

中华人民共和国国家标准
《饲料中总抗坏血酸的测定》

编制说明

(公开征求意见稿)

国粮武汉科学研究设计院有限公司

2024年12月

目录

一、 工作简况	3
1.1 任务来源	3
1.2 标准修订背景	3
1.3 主要工作过程	5
二、 标准编制原则和主要技术内容确定的依据	7
(一) 标准编制原则	7
(二) 标准主要技术内容确定的依据	8
1. 高效液相色谱法	11
1.2 方法主要参数及试验条件的确定	11
1.2.1 检测波长的选择	11
1.2.2 流动相的选择	12
1.2.3 流动相比例优化	13
1.2.4 流动相 pH 值优化	14
1.2.5 流速的选择	15
1.2.6 提取液浓度优化	16
1.2.7 提取方式优化	17
1.2.8 提取时间优化	18
1.2.9 还原剂的选择	19
1.2.10 干扰试验	20
1.2.11 储备液稳定性	20
1.3 方法学考察	21
1.3.1 线性范围	21
1.3.2 方法的检出限和定量限	21
1.3.3 方法回收率和精密度考察	23
1.3.4 方法适用性	25
2 邻苯二胺荧光法	25
2.2 方法学考察	26
2.2.1 线性范围	26
2.2.2 方法的检出限和定量限	27
2.2.3 方法回收率和精密度考察	27
2.2.4 不同检测方法对比研究	27
三、 试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果	28
四、 与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况	29
五、 采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准	29
六、 与有关法律、法规的关系	29
七、 重大分歧意见的处理经过和依据	29
八、 涉及专利的有关说明	29
九、 贯彻国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议	29
十、 其他应当说明的事项	30

一、 工作简况

1.1 任务来源

根据《国家标准化管理委员会关于下达 2022 年第一批推荐性国家标准计划及相关标准外文版计划的通知》(国标委发〔2023〕17号),本标准修订项目编号为 20232784-T-469,项目名称为《饲料中总抗坏血酸的测定》,项目承担单位为国粮武汉科学研究设计院有限公司。本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)提出并归口。

1.2 标准修订背景

抗坏血酸(Ascorbic Acid)又称“维生素 C”,是一种重要的水溶性维生素,为白色或微黄色晶体或粉末,无臭,易溶于水,微溶于乙醇,不溶于乙醚、氯仿、苯、石油醚等有机溶剂。

维生素 C 的工业化生产工艺,经历了浓缩提取法、化学合成法和生物发酵法三个阶段。目前维生素 C 工业化生产采用我国在上世纪七十年代开发的“两步生物发酵法”工艺技术路线,从 L-山梨糖到 2-酮基-L-古龙酸(以其为底物,经酯化转化后合成 Vc)的生物转化,是目前唯一应用于工业化生产的工艺路线。目前全球 Vc 主要生产厂家均在中国,主要有石药集团(年产 8.5 万吨)、山东鲁维(年产 5 万吨)、新和成(年产 4.5 万吨)、山东天力(年产 2.4 万吨)等企业。包衣维生素 C 是使用乙基纤维素作为衣膜将 VC 包裹而成,常见的有 90%、95%、97%等规格,衣膜的包裹作用能够降低维生素 C 在饲料加工过程中因高温、湿、热、挤压等而造成的损失,也能在动物体内动态缓慢释放,持续发挥生理功能;其微粒形态提升了产品流动性,有利于提高在饲料中分散的均匀性。

抗坏血酸按构型分为 L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸,其中 L-抗坏血酸对机体具有生物活性,既是动物体内多种代谢必不可少的辅助因子^[1],同时又是一种抗氧化剂和自由基清除剂,可以对机体起到保护作用,而 D-异抗坏血酸基本不参与机体生理作用,多为宠物饲料中抗氧化剂,在自然界极少存在。动物自身不能合成抗坏血酸,故需要在饲料中添加以供应机体所需。在家禽饲料中添加抗坏血酸,可有效缓解家禽因高温、拥挤、疾病等引起的应激反应,对鸡的产蛋率有良好的促进作用^[2];在水产饲料中添加抗坏血酸,可促进鱼虾的生长发育,提高抗病抗应激能力,避免维生素 E 被破坏和油脂的氧化腐败,对重金

属如铜、锌、汞、砷等有解毒功能；在猪饲料中添加抗坏血酸，可有效减缓应激，减少猪群的发病机会，增强仔猪的免疫力，提高公猪的精液品质，提高母猪的受孕率等。

2013年，农业部2045号公告《饲料添加剂目录》规定，L-抗坏血酸为维生素及类维生素类饲料添加剂，适用范围为所有养殖动物。2018年农业部第21号公告规定，将D-异抗坏血酸作为抗氧化剂增补进入《饲料添加剂品种目录（2013）》，适用范围为犬、猫。2023年农业部第692号公告规定，增补饲料添加剂L-抗坏血酸到《饲料添加剂品种目录》的“抗氧化剂”类中，适用范围为养殖动物。

L型和D型抗坏血酸又分为还原型抗坏血酸和脱氢型抗坏血酸，两者之间的转化是可逆的^[3]。总抗坏血酸测定的主要思路就是将L-抗坏血酸氧化为L-脱氢抗坏血酸或将L-脱氢抗坏血酸还原为L-抗坏血酸后，得到的L-抗坏血酸、L-脱氢抗坏血酸和D-异抗坏血酸总含量即为样品中的总抗坏血酸含量。目前国内测定样品中抗坏血酸的标准方法主要有滴定法、荧光法和液相法。GB 5009.86-2016《食品安全国家标准 食品中抗坏血酸的测定》、SN/T 0869-2017《出口饮料中抗坏血酸的测定》和GB/T 17816-1999《饲料中总抗坏血酸的测定》采用荧光法测定总抗坏血酸含量，该方法灵敏度高，但操作繁琐，易受到干扰，且不能区分开L-抗坏血酸和其同分异构体D-异抗坏血酸。GB 5009.86-2016《食品安全国家标准 食品中抗坏血酸的测定》中采用2,6-二氯靛酚滴定法测定L-抗坏血酸含量，此方法虽简单，但易受到实际样品中背景基质的干扰，灵敏度低，误差较大。GB 5009.86-2016《食品安全国家标准 食品中抗坏血酸的测定》、SN/T 0869-2017《出口饮料中抗坏血酸的测定》和DB22/T 1824-2013《饮料中抗坏血酸和D-异抗坏血酸的测定 高效液相色谱法》采用液相法测定抗坏血酸含量，此方法准确度高，重现性好，测试条件要求易于控制，但由于L-脱氢抗坏血酸只能在210 nm处检测，紫外检测器对其灵敏度和选择性都很低，因此液相色谱测定总抗坏血酸主要是将L-脱氢抗坏血酸转化为L-抗坏血酸后，再用紫外检测器测定总抗坏血酸含量。

国际上测定抗坏血酸的标准方法主要有液相色谱法、荧光法、紫外法和毛细管电泳法等。ISO 6557-1-1986标准采用分子荧光光谱法测定L-抗坏血酸和

L-脱氢抗坏血酸的总含量。ISO 20635:2018 使用（超）高效液相色谱法和紫外法测定婴儿和成人配方奶粉中 L-抗坏血酸的含量。欧盟标准 EN 14130: 2003 采用高效液相色谱法测定食品中 L（+）-抗坏血酸和 L（+）-脱氢抗坏血酸的含量。俄罗斯标准 GOST 31483-2012 使用毛细管电泳法测定预混合料中抗坏血酸的含量。液相色谱法相对于其他方法来讲，能区分测定不同构型的抗坏血酸，前处理操作更为简便高效、测定结果准确稳定。经比较，液相色谱法与荧光法测定总抗坏血酸的结果无明显差异。因此在原标准基础上补充液相法，以适应我国饲料工业技术的发展。

1.3 主要工作过程

1.3.1 成立标准编制小组

国粮武汉科学研究设计院有限公司接到国家标准修订任务后，成立了标准编制小组，落实了人员分工。

表 1 标准主要起草人员和任务分工

人 员	职 称	任 务 分 工
邵 瑞	工程师	项目负责人，负责项目的全面工作
杜 言	工程师	检测方法研究、样品检测
王博媛	工程师	检测方法研究、样品检测
陈梦莹	工程师	检测方法研究、样品检测
陈析羽	助理工程师	标准文本和编制说明编写和完善
刘小敏	副研究员	技术顾问、标准文本和编制说明修改
严宏岳	工程师	检测方法研究
宿永波	工程师	检测方法研究
邱惠娟	工程师	检测方法研究

1.3.2 标准修订技术路线和方案制定

2024 年初，标准编制小组查阅了国内外有关标准文献资料，制定了标准修订内容和技术路线草案。2024 年 2 月，国粮武汉科学研究设计院有限公司组织有关专家、主要起草人员召开标准修订项目启动会，确定标准修订的主要内容、技术路线（见图 1）、分工、完成时限等。

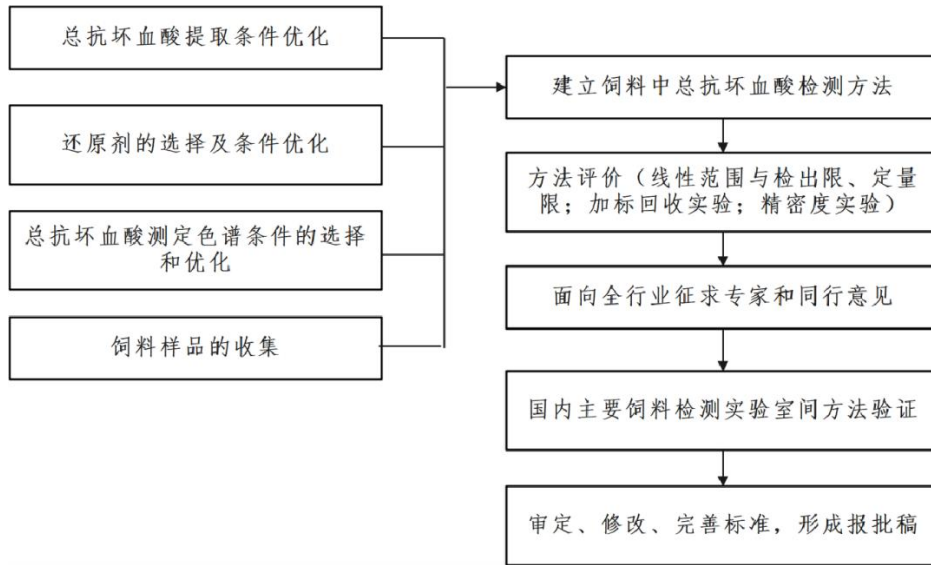


图 1 标准修订技术路线图

1.3.3 样品收集、方法学研究和实际样品检测

2024 年 3 月~2023 年 8 月，开展样品收集、方法学研究和方法适用性考察等。

1.3.4 编写编制说明和征求意见稿

2023 年 10 月，标准编制小组完成标准文本、编制说明定向征求意见稿编制工作。

1.3.5 定向征求意见和标准验证

2025 年 1 月，标准编制小组开展定向征求意见、3 家检测机构标准验证工作。

二、 标准编制原则和主要技术内容确定的依据

（一） 标准编制原则

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》、GB/T 20001.4—2015《标准编制规则 第 4 部分：试验方法标准》的规定和要求编写标准全文。查阅了国内外相关文献和标准，结合现行标准存在的问题，新增高效液相色谱法，补充荧光法的定量限，有效提升标准的科学性、先进性、稳定性和可靠性。

（三） 修订内容的说明

本次修订除按照 GB/T 1.1-2020 和 GB/T 20001.4-2015 对标准进行编辑性修改外，将文件名称《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；增加了术语和定义；更改了邻苯二胺荧光法分析结果的计算及表示；增加了高效液相色谱测定方法，详见表 1。

表 2 标准主要技术内容修订说明

序号	章条编号	原标准	修订后	修订原因
1	首页	《饲料中总抗坏血酸的测定 邻苯二胺荧光法》	《饲料中抗坏血酸的测定》	抗坏血酸存在同分异构体，邻苯二胺荧光法不能区分测定不同构型的抗坏血酸，原标准名称已不符合现标准内容。
2	前言	“本标准...”	“本文件按照 GB/T1.1-2020...-- GB/T 17816-1999。”	按照 GB/T1.1-2020 要求重新整理。
3	1 范围	本标准规定了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总抗坏血酸的测定。 在最终提取液中抗坏血酸最小检出限为 0.022 μg/mL。	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。 本文件邻苯二胺荧光法的检出限为 3 mg/kg，定量限为 10 mg/kg；高效液相色谱法检出限	重新确定了荧光法的检出限、定量限；根据新方法确定了其适用范围、检出限、定量限。

			为 5 mg/kg, 定量限为 20 mg/kg。	
4	2 规范性引用文件	下列标准所包含的条文,通过在本标准中引用而构成为本标准的条文。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/T6682-1992 分析实验室用水规格和试验方法	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	按照 GB/T 1.1-2020 和 GB/T 20001.4-2015 规定要求。增加试样制备的标准。
5	3 术语和定义	无	<p>3 术语和定义 下列术语和定义适用于本文件。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>3.5</p>	按照 GB/T 1.1-2020 的规定补充。

			<p>L-抗坏血酸总量 Total L-Ascorbic acid</p> <p>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。</p>	
6	8 分析结果的计算及表示	<p>分析结果按公式 (1) 计算:</p> $X = \frac{nC}{m} \dots\dots\dots (1)$ <p>式中:</p> <p>X——每千克试样中含抗坏血酸及脱氢抗坏血酸总量, mg;</p> <p>C——从标准曲线上查得的试样液中抗坏血酸的含量, μg;</p> <p>m——试样质量, g;</p> <p>n——试样溶液的稀释倍数。</p> <p>所得结果表示到小数点后一位。</p>	<p>试样中抗坏血酸的含量, 以质量分数 ω_1 表示, 单位为毫克每千克 (mg/kg), 按公式 (1) 计算:</p> $\omega_1 = \frac{m_1 \times V \times 1000}{m \times V_1 \times 1000} \dots\dots\dots (1)$ <p>式中:</p> <p>ω_1——试样中抗坏血酸及脱氢抗坏血酸的总量, 单位为毫克每千克 (mg/kg);</p> <p>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);</p> <p>V——试样溶液的总体积, 单位为毫升 (mL);</p> <p>m——试样质量, 单位为克 (g);</p> <p>V_1——荧光反应所用试样体积, 单位为毫升 (mL)。</p> <p>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。</p>	使结果计算表述更加准确。
7	第二法 高效液相色谱法	无	第二法 高效液相色谱法	增加饲料中抗坏血酸的高效液相色谱法。

（二）标准主要技术内容确定的依据

1. 高效液相色谱法

1.1 方法原理

试样中的抗坏血酸用偏磷酸溶解超声提取后，以离子对试剂为流动相，经反相色谱柱分离，其中 L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸直接用配有紫外检测器的液相色谱仪测定；试样中的 L-脱氢抗坏血酸经还原剂进行还原后，用紫外检测器测定 L-抗坏血酸总量。以色谱峰的保留时间定性，外标法定量。

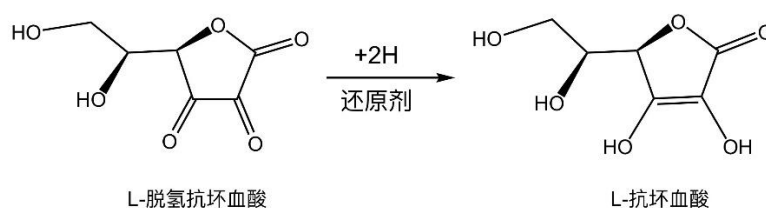


图 2 L-脱氢抗坏血酸的还原原理图

1.2 方法主要参数及试验条件的确定

1.2.1 检测波长的选择

将 L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸标准物质分别配制成浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液，采用二极管矩阵检测器在 190~400 nm 波长范围内采集光谱图，如图 3 图 4。结果表明，L-抗坏血酸在 263nm 处有最大吸收， D-异抗坏血酸在 261nm 处有最大吸收。将液相法的检测波长确定为 263 nm。

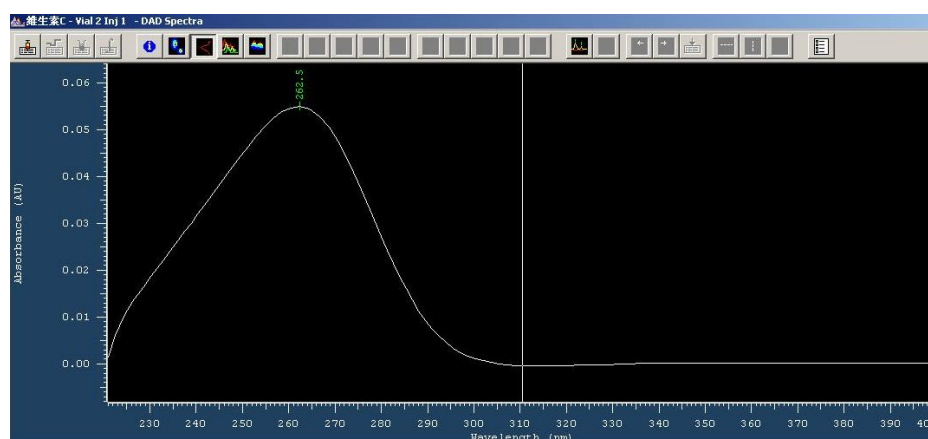


图 3 L-抗坏血酸紫外光谱扫描图

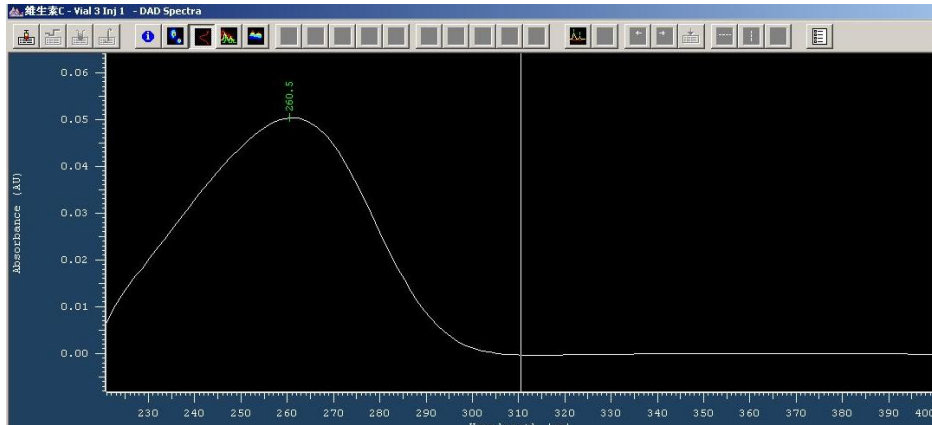


图 4 D-异抗坏血酸紫外光谱扫描图

1.2.2 流动相的选择

抗坏血酸的同分异构体分为 L-型和 D-型，每种构型均存在氧化和还原型形式。L-抗坏血酸作为维生素类营养强化剂广泛应用于饲料产品中。L-脱氢抗坏血酸的生理活性约为 L-抗坏血酸的 80%^[4]。D-异抗坏血酸仅具有 5% 的维生素 C 原活性^[5]，但其抗氧化性极佳，2018 年农业部将其作为抗氧化剂增补进入《饲料添加剂品种目录（2013）》。但 GBT17816-1999《饲料中总抗坏血酸的测定》采用的荧光法只能测定饲料样品中添加的抗坏血酸总量，无法区分 L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸。为了同时测定并有效分离不同构型的抗坏血酸，查阅文献考察了 0.05 mol/L 偏磷酸（ HPO_3 ）水溶液、0.1% 甲酸（ HCOOH ）水溶液、0.1% 磷酸（ H_3PO_4 ）水溶液、0.05 mol/L 磷酸二氢钾（ KH_2PO_4 ）水溶液和 6.8 g 磷酸二氢钾和 0.91 g 十六烷基三甲基溴化铵（ $\text{KH}_2\text{PO}_4+\text{CTAB}$ ）这六种流动相体系下的分离效果，其色谱图见图 5，不同流动相的分离度见表 2。

结果表明，以 0.05 mol/L HPO_3 水溶液为流动相时，L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸不能实现良好分离；以 0.1% H_3PO_4 水溶液为流动相时，D-异抗坏血酸的峰形不好，对称性不佳；以 0.1% HCOOH 水溶液、0.05 mol/L KH_2PO_4 为流动相时，在目标峰前有溶剂峰；而以 $\text{KH}_2\text{PO}_4+\text{CTAB}$ 为流动相时，理论塔板数大于 3000，分离度大于 1.5，无溶剂峰干扰、峰型良好、保留时间适中，故最终选择其作为流动相。

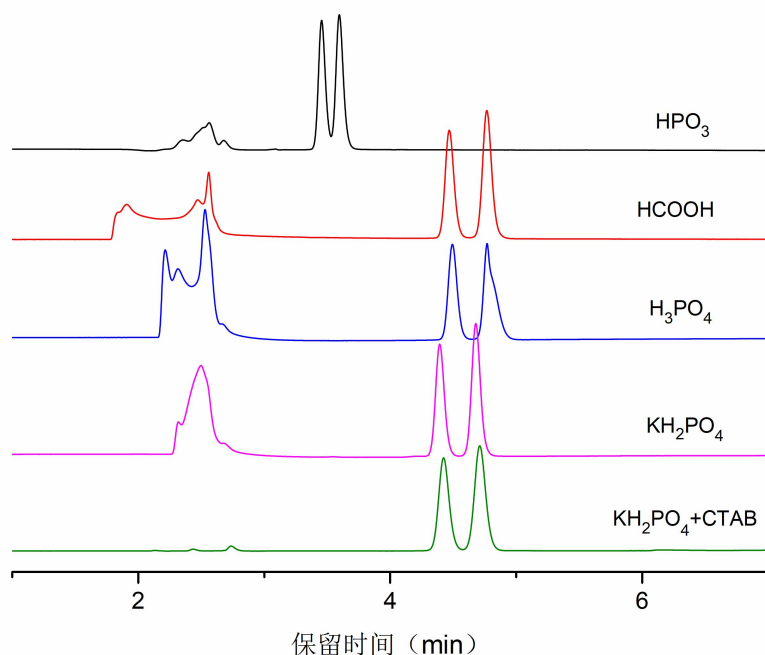


图 5 L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸混合标准溶液在不同流动相下的色谱图

表 3 流动相对色谱分离的影响

流动相种类	L-抗坏血酸塔板数 n	D-异抗坏血酸塔板数 n	分离度 R
HPO ₃	17636	17292	1.32
HCOOH	18361	20114	2.25
H ₃ PO ₄	18598	13271	1.86
KH ₂ PO ₄	18190	20660	2.21
KH ₂ PO ₄ +CTAB	13012	12833	1.80

1.2.3 流动相比比例优化

为了提高方法的选择性，改善分离度，在流动相中引入甲醇并对其比例进行优化。以磷酸二氢钾-十六烷基三甲基溴化铵为水相，甲醇比例分别为 0%、1%、2%、3%，结果见图 6 和表 3。结果表明，当甲醇比例为 1% 时，L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸色谱峰的分度最大，对称性好，故流动相中甲醇的比例定为 1%。

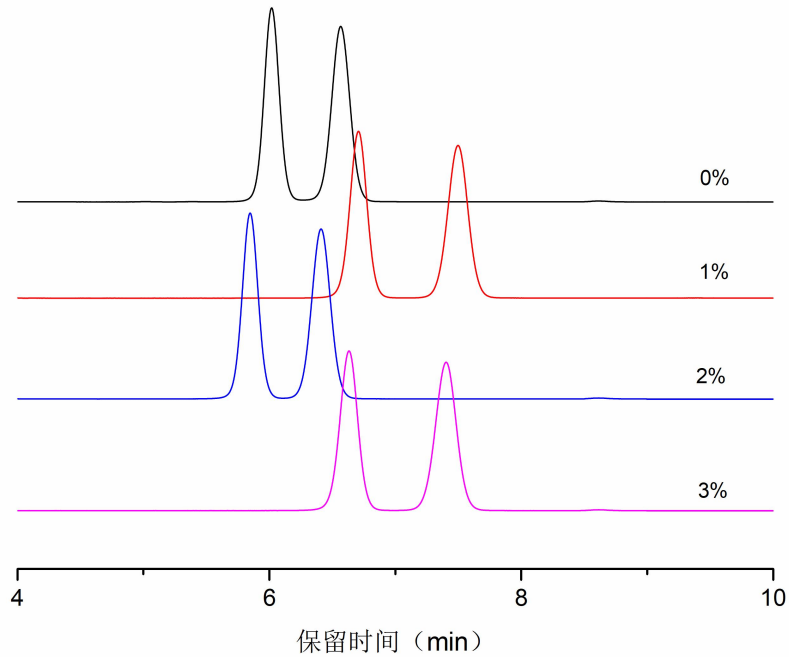


图 6 L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸混合标准溶液在不同比例甲醇作为流动相下的色谱图

表 4 甲醇比例对色谱分离的影响

甲醇 (% , v)	L-抗坏血酸塔板数 n	D-异抗坏血酸塔板数 n	分离度 R
0	11156	9153	2.19
1	10859	9611	2.82
2	9613	8170	2.16
3	9779	8808	2.65

1.2.4 流动相 pH 值优化

L-抗坏血酸具有酸性和还原性，其在干燥状态下十分稳定，但在溶液中不稳定，受光、热、氧化酶及铜、铁离子会氧化分解，在中性或碱性溶液中易被破坏^[6]。考察不同 pH 值对 L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸色谱行为的影响。由图 7 和表 4 可知，流动相的 pH 值对分离起到非常关键的作用。随着 pH 值进一步增大，两者分离度增大，但峰形逐渐变宽，灵敏度降低。同时考虑到色谱柱使用寿命，选择流动相的 pH 值为 3.50。

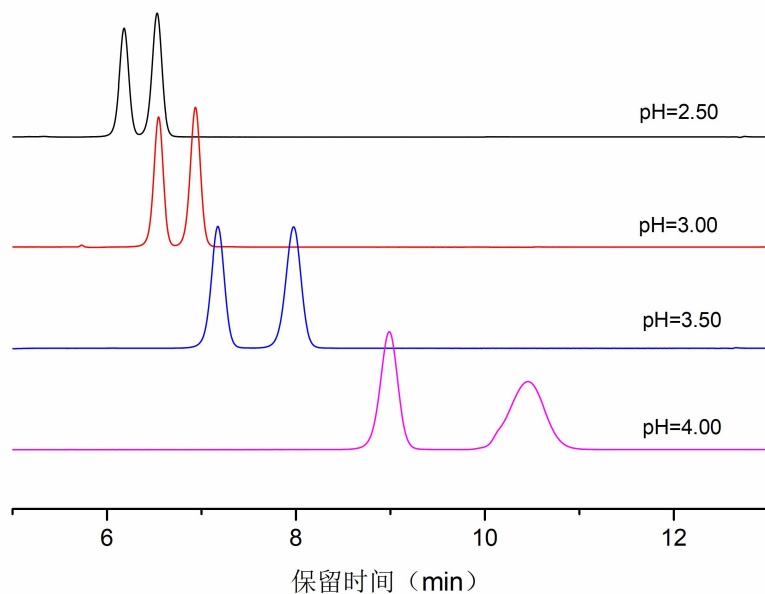


图 7 L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸混合标准溶液在不同 pH 值的流动相下的色谱图

表 5 pH 值对色谱分离的影响

pH 值	L-抗坏血酸塔板数 n	D-异抗坏血酸塔板数 n	分离度 R
2.50	17216	17500	1.80
3.00	16378	16203	2.00
3.50	12085	11100	2.85
4.00	10689	3469	2.79

1.2.5 流速的选择

考察了流动相流速分别为 0.7、0.8、0.9、1.0 ml/min 对 L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸分离效果的影响，结果见图 5 和表 5。结果表明，随着流速的降低，分离度和理论塔板数逐渐增加，但保留时间也随之延长，增加了时间成本，并且进样前，离子对试剂需要大量时间平衡，否则连续进样时会出现保留时间漂移现象。综合考虑分析时间、分离效果，选择流动相的流速为 1.0 ml/min。

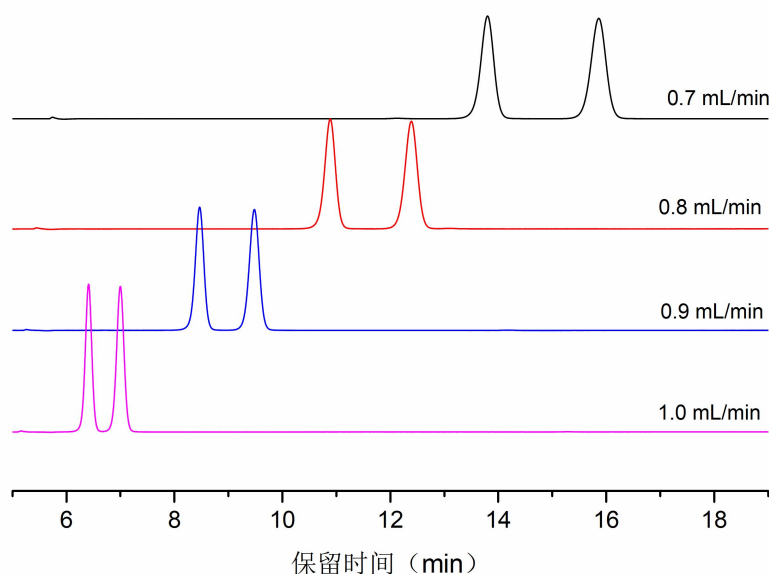


图 8 L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸混合标准溶液在不同流速下的色谱图

表 6 流速对色谱分离的影响

流速 (mL/min)	L-抗坏血酸塔板数 n	D-异抗坏血酸塔板数 n	分离度 R
0.7	15087	14926	4.26
0.8	13820	13425	3.77
0.9	13107	12282	3.18
1.0	13085	11809	2.45

1.2.6 提取液浓度优化

L-抗坏血酸在碱性条件下易分解，在酸性溶液中较为稳定，Xingnan Li^[7]等发现向血浆中加入等体积的 10% 偏磷酸水溶液可以稳定血浆中天然 L-抗坏血酸含量。Jens Lykkesfeldts^[8]等发现当以 5% 的偏磷酸为提取液时，加入还原剂三-(2-羧乙基)磷，能使 L-抗坏血酸 96 h 内保持稳定，不被氧化分解。曾雪仪^[9]发现与 0.1 mol/L 草酸、0.1% 盐酸、0.1 mol/L 磷酸相比，使用 20 g/L 偏磷酸溶液提取粳米样品时，具有较高的回收率。本实验在综合上述研究基础上选择偏磷酸作为提取液，并研究了标准物质在浓度为 5、10、20、40 g/L 偏磷酸溶液中的稳定性的差异。结果表明，随着偏磷酸浓度的增加，L-抗坏血酸标准溶液的平均峰面积有所降低，以 20 g/L 偏磷酸溶液为提取液时，峰面积的相对标准偏差 (RSD) 最小，稳定性最好。故选择 20 g/L 偏磷酸溶液作为提取溶液。

表7 偏磷酸浓度对L-抗坏血酸标准溶液稳定性的影响

峰面积 偏磷酸 浓度 (g/L)	1	2	3	平均值	RSD (%)
5	16.279	16.021	16.188	16.16	0.81
10	16.117	15.996	15.383	15.83	2.49
20	16.000	15.997	15.872	15.96	0.46
40	15.621	15.425	15.539	15.53	0.63

1.2.7 提取方式优化

生产厂家通常采取乙基纤维素作为包衣材料^[10]，通过包衣工艺将L-抗坏血酸原料进行包埋，从而隔断其与外部环境的接触，提升L-抗坏血酸的稳定性。为了使L-抗坏血酸彻底溶出，选取配合饲料和预混料，加入一定含量的L-抗坏血酸稀释剂，比较超声提取、震荡提取、超声+震荡提取三种方式对提取效果的影响。结果表明，以震荡为提取方式时，L-抗坏血酸的回收率最低。以超声、超声+震荡两者为提取条件L-抗坏血酸的回收率经检验统计分析，两者在95%置信区间内无显著性差异，故选择超声提取为样品前处理条件，更加方便快捷。

表8 提取方式对回收率的影响

提取方式	样品名称	回收率/%			平均回收率/%	RSD/%
超声	配合饲料	94.47	92.24	94.41	93.7	1.36
	预混料	98.58	102.41	100.8	100.6	1.91
震荡	配合饲料	84.13	86.88	85.89	85.6	1.63
	预混料	104.20	83.86	97.46	95.2	10.88
超声+震荡	配合饲料	93.19	94.11	94.32	93.9	0.64
	预混料	96.81	103.22	98.68	99.6	3.31

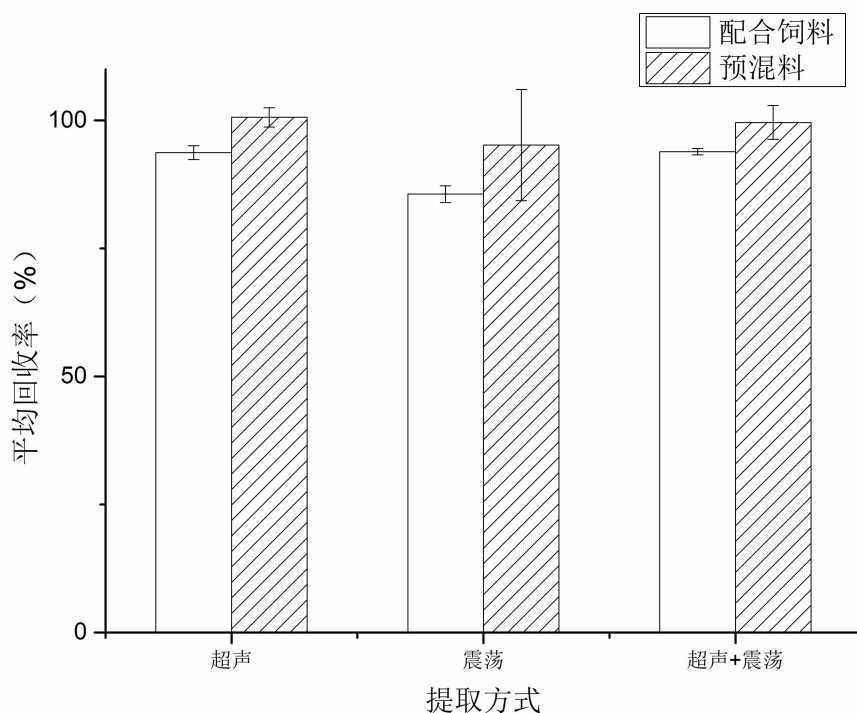


图 9 提取方式对回收率的影响

1.2.8 提取时间优化

选取配合饲料和预混料，加入一定含量的 L-抗坏血酸稀释剂，研究不同提取时间（5、10、20、30 min）对提取效率的影响。结果表明，超声为 10min 和 20min 时，回收率最高，考虑到 L-抗坏血酸水溶液性质不稳定，故超声时间选 10 min。

表 9 提取时间对回收率的影响

提取时间 /min	样品名称	回收率/%			平均回收率/%	RSD/%
5	配合饲料	91.47	88.05	88.39	89.3	2.11
	预混料	82.22	94.09	87.30	87.9	6.78
10	配合饲料	94.47	92.24	94.41	93.7	1.36
	预混料	98.58	102.41	99.54	100.2	1.99
20	配合饲料	92.92	93.94	92.02	93.0	1.03
	预混料	99.54	101.04	94.45	98.3	3.51
30	配合饲料	86.92	85.59	86.24	86.3	0.77
	预混料	85.61	99.59	90.14	91.8	7.77

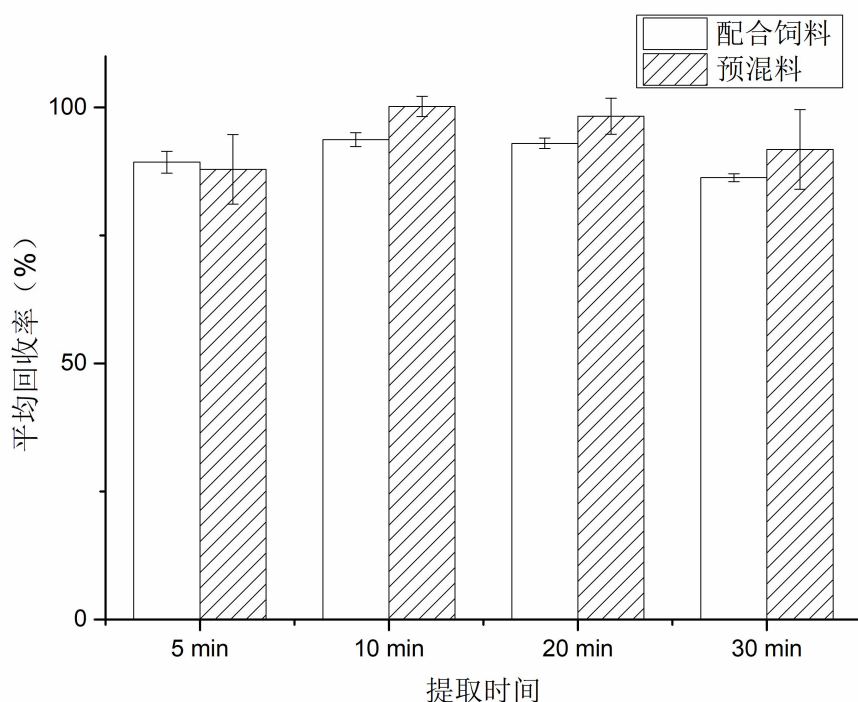


图 10 提取时间对回收率的影响

1.2.9 还原剂的选择

L-抗坏血酸易受光、热、pH 值等条件的氧化成 L-脱氢抗坏血酸，如果 L-脱氢抗坏血酸不还原回其抗坏血酸状态，它将进一步不可逆地氧化成 2,3-二酮古洛糖酸^[11]，将大大降低 L-抗坏血酸活性。L-抗坏血酸在 263 nm 处有最大紫外吸收，而 L-脱氢抗坏血酸只能在 210 nm 处检测，紫外检测器对其响应能力和选择性都较低，不利于定量分析，因此需要将 L-脱氢抗坏血酸还原成 L-抗坏血酸进行检测。含硫醇的化合物可以将脱氢型抗坏血酸稳定地还原为还原型抗坏血酸。选用三-(2-羧乙基)膦、二硫苏糖醇、L-半胱氨酸三种还原剂分别与 L-脱氢抗坏血酸反应。L-脱氢抗坏血酸转化率见表 9，结果表明，以 L-半胱氨酸为还原剂时，L-脱氢抗坏血酸转化率最佳，同时考虑到 L-半胱氨酸价格便宜易取得，故选择 L-半胱氨酸作还原剂。



图 11 L-抗坏血酸的降解途径

表 10 还原剂对还原率的影响

还原剂种类	还原率/%			平均还原率/%	RSD/%
三-(2-羧乙基)膦	97.24	97.46	96.44	97.0	0.55
二硫苏糖醇	89.35	91.08	93.87	91.4	2.50
L-半胱氨酸	97.01	100.24	98.73	98.7	1.64

1.2.10 干扰试验

L-抗坏血酸-2-磷酸酯盐是以 L-抗坏血酸与偏磷酸盐(钠、钙、镁等)反应所制得的。其既具有 L-抗坏血酸所有功效，又克服了 L-抗坏血酸怕光、热及金属离子等，易被氧化的缺点，因此也在饲料产品中应用广泛。考察 L-抗坏血酸-2-磷酸酯镁盐、L-脱氢抗坏血酸对本方法的两种化合物测定的影响，将四种物质配置成 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准溶液，在上述优化后的实验条件下进行测定，得到的色谱图见图 10。结果表明，L-抗坏血酸-2-磷酸酯镁盐、L-脱氢抗坏血酸均未出峰，表明这两种物质对 L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸的测定无干扰。

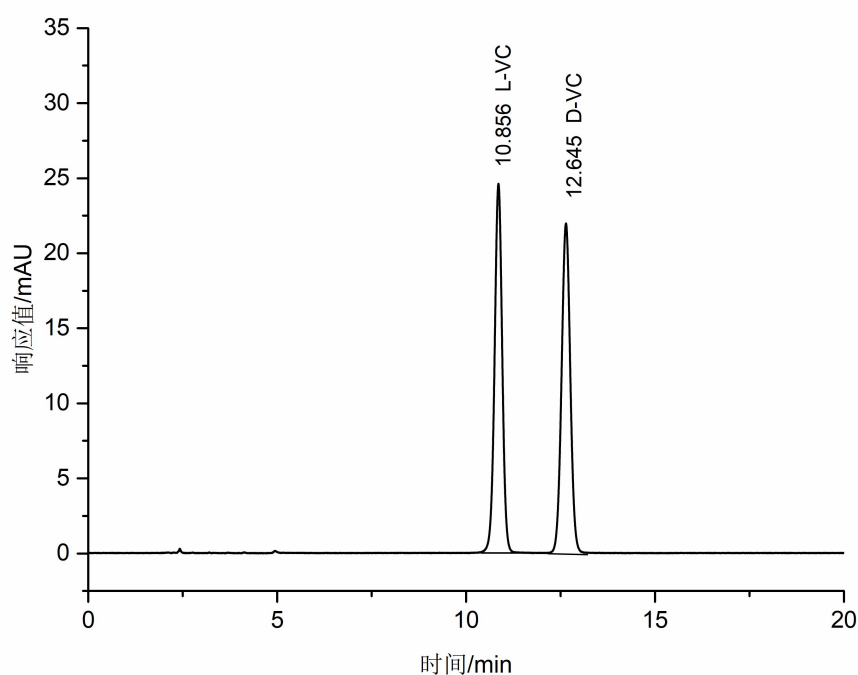


图 12 干扰试验色谱图

1.2.11 储备液稳定性

L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸配制成 1 mg/mL 的混合标准溶液，2 $^{\circ}\text{C}$ -8 $^{\circ}\text{C}$ 避

光条件下保存，每天将其逐级稀释成 20 $\mu\text{g/mL}$ 的工作液，进行一次稳定性考察，每次重复测定三次，记录色谱峰面积，连续考察七天，稳定性实验结果见表 10，结果表明，L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸的混合标准溶液七天内测得的峰面积的 RSD 均小于 5%。因此，将标准物质的储备液（1 mg/mL ）在 2 $^{\circ}\text{C}$ -8 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下保存的有效期定为七天。

表 11 标准储备溶液稳定性试验结果

时间 (天)	0	3	5	7	RSD/%
L-抗坏血酸平均峰面积	11.413	11.123	11.133	11.012	1.53
D-异抗坏血酸平均峰面积	12.354	11.955	11.999	11.819	1.73

1.3 方法学考察

1.3.1 线性范围

取 L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸的混合标准工作液适量，配制成质量浓度分别为 0 $\mu\text{g/mL}$ 、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 $\mu\text{g/mL}$ 混合标准系列溶液，以峰面积为纵坐标，混合标准溶液的质量浓度为横坐标绘制标准曲线，线性方程、相关系数见表 11。结果表明，L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸在 0 $\mu\text{g/mL}$ ~ 50 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内呈良好的线性关系。

表 12 L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸的线性范围、线性方程和相关系数

序号	待测组分	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	线性方程	R^2
1	L-抗坏血酸	0-50.0	$Y=0.5874X-0.1072$	0.9999
2	D-异抗坏血酸	0-50.0	$Y=0.6593X-0.1872$	0.9999

1.3.2 方法的检出限和定量限

选取空白配合饲料、浓缩料、预混合饲料，添加标准溶液 5 mg/kg ，按照上述条件和方法，经液相色谱仪测得信噪比 (S/N) 均大于 3；添加标准溶液 20 mg/kg ，按建立的方法处理样品，经液相色谱仪测得信噪比 (S/N) 均大于 10。最终确定本方法检出限为 5 mg/kg ，定量限为 20 mg/kg 。配合饲料、浓缩料、预混合饲料样品空白、定量限浓度添加样品 (20 mg/kg) 的色谱图见图 13~图 15。

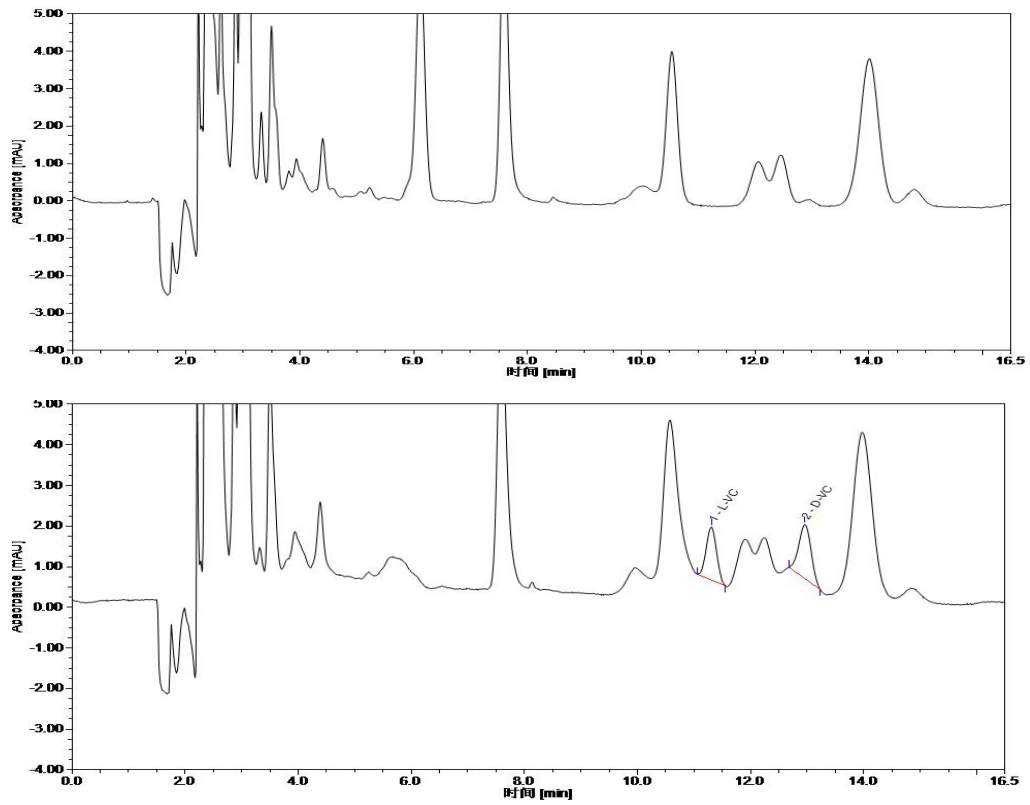


图 13 配合饲料样品空白、定量限色谱图

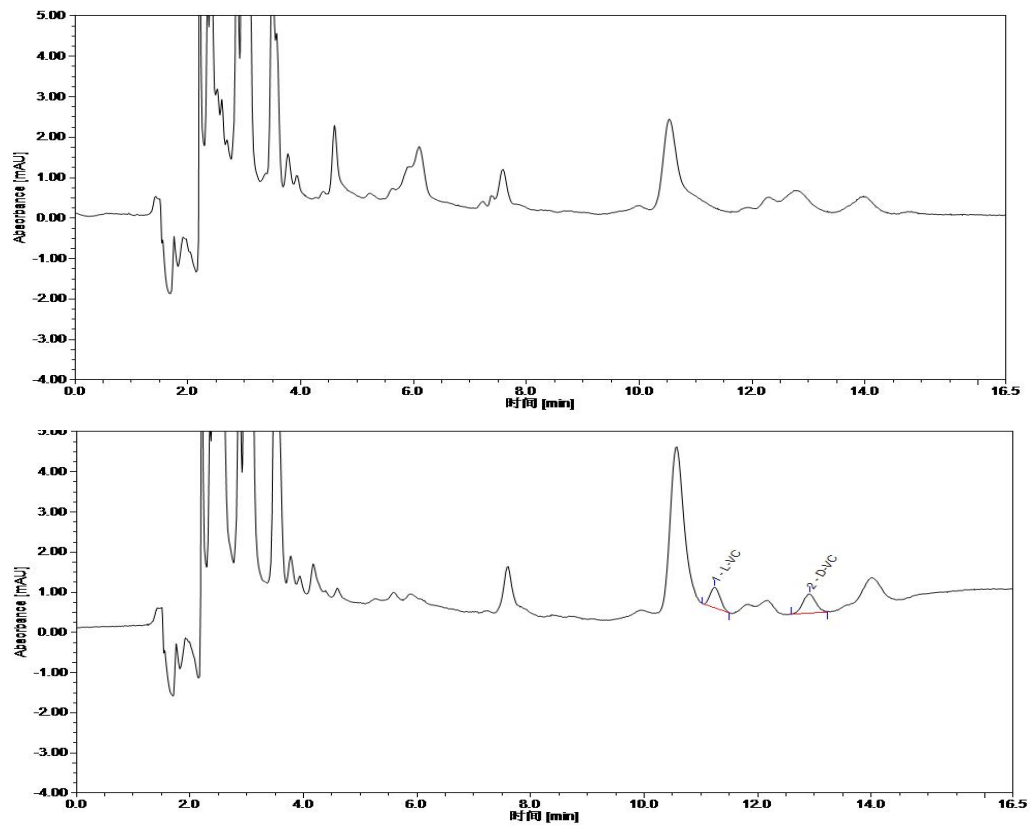


图 14 浓缩料样品空白、定量限色谱图

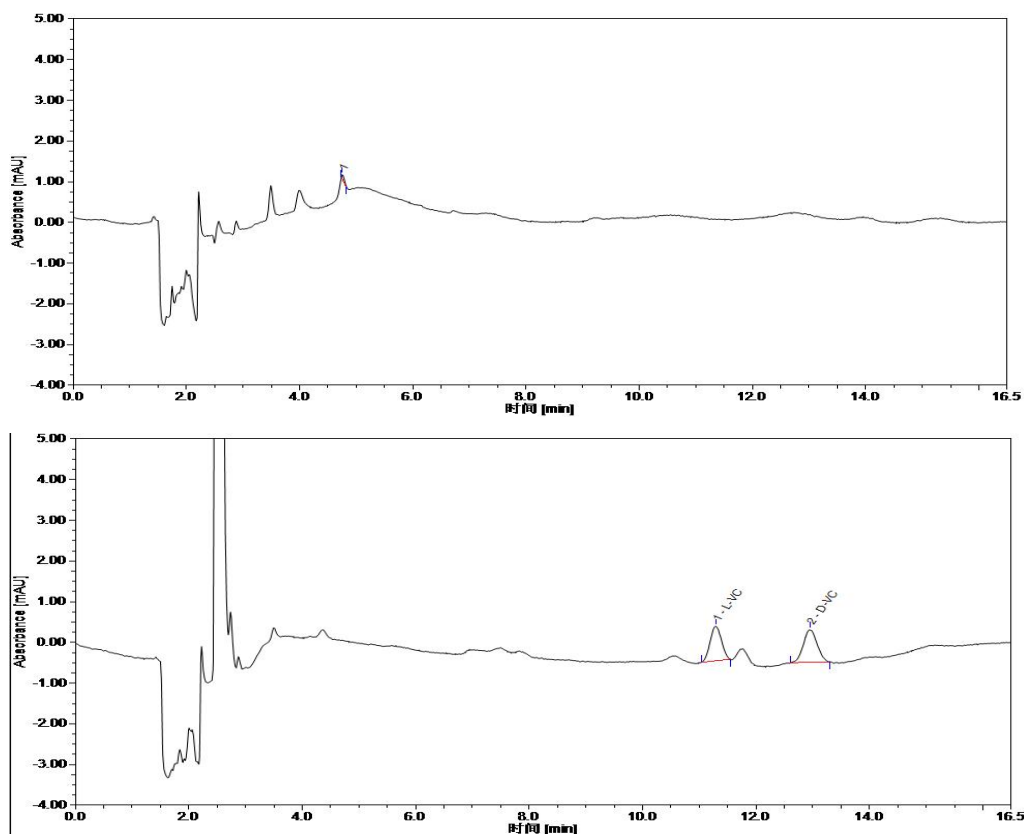


图 15 预混料样品空白、定量限色谱图

1.3.3 方法回收率和精密度考察

本方法收集鸡配合饲料、猪配合饲料、虾料、鱼料、浓缩饲料、蛙预混合饲料、兔生长繁殖饲料、兔维生素预混合饲料等 11 种饲料产品做添加回收实验，分别添加低、中、高 3 个浓度的标准溶液，每个浓度平行测定 6 次，计算平均回收率及相对标准偏差 (RSD)，测定结果见表 12。结果表明采用液相色谱法测定 L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸，在低、中、高三个添加水平下有良好的加标回收率和精密度，能满足定量检测的要求。

表 13 饲料样品的添加回收率和精密度

样品名称	待测组分	添加水平(μg)	回收率 (%)						平均回收率 (%)	RSD (%)
			1	2	3	4	5	6		
鸡配合饲料	L-抗坏血酸	40	87.50	88.44	85.50	81.57	79.57	87.37	85.0	4.25
		120	83.00	86.64	89.32	85.83	86.64	85.81	86.2	2.36
		200	83.75	83.40	83.68	80.73	79.89	81.71	82.2	2.02
	D-异抗坏血酸	40	88.50	85.93	88.00	84.79	85.11	83.68	86.0	2.20
		120	69.67	74.46	75.63	67.67	69.95	70.62	71.3	4.29
		200	73.52	71.80	73.17	70.90	72.62	72.14	72.4	1.32

猪配合饲料	L-抗坏血酸	40	70.00	65.50	78.00	70.32	82.83	74.68	73.6	8.49
		120	85.67	88.31	75.29	81.50	87.65	82.47	83.5	5.81
		200	86.24	77.93	84.14	79.08	77.16	78.75	80.6	4.61
	D-异抗坏血酸	40	65.00	69.00	74.50	67.12	70.82	68.78	69.2	4.70
		120	77.50	81.80	74.12	71.17	75.46	80.47	76.8	5.20
		200	84.44	70.41	74.70	76.92	74.22	80.08	76.8	6.41
成猫粮	L-抗坏血酸	40	76.88	82.59	80.00	74.88	81.17	77.36	78.8	3.70
		120	73.26	86.17	91.62	80.33	84.31	81.80	82.9	7.43
		200	90.83	88.82	85.06	80.38	81.72	81.44	84.7	5.09
	D-异抗坏血酸	40	72.36	80.10	71.00	77.73	76.68	75.00	75.5	4.51
		120	66.94	63.91	69.01	65.67	65.11	63.44	65.7	3.13
		200	64.42	75.35	76.83	68.58	73.69	67.77	71.1	6.88
鱼饲料	L-抗坏血酸	40	87.44	71.86	87.94	74.65	87.68	81.37	81.8	8.72
		120	93.14	94.00	92.32	90.67	88.15	86.48	90.8	3.26
		200	93.49	89.19	97.60	87.79	90.07	95.27	92.2	4.15
	D-异抗坏血酸	40	73.37	83.92	78.89	77.46	82.94	79.90	79.4	4.83
		120	62.04	62.50	60.43	65.17	66.11	70.95	64.5	5.85
		200	67.87	66.67	73.97	67.13	69.05	67.67	68.7	3.92
虾饲料	L-抗坏血酸	40	89.55	83.50	87.00	68.68	83.18	88.27	83.4	9.15
		120	72.79	67.39	71.50	67.90	69.63	65.49	69.1	3.94
		200	85.47	83.28	84.32	81.85	82.17	79.32	82.7	2.60
奶牛浓缩料	L-抗坏血酸	40	82.41	72.86	71.36	81.59	70.50	68.66	74.6	7.94
		120	77.30	77.89	66.72	73.02	75.28	76.90	74.5	5.64
		200	89.37	85.31	83.88	86.47	77.60	76.15	83.1	6.25
	D-异抗坏血酸	40	67.84	69.35	70.35	74.00	71.14	68.50	70.2	3.16
		120	66.72	67.09	63.65	65.61	61.98	70.90	66.0	4.67
		200	66.40	65.23	74.67	68.94	67.70	65.83	68.1	5.10
兔生长繁殖饲料	L-抗坏血酸	50	98.55	96.03	96.40	96.56	98.21	94.38	96.7	1.58
		100	100.00	90.88	91.88	90.47	95.79	93.40	93.7	3.87
		150	95.42	98.33	96.86	96.17	99.15	97.25	97.2	1.41
牛蛙复合预混料	L-抗坏血酸	100	94.09	96.55	98.52	94.79	101.62	94.83	96.7	2.98
		250	98.35	95.83	94.64	92.99	92.42	96.36	95.1	2.33
		500	96.01	95.64	94.59	94.89	94.26	95.63	95.2	0.72
	D-异抗坏血酸	40	67.40	64.53	61.01	65.56	66.43	62.93	64.6	3.65
		120	61.66	60.57	61.63	64.10	63.06	62.91	62.3	2.04
		200	65.53	64.56	64.45	65.10	67.24	62.52	64.9	2.38
猪复合预混料	L-抗坏血酸	500	100.12	94.46	95.80	92.76	97.11	96.67	96.2	2.61
		1000	94.46	95.31	93.87	97.86	98.67	93.36	95.6	2.29
		2000	96.00	95.76	97.64	97.97	95.97	98.07	96.9	1.13
兔维生素	L-抗坏血酸	5000	100.60	98.18	97.04	99.38	100.22	101.12	99.4	1.57
		10000	100.11	98.73	101.43	97.05	99.95	98.77	99.3	1.51

预混料	酸	20000	98.27	100.76	97.31	99.29	98.72	98.33	98.8	1.18
蛙维生素预混料	L-抗坏血酸	5000	95.18	98.78	96.11	95.12	97.10	95.49	96.3	1.48
		10000	95.44	96.84	98.46	97.02	96.42	97.04	96.9	1.01
		20000	97.04	99.46	97.36	98.87	97.73	96.58	97.8	1.13
	D-异抗坏血酸	40	72.69	64.86	62.75	75.27	66.67	64.56	67.8	7.39
		120	65.15	66.59	62.98	61.37	64.10	64.25	64.1	2.79
		200	70.44	71.65	63.85	69.67	70.14	63.35	68.2	5.30

1.3.4 方法适用性

从市场采集奶牛浓缩饲料、水产配合饲料、兔配合饲料、猪复合预混合饲料、水产维生素预混合饲料等饲料产品，按照上述确定的条件和方法，测定实际样品中 L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸的含量，结果见表 13，可看出不同饲料产品 L-抗坏血酸含量差别较大，且 11 种饲料产品均未检出 D-异抗坏血酸。结果表明，该方法适用于配合饲料、浓缩饲料、复合预混合饲料和维生素预混合饲料中总抗坏血酸的测定。

表 14 实际样品中 L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸含量的测定结果

序号	样品名称	测定结果(mg/kg)	
		L-抗坏血酸	D-异抗坏血酸
1	鸡配合饲料	ND	ND
2	猪配合饲料	ND	ND
3	成猫粮	ND	ND
4	鱼饲料	ND	ND
5	虾饲料	ND	ND
6	奶牛浓缩料	ND	ND
7	兔生长繁殖饲料	52.5±2.86	ND
8	牛蛙复合预混料	203±1.30	ND
9	猪复合预混料	1214±0.45	ND
10	兔维生素预混料	20414±0.56	ND
11	蛙维生素预混料	15521±0.72	ND

2 邻苯二胺荧光法

2.1 方法原理

采用酸性溶液提取后，用活性炭将还原型的 L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸转

化成氧化型的 L-脱氢抗坏血酸和 D-脱氢抗坏血酸，然后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。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。

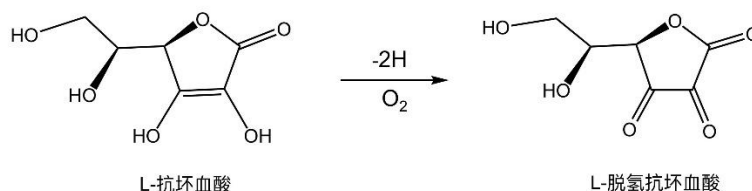


图 16 L-抗坏血酸的氧化原理图

2.2 方法学考察

2.2.1 线性范围

取 L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸的标准工作液（10 μg/mL）0.1 mL、0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL 和 2.0 mL，按照原标准中的操作步骤，配制成 L-抗坏血酸标准系列溶液、D-异抗坏血酸标准系列溶液、L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸混合标准系列溶液，以标准系列荧光值分别减去标准空白荧光值为纵坐标，对应抗坏血酸含量（μg）为横坐标绘制标准曲线，回归方程、相关系数见表 14。可见不同质量浓度的 L-抗坏血酸标准系列溶液、D-异抗坏血酸标准系列溶液、L-抗坏血酸和 D-异抗坏血酸混合标准系列溶液所测得的荧光值接近。故接下来的实验选用 L-抗坏血酸来进行。

表 15 L-抗坏血酸、D-异抗坏血酸以及两者混合标液的线性范围、线性方程和相关系数

待测组分 \ 荧光值	测定批次	1 μg	5 μg	10 μg	15 μg	20 μg	标准曲线	R ²
L-抗坏血酸	I	2.43	19.86	40.44	65.06	88.56	Y=4.5341X-2.9774	0.9995
	II	2.41	20.25	40.36	65.48	89.22	Y=4.5629X-2.9975	0.9993
	III	2.36	20.14	40.08	63.65	86.25	Y=4.4034X-2.4191	0.9996
D-异抗坏血酸	I	2.29	19.98	41.01	64.57	87.45	Y=4.4791X-2.6270	0.9998
	II	2.03	20.11	40.98	64.82	87.88	Y=4.5100X-2.8384	0.9998
	III	2.18	21.67	43.49	65.46	87.42	Y=4.4605X-1.4532	0.9998
混合标准系列	I	1.80	21.16	42.98	63.89	85.05	Y=4.3543X-1.4379	0.9997
	II	2.50	21.77	41.37	65.03	87.65	Y=4.4482X-1.7073	0.9996
	III	2.15	19.78	41.32	64.86	87.86	Y=4.5124X-2.8322	0.9998

2.2.2 方法的检出限和定量限

按照空白标准偏差法评估检出限。选取空白配合饲料，添加一定浓度的 L-抗坏血酸（添加水平为 50 mg/kg），按照原标准中的分析步骤，独立测试 10 次，计算出检测结果的标准偏差（S），按 3 倍标准偏差计算得 L-抗坏血酸的检出限为 3.0 mg/kg，按 10 倍标准偏差计算得 L-抗坏血酸的检出限为 10 mg/kg。

表 16 空白样品加标测定结果

待测组分	测定结果(mg/kg)										S (%)
L-VC	34.57	35.44	35.35	37.45	34.69	33.96	34.57	35.94	35.72	36.44	1.03

2.2.3 方法回收率和精密度考察

本方法收集奶牛浓缩料、兔生长繁殖饲料、牛蛙复合预混料 3 种饲料产品做 L-抗坏血酸添加回收实验，分别添加低、中、高 3 个浓度的标准溶液，每个浓度平行测定 6 次，计算平均回收率及相对标准偏差（RSD），测定结果见表 16。

表 17 饲料样品的添加回收率和精密度

样品名称	添加水平(μg)	回收率 (%)						平均回收率 (%)	RSD (%)
奶牛浓缩料	500	64.17	65.80	68.02	65.40	65.00	64.60	65.5	2.08
	1000	73.75	75.15	76.00	74.92	74.00	76.30	75.0	1.40
	1500	72.65	74.88	73.90	71.56	75.66	73.16	73.6	2.04
兔生长繁殖饲料	500	92.38	94.19	96.19	93.39	94.13	92.14	93.7	1.57
	1000	94.59	95.04	93.30	94.48	92.46	93.93	94.0	1.01
	1500	97.91	96.80	96.23	97.19	96.25	95.15	96.6	0.98
牛蛙复合预混料	1000	98.15	97.90	96.19	98.50	97.43	97.60	97.6	0.82
	2000	98.72	97.90	99.00	97.52	98.01	99.47	98.4	0.76
	3000	98.06	97.86	98.88	98.45	97.88	98.06	98.2	0.40

2.2.4 不同检测方法对比研究

运用邻苯二胺荧光法对收集的水产配合饲料、兔配合饲料、奶牛浓缩饲料、猪复合预混合饲料、水产维生素预混合饲料等饲料产品进行检测，与液相法检测结果进行对比，结果见表 17。由表 17 可知，两种检测方法检测兔维生素预混料的结果差异最小，RSD 为 0.30%，检测兔生长繁殖饲料的结果差异最大，

RSD 为 1.50 %，结果符合 GB/T 27404-2008 中检测方法确认技术要求。经 t 检验，两种方法检测 11 种饲料样品的检测结果在 95%置信区间内无显著性差异，结果准确可靠。

表 18 2 种检测方法检测相同样品的结果比较

序号	样品名称	测定结果(mg/kg)		
		荧光法	液相法	RSD (%)
1	鸡配合饲料	ND	ND	ND
2	猪配合饲料	ND	ND	ND
3	成猫粮	ND	ND	ND
4	鱼饲料	ND	ND	ND
5	虾饲料	ND	ND	ND
6	奶牛浓缩料	ND	ND	ND
7	兔生长繁殖饲料	51.4	52.5	1.50
8	牛蛙复合预混料	206.5	203.4	1.07
9	猪复合预混料	1224	1214	0.58
10	兔维生素预混料	20500	20414	0.30
11	蛙维生素预混料	15643	15521	0.55

表 19 2 种检测方法比较 t 检验

	差值 95 %置信区间		t 值	自由度	p 值
	下限	上限			
邻苯二胺荧光法-高效液相色谱法	-6.525	95.10	1.783	29	0.085

三、 试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

本次标准修订根据我国饲料行业发展现状，在原标准 GB/T 17816-1999 《饲料中总抗坏血酸的测定 邻苯二胺荧光法》的基础上补充液相法，考察抗坏血酸提取条件、还原条件和色谱条件和定量方法，确定饲料中总抗坏血酸检测方法。在制定过程中，起草组委托 XXXXXX、XXXXXXXXX、XXXXXX 进行方法验证，验证结果良好，能满足配合饲料、浓缩饲料、复合预混合饲料、维生素预混合饲料中总抗坏血酸的测定。

四、 与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

本标准在制定过程中，起草组收集了国内相关标准，GB 5009.86—2016《食品安全国家标准 食品中抗坏血酸的测定》、GB 7303—2018《饲料添加剂 L-抗坏血酸（维生素 C）》，结合国内外相关文献资料，进行分析和总结，通过实验室试验研究，完成了标准文本的起草。

五、 采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准

本标准未合规引用或采用国际国外标准。

六、 与有关法律、法规的关系

本标准的制定过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章等、严格执行国家强制性标准和行业标准。与相关的各种基础标准相衔接，遵循了政策性和协调同一性的原则。本标准与现行法律、法规、规章和政策以及有关基础和强制性标准不矛盾。

七、 重大分歧意见的处理经过和依据

无重大分歧意见。

八、 涉及专利的有关说明

本标准未明确涉及某一具体专利，但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。

九、 贯彻国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

(1) 首先应在实施前保证文本的充足供应，让每个使用者都能及时得到文本；

(2) 发布后、实施前应将信息在媒体上广为宣传，建议全国饲料工业标准化技术委员会组织标准起草单位通过标准培训、会议宣贯、影音文件等方式，积极开展本标准的宣贯工作。

(3) 建议本标准正式发布后，设定 6 个月的过渡期，过渡 6 个月后实施。

十、 其他应当说明的事项

无。

参考文献

- [1]王建翠.HPLC 测定蜂花粉中的总抗坏血酸和黄曲霉毒素[D].福建农林大学,2013.
- [2]抗坏血酸在鸡饲料中的应用[J].广东畜牧兽医科技,1995,(02):44-45.
- [3] Fenoll J, Martínez A, Hellín P, et al. Simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in vegetables and fruits by liquid chromatography with tandem-mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2011, 127(1): 340-344.
- [4]郭帅,邵丽华,裴晶晶,等.还原型抗坏血酸及总抗坏血酸稳定性研究[J].卫生研究,2008,(06):699-701.
- [5]崔玲君,孙海新,李洁,等.高效液相色谱测定食品中抗坏血酸含量的方法优化[J].现代食品科技,2018,34(04):258-263.DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.04.038.
- [6]李圣男,蔡大川,郑家概,等.HPLC 法测定番石榴中总维生素 C 的含量[J].广州化工,2017,45(11):136-138.
- [7] Li X, Franke A A. Fast HPLC–ECD analysis of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and uric acid[J]. Journal of Chromatography B, 2009, 877(10): 853-856.
- [8]Lykkesfeldt J. Determination of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid in Biological Samples by High-Performance Liquid Chromatography Using Subtraction Methods: Reliable Reduction with Tris[2-carboxyethylphosphine Hydrochloride]. Analytical Biochemistry 2000,(282):89-93
- [9]曾雪仪.高效液相色谱法同时测定粳米中 D(-)-抗坏血酸和 L(+)-抗坏血酸的方法优化[J].食品安全导刊,2022,(34):63-66.DOI:10.16043/j.cnki.cfs.2022.34.005.
- [10]贾书静,冯三令,储瑞武,等.高效液相色谱法测定饲料中总抗坏血酸含量[J].农技服务,2012,29(03):318-320.
- [11] Neto J F S, Khan S D S, Filho C a D A, et al. Photostability of vitamin C in industrialized fruit juices and isomers determination by HPLC-DAD[J]. Journal of Chromatography Open, 2023, 4.