

中华人民共和国国家标准

GB/T 17816—2025

代替 GB/T 17816—1999

饲料中总抗坏血酸的测定

Determination of total ascorbic acid in feeds

2025-08-01 发布

2026-02-01 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：

- 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）；
- 增加了高效液相色谱测定方法（见第 4 章）；
- 更改了邻苯二胺荧光法分析结果的计算及表示（见 5.5.4，1999 年版的第 8 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：邵瑞、杜言、陈析羽、王博媛、陈梦莹、马生晖、汪忠艳、严宏岳、宿永波、邱惠娟、常晓红、魏双正、刘小敏。

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。

饲料中总抗坏血酸的测定

1 范围

本文件描述了饲料中总抗坏血酸测定的高效液相色谱法和邻苯二胺荧光法。

本文件高效液相色谱法适用于配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料中 L-抗坏血酸、D-异抗坏血酸和总抗坏血酸的测定；邻苯二胺荧光法适用于配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料中总抗坏血酸的测定。

本文件不适用以酯化抗坏血酸形式添加的各种饲料中总抗坏血酸的测定。

本文件高效液相色谱法 L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸的检出限均为 5 mg/kg，定量限均为 20 mg/kg；邻苯二胺荧光法的检出限为 8 mg/kg，定量限为 25 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

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 高效液相色谱法

4.1 原理

试样中的抗坏血酸用偏磷酸溶液提取，高效液相色谱仪测定，外标法定量。

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 6682，一级。

4.2.2 L-半胱氨酸：优级纯。

4.2.3 磷酸二氢钾：色谱纯。

4.2.4 十六烷基三甲基溴化铵：色谱纯。

4.2.5 磷酸：色谱纯。

4.2.6 甲醇：色谱纯。

4.2.7 偏磷酸溶液(20 g/L)：称取 20 g 偏磷酸，用水溶解并稀释至 1 L，混匀。于 4 ℃ 保存，有效期为 1 个月。

4.2.8 磷酸三钠溶液(100 g/L)：称取 100 g 磷酸三钠，用水溶解并稀释至 1 L，混匀。

4.2.9 L-半胱氨酸溶液(40 g/L):准确称取 4 g(精确至 0.01 g)L-半胱氨酸(4.2.2),用水溶解并稀释至 100 mL,混匀。临用现配。

4.2.10 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(4.2.3)和 0.91 g 十六烷基三甲基溴化铵(4.2.4),用水溶解并定容至 1 L,混匀。用磷酸调节 pH 至 3.5,过 0.45 μm 滤膜,超声脱气。

4.2.11 标准储备溶液(1 mg/mL):分别准确称取 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%)标准品各 50 mg(精确至 0.01 mg)分别于 50 mL 棕色容量瓶中,用偏磷酸溶液(4.2.7)溶解并定容,混匀。于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期为 1 周。

4.2.12 标准中间溶液(100 $\mu\text{g/mL}$):准确移取抗坏血酸标准储备溶液(4.2.11)各 1 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中,用偏磷酸溶液(4.2.7)稀释并定容,混匀。于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期为 1 周。

4.2.13 标准系列溶液:准确移取适量标准中间溶液(4.2.12),用偏磷酸溶液(4.2.7)稀释并定容,混匀,配制质量浓度分别为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 的标准系列溶液。临用现配。

4.2.14 微孔滤膜:0.45 μm ,水系。

4.3 仪器设备

4.3.1 高效液相色谱仪:配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

4.3.2 分析天平:精度为 0.01 mg、0.1 mg 和 0.01 g。

4.3.3 超声波清洗器。

4.3.4 离心机:转速不低于 4 000 r/min。

4.3.5 pH 计:精度为 0.01。

4.3.6 往复式振荡器:转速不低于 200 r/min。

4.4 样品

按 GB/T 20195 制备试样,取样品至少 200 g,粉碎使其全部通过 0.425 mm 孔径的试验筛,充分混匀,装入棕色、密闭容器中,避光保存,备用。

4.5 试验步骤

注意:试验全过程避光操作。

4.5.1 提取

平行做两份试验。称取 0.5 g~2 g(精确至 0.1 mg)试样于 50 mL 棕色容量瓶中,加入 30 mL 偏磷酸溶液(4.2.7),混匀。超声提取 10 min,冷却至室温,用偏磷酸溶液(4.2.7)定容,混匀。于 4 000 r/min 离心 5 min,上清液备用。

4.5.2 还原

准确移取 20 mL 提取液(4.5.1)于 50 mL 离心管中,加入 10 mL L-半胱氨酸溶液(4.2.9),用磷酸三钠溶液(4.2.8)调节 pH 至 7.0~7.2,200 r/min 振荡 5 min。用磷酸调节 pH 至 3.5,转移至 50 mL 棕色容量瓶中,用水定容,混匀。用微孔滤膜(4.2.14)过滤,立即测定。

4.5.3 测定

4.5.3.1 高效液相色谱参考条件

高效液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱: C₁₈柱,长 250 mm,内径 4.6 mm,粒径 5 μm,或性能相当者;
- b) 流动相: V[磷酸二氢钾-十六烷基三甲基溴化铵溶液(4.2.10)]+V[甲醇(4.2.6)]=99+1;
- c) 流速: 1.0 mL/min;
- d) 柱温: 25 ℃;
- e) 进样量: 20 μL;
- f) 检测波长: 263 nm。

4.5.3.2 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(4.2.13)和试样溶液(4.5.2)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。

4.5.3.3 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(质量浓度相当)中待测物的保留时间一致,其相对偏差在±2.5%之内。

4.5.3.4 定量

以标准系列溶液中的质量浓度为横坐标、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(4.2.7)稀释后重新测定。单点校准定量时,试样溶液中待测物的质量浓度与标准溶液质量浓度相差不超过 30%。

4.6 试验数据处理

4.6.1 L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸

试样中待测物的含量以质量分数 w_{1i} 计,数值以毫克每千克(mg/kg)表示。多点校准按公式(1)计算;单点校准按公式(2)计算:

$$w_{1i} = \frac{\rho_i \times V_1 \times V_3 \times 1\,000}{m_1 \times V_2 \times 1\,000} \times f \dots\dots\dots (1)$$

- 式中:
- ρ_i ——从标准曲线查得的试样溶液中待测物的质量浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);
 - V_1 ——试样溶液的定容体积,单位为毫升(mL);
 - V_3 ——试样溶液(V_2)的定容体积,单位为毫升(mL);
 - m_1 ——试样质量,单位为克(g);
 - V_2 ——从试样溶液(V_1)中分取的溶液体积,单位为毫升(mL);
 - f ——超出标准曲线范围后的稀释倍数;
 - 1 000 ——换算系数。

$$w_{1i} = \frac{A_i \times \rho_{si} \times V_1 \times V_3 \times 1\,000}{A_{si} \times m_1 \times V_2 \times 1\,000} \times f \dots\dots\dots (2)$$

- 式中:
- A_i ——试样溶液中待测物的色谱峰面积;
 - ρ_{si} ——标准溶液中待测物的质量浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);
 - V_1 ——试样溶液的定容体积,单位为毫升(mL);
 - V_3 ——试样溶液(V_2)的定容体积,单位为毫升(mL);
 - A_{si} ——标准溶液中待测物的色谱峰面积;



- m_1 ——试样质量,单位为克(g);
 V_2 ——从试样溶液(V_1)中分取的溶液体积,单位为毫升(mL);
 f ——超出标准曲线范围后的稀释倍数;
 1 000 ——换算系数。

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。

4.6.2 总抗坏血酸

试样中总抗坏血酸含量以质量分数 w_2 计,数值以毫克每千克(mg/kg)表示,按公式(3)计算:

$$w_2 = w_{L\text{-抗坏血酸}} + w_{D\text{-异抗坏血酸}} \dots\dots\dots (3)$$

4.7 精密度



在重复性条件下,两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不超过该算术平均值的 10%。

5 邻苯二胺荧光法

5.1 原理

弱酸性条件下提取试样中的抗坏血酸,还原型抗坏血酸经活性炭氧化为脱氢抗坏血酸,与邻苯二胺反应生成有荧光的喹喔啉,其荧光强度与脱氢抗坏血酸的浓度在一定条件下成正比,以此测定试样中抗坏血酸总量。

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 6682,三级。

5.2.2 偏磷酸-乙酸溶液:称取 15 g 偏磷酸,加入 40 mL 冰乙酸和 250 mL 水,加温,搅拌溶解,冷却至室温后,用水转移至 500 mL 容量瓶中,定容、混匀。于 2℃~8℃下保存,有效期 7 d。

5.2.3 硫酸溶液(0.15 mol/L):移取 8.3 mL 硫酸,小心加入水中,再用水转移至 1 000 mL 容量瓶中,定容,混匀。

5.2.4 偏磷酸-乙酸-硫酸溶液:称取 15 g 偏磷酸,加入 40 mL 冰乙酸,滴加硫酸溶液(5.2.3)至溶解,用硫酸溶液(5.2.3)转移至 500 mL 容量瓶中,定容,混匀。

5.2.5 乙酸钠溶液(500 g/L):称取 500 g 乙酸钠,加水溶解并稀释至 1 000 mL,混匀。

5.2.6 硼酸-乙酸钠溶液:称取 3 g 硼酸,用乙酸钠溶液(5.2.5)溶解并稀释至 100 mL,混匀。临用现配。

5.2.7 邻苯二胺溶液(200 mg/L):称取 20 mg 邻苯二胺,用水溶解并稀释至 100 mL,混匀。临用现配。

5.2.8 L-抗坏血酸标准溶液(1 mg/mL):称取 50 mg L-抗坏血酸标准品(CAS 号:50-81-7,纯度不低于 99.0%),精确至 0.01 mg,置于 50 mL 棕色容量瓶中,用偏磷酸-乙酸溶液(5.2.2)溶解、定容,混匀。临用现配。

5.2.9 L-抗坏血酸标准工作液(100 μg/mL):准确移取 10 mL L-抗坏血酸标准溶液(5.2.8)于 100 mL 棕色容量瓶中,用偏磷酸-乙酸溶液(5.2.2)稀释[稀释前测试 pH,如其 pH 大于 2.2 时,则应用偏磷酸-乙酸-硫酸溶液(5.2.4)稀释]并定容,混匀。临用现配。

5.2.10 百里酚蓝指示剂溶液(0.4 mg/mL):称取 0.1 g 百里酚蓝,加入 0.02 mol/L 氢氧化钠溶液 10.75 mL,在玻璃研钵中研磨至溶解,用水稀释至 250 mL。

注: 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。

5.2.11 活性炭的活化:称取约 200 g 活性炭粉(75 μm~177 μm),加入 1 L 10% 盐酸溶液,加热回流

1 h~2 h, 过滤, 用水洗至滤液中无铁离子为止(将 20 g/L 亚铁氰化钾溶液与 1% 盐酸溶液等量混合, 将洗出滤液滴入, 如有铁离子则产生蓝色沉淀), 置于 110 °C~120 °C 烘箱中干燥 10 h, 备用。

5.3 仪器设备

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

5.3.2 分析天平: 精度为 0.1 mg 和 0.01 mg。

5.3.3 涡旋混合仪。

5.3.4 恒温干燥箱。

5.3.5 pH 计: 精度为 0.01。

5.4 样品

同 4.4。

5.5 试验步骤

注意: 试验全过程避光操作。

5.5.1 试样中碱性物质的预检

称取 1 g 试样于烧杯中, 加入 10 mL 偏磷酸-乙酸溶液(5.2.2), 滴入 2 滴百里酚蓝指示剂, 检查溶液的 pH, 如果溶液呈红色, 用偏磷酸-乙酸溶液(5.2.2)作样品提取稀释液; 若呈黄色或蓝色, 滴加偏磷酸-乙酸-硫酸溶液(5.2.4), 使其变红, 记录所用量。

5.5.2 试液的制备

平行做两份试验。称取试样 0.5 g~10 g(精确至 0.1 mg, 含抗坏血酸约 2.5 mg~10 mg)于 100 mL 棕色容量瓶中, 按 5.5.1 预检碱量, 加入相应量的偏磷酸-乙酸-硫酸溶液(5.2.4)调整 pH 至 1.2, 或者直接用偏磷酸-乙酸溶液(5.2.2)定容, 混匀。如样品含大量悬浮物, 待样品充分溶解, 过滤, 取滤液为试样溶液。

5.5.3 测定

5.5.3.1 氧化处理: 取试样溶液(5.5.2)及标准工作溶液(5.2.9)各 100 mL, 分别于 200 mL 带盖三角瓶中, 加入 2 g 活性炭(5.2.11), 用力振摇 1 min, 过滤, 弃去最初约 5 mL 滤液, 收集剩余滤液, 为样品氧化液和标准氧化液。

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

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

5.5.3.4 于“标准空白”及“样品空白”溶液中各加 5 mL 硼酸-乙酸钠溶液(5.2.6), 涡旋混匀 15 min, 用水稀释至 100 mL, 混匀。

5.5.3.5 于“标准”及“样品”溶液中各加 5 mL 乙酸钠溶液(5.2.5), 用水稀释至 100 mL, 混匀。

5.5.3.6 荧光反应: 准确移取 5.5.3.4 中“标准空白”“样品空白”溶液及 5.5.3.5 中“样品”溶液各 2 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(5.2.7), 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。

5.5.3.7 标准曲线的绘制: 准确移取“标准”溶液(5.5.3.5)(抗坏血酸含量 10 µg/mL)0.05 mL、0.1 mL、0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL 和 2.0 mL 分别于 10 mL 带盖试管中, 用水补充至 2.0 mL。从“在暗室迅速向”开始按 5.5.3.6 步骤操作, 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、对应抗坏血酸质量(µg)为横坐标, 绘制标准曲线, 其相关系数应不低于 0.99。

5.5.4 试验数据处理

试样中总抗坏血酸的含量以质量分数 w_3 计,数值以毫克每千克(mg/kg)表示。按公式(4)计算:

$$w_3 = \frac{M_1 \times V_4 \times V_6 \times 1\,000}{m_2 \times V_5 \times V_7 \times 1\,000} \dots\dots\dots (4)$$

式中:

M_1 ——样品荧光强度减去样品空白荧光强度后,代入标准曲线查得的试样溶液中总抗坏血酸的质量,单位为微克(μg);

V_4 ——试样溶液的定容体积,单位为毫升(mL);

V_6 ——试样溶液(V_5)的定容体积,单位为毫升(mL);

m_2 ——试样质量,单位为克(g);

V_5 ——从试样溶液(V_4)中分取的溶液体积,单位为毫升(mL);

V_7 ——荧光反应所用试样溶液(V_6)体积,单位为毫升(mL);

1 000——换算系数。

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。

5.5.5 精密度

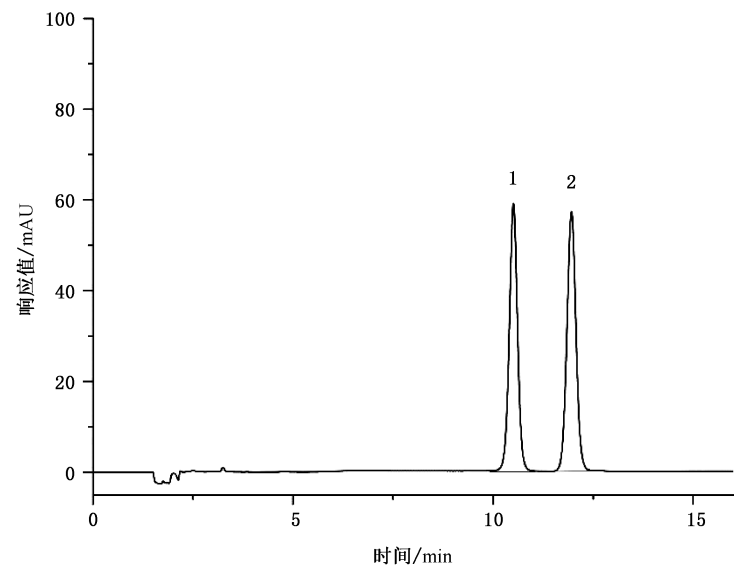
当饲料中总抗坏血酸的含量小于或等于 1.00×10^3 mg/kg 时,在重复性条件下,两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不超过该算术平均值的 10%。

当饲料中总抗坏血酸的含量大于 1.00×10^3 mg/kg 时,在重复性条件下,两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不超过该算术平均值的 5%。

附 录 A
(资料性)

L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸标准溶液液相色谱图

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.1。



标引序号说明：

1——L-抗坏血酸；

2——D-异抗坏血酸。

图 A.1 L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸标准溶液(25 $\mu\text{g/mL}$)液相色谱图

