

上海洪纪仪器设备有限公司

食物中生物素（维生素 H）的测定方法

微生物测定法

1. 原理

生物素对于 *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* 的生长与繁殖速度与溶液中生物素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生长和繁殖的强度可间接地测定出食物样品中的生物素含量。最低检出限为 0.003ng。

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及饲料中的生物素含量。

3. 试剂

本试验所用水均为蒸馏水，所用试剂均需分析纯试剂。

3.1 甲苯。

3.2 1 mol/L 硫酸溶液：在 600ml 水中加入 55.6ml 浓硫酸，稀释至 1000ml。

3.3 3 mol/L 硫酸溶液：在 600ml 水中加入 166.7ml 浓硫酸，稀释至 1000ml。

3.4 10mol/L 氢氧化钠溶液：溶 200g 氢氧化钠于水中，定容至 500ml。

3.5 1: 1 (1+1) 乙醇溶液：500ml 无水乙醇与 500ml 水充分混匀。

3.6 酸解酪蛋白：称取 50g 不含维生素的酪蛋白于 500ml 烧杯中，加 200ml 3 mol/L 盐酸，121℃ 高压水解 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 4℃ 冰箱中保存。

酸解的目的是为了消除酪蛋白中的维生素，确保基本培养基中不含待测定的生物素，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（最好为 Sigma 公司产品），这样可较好地确保酸解酪蛋白中不含生物素。

3.7 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 (1+5) 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 4℃ 冰箱中保存。

3.8 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，贮存于试剂瓶中，加少许甲苯于冰箱中保存。

3.9 维生素溶液：称取 20mg 核黄素，10mg 盐酸硫胺素，10mg 对氨基苯甲酸，40mg 盐酸吡哆醇，用 0.02mol/L 乙酸溶液溶解并定容至 1000ml。

3.10 盐溶液：称取 10g MgSO₄ 7H₂O、1g KCl、0.5g MnSO₄ 4H₂O，0.5g FeSO₄ 7H₂O 加 23 ml 85% H₃PO₄，用水溶解并定容至 500ml。

3.11 生物素标准溶液

溶液名称	浓度	配置方法
标准	50 μg / ml	称取 25mg 无水生物素用 (1+1) 乙醇溶液定至 500ml，于 4℃ 冰箱中保存

地址：上海市普陀区桐柏路芙蓉园 18 号 403

邮编：200062

电话：(021) 61028032 传真：(021) 52710535

网址：<http://www.foodtechs.com>

上海洪纪仪器设备有限公司

储备溶液	℃冰箱中贮存。
标准	取 5ml 储备液用 (1+1) 乙醇溶液定容至 250ml, 于 2-4℃冰
1 μg / ml	箱中贮存。
中间液 I	
标准	取 5ml 中间液 I 用 (1+1) 乙醇溶液定容 500ml, 于 2-4℃冰
10 ng / ml	箱中贮存
中间液 II	
标准	取 5ml 中间液 II 用去离子水定容至 50ml, 在 2-4℃冰箱中贮
1 ng / ml	存。
工作液	

3.12 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 5ml

盐溶液 5ml

无水葡萄糖 5g

无水醋酸钠 5g

此培养基也可从 Difco 公司购得, 产品号为 No. 0419-15-8。

? 由于国内的某些试剂的纯度不够, 所以自行配制的培养基较浑浊, 且常有刺激细菌生长的物质存在, 因此严重影响到最后的浊度测定结果, 建议使用商品化培养基。

3.12 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, 5.0~7.5g 琼脂, 加热溶解, 用 (2+3) 氢氧化钠调节 pH 为 6.5~6.8, 然后定容至 1000ml, 分装于试管, 于 121℃ 高压灭菌 10 分钟, 取出后竖直试管, 待冷却至室温后于冰箱 2-4℃ 保存。

3.13 生理盐水: 称取 9.0g 氯化钠溶于 1000ml 水中, 。每次使用时分别倒入 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。

3.14 0.4g/L 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。

3.15 0.4g/L 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。

3.16 1g/L 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。

3.17 番茄汁: 将新鲜番茄去皮、去籽后, 制成匀浆, 用纱布多次过滤, 直至滤液呈淡黄色透明液体, 滴加几滴甲苯于液体表面, 放置冰箱中冷冻保存。

4. 仪器与设备

- (1) 实验室常用设备
- (2) 电热恒温培养箱
- (3) 压力蒸汽消毒器
- (4) 液体快速混合器
- (5) 离心机

上海洪纪仪器设备有限公司

(6) 分光光度计

(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 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 恒温箱中培养 16~24 小时, 取出后放入冰箱中保存, 每隔一周至少传种一次。在实验前一天必须传种一次。

5.2 种子培养液的制备: 加 2ml 生物素标准应用液和 3ml 基本培养基于 10ml 离心管中, 塞好棉塞, 于 121°C 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。

? 加入离心管中的生物素标准液要适量, 过少会影响 *Lactobacillus plantarum* 的生长, 过多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 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 培养 16~24 小时, 取出后离心 10 分钟 (3000rpm), 弃去上清液, 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。

? 菌种的淋洗一定要彻底, 否则部分残留在细菌表面的生物素会使空白管的光密度值升高, 影响结果的准确性。

6.2 样品制备: 称取适量样品, 放入 100ml 三角瓶中, 加 50ml 1mol/L 硫酸(水解动物样品用 3mol/L 硫酸, 水解植物样品及混合型样品用 1mol/L 硫酸), 混匀后于 121°C 高压水解 90 分钟, 取出冷却至室温。以溴甲酚绿为外指示剂, 用 10mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 为 4.5, 将水解液移至 100ml 容量瓶中, 定容, 过滤。样品水解液只能在 4°C 冰箱保存 2~3 天。取适量水解液于 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 为 6.8, 用水稀释至刻度。

6.3 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, 加水至 5ml, 然后再加入 5ml 基本液体培养基。

6.4 标准系列管的制备: 每组试管中分别加入生物素标准工作液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml, (相当于 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0ng) 加水至 5ml, 再加入 5 ml 基本液体培养基, 需做三组标准曲线。

6.5 灭菌: 样品管与标准系列管均用棉塞塞好, 于 121°C 条件下高压灭菌 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。

6.6 接种与培养: 待试管冷至室温后, 每管接种一滴种子液, 于 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 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。

6.7 测定: 分光光度计, 波长 550nm 条件下, 以标准系列 0 管调零测定样品管及标准管的光密度值。

? 首先以未接种的标准系列 0 管进行仪器调零, 然后在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。两次调零的目的在于彻底消除液体本身的颜色及污染对实验结果的影响。

7. 计算

以生物素标准系列的不同纳克数为横坐标, 光密度值为纵坐标, 绘制标准曲线。在曲线上查出相对应的样品测定管中的生物素含量, 然后再按以下公式计算样品中生物素含量:

$$c \cdot V \cdot f$$

上海洪纪仪器设备有限公司

$$X = \frac{\text{测定管中的生物素含量}}{m \times 1000} \times 100$$

式中 X——样品中生物素含量， $\mu\text{g}/100\text{g}$ ；

c——测定管中的生物素含量，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

8. 注意事项

在实验过程中，一定要注意避免油脂的污染，因为当有油脂存在时，会刺激 *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) 快速生长，导致其生长速度不再与生物素的含量呈线性关系。因此在实验前，要检查所用玻璃器皿的表面是否已彻底清洗，操作者的双手不要涂摸各种护手霜，以防此类油脂进入被测液体中。