

吡哆醛含量检测试剂盒（高效液相色谱法 HPLC）

产品货号：BA2195

产品规格：50T/48S

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（4.6×250mm），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℃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℃保存。

试剂二：液体 1.5mL ×1 瓶，4℃保存。

试剂三：粉剂×2 瓶，4℃保存。

标准品：粉剂×1 瓶，4℃避光保存。临用前加入 0.821mL 蒸馏水配制成 5mg/mL 吡哆醛标准溶液，4℃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、3200ng/mL、640ng/mL、128ng/mL、25.6ng/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℃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 0.1g 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℃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（10⁴）：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℃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）1~5:1 比例，建议取 0.5mL 血清，加入 0.1mL 提取液，密封混匀，置于 60℃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 μ L，柱温：30 $^{\circ}$ 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 μ L，在 10min 内可分离出吡哆醛，吡哆醛的保留时间为 6.3min 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）。
4. 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。
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
10min	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生物素的标准曲线，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 (μ 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；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 μ g=1000ng。

2. 细胞样本

吡哆醛的含量 (μ 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，1mL（0.6mL 提取液+0.1mL 试剂一+0.3mL 蒸馏水）；细胞数量：单位 10^4 ；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 μ g=1000ng。

3. 血清样本

吡哆醛的含量 (μ 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 μ g=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。



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