

维生素 B6 (VB6) 含量检测试剂盒 (高效液相色谱法 HPLC)

产品货号: BA2226

产品规格: 50T/48S

产品简介:

维生素 B6 (Vitamin B6) 又称吡哆素, 在体内以磷酸酯的形式存在, 是一种水溶性维生素, 肉类、全谷类、蔬菜和坚果类中含量较高。在机体中参与多种蛋白质和氨基酸的代谢, 对生物体具有极其重要的作用。

维生素 B6 在一定条件的光激发下具有荧光效果, 可以利用高效液相色谱法荧光检测器测定其含量。荧光检测器灵敏度较高, 常用于痕量分析。

试验中所需的仪器和试剂:

高效液相色谱仪 (Polaris C18-A 色谱柱 (4.6×250mm), 荧光检测器 (FLD))、台式离心机、可调式移液枪、研钵/匀浆器、EP 管 (1.5mL)、针头式过滤器 (水系)、注射器、抽滤器、滤膜 (水系、有机系)、棕色进样瓶、超纯水、甲醇 (色谱纯)。

产品内容:

提取液: 液体 30mL ×1 瓶, 4°C 保存。本提取液中含有不溶物, 需摇匀后使用。

试剂一: 液体 5mL ×1 瓶, 4°C 保存。

试剂二: 液体 1.5mL ×1 瓶, 4°C 保存。

试剂三: 粉剂 ×2 瓶, 4°C 保存。

标准品: 粉剂 ×1 瓶, 4°C 避光保存。临用前加入 0.822mL 蒸馏水配制成 5mg/mL 维生素 B6 标准溶液, 4°C 密封保存, 避免阳光直射。

实验前准备工作:

1. 将 1 瓶试剂三溶解到 1000mL 超纯水中, 再加入 0.55mL 的试剂二, 混匀, 得到流动相 A。
2. 将 1000mL 配制好的流动相 A、甲醇 (色谱纯) 用滤膜抽滤。(配制好的流动相 A 采用 0.22μm 水系滤膜抽滤, 甲醇采用 0.45μm 有机系滤膜抽滤)。
3. 将抽滤好的流动相超声 20min, 除去气泡。
4. 标准品的配制: 将 5mg/mL 的维生素 B6 标准溶液采用倍比稀释的方法分别用蒸馏水稀释成 16000ng/mL、3200ng/mL、640ng/mL、128ng/mL、25.6ng/mL 的维生素 B6 标准溶液。(标准品浓度仅供参考, 可根据实际样品浓度进行调整)。4°C 避光保存 (密封), 测试前采用水系针头式过滤器过滤到棕色进样瓶内, 待测。

操作步骤:

一、维生素 B6 的提取:

样本: 按质量 (g): 提取液体积 (mL) 1:5~10 比例, 建议称取 0.1g 样本 (新鲜样本: 剪碎; 烘干样本: 研磨过筛), 加入 0.6mL 提取液 (新鲜样本需匀浆), 密封, 混合均匀, 置于 60°C 水浴锅中浸取 30min。冷却至室温, 加入 0.1mL 试剂一, 0.3mL 蒸馏水, 混匀, 静置 2min。10000rpm 离心 10min, 取上清液 (若仍有浑浊, 可再次离心), 测试前采用水系针头式过滤器过滤到棕色进样瓶内, 待测 (若上清液颜色过深或者浓度过高, 可稀释后再次过滤待测)。

细胞: 按细胞数量 (10^4): 提取液体积 (mL) 1000~5000 万:1 比例, 建议取 5000 万细胞, 加入 0.6mL 提取液, 超声破碎细胞 (功率 20%, 超声 3s, 间歇 9s, 重复 30 次, 总时间: 6min), 密封混匀, 置于 60°C 水浴锅中浸取 30min。冷却至室温, 加入 0.1mL 试剂一, 0.3mL 蒸馏水, 混匀, 静置 2min。10000rpm 离心 10min, 取上清液 (若仍有浑浊, 可再次离心), 测试前采用水系针头式过滤器过滤到棕色进样瓶内, 待测。

血清: 按血清体积 (mL): 提取液体积 (mL) 1~5: 比例, 建议取 0.5mL 血清, 加入 0.1mL 提取液, 密封混匀, 置于 60°C 水浴锅中浸取 30min。冷却至室温, 加入 0.1mL 试剂一, 0.3mL 蒸馏水, 混匀, 静置 2min。10000rpm 离心 10min, 取上清液 (若仍有浑浊, 可再次离心), 测试前采用水系针头式过滤器过滤到棕色进样瓶内, 待测。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

二、测定步骤:

1. 开启电脑、打开液相色谱仪各模块开关按钮，安装上色谱柱，打开软件，在方法组中设置进样量为 10 μL ，柱温：30 $^{\circ}\text{C}$ ，流速为 1mL/min，荧光检测器：Ex=293nm，Em=395nm。单个样本走样时间 10min，设置完毕保存方法组。
2. 采用相应的流动相清洗柱子，用流动相 A 平衡柱子，待基线稳定后开始加样。
3. 检测待测的标准品溶液，进样量为 10 μL ，在 10min 内可分离出维生素 B6，维生素 B6 的保留时间为 7.7min 左右（体系、柱子、流动相 pH、温度等不同，保留时间有差异，仅作为参考）。
4. 检测待测的样品溶液，进样量为 10 μL ，在相应的保留时间处检测维生素 B6 的峰面积。
5. 序列完整加样表：（包含单个样本测定完成后色谱柱的清洗和平衡过程）

时间 (t)	甲醇 (%)	流动相 A (%)
0 min	0	100
1 min	0	100
1.1 min	3	97
10 min	3	97
10.1 min	60	40
20 min	60	40
20.1 min	0	100
30 min	0	100

三、维生素 B6 含量计算

以标准品浓度 (ng/mL) 为横坐标，峰面积为纵坐标绘制维生素 B6 的标准曲线，将样本的峰面积代入标准曲线，计算提取液中维生素 B6 的浓度 x (ng/mL)。

1. 组织样本

维生素 B6 的含量 ($\mu\text{g/g}$) = $x \times V_{\text{提取}} \div W \times F \div 1000 = 0.001x \div W \times F$

V 提取：加入提取液总体积，1mL (0.6mL 提取液+0.1mL 试剂一+0.3mL 蒸馏水)；W：样本质量，g；F：稀释倍数，稀释后测试的样本，计算时需要乘以相应的稀释倍数；1000：单位转化系数，1 μg =1000ng。

2. 细胞样本

维生素 B6 的含量 ($\mu\text{g}/10^4$ 细胞) = $x \times V_{\text{提取}} \div \text{细胞数量} (10^4) \times F \div 1000 = 0.001x \div \text{细胞数量} \times F$

V 提取：加入提取液总体积，1mL (0.6mL 提取液+0.1mL 试剂一+0.3mL 蒸馏水)；细胞数量：单位 10⁴；F：稀释倍数，稀释后测试的样本，计算时需要乘以相应的稀释倍数；1000：单位转化系数，1 μg =1000ng。

3. 血清样本

维生素 B6 的含量 ($\mu\text{g/mL}$) = $x \times V_{\text{提取}} \div V_{\text{样本}} \times F \div 1000 = 0.002x \times F$

V 提取：提取液总体积，1mL (0.5mL 血清+0.1mL 提取液+0.1mL 试剂一+0.3mL 蒸馏水)；V 样本：加入样本体积，0.5mL；F：稀释倍数，稀释后测试的样本，计算时需要乘以相应的稀释倍数；1000：单位转化系数，1 μg =1000ng。

注意事项:

1. 本试剂盒提取液中含有不溶物，需摇匀后使用。
2. 测试完毕后，需要用高浓度的超纯水相冲洗色谱柱（约 20-30 个柱体积），以防阻塞色谱柱，再用高浓度的有机相冲洗色谱柱，最后按柱子的种类规范冲洗，防止损伤色谱柱。
3. 标准品的稀释倍数要根据样品中维生素 B6 的浓度确定，样品中维生素 B6 的峰面积必须在不同浓度的标准品溶液的峰面积之内，该标准品的稀释倍数只是一个参考。若样本中维生素 B6 浓度过高，建议用蒸馏水稀释后再测。
4. 若样本量过大，建议每天测试一次标准溶液（一个浓度的标准溶液即可），以确定相应的保留时间，待测溶液测试前须放置至室温状态。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com