

团 体 标 准

T/CNFIA ***-202*

维生素 C 产品中抗坏血酸的稳定碳同位素比值 ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) 测定方法

Determination of the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio of ascorbic acid in Vitamin C products
(审定稿)

** -XX-XX 发布

** -XX-XX 实施

中国食品工业协会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020 给出的规则起草。

本文件由中国食品工业协会 专业委员会 提出

本文件由中国食品工业协会归口。

本文件起草单位：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

本文件主要起草人：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

维生素 C 产品中抗坏血酸的稳定碳同位素比值 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 测定方法

1 范围

本标准规定了采用液相色谱-稳定同位素比值质谱仪测定维生素C产品中抗坏血酸稳定碳同位素比值 ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) 的方法。

本标准适用于抗坏血酸含量不低于0.5%的维生素C产品（食品工业用原料或直接提供给消费者的终产品）中抗坏血酸 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 的测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

3 符号、缩略语及含义

下列符号和缩略语适用于本标准。

3.1 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$: 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。

3.2 $\delta^{13}\text{C}$: 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。

3.3 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。

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

4 方法提要

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 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 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 $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ 表示。



5 试剂和材料

除非另有说明，所用试剂均为分析纯。

5.1 标准品

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。

5.2 氦气（He）：纯度 $\geq 99.999\%$ 。

5.3 二氧化碳参考气体（CO₂）：纯度 $\geq 99.99\%$ 。

5.4 超纯水。

5.5 浓硫酸。

5.6 过二硫酸钠（纯度 $\geq 99\%$ ）。

5.7 磷酸（纯度 $\geq 99\%$ ）。

5.8 硫酸溶液（0.005mol/L）：量取 272 μL 浓硫酸（5.5），用超纯水溶解后定容至 1000mL，用溶剂过滤器过滤。

5.9 过二硫酸钠溶液（0.25mol/L）：称取 39.5g 过二硫酸钠（5.6），用超纯水溶解并定容至 500mL。

5.10 磷酸溶液（0.5mol/L）：称取 49.0g 磷酸（5.7），用超纯水溶解并定容至 500mL。

5.11 工作参考物：抗坏血酸，纯度 $\geq 99.8\%$ ，其 $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$ 经标准品校准。

6 仪器

6.1 超纯水装置。

6.2 LC-IRMS。

6.3 溶剂过滤器（带 0.22 μm 水系滤膜）。

6.4 天平：感量 0.1mg。

6.5 烘箱。

6.6 0.45 μm 水系滤膜。

6.7 移液枪：量程 1000 μL 。

6.8 稳定同位素比值质谱仪

用于测量稳定同位素比值，配备三个法拉第杯收集器，同时测量 $m/z=44$ 、 $m/z=45$ 和 $m/z=46$ 的离子强度。应配备一个连续流系统，样品中抗坏血酸经定量燃烧成二氧化碳，并在进入质谱测量之前进行分离纯化。

6.9 液相色谱仪

液相色谱仪（LC）通过接口与稳定同位素比值质谱仪连接，接口由氧化反应器和交换膜组成，液相色谱配备了色谱柱后能在不使用有机溶剂或添加剂的情况下将样品中的抗坏血酸和其他物质进行有效分离。

7 分析步骤

7.1 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。

7.2 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 20 mg，用超纯水（5.4）稀释至抗坏血酸含量 0.1g/L~0.15g/L，用滤膜过滤（6.6）后测定。

7.3 测定条件

7.3.1 色谱参考条件

7.3.1.1 色谱柱：C18 色谱柱（250 mm \times 4.6mm \times 5 μm ）或性能相当者。

7.3.1.2 流动相：水+硫酸溶液（5.8）=90+10。

7.3.1.3 流速：200 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。

7.3.1.4 色谱柱温度：40 $^{\circ}\text{C}$ 。

7.3.1.5 进样量：10 μL 。

7.3.2 氧化反应器参考条件

7.3.2.1 氧化剂：过二硫酸钠溶液，流速 60 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。

7.3.2.2 酸剂：磷酸溶液，流速 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。

7.3.2.3 反应炉温度：99.7 $^{\circ}\text{C}$ 。

7.3.3 同位素质谱参考条件

7.3.3.1 离子源：电子轰击离子源（EI 源）。

7.4 测定

7.4.1 仪器准备

移取抗坏血酸工作标准溶液（7.2）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。按照 7.3 中测定，质谱峰图参加附录图 A.1。

7.4.2 样品分析

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

7.4.3 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%，

8 计算

8.1 分析结果的表述

样品中抗坏血酸的碳同位素组成以其对标准物质中相应同位素比值的千分差表述，即：

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{SA}} - (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{ST}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{ST}}} \times 1000\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- $\delta^{13}\text{C}$ —— 样品中抗坏血酸转化的 CO_2 气体 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 测定结果相对于二氧化碳标准气 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 测定结果的千分差；
- $(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{SA}}$ —— 样品中抗坏血酸转化的 CO_2 的 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 测定结果；
- $(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{ST}}$ —— 二氧化碳标准气的 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 测定结果。

8.2 结果计算

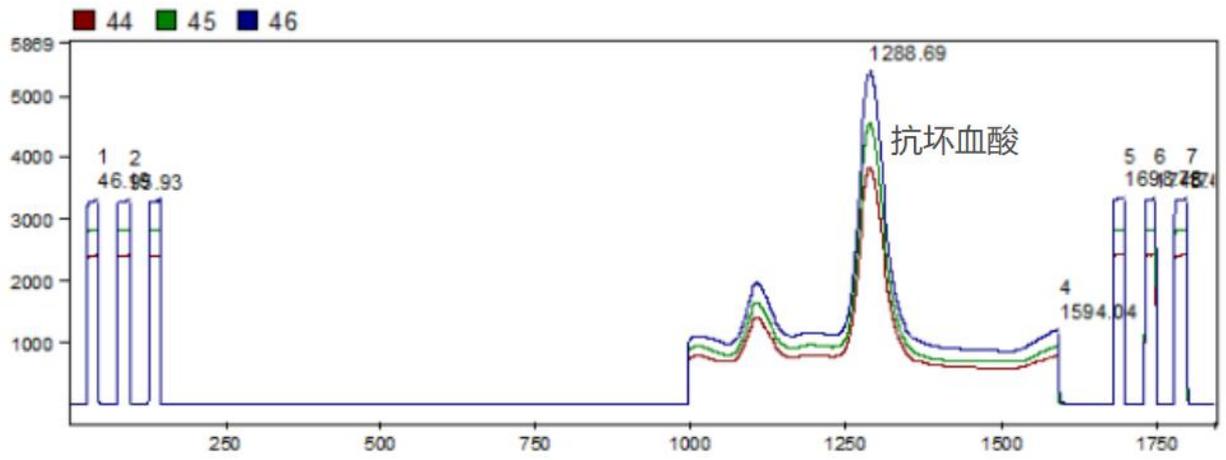
所测的碳同位素组成结果应校准到国际标准 PDB 值，按公式（2）计算：

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{SA-PDB}}(\text{‰}) = \delta^{13}\text{C}_{\text{SA-RM}} + \delta^{13}\text{C}_{\text{RM-PDB}} + 10^{-3} \times \delta^{13}\text{C}_{\text{SA-RM}} \times \delta^{13}\text{C}_{\text{RM-PDB}} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

- $\delta^{13}\text{C}_{\text{SA-PDB}}(\text{‰})$ —— 样品相对 V-PDB 的 $\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$ 同位素值。
 - $\delta^{13}\text{C}_{\text{SA-ST}}(\text{‰})$ —— 样品相对标准物质的 $\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$ 同位素值。
 - $\delta^{13}\text{C}_{\text{ST-PDB}}(\text{‰})$ —— 标准物质相对 V-PDB 的 $\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$ 同位素值。
- 结果保留至小数点后两位。

附录 A
(资料性附录)
质谱峰图



图A.1 样品抗坏血酸的LC-IRMS质谱峰图

