

维生素 B5 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: AC10754

规格:50T/48S

产品简介：

维生素 B5 又叫泛酸。维生素 B5 颜色呈浅黄，因广泛存在于动植物中而得“泛酸”之名。它主要的作用是起到参加脂肪的代谢，同时还能够参加水的合成，是人体必不可少的元素。

维生素 B5 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 蒸馏水配制成 5 mg/mL 维生素 B5 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 B5 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 B5 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、维生素 B5 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（10⁴）: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℃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 μL，柱温：30℃，流速为 1 mL/min，紫外检测器：波长为 210 nm。单个样本走样时间 18 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 μL，在 18 min 内可分离出维生素 B5，维生素 B5 的保留时间为 14 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 μL，在相应的保留时间处检测维生素 B5 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
18 min	32	68
18.1 min	60	40
28 min	60	40
28.1	0	100
38	0	100

三、维生素 B5 含量计算

以标准品浓度（μg/mL）为横坐标，峰面积为纵坐标绘制维生素 B5 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 B5 的浓度 x（μg/mL）。

1. 组织样本

维生素 B5 的含量（μg/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 B5 的含量（μg/10⁴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：5000，单位 10⁴；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 B5 的浓度确定，样品中维生素 B5 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 B5 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。