



中华人民共和国国家标准

GB/T 17816—202×

代替GB/T 17816—1999

饲料中抗坏血酸的测定

Determination of ascorbic acid in feed

(公开征求意见稿)

202×-××-××发布

202×-××-××实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会

发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替GB/T 17816—1999《饲料中总抗坏血酸的测定 邻苯二胺荧光法》。与GB/T 17816—1999相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

——文件名称由《饲料中总抗坏血酸的测定 邻苯二胺荧光法》改为《饲料中抗坏血酸的测定》；

——更改了邻苯二胺荧光法的检出限，增加了定量限（见第1章，1999年版的第1章）；

——增加了术语和定义（见第3章）；

——更改了邻苯二胺荧光法分析结果的计算及表示（见4.5.4，1999年版的第8章）；

——增加了高效液相色谱测定方法（见第5章）。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）提出并归口。

本文件起草单位：国粮武汉科学研究设计院有限公司。

本文件主要起草人：

本文件及其所代替文件历次版本发布情况为：

——1999年首次发布为GB/T 17816—1999；

——本次为第一次修订。

饲料中抗坏血酸的测定

1 范围

本文件规定了邻苯二胺荧光法、高效液相色谱法测定饲料中抗坏血酸的方法。

本文件第一法适用于单一饲料、配合饲料、预混料、浓缩饲料中抗坏血酸的测定。第二法适用于配合饲料、浓缩饲料、复合预混合饲料、维生素预混合饲料中抗坏血酸的测定。

本文件第一法的检出限为3 mg/kg，定量限为10 mg/kg；第二法的检出限为5 mg/kg，定量限为20 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

抗坏血酸 Ascorbic acid

一种具有抗氧化性质的有机化合物，分L型和D型。

3.2

L-抗坏血酸 L-Ascorbic acid

具有强还原性，对机体具有生物活性。

3.3

D-异抗坏血酸 D-Isoascorbic acid

具有强还原性，对机体基本无生物活性。

3.4

L-脱氢抗坏血酸 L-Dehydroascorbic acid

L-抗坏血酸极易被氧化为L-脱氢抗坏血酸，L-脱氢抗坏血酸亦可被还原为L-抗坏血酸。

3.5

L-抗坏血酸总量 Total L-Ascorbic acid

将试样中L-脱氢抗坏血酸还原成L-抗坏血酸或将试样中L-抗坏血酸氧化成L-脱氢抗坏血酸后测得

的L-抗坏血酸总量。

4 第一法 邻苯二胺荧光法

4.1 原理

先将试样中抗坏血酸在弱酸性条件下提取出来,提取液中还原型抗坏血酸经活性炭氧化为脱氢抗坏血酸,与邻苯二胺(OPDA)反应生成有荧光的喹喔琳(quinoxaline),其荧光强度与脱氢抗坏血酸的浓度在一定条件下成正比。另外,根据脱氢抗坏血酸与硼酸可形成硼酸-脱氢抗坏血酸络合物而不与邻苯二胺反应,以此作为“空白”排除试样中荧光杂质的干扰。

4.2 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

4.2.1 水:GB/T 6682,三级。

4.2.2 偏磷酸-乙酸溶液:称取15g偏磷酸,加入40mL冰乙酸及250mL水,加温,搅拌,使之逐渐溶解,冷却后加水至500mL。于4℃冰箱可保存7~10天。

4.2.3 硫酸溶液(0.15 mol/L):取10mL硫酸,小心加入水中,再加水稀释至1200mL。

4.2.4 偏磷酸-乙酸-硫酸溶液:称取15g偏磷酸,加入40mL冰乙酸,滴加0.15 mol/L硫酸溶液(4.2.4)至溶解,并稀释至500mL。

4.2.5 乙酸钠溶液(500 g/L):称取500g乙酸钠,加水至1000mL。

4.2.6 硼酸-乙酸钠溶液:称取3g硼酸,用500g/L乙酸钠溶液(4.2.5)溶解并稀释至100mL。临用时配制。

4.2.7 邻苯二胺溶液(200 mg/L):称取20mg邻苯二胺,用水溶解并稀释至100mL,临用时配制。

4.2.8 L-抗坏血酸标准溶液(1 mg/mL):称取L-抗坏血酸标准品0.05g(精确至0.01mg)于50mL容量瓶中,用偏磷酸-乙酸溶液(4.2.2)溶解并定容。临用时配制。

4.2.9 L-抗坏血酸标准工作液(100 μg/mL):准确吸取L-抗坏血酸标准溶液(4.2.8)10mL于100mL容量瓶中,用偏磷酸-乙酸溶液(4.2.2)稀释并定容。临用时配制。稀释前测试pH值,如其pH大于2.2时,则应用偏磷酸-乙酸-硫酸溶液(4.2.4)稀释。

4.2.10 百里酚蓝指示剂溶液(0.4 mg/mL):称取0.1g百里酚蓝,加入0.02 mol/L氢氧化钠溶液约10.75mL,在玻璃研钵中研磨至溶解,用水稀释至250mL。(变色范围:pH等于1.2时呈红色;pH等于2.8时呈黄色;pH大于4时呈蓝色)。

4.2.11 活性炭的活化:称取约200g炭粉,加入1L盐酸(1+9),加热回流1~2h,过滤,用水洗至滤液中无铁离子为止,置于110~120℃烘箱中干燥,备用。

检验铁离子方法:利用普鲁士蓝反应。将20g/L亚铁氰化钾与1%盐酸等量混合,将上述洗出滤液滴入,如有铁离子则产生蓝色沉淀。

4.3 仪器设备

4.3.1 荧光分光光度计:激发波长350nm,发射波长430nm。配有1cm石英比色皿。

4.3.2 分析天平:感量0.0001g和0.01mg。

4.3.3 涡旋混合仪。

4.4 样品

按GB/T 20195制备样品,至少约200g,粉碎使其全部通过0.45mm孔径的分析筛,充分混匀,装入棕色磨口瓶中避光保存,备用。

4.5 试验步骤

4.5.1 试样中碱性物质质量的预检

称取试样1 g于烧杯中，加10 mL偏磷酸-乙酸溶液（4.2.2），用百里酚蓝指示剂检查 pH值，如呈红色，即可用偏磷酸-乙酸溶液（4.2.2）作样品提取稀释液。若呈黄色或蓝色，则滴加偏磷酸-乙酸-硫酸溶液（4.2.4），使其变红，并记录所用量。

4.5.2 试液的制备

称取试样若干克（精确至0.000 1 g，含抗坏血酸约2.5~10 mg）于100 mL容量瓶中，按4.5.1预检碱量，加偏磷酸-乙酸-硫酸溶液（4.2.4）调至 pH为1.2，或者直接用偏磷酸-乙酸溶液（4.2.2）定容，摇匀。如样品含大量悬浮物，则需进行过滤，滤液为试样溶液。

4.5.3 测定

4.5.3.1 氧化处理：分别取上述试样溶液（4.5.2）及标准工作溶液（4.2.9）100 mL于200 mL带盖三角瓶中，加2 g活性炭（4.2.11），用力振摇1 min，干法过滤，弃去最初数毫升，收集其余全部滤液，即为样品氧化液和标准氧化液。

4.5.3.2 各取10 mL标准氧化液于两个100 mL容量瓶中分别标明“标准”及“标准空白”。

4.5.3.3 各取10 mL样品氧化液于两个100 mL容量瓶中分别标明“样品”及“样品空白”。

4.5.3.4 于“标准空白”及“样品空白”溶液中各加5 mL硼酸-乙酸钠溶液（4.2.6），混合摇动15 min，用水稀释至100 mL。

4.5.3.5 于“标准”及“样品”溶液中各加5 mL乙酸钠溶液（4.2.5），用水稀释至100 mL。

4.5.3.6 荧光反应：取4.5.3.4中“标准空白”、“样品空白”溶液及4.5.3.5中“样品”溶液2.0 mL，分别置于10 mL带盖试管中。在暗室迅速向各管中加入5 mL邻苯二胺溶液（4.2.7），振摇混合，在室温下反应35 min，于激发波长350 nm，发射波长430 nm处测定荧光强度。

4.5.3.7 标准曲线的绘制：取上述“标准”溶液（4.5.3.5）（抗坏血酸含量10 μg/mL）0.1, 0.5, 1.0, 1.5和2.0 mL标准系列，各双份分别置于10 mL带盖试管中，再用水补充至2.0 mL。荧光反应按4.5.3.6。以标准系列荧光强度分别减去标准空白荧光强度为纵坐标，对应抗坏血酸含量（μg）为横坐标，绘制标准曲线。

4.5.4 试验数据处理

试样中抗坏血酸的含量，以质量分数 w_1 表示，单位为毫克每千克（mg/kg），按公式（1）计算：

$$\omega_1 = \frac{m_1 \times V \times 1000}{m \times V_1 \times 1000} \dots \dots \dots (1)$$

式中：

ω_1 ——试样中抗坏血酸及脱氢抗坏血酸的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

m_1 ——从标准曲线上查得的试样溶液中抗坏血酸的含量，单位为微克（μg）；

V ——试样溶液的总体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样质量，单位为克（g）；

V_1 ——荧光反应所用试样体积，单位为毫升（mL）。

测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留3位有效数字。

4.5.5 精密度

每千克饲料中抗坏血酸的含量小于或等于 1000 mg 时，测定结果的相对偏差不大于 10 %。
每千克饲料中抗坏血酸的含量大于 1000 mg 时，测定结果的相对偏差不大于 5 %。

5 第二法 高效液相色谱法

5.1 原理

试样中的抗坏血酸用偏磷酸溶解超声提取，用高效液相色谱仪可直接测定 L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸的含量；将提取液进一步与 L-半胱氨酸反应使 L-脱氢抗坏血酸还原成 L-抗坏血酸后，用高效液相色谱仪可测定 L-抗坏血酸总量。以色谱峰的保留时间定性，外标法定量。

5.2 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.2.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2.2 L-半胱氨酸：优级纯。

5.2.3 十六烷基三甲基溴化铵：色谱纯。

5.2.4 甲醇：色谱纯。

5.2.5 偏磷酸溶液（20 g/L）：称取 20 g（精确至 0.1 g）偏磷酸，溶于水并稀释至 1 L，此溶液于 4 °C 的环境下可保存一个月。

5.2.6 磷酸三钠溶液（100 g/L）：称取 100 g（精确至 0.1 g）磷酸三钠，溶于水并稀释至 1 L。

5.2.7 L-半胱氨酸溶液（40 g/L）：称取 4 g L-半胱氨酸（5.2.2），溶于水并稀释至 100 mL。临用时配制。

5.2.8 磷酸二氢钾-十六烷基三甲基溴化铵溶液：称取 6.8 g 磷酸二氢钾和 0.91 g 十六烷基三甲基溴化铵（5.2.3），用水溶解并定容至 1 L（用磷酸调节 pH 至 3.50），过 0.45 μm 滤膜，超声脱气。

5.2.9 标准储备溶液（1 mg/mL）：准确称取 L-抗坏血酸（CAS 号：50-81-7；纯度不低于 99.0 %）、D-异抗坏血酸（CAS 号：89-65-6；纯度不低于 99.0 %）标准品 50 mg（精确至 0.01 mg）于 50 mL 棕色容量瓶中，用 20 g/L 的偏磷酸溶液（5.2.5）溶解并定容，混匀。于 2 °C~8 °C 保存，有效期为一周。

5.2.10 标准中间溶液（100 μg/mL）：准确移取抗坏血酸标准储备溶液（5.2.9）2 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中，用 20 g/L 的偏磷酸溶液（5.2.5）稀释并定容，混匀。

5.2.11 标准系列溶液：准确移取适量标准中间溶液（5.2.10），用 20 g/L 的偏磷酸溶液（5.2.5）稀释并定容，混匀，配制成质量浓度分别为 0 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、25 μg/mL、50 μg/mL 的标准系列溶液。

5.3 仪器设备

5.3.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

5.3.2 分析天平：精度 0.01 mg 和 0.001 g。

5.3.3 超声波清洗机。

5.3.4 离心机：转速不低于 4 000 r/min。

5.3.5 pH 计：精度 0.01。

5.3.6 振荡器。

5.3.7 针头过滤器：备 0.45 μm 水系滤膜。

5.4 样品

按 GB/T 20195 制备试样，至少 200 g，粉碎使其全部通过 0.42 mm 孔径的分析筛，充分混匀，装

入棕色磨口瓶中避光保存，备用。

5.5 试验步骤

5.5.1 提取

称取约 0.5~2 g 试样(精确至 0.001 g)，置于 50 mL 棕色容量瓶中，加入 30 mL 20 g/L 的偏磷酸溶液(5.2.5)，于超声波水浴中超声提取 10 min，冷却至室温，用 20 g/L 的偏磷酸溶液(5.2.5)定容至刻度，摇匀，于 4000 r/min 离心 5 min，取上清液过 0.45 μm 水系滤膜，滤液待测。

5.5.2 还原

准确吸取 20 mL 上述离心后的上清液于 50 mL 离心管中，加入 10 mL 40 g/L 的 L-半胱氨酸溶液(5.2.7)，用 100 g/L 磷酸三钠溶液(5.2.6)调节 pH 至 7.0~7.2，以 200 次/min 振荡 5 min。再用磷酸调节 pH 至 3.50，用水将试液全部转移至 50 mL 容量瓶中，并定容至刻度。混匀后取此试液过 0.45 μm 水系滤膜后待测。

5.5.3 测定

5.5.3.1 高效液相色谱参考条件：

- a) 色谱柱: C₁₈柱，长 150 mm，内径 4.6 mm，粒径 5 μm，或性能相当者；
- b) 流动相: A 相为磷酸二氢钾-十六烷基三甲基溴化铵溶液(5.2.8)，B 相为甲醇(5.2.4)，A+B=99+1；
- c) 流速: 1.0 mL/min；
- d) 柱温: 25 °C；
- e) 进样量: 20 μL；
- f) 检测波长: 263 nm。

5.5.3.2 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取标准系列溶液(5.2.11)和试样溶液(5.5.1和5.5.2)上机测定。L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸标准溶液的液相色谱图见附录 A。

5.5.3.3 定性

以保留时间定性，试样溶液中待测物保留时间应与标准系列溶液(浓度相当)中待测物的保留时间一致，其相对偏差在 ±2.5 % 之内。

5.5.3.4 定量

以标准系列溶液中的浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，其相关系数应不低于 0.99。试样溶液中待测物的质量浓度应在标准曲线的线性范围内，若超出范围，应将试样溶液用偏磷酸溶液(5.2.5)稀释后，重新测定。单点校准定量时，样溶液中待测物的浓度与标准溶液浓度相差不超过 30 %。

5.6 试验数据处理

试样中 L-抗坏血酸[或 D-异抗坏血酸、L-抗坏血酸总量]的含量以质量分数 w_2 计，单位为毫克每千克 (mg/kg)。多点校准按公式(2)计算；单点校准按公式(3)计算：

$$\omega_2 = \frac{\rho \times V \times 1000}{m \times 1000} \times n \dots\dots\dots (2)$$

式中：

ρ ——从标准曲线查得的试样溶液中L-抗坏血酸或D-异抗坏血酸的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V ——试样溶液定容体积，单位为毫升（ mL ）；

m ——试样质量，单位为克（ g ）；

n ——试样溶液稀释倍数。

$$\omega_2 = \frac{A \times \rho_s \times V \times 1000}{A_s \times m \times 1000} \times n \dots\dots\dots (3)$$

式中：

A ——试样溶液中L-抗坏血酸或D-异抗坏血酸的色谱峰面积；

ρ_s ——标准溶液中L-抗坏血酸或D-异抗坏血酸的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V ——试样溶液定容体积，单位为毫升（ mL ）；

A_s ——标准溶液中L-抗坏血酸或D-异抗坏血酸的色谱峰面积；

m ——试样质量，单位为克（ g ）；

n ——试样溶液稀释倍数。

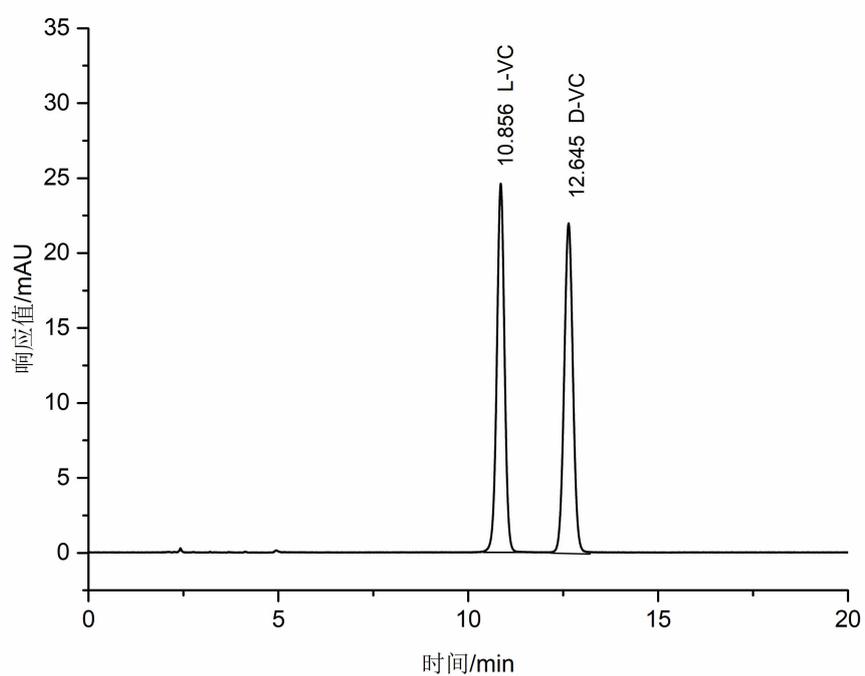
测定结果以平行测定的算术平均值表示，保留3位有效数字。

5.7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

附录 A
(资料性)
L-抗坏血酸和D-异抗坏血酸液相色谱图

L-抗坏血酸和D-异抗坏血酸标准溶液的液相色谱图见图A。



图A L-抗坏血酸和D-异抗坏血酸标准溶液（20 μg/mL）液相色谱图