

ICS 67.040  
C 53



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.211—2008

---

## 食品中叶酸的测定

Determination of folates 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 发布  
中国国家标准化管理委员会

## 前 言

本标准修改采用国际分析家学会(AOAC INTERNATIONAL)中 AOAC 944.12《维生素预混料中叶酸的测定》(Folic acid in vitamin preparations)。

本标准与 AOAC 944.12 相比主要差异为：

- 增加了普通食品试样提取步骤；
- 扩大了适用范围。

本标准的附录 A 和附录 B 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、唐靛、李跃中、王克诚。

 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

# 食品中叶酸的测定

## 1 范围

本标准规定了食品中叶酸的测定方法。

本标准适用于食品中叶酸的测定。

本标准的检出限:普通食品,当称样量为 5 g 时,检出限为 2  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ; 营养素补充剂、强化剂及预混料,当称样量为 1 g 时,检出限为 2  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 。

## 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

叶酸是细菌生长所必需的营养素,在一定控制条件下,细菌的生长响应与培养基中叶酸含量呈线性关系。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叶酸的含量。

## 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 甲苯( $\text{C}_7\text{H}_8$ )。
- 4.2 磷酸钠( $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )。
- 4.3 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )。
- 4.4 抗坏血酸( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ )。
- 4.5 无水乙醇( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ )。
- 4.6 氢氧化钠( $\text{NaOH}$ )。
- 4.7 盐酸( $\text{HCl}$ )。
- 4.8 鸡胰酶(chicken pancrease)<sup>1)</sup>。
- 4.9 木瓜蛋白酶(papain)<sup>2)</sup>。
- 4.10 淀粉酶(taka-diastase)<sup>2)</sup>。
- 4.11 叶酸( $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_6$ ):纯度 $>98\%$ 。
- 4.12 葡萄糖( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ )。
- 4.13 蛋白胨(peptone)。
- 4.14 酵母提取物(yeast extract)。

1) 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。

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。

- 4.15 琼脂。
- 4.16 磷酸氢二钾( $K_2HPO_4$ )。
- 4.17 磷酸二氢钾( $KH_2PO_4 \cdot 3H_2O$ )。
- 4.18 硫酸镁( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )。
- 4.19 氯化钠( $NaCl$ )。
- 4.20 硫酸亚铁( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )。
- 4.21 硫酸锰( $MnSO_4 \cdot H_2O$ )。
- 4.22 溴麝香草酚蓝( $C_{27}H_{28}Br_2O_5S$ ):指示剂。
- 4.23 磷酸缓冲液(0.05 mol/L, pH 6.8):分别称取 4.35 g 磷酸钠(4.2)和 10.39 g 磷酸氢二钠(4.3),用水溶解至 1 L。临用前按大约 5 g/L 的比例加入抗坏血酸(4.4),使 pH 值为 6.8。
- 4.24 乙醇溶液(1+4):量取 200 mL 乙醇(4.5)与 800 mL 水混匀。
- 4.25 氢氧化钠乙醇溶液(0.01 mol/L):称取 0.4 g 氢氧化钠(4.6)用乙醇溶液(1+4)(4.24)溶解并稀释至 1 000 mL。
- 4.26 氢氧化钠溶液(1 mol/L):称取 4 g 氢氧化钠(4.6),加水溶解并稀释至 100 mL。
- 4.27 盐酸溶液(1 mol/L):吸取 8.4 mL 盐酸(4.7),用水稀释至 100 mL。
- 4.28 鸡胰酶液:称取 100 mg 鸡胰酶(4.8),加入 20 mL 磷酸缓冲液(4.23),研磨至匀浆。现用现配。
- 4.29 蛋白酶-淀粉酶液:分别称取 200 mg 木瓜蛋白酶(4.9)和淀粉酶(4.10),加入 20 mL 磷酸缓冲液(4.23)研磨至匀浆。现用现配。
- 4.30 叶酸标准储备液(20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ):精确称取 20.0 mg 叶酸(4.11)置于 1 L 容量瓶中,用氢氧化钠乙醇溶液(4.25)溶解并定容至刻度。储存于棕色瓶中,2  $^{\circ}\text{C}$ ~4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存两年。当叶酸(4.11)纯度不够或储存时间超过半年以上时,需按附录 A 进行浓度标定后再使用。
- 4.31 叶酸标准中间液(20.0  $\text{ng}/\text{mL}$ ):准确吸取 1.00 mL 叶酸标准储备液(4.30)置于 1 L 容量瓶中,用氢氧化钠乙醇溶液(4.25)稀释并定容至刻度,混匀后储存于棕色瓶中 2  $^{\circ}\text{C}$ ~4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存一年。
- 4.32 叶酸标准工作液(0.200  $\text{ng}/\text{mL}$ ):临用前吸取 1.00 mL 叶酸标准中间液(4.31),置于 100 mL 容量瓶中,用水稀释定容至刻度。临用前现配。
- 4.33 甲盐溶液:分别称取 25 g 磷酸氢二钾(4.16)和 25 g 磷酸二氢钾(4.17),加水溶解并稀释至 500 mL。加入 3 滴~5 滴甲苯,2  $^{\circ}\text{C}$ ~4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱可保存一年。
- 4.34 乙盐溶液:分别称取 10 g 硫酸镁(4.18)、0.5 g 氯化钠(4.19)、0.5 g 硫酸亚铁(4.20)和 0.5 g 硫酸锰(4.21),加水溶解并稀释至 500 mL。加 5 滴盐酸(4.7),2  $^{\circ}\text{C}$ ~4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存一年。
- 4.35 溴麝香草酚蓝溶液:称取 0.1 g 溴麝香草酚蓝(4.22)于研钵中,加 1.6 mL 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液研磨,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)。
- 4.36 基础培养液:可按附录 B 配制叶酸测定用基础培养液,也可直接由试剂公司购买叶酸测定培养基干粉(folic acid casein medium)<sup>3)</sup>,用前根据需要量按说明书配制。效力相当。
- 4.37 菌种储备用琼脂培养基:按表 1 各成分用量称取或吸取混合后,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(4.27)调节 pH 至指示剂呈草绿色,如过量用 1 mol/L 氢氧化钠溶液(4.26)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  $^{\circ}\text{C}$  高压灭菌 10 min,取出后直立放置,待冷却后于冰箱内保存。

3) 由 Difco 公司提供的产品商品名。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。

表 1 菌种储备用琼脂培养基配制一览表

试 剂	用 量
葡萄糖	1.0 g
蛋白胨	0.8 g
酵母提取物干粉	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。
- 5.6 接种针和接种环。
- 5.7 pH 计:精度 ± 0.01。
- 5.8 分光光度计。
- 5.9 超净台。

## 6 菌种的制备与保存

- 6.1 菌种:干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei* (ATCC 7469)。
- 6.2 储备菌种的制备:将干酪乳杆菌菌种转接至菌种储备用琼脂培养基(4.37)中,在 37 °C ± 1 °C 恒温培养箱中培养 16 h~24 h。取出后放入 2 °C~4 °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 1 mL 叶酸标准工作液和 10 mL 基础培养液混匀,分装至四支 5 mL 离心管中,塞上棉塞,于 121 °C 高压灭菌 15 min 后即为种子培养液。冷却后用接种环将培养了 16 h~24 h 的干酪乳杆菌储备菌种转种至两支种子培养液中,于 37 °C ± 1 °C 恒温培养箱中培养 16 h~20 h。取出后将种子培养液混悬,无菌操作下吸取 0.2 mL 转种至另两支已消毒的种子培养液中,于 37 °C ± 1 °C 再培养 6 h。振荡混匀,制成菌种混悬液,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 普通食品:准确称取适量试样(约含 0.2 μg~2 μg 叶酸),精确至 0.001 g。一般谷薯类、肉类、鱼类、乳类、果蔬、藻类 2 g~5 g;蛋类、豆类、坚果类、饲料等 1 g~3 g;内脏 0.2 g~1 g;半流质或流质 5 g~10 g。转入 100 mL 锥形瓶中,加 30 mL 磷酸缓冲液(4.23),振摇后于 121 °C 高压水解 15 min,取出冷却至室温。加入 1 mL 鸡胰酶液(4.28),如试样中含有蛋白质、淀粉需另加入 1 mL 蛋白酶-淀粉酶液(4.29)。加入 3 滴~5 滴甲苯,充分混合,置于 37 °C ± 1 °C 恒温培养箱内酶解 16 h~20 h。取出,转

入 100 mL 容量瓶,加水定容至刻度,过滤。另取一支 25 mL 刻度试管,加入 15 mL 磷酸缓冲液,1 mL 鸡胰酶液和(或)1 mL 蛋白酶-淀粉酶液,混合,同试样一起温育后,加水定容至 25.0 mL 后过滤,此为酶空白液。

7.1.2 营养素补充剂、强化剂及预混料:准确称取 0.1 g~0.5 g 试样,精确至 0.001 g,转入 100 mL 容量瓶中,加入 80 mL 氢氧化钠乙醇溶液(4.25)振摇提取过夜(4 h 以上),用水定容至刻度。

## 7.2 稀释

如有必要,用水对试样提取液进行适当稀释,使稀释后试样提取液中叶酸含量在 0.2 ng/mL~0.4 ng/mL 范围内。

## 7.3 测定管制备

7.3.1 试样管和酶空白管:取三支试管,分别加入试样提取液或酶空白液 0.5 mL、1.0 mL、2.0 mL,补水至 5.0 mL,加入 5.0 mL 基础培养液(4.36),混匀。

7.3.2 标准系列管:取试管分别加入叶酸标准工作液 0.00 mL、0.25 mL、0.50 mL、1.00 mL、1.50 mL、2.00 mL、2.50 mL、3.00 mL、4.00 mL 和 5.00 mL,加水至 5.00 mL,相当于标准系列管中叶酸含量为 0.00 ng、0.05 ng、0.10 ng、0.20 ng、0.30 ng、0.40 ng、0.50 ng、0.60 ng、0.80 ng、1.00 ng。加 5.0 mL 基础培养液(4.36),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。

## 7.4 培养

7.4.1 灭菌:将所有测定管塞好棉塞,于 121 °C 高压灭菌 15 min。

7.4.2 接种和培养:快速冷却试管至室温,在无菌操作条件下,每管接种一滴菌种混悬液。置于 37 °C ± 1 °C 恒温培养箱中培养 20 h~40 h,直至获得最大混浊度,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 ng 叶酸)不接种作为对照。

## 7.5 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,于 540 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叶酸混入,需重做实验。

## 7.6 结果计算

以标准系列管叶酸含量为横坐标、透光率为纵坐标,绘制标准曲线。从标准曲线查得试样管或酶空白管中叶酸的相应含量,如果每个试样的三支试样管中有两支叶酸含量落在 0.20 ng~1.0 ng 范围内则可继续按式(1)、式(2)进行结果计算,否则需重新取样测定。

酶空白液中叶酸含量按式(1)计算:

$$m_1 = \frac{m_2 \times 25}{V_0} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$m_1$ ——鸡胰酶液或(和)蛋白酶-淀粉酶液中叶酸含量,单位为纳克(ng);

$m_2$ ——从标准曲线上查得酶空白管中叶酸含量,单位为纳克(ng);

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)。

试样中叶酸含量按式(2)计算:

$$X = \frac{\frac{m_3}{V_1} \times V_2 \times f - m_1}{m} \times \frac{100}{1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

$X$ ——试样中叶酸含量,单位为微克每百克( $\mu\text{g}/100\text{g}$ );

$m_3$ ——从标准曲线上查得试样管中叶酸含量,单位为纳克(ng);

$V_1$ ——制备试样管时吸取的试样液体积,单位为毫升(mL);

$V_2$ ——试样提取液定容体积,单位为毫升(mL);

$f$ ——试样液稀释倍数;

$m_1$ ——鸡胰酶液或(和)蛋白酶-淀粉酶液中叶酸含量,单位为纳克(ng);

$m$ ——试样质量,单位为克(g);

$\frac{100}{1\ 000}$ ——由纳克每克(ng/g)换算为微克每百克( $\mu\text{g}/100\ \text{g}$ )的系数。

注: 营养素补充剂、强化剂及预混料等试样提取步骤中因无酶解处理,故无需计算酶空白液中叶酸含量,即式(2)中  $m_1=0$ 。

## 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)

叶酸标准储备液浓度的测定

A.1 测定

准确吸取 1.0 mL 标准储备液至 10 mL 容量瓶中,用氢氧化钠溶液(0.1 mol/L)定容至刻度。以氢氧化钠溶液(0.1 mol/L)调零点,比色杯厚度 1 cm,波长 256 nm,用紫外分光光度计测定三次吸光度值,取平均值。

A.2 计算

按式(A.1)计算标准储备液叶酸浓度。

$$c = \frac{\bar{A}}{E} \times M \times 10 \times 10^3 \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:

$c$ ——标准储备液中叶酸浓度,单位为微克每毫升( $\mu\text{g}/\text{mL}$ );

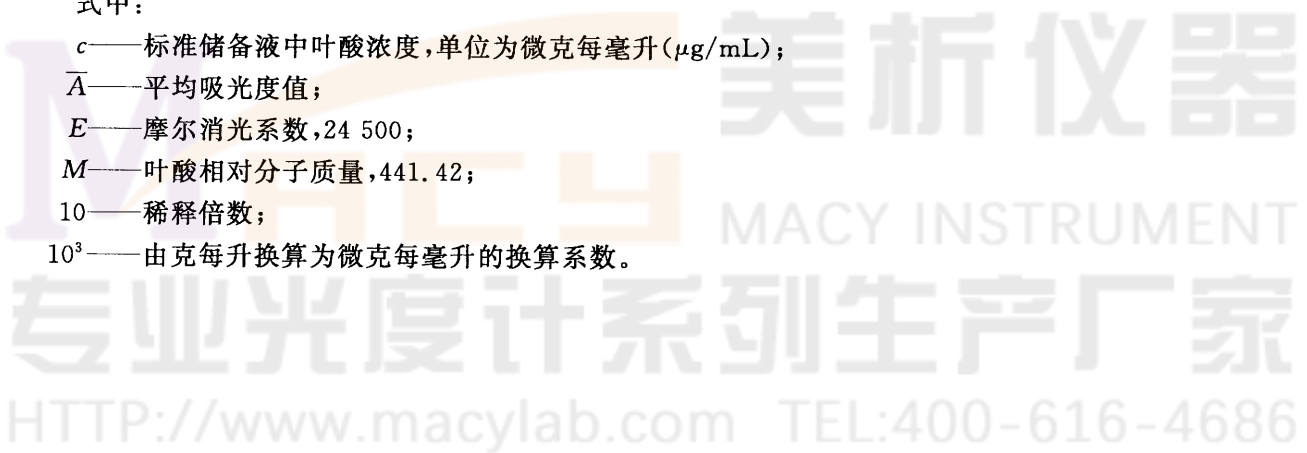
$\bar{A}$ ——平均吸光度值;

$E$ ——摩尔消光系数,24 500;

$M$ ——叶酸相对分子质量,441.42;

10——稀释倍数;

$10^3$ ——由克每升换算为微克每毫升的换算系数。





## 附录 B

(资料性附录)

## 叶酸测定用基础培养液的配制方法

## B.1 试剂

- B.1.1 无水乙醇( $C_2H_6O$ )。
- B.1.2 不含维生素的酪蛋白(vitamin free casein)。
- B.1.3 碳酸氢钠( $NaHCO_3$ )。
- B.1.4 碳酸氢钠( $NaHCO_3$ )溶液:0.1 mol/L。
- B.1.5 盐酸(HCl)。
- B.1.6 盐酸溶液:3 mol/L,1 mol/L。
- B.1.7 氢氧化钠(NaOH)溶液:10 mol/L,1 mol/L。
- B.1.8 胰酶(pancreatin)。
- B.1.9 甲苯。
- B.1.10 硅藻土。
- B.1.11 冰乙酸( $C_2H_4O_2$ )。
- B.1.12 乙酸溶液:0.02 mol/L。
- B.1.13 活性炭。
- B.1.14 硫酸腺嘌呤( $C_{10}H_{10}N_{10} \cdot H_2SO_4$ )。
- B.1.15 盐酸鸟嘌呤( $C_5H_5N_5O_5 \cdot HCl$ )。
- B.1.16 尿嘧啶( $C_4H_4N_2O_2$ )。
- B.1.17 黄嘌呤( $C_5H_4N_4O_2$ )。
- B.1.18 氨水( $NH_3 \cdot O$ )。
- B.1.19 三水合乙酸钠( $C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$ )。
- B.1.20 核黄素( $C_{17}H_{20}N_4O_6$ )。
- B.1.21 生物素( $C_{10}H_{16}N_2O_3S$ )。
- B.1.22 对氨基苯甲酸( $C_7H_7NO_2$ )。
- B.1.23 盐酸吡哆醇( $C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$ )。
- B.1.24 盐酸硫胺素( $C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$ )。
- B.1.25 泛酸钙( $C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$ )。
- B.1.26 尼克酸( $C_6H_5NO_2$ )。
- B.1.27 聚山梨酯-80(吐温-80)。
- B.1.28 还原型谷胱甘肽( $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ )。
- B.1.29 L-天冬氨酸( $C_4H_7NO_4$ )。
- B.1.30 L-色氨酸( $C_{11}H_{12}N_2O_2$ )。
- B.1.31 L-盐酸半胱氨酸( $C_3H_7NO_2S \cdot HCl$ )。
- B.1.32 无水葡萄糖( $C_6H_{12}O_6$ )。
- B.1.33 溴麝香草酚蓝( $C_{27}H_{28}Br_2O_5S$ )溶液:按 4.35 配制。
- B.1.34 溴酚蓝( $C_{19}H_{10}Br_4O_5S$ )溶液:0.1 g/100 mL,无水乙醇(B.1.1)配制。此指示剂变色终点为草绿色(pH 3.5)。
- B.1.35 酪蛋白液:可按下列任一种方法制备。

**B. 1. 35. 1 酶解酪蛋白液:**称取 60 g 不含维生素的酪蛋白(B. 1. 2)至 1 L 烧杯中,慢慢加入 1 L 碳酸氢钠溶液(B. 1. 4),以防止结块,用 10 mol/L 氢氧化钠溶液(B. 1. 7)调节 pH 值至 8.0。加入 300 mg 胰酶(B. 1. 8),搅拌 20 min,使胰酶充分混匀。加入 2.5 mL 甲苯(B. 1. 9),置 37 °C ± 1 °C 恒温培养箱中酶解 48 h ~ 72 h。从恒温培养箱中取出酪蛋白酶解液,于 121 °C 高压 30 min 以终止反应,冷却至室温。加入 10 g 硅藻土(B. 1. 10),搅拌均匀,用布氏漏斗过滤,滤液用约 60 mL 冰乙酸(B. 1. 11)调节 pH 值至 3.7。称取 12 g 活性炭(B. 1. 13),加入滤液中准确搅拌 10 min,用铺有 10 g 硅藻土的布氏漏斗过滤,滤液从“称取 12 g 活性炭……”开始重复操作两次。最终滤液用水稀释至 1 200 mL。取 10 mL 酶解酪蛋白液于平皿中 150 °C 烘干至恒重,如固体含量 < 40 mg/mL,则弃除酪蛋白液,重新制备。制备好的酪蛋白液加 1 mL ~ 3 mL 甲苯(B. 1. 9),2 °C ~ 4 °C 冰箱冷藏保存一年。

**B. 1. 35. 2 酸解酪蛋白液:**称取 50 g 不含维生素的酪蛋白(B. 1. 2)于 500 mL 烧杯中,加 200 mL 盐酸溶液(B. 1. 6),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,如此反复三次,以除去盐酸。以溴酚蓝(B. 1. 34)作外指示剂,用 10 mol/L 氢氧化钠(B. 1. 7)调节 pH 值至指示剂颜色转为草绿色(pH 3.5)。加 20 g 活性炭(B. 1. 13),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,置 2 °C ~ 4 °C 冰箱中保存一年。

注:每次蒸发时不可蒸干或焦糊,以避免所含营养素破坏。

**B. 1. 36 腺嘌呤-鸟嘌呤-尿嘧啶溶液。**分别称取硫酸腺嘌呤(B. 1. 14)、盐酸鸟嘌呤(B. 1. 15)以及尿嘧啶(B. 1. 16)各 0.1 g 于 250 mL 烧杯中,加 75 mL 水和 2 mL 盐酸(B. 1. 5),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,加水至 100 mL。加 3 滴 ~ 5 滴甲苯,贮存于棕色试剂瓶中,置 2 °C ~ 4 °C 于冰箱中可保存一年。

**B. 1. 37 黄嘌呤(C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>)溶液:**称取 0.4 g 黄嘌呤(B. 1. 17),加 10 mL 氨水(B. 1. 18),加热溶解,加水至 100 mL。加 3 滴 ~ 5 滴甲苯,贮存于棕色试剂瓶中,2 °C ~ 4 °C 冰箱保存一年。

**B. 1. 38 乙酸缓冲液(1.6 mol/L, pH 4.5):**称取 63 g 三水合乙酸钠(B. 1. 19),用 200 mL 水溶解,加大约 20 mL 冰乙酸(B. 1. 11),调节 pH 至 4.5,混合后,用水稀释至 500 mL。

**B. 1. 39 维生素液:**称取 100 mg 核黄素(B. 1. 20)用 400 mL 乙酸缓冲液(B. 1. 38)溶解。取 25 mg 碳酸氢钠(B. 1. 3)溶解于 500 mL 水中,加入 2 mg 生物素(B. 1. 21)、200 mg 对氨基苯甲酸(B. 1. 22)、400 mg 盐酸吡哆醇(B. 1. 23)、40 mg 盐酸硫胺素(B. 1. 24)、80 mg 泛酸钙(B. 1. 25)、80 mg 尼克酸(B. 1. 26)溶解。将上述溶液混合,加水至 1 000 mL。加入 3 滴 ~ 5 滴甲苯,贮存于棕色试剂瓶中,2 °C ~ 4 °C 冰箱保存一年。

**B. 1. 40 聚山梨酯-80(吐温-80)溶液:**将 10 g 聚山梨酯-80(B. 1. 27)溶于无水乙醇(B. 1. 1)中并稀释至 100 mL,2 °C ~ 4 °C 冰箱保存。

**B. 1. 41 还原型谷胱甘肽(C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S)溶液:**称取 0.1 g 还原型谷胱甘肽(B. 1. 28),加 100 mL 水溶解,贮于棕色瓶中,2 °C ~ 4 °C 冰箱保存。

**B. 1. 42 甲盐溶液:**按 4.33 配制。

**B. 1. 43 乙盐溶液:**按 4.34 配制。

## B. 2 基础培养液

配制 250 mL 基础培养液,按表 B. 1 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。以溴麝香草酚蓝为外指示剂,用 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 pH 值至 6.8。加入乙盐溶液 5 mL,用磷酸缓冲液(4.23)补至 250 mL。2 °C ~ 4 °C 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 B.1 叶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	酪蛋白液	50 mL	固 体 试 剂	L-天冬氨酸	0.15 g
	腺嘌呤-鸟嘌呤-尿嘧啶溶液	5.0 mL		L-盐酸半胱氨酸	0.10 g
	黄嘌呤溶液	1.25 mL		L-色氨酸	0.10 g
	维生素液 I	2.5 mL		无水葡萄糖	10 g
	聚山梨酯-80 溶液	0.25 mL		三水合乙酸钠	10 g
	甲盐溶液	5.0 mL			
	还原型谷胱甘肽溶液	1.25 mL			


**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