

生物素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: AC10748

规格:50T/48S

产品简介：

生物素又称维生素 H、辅酶 R，是水溶性维生素，也属于维生素 B 族，B7。生物素作为羧化酶的辅酶，是参与糖异生、脂肪酸合成与氨基酸代谢不可或缺的物质，是一种维持人体自然生长、发育和正常人体机能健康必要的营养素。

生物素在 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℃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℃保存。

试剂二：液体 1.5 mL×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 1 mL 0.1 mol/L KOH 配制成 5 mg/mL 生物素标准溶液，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 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 0.45 μm 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 的生物素标准溶液采用倍比稀释的方法分别用蒸馏水稀释成 1000 μg/mL、500 μg/mL、100 μg/mL、20 μg/mL、4 μg/mL 的生物素标准溶液。（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、生物素的提取：

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℃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25 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25 min内可分离出生物素，生物素的保留时间为21.3 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生物素的峰面积。

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
25 min	40	60
25.1 min	60	40
35 min	60	40
35.1	0	100
45	0	100

三、生物素含量计算

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，计算提取液中生物素的浓度x（ μ g/mL）。

1. 组织样本

生物素的含量（ 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；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

生物素的含量 ($\mu\text{g}/10^4$ 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

生物素的含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) = $x \times V_{\text{提取}} \div V_{\text{样本}} \times F = 2x \times F$

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生物素的浓度确定, 样品中生物素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。若样本中生物素浓度过高, 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。