

前 言

本标准的全部技术内容为推荐性的。

本标准从 GB 14924—1994《实验动物 全价营养饲料》中分离出来,形成独立的标准。

本标准中所列两种方法具有同等效力。

本标准及其配套标准自实施之日起,代替 GB 14924—1994。

本标准由中华人民共和国科学技术部提出并归口。

本标准起草单位:中国实验动物学会。

本标准主要起草人:周瑞华、王竹、石磊、王光亚、张瑜、郑陶、刘秀梅。

本标准由国家科学技术部委托技术归口单位中国实验动物学会负责解释。

本标准于 1994 年 1 月首次发布。

中华人民共和国国家标准

实验动物 配合饲料 维生素的测定

GB/T 14924.11—2001

Laboratory animals—Formula feeds
—Determination of vitamins

代替 GB 14924 · 1994

1 范围

本标准规定了实验动物配合饲料中维生素的测定方法,即配合饲料中维生素 A、维生素 E、维生素 B₁、维生素 B₂、烟酸、维生素 B₆、总抗坏血酸、总胆碱、叶酸、维生素 B₁₂、维生素 K₃、泛酸、生物素、维生素 D₃ 的测定方法。

本标准适用于实验动物小鼠、大鼠、兔、豚鼠、地鼠、犬和猴的配合饲料及其原料的测定。

2 引用标准

下列标准所包含的条文,通过在本标准中引用而构成为本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准时的各方应探讨使用下列标准的最新版本的可能性。

- GB/T 12388—1990 食物中维生素 A 和维生素 E 的测定方法
- GB/T 12390—1990 食物中硫胺素(维生素 B₁)的测定方法
- GB/T 12391—1990 食物中核黄素的测定方法
- GB/T 12392—1990 蔬菜、水果及其制品中总抗坏血酸的测定方法 荧光法和 2,4-二硝基苯胺法
- GB/T 12395—1990 食物中烟酸的测定方法
- GB/T 14700—1993 饲料中维生素 B₁ 测定方法
- GB/T 14701—1993 饲料中维生素 B₂ 测定方法
- GB/T 17407—1998 食物中维生素 B₆ 的测定
- GB/T 17812—1999 饲料中维生素 E 的测定 高效液相色谱法
- GB/T 17816—1999 饲料中总抗坏血酸的测定 邻苯二胺荧光法
- GB/T 17817—1999 饲料中维生素 A 的测定 高效液相色谱法
- GB/T 17818—1999 饲料中维生素 D₃ 的测定 高效液相色谱法

3 测定方法

3.1 配合饲料中维生素 A 和维生素 E 的测定

按 GB/T 12388、GB/T 17812、GB/T 17817 的规定执行。

3.2 配合饲料中维生素 B₁ 的测定

按 GB/T 14700、GB/T 12390 的规定执行。

3.3 配合饲料中维生素 B₂ 的测定

按 GB/T 12391、GB/T 14701 的规定执行。

3.4 配合饲料中烟酸的测定

按 GB/T 12395 规定执行。

3.5 配合饲料中维生素 B₆ 的测定

按 GB/T 17407 规定执行。

3.6 配合饲料中总抗坏血酸的测定

按 GB/T 12392、GB/T 17816 规定执行。

3.7 配合饲料中总胆碱的测定

3.7.1 原理

配合饲料中的胆碱经过碱处理提取后,通过硅镁吸附剂柱色谱纯化,然后用雷纳克盐(reineckate)与胆碱反应生成粉红色的胆碱-雷纳克盐复合物。此复合物被丙酮洗脱后,在 526 nm 有最大吸收,其吸收值与胆碱浓度成正比。本方法检出限为 0.1 mg。

3.7.2 试剂

所有试剂均为分析纯,实验用水为蒸馏水。

3.7.2.1 甲醇。

3.7.2.2 三氯甲烷。

3.7.2.3 乙酸甲酯。

3.7.2.4 丙酮。

3.7.2.5 10%丙酮:取 10 mL 丙酮与 90 mL 水混合。

3.7.2.6 冰乙酸。

3.7.2.7 冰乙酸-甲醇溶液:取 10 mL 冰乙酸和 90 mL 甲醇混合。

3.7.2.8 氢氧化钡。

3.7.2.9 硅镁吸附剂(Florisil):60~100 目。

3.7.2.10 提取液:于 100 mL 甲醇中加入 4~5 g 无水氢氧化钡,搅拌 10 min 再加入 10 mL 三氯甲烷,混合,过滤去除多余的氢氧化钡。

3.7.2.11 雷纳克铵盐(ammonium reineckate)饱和溶液:称取 2~3 g 雷纳克铵盐,加入 100 mL 水,搅拌 10 min,过滤去除多余的雷纳克铵盐。实验当日配制。

3.7.2.12 胆碱标准贮备液(5 mg/mL):准确称取无水氯化胆碱 0.576 1 g,溶解于水中,并定容至 100 mL。冰箱保存。

3.7.2.13 胆碱标准应用液(1.0 mg/mL):准确吸取 20.0 mL 标准贮备液,用水稀释并定容至 100 mL。

3.7.3 仪器与设备

3.7.3.1 实验室常用设备。

3.7.3.2 回流提取装置。

3.7.3.3 色谱柱:0.8 cm(内径)×30 cm 的玻璃柱,柱上端为容积 30~50 mL 的储液杯,底端收缩变细,并装有活塞。活塞上约 1 cm 处有一玻璃筛板,筛板孔径为 16~30 μm。使用前需干燥。

3.7.3.4 分光光度计。

3.7.4 测定步骤

3.7.4.1 提取

称取适量样品(约含 5~50 mg 胆碱),置于 100 mL 具塞锥形瓶中,加入 40 mL 提取液,于 76~82℃ 恒温水浴回流 3 h,回流速度为每秒 1~2 滴。冷却,样品过滤至 100 mL 容量瓶中,反复用 5~10 mL 冰乙酸-甲醇溶液洗涤锥形瓶和滤渣,洗液并入容量瓶中,用冰乙酸调节 pH 至 2~6,用甲醇定容至刻度。

3.7.4.2 纯化

3.7.4.2.1 填装色谱柱:将干燥的硅镁吸附剂约 4 g 浸入甲醇中,取干燥色谱柱,湿法将硅镁吸附剂填

充入色谱柱中,至硅镁吸附剂的高度达 10 cm 左右。用甲醇冲洗色谱柱,并保持甲醇液面高于硅镁吸附剂 1~2 cm,直至使用为止。

3.7.4.2.2 柱色谱纯化:吸取 50 mL 的提取液,加到已填装好的色谱柱中,打开底端活塞,使提取液靠重力作用流过色谱柱。立即依次用 5,10 mL 甲醇,2 份 10 mL 乙酸甲酯和 10 mL 10% 丙酮洗涤色谱柱。接着加入 5 mL 雷纳克铵盐饱和溶液通过色谱柱,用 2 份 10 mL 冰乙酸洗涤,直至流出液清亮为止。用 15 mL 丙酮洗脱色谱柱上胆碱-雷纳克盐复合物的粉红色色谱带,用 25 mL 具塞量筒收集全部洗脱液,并用丙酮定容至 15 mL。

3.7.4.3 比色测定:用分光光度计,于 526 nm 波长下,以丙酮调节零点,测定样品吸光度值,在标准工作曲线上查出胆碱含量,或用回归方程计算出相应的胆碱含量,求得计算结果。

3.7.4.4 标准工作曲线:分别吸取 0.50,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL 标准应用液,相当于胆碱含量 0.5,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mg,按照上述样品测定步骤操作。以胆碱含量做横坐标,以吸光度值为纵坐标绘制标准工作曲线,并计算回归方程。

3.7.5 计算结果

见式(1)。

$$X = \frac{c \times V_1}{m \times V_2} \times 100 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中: X ——样品中胆碱的含量,mg/100 g;

c ——从标准回归曲线上查得的胆碱含量,mg;

V_1 ——样品提取液定容体积,mL;

V_2 ——纯化用提取液的体积,mL;

m ——样品质量,g。

3.7.6 结果的允许差

同一实验室平行测定或重复测定结果的相对偏差绝对值 $\leq 10\%$ 。

3.8 配合饲料中叶酸的测定——微生物法

3.8.1 原理

叶酸是干酪乳酸杆菌(*Lactobacillus casei*, L. C, ATCC7469)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,细菌增殖强度用测定吸光度值表示。与标准曲线相比较,计算出样品中叶酸的含量。本方法检出限为 0.1 ng。

3.8.2 试剂

本实验用水均为蒸馏水。试剂纯度除特别说明外均为分析纯。

3.8.2.1 甲苯。

3.8.2.2 生理盐水:使用前需灭菌处理。

3.8.2.3 菌种:干酪乳酸杆菌(*Lactobacillus casei*, L. C, ATCC7469)

3.8.2.4 磷酸缓冲液(0.05 mol/L, pH6.8):称取 4.35 g 磷酸钠($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$),10.39 g 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)溶解于 800 mL 水中。临用前加入约 5 g 抗坏血酸,并调节 pH 至 6.8。

3.8.2.5 鸡胰酶:称取 100 mg 干燥的鸡胰酶,加入 20 mL 磷酸缓冲液制成匀浆,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液备用,临用前配制。

3.8.2.6 蛋白酶-淀粉酶:分别称取蛋白酶和淀粉酶各 200 mg,加入 20 mL 磷酸缓冲液制成匀浆,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液备用。临用前配制。

3.8.2.7 氢氧化钠溶液(0.01 mol/L):用 20%乙醇配制。

3.8.2.8 氢氧化钠溶液(10 mol/L)。

3.8.2.9 叶酸标准储备液(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$):准确称取 200 mg 叶酸标准品,用 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液溶解并定容至 1 L。储存于棕色瓶中。

- 3.8.2.10 叶酸标准中间液(200 ng/mL):吸取 1.0 mL 叶酸标准储备液,用 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液溶解并定容至 1 L。储存于棕色瓶中。
- 3.8.2.11 叶酸标准应用液(0.2 ng/mL):吸取 1.0 mL 叶酸标准中间液,用磷酸缓冲液稀释定容至 1 L。
- 3.8.2.12 酶解酪蛋白:将 8 g 碳酸氢钠溶解于 1 L 水中,加入 60 g 去维生素酪蛋白,用 10 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 8.0。加入 300 mg 胰酶,搅拌 20 min,使胰酶充分混匀。再加入 2.5 mL 甲苯,置 37℃ 恒温箱酶解 48~72 h。将酪蛋白从恒温箱中取出,经 121℃ 高压 30 min 以终止反应,去除甲苯。冷却,加 10 g 硅藻土(技术级)搅拌,用布氏漏斗过滤。滤液中加入约 60 mL 冰乙酸调节 pH 至 3.7。称取活性炭 12 g,加至滤液中搅拌 10 min,用布氏漏斗过滤,重复三次。每次过滤时,布氏漏斗内加 10 g 硅藻土助滤。最后滤液用水稀释至 1 200 mL,冰箱保存。取一小份酶解酪蛋白液进行干燥处理,如固体含量小于 40 mg/mL,则需重新制备。
- 3.8.2.13 黄嘌呤溶液:取 0.4 g 黄嘌呤,加入 10 mL 氨水,加热溶解,用水稀释至 100 mL。冰箱保存。
- 3.8.2.14 腺嘌呤-鸟嘌呤-尿嘧啶溶液:分别称取硫酸腺嘌呤,盐酸鸟嘌呤和尿嘧啶各 0.2 g,加入(1+4) 盐酸溶液,加热溶解,用水稀释至 100 mL 室温贮存。
- 3.8.2.15 乙酸缓冲液(1.7 mol/L, pH4.5):38.65 g 乙酸钠,19.8 mL 乙酸,加水至 500 mL。
- 3.8.2.16 维生素溶液:取 10 mg 核黄素溶解于 40 mL 乙酸缓冲液中。取 0.2 mg 生物素,2.5 mg 碳酸氢钠,20 mg 对氨基苯甲酸,40 mg 盐酸吡多醇,4 mg 盐酸硫胺素,8 mg 泛酸钙,8 mg 尼克酸溶解于 50 mL 水中。将上述两种溶液混合,加水至 100 mL。
- 3.8.2.17 吐温-80 溶液:将 2 g 吐温-80 加入 100 mL 45℃ 水中,混匀。
- 3.8.2.18 还原型谷胱甘肽溶液:取 0.1 g 还原型谷胱甘肽,加水溶解至 100 mL。
- 3.8.2.19 甲盐溶液:称取 5 g 磷酸氢二钾和 2 g 磷酸二氢钾,加水溶解至 100 mL,液面上加入少许甲苯以保存之。
- 3.8.2.20 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,加水溶解至 100 mL,液面上加少许甲苯以保存之。
- 3.8.2.21 基础培养基:酶解酪蛋白 100 mL,腺嘌呤-鸟嘌呤-尿嘧啶溶液 2.5 mL,黄嘌呤溶液 2.5 mL,维生素溶液 5 mL,吐温-80 溶液 2.5 mL,L-天冬氨酸 0.3 g,L-盐酸半胱氨酸 0.2 g,还原型谷胱甘肽溶液 2.5 mL,葡萄糖 20 g,乙酸钠 20g,甲盐溶液 2.5 mL,加水至 250 mL,搅拌,用氢氧化钠溶液调节 pH 至 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。冰箱内可保存一周。
- 3.8.2.22 琼脂培养基:葡萄糖 1 g,蛋白胨 0.8 g,酵母提取物干粉 0.2 g,乙酸钠($\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 1.7 g,甲盐溶液 0.2 mL,乙盐溶液 0.2 mL,琼脂 1.2 g 加水至 100 mL,置水浴煮至琼脂完全熔化,调节 pH 至 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。
- 3.8.3 仪器与设备
- 3.8.3.1 实验室常用设备。
- 3.8.3.2 恒温培养箱。
- 3.8.3.3 离心机。
- 3.8.3.4 高压消毒锅。
- 3.8.3.5 震荡器。
- 3.8.3.6 接种针和接种环。
- 3.8.3.7 分光光度计。
- 3.8.4 菌种制备与保存
- 3.8.4.1 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。

3.8.4.2 种子培养液的制备:取 2 mL 叶酸标准应用液和 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,备用。

3.8.5 测定步骤(所有操作均需避光进行)

3.8.5.1 接种液的制备:使用前一天,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。次日晨,混悬种子培养液,无菌操作下吸取 0.2 mL,将细菌转种至另 2 支灭菌的种子培养液中,(37±0.5)℃ 再培养 6 h。取出 3 000 r/min,离心 10 min,倾去上清液,用已灭菌的生理盐水清洗二次,离心,弃去上清液。最后加 5 mL 生理盐水,震荡混匀,制成菌种混悬液。立即使用。

3.8.5.2 样品制备

3.8.5.2.1 样品处理:将样品磨成粉末。

3.8.5.2.2 水解: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。

3.8.5.2.3 酶解:水解样品冷却后,加入 1 mL 鸡胰酶,1 mL 蛋白酶-淀粉酶,1 mL 甲苯,充分混合(37±0.5)℃ 恒温培养箱中酶解 16~20 h。取出酶解样品用水定容至 100 mL,过滤。取 2 mL 滤液稀释至 20 mL,使叶酸终含量在 0.1~0.3 ng/mL 范围之内。同时另取一支试管,加入 1 mL 鸡胰酶,1 mL 蛋白酶-淀粉酶,作酶空白对照。

3.8.5.3 标准系列管的制备

取 2 组平行试管,每管分别加入叶酸标准应用液 0.0,0.5,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL,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 5.0 mL,再加 5 mL 基础培养基,混匀。

3.8.5.4 样品管的制备

取 4 组试管,每管分别加入酶解样品 1.0,2.0,3.0,4.0 mL,补充水至体积为 5.0 mL,再加 5 mL 基础培养基,混匀。

3.8.5.5 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。

3.8.5.6 接种:待标准系列管、样品管和酶空白管冷却至室温,在无菌操作条件下接种,每管接种一滴接种液,直接滴在培养基内。留一支标准 0 管不接种,用于测定吸光度时调零。

3.8.5.7 培养:置于(37±0.5)℃ 恒温培养箱中培养 20~40 h。

3.8.5.8 测定:用分光光度计,波长 540 nm 下,以未接种的标准 0 管调吸光度值为 0,测定标准管、样品管和酶空白管的吸光度值。

3.8.5.9 绘制标准曲线

以叶酸标准系列含量作横坐标,吸光度值作纵坐标,绘制标准曲线。

3.8.6 结果计算

见式(2)。

$$X = \frac{(c - P) \times V \times 10 \times 100}{m \times 1\,000} \dots\dots\dots(2)$$

式中: X——样品中叶酸含量,μg/100 g;
c——从标准曲线上查得每毫升样品测定管中叶酸含量,ng/mL;
P——酶空白对照管中叶酸含量,ng/mL;
V——样品酶解液定容总体积,mL;
m——样品质量,g;
10——稀释倍数;

100/1 000——样品含量由 ng/g 换算成 μg/100 g 的系数。

3.8.7 允许误差

同一实验室平行测定或重复测定结果相对偏差绝对值<10%。

3.9 配合饲料中维生素 B₁₂的测定

3.9.1 原理

维生素 B₁₂对于 *Lactobacillus leichmannii* (ATCC 7830) 的正常生长是必需的营养素,在一定生长条件下, *Lactobacillus leichmannii* 的生长繁殖与溶液中维生素 B₁₂的含量成一定的线性关系,用吸光度测定法测定细菌生长繁殖的强度,即可计算出食物及饲料样品中的维生素 B₁₂含量。本方法最低检出限为 0.001 ng。

3.9.2 试剂

本试验所用水均为蒸馏水,所用试剂均需分析纯试剂。

3.9.2.1 甲苯

3.9.2.2 柠檬酸(C₆H₈O₇ · 3H₂O)。3.9.2.3 磷酸氢二钠(Na₂HPO₄)。3.9.2.4 偏重亚硫酸钠(Na₂S₂O₃)。

3.9.2.5 抗坏血酸(生化试剂)。

3.9.2.6 无水葡萄糖。

3.9.2.7 无水乙酸钠。

3.9.2.8 L-胱氨酸(生化试剂)。

3.9.2.9 D,L-色氨酸(生化试剂)。

3.9.2.10 10 mol/L 氢氧化钠溶液:称取 200 g 氢氧化钠溶于适量水中,定容至 500 mL。

3.9.2.11 (1+4)乙醇溶液:200 mL 无水乙醇与 800 mL 水充分混匀。

3.9.2.12 酸解酪蛋白:称取 50 g 不含维生素的酪蛋白于 500 mL 烧杯中,加 200 mL 3 mol/L 盐酸,经 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,以去除盐酸。以溴酚蓝作外指示剂,用 10 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 3.5。加 20 g 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 500 mL,液面上加少许甲苯于冰箱中保存。(该试剂也可从 Dfico 公司购得,产品号为 No.0288-15-6。)

3.9.2.13 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 0.1 g 于 250 mL 烧杯中,加 75 mL 水和 2 mL 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,反复至冷却后无沉淀产生为止,用水稀释至 100 mL。液面上加少许甲苯于冰箱中保存。

3.9.2.14 维生素溶液 I:称取 25 mg 核黄素,25 mg 盐酸硫胺素,0.25 mg 生物素,50 mg 尼克酸,用 0.02 mol/L 乙酸溶液溶解并定容至 1 000 mL。

3.9.2.15 维生素溶液 II:将 50 mg 对氨基苯甲酸,25 mg 泛酸钙,100 mg 盐酸吡哆醇,100 mg 盐酸吡哆醛,20 mg 盐酸吡哆胺,5 mg 叶酸溶于(1+4)乙醇溶液,并定容至 1 000 mL。

3.9.2.16 甲盐溶液:称取 25 g 磷酸二氢钾、25 g 磷酸氢二钾溶于 500 mL 水中,加 5 滴浓盐酸,混匀。

3.9.2.17 乙盐溶液:称取 10 g 硫酸镁(MgSO₄ · 7H₂O)、0.5 g 氯化钠、0.5 g 硫酸锰(MnSO₄ · 4H₂O)、0.5 g 硫酸亚铁(FeSO₄ · 7H₂O)溶于水并定容至 500 mL,加 5 滴浓盐酸,混匀。

3.9.2.18 黄嘌呤溶液:称取 1.0 g 黄嘌呤溶于 200 mL 水中,70°C 加热条件下,加入 30 mL 氢氧化铵(NH₄OH)(2+3),搅拌直至固体全部溶解,冷却后用水定容至 1 000 mL。

3.9.2.19 天冬酰胺溶液:称取 1.0 g L-天冬酰胺溶于水中,并定容至 100 mL。

3.9.2.20 吐温-80 溶液:将 25 g 吐温-80 溶于乙醇并定容至 250 mL。

3.9.2.21 维生素 B₁₂标准溶液(均使用棕色试剂瓶)。

3.9.2.21.1 维生素 B₁₂标准储备溶液(100 ng/mL):称取 50 μg(精度 0.01 mg 天平)维生素 B₁₂暗红色针状结晶,用(1+4)的乙醇溶液定容至 500 mL,4°C 冰箱储存。

3.9.2.21.2 维生素 B₁₂标准中间液(1 ng/mL):取 2.5 mL 储备液用(1+4)的乙醇定容至 250 mL,4°C

冰箱储存。

3.9.2.21.3 维生素 B₁₂标准应用液(0.02 ng/mL):取 1 mL 中间液用水定容至 50 mL,用时现配。

3.9.2.22 基本培养基:在本标准的制作中使用了 Difco 公司产品,产品号为 No. 0457-15 1。也可如下自己配制:

将下列试剂混合于 500 mL 烧杯中,加水至 200 mL,以溴甲酚紫作外指示剂,用 10 mol/L 氢氧化钠液调节 pH 为 6.0~6.1,用水稀释至 250 mL。

酸解酪蛋白	25 mL
腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶溶液	5 mL
天冬氨酰溶液	5 mL
吐温-80 溶液	5 mL
甲盐溶液	5 mL
乙盐溶液	5 mL
维生素溶液 I	5 mL
维生素溶液 II	5 mL
黄嘌呤溶液	5 mL
抗坏血酸	1.0 g
L-胱氨酸	0.1 g
D,L-色氨酸	0.1 g
无水葡萄糖	10.0 g
无水乙酸钠	8.3 g

3.9.2.23 琼脂培养基:在 600 mL 水中,加入 15 g 蛋白胨,5 g 水溶性酵母提取物干粉,10 g 无水葡萄糖,2 g 无水磷酸二氢钾,100 mL 番茄汁,10 mL 吐温-80 溶液,每 500 mL 液体培养基加 5.0~7.5 g 琼脂,加热溶解,用 10 mol/L 氢氧化钠调节 pH 为 6.5~6.8,然后定容至 1 000 mL,分装于试管中,于 121°C 高压灭菌 10 min,取出后竖立试管,待冷却至室温后于冰箱保存。

3.9.2.24 生理盐水:称取 9.0 g 氯化钠溶于 1 000 mL 水中。每次使用时分别倒入 2~4 支试管中,每支约加 10 mL,塞好棉塞,于 121°C 高压灭菌 10 min,备用。

3.9.2.25 0.4 g/L 溴甲酚紫指示剂:称取 0.1 g 溴甲酚紫于小研钵内,加 1.6 mL 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 250 mL。

3.9.3 仪器与设备

3.9.3.1 实验室常用设备。

3.9.3.2 电热恒温培养箱。

3.9.3.3 压力蒸汽消毒器。

3.9.3.4 液体快速混合器。

3.9.3.5 离心机。

3.9.3.6 硬质玻璃试管:20 mm×150 mm。

3.9.3.7 分光光度计。

3.9.4 菌种与培养液的制备与保存

3.9.4.1 储备菌种的制备:*Lactobacillus leichmannii*(ATCC 7830)接种于直面琼脂培养管中,在(37±0.5)°C 恒温箱中培养 16~24 h,取出后放入冰箱中保存,每隔两周至少传种一次。在实验前一天必须传种一次。

3.9.4.2 种子培养液的制备:加 2 mL 0.02 ng/mL 维生素 B₁₂标准工作液和 3 mL 基本培养基于 10 mL 离心管中,塞好棉塞,于 121°C 高压灭菌 10 min,取出冷却后于冰箱中保存。每次制备两管,备用。

3.9.5 操作步骤

3.9.5.1 接种液的配制:使用前一天,将已在琼脂管中生长 16~24 min 的 *L. leichmannii* 接种于种子培养液中,在(37±0.5)℃培养 16~24 h,取出以 3 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,用已灭菌的生理盐水淋洗 2 次,再加入 3 mL 灭菌生理盐水,混匀后,将此液倒入已灭菌的注射器中,供接种用。

3.9.5.2 样品制备

3.9.5.2.1 水解液的制备:称取 1.3 g 无水磷酸二氢钠、1.2 g 柠檬酸及 0.1 g 偏重亚硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$),溶于水中并定容至 100 mL,用时现配。

3.9.5.2.2 称取适量样品,置于 100 mL 三角瓶中,加 70 mL 水解液,混匀,于 121℃ 高压灭菌 10 min。取出冷却至室温,过滤。以溴甲酚紫为外指示剂,用 10 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 6.0~6.1,将水解液移至 100 mL 容量瓶中,用水定容至刻度。样品需进行适当稀释,使测定管中 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 终浓度应 ≤ 0.03 mg/mL。

3.9.5.3 样品试管的制备

每组平行样品管中分别加入 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mL 样品水解液,并用水稀释至 5 mL,然后再加入 5 mL 基本液体培养基。

3.9.5.4 标准系列管的制备

每组试管中分别加入维生素 B_{12} 标准工作液 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL,使每组试管中维生素 B_{12} 的含量为 0.00 ng, 0.02 ng, 0.04 ng, 0.06 ng, 0.08 ng, 0.1 ng,加水至 5 mL,再加入 5 mL 基本液体培养基,需做三组标准曲线。

3.9.5.5 灭菌:样品管与标准管均用棉塞塞好,于 121℃ 高压灭菌 10 min。

接种与培养:待试管冷至室温后,每管接种一滴种子菌液,于(37±0.5)℃恒温箱中培养 16~20 h。

3.9.5.6 测定吸光度:于 640 nm 波长条件下,以标准系列中的零管调节仪器零点,测定样品管液体及标准管培养物的吸光度值。

3.9.6 计算

以维生素 B_{12} 标准系列的 ng 数为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线。由样品测定管中的吸光度值在曲线上查出相对应的样品测定管中的维生素 B_{12} 含量,再按以式(3)计算样品中维生素 B_{12} 含量:

$$X = \frac{c \cdot V \cdot f}{m \times 1\,000} \times 100 \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中: X ——样品中维生素 B_{12} 含量, $\mu\text{g}/100$ g;

c ——测定管中的维生素 B_{12} 含量, ng/mL;

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。

3.9.7 结果的重复性

同一实验室重复测定或同时测定两次结果的相对偏差绝对值 $\leq 10\%$ 。

3.10 配合饲料中维生素 K_3 (甲萘醌)的测定

3.10.1 原理

在氨存在的条件下维生素 K_3 (甲萘醌, V_{K_3})与氰乙酸乙酯形成蓝紫色的有色物质,在 575 nm 下的吸光度值与维生素 K_3 的浓度成正比,用分光光度计测定有色物质的吸光度值,由标准曲线计算样品中维生素 K_3 的含量。本方法检出限为 0.05 mg。

3.10.2 试剂

本实验所用试剂均为分析级,实验用水为蒸馏水。

3.10.2.1 0.1 mol/L 碘溶液:称取 25 g 碘化钾溶解于 20 mL 水中,加入 9.8 g 碘试剂,混匀溶解,加水至 750 mL。贮存于棕色瓶中,避光保存 24 h。

3.10.2.2 0.1 mol/L 硫代硫酸钠(Na₂S₂O₃):将水煮沸后冷却。称取 25 g 硫代硫酸钠(Na₂S₂O₃·5H₂O)溶解于 500 mL 含 0.1 g 碳酸钠的冷却水中,并用冷却的水稀释至 1 000 mL。

3.10.2.3 淀粉指示剂:称取 2 g 可溶性淀粉,加于 10 mL 水中,摇匀。然后缓慢加至 200 mL 沸水中,煮 2 min。

3.10.2.4 氨水-异丙醇溶液:取异丙醇与等体积的浓氨水混合。

3.10.2.5 氰乙酸乙酯(30 g/L):取 3 g 氰乙酸乙酯溶解于 100 mL 异丙醇中。

3.10.2.6 V_{k₃}标准溶液(0.1 mg/mL)准确称取 50 mg V_{k₃}标准品,移至 500 mL 棕色容量瓶中,用异丙醇溶解并定容至刻度。

3.10.3 仪器与设备

3.10.3.1 实验室常用设备。

3.10.3.2 分光光度计。

3.10.4 测定步骤(所有操作均需避光进行)

3.10.4.1 提取

准确称取约 15 g 已混匀的样品,准确加入 100 mL 水,搅拌 10 min,保证 V_{k₃}充分溶解与混匀。过滤,如滤液浑浊,则反复过滤至澄清。

3.10.4.2 氧化去杂质:吸取 40 mL 滤液至 100 mL 容量瓶中,加 1~2 滴淀粉指示剂,用 0.1 mol/L 碘溶液滴定,至出现持续的蓝色。向溶液中滴入 1 滴 0.1 mol/L Na₂S₂O₃ 消除蓝色。用水定容至刻度。

3.10.4.3 标准管和样品管的制备:分别取 2 套 20 mL 比色管,分别按表 1 顺序加入 V_{k₃}标准溶液、样品提取液及试剂,制备标准管和样品管。

表 1 标准管和样品管的制备

试剂	标准管					样品管	
	0	1	2	3	4	空白管	测定管
V _{k₃} 标准溶液,mL	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	—	—
样品提取液,mL	—	—	—	—	—	10.0	10.0
异丙醇,mL	3.0	1.50	1.0	0.5	0.0	3.0	2.0
乙基氰乙酸,mL	—	1.0	1.0	1.0	1.0	—	1.0
氨水-异丙醇,mL	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

各管用水定容至 20 mL,摇匀,放置 20 min。

3.10.4.4 比色测定:用分光光度计于 575 nm 波长下,以标准 0 管调仪器零点,测定各管吸光度值。

3.10.5 计算:以标准 V_{k₃}含量作横坐标,吸光度值作纵坐标,并绘制标准曲线,计算回归方程。用样品测定管与空白管吸光度值的差值在标准曲线上查出样品管的 V_{k₃}含量,然后计算出样品中 V_{k₃}的含量,见式(4)。

$$X = \frac{c_{a-b} \times 25}{m} \times 100 \dots\dots\dots(4)$$

式中: X——样品中 V_{k₃}的含量,mg/100 g;

c_{a-b}——样品测定管与空白管吸光度值的差值在标准曲线上对应的 V_{k₃}含量,mg;

m——样品质量,g;

25——样品稀释倍数。

3.10.6 结果的允许差

同一实验室平行测定或重复测定结果的相对偏差绝对值<10%。

3.11 配合饲料中泛酸的测定

3.11.1 原理

泛酸对于 *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) 的正常生长是必需的营养素,在一定生长条件下, *Lactobacillus plantarum* 的生长繁殖速度与溶液中泛酸的含量成一定的线性关系,细菌增殖的强度可用比浊法或光密度法测定,与标准曲线比较,可计算出样品中的泛酸含量。本方法最低检出限为 5 ng。

3.11.2 试剂

本试验所用水均为蒸馏水,所用试剂均需分析纯试剂。

3.11.2.1 甲苯。

3.11.2.2 1mol/L 盐酸溶液。

3.11.2.3 Tris 缓冲溶液:将 24.2 g 三羟基氨基甲烷溶于 150 mL 水中,用 7.5 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 为 8.0~8.3 然后定容至 200 mL,贮存于 4℃ 冰箱中,保质期为 2 周。

3.11.2.4 7.5 mol/L 氢氧化钠溶液:溶 150 g 氢氧化钠于水中,定容至 500 mL。

3.11.2.5 0.2 mol/L 乙酸:12 mL 冰乙酸用水定容至 1 000 mL。

3.11.2.6 0.2 mol/L 乙酸钠溶液:将 16.4 g 乙酸钠溶于水并定容至 1 000 mL。

3.11.2.7 0.1 mol/L 碳酸氢钠溶液:称取 0.85 g 碳酸氢钠溶于水,然后定容至 100 mL。

3.11.2.8 0.2 mol/L 碳酸氢钾溶液:称取 10.012 g 碳酸氢钾溶于水,然后定容至 500 mL。

3.11.2.9 20g/L 碱性磷酸酶溶液:称取 2 g 碱性磷酸酶(Sigma 公司 No. P-3877)溶于水,然后定容至 100 mL。贮存于 4℃ 冰箱中保存。

3.11.2.10 10% 鸽子肝脏提取物溶液:将所用容器在配制此试剂前一天放入 4℃ 冰箱中过夜。(1)称取 30 g 鸽子肝脏丙酮提取物粉末(Sigma 公司 No. L-8376)放入冷的研钵中,分两次加入 300 mL 0.2 mol/L 碳酸氢钾,置于 0℃ 的冰浴中研磨成悬浊液;(2)将此悬浊液分别放入 8 支离心管中,塞紧后充分振摇,冷冻 10 min,然后 3000 r/min 离心 5 min;(3)将上清液放入 500 mL 冷的烧杯中,加 150 g 离子交换树脂 Dowex1-X8(Bio-Rad Laboratories, Inc., Brussels, Belgium),放在冰浴中震荡 5 min;将混合液倒入离心管中,3000/min 离心 5 min;(4)再将上清液移入另一个冷的 500 mL 烧杯中,冷冻 10 min;(5)重复上述(3)、(4)步骤一次;(6)然后分装于试管中,冷冻条件下保存,用前化冻。

3.11.2.11 酸解酪蛋白:称取 50 g 不含维生素的酪蛋白于 500 mL 烧杯中,加 200 mL 3 mol/L 盐酸,于 121℃ 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,以去除盐酸。以溴酚蓝作外指示剂,用 10 mol/L 氢氧化钠调节 pH 至 3.5。加 20 g 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 500 mL,加少许甲苯于冰箱中保存。

3.11.2.12 胱氨酸、色氨酸溶液:称取 4 g L-胱氨酸和 1 g L-色氨酸(或 2 g DL-色氨酸)于 800 mL 水中,加热至 70~80℃,逐滴加入(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 1 000 mL,贮存于试剂瓶中,液面上加少许甲苯于冰箱中保存。

3.11.2.13 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 0.1 g 于 250 mL 烧杯中,加 75 mL 水和 2 mL 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 100 mL。液面上加少许甲苯于冰箱中保存。

3.11.2.14 吐温-80 溶液:将 25 g 吐温-80 溶于乙醇中并定容至 250 mL。

3.11.2.15 维生素溶液 I:称取 20 mg 核黄素,10 mg 盐酸硫胺素,0.04 mg 生物素,用 0.2 mol/L 乙酸溶液溶解并定容至 1 000 mL。

3.11.2.16 维生素溶液 II:10 mg 对氨基苯甲酸,50 mg 尼克酸,40 mg 盐酸吡哆醇,溶于(1+3)的乙醇溶液,并定容至 1 000 mL。

3.11.2.17 盐溶液 A:称取 25 g 磷酸二氢钾和 25 g 磷酸氢二钾溶于 500 mL 水中,加 5 滴浓盐酸。

3.11.2.18 盐溶液 B:称取 10 g 硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)、1 g 氯化钾、0.5 g 硫酸锰($MnSO_4 \cdot 4H_2O$),

0.5 g 硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、23 mL 85% 磷酸,溶于水中并定容至 500 mL。

3.11.2.19 泛酸标准溶液

3.11.2.19.1 泛酸标准储备溶液($40 \mu\text{g}/\text{mL}$):称取 43.47 mgD 泛酸钙(Sigma 公司, No. P-2250),溶解于 500 mL 水中,加入 10 mL 0.2 mol/L 的乙酸,100 mL 0.2 mol/L 乙酸钠,然后用水定容至 1 000 mL。此时溶液的泛酸钙浓度为 $43.47 \mu\text{g}/\text{mL}$,相当于泛酸浓度为 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$,在冰箱中贮存。

3.11.2.19.2 泛酸标准中间液($1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$):取 25 mL 储备液放入 500 mL 水中,再加入 10 mL 0.2 mol/L 的乙酸,100 mL 0.2 mol/L 乙酸钠,然后用水定容至 1 000 mL,在冰箱中贮存。

3.11.2.19.3 泛酸标准应用液($10 \text{ ng}/\text{mL}$):取 1 mL 中间液用水定容至 100 mL,在冰箱中贮存。

3.11.2.20 基本培养基:本标准中使用了 Difco 公司产品,产品号为 No. 0816-15-7。也可按下列配方自行配制:

将下列试剂混合于 500 mL 烧杯中,加水至 200 mL。以溴麝香草酚蓝作外指示剂,用 10 mol/L 氢氧化钠液调节 pH 至 6.8,用水稀释至 250 mL。

酸解酪蛋白	25 mL
胱氨酸、色氨酸溶液	25 mL
腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶溶液	5 mL
维生素溶液 I	5 mL
维生素溶液 II	5 mL
盐溶液 A	5 mL
盐溶液 B	5 mL
无水葡萄糖	10 g
乙酸钠($\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	8.3 g
吐温-80 溶液	0.25 mL

3.11.2.21 琼脂培养基:在 600 mL 水中,加入 15 g 蛋白胨,5 g 水溶性酵母提取物干粉,10 g 无水葡萄糖,2 g 无水磷酸二氢钾,100 mL 番茄汁,10 mL 吐温-80,每 500 mL 液体培养基加 10~15 g 琼脂,加热溶解。用 7.5 mol/L 氢氧化钠调节 pH 为 6.5~6.8,然后定容至 1 000 mL,分装于试管中。于 121 C 高压灭菌 10 min,取出后竖直试管,待冷却至室温后于冰箱保存。

3.11.2.22 生理盐水:称取 9.0 g 氯化钠溶于 1 000 mL 水中。每次使用时分别倒入 2~4 支 10 mL 试管中,每支约加 10 mL,塞好棉塞,于 121 C 高压灭菌 10 min,备用。

3.11.2.23 0.4 g/L 溴麝香草酚蓝溶液:称取 0.1 g 溴麝香草酚蓝于小研钵内,加 1.6 mL 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 250 mL。

3.11.2.24 0.4 g/L 溴甲酚绿溶液:称取 0.1 g 溴甲酚绿于小研钵中,加 1.4 mL 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 250 mL。

3.11.2.25 1 g/L 溴酚蓝乙醇溶液:称取 0.1 g 溴酚蓝,用乙醇溶解后,加乙醇稀释至 100 mL。

3.11.3 仪器与设备

3.11.3.1 实验室常用设备。

3.11.3.2 电热恒温培养箱。

3.11.3.3 压力蒸汽消毒器。

3.11.3.4 液体快速混合器。

3.11.3.5 离心机。

3.11.3.6 分光光度计或浊度计。

3.11.3.7 硬质玻璃试管:20 mm×150 mm。

3.11.4 菌种与培养液的制备与保存

3.11.4.1 储备菌种的制备:*Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014)接种于直面琼脂培养管中,在(37±

0.5)℃恒温箱中培养16~24 h,取出后放入冰箱中保存,每隔两周至少传种一次。在实验前一天必须传种一次。

3.11.4.2 种子培养液的制备:加2 mL泛酸标准应用液和3 mL基本培养基于10 mL离心管中,塞好棉塞,于121℃高压灭菌10 min,取出,冷却后于冰箱中保存。每次制备两管,备用。

3.11.5 操作步骤

3.11.5.1 接种液的配制:使用前一天,将已在琼脂管中生长16~24 h的*L. plantarum*接种于种子培养液中。(37±0.5)℃培养16~24 h,取出后离心10 min(3 000 r/min),弃去上清液。用已灭菌的生理盐水淋洗2次,再加入3 mL灭菌生理盐水,混匀后,将此液倒入已灭菌的注射器中,备接种用。

3.11.5.2 样品制备

3.11.5.2.1 称取适量样品,放入100 mL三角瓶中,加10 mL Tris缓冲液,加蒸馏水30 mL,混匀后于121℃高压水解15 min,取出冷却至室温。定容至50 mL,过滤。

3.11.5.2.2 取1 mL样品液(3.11.5.2.1),加入0.4 mL碱性磷酸酶溶液,0.2 mL肝脏提取物溶液,0.1 mL碳酸氢钠溶液,0.4 mL蒸馏水,混匀后,37℃温箱中培养过夜。加水至20 mL,以溴甲酚绿为外指示剂,用乙酸调节pH为4.5,定容至25 mL,过滤。

3.11.5.2.3 取适量水解液(3.11.5.2.2)于25 mL具塞刻度试管中,以溴麝香草酚蓝为外指示剂,用0.1 mol/L氢氧化钠调节至pH为6.8,用水稀释至刻度。

3.11.5.3 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(3.11.5.2.3),加水至5 mL,然后再加入5 mL基本液体培养基。

3.11.5.4 标准系列管的制备

每组试管中分别加入泛酸标准应用液0.0,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL,(相当0.0,10.0,20.0,30.0,40.0,50.0 ng),加水至5 mL,再加入5 mL基本液体培养基,需做三组标准曲线。

3.11.5.5 灭菌:样品管与标准系列管均用棉塞塞好,于121℃高压灭菌10 min。

3.11.5.6 接种与培养:待试管冷至室温后,每管接种一滴种子液,于(37±0.5)℃恒温箱中培养16~20 h。

3.11.5.7 测定:分光光度计,波长640 nm条件下,以标准系列0管调仪器零点,测定样品管及标准管的吸光度值。

3.11.6 计算

以泛酸标准系列的ng数为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线。在曲线上查出相对应的样品测定管中的泛酸含量,然后再按以式(5)计算样品中泛酸含量。

$$X = \frac{c \times V \times f}{m \times 1\,000} \times 100 \quad \dots\dots\dots(5)$$

式中: X——样品中泛酸含量,μg/100 g;

c——测定管中的泛酸含量,ng/mL;

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。

3.11.7 结果的重复性

同一实验室重复测定或同时测定两次的结果的相对偏差绝对值≤10%。

3.12 配合饲料中生物素的测定

3.12.1 原理

生物素对于*Lactobacillus plantarum*(ATCC 8014)的正常生长是必需的营养素,在一定生长条件下,*Lactobacillus plantarum*的生长繁殖与溶液中生物素的含量成一定的线形关系,因此可以用浊度法

或吸光度测定法来测定样品中生物素的含量。方法检出限为 0.03 ng。

3.12.2 试剂

本试验所用水均为蒸馏水,所用试剂均需分析纯试剂。

3.12.2.1 甲苯。

3.12.2.2 1 mol/L 硫酸溶液:在 600 mL 水中加入 55.6 mL 浓硫酸,稀释至 1 000 mL。

3.12.2.3 3 mol/L 硫酸溶液:在 600 mL 水中加入 166.7 mL 浓硫酸,稀释至 1 000 mL。

3.12.2.4 10 mol/L 氢氧化钠溶液:溶 200 g 氢氧化钠于水中,定容至 500 mL。

3.12.2.5 (1+1)乙醇溶液:500 mL 无水乙醇与 500 mL 水充分混匀。

3.12.2.6 酸解酪蛋白:称取 50 g 不含维生素的酪蛋白于 500 mL 烧杯中,加 200 mL 3 mol/L 盐酸,121℃ 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,以去除盐酸。以溴酚蓝作外指示剂,用 10 mol/L 氢氧化钠调节 pH 至 3.5。加 20 g 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 500 mL,液面上加少许甲苯于 4℃ 冰箱中保存。

3.12.2.7 胱氨酸、色氨酸溶液:称取 4 g L-胱氨酸和 1 g L-色氨酸(或 2 g DL-色氨酸)于 800 mL 水中,加热至 70~80℃,逐滴加入体积分数为 20% 的盐酸,不断搅拌,直至完全溶解为止。冷至室温,加水稀释至 1 000 mL。液面上加少许甲苯于 4℃ 冰箱中保存。

3.12.2.8 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 0.1 g 于 250 mL 烧杯中,加 75 mL 水和 2 mL 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 100 mL。液面上加少许甲苯于冰箱中保存。

3.12.2.9 维生素溶液:称取 20 mg 核黄素,10 mg 盐酸硫胺素,10 mg 对氨基苯甲酸,40 mg 盐酸吡哆醇,用 0.02 mol/L 乙酸溶液溶解并定容至 1 000 mL。

3.12.2.10 盐溶液:称取 10 g 硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)、1 g 氯化钾、0.5 g 硫酸锰($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)、0.5 g 硫酸亚铁($FeSO_4 \cdot 7H_2O$),加 23 mL 85% 磷酸,用水溶解并定容至 500 mL。

3.12.2.11 生物素标准溶液

3.12.2.11.1 生物素标准储备液(50 $\mu g/mL$):称取 25 mg 无水生物素用(1+1)乙醇溶液定容至 500 mL,于 4℃ 冰箱中贮存。

3.12.2.11.2 生物素标准中间液 I(1 $\mu g/mL$):取 5 mL 储备液用(1+1)的乙醇溶液定容至 250 mL,于 4℃ 冰箱中贮存。

3.12.2.11.3 生物素标准中间液 II(10 ng/mL):取 5 mL 中间液 I 用(1+1)的乙醇溶液定容 500 mL,于 4℃ 冰箱中贮存。

3.12.2.11.4 生物素标准应用液(0.2 ng/mL):取 5 mL 中间液 II 用 50% 的乙醇溶液定容至 250 mL,在 2~4℃ 冰箱中贮存。

3.12.2.12 基础培养基:本标准的制作采用 Difco 公司的培养基,产品号为 No. 0419-15-8。也可按如下配方自行配制。

将下列试剂混合于 500 mL 烧杯中,加水至 200 mL,以溴麝香草酚蓝作外指示剂,用 10 mol/L 氢氧化钠液调节 pH 至 6.8,用水稀释至 250 mL。

酸解酪蛋白	25 mL
胱氨酸、色氨酸溶液	25 mL
腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶溶液	5 mL
维生素溶液	5 mL
盐溶液	5 mL
无水葡萄糖	5 g

无水乙酸钠

5 g

3.12.2.13 琼脂培养基:在 600 mL 水中,加入 15 g 蛋白胨,5 g 水溶性酵母提取物干粉,10 g 无水葡萄糖,2 g 无水磷酸二氢钾,100 mL 番茄汁,10 mL 吐温-80,5.0~7.5 g 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 1 000 mL,分装于试管,于 121℃ 高压灭菌 10 min,取出后竖直试管,待冷却至室温后于冰箱保存。

3.12.2.14 生理盐水:称取 9.0 g 氯化钠溶于 1 000 mL 水中,每次使用时分别倒入 2~4 支 10 mL 试管中,每支约加 10 mL。塞好棉塞,于 121℃ 高压灭菌 10 min,备用。

3.12.2.15 0.4 g/L 溴麝香草酚蓝溶液:称取 0.1 g 溴麝香草酚蓝于小研钵内,加 1.6 mL 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 250 mL。

3.12.2.16 0.4 g/L 溴甲酚绿溶液:称取 0.1 g 溴甲酚绿于小研钵中,加 1.4 mL 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 250 mL。

3.12.3 仪器与设备

3.12.3.1 实验室常用设备。

3.12.3.2 电热恒温培养箱。

3.12.3.3 压力蒸汽消毒器。

3.12.3.4 液体快速混合器。

3.12.3.5 离心机。

3.12.3.6 分光光度计。

3.12.3.7 硬质玻璃试管;20 mm×150 mm。

3.12.4 菌种与培养液的制备与保存

3.12.4.1 储备菌种的制备:*Lactobacillus plantarum*(ATCC 8014)接种于直面琼脂培养管中,在(37±0.5)℃ 恒温箱中培养 16~24 h,取出后放入冰箱中保存,每隔两周至少传种一次。在实验前一天必须传种一次。

3.12.4.2 种子培养液的制备:加 2 mL 生物素标准应用液和 3 mL 基本培养基于 10 mL 离心管中,塞好棉塞,于 121℃ 高压灭菌 10 min,取出,冷却后于冰箱中保存。每次制备两管,备用。

3.12.5 操作步骤

3.12.5.1 接种液的配制:使用前一天,将已在琼脂管中生长 16~24 min 的 *L. plantarum* 接种于种子培养液中,在(37±0.5)℃ 培养 16~24 h,取出后离心 10 min(3 000 r/min),弃去上清液,用已灭菌的生理盐水淋洗 2 次,再加入 3 mL 灭菌生理盐水,混匀后,将此液倒入已灭菌的注射器中,备接种用。

3.12.5.2 样品制备:称取适量样品,放入 100 mL 三角瓶中,加 50 mL 1 mol/L 硫酸(水解动物样品用 3 mol/L 硫酸,水解植物样品及混合型样品用 1 mol/L 硫酸),混匀后于 121℃ 高压水解 90 min,取出冷却至室温。以溴甲酚绿为外指示剂,用(2+3)氢氧化钠溶液调节 pH 为 4.5,将水解液移至 100 mL 容量瓶中,定容,过滤。样品水解液只能 4℃ 冰箱保存 2~3 日。取适量水解液于 25 mL 具塞刻度试管中,以溴麝香草酚蓝为外指示剂,用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调节至 pH 为 6.8,用水稀释至刻度。

3.12.5.3 样品管的制备

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 5 mL,然后再加入 5 mL 基本液体培养基。

3.12.5.4 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 0.0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 ng)加水至 5 mL,再加入 5 mL 基本液体培养基,需做三组标准曲线。

3.12.5.5 灭菌:样品管与标准系列管均用棉塞塞好,于 121℃ 高压灭菌 10 min。

3.12.5.6 接种与培养:待试管冷至室温后,每管接种一滴种子液,于(37±0.5)℃ 恒温箱中培养 16~20 h。

3.12.5.7 测定:分光光度计,波长 550 nm 条件下,以标准系列零管仪器调零测定样品管及标准管的吸光度值。

3.12.6 计算

以生物素标准系列的 ng 数为横坐标,吸光度值为纵坐标,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,然后再按式(6)计算样品中生物素含量。

$$X = \frac{c \times V \times f}{m \times 1\,000} \times 100 \quad \dots\dots\dots(6)$$

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/mL ;

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 。

3.12.7 结果的重复性

同一实验室重复测定或同时测定两次的结果的相对偏差绝对值 $\leq 10\%$ 。

3.13 配合饲料种维生素 D_3 的测定——高效液相色谱法

按 GB/T 17818—1999 中规定进行测定。