维生素 B_2 检测试剂盒(荧光光度法)

产品简介:

维生素 B_2(Vitamin B_2)又称核黄素，是一种异咯嗪衍生物，耐热、微溶于水，中性水溶液及乙醇溶液呈黄色，具有很强的荧光，在 pH 值 6~7 的溶液中荧光最强，在 pH=11 时荧光消失，核黄素可被还原性物质还原为无色的二氢化物，同时失去荧光；二氢化物在空气中易重新氧化，恢复其荧光。

维生素 B_2 检测试剂盒(荧光光度法)是利用 Vitamin B_2 的中性溶液有强荧光，当加入有还原性的亚硫酸盐时，核黄素被还原为无荧光的物质，根据稀核黄素溶液在还原前后荧光强度的变化即可定量检测 Vitamin B_2 的含量，其激发波长为 440~500nm(多为460nm)，发射波长为 510~550nm(多为 520nm)。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

编号 / 名称	GCTC2025 50T	Storage
试剂(A): Vitamin B_2 标准(100μg/ml)	1.5ml	4℃ 避光
试剂(B): 组织匀浆液(10×)	250ml	RT
试剂(C): 亚硫酸盐	4×100mg	RT
使用说明书	1 份	

自备材料:

1、待测样品如青菜、水果、牛奶、药品、蒸馏水、稀盐酸或氢氧化钠(0.1mol/L)等

2、精密天平、匀浆器、pH 计或 pH 试纸、离心机、离心管、锥形瓶、容量瓶、高压灭菌锅或恒温水浴锅、荧光分光光度计

操作步骤(仅供参考):

1、稀释组织匀浆液：取适量的组织匀浆液(10×)，按组织匀浆液(10×)：蒸馏水=1：9 的比例稀释，获得 1×组织匀浆液，待用。

2、样品准备：

a)固体样本：准确称量 2~10g 样品置于研磨器内研磨，加入少量 1×组织匀浆液，研磨碎，留取上清，再次用 1×组织匀浆液研磨，最后一并倒入 50ml 锥形瓶，加入 1×组织匀浆液至 40ml，充分摇匀，置于高压灭菌锅内，121℃下保持 30min，冷却至室温后用稀氢氧化钠调 pH 值至 6.0~6.5，用 1×组织匀浆液定容至 50ml；如样品杂质较多，可在氢氧化

钠调至 6.0 后立即用稀盐酸再调 pH 值至 4.5，4000g 离心 5min 或者过滤，上清液或滤液再调 pH 值至 6.0~6.5，定容，滤液 4℃保存备用。

b)液体样品：牛奶、饮料等液体样品，取 5ml 牛奶于 50ml 锥形瓶中，加入 1×组织匀浆液至 40ml，以下操作同上。

3、 稀释标准品：取适量的 Vitamin B_2 标准(100μg/ml)，按 Vitamin B_2 标准(100μg/ml)：蒸馏水=1：9 稀释成 Vitamin B_2 标准(10μg/ml)，4℃保存。注意：Vitamin B_2 标准(100μg/ml)需要充分溶解混匀，否则会导致标准值不准确。

4、 制备亚硫酸盐工作液：取一支亚硫酸盐 100mg 粉末，充分溶解于 2ml 蒸馏水，即配制成 50mg/ml 的亚硫酸盐工作液，即配即用，冰水浴保存，4 小时内有效，也可以用精密天平自行称量溶解。

5、 Vitamin B_2 检测：选用恰当的滤色片，核黄素测定的激发波长为 460nm，发射波长为 520nm，提前预热仪器 30min，蒸馏水调零，以下表 6 号管作参比溶液调荧光分光光度计的荧光强度读数到满刻度(100%)，分别测定其他标准溶液和样品溶液的相对荧光强度，在测定中如果样品溶液的荧光强度大于 100%，需要稀释后再行测定。

测定加入亚硫酸盐工作液前后的荧光值，分别记为 F_0 和 F_T。加入亚硫酸盐后，应立即混匀，并在 20s 内测出各管荧光值。

Vitamin B_2 检测标准曲线绘制及待测样品操作表

加入物(ml)	1	2	3	4	5	6	样品
Vitamin B_2 标准(10μg/ml)	0.125	0.25	0.5	0.75	1.0	1.25	—
蒸馏水	4.875	4.75	4.5	4.25	4.0	3.75	—
待测上清或滤液(ml)	—	—	—	—	—	—	5.0
浓度(μg/ml)	0.25	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	—
含量(μg)	1.25	2.5	5	7.5	10	12.5	—
还原前荧光值 F_0							
亚硫酸盐工作液	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
还原后荧光值 F_T							

计算：

溶液的荧光强度校准值：$F= F_0-F_T$

式中：F=校正后的荧光强度

F_0=还原前荧光强度

F_T=还原后荧光强度

以各管 Vitamin B_2 标准的浓度(μg/ml)或含量(μg)为横坐标，以对应的校正后的荧光强

度(F)为纵坐标，做出 Vitamin B_2 标准曲线。

根据 Vitamin B_2 标准曲线及样品管的校正后的荧光强度(F)即可计算出待测样品中 Vitamin B_2 的实际浓度和含量。

100ml 液体样品中 Vitamin B_2 含量(μg/100ml)= $C \times V_2 \times 100/V_1$

100g 固体样品中 Vitamin B_2 含量(μg/100g)=$C \times V_3 \times 100/m$

式中：C=待测样品中 Vitamin B_2 的浓度(μg/ml)

V_1=检测体系中加入的滤液体积(ml)=5

V_2=液体样本滤液的总体积(ml)=50

V_3=固体样品的上清液总体积(ml)=50

m=固体样品的质量(g)

注意事项：

1、 Vitamin B_2 见光易分解，在上述操作中，应严格避免阳光直射。
2、 组织匀浆液为酸性，有腐蚀性，应小心操作。
3、 待测样品如不能及时测定，应置于 2~8℃避光保存，3 天内稳定。
4、 Vitamin B_2 在碱性溶液中不稳定，因此在加稀氢氧化钠调 pH 值时应边加边摇，防止局部碱度过大，破坏 Vitamin B_2。
5、 样品提取液中如有色素，会吸收部分荧光，需要使用高锰酸钾氧化除去色素。
6、 Vitamin B_2 不易被中等氧化剂或还原剂破坏，但有 Fe^{2+} 存在时，可被过氧化氢破坏。
7、 含核黄素的标准品或样品一旦加入亚硫酸盐后会因产生二氢化物失去荧光，但二氢化物在空气中又易重新氧化，恢复荧光，因此应在 10min 内检测完毕，而且越快越好。
8、 如果样品浓度过高，应用蒸馏水稀释后重测，结果乘以稀释倍数。
9、 试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

有效期： 6 个月有效；低温运输，按要求保存。

相关产品：

产品编号	产品名称
GCDC0032	Masson 三色染色液
GCDM0007	瑞氏-姬姆萨复合染色液
GCDP0013	GUS 染色液(即用型)
GCDZ2011	环保浸蜡脱蜡透明液
GCNR0001	DEPC 处理水(0.1%)
GCPW0053	Western 抗体洗脱液(碱性)
GCTO1013	丙二醛(MDA)检测试剂盒(TBA 比色法)

