

吡哆醛含量检测试剂盒

中文名称：吡哆醛含量检测试剂盒

英文名称：Pyridoxal HPLC Assay kit

产品包装：盒装

产品规格：50T/48S

储存条件：-20°C

检测方法：高效液相色谱法

有效期：6个月

产品简介：

吡哆醛 (pyridoxal, PL) 是维生素 B6 的组成成分之一，是氧化吡哆醇所得到的醛，广泛存在于肉类、谷类、蔬菜及坚果中。吡哆醛在生物体内主要的活性辅酶形式是磷酸吡哆醛 (PLP)，是转氨酶、脱羧酶、消旋酶等多种酶的辅酶。

吡哆醛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、过滤器、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 0.821 mL 蒸馏水配制成 5 mg/mL 吡哆醛标准溶液, 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 0.55 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 的吡哆醛标准溶液采用倍比稀释的方法分别用蒸馏水稀释成 16000ng/mL、3200 ng/mL、640 ng/mL、128 ng/mL、25.6 ng/mL 的吡哆醛标准溶液。(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、吡哆醛的提取:

组织样本: 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。10000rpm 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 0.1mL 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 μ L , 柱温: 30°C , 流速为 1 mL/min , 荧光检测器: Ex=293 nm , Em=395 nm 。单个样本走样 时间 10 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 μ L , 在 10 min 内可分离出吡哆醛, 吡哆醛的保留时间为 6.3 min 左右 (体系、柱子、流动相 pH 、温度等不同, 保留时间有差异, 仅作参考)。
5. 检测待测的样品溶液, 进样量为 10 μ L, 在相应的保留时间处检测吡哆醛的峰面积。
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
10 min	3	97
10.1 min	60	40
20 min	60	40
20.1 min	0	100
30 min	0	100

三、吡哆醛含量计算

以标准品浓度(ng/mL)为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制吡哆醛的标准曲线, 将样本的峰面积代入标准曲线, 计算提取液中吡哆醛的浓度 x (ng/mL)。

1. 组织样本

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

V 提取: 加入提取液总体积, 1 mL; W: 样本质量, g; F: 样本稀释倍数 (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, $1\mu\text{g} = 1000\text{ng}$ 。

2. 细胞样本

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

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); 细胞数量: 单位 10^4 ; F: 样本稀释倍数 (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, $1\mu\text{g} = 1000\text{ng}$ 。

吡哆醛的含量($\mu\text{g/mL}$) = $x \times V$

3. 血清样本

提取 $\div V_{\text{样本}} \times F \div 1000 = 0.002x \times F$

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: 样本稀释倍数 (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, $1\mu\text{g}=1000\text{ng}$ 。

注意事项:

1. 本试剂盒的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, 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吡哆醛的浓度确定, 样品中吡哆醛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。若样本中吡哆醛浓度过高, 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。

mlbio 梅乐生物
Good elisakit producers