

前 言

本标准参考了美国公职分析化学家协会 AOAC(1995 年版)45.1.14~45.1.16《维生素制品和果汁中的维生素 C》、《维生素制品中的维生素 C》和《食品中的总维生素 C》的规定,在技术内容上,综合上述三种方法,在操作步骤上作了相应的变更,以便于实际操作。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会提出并归口。

本标准由国家饲料质量监督检验中心(武汉)负责起草。

本标准主要起草人:屈利文、钱肪。

中华人民共和国国家标准

饲料中总抗坏血酸的测定 邻苯二胺荧光法

GB/T 17816—1999

Determination of total ascorbic acid in feeds—
o-Phenylenediamine fluorometry

1 范围

本标准规定了用邻苯二胺荧光法测定饲料中总抗坏血酸的方法。

本标准适用于单一饲料、配合饲料、预混料及浓缩饲料。不适用以酯化抗坏血酸形式添加的各种饲料中抗坏血酸的测定。

在最终提取液中抗坏血酸最小检出限为 $0.022 \mu\text{g/mL}$ 。

2 引用标准

下列标准所包含的条文,通过在本标准中引用而构成本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

GB/T 6682—1992 分析实验室用水规格和试验方法

3 方法原理

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啉(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 试剂

本标准所用试剂,除特殊说明外,均为分析纯。

实验室用水应符合 GB/T 6682 中三级水的规格。

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

4.2 0.15 mol/L 硫酸溶液:取 10 mL 硫酸,小心加入水中,再加水稀释至 1 200 mL。

4.3 偏磷酸-乙酸-硫酸溶液:以 0.15 mol/L 硫酸溶液(4.2)为稀释液代替水,其余同 4.1 配制。

4.4 50%乙酸钠溶液:称取 500 g 乙酸钠($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$),加水至 1 000 mL。

4.5 硼酸-乙酸钠溶液:称取 3 g 硼酸,溶于 100 mL 乙酸钠溶液(4.4)中。临用前配制。

4.6 邻苯二胺溶液:称取 20 mg 邻苯二胺,于临用前用水稀释至 100 mL。

4.7 抗坏血酸标准溶液(1 mg/mL):准确称取 50 mg 抗坏血酸,用溶液(4.1)溶于 50 mL 容量瓶中,并稀释至刻度。临用前配制。

4.8 抗坏血酸标准工作溶液($100 \mu\text{g/mL}$):取 10 mL 抗坏血酸标准溶液(4.7),用溶液(4.1)稀释至

100 mL。稀释前测试 pH 值,如其 pH 大于 2.2 时,则应用溶液(4.3)稀释。

4.9 0.04%百里酚蓝指示剂溶液:称取 0.1 g 百里酚蓝,加 0.02 mol/L 氢氧化钠溶液,在玻璃研钵中研磨至溶解,氢氧化钠的用量为 10.75 mL,磨溶后用水稀释至 250 mL。

变色范围:pH 值等于 1.2 为红色;pH 值等于 2.8 为黄色;pH 值大于 4.0 为蓝色。

4.10 活性炭的活化:加 200 g 炭粉于 1L 盐酸(1+9)中,加热回流 1~2 h,过滤,用水洗至无铁离子(Fe^{3+})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 2%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。

5 仪器、设备

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

5.2 实验室用样品粉碎机。

5.3 实验室常用仪器、设备。

6 试样制备

取具有代表性样品,用四分法缩分至 200 g,然后粉碎至过 0.45 mm(40 目)筛,混匀后装于密封容器,保存备用。

7 测定步骤

7.1 试样中碱性物质的预检

称取试样 1 g 于烧杯中,加 10 mL 偏磷酸-乙酸溶液(4.1),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(4.3),使其变红,并记录所用量。

7.2 试样溶液的制备

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 7.1 预检碱量,加偏磷酸-乙酸-硫酸溶液(4.3)调至 pH 为 1.2,或者直接用偏磷酸-乙酸溶液(4.1)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。

7.3 测定步骤

7.3.1 氧化处理:分别取上述试样溶液(7.2)及标准工作溶液(4.8)100 mL 于 200 mL 带盖三角瓶中,加 2 g 活性炭(4.10),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。

7.3.2 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”。

7.3.3 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”。

7.3.4 于“标准空白”及“样品空白”溶液中各加 5 mL 硼酸-乙酸钠溶液(4.5),混合摇动 15 min,用水稀释至 100 mL。

7.3.5 于“标准”及“样品”溶液中各加 5 mL 乙酸钠溶液(4.4),用水稀释至 100 mL。

7.3.6 荧光反应:取 7.3.4 中“标准空白”、“样品空白”溶液及 7.3.5 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(4.6),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。

7.3.7 标准曲线的绘制:取上述“标准”溶液(7.3.5)(抗坏血酸含量 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)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 7.3.6。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。

8 分析结果的计算及表示

分析结果按式(1)计算:

$$X = \frac{nC}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中: X ——每千克试样中含抗坏血酸及脱氢抗坏血酸总量,mg;

C ——从标准曲线上查得的试样液中抗坏血酸的含量, μg ;

m ——试样质量,g;

n ——试样溶液的稀释倍数。

所得结果表示到小数点后一位。

9 允许差

每个试样称取两份试料进行平行测定,以其算术平均值为测定结果。

在每千克饲料中抗坏血酸的含量小于或等于 1 000 mg 时,测定结果的相对偏差不大于 10%。

在每千克饲料中抗坏血酸的含量大于 1 000 mg 时,测定结果的相对偏差不大于 5%。