

维生素 B1 (VB1) 含量检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: AC10653

规格: 50T/48S

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 35 mL×1 瓶	4°C保存
稀释液	液体 60 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 6 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 7 mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	液体 6 mL×1 瓶	4°C保存
试剂四	液体 15 mL×1 瓶	4°C保存
试剂五	液体 8 mL×1 瓶	4°C保存
标准品	粉剂×1 支	4°C保存

溶液的配制:

- 1、提取液: 内含不溶物, 使用前摇匀;
- 2、标准品: 10mg 维生素 B1。临用前加入 1mL 稀释液, 配成 10mg/mL (即 10000 μ g/mL) 的标准液。

产品说明:

维生素B1 (Vitamin B1) 又称硫胺素, 以辅酶形式参与糖的分解代谢, 在生物体能量代谢中有重要的作用。

VB1在碱性条件下还原铁氰化钾生成亚铁氰化钾, 亚铁氰化钾与Fe³⁺在弱酸条件下生成普鲁士蓝, 测定布鲁士蓝在704nm下的特征吸收峰, 即可反映VB1的含量。

技术指标:

最低检出限: 7.366 μ g/mL线性范围: 7.8125-250 μ g/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、冰和蒸馏水。

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)

1、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°C浸提 30min, 加蒸馏水 0.4mL, 混匀后于 25°C, 13000g 离心 10min, 取上清测定 (动物组织、豆类种子等蛋白含量较高的样本建议离心 20-30 分钟或反复离心 2-3 次至上清无浑浊)。

2、细胞：按照细胞数量（10⁴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℃，13000g 离心 10min，取上清测定。

3、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704nm，蒸馏水调零。

2、将10mg/mL（10000μg/mL）标准液用稀释液稀释为250、125、62.5、31.25、15.625、7.8125μg/mL的标准溶液备用。

3、操作表（在1.5mLEP管中进行下列操作）：

	测定管	标准管	空白管
样本（μL）	100	-	-
稀释液（μL）	-	-	100
标准品溶液（μL）	-	100	-
试剂一（μL）	80	80	80
试剂二（μL）	100	100	100
充分混匀，80℃水浴反应30min。			
试剂三（μL）	80	80	80
试剂四（μL）	220	220	220
试剂五（μL）	120	120	120
蒸馏水（μL）	300	300	300
充分混匀，反应 5min，测定 704nm 处吸光值 A，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。空白管只需做 1-2 次。			

三、维生素B1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x（μg/mL）。

2、维生素B1含量的计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算： $VB1 (\mu\text{g}/\text{mg prot}) = x \times V_{\text{样总}} \div (Cpr \times V_{\text{样总}}) = x \div Cpr$

(2) 按样本质量计算： $VB1 (\mu\text{g}/\text{g 质量}) = x \times V_{\text{样总}} \div W = x \div W$

(3) 按细胞数量计算： $VB1 (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = x \times V_{\text{样总}} \div \text{细胞数量 (万个)} = x \div \text{细胞数量 (万个)}$

(4) 按液体体积计算： $VB1 (\mu\text{g}/\text{mL}) = x$

V样总：样本总体积，1mL； 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，豆类种子等建议将样本稀释20倍或40倍后再测定并在计算公式中乘以稀释倍数。

3、显色完成后立即进行测定，若显色完成后有沉淀产生，将其摇匀后测定。

实验实例:

1、称取 0.1g 肾脏, 加入 0.6mL 提取液, 60°C浸提 30min, 加蒸馏水 0.4mL, 混匀后于 25°C, 13000rpm 离心 10min, 取上清, 将上清稀释 20 倍之后按照测定步骤操作, 测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}} = 0.339 - 0.265 = 0.074$, 带入标准曲线 $y = 0.006x + 0.001$, 计算 $x = 12.17 \mu\text{g/mL}$, 按样本质量计算 VB1 含量得:

$$\text{VB1 } (\mu\text{g/g 质量}) = x \times V_{\text{样总}} \div W \times 20 \text{ (稀释倍数)} = 12.17 \times 1 \div 0.1 \times 20 = 2434 \mu\text{g/g 质量}。$$

2、称取 0.1g 三叶草, 加入 0.6mL 提取液, 60°C浸提 30min, 加蒸馏水 0.4mL, 混匀后于 25°C, 13000rpm 离心 10min, 取上清, 将上清稀释 40 倍之后按照测定步骤操作, 测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}} = 0.748 - 0.265 = 0.483$, 带入标准曲线 $y = 0.006x + 0.001$, 计算 $x = 80.33 \mu\text{g/mL}$, 按样本质量计算 VB1 含量得:

$$\text{VB1 } (\mu\text{g/g 质量}) = x \times V_{\text{样总}} \div W \times 40 \text{ (稀释倍数)} = 80.33 \times 1 \div 0.1 \times 40 = 32132 \mu\text{g/g 质量}。$$