

基于碳氮稳定同位素比值和UPLC-Q-Orbitrap代谢组学技术的有机奶和普通奶的成分差异研究

聂雪梅, 谢 昀, 许博舟, 许秀丽

Differentiated Study of Constituents between Organic Milk and Ordinary Milk by Stable Isotope Ratio and UPLC-Q-Orbitrap

NIE Xuemei, XIE Yun, XU Bozhou, and XU Xiuli

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022120095>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

稳定同位素技术在蜂蜜真实性溯源中的研究进展

Research Progress of Stable Isotope Ratio Mass Spectrometry for Authenticity and Traceability in Honey

食品工业科技. 2018, 39(17): 300-304,308 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.17.050>

UPLC-Q-Orbitrap HRMS测定白酒接触塑料制品中21种双酚类及其衍生物

Simultaneous Determination of 21 Bisphenol and Bisphenol Derivatives in Baijiu Contact Plastic Materials by UPLC-Q-Orbitrap High Resolution Mass Spectrometry

食品工业科技. 2021, 42(9): 263-269 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020060229>

稳定同位素技术在动植物源食品溯源中的应用研究

Application and Research Progress of Stable Isotope Technology in Animal and Plant Food Traceability

食品工业科技. 2021, 42(8): 338-345 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020040141>

改良QuEChERS结合超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法测定果蔬中15种植物生长调节剂残留

Determination of 15 Plant Growth Regulators Residues in Fruits and Vegetables by Modified QuEChERS Coupled with UPLC-Q-Orbitrap HRMS

食品工业科技. 2020, 41(2): 195-200,206 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.02.031>

UPLC-Q/Orbitrap HRMS测定白酒中氨基甲酸乙酯含量的不确定度分析

Evaluation of Uncertainty in Determination of Ethyl Carbamate Residues in Chinese Baijiu by UPLC-Q/Orbitrap HRMS

食品工业科技. 2021, 42(24): 239-246 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030281>

基于UPLC-Q-TOF-MS技术分析黄刺玫果的化学成分

Characterization of Chemical Constituents from Fruits of *Rosa xanthina* by UPLC-Q-TOF-MS

食品工业科技. 2021, 42(23): 251-258 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021020115>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

聂雪梅, 谢昀, 许博舟, 等. 基于碳氮稳定同位素比值和 UPLC-Q-Orbitrap 代谢组学技术的有机奶和普通奶的成分差异研究 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(23): 246–252. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022120095

NIE Xuemei, XIE Yun, XU Bozhou, et al. Differentiated Study of Constituents between Organic Milk and Ordinary Milk by Stable Isotope Ratio and UPLC-Q-Orbitrap[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(23): 246–252. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022120095

· 分析检测 ·

基于碳氮稳定同位素比值和 UPLC-Q-Orbitrap 代谢组学技术的有机奶和普通奶的成分差异研究

聂雪梅^{1,2}, 谢 昀^{1,2}, 许博舟^{1,2}, 许秀丽^{1,2,*}

(1. 中国检验检疫科学研究院食品安全研究所, 北京 100176;
2. 国家市场监督管理总局重点实验室(食品质量与安全), 北京 100176)

摘要:目的: 为了防止受利益驱动的一些不法商家随意标注“有机”字样来对食品采取假冒、伪造、以次充好等方式欺诈消费者。方法: 本研究提出采用碳氮稳定同位素比值和 UPLC-Q-Orbitrap 代谢组学技术两种方式对有机奶和普通奶进行差异成分的研究, 同时对不同泌乳期的有机奶进行分析。结果: 由于碳和氮同位素比值单因素方差分析 $P < 0.01$, 因此有机奶和普通奶具有显著性差异, 可通过碳和氮同位素比值对有机奶进行判别; 同时基于液相色谱-高分辨质谱的差异物质的代谢组学数据, 采用 OPLS-DA 方法筛选出差异常代谢物, 共筛选包括组氨酸等 5 种差异较大的代谢物, 且不同泌乳期的有机奶中组氨酸等化合物含量差异性较大。结论: 该研究虽然样本有限, 但有机奶和普通奶存在显著的差异代谢物, 通过 C 和 N 同位素比值, 以及 5 种筛查的差异代谢物可初步判定有机奶, 该研究对有机奶和普通奶的差异化研究提供一定的科学依据。

关键词: 有机奶, 碳氮同位素比值, UPLC-Q-Orbitrap, 成分差异

中图分类号: TS207.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)23-0246-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022120095



本文网刊:

Differentiated Study of Constituents between Organic Milk and Ordinary Milk by Stable Isotope Ratio and UPLC-Q-Orbitrap

NIE Xuemei^{1,2}, XIE Yun^{1,2}, XU Bozhou^{1,2}, XU Xiuli^{1,2,*}

(1. Institute of Food Safety, Chinese Academy of Inspection & Quarantine, Beijing 100176, China;

2. Key Laboratory of Food Quality and Safety for State Market Regulation, Beijing 100176, China)

Abstract: Objective: To prevent some illegal companies driven by interests from arbitrarily labeling "organic" to deceive consumers using ways such as counterfeiting, forgery, and shoddy food. Methods: This study investigated differential components between organic and regular milk by stable isotope ratio and UPLC-Q-Orbitrap-based metabolomics. Organic milk with different lactation stages was also analyzed. Results: There was a significant difference between organic and ordinary milk for single factor ANOVA $P < 0.01$. The carbon stable isotope and nitrogen stable isotope ratios could be used to distinguish organic and ordinary milk. Based on the data from UPLC-Q-Orbitrap, differential metabolites were screened by the OPLS-DA method, five different constituents were obtained, and there was a big difference between different lactation stages of organic milk such as histidine etc. Conclusion: Although the data of this study was obtained from limited samples, the different constituents between organic and ordinary milk were confirmed. Organic milk could be preliminarily

收稿日期: 2022-12-13

基金项目: 中国检科院基本科研业务费项目(2020JK008)。

作者简介: 聂雪梅(1978-), 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 食品安全, E-mail: niexuemei_00@163.com。

* 通信作者: 许秀丽(1983-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 食品安全, E-mail: xuxiuli_78@163.com。

determined by the data of carbon isotope ratio, nitrogen isotope ratio, and five different constituents screened by the UPLC-Q-Orbitrap method. This study could provide a scientific basis for the identification of organic and ordinary milk.

Key words: organic milk; carbon isotope ratio and nitrogen isotope ratio; UPLC-Q-Orbitrap; different constituents

乳业是健康中国、强壮民族不可或缺的产业^[1],随着消费者收入水平的提高,人们对牛奶品质的要求越来越高,纯天然、无污染、安全健康的有机奶得到了消费者的青睐,因此有较高的安全性和经济价值,但受利益驱动,一些不法商家随意标注“有机”字样来对食品采取假冒、伪造、以次充好等方式欺诈消费者,因此对有机奶和非有机奶中差异性成分的研究非常重要。有机乳制品甄别目前主要集中在产地的认证和安全指标的检测,但仅依靠产地有机认证的信息不能完全保证有机奶的真实性,目前尚无有效的检测方法对有机奶和非有机奶进行精准鉴别。

在有机产品真实性鉴别方面,稳定同位素质谱技术可用于鉴别不同种类和来源的食品,是国际上目前用于鉴别食品成分和掺假的一种有效工具,并在有机乳^[2-3]、葡萄酒^[4]、蜂蜜^[5-6]、果汁^[7-8]等食品的鉴别方面有所应用。葡萄酒、蜂蜜和果汁中掺假的问题,由于添加物与天然糖中¹³C/¹²C、¹⁵N/¹⁴N 比值的不同,因此通过稳定同位素比值质谱技术可以比较明显地区分出来。但有机乳与普通乳的区别在于有机牧场和普通牧场饲养方式不同,影响¹³C/¹²C、¹⁵N/¹⁴N 比值的因素较多。除不同牧场饲料差别外^[3],同一牧场奶牛冬天食用玉米,夏天食用草或豆科植物,稳定同位素 C 和 N 比值也会随着饮食的季节不同而有变化^[9]。此外,采样时间和地理位置也会影响稳定同位素 C 和 N 的比值^[10],因此仅通过一种检测手段很难满足精准分析。

代谢组学近年来在动植物疾病诊断、生物标志物筛选、物质毒性毒理研究、中医药等多个领域得到了广泛应用^[11],对食品中代谢小分子也可以进行定性和定量的分析,从而动态呈现出机体内代谢物的变化,代谢组学常用的研究方法主要包括气相色谱-质谱联用法^[12-14]、质子核磁共振法^[15-16]和超高效液相色谱-串联四极杆质谱法^[17-19]等。已有相关报道代谢组学用于不同泌乳期乳制品的代谢物差异物分析^[20-21],其中超高效液相串联-四极杆静电场轨道阱质谱更具有高灵敏度、选择性强、重现性好等优点,目前被广泛应用于代谢物测定、中药组分分析鉴定研究,康佳欣等^[22]采用超高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱质谱非靶向代谢组学方法对萨能奶中山羊初乳和常乳进行了代谢组学分析,发现有 118 种代谢物与常乳存在差异,主要是脂质类、氨基酸类、核苷类等。也有文献表明通过稳定同位素氮和高分辨质谱结合的方式可对有机番茄进行鉴别^[23],因此本论文也将首次尝试将稳定同位素比值、超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法(UPLC-Q-Orbitrap)及化学计量学相结合的分析技术对有机奶进行研究,旨在

揭示有机奶和普通奶之间的差异性,为有机牛奶的真实性筛选提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

泌乳早期有机牛奶(30~90 d)、泌乳晚期有机牛奶(210~270 d)、普通牛奶 内蒙古的有机奶饲养基地和普通奶饲养基地,每批次牛奶从挤奶场随机取样,经分析剔除掉不符合牛奶(经代谢组学分析个体差异较大为不符合牛奶),共有 63 个样品,其中有机奶包括 17 个泌乳早期奶,22 个泌乳晚期奶,普通奶包括 24 个,所取的牛奶混合均匀,具有代表性;乙腈(色谱纯)、甲醇(色谱纯)、锡杯(9 mm×5 mm)、CN 反应管 美国 Thermo Fisher Scientific 公司;甲酸 质谱级,J&K 科学有限公司;实验室用水 实验室自制;IAEA600 咖啡因($\delta^{13}\text{C}=-27.271\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N}=1\text{‰}$) 国际原子能机构。

Delta V 同位素质谱仪、Flash EA2000 元素分析仪 美国 Thermo-Fisher 公司;Q-exactive 高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨率质谱仪 美国 Thermo Fisher Scientific;Milli-R04 纯水仪 德国 Millipore 公司;ML104/02 分析天平 梅特勒-托利多上海有限公司;HSC-12B 针式氮吹仪 天津恒奥科技有限公司;旋涡混合仪 德国 IKA 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 同位素质谱测定方法

1.2.1.1 同位素质谱样品的制备 将鲜牛奶混匀后,冷冻干燥成粉末,过 20 目筛放于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.1.2 样品中碳氮同位素比值分析 冻干成粉末的样品,分别称量约 150~180 μg ,并用锡杯密封包裹成球,每份样品重复 3 次,测定稳定碳同位素比值。冻干成粉末的样品,分别称量约 3000~3200 μg ,并用锡杯密封包裹成球,每份样品重复 3 次,测定稳定氮同位素比值。

1.2.1.3 同位素质谱仪参数 离子化方式:EI 离子源,离子源电压:3.06 kV,真空度: 1.5×10^{-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。

1.2.1.4 元素分析仪参数 元素分析仪氧化炉最高温度为 980 $^{\circ}\text{C}$,载气氮流量为 100 mL/min,氧气流速为 175 mL/min;氦气吹扫气为 180 mL/min,柱温为 50 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.1.5 碳氮同位素比值测定 元素分析-同位素质谱(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:

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

其中, R 代表 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 或 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 的同位素含量比, SPL 与 STD 分别代表样品和标准物质; δ 值用千分数表示(‰)。

1.2.2 高分辨质谱测定方法

1.2.2.1 高分辨质谱样品前处理 前处理方法参考相关文献 [24–25], 将鲜牛奶称量约 2 g, 加入 10 mL 乙腈, 超声提取 30 min 后, 加入 3 g NaCl, 在 4 °C 下 10000 r/min 离心 10 min, 取 5 mL 上层提取液, 在 40 °C 下氮气吹至近干。残渣加乙腈 1 mL 进行复溶, 过 0.22 μm 滤膜, 放置于 2 mL 液相进样瓶中, 待测。

1.2.2.2 高分辨质谱仪器参数 液相色谱条件^[26]: 色谱柱 Accucore aQ(2.1 mm×150 mm, 2.6 μm); 流动相为 A 为有机相乙腈, 流动相 B 为水溶液(0.1% 甲酸, v/v); 流速 0.3 mL/min; 进样体积为 5 μL , 柱温 40 °C; 流动相梯度洗脱程序: 0~0.5 min, 5% A; 0.5~5 min, 5%~30% A; 5~10 min, 30%~100% A; 10~12 min, 100% A; 12~15 min, 5% A。

质谱条件: 离子源为加热电喷雾离子源; 喷雾电压为 3.5 kV; 离子传输管温度为 320 °C; 全扫描-数据依赖二级扫描模式, 一级分辨率 70000, 二级分辨率 17500, 实验中所用的气体均为高纯氮气, 质量扫描范围(m/z)为 100~1500, 监测模式: 正离子监测模式。

1.3 数据处理

通过 Xcalibur 软件进行原始数据采集, 将原始数据导入 Compound Discover™ 3.0 软件, 对总离子流图中的色谱峰提取、峰对齐、匹配分析等, 质荷比范围为 m/z 100~1500; 峰相应强度最小值 1×10^{-6} 。同时将数据矩阵提取出来的数据信息利用 SIMCA-13.0 软件进行标准化归一化处理, 并进行正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA), 根据 VIP(VIP>1)和组间变化的显著性($P<0.01$)进行有机奶和普通奶的差异性代谢物的筛选。

2 结果与分析

2.1 有机牛奶和普通牛奶稳定碳氮同位素比值的分析

利用元素分析仪共测定 39 个有机奶和 24 个普通奶, 表 1 为有机奶和普通奶的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值对比。

2.1.1 有机与普通牛奶稳定碳同位素比值的分析

通过碳同位素元素分析仪测定 63 个有机奶和普通奶, 对比分析了有机奶和普通奶的 $\delta^{13}\text{C}$ 值, 39 个有机奶样品的中位值 $\delta^{13}\text{C}$ 为-27.46‰; 24 个普通奶的 $\delta^{13}\text{C}$ 中位值为-27.36‰, 有机奶和普通奶 $\delta^{13}\text{C}$ 值有部分交叉, 但有机奶和普通奶的单因素方差分析 $P<0.01$, 从结果的平均值分析, 有机奶的 $\delta^{13}\text{C}$ 值的整体情况比普通奶的 $\delta^{13}\text{C}$ 值更偏负, 这与赵超敏等^[2]有机奶粉所研究的结果一致, $\delta^{13}\text{C}$ 值反映了奶牛饲料中 C3 植物与 C4 植物的比值, 理论上有机牛奶的

表 1 有机奶和普通奶样品 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值对比

Table 1 $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in organic milk and ordinary milk

样品	$\delta^{13}\text{C}$ 范围(‰)	$\delta^{13}\text{C}$ 中位值(‰)	$\delta^{15}\text{N}$ 范围(‰)	$\delta^{15}\text{N}$ 中位值(‰)
有机奶(n=39)	-30.60~-23.06	-27.46	3.02~3.82	3.40
普通奶(n=24)	-31.39~-22.16	-27.36	2.43~3.25	2.81

奶牛是食用天然牧草长大的, 这些牧草主要都是 C3 植物^[27–28], C3 植物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值变化范围为-23‰至-35‰之间, 普通牛奶的奶牛主要食用的玉米属于 C4 植物, C4 植物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值变化范围在-9‰至-19‰之间, 因此从理论上分析, 有机奶的 $\delta^{13}\text{C}$ 应该比普通奶更偏负。但由于有机奶的奶牛所食用的并非只有有机牧场的牧草, 还包括其他进口燕麦等一定比例的饲料, 且存在其他含有 C 元素的物质对结果有影响, 所以导致有机奶和普通奶的 $\delta^{13}\text{C}$ 数值有交叉, 但是从单因素方差分析 $P<0.01$, 说明存在显著差异, 因此碳稳定同位素比值可以作为区分有机奶和普通奶的一种技术手段。

2.1.2 有机奶与普通牛奶稳定氮同位素比值的差异分析 通过氮同位素元素分析仪测得 63 个样品数据, 共计 39 个有机奶和 24 个普通奶, 对比分析了有机奶和普通奶的 $\delta^{15}\text{N}$ 值, 有机奶的 $\delta^{15}\text{N}$ 的中位值为 3.40‰, 普通奶的 $\delta^{15}\text{N}$ 的中位值为 2.81‰。有机奶和普通奶的 $\delta^{15}\text{N}$ 具有显著的差异($P<0.01$), 从 $\delta^{15}\text{N}$ 平均比值来分析, 有机奶中 $\delta^{15}\text{N}$ 比值明显高于普通牛奶, 王世成等^[23]所研究的有机番茄中氮同位素比值明显高于普通番茄, 两者结论较为一致, $\delta^{15}\text{N}$ 值反映了奶牛饲料中 ^{15}N 与 ^{14}N 的比值, 理论上来说有机牧草不允许使用人造肥料, 有机牧场的奶牛所食用的饲料主要为有机牧草, 有机牧草中高含量的 ^{15}N 使有机奶中 ^{15}N 比例增高^[23], 而普通牧草的种植允许使用化肥, 因此牛奶中氮同位素比取决于土壤中的氮源, 有机奶中 $\delta^{15}\text{N}$ 比值明显高于普通牛奶, 氮同位素比值也可以作为区分有机奶和普通奶的一种技术手段。

2.2 液相色谱高分辨质谱分析有机牛奶和普通奶组成成分

2.2.1 UPLC-Q-Orbitrap 谱图分析 采用正离子模式对有机奶和普通奶进行分析, 图 1 为有机奶和普通奶的总离子流图, 由图 1 可知, 谱图基线较为平稳, 说明仪器有较好的稳定性, 图像可信度较高, 有机奶和普通奶的原始数据经过 Compound Discover 软件降噪后进一步分析研究, 提取了所有化合物的质谱信息, 共提取 1682 个化合物, 下述分析以 1682 个正离子检测进行研究。

2.2.2 液相色谱-高分辨质谱的主成分分析 将有机奶和普通奶的 1682 种化合物信息导入 SIMCA-P 软件, 进行 PCA 主成分分析, 用以判别有机奶和普通奶之间的差异, 但 PCA 不能很好地将两种牛奶分

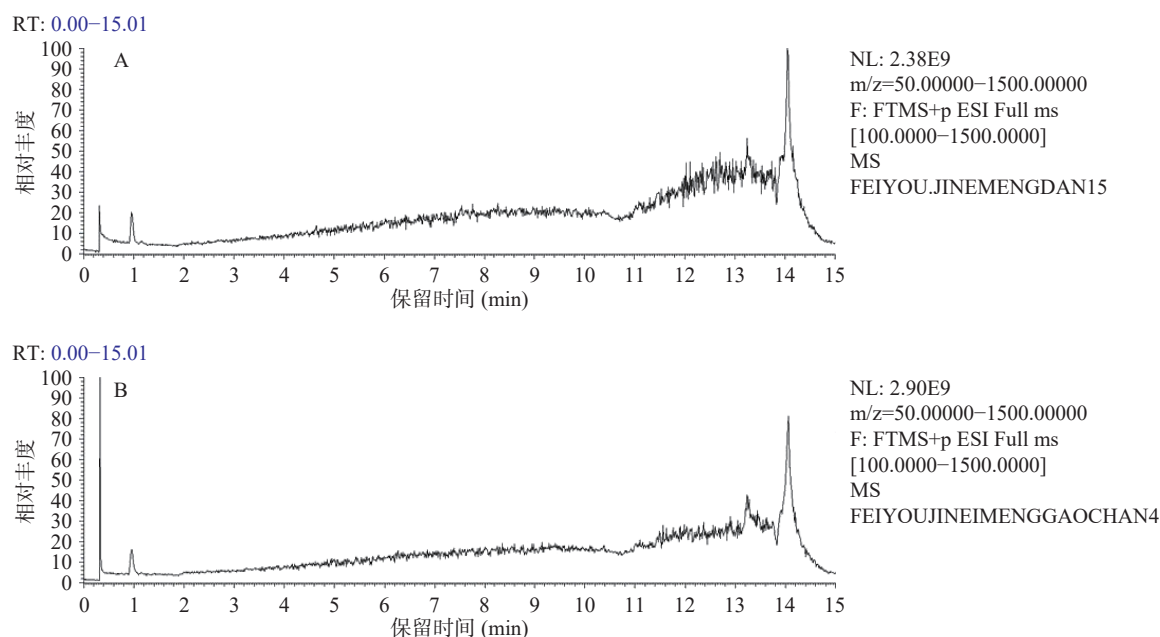


图 1 普通奶(A)和有机奶(B)单个样品的总离子流图

Fig.1 Total ion chromatogram for a random single ordinary milk (A) and organic milk (B)

开,由于 PCA 无监督分析方法存在组内的误差和无关的随机误差,所以本研究采用了有监督的判别方法 OPLS-DA(正交偏最小二乘-判别分析)进行代谢差异物的筛选,OPLS-DA 不同于 PCA,运用正交偏最小二乘回归建立代谢物表达量与样本类别之间的关系模型,来实现对样本类别的预测,能够更科学更客观的区分代谢物的组间差异。如图 2 所示,有机奶样品主要分布在该置信区间的左侧,普通奶样品主要分布在置信区间的右侧,有机奶和普通奶样品区分效果佳。本次 OPLS-DA 模型分析得到 2 个主成分,该模型的参数 R^2 和 Q^2 分别为 0.997 和 0.709,均大于 0.5,说明该模型稳定性可靠。从图 2 可以看出不同的样品分布在不同的象限,普通奶差异较小,聚集在一起,而有机奶差异较大,较为分散,这是有机奶中包括不同泌乳期的有机牛奶的缘故,该结果表明有机奶和普通奶的代谢成分在种类、数量和含量上存在显著的差异。

由于有机奶依据泌乳期分为泌乳早期奶和泌乳晚期奶两种,因此同时对不同泌乳期和普通奶进行差异分析,如图 3 所示,有机泌乳早期奶和有机泌乳晚期奶与普通奶分布在不同的置信区间,区分效果佳。但是有机泌乳早期奶活性成分差异较大,样品点较分散。本次 OPLS-DA 模型分析得到 2 个主成分, R^2 和 Q^2 分别为 0.928 和 0.773,均大于 0.5,说明该模型稳定性可靠。这结果也表明不同泌乳期的有机奶其含量、种类和数量相差较大,但能够与普通奶有所区分。

2.2.3 有机牛奶和普通牛奶差异性组分分析

通过 Compound Discover 软件分析共有 1682 个化合物,对有机奶和普通奶间数据峰面积均值进行比对形成 S-PLOT 图(图 4)。在 S-PLOT 图的右侧象限为普通奶的代谢物,左侧象限为有机奶的代谢物,距离中

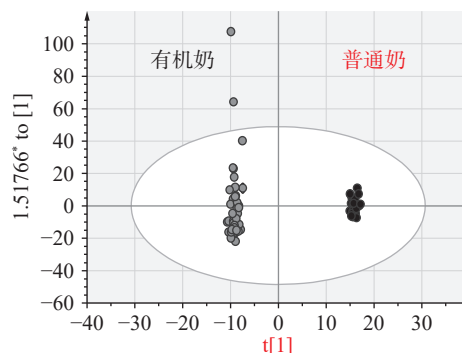


图 2 有机奶和普通奶样品的 OPLS-DA 得分图

Fig.2 Score plot of OPLS-DA between organic milk and ordinary milk

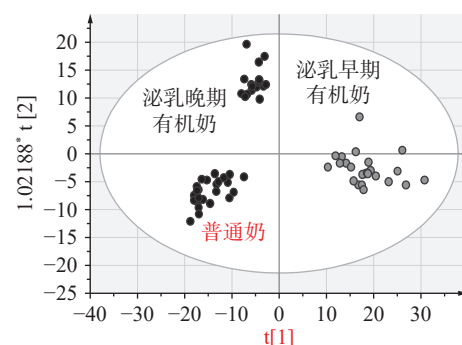


图 3 泌乳早期有机奶、泌乳晚期有机奶和普通奶的 OPLS-DA 得分图

Fig.3 Score plot of OPLS-DA between early lactation, later lactation of organic milk and ordinary milk

心原点越远的代谢物表示在两者之间的差异越大,从图上可以看到,有机奶中的差异性化合物种类远远多于普通奶,通过 Compound Discover 软件匹配 mzcloud、chemspider 等数据库,识别了 294 个化合物的信息,如保留时间、分子量、一级质谱碎片和二级质谱碎片等,并查阅了相关文献,进一步确认相关化合

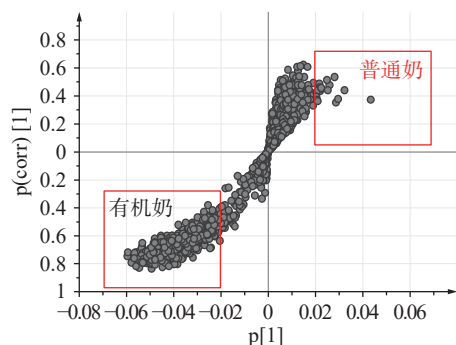


图4 有机奶和普通奶的 S-plot 图

Fig.4 S-plot of organic milk and ordinary milk

物的信息,从结果分析,牛奶成分中除了乳糖、葡萄糖等糖类,肌酸、氨基酸等有机酸类,还包括饲料里产生的葛根素,以及次生代谢物胆碱等,另外还有环境暴露的一些化合物例如塑化剂等。

其中含量较高的包括 α -乳糖,普通奶中的乳糖含量是有机乳中的 1~2 倍,这与 Wu 等^[29]的研究是一致的。胆碱在有机泌乳早期奶含量较高,是普通奶中的 2 倍左右,肌酸在普通奶中含量是有机奶中的

1~2 倍,异亮氨酸在有机奶中的含量是普通奶中的 2~3 倍。

经过 Simca-p 筛查共发现 651 种 VIP 值大于 1 的物质,同时依据 t 检验(t -test)的 P 值($P < 0.05$)筛查差异性代谢物,经与数据库匹配确证发现,以下 5 种化合物成分在有机和普通牛奶中在含量、数量上存在较大差异(见表 2),有机泌乳早期奶中组氨酸含量高于普通奶的 138 倍,有机泌乳晚期奶组氨酸含量高于普通奶的 22 倍,其他 4 种物质包括 2,6-二氨基甲苯、3,5-二甲基吡唑-1-甲酰胺、6-正己基氨基嘌呤、二乙烟酰胺含量也均高于普通奶。

2.2.4 有机牛奶和普通牛奶代谢物成分层次聚类分析 热图是对实验数据分布情况进行分析的直观可视化方法,可通过颜色深浅和差异来直观展示研究对象的差异,并对样品进行聚类分析(见图 5A 和图 5B),在图 5A 中右侧为有机奶,左侧为普通奶,从图 5A 可以看出右侧有机奶中代谢物较多,且有机奶和普通奶组数据分别能够较好的聚集在一起,说明代谢物聚集效果良好。由图 5B 可以看出 6-正己基氨基嘌呤

表 2 有机奶和普通奶样品部分差异物

Table 2 Partial different metabolites of organic milk and ordinary milk

序号	化合物	分子式	母离子(m/z)	P值	VIP	差异倍数(有机泌乳早期奶/普通奶)	差异倍数(有机泌乳晚期奶/普通奶)
1	2,6-二氨基甲苯	$C_6H_7FN_4O_2$	196.133	1.48×10^{-4}	2.54	117	42
2	3,5-二甲基吡唑-1-甲酰胺	$C_6H_{10}N_4$	138.091	7.64×10^{-5}	2.37	623	289
3	6-正己基氨基嘌呤	$C_{11}H_{17}N_5$	219.149	3.53×10^{-4}	2.10	630	241
4	二乙烟酰胺	$C_{10}H_{14}N_2O$	178.111	7.64×10^{-5}	2.24	514	182
5	组氨酸	$C_6H_9N_3O_2$	155.070	8.05×10^{-4}	1.48	138	22

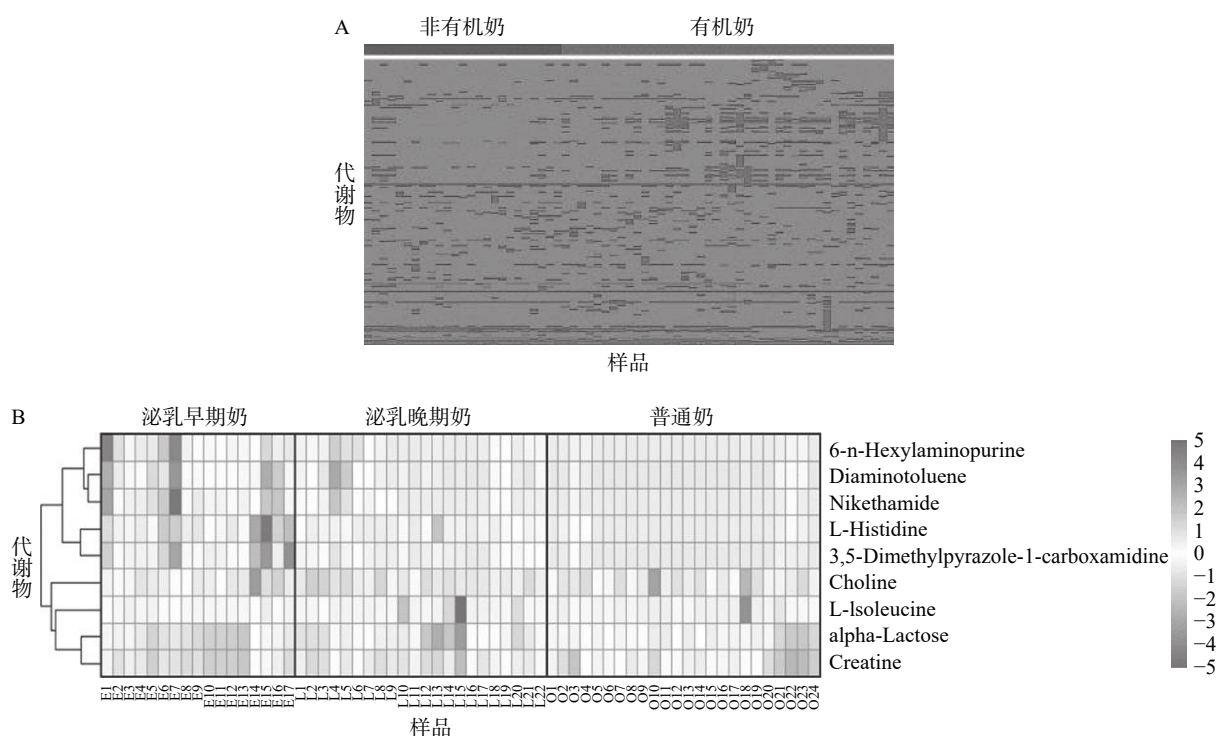


图5 有机奶和普通奶代谢物成分层次聚类分析色温图

Fig.5 Metabolites correlation heat-map of organic milk and ordinary milk

注: A 为所有代谢物, B 为主要代谢物。

呤、2,6-二氨基甲苯、组氨酸、3,5-二甲基吡唑-1-甲酰胺、二乙烟酰胺在有机泌乳早期奶中含量较高,在有机泌乳晚期奶中含量较低,而胆碱在有机泌乳早期奶中含量较高, α -乳糖、肌酸等在普通奶中的含量较有机奶中要高一些,尤其是有机泌乳早期奶中含量很低,这与吕牧军等^[30]研究结论一致,常乳的乳糖含量比初乳高。总体来说,有机奶中代谢物数量大于普通奶中代谢物的数量,尽管部分化合物在有机泌乳早期和晚期也不尽相同,但通过上面 5 种差异较大的代谢物可将有机奶和普通奶进行区分。

3 结论

本文采用稳定同位素比例质谱和高分辨质谱两种分析技术共同对有机奶和普通奶进行差异性的分析研究。首先通过对有机奶和普通奶进行 C 和 N 同位素平均比值分析,有机奶的 $\delta^{13}\text{C}$ 比普通奶更偏负,有机奶中 $\delta^{15}\text{N}$ 比值明显高于普通奶,从统计学意义上分析,由于单因素方差分析 $P < 0.01$,因此具有显著性差异,说明碳氮稳定同位素比值可以作为区分有机奶和普通奶的一种技术手段。其次结合 UPLC-Q-Orbitrap 进行代谢组学分析,通过 Simca-p 筛查共发现 651 种 VIP 值大于 1 的物质,经与数据库匹配确证发现,包括 5 种化合物成分在有机和普通牛奶中在含量、数量上存在较大差异,例如有机泌乳早期奶中组氨酸含量高于普通奶的 138 倍,有机泌乳晚期奶组氨酸含量高于普通奶的 22 倍,这些化合物可作为有机奶和普通奶的差异性特征成分。另外含量较高的 α -乳糖在普通奶中的含量是有机奶中 1~2 倍,普通奶中肌酸含量是有机奶中的 1~2 倍;胆碱在有机泌乳早期奶中含量较高,是普通奶中的 2 倍左右,异亮氨酸在有机奶中的含量是普通奶中的 2~3 倍。因此该研究初步判定通过 C 和 N 同位素比值、这些差异性成分基本可区分内蒙乳企的有机奶和普通奶,该结论对有机奶和普通奶的差异化成分研究提供一定的科学依据。

参考文献

[1] 梁玲玲,梁冉,石家宇. 基于专利信息分析的全球乳制品技术竞争态势研究[J]. *中国乳品工业*, 2020, 48(10): 36-41. [LIANG L L, LIANG R, SHI J Y, et al. Research on competition situation of global dairy technology based on patent information analysis[J]. *Dairy Industry*, 2020, 48(10): 36-41.]

[2] 赵超敏,王敏,张润何,等. 碳氮稳定同位素鉴别有机奶粉[J]. *现代食品科技*, 2018, 34(12): 211-215. [ZHAO C M, WANG M, ZHANG R H, et al. Identification of organic milk powder using carbon and nitrogen natural isotopes[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2018, 34(12): 211-215.]

[3] 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.

[4] SMAJLOVIC I, WANG D, TÚRI M, et al. Quantitative analysis and detection of chaptalization and watering down of wine using isotope ratio mass spectrometry[J]. *BIO Web of Conferences*, 2019, 15: 1-9.

[5] KHALED E H, MOHAMAD A I, FAROUK J. Evaluation of honey authenticity in Lebanon by analysis of carbon stable isotope ratio using elemental analyzer and liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2021, 56: 4730-4730.

[6] MANTHA M, URBAN J R, MARK W. A direct comparison of cavity ring down spectrometry and isotope ratio mass spectrometry for detection of sugar adulteration in honey samples[J]. *Journal of AOAC International*, 2018, 101: 1857-1863.

[7] CRISTEA G, DEHELEAN A, VOICA C. Isotopic and elemental analysis of apple and orange juice by isotope ratio mass spectrometry (IRMS) and inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS)[J]. *Analytical Letters*, 2021, 54: 212-226.

[8] MANTHA M, KUBACHKA K M, URBAN J R. Economically motivated adulteration of lemon juice: Cavity ring down spectroscopy in comparison with isotope ratio mass spectrometry: Round-robin study[J]. *Journal of AOAC International*, 2019, 102: 1544-1551.

[9] 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: 1299-1305.

[10] ZHAO S S, ZHAO Y, ROGERS K M, et al. Application of multi-element (C, N, H, O) stable isotope ratio analysis for the traceability of milk samples from China[J]. *Food Chemistry*, 2020, 310: 125826.

[11] 马贵,安彦昊,马莉花,等. 代谢组学技术在筛选奶牛脂肪肝生物标志物中的应用研究进展[J]. *畜牧与饲料科学*, 2023, 44(1): 38-43. [MA G, AN Y H, MA L H, et al. Application of metabolomics in screening biomarkers of fatty liver in dairy cows[J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2023, 44(1): 38-43.]

[12] ZHAO Q Y, XI J Z, XU X M. Volatile fingerprints and biomarkers of Chinese fragrant and non-fragrant japonica rice before and after cooking obtained by untargeted GC/MS-based metabolomics[J]. *Food Bioscience*, 2022, 47: 101764.

[13] KUMAR M, AGRAWAL P K, ROY P, et al. GC-MS-based metabolomics reveals dynamic changes in the nutritionally important metabolites in coconut meat during nut maturation[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2022, 114: 104869.

[14] FANG X, LIU Y N, XIAO J Y, et al. GC-MS and LC-MS/MS metabolomics revealed dynamic changes of volatile and non-volatile compounds during withering process of black tea[J]. *Food Chemistry*, 2023, 410: 135396-135396.

[15] HANNE C B, DITTE B D, SØREN R, et al. Metabonomic response to milk proteins after a single bout of heavy resistance exercise elucidated by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. *Metabolites*, 2013, 3: 33-46.

[16] MEONI G, TENORI L, LUCHINAT C. Nuclear magnetic resonance-based metabolomic comparison of breast milk and organic and traditional formula milk brands for infants and toddlers[J]. *Omics A Journal of Integrative Biology*, 2020, 24(7): 1-14.

[17] YUAN X, SHI W, JIANG J P, et al. Comparative metabolomics analysis of milk components between Italian Mediterranean buffaloes and Chinese Holstein cows based on LC-MS/MS technology[J]. *PLoS One*, 2022, 17(1): 0262878.

[18] MUNG D, LI L. Development of chemical isotope labeling LC-MS for milk metabolomics: Comprehensive and quantitative profiling of the amine/phenol submetabolome[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(8): 4435-4443.

- [19] WU R, CHEN J Y, ZHANG L S. LC/MS-based metabolomics to evaluate the milk composition of human, horse, goat and cow from China[J]. *European Food Research and Technology*, 2021, 247: 663–675.
- [20] 郭延生, 陶金忠. 基于 LC-Q/TOF-MS 代谢组学方法筛选奶牛妊娠识别阶段乳样生物标志物的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(8): 1633–1641. [GUO Y S, TAO J Z. Selection of milk biomarkers of pregnancy recognition in dairy cows based on LC-Q/TOF MS metabolomics[J]. *Acta Veterinaria et Zootecnica Sinica*, 2018, 49(8): 1633–1641.]
- [21] 王影, 文亮, 母童, 等. 荷斯坦牛高、低乳脂率牛乳代谢组分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2022, 53(5): 1396–1408. [WANG Y, WEN L, MU T, et al. Metabolomic analysis of milk from Holstein cows with high and low milk fat percentage[J]. *Acta Veterinaria et Zootecnica Sinica*, 2022, 53(5): 1396–1408.]
- [22] 康佳欣, 李萌, 廖敏和, 等. 萨能奶山羊初乳和常乳的代谢组学分析[J/OL]. *食品科学*, 2023: 1–12. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20230217.1109.016.html>. [KANG J X, LI M, LIAO M H, et al. Metabolomics analysis of colostrum and mature milk in Saanen goat[J/OL]. *Food Science*, 2023: 1–12. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20230217.1109.016.html>.]
- [23] 王世成, 李国琛, 王莹, 等. 基于氮稳定同位素比例质谱和液相色谱-高分辨质谱的有机番茄鉴别[J]. *食品科学*, 2021, 42(14), 159–164. [WANG S C, LI G C, WANG Y, et al. Authentication of organic tomatoes by nitrogen stable isotope ratio mass spectrometry and liquid chromatography-high resolution mass spectrometry[J]. *Food Science*, 2021, 42(14), 159–164.]
- [24] 贡松松, 陆亚男, 王博, 等. 高分辨质谱法快速筛查生鲜乳中的雌激素类药物[J]. *甘肃畜牧兽医*, 2021, 51(2): 40–44. [GONG S S, LU Y N, WANG B, et al. Rapid screening of estrogens in fresh milk by high resolution mass spectrometry[J]. *Gansu Animal and Veterinary Sciences*, 2021, 51(2): 40–44.]
- [25] 于倩倩, 汪龙飞, 鲍蕾. 高效液相色谱-高分辨质谱法定性筛查牛奶中 49 种 β -内酰胺类抗生素残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(4): 162–169. [YU Q Q, WANG L F, BAO L. Qualitative screening of 49 kinds of β -lactam antibiotic residues in milk by high performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2023, 14(4): 162–169.]
- [26] 李萌, 卢玺丞, 黄云艳, 等. 基于代谢组学技术分析不同纬度山羊乳的差异性[J]. *分析化学*, 2021, 49(11): 1864–1875. [LI M, LU E C, HUANG Y Y, et al. Differential analysis of goat milk at different latitudes based on metabolomics technology[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2021, 49(11): 1864–1875.]
- [27] BADECK F W, TCHERKEZ G, NOGUÉS S, et al. Post-photosynthetic fractionation of stable carbon isotopes between plant organs-A widespread phenomenon[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2005, 19: 1381–1391.
- [28] KIM S H, CRUZ G D, FADEL J G, et al. Food authenticity using natural carbon isotopes (^{12}C , ^{13}C , ^{14}C) in grass-fed and grain-fed beef[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2012, 21(1): 295–298.
- [29] WU J F, DOMELLOF M, ZIVKOVIC A M, et al. NMR-based metabolite profiling of human milk: A pilot study of methods for investigating compositional changes during lactation[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 469: 626–632.
- [30] 吕牧军, 赵冰熔, 丁连才, 等. 利用乳糖含量判定常乳中是否添加初乳的研究[J]. *中国乳品工业*, 2000, 28(6): 11–13. [LÜ M J, ZHAO B R, DING L C, et al. Survey of judging if milk is added with bovine colostrum by lactose content[J]. *China Dairy Industry*, 2000, 28(6): 11–13.]