

牛乳中多重元素及穩定同位素比值之檢驗方法

Method of Test for Multielement and Stable Isotope Ratios of Milk

- 1.適用範圍：本方法適用於市售牛乳中鉻(Cr)、錳(Mn)、鈷(Co)、鎳(Ni)、銅(Cu)、鎳(Ga)、砷(As)、銣(Rb)、銦(Sr)、鉬(Mo)、鎘(Cd)、銦(In)、銻(Sb)、銫(Cs)、鋇(Ba)、鉍(Tl)、鉛(Pb)、鉍(Bi)、鈣(Ca)、磷(P)、鈉(Na)、鎂(Mg)、鉀(K)、鋅(Zn)、碳穩定同位素比值($\delta^{13}\text{C}$)及氮穩定同位素比值($\delta^{15}\text{N}$)等26項檢驗，運用於無任何成分添加之牛乳為臺灣牛乳或境外牛乳之研判。
- 2.檢驗方法：檢體經冷凍乾燥後，分別(1)經加溫輔助酸消化後，以感應耦合電漿質譜儀(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)及感應耦合電漿放射光譜儀(inductively coupled plasma optical emission spectrometer, ICP-OES)進行多重元素之分析；(2)以錫杯包裹並經元素分析儀(element analyzer, EA)高溫裂解後，以穩定同位素比值質譜儀(stable isotope ratio mass spectrometry, IRMS)進行穩定同位素比值之分析。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 感應耦合電漿質譜儀。
 - 2.1.2. 感應耦合電漿放射光譜儀。
 - 2.1.3. 元素分析儀串聯穩定同位素比值質譜儀：
 - 2.1.3.1. 元素分析儀：Flash 2000，或同級品。
 - 2.1.3.2. 連續流串聯介面：Conflo IV，或同級品。
 - 2.1.3.3. 穩定同位素比值質譜儀：Delta V Advantage，或同級品。
 - 2.1.4. 冷凍設備：具凍結功能，溫度可達-20°C以下。
 - 2.1.5. 冷凍乾燥裝置：溫度可達-40°C以下，真空度可達113 mbar以下，供檢體乾燥用。
 - 2.1.6. 石墨熱板消化器(graphite block digester)：附溫度自動調節器。
 - 2.2. 試藥及氣體：
 - 2.2.1. 試藥：硝酸採用超純級(67~70%)及試藥特級；過氧化氫採用試藥特級；去離子水(比電阻於25°C可達18 M Ω ·cm以上)；鉻(chromium)、錳(manganese)、鈷(cobalt)、鎳(nickel)、銅(copper)、鎳(gallium)、砷(arsenic)、銣(rubidium)、銦(strontium)、鉬(molybdenum)、鎘

(cadmium)、銦(indium)、銻(antimony)、銫(caesium)、鋇(barium)、鉈(thallium)、鉛(lead)、鉍(bismuth)及鋅(zinc)標準品濃度為1000 µg/mL，鈣(calcium)、磷(phosphorus)、鈉(sodium)、鎂(magnesium)及鉀(potassium)標準品濃度為10000 µg/mL，銩(rhodium)內部標準品濃度為1000 µg/mL，均採用ICP分析級；USGS 40 ($\delta^{13}\text{C}$: -26.39‰、 $\delta^{15}\text{N}$: -4.52‰)^(註1)、USGS 43 ($\delta^{13}\text{C}$: -21.28‰、 $\delta^{15}\text{N}$: 8.44‰)^(註1)、USGS 61 ($\delta^{13}\text{C}$: -35.05‰、 $\delta^{15}\text{N}$: -2.87‰)^(註1)、USGS 62 ($\delta^{13}\text{C}$: -14.79‰、 $\delta^{15}\text{N}$: 20.17‰)^(註1)、USGS 73 ($\delta^{13}\text{C}$: -24.03‰、 $\delta^{15}\text{N}$: -5.21‰)^(註1)及IAEC-CH-6 ($\delta^{13}\text{C}$: -10.45‰)^(註1)參考物質。

註1：校正用參考物質可依檢體 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 範圍更換。

2.2.2. 氣體：氮氣、氧氣、氬氣及二氧化碳之氣體純度皆須大於99.9995%。

2.3. 器具及材料：

2.3.1. 容量瓶：50 mL，Pyrex材質。

2.3.2. 消化儲存瓶：50 mL，PP材質。

2.3.3. 濾膜：孔徑0.45 µm，PTFE材質。

2.3.4. 錫杯：直徑5 mm × 高8 mm。

2.3.5. 碳氮反應管：填充銀銳氧化物、還原銅、三氧化二鉻等物質之石英管。

2.4. 2% (w/w)硝酸溶液之調製：

取硝酸(超純級) 30 mL，緩緩加入去離子水500 mL中，再加入去離子水使成1000 mL。

2.5. 內部標準溶液之配製：

精確量取銩標準品0.5 mL，以2% (w/w)硝酸定容至50 mL，供作內部標準溶液。

2.6. 標準溶液之配製：

2.6.1. ICP-MS用之標準溶液：

精確量取鉻等18項標準品各0.1 mL，分別以2% (w/w)硝酸溶液定容至50 mL，移入儲存瓶中，作為標準原液。臨用時取適量各標準原液混合，加入內部標準溶液，以2% (w/w)硝酸溶液配製成鉻、錳、鈷、鎳、銅、鎂、砷、鉬、鎘、銻、銫、鋇、鉈、鉛、鉍為0~10 ng/mL、鋇為0~50 ng/mL及銩為

0~300 ng/mL (含內部標準品濃度5 ng/mL)，移入儲存瓶中，供作標準溶液。

2.6.2. ICP-OES用之標準溶液：

精確量取鋅等6項標準品各0.5 mL，分別以2% (w/w)硝酸溶液定容至50 mL，移入儲存瓶中，作為標準原液。臨用時取適量各標準原液混合，以2% (w/w)硝酸溶液配製成鋅為0~1 µg/mL及鈣、磷、鈉、鎂、鉀為0~100 µg/mL，移入儲存瓶中，供作標準溶液。

2.7. 標準品之製備：

取USGS 40、USGS 43、USGS 61、USGS 62、USGS 73及IAEC-CH-6參考物質各約0.20~0.90 mg (依碳、氮含量調整取樣量)^(註2)，精確稱定，分別置於錫杯中，包裹成粒後供作標準品。

註2：為避免訊號強度差異造成數值偏差，故調整樣品取樣量及氣體稀釋倍數，使其符合當次分析之參考氣體(CO₂、N₂)訊號強度(60~160%)。

2.8. 標準曲線之製作

2.8.1. ICP-MS標準曲線之製作：

將標準溶液以適當速率注入感應耦合電漿質譜儀中，依下列測定條件進行分析。就各元素與內部標準品訊號強度比值，與對應之各元素濃度，分別製作標準曲線。

感應耦合電漿質譜儀測定條件^(註3)：

電漿無線電頻功率：1500 W。

電漿氬氣流速：15 L/min。

輔助氬氣流速：0.9 L/min。

霧化氬氣流速：1.0 L/min。

偵測離子(m/z)：

分析元素		對應之內標元素	
鉻	53	鉍	103
錳	55		
鈷	59		
鎳	60		
銅	63		
鎳	69		
砷	75		

銦	85		
錒	88		
鉬	95		
鎘	111		
銦	115		
銻	121		
鉈	133		
鉕	137		
鉈	205		
鉛	208		
鉍	209		

2.8.2. ICP-OES標準曲線之製作：

將標準溶液以適當速率注入感應耦合電漿放射光譜儀中，依下列測定條件進行分析。就各元素之訊號強度與對應之各元素濃度，分別製作標準曲線。

感應耦合電漿放射光譜儀測定條件^(註3)：

電漿無線電頻功率：1000 W。

電漿氫氣流速：12 L/min。

輔助氫氣流速：1.0 L/min。

霧化氫氣流速：0.75 L/min。

偵測波長(nm)：

分析元素	偵測波長(nm)
鈣	422.673
磷	213.618
鈉	588.995
鎂	279.800
鉀	766.491
鋅	213.857

註3：上述測定條件分析不適時，依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

2.9. EA-IRMS標準化曲線之製作：

將各標準品分別以元素分析儀串聯穩定同位素比值質譜儀依下列條件進行分析。就各標準品之 $\delta^{13}\text{C}$ 及 $\delta^{15}\text{N}$ 測試值，與所對應參考物質之 $\delta^{13}\text{C}$ 及 $\delta^{15}\text{N}$ 驗證值進行線性迴歸，分別製作 $\delta^{13}\text{C}$ 及 $\delta^{15}\text{N}$

標準化曲線。

元素分析儀串聯穩定同位素比值質譜測定條件^(註4)：

反應爐溫度：1020°C。

層析管：IRMS Separation Column，不鏽鋼管，外徑6 mm，內
徑5 mm × 3 m。

層析管溫度：65°C。

載氣流速：氮氣，120 mL/min。

氧氣流速：250 mL/min。

參考氣體：氮氣，250 mL/min。

偵測離子(m/z)：

分析物	偵測離子(m/z)
氮氣	28、29
二氧化碳	44、45、46

註4：上述測定條件分析不適時，依所使用之儀器，設定適合之
測定條件。

2.10. 檢體前處理：

將檢體混勻後，取約20 g，精確稱定(W_1)，經凍結12小時及冷
凍乾燥48小時後秤重(W_2)，並將凍乾之檢體均質，供後續檢液
及檢品之調製用。

2.11. 檢液及檢品之調製：

2.11.1. 檢液之調製：

取2.10節經前處理之檢體約0.2 g，精確稱定，置於消化儲存
瓶中，加入內部標準溶液25 μ L、硝酸(超純級) 5 mL及過氧
化氫2 mL，靜置預消化30分鐘，再置於石墨熱板消化器中，
於70°C加熱消化30分鐘，升溫至90°C，加熱消化40分鐘，再
升溫至130°C，加熱消化90分鐘，冷卻後以去離子水定容至
50 mL，經濾膜過濾，供作檢液。另取一空白消化儲存瓶，
加入內部標準溶液25 μ L、硝酸(超純級) 5 mL及過氧化氫2
mL，以下步驟同檢液之操作，供作空白檢液。

2.11.2. 檢品之調製：

取2.10節經前處理之檢體約1.10~1.80 mg (依碳、氮含量調
整取樣量)^(註5)，精確稱定，置於錫杯中，包裹成粒後供作檢
品。

註5：為避免訊號強度差異造成數值偏差，故調整樣品取樣

量及氣體稀釋倍數，使其符合當次分析之參考氣體(CO₂、N₂)訊號強度(60~160%)。

2.12. 鑑別參數之測定：

2.12.1. 微量元素之含量測定：

將檢液、空白檢液及標準溶液以適當速率分別注入感應耦合電漿質譜儀中，以2.8.1節條件進行分析。就檢液、空白檢液及標準溶液中各元素與其內部標準品訊號強度比值，依下列計算式求出檢體中各元素之含量(ng/kg)：

$$\text{檢體中各元素之含量(ng/kg)} = \frac{(C - C_0) \times W_2 \times V}{W_1 \times W_S}$$

C：由標準曲線求得檢液中各元素之濃度(ng/mL)

C₀：由標準曲線求得空白檢液中各元素之濃度(ng/mL)

W₁：凍乾前檢體之取樣重量(g)

W₂：取樣檢體凍乾後之重量(g)

V：檢體最後定容之體積(mL)

W_S：取樣分析之經前處理檢體之重量(g)

2.12.2. 巨量元素之含量測定：

將檢液、空白檢液及標準溶液以適當速率分別注入感應耦合電漿放射光譜儀中，依2.8.2節條件進行分析。就檢液、空白檢液及標準溶液中各元素之訊號強度，依下列計算式求出檢體中各元素之含量(mg/kg)：

$$\text{檢體中各元素之含量(mg/kg)} = \frac{(C - C_0) \times W_2 \times V}{W_1 \times W_S}$$

C：由標準曲線求得檢液中各元素之濃度(μg/mL)

C₀：由標準曲線求得空白檢液中各元素之濃度(μg/mL)

W₁：凍乾前檢體之取樣重量(g)

W₂：取樣檢體凍乾後之重量(g)

V：檢體最後定容之體積(mL)

W_S：取樣分析之經前處理檢體之重量(g)

2.12.3. 碳及氮穩定同位素比値之測定：

檢品以元素分析儀串聯穩定同位素比値質譜儀依2.9節條件進行分析。就檢品之δ¹³C及δ¹⁵N測定值，由標準化曲線求得

檢體之 $\delta^{13}\text{C}$ 及 $\delta^{15}\text{N}$ 校正值。

2.13. 檢體產地之鑑別：

依據2.12節之檢體中各元素及穩定同位素比值之分析結果，代入財團法人中央畜產會已建置之牛乳數據資料庫^(註6)，利用機器學習模型^(註7)鑑別檢體為臺灣牛乳或境外牛乳。

註6：已建置1000筆以上牛乳樣品之數據資料庫。

註7：以電腦程式語言R所建構之Random Forest機器學習模型及辨別程式碼進行牛乳產地辨識；相關參數之設定皆透過k-折交叉驗證法(k-folds cross-validation)求得最佳解，最後經準確率(accuracy rate)確認預測效能，將辨識結果分為「臺灣牛乳」及「境外牛乳」。

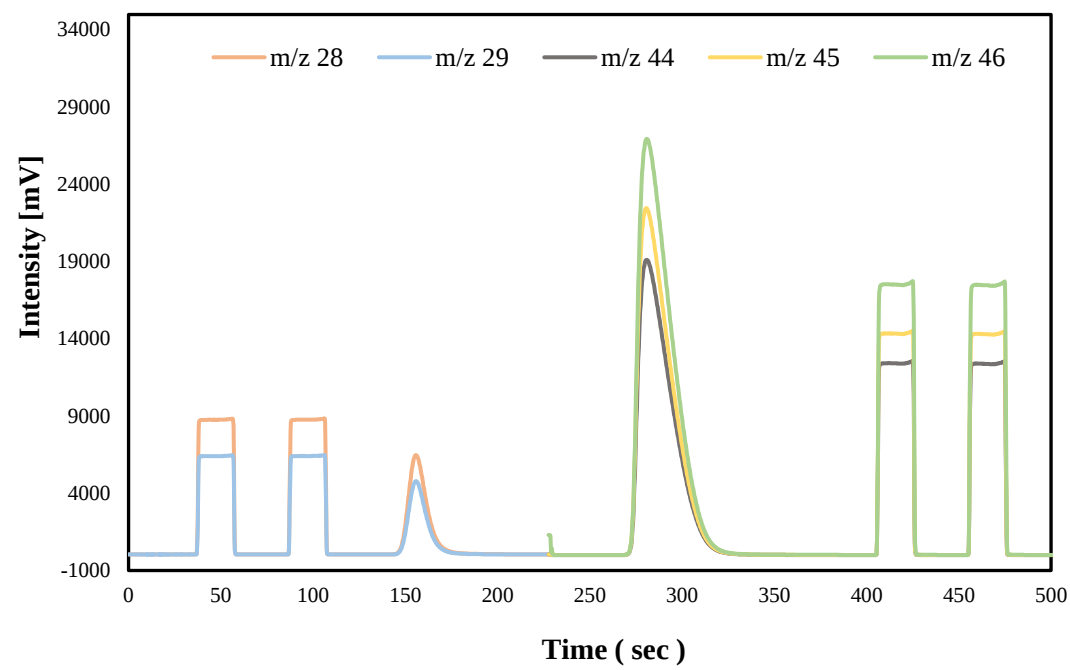
附註：1. 本檢驗方法可提供作為牛乳是否為臺灣牛乳或境外牛乳之參考，惟牛乳可能受飼養條件、氣候、品種及加工等因素影響，其結果仍需併調查結果所見綜合研判。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行檢討。

參考文獻：

1. Abbas, O., Zadavec, M., Baeten, V., Mikuš, T., Lešić, T., Vulić, A., J. Prpić, J., Jemeršić, L. and Pleadin, J. 2018. Analytical methods used for the authentication of food of animal origin. Food Chem. 246: 6-17.
2. Paul, D., Skrzypek, G. and Fórizs, I. 2007. Normalization of measured stable isotopic compositions to isotope reference scales - a review. Rapid. Commun. Mass Spectrom. 21: 3006-3014.
3. Varrà, M. O., Husáková, L., Patočka, J., Ghidini, S. and Zanardi, E. 2021. Multi-element signature of cuttlefish and its potential for the discrimination of different geographical provenances and traceability. Food Chem. 356: 129687.
4. Sullivan, R. O., Cama-Moncunill, R., Salter-Townshend, M., Schmidt, O. and Monahan, F. J. 2023. Verifying origin claims on dairy products using stable isotope ratio analysis and random forest classification. Food Chem.: X 19:100858.

參考層析圖譜



圖、牛乳之EA-IRMS層析圖譜