

元素分析/液相色谱-碳同位素比值质谱法在纯正 苹果汁掺假鉴别中的应用

谭梦茹¹, 张睿², 费晓庆^{2*}, 吴斌², 沈崇钰², 丁涛², 刘芸²

(1. 无锡市药品安全检验检测中心, 无锡 214000; 2. 江苏出入境检验检疫局食品实验室, 南京 210001)

摘要: **目的** 建立一种鉴别检测苹果汁掺假情况的元素分析/液相色谱-同位素比值质谱法(elemental analysis/liquid chromatography-isotope ratio mass spectrometry, EA/LC-IRMS)。 **方法** 通过对不同产区不同种类118个纯正苹果汁的糖、有机酸、果糖、葡萄糖、二糖、寡糖碳同位素比值($\delta^{13}\text{C}$ 值)的测定, 建立纯正苹果汁同位素数据库进而提出纯正苹果汁应满足的 $\delta^{13}\text{C}$ 值要求。 **结果** 有机酸和糖差值 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{O-S}}$ 在-1.38‰至1.09‰范围内, 果糖和葡萄糖差值 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{F-G}}$ 在-0.70‰至0.57‰范围内, 而各组分最大差值 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{max}} < 4.36$ ‰。对市售105个苹果汁进行检测, 采用本方法检出32个阳性样品, 而采用本实验室的糖浆标志物法仅检出12个阳性样品。 **结论** 本方法大大提高了苹果汁的掺假鉴别, 有很大的实际应用潜力。

关键词: 元素分析; 液相色谱; 稳定同位素质谱; 苹果汁掺假

Application of elemental analysis/liquid chromatography-isotope ratio mass spectrometry in detection of pure apple juice adulteration

TAN Meng-Ru¹, ZHANG Rui², FEI Xiao-Qing^{2*}, WU Bin², SHEN Chong-Yu², DING Tao², LIU Yun²

(1. Institute for Drug Control of Wuxi, Wuxi 214000, China; 2. Laboratory of Food, Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for adulteration identification of apple juice by elemental analysis/liquid chromatography-isotope ratio mass spectrometry (EA/LC-IRMS). **Methods** Based on the individual $\delta^{13}\text{C}$ values of sugar, organic acid, fructose, glucose, disaccharide, oligosaccharide carbon isotope ratios collected for 118 pure apple juices from different producing areas with different varieties, the pure apple juice isotope database was established and the $\delta^{13}\text{C}$ value limits for the pure apple juice were proposed. **Results** The $\delta^{13}\text{C}$ difference between organic acid and sugar ($\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{O-S}}$) was -1.38‰~1.09‰, $\delta^{13}\text{C}$ difference between fructose and glucose ($\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{F-G}}$) was -0.70‰~0.57‰, and the maximum difference between all $\delta^{13}\text{C}$ values ($\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{max}}$) should be less than 4.36‰. Under the pure apple juice criteria, LC/EA-IEMS method confirmed 32 positive samples, while the syrup marker method only detected 12 samples among 105 commercial samples. **Conclusion** The novel developed method represents a significant improvement, which has good potential in practical application.

KEY WORDS: elemental analysis; liquid chromatography; isotope ratio mass spectrometry; apple juice adulteration

基金项目: 江苏出入境检验检疫局科技计划项目(2015KJ31)

Fund: Supported by Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of Science and Technology Plan Projects (2015KJ31)

*通讯作者: 费晓庆, 高级工程师, 主要研究方向为食品分析与食品掺假鉴别。E-mail: dii01208@163.com

*Corresponding author: FEI Xiao-Qing, Senior Engineer, Laboratory of Food, Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China. E-mail: dii01208@163.com

1 引言

由于果汁产品既具有水果的天然风味,且富含水果中的营养成分,因此深受广大消费者喜爱^[1]。根据WHO的报告^[2],市售纯正果汁产品类型主要是橙汁、苹果汁、葡萄汁等。纯正苹果汁中含有糖、有机酸、纤维素、维生素、氨基酸、黄酮类化合物等物质^[3-5],具有较高的营养价值。我国的苹果种植面积和产量均居于世界前列,2014年我国苹果产量为3849.1万吨,进出口总量为104.35万吨^[6]。近年来,纯正苹果汁在果汁消费市场中所占比重在逐年增加,苹果汁加工产品约占苹果产量的50%,有广阔的市场前景。

在国际食品法典委员会(Codex Alimentarius Commission, CAC)关于果汁的标准(CODEX STAN 247-2005)^[7]中指出,如果在纯正果汁中添加了糖或有机酸,需要在标签上注明。同样GB 7718-2011《预包装食品标签通则》^[8]指出,配料表中必须列出在制造或加工食品时所使用的并存在于产品中的任何物质。2012年欧盟发布了第2012/12/EU号指令^[9],规定纯正果汁中不允许添加糖类成分。目前,市场上销售的大量纯正苹果汁在标签上都会标注未添加糖、有机酸等,如果添加了这些物质但是未注明,则视为违反法规的掺假行为。

果汁掺假问题是一个严重的经济问题和社会问题,不仅会造成消费者的经济利益损失,还会影响正规果汁企业的健康发展,造成果汁行业的秩序混乱。因此,开发出灵敏有效的鉴别果汁掺假的方法具有重要意义。目前关于果汁掺假鉴别方法主要有高效液相色谱-串联质谱法^[10]、裂解质谱法^[11]、电子鼻^[12]、毛细管电泳法^[13]、红外光谱法^[14]、气相色谱-串联质谱法^[15]等。但是由于果汁中内源性物质和外源性添加物质在结构和特性上的相似性,仅仅是天然来源或人工合成的差异,以上这些方法不足以较好地鉴别出果汁掺假。

近年来,稳定同位素技术已经发展为解决食品掺假及产地溯源问题的一个强有力手段。目前,通过该技术可实现对各种食品的掺假鉴定(蜂蜜、油脂、葡萄酒、调味品等)以及溯源(如果汁、乳制品和蔬菜等)^[16-19]。通过碳-3和碳-4两种不同光合作用代谢途径所得产物的碳同位素比值($\delta^{13}\text{C}$ 值)的差异,可以鉴别纯正果汁中碳-4植物糖和碳-4来源的有机酸的掺入^[20]。但是,当掺入碳-3来源的甜味剂或有机酸时,仅仅通过元素分析-同位素比值质谱法测定样本的 $\delta^{13}\text{C}$ 值无法有效地鉴别纯正果汁掺假。有相关研究表明^[21],液相色谱-同位素比值质谱法(liquid chromatography-isotope ratio mass spectrometry, LC-IRMS)的引入可以有效鉴别碳-3来源物质的掺假。

目前尚无采用元素分析/液相色谱-同位素比值质谱法(elemental analysis/liquid chromatography-isotope ratio mass spectrometry, EA/LC-IRMS)研究纯正苹果汁掺假的报道,

本研究通过对不同产区不同种类纯正苹果汁的糖、有机酸、果糖、葡萄糖、二糖、寡糖 $\delta^{13}\text{C}$ 值的测定,建立了纯正苹果汁 $\delta^{13}\text{C}$ 值数据库,提出纯正苹果汁应满足的 $\delta^{13}\text{C}$ 值要求。根据这个要求,分别对糖浆、自制掺假苹果汁及市售苹果汁进行测定,建立了苹果汁真伪鉴别的新应用。本方法的建立旨在为有关监管部门进一步开展苹果汁品质、真伪鉴别的监管工作提供科学根据和技术支持,对保护消费者权益和维护果汁消费市场稳定方面起到重要作用。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Flash 2500型元素分析仪、Survey液相色谱仪和DELTA V Advantage同位素质谱仪(美国Thermo Scientific公司);FD115型恒温干燥箱(德国Binder公司);5 mm×3.5 mm锡杯(英国Element microanalysis公司);RJ-LDL-50G型低速大容量多管离心机(无锡市瑞江分析仪器有限公司);WH-861型涡旋混合器(太仓市华利达实验设备有限公司);JYZ-E6型榨汁机(九阳股份有限公司产品);Milli-Q超纯水仪(美国Millipore公司)。

碳同位素标准物质 Beet Sugar(IA-R005, $\delta^{13}\text{C}$ 值-26.03‰,英国Sercon公司);过二硫酸钠和高纯磷酸(纯度99.0%,美国Sigma-Aldrich公司);丙酮、硫酸、氢氧化钙(分析纯,南京化学试剂有限公司)。

2.2 材料

所有的118个苹果样品来自于果园和超市,选取包括美国、新西兰、日本、中国(陕西、山西、山东、河南、甘肃)等不同地区的苹果,苹果的种类包括冰糖富士、蛇果、黄金帅、姬娜果、嘎啦果、喜多果等。选取新鲜、饱满、无病斑、无划痕的苹果,去除果梗、果核和果皮,切成瓣状放入榨汁机中得到纯正苹果汁。

105个市售苹果汁样品均来自超市或者生产企业,样品来源可靠,本研究所选用的市售苹果汁样本均在标签上标明为100%苹果汁样本。

2.3 实验方法

2.3.1 样品前处理

样品前处理过程参考果汁中糖 $\delta^{13}\text{C}$ 值的检测标准^[22,23]。取50 mL天然或者市售果汁样品,在3000 r/min离心5 min,以除去果汁中的固体果渣成分。向所得上清液中加入2.0 g氢氧化钙沉淀有机酸,并于90℃水浴中静置3 min,再3000 r/min离心5 min,所得上清液用于果汁中糖 $\delta^{13}\text{C}$ 值($\delta^{13}\text{C}_\text{S}$)的测定,所得沉淀用于果汁中有机酸的 $\delta^{13}\text{C}$ 值($\delta^{13}\text{C}_\text{O}$)的测定。

果汁中果糖、葡萄糖、二糖、寡糖($\delta^{13}\text{C}_\text{F}$ 、 $\delta^{13}\text{C}_\text{G}$ 、 $\delta^{13}\text{C}_\text{D}$ 、 $\delta^{13}\text{C}_\text{OS}$)等的 $\delta^{13}\text{C}$ 值测定:用水稀释上述上清液30倍,混匀后经0.22 μm的水相滤膜至进样瓶中待测。

果汁中总糖的 $\delta^{13}\text{C}$ 值($\delta^{13}\text{C}_S$)测定: 用 0.1 mol/L 硫酸溶液调节上清液的 pH 至 5.0, 于 4 °C 下过夜沉淀, 用 5 μL 微量进样器移取 1 μL 上清液至 5 mm \times 3.5 mm 锡杯中待测。

果汁中有机酸的 $\delta^{13}\text{C}$ 值($\delta^{13}\text{C}_O$)测定: 所得有机酸沉淀, 用 40 mL 去离子水洗 3 次(以除去残留糖), 然后用 40 mL 丙酮洗 3 次(以除去脂质), 所得沉淀于 75 °C 恒温干燥后, 称取约 0.1 mg 至 5 mm \times 3.5 mm 锡杯中待测。

每个样各组分平行测定 3 次取平均值, 绝对差值不超过 0.30 ‰。

2.3.2 元素分析/液相色谱-同位素比值质谱条件

(1)元素分析仪条件

氧化管温度: 950 °C; 还原管温度: 680 °C; 气相色谱柱温箱温度: 50 °C; 载气氦气流速: 120 mL/min; 氧气流速: 250 mL/min; 氧化时间: 3 s。

(2)液相色谱条件

色谱柱: Carbomix Ca-NP5(300 mm \times 7.8 mm, 5 μm , Sepax Technologies, USA); 柱温: 85 °C; 流动相: 水; 流速: 300 $\mu\text{L}/\text{min}$; 氧化剂(1.12 mol/L 过二硫酸钠溶液和 0.33 mol/L 磷酸溶液)流速: 40 $\mu\text{L}/\text{min}$, 氧化反应管温度: 99.9 °C, 进样体积: 5 μL 和 25 μL , 分别对应于果糖、葡萄糖和二糖、寡糖的测定。

(3)同位素质谱条件

离子源: 电子轰击离子源(electron impact ion source EI); 氦气压力: 1.0 bar; 二氧化碳压力: 1.0 bar; 离子源电压: 2.97 kV; 真空度: 1.8×10^{-6} mbar。

2.3.3 样品 $\delta^{13}\text{C}$ 值的测定

样品的 $\delta^{13}\text{C}$ 值由 Isodat 3.0 软件直接给出。 $\delta^{13}\text{C}$ 值的计算是基于一个国际标准物质 Vienna peedee belemnite standard (VPDB), 计算公式为:

$$\delta^{13}\text{C}=(R_{\text{sample}}-R_{\text{VPDB}})/R_{\text{VPDB}}\times 1000 \quad (1)$$

这里 R_{sample} 为样品的 ^{13}C 与 ^{12}C 的同位素比值 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $R_{\text{VPDB}}=0.0112372$ 。

在测定样品时, 每间隔 10 个样品需测定一次碳同位素标准物质 Beet Sugar 进行系统稳定性评价, 要求所测得的 $\delta^{13}\text{C}$ 值与证书标明值相差小于 0.30 ‰。

3 结果与分析

3.1 纯正苹果汁各组分的 $\delta^{13}\text{C}$ 值测定

首先采用 EA/LC-IRMS 法对纯正苹果汁的糖和有机酸、果糖、葡萄糖、二糖和寡糖的 $\delta^{13}\text{C}$ 值进行测定, 结果如表 1。某一纯正苹果汁的 LC-IRMS 色谱图(进样体积: 5 μL)见图 1。由此可见, 本研究所建立方法可以对苹果汁中寡糖、二糖、葡萄糖和果糖等成分的 $\delta^{13}\text{C}$ 值进行有效测定。

同时作为 EA/LC-IRMS 法的重现性评估, 选取一个纯正苹果汁样本, 连续 20 d 检测该样本的 $\delta^{13}\text{C}_S$ 、 $\delta^{13}\text{C}_O$ 、 $\delta^{13}\text{C}_F$ 、 $^{13}\text{C}_G$ 、 $\delta^{13}\text{C}_D$ 和 $\delta^{13}\text{C}_{OS}$, 所得结果的标准偏差在 0.19‰

至 0.30‰范围内(见表 2), 可见本方法的数据重现性较好, 能满足检测纯正苹果汁中各组分 $\delta^{13}\text{C}$ 值的要求。

表 1 EA/LC-IRMS 测试纯正苹果汁的 $\delta^{13}\text{C}$ 值
Table 1 The $\delta^{13}\text{C}$ values of pure apple juices by EA/LC-IRMS

参数	均值/‰	范围/‰
糖 $\delta^{13}\text{C}_S$	-25.88	-24.22~-27.29
有机酸 $\delta^{13}\text{C}_O$	-26.43	-23.09~-28.42
有机酸和糖差值 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{O-S}$	-0.55	-1.38~-1.09
果糖 $\delta^{13}\text{C}_F$	-25.72	-24.16~-28.42
葡萄糖 $\delta^{13}\text{C}_G$	-26.21	-24.32~-28.60
二糖 $\delta^{13}\text{C}_D$	-23.93	-21.51~-26.09
寡糖 $\delta^{13}\text{C}_{OS}$	-27.23	-25.71~-28.73
果糖和葡萄糖差值 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{F-G}$	0.49	-0.70~-0.57
各组分最大差值 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{max}}$	3.63	2.56~4.36

表 2 EA/LC-IRMS 测试一个纯正苹果汁的 $\delta^{13}\text{C}$ 值结果($n=20$)
Table 2 The $\delta^{13}\text{C}$ values of a pure apple juice by EA/LC-IRMS ($n=20$)

参数	均值/‰	SD/‰
糖 $\delta^{13}\text{C}_S$	-25.72	0.26
有机酸 $\delta^{13}\text{C}_O$	-26.25	0.29
果糖 $\delta^{13}\text{C}_F$	-25.66	0.19
葡萄糖 $\delta^{13}\text{C}_G$	-25.83	0.22
二糖 $\delta^{13}\text{C}_D$	-25.17	0.28
寡糖 $\delta^{13}\text{C}_{OS}$	-27.69	0.30

结合 EA-IRMS 和 LC-IRMS 2 种方法的各种同位素值结果, 计算各个纯正苹果汁的 3 个参数: 有机酸和糖的 $\delta^{13}\text{C}$ 差值 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{O-S}$ 、果糖和葡萄糖 $\delta^{13}\text{C}$ 之差 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{F-G}$ 和各组分 $\delta^{13}\text{C}$ 最大差值 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{max}}$ 。从表 1 可以看出, $\Delta\delta^{13}\text{C}_{O-S}$ 在 -1.38‰至 1.09‰范围内。果糖和葡萄糖的 $\delta^{13}\text{C}$ 较为接近, 所得的 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{F-G}$ 在 -0.70‰至 0.57‰范围内。由于寡糖和二糖的差值较大, 导致 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{max}}$ 偏大, 在 2.56‰至 4.36‰范围内, 即不能超过 4.36‰。根据上述数据, 提出纯正苹果汁应该符合以下要求: $\Delta\delta^{13}\text{C}_{O-S}$ 应在 -1.38‰至 1.09‰范围内, $\Delta\delta^{13}\text{C}_{F-G}$ 应该在 -0.70‰至 0.57‰范围内, 而 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{max}}$ 不超过 4.36‰。对于不符合以上任何一项要求的苹果汁样品, 将被认为是掺假苹果汁。

3.2 对常见糖浆和自制掺假苹果汁样品的 $\delta^{13}\text{C}$ 值测定

选取 4 个常见的糖浆(大米糖浆、甜菜糖浆、甘蔗糖

浆、玉米糖浆)进行了检测,其中大米糖浆、甜菜糖浆为碳-3 植物糖,而甘蔗糖浆、玉米糖浆为碳-4 植物糖。另外选取 1 个纯正苹果汁样本,分别掺入大米糖浆和玉米糖浆,掺入比例为 10%,标为掺假苹果汁 1 和掺假苹果汁 2。采用 EA/LC-IRMS 测定上述样本的 $\delta^{13}\text{C}_\text{S}$ 、 $\delta^{13}\text{C}_\text{O}$ 、 $\delta^{13}\text{C}_\text{F}$ 、 $^{13}\text{C}_\text{G}$ 、 $\delta^{13}\text{C}_\text{D}$ 和 $\delta^{13}\text{C}_\text{O}_\text{S}$, 详细结果见表 3。

从表 3 中可以看出,4 种糖浆均未能检出有机酸。从大米糖浆的结果,可以看出其 $\Delta\delta^{13}\text{C}_\text{F-G}$ 和 $\Delta\delta^{13}\text{C}_\text{max}$ 超过了 3.1 中所得出的限量要求,其 LC-IRMS 色谱图如图 2,从该图可见,大米糖浆中各个糖的组成情况与图 1 中纯正苹果汁差别较大。甜菜糖浆原料是甜菜蔗糖,可以进一步通过转化酶转化成果糖、葡萄糖,因此其测定结果中仅有果糖、

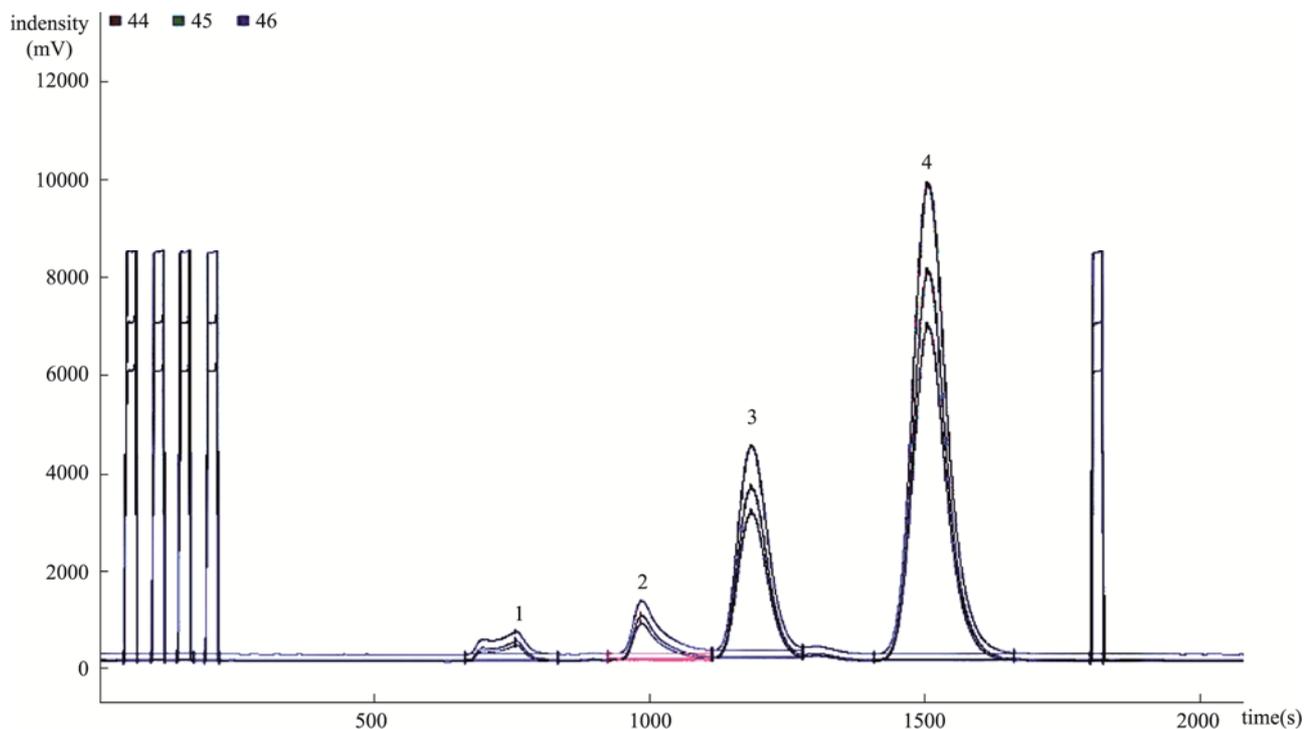


图 1 纯正苹果汁的 LC-IRMS 色谱图

Fig. 1 LC-IRMS chromatogram of pure apple juice

1.寡糖(oligosaccharides);2.二糖(disaccharide);3.葡萄糖 (glucose);4.果糖(fructose)

表 3 常见糖浆和自制掺假苹果汁的 $\delta^{13}\text{C}$ 值(‰, $n=3$)

Table 3 The $\delta^{13}\text{C}$ values of representative syrups and self-made adulterated apple juices (‰, $n=3$)

参数	大米糖浆	甜菜糖浆	玉米糖浆	甘蔗糖浆	掺假果汁 1	掺假果汁 2
$\delta^{13}\text{C}_\text{S}$	-26.48	-24.73	-12.13	-10.45	-25.89	-24.27
$\delta^{13}\text{C}_\text{O}$	ND	ND	ND	ND	-26.97	-27.01
$\Delta\delta^{13}\text{C}_\text{O-S}$	-	-	-	-	-1.08	-2.74
$\delta^{13}\text{C}_\text{F}$	-25.28	-24.02	-10.52	ND	-25.37	-23.91
$\delta^{13}\text{C}_\text{G}$	-27.72	-25.85	-13.69	ND	-26.27	-24.87
$\delta^{13}\text{C}_\text{D}$	-22.91	ND	-10.11	-10.82	-23.76	-22.41
$\delta^{13}\text{C}_\text{O}$	-29.69	ND	-17.22	ND	-28.59	-27.18
$\Delta\delta^{13}\text{C}_\text{F-G}$	2.44	1.83	3.17	-	0.90	0.96
$\Delta\delta^{13}\text{C}_\text{max}$	6.78	1.83	6.11	-	4.83	4.77

注: ND 表示未检出。

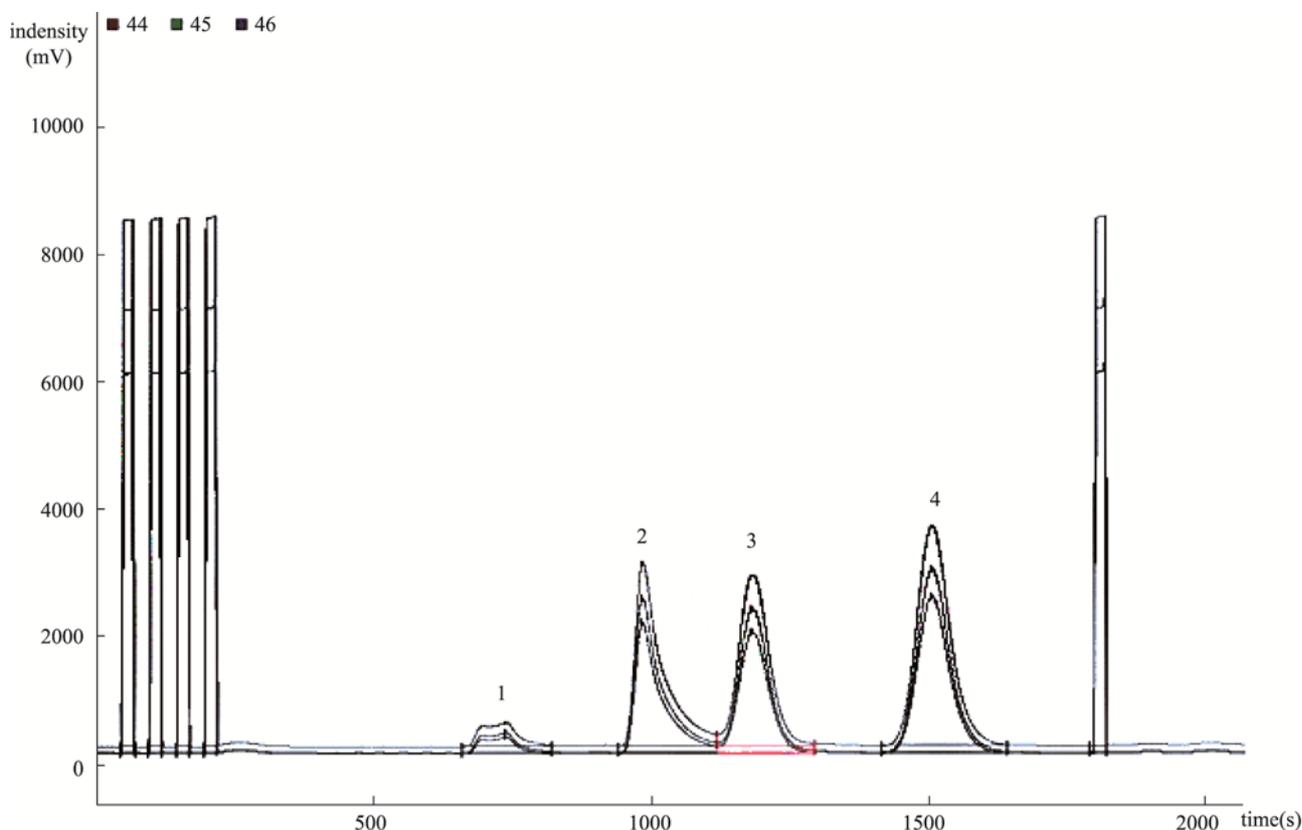


图 2 大米糖浆的 LC-IRMS 色谱图

Fig. 2 LC-IRMS chromatogram of rice syrup

1. 寡糖(oligosaccharides); 2. 二糖(disaccharide); 3. 葡萄糖 (glucose); 4. 果糖(fructose)

葡萄糖的 $\delta^{13}\text{C}$ 值, 该糖浆的 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{F-G}}$ 也超过限量要求。玉米糖浆的 2 个参数 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{F-G}}$ 和 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{max}}$ 都超过了限量要求。甘蔗糖浆中仅含有蔗糖, 无法计算各组分的差值, 但是因为甘蔗糖浆属于碳-4 植物糖, 所以其糖 $\delta^{13}\text{C}$ 值都偏正, 可以很明显地与纯正苹果汁进行区分。

同时, 掺假苹果汁 1 的 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{F-G}}$ 和 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{max}}$ 超过了限量要求, 从 $\delta^{13}\text{C}$ 值的组成情况可以判定其是掺入了碳-3 植物糖。对于掺假苹果汁 2, 由于掺入了 $\delta^{13}\text{C}$ 值偏正的玉米糖浆, 使得其 3 个参数均超过了限量要求, 另外从 $\delta^{13}\text{C}$ 值的组成情况可以判定该样本掺入了碳-4 植物糖。从上述 2 个例子可以看出, 采用本方法可以有效鉴别掺入 10% 以上糖浆的苹果汁, 并且可以从其 $\delta^{13}\text{C}$ 值的组成情况推测其掺入的糖浆类型。

3.3 市售果汁样品的 $\delta^{13}\text{C}$ 值测定

根据上述所建苹果汁掺假鉴别新方法, 采用 EA/LC-IRMS 对市售苹果汁样品的真伪情况进行研究, 样本选自超市或者果汁生产企业, 样品数总计 105 个, 同时采用本单位研发的糖浆标志物法(syrup marker method)检

测上述样本, 这些方法是采用 HPLC-MS/MS 来检测各类糖浆的特征标志物含量来鉴别样本中是否掺入糖浆。

根据测试结果, 利用 EA/LC-IRMS 法, 检测出阳性样品数达 32 个, 阳性率达 30.48%, 其 21 个鉴定为掺入碳-4 来源产物。而采用糖浆标志物的方法检出的阳性样品为 12 个, 样品阳性率为 11.43%。本研究从上述样品中选取一些代表性的样品, 进一步比较 2 种方法的检测能力, 详细结果见表 4。

从表 4 可以看出, 1 号样品 2 种方法都未检出阳性, 为纯正苹果汁。2 号样品的 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{F-G}}$ 超过限量要求, 结合其各组分的同位素分布情况可以判为碳-3 植物糖掺假, 但糖浆标志物法没有检出。3 号样品由于其糖、果糖、葡萄糖的 $\delta^{13}\text{C}$ 值均高于正常的纯正苹果汁的 $\delta^{13}\text{C}$ 值, 且其 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{F-G}}$ 和 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{max}}$ 超过了限量要求, 结合其各组分的同位素分布情况判定其掺入了碳-4 植物糖, 而糖浆标志物法没有检出。4 号样品由于其有机酸的 $\delta^{13}\text{C}$ 值高于正常纯正苹果汁的 $\delta^{13}\text{C}_{\text{O-S}}$ 值, 导致其 $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{O-S}}$ 超过限量要求, 因此判定其为碳-4 来源有机酸的掺假, 而糖浆标志物法没有检出, 从上述几个例子可以看出 EA/LC-IRMS 更为有效。

表4 EA/LC-IRMS和糖浆标志物法检测典型市售苹果汁的结果比较($n=3$)Table 4 Comparison of the detection results of representative commercial samples by EA/LC-IRMS and syrup marker method ($n=3$)

参数	1	2	3	4	5
$\delta^{13}C_S$	-25.93	-26.01	-23.05	-25.69	-26.32
$\delta^{13}C_O$	-26.45	-26.63	-26.37	-21.34	-26.17
$\Delta\delta^{13}C_{O-S}$	-0.52	-0.62	-3.32	4.35	0.15
$\delta^{13}C_F$	-26.04	-25.59	-23.13	-25.94	-25.97
$^{13}C_G$	-25.65	-26.47	-21.88	-25.41	-26.52
$\delta^{13}C_D$	-22.67	-23.04	-22.17	-22.58	-23.16
$\delta^{13}C_{OS}$	-26.28	-26.98	-25.66	-26.44	-27.49
$\Delta\delta^{13}C_{F-G}$	-0.39	0.88	-1.25	-0.53	0.55
$\Delta\delta^{13}C_{max}$	3.78	3.94	4.49	5.10	4.33
EA/LC-IRMS	合格	碳-3 糖掺假	碳-4 糖掺假	碳-4 有机酸掺假	合格
糖浆标志物法	合格	合格	合格	合格	碳-3 糖掺假

5号样品在糖浆标志物法判定为阳性的情况下,从EA/LC-IRMS法所得结果可以看出 $\Delta\delta^{13}C_{F-G}$ 和 $\Delta\delta^{13}C_{max}$ 都接近但是没有超过限量值,故无法有效鉴别。所以对于某些碳-3植物糖的掺假本法有一定局限性,可见在纯正苹果汁掺假鉴别工作中本法与其他方法结合使用更为有效。

通过上述几个典型样品的测定结果,可见本实验提出的新判定方法对于已有糖浆标志物法有更高的灵敏度,可以大大提高对于苹果汁掺假的检测能力。但是目前本方法无法解决碳-3来源有机酸掺假的问题,需要借助其他类型色谱柱利用LC-IRMS法分别测定各种有机酸的 $\delta^{13}C$ 值来实现,这将是本次研究的后续工作。

4 结论

本研究建立了EA/LC-IRMS法鉴别纯正苹果汁掺假的新技术,通过对纯正苹果汁的糖、有机酸、果糖、葡萄糖、二糖、寡糖等多指标的测定结果,分析各组分 $\delta^{13}C$ 值的差异能有效地鉴别出纯正苹果汁掺入外源性糖和有机酸的行为。同时对市售苹果汁样品进行检测,与糖浆标志物法进行对比,发现本方法的阳性检出率更高,虽然对碳-3植物糖的掺假检测性能有待改善,但新方法在纯正苹果汁掺假鉴别的灵敏度方面显示了较大优势,大大提高了掺假检测的能力。

参考文献

- [1] Gómez-Ariza JL, Villegas-Portero MJ, Bernal-Daza V. Characterization and analysis of amino acids in orange juice by HPLC-MS/MS for authenticity assessment [J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 540(1): 221–230.
- [2] World Health Organization. Fruit and Vegetables for Health: Report of a Joint FAO/WHO Workshop [C]. Fruit and vegetables for health: Report of a Joint FAO/WHO Workshop, Kobe, Japan, 2005.
- [3] Ehling S, Cole S. Analysis of organic acids in fruit juices by liquid chromatography-mass spectrometry: an enhanced tool for authenticity testing [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(6): 2229–2234.
- [4] Yamamoto A, Kawai M, Miwa T, *et al.* Determination of adulteration in apple juice by HPLC with novel optical rotation detector [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(16): 7302–7304.
- [5] Thavarajah P, Low NH. Adulteration of apple with pear juice: emphasis on major carbohydrates, proline, and arbutin [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(13): 4861–4867.
- [6] 豆常潇. 中国苹果汁出口贸易研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014.
Dou CX. China apple juice import [D]. Yangling: North West Agriculture and Forestry University, 2014.
- [7] CODEX STAN 247-2005, Codex general standard for fruit juices and nectars [S].
- [8] GB 7718-2011 预包装食品标签通则 [S]
GB 7718-2011 General rules of pre-packaged food labels [S].
- [9] 2012/12/EU Directive 2012/12/EU of the European Parliament and of the Council of 19 April [S].
- [10] Scordino M, Sabatino L, Traulo P, *et al.* HPLC-PDA/ESI-MS/MS detection of polymethoxylated flavones in highly degraded citrus juice: a quality control case study [J]. *Eur Food Res Technol*, 2011, 232(2): 275–280.
- [11] Goodacre R, Hammond D, Kell DB. Quantitative analysis of the adulteration of orange juice with sucrose using pyrolysis mass spectrometry and chemometrics [J]. *J Anal Appl Pyrol*, 1997, 40: 135–158.
- [12] 赵洁, 于海燕. 电子鼻与电子舌在饮料品质评价中的应用[J]. *上海应用技术学院学报(自然科学版)*, 2014, 14(2): 113–117.
Zhao J, Yu HY. Applications of electronic nose and electronic tongue in quality evaluation of beverages [J]. *J Shanghai Inst Tech (Nat Sci Ed)*, 2014, 2: 113–117.

- [13] Saavedra L, Garca A, Barbas C. Development and validation of a capillary electrophoresis method for direct measurement of isocitric, citric, tartaric and malic acids as adulteration markers in orange juice [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 881(1): 395–401.
- [14] 马寒露, 董英, 张孝芳, 等. 拉曼光谱法快速检测掺入梨汁的浓缩苹果汁[J]. *分析测试学报*, 2009, (5): 535–538.
Ma HL, Dong Y, Zhang XF, *et al.* Rapid determination of apple juice mingled with pear juice by Raman spectroscopy [J]. *J Instrum Anal*, 2009, 28(5): 535–538.
- [15] 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 LL, Chen J, Hou JL, *et al.* Trace of infant formula milk powders by elemental analysis-stable isotope ratio mass spectrometry [J]. *J Chin Mass Spectr Soc*, 2015, 36(1): 66–71.
- [16] 李宝丽, 朱宇轩, 邓建玲, 等. 基于 GC-MS 指纹图谱和化学计量分析鉴别预包装纯葡萄汁及葡萄汁制品[J]. *食品科学*, 2015, 36(8): 156–161.
Li BL, Zhu YX, Deng JL, *et al.* Discrimination of prepackaged pure grape juice and its commercial products based on gas chromatography-mass spectrometry fingerprints and chemometrics methods [J]. *Food Sci*, 2015, 8: 156–161.
- [17] 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 MR, Lin H, Shen CY, *et al.* Detection of fermented soy sauce adulteration using elemental analyzer-carbon isotope ratio mass spectrometry [J]. *J Chin Mass Spectr Soc*, 2015, 36(4): 334–340.
- [18] 费晓庆, 沈崇钰, 吴斌, 等. 元素分析-碳同位素比值质谱法在蜂王浆掺假鉴定中的应用[J]. *质谱学报*, 2014, 35(2): 144–148.
Fei XQ, Shen CY, Wu B, *et al.* Detection of royal jelly adulteration using elemental analyzer-carbon isotope ratio mass spectrometry [J]. *J Chin Mass Spectr Soc*, 2014, 35(2): 144–148.
- [19] 钟石林. 稳定同位素技术在果汁中的应用[J]. *分析测试学报*, 2008, 27(s1): 221–223.
Zhong SL. Application of stable isotope ratio technique to fruit juices [J]. *J Instrum Anal*, 2008, 27(s1): 221–223.
- [20] 谭梦茹, 费晓庆, 吴斌, 等. 元素分析-碳同位素比值质谱法在纯正葡萄汁掺假鉴别中的应用[J]. *分析测试学报*, 2016, 35(8): 1031–1035.
Tan MR, Fei XQ, Wu B, *et al.* Identification of authentic grape juice adulteration using elemental analysis-carbon isotope ratio mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2016, 35(8): 1031–1035.
- [21] 费晓庆, 吴斌, 沈崇钰, 等. 液相色谱/元素分析-同位素比值质谱联用法鉴定蜂蜜掺假[J]. *色谱*, 2011, 29(1): 15–19.
Fei XQ, Wu B, Shen CY, *et al.* Honey adulteration detection using liquid chromatography/ elemental analysis- isotope ratio mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2011, 29(1): 15–19.
- [22] DD ENV 12140-1997 Method for determination of stable carbon isotope ratio ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) of sugars from fruit juices, using isotope ratio mass spectrometry [S].
- [23] DD EVN13070-1998 Fruit and vegetable juices. Determination of the stable carbon isotope ratio ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) in the pulp of fruit juices. Method using isotope ratio mass spectrometry [S].

(责任编辑: 姚 菲)

作者简介



谭梦茹, 检验员, 主要研究方向为分析检测。

E-mail: tiantan1289@sina.com



费晓庆, 高级工程师, 主要研究方向为食品分析与食品掺假鉴别。

E-mail: dii01208@163.com