《维生素 C 产品中抗坏血酸的稳定碳同位素比值 $^{13}C/^{12}C$ 测定方法》团体标准编制说明

一、任务来源及起草单位

（一）任务来源

由中国食品工业协会**专业委员会向中国食品工业协会提出申请，由中国食品工业协会批准中轻食品检验认证有限公司和浙江养生堂天然药物研究所有限公司作为主要牵头单位起草编制《维生素 C 产品中抗坏血酸的稳定碳同位素比值 $^{13}C/^{12}C$ 测定方法》的团体标准 。

（二）起草单位及起草人

起草单位：中轻食品检验认证有限公司、浙江养生堂天然药物研究所有限公司、养生堂药业有限公司、农夫山泉股份有限公司

主要起草人：钟其顶 周力 曹翠峰 翟鹏贵 王道兵 徐胜 张红霞 洪玉玲 童玲 岳红卫 张洛琪

（三）起草分工：

中国食品工业协会负责标准制定工作的组织、协调，相关资料的查阅、收集。

中轻食品检验认证有限公司负责标准的起草、撰写、修订及相关产品的检验和数据分析，为标准的主要起草单位。

浙江养生堂天然药物研究所有限公司、养生堂药业有限公司和农夫山泉股份有限公司为团体标准的研制提供基本样品、产品分类等重要依据。

二、 标准制定的目的和意义

维生素 C 又名 L-抗坏血酸，作为人体必需的一种水溶性维生素，有助于改善机体免疫系统的功能，参与胶原蛋白、细胞间质和神经递质的合成等。在食品工业中，维生素 C 常被作为抗氧化剂用于食品的保鲜。是人体内的高效抗氧化剂，用来减轻抗坏血酸过氧化物酶（ascorbate peroxidase）sch 的氧化应激（oxidative stress），许多重要的生物合成过程中也需要维生素 C 参与作用。但人类不能自身合成，必须通过食物、药物等摄取。

维生素 C 是全球产销规模最大的维生素品种之一，也是允许使用的食品添加剂（GB 14754-2010），其生产商主要集中于中国，而由于行业进入壁垒较低，国内维生素 C 生产企业众多，2019 年全国维生素 C 产量 19.7 万吨，相比 2018 年的 17.8 万吨增长了 10.67%，当前平均单价为 4.64 美元/公斤。

目前市场上以补充维生素 C、增强免疫力为保健功能，或以维生素 C 为标志性成分的保健食品主要有两类，一类是以抗坏血酸为主要原料作为维生素 C 的来源，另一类是以天然植物提取物或浓缩物为主要原料作为维生素 C 的来源，这一类天然植物提取物或浓缩物最大的特点就是含有非常高含量的维生素 C，而这也比较符合消费者普遍认同的天然健康理念。

当前市场中部分混合或全部以合成维生素 C 为原料的产品，存在假冒 “天然维生素 C”、“不含人工合成维生素 C”、“自然来源维生素 C”、“天然好维 C”等产品特征的情况，容易使消费者误解并

在市场中造成了一定乱象，影响天然维生素C产品的正常发展。当前行业还缺失天然维生素C的原料标准及产品真实性鉴别手段，无法从标准和技术上来保障解决上述问题，因此行业急需研究制定出台相关标准及真实性鉴别方法，以规范各方，促进行业健康发展。

三、编制过程

2021年5月17日，初步组建标准起草工作组。

2021年5月27日，《维生素C产品中抗坏血酸的稳定碳同位素比值$^{13}C/^{12}C$测定方法》团体标准立项并征求立项意见。

2021年6月~2021年10月，标准起草工作组通过查阅大量国内外碳同位素测定的方法，确定了研究方案。开发了液相色谱-稳定同位素比值质谱测定抗坏血酸碳同位素比值的方法，并从重复性、准确性、可推广性方面进行了验证，为标准研究提供足够的数据支持。同时，起草小组完成行业调研、天然维生素C和合成维生素C产品的的收集、指标检测及分析工作，完成标准草案稿及编制说明的编写。

四、标准制订的基本原则和依据

（一）基本原则

1、贯彻国家有关法律法规和方针政策；

2、考虑使用要求，结合行业和产品特点，并兼顾社会、行业的综合效益；

3、推广先进技术成果，在符合使用要求的条件下，有利于标准对象的简化、选优、通用和互换，做到技术上先进、经济上合理，具有科学性和可操作性；

4、相关标准协调配套，与相关标准法规协调一致；

5、有利于保障食品安全和人民身体健康，促进行业健康发展与技术进步

（二）标准依据

标准的编制按照主要按 GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构和编写》和 GB/T 1.2-2002《标准化工作导则 第 2 部分：标准中规范性技术要素内容的确定方法》的要求，力求确保标准的科学性、先进性、可操作性，并结合行业实际制定。

五、标准主要章、节确定原则

为更准确、完整的说明标准中所采用的标准方法的技术方法，将原标准计划名称进行调整：标准名称由《食品中维生素 C 的稳定碳同位素比值 $^{13}C/^{12}C$ 测定方法》变更为《维生素 C 产品中抗坏血酸的稳定碳同位素比值 $^{13}C/^{12}C$ 测定方法》，此次变更交由专家审查并确定。

（一）符号、缩略语及含义

本标准采用液相色谱联用稳定同位素比值质谱技术测定抗坏血酸中的稳定碳同位素比值，根据稳定同位素分析技术领域的特定规则，相关符号和缩略语参照 QBT 5299-2018《葡萄酒中甘油稳定碳同位素比值 $^{13}C/^{12}C$ 测定方法　液相色谱联用稳定同位素比值质谱法》的用法和定义，具体描述如下：

$^{13}C/^{12}C$：稳定碳同位素比值，是稳定碳同位素 ^{13}C 与 ^{12}C 的原子丰度之比。

$\delta^{13}C$：样品的稳定碳同位素比值相对于参考物质的稳定碳同位素比值的千分差。

PDB：Pee-Dee Belemnite，美国南卡罗来纳州白垩纪皮狄组层位中的拟箭石化石，是稳定碳同位素比值的国际基准物质。

LC-IRMS：Liquid Chromatograph-Isotope Ratio Mass Spectrometry，液相色谱-稳定同位素比值质谱仪。

（二）原理

本部分介绍了本标准方法测定抗坏血酸稳定同位素比值的基本原理，即该方法如何实现。基本描述如下：

样品稀释后通过液相色谱分离各含碳化合物，抗坏血酸被氧化形成二氧化碳（CO_2），经气液分离膜后从溶剂相进入载气流，经过干燥后由载气转移至稳定同位素比值质谱的离子源。不同质量数的CO_2在质谱中被电离后通过磁场分离，并分别记录质荷比（m/z）为44、45和46三种离子的信号强度，通过45和44两种离子的信号强度可得出$^{13}C/^{12}C$的比值，经与国际标准物质V-PDB比较，计算得出抗坏血酸的稳定碳同位素比值，以$\delta^{13}C_{PDB}$表示。

$$C_6H_8O_6 + O_2 \rightarrow CO_2 + H_2O$$

（三）标准品

稳定同位素分析的结果不是物质中相关同位素的绝对含量，而是相对于国际基准物质 V-PDB 的一个相对值。因此，测定结果需溯源到国际基准物质 V-PDB，在实际工作中则需要使用标准物质/标准样

品进行数据校正。可选择国际原子能机构（IAEA）或其他获得国际/国家认可的标准品，根据实际工作需要选择其中一种或几种。

（四）分析步骤

本标准根据产品技术要求，规定了相应的样品前处理方法和分析步骤：

a）样品处理

取完全均质的抗坏血酸含量约 170 mg 的样品，加入 50mL 水并涡旋振荡后，用 0.45 μm 滤膜过滤，取 200 μL 稀释至抗坏血酸含量 0.10~0.15g/L 后保存试样待测。

b）工作标准溶液配制

以纯抗坏血酸作为工作标准，称取抗坏血酸 0.02g，用超纯水稀释至抗坏血酸含量 0.1g/L~0.15g/L，用滤膜过滤后测定。

c）色谱条件

色谱柱：C18 色谱柱（250 mm×4.6mm×5 μm）或性能相当者

流动相：水+硫酸溶液=90+10。

流速：200 μL/min。

色谱柱温度：40℃。

d）反应炉条件

氧化剂：过二硫酸钠溶液，流速 60 μL/min。

酸剂：磷酸溶液，流速 50 μL/min。

反应炉温度：99.7℃。

e）测定

1. 仪器准备

移取抗坏血酸工作标准溶液 1 mL 于进样瓶中，密封备用，作为标准样品。确认稳定同位素比值质谱仪、液相色谱的工作环境、气密性、离子室真空度等指标均符合质谱运行要求。利用二氧化碳参考气体质谱稳定性检测，10 组参考气体标准偏差（SD）应小于 0.06‰。确认数据采集系统设置正确，必要时进行相应调整。

2. 样品分析

样品置于 LC-IRMS 的进样盘中，取 10μL 样品按照 7.1 中的条件进行样品分析。

3. 质量控制

采用两点标准漂移校正模式安排分析序列，每个分析序列应同时测定参考物质或工作标准物质，其比例一般为 10%～20%。同一样品重复测定 2 次，极差应小于 0.30‰，

（五）方法验证

1） IRMS 系统的稳定性

IRMS 系统的性能优劣是确定碳稳定同位素比值能否被准确的重要指标。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 $\delta^{13}C$，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
$\delta^{13}C$	0.019	-0.000	0.012	0.019	0.020	0.057	0.061	0.048	0.064	0.071	0.026

由上表可知，该系统测定 CO_2 中 $\delta^{13}C$ 的标准偏差为 0.026‰符合碳氮稳定同位素的测定要求。

2）方法重复性

按照上文中的样品前处理方法和程序，用 LC-IRMS 连续 5 次测定同一天然维生素 C 产品（抗坏血酸含量 17.41%）和合成维生素 C 产品（抗坏血酸含量 99.8%）中 $\delta^{13}C_{PDB}$，结果见表 2：

表 2 抗坏血酸 $\delta^{13}C$ 重复性测定结果

样品	1	2	3	4	5	std
天然维生素 C 产品	-22.73	-22.52	-22.90	-22.88	-22.58	0.15
合成维生素 C 产品	-10.91	-10.84	-10.77	-11.16	-11.03	0.10

数据表明，LC-IRMS 测定产品中抗坏血酸的 $\delta^{13}C_{PDB}$，标准偏差分别为 0.15 和 0.10‰，符合国际碳同位素测定要求（SD≤0.20‰）。

3）方法再现性

选择一天然维生素 C 产品，在不同时段测定该样品中抗坏血酸的 $\delta^{13}C$ 值，结果如图 1 所示：

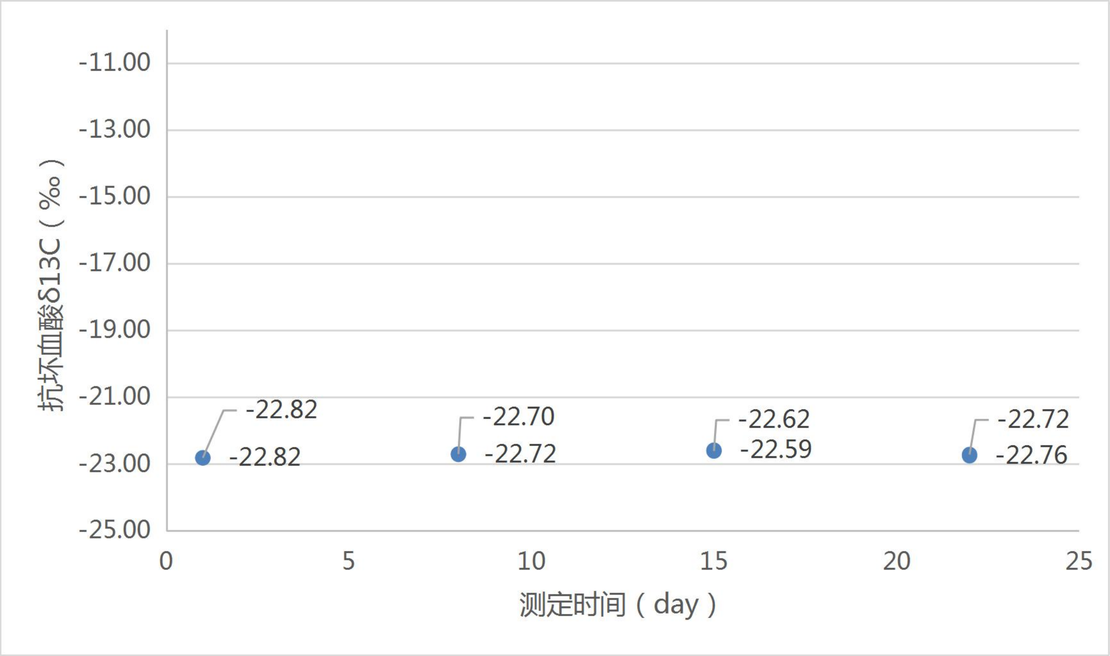

图 1 $\delta^{13}C_{PDB}$ 值

在 22 天内分四次测定天然维生素 C 产品中抗坏血酸的 $\delta^{13}C_{PDB}$ 值，$\delta^{13}C$ 测定值在-22.82‰～-22.59‰范围内波动，标准偏差为 0.08‰，说明该方法再现性良

好。

4）方法准确性

由于国际上缺乏食品基质中抗坏血酸δ^{13}C 分析的参考物质，因此本研究采用配制模拟样品的方式对方法的准确性进行评估：分别用水溶解天然维生素 C 产品和合成维生素 C 产品至抗坏血酸含量 1.74g/L，按照比例混合两种溶液，并分别按上述步骤处理后测定抗坏血酸的δ$^{13}C_{PDB}$值，结果见表 3。

表 10 模拟样品中甘油δ$^{13}C_{PDB}$测定结果（‰）

天然与合成比例	预测值	实测值
1:3	-13.89	-13.42
1:1	-16.83	-16.63
3:1	-19.77	-19.68

通过对表 10 数据分析，我们发现两组数据的线性拟合的相关系数 R^2 为 0.9984（图 2），配对 t-检验结果表明两组数据无显著性差异（$p<0.05$），这说明该方法能够准确测定样品中抗坏血酸的δ$^{13}C_{PDB}$值。

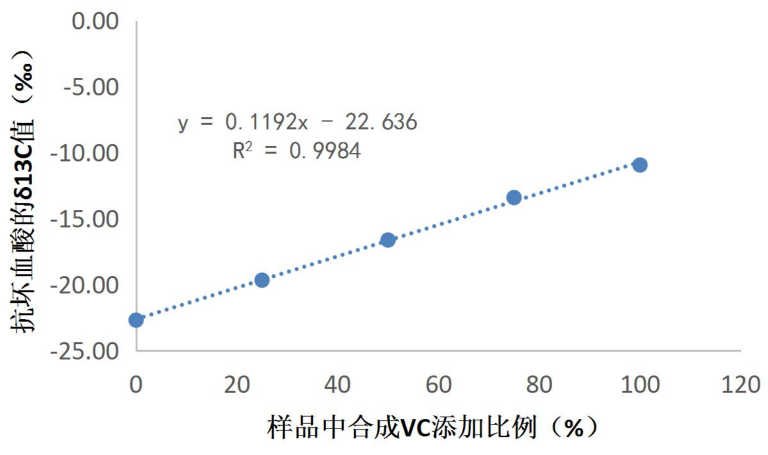

图 2 样品测定值与添加比例的关系特征

5）实验室协同试验

本方法经过秦皇岛出入境检验检疫局、浙江省检验检疫科学技术研究院等单位的稳定同位素实验室进行了方法验证：制备了A、B两种天然维生素C产品，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3；参与实验室间能力验证数据见表4-5。图4-7是参与实验室间能力验证结果。

表 3 实验室协同试验数据统计表（δ$^{13}C_{PDB}$‰）

实验室	天然维生素 C 产品 A			天然维生素 C 产品 B		
L1	-22.53	-22.56	-22.49	-22.18	-22.33	-22.17
L2	-22.82	-22.82	-22.72	-22.27	-22.08	-22.14
L3	-22.59	-22.62	-22.76	-22.25	-22.02	-22.23
平均值	-22.66			-22.19		
标准差	0.13			0.10		

由上表可知各同位素分析实验室所测定结果具有良好的一致性，同样的样品，起草工作组测得的平均结果分别为-22.72‰和-22.13‰，与外单位实验室的结果不存在显著差异，这说明本方法测定维生素 C 产品中抗坏血酸$\delta^{13}C_{PDB}$的结果是准确可靠的，方法适合在行业内推广。

六、征求意见处理结果

无。

七、标准实施建议

在本标准通过审核、批准发布之后，由相关机构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 1 个月之后开始实施。

八、其他需要说明的问题

暂无