

叶酸的测定方法

微生物法

1. 原理

叶酸是酪乳酸杆菌 (*Lactobacillus casei*, L. C, ATCC 7469) 生长所必需的营养素。在一定条件下, L.C 的生长繁殖与培养基中叶酸含量呈正比关系, 细菌增殖的量以光密度值计, 通过与标准曲线相比较, 计算出样品中叶酸的含量。

2. 适用范围

参考《Methods of Vitamin Assay》, 第4版。本方法适用于各类食物中叶酸的测定。检测限为 0.1ng。

3. 仪器与设备

- (1) 恒温培养箱
- (2) 离心机
- (3) 高压消毒锅
- (4) 震荡器
- (5) 接种针和接种环
- (6) 分光光度计

4. 试剂

除特殊说明外, 本实验中所有试剂均为分析纯, 水为蒸馏水。

- (1) 菌种: 酪乳酸杆菌 (*Lactobacillus casei*, L.C, ATCC 7469)
- (2) 磷酸缓冲液(0.05mol/L, pH6.8): 称取 4.35g $\text{Na}_3\text{P}_04 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 10.39g $\text{Na}_2\text{HP}_04 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶解于 800ml 水中。临用前用约 5g 抗坏血酸调节 pH 至 6.8。(注: 叶酸对光、热敏感, 易被氧化破坏, 抗坏血酸有助于保护叶酸被氧化。)
- (3) 鸡胰酶溶液: 称取 100mg 干燥的鸡胰酶 (Difco 公司) (注: 含有叶酸转合酶, 用于水解叶酸多谷氨酸盐), 加入 20ml 磷酸缓冲液制成匀浆, 3000rpm 离心 10min, 取上清液备用。临用前现配。
- (4) 蛋白酶-淀粉酶溶液: 分别称取 200mg 蛋白酶 (Sigma 公司) 和淀粉酶 (Sigma 公司), 加入 20ml 磷酸缓冲液制成匀浆, 离心 3000rpm 10min, 取上清液备用。临用前配制。
- (5) 2+8 乙醇溶液: 量取 20ml 无水乙醇溶液, 加入 80ml 水混匀。
- (6) 0.1mol/L NaOH: 称取 0.4g 氢氧化钠, 加 2+8 乙醇溶液溶解并稀释至 1L。
- (7) 10mol/L NaOH: 称取 400g 氢氧化钠, 加水溶解并稀释至 1L。
- (8) 叶酸标准储备液 (200mg/ml): 准确称取 200mg 叶酸标准品 (Sigma 公司, 纯度大于 98%), 用 0.01mol/L NaOH 溶解并定容至 1L。储存于棕色瓶中。
- (9) 叶酸标准中间液 (200ng/ml): 准确吸取 1.0ml 叶酸标准储备液, 用 0.01mol/L NaOH 溶解并定容至 1L。储存于棕色瓶中。待标定。

标定: 准确吸取 1ml 叶酸标准中间液, 用 0.1mol/L NaOH 定容至 10ml。以 0.1mol/L NaOH 调零点, 比色杯厚度 1cm, 波长 256nm, 测定 3 次紫外吸光度值, 取平均值, 按下式计算标准中间液浓度。

$$X_I = \frac{\bar{A}}{E} \times M \times 10 \times 10^6 \dots\dots\dots(1)$$

上海洪纪仪器设备有限公司

式中:

X1 -- 叶酸标准中间液浓度, ng/ml;

A -- 标准中间液平均紫外吸光度值;

E -- 摩尔消光系数 24,500;

M -- 叶酸分子量 441.42;

10-- 测定紫外吸光度值时的稀释倍数;

106 -- 由 g/L 换算成 ng/ml 的换算系数。

(10) 叶酸标准工作液 (0.2ng/ml): 准确吸取 1.0ml 叶酸标准中间液, 用磷酸缓冲液稀释定容至 1L。

(11) 2.4mol/L HCl: 量取 20ml 浓盐酸, 加水稀释至 100ml。

(12) 酶解酪蛋白溶液: 将 8g 碳酸氢钠溶解于 1L 水中, 加入 60g 去维生素酪蛋白 (Sigma 公司), 用 10mol/L NaOH 调节 pH 至 8.0 (调 pH 时应小心, 不要过碱后再加酸反复调节, 避免酪蛋白结块)。加入 300mg 胰酶, 搅拌 20min, 使胰酶混匀充分。再加入 2.5ml 甲苯, 置 37℃ 恒温箱酶解 48~72h (此步骤是将酪蛋白酶解为 L.C 可以利用的小分子肽。酶解时间不易超过 72h, 如时间过长, 配成的培养基不利于细菌生长)。将酪蛋白液从恒温箱中取出, 121℃ 高压 30min 以终止反应并去除甲苯。冷却, 加 10g 硅藻土搅拌, 用垫有滤纸的布氏漏斗过滤。向滤液中加入约 60ml 冰乙酸调节 pH 至 3.7。称取活性炭 12g, 加入滤液中搅拌 10min, 用布氏漏斗过滤, 重复三次。每次过滤时, 布氏漏斗内加有 10g 硅藻土协助过滤。最后滤液用水稀释至 1200ml, 4℃ 冰箱保存 1 年 (活性炭可吸附酪蛋白中的叶酸以减少试剂空白, 同时也可吸附肽及氨基酸, 应注意控制搅拌时间)。取 10ml 酶解后的酪蛋白溶液加入已称重的蒸发皿中, 沸水浴蒸发至干。将蒸发皿置于 100℃ 恒温烤箱内干燥至恒重, 在干燥器中冷却至室温。称量蒸发皿的重量, 蒸发皿内固体重量, 如固体重量小于 400mg, 即每毫升酪蛋白溶液中固体含量 < 40mg, 则弃除酪蛋白液, 重新制备。

(13) 黄嘌呤溶液: 取 0.4g 黄嘌呤, 加入 10ml 氨水, 加热溶解, 用水稀释至 100ml。冰箱保存。

(14) 腺嘌呤-鸟嘌呤-尿嘧啶: 分别称取硫酸腺嘌呤, 盐酸鸟嘌呤和尿嘧啶各 0.2g, 加入 2.4 mol/L HCl 溶液 10 ml, 加热溶解, 用水稀释至 100ml, 室温贮存。

(15) 乙酸缓冲液 (1.7mol/L, pH4.5): 38.65g 无水乙酸钠, 19.8ml 冰乙酸, 加水稀释至 500ml。

(16) 维生素溶液: 取 10mg 核黄素溶解于 40 ml 乙酸缓冲液中。取 0.2mg 生物素, 2.5mg NaHCO₃, 20mg 对氨基苯甲酸, 40mg 盐酸吡多醇, 4mg 盐酸硫胺素, 8mg 泛酸钙, 8mg 尼克酸溶解于 50ml 水中。将上述两种溶液混合, 加水至 100ml。

(17) 吐温-80 溶液: 将 2g 吐温-80 加入 100ml 45℃ 水中, 混匀。

(18) 还原型谷胱甘肽溶液: 取 0.1g 还原型谷胱甘肽, 加水至 100ml。

(19) 甲盐溶液: 称取 5g 磷酸氢二钾和 2g 磷酸二氢钾, 加水溶解至 100ml, 液面上加入少许甲苯保存。

(20) 乙盐溶液: 称取 2 g 硫酸镁, 0.5 g 硫酸亚铁和 0.5 g 硫酸锰, 加水至 100 ml, 液面上加少许甲苯保存。

(21) 基础培养基: 按下表配制, 最终定容至 500ml。

酶解酪蛋白	100ml	L-盐酸半胱氨酸	0.2 g
腺嘌呤-鸟嘌呤-尿嘧啶	2.5 ml	色氨酸	0.2 g
黄嘌呤溶液	2.5 ml	还原型谷胱甘肽溶液	2.5ml
维生素溶液	5ml	葡萄糖	20 g

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

吐温-80 溶液	2.5 ml	乙酸钠	20 g
L-天冬氨酸	0.3 g	甲盐溶液	2.5 ml

加水至 250 ml, 搅拌, 用 10mol/L NaOH 溶液调节 pH 6.8 ± 0.1 , 然后加入乙盐溶液 2.5 ml, 磷酸缓冲液 200 ml, 用水补至 500 ml。4℃ 冰箱内可保存一周。

(甲、乙盐混合后易产生沉淀, 所以配培养基时不可同时加入, 加入甲盐后先调节 pH 再加入乙盐。基础培养基也可直接选购 DIFCO 公司生产的叶酸测定用培养基)

(22) 琼脂培养基:

葡萄糖	1 g	甲盐溶液	0.2 ml
蛋白胨	0.8 g	乙盐溶液	0.2 ml
酵母提取物干粉	0.2 g	琼脂	1.2g
乙酸钠(NaAc·3H ₂ O)	1.7 g		

加水至 100 ml, 置水浴煮至琼脂完全熔化, 调节 pH 6.8 ± 0.1 。尽快倒入试管中, 每管 3~5 ml, 塞上棉塞, 121℃ 高压灭菌 15 min, 取出后直立试管, 冷却至室温。于冰箱内保存。

5. 菌种制备与保存

(1) 储备菌种的制备: 将 L.C 纯菌种转接至 2 个或多个琼脂培养基管中。37℃ ± 0.5 ℃ 恒温培养箱中培养 16~24 h。贮于冰箱内, 每周转种一次留作储备菌种。

(2) 种子培养液的制备: 取 2 ml 叶酸标准使用液和 10 ml 基础培养基, 混匀, 分装至 4 支 5 ml 离心管中, 塞上棉塞, 121℃ 高压灭菌 15 min, 实验时现制。

6. 操作步骤

所有操作均需避光进行

6.1 样品制备

(1) 强化剂型样品: 称取 0.1~0.5 g 样品 (约含叶酸 100~300 ng) 于 100 ml 锥形瓶中, 加入 50 ml 磷酸缓冲液, 混匀。121℃ 高压水解 15 min。定容至 100ml, 过滤。

(2) 果蔬类: 称取样品 0.2~2 g (约含叶酸 100~300 ng), 加磷酸缓冲液经高压水解后过滤, 残渣用同样缓冲液再次高压, 过滤。合并两次滤液, 定容至 100ml。

(3) 谷、肉、蛋、鱼、豆、奶类等富含淀粉和/或蛋白类样品: 称取样品 0.1~2 g (约含叶酸 100~300 ng), 加磷酸缓冲液高压水解后, 冷却。加入 1 ml 鸡胰酶和 1 ml 蛋白酶-淀粉酶液, 1 ml 甲苯, 充分混合, 置于 37℃ ± 0.5 ℃ 恒温箱内酶解 16~20h。酶解后定容至 100ml 过滤。另取一支试管, 加入 1 ml 鸡胰酶, 1 ml 蛋白酶-淀粉酶和磷酸缓冲液, 作酶空白。

(4) 口服液、饮料、果汁等样品: 称取样品 0.5~2 ml (约含叶酸 100~300 ng), 加磷酸缓冲液高压水解后, 冷却, 加入 1ml 鸡胰酶, 1 ml 甲苯, 充分混合, 置于 37℃ ± 0.5 ℃ 恒温箱内酶解 16~20 h。酶解后定容至 100ml, 过滤。另取一支试管, 加入 1 ml 鸡胰酶和磷酸缓冲液, 作酶空白。

6.2 根据样品叶酸含量, 将上述滤液用磷酸缓冲液稀释到一定倍数, 使叶酸终浓度为 0.1~0.4 ng/ml。

6.3 样品管的制备: 取 4 支试管, 每支试管中分别加入稀释后样品液 1.0、2.0、3.0、4.0 ml, 补充水至体积为 5.0 ml, 加入 5 ml 基础培养基, 混匀。同样制作酶空白管。

6.4 灭菌: 将以上标准系列管、样品管和酶空白管全部塞上棉塞, 121℃ 高压灭菌 15 min。

6.5 标准系列管的制备: 取试管分别加入叶酸标准工作液 0.0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0ml, 相当于叶酸含量 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 ng, 加水补至体积为 5.0 ml, 再加 5 ml

上海洪纪仪器设备有限公司

基础培养基，混匀。如样品管一样进行灭菌。标准系列管进行平行测定。

6.6 接种

(1) 接种液的制备：接种前一天，用灭菌的接种针将菌种由储备菌种管中转种至 2 支已灭菌的种子培养液中，37℃±0.5℃恒温培养箱中培养 16~24 h。混悬种子培养液，无菌操作下用接种针管将 20 滴种子培养液转移至另 2 支无菌的种子培养液中，37℃±0.5℃再培养 6h。震荡混匀，制成菌种混悬液。立即使用。（叶酸是 L.C 生长所必需的，但是如果培养基中叶酸含量过高，细菌可在体内贮存，使测定空白值，影响细菌生长曲线。将接种液转种再培养 6h，有利于消耗细菌体内贮存的叶酸。）

(2) 接种：在无菌操作条件下向每支已灭菌的标准系列管、样品管和酶空白管接种一滴上述接种液（注意应直接滴在培养基内），混匀。留一支标准 0 管不接种，用于测定光密度时调零。

6.7 培养：置于 37℃±0.5℃恒温培养箱中培养 20~40 h。

6.8 测定：用分光光度计，在波长 540 nm 下，以未接种的标准 0 管调节零点，测定标准管、样品管和酶空白管的光密度值。

7. 计算

(1) 绘制标准曲线：以标准系列管中叶酸含量为横坐标，光密度值为纵坐标，绘制叶酸标准曲线。

(2) 结果计算：根据样品管和酶空白管的光密度值，从标准曲线上查得相应的叶酸含量，按下式计算。

$$X = \frac{(c - P) \times V_1 \times F}{m \times V_2} \times \frac{100}{1000}$$

式中：

X—样品中叶酸含量，μg/100g；

c—从标准曲线上查得样品测定管中叶酸含量，ng；

P—从标准曲线上查得酶空白管中叶酸含量，ng；

V1—样品制备时定容体积，ml；

F—稀释倍数；

V2—制备样品测定管时加入的样品液体积，ml；

m—样品质量，g；

100/1000——样品含量由 ng/g 换算成 μg/100g 的系数。

8. 注意事项

(1) 同一实验室平行测定或重复测定结果相对偏差绝对值<10%。

(2) 微生物法的测定结果为总叶酸含量。

(3) 微生物法测定叶酸常用的菌种除 L.C 外还有粪链球菌 (Streptococcus faecalis, S.F. ATCC 8043)。用 L.C 测定灵敏度高，用 S.F. 测定重现性好。本方法选用 L.C，实验条件以适宜酪乳酸杆菌的生长条件而定。

(4) 常用的酪蛋白处理方法有酶水解法、酸水解法和碱水解法，由于叶酸在碱性条件下相对稳定，所以用碱处理酪蛋白不能完全破坏叶酸，使培养基中叶酸含量偏高，标准空白值高，线性差。酸水解法和酶水解法均可有效去除叶酸，降解蛋白，使细菌生长曲线在 0~1ng 范围内线性良好，其中实验证明酶水解法更好。

(5) 培养基的 pH 对细菌生长很重要，pH6.8~7.2，生长曲线最佳。PH 过低或过高均不利于细菌生长。

(6) 本方法配制的培养基和 Difico 公司的叶酸培养基比较，标准曲线线性基本一致，对样品

上海洪纪仪器设备有限公司

检测结果基本一致。

(7) 食物中叶酸多以多谷氨酸盐形式存在，而 L.C 只能利用叶酸单、双、三谷氨酸盐，所以对天然食品处理时先用辄合酶对叶酸进行降解。常用的辄合酶来源有血浆、鸡胰酶和猪肾酶。猪肾酶需从市售猪肾中提取，操作复杂，提取后对酶的坚定相对困难，且重复性差，酶的用量难于控制。鸡胰酶可从 Difco 公司购买，可直接使用，重复性好。鸡胰酶的用量与叶酸测定结果相关，以往报告中认为水解 200ng 叶酸需加入 0.5~1mg 鸡胰酶。也有人认为在 pH7.0 的环境下增加酶的用量可提高叶酸水解率。本实验室认为水解 200 ng 叶酸，鸡胰酶用量宜控制在 3~5mg 左右，过高可降低水解效果。

(8) 辄合酶在应用中也有其局限性。天然食物中往往也含有辄合酶，在食物贮藏、运输过程中叶酸衍生物之间可发生相互转化，使外源性辄合酶作用下降；并且蔬菜水果存在一些酶的干扰物质也影响酶的活性，如柠檬酸、鞣酸等。所以测定中样品需注意保鲜，及时测定；样品处理方法也应视样品性质而定。

(9) 蛋白酶、淀粉酶的应用可将包裹于蛋白、淀粉之间或与蛋白结合的叶酸释放，有助于样品检测。蛋白酶、淀粉酶、鸡胰酶联合应用，水解效力大于 3 酶效力之和。