



中华人民共和国食品安全国家标准

GB ××××—××××
代替GB/T 5413.15—1997

婴幼儿食品和乳品中烟酸和烟酰胺的测定

Determination of vitamin niacin and niacinamide in foods for infants and
young children, raw milk and dairy products

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准第一法等同采用国际公职分析化学家联合会（AOAC）944.13《烟酸和烟酰胺的测定方法》。

本标准代替GB/T 5413.15—1997《婴幼儿配方食品和乳粉 烟酸和烟酰胺的测定》。

本标准第一法与GB 5413.15—1997相比，主要变化如下：

- 增加了光密度法测定；
- 增加了淀粉类试样的测定；
- 增加标准曲线绘制的文字描述。

本标准附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准代替标准的历次版本发布情况为：

- GB 5413—1985、GB/T 5413.15—1997。

婴幼儿食品和乳品中烟酸和烟酰胺的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中烟酸和烟酰胺的测定方法。
本标准适用于婴幼儿食品和乳品中烟酸和烟酰胺的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T6682 分析实验室用水规格和试验方法

第一法 微生物法

3 原理

通过植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）ATCC 8014 产生的酸度或形成的光密度的测定来计算烟酸和烟酰胺的含量。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的二级水。

4.1 硫酸溶液A， H_2SO_4 为 10mol/L。

将质量分数为 95%~98%的浓硫酸 280mL 缓慢加入到 600mL 水中，边加边搅拌，冷却后定容至 1000mL。

4.2 硫酸溶液B， H_2SO_4 为 1mol/L。

吸100mL 10mol/L的硫酸溶液A（3.1）用水定容至1000mL。

4.3 氢氧化钠溶液，NaOH 质量分数为 150g/L。

称取 150g 氢氧化钠于 1000mL 烧杯中用 400mL 水溶解，冷却至室温后，再用水稀释至 1000mL。

4.4 氢氧化钠溶液，NaOH 为 0.1mol/L。

称取 4g 氢氧化钠(精确至 0.1mg) 用水稀释至 1000mL，用邻苯二甲酸氢钾标定。

4.5 盐酸溶液，HCl 为 0.1mol/L。

吸取 3.65g 盐酸，用水稀释至 1000mL。

4.6 乙醇溶液，体积分数为 25%。

量取 250mL 无水乙醇溶液，用水定容至 1000mL。

4.7 菌株：植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）ATCC 8014。

4.8 培养基

4.8.1 乳酸杆菌琼脂培养基：光解脲 15g，葡萄糖 10g，番茄汁 100mL，磷酸二氢钾 2g，聚山梨糖单油酸酯 1g，琼脂 10g，加蒸馏水至 1000mL，pH6.8±0.2（25℃）。

4.8.2 乳酸杆菌肉汤培养基：光解脲 15g，葡萄糖 10g，番茄汁 100mL，磷酸二氢钾 2g，聚山梨糖单油酸酯 1g，加蒸馏水至 1000L，pH6.8±0.2（25℃）。

4.8.3 烟酸测定用培养基：维生素测定用 Casamino Acids 12g，葡萄糖 40g，乙酸钠 20g，L-胱氨酸 0.4g，DL-色氨酸 0.2g，盐酸腺嘌呤 20mg，盐酸鸟嘌呤 20mg，尿嘧啶 20mg，盐酸硫胺素 200μg，泛酸钙 200μg，

盐酸吡哆醇 400 μ g, 核黄素 400 μ g, β -氨基苯甲酸 100 μ g, 生物素 0.8 μ g, 磷酸氢二钾 1g, 磷酸二氢钾 1g, 硫酸镁 0.4g, 氯化钠 20mg, 硫酸亚铁 20mg, 硫酸锰 20mg。加蒸馏水至 1000mL, 调 pH 至 6.7 \pm 0.2 (25 $^{\circ}$ C)。

4.9 标准溶液

4.9.1 烟酸标准贮备液, 浓度为 100 μ g/mL。

在五氧化二磷干燥器中取出已干燥的烟酸标样称取 50~60mg (精确至 0.1mg), 用体积分数为 25%乙醇溶液 (4.6) 溶解并定容至 100ml, 放入冰箱冷藏。

4.9.2 烟酸标准中间溶液, 浓度为 10 μ g/mL。

从烟酸标准贮备液 (4.9.1) 中吸 10mL 至 100mL 容量瓶, 用体积分数为 25%乙醇溶液 (4.6) 定容, 贮于冰箱中。

4.10 0.9%生理盐水

称 0.9g 氯化钠 (分析纯) 于 100mL 容量瓶中, 稀释至刻度, 振荡溶解。分装 10mL 到试管中, 盖上盖, 121 $^{\circ}$ C 灭菌 15min, 每周准备一次。

5 仪器和设备

常用实验室仪器及下列仪器设备:

5.1 分光光度仪

5.2 pH 计

5.3 漩涡振荡器

5.4 分析天平: 感量 0.1mg。

6 分析步骤

6.1 菌株的制备

6.1.1 从植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) ATCC 8014 贮备菌种培养基上分别转接到三个乳酸杆菌琼脂培养基 (4.8.1) 试管中, 放入培养箱中 37 $^{\circ}$ C 培养 24h。每月转接一次, 作为月接种管贮于冰箱中。再从月接种的培养管中的一支再接种 1 支乳酸杆菌琼脂培养基 (4.8.1) 试管, 37 $^{\circ}$ C 培养 24h, 作为日接种管每日测定用。每月定期从月接种管中重新接种 3 个转接管保存新菌株。

6.1.2 从日接种管中接种一管乳酸杆菌肉汤培养基 (4.8.2), 37 $^{\circ}$ C 培养 24h。在无菌条件下离心该培养液 10min (2000r/min), 倾去上清液, 再用 10mL 生理盐水 (4.10) 振荡洗涤菌体, 再离心 10min (2000r/min), 倾去上清液, 再用另外的 10mL 生理盐水 (4.10) 清洗。如前面一样离心, 弃去上清液, 再加 10mL 生理盐水 (4.10)。吸 1mL 该菌悬液于 10mL 生理盐水 (4.10) 中, 混合均匀。

6.1.3 分光光度计, 于 550nm 波长下, 以生理盐水 (4.10) 做对照, 测 6.1.2 菌悬液的光密度值, 此值应在 60%~80% 之间。

6.2 试样的制备

固态试样称取 2g, 液态试样称取 5g (精确至 0.1mg) 试样 (约含烟酸 0.1mg), 放入 250mL 三角烧杯中, 加 20mL 1mol/L 的硫酸溶液 B (4.2), 溶解试样, 放入高压灭菌釜中 121 $^{\circ}$ C 灭菌 30min, 取出冷却。用质量分数为 150g/L 氢氧化钠溶液 NaOH (4.3) 调 pH 至 6.0~6.5, 再用盐酸溶液 (4.5), 调 pH 至 4.5, 用水定容至 100mL, 过滤。吸取 25mL 上清液于 100mL 烧杯中, 用 c(NaOH) 为 0.1mol/L 氢氧化钠溶液 (4.4) 调 pH 至 6.8, 转入 250mL 容量瓶中定容。

6.3 标准工作溶液, 烟酸的浓度 100ng/mL

从标准中间液 (4.9.2) 中吸 5.0mL, 用水稀释至 500mL。每次使用前重新制备该标准溶液。

6.4 标准曲线的制备

按表 1 顺序加入蒸馏水, 标准溶液和培养基于试管中, 一式三份。根据微生物阶段生长的特点, 其在对数期和平台期不同的生长曲线把标准溶液曲线分成两段对数曲线。绘制标准曲线原则尽量使曲线平滑, 尽量使线穿过两个离散点的中间。

表 1

试管号 No	1	2	3	4	5	6	7
蒸馏水 mL	5	5	4	3	2	1	0
标准溶液 mL	0	0	1	2	3	4	5
培养基 mL	5	5	5	5	5	5	5

6.5 试样

按表 2 顺序加入蒸馏水、试样和培养基于试管中，一式三份。

表 2

试管号 No.	1	2	3	4
蒸馏水, mL	4	3	2	1
样品, mL	1	2	3	4
培养基, mL	5	5	5	5

6.6 灭菌

121℃保温 5min，灭菌所有的试管，迅速冷却到培养温度，使颜色形成最浅。尽量保证加热和冷却过程中条件均匀（灭菌管数过多或距离太近，在灭菌锅中都可产生不良影响）。

6.7 接种

在无菌条件下每管中均加入 50μL 适当菌液，盖上盖，充分振荡混合所有管（标准管 No.1 以除外）。

6.8 培养

6.8.1 酸度法：在 30℃~40℃之间选择一个恒定温度（±0.5℃），培养 72h。

通过对每个试管的目测检查进行反应的预测，未接种管应是澄清的，标准试样和试样管中生长应有梯度且无其他菌生长。试管若被其他微生物污染则测定无效。

6.8.2 光密度法：在 30℃~40℃之间选择一个恒定的温度（±0.5℃）培养 16h~24h。其他同 6.8.1。

6.9 测定

6.9.1 酸度法：以溴麝香草酚蓝作指示剂，用标准氢氧化钠溶液（4.5）滴定标准溶液和试液；或以 pH6.8 为电位滴定终点。如果接种空白滴定反应消耗的氢氧化钠溶液体积数等于或高于未接种空白水平的 1.5mL，则测定结果应忽略不计。注：通常标准溶液在 5.0mL 的反应等于 c(NaOH)=0.1mol/L 的氢氧化钠溶液 8~12mL 的滴定度。

6.9.2 光密度法：以接种空白管做对照，在振荡 5 秒，波长 550nm 条件下读取最高浓度标准试样管的光密度，2h 后同等条件重新测该管的光密度，二次光密度(T°)之差结果≤2%，则取出全部检验管测定标准溶液和试样的光密度。

6.10 标准曲线的绘制

根据微生物阶段生长的特点，在对数期和平台期不同的生长规律把标准溶液曲线分成两段对数曲线。以标样烟酸含量作横坐标，光密度（酸度，pH 值）为纵坐标作曲线，绘制标准曲线原则尽量使曲线平滑，尽量使线穿过两个离散点的中间。

对每个浓度的检验溶液进行维生素的定量测定，舍弃低于 0.5mL 标准溶液的吸收值或高于 4.5mL 标准溶液的吸收值。

对每个浓度的检验溶液，计算其每毫升中的烟酸含量。计算所得值的平均数，每个浓度的测量值不得超过该平均值的±15%。如果所得到的可用于计算管数少于总管数的 2/3，必须重做；如果可用于计算的管数占总管数的 2/3 或更多，则可根据平均值计算其试样中的含量。

7 结果计算和表示

试样中烟酸（烟酰胺）含量 X，以质量分数（μg/100g）表示，按式（1）计算：

$$X (\mu\text{g}/100\text{g}) = \frac{C_x}{m} \times \frac{F}{1000} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中：

C_x ——从标准曲线中查得的试样中烟酸的平均含量， μg ；

F ——稀释因子；

m ——试样的质量或体积，g 或 mL；

100——换算成每 100g 表达；

1000——ng 换算成 μg 的换算系数。

计算结果以二次独立测定结果的算术平均平均值表示，结果保留到小数一位。

8 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数平均值的10%。

第二法 高效液相色谱法

9 原理

试样经热水萃取、酸性沉淀蛋白质后，以 C_{18} 色谱柱分离，用紫外检测器定量。

10 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的三级水。

10.1 α -淀粉酶：酶活力 $\geq 1.5\text{U}/\text{mg}$ 。

10.2 盐酸溶液： $c(\text{HCl})$ 为 $5.0\text{mol}/\text{L}$ 。

10.3 氢氧化钠溶液： $c(\text{NaOH})$ 为 $5.0\text{mol}/\text{L}$ 。

10.4 高氯酸：体积分数为 60%。

10.5 无水甲醇：色谱纯。

10.6 异丙醇：色谱纯。

10.7 辛烷磺酸钠：优级纯。

10.8 标准溶液

10.8.1 烟酸及烟酰胺标准储备液，浓度为 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

精确称取烟酸及烟酰胺标准品各 10.0mg ，用水溶解，分别定容至 100mL 容量瓶中。

10.8.2 烟酸及烟酰胺混合标准工作溶液，浓度为 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

各取 5.0mL 上述标准储备溶液于 100mL 容量瓶中，用水定容（烟酸、烟酰胺浓度均为 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

11 仪器和设备

常用实验室仪器及下列仪器设备：

11.1 高效液相色谱仪：紫外检测器。

11.2 酸度计。

11.3 超声波振荡器。

11.4 分析天平：感量 0.1mg

12 分析步骤

12.1 试样的预处理

12.1.1 含淀粉的试样

固体试样称取约 5.0g ；液体试样称取约 20g （精确到 0.1mg ）混合均匀的试样于 150mL 锥形瓶中，加入 0.5g α -淀粉酶（10.1），用 25mL $45\sim 50^\circ\text{C}$ 的水混合均匀后向锥形瓶中充氮，盖上瓶塞，置于 $50\sim 60^\circ\text{C}$ 的

培养箱内培养 30min, 取出冷却至室温。

12.1.2 不含淀粉的试样

固体试样称取约 5.0g; 液体试样称取约 20g (精确到 0.1mg) 混合均匀的试样于 150mL 锥形瓶中, 加入 25mL 45~50℃ 的水振摇, 静置 5~10min, 充分溶解, 并冷却至室温。

12.1.3 提取: 将上述锥形瓶置于超声波振荡器中振荡 10min。

12.1.4 沉淀及定容: 待试样溶液降至室温后, 用盐酸溶液 (10.2) 调节试样溶液的 pH 值至 1.70, 放置 2min 后, 再用氢氧化钠溶液 (10.3) 调节试样溶液的 pH 值至 4.50。将试样溶液转至 50mL 容量瓶中, 用蒸馏水反复冲洗锥形瓶, 洗液合并于 50mL 容量瓶中, 用水定容至刻度后经滤纸过滤。滤液再经 0.45 μm 微孔滤膜加压过滤, 用试管收集, 即为试样待测液。

12.2 参考色谱条件

色谱柱: C₁₈ 柱, 150×4.6 mm, 5μm, 或具有相同性能的色谱柱。

紫外检测器波长: 261nm。

进样量: 10μL

柱温: 25℃。

流速: 1.00mL/min。

流动相: 体积分数为 7.0% 的甲醇、体积分数为 2.0% 的异丙醇、1g/L 辛烷磺酸钠的水溶液, 用高氯酸调 pH=2.10, 经 0.45 μm 膜过滤后备用。

12.3 定量分析 (外标法)

注射一定量的标准工作液 (10.8.2) 进入色谱仪, 得到组分 i 的峰面积 (或峰高) A_i; 注射等体积的试样待测液进入色谱仪, 得到组分 i 的峰面积高 (或峰高) B_i。

13 结果计算和表示

试样中烟酸的含量 X, 以质量分数毫克每百克 (mg/100g) 表示, 按 (2) 式计算:

$$X = X_1 + X_2 \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

X——试样中维生素 PP 的含量, 单位为毫克每百克 (mg/100g);

X₁——试样中烟酸的含量, 单位为毫克每百克 (mg/100g);

X₂——试样中烟酰胺的含量, 单位为毫克每百克 (mg/100g)。

其中 X₁ 或 X₂ :

$$X_{1或2} = \frac{B_i \times C_s \times 100}{m \times A_i \times 1000} \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

X_{1或2}——试样中烟酸或烟酰胺的含量, 单位为毫克每百克 (mg/100g);

m——试样的质量, 单位为克 (g);

A_i——由 13.3 所得的标准工作液的峰面积 (或峰高);

B_i——由 13.3 所得的试样待测液的峰面积 (或峰高);

c_s——标准工作液中烟酸或烟酰胺的浓度, 单位为微克每毫升 (μg/mL);

V——试样溶液的体积, 单位为毫升 (mL)。

计算结果以二次独立测定结果的算术平均平均值表示, 结果保留到小数两位。

14 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
(资料性附录)

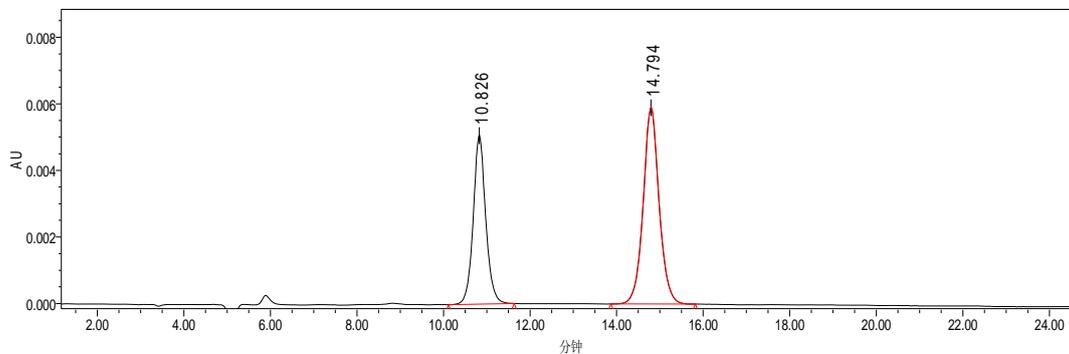


图 1 烟酸标准色谱图

