# 维生素 B6（VB6）含量检测试剂盒说明书

可见分光光度法

**货号：** AC10385

**规格：** 50T/24S

**产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。**

| 试剂名称 | 规格 | 保存条件 |
|---|---|---|
| 提取液 | 液体 18 mL×1 瓶 | 4℃保存 |
| 试剂一 | 液体 30 mL×1 瓶 | 4℃保存 |
| 试剂二 | 液体 15 mL×1 瓶 | 4℃保存 |
| 试剂三 | 液体 20 mL×1 瓶 | 4℃保存 |
| 试剂四 | 粉剂×1 瓶 | 4℃保存 |
| 标准品 | 粉剂×1 支 | 4℃保存 |

溶液的配制：

1、 提取液：内含不溶物，使用前摇匀；

2、 试剂四：临用前加入 20 mL 蒸馏水混匀，4℃保存一周，如果一次性用不完，可分装于-20℃保存待用；

3、 标准品：10mg 维生素 B6，临用前加入 1 mL 试剂一，配成 10 mg/mL 的标准液。

**产品说明：**

维生素 B6（Vitamin B6）又称吡哆素，其包括吡哆醇、吡哆醛及吡哆胺，在体内以磷酸酯的形式存在，是一种水溶性维生素，肉类、全谷类、蔬菜和坚果类中含量较高。在机体中参与多种蛋白质和氨基酸的代谢，对生物体具有极其重要的作用。

VB6 与 4-氨基安替比林在强氧化剂作用下生成稳定的黄色化合物，在 400nm 有特征吸收峰。

**技术指标：**

最低检出限：0.0162 mg/mL

线性范围：0.015625-1 mg/mL

**注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

**需自备的仪器和用品：**

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、1mL 玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、EP 管、蒸馏水。

**操作步骤：**

**一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）**

组织：将样本磨碎，按照质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g，加入 0.6mL 提取液）加入提取液，60℃浸提 30min，加蒸馏水 0.4mL，混匀后于 25℃，16000rpm 离心 10min，取上清测定（**动物组织及其他蛋白含量较高的样本建议离心 20-30 分钟或反复离心 2-3 次至上清无混浊**）。

细胞或细菌：按照细胞数量（$10^4$ 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 0.6mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；加蒸馏水 0.4mL，混匀后于 25°C，16000rpm 离心 10min，取上清测定。

液体：直接检测。

**二、测定步骤**

1. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 400nm，蒸馏水调零。
2. 将 10mg/mL 标准液用试剂一稀释为 1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.015625mg/mL 的标准溶液备用。
3. 操作表：在 1.5mL 离心管中依次加入下列试剂：

| | 对照管 | 测定管 | 标准管 | 空白管 |
|---|---|---|---|---|
| 样本（μL） | 200 | 200 | - | - |
| 试剂一（μL） | - | - | - | 200 |
| 标准溶液（μL） | - | - | 200 | - |
| 试剂二（μL） | 200 | 200 | 200 | 200 |
| 试剂三（μL） | 300 | 300 | 300 | 300 |
| 试剂四（μL） | - | 300 | 300 | 300 |
| 蒸馏水（μL） | 300 | - | - | |
| 充分混匀，25℃反应 20min，测定 400nm 处吸光值，记为 A 测定管、A 对照管、A 标准管、A 空白管，ΔA=A 测定管-A 对照管，ΔA=A 标准管-A 空白管。（空白管只要做 1-2 管） | | | | |

**三、维生素 B6 含量计算**

1、标准曲线的绘制：

以各个标准溶液的浓度为 x 轴，其对应的 ΔA 标准为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 y=kx+b，将 ΔA 带入方程得到 x（mg/mL）。

2、维生素 B6 含量的计算：

（1）按蛋白浓度计算； VB6（mg/mg prot）=x×V 提取÷（V 提取×Cpr）= x÷Cpr

（2）按样本质量计算；VB6（mg/g 质量）=x×V 提取÷W=x÷W

（3）按照细胞数量计算：VB6（mg/$10^4$ cell）=x×V 提取÷细胞数量（万个）=x÷细胞数量（万个）

（4）按液体体积计算：VB6（mg/mL）=x×V 样÷V 样=x

V 提取：样本提取体积，1mL；V 样：加入的样本体积，0.2mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g。

**注意事项：**

1、如果测定吸光值超过线性范围吸光值，可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。

2、蛋白浓度较高的样本，比如动物组织、豆类种子等，若显色完成后有沉淀产生，将样本稀释后再测定，在计算公式中乘以稀释倍数。

3、显色完成后立即进行测定，尽量保证反应时间一致。

**实验实例：**

1、 称取 0.1g 小鼠肌肉组织，加入 0.6mL 提取液，60℃浸提 30min，加蒸馏水 0.4mL，混匀后于 25℃，16000rpm 离心 10min，取上清，之后按照测定步骤操作，测得计算 ΔA=A 测定管-A 对照管=0.1916-0.1238=0.0678，标准曲线 y=1.1434x-0.009，计算 x=0.0672，按样本质量计算 VB6 含量得：

VB6（mg/g 质量）=x×V 提取÷W=0.0672×1÷0.1=0.672 mg/g 质量。

2、 称取 0.1g 花生，加入 0.6mL 提取液，60℃浸提 30min，加蒸馏水 0.4mL，混匀后于 25℃，16000rpm 离心 10min，取上清，之后按照测定步骤操作，测得计算 ΔA=A 测定管-A 对照管=0.4473-0.2885=0.1588，标准曲线 y= y=1.1434x-0.009，计算 x=0.147，按样本质量计算 VB6 含量得：

VB6（mg/g 质量）=x×V 提取÷W=0.147 ×1÷0.1=1.47 mg/g 质量。