中华人民共和国国家标准

GB 5413.15—2010

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中烟酸和烟酰胺的测定

National food safety standard

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

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

前　言

本标准第二法等同采用国际分析家学会（AOAC）944.13 Niacin and Niacinamide(Nicotinic Acid and Nicotinamide) in Vitamin Preparations。

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》。

本标准第二法与GB/T 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。

本标准代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5413-1985、GB/T 5413.15-1997。

食品安全国家标准
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 规范性引用性文件

本标准中引用的文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

第一法 高效液相色谱法

3 原理

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

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规定的一级水。

4.1 淀粉酶：酶活力≥1.5 U/mg。

4.2 盐酸。

4.3 氢氧化钠。

4.4 盐酸(2.4 mol/L)：准确移取 10 mL 盐酸（4.2）于 50 mL 容量瓶中，用水定容。

4.5 氢氧化钠溶液（2.5 mol/L）：称取 5.0g 氢氧化钠（4.3）于 50 mL 容量瓶中，用水定容。

4.6 高氯酸（$HClO_4$）：体积分数为 60%。

4.7 甲醇（CH_4O）：色谱纯。

4.8 异丙醇(C_3H_8O)：色谱纯。

4.9 庚烷磺酸钠($C_7H_{15}NaO_3S$)：优级纯。

4.10 标准溶液

4.10.1 烟酸及烟酰胺标准储备液（1.0 mg/mL）：称取烟酸及烟酰胺标准品各 0.1 g（精确到 0.0001 g），分别置于 100 mL 容量瓶中，用水溶解定容。

4.10.2 烟酸及烟酰胺混合标准中间液（40 μg/mL）：分别准确吸取烟酸及烟酰胺标准储备液（4.10.1）2 mL 至 50 mL 定量瓶中，用水定容。临用前配制。

4.10.3 烟酸及烟酰胺混合标准系列测定液：分别准确吸取烟酸及烟酰胺混合标准中间液（4.10.2）0.0 mL、1.0 mL、2.0 mL、5.0 mL、10.0 mL，至 50 mL 容量瓶中用水定容。该标准系列浓度分别为 0.00 μg/mL、0.80 μg/mL、1.60 μg/mL、4.00 μg/mL、8.00 μg/mL。临用前配制。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪，带紫外检测器。

5.2 pH 计：精度为 0.01。

5.3 超声波振荡器。

5.4 天平：感量为 0.1 mg。

5.5 培养箱：30 ℃～80 ℃。

6 分析步骤

6.1 试样的预处理

6.1.1 含淀粉的试样：称取混合均匀固体试样约 5.0 g（精确到 0.0001 g）加入约 25 mL 45 ℃～50 ℃的水，或称取混合均匀液体试样约 20.0 g（精确到 0.0001 g）于 150 mL 锥形瓶中，再加入约 0.5 g 淀粉酶（4.1），摇匀后向锥形瓶中充氮，盖上瓶塞，置于 50 ℃～60 ℃的培养箱内培养约 30 min，取出冷却至室温。

6.1.2 不含淀粉的试样：称取混合均匀固体试样约 5.0 g（精确到 0.0001 g）加入约 25 mL 45 ℃～50 ℃的水，或称取混合均匀液体试样约 20.0 g（精确到 0.0001 g）于 150 mL 锥形瓶中，振摇，静置 5 min～10 min，充分溶解，并冷却至室温。

6.1.3 提取：将上述锥形瓶置于超声波振荡器中振荡约 10 min。

6.1.4 沉淀及定容：待试样溶液降至室温后，用盐酸（4.4）调节试样溶液的 pH 值至 1.7 ±0.1，放置约 2 min 后，再用氢氧化钠溶液（4.5）调节试样溶液的 pH 值至 4.5 ±0.1。将试样溶液转至 50 mL 容量瓶中，用水反复冲洗锥形瓶，洗液合并于 50 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，混匀后经滤纸过滤，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。

6.2 参考色谱条件

色谱柱：C_{18} 柱（粒径5 μm，150 mm ×4.6 mm）或具有同等性能的色谱柱。

流动相：甲醇（4.7）70 mL，异丙醇（4.8）20 mL，庚烷磺酸钠（4.9）1 g，用910 mL水溶解并混匀后，用高氯酸（4.6）调pH至2.1 ± 0.1，经0.45 μm膜过滤。

流速：1.0 mL/min。

检测波长：261 nm。

柱温：25 ℃。

进样量：10 μL。

6.3 定量分析

6.3.1 标准曲线绘制

将烟酸及烟酰胺混合标准系列测定液（4.10.3）依次进行色谱测定（其标准样品色谱图参见附录 A 中图 A.1.1）。记录各组分的色谱峰面积或峰高，以峰面积或峰高为纵坐标，以标准测定液的浓度为横坐标，绘制标准曲线。

6.3.2 试样测定

将试样待测液（6.1.4）进行色谱测定。记录各组分色谱峰面积或峰高，根据标准曲线计算出试样待测液中烟酸及烟酰胺各组分的浓度 c_i。

7 分析结果的表述

7.1 试样中烟酸或烟酰胺含量的计算

试样中烟酸或烟酰胺的含量按（1）式计算：

$$X_{1或2}=\frac{c_i\times V\times 100}{m} \quad \cdots\cdots(1)$$

式中：

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

m——试样的质量，单位为克（g）；

c_i——试样待测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）。

7.2 试样中维生素烟酸总含量的计算

试样中维生素烟酸的总含量按（2）式计算：

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

式中：

X——试样中维生素烟酸的总含量，单位为微克每百克（μg/100 g）；

X_1——试样中烟酸的含量，单位为微克每百克（μg/100 g）；

X_2——试样中烟酰胺的含量，单位为微克每百克（μg/100 g）。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留两位有效数字。

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术平均值的10 %。

第二法 微生物法

9 原理

利用植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）ATCC 8014 对烟酸和烟酰胺的特异性，在含有烟酸和烟酰胺的样品中生长产生的酸度和形成的光密度来测定烟酸和烟酰胺的含量。

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 规定的二级水。

10.1 硫酸溶液 A（10 mol/L）：将质量分数为 95 %～98 %的浓硫酸 560 mL 缓慢加入到 600 mL 水中，边加边搅拌，冷却后定容至 1000 mL。

10.2 硫酸溶液 B（1 mol/L）：吸取 100 mL 10 mol/L 的硫酸溶液 A（10.1），转移至 1000 mL 容量瓶用水定容。

10.3 氢氧化钠溶液 A（3.75 mol/L）：称取 150 g 氢氧化钠于 1000 mL 烧杯中，用 400 mL 水溶解，冷却至室温后，转移至 1000 mL 容量瓶中，用水定容。

10.4 氢氧化钠溶液 B（0.375 mol/L）：吸取 100 mL 氢氧化钠溶液 A（10.3）转移至 1000 mL 容量瓶用水定容。

10.5 氢氧化钠标准滴定溶液（0.1 mol/L ± 0.0002 mol/L）：称取 4g（精确至 0.0001 g）氢氧化钠用水稀释至 1000 mL，用邻苯二甲酸氢钾标定。保存此溶液的容器要密封，以防二氧化碳渗透。

10.5.1 氢氧化钠标准溶液的标定：称取约 0.18 g（精确至 0.0001 g）于 105 ℃～110 ℃烘至恒重的邻苯二甲酸氢钾，用 50 mL 除二氧化碳的水溶于锥形瓶中，加两滴 5 g/L 的酚酞指示剂，用配好的氢氧化钠溶液滴定至粉红色，同时作空白实验。氢氧化钠标准溶液的浓度为：

$$c=\frac{\mathrm{m}}{(V_1-V_2)\times 0.2042} \quad \cdots\cdots (3)$$

式中：

c——氢氧化钠的浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

m——邻苯二甲酸氢钾的质量，单位为克（g）；

V_1——氢氧化钠溶液的用量，单位为毫升（mL）；

V_2——空白试验氢氧化钠溶液的用量，单位为毫升（mL）。

10.5.2 酚酞溶液：称取 0.5 g 酚酞溶于 75 mL 体积分数为 95 %的乙醇中，并加入 20mL 水，加入氢氧化钠标准滴定溶液（10.5），直至加入一滴立即变成粉红色，再加入水定容至 100 mL。

10.6 盐酸（0.1 mol/L）：吸取 8.3 mL 盐酸，用水稀释至 1000 mL。

10.7 乙醇溶液：体积分数为 25 %。量取 250 mL 无水乙醇，加入 750 mL 水，混匀。

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

10.9 培养基（或可使用商品化的合成培养基）

10.9.1 乳酸杆菌琼脂培养基：光解胨 15 g，葡萄糖 10 g，番茄汁 100 mL，磷酸二氢钾 2 g，聚山梨糖单油酸酯 1 g，琼脂 10 g，加蒸馏水至 1000 mL，pH6.8 ± 0.2（20 ℃～25 ℃）。 121℃高压灭菌 15min，备用。

10.9.2 乳酸杆菌肉汤培养基：光解胨 15g，葡萄糖 10 g，番茄汁 100 mL，磷酸二氢钾 2 g，聚山梨糖单油酸酯 1 g，加蒸馏水至 1000 mL，pH 6.8 ± 0.2（20 ℃～25 ℃）。121℃高压灭菌 15min，备用。

10.9.3 烟酸测定用培养基：维生素测定用酸水解酪蛋白氨基酸（Casamino Acids）12 g，葡萄糖 40 g，乙酸钠 20 g，L-胱氨酸 0.4 g，DL-色氨酸 0.2 g，盐酸腺嘌呤 20 mg，盐酸鸟嘌呤 20 mg，尿嘧啶 20 mg，盐酸硫胺素 200 μg，泛酸钙 200 μg，盐酸吡哆醇 400 μg，核黄素 400 μg，p-氨基苯甲酸 100 μg，生物素 0.8 μg，磷酸氢二钾 1 g，磷酸二氢钾 1 g，硫酸镁 0.4 g，氯化钠 20 mg，硫酸亚铁 20 mg，硫酸锰 20 mg。加蒸馏水至 1000 mL，调 pH 至 6.7 ± 0.2（20 ℃～25 ℃）。

10.10 标准溶液

10.10.1 烟酸标准贮备液（100 μg/mL）：在五氧化二磷干燥器中取出已干燥的烟酸标准品，称取 50.0 mg (精确至 0.1 mg)，用乙醇溶液（10.7）溶解并定容至 500 mL，2 ℃～4 ℃冰箱冷藏，保存期为 4 个月。

10.10.2 烟酸标准中间溶液（10 μg/mL）：从烟酸标准贮备液（10.10.1）中吸取 10 mL 至 100 mL 容量瓶，用乙醇溶液（10.7）定容，2 ℃～4 ℃冰箱冷藏，保存期为 1 个月。

10.10.3 烟酸标准工作液（100 ng/mL）：从标准中间液（10.10.2）中吸取 5.0 mL，用水稀释至 500 mL。临用前配制。

10.11 0.9 %生理盐水：称 0.9 g 氯化钠于 100 mL 容量瓶中，稀释至刻度，振荡溶解。分装于具塞试管中，每管 10 mL，121 ℃灭菌 15 min，每周准备一次。

10.12 溴麝香草酚蓝指示剂：称取 0.1 g 溴麝香草酚蓝于研钵中，加入 1.6 mL 氢氧化钠标准滴定溶液（10.5）研磨，加少许水至完全溶解，转移至 250 mL 容量瓶中用水定容。

11 仪器和设备

11.1 分光光度仪。

11.2 pH 计：精度为 0.01。

11.3 涡旋振荡器。

11.4 天平：感量为 0.1 mg。

11.5 生化培养箱：36 ℃ ±1 ℃。

11.6 离心机：转速≥2000 转/分钟。

11.7 滴定管：分刻度值为 0.1 mL。

12 分析步骤

12.1 测试菌液的制备

12.1.1 把植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）ATCC 8014 冻干菌粉转入乳酸杆菌肉汤培养基（10.9.2）试管中，36 ℃ ± 1℃培养 24 h，转接至乳酸杆菌琼脂培养基（10.9.1）试管中，36 ℃ ± 1 ℃再培养 24 h。培养好的乳酸杆菌琼脂培养基（10.9.1）试管的培养物作为贮备菌种。

12.1.2 从贮备菌种培养基上分别转接到三个乳酸杆菌琼脂培养基（10.9.1）试管中，放入培养箱中 36 ℃ ± 1 ℃培养 24 h。每月转接一次，作为月接种管贮于冰箱中。每月定期从月接种管中重新接种 3 个转接管保存新菌株。

12.1.3 从月接种的培养管中的一支再接种一支乳酸杆菌琼脂培养基（10.9.1）试管，36 ℃ ±1 ℃培养 24 h，作为日接种管每日测定用。

12.1.4 从日接种管中接种一管乳酸杆菌肉汤培养基（10.9.2），36 ℃ ± 1 ℃培养 24 h。在无菌条件下离心该培养液 10 min（2000 转/分钟），弃去上清液。用 10 mL 生理盐水（10.11）振荡洗涤菌体，离心 10 min（2000 转/分钟），弃去上清液，再加入 10 mL 生理盐水（10.11）振荡清洗。如前离心操作，弃去上清液。再加 10 mL 生理盐水（10.11），混匀。吸取适量该菌悬液于 10 mL 生理盐水（10.11）中，混匀制成测试菌液。

12.1.5 以生理盐水（10.11）做对照，用分光光度计于 550 nm 波长下，测测试菌液（12.1.4）的透光率，此值应在 60 %～80 %之间。

12.2 试样的制备

称取 2 g（精确至 0.0001 g）固态试样或 5 g（精确至 0.0001 g）液态试样（约含烟酸 0.1 mg）于 250 mL 三角烧瓶中，加 20 mL 的硫酸溶液 B（10.2）溶解试样，放入高压灭菌釜中 121 ℃保持 30 min，取出冷却至室温。用氢氧化钠溶液 A（10.3）和氢氧化钠溶液 B（10.4）调 pH 至 6.0～6.5，再用盐酸（10.6），调 pH 至 4.5 ± 0.1，用水定容至 100 mL，过滤。吸取 25 mL 滤液于 100 mL 烧杯中，用氢氧化钠标准滴定溶液（10.5）调 pH 至 6.8 ± 0.1，转入 250 mL 容量瓶中定容。

12.3 标准曲线管的制作

按表 1 顺序加入蒸馏水、标准溶液和培养基于试管中，表 1 中每一编号需制作 3 管。试管 S2 至 S7 中，相当烟酸含量为 0 ng、100 ng、200 ng、300 ng、400 ng、500 ng。

表 1 标准曲线管的制作

试管号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
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

12.4 试样管的制作

按表 2 顺序加入蒸馏水、试样和培养基于试管中，表中每一编号需制作 3 管。

表 2 试样管的制作

试管号	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

12.5 灭菌

将标准曲线管和试样管 121 ℃灭菌 5 min，迅速冷却到室温（商品化培养基按标签说明进行灭菌)。

注：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。

12.6 接种

在无菌条件下，向上述每管中各加入一滴（约 50 μL）测试菌液（12.1.4），加盖，充分振荡混匀所有试管（标准曲线未接种空白管 S1 除外）。

12.7 培养

12.7.1 酸度法：在 36 ℃ ± 1 ℃，培养 72 h。通过对每个试管的目测检查，未接种试管内培养液应是澄清的，标准曲线管和试样管中培养液的浊度应有梯度。未接种管若混浊，则测定无效。

12.7.2 光密度法：在 36 ℃ ± 1 ℃，培养 16 h～24 h。其他同 12.7.1。

12.8 测定

12.8.1 酸度法

12.8.1.1 用 10 mL 水将未接种空白管 S1 和接种空白管 S2 的培养物转至三角烧瓶中，以溴麝香草酚蓝（10.12）作指示剂，或用 pH 计以 pH 6.8 ± 0.2 为滴定终点用氢氧化钠标准滴定溶液（10.5）滴定标准曲线管中未接种空白管 S 1 和接种空白管 S 2。记录下消耗的氢氧化钠标准滴定溶液体积。

注：如果接种空白滴定反应消耗的氢氧化钠标准滴定溶液体积数等于或高于未接种空白水平的1.5 mL，则测定结果无效。

12.8.1.2　用 10 mL 水将标准曲线管和试样管中的培养物转至三角烧瓶中，以溴麝香草酚蓝（10.12）作指示剂，或用 pH 计以 pH 6.8 ± 0.2 为滴定终点用氢氧化钠标准滴定溶液（10.5）滴定标准曲线管和试样管的培养物。记录下消耗的氢氧化钠标准滴定溶液体积。

注：通常标准曲线管 S7 消耗的氢氧化钠标准滴定溶液体积数在 8 mL～12 mL 之间。

12.8.2　光密度法

以接种空白管（表 1 中试管号 S 2）作对照，取出最高浓度标准曲线管 S 7，振荡 5 s，在波长 550 nm 条件下读取光密度值，放回重新培养。2 h 后同等条件重新测该管的光密度，如果两次光密度的绝对差结果≤2 %，则取出全部检验管测定标准溶液和试样的光密度。

12.9　标准曲线的绘制

以标准曲线管烟酸含量作横坐标，以消耗氢氧化钠标准滴定溶液的滴定毫升数或光密度值为纵坐标绘制标准曲线。

12.10　试样管中烟酸含量的计算

按照 12.8 每个试样管测定消耗的氢氧化钠标准滴定溶液的毫升数或光密度值，从标准曲线中查得对应的烟酸含量。每一编号的三个试样管应计算管中每毫升测定液烟酸的含量，并与其平均值相比较。相对偏差小于 15 %的试管为有效试管，无效试样管应舍去，有效试样管总数应大于所有试样管总数的 2/3。重新计算每一编号的有效试样管中每毫升测定液烟酸含量的平均值，以此平均值计算全部编号试样管的总平均值 C_x。

注：样品管中烟酸含量低于 100 ng，高于 500 ng 的值应舍去。

13　分析结果的表述

试样中烟酸（烟酰胺）含量按式（4）计算：

$$X=\frac{C_x}{m}\times\frac{f}{1000}\times 100 \qquad \cdots\cdots(4)$$

式中：

X——试样中烟酸（烟酰胺）含量，单位为微克每百克（μg/100 g）；

C_x—— 12.10 中计算所得的总平均值，单位为纳克（ng）；

f——稀释倍数；

m——试样的质量或体积，单位为克（g）。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留两位有效数字。

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 %。

15　其他

本标准第一法检出限为：烟酸30 μg/100 g，烟酰胺40 μg/100 g。

附录 A
（资料性附录）
烟酸和烟酰胺标准溶液的液相色谱图

A.1　烟酸和烟酰胺标准溶液的液相色谱图

烟酸和烟酰胺标准溶液的液相色谱图见图 A.1。

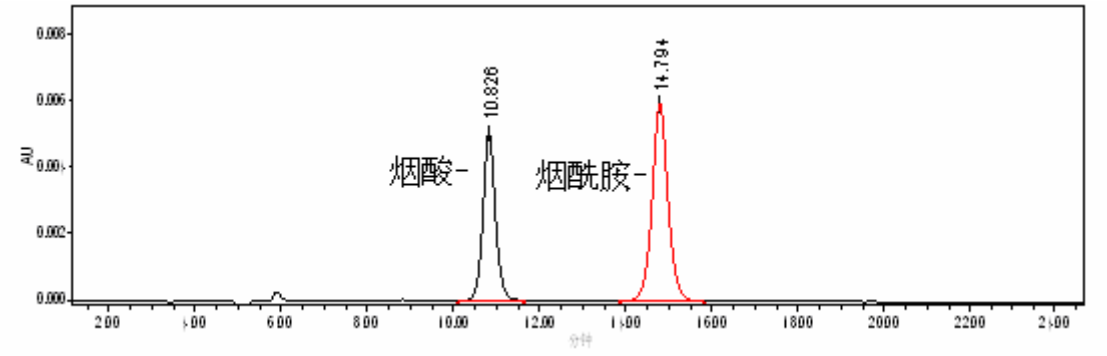


图 A.1　烟酸和烟酰胺标准溶液的液相色谱图