

## 维生素 B2 含量检测试剂盒说明书

高效液相色谱法

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

货号: BC4854

规格: 50T/48S

### 产品简介:

维生素 B2 又名核黄素，是机体健康和正常生长所必需的维生素，广泛存在于酵母、肝、肾、蛋黄、奶及大豆中。维生素 B2 所形成的辅酶广泛参与体内各种氧化还原反应，能促进糖类、脂肪与蛋白质的代谢，对维持皮肤、粘膜和视觉的正常机能有着重要作用。

维生素 B2 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（4.6×250 mm），荧光检测器（FLD））、台式离心机、可调式移液枪、研钵/匀浆器、EP 管（1.5 mL）、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 30 mL ×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 5 mL ×1 瓶，4°C 保存。

试剂二：液体 1.5 mL ×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 1 mL 0.05 mol/L KOH 溶解配制成 5 mg/mL 维生素 B2 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 1000 mL 超纯水中，再加入 0.55 mL 的试剂二，混匀，得到流动相 A。
2. 将 1000 mL 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 0.22 μm 水系滤膜抽滤，甲醇采用 0.45 μm 有机系滤膜抽滤）。
3. 将抽滤好的流动相超声 20 min，除去气泡。
4. 标准品的配制：将 5 mg/mL 的维生素 B2 标准溶液采用倍比稀释的方法分别用蒸馏水稀释成 20000 ng/mL、4000 ng/mL、800 ng/mL、160 ng/mL、32 ng/mL、6.4 ng/mL 的维生素 B2 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 B2 的提取:

样本：按质量（g）:提取液体积（mL）1:5~10 比例，建议称取 0.1 g 样本（新鲜样本：剪碎；烘干样本：研磨过筛），加入 0.6 mL 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 30 min。冷却至室温，加入 0.1 mL 试剂一，0.3 mL 蒸馏水，混匀，静置 2 min。10000 rpm

离心 10 min，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 0.6 mL 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：6 min），密封混匀，置于 60°C 水浴锅中浸取 30 min。冷却至室温，加入 0.1 mL 试剂一，0.3 mL 蒸馏水，混匀，静置 2 min。10000 rpm 离心 10 min，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）1~5:1 比例，建议取 0.5 mL 血清，加入 0.1 mL 提取液，密封混匀，置于 60°C 水浴锅中浸取 30 min。冷却至室温，加入 0.1 mL 试剂一，0.3 mL 蒸馏水，混匀，静置 2 min。10000 rpm 离心 10 min，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。

## 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  $\mu$ L，柱温：30°C，流速为 1 mL/min，荧光检测器：Ex=462 nm，Em=522 nm。单个样本走样时间 25 min，设置完毕保存方法组。
3. 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。
4. 检测待测的标准品溶液，进样量为 10  $\mu$ L，在 25 min 内可分离出维生素 B2，维生素 B2 的保留时间为 22.8 min 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）。
5. 检测待测的样品溶液，进样量为 10  $\mu$ L，在相应的保留时间处检测维生素 B2 的峰面积。
6. 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再平衡过程）

时间 (t)	甲醇 (%)	流动相 A (%)
0 min	0	100
1 min	0	100
1.1 min	3	97
8 min	3	97
8.1 min	15	85
23 min	40	60
25 min	40	60
25.1 min	60	40
35 min	60	40
35.1 min	0	100
45 min	0	100

## 三、维生素 B2 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吡哆胺的标准曲线，将样本的峰面积代入标准曲线，计算提取液中吡哆胺的浓度 x（ng/mL）。

### 1. 组织样本

吡哆胺的含量（ $\mu$ g/g）=  $x \times V_{\text{提取}} \div W \times F \div 1000 = 0.001x \times F$

V 提取：加入提取液总体积，1 mL（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=1000 ng。

## 2. 细胞样本

吡哆胺的含量（μg/10<sup>4</sup> 细胞）= x × V 提取 ÷ 细胞数量（10<sup>4</sup>）× F ÷ 1000 = 0.001x ÷ 细胞数量 × F

V 提取：加入提取液总体积，1 mL（0.6mL 提取液+0.1mL 试剂一+0.3mL 蒸馏水）；细胞数量：单位 10<sup>4</sup>；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=1000 ng。

## 3. 血清样本

吡哆胺的含量（μg/mL）= x × V 提取 ÷ V 样本 × F ÷ 1000 = 0.002x × F

V 提取：提取液总体积，1 mL（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，0.5 mL；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=1000 ng。

## 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 B2 的浓度确定，样品中维生素 B2 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 B2 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。
5. 为了排除梯度洗脱基线漂移的影响，可进行一次空白检测。