38±0.08 ^a	0.52±0.21 ^a	0.43±0.29 ^a	0.45±0.26 ^a	0.38±0.11 ^a	0.33±0.07 ^a	0.32±0.11 ^a	0.57
V/(μg/kg)	2.58±1.67 ^b	4.08±0.85 ^{ab}	3.41±0.92 ^{ab}	3.88±1.65 ^{ab}	4.65±2.43 ^a	4.20±0.53 ^{ab}	3.76±0.68 ^{ab}	0.18
Cr/(mg/kg)	0.14±0.12 ^a	0.17±0.11 ^a	0.12±0.07 ^a	0.19±0.21 ^a	0.18±0.29 ^a	0.09±0.06 ^a	0.21±0.15 ^a	0.88
Mn/(mg/kg)	0.32±0.05 ^a	0.35±0.05 ^a	0.27±0.04 ^a	0.61±0.80 ^a	0.51±0.42 ^a	0.28±0.05 ^a	0.28±0.04 ^a	0.54
Fe/(mg/kg)	3.67±0.83 ^a	5.67±2.66 ^a	7.77±7.76 ^a	5.42±3.17 ^a	4.58±1.93 ^a	4.82±1.51 ^a	6.91±4.42 ^a	0.30
Co/(mg/kg)	0.06±0.06 ^a	0.04±0.02 ^a	0.07±0.03 ^a	0.08±0.14 ^a	0.06±0.03 ^a	0.03±0.02 ^a	0.10±0.11 ^a	0.85
Ni/(mg/kg)	0.068±0.043 ^a	0.10±0.09 ^a	0.05±0.04 ^a	0.08±0.07 ^a	0.08±0.06 ^a	0.02±0.03 ^a	0.08±0.06 ^a	0.24
Cu/(mg/kg)	0.50±0.10 ^a	0.54±0.09 ^a	0.54±0.14 ^a	0.54±0.22 ^a	0.91±1.11 ^a	0.48±0.07 ^a	0.45±0.07 ^a	0.29
Zn/(mg/kg)	33.64±4.76 ^a	36.62±5.69 ^a	36.11±8.18 ^a	36.93±5.93 ^a	35.56±7.13 ^a	34.76±4.14 ^a	36.90±6.83 ^a	0.85
As/(μg/kg)	0.59±1.76 ^b	11.04±18.28 ^a	6.71±7.45 ^{ab}	1.34±3.14 ^b	2.80±2.95 ^b	5.02±8.70 ^{ab}	5.26±3.31 ^{ab}	0.01
Se/(mg/kg)	0.17±0.03 ^{bc}	0.25±0.07 ^a	0.22±0.05 ^{ab}	0.16±0.05 ^{bc}	0.17±0.11 ^{bc}	0.29±0.09 ^a	0.12±0.02 ^c	0.001
Rb/(mg/kg)	17.78±13.62 ^{bcd}	22.80±4.36 ^{bc}	11.44±2.72 ^d	19.50±8.82 ^{bcd}	42.98±10.88 ^a	13.21±4.80 ^{cd}	27.52±5.15 ^b	0.001
Sr/(mg/kg)	2.91±0.52 ^{bc}	3.65±0.90 ^{bc}	3.48±0.70 ^{bc}	5.67±1.54 ^a	4.36±1.29 ^{ab}	5.88±2.53 ^a	2.25±0.24 ^c	0.001
Mo/(mg/kg)	0.43±0.03 ^{cd}	0.51±0.10 ^{ab}	0.49±0.08 ^{abc}	0.42±0.08 ^{cd}	0.37±0.05 ^d	0.44±0.01 ^{bcd}	0.54±0.05 ^a	0.001
Ag/(μg/kg)	2.40±3.34 ^a	4.89±6.90 ^a	3.93±1.62 ^a	4.06±3.43 ^a	16.61±40.42 ^a	1.55±2.68 ^a	5.10±0.69 ^a	0.35
Cd/(μg/kg)	0.89±0.81 ^b	0.83±0.85 ^b	0.79±0.82 ^b	1.13±1.12 ^b	0.81±0.54 ^b	0.42±0.18 ^b	2.59±1.45 ^a	0.01
Sb/(μg/kg)	0.68±2.04 ^a	3.79±7.58 ^a	5.05±6.32 ^a	4.90±9.53 ^a	2.68±5.97 ^a	ND ^a	2.83±6.32 ^a	0.62
Cs/(mg/kg)	0.08±0.18 ^b	0.05±0.01 ^b	0.03±0.01 ^b	0.04±0.02 ^b	0.26±0.21 ^a	0.04±0.02 ^b	0.04±0.01 ^b	0.001
Ba/(mg/kg)	0.71±0.38 ^b	0.46±0.16 ^b	0.84±0.51 ^b	0.87±0.32 ^b	1.72±0.70 ^a	0.43±0.12 ^b	0.92±0.54 ^b	0.001
Sm/(mg/kg)	0.06±0.03 ^a	0.08±0.03 ^a	0.06±0.04 ^a	0.06±0.04 ^a	0.07±0.03 ^a	0.09±0.003 ^a	0.08±0.04 ^a	0.42
Tl/(μg/kg)	2.53±2.23 ^{ab}	1.40±0.25 ^{bc}	0.43±0.87 ^c	1.06±1.28 ^{bc}	3.58±3.44 ^a	0.15±0.41 ^c	0.42±0.40 ^c	0.001
Bi/(mg/kg)	0.01±0.01 ^b	0.02±0.02 ^{ab}	0.01±0.01 ^b	0.03±0.03 ^{ab}	0.08±0.12 ^a	0.004±0.007 ^b	0.002±0.001 ^b	0.04
$\delta^{13}\text{C}/\text{‰}$	-22.99±0.82 ^c	-21.40±0.19 ^{bc}	-20.73±0.65 ^{ab}	-26.58±1.85 ^d	-28.80±1.76 ^c	-19.64±1.16 ^a	-27.58±1.73 ^{de}	0.001
$\delta^{15}\text{N}/\text{‰}$	5.19±0.41 ^b	4.32±0.15 ^c	4.97±0.40 ^{bc}	5.88±0.58 ^a	5.25±0.85 ^{ab}	2.81±0.73 ^d	4.93±0.54 ^{bc}	0.001
$\delta^2\text{H}/\text{‰}$	-31.28±4.08 ^c	-8.27±3.43 ^b	-40.07±6.71 ^c	3.10±11.18 ^a	-5.73±9.34 ^{ab}	-58.23±9.14 ^d	-51.45±5.74 ^d	0.001
$\delta^{18}\text{O}/\text{‰}$	-3.82±0.62 ^{cd}	-1.94±0.39 ^b	-5.31±0.78 ^{de}	-0.02±1.69 ^a	-2.80±2.72 ^{bc}	-5.86±1.11 ^c	-5.87±0.82 ^e	0.001

注: (1) 表中的数值为平均值±标准差, 同一列不同字母表示存在显著性差异 ($p<0.05$); (2) Na、Mg、K、Ca 单位为 g/kg;

Al、Ti、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Se、Rb、Sr、Mo、Cs、Ba、Sm、Bi 单位为 mg/kg; V、As、Ag、Cd、Sb、Tl 单位为 μg/kg;

(3) $\delta^{15}\text{N}$ 和矿物元素是对牛奶冻干粉进行测定的结果。

2.2 牛奶中元素含量和稳定同位素比值的主成分分析

表2 前5个主成分分析中各参数的特征向量和方差贡献率

Table 2 The eigenvectors and cumulative contribution of variance of the first five principal components

参数	主成分分析				
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
$\delta^{13}C$	-0.02	-0.12	-0.22	-0.14	-0.04
$\delta^{15}N$	-0.08	0.29	0.14	-0.03	-0.12
δ^2H	-0.01	0.34	-0.04	-0.06	0.02
$\delta^{18}O$	-0.01	0.34	-0.13	-0.17	0.05
As	-0.10	0.02	-0.06	0.14	-0.56
Se	-0.02	-0.08	-0.38	0.05	0.14
Rb	0.28	-0.04	0.03	0.06	0.003
Sr	-0.07	-0.04	-0.21	0.27	0.64
Mo	0.02	-0.17	0.26	-0.26	0.33
Cd	-0.07	-0.08	0.49	-0.003	0.02
Cs	0.35	-0.07	-0.06	-0.03	0.05
Ba	0.14	-0.06	0.03	0.34	0.01
Tl	0.35	0.00	-0.07	-0.21	0.08
Bi	-0.08	-0.11	-0.01	0.58	0.05
方差贡献率/%	27.77	17.04	56.83	9.36	7.41
累积贡献率/%	27.77	44.81	12.02	66.19	73.60

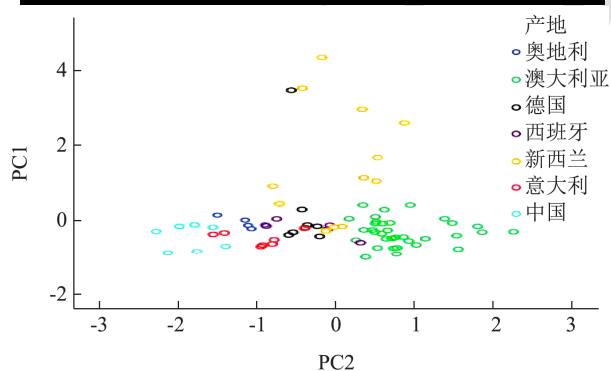


图1 PC1 和 PC2 的得分散点图

Fig.1 Scatter plot of PC1 and PC2

实验对不同国家之间牛奶中存在显著差异的 14 个参数 (As、Se、Rb、Sr、Mo、Cd、Cs、Ba、Tl、Bi、 $\delta^{13}C$ 、 $\delta^{15}N$ 、 δ^2H 和 $\delta^{18}O$) 进行主成分分析, 通过主成分分析将样本中多个参数信息进行综合, 结果如表 2 所示, 前 5 个主成分的累积方差贡献率为 73.60%, 从主成分的特征向量中可以看出, 第 1 主成分 (PC1) 主要综合了 Rb, Cs 和 Tl 3 种元素含量信息, 第 2 主

成分 (PC2) 主要综合了 $\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$, δ^2H 和 $\delta^{18}O$ 4 种参数信息, 第 3 主成分 (PC3) 主要综合了 Se 和 Cd 2 种元素含量信息, 第 4 主成分 (PC4) 主要综合了 Ba 和 Bi 2 种元素含量信息, 第 5 主成分 (PC5) 主要综合了 As, Sr 和 Mo 3 种元素含量信息。

利用 PC1 和 PC2 的标准化得分做图, 如图 1 所示, 可对德国, 意大利, 澳大利亚, 新西兰, 中国, 奥地利的牛奶样品进行一定的区分, 其中中国与澳大利亚和新西兰的差异比较明显, 欧洲地区的样品存在一定的交叉性, 中国与西班牙和德国的差异性较大。

2.3 牛奶中元素含量和稳定同位素比值的聚类分析

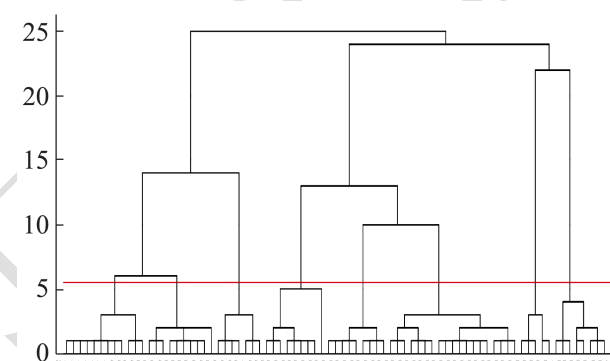


图2 不同产地牛奶的系统聚类树图

Fig.2 The Dendrogram of cluster analysis from different country

注: A: 德国; B: 西班牙; C: 意大利; D: 澳大利亚; E: 新西兰; F: 中国; G: 奥地利。

实验利用前 5 个主成分的标准化得分进行聚类分析 (系统聚类法, 聚类距离采用欧氏距离, 聚类方法为 Ward 法), 结果如图 2 所示, 利用多元素和稳定同位素比组合参数的主成分分析可对不同产地的牛奶进行分类, 其中在聚类距离 5.50 处将树型图切割, 牛奶样品被分为 8 类, 第 1 类主要为德国和意大利牛奶样品 (包括 1 个中国牛奶样品), 第 2 类主要为中国样品 (包括 2 个西班牙和 2 个意大利牛奶样品), 第 3 类主要为奥地利牛奶样品 (包括 1 个的德国和 1 个意大利牛奶样品), 第 4, 5, 6 类主要为澳大利亚牛奶样品 (包括 2 个西班牙和 1 个新西兰牛奶样品), 第 7, 8 类主要为新西兰牛奶样品 (包括了 1 个澳大利亚和 1 个德国牛奶样品)。

2.4 牛奶产地的判别分析

对不同产地牛奶样品中 10 种特征矿物元素和 4 种稳定同位素比测定指标的差异分析, 主成分分析和

聚类分析结果可以看出,利用多元素和稳定同位素比组合参数对牛奶产地判别具有一定的可行性。为了进一步了解各指标对牛奶产地的判别情况,对上述参数进行逐步判别分析,筛选出牛奶产地判别的有效变量并建立判别模型。

对 10 种矿物元素指标,4 种稳定同位素比以及组合指标(元素和稳定同位素比值)进行判别分析,结果如表 3 所示,仅 10 种矿物元素进行逐步判别分析后

$$\begin{aligned}
 Y_{\text{德国}} &= -329.08 + 0.19As + 155.26Se + 1.86Rb - 0.36Sr + 64.34Mo - 150.08Cs - 2.42Ba + 5.53Tl - 17.26\delta^{13}C + 30.86\delta^{15}N - 0.20\delta^2H \\
 Y_{\text{西班牙}} &= -306.70 + 0.59As + 178.04Se + 1.80Rb + 0.43Sr + 87.86Mo - 138.96Cs - 2.51Ba + 6.82Tl - 16.33\delta^{13}C + 27.78\delta^{15}N + 0.11\delta^2H \\
 Y_{\text{意大利}} &= -285.46 + 0.48As + 151.38Se + 1.65Rb - 1.34Sr + 103.47Mo - 123.78Cs + 0.97Ba + 5.32Tl - 14.89\delta^{13}C + 28.71\delta^{15}N - 0.37\delta^2H \\
 Y_{\text{澳大利亚}} &= -424.06 + 0.02As + 186.47Se + 1.91Rb + 3.21Sr + 29.67Mo - 159.45Cs - 3.42Ba + 8.82Tl - 20.37\delta^{13}C + 34.48\delta^{15}N + 0.49\delta^2H \\
 Y_{\text{新西兰}} &= -479.08 + 0.04As + 219.31Se + 2.30Rb + 2.46Sr + 10.05Mo - 153.03Cs - 1.26Ba + 8.72Tl - 22.17\delta^{13}C + 33.58\delta^{15}N + 0.29\delta^2H \\
 Y_{\text{中国}} &= -227.04 + 0.41As + 152.27Se + 1.69Rb + 0.54Sr + 57.05Mo - 87.98Cs - 5.23Ba + 3.59Tl - 13.88\delta^{13}C + 20.16\delta^{15}N - 0.59\delta^2H \\
 Y_{\text{奥地利}} &= -429.81 + 0.52As + 148.57Se + 2.47Rb - 2.33Sr + 100.68Mo - 173.93Cs - 4.14Ba + 6.61Tl - 19.09\delta^{13}C + 33.14\delta^{15}N - 0.70\delta^2H
 \end{aligned}$$

表 3 不同国家牛奶的判别分析

Table 3 The cross validation classification results of linear discriminant analysis of milk from different country

国家	交叉检验/%				
	元素	$\delta^{13}C, \delta^{15}N, \delta^2H$	$\delta^{13}C, \delta^{15}N, \delta^2H, \delta^{18}O$	元素和 $\delta^{13}C, \delta^{15}N, \delta^2H$	元素和 $\delta^{13}C, \delta^{15}N, \delta^2H, \delta^{18}O$
德国	88.9	100	100	88.9	88.9
西班牙	25.0	100	100	75.0	75.0
意大利	42.9	100	100	85.7	85.7
澳大利亚	68.6	68.6	77.1	100	100
新西兰	91.7	75.0	83.3	83.3	83.3
中国	28.6	100	100	100	100
奥地利	80.0	100	80.0	100	100
整体	67.1	82.3	86.1	92.4	93.7

对判别结果进行交叉检验,西班牙正确判别率 75%,德国正确判别率 88.9%,新西兰正确判别率 83.3%,意大利正确判别率 85.7%,澳大利亚,奥地利和中国的正确判别率 100%,整体正确判别率 92.4%。

对来自不同地区的样品进行鉴别归类时,可将各样品的测定结果分别代入上述判别模型,比较各地域 Y 值大小,盲样归属于 Y 值最大的地域。

3 结论

本实验通过电感耦合等离子质谱仪(ICP-MS),同位素比质谱仪(IRMS)对牛奶中 Li、Na 等 40 种矿物元素含量和碳、氮、氢、氧稳定同位素比值进行测定。通过多元统计分析分别对德国、西班牙、意大利、澳大利亚、新西兰、中国和奥地利七个区域 79 个牛奶的碳、氮、氢、氧稳定同位素比值和多元检测指标进行方差分析、主成分分析、聚类分析和判别分析。研究表明,As、Se、Rb、Sr、Mo、Cs、Ba、Tl、 $\delta^{13}C$ 、 $\delta^{15}N$ 和 δ^2H 组合指标对牛奶地域的整

交叉检验正确率为 67.1%。采用稳定同位素比值进行判别分析,交叉检验正确率均大于 80%,由于 δ^2H 和 $\delta^{18}O$ 均源自牛奶中 H_2O , 存在一定的相关性, $\delta^{18}O$ 指标引入前后整理判别率并未明显提升,因此采用矿物元素和 $\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$, δ^2H 组合指标对牛奶产地进行判别分析。在 0.05 显著水平下,将 As, Se, Rb, Sr, Mo, Cs, Ba, Tl, $\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$, δ^2H 总计 11 个指标参数引入模型,所建立的判别函数:

体判别率 92.4%。该方法可为牛奶的产地分析提供一些必要的信息,可作为牛奶产地研究的有效参考指标。

参考文献

- [1] Kelly S, Heaton K, Hoogewerf J. Tracing the geographical origin of food: The application of multi-element and multi-isotope analysis [J]. Trends in Food Science & Technology, 2005, 16: 555-567
- [2] Franke B M, Gremaud G, Hadorn R, et al. Geographic origin of meat-elements of an analytical approach to its authentication [J]. European Food Research and Technology, 2005, 221: 493-503
- [3] Schwägele F. Traceability from a European perspective [J]. Meat Science, 2005, 71: 164-173
- [4] 中华人民共和国食品安全法.[2019-01-07]. http://www.npc.gov.cn/npc/xinwen/2019-01/07/content_2070256.htm.
- [5] Guo B L, Wei Y M, Pan J R, et al. Stable C and N isotope

- ratio analysis for regional geographical traceability of cattle in China [J]. *Food Chemistry*, 2010, 118: 915-920
- [6] Sun S M, Guo B L, Wei Y M, et al. Multi-element analysis for determining the geographical origin of mutton from different regions of China [J]. *Food Chemistry*, 2011, 124: 1151-1156
- [7] 郭波莉,孙淑敏,魏益民.羊肉产地指纹图谱溯源技术研究[M].1版.北京:科学出版社,2014
- GUO Bo-li, SUN Shu-min, WEI Yi-min. Study on the Traceability Technology of Fingerprint Map of Lamb Geographical Origin [M]. 1st version, Beijing: Science Press, 2014
- [8] 刘美玲,高玎玲,闫鑫磊,等.矿物质指纹技术在动物性食品产地溯源中的应用[J].*中国食物与营养*,2017,23(5): 9-13
- LIU Mei-ling, GAO Ding-ling, YAN Xin-lei, et al. Application of mineral fingerprint in geographical origin tracing of animal-derived foods [J]. *Food and Nutrition in China*, 2017, 23(5): 9-13
- [9] Selih V S, Sala M, Drgan V. Multi-element analysis of wines by ICP-MS and ICP-OES and their classification according to geographical origin in Slovenia [J]. *Food Chemistry*, 2014, 153: 414-423
- [10] Geana I, Iordache A, Ionete R, et al. Geographical origin identification of Romanian wines by ICP-MS elemental analysis [J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(2-3): 1125-1134
- [11] Raco B, Dotsika E, Poutoukis D, et al. O-H-C isotope ratio determination in wine in order to be used as a fingerprint of its regional origin [J]. *Food Chemistry*, 2015, 168: 588-594
- [12] Spyridon P, Artemis L, Ioanna K, et al. Characterization and differentiation of botanical and geographical origin of selected popular sweet cherry cultivars grown in Greece [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2018, 72: 48-56
- [13] 邵圣枝,陈元林,张永志,等.稻米中同位素与多元素特征及其产地溯源 PCA-LDA 判别[J].*核农学报*,2015,29(1): 119-127
- SHAO Sheng-zhi, CHEN Yuan-lin, ZHANG Yong-zhi, et al. Determination of the geographic origin of rice by PCA-LDA based on the stable isotopes and multi-elements concentrations [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2015, 29(1): 119-127
- [14] 赵海燕,郭波莉,魏益民.谷物原产地溯源技术研究进展[J].*核农学报*,2011,25(4):768-772
- ZHAO Hai-yan, GUO Bo-li, WEI Yi-min. Determining geographical origin of cereals [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2011, 25(4): 768-772
- [15] 袁玉伟,张永志,付海燕,等.茶叶中同位素与多元素特征及其原产地 PCA-LDA 判别研究[J].*核农学报*,2013,27(1): 47-55
- YUAN Yu-wei, ZHANG Yong-zhi, FU Hai-yan, et al. Application of PCA-LDA method to determine the geographical origin of tea based on determination of stable isotopes and multi-elements [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2013, 27(1): 47-55
- [16] Bontempo L, Camin F, Ziller L, et al. Isotopic and elemental composition of selected types of Italian honey [J]. *Measurement*, 2017, 98: 283-289
- [17] Bat K B, Eler K, Mazej D, et al. Isotopic and elemental characterisation of Slovenian apple juice according to geographical origin: Preliminary results [J]. *Food Chemistry*, 2016, 203: 86-94
- [18] 周雪巍,屈雪寅,郑楠,等.国产与进口品牌 UHT 牛奶中 17 种微量元素含量及差异分析[J].*中国农业科技导报*,2015, 17(3):84-91
- ZHOU Xue-wei, QU Xue-yin, ZHENG Nan, et al. Contents of 17 trace elements and difference analysis in UHT milk of local and import brands [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2015, 17(3): 84-91
- [19] Osorio M T, Koidis A, Papademas P. Major and trace elements in milk and Halloumi cheese as markers for authentication of goat feeding regimes and geographical origin [J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2015, 68(4): 573-581
- [20] 梁莉莉,陈剑,侯敬丽,等.元素分析-稳定同位素质谱技术在婴幼儿配方奶粉奶源地追溯中的应用[J].*质谱学报*,2015, 36(1): 66-71
- LIANG Li-li, CHEN Jian, HOU Jing-li, et al. Traces of infant formula milk powders by elemental analysis-stable isotope ratio mass spectrometry [J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2015, 36(1): 66-71
- [21] Camin F, Wehrens R, Bertoldi D, et al. H, C, N and S stable isotopes and mineral profiles to objectively guarantee the authenticity of grated hard cheeses [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 711: 54-59
- [22] Marijan N, Doris P, Nives O. Discrimination between Slovenian cow, goat and sheep milk and cheese according to geographical origin using a combination of elemental content and stable isotope data [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2016, 52: 16-23
- [23] Licata P, Di B G, Potorti A G, et al. Determination of trace elements in goat and ovine milk from Calabria (Italy) by

- ICP-AES [J]. Food Additives & Contaminants Part B-Surveillance, 2012, 5(4): 268-271
- [24] Nina B, Maja D, Marija S, et al. Trace element levels in raw milk from northern and southern regions of Croatia [J]. Food Chemistry, 2011, 127: 63-66
- [25] Tricia H, Radojko J, Lian J B, et al. Development of a method for the elemental analysis of milk powders using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS) and its potential use in geographic sourcing [J]. Talanta, 2018, 186: 670-677
- [26] Luo D H, Dong H, Luo H Y, et al. Multi-element (C, N, H, O) stable isotope ratio analysis for determining the geographical origin of pure milk from different regions [J]. Food Analytical Methods, 2016, 9: 437-442
- [27] Scampicchio M, Mimmo T, Capici C, et al. Identification of milk origin and process-induced changes in milk by stable isotope ratio mass spectrometry [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60: 11268-11273
- [28] Camin F, Perini M, Colombari G, et al. Influence of dietary composition on the carbon, nitrogen, oxygen and hydrogen stable isotope ratios of milk [J]. Rapid Communication Mass Spectrometry, 2008, 22: 1690-1696
- [29] Dong H, Xiao K J, Luo D H. Stability of carbon and nitrogen isotopic compositions of the protein extracted from milk and their potential as “fingerprints” of geographical origin [J]. RSC Advances, 2017, 7: 18946-18952
- [30] GB 5009.268-2016 食品安全国家标准食品中多元素的测定[S]
GB 5009.268-2016 National Food Safety Standard Determination of Multiple Elements in Food [S]
- [31] James F C, Lesley A C. Food Forensics Stable Isotopes as a Guide to Authenticity and Origin [M]. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2017: Chapter 3 Interpreting Stable isotope Ratios in Plants and Plant-base Foods
- [32] 孙淑敏,郭波莉,魏益民,等.羊组织中碳、氮同位素组成及地域来源分析[J].中国农业科学,2010,43(8):1670-1676
SUN Shu-min, GUO Bo-li, WEI Yi-min, et al. Analysis of stable carbon and nitrogen isotope compositions and geographical origins of sheep tissues [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(8): 1670-1676

(上接第 226 页)

- [22] 张琪,朱丹,牛广财,等.沙棘果酒发酵动力学及其抗氧化活性[J].食品与发酵工业,2019,45(15):53-58
ZHANG Qi, ZHU Dan, NIU Guang-cai, et al. Fermentation kinetics and antioxidant activity of sea buckthorn wine [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(15): 53-58
- [23] 孙时光,左勇,张诗琪,等.基于发酵动力学模型的桑椹果酒发酵过程中抗氧化活性[J].食品工业,2019,40(8):146-151
SUN Shi-guang, ZUO Yong, ZHANG Shi-qi, et al. Antioxidant activity of *Mulberry* wine during fermentation based on fermentation kinetics model [J]. The Food Industry, 2019, 40(8): 146-151
- [24] 李明月,郝雅兰,樊明涛,等.石榴酒酿造过程中的多酚及其抗氧化性[J].天津农业科学,2014,20(11):19-23.
LI Ming-yue, HAO Ya-lan, FAN Ming-tao, et al. Polyphenol content and antioxidant properties of pomegranate wine in production process [J]. Tianjin Agricultural Sciences, 2014, 20(11): 19-23
- [25] 张琪,朱立斌,朱丹,等.黑加仑果酒发酵动力学研究[J].中国酿造,2020,39(2):125-128
ZHANG Qi, ZHU Li-bin, ZHU Dan, et al. Fermentation kinetics of blackcurrant fruit wine [J]. China Brewing, 2020, 39(2): 125-128
- [26] 代志凯,印遇龙,阮征.微生物发酵动力学模型及其参数拟合的软件实现[J].计算机与应用化学,2011,28(4):437-441
DAI Zhi-kai, YIN Yu-long, RUAN Zheng. Microbial fermentation kinetic model and its parameters estimation by software [J]. Computers and Applied Chemistry, 2011, 28(4): 437-441
- [27] 吴树坤,邓杰,范勇,等.山葡萄酒发酵动力学及抗氧化活性研究[J].食品与发酵工业,2018,44(4):42-48
WU Shu-kun, DENG Jie, FAN Yong, et al. Fermentation kinetics and antioxidant activity of mountain *Vitis amurensis* wine [J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(4): 42-48