



## 吡哆醛含量检测试剂盒(高效液相色谱法)

**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：**2-8°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、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 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 0.45μm 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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

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

**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 $\mu\text{g}$ = 1000ng。

#### 2. 细胞样本

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

**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<sup>4</sup>；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 $\mu\text{g}$ = 1000ng。

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

#### 3. 血清样本

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



V 提取：提取液总体积，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。