

食物中维生素 B6 的测定方法

微生物法

1.原理

维生素 B6 在酸性介质中对热比较稳定，但在碱性介质中对热不稳定。测量维生素 B6 比较经典的方法是“微生物法”它的优点是：1.特异性高、精密度好、操作简单（不需要特殊设备，易于推广，样品不需要进行一系列的提纯步骤）、准确度高。它的缺点是：耗时长、必须经常保存菌种、试剂较贵。

2.适用范围

GB/T 17407-1998，适用于药物、食物及饲料的检测

3.仪器

电热恒温培养箱

电热手提式压力蒸汽消毒器

液体快速混合器

离心机

722 光栅分光光度计

硬质玻璃试管

4.试剂

- (1) 0.22mol/L 硫酸:于 2000ml 烧杯中加入 700ml 水,加入 12.32ml H₂SO₄,用水稀释至 1000ml。
- (2) 0.5mol/L 硫酸:于 2000ml 烧杯中加入 700ml 水,加入 28ml H₂SO₄,用水稀释至 1000ml。
- (3) 10mol/L 氢氧化钠:溶 200g NaOH 于水中,稀释至 500ml。
- (4) 0.1mol/L 氢氧化钠:取 10ml 10mol/L NaOH,用水稀释至 1000ml。
- (5) 溴甲酚绿:0.04%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。
- (6) 培养基:称取吡哆醇 Y 培养基 5.3g,溶解于 100ml 蒸馏水中。
- (7) 100ug/ml 吡哆醇标准储备液:称取 122mg 盐酸吡哆醇标准溶于 1L25%乙醇中,保存于 4℃ 冰箱中,稳定 1 个月。
- (8) 1ug/ml 吡哆醇标准中间液:,取 1ml 吡哆醇标准储备液,稀释至 100ml。
- (9) 琼脂培养基:吡哆醇 Y 培养基 5.3g,琼脂 1.2g,稀释至 100ml。
- (10) 1.5MOL/l 生理盐水:取 9gNaCl 溶于 1000ml 水中。

5.菌种的制备与保存

5.1 储备菌种的制备与保存:以卡尔斯伯酵母菌 *Saccharomyces Carlsbergensis* ATCC No.9080 简称 SC²纯菌种接入 2 个或多个琼脂培养基管中,在 30±0.5℃恒温箱中培养 18-20 小时,取出后置入冰箱中保存,至多不超过两星期。保存两周以上的菌种,不能立即用作制备接种用的种子液,一定要在使用前每天移种一次,连续 2~3 天,方可使用,否则生长不好。

5.2 种子培养液的制备:加 0.5ml 50ng/ml 的 VB6 标准应用液于尖管中,加入 5ml 基本培养基,塞好棉塞,于压力蒸汽消毒器内(高压锅)151b 压力下消毒 10min,取出,置于冰箱中,此管可保留数星期之久。

6.操作步骤

整个步骤要避光

(1) 样品制备:取样 0.5~10g (VB6 含量不超过 10ng) 放入 100ml 三角瓶中,加 0.22mol/LH₂SO₄72ml。放入高压蒸汽锅 121℃下水解 5 个小时,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。(指示剂由黄-黄绿色),

上海洪纪仪器设备有限公司

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，保存滤液即样液于冰箱内备测定（保存期不超过 36 小时）。

（2）接种液的制备：使用前一天，将卡尔斯伯酵母菌菌种由储备菌种管移种于已消毒的种子培养液中，可同时接种两管，在 $30\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 的恒温箱中培养 18-20 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。3.样品标准曲线的测定：取标准储备液 2ml 稀释至 200ml 成为中间液，从中间液中取 5ml 稀释至 100ml 作为工作液，浓度为 50ng/ml，3 组试管各加 0，0.02，0.04，0.08，0.12，和 0.16ml 工作液，再加 5ml 吡哆醇 Y 培养基，混匀，加棉塞。

（3）试样的测定：在试管中分别加入 0.05，0.10，0.20ml 样液，再加入 5ml 吡哆醇 Y 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°C ，15 磅/英寸²）高压 10min，冷至室温备用。

（4）接种和培养：每管接种一滴接种液，于 $30\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养 18-22 小时

（5）测定：从恒温箱中取出后，用 722 分光光度计测量，用空白管调零。550nm 波长下，测定各管的吸光度值，以标准管所含 VB6 的浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标，绘制 VB6 标准工作曲线，用测定管得到的吸光度值，在标准曲线上查到测定管内所含 VB6 的量。

7.计算

各样管的吡哆醇含量 A 为：

$$A(\text{ng/ml}) = (x_1/V_1 + x_2/V_2 + x_3/V_3) / 3$$

则样品的吡哆醇含量为：

$$\text{mg}/100\text{g} = A \times V \times 102 / w \times 106 = A \times V / W \times 104$$

每个样品各测定管的吡哆醇含量为 x_1 ， x_2 ， x_3 ；

取液量分别为 V_1 ， V_2 ， V_3

样品重 W (g) 取液量 V (ml)，

定容至 100ml

8.注意事项

- （1）所有步骤需要避光处理
- （2）培养时每管必须在同一温度，培养时间以 18-24hour 为宜。
- （3）本实验所有用水皆采用蒸馏水。