

# ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТЕЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ИЗОТОПНЫХ ОТНОШЕНИЙ ПРИ УСТАНОВЛЕНИИ ГЕОГРАФИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ЦЕЛЬНОГО МОЛОКА

И.В. Подколзин<sup>1</sup>, А.И. Соловьёв<sup>2</sup>

<sup>1</sup> старший научный сотрудник, кандидат химических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: podkolzin@arriah.ru

<sup>2</sup> химик, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: solovev@arriah.ru

## РЕЗЮМЕ

На примере 235 образцов цельного молока, собранных в различных регионах Российской Федерации, проведена оценка возможности применения масс-спектрометрии изотопных отношений легких элементов (С, N, O, H) в задаче установления географического происхождения молока в границах территории Российской Федерации. Количественная оценка возможностей метода выполнена с помощью серии статистических тестов, основанных на непараметрическом дисперсионном анализе.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, изотопные отношения, идентификация, «post-hoc»-анализ.

# ASSESSING APPLICABILITY OF ISOTOPE-RATIO MASS SPECTROMETRY (IRMS) FOR GEOGRAPHICAL IDENTIFICATION OF WHOLE MILK

I.V. Podkolzin<sup>1</sup>, A.I. Solovyev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Chemistry), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: podkolzin@arriah.ru

<sup>2</sup> Chemist, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: solovyev@arriah.ru

## SUMMARY

Applicability of isotope-ratio mass spectrometry of light elements (C, N, O, H) has been assessed for identification of geographical origin of Russian milk collected in different parts of the Russian Federation (235 sample of whole milk). Quantitative assessment was carried out in a series of statistical tests based on nonparametric dispersion analysis.

Key words: mass-spectrometry, isotope-ratio, identification, «post-hoc»-analysis.

## ВВЕДЕНИЕ

Данная работа выполнена в рамках международного научного проекта по сотрудничеству лабораторий с целью объединения усилий в разработке и создании глобальной системы идентификации географического происхождения молочной продукции, поддерживаемого Продовольственной и сельскохозяйственной организацией ООН (Food and Agriculture Organization, FAO) и Международным агентством по атомной энергии (International Atomic Energy Agency, МАГАТЭ). Выбор молока и молочных продуктов в качестве объектов исследования обусловлен разными причинами, в числе которых огромные объемы мирового производства, высокий уровень оборота в торговле и чувствительность потребителей к фальсификации. Предполагается, что опыт, полученный при разработке системы для отслеживания происхождения молочных продуктов, будет в дальнейшем применен и к другим пищевым продуктам.

К настоящему времени изотопный анализ, в том числе в различных его вариациях и сочетаниях с другими методами исследования, был применен к целому ряду продуктов питания и пищевого сырья [10] с целью создания методического подхода, который позволит устанавливать их географическое происхождение с той или иной степенью достоверности. Следует отметить, что существует обширное множество других аналитических методов [8, 12] для проверки происхождения продуктов, таких как элементный анализ (ИСП-МС, ИСП-АЭС) [1, 2], методы «отпечатков пальцев» или так называемое химическое профилирование с применением ядерного магнитного резонанса (<sup>1</sup>H-ЯМР, <sup>13</sup>C-ЯМР, SNIF-NMR) [4, 9, 18], инфракрасной (СИК, БИК) [7] и флуоресцентной [14, 15] спектроскопии, хроматографическое профилирование (ВЭЖХ-МС, ГХ-МС) [5, 6]. Перечисленные методы могут служить чрезвычайно мощным инструментом для решения задач идентификации происхождения. Тем не менее эти подходы имеют ограничения, и потому все они являются взаимодополняющими.

Неотъемлемой частью разработки методов идентификации является создание базы данных подлинных образцов, с которой впоследствии неизвестные образцы могут быть сравнены и идентифицированы. Установление географического происхождения молока не является исключением, однако сбор образцов из хозяйств разных стран является дорогостоящим и трудоемким этапом. В связи с этим появляется необходимость создания локальных баз данных на основе результатов исследований отдельных стран с последующей консолидацией их в единую библиотеку и внедрением в глобальную систему отслеживания пищевых продуктов (Food Traceability System).

Цель данной работы заключалась в оценке возможности применения изотопного метода (IRMS), предложенного в работах Rossmann A. и соавт. [19, 21], для установления географической принадлежности молока в границах Российской Федерации с учетом географической протяженности, климатических особенностей и условий ведения хозяйства.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Средства измерений.** Определение изотопных сигнатур углерода, азота, водорода и кислорода (С, N, H, O) выполняли с помощью масс-спектрометра изотопных отношений Delta V ADVANTAGE (Thermo Fisher, Герма-

ния), соединенного с элементным анализатором Flash 2000 (Thermo Fisher, Германия), оснащенного окислительным и высокотемпературным конверсионным реакторами. Автоматическое разбавление газообразных продуктов сгорания, полученных в результате сжигания или высокотемпературной конверсии пробы в элементном анализаторе, а также независимую подачу рабочих газов обеспечивали с помощью интерфейсного устройства CONFLOW IV (Thermo Fisher, Германия). Навески рабочего материала взвешивали на весах специального класса с наибольшим пределом взвешивания 6,1 г METTLER TOLEDO XP6 (Швейцария).

**Вспомогательная аппаратура.** Сепарацию твердой фазы проводили в центрифуге MPW 260R (MPW, Польша). Обезвоживание твердой фракции осуществляли в аппарате сублимационной сушки VirTis Benchtop 2K (SP Scientific, США) и эксикаторе по ГОСТ 25336-82.

**Газы и реагенты.** Двуокись углерода жидкая с объемной долей основного вещества не менее 99,8% в газовом баллоне на 10 л; поверочный нулевой газ — азот марки «Б» в газовом баллоне на 10 л; гелий газообразный марки «А» с объемной долей основного вещества не менее 99,995% в газовом баллоне на 40 л; кислород газообразный марки 5.0 с объемной долей основного вещества не менее 99,999% в газовом баллоне на 40 л; водород ОСЧ с объемной долей основного вещества не менее 99,999% в газовом баллоне на 10 л; монооксид углерода с объемной долей основного вещества не менее 99,99% в газовом баллоне на 10 л; эфир петролейный 40/70, ХЧ; оловянные «мягкие» универсальные капсулы (Thermo Scientific, Германия); кислота трифторуксусная концентрированная 99% (Sigma-Aldrich, Германия); международные сертифицированные стандарты: IAEA-152, IAEA-153, IAEA-600, IAEA-601, IAEA-CN-7 (МАГАТЭ, Вена/Зайбердорф, Австрия).

**Подготовка проб.** Пластиковую пробирку из полипропилена объемом 50 мл заполняли 40 мл цельного молока и к содержимому приливали 5 мл трифторуксусной кислоты. Полученную смесь плотно закрывали крышкой, перемешивали 5-кратным переворачиванием и помещали в центрифугу. Осаждение твердой фазы проводили при 5000 мин<sup>-1</sup> в течение 15 мин. Супернатант затем декантировали, осадок подвергали сублимационной сушке, предварительно заморозив образцы при минус 20°C. Удаление компонентов жирного ряда проводили путем экстракции органическим растворителем. Для этой цели навеску высушенного осадка массой около 1 г помещали в полипропиленовую коническую пробирку объемом 15 мл и приливали 5 мл петролейного эфира. Пробирку плотно закручивали и встряхивали содержимое на шейкере в течение 3 мин. Экстракт декантировали, и повторяли процедуру экстракции еще раз с новой порцией петролейного эфира. Остатки эфира удаляли в течение 10–15 мин, оставив открытые пробирки в вытяжном шкафу при комнатной температуре. Полученное сухое обезжиренное молоко (СОМ) хранили в закрытых пробирках в темноте при 5–8°C до востребования.

**Параметры и настройки измерительного оборудования.** Для определения δ<sup>13</sup>C и δ<sup>15</sup>N навеску СОМ массой 400 мкг упаковывали в оловянные капсулы 9×5 мм, вводили в окислительный реактор при 1020°C. С целью калибровки измерительного оборудования использовали инкапсулированные образцы международного стандарта IAEA-600 массой 400 мкг. В случае

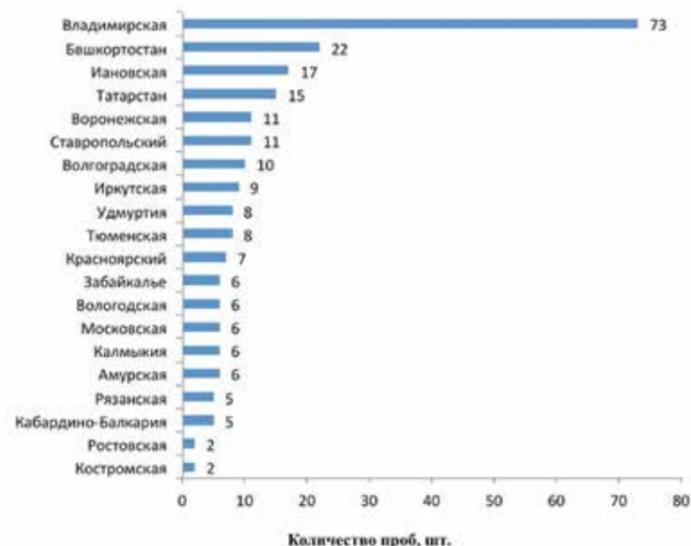


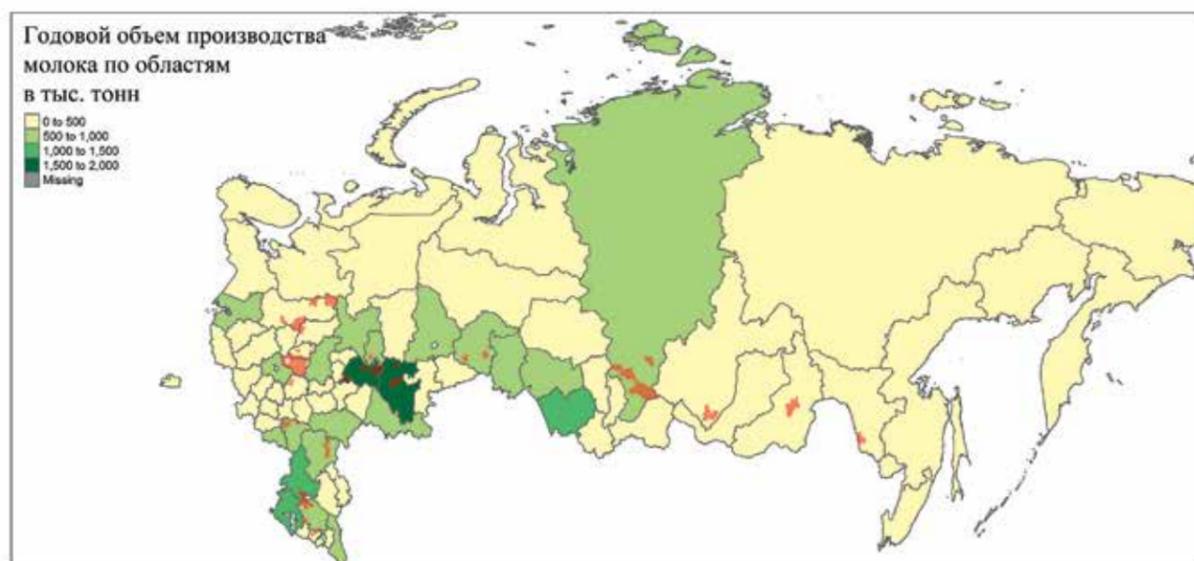
Рис. 1. Состав выборки

определения  $\delta^2\text{H}$  и  $\delta^{18}\text{O}$  навеску COM 170 мкг помещали в капсулу 6x4 мм из серебряного сплава и вводили в пиролизный реактор, разогретый до 1350°C. В качестве калибровочных стандартов применяли IAEA-600 (180 мкг) и IAEA-CH-7 (50 мкг) для кислорода и водорода соответственно.

**Программное обеспечение.** Первичные результаты измерений были обработаны с помощью пакета программного обеспечения ISODAT 3.0 (Thermo Electron, Германия). Статистическую обработку данных проводили с использованием свободного программного обеспечения для статистических расчетов — R версии 3.1.2 [22] с использованием следующих программных пакетов: e1071 1.6-4 [13], ggplot2 1.0.0 [24], kernlab 0.9-19 [11], lattice 0.20-29 [20], MASS 7.3-35 [23], tmap 1.2 [16], RMCMM 4.1 [17].

Рис. 2. Годовое производство цельного молока в Российской Федерации за 2013 г.

Объемы производства обозначены оттенками зеленого цвета, красным выделены регионы отбора проб.



### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Образцы.** Пробы молока были собраны в период 2013–2014 гг. Данная выборка состоит из 235 образцов, собранных на территории 65 административных районов в 20 областях РФ. Состав выборки представлен на рис. 1.

Стратегия отбора проб была разработана таким образом, чтобы по возможности покрыть территории с наибольшими объемами производства молока. Отбор проб на территории РФ осуществлялся точечно, со следующими крайними точками (в десятичных градусах):

	Широта	Долгота
Север	60.6686	46.3289
Восток	50.3587	127.9991
Юг	43.5667	43.5833
Запад	56.2179	35.6480

На рис. 2 показаны регионы отбора проб, наложенные на области с наибольшими объемами производства молока. Все доставленные в лабораторию образцы до проведения анализа хранились при температуре минус 25°C.

Определение изотопных отношений  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$ ,  $\delta^2\text{H}$  проводили в составе протеиновой фракции молока в режиме сжигания (EA-IRMS) и высокотемпературной конверсии (TC/EA-IRMS). Предварительно выделенная и высушенная протеиновая фракция обрабатывалась в соответствии с общими требованиями для измерения методом IRMS [3]. Полученные результаты затем были приведены к соответствующим международным δ-шкалам:

- VPDB — Венский стандарт Pee Dee Belemnite ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ );
- AIR — атмосферный азот ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ );
- VSMOW — Венский стандарт океанической воды ( $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$ ,  $\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$ ).

Результаты анализа представлены на рис. 3. Полученные значения δ-величины, привязанные к координатам мест отбора проб, нанесены на географическую

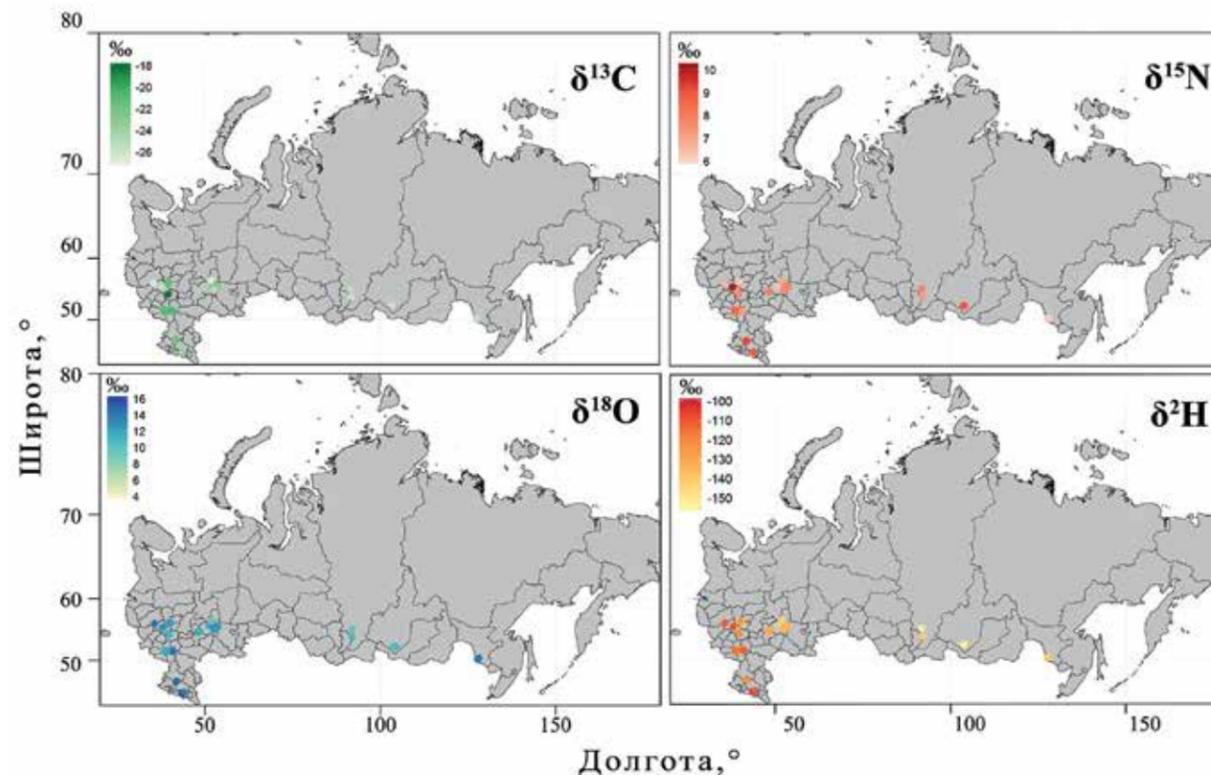


Рис. 3. Результаты определения  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$ ,  $\delta^2\text{H}$

карту. Ввиду отсутствия достаточного объема данных пространственная интерполяция значений изотопных отношений не выполнялась. Тем не менее подобная поточечная интерпретация даёт представление о плотности распределения значений величины δ на исследуемой территории.

**Статистическая обработка.** На основе полученных данных была выполнена первичная (промежуточная) оценка результатов. Так как в будущем предполагается проводить идентификацию неизвестных проб с помощью сравнения с набором эталонных образцов, т.е. проводить классификацию, используя в качестве входных данных результаты определения изотопных отношений, то на данном этапе целесообразно оценить эти переменные с точки зрения статистической значимости. Принимая во внимание вышесказанное, а также размер выборки и географические характеристики территории, на которой был проведен отбор проб, выполнение расчетов начали с применения кластерного анализа с целью группировки регионов по признакам сходства. Ввиду того, что существенной разницы в кластеризации между методом k-средних и EM-алгоритмом на данной выборке не выявлено, далее в расчетах использовали метод k-средних. Объединение регионов (административных районов) в группы проводили на основе географической близости пунктов отбора проб, т.е. на основе географических координат. Путем итеративного выполнения процедуры кластеризации было установлено пять уникальных групп (А-Е). Количество групп выбирали эмпирически. Состав и расположение полученных групп представлены на рис. 4.

Значимость различий между средними значениями изотопного состава между группами была оценена с помощью статистического теста. Графическое пред-

Таблица 1  
Результаты теста Краскела-Уоллиса

Изотопная сигнатура	Статистика $\chi^2$	df	p-value
$\delta^{13}\text{C}$	19,59	4	0,00060
$\delta^{15}\text{N}$	28,35	4	0,00001
$\delta^{18}\text{O}$	9,12	4	0,05823
$\delta^2\text{H}$	44,34	4	$5,5 \times 10^{-9}$

ставление величин δ с учетом вариации в группах показано на рис. 5.

Проверку на равенство средних медиальных выполняли с помощью непараметрического однофакторного дисперсионного анализа (тест Краскела-Уоллиса). Из результатов теста, представленных в табл. 1, видно, что среди пяти групп существует хотя бы одна, значительно отличающаяся от остальных по каждой переменной (изотопной сигнатуре).

Для того чтобы получить качественную и количественную характеристику различий между кластерами, проводили попарное сравнение групп — «post-hoc»-тест. Установлено, что между парами групп существует значимая статистическая разница. Исключение составляют группы, имеющие общие границы (табл. 2).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена оценка возможности применения метода масс-спектрометрии изотопных отношений в решении задачи установления географической принадлежности. Несмотря на относительно небольшой объем выборки и условный выбор количества групп, было

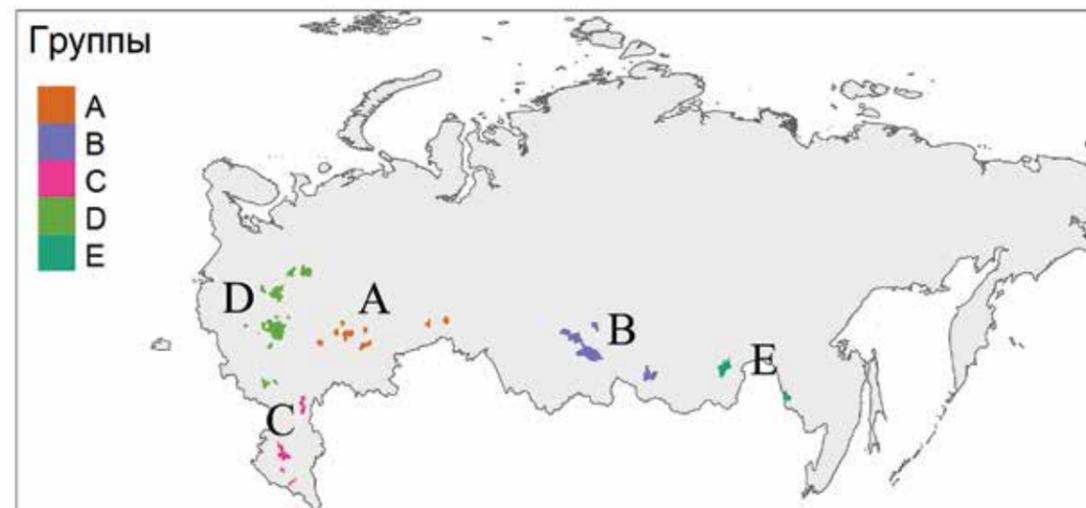
Таблица 2  
Результаты «post-hoc»-теста (парное сравнение)

	$\delta^{13}C$			
	A	B	C	D
B	0,9994	-	-	-
C	0,0025	0,0250	-	-
D	0,0694	0,2703	0,6991	-
E	0,9996	0,9963	0,0376	0,2648
	$\delta^{15}N$			
	A	B	C	D
B	0,5776	-	-	-
C	0,0029	0,3955	-	-
D	0,1577	0,9923	0,5199	-
E	0,1659	0,0134	0,00002	0,0013
	$\delta^{18}O$			
	A	B	C	D
B	0,260	-	-	-
C	0,997	0,187	-	-
D	0,763	0,844	0,617	-
E	0,821	0,093	0,933	0,323
	$\delta^2H$			
	A	B	C	D
B	0,20711	-	-	-
C	0,00082	0,000001	-	-
D	0,02160	0,000023	0,75399	-
E	0,77021	0,98606	0,00073	0,01017

установлено значимое различие между кластерами, что доказано с помощью соответствующих статистических тестов.

Результаты исследования показали, что изотопные отношения C, N, O, H обладают достаточной вариацией в значениях, чтобы служить основными отличительными

Рис. 4. Группы, сформированные на основе географических координат



ми характеристиками в задаче идентификации продукции, тем самым определяя ТС/EA-IRMS в качестве базового метода. С другой стороны, комбинирование его с другими аналитическими подходами может служить надежным инструментом при подтверждении подлинности происхождения молока. Поиск дополнительных факторов (характеристик), основанных на комбинировании нескольких аналитических подходов, например, с элементным анализом, изотопным анализом компонентов и др., и создание подходящего метода расчёта открывают новые возможности при идентификации молока.

Авторы выражают глубокую признательность ФАО/МАГАТЭ за финансовую поддержку в рамках сотрудничества в международном проекте D5.20.38 (Accessible Technologies for the Verification of Origin of Dairy Products as an Example Control System to Enhance Global Trade and Food Safety).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Anderson K.A., Smith B.W. Chemical profiling to differentiate geographic growing origins of coffee // J. Agr. Food Chem. — 2002. — Vol. 50, № 7. — P. 2068–2075.
- Ariyama, K., Yasui A. The determination technique of the geographic origin of welsh onions by mineral composition and perspectives for the future // JARQ-Jpn. Agr. Res. Q. — 2006. — Vol. 40, № 4. — P. 333–339.
- Carter J.F., Barwick V.J. Good practice guide for isotope ratio mass spectrometry // FIRMS Network. — 2011. — URL: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Good+Practice+Guide+for+Isotope+Ratio+Mass+Spectrometry#0>.
- Characterization of animal products according to geographic origin and feeding diet using nuclear magnetic resonance and isotope ratio mass spectrometry. Part II: Beef meat / J.-P. Renou, G. Bielicki, C. Deponge [et al.] // Food Chem. — 2004. — Vol. 86, № 2. — P. 251–256.
- Characterization of milk by analysis of its terpene fractions / C. Fernandez, C. Astier, E. Rock [et al.] // Int. J. Food Sci. Tech. — 2003. — Vol. 38, № 4. — P. 445–451.
- Comparison of the microbiological, compositional, biochemical, volatile profile and sensory characteristics of three Italian PDO ewes' milk cheeses / R. Di Cagno,

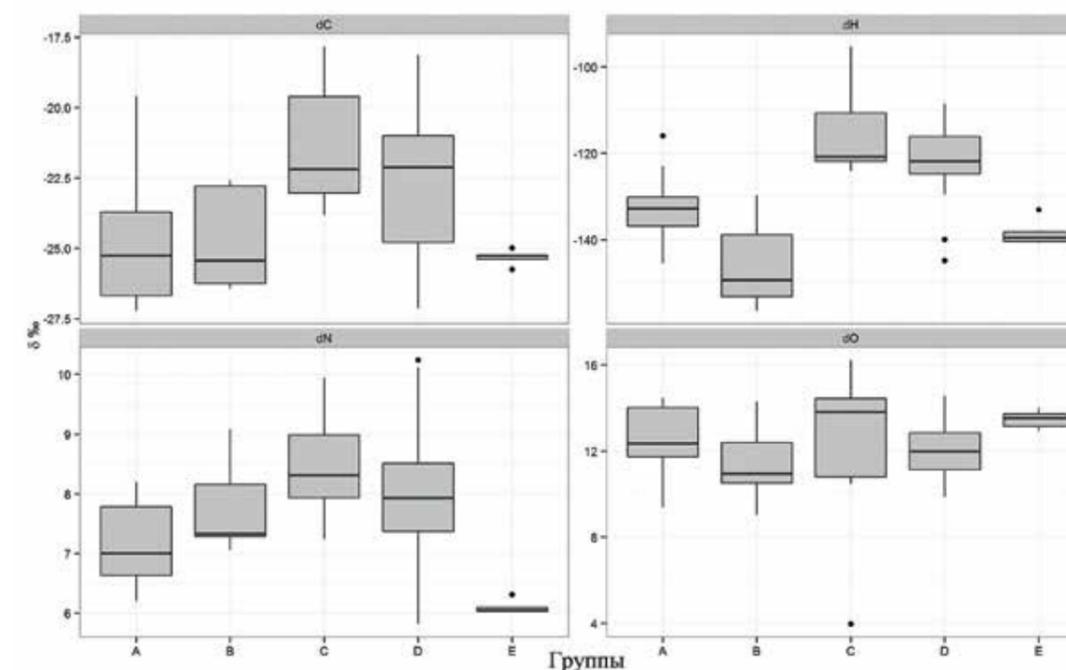


Рис. 5. Сравнение значений изотопных распространенностей по группам

- J. Banks, L. Sheehan [et al.] // Int. Dairy J. — 2003. — Vol. 13, № 12. — P. 961–972.
- Determining the geographic origin of Emmental cheeses produced during winter and summer using a technique based on the concatenation of MIR and fluorescence spectroscopic data / R. Karoui, E. Dufour, L. Pilonel [et al.] // Eur. Food Res. Technol. — 2004. — Vol. 219, № 2. — P. 184–189.
- Food Authenticity and Traceability / ed. M. Lees. — 1<sup>st</sup> ed. — Woodhead Publishing, 2003. — 400 p.
- Ibañez E., Cifuentes A. New analytical techniques in food science // Crc. Rev. Food Sci. — 2001. — Vol. 41, № 6. — P. 413–450.
- Kelly S., Heaton K., Hoogewerff J. Tracing the geographical origin of food: The application of multi-element and multi-isotope analysis // Trends Food Sci. Tech. — 2005. — Vol. 16, № 12. — P. 555–567.
- kernlab – An {S4} Package for Kernel Methods in {R} / A. Karatzoglou, A. Smola, K. Hornik, A. Zeileis // J. Stat. Softw. — 2004. — Vol. 11, № 9. — P. 10–20. — URL: <http://www.jstatsoft.org/v11/i09> (дата обращения: 17.07.15).
- Luyckx D.M.A.M., van Ruth S.M. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products // Food Chem. — 2008. — Vol. 107, № 2. — P. 897–911.
- Misc Functions of the Department of Statistics, Probability Theory Group (Formerly: E1071). TU Wien / D. Meyer, E. Dimitriadou, K. Hornik [et al.]. — 2014. — e1071: — URL: <https://cran.r-project.org/web/packages/e1071/e1071.pdf> (дата обращения: 17.07.15).
- Monitoring the geographic origin of both experimental French Jura hard cheeses and Swiss Gruyère and L'Etivaz PDO cheeses using mid-infrared and fluorescence spectroscopies: a preliminary investigation / R. Karoui, J.-O. Bosset, G. Mazerolles [et al.] // Int. Dairy J. — 2005. — Vol. 15, № 3. — P. 275–286.
- Monitoring the identity and the structure of soft cheeses by fluorescence spectroscopy / S. Herbert, N. Mouhous Riou, M.F. Devaux [et al.] // Le Lait. — 2000. — Vol. 80, № 6. — P. 621–634.
- Package 'tmap': Thematic Maps / M. Tennekes, J. Gombin, K. Russell, R. Zijdeman. — 2015. — URL: <https://cran.r-project.org/web/packages/tmap> (дата обращения: 16.12.15).
- Pohlert T. The Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR). — 2014. — URL: <http://cran.r-project.org/package=PMCMR> (дата обращения: 18.12.15).
- Reid L.M., O'Donnell C.P., Downey G. Recent technological advances for the determination of food authenticity // Trends Food Sci. Tech. — 2006. — Vol. 17, № 7. — P. 344–353.
- Rossmann A. Determination of stable isotope ratios in food analysis // Food Rev. Int. — 2001. — Vol. 17, № 3. — P. 347–381.
- Sarkar D. Lattice: Multivariate Data Visualization with R. — NY: Springer, 2008. — URL: Retrieved from <http://lmdvr.r-forge.r-project.org> (дата обращения: 17.07.15).
- The potential of multielement stable isotope analysis for regional origin assignment of butter / A. Rossmann, G. Haberhauer, S. Hölzl [et al.] // Eur. Food Res. Technol. — 2000. — Vol. 211, № 1. — P. 32–40.
- The R Project for Statistical Computing / R-project.org. — URL: <http://www.r-project.org> (дата обращения: 17.07.15).
- Venables W.N., Ripley B.D. Modern Applied Statistics with S (Fourth). — NY: Springer, 2002. — URL: <http://www.stats.ox.ac.uk/pub/MASS4> (дата обращения: 17.07.15).
- Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis / ed. R. Gentleman K. Hornik, G. Parmigiani. — London, NY: Springer Science+Business Media, LLC, 2009. — URL: <http://doi.org/10.1007/978-0-387-98141-3>.