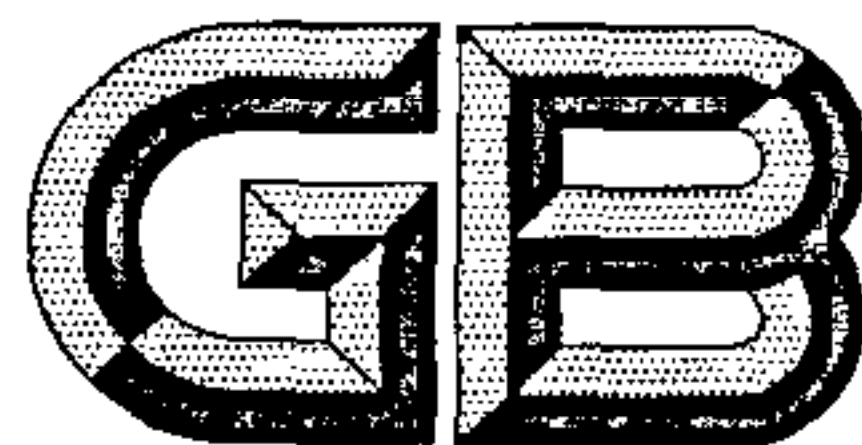


ICS 67.040  
C 53



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.89—2003  
代替 GB/T 12395—1990

## 食品中烟酸的测定

Determination of niacin in foods

2003-08-11 发布

2004-01-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布  
中国国家标准化管理委员会

639

## 前 言

本标准对应于 AOAC 43.167~43.174《食物中烟酸的微生物测定法》(1984年版)。

本标准与 AOAC 43.167~43.174 的一致性程度为非等效。

本标准代替 GB/T 12395—1990《食物中烟酸的测定方法》。

本标准与 GB/T 12395—1990 相比主要修改如下：

——修改了标准的中文名称，标准中文名称改为《食品中烟酸的测定》；

——按 GB/T 20001.4—2001《标准编写规则 第4部分：化学分析方法》对原标准的结构进行了修改。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准起草单位：中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所。

本标准主要起草人：王光亚、李小林、沈湘、石磊、杨晓莉。

原标准于 1990 年首次发布，本次为第一次修订。

## 食品中烟酸的测定

### 1 范围

本标准规定了用微生物方法测定食品中的烟酸含量。

本标准适用于各类食品中烟酸的测定。

本方法检出限为 10 ng, 线性范围为 0.05  $\mu\text{g}$ ~0.3  $\mu\text{g}$ 。

### 2 原理

某一种微生物的生长, 必需某种维生素, 例如 *L. arabinosus*17-5 之生长需要烟酸, 培养基中若缺乏这种维生素该细菌便不能生长。在一定条件下, 该细菌生长的情况, 以及它的代谢物乳酸的浓度是与培养基中该维生素含量成正比的, 因此可以用酸度或浑浊度的测定法来测定试样中烟酸的含量。

### 3 试剂

3.1 甲苯。

3.2 3 mol/L 盐酸溶液。

3.3 2.4 mol/L 盐酸溶液。

3.4 0.5 mol/L 硫酸溶液。于 2 000 mL 的烧杯中先注入 700 mL 水, 将 28 mL 硫酸沿烧杯壁慢慢倒入水中, 用水稀释至 1 000 mL。

3.5 0.02 mol/L 冰乙酸溶液。

3.6 10 mol/L 氢氧化钠溶液。溶 200 g 氢氧化钠于水中, 稀释至 500 mL。

3.7 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液。溶 4 g 氢氧化钠于水中, 稀释至 1 000 mL。

3.8 25%(体积分数)乙醇溶液。

3.9 酪蛋白: 不含维生素。

3.9.1 不含维生素酪蛋白的制备。

3.9.1.1 乙醇处理法: 称取 100 g 酪蛋白细粉于烧瓶中, 加入 300 mL 95% 乙醇, 在水浴中加热回流 1 h, 减压抽滤, 弃去滤液, 再加入乙醇回流, 如此反复 3 次~4 次, 至滤液呈微黄色或无色, 取出在烘箱内 70℃~80℃ 干燥即可。

3.9.1.2 酸洗法: 称取 250 g 酪蛋白, 置于 5 L 容器中, 慢慢加入 3.6 L 水以防成块, 加入浓盐酸 2.77 mL, 搅拌浸泡 3 min。用虹吸管除去上层清液。加入 3.6 L 水, 再加入浓硫酸 2.77 mL, 如此反复 8 次后, 再加水 3.6 L, 加入 55.5 mL 12 mol/L 氨水, 放置过夜, 使酪蛋白溶解成浆状。用布过滤, 于滤液中慢慢加入约 50 mL 3 mol/L 盐酸, 调至 pH4.5, 使酪蛋白全部沉淀, 过滤。弃去滤液, 用 50℃~60℃ 热水冲洗数次, 挤压去水, 放入烤箱内于 100℃ 烤干即可。

3.10 酸解酪蛋白: 称取 50 g 不含维生素的酪蛋白于 500 mL 烧杯中, 加 200 mL 3 mol/L 盐酸, 于压力蒸汽消毒器内  $10.3 \times 10^4$  Pa 压力下水解 6 h。将水解物转移至蒸发皿内, 在沸水浴上蒸发至膏状。加 200 mL 水使之溶解后再蒸发至膏状, 如此反复 3 次, 以除去盐酸。注意每次蒸发时不可蒸干或使之焦糊。用 10 mol/L 氢氧化钠调节 pH 值至 3.5, 以溴酚蓝作外指示剂。加 20 g 活性炭, 振摇, 过滤。如果滤液不呈淡黄色或无色, 可用活性炭重复处理。滤液加水稀释至 500 mL, 加少许甲苯于冰箱中保存。

3.11 生理盐水: 取 9 g 氯化钠溶于 1 000 mL 的水中。每次使用时分别倒入 6 支~8 支 10 mL 试管中, 每支约加 10 mL, 塞好棉塞, 于压力蒸汽消毒器内  $6.9 \times 10^4$  Pa 压力下消毒 15 min, 备用。

3.12 胱氨酸、色氨酸溶液: 称取 4 g L-胱氨酸和 1 g L-色氨酸溶于 800 mL 水中, 加热至 70℃~80℃,

逐滴加入 2.4 mol/L 盐酸,不断搅拌,直至完全溶解为止。冷至室温,加水稀释至 1 000 mL。加少许甲苯于冰箱中保存。

3.13 腺嘌呤、鸟嘌呤(生化试剂)、尿嘧啶溶液:称取硫酸腺嘌呤(纯度为 98%)、盐酸鸟嘌呤生化试剂、尿嘧啶各 0.1g,加 75 mL 水和 2 mL 浓盐酸,然后加热使其完全溶解,冷却,若有沉淀产生,加盐酸数滴,再加热。如此反复,直至冷却后无沉淀产生为止,用水稀释至 100 mL。加少许甲苯于冰箱中保存。

3.14 D-泛酸钙、对氨基苯甲酸、盐酸吡哆醇溶液:称取 D-泛酸钙、对氨基苯甲酸、盐酸吡哆醇各 10 mg 于烧杯中,以水溶解并稀释至 1 000 mL,将此液置于棕色试剂瓶中,加少许甲苯于冰箱中保存。

3.15 核黄素、盐酸硫胺素、生物素溶液:溶解 1 mg 生物素结晶于 100 mL 0.02 mol/L 乙酸中,取此液 4 mL(相当于 40  $\mu$ g 生物素)于 2 000 mL 烧杯中,加入 20 mg 核黄素和 10 mg 盐酸硫胺素,以 0.02 mol/L 乙酸溶解并稀释至 1 000 mL。加少许甲苯于冰箱中保存,此试剂需保存于棕色瓶中,以防止核黄素被光破坏。

3.16 甲盐溶液:称取 25 g 磷酸氢二钾( $K_2HPO_4$ )和 25 g 磷酸二氢钾( $KH_2PO_4$ ),加水溶解后稀释至 500 mL,加少许甲苯于冰箱中保存。

3.17 乙盐溶液:称取 10 g 硫酸镁( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )、0.5 g 氯化钠、0.5 g 硫酸亚铁( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )和 0.5 g 硫酸锰( $MnSO_4 \cdot H_2O$ ),加水溶解后稀释至 500 mL,加 5 滴盐酸,加少许甲苯于冰箱中保存。

3.18 烟酸标准储备液(0.1 mg/mL):准确称取 50.0 mg 已干燥恒量并贮存于五氧化二磷干燥器中的烟酸标准品,以 25% 乙醇溶液溶解并定容至 500 mL,混匀,于冰箱中保存。此溶液每毫升相当于 100  $\mu$ g 烟酸。

3.19 烟酸标准中间液(1  $\mu$ g/mL):吸取 1.00 mL 烟酸标准储备液,置于 100 mL 容量瓶中,用 25% 乙醇溶液定容,混匀,于冰箱中保存。此溶液每毫升相当于 1  $\mu$ g 烟酸。

3.20 烟酸标准使用液(0.1  $\mu$ g/mL):临用时吸取 5.00 mL 烟酸标准中间液,置于 50 mL 容量瓶中,用水定容,混匀。此溶液每毫升相当于 0.1  $\mu$ g 烟酸。

3.21 基本培养基储备液:将下列试剂混合于 500 mL 烧杯中,加水至 450 mL,用 10 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 6.8,以溴麝香草酚蓝作外指示剂,用水稀释至 500 mL。

酸解酪蛋白	50 mL
胱氨酸、色氨酸溶液	50 mL
腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶溶液	10 mL
D-泛酸钙、对氨基苯甲酸、吡哆醇溶液	10 mL
核黄素、盐酸硫胺素、生物素溶液	10 mL
甲盐溶液	10 mL
乙盐溶液	10 mL
无水葡萄糖	10 g
无水乙酸钠	10 g

3.22 琼脂培养基:将下列试剂混合于 250 mL 三角瓶中,加水至 100 mL,于水浴上煮至琼脂完全溶化,以溴麝香草酚蓝为外指示剂,用 1 mol/L 盐酸趁热调节 pH 至 6.8,尽快倒入试管中,每管 3 mL~5 mL,塞好棉塞,于压力蒸汽消毒器内  $6.9 \times 10^4$  Pa 压力下灭菌 15 min。取出后竖直试管,待冷至室温,于冰箱中保存。

无水葡萄糖	1.0 g
乙酸钠( $NaAc \cdot 3H_2O$ )	1.7 g
蛋白胨(生化试剂)	0.8 g
酵母提取物干粉(生化试剂)	0.2 g
甲盐溶液	0.2 mL
乙酸溶液	0.2 mL

琼脂(细菌培养) 1.2 g

- 3.23 1 g/L 溴酚蓝乙醇溶液。称取 0.1 g 溴酚蓝,用乙醇(1+3)溶解后,再加乙醇稀释至 100 mL。
- 3.24 0.4 g/L 溴麝香草酚蓝溶液:称取 0.1 g 溴麝香草酚蓝于小研钵内,加 1.6 mL 0.1 mol/L 氢氧化钠研磨,加少量水继续研磨,直至完全溶解,加水稀释至 250 mL。
- 3.25 0.4 g/L 溴甲酚绿溶液。称取 0.1 g 溴甲酚绿于小研钵中,加 1.4 mL 0.1 mol/L 氢氧化钠研磨,加少许水继续研磨,直至完全溶解,用水稀释至 250 mL。
- 3.26 溴麝香草酚蓝:0.01 g/L 溶液,量取 25 mL 0.4 g/L 溴麝香草酚蓝溶液,加水稀释至 1 000 mL,供滴定用。

#### 4 仪器

- 4.1 实验室常用设备。
- 4.2 电热恒温培养箱。
- 4.3 压力蒸汽消毒器。
- 4.4 液体快速混合器。
- 4.5 离心机。
- 4.6 硬质玻璃试管:20 mm×150 mm。

#### 5 菌种与培养液的制备与保存

- 5.1 储备菌种的制备:以阿拉伯乳酸杆菌(*Lactobacillus arabinosus* 17-5 ATCC No. 8014,简称 L. A.) 纯菌种接入 2 个或多个琼脂培养基管中,在 37℃±0.5℃ 恒温箱中保温 16 h~24 h,取出于冰箱中保存,不超过两周。保存数周以上的储备菌种,不能立即用作制备接种液之用,应在使用前每天移种一次,连续两至三天,方可使用。
- 5.2 种子培养液的制备:加 5 mL 0.1 μg/mL 烟酸标准使用液和 5 mL 基本培养基储备液于一 15 mL 离心管中,塞好棉塞,于 6.9×10<sup>4</sup> Pa 压力下灭菌 15 min,取出,于冰箱中保存每次制备 2 管~4 管,备用。

#### 6 分析步骤

##### 6.1 接种液的制备

使用前一天,将 L. A. 菌种由储备菌种管移种于已消毒的种子培养液中。在 37℃±0.5℃ 恒温箱中保温 16 h~24 h,取出离心 10 min(3 000 r/min),倾去上部液体,用已灭菌的生理盐水淋洗 2 次,再加 10 mL 灭菌生理盐水,将离心管置于液体快速混合器上混合,使菌种成混悬体,将此液倒入已灭菌的注射器内,立即使用。

##### 6.2 试样制备

从均匀试样(0.200 g~10.000 g)中称取含烟酸约 5 μg~50 μg(用千分之一天平称量),置于 100 mL 三角瓶中,加 50 mL 0.5 mol/L 硫酸,混匀,于 10.3×10<sup>4</sup> Pa 压力下水解 30 min,取出冷至室温,用 10 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 4.5,以溴甲酚绿为外指示剂。将水解液移至 100 mL 容量瓶中,定容,过滤。脂肪含量高的试样,用无水乙醚提取以除去脂肪。此试样水解液可在 4℃ 冰箱中保存数周。取适量水解液于 25 mL 具塞刻度试管中,用 0.1 mol/L 氢氧化钠调节 pH 至 6.8,以溴麝香草酚蓝作外指示剂,用水稀释至刻度,使溶液中烟酸含量约为 50 ng/mL,此液为试液。

##### 6.3 试液管的制备

每支试管中分别加入 1.0、2.0、3.0、4.0 mL 试样试液,需做两组。每管加水稀释至 5 mL,再加入 5 mL 基本培养基储备液。

#### 6.4 标准管的制备

每支试管中分别加入烟酸标准使用液 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL,需做三组。每管加水稀释至 5 mL,再加入 5 mL 基本培养基储备液。

#### 6.5 灭菌

试样管和标准管均用棉塞塞好,于  $6.9 \times 10^4$  Pa 压力下灭菌 15 min。

#### 6.6 接种和培养

待试管冷至室温后,每管接种一滴种子液,于  $37^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$  恒温箱中培养约 72 h。

#### 6.7 滴定

将试管中培养液倒入 50 mL 三角瓶中,用 5 mL 0.04 g/L 溴麝香草酚蓝溶液分两次淋洗试管,洗液倒入该三角瓶中,以 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液滴定,呈绿色即为终点,其 pH 约为 6.8。

### 7 结果计算

$$X = \frac{cVF}{m} \times \frac{100}{1\,000}$$

式中:

$X$ ——试样中烟酸的含量,单位为毫克每百克(mg/100 g);

$c$ ——每毫升试样液中烟酸含量的平均值,单位为微克每毫升( $\mu\text{g}/\text{mL}$ );

$V$ ——试样水解液定容总体积,单位为毫升(mL);

$F$ ——试样液的稀释倍数;

$m$ ——试样质量,单位为克(g);

$\frac{100}{1\,000}$ ——折算成每 100 g 试样中烟酸毫克数的换算系数。

计算结果表示到小数点后两位。

### 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术平均值的 10%。