

维生素 B12 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: BC4794

规格: 50T/48S

产品简介:

维生素 B12 (Vitamin B12) 为 B 族维生素之一, 是一类含钴的复杂有机化合物。人体内每天需要量最少的一种, 过量的维生素 B12 会产生毒副作用。

维生素 B12 在 210 nm 处存在紫外吸收, 可利用紫外检测器测定其含量。

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), 紫外检测器 (VWD))、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 蒸馏水配制成 5 mg/mL 维生素 B12 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 B12 标准溶液采用倍比稀释的方法分别用蒸馏水稀释成 500 μg/mL、100 μg/mL、20 μg/mL、4 μg/mL、0.8 μg/mL 的维生素 B12 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 B12 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，冰浴超声破碎细胞（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 μ L，柱温：30°C，流速为 1 mL/min，紫外检测器：波长为 210 nm。单个样本走样时间 23 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 23 min 内可分离出维生素 B12，维生素 B12 的保留时间为 19.5 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 μ L，在相应的保留时间处检测维生素 B12 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
23.1 min	60	40
33 min	60	40
33.1 min	0	100
43 min	0	100

三、维生素 B12 含量计算

以标准品浓度（ μ g/mL）为横坐标，峰面积为纵坐标绘制维生素 B12 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 B12 的浓度 x（ μ g/mL）。

1. 组织样本

维生素 B12 的含量（ μ g/g）= $x \times V_{\text{提取}} \div W \times F = x \div W \times F$

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。

2. 细胞样本

维生素 B12 的含量（ μ g/ 10^4 细胞）= $x \times V_{\text{提取}} \div \text{细胞数量}（10^4） \times F = x \div \text{细胞数量} \times F$

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：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。

3. 血清样本

维生素 B12 的含量 ($\mu\text{g/mL}$) = $x \times V_{\text{提取}} \div V_{\text{样本}} \times F = 2x \times F$

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：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。

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 B12 的浓度确定，样品中维生素 B12 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 B12 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。