

《醋中乙酸稳定碳同位素比值($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$)测定方法 稳定同位素比值质谱法》行业标准编制说明

一、工作简况

1、任务来源

根据工业和信息化部办公厅下达的 2012 轻工行业标准制定计划,《醋中乙酸稳定碳同位素比值 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 测定方法 稳定同位素比值质谱法》行业标准由中国食品发酵工业研究院等单位负责起草,全国食品发酵标准化中心归口,计划编号:2012-1195T-QB。

2、目的意义

食醋是中国各大菜系中传统的调味品,也是人们日常生活中的必需品。目前中国各种醋(包括传统醋、保健醋和果汁醋)的人均年消费量仅为 0.19 公斤,是日本的 1/9,美国的 1/7,市场潜力巨大。

根据我国食醋国家标准和行业标准的定义要求,我国食醋分为谷物食醋、水果食醋、配制食醋等。由于生产原料和生产工艺的差异,不同食醋在市场上销售价格差异较大,尤其是水果食醋(如苹果醋)远远高于普通食醋的价格,市场出现以次充好,不如实标注食醋原料或工艺等现象。为了让消费者更加明白消费,加强食醋行业真实性科技监管,引入了稳定同位素质谱技术开展食醋真实性检测技术标准的研制,对保障食醋行业的健康稳定发展具有重要意义。

《醋中乙酸稳定碳同位素比值($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$)测定方法 稳定同位素比值质谱法》可用于准确测定醋中乙酸的 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比值,制定此项分析方法标准将为稳定同位素技术在醋制品的真实性鉴别研究、稳定同位素数据库构建和科学监管提供标准方法基础和参考依据,对我国醋产业中健康发展,打击假冒伪劣行为具有重要意义。

3、简要编制过程

根据工业和信息化部办公厅下达的 2012 轻工行业标准制定计划,《醋中乙酸稳定碳同位素比值($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$)测定方法 稳定同位素比值质谱法》行业标准由中国食品发酵工业研究院牵头组织制定。

起草工作组查阅国际上有关醋中乙酸碳同位素比值测定的文献,通过对测定原理的梳理与理解,开发了气相色谱-燃烧-稳定同位素比值质谱仪(GC-C-IRMS)测定酒中乙酸碳同位素比值的方法,并从重复性、稳定性、准确性方面进行了验

证。结果表明本方法操作简单，所需样品量少，耗时很少，适用于白酒中乙醇碳同位素比值的测定。

2014年4月-2014年9月本方法经过中国食品发酵工业研究院、中国计量科学研究院、中科院微生物所等8家单位的稳定同位素实验室对该方法进行验证，验证结果比较理想。

二、标准编制原则和主要内容

1、标准编制原则

本标准以科学技术和实验数据为依据，结合产品实际情况，经过科学研究而制定。本标准的制定充分考虑醋产品的成分特征、严格按照稳定同位素分析的基本要求，确保标准的科学性、先进性、可操作性。

2、主要内容

本标准规定了气相色谱-燃烧-稳定同位素比值质谱仪测定醋中乙酸稳定碳同位素比值的方法；

本标准适用于酿造食醋、配制食醋、水果醋和食用冰乙酸（冰醋酸）中乙酸碳同位素比值的测定，连续2次重复测定的标准偏差 $SD \leq 0.20\%$ 。

三、主要试验（或验证）情况分析

针对醋中乙酸稳定碳同位素比值测定方法进行了系统研究，详细的研究数据见附件一。

（1）**方法稳定性：**分别以食醋、水果醋和冰乙酸样品为实验对象，处理后连续5次的标准偏差 $SD \leq 0.15\%$ ，连续2次测定的 $SD \leq 0.20\%$ ，说明该方法的稳定性符合国际要求；

（2）**方法准确性：**由于国内外均无乙酸碳同位素分析的参考物质，因此采用模拟混合的方式验证方法的准确性。通过向食醋样品中加入不同梯度的冰乙酸溶液，乙酸碳同位素比值与食醋样品中冰乙酸的含量呈显著负相关关系，相关系数 R^2 为0.999。

四、标准中涉及的专利

ZL 2012 1 0473395.8：一种食醋中乙酸稳定碳同位素的快速测定方法。

五、产业化情况、推广应用论证和预期达到的经济效果等情况

醋产业是关乎国计民生的行业之一，与老百姓日常生活息息相关，其安全问题、质量问题和产品真假问题历来为消费者所重视。根据我国醋制品的标准定义

要求，酿造食醋不能添加非自身发酵的食用醋精。然而近年来，配制食醋虚假标注酿造食醋的现象时有发生，影响了酿造食醋的品质声誉，也影响了消费者的消费信心和政府公信力，是酿造食醋产业健康发展的隐患。制定此项分析方法标准，将为研究酿造食醋的碳同位素特征、建立醋同同位素数据库和科技监管提供标准方法和参考依据，有望规范配制食醋和酿造食醋的有序竞争，具有显著经济效益和社会效益，并将占领国际领域醋中稳定同位素技术标准制定的制高点。

六、采用国际标准和国外先进标准情况，与国际、国外同类标准水平的对比情况，国内外关键指标对比分析与测试的国外样品、样机的相关数据对比情况
未采用国际标准和国外标准。

七、与现行相关法律、法规、规章及相关标准，特别是强制性标准的协调性

该标准从我国稳定同位素食品分析领域的实际情况出发，参考了国内外相关资料，体现了科学性、先进性和可操作性原则，在制定过程中充分考虑国内相关的法规要求，结合醋制品的产品特点，与相关标准法规包括强制性标准协调一致。

八、重大分歧意见的处理经过和依据

无。

九、标准性质的建议说明

建议《醋中乙酸稳定碳同位素比值($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$)测定方法 稳定同位素比值质谱法》为推荐性行业标准。

十、贯彻标准的要求和措施建议

在本标准通过审核、批准发布之后，由相关部门组织力量对本标准进行宣贯，在行业内进行推广。建议本标准自发布6个月之后开始实施。

十一、废止现行相关标准的建议

无。

十二、其它应予说明的事项

无。

全国食品发酵标准化中心

2014年12月

附件一 醋中乙酸稳定碳同位素比值 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 测定方法验证

一、测定原理及主要指标

1. 仪器测定原理

原子核由 Z 个质子和 N 个中子组成, 质子数和中子数的和 $Z+N=A$ 为质量数, 即组成原子核的核子数。质子数相同而中子数不同的原子称为同位素。测定稳定同位素含量 (丰度) 的方法很多, 其中最普遍的是质谱法。

质谱仪器是利用离子光学和电磁原理, 按照质荷比 (M/e) 进行分离从而测定样品的同位素质量或相对含量。

在稳定同位素分析中均以气体形式 (如 CO_2 , N_2 , SO_2 或 H_2) 进行质谱分析, 测量过程可归结为以下步骤:

- 1.1 将被分析的样品以气体形式送入离子源;
- 1.2 把被分析的元素转变为电荷为 e 的阳离子, 应用纵电场将离子束准直成为一定能量的平行离子束;
- 1.3 利用电、磁分析器将离子束分解成不同 M/e 比值的组分;
- 1.4 记录并测定离子束每一组分的强度;
- 1.5 应用计算机程序将离子束强度转化为同位素丰度;
- 1.6 将待测样品与工作标准相比较, 得到相对于国际标准的同位素比值。

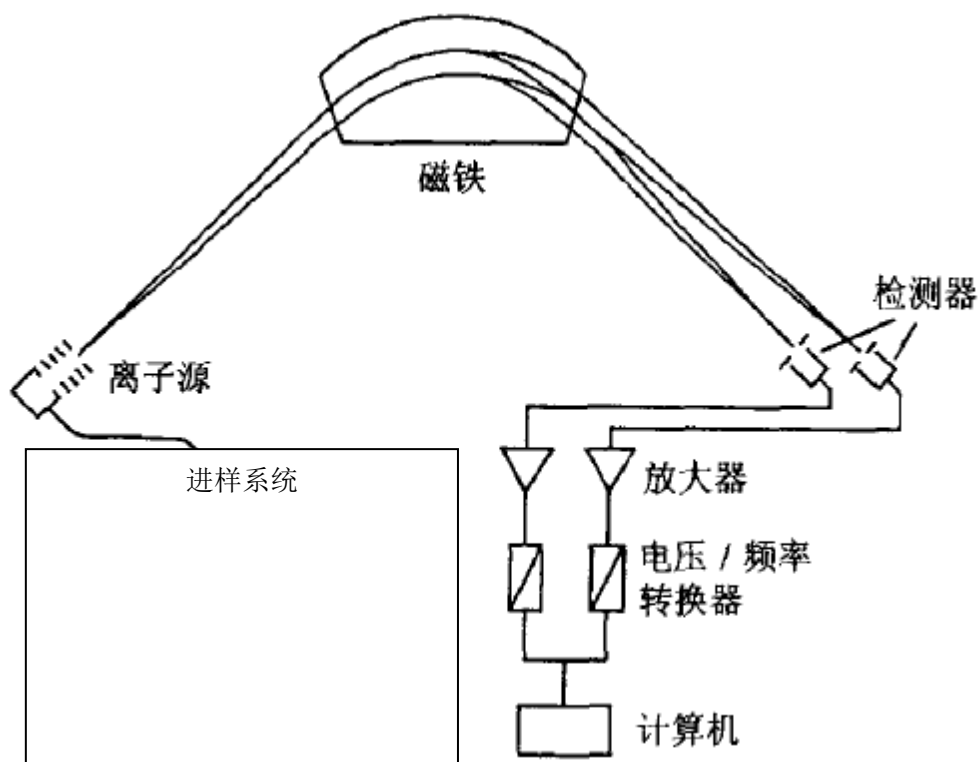


图 1 稳定同位素比值质谱仪结构示意图

2. 样品测定原理

乙酸在氧气或氧化剂的存在下,在燃烧炉中转化成 CO_2 后用 IRMS 测定该气体的碳同位素组成,与参考物质比较得出该乙酸的稳定碳同位素比值 ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$),并以千分差的形式表达 ($\delta^{13}\text{C}$, ‰)。由于氧气或助燃剂的作用,乙酸转化过程中需排除其他有机物的干扰,以防止此类有机物产生 CO_2 混入乙醇转化的 CO_2 中;同时乙酸转化 CO_2 时会产生一定量的水分,IRMS 测定前应干燥 CO_2 气体,防止水分对 IRMS 测定的干扰。需要注意的是,排除有机物和干燥 CO_2 气体时,应避免出现碳同位素分馏。

二、方法验证

1. IRMS 系统的测定稳定性

IRMS 系统的性能优劣是确定乙酸转化的 CO_2 中稳定碳同位素比值能否被准确测定的重要指标。验证 IRMS 系统的测定稳定性,连续 10 次通入固定体积的高纯 CO_2 气体,测定 CO_2 中 $\delta^{13}\text{C}$,结果见表 1。

表 1 IRMS 系统的稳定性

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	SD
$\delta^{13}\text{C}$	0.043	0.000	-0.033	-0.044	-0.060	-0.081	-0.118	-0.107	-0.132	-0.151	0.05

由上表可知，该系统测定 CO_2 中 $\delta^{13}\text{C}$ 的标准偏差为 0.06‰，符合稳定碳同位素的测定要求。

2. IRMS 系统的线性范围

由于 IRMS 给出样品气的 $\delta^{13}\text{C}$ 时需以高纯 CO_2 气体（参考气）为基准，因此确保样品气与高纯 CO_2 气体的进样体积一致是准确测定的关键。为验证该 IRMS 系统的线性范围，在连续的 8 次进样过程中不断增加高纯 CO_2 气体的进样量，并测定，结果见表 2。

表2 EA-IRMS 系统的线性

测定次数	离子强度/V	$\delta^{13}\text{C}$
1	0.43	0.10
2	0.76	0
3	2.29	-0.08
4	2.88	-0.12
5	3.87	-0.18
6	4.88	-0.19
7	6.32	-0.16
8	9.86	-0.07

从表 2 中可以看出，离子流强度范围为 0.5~10V 时，其总体线性 $R=-0.03\%/V$ 优于仪器指标 $\pm 0.066\%/V$ 。通常以 2~10V 作为实验的线性范围，其线性 $R=-0.003\%/V$ ，优于总体线性。

3. 样品前处理

醋样品经 0.22 μm 滤膜过滤，根据 IRMS 的测定线性范围（2V~10V）及色谱条件，用乙醇将醋样品稀释至乙酸含量约 8g/L。

4. 稀释溶剂保留时间

配制 1:1 的乙醇-丙酮溶液，采用大分流比（60:1）、微量进样（0.1 μL ）的模式将溶液注入 GC 中，色谱柱分离后测定 CO_2 中 $\delta^{13}\text{C}$ ，乙醇和乙酸 m/z 44，45 和 46 离子图见图 2）。

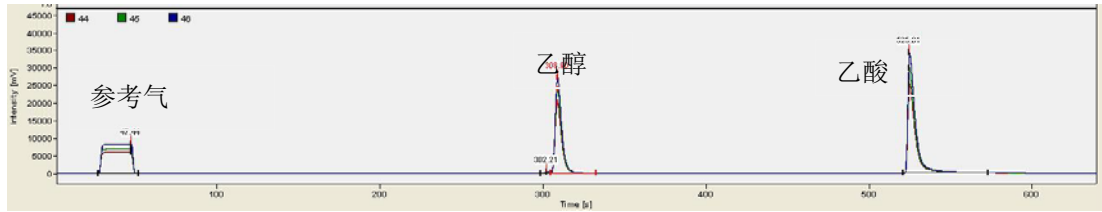


图2 乙醇和乙酸的 GC-C-IRMS 分析图谱

由图2可知,依照上述色谱程序,乙醇和乙酸的保留时间分别为309s和525s,二者分离效果明显,因此,可采用气相色谱-燃烧-稳定同位素比值质谱仪(GC-C-IRMS)的Backflush功能将溶剂峰乙醇除去,从而有选择的转化乙酸。

5. 乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 测定

根据乙醇和乙酸的保留时间,重新设定 GC-C-IRMS 方法后,样品稀释后进样测定,分析图谱见图3:

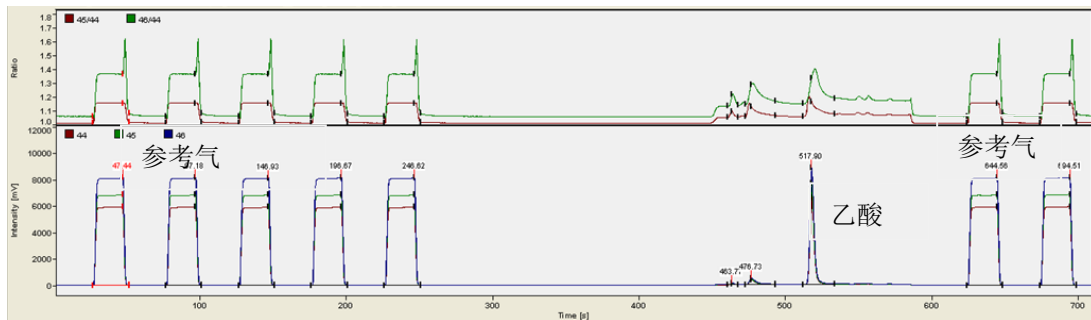


图3 乙醇的 GC-C-IRMS 分析图谱

由上图可知,该方法测定乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 时可有效避免其他有机物质的干扰。

6. 水对乙醇溶液中乙醇 $\delta^{13}\text{C}$ 测定影响

为了验证方法中乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 时是否会受水的影响,针对性配置了5%、10%、30%、50%的乙酸水溶液,按照以上方法继续多次测定,并与冰乙酸对比,结果见表3:

表3 多次测定三个酒精浓度梯度的乙醇 $\delta^{13}\text{C}$ 值

乙酸浓度	测定次数	极大值 (%)	极小值 (%)	平均值 (%)	标准偏差 (%)
5%	5	-25.810	-25.970	-25.898	0.062
10%	5	-25.788	-26.109	-25.921	0.121
30%	5	-25.804	-25.878	-25.835	0.028
50%	5	-25.799	-25.933	-25.858	0.052
99.9%	5	-25.873	-26.027	-25.946	0.069

上述数据表明,尽管不同溶液中乙醇浓度差异较大,但乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 的测定结

果稳定一致的，结果标准偏差均小于 0.15‰。研究结果表明该法可有效规避水对乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 测定影响。

7. 方法稳定性

7.1 重复性

按照上文中的样品前处理方法和色谱程序，用 GC-C-IRMS 连续 10 次测定一醋样品中乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ ，结果见表 4：

表 4 食醋中乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 重复性测定结果

测定次数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值	标准偏差
$\delta^{13}\text{C}$	-13.04	-12.91	-13.04	-13.00	-13.12	-13.05	-12.98	-13.00	-12.64	-12.93	-12.97	0.13

表 4 数据表明，GC-C-IRMS 测定醋样中乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 时，标准偏差仅 0.13‰，符合国际碳同位素测定要求 ($\text{SD} \leq 0.20\text{‰}$)。

7.2 再现性

选择 7.1 中的醋样品为试验对象，分别置于 5 个溶剂瓶 A、B、C、D 和 E，其中 A、B、C 和 D 分别在第 1 天、第 3 天、第 5 天、第 7 天和第 9 天进行测定，测定结果见表 4：

表 5 食醋中乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 再现性测定结果

样品编号	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	1σ (‰)	测定次数
A	-12.78	0.12	3
B	-12.97	0.05	3
C	-12.89	0.14	3
D	-13.00	0.06	3
E	-12.93	0.11	3
平均值	-12.91		
标准偏差 (1σ)	0.09		

表 5 结果显示该法的标准偏差 0.09‰，说明方法再现性很好，满足再现性测定要求 (小于 0.2‰)。

8. 准确性验证

由于目前国际上以及国外尚无醋制品中乙酸碳同位素测定的方法标准，也缺乏具有明确碳同位素组成的乙酸参考物质，因此项目组采用模拟混合的方法，将上文研究中用到的食醋样品以及冰乙酸样品以不同比例混合：以纯乙酸为基准，分别向食醋样品中混入 5%、15%、30% 和 50% 的冰乙酸，混匀后测定样品中乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ ，并以冰乙酸的比例为横坐标，以混合样品中乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 为纵坐标作图，

见图 4。

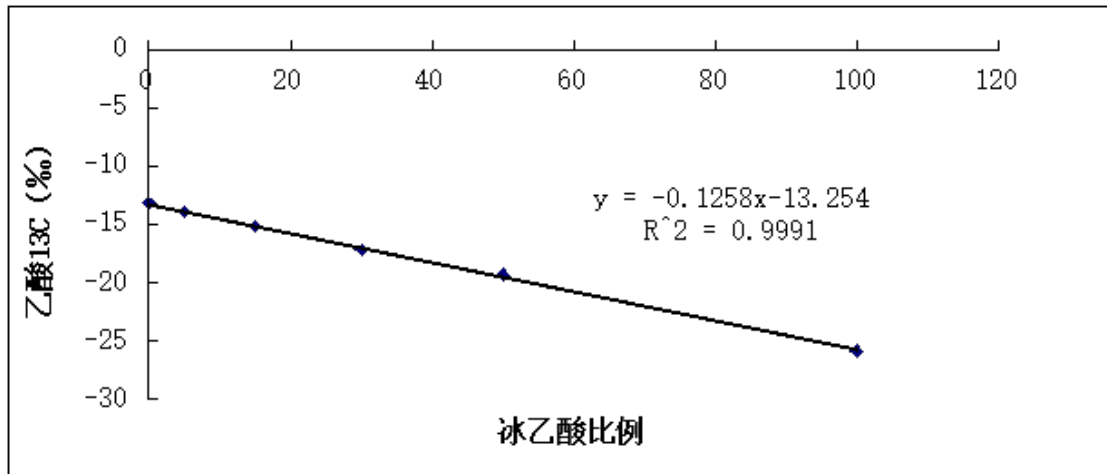


图 4 食醋中冰乙酸比例与乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 的相关性

由上图可知，冰乙酸与醋中乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 差异明显，而混合样品中乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 与冰乙酸的混入比例呈显著负相关关系，相关系数为 0.999，由此可知本方法可以准确具有不同碳同位素组成的乙酸 $\delta^{13}\text{C}$ 。

四、实验室协同试验结果

本方法经过中国食品发酵工业研究院、中国计量科学研究院、中国科学院微生物所等稳定同位素实验室进行的方法验证；制备了 A 与 B 两个醋样品，以及 C 冰乙酸，不同实验室严格按照标准文本进行检测，并及时反馈数据，具体验证结果见表 7。

表 7 实验室协同试验数据统计表 (‰)

实验室	醋 A		醋 B		冰乙酸 C	
1	-13.86	-13.58	-27.82	-27.64	-24.33	-24.32
2	-13.96	-13.81	-27.52	-27.65	-24.44	-24.33
3	-14.06	-13.81	-27.47	-27.51	-24.48	-24.37
4	-13.82	-13.61	-27.33	-27.45	-24.31	-24.18
5	-13.55	-13.33	-27.28	-27.46	-24.07	-24.07
6	-13.77	-13.55	-27.67	-27.86	-24.36	-24.38
7	-13.94	-13.79	-27.67	-27.90	-24.51	-24.43
8	-13.81	-13.76	-27.66	-27.73	-24.76	-24.69

平均值	-13.788	-27.602	-24.377
重复性标准差 Sr	0.12	0.11	0.05
重复性 r	0.34	0.31	0.15
再现性标准差 SR	0.14	0.18	0.19
再现性限 R	0.40	0.52	0.54