

稳定同位素及放射性¹⁴C 技术在香兰素溯源中的应用

刘维维¹, 尹希杰¹, 王建飞², 林珊珊¹

(1. 自然资源部第三海洋研究所, 福建 厦门 361000; 2. 昆山市绿渊香料有限公司, 江苏 昆山 215300)

摘要: 香兰素分为天然香兰素、化学合成香兰素和生物合成香兰素, 不同来源的香兰素价格差异巨大。本研究分析了不同来源香兰素的 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^2\text{H}$ 、 $\delta^{18}\text{O}$ 值和放射性同位素¹⁴C 活度。结果显示, 结合 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^2\text{H}$ 、 $\delta^{18}\text{O}$ 值可区分以天然丁香酚、阿魏酸和 4-甲基愈创木酚等为前体原料的香兰素; 放射性同位素¹⁴C 活度仅能识别香兰素的前体原料为生物或化石来源; 通过这 4 个指标无法区分不同合成路径(化学和生物合成)的香兰素。同时, 制备过程用水对香兰素的 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值基本没有影响, 但制备过程中结晶溶剂和酶的使用对香兰素的 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值产生了显著影响。结果表明, 稳定同位素及放射性同位素技术可在一定程度上有效鉴别香兰素来源, 为打击香兰素市场的欺诈行为提供了技术支持。

关键词: 香兰素; 稳定同位素; 放射性同位素¹⁴C; 溯源

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2026)00-0001-09

DOI: 10.7538/zpxb.2025.0125

CSTR: 32365.14.zpxb.2025.0125

Application of Stable Isotope and Radioactive ¹⁴C Techniques in Vanillin Traceability

LIU Wei-wei¹, YIN Xi-jie¹, WANG Jian-fei², LIN Shan-shan¹

(1. Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Xiamen 361000, China;

2. Kunshan Lvyuan Flavoring Co., Ltd., Kunshan 215300, China)

Abstract: Vanillin is classified into natural vanillin (i.e., the vanillin extracted from vanilla beans), chemically synthesized vanillin, and biologically synthesized vanillin. The prices of vanillin derived from different sources vary greatly, so identifying the source of vanillin can help to combat persistent fraudulent activities. Owing to the differences in isotopic compositions of vanillin from different sources, isotope technology is effective for distinguishing natural vanillin from biologically or chemically synthesized vanillin. In this study, the $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^2\text{H}$ 、 $\delta^{18}\text{O}$, and ¹⁴C activity of vanillin from different precursor materials and synthesis pathways were analyzed, and then one-way analysis of variance was conducted to identify the isotopic characteristics of vanillin from different precursors and synthesis pathways, verifying the feasibility of tracing the sources of vanillin using isotope technology and providing basic data for the vanillin isotopic database. Additionally, for the first time, the influence of using water with different isotopic compositions during the preparation processes on

the vanillin's isotopic compositions was investigated, thereby further improving the vanillin isotope tracing methodology. The results showed that the combination of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^2\text{H}$ can clearly distinguish vanillin derived from different precursor materials including natural eugenol, ferulic acid, 4-methylguaiacol and so on. The combination of $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ can also distinguish vanillin derived from different precursor materials, but the differentiation effect is inferior, mainly because the discriminatory effect of $\delta^{18}\text{O}$ is less clear. The activity of radioactive isotope ^{14}C can identify whether the precursor material of vanillin is from natural biological sources or fossil fuels, while it is hard to distinguish the specific biological origin of vanillin, even if they come from different plant precursors. However, these four indicators can not distinguish vanillin from different synthetic routes (e.g., chemical or biological synthesis). Meanwhile, the water used in the production process has little effect on the $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ of vanillin, but the use of crystallization solvents and enzymes during the processes has a significant impact on the $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ of vanillin. These results indicated that the precursor materials, the exchange reactions during the biochemical synthesis or purification processes, and the degree of isotopic fractionation may all have influence on the isotope distribution in the final product of vanillin. As a result, the stable and radioactive isotope techniques are effective tools for identifying the source of vanillin, which can provide strong technical support for combating vanillin fraud.

Key words: vanillin; stable isotope; radioactive isotope ^{14}C ; traceability

香兰素(3-甲氧基-4-羟基苯甲醛),又名香草醛,是香草的主要风味成分,最早于1816年从香草豆中分离出来^[1],是最受欢迎的风味物质之一,其广泛应用于香精香料、食品调味剂、化工和医药等行业,是目前世界上产量最大的香料。从香草豆中提取的香兰素通常被称为天然香兰素,由于香草豆的种植条件较为严苛,其产量远不能满足市场的巨大需求,在全球消费量中占比不足1%。据统计,市场上超过90%的香兰素来源于化学合成^[2],主要以木质素、愈创木酚等石油化工原料或丁香酚为前体,经一系列化学反应制得^[3];天然香兰素的价格约为化学合成香兰素的300倍。近年来,消费者愈发青睐天然健康食品,生物香兰素应运而生,它是利用丁香酚、阿魏酸、姜黄素或葡萄糖等为天然前体,经酶或微生物转化而成^[4]。几种常见的化学和生物合成香兰素的反应路径示于图1。生物香兰素的生产成本虽远低于香草豆提取物,但仍高于化学合成香兰素,预计未来市场份额会稳步上升。另一方面,根据欧盟相关法规,以天然前体为原料,通过生物技术生产的香料,依法应被视为“天然”产品^[5],因此生物香兰素等同于“天然”香兰素,其在替代香草豆提取物方面展现出巨大潜力。市场上不同来源香兰素的价格差异巨大,导

致天然香兰素掺假欺诈行为极易发生,因此,开发可靠的分析方法以鉴定香兰素的真实来源非常重要。

元素稳定同位素的化学性质相似,但因质量存在差异可能会发生分馏,例如,重同位素的化学键更强,断裂和形成时需要更高的活化能,导致其反应速率相较于轻同位素更慢,从而产生同位素分馏效应。不同来源的同类化合物具有不同的元素同位素分布特征,利用稳定同位素技术这一原理可实现香兰素来源判断。

香兰素分子含有的碳、氢和氧3种元素均可被用作判别其来源的同位素指标。对于植物而言,大多数同位素研究都采用碳同位素($\delta^{13}\text{C}$)进行溯源。有研究^[6]报道,依据光合作途径的不同可分为C3、C4和CAM植物,它们分别具有不同的 ^{13}C 分馏特征;C3植物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值范围为 $-33\text{‰}\sim-24\text{‰}$,C4植物为 $-16\text{‰}\sim-10\text{‰}$,CAM植物介于C3和C4植物之间;而香草属于典型的CAM植物,化学合成与生物香兰素的前体源自C3、C4植物或石油化工燃料,因此, $\delta^{13}\text{C}$ 是香兰素溯源的一项强有力且有效的指标。不同来源香兰素的氢同位素($\delta^2\text{H}$)差异尚未得到广泛关注。植物吸收水分用于生物合成代谢物,而水的 $\delta^2\text{H}$ 值取决于其地理位置,具有海拔、季节、

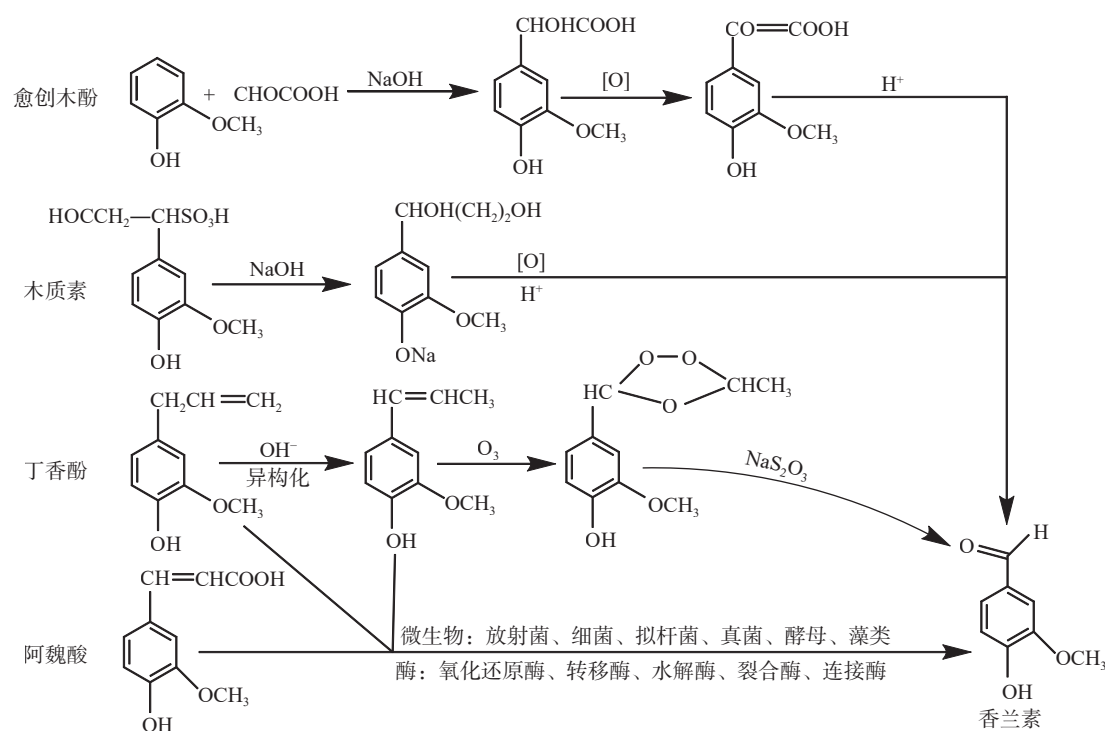


图 1 常见的化学和生物合成香兰素的反应路径

Fig. 1 Reaction pathways of chemical and biosynthesis of vanillin

大陆及纬度效应,因此天然和合成香兰素前体的来源可通过其 $\delta^2\text{H}$ 值反映出来^[7]。香兰素的氧同位素($\delta^{18}\text{O}$)很少受到关注,降水中的 $\delta^{18}\text{O}$ 与 $\delta^2\text{H}$ 存在较强的相关性,可被用于产地示踪。有机物质中的氧原子主要来源于 CO_2 、 O_2 和植物水源,这三者的同位素特征具有显著差异,因此通过分析香兰素的 $\delta^{18}\text{O}$ 值也能够获得大量信息^[8]。

^{14}C 是碳元素的放射性同位素,在鉴别香兰素源自生物碳基还是化石碳基方面具有独特优势。 ^{14}C 由宇宙射线在高层大气中产生,其能迅速融入陆地生态系统的碳循环,因此现代生态系统(包括所有动植物)中 ^{14}C 含量与大气中含量保持一致。当动植物死亡并停止呼吸代谢后,体内 ^{14}C 随着时间推移缓慢衰变直至消耗殆尽,特别是以石油化工原料合成的香兰素中不含 ^{14}C ,因此其可有效区分香兰素的石油化工来源或生物来源^[9]。

越来越多的学者开始关注同位素技术在香兰素鉴别领域的应用潜力。例如,Ordaz-Ortiz等^[10]通过分析香兰素的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$,实现了对不同前体原料来源香兰素的有效区分。Hansen等^[11]发现 $\delta^{13}\text{C}$ 可用于鉴定香兰素的来源,尤其适用于香草豆提取物与人工合成香兰素的区分;同

时,结合 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^2\text{H}$ 分析,还可进一步对香兰素的地理来源及物种进行区分。目前,利用同位素技术对不同前体原料来源香兰素进行溯源已受到广泛关注,然而,关于制备工艺对最终产物香兰素的影响则鲜有报道。

本研究拟测定不同前体原料(天然丁香酚、阿魏酸和4-甲基愈创木酚)及不同合成路径制得的香兰素 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^2\text{H}$ 、 $\delta^{18}\text{O}$ 和 ^{14}C ,结合统计学分析与同位素特征比对,为验证同位素技术在香兰素前体原料及合成路径溯源中的可行性提供科学依据,并为构建香兰素同位素数据库奠定基础。此外,本研究还考察在香兰素制备过程中,使用同位素组成不同的水对其同位素组成的影响,从而进一步完善香兰素同位素溯源技术的方法体系。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

EL Cube型元素分析仪、Isoprime 100气体稳定同位素比值质谱仪:德国Elementar公司产品;TC/EA型元素分析仪、Delta V Advantage气体稳定同位素比值质谱仪:美国Thermo Scientific公司产品;200KV MICADAS加速器质谱仪:瑞

士 IonPlus AG 公司产品; L2130i 高精度水同位素分析仪: 美国 Picarro 公司产品; 百万分之一电子天平: 瑞士 Mettler Toledo 公司产品; 锡杯(4 mm×6 mm): 英国 Elemental microanalysis 公司产品; 银杯(4 mm×3.2 mm): 英国 OEA Labs 公司产品。

元素分析仪标准物质: USGS24($\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -16.05 \pm 0.04$)‰, USGS40($\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -26.39 \pm 0.04$)‰, 咖啡因($\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -33.9$)‰, EMA-P1($\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -25.3 \pm 5.1$)‰、 $\delta^{18}\text{O}_{\text{V-SMOW}} = (20.99 \pm 0.72)$ ‰), EMA-P2($\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -87.8 \pm 2.2$)‰, NBS127($\delta^{18}\text{O}_{\text{V-SMOW}} = (8.59 \pm 0.26)$ ‰), IAEA601($\delta^{18}\text{O}_{\text{V-SMOW}} = (23.14 \pm 0.19)$ ‰); 加速器质谱仪标准物质: Oxalic acid II(SRM-4900C, $Fm = 1.3407 \pm 0.0019$), IAEA-C7($Fm = 0.4953 \pm 0.0012$); 水同位素标准物质: VSMOW2($\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = (0 \pm 0.3)$ ‰、 $\delta^{18}\text{O}_{\text{V-SMOW}} = (0 \pm 0.02)$ ‰), 实验室内标 1($\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -34.5$ ‰、 $\delta^{18}\text{O}_{\text{V-SMOW}} = -5.3$ ‰), 实验室内标 2($\delta^2\text{H}_{\text{V-SMOW}} = -149.7$ ‰、 $\delta^{18}\text{O}_{\text{V-SMOW}} = -18.8$ ‰)。以上标准物质用于精确校准实验数据, 确保测试结果的准确性和可靠性。

1.2 样品信息

本实验共分析了 11 个香兰素样品, 均为纯度 99.9% 的粉末样品; 另选取 1 个异丁香酚样品作为 1~8 号香兰素样品的前体原料。香兰素样品的制备工艺、前体原料、制备过程用水信息、溶剂结晶信息及种类等情况列于表 1。异丁香酚、香兰素样品以及不同同位素组成的制备用水(即昆山、泰国、洞庭山、四川和西藏等地区的水样): 均由昆山市绿渊香料有限公司提供。

1.3 同位素测试

1.3.1 香兰素 $\delta^{13}\text{C}$ 的测试 取适量待测样品包裹于锡杯中, 由自动进样器送入 950 °C 氧化管中; 样品在富氧环境下瞬间燃烧氧化, 并被氧化管中的氧化剂氧化生成 CO_2 ; 经吸附柱分离纯化后, 进入元素分析仪-气体稳定同位素比值质谱仪(EA-IRMS)测试其 $\delta^{13}\text{C}$ 值。以 USGS24、USGS40 和咖啡因作为标准物质对测试数据进行校正, 每个样品平行测试 3 次, 仪器测试精度优于 0.1‰。

1.3.2 香兰素 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 的测试 取适量待测样品包裹于银杯中, 由自动进样器送入 1380 °C 裂解炉中; 样品中的氢被直接裂解为 H_2 , 样品中的氧裂解后与裂解炉中的玻璃碳结合生成 CO ; 经色谱柱分离纯化后, 进入高温裂解元素分析仪-气体稳定同位素比值质谱仪(TC/EA-IRMS)测试其 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值。以 EMA-P1 和 EMA-P2 作为标准物质对 $\delta^2\text{H}$ 测试数据进行校正; 以 EMA-P1、IAEA601 和 NBS127 作为标准物质对 $\delta^{18}\text{O}$ 测试数据进行校正, 每个样品平行测试 3 次, $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 的测试精度分别优于 1‰、0.3‰。

1.3.3 水中 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 的测试 高精度水同位素分析仪基于波长扫描光腔衰荡光谱技术, 可同时测定液态水中的 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值。将待测样品装入小瓶中, 待仪器预热就绪后, 每个样品平行测试 3 次。以 VSMOW2、实验室内标 1 和 2 作为标准物质对测试数据进行校正, $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 的测试精度分别优于 0.1‰、0.025‰。

在实际应用中, 稳定同位素比值使用国际标准物质的相对量表达同位素的富集程度, 其中,

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

序号 No.	制备工艺 Preparation technology	前体原料 Precursor material	制备过程用水 Water for preparation	溶剂结晶 Solvent crystallization	香兰素种类 Vanillin type
1	生物发酵法	天然丁香酚	昆山水	乙醇	生物香兰素
2	生物发酵法	天然丁香酚	昆山水	乙酸丁酯	生物香兰素
3	生物发酵法	天然丁香酚	昆山水	乙酸乙酯	生物香兰素
4	生物发酵法	天然丁香酚	泰国水	无	生物香兰素
5	臭氧氧化法	天然丁香酚	泰国水	乙醇	化学合成香兰素
6	臭氧氧化法	天然丁香酚	洞庭山水	无	化学合成香兰素
7	臭氧氧化法	天然丁香酚	四川水	乙醇	化学合成香兰素
8	臭氧氧化法	天然丁香酚	西藏水	无	化学合成香兰素
9	生物发酵法	阿魏酸	陕西水	乙醇	生物香兰素
10	生物发酵法	阿魏酸	湖北水	乙醇	生物香兰素
11	空气氧化法	4-甲基愈创木酚	—	乙醇	化学合成香兰素

$\delta^{13}\text{C}$ 的相对国际标准为 VPDB (Vienna Pee Dee Belemnite), $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 的相对国际标准为 VSMOW (Vienna-Standard Mean Ocean Water), 计算公式^[12]为:

$$\delta/\text{‰} = (R_{\text{sample}} - R_{\text{standard}}) / R_{\text{standard}} \times 1000 \quad (1)$$

式中, R 为元素重同位素与轻同位素的比值, 即 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 、 $^2\text{H}/^1\text{H}$ 和 $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ 。

1.3.4 香兰素¹⁴C 的测试 取适量的香兰素样品经 Zn/Fe 催化还原法制备为石墨靶, 采用加速器质谱 (AMS) 技术进行分析测试, AMS 在线检测可直接获取样品的 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 和 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比值。其中, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比值用于通过同位素质量分馏指数校正模型校正实测 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比值; 校正后, 以草酸标准样品 (Oxalic acid II) 的 0.7459 倍值作为现代碳比值标准, 计算得到待测样品的现代碳比值。测试过程中, 以 IAEA-C7 作为标准物质进行质量控制, AMS 系统 ^{14}C 本底在 4.5 万年以上, $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 测试精度优于 2‰。

放射性同位素 ^{14}C 常用 Fm (Fraction Modern) 表示现代碳比值:

$$Fm = \frac{A_{\text{SN}}}{A_{\text{ON}}} = \frac{pMC}{100\%} \quad (2)$$

式中, pMC 为现代碳百分比; A_{SN} 为同位素校正的样品放射性比活度; A_{ON} 为草酸标准 (OxII) 放射性比活度。

1.4 数据处理

测定数据均以 3 次平行测定的平均值 \pm 标准偏差表示; 采用 SPSS 27 统计软件, 对不同来源香兰素的稳定同位素比值进行单因素方差分析, 使用 Origin pro 2024 软件绘制图形。

2 结果与讨论

2.1 香兰素 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 的测试结果

11 个香兰素样品在上机测试前均进行充分研磨, $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 的测试结果示于图 2。结果显示, 所测样品的 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值均具有良好的重复性, 平行样品测试结果的标准偏差 (STD) 分别不高于 0.02‰、0.67‰ 和 0.17‰。

从图 2 可知, 天然丁香酚来源的香兰素 $\delta^{13}\text{C}$ 值在 $-33.82\text{‰} \sim -31.72\text{‰}$ 之间。本研究中的阿魏酸来自 C3 植物大米, 以其为前体原料制备的香兰素 $\delta^{13}\text{C}$ 值在 $-38.15\text{‰} \sim -37.54\text{‰}$ 之间; 4-甲基愈创木酚来自木焦油, 以其为前体原料制备的香兰素 $\delta^{13}\text{C}$ 值为 -25.86‰ 。本研究结果与文献报

道的相同来源香兰素 $\delta^{13}\text{C}$ 值 (天然丁香酚: $-33\text{‰} \sim -24\text{‰}$ ^[13]; 大米中阿魏酸: $-37.9\text{‰} \sim -35.7\text{‰}$ ^[14]; 4-甲基愈创木酚: -25.2‰ ^[9]) 接近。此

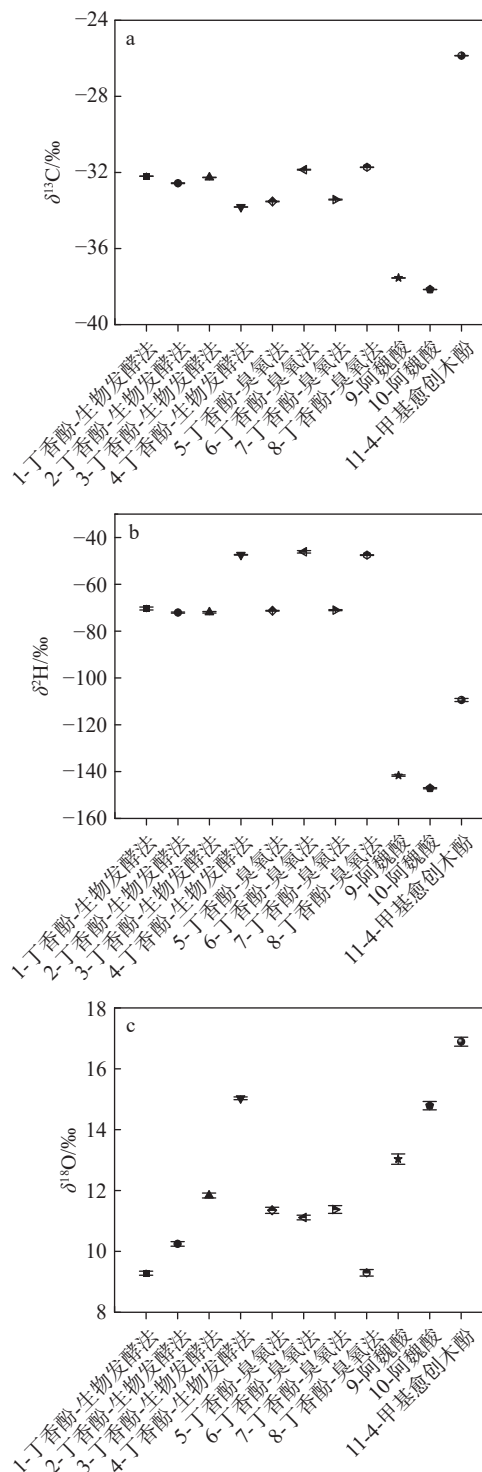


图 2 不同来源香兰素的碳(a)、氢(b)、氧(c)稳定同位素比值分布

Fig. 2 Distributions of $\delta^{13}\text{C}$ (a), $\delta^2\text{H}$ (b), and $\delta^{18}\text{O}$ (c) of vanillin from different sources

外, Martin 等^[15]提出, 不同来源香兰素的总 $\delta^{13}\text{C}$ 值存在丁香酚(合成) < 愈创木酚 < 木质素 < 香草豆提取物的变化趋势, 这一结论与本研究结果一致。

天然丁香酚来源的香兰素 $\delta^2\text{H}$ 值在 -72.06% ~ -46.12% 之间, $\delta^{18}\text{O}$ 值在 9.29% ~ 15.03% 之间; 阿魏酸来源的香兰素 $\delta^2\text{H}$ 值在 -147.1% ~ -141.69% 之间, $\delta^{18}\text{O}$ 值在 13.03% ~ 14.79% 之间; 4-甲基愈创木酚来源的香兰素 $\delta^2\text{H}$ 值为 -109.4% , $\delta^{18}\text{O}$ 值为 16.89% 。前体原料天然丁香酚来自印尼产的 85% 丁香叶油, 由于印尼地处赤道附近, 因此天然丁香酚来源的香兰素显示出较高的 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值。Perini 等^[16] 研究报道, 丁香酚来源的香兰素 $\delta^2\text{H}$ 值在 -91% ~ -75% 之间, 阿魏酸来源的香兰素 $\delta^2\text{H}$ 值在 -176% ~ -168% 之间, 这与本研究结果的变化规律一致(丁香酚来源的香兰素 $\delta^2\text{H}$ 值 > 阿魏酸来源的香兰素 $\delta^2\text{H}$ 值), 但 $\delta^2\text{H}$ 值范围存在差异。香兰素 $\delta^2\text{H}$ 值与前体原料产地的地理位置有关, 同时, 前体原料转化为香兰素的过程中可能发生分馏和交换反应, 均会对 $\delta^2\text{H}$ 值产生影响。

单因素方差分析显示, 不同制备工艺的香兰素(1~8号样品) $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值均无显著差异; 而不同前体原料的香兰素(1~11号样品) $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值均存在显著性差异, 结果列

于表 2。Wilde 等^[7] 发现, 葡萄糖来源的香兰素样品的碳骨架源自其前体原料葡萄糖, 据此推测本研究中天然丁香酚来源香兰素的碳骨架源自天然丁香酚, 而与合成过程中的生化反应无关, 这一观点得到了 Hansen 等^[11] 的验证。

表 2 不同来源香兰素 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值的单因素方差分析

Table 2 One-way analysis of variance of $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ values of vanillin from different sources

元素 Element	因子 Factor	F值 F Value	p值 p Value
$\delta^{13}\text{C}$	制备工艺	0.015	>0.05
	前体原料	83.152	0.000**
$\delta^2\text{H}$	制备工艺	0.485	>0.05
	前体原料	41.417	0.000**
$\delta^{18}\text{O}$	制备工艺	0.362	>0.05
	前体原料	5.785	0.028*

注: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

2.2 不同前体原料的香兰素鉴别

文献[17]和本研究的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^2\text{H}$ 数据示于图 3a, 可见, 相同来源的香兰素基本聚集在同一区域, 而不同前体原料的香兰素被明显分开, 表明前体原料是影响香兰素稳定同位素分布的关键因素。

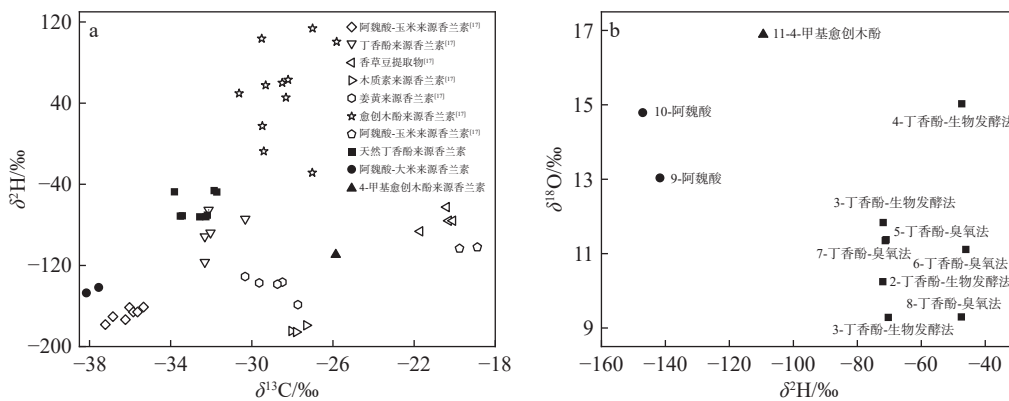


图 3 不同前体原料的香兰素 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^2\text{H}$ 值(a)、 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值(b)分布

Fig. 3 Distributions of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^2\text{H}$ values (a), $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ values (b) of vanillin derived from different precursors

香兰素 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值的二维散点图示于图 3b。结果表明, 3 组不同前体原料的香兰素大致可被区分, 但每组香兰素在各自区域内较为分散, 且 4 号与 10 号样品的 $\delta^{18}\text{O}$ 值存在重叠。同时, 结合 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值对不同前体原料的香兰

素进行分类的效果较差(图未显示), 推测 $\delta^{18}\text{O}$ 值在鉴别过程中未发挥重要作用。Fronza 等^[8] 测定了愈创木酚、木质素合成香兰素及香草豆提取物的 $\delta^{18}\text{O}$ 值, 发现其数值非常接近, 在 9.9% ~ 11.9% 范围内。不同来源香兰素 $\delta^{18}\text{O}$ 值

的高度相似性证实了如下结论: 由于全球范围内的氧气具有恒定的 $\delta^{18}\text{O}$ 值, 所以由大气中氧气衍生的相同含氧化合物的 $\delta^{18}\text{O}$ 组成与气候或纬度无关。本研究中, 除 4 号样品外, 其他天然丁香酚来源的香兰素 $\delta^{18}\text{O}$ 值也在 9.9‰~11.9‰ 范围内, 而阿魏酸和 4-甲基愈创木酚来源的香兰素则超出该区间。受限于当前技术手段, 关于香兰素 $\delta^{18}\text{O}$ 的文献报道较少, 因此需开展更系统的研究以阐明香兰素 $\delta^{18}\text{O}$ 的分布机理。

2.3 不同合成路径的香兰素鉴别

香草豆提取物非常珍贵, 其 $\delta^{13}\text{C}$ 值备受关注, 且已有较为成熟的参考认证区间(-22.2‰~-14.6‰), 目前相关研究的核心在于区分化学与生物合成的香兰素。本研究中, 天然丁香酚来源香兰素的制备工艺为: 先从丁香叶油中提取丁香酚, 再将丁香酚异构化为异丁香酚, 随后通过臭氧法或生物发酵法对其进行氧化以生成香兰素。由表 2 可知, 不同合成路径所得香兰素的 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值均无显著性差异, 这进一步证实了香兰素的同位素组成主要取决于前体原料, 而合成路径的影响甚微。Schipilliti 等^[18]提出, 相同前体原料经不同合成路径制备的香兰素, 其 $\delta^{13}\text{C}$ 值具有较高相似性, 前体原料是影响同位素组成的核心因素。Desmurs 等^[19]认为, 同位素技术与核磁共振位点特异性同位素分馏(SNIF-NMR)技术可用于鉴别香兰素的来源, 却无法明确其制备工艺。上述结论均与本研究结果一致。此外, 本研究还发现, 除 $\delta^{13}\text{C}$ 外, 前体原料同样是影响香兰素 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值的关键因素。

从图 2b 可知, 本研究中天然丁香酚来源的香兰素 $\delta^2\text{H}$ 值大致可分为两类, 其分组依据并非合成路径, 而是合成过程中是否使用有机试剂结晶。有机试剂结晶是香兰素的纯化步骤, 臭氧法和生物发酵法的工艺流程中均包含此操作。因制备过程中样品量较少, 4、6、8 号样品未开展有机试剂结晶操作。氢原子极易发生交换反应^[2], 香兰素分子含有 8 个氢原子, 其羟基上的氢原子易与结晶试剂发生氢交换^[20]; 经有机试剂结晶处理的香兰素可能受氢交换反应和有机试剂残留的双重影响, 导致其 $\delta^2\text{H}$ 值偏负。此外, 经有机试剂结晶处理的香兰素尽管合成路径不同, 但它们的 $\delta^2\text{H}$ 值基本一致, 未经结晶处理的香兰素也有相同的表现。从图 2c 可知, 有机试剂结晶和合成路径均未对香兰素 $\delta^{18}\text{O}$ 值产生显

著影响; 4 号样品的 $\delta^{18}\text{O}$ 值呈偏正特征, 这可能与该样品所用酶不同于 1、2、3 号样品有关。综上, 本研究未发现合成路径对香兰素稳定同位素分布存在显著影响, 但制备过程中的有机试剂结晶对香兰素 $\delta^2\text{H}$ 值存在一定影响; 同时, 制备过程所用酶对香兰素 $\delta^{18}\text{O}$ 值产生了影响。该结果表明, 前体原料、生化合成或纯化过程中的交换反应, 以及合成过程中的分馏程度, 均可能在不同程度上影响最终产物香兰素的稳定同位素分布, 因此需要开展进一步研究以阐明生产条件与基质对香兰素稳定同位素分布的影响。

2.4 制备过程用水对香兰素 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 的影响

水中 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值的分布很大程度上取决于当地的地理参数, 具体表现为其与纬度、海拔高度及距海洋的距离均呈负相关。泰国、四川、洞庭山、昆山的纬度依次递增, 制备过程用水对 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 的影响示于图 4。可知, 泰国、四川、洞庭山、昆山的水 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值呈现随纬度升高而降低的趋势, 西藏地区的水因海拔较高, 其 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值最低。另一方面, 泰国、四川、洞庭山及昆山的水 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值差异较小, 其对应的香兰素 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值也呈现相似的变化规律; 西藏地区的水 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值显著低于其他地区, 但以该地区水制备的香兰素, 其 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值却与其他地区大致相当。这一现象表明, 制备过程用水对最终产物香兰素的 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值的影响较小。

香兰素分子中不同位点的 $\delta^2\text{H}$ 值分布因来源不同而存在差异。例如, 羟基位点的 $\delta^2\text{H}$ 值可反映结晶溶剂的 $\delta^2\text{H}$ 值, 而甲氧基位点的 $\delta^2\text{H}$ 值与前体原料的 $\delta^2\text{H}$ 值密切相关^[20]。理论上, 氢交换反应可改变香兰素 $\delta^2\text{H}$ 值, 然而发生氢交换需满足一定的反应条件, 如反应时间、反应温度或压强等; 本研究中 1~8 号样品的香兰素制备时长较短(约 5 h)。此外, 现有文献报道的氢交换反应均发生在香兰素与结晶溶剂之间, 尚未见与制备过程用水发生氢交换的相关研究。即便制备用水可与香兰素发生氢交换, 由于香兰素分子中可发生交换的氢原子极少, 其对香兰素 $\delta^2\text{H}$ 值的影响微乎其微。综上, 香兰素与制备用水基本未发生氢交换反应是导致不同同位素组成的水对香兰素总 $\delta^2\text{H}$ 值未产生显著作用的原因。

香兰素分子中含有 3 个氧原子, Ordaz-Ortiz 等^[10]提出, 香兰素醛基上的氧原子易与水分子中

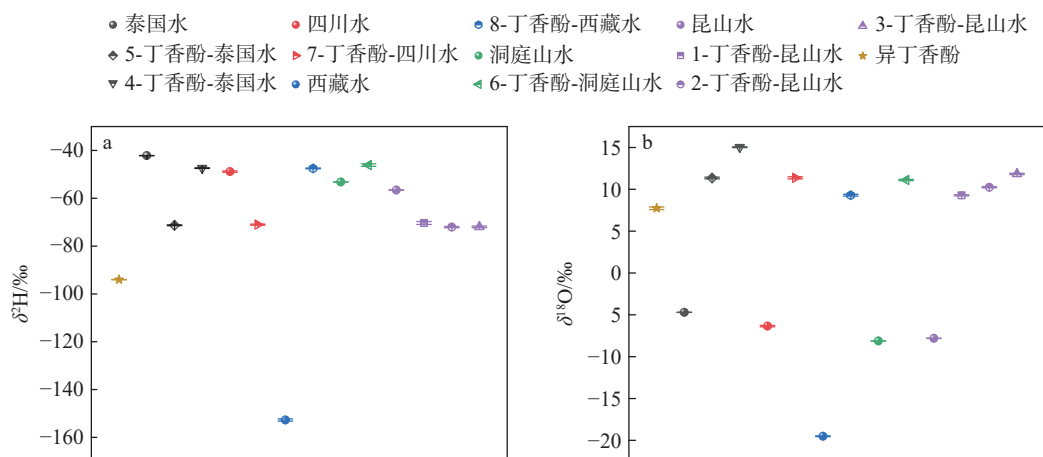


图4 制备过程用水对香兰素氢(a)和氧(b)稳定同位素比值的影响

Fig. 4 Effects of water used in the preparation process on the $\delta^2\text{H}$ (a) and $\delta^{18}\text{O}$ (b) of vanillin

的氧原子发生化学交换,但该过程需在 37 °C 条件下反应 24 h 才能实现。据此推测,香兰素 $\delta^{18}\text{O}$ 值不会受制备过程用水的影响,本研究结果也验证了这一推论。前体原料向香兰素转化的过程中可能发生同位素分馏效应,异丁香酚的 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值显著低于以其作为原料制备的香兰素,这表明无论采用生物发酵法还是臭氧法,同位素分馏均可能是影响最终产物香兰素 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值分布的重要因素。

2.5 香兰素¹⁴C 的测试结果

¹⁴C 测定技术可有效区分香兰素的化石来源与生物来源,其¹⁴C 活度通常以 *pMC* 表示,*pMC* 值为 100% 时对应 1950 年大气¹⁴C 的放射性比活度。通常而言,生物来源香兰素的¹⁴C 活度较高,这是由于植物可通过光合作用持续从大气中获取¹⁴C;而化石来源香兰素的 *pMC* 值接近于 0%^[9,17],这是因为化石中的¹⁴C 经历了百万年的衰变过程(¹⁴C 半衰期为 (5 730±40) a),其放射性已基本耗尽。若将化石来源香兰素与生物来源香兰素混合,所得产物的 *pMC* 值将介于 0%~100% 之间。

选取 4 个天然丁香酚来源的香兰素(1、3、6、8 号)测试¹⁴C,结果列于表 3。可知,尽管 4 个天然丁香酚来源的香兰素样品合成路径不同,但其 *pMC* 值均接近于 100%,这表明它们具有较高的¹⁴C 活度,原料源于生物材料且未与化石来源的香兰素混合,测试结果与实际情况相符。Mao 等^[9]测定的香草豆提取物 *pMC* 值与表 3 中的数值一致。因此,利用¹⁴C 测定技术无法区分不同生物来源的香兰素;同时,该技术也无法区分香兰素的合成路径。

表 3 天然丁香酚来源的香兰素¹⁴C 测试结果

Table 3 ¹⁴C test results of vanillin derived from natural eugenol

样品编号 Number	现代碳比值 <i>Fm</i>	现代碳百分比 <i>pMC</i> /%
1	0.9906	99.06
3	1.0077	100.77
6	0.9946	99.46
8	0.9967	99.67

3 结论

本研究建立了一种可用于香兰素溯源的多元素同位素比值分析方法,利用 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^2\text{H}$ 值,或结合 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值可有效区分不同前体原料的香兰素。¹⁴C 测定技术可实现香兰素生物来源或化石来源的鉴别。通过香兰素的 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^2\text{H}$ 、 $\delta^{18}\text{O}$ 和 ¹⁴C 均无法区分不同合成路径制备的香兰素。制备过程用水对香兰素的 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值基本无影响,但制备过程中有机试剂结晶和所用酶均在一定程度上影响香兰素的 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值。

本研究为深入探究香兰素制备过程中的同位素分馏和稳定同位素交换对最终产物同位素分布的影响奠定了理论基础。然而,本研究的样本量较少,后续研究需扩充样本规模,以进一步探索制备过程对香兰素稳定同位素分布的影响。目前,不同来源的香兰素 $\delta^{13}\text{C}$ 值已有较成熟的参考数据,但 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 数据相对匮乏,本研究可为香兰素同位素数据库的完善提供数据支撑,对推动香兰素同位素溯源技术的实际应用具有重要意义。

参考文献:

- [1] ZHENG L, ZHENG P, SUN Z, BAI Y, WANG J, GUO X. Production of vanillin from waste resid of rice bran oil by *Aspergillus Niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(5): 1 115-1 119.
- [2] LE P M, MARTINEAU E, AKOKA S, REMAUD G, CHARTRAND M M G, MEIJA J, MESTER Z. Site-specific carbon isotope measurements of vanillin reference materials by nuclear magnetic resonance spectrometry[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2022, 414(24): 7 153-7 165.
- [3] 田怀香, 杭书扬, 黄宁炜, 陈臣, 于海燕, 葛畅. 香兰素生产方法对其风味品质影响的研究进展[J]. *食品科学*, 2025, 46(14): 7-15.
TIAN Huaixiang, HANG Shuyang, HUANG Ningwei, CHEN chen, YU Haiyan, GE Chang. Research progress in the effect of vanillin production methods on its flavor quality[J]. *Food Science*, 2025, 46(14): 7-15(in Chinese).
- [4] AMR K, RASHEED D M, KHACHILA M, FARAG M A. Production, extraction, and authentication of natural and non-natural vanillin. A comprehensive review and economic future biotechnology perspectives[J]. *Food Chemistry*, 2025, 466: 142 249.
- [5] GREULE M, TUMINO L D, KRONEWALD T, HENER U, SCHLEUCHER J, MOSANDL A, KEPPLER F. Improved rapid authentication of vanillin using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^2\text{H}$ values[J]. *European Food Research and Technology*, 2010, 231(6): 933-941.
- [6] 孟靖, 张莉. 稳定同位素质谱技术在香精香料鉴别研究中的应用[J]. *分析实验室*, 2018, 37(7): 856-862.
MENG Jing, ZHANG Li. Applications of stable isotope ratio mass spectrometry in flavors identification[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2018, 37(7): 856-862 (in Chinese).
- [7] WILDE A S, STRUCKO T, VEJE C R, MORTENSEN U H, DUEDAHL-OLESEN L. Authentication of vanillin ex glucose-A first study on the influence of the glucose-source on the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^2\text{H}$ value[J]. *Food Control*, 2022, 131: 108 389.
- [8] FRONZA G, FUGANTI C, SERRA S, BURKE A, GUILLOU C, RENIERO F. The positional (¹⁸O) values of extracted and synthetic vanillin[J]. *Helvetica Chimica Acta*, 84(2): 351-359.
- [9] MAO H, WANG H, HU X, ZHANG P, XIAO Z, LIU J. One-pot efficient catalytic oxidation for bio-vanillin preparation and carbon isotope analysis[J]. *ACS Omega*, 2020, 5(15): 8 794-8 803.
- [10] ORDAZ-ORTIZ J J, CRUZ-NARVÁEZ Y, GUERRERO-ESPERANZA M, ROMERO-GARCÍA N L, ARROYO-SILVA A, GÓMEZ-CRUZ C Y. Carbon and oxygen isotopic ratio analysis by FT ICR MS for natural vanillin authentication[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2023, 34(12): 2 755-2 763.
- [11] HANSEN A S, FROMBERG A, FRANDBEN H L. Authenticity and traceability of vanilla flavors by analysis of stable isotopes of carbon and hydrogen[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(42): 10 326-10 331.
- [12] 易州, 尹希杰, 林珊珊, 刘维维, 杨海丽, 王吉苹. 基于温度梯度的碳同位素测试系统研制与方法开发[J]. *质谱学报*, 2025, 46(5): 649-657.
YI Zhou, YIN Xijie, LINn Shanshan, LIU Weiwei, YANG Haili, WANG Jiping. Research and development of carbon isotope testing system based on temperature gradient[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2025, 46(5): 649-657(in Chinese).
- [13] HANSEN A M S. Authenticity of aroma components enantiomeric separation and compound specific stable isotope analysis[D]. Denmark: Technical University of Denmark, 2015.
- [14] CHARTRAND M M G, MEIJA J, HÉLIE J F, MIDLESTEAD P, RAMALINGAM M, AZIZ A A, MESTER Z. Characterization of vanillin carbon isotope delta reference materials[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2022, 414(27): 7 877-7 883.
- [15] MARTIN G, REMAUD G, MARTIN G J. Isotopic methods for control of natural flavours authenticity[J]. *Flavour and Fragrance Journal*, 1993, 8(2): 97-107.
- [16] PERINI M, PIANEZZE S, STROJNIK L, CAMIN F. C and H stable isotope ratio analysis using solid-phase microextraction and gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry for vanillin authentication[J]. *Journal of Chromatography A*, 2019, 1 595: 168-173.
- [17] GEIBLER K, GREULE M, SCHÄFER U, HANS J, GEIBLER T, MEIER L, KEPPLER F, KRAMMER G. Vanilla authenticity control by DNA barcoding and isotope data aggregation[J]. *Flavour and Fragrance Journal*, 2017, 32(4): 228-237.
- [18] SCHIPILLITI L, BONACCORSI I L, MONDELLO L. Characterization of natural vanilla flavour in foodstuff by HS-SPME and GC-C-IRMS[J]. *Flavour and Fragrance Journal*, 2017, 32(2): 85-91.
- [19] DESMURS J R, GIANNOTTA D, GELO-PUJC M, ROLE C, LANCELIN P, PERFUMERY R. Synthesis and authentication of natural vanillins prepared by fermentation[J]. *Perfumer and Flavorist*, 2004, 29(1): 32-43.
- [20] JAMIN E, MARTIN F, MARTIN G G. Determination of site-specific (deuterium/hydrogen) ratios in vanillin by 2H-nuclear magnetic resonance spectrometry: collaborative study[J]. *Journal of AOAC International*, 2007, 90(1): 187-195.

(收稿日期: 2025-09-15; 修回日期: 2025-12-14)