

ICS 67.040
C 53



中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.210—2008

食品中泛酸的测定

Determination of pantothenic acid in foods

MACY 美析仪器
MACY INSTRUMENT
专业光度计系列生产厂家
HTTP://www.macylab.com TEL:400-616-4686

2008-11-21 发布

2009-03-01 实施

中华人民共和国卫生部
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准修改采用国际分析家学会(AOAC INTERNATIONAL)中 AOAC 945.74《维生素预混料中泛酸的测定》(Pantothenic acid in vitamin preparations)。

本标准与 AOAC 945.74 相比主要差异为：

- 修改了试样提取步骤；
- 增加了试样酶解处理；
- 扩大了适用范围。

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准由中华人民共和国卫生部负责解释。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心营养与食品安全所、辽宁省疾病预防控制中心、浙江省医学科学院、北京市营养源研究所。

本标准主要起草人：王竹、杨晶明、张旭、马景宏、唐靓、唐华澄、王克诚。



食品中泛酸的测定

1 范围

本标准规定了食品中泛酸的测定方法。

本标准适用于食品中泛酸的测定。

本标准的检出限:食品,当称样量为 5 g 时,检出限为 250 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; 营养素补充剂等,当称样量为 1 g 时,检出限为 200 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—2008,ISO 3696:1987,MOD)

3 原理

泛酸是植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) 生长所必需的营养素,在一定控制条件下,植物乳杆菌的生长响应与培养基中泛酸含量呈线性关系。用比浊法测定试样液中细菌增殖后的混浊度,通过与标准曲线相比较计算出试样中泛酸的含量。

4 试剂

除另有说明外,所用试剂均为分析纯,实验用水为 GB/T 6682 规定的二级水。

- 4.1 冰乙酸($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)。
- 4.2 三水合乙酸钠($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)。
- 4.3 氢氧化钠(NaOH)。
- 4.4 盐酸(HCl)。
- 4.5 三羟甲基氨基甲烷[Tri (hydroxymethyl) aminomethane, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$]。
- 4.6 碳酸氢钾(KHCO_3)。
- 4.7 碳酸钠(Na_2CO_3)。
- 4.8 磷酸氢二钾(K_2HPO_4)。
- 4.9 磷酸二氢钾($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)。
- 4.10 硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)。
- 4.11 氯化钠(NaCl)。
- 4.12 硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)。
- 4.13 硫酸锰($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)。
- 4.14 无水乙醇($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$)。
- 4.15 Dowex 1X8¹⁾, 200 目~400 目。

- 1) 由 Fluck 公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效的产品。

- 4.16 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase)²⁾。
- 4.17 鸽子肝脏丙酮提取物(liver acetone powder)²⁾。
- 4.18 D-泛酸钙(C₁₈H₃₂CaN₂O₁₀):纯度>98%。
- 4.19 葡萄糖(C₆H₁₂O₆)。
- 4.20 蛋白胨(peptone)。
- 4.21 酵母提取物(yeast extract)。
- 4.22 琼脂。
- 4.23 甲苯(C₇H₈)。
- 4.24 溴麝香草酚蓝(C₂₇H₂₈Br₂O₅S):指示剂。
- 4.25 溴甲酚绿(C₂₁H₁₄Br₄O₅S):指示剂。
- 4.26 乙酸溶液(0.2 mol/L):吸取 11.8 mL 冰乙酸(4.1),加水稀释至 1 000 mL。
- 4.27 乙酸钠溶液(0.2 mol/L):称取 27.2 g 三水合乙酸钠(4.2),加水溶解并稀释至 1 000 mL。
- 4.28 氢氧化钠溶液(1 mol/L):称取 4.0 g 氢氧化钠(4.3),加水溶解并稀释至 100 mL。
- 4.29 氢氧化钠溶液(0.1 mol/L):称取 0.4 g 氢氧化钠(4.3),加水溶解并稀释至 100 mL。
- 4.30 盐酸溶液(1 mol/L):吸取 83 mL 盐酸(4.4),用水稀释至 1 000 mL。
- 4.31 Tris 缓冲液:称取 121 g 三羟甲基氨基甲烷(4.5)溶于 500 mL 水中,用冰乙酸(4.1)调 pH 至 8.0~8.3,加水至 1 000 mL,贮存于 2 °C~4 °C 冰箱中,可保存两周。
- 4.32 生理盐水:称取 9 g 氯化钠(4.11)溶于 1 000 mL 水中。临用前,取生理盐水分装于 2 支~4 支试管中,每支约加 10 mL,塞好棉塞,于 121 °C 高压灭菌 10 min 后备用。
- 4.33 乙醇溶液(1+4):量取 200 mL 无水乙醇(4.14)与 800 mL 水混匀。
- 4.34 碳酸钠溶液(0.08 mol/L):称取 0.85 g 碳酸钠(4.7),加水溶解并稀释至 100 mL。
- 4.35 碱性磷酸酶溶液:称取 2 g 碱性磷酸酶(4.16)加水溶解并稀释至 100 mL。临用现配,用前 2 °C~4 °C 冰箱冷藏。
- 4.36 碳酸氢钠溶液(0.02 mol/L):称取 1 g 碳酸氢钾(4.6),加水溶解并稀释至 500 mL。混匀。
- 4.37 活化 Dowex 1X8:称取 100 g Dowex 1X8(4.15)于锥形瓶中,加入 1 L 盐酸溶液(4.30)于振荡器上充分振摇 10 min,用铺有滤纸的布氏漏斗过滤。再加入 1 L 盐酸溶液重复振摇、过滤。加入 1 L 水振摇 10 min,过滤,用水洗涤 Dowex 1X8 10 次。逐滴加入 Tris 缓冲液(4.31)调节 Dowex 1X8 pH 至 8.0。2 °C~4 °C 冰箱保存,两天内用完。
- 4.38 鸽子肝脏提取液:配制此试剂前一天将所用容器放入 2 °C~4 °C 冰箱中冷藏过夜。
- 4.38.1 称取 30 g 鸽子肝脏丙酮提取物(4.17)放入冷的研钵中,冰浴条件下分两次加入 300 mL 碳酸氢钾溶液(4.36)研磨至匀浆,转入预冷的具塞离心管中,盖好塞后充分振摇,-20 °C 冷冻 10 min 后以 3 000 r/min 离心 5 min,将上清液转至 500 mL 预冷的广口瓶中。
- 4.38.2 加 150 g 活化 Dowex 1X8(4.37),放入冰浴中振摇 5 min,将混合液倒入离心管中,3 000 r/min 离心 5 min。将上清液移入另一 500 mL 预冷的广口瓶中,-20 °C 冷冻 10 min。
- 4.38.3 重复 4.38.2 步骤操作一次。将上清液分装于具塞试管中(每管大约 3 mL),-20 °C 冷冻保存。用前化冻并保存于 2 °C~4 °C 冰箱内直至用时。
- 4.39 泛酸标准储备液(40.0 μg/mL):精确称取 43.5 mg 预干燥至恒重的 D-泛酸钙(4.18)于 1 000 mL 容量瓶中,用约 500 mL 水溶解,加入 10 mL 乙酸溶液(4.26),100 mL 乙酸钠溶液(4.27),用水定容至刻度。加入 3 滴~5 滴甲苯(4.23)于 2 °C~4 °C 冰箱中贮存两年。

2) 由 Sigma 公司提供的产品。给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效的产品。

4.40 泛酸标准中间液(1.00 μg/mL):准确吸取 25.0 mL 泛酸标准储备液(4.39)置于 1 000 mL 容量瓶中,加入 10 mL 乙酸溶液(4.26),100 mL 乙酸钠溶液(4.27),用水定容至刻度。加入 3 滴~5 滴甲苯(4.23)于 2 °C~4 °C 冰箱中贮存一年。

4.41 泛酸标准工作液(0.020 μg/mL):准确吸取 2.00 mL 泛酸标准中间液(4.40)置于 100 mL 容量瓶中,用水定容至刻度。此标准工作液现用现配。

4.42 溴麝香草酚蓝溶液:称取 0.1 g 溴麝香草酚蓝(4.24)于研钵中,加 1.6 mL 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液(4.29)研磨,加少许水继续研磨至完全溶解,用水稀释至 250 mL。此指示剂变色终点为草绿色(pH 6.8)。

4.43 溴甲酚绿溶液:称取 0.1 g 溴甲酚绿(4.25)于小研钵中,加 1.4 mL 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液研磨(4.29),加少许水继续研磨,直至完全溶解,用水稀释至 250 mL。此指示剂变色终点为草绿色(pH 4.5)。

4.44 甲盐溶液:分别称取 25 g 磷酸氢二钾(4.8)和 25 g 磷酸二氢钾(4.9),加水溶解并稀释至 500 mL。加入 3 滴~5 滴甲苯,2 °C~4 °C 冰箱可保存一年。

4.45 乙盐溶液:分别称取 10 g 硫酸镁(4.10)、0.5 g 氯化钠(4.11)、0.5 g 硫酸亚铁(4.12)和 0.5 g 硫酸锰(4.13),加水溶解并稀释至 500 mL。加 5 滴盐酸(4.4),2 °C~4 °C 冰箱保存一年。

4.46 基础培养液:可按附录 A 配制泛酸测定用基础培养液。也可直接由试剂公司购买泛酸培养基干粉(pantothenate medium)³⁾,用前根据需要量按说明书配制,效力相当。

4.47 菌种储备用琼脂培养基:按表 1 各成分用量称取或吸取后,加水至 100 mL,沸水浴加热至琼脂完全溶化。趁热以溴麝香草酚蓝为外指示剂,用 1 mol/L 盐酸溶液(4.30)调节指示剂呈草绿色(pH 6.8),如过量用 1 mol/L 氢氧化钠溶液(4.28)回调 pH 至 6.8。尽快分装于试管中,每管 3 mL~5 mL,视试管内径粗细而定,液面高度不得低于 2 cm。塞上棉塞,121 °C 高压灭菌 10 min,取出后直立放置,待冷却后于冰箱内保存。

表 1 菌种储备用培养基配制一览表

试剂	用量
葡萄糖	1.0 g
蛋白胨	0.8 g
酵母提取物	0.2 g
三水合乙酸钠	1.7 g
甲盐溶液	0.2 mL
乙盐溶液	0.2 mL
琼脂	1.2 g

5 仪器和设备

- 5.1 天平:感量 0.1 mg。
- 5.2 电热恒温培养箱:37 °C ± 1 °C。
- 5.3 压力蒸汽消毒器。
- 5.4 旋涡混匀器。
- 5.5 离心机。

3) 由 Difco 公司提供的产品。给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效的产品。

- 5.6 振荡器。
- 5.7 接种针和接种环。
- 5.8 pH计:精度 ± 0.01 。
- 5.9 分光光度计。
- 5.10 超净工作台。

6 菌种的制备与保存

6.1 菌种:植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014)。

6.2 储备菌种的制备:将植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014)菌种接种于菌种储备用琼脂培养基(4.47)中,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养16 h~24 h,取出后放入 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。至少每隔7 d传种一次。保存数周以上的储备菌种,不能立即用作接种液制备,需在使用前每天接种一次,连续传代2次~3次后方可使用,以增加细菌活力,提高细菌的灵敏度。

6.3 接种液的制备:试验前一天,取2 mL泛酸标准工作液和3 mL基础培养液混合,分装于两支10 mL离心管中,塞好棉塞,于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌10 min后即作为种子培养液。将培养16 h~24 h的植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014)储备菌种转种至两支种子培养液中,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养16 h~20 h。取出后3 000 r/min离心10 min,弃上清液,用已灭菌的生理盐水淋洗两次,3 000 r/min离心10 min,弃上清液。再加入3 mL灭菌生理盐水,混匀后立即使用。

7 测定步骤

所有操作均需避光进行。

7.1 试样提取

7.1.1 食品(包括各类食品及以食物为基质的营养强化食品和保健食品)

7.1.1.1 水解:准确称取适量试样至100 mL锥形瓶中(精确至0.001 g),使泛酸含量大致在 $50\text{ }\mu\text{g}\sim 200\text{ }\mu\text{g}$ 。一般固体试样称取2 g~5 g;液体试样称取5 g~10 g;营养强化或保健食品试样称取0.3 g~2 g。加10 mL Tris缓冲液(4.31)、30 mL水,混匀。于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压条件下水解15 min。冷却至室温,转移至100 mL容量瓶中,用水定容至刻度(V_1),过滤。

7.1.1.2 酶解:吸取1.0 mL水解液(V_2)于25 mL具塞刻度试管底部,在冰浴条件下,分别小心加入预冷的0.1 mL碳酸氢钠溶液(4.35)、0.4 mL碱性磷酸酶溶液、0.2 mL鸽子肝脏提取液和0.4 mL水。分别小心混匀每个试管,避免混合物粘附于试管壁,加1滴甲苯, $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱中培养过夜(4 h以上)。加水至20 mL,以溴甲酚绿溶液为外指示剂,用冰乙酸调节pH至4.5,加水定容至25.0 mL(V_3),过滤。

7.1.1.3 调节pH值:吸取适量的澄清酶解液(2.0 mL~10.0 mL, V_4)于25 mL具塞刻度试管中,以溴麝香草酚蓝溶液为外指示剂,用0.1 mol/L氢氧化钠溶液(4.29)调节pH至6.8,用水定容至25.0 mL(V_5)。根据试样中泛酸含量必要时用水对试样提取液进行稀释(f),使稀释后试样提取液中泛酸浓度在 $0.02\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}\sim 0.03\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内。

7.1.1.4 酶空白液:另取一试管分别加入1.0 mL Tris缓冲液、0.1 mL碳酸氢钠溶液、0.4 mL碱性磷酸酶溶液、0.2 mL鸽子肝脏提取液和0.4 mL水,混匀后于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱中培养过夜。以溴麝香草酚蓝为外指示剂,用0.1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH至6.8,加水定容至25.0 mL,即为酶空白液。

7.1.2 营养素补充剂、强化剂、维生素预混料等

固体准确称取0.300 g~1.000 g,液体准确吸取3.0 mL~10.0 mL,转入100 mL锥形瓶中,加入乙醇溶液(1+4)80 mL,振荡提取过夜(4 h以上至试样完全溶解),用水定容至100 mL(V_1)。根据试样中泛酸含量用水对进行适当稀释(f),使稀释后试样提取液中泛酸浓度在 $0.02\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}\sim 0.03\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内。

7.2 测定管制备

7.2.1 试样管和酶空白管:取四支试管,分别加入 1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL、4.0 mL 试样酶解液(V_6)或酶空白液(V_0),补水至体积为 5.0 mL,再加入 5.0 mL 基础培养液(4.46),混匀。

7.2.2 标准系列管:分别吸取泛酸标准工作液 0.0 mL、1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL、4.0 mL、5.0 mL 于试管中,相当于标准系列管中泛酸含量为 0.0 μg 、0.020 μg 、0.040 μg 、0.060 μg 、0.080 μg 、0.100 μg 泛酸。加水至 5.0 mL,再加入 5.0 mL 基础培养液(4.46),混匀。为保证标准曲线的线性关系,至少应制备两套标准系列管,绘制标准曲线时,以每点的均值计算。

7.3 培养

7.3.1 灭菌:将所有测定管塞好棉塞,于 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 10 min。

7.3.2 接种和培养:待试管冷却至室温后,在无菌操作条件下,每管接种一滴接种液。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 16 h~20 h,直至达到最大混浊度,即再培养 2 h 透光率变化不超过 2%。另准备一支标准管(含 0.0 μg 泛酸)不接种作为对照。

7.4 测定

将培养好的试样管、酶空白管、标准系列管用旋涡混匀器混匀。用厚度为 1 cm 比色杯,在 640 nm 处,以未接种的标准管调节透光率为 100%,然后依次测定标准系列管、试样管和酶空白管的透光率。如果接种后标准系列管中的 0 管透光率在 90% 以下,或与未接种的标准管相比标准系列管透光率最大变化量在 40% 以下时,说明有杂菌或不明来源的泛酸混入,需重做实验。

7.5 结果计算

以标准系列管泛酸含量为横坐标、透光率为纵坐标,绘制标准曲线。从标准曲线查得试样管和酶空白管中泛酸的相应含量,如果每个试样的四支试样管中有两支以上泛酸含量在 0.02 μg ~0.1 μg 范围内,则可继续进行结果计算,否则需重新取样测定。

食品试样首先按式(1)计算酶空白液中泛酸含量,然后按式(2)计算试样中泛酸含量。

$$m = \frac{m_0 \times 25}{V_0} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- m ——酶空白液中泛酸含量,单位为微克(μg);
- m_0 ——从标准曲线上查得酶空白管中泛酸含量,单位为微克(μg);
- 25——酶空白液总体积,单位为毫升(mL);
- V_0 ——制备酶空白管时吸取的酶空白液体积,单位为毫升(mL)。

$$X = \frac{\left(\frac{m_1}{V_6} \times \frac{V_5}{V_4} \times V_3 \times f - m\right) \times V_1}{m_2 \times V_2} \times \frac{100}{1\,000} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

- X ——试样中泛酸含量,单位为毫克每百克(mg/100 g);
- m_1 ——从标准曲线上查得试样管中泛酸含量,单位为微克(μg);
- V_6 ——制备试样管时吸取的试样稀释液体积,单位为毫升(mL);
- V_5 ——试样稀释液的定容体积,单位为毫升(mL);
- V_4 ——试样稀释时吸取的酶解液体积,单位为毫升(mL);
- V_3 ——试样酶解液的定容体积,单位为毫升(mL);
- f ——试样稀释倍数;
- m ——酶空白液中泛酸含量,单位为微克(μg);
- V_1 ——试样水解液的定容体积,单位为毫升(mL);
- m_2 ——试样质量,单位为克(g);
- V_2 ——试样酶解时吸取的水解液体积,单位为毫升(mL);

$\frac{100}{1\ 000}$ ——由微克每克($\mu\text{g/g}$)换算为毫克每百克($\text{mg}/100\ \text{g}$)的系数。

营养素补充剂、强化剂、维生素预混料等试样按式(3)计算泛酸含量。

$$X = \frac{m_1 \times V_1 \times f}{m_2 \times V_6} \times \frac{100}{1\ 000} \dots\dots\dots(3)$$

式中:

X ——试样中泛酸含量,单位为毫克每百克($\text{mg}/100\ \text{g}$);

m_1 ——从标准曲线上查得试样管中泛酸含量,单位为微克(μg);

V_1 ——试样水解液的定容体积,单位为毫升(mL);

f ——试样稀释倍数;

m_2 ——试样质量,单位为克(g);

V_6 ——制备试样管时吸取的试样稀释液体积,单位为毫升(mL);

$\frac{100}{1\ 000}$ ——由微克每克($\mu\text{g/g}$)换算为毫克每百克($\text{mg}/100\ \text{g}$)的系数。

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15%。



附录 A

(资料性附录)

泛酸测定用基础培养液的配制方法

A.1 试剂

- A.1.1 不含维生素的酪蛋白(vitamin free casein)。
- A.1.2 盐酸(HCl)。
- A.1.3 盐酸溶液:3 mol/L,1 mol/L。
- A.1.4 氢氧化钠(NaOH)溶液:10 mol/L,1 mol/L。
- A.1.5 活性炭。
- A.1.6 硫酸腺嘌呤($C_{10}H_{10}N_{10} \cdot H_2SO_4$)。
- A.1.7 盐酸鸟嘌呤($C_5H_5N_5O_5 \cdot HCl$)。
- A.1.8 尿嘧啶($C_4H_4N_2O_2$)。
- A.1.9 L-胱氨酸($C_6H_{12}N_2O_4S_2$)。
- A.1.10 L-色氨酸或 DL-色氨酸($C_{11}H_{12}N_2O_2$)。
- A.1.11 核黄素($C_{17}H_{20}N_4O_6$)。
- A.1.12 盐酸硫胺素($C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$)。
- A.1.13 生物素($C_{10}H_{16}N_2O_3S$)。
- A.1.14 乙酸($C_2H_4O_2$)溶液:0.02 mol/L。
- A.1.15 对氨基苯甲酸($C_7H_7NO_2$)。
- A.1.16 尼克酸($C_6H_5NO_2$)。
- A.1.17 盐酸吡哆醇($C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$)。
- A.1.18 无水乙醇(C_2H_6O)。
- A.1.19 乙醇溶液(1+3)。
- A.1.20 聚山梨酯-80(吐温-80)。
- A.1.21 无水葡萄糖($C_6H_{12}O_6$)。
- A.1.22 三水合乙酸钠($C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$)。
- A.1.23 甲苯(C_7H_8)。
- A.1.24 溴酚蓝($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$)溶液:称取 0.1 g 溴酚蓝,用少量无水乙醇(A.1.18)溶解后,用乙醇稀释至 100 mL。此指示剂变色终点为草绿色(pH 3.5)。
- A.1.25 溴麝香草酚蓝($C_{27}H_{28}Br_2O_5S$)溶液:按 4.42 配制。
- A.1.26 酸解酪蛋白液:称取 50 g 不含维生素的酪蛋白(A.1.1)于 500 mL 烧杯中,加 200 mL 3 mol/L 盐酸溶液(A.1.3),于 121 °C 高压水解 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。以溴酚蓝溶液作外指示剂,用 10 mol/L 氢氧化钠溶液(A.1.4)调节 pH 值至指示剂颜色转为草绿色(pH 3.5)。加 20 g 活性炭(A.1.5),振摇约 20 min,过滤。重复活性炭处理直至滤液呈淡黄色或无色。滤液加水稀释至 1 000 mL,加 1 mL~3 mL 甲苯(A.1.23),置 2 °C~4 °C 冰箱中可保存一年。
- 注:每次蒸发时不可蒸干或焦糊,以避免所含营养素破坏。
- A.1.27 腺嘌呤-鸟嘌呤-尿嘧啶溶液:分别称取硫酸腺嘌呤(A.1.6)、盐酸鸟嘌呤(A.1.7)和尿嘧啶(A.1.8)各 0.1 g 于 250 mL 烧杯中,加 75 mL 水和 2 mL 盐酸(A.1.2),加热使其完全溶解后冷却。若有沉淀产生,再加盐酸数滴,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

GB/T 5009.210—2008

3滴~5滴甲苯,贮存于棕色试剂瓶中,置2℃~4℃冰箱中可保存一年。

A. 1.28 胱氨酸-色氨酸溶液:分别称取4g L-胱氨酸(A. 1.9)和1g L-色氨酸或2g DL-色氨酸(A. 1.10)于800 mL水中,加热至70℃~80℃,逐滴加入3 mol/L盐酸溶液(A. 1.3),不断搅拌,直至完全溶解为止。冷却至室温后加水稀释至1 000 mL。加3滴~5滴甲苯,贮存于棕色试剂瓶中,于2℃~4℃冰箱中可保存一年。

A. 1.29 维生素液 I:分别称取20 mg 核黄素(A. 1.11)和10 mg 盐酸硫胺素(A. 1.12),加入1.0 mL 生物素溶液(40 μg/mL),用0.02 mol/L 乙酸溶液(A. 1.14)溶解并定容至1 000 mL。加入3滴~5滴甲苯,贮存于棕色试剂瓶中,2℃~4℃冰箱可保存一年。

A. 1.30 维生素液 II:分别称取10 mg 对氨基苯甲酸(A. 1.15)、50 mg 尼克酸(A. 1.16)和40 mg 盐酸吡哆醇(A. 1.17),溶于1 000 mL 乙醇溶液(A. 1.19)中。加入3滴~5滴甲苯,贮存于棕色试剂瓶中,2℃~4℃冰箱可保存一年。

A. 1.31 聚山梨酯-80 溶液:将25 g 聚山梨酯-80(A. 1.20)用乙醇(A. 1.18)溶解并稀释至250 mL。2℃~4℃冰箱可保存一年。

A. 1.32 甲盐溶液:按4.44 配制。

A. 1.33 乙盐溶液:按4.45 配制。

A. 2 基础培养液

配制250 mL 基础培养液,按表 A.1 各成分用量吸取液体试剂,混合后加水150 mL,依次加入固体试剂,煮沸搅拌2 min。以溴麝香草酚蓝溶液为外指示剂,用10 mol/L 或1 mol/L 氢氧化钠溶液调节基础培养液 pH 值直至指示剂变为草绿色(pH 6.8);如果指示剂变蓝说明加入的氢氧化钠溶液过量,以1 mol/L 盐酸溶液回调指示剂至草绿色。加入乙盐溶液5 mL,用水补至250 mL。2℃~4℃冰箱内可保存7 d。配制时可根据基础培养液用量按比例增减。

表 A.1 泛酸测定用基础培养液配制一览表

试剂		用量	试剂		用量
液体试剂	酸解酪蛋白液	25 mL	液体试剂	聚山梨酯-80 溶液	0.25 mL
	腺嘌呤-鸟嘌呤-尿嘧啶溶液	5.0 mL		甲盐溶液	5.0 mL
	维生素溶液 I	5.0 mL		固体试剂	无水葡萄糖
	维生素溶液 II	5.0 mL	三水合乙酸钠		8.3 g
	胱氨酸-色氨酸溶液	25 mL			