

尼克酸（维生素 PP，又称烟酸）的测定方法

此处介绍微生物法、比色法以及复合维生素制剂中的烟酰胺测定方法（分光光度法）

一、微生物法

1. 原理

一种微生物生长必需某些维生素，*Lactobacillus arabinosus* 的生长需要尼克酸。尼克酸是指具有尼克酸生物学活性的吡啶 3-羧酸及其衍生物的总称。它是白色晶体，是维生素中最稳定的一种，对酸、碱、热、光及弱氧化剂都很稳定，微溶于冷水，易溶于热水及乙醇。其检出限为 10ng。

2. 适用范围

本方法源自 AOAC 和国标 GB12395-90。适用于食物及饲料中的尼克酸的检测。

3. 仪器

- (1) 电热恒温培养箱 ($37 \pm 0.5^\circ\text{C}$)
- (2) 无菌室（紫外灯消毒）
- (3) 电热手提式压力蒸汽消毒器 (121°C ，高压 30min)
- (4) 液体快速混合器
- (5) 离心机 (3000 转，10min)
- (6) 碱式滴定管
- (7) 硬质玻璃试管

4. 试剂

所用试剂皆为分析纯；所用水皆为蒸馏水

4.1 标准溶液的配制

(1) 尼克酸标准储备液 (0.1mg/ml)：准确称取 50.0mg 已干燥恒重并储于五氧化二磷干燥器中的尼克酸标准，以 25%乙醇溶液溶解并定容至 500ml，于冰箱中保存。

(2) 尼克酸标准中间液 (1ug/ml)：吸取 1.00ml 尼克酸标准储备液，置于 100ml 容量瓶中，用 25%乙醇溶液定容，混匀，于冰箱中保存。

(3) 尼克酸标准工作液 (0.1ug/ml)：临用时吸取 5.00ml 尼克酸标准中间液，置于 50ml 容量瓶中，用水定容，混匀。

4.2 其它试剂的配制

(1) 0.5mol/L 硫酸：于 2000ml 烧杯中加入 700ml 水，加入 28ml H_2SO_4 ，用水稀释至 1000ml。

(2) 10mol/L 氢氧化钠：溶 200g NaOH 于水中，稀释至 500ml。

(3) 0.1mol/L 氢氧化钠：，取 10ml 10mol/L NaOH，用水稀释至 1000ml。

(4) 0.04%溴甲酚绿溶液，称取 0.1g 溴甲酚绿于研钵中，加 1.4ml 0.1mol/L NaOH 研磨，加少许水继续研磨，直至完全溶解，用水稀释到 250ml。

(5) 酪蛋白 (sigma 公司)：称取 50g 不含维生素的酪蛋白，加 200ml (3mol/L) 盐酸， 121°C 磅压力下水解 6 小时，将水解物转移至蒸发皿内，在水浴上蒸发至膏状。加 200ml 水使之溶解后再蒸发至膏状，反复 3 次，以除去盐酸。

注意：*酸解酪蛋白是为了去除酪蛋白中的维生素，确保培养基中不含代测的尼克酸，但酸解并不一定彻底，因此选用不含维生素的酪蛋白。

*水浴蒸发时不可蒸干或使之焦糊，若溶液被蒸干，水解液所含营养物已被破坏

用 10mol/L 氢氧化钠调节 PH 值至 3.5，以溴酚蓝作外指示剂。加 20g 活性炭，振摇，过滤，反复操作至滤液无色。滤液加水稀释至 500ml，加少许甲苯置冰箱中保存。

*注意：活性炭不能在溶液中太久，否则容易破坏酪蛋白的营养成分

上海洪纪仪器设备有限公司

(6) 溴酚蓝: 称取 0.1g 溴酚蓝, 用 1+4 乙醇溶解后, 再加乙醇稀释至 100ml。

(7) 甲苯

(8) 4mol/L 盐酸溶液, V+V=1+4

(9) 5mol/L 生理盐水: 取 9gNaCl 溶于 1000ml 水中。

(10) 胱氨酸、色氨酸溶液: 称取 4gL-胱氨酸和 1gL-色氨酸溶于 800ml 水中, 加热至 70~80℃, 逐滴加入 20%盐酸, 不断搅拌, 直至完全溶解为止。冷至室温, 加水稀释至 1000ml。加少许甲苯于冰箱中保存。

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

(12) 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 10mg 于烧杯中, 以水溶解并稀释至 1000ml, 将此液置于棕色瓶中, 加少许甲苯于冰箱中保存。

*注意: 此溶液见光分解, 因此储存于棕色瓶中

(13) 0.02mol/L 醋酸溶液: 取 1.18ml 纯的冰醋酸, 稀释至 1000ml

(14) 核黄素、盐酸硫胺素、生物素溶液: 溶解 1mg 生物素结晶于 100ml 0.01747mol/L 的醋酸中, 取此液 4ml(相当于 40ug 生物素), 加入 20mg 核黄素和 10mg 盐酸硫胺素, 以 0.01747mol/L 醋酸溶解并稀释至 1000ml, 将此液置于棕色瓶中, 加少许甲苯于冰箱中保存。

*注意: 此溶液见光分解, 因此储存于棕色瓶中

(15) 甲盐溶液: 取 25g 磷酸氢二钾和 25g 磷酸二氢钾, 加水溶解后稀释至 500ml, 加少许甲苯于冰箱中保存。

(16) 乙盐溶液: 取 10g 硫酸镁、0.5g 氯化钠、0.5g 硫酸亚铁和 0.5g 硫酸锰, 加水溶解后稀释至 500ml, 加 5 滴浓盐酸, 加少许甲苯于冰箱中保存。

(17) 乙醇溶液 V/V=1/3

(18) 溴酚蓝: 称取 0.1g 溴酚蓝, 用 1+3 乙醇溶液溶解后, 再稀释至 100ml。

(19) 0.04%溴麝香草酚蓝溶液: 称取 0.1g 溴麝香草酚蓝于研钵中, 加 1.6ml, 0.1mol/L NaOH, 研磨, 加少许水继续研磨, 直至完全溶解, 用水稀释至 250ml。

(20) 0.004%溴麝香草酚蓝溶液: 量取 100ml 0.04%溴麝香草酚蓝溶液, 加水稀释至 1000ml, 供滴定用。

(21) 基本培养基储备液:

酸解酪蛋白 50ml

胱氨酸、色氨酸溶液 50ml

腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶溶液 10ml

D-泛酸钙、对氨基苯甲酸、吡哆醇溶液 10ml

核黄素、盐酸硫胺素、生物素溶液 10ml

甲盐溶液 10ml

乙盐溶液 10ml

无水葡萄糖 10g

无水醋酸钠 10g

(或结晶醋酸钠 NaAC. 3H₂O 16.6g)

将上列试剂混合, 用水稀释至 500ml 用氢氧化钠调 PH 至 6.8, 以溴麝香草酚蓝作外指示剂。

(22) 琼脂培养基:

无水葡萄糖 1g

醋酸钠 1g

上海洪纪仪器设备有限公司

蛋白胨 0.8g
酵母提取物干粉 0.2g
甲盐溶液 0.2ml
乙盐溶液 0.2ml
琼脂 1.2g

混合，加水至 100ml，加热至琼脂完全溶化，以溴麝香草酚蓝为外指示剂，用盐酸趁热调 PH 至 6.8，尽快倒入试管中，每管 3~5ml，加塞棉塞，于压力蒸汽消毒器中 121℃ 灭菌 10min，取出后竖立试管，冷至室温后保存于冰箱中。

4.3 菌种的制备与保存

(1) 菌种的制备与保存：以阿拉伯乳酸杆菌 *Lactobacillus arabinosus* 17-5 ATCC No. 8014 简称 Lact. 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 16-24 小时，取出于冰箱中保存，至多不超过两周。保存数周以上的菌种，不能立即用作制备接种液之用，一定要在使用前每天转种一次，连续 2-3 天，方可使用，否则生长不好。

(2) 种子培养液的制备：加 5ml 0.1ug/ml 的尼克酸标准应用液于尖头试管中，加入 5ml 基本培养基，塞好棉塞，于压力蒸汽消毒器内（高压锅）121℃ 下消毒 10min，取出，置于冰箱中，此管可保存数周之久。

5. 操作步骤

5.1 样品制备：取含尼克酸约 5-50ug 的均匀样品于 100ml 三角瓶中，加 0.5mol/LH₂SO₄50ml。放入高压蒸汽锅 121℃ 下水解 30min，取出，于水中冷却，用 10mol/LNaOH 和 0.5mol/LH₂SO₄ 调 PH 值至 4.5，用溴甲酚绿做指示剂。将三角瓶内的溶液转移到 100ml 容量瓶中，用蒸馏水定容至 100ml，滤纸过滤，保存滤液于冰箱内备测（保存期不超过 36 小时）。

*用 0.5mol/L 硫酸水解，可以断开尼克酸和其它物质结合的键，使尼克酸游离出来。

*观察溴甲酚绿至草绿色为终点，说明溶液 PH 值到了 4.5。调 PH 值至 4.5 可以除去样品中刺激和抑制细菌生长的物质，如：淀粉、脂肪酸及磷脂。许多蛋白质的等电点也在 PH4.5，所以此 PH 值也可用来沉淀蛋白质。

5.2 接种液的制备：使用前一天，将阿拉伯乳酸杆菌菌种由储备菌种管移种于已消毒的种子培养液中，可同时制备两管，在 37±0.5℃ 的恒温箱中培养 16-24 小时。取出离心 10 分钟（3000rpm）倾去上部液体，用已消毒的生理盐水淋洗 2 次，再加 10ml 消毒过的生理盐水，将离心管置于液体快速混合器上混合，使菌种成为混悬体，将此液倒入已消毒的注射器内，立即使用。

5.3 样品标准曲线的测定：3 组试管各加 0，0.5，1.0，1.5，2.0，2.5 和 3.0ml 工作液，每管加水稀释至 5ml，再加 5ml 基本培养基，混匀，加棉塞。

5.4 试样的测定：在试管中分别加入 1，2，3，4ml 样液，加水稀释至 5ml，再加入 5ml 基本培养基，用棉塞塞住试管，将制备好的标准曲线和试样测定管放入高压锅（121℃）高压 10min，冷至室温备用。

5.5 接种和培养：每管种一滴接种液，于 37±0.5℃ 恒温箱中培养 72 小时

*注意：接种后用振荡器振荡混匀试管中的液体。

5.6 滴定：从恒温箱中取出后，将试管中培养液倒入 50ml 三角瓶中，用 5ml0.004% 溴麝香草酚蓝分二次淋洗试管，洗液倒入该三角瓶中，以 0.1mol/L 氢氧化钠溶液滴定，呈绿色即为终点，此时 PH 约 6.8，绘制尼克酸标准工作曲线，用测定管得到的值，在标准曲线上查到测定管内所含尼克酸的量。

* 水解液的 PH 值调至 6.8 是为了不同的试剂加入基本培养基时，不致改变基本培养基的 PH 值。

（此乳酸菌生长的适宜 PH 值为 6.8）

6. 计算

以尼克酸标准系列的不同微克数为横坐标，滴定所需 0.1mol/L 氢氧化钠 毫升数为纵坐标，作

上海洪纪仪器设备有限公司

为标准曲线。

$$X = (C \times V/m) \times F \times (100/1000)$$

X—样品中尼克酸的含量, mg/100g;

C—每毫升样品中尼克酸含量的平均值, ug/ml;

V—样品水解液定容总体积, ml;

F—样品试液的稀释倍数;

m—试样质量, g;

100/1000—折算成每 100g 样品中尼克酸含量, mg。

7. 举例

取一螺旋藻样品 1.004g (m), 处理后定容为 100ml (V), 从中取 1ml 稀释至 25ml (F), 取 1, 2, 3, 4ml 入试管中, 加入水和培养基, 高压消毒, 培养, 滴定, 测量根据曲线分别得出四管 C 值为 0.037, 0.073, 0.110, 0.136, 所以四管平均值为 $C = (0.037 + 0.073/2 + 0.110/3 + 0.136/4) / 4 = 0.036$ 。代入方程式为:

$$X = (C \times V/m) \times F \times (100/1000) = (0.036 \times 100/1.004) \times 25 \times (100/1000) = 8.96 \text{ (mg/100g)}$$

因此得出每 100 克螺旋藻中含 8.96 毫克尼克酸。

8. 注意事项

(1) 当管中尼克酸的量少于 0.05 或多于 0.3ug, 即超过标准曲线范围时所得到的数值不能用于计算。

(2) 3mol/L 盐酸的配制方法: 取 250ml 浓盐酸, 加入 750ml 蒸馏水, 共配成 1L 3mol/L 的盐酸

(3) 试管应先用洗衣粉清洗后, 用水冲净, 再放入酸缸中浸泡 1 天左右, 捞出后再用自来水和蒸馏水清洗干净, 凉干, 方可再用。

二、比色法

1. 原理

烟酸和烟酰胺于 Ph=4.5 下用稀 NH₄OH 提取, 再与 CNBr 溶液与 10% 对氨基苯磺酸反应, 测其比色值。

2. 适用范围

选自 AOAC; 适用范围: 适用于药物、食物和饲料

3. 仪器设备

- (1) 容量瓶, 100ml
- (2) 锥形瓶, 250ml
- (3) 电热板
- (4) 高压釜 (121°C, 30min)
- (5) 离心管, 5ml
- (6) 漏斗
- (7) 通风橱
- (8) 酸式滴定管

比色计 (药物 430-450nm, 谷物 470nm)

4. 试剂

所用试剂皆为分析纯; 所用水皆为蒸馏水

4.1 尼克酸标准溶液

(1) 尼克酸标准储备液 (100 μg/ml): 将 50mg USP 烟道参比标准 (贮于 P205 干燥器中, 放于暗处保存。)

上海洪纪仪器设备有限公司

(2) 标准中间液 I ($10 \mu\text{g/ml}$): 取少量贮备液放置至室温。用蒸馏水将 10.0ml 贮备液稀释至 100ml。

(3) 标准工作液 II ($4 \mu\text{g/ml}$): 将恢复至室温的贮备液 2.0ml 用蒸馏水稀释至 50ml。

4.2 其它试剂

(1) 稀氢氧化铵溶液: 5ml NH_4OH 用 H_2O 稀释至 250ml

(2) 稀盐酸: $V+V=1+5$

(3) 磷酸缓冲液 ($\text{pH}=8$): 将 60g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 10g KH_2PO_4 溶于蒸馏水中并稀释至 200ml。

(4) 溴化氢溶液 (10%, 通风橱中制备): 将 370ml H_2O 温热至 40°C , 并加入 40g CNBr 。振荡至溶解冷却并稀释至 400ml。溶液在冰箱保存。

* CNBr 剧毒, 切勿与皮肤接触, 必须在通风橱中操作。

(5) 10%对氨基苯磺酸溶液: 按每次 1ml 将 NH_4OH 加到 20g 对氨基苯磺酸和 170ml 蒸馏水的混合液中, 直至酸溶解为止。用盐酸与蒸馏水溶液 (1: 1) 调节 pH 至 4.5, 采用溴甲酚绿指示剂指示。稀释至 200ml。

*注: 因为溶液有颜色会影响最后结果, 所以稀释结束后溶液应几乎无色

(6) 55%对氨基苯磺酸溶液: 在 55g 对氨基苯磺酸中加入 27ml 蒸馏水和 27ml NH_4OH , 振荡至溶解。(必要时加温)。用 NH_4OH 或 5NHCl 调 pH 为 7, 再用蒸馏水稀释至 100ml。(保存在暗处)

5. 操作步骤

5.1 样品制备

(1) 药物: 将药品研碎, 溶于蒸馏水中, 稀释定容。取 10ml 样品于锥形瓶中, 加入 10ml HCl , 在电热板上加热蒸发至约 2ml, 冷却, 加入 25-50ml 蒸馏水, 用 40% NaOH 或 KOH 溶液调节 pH 值至 2.5-4.5。过滤, 弃去 10ml 处液, 转移至容量瓶中定容, 使溶液含尼克酸约 $4 \mu\text{g/ml}$ 。

*注: 溶液的尼克酸含量应在 50-200 $\mu\text{g/ml}$

(2) 非谷类食品及饲料: 称取约 28g 样品, 加入 0.5mol/L H_2SO_4 200ml, 混匀, 在高压釜中 121°C 加热半个小时。冷却, 用 10mol/L NaOH 调节 pH 值至 4.5, 以溴甲酚绿作外指示剂, 用蒸馏水稀释至 250ml, 过滤。取 17g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 于 50ml 容量瓶中, 吸取 40ml 样品液, 用 H_2O 稀释定容, 强力振摇。过滤, 混匀, 取 1ml 作比色测定用。如果样品中尼克酸含量为 16mg/1b。最终液浓度 $3.2 \mu\text{g/ml}$ 。

移取 40ml 标准工作液 II 至盛有 17g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 50ml 容量瓶中, 用蒸馏水稀释定容, 此液含尼克酸 $3.2 \mu\text{g/ml}$ 。

*注: 加入 H_2SO_4 主要是为了去除样品中的蛋白及其它杂质, 以防其对测量结果造成影响

(3) 谷类产品: 随同样品做 1 试剂空白和 5 个浓度的工作标准液。

分别将 1.5g $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 放入 7 个锥形瓶中, 移入 0、5、10、15、20、25ml 标准中间液 I 和 2.5g 样品 (含 $100 \mu\text{g}$ 烟酸), 加入蒸馏水至 90ml, 振荡混匀。高压 121°C 下 2 小时。趁热混匀, 冷却至 40°C , 转移至 100ml 容量瓶中, 稀释定容。

从容量瓶移 50ml 上清液至离心管中, 冰浴 15min 或置于冰箱中 ≥ 2 小时。离心 15min, 吸取 20ml 上清液至盛有 8g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 2ml 磷酸盐缓冲液的离心管中。振荡溶解并温热至 $55-60^\circ\text{C}$ 。离心 5min, 过滤。

5.2 操作程序

(1) 药物制剂和非谷类食物和饲料: 假如 10%的对氨基苯磺酸溶液, CNBr 溶液, 在通风橱中用酸式滴定管滴入, 用标准工作液 II, 如下表制备各管:

试剂 标准空白 样品空白

标准溶液 (mL) 1.0 1.0

H_2O (mL) 5.0 5.0

上海洪纪仪器设备有限公司

稀 NH₄OH (mL) 0.5 0.5
10%对氨基苯磺酸 2.0 2.0
稀 HCl (mL) 0.5 0.5
样品溶液
标准溶液 (mL) 1.0 1.0
稀 NH₄OH (mL) 0.5 0.5
CNBr (mL) 5.0 5.0
10%对氨基苯磺酸 (mL) 2.0 2.0
H₂O (mL) 0.5 0.5

*注: CNBr 有毒, 注意通风

每只样品都要分别制备样品空白。

将标准和样品移入试管中, 分别加入 5mL 蒸馏水作为标准空白和样品空白。转动试管内的液体, 立即加入稀 NH₄OH, 转动, 加对氨基苯磺酸, 再次旋转混合。立即加入 0.5mL 稀 HCl, 混匀, 置于光电比色计上, 加入对氨基苯磺酸后约 30s 内在 430 和 450nm 波长之间任意波长调节仪器至 0 的 A 值。从加入稀 NH₄OH 开始按标准空白同样的方法处理标准溶液。立即转动管子, 加 CNBr 溶液并再次转动混匀, 在加入 CNBr 溶液后 30s 后转动管子, 加入对氨基苯磺酸溶液, 再转动。立即加入 0.5mL 蒸馏水, 混匀, 加塞。测量。(加入对氨基苯磺酸溶液后 1.5min 时颜色最深, 保留 2min, 然后慢慢褪色。)

将样品空白设在 0A, 测样品溶液的 A 值。若标准和样品液含量大致相等, 则尼克酸含量与 A 值成正比。

(2) 谷类制品: 取 5 只试管, 其中两只加入 5mL 标准液, 两只加入 5mL 样品液, 另一只加入 5mL 蒸馏水做试剂空白。于一只空白管, 一只标准管和一只样品管各加 10mL 蒸馏水, 将所有管置于冰中冰浴 30min。对剩下的管按顺序加入 10mL 冷的 CNBr, 30s 后加入 1.0mL 55%对氨基苯磺酸溶液。

用标准空白在 470nm 处, 调比色计为 0A, 加入对氨基苯磺酸后 12-15min 读出其它各管的 A 值。
*放入比色计前, 试管必需冷却一致, 每管必需拭干。如管呈雾状, 浸于热水中片刻, 测定前拭干。

6. 计算

将扣除试剂空白的标准 A 对尼克酸含量 $\mu\text{g/ml}$ 作图, 画出适宜的直线, 从此图上求出已扣除样品空白和试剂空白后样品校正的 A 所对应的浓度 C。

$\text{Mg 尼克酸/g 样品} = C/10\text{ng 样品}$

7. 注意事项

- (1) CNBr 溶液有毒, 要注意安全。
- (2) 样品不同, 处理方法不同, 不要混淆。
- (3) 注意通风橱的通风。
- (4) 因为采用比色法测量, 因此样品含有色素易干扰测定, 影响测定结果的正确性。
- (5) 试管应先用洗衣粉清洗后, 用水冲净, 再放入酸缸中浸泡 1 天左右, 捞出后再用自来水和蒸馏水清洗干净, 凉干, 方可再用。

三、复合维生素制剂中的烟酰胺测定——分光光度法

1. 原理

在 PH 约 4.5 处将烟酰胺抽提到 KH₂PO₄ 溶液中, 再与 CNBr 和巴比士酸反应。用分光光度法测定

上海洪纪仪器设备有限公司

反应产物。烟酸含量超过烟酰胺三倍量时干扰烟酰胺测定。

2. 适用范围

选自 AOAC；适用于复合维生素制剂检测

3. 仪器

- (1) 搅拌器
- (2) 量筒
- (3) 锥形瓶
- (4) 高压釜 (121°C, 15min)

分光光度计 (550nm)

4. 试剂

所用试剂皆为分析纯；所用水皆为蒸馏水

4.1. 烟酰胺标准溶液：

(1) 标准储备液 (250 μ g/mL)：50mg USP 烟酰胺标准加 60%乙醇溶解并稀释到 200mL。在 10°C 贮存。

(2) 标准工作液 (5 μ g/mL)：将少量贮备液温热至室温。取出 2mL 用 0.3%KH₂PO₄ 溶液稀释至 100mL。

4.2 其它试剂

(1) 溴化氰溶液：10%，将 370ml H₂O 温热至 40°C，并加入 40gCNBr。振荡至溶解冷却并稀释至 400ml。溶液在冰箱保存。使用前需恢复到室温。

*注：CNBr 剧毒，切勿与皮肤接触，注意在通风橱中操作。

(2) 磷酸二氢钾溶液：

A. 13%的磷酸二氢钾溶液：将 30gKH₂PO₄ 用蒸馏水溶解并稀释到 1L。

B. 3%的磷酸二氢钾溶液：将 3%的磷酸二氢钾溶液用蒸馏水稀释 (1+9)。

(3) 巴比土酸缓冲液：按每批测定需用量计算，按每 100mL3%KH₂PO₄ 溶液加 2g 试剂级巴比土酸制备。搅拌 1 小时，用前过滤。

5. 操作步骤

5.1 样品制备：取适量样品于锥形瓶中，加入 0.3%的 KH₂PO₄ (KH₂PO₄ 的量至少是估计的烟酰胺量的两倍)。若样品不易溶解，则振摇使其分散并用高压釜在 121°C 下加热 15min。用 0.3% KH₂PO₄ 溶液稀释至 5 μ g/mL。过滤。

用蒸馏水代替 CNBr 分别制备各样品的空白。

将 1mL 工作标准液或测定液置于分光光度计比色管中。加 0.5mL CNBr 溶液，混匀，塞住，放置 25-30min，加 10mL 巴比土酸溶液并旋摇

*注：若 30min 后不能加巴比土酸溶液。将管置于碎冰浴中稳定 CNBr 反应。

5.2 用蒸馏水代替 CNBr 做为适当的空白，(550nm，分光光度计设定在 0A) 颜色最深时测定反应产物的吸光度

*注：加入巴比土酸后 2-4min 时颜色最深，稳定约 1min，慢慢褪去

*注：测定样品时，其放置时间不应超过 30min。加入 CNBr 时应有规律的间隔 1-2min。

6. 计算

样品中烟酰胺含量 (mg) = (A × 5 × 稀释倍数) / (A' × 1000)

式中

A- 样品吸光度

A' --标准吸光度

5- μ g 烟酰胺/mL 标准工作液

上海洪纪仪器设备有限公司

(结果用烟酰胺 mg/片报告)

7. 注意事项

- (1) CNBr 有毒，应在通风橱中操作。
- (2) 样品中烟酸含量超过烟酰胺含量的三倍量时会干扰烟酰胺的测定，因此样品应有明确的烟酸和烟酰胺的含量。
- (3) 试管应先用洗衣粉清洗后，用水冲净，再放入酸缸中浸泡 1 天左右，捞出后再用自来水和蒸馏水清洗干净，凉干，方可再用。