DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260331003
引用格式: 宁霄, 王美力, 曹进, 等. 液相色谱-高分辨质谱法结合同位素轮廓分析鉴别咖啡因和洛伐他汀来源[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(11): 167–174.
NING X, WANG ML, CAO J, *et al*. Source identification of caffeine and lovastatin by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry combined with isotope profile analysis [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(11): 167–174. (in Chinese with English abstract).

液相色谱-高分辨质谱法结合同位素轮廓分析鉴别咖啡因和洛伐他汀来源

宁 霄, 王美力, 曹 进*, 王钢力*
(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘 要: 目的 建立液相色谱-高分辨质谱法(liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry, LC-HRMS)的化合物特异性同位素轮廓分析方法, 鉴别食品中天然提取、化学合成及生物工程发酵来源的咖啡因、洛伐他汀。**方法** 采用 Waters XBridge BEH C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 通过平缓洗脱梯度适度展宽目标化合物色谱洗脱时间; 采用分辨率 140000 半峰全宽(full width at half maximum, FWHM)的四极杆-静电场轨道阱质谱仪, 对色谱峰内不少于 20 个非等间隔时间点的目标分子完整同位素峰进行连续采集; 数据处理阶段应用理论同位素杂原子贡献扣除模型, 结合 Grubbs 离群值检验与修剪精确线性时间(pruned exact linear time, PELT)变点检测算法, 量化色谱峰内同位素比值的不均一性及阶跃变化, 辅以全洗脱去卷积技术构建食品基质二维同位素特征分布模型。**结果** 天然茶源、化学合成及生物工程发酵来源的咖啡因, 以及天然红曲发酵与药用级来源的洛伐他汀, 其基础同位素指纹存在显著差异。模拟掺杂体系中, 当外源合成物质添加量达目标物总量 10%时, PELT 算法可在 P<0.01 置信水平下准确识别同位素比值变点; 当比例大于等于 20%时, 可锁定阶跃突变点。通过同位素质量平衡模型反推掺假比例, 相对偏差控制在±15%以内。方法在 0.1~10.0 μg/mL 范围内连续 5 d 测试的 δ^{13}C 日间相对标准偏差为 0.8%, 最大系统偏差+0.8‰, 表明具有高精密度和良好抗基质干扰能力。**结论** 本研究建立的多维同位素轮廓时序分析方法, 可在无需目标物完全色谱分离的条件下, 利用色谱同位素分馏效应实现同一分子天然与人工合成形态的定性区分, 为解决天然存在与人为添加来源易混淆物质的定性难题提供了可行技术手段, 为食品安全监管模式优化提供方法学参考。

关键词: 咖啡因; 洛伐他汀; 液相色谱-高分辨质谱法; 同位素轮廓分析; 色谱同位素分馏; 变点检测算法

收稿日期: 2026-03-31
基金项目: 高通量液质联用检测方法及诊断试剂研发项目(2021YFC2401103)
第一作者: 宁霄(1985—), 女, 硕士, 主任药师, 主要研究方向为分析化学。E-mail: 506612164@qq.com
***通信作者:** 曹进(1970—), 男, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: caojin@nifdc.org.cn
王钢力(1969—), 女, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品和化妆品安全检测。E-mail: duneer@163.com

Source identification of caffeine and lovastatin by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry combined with isotope profile analysis

NING Xiao, WANG Mei-Li, CAO Jin*, WANG Gang-Li*

(*National Institutes for Food and Drug Control*, *Beijing* 100050, *China*)

ABSTRACT: Objective To establish a compound-specific isotope profiling method by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS) for identify caffeine and lovastatin derived from natural extraction, chemical synthesis and bioengineered fermentation in food matrices. **Methods** Waters XBridge BEH C_{18} column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) coupled with a mild elution gradient was used to moderately broaden the chromatographic elution window of target compounds. A quadrupole-orbitrap mass spectrometer operated at a resolution of 140000 full width at half maximum (FWHM) was used to continuously acquire the complete isotopic peaks of target molecules at no fewer than 20 non-equidistant time points within each chromatographic peak. During data processing, a theoretical correction model was applied to subtract heteroatom isotope contributions. Grubbs' outlier test and the pruned exact linear time (PELT) change-point detection algorithm were then used to quantify intra-peak isotopic heterogeneity and stepwise shifts. Full-elution deconvolution was further used to construct a two-dimensional isotope landscape model of the food matrix. **Results** Caffeine from natural tea sources, chemical synthesis and bioengineered fermentation, as well as lovastatin from natural red-yeast fermentation and pharmaceutical-grade sources, showed distinct baseline isotopic fingerprints. In simulated adulteration systems, when exogenous synthetic substances accounted for 10% of the total target compound, the PELT algorithm accurately detected isotope-ratio change points at the P<0.01 confidence level; When the proportion was greater than or equal to 20%, stepwise transition points were reliably localized. The adulteration proportions back-calculated using the isotope mass-balance model showed relative deviations within ±15%. Over the concentration range of 0.1–10.0 μg/mL, the 5 consecutive days of testing gave an inter-day relative standard deviation of 0.8% for $\delta^{13}C$, with a maximum systematic bias of +0.8‰, demonstrating high precision and strong resistance to matrix interference. **Conclusion** The multidimensional isotope-profile time-series method established in this study enables qualitative differentiation between natural and artificially synthesize forms of the same molecule by exploiting chromatographic isotope fractionation without requiring complete chromatographic separation. This approach provides a feasible technical solution for resolving source-identification challenges involving substances with overlapping natural occurrence and artificial addition, and offers a methodological reference for improving food safety regulatory strategies.

KEY WORDS: caffeine; lovastatin; liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry; isotope profile analysis; chromatographic isotope fractionation; change-point detection algorithm

0 引 言

食品真伪鉴别与非法添加检测正由目标物检出和含量测定向来源属性判定延伸[1–2]。在实际抽检中，部分化合物兼具天然内源性成分和外源添加风险物质的双重属性[3–4]。含茶食品中的咖啡因可来源于茶叶等植物原料，也可能由化学合成咖啡因外源引入[5]；红曲类发酵食品中的洛伐他汀可由红曲霉发酵产生，也可能来自药用级洛伐他汀原料[6–7]。因此，此类目标物被检出并不必然等同于非法添加，关键在于判断其来源。常规高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)[8]、高效液相色谱-二极管阵列检测法[9]、液相色谱-串联质谱法[6,10]及超高效液相色谱-二极管阵列检测法[11]等方法可用于咖啡因、洛伐他汀及相关组分的定性定量分析，但通常反映目标物总量，难以直接区分天然内源成分与外源添加成分，且原料产地、品种、加工工艺和发酵条件差异会造成天然本底波动，使单纯依赖浓度阈值进行来源判定存在不确定性[12–13]。

目前，区分内源性与外源性物质的技术路径主要包括靶向色谱质谱分析法、非靶向指纹图谱和稳定同位素比值分析。靶向色谱质谱方法适用于硝基呋喃代谢物[14]、咖

啡因[10]等物质的筛查和含量测定, 但对同一分子不同来源的区分能力有限。非靶向高分辨质谱、代谢组学和化学计量学方法可用于食品真实性、产地和品种鉴别[15], 适合发现基质差异和潜在标志物, 但其判断通常依赖整体化学谱图或分类模型, 对咖啡因、洛伐他汀这类单一目标分子的来源识别仍需更直接的化合物特异性证据。稳定同位素比值分析能够利用生物合成、化学合成和工业发酵过程中的同位素分馏差异进行来源判定, 已有研究将其用于甲壳类水产品中内源性与外源性氨基脲识别[16]、植物精油和植物提取物真实性鉴别[17–18], 并涉及饮料中天然与合成咖啡因以及红曲膳食补充剂中洛伐他汀掺假来源分析。

多元素稳定同位素比值分析在区分天然提取来源与人工合成来源方面提供了重要参考途径。传统稳定同位素比质谱法(isotope ratio mass spectrometry, IRMS)虽然在食品真实性和产地溯源中应用较多[19–20], 但通常需要样品高温燃烧或裂解气体化[21–23]。该过程可能造成有机化合物结构信息和色谱保留特征丢失, 且对目标物纯度和前处理要求较高[24], 限制了其在复杂基质和微量目标物日常检测中的应用。液相色谱-高分辨质谱法(liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry, LC-HRMS)具有精确质量测定和全扫描采集能力, 在复杂食品基质小分子分析中应用广泛[25–27], 为在完整分子层面解析同位素轮廓提供了技术基础。

基于上述问题, 本研究以咖啡因和洛伐他汀为对象, 建立基于 LC-HRMS 的化合物特异性同位素轮廓分析方法。研究拟通过适度展宽色谱峰, 采集目标物洗脱周期内多个时间点的同位素峰信息, 结合杂原子同位素贡献校正、Grubbs 离群值检验和修剪精确线性时间(pruned exact linear time, PELT)变点检测算法, 分析色谱峰内同位素比值的连续性和阶跃变化, 并通过不同来源标准品、模拟掺杂体系和实际样品验证方法适用性。该研究聚焦天然内源背景与外源添加来源易混淆的检测问题, 为含茶饮料和红曲类保健食品中相关风险物质的来源判定提供方法学参考。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

初级毛茶原料共 52 批, 包括云南普洱茶区 18 批、福建武夷茶区 12 批、浙江西湖茶区 10 批、贵州遵义茶区 6 批、四川蒙顶茶区 6 批, 覆盖 50~1800 m 不同的海拔范围和春、夏、秋等不同采样季节。传统红曲样品共 36 批, 包括福建古田 15 批、浙江温州 12 批和江西宜春地区 9 批, 覆盖 *Monascus purpureus*、*Monascus ruber*、*Monascus pilosus* 3 个主要产业菌种。市售抽检茶饮料样品 20 批次, 红曲类保健食品样品 15 批次, 均来自国内流通市场。

天然来源咖啡因标准品、化学合成来源咖啡因标准品、天然发酵来源洛伐他汀标准品、药用级洛伐他汀标准品(纯度均≥99.0%, 中国食品药品检定研究院); 甲醇、乙腈(色谱纯, 德国 MerckKGaA 公司); 甲酸、甲酸铵(色谱纯, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 实验用水均为 Milli-Q 超纯水(电阻率≥18.2 MΩ • cm)。

1.2　仪器与设备

Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱复合高分辨质谱仪(配套 Ultimate 3000 高效液相色谱系统与加热型电喷雾电离源, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 3-18K 高速冷冻离心机(德国 Sigma Laborzentrifugen GmbH 公司); KQ-500DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Milli-Q 超纯水仪(美国 EMD Millipore Corporation 公司); MS205DU 电子分析天平(感量 0.01 mg, 瑞士 Mettler-Toledo International 公司); N-EVAP 112 型恒温水浴氮吹仪(美国 Organomation Associates 公司); Waters XBridge BEH C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、柱前配套同型号保护柱(10 mm×4.6 mm, 5 μm)(美国 Waters 公司); 0.22 μm 聚四氟乙烯(polytetrafluoroethylene, PTFE)疏水滤膜(美国 Pall Corporation 公司)。

1.3　实验方法

1.3.1　样品的前处理

为严格控制同位素交换反应或分馏效应, 所有前处理过程均在室温(20~25 ℃)下完成, 严格控制温度、pH 与提取强度[28–30]。

(1)茶饮料及功能茶饮

将匀浆后的样品置于80%甲醇水溶液中, 室温下进行温和超声提取 30 min。提取液经高速离心并过 0.22 μm PTFE 疏水滤膜后封闭待测。

(2)红曲类保健品

采用乙腈-水(70:30, *V*:*V*)中性提取体系, 并添加 0.1%甲酸铵作为缓冲对将微环境 pH 稳定在 6.8。浓缩过程采用柔性氮气流吹扫, 水浴温度全程控制在 40 ℃以内。

1.3.2　色谱条件

(1) HPLC 条件

选用 Waters XBridge BEH C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱前配套同型号保护柱(10 mm×4.6 mm, 5 μm)。采用色谱峰均匀展宽策略。流速 0.4 mL/min, 柱温 30 ℃。

咖啡因分析流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液, B 为色谱级甲醇, 进样量 10 μL。梯度洗脱程序为: 0~5 min, 20% B; 5~25 min, 20%→35% B(线性); 25~30 min, 35% B; 30~31 min, 35%→95% B; 31~35 min, 95% B; 35~36 min, 95%→20% B; 36~45 min, 20% B 平衡。

洛伐他汀分析流动相 A 为含 2 mmol/L 甲酸铵的 0.1%甲酸水溶液, B 为乙腈, 进样量 20 μL。0~3 min, 40% B; 3~20 min, 40%→75% B; 20~25 min, 75% B; 25~26 min, 75%→95% B; 26~30 min, 95% B; 30~31 min, 95%→40% B; 31~40 min, 40% B 平衡。

另设置扩展梯度洗脱程序, 0~65 min, 流动相 B 由 0%线性升至 95%, 用于基质全组分解卷积与交叉验证。

(2) MS 条件

质谱采用加热型电喷雾电离源, 正离子监测模式, 喷雾电压 3.5 kV, 离子传输管温度为 320 ℃, 鞘气流量 40 arb, 辅助气流量 10 arb, 质量分辨率为 140000 半峰全宽(full width at half maximum, FWHM) (*m*/*z* 200)。自动增益控制目标值(automatic gain control, AGC target)设定为 1×10^6, 最大离子注入时间(maximum injection time, Max IT)为 200 ms。全扫描数据采集速率设定为 2 Hz, 同位素切片采用非等间隔采样策略, 确保单一色谱峰内获取不少于 20 个有效时间点。

本研究采用全扫描模式(full mass scan, Full MS)/靶向选择离子监测(targeted selected ion monitoring, t-SIM)复合扫描模式。Full MS 通道: 扫描范围 *m*/*z* 100~500, 用于全洗脱二维同位素特征分布构建与基质代谢物去卷积。t-SIM 通道: 用于同位素轮廓的高灵敏度精细采集, 咖啡因[M+H]$^+$隔离窗口设为 *m*/*z* (195.0877±2.0) Da, 覆盖 M、M+1、M+2 同位素峰簇; 洛伐他汀[M+H]$^+$隔离窗口设为 *m*/*z* (405.2636±3.0) Da, 覆盖至 M+3 同位素峰。

1.4 数据解析与统计算法构建

1.4.1 多元素同位素混合贡献的解析校正

质谱提取的同位素信号包含了氮、氧、氢等杂原子重同位素的叠加干扰。设定表观相对丰度比为 $R_{obs}=I_{M+1}/I_M$。以咖啡因($C_8H_{10}N_4O_2$)为例, 各杂原子干扰贡献为: ^{15}N 干扰贡献为 0.0148; ^{17}O 干扰贡献为 0.0008; ^{2}H 干扰贡献为 0.0015。基于最小二乘法同位素轮廓拟合算法, 校正后分子内单碳原子的纯同位素比值计算公式如(1)所示。

$$R_{CC}=\frac{R_{obs}-0.0148-0.0008-0.0015}{8} \tag{1}$$

式中: R_{CC} 为扣除杂原子同位素贡献后单个碳原子的表观同位素比值, 无量纲; R_{obs} 为质谱实测表观同位素相对丰度比, 无量纲; I_{M+1} 为 M+1 同位素峰强度或峰面积; I_M 为单同位素峰强度或峰面积。

并以维也纳皮迪箭石为参照, 标准化为学术界通用的 δ^{13}C 千分差值(‰), 计算如公式(2)所示。

$$\delta^{13}C=(\frac{R_{sample}}{R_{standard}}-1)\times1000 \tag{2}$$

式中: δ^{13}C 为样品相对于国际标准物质的碳稳定同位素组成, ‰; R_{sample} 为样品经杂原子同位素贡献校正后的 ^{13}C/^{12}C, 无量纲; $R_{standard}$ 为国际标准物质维也纳皮迪箭石的 ^{13}C/^{12}C 基准比值, 本研究取 0.0112372[31], 无量纲。

1.4.2 基于 PELT 动态规划算法的时序变点检测

为在仪器噪声等高频数据序列中定位同位素比值阶跃变化, 引入了 PELT 算法。针对长度为 20 的千分差值序列 $y_1, y_2, \ldots, y_{20}$, PELT 算法通过寻找最优分割集合最小化全局目标惩罚成本函数, 计算如公式 (3)所示。

$$C(y_{1:n})=\min_{\tau}[\sum_{i=1}^{m}C(y_{\tau_{i-1}+1:\tau_i})+\beta_m] \tag{3}$$

式中: C 为衡量数据内聚度的方差成本函数, β 为通过贝叶斯信息准则设定的全局惩罚项。经 1000 次蒙特卡洛随机置换检验, 设定 P<0.01 为阈值, 以研判洗脱周期内的同位素组成是否存在具有统计学意义的跃迁。

1.4.3 基于扩展梯度全扫描的二维同位素特征分布构建

为对结果进行交叉验证, 系统采用 65 min 超长洗脱梯度(0%~95%全跨度有机相冲洗)与连续小波变换算法对基质组分进行解卷积处理。通过高斯核密度估计拟合解卷积识别出的 100~500 种代表性内源代谢物在二维空间中的概率云分布。进一步采用马氏距离量化目标化合物空间坐标 X 与天然基质密度区 μ 间的偏离程度, 计算如公式 (4)所示。

$$D=\sqrt{(X-\mu)^T S^{-1}(X-\mu)} \tag{4}$$

式中: D 为目标化合物的马氏距离, 无量纲; X 为目标化合物的空间坐标; μ 为天然基质中内源组分的均值向量; S 为天然基质中内源组分二维特征变量的协方差矩阵; $(X-\mu)^T$ 为向量$(X-\mu)$的转置。

若目标物马氏距离超出基质总体分布的 95%置信度包络面(遵循 χ^2 分布), 则提示其可能来源于外源添加。

1.5 数据处理

原始质谱数据采集与峰提取采用 Xcalibur 4.2.47 软件完成, 同位素峰精确质量积分采用 FreeStyle 1.6 SP1 软件完成。同位素轮廓拟合采用 enviPat Web 2.4 平台进行。PELT 变点检测采用 R 4.3.1 语言环境下的 changepoint 2.2.4 完成, 蒙特卡洛置换检验采用 Python 3.10 环境下的 scipy.stats 1.11.3 模块完成。连续小波变换去卷积采用 MATLAB R2022b Wavelet Toolbox 完成, 马氏距离和高斯核密度估计计算采用 Python scikit-learn 1.3.0 完成。数据整理采用 Microsoft Excel 2021, 图片绘制采用 OriginPro 2024, 组间统计差异分析采用 IBM SPSS Statistics 26.0。

所有标准品测定均进行 6 次平行实验, 模拟掺假体系每个掺杂比例进行 5 次独立平行实验, 市售样品每批次重复进样 3 次, 方法精密度验证连续 5 d、每日 6 次, 共 30 次。组间差异采用单因素方差分析, 并配合 Tukey 事后检验进行多重比较, P<0.05 表示差异具有统计学意义。PELT 算法变点判定采用 1000 次蒙特卡洛随机置换检验, 置信阈值设为 P<0.01。

以目标化合物质量浓度为横坐标(X, μg/mL), 以单同位素峰色谱峰面积为纵坐标(Y), 在 0.1~10.0 μg/mL 范围内进行线性回归分析。检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ)分别按 3 倍信噪比(S/N=3)和 10 倍信噪比(S/N=10)确定。

2　结果与分析

2.1　方法条件确定与数据采集策略

2.1.1　样品前处理条件确定

在应对复杂基质样品前处理时, 需要在最大化实现目标物提取净化的前提下, 避免因化学环境剧变或热力学做功引入同位素交换反应或分馏效应。

(1)茶饮料及功能茶饮的提取。针对咖啡因特性, 本研究弃用传统高温索氏或回流提取, 避免高温导致分子热解离。将匀浆后的食品样品置于 80%甲醇水溶液中, 在 20~25 ℃室温下进行功率受控的温和超声提取 30 min。提取液经高速离心并过 0.22 μm PTFE 疏水滤膜后封闭待测。该条件在保证对咖啡因良好溶解性的同时, 有效规避了高温可能引发的同位素交换。

(2)红曲保健品的提取。洛伐他汀在无活性内酯型与活性开环羟基酸型之间的动态平衡对 pH 高度敏感。为锁定原食品体系中的原始同位素状态, 本研究采用乙腈-水(70:30, *V*:*V*)中性提取体系, 添加 0.1%甲酸铵作为缓冲对, 将微环境 pH 稳定在 6.8。浓缩过程采用柔性氮气流吹扫, 水浴温度全程控制在 40 ℃以内, 避免热分解或同位素交换。

2.1.2　色谱峰展宽与采样点覆盖

与传统靶向分析追求窄峰不同, 同位素轮廓分析需在单色谱峰洗脱时间内采集充足的高频数据切片。因此, 本研究采用色谱峰展宽策略, 通过调整分配系数均匀展宽目标色谱峰。实验弃用了亚 2 μm 填料的 UHPLC 短柱, 选用 5 μm 粒径的 Waters XBridge BEH C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)反相色谱柱。较长的柱床体积与适中的粒径增加了溶质分子的纵向扩散效应, 在不破坏峰形对称性的前提下实现了有效加宽。在 1.3.2 色谱条件下, 咖啡因的色谱峰底宽延展至 2~3 min。

2.1.3　高分辨质谱采集参数设置

为满足目标分子同位素峰精确采集和峰内时序分析的需要, 本研究采用正离子模式进行质谱检测。质量分辨率设定为 140000 FWHM (*m*/*z* 200), 以提高单同位素峰及低丰度重同位素峰的质量分辨能力, 减少等压基质离子对同位素峰积分的干扰。喷雾电压设定为 3.5 kV, 离子传输管温度为 320 ℃, 并结合鞘气和辅助气条件促进溶剂脱除, 以获得较稳定的离子化效率, 同时降低源内碎裂和低质量端溶剂簇合物干扰。

针对咖啡因和洛伐他汀分子量及离子传输特性的差异, S-lens 射频透镜电压分别设定为 50 和 65, 以提高目标离子进入质谱分析器的传输效率。AGC target 设定为 1×10^6, Max IT 设定为 200 ms; 当低丰度重同位素峰信号不足时, Max IT 可适当延长至 500 ms, 以提高同位素峰测定的稳定性。全扫描数据采集速率设定为 2 Hz, 结合前述色谱峰展宽条件, 可在 2~3 min 的目标峰洗脱周期内获得约 240~360 张质谱图, 为后续峰内多点同位素轮廓提取提供足够数据基础。

在数据提取阶段, 采用非等间隔切片策略对目标峰进行采样。根据目标峰的峰前沿、峰顶核心区、中部洗脱区和峰尾区域的信号分布, 分别提取 3、5、8 和 4 个时间点的质谱数据, 确保单一色谱峰内获得不少于 20 个有效采样点。该采样方式兼顾峰顶区域的信号稳定性和峰边缘区域对同位素组成变化的敏感性, 可用于后续 δ^{13}C 时序分布分析和 PELT 变点检测。

2.2　不同来源目标化合物的同位素基准指纹特征

初级毛茶原料样品共 52 批, 每批样品独立提取并平行测定 3 次, 共获取 156 个咖啡因样本数据点。结果显示, 天然茶叶咖啡因的 δ^{13}C 值稳定在–27.2‰附近, δ^{15}N 值稳定在+1.2‰至+2.8‰区间。受合成途径影响, 不同工艺纯品表现出明显不同的同位素特征指纹(表 1)。

同时, 天然红曲发酵来源的 108 个洛伐他汀样本数据点结果显示: δ^{13}C 稳定在–25‰至–23‰区间, δ^{18}O 稳定在 0‰至+22‰区间, 与药用级合成洛伐他汀同位素特征存在显著差异, 为来源鉴别提供了明确的基准阈值。

2.3　方法学验证结果

2.3.1　线性关系、检出限与定量限

在优化的 LC-HRMS 条件下, 两种目标化合物在 0.1~10.0 μg/mL 范围内线性关系良好, 决定系数 r^2 均大于 0.999。其中, 咖啡因的线性方程为 $Y=1.276\times10^7X+3.842\times10^5$, r^2 为 0.9994, LOD 和 LOQ 分别为 0.02 μg/mL 和 0.08 μg/mL; 洛伐他汀的线性方程为 $Y=8.635\times10^6X+2.157\times10^5$, r^2 为 0.9991, LOD 和 LOQ 分别为 0.03 μg/mL 和 0.10 μg/mL。在上述 LOQ 浓度水平下, M+1 同位素峰信噪比均大于 50, 可满足同位素比值精密测定的信号强度需求, 保证 δ^{13}C 计算的准确性与稳定性。

2.3.2　掺假检出限与识别效能

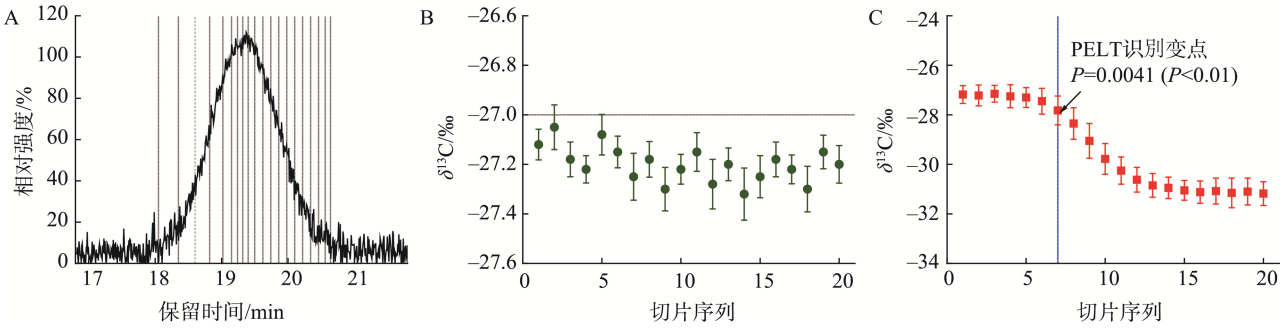
将化学合成咖啡因按 5%、10%、20%、30%、50%的质量比例掺入标准茶汤基质。平行测试显示: 5%添加组, 仅 2~3 个孤立数据点出现轻微漂移, PELT 算法未识别到统计学意义的变点, 无法稳定检出。10%添加组, 出现 5~7 个连续异常数据点, PELT 算法可在 $P<0.01$ 置信水平下稳定识别色谱峰中后段的阶跃变点。≥20%高比例添加组, 算法可准确锁定突变点; 通过同位素质量平衡动力学模型对掺假比例进行反推计算, 估算值与真实添加值的相对偏差控制在±15%以内, 且随着添加比例升高, 估算偏差逐步缩小。

本研究的同位素轮廓分析原理及典型时序鉴别结果如图 1 所示。通过色谱峰展宽策略, 目标物在洗脱周期内被切分为多个高频质谱分析窗口, 放大了微观的色谱同位素效应(chromatographic isotope effect, CIE)。在不含外源添加物的天然本底样品中, 由于单一物质在洗脱过程中的同位素分馏处于动态平衡, 其 δ^{13}C 时序分布表现出较好的均一性与连续性。然而, 当体系中混入基础同位素指纹存在

表 1 不同工艺来源纯品咖啡因的多维同位素指纹特征(n=6)

Table 1 Multi-dimensional isotopic fingerprint characteristics of pure caffeine from different processes (n=6)

咖啡因来源体系	δ^{13}C/‰	δ^{15}N/‰	工艺特征分析
生咖啡豆/原叶茶天然提取物	–27.2±0.8	+2.1±0.6	遵循高等植物 C_3 途径生物合成，酶促反应动力学同位素分馏特征明显
尿素/氰乙酸起始全化学合成工业级试剂	–32.5±0.5	–1.5±0.4	以石油化工衍生品与无机合成氮源为前体，碳氮同位素呈显著贫化特征
特定菌种生物工程定向发酵产物	–20.3±0.6	+5.4±0.7	以玉米衍生碳源为发酵底物，同位素富集特征与天然植物来源存在明显差异



注: A. 色谱峰展宽策略与高频质谱切片采样模式示意图; B. 天然本底样品(标准茶汤咖啡因)洗脱周期内的 δ^{13}C 时序分布，表现为均一连续特征; C. 掺假样品(含 20%合成咖啡因)的 δ^{13}C 时序分布, PELT 算法成功识别出 CIE 引起的阶跃突变点(蓝色虚线, P<0.01)。

图 1 基于 LC-HRMS 的化合物特异性同位素轮廓分析原理及典型鉴别结果

Fig.1 Principle and typical identification results of compound-specific isotope profile analysis based on LC-HRMS

差异的外源合成物质时，由于重同位素分子的保留时间微小偏移，混合物在色谱洗脱中后段的同位素组成发生了显著改变。PELT 算法成功感知并量化了这一均值漂移，在 P<0.01 的置信水平下明确标定了同位素比值的阶跃突变点。这一结果直观地表明，即使在宏观色谱图中目标物呈现为单一未分离色谱峰，本方法依然能够通过时序同位素轮廓的内部解构，实现对隐蔽掺杂行为的定性识别。

2.3.3 抗基质干扰能力与精密度验证

在 0.1~10.0 μg/mL 线性范围内连续 5 d 的测试显示，在高糖、高蛋白基质中目标物 δ^{13}C 的日间相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)仅为 0.8%，基质效应导致的最大系统偏差为+0.8‰，表明方法具备良好的抗基质干扰能力与检测精密度。

2.4 市售实际样品检测结果

2.4.1 茶饮料样品的筛查分析

抽检 20 批次市售茶饮料，18 批次咖啡因同位素序列表现均一且马氏距离处于 95%置信域内, 2 批次异常。样本 A(原叶浓缩绿茶): 理化指标合规，但色谱峰后半段 8 个时序数据点 δ^{13}C 值较前端下降 4‰，全洗脱去卷积检出咖啡豆特征代谢物(咖啡酸、绿原酸碎片)，提示添加了咖啡豆提取物。样本 B(某提神功能茶饮): 靶向色谱呈单一尖峰，但同位素切片呈现二元特征。前半段 δ^{13}C 均值约–27‰(符合天然茶源)，后半段稳定在–32‰左右(符合合成指纹)。估算合成咖啡因占比约 35%。

2.4.2 红曲保健食品的筛查分析

抽检 15 批次产品，12 批次洛伐他汀的 δ^{13}C (–25‰至–23‰)与 δ^{18}O (0‰至+22‰)符合天然发酵特征。3 批次异常: 样本 C(标称纯发酵，洛伐他汀 0.8%)呈现二元分布特征，早期微弱信号组 δ^{13}C 为–23.82‰至–24.05‰，位于天然红曲发酵来源洛伐他汀 δ^{13}C 基准范围内，而占绝对主体的信号组 δ^{13}C 迅速转入–28.42‰至–31.35‰区间，与药用级洛伐他汀标准品高度匹配。样本 D、E(洛伐他汀 0.3%)浓度处于常规合法限值范围内，但同位素组成显著偏离天然红曲真菌发酵产物阈值区间，提示存在外源添加行为。表 2 为典型异常样品 δ^{13}C 时序分布。

表 2 典型异常样品的 δ^{13}C 时序分布(‰, n=20)

Table 2 δ^{13}C temporal distribution of typical abnormal samples (‰, n=20)

切片序号	样本 A (茶饮料)	样本 B (功能茶饮)	样本 C (红曲保健品)
1	–27.05	–27.18	–23.82
2	–27.11	–27.22	–23.91
3	–27.08	–26.95	–24.05
4	–27.15	–27.31	–28.42
5	–27.20	–27.05	–29.18
6	–27.18	–27.42	–30.05
7	–27.25	–27.28	–30.51
8	–27.32	–27.95	–30.88
9	–27.45	–29.12	–31.02

表 2(续)

切片序号	样本 A (茶饮料)	样本 B (功能茶饮)	样本 C (红曲保健品)
10	–27.68	–30.25	–31.15
11	–28.05	–31.18	–31.22
12	–28.55	–31.85	–31.18
13	–29.12	–32.15	–31.25
14	–29.85	–32.28	–31.30
15	–30.45	–32.42	–31.35
16	–30.92	–32.35	–31.28
17	–31.25	–32.51	–31.32
18	–31.48	–32.45	–31.25
19	–31.55	–32.38	–31.30
20	–31.62	–32.42	–31.28

注: 样本 A: PELT 算法在切片#12 处识别到统计学显著的均值阶跃, P=0.0023 (P<0.01), 结合全洗脱去卷积检测到的咖啡酸(m/z 181.0495)与绿原酸特征碎片(m/z 353.0878), 判定为咖啡豆提取物外源添加; 样本 B: PELT 算法在切片#9 识别变点, P=0.0008, 基于同位素质量平衡模型反推, 合成咖啡因添加比例为 34.7%±2.1%(与官方复检值 36.2%相对偏差–4.1%); 样本 C: 变点位于切片#4, P=0.0005, 反推药用级洛伐他汀占比 88.5%±3.4%。

3　讨　论

3.1　同位素轮廓用于来源判定的适用性

咖啡因和洛伐他汀既可来源于食品原料本身, 也可来自外源添加, 因此常规含量测定只能判断目标物是否存在及其含量水平, 难以直接说明其来源。本研究结果显示, 不同来源咖啡因及洛伐他汀在稳定同位素组成上具有可区分特征, 说明同位素轮廓可作为含量检测之外的来源判定依据。对于含茶饮料和红曲类保健食品, 此类信息有助于区分天然内源背景与外源添加信号。但同位素判定依赖天然样品本底范围, 后续仍需扩大不同产区、原料品种、加工方式和发酵工艺样本量, 以提高阈值设定的代表性。

3.2　峰内 δ^{13}C 时序变化与 PELT 判定的意义

本研究采用色谱峰适度展宽和峰内多点采样, 以观察同一色谱峰内部 δ^{13}C 是否保持连续稳定。天然本底样品中 δ^{13}C 时序分布较稳定, 未出现显著变点, 因此, 峰内 δ^{13}C 时序分布的稳定性可作为判断目标物来源是否单一的重要依据。相反, 当样品中混入化学合成咖啡因时, 即使总离子流色谱图仍表现为单一色谱峰, 其峰内不同时间段的同位素组成也可能出现方向性变化, 这种变化为识别天然来源与外源添加来源的混合提供了信息。

PELT 算法在本研究中的作用是对上述时序变化进行统计判定。与单点离群值检验相比, PELT 更关注连续数据段之间均值水平是否发生改变, 因此能够降低个别积分误差、离子源瞬时波动或基质抑制造成的误判风险。模拟掺假结果显示, 当外源添加比例较低时, δ^{13}C 异常多表现为零散波动, 尚不足以形成稳定变点; 当外源添加比例达到一定水平后, 色谱峰中后段出现连续偏移, PELT 可识别出具有统计学意义的阶跃变化。由此说明, 该方法更适合作为来源异常筛查和辅助判定工具, 尤其适用于常规含量检测不能解释目标物来源的样品; 但对于极低比例掺假, 仍需结合重复测定、同位素质量平衡模型及其他特征标志物进行综合判断。

3.3　实际样品应用与方法局限

市售样品结果表明, 同位素时序分析能够为常规含量合规但来源异常的样品提供进一步证据。茶饮料异常样品中, δ^{13}C 时序偏移与咖啡豆相关特征代谢物信息相互印证。红曲类样品中, 洛伐他汀同位素组成偏离天然发酵区间, 提示存在外源药用级原料加入的可能。实际应用中, 单一同位素指标不宜作为唯一判定依据, 应结合目标物含量、特征代谢物、同位素质量平衡模型、生产配方及复检结果进行综合判断。此外, 不同基质的离子抑制、峰形变化和低丰度同位素峰积分误差均可能影响时序判定结果, 后续需开展不同实验室、不同仪器平台和更多真实样品的验证, 以进一步评价方法的稳定性和可推广性。

4　结　论

本研究以含茶饮料中咖啡因和红曲类保健食品中洛伐他汀为对象, 建立了基于 LC-HRMS 的化合物特异性同位素轮廓分析方法。该方法通过缓梯度洗脱获得适于峰内采样的色谱峰宽度, 结合高分辨质谱同位素峰采集、杂原子同位素贡献校正和 PELT 变点检测, 对目标物洗脱周期内 δ^{13}C 时序变化进行分析。结果表明, 不同来源咖啡因和洛伐他汀具有可区分的同位素特征; 模拟掺假体系中, 外源添加比例达到 10%时可识别同位素比值变点, 添加比例大于等于 20%时变点定位更稳定; 方法在连续 5 d 测试中 δ^{13}C 日间 RSD 为 0.8%, 表现出较好的重复性。实际样品分析显示, 该方法可为含茶饮料和红曲类保健食品中目标物来源异常筛查提供补充证据。后续仍需扩大天然本底数据库, 并开展多实验室验证, 以进一步评价其在实际监管检测中的适用性。

参考文献

[1] ZHANG S, CHEN J, GAO F, *et al*. Foodomics as a tool for evaluating food authenticity and safety from field to table: A review [J]. Foods, 2025, 14(1): 15.

[2] KAMBLE A, BAJAJ S, DHAULANIYA AS, *et al*. Analytical advances in food authentication and origin traceability: From mass spectrometry to AI and IoT-enabled smart sensing systems [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2025, 19(8): 5257–5285.

[3] YOU H, GERSHON H, GOREN F, *et al*. Analytical strategies to determine the labelling accuracy and economically-motivated adulteration

of “natural” dietary supplements in the marketplace: Turmeric case study [J]. Food chemistry, 2022, 370: 131007.

[4] SHEN Q, ZENG X, KONG L, *et al*. Research progress of nitrite metabolism in fermented meat products [J]. Foods, 2023, 12(7): 1485.

[5] VIANA C, ZEMOLIN GM, DALMOLIN TR, *et al*. Detection and determination of undeclared synthetic caffeine in weight loss formulations using HPLC-DAD and UHPLC-MS/MS [J]. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2018, 8(6): 366–372.

[6] HANNON KM, SABALA JD, MANTHA M, *et al*. Using stable carbon isotope ratio analysis to detect adulteration in red yeast rice dietary supplements [J]. Talanta, 2024, 266: 125076.

[7] RIGHETTI L, DALL’ASTA C, BRUNI R. Risk assessment of RYR food supplements: Perception *vs*. reality [J]. Frontiers in Nutrition, 2021, 8: 792529.

[8] IVANOVA S, TODOROVA V, GREKOVA-KAFALOVA D, *et al*. Approaches to authenticating products containing red yeast rice extract (monacolin K) [J]. Molecules, 2026, 31(4): 723.

[9] SZÉKELYHIDI R, AJTONY Z, LAKATOS E, *et al*. Optimization and validation of HPLC–DAD method for simultaneous analysis of sweeteners, preservatives, and caffeine in sugar-free beverages [J]. European Food Research and Technology, 2023, 249(11): 2797–2805.

[10] 郭紫娟, 程晓芳. 超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱法测定景德镇地区茶叶中咖啡因含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(2): 88–95.
GUO ZJ, CHENG XF. Determination of caffeine content in Jingdezhen tea by ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(2): 88–95.

[11] DAVANI L, TERENZI C, DE SIMONE A, *et al*. Design of experiments and optimization of monacolin K green extraction from red yeast rice by ultra-high-performance liquid chromatography [J]. Foods, 2024, 13(16): 2509.

[12] AYAKDAŞ G, AĞAGÜNDÜZ D. Determination of *L*-theanine and caffeine contents in tea infusions with different fermentation degrees and brewing conditions using the chromatographic method [J]. Foods, 2025, 14(13): 2313.

[13] YUAN X, GAO S, TAN Y, *et al*. Production of red yeast rice rich in monacolin K by variable temperature solid fermentation of *Monascus purpureus* [J]. RSC advances, 2023, 13(39): 27303–27308.

[14] GONG X, LI K, XU W, *et al*. Determination of nitrofuran metabolites in complex food matrices using a rough, cheap, easy-made wooden-tip-based solid-phase microextraction probe and LC-MS/MS [J]. Journal of Chemistry, 2022, 2022(1): 1315276.

[15] GARCÍA-PÉREZ P, BECCHI PP, ZHANG L, *et al*. Metabolomics and chemometrics: The next-generation analytical toolkit for the evaluation of food quality and authenticity [J]. Trends in Food Science & Technology, 2024, 147: 104481.

[16] HUIZHEN W, ZHI L, HU Z, *et al*. Identification of endogenous and exogenous semicarbazide (SEM) in crustacea aquatic products using compound-specific nitrogen stable isotope ratio analysis (NSIRA) [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2023, 119: 105257.

[17] CUCHET A, ANCHISI A, TELOUK P, *et al*. Multi-element (^{13}C, ^{2}H and ^{34}S) bulk and compound-specific stable isotope analysis for authentication of allium species essential oils [J]. Food Control, 2021, 126: 108086.

[18] CUCHET A, JAME P, ANCHISI A, *et al*. Authentication of Tonka beans extracts (dipteryx odorata) using LC-UV/MS, GC-MS and multi element (^{13}C, ^{2}H and ^{18}O) bulk specific isotope analysis [J]. Industrial Crops and Products, 2024, 209: 118038.

[19] 杜晓宁, 张鹏帅, 雷雯, 等. 稳定同位素技术在我国食品安全检测领域的应用进展[J]. 同位素, 2019, 32(3): 231–243.
DU XN, ZHANG PS, LEI W, *et al*. Application of stable isotope technique in food safety field [J]. Journal of Isotopes, 2019, 32(3): 231–243.

[20] LI C, KANG X, NIE J, *et al*. Recent advances in Chinese food authentication and origin verification using isotope ratio mass spectrometry [J]. Food chemistry, 2023, 398: 133896.

[21] ARTAVIA G, CORTÉS-HERRERA C, GRANADOS-CHINCHILLA F. Selected instrumental techniques applied in food and feed: quality, safety and adulteration analysis [J]. Foods, 2021, 10(5): 1081.

[22] LIU H, NIE J, LIU Y, *et al*. A review of recent compound-specific isotope analysis studies applied to food authentication [J]. Food Chemistry, 2023, 415: 135791.

[23] NURALYKYZY B, WADOOD SA, NIE J, *et al*. Guidelines for sample preparation and Stable Isotope Analysis of food for traceability studies [J]. Food Safety and Health, 2026, 4(2): 299–309.

[24] KUZNETSOVA OV. Current trends and challenges in the analysis of marine environmental contaminants by isotope ratio mass spectrometry [J]. Analytical and bioanalytical chemistry, 2024, 416(1): 71–85.

[25] SENYUVA HZ, GÖKMEN V, SARIKAYA EA. Future perspectives in Orbitrap™-high-resolution mass spectrometry in food analysis: A review [J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2015, 32(10): 1568–606.

[26] GAVAGE M, DELAHAUT P, GILLARD N. Suitability of high-resolution mass spectrometry for routine analysis of small molecules in food, feed and water for safety and authenticity purposes: A review [J]. Foods, 2021, 10(3): 601.

[27] 刘兰花, 孙智伟, 刘长庆, 等. 液相色谱-高分辨质谱法检测果蔬脆片中 9 种有机酸含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(15): 264–272.
LIU LH, SUN ZW, LIU CQ, *et al*. Determination of 9 organic acids in fruit and vegetable crisps by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(15): 264–272.

[28] PILECKY M, WASSENAAR LI, TAIPALE S, *et al*. Protocols for sample preparation and compound-specific stable-isotope analyses (δ^{2}H, δ^{13}C) of fatty acids in biological and environmental samples [J]. MethodsX, 2023, 11: 102283.

[29] RONCONE A, BONTEMPO L. Stable isotope analysis of alcoholic beverages: A review [J]. Beverages, 2025, 11(3): 89.

[30] PILECKY M, MEADOR TB, WASSENAAR LI. Advancements in compound-specific hydrogen stable-isotope analysis of fatty and amino acids [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2025, 186: 118194.

[31] International Organisation of Vine and Wine. Method for ^{13}C/^{12}C isotope ratio determination of acetic acid in wine vinegar by isotopic mass spectrometry (Type II) [EB/OL]. (2013-06-07) [2026-05-12]. https://www.oiv.int/standards/compendium-of-international-methods-of-analysis-for-vinegars/wine-vinegars/methods-of-analysis-for-vinegars/method-for-13c/12c-isotope-ratio-determination-of-acetic-acid-in-wine-vinegar-by-isotopic-mass-spectrometry-%28type-ii%29

(责任编辑：曹岱琳 蔡世佳)