

食物中泛酸的测定方法

微生物测定法

1. 原理

泛酸对于 *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) 的正常生长是一种必需的营养素, 在一定生长条件下, *Lactobacillus plantarum* 的生长与繁殖速度同样品中泛酸的含量成一定的线性关系, 通过利用浊度法或光密度法测定细菌增殖的强度即可间接地检测出食物样品中泛酸的含量。本方法最低检出限为 5ng。

2. 适用范围

本方法参考“Official Methods of Analysis of the Association of official Analytical Chemists”、“Methods of Vitamin Analysis”以及“Methods of the Microbiological Analysis of Selected Nutrients”。本方法适用于测定各类食物(包括天然食物及加工食物)及饲料中的泛酸含量。

3. 试剂

本试验用水均为蒸馏水, 所用试剂均需分析纯试剂。

3.1 甲苯

3.2 1mol/L 盐酸溶液

3.3 Tris 缓冲溶液: 将 24.2 三羟基氨基甲烷溶于 150ml 水中, 用 7.5mol/L NaOH 调 pH 至 8.0~8.3, 然后定容至 200ml, 贮存于 4℃ 冰箱中, 可保存 2 周。

3.4 7.5mol/L 氢氧化钠溶液: 溶 150g 氢氧化钠于水中, 定容至 500ml。

3.5 2mol/L 醋酸: 12ml 冰醋酸用水定容至 1000ml。

3.6 2mol/L 醋酸钠溶液: 将 16.4g 醋酸钠用水定容至 1000ml。

3.7 2mol/L 碳酸氢钾溶液: 称取 10.012g 碳酸氢钾溶于水, 然后定容至 500ml。

3.8 2%碱性磷酸酶溶液: 称取 2g 碱性磷酸酶 (Sigma 公司 No. P-3877) 溶于水, 然后定容至 100ml。贮存于 4℃ 冰箱中保存。

3.9 10%鸽子肝脏提取物溶液: 将所用容器在配制此试剂前一天放入 4℃ 冰箱中过夜。(1) 称取 30g 鸽子肝脏丙酮提取物粉末 (Sigma 公司, No. L-8376) 放入冷的研钵中, 分两次加入 300 ml 0.2N KHCO_3 , 至 0℃ 的冰浴中研磨均匀直至呈悬浊液; (2) 将此悬浊液分别放入 8 支离心管中, 塞紧后充分振摇, 冷冻 10 分钟, 然后 3000 转离心 5 分钟; (3) 将上清液放入 500ml 预冷的广口烧瓶中, 加 150g 活性 Dowex1-X8 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Brussels, Belgium), 放在冰浴中震荡 5 分钟; 将混合液倒入离心管中, 3000 转离心 5 分钟; (4) 再将上清液移入另一个冷的 500ml 广口烧瓶中, 冷冻 10 分钟; (5) 重复上述 (3)、(4) 步骤一次; (6) 然后分装于试管中, 冷冻条件下保存, 用前化冻。

3.10 酸解酪蛋白液: 称取 50g 不含维生素的酪蛋白于 500ml 烧杯中, 加 200ml 3 mol/L 盐酸, 于压力蒸汽消毒器内 10.3×104Pa (15 lb/in²) 压力下水解 6 小时。将水解物转移至蒸发皿内, 在沸水浴上蒸发至膏状。加 200ml 水使之溶解后再蒸发至膏状, 如此反复 3 次, 以去除盐酸。以溴酚蓝作外指示剂, 用 10mol/L 氢氧化钠调节 pH 至 3.5。加 20g 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 500ml, 贮存于试剂瓶中, 加少许甲苯于冰箱中保存。

酸解的目的是为了去除酪蛋白中的维生素, 使基本培养基中不含待测定的维生素, 但有时酸水解不一定彻底, 所以一定要选用不含维生素的酪蛋白粉, 这样可较好地确保酸解酪蛋白中不

上海洪纪仪器设备有限公司

含生物素。

3.11 胱氨酸-色氨酸溶液：称取 4g L-胱氨酸和 1g L-色氨酸（或 2g DL-色氨酸）于 800ml 水中，加热至 70-80℃，逐滴加入（1+5）的盐酸，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。

3.12 腺嘌呤、鸟嘌呤、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）以及尿嘧啶各 0.1g 于 250ml 烧杯中，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，加盐酸数滴，再加热，如此反复，直至冷却后无沉淀产生为止，以水稀释至 100ml。加少许甲苯于冰箱中保存。

3.13 吐温 80 溶液：将 25g 吐温溶于乙醇中并定容至 250ml。

3.14 维生素溶液 I：称取 20mg 核黄素，10mg 盐酸硫胺素，0.04mg 生物素，用 0.02mol/L 醋酸溶液溶解并定容至 1000ml。

3.15 维生素溶液 II：10mg 对氨基苯甲酸，50mg 尼克酸，40mg 盐酸吡哆醇，溶于（1+3）的乙醇溶液，并定容至 1000ml。

3.16 盐溶液 A：称取 25g 磷酸二氢钾和 25g 磷酸氢二钾溶于 500ml 水中，加 5 滴浓盐酸。

3.17 盐溶液 B：称取 10g MgSO₄ 7H₂O、1g KCl、0.5g MnSO₄ 4H₂O、0.5g FeSO₄ 7H₂O、23 ml 85% H₃PO₄，溶于水中并定容至 500ml。

3.18 泛酸标准溶液

溶液名称	浓度	配置方法
标准储备液	40 μg / ml	称取 43.47mgD-泛酸钙（Sigma 公司，No. P-2250）标准物，溶解于 500ml 水中，加入 10ml 0.2mol/L 的醋酸，100ml 0.2mol/L 醋酸钠，然后用水定容至 1000ml，此时溶液的泛酸钙浓度为 43.47 μg / ml，相当于泛酸浓度为 40 μg / ml，贮存于 2-4℃冰箱中。
标准中间液	1.0 μg / ml	取 25ml 储备液放入 500ml 水中，再加入 10mlmol/L 的醋酸，100ml 0.2mol/L 醋酸钠，然后用水定容至 1000ml，在 2-4℃冰箱中贮存。
标准工作液	10 ng / ml	取 1ml 中间液用水定容至 100ml，在 2-4℃冰箱中贮存。

3.19 基本培养基：将下列试剂混合于 500ml 烧杯中，加水至 200ml，以溴麝香草酚蓝作外指示剂，用 10mol/L 氢氧化钠液调节 pH 至 6.8，用水稀释至 250ml。

酸解酪蛋白 25ml

胱氨酸、色氨酸溶液 25ml

腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶溶液 5ml

维生素溶液 I 5ml

维生素溶液 II 5ml

盐溶液 A 5ml

地址：上海市普陀区桐柏路芙蓉园 18 号 403
电话：(021) 61028032 传真：(021) 52710535

邮编：200062
网址：<http://www.foodtechs.com>

上海洪纪仪器设备有限公司

盐溶液 B 5ml

无水葡萄糖 10g

三水醋酸钠 8.3g

吐温 80 溶液 0.25ml

此培养基也可从 Difco 公司购得，产品号为 0816-15-7。

? 由于国内的某些试剂纯度不够，所以自行配制的培养基较浑浊，严重影响到最后的浊度测定结果，因此建议使用进口培养基。

3.20 琼脂培养基：在 600ml 水中，加入 15g 蛋白胨，5g 水溶性酵母提取物干粉，10g 无水葡萄糖，2g 无水磷酸二氢钾，100ml 番茄汁，10ml 吐温 80，加热溶解，用 40% 氢氧化钠调节 pH 为 6.5~6.8，然后定容至 1000ml，每 500ml 液体培养基加 5.0~7.5g 琼脂，于 121℃ 高压灭菌 10 分钟，取出后竖立试管，待冷却至室温后于冰箱 2-4℃ 条件下保存。

3.21 生理盐水：称取 9.0g 氯化钠溶于 1000ml 水中，。每次使用时分别到入 2~4 支 10ml 试管中，每支约加 10ml，塞好棉塞，于 121℃ 高压灭菌 10 分钟，备用。

3.22 0.04% 溴麝香草酚蓝溶液：称取 0.1g 溴麝香草酚蓝于小研钵内，加 1.6ml 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 250ml。

3.23 0.04% 溴甲酚绿溶液：称取 0.1g 溴甲酚绿于小研钵中，加 1.4ml 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 250ml。

3.24 0.1% 溴酚蓝乙醇溶液：称取 0.1g 溴酚蓝，用乙醇溶解后，加乙醇稀释至 100ml。

3.25 番茄汁：将新鲜番茄去皮、去籽，制成匀浆后，用纱布过滤数次，直至呈淡黄色透明液体，在液面上加几滴甲苯，冷冻保存。

4. 仪器与设备

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

4.6 722 分光光度计

4.7 硬质玻璃试管：20mm×150mm

5. 菌种与培养液的制备与保存

5.1 储备菌种的制备：Lactobacillus plantarum (ATCC 8014) 接种于直面琼脂培养管中，在 37±0.5℃ 恒温箱中培养 16~24 小时，取出后放入冰箱中保存，每隔两周至少传种一次。在实验前一天必须传种一次。

5.2 种子培养液的制备：加 2ml 泛酸标准工作液和 3ml 基本培养基于 10ml 离心管中，塞好棉塞，于 121℃ 高压灭菌 10 分钟，取出，冷却后于冰箱中保存。每次制备两管，备用。

? 加入离心管中的泛酸标准液要适量，过少会影响 Lactobacillus plantarum 的生长，过多则不宜于洗净残余泛酸，因此会使零管中的光密度值增大，影响测定结果的准确性。一般 2-3ml 标准工作液即可。

6. 操作步骤

6.1 接种液的配制：使用前一天，将已在琼脂管中生长 16-24 小时的 L. plantarum 接种于种子培养液中，在 37±0.5℃ 培养 16-24 小时，取出后离心 10 分钟 (3000rpm)，弃取上清液，用已灭菌的生理盐水淋洗 2 次，再加入 3ml 灭菌生理盐水，混匀后，将此液倒入已灭菌的注射器中，立即使用。

6.2 样品制备：

称取适量样品，放入 100ml 三角瓶中，加 10ml Tris 缓冲液，加蒸馏水 30ml，混匀于 121℃ 高压

上海洪纪仪器设备有限公司

条件下水解 15 分钟，取出冷却至室温，定容至 50ml，过滤。

? 泛酸在空气中稳定，但对于热不稳定，因此水解时间切勿过长。

取 1ml 样品液 (5.2.1.)，加入 0.4ml 碱性磷酸酶溶液，0.2ml 肝脏提取物溶液，0.1ml 碳酸氢钠溶液，0.4ml 蒸馏水，混匀后，37℃温箱中培养过夜。

加水至 20ml，以溴甲酚绿为外指示剂，用冰醋酸调节 pH=4.5，定容至 25ml，过滤。

取适量水解液 (5.2.3) 于 25ml 具塞刻度试管中，以溴麝香草酚蓝为外指示剂，用 0.1mol/L 氢氧化钠调节至 pH=6.8，用水定容至某刻度。

样品试管的制备：于平行样品管中分别加入 1.0、2.0、3.0、4.0 ml 样品水解液 (5.2.4)，加水至 5ml，然后再加入 5ml 基本液体培养基。

6.3 标准管的制备

每组试管中分别加入泛酸标准工作液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml (相当 0.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0ng 泛酸)，加水至 5ml，再加入 5 ml 基本液体培养基，需做三组标准曲线。。

6.4 灭菌：样品管与标准管均用棉塞塞好，于 121℃ 高压灭菌 10 分钟。

? 灭菌时间不宜过长，否则会破坏基本培养基中的营养成分，影响 *Lactobacillus plantarum* 的生长，最好在 5-10 分钟内。

6.5 接种与培养：待试管冷至室温后，每管接种一滴种子液，于 37±0.5℃ 恒温箱中培养 16~20 小时。

? (1) 接种前，接种室要在紫外灯下消毒至少 30 分钟。(2) 在接种时，其中一支标准系列 0 管可不接种，这样可观察此次实验是否存在污染，并且可消除由于管中液体的颜色造成的误差。

6.6 测定：722 分光光度计，波长 640nm 条件下，以标准系列 0 管仪器调零，测定样品管及标准管的吸光度值。

? 首先以未接种的标准系列 0 管进行仪器调零，然后再用接种后的标准系列 0 管进行二次调零，之后再测定其他管中液体的光密度值。

7. 计算

以泛酸标准系列的不同纳克数为横坐标，吸光度值为纵坐标，制做标准曲线。在曲线上查出相对应的样品测定管中的泛酸含量，然后再按以下公式计算样品中泛酸含量：

$$X = \frac{C \cdot V \cdot F}{m \times 1000} \times 100$$

式中

X —— 样品中泛酸含量，μg/100g:

C —— 测定管中的泛酸含量，ng:

V —— 样品水解液的定容体积，ml:

F —— 样品液的稀释倍数

m —— 样品质量，g。

100/1000 —— 单位换算系数